

重组大熊猫 IFN- γ 聚氰基丙烯酸正丁酯 纳米球的制备与评价

杨莎莎^{①②} 徐志文^② 王承东^③ 李才武^③ 朱玲^② 周远成^② 李新琼^②
温安祥^{①*} 李德生^{③*}

① 四川农业大学生命科学学院 雅安 625014; ② 四川农业大学动物生物技术中心 雅安 625014;

③ 中国保护大熊猫研究中心 雅安 625000

摘要: 为了制备并评价大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 重组干扰素 γ (IFN- γ) 聚氰基丙烯酸正丁酯 (PBCA) 纳米球, 本研究利用蛋白质原核表达技术, 获得了重组大熊猫 IFN- γ 蛋白, 然后以 PBCA 为载药材料, 采用乳化聚合方法制备了大熊猫干扰素 γ 纳米微球 (IFN γ -PBCA-NS), 最后借助感染大熊猫流感病毒 A/Panda/Sichuan/01/2011 (H1N1) 的昆明小鼠 (*Mus musculus*) 模型, 通过灌胃和皮下注射药物初步评价了 IFN γ -PBCA-NS 的药效。结果表明, 大熊猫 IFN- γ 的蛋白分子量约为 33.5 ku, 所制备的大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 外观规整, 粒径在 50 ~ 200 nm 之间, 跨距 0.55, 大小较均匀, 包封率为 56.7%, 载药量为 0.86%。灌胃和注射两种给药途径中, IFN γ -PBCA-NS 组小鼠的生命延长率均显著高于 IFN- γ 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。显示 IFN γ -PBCA-NS 在小鼠体内有更好的缓释和抗病毒作用, 可为进一步研究制备大熊猫多肽类药物微粒提供参考。

关键词: 大熊猫; 干扰素 γ ; 聚氰基丙烯酸正丁酯; 纳米球

中图分类号: S858.9 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2017) 02-314-08

Preparation and Evaluation of Recombinant Interferon-gamma Nanosphere Loaded in Polybutylcyanoacrylate in Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*)

YANG Sha-Sha^{①②} XU Zhi-Wen^② WANG Cheng-Dong^③ LI Cai-Wu^③ ZHU Ling^②
ZHOU Yuan-Cheng^② LI Xin-Qiong^② WEN An-Xiang^{①*} LI De-Sheng^{③*}

① College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014; ② Animal Biotechnology Center of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014; ③ China Conservation and Research Center for the Giant Panda, Ya'an 625000, China

Abstract: To prepare and investigate the recombinant Interferon-gamma (IFN- γ) nanosphere loaded in

基金项目 四川省科技计划项目 (No. 2012JQ0037);

* 通讯作者, E-mail: 2960657740@qq.com; 1050133153@qq.com;

第一作者介绍 杨莎莎, 女, 硕士研究生; 研究方向: 野生动物保护; E-mail: 158335174@qq.com.

收稿日期: 2016-06-17, 修回日期: 2016-12-08 DOI: 10.13859/j.cjz.201702015

polybutylcyanoacrylate (PBCA) in Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*), we firstly obtained the recombinant IFN- γ protein through prokaryotic protein expression technology, and then, by choosing PBCA as the drug delivery material, prepared the INF- γ PBCA nanosphere (IFN γ -PBCA-NS) using an emulsion polymerization method. Further more, the Kunming Mice (*Mus musculus*), which were infected with giant panda influenza virus A/Panda/Sichuan/01/2011 (H1N1), were used as models to test the efficacy of IFN γ -PBCA-NS compared to that of IFN γ after intragastric administration and subcutaneous injection of drugs. The results demonstrated that the molecular weight of INF- γ protein was about 33.5 ku, and the IFN γ -PBCA-NS was globular in appearance, with uniform particle size. The diameters ranged from 50 to 200 nm, the span was 0.55, the encapsulation efficiency of the particles was 56.7% and the drug loading was 0.86%. Moreover, the prolonged life rate of mice in the IFN γ -PBCA-NS group was significantly higher than that of the IFN γ group in both intragastric administration and subcutaneous injection approaches ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In summary, IFN γ -PBCA-NS showed better sustained release and antiviral activity in mice, which could provide references for further research on the preparation of the Giant Panda peptide drug microparticles.

Key words: Giant Panda, *Ailuropoda melanoleuca*; Interferon-gamma; Polybutylcyanoacrylate; Nanosphere

干扰素 γ (interferon-gamma, IFN- γ) 具有抗病毒、抗肿瘤等作用 (孙亚萍等 2006)。虽然干扰素 γ (IFN- γ) 在免疫性疾病的预防与治疗方面应用广泛,但在体内不稳定、半衰期短、生物利用度低,由此限制了其在临床的广泛应用 (Zlotnik et al. 2000)。高分子纳米载药系统能保护蛋白类药物免遭破坏,增加药物的穿透力、靶向性和稳定性,从而达到长效缓释和提高利用度的效果 (Yang et al. 2011)。聚氰基丙烯酸正丁酯 (polybutylcyanoacrylate, PBCA) 具有良好的生物相容性和可降解性,无免疫原性,是一种极具潜力的纳米材料 (Gao et al. 2015)。大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 是中国特有珍稀野生动物,其干扰素纳米载药系统的研究尚未见报道。本实验选取聚氰基丙烯酸正丁酯 (PBCA) 为载体,采用乳合法制备重组大熊猫干扰素 γ 聚氰基丙烯酸正丁酯纳米球 (Interferon-gamma-polybutylcyanoacrylate-nanospheres, IFN γ -PBCA-NS),以期为进一步研究制备大熊猫多肽类药物微粒提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 大熊猫 IFN- γ 克隆载体的构建和表达纯化

本研究中大熊猫外周血液由中国保护大熊猫研究中心雅安碧峰峡基地提供,大熊猫 IFN- γ 克隆载体的构建和表达参考朱辉等 (2009) 的方法。

1.1.1 大熊猫 cDNA 模版的获取 参照说明书,用淋巴细胞分离液 (北京 Solarbio 公司) 分离大熊猫外周血淋巴细胞; 1 000 r/min 离心获得大熊猫淋巴细胞, RNAiso plus (TaKaRa 公司) 提取细胞总 RNA, PrimeScript RT Reagent (TaKaRa 公司) 将总 RNA 反转录成 cDNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.1.2 IFN- γ 克隆载体的构建 参考 NCBI 上大熊猫 (登陆号: DQ450843) 和近源物种的 IFN- γ 基因序列,利用 DNASTAR 软件设计了大熊猫 IFN- γ 基因的 1 对引物 P1/P2 (上游引物 P1: 5'-GGA TCC GAA TTC GGC TAT TAC TGT CAG GCC-3', 下游引物 P2: 5'-GTC GAC TTA TTT CGA TGC TCT GCG GCC TCG-3'), 在上、下游引物 5'端各自添加限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以 P1/P2 为引物, 大熊

猫基因组 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。按照 DNA 胶回收试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明纯化 PCR 产物, 将回收产物与 pMD19-T Simple Vector 载体 (TaKaRa 公司) 连接, 构建 IFN γ -pMD19-T 质粒。随后将 IFN γ -pMD19-T 质粒转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 (TaKaRa 公司), 并将转化后的 DH5 α 感受态细胞均匀地涂在含有氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 的 LB (Luria-Bertani, LB) 固态培养基中, 挑单菌落进行 PCR 鉴定, 并将阳性菌落扩大培养, 利用质粒提取试剂盒 (OMEGA 公司) 提纯 IFN γ -pMD19-T 质粒, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

将重组质粒 IFN γ -pMD19-T 和空载体 pET32a (+) 分别用 *Bam*H I (TaKaRa 公司) 和 *Sal* I (TaKaRa 公司) 进行双酶切, 分别胶回收已露出相同粘性末端的 *INF*- γ 片段和 pET32a (+) 质粒, 连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 涂板, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 阳性菌落扩大培养, 送菌液测序 (上海生工生物工程技术有限公司), 阳性质粒命名为 IFN γ -pET32a (+)。

1.1.3 大熊猫 IFN γ 蛋白的表达纯化 将重组质粒 IFN γ -pET32a (+) 转化大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 感受态细胞。用含氨苄青霉素的 LB 培养基筛选阳性质粒, *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切鉴定, 阳性菌株命名为 Rosetta (DE3)-pET32-IFN γ 。将 Rosetta (DE3)-pET32-IFN γ 菌种接于含氨苄青霉素 (50 mg/L) 的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 180 r/min 振荡培养, 至 $A_{600\text{nm}}$ 约达到 0.6 时加入 0.3 mmol/L 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导 10 h。菌液离心后用 pH 7.4 PBS 洗涤 3 次, 以 400 W 超声波破裂, 6 000 r/min 离心 20 min, 取上清使用 Ni 柱纯化带有 His 标签的重组蛋白 (萨姆布鲁克 2009)。将纯化后的可溶性表达产物进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, 15% 凝胶浓度)。转印至聚偏氟乙烯膜 (PVDF 膜), THETM His 标签单克隆抗体

(Sigma 公司) 为一抗, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠 IgG (Sigma 公司) 为二抗进行 Western-blot 检测。纯化后的大熊猫 IFN γ 重组蛋白用核酸蛋白仪 (Smart SpecTM Plus, 美国 BIO-RAD 公司) 记录 280 nm 和 260 nm 波长下的光吸收值, 计算大熊猫 IFN γ 浓度, 蛋白浓度 (g/L) = $(1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}) \times$ 稀释倍数。参考 Pfeiffer 等 (1998) 的方法用 VSV-WISH 系统测定纯化后的大熊猫 IFN γ 重组蛋白活性, 其中人羊膜成纤维细胞 (WISH) 由四川农业大学动物生物技术中心提供, 水泡性口炎病毒 (VSV) 购自四川大学微生物室。得到的蛋白产物为大熊猫 IFN γ , 冻干, -20 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.2 大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 的制备

采用乳化聚合法制备大熊猫 IFN γ -PBCA-NS, 制备全程在 10 $^{\circ}$ C 以下无菌操作。将 23 g 大熊猫 IFN γ 和 0.250 3 g 泊洛沙姆 188 (poloxamer 188, 上海化学试剂有限公司) 溶于 50 ml 超纯水中, 700 r/min 磁力搅拌 5 min, 加入 0.01 mol/L 盐酸调节 pH 至 4.0, 然后用注射器缓慢加入 0.301 4 g 氰基丙烯酸正丁酯单体 (polybutylcyanoacrylate, BCA, 北京康派特医疗器械有限公司), 700 r/min 磁力搅拌 2 h, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 5.5, 700 r/min 继续搅拌 2 h。再用磷酸盐缓冲液调节 pH 至 7.3。用孔径为 0.8 μ m 的微孔滤膜过滤得到大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 胶体溶液样品。最后将过滤后的溶液加入冻干保护剂 (蔗糖 6 kg/L 和 NaCl 0.5 kg/L), 以每瓶 2 ml 分装于西林瓶中, 冷冻干燥。

用 JSM-5900LV 型扫描电子显微镜观察纳米粒子的形貌、大小及分散性, 根据公式评价纳米粒子均匀性, 跨距 = $(D_{90} - D_{10}) / D_{50}$, D_{10} 、 D_{50} 和 D_{90} 分别表示在粒径累积分布中 (以累积频率为纵坐标、以粒径为横坐标绘得的 S 型曲线) 相应于累积频率 10%、50% 和 90% 处的粒径。此外, 将大熊猫 IFN γ -PBCA-NS、PBCA-NS、大熊猫 IFN γ 和泊洛沙姆 188 (Poloxamer 188)

分别冷冻干燥制成粉末, 各取 0.005 g, 分别与溴化钾粉末 0.15 g 制片, 用 ALPHA FT-IR 型傅里叶红外光谱仪在波数 400 ~ 4 000 /cm 范围内测定上述 4 种物质的红外光谱, 比较其透过率, 判断 INF- γ 是否被包被。

1.3 大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 的质量评价

1.3.1 包封率和载药量测定 取 50 ml 大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 胶体溶液样品, 12 000 r/min 离心 5 min, 留上清液备用。采用考马斯亮蓝染色法定量上清液中游离的大熊猫 IFN- γ 。包封率 = 100% $(C_1 - C_2) / C_1$, 载药量 = 100% $(C_1 - C_2) / W_1$, 式中, C_1 是投药量 (mg), C_2 是上清液中未包封药量 (mg), W_1 是 BCA 加入量 (mg)。

1.3.2 药效测定 以 DMEM 培养基 (美国 GIBCO 公司) 培养 MDCK 细胞 (美国 Gibco 公司) 至单层汇合, 接种 200 μ l 大熊猫流感病毒 A/Panda/Sichuan/01/2011 (H1N1) (四川农业大学动物生物技术中心提供), 37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h。弃去未吸附的病毒液, 加入含 1 U/L 青霉素/链霉素混合溶液 (美国 GIBCO 公司) 和 2 mg/L TPCK-Trypsin (美国 GIBCO 公司) 无血清的病毒维持液 5 ml。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养, 每日观察细胞病变情况。3 d 后收存引起细胞病变的病毒液, 用生理盐水分别稀释成 0.1、0.01、0.001 和 0.000 1 四个浓度梯度。按照上海南方模式生物研究中心实验动物管理与使用委员会 (IACUC) 对模式生物的使用要求, 将 25 只体重 12 ~ 16 g 昆明小鼠 (*Mus musculus*) 随机分为 5 组, 乙醚麻醉后分别用病毒原液和 0.1、0.01、0.001 和 0.000 1 稀释度病毒液 100 μ l 滴鼻感染, 记录每组死亡情况。计算小鼠半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀)。公式为 $\log_{LD50} = X_m - i (\sum P - 0.5)$, 其中 X_m 为最大剂量组剂量对数值, i 为相邻两组剂量对数差值, P 为各组动物死亡率 (用小数表示), $\sum P$ 为各组动物死亡率总和。

将 80 只 14 ~ 18 g 昆明小鼠随机分成灌胃组 (intragastric administration, ig) 和皮下注射

组 (subcutaneous injection, sc) 2 个大组, 每个大组按照考察药品不同分别包含大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 组、大熊猫 IFN- γ 组和 PBCA-NS 对照组, 另以注射生理盐水为空白对照组。以 5 倍半致死剂量浓度大熊猫流感病毒 A/Panda/Sichuan/01/2011 (H1N1) 液滴鼻感染小鼠, 滴入后立即按照灌胃大组给药 0.02 ml/g, 每天 2 次; 皮下注射大组给药 0.015 ml/g, 隔天 1 次。给药剂量都是以药物占小鼠体重的量计算, 实验重复 3 次, 记录小鼠死亡情况。以生命延长率 (rates of lengthening mice life, R) 考察大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 的缓释性, $R = [(T - C) / C] \times 100\%$, 其中, R 为小鼠生命延长率, T 表示给药组平均生存天数, C 表示对照组平均生存天数。

1.4 实验数据处理

本研究中大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 药效测定相关数据经 SPSS 20.0 统计分析, 用 One-way-ANOVA 检验各组数据的差异显著性, 统计结果用平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 大熊猫 IFN- γ 克隆载体的构建与纯化

本次扩增的大熊猫 IFN- γ 的大小约 450 bp, 将经测序后的大熊猫 IFN- γ 序列与 GenBank 中已公布的大熊猫 IFN- γ (登陆号: DQ450843) 基因相比, 匹配率达 99%, 与预测结果相同。将大熊猫 IFN- γ 重组质粒 IFN γ -pET32a (+) 转化大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 180 r/min 振荡培养, 将诱导的菌液制样进行 SDS-PAGE 电泳 (图 1), 与 pET-32a (+) 空载体相比, 在 37 ku 条带附近出现重组蛋白条带 (图 1a)。电泳后进行 Western-blot 检测, 结果在约 33.5 ku 处出现特异反应条带, 与电泳结果吻合 (图 1b)。蛋白纯化后制样, 经 SDS-PAGE 电泳, 同样在约 33.5 ku 处出现条带, 纯化的重组蛋白纯度可达 90% 以上 (图 1c)。用核酸蛋

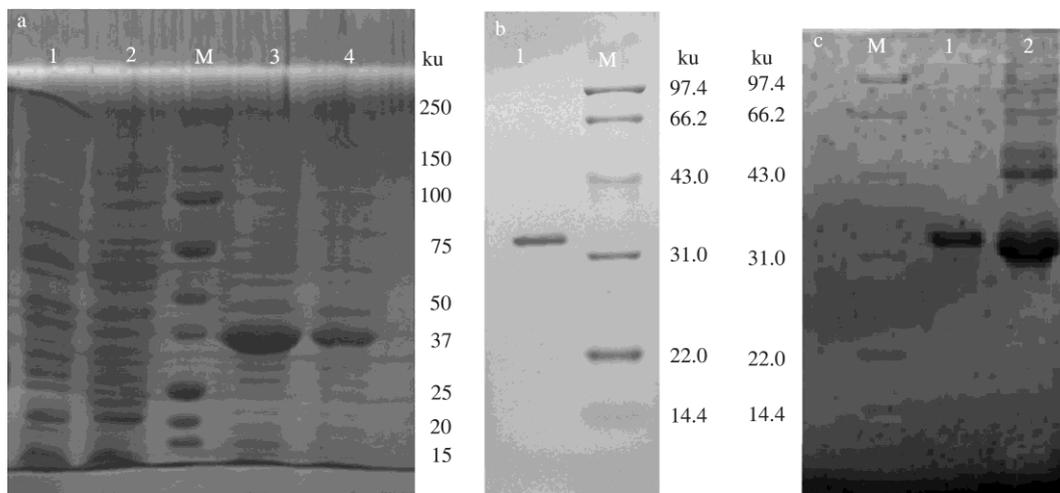


图 1 大熊猫 IFN- γ 蛋白的 SDS-PAGE (a)、Western blot (b) 分析和纯化 (c)

Fig. 1 Analysis of IFN- γ protein by SDS-PAGE (a)、Western blot (b) and purification (c)

a: 1、2. pET32a(+)空载体, 3、4. 重组大熊猫干扰素; b: 1. pET32-IFN γ 表达产物; c: 1. 纯化的大熊猫干扰素 γ (IFN- γ) 蛋白, 2. 未纯化的大熊猫干扰素 γ (IFN- γ) 蛋白; M. 蛋白 Marker。

a: lane 1 and 2. pET32a(+) vector, lane 3 and 4. Giant panda IFN- γ protein; b: lane 1. Giant panda IFN- γ protein; c: lane 1. Purification of IFN- γ protein, lane 2. Unpurified IFN- γ protein; lane M. Protein Marker.

白仪测定蛋白浓度, 记录 280 nm 和 260 nm 波长下的光吸收值, 根据蛋白浓度公式计算得到大熊猫干扰素 γ 蛋白浓度为 0.46 g/L。采用 VSV-WISH 系统测定重组干扰素活性为 3.2×10^5 U/mg。

2.2 大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 的制备结果

所得纳米颗粒粒径在 50 ~ 200 nm 之间, 大多为 130 nm 左右, 平均粒径 123 nm, 跨距为 0.55, 样品形态良好、大小均匀 (图 2)。从对照样品与 BCA 单体在 FTIR 谱图中的峰形和位置, 可见包被干扰素曲线在 3 400/cm 处的 “-NH₂”、3 300/cm 处的 “=NH”、2 750/cm 处的 “-CH₂-” 和 1 752/cm 处的 “C=O”, 初步说明大熊猫干扰素 γ (IFN- γ) 和氰基丙烯酸正丁酯 (PBCA) 形成聚合物, 干扰素已被包被 (图 3)。

2.3 大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 的质量评价

2.3.1 大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 的封装率和载药量

以标准蛋白含量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制蛋白标准曲线 (图 4), 拟合方程:

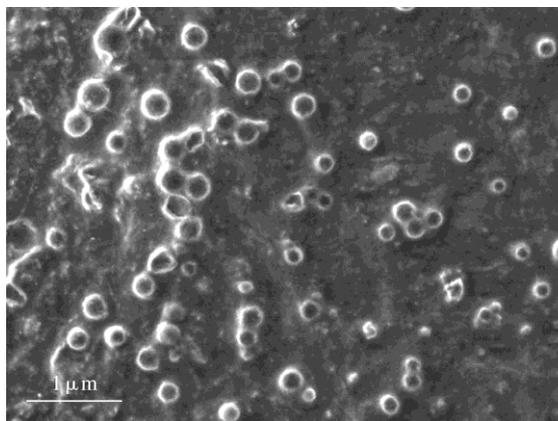


图 2 大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 的扫描电镜图像
Fig. 2 Scanning electron microscope (SEM) photograph of interferon-gamma polybutylcyanoacrylate nanosphere (IFN γ -PBCA-NS)

$Y = 0.004 X - 0.003$, $R^2 = 0.9987$, 其中 X 表示样品蛋白质浓度, Y 表示样品 595 nm 的吸光度。得到上清液中游离大熊猫 IFN- γ 为 0.199 mg。根据公式计算制备的大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 的

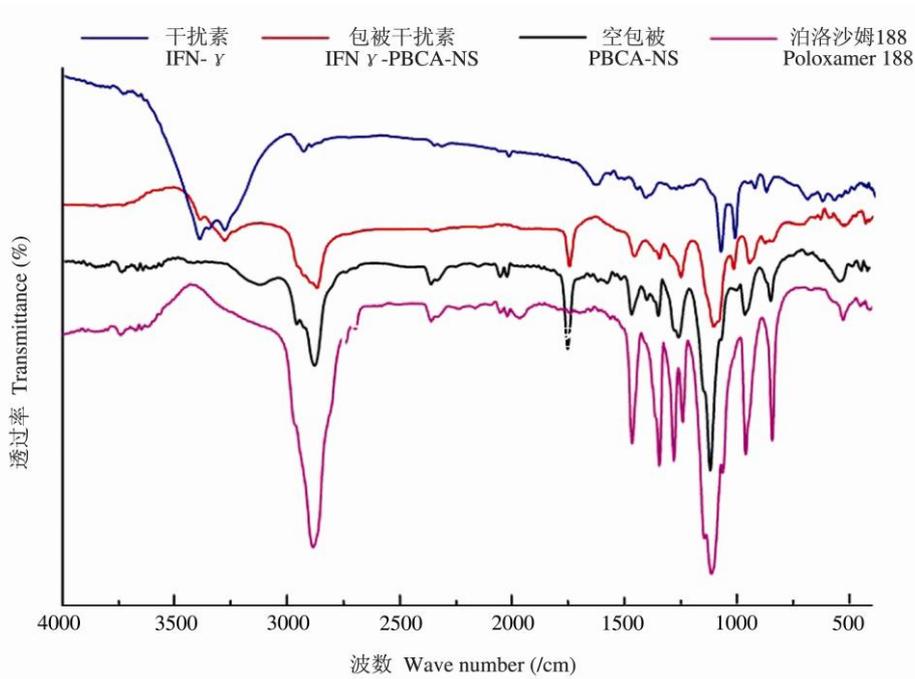


图 3 大熊猫 IFN- γ 、大熊猫 IFN γ -PBCA-NS、PBCA-NS、Poloxamer 188 的红外光谱

Fig. 3 Infrared spectroscopy of IFN- γ , interferon-gamma polybutylcyanoacrylate nanosphere (IFN γ -PBCA-NS), polybutylcyanoacrylate nanosphere (PBCA-NS) and Poloxamer 188

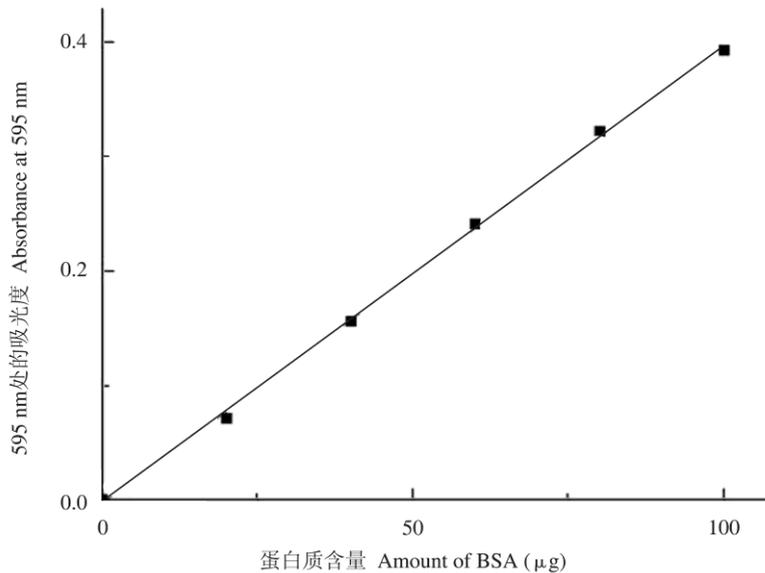


图 4 蛋白标准曲线

Fig. 4 The standard curve of protein

牛血清白蛋白含量 (μg) 为 3 次测试值的均值。Bovine serum albumin (BSA) (μg) represents the average value of three tests.

包封率为 56.7%，载药量为 0.86%。

2.3.3 大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 的药效 皮下

注射大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 组小鼠的生命延长率极显著高于皮下注射大熊猫 IFN- γ 组 ($P <$

0.01), 灌胃大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 组小鼠的生命延长率显著高于灌胃大熊猫 IFN- γ 组 ($P < 0.05$); 而在皮下注射和灌胃组间大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 生命延长率无显著差异 ($P > 0.05$)。显示大熊猫 IFN γ -PBCA-NS 药效优于大熊猫 IFN- γ (图 5)。

3 讨论

研究显示, 采用乳化聚合法制备阿苯达唑和吉西他滨 PBCA 纳米粒, 介质 pH 值为 3 时的包封率和载药量最高, 稳定性也好 (张学农等 2003, 黄乐松等 2008)。本实验采用优化条件后的乳化聚合法, 在介质 pH 6.0 ~ 7.0、中等搅拌速度等条件下制备 IFN γ -PBCA-NS, 更大程度地保持了 IFN- γ 的活性。

稳定剂是乳化聚合法制备纳米微球的另一重要影响因素。Poloxamer 188 是由聚氧乙烯 (polyethylene oxide, PEO) 和聚氧丙烯

(polypropylene oxide, PPO) 组成的 PEO-PPO-PEO 非离子型三嵌段共聚物, 毒性低, 具有两亲性, 水溶性好 (Chen et al. 2015)。本实验选用 Poloxamer 188 作为稳定剂, BCA 的聚合由 Poloxamer 188 启动 (Moloughney et al. 2012), 能够在聚合反应中起乳化剂和稳定剂的作用。

大蒜素 DATS-PBCA-NP 包封率为 92.87%, 载药量为 18.57% (徐巍等 2006); 紫杉醇 PTX-PBCA-NP 包封率为 95.71%、载药量为 0.80% (陈如大等 2010)。本实验制备的 IFN γ -PBCA-NS 包封率为 56.7%, 载药量为 0.86%, 相比而言, 包封率和载药量略低, 这可能是由于表达的蛋白浓度不高所致。包封率和载药量是评价微球质量的重要指标 (曲燕燕等 2009), 因而 IFN γ -PBCA-NS 的制备工艺还需进一步优化。

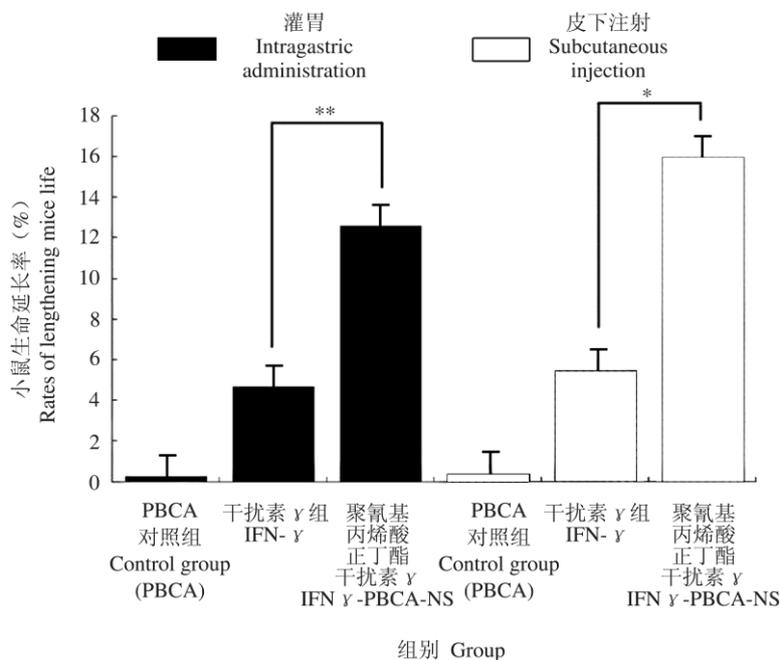


图 5 小鼠生命延长率

Fig. 5 Rates of lengthening life of mice

结果用平均值 \pm 标准差表示, $n = 3$; * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$ 。

Results were shown as Mean \pm SD, $n = 3$; * means $P < 0.05$; ** means $P < 0.01$.

本次实验制备了大熊猫 IFN γ -PBCA-NS, 但要达到临床用药标准, 药物的药代动力学、生物利用度和安全性评估等方面还需深入探讨。

参 考 文 献

- Chen Z, Liu Z, Qian F. 2015. Crystallization of Bifonazole and Acetaminophen within the Matrix of Semicrystalline, PEO-PPO-PEO Triblock Copolymers. *Molecular Pharmaceutics*, 12(2): 590–599.
- Gao S, Xu Y, Asghar S, et al. 2015. Polybutylcyanoacrylate nanocarriers as promising targeted drug delivery systems. *Journal of Drug Targeting*, 23(6): 481–496.
- Moloughney J G, Weisleder N. 2012. Poloxamer 188 (p188) as a membrane resealing reagent in biomedical applications. *Recent Patents on Biotechnology*, 6(3): 200–211.
- Pfeffer L, Dinarello C, Herberman R, et al. 1998. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Research*, 58(12): 2489–2499.
- Yang F, Shu Y J, Yang Y Q, et al. 2011. The pharmacokinetics of recombinant human Interferon-alpha-2b poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres in rats. *Journal of Microencapsulation*, 28(6): 483–489.
- Zlotnik A, Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2): 121–127.
- 陈如大, 任非, 李国锋, 等. 2010. 紫杉醇聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒制备研究. *南方医科大学学报*, 30(4): 763–766.
- 黄乐松, 王春霞, 陈志良, 等. 2008. 吉西他滨聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备工艺. *南方医科大学学报*, 27(11): 1653–1656.
- 曲燕燕, 张竞, 苏昕, 等. 2009. 基于 PEGT/PBT 新型材料的干扰素缓释微球的药动学研究. *中国药学杂志*, 7(6): 456–459.
- 萨姆布鲁克[美]. 2009. 分子克隆实验指南: 上/下. 3 版(精). 北京: 科学出版社.
- 孙亚萍, 王英明, 乔守怡. 2006. 干扰素及其最新研究进展. *中国免疫学杂志*, 22 (7): 676–679.
- 徐巍, 邓树海, 李艳辉, 等. 2006. 大蒜素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备工艺研究. *中国新药杂志*, 15(6): 448–451.
- 张学农, 张强, 温浩, 等. 2003. 乳化聚合法制备阿苯达唑聚氰基丙烯酸酯纳米球的方法比较及稳定性考察. *中国药学杂志*, 38(5): 357–359.
- 朱辉, 马清义, 乔琪, 等. 2009. 秦岭大熊猫 IFN- γ 基因的表达及其生物活性分析. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, (12): 22–28.