

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.06.0700

• 短篇论著 •

载天冬酰胺酶羟丙基- β -环糊精脂质体的理化特性和药代动力学

万胜利, 何丹, 晏子俊, 李瑶, 张景劼*

重庆医科大学药学院重庆高校药物工程研究中心, 重庆 400016

[摘要] **目的** 考察载天冬酰胺酶羟丙基- β -环糊精脂质体 (AHL) 的理化性质及其在大鼠体内的药代动力学特性。**方法** 采用逆相蒸发法制备 AHL, 考察其包封率、粒径、zeta 电位和形态。取 12 只 SD 大鼠随机分成两组, 分别尾静脉注射 AHL 和天冬酰胺酶 (*L*-ASN), 给药后定时眼眶下静脉丛取血, 测定血浆样品中 *L*-ASN 的活性并绘制活性-时间曲线, 采用 DAS 2.1.1 软件分析计算主要的药代动力学参数。**结果** AHL 的平均包封率为 (53.53±0.58)%, 平均粒径为 (388.99±2.02) nm, 平均 zeta 电位为 (-8.56±0.75) mV, 透射电镜下观察为类球形。AHL 的活性-时间曲线下面积大于 *L*-ASN, AHL 和 *L*-ASN 的 0~48 h 曲线下面积分别为 (198.79±9.15)、(57.78±2.90) U/(mL·h), 0~48 h 平均滞留时间分别为 (4.61±0.09)、(2.09±0.05) h, 峰浓度分别为 (32.32±1.33)、(26.82±1.38) U/mL, 达峰时间分别为 (1.08±0.20)、(0.10±0.04) h。AHL 相对 *L*-ASN 的生物利用度为 344.05%。**结论** AHL 能改善 *L*-ASN 的药代动力学特性, 提高其生物利用度。

[关键词] 天冬酰胺酶; 羟丙基- β -环糊精脂质体; 理化特性; 药代动力学

[中图分类号] R 943.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)06-0700-04

Physicochemical properties and pharmacokinetics of hydroxypropyl- β -cyclodextrin liposomes containing *L*-asparaginase

WAN Sheng-li, HE Dan, YAN Zi-jun, LI Yao, ZHANG Jing-qing*

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

[Abstract] **Objective** To investigate the physicochemical properties and pharmacokinetics of *L*-asparaginase loaded hydroxypropyl- β -cyclodextrin liposome (AHL) in rats. **Methods** AHL was prepared by reverse evaporation method, and the entrapment rate, particle size, zeta potential and morphology of AHL were observed. Twelve SD rats were randomly divided into two groups. One group was injected with AHL, and the other group was injected with *L*-asparaginase (*L*-ASN). The blood samples were taken from infraorbital venous plexus, and the activity of *L*-ASN in the samples were determined and the activity-time curve was plotted. Main pharmacokinetic parameters were calculated by software DAS2.1.1. **Results** The average entrapment efficiency of AHL was (53.53±0.58)%, with an average particle size of (388.99±2.02) nm and an average zeta potential of (-8.56±0.75) mV. The pharmacokinetic parameters for AHL and *L*-ASN were: 0-48 h area under curve (198.79±9.15) U/(mL·h), (57.78±2.90) U/(mL·h); 0-48 h mean resident time (4.61±0.09) h, (2.09±0.05) h; peak concentration (32.32±1.33) U/mL, (26.82±1.38) U/mL; and time to peak (1.08±0.20) h, (0.10±0.04) h, respectively. The relative bioavailability of AHL was 344.05%. **Conclusion** AHL can improve the pharmacokinetics and enhance the bioavailability of *L*-ASN.

[Key words] asparaginase; hydroxypropyl- β -cyclodextrin liposomes; physicochemical properties; pharmacokinetics

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(6): 700-703]

天冬酰胺酶 (*L*-asparaginase, *L*-ASN) 是治疗急性淋巴白血病和淋巴瘤的有效药物^[1]。天冬酰胺是癌变淋巴瘤母细胞生长所必需的氨基酸, *L*-ASN 通过消耗天冬酰胺发挥抗癌作用^[2]。*L*-ASN 是蛋

白多肽类药物, 与传统合成药物相比, 其对正常细胞和组织的毒副作用较轻, 但在体内易失活、稳定性差、生物利用度低, 限制了其临床应用^[3]。羟丙基- β -环糊精脂质体是一类新型药物载体, 药

[收稿日期] 2018-10-27 **[接受日期]** 2019-01-23

[基金项目] 国家自然科学基金(30973645). Supported by National Natural Science Foundation of China (30973645).

[作者简介] 万胜利, 硕士, 药师(现工作单位为西南医科大学附属医院). E-mail: wanshengli0000@163.com

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

物被羟丙基-β-环糊精包合后再制备成脂质体能提高药物包封率, 增强药物稳定性, 并能提高药物的生物利用度, 具有良好的应用前景^[4-5]。目前, 国内尚未见羟丙基-β-环糊精脂质体载治疗酶的研究报道, 本研究首次将 *L*-ASN 制备成载天冬酰胺酶羟丙基-β-环糊精脂质体 (*L*-asparaginase loaded hydroxypropyl-β-cyclodextrin liposome, AHL), 以期提高 *L*-ASN 的稳定性和生物利用度。

1 材料和方法

1.1 药品、试剂与仪器 *L*-ASN (以色列 Prospec 公司, 纯度 >96%, 批号: 312PLASP11), 天冬酰胺、胆固醇 (美国 Sigma 公司), 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 国药集团化学试剂有限公司), 磷脂 (德国 Lipoid 公司), 乙醚、二氯甲烷 [重庆川东化工 (集团) 有限公司]。A200S 型精密电子天平 (德国赛多利斯公司), G16 型医用离心机 (北京白洋医疗器械有限公司), PHS-25 型酸度计 (上海雷磁仪器厂), HWCL-3 型集热式恒温磁力搅拌器 (郑州长城科工贸有限公司), Zetasizer Nano 型激光粒度仪 (英国马尔文仪器有限公司), JEM-1400Plus 型透射电子显微镜 (日本电子株式会社)。

1.2 实验动物 清洁级 SD 大鼠, 体质量 (200±20)g, 雄性, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 使用许可证号: SYXK (渝) 2014-0001。

1.3 AHL 的制备 采用逆相蒸发法制备 AHL^[5-6]。称取适量胆固醇、卵磷脂, 加 15 mL 二氯甲烷溶解, 减压蒸发至形成均匀透明薄膜, 加 15 mL 乙醚溶解已形成的薄膜, 然后加入 *L*-ASN 羟丙基-β-环糊精包合物溶液 10 mL, 冰浴中超声后, 旋转蒸发至形成乳白色均匀混悬液, 即得 AHL。将 *L*-ASN 及 AHL 置于 4 °C 环境下, 于第 0、1、5、10、15、20、25、30 天分别测定各溶液中 *L*-ASN 的活性, 考察其稳定性。

1.4 AHL 包封率的测定 采用葡聚糖凝胶柱法测定 AHL 的包封率^[6]。取 AHL 混悬液上葡聚糖凝胶 G-200 柱, Tris-盐酸缓冲液 (pH 7.3) 洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 分离 AHL 与游离酶, 接取 AHL 部分, 乙醚破乳后离心。取上清液加入考马斯亮蓝 G-250 溶液显色, 于波长 595 nm 处测定其光密度值, 计算过柱后的 AHL 中 *L*-ASN 的含量 (W_1)。另取相同

体积未过柱的 AHL 同法测定, 计算出其中 *L*-ASN 的含量 (W_2)。包封率 = $(W_1/W_2) \times 100\%$ 。

1.5 AHL 粒径、zeta 电位与形态的测定^[3] 取 AHL 混悬液, 用 pH 为 7.3 的 Tris-盐酸缓冲液稀释 20 倍, 混合均匀后使用马尔文激光粒度仪测定其粒径与 zeta 电位; 同时取部分稀释液滴加在铜网上, 用 1% 的磷钨酸染色, 晾干后在透射电子显微镜下观察其形态。

1.6 AHL 药代动力学的测定 取 12 只 SD 大鼠随机分为两组, 每组 6 只, 分别静脉注射 AHL 和 *L*-ASN, 剂量均为 2 U/g, 给药后 5 min、10 min、15 min、30 min、45 min、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、24 h、48 h 眼眶下静脉丛取血, 置于肝素化的离心管中, 1 006×*g* 离心 10 min, 取上层血浆样品, 采用奈斯勒试剂显色法测定 *L*-ASN 的活性^[3,7]。*L*-ASN 活性单位定义为: 在 37 °C、pH 7.3 的条件下, 每分钟催化天冬酰胺水解释放 1 μmol 氨所需的酶量。根据所测结果绘制活性-时间曲线, 采用 DAS 2.1.1 软件计算主要的药代动力学参数^[8]。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 AHL 的制备 成功制备得到 AHL。如图 1 所示, 4 °C 环境下 30 d 内 AHL 的稳定性优于 *L*-ASN ($P < 0.05$)。

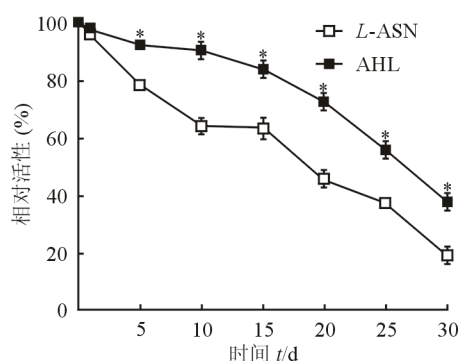


图1 *L*-ASN 和 AHL 稳定性考察

L-ASN: 天冬酰胺酶; AHL: 载天冬酰胺酶羟丙基-β-环糊精脂质体。* $P < 0.05$ 与 *L*-ASN 比较。 $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2 AHL 的包封率、粒径、zeta 电位与形态 测得 AHL 的平均包封率为 $(53.53 \pm 0.58)\%$, 平

均粒径为 (388.99 ± 2.02) nm, 平均 zeta 电位为 (-8.56 ± 0.75) mV。由图 2 可见, 制备得到的 AHL 呈类球形, 大小分布较均匀。

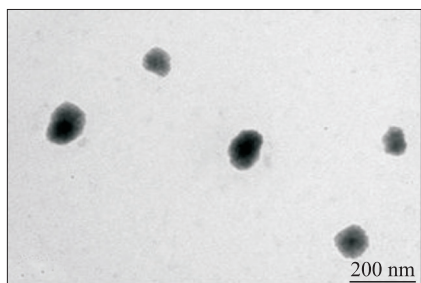


图 2 载天冬酰胺酶羟丙基-β-环糊精脂质体的透射电子显微镜图

2.3 AHL 的活性-时间曲线 SD 大鼠分别静脉注射 AHL 和 L-ASN 后定时采血, 测定不同时间点血浆中 L-ASN 的活性 (AHL 组中 L-ASN 的活性是包载与游离 L-ASN 活性的总和)。如图 3 所示, AHL 的活性-时间曲线下面积大于 L-ASN ($P < 0.05$)。在大鼠体内, 注射 L-ASN 后大鼠血浆中 L-ASN 的活性迅速下降, 8 h 时已接近于 0 U/mL; 而注射 AHL 后大鼠血浆中 L-ASN 的活性下降趋势缓慢, 12 h 时仍能检测到较高活性。这表明 AHL 能提高 L-ASN 在大鼠体内的血药浓度水平, 延长其作用时间。

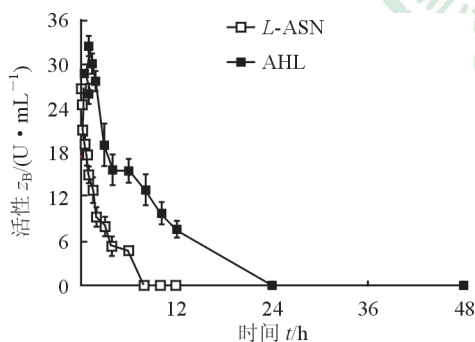


图 3 L-ASN 和 AHL 的活性-时间曲线

L-ASN: 天冬酰胺酶; AHL: 载天冬酰胺酶羟丙基-β-环糊精脂质体. $n=6, \bar{x} \pm s$

2.4 AHL 的主要药代动力学参数 L-ASN 和 AHL 的主要药代动力学参数见表 1。与 L-ASN 相比, AHL 的相对生物利用度为 344.05%, 说明 AHL 能提高 L-ASN 的生物利用度。AHL 的 0~48 h 平均滞留时间约为 L-ASN 的 2.21 倍, 表明 AHL 能延长 L-ASN 在生物体内的作用时间。AHL 的峰浓度 (C_{max}) 约为 L-ASN 的 1.2 倍, 表明 AHL 能提高 L-ASN 在生物

体内的活性。AHL 的达峰时间 (T_{max}) 约为 L-ASN 的 10.8 倍, 表明 AHL 具有缓释作用。

表 1 L-ASN 和 AHL 的主要药代动力学参数

参数	$n=6, \bar{x} \pm s$	
	L-ASN	AHL
0~48 h 曲线下面积 ($U \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$)	57.78 ± 2.90	198.79 ± 9.15
0~48 h 平均滞留时间 t/h	2.09 ± 0.05	4.61 ± 0.09
峰浓度 ($U \cdot mL^{-1}$)	26.82 ± 1.38	32.32 ± 1.33
达峰时间 t/h	0.10 ± 0.04	1.08 ± 0.20

L-ASN: 天冬酰胺酶; AHL: 载天冬酰胺酶羟丙基-β-环糊精脂质体

3 讨论

本研究采用逆相蒸发法制备 AHL。制备脂质体的方法很多, 如薄膜分散法、乙醇注入法、冷冻干燥法及逆相蒸发法等^[3-4,9-10]。薄膜分散法用于难溶性, 尤其是挥发油类药物的制备; 乙醇注入法制备速度慢, 不适合大规模生产, 用于醇溶性及挥发油类药物的制备; 冷冻干燥法制备的脂质体稳定性好, 但是需要加入保护剂, 用于热不稳定性药物的制备; 逆相蒸发法应用广、包封率高, 适合制备水溶性的大分子类药物, 通常采用逆相蒸发法制备酶类脂质体^[3,6]。酶类脂质体的包封率普遍不高, 有些甚至低至 10%, 本研究中 AHL 的平均包封率为 $(53.53 \pm 0.58)\%$, 高于 L-ASN 脂质体^[11], 远高于抗自由基复酶脂质体^[12], 表明 AHL 的包封较好。粒径和 zeta 电位是评价脂质体的重要指标。脂质体的粒径一般为 50~1 000 nm^[13], 而酶类药物脂质体的粒径一般为 250~850 nm^[13-16], 本研究中 AHL 的平均粒径为 (388.99 ± 2.02) nm, 与文献报道一致。

有文献报道, 大鼠静脉注射 L-ASN 纳米囊后峰浓度为 29.95 U/mL, 0~48 h 曲线下面积为 137.34 U/(mL·h)^[7]。本研究中 AHL 的给药剂量与 L-ASN 纳米囊^[7]一致, 其峰浓度较天冬酰胺酶纳米囊提高了 8%, 且其相对 L-ASN 纳米囊的生物利用度为 144.32%, 而 AHL 相对 L-ASN 的生物利用度为 344.05%, 可见 AHL 能有效提高药物的生物利用度。分析 AHL 生物利用度提高的原因可能有: (1) 羟丙基-β-环糊精脂质体对药物有保护作用, 能提高 L-ASN 抗吞噬细胞清除和抗蛋白酶水解的能力^[17-19]; (2) 羟丙基-β-环糊精脂质体能

增强药物的稳定性, 使 *L*-ASN 长时间保持较高活性^[18,20]。本研究中静脉注射 AHL 1 h 后大鼠血浆中 *L*-ASN 的活性最高, 这与尿酸酶多囊脂质体静脉注射 1 h 后出现最大活性^[15]类似。

综上所述, AHL 能有效改善 *L*-ASN 的药代动力学特性, 提高其生物利用度。本研究成功制备了 AHL, 为 *L*-ASN 及其他蛋白多肽类药物的临床应用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] BAHREINI E, AGHAIYPOUR K, ABBASALIPOURKABIR R, MOKARRAM A R, GOODARZI M T, SAIDIJAM M. Preparation and nanoencapsulation of *L*-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and *in vitro* release study[J/OL]. *Nanoscale Res Lett*, 2014, 9: 340. doi: 10.1186/1536-276x-9-340.
- [2] KARAMITROS C S, YASHCHENOK A M, MÖHWALD H, SKIRTACH A G, KONRAD M. Preserving catalytic activity and enhancing biochemical stability of the therapeutic enzyme asparaginase by biocompatible multilayered polyelectrolyte microcapsules[J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14: 4398-4406.
- [3] WAN S L, HE D, YUAN Y M, YAN Z, ZHANG X, ZHANG J. Chitosan-modified lipid nanovesicles for efficient systemic delivery of *L*-asparaginase[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 143: 278-284.
- [4] CHEN J, LU S, GU W, PENG P, DONG J, XU F, et al. Characterization of 9-nitrocaptophecine-in-cyclodextrin-in-liposomes modified with transferrin for the treating of tumor[J]. *Int J Pharm*, 2015, 490: 219-228.
- [5] ZHANG L, ZHANG Q, WANG X, ZHANG W, LIN C, CHEN F, et al. Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes: a novel drug delivery system for flurbiprofen[J]. *Int J Pharm*, 2015, 492: 40-45.
- [6] ZHOU Y, ZHANG M, HE D, HU X, XIONG H, WU J, et al. Uricase alkaline enzymosomes with enhanced stabilities and anti-hyperuricemia effects induced by favorable microenvironmental changes[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 46390. doi: 10.1038/srep46390.
- [7] 谢江川,胡雪原,晏子俊,周云莉,张景劼. 载天冬酰胺酶自组装纳米囊的药动力学及生物等效性[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.
- [8] 邓雪,何丹,熊华蓉,周云莉,张景劼. 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.
- [9] 张冬青,程怡,白丛林,吴琼,庞盖豪. 苦参素空间稳定脂质体的制备及其药剂学性质考察[J]. 中药材, 2011,34:786-789.
- [10] CHEN H, WU J, SUN M, GUO C, YU A, CAO F, et al. *N*-trimethyl chitosan chloride-coated liposomes for the oral delivery of curcumin[J]. *J Liposome Res*, 2012, 22: 100-109.
- [11] 王弘,吴梧桐,顾学裘. 重组 *L*-门冬酰胺酶空前体脂质体的研制及其包封率的测定[J]. 沈阳药科大学学报,1999,16:235-238.
- [12] 晋可,李颖,尹宗宁,吴冰玉. 抗自由基复酶脂质体的制备及其性质的初步研究[J]. 华西药学杂志, 2009,24:452-454.
- [13] SOLARO R, CHIELLINI F, BATTISTI A. Targeted delivery of protein drugs by nanocarriers[J]. *Materials*, 2010, 3: 1928-1980.
- [14] 陈焱,黄健花,蔡春明,王兴国. 过氧化氢酶固体脂质纳米粒的制备[J]. 食品与生物技术学报,2011,30:489-495.
- [15] XIONG H, ZHOU Y, ZHOU Q, HE D, WAN S, TAN Q, et al. Nanosomal microassemblies for highly efficient and safe delivery of therapeutic enzymes[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 20255-20263.
- [16] 谢江川,何丹,胡雪原,周云莉,晏子俊,陈薇. 透明质酸修饰的尿酸酶脂质体的制备及特性[J]. 第二军医大学学报,2016,37:1076-1081.
XIE J C, HE D, HU X Y, ZHOU Y L, YAN Z J, CHEN W, et al. Preparation and characterization of hyaluronic acid-uricase liposomes[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2016, 37: 1076-1081.
- [17] HAYASHIDA K, HIGASHI T, KONO D, MOTOYAMA K, WADA K, ARIMA H. Preparation and evaluation of cyclodextrin polypseudorotaxane with PEGylated liposome as a sustained release drug carrier[J]. *Beilstein J Org Chem*, 2014, 10: 2756-2764.
- [18] MATLOOB A H, MOURTAS S, KLEPETSANIS P, ANTIMISIARIS S G. Increasing the stability of curcumin in serum with liposomes or hybrid drug-in-cyclodextrin-in-liposome systems: a comparative study[J]. *Int J Pharm*, 2014, 476: 108-115.
- [19] GHARIB R, GREIGE-GERGES H, FOURMENTIN S, CHARCOSSET C, AUEZOVA L. Liposomes incorporating cyclodextrin-drug inclusion complexes: current state of knowledge[J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 129: 175-186.
- [20] ALOMRANI A H, SHAZLY G A, AMARA A A, BADRAN M M. Itraconazole-hydroxypropyl- β -cyclodextrin loaded deformable liposomes: *in vitro* skin penetration studies and antifungal efficacy using *Candida albicans* as model[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 121: 74-81.