

生物响应酸性磷酸酶浓度的载药聚电解质的体外控释分析

姜磊¹, 陈素芸¹, 杨晓玲², 易静³, 李培勇¹

1 上海交通大学瑞金医院核医学科, 上海 200025

2 华东理工大学超细材料制备与应用教育部重点实验室, 上海 200237

3 上海交通大学基础医学院细胞生物学教研室, 上海 200025

摘要: 研制一种可响应酸性磷酸酶浓度变化的聚电解质胶囊, (PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)胶囊, 在分析胶囊的理化性质的基础上对其阿霉素药物包封和体外控释行为进行研究。通过层层组装的方法, 制备囊壁含有酸性磷酸酶底物 β -甘油磷酸酯的空壳胶囊和囊壁不含酸性磷酸酶底物的对照空壳胶囊; 用电镜测定胶囊的大小和形态; 用 MTT 方法分析胶囊的生物相容性。通过药物浓度梯度法进行胶囊的阿霉素药物包封并测定其包封率。将酸性磷酸酶标准品、分泌酸性磷酸酶的 HepG2 细胞株分别与载药阿霉素胶囊和载药阿霉素对照胶囊作用, 观察阿霉素胶囊的药物控释情况和对肿瘤细胞生长的影响。空壳(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)胶囊粒径多在 200~300 nm 之间, 胶囊浓度 $\leq 250 \mu\text{g/mL}$ 时生物相容性良好, 对阿霉素的包封率达 68.12%; 载药胶囊组和对照组分别与酸性磷酸酶标准品作用, 至 48 h 时分别释放出载药量的 38% 和 15%, 两者差异具有显著的统计学意义($P < 0.05$); 载药胶囊组较载药对照组对 HepG2 细胞株的生长抑制作用明显增加, 24 h HepG2 细胞凋亡相差 7.59%(13.73 Vs 6.14), 有明显统计学意义($P < 0.05$)。囊壁含有酸性磷酸酶底物的载药聚电解质胶囊, 可在体外响应酸性磷酸酶浓度变化, 具有药物控释性状, 为临床上有酸性磷酸酶升高的良、恶性疾病的药物控释治疗提供了一种新的方法, 其应用前景值得进一步探讨。

关键词: 酸性磷酸酶, 生物响应, 控释

Prolonged-releasing Performance of Drug Loaded Polyelectrolyte Nanocapsules Effected by Acid Phosphatase: *in vitro* Analysis

Lei Jiang¹, Suyun Chen¹, Xiaoling Yang², Jing Yi³, and Peiyong Li¹

1 Department of Nuclear Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

2 Key Laboratory for Ultrafine Materials of Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

3 Department of Cell Biology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Abstract: The aims of the study were to prepare polyelectrolyte nanocapsules effected by acid phosphatase (ACP) and to study prolonged-releasing performance of the nanocapsules *in vitro*. Using the layer by layer (LbL) self-assembly technique,

Received: February 2, 2008; **Accepted:** July 1, 2008

Supported by: the Shanghai Committee of Science and Technology, China (No. 0552nm024).

Corresponding author: Peiyong Li. E-mail: peiyli@vip.sina.com

上海科委(No. 0552nm024)资助。

polyelectrolyte- β -glycerophosphoric acid nanocapsules were prepared. The morphologies of the nanocapsules were characterized by transmission electron microscopy (TEM) and biocompatibility was well examined by cell-culture method. The drug adriamycin would be loaded in nanocapsules for concentration gradient, the encapsulation efficiency could be calculated. Nanocapsules were reacted with acid phosphatase standard and HepG2 cells that express the ACP, respectively. The prolonged-releasing of adriamycin was verified and tumor cells apoptosis were measured. TEM images showed that the nanocapsule sizes were between 200~300 nm. The material biocompatibility was good until the concentration of nanocapsule was up to 250 $\mu\text{g/mL}$. The drug encapsulation efficiency reached 68.12%. The release rate of polyelectrolyte (PAH/PSS- β -glycerophosphoric acid)s nanocapsules was higher than in the control nanocapsules at 48 h (38% Vs 15%) after its reaction to the ACP standard ($P<0.05$). Compared with the control, nanocapsules could significantly inhibit the growth of HepG2 cells that expressed the ACP, and the efficiency of cell apoptosis was 7.59% higher at 24 h (13.73 Vs 6.14, $P<0.05$). Polyelectrolytes (PAH/PSS- β -glycerophosphoric acid) nanocapsules *in vitro* have response to acid phosphatase by which prolonged-releasing can be affected. This property can be used for treatment of some malignant and benign diseases with elevated acid phosphatase level.

Keywords: acid phosphatase, biological response, prolonged-releasing performance

临床上化疗药物的毒副作用需要寻找一种新的药物载体。聚电解质胶囊是以胶体颗粒为核心,通过层层自组装制得。由于核壳式胶囊具有球形貌和性质可控、环境友好(大多数为水溶液)、简单且重复性好等优点,作为一种药物载体其具有独特优势^[1,2]。在体外实验中,纳米级的聚电解质胶囊对 pH 值、离子强度、温度等外在条件的变化非常敏感,其囊壁的渗透性也随以上因素的变化而变化。Antipov^[3]等报道其制备的聚电解质胶囊在 pH 为 3.5 的情况下孔径最大,在 pH 为 7 的情况下孔径几乎关闭;Dai^[4]和 Shchukin^[5]等报道其制备的聚电解质胶囊在温度 90°C 或 32°C 的情况下孔径才打开。但对人体内环境系统而言,由于其存在大量酸碱缓冲体系以及三大调节机制, pH 值、离子强度、温度等因素的变化受到限制^[6,7],探索其它有效的控释条件对体内应用有重要的实际意义。

当肿瘤发生时,人体内某些基因异常表达,导致体内某些特异性酶(即肿瘤标志物)浓度升高,这为我们探讨新的控释条件提供了一种方法。本实验利用聚电解质胶囊壁可组装的特点,制备囊壁含有酸性磷酸酶底物的空壳胶囊,对其进行阿霉素药物的封装以及载药胶囊分别与酸性磷酸酶标准品、表达酸性磷酸酶的细胞株作用,对制备生物响应酸性磷酸酶浓度的载药聚电解质胶囊的可行性进行研究,为进行体内生物响应研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及胶囊制备

四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲亚砜(DMSO)

(Sigma), 酸性磷酸酶标准品(Abbott), 酸性磷酸酶染色液(上海太阳生物技术有限公司), Annexin-FITC 凋亡检测试剂盒(BD), 盐酸阿霉素(深圳万乐药业有限公司);其余试剂为国产分析纯。聚电解质(PAH/PSS)胶囊(由本实验室提供,制备方法参见文献[8])。

1.1.1 制备 PSS- β -甘油磷酸酯复合物的水溶液

配制浓度为 2 g/L 的阴离子聚电解质聚 4-苯乙烯磺酸盐(PSS)(含有 0.6 mol/L NaCl)和 β -甘油磷酸酯水溶液 1000 mL,在磁力搅拌下加以混合,继续搅拌 30 min,使其充分混合均匀,制得 PSS- β -甘油磷酸酯复合物的水溶液。

1.1.2 制备(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)胶囊

将 PSS- β -甘油磷酸酯代替原方法中的 PSS 溶液,并参见文献[8],通过层层自组装制得囊壁含有酸性磷酸酶底物的空壳胶囊,即(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)胶囊,囊壁不含有酸性磷酸酶底物的聚电解质(PAH/PSS)胶囊为对照胶囊。

1.2 细胞株

人肝癌细胞株 HepG2、人前列腺癌细胞株 PC3 为中国科学院上海细胞所保存株,鼠成纤维细胞株 3T3、人前列腺癌细胞株 DU145 为上海交通大学医学院细胞生物学实验室所惠赠。

1.3 空壳胶囊的理化性质及其生物相容性测定

1.3.1 透射电镜观察溶解内核前后聚电解质(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)胶囊的形状、粒径等情况

将溶解内核前后的胶囊滴在铜网上,待干,用 PHILIP (荷兰飞利浦公司) CM-120 透射电镜观察。

1.3.2 空壳胶囊与3T3细胞株的MTT试验。

将3T3细胞悬液接种于96孔培养板中, 10、100、200、250、300、500 $\mu\text{g/mL}$ 的6个剂量组, 阳性对照组为0.7%丙烯酰胺, 阴性对照组为DMEM培养液。37°C、5% CO_2 孵育24 h、48 h后, 加入MTT溶液(5 mg/mL), 4 h后, 弃去MTT, 加入DMSO, 摇床上摇匀10 min。置于酶标仪在570 nm下测定每孔溶液的OD值, 计算3T3细胞的相对增殖率。细胞相对增殖率(RGR)=干预因素组OD值/对照组OD值 $\times 100\%$, 按分级标准把值转换成0~IV级, 以评定材料的毒性程度。分级标准如下: RGR $\geq 100\%$ 为0级, 80%~99%为I级, 60%~79%为II级, 30%~59%为III级, 0~29%为IV级^[9]。

1.4 胶囊的阿霉素包封及包封率测定

取不同剂量的聚电解质(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)空壳胶囊分别与100 $\mu\text{g/mL}$ 的阿霉素溶液混合, 且加入0.7 mol/L NaCl调节盐浓度后, 置于振荡器中20°C恒温振荡24 h, 随后高速离心, 取上层清液, 以去离子水为空白, 于490 nm处测定OD值, 计算包封率, 并结合胶囊的生物相容性, 确定最合适的空壳胶囊和阿霉素溶液比值。

1.5 阿霉素载药胶囊与酸性磷酸酶标准品溶液反应

1.5.1 与酸性磷酸酶标准品溶液反应

实验组是阿霉素聚电解质(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)胶囊和酸性磷酸酶标准品溶液混合; 对照组是去离子水取代酸性磷酸酶标准品溶液与胶囊混合。各组分别在不同时间点高速离心取超滤液, 以去离子水为空白对照, 于490 nm处测定OD值并作出阿霉素的释放曲线。

1.5.2 透射电镜观察

通过透射电镜观察反应后胶囊的形状和粒径。

1.6 阿霉素载药胶囊与表达酸性磷酸酶的细胞株作用

1.6.1 HepG2细胞株和DU145细胞株的酶细胞化学染色

文献报道^[10,11], HepG2细胞株表达酸性磷酸酶阳性, DU145细胞株几乎不表达酸性磷酸酶。HepG2细胞和DU145细胞分别用胰酶消化后涂片, 在孵育液中孵育10~30 min(37°C), 用双蒸水洗数次, 甘油明胶封片。孵育液包括 α -萘酚磷酸钠、N,N-二甲基甲酰胺、醋酸盐缓冲液、坚牢蓝B盐、 MnCl_2 、双

蒸水等^[12]。

1.6.2 载药胶囊对HepG2细胞、DU145细胞的生长抑制作用

将HepG2细胞悬液接种于96孔培养板中, 实验组分别加入不同浓度的阿霉素胶囊、阿霉素对照胶囊、游离阿霉素, 对照组用DMEM培养液补足。37°C、5% CO_2 恒温细胞培养箱中孵育12 h、24 h后, 分别取一板, 加入MTT溶液(5 mg/mL), 4 h后, 弃去MTT, 加入DMSO, 摇床上摇匀10 min。置于酶标仪在570 nm下测定每孔溶液的OD值, 计算HepG2细胞12 h和24 h的抑制率。细胞抑制率=(对照组OD值-干预因素组OD值)/对照组OD值 $\times 100\%$ 。DU145细胞的MTT试验同上。

1.6.3 载药胶囊对HepG2细胞凋亡的影响

将HepG2细胞悬液接种于6孔培养板中, 实验组分别加入阿霉素胶囊、阿霉素对照胶囊、游离阿霉素, 对照组用DMEM培养液补足, 分别于3 h、6 h、12 h、24 h收集细胞, 按Annexin-FITC凋亡检测试剂盒说明书提示标记凋亡细胞。用EPICS Profile II型流式细胞仪检测, 观察各组细胞凋亡是否存在凋亡, 检测结果用Cellquest软件分析。

1.7 统计学分析

实验所有数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm S$)表示, SPSS11.0分析, 组间比较采用t检验和方差分析。

2 结果

2.1 聚电解质胶囊(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)的形状和粒径

聚电解质胶囊的TEM照片见图2-a所示。由图可见, 制得的聚电解质胶囊球形度较好, 在溶液中分散均匀, 电镜下测量粒径多在200~300 nm。

2.2 空壳胶囊的生物相容性

聚电解质(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)空壳胶囊与鼠成纤维细胞(3T3细胞)培养24 h、48 h后, 空壳胶囊浓度 $\leq 300 \mu\text{g/mL}$ 的实验组细胞生长状态良好, 细胞数量明显增加, 与阴性对照组无差别。MTT比色法检测, 0.7%丙烯酰胺的阳性对照组毒性为4级, 其OD值明显低于其他组($P < 0.05$); 阴性对照组与 $\leq 250 \mu\text{g/mL}$ 各处理组之间均无显著差异($P > 0.05$), 说明其生物相容性良好, 能够进一步进行体内实验。

2.3 空壳胶囊对阿霉素包封率的测定

不同的空壳(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)胶囊与阿霉素浓度比导致了包封率的不同。在空壳胶囊和阿霉素的浓度比为 1:1 时,包封率为 19.37%,随着其比值逐渐增高,包封率逐渐增加;当空壳胶囊和阿霉素的浓度比>20:1 时,包封率基本不变。

结合胶囊的生物相容性,确定实验中空壳胶囊和阿霉素的浓度比为 20:1,此时胶囊对药物阿霉素的包封率为 68.12%。

2.4 胶囊的载药释放和形态改变

2.4.1 胶囊与酸性磷酸酶标准品溶液反应

室温下,阿霉素胶囊存在着一种称为“初始爆发性释放”的性质。在开始的 2 h 内,阿霉素胶囊和阿霉素对照胶囊分别释放了载药量的 17.97%、13.80%。其后,随着时间的延长,组 1(即阿霉素胶囊组)由于酸性磷酸酶和其胶囊壁上的磷酸脂反应,胶囊壁被破坏,胶囊内的阿霉素释放速率逐渐加快,至 48 h 时释放出载药量的 38.42%,组 2(对照组)仅因为存在浓度梯度,渗透释放阿霉素,至 48 h 时仅释放出略高于 15%的载药量,两者差异具有显著的统计学意义($P<0.05$),胶囊对酸性磷酸酶浓度具有明显的生物响应的控释作用(图 1)。

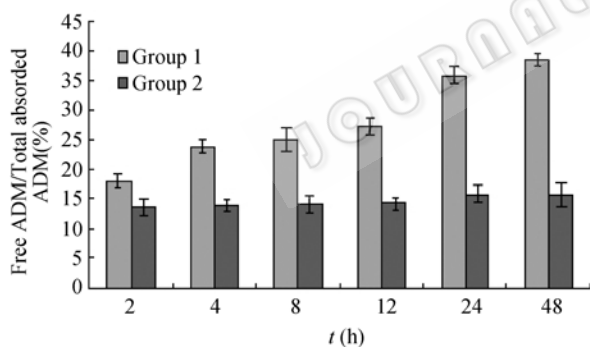


图 1 胶囊和酸性磷酸酶标准品作用后释放的游离阿霉素占总包封阿霉素的量

Fig. 1 The Ratio of free ADM and the total absorbed ADM after the reaction of the nanocapsules to the ACP standard
Group1 is ADM (PAH/PSS- β -glycerophosphoric acid) nanocapsule reacted with ACP; group 2 is ADM (PAH/PSS) nanocapsule reacted with ACP

2.4.2 胶囊的形态变化

实验组的胶囊与酸性磷酸酶反应后,胶囊球形结构几乎被完全破坏,视野中出现“雪花状”物质;对照组的胶囊球形度仍较好,在溶液中分散均匀,与空壳胶囊形状和粒径类似(图 2, A 为实验组,标尺

为 1000 nm; 图 2, B 为对照组,标尺为 500 nm)。

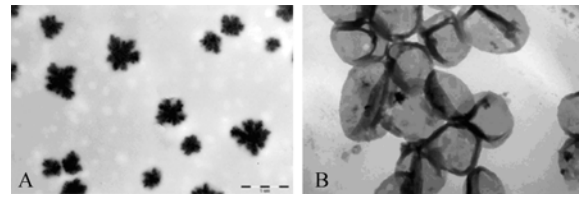


图 2 实验组和对照组反应 48 h 后的电镜照片

Fig. 2 TEM pictures at the 48th hour

A: ADM (PAH/PSS- β -glycerophosphoric acid) nanocapsules reacted with ACP, the scale is 1000 nm; B: ADM (PAH/PSS- β -glycerophosphoric acid) nanocapsules reacted with ddH₂O, the scale is 500 nm

2.5 阿霉素胶囊与表达酸性磷酸酶的细胞株作用

2.5.1 细胞株的酸性磷酸酶染色

在光镜下, HepG2 细胞内反应产物呈现均匀一致的红色沉淀物,呈强阳性分布在细胞浆中(图 3, A),但不存在几乎无磷酸酶分泌的 DU145 细胞中(图 3, B)。

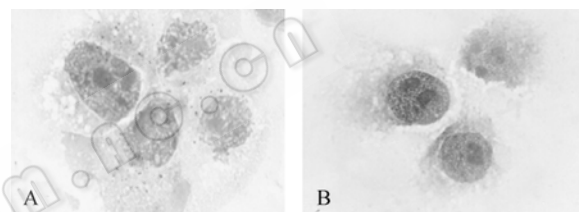


图 3 细胞酶化学反应后的组织学观察(1000×)

Fig. 3 Histological image of cells after ACPase reaction (1000×)

(A) HepG2 cell line (B) DU145 cell line

2.5.2 载药胶囊对 HepG2 细胞、DU145 细胞的生长抑制作用

如表 1 所示, 12 h 时阿霉素载药胶囊和对照载药胶囊其对 HepG2 肝癌细胞生长的抑制率相似, 对肿瘤细胞的抑制率分别为 38.04%和 38.82%, 与游离阿霉素组的接近(44.70%);但在 24 h 时,阿霉素胶囊对 HepG2 肝癌细胞生长的抑制率明显高于对照胶囊组,分别为 64.67%和 41.25%,二者有明显差别($P<0.05$),但其和游离阿霉素组比较无明显差别($P>0.05$)。

在无酸性磷酸酶分泌的细胞实验中,阿霉素胶囊组和对照胶囊组其对 DU145 前列腺癌细胞的生长抑制作用无明显差别(见表 1)。

2.5.3 载药胶囊对 HepG2 细胞凋亡的影响

流式细胞仪分析结果显示,在初始 3 h 时,阿霉素胶囊与游离阿霉素对 HepG2 细胞凋亡的影响分别为 6.12%和 6.02%,两者差异无统计学意义($P>0.05$);

但随着时间的延长, 游离阿霉素对促 HepG2 细胞凋亡的作用在 6 h 后逐渐下降, 而由于阿霉素胶囊存在控释, 24 h 前都能维持一个较高的促凋亡作用, 两者差异具有显著的统计学意义($P<0.05$)。

阿霉素胶囊和对照胶囊分别在 3 h、6 h、12 h、24 h 时对 HepG2 细胞凋亡的影响分别为 6.12 Vs 2.69, 6.96 Vs 4.03, 14.08 Vs 10.7, 13.73 Vs 6.14, 两者差异具有显著的统计学意义($P<0.05$)。

表 1 MTT 法分析二种胶囊对 HepG2 细胞、DU145 细胞生长的影响
Table 1 Influence of two nanocapsules on the HepG2 cell line and DU145 cell line by MTT assay

	<i>t</i> (h)	Growth suppression rate (%)		
		ADM (PAH/PSS-β-glycerophosphoric acid) nanocapsule 6 μg/mL	ADM (PAH/PSS) nanocapsule 6 μg/mL	Free ADM 10 μg/mL
HepG2 cell	12	38.04	38.82	44.70
	24	64.67	41.25	61.01
DU145 cell	12	36.73	36.34	17.86
	24	49.70	49.70	45.18

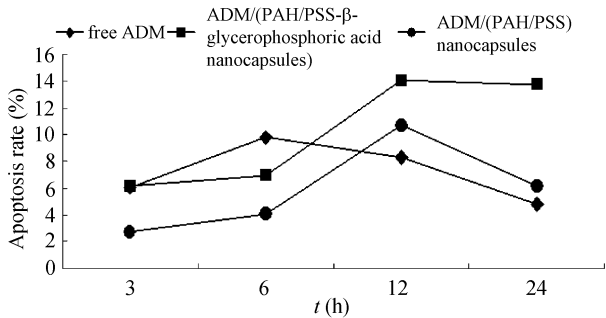
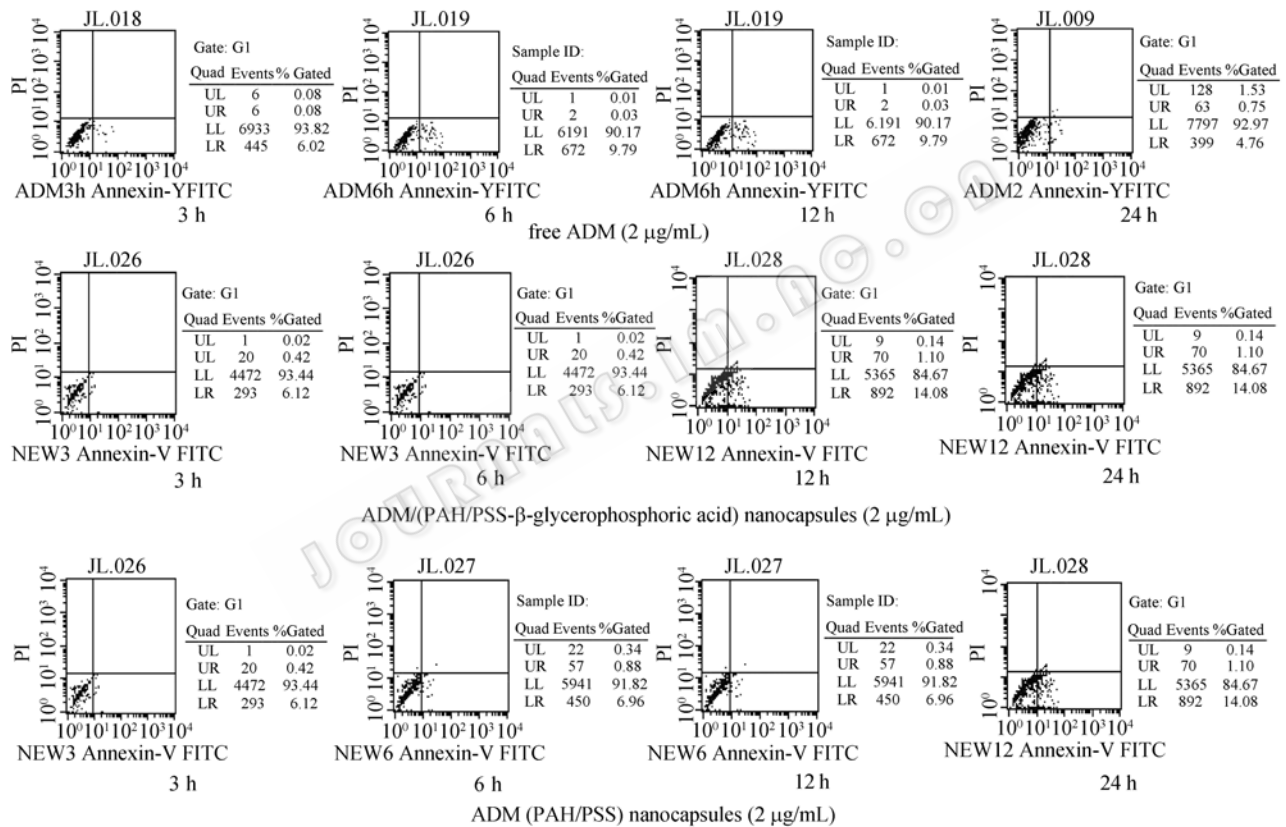


图 4 流式细胞仪分析不同干预因素对 HepG2 细胞凋亡的影响
Fig. 4 Influence of different factors on HepG2 cell apoptosis analysed by flow cytometer

3 讨论

本研究中,根据文献[8]的方法,PSS- β -甘油磷酸酯溶液代替原方法中的 PSS 溶液,以明胶颗粒为核心,通过层层自组装的方法制备出(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)纳米级胶囊。通过电镜观察到胶囊的球形度良好,粒径多在 200~300 nm 之间,在溶液中分散比较均匀。文献报道^[15], (PAH/PSS)此类型的聚电解质不能进行生物降解,影响生物相容性。本研究通过空壳(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)胶囊与鼠成纤维细胞(3T3)的培养实验证明,该胶囊浓度 $\leq 300 \mu\text{g/mL}$ 时,3T3 细胞生长状态良好,细胞数目增加,说明空壳(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)胶囊在某一浓度范围内的生物相容性良好,可以进行体内实验。

在纳米胶囊制备过程中包裹药物或在溶液中吸附药物均是常用的载药方法,影响包封率的因素包括材料性质、药物性质、pH、药物浓度以及聚合物浓度等^[13]。本研究采用后一种包封方法中的浓度梯度渗透法包封药物。由于不同的(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)纳米级胶囊浓度与阿霉素浓度比导致了药物的包封率不同,当两者比值 $>20:1$ 时,胶囊对阿霉素的包封率基本不变,维持在 60%~70%。所以在此基础上,并结合胶囊的体外细胞相容性实验,确定最合适的空壳胶囊和阿霉素溶液比值为 20:1,并调节溶液的 pH 值和盐浓度,此时胶囊对阿霉素的包封率可达 68.12%。这与文献报道的此类聚电解质药物包封 60.74%基本一致^[14]。

本研究中,通过包封阿霉素的(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)胶囊与酸性磷酸酶标准品作用,证明囊壁成份中的磷酸酯确能与酸性磷酸酶反应,释放出胶囊内包封的阿霉素。随着时间的延长,囊壁破裂程度逐渐增加,药物阿霉素的释放量逐渐增多;反应后,实验组与对照组的电镜照片也证明了在酸性磷酸酶的作用下,聚电解质胶囊囊壁被完全破坏,聚电解质残体 PAH、PSS 正、负电荷相互吸引,并夹带反应后的残留物,聚集成“雪花”状,这样胶囊内包封的药物释放更充分,解体后的聚电解质残体体积变小,在体内更利于代谢,可提高其与机体的生物相容性。包封阿霉素的(PAH/PSS- β -甘油磷酸酯)胶囊和包封阿霉素的(PAH/PSS)胶囊分别与表达酸性磷酸酶的 HepG2 细胞株作用,前者因囊壁含有磷

酸酯成分,与 HepG2 细胞表达的酸性磷酸酶反应,对细胞的生长抑制率和凋亡率明显高于对照组;两种胶囊分别与无酸性磷酸酶表达的 DU145 细胞反应,对 DU145 细胞的生长抑制率和无统计学意义上的差异。因此,本研究初步证实了此胶囊能受肿瘤标志物浓度的调控,具有优良的智能化体外控释能力。

利用肿瘤标志物作为聚电解质胶囊的控释条件,为寻找新的控释条件提供了一种新思路。一方面,随着聚电解质材料的进展,可以采用具有良好生物相容性、生物降解、生物粘结性能的材料来制备聚电解质胶囊,如壳聚糖/海藻酸钠微囊^[15];另一方面,随着肿瘤分子靶向药物的研究^[16],可以在聚电解质胶囊的囊壁中加入与抗原特异性更高的抗体,胶囊包封化疗药物,进一步完善智能化控释体系,达到优良的体内控释,为临床上的恶性肿瘤及一些良性疾病的治疗提供新方法。

REFERENCES

- [1] Radtchenko IL, Sukhorukov GB, Leporatti S, et al. Assembly of alternated multivalent ion/polyelectrolyte layers on colloidal particles. Stability of the multilayers and encapsulation of macromolecules into polyelectrolyte capsules. *J Colloid Interface Sci*, 2000, **230**(2): 272–280.
- [2] Yang XL, Zhu YH. Layer-by-layer (LBL) self-assembled with colloid template. *J Chem*, 2003, **66**: 1–7.
杨晓玲, 朱以华. 以胶粒为模板的静电自组装. 化学通报, 2003, **66**: 1–7.
- [3] Antipov AA, Sukhorukov GB. Polyelectrolyte multilayer capsules as vehicles with tunable permeability. *Adv Colloid Interface Sci*, 2004, **29**(111): 49–61.
- [4] Dai Z, Dähue L, Möhwald H, et al. Novel capsules with high stability and controlled permeability by hierarchic templating. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, **41**(21): 4019–4022.
- [5] Shchukin DG, Sukhorukov GB, Möhwald H. Smart inorganic/organic nanocomposite hollow microcapsules. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003, **42**(37): 4472–4475.
- [6] Yang XL, Han X, Zhu Y. (PAH/PSS)5 microcapsules templated on silica core: encapsulation of anticancer drug DOX and controlled release study. *Colloid Surf A*, 2005, **264**: 49.
- [7] Bromberg L. Intelligent polyelectrolyte and gels in oral drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol*, 2003, **4**(5): 339–349.
- [8] Zhu YH, Yang XL, Li PY, et al. From layer-by-layer assembled core-shell particles to medical/biochemical diagnostics and drug delivery. *Prog in Chem*, 2003, **15**(6): 512–517.
朱以华, 杨晓玲, 李培勇, 等. 从层层组装的核壳粒子

- 到医学/生物化学诊断和药物输送. 化学进展, 2003, 15(6): 512-517.
- [9] Rogero SO, Malmonge SM, Lugão AB, *et al.* Biocompatibility study of polymeric biomaterials. *Artif Organs*, 2003, 27 (5): 424-427.
- [10] Panara F, Guiderdone S, Pellegrini M, *et al.* Acid phosphatase and zinc ion-dependent acid phosphatase expression in normal human liver and in HepG2 (human hepatocellular carcinoma) cell line. *Cytosbios*, 1998, 94 (376): 111-119.
- [11] Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, *et al.* Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer*, 1978, 21(3): 274-281.
- [12] Lewis PR, Knight DP. *Cytochemical Staining Methods for Electron Microscopy*. New York: Amsterdam Elsevier Science Publishers, 1992, 147.
- [13] Zhang YD. *Nano Pharmacology*. Beijing: Chemistry and Industry Press, 2006, 47.
- 张阳德主编. 纳米药理学. 北京: 化学工业出版社, 2006, 47.
- [14] Yang XL, Han X, Da H, *et al.* Fabrication of magnetic polyelectrolyte dextrorubicin hydrochloride capsules templated on colloidal particles. *J of East China Univ of Sci and Tech (Natural Science Edition)*, 2006, 32(5): 568-601.
- 杨晓玲, 韩霄, 答鸿, 等. 以胶体粒子为模板制备含磁药物胶囊. 华东理工大学学报(自然科学版), 2006, 32(5): 568-606.
- [15] Hiller S, Leporatti S, Schnäkel A, *et al.* Protamine assembled in multilayers on colloidal particles can be exchanged and released. *Biomacromolecules*, 2004, 5(4): 1580-1587.
- [16] Cong CS, Yu YH. Therapeutic response and adverse reaction of molecular targeted therapy of tumor. *J Int Oncol*, 2007, 34(9): 654-657.
- 丛昌盛, 于甬华. 肿瘤分子靶向治疗疗效及不良反应. 国际肿瘤学杂志, 2007, 34(9): 654-657.

2008 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动



《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。

《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。

《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 全年定价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。

《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80.00 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472, CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。

欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄

汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401

收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn

请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

欲知详细信息请查看如下网址: <http://journals.im.ac.cn>