

文章编号:1001-6880(2015)1-0163-06

# PEG 修饰青蒿素脂质纳米粒的体外释放及抗巨噬细胞摄取特性

栾淑伟,赵青,程慧芳,王锐利,梁桂贤,张淑秋\*

山西医科大学药学院,太原 030001

**摘要:**研究聚乙二醇硬脂酸酯( $\text{PEG}_n\text{-SA}$ )修饰的青蒿素脂质纳米粒( $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$ )体外释放及抗巨噬细胞(J774)摄取特性。采用高压乳匀法制备 $\text{PEG}_n\text{-SA}$ ( $n=25, 40, 55$ )修饰的 $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$ 及未修饰的青蒿素脂质纳米粒(ART-NLC),进行体外释放试验、抗吞噬实验、利用Gouy-Chapmann理论计算固定水化层厚度(FALT),并加以比较。在pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)中,药物的体外释放度随 $\text{PEG}_n\text{-SA}$ 聚合度的改变而改变;加入血浆后,亦有改变。J774 细胞对 $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$ 的摄取量随 $\text{PEG}_n\text{-SA}$ 聚合度及 J774 细胞与制剂孵育时间的改变而改变;加入血浆孵育后,亦有改变。ART-NLC 及三种 $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$ 的固定水化层厚度分别为 0.31、1.76、1.86 和 2.04 nm。结果表明该制剂体外具有良好的缓释特性及抗 J774 细胞吞噬性。

**关键词:**青蒿素;脂质纳米粒;长循环;体外释放;吞噬细胞的摄取

中图分类号:R944

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.033

## PEGylated Nanostructured Lipid Carriers Loaded with Artemisinin: *in vitro* Releasing Characteristics and Uptake by Mononuclear Phagocyte Macrophage

LUAN Shu-wei, ZHAO Qing, CHENG Hui-fang, WANG Rui-li, LIANG Gui-xian, ZHANG Shu-qiu \*

Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

**Abstract:** Three long-circulating nanostructured lipid carriers loaded with artemisinin (ART) were prepared with polyethyleneglycol stearate of different polymerization degree ( $\text{PEG}_n\text{-SA}$ ,  $n=25, 40, 55$ ) by the high pressure homogenization method. The *in vitro* drug release, phagocytic uptake by J774 cells and fixed aqueous layer thickness (FALT) of nanostructured lipid carriers loaded with ART (ART-NLC) and three PEGylated nanostructured lipid carriers loaded with ART ( $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$ ,  $n=25, 40, 55$ ) were examined and compared. The profiles of ART release from ART-NLC and  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  were studied at pH 7.4 with or without human plasma by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and UV detection. The ART release from  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  increased as the increasing of polymerization degree of polyethyleneglycol (PEG). When plasma was added in release media, the ART *in vitro* releasing from NLCs was remarkably up-regulated. On the contrary, ART release was reduced as the increasing of polymerization degree of PEG. The ART *in vitro* phagocytic uptakes of  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLCs}$  by J774 cells were significantly lower than that of ART-NLC. ART phagocytic uptake by J774 cells increased as the increasing of polymerization degree of PEG or incubation time. Human plasma can noticeably up-regulate ART phagocytic uptake by J774 cells. The FALTs of ART-NLC and three  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  ( $n=25, 40, 55$ ) were 0.31 nm, 1.76 nm, 1.86 nm and 2.04 nm, respectively. These results suggested that the prepared artemisinin PEGylated nanostructured lipid carriers exhibited sustained release and anti-phagocytic uptake characteristics.

**Key words:** artemisinin; nanostructured lipid carriers; long-circulating; *in vitro* release; phagocytic uptake

青蒿素(artemisinin, ART)是从植物黄花蒿中提取分离得到的具有内过氧桥结构的倍半萜内酯类化合物<sup>[1]</sup>,为目前治疗疟疾的一线药物。该类药物因其特殊的化学结构,可减少血液中传播疟疾的疟原

虫配子体,主要作用于膜系结构,干扰了疟原虫的表膜-线粒体功能,阻断了宿主红细胞浆对疟原虫的营养供给,具有良好的临床效果。青蒿素在水中几乎不溶,现有的制剂主要有油针、片剂、栓剂等。本课题组将其制成青蒿素脂质纳米粒(artemisinin nanostructured lipid carrier, ART-NLC),制成冻干粉稳定性好,静脉注射给药后血药浓度平稳。

收稿日期:2014-01-08 接受日期:2014-03-14

基金项目:国家自然基金项目(81373364)

\* 通讯作者 Tel:86-351-4690140; E-mail: shuqiu\_zhang@126.com

纳米结构脂质载体(NLC)静脉注射给药存在一些问题:可被单核巨噬细胞(mononuclear phagocyte macrophage, MPM)吞噬,体内循环时间短,限制了其靶向给药。为了克服上述问题,充分利用NLC的载药优势,对其表面修饰成为近年来研究NLC的热点<sup>[2]</sup>。其中用聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)或其衍生物对NLC进行表面修饰的研究日益活跃,并将有良好的前景。由于PEG分子的亲水性和柔顺性,PEG修饰后NLC将较少受到调理素的调理,进而减少其被MPM识别吞噬的机会,体内循环时间延长,称为长循环纳米结构脂质载体(PEG-NLC)<sup>[3]</sup>。PEG-NLC具有长循环特性,再借助NLC控释作用,可以延长载药粒子在血液循环滞留时间,从而增强药物在血液循环系统中的被动靶向性和疗效<sup>[4]</sup>。

由于PEG-NLC的表面特性等理化性质是影响其体内命运的关键因素<sup>[5]</sup>。本研究在本实验室先前工作的基础上,构建3种不同聚合度的聚乙二醇硬脂酸酯(PEG<sub>n</sub>-SA, n=25、40、55)表面修饰的青蒿素脂质纳米粒(PEG<sub>n</sub>-ART-NLC),探讨PEG<sub>n</sub>-ART-NLC的体外释放及巨噬细胞(J774)摄取特性,为静脉注射PEG-NLC长循环给药系统提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品和试剂

青蒿素原料药(ART,重庆华立武陵山制药有限公司,纯度99.0%~101.0%,批号C00120130510);青蒿素标准品(中国食品药品检定研究所,批号20100609);中链甘油酸三酯(MCT,德国萨索尔);单硬脂酸甘油酯(GMS,天津市光复精细化工研究所,批号20130326);PEG<sub>n</sub>-硬脂酸酯(n=25、40、55)(梯希爱化成工业发展有限公司);聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH40,上海运宏化工制剂辅料有限公司);泊洛沙姆188(F68,德国巴斯夫);纯化水(Heal Force);巨噬细胞细胞株(J774,中科院上海细胞库);DMEM培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium)、胎牛血清(fetal bovine serum)购自Gibco公司;乙腈、甲醇(色谱纯,山东禹王试剂有限公司,批号2013061005);其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器

高效液相色谱仪(美国Agilent 1200);马尔文粒度仪(Malvern,1079008);高压乳匀机(APV-2000);

高速分散均质机(上海标本模型厂,FJ-200);台式离心机(上海安亭科学仪器厂,TDL-5-A);HY-2调速多用振荡器(江苏中大仪器厂);FA1104N电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);85-2数显恒温磁力搅拌器(荣华仪器制造有限公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 ART-NLC的制备

PEG<sub>n</sub>-ART-NLC和ART-NLC的处方见表1,处方筛选及工艺优化工作将另文报道。制备方法均采用高压乳匀法。

表1 PEG<sub>n</sub>-ART-NLC(n=25、40、55)及ART-NLC处方组成

Table 1 Formulations of ART long-circulating nanostructured lipid carriers (PEG<sub>n</sub>-ART-NLC, n = 25, 40, 55) and ART nanostructured lipid carrier (ART-NLC)

组分(g) Ingredient	PEG <sub>n</sub> -ART-NLC			ART-NLC
	PEG <sub>25</sub>	PEG <sub>40</sub>	PEG <sub>55</sub>	
ART	0.1503	0.1503	0.1503	0.1503
GMS	1.5028	1.5028	1.5028	1.8676
MCT	1.5028	1.5028	1.5028	1.5028
RH40	1.0508	1.0508	1.0508	1.0508
F68	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
PEGn-SA n=25	0.3648	-	-	-
n=40	-	0.3648	-	-
n=55	-	-	0.3648	-

#### 1.3.2 ART体外含量测定

采用本实验室已建立的HPLC柱后衍生化-UV检测方法<sup>[6]</sup>测定ART含量。青蒿素分子结构内无共轭基团,仅在紫外区203 nm处有较弱的末端吸收。与碱反应后,分子内的过氧桥结构被破坏,重排形成共轭结构,产物在289 nm处有最大吸收。由于反应有碱存在,损坏色谱柱,不宜直接进样,因此选用柱后衍生化法进行测定。

色谱条件如下:色谱柱:C<sub>18</sub>液相色谱柱(5 μm,150 mm×4.6 mm);流动相:乙腈-0.1 mol/L醋酸盐缓冲盐(77:23);流速:流动相0.7 mL/min,柱后衍生试剂(1 mol/L KOH 90%乙醇溶液)0.2 mL/min;柱温:30 °C;柱后反应温度:70 °C;进样量:20 μL;检测波长:289 nm。

#### 1.3.3 体外释放实验

##### 1.3.3.1 释放介质的选择

为研究ART-NLCs体外释放规律,经试验选用pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS)作释放介质。

### 1.3.3.2 ART-NLCs 体外释放

分别精密量取各 ART-NLCs 溶液 1 mL, 置于预先处理好的透析袋(截留相对分子质量 1~1.2 万)中, 平行操作 3 份, 扎紧袋口后, 完全放入装有 200 mL pH 7.4 PBS 溶液的磨口三角锥瓶中, 封口, 于  $(37 \pm 0.5)$  °C, 100 rpm 恒温振荡。在设定的不同时间点 1、2、3、4、6、8、12、24、36、48 h 分别取样 2 mL, 同时补加  $(37 \pm 0.5)$  °C 空白释放介质 2 mL。48 h 后, 将透析袋取出剪开, 转移到 10 mL 容量瓶中, 加入 5 mL 乙腈, 超声 5 min 使 NLC 完全破乳, 乙腈定容。以该溶液作为时间无穷大时刻的样品。0.45 μm 微孔滤膜过滤样品, 取续滤液 20 μL, 按“1.3.2”项 HPLC-柱后衍生化-UV 检测方法测定药物浓度。

### 1.3.3.3 考察透析袋对释放的影响

用乙腈配制 1.5 mg/mL ART 溶液, 精密量取该溶液 1 mL, 置于预先处理好的透析袋(截留相对分子质量 1~1.2 万)中, 按“1.3.3.2”项下操作进行。

### 1.3.3.4 考察血浆对释放的影响

另精密量取各 ART-NLCs 溶液 1 mL, 置于预先处理好的透析袋(截留相对分子质量 1~1.2 万)中, 随即加入 0.5 mL 人血浆, 混合均匀, 按“1.3.3.2”项下操作进行。

### 1.3.3.5 体外释放计算公式

按公式  $F(\%) = m_i/m_0 \times 100\%$  (1) 计算累计释放量。其中 F 为累计释放量,  $m_i$  为每个时间点的累计药物含量,  $m_0$  为 ART-NLCs 中药物的含量。

### 1.3.4 J774 细胞体外摄取实验<sup>[7]</sup>

#### 1.3.4.1 J774 细胞混悬液的制备

用含 10% 胎牛血清(FBS) DMEM 吹打混悬细胞, 稀释至细胞数  $1 \times 10^5 / \text{mL}$ 。

#### 1.3.4.2 PEG<sub>n</sub>-SA 聚合度对 J774 细胞体外摄取的影响

于离心管中分别加入 J774 细胞悬液 1 mL 和样品 0.5 mL(PEG<sub>n</sub>-ART-NLC 或 ART-NLC) ( $n = 5$ ), 以 0.5 mL 双蒸水作为对照组, 于  $(37 \pm 0.5)$  °C 水浴中 50 rpm 振摇 30 min, 取出后在冰浴中终止吞噬, 离心(1000 rpm, 5 min), 弃去上清液。用 pH 7.0 的 PBS 分次洗涤, 离心, 弃去上清后得 J774 细胞样品。

取离心分离后得到的 J774 细胞样品, 依次加入乙腈 400 μL, 超声粉碎(超声时间 1 s, 间隔 1 s, 超声 30 次), 3500 rpm 离心 15 min, 0.45 μm 微孔滤膜过滤样品上清液, 取续滤液 20 μL, 按“1.3.2”项 HPLC-柱后衍生化-UV 检测方法测定药物浓度。

$$\text{Uptake percentage} = W_u/W_t \times 100\% \quad (2)$$

上式中  $W_t$  为加入药物的总量,  $W_u$  为 J774 细胞摄取的药物量。

#### 1.3.4.3 蛋白吸附对 J774 细胞体外摄取的影响

另取 J774 细胞悬液 1 mL, 样品 0.5 mL (PEG<sub>n</sub>-ART-NLC 或 ART-NLC) 及血浆 0.5 mL, 按“1.3.4.2”项下操作进行。

#### 1.3.4.4 孵育时间对 J774 细胞体外摄取的影响

在  $(37 \pm 0.5)$  °C 分别孵育 0.5、1、2 h, 按“1.3.4.2”项下操作进行。

#### 1.3.5 估算水化层的厚度<sup>[7]</sup>

NLC 表面覆有柔顺的 PEG 长链, 亲水性的 PEG 链上具有很多亲水位点, 可吸附大量水分形成一层水分子的空间位阻, 称为固定水化层<sup>[8]</sup>。利用 Gouy-Chapmann 扩散双电层模型, 估算固定水化层厚度 (Fixed aqueous layer thickness, FALT), 公式如下:

$$\ln \xi = \ln A - KL = \ln A - \frac{\sqrt{C}}{0.3} \times L \quad (3)$$

其中,  $\xi$  为 Zeta 电位的绝对值, A 为常数, K 为 Debye-Hückel 参数, 等于  $\frac{\sqrt{C}}{0.3}$ , C 为电解质的浓度, L 为 FALT/nm。

以 0、0.01、0.05、0.1 mol/L 的 NaCl 电解质溶液将 ART-NLC、PEG<sub>25</sub>-ART-NLC、PEG<sub>40</sub>-ART-NLC 和 PEG<sub>55</sub>-ART-NLC 稀释, 测得 Zeta 电位, 代入公式 3 求算 L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 ART 体外含量测定

ART 在 2~20 μg/mL 浓度范围内线性关系良好, 标准曲线为  $A = 63.468x + 9.7071, r = 0.9999$ 。

ART 高、中、低 3 个浓度(18、10、5 μg/mL)的平均回收率分别为 99.6%、99.4%、99.3% ( $n = 3$ )。日内精密度(RSD)0.32%、1.17% 和 1.70% ( $n = 3$ )。

表 2 ART-NLCs 的包封率及载药量( $n = 3$ )

Table 2 Entrapment rate and drug-loading rate of ART-NLCs ( $n = 3$ )

样品 Sample	包封率 Entrapment efficiency (%)	载药量 Drug loading efficiency (%)
ART-NLC	$80.5 \pm 1.32$	$0.149 \pm 1.01$
PEG <sub>25</sub> -ART-NLC	$66.7 \pm 1.26$	$0.141 \pm 1.32$
PEG <sub>40</sub> -ART-NLC	$68.2 \pm 1.24$	$0.145 \pm 1.21$
PEG <sub>55</sub> -ART-NLC	$67.3 \pm 1.03$	$0.134 \pm 1.43$

5), 日间 RSD 0.67%、1.45% 和 1.82% ( $n = 3$ )。

ART-NLCs 的包封率及载药量见表 2。

## 2.2 体外释放实验

### 2.2.1 考察透析袋对释放的影响

ART 溶液在 4 h 内基本完全透过透析袋, 并测得药物溶液体外释放透析袋回收率, 为 (99.8 ± 0.90)%, 结果表明, 透析袋对 ART 脂质纳米粒的释放无限速作用。

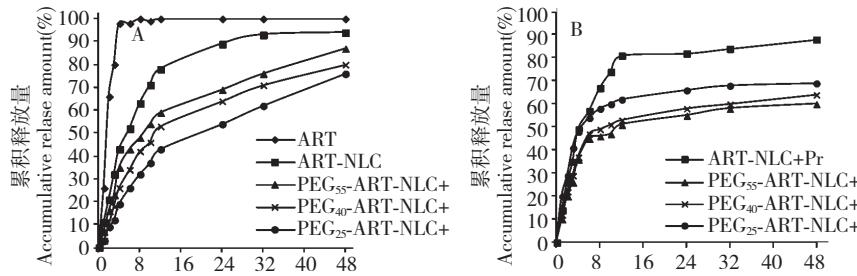


图 1 青蒿素体外释放曲线:(A)  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  ( $n = 25, 40, 55$ )、ART-NLC 和青蒿素溶液在 PBS 中的释放曲线;(B)  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  ( $n = 25, 40, 55$ ) 和 ART-NLC 在加入人血浆的 PBS 中的释放曲线( $n = 3$ )

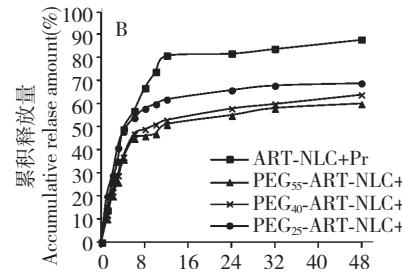
Fig. 1 *In vitro* release profiles of ART; (A) Release profiles of ART from  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  ( $n = 25, 40, 55$ ), ART-NLC and ART solution in PBS; (B) Release profiles of ART from  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  ( $n = 25, 40, 55$ ) and ART-NLC in PBS with human plasma ( $n = 3$ )

由图 1 中 A、B 可见, 随  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  聚合度增大,  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  ( $n = 0, 25, 40, 55$ ) 体外释放增加, 48 h 内分别释放了 94%、76%、80%、87%。加入人血浆后, ART-NLC、 $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  均比在未加入血浆的 PBS 中释放加快; 但随  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  聚合度增大,  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  ( $n = 0, 25, 40, 55$ ) 体外释放减少, 48 h 内分别释放了 88%、69%、64%、60%。

采用透析与血浆透析两种方法研究 ART-NLCs 体外释放, 结果表明不加血浆  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  ( $n = 25, 40, 55$ ) 三种制剂释放度随  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  聚合度的增大而增加, 其原因可能是 NLC 表面的  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  聚合度越大, 亲水性越强, 使得药物与 NLC 胶体溶液扩散层的亲和力增大, 更易于释放。血浆的加入使得 ART-NLC、 $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  ( $n = 25, 40, 55$ ) 四种制剂释放速度均明显加快, 其主要机理可能是由于血浆中多种蛋白成分迅速吸附于 NLC 表面, 发生相互作用, 影响了脂质的膜稳定性, 导致药物通透性有所增加; 血浆中其他成分如酶也可能促进药物从 NLC 中的释放速度。但  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  与血浆混合释放度降低的原因可能是  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  插嵌到 NLC 的表面, 形成一层厚厚的“云层”, 避免了纳米粒之间的聚集, 并阻止其他聚合物与之发生相互作用, 使  $\text{PEG}_n\text{-}$

### 2.2.2 $\text{PEG}_n\text{-SA}$ 聚合度对体外释放的影响

按“1.3.1”项下处方, 考察  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  的加入量不变, PEG 聚合度 n 分别为 25、40、55 时,  $\text{PEG}_{25}\text{-ART-NLC}$ 、 $\text{PEG}_{40}\text{-ART-NLC}$ 、 $\text{PEG}_{55}\text{-ART-NLC}$ 、ART-NLC 及青蒿素溶液的体外释放曲线, 结果见图 1 (A)。加入血浆后以上各制剂的体外释放曲线, 结果见图 1 (B)。



ART-NLC 膜更加稳定, 从而使药物不易被释放出来<sup>[9]</sup>。

### 2.3 J774 细胞体外摄取实验

与 ART-NLC 相比, J774 细胞对  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  的摄取量明显减小 ( $P < 0.01$ ), 并受  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  聚合度的影响,  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  含量一定时,  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  与 J774 细胞 37 °C 孵育分别 0.5、1、2 h 后, J774 细胞对  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  的摄取量均随  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  聚合度增大而降低。其中 J774 细胞对  $\text{PEG}_{55}\text{-ART-NLC}$  的摄取量明显小于  $\text{PEG}_{40}\text{-ART-NLC}$  和  $\text{PEG}_{25}\text{-ART-NLC}$  ( $P < 0.01$ )。

J774 细胞对  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  和 ART-NLC 的体外摄取作用受孵育时间的影响, 摄取量随孵育时间的延长而增大。分别在 1 h 和 2 h 后出现显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

J774 细胞对 ART-NLCs 体外细胞摄取作用受蛋白吸附的影响, 与不加血浆相比, 加入血浆后各试管中 J774 细胞对 ART-NLCs 的摄取量均明显增大 ( $P < 0.01$ ), 其中 J774 细胞对  $\text{PEG}_{25}\text{-ART-NLC}$  的摄取量要明显大于  $\text{PEG}_{40}\text{-ART-NLC}$  和  $\text{PEG}_{55}\text{-ART-NLC}$  ( $P < 0.01$ )。J774 细胞与 ART-NLCs 孵育不同时间后, 各时间点可见, 与不加血浆相比, 加入血浆后各

试管中 J774 细胞对  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  和 ART-NLC 的摄取量均明显增大( $P < 0.01$ )。

J774 细胞对  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  和 ART-NLC 的摄取结果见表 3, 图 2。

表 3 ART-NLCs 与 J774 细胞 37 °C 孵育 0.5 h 后摄取量的比较( $n = 5$ )  
Table 3 *In vitro* uptake of ART-NLC and  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  by J774 at 37 °C ( $n = 5$ )

样品 Samples	摄取率 <sup>△</sup> Uptake <sup>△</sup> /0 mL plasma (%)	抗吞噬率 <sup>△</sup> Change <sup>△</sup> (%)	摄取率 <sup>▽</sup> Uptake <sup>▽</sup> /0.5 mL plasma (%)	抗吞噬率 <sup>▽</sup> Change <sup>▽</sup> (%)
$\text{PEG}_{25}\text{-ART-NLC}$	$17.30 \pm 1.9^*$	55.91	$38.50 \pm 1.9^*$	52.05
$\text{PEG}_{40}\text{-ART-NLC}$	$15.52 \pm 2.1^*$	60.45	$18.30 \pm 2.2^*$	77.21
$\text{PEG}_{55}\text{-ART-NLC}$	$8.32 \pm 2.6^*$	78.80	$16.90 \pm 2.4^*$	78.95
ART-NLC	$39.24 \pm 1.4$	0.00	$80.30 \pm 1.2$	0.00
control	0.00	-	0.00	-

注: change percentage = (ART-NLC uptake value -  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  uptake value) / ART-NLC uptake value × 100%, 与 ART-NLC 相比 \*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with ART-NLC, \*  $P < 0.01$ .

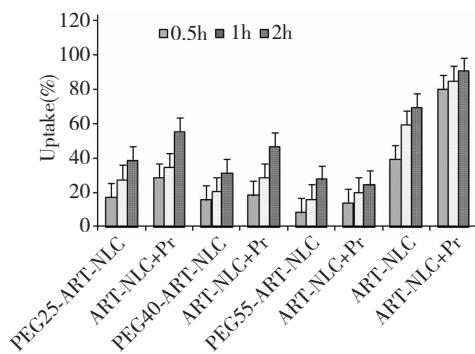


图 2 37 °C J774 细胞与 ART-NLCs 分别孵育 0.5、1、2 h 后的摄取量( $n = 5$ )

Fig. 2 Uptake of ART-NLCs by J774 after incubation at 37 °C for 0.5, 1 and 2 h ( $n = 5$ )

体外巨噬细胞摄取实验是体外评价 PEG-NLC 长循环能力的常用方法<sup>[3]</sup>。

机体 MPS 系统识别异物的机制为<sup>[9]</sup>:当异物进入体内后多种蛋白成分迅速吸附于纳米粒表面。若增加纳米粒的表面亲水性,就可减少调理素(蛋白质)的吸附,因此 PEG 的亲水性柔韧长链及其高密度覆盖层是减小蛋白吸附的必要条件。

J774 细胞对  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  与 ART-NLC 的摄

取量相比,  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  表面修饰的 NLC 表现出显著的抗吞噬性,可能是用  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  对 ART-NLC 进行表面修饰后,PEG 长链的柔韧性使  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  的空间结构时刻发生变化而使 J774 细胞难以对其产生有效的识别,从而使 J774 细胞对  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  的摄取减少。一般而言,PEG 长链的长度越长,其柔韧性越好,其抵抗细胞摄取的作用越强,本实验可见随  $\text{PEG}_n\text{-SA}$  ( $n = 25, 40, 55$ ) 聚合度增大,J774 细胞对  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  的摄取量增加。高哲等<sup>[10]</sup>的研究获得了同样的结果,可能与  $\text{PEG}_n\text{-ART-NLC}$  具有较厚的表面固定水化层和较高的 PEG 链密度和较强的干扰蛋白吸附到脂质纳米粒表面的能力有关<sup>[7]</sup>。

## 2.4 固定水化层厚度的估算

以 0、0.01、0.05、0.1 mol/L 的 NaCl 电解质溶液稀释  $\text{PEG}_{25}\text{-ART-NLC}$ 、 $\text{PEG}_{40}\text{-ART-NLC}$  和  $\text{PEG}_{55}\text{-ART-NLC}$ , 测得 Zeta 电位结果见表 4。根据公式 3 将  $\ln\xi$  对  $\frac{1}{C}$  进行线性回归, 见图 3, 其斜率即为 L。ART-NLC、 $\text{PEG}_{25}\text{-ART-NLC}$ 、 $\text{PEG}_{40}\text{-ART-NLC}$  和  $\text{PEG}_{55}\text{-ART-NLC}$  的固定水化层厚度 L 分别为 0.31、1.76、1.86 和 2.04 nm。

表 4 ART-NLCs 在不同 NaCl 浓度下的 Zeta 电位  
Table 4 Zeta potential of ART-NLCs in different concentrations of NaCl

NaCl (mol/L)	ART-NLC (mV)	$\text{PEG}_{25}\text{-ART-NLC}$ (mV)	$\text{PEG}_{40}\text{-ART-NLC}$ (mV)	$\text{PEG}_{55}\text{-ART-NLC}$ (mV)
0	$-42.8 \pm 1.24$	$-23.4 \pm 1.25$	$-25.3 \pm 1.27$	$-21.8 \pm 1.54$
0.01	$-38.6 \pm 1.30$	$-15.1 \pm 1.34$	$-13.2 \pm 1.25$	$-13.5 \pm 1.32$
0.05	$-33.7 \pm 1.01$	$-6.73 \pm 0.78$	$-5.86 \pm 1.43$	$-4.38 \pm 1.26$
0.1	$-30.8 \pm 0.89$	$-3.77 \pm 0.67$	$-3.63 \pm 0.98$	$-2.85 \pm 1.20$

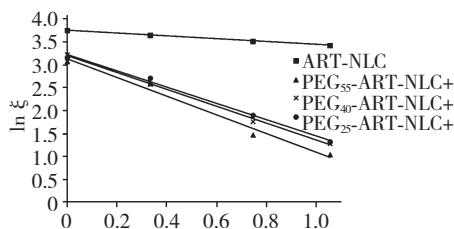


图3  $\ln \xi$  对  $\frac{C}{0.3}$  的线性回归

Fig. 3 Regression of  $\ln \xi$  to  $\frac{C}{0.3}$

L是影响PEG表面修饰长循环给药系统的重要表面性质,增加L可显著延长粒子的体内循环时间。PEG<sub>n</sub>-SA含量相同时,随着PEG<sub>n</sub>-SA聚合度的增加,PEG<sub>n</sub>-ART-NLC Zeta电位(绝对值)减小,L增大,体外J774细胞摄取减少。可见PEG<sub>n</sub>-SA对ART-NLC的修饰作用,与PEG<sub>n</sub>-SA在ART-NLC表面的空间结构密切相关。

根据Needham的模型<sup>[11]</sup>,L可体现PEG链在纳米粒表面的长度;Needham认为,PEG可在纳米粒表面形成“线型”或“蘑菇”样的构型,在线性构型中,PEG链是舒展的,理论上聚合度为40的PEG线型构型的链长为16.7 nm,而实际上,PEG链在纳米粒表面往往以弯曲、折叠、压缩的形式存在,即“蘑菇”样构型,PEG<sub>25</sub>-ART-NLC、PEG<sub>40</sub>-ART-NLC和PEG<sub>55</sub>-ART-NLC形成的固定水化层分别仅有1.76 nm、1.86 nm和2.04 nm;“蘑菇”样构型对PEG<sub>n</sub>-ART-NLC有两方面的影响:其一,PEG链减少了其摆动的可能性,也就是说PEG链的柔韧性下降;其二,表观上增加了单位PEG链对纳米粒表面的覆盖面积,从而一定程度上增加了保护作用<sup>[12]</sup>。

本研究为构建PEG<sub>n</sub>-SA表面修饰的NLC长循环给药系统提供了理论和实验依据,下一步本文拟进行不同PEG<sub>n</sub>-ART-NLC体内动力学的比较性研究,证明PEG表面修饰青蒿素脂质纳米粒具有长循环作用,将另文报道。

## 参考文献

1 Liu JM(刘静明), Ni MY(倪慕云), Fan JF(樊菊芬), et al. The structure and reaction of Qinghaosu. *Acta Chem Sin*(化学学报), 1979, 37:129-141.

- 2 Zhang XX, Pan WS, Gan L, et al. Preparation of a dispersible PEGylate nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with 10-hydroxycamptothecin by spray-drying. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56:1645-1650.
- 3 Yu L(于莲), Cui D(崔丹), Ying XY(应晓英), et al. Research progress in drug delivery of surface modified lipid nanoparticles. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2011, 28:108-112.
- 4 Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, 2001, 70(122):1-20.
- 5 Bures P, Huang Y, Oral E, et al. Surface modifications of molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications. *J Control Release*, 2001, 72(123):25-33.
- 6 Gao WQ(高伟祺), Luan SW(栾淑伟), Wang RL(王锐利), et al. Determination of equilibrium solubility and apparent octanol/water partition coefficient of artemisinin in different solvents. *Drug Eval Res*(药物评价研究), 2013, 36:35-38.
- 7 Fang C(方超), Shi B(施斌), Hong MH(洪鸣凰), et al. Influence of particle size and MePEG molecular weight on in vitro macrophage uptake and in vivo long circulating of stealth nanoparticles in rats. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2006, 41:305-312.
- 8 Sadzuka Y, Nakade A, Hirama R, et al. Effects of mixed polyethyleneglycol modification on fixed aqueous layer thickness and antitumor activity of doxorubicin containing liposome. *Int J Pharm*, 2002, 238:171-180.
- 9 Xiong YX(熊迎新), Yin ZN(尹宗宁). Effect of surface modification on target-oriented drug delivery systems. *Chin New Drug J*(中国新药杂志), 2004, 13:1275-1279.
- 10 Gao Z(高哲), Chen J(陈建). The inference of PEG modified solid lipid nanoparticles on biotransport in gastrointestinal tract and elimination in vivo. *J Tongji Univ*(同济大学学报,医学版), 2011, 32:35-39.
- 11 Needham D, Stoicheva N, Zhelev DV. Exchange of monooleoyl phosphatidyl-choline as monomer and micelle with membranes containing poly(ethylene glycol)-lipid. *Biophys J*, 1997, 73:2615-2629.
- 12 Zhang XX(张馨欣), Pan WS(潘卫三), Gan Y(甘勇), et al. In vitro and in vivo study of long-circulating nanostructured lipid carries containing hydroxycamptothecin //The Sixth Pharmaceutical Association Annual(第六届中国药学会学术年会论文集). Guangzhou, 2006. 1926-1938.