

· 论著 ·

薄荷脑鼻腔原位凝胶剂的制备及安全性研究

李新方¹, 李现贵¹, 马志强¹, 钟延强¹, 高钰琪², 杨峰¹ (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 第三军医大学高原军事医学系, 重庆 400038)

[摘要] 目的 制备薄荷脑鼻用原位凝胶剂, 并对其进行安全性考察。方法 采用去乙酰结冷胶为材料制备离子敏感性原位凝胶。考察鼻腔原位凝胶对蟾蜍鼻黏膜纤毛的毒性及大鼠鼻黏膜的影响; 并进行家兔皮肤刺激实验和豚鼠皮肤过敏实验, 观察皮肤反应并评分。结果 薄荷脑鼻用原位凝胶剂对蟾蜍鼻黏膜纤毛无显著毒性, 对大鼠鼻黏膜形态及细胞分化无显著影响; 对家兔完整皮肤无刺激作用, 豚鼠皮肤无过敏反应。结论 薄荷脑鼻用原位凝胶剂具有制备工艺简便、纤毛毒性低、生理相容性好的优点, 开发为经鼻给药系统可行性良好。

[关键词] 原位凝胶; 薄荷脑; 鼻腔给药; 结冷胶; 安全性

[中图分类号] R944 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)04-0321-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.008

An *in situ* gel system for nasal delivery of menthol : preparation and safety evaluation

LI Xinfang¹, LI Xiangui¹, MA Zhiqiang¹, ZHONG Yanqiang¹, GAO Yuqi², YANG Feng¹ (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. College of High-Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To prepare an *in situ* gel system for nasal delivery of menthol and to evaluate the safety of this formulation. **Methods** Menthol *in situ* gel was prepared with deacetylated gellan gum. The nasal mucocilia toxicities of this formulation was evaluated using *in situ* toad palate model. Guinea pig skin sensitization test and the rabbit skin irritation test were conducted. Skin allergy and irritation reaction were monitored and scored. **Results** No significant effect on nasal mucosa ciliary movement and the morphology of rat nasal mucosa were observed. The formulation did not induce any dermal irritation in rabbits. Skin allergic reaction was not found in guinea pigs. **Conclusion** The preparation of menthol *in situ* nasal gel with low ciliary toxicity was easily achieved. This gel has good physiological flexibility. The further investigation was warranted for this formulation as an intranasal drug delivery system.

[Key words] *in situ* gel; menthol; nasal drug delivery; deacetylated gellan gum; safety

薄荷脑具有清凉、止痒、抗炎、抗菌等功效, 能散发一种令人愉悦的芳香。鼻腔给药系统是药物经鼻黏膜吸收从而发挥预防或治疗作用的制剂, 具有使用方便、吸收迅速等优点^[1]。去乙酰结冷胶鼻腔给药后, 受到鼻液中钠、钾、钙等离子的刺激, 由液态转变为凝胶态, 延长了药物在鼻腔的停留时间^[2], 提高其生物利用度^[3]。鼻黏膜纤毛是呼吸系统的第一道屏障, 生理条件下, 纤毛协调地摆动可清除鼻腔的异物和微生物, 起到保护作用。然而, 受到药物及辅

料的影响, 会产生不同程度的纤毛毒性, 导致患者依从性降低^[4]。本研究以薄荷脑为有效药物, 以去乙酰结冷胶为凝胶材料, 制备薄荷脑鼻用原位凝胶剂, 考察薄荷脑鼻腔原位凝胶对大鼠鼻黏膜形态和细胞分化的影响及对蟾蜍鼻黏膜纤毛的毒性, 并进行家兔皮肤刺激实验和豚鼠皮肤过敏实验, 综合评价该制剂的安全性, 为其临床应用的安全性提供依据。

1 材料

1.1 仪器 超纯水系统 Nanopure (美国赛默飞科技公司); FA1004 万分之一天平 (上海天平仪器厂); 超声波水浴 (SK2510HP, 上海科导超声仪器有限公司); SNB-2 数字旋转黏度计 (上海精科天美科学仪器有限公司); 带照相机光学显微镜 (LEIKA);

[基金项目] 全军后勤科研计划重大项目 (AWS14L005)

[作者简介] 李新方, 硕士研究生。研究方向: 军事药学。Tel: 18571099834; Email: liznfr3087@126.com

[通讯作者] 杨峰, 博士, 副教授, 硕士生导师。研究方向: 军事药学。Tel: (021)81871218; Email: yangfeng1008@126.com

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司)。

1.2 药品和试剂 对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯(国药集团化学试剂公司);去乙酰结冷胶(sigma);薄荷脑(上海迈瑞尔化学技术有限公司);注射用生理盐水(安徽双鹤药业有限责任公司);2,4-二硝基氯苯(上海哈灵生物科技有限公司);1%呋麻滴鼻液(上海长海医院自制);吐温-80(中国医药集团上海化学试剂公司);去氧胆酸钠(青岛高科园海博生物技术有限公司);4%多聚甲醛(上海博光生物技术有限公司);苏木素-伊红染色液(北京索莱宝科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.3 实验动物 健康雄性成年SD大鼠,体重250~300 g,购自第二军医大学实验动物中心,饲养条件为层流环境,适宜的温度、湿度与光照;白色豚鼠,2月龄,体重350~400 g,雄性家兔,3月龄,体重2.2~2.5 kg,由上海斯莱克实验动物有限公司提供;中华大蟾蜍,雄性,体重35~40 g,第二军医大学药理学教研室提供。

2 实验方法及结果

2.1 薄荷脑鼻用原位凝胶剂的制备 称取对羟基苯甲酸甲酯0.1 g、对羟基苯甲酸丙酯0.01 g,置于适量去离子水中,水浴搅拌至溶解,加入去乙酰结冷胶0.4 g,加热至溶液澄清。所得溶液冷却后,加入吐温-80,搅拌至溶液混合均匀,少量逐次加入薄荷脑

0.1 g,用去离子水定容至100 ml,搅拌溶解即得。

2.2 鼻用原位凝胶对大鼠鼻黏膜形态及细胞分化的影响 选取9只健康雄性SD大鼠随机分为鼻用原位凝胶组、生理盐水组(阴性对照)和1%去氧胆酸钠组(阳性对照),每组3只。每只大鼠左侧鼻孔每次给予50 μ l药液,每日3次,连续7 d,第8天处死,分离鼻中隔黏膜,用生理盐水洗净血块及杂物。用4%多聚甲醛固定分离出来的黏膜,脱水处理,制成3~5 μ m石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察并拍照记录细胞形态。

生理盐水组(图1 A、B)表面被覆上皮部分为假复层纤毛上皮,部分为无角化复层扁平上皮,上皮下的软骨或浆液腺均有暴露,形态基本正常,炎症表现不突出,但部分区域查见巢片状分布的胞质丰富、粉染、核圆形或卵圆形的浆细胞样单核细胞浸润,黏膜无充血、水肿、坏死等异常现象。鼻用原位凝胶组(图1 C、D)组织图像显示被覆上皮相对比较规整,上皮下结缔组织的炎症表现较轻,浆液腺体规整、腔小,分泌欠旺盛,仅前庭部黏膜上皮见有少量慢性炎症细胞浸润;暴露的黏膜上皮细胞大多依然规整,上皮下浸润的慢性炎症细胞松散、量少,伴小灶性出血。1%去氧胆酸钠组(图1 E、F)鼻黏膜炎症表现较突出,上皮层细胞厚薄不等,局部区域细胞排列较混乱,上皮下微血管扩张充血,大多区域密布慢性炎症细胞为主的炎性细胞浸润。结果显示,鼻用原位凝胶对大鼠鼻黏膜无明显的毒性。

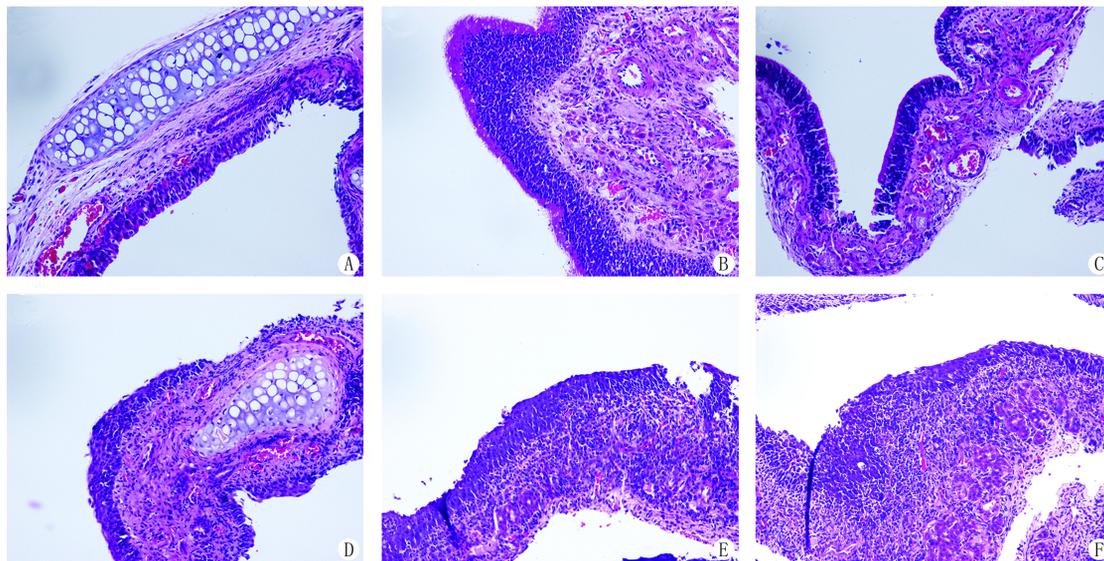


图1 大鼠鼻黏膜组织切片图(HE染色,×200)

A、B.生理盐水组(阴性对照);C、D.鼻用原位凝胶组;E、F.1%去氧胆酸钠组(阳性对照)

2.3 鼻用原位凝胶对蟾蜍鼻黏膜纤毛的影响 采用在体法考察鼻黏膜纤毛毒性^[5]。阴性对照组、阳

性对照组分别采用生理盐水、1%去氧胆酸钠溶液处理。将蟾蜍仰卧固定,止血钳牵拉,使口张开,于上

颞黏膜分别滴加生理盐水、1% 去氧胆酸钠溶液、鼻用原位凝胶 0.5 ml,使完全浸没上颞。30 min 后用生理盐水洗净药物,分离出大小约为 3 mm×3 mm 的蟾蜍上颞黏膜,再用生理盐水清洗附着的血块,将黏膜朝上平铺于载玻片上,用生理盐水润湿,盖上盖玻片,排除气泡,光学显微镜下(10×40 倍)观察纤毛运动情况。再将载玻片室温放置于加有少量生理盐水的密闭容器内,每隔 30 min 取出,显微镜下观察,并记录纤毛持续运动时间。记录以上各实验组的纤毛运动停止时间,计算纤毛持续运动时间百分比。此百分比越高,表明制剂对纤毛的毒性越小,制剂的安全性越高。一般以纤毛持续运动时间百分比大于 85% 为制剂的安全阈值。

$$\text{运动时间百分比} = \frac{\text{给药组运动时间}}{\text{阴性对照组运动时间}} \times 100\%$$

纤毛毒性试验持续运动时间见表 1,以生理盐水组纤毛持续运动时间为 100%,按照上述公式计算得到各组纤毛持续运动时间百分比,阳性对照组纤毛持续运动时间百分比为 5.08%,有明显的纤毛毒性;鼻腔原位凝胶组纤毛在显微镜下清晰完整且纤毛运动活跃,纤毛持续运动时间百分比为 94.92% (>85%),表明鼻腔原位凝胶对鼻黏膜纤毛运动基本无影响,没有显著毒性,用于鼻腔给药基本安全。

表 1 3 组药物对蟾蜍鼻黏膜纤毛持续运动时间的影响(n=3)

受试药物	纤毛运动时间(t/min)	平均纤毛运动时间(t/min)	纤毛持续运动时间百分比(%)
生理盐水	600	590	100
	570		
	600		
鼻腔原位凝胶	570	560	94.92
	570		
	540		
1% 去氧胆酸钠	30	30	5.08
	30		
	30		

2.4 皮肤过敏性实验^[6] 白色豚鼠 30 只,随机分为蒸馏水组、鼻腔原位凝胶组和 1% 2,4-二硝基氯苯组(阳性对照),每组 10 只。实验前 24 h,用 8% 硫化钠溶液将豚鼠背部脊柱两侧脱毛,去毛范围每侧约 3 cm×3 cm,24 h 后致敏接触,取蒸馏水和鼻腔原位凝胶及 1% 2,4-二硝基氯苯液各 0.2 ml,分

别涂在各组动物背部左侧脱毛区,2 层纱布覆盖,再以无刺激胶布封闭固定,持续 6 h。第 7 和 14 天以同样方法重复 1 次,共计 3 次。于第 14 天末次给药后进行激发接触实验,取蒸馏水及鼻腔原位凝胶及 0.1% 2,4-二硝基氯苯液各 0.2 ml,分别涂在各组动物背部右侧脱毛区,2 层纱布覆盖,再以无刺激的医用胶布封闭固定。包裹固定 6 h 后,洗净药物,于 1、24、48、72 h 观察受试各组豚鼠是否有过敏反应,如哮喘、皮肤红肿等。根据皮肤刺激反应评分标准(表 2)及皮肤致敏性评价标准(表 3)评价受试各组豚鼠皮肤过敏反应分值及过敏程度。致敏反应发生率及平均反应分值按下列公式计算。

$$\text{致敏反应发生率} = (\text{出现红斑动物例数} + \text{水肿动物例数}) / \text{受试动物总数} \times 100\%$$

$$\text{平均反应分值} = (\text{红斑形成总分} + \text{水肿形成总分}) / \text{受试动物总数}$$

表 2 皮肤刺激反应评分标准

分值	红斑	水肿
0	无红斑	无水肿
1	轻度红斑,勉强可见	轻度水肿,勉强可见
2	中度红斑,明显可见	中度水肿,明显隆起
3	重度红斑	重度水肿,皮肤隆起 1 mm,轮廓清楚
4	紫红色红斑并有焦痂形成	严重水肿,皮肤隆起 1 mm 以上

表 3 皮肤致敏性评价标准

致敏发生率(%)	皮肤致敏性评价
0~10	弱致敏性
11~30	轻度致敏性
31~60	中度致敏性
61~80	重度致敏性
81~100	极度致敏性

皮肤致敏接触给药 6 h 后观察豚鼠脱毛区域的皮肤变化,阳性对照组的皮肤明显可以看到呈鳞片状损伤,鼻用原位凝胶组和蒸馏水组的豚鼠皮肤无红斑及水肿出现,无明显区别。激发给药 6 h 后阳性对照组出现轻度红斑,无水肿,致敏率 100%,为极度致敏性;鼻腔原位凝胶组和蒸馏水组在整个观察过程中未出现红斑及水肿,致敏率为 0,为弱致敏性,鼻用原位凝胶对皮肤激发接触结果见表 4。根据致敏接触、激发接触实验结果,鼻用原位凝胶组与蒸馏水组豚鼠皮肤反应无明显差别,可以认为鼻腔原位凝胶为弱致敏物质。

表 4 鼻腔原位凝胶对豚鼠皮肤的过敏反应结果(n=10)

组别	各观察时间点的反应平均分				致敏率 (%)	反应强度
	1 h	24 h	48 h	72 h		
鼻用原位凝胶组	0	0	0	0	0	弱致敏性
蒸馏水组	0	0	0	0	0	弱致敏性
1% 2,4-二硝基氯苯(阳性对照)组	1.5	1.2	1.0	1.0	100	极度致敏性

表 5 鼻用原位凝胶对家兔皮肤刺激反应结果(n=10)

组别	动物数 (只)	各观察时间点的反应平均分				刺激强度
		1 h	24 h	48 h	72 h	
完整皮肤组	5					
给药侧		0	0	0	0	无刺激性
对照侧		0	0	0	0	无刺激性
破损皮肤组	5					
给药侧		0.43	0	0	0	无刺激性
对照侧		0.38	0	0	0	无刺激性

2.5 皮肤刺激性实验^[7] 实验开始前家兔饲养1周,观察摄食和行为,完全无异常后随机分为单次给药组和多次给药组,每组包含完整皮肤组及破损皮肤组,每组5只。单次给药:在给药前24h,背部脊柱两侧剪毛,8%硫化钠溶液脱毛,去毛范围每侧约5cm×5cm。破损皮肤组的脱毛区皮肤消毒后,用无菌注射器针头在皮肤上划“#”字,长度约3cm,以皮肤渗血为度,保持左右两侧损伤程度一致,完整皮肤组无需划伤。实验采用自体左右自身对照,家兔右侧脱毛区涂以0.5ml鼻腔原位凝胶,左侧脱毛区涂以蒸馏水0.5ml作为对照,用2层无菌纱布覆盖,再盖以聚乙烯薄膜,再加兔套(背心式)包裹固定,单笼饲养。6h后,去除覆盖物,温水洗净药物,自然光下,肉眼观察去除受试物后1、24、48、72h的局部情况,观察涂药处有无红斑和水肿等情况。多次给药:实验操作同单次给药,每日给药1次,连续7次。每次去除受试物后注意观察局部皮肤是否有红肿,记录第7次给药后1、24、48、72h的局部情况。按表2对皮肤红斑和水肿进行评分。

鼻用原位凝胶对皮肤刺激性评分结果见表5。单次给药:完整皮肤组在去除受试药物后各个时间点内,肉眼观察皮肤刺激反应,未发现明显红斑、水肿等反应,左右两边无显著差异;破损皮肤组给予受试物1h后,两侧划伤部位均可见有轻微红肿,至24h消失,后续观察未再发现异常。多次给药:完整皮肤组未见皮肤有红斑、水肿等刺激反应;破损皮肤组给予鼻腔原位凝胶及蒸馏水时,第1天给药侧和对照侧均可见划伤部位轻微红肿,至第3天完全恢复,其后每次去除药物后1h及再次给药前,末次给药后1、24、48、72h,均未见有红斑、水肿等情况。停药后继续观察,破损皮肤出现不同程度的痂皮,第7天后皮肤变光滑,逐渐痊愈,未见色素沉着和皮肤粗糙等情况。实验结果表明鼻腔原位凝胶对家兔皮肤无刺激性。

3 讨论

根据形成凝胶的机制不同,原位凝胶分为温度敏感、pH敏感和离子敏感3种类型。结冷胶无毒、

耐酸碱^[8]、凝胶能力强、稳定性好,已广泛应用于制药、食品等领域^[9]。研究发现结冷胶对二价离子(如钙、镁等)特别敏感,胶凝强度是钠、钾等一价离子的25倍,鼻液中含有大量二价阳离子,可以很好的促进结冷胶完成相转变过程。鼻腔给药是传统的给药方式,在耳鼻喉科应用极为广泛,一般用来治疗各种鼻腔和鼻窦等局部疾病,也可用于与鼻病有关的邻近器官疾患的辅助用药及脑靶向药物用药。鼻腔对异物和气味比较敏感,所以鼻用制剂一般不宜有强烈的气味,而结冷胶溶液无色无味,适合用作鼻用制剂的载体。

本研究采用在体法考察了鼻腔原位凝胶对蟾蜍鼻黏膜纤毛的毒性,同时验证了原位凝胶对大鼠鼻黏膜形态和细胞分化的影响;并进行家兔皮肤刺激实验和豚鼠皮肤过敏实验。研究结果表明,以结冷胶为凝胶材料制备的薄荷脑鼻用原位凝胶剂工艺简便,纤毛毒性低,对大鼠鼻黏膜无毒性,具有良好的生物相容性,为此类制剂的研发提供了数据支持。

【参考文献】

[1] Takano K, Kojima T, Keira T, et al. A novel drug delivery system for the human nasal epithelium [J]. *Adv Otorhinolaryngol*, 2016, 77: 67-74.

[2] Gu F, Ma W, Meng G, et al. Preparation and *in vivo* evaluation of a gel-based nasal delivery system for risperidone [J]. *Acta Pharm*, 2016, 66(4): 555-562.

[3] Karavasili C, Fatouros D G. Smart materials: *in situ* gel-forming systems for nasal delivery [J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21(1): 157-166

[4] 张奕, 蒋新国. 鼻腔给药系统的鼻黏膜毒性及解决途径[J]. *中国医药工业杂志*, 2001, 32(7): 323-327.

[5] Xu X, Shen Y, Wang W, et al. Preparation and *in vitro* characterization of thermosensitive and mucoadhesive hydrogels for nasal delivery of phenylephrine hydrochloride [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 88(3): 998-1004.

[6] 李彦林, 周云丰, 李琳, 等. 平痒洗剂皮肤刺激和过敏性实验研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(2): 56-58.

[7] 李杰, 欧余航, 陈强. 复方九节茶乳膏的抗炎镇痛及皮肤安全性的初步研究[J]. *西北药学杂志*, 2016, (1): 64-67.

- 558 .
- [28] Jiang SS, Tang Y, Zhang YJ, *et al*. A phase I clinical trial utilizing autologous tumor-infiltrating lymphocytes in patients with primary hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(38): 41339-41349 .
- [29] Dolan DE, Gupta S. PD-1 pathway inhibitors: changing the landscape of cancer immunotherapy [J]. *Cancer Control*, 2014, 21(3): 231-237 .
- [30] Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(328): 328rv324 .
- [31] Wu K, Kryczek I, Chen L, *et al*. Kupffer cell suppression of CD8⁺ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(20): 8067-8075 .
- [32] Finkelmeier F, Canli Ö, Tal A, *et al*. High levels of the soluble programmed death-ligand (sPD-L1) identify hepatocellular carcinoma patients with a poor prognosis[J]. *Eur J Cancer*, 2016, 59: 152-159 .
- [33] Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, *et al*. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3): 971-979 .
- [34] Kuang DM, Zhao Q, Peng C, *et al*. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1 [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(6): 1327-1337 .
- [35] Ouyang FZ, Wu RQ, Wei Y, *et al*. Dendritic cell-elicited B-cell activation fosters immune privilege *via* IL-10 signals in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13453 .
- [36] Powles T, Eder JP, Fine GD, *et al*. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer[J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 558-562 .
- [37] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, *et al*. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(26): 2455-2465 .
- [38] Armand P, Nagler A, Weller EA, *et al*. Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(33): 4199-4206 .
- [39] Westin JR, Chu F, Zhang M, *et al*. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(1): 69-77 .
- [40] Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, *et al*. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(4): 311-319 .
- [41] Herbst RS, Soria JC, Kowanzet M, *et al*. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients [J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 563-567 .
- [42] El-Khoueiry A B, Melero I, Crocenzi T S, *et al*. Phase I/II safety and antitumor activity of nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): CA209-040 [J]. *Clin Oncol* 2015, 33(18): LBA101 .
- [43] Chen CL, Pan QZ, Zhao JJ, *et al*. PD-L1 expression as a predictive biomarker for cytokine-induced killer cell immunotherapy in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(7): e1176653 .
- [44] Le DT, Uram JN, Wang H, *et al*. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(26): 2509-2520 .
- [45] Sun TW, Gao Q, Qiu SJ, *et al*. B7-H3 is expressed in human hepatocellular carcinoma and is associated with tumor aggressiveness and postoperative recurrence [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(11): 2171-2182 .
- [46] Pan QZ, Wang QJ, Dan JQ, *et al*. A nomogram for predicting the benefit of adjuvant cytokine-induced killer cell immunotherapy in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9202 .
- [47] Tang H, Qiao J, Fu YX. Immunotherapy and tumor microenvironment [J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1): 85-90 .
- [48] Sivan A, Corrales L, Hubert N, *et al*. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy [J]. *Science*, 2015, 350(6264): 1084-1089 .
- [49] Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, *et al*. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota [J]. *Science*, 2015, 350(6264): 1079-1084 .
- [50] Wang XP, Xu M, Gao HF, *et al*. Intraperitoneal perfusion of cytokine-induced killer cells with local hyperthermia for advanced hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(19): 2956-2962 .
- [51] Qiu Y, Xu MB, Yun MM, *et al*. Hepatocellular carcinoma-specific immunotherapy with synthesized alpha1,3-galactosyl epitope-pulsed dendritic cells and cytokine-induced killer cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(48): 5260-5266 .
- [收稿日期] 2017-01-18 [修回日期] 2017-05-31
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 324 页)

- [8] Li X, Du L, Chen X, *et al*. Nasal delivery of analgesic ketorolac tromethamine thermo- and ion-sensitive *in situ* hydrogels [J]. *Int J Pharm*, 2015, 489(1-2): 252-260 .
- [9] Osmalek T, Froelich A, Tasarek S, *et al*. Application of gel-

lan gum in pharmacy and medicine [J]. *Int J Pharm*, 2014, 466(1-2): 328-340 .

[收稿日期] 2016-12-01 [修回日期] 2017-03-17
[本文编辑] 顾文华