

胆固醇对脂微球与人血清白蛋白相互作用的影响

李玲燕, 吴兴杰, 陈英, 王玉娥, 贺智勇, 沈祥春*, 陶玲*

贵州医科大学药学院, 贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心, 贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室, 贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室, 天然药物资源优效利用重点实验室, 贵州 贵阳 561113

摘要: 目的 研究胆固醇(CH)对脂微球(LM)与人血清白蛋白(HSA)形成蛋白晕的影响。方法 采用高速剪切-高压均质两步乳化法制备LM及含CH的CH@LM后,分别将相同体积但不同浓度(8、12、24、36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的HSA溶液与等体积不同质量浓度(10.76、15.37、26.90、35.87、53.80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的LM及CH@LM(以LM计)用恒温震荡器孵育不同时间,采用尺寸排阻色谱法分离出含有HSA蛋白晕的LM-HSA和CH@LM-HSA复合物以及过剩的HSA。通过粒径仪检测粒径及聚合物分散性指数(PDI),紫外可见分光光度计检测蛋白晕复合物的紫外图谱,荧光酶标仪检测蛋白晕复合物荧光图谱,分子对接研究油相中辅料的主要成分与HSA的结合能、油相中各辅料之间的结合能,并采用考马斯亮蓝染色对蛋白晕复合物进行表征。结果 LM、CH@LM自身稳定性较好,LM与HSA之间存在相互作用,所形成复合物的粒径及PDI具有时间及浓度相关性;加入CH后改变了复合物的粒径随时间的变化模式,同时减弱了由于LM浓度变化引起的与蛋白质之间相互作用的变化。加入CH后HSA自身荧光淬灭程度增强,最大吸收波长蓝移程度增加,表明加入CH后增强了LM与HSA的相互作用程度。CH与HSA的分子对接结合能绝对值最高,且有CH的油相中各辅料分子与分子间对接结合能均高于无CH参与组;LM-HSA及CH@LM-HSA均保留了HSA的特征条带。结论 CH增强了LM对HSA的吸附能力,CH与其他辅料分子和蛋白具有更强的结合能力可能是主要原因。

关键词: 胆固醇;脂微球;人血清白蛋白;蛋白晕;相互作用

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)08-1848-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.018

Effect of cholesterol on interaction between lipid microspheres and human serum albumin

LI Lingyan, WU Xingjie, CHEN Ying, WANG Yu'e, HE Zhiyong, SHEN Xiangchun, TAO Ling

Guizhou Medical University, Efficient Utilization Engineering Center for Characteristic Natural Medicinal Resources in Guizhou Province, Key Laboratory of Pharmacology and Evaluation of Traditional Chinese Medicine in Higher Education Institutions in Guizhou Province, Joint Key Laboratory of Guizhou Medical University and Guiyang City, The State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants & School of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Guiyang 561113, China

Abstract: Objective To study effect of cholesterol (CH) on the formation of protein coronas between lipid microspheres (LM) and human serum albumin (HSA). **Methods** After preparing LM and CH@LM using a two-step emulsification method involving high-speed shear-high-pressure homogenization, HSA solution with the same volume but different concentrations (8, 12, 24, 36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and LM and CH@LM(calculated in LM) with the same volume and different mass concentrations (10.76, 15.37, 26.90, 35.87, 53.80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were incubated with constant temperature oscillators for different times, respectively. The LM-HSA and CH@LM-HSA complexes containing HSA protein coronas and excess HSA were isolated by size-exclusion chromatography. Particle size and

收稿日期: 2024-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82260827);贵州省科技计划项目黔科合基础-ZK[2022]380;贵州省科技创新基地,黔科合中引地[2023]003;贵州省高层次创新型人才十层次人才黔科合平台人才-GCC[2023]048;贵州医科大学国家自然科学基金培育项目(20NSP050);贵州医科大学高层次人才科研启动基金项目 校博合J字(2023)026号

第一作者: 李玲燕,女,硕士研究生,主要从事药物递送系统研究。E-mail:18370376687@163.com

***共同通信作者:** 陶玲(1975—),女,硕士,教授,主要从事药物递送系统研究。E-mail:649511230@qq.com

沈祥春(1973—),男,博士,教授,从事心脑血管药物药理、天然功能物质化学生物学领域的研究。

E-mail:shenxiangchun@126.com

polymer dispersion index (PDI) were detected by particle size meter, ultraviolet visible spectrophotometry was used to detect the ultraviolet spectrum of the protein coronas complex, fluorescence enzyme spectrometer was used to detect the fluorescence spectrum of the protein coronas complex, and molecular interconnection was conducted to study the binding energy between the main components of excipients in the oil phase and HSA, as well as the binding energy between excipients in the oil phase. The protein coronas complex was characterized by Coomassie bright blue staining. **Results** Both LM and CH@LM demonstrate excellent inherent stability. An interaction between LM and HSA is observed, leading to the formation of complexes with particle size and PDI that are dependent on both time and concentration. The introduction of CH further enhances the fluorescence quenching effect on HSA itself, while also increasing the degree of blue shift in maximum absorption wavelength, indicating an intensified interaction between LM and HSA upon CH addition. The binding energy between CH and HSA exhibits the highest absolute value, surpassing that without CH involvement, thereby resulting in higher intermolecular binding energy when CH is present. Both LM-HSA and CH@LM-HSA retain characteristic bands associated with HSA. **Conclusion** CH enhanced the adsorption capacity of LM to HSA, and the stronger binding ability of CH with other excipient molecules and proteins may be the main reason.

Key words: cholesterol; lipid microspheres; human serum albumin; protein corona; interaction

近年来发现,药物递送系统(DDS)进入体内后,靶向效应与处方设计时预测的不一样,可能是当其进入生物体后,表面会覆盖蛋白质等物质,即形成“蛋白晕”^[1]。蛋白晕的部分组分可以在纳米载体表面保持较长时间并阻止其他蛋白的吸附,称之为“硬晕”。反之,“硬晕”之外的部分组分能够与环境中的其他蛋白质进行动态交换,被称为“软晕”,即弗罗曼效应。它们都能影响着纳米载体的电荷、大小和表面特性,并赋予纳米材料新的生物学特性^[2],进一步影响着纳米载体的分布、毒性、细胞内化和最终命运^[3]。因此,研究DDS的蛋白晕结合特点及与疾病部位的靶作用位点的相互作用,对阐明DDS在体内的转运、分布和代谢等具有重要意义。而蛋白晕的组成除了取决于所处的生物环境,还受处方因素影响^[4]。

脂微球(LM)是来源于静脉营养乳,以脂肪油为软基质,被磷脂膜包封且中位直径在200 nm左右的微粒体分散体系,也是亲脂性药物的良好DDS^[5]。前列地尔、氟比洛芬酯等LM注射液已在临床广泛应用,递送优势突出^[6-7]。药物借助LM可选择性地在粗糙血管内壁、肿瘤及炎症部位靶向蓄积^[8],药物通常溶于LM的油相或油相界面中,可以避免或减少局部或血管刺激^[9]。因此,LM同时具有持续性和高效性及高度的用药安全性特点,可以减少药物用量,降低不良反应发生率^[10]。而LM作为广泛应用的静脉注射乳剂,对LM及其处方因素与体内生物源性物质的相互作用模式的研究甚少。

在现代药剂学研究中,具有两亲性的胆固醇(CH)作为DDS的重要组成部分之一,用于增强膜的强度,发挥着重要的膜稳定作用,并降低了药物从DDS中渗漏^[11],被广泛应用于多种递送系统如

脂质体及LM中^[12]。Teng等^[13]在改进的卡氮紫杉醇脂质体制备工艺中加入CH,解决了化学不稳定性问题,并证实了CH衍生的亲水基团与磷脂分子紧密相连,阻碍了卡氮紫杉醇的渗漏,从而限制了卡氮紫杉醇的水解,证明LM中CH的加入在制剂层面是一种好的修饰方式。Yang等^[14]研究发现减少了CH的经皮给药系统(TDDs),可以避免中途遇到的巨噬细胞的被动吞噬,更好地达到靶向部位,说明高CH具有摄取促进作用。虽然高CH长期以来备受诟病,开始有药剂学工作者尝试寻找CH的替代物^[15],CH代谢异常与心脑血管疾病、神经退行性疾病及肿瘤等密切相关^[16]。然而,正常范围内的CH是哺乳动物体内含量最丰富的甾醇类分子之一,是细胞膜的基本组分之一,能与邻近脂类分子作用调节膜的刚性、流动性和渗透性,或与跨膜蛋白结合维持或改变后者的构象^[17-18]。此外,CH还是氧化甾醇和甾醇类激素必需的合成前体,是维系正常生理状态的必需物质,对维持细胞和机体的生命活动至关重要^[19],实验室前期研究表明,适量的CH不会导致细胞内脂质堆积和损伤。

人血清白蛋白(HSA)是人血浆中最丰富的蛋白,占血浆总蛋白的40%~60%。HSA是由585个氨基酸组成的单链蛋白质,相对分子质量为 6.7×10^4 。成熟的HSA是一个心形分子,由3个结构相似的 α -螺旋结构域组成^[20]。Marković等^[21]研究表明,HSA在血液中可以结合和运输药物、糖、脂类、脂肪酸和多种代谢物。HSA在现代医学中是一种重要的临床生物制品,作为血浆容量扩充剂广泛应用于创伤、烧伤和外科手术中,它还能运输体内大多数脂溶性药物,从而可提高药物在血浆中的溶解性和半衰期^[22]。同时,常作为模型蛋白用于DDS与蛋白

晕关系的研究中^[23]。

在本实验室前期已经完成LM处方和基本药剂学性能等研究的基础上^[24],本实验初步进行了LM和含CH的LM(CH@LM)与HSA之间体外孵育形成LM-HSA和CH@LM-HSA过程中的影响因素和相互作用研究,拟为LM的处方研究提供参考。

1 材料

1.1 试剂

大豆磷脂(供注射用)购自上海太伟药业股份有限公司(货号202202012);大豆油(供注射用)购自浙江田雨山药用油有限公司(货号20210502);中链三酰甘油(供注射用)购自辽宁新兴药业股份有限公司(货号200301201);CH购自国药集团化学试剂有限公司(货号20201112);甘油(供注射用)购自浙江遂昌惠康药业有限公司(货号20191213);Kolliphor® HS 15购自德国巴斯夫公司(货号0339458800);油酸钠购自上海源叶生物科技有限公司(货号F23HS175842);HSA(货号20230313,北京索莱宝科技有限公司);琼脂糖凝胶CL-4B(货号QC4L2009,北京瑞达恒辉科技发展有限公司);考马斯亮蓝R-250染色液(货号P0017,碧云天有限公司);其他的试剂和化学品均为分析纯。

1.2 仪器

ME104/02型分析电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];KQ-300DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UPW-UP-10型实验室专用纯水仪(成都天萃宁科技有限公司);VORTEX-6型漩涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);85-2B型恒温加热磁力搅拌器(金坛市科析仪器有限公司);T18 digital ULTRA-TURRAX型高速剪切机(德国艾卡公司);AH-BASIC型高压均质机[安拓思纳米技术(苏州)有限公司];NanoBrook 90 Plus PALS型纳米电位粒度分析仪(美国布鲁克海文有限公司);SHZ-88型恒温震荡仪(江苏金怡仪器科技有限公司);Q5000型微量紫外-分光光度计(美国Quawell公司);CHIRISCAN型圆二色谱仪(英国Applied Photophysics公司);VARIOKANLUX型多功能酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);UV-2700型紫外-分光光度计[岛津仪器(苏州)有限公司]。

2 方法与结果

2.1 LM的制备及其稳定性评价

在实验室前期研究基础上^[24],采用高速剪切-高压均质两步乳化法分别制备了LM和CH@LM。由

长链三酰甘油2.5%、中链三酰甘油7.5%,大豆磷脂0.76%,CH用量分别为0、0.38%组成LM或CH@LM的油相,油相在35℃下超声溶解。水相中油酸钠为0.60%,HS15为0.40%,甘油为2.30%,超纯水加至制剂总体积为50 mL,水相在35℃下用磁力搅拌混合。用10 mL注射器将油相缓慢注入水相中,在4℃冰浴条件下高速剪切7 min(转速10 000 r·min⁻¹)得到初乳。在制备初乳后用0.10 mol·L⁻¹的HCl/NaOH溶液调节pH至7.00,高压均质11 min(86.7 MPa),分别得到LM及CH@LM,粒径分别为(142.10±2.54) nm和(137.09±3.23) nm, Zeta电位分别为(-31.2±0.52) mV和(-30.85±1.34) mV, LM浓度以油相计(LCT、MCT与磷脂的总质量浓度)为107.6 mg·mL⁻¹。

通过采用布鲁克海文激光粒度分析仪测定LM、CH@LM在(37.0±0.5)℃条件下放置0、0.5、1.0、3.0、6.0、12.0、24.0 h后的累积分布百分数达到50%时所对应的粒径值(D_{50})及聚合物分散性指数(PDI)以评价其稳定性。结果表明,在37℃条件下,LM、CH@LM的粒径和PDI在24 h内未观察到明显变化,这表明两者均具有良好的稳定性。见图1。

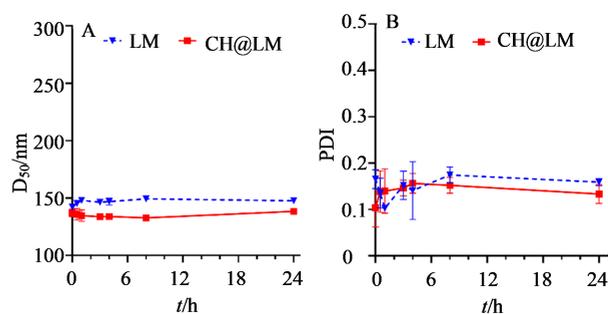


图1 LM、CH@LM在24 h内的 D_{50} (A)及PDI (B)变化
Fig. 1 Changes in D_{50} (A) and PDI (B) of LM and CH@LM within 24 h

2.2 不同孵育条件对 D_{50} 、PDI影响

分别将相同体积但不同浓度(8、12、24、36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的HSA溶液与等体积不同质量浓度(10.76、15.37、26.90、35.87、53.80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的LM及CH@LM(以LM计)在37℃、150 r·min⁻¹条件下用恒温震荡器孵育不同时间,使用PBS(pH 7.4)预平衡琼脂糖凝胶CL-4B色谱柱,采用尺寸排阻色谱法分离出含有HSA蛋白晕的LM、CH@LM样品即LM-HSA和CH@LM-HSA以及过剩的HSA,收集总体积为15 mL(30份)、每份0.5 mL洗脱液。通过微量紫外-分光光度计测量其在280 nm处的吸光度(A)值来确

定洗脱曲线,并随后收集含蛋白晕部分,除特别说明,后续实验均为分离纯化后样品。通过粒径仪分别测定孵育0.5、1.0、3.0、6.0、12.0和24.0 h后的LM-HSA及CH@LM-HSA的 D_{50} 及PDI大小以评价蛋白晕的变化模式。

随着不同质量浓度的LM、CH@LM与不同浓度HSA相互作用时间的增加,可以观察到整体粒径逐渐增大。在6~24 h内, D_{50} 和PDI基本保持不变,表明蛋白晕吸附在6 h时达到稳定状态,LM和CH@LM质量浓度、HSA浓度以及CH的加入对该结果的影响无统计学差异。同时,在LM与HSA相互作用时,无论是LM质量浓度还是HSA浓度都几乎不会改变这个时间段内 D_{50} 的变化模式,即在1 h达到峰值后3 h出现波谷,并且在6 h时趋于平衡的HSA吸附模式。然而,在加入CH后,出现曲线从1~3 h呈下降趋势转为平稳甚至上升趋势。这说明CH的加入会改变LM与HSA之间的相互作用模式。结果见图2、3。

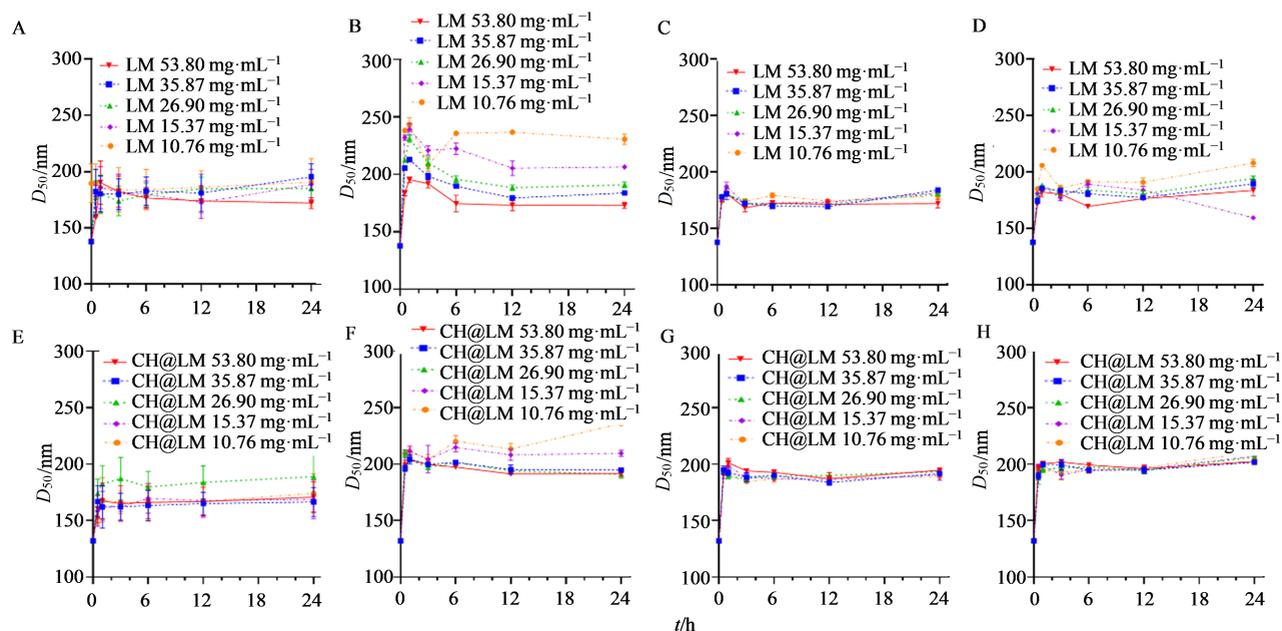
在相同体积条件下,LM和CH@LM的质量浓度增加会导致单位体积内制剂粒子数目的增加。而随着LM和CH@LM质量浓度降低,即HSA的相对浓度增大时,在HSA初始孵育浓度为24和36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时生成的CH@LM-HSA复合物粒径组内差异不显著,LM-HSA复合物粒径组内差异较为明显;此外,在进行组间比较时发现,整体粒径在加

入CH后高于LM-HSA组,这表明加入CH会增强LM对HSA的吸附能力,并且同时减弱了由于LM质量浓度变化引起的与蛋白质之间相互作用的变化。

制备浓度分别为12、24、36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的HSA溶液,溶剂为超纯水,通过圆二色谱仪分析单独HSA溶液在不同浓度时的二级结构变化,扫描范围为185~280 nm。圆二色谱测试结果显示(图4),当HSA浓度分别为12、36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,在222、208 nm处呈现负峰,且在190 nm附近出现正峰,表明其二级结构主要呈 α -螺旋构象;而当HSA浓度为24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,在217~218 nm处有一负峰,并在195~198 nm处有一个强烈的正峰,经鉴定为 β -折叠构象,而HSA中 α -螺旋结构占68%左右,无 β -折叠^[25],这说明HSA自身构象发生了变化;此外,在12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下HSA与不同质量浓度制剂相互作用后的复合物粒径变化差异较大,LM和CH@LM的质量浓度对它们与HSA之间相互作用产生显著影响。同时可以观察到LM组与CH@LM组之间存在不同的变化模式,而整体PDI保持一致。因此,在进一步深入研究相互作用时,选择了初始孵育浓度为12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的HSA进行后续实验。

2.3 CH对LM蛋白晕复合物荧光图谱的影响

采用荧光多功能酶标仪测定HSA、LM、CH@LM、LM-HSA、CH@LM-HSA的荧光光谱以研

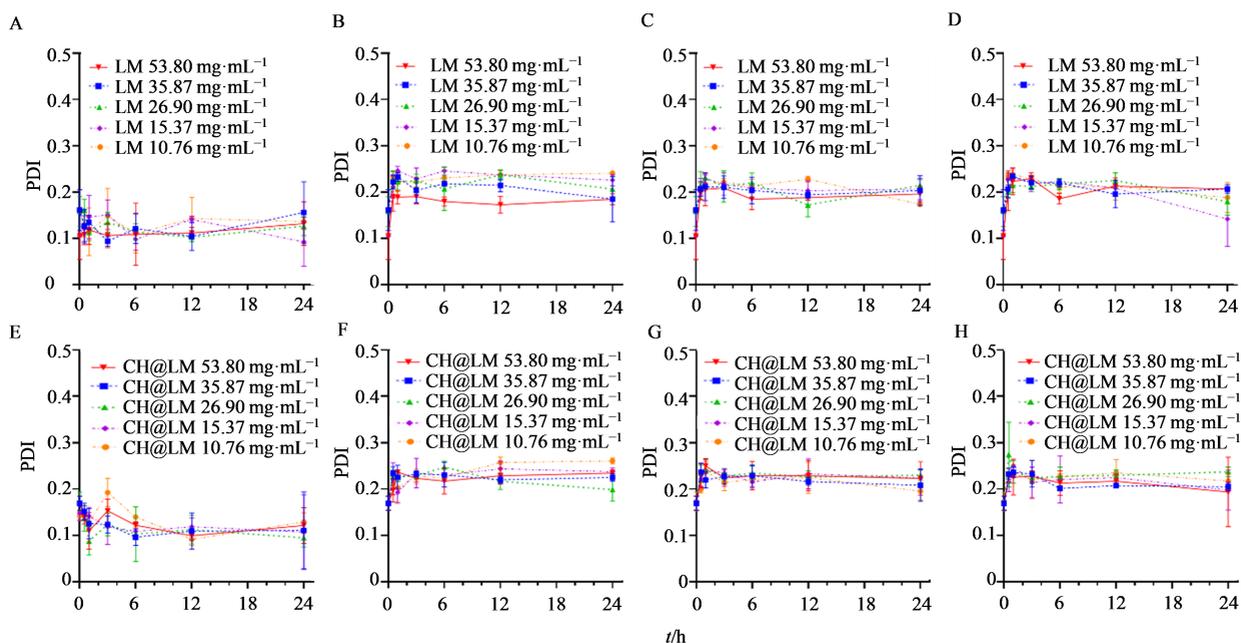


A、E-HSA 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B、F-HSA 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C、G-HSA 24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D、H-HSA 36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

A、E-HSA 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B、F-HSA 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C、G-HSA 24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D、H-HSA 36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

图2 不同孵育条件对LM-HSA、CH@LM-HSA的 D_{50} 的影响

Fig. 2 Effect of different incubation conditions on D_{50} of LM-HSA and CH@LM-HSA



A, E-HSA 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B, F-HSA 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C, G-HSA 24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D, H-HSA 36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.
A, E-HSA 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B, F-HSA 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C, G-HSA 24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D, H-HSA 36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

图 3 不同孵育条件对 LM-HSA、CH@LM-HSA PDI 的影响

Fig. 3 Effect of different incubation conditions on PDI of LM-HSA and CH@LM-HSA

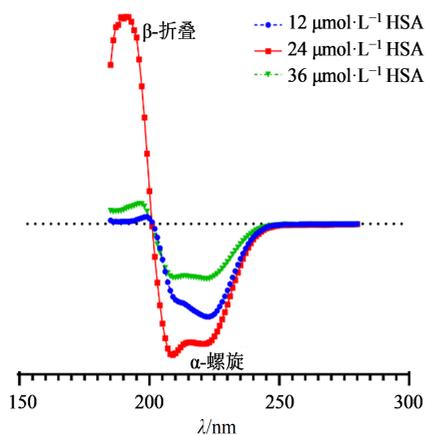


图 4 不同浓度 HSA 溶液的圆二色谱图

Fig. 4 Circular dichroic plots of HSA solutions with different concentrations

究其相互作用。将不同质量浓度 (10.76、15.37、26.90、35.87、53.80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 LM、CH@LM 与等体积 HSA 溶液 (12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下孵育不同时间 (0.5、1.0、3.0、6.0、12.0、24.0 h)，测定其荧光光谱的变化，激发波长为 280 nm，狭缝宽度为 3 nm，扫描范围 300~400 nm。HSA 的荧光来源于酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸残基，荧光淬灭实验结果表明，单独制剂的荧光强度与 HSA 的荧光强度相比可以忽略不计，LM 和 CH@LM 在不同质量浓度下与 HSA 相互作用 6.0 h 后，相较于单独的 HSA 组，LM 和 CH@LM 的存在均猝灭了 HSA 的部

分内在荧光，这表明 HSA 分别和 LM 及 CH@LM 之间均存在相互作用。当含 LM 质量浓度均为 15.37、26.90、35.87 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，对应的 LM-HSA 组间荧光图谱变化不大，而 CH@LM-HSA 组随着质量浓度的增大，HSA 的内在荧光被掩蔽程度呈增加趋势，表明相互作用程度增强；当 LM 质量浓度为 10.76 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，LM-HSA 复合物的荧光强度低于其他各质量浓度组，53.80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组荧光略高于 10.76 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组，具体原因有待进一步考察；当 CH@LM 质量浓度为 53.80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时复合物的荧光强度低于其他各质量浓度组，10.76 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组略高于 53.80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组，表明加入 CH 改变了 LM 与 HSA 相互作用的浓度-荧光图谱变化模式。而相较于 LM-HSA 组，CH@LM-HSA 的荧光受到时间影响程度较小，可能加入 CH 后提高了与 HSA 相互作用的速度，从而增强了相互作用稳定性。结果见图 5、6。

2.4 CH 加入对 LM 蛋白晕复合物的紫外图谱影响

采用紫外-可见分光光度计测定 HSA、LM、CH@LM、LM-HSA、CH@LM-HSA 的紫外图谱以研究其相互作用。将不同质量浓度 (10.76、15.37、26.90、35.87、53.80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) LM、CH@LM 与等体积 HSA 溶液 (12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下孵育不同时间 (0.5、1.0、3.0、6.0、12.0、24.0 h)，测定其

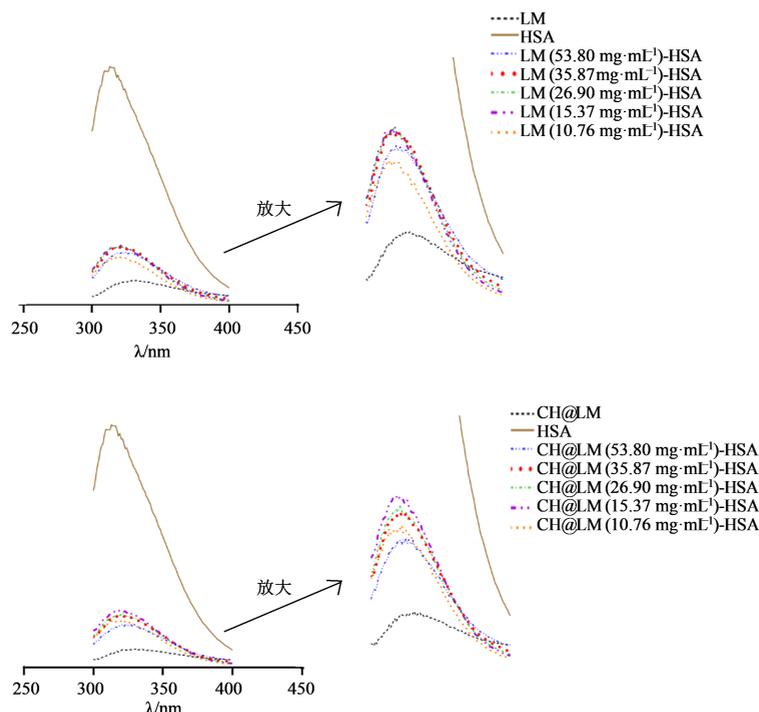


图 5 不同质量浓度 LM 和 CH@LM 与 HSA 相互作用 6.0 h 的荧光图谱及局部放大图

Fig. 5 Fluorescence spectra and local enlarged view of the interaction between LM and CH@LM with HSA for 6.0 h at different concentrations

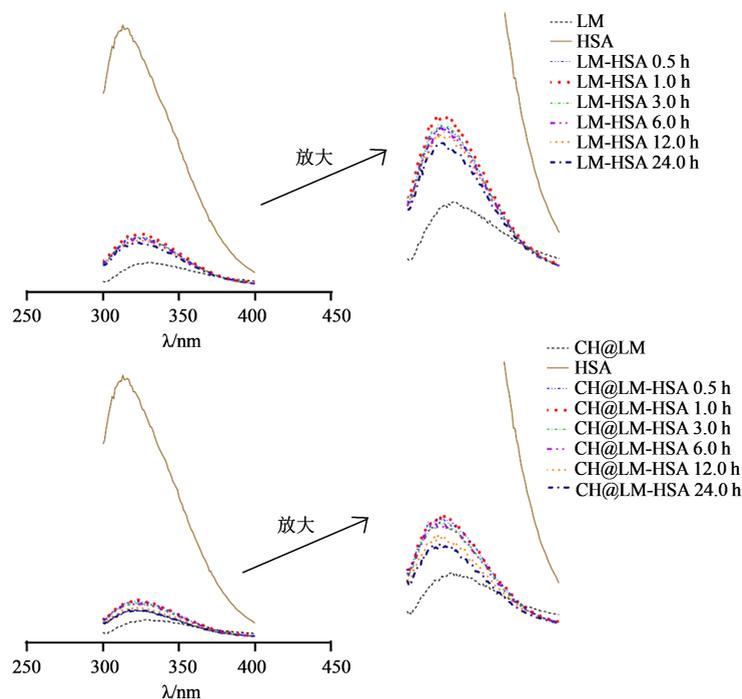


图 6 LM 和 CH@LM 与 HSA (53.80 mg·mL⁻¹) 相互作用不同时间的荧光图谱及局部放大图

Fig. 6 Fluorescence spectra and local enlarged view of LM and CH@LM (53.80 mg·mL⁻¹) interacting with HSA at different time points

紫外图谱的变化,扫描范围 250~350 nm。随着 LM 质量浓度的增大, HSA 的 270 nm 特征峰逐渐消失, 制剂-蛋白复合物的最大吸收波长出现蓝移; 在 0.5、1.0、3.0、6.0、12.0、24.0 h 的不同孵育

时间下,最大吸收波长均在 265 nm 左右。总体结果表明 HSA 与 LM 形成了基态复合物, LM 与 HSA 之间的相互作用迅速且稳定, 且 CH@LM-HSA 的蓝移程度更甚, 其结合程度更强。

见图7。

2.5 CH的加入对LM与HSA相互作用位点的影响

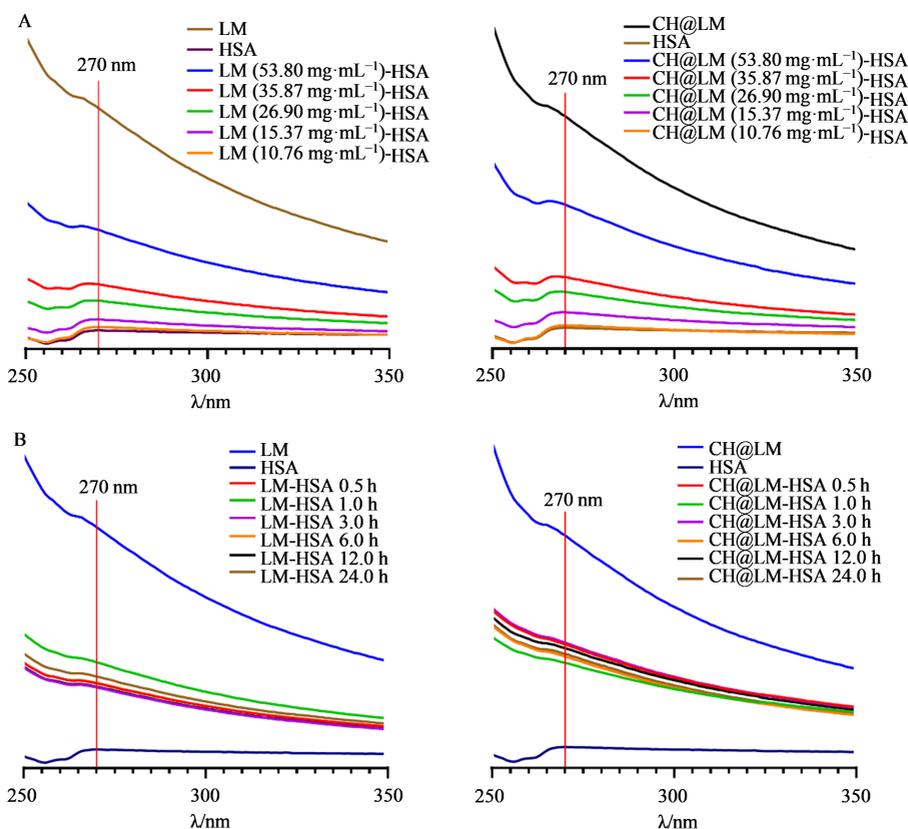
通过采用 AutoDock Vina 软件^[26]进行分子对接,验证油相中辅料主要成分和HSA的结合能力。首先,从 ProteinData Bank (PDB)数据库下载 HSA 的蛋白质晶体结构,并使用 pymol^[27]将蛋白的原配体与其蛋白分离,去除水分子后保存。接着,利用 AutoDockTool 为蛋白质结构加氢加电荷,保存为 PDBQ 格式以供下一步对接。针对目标受体,利用预测好的模型进行预处理,包括去除加氢、修饰氨基酸、优化能量和调整力场参数。在下载配体结构(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)后,选择满足低能量构象的配体结构,并将HSA与目标成分结构进行分子对接。对接后的 Affinity 值即代表两者的结合能,结合能越低,配体与受体结合越稳定。最后,通过在线分析网站 PLIP v2.3.0(<https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>)分析受体-配体复合物的作用方式,并导出 pse 格式文件,借助 pymol 软件及 Discovery studio^[28]软件进行可视化

分析。

分子与蛋白之间的分子对接结果表明(图8),油相中辅料的主要成分即长链三酰甘油、中链甘油三酯的代表成分大豆油、三辛酸甘油酯及大豆磷脂、CH与HSA的结合能分别为-30.96、-28.87、-26.36、-35.98 kJ·mol⁻¹。这些对接结合能绝对值均大于 20 kJ·mol⁻¹,说明这些主要成分能够有效地结合到HSA的活性口袋,且能够较强地自发性与蛋白结合口袋发生氢键相互作用、疏水相互作用。其中,CH与HSA之间的对接结合能最高,表明其与HSA之间存在最稳定的结合关系。此外,在油相中各辅料之间进行对接时也观察到了有CH参与对接时所得到的对接结合能绝对值均较高(图9),结合文献报道的LM结构模式图^[8],进一步证明了CH在CH@LM中可能通过利用其自身特点增强了LM与HSA之间相互作用。

2.6 考马斯亮蓝染色

制备不同孵育时间的LM-HSA、CH@LM-HSA样品,同时设置单独的LM、CH@LM、HSA样品组,使用BCA试剂盒定量测定各样品中的蛋白质浓度。



A-不同质量浓度LM、CH@LM与HSA相互作用6.0 h; B-LM(53.80 mg·mL⁻¹)与HSA相互作用不同时间。

A-LM and CH@LM interacting with HSA for 6.0 h at different concentrations; B-LM (53.80 mg·mL⁻¹) interacting with HSA at different time points.

图7 不同质量浓度LM、CH@LM与HSA相互作用不同时间的紫外图谱

Fig. 7 UV profiles of different concentrations of LM and CH@LM interacting with HSA at different time points

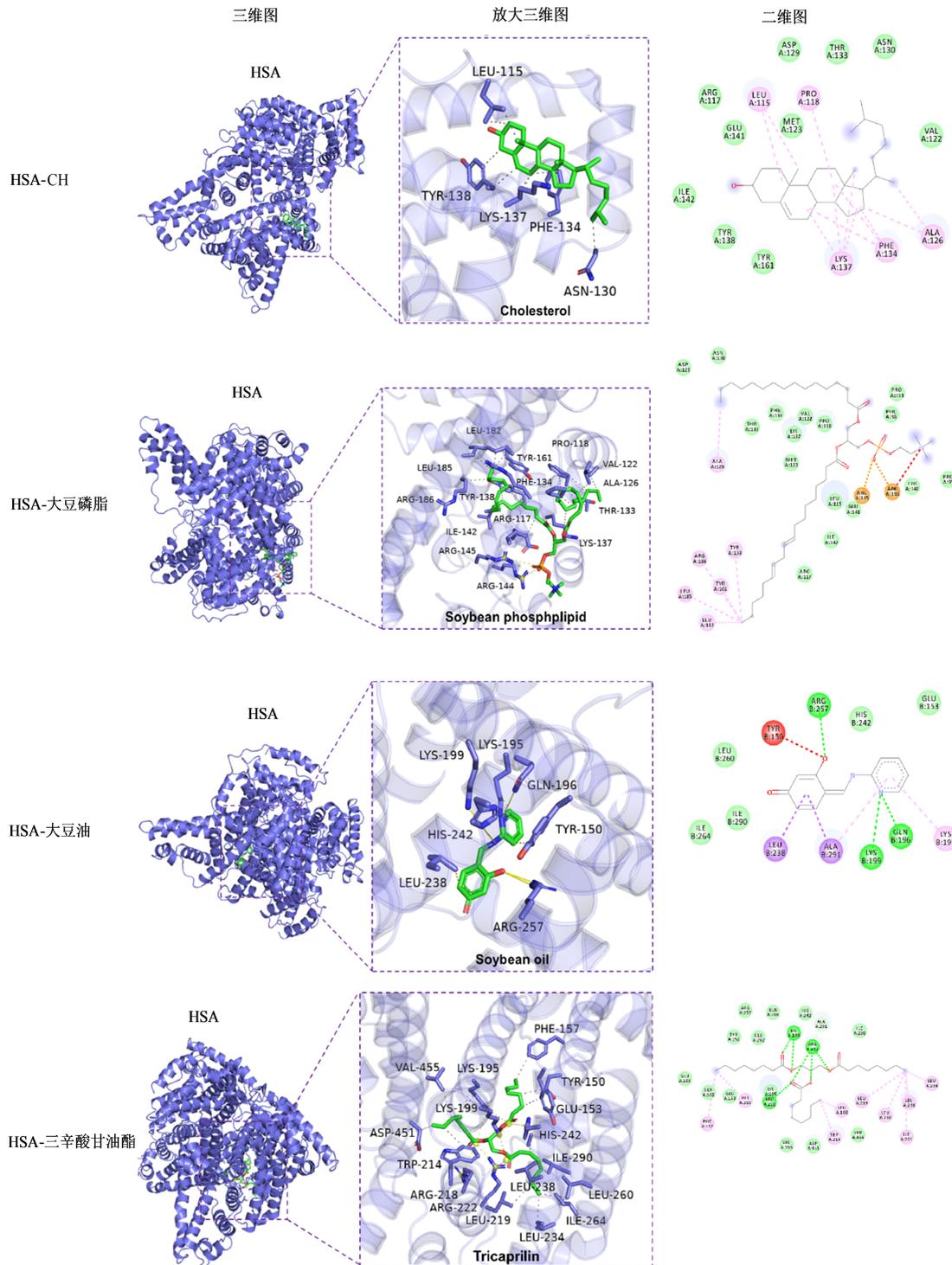


图8 油相中各辅料的主要成分与HSA的分子对接

Fig. 8 Molecular docking of main components of various excipients in oil phase with HSA

将这些样品在 10% SDS-PAGE 凝胶上进行电泳分离(恒定电压 120 V, 90 min), 然后取出凝胶并用 Coomassie Blue R-250 染色可视化显示出其中的蛋白带。

根据图 10 所示, 单独的 LM、CH@LM 未显示出蛋白条带, 而单独的 HSA 除了显示 6.7×10^4 的主要

条带外, 还存在相对分子质量大于或小于 6.7×10^4 的条带, 这些条带可能与 HSA 中存在的亚基有关。相较于单独的制剂组, LM-HSA、CH@LM-HSA 组保留了 HSA 的 6.7×10^4 特征条带, 表明形成了蛋白复合物, 且条带的深浅与粒径变化基本一致, 同时 LM、CH@LM 分别与 HSA 的相互作用也会影响

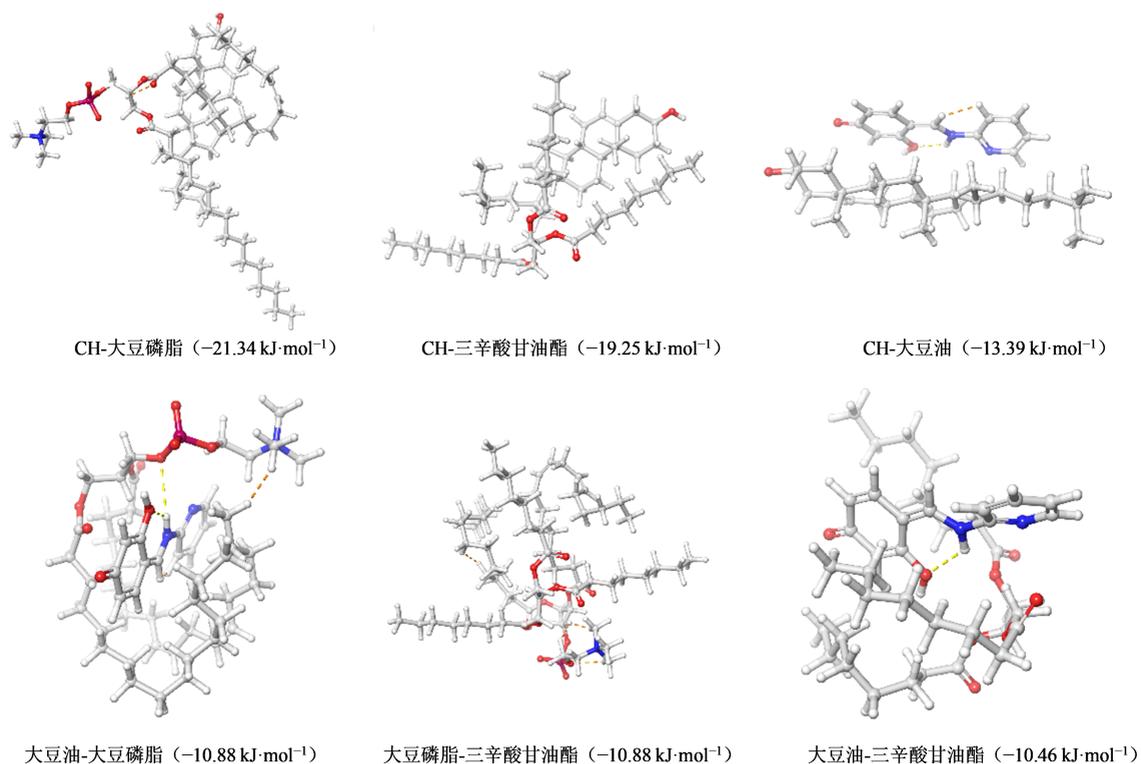


图9 油相中各辅料之间的分子对接

Fig. 9 Docking between various additives in oil phase

HSA 的结构, LM 和 CH@LM 可能与 HSA 的亚基发生结合, 从而导致部分条带未显示。

3 讨论

研究蛋白质晕的粒径变化等可以更好地了解纳米制剂可能的体内过程。粒径变化会受到多种因素的影响, 比如溶剂条件(pH、离子强度等)、蛋白

质浓度、温度等。通过研究这些变化, 可以揭示蛋白质在不同条件下的构象变化、聚集状态以及与其他分子的相互作用。目前对于 LM 在生理环境中与蛋白的相互作用研究甚少。为此, 本研究采用了多种实验手段研究 LM 与 HSA 的相互作用, 并考察处方因素 CH 对二者相互作用的影响。首先研究了制

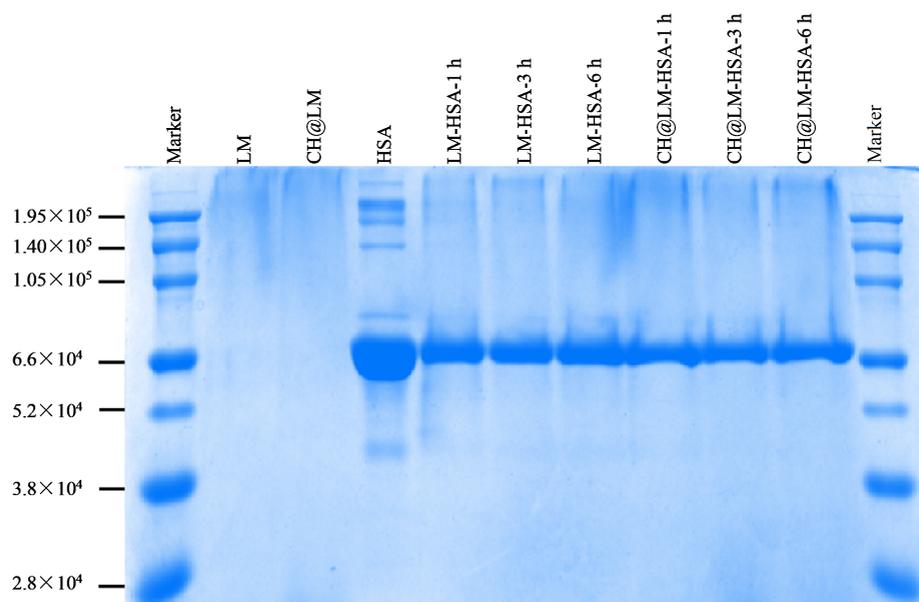


图10 考马斯亮蓝染色结果

Fig. 10 Results of Coomassie Brilliant Blue staining

剂自身的稳定性,以确定在与HSA接触后 D_{50} 及PDI的变化主要是由二者的相互作用引起的。随后设计了系列制剂浓度、系列HSA浓度及系列作用时间以更为全面揭示CH的加入对LM与HSA相互作用的影响模式。

由于文献报道牛血清白蛋白(BSA)自身浓度不同时,构象也会发生变化^[29],考虑到BSA与HSA的结构类似性,测定了系列浓度HSA的二级结构,发现HSA浓度为 $24\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时构象确实发生了转变,氢键是 α -螺旋稳定的主要次级键,若氢键破坏, α -螺旋构象即被破坏。而自身能形成 β -折叠的氨基酸残基一般不大,而且不带同种电荷,因而可能是特定浓度下HSA氢键被破坏,从而导致 $24\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时HSA的构象转变。

当DDS与蛋白质相互作用后,会改变生色团的空间结构或分子作用力,从而改变生色团的能级,使其特征吸收峰产生强度降低或红移(蓝移)现象。由于HSA自身存在特征荧光及生色基团,通过荧光淬灭实验和紫外实验提供的信息可进一步证明DDS与HSA之间的相互作用,实验结果表明,LM和CH@LM与不同浓度HSA孵育后,均在6 h时达到稳定,加入CH后,随着初始HSA浓度的下降,吸附曲线从1 h至3 h呈下降趋势后转为平稳甚至上升趋势,6 h内的吸附变化有必要在后期深入研究。在初始孵育浓度为 8 、 24 、 $36\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时生成的CH@LM-HSA复合物粒径组内差异不显著,然而,LM-HSA复合物粒径组内差异较为明显,可能是CH@LM中CH较强的吸附能力,能在更短时间内吸附HSA并达到饱和,与传统认为CH具有DDS膜稳定作用的观念一致。在进行组间比较时发现,整体粒径在加入CH后高于LM-HSA组,这表明加入CH会增强LM对HSA的吸附能力,并且同时减弱了由于LM浓度变化引起的与蛋白质之间相互作用的变化。LM-HSA在LM质量浓度偏高($53.80\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)及偏低($10.76\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)时相互作用程度出现无规律增强,且低浓度组荧光掩蔽程度高于高浓度组;CH@LM-HSA组同样观察到 $53.80\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及 $10.76\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度组相互作用程度无规律增强的现象,但此时高浓度组荧光掩蔽程度高于低浓度组。这可能是因为在过高或过低的浓度下,LM与HSA的接触可能性相对增加,从而导致相互作用程度增强,且CH的加入减弱了LM浓度对其与HSA相互作用的影响,与粒径变化结果基本一致。此外,由于LM和CH@LM制剂的自身吸光度在扫描

范围内会影响分析,仅讨论了相互作用对特征吸收峰迁移的影响,而未对吸收强度变化进行深入分析。

结合CH的化学结构($\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$),可以将其简单分为3部分:亲水的羟基头、碳碳环和疏水的尾巴。尾部烷基链的构象、饱和度以及官能团的缺乏是其保持灵活性必不可少的先决条件。四环身体以及侧链尾巴共同有助于疏水脂质双层膜的有序形成。因而CH已被证明是可以增加脂质膜的流动性,同时维持其稳定性的有效物质^[30]。通过分子对接的结合位点的分析,可以确定DDS与蛋白之间的结合模式、亲和力等关键参数。为了研究加入CH后产生影响的可能机制,首先对油相中辅料的主要成分与HSA进行了对接,结果显示LM中的辅料分子与HSA的多个氨基残基结合,CH与HSA的结合能绝对值最高。此外,还进行了油相中辅料的主要分子与分子之间的对接考察,结果表明,CH与大豆磷脂的结合能绝对值最高,并且有CH参与的对接组比无CH参与的组具有更高的结合能绝对值。CH的四环身体与HSA的残基LEU-115(亮氨酸)、TYR-138(酪氨酸)、LYS-137(赖氨酸)及PHE-134(苯丙氨酸)存在疏水相互作用,尾部与HSA的残基ASN-130(天冬氨酸)存在疏水相互作用;油相中辅料的主要成分之间的对接结果表明,CH的头部与磷脂的极性头部形成氢键作用。结合LM的结构模式图可以推测,在使用表面活性剂大豆磷脂作为乳化剂时,LM主要在油水界面上形成单层磷脂膜。进一步推测加入CH后其与大豆磷脂以复合乳化剂形式降低界面张力并增强乳化膜机械强度,从而显著提高系统稳定性,具有DDS膜稳定作用。此外,由于其自身的分子及蛋白质结合能力强,在LM中加入CH介导了LM与HSA之间相互作用的增强。分子对接的机制探索在一定程度上解释了CH稳定DDS膜的可能原因,丰富了CH的处方内涵,有望为脂质体、脂质纳米粒子等剂型中CH类似物或衍生物替代研究提供新策略。

加入CH后会改变LM与HSA所形成复合物的 D_{50} 和PDI与时间及浓度演变模式,CH增强了LM对HSA的吸附能力,并且同时减弱了由于LM浓度变化引起的与HSA之间相互作用的变化。CH自身与其他辅料分子和蛋白更强的结合能力可能是介导LM与HSA之间相互作用程度及结合稳定性增强的主要原因。本研究初步揭示了CH的加入对LM与HSA相互作用的影响,探究了其可能的影响机制,丰富了CH的处方内涵,为预测LM的体内生物学行

为和处方研究提供了参考,并为研究DDS与蛋白质之间的相互作用提供了新策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Martínez-Negro M, González-Rubio G, Aicart E, et al. Insights into colloidal nanoparticle-protein corona interactions for nanomedicine applications [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2021, 289: 102366.
- [2] Liu R G, Yu D Y, Abd El-Aty A M, et al. Protein corona of food nanoparticles: Implications for biological responses and future research directions [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2023, 141: 104179.
- [3] He Y, Fang Y F, Zhang M, et al. Remodeling "cold" tumor immune microenvironment via epigenetic-based therapy using targeted liposomes with *in situ* formed albumin corona [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(4): 2057-2073.
- [4] Tang Y Y, Gao J C, Wang T, et al. The effect of drug loading and multiple administration on the protein corona formation and brain delivery property of PEG-PLA nanoparticles [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(4): 2043-2056.
- [5] Luo L F, Wang X Z, Chen Q Y, et al. A parenteral docetaxel-loaded lipid microsphere with decreased 7-epidocetaxel conversion *in vitro* and *in vivo* [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 109: 638-649.
- [6] Liu Z Z, Feng Y K, Zhang L H, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of larotaxel in rats: Comparison of larotaxel-loaded microsphere with larotaxel-solution [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71(5): 1131-1139.
- [7] 何军, 张兵, 陈艳华. 脂质乳剂释药机制及其靶向性的研究进展 [J]. *中国医药工业杂志*, 2008, 39(1): 56-60.
He J, Zhang B, Chen Y H. Progress of lipid emulsions on drug release mechanism and targeting delivery [J]. *Chin J Pharm*, 2008, 39(1): 56-60.
- [8] 章秀丽, 马月琴, 李刚. 脂微球载药系统的研究进展 [J]. *药学实践杂志*, 2014, 32(6): 409-411, 459.
Zhang X L, Ma Y Q, Li G. Research development of lipid microsphere delivery system [J]. *J Pharm Pract*, 2014, 32(6): 409-411, 459.
- [9] Srinath P, Diwan P V. Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of lipid microspheres of indomethacin [J]. *Pharm Acta Helv*, 1998, 73(4): 199-203.
- [10] Eo S, Kwon C, Lee H, et al. Quantification of the effect of Lipo-PGE1 on angiogenesis [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2015, 68(1): 104-112.
- [11] Shi L L, Wang Y C, Wang Q C, et al. Transforming a toxic drug into an efficacious nanomedicine using a lipoprodrug strategy for the treatment of patient-derived melanoma xenografts [J]. *J Control Release*, 2020, 324: 289-302.
- [12] Maranhao R C, Tercyak A M, Redgrave T G. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein-free emulsion models of lipoproteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 875(2): 247-255.
- [13] Teng F, Yang H, Li G F, et al. Parenteral formulation of larotaxel lipid microsphere tackling poor solubility and chemical instability [J]. *Int J Pharm*, 2014, 460(1/2): 212-219.
- [14] Li L, Zhang M X, Li J, et al. Cholesterol removal improves performance of a model biomimetic system to co-deliver a photothermal agent and a STING agonist for cancer immunotherapy [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5111.
- [15] 杨斌. 胆固醇衍生物脂质体作为药物载体的研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2011.
Yang B. Study on cholesterol derivative liposome as drug carrier [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2011.
- [16] Nagata T, Dwyer C A, Yoshida-Tanaka K, et al. Cholesterol-functionalized DNA/RNA heteroduplexes cross the blood-brain barrier and knock down genes in the rodent CNS [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(12): 1529-1536.
- [17] Luo J, Jiang L Y, Yang H Y, et al. Intracellular cholesterol transport by sterol transfer proteins at membrane contact sites [J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(3): 273-292.
- [18] Xiao X, Tang J J, Peng C, et al. Cholesterol modification of smoothened is required for hedgehog signaling [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 154-162.e10.
- [19] Luo J, Yang H Y, Song B L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 225-245.
- [20] Linciano S, Moro G, Zorzi A, et al. Molecular analysis and therapeutic applications of human serum albumin-fatty acid interactions [J]. *J Con Rel*, 2022, 348: 115-126.
- [21] Marković O S, Cvijetić I N, Zlatović M V, et al. Human serum albumin binding of certain antimalarials [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2018, 192: 128-139.
- [22] de Zeeuw D, Parving H H, Henning R H. Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(8): 2100-2105.
- [23] 陈重, 野庆松, 吴锦慧. 基于人血清白蛋白的药物递送系统研究进展 [J]. *药学进展*, 2022, 46(7): 495-501.
Chen C, Ye Q S, Wu J H. Research progress of human serum albumin-based drug delivery systems [J]. *Prog*

- Pharm Sci, 2022, 46(7): 495-501.
- [24] 杨佳佳, 韦世权, 李婉蓉, 等. 星点设计-效应面法优化丹皮酚脂微球处方工艺及其体外释药机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 3901-3910.
- Yang J J, Wei S Q, Li W R, et al. Optimization of formulation of paeonol lipid microspheres by central composite design-response surface method and its drug release mechanism *in vitro* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(15): 3901-3910.
- [25] 李荣, 胡维新. 血清白蛋白的生物学特性研究进展 [J]. 生命科学, 2013, 25(10): 1022-1026.
- Li R, Hu W X. Molecular and biological characteristics of human serum albumin [J]. Chin Bull Life Sci, 2013, 25(10): 1022-1026.
- [26] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2010, 31(2): 455-461.
- [27] Seeliger D, de Groot B L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina [J]. J Comput Aided Mol Des, 2010, 24(5): 417-422.
- [28] Biovia, D. S. (2015) Discovery Studio Modeling Environment. Dassault Syst. Release, San Diego, 4.
- [29] Fu F Q, Huang Z W, Wang W H, et al. Interaction between bovine serum albumin and Solutol® HS 15 micelles: A two-stage and concentration-dependent process [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2021, 64: 102376.
- [30] Patel S, Ashwanikumar N, Robinson E, et al. Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 983.

[责任编辑 兰新新]