

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.30.003

雾化吸入抗 NGF 缓释微球抑制哮喘气道炎症的疗效探讨*

余巍巍¹,马礼兵¹,罗 森¹,林武洲¹,赵海金²

(1. 桂林医学院附属医院呼吸与危重症科/桂林医学院呼吸疾病研究所,广西桂林 541001;
2. 南方医科大学南方医院呼吸和危重症科/慢性气道疾病研究室,广州,510515)

[摘要] **目的** 探讨哮喘小鼠雾化吸入抗神经生长因子(NGF)缓释微球(NGFM)对气道炎症的抑制作用。**方法** 动物分为 4 组:对照组、哮喘组、抗 NGF 组和雾化抗 NGFM 组。卵蛋白诱导建立气道重塑模型;测定并评估网状基底膜厚度、胶原蛋白厚度和肺组织的气道壁厚度;HE、Masson 和 AB-PAS 染色观察拮抗前、后肺部病理变化,免疫组织化学方法及 RT-PCR 分别检测小鼠拮抗前、后的肺内的 NGF 蛋白及 mRNA 表达变化。**结果** 病理严重程度评分结果依次为哮喘组>抗 NGF 组>抗 NGFM 组。各组肺功能的平均气道阻力值依次为哮喘组>抗 NGF 组>抗 NGFM 组>对照组。NGF 激发后的动态肺顺应值依次为对照组>抗 NGFM 组>抗 NGF 组>哮喘组。对气道平滑肌厚度、网状基底膜厚度、胶原蛋白厚度进行比较,抗 NGFM 组<抗 NGF 组<哮喘组,NGF 蛋白和 mRNA 水平进行比较,对照组<哮喘组<抗 NGF 组<抗 NGFM 组间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 雾化吸入抗 NGF 缓释微球对哮喘小鼠气道炎症有抑制作用,并能改善肺功能。

[关键词] 神经生长因子;哮喘;气管炎;缓释微球

[中图法分类号] R562.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)30-3854-04

Atomization inhalation anti-NGF slow-release microspheres inhibite airway inflammation in asthma mice*

SHE Weiwei¹,MA Libin¹,LUO Miao¹,LIN Wuzhou¹,ZHAO Haijin²

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine,the Affiliated Hospital of Guilin Medical University/Institute of Respiratory,Guilin Medical University Diseases,Guilin 541001,China;
2. Chronic Airways Diseases Laboratory/Department of Respiratory and Critical Care Medicine ,Nanfang Hospital ,Southern Medical University ,Guangzhou,Guangdong 510515,China)

[Abstract] **Objective** To explore atomization inhalation anti-nerve growth factor (anti-NGF) slow-release microspheres whether can inhibit the airway inflammation of asthma mice. **Methods** Animals were randomly divided into four groups:control group,asthma group,anti-NGF group,and anti-NGF slow-release microspheres (refer to anti-NGFM) group,10 mice in each group. We used OVA induced sensitization mice so as to establish the airway remodeling of asthma model mice. Detection and evaluation of the reticular basement membrane thickness,collagen and lung airway wall thickness were done. HE staining,Masson staining and AB-PAS staining was used to study the lung pathological changes after mice were antagonism,immunohistochemical method to detect and compare the NGF protein and mRNA expression of bronchial mucosa. Immunohistochemical method was used to detect NGF protein and mRNA expression change in the lungs before and after the mice were antagonism. **Results** According to the severity,the score for each group of pathology was in the order of anti-NGFM group>anti-NGF group>asthma group. Groups of average airway resistance value of the lung function were analyzed,resistance value was in the order of asthma group>anti-NGF group>anti-NGFM group>the control group. Dynamic lung compliance of mice after histamine excitation generated by NGF was in the order of control group>anti-NGFM group>anti-NGF group> asthma group. The airway smooth muscle and reticular basement membrane thickness,collagen deposition was in the order of anti-NGFM group>anti-NGF group>asthma group and NGF protein and mRNA expression was control group<asthma group<anti-NGF group<anti-NGFM group ($P<0.05$). **Conclusion** Atomization inhalation anti-NGF slow-release microspheres can inhibit the airway inflammation,and improve the lung function in asthma mice.

[Key words] nerve growth factor;asthma;tracheitis;slow-release microspheres

* 基金项目:广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题(Z2013481);广西壮族自治区教育厅高校科研项目(LX2014262)。 作者简介:余巍巍(1978—),博士,副主任医师,主要从事哮喘研究。

神经生长因子(NGF)与过敏性和炎症疾病有关,在哮喘的病理生理学中起着重要的作用^[1]。已有文献报道了抗 NGF 与支气管哮喘病理改变的关系,如网状基底膜的厚度、胶原蛋白厚度、气道壁厚度和 NGF mRNA 表达的关系^[2-3]。然而,抗 NGF 在哮喘患者中的应用仍存在一定的困难。例如,关于抗 NGF 的具体机制及其药理作用尚不清楚。此外,抗 NGF 的短静脉半衰期,用药后的快速稀释和代谢,体内 NGF 抗体的中和作用都会影响其疗效。肺部因与外界相通且易于雾化吸入这一特殊的生理结构故常适合于医学上将其作为局部用药的给药部位,但对肺内雾化吸入缓释微球这一方法在肺部局部用药治疗疾病方面优越性,这些目前尚缺乏更多的报道^[4]。因此,本研究采用免疫组织化学法观察雾化吸入抗 NGF 缓释微球(NGFM)对哮喘小鼠 NGF 表达的影响,并为哮喘的发病机制和治疗提供了新的实验数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雌性体健的 8~10 周龄 BALB/c 小鼠 40 只,由桂林医学院实验动物中心提供。

1.2 仪器与试剂 牛血清清蛋白(BSA,杭州四季青生物工程材料有限公司);抗鼠 NGF 抗体(美国 Sigma);Masson 染色试剂盒(福建迈新生物技术开发公司);羊抗鼠 IgG、免疫组织化学染色(SABC)试剂盒及辣根过氧化物酶显色剂(武汉博士德生物工程有限公司);小鼠雾化吸入箱(自制)。

1.3 方法

1.3.1 抗 NGFM 的制备 用改进的高分子合金方法^[5]制备抗 NGFM。300 μ g 鼠抗-NGF 抗体用 0.5 mL 含 10 mg 的 BSA 溶液混合。冷冻干燥条件:预冻温度 50 $^{\circ}$ C,以 20 $^{\circ}$ C/min 的速率降温,其次将 20 $^{\circ}$ C 孵化 3 h 和 20 $^{\circ}$ C 孵化 12 h 冷冻干燥处理后的冻干抗 NGF 粉均匀地分散在 BSA 矩阵中。将约 300 mg 的聚乳酸(PLA)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)按质量比 1:3 添加到一个试管中,将所制备的冻干抗 NGF 粉取出。然后将聚合物溶解在 2 mL 二氯甲烷形成的油相中,10 mL 2% 的聚乙烯醇作为水相,水相加入油相,1 700 r/min 磁搅拌 30 s,产生 S/O/W 型乳液,S/O/W 型乳液转移至 400 mL 10% 氯化钠去离子水溶液中。室温下 1 700 r/min 磁搅拌 30 s。制备成 256.7 mg 抗 NGFM,于 4 $^{\circ}$ C 保存,用于后续实验。

1.3.2 动物建模和分组 小鼠分为 4 组:对照组、哮喘组、抗 NGF 组和抗 NGFM 组,每组 10 只。除对照组外各组均于第 1、7 天腹腔注射含卵清蛋白(OVA)的致敏液 0.5 mL[含 50 μ g OVA 和 2 mg Al(OH)₃ 混合液]腹腔注射致敏。然后抗 NGF 组:第 15 天起小鼠采用 1% OVA 约 10 mL 进行反复雾化吸入激发小鼠,每次雾化 30 min,隔天 1 次,持续至第 72 天,并同时分别于以抗 NGF 抗体(4 mL/kg)腹腔内注射(隔天 1 次),观察小鼠症状,于最后一次腹腔注射抗

NGF 抗体后测定气道反应性。抗 NGF 微球组:于第 15 天开始小鼠采用 1% 10 mL OVA 进行反复雾化吸入激发小鼠,每次雾化 30 min,隔天 1 次,持续至第 72 天,并同时分别于以抗 NGFM 雾化吸入治疗(每次雾化 30 min,隔天 1 次)。对照组则参照相同的方案第 1 和 7 天腹腔注射磷酸盐缓冲液(PBS),第 15 天给予 PBS 雾化,每次 30 min,隔天 1 次,持续至第 72 天。以上各组在第 72 天的 24 h 内处死小鼠,取肺组织作后续分析。

1.3.3 肺功能测试 麻醉小鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛。采用全身体积描记系统(美国 Buxco 电子有限公司)进行肺功能测试,先记录基线时的跨肺压、肺流量、潮气量等,随后记录吸入各组胺浓度后的(组胺雾化 20 s 以后)跨肺压、肺流量和潮气量等,计算出气道肺阻力和动态肺顺应性,气道反应性是用气道肺阻力和动态肺顺应性来表现。

1.3.4 组织学检查 对支气管网状基底膜厚度的组织学检查,在切片距离 200 μ m 分隔处的两个位置分别取出标本,在 100 μ m 区间内取 3 点作为样本并记录其支气管黏膜网状基底膜厚度,以这 3 点样本的平均值做为网状基底膜厚度。用千分尺放大($\times 1\ 000$)并从基底的支气管上皮下的网状层的外边缘厚度测量。使用计算机图像分析软件来测定平滑肌层、网状基底膜层厚度和气道壁的内外径。

1.3.5 SABC 免疫组织化学法检测 NGF 蛋白表达 将标本放入 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 切片,采用 SABA 免疫组织化学法,一抗稀释比为 1:50,显色后中性树胶封片,参照经典方法^[8-9],记录 NGF 阳性反应区。

1.3.6 病理染色 从右侧主支气管开口和从中、下支气管各取 3 个标本来进行活组织检查。经 100 mg 的苯巴比妥腹腔注射麻醉后,所有大鼠均行开胸手术。HE 染色:肺组织 5 μ m 石蜡切片,59 $^{\circ}$ C 烤箱熔蜡,二甲苯透明 30 min,梯度乙醇脱水约 10 min,苏木素染色约 10 min,随后盐酸分化 2 s,给予快速伊红染色,再梯度乙醇脱水,最后干燥行中性树胶并且封片。Massion 染色:肺组织 5 μ m 石蜡切片,水洗后行苏木素染色,盐酸乙醇分化,1% 酸性品红液染色,给予 1% 磷钼酸水溶液浸染,再行冰乙酸分化;然后给予苯胺蓝溶液染色,1% 冰醋酸液进行分色,随后用 95% 乙醇、无水乙醇进行脱水;二甲苯透明,中性树胶进行封片。AB-PBS 染色:肺组织 5 μ m 石蜡切片,常规脱蜡至水,3% 乙酸液洗 2 min,加入 1% 阿利新兰醋酸液 10~20 min,蒸馏水冲洗,0.5% 过碘酸水溶液浸染 5 min;然后蒸馏水冲洗,70% 乙醇冲洗;Schiff 液浸染 15~30 min;流水冲洗 10 min;苏木素淡染 2~3 min,水洗;常规脱水、封片。观察左侧主支气管及其周围 3 个大血管的炎性细胞浸润程度,并得到平均值。采用光笔来描写平滑内外边界及气道基底膜的周长。检测

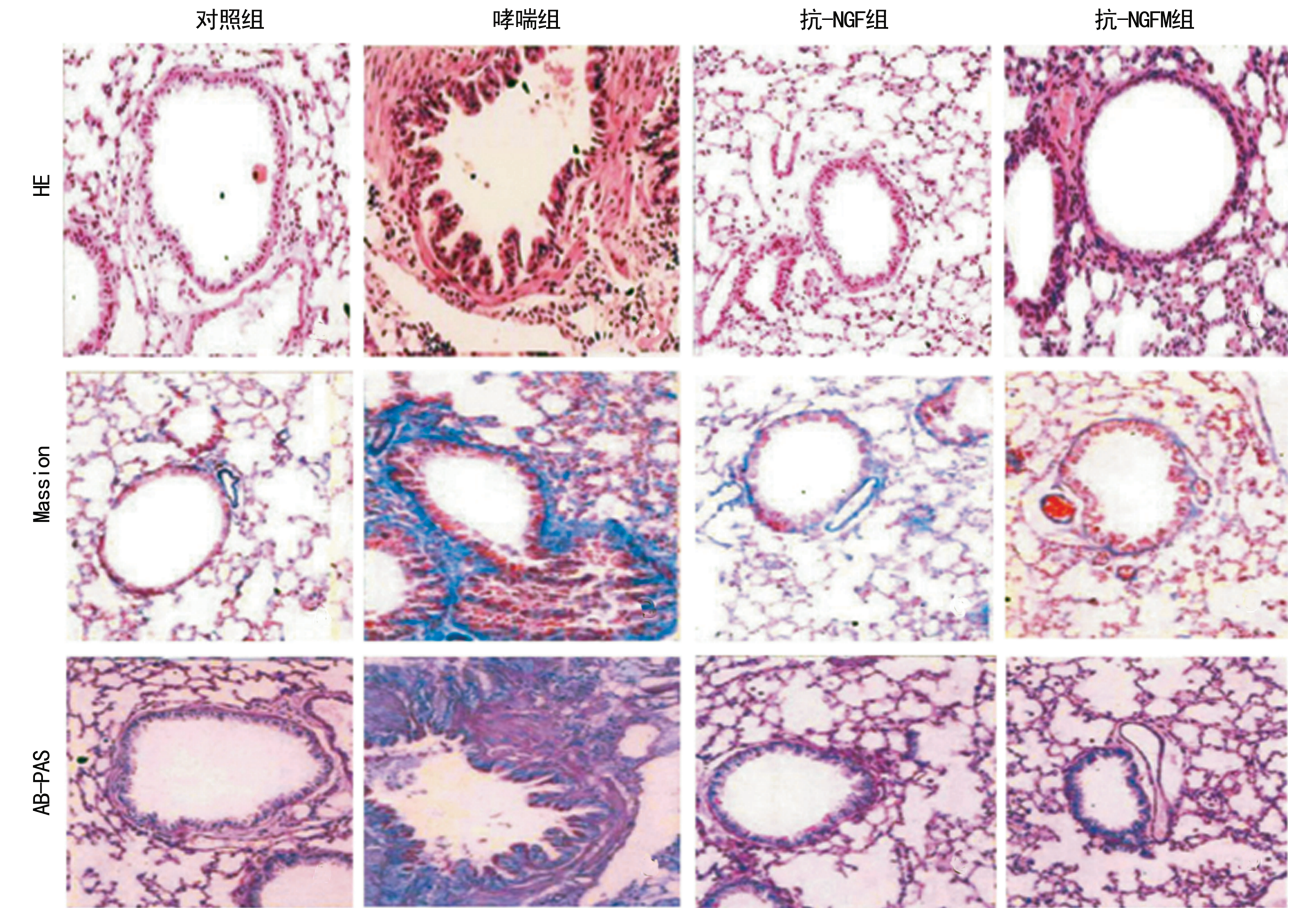


图 1 各组小鼠肺组织的病理图片(×400)

基底膜的周长(BM)及平滑肌的面积(AM),并计算平滑肌的肌肉厚度为(μm)。

1.3.7 RT-PCR 检测 从活检组织中分离出总 RNA,并反向转录为 cDNA。用 RT-PCR 检测 NGF 表达,以 GAPDH 作为内部控制。NGF 正向引物 5'-ATC CAC CCA CCC AGT CTT CCA CAT-3', 反向引物 5'-GGC AGC CTG TTT GTC GTC TGT TGT-3';GAPDH 正向引物 5'-CCT CTG GAA AGC TGT GGC GT-3', 反向引物 5'-TTG GAG GCC ATG TAG GCC AT-3',反应条件:95 ℃变性 5 min;95 ℃变性 5 s,55 ℃退火 5 s,72 ℃扩展 15 s,40 个循环。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行方差齐性检验,多组均数间比较用单因素方差分析(one way ANOVA),组间两两比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物行为学及肺组织病理学 HE 染色:哮喘组可见血管旁和呼吸道周围有许多的淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等炎性细胞浸润,并且平滑肌层和黏膜下层增厚,气道的管腔明显狭窄;抗 NGF 组、抗 NGFM 组均较哮喘组气道重塑情况有明显减轻。Masson 染色:哮喘组的胶原沉积多存在于气道上皮和血管壁处,并有显著的增加现象,少量胶原沉积存在于肺泡间

隔、小叶间及血管周围的结缔组织中;抗 NGF 组和抗 NGFM 组均较哮喘组有显著的减弱。AB-PAS 染色:哮喘组可见 AB-PAS 阳性信号面积在气管上皮内有显著的增加,黏液杯状细胞增生。抗 NGF 组、抗 NGFM 组均较哮喘组黏液细胞增生减轻,见图 1。在哮喘组,可见双侧鼻流鼻涕、呼吸急促和喘息。安静时,抗 NGF 组和抗 NGFM 组出现了轻微的症状。根据病理改变的程度,按严重程度依次为哮喘组>抗 NGF 组>抗 NGFM 组。

表 1 NGF 激发前、后小鼠平均气道阻力 ($\bar{x} \pm s, \text{cm H}_2\text{O}$)

组别	<i>n</i>	激发前	激发后
对照组	10	0.18±0.002	0.18±0.002
哮喘组	10	0.28±0.001	0.37±0.031 ^a
抗 NGF 组	10	0.25±0.003	0.31±0.01 ^{ab}
抗 NGFM 组	10	0.21±0.002	0.24±0.02 ^{ac}

^a: $P < 0.05$,与激发前比较;^b: $P < 0.05$,与哮喘组比较;^c: $P < 0.05$,与抗 NGF 组比较

2.2 小鼠肺功能测试显示 NGF 激发后在平均气道阻力方面,哮喘组>抗 NGF 组>抗 NGFM 组>对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。在肺顺应性方面,对照组的动态肺顺应性值在激发前、后无明显差异。在 NGF 激发后对照组>抗 NGFM 组>抗 NGF 组>哮喘组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表2 NGF 激发前、后小鼠的平均动态肺顺应性
($\bar{x}\pm s$,cm H₂O)

组别	n	激发前	激发后
对照组	10	0.90±0.01	0.90±0.02
哮喘组	10	0.43±0.01	0.37±0.02 ^a
抗 NGF 组	10	0.58±0.01	0.41±0.02 ^{ab}
抗 NGFM 组	10	0.71±0.01	0.69±0.02 ^{abc}

^a: $P<0.05$,与激发前比较;^b: $P<0.05$,与哮喘组比较;^c: $P<0.05$,与抗 NGF 组比较

2.3 网状基底膜厚度、胶原蛋白厚度及气道壁厚度 各组在小鼠肺组织网状基底膜厚度、胶原蛋白厚度及气道壁厚度比较可见抗 NGFM 组<抗 NGF 组<哮喘组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表3 网状基底膜厚度、胶原蛋白厚度、气道壁厚的比较($\bar{x}\pm s$, μ m)

组别	n	网状基底膜厚度	胶原蛋白厚度	小鼠气道壁厚
对照组	10	4.32±0.58	66.07±15.56	17.13±2.05
哮喘组	10	8.02±1.22 ^a	86.07±18.58 ^a	30.63±2.10 ^a
抗 NGF 组	10	6.93±0.68 ^{ac}	78.27±16.58 ^{ac}	22.11±2.12 ^{ac}
抗 NGFM 组	10	4.68±0.59 ^{bc}	72.18±22.60 ^{bc}	17.02±2.02 ^{bc}

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与抗-NGF 组比较;^c: $P<0.05$,与哮喘组比较

2.4 肺组织中 NGF 蛋白及 mRNA 的表达 表 4 显示了各组肺组织中 NGF 蛋白和 NGF mRNA 的平均灰度值。NGF 蛋白及 mRNA 均为哮喘组>抗-NGF 组>抗-NGFM 组>对照组,两两比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

表4 4 组小鼠的 NGF 蛋白表达与 NGF mRNA 的平均灰度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NGF 灰度值	NGF mRNA 灰度值
对照组	10	72.42±2.56	0.87±0.17
哮喘组	10	108.25±1.69 ^a	1.97±0.13 ^a
抗 NGF 组	10	92.25±2.21 ^{ab}	1.77±0.46 ^{ab}
抗 NGFM 组	10	83.01±2.01 ^{abc}	1.43±0.38 ^{abc}

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与哮喘组比较;^c: $P<0.05$,抗 NGF 组比较

3 讨 论

最近的研究表明,抗 NGF 可能会拮抗过敏性哮喘的气道高反应性。哮喘可以诱导肺组织的 NGF 过度表达^[3,6],NGF 过度表达可能与哮喘发病机制中涉及的其他致病因素协同配合,诱发关键性肺损伤^[2]。NGF 在哮喘^[7]中起着“粘结”作用,合理的抗 NGF 调节可以有效地减少气道哮喘及肺组织的 NGF 过度表达^[6],抑制气道重塑和炎症^[3],从而延缓甚至逆转哮喘的进程。在本研究中,雾化吸入后的抗 NGFM 能附着在受损气道内的内皮外露神经末梢,导致神经末梢和神经递质释放的持续抑制,从而达到控制哮喘气道炎症的目的。

在肺功能测试中发现,气道流速的大小、气道阻力程度、动态肺顺应性值在抗 NGFM 组中均有明显抑制,提示抗 NGFM 可降低气道流速,改善气道阻力

及动态顺应性,局部雾化吸入抗 NGFM 是较好的药物管理途径。本研究在网状基底膜厚度、胶原厚度和气道壁厚度方面抗-NGFM 和抗-NGF 之间的差异明显,表明雾化吸入抗-NGFM 可以显著抑制网状基底膜厚度、胶原蛋白沉积、哮喘气道炎症和气道壁厚度。抗 NGF 组与抗 NGFM 组之间的差异有统计学意义,提示腹腔内注射不能集中药物于肺内,可能会拮抗 NGF 在神经系统和其他器官的正常功能需要。

本研究显示 NGF mRNA 和 NGF 蛋白质在抗 NGFM 组中的表达明显低于抗 NGF 组,这提示与腹腔注射比较,雾化吸入治疗可更有效地减少 NGF 表达。基于以往的研究^[3,8-9],抗 NGF 干预可拮抗气道高反应性和气道炎症,从而减少 NGF 的分泌,当抗 NGF 药物制成微球后,其对肺组织有亲和力,并选择性地药物直接靶向相应部位。微球可以准确地递送到所需的部位,以连续或脉冲的方式释放活性蛋白,避免由于重复使用生物半衰期短的药物而给患者带来不便^[10]。美国食品和药物管理局已批准微球配方作为人体的载体材料^[11]。王世寿等^[12]提出:肺部微球因载体材料的释药性能而具有缓释性,并因常用的材料有淀粉、聚乳酸等,具有生物可降解性、生物相容性和生物黏附性,故具有安全性,同时因微球在肺内局部作用故具有良好肺内靶向性,可提高药物的疗效。因此,如果抗 NGFM 可用于临床治疗哮喘,其可能会提供更好的治疗效果。然而,抗 NGFM 在人类身上的安全性和有效性还需要进一步研究。

总之,雾化吸入抗 NGFM 的治疗改善了哮喘小鼠肺的行为和病理变化,提示该药给予雾化吸入可能优于腹腔注射。这可能是因为雾化吸入给药可以增加局部血液的药物浓度并超过药物治疗的阈值浓度,此外,缓释微球是一种有效的控释制剂,能提高稳定性,降低机体损伤程度,具有良好的生物耐受性,使药物集中在靶区。这些特点可以改善药物治疗的疗效。

参考文献

[1] ABRAM M,WEGMANN M,FOKUHL V,et al. Nerve growth factor and neurotrophin-3 mediate survival of pulmonary plasma cells during the allergic airway inflammation[J]. J Immunol,2009,182(8):4705-4712.

[2] YANG Y G,TIAN W M,ZHANG H,et al. Nerve growth factor exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in a rat model of chronic asthma[J]. Expand Ther Med,2013,6(5):1251-1258.

[3] HUANG L W,SUN G,WANG D L,et al. Inhibition of nerve growth factor/tyrosine kinase receptor A signaling ameliorates airway remodeling in chronic allergic airway inflammation[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2015,19(12):2261-2268.

[4] MASAELI R,KASHI T S J,DINARVAND R,et al. Preparation, characterization and evaluation of drug release properties of simvastatin-loaded PLGA(下转第 3862 页)

Akt 有望降低顺铂抗三阴性乳腺癌治疗的有效浓度,从而减少顺铂的毒副作用和化疗耐药的发生。

综上所述, MK-2206 通过抑制 Akt 激酶促进顺铂诱导的线粒体途径细胞凋亡, 并与顺铂通过药物协同作用抑制 MDA-MB-468 细胞增殖。上述研究表明, MK-2206 与顺铂联合应用具有潜在的抗三阴性乳腺癌临床应用价值。

参考文献

- [1] FOULKES W D, SMITH I E, FEIS-FILHO J S. Triple-negative breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(20): 1938-1948.
- [2] VON MINCKWITZ D, PROCTER M, DE AZAMBUJA E A, et al. Adjuvant pertuzumab and trastuzumab in early HER2-positive breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(2): 122-131.
- [3] PICCART-GEBHART M, HOLMES E, BASELGA J, et al. Adjuvant lapatinib and trastuzumab for early human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: results from the randomized phase III adjuvant lapatinib and/or trastuzumab treatment optimization trial[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(10): 1034-1042.
- [4] MAYER I A, ARTEAGA C L. The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment[J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67(1): 11-28.
- [5] HAHNE C, JENS B, HONIG A, et al. The PI3K/AKT/mTOR-signal transduction pathway as drug target in triple-negative breast cancer[J]. *Clin Cancer Drugs*, 2017, 4(1): 47-58.
- [6] LARA J, LONGMATE J, MACK P C, et al. Phase II study of the AKT inhibitor MK-2206 plus erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer who previously progressed on erlotinib[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(19): 4321-4326.
- [7] TOLCHER A W, PATNAIK A, PAPADOPOULOS K P, et al. Phase I study of the MEK inhibitor trametinib in combina-

tion with the AKT inhibitor afuresertib in patients with solid tumors and multiple myeloma[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 75(1): 183-189.

- [8] GODUGU C, DODDAPANENI R, SINGH M. Honokiol nanomicellar formulation produced increased oral bioavailability and anticancer effects in triple negative breast cancer (TNBC)[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 153: 208-219.
- [9] 焦明文, 袁凯, 王玉龙, 等. MK-2206 逆转 MCF-7/ADR 阿霉素耐药作用的初步探讨[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(11): 1494-1500.
- [10] CHOU T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440-446.
- [11] FAES S, DORMOND O. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 21138-21152.
- [12] MA C X, SANCHEZ C, GAO F, et al. A phase I study of the AKT inhibitor MK-2206 in combination with hormonal therapy in postmenopausal women with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(11): 2650-2658.
- [13] MA C X, SUMAN V, GOETZ M P, et al. A phase II trial of neoadjuvant MK-2206, an AKT inhibitor, with anastrozole in clinical stage II or III PIK3CA-Mutant ER-Positive and HER2-Negative breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(22): 6823-6832.
- [14] HU X C, ZHANG J, XU B H, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus paclitaxel plus gemcitabine as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (CBC-SG006): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(4): 436-446.
- [15] DIMMELER S, FLEMING I, FISSLTHALER B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation[J]. *Nature*, 1999, 399(6736): 601-605.

(收稿日期: 2018-05-18 修回日期: 2018-06-16)

(上接第 3857 页)

- microspheres[J]. *Iran J Pharm Res*, 2016, 15(Suppl): 205-211.
- [5] YUAN W, LIU Z. Controlled-release and preserved bioactivity of proteins from (self-assembled) core-shell double-walled microspheres[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012(1), 7: 257-270.
- [6] 余巍巍, 杨新官. 哮喘大鼠肺内神经生长因子的表达变化及与病理改变的关系[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2012, 33(1): 65-67.
- [7] 余巍巍, 陈峰, 罗森. 神经生长因子对哮喘大鼠气道炎症中 TNF- α 表达的调节作用[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(17): 3301-3303.
- [8] LIU Y, ZHANG B, ZHANG S, et al. Nerve growth factor mediated SH2-B β /Akt signal pathway activated in allergic airway challenge in mice[J]. *Respirology*, 2010, 15(1): 80-87.

- [9] FREUND V, PONS F, JOLY V, et al. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions[J]. *Eur Respir J*, 2002, 20(2): 458-463.
- [10] HANF Y, THURECHTK J, WHITTAKER K, et al. Bioerodable PLGA-based microparticles for producing sustained-release drug formulations and strategies for improving drug loading[J]. *Front Pharmacol*, 2016(7): 185.
- [11] JIANG W, GUPTA R K, DESHPANDE M C, et al. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticle for injectable delivery of vaccine antigens[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(3): 391-410.
- [12] 王世寿, 武刚. 肺部缓释微球治疗肺部疾病的性能及评价[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(12): 2241-2248.

(收稿日期: 2018-05-18 修回日期: 2018-06-26)