

技术方法

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.012

紫杉醇白蛋白片段纳米粒的制备

高原¹, 于洪儒¹, 王洪新²

(辽宁医学院 1. 生物化学与分子生物学教研室; 2. 药物研究所, 锦州 121001)

【摘要】目的: 利用蛋白酶解和纳米粒技术在白蛋白片段的基础上筛选制备紫杉醇纳米粒的新型载体, 并考察相关理化指标。方法: 利用牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA) 酶解片段作为载体, 分散乳化-旋蒸去溶剂法制备紫杉醇-BSA 酶解片段-纳米粒, 在外观、粒径分布、收率、包封率、载药量及体外释药性方面对样品进行考察。结果: BSA 酶解后经粗分离得到 4 个片段组, 选择第 4 组为候选载体, 得到的纳米粒外观形态圆整、均匀, 初制备纳米粒混悬剂平均粒径为 150.2 nm, 平均收率为 $(45.132 \pm 0.903)\%$, 平均包封率为 $(50.246 \pm 0.712)\%$, 平均载药量为 $(4.804 \pm 0.101)\%$, 48 h 累计释药 82.4%。结论: 利用白蛋白酶解片段制备紫杉醇纳米粒是可行的, 为扩大紫杉醇纳米粒的载体来源、降低制备成本提供了可能。

【关键词】紫杉醇; 纳米粒; 载体; 白蛋白片段

【中国图书分类法分类号】R94

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-01-19

Preparation of Paclitaxel-loaded nanoparticles by albumin fragments

GAO Yuan¹, YU Hongru¹, WANG Hongxin²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology;

2. Institute of Pharmaceutical Research, Liaoning Medical University)

【Abstract】Objective: To screen and prepare the new carrier for Paclitaxel-loaded nanoparticles from bovine serum albumin by proteolysis and nanoparticle technology and to study the physical and chemical indicators. Methods: Bovine serum albumin (BSA) which was degraded to fragments by pepsin was used as a carrier, the Paclitaxel-BSA fragments-nanoparticles were prepared by homogenized-spin steam. The appearance, size distribution, yield, encapsulation efficiency, drug loading and release in vitro of the sample were assessed. Results: Four clip groups were got through column chromatography after BSA enzymolysis. The fourth group was chosen as the candidate carrier. The nanoparticles got were round and uniform in shape with an average diameter of 150.2 nm. The average yield of nanoparticles was $(45.132 \pm 0.903)\%$, average encapsulation efficiency was $(50.246 \pm 0.712)\%$, average drug-loading rate was $(4.804 \pm 0.101)\%$ and the 48 h accumulative release percentage was 82.4%. Conclusions: The preparation of Paclitaxel-loaded nanoparticles through BSA enzymolysis is feasible. Therefore, there is possibility to increase the sources of carriers for Pacli-

作者介绍: 高原(1987-), 男, 硕士,

研究方向: 生化药物。

通信作者: 于洪儒, 男, 教授, Email: abugy@126.com。

taxel-loaded nanoparticles and to reduce the cost of preparation.

【Key words】Paclitaxel; nanoparticles; carrier; albumin fragments

达、纯化及鉴定[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(4): 5-8.

You L, Xu L L, Guo Y Y, et al. Prokaryotic expression, purification and identification of GST-human S100A9 fusion protein[J]. Chin J Biochem Pharmaceut, 2011, 32(4): 5-8.

[13] Smith D B, Johnson K S. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione-S-transferase[J]. Gene, 1988, 67(1): 31-40.

[14] Dixon M, Webb E C. Enzymes[M]. London: Longman Group Ltd., 3rd ed., 1979.

[15] Liao F, Li J C, Kang G F, et al. Measurement of mouse liver glutathione S-transferase activity by the integrated method[J]. J Med Coll PLA, 2003, 18(5): 295-300.

[16] King E L, Altman C. A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reaction[J]. J Phys chem, 1956, 60(10): 1375-

1378.

[17] Li W, Yuan Y H, Luo Z W, et al. Bacterial expression, refolding, functional characterization and mass spectrometric identification of full-length human PPAR- γ [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(6): 1173-1180.

[18] Zhu S, Gan Z Y, Li Z R, et al. The measurement of cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 activities via the quantification of inorganic phosphate with malachite green[J]. Anal Chim Acta, 2009, 636(1): 105-110.

[19] Zhang C, Yang X L, Feng J, et al. Effects of modification of amino groups with poly(ethylene glycol) on a recombinant uricase from Bacillus fastidiosus[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(6): 1298-1301.

(责任编辑: 关蕴良)

紫杉醇(Paclitaxel)具有良好的抗肿瘤活性,是近年来肿瘤化疗领域的最重要发现之一^[1]。其水溶性很差仅为 $0.77\ \mu\text{mol/L}$,难以直接用于临床给药。紫杉醇-白蛋白纳米混悬剂(ABRAXANE®)以人血白蛋白(Human seroalbumin,HSA)包裹紫杉醇形成纳米粒,使紫杉醇稳定分散在水溶液中,避免了表面活性剂带来的副作用^[2,3]。纳米粒粒径很小具有被动靶向性,肿瘤细胞上存在特殊的载体能主动摄取白蛋白,使得白蛋白纳米粒技术显示出很高的优越性^[4,5]。但作为载体的 HSA 资源稀缺、价格较高,加之专利费昂贵,造成医疗成本很高。同时因为完整白蛋白的空间位阻等原因使得 HSA 与紫杉醇的特异性结合区域不能被充分利用,降低了载体的使用效率。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin,BSA)同样具有包裹紫杉醇的能力但不能直接用于人体给药,本实验基于 BSA 片段的基础上,进行过敏性实验,筛选紫杉醇纳米粒的新型载体,并对其理化性质和体外释药性等进行考察^[6],以扩大紫杉醇纳米粒载体的来源,为进一步的研究做好基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

分析天平(Mettler Toledo,瑞典),高剪切分散乳化仪(FLUKO 25F,上海弗鲁克流体机械制造有限公司),紫外分光光度计(岛津 uv2550,日本),透射电子显微镜(JEM-1200EX,日本),旋转蒸发仪(SENCO,上海申生科技有限公司),冷冻高速离心机(Hitachi himac CP-100MX,日本),溶出试验仪(RC806,天津天天发科技有限公司),高效液相色谱仪(Agilent 1200), $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜(大连依利特科学仪器有限公司)。

豚鼠,雌雄不限,体质量 $150\ \text{g}$ 左右(购自中国医科大学实验动物中心,生产许可证 SCXK(辽)2008-0005),紫杉醇(99%,阿拉丁试剂),BSA(Amresco),胃蛋白酶(Sigma),其余的常规试剂为分析纯。

1.2 BSA 酶解片段的制备

取适量 BSA,溶于柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲液($\text{pH}=3$)中,加入适量的胃蛋白酶,室温反应 $24\ \text{h}$ 。 $2\ \text{mol/L}$ Tris 缓冲液调 pH 值到 7.9 以上来终止反应。

1.3 BSA 酶解片段分离及浓度测定

将 1.1 项中所得反应液连续经 Sepharose CL-6B 凝胶离子交换层析和 Sephadex G 75 凝胶分子筛层析,在线紫外检测,自动连续收集分离样品。根据吸收图谱合并相应样品管,浓缩过夜,对各吸收峰所在样品进行 SDS-PAGE 电泳检测,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

1.4 BSA 酶解片段的过敏性实验

将各组蛋白片段溶液稀释至相同浓度,微孔滤膜过滤除菌。对应每组蛋白片段取健康豚鼠 6 只,每隔 $1\ \text{d}$ 腹腔注射 $0.5\ \text{ml}$ 试液,连续 3 次,然后分成 2 组,每组 3 只。分别在第 1 次注射后的第 14 天和第 21 天静脉注射 $1.0\ \text{ml}$ 试液。

1.5 紫杉醇-BSA 酶解片段-纳米粒的制备

用 2.2 项中得到的样品作为水相,另称取适量 HSA 溶于水作为阳性对照,精确称取适量紫杉醇溶于乙酸乙酯作为油相。两者混合,冰浴条件下分散乳化 $5\ \text{min}$ 形成微乳。加戊二醛固定 $2\ \text{h}$,旋蒸除去有机溶剂,即得到紫杉醇-BSA 片段-纳米粒,真空干燥 $24\ \text{h}$,得样品粉末。

1.6 紫杉醇-BSA 酶解片段-纳米粒的形态观察及粒径分布

将粉末加纯化水重制成混悬液,同留样混悬液一起用透射电子显微镜观察,比较其形态和外观,激光粒度仪分析平均粒径。

1.7 紫杉醇-BSA 片段-纳米粒的理化评价

1.7.1 纳米粒收率的测定 取适量留样混悬液,超高速冷冻离心 $1\ \text{h}$,取上清液,考马斯亮蓝法测定其蛋白浓度,再代入公式计算:纳米粒收率($\%$)=(投入的蛋白片段浓度-未去溶剂化蛋白片段的浓度)/投入的蛋白片段浓度 $\times 100\%$ 。

1.7.2 纳米粒包封率、载药量的测定 重制紫杉醇纳米粒混悬液,超高速冷冻离心 $1\ \text{h}$,取上清液 $0.1\ \text{ml}$,加入 $0.9\ \text{ml}$ 流动相稀释,进样,HPLC 法测定游离紫杉醇的量。将上述各观测值代入公式计算:包封率=(紫杉醇投入量-游离紫杉醇的量)/紫杉醇投入量 $\times 100\%$;载药量=(紫杉醇投入量-游离紫杉醇的量)/(紫杉醇投入量+有效载体投入量) $\times 100\%$ 。

1.7.3 纳米粒体外释药性考察 采用动态透析法考察纳米粒的体外释药性。将紫杉醇-白蛋白片段-纳米粒溶解在含 0.1% 吐温 80 的 PBS($0.01\ \text{mol/L}$, $\text{pH}=7.4$)缓冲液中,恒温震荡水浴,在预定时间梯度里取样,同时补充等量的溶出介质,HPLC 检测紫杉醇含量,计算累计释药率。

1.8 统计学方法

测量未去溶剂化蛋白质浓度和游离紫杉醇浓度,计算纳米粒的收率、包封率、载药量。采用 SPSS 13.0 版软件进行分析,形成的各组数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BSA 酶解片段的制备、分离、浓度测定

BSA 的等电点约为 7.8 ,胃蛋白酶的等电点约为 8.1 ,在 $\text{pH}=7.0$ 的环境中 BSA 和胃蛋白酶均带负电荷。BSA 酶解片段的等电点聚焦实验显示各片段的等电点在 $5.50\sim 6.20$ 的范围,在 $\text{pH}=7.0$ 的环境中均带正电荷。 $\text{pH}=7.0$ 条件下洗脱,图 1 中第 1 个洗脱下来的峰是完整的 BSA 和胃蛋白酶,弃去,合并后面各峰做分子筛层析。

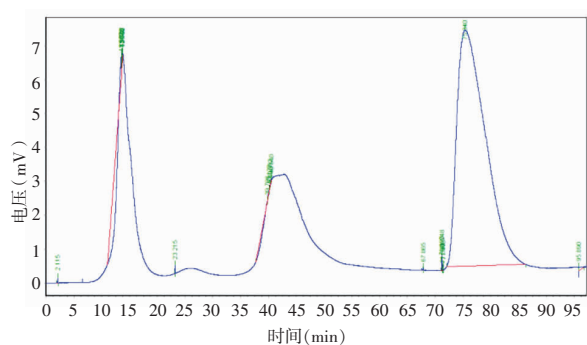


图 1 BSA 酶解片段离子交换层析分离图谱

Fig.1 Chromatography of ion exchange layer in BSA enzymolysis fragments

经分子筛层析分离共出现 4 个峰,图谱见图 2。

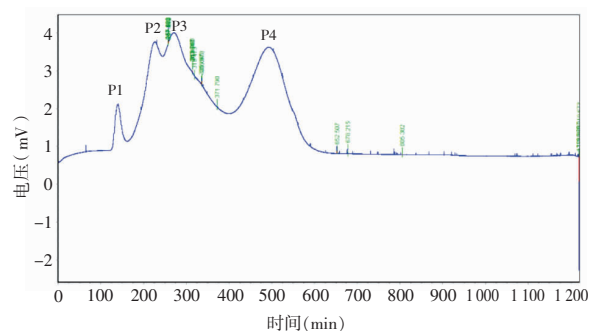
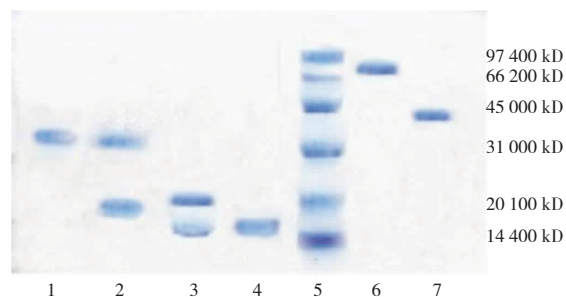


图 2 BSA 酶解片段分子筛层析分离图谱

Fig.2 Chromatography of molecular sieve layer in BSA enzymolysis fragments

对各吸收峰所在的样品做 SDS-PAGE 电泳检测(图 3), P₁ 为 1 条 40 kD 的条带;P₂ 有 2 条带分别为 40 kD 和 20 kD; P₃ 为 20 kD 的条带和 17 kD 条带;P₄ 为 17 kD 的条带。考马斯亮蓝法测定各组的蛋白浓度分别为 1.230、1.098、0.755、0.851 g/L。



1. P₁ 片段;2. P₂ 片段;3. P₃ 片段;4. P₄ 片段;5. 标准蛋白;6. BSA;7. 胃蛋白酶

图 3 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.3 Results of SDS-PAGE gel electrophoresis

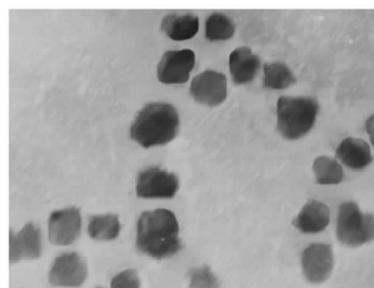
2.2 过敏性实验结果

静脉注射 15 min 内,若出现竖毛、呼吸困难、喷嚏、干呕或者咳嗽 3 声以上现象中的 2 项,或者啰音、虚脱或死亡现象之一应判为过敏。P₁、P₂ 组出现不同程度的过敏反应,P₃、P₄

组安全,但 P₄ 组成分更单一,选择 P₄ 组蛋白片段作为紫杉醇的载体。

2.3 紫杉醇-BSA 片段-纳米粒的形态观察及粒径分布

对得到纳米粒样品经透射电子显微镜(Transmission electro microscope,TEM)观察,结果见图 4 可,阳性对照组(完整 HSA 组)和样品组(BSA 片段组)制备得到纳米粒外观均圆整、均匀。激光粒度仪分析平均粒径分别为 180.3、150.2 nm。



A. 阳性对照组



B. 样品组

图 4 紫杉醇纳米粒的投射电镜照片 (10 000 ×)

Fig.4 TEM photograph of Paclitaxel-loaded nanoparticles (10 000 ×)

2.4 紫杉醇-BSA 片段-纳米粒的理化评价

2 组样品的理化指标见表 1。HPLC 法测定紫杉醇浓度,计算各时间点的平均累计释药百分率(Q,n=3),绘制释药曲线见图 5,样品组同阳性对照组释药曲线相似,短时间内具有突释效应,12 h 之后稳定释放维持较高浓度,达到缓释的效果,显著提高了溶解性。

表 1 纳米粒的理化评价指标 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab.1 Physical and chemical indicators of nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

理化评价指标	阳性对照组	样品组
投入蛋白浓度 (g/L)	0.851	0.851 ± 0.089
未去溶剂化蛋白浓度 (g/L)	0.297 ± 0.023	0.467 ± 0.064
紫杉醇投入量 (mg)	0.203	0.203
游离紫杉醇量 (mg)	0.077 ± 0.008	0.101 ± 0.009
平均收率 (%)	65.100 ± 0.792	45.132 ± 0.903
平均包封率 (%)	62.069 ± 0.752	50.246 ± 0.712
平均载药量 (%)	4.243 ± 0.090	4.804 ± 0.101

注:各组取样量为 5 ml,方差齐性,各组采取独立样本 *t* 检验,*t* 收率 =28.791, *P* 收率 =0.000; *t* 包封率 =19.751, *P* 包封率 =0.000; *t* 载药量 =7.181, *P* 载药量 =0.002;按照 α=0.05 的水平,各组数据的差异均具有统计学意义

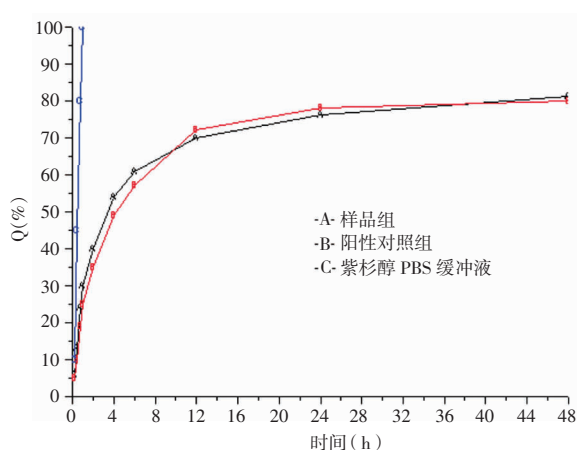


图 5 紫杉醇纳米粒的体外释药性曲线

Fig.5 Release curves of Paclitaxel-loaded nanoparticles in vitro

3 讨论

紫杉醇-白蛋白纳米混悬剂在提供一种良好药物传递方式的同时因其价格高昂限制了在临床的应用,因此筛选制备紫杉醇纳米粒的新型载体对降低医疗成本、扩大临床应用具有重大的意义。BSA与作为紫杉醇-白蛋白纳米混悬剂载体的 HSA 同属于白蛋白,都具有包裹紫杉醇形成纳米粒的能力。由于来源不同,BSA 具有一定抗原性,但随着蛋白片段的减小可降低其本身的致敏性^[7],这使得 BSA 片段作为载体用于人体给药具有一定可能。

完整的 BSA 分子量为 66 kD,本实验中 BSA 酶解后得到大量大小不一的蛋白片段,通过连续的 2 次柱层析去掉了完整 BSA 的影响,把酶解片段按分子量大小分离为 P₁~P₄ 4 组。经过动物过敏实验选择其中安全并成分单一的 P₄ 组蛋白片段为载体,以完整 HSA 为阳性对照载体,制备得到紫杉醇纳米粒,通过 TEM 观察,2 组纳米粒外观完整、均匀,明显成球形,粒度仪测量平均粒径为 150.2 nm,说明 BSA 片段可以包裹紫杉醇形成纳米粒。通过对样品组和阳性对照组的理化性质进一步研究,阳性对照组纳米粒平均包封率高于样品组,说明样品组中蛋白片段的利用率不够高,指明了下一步研究应摸索制剂条件来提升样品的收率。样品组的载药量高于阳性对照组,说明有效载体量相同的情况下,样品组携带的有效治疗量的紫杉醇更多,在药物经济学的角度更具有优势,这也正是本研究的目的之一。

由图 4 释药曲线可见,紫杉醇在 PBS 缓冲液中 1 h 内全部释放,而样品组和阳性对照组的释药曲线相似,在 48 h 处的累积释药率分别为 90.2% 和 82.4%,说明两者均具有明显的缓释效果,有利于提高药物体内循环时间。

本实验证明用 BSA 片段制备紫杉醇纳米颗粒具有可行性,其相关理化性质同使用完整 HSA 制备得到的纳米粒相似。与紫杉醇-白蛋白纳米混悬剂 (ABRAXANE®) 专利 (200610077006) 相比,本研究提供了一种新的载体材料,存在以下两方面意义,一方面通过水解可以使白蛋白与紫杉醇特异性结合的区域得到更加充分的暴露,提高载体的使用效率;另一方面拓宽了载体的来源,使得非人源白蛋白用于人体给药存在可能,且白蛋白片段的结构比完整白蛋白简单,经进一步研究后可通过重组或人工合成等手段大规模获取,既缓解资源紧张问题,又达到降低药物成本的目的。

参 考 文 献

- [1] Scripture C D, Figg W D, Sparreboom A. Paclitaxel chemotherapy: from empiricism to a mechanism-based formulation strategy[J]. Therapeutics and Clinical Risk Management, 2005, 1(2): 107-114.
- [2] Garber K. Improved paclitaxel formulation hints at new chemotherapy approach[J]. Journal of the National Cancer Institute, 2004, 96(2): 90-91.
- [3] Desai N, Trieu Vuong, Yao Z W, et al. Increased antitumor activity intratumor paclitaxel concentrations and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007 compared with cremophor-based Paclitaxel[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(4): 1317-1324.
- [4] Kratz F. Albumin as a drug carrier; design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles[J]. Journal of Controlled Release, 2008, 5(10): 171-183.
- [5] Hawkins M J, Soon-Shiong P, Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60(8): 876-885.
- [6] Zhang X Y, Ping Q N. Preparation and in vitro evaluation of bovine serum albumin nanoparticles containing docetaxel[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2008, 32(5): 223-228.
- [7] Ahmed F S, Habeeb A, Atassi M Z. A fragment comprising the last third of bovine serum albumin which accounts for almost all the antigenic reactivity of the native protein[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1976, 251(15): 4616-4621.

(责任编辑:冉明会)