

聚合物胶束体内命运分析技术的研究进展

于璐瑶¹, 刘美辰¹, 郭莹霞¹, 尤建嵩², 史美云^{*1}, 尹磊^{*1}

(1. 大连理工大学 化工海洋与生命学院, 辽宁 盘锦 124221;

2. 艾美诚信生物制药有限公司, 辽宁 大连 116600)

摘要: 聚合物胶束(PMs)是研究非常广泛的纳米给药系统。它是由两亲性聚合物组成的自聚集纳米颗粒, 这些聚合物在临界胶束浓度(CMC)以下以单分子形式存在于溶液中, 在 CMC 以上则会自组装形成胶束。相对于其他纳米载体, PMs 具有独特的性质: 相对较小的尺寸, 疏水性核对疏水性化合物具有良好溶解性, 亲水性壳能延长药物在血液的循环时间。对 PMs 体内时空命运的未知, 使得 PMs 从实验室设计到临床应用的成功转化仍然面临重大挑战。目前, 一系列分析测试技术已经开发出来用于揭示 PMs 的体内命运, 包括放射性示踪, 荧光共振能量转移(FRET)、聚集诱导发射(AIE)、聚集荧光猝灭(ACQ)、液质联用(LC-MS)、透射电子显微镜(TEM)等。主要叙述了一系列分析技术在 PMs 体内命运研究中的进展。

关键词: 聚合物胶束; 体内命运; 荧光生物成像; 分析技术; 研究进展

中图分类号: O65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)07-0075-10

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0845

Advances of Analytical Technologies for Studying in Vivo Fate of Polymeric Micelles YU Lu-yao¹, LIU Mei-chen¹, GUO Ying-xia¹, YOU Jian-song², SHI Mei-yun^{*1}, YIN Lei^{*1} (1. School of Chemical Engineering, Ocean and Life Sciences, Dalian University of Technology, Panjin 124221, China; 2. Aim Honesty Biopharmaceutical Co., Ltd., Dalian 116600, China)

Abstract: Polymer micelles (PMs) are extensively studied nano delivery systems consisting of amphiphilic polymers that form self-aggregating nanoparticles. These nanoparticles exist as individual molecules in solution below a critical micelle concentration (CMC) but self-assemble into micelles above this threshold. PMs possess numerous advantages just like relatively small size, hydrophobic cores that promote the solubility of hydrophobic compounds, and hydrophilic shells that enhance drug delivery in the bloodstream. However, the transition of PMs from laboratory development to clinical application is challenged by the unknown spatiotemporal fate of PMs in vivo. To address this challenge, several analytical assays have been developed to elucidate the in vivo fate of PMs such as radiotracking, fluorescence resonance energy transfer (FRET), aggregation-induced emission (AIE), aggregation fluorescence burst (ACQ), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), transmission electron microscopy (TEM) and other analytical techniques. This article outlined the progress of these analytical techniques in the studying the in vivo fate of PMs.

Key words: polymer micelles, in vivo fate, fluorescence bioimaging, analytical techniques, research progress

传统小分子化学药物在肿瘤的临床治疗中存在不良反应和治疗效果不足等缺陷, 粒径在纳米范围内的纳米载体药物递送系统(Nanocarrier drug delivery systems, NDDS)能提高药物在肿瘤部位的靶向性, 提高药物的疗效, 降低药物的毒性作用, 在药物研发中受到了广泛的关注^[1]。目前已经报道了由各种材料组成的不同类型的 NDDS 包括: 脂质体、聚合物胶束、抗体药物偶联物、蛋白质结合纳米颗粒、无机纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、树枝状聚合物、聚合物药物偶联物、纳米晶体和细胞衍生载体等^[2,3]。NDDS 通过特定的结构和特殊的表面特性, 可以通过被动靶向或者主动靶向, 优化药物向肿瘤等病变部位的递送, 并最大限度

地减少正常组织的药物分布, 从而有针对性的实现向目标部位递送药物的任务^[4,5]。

收稿日期: 2023-12-28; **网络首发日期:** 2024-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603182, 81703607); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(DUT21RC(3)057, DUT23YG228, DUT24MS018); 大连市科技创新基金项目(2022JJ13SN075); 辽宁省自然科学基金项目(2023-MS-BA-018); 辽宁省肿瘤医院“肿瘤+”项目(2024-ZLKF-33)。
作者简介: 于璐瑶(2000-), 女, 新疆伊宁人, 硕士生, 主要研究方向为药物代谢与药物动力学。

通讯作者: 尹磊, E-mail: lei.yin@dlut.edu.cn; 史美云, E-mail: shimy@dlut.edu.cn。

引用本文: 于璐瑶, 刘美辰, 郭莹霞, 等. 聚合物胶束体内命运分析技术的研究进展[J]. 化学试剂, 2024, 46(7): 75-84。

聚合物胶束(Polymeric micelles, PMs)是一种非常成功的纳米载体系统^[6]。PMs 是由两亲性嵌段共聚物在水性介质中自组装形成的核-壳结构的纳米颗粒^[7],如图 1 所示。疏水性核携带并保护药物,亲水性壳则在水性介质中起到支撑和稳定疏水性核的作用,增强聚合物胶束的水溶性^[7,8]。最常见的共聚物亲水链如:聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)^[6]、聚(2-乙基-2-噁唑啉)(Poly 2-ethyl-2-oxazoline, PEtOx)^[9]、聚(N-异丙基丙烯酰胺)(Poly N-isopropylacrylamide, PNIPAM)^[10]和聚肌氨酸(Poly sarcosine, PSar)^[11]等。常用的疏水链包括:聚丙交酯(Polylactide, PLA)^[12]、聚乙丙交酯(Poly(D, L-lactide-co-glycolide), PLGA)^[13]、聚(2-正丁基-2-噁唑啉)(Poly 2-n-butyl-2-oxazoline, PBuOx)^[14]、聚己内酯(Polycaprolactone, PCL)^[13]等结构,如图 2 所示。

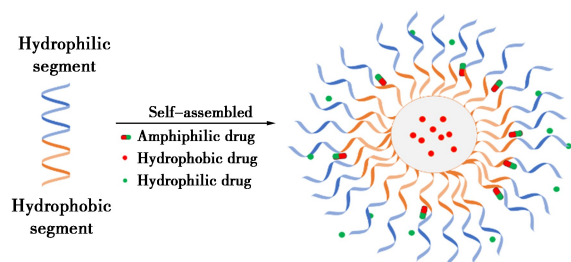


图 1 聚合物胶束结构图

Fig.1 Structure of PMs

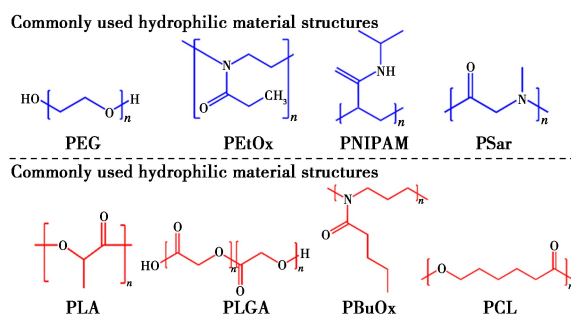


图 2 PMs 常用亲水和疏水材料结构式

Fig.2 Structural formulas for hydrophilic and hydrophobic polymers commonly used in PMs

目前通过高通量筛选技术鉴定出的潜在候选药物中,约有一半在水中的溶解度较差,因此不能进一步开发成药物,使得这些候选药物在临床的应用受到了限制^[15]。PMs 通过将亲脂性分子装载到疏水性核中,可以增加微溶性药物的水溶性,并且一定粒径范围的聚合物胶束可根据肿瘤部位的异质性,通过增强的渗透和滞留效应(Enhanced permeability and retention effect, EPR),使聚合物

胶束载体在肿瘤部位的累积速率远高于正常组织^[16]。聚合物胶束通过 EPR 效应,以被动靶向的方式更多地在肿瘤部位累积,减少药物不良反应的同时增强了疗效^[16],EPR 效应作用机理如图 3 所示。Genexol PMTR 是首个成功上市的载有抗癌药物紫杉醇(Paclitaxel, PTX)的 PMs 产品,通过甲氧基聚乙二醇-聚(d, l-丙交酯)(Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(d, l-lactide, mPEG-PDLLA)消除了使用常规增溶剂(如聚氧乙烯蓖麻油)所带来的相关副作用^[17]。但到目前为止,成功上市的 PMs 产品总数却是有限的,除了 Genexol PMTR 之外,还包括 Nanoxeltine[®]、Nanoxeltine[®] M 和 Paclicaltine^[18]。尽管目前正在进行如负载阿霉素(Doxorubicin, DOX)和顺铂(Cisplatin, CDDP)的 PM 制剂临床试验^[19],但许多努力都以失败告终^[20]。注射后血液稳定性差,难以通过细胞膜转运、对 PMs 体内时空命运的不了解等都是限制 PMs 制剂改进和转化的主要障碍。深入了解聚合物胶束的体内时空命运是胶束成功研发和进行临床应用的重要条件^[21]。

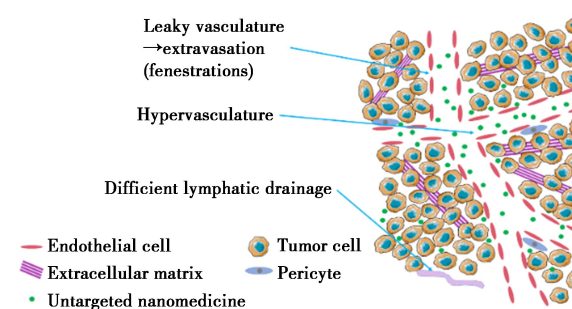


图 3 PMs 的 EPR 效应

Fig.3 EPR effect of PMs

PMs 的形成是动态的,在疏水作用的驱动下,以单聚体形式存在的共聚物会自组装形成纳米级的聚集体。自组装开始的阈值被称为临界胶束浓度(Critical micelle concentration, CMC),高于该阈值,胶束与单聚体之间能保持稳定的状态^[22],如图 4 所示。对于聚合物胶束而言,当作为药物递送载体时,胶束必须保持完整,以防止负载药物在到达靶细胞之前释放^[23]。但胶束在进入体内后会经历一系列复杂的生理环境变化包括:浓度稀释、环境中 pH 值和盐的变化以及与多种蛋白质和细胞接触^[21,24]。当 PMs 通过静脉注射进入到循环系统,快速稀释、与血液组分的相互作用以及血液的剪切应力共同挑战单聚体和 PM 之间的组装/拆卸平衡^[25]。稀释的环境可能会使得单聚

体的浓度降低,当低至到 CMC 以下时,平衡就会趋向分解,聚集体开始解聚变成单聚体。血液成分中包括:白蛋白、球蛋白和脂蛋白,它们同样会影响 PMs 体内的稳定性^[26]。与其他纳米载体不同,血浆蛋白不仅能够吸附在 PMs 的表面上,而且由于 PM 的动态自组装性质,还能够嵌入胶束结构中^[27]。虽然可以在体外通过模拟实验得到聚合物胶束的 CMC,但实际在 PMs 进入体内后,复杂的体内环境使得模拟的 CMC 和实际的 CMC 之间可能存在着很大的不同^[25]。PMs 的目的是有效地将活性药物成分 (Active pharmaceutical ingredient, API) 递送至靶组织,然后是靶细胞,最后是细胞内靶细胞器^[28]。目前将有效治疗水平的药物载荷递送到特定类型的细胞中仍然存在巨大挑战。理解 PMs 体内命运是解决 PMs 在药品研发和临床实验中遇到的困难的关键途径。为了阐明 PMs 的体内的命运,需要设计一定的分析策略来定量或定性监测药物有效载荷和共聚物。本文中,将回顾已报告的用于标记和监测 PMs 的各种分析技术。

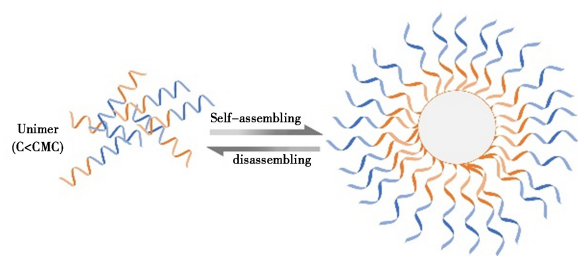


图 4 PM 和单体之间的动态自组装/拆卸平衡

Fig.4 Dynamic self-assembling/disassembling equilibrium between PMs and unimers

1 放射性示踪

放射性示踪是利用放射性核素作为示踪剂通过标记药物或构成材料来定量监测纳米颗粒的技术^[29]。Letchford 等^[30]通过 ^{14}C -PTX 和 ^3H -mPEG-b-PCL, 基于放射性计数对 PTX 和共聚物同时定量分析,以研究 PTX 和共聚物的体外分布和小鼠静脉给药后聚合物胶束的体内命运。刘金剑^[31]通过氯胺-T 法对聚合物胶束进行放射性同位素碘 ^{125}I 标记,标记部位位于聚合物胶束疏水核中的酪氨酸残基,通过 γ 成像定性观察胶束在体内的分布情况,以及用 γ 计数器来检测不同组织器官中胶束的含量。Hoang 等^[32]使用放射性同位素铟 ^{111}In , 将其标记在聚合物胶束的疏水嵌段,

通过高灵敏度和高分辨率的微型单光子发射断层显像/电子计算机断层成像系统 (Micro single photon emission computed tomography/computed tomography, microSPECT/CT), 对嵌段共聚物胶束在体内通路和命运进行实时和无创评估。Mathot 等^[33]通过 ^{14}C 对聚合物胶束 (Monomethyletherpoly (oxyethylene glycol750)-poly (caprolactone-co-trimethylene-carbonate), mmePEG750P (CL-co-TMC)) 的亲水嵌段进行标记,使用液态闪烁光谱仪评估共聚物和包埋在聚合物胶束中药物的药代动力学参数,证明负载有利培酮的自组装聚合物胶束在口服给药后能穿过肠道屏障,提供药物的持续释放并最终通过肾脏排泄消除的证据。Liu 等^[34]对 mePEG5000-b-PCL5000 胶束的亲水嵌段使用 ^3H 进行同位素标记,以进一步评估静脉注射后聚合物胶束的命运和稳定性,并发现当共聚物浓度低于 CMC 时,主要由胶束核心的疏水程度和状态 (即半结晶或无定形) 决定 PMs 系统动力学稳定性,并对 PMs 体内稳定性以及药代动力学特征和生物分布产生重大影响。值得注意的是虽然没有进行详细的讨论,但普遍认为内部疏水嵌段的标记相比标记于外部亲水嵌段可能具有更高的标记稳定性,也能进一步减少游离放射性核素衍生的伪影。

此外,物理吸附、直接化学吸附、阳离子交换、粒子束、同位素交换等其他替代放射性标记策略的方法也可以用于检测 PMs 在体内的命运^[35]。使用放射性标记的方法虽然能同时对 PMs 中负载药物和共聚物的生物分布进行定量监测,但一方面放射性标记可能从纳米载体上脱落或泄漏,所有来源的放射性标记都能产生相同的信号,使得难以区分载体相关信号与游离或释放的放射性标记的干扰信号^[36],另一方面引入放射性标记的方法,胶束的物理化学性质以及其药理学特征可能会改变,从而干扰纳米颗粒体内行为的分析^[37]。

2 荧光生物成像

荧光生物成像技术是当前应用广泛的高灵敏度、无创、实时监测 PMs 的方法。尤其是环境响应性荧光探针,它们受各种环境因素触发如: pH 值、极性、空间距离、酶或特定分子的影响,荧光光谱能随纳米载体的动态变化而发生改变,从而进一步探索 PMs 在体内的命运^[37]。图 5 说明了一系列环境响应探针的荧光生物成像的机理。

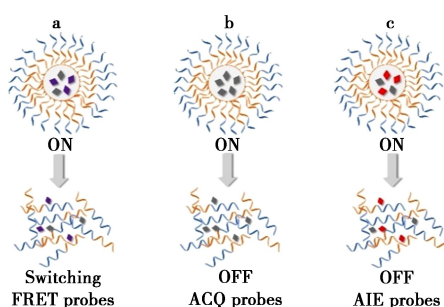


图 5 基于荧光共振能量转移(FRET)(a)、聚集引起的淬灭(ACQ)(b)和聚集诱导的发射(AIE)(c)的荧光生物成像的机理

Fig.5 Mechanisms of fluorescence bioimaging based on Fluorescence resonance energy transfer (FRET)(a), Aggregation-caused quenching (ACQ)(b) and aggregation-induced emission (AIE)(c)

2.1 荧光共振能量转移

荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)是指从激发态的供体荧光团到相邻的(通常在 1~10 nm 的距离内)基态受体荧光团的非放射性共振能量转移,使得供体的荧光强度较其单独存在时降低(荧光淬灭),而受体分子的荧光强度大大增强的现象。利用 FRET 的特殊原理,构建能感知生物环境中的时间和空间变化的高灵敏度荧光生物成像方法,可以实时监测 PMs 在体内的命运^[38]。为了触发有效的能量转移,供体和受体之间需要有超过 30% 的光谱重叠,合适地选择供体/受体对,可以提高 FRET 对胶束在体内结构复杂变化的理解^[25,39]。将 FRET 荧光探针与聚合物胶束通过物理包埋/化学键合的作用形成具有 FRET 现象的胶束团聚体,使胶束具备荧光性能,通过荧光对来模拟药物,或将疏水药物与荧光染料形成 FRET 探针,在特定的激发波长下通过成像技术来实时监测 FRET 聚合物胶束在体内/外的药物释放、药代动力学行为和 FRET 比率等,以此进一步评价聚合物胶束在体内的稳定性和分布情况,了解聚合物胶束体内命运^[38]。目前研究聚合物胶束结构及性能的主要 FRET 策略:荧光淬灭到荧光恢复,形成胶束时淬灭剂的存在使荧光消失,胶束解离时荧光与淬灭剂分开,从而恢复荧光强度^[40];荧光增强到荧光减弱,形成胶束时因供体能量转移而产生荧光现象,胶束解离时使受体结构发生改变,荧光现象消失^[41]。

Morton 等^[42]依据荧光增强到荧光减弱的策

略,使用花菁(Cyanine, Cy)类中两种含叠氮化物的近红外(Near infrared, NIR)染料 Cy5.5 和 Cy7 与聚合物胶束聚(乙二醇)-b-聚(γ -丙炔-谷氨酸)(Poly(ethylene glycol)-b-poly(γ -propargyl-glutamate, PEG-b-PPLG)通过点击反应,形成 PEG-b-PPLG-Cy5.5 和 PEG-b-PPLG-Cy7 聚合物-荧光团偶联物,探测静脉内给药时 PMs 的命运。Fu 等^[43]制备的 pH 敏感型胶束,将 Cy5.5/猝灭剂(Fluorescent quencher, FQ)与胶束的共聚物通过化学键合的方式进行缀合,由于 Cy5.5 和猝灭剂之间的 FRET 作用,形成的胶束显示出低荧光,但当处于弱酸性条件胶束被分解,可以启动对超 pH 值敏感的荧光,即对 FRET-胶束在不同 pH 环境作用下的 FRET 现象和 PMs 的释药行为进行了表征。Chen 等^[44]使用荧光染料(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, DiI; 3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate, DiO),其中作为受体的 DiI 和作为供体的 DiO 通过物理包埋的方法装载到单甲氧基聚(乙二醇)-b-聚(d,l-乳酸)(Monomethoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(d,l-lactic acid), mPEG-PDLA)胶束的核心中。DiI 和 DiO 属于亲脂性二烷基碳菁类染料,它们在进入细胞膜之前荧光非常弱,当它们与膜结合或者与亲脂性生物分子如蛋白质结合时,荧光强度会显著增强。通过监测 FRET 效率,发现聚合物胶束作用于肿瘤细胞期间,在细胞膜和细胞内部观察到 FRET 的减少,表明在胶束与膜相互作用过程中,胶束核内负载的分子被有效地转移到质膜上,并可以从质膜中被内吞或扩散到靶标即特定的细胞内结构中。

尽管在分析聚合物胶束中 FRET 应用广泛,但基于 FRET 的策略具有几个缺点:(1)荧光信号和 PMs 浓度之间的线性关系较差;(2)过早释放的 FRET 荧光团在重新分配到疏水环境中如蛋白质的口袋中后可能被重新激活,从而产生干扰信号,即荧光再照明^[45];(3)荧光发射相对较弱并且易受到检测条件的影响。

2.2 聚集淬灭

聚集淬灭(Aggregation-caused quenching, ACQ)是指稀释状态下的高发射荧光团在聚集状态下变得弱发射或甚至完全淬灭的现象,也是实时监测 PMs 的荧光生物成像技术之一^[46]。ACQ 效应普遍存在于大多数荧光芳香烃中,由于在水环境中 π - π 堆积作用导致激基缔合物和激基复

合物的形成,从而消耗了激发态的能量^[47]。当基于 ACQ 的探针嵌入纳米载体基质内时,物理屏障防止荧光团聚和猝灭,从而照亮纳米载体^[46]。当纳米载体降解,包封的探针被释放到周围的水性环境中并立即形成聚集体会使荧光淬灭。所以 ACQ 染料应该在疏水基质中以良好的分散状态保持照明,当它们离开纳米载体的疏水基质时就会熄灭^[48]。ACQ 这类环境响应探针可以在 PMs 结构解离时发生信号切换,从而能够将完整的 PMs 与单聚物和释放的探针区分开来,进一步探究 PMs 在体内的命运。Li 等^[49]通过具有氟硼二吡咯 (Boron-dipyrromethene, BODIPY) 和氮杂氟硼二吡咯 (Aza-boron-dipyrromethene, aza-BODIPY) 结构的 ACQ 探针用于研究纳米粒子的自识别,使用姜黄素 (Curcumin, Cur) 作为模型药物,将 ACQ 探针封装在纳米颗粒内部,通过对鼻腔给药后的大鼠进行活体成像或体内外组织学检查,收集了完整纳米粒子和 Cur 转运的证据,探究负载 Cur 的聚己内酯纳米颗粒 (Polycaprolactone nanoparticles, PCL NPs) 的鼻内命运。BODIPY 和 aza-BODIPY 是一类具有独特性质的荧光染料,具有吸收强、量子产率高、发射波长可调、稳定性好、对 pH 值不敏感等优点。其所选的 aza-BODIPY 染料 (P2) 和 BODIPY (P4),如 6 图所示,P2 是一种只有一个融合吡咯环的部分构象受限染料,P4 则是一种缺乏两个苯基取代基的构象受限 BODIPY 染料,构象受限染料具有吸收带更窄、吸收最大值更长和消光系数更高的显著特征^[49]。当 P2 和 P4 探针处于负载状态是发射的,而释放的探针则在胶束降解时被瞬间和完全地猝灭,P2 和 P4 信号可以代表完整的胶束用于活体成像和离体成像^[50]。通过小动物活体光学成像系统 (*In vivo* imaging systems, IVIS) 观察给药后小鼠的血液、主要器官、鼻粘膜、三叉神经和脑组织的荧光信号,发现三叉神经通路主导了完整聚合物纳米颗粒从鼻到脑的输送。Ahmad 等^[51]同样使用 ACQ 探针 P2 和 P4,通过探针从负载状态到释放状态的荧光切换探究 mPEG-PDLLA 胶束和 HIV-1 转录激活剂 (HIV-1 trans-activator of transcription, TAT) 肽修饰的 mPEG-PDLLA 胶束的从鼻到脑的递送情况,发现 TAT 修饰减少了完整胶束在鼻腔中的保留,促进胶束从鼻腔到大脑的递送。并通过实验进一步证明三叉神经是完整胶束从鼻到脑递送的主要运输途径。He 等^[52]将 P2 和 P4 负载到

mPEG-PDLLA 聚合物胶束中,从而对生物介质和组织中的整体聚合物胶束进行精确的生物成像和半定量分析。尤其是通过活体成像和体内外胃食管组织检查,表明所有组别的 PMs 都能在胃食管中保留至少 4 h。肝脏和血液中出现的完整的聚合物胶束荧光信号有力地证明了聚合物胶束可以穿过肠道上皮,进入到全身循环。这些证据都证明了 PMs 口服给药的潜力。

与 FRET 不同,ACQ 探针在嵌入纳米载体时会发光,在纳米载体降解后释放到周围水环境中时会立即完全淬灭,可以最大程度减少自由探针的干扰,这使 ACQ 能更准确地对纳米载体进行生物成像^[46]。但因为 ACQ 是一个受外部因素影响的自然过程,它不适用于亲水性的纳米载体,因为亲水性基质很容易被浸透,从而立即导致嵌入的荧光团发生荧光淬灭^[53]。并且探针分子在生理的疏水环境中的分解和重新分配导致再发光也会对实验结果带来潜在的干扰。

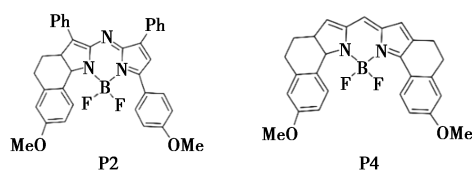


图 6 aza-BODIPY 染料 (P2) 和 BODIPY 染料 (P4) 的化学结构

Fig.6 Chemical structures of aza-BODIPY dye (P2) and BODIPY dye (P4)

2.3 聚集诱导发射

聚集诱导发射 (Aggregation-induced emission, AIE) 与 ACQ 探针相反,AIE 荧光探针在稀释状态下发射的荧光可以忽略不计,在胶束基质内形成聚集或分散体后,基于限制单个分子自由旋转的原理诱导强荧光发射,所以装载在聚合物胶束内的 AIE 探针可以照亮纳米颗粒,而释放的探针则产生最小的荧光^[54]。AIE 荧光探针因其灵活的可控性、较小的毒性和优秀的光稳定性而成为有吸引力的生物成像工具^[54]。Su 等^[55]合成了负载 AIE 荧光团四苯乙烯 (Tetraphenylethene, TPE) 的 PM 以监测 DOX 的释放曲线。TPE 是一种已经广泛应用于生物传感和成像领域的荧光生物探针,由于其分子内旋转在聚集状态下受到限制,表现出显著的 AIE 现象,因此可将 TPE 作为荧光生物探针引入聚合物胶束,以追踪胶束的生物分布。通过合成的 DOX 共轭多嵌段共聚物自组装形成

的壳结构将 TPE 包裹在其中,使胶束具有很强的生物成像能力,以追踪聚合物胶束在细胞内的递送。Yu 等^[56]开发了基于 pH 响应的共聚物和负载 4,4'-双[(4-溴苯基)苯基氨基]联苯(4-(4'-(diphenylamino))-[1, 1'-biphenyl]-4-yl)-1-((methacryloyloxy)methyl)pyridin-1-ium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)amide, TPMA)的双光子吸收聚集诱导发射荧光探针的吉西他滨(Gemcitabine, GEM)共轭氧化还原响应原药胶束,用于溶酶体靶向药物释放和生物成像。相比于 TPE 激发仅限于紫外区域的单光子荧光探针,TPMA 等双光子荧光探针可以被近红外或红外波长激发,可以避免短波长激发的光毒性,实现更深的成像深度和更高的空间分辨率。Yuan 等^[57]使用 TPETP 即 TPE 的衍生物,通过对 ROS 敏感的硫酮(Thio-ketal, TK)连接体与聚乙二醇链共轭。两亲性的 TPETP-TK-PEG 共聚物将 DOX 包裹在其中。作为该系统的一部分,TPETP 和 DOX 因相互荧光淬灭而表现出微弱的发射。一旦暴露在光照射下,快速产生的 ROS 就会破坏 TK 链接,诱导 DOX 的释放,使 TPETP 载体和 DOX 复合物都显示出强烈的荧光信号,从而监测 NDDS 载体的光反应分解过程和随后的溶酶体逃逸过程,并比较负载药物和载体在细胞内的分布情况。

虽然 AIE 荧光探针的高分辨率、高灵敏度和实时成像使研究人员能够更深入地了解聚合物胶束中负载药物和共聚物的细胞内激活、分解和分布过程。但 AIE 分子掺入 NDDS,其生物活性可能会影响负载药物的性质,以及 NDDS 的治疗效果。AIE 分子与 PMs 之间不稳定的连接可能会导致 AIE 意外解体,释放的 AIE 探针形成聚集体后错误的荧光发射将导致不可靠的结果。

3 液质联用

LC-MS 同时具有色谱的高分离能力以及质谱高特异性、高灵敏度和能够进行快速痕量分析等优点^[58]。

Shi 等^[59]建立了基于源内裂解技术的 LC-MS/MS 方法,并利用该方法研究了大鼠静脉给予 mPEG2000-PDLLA2500 之后的药代动力学行为。研究表明,经静脉给药后, mPEG2000-PDLLA2500 会被代谢生成 mPEG2000 和乳酸,血浆中会同时存在 mPEG2000-PDLLA2500 和 mPEG2000,血浆中 mPEG2000-PDLLA2500 和

mPEG2000 的暴露量随着给药剂量的增加而增加,但在给药剂量为 1.25 ~ 5.0 mg/kg 范围内药代动力学行为符合非线性特征。组织分布研究结果表明, mPEG2000-PDLLA2500 和 mPEG2000 在肝脏、肺、脾中含量较高,这与这些组织中网状内皮系统比较丰富有关。mPEG2000 在肾脏的组织分布明显高于 mPEG2000-PDLLA2500,预示着它们可能通过肾脏进行排泄。代谢和排泄实验结果显示粪便中 mPEG2000 的累积排泄量占 mPEG2000-PDLLA2500 剂量的 17.51%,尿液中 mPEG2000 的累积排泄量占剂量的 45.62%。通过尿和粪便排出的 mPEG2000 总量占 mPEG2000-PDLLA2500 剂量的 63.13%,说明静脉注射的 mPEG2000-PDLLA2500 主要以 mPEG2000 的形式通过尿液排出。Virender 等^[60]研究了向原位胰腺荷瘤 NSG 小鼠分别静脉注射给予包裹有 Cy5.5-let-7b、GDC-0449 的聚乙二醇-嵌段聚(2-甲基-2-羧基-碳酸丙烯-接枝-十二醇-接枝-四乙基戊二胺)(PEG-b-PCC-g-DC-g-TEPA)胶束、GDC-0449 乳剂之后的药代动力学行为,采用 LC-MS 方法定量血浆和组织样品中的 GDC-0449 含量。结果表明,胶束共递送系统可以有效地在肿瘤中积累。与单药胶束相比, GDC-0449 的胶束表现出较高的肿瘤抑制效果。Šimek 等^[61]提出了一种不需要任何标记直接测定体液和其他组织中透明质酸衍生物生物分布的 LC-MS/MS 方法。利用该方法分析了 DOX、代谢物(Doxorubicinol, DOXol)和油基透明质酸(HA-C18:1)不同时间在血浆、组织中的浓度。小鼠经静脉注射给药后,与游离 DOX 给药相比,负载 DOX 胶束血浆中检测到明显更高的 DOX 浓度。而 DOXol 的消除动力学和生物分布没有显著差异,表明 DOXol 的药代动力学特征与 DOX 给药形式无关。与负载 DOX 胶束相比,以空白胶束形式给药的 HA-C18:1 在所有观察到的组织中浓度水平较低。表明由接枝的两亲性聚合物制备的含药物胶束可以被疏水药物稳定。载体基质和药物的不同药代动力学特征表明,静脉注射后 HA 聚合物胶束可以被较快的破坏释放游离药物。结果表明,所提出的 HA 基含有透明质酸的两亲性共聚物形成纳米载体的体内稳定性较差,给药后 DOX 从 HA-C18:1 胶束中快速释放。给药 48 h 后,血浆中 Δ HA2 和 Δ HA2-C18:1 的相对含量没有明显变化。在肝脏中 HA-C18:1 在 30 min 后已经部分断裂,产生的片段与

原始 HA-C18:1 链的 $\Delta\text{HA}2/\Delta\text{HA}2\text{-C18:1}$ 比例不同。所提出的方法适用于体内跟踪其他 HA 纳米载体的基质和药物。便于评估纳米载体的体内稳定性。

LC-MS 方法相较于其他标记技术,具有高特异性和灵敏度的优点,但为了降低基质效应,需要对血浆、组织等复杂样品进行前处理,并且 LC-MS 的方法无法有效区分胶束与单体共聚物。

4 透射电子显微镜

透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM),简称透射电镜,通过将电子束投射到样品上,电子束与纳米级组件碰撞,产生立体角散射,不同的散射角会形成明暗不同的影像,样品主要特征由此实现详细可视化^[62]。

Ma 等^[63]制备了一种负载 PTX 的 F127-CS-DOX 聚合物胶束。通过透射电镜观察了胶束的尺寸与形貌。TEM 图像显示,负载 PTX 的 F127-CS-DOX 胶束呈球形,具有良好的分散性。与未负载 PTX 的 F127-CS-DOX 胶束相比,负载 PTX 的 F127-CS-DOX 胶束直径没有明显增加。DOX 和 PTX 的释放均随着 pH 的降低而增加。研究结果表明,PTX 负载的 F127-CS-DOX 聚合物胶束在联合治疗癌症方面具有很好的潜力。Liu 等^[64]开发了一种负载多西他赛(Docetaxel, DXT)的普朗尼克 P123(P123)胶束。通过透射电镜观察新制备的胶束和冻干胶束,观察到新制备的球形胶束分散的很好,冻干胶束仍为球形。胶束平均粒径为 50.7 nm。并证明负载 DTX 的胶束对肿瘤细胞有很好的杀伤作用,P123 胶束被认为是一种有效的 DTX 递送系统。Kiran

等^[65]通过透射电镜对负载伏立诺他的 PEG-PLGA 胶束的形态和尺寸进行了表征。空白胶束和负载胶束均呈球形,胶束尺寸分布较窄。胶束负载药物包封效率可达 90%,药物从 PEG-PLGA 胶束持续释放长达 72 h。与游离伏立诺他相比,负载伏立诺他胶束给药的细胞表现出优越的细胞内化能力,毒性有所增强。同时,经负载药物胶束处理的黑色素瘤小鼠肿瘤体积减小。结果表明负载伏立诺他的 PEG-PLGA 胶束改善了伏立诺他的物理化学性质,增强了其抗肿瘤功效。

TEM 虽然能可视化聚合物胶束聚集状态、尺寸等特征,但由于透射电镜观察前需要将样品脱水,聚合物胶束所处的环境条件会影响聚合物胶束形态,观察到的是聚合物胶束脱水后的形态而非聚合物胶束真正在体内的形态^[66]。目前低温透射电子显微镜(Electron cryo-microscopy, Cryo-TEM)可以弥补透射电镜这一缺点,得到样品的真实形态,多数研究显示,透射电镜和低温透射电子显微镜观察到的结果一致。

5 PMs 的多组分分析

负载药物的胶束在进入体循环之后,会有解离和释放出药物和载体材料的过程,完整的给药载体、共聚物单体、游离药物和解体的共聚物残留物会同时存在于体液中,不同组分具有不同的形态和尺度,同时也扮演着具有不同生物功能的角色。研究 PMs 在体内的结构变化,对这些不同组分进行定性定量分析,是实时监测体内 PMs 命运必须解决的难题。以上提到的分析测试技术已经可以用来定量或定性监测 PMs 在体内的变化,这些方法的优点和缺点总结见表 1。

表 1 用以研究 PMs 生物命运的分析测试技术

Tab.1 Analytical testing techniques used to study the biological fate of PMs

技术	应用	优势	局限
放射性示踪	能够定量监测共聚物和药物生物分布	灵敏度高,适用范围广	放射性标记可能从纳米载体上脱落或泄漏
FRET	研究 PMs 在体内的结构变化、胶束稳定性、药物释放等	灵敏度高、专属性强、重现性好	非定量,线性差
ACQ	完整胶束在体内的示踪	优秀的光稳定性,较小的毒性	非定量,再照明
AIE	完整胶束在体内的示踪	优秀的光稳定性,较小的毒性	非定量,再照明
LC-MS	药物和共聚物的定量测量;释放的药物与总药物的定量测定	灵敏度高,可以降低来自标记的伪影	不能区分胶束和单聚体
TEM	可视化聚合物胶束聚集状态、尺寸等特征	成像结果易懂,直观	非定量,前处理会影响分析结果

6 结论与展望

了解 PMs 体内的命运是 PMs 的研究和开发

的关键,这意味着需要掌握 PM 整体以及构成的共聚物和药物有效载荷,从 PM 进入体内与生物

系统接触开始所发生的整个过程。具体问题可能包括:PM 的结构变化、体内和亚细胞药物释放、药物和共聚物的降解、药代动力学、细胞摄取和亚细胞运输。但由于 PM 相对较小的尺寸,自组装/拆卸动力学与生物系统相互作用的复杂性,以及缺乏同时监测 PM 载体、组成共聚物和药物有效载荷的可行策略,想要真正的了解 PMs 体内的命运是充满挑战的。传统的放射性标记虽然能同时对 PMs 中负载药物和共聚物进行定量监测,但不能阐述 PMs 在体内的动态变化。FRET、AIE 和 ACQ 等环境响应荧光团的发展为监测 PMs 体内命运打开了一扇大门,但一个理想的监测策略,不仅可以识别,还应提供体内 PMs 高精度的定量结果。由于这类环境响应荧光团存在的自发荧光和光散射等问题,在荧光信号(强度或比率)和 PM 浓度之间建立精确的线性仍然存在困难。与标记方法相比,基于 LC/MS 的分析方法避免了来自标记的伪影,并将来自降解材料的干扰信号降至最低,但 LC/MS 的定量方法无法区分胶束与单体共聚物。TEM 作为监测纳米载体的补充技术,虽然能提供 PMs 与生物组织相互作用的部分信息,但 TEM 分析的样品前处理可能会改变 PM 的原始条件,而且也无法对 PMs 进行实时和定量的体内监测。虽然现在的分析技术都存在一些缺陷,完全了解 PMs 的体内行为仍存在许多困难,但这些监测策略的出现为后续研究 PMs 体内命运指引了方向并奠定了坚实的基础。

参考文献:

- [1] YOU H B, PARK K. Advanced drug delivery 2020 and beyond: Perspectives on the future[J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2020, **158**: 4-16.
- [2] LIU Q Y, ZOU J H, CHEN Z J, et al. Current research trends of nanomedicines[J]. *Acta Pharm. Sin. B*, 2023, **13**(11): 4 391-4 416.
- [3] 赵宇,梁旭阳,刘超,等.pH 敏感型二氧化硅纳米载体的制备研究[J]. *化学试剂*, 2022, **44**(10): 1 439-1 444.
- [4] BRUSINI R, VARNA M, COUVREUR P. Advanced nanomedicines for the treatment of inflammatory diseases[J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2020, **157**: 161-178.
- [5] 高嘉,丁宣凯,胡嘉欢,等.共价有机框架材料在药物递送中的应用进展[J]. *化学试剂*, 2023, **45**(1): 62-74.
- [6] HWANG D, RAMSEY J D, KABANOV A V. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval[J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2020, **156**: 80-118.
- [7] KAUR J, MISHRA V, SINGH S K, et al. Harnessing amphiphilic polymeric micelles for diagnostic and therapeutic applications: Breakthroughs and bottlenecks[J]. *J. Control. Release*, 2021, **334**: 64-95.
- [8] MIKHAIL A S, ALLEN C. Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: Transport at the whole body, tissue and cellular levels[J]. *J. Control. Release*, 2009, **138**(3): 214-223.
- [9] LORSON T, LÜBTOW M M, WEGENER E, et al. Poly(2-oxazoline)s based biomaterials: A comprehensive and critical update[J]. *Biomaterials*, 2018, **178**: 204-280.
- [10] 郭娜,吕佳琦,李云,等.聚合物胶束作为抗癌药物纳米递送载体的研究进展[J]. *天津科技大学学报*, 2022, **37**(4): 71-80.
- [11] HARA E, UEDA M, KIM C J, et al. Suppressive immune response of poly-(sarcosine) chains in peptide-nanosheets in contrast to polymeric micelles[J]. *J. Pept. Sci.*, 2014, **20**(7): 570-577.
- [12] HE H S, WANG L T, MA Y H, et al. The biological fate of orally administered mPEG-PDLLA polymeric micelles[J]. *J. Control. Release*, 2020, **327**: 725-736.
- [13] BISWAS S, KUMARI P, LAKHANI P M, et al. Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery[J]. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2016, **83**: 184-202.
- [14] WAN X M, BEAUDOIN J J, VINOD N, et al. Co-delivery of paclitaxel and cisplatin in poly(2-oxazoline) polymeric micelles: Implications for drug loading, release, pharmacokinetics and outcome of ovarian and breast cancer treatments[J]. *Biomaterials*, 2019, **192**: 1-14.
- [15] WU W, LI T L. Unraveling the in vivo fate and cellular pharmacokinetics of drug nanocarriers[J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2019, **143**: 1-2.
- [16] ZOYA I, HE H S, WANG L T, et al. The intragastrintestinal fate of paclitaxel-loaded micelles: Implications on oral drug delivery[J]. *Chin. Chem. Lett.*, 2021, **32**(4): 1 545-1 549.
- [17] BERNABEU E, CAGEL M, LAGOMARSINO E, et al. Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead[J]. *Int. J. Pharm.*, 2017, **526**(1/2): 474-495.
- [18] RANADE A A, BAPSY P P, NAG S, et al. A multicenter phase II randomized study of cremophor-free polymeric nanoparticle formulation of paclitaxel in women with locally advanced and/or metastatic breast cancer after failure of anthracycline[J]. *Asia-Pac. J. Clin. Onco.*, 2013, **9**(2): 176-181.
- [19] BISSO S, LEROUX J C. Nanopharmaceuticals: A focus

- on their clinical translatability[J]. *Int. J. Pharm.*, 2020, **578**:119-136.
- [20] HOUDAIHED L, EVANS J C, ALLEN C. Overcoming the road blocks: Advancement of block copolymer micelles for cancer therapy in the clinic[J]. *Mol. Pharmaceutics*, 2017, **14**(8): 2 503-2 517.
- [21] CAI Y F, QI J P, LU Y, et al. The fate of polymeric micelles[J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2022, **188**:114-136.
- [22] MABROUK M, HAMED N A, MANSOUR F. Spectroscopic methods for determination of critical micelle concentrations of surfactants; a comprehensive review[J]. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2023, **58**(3): 206-234.
- [23] ZHU C L, GONG S, DING J S, et al. Supersaturated polymeric micelles for oral silybin delivery: The role of the soluplus-PVPVA complex[J]. *Acta Pharm. Sin. B*, 2019, **9**(1): 107-117.
- [24] ZHANG Z C, QI J P, LU Y, et al. Peroral targeting of drug micro or nanocarriers to sites beyond the gastrointestinal tract[J]. *Med. Res. Rev.*, 2021, **41**(4): 2 590-2 598.
- [25] YOU H B, YIN H Q. Stability issues of polymeric micelles[J]. *J. Control. Release*, 2008, **131**(1): 2-4.
- [26] SUN X R, WANG G W, ZHANG H, et al. The blood clearance kinetics and pathway of polymeric micelles in cancer drug delivery[J]. *ACS Nano*, 2018, **12**(6): 6 179-6 192.
- [27] TIAN R, ZENG Q, ZHU S, et al. Albumin-chaperoned cyanine dye yields superbright NIR-II fluorophore with enhanced pharmacokinetics[J]. *Sci. Adv.*, **5**(9): eaaw0672.
- [28] RAJENDRAN L, KNÖLKER H J, SIMONS K. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery[J]. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2010, **9**(1): 29-42.
- [29] LAMB J, HOLLAND J P. Advanced methods for radiolabeling multimodality nanomedicines for SPECT/MRI and PET/MRI[J]. *J. Nucl. Med.*, 2018, **59**(3): 382-389.
- [30] LETCHFORD K, BURT H M. Copolymer micelles and nanospheres with different in vitro stability demonstrate similar paclitaxel pharmacokinetics[J]. *Mol. Pharmaceutics*, 2012, **9**(2): 248-260.
- [31] 刘金剑. ¹²⁵I 标记示踪研究胶束表面亲疏水性与其体内分布的关系[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [32] HOANG B, LEE H, REILLY R M, et al. Noninvasive monitoring of the fate of ¹¹¹In-labeled block copolymer micelles by high resolution and high sensitivity microSPECT/CT imaging[J]. *Mol. Pharmaceutics*, 2009, **6**(2): 581-592.
- [33] MATHOT F, VAN B L, PRÉAT V, et al. Intestinal uptake and biodistribution of novel polymeric micelles after oral administration[J]. *J. Control. Release*, 2006, **111**(1): 47-55.
- [34] LIU J B, ZENG F Q, ALLEN C. In vivo fate of unimers and micelles of a poly(ethylene glycol)-block-poly(ε-caprolactone) copolymer in mice following intravenous administration[J]. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2007, **65**(3): 309-319.
- [35] LAMB J, HOLLAND J P. Advanced methods for radiolabeling multimodality nanomedicines for SPECT/MRI and PET/MRI[J]. *J. Nucl. Med.*, 2018, **59**(3): 382-389.
- [36] HU X W, DONG X C, LU Y, et al. Bioimaging of nanoparticles: The crucial role of discriminating nanoparticles from free probes[J]. *Drug Discovery Today*, 2017, **22**(2): 382-387.
- [37] MAN F, GAWNE P J, ROSALES R. Nuclear imaging of liposomal drug delivery systems: A critical review of radiolabelling methods and applications in nanomedicine[J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2019, **143**: 134-160.
- [38] 蒋林芮, 曾妮, 苗青山, 等. 荧光共振能量转移聚合物胶束及其作为药物载体的研究进展[J]. 生物医学工程杂志, 2022, **39**(5): 1 022-1 032.
- [39] 刘箫音, 杨素华, 张寒, 等. 基于螺(噁)嗪光异构化的多功能荧光染料及应用[J]. 化学试剂, 2024, **46**(1): 45-52.
- [40] RUAN Z, LIU L, FU L, et al. An amphiphilic block copolymer conjugated with carborane and a NIR fluorescent probe for potential imaging-guided BNCT therapy[J]. *Polym. Chem.*, 2016, **7**(26): 4 411-4 418.
- [41] ZHAO Y M, SCHAPOTSCHNIKOW P, SKAJAA T, et al. Probing lipid coating dynamics of quantum dot core micelles via Förster resonance energy transfer[J]. *Small*, 2014, **10**(6): 1 163-1 170.
- [42] MORTON S W, ZHAO X Y, QUADIR M A, et al. FRET-enabled biological characterization of polymeric micelles[J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(11): 3 489-3 496.
- [43] FU L Y, YUAN P, RUAN Z, et al. Ultra-pH-sensitive polypeptide micelles with large fluorescence off/on ratio in near infrared range[J]. *Polym. Chem.*, 2017, **8**(6): 1 028-1 038.
- [44] CHEN H T, KIM S, LI L, et al. Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Förster resonance energy transfer imaging[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008, **105**(18): 6 596-6 601.
- [45] ZHANG H, LI H J, CAO Z T, et al. Investigation of the in vivo integrity of polymeric micelles via large Stokes shift fluorophore-based FRET[J]. *J. Control. Release*, 2020, **324**: 47-54.

- [46] QI J P, HU X W, DONG X C, et al. Towards more accurate bioimaging of drug nanocarriers: Turning aggregation-caused quenching into a useful tool [J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2019, **143**: 206-225.
- [47] MA X F, SUN R, CHENG J H, et al. Fluorescence aggregation-caused quenching versus aggregation-induced emission: A visual teaching technology for undergraduate chemistry students [J]. *J. Chem. Educ.*, 2016, **93**(2): 345-350.
- [48] SHEN C Y, YANG Y Q, SHEN B D, et al. Self-discriminating fluorescent hybrid nanocrystals: Efficient and accurate tracking of translocation via oral delivery [J]. *Nanoscale*, 2018, **10**(1): 436-450.
- [49] LI Y, WANG C L, ZONG S Y, et al. The trigeminal pathway dominates the nose-to-brain transportation of intact polymeric nanoparticles: Evidence from aggregation-caused quenching probes [J]. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2019, **15**(4): 686-702.
- [50] HU X W, ZHANG J, YU Z, et al. Environment-responsive aza-BODIPY dyes quenching in water as potential probes to visualize the in vivo fate of lipid-based nanocarriers [J]. *Nanomed. Nanotechnol.*, 2015, **11**(8): 1 939-1 948.
- [51] AHMAD E, LV Y J, ZHU Q G, et al. TAT modification facilitates nose-to-brain transport of intact mPEG-PDLLA micelles: Evidence from aggregation-caused quenching probes [J]. *Appl. Mater. Today*, 2020, **19**: 100 556.
- [52] HE H S, WANG L T, MA Y H, et al. The biological fate of orally administered mPEG-PDLLA polymeric micelles [J]. *J. Control. Release*, 2020, **327**: 725-736.
- [53] ZHAI D, XU W, ZHANG L Y, et al. The role of “disaggregation” in optical probe development [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**(8): 2 402-2 411.
- [54] PEI Y, WANG Z Y, WANG C. Recent progress in polymeric AIE-active drug delivery systems: Design and application [J]. *Mol. Pharmaceutics*, 2021, **18**(11): 3 951-3 965.
- [55] SU X, MA B X, HU J, et al. Dual-responsive doxorubicin-conjugated polymeric micelles with aggregation-induced emission active bioimaging and charge conversion for cancer therapy [J]. *Bioconjugate Chem.*, 2018, **29**(12): 4 050-4 061.
- [56] YU T, ZHUANG W H, SU X, et al. Dual-responsive micelles with aggregation-induced emission feature and two-photon absorption for accurate drug delivery and bioimaging [J]. *Bioconjugate Chem.*, 2019, **30**(7): 2 075-2 087.
- [57] YUAN Y Y, XU S D, ZHANG C J, et al. Light-responsive AIE nanoparticles with cytosolic drug release to overcome drug resistance in cancer cells [J]. *Polym. Chem.*, 2016, **7**(21): 3 530-3 539.
- [58] 阎娜, 于晓燕, 陈武炼. 高效液相色谱-串联质谱法测定人血清中 5 种抗真菌药物及相关代谢产物的测量方法 [J]. *化学试剂*, 2023, **45**(3): 126-131.
- [59] SHI M Y, ZHENG X Y, JIANG H, et al. Unraveling the in vivo biological fate of mPEG2000-PDLLA2500-COOH diblock copolymers by LC-MS/MS based on CID in source technique [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2023, **1 267**: 341 375.
- [60] VIRENDER K, VAIBHAV M, YANG P, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of polymeric micelles containing miRNA and small-molecule drug in orthotopic pancreatic tumor-bearing mice [J]. *Theranostics*, 2018, **8**(15): 4 033-4 049.
- [61] ŠIMEK M, HERMANNOVÁ M, ŠMEJKALOVÁ D, et al. LC-MS/MS study of in vivo fate of hyaluronan polymeric micelles carrying doxorubicin [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2018, **209**: 181-189.
- [62] MILNE J L S, BORGNA M J, ALBERTO B, et al. Cryo-electron microscopy—A primer for the non-microscopist [J]. *FEBS J.*, 2013, **280**(1): 28-45.
- [63] MA Y K, FAN X H, LI L B. pH-sensitive polymeric micelles formed by doxorubicin conjugated prodrugs for co-delivery of doxorubicin and paclitaxel [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2016, **137**: 19-29.
- [64] LIU Z H, LIU D H, WANG L L, et al. Docetaxel-loaded pluronic p123 polymeric micelles: In vitro and in vivo evaluation [J]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, **12**(3): 1 684-1 696.
- [65] KIRAN R S V, TRIVEDI P, PREETI K, et al. Evaluation of anti-tumor efficacy of vorinostat encapsulated self-assembled polymeric micelles in solid tumors [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, **19**(7): 3 141-3 151.
- [66] ZHONG S, POCHAN D J. Cryogenic transmission electron microscopy for direct observation of polymer and small-molecule materials and structures in solution [J]. *Polym. Rev.*, 2010, **50**(3): 287-320.