

藤黃酸-重组高密度脂蛋白納米粒的制备及评价

刘聪燕^{1,2}, 王伟^{1,2*}, 周建平^{1,2**}, 丁杨^{1,2}, 周欣^{1,2}, 王兆先^{1,2}

(中国药科大学¹天然药物活性组分与药效国家重点实验室;²药剂学教研室,南京 210009)

摘要 采用胆酸钠法制备藤黄酸(GA)重组高密度脂蛋白纳米粒(GA-rHDL-NPs),并测定其形态、粒径、Zeta电位、包封率和载药量等理化性质,同时以透析法研究制剂的体外释药特性,细胞实验考察肿瘤细胞对其的摄取能力,溶血性试验和家免耳缘静脉刺激性试验评价其静脉注射的安全性。结果显示,GA-rHDL-NPs 外观呈类球形,平均粒径为(113.53 ± 2.50)nm,Zeta 电位为 $-(29.48 \pm 0.05)$ mV,包封率和载药量分别为(95.30 ± 0.37)% 和(8.51 ± 0.95)%,其水分散液4 °C 放置一个月稳定;GA-rHDL-NPs 体外24 h 和72 h 的累积释放量分别为24.3% 和73.6%,其肝肿瘤细胞(HepG2)摄取能力明显强于正常肝细胞(L02),且无明显溶血作用和耳缘静脉刺激性反应。研究结果表明,GA-rHDL-NPs 的药物包封率高,性质稳定,药物释放缓慢,分散性和安全性良好,可供静脉注射使用,并具有良好的肿瘤细胞摄取能力。

关键词 藤黄酸; 重组高密度脂蛋白; 纳米粒; 制备; 载脂蛋白 A-I; 稳定性; 细胞摄取; 安全性

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)04-0311-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130405

Preparation and evaluation of gambogic acid-loaded reconstituted high density lipoprotein nanoparticles

LIU Congyan^{1,2}, WANG Wei^{1,2*}, ZHOU Jianping^{1,2**}, DING Yang^{1,2}, ZHOU Xin^{1,2}, WANG Zhaoxian^{1,2}

¹State Key Laboratory of Natural Medicines; ²Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University Nanjing 210009, China

Abstract Gambogic acid (GA)-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles (GA-rHDL-NPs) were prepared by sodium cholate method. The physicochemical properties such as morphology, particle size, Zeta potential, entrapment efficiency and drug-loading capability were evaluated. Dialysis method was employed to investigate in vitro release of GA-rHDL-NPs. In addition, the cellular uptake experiments were performed to evaluate the tumor cellular targeting ability of GA-rHDL-NPs, and safety evaluation following the intravenous injection of GA-rHDL-NPs was carried out using hemolysis testing and irritation testing upon rabbit ear vein. It was found that the well-formulated GA-rHDL-NPs displayed regular spherical shape with particle size of (113.53 ± 2.50) nm, Zeta potential of $-(29.48 \pm 0.05)$ mV, entrapment efficiency of (95.30 ± 0.37)% and drug-loading of (8.51 ± 0.95)%. The GA-rHDL-NPs solution was found to be stable after one-month storage at 4 °C. *In vitro* 24-h and 72-h accumulative releases of GA from GA-rHDL-NPs were approximately 24.3% and 73.6%, respectively. It revealed that there was much more uptake of GA-rHDL-NPs by HepG2 cells than by L02 cells. GA-rHDL-NPs also exhibited less local venous irritation and hemolysis than did the unencapsulated drug group. Therefore, the GA-rHDL-NPs possessed accepted entrapment efficiency, stability, sustained-release, dispersion and safety properties, and tumor cell uptake, which might be suitable for iv injection and cancer therapy.

Key words gambogic acid; reconstituted high density lipoprotein; nanoparticles; preparation; apolipoprotein A-I; stability; cellular uptake; safety

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81102398, No. 81273469); the Ministry of Edu-

* 收稿日期 2013-01-02 通信作者 * Tel: 025-83271102 E-mail: wangcpu@163.com

** Tel: 025-83271102 E-mail: zhoujianp60@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81102398, No. 81273469); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(No. 20110096120003); 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(No. JKP2011007)

cation Doctoral Program of Higher Specialized Research Fund Project (No. 20110096120003), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JKP2011007)

藤黄酸(gambogic acid, GA)是中药藤黄的主要有效成分之一,具有较强的抗肿瘤作用,且抗瘤谱广,有望成为一种新结构类型的抗肿瘤药物^[1-3]。由于水溶性低、血管刺激性强、体内消除半衰期短,其在临床上的应用受到限制。纳米粒(nanoparticles, NPs)作为一种新型胶态药物载体,因其可增加药物溶解度,降低药物刺激性,延长药物在体内的滞留时间以及提高药效,近年来已成为国内外学者研究的热点^[4]。

成熟高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)是由一个非极性的脂质核(主要是胆固醇酯和少量甘油三酯)以及外周包绕的一层磷脂单层(主要是磷脂酰胆碱)、游离胆固醇及载脂蛋白(apolipoprotein, apo)(主要为apoA-I)组成的外亲水性-内疏水性的球形结构。HDL具备作为抗肿瘤药物载体的多种优良特性^[5-6],然而天然HDL需要从血液中提取获得,其生物安全性问题以及高昂的提取费用均限制了它的使用。重组HDL(reconstituted HDL, rHDL)由内源性分离或体外合成的apoA-I与磷脂酰胆碱在体外重组形成,在生化特性和功能上与内源性HDL类似,拥有天然HDL作为药物载体的多种优良特性,可广泛用于抗肿瘤药物载体^[7-9]。

本研究以磷脂、三油酸甘油酯、apoA-I及GA为原料,采用胆酸钠法制备藤黄酸-重组高密度脂蛋白纳米粒(GA-rHDL-NPs),对其形态、粒径、Zeta电位、包封率与载药量等性质进行表征,并研究了GA-rHDL-NPs的体外释药行为、肿瘤细胞摄取能力和静脉注射安全性。

1 材料

1.1 药品与试剂

藤黄酸对照品(纯度95%,江苏康缘药业股份有限公司);藤黄酸(纯度大于90%,中国药科大学药物化学教研室提供);蛋黄卵磷脂(PC 98-T,上海艾伟特医药科技有限公司);三油酸甘油酯(纯度大于80%,美国Sigma公司);胆酸钠(上海阿拉丁试剂有限公司);载脂蛋白A-I(纯度大于90%,本实验室自制);香豆素-6(coumarin-6,

美国Sigma-Aldrich公司);甲醇(色谱级,上海凌峰化学试剂有限公司);其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

YB-6P型扩散透皮实验仪(上海精胜科学仪器有限公司);Nano-ZS90激光粒度分析仪(英国马尔文公司);H-7650透射电镜(日本日立公司);LC-10AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司);8453紫外分光光度计(美国安捷伦公司)。

1.3 细胞和动物

人肝肿瘤细胞HepG2和正常人肝细胞L02,由中国药科大学药理学教研室提供;雄性家兔,体重2.0~2.5 kg,由南京市青龙山动物养殖场提供,合格证号:SCXK(苏)2007-0008。

2 方法与结果

2.1 GA-rHDL-NPs的制备^[10]

精密称取蛋黄卵磷脂50 mg、三油酸甘油酯15 mg和GA 5 mg,溶于丙酮-乙醇(4:1)混合溶剂5 mL中,于(40±2)℃水浴下形成有机相。另取胆酸钠10 mg溶于Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)15 mL中,加热至(40±2)℃,构成水相。在搅拌过程中用5号针头将有机相缓慢注入等温水相中,1 500 r/min磁力搅拌2 h,在冰水浴中300 W超声300 s,减压蒸馏,除去丙酮、乙醇及一部分水,所得溶液经3 000 r/min离心后过0.22 μm微孔滤膜,即得载有藤黄酸的脂质纳米粒混悬液。取apoA-I 5 mg,溶解于该纳米粒混悬液中,于37℃磁力搅拌8 h,即得GA-rHDL-NPs溶液。将该溶液加入孔径为10 kD的蛋白透析袋中,4℃Tris-HCl缓冲液透析过夜,以除去胆酸钠。将制备的GA-rHDL-NPs混悬液通过预饱和的Sephadex G-100柱(1 cm×18 cm)分离纯化,用Tris缓冲液洗脱,除去未结合的apoA-I。

2.2 GA-rHDL-NPs的形态观察

取GA-rHDL-NPs溶液适量,用蒸馏水稀释,滴于铜网上,自然烘干,用透射电镜观察其形态(图1)。结果表明:GA-rHDL-NPs形态基本趋于均一的球形,外观光滑圆整,分散性良好。

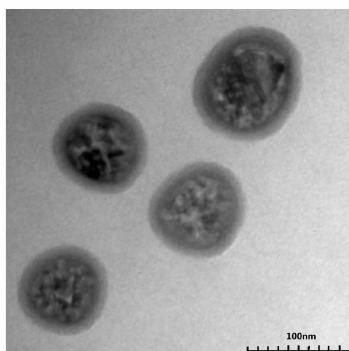


Figure 1 Transmission electron microgram of gambogic acid (GA) loaded reconstituted high density lipoprotein nanoparticles (GA-rHDL-NPs)

2.3 GA-rHDL-NPs 粒径及 Zeta 电位

取 GA-rHDL-NPs 溶液适量,用蒸馏水稀释,采用激光粒度仪测得 GA-rHDL-NPs 的平均粒径为 (113.53 ± 2.50) nm, Zeta 电位为 $- (29.48 \pm 0.05)$ mV。

2.4 GA-rHDL-NPs 中 GA 的含量测定

2.4.1 色谱条件^[11] 色谱柱:Hedera ODS-2 柱 ($250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$);流动相:甲醇-水(94:6),以磷酸调 pH 到 3.5;流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;进样量:20 μL;检测波长:360 nm。方法学考察表明在该色谱条件下,GA 的峰面积(*A*)与药物质量浓度(*c*, μg/mL)之间存在良好的线性关系,回归方程为: $A = 21.598 c - 1.106.5$ ($r = 0.9999$, $n = 3$),线性范围 1~60 μg/mL。辅料对 GA 的测定无干扰,方法属性良好,回收率和精密度考察符合要求。

2.4.2 包封率与载药量的测定 采用离心超滤法测定 GA-rHDL-NPs 的包封率与载药量^[12]。精密量取 GA-rHDL-NPs 溶液 0.5 mL,置 Nanosep 超滤离心管上层,10 000 r/min 离心 5 min。取下清液 100 μL,用甲醇稀释至 1 mL, HPLC 进样 20 μL,测定游离 GA 量。计算得包封率为 $(95.30 \pm 0.37)\%$,载药量为 $(8.51 \pm 0.95)\%$ 。

2.5 GA-rHDL-NPs 的外观及稳定性

新制备的 GA-rHDL-NPs 溶液为淡黄色、澄清、均一、半透明溶液,无黏附和聚集现象。4 °C 保存 1 个月后,恢复至室温仍澄清,无浑浊产生。15 000 r/min 离心 1 h,溶液依然澄清、半透明,说明 GA-rHDL-NPs 具有较好的稳定性。

2.6 GA-rHDL-NPs 的体外释药特性

采用动态透析法考察 GA-rHDL-NPs 的体外释药特性。精密量取 GA-rHDL-NPs 混悬液适量(约相当于 GA 20 mg),置透析袋(截留相对分子质量 10 kD)内,将透析袋置含 0.2% Tween 80 的 PBS 100 mL 中,于 37 °C,100 r/min 磁力搅拌,分别于 1,2,4,6,8,12,24,48,72 h 取样 1 mL,同时补加同体积新鲜的释放介质。各时间点的样品用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液 20 μL 进样,测定,计算累积释药量。结果如图 2 所示,GA-rHDL-NPs 呈现出持续、缓慢释药的特征。药物在 24 h 内释放缓慢,无明显突释,累积释放量为 24.3%,而 72 h 内累积释放达 73.6%,表明制备的纳米粒可通过缓慢释放,使药物持续发挥药效。

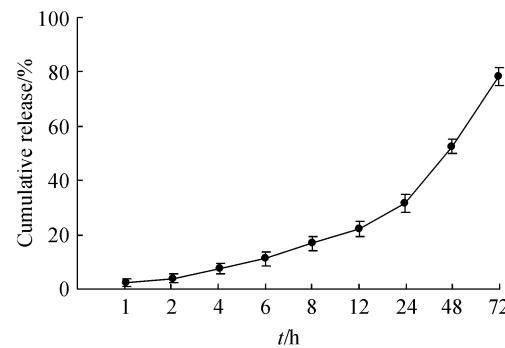


Figure 2 Cumulative release profile of GA from GA-rHDL-NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.7 载香豆素-6 的 rHDL-NPs 的体外肿瘤细胞靶向性

取生长状态良好的 HepG2 肝肿瘤细胞和正常肝细胞 L02,以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 24 孔培养板中,37 °C 孵育 24 h 后,吸去培养液,分别加入用不含血清的培养基稀释的载有香豆素-6 的 rHDL-NPs(纳米粒质量浓度为 100 μg/mL) 500 μL,37 °C 孵育 2 h 后,移去上层供试液,用 PBS (pH 7.4) 洗 3 遍,倒置荧光显微镜下观察。结果如图 3 所示,纳米粒进入肿瘤细胞 HepG2 的量远远大于进入正常细胞 L02 的量,说明 rHDL-NPs 具有较好的肿瘤细胞靶向性。

2.8 GA-rHDL-NPs 的安全性评价

2.8.1 溶血试验^[13] 取试管 9 支进行编号,1~7 号管为 GA-rHDL-NPs 供试品管,8 号管为阴性对照管(0% 溶血),9 号管为阳性对照管(100% 溶血)。按表 1 所示准备样品,并于不同时间点观察各试管

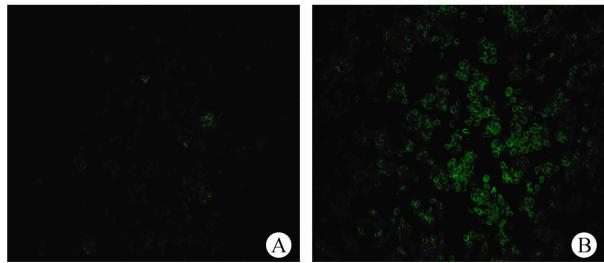


Figure 3 Uptake of coumarin-6-loaded rHDL-NPs in L02 (A) and HepG2 (B) cells

是否有溶血或凝集现象。观察结束后,将各管溶液在1 500 r/min 离心10 min,取上清液在紫外分光光度计545 nm处,以生理盐水为空白,测定吸收度。由于样品溶液本身可能在545 nm处有吸收,因此将样品母液直接以生理盐水稀释相同的倍数,按上述方法测定样品本身的吸收度,以上两者吸收度之差即为 A_{sample} ,溶血百分率(%) = $(A_{\text{sample}} - A_{0\%}) / (A_{100\%} - A_{0\%}) \times 100$ 。结果表明,不同浓度的GA-rHDL-NPs在4 h内无明显溶血作用,溶血率均小于5%,符合医用材料的溶血实验要求,可供注射用。

Table 1 Design of hemolysis test and hemolytic rate of GA-rHDL-NPs at different concentrations

No.	Sample/ mL	Saline/ mL	2% RBC	A_{sample}	Hemolytic rate/%
1	0.1	2.4	2.5	0.045	0.19
2	0.2	2.3	2.5	0.047	0.38
3	0.3	2.2	2.5	0.048	0.48
4	0.4	2.1	2.5	0.050	0.67
5	0.5	2.0	2.5	0.052	0.86
6	1.0	1.5	2.5	0.060	1.62
7	2.0	0.5	2.5	0.065	2.10
8	0	2.5	2.5	0.043	0.00
9	0	2.5 (H ₂ O)	2.5	1.090	100.00

2.8.2 家兔耳缘静脉刺激性试验^[14] 制备含GA质量浓度为0.5 mg/mL的GA-rHDL-NPs溶液。GA溶液配制:将GA 4 mg与L-精氨酸2 mg,用5%葡萄糖溶液8 mL溶解,超声30 min,即得质量浓度为0.5 mg/mL的GA透明澄清溶液。取健康家兔两只,于耳缘静脉注射上述各溶液,以4 mL/kg剂量连续给药3 d,切片观察。结果显示,5%葡萄糖溶液组和GA-rHDL-NPs溶液组的耳缘静脉均未见明显淤血、渗出、水肿及坏死等变化,而GA溶液组的耳缘静脉可见明显淤血、水肿、炎症等变化。

3 讨论

从GA-rHDL-NPs的各项质量评价指标可以看出,采用TEM测得的纳米粒粒径小于100 nm,小于激光粒度仪测得的粒径,其原因可能是GA-rHDL-NPs表面的蛋白含有大量亲水性氨基,会结合较多的水分子形成较厚的水化层,使激光粒度仪测定的粒径偏大。GA-rHDL-NPs的表面荷负电,可能与apoA-I(等电点为5.5)在pH 8.0的缓冲液中带负电荷有关。制备过程中表面活性剂胆酸钠的加入,可有效介导apoA-I与脂质结合,制备出粒径较小、分布均一的GA-rHDL-NPs。与脂质体相比,GA-rHDL-NPs以液态甘油三酯作为内核,为脂溶性药物提供更大的承载空间,故具有较高的包封率与载药量;与胶束相比,以甘油三酯为核心外部覆以磷脂层的结构更加稳定。

GA-rHDL-NPs具有明显的缓释特征,原因可能是药物的释放受到了脂质膜的阻碍,脂质膜形成了一个分子栅栏,使药物留在疏水性的核心内部,并阻碍了水分子进入脂质核心,减缓了药物的释放^[15],而GA-rHDL-NPs表面包覆有大量的两亲性蛋白,使载体具有较好的稳定性,对药物的缓慢释放可能也有影响。载有香豆素-6的rHDL-NPs具有一定的肿瘤细胞靶向性,可能与肿瘤细胞表面高度表达HDL受体有关,rHDL-NPs可通过apoA-I特异性识别结合肿瘤细胞表面的HDL受体,引发肿瘤细胞的高效摄取能力。体外安全性评价结果表明,GA-rHDL-NPs安全无毒,具有较好的生物相容性,可用于静脉给药,这可能与药物被包裹在rHDL的脂质核心里,减少了药物与细胞的直接接触机会有关。

4 结论

本研究成功构建了具有仿生意义的新型蛋白脂质复合纳米载体-rHDL,该载体系统内部为疏水性脂核,脂核中心由甘油三酯构成,为疏水性药物提供稳定的载药空间;脂核外部是一层极性的磷脂单层,使脂核的结构得到稳定,并被亲水性的apoA-I所包覆。藤黄酸在水中的溶解度较低,将其作为模型药物,使药物颗粒溶解并以分子形式存在rHDL脂质核心里,即提高了藤黄酸的溶解度,又降低了其毒性和刺激性,生物相容性好,肿瘤靶

向能力增强。因此,rHDL作为抗肿瘤药物的传递系统,对肿瘤治疗具有潜在的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Lu N,Gu HY,You QD,*et al.* Gene expression spectra in human hepatoma SMMC-7721 cells treated with gambogic acid [J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*,2007,38(5):424-428.
- [2] Han QB,Cheung S,Tai J,*et al.* Stability and cytotoxicity of gambogic acid and its derivative, gambogoic acid [J]. *Biol Pharm Bull*,2005,28(12):2 335-2 337.
- [3] Huang KF,Lu YH,He R,*et al.* Gambogic acid-induced apoptosis of gastric cancer cells BGC-803 and its influence on the expression of survivin [J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*,2008,39(5):474-478.
- [4] Wang X,Qian XM,Beitler JJ,*et al.* Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced raman scattering nanoparticles [J]. *Cancer Res*,2011,71(5):1 526-1 532.
- [5] Ryan RO. Nanobiotechnology applications of reconstituted high density lipoprotein [J]. *J Nanobiotechnol*,2010,8(1):28.
- [6] Bhat S,Sorci-Thomas MG,Calabresi L,*et al.* Conformation of dimeric apolipoprotein A-I milano on recombinant lipoprotein particles [J]. *Biochem*,2010,49(25):5 213-5 224.
- [7] McConathy WJ,Nair MP,Paranjape S,*et al.* Evaluation of synthetic/reconstituted high-density lipoproteins as delivery vehicles for paclitaxel [J]. *Anticancer Drugs*,2008,19(2):183-188.
- [8] Ding Y,Wang W,Feng MQ,*et al.* A biomimetic nanovector-mediated targeted cholesterol-conjugated siRNA delivery for tumor gene therapy [J]. *Biomaterials*,2012,33(34):8 893-8 905.
- [9] Lou B,Liao XL,Wu MP,*et al.* High-density lipoprotein as a potential carrier for delivery of a lipophilic antitumoral drug into hepatoma cells [J]. *World J Gastroenterol*,2005,11(7):954-959.
- [10] Zhang WL,Xiao Y,Liu JP,*et al.* Structure and remodeling behavior of drug-loaded high density lipoproteins and their atherosclerotic plaque targeting mechanism in foam cell model [J]. *Int J Pharm*,2011,419(1/2):314-321.
- [11] Hao K,Liu XQ,Wang GJ. Pharmacokinetics of gambogic acid in rats [J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*,2005,36(4):338-341.
- [12] Xu Y,Jin XF,Ping QN,*et al.* A novel lipoprotein-mimic nanocarrier composed of the modified protein and lipid for tumor cell targeting delivery [J]. *J Control Release*,2010,146(3):299-308.
- [13] Yang XX,Chen JH,Guo D. Study of biocompatibility of polybutylcyanoacrylate nanoparticles [J]. *J First Mil Med Univ(第一军医大学学报)*,2005,25(10):1 261-1 263.
- [14] He JQ,Zhang HY,Yang L,*et al.* Preparation and evaluation of intravenous tetrandrine emulsion [J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*,2011,46(22):1 734-1 739.
- [15] Chan JM,Zhang L,Yuet KP,*et al.* PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery [J]. *Biomaterials*,2009,30(8):1 627-1 634.

· 行业动态 ·

2013年财富世界500强:制药企业名单

排名	公司名称	营业收入(百万美元)	利润(百万美元)	国家
132	强生	67 224	10 853	美国
148	辉瑞制药	61 244	14 570	美国
162	诺华公司	57 561	9 505	瑞士
194	拜耳集团	51 096.7	3 143.4	德国
197	瑞士罗氏公司	50 609.4	10 175.4	瑞士
214	默沙东	47 267	6 168	美国
219	赛诺菲	46 209.3	6 383.2	法国
253	葛兰素史克公司	41 885.5	7 234.2	英国
261	雅培公司	39 873.9	5 962.9	美国
267	杜邦公司	39 528	2 788	美国
413	阿斯利康	27 973	6 297	英国
446	中国医药集团	26 189.5	343.3	中国