

吉西他滨单磷酸盐/紫杉醇联用靶向纳米粒的制备及其大鼠体内药动学研究

赖梦琴¹, 张 鹏^{1,3}, 杨 明^{1,2}, 李 翔^{1,2*}, 张 婧^{1,2*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学 创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 江西 南昌 330006

3. 九江学院 临床医学院/附属医院, 江西 九江 332000

摘要: 目的 制备共载吉西他滨单磷酸盐 (gemcitabine monophosphate, GMP)/紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 的靶向纳米粒并对其大鼠体内药动学行为进行研究。方法 采用金正均 Q 值法筛选 GMP/紫杉醇协同比例; 采用钙磷沉淀-微乳法、薄膜分散法制备 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-聚乙二醇-cRGD 修饰的非对称脂质双层紫杉醇/GMP 纳米粒 (P/G-NPs); 采用透射电子显微镜、马尔文激光粒度仪、超速离心法、LC-MS/MS、流通池法测定 P/G-NPs 的形态、平均粒径、Zeta 电位、包封率及载药量、体外释放行为, 并对 P/G-NPs iv 后在大鼠体内药动学行为进行研究。结果 GMP/紫杉醇联用最佳物质的量比为 17:1, 按照该配比制备得到 P/G-NPs 外观呈乳白色光, 粒子形态呈球形, 平均粒径为 (85.7±10.5) nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.14±0.06, Zeta 电位为 (18.30±0.63) mV。GMP 和紫杉醇的包封率分别为 (93.60±1.20)% 和 (98.70±0.50)%, 载药量分别为 (6.300±0.100)% 和 (0.800±0.004)%。体外释放行为显示 P/G-NPs 可实现药物的 pH 值敏感性缓释。药动学参数显示, P/G-NPs 药-时曲线下面积是紫杉醇和吉西他滨单磷酸盐混合溶液的 6 倍。结论 钙磷沉淀-微乳法、薄膜分散法联用可实现溶解度相异的 GMP、紫杉醇的按比例协同包载, 得到稳定性良好的 pH 值敏感性靶向纳米粒, 为更好发挥其临床应用提供了支持。

关键词: 吉西他滨单磷酸盐; 紫杉醇; 靶向纳米粒; 药动学; 钙磷沉淀-微乳法; 薄膜分散法; 体外释放; pH 值敏感

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)03-0669-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.008

Preparation of targeting nanoparticles co-loaded with gemcitabine monophosphate and paclitaxel and their pharmacokinetics in rats

LAI Meng-qin¹, ZHANG Peng^{1,3}, YANG Ming^{1,2}, LI Xiang^{1,2}, ZHANG Jing^{1,2}

1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. State Key Laboratory of Innovative Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

3. Clinical Medical College/Affiliated Hospital, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China

Abstract: **Objective** To prepare targeting nanoparticles co-loaded with gemcitabine monophosphate (GMP) and paclitaxel (PTX) and investigate its *in vivo* pharmacokinetics behaviors in rats. **Methods** The optimal molar ratio of GMP to PTX was screened by the Q value method. Calcium-phosphate precipitation-microemulsion and thin film dispersion methods were used to prepare the 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]-cRGD modified nanoparticles with asymmetric lipid bilayers containing PTX and GMP (P/G-NPs). Transmission electron microscope, Malvern Nano ZS, ultrafiltration combined with LC-MS/MS, and flow-through cell method were employed to study the physicochemical properties and drug

收稿日期: 2020-09-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760639); 国家自然科学基金资助项目 (81603054); 江西省自然科学基金资助项目 (20171BAB215066); 江西省自然科学基金资助项目 (20202ACBL216015); 江西省自然科学基金资助项目 (20202BABL206157); 江西省教育厅科研项目 (GJJ190666); 江西省教育厅科研项目 (GJJ190663); 江西省青年井冈山学者 (赣教党字[2018]41 号, 张婧); 江西省新世纪百千万人才 (2017082 李翔); 江西省新世纪百千万人才 (2020028 张婧); 江西中医药大学“1050”青年人才 (李翔, 张婧)

作者简介: 赖梦琴 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型研究。Tel: (0791)87119661 E-mail: 1034248536@qq.com

***通信作者:** 李 翔 (1981—), 男, 博士, 教授, 研究方向为药物新剂型研究。Tel: (0791)87119661 E-mail: sterlinghawk@126.com
张 婧 (1983—), 女, 博士, 教授, 研究方向为药物新剂型研究。Tel: (0791)87119027 E-mail: evens_zhang@163.com

concentrations of P/G-NPs after iv injection. **Results** P/G-NPs were prepared by the optimal molar ratio of GMP to PTX of 17:1. P/G-NPs was milky white with spherical shape. The mean particle size was (85.7 ± 10.5) nm, PDI was 0.14 ± 0.06 , and the Zeta potential was (18.30 ± 0.63) mV. The entrapment efficiency of GMP and PTX in P/G-NPs were $(93.60 \pm 1.20)\%$ and $(98.70 \pm 0.50)\%$, respectively, and the drug loading was $(6.300 \pm 0.100)\%$ and $(0.800 \pm 0.004)\%$, respectively. *In vitro* release of P/G-NPs showed a sustained-release behavior with certain pH sensitivity. The AUC of P/G-NPs was six folds higher than that of mixed solution containing free PTX and GMP. **Conclusion** The targeting synergistic nanoparticles co-loaded with GMP and PTX, two drugs with different solubility, can be obtained by calcium-phosphate precipitation-microemulsion and thin film dispersion methods, with good stability and pH-sensitive release profile, which provides support for better clinical application in future.

Key words: gemcitabine monophosphate; paclitaxel; targeting nanoparticles; pharmacokinetics; calcium-phosphate precipitation-microemulsion method; thin film dispersion method; *in vitro* release; pH-sensitive

紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 通过促进微管聚合, 抑制微管蛋白解聚, 诱导细胞周期阻滞在 G_2 与 M 期并促进凋亡, 具有独特的抗肿瘤机制^[1-2], 被广泛应用于乳腺癌等各种肿瘤的治疗, 然而紫杉醇几乎不溶于水、且无选择性全身分布是限制其临床应用的主要原因^[3-4]。为此, 制剂工作者尝试采用多种制剂技术方法改善其水溶性及靶向性^[5-6]。吉西他滨 (gemcitabine, GEM) 作为水溶性胞嘧啶核苷衍生物, 是细胞周期特异性抗代谢药物, 通过核苷激酶磷酸化, 转化成具有活性的二磷酸及三磷酸核苷发挥抗肿瘤作用^[7]。紫杉醇/吉西他滨作用机制相异、无交叉耐药性^[8], 联合用药后毒性显著下降^[9-10], 然而由于紫杉醇与吉西他滨溶解性完全相反, 且吉西他滨的体内半衰期比较短, 影响了药物联用的临床效果。

由于第 1 步的单磷酸化反应为吉西他滨能够产生活性的重要限速步骤^[11-12], 因此本课题使用吉西他滨单磷酸盐 (gemcitabine monophosphate, GMP) 作为吉西他滨替代药物。前期研究结果表明 GMP 具有和吉西他滨相同的作用机制, 且无明显骨髓抑制反应^[13], 本课题组前期已成功采用反相微乳液法在反相微乳体系中制备了尺寸均一、分散性良好且负载 GMP 药物的单层脂质包裹的磷酸钙纳米核心 (GMP-Cores)^[14]。

为了验证并实现 GMP 和紫杉醇的协同作用, 本实验进一步将 GMP-Cores、紫杉醇、胆固醇、长循环靶向磷脂分散于有机溶剂中, 采用薄膜分散法对 GMP-cores 进行二次包裹, 得到非对称脂质双层修饰的紫杉醇/GMP 的纳米粒 (asymmetric lipid layers coated nanoparticles co-loaded with gemcitabine monophosphate and paclitaxel, P/G-NPs, 结构示意图见图 1), 并对所得 P/G-NPs 的理化性质及体内药动学行为进行评价。

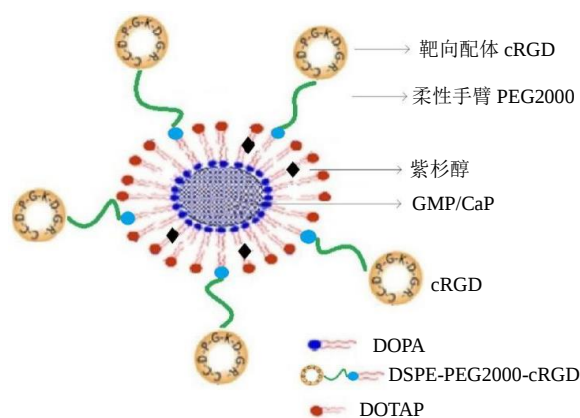


图 1 P/G-NPs 结构示意图

Fig. 1 Schematic structure of P/G-NPs

1 仪器与材料

1.1 仪器

JEM-1200 EX 型透射电子显微镜 (TEM), 日本 JEOL 公司; Nano ZS 型纳米粒度仪, 英国 Malvern 公司; 3-18K 型冷冻高速离心机, 德国 Sigma 公司; Qtrap4500 三重四级杆液质联用仪, 美国 AB Sciex 公司; 减压旋转蒸发器, 瑞士 Buchi 公司; Bio-RAD 680 酶标仪, 美国 Bio-RAD 公司; FV1000-IX81 激光共聚焦显微镜, 日本 Olympus 公司; BSA124S 电子分析天平, 北京赛多利斯天平有限公司; KQ5200BE 型数控超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; JY92-IIIN 探头超声仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; DF-101S 磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限公司。

1.2 材料

紫杉醇, 质量分数 $\geq 97\%$, 美国 Sigma-Aldrich 公司; GMP, 质量分数 $\geq 97\%$, 常州施嘉生物医药科技有限公司; 紫杉醇注射剂 (规格 5 mL : 30 mg), 批号 1604201, 四川三精升和制药有限公司, 国药准字 H20046119; 多西紫杉醇 (doxorubicin, DOX), 质量分数 $\geq 99.0\%$, 批号 18072044, 上海同田生物

技术股份有限公司；头孢克洛（cefaclor, CEC），质量分数 94.4%，批号 130481-201205，中国食品药品检定研究院；1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷（甲基硫酸盐）（1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane chloride salt, DOTAP）和二油酰磷脂酸（dioleoylphosphatidic acid, DOPA），美国 Avanti Polar Lipids 公司；1,2-二硬酯酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-聚乙二醇 2000（1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000], DSPE-PEG2000）和 1,2-二硬酯酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-聚乙二醇 2000-cRGD（1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]-cRGD, DSPE-PEG2000-cRGD），西安瑞禧生物科技有限公司；表面活性剂聚氧代乙烯（5）壬基苯基醚，支化（Igepal® CO-520），美国 Sigma 公司；实验用水为去离子水，甲醇、乙腈为色谱纯；其余试剂或药品均为分析纯。

人乳腺癌 MCF-7 细胞，北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司；RPMI 1640 培养基和胎牛血清，美国 Gibco 公司；CCK-8 试剂盒、胆固醇，美国 Sigma 公司。SD 大鼠，体质量（200±20）g，雄性，湖南斯莱克景达有限公司提供，合格证号：SCXK（湘）2019-0004。所有动物实验遵循江西中医药大学有关实验动物管理和使用的规定，均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 体外协同作用考察

取对数生长期的 MCF-7 细胞，以细胞数 $5 \times$

$10^4/\text{mL}$ 接种在 96 孔板中，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h，弃去上层培养液，分别加入含有不同物质的量比药物溶液的培养基（free PTX/GMP, P/G-Free）（给药组为实验组），同时设置阴性对照孔（以未给药的含细胞组为对照组）和空白孔（RPMI 1640 培养基的不含细胞孔作为空白组），每个浓度设 3 复孔，24 h 后每孔加入 CCK-8 液 10 μL，混匀，37 °C 继续培养 2 h，以酶标仪检测 450 nm 处的吸光度（A）值，按照说明书计算细胞生长抑制率 [生长抑制率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$]。P/G-Free 对 MCF-7 细胞的生长抑制率结果见表 1。

采用金正均 Q 值法判断两药是否具有协同作用，计算 q 值^[15]： $q = E_{ab} / (E_a + E_b - E_a \times E_b)$ ，其中 E_a 、 E_b 为单药抑制率， E_{ab} 为两药合用抑制率。

q 值计算结果见表 2，其中， $q > 1.15$ 为协同作用， $0.85 \leq q \leq 1.15$ 为相加作用， $q < 0.85$ 为拮抗作用。结果见表 2，当 GMP 与紫杉醇混合物质的量比为 17:1 时，q 值为 0.908，表现为相加作用且抑制率最高。

2.2 P/G-NPs 的制备

2.2.1 GMP-Cores 的制备 采用反向微乳法制备纳米核心 GMP-Cores^[14]。取一定量含有环己烷-Igepal® CO-520 溶液（71:29）的混合物作为油相，分成 2 份（A 和 B）。A 油相中滴加 300 μL 60 mmol/L CaCl₂ 溶液；B 油相中滴加 300 μL 由 75 μL 50 mmol/L Na₂HPO₄、90 μL 60 mmol/L GMP 组成的水溶液，搅拌均匀后加入 1 mL 20 mmol/L DOPA，然后将 A、

表 1 P/G-Free 对 MCF-7 细胞的生长抑制率 (n = 3)

Table 1 Inhibition rates of P/G-Free on MCF-7 cells (n = 3)

紫杉醇/ (μmol·L ⁻¹)	GMP/ (μmol·L ⁻¹)	生长抑 制率/%	紫杉醇/ (μmol·L ⁻¹)	GMP/ (μmol·L ⁻¹)	生长抑 制率/%	紫杉醇/ (μmol·L ⁻¹)	GMP/ (μmol·L ⁻¹)	生长抑 制率/%
12.0	10.3	75.9±1.8	3.0	10.3	68.8±0.9	0.7	10.3	55.7±2.1
	5.2	65.3±2.0		5.2	42.7±2.5		5.2	74.0±1.0
	2.6	51.2±4.3		2.6	35.5±3.3		2.6	43.1±1.9
	1.3	56.4±5.3		1.3	35.7±2.2		1.3	42.9±3.9
	0.7	60.7±2.6		0.7	28.2±5.0		0.7	29.2±4.1
	0.3	48.5±2.9		0.3	22.7±3.6		0.3	27.4±4.8
6.0	10.3	73.6±3.2	1.5	10.3	58.1±4.1	0.3	10.3	56.9±1.5
	5.2	56.3±1.4		5.2	42.8±2.2		5.2	78.3±3.0
	2.6	50.4±2.5		2.6	34.1±5.4		2.6	70.3±3.7
	1.3	43.5±4.4		1.3	39.3±4.2		1.3	71.5±2.0
	0.7	45.7±3.8		0.7	30.5±3.8		0.7	29.0±6.8
	0.3	36.0±4.2		0.3	30.1±5.1		0.3	27.0±2.3

表 2 P/G-Free 对 MCF-7 细胞的协同抑制作用 ($n=3$)Table 2 Synergistic inhibition effect of P/G-Free on MCF-7 cells ($n=3$)

紫杉醇/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	GMP/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	q 值	紫杉醇/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	GMP/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	q 值
12.0	10.3	0.893	1.5	10.3	0.798
	5.2	0.840		5.2	0.578
	2.6	0.631		2.6	0.488
	1.3	0.782		1.3	0.528
	0.7	0.813		0.7	0.475
	0.3	0.636		0.3	0.473
6.0	10.3	0.873	0.7	10.3	0.772
	5.2	0.747		5.2	0.876
	2.6	0.608		2.6	0.571
	1.3	0.581		1.3	0.568
	0.7	0.599		0.7	0.462
	0.3	0.497		0.3	0.449
3.0	10.3	0.834	0.3	10.3	0.869
	5.2	0.572		5.2	0.908
	2.6	0.491		2.6	0.85
	1.3	0.509		1.3	0.696
	0.7	0.455		0.7	0.459
	0.3	0.405		0.3	0.441

B 2 相混合, 继续在混合液中滴加 1 mL 20 mmol/L DOPA, 20 min 后待反应完成, 加入等量无水乙醇破乳, 4 °C 高速离心 ($10\,000\times g$) 20 min, 弃去上清液, 无水乙醇洗涤 2 次后, 将得到的 GMP-Cores 溶解在氯仿中, 置于 -20 °C 冰箱中备用。

2.2.2 P/G-NPs 的制备 采用改进的薄膜分散法^[16], 制备 P/G-NPs。将 GMP-Cores 与紫杉醇 (GMP 与紫杉醇的物质的量比为 17:1), 总磷脂与胆固醇质量比为 7.1:1, 含 cRGD 多肽的磷脂混合物 (DOTAP、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG2000-cRGD 质量比 3.5:11:1) 共同溶解于一定量氯仿中, 旋转真空蒸发除去有机溶剂, 并在恒定的氮气流下进一步干燥 30 min, 以在玻璃壁表面形成含药的脂质薄膜。以水为水化介质, 60 °C 水浴搅拌 30 min, 洗脱脂质薄膜, 所得混悬液于 200 W 功率下探头超声 2 min, 得到的混悬液通过 0.22 μm 滤膜滤过, 并储存在 4 °C。

2.3 理化性质考察

2.3.1 GMP 和紫杉醇的测定 采用三重四级杆液质联用仪 (LC-MS/MS) 测定 GMP 和紫杉醇的含量。

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Welch Materials 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~1 min, 50% 乙腈; 1~2.5 min, 55% 乙腈; 2.5~3 min, 96% 乙腈; 3~6.6 min, 10% 乙腈; 体积流量 0.28 mL/min; 自动进样器温度 25 °C, 进样体积 10 μL 。

(2) 质谱条件: 质谱仪在多离子反应监测模式下以正离子模式操作。用于 GMP 和内标 CEC 的定量分析的离子反应比分别为 m/z 342.0 $\rightarrow$ 301.2 和 m/z 368.1 $\rightarrow$ 174.1。GMP 与内标的碰撞能量分别为 15、16 eV。紫杉醇和内标 DOX 的定量分析的离子反应比分别为 m/z 876.3 $\rightarrow$ 308.1 和 m/z 830.5 $\rightarrow$ 549.3。紫杉醇和内标的碰撞能量分别为 37、36 eV。电离条件包括使用电喷雾离子源, 注入电压为 5.5 kV, 离子源温度为 600 °C, GS1 和 GS2 压力为 379.21 kPa (55 psi), 碰撞气体压力为 48.26 kPa (7 psi)。

以质量浓度为纵坐标 (Y), 药物峰面积与内标峰面积比值为横坐标 (X) 建立标准曲线, 得紫杉醇、GMP 线性回归方程分别为 $Y=0.113\,1\,X+0.050\,3$ ($r=0.999\,0$)、 $Y=0.019\,9\,X-0.003\,8$ ($r=0.998\,5$), 线性范围依次为紫杉醇 0.02~20.00 $\mu\text{g/mL}$ 、GMP 0.01~10.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.2 包封率与载药量的测定 采用超滤离心分离游离药物^[17]。取 P/G-NPs 适量置于超滤离心管中 (截留相对分子质量 10 000), 4 °C 离心 ($4000\times g$) 15 min, 收集滤液, 采用 “2.2” 项下方法测定滤液中 GMP、紫杉醇含量 (W_{free}); 另取等体积 P/G-NPs, 按照 1:4 的体积比加入有机溶剂 [四氢呋喃-1 mol/L 盐酸 (7:3)], 涡旋混匀, 测定混合液中 GMP、紫杉醇含量 (W_{total}), 计算 P/G-NPs 的包封率 [包封率 = $(W_{\text{total}} - W_{\text{free}})/W_{\text{total}}$] 与载药量 [载药量 = $(W_{\text{total}} - W_{\text{free}})/W_{\text{纳米粒}}$], 其中纳米粒总质量 ($W_{\text{纳米粒}}$) 由冷冻干燥后称定计算得到。结果紫杉醇、GMP 的包封率分别为 $(98.70\pm0.50)\%$ 、 $(93.60\pm1.20)\%$ ($n=3$), 载药量分别为 $(0.800\pm0.004)\%$ 、 $(6.300\pm0.100)\%$ ($n=3$)。

2.3.3 形态及粒径、Zeta 电位测定 分别取 GMP-Cores 和 P/G-NPs 5 μL 滴加于铜网上, 2 min 后吸去多余液体, 自然晾干, TEM 下观察, GMP-Cores 呈球形, 分散性好, 透射电镜测得的粒径约 20 nm (图 2-A)。表面修饰非对称的磷脂双分子层, 并将脂溶性的紫杉醇嵌入于磷脂双分子层后, 观察到球形或椭球形 P/G-NPs (图 2-B)。

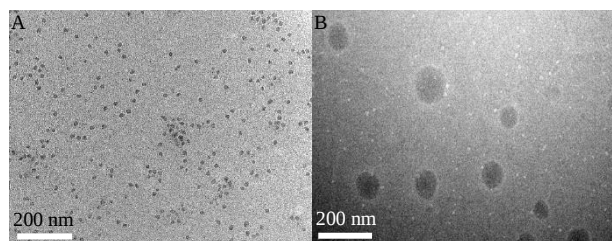


图2 GMP-Cores (A) 和 P/G-NPs (B) 的 TEM 图

Fig. 2 TEM of GMP-Cores (A) and P/G-NPs (B)

采用马尔文激光粒度测定仪测定其粒径及 Zeta 电位。结果 P/G-NPs 的平均粒径为 (85.7 ± 10.5) nm ($n=3$), 多分散指数为 0.14 ± 0.06 ($n=3$), Zeta 电位为 (18.3 ± 0.63) mV ($n=3$)。

2.4 体外释放度考察^[18]

采用流通池法考察 P/G-NPs 的体外释放 (CE7 Smart, 美国 Sotax 公司)。精密量取一定量的 P/G-NPs, 置于透析袋中 (截留相对分子质量 300 000), 然后放置于 100 mL 不同 pH 值的 PBS 溶液中 (含有 0.5% 聚山梨酯 80, pH 7.4、6.5、5.0), 在 37 °C、200 r/min 的条件下恒温振荡。分别于 0.5、1、2、4、8、12、24 h 取样 1 mL, 并补充相同体积的新鲜释放介质, 按“2.3.1”项下测定释放介质中药物的质量浓度, 以释放时间为横坐标、累积释放率为纵坐标绘制释放曲线, 结果见图 3。P/G-NPs 的药物释放未见明显突释。对于紫杉醇, 在不同 pH 值释放介质中均释放快于 GMP, 尤其在 pH 7.4 条件下 24 h 累积释放率达到 50%。对于 GMP, 随着释放介质 pH 值的降低, P/G-NPs 释放速度逐渐加快, pH 值为 5 介质中在 24 h 药物累积释放率达到 34%, 分别是 pH 7.4、6.5 条件下释放度的 3.8、1.7 倍, 说明 P/G-NPs 中 GMP 的释放具有一定的 pH 值敏感性,

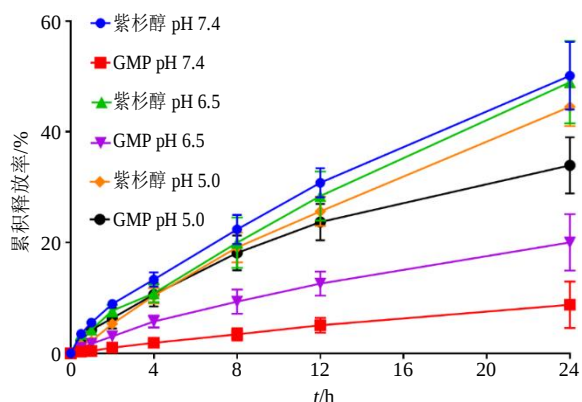


图3 P/G-NPs 中的 GMP 和紫杉醇在不同 pH 值介质中的体外释放曲线 ($n=3$)

Fig. 3 *In vitro* release profiles of GMP and PTX from P/G-NPs in media with different pH values ($n=3$)

对肿瘤内部酸性环境具有响应性。

2.5 药物动力学研究

2.5.1 血浆样品处理 取大鼠眼眶静脉血 300 μ L 加入到肝素钠抗凝血管中, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。取血浆 100 μ L, 精密加入质量浓度为 1.0 μ g/mL DOX 的甲醇溶液 50 μ L 作为紫杉醇的内标, 加入质量浓度为 0.1 μ g/mL 头孢克洛内标水溶液 50 μ L 作为 GMP 的内标, 涡旋 5 min, 再加入 300 μ L 甲醇沉淀剂, 继续涡旋 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液按照“2.3.1”项下方法进行检测。

2.5.2 专属性考察 专属性考察结果如图 4 所示,

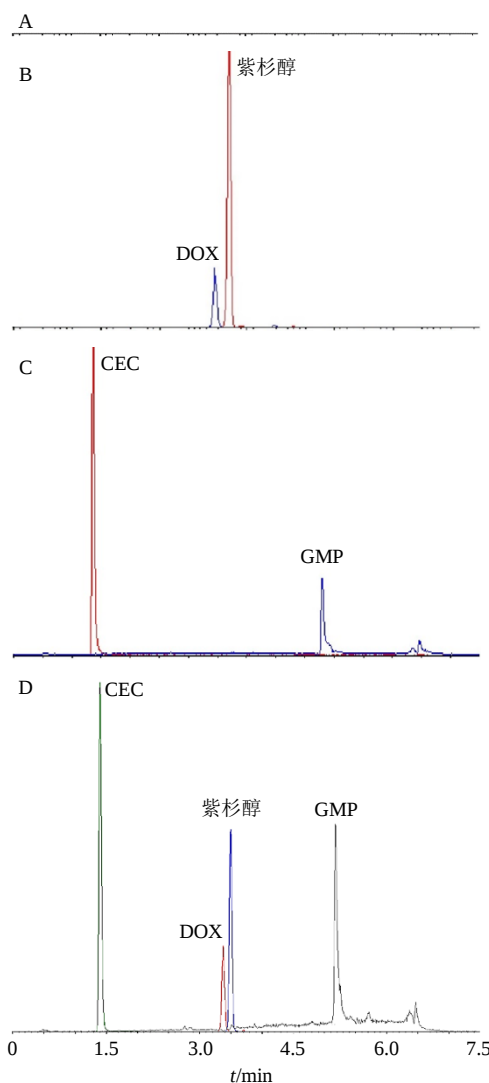


图4 空白血浆 (A)、空白血浆加紫杉醇和 DOX (B)、空白血浆加 GMP 和 CEC (C)、空白血浆加紫杉醇、DOX、GMP 和 CEC (D) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of blank plasma (A), plasma spiked with PTX and DOX (B), plasma spiked with GMP and CEC (C), and plasma spiked with PTX, DOX, GMP and CEC (D)

在此色谱条件下,可实现同时检测溶解度不同的紫杉醇和 GMP,与血浆内源性物质分离良好。

2.5.3 精密度实验 精密称取紫杉醇和 GMP 对照品适量,用甲醇溶解并定容,摇匀,再次稀释至系列质量浓度,得到混合对照品溶液,将空白血浆与对照品溶液混匀,按照“2.5.1”项下操作,得到紫杉醇的质量浓度分别为 0.1、2.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$, GMP 的质量浓度分别为 0.05、1.00、10.00 $\mu\text{g/mL}$ 的低、中、高 3 个质量浓度的样品,平行制备 5 份样本进行检测。每个质量浓度在同 1 d 内检测 3 次,分别计算紫杉醇和 GMP 的日内精密度;相同的方法下每个浓度连续检测 3 d,分别计算紫杉醇和 GMP 的日间精密度,结果见表 3,结果显示该方法日内、日间精密度 $\text{RSD} < 15\%$,符合方法学要求。

表 3 紫杉醇和 GMP 血浆样品的精密度考察 ($n = 5$)

Table 3 Precision of PTX and GMP plasma samples ($n = 5$)

紫杉醇/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度/%		GMP/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度/%	
	日间	日内		日间	日内
0.1	11.3	9.1	0.05	14.1	7.7
2.0	7.9	6.6	1.00	13.0	8.1
20.0	6.8	4.2	10.00	9.6	5.4

2.5.4 提取回收率 配制质量浓度分别为 0.1、2.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的低、中、高 3 个质量浓度的紫杉醇血浆样品,质量浓度分别为 0.05、1.00、10.00 $\mu\text{g/mL}$ 的低、中、高 3 个质量浓度的 GMP 血浆样品,按照“2.5.1”项下方法分别测定紫杉醇、GMP 的峰面积 ($A_{\text{实测}}$)。

精密称取紫杉醇和 GMP 对照品适量,用甲醇溶解并定容,摇匀,再次稀释至系列浓度,得到混合对照品溶液,将空白血浆与对照品溶液混匀,按照“2.5.1”项下操作,得到紫杉醇的浓度分别为 0.1、2.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、GMP 的浓度分别为 0.05、1.00、10.00 $\mu\text{g/mL}$ 的低、中、高 3 个质量浓度的样品,测定紫杉醇和 GMP 的峰面积 ($A_{\text{理论}}$)。计算紫杉醇和 GMP 的提取回收率 (提取回收率 = $A_{\text{实测}}/A_{\text{理论}}$),平行 5 次。结果表明,高、中、低 3 个质量浓度的紫杉醇提取回收率均在 86.4%~95.5%,高、中、低 3 个质量浓度的 GMP 提取回收率均在 80.3%~94.4%,符合生物样品检测要求。

2.5.5 药动学实验 SD 大鼠 12 只,体质量 (200 $\pm$ 20) g,随机分为 2 组,实验前禁食不禁水。按照 16 mg/kg GMP 和 2.0 mg/kg 紫杉醇的剂量尾 iv 分

别注射 P/G-Free (按照规定剂量将 GMP 溶解于紫杉醇注射液)、P/G-NPs,分别于给药后 1、4、7、15、30 min 及 1、2、4、8、12 h,大鼠眼眶静脉丛取血 0.5 mL,放置于低温离心机 6000 r/min 离心 5 min,取上清按照“2.5.1”项下方法处理,检测紫杉醇及 GMP 的血药浓度,数据经 PK solver 软件处理,血药浓度-时间曲线如图 5 所示,药动学参数结果见表 4。

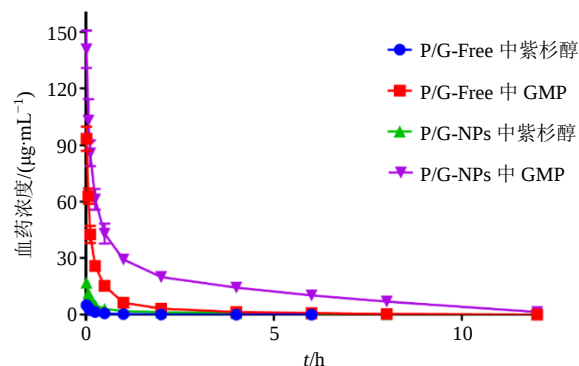


图 5 静脉注射含有紫杉醇、GMP 不同制剂的血药-浓度时间曲线 ($n = 6$)

Fig. 5 Plasma concentration-time curves of PTX and GMP after iv injection of different preparations ($n = 6$)

3 讨论

多成分药物联合治疗在肿瘤等疾病领域愈发重要,将多种成分同时包载于纳米载体中,可以保持药物活性的同时,进一步发挥其相加作用而增强抑制剂疗效^[19]。本研究采用核-壳结构纳米粒对紫杉醇、GMP 进行联合包载。紫杉醇、GMP 分别从抑制微管蛋白解聚、阻止 DNA 聚合酶链延长、降低核苷酸还原酶活力等方面对肿瘤细胞起到杀伤作用^[20]。紫杉醇/吉西他滨联合应用与单纯紫杉醇的 III 期试验表明,在紫杉醇中加入吉西他滨,对先前接受蒽环类药物治疗的乳腺癌妇女,是一种有效的治疗方法^[21]。本实验设计金正均 Q 值法实验也证明了紫杉醇及 GMP 单药在物质的量比为 17:1 的条件下可以对降低 MCF-7 细胞细胞活力起到协同作用。

本研究采用反相微乳法制备了粒径可控的 GMP-Cores,并用薄膜分散法在 GMP-Cores 表面包裹非对称的磷脂双分子层,并将脂溶性的紫杉醇嵌入于磷脂双分子层,双分子层修饰 cRGD 靶向长循环磷脂,制备得到主动靶向 P/G-NPs。体外释放结果显示,和 GMP 相比,紫杉醇释放速度更快,原因在于紫杉醇位于磷脂双分子层疏水区,而 GMP 包裹于内部核心颗粒中,因此紫杉醇更容易接触释

表 4 P/G-Free 和 P/G-NPs 中紫杉醇和 GMP 的药动学参数 (n = 6)
Table 4 Pharmacokinetic parameters of PTX and GMP in P/G-Free and P/G-NPs (n = 6)

参数	单位	P/G-Free		P/G-NPs	
		紫杉醇	GMP	紫杉醇	GMP
C_{max}	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	5.10 ± 1.76	93.38 ± 18.87	$17.04 \pm 4.22^*$	$140.80 \pm 25.22^{\S}$
t_{max}	h	0.016 7	0.016 7	0.016 7	0.016 7
$t_{1/2}$	h	2.33 ± 0.38	3.04 ± 0.93	$7.71 \pm 0.44^*$	$4.46 \pm 0.76^{\S}$
$AUC_{0\sim t}$	$\text{min}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	114.53 ± 13.53	$2\,265.79 \pm 293.34$	$684.97 \pm 99.93^*$	$10\,324.06 \pm 1\,801.59^{\S}$
$MRT_{0\sim t}$	min	59.25 ± 4.13	92.45 ± 11.25	$197.28 \pm 17.08^*$	$210.68 \pm 16.32^{\S}$
CL^a	$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	0.017 ± 0.003	$0.007 \pm 0.002\,3$	$0.002\,8 \pm 0.001\,1^*$	$0.001\,5 \pm 0.000\,4^{\S}$
V_z^b	$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.49 ± 0.31	1.22 ± 0.35	$0.74 \pm 0.23^*$	$0.34 \pm 0.11^{\S}$

a-血浆清除率 b-表观分布容积 与 P/G-Free 组中紫杉醇比较: * $P < 0.05$; 与 P/G-Free 组中 GMP 比较: $^{\S}P < 0.05$

a-the total plasma clearance b-the apparent volume of distribution * $P < 0.05$ vs PTX in P/G-Free; $^{\S}P < 0.05$ vs GMP in P/G-Free

放介质。由于 GMP 是在发生磷酸盐与钙盐共沉淀的过程中,包裹于 Ca-P 颗粒中,其释放特性具有一定的酸敏感特性,体外不同 pH 释放介质对 GMP 的体外释放行为的影响也显示, Ca-P 在接近内涵体酸性 pH 条件下 (pH 5.0~5.5) 可快速溶解, GMP 释放速度快于 pH 7.4、6.5,这有利于实现纳米粒在内涵体内造成渗透压的失衡致内涵体破裂,释放药物进入胞浆中,使其具有自发的胞浆释药特性。

药动学结果显示, P/G-NPs 中紫杉醇和 GMP 的最大血浆浓度 (C_{max}) 均显著高于 P/G-Free。P/G-NPs ($AUC_{0\sim t}$) 的面积比 P/G-Free 高 6 倍,平均停留时间 ($MRT_{0\sim t}$) 增加 2.3 倍。与 P/G-Free 相比, P/G-NPs 中紫杉醇和 GMP 的 V_z 值明显降低,分别为 50.3%和 72.1%,说明与 P/G-Free 相比, P/G-NPs 可实现较好的长循环效果,这与纳米粒中 PEG2000 修饰磷脂相关,PEG 可在纳米粒表面水化形成屏障^[22],可减少血液中蛋白对其的吸附,还可帮助纳米粒逃避网状内皮吞噬系统的捕获,使得纳米粒在血液系统中的稳定性明显提高。

在长循环 PEG 链可延长药物在体内的循环时间的同时, P/G-NPs 表明修饰 DSPE-PEG2000-cRGD,其靶向基团 cRGD 可与癌细胞表面 $\alpha_v\beta_3/\beta_5$ 整合素受体特异性结合^[23-24],进而通过内吞作用进入肿瘤细胞,有望进一步增强纳米粒靶向性,在肿瘤部位发挥药物协同作用,提高药物抗肿瘤效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Zhang Z P, Mei L, Feng S S. Paclitaxel drug delivery systems [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10(3): 325-340.

[2] Leung J C, Cassimeris L. Reorganization of paclitaxel-stabilized microtubule arrays at mitotic entry: Roles of depolymerizing kinesins and severing proteins [J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(10): 1337-1347.

[3] 史清文. 天然药物化学史话: 紫杉醇 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 1878-1884.

[4] 张梦莹, 王一帆, 敖惠, 等. 聚多巴胺表面功能化叶酸靶向紫杉醇纳米粒的制备及抗肿瘤研究 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(1): 52-56.

[5] 王小宁, 闫梦茹, 马远涛, 等. 载紫杉醇聚(2-乙基-2-噁唑啉)修饰单壁碳纳米管递药系统的制备及体外抗肿瘤作用评价 [J]. *中草药*, 2020, 51(3): 607-615.

[6] 张倩, 杨坛, 黎枰坪, 等. 左旋肉碱修饰的壳聚糖-硬脂酸协载槲皮素口服紫杉醇纳米胶束的制备、表征及在体肠循环研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(21): 5440-5446.

[7] Plunkett W, Huang P, Searcy C E, et al. Gemcitabine: Preclinical pharmacology and mechanisms of action [J]. *Semin Oncol*, 1996, 23(5 suppl 10): 3-15.

[8] Gazitt Y, Rothenberg M L, Hilsenbeck S G, et al. Bcl-2 overexpression is associated with resistance to paclitaxel, but not gemcitabine, in multiple myeloma cells [J]. *Int J Oncol*, 1998, 13(2): 397-405.

[9] Delfino C, Caccia G, Gonz  les L R, et al. Gemcitabine plus paclitaxel as first-line chemotherapy for patients with advanced breast cancer [J]. *Oncology*, 2004, 66(1): 18-23.

[10] Shroff R T, Javle M M, Xiao L, et al. Gemcitabine, cisplatin, and nab-paclitaxel for the treatment of advanced biliary tract cancers: A phase 2 clinical trial [J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(6): 824-830.

[11] Heinemann V, Hertel L W, Grindey G B, et al. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine [J]. *Cancer Res*, 1988, 48(14): 4000-4006.

- 4024-4031.
- [12] Derissen E J B, Huitema A D R, Rosing H, *et al.* Intracellular pharmacokinetics of gemcitabine, its deaminated metabolite 2',2'-difluorodeoxyuridine and their nucleotides [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2018, 84(6): 1279-1289.
- [13] Miao L, Guo S, Zhang J, *et al.* Nanoparticles with precise ratiometric co-loading and co-delivery of gemcitabine monophosphate and cisplatin for treatment of bladder cancer [J]. *Adv Funct Mater*, 2014, 24(42): 6601-6611.
- [14] Zhang J, Miao L, Guo S, *et al.* Synergistic anti-tumor effects of combined gemcitabine and cisplatin nanoparticles in a stroma-rich bladder carcinoma model [J]. *J Control Release*, 2014, 182: 90-96.
- [15] 赵文歌, 孙月, 庄静, 等. 金正均 Q 值法评价苦参碱联合阿霉素对人乳腺癌细胞的协同作用 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(1): 33-36.
- [16] 倪斌, 李翔, 罗云, 等. 姜黄素眼用脂质体的制备及晶状体抗氧化作用考察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(6): 5-9.
- [17] 吴艳婷, 郭思旖, 时军, 等. 穿膜肽 TAT 修饰载丹酚酸 B 脂质体的制备及其抑制人皮肤成纤维细胞增殖与迁移初步研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(1): 59-68.
- [18] Zhang J, Chen Y, Li X, *et al.* The influence of different long-circulating materials on the pharmacokinetics of liposomal vincristine sulfate [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 4187-4197.
- [19] Zhang J, Shen L, Li X, *et al.* Nanoformulated codelivery of quercetin and alantolactone promotes an antitumor response through synergistic immunogenic cell death for microsatellite-stable colorectal cancer [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(11): 12511-12524.
- [20] Samanta K, Setua S, Kumari S, *et al.* Gemcitabine combination nano therapies for pancreatic cancer [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(11): 574.
- [21] Albain K S, Nag S M, Calderillo-Ruiz G, *et al.* Gemcitabine plus paclitaxel versus paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(24): 3950-3957.
- [22] Shimizu T, Abu Lila A S, Fujita R, *et al.* A hydroxyl PEG version of PEGylated liposomes and its impact on anti-PEG IgM induction and on the accelerated clearance of PEGylated liposomes [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 127: 142-149.
- [23] Zhang N, Li C, Zhou D, *et al.* Cyclic RGD functionalized liposomes encapsulating urokinase for thrombolysis [J]. *Acta Biomater*, 2018, 70: 227-236.
- [24] Li J C, Ding F Y, Qian X L, *et al.* Anti-inflammatory cytokine IL10 loaded cRGD liposomes for the targeted treatment of atherosclerosis [J]. *J Microencapsul*, 2020, doi:10.1080/02652048.2020.1836058.

[责任编辑 郑礼胜]