

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.03.0300

载天冬酰胺酶纳米囊的活性及体外稳定性评价

李 瑶¹, 晏子俊², 何 丹¹, 胡雪原¹, 张景劼^{1*}

1. 重庆医科大学重庆高校药物工程研究中心, 重庆 400016
2. 攀枝花市中心医院药学部, 攀枝花 617067

[摘要] **目的** 制备载天冬酰胺酶(asparaginase, AN)透明质酸-聚乙二醇[hyaluronic acid-*graft*-poly(ethylene glycol), HA-*g*-PEG]/ α -环糊精(α -cyclodextrin, α -CD)纳米囊(HA-*g*-PEG/ α -CD hollow nanocapsules loaded with asparaginase, AHAPs),并对其体外活性及稳定性进行初步考察。**方法** 采用自组装法制备 AHAPs,测定 AHAPs 的最适温度、最适 pH、粒径、zeta 电位和包封率,并通过热稳定性、酸碱稳定性、抗胰蛋白酶水解能力、抗金属离子和有机化合物能力、血浆稳定性和贮存稳定性实验对游离 AN 与 AHAPs 的体外稳定性差异进行考察。通过荧光实验对 AN 与空白 HA-*g*-PEG/ α -CD 纳米囊的相互作用进行研究。**结果** AHAPs 的最适温度为 50 ℃,最适 pH 值为 7.0,测得平均粒径为(424.53±7.25) nm, zeta 电位为(-48.77±0.99) mV。经计算, AHAPs 的平均包封率为(64.40±1.82)%。稳定性实验结果显示, AHAPs 中 AN 的体外稳定性及活性明显优于游离 AN,且部分实验结果差异具有统计学意义($P < 0.05$)。荧光实验结果表明, AHAPs 中 AN 生物活性的提高可能与 AN 和空白 HA-*g*-PEG/ α -CD 纳米囊的相互作用引起蛋白质残基微环境和酶构象改变相关。**结论** AHAPs 不仅提高了 AN 的活性,而且明显增强了 AN 的体外稳定性。

[关键词] 天冬酰胺酶; 纳米囊; 活性; 稳定性

[中图分类号] R 943.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)03-0300-06

Activity of hollow nanocapsules loaded with asparaginase and evaluation of *in vitro* stability

LI Yao¹, YAN Zi-jun², HE Dan¹, HU Xue-yuan¹, ZHANG Jing-qing^{1*}

1. Chongqing Research Center for Pharmaceutical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
2. Department of Pharmacy, Panzhihua Central Hospital, Panzhihua 617067, Sichuan, China

[Abstract] **Objective** To prepare hyaluronic acid-*graft*-poly(ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules loaded with asparaginase (AHAPs) and to investigate their *in vitro* stability and activity. **Methods** We prepared the AHAPs by self-assembly method and detected the optimal temperature, optimal pH value, particle size, zeta potential and entrapment efficiency. Then the differences in *in vitro* stability between AHAPs and free asparaginase (AN) were investigated by measuring thermal stability, acid- and basic-stability, stability to trypsinase, stability to metal ions and organic compounds, plasma stability and storage stability. The interaction between AN and blank hyaluronic acid-*graft*-poly(ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules was studied through the fluorescence experiment. **Results** The optimal temperature for AHAPs was 50 ℃, the optimal pH value was 7.0, the mean particle size was (424.53±7.25) nm, and the mean zeta potential was (-48.77±0.99) mV. The entrapment efficiency of AHAPs was (64.40±1.82)%. The results of stability experiment showed that AHAPs had a significantly better *in vitro* stability than free AN, and some stability experimental results were statistically significant ($P < 0.05$). Fluorescence experiment showed that the improvement of biological activity of AHAPs may be related to the change of protein residues microenvironment and enzyme conformation caused by the interaction between AN and blank hyaluronic acid-*graft*-poly(ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules. **Conclusion** It has been found that AHAPs can not only improve the activity but also greatly enhance the stability of AN *in vitro*.

[Key words] asparaginase; nanocapsules; activity; stability

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(3): 300-305]

[收稿日期] 2016-08-25 **[接受日期]** 2016-11-28

[基金项目] 国家自然科学基金(30973645), 重庆市自然科学基金(cstc2015jcyjBX0027). Supported by National Natural Science Foundation of China (30973645) and Natural Science Foundation of Chongqing (cset2015jcyjBX0027).

[作者简介] 李 瑶, 硕士生. E-mail: 1422405629@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485161, E-mail: zjqrac01@163.com

天冬酰胺酶(asparaginase, AN)是一种具有抗肿瘤作用的化疗药物,能将天冬酰胺水解为天冬氨酸和氨^[1]。AN广泛用于治疗淋巴系统恶性肿瘤,如儿童急性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤和骨肉瘤^[2]。AN可以降解淋巴瘤细胞的必需氨基酸外源天冬酰胺,从而导致肿瘤细胞死亡^[3-5]。尽管AN对肿瘤细胞的抑制作用明显,但其具有的半衰期短、稳定性差、高免疫原性等缺点限制了AN在临床上的应用^[5-6]。

针对AN的缺陷现已进行了下列研究^[7-8]:(1)化学修饰,如聚乙二醇(PEG)修饰;(2)固定化,将AN制成用各种载体固定的固定酶;(3)脂质体包封,定向给药,减少毒副作用;(4)利用蛋白质工程技术对AN进行分子改造等。但改造后的AN仍存在酶活性损失、易脱落和生物相容性等问题^[8]。自组装纳米囊作为一种新型的可封装酶、小分子药物、基因等物质的药物载体,具有生物膜相似性,能提高封装药物的稳定性,延长被封装药物的生物半衰期、提高封装药物的生物利用度以及降低毒副作用等优点^[9-11]。

本实验主要考察自组装法制备的天冬酰胺酶透明质酸(HA)-聚乙二醇[hyaluronic acid-graft-poly(ethylene glycol), HA-g-PEG]/ α -环糊精(α -cyclodextrin, α -CD)纳米囊(HA-g-PEG/ α -CD hollow nanocapsules loaded with asparaginase, AHAPs)的活性和体外稳定性。实验首先对AHAPs的生物学特性进行了考察,然后通过AHAPs和游离AN的热稳定性、酸碱稳定性、抗部分金属离子及化合物能力、抗胰蛋白水解能力、血浆稳定性和贮存稳定性实验,对AHAPs的体外稳定性进行了评价,最后通过荧光光谱实验对AN与脂质膜的相互作用进行了研究。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 AB 204S 电子天平(瑞士Mettler Toledo 仪器公司);KQ 2200B 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司);pH 计(上海精密科学仪器有限公司);RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);UV-7504PC 紫外分光光度计(上海欣茂仪器有限公司);F-2500 型荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司);85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司)。AN(以色列 Prospec 公司,批号:312PLASP1,纯度:96%);HA(山东曲阜市广龙生物制品厂,批号:20131027,纯度:95.6%);PEG

(Sigma-Aldrich 公司,批号:EY-(BR)-2669,纯度:99%);AHAPs(实验室自制,批号:20151022);其他试剂均为分析纯。

1.2 AHAPs 的特性考察 将 AN 溶于 HA-g-PEG 溶液中后,缓慢滴加至 α -CD 饱和溶液中,一定温度下磁力搅拌 2 h,即得 AHAPs^[11-12]。取 AHAPs 溶液,加入 Tris-HCl 缓冲液稀释后,使用马尔文粒度仪测定其粒径和 zeta 电位。按葡聚糖凝胶法^[13]测定 AHAPs 的包封率。取空白 HA-g-PEG/ α -CD 纳米囊溶液(空白 HA-g-PEG/ α -CD 纳米囊的制备方法与 AHAPs 的基本一致,唯一区别在于不加入 AN),加入乙醇摇匀至溶液澄清,得溶液 1。再取等体积过柱后的 AHAPs 溶液,同样加入乙醇摇匀至溶液澄清,得溶液 2。最后取 AHAPs 溶液,加入破乳剂摇匀至溶液澄清,得溶液 3。分别取溶液 1、2、3,加入考马斯亮蓝 G-250,混合,放置 2 min 后,以溶液 1 作为空白对照,测定溶液 2 和溶液 3 的光密度(D)值 D_1 、 D_2 ,并计算包封率。包封率(%) = $(D_1/D_2) \times 100\%$ 。

1.3 AN 活性的测定 参照奈斯勒试剂法^[14]测定。取适量天冬酰胺底物溶液,加入 0.10 mL AN 溶液后预热 2 min,于 37 °C 下反应 10 min。加入 0.10 mL 三氯醋酸溶液,离心,取上清液,加入适量蒸馏水和奈斯勒指示剂。10 min 后,于 480 nm 处测定其 D 值。酶活力单位定义为:在规定条件下,催化一个单位的底物释放 1 μ mol 氨所需的酶量。

1.4 最适温度 将样品溶液分别放置于加热到 20、30、37、40、50、60、70、80 °C 的水浴锅中,在各温度下预热 2 min,于相应温度下反应 10 min 后,分别按照 1.3 项下的方法测定游离 AN 及 AHAPs 中 AN 的活性,并以 AN 最适温度下活性为 100% 计算相对活性。

1.5 最适 pH 用 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 的 Tris-HCl 缓冲液配制底物 AN 溶液,放置 37 °C 下预热 2 min 后,按照 1.3 项下的方法测定游离 AN 及 AHAPs 中 AN 的活性。以 AN 最适 pH 下活性为 100% 计算相对活性。

1.6 热稳定性的测定 取 AHAPs 和游离 AN 溶液分别置于 55 °C 的水浴中,于 0、1、2、3、4、5 h 时分别取出,按照 1.3 项下的方法测定游离 AN 及 AHAPs 中 AN 的活性。

1.7 酸碱稳定性的测定 取适量 AHAPs 溶液,分别用 pH 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 的 Tris-HCl 缓冲液稀释,37 °C 水浴放置 40 min 后,

按照 1.3 项下方法分别测定游离 AN 及 AHAPs 中 AN 的活性。

1.8 抗胰蛋白酶水解能力的测定 取游离 AN 和 AHAPs 溶液,分别加入胰蛋白酶溶液,混匀后置于 37 °C 水浴中,分别于 0、10、20、30、40、50、60、70、80 min 时取出,按照 1.3 项下的方法测定游离 AN 及 AHAPs 中 AN 的活性。

1.9 抗金属离子和有机化合物能力的测定 取游离 AN 和 AHAPs 溶液,分别加入配制好的山梨醇、吐温-80、氯化钾(KCl)、氟化钠(NaF)、PEG2000 和氯化铵(NH₄Cl)溶液,混匀,于 25 °C 水浴中放置 1 h 后,按照 1.3 项下的方法测定游离 AN 及 AHAPs 中 AN 的活性。

1.10 血浆稳定性的测定 参照文献[15]方法配制体外模拟空白血浆样品后,取 AHAPs 和游离 AN 溶液,分别加入 5 倍体积的体外模拟空白血浆,混匀,于 37 °C 下孵育 0、1、2、4、8、12、24、48、72、96 h 后,按照 1.3 项下的方法分别测定游离 AN 及 AHAPs 中 AN 的活性。

1.11 贮存稳定性的测定 取 AHAPs 和游离 AN 溶液,贮存于 4 °C,分别在 0、1、2、5、10、15、20、25、28 d 时取出,并按 1.3 项下的方法分别测定游离 AN 及 AHAPs 中 AN 的活性。

1.12 AN 与纳米制剂膜的相互作用 取 AN 溶液、空白 HA-g-PEG/ α -CD 纳米囊溶液、AN 与空白 HA-g-PEG/ α -CD 纳米囊的混合溶液(混合后需室温孵育 1 h)各 980 μ L,分别与 20 μ L 含异硫氰基荧光素(FITC)的 Tris-HCl 溶液混合,得样品溶液 1、2 和 3,将 3 种样品溶液置于黑暗处孵育 5 min。在发射波长为 500~600 nm、激发波长为 480 nm 的条件下,于 1 mL 比色皿中检测荧光强度^[14-15]。

1.13 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件对游离 AN 和 AHAPs 中 AN 的活性及稳定性数据进行双向单侧 *t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 AHAPs 的特性 测得 AHAPs 的平均粒径为 (424.53 \pm 7.25) nm, zeta 电位为 (-48.77 \pm 0.99) mV。经计算, AHAPs 的平均包封率为 (64.40 \pm 1.82)%。

2.2 最适温度 如图 1 所示,游离 AN 的最适温度为 60 °C, AHAPs 的最适温度为 50 °C。当温度在 20~70 °C 范围内变化时, AHAPs 中 AN 的活性均高于游离 AN (60 °C 时除外)。

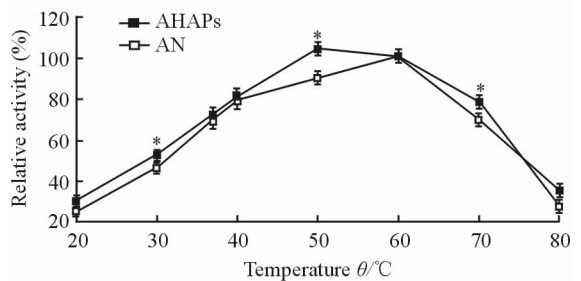


图 1 游离 AN 与 AHAPs 的最适温度

Fig 1 Optimum temperature of free AN and AHAPs

AN: Asparaginase; AHAPs: Hyaluronic acid-*graft*-poly (ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules loaded with asparaginase. * *P*<0.05 vs AN group. *n*=3, $\bar{x}\pm s$

2.3 最适 pH 如图 2 所示, AHAPs 的最适 pH 为 7.0。实验条件下 (pH 7.5 和 9.0 除外) AHAPs 中 AN 的活性均高于游离 AN, 且当 pH 为 7.0 和 9.5 时 AHAPs 中 AN 的活性优于游离 AN (*P*<0.05)。

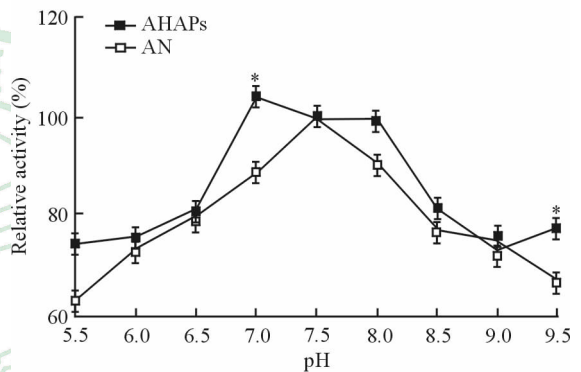


图 2 游离 AN 与 AHAPs 的最适 pH

Fig 2 Optimum pH of free AN and AHAPs

AN: Asparaginase; AHAPs: Hyaluronic acid-*graft*-poly (ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules loaded with asparaginase. * *P*<0.05 vs AN group. *n*=3, $\bar{x}\pm s$

2.4 热稳定性 从图 3 中可知, 实验条件下游离 AN 失活较快, 3 h 已完全失活; 而此时 AHAPs 中 AN 的活性仍在 80% 左右, 5 h 时 AHAPs 中 AN 的活性仍 >50%。实验结果说明 AHAPs 大大提高了 AN 的热稳定性。

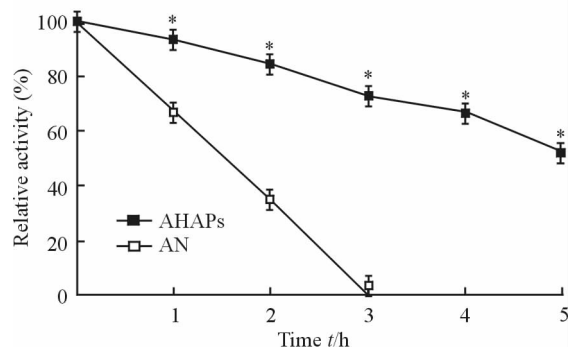


图 3 游离 AN 与 AHAPs 在 55 °C 下的热稳定性

Fig 3 Thermal stabilities of free AN and AHAPs at 55 °C

AN: Asparaginase; AHAPs: Hyaluronic acid-*graft*-poly (ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules loaded with asparaginase. * *P*<0.05 vs AN group. *n*=3, $\bar{x}\pm s$

2.5 酸碱稳定性 以 pH 8.5 时 AN 的活性为 100% 而计算的相对活性见图 4。不同酸碱环境下 AHAPs 中 AN 的活性都高于游离 AN (除 pH 7.0 时 AHAPs 中 AN 与游离 AN 的活性接近外), 且当 pH 为 8.5 和 9.0 时, 两者的活性差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。当 pH 值在 7.5~9.5 范围内变化时, AHAPs 中的 AN 都能保持 80% 以上的高活性。结果可知, AHAPs 较游离 AN 具有更好的耐溶液酸碱变化的能力。

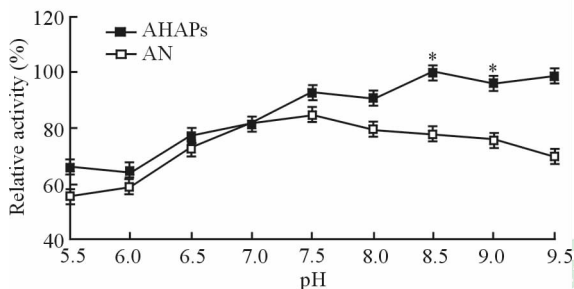


图 4 游离 AN 与 AHAPs 的酸碱稳定性

Fig 4 pH stabilities of free AN and AHAPs

AN: Asparaginase; AHAPs: Hyaluronic acid-*graft*-poly (ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules loaded with asparaginase. * $P < 0.05$ vs AN group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.6 抗胰蛋白酶水解能力 如图 5 所示, 在胰蛋白酶的作用下, 游离 AN 被迅速酶解, 其活性呈快速下降的趋势, 30 min 时, 游离 AN 的活性仅存约 30%, 而此时 AHAPs 中 AN 的活性仍 $>60%$; 50 min 时, 游离 AN 已完全失活, 而 AHAPs 中 AN 的活性仍 $>30%$, 并到 80 min 时才完全失活。结果显示 AHAPs 中的 AN 相比游离 AN 具有更好的抗酶解能力。

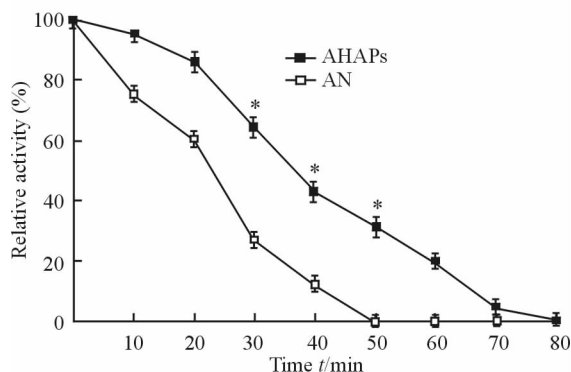


图 5 游离 AN 与 AHAPs 的抗胰蛋白酶水解能力

Fig 5 Trypsinase stabilities of free AN and AHAPs

AN: Asparaginase; AHAPs: Hyaluronic acid-*graft*-poly (ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules loaded with asparaginase. * $P < 0.05$ vs AN group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.7 抗部分金属离子及有机化合物能力 如图 6 所示, 加入 PEG2000 后, AHAPs 中 AN 及游离 AN 的活性与不加 PEG2000 的初始活性 (100%) 相比,

均提高了近 40%; 其次是吐温-80, 使游离 AN 与 AHAPs 中 AN 的活性均提高了 10% 左右。其中, 山梨醇组、NaF 组和 NH_4Cl 组中游离 AN 及 AHAPs 中 AN 的活性差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 KCl 对游离 AN 及 AHAPs 中 AN 的活性无明显影响。结果表明, PEG2000、吐温-80、山梨醇、KCl、NaF 和 NH_4Cl 对游离 AN 及 AHAPs 的活性均有不同程度的影响。

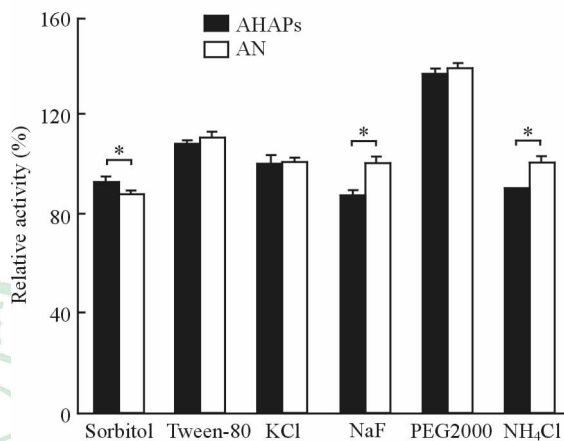


图 6 部分金属离子及有机化合物对游离 AN 与 AHAPs 活性的影响

Fig 6 Effects of several metal ions and organic compounds on activities of free AN and AHAPs

AN: Asparaginase; AHAPs: Hyaluronic acid-*graft*-poly (ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules loaded with asparaginase. * $P < 0.05$. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.8 血浆稳定性 如图 7 所示, 当时间为 4、12、24、48、72、96 h 时, 游离 AN 和 AHAPs 中 AN 的活性差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中, 游离 AN 活性降低速度较快, 4 h 已损失了近一半的活性, 而此时 AHAPs 中 AN 的活性仍高达 90%; 48 h 时, 游离 AN 已完全失活, 而 96 h 时 AHAPs 中 AN 仍保持有 20% 以上的活性。实验结果说明 AHAPs 中的 AN 较游离 AN 具有更好的血浆稳定性。

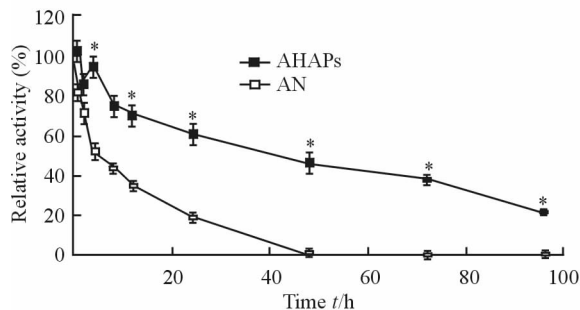


图 7 游离 AN 与 AHAPs 的血浆稳定性

Fig 7 Plasma stabilities of free AN and AHAPs

AN: Asparaginase; AHAPs: Hyaluronic acid-*graft*-poly (ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules loaded with asparaginase. * $P < 0.05$ vs AN group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.9 贮存稳定性 如图8所示,5、10、15、20、25和28 d时两组的活性差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其中,15 d时游离 AN 的活性已降至50%以下,而此时 AHAPs 中 AN 仍保持有近70%的活性;28 d时,游离 AN 的活性仅存约20%,而此时 AHAPs 中 AN 的活性约为游离 AN 的2倍。结果表明,AHAPs 中的 AN 具有更好的贮存稳定性。

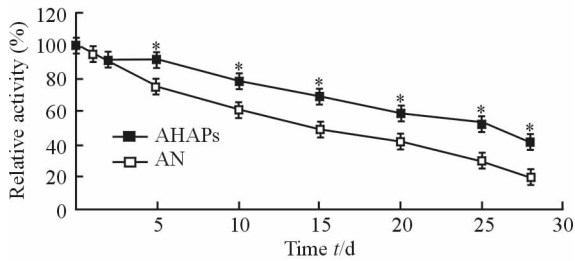


图8 游离 AN 与 AHAPs 的贮存稳定性

Fig 8 Storage stabilities of free AN and AHAPs

AN: Asparaginase; AHAPs: Hyaluronic acid-*graft*-poly (ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules loaded with asparaginase. * $P < 0.05$ vs AN group. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.10 AN 与纳米制剂膜相互作用结果 AN 与纳米制剂膜的相互作用实验结果见图9。如图9所示,3种样品(从上到下依次为:AN、空白 HA-g-PEG/ α -CD 纳米囊、AN+空白 HA-g-PEG/ α -CD 纳米囊)的荧光强度呈规律性降低,其中 AN+空白 HA-g-PEG/ α -CD 纳米囊混合溶液(曲线3)的荧光强度最小;空白 HA-g-PEG/ α -CD 纳米囊溶液(曲线2)的荧光强度稍大;AN 溶液(曲线1)的荧光强度最大。与 AN 相比,AN+空白 HA-g-PEG/ α -CD 纳米囊混合溶液的荧光强度明显减弱,说明 AN 和 FITC 竞争性地与纳米制剂膜结合,也证明 AN 与纳米制剂膜之间产生了相互作用。比较 AN+空白 HA-g-PEG/ α -CD 纳米囊混合溶液和空白 HA-g-PEG/ α -CD 纳米囊也能得出同样的结论。

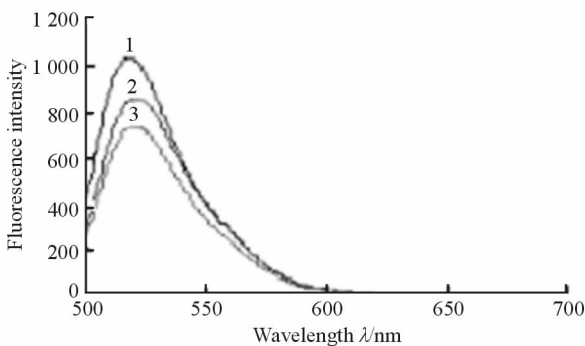


图9 荧光图谱

Fig 9 FITC fluorescence spectra

Excitation wavelength: 480 nm; emission wavelength: 500-600 nm. 1: AN; 2: Blank HA-g-PEG/ α -CD; 3: AN+Blank HA-g-PEG/ α -CD. AN: Asparaginase; HA-g-PEG/ α -CD: Hyaluronic acid-*graft*-poly (ethylene glycol)/ α -cyclodextrin hollow nanocapsules

3 讨论

不同种类的 CD 衍生物,如 α -CD 和磺丁基- β -CD,在理化性质如相对分子量、葡萄糖单元数、分子结构、增溶作用、毒性作用、水溶性等方面存在着明显差异,且以 α -CD 和磺丁基- β -CD 为主要辅料加上其他辅料后制得的新型药物纳米递送系统的稳定性、溶解性、生物学特性、药代动力学、毒性作用等都可能存在不同。实验发现,本研究中以 α -CD 为主要辅料制得的新型药物纳米递送系统与谢江川等^[16]以磺丁基- β -CD 为主要辅料制得的新型药物纳米递送系统在平均 zeta 电位、平均包封率、最适 pH 等方面存在较大差异。两种递送系统在药代动力学、毒性作用等方面是否存在差异还需进一步研究。

药物制剂的稳定性是其质量控制的关键因素,良好的稳定性也是其临床应用的必要条件^[17]。本实验测定了 AHAPs 的最适温度、最适 pH、粒径、zeta 电位和包封率,并分别对 AHAPs 和游离 AN 的热稳定性、酸碱稳定性、抗胰蛋白酶水解能力、抗部分金属离子及有机化合物能力、血浆稳定性、贮存稳定性及 AN 与纳米制剂膜的相互作用进行了考察。实验结果显示,AHAPs 中的 AN 较游离 AN 具有更优的活性和体外稳定性。

荧光实验结果发现 AN 与纳米制剂膜之间产生了相互作用,该相互作用可能会导致酶的构象发生变化,而这些改变可能正是 AHAPs 中 AN 生物学特性明显提高的原因^[18-19]。若要进一步验证 AN 的构象是否发生了变化以及深入探讨该变化对 AN 酶学性质的影响,还需更深入的研究。

理论上 AHAPs 不仅具有纳米囊所具有的提高封装药物稳定性、延长被封装药物的生物半衰期、提高封装药物的生物利用度以及降低毒副作用等优势,而且通过 HA 的修饰还具有缓释和肿瘤靶向性的特点,本实验结果已证明相比游离 AN,AHAPs 中的 AN 具有更好的酶学活性和更优的体外稳定性,为剂量的减少及临床上的广泛应用奠定了一定的基础,同时本研究也为 AHAPs 在体内的进一步研究奠定了良好的基础。

[参考文献]

[1] WANG R, XIA B, LI B J, PENG S L, DING L S,

- ZHANG S. Semi-permeable nanocapsules of konjac glucomannan-chitosan for enzyme immobilization[J]. *Int J Pharm*, 2008, 364: 102-107.
- [2] ZUO S, ZHANG T, JIANG B, MU W. Recent research progress on microbial *L*-asparaginases [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 1069-1079.
- [3] NARTA U K, KANWAR S S, AZMI W. Pharmacological and clinical evaluation of *L*-asparaginase in the treatment of leukemia[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 61: 208-221.
- [4] MOHAN-KUMARI H P, DHALE M A, AKHILENDER NAIDU K, VIJAYALAKSHMI G. Antioxidant effect of red mould rice in hypercholesterolemic Wistar male rats [J]. *Cell Biochem Funct*, 2011, 29: 597-602.
- [5] 吴南海,吕善根,赵新民. 左旋天门冬酰胺酶在治疗急性淋巴细胞白血病中的副作用及防治[J]. *白血病*, 2000, 9:120.
- [6] 张小华,王绍华. 左旋天门冬酰胺酶的不良反应[J]. *中国医院药学杂志*, 2000, 20:767.
- [7] HA W, MENG X W, LI Q, FAN M M, PENG S L, DING L S, et al. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation[J]. *Soft Matter*, 2010, 6: 1405-1408.
- [8] 杜少平,杨冠东,彭中健,梁淑娃. 降低 *L*-天门冬酰胺酶毒副作用的研究进展[J]. *广州医药*, 2003, 34:3-5.
- [9] CAI B, WEN D, LIU W, HERRMANN A K, BENAD A, EYCHM LLER A. Function-led design of aerogels: self-assembly of alloyed PdNi hollow nanospheres for efficient electrocatalysis[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54: 13101-13105.
- [10] ARAVIND A, JEYAMOHAN P, NAIR R, VEERANARAYANAN S, NAGAOKA Y, YOSHIDA Y, et al. AS1411 aptamer tagged PLGA-lecithin-PEG nanoparticles for tumor cell targeting and drug delivery[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 2920-2931.
- [11] HA W, FAN M M, ZHANG S, VEERANARAYANAN S, NAGAOKA Y, YOSHIDA Y, et al. Self-assembly of chitosan-*g*-PEG and α -cyclodextrin into hollow spheres in aqueous solution[J/OL]. *J Control Release*, 2011, 152 (Suppl 1): e204-e205. doi: 10. 1016/j. jconrel. 2011. 09. 010.
- [12] MENG X W, HA W, CHENG C, DONG Z Q, DING L S, LI B J, et al. Hollow nanospheres based on the self-assembly of alginate-*graft*-poly(ethylene glycol) and α -cyclodextrin[J]. *Langmuir*, 2011, 27: 14401-14407.
- [13] LI Q, XIA B, BRANHAM M, HA W, WU H, PENG S L, et al. Self-assembly of carboxymethyl konjac glucomannan-*g*-poly(ethylene glycol) and (α -cyclodextrin) to biocompatible hollow nanospheres for glucose oxidase encapsulation[J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86: 120-126.
- [14] 施特马赫 B. 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊,译. 北京:中国轻工业出版社,1992:85-88.
- [15] SARACINO M A, MARCHESELLI C, SOMAINI L, GERRA G, DE STEFANO F, PIERI M C, et al. Simultaneous determination of disulfiram and bupropion in human plasma of alcohol and nicotine abusers[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398: 2155-2161.
- [16] 谢江川,何丹,晏子俊,周云莉,张景勃. 天门冬酰胺酶聚乙二醇-透明质酸/磺丁基- β -环糊精纳米粒体外稳定性的初步研究[J]. *华西药理学杂志*, 2016, 31:124-127.
- [17] 张枚,杨林,周云莉,邓雪,张景勃. 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.
- [18] ZHOU Y, ZHANG M, HE D, HU X, XIONG H, WU J, et al. Uricase alkaline enzymosomes with enhanced stabilities and anti-hyperuricemia effects induced by favorable microenvironmental changes[J]. *Sci Rep*, 2016, 7: 20136.
- [19] XIONG H, ZHOU Y, ZHOU Q, HE D, WAN S, TAN Q, et al. Nanosomal microassemblies for highly efficient and safe delivery of therapeutic enzymes[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 20255-20263.