文章编号:1000-5404(2014)22-2287-05

论著

纳米炭-表阿霉素混悬液对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖的抑制作用

张永松,梁全琨,钟 玲,齐晓伟,宗贝歌,杜俊泽,岳志强,张 毅,范林军 (400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺中心)

[摘要] **目的** 探讨纳米炭-表阿霉素混悬液(carbon nanoparticles-epirubicin suspension,CNP-EPI)对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 采用不同浓度的CNP-EPI处理MDA-MB-231细胞,CCK-8法测定不同浓度、不同时间对MDA-MB-231细胞增殖的抑制作用;根据测定的IC_{50}选取5 μg/mL CNP-EPI,相应浓度25 μg/mL CNP及仅加培养基作用24 h后,观察细胞形态的变化,流式细胞仪(flow cytometry, FCM)测定细胞凋亡率。**结果** 在1~200 μg/mL浓度范围内,CNP-EPI对乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖的抑制作用逐渐增强,48 h后仍有增加的趋势,但逐渐趋于稳定,且各时间段内对细胞的抑制率与药物浓度呈剂量依赖关系,与正常对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),而相应各浓度CNP对细胞的增殖抑制作用不明显;5 μg/mL CNP-EPI作用细胞24 h后,显微镜下可以看到大量的细胞死亡,正常对照组和相应浓度的CNP组细胞生长未见明显异常;流式细胞仪检测,CNP-EPI组作用24 h后,细胞的凋亡率为(14.37±6.25)%,死亡率可达(80.70±6.20)%,与相应浓度CNP组及正常对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** CNP-EPI混悬液对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖有明显抑制或杀伤作用,其抑制作用可能是通过其缓慢释放的表阿霉素直接杀伤癌细胞或诱导其凋亡实现。

[关键词] 纳米炭-表阿霉素混悬液; MDA-MB-231细胞;增殖;凋亡
[中图法分类号] R73-354;R737.9;R979.14 [文献标志码] A

Carbon nanoparticles-epirubicin suspension suppresses proliferation in human breast cancer MDA-MB-231 cells

Zhang Yongsong, Liang Quankun, Zhong Ling, Qi Xiaowei, Zong Beige, Du Junze, Yue Zhiqiang, Zhang Yi, Fan Linjun(Center of Breast Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of carbon nanoparticles-epirubicin suspension (CNP-EPI) on the proliferation and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** MDA-MB-231 cells were cultured with different concentrations of CNP-EPI *in vitro*. CCK-8 assay was used to determinate the inhibitory effect of CNP-EPI on the proliferation of MDA-MB-231 cells at different concentrations and for different times. According to the determination of IC_{50}, 5 μg/mL CNP-EPI (25 μg/mL CNP) and only add culture medium were selected, and the cell morphology was observed with inverted microscopy, and cell apoptotic rates were determined by flow cytometry after 24 hours' treatment. **Results** CNP-EPI exerted gradually stronger inhibitory effect on the proliferation of MDA -MB-231 cells in a dose-dependent manner when the concentration ranged from 1 to 200 μg/mL for same time period, and the inhibitory effect was still in a increasing trend after 48 hours' treatment, but slowly turned to stable. The inhibitory effect of CNP-EPI was significantly stronger in CNP-EPI treated cells than in normal control cells at all time points ($P<0.01$). However, no such inhibitory effect was found in the MDA-MB-231 cells treated by different concentrations of CNP. For the cells treated by 5 μg/mL CNP-EPI for 24 h, inverted microscopy observed that a great deal of cells were dead, but no obvious change of cell morphology was seen in the control cells and the cells treated by CNP. Flow cytometry indicated

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(CSTC2011AB05041)
[通信作者] 范林军,E-mail: flj212@medmail.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141104.1729.001.html(2014-11-04)

that the apoptotic rate was (14.37 ± 6.25) % and the mortality reached to (80.70 ± 6.20) % in the cells treated by 5 μg/mL CNP-EPI group for 24 h, which were significantly higher than those of CNP-treated cells and normal control cells ($P < 0.05$). **Conclusion** CNP-EPI exerts obviously inhibitory effect on the proliferation or killing effect in the human breast cancer MDA-MB-231 cells. The inhibitory effect of CNP-EPI might be due to delayed releasing of EPI to directly kill the tumor cells or induce cell apoptosis.

[**Key words**] carbon nanoparticles-epirubicin suspension; MDA-MB-231cells; proliferation; apoptosis

Supported by the Tackling Project of Science and Technology Research of Chongqing (CSTC2011AB05041). Corresponding author: Fan Linjun, E-mail: flj212@medmail.com.cn

纳米炭混悬液是一种靶向性强、安全可靠的新型淋巴结示踪剂,近年来被用于胃癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、甲状腺癌等手术的术中淋巴结及前哨淋巴结活检示踪的研究[1-6]。纳米炭被注入组织间隙后,易被巨噬细胞吞噬并能很快进入淋巴管,聚集滞留到淋巴结,使淋巴结黑染,实现区域淋巴结的活体染色,对机体无明显毒性及致畸作用,未见不良反应和并发症[1-2,7-11]。纳米炭的多孔蜂窝样结构使其具有强大的表面吸附能力和功能缓释性,已有学者将其作为载体进行靶向淋巴化疗[12-13]。但纳米炭吸附表阿霉素后体外对乳腺癌细胞增殖的抑制作用研究尚少见报道。本研究通过体外细胞实验,分析纳米炭吸附表阿霉素对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响,为临床应用纳米炭吸附表阿霉素进行靶向淋巴化疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购自中国科学院上海细胞所,由第三军医大学乳腺中心齐晓伟博士传代保存惠赠。胎牛血清(Gibco 公司,USA),DMEM/H 糖培养基(Hyclone 公司,USA),胰蛋白酶(Hyclone 公司,USA),青霉素/链霉素混合液(100×,Hyclone 公司,USA),PBS 粉剂(北京中杉金桥生物技术有限公司),CCK-8 试剂盒(江苏南通碧云天生物技术研究所),Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(江苏南京凯基生物科技发展有限公司),纳米炭混悬液(Carbon Nanoparticles Suspension Injection,CNP,规格 1 mL∶50 mg,生产批号:1304010,重庆莱美药业股份有限公司),注射用盐酸表柔比星即表阿霉素(Epirubicin Hydrochloride for injection,EPI,规格:10 mg/支,生产批号:130100302,辉瑞制药无锡有限公司),酶联反应检测仪、流式细胞仪(美国 BD 公司),CK-40 倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 纳米炭-表阿霉素混悬液的制备

纳米炭-表阿霉素混悬液的制备参照文献[14]进行。使用前将注射用表阿霉素 10 mg 加入 1 mL 注射用生理盐水,摇匀,充分溶解。取 1 mL(含量 50 mg)纳米炭混悬液加入到溶解的表阿霉素(10 mg/mL)1 mL 中,摇匀,震荡 5 ~ 10 min,使纳米炭与表阿霉素充分吸附,制备成纳米炭-表阿霉素混悬液(CNP-EPI),呈黑色,用生理盐水依次按比例稀释成所需各浓度即可。不同浓度的 CNP-EPI 混悬液中 CNP 与 EPI 质量比均为 5∶1。

1.3 细胞培养和传代

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 用含 10% 胎牛血清、青霉素/链霉素混合液的 DMEM/H 糖培养液,放置于 37 ℃、5% CO_2 的恒温孵育箱中培养。常规换液培养,细胞生长至 80% ~ 90% 汇合时,0.25% 胰酶消化传代。取对数生长期的细胞进行试验。

1.4 CCK-8 检测 CNP-EPI 对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用

取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,经胰酶消化后,调整细胞数为每孔 5×10^3/100 μL,接种于 96 孔培养板内,置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。培养 24 h 待细胞贴壁后,弃去旧细胞培养液,实验组每孔分别加入不同浓度的 CNP-EPI 10 μL(CNP-EPI 的浓度系指其内所含 EPI 的浓度)和 90 μL 细胞培养液,使其终浓度为 1、5、10、25、50、100、200 μg/mL;CNP 对照组分别加入相应浓度的 CNP(与实验组 CNP 含量相同)10 μL 和 90 μL 细胞培养液,正常对照组加入 100 μL 细胞培养液,另设仅加同体积不含细胞的培养液作为空白组,每组 3 个复孔。将其放置于培养箱中培养 24、48、72 h,分别于相应时间点培养结束前 4 h,取出各培养板弃去旧培养液,每孔加入 10 μL CCK-8 和 100 μL 培养液,继续培养 4 h,取出各培养板水平离心(1 000 r/min、5 min),使残留的纳米炭沉淀,排除其对显色的干扰,吸取上清液至新的 96 孔培养板,用酶标仪测定 450 nm 波长处各细胞培养孔的光吸收值[D(450)]。以 3 个孔 D(450) 值的平均值作为各组的 D(450) 值,计算细胞生长抑制率,绘制细胞生长抑制曲线。细胞生长抑制率(%) = {1 -[实验组 D(450) 值 - 空白组 D(450) 值]}/[正常对照组 D(450) 值 - 空白组 D(450) 值] × 100%。分析计算各时间点半数抑制浓度值(IC_{50})。所有实验重复 3 次。

1.5 倒置显微镜下观察 MDA-MB-231 细胞形态的变化

根据实验组测定的 IC_{50} 选取 5 μg/mL CNP-EPI,相对应浓度 25 μg/mL CNP 作对照及仅加培养基作正常对照分别作用于细胞 24 h 后,避光条件下用倒置显微镜观察细胞形态的变化情况。

1.6 流式细胞仪检测 CNP-EPI 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

根据1.4实验所得各时间点对MDA-MB-231细胞的IC_{50}值,选取5 μg/mL CNP-EPI和相对应浓度CNP进行细胞凋亡率测定。取对数生长期MDA-MB-231细胞,0.25%胰酶消化后制成单细胞悬液,按0.5×10^6个/孔细胞数接种于6孔板中,培养24 h细胞贴壁后更换新鲜培养液,实验组加入终浓度5 μg/mL CNP-EPI培养液,CNP对照组加入相应终浓度25 μg/mL CNP培养液,正常对照组加入同体积培养液的细胞,每组3个复孔,培养24 h后,用4 ℃冷PBS洗涤2次,离心(1 000 r/min、5 min)收集细胞。按Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂说明书进行操作,加入500 μL的Binding Buffer悬浮细胞,再加入5 μL AnnexinV-FITC混匀后,加入5 μL PI染色,轻轻混匀,室温、避光、反应10 min,1 h内进行流式细胞仪检测和分析处理。

1.7 统计分析

采用SPSS 13.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,多组数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验;用GraphPad Prism 5软件计算IC_{50}。

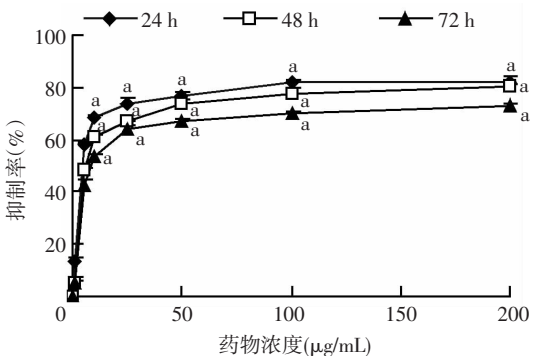
2 结果

2.1 CNP-EPI 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖

CCK-8检测结果显示,不同浓度的CNP-EPI混悬液分别作用于MDA-MB-231细胞24、48、72 h后,对乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖均有不同程度的抑制作用。与同时间点正常对照组相比,差异具有统计学意义(F值分别为2 188.779、1 915.934和1 748.166;$P<0.01$),且各时间点内对细胞增殖的抑制作用与药物浓度呈现剂量依赖关系,随药物浓度的增加抑制作用增强。在1~200 μg/mL浓度内,其抑制曲线显示随着时间的延长,不同浓度的CNP-EPI对乳腺癌细胞增殖的抑制作用均逐渐增强,48 h后其抑制作用仍有增加的趋势,但逐渐趋于稳定(图1)。利用GraphPad Prism 5软件计算出CNP-EPI在24、48、72 h对乳腺癌MDA-MB-231细胞的IC_{50}值,分别为5.80、9.64、12.51 μg/mL。CNP对照组中相应各浓度的CNP混悬液对乳腺癌MDA-MB-231细胞均无明显的抑制作用,与同时间点正常对照组比较,差异无统计学意义($F=2.487$,$P=0.062$;$F=2.443$,$P=0.066$;$F=2.160$,$P=0.096$),见表1。

2.2 MDA-MB-231 细胞的形态学观察

作用24 h后,正常对照组细胞呈梭形,贴壁生长良好,未见明显异常(图2A);25 μg/mL CNP组细胞大量贴壁生长,形态良好,细胞周围及表面可见黑色的纳米炭颗粒(图2B);5 μg/mL CNP-EPI组可以看到大量的死亡细胞,细胞数目大量减少,细胞贴壁生长不良,细胞形态变圆,体积变小,核固缩,可见细胞核碎片,周围及细胞表面可见较多黑色的纳米炭颗粒(图2C)。



a:$P<0.01$,与0 μg/mL药物浓度组比较

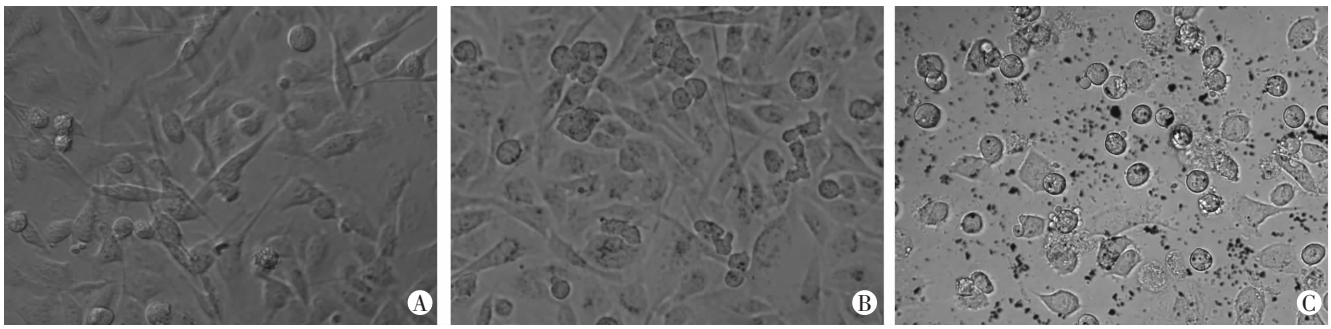
图1 不同浓度、不同时间 CNP-EPI 对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用

表1 不同浓度、不同时间 CNP 混悬液对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

浓度(μg/mL)	24 h	48 h	72 h
0	1.55±0.03	1.61±0.01	1.77±0.02
5	1.54±0.03	1.63±0.01	1.77±0.01
25	1.52±0.02	1.60±0.01	1.75±0.01
50	1.49±0.02	1.60±0.01	1.79±0.01
125	1.51±0.01	1.61±0.01	1.76±0.01
250	1.50±0.01	1.60±0.01	1.76±0.02
500	1.50±0.02	1.60±0.02	1.76±0.01
1 000	1.52±0.02	1.61±0.01	1.75±0.02

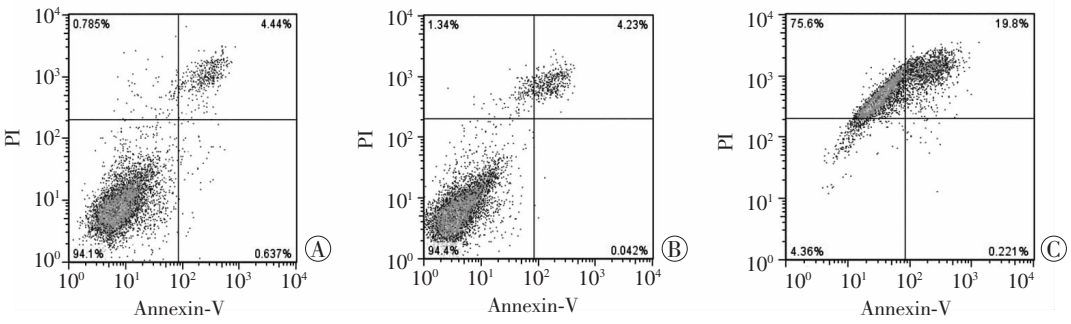
2.3 流式细胞仪检测 MDA-MB-231 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示,处理24 h后,5 μg/mL CNP-EPI组、25 μg/mL CNP组和正常对照组对MDA-MB-231细胞的凋亡率分别为(14.37±6.25)%、(3.37±0.80)%、(5.23±1.94)%,5 μg/mL CNP-EPI组对MDA-MB-231细胞的凋亡率明显高于25 μg/mL CNP组和正常对照组,差异有统计学意义($P=0.012$,$P=0.026$),25 μg/mL CNP组和正常对照组24 h时对MDA-MB-231细胞的凋亡率比较,差异无统计学意义($P=0.571$,图3)。



A:正常对照组;B:25 μg/mL CNP组;C:5 μg/mL CNP-EPI组

图2 倒置显微镜下观察 CNP 和 CNP-EPI 作用 24 h 后 MDA-MB-231 细胞形态的变化 (×100)



A：正常对照组；B：25 μg/mL CNP 组；C：5 μg/mL CNP-EPI 组

图3 流式细胞术检测 CNP、CNP-EPI 作用 MDA-MB-231 细胞24 h 后各组细胞的凋亡率

3 讨论

MDA-MB-231 细胞是三阴性乳腺癌细胞（triple-negative breast cancer，TNBC），即雌激素受体（ER）、孕激素受体（PR）和人类表皮生长因子受体 2（HER-2）表达均是阴性，对内分泌治疗及分子靶向治疗不敏感，侵袭性强，恶性程度高，转移和复发率较高，预后差[15-16]。已有临床试验研究[17-18]表明，TNBC 对以蒽环类和紫杉类为基础的化疗方案敏感，有较高的总缓解率及病理缓解率，一旦达到完全病理缓解率，预后较好，但没有达到完全病理缓解率则生存率较低，总的临床预后生存仍然较差。近年也有实验研究[19]显示，以铂类为基础的化疗方案能改善 TNBC 患者的预后，但尚缺乏大量临床研究加以验证。目前，对 TNBC 患者唯一有确切疗效的只有化疗，但无最适合的化疗指南，无标准的治疗方案。因此，探索新的 TNBC 治疗方法对提高乳腺癌的治疗效果具有重要意义。本研究设想通过应用药物载体，将化疗药物运送至有转移的腋窝淋巴结进行靶向淋巴化疗，可能改善乳腺癌患者的预后，提高疗效及生存质量。

纳米炭具有良好的淋巴趋向性，强大的吸附性能和功能缓释性，同时能被巨噬细胞吞噬，既能将区域淋巴结黑染，利于术中辨认和清扫，又能将吸附的化疗药物导入淋巴系统并缓慢释放，发挥淋巴化疗作用，是一种良好的淋巴示踪剂和药物载体[1,3,12-13,20]。表阿霉素是蒽环类药物阿霉素的同分异构体，属于细胞周期非特异性药物，它直接嵌入 DNA 链之间，干扰 DNA 转录过程，阻止 mRNA 的形成，从而抑制 DNA 和 RNA 的合成，对拓扑异构酶Ⅱ也有抑制作用，导致 DNA 损伤及诱导细胞凋亡[21]。这种诱导细胞凋亡的能力，疗效确切，心脏毒性小等特点使表阿霉素成为临床上治疗乳腺癌的基础性药物[22-24]。利用纳米炭的特点吸附表阿霉素进行靶向淋巴化疗，能提高淋巴结内表阿霉素的浓度，更好地发挥其对淋巴结内转移的癌细胞的杀灭作用。

我们前期研究发现在 CNP-EPI 混悬液中，纳米炭与表阿霉素质量比为 5∶1混合配比时，其吸附率可达 95% 以上，达到最佳的吸附比例。再增加表阿霉素的比例会导纳米炭的吸附率降低。因此本研究中纳米炭与表阿霉素按 5∶1的比例配制 CNP-EPI 混悬液。本研究结果表明，不同浓度的纳米炭-表阿霉素混悬液对 MDA-MB-231 细胞增殖均有不同程度的抑制作用，且各时间点内对细胞增殖的抑制作用与药物浓度呈现剂量依赖关系，随药物浓度的增加抑制作用增强。而不同浓度的纳米炭混悬液对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞均没有明显的抑制作用，这同杨钟等[25]研究的活性炭纳米粒子（activated carbon nanoparticles，ACNP）本身体外对人胃癌 BG-823 细胞无明显的抑制生长作用结果相一致。说明 CNP-EPI 对乳腺癌的抑制是通过纳米炭缓慢释放其吸附的表阿霉素作用于癌细胞从而抑制其增殖。随着时间的延长，不同浓度的 CNP-EPI 对乳腺癌细胞增殖的抑制作用均逐渐增强，但在 48 h 逐渐趋于稳定。这可能是由于在 48 h 后 CNP-EPI 对表阿霉素的吸附和释放达到平衡，其对乳腺癌的抑制作用也达到稳定。

本研究还显示，根据 IC_{50}值选取的 5 μg/mL CNP-EPI 混悬液作用 24 h 内可导致乳腺癌 MDA-MB-231 细胞有明显的凋亡和死亡，死亡数目较多，而早期凋亡率较小，晚期凋亡率数值较大；倒置显微镜观察到细胞贴壁生长不良，细胞形态变圆，体积变小，核固缩，可见细胞核碎片，周围及细胞表面可见较多黑色的纳米炭颗粒，说明 CNP-EPI 在早期释放表阿霉素较多从而直接杀伤癌细胞，而随着时间的延长释放表阿霉素减少从而以诱导癌细胞凋亡为主。通过 CCK-8 细胞增殖实验、流式细胞术检测细胞凋亡实验及倒置显微镜观察结果说明 CNP-EPI 对乳腺癌细胞增殖的抑制作用

可能是通过其不断释放的表阿霉素直接杀伤癌细胞或诱导其凋亡而实现。

综上所述,本实验表明CNP-EPI混悬液对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖有明显抑制作用,其作用有剂量依赖性,随着时间的延长,其抑制作用逐渐增强,但48 h后达到稳定。且CNP-EPI对乳腺癌细胞增殖的抑制作用可能是通过其缓慢释放的表阿霉素直接杀伤癌细胞或诱导其凋亡实现。这一结果为临床应用纳米炭-表阿霉素进行靶向淋巴化疗提供了理论参考依据。

参考文献:

[1] He J, Li S, Shao W, *et al*. Activated carbon nanoparticles or methylene blue as tracer during video-assisted thoracic surgery for lung cancer can help pathologist find the detected lymph nodes[J]. J Surg Oncol, 2010, 102(6): 676-682.

[2] Cai H K, He H F, Tian W, *et al*. Colorectal cancer lymph node staining by activated carbon nanoparticles suspension *in vivo* or methylene blue *in vitro*[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(42): 6148-6154.

[3] Huang K, Luo D, Huang M, *et al*. Protection of parathyroid function using carbon nanoparticles during thyroid surgery[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2013, 149(6): 845-850.

[4] 葛洁, 颜博, 曹旭晨. 纳米炭混悬注射液与亚甲蓝注射液在早中期乳腺癌前哨淋巴结活检中的应用[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(3): 226-228.

[5] Hao R T, Chen J, Zhao L H, *et al*. Sentinel lymph node biopsy using carbon nanoparticles for Chinese patients with papillary thyroid microcarcinoma[J]. Eur J Surg Oncol, 2012, 38(8): 718-724.

[6] 陈秀峰, 张波, 杨弘鑫, 等. 早期胃癌前哨淋巴结的临床研究[J]. 四川大学学报:医学版, 2013, 44(1): 151-154.

[7] 范林军, 钟玲, 郭德玉, 等. 纳米炭对乳腺癌腋窝淋巴结示踪效果及其安全性的初步研究[J]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2010, 4(3): 313-321.

[8] Xu H Y, Meng J, Kong H. What are carbon nanotubes' roles in antitumor therapies?[J]. Sci China Chem, 2010, 53(11): 2250-2256.

[9] Fiorito S, Serafino A, Andreola F, *et al*. Toxicity and biocompatibility of carbon nanoparticles[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2006, 6(3): 591-599.

[10] Liu Z, Davis C, Cai W, *et al*. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(5): 1410-1415.

[11] Muller J, Delos M, Panin N, *et al*. Absence of carcinogenic response to multiwall carbon nanotubes in a 2-year bioassay in the peritoneal cavity of the rat[J]. Toxicol Sci, 2009, 110(2): 442-448.

[12] Guo F, Mao X, Wang J, *et al*. Gemcitabine adsorbed onto carbon particles increases drug concentrations at the injection site and in the regional lymph nodes in an animal experiment and a clinical study[J]. J Int Med Res, 2011, 39(6): 2217-2227.

[13] Yang Q, Wang X D, Chen J, *et al*. A clinical study on regional lymphatic chemotherapy using an activated carbon nanoparticle-epirubicin in patients with breast cancer[J]. Tumour Biol, 2012, 33(6): 2341-2348.

[14] 杨钱, 陈洁, 田春祥, 等. 纳米活性碳对表阿霉素溶液吸附性能的体外实验[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2012, 19(7): 739-742.

[15] Yuan N, Meng M, Liu C, *et al*. Clinical characteristics and prognostic analysis of triple-negative breast cancer patients[J]. Mol Clin Oncol, 2014, 2(2): 245-251.

[16] Oakman C, Viale G, Di-Leo A. Management of triple negative breast cancer[J]. Breast, 2010, 19(5): 312-321.

[17] Martin M, Rodriguez-Lescure A, Ruiz A, *et al*. Molecular predictors of efficacy of adjuvant weekly paclitaxel in early breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 123(1): 149-157.

[18] Yadav B S, Sharma S C, Chanana P, *et al*. Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer[J]. World J Clin Oncol, 2014, 5(2): 125-133.

[19] Staudacher L, Cottu P H, Dieras V, *et al*. Platinum-based chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer: the Institut Curie experience[J]. Ann Oncol, 2011, 22(4): 848-856.

[20] Chen J, Yao Q, Li D, *et al*. Chemotherapy targeting regional lymphatic tissues to treat rabbits bearing VX2 tumor in the mammary glands[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(5): 721-725.

[21] Villman K, Sjostrom J, Heikkila R, *et al*. TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer[J]. Acta Oncol, 2006, 45(5): 590-596.

[22] Harada M, Bobe I, Saito H, *et al*. Improved anti-tumor activity of stabilized anthracycline polymeric micelle formulation, NC-6300[J]. Cancer Sci, 2011, 102(1): 192-199.

[23] Rocca A, Bravaccini S, Scarpi E, *et al*. Benefit from anthracyclines in relation to biological profiles in early breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 144(2): 307-318.

[24] Munro A F, Cameron D A, Bartlett J M. Targeting anthracyclines in early breast cancer: new candidate predictive biomarkers emerge[J]. Oncogene, 2010, 29(38): 5231-5240.

[25] 杨钟, 赵君贤, 李培锋, 等. 活性炭纳米粒子对5-Fu抗肿瘤作用的影响[J]. 军事医学科学院院刊, 2009, 33(5): 416-420.

(**收稿**:2014-06-11;**修回**:2014-06-16)

(编辑 龙 亮)