

乳酸-羟基乙酸共聚物包载匹伐他汀纳米粒的制备及其对内皮祖细胞的增殖作用

刘焕云, 李禄丰, 徐春馨, 邓梦杨, 赵晓辉*

(第三军医大学新桥医院心血管内科 心血管病研究所, 重庆 400037)

摘要 制备乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)包载匹伐他汀纳米粒, 检测其形貌、粒径、载药量、包封率及体外释药特点, 研究其对内皮祖细胞的增殖作用。采用溶剂扩散法制备 PLGA 包载的匹伐他汀纳米粒, 扫描电镜观察纳米粒形貌, 激光粒度仪测定粒径, 高效液相色谱法检测并计算载药量、包封率, 体外药物释放实验检测纳米粒的缓释效能, CCK8 法检测空白 PLGA 纳米粒及匹伐他汀纳米粒对内皮祖细胞的活性影响。扫描电镜下匹伐他汀纳米粒呈圆球形, 平均粒径在 (230.1 ± 45) nm, 载药量与包封率分别为 $(10.00 \pm 1.83)\%$ 、 $(35.54 \pm 5.40)\%$, 具备缓释性能, 不同浓度空白 PLGA 纳米粒对内皮祖细胞活性均无影响, 匹伐他汀纳米粒组($0.01, 0.1 \mu\text{mol/L}$)可显著改善内皮祖细胞的增殖活性, 与同浓度匹伐他汀原药组相比差异显著。结果表明, 溶剂扩散法可制备形态较好的匹伐他汀纳米粒, 具备缓释性能, 载体材料具有较好的细胞生物相容性, 匹伐他汀纳米粒显著改善内皮祖细胞增殖活性。

关键词 匹伐他汀; 乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒; 内皮祖细胞; 细胞相容性; 细胞增殖

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000–5048(2016)02–0166–05

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20160207

引用本文 刘焕云, 李禄丰, 徐春馨, 等. 乳酸-羟基乙酸共聚物包载匹伐他汀纳米粒的制备及其对内皮祖细胞的增殖作用[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(2): 166 – 170.

Cite this article as: LIU Huanyun, LI Lufeng, XU Chunxin, et al. Preparation of pitavastatin-loaded poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles and their effects on proliferation of endothelial progenitor cells[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(2): 166 – 170.

Preparation of pitavastatin-loaded poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles and their effects on proliferation of endothelial progenitor cells

LIU Huanyun, LI Lufeng, XU Chunxin, DENG Mengyang, ZHAO Xiaohui*

Institute of Cardiovascular Science, Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Abstract The objectives of this study were to prepare pitavastatin-loaded poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles (PLGA), to characterize their pharmaceutical properties, to conduct *in vitro* drug-release from the nanoparticles, and to observe the effects on the proliferation of endothelial progenitor cells. Both pitavastatin-loaded PLGA and blank PLGA nanoparticles were prepared using emulsion-solvent diffusion method with PLGA being carrier materials. Morphology of the nanoparticles was observed by scanning electron microscopy (SEM), and particle size was analyzed by laser nanometer particle size analyzer. The drug loading and encapsulation efficiency were assayed using high-performance liquid phase. Impact of blank and pitavastatin-loaded nanoparticles on the viability of endothelial progenitor cells was investigated by CCK8 method. Pitavastatin-loaded PLGA nanoparticles exhibited the structure with spherical shape, smooth surface and average diameter of (230.1 ± 45) nm. The drug loading capacity and encapsulation efficiency were $(10.00 \pm 1.83)\%$ and $(35.54 \pm 5.40)\%$, respectively. *In vitro* sustained-release of pitavastatin from the nanoparticles was found. The blank PLGA nanoparticles had no effect on the viability of the endothelial progenitor cells in different concentrations. Compared with pitavastatin

group, pitavastatin-loaded nanoparticles ($0.01 \mu\text{mol/L}$, $0.1 \mu\text{mol/L}$) had more effects on the proliferation of endothelial progenitor cells. In conclusion, emulsion-solvent diffusion method is applicable in preparation of pitavastatin-loaded PLGA nanoparticles with good shape and sustained-release of interest. Pitavastatin-loaded nanoparticles could significantly improve proliferation of the endothelial progenitor cells.

Key words pitavastatin; poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles; endothelial progenitor cells; cell biocompatibility; cell proliferation

匹伐他汀是第 3 代 HMG2CoA 还原酶抑制剂,被誉为“超级他汀”,因具有独特的化学结构而使其药理活性优于其他他汀类药物,在各项基础和临床试验中已突显出其独特的优势,有着广阔的应用前景,但研究显示匹伐他汀存在以下不足:口服绝对生物利用度偏低、需要大剂量多次给药、长期大剂量用药导致不良反应风险增加等^[1-2]。如何在确保药物疗效的前提下降低药物剂量、提高生物利用度、减少给药次数成为目前亟待解决的问题。

纳米技术的提出为药物体内转运提供了新的手段,它采用可生物降解的高分子物质作为包封载体,改变其包裹在内的药物的药代动力学特征,从而提高疗效,减轻不良反应,与传统药物相比,纳米药物具备更好的生物利用度、靶向性、溶解性及缓控释性等优点^[3]。目前国外已有研究发现匹伐他汀 PLGA 纳米粒可被内皮细胞、巨噬细胞吞噬摄取,并在促血管新生、抗动脉粥样硬化等方面优势显著,与传统匹伐他汀相比具有靶向定位、高效持久的特点^[4-5]。但目前尚无这种他汀纳米制剂应用于内皮祖细胞的相关研究。

本研究采用超声乳化溶剂扩散法制备乳酸-羟基乙酸共聚物包载匹伐他汀纳米粒,载体材料选用可生物降解的乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA),检测其粒径、载药量、包封率及体外释药特点,并研究匹伐他汀纳米粒对内皮祖细胞增殖活性的影响。

1 材 料

1.1 药品与试剂

匹伐他汀(美国 Abcam 公司);乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA 75:25, 山东济南岱罡生物科技公司);聚乙烯醇(PVA, 成都科龙化工试剂厂);二氯甲烷(成都科龙化工试剂厂);无水乙醇(川东化工有限公司);CCK8 试剂盒(上海碧云天生物技术研究

所);DMEM 低糖细胞培养基、优质胎牛血清(美国 Gibco 公司);0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司);其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

YC-750 超声破碎仪(美国 Arstevip 公司);Zetasizer NanoZS90 纳米粒度仪(英国马尔文公司);S-3400N 扫描电子显微镜(日本日立公司);E2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);低温高速离心机(美国 Beckman 公司)。

1.3 动 物

健康 SD 大鼠, 雄性, 体重(130 ± 20) g, 由第三军医大学大坪医院试验动物中心提供, 合格证号: SYXK(军)2012-0035。

2 方 法

2.1 PLGA 包载匹伐他汀纳米粒的制备

采用乳化溶剂扩散法, 取适量 PLGA、匹伐他汀(质量比 3:1)溶于二氯甲烷, 取一定量无水乙醇, 混合两种有机溶剂。在冰浴条件下将混合的有机溶剂缓慢滴加到 2% PVA 溶液中, 超声破碎仪乳化处理 8 min(振幅 50%, 脉冲比为 4:2)形成水包油乳液。自然条件下磁力搅拌过夜(400 r/min)。高速离心(4°C , 22 000 r/min, 30 min)取得固化的纳米粒。双蒸水洗涤离心 2 次。冷冻干燥后置干燥器中存放。制备过程中保留上清液及洗涤液, 不含匹伐他汀的空白纳米粒使用上述方法制备。

2.2 PLGA 包载匹伐他汀纳米粒的表征

2.2.1 纳米粒粒径及粒径分布 称取少许纳米粒溶于蒸馏水, 形成纳米混悬液, 超声分散后用纳米粒度仪分析其粒径及分布情况。

2.2.2 表面形态 称取少许纳米粒溶于蒸馏水, 制备成纳米混悬液滴在锡箔纸黏性面, 待干燥后真空喷金, 在扫描电子显微镜下观察粒子的外貌形态。

2.3 PLGA 包载匹伐他汀纳米粒载药量、包封率及体外释放药物测定

采用高效液相色谱法测定, 色谱条件: 色谱柱为 Bridge C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm); 流动相: 乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾 (50: 50); 流动相速度: 0.6 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 25 °C; 紫外检测波长: 激发波长 E_{x} 245 nm, 发射波长 E_{m} 420 nm。步骤如下: 匹伐他汀原液按比例稀释, 测得标准曲线 $Y = 1.205890 \times 10^7 + 1.048551X$ (Y 为峰面积, X 为药物质量浓度, 单位 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。取上清液及洗涤液为待测样品, 稀释一定倍数后检测, 代入标准曲线中计算匹伐他汀含量, 实验重复 3 次。计算包封率和载药量。

称取匹伐他汀纳米粒 25 mg 或匹伐他汀原药 0.25 mg, 分散在 PBS 缓冲液 10 mL 中 (pH 7.4), 装在密闭的透析袋中, 置于含 PBS 缓冲液 100 mL 的具塞玻璃容器中, 模拟体内生理环境在恒温振荡仪 (37 °C, 100 r/min) 中振荡透析, 分别于 1, 3, 5, 7, 14 d 取透析液 10 mL, 同时补充新鲜 PBS 缓冲液, 保持总体积在 100 mL, HPLC 法测定透析液中匹伐他汀量后计算累积释放量, 并绘制释放曲线, 实验重复 3 次。

2.4 空白 PLGA 纳米粒对内皮祖细胞活性检测

取培养 1 周的原代 SD 大鼠脾源性内皮祖细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基重悬, 将等量细胞悬液 100 μL 接种至 96 孔板培养 24 h, 每孔细胞数为 5×10^3 个, 后加入不同质量浓度空白 PLGA 纳米粒悬液 (质量浓度分别为 5, 25, 50, 100, 200 μg/mL), 同时设不含空白 PLGA 纳米粒的细胞为对照组, 每组 3 个复孔, 放置培养箱中继续培养 24 h 后, 每孔加入 CCK8 10 μL, 培养 4 h 后, 于酶标仪 450 nm 波长处测吸收度。

2.5 PLGA 包载匹伐他汀纳米粒对内皮祖细胞活性检测

取培养 1 周的原代 SD 大鼠脾源性内皮祖细胞, 加入不同浓度的匹伐他汀纳米颗粒、匹伐他汀原药 (含匹伐他汀浓度分别为 0.001, 0.01, 0.1 μmol/L) 培养 24 h 后, 更换新鲜培养基继续培养 72 h 后, 用 0.25% 胰酶消化, 终止消化离心计数, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬, 将等量细胞悬液 100 μL 接种至 96 孔板培养 24 h, 每孔

细胞数为 5×10^3 个, 同时设不含药物的细胞为阴性对照组, 每组 3 个复孔, 放置培养箱中继续培养 24 h 后, 每孔加入 CCK8 10 μL, 培养 4 h 后, 于酶标仪 450 nm 波长处测吸收度。

2.6 统计学方法

使用 SPSS 16.0 统计软件处理数据, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用多因素方差分析或单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

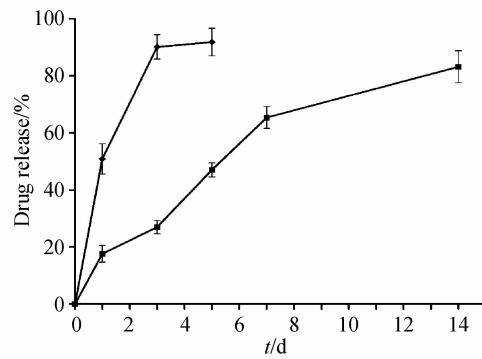
3 结 果

3.1 PLGA 包载匹伐他汀纳米粒的表征

扫描电镜观察可见纳米粒呈圆球形, 表面光滑, 大小不一, 有少许聚集及黏连。测得平均粒径 (230.1 ± 45) nm, 呈窄分布, 纳米粒分散性好, 多分散指数为 0.1147 ± 0.047 。

3.2 PLGA 包载匹伐他汀纳米粒的载药量、包封率及体外释放

HPLC 法测量 3 批纳米粒样品及匹伐他汀原药, 带入标准曲线计算得载药量 $(10.00 \pm 1.83)\%$, 包封率为 $(35.54 \pm 5.40)\%$ 。体外药物释放试验结果显示: 匹伐他汀纳米粒释放速度较均匀, 2 周后累积释放量达到 $(83.20 \pm 5.63)\%$, 匹伐他汀原药在模拟体内环境下释放较快, 第 3 天测得释放量达 $(91.80 \pm 4.82)\%$ (图 1), 说明匹伐他汀纳米粒具有长效、缓释的性能。



—●—Pitavastatin; —■—Pitavastatin-NP

Figure 1 Accumulative release profiles of pitavastatin-loaded PLGA nanoparticles (NP) and pitavastatin *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 空白 PLGA 纳米粒对内皮祖细胞活性检测

采用 CCK8 法检测空白 PLGA 纳米粒对内皮祖细胞的活性影响, 通过酶标仪在 450 nm 处测各孔吸收度。结果显示: 随着空白 PLGA 纳米粒的质

量浓度增加,处理组各孔吸收度较对照组均无明显变化($P=0.495$)(图2),说明载体材料PLGA对细胞活性无影响,具有较好的生物相容性。

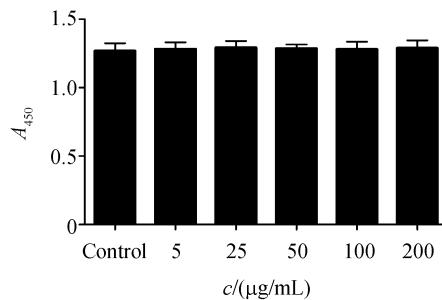


Figure 2 Effect of blank PLGA nanoparticles on viability of endothelial progenitor cells (EPCs) ($\bar{x} \pm s, n=9$)

3.4 PLGA 包载匹伐他汀纳米粒对内皮祖细胞增殖活性检测

采用CCK8法检测匹伐他汀纳米粒对内皮祖细胞增殖活性的影响,以同浓度匹伐他汀原药作为阳性对照组,以不含药物的细胞为阴性对照组。结果显示:与对照组相比,不同浓度匹伐他汀纳米粒及原药刺激后均可提高内皮祖细胞的吸收度,其中以0.1 μmol/L浓度组提高明显($P<0.01$)。在0.001 μmol/L浓度水平,匹伐他汀纳米粒组与匹伐他汀原药组的吸收度无差异,而在0.01和0.1 μmol/L这两个浓度水平,匹伐他汀纳米粒组内皮祖细胞吸收度均高于同浓度匹伐他汀原药组,其中以0.1 μmol/L组更为明显($P<0.01$)(图3)。体外培养的细胞吸收度越大,可反映细胞增殖活性越强。

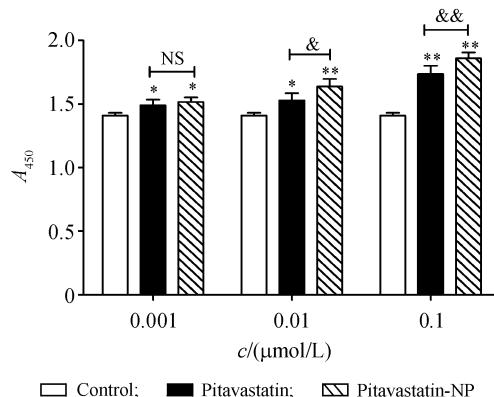


Figure 3 Effect of pitavastatin-loaded PLGA nanoparticles on viability of EPCs ($\bar{x} \pm s, n=9$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; & $P < 0.05$ vs the 0.01 μmol/L pitavastatin group, && $P < 0.01$ vs the 0.1 μmol/L pitavastatin group. NS: Not significant.

4 讨论

安全无毒、可生物降解的高分子聚合物PLGA作为包封载体,体内水解产物为二氧化碳和水,对机体无任何不良反应,已通过美国FDA认证并作为药物辅料收录入药典^[6]。PLGA纳米粒以有效的内吞作用通过细胞膜(细胞摄取率达90%或更高),将药物递送到靶细胞,并利用溶酶体逃逸机制使其包裹的药物免受溶酶体破坏,进而在胞内缓慢释药发挥治疗作用,不但可增强药物选择性和药效,减少药物不良反应,还可对药物进行控制释放,减少给药剂量,延长药物作用时间^[4,7]。近年来,纳米技术在心血管疾病的影像学诊断和治疗中显示出巨大的优势^[8-9],其中多项研究涉及载匹伐他汀纳米粒的应用,在小鼠和兔的慢性缺血下肢模型中证实了匹伐他汀纳米粒小剂量单次给药可在缺血组织的活体细胞中可持续存在14~28 d,促血管新生的效果是长期大剂量匹伐他汀原药组的100~300倍^[4,10]。Katsuki等^[5]研究发现匹伐他汀纳米粒静脉注射后可被单核细胞吞噬并靶向定位于动脉粥样斑块,局部发挥稳定斑块、抑制斑块破裂的作用,效果为匹伐他汀原药组的20倍。

目前已有研究显示匹伐他汀可促进体外培养人脐静脉内皮祖细胞的增殖,并改善其迁移、黏附等生物学功能^[11],本研究中给予内皮祖细胞药物刺激24 h后洗脱药物,继续培养72 h后检测药物对细胞活性的影响,结果发现:两种匹伐他汀剂型均可改善内皮祖细胞增殖功能,但匹伐他汀纳米粒组效果更显著。原因可能为匹伐他汀纳米粒可通过内吞作用进入细胞,而游离药物大多在作用24 h后去除,进入细胞的匹伐他汀纳米粒随着PLGA的缓慢降解释放药物,给予细胞持续刺激,从而提高药物的生物学效能。

本研究采用超声乳化溶剂扩散法成功制备了匹伐他汀纳米粒,检测其表征符合纳米药物特性,在模拟生理条件下具备药物缓释的特点,且载体材料与细胞生物相容性良好,匹伐他汀纳米粒也可有效改善内皮祖细胞增殖活性,为其在干细胞研究领域的应用提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Catapano AL. Pitavastatin-pharmacological profile from early phase studies [J]. *Atheroscler Suppl*, 2010, **11**(3):3–7.
- [2] Betteridge J. Pitavastatin—results from phase III & IV [J]. *Atheroscler Suppl*, 2010, **11**(3):8–14.
- [3] Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects [J]. *FASEB J*, 2005, **19**(3):311–330.
- [4] Kubo M, Egashira K, Inoue T, et al. Therapeutic neovascularization by nanotechnology-mediated cell-selective delivery of pitavastatin into the vascular endothelium [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, **29**(6):796–801.
- [5] Katsuki S, Matoba T, Nakashiro S, et al. Nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin inhibits atherosclerotic plaque destabilization/rupture in mice by regulating the recruitment of inflammatory monocytes [J]. *Circulation*, 2014, **129**(8):896–906.
- [6] Malathi S, Nandhakumar P, Pandiyan V, et al. Novel PLGA-based nanoparticles for the oral delivery of insulin [J]. *Int J Nanomed-*
- cine*, 2015, **10**:2207–2218.
- [7] Vasir JK, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, **59**(8):718–728.
- [8] Suarez S, Almutairi A, Christman KL. Micro- and nanoparticles for treating cardiovascular disease [J]. *Biomater Sci*, 2015, **3**(4):564–580.
- [9] Matoba T, Egashira K. Nanoparticle-mediated drug delivery system for cardiovascular disease [J]. *Int Heart J*, 2014, **55**(4):281–286.
- [10] Oda S, Nagahama R, Nakano K, et al. Nanoparticle-mediated endothelial cell-selective delivery of pitavastatin induces functional collateral arteries (therapeutic arteriogenesis) in a rabbit model of chronic hind limb ischemia [J]. *J Vasc Surg*, 2010, **52**(2):412–420.
- [11] Xu YX, Luan TZ, Shi PW, et al. Effects of pitavastatin on number and activity of endothelial progenitor cells from umbilical vein blood [J]. *Prog Mod Biomed* (现代生物医学进展), 2014, **14**(6):1053–1056.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2016 年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由国家教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药代动力学、药物生物技术、药理学、药事管理等学科的原创研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录,被国内权威数据库:中国科学引文核心数据库(CSCD 核心)、《中文核心期刊要目总览》(2014 年版)、中国科技论文统计源数据库等列为药学类核心期刊,屡获国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2008 年,《中国药科大学学报》被评为中国精品科技期刊,2006、2008、2010 年连续 3 次被教育部评为中国高校精品科技期刊。据中国知网,中国学术期刊(光盘版)电子杂志社《中国学术期刊影响因子年报(2010 版)》公布的最新数据,《中国药科大学学报》复合影响因子为 1.171,位居中国药学学术期刊第 4 位。学术影响力极高,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,128 页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32–1157/R

ISSN:1000–5048

国内邮发代号:28–115

定 价:40 元/期,全年 240 元

地 址:南京市童家巷 24 号

邮政编码:210009

电 话:025–83271566

传 真:025–83271279

E-mail:xuebao@cpu.edu.cn

http://www.zgykdxxb.cn