

10-羟基喜树碱的聚赖氨酸/海藻酸钠微胶囊的制备及其体外释药特性研究

李思阳, 郑健, 骆沙曼, 王洋*

东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 制备 10-羟基喜树碱 (HCPT) 缓释微胶囊, 测定其包封率, 并考察其体外释药特性。方法 以生物相容性良好的聚赖氨酸和海藻酸钠为囊壁材料, HCPT 药物微粒为囊芯, 采用静电吸引层层纳米自组装技术 (LBL 法) 制备 HCPT 微胶囊。结果 LBL 法制备的 HCPT 微胶囊用扫描电子显微镜和激光共聚焦显微镜观察具有明显的核-壳结构; HCPT 微胶囊的包封率较高, 达到 $(68.41 \pm 0.72)\%$; 随着包裹层数的增加, HCPT 微胶囊在体外释放速率降低。结论 用 LBL 法制备的 HCPT 微胶囊具有较高的包封率和缓释特性, 具有一定的应用前景。

关键词: 10-羟基喜树碱; 体外释放; 层层自组装; 微胶囊; 缓释

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1724-04

Preparation and *in vitro* release of microcapsules for controlled release of 10-hydroxycamptothecin-loaded polylysine and alginate

LI Si-yang, ZHENG Jian, LUO Sha-man, WANG Yang

Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To prepare microcapsules for controlled release of 10-hydroxycamptothecin (HCPT), and determine its encapsulation efficiency and drug release profile *in vitro*. **Methods** The microcapsules loaded with HCPT were prepared using a novel coating technology based on the layer-by-layer (LBL) deposition of oppositely charged polylysine (PLL) and alginate (ALG) polyelectrolytes with good biocompatibility onto microcrystal templates. **Results** The microcapsules fabricated by this method had visible core-shell structure observed by scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM); The entrapment efficiency of the microcapsules was as high as $(68.41 \pm 0.72)\%$; The release rate of HCPT decreased as the bilayers increased *in vitro*. **Conclusion** The microcapsules of HCPT prepared by LBL have higher entrapment efficiency and are characterized with controlled drug release, which has potential for future application.

Key words: 10-hydroxycamptothecin (HCPT); *in vitro* drug release; layer-by-layer (LBL); microcapsules; controlled drug release

喜树碱 (camptothecin, CPT) 是 1966 年由 Wall 等^[1-2]从我国特有珙桐科植物喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 中分离得到的一种吲哚类生物碱, 具有显著的广谱抗肿瘤活性^[3-4]。10-羟基喜树碱 (10-hydroxycamptothecin, HCPT) 是喜树碱的天然衍生物, 是我国临床应用的喜树碱类抗肿瘤药物, 但由于不良反应大、生物利用度低限制了其应用价值。开发新的微纳米控释制剂是降低药物不良反应、提高生物利用度的有效途径之一^[5-6]。静电吸引层层纳米自组装 (layer-by-layer, LBL) 的方法

是近年来迅速发展起来的一种简易、多功能的表面修饰方法^[7], LBL 技术用于制备微胶囊的显著优越性在于能够在纳米尺度上对胶囊囊壁的组成、厚度、结构形态、表面状态进行准确的载控。聚赖氨酸 (polylysine, PLL) 是一种具有抑菌功效的多肽, 海藻酸钠 (alginate, ALG) 是一类从褐藻类植物的细胞壁中提取出来的天然多糖, 二者同样具有良好的生物相容性和生物降解性能, 均是良好的天然微胶囊制备材料^[8-10]。本实验以 PLL、ALG 为微胶囊的囊壁, 以 HCPT 药物微粒为囊芯, 通过 LBL 技术对

收稿日期: 2011-01-13

基金项目: “948” 计划资助项目 (2011-4-16); 黑龙江省留学归国基金资助项目 (LC201004)

作者简介: 李思阳 (1987—), 男, 硕士, 研究方向为生物活性物质利用。Tel: (0451)82191247 13936445773 E-mail: 253595136@qq.com

*通讯作者 王洋 Tel: (0451)82191247 13936403608 E-mail: ywang@nefu.edu.cn

HCPT 进行微胶囊化,制成缓释微胶囊,以保证其在体内释放的稳定性,使其达到一种长期平稳缓释的效果。

1 仪器与材料

激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司);扫描电子显微镜(美国 FEI 公司);荧光光谱仪(美国 Varian 公司);Zeta 电位仪(美国 Bic 公司);Sorvall Legend Micro 17 型离心机(美国 Thermo 公司);KQ—50 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);真空离心浓缩系统(美国 SIM 公司)。

HCPT(批号 081020,质量分数为 99%)由哈尔滨峰源高科技开发有限公司提供;PLL(批号 P2658,质量分数>95%,相对分子质量 15 000~30 000, Sigma 公司);ALG(批号 W201502,质量分数>95%,相对分子质量 12 000~80 000, Sigma 公司);水为去离子水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HCPT 缓释微胶囊的制备

取 HCPT 粉末 20 mg,精密称定,置 2 mL 离心管中,加入 0.1 mg/mL PLL 溶液 1 mL,吸附时间为 5~10 min,使其分散均匀,4 000 r/min 离心 5 min,去上清液,用去离子水洗涤沉淀 3 次,每次水洗后 4 000 r/min 离心 5 min;加入 2 mg/mL ALG 溶液 1 mL,重复上述吸附和洗涤步骤,制备出总层数分别为 4、7、10 个双层的微胶囊。

2.2 微胶囊 Zeta 电位的测量

通过 Zeta 电位仪检测用两种带相反电荷的聚电解质(PLL 和 ALG)被吸附后,HCPT 表面电位变化的情况。在实验过程中可以观察到,未包裹的 HCPT 微粒在水中分散性很差,经过几层聚电解质包裹后,大大提高了其在水中的分散性,初步证明 PLL 和 ALG 这两种亲水性聚电解质吸附到了 HCPT 的表面。HCPT 表面电位变化的情况见表 1。未包裹前 HCPT 表面的电位为-32.68 mV。当 PLL(奇数层时)被吸附到其表面时,表面电位值约为 12 mV,说明带正电的 PLL 覆盖其表面;当 ALG(偶数层时)被吸附后,其表面电位值约为-45 mV,说明带负电的 ALG 覆盖其表面,这种电位的正负交替变化,证明了 HCPT 表面所带电荷的正负交替变化,从而证实了每一层聚电解质都被吸附到微粒的表面。

2.3 微胶囊核-壳结构的观察

HCPT 微胶囊的结构用扫描电子显微镜(SEM)和激光共聚焦显微镜(CLSM)来表征。

表 1 HCPT 表面交替吸附 PLL/ALG 的 Zeta 电位变化 ($n=3$)

Table 1 Zeta-potential as a function of adsorption step for PLL and ALG deposited on HCPT-loaded microcapsules ($n=3$)

层数	Zeta 电位/ mV	层数	Zeta 电位/ mV
0	-32.68	6	-42.43
1	12.43	7	11.48
2	-40.50	8	-43.05
3	11.38	9	14.25
4	-40.62	10	-51.16
5	10.26		

2.3.1 SEM 观察 向载物台的载玻片上滴加稀释的微胶囊悬浮液,空气中干燥后喷金,在 15 keV 的加速电压下进行 SEM 观察。图 1-A 为未包裹的 HCPT 晶体,图 1-B 为包裹 4 个 PLL/ALG 双层的 HCPT 微胶囊。随着吸附的聚电解质层数的增多,药物晶体表面的粗糙程度增加;随着聚电解质在晶体表面的沉积,晶体的不透明度也增加。结果表明成功制备了 HCPT(PLL/ALG)₄ 微胶囊。

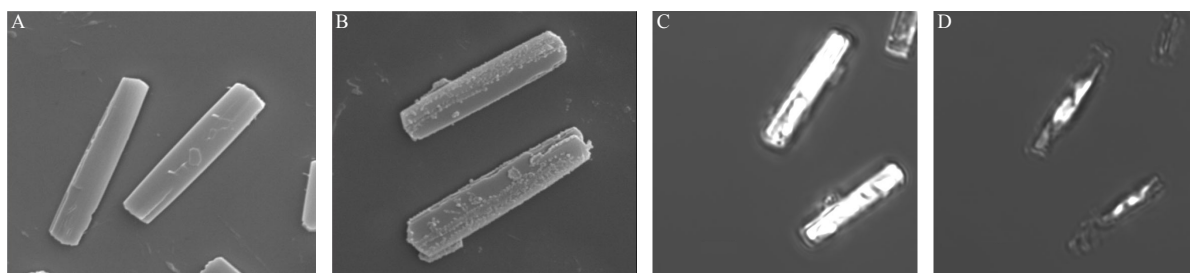
2.3.2 CLSM 观察 将微胶囊的悬浮液滴在载玻片上,用 485 nm 的氩激光激发,在 40 倍油镜上成像。图 1-C 为包裹 4 个 PLL/ALG 双层的 HCPT 微胶囊的 CLSM 图像,可以看出 HCPT 晶体呈棒状,大小为 10~15 μm 。为了观察由 PLL/ALG 组成的微胶囊外壳,用二甲基亚砜(DMSO)溶解 HCPT 粒子。图 1-D 展示了微胶囊核心 HCPT 正在溶解的过程,DMSO 把大部分 HCPT 核心溶出,剩下聚电解质外壳和少量未溶出的 HCPT,进一步证明了 PLL 和 ALG 两种聚电解质吸附在 HCPT 表面形成微胶囊的囊壁。

2.4 线性关系考察

精密称取 HCPT 粉末 5.0 mg,置 50 mL 量瓶中,甲醇定容得 0.1 mg/mL 的对照品溶液。将对照品溶液分别稀释至 0.012 5、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 系列对照品溶液。通过荧光光谱仪在激发波长为 383 nm,发射波长为 428 nm 的条件下,测定其吸光度值。以 HCPT 质量浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=1\,742.6X+0.304\,7$, $r^2=0.999\,6$,表明 HCPT 在 0.012 5~0.4 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.5 微胶囊包封率的测定

向制备好的总层数分别为 4、7、10 个双层的



A-HCPT 晶体 (SEM) B-包裹 4 个 PLL/ALG 双层的 HCPT 微胶囊 (SEM) C-包裹 4 个 PLL/ALG 双层的 HCPT 微胶囊 (CLSM) D-HCPT 微胶囊核溶解过程中 (CLSM)

A-HCPT crystal (SEM) B-bilayers (PLL/ALG)₄ coated HCPT microcapsules (SEM) C-bilayers (PLL/ALG)₄ coated HCPT microcapsules (CLSM) D-HCPT crystal cores in dissolution process with DMSO (CLSM)

图 1 HCPT 及其微胶囊的 SEM 和 CLSM 图像

Fig. 1 SEM and CLSM images of microcapsules and HCPT

HCPT 微胶囊中加入 1 mL 体积分数为 5% 的冻干保护剂甘露醇, 震荡使其充分混匀以保证 HCPT 在甘露醇中分散均匀, 然后冻干。

分别向装有冻干粉末的 10 mL 离心管中加入 5 mL DMSO, 充分溶解后 (此过程为溶核过程, 目的是将包埋在聚电解质中的 HCPT 溶解出来), 10 000 r/min 离心 5 min。分别取 50 μ L 上清液, 稀释 5 000 倍, 通过荧光光谱仪测定其吸光度值, 并通过线性回归方程计算溶解的 HCPT 的质量浓度, 从而得到微胶囊中 HCPT 的量, 计算包封率。

包封率 = 微胶囊中 HCPT 的质量 / 加入 HCPT 的总质量

总层数为 4、7、10 个 PLL/ALG 双层的 HCPT 微胶囊的平均包封率分别为 (68.41 $\pm$ 0.72) %、(62.06 $\pm$ 1.12) %、(55.24 $\pm$ 1.95) % ($n=3$)。随着 HCPT 微胶囊层数的增加, 在洗涤沉淀的过程中, 会导致 HCPT 的损失, 最终导致包封率下降。从整体上来看, 这种新型 HCPT 缓释微胶囊具有较高的包封率。

2.6 微胶囊体外释药特性研究

以 pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液为释放介质, 通过荧光光谱仪检测不同 PLL/ALG 双层面数 (0、4、7、10 个双层) 的 HCPT 微胶囊的体外释放性能。未被包裹的 HCPT 累积释放率超过 80% 只需要 4 h, 而囊壁层数为 4、7、10 个双层的微胶囊累积释放率超过 80% 的时间分别为 5.5、6、8 h (图 2), 释放时间随着聚电解质层数的增加而增加, 这说明聚电解质 PLL/ALG 包裹的 HCPT 微胶囊能够减缓 HCPT 的释放速度, 且释放速率随着聚电解质层数的增加而降低, 这是因为随着层数的增加囊壁变厚, 囊壁的渗透性降低, 导致 HCPT 释放速率降低, 这一结

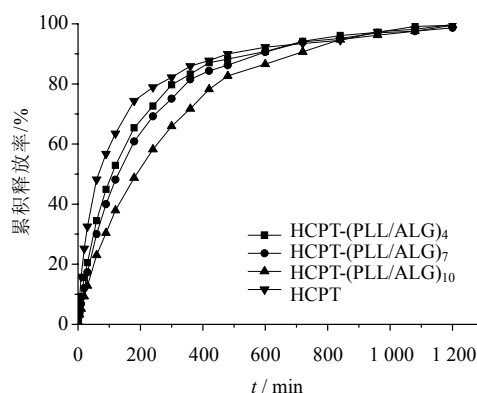


图 2 0、4、7、10 个 PLL/ALG 双层的 HCPT 微胶囊体外释放曲线

Fig. 2 Release curves of HCPT microcapsules with 0, 4, 7, 10 bilayers PLL/ALG *in vitro*

果也证明了两种聚电解质成功地吸附在 HCPT 表面形成缓释微胶囊。

3 讨论

HCPT 是喜树碱的一种重要衍生物, 其水溶性较差, 但化学结构中 E 环闭合的内酯结构在碱性条件下可开环形成可溶于水的羧酸盐形式^[11-12], 而封闭的内酯结构是抗肿瘤活性的必须结构^[13-14]。在配置 PLL 溶液的时候加入适量乙酸, 可以促进 HCPT 的 E 环内酯结构处于闭合状态。

采用 Zeta 电位仪检测 HCPT 表面电位的变化情况, 从而监控微胶囊的形成过程, 通过 SEM 和 CLSM 不但能表征微胶囊的核壳结构, 而且能够观察到 HCPT 的溶核过程, 证明了用 DMSO 溶解包封的 HCPT 来测定微胶囊包封率方法的可靠性。

本实验采用荧光光谱仪进行药物释放的研究, 选择了合适的激发和发射波长, 能够随时监测

HCPT 的累积释放情况。该方法专属性强、持续性好,不但简便易行,而且能够维持稳定的体外环境,排除不利因素的干扰,从而提高分析结果的准确性。

本实验通 LBL 将聚电解质 PLL 和 ALG 沉积在 HCPT 的表面,成功地制备了具有核壳结构的 HCPT 微胶囊,这种微胶囊具有较高的包封率和明显的缓释效应,方法简单易行,具有一定的应用前景。

参考文献

- [1] Wall M E, Wani M C, Cook C E, *et al.* Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Am Chem Soc*, 1966, 88(16): 3888-3890.
- [2] 黄瑞松, 叶云锋, 梁启成, 等. HPLC 法测定不同产地喜树果中喜树碱 [J]. *中草药*, 2009, 40(1): 137-140.
- [3] Hsiang Y H, Hertzberg R, Hecht S, *et al.* Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(27): 14873-14878.
- [4] 谢峻, 谈锋. 植物来源抗肿瘤药物研究进展 [J]. *中草药*, 2007, 38(2): 285-289.
- [5] Tyner K M, Schiffman S R, Giannelis E P. Nano-biohybrids as delivery vehicles for camptothecin [J]. *J Controlled Release*, 2004, 95(3): 501-514.
- [6] 许海玉, 张铁军, 赵平, 等. 中药缓控释制剂的研究现状及研发思路 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(1): 30-35.
- [7] 马艳, 岳秀丽, 马放, 等. 新型喜树碱缓释微胶囊的制备 [J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2009, 41(4): 48-50.
- [8] 王喆, 王为, 于炜婷, 等. 表面活性剂和全氟三丁胺对可移植海藻酸钠/聚赖氨酸/海藻酸钠微胶囊性能的影响 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(27): 5271-5274.
- [9] 陈儿同, 杨晓昀, 叶萍, 等. 微囊胰岛移植的实验研究进展 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(3): 561-565.
- [10] 肖莉, 张韵慧, 许建辰, 等. 芦丁壳聚糖-海藻酸钠漂浮微囊的制备研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(2): 209-212.
- [11] Yang L, Cui F D, Cun D M, *et al.* Preparation, characterization and biodistribution of the lactone form of 10-hydroxycamptothecin (HCPT)-loaded bovine serum albumin (BSA) nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2007, 340(1/2): 163-172.
- [12] Zhou Y Y, Du Y Z, Wang L, *et al.* Preparation and pharmacodynamics of stearic acid and poly (lactic-co-glycolic acid) grafted chitosan oligosaccharide micelles for 10-Hydroxycamptothecin [J]. *Int J Pharm*, 2010, 393(1/2): 143-151.
- [13] 郝艳丽, 邓英杰, 陈研, 等. 盐酸拓扑替康脂质体的制备及影响因素考察 [J]. *中国药学杂志*, 2004, 39(8): 602-604.
- [14] 马学琴, 董琳, 李国姗, 等. 环糊精的包合作用对羟基喜树碱活性内酯结构的保护 [J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(14): 1270-1274.