

## 磷酸钙纳米体系用于顺铂前药的运载

曾冰茹, 师红东, 刘扬中

(中国科学技术大学化学与材料科学学院, 合肥 230026)

**摘要:** 纳米载药体系能促进铂类广谱抗癌药物的运输和增强药效, 并保护作为前药的四价铂在到达细胞前不被还原. 以磷酸钙纳米颗粒为基础建立了一种生物相容性高、制备方法简单的四价铂前药运载体系. 通过动态光散射、扫描电镜和 X 射线衍射对颗粒粒径和形貌进行了表征, 并研究其细胞摄取效率和细胞毒性. 实验结果表明, 该纳米载药体系的粒径分布较窄、分散性较好、细胞摄取效率较高, 并具有还原响应性, 可在胞内还原剂的作用下释放出顺铂, 显著提高了四价铂前药对肿瘤细胞的抑制作用.

**关键词:** 磷酸钙纳米颗粒; 载药体系; 顺铂前药; 四价铂

**中图分类号:** R979.1      **文献标识码:** A      doi:10.3969/j.issn.0253-2778.2015.08.006

**引用格式:** Zeng Bingru, Shi Hongdong, Liu Yangzhong. Calcium phosphate nanoparticles for the delivery of the prodrug of cisplatin[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2015, 45(8): 649-654.

曾冰茹, 师红东, 刘扬中. 磷酸钙纳米体系用于顺铂前药的运载[J]. 中国科学技术大学学报, 2015, 45(8): 649-654.

### Calcium phosphate nanoparticles for the delivery of the prodrug of cisplatin

ZENG Bingru, SHI Hongdong, LIU Yangzhong

(School of Chemistry and Materials Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

**Abstract:** Drug delivery systems can facilitate the delivery of platinum-based drugs, enhance drug efficiency and protect Pt(IV) from being reduced before cellular uptake. A highly biocompatible Pt(IV) prodrugs delivery system using calcium phosphate (CaP) nanoparticles with simple preparation procedures were reported. The diameter and morphology of Pt(IV)/CaP nanoparticles were characterized by dynamic light scattering, scanning electron microscope and X-ray diffraction. Then cellular uptake efficiency and cytotoxicity were studied. The results indicate that nanoparticles are well-dispersive with narrow size distribution; they have high cellular uptake efficiency and redox response so as to release cisplatin after being reduced by cellular reductants. Moreover, the delivery system demonstrates a significantly higher inhibitory effect than the free Pt(IV) prodrug.

**Key words:** calcium phosphate nanoparticle; drug delivery system; cisplatin prodrug; Pt(IV)

收稿日期: 2015-06-15; 修回日期: 2015-07-16

基金项目: 国家重点基础研究发展(973)计划(2012CB932502), 高等学校博士学科点专项科研基金(20133402110041)资助.

作者简介: 曾冰茹, 女, 1990年生, 硕士. 研究方向: 无机化学. E-mail: brzeng@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 刘扬中, 博士/教授. E-mail: liuyz@ustc.edu.cn

## 0 引言

顺铂作为一种重要的抗癌药物,广泛应用于很多肿瘤的治疗,如卵巢、睾丸和头颈部的肿瘤<sup>[1]</sup>. 其作用靶点通常认为是 DNA,顺铂通过配位作用与 DNA 结合形成加合物,造成 DNA 双螺旋结构的扭曲,进而抑制 DNA 的转录与复制,最终导致肿瘤细胞的凋亡,达到治疗肿瘤的目的. 顺铂具有抗癌谱广、作用强、可以与多种抗肿瘤药有协同作用等特点,为当前联合化疗中最常用的药物之一<sup>[2-3]</sup>. 然而,顺铂的副作用和抗药性限制了它在临床中的应用. 一方面,由于顺铂的非特异性反应,只有一小部分与细胞内的 DNA 发生交联反应<sup>[4]</sup>. 这种非特异性反应降低了药物效率,同时也增加了顺铂的副作用<sup>[5]</sup>. 另一方面,肿瘤细胞可以通过减少药物摄取、药物在细胞内失活、DNA 修复等机制,减少 DNA 铂化产物,从而获得抗药性<sup>[5]</sup>. 为了避免因使用顺铂导致的抗药性,近年来出现了一些非传统的铂类化合物,表现出独特的抗肿瘤效应,包括反式配位化合物、多核铂化合物以及四价铂化合物<sup>[6-8]</sup>. 这些铂化合物与顺铂相比有着不同的细胞摄取方式和 DNA 结合方式,对胞内蛋白的反应活性也不同. 四价铂化合物具有八面体构型和两个额外的配体位点,可被修饰各种具有不同生物学功能的分子<sup>[9-10]</sup>. 四价铂化合物在癌细胞内被胞内还原剂(GSH, V<sub>C</sub> 等)还原成相应的二价铂,从而获得抗癌活性.

由于纳米载药体系能促进铂类药物的运输并增强药效,铂类药物纳米运载体得到越来越多的关注. 目前已有多种不同类别的载药体系应用于铂类药物运输,包括高分子多聚物<sup>[11]</sup>、脂质体<sup>[12]</sup>和无机纳米材料<sup>[13]</sup>. 细胞响应纳米载药体系是增强药物运载效率的一种有效方式,包括 pH 响应、还原响应、酶响应等<sup>[14]</sup>. 磷酸钙纳米载药体系材料是一种典型的 pH 响应体系,在生物医药领域有着广泛的应用,包括转染、基因沉默、药物运载、生物成像等方面<sup>[15]</sup>. 同时,磷酸钙具有良好的生物相容性,是脊椎动物硬组织中最重要组成成分<sup>[16]</sup>. 磷酸钙纳米颗粒能在内体/溶酶体的弱酸性环境<sup>[17]</sup>中降解成 Ca<sup>2+</sup>和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>,这两种离子以毫摩尔级别广泛存在于生物体内<sup>[18]</sup>,因而磷酸钙具有生物相容性和低免疫反应<sup>[19]</sup>的特点. 磷酸钙纳米颗粒被用来作为很多生物活性药物无毒高效的纳米载体,包括用作顺铂的载药体系<sup>[20-22]</sup>. 在本文中,我们用一种简单的方

法制备磷酸钙纳米颗粒. 由于羧基化合物与钙离子有很强的相互作用力,能通过共沉淀法包裹进磷酸钙纳米颗粒,因此我们将磷酸钙纳米颗粒作为含有双羧基的四价铂前药 *c, c, t*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>](Pt(IV))的载体. 由于实体瘤细胞比正常组织细胞有更低的 pH 和更高的 GSH 水平<sup>[23]</sup>,磷酸钙纳米药体系能选择性地实现 pH 响应和还原响应双重响应机制. 该体系能在内体/溶酶体的弱酸性环境中降解,释放负载的 Pt(IV)并在细胞被还原成顺铂与 DNA 结合,以此提高四价铂药物的特异性.

## 1 实验

### 1.1 Pt(IV)的合成和表征

将 3.5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 g/L, 0.03 mol)加入到含有 100 mg 顺铂(0.33 mmol)的 5 mL 溶液中. 50 °C 搅拌 1 h,然后在室温搅拌 12 h. 溶液旋干,产物用水、乙醇和乙醚洗涤,然后真空干燥,得到 *c, c, t*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]. 将丁二酸酐(0.15 g, 1.5 mmol)加入到 16 mL 溶有 *c, c, t*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>](0.1 g, 0.3 mmol)的 DMSO 溶液里,在室温下搅拌 12 h. 溶液冻干,加入 10 mL 丙酮,得到浅黄色的沉淀. 分别用丙酮、乙醚洗涤数次,冻干. 产物用核磁共振和电喷雾质谱法(ESI-MS)来表征.

### 1.2 负载 Pt(IV)的磷酸钙纳米颗粒(Pt(IV)/CaP)的制备和表征

取 3 mg Pt(IV)和 29.5 mg 四水硝酸钙加入 50 mL 超纯水中溶解,室温搅拌 15 min. 然后加入 2 g PEG<sub>4000</sub> 溶解,并调 pH 到 10.0. 将溶液置于室温下搅拌 10 min. 取 16.5 mg 磷酸氢二铵溶于 50 mL 超纯水,调 pH 到 10.0. 将该溶液缓慢滴加到第 1 步的溶液中,滴加完后继续搅拌 10 min. 将反应后的溶液在 4 °C, 10 000 r/min 的条件下离心 20 min. 弃上清,将沉淀颗粒用超纯水洗 3 次,最后重悬于超纯水或者 DMEM 培养基中. 在四水硝酸钙溶液中加入 1.5 mg 罗丹明,制备负载罗丹明的 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒.

取少量负载 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒用超纯水稀释到 0.05 g/L,使用 Malvern Zetasizer Nano ZS90 的动态光散射仪检测粒径. 使用 FEI Sirion200 扫描显微镜观察颗粒的形态, TTR-III-型 X 射线衍射仪检测颗粒的晶体形态.

### 1.3 Pt(IV)的还原和与 DNA 的反应

在 37 °C 避光的条件下,将 0.04 g/L 的鱼精 DNA 和 0.1 mmol/L Pt(IV)或者顺铂加入到 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH=7.4,含 10 mmol/L 抗坏血酸 V<sub>C</sub> 和 10 mmol/L NaClO<sub>4</sub>)里混合(500 μL 体系).经过不同的时间(0,2,4,8,12,24,36,48 h)反应后,取 400 μL 样品,加入 0.025 g/L EtBr 和 0.4 mol/L NaCl 孵育 10 min.使用 Hitachi F-4600 荧光分光光度计检测荧光,激发波长为 530 nm,发射波长为 592 nm,获得 DNA 中铂的结合率.

### 1.4 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒的细胞摄取

收集对数期 HepG2 细胞,以每孔 10 万的密度种在 24 孔板,在 5% CO<sub>2</sub>,37 °C 的条件下培养 24 h.每孔加入 500 μL 含有浓度为 0.2 g/L 颗粒的培养基.培养 0.5,1,2,4 h 后,弃掉培养基,用 PBS 缓冲液(pH=7.4)洗 3 次,确保附着在细胞外的颗粒被洗掉.然后用荧光显微镜观察.

### 1.5 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒的 MTT 检测

收集对数期 HepG2 细胞,以每孔 6 000 个细胞的密度种在 96 孔板,5% CO<sub>2</sub>,37 °C 过夜孵育.第 2 天分别加入含有 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒、顺铂、Pt(IV)和空白磷酸钙纳米颗粒不同浓度梯度的 100 μL DMEM 培养基,每个浓度设 3 个复孔.颗粒中 Pt(IV)的浓度通过电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)来检测.在 5% CO<sub>2</sub>,37 °C 的条件下孵育 48 h 后,每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 g/L,即 0.5% MTT),继续培养 4 h.然后弃去溶液,每孔加入 150 μL DMSO,置于摇床上低速(50 r/min)振荡 15 min,使结晶物充分溶解.然后用酶标仪测量各孔在 490 nm 的吸光值.

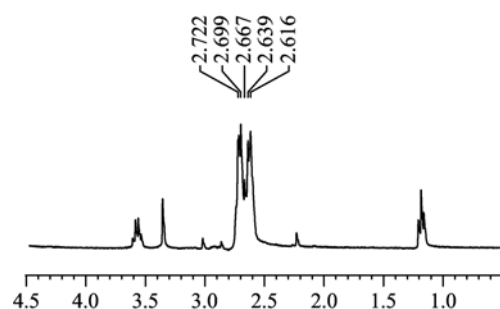
## 2 结果与讨论

### 2.1 Pt(IV)的合成与表征

我们使用核磁共振和质谱来表征 Pt(IV).图 1 为 Pt(IV)的<sup>1</sup>H NMR 表征谱图.其中,丁二酸两个亚甲基的特征峰出现在 2.616~2.722(m,4H).此外,7.905,2.986 和 2.830 为残余 DMF 的溶剂峰,2.22 为残余丙酮的溶剂峰,3.56 和 1.18 为残余乙醚的溶剂峰.图 2 为 Pt(IV)在负电荷模式下的 ESI-MS 谱图,其中检测的分子离子峰 m/z 为 532.92(-1),理论 m/z 为 533.22.结果证实目标产物 Pt(IV)结构正确.

### 2.2 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒的表征

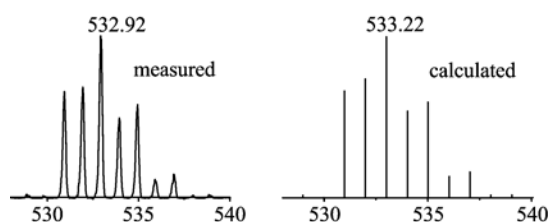
图 3(a)为扫描显微镜对 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒



The spectrum was recorded using presaturation pulse sequence to suppress the residual H<sub>2</sub>O signal

图 1 重水中 Pt(IV)的<sup>1</sup>H NMR 谱图

Fig. 1 <sup>1</sup>H NMR spectrum of Pt(IV) in D<sub>2</sub>O



Left portion: the measured spectrum; right portion: the calculated spectrum

图 2 Pt(IV)的 ESI-MS 谱图

Fig. 2 ESI-MS spectrum of Pt(IV)

的形貌分析,显示颗粒为均匀的球形.图 3(b)的动态光散射(DLS)结果表明颗粒的粒径分布范围较窄,平均水合半径为 156 nm(PDI=0.15),说明颗粒分散性良好.图 3(c)分别为 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒和负载了罗丹明的 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒分散在超纯水中的图片,溶液分别为白色澄清透明和红色澄清透明胶体状液体.Pt(IV)/CaP 纳米颗粒粉末的 X 射线衍射结果如图 3(d),表明 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒为无定形态.样品经硝酸消化处理后通过 ICP-MS 检查其中铂元素含量,结果显示 Pt(IV)前药的负载量约为总质量的 1%.根据这一含量配制样品用于之后的细胞实验,并进一步对所配制的样品中 Pt 的浓度进行定量检测用于实验结果的分析.

### 2.3 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒的还原性响应

细胞内的还原是激活 Pt(IV)前药结合到目标 DNA 的重要步骤.因此,我们通过胞内还原剂抗坏血酸 V<sub>C</sub> 的存在下检测 Pt(IV)与 DNA 的反应,分析 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒的还原响应性.EtBr 作为荧光探针,可以嵌入到 DNA 碱基对中,在 590 nm 处发射荧光.铂类药物与 DNA 结合,可以阻止 EtBr 嵌入 DNA,导致 EtBr-DNA 复合物的荧光淬灭<sup>[24]</sup>.

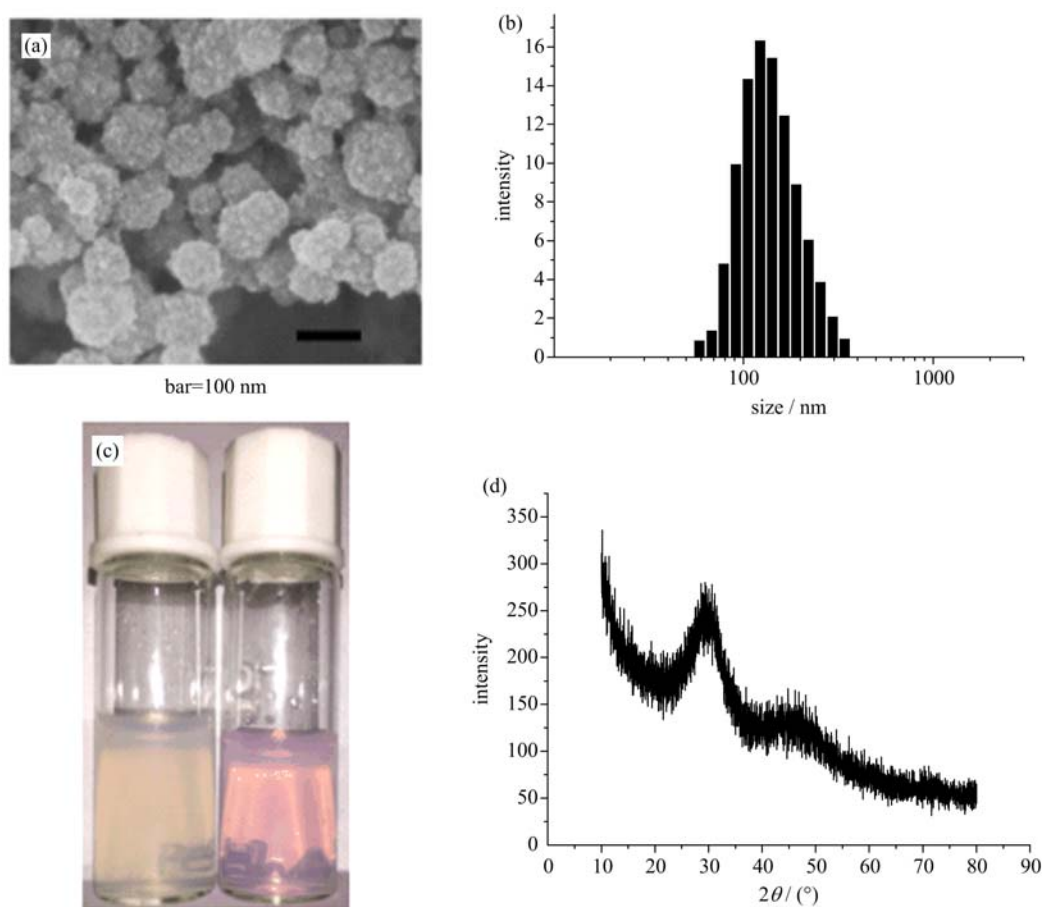


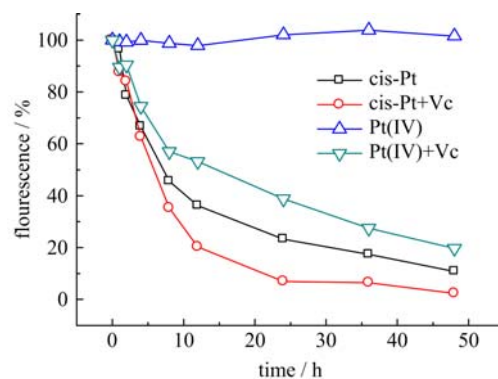
图 3 (a)Pt(IV)/CaP 纳米颗粒的扫描电镜图;(b)分散在水中的 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒的动态光散射粒径分布;(c)Pt(IV)/CaP 纳米颗粒和负载了罗丹明的 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒分散在水中的图片;(d)Pt(IV)/CaP 纳米颗粒的 X 射线衍射图

Fig. 3 (a) SEM micrograph of Pt(IV)/CaP nanoparticles; (b) DLS result of Pt(IV)/CaP nanoparticles suspended in water; (c) image of Pt(IV)/CaP nanoparticles loaded with or without rhodamine suspended in water; (d) XRD pattern of Pt(IV)/CaP nanoparticles

如图 4 所示,对照组中顺铂与 DNA 的反应显示荧光缓慢下降,而在没有还原剂  $V_c$  的存在下,Pt(IV)与 DNA 的混合物没有荧光的变化. 5 mmol/L  $V_c$  的存在逐渐降低 DNA/EtBr 复合物的荧光,达到与顺铂近似的效果. 实验结果证实了 Pt(IV)在细胞内  $V_c$  浓度存在的条件下被还原,进而实现与 DNA 的结合. 这个结果也与文献[25]报道 Pt(IV)前药在细胞环境内还原的结论相符,表明磷酸钙纳米颗粒负载的 Pt(IV)能作为顺铂的前药被细胞内还原剂还原.

#### 2.4 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒的细胞摄取

为了研究颗粒的细胞摄取情况,我们将 HepG2 种到 24 孔板中,每孔加入 500  $\mu$ L 含有负载罗丹明的 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒(0.2 g/L)的 DMEM 培养基,培养不同时间后弃掉培养基,用荧光显微镜观察(图 5). 培养 1 h 后,我们能看到罗丹明的红色荧光呈点状分散在细胞里. 随着时间的增加,细胞内红色



All reaction were studied at Pt/nucleotide ratio of 1 in 10 mmol/L  $NaClO_4$  and 10 mmol/L phosphate buffer (pH=7.4) at 37  $^{\circ}C$ . 0.04 mg EtBr and 0.4 mol/L NaCl was added before the fluorescence measurements. The excitation wavelength was 530 nm and the emission was mentioned at 592 nm

图 4 荧光分光光度计监测 Pt(IV)与 DNA 的动力学反应

Fig. 4 Kinetics of reaction of Pt(IV) with DNA measured by fluorescence spectrometer

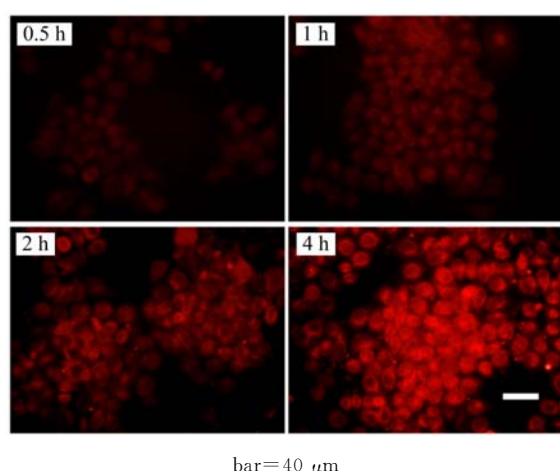


图 5 HepG2 细胞与负载有罗丹明的 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒孵育 0.5、1、2 和 4 h 后的荧光显微镜图片

Fig. 5 Fluorescent images of HepG2 cells incubating with rhodamine loaded Pt(IV)/CaP nanoparticles for 0.5, 1, 2 and 4 h at 37 °C

荧光越来越强. 4 h 后, 能看到红色荧光均匀地分布在细胞里. 该实验结果表明, Pt(IV)/CaP 纳米颗粒能有效地被肿瘤细胞摄取, 且在实验条件下, 细胞摄取量随时间而增加.

### 2.5 Pt(IV)/CaP 颗粒对癌细胞的生长抑制

我们采用 MTT 法分析 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒对人类肿瘤细胞系的细胞毒性, 包括人肝癌细胞 (HepG2) 和宫颈癌细胞 (HeLa). Pt(IV)/CaP 纳米颗粒、顺铂和 Pt(IV) 对这两种细胞系的 IC<sub>50</sub> 值分别如表 1 所示. 如图 6, Pt(IV)/CaP 纳米颗粒表现出了比 Pt(IV) 更强的细胞毒性, 这说明磷酸钙载体增强了 Pt(IV) 的抗癌活性. 图 6(c) 中空载体的实验结果显示, 在加入与上述实验同样浓度颗粒的情况下, 磷酸钙载体本身对于两种细胞系都没有细胞毒性.

表 1 顺铂、Pt(IV) 和 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒对 HepG2 和 HeLa 两种细胞系的 IC<sub>50</sub> 值

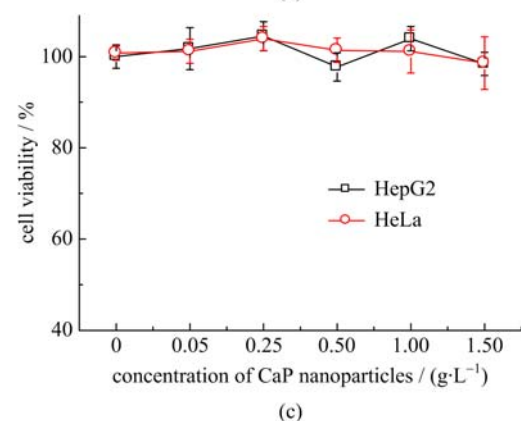
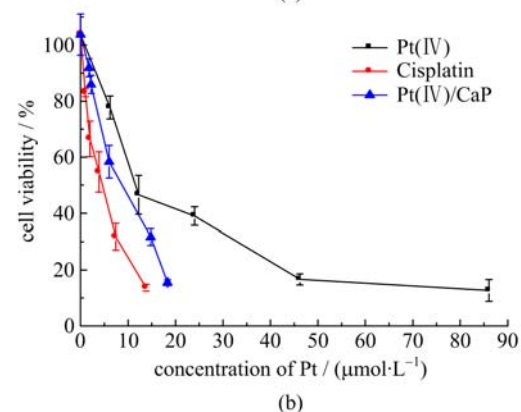
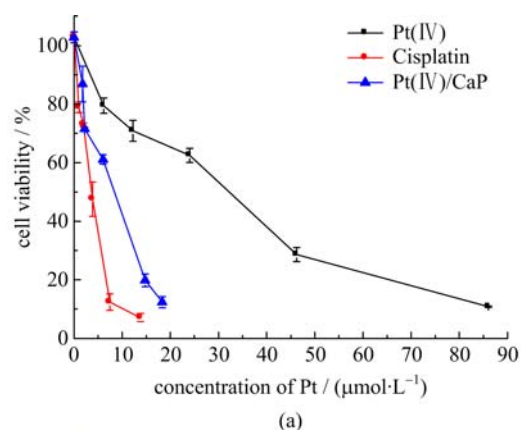
Tab. 1 IC<sub>50</sub> values (Pt concentration/μM) of cisplatin, Pt(IV) and Pt(IV)/CaP nanoparticles to HepG2 and HeLa cells

IC <sub>50</sub> (μM)	Cisplatin	Pt(IV)	Pt(IV)/CaP
HepG2	3.18	25.60	6.20
HeLa	3.85	14.02	7.64

【Note】 The unit of Pt concentration is μmol/L.

## 3 结论

本文用简单易行的方法制备了一种生物相容性高, 具有 pH 和还原性双响应的四价铂前药载药体



Data points represented the average of three experiments

图 6 MTT 法检测 Pt(IV)/CaP 纳米颗粒、顺铂和 Pt(IV) 对 HepG2 细胞系 (a) 和 HeLa 细胞系 (b) 的细胞毒性;

(c) 为 CaP 纳米颗粒空载体的细胞毒性

Fig. 6 Cytotoxicity of Pt(IV)/CaP nanoparticles to HepG2 (a) and HeLa (b) cells by MTT assays; (c) the cytotoxicity of CaP nanoparticles

系. Pt(IV)/CaP 纳米颗粒的粒径分布较窄、分散性较好; 细胞摄取效率较高, 能在内体/溶酶体的弱酸性环境中快速降解, 将 Pt(IV) 释放到细胞质, 进而被细胞内还原性物质还原成顺铂实现抗癌效果. Pt(IV)/CaP 纳米体系显著降低了 Pt(IV) 的 IC<sub>50</sub> 值, 增强了 Pt(IV) 对癌细胞的生长抑制作用.

## 参考文献(References)

- [1] Prestayko A W, D'Aoust J C, Issell B F, et al. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 1979, 6(1): 17-39.
- [2] Jamieson E R, Lippard S J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts [J]. *Chemical Reviews*, 1999, 99(9): 2 467-2 498.
- [3] Jung Y, Lippard S J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage [J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(5): 1 387-1 407.
- [4] Gonzalez V M, Fuertes M A, Alonso C, et al. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? [J]. *Molecular Pharmacology*, 2001, 59(4): 657-663.
- [5] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7(8): 573-584.
- [6] Alderden R A, Mellor H R, Modok S, et al. Elemental tomography of cancer-cell spheroids reveals incomplete uptake of both platinum (II) and platinum (IV) complexes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(44): 13 400-13 401.
- [7] Ronconi L, Sadler P J. Using coordination chemistry to design new medicines [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2007, 251(13): 1 633-1 648.
- [8] Li C, Li Z, Sletten E, et al. Methionine can favor DNA platination by trans-coordinated platinum antitumor drugs [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(45): 8 497-8 500.
- [9] Alderden R A, Mellor H R, Modok S, et al. Elemental tomography of cancer-cell spheroids reveals incomplete uptake of both platinum (II) and platinum (IV) complexes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(44): 13 400-13 401.
- [10] Hall M D, Hambley T W. Platinum (IV) antitumour compounds: Their bioinorganic chemistry [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, 232 (1): 49-67.
- [11] Dhar S, Gu F X, Langer R, et al. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt (IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(45): 17 356-17 361.
- [12] Torchilin V P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4(2): 145-160.
- [13] Wong B S, Yoong S L, Jagusiak A, et al. Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65 (15): 1 964-2 015.
- [14] Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery [J]. *Nature Materials*, 2013, 12(11): 991-1 003.
- [15] Epple M, Ganesan K, Heumann R, et al. Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2010, 20(1): 18-23.
- [16] Driessens F C M, Van Dijk J W E, Borggreven J. Biological calcium phosphates and their role in the physiology of bone and dental tissues I. Composition and solubility of calcium phosphates [J]. *Calcified Tissue Research*, 1978, 26(1): 127-137.
- [17] Murphy R F, Powers S, Cantor C R. Endosome pH measured in single cells by dual fluorescence flow cytometry: Rapid acidification of insulin to pH 6 [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1984, 98 (5): 1 757-1 762.
- [18] Oyane A, Kim H M, Furuya T, et al. Preparation and assessment of revised simulated body fluids [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 65(2): 188-195.
- [19] Radin S, Campbell J T, Ducheyne P, et al. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin [J]. *Biomaterials*, 1997, 18(11): 777-782.
- [20] Barroug A, Kuhn L T, Gerstenfeld L C, et al. Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: In vitro controlled adsorption and release [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2004, 22(4): 703-708.
- [21] Barroug A, Kuhn L T, Gerstenfeld L C, et al. Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: In vitro controlled adsorption and release [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2004, 22(4): 703-708.
- [22] Chen W, Xiao Y, Liu X, et al. Overcoming cisplatin resistance in chemotherapy by biomineralization [J]. *Chemical Communications*, 2013, 49 (43): 4 932-4 934.
- [23] Stratford I J, Adams G E, Bremner J C M, et al. Manipulation and exploitation of the tumour environment for therapeutic benefit [J]. *International Journal of Radiation Biology*, 1994, 65(1): 85-94.
- [24] Brabec V, Vrána O, Nováková O, et al. DNA adducts of antitumor trans-[PtCl<sub>2</sub>(E-imino ether)<sub>2</sub>] [J]. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(2): 336-341.
- [25] Wexselblatt E, Gibson D. What do we know about the reduction of Pt (IV) pro-drugs? [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012, 117: 220-229.