

海藻酸钠包覆的降钙素脂质体的制备和体内外黏附性质

黄爱文¹, 竹内洋文², 肖衍宇¹, 孙敏捷¹, 平其能^{1*}, 牛江秀¹, 苏志桂¹

(¹中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009; ²岐阜药科大学制剂学实验室, 岐阜 502-8585, 日本)

摘要 制备海藻酸钠包覆的脂质体, 并对其黏膜黏附性质进行研究。采用薄膜水化法制备了包封率为(86.2 ± 2.3)%的带正电荷的降钙素脂质体, 并用不同黏度的海藻酸钠对脂质体进行包覆, 包覆后的脂质体实现了电荷反转。通过黏蛋白-颗粒结合法、组织匀浆法和激光共聚焦显微镜法分别对海藻酸钠包覆脂质体的体内外黏附性质进行研究, 黏蛋白-颗粒结合法研究结果表明: 海藻酸钠可以与黏蛋白颗粒结合使其电位发生变化, 组织匀浆法研究结果表明: 海藻酸钠包覆脂质体能够增加肠道中荧光标记物的含量, 并且随着海藻酸钠黏度的增加, 肠道中荧光标记物的含量增大。激光共聚焦显微镜法研究表明: 高黏度的海藻酸钠包覆脂质体与未包覆脂质体相比表现出了更强的荧光强度, 海藻酸钠包覆脂质体与未包覆脂质体相比具有良好的黏膜黏附特性, 且这一特性随着海藻酸钠黏度的增加而增大。

关键词 海藻酸钠; 降钙素脂质体; 黏膜黏附; 激光共聚焦

中图分类号 R944 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2011)05-0423-05

Preparation of sodium alginate coated calcitonin liposome and its mucoadhesive properties *in vitro* and *in vivo*

HUANG Ai-wen¹, TAKEUCHI Hirofumi², XIAO Yan-yu¹, SUN Min-jie¹, PING Qi-neng^{1*}, NIU Jiang-xiu¹, SU Zhi-gui¹

¹Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

²Laboratory of Pharmaceutical Engineering, Gifu Pharmaceutical University, Gifu 502-8585, Japan

Abstract The aim of this study was to prepare sodium alginate coated liposome containing calcitonin and to study its mucoadhesive properties *in vitro* and *in vivo*. The positive charged liposome containing calcitonin was prepared through thin film hydration with the entrapment efficiency of (86.2 ± 2.3)%. The non-coated liposome was coated with sodium alginate solution with various viscosity to get the sodium alginate coated liposome and the Zeta potential of sodium alginate coated liposome switched to negative charge. The *in vitro* and *in vivo* mucoadhesive properties were evaluated by ss-mucin particle method, tissue homogenation and confocal laser scanning microscopy. It was shown that sodium alginate attached to the mucin particles changed the Zeta potential of them. Furthermore, the quantity of the fluorescent material in rat intestinal tissue increased when the liposome was coated with sodium alginate. With the increase of the viscosity of sodium alginate, the higher quantity of the fluorescent material was observed. The images of confocal laser scanning microscopy also showed that the sodium alginate coated liposome showed stronger intensity of fluorescence than non-coated liposome. In conclusion, sodium alginate coated liposome had better mucoadhesion than non-coated liposome and the viscosity of sodium alginate could increase the mucoadhesion.

Key words sodium alginate; calcitonin loaded liposome; mucoadhesion; confocal laser scanning microscopy

This project was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2009300)

随着生物化学与生物技术的发展,大量具有较强生物学活性的蛋白及多肽类药物不断涌现。这类药物具有活性高、用量少、不良反应小等优点,但这类药物也存在着相对分子质量大、多数为水溶性、半衰期短、膜透过性差、易降解不稳定、对制剂处方工艺要求高等缺点,使临床应用受到极大的限制^[1-2]。目前临床上常用的剂型为注射用溶液剂和冻干粉针剂,给药途径单一,给药间隔短,患者的顺应性差。因此,研制开发蛋白质多肽类药物新剂型和制剂新技术,增加药物的稳定性、延长其半衰期、增加它的膜通透性,使其更好地应用于疾病的预防和治疗,已成为现代药剂学的热点之一。

目前提高蛋白或多肽口服生物利用度的方法包括使用酶抑制剂、应用吸收促进剂、采用新型的给药载体与递送系统,如微囊、脂质体、纳米粒,以及结肠定位给药系统与生物黏附型给药系统(bio-adhesive drug delivery system, BDDS)等^[3-12]。生物黏附型脂质体口服递送系统结合了脂质体与生物黏附技术两者的优势,在蛋白与多肽口服递送的应用方面具有巨大的前景^[13-15]。

海藻酸钠是由褐藻提取出来的水溶性直链聚多糖海藻酸的钠盐,具有良好的生物相容性和生物可降解性。Chang等^[16]与Kwok等^[17]研究表明海藻酸具有很强的生物黏附性质,其生物黏附能力与已知的具有很强的生物黏附能力的聚合物(如壳聚糖、聚苯乙烯、羧甲基纤维素以及聚乳酸)相比也毫不逊色。鲑鱼降钙素是由32个氨基酸组成的多肽类激素药物,具有调节钙代谢,抑制甲状旁腺素的作用,能显著地降低高周转性骨病的骨钙丢失。本文选用鲑鱼降钙素为多肽类模型药物,制备了载有降钙素的海藻酸钠包覆脂质体,对其理化性质进行评价,并研究了其体内外黏附性质。

1 材料

1.1 试剂

二硬脂酸磷脂酰胆碱(DSPC,日本Nippon油脂公司);十八胺(SA,日本Tokyo Kasei公司);胆固醇(Chol)、香豆素(C6)、1-1'-二(十八烷基)-3,3',3'-四甲基吡啶羧基花青高铝酸盐(DiI)、猪胃黏膜蛋白(Mucin)(美国Sigma公司);降钙素(日本Asahi化学公司);海藻酸钠(Algi,黏度:0.08~0.12 Pa·s,0.5~0.6 Pa·s,1 Pa·s,日本Wako Pure

化学工业公司);Micro BCA™蛋白测定试剂盒(美国Pierce公司);OCT包埋剂(日本樱花公司)。

1.2 仪器

探头超声仪(Sonifier 250,美国Branson公司);Zetasizer Nano ZS马尔文激光粒度仪(英国马尔文公司);SCP85H超速离心机,F3010荧光分光光度计(日本日立公司);组织匀浆机(美国Omni TH公司);酶联免疫测定仪(美国赛默飞世尔公司);冷冻切片机(日本莱卡公司);LSM510激光共聚焦显微镜(德国卡尔蔡司公司)。

1.3 动物

雄性Wistar大鼠,180~220 g,由日本SLC动物中心提供。

2 方法

2.1 海藻酸钠包覆脂质体的制备

参考Takeuchi等^[18]的制备方法将DSPC,SA和胆固醇按8:0.2:1的物质的量比溶于适量氯仿中,在40℃水浴下旋转蒸发除去有机溶剂在茄形瓶上形成均匀薄膜。用适当的水合介质在70℃水浴中浸浴10 s,涡旋洗脱,重复3次,10℃水浴孵育1 h,冰水浴中探头超声200 W,5 min即得空白脂质体。载药脂质体的制备是将水合介质换成降钙素溶液后水合,超声制得。C6或DiI标记的脂质体的制备过程基本同上,只是将脂溶性的荧光物质C6或DiI在制备脂质膜时加入后形成脂质膜。

海藻酸钠对脂质体的包覆过程是通过静电作用完成的。将上述未包覆脂质体逐滴滴加到等体积的海藻酸钠溶液中,室温下磁力搅拌1 h即得海藻酸钠包覆脂质体(Algi-Lip)。

2.2 海藻酸钠包覆脂质体的性质研究

制得的未包覆脂质体和包覆脂质体的粒径和电位用激光粒度分析仪测定。载有降钙素的脂质体的包封率的测定方法如下:取适量载药脂质体,在4℃以75 000 r/min的转速超速离心45 min,取上清液用蛋白测定试剂盒测定降钙素含量。包封率(EE)的计算公式为:EE(%) = [(A_i - A_s)/A_i] × 100。其中A_i是降钙素理论加入量,A_s是上清液中游离降钙素量。

2.3 黏蛋白-颗粒结合法评价海藻酸钠体外黏附性质

以黏蛋白-颗粒结合法评价海藻酸钠的体外黏

附性质^[18-19]。取猪胃黏膜蛋白溶于磷酸盐缓冲液(PBS, pH 6.8)中,配成浓度为1%的混悬液,搅拌过夜使之充分混悬。将黏蛋白混悬液在冰水浴中探头超声10 min后以5 000 r/min的转速离心15 min,取上清液稀释到浓度为0.5%,经粒径仪测定其粒径为 (146.7 ± 2.8) nm,即可得到亚微米级黏蛋白混悬液。将不同浓度的海藻酸钠PBS溶液(pH 6.8)加入上述黏蛋白混悬液中,37℃孵育2 h后测定其电位变化。

2.4 组织匀浆法评价海藻酸钠包覆脂质体的体内黏附性质

2.4.1 检测条件 选择荧光分光光度法测定组织样品中荧光物质DiI的含量。检测条件:激发波长550 nm,光栅1.5 nm;发射波长570 nm,光栅3 nm;平均时间10 s;响应2 s。

2.4.2 组织样品的处理 肠段组织取出后,精密称重,每克样品加入生理盐水5 mL,后用组织匀浆机粉碎,取组织混悬液300 μ L,加入氯仿-甲醇(1:1)6 mL,放入摇床中避光振摇40 min,3 500 r/min离心10 min后取上清液用荧光分光光度计测定。

2.4.3 标准曲线的制备 精密称取DiI配制成浓度为275,550,1 100,2 200,4 400,8 800 ng/mL的标准系列溶液。精密移取空白组织匀浆0.3 mL,分别加入以上标准系列溶液30 μ L,使组织匀浆中的DiI浓度为25,50,100,200,400,800 ng/mL,按“2.4.2”项下方法处理样品,“2.4.1”项下方法进行测定,以荧光强度 F 对DiI浓度进行线性回归,得标准方程。

2.4.4 绝对回收率 分别取空白组织匀浆0.3 mL,加入高、中、低3种不同浓度的DiI标准液,混匀,配制成浓度为25,200,800 ng/mL的组织匀浆样品,按“2.4.2”项下方法处理样品,“2.4.1”项下方法进行测定,记录荧光强度 F_x 。

另外,用纯水代替空白组织匀浆,重复以上步骤,记录荧光强度 F_s 。由 F_x 与 F_s 的比,计算绝对回收率:绝对回收率(%) = $F_x/F_s \times 100$ 。

2.4.5 相对回收率 分别取空白组织匀浆0.3 mL,加入高、中、低3种不同浓度的DiI标准液,混匀,配制成浓度为25,200,800 ng/mL的组织匀浆样品,按“2.4.2”项下方法处理样品,“2.4.1”项下方法进行测定,记录荧光强度。将荧光强度带入标准

曲线计算DiI的浓度,与理论值进行比较,计算相对回收率。

2.4.6 方法精密密度 分别取空白组织匀浆0.3 mL,加入不同浓度的DiI溶液,配制成低(25 ng/mL)、中(200 ng/mL)、高(800 ng/mL)浓度的样品各3份。按“2.4.2”项下的方法处理后,同日内平行测定3次,连续测定3 d,计算日内和日间精密密度。

2.4.7 给药方案 取实验前禁食48 h的雄性Wistar大鼠12只,随机分成4组,每组3只,分别灌胃给予DiI标记(DiI最终浓度为200 mg/mL)的未包覆脂质体(DiI-non-Lip)以及不同黏度的海藻酸钠包覆脂质体(DiI-Algi-Lip)1 mL,给药后4 h处死,分别取其十二指肠、空肠、回肠,准确称重,每个肠段按“2.4.2”项下方法处理样品,“2.4.1”项下方法进行测定,计算每个肠段中DiI的含量。

2.5 激光共聚焦显微镜法(CLSM)评价海藻酸钠包覆脂质体的体内黏附性质

取实验前禁食48 h的雄性Wistar大鼠6只,随机分成2组,每组3只,分别灌胃给予C6(C6的最终浓度为50 μ g/mL)标记的未包覆脂质体(C6-non-Lip)以及黏度为1 Pa·s的海藻酸钠包覆脂质体(C6-Algi-Lip)1 mL,给药后4 h处死,分别取其十二指肠、空肠、回肠部位,冷冻切片后用激光共聚焦显微镜观察拍照(激发波长:488 nm)。

3 结果与讨论

3.1 海藻酸钠包覆脂质体的性质研究

不同黏度与浓度的海藻酸钠包覆脂质体后的粒径,电位变化参见图1(A-C)。制备的空白阳离子脂质体电位为 (13.85 ± 0.44) mV,粒径和多分散系数分别为 (95.16 ± 0.54) nm与 0.20 ± 0.02 。由图可见,空白阳离子脂质体与海藻酸钠溶液混合搅拌1 h后,脂质体的粒径明显增大,电位也由正变负,实现了电荷反转,这说明海藻酸钠能成功的包覆在阳离子脂质体的表面,从而使得包覆后的脂质体的表面性质发生变化。随着聚合物浓度的增加,脂质体的粒径增大,电位也逐渐下降,直至达到饱和吸附。经过计算,载有降钙素的未包覆脂质体的包封率为 (86.2 ± 2.3) %。

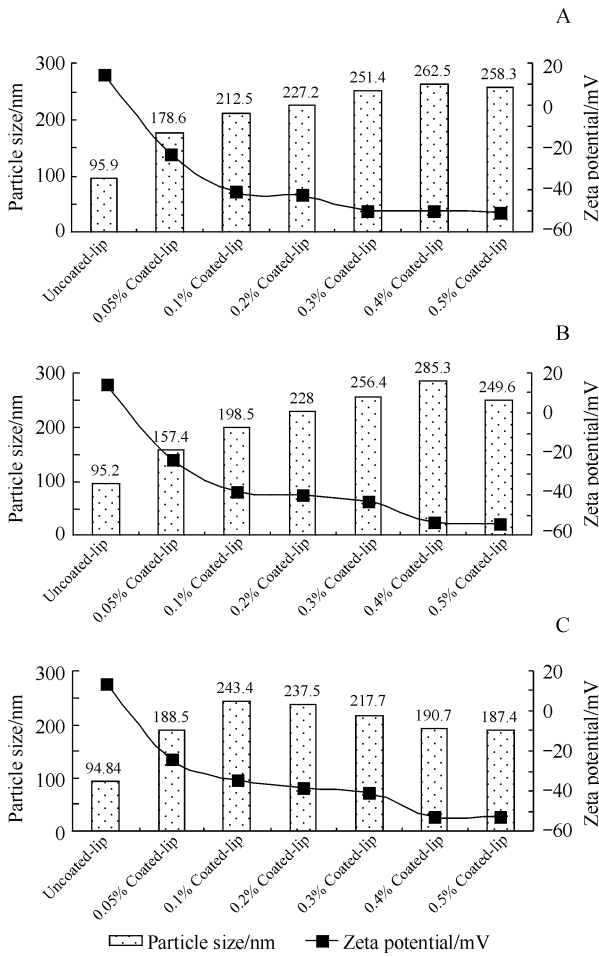


Figure 1 Particle size and Zeta potential of various sodium alginate coated liposomes
 A: Sodium alginate with viscosity of 0.08-0.12 Pa·s; B: Sodium alginate with viscosity of 0.5-0.6 Pa·s; C: Sodium alginate with viscosity of 1 Pa·s

3.2 黏蛋白-颗粒结合法评价海藻酸钠体外黏附性质

海藻酸钠的体外黏附性质采用黏蛋白-颗粒结合法进行评价。黏蛋白混悬液与不同浓度,不同黏度的海藻酸钠溶液孵育后的电位变化如图 2 所示。结果表明,在与海藻酸钠溶液共同孵育 2 h 后,黏蛋白微粒的负电性增强,且随海藻酸钠溶液浓度的增加而逐渐增强,这说明在 pH 6.8 的 PBS 环境中海藻酸钠对黏蛋白颗粒具有良好的黏附性,可以稳定的吸附在黏蛋白的表面从而改变其表面电荷。

3.3 组织匀浆法评价海藻酸钠包覆脂质体的体内黏附性质

3.3.1 标准曲线的制备 以荧光强度 F 对 DiI 浓度进行线性回归,得标准曲线。线性回归结果表

明,在 0 ~ 800 ng/mL 的范围内,组织匀浆中 DiI 浓度与荧光强度有良好的线性关系,标准曲线方程为: $F = 0.0021c + 1.7592$,相关系数 $r = 0.999$ 。

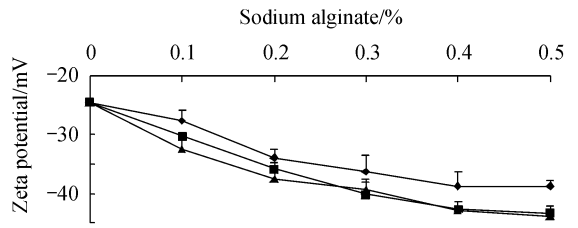


Figure 2 Zeta potential of ss-mucin particles in the solution of sodium alginate with various viscosity and concentration (PBS, pH 6.8)

3.3.2 精密度与回收率测定 在标准曲线范围内,方法的日内,日间精密度良好, RSD 均小于 3%。绝对回收率和相对回收率分别为 94% ~ 100% 和 95% ~ 103%,符合生物分析要求。

3.3.3 各肠段中 DiI 含量 大鼠灌胃给予 DiI 标记的未包覆脂质体和不同黏度的海藻酸钠包覆脂质体后,测定 4 h 时间点时各肠段 DiI 浓度,计算各肠段 DiI 含量。结果见图 3。结果表明,与未包覆的脂质体相比,海藻酸钠包覆脂质体能够显著提高制剂在肠道的滞留时间,其延长肠道滞留时间的作用随着海藻酸钠的黏度增加而增大。同一个制剂在不同的肠段的黏附行为也不同。给药 4 h 后,脂质体主要集中在回肠部位,使得该部位 DiI 含量明显高于十二指肠和空肠,这是由于回肠部位分布着较多的派尔集合淋巴结 (Peyer's patch) 对粒径较小的纳米制剂能产生摄取作用。Kim 等^[20]也证明了负电性的海藻酸钠微粒能够被 Peyer's patch 摄取。

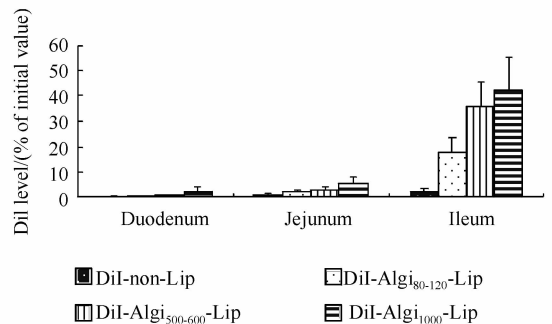


Figure 3 Adhesive percentage (%) of 1'-diiodo-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) labeled liposomal formulations to the different intestinal segments of rats at 4 h after intragastric administration
 Algi₈₀₋₁₂₀, Algi₅₀₀₋₆₀₀, Algi₁₀₀₀: sodium alginate with viscosity of 0.08-0.12 Pa·s, 0.5-0.6 Pa·s and 1 Pa·s, respectively

3.4 激光共聚焦显微镜法评价海藻酸钠包覆脂质体的体内黏附性质

大鼠灌胃给予 C6 标记的未包覆脂质体 (C6-non-Lip) 和黏度为 $1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ 的海藻酸钠包覆脂质体 (C6-Algi₁₀₀₀-Lip) 后 4 h 的各肠段切片的激光共聚焦显微镜照片显示,同一时间点海藻酸钠包覆脂质体在各肠段的荧光强度明显大于未包覆的脂质体,这说明海藻酸钠包覆的脂质体表现出了更强的黏膜黏附和穿透特性,尤其是在回肠段,海藻酸钠包覆脂质体不仅在黏膜侧有黏附和渗透,同时在基底侧也表现出了较强的荧光强度。这一结果也与“3.3”项中的结果相呼应,证明了海藻酸钠包覆脂质体对大鼠肠道有着更好的黏附和渗透作用,并且在回肠段有着最强的黏附和渗透作用。

体内黏附性质研究结果表明海藻酸钠具有良好的黏附特性,且这一特性随着黏度的增加而增大,这是由海藻酸钠的性质决定的。海藻酸钠是含有羧基基团的亲水性聚合物,它与黏蛋白之间可以通过氢键作用、范德华力作用及相互缠结表现出黏附能力。虽然海藻酸钠与黏液层一样带有负电荷,但两者的结合力大于其静电斥力,因此仍表现为较强的黏附性能。

4 结 论

本实验制备了包封率为 86.2% 的载有降钙素的脂质体并以海藻酸钠为包覆材料进行包覆,研究了其理化性质和体内外黏附性质。结果表明高黏度的海藻酸钠包覆脂质体具有良好的黏附和促渗透作用,可以作为多肽、蛋白质及核酸类亲水性大分子口服递送的有效载体。

参 考 文 献

- [1] Woodley JF. Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1994, **11** (2/3): 61-95.
- [2] Mahato RI, Narang AS, Thoma L, et al. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2003, **20** (2/3): 153-214.
- [3] Werle M, Makhlof A, Takeuchi H. Oral protein delivery: a patent review of academic and Industrial approaches [J]. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2009, **3** (2): 94-104.
- [4] Woitiski CB, Carvalho RA, Ribeiro AJ, et al. Strategies toward the improved oral delivery of insulin nanoparticles via gastrointestinal uptake and translocation [J]. *BioDrugs*, 2008, **22** (4): 223-237.
- [5] Chalasani KB, Russell-Jones GJ, Jain AK, et al. Effective oral delivery of insulin in animal models using vitamin B12-coated dextran nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2007, **122** (2): 141-150.
- [6] Martins S, Sarmiento B, Ferreira DC, et al. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery — liposomes versus lipid nanoparticles [J]. *Int J Nanomedicine*, 2007, **2** (4): 595-607.
- [7] Malik DK, Baboota S, Ahuja A, et al. Recent advances in protein and peptide drug delivery systems [J]. *Curr Drug Deliv*, 2007, **4** (2): 141-151.
- [8] Sinha V, Singh A, Kumar RV, et al. Oral colon-specific drug delivery of protein and peptide drugs [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2007, **24** (1): 63-92.
- [9] Turker S, Onur E, Ozer Y. Nasal route and drug delivery systems [J]. *Pharm World Sci*, 2004, **26** (3): 137-142.
- [10] Werle M, Makhlof A, Takeuchi H. Carbopol-lectin conjugate coated liposomes for oral peptide delivery [J]. *Chem Pharm Bull*, 2010, **58** (3): 432-434.
- [11] Kim BY, Jeong JH, Park K, et al. Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-microparticle conjugates in oral insulin delivery system [J]. *J Control Release*, 2005, **102** (3): 525-538.
- [12] Pan Y, Li YJ, Zhao HY, et al. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin *in vivo* [J]. *Int J Pharm*, 2002, **249** (1/2): 139-147.
- [13] Wong TW. Design of oral insulin delivery systems [J]. *J Drug Target*, 2010, **18** (2): 79-92.
- [14] Jintapattanakit A, Junyaprasert VB, Kissel T. The role of mucoadhesion of trimethyl chitosan and PEGylated trimethyl chitosan nanocomplexes in insulin uptake [J]. *J Pharm Sci*, 2009, **98** (12): 4 818-4 830.
- [15] Cone RA. Barrier properties of mucus [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61** (2): 75-85.
- [16] Chang H, Park H, Kelly P, et al. Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers [J]. *J Pharm Sci*, 1985, **74** (4): 399-405.
- [17] Kwok KK, Groves MJ, Burgess DJ. Sterile microencapsulation of BCG in alginate-poly-L-lysine by an air spraying technique [J]. *Proc Int Symp Control Release Bioact Mater*, 1989, **16**: 341-344.
- [18] Takeuchi H, Thongborisute J, Matsui Y, et al. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, **57** (11): 1 583-1 594.
- [19] Thongborisute J, Takeuchi H. Evaluation of mucoadhesiveness of polymers by BIACORE method and mucin-particle method [J]. *Int J Pharm*, 2008, **354** (1/2): 204-209.
- [20] Kim B, Bowersock T, Griebel P, et al. Mucosal immune responses following oral immunization with rotavirus antigens encapsulated in alginate microspheres [J]. *J Control Release*, 2002, **85** (1/3): 191-202.