

蟾毒灵纳米结构脂质载体的制备及性质研究

田振芬^{1#} 吕文华^{1#} 龚亚斌² 张照悦³ 陈蕴琪³ 邹爱华^{1*}

(¹ 华东理工大学化学与分子工程学院 上海 200237; ² 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 上海 200437;

³ 华东理工大学中德工学院 上海 200237)

摘要 本文采用高压均质法成功将脂溶性药物蟾毒灵(BUF)负载于纳米结构脂质载体(NLC)中,并对其物理化学性质、体外释放性质及体外肿瘤细胞毒性等进行了研究。结果表明,制备获得的蟾毒灵纳米结构脂质载体(BUF-NLC)粒径小、分散度和稳定性好,具有明显的药物缓释作用。MTT实验表明,将BUF负载于NLC后,作用初期对肿瘤细胞的毒性作用低于原药,作用时间延长,毒性与原药达到一致,说明NLC的包裹并未降低蟾毒灵的药效,而是逐步释放出来,这对克服临床应用中蟾毒灵的高毒副作用有非常重要的意义。

关键词 蟾毒灵 纳米结构脂质载体 缓释 毒性

Preparation and Characterization of Bufalin Nanostructure Lipid Carrier

Tian Zhenfen^{1#}, Lv Wenhua^{1#}, Gong Yabin², Zhang Zhaoyue³, Chen Yunqi³, Zou Aihua^{1*}

(¹ School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237; ² Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai, 200437;

³ International College of Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract In this paper, Bufalin loaded nanostructure lipid carrier (BUF-NLC) was successfully prepared by high pressure homogenization. The physicochemical properties, *in vitro* release and cytotoxicity (MTT) were characterized. The results indicated that BUF-NLC has small particle size, good dispersibility and stability. The MTT test suggested that the cytotoxicity of BUF-NLC on tumor cells was lower than free BUF in the initial stage, but after prolonged the action time, the cytotoxicity of BUF-NLC was consistent with that of BUF, indicating that NLC package does not reduce the cytotoxicity of BUF, but gradually release it, which was very important to overcome the side-effects caused by the high toxicity of BUF.

Keywords Bufalin (BUF), Nanostructure lipid carrier (NLC), Sustained release, Toxicity

DOI:10.14159/j.cnki.0441-3776.2017.07.011

蟾毒灵是中国传统药物蟾酥的主要有效成分,具有广谱抗肿瘤作用,是当前治疗恶性肿瘤的重要药物^[1]。然而水溶性差、毒性大、代谢速度快、治疗窗窄等缺点严重限制了其临床应用。为了克服这些缺点,国内外学者采用不同的纳米载体包载蟾毒灵,以使其更加安全、有效、稳定地发挥作用。目前,用于包载蟾毒灵的纳米载体主要为脂质体和纳米结构脂质载体(NLC)。其中, Li等^[2]制备了修饰有柑橘果胶的卵磷脂脂质体,将其用于对蟾毒灵进行包载; Liu等^[3]制备了修饰有胚芽凝集素的蟾毒灵脂质纳米粒子; Yin等^[4]将蟾毒灵包裹在由 mPLGA-PLGA-PLL-cRGD

(mPLGA: 甲氧基聚乙二醇; PLGA: 聚乳酸-co-乙醇酸; PLL: 聚-L-赖氨酸; cRGD: 环状精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)制成的具有靶向功能的纳米颗粒中; Tian等^[5]将蟾毒灵负载于以维生素H修饰的壳聚糖纳米颗粒中。这些文献报道中,蟾毒灵药物载体的最大包封率为(81.7 ± 0.89)%。

NLC是将药物以镶嵌、吸附或溶解的方式存于脂质基质中而形成的载体系统,具有粒径小、表面积大、耐受性好、生物相容性好等优点。与脂质体相比, NLC的固体纳米粒子与外水相之间不存在药物分配现象,能更好地保护药物分子,使其不发生降解,可显著提高稳定性^[6~8]。

#为共同第一作者。* 联系人 邹爱华 女,博士,副教授,主要从事胶体与界面化学研究, E-mail: aihuazou@ecust.edu.cn

国家自然科学基金项目(21573070)资助

2017-01-10 收稿 2017-03-03 接受

基于此,本文在载体配方筛选的基础上通过高压均质法制备了高包封率的蟾毒灵 NLC,并对其物理化学性质、体外释放性质及体外肿瘤细胞毒性等进行了研究,以期获得稳定性好、高生物利用度、低毒性的蟾毒灵纳米给药系统,为蟾毒灵的临床应用提供更多可能。

1 实验部分

1.1 原料与仪器

蟾毒灵(北京华奉联博有限公司);油酸聚乙二醇甘油酯(1944 CS,法国嘉法狮);双硬脂酸甘油酯(NA,凌峰化学试剂公司);辛酸癸酸甘油酯(MCT,阿拉丁试剂);泊洛沙姆 477(F127,阿拉丁试剂);泊洛沙姆 188(F68,阿拉丁试剂);海藻糖(阿拉丁试剂),重蒸水(自制);透析袋(M_w : 8 ~ 14kDa,上海源叶)。

高压均质机(NanoGenizer,苏州微流纳米生物技术有限公司);高速剪切机(德国);Nicom380 Z3000 粒度及 Zeta 电位分析仪(苏州微流纳米生物技术有限公司);紫外可见分光光度计(日本岛津);电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);电热恒温水槽(金坛市科兴仪器厂);冷冻干燥机(北京博医康仪器设备有限公司);1810-B 型石英自动双重纯水蒸馏器(金坛市科兴仪器厂);KDC-140HR 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);SHZ-82 型数显水浴恒温振荡器(金坛市科兴仪器厂);Nanostar 小角 X 射线散射仪(德国 Bruker 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 蟾毒灵及空白 NLC 的制备 采用高压均质法制备蟾毒灵纳米结构脂质载体(BUF-NLC)及空白纳米结构脂质载体(空白 NLC)。具体为,将 $30\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的油脂按固态油脂(NA)和液态油脂(1944 CS 和 MCT) 3:1(质量比)比例混合后,加入 20mg 蟾毒灵,加热至 70°C 熔融混匀。同时加热含有 $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 乳化剂(F127 和 F68)的水相至相同温度,迅速倒入油相中,使油相分散,样品总体积为 50mL。用高速剪切机搅拌油水混合物 2min($10000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),用高压均质机在 600bar 下均质,循环 6 次。将得到的纳米悬浊液冷却过夜,即可得到 BUF-NLC。为提高 BUF-NLC 的稳定性,对其进行冷冻干燥,并用海藻糖作为冷冻保护剂在 -20°C 下预冻 24h,然后放入冷冻干燥机进行冷冻干燥。采用上述操作,不加入蟾毒灵,即

可得空白 NLC。

1.2.2 包封率和载药量的测定 将 BUF-NLC 样品稀释 10 倍后涡旋 1min 混合均匀,取 $400\mu\text{L}$ 稀释后的样品于超滤管中,在 $9000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下冷冻离心 40min,取滤液用紫外可见分光光度计测量其在 298nm 处的吸光度。包封率和载药量的计算方法为:

$$\text{EE}\% = (1 - m_U / m_T) \times 100\%$$

$$\text{DL}\% = (m_T - m_U) / m_L \times 100\%$$

其中 m_U 为未包封的蟾毒灵的质量(mg), m_T 为加入 NLC 中蟾毒灵的总质量(mg), m_L 为 NLC 的质量(mg)。

1.2.3 平均粒径、分散度及 zeta 电位测定 制得的 BUF-NLC 样品用重蒸水稀释一定倍数,用 450nm 的滤膜过滤,经动态光散射测定其平均粒径、分散度(PDI)及 Zeta 电位。测试条件为 25°C 下平衡 4min,重复 3 次,取平均值。

1.2.4 小角 X 射线散射(SAXS) X 射线的波长设置为 1.033\AA ,散射强度通过 Pilatus 1M 检测器(DECTRIS Ltd)检测。样品到检测器的距离设置符合以下条件:散射矢量 q 探测范围在 $0.01 \sim 0.5\text{\AA}^{-1}$ ($q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, 2θ 为散射角),对应的长度范围为 $10 \sim 600\text{\AA}$ 。为减小辐射损伤,采用直径 1.5mm、壁厚 $10\mu\text{m}$ 的石英流动池,曝光时间设置为 $1 \sim 2\text{ s}$ 。每次实验都调节入射光束尺寸使 X 射线光束通过毛细管中心。为了得到好的信噪比,每个样品重复测试 10 次。二维图像采用 BioXTASRAW 软件包通过立体角修正为平均方位角,然后把发射束的强度归一化后转变为一维 SAXS 曲线图。

1.2.5 体外释放实验 取 BUF-NLC 和 BUF 溶液各 2mL 置于透析袋中,将其放置在 120mL PBS (pH 7.4) 缓冲溶液中,于 37°C 水浴中缓慢振荡。分别在 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48、60 和 72 h 时取释放介质 2mL,并及时补充 2mL 相同温度的新鲜释放介质。采用紫外可见分光光度计在 298nm 下测定取出的释放外液中 BUF 的浓度。释放累积量通过如下公式计算得到:

$$Q_n = c_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} c_i \times V_i$$

其中 c_n 代表每个取样点缓释介质中 BUF 的浓度, c_i 代表第 i 次所取样品中 BUF 的浓度, V_0 和 V_i 分别代表释放介质的体积和所取样品的体积。

1.2.6 体外肿瘤细胞毒性实验 A549 细胞的培

培养基为 RPMI1640 培养基(含 10% (体积比) 小牛血清和 $100\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素), 培养条件为 37°C , $5\% \text{CO}_2$, 饱和湿度。

采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT 法) 研究空白 NLC、BUF 原药和 BUF-NLC 对 A549 细胞的抑制作用。具体的操作为: 取对数生长期的 A549 细胞($5 \times 10^3 \text{cells}\cdot\text{well}^{-1}$) 接种于 96 孔板中, 每孔接种体积为 $100\mu\text{L}$, 在培养基中培养 24h。将培养基分别用 BUF-NLC、blank-NLC 和 BUF 原药培养液代替。其中, BUF-NLC 和 BUF 原药中的 BUF 含量相等(均为 $20\text{nmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 分别继续培养 24、48、72、96 h。弃去培养液, 添加 $20\mu\text{L}$ MTT 溶液($5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37°C 下培养 4h, 加入 $100\mu\text{L}$ DMSO 溶液, 混合均匀。酶联免疫分析仪测量各

组吸光度值, 吸收波长 $\lambda = 490\text{nm}$ 。对照组为未处理的细胞。

细胞存活率 = (各组吸光值/对照组吸光值) $\times 100$ 。

1.2.7 统计学方法 应用 student's *t*-test 进行统计检验, 计量数据用 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示, 各组间差异比较用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 空白 NLC 的配方筛选

研究不同油脂浓度和不同乳化剂浓度对空白 NLC 的粒径、分散度及稳定性的影响。结果见表 1。

表 1 空白 NLCs 的配方和物理表征($n=3$)

Tab. 1 Formulation and physical characterization of blank-NLCs($n=3$)

编号	乳化剂 /($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	油脂 /($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	粒径/nm			PDI		
			1d	7d	30d	1d	7d	30d
1	2.5	30	160.9 ± 2.3	160.1 ± 2.7	168.4 ± 2.8	0.183 ± 0.01	0.131 ± 0.008	0.156 ± 0.012
2	3.0	30	160.0 ± 1.8	160.3 ± 2.5	166.4 ± 3.1	0.192 ± 0.007	0.168 ± 0.015	0.178 ± 0.017
3	4.0	30	152.9 ± 1.9	151.6 ± 2.6	154.4 ± 3.2	0.219 ± 0.007	0.181 ± 0.017	0.174 ± 0.019
4	5.0	30	144.3 ± 2.3	147.0 ± 2.1	147.6 ± 3.7	0.199 ± 0.009	0.175 ± 0.017	0.180 ± 0.015
5	5.0	35	160.0 ± 2.7	164.4 ± 2.5	166.4 ± 2.4	0.192 ± 0.01	0.137 ± 0.009	0.178 ± 0.01
6	5.0	40	164.8 ± 2.5	163.8 ± 2.7	168.9 ± 2.0	0.199 ± 0.02	0.183 ± 0.018	0.180 ± 0.021
7	5.0	45	173.2 ± 2.8	171.9 ± 2.3	171.5 ± 3.5	0.181 ± 0.005	0.160 ± 0.015	0.155 ± 0.02
8	5.0	50	173.6 ± 3.3	172.9 ± 2.9	174.8 ± 2.7	0.182 ± 0.009	0.165 ± 0.013	0.175 ± 0.02

由表 1 可知, 通过筛选载体配方 4 号样品粒径较小, 分散度较好, 且 30d 内稳定, 故选此配方进行药物包载。

2.2 包封率和载药量的测定

新鲜制备的 BUF-NLC 及存储 30d 的 BUF-NLC 冻干粉包封率分别为 (83.1 ± 1.3)% 和 (80.3 ± 0.8)%, 载药量分别为 (1.09 ± 0.11)% 和 (1.07 ± 0.09)%。由此可以看出, 在 30d 的存储时间内, 包封率和载药量均无明显变化。

2.3 平均粒径、分散度(PDI) 及 zeta 电位测定

由表 2 可知, 加入蟾毒灵后 NLC 的粒径发生了微小的变化, PDI 值明显小于空白 NLC, Zeta 电位的绝对值有所增加, 说明 BUF-NLC 体系的分散度更好, 稳定性增加^[9]。另外, BUF-NLC 平均粒径为 $147.2 \pm 3.2 \text{nm}$, 具有被动靶向作用^[10, 11], 能高效到达靶细胞, 降低对正常组织的毒性。

表 2 空白 NLC 和 BUF-NLC 的平均粒径、分散度及 zeta 电位($n=3$)

Tab. 2 Average particle size, PDI and Zeta potential of blank-NLC and BUF-NLC($n=3$)

	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
空白 NLC	144.3 ± 2.3	0.199 ± 0.009	-39.63 ± 0.13
BUF-NLC	147.2 ± 3.2	0.172 ± 0.015	-45.45 ± 0.15

2.4 小角 X 射线散射

空白 NLC 和 BUF-NLC 的 SAXS 扫描结果如图 1 所示, 两条曲线都有 3 个散射峰 $q_1: q_2: q_3$ 接近 $1: 2: 3$, 说明两者均为多层结构。同时也有微小差别, 通过 $d = 2\pi/q$ 可知, 空白 NLC 的层间距 $d = 47.9 \text{\AA}$, 而 BUF-NLC 的层间距 $d = 48.7 \text{\AA}$, 层间距有所增加, 说明蟾毒灵成功包裹进了 NLC 内部。并且层间距的增加表明粒径增大, 与粒径测定结果一致。

2.5 体外释放实验

以 BUF 原药作为对照组, 如图 2 所示, 释放时间为 12h 时, BUF 原药的释放量已经达到 90%; 24h 时, 几乎全部从透析袋中释放出来。而

12h 时 BUF-NLC 中蟾毒灵的释放量不到 60% ; 72h 时 释放量为 75% 左右。说明将 BUF 负载于 NLC 中有明显的缓释行为 , 有利于 BUF 在体内缓慢发挥药效 , 降低局部药物浓度过高引起的毒副作用。

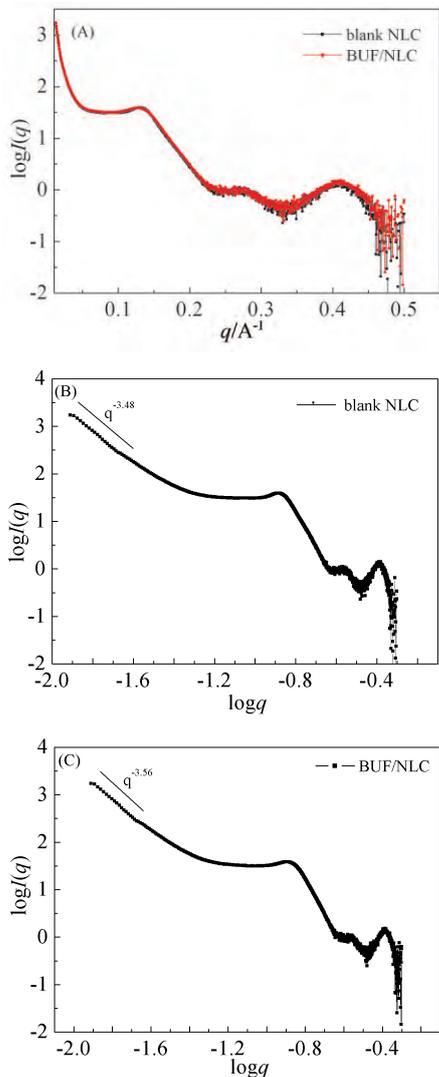


图 1 SAXS 曲线: (A) 空白 NLC 和 BUF-NLC 的 $\log I(q) - q$ 曲线; (B) 空白 NLC 的 $\log I(q) - \log q$ 曲线; (C) 蟾毒灵 NLC 的 $\log I(q) - \log q$ 曲线 ($n=3$)

Fig. 1 SAXS curves: (A) $\log I(q) \sim q$ curves of blank-NLC and BUF-NLC; (B) $\log I(q) - \log q$ curve of blank-NLC; (C) $\log I(q) - \log q$ curve of BUF-NLC ($n=3$)

2.6 体外肿瘤细胞毒性实验

如图 3 所示 , 空白载体对 A549 细胞没有毒性作用 , 而 BUF 原药和 BUF-NLC 对 A549 有明显的毒性作用。24h 时 BUF 原药的毒性大于 BUF-NLC 随着作用时间的增加 , 两者的毒性作用逐渐趋于一致。以 BUF 原药为对照组 , 作用时间分别为 24、48、72 和 96 h , 经统计学处理分析 , 24、48、

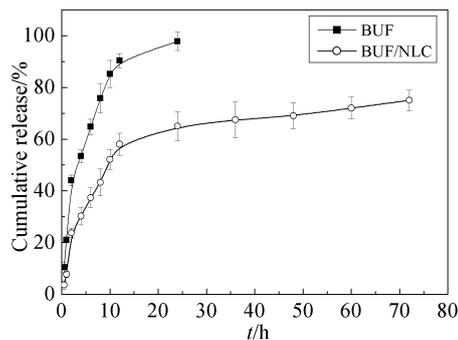


图 2 BUF 原药和 BUF-NLC 的释放曲线 ($n=3$)
Fig. 2 *In vitro* release profile of BUF and BUF-NLC ($n=3$)

72 h 时 BUF-NLC 组与对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$) , 96h 时与对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$) 。导致这种现象的原因是: (1) 蟾毒灵原药溶液在细胞内外有明显的浓度差 , 使得蟾毒灵通过主动扩散快速到达细胞内部 , 对细胞产生明显的毒性作用 , 而 BUF-NLC 主要是通过内吞作用进入细胞^[12, 13]。(2) BUF 是从 NLC 中缓慢释放出来的 , 作用时间短时 , 释放量小 , 毒性作用比原药低; 作用时间延长 , 释放量增加 , 其对肿瘤细胞的毒性作用也随之增加 , 最后跟原药达到相同的效果。根据文献报道 , 药物长时间以适度的浓度与肿瘤细胞接触较短暂的高浓度接触效果要更好^[14, 15]。因此 , NLC 的包载能更有效地克服 BUF 在临床应用中的高毒副作用。

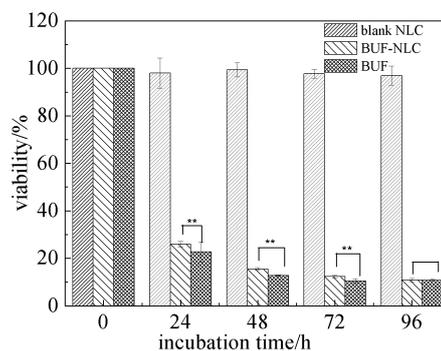


图 3 空白载体、BUF 原药、BUF-NLC 对 A549 细胞的体外毒性研究 ($n=3$)

Fig. 3 *In vitro* cytotoxicity of blank NLC , BUF and BUF-NLC against A549 cells ($n=3$)
与对照组比较 , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 结论

本文采用高压均质法制备了粒径小、分散度高、稳定性好、包封率较高的蟾毒灵 NLC。MTT 实验表明 , NLC 的包裹并不会降低其对肿瘤细胞

的毒性作用,作用初期,BUF-NLC 对 A549 的毒性弱于原药;作用时间延长,毒性作用与原药达到一致。说明 NLC 的包载能克服 BUF 在临床应用中的高毒副作用,增大 BUF 临床应用的可能。

参 考 文 献

- [1] 张慧卿,殷子斐,盛佳钰等. 中国药理与临床,2012,28(3):130~133.
- [2] Y Li, H Zhao, L R Duan et al. Colloid. Surf. A, 2014, 444: 54~62.
- [3] Y Liu, P Wang, C Su et al. Int. J. Pharm., 2010, 397(1/2): 155~163.
- [4] P Yin, Y Wang, Y Qiu et al. Int. J. Nanomed., 2012, 7(2): 3961~3969.
- [5] X Tian, H Z Yin, S C Zhang et al. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2014, 87: 445~453.
- [6] J Varshosaz, S Eskandari, M Tabakhian. Pharm. Dev. Technol., 2010, 15(1): 89~96.
- [7] M L Bondi, E F Craparo, G Giammona. Drug Deliv., 2007, 14(2): 61~67.
- [8] S Anne, K C Gordon, R Thomas. Int. J. Pharm., 2006, 314(1): 56~62.
- [9] P Lakshmi, G A Kumar. Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 2010, 2(4): 35~40.
- [10] E B Souto, R H Müller. Handb. Exp. Pharmacol., 2011, 197: 115~141.
- [11] Y Y Chen, X M Yang, L Zhao et al. Colloid. Surf. A, 2014, 455(1): 36~43.
- [12] T L Zong, L Mei, H L Gao et al. Mol. Pharm., 2014, 11(7): 2346~2357.
- [13] K Hayashi, T Tatsui, T Shimanouchi et al. Int. J. Biol. Sci., 2013, 9(2): 142~148.
- [14] D R Kalaria, G Sharma, V Beniwal et al. Pharm. Res., 2009, 26: 492~501.
- [15] J E Kim, I S Yoon, H J Cho et al. Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 2014, 464(1/2): 117~126.
- (上接第 641 页)
- [32] C Z Wu, X Zhu, L L Ye et al. Inorg. Chem., 2006, 45: 8543~8550.
- [33] B Fang, M Kim, J H Kim et al. Langmuir, 2008, 24(20): 12068~12072.
- [34] C Zhang, J Li, E Liu et al. Carbon, 2012, 50(10): 3513~3521.
- [35] J Zhang, L Ma, M G Gan et al. J. Power Source, 2015, 288: 42~52.
- [36] J Wu, F Hu, X Hu et al. Electrochim. Acta, 2008, 53(28): 8341~8345.
- [37] X Y Qiu, P Wu, L Xu et al. Adv. Mater. Interf., 2016, 2(18): 1500321.
- [38] Z Chen, D He, X Xu et al. RSC Adv., 2016, 6(41): 34159~34164.
- [39] G Zhu, P Gai, Y Yang et al. Anal. Chim. Acta, 2012, 723: 33~38.
- [40] L Wei, Y Lei, H Fu et al. ACS Appl. Mater. Interf., 2012, 4(3): 1594~1600.
- [41] Y Zhang, J Zhang, Y Liu et al. Mater. Res. Bull., 2012, 47(4): 1034~1039.
- [42] 穆季平. 环境科学与技术, 2006, 29: 40~143.
- [43] G Zhu, Y Yi, H Sun et al. J. Mater. Chem. B, 2015, 3(1): 45~52.
- [44] T Gan, Z Shi, K Wang et al. J. Solid State Electrochem., 2015, 19(8): 2299~2309.
- [45] 汪乃兴, 王彦刚. 分析化学, 1995, 23(05): 529~532.
- [46] C Xiao, X Chu, Y Yang et al. Biosens. Bioelectron., 2011, 26(6): 2934~2939.
- [47] Y Li, X Cao, X Qian et al. J. Electroanal. Chem., 2012, 686(11): 7~11.
- [48] Z R Zad, S S H Davarani, A R Taheri et al. Biosens. Bioelectron., 2016, 86: 616~622.
- [49] H Dong, Z Zhu, H Ju et al. Biosens. Bioelectron., 2015, 760: 143.
- [50] 梅光泉. 微量元素与健康研究, 2004, 21(4): 54~56.
- [51] Y F Sun, L J Zhao, T J Jiang et al. J. Electroanal. Chem., 2016, 760: 143~150.
- [52] L H Zhang, W C Li, D Yan et al. Nanoscale, 2016, 8: 13695~13700.