

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.09.1076

透明质酸修饰的尿酸酶脂质体的制备及特性

谢江川¹, 何丹¹, 胡雪原¹, 周云莉¹, 晏子俊¹, 陈薇², 张景勍^{1*}

1. 重庆医科大学药物高校工程研究中心, 重庆 400016

2. 重庆市中医院药剂科, 重庆 400021

[摘要] **目的** 制备透明质酸修饰的尿酸酶脂质体(hyaluronic acid-uricase liposomes, UHLP), 并对尿酸酶(uricase, UC)和UHLP的体外活性及稳定性进行研究。**方法** 采用逆向蒸发法制备UHLP, 测定UHLP的包封率、粒径与zeta电位, 用透射电镜对UHLP进行观察。考察游离UC和UHLP中UC的最适温度和最适pH, 还考察了其热稳定性、贮存稳定性、酸碱稳定性、抗胰蛋白酶水解能力以及抗部分金属离子和有机化合物能力, 并对UHLP提高UC活性的机制进行了初步研究。**结果** UHLP的平均包封率为 $(57.27 \pm 3.93)\%$ ($n=3$), 平均粒径为 (322.6 ± 8.2) nm ($n=3$), zeta电位为 (-19.4 ± 1.7) mV ($n=3$)。透射电镜下UHLP呈分布均匀的圆形或椭圆形。游离UC和UHLP中UC最适温度均为 40°C ; 游离UC最适pH为8.5, UHLP中UC最适pH为8.0。稳定性结果显示, UHLP中UC的热稳定性、贮存稳定性、酸碱稳定性、抗胰蛋白酶水解能力以及抗部分金属离子和有机化合物能力均优于游离UC。UHLP提高UC活性机制初步研究结果表明, UC经UHLP包裹后其活性发生改变, 和UC与UHLP脂质膜的相互作用有关, 它们在相互作用的过程中使UC的构象发生翻转, 构效发生改变, UC活性中心暴露, 从而导致其活性增强。**结论** UHLP不仅能提高UC在体外的活性, 还能提高UC在体外的稳定性。

[关键词] 尿酸酶; 透明质酸; 脂质体; 稳定性

[中图分类号] R 943.42

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)09-1076-06

Preparation and characterization of hyaluronic acid-uricase liposomes

XIE Jiang-chuan¹, HE Dan¹, HU Xue-yuan¹, ZHOU Yun-li¹, YAN Zi-jun¹, CHEN Wei², ZHANG Jing-qing^{1*}

1. Medicine Engineering Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Pharmacy, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China

[Abstract] **Objective** To prepare hyaluronic acid-uricase liposomes (UHLP) and to investigate the activity and stability of UHLP and uricase (UC) *in vitro*. **Methods** UHLP was prepared using reverse-phase evaporation and observed by transmission electron microscopy. The entrapment efficiency, particle size and zeta potential of UHLP were detected. The physical and chemical properties of UC in free UC and UHLP, including the optimum pH and temperature, thermal stability, storage stability, pH stability, stability to trypsinase, and stability to metal ions and organic compounds, were examined. In addition, the mechanism by which UHLP promotes UC activity was also explored. **Results** The mean entrapment efficiency of UHLP was $(57.27 \pm 3.93)\%$ ($n=3$), mean particle size was (322.6 ± 8.2) nm ($n=3$), and mean zeta potential was (-19.4 ± 1.7) mV ($n=3$). UHLP was round or oval in shape and was evenly distributed under transmission electron microscopy. The optimum temperature of UC in UHLP and free UC was 40°C , and the optimum pH values of UC in UHLP and free UC was 8.0 and 8.5, respectively. Thermal stability, storage stability, pH stability, stability to trypsin and stability to metal ions and organic compounds of UC in UHLP were better than those in free UC. The envelopment of UC with UHLP increased the activity of UC by reversing conformation and exposing active center of UC. **Conclusion** UHLP can not only enhance the activity but also improve the stability of UC *in vitro*.

[Key words] uricase; hyaluronic acid; liposomes; stabilities

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(9): 1076-1081]

[收稿日期] 2015-09-05 **[接受日期]** 2015-12-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30973645), 重庆市首批高等学校优秀人才资助计划. Supported by National Natural Science Foundation of China (30973645) and the First Batch Outstanding Talent Project of Higher Education in Chongqing.

[作者简介] 谢江川, 硕士生. E-mail: 987168036@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485161, E-mail: zjqrae01@163.com

尿酸是嘌呤代谢的产物,血液中过量积累尿酸会使尿酸单钠结晶沉积在远端关节周围相对缺乏血管的组织中,从而导致痛风性关节炎^[1-2]。尿酸酶(uricase, UC)可催化氧气和尿酸生成尿囊素、二氧化碳和过氧化氢^[3]。由于人体缺乏 UC,只能将尿酸作为终产物由肾脏排出体外。在临床上,UC 主要用于尿酸水平的诊断和与尿酸水平升高相关疾病的治疗^[3]。但是 UC 半衰期短、生物利用度低、稳定性差,大大限制了其临床使用^[3]。

脂质纳米粒(lipid nanoparticles, LP)是一种定向药物载体,属于靶向给药系统。它具有生物膜相似性,能提高被封装药物的稳定性,降低药物不良反应,降低免疫原性,提高药物生物利用度,并兼具靶向和缓释的作用^[4]。透明质酸(hyaluronic acid, HA)可靶向到 HA 受体 CD44 和 CD168,减少炎症细胞的数量,调整细胞因子的表达,对痛风性关节炎组织起保护作用^[5-7]。HA 还可通过促进内源性 HA 合成来改善病理性关节液的性状,达到持续缓解痛风性关节炎症状、延缓痛风性关节炎病情的作用^[8-11]。

本研究拟将 UC 制备成 HA 修饰的 UC 脂质体(hyaluronic acid-uricase liposomes, UHLP),不仅希望能提高 UC 的活性和治疗效果;而且希望 UC 脂质体(uricase liposomes, ULP)经 HA 修饰后,在降低体内尿酸水平的同时能够靶向到 HA 受体 CD44 和 CD168,减少炎症细胞的数量,起到保护关节和抗炎的作用。文献报道的 UC 剂型有 PEG 化 UC、ULP^[12]、UC 及过氧化氢酶复合脂质体等^[13-15]、白蛋白包裹在 HA 修饰的 LP^[16]。将 UC 包载于 UHLP 中尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料 产假假丝酵母 UC(美国 Sigma-Aldrich 公司);尿酸(英国 Alfa Aesar 公司);大豆卵磷脂(德国 Lucas Meyer 公司);胆固醇(广州天马精细化工厂);胰蛋白酶、PEG2000(国药集团化学试剂有限公司);HA(曲阜市广龙生物制品厂,平均相对分子质量:12 000,纯度>99.0%,批号:20131027);1-乙基-3-[3-(二甲氨基)丙基]碳化二亚胺盐酸盐(成都格雷西亚化学技术有限公司);D-山梨醇、吐温-80(成都市科龙化工试剂厂);氯化钾(重庆北碚化学试剂厂);Bicine(美国 Amresco 公司);硼酸、氟化钠(重庆博艺化学试剂有限公司);硼砂(江苏强盛化工有

限公司);其余试剂均为分析纯。

1.2 UHLP 的制备 称取适量的卵磷脂和胆固醇溶于氯仿中,在旋转蒸发仪上挥干氯仿,形成均匀的薄膜;加入乙醚及 pH 8.5 的 Bicine-NaOH 缓冲液(含 UC),在水浴型超声仪上超声至形成均匀分散体系。将此体系在旋转蒸发仪上除去乙醚,最后形成均匀的乳白色混悬液,经 0.22 μm 滤膜过滤即得 ULP。将含适量 HA 的 Bicine-NaOH 溶液在 pH 6.0 条件下用 1-乙基-3-[3-(二甲氨基)丙基]碳化二亚胺盐酸盐在 37℃ 孵育预活化。将已激活的 HA 加入到 ULP 溶液中,调节 pH 为 8.5 并在 37℃ 条件下与 ULP 孵化。离心后取沉淀,用 pH 8.5 的 Bicine-NaOH 洗涤即可^[17-18]。

1.3 UC 活性测定方法的建立 用硼酸-硼砂缓冲液(pH 8.5, 50 mmol/L)配制得到 75 μmol/L 尿酸溶液,即为测定 UC 活性的底物。参照王娜等^[13]的方法测定 UC 的活性。在 1.18 mL 尿酸溶液中加入 20 μL 的 UC 和 20 μL UHLP 破乳后的上清液,然后在 293 nm 处测定相应的紫外吸收变化值。

1.4 UHLP 特性的考察 包封率:采用凝胶柱分离-考马斯亮蓝法^[16]测定包封率。吸取 0.5 mL 的 UHLP,上 Sephadex G-200 层析柱,用 Bicine-NaOH 缓冲液(pH 8.5, 50 mmol/L)洗脱分离 UHLP 和 UC。收集 UHLP 部分,取 100 μL,加入乙醚破乳后再加入考马斯亮蓝,在 595 nm 波长处测定光密度(D_{UHLP})值;以同法处理未过柱的 UHLP,测定光密度($D_{总}$)值。包封率(%) = $D_{UHLP}/D_{总} \times 100\%$,重复 3 次。

粒径和 zeta 电位:取 0.5 mL 的 UHLP,加入 4.5 mL 的 Bicine-NaOH(pH 8.5, 50 mmol/L)稀释后,混匀,立即在 25℃ 下用激光粒度电位仪测定粒径和 zeta 电位。

透射电镜观察:UHLP 稀释 10 倍,用带支持膜的铜网滴片。滴加 1 滴 1% 的磷钨酸,染色数分钟后用滤纸吸干染液。在 37℃ 下干燥 0.5 h 后上机观察。

最适温度:将尿酸溶液分别在 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃ 和 70℃ 水浴条件下预热 10 min 后,在室温(25℃)条件下分别测定游离 UC 和 UHLP 中 UC 的活性。最适 pH:将 pH 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 的尿酸溶液在酶的最适温度条件下预热 10 min 后,测定游离 UC 和 UHLP 中 UC 的活性。热稳定性:取 UC 和 UHLP 各 2 mL,分别放置于 55℃ 的水浴中,于 0、1、2、3、4 和 5 h 时分别取样,

测定游离 UC 和 UHLP 中 UC 的活性。贮存稳定性:将 UC 和 UHLP 放置于 4℃ 的冰箱中,于第 0、5、10、15、20 天时分别取样,测定游离 UC 和 UHLP 中 UC 的活性。酸碱稳定性:取 UC 和 UHLP,分别用 pH 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、8.0、9.5 的 Bicine-NaOH 缓冲液稀释后,于 40℃ 水浴条件下放置 40 min,取出并测定游离 UC 和 UHLP 中 UC 的活性。抗胰蛋白酶水解能力:分别取 1 mL UC 和 UHLP 混悬液,加入 Bicine-NaOH 缓冲液溶解的胰蛋白酶溶液稀释,混合均匀后放置于 37℃ 的水浴中,在 0、10、20、30、40、50、60 min 时分别取出并测定游离 UC 和 UHLP 中 UC 的活性。抗部分金属离子和有机化合物能力:取 UC 和 UHLP,分别加入等量的 D-山梨醇、吐温-80、氯化钾、氟化钠、PEG2000 混匀,在 25℃ 条件下放置 1 h 后,取出并测定游离 UC 和 UHLP 中 UC 的活性。

1.5 UHLP 提高 UC 活性机制的初步研究

1.5.1 UC 与脂质膜的相互作用 精密称取 1 mg UC 溶解于 10 mL 的 Bicine-NaOH 缓冲液 (pH 8.5, 50 mmol/L) 中,按 1.2 项下方法制备 UHLP 和空白 UHLP (不加入 UC)。分别取 UC、UHLP 和空白 UHLP 与 Bicine-NaOH (pH 8.5, 50 mmol/L) 溶解的异硫氰酸荧光素 (FITC) 溶液混合后,避光孵化 5 min。在激发波长为 480 nm、发射波长 500~600 nm 的条件下,25℃ 恒温扫描其荧光发射图谱。

1.5.2 UC 构象改变 取 UC,分别在 25℃、55℃ 下孵化 3 h,取上层液与 FITC 的 Bicine-NaOH 溶液 (pH 8.5, 50 mmol/L) 混合,在激发波长为 480 nm、发射波长 500~600 nm 下检测其荧光强度。取 UHLP,分别在 25℃、55℃ 下孵化 3 h,在 25℃、55℃ 下提取 UC,取上层液与 FITC 的 Bicine-NaOH 溶液 (pH 8.5, 50 mmol/L) 混合,同法检测其荧光强度。

1.5.3 UC 构效改变 取游离 UC,用氯仿提取 UHLP 中的 UC,在激发波长为 280 nm、发射波长为 200~400 nm 的条件下,25℃ 恒温扫描其荧光发射图谱。

2 结果

2.1 UHLP 的包封率、粒径及 zeta 电位 制备 3 批 UHLP,经检测,平均包封率为 (57.27 ± 3.93)% (n=3),平均粒径为 (322.6 ± 8.2) nm (n=3),zeta 电位为 (-19.4 ± 1.7) mV (n=3)。UHLP 的粒径分布和 zeta 电位见图 1。

2.2 UHLP 的透射电镜图 电镜下观察到所制备的 UHLP 呈分布均匀的圆形或椭圆形,见图 2。UC 形成的脂质体表面附着一圈 HA,说明 HA 已成功地在脂质体表面。

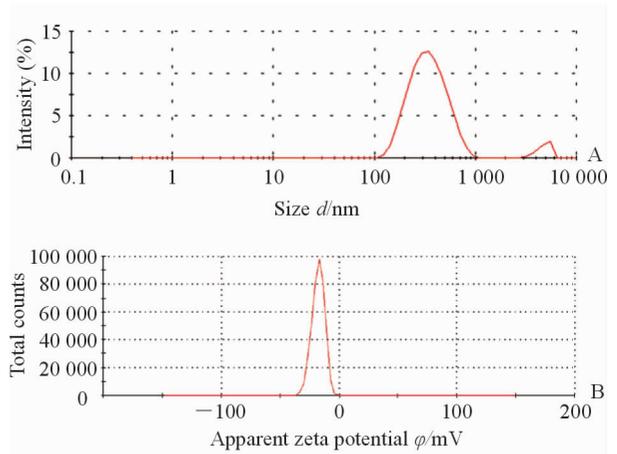


图 1 UHLP 的粒径分布图(A)和 zeta 电位分布图(B)
Fig 1 Particle size distribution profiles (A) and zeta potential profiles (B) of UHLP
UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes

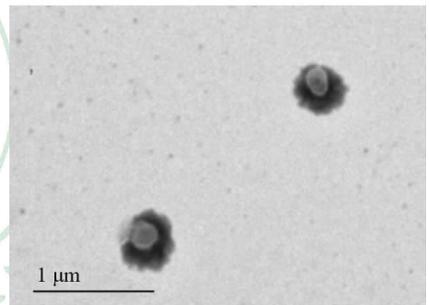


图 2 UHLP 的透射电镜图

Fig 2 The transmission electron photomicrograph of UHLP
UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes

2.3 最适温度的测定结果 UHLP 和 UC 最适温度皆为 40℃,UHLP 在其最适温度时的 UC 活性约是游离 UC 在其最适温度时活性的 1.09 倍。UHLP 在温度 20~70℃ 时的活性均较游离 UC 高,且在 40~50℃ 条件下比游离 UC 在最适温度下的活性高,此时 UC 和 UHLP 中 UC 活性主要受温度的影响。见图 3。

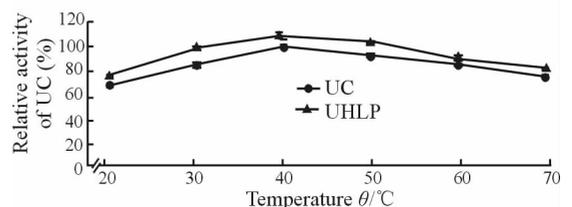


图 3 游离 UC 和 UHLP 的最适温度

Fig 3 Optimum temperature of UC in free UC and UHLP
UC: Uricase; UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes, n=3, x̄ ± s

2.4 最适 pH 的测定结果 在 37℃、pH 6.5~9.5 时,UHLP 和 UC 的最适 pH 值分别为 8.0 和 8.5。UHLP 在其最适 pH(pH=8.0)时的 UC 活性约是游离 UC 在其最适 pH(pH=8.5)时活性的 1.12 倍。UHLP 和游离 UC 在 pH 8.5 时的 UC 活性较为接近,pH 6.5~8.0 间 UHLP 中 UC 的活性较游离 UC 高。结果表明在 37℃ 条件下经过纳米粒修饰的 UHLP 能明显提高 UC 的活性,此时游离 UC 和 UHLP 中 UC 活性主要受 pH 值的影响。UHLP 和 UC 表现出不同的最适 pH,可能是因为 UHLP 包裹改变了 UC 的构象,对 UC 的生物活性带来了一定的影响。见图 4。

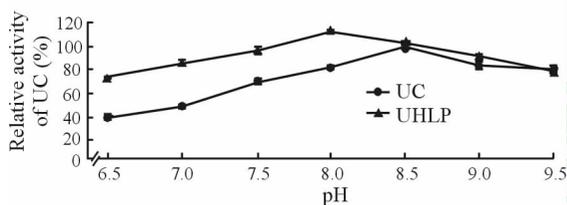


图 4 游离 UC 和 UHLP 的最适 pH

Fig 4 Optimum pH of UC in free UC and UHLP

UC: Uricase; UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.5 热稳定性的测定结果 在相同条件下,UHLP 表现出了较好的热稳定性。UC 活性降到 90% 需要约 0.6 h,而 UHLP 中 UC 活性降到 90% 需要约 1.8 h;在 5 h 时游离 UC 只保留了不到初始活性的 20%,UHLP 中 UC 保留的活性高达 70%。结果说明 UHLP 中 UC 的热稳定性优于游离 UC。见图 5。

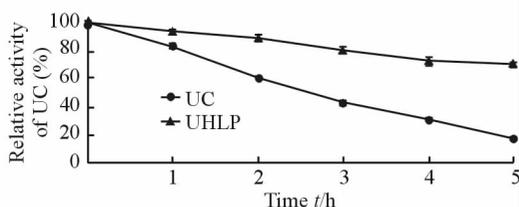


图 5 游离 UC 和 UHLP 在 55℃ 条件下的热稳定性

Fig 5 Thermal stability of UC in free UC and UHLP at 55°C

UC: Uricase; UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.6 贮存稳定性的测定结果 在相同条件下,UHLP 表现出了更好的贮存稳定性。游离 UC 活性降到 90% 需要约 1.42 d,UHLP 中 UC 活性降到 90% 需要约 2.79 d;游离 UC 活性降到 50% 需要约 12.04 d,UHLP 放置 20 d 后,其 UC 活性约为初始活性的 68%。结果说明 UHLP 中 UC 的贮存稳定性好于游离 UC。见图 6。

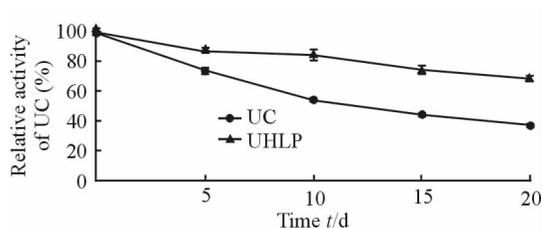


图 6 游离 UC 和 UHLP 在 4℃ 条件下的贮存稳定性

Fig 6 Storage stability of UC in free UC and UHLP at 4°C

UC: Uricase; UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.7 酸碱稳定性的测定结果 在 pH 5.0~9.0 条件下,UHLP 中 UC 的活性比游离 UC 的活性高。根据变化趋势可以看出游离 UC 的活性比 UHLP 中 UC 更容易受到 pH 变化的影响。本结果表明 UHLP 较 UC 有更好的耐溶液酸碱变化的能力。见图 7。

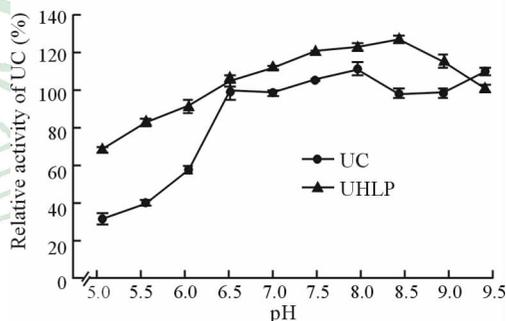


图 7 游离 UC 和 UHLP 的酸碱稳定性

Fig 7 pH stability of UC in free UC and UHLP

UC: Uricase; UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.8 抗蛋白酶水解能力的测定结果 在蛋白酶作用下,游离 UC 的活性呈快速下降的趋势:游离 UC 活性降至 90% 所需的时间约为 3.8 min;活性降至 50% 所需的时间约为 22.8 min。同等条件下,UHLP 中 UC 活性降至 90% 所需的时间约为 7.3 min;直到 50.0 min,UHLP 仍有 69% 的活性。结果表明 UHLP 中 UC 的抗蛋白酶水解能力优于游离 UC。见图 8。

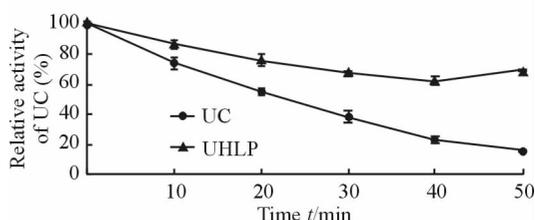


图 8 游离 UC 和 UHLP 抗胰蛋白酶水解的稳定性

Fig 8 Trypsinase stability of UC in free UC and UHLP

UC: Uricase; UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.9 抗部分金属离子和有机化合物能力的测定结果 加入氟化钠后,UC 活性保留为约 94%,UHLP

中 UC 活性约为 103%；加入 PEG2000 后，UC 活性保留为约 97%，UHLP 中 UC 活性降低至约 75%；D-山梨醇、吐温-80、氯化钠对 UHLP 及 UC 影响不大。见图 9。

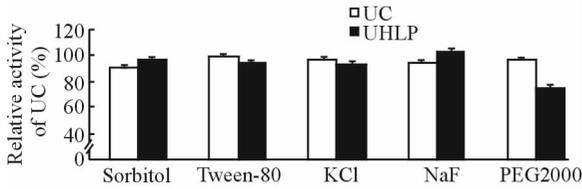


图 9 部分金属离子和有机化合物对游离 UC 和 UHLP 的活性影响

Fig 9 Effect of several metal ions and organic compounds on activity of UC in free UC and UHLP

UC: Uricase; UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.10 UHLP 活性提高机制的初步研究

2.10.1 UC 与脂质体膜作用实验结果 空白 UHLP 的荧光强度最小，可能是由于其 zeta 电位为负，导致 FITC 与 UHLP 之间出现静电排斥现象；UHLP 的荧光强度增加，表明 UC 可能与 FITC 竞争性结合脂质体膜，由此可以推测，UC 与 UHLP 的相互作用可能同时存在于 UHLP 内部和外部的表面区域。见图 10。

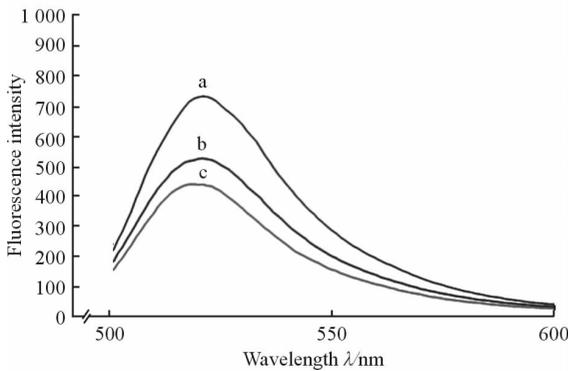


图 10 荧光图谱

Fig 10 FITC fluorescence spectrum

a: UC; b: UHLP; c: Blank UHLP. UC: Uricase; UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes

2.10.2 UC 构象改变实验结果 在对 UC 构象改变的考察中，UC(25℃)的荧光强度为 784.2，UC(55℃)的荧光强度为 532.9，两者的差值为 251.3；UHLP(25℃)的荧光强度为 731.6，UHLP(55℃)的荧光强度为 719.7，两者的差值为 11.9。经过高温处理后的 UHLP 和游离 UC 的荧光强度相比处理前均明显下降，说明高温条件对酶的结构有所改变。但是，UHLP 和游离 UC 荧光强度变化不同，由此可以推测 UC 与 UHLP 的脂质体膜有一定的相互作用，UHLP 脂质体膜对 UC 有一定的保护作用，

这也可以说明为什么 UHLP 的热稳定性优于游离 UC。见图 11。

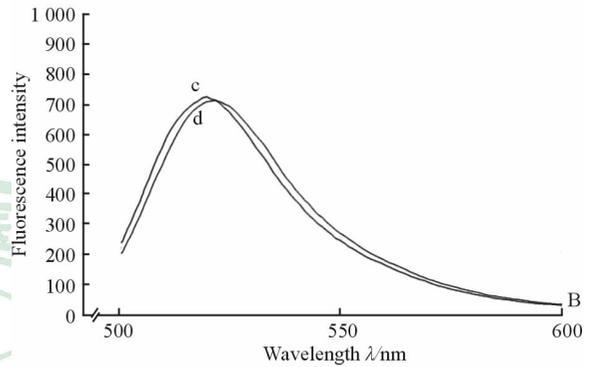
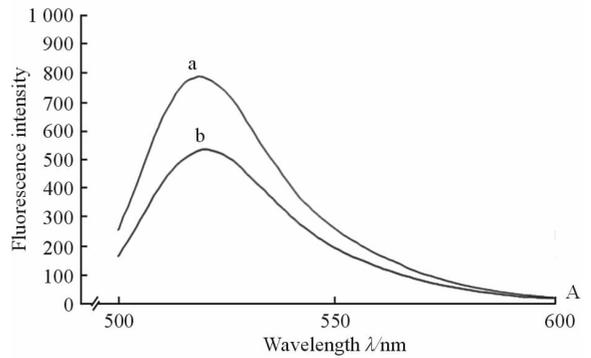


图 11 UC(A)和 UHLP(B)在 25℃和 55℃时的荧光强度
Fig 11 Fluorescence intensity of UC (A) and UHLP (B) at 25℃ and 55℃

a: UC (25℃); b: UC (55℃); c: UHLP (25℃); d: UHLP (55℃). UC: Uricase; UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes

2.10.3 UC 构效改变实验结果 UHLP 中的 UC 在 280 nm 处的吸收强于游离 UC，说明 UHLP 中 UC 的酪氨酸数量多于游离 UC。由此可以推测，UC 经 UHLP 包裹后在相同条件下活性高于游离 UC 与酪氨酸数量有关，酪氨酸数量越多，其活性越强。见图 12。

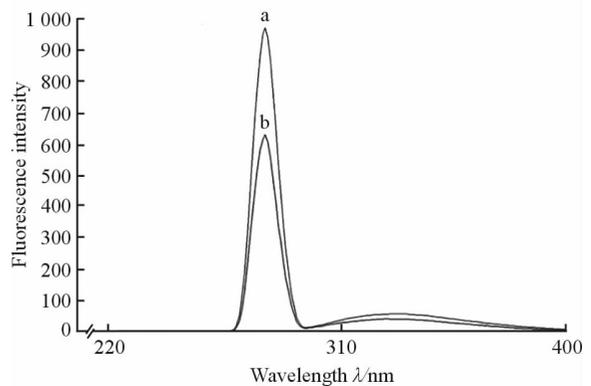


图 12 UC 和 UHLP 在 280 nm 处的荧光强度

Fig 12 Fluorescence intensity of UC in free UC and UHLP at 280 nm

a: UHLP; b: UC. UC: Uricase; UHLP: Hyaluronic acid-uricase liposomes

3 讨论

本实验测定了 UC 和 UHLP 的最适温度、最适 pH,结果表明 UHLP 中 UC 与游离 UC 相比能更有效地发挥酶促反应。而测定酸碱稳定性、部分金属离子及有机化合物对活性等的影响的目的在于考察制剂与游离酶相比是否能够提高体外稳定性。热稳定性的结果表明,UC 被包封在 UHLP 中以后对抗外界温度变化的能力明显增强,即在相同的条件下 UHLP 较 UC 表现出了更好的热稳定性,在加热条件(55℃)和贮存条件(4℃)下,UHLP 也均能很好地保持 UC 的活性。酸碱稳定性的结果充分说明,UHLP 能很好地保护 UC 免受外界 pH 变化的干扰。抗酶解能力的结果也可充分说明,UHLP 能很好地保护 UC 免受蛋白酶的破坏。

本实验利用 FITC 能与蛋白质中氨基酸(主要是酪氨酸)结合的原理^[16],通过将 FITC 与 UC 结合从而使 UC 有一定的荧光强度。UHLP 提高 UC 活性机制的初步研究的实验结果表明:UC 经 UHLP 包裹后其活性发生了改变,原因与 UC 同 UHLP 脂质体膜的相互作用有关,它们的相互作用使 UC 的构象发生翻转,构效发生改变,UC 活性中心暴露,从而导致其活性增强。通过测定酪氨酸的荧光强度来考察 UC 的构效,利用酪氨酸含量与其荧光吸收强度成正比的关系,当荧光强度越强时表明此时溶液体系中酪氨酸的含量越多^[18-19]。由本实验数据可看出,UHLP 有增强 UC 活性和提高 UC 体外稳定性的优点,本实验为 UC 纳米粒的体内研究奠定了良好的基础。

【参考文献】

[1] SAKAI H, TSUTAMOTO T, TSUTSUI T, TANAKA T, ISHIKAWA C, HORIE M. Serum level of uric acid, partly secreted from the failing heart is a prognostic marker in patients with congestive heart failure[J]. *Circ J*, 2006, 70: 1006-1011.

[2] KRISHNAN E, KWONG C K, SCHUMACHER H R, KULLER L. Hyperuricemia and incidence of hypertension among men without metabolic syndrome[J]. *Hypertension*, 2007, 49: 298-303.

[3] FREITAS D S, SPENCER P J, VASSÃO R C, ABRAHÃO-NETO J. Biochemical and biopharmaceutical properties of PEGylated uricase[J]. *Int J Pharm*, 2010, 387(1/2): 215-222.

[4] CUI Y, WU Z, LIU X, NI R, ZHU X, MA L, et al. Preparation, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of liposomes containing *Brucea javanica* oil[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2010, 11: 878-884.

[5] HUANG M H, YANG R C, LEE C L, CHEN T W, WANG M C. Preliminary results of integrated therapy for patients with knee osteoarthritis[J]. *Arthritis*

Rheum, 2005, 53: 812-820.

[6] MORELAND L W. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action[J]. *Arthritis Res Ther*, 2003, 5: 54-67.

[7] ASARI A, MIYAUCHI S, MATSUZAKA S, ITO T, KOMINAMI E, UCHIYAMA Y. Molecular weight dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium[J]. *Arch Histol Cytol*, 1998, 61: 125-135.

[8] GHOSH P. The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 1994, 12: 75-82.

[9] YASUI T, AKATSUKA M, TOBETTO K, HAYAISHI M, ANDO T. The effect of hyaluronan on interleukin-1 α -induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells [J]. *Agents Actions*, 1992, 37(1/2): 155-156.

[10] MONFORT J, NACHER M, MONTELL E, VILA J, VERGES J, BENITO P. Chondroitin sulfate and hyaluronic acid (500-730 kDa) inhibit stromelysin-1 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes [J]. *Drugs Exp Clin Res*, 2005, 31: 71-76.

[12] 张 枚,杨 林,周云莉,邓 雪,张景勍. 脂质纳米粒提高尿酸氧化酶体外稳定性的初步研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39: 1452-1455.

[13] 王 娜,赵春景,黄开顺,滕永真,张景勍. 产朊假丝酵母尿酸酶脂质纳米粒的制备及其药效学特性分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26: 1147-1150.

[14] 张 纯. 尿酸酶的聚乙二醇修饰及其成药性的初步评价[D]. 重庆:重庆医科大学, 2011.

[15] 周云莉,杨 林,吴建勇,张永红,张景勍. 尿酸酶复合脂质体中尿酸酶的药理学考察[J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34: 1805-1808.

[16] PEER D, MARGALIT R. Loading mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in three mice tumor models[J]. *Int J Cancer*, 2004, 108: 780-789.

[17] 方奕巍,尹宗宁. 透明质酸修饰的白蛋白纳米粒的制备及抗肿瘤作用的初步评价[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2011, 42: 480-484.

[18] TAN Q, ZHANG J Q, WANG N, YANG H, LI X, XIONG H R, et al. Improved biological properties and hypouricemic effects of uricase from *Candida Utilis* loaded in novel alkaline enzymosomes [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 3929-3938.

[19] TAN Q, ZHANG J, WANG N, LI X, XIONG H, TENG Y, et al. Uricase from *Bacillus fastidious* loaded in alkaline enzymosomes: enhanced biochemical and pharmacological characteristics in hypouricemic rats [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 82: 43-48.