

红细胞膜包裹的聚多巴胺载补骨脂二氢黄酮甲醚纳米粒的制备及其药代动力学

夏晨洁^{1,2}, 陈志鹏^{1,2}, 李伟东^{1,2*}

(¹南京中医药大学药学院; ²江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210023)

摘要 利用聚多巴胺(PDA)为载体,通过物理吸附作用高效负载补骨脂二氢黄酮甲醚(BVA),进一步利用红细胞膜进行修饰,构建红细胞膜仿生纳米粒(RBC-BP),延长其在体内的驻留时间并研究其药代动力学过程。采用溶剂置换法制备负载BVA的PDA纳米粒(BP),以吸附率为评价指标,考察PDA负载BVA的影响因素;提取分离红细胞膜,采用孵育共挤出法制备RBC-BP,考察pH对膜包覆的影响,挤出次数对RBC-BP的粒径和均一性的影响;对RBC-BP的粒径、电位、形态及累积释放率进行系统表征,初步探讨其药代动力学特征。结果表明,当PDA与BVA之比为1:0.5、溶液pH为7、孵育时间为6 h、孵育温度为20℃时,BP吸附率高达(92.08±0.17)%,载药率为(42.05±2.95)%;当pH为4时,红细胞膜可通过电荷作用成功定向包覆在BP表面。体外研究表明,RBC-BP具有明显的核壳结构,粒径(308.63±6.56)nm,稳定性好;体内药代动力学研究显示,RBC-BP可以延长纳米粒在体内的循环时间。

关键词 补骨脂二氢黄酮甲醚;红细胞膜;仿生纳米粒;药代动力学

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)06-0692-07

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210606

引用本文 夏晨洁, 陈志鹏, 李伟东. 红细胞膜包裹的聚多巴胺载补骨脂二氢黄酮甲醚纳米粒的制备及其药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(6): 692 - 698.

Cite this article as: XIA Chenjie, CHEN Zhipeng, LI Weidong. Preparation and pharmacokinetics of polydopamine-loaded bavachinin nanoparticles coated with erythrocyte membrane[J]. *J China Pharm Univ*, 2021, 52(6): 692 - 698.

Preparation and pharmacokinetics of polydopamine-loaded bavachinin nanoparticles coated with erythrocyte membrane

XIA Chenjie^{1,2}, CHEN Zhipeng^{1,2}, LI Weidong^{1,2*}

¹School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine;

²Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210023, China

Abstract Polydopamine (PDA) nanoparticles were prepared as a carrier, and bavachinin (BVA) was efficiently loaded by physical adsorption. The erythrocyte membrane was further utilized to modify and construct the erythrocyte membrane biomimetic nanoparticles (RBC-BP), the residence time in the body was extended and the *in vivo* analytical method was established to investigate their pharmacokinetics in mice. Polydopamine nanoparticles loaded with BVA (BP) were prepared by solvent replacement method, and the influencing factors of PDA loaded with BVA were investigated with the adsorption rate as the evaluation index. The erythrocyte membrane was extracted and separated, and RBC-BP was prepared by incubation coextrusion method. The effects of pH value on membrane coating and the extrusion times on the particle size and uniformity of RBC-BP were investigated. The particle size, potential, morphology, and cumulative release rate of RBC-BP were systematically characterized, and their pharmacokinetics in mice were preliminarily explored. The results showed that the adsorption rate of BP was as high as (92.08±0.17)% and the drug loading rate was (42.05±2.95)% at the PDA to BVA ratio of 1:0.5, the solution pH value of 7, the incubation time of 6 h, and the incubation temperature of 20℃.

收稿日期 2021-07-05 * 通信作者 Tel: 13905184680 E-mail: liweidong0801@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81773902, No. 81973484)

and that the erythrocyte membrane could be successfully oriented and coated on the surface of BP by the action of electric charge at the pH value of 4. The *in vitro* studies showed that RBC-BP has the apparent core-shell structure with the particle size of (308.63 ± 6.56) nm and good stability, and *in vivo* pharmacokinetic studies showed that RBC-BP can significantly extend the circulation time of nanoparticles *in vivo*.

Key words bavachinin; erythrocyte membrane; biomimetic nanoparticles; pharmacokinetics

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81773902, No. 81973484)

纳米技术作为“21 世纪的决定性技术”,在药物研发、疾病治疗和诊断及药物递送领域发展迅猛^[1]。纳米载体以不同形式与药物分子通过物理包埋、化学键合,构成纳米药物递送系统。因其尺寸、形状、材料等特殊特性,可有效改善药物的药代动力学和药效学性能,提高疗效^[2]。但物理包埋存在药物稳定性差、载药量低的问题,化学偶联虽然可以提高药物的稳定性和载药量^[3],但合成复杂以及会对断裂后药物的药理作用有一定影响。因此,寻找一种简便、高效的策略提高纳米药物的载药量和稳定性是推动其转化的重要方向。

聚多巴胺(polydopamine, PDA)可以在碱性溶液中由多巴胺发生氧化自聚反应得到^[4],具有良好的生物相容性和可降解性。更为重要的是,由于其表面具有大量的儿茶酚基和胺基,从而显示出较强的吸附能力,具有高载药潜力,适合作为药物载体^[5]。此外,为了进一步提高聚多巴胺载药纳米粒在体内的驻留时间,有必要对其进行修饰。细胞膜仿生技术利用仿生载体与机体实现完美兼容,在体内具有长循环、靶向、生物相容性等优

势^[6-7]。已有文献报道,利用红细胞膜修饰纳米粒可以有效逃逸机体网状内皮系统的吞噬^[8-9],延长其体内循环时间。

补骨脂二氢黄酮甲醚(bavachinin, BVA)是从补骨脂中提取的一种异戊烯基黄酮类化合物,具有抗炎^[10]、平喘^[11]、抗氧化^[12]及抗肿瘤^[13]等多种药理作用,具有较为广阔的开发前景。其中,抗肿瘤作用是目前的研究热点,但其口服生物利用度低,无法在体内达到有效的治疗浓度,制约其临床应用,而传统的脂质体等手段无法实现其高载药量负载。为此,本研究利用聚多巴胺的强吸附性,构建补骨脂二氢黄酮甲醚高载药量储库(polydopamine nanoparticles loaded with BVA, BP),进一步利用红细胞膜修饰,构建红细胞膜仿生纳米粒(erythrocyte membrane biomimetic nanoparticles, RBC-BP)(图 1),延长其在体内的驻留时间,并初步研究了该递送系统的静脉注射后的小鼠体内药代动力学行为,为利用聚多巴胺纳米粒构建高载药量纳米药物提供有益的借鉴。

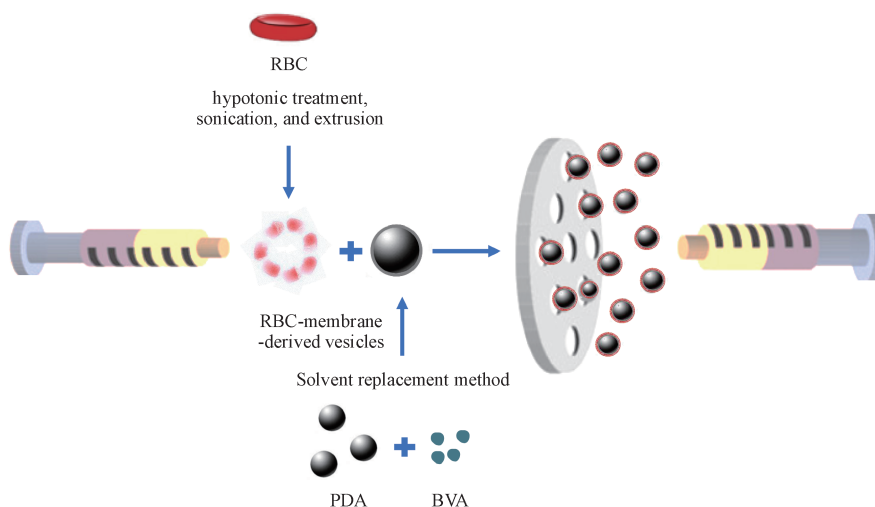


Figure 1 Schematic illustration of the preparation process of erythrocyte membrane biomimetic nanoparticles (RBC-BP)

RBC: Red blood cell; PDA: Polydopamine; BVA: Bavachinin

1 材料

1.1 药品与试剂

补骨脂二氢黄酮甲醚(纯度 $\geq 98\%$,批号:110502,南京世洲生物科技有限公司);滨蒿内酯(纯度 $\geq 99\%$,批号:20180203,南京世洲生物科技有限公司);盐酸多巴胺(美国Sigma-Aldrich公司);PBS(北京索莱宝科技有限公司);甲醇、氨水、乙腈(南京化学试剂有限公司)均为色谱纯;甲酸(德国Merck公司)。

1.2 仪器

BS-124S 电子天平(德国赛多利斯公司);1736R 低温高速离心机(GENE有限公司);JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Zetasizer Nano ZS90 激光粒度仪(英国马尔文公司);脂质体挤出仪(美国Avanti公司);100CX 透射电子显微镜(日本Jeol公司);QF-3800 氮气吹干仪(广州科雷纳仪器设备有限公司);Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国Thermo公司);5500 MS 系统三重四极杆质谱仪(美国AbSciex公司)。

1.3 动物

ICR小鼠,雌性,SPF级,体重18~22 g(南京中医药大学实验动物中心),动物许可证号:SCXK(浙)2019-0002。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方法

2.1 BVA体外含量测定方法的建立

采用HPLC法测定BVA含量。色谱条件:色谱柱为Kromasil-C₁₈柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相为乙腈-0.01%甲酸水(75:25);检测波长为270 nm;柱温为30 $^{\circ}$ C;流速为1.0 mL/min;进样量为20 μ L。BVA在0.10~25.0 μ g/mL范围内线性关系良好,回归方程为 $y = 46\,900x + 76.948$, $r^2 = 0.9998$;进样精密度RSD为0.78%($n = 6$);加样回收率平均值(100.00 \pm 0.35)%($n = 6$),经验证该方法满足BVA的含量测定要求。

2.2 BP的制备及处方工艺筛选

参照课题组前期制备工艺^[14],利用溶剂置换法制备BP,称取一定量的BVA溶于乙醇20 mL中得有机相。随后在搅拌条件下缓慢加入至含PDA

的纯水5 mL中,通过室温搅拌孵育负载BVA,旋转蒸发除去乙醇,高速离心10 min,弃去上清液得BP。以吸附率为评价指标,考察PDA与BVA的比例、溶液pH、孵育时间和温度等因素对PDA负载BVA的影响。

2.3 RBC-BP的构建

参照文献报道制备RBC^[15],将制备后的RBC和BP纳米粒进行混合,调节混合液的pH,常温振荡孵育,高速离心,弃上清液,加入PBS溶液混匀,得RBC-BP粗悬液,通过脂质体挤出仪进行多次挤压,制备得粒径均一的RBC-BP混悬液。为了更好地利用正负电荷作用实现包裹,考察pH对BP电位的影响,以PDI为评价指标考察挤出次数对RBC-BP粒径和均一性的影响。

2.4 RBC-BP的表征

2.4.1 外观形貌观察 用移液枪分别吸取少量的BP、RBC和RBC-BP,滴加到铜网,用磷钨酸负染法染色,自然晾干,将制得的样品通过透射电子显微镜进行分析。

2.4.2 粒径与电位测定 取上述制备所得的RBC、BP和RBC-BP,用粒度测定仪测定不同样品的粒径和Zeta电位。

2.4.3 吸附率与载药量的测定 称取固定量的BP或RBC-BP,加入破膜剂(异丙醇-无水乙醇,4:1),充分吹打并涡旋,高速离心10 min,取上清液,按“2.1”项下色谱条件,HPLC进样分析,测定BVA的含量,计算其质量。按下述公式计算吸附率与载药率:吸附率=(载体中BVA的量/BVA的加入量) $\times 100\%$,载药率=(载体中BVA的量/制剂的总量) $\times 100\%$ 。

2.4.4 释放行为研究 取BVA、BP和RBC-BP 1 mL置于透析袋内,放入pH 7.4的溶出介质10 mL中,37 $^{\circ}$ C振荡,在给定时间点取样,按“2.1”项下色谱条件测定BVA含量,计算累积释放率,绘制时间-累积释放率曲线。

2.5 小鼠体内药代动力学研究

2.5.1 给药及取样 ICR小鼠75只,随机分为3组,实验前12 h禁食,自由饮水。分别尾静脉注射BVA、BP、RBC-BP,给药剂量为40 mg/kg。分别于给药后1、4、8、12、24 h,摘眼球取血约0.5 mL,置预先装有肝素钠的试管中,3 000 r/min离心10 min,分离血浆,-20 $^{\circ}$ C条件下保存,备用。

2.5.2 血浆样品处理方法 取小鼠血浆样品 90 μL 于 1.5 mL EP 管中,加入内标液 10 μL ,振摇混合均匀,再加入乙腈 290 μL ,涡旋 5 min,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液 300 μL ,真空浓缩后,加甲醇 150 μL 复溶,13 000 r/min 离心 10 min。取上清液用于 UHPLC-MS/MS 分析。

2.5.3 体内分析方法建立 色谱质谱条件:流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B);梯度洗脱:0.01 ~ 1.0 min,5% ~ 75%(B);1.0 ~ 3.5 min,75%(B),4.5 ~ 5.0 min,75% ~ 50%(B);流速为 0.3 mL/min;柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 2 μL 。离子源为 ESI 源;CUR: 35 psi (1 psi = 6.895 kPa);CAD: 8 V;IS: 5 500 N;TEM: 600 $^{\circ}\text{C}$;GS1: 50 psi;GS2: 60 psi。补骨脂二氢黄酮甲醚在血浆中 1 ~ 1 250 ng/mL 线性关系良好,回归方程为 $y = 0.001\,30x + 0.007\,56$, $r^2 = 0.999\,9$;方法学考察显示符合生物样品的分析控制要求。

3 结果与讨论

3.1 BP 的制备及处方工艺筛选

PDA 与 BVA 比例、溶液 pH、孵育时间和温度对 PDA 负载 BVA 的影响结果见图 2。如图 2-A 所示,当固定 PDA 用量时,BVA 在一定范围内均可被负载,吸附率稳定在 90% 以上,随着 BVA 加入量的增加,质量比例大于 1:0.5 时,PDA 的吸附逐渐趋于饱和,吸附率呈下降趋势。溶液 pH 影响研究结果显示(如图 2-B 所示),随着 pH 增加,吸附率出现先增大后减小的趋势。当 pH 为 7 时,吸附率最高。随着孵育时间延长,吸附率显著增加,而当孵育时间达 6 h 后,吸附率趋于稳定(如图 2-C 所示)。孵育温度在 10 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 时,对吸附率没有明显影响。

综上,最终确定 PDA 负载 BVA 的处方和工艺参数为:PDA 与 BVA 的质量比例为 1:0.5、溶液 pH 为 7、孵育时间为 6 h、孵育温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

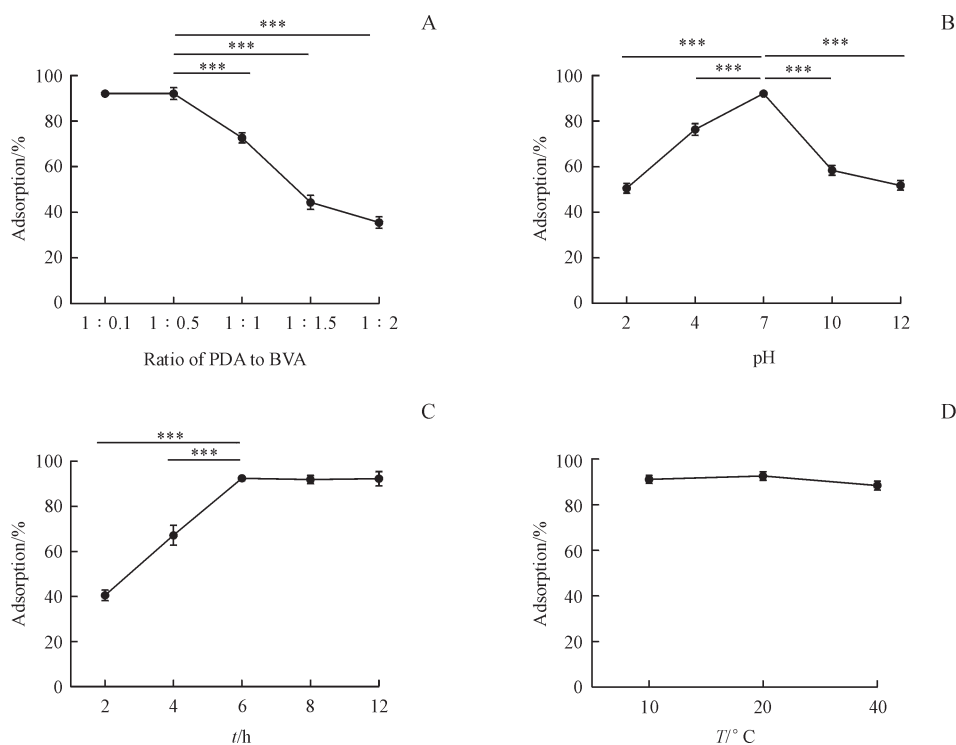


Figure 2 Changes in adsorption rate under different ratios of PDA to BVA (A), pH (B), incubation time (C) and incubation temperature (D) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

*** $P < 0.001$

3.2 RBC-BP 的构建

溶液 pH 对 BP 表面电荷影响结果如图 3-A 所示,随着 pH 的增加,BP 表面电荷逐渐降低,在 pH

4 ~ 7 时,由正电荷转为负电荷。依据细胞膜外侧正电荷内侧负电荷的特性,巧妙地选择 BP 在负电荷时进行包覆,实现细胞膜的定向包裹。而当 pH

为2时, BP有聚集变大的趋势, 故而本研究选择的溶液pH为4。

挤出次数对RBC-BP的影响如图3-B所示, 经200 nm的聚碳酸酯膜挤压, 平均粒径控制在200 ~

300 nm, 随着挤出次数增加, PDI逐渐减小, 挤出达3次以上时, PDI无明显变化。通过反复挤出可以改善粒径分布, 获得均一性良好纳米粒。

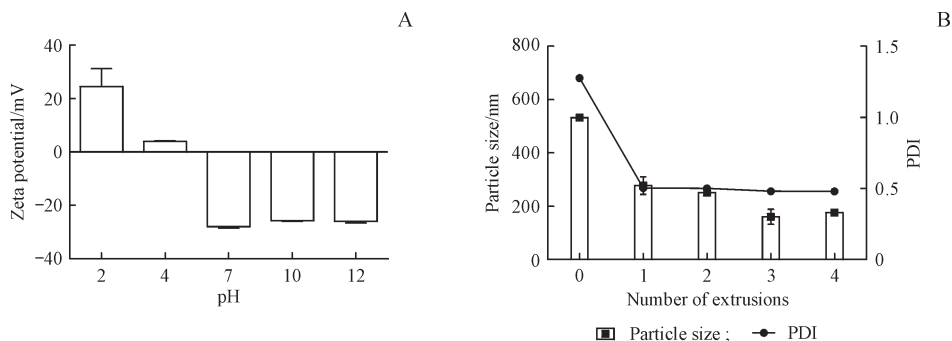


Figure 3 BP Zeta potential of different pH (A) and particle size and PDI of RBC-BP with different extrusion times (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 RBC-BP的表征

3.3.1 外观形态观察 BP、RBC和RBC-BP的透射电镜照片见图4。如图4-A和4-B所示, BP具有良好的球形形貌, RBC多以碎片存在, 部分自发聚集形成不规则的囊泡, 图4-C所示, RBC-BP呈明显的核壳结构, 球形的BP外周包裹了一层膜结构, 说明细胞膜成功包覆。

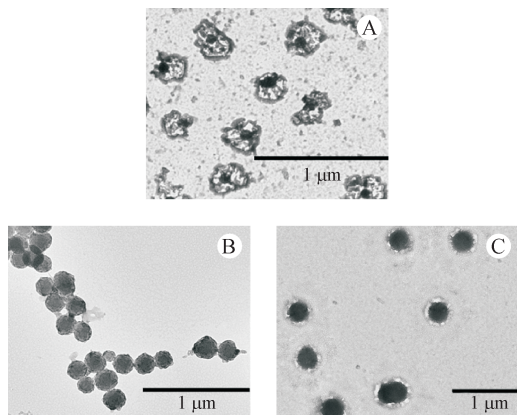


Figure 4 Transmission electron microscopy of RBC (A), BP (B) and RBC-BP (C)

3.3.2 粒径与电位测定 BP、RBC和RBC-BP粒径电位结果见图5。BP的粒径为(146.67 ± 11.90) nm, 由于RBC部分发生自身聚集形成不规则囊泡, 其粒径为(213.67 ± 34.63) nm, 与BP相比, 制得的RBC-BP粒径有所增大为308 nm。RBC-BP的电位为(4.78 ± 0.76) mV, 与RBC的表面电位(4.89 ± 0.19) mV相似, 间接证明了RBC-BP的成功制备。

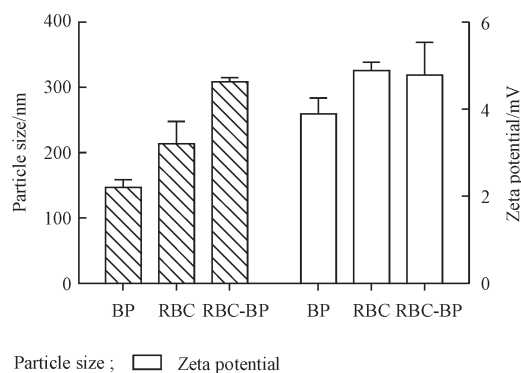


Figure 5 Particle size and Zeta potential of polydopamine nanoparticles loaded with BVA (BP), RBC and RBC-BP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3.3 载药量及药物释放情况 使用HPLC法检测BP和RBC-BP中BVA的含量, 根据公式计算封装率和载药率, 测得BP吸附率为(92.08 ± 0.17)%, 载药率为(42.05 ± 2.95)%; RBC-BP吸附率为(92.72 ± 3.31)%, 载药量为(30.23 ± 4.32)%, 吸附率无显著变化, 证明包覆过程无药物渗漏。

BVA、BP和RBC-BP的累积释药曲线见图6。BVA溶液表现出快速释放的特征, 在1 h内已经释放近97%的药量; BP组在前4 h释放了约50%的BVA, 之后释放速率减慢, 48 h累积释放量为67%; RBC-BP在前2 h释放了约20%的BVA, 之后几乎不释放, 48 h累积释放量仅为30%。

综上, PDA具有较高的载药能力, 且在生理环境下较为稳定, 进一步用细胞膜包裹后, 其稳定性增加。

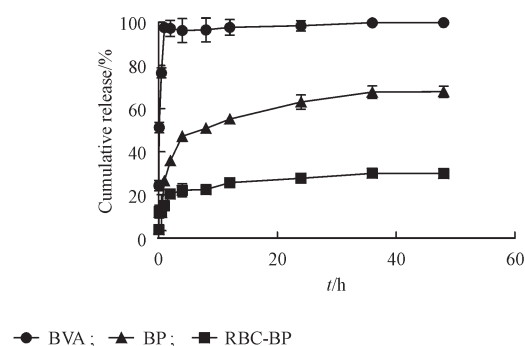


Figure 6 Cumulative release curves of BVA, BP and RBC-BP *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 药代动力学研究

采用中国药理学学会 3P97 软件包进行房室模型拟合并计算药代动力学参数。BVA、BP 和 RBC-BP 药时曲线见图 7,其主要药代动力学参数见表 1。与 BVA 溶液剂相比,BP 和 RBC-BP 的 $AUC_{0-\infty}$ 和 $MRT_{0-\infty}$ 分别是 BVA 的 2.0 倍、2.5 倍和 5.4 倍、3.2 倍。RBC-BP 的 $AUC_{0-\infty}$ 和 $MRT_{0-\infty}$ 是 BP 的 2.6 倍和 1.2 倍,表明红细胞膜的包裹能够进一步提高 BP 的体内驻留时间。

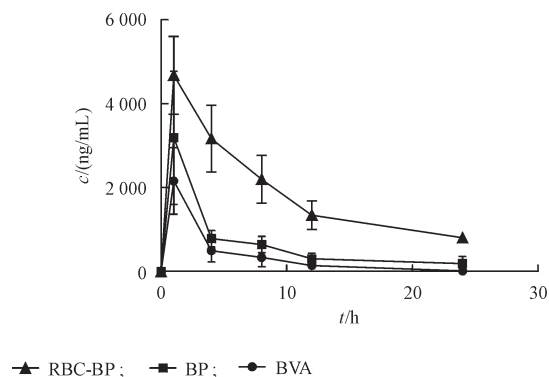


Figure 7 Plasma concentration-time curves of BVA, BP and RBC-BP ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Comparison of the mean pharmacokinetic parameters of BVA, BP, RBC-BP after a single 40 mg/kg intravenous injection in mouse ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Parameter	BVA	BP	RBC-BP
$AUC_{0-t}/(mg/L \cdot h)$	9.72 ± 4.26	16.74 ± 7.10	$47.29 \pm 10.15^{***}$
$AUC_{0-\infty}/(mg/L \cdot h)$	9.84 ± 4.25	20.18 ± 10.79	$53.18 \pm 13.85^{**}$
MRT_{0-t}/h	3.76 ± 0.51	5.50 ± 0.78	$7.82 \pm 0.27^{***}$
$MRT_{0-\infty}/h$	3.97 ± 0.55	10.00 ± 5.37	12.51 ± 0.99

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs BP group

4 结 论

近年来,纳米药物取得了长足的进展,但是能

够转化应用于临床的却很少,载药量、稳定性以及工业化的可行性一直是限制其发展的主要瓶颈。从中药中提取分离获得多种生理活性良好的化合物,由于溶解度低等问题制约其临床应用。

本研究依据 PDA 的强吸附性,实现对 BVA 高效负载,制备 BVA 的高载药量储库,为进一步制备新型递释系统提供了基础。其次,利用红细胞膜仿生技术进一步修饰载药纳米粒,基于红细胞膜内负外正的电荷特性,巧妙通过调节溶液 pH 实现对 PDA 的电荷调控,从而实现细胞膜定向包覆纳米粒的目的。成功构建具有长循环特性和高载药量的递送系统,其临床转化有望在将来实现为肿瘤治疗。

PDA 作为一种新型载体,载药方式多样且可调控性强,可以负载多种成分,进一步研究其载药机制,有望将其作为负载多成分的载体,在中药多组分负载具有良好的应用前景,也为中药制剂的现代化研究提供一种新的方向。同时,通过调节细胞膜包覆时的条件,实现细胞膜的定向包裹,最大程度地保留其生理学特点,也为细胞膜修饰递释系统的应用提供了有益的借鉴。

References

- [1] Li SX, Li DL, Li ZJ, *et al.* Research progress in nano-preparations[J]. *J North Pharm* (北方药学), 2014, **11**(6):61-62.
- [2] Zhou JP. Application and prospect of nanotechnology in the drug delivery system[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2020, **51**(4):379-382.
- [3] Yi CH, Xu QH, Wang M, *et al.* Research progress of pH-sensitive biopolymer nanocarriers[J]. *Chem Ind Eng Prog* (化工进展), 2021, **40**(6):3411-3420.
- [4] Lee H, Dellatore SM, Miller WM, *et al.* Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings[J]. *Science*, 2007, **318**(5849):426-430.
- [5] Wang W, Tang Z, Zhang Y, *et al.* Mussel-inspired polydopamine: the bridge for targeting drug delivery system and synergistic cancer treatment[J]. *Macromol Biosci*, 2020, **20**(10):e2000222.
- [6] Li T, Qin X, Li Y, *et al.* Cell membrane coated-biomimetic nano-platforms toward cancer theranostics[J]. *Front Bioeng Biotech*, 2020, **29**(8):371.
- [7] Luk BT, Fang RH, Hu CM, *et al.* Safe and immunocompatible nanocarriers cloaked in RBC membranes for drug delivery to treat solid tumors[J]. *Theranostics*, 2016, **6**(7):1004-1011.
- [8] Chambers E, Mitragotri S. Prolonged circulation of large poly-

- meric nanoparticles by non-covalent adsorption on erythrocytes [J]. *J Control Release*, 2004, **100**(1): 111-119.
- [9] Hu CM, Fang RH, Zhang L. Erythrocyte-inspired delivery systems [J]. *Adv Healthc Mater*, 2012, **1**(5): 537-547.
- [10] Nepal M, Choi HJ, Choi BY, et al. Anti-angiogenic and anti-tumor activity of bavachinin by targeting hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, **691**(1/2/3): 28-37.
- [11] Nie LJ, Li HM, Guo X, et al. Study on antioxidant and antitumor active ingredient from *Psorale corylifolia* [J]. *J Bengbu Med Coll* (蚌埠医学院学报), 2015, **40**(11): 1461-1464.
- [12] Chen X, Wen T, Wei J, et al. Treatment of allergic inflammation and hyperresponsiveness by a simple compound, bavachinin, isolated from Chinese herbs [J]. *Cell Mol Immunol*, 2013, **10**(6): 497-505.
- [13] Yue SY, Wu KJ. Research progress of bavachinin [J]. *Pract Pharm Clin Rem* (实用药物与临床), 2017, **20**(7): 852-855.
- [14] Zhu CQ, Gu Y, Zhou Q, et al. Study on preparation of *Danshen* injection sustained-release preparation using polydopamine [J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2020, **15**(15): 2245-2248.
- [15] Feng SN, Zhang HJ, Gao XD, et al. Preparation of erythrocyte membrane biomimetic boron nitride nanospheres and their research as anti-tumor drug carriers [J]. *J Food Biotech*, 2019, **38**(9): 72-77.



中国药科大学学报

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊
中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿

提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

创新成果

展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

研究论文

科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号：28-115, 欢迎订阅，欢迎投稿！