

## 藤黄酸-重组高密度脂蛋白纳米粒的制备及评价

刘聪燕<sup>1,2</sup>, 王伟<sup>1,2\*</sup>, 周建平<sup>1,2\*\*</sup>, 丁杨<sup>1,2</sup>, 周欣<sup>1,2</sup>, 王兆先<sup>1,2</sup>(中国药科大学<sup>1</sup>天然药物活性组分与药效国家重点实验室;<sup>2</sup>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, 溶血性试验和家兔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  $(113.53 \pm 2.50)$  nm, Zeta 电位为  $-(29.48 \pm 0.05)$  mV, 包封率和载药量分别为  $(95.30 \pm 0.37)\%$  和  $(8.51 \pm 0.95)\%$ , 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<sup>1,2</sup>, WANG Wei<sup>1,2\*</sup>, ZHOU Jianping<sup>1,2\*\*</sup>, DING Yang<sup>1,2</sup>, ZHOU Xin<sup>1,2</sup>, WANG Zhaoxian<sup>1,2</sup><sup>1</sup>State Key Laboratory of Natural Medicines; <sup>2</sup>Department 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  $(113.53 \pm 2.50)$  nm, Zeta potential of  $-(29.48 \pm 0.05)$  mV, entrapment efficiency of  $(95.30 \pm 0.37)\%$  and drug-loading of  $(8.51 \pm 0.95)\%$ . 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,且抗癌谱广,有望成为一种新结构类型的抗肿瘤药物<sup>[1-3]</sup>。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<sup>[4]</sup>。

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<sup>[5-6]</sup>,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<sup>[7-9]</sup>。

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。

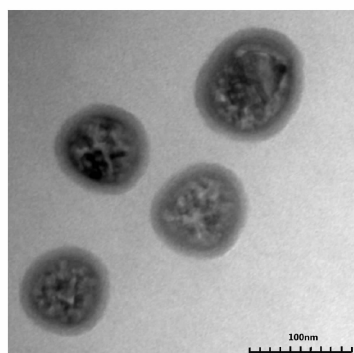
## 2 方法与结果

### 2.1 GA-rHDL-NPs 的制备<sup>[10]</sup>

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 $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,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、乙醇及部分水,所得溶液经 3 000 r/min 离心后过 0.22  $\mu\text{m}$  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  $^\circ\text{C}$  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  $^\circ\text{C}$  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 $\times$ 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  $(113.53 \pm 2.50)$  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<sup>[11]</sup>** 色谱柱: Hadera ODS-2 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 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) 之间存在着良好的线性关系, 回归方程为:  $A = 21\,598\,c - 1\,106.5$  ( $r = 0.999\,9$ ,  $n = 3$ ), 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。

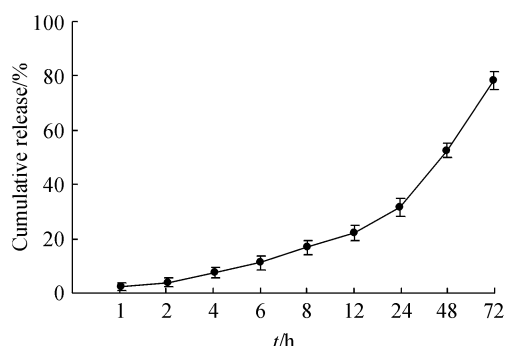
**2.4.2 包封率与载药量的测定** 采用离心超滤法测定 GA-rHDL-NPs 的包封率与载药量<sup>[12]</sup>。精密量取 GA-rHDL-NPs 溶液 0.5 mL, 置 Nanosep 超滤离心管上层, 10 000 r/min 离心 5 min。取下清液 100 μL, 用甲醇稀释至 1 mL, HPLC 进样 20 μL, 测定游离 GA 量。计算得包封率为  $(95.30 \pm 0.37)\%$ , 载药量为  $(8.51 \pm 0.95)\%$ 。

### 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。



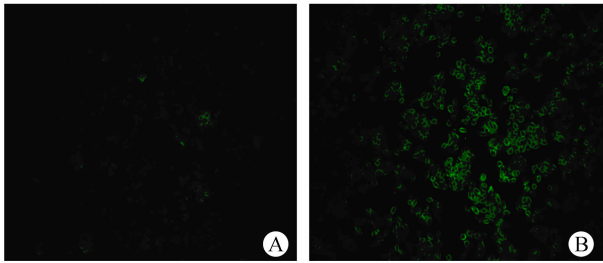
**Figure 2** Cumulative release profile of GA from GA-rHDL-NPs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

### 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  $1 \times 10^5$  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<sup>[13]</sup>** 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  $A_{\text{sample}}$ ,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	$A_{\text{sample}}$	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 <sub>2</sub> O)	2.5	1.090	100.00

**2.8.2 家兔耳缘静脉刺激性试验<sup>[14]</sup>** 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<sup>[15]</sup>,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质脂质复合纳米载体-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, gambogioic 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 polybutylecyanoacrylate 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

(人民网,本刊有删节)