

地塞米松纳米胶束的制备及体外抗肿瘤作用研究[△]

侯杰荣*, 侯思奎, 杨欣, 姚小东[#](西南医科大学卫生科, 四川 泸州 646000)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)31-4425-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.31.31

摘要 目的:制备地塞米松(Dex)纳米胶束(简称Dex胶束),并研究其体外抗肿瘤作用。方法:以 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)为载体、二甲亚砜为有机溶剂,采用透析法制备Dex胶束;观察并检测其形态、粒径、Zeta电位、多分散系数(PDI)、临界胶束浓度(CMC)、载药量、包封率;比较pH 5.5、7.4条件下Dex胶束和Dex的体外释药情况;比较0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 $\mu\text{mol/ml}$ 的Dex、 γ -PGA、Dex胶束和泼尼松龙(阳性对照)对人肺腺癌A549细胞存活率的影响,比较A549细胞在4、37 $^{\circ}\text{C}$ 下对0.5 $\mu\text{mol/ml}$ 的Dex胶束和Dex的摄取量。结果:所制备Dex胶束呈圆球形、形态规则,粒径为 (76.25 ± 3.74) nm, Zeta电位为5.0 mV, PDI为 0.163 ± 0.38 , CMC为7.609 $\mu\text{g/ml}$,载药量为 $(9.56 \pm 0.92)\%$,包封率为 $(89.25 \pm 1.36)\%$;与Dex比较,Dex胶束在pH 5.5、7.4条件下释药时间延长;在0.05~0.2 $\mu\text{mol/ml}$ 范围内,游离Dex、 γ -PGA、Dex胶束和泼尼松龙对细胞存活率的影响差异无统计学意义($P > 0.05$);在0.5、1.0 $\mu\text{mol/ml}$ 时,Dex胶束作用下细胞存活率明显低于游离Dex或泼尼松龙作用($P < 0.05$)。4 $^{\circ}\text{C}$ 下,细胞对Dex胶束和Dex的摄取量差异无统计学意义($P > 0.05$);37 $^{\circ}\text{C}$ 下,细胞对Dex胶束的摄取量明显高于游离Dex和4 $^{\circ}\text{C}$ 下的游离Dex、Dex胶束($P < 0.05$)。结论:所制备的Dex胶束能延长Dex的释药时间,降低A549细胞的存活率和细胞的摄取效率。

关键词 地塞米松; γ -聚谷氨酸; 纳米胶束; 制备; 抗肿瘤

Preparation of Dexamethasone Nano-micelles and Study on Its *in vitro* Anti-tumor Effect

HOU Jierong, HOU Sikui, YANG Xin, YAO Xiaodong (Dept. of Health, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To prepare Dexamethasone (Dex) nano-micelles (called Dex micelles for short), and to study its *in vitro* anti-tumor effect. **METHODS:** Using γ -PGA as carrier, DMSO as organic solvent, Dex micelles were prepared by dialysis method. The morphology, particle size, Zeta potential, PDI, CMC, drug-loading amount and entrapment efficiency (EE) of micelle were observed and detected. Drug release of Dex micelles and Dex were compared under pH 5.5, 7.4. The effects of free Dex, γ -PGA, Dex micelles and prednisolone (positive control) (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/ml}$) on the survival rate of human lung adenocarcinoma A549 cells were compared. The uptake amount of A549 cells to 0.5 $\mu\text{mol/ml}$ Dex micelles and free Dex were compared at 4, 37 $^{\circ}\text{C}$. **RESULTS:** Prepared Dex micelles were spheroidal and completely round with particle size of (76.25 ± 3.74) nm, Zeta potential of 5.0 mV, PDI of 0.163 ± 0.38 , CMC of 7.609 $\mu\text{g/ml}$, drug-loading amount of $(9.56 \pm 0.92)\%$ and EE of $(89.25 \pm 1.36)\%$. Compared with free Dex, the duration of drug release for Dex micelles prolonged under pH 5.5, 7.4. When the concentration ranged 0.05-0.2 $\mu\text{mol/ml}$, the effects of free Dex, γ -PGA, Dex micelles and prednisolone on cellular survival rate had no statistically significant difference ($P > 0.05$). When the concentration was 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/ml}$, survival rate of A549 cells treated with Dex micelles was significantly lower than that treated with free Dex or prednisolone ($P < 0.05$). At 4 $^{\circ}\text{C}$, the uptake amount of A549 cells to Dex micelles and free Dex had no statistically significant difference ($P > 0.05$). At 37 $^{\circ}\text{C}$, the uptake amount of A549 cells to Dex micelles was significantly higher than that of cells to free Dex, and that of A549 cells to Dex micelles and free Dex at 4 $^{\circ}\text{C}$. **CONCLUSIONS:** Prepared Dex micelles can prolong the duration of drug release of Dex, and decrease the survival rate of A549 cells and cellular uptake efficacy.

KEYWORDS Dexamethasone; γ -glutamic acid; Nano-micelles; Preparation; Anti-tumor

地塞米松(Dexamethasone, Dex)是临床最常用的糖皮质激素,主要适应证包括过敏性与自身免疫性炎症性疾病(如结缔组织病,严重的支气管哮喘、皮炎等过敏性疾病)、溃疡性结肠炎、急性白血病、肺腺癌和恶性淋巴瘤等^[1-2],但因其半衰期短,需要反复给药,且在局部病变部位的滞留时间短,疗效较差^[3-4],所以患者依从性较差^[5]。为了延长Dex的半衰期,延缓释放速率,增强疗效,目前的研究热点主要是将糖皮质激素类药物制备成前体药物、各种缓控释制剂或者其他长效制剂如

胶束^[6]、脂质体^[7]和纳米粒^[8]等。相比较普通剂型而言,这些长效剂型不仅可以延缓药物的释放^[9],而且可以增加其在病变部位的蓄积,增强疗效^[10-11]。

γ -聚谷氨酸(γ -PGA)是一种由D,L-谷氨酸单体经过 γ -酰胺键结合而形成的多聚氨基酸,其具有良好的生物相容性、水溶性和可降解性^[12-13],并且其侧链上存在大量游离羧基,其有利于进行化学修饰和携带生物活性基团^[14-15],因此备受广大国内外研究者的关注,在生物医学领域具有较好的应用前景^[16-17]。

本研究将 γ -PGA与Dex通过透析法制备成Dex纳米胶束(简称Dex胶束),并对其性质表征和抗肿瘤作用研究,以期为进一步的体内研究提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器

[△] 基金项目:四川省教育厅重点项目(No.12ZB245)

* 主管中药师,硕士。研究方向:药物制剂工艺。E-mail: 2632892465@qq.com

通信作者:助理研究员,硕士。研究方向:医院制剂。E-mail: 114408231@qq.com

高效液相色谱仪,包括 P680A 四元低压梯度泵(美国戴安公司);Zeta Sizer-Nano ZS90 纳米粒度仪(英国马尔文公司);SP-752 紫外-可见分光光度计(上海奥析科学仪器有限公司);RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司);Tecnai G2F-20 透射电镜(上海费尔伯恩实业发展有限公司);DG5031 酶联免疫检测仪(上海珂准仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

Dex 对照品(成都艾科达化学试剂有限公司,批号:201305,纯度: $>99\%$); γ -PGA(湖北兴纵晨科技有限公司,批号:201402,纯度: $>95\%$);乙腈为色谱纯;水为超纯水;其余试剂为分析纯。

1.3 细胞

人肺腺癌 A549 细胞由上海博谷生物科技有限公司提供,以含 10% 小牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 u/ml 链霉素的 DMEM 培养基进行培养,每隔 1 d 换 1 次培养基。

1.4 其他

透析袋(美国 Sigma 公司,截留分子量:5 000 Da)。

2 方法

2.1 Dex 胶束的制备与性质表征

采用透析法制备 Dex 胶束。首先将适量 γ -PGA 固体溶于 2.0 ml 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)中,搅拌 30 min,加入 3.0 ml 有机溶剂二甲基亚砜(DMSO),继续搅拌 1 h 后,缓慢滴入适量 Dex 溶液,使得 Dex 与 γ -PGA 的比例为 1:10,再继续搅拌 30 min 后,置于 4 °C 去离子水中透析 24 h,获得 Dex 胶束溶液。将制得的 Dex 胶束溶液用水稀释至 1 mg/ml,用 Zeta Sizer-Nano ZS90 纳米粒度仪测定其粒径、多分散系数(PDI)、Zeta 电位,再取适量于透射电镜下观察 Dex 胶束形态。

2.2 临界胶束浓度(CMC)的测定

采用荧光探针法测定 Dex 胶束的 CMC。按“2.1”项下方法制备 $1\sim 10^{-4}$ mg/ml 的 Dex 胶束溶液,使其每个质量浓度溶液中芘的终浓度为 1.0×10^{-7} mol/L,超声 0.5 h,室温下避光放置 24 h。测定各溶液 372 nm 波长处的峰(I_{372})与 383 nm 波长处的峰(I_{383}),其中激发波长(E_x)390 nm, E_x 狭缝 3 nm,发射波长(E_m)狭缝 3 nm,计算 I_{383}/I_{372} 。以 $I_{383}/I_{372}(y)$ 为纵坐标、胶束浓度对数值($\lg c, x$)为横坐标,用 Origin 8.0 软件按照 Boltzmann 公式^[18]进行曲线拟合。

2.3 Dex 的含量测定方法

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Diamondsil C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(60:40, V/V),流速:1 ml/min;柱温:35 °C;检测波长:240 nm;进样量:20 μ l。

2.3.2 专属性试验 分别取空白乙腈溶液、Dex 溶液、Dex 胶束溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。

2.3.3 标准曲线的制备 精密称取 Dex 10 g,加乙腈溶液溶解并定容制成 1 g/ml 贮备液。精密量取上述贮备液适量,用乙腈溶液稀释至质量浓度 1、5、10、25、50、100、150、200 mg/ml 后按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,以峰面积(A)对质量浓度(c)进行线性回归分析。

2.3.4 精密度试验 取质量浓度 55 mg/ml 的 Dex 溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,重复进样 6 次,考察精密度。

2.3.5 回收率试验 精密吸取不同浓度的 Dex 溶液于量瓶中,按“2.1”项下方法制备成 5、50、200 mg/ml 的 Dex 胶束溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定峰面积,计算回收率和 RSD。

2.4 载药量和包封率的测定

固定 γ -PGA 的量,将 Dex 与 γ -PGA 以 1:5 和 1:10 投料,溶

于适量的 DMSO 中制得 Dex 胶束溶液,然后加入 3 倍量的乙腈溶液,13 500 r/min(离心半径 25 cm)离心 10 min,取上清液,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定游离 Dex 含量。计算载药量(DL)和包封率(EE), $DL(\%)=(Dex\text{投入量}-\text{游离 Dex 的量})/Dex\text{胶束的量}\times 100\%$, $EE(\%)=(Dex\text{投入量}-\text{游离 Dex 的量})/Dex\text{投入量}\times 100\%$ 。

2.5 体外释放特性的考察

取 Dex 适量,加入 DMSO-生理盐水(3:8)溶液制成 1 mg/ml 的 Dex 溶液。取 Dex 溶液和“2.1”项下制备的 Dex 胶束溶液各 0.5 ml,分别置于透析袋中,密封后,放入装有 25 ml pH 5.5 或 7.4 的 PBS 释放介质的圆底烧瓶中,于 37 °C 下 100 r/min 恒温水浴振荡孵育,于 1、2、4、8、16、32、48、60、72 h 时吸出各烧瓶中释放介质 300 μ l,同时补加等量新鲜释放介质至烧瓶中。按照“2.3”项下方法测定释放介质中 Dex 的含量并作图。

2.6 细胞存活率的测定

取生长状态良好的 A549 细胞,采用 0.25% 胰酶消化后,再用相应的培养基制成单个细胞悬液,调整密度为 1×10^4 个/ml,接种于 96 孔板,每孔体积为 200 μ l,待细胞长至 80% 左右时再进行 MTT 试验。分别用无血清无双抗培养基制备阳性对照溶液(含 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 μ mol/ml 的泼尼松龙)、游离 Dex 溶液(0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 μ mol/ml)、 γ -PGA 溶液(0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 μ mol/ml)和 Dex 胶束溶液(0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 μ mol/ml),并用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。然后分别加入至接种有 A549 细胞的 96 孔板中,每个浓度设 5 个复孔,另设阴性对照孔(加入培养基和细胞,不加药物)和空白孔(只加培养基,不加细胞和药物),置于 37 °C、5% CO₂ 下培养 24 h。吸出孔内液体,PBS 洗涤 3 次,加入 180 μ l 培养基和 20 μ l MTT 液(5 mg/ml),再继续培养 4 h。取出培养板并吸出上清液,再加入 DMSO 150 μ l,最后将培养板置于 37 °C 下振荡 15 min,使结晶物甲瓊充分溶解后,于酶联免疫检测仪上 570 nm 波长处测定各孔的吸光度(A),计算细胞存活率 $[(A_{\text{加药孔}}-A_{\text{空白孔}})/(A_{\text{阴性对照孔}}-A_{\text{空白孔}})\times 100\%]$ ^[19]。

2.7 细胞摄取量的测定

将 1×10^4 个/ml 的 A549 细胞接种于 96 孔板,待细胞贴壁 80% 左右时进行细胞摄取试验。吸出培养皿中的培养基,加入 4 °C 或 37 °C 预热的含相同浓度(0.5 μ mol/ml)的 Dex 胶束溶液或 Dex 溶液,设 3 个复孔,分别于 4 °C 或 37 °C 孵育 1 h。吸出含有 Dex 胶束或游离 Dex 的培养基,用 PBS 洗涤 3 次,用 0.25% 胰酶消化细胞后,吸取细胞悬液入 1.5 ml 的 EP 管中,5 000 r/min(离心半径 15 cm)离心 10 min,收集细胞沉淀,并用 0.5 ml 的 RIPA 细胞裂解液裂解细胞 15 min,取 20 μ l 用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白含量。然后再取其中 500 μ l,加入乙腈沉淀蛋白,13 500 r/min(离心半径 25 cm)离心 10 min,取上清液 20 μ l 进样,测定 Dex 含量。

3 结果

3.1 Dex 胶束的粒径、PDI、Zeta 电位

所制备的 Dex 胶束呈圆球形、形态规则,粒径为 (76.25 ± 3.74) nm, PDI 为 0.163 ± 0.38 , Zeta 电位为 5.0 mV。Dex 胶束的透射电镜图见图 1,粒径和 Zeta 电位分布见图 2。

3.2 Dex 胶束的 CMC

$I_{383}/I_{372}-\lg c$ 的曲线图见图 3。

由图 3 可知,曲线方程为 $y=(A_1-A_2)/[1+e^{(x-x_0)/dx}]+A_2$,式中, A_1 为低浓度下的 I_{383}/I_{372} (1.926 4), A_2 为高浓度下的 I_{383}/I_{372}

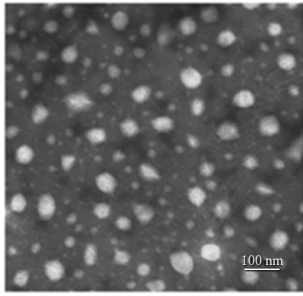


图1 Dex胶束的透射电镜图

Fig 1 TEM of Dex micelles

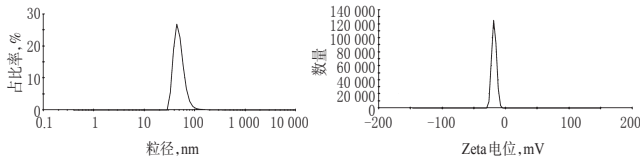


图2 Dex胶束的粒径和Zeta电位分布

Fig 2 Particle size and Zeta potential of Dex micelles

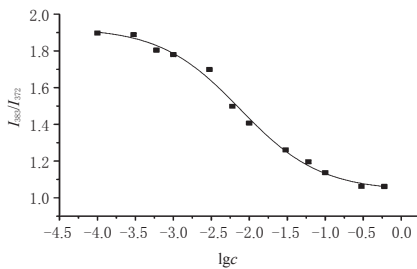


图3 I_{389}/I_{372} -lgc的曲线图

Fig 3 Curves for I_{389}/I_{372} -lgc

(1.037 8), x_0 是曲线突变中点(-2.118 4), $d\chi = 0.525 8$ 。由于 $\chi_0/d\chi < 10$, χ_0 就是CMC的对数值^[20], 即 $CMC = 10^{-2.118 4} \text{ mg/ml} = 0.007 609 \text{ mg/ml} = 7.609 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

3.3 Dex的含量

在“2.3.1”项色谱条件下, Dex溶液和Dex胶束溶液的出峰时间一致, 均为5.0 min, 且空白乙腈溶液不干扰Dex的含量测定。Dex检测质量浓度的线性范围为1~200 mg/ml, 回归方程为 $A = 7.549c + 25.676 (r = 0.999 7)$; 精密性试验的 $RSD = 0.82\%$ ($n = 6$); 平均回收率为 98.42% ($RSD = 0.93\%$, $n = 9$)。色谱图见图4。

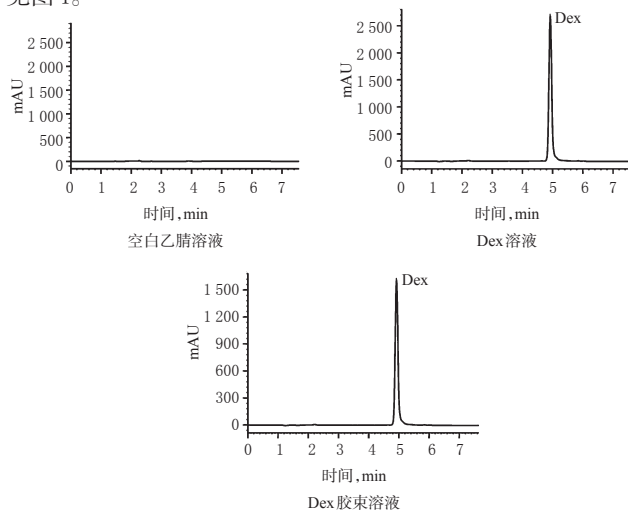


图4 高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms

3.4 Dex胶束的DL和EE

不同Dex和 γ -PGA投料比对DL无显著影响, 但对EE的影响较大。当投料比例从1:5减小到1:10时, EE从35%增大到89.25%, 因此选择Dex和 γ -PGA的投料比为1:10。按此比例制备的3批Dex胶束的DL为 $(9.56 \pm 0.92)\%$, EE为 $(89.25 \pm 1.36)\%$ 。

3.5 体外释药特性

Dex在pH 5.5、7.4的PBS中48 h内的累积释放度均达到100%; Dex胶束在pH 5.5的PBS中48 h内的累积释放度仅为87.65%, 而在pH 7.4的PBS中48 h的累积释放度为85.19%。在两种PBS中72 h内的累积释放度才达到100%。由此可见, 在相同的时间点Dex胶束在两种释放介质中的累积释放度均低于Dex的累积释放度, 说明以 γ -PGA包载Dex并制备成胶束后, 可延长Dex的释药时间。Dex和Dex胶束在pH 5.5、7.4的介质中的释放曲线见图5。

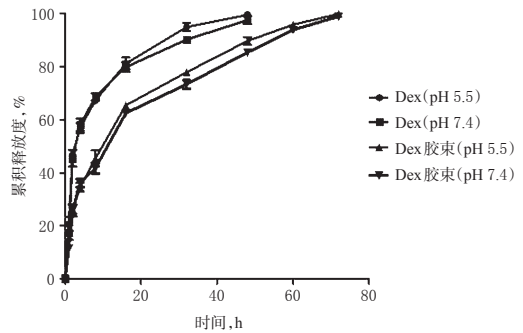


图5 Dex和Dex胶束在pH 5.5、7.4的介质中的释放曲线($n = 3$)

Fig 5 Release curves of Dex and Dex micelles under pH 5.5 and 7.4 ($n = 3$)

3.6 细胞存活率

游离Dex、 γ -PGA、Dex胶束和泼尼松龙在0.05~0.2 $\mu\text{mol/ml}$ 浓度范围内对A549细胞的存活率均无明显影响($P > 0.05$)。在0.5、1.0 $\mu\text{mol/ml}$ 时, Dex胶束作用下细胞存活率明显低于游离Dex或泼尼松龙($P < 0.05$)。不同浓度游离Dex、 γ -PGA、Dex胶束和泼尼松龙对A549细胞存活率的影响见图6。

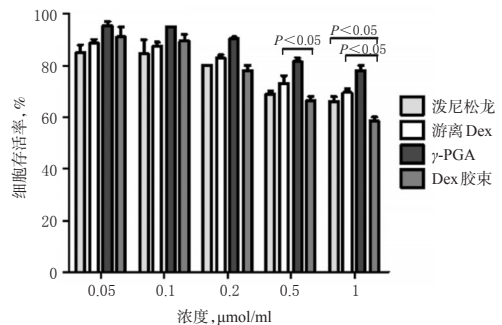


图6 不同浓度游离Dex、 γ -PGA、Dex胶束和泼尼松龙对A549细胞存活率的影响($n = 5$)

Fig 6 Effects of different concentrations of free Dex, γ -PGA, Dex micelles and prednisolone on survival rate of A549 cells ($n = 5$)

3.7 细胞摄取量

4 $^{\circ}\text{C}$ 下, A549细胞对Dex胶束和游离Dex的摄取量差异无统计学意义($P > 0.05$); 37 $^{\circ}\text{C}$ 下, A549细胞对游离Dex胶束的摄取量明显高于游离Dex和4 $^{\circ}\text{C}$ 下的游离Dex、Dex胶束($P < 0.05$)。A549细胞对游离Dex和Dex胶束的摄取结果见图7。

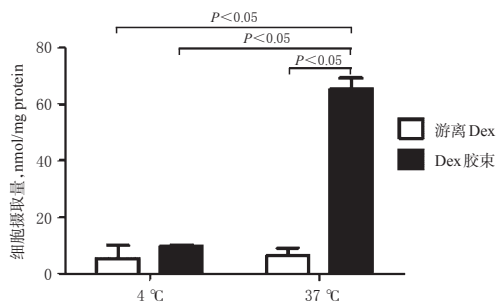


图7 A549细胞对游离Dex和Dex胶束的摄取结果($n=3$)

Fig 7 Uptake of A549 cells to free Dex and Dex micelles($n=3$)

4 讨论

本研究中体外释放结果显示, γ -PGA 与 Dex 形成胶束后, 增加了 Dex 的水溶性, 而且延缓了 Dex 的释放, 增强了其在局部细胞的滞留时间。在进一步的 MTT 试验中, 证明在低剂量时, 游离 Dex 和 Dex 胶束对 A549 细胞均无显著抑制作用($P>0.05$); 而在高剂量时游离 Dex 和 Dex 胶束均表现出对 A549 细胞的抑制作用和毒性, Dex 胶束的抑制作用显著强于游离 Dex ($P<0.05$)。这说明利用 γ -PGA 作为游离 Dex 的一种新型载体材料制备纳米胶束, 能够显著增强对 A549 细胞的抑制作用。这与体外释放试验结果一致, 说明 Dex 胶束对 A549 细胞的显著抑制作用是通过增强在细胞局部的滞留时间而实现的。

在体外细胞摄取试验中发现, 37 °C 时 Dex 胶束在 A549 细胞中的摄取量显著高于 4 °C 时的摄取量, 而且也显著高于 37 °C 和 4 °C 时游离 Dex 在 A549 细胞中的摄取量。该结果表明, Dex 胶束在 A549 细胞中的摄取具有温度依赖性, 所以其进入细胞是依靠能量依赖性的主动靶向作用; 而游离 Dex 的摄取不具有温度依赖性, 是被动靶向进入细胞的。

以上研究均证明, γ -PGA 作为 Dex 的一种新型载体, 可以增强 Dex 对 A549 细胞的抑制作用, 提高细胞对 Dex 的摄取量, 从而有希望发展与其他糖皮质激素类药物的载体, 为增加糖皮质激素类药物在疾病部位的滞留作用、提高其治疗效果提供研究思路。

参考文献

[1] 李倩. 地塞米松联合拉米夫定治疗重型乙型肝炎的近期疗效观察[J]. 中国药房, 2013, 24(12): 1 100.

[2] 王丽杰, 卢炜, 周田彦. 地塞米松应用于肿瘤治疗的研究进展[J]. 药学学报, 2015, 50(10): 1 217.

[3] 吴军, 杨秀萍. 我院 2013 年糖皮质激素类药物专项处方点评干预分析[J]. 中国药房, 2014, 25(42): 3 970.

[4] 马辉, 朱宝玉. 地塞米松致药品不良反应 158 例文献分析[J]. 中国药房, 2011, 22(48): 4 588.

[5] 林彬, 林雨婷, 张羽. 纳洛酮联合地塞米松对脑缺血再灌注损伤模型小鼠脑组织的保护作用[J]. 中国药房, 2015, 26(10): 1 325.

[6] 胡钰, 罗洁丽, 黄艳芳. 药物利用评估方法在肿瘤科糖皮质激素类药物使用评价中的作用[J]. 中国药房, 2016, 27(8): 1 081.

[7] Danhier F, Ansorena E, Silva JM. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications[J]. *J Control Release*, 2012, 161(2): 505.

[8] Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine (s) under the microscope[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2011, 8(6): 2 101.

[9] Crieleard BC, Rijcken CJ, Quan L, et al. Glucocorticoid-loaded core-cross-linked polymeric micelles with tailorable release kinetics for targeted therapy of rheumatoid arthritis[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(29): 7 254.

[10] Yuan F, Quan L, Cui L, et al. Development of macromolecular prodrug for rheumatoid arthritis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(12): 1 205.

[11] Quan L, Zhang Y, Crieleard BJ, et al. Nanomedicines for inflammatory arthritis: head-to-head comparison of glucocorticoid-containing polymers, micelles, and liposomes[J]. *ACS Nano*, 2013, 8(1): 458.

[12] 甘李, 余义义, 徐蓓, 等. 载紫杉醇的甲氧基聚乙二醇-胆固醇胶束的研究[J]. 华西药学杂志, 2014, 29(6): 613.

[13] 高春媛, 惠明, 杜小波, 等. γ -聚谷氨酸水凝胶制备方法和应用研究进展[J]. 河南科技学院学报: 自然科学版, 2013, 41(3): 24.

[14] 疏秀林, 施庆珊, 黄小莱, 等. γ -聚谷氨酸及其衍生物在生物医学领域中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(16): 3 009.

[15] Yu SH, Wu SJ, Tang DW, et al. Stimuli-responsive materials prepared from carboxymethyl chitosan and poly(γ -glutamic acid) for protein delivery[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(1): 531.

[16] 彭英云, 张涛, 缪铭, 等. γ -聚谷氨酸的合成、性质和应用[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(6): 133.

[17] Curley AA, Eggan SM, Lazarus MS, et al. Role of glutamic acid decarboxylase 67 in regulating cortical parvalbumin and GABA membrane transporter 1 expression: implications for schizophrenia[J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 50(1): 179.

[18] 万强, 杨玉萍, 刘中勇. 小檗碱对 PM2.5 诱导的血管内皮细胞损伤的抑制作用及其 p38MAPK 通路机制研究[J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3 464.

[19] Aguiar J, Carpena P, Molina-Bolivar JA, et al. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, 258(1): 116.

[20] Sakai-Kato K, Nishiyama N, Kozaki M, et al. General considerations regarding the in vitro and in vivo properties of block copolymer micelle products and their evaluation[J]. *J Control Release*, 2015, 210(1): 76.

(收稿日期: 2016-01-29 修回日期: 2016-09-20)

(编辑: 邹丽娟)