

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000320

脂质纳米粒提高尿酸氧化酶体外稳定性的初步研究

张 救¹, 杨 林², 周云莉¹, 邓 雪¹, 张景勃¹

(1. 重庆医科大学药物高校工程研究中心, 重庆 400016; 2. 重庆市食品药品检验所化学室, 重庆 401121)

【摘要】目的:使用 Tricine-NaOH 缓冲液制备含 UOX 的脂质纳米粒(urate oxidase lipid nanoparticles prepared by Tricine-NaOH buffer, UTLNs), 并对游离尿酸氧化酶(urate oxidase, UDX)在体外的活性和稳定性进行初步研究。**方法:**采用逆向蒸发法制备 UTLNs。分别从最适温度、最适 pH、热稳定性、贮存稳定性、酸碱稳定性和抗胰蛋白酶水解能力初步考察游离 UOX 和 UTLNs 的差异。**结果:**游离 UOX 和 UTLNs 最适温度均为 40 ℃; 游离 UOX 最适 pH 为 8.5, UTLNs 最适 pH 为 8.0; 稳定性结果显示, UTLNs 的体外稳定性明显优于游离 UOX。**结论:**UTLNs 不仅提高了 UOX 在体外的活性, 并且明显地增强了 UOX 在体外的稳定性。

【关键词】尿酸酶; 脂质纳米粒; 最适温度; 最适 pH; 稳定性

【中图分类号】R944.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-07

Preliminary study on the stability of urate oxidase loaded in lipid nanoparticles

Zhang Mi¹, Yang Lin², Zhou Yunli¹, Deng Xue¹, Zhang Jingbo¹

(1. Department of Medicine, Engineering Research Center, Chongqing Medical University;

2. Department of Food and Drug Control, the Lab of Chemistry Institute of Chongqing)

【Abstract】Objective: To prepare urate oxidase lipid nanoparticles by Tricine-NaOH buffer (UTLNs) and then to study the *in vitro* activity and stability of free UOX and UTLNs. **Methods:** UTLNs was prepared by reverse-phase evaporation method. The optimum temperature, optimum pH, thermal stability, storage stability, pH stabilities and proteolytic stabilities of free UOX and UTLNs were measured. **Results:** The optimum temperatures for free UOX and UTLNs were both 40 ℃. The optimum pH for free UOX and UTLNs were 8.5 and 8.0, respectively. UTLNs had significantly better stability than free UOX *in vitro*. **Conclusion:** UTLNs not only improved the activity but also significantly enhanced the stability of free UOX *in vitro*.

【Key words】urate oxidase; lipid nanoparticles; optimum temperature; optimum pH; stability

尿酸氧化酶(urate oxidase, UOX)以分子氧作为受体^[1], 是嘌呤代谢途径的重要酶, 能催化尿酸氧化, 生成尿囊素、CO₂ 和 H₂O₂^[2-4]。UOX 使尿酸迅速氧化分解, 不再被肾小管吸收, 从而排出体外, 故对结节性痛风、尿结石及肾病功能衰竭所致的高尿酸血症有良效。由于人体内缺乏 UOX 且它对人类有着很大的应用价值和发展前景, 许多不同来源的 UOX 相继被研究^[5]。Patte 等^[6]已用从黄曲霉中制备的 UOX 治疗由白血病化疗引起的严重高尿酸血症; 在美国,

已在近几年的临床试验中将 UOX 运用于白血病化疗引起高尿酸血症的治疗^[7], 结果证明 UOX 比别嘌呤醇起效更快^[8]。天然的 UOX 存在许多缺点: UOX 最适 pH 偏碱性, 在生理 pH 7.4 时活性低, 这导致治疗时所需 UOX 的量较大, 治疗的成本高, 安全性较低; 在温度和 pH 改变时维持活性的能力较差; 稳定性低, 体内活性半衰期短, 易被蛋白酶水解失活; 机体易产生免疫反应等缺点。

本研究采用脂质纳米粒(lipid nanoparticles, LNs)作为 UOX 的载体, 以改善天然 UOX 的缺点。LNs 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, 能提高被包封药物的稳定性, 降低药物毒副作用, 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^[9]。目前在已报道的文献中, 对 UOX-LNs 的研究多是采用硼酸-硼砂缓冲

作者简介: 张 救, Email: 475085340@qq.com,

研究方向: 药物新剂型与新技术。

通信作者: 张景勃, Email: zjqrae01@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30973645); 重庆市首批高等学校优秀人才资助项目(编号: [渝教人(2009)2号])。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000320.html>

液,而本实验则采用的是 Good's 缓冲液系统中的 Tricine-NaOH 缓冲液对其进行研究。Good's 缓冲液具有不参加和不干扰生物化学反应过程,对酶化学反应等无抑制作用,所以常专门用于细胞器和极易变性的、对 pH 敏感的蛋白质和酶的研究工作^[10],因此非常适合 UOX 的研究。本研究依据上述思路,使用 Tricine-NaOH 缓冲液(pH 8.5, 50 mmol/L)制备了含 UOX 的脂质纳米粒(urate oxidase lipid nanoparticles prepared by Tricine-NaOH buffer, UTLNs)。结果表明,在体外实验条件下,UTLNs 较游离 UOX 表现出更高的活性;且体外稳定性实验得出,UTLNs 明显增强了 UOX 的稳定性。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

UV-7504 单光束紫外-可见分光光度计(上海精密仪器有限公司);分析电子天秤(瑞士 Mettler Toledo 仪器公司);RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);TGL-16B 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂);PHS-3C 型 pH 测定仪(上海精科仪器有限公司);Milli-Q Biocel A-10 超纯水制备系统(美国 Millipore 公司);UOX(美国 sigma 公司);卵磷脂(德国 Lucas Meyer 公司);胆固醇(广州天马精细化工厂);三(羟甲基)甲基甘氨酸(美国 Amresco 公司);乙醇、氯仿、乙醚和氢氧化钠均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 UTLNs 的制备 采用逆向蒸发法制备 UTLNs。精密称取处方量的卵磷脂和胆固醇置于圆底烧瓶中,加 30 ml 氯仿充分溶解后,于旋转蒸发器上减压除去氯仿,此时,形成均匀薄膜。加入乙醚重新分散,再加入 10 ml 含 2 mg UOX 的 Tricine-NaOH 缓冲液(pH 8.5, 50 mmol/L),冰浴超声,形成均匀带乳光分散体系后重新减压旋转蒸发至凝胶塌陷,形成均匀乳白色带乳光液体时,取出过膜定容至 20 ml,即得 UTLNs。低温保存备用。

1.2.2 UOX 活性的测定 在尿酸浓度为 75 $\mu\text{mol/L}$ 的硼酸-硼砂缓冲液(pH 8.5, 50 mmol/L)中测定 UOX 的活性,测定前底物溶液置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 预热。取 1.18 ml 底物溶液,加入 20 μl 游离 UOX 或 UTLNs 经氯仿破乳后的上清液,加入后迅速用手轻轻振摇使混合均匀,于波长 293 nm 处精确记录反应 1 min 前后的紫外吸光度变化值^[11]。酶活单位定义为:每 1 min 催化 1 μmol 底物转化为产物所需的酶量。

1.2.3 最适温度的测定 在指定温度下(20、30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$)分别测定游离 UOX 和 UTLNs 中 UOX 的活性。底物溶液预先置于各个温度下预热后,按“1.2.2 活性测定”项下所述方法进行测定,以确定游离 UOX 和 UTLNs 的最适温度。以

游离 UOX 最适温度下的活性为 100%,计算其余样品各点的相对活性值。

1.2.4 最适 pH 的测定 在指定 pH 下(pH 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5)分别测定游离 UOX 和 UTLNs 中 UOX 的活性。使用不同 pH 值的缓冲溶液配制底物溶液后,按“1.2.2 活性测定”项下所述方法进行测定,以确定游离 UOX 和 UTLNs 的最适 pH 值。以游离 UOX 最适 pH 下的活性为 100%,计算其余样品各点的相对活性值。

1.2.5 热稳定性的测定 将游离 UOX 和 UTLNs 溶液分别配制成酶浓度为 100、50、10、5 $\mu\text{g/ml}$ 的 4 种不同浓度的酶溶液,放置于 55 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中,分别于 0、1、2、3、4、5 h 测定游离 UOX 和 UTLNs 中 UOX 的活性,活性测定方法参照“1.2.2 活性测定”项下。结果以活性保留百分数进行计算。

1.2.6 贮存稳定性的测定 将游离 UOX 和 UTLNs 避光密封贮存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下,于指定时间(0、1、2、5、10、15、20、28 d)取出测定游离 UOX 和 UTLNs 中 UOX 的活性,活性测定方法参照“1.2.2 活性测定”项下。结果以活性保留百分数进行计算。

1.2.7 酸碱稳定性的测定 取游离 UOX 和 UTLNs 分别加入 pH 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 的缓冲液^[12-13],使各组溶液中 UOX 的终浓度为 0.1 mg/ml。各样品于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置 40 min,取出测定样品中 UOX 的活性,活性测定方法参照“1.2.2 活性测定”项下。以 UTLNs 在 pH 8.0 时的酸碱稳定性测定结果为 100%,计算其余样品各点的相对活性。

1.2.8 抗胰蛋白酶水解能力 取 1 ml 游离 UOX 和 UTLNs,分别加入等体积的 0.1 mg/ml 胰蛋白酶溶液,混合均匀后放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中,在 0、10、20、30、40、50、60 min 时分别取出测定游离 UOX 和 UTLNs 中 UOX 的活性。活性测定方法参照“1.2.2 活性测定”项下。结果以活性保留百分数进行计算。

2 结果

2.1 最适温度的测定

最适温度测定的结果见图 1。由图 1 可知,游离 UOX 和 UTLNs 的最适温度均为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。UTLNs 在温度 20 $^{\circ}\text{C}$ ~70 $^{\circ}\text{C}$ 时均较游离 UOX 的活性高,其中 40 $^{\circ}\text{C}$ 时 UTLNs 中 UOX 的活性约是游离 UOX 的 110%。

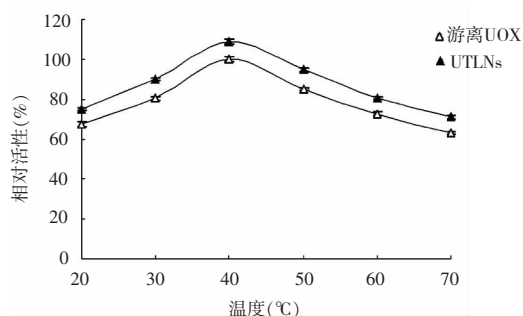


图 1 游离 UOX 和 UTLNs 最适温度的测定 ($n=3$)

Fig.1 Optimum temperature for UTLNs and free UOX ($n=3$)

2.2 最适 pH 的测定

最适 pH 测定的结果见图 2。由图 2 可知,游离 UOX 的最适 pH 为 8.5,UTLNs 的最适 pH 为 8.0。在各自的最适 pH 值时,UTLNs 明显增加了游离 UOX 的活性,是游离 UOX 活性的 1.2 倍。在 pH 7.5(约等于血浆生理 pH 7.4)时,UTLNs 的活性保留在 108.78%,而游离 UOX 的活性仅为 61.82%,此时,UTLNs 是游离 UOX 活性的 1.75 倍。在 pH 7.5~9.0 范围内,UTLNs 的活性均较游离 UOX 在最适 pH 时的活性更大,表明经 LNs 修饰的 UOX 能明显提高 UOX 的活性。

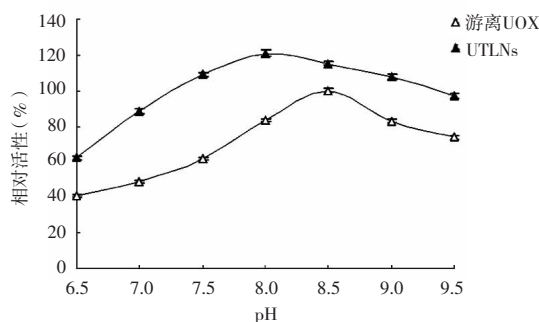


图 2 游离 UOX 和 UTLNs 最适 pH 的测定 ($n=3$)

Fig.2 Optimum pH for UTLNs and free UOX ($n=3$)

2.3 热稳定性的测定

图 3 和图 4 分别是游离 UOX 和 UTLNs 的热稳定性测定结果。由图 3 可知,游离 UOX 在 55 °C 放置 2 h 后,高浓度游离 UOX 溶液的活性仅保留了 55.19%,几乎丧失了一半的活性,而低浓度游离 UOX 溶液在此条件下活性更低,约为 34%。当 5 h 时,高浓度活性几乎丧失,仅为 4.45%,低浓度酶溶液已经完全丧失活性。

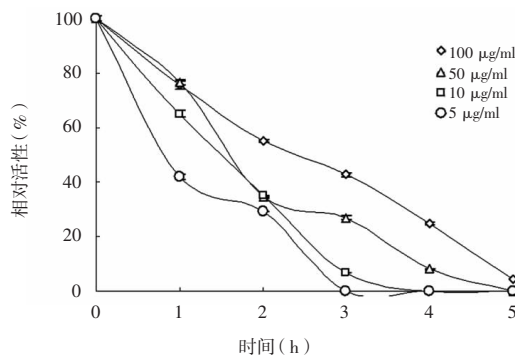


图 3 游离 UOX 热稳定性的测定 ($n=3$)

Fig.3 Thermal stabilities of free UOX at enzyme concentrations of 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml and 5 µg/ml at 55 °C ($n=3$)

在相同条件下,UTLNs 则表现出了很好的热稳定性。由图 4 可以看出在 2 h 时,高浓度 UTLNs 的活性保留值在 90% 左右,低浓度 UTLNs 的活性也均大于 50%;当 5 h 时,高浓度的 UTLNs 保留了大于 73% 的活性,此时只有一组低浓度 UTLNs 丧失了活性,另一组为 30.61%,这与游离 UOX 的热稳定性结果相反,表明 UTLNs 比游离 UOX 有更良好的热稳定性。

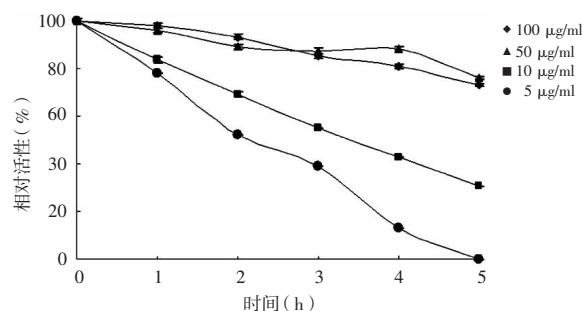


图 4 UTLNs 热稳定性的测定 ($n=3$)

Fig.4 Thermal stabilities of UTLNs at enzyme concentrations of 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml and 5 µg/ml at 55 °C ($n=3$)

2.4 贮存稳定性的测定

贮存稳定性的结果见图 5,可看出,UTLNs 的贮存稳定性明显优于游离 UOX。当游离 UOX 在第 10 天活性保留值降至 50% 时,UTLNs 仍保留有 72% 的活性;UTLNs 在第 20 天时活性保留值为 56% 时,游离 UOX 则低于 30%。综上,UTLNs 有更好的贮存稳定性。

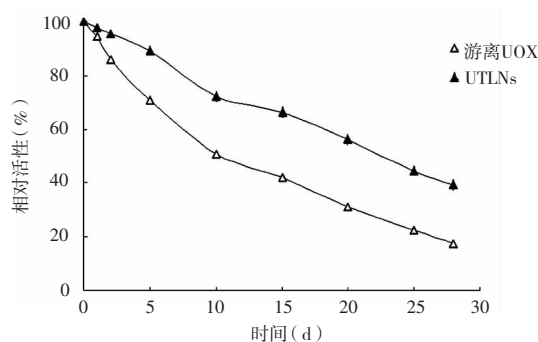


图 5 游离 UOX 和 UTLNs 贮存稳定性的测定 ($n=3$)

Fig.5 Storage stabilities of UTLNs and free UOX at 4 °C ($n=3$)

2.5 酸碱稳定性的测定

酸碱稳定性的测定结果见图 6。由图 6 可知 UTLNs 的酸碱稳定性明显优于游离 UOX。在 pH 6.5~9.5 中 UTLNs 均保留了 80% 以上的活性,最大值为 109.39%;在此 pH 范围内游离 UOX 活性保留最大值仅为 85.11%,最小值为 71%。本结果表明 UTLNs 较游离 UOX 有更好的耐溶液酸碱变化的能力。

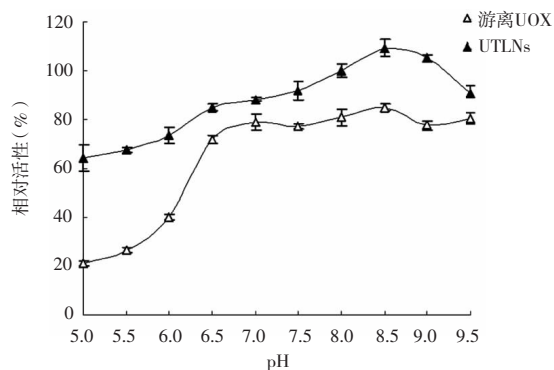


图 6 游离 UOX 和 UTLNs 酸碱稳定性的测定 ($n=3$)

Fig.6 pH stabilities of UTLNs and free UOX ($n=3$)

2.6 抗胰蛋白酶水解能力

抗胰蛋白酶水解能力的测定结果见图 7。如图 7 所示,游离 UOX 的活性呈快速下降的趋势,在 20 min 时,活性仅保留了 48.54%,60 min 时活性降至 6.80%,几乎丧失活性。相反,UTLNs 保持活性的时间明显延长,50 min 时活性仍保持了 50%以上,60 min 时活性继续保持在 46.49%。研究结果表明 UTLNs 相比于游离 UOX 有更好的抗酶解能力。

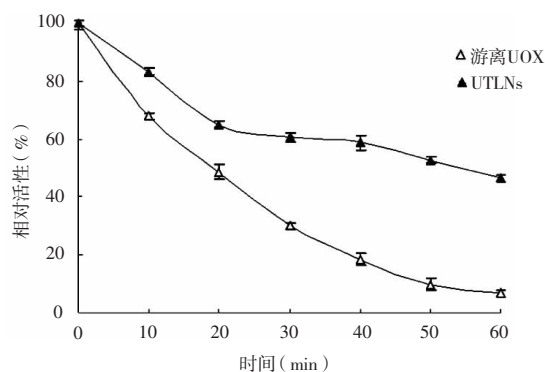


图 7 游离 UOX 和 UTLNs 抗胰蛋白酶水解能力的测定 ($n=3$)

Fig.7 Proteolytic stabilities of UTLNs and free UOX ($n=3$)

3 讨论

UOX 是一种具有生物活性的蛋白质类大分子药物,缓冲液的离子种类、离子强度对其活性影响是很大的,这可能是与其改变蛋白质的空间结构有关。本实验将 Good's 缓冲液首次应用于 UOX 的研究,不仅丰富了 UOX 的研究内容,更对 Good's 缓冲液应用于蛋白质类大分子药物提供了参考,具有很高的研究价值。制备所得的 UTLNs 与使用硼酸-硼砂缓冲液制备的 UOX-LNs^[14]相比,两者最适温度均为 40℃,最适 pH 均为 8.0,并且在最适条件下均能明显地提高游离 UOX 在体外的活性;两者都能很好地提高游离 UOX 在体外的稳定性。

本实验从热稳定性、贮存稳定性、酸碱稳定性和抗胰蛋白酶水解能力分别对 UTLNs 和游离 UOX 的体外稳定性进行了研究,由图 3、图 4 和图 5 的结果可知,在加热条件(55℃)和贮存条件(4℃)下,UTLNs 均能很好的保持 UOX 的活性,这说明 UOX 被 LNs 包封在脂质膜内部后有更好的对抗外界温度变化的能力。酸碱稳定性的结果充分说明,在外界溶液 pH 值变化时,脂质膜能很好地保护 UOX 免受外界 pH 变化的干扰,UTLNs 的酸碱稳定性在 pH 8.5 时活性提高(较 pH 8.0 和 pH 9.0 时的活性更高),可能是由于:制备 UTLNs 时,是将 UOX 溶于 pH 8.5

的 Tricine-NaOH 缓冲液(50 mmol/L),Tricine-NaOH 缓冲液为 Good's 缓冲液,文献报道^[15]Good's 缓冲液不能通过生物膜,UTLNs 可将 UOX 局限于磷脂双分子层(具有生物膜的相似特性)中,故 UTLNs 能在 pH 8.5 时能很好地保持 UOX 较高的活性。游离 UOX 的最适 pH 为 8.5(请见“2.2 最适 pH 的测定”结果),故在 pH 8.5 时能保持很好的稳定性。抗酶解能力的结果也充分说明,脂质膜能很好地保护 UOX 免受膜外胰蛋白酶的破坏。用 LNs 作为药物载体使 UOX 稳定性提高的原因除上述所说的 LNs 将 UOX 完整的包封于脂质膜内,使 UOX 免受脂质膜外界条件的干扰而丧失活性之外,还可能是因为部分酶分子与脂质膜之间的相互作用使酶的活性更稳定^[16]。UOX-LNs 的稳定性是其质量控制的关键因素,良好的稳定性是大规模生产和应用于临床实现的关键。

从最适 pH 的实验结果(图 2)可看出,当溶液在 pH 7.5 的近中性条件下,UTLNs 表现出了较游离 UOX 更高的活性,是游离 UOX 的 1.75 倍,图中也可看出,当 pH 7.4 时 UTLNs 的活性是明显高于游离 UOX 的。酸碱稳定性的结果也显示出,pH 7.5 时 UTLNs 的酸碱稳定性明显高于游离 UOX,而该 pH 值与体内血浆生理 pH 7.4 是很接近的。以上结果均表明当 UTLNs 在体内血浆 pH 7.4 条件下时,UTLNs 较游离 UOX 有更高的活性和更强的稳定性。

由本文实验数据可看出,UTLNs 有增强 UOX 活性和提高 UOX 体外稳定性的优点,本实验为 UTLNs 的在体研究奠定了良好的基础。在理论上,UTLNs 还应具有降低 UOX 免疫原性和提高 UOX 生物利用度等特点,而 UOX 脂质纳米粒 UTLNs 的在体情况有待进行深入和全面的研究。

参 考 文 献

- [1] 寇文娥,荣俊,于勤.猪尿酸酶动力学特性研究[J].中国医药生物技术,2009,4(2):128-131.
- [2] Sherman MR, Saifer MG, Perez-Ruiz F. PEG-uricase in the management of treatment-resistant gout and hyperuricemia[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(1): 59-68.
- [3] Pasut G, Sergi M, Veronese FM. Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(1): 69-78.
- [4] Tan QY, Wang N, Yang H, et al. Characterization, stabilization and activity of uricase loaded in lipid vesicles[J]. Int J Pharm, 2010, 384(1-2): 165-172.

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000397

通过皮肤图像角点密度和皮沟面积判断皮肤发育的研究

江 正¹, 贺向前¹, 孙 露², 单改仙², 李玲玉²

(重庆医科大学 1. 医学信息学院计算机教研室; 2. 基础医学院法医学与生物医学信息研究室, 重庆 400016)

【摘要】目的:通过筛选人体皮肤的部分纹理参数,探索皮肤发育老化的规律。**方法:**用数码显微镜采集健康人群前臂内侧中间部位皮肤的放大图像,通过数字图像处理技术提取皮肤纹理角点密度和皮沟面积 2 个参数,采用相关性、差异性以及回归分析方法分析其随年龄增长的发育规律。**结果:**实验数据表明,男女性均存在皮沟面积随年龄的增长而增加的现象(男性: $r=0.950$, $P=0.000$, 女性: $r=0.960$, $P=0.000$);而男女性的皮肤纹理角点密度随年龄的增长而减小(男性: $r=-0.958$, $P=0.000$, 女性: $r=-0.969$, $P=0.000$)。**结论:**通过对皮肤纹理角点密度和皮沟面积的定量分析,揭示了皮肤纹理部分参数的生理发育和老化规律,有利于美容效果的评价,为皮肤修复、皮肤美容、皮肤保养等提供定量数据支撑,同时在法医学领域提供一种新的年龄鉴定方法。

【关键词】皮肤纹理角点密度;皮沟面积;图像处理;皮肤发育**【中图分类号】**R322.99;TP391**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-03-17

Evaluating skin development based on corner density and rimae cutis area in skin image

Jiang Zheng¹, He Xiangqian¹, Sun Lu², Shan Gaixian², Li Lingyu²

(1. Teaching and Research Section of Computer, Medical Informatics College; 2. Teaching and Research Section of Forensic Medicine and Biomedical Informatics, Basic Medical College, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To probe into rule of skin development and aging by extracting corner density and rimae cutis area in skin image. **Methods:** The amplificatory skin images on the middle of inner forearm of healthy people were collected by digital microscope.

作者介绍:江 正, Email: 510497166@qq.com,

研究方向:医学图像处理及医学信息挖掘。

通信作者:贺向前, Email: hexiangqian@gmail.com。

基金项目:重庆市科委资助项目(编号:CSTC2013yykfA10013);重庆市渝中区科委资助项目(编号:20120305)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000397.html>

High technologies of image processing including image segmentation and corner detection were applied to extract quantitative data of the two parameters. Skin texture development rules were analyzed by using statistics methods of correlation analysis, variance analysis and regression analysis. **Results:** The experiment data showed that the area of rimae cutis increased with

- [5] Huang SH, Wu TK. Modified colorimetric assay for uricase activity and a screen for mutant *Bacillus subtilis* uricase genes following StEP mutagenesis[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(3): 517-523.
- [6] Patte C, Sakiroglu O, Sommelet D. European experience in the treatment of hyperuricemia[J]. *Semin Hematol*, 2001, 38(4 S10): 9-12.
- [7] Pui CH. Urate oxidase in the prophylaxis or treatment of hyperuricemia; the United States experience[J]. *Semin Hematol*, 2001, 38(4 S10): 13-21.
- [8] Goldman SC, Holcenberg JS, Finklestein JZ, et al. A randomized comparison between rasburicase and allopurinol in children with lymphoma or leukemia at high risk for tumor lysis[J]. *Blood*, 2001, 97(10): 2998-3003.
- [9] Cui Y, Wu Z, Liu X, et al. Preparation, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of liposomes containing *Brucea javanica* oil[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2010, 11(2): 878-884.
- [10] El-Gahami MA, Albishri HM. Equilibrium studies of dibutyltin (IV)-zwitterionic buffer complexation. *J Solution Chem*, 2013, (42):

2012-2024

- [11] Tan QY, Zhang JQ, Wang N, et al. Uricase from *Bacillus fastidiosus* loaded in alkaline enzyosomes: enhanced biochemical and pharmacological characteristics in hypouricemic rats[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 82(1): 43-48.
- [12] Patten CS, Daniels D, Suzuki A, et al. Structural and signaling requirements of the human melanocortin 4 receptor for MAP kinase activation[J]. *Regul Pept*, 2007, 142(3): 111-122.
- [13] Chen M, Cai M, McPherson D, et al. Contribution of the transmembrane domain 6 of melanocortin-4 receptor to peptide [Pro 5, DNaI(2') 8]-gamma-MSH selectivity[J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(1): 114-124.
- [14] 王 娜. 治疗高尿酸血症 UOX 脂质纳米粒的初步研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2010.
- [15] 何忠效. 生物化学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 4-5.

(责任编辑: 关蕴良)