

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.008

血卟啉单甲醚对食管癌细胞 Eca-109 的光动力学杀伤效应*

宋远见 刘立凤 许 鹏 郭 哲 王书会 韩继武[△]

(哈尔滨医科大学附属第四医院消化内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨血卟啉单甲醚(HMME)介导的光动力学疗法(PDT)对人食管癌细胞杀伤效应的最佳作用参数,为 HMME-PDT 的临床应用提供一定的参考依据。**方法:**以 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ HMME 与人食管癌 Eca-109 细胞孵育不同时间后,利用形态学软件分析其荧光强度;进一步予不同浓度($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) HMME 与细胞孵育 1.5 小时后,在特定波长下以不同能量的激光($2, 4, 8 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$)照射,采用 CCK8 法检测细胞的存活率。**结果:**HMME 在细胞内的荧光强度于给药 1.5 h 后达到高峰。在一定范围内,随着 HMME 浓度与激光剂量的增加,细胞存活率逐渐下降,当 HMME 浓度增高到 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,光照强度增高到 $4 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$,进一步提高药物浓度与激光剂量,细胞存活率并不随之降低。**结论:**不同的孵育浓度、不同的孵育时间及不同的光照剂量密度可以显著的影响 HMME-PDT 对人食管癌 Eca-109 细胞的体外效应。

关键词:光动力学疗法;血卟啉单甲醚;孵育浓度;光照剂量密度;细胞生存率

中图分类号:R735.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)06-1032-04

Photodynamic Effect of Hematoporphyrin Monomethyl Ether on Esophageal Cancer Cell Line Eca-109*

SONG Yuan-jian, LIU Li-feng, XU Peng, GUO Zhe, WANG Shu-hui, HAN Ji-wu[△]

(Department of Gastroenterology, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the optimal interaction parameters of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME)-mediated photodynamic therapy (PDT) on the killing effect on human esophageal cancer cells and provide references for the clinical application of HMME-PDT. **Methods:** The fluorescence intensity of human esophageal cancer Eca-109 cells induced by $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ HMME for different incubation time was analyzed using morphological software. Furthermore, CCK8 assay was used to detect the cell viability of Eca-109 cells irradiated at specific wavelength and different energy ($2, 4, 8 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) laser irradiation after being induced by different concentrations ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of HMME for 1.5 h. **Results:** The intracellular fluorescence of HMME intensity peaked after treatment for 1.5h. Within a certain range, the cell viability decreased with the increasing of the laser dose and HMME concentration. When the HMME concentration increased to $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the light intensity increased to $4 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, the cell viability hadn't decreased with the increase of drug concentration and laser dose. **Conclusion:** Different incubation concentration, incubation time and light doses density could significantly affect the in vitro effect of HMME-PDT on human esophageal cancer Eca-109 cells.

Key words: Photodynamic therapy; Hematoporphyrin monomethyl ether; Incubation concentration; Light dose density; Cell survival

Chinese Library Classification(CLC): R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)06-1032-04

前言

食管癌指食道上皮组织异常增生形成的一种恶性肿瘤,在我国其发病率仅次于胃癌,在上消化道肿瘤中居于第二位^[1]。光动力学疗法自从 20 世纪 70 年代进入临床研究以来,经过多年来的改进与优化,其技术已趋于成熟^[2],在临床上不仅可治愈一些良性疾病如微血管病变、痤疮、鲜红斑痣、息肉、不典型增生组织及良性肿瘤等,还可以用于恶性肿瘤的诊断与姑息治疗^[3]。

光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)的基本原理为利用特定波长的激光激活定向分布于新生物组织中的光敏剂,从而产生单线态氧或氧自由基,进一步对肿瘤细胞产生毒杀效应,

破坏肿瘤组织的血管,达到治疗肿瘤的目的^[4]。HMME 是第二代血卟啉衍生物类光敏剂^[5],多年的研究及临床实验表明 HMME 与第一代光敏剂相比具有价格低廉、体内代谢快、避光时间短、靶向作用强、副作用小、活性氧产量高、吸收波长范围大等优点^[6-9]。但由于光动力治疗的多样性及光敏剂种类的不同,血卟啉单甲醚介导的光动力学疗法(hematoporphyrin monomethyl ether-mediated photodynamic therapy, HMME-PDT)治疗食管癌的最佳参数仍未明确,因而其疗效的不稳定性是我们目前面临的一个难题。本研究将探讨随着孵育时间的变化 HMME 在细胞内的分布量,并进一步分析光动力学疗法对人食管鳞状细胞癌 Eca-109 细胞体外杀伤效应与 HMME 孵育浓度

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(10551210)

作者简介:宋远见(1986-),男,硕士研究生, E-mail: songyuanjian@126.com, 电话: 18249516547

△ 通讯作者:韩继武,教授,硕士生导师, E-mail: hanjiwu0105@126.com

(收稿日期:2014-06-07 接受日期:2014-06-30)

及光照剂量密度之间的关系,以期为临床应用血卟啉单甲醚介导的光动力疗法治疗食管癌提供更多的参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人食管癌 Eca-109 细胞系购自哈尔滨医科大学细胞库; HMME 为冻干粉剂,购自上海先锋医药有限公司。主要试剂有胎牛血清(FBS)、RPMI-DMEM 培养基(Clonal 公司),细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(Cell Counting Kit-8,简称 CCK-8 试剂盒)购自武汉博士德生物工程有限公司。全自动酶免工作站(瑞士 TECAN freedomevolyzer);CO₂ 培养箱;LXJ-II 离心沉淀机;倒置相差显微镜;均由哈尔滨医科大学附属第四医院实验室提供;半导体激光器(630 nm);荧光光谱分析仪;均由哈尔滨工业大学提供。

1.2 人食管癌细胞 Eca-109 的培养

将 Eca-109 细胞株培养于含 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素及 10%胎牛血清的 RPMI-DMEM 培养液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养,用含 EDTA 的 0.25%胰酶常规消化传代,2~3 天传代 1 次。取对数生长期细胞,培养瓶长满 80%左右时,用含 EDTA 的 0.25%胰蛋白酶消化约 1 min,在显微镜下观察大部分细胞形态变圆形后,弃掉消化液,及时用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化,轻柔吹打使贴壁细胞完全混到培养液中,在离心机上以 1200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min,丢弃上清液,加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,计算细胞数量并稀释其密度为 $1.0\times 10^5/\text{L}$,在 96 孔板上每孔加入 150 μL 培养液,尽量使每孔的细胞数量均匀,静置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱中培养,24 h 后进行干预。

1.3 人食管癌细胞 Eca-109 吸收 HMME 光谱探测

将培养在 96 孔板的 Eca-109 细胞用 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HMME 溶液分别孵育 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 和 5.5 h 后(每一组设置四个复孔),弃去孔内培养液,用 PBS 冲洗 3 遍。在室温、避光条件下用 $\lambda=405\text{ nm}$ 激光器分别照射每孔的中间位置,其发出的荧光由与电脑连接的光纤接收,用 Origin 软件进行荧光光谱分析。

1.4 CCK8 法检测 Eca-109 细胞的活性

将培养在 96 孔板内的 Eca-109 细胞随机分为对照组和光动力实验组,每组设置四个复孔。将光动力实验组的 HMME 孵育浓度分别调整为:0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,在恒温保湿培养箱内避光静置培养,待培养时间满 1.5 h 后,弃去含有光敏剂的培养液,PBS 反复冲洗 3 次,加入全培养基的 DMEM 培养液,立即给予不同的光剂量密度照射(0、2、4、8 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$),光源采用 DIOMED 630 PDT 系统,波长为 630 nm。光动力作用后,弃去培养液,加入新的 DMEM 全血清培养液继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱内避光孵育 24 小时,弃去孔内培养液,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液及 90 μL RPMI-DMEM 培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱内继续避光孵育 2 h。用酶标仪检测各孔吸光度(A),吸收波长设置为 450 nm,记录结果,并计算细胞的存活率。细胞存活率计算公式为:细胞存活率=(实验组 A 值-空白对照组 A 值)/(对照组 A 值-空白对照组 A 值) $\times 100\%$ 。

1.5 统计学分析

所有数据运用 SAS9.2 软件,应用析因设计的方差分析进行统计分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血卟啉单甲醚孵育 Eca-109 细胞不同时间的光谱探测

将 Eca-109 细胞恒温避光孵育 (HMME 孵育浓度均为 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 和 5.5 h 后,用激发波长为 405 nm 的激光器,分别进行荧光探测,在电脑屏幕上可以接收到 HMME 激发出的荧光,结果显示随着孵育时间的增加荧光强度先迅速增加,1.5 h 时达到高峰后开始缓慢下降,表明细胞内 HMME 的含量先迅速增加后被细胞缓慢排出体外,因此在其后的光动力实验中,加入 HMME1.5 h 时进行光照可达最佳的治疗效果,因此其后的光动力治疗选择 1.5 h 为孵育时间(图 1)。

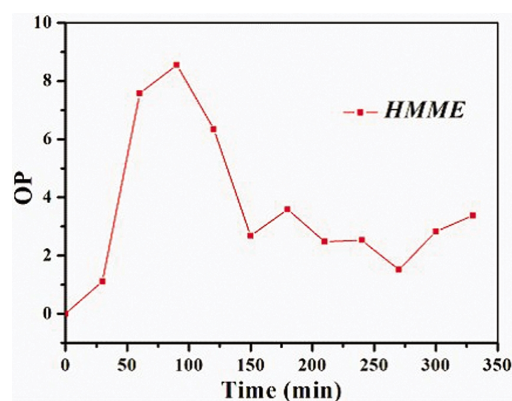


图 1 HMME 在食管癌细胞内的代谢情况

Fig.1 Metabolism of HMME in esophageal cancer cells in vitro

2.2 光动力治疗对 Eca-109 细胞活力的影响

不同光照剂量密度及不同浓度 HMME-PDT 对 Eca-109 细胞生存率的影响见表 1 及图 2。食管癌 Eca-109 细胞在三种不同光照剂量密度及 HMME 的不同孵育浓度 (浓度为 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组除外)下的生存率均有显著差异($P<0.01$),且光照剂量密度及 HMME 的孵育浓度之间有显著的交互效应($P<0.01$)。当固定同一光照剂量密度不变时,Eca-109 细胞的生存率在不同

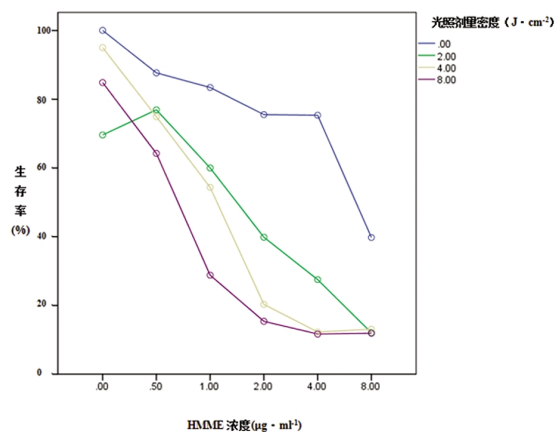


图 2 不同光照剂量密度与不同 HMME 孵育浓度的生存率间的交互效应

Fig.2 The interactive effects of survival by different doses of light density and different HMME incubation concentrations

HMME 孵育浓度下 (除浓度为 $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组外) 均有显著差异 ($P<0.01$), 且当固定同一 HMME 孵育浓度 (除浓度为 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组外) 不变时, Eca-109 细胞的生存率在不同光照剂量密度 (除光照剂量密度为 $0 \text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ 组外) 下亦有显著差异 ($P<0.01$), 且孵育浓度为 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的细胞在三种光照剂量密度下有明显差异 ($P<0.05$)。由此可见, HMME-PDT 对 Eca-109 细胞的生长有明显的抑制或杀伤作用, 且在一定范围内, 其抑制或杀伤作用随着光照剂量密度及孵育浓度的增加而逐渐增强。当

HMME 的孵育浓度由 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 升高至 $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 光照剂量密度由 $4 \text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ 延长至 $8 \text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时, A 值无明显下降, 即其对细胞的抑制或杀伤作用没有提高, 表明当 HMME 孵育浓度和光照剂量密度达到一定程度时, 其对食管癌细胞的杀伤效应为最大, 即达到平台期。因此, HMME-PDT 对人食管癌 Eca-109 细胞体外效应的最佳孵育浓度为 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最佳光照剂量为 $4 \text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。

表 1 不同光照剂量密度及不同浓度 HMME 介导的 PDT 作用 Eca-109 细胞的生存率 (%) 比较 (t s)

Table 1 The comparison of Eca-109 cell survival rate (%) between different light doses densities and different HMME concentrations mediated PDT effect

Light dose density ($\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$)	MHHE concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						Total	F value	P value
	0	0.5	1	2	4	8			
0	—	0.88 ± 0.05	0.83 ± 0.12	0.76 ± 0.07	0.75 ± 0.09	0.40 ± 0.03	0.77 ± 0.20		
2	0.70 ± 0.07	0.77 ± 0.11	0.60 ± 0.11	0.40 ± 0.02	0.28 ± 0.05	0.12 ± 0.01	0.48 ± 0.25	49.35	<0.0001
4	0.95 ± 0.07	0.75 ± 0.06	0.54 ± 0.04	0.20 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.45 ± 0.33	297.25	<0.0001
8	0.85 ± 0.15	0.64 ± 0.12	0.29 ± 0.04	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.36 ± 0.30	59.10	<0.0001
Total	0.87 ± 0.15	0.76 ± 0.12	0.57 ± 0.21	0.38 ± 0.25	0.32 ± 0.27	0.19 ± 0.12	0.51 ± 0.31	29.02	<0.0001
F value		4.62	27.10	223.30	148.64	196.45	10.03	72.91	
P value		0.0226	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

3 讨论

目前, 全世界每年死于食管癌的患者高达 20 多万, 而我国食管癌的发病率居世界首位, 且约 90% 的病理类型为鳞状细胞癌^[1]。由于大部分食管癌确诊时已是中晚期, 有些甚至存在远处转移, 失去了手术切除治疗的最佳时机, 甚至无法耐受放、化疗, 因而我们迫切需要探索一种创伤小、副作用少的治疗手段应用于中晚期食管癌的姑息治疗。

研究表明^[10]HMME 可以高浓度的聚集在肿瘤组织表面, 而周围正常组织仅一过性吸收或不吸收 HMME, 且正常组织中 HMME 排泄较快, 故与传统的放、化疗治疗相比, 光动力疗法能够选择性杀伤肿瘤细胞, 而对正常细胞影响小, 既避免了放、化疗给患者带来的痛苦, 又给肿瘤的治疗提供了一种新的途径。光动力疗法自从应用于临床以来, 已被证实具有较好的临床疗效, 因其创伤小、副作用少, 易于被患者接受, 已较好地应用于上消化道肿瘤的治疗^[11]。研究表明^[12]PDT 对食管癌的一些癌前病变的有效率可高达 60% 以上。关于 HMME-PDT 对人食管癌细胞凋亡的具体作用机制, 目前国内外尚缺乏有力的研究。但 HMME-PDT 对其他肿瘤的作用研究表明^[13, 14]HMME 定位于线粒体可能是其诱导凋亡的基本途径, PDT 诱导产生的活性氧物质首先造成线粒体损伤、内膜通透性增加, 导致线粒体肿胀破裂, 细胞色素 c 释放, caspase 激活, 细胞进入凋亡途径; 同时, 细胞内 Ca^{2+} 作为第二信使可同时参与多种细胞功能的调节, 研究已证实胞浆内 Ca^{2+} 浓度的改变与细胞凋亡有密切的关系。研究发现^[15]HMME-PDT 可使细胞内 Ca^{2+} 浓度迅速增高, 并可促进细胞的死亡。因此, 细胞内 Ca^{2+} 浓度也可能是 HMME-PDT 导致细胞凋亡的机制之一。

本研究对人食管癌细胞 Eca-109 的体外光动力效应结果显示, 影响 HMME 介导的光动力疗法效应的主要因素为光照剂量密度、HMME 孵育浓度及 HMME 孵育时间。随着孵育时间的变化, HMME 在 Eca-109 细胞中的量不是一成不变的, 其在细胞中的量表现为一种吞吐现象, 因此首先需找出其最佳孵育时间。结果显示加入同一浓度的 HMME 后, 孵育时间为 1.5 h 时, 细胞中的 HMME 浓度达到最大 (在表中表现为其下的面积最大); 其后, 随着孵育时间的增加, 其量开始减少, 由此我们以 1.5 h 为 HMME 对 Eca-109 细胞的最佳孵育时间。在特定孵育时间下 (1.5 h 为本实验的最佳孵育时间), 三种不同光照剂量密度及不同孵育浓度下细胞的生存率均有显著差异, 当固定光照剂量密度不变时, 细胞的生存率在不同 HMME 孵育浓度间均有显著差异; 而当固定 HMME 孵育浓度不变时, 细胞的生存率在不同光照剂量密度间也均有显著差异, 但 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ HMME 孵育浓度除外; 且光照剂量密度与孵育浓度之间也有明显的交互效应。当其孵育浓度为 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 光照剂量密度为 $4 \text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时细胞的生存率最低, 此时进一步提高孵育浓度及光照剂量密度并不能增强其杀伤效应, 即杀伤效应达到了平台期。由此可见, 孵育浓度为 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 光照剂量密度为 $4 \text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时 HMME 达到其 PDT 治疗的最佳效应。因此, 应避免过强的光照剂量密度及过高的光敏剂浓度, 以防对正常组织造成不必要的损伤。本研究为临床上应用 HMME-PDT 治疗食管癌提供了一定的参考依据。

参考文献 (References)

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2011, 61(2): 69-90
- [2] Snyder J W, Greco W R, Bellnier D A, et al. Photodynamic Therapy A

- Means to Enhanced Drug Delivery to Tumors [J]. Cancer research, 2003, 63(23): 8126-8131
- [3] Lei T C, Glazner G F, Duffy M, et al. Optical properties of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME), a PDT photosensitizer [J]. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2012, 9(3): 232-242
- [4] Agostinis P, Berg K, Cengel K A, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2011, 61(4): 250-281
- [5] Li H T, Song X Y, Yang C, et al. Effect of hematoporphyrin monomethyl ether-mediated PDT on the mitochondria of canine breast cancer cells [J]. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2013, 10(4): 414-421
- [6] Du P, Hu S L, Cheng Y X, et al. Photodynamic therapy leads to death of C6 glioma cells partly through AMPAR [J]. Brain research, 2012, 1433: 153-159
- [7] Zeng H, Sun M, Zhou C, et al. Hematoporphyrin Monomethyl Ether-Mediated Photodynamic Therapy Selectively Kills Sarcomas by Inducing Apoptosis[J]. PloS one, 2013, 8(10): e77727
- [8] Su X, Wang P, Wang X, et al. Apoptosis of U937 cells induced by hematoporphyrin monomethyl ether-mediated sonodynamic action[J]. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 2013, 28(3): 207-217
- [9] Li C Z, Cheng L F, Wang Z Q, et al. Attempt of photodynamic therapy on esophageal varices [J]. Lasers in medical science, 2009, 24(2): 167-171
- [10] Steinbauer J M, Schreml S, Kohl E A, et al. Photodynamic therapy in dermatology [J]. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2010, 8(6): 454-464
- [11] 沙卫红, 李瑜元, 聂玉强, 等. 光动力疗法与支架放置术治疗进展期食管癌比较[J]. 中华消化内镜杂志, 2006, 23(1): 27-30
- Sha Wei-hong, Li Yu-yuan, Nie Yu-qiang, et al. Effect of photodynamic therapy and stent on the management of advanced esophageal cancer[J]. Chin J Dig Endosc, 2006, 23(1): 27-30
- [12] Overholt B F, Lightdale C J, Wang K K, et al. Photodynamic therapy with porfimer sodium for ablation of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: international, partially blinded, randomized phase III trial [J]. Gastrointestinal endoscopy, 2005, 62(4): 488-498
- [13] Cheng J, Liang H, Li Q, et al. Hematoporphyrin monomethyl ether-mediated photodynamic effects on THP-1 cell-derived macrophages [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2010, 101(1): 9-15
- [14] Wang L, Gu Y, Li X S, et al. Fluorescence spectroscopy study on photobleaching properties of photosensitizers in photodynamic therapy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2007, 27(10): 2073-2078
- [15] Ding X, Xu Q, Liu F, et al. Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation [J]. Cancer letters, 2004, 216(1): 43-54

(上接第 1018 页)

- [6] Sinha VR, Aman T. Biodegradable microspheres for protein delivery [J]. Journal of Controlled Release, 2003, 90 (3): 261-280
- [7] Thomas T, Chen M-H, Ronald L. Idiotype-cytokine fusion proteins as cancer vaccines relative efficacy of IL-2, IL-4, and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor [J]. The Journal of Immunology, 1994, 153(10): 4775-4787
- [8] Masaki T, Jay AB. Immunoregulatory T cells in tumor immunity[J]. Current Opinion in Immunology, 2004, 16(2): 157-162
- [9] Hank CH, Thomas F, Conway Jr, et al. Cancer Immunotherapy with Interleukin 12 and Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor-encapsulated Microspheres: Coinduction of Innate and Adaptive Antitumor Immunity and Cure of Disseminated Disease[J]. Cancer Res, 2002, 62(24): 7254-7263
- [10] Hill JA. Cytokines considered critical in pregnancy [J]. Am J Reprod Immunol, 1992, 28(3-4): 123-126
- [11] Fu K, Griebenow K, Hsieh L, et al. FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres[J]. Journal of Controlled Release, 1999, 58(3): 357-366
- [12] 孟乐乐, 洪晓芸, 张奇昕, 等. 干扰素 α 缓释微球的制备及体外释放研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(27): 5201-5203
- Meng Le-le, Hong Xiao-yun, Zhang Qi-xin, et al. The Preparation and Research of Vitro-release of Interferon-loaded Microspheres [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(27): 5201-5203
- [13] Yuan W, Geng Y, Wu F, et al. Preparation of polysaccharide glassy microparticles with stabilization of Proteins [J]. Int. J. Pharm, 2009, 366(1-2): 154-159
- [14] Weert MV, Hennink WE, Jiskoot W. Protein instability in poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles [J]. Pharmaceutics Research, 2000, 17(10): 1159-1167
- [15] Muller R, Keck C. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs-a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles[J]. Journal of biotechnology, 2004, 113 (1-3): 151-170
- [16] Jeffrey LC, Olu Funmi LJ, Scott P, et al. Recombinant human growth hormone poly (lactic-co-glycolic acid) microsphere formulation development[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997, 28(1): 71-84
- [17] Byeongmoon J, You HB, Lee DS, et al. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems[J]. Nature, 1997, 388 (6645): 860-862
- [18] Jin T, Zhu J, Wu F, et al. Preparing polymer-based sustained-release systems without exposing protein to water-oil or water-air interface [J]. J Control Release, 2008, 128(1): 50-59
- [19] Geng Y, Yuan W, Wu F, et al. Formulating erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation[J]. J Control Release, 2008, 130(3): 259-265
- [20] Gombotz W R, Pettit D K. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery[J]. Bioconj Chem, 1995, 6(4): 332-351
- [21] Jin T, Chen L, Zhu H, et al. Stable polymer aqueous/ aqueous emulsion system and uses thereof[P]. US patent, 2004, 6805879