

AEYLR小肽修饰的紫杉醇纳米结构脂质载体的制备及抗肿瘤效果评价[△]

韩翠艳^{1*},周建文²,刘畅¹,马晓星¹,袁橙¹,董岩¹,金珊珊³(1.齐齐哈尔医学院药学院,黑龙江齐齐哈尔161006;2.佳木斯大学药学院,黑龙江佳木斯154007;3.北京万全德众医药科技股份有限公司制剂部,北京102299)

中图分类号 R943;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)06-0770-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.06.10

摘要 目的:制备序列为丙氨酸-谷氨酸-酪氨酸-亮氨酸-精氨酸(简称为“AEYLR”)的小肽修饰的紫杉醇(PTX)纳米结构脂质载体(A-P-NLC),并对其体内外抗肿瘤效果进行评价。方法:采用熔融乳化-低温固化法制备纳米结构脂质载体(NLC)、PTX纳米结构脂质载体(P-NLC)和A-P-NLC,表征其外观形态、粒径、多分散指数(PDI)、Zeta电位,并检测其包封率、载药量及体外释放度;以NCI-H1299细胞和S180细胞为对象,采用CCK-8法对游离PTX、P-NLC、A-P-NLC(0.44~44.00 μg/mL,以PTX计)的细胞抑制作用进行考察,并计算其半数抑制浓度(IC₅₀);以S180荷瘤小鼠为模型动物,对游离PTX、P-NLC、A-P-NLC(5 mg/kg,以PTX计)的抑瘤效果进行评价。结果:P-NLC和A-P-NLC外观均呈类圆形、分布均匀;A-P-NLC的粒径、PDI、Zeta电位分别为(43.92±0.76)nm、0.203±0.034、(-19.77±1.16)mV,较P-NLC有所增加;A-P-NLC的包封率、载药量分别为(95.71±0.68)%、(1.97±0.25)%,较P-NLC有所降低;A-P-NLC在48 h内累积释放百分率达(35.17±2.08)%,较游离PTX表现出明显的缓释作用,且比P-NLC的释放更缓慢。与游离PTX和P-NLC比较,相同质量浓度的A-P-NLC对NCI-H1299细胞和S180细胞的抑制率大部分均显著升高,IC₅₀值均显著降低;A-P-NLC给药处理的S180荷瘤小鼠无死亡现象,一般状态良好,且瘤体显著缩小、瘤质量显著降低、瘤质量抑制率显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:A-P-NLC具有明显的缓释作用,其对NCI-H1299细胞和S180细胞的体外抑制作用以及对小鼠S180实体瘤的抑制作用均优于游离PTX和P-NLC,且毒性有所降低。

关键词 AEYLR;小肽;紫杉醇;纳米结构脂质载体;抗肿瘤;小鼠

Preparation of Small Peptide AEYLR Modified Paclitaxel Nanostructured Lipid Carriers and Evaluation of Its Anti-tumor Effects

HAN Cuiyan¹, ZHOU Jianwen², LIU Chang¹, MA Xiaoxing¹, YUAN Cheng¹, DONG Yan¹, JIN Shanshan³(1. School of Pharmacy, Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 2. School of Pharmacy, Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China; 3. Dept. of Preparation, Beijing Wanquan Dezhong Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Beijing 102299, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Paclitaxel (PTX) nanostructured lipid carriers (NLC) modified by small peptide alanine-glutamic acid-tyrosine-leucine-arginine (AEYLR), and to evaluate its anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo*. METHODS: NLC, PTX-NLC (P-NLC) and AEYLR modified P-NLC (A-P-NLC) were prepared by emulsion evaporation-low temperature solidification curing method. Its appearance, particle size, multi-dispersion index (PDI) and Zeta potential were characterized, encapsulation rate, drug loading and *in vitro* drug release were detected respectively. Using NCI-H1299 and S180 cells as objects, CCK-8 method was adopted to investigate inhibitory effects of free PTX, P-NLC and A-P-NLC (0.44-44.00 μg/mL, by PTX) to those cells. The half inhibition concentration (IC₅₀) was calculated. Using S180 tumor-bearing mice as model animal, anti-tumor effects of free PTX, P-NLC and A-P-NLC (5 mg/kg, by PTX) were evaluated. RESULTS: P-NLC and A-P-NLC were round-like and dispersed evenly. The particle size, PDI and Zeta potential of A-P-NLC were (43.92±0.76) nm, 0.203±0.034 and (-19.77±1.16) mV, which were all increased to certain extent, compared with P-NLC. The encapsulation efficiency and drug loading of A-P-NLC were (95.71±0.68)% and (1.97±0.25)%, which were both decreased to certain extent, compared with P-NLC. The cumulative release rate of A-P-NLC was (35.17±2.08)% within 48 h, showing significant sustained-release effect compared with free PTX; the release of A-P-NLC was slower than P-NLC. Compared with free PTX and P-NLC, inhibitory rates of same concentration of A-P-NLC to NCI-H1299 cells and S180 cells were almost increased significantly, while IC₅₀ values were all decreased significantly. There was no death in S180 tumor-bearing mice treated with A-P-NLC and the general condition was good; the volume of tumors was significantly reduced, the mass of tumors was significantly reduced, and the inhibition rate of tumors was significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: A-P-NLC has significantly sustained-release effects; its inhibitory rate to NCI-H1299 cells and S180 cells *in vitro*, and its inhibitory effects on S180 solid tumor in mice are all better than free PTX and P-NLC, while the toxicity is decreased to certain extent.

[△] 基金项目:黑龙江省自然科学基金面上项目(No.H2015070)

* 教授,博士。研究方向:药物制剂新技术和新剂型。电话:0452-2663382。E-mail:hcyjy2013@163.com

KEYWORDS AEYLR; Small peptide; Paclitaxel; Nanostructured lipid carriers; Anti-tumor; Mice

紫杉醇(Paclitaxel, PTX)是从红豆杉中提取的一种四环二萜类化合物,在临床上主要用于乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌等的一线/二线治疗;其常规剂型为溶液型注射剂,但该类剂型含有的增溶剂聚氧乙烯蓖麻油会引起过敏反应,故将其制备成各种纳米制剂以降低其毒性已成为研究热点^[1-4]。纳米结构脂质载体(Nanostructured lipid carriers, NLC)是采用单甘油酯、双甘油酯、其他类甘油酯、磷脂、鞘脂类等脂质为载体,并添加一定比例的液态油,将药物吸附或包裹于脂质核中而形成的脂质纳米给药系统^[5-6]。NLC具有良好的生物相容性,适于静脉注射、口服等多种途径给药^[7-8],具有极大的潜在应用价值。序列为丙氨酸-谷氨酸-酪氨酸-亮氨酸-精氨酸(Ala-Glu-Tyr-Leu-Arg, 简称为“AEYLR”)的小肽来自于表皮生长因子受体(EGFR)自磷酸化位点Y1173,前期研究已证明其对EGFR高表达的肿瘤具有良好的体内外靶向性^[9-10]。为降低抗肿瘤药物的毒性并提高其靶向性,本课题组将PTX制成AEYLR小肽修饰的NLC(简称为“A-P-NLC”),对其进行表征,并对其体内外抗肿瘤效果进行评价,为PTX抗肿瘤制剂的进一步开发提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器

AL204型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);HT7700型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);Zetasizer Nano-ZS90型纳米粒径电位分析仪(英国Malvern公司);ZHWHY-200D型恒温培养振荡器(上海智城分析仪器有限公司);2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司);5804R型台式高速大容量离心机(德国Eppendorf公司);3111型细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);Tecan Safire 2型酶标仪(瑞士Tecan公司);ARZ型电子数显游标卡尺(宁波市鲁匠工具有限公司);MD44MM透析袋(美国Viskase公司,截留分子量:8 000~14 000 Da)。

1.2 药品与试剂

PTX对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号:17022701,纯度:≥98%);二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-AEYLR(DSPE-PEG2000-AEYLR,广州特立生物科技有限公司,批号:GT60304-0324-A,纯度:≥90%);CCK-8试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:20332);山嵛酸甘油酯(ATO,法国Gattefossé公司);单硬脂酸甘油酯(GMS,马来西亚KLK公司);中链三酰甘油(MCT,北京凤礼精求商贸有限公司);聚氧乙烯35蓖麻油(ELP)、聚乙二醇-15-羟基硬脂酸酯(HS15)(德国BASF公司);RPMI 1640培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);聚山梨酯80(美国Sigma公司);pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS,由北京酷来博科技有限公司的固体粉末产品用超纯水配制);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯化水或超纯水。

1.3 细胞

人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299、小鼠腹水瘤细胞S180均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.4 动物

SPF级昆明小鼠50只(雌性30只、雄性20只),体重18~22 g,购于哈尔滨医科大学实验动物学部,生产许可证号:SCXK(黑)2013-001。所有动物均饲养于SPF级实验室,环境温度为18~22℃、湿度为50%~60%,饲喂清洁级真空包装小鼠饲料。

2 方法与结果

2.1 不同NLC样品制备

采用熔融乳化-低温固化法进行制备。称取ATO 40 mg、GMS 13 mg、MCT 27 mg、ELP 54 mg作为油相,另称取/量取HS15 54 mg、水4 mL作为水相,将油相和水相分别置于80℃水浴中熔融或溶解;在恒温磁力搅拌下,将油相缓慢滴入水相,待滴加完成,继续乳化10 min;随后将油水混合物迅速置于冰水浴中固化15 min,再分别经0.45 μm、0.22 μm微孔滤膜滤过后,即得NLC溶液。另外,先单独将5 mg/mL的PTX无水乙醇溶液200 μL(挥干乙醇)或与DSPE-PEG2000-AEYLR 8 mg同时加入上述油相中,再按同样的操作方法分别制得PTX纳米结构脂质载体(P-NLC)溶液和修饰有AEYLR小肽的PTX纳米结构脂质载体(A-P-NLC)溶液。3种NLC样品溶液均显蓝色乳光。

2.2 P-NLC和A-P-NLC的表征

2.2.1 外观形态 取“2.1”项下制备的P-NLC、A-P-NLC样品溶液适量,以水稀释10倍后用磷钨酸负染,在电镜下观察。结果,两者外观均呈类圆形、大小均一,详见图1。

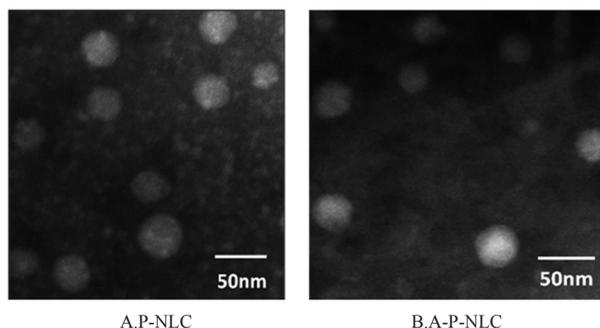


图1 P-NLC和A-P-NLC的透射电镜图(×350 000)

Fig 1 TEM of P-NLC and A-P-NLC(×350 000)

2.2.2 粒径、粒度及电位 取“2.1”项下制备的P-NLC、A-P-NLC样品溶液适量,用水稀释50倍,采用纳米粒径电位分析仪测定其粒径、粒度分布及Zeta电位。试验均重复3次。结果,P-NLC的粒径为(39.56 ± 1.22) nm,多分散指数(PDI)为0.161 ± 0.026,Zeta电位为(-16.34 ± 0.85) mV;A-P-NLC的上述指标或其绝对值均有增加,分别为(43.92 ± 0.76) nm、0.203 ± 0.034、(-19.77 ± 1.16) mV。P-NLC和A-P-NLC的粒径与Zeta电位分布见图2。

2.3 封装率和载药量

采用高效液相色谱(HPLC)法测定PTX含量。色谱

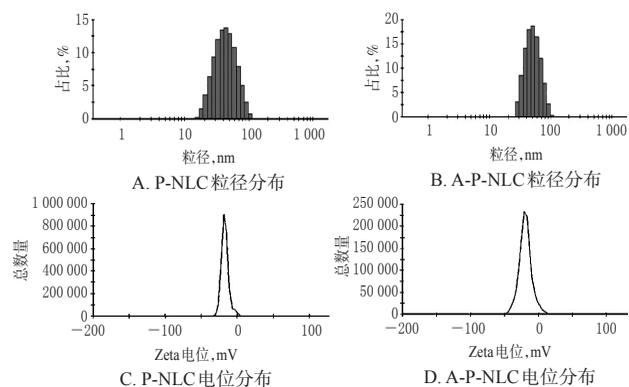


图2 P-NLC和A-P-NLC的粒径和Zeta电位分布

Fig 2 Particle size and Zeta potential of P-NLC and A-P-NLC

条件:色谱柱为Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(55:45, V/V);流速为1 mL/min;柱温为25 ℃;检测波长为227 nm;进样量为20 μL^[11]。精密称取PTX对照品适量,以流动相制成质量浓度分别为5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 μg/mL的系列标准溶液,按上述色谱条件测定;以PTX的峰面积(A)对质量浓度(c, μg/mL)进行线性回归,得标准曲线方程为 $A=0.5585c+0.9107$ ($r=0.9998$)。结果表明,PTX的质量浓度在5.0~100.0 μg/mL范围内线性关系良好。

采用超滤离心法^[12]测定样品的载药量和包封率。取“2.1”项下制备的P-NLC样品溶液适量,置于超滤离心管(截留分子量:10 kDa,下同)中,10 000 r/min离心40 min,收集下清液,经甲醇适当稀释后,按上述色谱条件进样测定,得游离药物含量($W_{\text{游离}}$);另取P-NLC样品溶液适量,置于离心管中,经乙腈破乳后,3 000 r/min离心20 min,取上清液,按上述HPLC色谱条件进样测定,得总药物含量($W_{\text{总}}$)。按照公式计算P-NLC的载药量(DL)和包封率(EE): $DL(\%)=(W_{\text{总}}-W_{\text{游离}})/W_{\text{脂质}}\times 100\%$, $EE(\%)=(W_{\text{总}}-W_{\text{游离}})/W_{\text{总}}\times 100\%$;式中, $W_{\text{脂质}}$ 为处方中液态脂质和固态脂质的总量^[13]。另取“2.1”项下制备的A-P-NLC样品溶液适量,同法测定。试验均重复3次。结果,P-NLC和A-P-NLC的载药量分别为(99.13±0.86)%、(95.71±0.68)%,包封率分别为(2.33±0.15)%、(1.97±0.25)%,A-P-NLC的载药量和包封率较P-NLC均有所降低。

2.4 体外释放度

取游离PTX和“2.1”项下制备的P-NLC和A-P-NLC样品溶液适量,采用透析法^[13]模拟药物释放过程,设置截留分子量为10 kDa,释放介质为含0.2%聚山梨酯80的PBS,于0、2、4、6、8、10、12、24、48 h时取样,按“2.3”项下HPLC法测定PTX质量浓度,考察其体外释放度,并按公式计算累积释放百分率:累积释放百分率($\%$)= $[V_0\times C_t+V(C_1+C_2+C_3+\dots+C_{t-1})]/m\times 100\%$,其中, m 是加入制剂含药总量, V 是每次取样体积, V_0 是释放介质的总体积, C_1 、 C_2 、 C_3 、 \dots 、 C_t 分别是第1、2、3、 \dots 、 t 取样时间点的浓度。试验均重复3次。结果显示,游离PTX在12 h

时的累积释放率已达到(90.00±2.33)%,而P-NLC、A-P-NLC在48 h时的累积释放百分率分别为(43.05±3.74)%、(35.17±2.08)%;与游离PTX比较,P-NLC和A-P-NLC均表现出明显的缓释作用,且A-P-NLC较P-NLC的释放更缓慢,详见图3。

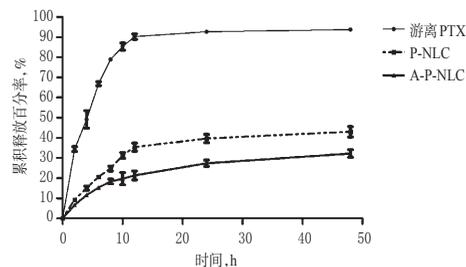


图3 3种样品的体外累积释放率($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig 3 Cumulative release rate of 3 kinds of samples *in vitro* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.5 不同样品对NCI-H1299细胞和S180细胞的抑制作用考察

2.5.1 NLC的细胞抑制作用 采用CCK-8法进行检测。取对数生长期的NCI-H1299细胞进行消化计数后接种于96孔板中(1×10^4 个/孔),在37 ℃、5% CO₂(以下培养条件同)的培养箱中培养24 h。弃去孔中培养基(即含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,下同),分为对照组(细胞+培养基)和不同质量浓度的NLC试验组(细胞+终质量浓度分别为22、220、2 200、22 000 μg/mL的NLC,分别相当于0.11、1.10、11.00、110.00 μg/mL PTX的载体量),分别加入不含药/含药培养基100 μL,每组设置6个孔。剂量均根据预试验结果设置。各组细胞培养48 h后,每孔加入CCK-8溶液10 μL,混匀后继续培养4 h。采用酶标仪于450 nm波长处测定各孔光密度(OD)。按照公式计算细胞存活率:细胞存活率($\%$)= $OD_{\text{NLC试验组}}/OD_{\text{对照组}}\times 100\%$ 。另取对数生长期的S180细胞,同法测定NLC作用后的细胞存活率。结果显示,经不同质量浓度的NLC作用后,NCI-H1299细胞和S180细胞的存活率均在83%以上,未表现出明显细胞抑制作用,表明NLC对上述两种细胞的毒性均较小,详见图4。

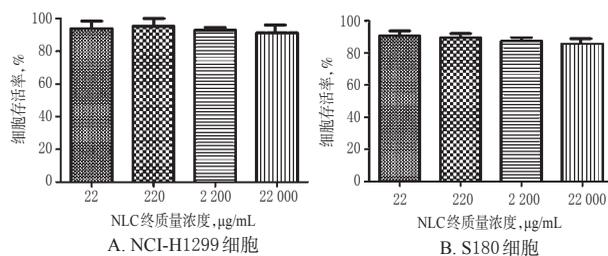


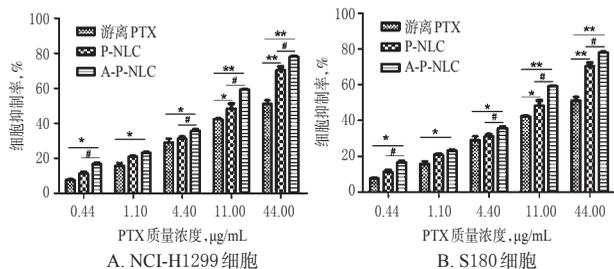
图4 NLC作用后NCI-H1299细胞和S180细胞的存活率($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig 4 Survival rate of NCI-H1299 and S180 cells after treated with NLC ($\bar{x}\pm s, n=6$)

2.5.2 不同PTX样品的细胞抑制作用 按“2.5.1”项下方法取细胞接种并培养,分为对照组(细胞+培养基)和各药物组(细胞+游离PTX或P-NLC或A-P-NLC的含药

培养基,所含PTX的终质量浓度均分别为0.44、1.10、4.40、11.00、44.00 $\mu\text{g/mL}$);另设不含细胞的空白组(培养基),每组设置6个孔。剂量均根据预试验结果设置。按照“2.5.1”项下方法培养并测定各孔OD值,并按公式计算细胞抑制率:细胞抑制率(%)=(OD_{药物组}-OD_{空白组})/(OD_{对照组}-OD_{空白组}) $\times 100\%$ 。采用SPSS 17.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用*t*检验($P < 0.05$ 为差异有统计学意义);同时,计算药物的半数抑制浓度(IC₅₀)。

结果显示,当PTX质量浓度为0.44~44.00 $\mu\text{g/mL}$ 时,各样品对两种细胞的抑制率随着PTX浓度增加而呈升高趋势,表明不同PTX样品对两种细胞的抑制作用均具有剂量依赖趋势;与游离PTX比较,在相同质量浓度的P-NLC和A-P-NLC作用下,两种细胞的抑制率均显著升高,IC₅₀值均显著降低;与P-NLC比较,在相同质量浓度的A-P-NLC作用下(除1.10 $\mu\text{g/mL}$ 外),两种细胞的抑制率均显著升高,IC₅₀值均显著降低。以上差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图5、表1。



注:与游离PTX组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与P-NLC组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. free PTX group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. P-NLC group, * $P < 0.05$

图5 不同PTX样品对NCI-H1299细胞和S180细胞的抑制率($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig 5 Inhibition rates of different PTX samples to NCI-H1299 and S180 cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

表1 不同PTX样品对NCI-H1299细胞和S180细胞的IC₅₀值($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 IC₅₀ values of different PTX samples to NCI-H1299 and S180 cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

样品	IC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$	
	NCI-H1299细胞	S180细胞
游离PTX	45.13 \pm 2.00	42.40 \pm 4.04
P-NLC	12.21 \pm 1.04**	15.74 \pm 5.57**
A-P-NLC	7.57 \pm 2.48***	5.94 \pm 0.96***

注:与游离PTX组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与P-NLC组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. free PTX group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. P-NLC group, * $P < 0.05$

2.6 A-P-NLC的体内抗肿瘤实验

2.6.1 S180荷瘤小鼠模型建立 取对数生长期的S180细胞,以4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水漂洗并调节细胞浓度至 1×10^7 个/mL,按200 μL /只接种于小鼠(雌性10只)的腹腔[14]。4~

5 d后可见小鼠腹部凸起、明显增大,此时取其S180腹水瘤细胞用于传代[13]。传至第3代后,抽取腹水瘤模型小鼠的腹水,以4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水漂洗并调节细胞浓度至 1×10^8 个/mL,另取小鼠(雌雄各20只),按200 μL /只注射至其腋窝皮下,并观察其腋窝处实体瘤形成情况。当小鼠腋窝处出现小的突起且触摸有硬结感时,即为荷瘤造模成功。

2.6.2 A-P-NLC的体内抗肿瘤作用考察 取“2.6.1”项下造模成功的荷瘤小鼠32只,随机分为对照组、游离PTX组、P-NLC组、A-P-NLC组,每组8只。各组小鼠均尾静脉给药100 μL /次,隔天1次,连续8次。除对照组给予生理盐水外,各给药组的给药剂量均以5 mg/kg PTX计算,剂量根据预试验结果设置。每天观察小鼠一般状态,并测量其体质量;以游标卡尺测量肿瘤垂直方向上的长径(*a*)和短径(*b*),计算肿瘤体积($V = ab^2/2$) [15];末次给药24 h后处死小鼠,剖取肿瘤,称定瘤质量,并按公式计算瘤质量抑制率:瘤质量抑制率(%)=(1-给药组瘤质量/对照组瘤质量) $\times 100\%$ [16]。统计学方法同“2.5.2”项。

结果显示,给药期间,对照组小鼠肿瘤增长速度快,前期进食和饮水量正常、毛发光亮,后期随着肿瘤变大,其活动变迟缓、毛发变得不光亮,有1只小鼠死亡;游离PTX组小鼠出现躁动、尖叫等现象,精神状态不佳,毛发不光亮,食欲减退,活动量减少,有3只小鼠死亡;P-NLC组、A-P-NLC组小鼠状态较好,毛发光亮,进食和饮水量正常,其中P-NLC组有1只小鼠死亡。对照组和游离PTX组小鼠体质量增长较慢,而P-NLC组和A-P-NLC组小鼠体质量增长明显,详见图6。

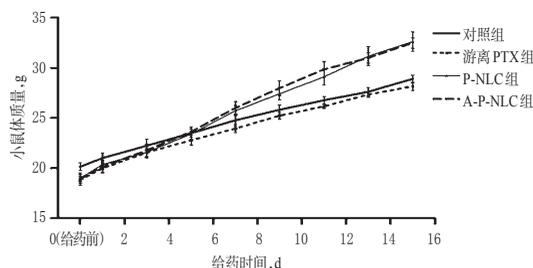


图6 给药期间各组小鼠体质量变化($\bar{x} \pm s, n=5-8$)

Fig 6 Changes of body weight of mice in each group during medication($\bar{x} \pm s, n=5-8$)

各组小鼠瘤体积均随时间延长而呈增加趋势;与对照组比较,各给药组小鼠自给药3 d时起瘤体积均显著缩小,P-NLC组和A-P-NLC组小鼠在末次给药后24 h时瘤质量均显著降低;与游离PTX组比较,P-NLC组和A-P-NLC组小鼠分别自给药7、5 d时起瘤体积显著缩小,在末次给药后24 h时瘤质量显著降低、瘤质量抑制率显著升高;与P-NLC组比较,A-P-NLC组小鼠自给药7 d时起瘤体积显著缩小,在末次给药后24 h时瘤质量显著降低、瘤质量抑制率显著升高。以上差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表2、表3。

表2 给药期间各组小鼠瘤体积变化($\bar{x} \pm s, n=5 \sim 8, \text{mm}^3$)Tab 2 Changes of tumor volume of mice in each group during medication ($\bar{x} \pm s, n=5-8, \text{mm}^3$)

组别	给药时间									
	0 d(给药前)	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d	
对照组	106.5±3.4	124.2±6.7	307.6±35.9	601.6±26.7	682.6±19.9	1 113.4±25.2	1 515.9±28.3	2 021.7±24.5	2 633.9±14.0	
游离PTX组	112.1±4.7	127.0±5.0	207.4±9.3*	328.6±17.7*	465.0±15.8**	622.2±16.2**	843.2±20.9**	1 215.8±31.0**	1 730.0±7.6**	
P-NLC组	115.4±6.5	135.3±7.2	206.7±7.2*	284.6±10.7*	372.8±11.5***	463.3±9.0***	602.4±8.7***	676.3±7.6***	802.7±5.7***	
A-P-NLC组	122.3±8.8	134.4±13.3	173.9±15.2*	230.5±12.4***	297.6±13.8***	339.4±17.7***	385.3±17.7***	417.5±15.3***	467.8±17.2***	

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与游离PTX组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与P-NLC组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. free PTX group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. P-NLC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表3 末次给药24 h后各组小鼠瘤质量及其抑制率($\bar{x} \pm s, n=5 \sim 8$)Tab 3 Tumor weight and tumor weight inhibition rate of mice in each group 24 h after last medication ($\bar{x} \pm s, n=5-8$)

组别	瘤质量,g	瘤质量抑制率,%
对照组	6.8±1.1	
游离PTX组	5.5±1.4	19.47
P-NLC组	4.1±1.7*	38.83*
A-P-NLC组	2.5±1.9***	62.51***

注:与游离PTX组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与P-NLC组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. free PTX group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. P-NLC group, * $P < 0.05$

3 讨论

经PEG修饰的NLC可通过“高渗透、长滞留”效应被动靶向进入肿瘤组织,即通过肿瘤微血管的空隙渗漏进入肿瘤组织,但进入肿瘤组织的NLC因其表面修饰有PEG故亲水性增强,会使其跨膜进入细胞受到影响;AEYLR小肽对EGFR具有特异的靶向性,可使连接有AEYLR的NLC对EGFR高表达的细胞及肿瘤组织具有主动靶向作用,同时还可通过EGFR受体介导肿瘤细胞对NLC的内吞,提高NLC的入瘤量^[9-10]。

DSPE-PEG2000-AEYLR是AEYLR通过PEG末端活化技术连接在DSPE-PEG2000末端的产物。本研究采用熔融乳化-低温固化法制备A-P-NLC,在乳化过程中DSPE-PEG2000-AEYLR结构中的亲水部分PEG2000-AEYLR存在于乳滴表面,而在低温固化后AEYLR部分即被修饰到了P-NLC的表面。与P-NLC比较,A-P-NLC在制备过程中加入了DSPE-PEG2000-AEYLR,增加了NLC表面PEG的量,导致粒径、粒度分布及Zeta电位绝对值均有所增长,同时空间位阻的增加使其包封率和载药量略有降低;二者的体外释放行为相似,均有缓释效果,但A-P-NLC的缓释效果更为明显,可能是由于DSPE-PEG2000-AEYLR的加入使P-NLC的结构变得更加稳定,从而使药物释放更缓慢。

本研究选择EGFR高表达的人非小细胞肺癌细胞系NCI-H1299和鼠源S180细胞系^[17-18]作为模型细胞,主要考察了A-P-NLC对两种肿瘤细胞的体外抑制效果。结果显示,与游离PTX和P-NLC比较,加入了具有主动靶向作用的AEYLR后,A-P-NLC显示出更强的体外肿

瘤细胞抑制效果。而进一步采用S180细胞建立小鼠荷瘤模型并进行体内抑瘤作用考察的结果显示,与游离PTX组和P-NLC组比较,A-P-NLC组小鼠的瘤体积、瘤质量均显著缩小或降低,瘤质量抑制率均显著升高;另外,游离PTX组有3只小鼠由于PTX的长期毒性而死亡,而P-NLC组与A-P-NLC组小鼠死亡情况减少,且体质量较游离PTX组显著增长,提示PTX制成NLC后可减小药物的毒副作用,提高用药安全性。

综上,A-P-NLC具有明显的缓释作用,其对NCI-H1299细胞和S180细胞的体外抑制作用以及对小鼠S180实体瘤的抑制作用均优于游离PTX和P-NLC,且毒性有所降低。

参考文献

- [1] CHOI H, LIU T, QIAO H, et al. Biomimetic nano-surfactant stabilizes sub-50 nanometer phospholipid particles enabling high paclitaxel payload and deep tumor penetration [J]. *Biomaterials*, 2018. DOI:10.1016/j.biomaterials.2018.07.034.
- [2] TUTEJA M, KANG M, LEAL C, et al. Nanoscale partitioning of paclitaxel in hybrid lipid-polymer membranes [J]. *Analyst*, 2018, 143(16):3808-3813.
- [3] ZHAI J, LUWOR RB, AHMED N, et al. Paclitaxel-loaded self-assembled lipid nanoparticles as targeted drug delivery systems for the treatment of aggressive ovarian cancer[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(30):25174-25185.
- [4] 王子琪,王狄狮,李馨儒,等.紫杉醇的pH敏感聚合物胶束的制备及其体外释放研究[J].*中国新药杂志*, 2018, 27(4):459-464.
- [5] PARDEIKE J, HOMMOSS A, MÜLLER RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products[J]. *Int J Pharm*, 2009, 366(1/2):170-184.
- [6] CHAKRABORTY S, SHUKLA D, MISHRA B, et al. Lipid: an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 73(1):1-15.
- [7] FENG L, MUMPER RJ. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery[J]. *Cancer Lett*, 2013, 334(2):157-175.
- [8] LIN X, GAO R, ZHANG Y, et al. Lipid nanoparticles for chemotherapeutic applications: strategies to improve anti-cancer efficacy[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9(7):

LC-MS/MS法同时测定艾司奥美拉唑钠原料药及其制剂中3种杂质的含量^Δ

刘克锋^{1*}, 刘宇¹, 王雪芹², 赵杰^{1#} (1. 郑州大学第一附属医院药学部, 郑州 450002; 2. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)06-0775-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.06.11

摘要 目的: 建立同时测定艾司奥美拉唑钠原料药及其制剂中杂质E、杂质I和杂质IV含量的方法。方法: 采用液相色谱-串联质谱法。色谱柱为Agela VenusiL MP C₁₈, 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为0.2 mL/min, 柱温为35 ℃, 进样量为1 μL; 离子源为电喷雾离子源, 检测方式为负离子模式, 工作模式为多反应监测模式, 用于定量分析的离子对分别为m/z 360.1→194.0(杂质E)、m/z 375.8→210.7(杂质I)、m/z 330.2→312.1(杂质IV)。结果: 杂质E、杂质I、杂质IV检测质量浓度的线性范围分别为0.001 26~0.044 80 μg/mL($r=0.994 7$)、0.001 34~0.045 2 μg/mL($r=0.992 8$)、0.018 9~1.260 00 μg/mL($r=0.991 4$); 定量限分别为0.001 26、0.001 34、0.018 9 μg/mL, 检测限分别为0.000 41、0.000 44、0.006 3 μg/mL; 精密度、重复性试验的RSD均小于4%, 稳定性试验杂质E、杂质I的RSD<10% ($n=5$), 杂质IV的RSD>15% ($n=7$); 加样回收率分别为87.69%~100.72% ($RSD=4.29%$, $n=9$)、90.04%~100.63% ($RSD=3.67%$, $n=9$)、93.58%~101.86% ($RSD=2.66%$, $n=9$)。结论: 该方法准确、快速、灵敏、专属性强, 可用于同时测定艾司奥美拉唑钠原料药及其制剂中3种杂质的含量。

关键词 艾司奥美拉唑钠; 杂质E; 杂质I; 杂质IV; 液相色谱-串联质谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of 3 Impurities in Crude Drug and Preparation of Esomeprazole Sodium by LC-MS/MS

LIU Kefeng¹, LIU Yu¹, WANG Xueqin², ZHAO Jie¹ (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

- 767-781.
- [9] HAN C, YUE L, TAI L, et al. A novel small peptide as an epidermal growth factor receptor targeting ligand for nanodelivery in vitro[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013. DOI: 10.2147/IJN.S43627.
- [10] HAN C, LI Y, SUN M, et al. Small peptide-modified nanostructured lipid carrier distribution and targeting to EGFR overexpressing tumor in vivo[J]. *Artif Cells Nano-med Biotechnol*, 2014, 42(3):161-166.
- [11] 靳彩玲, 赵树鹏, 张敏, 等. 转铁蛋白修饰紫杉醇脂质体的制备及其抑瘤作用[J]. *中国药房*, 2016, 27(1):44-47.
- [12] WANG W, CHEN L, HUANG X, et al. Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2016, 18(2):1-8.
- [13] CAO J, HOU D, LU J, et al. Anti-tumor activity of exopolysaccharide from *Rhizopus nigricans* Ehrenb on S180 tumor-bearing mice[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(8):2098-2104.
- [14] 姜一朴, 滕晋莹, 胡金芳, 等. 小鼠H22、S180腹水模型临床检查特征研究[J]. *药物评价研究*, 2018, 41(8):1386-1390.
- [15] 李学涛, 程岚, 姜英, 等. 长春碱亲水基修饰阳离子脂质体对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(31):4339-4341.
- [16] OLERILE LD, LIU Y, BO Z, et al. Near-infrared mediated quantum dots and paclitaxel co-loaded nanostructured lipid carriers for cancer theragnostic[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017. DOI:10.1016/j.colsurfb.2016.11.032.
- [17] LIAO H, ZHAO X, QU J, et al. Matrine suppresses invasion and metastasis of NCI-H1299 cells by enhancing microRNA-133a expression[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7):10714-10722.
- [18] WANG J, CHEN S, XU S, et al. In vivo induction of apoptosis by fucoxanthin, a marine carotenoid, associated with down-regulating STAT3/EGFR signaling in sarcoma 180 (S180) xenografts-bearing mice[J]. *Mar Drugs*, 2012, 10(9):2055-2068.

Δ 基金项目: 中央引导地方科技发展专项项目(No. 豫财科[2016]149号)

* 主管药师。研究方向: 临床药理学和药动学。电话: 0371-66862018。E-mail: liukefeng-num.1@163.com

通信作者: 主任药师, 教授, 博士生导师。研究方向: 临床药理学和药动学。E-mail: zhaojie@zzu.edu.cn

(收稿日期: 2018-09-28 修回日期: 2019-01-22)

(编辑: 段思怡)