

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001896

艾塞那肽聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒制备及体外评价

朱德弟,董平,张健,许颖,吴海英

[上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心,上海 201508]

【摘要】目的:制备艾塞那肽聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]纳米粒并对其进行体外评价及表征。**方法:**通过正交实验设计优化法筛选艾塞那肽 PLGA 纳米粒的处方及工艺,并通过动态光散射和透射电镜对其进行了表征,通过体外模拟胃肠液和 Caco-2 细胞模型对其稳定性和细胞摄取及转运进行评价。**结果:**通过正交设计最终确定了最佳处方工艺:内水相和油相的比例为 1:5,超声功率 200 W,超声时间 4 min,聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)浓度为 2%,初乳与外水相体积比为 1:20。所制得纳米粒粒径为 116.2 nm,透射电镜显示 PLGA 纳米粒为类圆形球状纳米粒,表面规则。体外研究结果表明,PLGA 纳米粒可延缓艾塞那肽在胃肠液中的释放,同时也明显增加了其稳定性($P<0.05$),在人工胃液和人工肠液中孵育 4 h 后,仍分别有约 50%和 80%的保留。细胞实验表明,PLGA 纳米粒的摄取和转运分别是对照组的 7 倍和 5 倍之多($P<0.05$)。**结论:**PLGA 纳米粒可作为艾塞那肽潜在的高效口服递药系统。

【关键词】艾塞那肽;PLGA 纳米粒;口服;细胞转运;稳定性

【中图分类号】R944.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-04-20

Preparation and *in vitro* evaluation of exenatide-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles

Zhu Dedi, Dong Ping, Zhang Jian, Xu Ying, Wu Haiying

(Shanghai Public Health Clinical Center of Fudan University)

【Abstract】Objective: To prepare exenatide-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles, and to evaluate its *in vitro* effect and characteristics. **Methods:** The orthogonal experimental design was used to screen out the optimal formulation and process of exenatide-loaded PLGA nanoparticles, and dynamic light scattering and a transmission electron microscope were used for characterization. *In vitro* simulation of gastrointestinal fluid and Caco-2 cell model were used to evaluate its stability, cellular uptake, and cellular transport. **Results:** The optimal formulation and process were obtained by the orthogonal design, i.e., a volume ratio of internal water phase to oil phase of 1:5, an ultrasonic power of 200 W, an ultrasonic time of 4 minutes, a concentration of polyvinyl alcohol of 2%, and a volume ratio of primary emulsion to external water phase of 1:20. The nanoparticles obtained had a diameter of 116.2 nm and the transmission electron microscope showed that PLGA nanoparticles had a sphere-like shape with a regular surface. The *in vitro* study demonstrated that PLGA nanoparticles significantly prolonged the release of exenatide in gastrointestinal fluid and improved its stability ($P<0.05$), and 50% of exenatide was retained after 4-hour culture in simulated gastric fluid, while 80% was retained after 4-hour culture in simulated intestinal juice. The cell experiment showed that the uptake and transport of PLGA nanoparticles in the experimental group were 7 and 5 times those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion:** PLGA nanoparticles may be a potential efficient oral drug delivery system for exenatide.

【Key words】 exenatide; poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle; oral delivery; cellular transport; stability

糖尿病由于其发病机制复杂,难于治愈,多年来一直是困扰医药学界的一大难题。目前已有许多

作者介绍:朱德弟, Email: zhudedi@shaphc.org,

研究方向:新型递药系统设计研究。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181103.1452.010.html>
(2018-11-06)

治疗糖尿病的药物,如二甲双胍等化学药物^[1],胰岛素等生物药物,但是对于严重糖尿病患者唯一的选择只能是胰岛素^[2]。近年来,胰高血糖素-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)类似物的开发给糖尿病的治疗带来了另一大类生物药物^[3],其中艾塞那肽(Ex-

endin-4)是这一类药物中的典型代表,它是从毒蜥蜴分泌的唾液中分离出的含有 39 个氨基酸的多肽,作为 GLP-1 受体激动药,可促进胰腺 β -细胞增殖,改善其功能,促进胰岛素的分泌,增加机体对胰岛素的敏感性和延缓胃排空作用^[4-5]。2005 年于美国上市,在 2 型糖尿病的治疗上具有显著的疗效,显示出很好的临床应用前景。但是作为多肽药物,在体内稳定性差导致生物半衰期短,口服吸收差^[6],目前只能采用一天多次的给药方案,导致患者顺应性很差,目前已有很多研究开始关注其长效及口服制剂的开发。

多肽蛋白质药物目前最常用的剂型是注射给药,如皮下注射、肌肉注射等,这为临床应用带来了诸多不便,但是多肽蛋白质药物制成普通口服制剂后,无法发挥药效,这主要由于其无法克服口服吸收中的层层屏障。多肽蛋白质药物口服吸收的主要障碍包括:在胃肠液中易受酶的作用,快速降解失活,稳定性差;亲水性强,分子量大,跨膜转运能力差;吸收进入肝门静脉后易受肝脏首过作用灭活^[7],而前两者是限制多肽蛋白质药物吸收的最主要因素。聚合物纳米粒可通过包裹多肽或蛋白质药物而增加其在胃肠道中的稳定性,同时也可显著促进小肠上皮细胞的摄取,从而提高药物的生物利用度。聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]纳米粒作为一种常用的制剂手段,用于延缓药物的释放,增加生物半衰期,以及保护药物不被降解,增加药物稳定性^[8]。已有许多研究报道 PLGA 纳米粒可明显增加胰岛素在胃肠道内的稳定性,增加其口服生物利用度^[9-10]。PLGA 纳米粒可以有效包载亲水性和亲脂性药物,可以在很大程度上延缓药物的释放,实现药物的长效作用,但是 PLGA 纳米粒对亲水性药物的载药量较低,受多种因素的影响^[11],且针对于不同性质的药物需要采用不同的工艺进行制备,工艺对纳米粒的载药量及粒径,甚至对其释放及稳定性都具有显著的影响。

本文主要通过研究影响 PLGA 纳米粒对艾塞那肽载药的因素,进一步优化其处方工艺,并通过体外模拟胃肠液评价艾塞那肽 PLGA 纳米粒的稳定性,说明 PLGA 纳米粒用于艾塞那肽口服给药的可行性,并通过 Caco-2 细胞进一步评价细胞对 PLGA 纳米粒的摄取和转运情况。

1 材料与方法

1.1 材料

艾塞那肽(纯度>97%,批号:20151223,大连美仑生物技术有限公司);聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA](LA:GA=50:50, Mw=10 000, 赢创-德国赛公司);聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)和异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC, 纯度 99%)(Sigma 公司);Caco-2 细胞(45~60 代之间,中国科学院上海生命科学研究院细胞库);其他试剂均为分析纯,水为密理博(Millipore)纯水机所制纯化水。

1.2 方法

1.2.1 艾塞那肽 PLGA 纳米粒的制备及优化 采用乳化溶剂挥发法制备艾塞那肽 PLGA 纳米粒^[12-13],首先将 50 mg 艾塞那肽溶于 1 mL 水中,形成内水相,然后将一定量的 PLGA (LA:GA=50:50, Mw=10 000)溶于 5 mL 二氯甲烷中,形成油相,然后将水相加入油相中探头超声(Scientz-II D 型探头超声仪,宁波新芝生物科技股份有限公司),其中超声功率固定为 200 W,超声一定时间后形成初乳,将此初乳迅速转移到 100 mL 一定浓度的 PVA 水溶液中,搅拌得复乳,60 ℃下减压蒸发除去有机溶剂得纳米粒混悬液,离心,并用纯水洗涤数次,冷冻干燥得固体 PLGA 纳米粒。在单因素考察的基础上,固定如下实验参数:艾塞那肽的量为 50 mg,内水相量为 1 mL;固定内水相和油相比例为 1:5,超声功率 200 W,初乳与外水相体积比为 1:20,减压蒸发温度 60 ℃。选择投药量和 PLGA 的比例、超声时间和 PVA 浓度为考察对象,按 L9(3⁴)正交设计表进行处方优化(表 1)。

表 1 艾塞那肽 PLGA 纳米粒处方工艺优化正交试验因素水平

水平	因素		
	投药量和 PLGA 的比例	超声时间 (min)	PVA 浓度 (%)
1	1:100	0.5	0.5
2	4:100	4	2
3	8:100	10	4

1.2.2 载药量(drug loading, DL)的测定 精密称取 50 mg 冷冻干燥 PLGA 纳米粒于 5 mL 离心管中,加入二氯甲烷 0.5 mL,涡旋使其溶解,再加入蒸馏水 1 mL,涡旋 5 min,离心(4 000 × g)10 min,上清液进样测定艾塞那肽浓度,并计算艾塞那肽的质量,载药量(DL)通过下式计算。

$$DL = \frac{\text{艾塞那肽的质量}}{\text{纳米粒的总质量}} \times 100\%$$

高效液相(high performance liquid chromatography, HPLC)色谱条件:Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);色谱柱 Diamonsil C18 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m);流动相 0.15 mol/L 硫酸钠溶液/乙腈/三氟乙酸(80/20/0.1);流

速 1.0 mL/min;柱温 25 ℃;检测波长 283 nm;进样量 20 μ L。

1.2.3 粒径及 Zeta 电位的测定 冷冻干燥所得的 PLGA 纳米粒加入一定量的纯水进行混悬,混悬后稀释一定倍数,利用 ZetaSizer-Nano 型激光粒度仪(英国 Malvern 公司)测定其粒径和 Zeta 电位。

1.2.4 透射电镜观察 利用透射电镜观察纳米粒的形态特征及圆整程度,将纳米粒混悬于水中,稀释至适当浓度,滴至覆有支持膜的 300 目铜网上,停留 2~3 min,以滤纸吸去多余溶液,得一薄层纳米粒于铜网上,滴加 1%的磷钨酸溶液染色 30~60 s,自然晾干,置于 JEM-1230 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)观察,记录图像。

1.2.5 艾塞那肽 PLGA 纳米粒的释放 将纳米粒 200 mg 置于 10 mL 的 pH1.0 盐酸溶液中和 pH6.8 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)中,然后放入摇床中振摇(37 ℃, 50 r/min)。分别于 0、0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8 和 10 h 取样,其中在 pH1.0 中仅取点至 2 h。以 30 000 r/min 低温超速离心 30 min,取上清液进行测定,计算药物的累积释放量。

1.2.6 艾塞那肽 PLGA 纳米粒在模拟胃液中的稳定性 将纳米粒 200 mg 加入到人工胃液(simulated gastric fluid, SGF, 参照 USP N30 配制)或人工肠液(simulated intestinal fluid, SIF, 参照 USP N30 配制)10 mL 中,涡旋混匀,在 37 ℃的水浴摇床(100 r/min)中孵育 4 h,在 0.5、1、2、3 和 4 h 分别取样 200 μ L,取样后,对于人工胃液的样品,加入等量的冷却的 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液,涡旋混合后终止反应;而对于人工肠液的样品,加入等量的冷却的 0.1 mol/L 盐酸终止反应^[14],然后加入二氯甲烷 100 μ L,涡旋 5 min,离心,取上清液 20 μ L 通过高效液相测定其浓度。同样地,将含有与纳米粒等量艾塞那肽的溶液分别加入到上述 SGF 和 SIF 中,在不同时间点取样,采用同样的方法测定艾塞那肽的稳定性,以此作为阴性对照。

SGF 配方:NaCl 0.50 g,浓盐酸 1.75 mL,胃蛋白酶 0.80 g,加约 100 mL 去离子水溶解后,转入 250 mL 容量瓶,用去离子水定容。

SIF 配方:KH₂PO₄ 1.7g 溶于 150 mL 去离子水中,加入 18 mL 0.2 mol/L NaOH,2.5 g 胰蛋白酶,超声溶解后用 0.2 mol/L HCl 或 NaOH 调节 pH=6.8,转入 250 mL 容量瓶中,去离子水定容。

1.2.7 FITC-艾塞那肽的合成 取艾塞那肽 100 mg 溶于 0.1 mol/L 碳酸钠缓冲溶液(pH 9.0)50 mL 中,冰浴冷却下分多次滴加 5 mL 含 20 mg FITC 的二甲亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)溶液,滴毕,于 4 ℃~10 ℃避光反应 24 h。为终止 FITC 反应,加入 1 mol/L 氯化铵溶液 5 mL,室温下搅拌 2 h,然后将反应液转入透析袋(截留相对分子质量 3 500)中用 4 ℃~10 ℃去离子水透析 48 h,分装到冻干小瓶中,−80 ℃预冻 4 h,室温

冷冻干燥 24 h 得黄色粉末,收集后于−20 ℃避光保存备用。

1.2.8 Caco-2 细胞的摄取 Caco-2 是一种模拟肠道上皮细胞的模型,本研究采取 Caco-2 细胞评价纳米粒的体外摄取,纳米粒口服后被细胞摄取,并进一步转运至血液或淋巴循环中,完成吸收过程。Caco-2 细胞复苏后种于 T25 细胞培养瓶中,细胞培养液采用杜尔伯科改良伊格尔(dulbecco modified eagle medium, DMEM)高糖培养基,加入 10%胎牛血清、1%非必需氨基酸和 1%青-链霉素。将培养瓶置于 37 ℃、5% CO₂、相对湿度 90%的细胞培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次。取对数生长期的细胞,照每 1 cm² 含 50 000 个细胞的密度接种于黑色玻璃底 96 孔板中,第 1 周每 2 d 更换培养液,1 周之后每 1 d 更换培养液,2 周之后即可用于细胞摄取试验。取稀释后的艾塞那肽 PLGA 纳米粒和艾塞那肽溶液加入到细胞摄取模型的 96 孔板中,每孔加液 0.2 mL,分别在不同时间点(0.5、1、2 和 4 h),弃去制剂,用 D-Hank's 缓冲液润洗 3 遍,通过酶标仪(Triad,美国 Dynex 公司)测定荧光强度,并破碎细胞,利用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定总蛋白含量。另外将细胞培养在培养皿中,1 周后,取稀释后的艾塞那肽 PLGA 纳米粒和艾塞那肽溶液加入到培养皿中,培养 4 h,利用 LSM710 型激光共聚焦显微镜(德国 Carl Zeiss 公司)观察其摄取情况。

1.2.9 Caco-2 细胞的转运 取对数生长期的细胞,照每 1 cm² 含 50 000 个细胞的密度接种于插入式培养皿(Millipore, PCF, 0.4 μ m)中,接种后每 2 d 换 1 次培养液,1 周后每天换液,培养至 3 周后测定跨膜电阻值(trans epithelial electrical resistance, TEER)值,TEER 高于 600 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 的细胞用于转运实验。培养 21 d 后,弃去培养液,用 PBS(pH 7.4)冲洗 3 遍,并在 37 ℃培养箱中平衡 30 min 后弃去 PBS,在供给池中加入 0.4 mL FITC-艾塞那肽的 PBS 溶液或 FITC-艾塞那肽 PLGA 纳米粒(艾塞那肽浓度 200 μ g/mL),在接受池中加入 0.6 mL 空白 PBS 溶液,共同孵育,于 0.5、1、2、3、4 h 从接受池取 200 μ L 样品加入到 96 孔板中,用酶标仪测定 FITC-艾塞那肽的含量(λ_{ex} =486 nm, λ_{em} =520 nm),同时补加 37 ℃的接受液 200 μ L。

1.3 统计学处理

所有数值均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Graphpad Prism 5.0 和 SigmaStat 4.0 软件进行作图和统计分析,采用独立样本 *t* 检验比较 2 组计量资料差异,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 纳米粒的制备及处方工艺优化

以载药量和粒径为指标,运用正交试验设计优化法对艾塞那肽 PLGA 纳米粒的处方及工艺参数进行优化,最终确定

最佳处方工艺并进行验证。以载药量和粒径为评价指标,通过极差法分析正交试验结果(表 2),影响载药量的顺序为 $A>B>C$,而影响粒径的顺序为 $B>C>A$,对于载药量来说,最佳处方工艺为 A2B1C2,而对于粒径来说,最佳处方工艺为 A2B3C2。为了兼顾载药量和粒径,在本研究中最佳处方工艺选择为 A2B2C2,因为 B1 和 B2 的载药量较为相近,而 B2 和 B3 的粒径也较为相近。

表 2 正交试验结果分析表

	载药量 (%)			粒径 (nm)		
	A	B	C	A	B	C
K1	0.50	1.11	0.86	302.00	537.67	333.67
K2	1.21	0.97	1.00	240.00	153.33	229.00
K3	1.10	0.73	0.95	259.33	110.33	238.67
R	0.71	0.38	0.14	62.00	427.33	104.67

按最佳制备工艺,内水相和油相比比例为 1:5,投药量和 PLGA 的比例为 4:100,超声功率 200 W,超声时间 4 min, PVA 浓度为 2%,初乳与外水相体积比为 1:20 制备 3 批 PLGA 纳米粒,测定其粒径和载药量,结果显示粒径约为 110 nm,载药量在 1.3%左右(表 3),表明制备工艺可行。

表 3 最佳工艺条件下纳米粒的粒径和载药量

批号	粒径 (nm)	载药量 (%)
160719	115.0 ± 10.2	1.28 ± 0.25
160720	108.0 ± 7.8	1.35 ± 0.47
160722	112.0 ± 9.4	1.32 ± 0.14

2.2 纳米粒的粒径和 Zeta 电位

所制得的纳米粒粒径如图 1 所示,经马尔文粒径仪测得其平均粒径为 116.2 nm,粒径分布较窄,多分散指数(polydispersion index, PDI)为 0.128, Zeta 电位为 -47.7 mV。

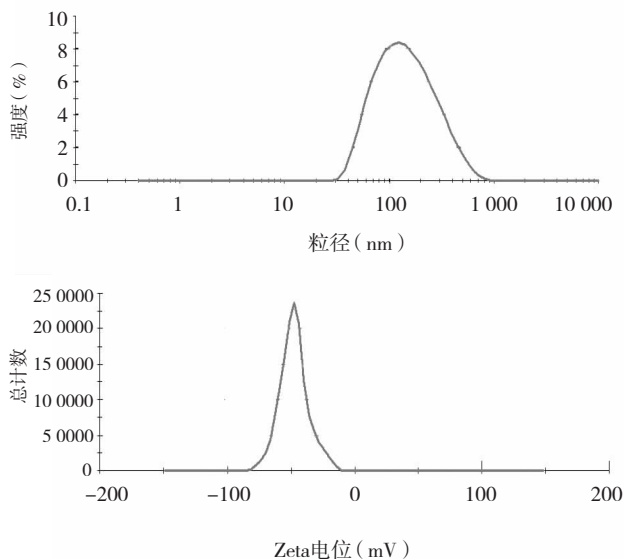
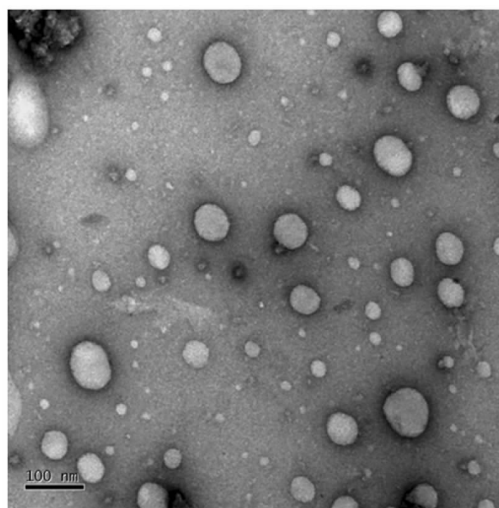


图 1 艾塞那肽 PLGA 纳米粒的粒径分布及 Zeta 电位

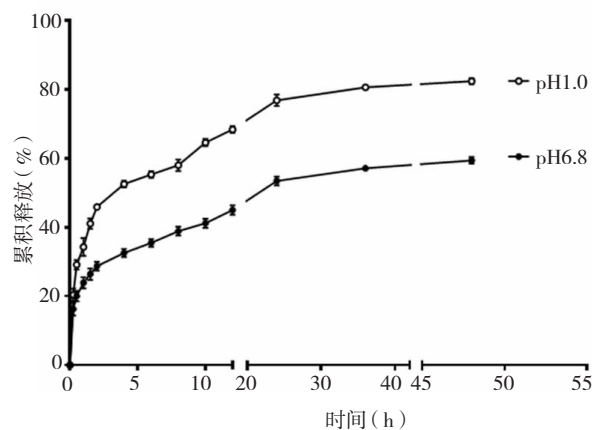
2.3 纳米粒的形态

从透射电镜照片可以看出纳米粒在再分散后形态圆整,无粘连,粒径分布均匀,粒径约 100 nm(图 2)。

图 2 艾塞那肽 PLGA 纳米粒透射电镜照片 ($10^5 \times$)

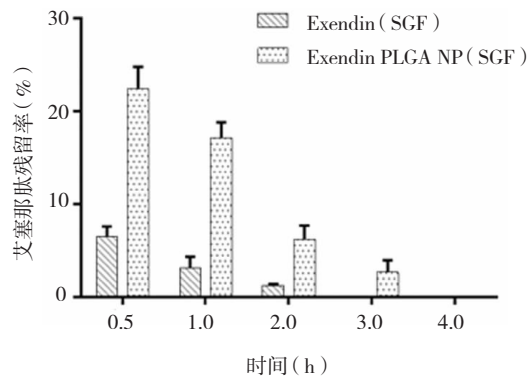
2.4 纳米粒的释放

纳米粒的释放如图 3 所示,艾塞那肽在 pH1.0 中会迅速泄露,2 h 即可达到近 50% 的累积释放,但是随后释放速度变缓,48 h 可达到累积释放到 80% 左右。而在 pH6.8 的缓冲液中释放较慢,1 h 释放 20%,而 10 h 也只释放约 40%,48 h 的累积释放在 60% 以下。

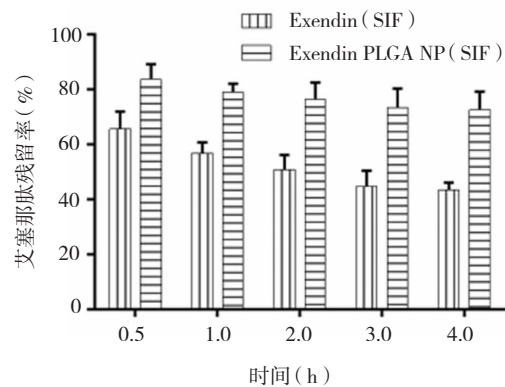
图 3 艾塞那肽 PLGA 纳米粒在 pH1.0 盐酸溶液和 pH6.8 磷酸盐缓冲液中的释放曲线 ($n=3$)

2.5 纳米粒在模拟胃肠液中的稳定性

艾塞那肽纳米粒在模拟胃肠液中的稳定性如图 4 所示。结果显示 PLGA 纳米粒可以在很大程度上保护艾塞那肽不受胃肠道内水解酶的降解,提高其稳定性,通过实验证明艾塞那肽在 pH4.5 的溶液中放置 12 h,其含量可保持在 $(97.4 \pm 5.6)\%$,说明在该 pH 下可保持良好的稳定性。



A. 模拟胃液



B. 模拟肠液

图 4 艾塞那肽 PLGA 纳米粒在模拟胃肠液中的稳定性 (n=3)

表 4 为艾塞那肽溶液和 PLGA 纳米粒在模拟胃肠液中的稳定性,通过独立样本单侧 *t* 检验法分析可知,艾塞那肽 PLGA 纳米粒在模拟胃液和模拟肠液中的稳定性与艾塞那肽溶液相比,差异均有统计学意义 (*P* 均<0.05),说明 PLGA 纳米粒可增加艾塞那肽在胃肠道中的稳定性。

表 4 艾塞那肽 PLGA 纳米粒与其溶液在模拟胃肠液中稳定性统计学分析

	时间 (h)	艾塞那肽溶液	艾塞那肽 PLGA 纳米粒	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
SGF	0.5	6.46 ± 1.12	22.47 ± 2.35	-10.654	0.000
	1.0	3.07 ± 1.27	17.17 ± 1.64	-11.768	0.000
	2.0	1.23 ± 0.15	6.23 ± 1.46	-5.911	0.002
	3.0	0.00 ± 0.00	2.67 ± 1.31	-3.539	0.010
	4.0	0.00 ± 0.00	2.67 ± 1.31	-3.539	0.010
SIF	0.5	65.67 ± 6.26	83.57 ± 5.55	-3.707	0.010
	1.0	56.73 ± 4.01	79.03 ± 3.02	-7.693	0.001
	2.0	50.63 ± 5.52	76.33 ± 6.15	-5.386	0.003
	3.0	44.70 ± 5.71	73.37 ± 6.93	-5.529	0.003
	4.0	43.30 ± 2.80	72.67 ± 6.51	-7.180	0.001

FITC-艾塞那肽的荧光光谱扫描图(图 5)显示其激发波长为 490 nm,发射波长为 520 nm,显示出强烈的荧光。

由于艾塞那肽本身没有荧光,且最终合成的 FITC-艾塞那肽的激发和发射波长与 FITC 较为一致,说明已标记成功。

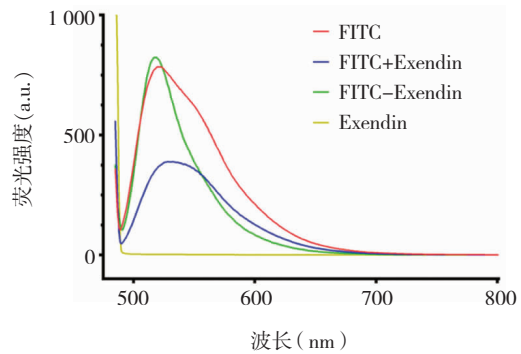


图 5 FITC、FITC 与艾塞那肽混合溶液 (FITC+Exendin)、FITC 标记艾塞那肽 (FITC-Exendin) 和艾塞那肽 (Exendin) 荧光扫描光谱图

2.6 细胞摄取

图 6 所示为艾塞那肽 PLGA 纳米粒被 Caco-2 细胞摄取的情况,随着时间的延长,细胞摄取显著增加,但是艾塞那肽溶液几乎无明显摄取。共聚焦图片(图 7)也显示纳米粒显著增加了 Caco-2 细胞的摄取。从图中可以看出,纳米粒(绿色)被摄取进入细胞浆,并大量充满其中,围绕在细胞核(蓝色)周围。

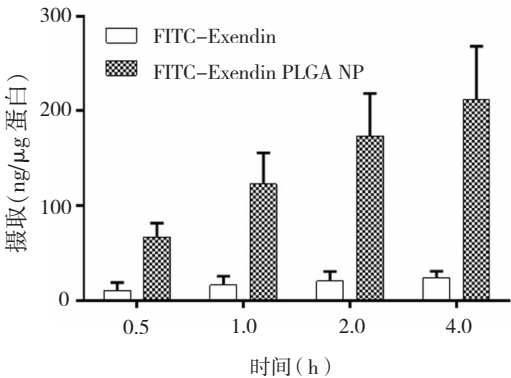
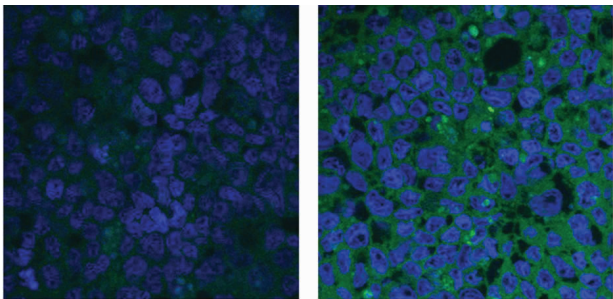


图 6 Caco-2 细胞对艾塞那肽 PLGA 纳米粒的摄取 (n=5)



蓝色为使用 DAPI 染的细胞核,绿色为 FITC-exendin 所发荧光

A. 艾塞那肽溶液

B. 艾塞那肽 PLGA 纳米粒

图 7 Caco-2 细胞对艾塞那肽 PLGA 纳米粒摄取的共聚焦图片

表 5 为 Caco-2 细胞对艾塞那肽溶液和 PLGA 纳米粒的摄取结果,通过独立样本单侧 t 检验法分析可知,细胞对艾塞那肽 PLGA 纳米粒和艾塞那肽溶液摄取在不同时间点相比, P 值均小于 0.05,有统计学差异,说明 PLGA 纳米粒可显著促进艾塞那肽的细胞摄取。

表 5 艾塞那肽 PLGA 纳米粒与其溶液细胞摄取的统计学分析

时间 (h)	艾塞那肽溶液	艾塞那肽 PLGA 纳米粒	t 值	P 值
0.5	10.63 ± 8.16	66.80 ± 14.87	-5.735	0.002
1.0	16.07 ± 9.61	122.53 ± 33.24	-5.329	0.006
2.0	20.47 ± 10.05	173.30 ± 45.41	-5.692	0.002
4.0	23.94 ± 6.82	211.73 ± 56.59	-5.707	0.002

2.7 细胞转运

艾塞那肽溶液和 PLGA 纳米粒的累积转运如图 8 所示,艾塞那肽包裹于 PLGA 纳米粒中可显著增加其跨膜转运,4 h 的累积转运是药物溶液的 5 倍左右。

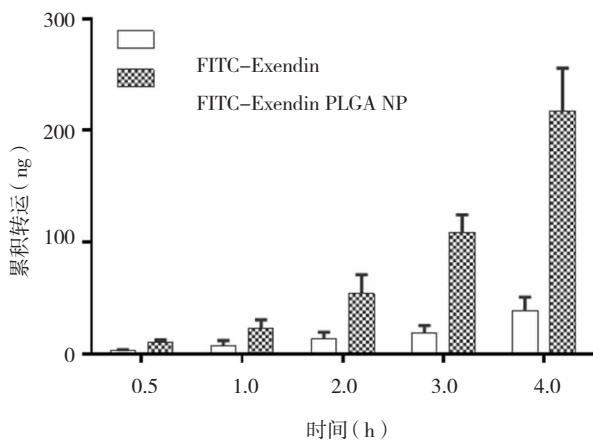


图 8 FITC-艾塞那肽及其 PLGA 纳米粒累积跨膜转运时间曲线 ($n=5$)

表 6 为艾塞那肽溶液和 PLGA 纳米粒跨 Caco-2 细胞累积转运量,通过独立样本单侧 t 检验法分析可知,艾塞那肽溶液和 PLGA 纳米粒通过 Caco-2 细胞单层的累积转运在不同时间点相比, P 值均小于 0.05,具有统计学意义,说明 PLGA 纳米粒可显著促进艾塞那肽的跨膜转运能力。

表 6 艾塞那肽 PLGA 纳米粒与其溶液细胞转运的统计学分析

时间 (h)	艾塞那肽溶液	艾塞那肽 PLGA 纳米粒	t 值	P 值
0.5	2.53 ± 1.11	10.47 ± 1.85	-6.374	0.002
1.0	6.87 ± 5.05	22.77 ± 7.51	-3.044	0.020
2.0	12.87 ± 6.51	53.93 ± 16.95	-3.918	0.009
3.0	18.77 ± 6.63	108.97 ± 15.37	-9.332	0.000
4.0	38.67 ± 11.97	217.27 ± 38.51	-7.671	0.001

3 讨论

本文主要从投药量和 PLGA 的比例、超声时间和 PVA 浓度 3 个方面通过正交设计法优化纳米粒的处方和工艺,投药量和 PLGA 的比例显著影响载药量的大小,但是对粒径影响较小。当投药量超过一定量时,载药量保持不变,这可能与药物与 PLGA 相容性大小具有很大的关系。而超声时间显著影响纳米粒的粒径,由于超声时间会影响初乳的粒径,初乳的粒径决定最终纳米粒的粒径,但是超声时间过长会导致初乳粒径过小,过大的表面张力在形成复乳时易合并,导致粒径增大以及药物泄露;PVA 浓度主要影响复乳的形成,所以在一定程度上也会影响最终纳米粒的粒径和载药量^[12,15]。最终通过正交设计对各因素进行了分析,并结合载药量和粒径两个主要指标确定了最优处方。

多肽蛋白质药物进入胃肠道后,会被胃肠道内的酸碱环境或酶快速降解而失去活性。通过纳米粒包裹后,会大大增加其稳定性。艾塞那肽制备成 PLGA 纳米粒后,明显提高了其在模拟胃肠液中的稳定性,主要原因之一是 PLGA 释放药物非常缓慢,胃肠道内酶也无法渗透入 PLGA 骨架内,所以可以保持其稳定性。但是仍然有部分艾塞那肽在模拟胃肠液中会被降解,这主要是水溶性强的药物更易分布在 PLGA 纳米粒的表面,导致突释效应所造成的^[16]。艾塞那肽纳米粒在人工胃液中的稳定性比人工肠液中更差,一方面是由于艾塞那肽本身被胃蛋白酶降解更快,而胰蛋白酶对其降解较慢,所以其在人工肠液中更为稳定;另一方面可从其释放曲线可知,艾塞那肽在人工胃液中释放比人工肠液中更快,而释放出的艾塞那肽即会被胃蛋白酶迅速降解,所以导致稳定性差。在临床应用中,可利用肠溶胶囊灌装 PLGA 纳米粒粉末避开胃部环境,进一步增加其在胃肠道内的稳定性。虽然释放试验显示,艾塞那肽在 48 h 内仍未完全释放,但是在体内 PLGA 可能还会受到酶的影响,释放速度会大幅加快,且 PLGA 纳米粒可能会被小肠细胞完整摄取后,在细胞内被酶降解从而释放药物。

由于艾塞那肽紫外吸收较弱,且吸收波长短,通

过 HPLC 检测,容易受其他物质的干扰,所以本研究采用荧光标记的手段,将艾塞那肽标记后研究其细胞的摄取和转运,可通过荧光检测手段快速准确的对其进行定量,另外也可通过共聚焦显微镜直观的观察细胞对其的摄取。PLGA 纳米粒在胃肠道中可大大保持艾塞那肽的活性,但是最终需要跨过肠上皮细胞吸收进入血液循环,才能发挥降血糖作用。本文采用 Caco-2 模型对 PLGA 纳米粒的口服吸收进行了初步评价,Caco-2 细胞单层模型是最常用的体外评价吸收的方法,Caco-2 细胞模型与肠道上皮细胞在功能、形态以及膜蛋白的表达上非常相似,因此与体内吸收具有较好的相关性,可通过体外试验预测体内吸收。本文通过 Caco-2 模型对 PLGA 纳米粒的摄取和转运进行了深入的研究,结果表明细胞对 PLGA 纳米粒的摄取约为水溶液的 7 倍之多,同时与溶液相比,PLGA 纳米粒可明显促进其跨 Caco-2 单层的转运能力,PLGA 纳米粒的转运是溶液的 5 倍,这也表明 PLGA 纳米粒有潜在的促进艾塞那肽口服吸收的作用^[17]。

口服后,PLGA 纳米粒一方面可保护艾塞那肽增加其在胃肠道中的稳定性,另一方面也可明显增加其跨膜能力以及细胞的摄取,这对于蛋白质药物口服给药具有重要的指导意义,也对于艾塞那肽的口服制剂开发具有重要的价值。但是本文仅对 PLGA 纳米粒的制备及体外释放和细胞摄取及转运进行了研究,而缺乏对其体内效果的评价,以及最终剂型的设计。后续的研究中将继续通过正常动物以及糖尿病动物模型评价艾塞那肽 PLGA 纳米粒体内的降血糖效果,并设计最终给药剂型(如肠溶胶囊),为其进一步临床应用提供更多的理论和数据支持。

参 考 文 献

[1] 杨 力,牛慧云,赵彩萍. 二甲双胍在糖尿病治疗中的作用[J]. 中国民族民间医药,2010,19(8):51.
[2] 於丽红,李春慧,苏胜偶,等. 不同时间注射甘精胰岛素治疗 1 型糖尿病的安全性及疗效评价[J]. 河北医科大学学报,2014,35(4):395-399.

[3] Meier JJ. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. Nature Rev Endocrinol,2012,8(12):728-742.
[4] Nauck MA,Vardarli I,Deacon CF,et al. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes:what is up,what is down?[J]. Diabetologia,2011,54(1):10-18.
[5] 张文静,付阿丹,赵 湜. 艾塞那肽治疗 2 型糖尿病患者的疗效及安全性评价[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(9):723-725.
[6] Soudry-Kochavi L,Naraykin N,Nassar T,et al. Improved oral absorption of exenatide using an original nanoencapsulation and microencapsulation approach[J]. J Control Release,2015,217:202-210.
[7] Gupta S,Jain A,Chakraborty M,et al. Oral delivery of therapeutic proteins and peptides:a review on recent developments[J]. Drug Deliv,2013,20(6):237-246.
[8] Malathi S,Nandhakumar P,Pandiyar V,et al. Novel PLGA-based nanoparticles for the oral delivery of insulin[J]. Int J Nanomedicine,2015,10:2207-2218.
[9] Jain S,Rathi VV,Jain AK,et al. Folate-decorated PLGA nanoparticles as a rationally designed vehicle for the oral delivery of insulin[J]. Nanomedicine(Lond),2016,7(9):1311-1337.
[10] Zhang X,Sun M,Zheng A,et al. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration[J]. Eur J Pharm Sci,2012,45(5):632-638.
[11] 宋逸婷,沈剑锋,钱 帅,等. PLGA 黏度及 PVA 浓度对微球形成过程中物理性质的影响[J]. 中国医药工业杂志,2010,41(4):269-272.
[12] 樊 莉,鲁 莹,吴 诚,等. 干扰素 α -2b 复合物 PLGA 微球的制备及影响因素[J]. 中国医药工业杂志,2006,37(10):674-678.
[13] 谢鑫鑫,王俊腾,奉利芳,等. 聚乙二醇化聚乳酸羟基乙酸纳米粒的制备及体外抗粘性能评价[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(21):1727-1731.
[14] Cui M,Wu W,Hovgaard L,et al. Liposomes containing cholesterol analogues of botanical origin as drug delivery systems to enhance the oral absorption of insulin[J]. Int J Pharm,2015,489(1-2):277-284.
[15] Fornaguera C,Dols-Perez A,Calderó G,et al. PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood-brain barrier[J]. J Control Release,2015,211:134-143.
[16] Silva AL,Rosalía RA,Sazak A,et al. Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticles:low-burst release is crucial for efficient CD8+ T cell activation[J]. Eur J Pharm Biopharm,2013,83(3):338-345.
[17] Joshi G,Kumar A,Sawant K. Bioavailability enhancement,Caco-2 cells uptake and intestinal transport of orally administered lopinavir loaded PLGA nanoparticles[J]. Drug Deliv,2016,23(9):3492-3504.

(责任编辑:冉明会)