

斑蝥素载药胶束的制备及其体外释药性能考察

李真真, 岳巧欣, 王杰, 臧琛, 易红, 李鹏岳, 赵庆贺*, 陈燕军*
(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:制备 pH 敏感斑蝥素聚合物胶束纳米制剂,以提高斑蝥素在水中的溶解度,并考察该制剂在弱酸性条件下的体外释药特性。方法:以聚乙二醇-聚乳酸共聚物[poly(ethylene glycol)-*b*-polylactide, PELA]和聚乙二醇-聚乳酸-聚(β -氨基酯)[poly(ethylene glycol)-*b*-polylactide-*b*-poly(β -amino ester), PELA-PBAE]为载体,采用薄膜水化法制备斑蝥素胶束。通过透射电子显微镜观察胶束的微观形态,采用粒度分析仪测定粒径,HPLC 测定其载药量和包封率,透析袋透析法测定纳米胶束在不同 pH 条件下的释放特性。结果:斑蝥素胶束呈明显的球状结构,PELA 载药(PELA-C)胶束和 PELA-PBAE 载药(PELA-PBAE-C)胶束的粒度分别为 21.6、21.2 nm,且至少在 5 d 内稳定;载药量分别为 1.68% 和 1.72%,包封率分别为 92.0% 和 88.8%;在 pH 5.5 下的 8 h 累计释放率分别为 24.7% 和 79.1%,在 pH 6.5 下的 8 h 累计释放率分别为 13.6% 和 50.0%,在 pH 7.4 下的 8 h 累计释放率分别为 10.2% 和 13.9%。结论:PELA-PBAE 作为纳米载体能明显提高斑蝥素的水溶性,体外释药具有显著的 pH 响应性能,在抗肿瘤药物的开发方面具有较好的应用前景。

[关键词] 斑蝥素; 聚合物胶束; pH 敏感; 抗肿瘤; 聚乙二醇-聚乳酸共聚物; 包封率

[中图分类号] R283.6;R284.1;R942;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0005-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240005

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160928.1610.002.html>

[网络出版时间] 2016-09-28 16:10

Preparation of Cantharidin Loaded Polymer Micelles and Investigation of Its *in Vitro* Release Properties

LI Zhen-zhen, YUE Qiao-xin, WANG Jie, ZANG Chen, YI Hong, LI Peng-yue,
ZHAO Qing-he*, CHEN Yan-jun*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** pH responsive polymer micelles loaded with cantharidin were prepared to increase the solubility of cantharidin in water. The pH responsive property of the micelles was verified by the controlled drug release under tumoral mimic mild acidic environment. **Method:** Cantharidin micelles were prepared by thin film hydration method with amphiphilic methoxy poly(ethylene glycol)-*b*-polylactide (PELA) block copolymer and methoxy poly(ethylene glycol)-*b*-polylactide-*b*-poly(β -amino ester) (PELA-PBAE) as carriers. The structure and morphology of the micelles was characterized by transmission electron microscopy. The particle size of the micelles was measured by laser light scattering analyzer. HPLC was employed to determine drug loading and encapsulation efficiency of the micelles. *In vitro* release of the micelles was performed in phosphate buffered saline (pH of 7.4, 6.5 and 5.5, respectively) by permeation diffusion method. **Result:** The micelles of PELA-cantharidin (PELA-C) and PELA-PBAE-C exhibited spherical shape with particle size of 21.6 nm and 21.2 nm, respectively; they were at least stable within 5 d. Drug loading and encapsulation efficiency of PELA-C

[收稿日期] 20160129(016)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09304307001);北京市自然科学基金项目(2152036)

[第一作者] 李真真,在读硕士,从事中药制剂研究,Tel:010-84036059,E-mail:shuangwaiwaide88@sina.com

[通讯作者] *赵庆贺,博士,副研究员,从事纳米药物传输研究,Tel:010-84036059,E-mail:qhzhao@icmm.ac.cn;

*陈燕军,博士,研究员,从事中药新型给药系统研究,E-mail:yjchen@icmm.ac.cn

micelles were 1.68% and 92.0%, while these of PELA-PBAE-C micelles were 1.72% and 88.8%, respectively. The cumulative release rates of PELA-C micelles and PELA-PBAE-C micelles in 8 h were 24.7% and 79.1% under pH of 5.5, 13.6% and 50.0% under pH of 6.5, 10.2% and 13.9% under pH of 7.4, respectively. **Conclusion:** The solubility of cantharidin is significantly improved with PELA-PBAE as nanocarrier, *in vitro* release of PELA-PBAE-C micelles has significant pH responsive performance.

[Key words] cantharidin; polymeric micelles; pH-sensitive; antitumor; poly(ethylene glycol)-*b*-polylactide; encapsulation efficiency

斑蝥具有破血逐瘀、散结消癥、攻毒蚀疮等功效,有效成分为斑蝥素^[1]。斑蝥素是一种单萜烯类提取物,为无色鳞状结晶,不溶于冷水,微溶于热水,易溶于丙酮、三氯甲烷及乙醚,具有明显的抗癌活性,临床用于治疗胰腺癌^[2]、肝癌等。因斑蝥素水溶性差、口服生物利用度低,且对胃肠道黏膜有很强的刺激性,使用过量可致人死亡,故在临床上使用限制较多^[3]。目前国内外有关斑蝥素及其衍生物的新制剂研究报导较少。

尹美珍等^[4]制备了去甲斑蝥素泊洛沙姆聚合物纳米胶束,该胶束具有较小的粒径及较高的包封率和载药量。刘晖^[5]研究了去甲斑蝥素脂质体在小鼠不同组织中的分布情况,相对于游离药,该脂质体能明显延长药物在血浆中的滞留时间,在肝、脾、肺中的分布明显增加。胡玮等^[6]系统研究了去甲斑蝥素壳聚糖纳米粒的肝靶向抗肿瘤作用,其对 H22 荷瘤小鼠具有良好的抑瘤作用。同时,该纳米粒的安全性远高于去甲斑蝥素^[7]。任杰等^[8]选择聚乙二醇-聚乳酸两亲共聚物为载体,研究去甲斑蝥素缓释纳米粒对人胆囊癌(GBC-SD)细胞的抑制作用,该纳米粒对肿瘤细胞的活性相对游离药可提高 1 倍以上。Chen 等^[9]将去甲斑蝥素载入聚乙二醇-聚己内酯胶束,该载药胶束对 HepG2, A549, A2780 等肿瘤细胞具有显著的增敏作用。体内抑瘤实验表明高浓度载药胶束抑瘤率可达 77.63%。上述研究均从不同层面阐释了纳米制剂对斑蝥素及其衍生物的减毒增效作用。

考虑到肿瘤组织为弱酸性环境,故建议针对该特点,设计具有 pH 响应释药能力的药物载体在抗肿瘤领域应用。聚乙二醇-聚乳酸-聚(β -氨基酯)(PELA-PBAE)是一种新型的三嵌段阳离子 pH 敏感可降解聚合物,在水中可自组装形成稳定疏水性内核-亲水性外壳的纳米胶束,可有效提高难溶性药物的溶解度、延长药物生物利用度,并可针对肿瘤局部 pH 变化响应性释放药物,从而实现靶向给药的目的^[10]。本实验分别以 PELA 和 PELA-PBAE 为载

体^[10],制备斑蝥素胶束,结果发现制备的药物载体可有效提高斑蝥素在水中的溶解度,载药胶束可长时间稳定,并可在弱酸性条件下响应性释放药物,为拓展斑蝥素等药物在抗肿瘤领域的应用提供参考。

1 材料

BSA224S-CW 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],Nano ZS90 型纳米激光粒度测定仪(英国马尔文公司),H-7650 型透射电子显微镜(日本日立),LGJ-10C 型真空冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂),FE20 型数显 pH 计(瑞士梅特勒-托利多公司),NSKY-100C 型恒温培养振荡器(上海苏坤实业有限公司),DL-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司)。斑蝥素(宝鸡市辰光生物科技有限公司,批号 20140617,质量分数 98%),聚乙二醇-聚乳酸共聚物(PELA)和聚乙二醇-聚乳酸-聚(β -氨基酯)(PELA-PBAE)均为自制,水为去离子水,甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 胶束的制备 采用薄膜水化法。称取一定量的 PELA 及斑蝥素,加乙醇溶解,于 50 ℃ 减压旋转蒸发,形成均一薄膜,加水振荡,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,得 PELA-斑蝥素(PELA-C)胶束。同法制备 PELA-PBAE-C 胶束。

2.2 胶束形貌 将胶束溶液滴至铜网,室温干燥后在透射电子显微镜下观察胶束的微观形态,见图 1。结果显示载药胶束呈明显的球状结构,粒径小且分布较均匀,且 PELA-PBAE-C 胶束的粒径大于 PELA-C 胶束粒径。

2.3 胶束粒径及表面电荷

2.3.1 粒径分布 取胶束溶液 1.0 mL 置石英比色皿中,观察 5 d,采用粒度分析仪测定,见表 1。结果表明斑蝥素载药胶束的粒度分布均匀,与透射电子显微镜观察结果较吻合。胶束溶液在室温下放置 5 d 后溶液澄清,无晶体析出。

2.3.2 胶束表面电荷 取胶束溶液 1.0 mL 置于弯曲式毛细管样品池中,采用粒度分析仪测定。结果

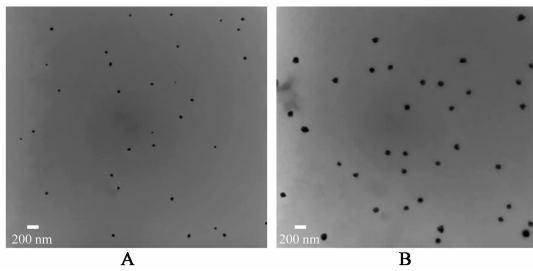


图 1 载斑蝥素的 PELA 胶束 (A) 和 PELA-PBAE 胶束 (B) TEM ($\times 30\ 000$)

Fig. 1 TEM of cantharidin loaded PELA micelles (A) and PELA-PBAE micelles (B) ($\times 30\ 000$)

表 1 PELA 和 PELA-PBAE 载药胶束的粒径稳定性考察

Table 1 Investigation of particle size of PELA-cantharidin and PELA-PBAE-cantharidin micelles

样品	第 1 天		第 3 天		第 5 天	
	粒径/nm	多分散指数	粒径/nm	多分散指数	粒径/nm	多分散指数
PELA-C	21.6 ± 0.16	0.020	21.8 ± 0.23	0.042	29.0 ± 0.27	0.216
PELA-PBAE-C	21.2 ± 0.24	0.099	21.6 ± 0.59	0.100	21.3 ± 0.29	0.088

1.0 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL, 流动相 0.1% 磷酸水溶液-乙腈 (69:31)。

2.4.2 线性关系考察^[11] 精密称取斑蝥素晶体 10.0 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得储备液。将储备液分别稀释至 70, 50, 30, 10, 5, 4, 2 mg·L⁻¹, 按 2.4.1 项下色谱条件测定 ($n = 6$), 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 942.017X + 383.047$ ($R^2 = 0.9997$), 线性范围 1.997 ~ 69.888 mg·L⁻¹。

2.4.3 专属性考察 精密移取适量空白胶束, 加 10 倍量甲醇萃取并定容, 得空白溶液; 精密称取斑蝥素晶体适量, 加甲醇溶解并定容, 得 100 mg·L⁻¹ 斑蝥素溶液, 取该斑蝥素溶液适量, 加 10 倍量空白溶液定容, 得对照品溶液; 精密移取斑蝥素胶束溶液适量, 加 10 倍量甲醇萃取并定容, 得样品溶液。按 2.4.1 项下色谱条件测定, 见图 2。结果表明空白胶束对斑蝥素检测无干扰。

2.4.4 精密度考察 取 30 mg·L⁻¹ 斑蝥素对照品溶液按 2.4.1 项下色谱条件测定, 平行进样 6 次, 计算斑蝥素含量的 RSD 0.9%, 保留时间的 RSD 0.02%, 说明仪器精密度良好。

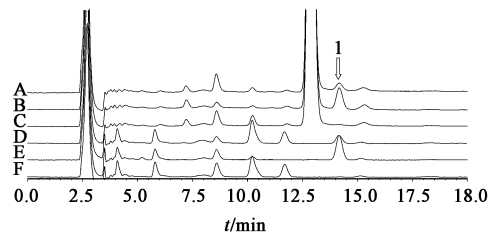
2.4.5 稳定性试验 精密移取同一样品溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 在 0, 1, 2, 4, 12, 24 h 分别按 2.4.1 项下色谱条件测定, 结果斑蝥素峰面积的 RSD 0.9%, 说明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.6 重复性试验 取同一样品溶液 6 份, 按 2.4.1 项下色谱条件测定, 结果斑蝥素含量的 RSD

PELA 和 PELA-PBAE 空白胶束溶液的 Zeta 电位分别为 (-8.45 ± 1.02) , (22.50 ± 3.52) mV, 电泳迁移率分别为 $-0.66, 1.76 \mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; 二者载药后的 Zeta 电位分别为 (-13.38 ± 0.66) , (18.67 ± 1.51) mV, 电泳迁移率分别为 $-1.05, 1.46 \mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。因胶束粒子呈球形或类球形, 故电泳迁移率的 12.8 倍约等于 Zeta 电位, 与结果相符合。

2.4 斑蝥素的含量测定

2.4.1 色谱条件 Kromasil-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30℃, 检测波长 234 nm, 流速



A. PELA-PBAE 空白胶束 + 斑蝥素溶液; B. PELA-PBAE-C; C. PELA-PBAE 空白胶束; D. PELA 空白胶束 + 斑蝥素溶液; E. PELA-C; F. PELA 空白胶束; 1. 斑蝥素

图 2 斑蝥素胶束 HPLC

Fig. 2 Specificity investigation for determination of cantharidin

0.5%, 说明该方法重复性良好。

2.4.7 绝对回收率试验 精密称取斑蝥素 10.0 mg, 加甲醇定容至 10 mL, 作为对照品溶液 A。精密移取对照品溶液 A 0.2 mL 和空白胶束溶液 (质量浓度 $2.0 \times 10^4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 mL, 加甲醇制成 100.0 mg·L⁻¹ 斑蝥素样品溶液, 按 2.4.1 项下色谱条件测定 ($n = 6$), 计算 PELA 和 PELA-PBAE 载药胶束的绝对回收率分别为 92.70% 和 93.45%, RSD 分别为 0.2% 和 0.6%。

2.5 包封率和载药量的测定 精密移取斑蝥素胶束溶液适量, 加 10 倍量甲醇萃取, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按 2.4.1 项下色谱条件测定 ($n = 3$)。计算 PELA-C 胶束中斑蝥素的包封率和载药量分别为 $(92.0 \pm 1.2)\%$ 和 $(1.68 \pm 0.02)\%$ 。PELA-PBAE-C 胶束中斑蝥素的包封率和载药量分别为 $(88.8 \pm 2.2)\%$ 和 $(1.72 \pm 0.04)\%$ 。

2.6 体外释药特性考察 精密移取胶束溶液 6.0 mL 装于截留相对分子质量 3.5 kDa 的透析袋中,置于 20 mL 含 0.5% 聚山梨酯-80 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中,于 37 °C, 100 r·min⁻¹ 条件下恒温振荡, PBS 的 pH 分别为 7.4, 6.5, 5.5。释放介质均分别在 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 h 更换。按 2.4.1 项下色谱条件测定, 绘制体外释药曲线, 见图 3。结果表明斑蝥素于 2 h 内快速释放; 同一载药胶束在不同 pH 介质中的释放速度排序为 pH 7.4 < pH 6.5 < pH 5.5; 同一条件下, PELA-PBAE-C 胶束较 PELA-C 胶束释放更快、更完全, 二者在 pH 5.5 下的 8 h 累计释放率分别为 79.1% 和 24.7%。提示 PELA-PBAE-C 胶束在弱酸环境下具有较高的释放特性。

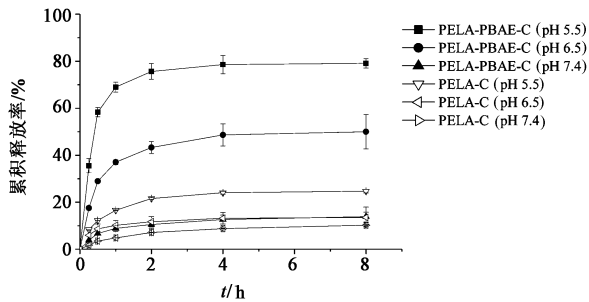


图 3 斑蝥素胶束在不同 pH 条件下的释放曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 Release profiles of cantharidin micelles under different pH conditions($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

莨菪体内的斑蝥素被认为是抗癌的主要有效物质,可治疗原发性肝癌、喉癌、食道癌、宫颈癌等^[12]。但该成分毒性较大,对心脏和肾脏有实质性损伤。为了降低斑蝥素的毒副作用,研究人员从不同层面研究了纳米制剂对斑蝥素及其衍生物的减毒增效作用。本文选择具有 pH 响应释药能力的共聚物 PELA-PBAE 为载体,制备了纳米制剂斑蝥素胶束。PELA-PBAE 在水中可自组装形成稳定疏水性内核-亲水性外壳的纳米胶束,可有效提高斑蝥素的溶解度。制备的胶束粒径约 20 nm,且稳定性良好。PELA-C 胶束和 PELA-PBAE-C 胶束中斑蝥素的载药量分别可达 1.68% 和 1.72%,可满足进一步生物学评价的要求。PELA-PBAE-C 在 pH 5.5, 6.5, 7.4 下的 8 h 累计释放率分别是 79.1%, 50.0%, 13.9%。而非 pH 响应性的 PELA-C 胶束在 pH 5.5, 6.5, 7.4 下的 8 h 累计释放率则分别只有 24.7%, 13.6%, 10.2%。表明 PELA-PBAE-C 胶束具有明显的 pH 响应性释药性能,这是由于 PELA-

PBAE-C 胶束中的 PBAE 嵌段在微酸性条件下可产生质子化,亲水作用增强而使得胶束结构发生一定程度破坏,从而使药物加速释放。该实验结果有望拓展斑蝥素类药物在抗肿瘤领域的应用,但 PELA-PBAE-C 的抗肿瘤活性及毒副作用有待后续体外和体内生物学评价予以证实。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:311-312.
[2] Shen M, Wu M Y, Chen L P, et al. Cantharidin represses invasion of pancreatic cancer cells through accelerated degradation of MMP2 mRNA[J]. Sci Rep, 2015, doi:10.1038/srep11836.
[3] 党云洁. 斑蝥素及斑蝥提取物的口服缓释制剂研究[D]. 北京:中国医学科学院药用植物研究所,2009.
[4] 尹美珍,杨子春,包洋,等. 去甲斑蝥素-泊洛沙姆聚合物纳米胶束的制备和表征[J]. 湖北理工学院学报, 2015, 31(6):43-46.
[4] 王江峰,鲁莹,钟延强. 聚氨基酯作为基因载体的研究进展[J]. 药学实践杂志,2011, 29(3):165-168.
[5] 刘晖. 去甲斑蝥素前体脂质体的制备及药代动力学的初步研究[D]. 长春:吉林大学,2008.
[6] 胡玮,章良,王钦,等. 去甲斑蝥素 N-乳糖酰壳聚糖纳米粒的肝靶向抗肿瘤药理学评价[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(19):1814-1820.
[7] 管敏,周奕,贝永燕,等. 乳糖化-去甲斑蝥素抗肿瘤药理学及急性毒性试验研究[J]. 抗感染药学,2010, 7(3):171-175.
[8] 任杰,仲谦,李航,等. 去甲斑蝥素聚乳酸-聚乙二醇纳米粒的制备及细胞毒性试验[J]. 药学服务与研究, 2007, 7(4):294-297.
[9] Chen S F, Lu W F, Wen Z Y, et al. Preparation characterization and anticancer activity of norcantharidin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(caprolactone) amphiphilic block copolymer micelles[J]. Pharmazie, 2012, 67(9):781-788.
[10] 杜林娇,岳巧欣,李真真,等. 紫杉醇聚合物胶束的制备及其 pH 响应性能[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10):9-13.
[11] 李慧,方清影,王艳荣,等. 高效液相色谱法测定纳米给药系统斑蝥素囊泡中药物的含量和包封率[J]. 中国中医药信息杂志,2010, 17(12):39-40.
[12] 魏方超,杜鹃,宋宁宁,等. 斑蝥素及其衍生物的研究现状与应用[J]. 现代生物医学进展,2012, 12(8):1586-1589.

[责任编辑 刘德文]