

· 论 著 ·

人血浆蛋白多烯紫杉醇纳米粒子的自组装及对肿瘤的靶向性

龚光明, 陈美惠, 王曙东

[摘要] 目的 提高多烯紫杉醇的溶解度, 提高其靶向性能。方法 用二硫键断裂法制备人血清白蛋白多烯紫杉醇纳米粒子, 并用电镜进行观察。对粒子载药量、稳定性及粒子对肿瘤部位趋向性进行表征。结果 二硫键断裂法成功组装了白蛋白-多烯紫杉醇纳米粒子。电镜观察该纳米粒子外貌为 80~100 nm 左右的球形粒子, 高效液相和蛋白质定量检测多烯紫杉醇载药量可达 21.5%。结果 白蛋白多烯紫杉醇纳米制剂可显著提高多烯紫杉醇的溶解度, 提高对肿瘤靶向性。结论 白蛋白-多烯紫杉醇纳米粒子对肿瘤细胞具有良好的靶向作用, 具有临床运用的潜在价值。

[关键词] 血浆蛋白; 多烯紫杉醇; 纳米粒子; 自组装; 肿瘤靶向

[中图分类号] R945 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.05.006

Preparation and characterization of human serum albumin-docetaxel nanoparticles

GONG Guang-ming, CHEN Mei-hui, WANG Shu-dong. Department of Pharmaceutics, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To improve the solubility of docetaxel and reduce its toxic and side effects, and to improve the targeting capability of docetaxel. **Methods** The human serum albumin-docetaxel nanoparticles were prepared by the disulfide bond reduction method, and were observed by electron microscope. The drug loading efficiency, stability and targeting capability of nanoparticles were explored. **Results** Albumin-docetaxel nanoparticles were successfully fabricated through disulfide bond reduction. Albumin-docetaxel nanoparticles were about 80-100 nm in diameter, and the loading of docetaxel was up to 21.5%. The marrow depression toxicity of albumin-docetaxel nanoparticles, which could accumulate at the tumor site, was reduced. **Conclusion** Albumin-docetaxel nanoparticles have good targeting effect on tumor cells, which have potential value in clinical application.

[Key words] human serum albumin; docetaxel; nanoparticles; self-assembly; tumor target

肿瘤新生血管不遵循正常的血管结构而具有毛细血管瘤的特征^[1], 其高通透性使得一些特殊大小的药物载体容易通过肿瘤血管但不能通过正常血管, 药物体系在其中聚集且滞留时间延长, 这就是渗透和滞留效应 (enhanced permeability and retention, EPR)^[2-4], 是肿瘤被动靶向^[5]。除分子靶向肿瘤药物外^[6-7], 血清白蛋白可在快速生长的肿瘤中积蓄, 具有主动靶向性^[8-9], 负载的药物能被选择性输送到肿瘤组织, 药物毒副作用被降低^[10]。多烯紫杉醇是一类合成的微管为靶点的抗肿瘤药物, 使用时需要吐温 80 和乙醇增溶, 具有显著毒性。前期我们用巯基乙醇为变性剂制备了白蛋白纳米粒子^[11]。本研究中我们用工艺更简便的三(2-羧乙基)膦 (trichloroethyl phosphate, TCEP) 为变性剂制备了白蛋白多烯紫杉醇纳米粒子,

并进行了相关表征。

1 材料与方法

1.1 材料 人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA), 近红外-797 (NIR-797), 购自 Sigma (美国)。TCEP 购自 Pierce (美国)。三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自国药集团, 多烯紫杉醇 (Docetaxel) 购自南京泽朗医药, 等其余试剂均为国产试剂, 现购现用。S180 (小鼠肛门纤维肉瘤细胞, 购自上海博谷生物公司), ICR 小鼠雄性, 20~22 g, 10 只, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [合格证号: 2008001640769, 许可证号码: SCXK (沪) 2013-0016]。JEM-2100 电子显微镜 (JEOL, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 白蛋白多烯紫杉醇粒子 (HSA docetaxel nanoparticles, NPs-Docetaxel) 的制备、形态观察 将 HSA 溶解于 5 mM Tris (pH 7.8), 浓度为 2 mg/mL, 搅拌作用下, 向 HSA 溶液中加入 TCEP, 10 min 后加入 Docetaxel (10 mg/mL)。Tris 缓冲液对纳米粒子溶液进行透析, 时间为 24 h。粒子溶液滴在 200 目

基金项目: 南京军区南京总医院院管课题 (2013055)

作者单位: 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院制剂科

通讯作者: 王曙东, E-mail: sdwangpharm@126.com

引用格式: 龚光明, 陈美惠, 王曙东. 人血浆蛋白多西紫杉醇纳米粒子的自组装及对肿瘤的靶向性 [J]. 东南国防医药, 2016, 18 (5): 468-471.

镀碳膜铜网上,用 1%磷钨酸染色。干燥后,用 JEOL 电子显微镜观察粒子。

1.2.2 纳米粒子中 Docetaxel 含量分析 HPLC 色谱条件:色谱柱:Kromasil C18 柱,5 μm , 250 mm \times 4.6 mm;流速:1.0 mL/min;流动相:乙腈:水(76:24, v/v);检测波长:230 nm。

载药量根据公式:载药量 = Docetaxel 重量/(蛋白质重量+Docetaxel 重量) \times 100%

取 100 μL NPs-Docetaxel 加入 800 μL 乙腈,震荡,混匀后,10 000 rpm,离心 10 min,取上清。Docetaxel 标准品为对照,HPLC 测定样品中 Docetaxel 质量,考马斯亮蓝试剂盒测定样品中白蛋白质量,计算纳米粒子溶液中 Docetaxel 载药量。

1.2.3 纳米粒子在 25 $^{\circ}\text{C}$ 5%葡萄糖水溶液中的稳定性 取 NPs-Docetaxel 冻干样品,5%葡萄糖+蒸馏水溶解后,用激光粒度测定仪检测粒径起始粒子大小,将溶液静置在 25 $^{\circ}\text{C}$,分别在 0、2、6、18、24、36、48 h 检测其粒子大小。

1.2.4 NPs-Docetaxel 的大鼠血液毒性 不同组分别连续 3 次给予生理盐水、Docetaxel (10 mg/kg) 和 NPs-Docetaxel (10、20 mg/kg) 后,抗凝管采血,全血自动分析仪(XS-800i, SYSMEX, Japan)分析白细胞和红细胞的数量。

1.2.5 NIR-797-NPs-Docetaxel 在小鼠体内的分布 用 5 mg NIR-797(二甲亚砜溶解)与 50 mg HSA(5 mM Tris, pH 7.8, 10 mL)混合反应 2 h 制备 NPs-Docetaxel,5 mM Tris 缓冲液透析 24 h,加入 1%甘露醇后冻干,临用前用水稀释。

1.2.5.1 S180 小鼠肿瘤模型 参照 Wu 等^[12]方法,将所购 S180 细胞接种至 ICR 小鼠左腋下,构建荷瘤小鼠。1 周后选肿瘤长径、短径在 0.5~1 cm 之间的成瘤小鼠 6 只,分成两组,3 只/组,分别用于 NIR-797 和 NIR-797-NPs-Docetaxel 成像,以脱毛膏脱去肿瘤部位毛发用于活体成像。

1.2.5.2 NIR-797-NPs-Docetaxel 示踪 NIR-797-NPs-Docetaxel 溶液甘露醇冻干粉用水溶解后,取 200 μL 尾静脉注射肿瘤小鼠,间隔 3、8、30、72、108 h 在近红外检测仪下观察荧光标记纳米粒子在小鼠体内成像情况。

1.2.5.3 实时荷瘤小鼠 NIR 体内示踪过程 小鼠麻醉后,放入红外成像仪暗室,将暗室通麻醉气体使小鼠处于麻醉状态,明场调节视野,使小鼠全身在视野范围之内,荧光激发波长调节至 704 nm,发射波长 700~950 nm,成像后保存图象待处理。小鼠活体成像结束后,将小鼠取心、肝、脾、肺、肾、肿瘤、

大脑、小肠、胃等脏器观察红外荧光,并拍片。拍片后,用活体成像仪上的软件处理小鼠活体和解剖后各组织器官的荧光信号。

2 结果

2.1 NPs-Docetaxel 的制备 NPs-Docetaxel 形成过程中,溶液逐渐变成淡蓝色,透射电镜观察粒子大小为 80~100 nm 左右(图 1)。TCEP 是一种广泛运用的二硫键断裂剂,无色无味、无毒性,后期易处理。制备的纳米粒子溶液搅拌条件下透析 24 h,中间发现溶液及容器壁上均有白色颗粒,可能在透析过程中,Docetaxel 从粒子中逐步释放出来,聚集成白色悬浮物,部分粒子分散开。

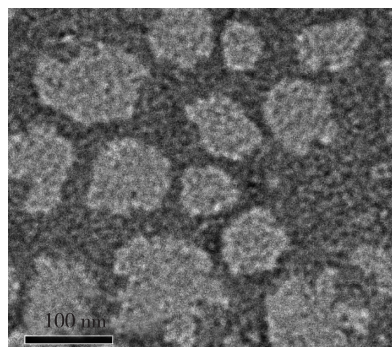


图 1 透射电镜观察白蛋白多西紫杉醇粒子外貌和形状(1%磷钨酸染色 \times 150 万)

2.2 NPs-Docetaxel 载药量和溶解度分析 高效液相检测 NPs-Docetaxel 溶液中 Docetaxel 的含量为 0.42 mg/mL, HSA 含量为 1.95 mg/mL, Docetaxel 载药量为 21.5%。Docetaxel 的溶解度提高了近 100 倍。

2.3 NPs-Docetaxel 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 5%葡萄糖水溶液中的稳定性 NPs-Docetaxel 的起始大小为 124.7 nm,随其在 25 $^{\circ}\text{C}$ 葡萄糖水溶液中放置时间的延长,纳米粒子逐渐变大,见图 2。样品放置 48 h 以内,没有明显沉淀,粒子小于 240 nm(DLS 检测)。

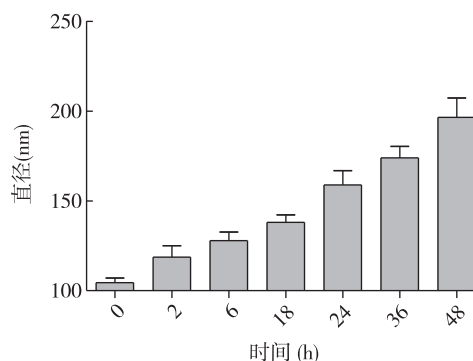


图 2 白蛋白多西紫杉醇粒子与 5%葡萄糖孵育 48 h 内粒径的变化

2.4 Docetaxel 及其制剂对大鼠血液毒性 大鼠分别连续 3 次给予生理盐水、Docetaxel 和 NPs-Docetaxel 制剂后,抗凝管采血,结果显示,Docetaxel 组与生理盐水组相比,白细胞数目呈显著性降低 ($P<0.05$,图 3a),而 NPs-Docetaxel 组白细胞与对照组相比,无显著下降(图 3a)。Docetaxel 和 NPs-Docetaxel 注射剂与对照组相比,对大鼠红细胞数量无显著影响(图 3b)。NPs-Docetaxel 所致的骨髓抑制较 Docetaxel 更低。

2.5 NIR-797-NPs-Docetaxel 在荷瘤小鼠体内的分布 将 1 h、24 h 和 72 h 的 NIRF 数据信号提取后,获取荧光信号如图 4。结果显示:24 h 内,NIR-797

组小鼠(左)和 NIR-797-NPs-Docetaxel 组小鼠(右)荧光主要在腹腔和膀胱位置富集,可能 NIR 经过肠道沿着肠道排泄,另外沿泌尿系统移行至膀胱,而被排出体外。72 h 后,NIR-797 小鼠腹腔部位荧光难以检测,主要集中于肝脏和肿瘤部位;NIR-797-NPs-Docetaxel 组小鼠荧光在肠道和肿瘤部位均有聚集(图 4a)。72 h 后,荷瘤小鼠各组织器官心脏、肝脏、肺脏、脾脏、肾脏、肿瘤、脑、小肠、胃被解剖剥离,近红外检测 NIR 荧光。结果表明,NPs-Docetaxel 组肿瘤部位荧光最强,肝脏和肾脏相对弱,其他器官没有检测到纳米粒子荧光,NIR-797 组小鼠肿瘤部位荧光较弱(图 4b)。

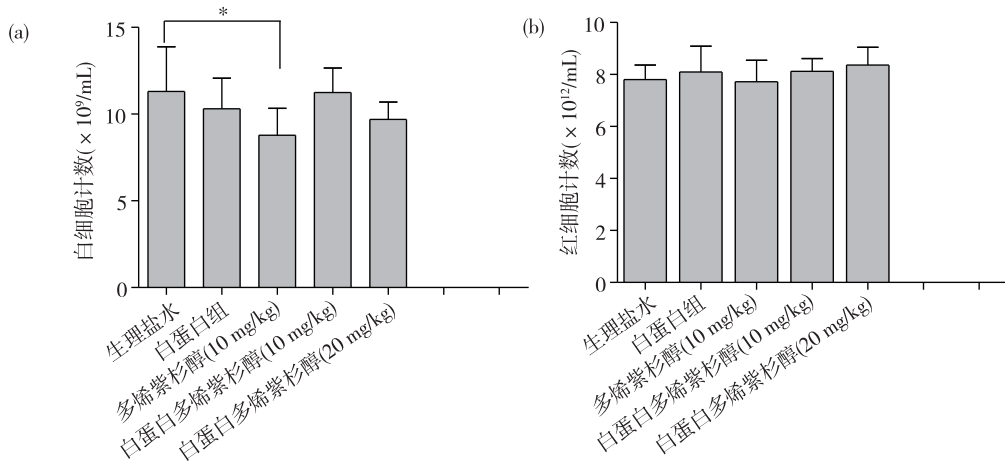


图 3 大鼠全血细胞计数分析[(a)白细胞计数;(b)红细胞计数;* $P<0.05$]

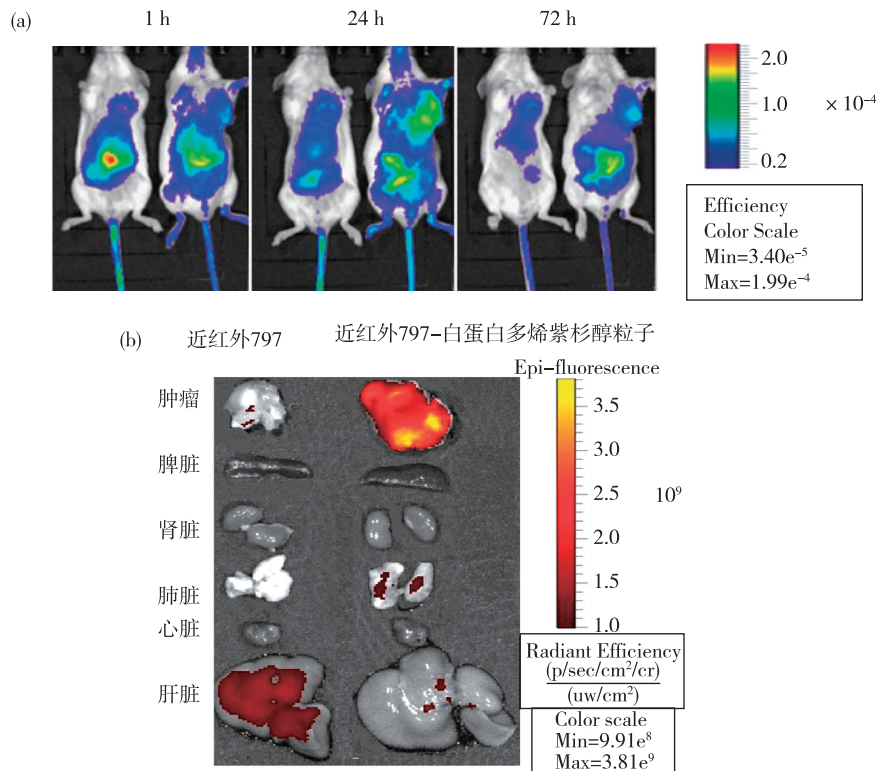


图 4 小鼠成像图[(a)S180 荷瘤小鼠静脉注射近红外-797、近红外-797-白蛋白多烯紫杉醇后 1 h、24 h 和 72 h 成像图;(b)72 h 后,小鼠离体脏器成像]

3 讨论

TCEP 变性法可用于制备 80~100 nm 大小的 NPs-Docetaxel。二硫键的破坏可能导致了 HSA 疏水性区域的暴露^[11],在 Docetaxel 的协同作用下形成了纳米粒子。本文 Docetaxel 的载药量达到 21.5%,大大提高了 Docetaxel 溶解度。临床上使用 Docetaxel 时,需要吐温和乙醇作为增溶剂,而 NPs-Docetaxel 无需吐温和乙醇增溶,避免了溶血反应的发生。纳米粒子在 5% 葡萄糖溶液中稳定性可达 30 h,粒径仍然小于 240 nm,表明 NPs-Docetaxel 非常稳定,符合注射剂的注射要求。NPs-Docetaxel 对白细胞数量降低的影响小于 Docetaxel 组,骨髓抑制毒性显著降低。由于 NPs-Docetaxel 对肿瘤组织具有较好被动或主动靶向作用,因此,本方法制备的 NPs-Docetaxel 是良好的 Docetaxel 递送系统,具有较强的临床开发价值。

【参考文献】

- [1] 符比炜,穆毅,路遂阳.微血管密度和血管内皮生长因子在肝细胞癌中的表达及意义[J].东南国防医药,2009,7(1):23-25.
- [2] Iyer AK, Greish K, Seki T, et al. Polymeric micelles of zinc protoporphyrin for tumor targeted delivery based on EPR effect and singlet oxygen generation[J]. J Drug Target, 2007, 15(7-8):496-506.
- [3] Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, et al. Regulation of transport

pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(8):4607-4612.

- [4] Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review[J]. J Contr Rel, 2000, 65(1-2):271-284.
- [5] Duncan R. Drug polymer conjugates potential for improved chemotherapy[J]. Anti-Cancer Drug, 1992, 3(3):175-210.
- [6] 王晓萍,丰俊东.放射治疗与分子靶向药物在肿瘤治疗中的联合应用[J].东南国防医药,2008,10(4):277-280.
- [7] 耿怀成,陈龙邦.抗体介导的抗肿瘤血管治疗[J].医学研究生学报,2001,14(6):535-537.
- [8] Lshima Y, Chen D, Fang J, et al. S-nitrosated human serum albumin dimer is not only a novel anti-tumor drug but also a potentiator for anti-tumor drugs with augmented EPR effects[J]. Bioconjug Chem, 2012, 23(2):264-271.
- [9] Kratz F, Muller-Driver R, Hofmann I, et al. A novel macromolecular prodrug concept exploiting endogenous serum albumin as a drug carrier for cancer chemotherapy[J]. J Med Chem, 2000, 43(7):1253-1256.
- [10] Sparreboom A, Scripture CD, Trieu V, et al. Comparative preclinical and clinical pharmacokinetics of a cremophor-free, nanoparticle albumin-bound curcumin (ABI-007) and curcumin formulated in cremophor (Taxol)[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(11):4136-4143.
- [11] Gong G, Zhi F, Wang K, et al. Fabrication of a nanocarrier system through self-assembly of plasma protein and its tumor targeting[J]. Nanotechnology, 2011, 22(29):295603-295611.
- [12] Wu D, Gao Y, Chen L, et al. Anti-tumor effects of a novel chimeric peptide on S180 and H22 xenografts bearing nude mice[J]. Peptides, 2010, 31(5):850-864.

(收稿日期:2016-05-05;修回日期:2016-05-17)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)

(上接第 460 页)

【参考文献】

- [1] Wagenlehner FME, Van Till JW, Magri V, et al. National Institutes of Health Chronic Prostatitis Symptom Index (NIH-CPSI) symptom evaluation in multi-national cohorts of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. Europ Urol, 2013, 63(5):953-959.
- [2] Turner JA, Ciol MA, Von Korff M, et al. Validity and responsiveness of the National Institutes of Health chronic prostatitis symptom index[J]. J Urol, 2003, 169(2):580-583.
- [3] 党鸿毅,戚秀美.规律性综合性治疗慢性前列腺炎的临床观察[J].中国热带医学,2007,7(2):245-245.
- [4] Krieger JN, Riley DE. Bacteria in the chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome: molecular approaches to critical research questions[J]. J Urol, 2002, 167(6):2574-2583.
- [5] 张桃福,梁朝朝,葛巍巍,等.前列腺炎样症状对患者生活质量的影响[J].安徽医学,2009,30(1):2-5.
- [6] 张凯,白文俊,商学军,等.泌尿男科医师应用《CUA 前列

腺炎诊断治疗指南》诊疗 CPPS 的调查[J].中华男科学杂志,2013,19(2):127-131.

- [7] Liu LF, Yang JR, Ginsberg DA, et al. Factors influencing the diagnosis and treatment of chronic prostatitis among urologists in China[J]. Asian J Androl, 2008, 10(4):675-681.
- [8] 洪泉,刘永胜,周高标,等.泌尿外科 1991~2007 年飞行员住院疾病谱分析[J].西南国防医药,2010,20(8):917-918.
- [9] 胡海翔,董静,沈燕玲,等.飞行人员慢性前列腺炎/慢性骨盆疼痛综合征的调查分析及干预对策[J].中华航空航天医学杂志,2012,20(4):262-265.
- [10] 那彦群,叶章群,孙颖浩,等.中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M].北京:人民卫生出版社,2013:447-448.
- [11] 郎根强,章益峰,褚健,等.短波、抗生素及前列腺栓治疗慢性前列腺炎 110 例[J].东南国防医药,2009,11(6):493-498.
- [12] 谢欣兰,胡素琴,王玲,等.门诊慢性前列腺炎患者就诊需求质性研究[J].东南国防医药,2013,15(5):532-533.

(收稿日期:2016-02-22;修回日期:2016-07-05)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)