

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.01.0081

• 研究快报 •

## 透明质酸修饰的尿酸酶多囊脂质体的体外特性及药效学过程

冯 娇, 谢江川, 晏声蕾, 晏子俊, 张景劼\*

重庆医科大学重庆高校药物工程研究中心, 重庆 400016

**[摘要]** **目的** 研究透明质酸修饰的尿酸酶(UC)多囊脂质体(uricase in hyaluronic acid-uricase multivesicular liposomes, UHMVLs)的体外特性及其在大鼠体内的药效学。**方法** 采用复乳法制备 UHMVLs 并测定包封率及理化特性。取 12 只健康雄性 SD 大鼠, 模型组采用次黄嘌呤和氧嗪酸钾建立高尿酸血症大鼠模型( $n=3$ ), UHMVLs 组( $n=3$ )和 UC 组( $n=3$ )分别于建模后尾静脉注射 UHMVLs 和游离 UC, 并以正常组( $n=3$ )为对照, 测定大鼠血清中尿酸水平。**结果** UHMVLs 的平均包封率为 $(62.48 \pm 3.87)\%$  ( $n=3$ )。UHMVLs 和 UC 最适温度均为  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , 最适 pH 值分别为 8.0 和 8.5。在同一温度( $20\sim 70\text{ }^\circ\text{C}$ )和 pH( $6.5\sim 9.5$ )条件下, UHMVLs 中 UC 的活性均高于游离 UC ( $P<0.05$ )。除 1、36、48 h 外, 其余各时间点 UHMVLs 降低高尿酸血症大鼠模型血清中尿酸水平的效果均较游离 UC 更显著( $P<0.05$ )。**结论** 在相同条件下, UHMVLs 不仅能提高 UC 的活性, 还可以增强 UC 的稳定性; UHMVLs 在大鼠体内降低血尿酸水平的能力优于游离 UC。

**[关键词]** 尿酸酶; 透明质酸; 多囊脂质体; 最适温度; 最适 pH; 药物效应动力学

**[中图分类号]** R 943.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)01-0081-05

## Characteristics *in vitro* and preliminary pharmacodynamics of hyaluronic acid-uricase multivesicular liposomes

FENG Jiao, XIE Jiang-chuan, YAN Sheng-lei, YAN Zi-jun, ZHANG Jing-qing\*

Chongqing Medicine Engineering Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the characteristics of hyaluronic acid-uricase multivesicular liposomes (UHMVLs) *in vitro* and the pharmacodynamics of UHMVLs in rats. **Methods** UHMVLs was prepared by multiple emulsion method. The entrapment efficiency and physicochemical properties were detected. Twelve healthy male SD rats were enrolled in this study. The rat model of hyperuricemia was established with hypoxanthine and oteracil potassium, while the normal rats ( $n=3$ ) were set as controls. Intravenous UHMVLs, uricase (UC) and nothing were given to the rats of UHMVLs group ( $n=3$ ), UC group ( $n=3$ ) and hyperuricemia model group ( $n=3$ ), respectively; the levels of serum uric acid (UA) were detected in rats of the 4 groups. **Results** The average entrapment efficiency of UHMVLs was  $(62.48 \pm 3.87)\%$ . The optimum temperatures of UHMVLs and UC were  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , while the optimum pH values of UHMVLs and free UC were 8.0 and 8.5, respectively. The activity of UC in UHMVLs was significantly higher than that in free UC at the same temperature ( $20\sim 70\text{ }^\circ\text{C}$ ) and pH value ( $6.5\sim 9.5$ ) ( $P<0.05$ ). UHMVLs was more effective than free UC in decreasing serum UA in rats with hyperuricemia at all time points ( $P<0.05$ ), except for 1 h, 36 h and 48 h. **Conclusion** Under the same condition, UHMVLs can improve not only the activity, but also the stability of UC. UHMVLs is more effective in decreasing serum uric acid in rats compared with free UC, which may pave a way for clinical application of UC.

**[Key words]** uricase; hyaluronic acid; multivesicular liposomes; optimum temperature; optimum pH; pharmacodynamics

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(1): 81-85]

**[收稿日期]** 2016-05-25 **[接受日期]** 2016-10-28

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30973645), 重庆市首批高等学校优秀人才资助计划(2009). Supported by National Natural Science Foundation of China (30973645) and the First Batch Outstanding Talent Project of Higher Education in Chongqing (2009).

**[作者简介]** 冯 娇, 硕士. E-mail: 313742227@qq.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485161, E-mail: zjqrae01@163.com

尿酸酶(uricase, UC)作为治疗高尿酸血症、痛风、肿瘤溶解综合征等疾病<sup>[1]</sup>的酶类药物,主要是通过有氧条件下催化尿酸生成尿囊素、二氧化碳和过氧化氢<sup>[2]</sup>来达到降尿酸作用的。现已上市的 UC 类药物主要有两大类:基因重组 UC 和聚乙二醇化 UC,但这两类药物均存在各种不良反应<sup>[3-4]</sup>,因此,具有更优治疗效果、更少不良反应的药物依然是研究热点。

多囊脂质体是内部由许多水性囊状腔室构成的非同心大型脂质体<sup>[5]</sup>。与传统脂质体相比,多囊脂质体有更适于包载水溶性药物、延长药物的作用时间达到缓释效果以及提高药物生物利用度等特点<sup>[6]</sup>。多囊脂质体不仅用于包载水溶性小分子药物,还可以作为生物大分子如载脂蛋白 E<sup>[7]</sup>、胰岛素<sup>[8]</sup>、LXT-101<sup>[9]</sup>等蛋白质、多肽类药物的载体。

本研究制备透明质酸(HA)修饰的 UC 多囊脂质体(uricase in hyaluronic acid-uricase multivesicular liposomes, UHMVLs),希望能提高 UC 的活性、增强 UC 的治疗效果;同时 UC 多囊脂质体经 HA 修饰以后,在降低尿酸水平的同时靶向到透明质酸受体 CD44 和 CD168,起到保护关节和抗炎的作用<sup>[10-11]</sup>;而且 HA 还可通过促进内源性 HA 合成来改善病理性关节液的性状,达到持续缓解痛风性关节炎症状和病情的作用<sup>[12-15]</sup>。目前尚无对 UHMVLs 的相关报道,本研究考察 UHMVLs 的体外特性及其在大鼠体内的药效学过程,为 UHMVLs 的进一步研究提供参考依据。

## 1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 UC(Sigma-Aldrich,批号:SLBC3289,生物试剂);大豆卵磷脂(德国 LucasMeyer 公司,批号:20120706,生物试剂);胆固醇(广州天马精细化工厂,批号:20110307,分析纯);1-乙基-3-[3-(二甲氨基)丙基]碳化二亚胺盐酸盐(成都格雷西亚化学技术有限公司,分析纯);N,N-二羟乙基甘氨酸(Bicine,美国 Amresco 公司,批号:20120614,分析纯);尿酸测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);氢氧化钠、氯仿、乙醚(重庆川东化工集团有限公司,分析纯)。

1.2 主要仪器与动物 RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);UV-7504PC 紫外分光光度计(上海欣茂仪器有限公司);SHZ-D(Ⅲ)型循环水

式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);KQ-2200B 型水浴型超声仪(江苏昆山市超声仪器有限公司);Nano-ZS90 型马尔文粒径测定仪(英国马尔文公司);AG-135 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

雄性 SD 大鼠,体质量(230±20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(渝)2015-0001。

1.3 UHMVLs 的制备 称取适量卵磷脂、胆固醇、三油酸甘油酯,加入适量乙醚使其充分溶解,再加入等体积的 3%葡萄糖溶液涡旋形成油包水型初乳。使用注射器将初乳快速注入 10 mL 含 L-赖氨酸的 4%葡萄糖水溶液中,用高速分散均质机剪切得到复乳。将复乳转移至磨口圆底烧瓶,减压旋蒸除去有机溶剂。将适量 HA 的 Bicine-NaOH 溶液在 pH 6.0 条件下用 1-乙基-3-[3-(二甲氨基)丙基]碳化二亚胺盐酸盐在 37℃ 孵育预活化<sup>[16]</sup>。将已激活的 HA 加入到复乳溶液中,调节 pH 为 8.5,并在 37℃ 条件下与复乳溶液进行孵化。将脂质体从过量的试剂和副产物中离心分离,即得 UHMVLs。

1.4 UC 活性测定方法的建立 参照 Tan 等<sup>[17]</sup>的方法,用硼酸-硼砂缓冲液(pH 8.5,50 mmol/L)配制 75 μmol/L 的尿酸溶液作为测定 UC 活性的底物,在 1.18 mL 尿酸溶液中加入 20 μL UC,快速混匀后,在 293 nm 处测定紫外吸收值。

### 1.5 UHMVLs 参数的测定

1.5.1 形态和粒径分布 取适量 UHMVLs 混悬液置于载玻片上,使用光学显微镜观察形态并拍照。使用测微尺测定 UHMVLs 的粒径分布<sup>[18]</sup>,每次微粒计数量为 500 个以上,计数 3 次。

1.5.2 包封率 采用葡聚糖凝胶柱分离-考马斯亮蓝法<sup>[19]</sup>测定包封率。吸取 0.5 mL 的 UHMVLs,上 Sephadex G-200 层析柱,用 Bicine-NaOH 缓冲液(pH 8.5)以 1 mL/min 的流速洗脱分离 UHMVLs 和 UC。接收 UHMVLs 部分,取 100 μL 加入乙醚提取 UC 后,再加入考马斯亮蓝,测定在 595 nm 波长处的紫外吸收值。以相同方法处理未过柱的 UHMVLs,计算包封率,重复 3 次。

1.5.3 最适温度 将尿酸溶液分别在 20、30、40、50、60、70℃ 水浴条件下预热,10 min 后在室温(25℃)条件下分别测定游离 UC 和 UHMVLs 中 UC 的活性。

1.5.4 最适 pH 将 pH 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 的尿酸溶液放置于 40 °C 水浴中预热 10 min,测定游离 UC 和 UHMVLs 中 UC 的活性。

1.5.5 血浆稳定性 取相同浓度的 UC 和 UHMVLs 各 500  $\mu$ L,分别与适量的含 10%胎牛血清的空白血浆混合,于 37 °C 下孵育 0、1、2、4、6、8、12、24、48 h,分别测定游离 UC 和 UHMVLs 中 UC 活性。

1.6 药效学研究 将大鼠随机分为 4 组,每组 3 只。设正常对照组、高尿酸血症对照组、UC 组和 UHMVLs 组。后 3 组大鼠按照 500 mg/kg 剂量一次性灌胃 2 mL 次黄嘌呤后,以 100 mg/kg 剂量皮下注射氧嗪酸钾,建立高尿酸血症大鼠模型<sup>[20]</sup>。

造模成功 1 h 后,UC 组和 UHMVLs 组大鼠分别尾静脉注射 470 mU 游离 UC 和 UHMVLs。高尿酸血症对照组、UC 组和 UHMVLs 组于造模后 1、2、3、4、5、7、9、12、24、36、48 h 分别从大鼠眼眶静脉取血 0.2 mL,空白对照组直接眼眶下静脉取血 0.2 mL,离心,取血清。使用尿酸测定试剂盒测定血清中的尿酸含量。

1.7 统计学处理 根据所测结果绘制尿酸浓度-时间曲线,用 DAS2.1.1 软件计算药代动力学参数。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用配对样品 *t* 检验,检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 形态和粒径分布 通过光学显微镜观察到 UHMVLs 为圆球形,大小相对均匀,见图 1。UHMVLs 的平均粒径为(23.1 $\pm$ 1.7)  $\mu$ m。

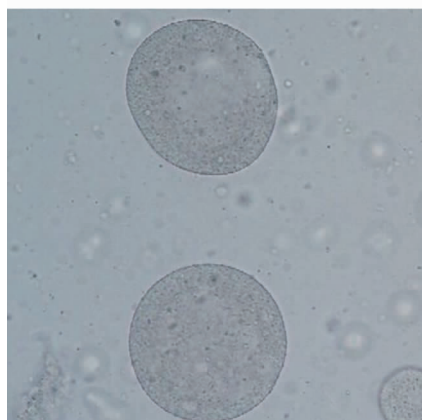


图 1 UHMVLs 的光学显微镜图

Fig 1 Micrographs of UHMVLs

UHMVLs: Uricase in hyaluronic acid-uricase multivesicular liposomes. Original magnification:  $\times 400$

2.2 包封率 制备的 3 批 UHMVLs 的平均包封率为(62.48 $\pm$ 3.87)%( $n=3$ )。

2.3 最适温度 结果见图 2A。游离 UC 和 UHMVLs 最适温度皆为 40 °C。在温度 20~70 °C 时,UHMVLs 中 UC 活性均较游离 UC 的高( $P<0.05$ )。结果表明,UHMVLs 能提高 UC 的活性,可能是因为 UHMVLs 的包裹改变了 UC 的构象,使 UC 的生物活性增强。

2.4 最适 pH 结果见图 2B。在 40 °C 时,游离 UC 和 UHMVLs 的最适 pH 值分别为 8.5 和 8.0。pH 6.5~9.5,UHMVLs 中 UC 的活性均较游离 UC 的活性高( $P<0.05$ )。结果表明 UHMVLs 能提高 UC 的活性。

2.5 血浆稳定性 结果见图 2C。除 0 h 外各时间点 UHMVLs 组中 UC 活性均高于 UC 组( $P<0.05$ ),在 37 °C 血浆中 UC 保留 50%初始活性的时间约为 8.53 h,而 UHMVLs 保留 50%初始活性的时间约为 35.41 h。可见将 UC 制备成 UHMVLs 提高了 UC 的血浆稳定性。

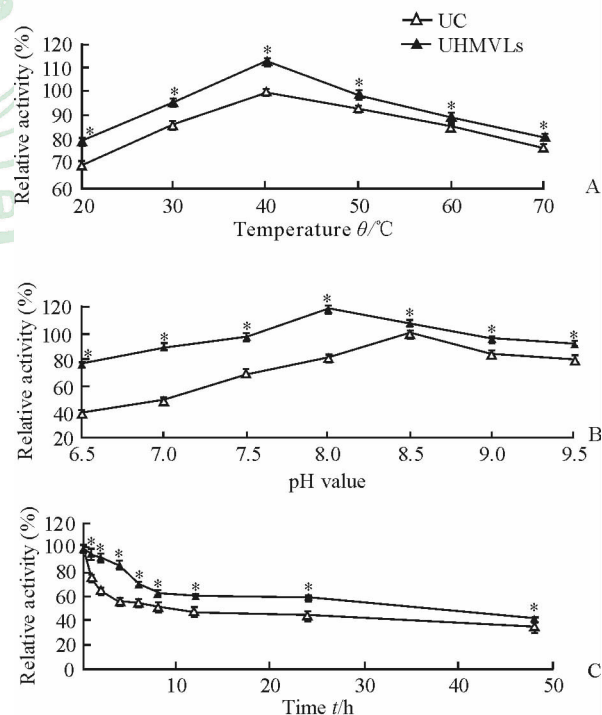


图 2 UC 和 UHMVLs 的最适温度(A)、最适 pH(B)和血浆稳定性(C)

Fig 2 Optimum temperature (A), pH (B) and plasma stability (C) of free UC and UHMVLs

UC: Uricase; UHMVLs: Uricase in hyaluronic acid-uricase multivesicular liposomes. \*  $P<0.05$  vs UC group.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.6 游离 UC 和 UHMVLs 的体内药效学特性 由图 3 可知,建模后高尿酸血症对照组、UC 组和 UHMVLs 组大鼠尿酸水平与正常对照组尿酸水平相比均升高( $P < 0.05$ ),UHMVLs 组大鼠血清中尿酸约 3 h 达到最高浓度,之后开始下降,约 9 h 时降至正常对照组水平,说明 UHMVLs 对高尿酸血症大鼠模型降尿酸效果明显。而 UC 组和高尿酸血症对照组达到最高尿酸浓度的时间延迟为 4 h,并且尿酸浓度降低至正常水平的时间延至 36 h。UC 组最高尿酸浓度低于高尿酸血症对照组,但两组尿酸浓度降至正常水平的时间接近,说明尾静脉注射 UC 后大鼠血清尿酸水平下降不明显。总之,UHMVLs 在很大程度上降低了尿酸浓度,2~24 h UHMVLs 降低高尿酸血症大鼠模型血清中尿酸水平的效果较游离 UC 更显著( $P < 0.05$ )。

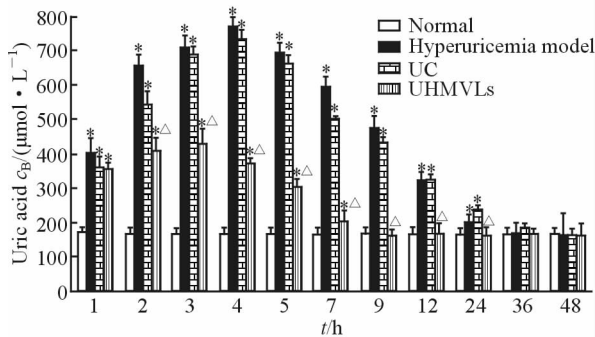


图 3 高尿酸血症大鼠静脉注射 UC 和 UHMVLs 后血清中的尿酸浓度

Fig 3 Concentrations of serum uric acid in rats with hyperuricemia after intravenous injection of free UC and UHMVLs

UC: Uricase; UHMVLs: Uricase in hyaluronic acid-uricase multivesicular liposomes. \*  $P < 0.05$  vs normal group;  $\triangle P < 0.05$  vs UC group.  $n=3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

UC 作为蛋白质类药物,具有生物大分子类药物的固有缺点,即稳定性差(分子结构易受环境影响)、代谢半衰期短(需多次给药),增加给药次数不仅影响患者的用药顺应性,还给学生增加了经济负担。多囊脂质体具有良好的缓释效应,且在载药和释药过程中不影响药物结构,以原形释药保证药物活性<sup>[6]</sup>。

本实验测定了 UC 和 UHMVLs 的最适温度、最适 pH,结果表明 UHMVLs 较 UC 更能有效发挥酶促反应。UHMVLs 和游离 UC 的最适温度均为

40 ℃,在 20~70 ℃时 UHMVLs 中 UC 的活性均较游离 UC 高( $P < 0.05$ )。在 pH 为 6.5~9.5 时,UHMVLs 中 UC 的活性较游离 UC 高( $P < 0.05$ ),且 UHMVLs 的最适 pH 值由游离 UC 的 8.5 变为 8.0,更接近于人体血浆 pH 值。UHMVLs 延长了 UC 在血浆中的半衰期,增强了 UC 在血浆中的稳定性。

本实验采用氧嗪酸钾成功构建了大鼠高尿酸血症模型,对 UHMVLs 进行体内初步药效学研究。结果显示,静脉注射游离 UC 和 UHMVLs 后,UHMVLs 组大鼠血清尿酸下降速度和程度均快于游离 UC 组模型大鼠。与游离 UC 相比,UHMVLs 表现出较高的活性,能更有效降低高尿酸血症大鼠模型血清中的尿酸水平。本实验为 UHMVLs 的进一步研究提供了依据。

### [参考文献]

[1] DONISELLI N, MONZEGLIO E, DAL PALÙA, MERLI A, PERCUDANI R. The identification of an integral membrane, cytochrome C urate oxidase completes the catalytic repertoire of a therapeutic enzyme[J/OL]. Sci Rep, 2015, 5: 13798. doi: 10.1038/srep13798.

[2] FREITAS DDA S, SPENCER P J, VASSAO R C, ABRAHAO-NETO J. Biochemical and biopharmaceutical properties of PEGylated uricase[J]. Int J Pharm, 2010, 387(1/2): 215-222.

[3] ALLEN K C, CHAMPLAIN A H, COTLIAR J A, BELKNAP S M, WEST D P, MEHTA J, et al. Risk of anaphylaxis with repeated courses of rasburicase: a Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project[J]. Drug Saf, 2015, 38: 183-187.

[4] 刘永贵,赵丽嘉,崔艳丽,贺星,沈雪砚,陈常青. 抗高尿酸血症药物研究进展[J]. 现代药物与临床, 2015, 30: 345-350.

[5] 雷婷婷,罗文,赵华,何丹,张景勍. 溴新斯的明多囊脂质体在大鼠体内的药动学研究[J]. 第二军医大学学报, 2015, 36: 459-462.

LEI T T, LUO W, ZHAO H, HE D, ZHANG J Q. Pharmacokinetics of neostigmine bromide multivesicular liposomes in rats[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36: 459-462.

[6] 李晗,梅兴国. 多囊脂质体递送蛋白质/多肽类药物的

- 研究进展[J]. 中国药学杂志, 2014, 49: 94-98.
- [7] RAMPRASAD M P, ANANTHARAMAIAH G M, GARBER D W, KATRE N V. Sustained-delivery of an apolipoprotein E-peptidomimetic using multivesicular liposomes lowers serum cholesterol levels[J]. *J Control Release*, 2002, 79: 207-218.
- [8] JAIN A K, CHALASANI K B, KHAR R K, AHMED F J, DIWAN P V. Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery [J]. *J Drug Target*, 2007, 15: 417-427.
- [9] 王涛. LXT-101 多囊脂质体研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2010.
- [10] KATRE N V. Liposome-based depot injection technologies[J]. *Am J Drug Deliv*, 2004, 2: 213-227.
- [11] KIM S. 7-DepoFoam-mediated drug delivery into cerebrospinal fluid[J]. *Methods Neurosci*, 1994, 21: 118-131.
- [12] ASARI A, MIYAUCHI S, MATSUZAKA S, ITO T, KOMINAMI E, UCHIYAMA Y. Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium[J]. *Arch Histol Cytol*, 1998, 61: 125-135.
- [13] GHOSH P. The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease; interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 1994, 12: 75-82.
- [14] MONFORT J, NACHER M, MONTELL E, VILA J, VERGES J, BENITO P. Chondroitin sulfate and hyaluronic acid (500-730 kDa) inhibit stromelysin-1 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes [J]. *Drugs Exp Clin Res*, 2005, 31: 71-76.
- [15] 方奕巍, 尹宗宁. 透明质酸修饰的白蛋白纳米粒的制备及抗肿瘤作用的初步评价[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2011, 42: 480-484.
- [16] 王娜, 赵春景, 黄开顺, 滕永真, 张景勍. 产朊假丝酵母尿酸酶脂质纳米粒的制备及其药效学特性分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26: 1147-1150.
- [17] TAN Q, ZHANG J, WANG N, LI X, XIONG H, TENG Y, et al. Uricase from *Bacillus fastidious* loaded in alkaline enzymosomes; enhanced biochemical and pharmacological characteristics in hypouricemic rats[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 82: 43-48.
- [18] 邓雪, 何丹, 熊华蓉, 周云莉, 张景勍. 静脉注射尿酸酶多囊脂质体的药代动力学和药效学研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2015, 46: 688-691.
- [19] 谢江川, 胡雪原, 晏子俊, 周云莉, 张景勍. 载天冬酰胺酶自组装纳米囊的药动学及生物等效性[J]. *第二军医大学学报*, 2016, 37: 690-693.
- XIE J C, HU X Y, YAN Z J, ZHOU Y L, ZHANG J Q. Pharmacokinetics and bioequivalence of self-assembly nanocapsules loaded with asparaginase [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2016, 37: 690-693.
- [20] 徐立, 时乐. 次黄嘌呤与氧嗪酸钾不同剂量配伍制备高尿酸血症大鼠模型[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2008, 22: 306-310.

[本文编辑] 尹 茶