技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000789

载天门冬酰胺酶自组装透明质酸－聚乙二醇/γ－环糊精纳米囊的体外活性和稳定性探究

李 瑶,晏子俊,李万玉,胡雪原,何 丹,张景勋
(重庆医科大学药物高校工程研究中心,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:制备载天门冬酰胺酶(asparaginase,AN)自组装透明质酸-聚乙二醇(hyaluronic acid-graft-poly(ethylene glycol),HA-g-PEG)/γ-环糊精(γ-cyclodextrin,γ-CD)纳米囊(HA-g-PEG/γ-CD nanocapsules loaded with AN,AHRPs),并对 AHRPs 及游离 AN 在体外的活性及稳定性进行研究。**方法**:采用自组装法制备了 AHRPs,考察了 AHRPs 的透射电镜、粒径、Zeta 电位、最适温度和最适 pH,并通过贮存稳定性、抗胰蛋白酶水解能力、抗部分金属离子及有机化合物、热稳定性、酸碱稳定性和血浆稳定性等实验,对游离 AN 与 AHRPs 体外稳定性差异进行了一定的考察。**结果**:AHRPs 的粒径为(410.30±3.20) nm,Zeta 电位为(-31.40±1.65) mV,AHRPs 和游离 AN 的最适温度分别为 50 ℃和 60 ℃,最适 pH 值均为 7.5。稳定性实验结果显示,相同条件下,AHRPs 的贮存稳定性、抗胰蛋白酶水解能力、抗金属离子和有机化合物、热稳定性、酸碱稳定性和血浆稳定性均优于游离 AN。**结论**:AHRPs 能同时提高游离 AN 在体外的活性及稳定性。

【关键词】天门冬酰胺酶;空心纳米囊;稳定性;最适 pH;最适温度
【中图分类号】R945 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-05-08

Study on in vitro activity and stability of asparaginase loaded in self-assembly of polyethylene glycol-hyaluronic acid/γ-cyclodextrin nanocapsules

Li Yao, Yan Zijun, Wanyu Li, Hu Xueyuan, He Dan, Zhang Jingqing
(*Department of Medicine, Engineering Research Center, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To prepare asparaginase (AN) loaded in self-assembly of polyethylene glycol-hyaluronic acid/γ-cyclodextrin nanocopsules (AHRPs), and then to investigate the in vitro activity and stability difference between AHRPs and free AN. ***Methods***: AHRPs was prepared by self-assembly method. The image of AHRPs under the transmission electron microscopy was observed. The size, zeta potential, optimal temperature and optimal pH value were detected. The in vitro activity and stability of AHRPs and free AN were investigated by measuring storage stability, trypsin stability, the effect of several metal ions and organic compounds, thermal stability, acid- and basic-stabilities and plasma stability on free AN and AHRPs. ***Results***: After calculating, the particle size was (410.30±3.20) nm, zeta potential was (-31.40±1.65) mV. The optimum temperature of AHRPs and free AN was 50 ℃ and 60 ℃, respectively. The optimum pH of AHRPs and free AN was 7.5. The results of stability experiments showed that, storage stability, trypsin stability, the effect of several metal ions and organic compounds, thermal stability, acid- and basic-stabilities and plasma stability of AHRPs all were better than those of free AN. ***Conclusion***: AHRPs can improve the activity and significantly enhance the stability of AN in vitro.

【Key words】asparaginase; hollow nanocapsules; stability; optimal pH; optimal temperature

天门冬酰胺酶(asparaginase,AN)是一类酰胺键水解酶,目前主要应用于肿瘤的治疗[1]。天门冬酰胺是细胞合成蛋白质的必需氨基酸,AN 通过降解天门冬酰胺从而抑制肿瘤细胞中蛋白质的正常合成,导致肿瘤细胞的死亡[2-4]。AN 具有疗效显著和对正常细胞几乎没有影响的优点,但在临床上仍然存在稳定性差、半衰期短且存在副作用等问题[5-6],这些问题在一定程度上限制了 AN 在临床上的应用。

作者介绍:李 瑶,Email:1422405629@qq.com,研究方向:药物新剂型与新技术。
通信作者:张景勋,Email:zjqrae01@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30973645);重庆市教委资助项目(高校优秀人才资助项目)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151022.2102.010.html (2015-10-22)

目前，针对 AN 的缺点，国内外已进行了下列研究：1）聚乙二醇对 AN 进行物理包埋或修饰[7-8]；2）制备纳米结构 AN 脂肪酸生物共轭体[9]；3）将 AN 共价结合固定化于丝素纳米颗粒[10]等。以上对 AN 的改善方法都不能使 AN 发挥其最优的催化活性，且大都会存在较低的生物相容性、较差的稳定性及 AN易脱落等缺点。自组装纳米囊是一种新型的药物载体，其空心结构可封装酶、小分子药物和基因等，有生物膜相似性。用自组装纳米囊装载药物具有装载量增大、防止酶泄露以保持酶活性以及显著提高游离酶稳定性的优点[11]。

本研究采用自组装法首次成功制备了 AHRPs，并对游离 AN 与 AHRPs 在体外稳定性上的差异进行了考察。

1 材料与方法

1.1 仪器、药物与试剂

AB 204 S 电子天秤（瑞士 Mettler Toledo 仪器公司）；RE-52AA 旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；85-2 型恒温磁力搅拌器（上海司乐仪器有限公司）；Milli-Q 超纯水系统（美国 Millipore 公司）；pH 计（上海精密科学仪器有限公司）；KQ 2200 B 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；UV-7504 PC 紫外分光光度计（上海欣茂仪器有限公司）；ZS90 型激光粒度电位仪（英国马尔文公司）；TGL-16B 型高速离心机（上海安亭科学仪器厂）；JEM-1230 透射电镜（日本电子株式会社）。

天门冬酰胺酶（以色列 Prospec 公司）；AHRPs（实验室自制，批号：20141013；20141017；20141025）；Tris-HCl 缓冲液（实验室自配）；其它试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 AHRPs 的制备 实验室自制，批号（20141013；20141017；20141025）。

1.2.2 AHRPs 的分离 采用高速离心法[6,11]对 AHRPs 与原辅料进行分离。方法如下：取“1.2.1”项制得的 AHRPs 混合溶液，以 16 000 r/min 离心 10 min 后，分离得到 AHRPs。于-20 ℃贮存备用。

1.2.3 AHRPs 的透射电镜 取 AHRPs 适量，用 Tris-HCl 缓冲液稀释适当倍数后，在透射电镜下观察 AHRPs 的形态。

1.2.4 AHRPs 的粒径和 Zeta 电位 使用马尔文粒度仪检测 AHRPs的粒径和 Zeta 电位。方法如下：取 AHRPs 溶液适量，加入 Tris-HCl 缓冲液稀释一定的倍数后，测定 AHRPs 的粒径和 Zeta 电位。

1.2.5 AN 活性的测定 参照玛斯本-利斯通法[12-14]测定 AN 的活性。具体方法如下：取适量天门冬酰胺底物溶液，加入 0.10 ml AN 溶液后，在 37 ℃下反应 10 min。加入 0.10 ml 三氯醋酸溶液，离心，取上清液，加入适量蒸馏水和奈斯勒指示剂。10 min 后，于波长 480 nm 处测定其吸光度值。酶活单位定义为：在规定条件下，催化一个单位的底物，所释放 1 μmol 氨所需的酶量。改进：实验前样品预热 2 min。

1.2.6 最适温度 在温度为 20 ℃、30 ℃、37 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃下，按照“1.2.5 AN 活性测定”的方法分别测定游离 AN 及 AHRPs 中 AN 的活性。

1.2.7 最适 pH 在 pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 条件下，按照“1.2.5 AN 活性测定”的方法分别测定游离 AN 及 AHRPs 中 AN 的活性。

1.2.8 贮存稳定性的测定 取 AHRPs 和游离 AN 溶液适量，于 4 ℃下，在指定时间（0、1、2、5、10、15、20、25、28 d）取出，按照“1.2.5 AN 活性测定”的方法分别测定游离 AN 及 AHRPs 中 AN 的活性。

1.2.9 抗胰蛋白酶水解能力的测定 取游离 AN 和 AHRPs 溶液适量，分别加入相对应量的胰蛋白酶溶液，混匀后放置于 37 ℃水浴，在 0、10、20、30、40、50、60 min 时取出，按照“1.2.5 AN 活性测定”的方法分别测定游离 AN 及 AHRPs 中 AN 的活性。

1.2.10 抗金属离子和有机化合物能力的测定 取游离 AN 和 AHRPs 溶液各适量，分别加入配制好的山梨醇、吐温-80、KCl、NaF、PEG2000 和 NH4Cl 溶液适量，混匀后于 25 ℃水浴中放置 1 h，按照“1.2.5 AN 活性测定”的方法分别测定游离 AN 及 AHRPs 中 AN 的活性。

1.2.11 热稳定性的测定 取游离 AN 和 AHRPs 溶液适量放置于 55℃的水浴中，分别于 0、1、2、3、4、5 h 时取出，按照“1.2.5 AN 活性测定” 的方法测定游离 AN 及 AHRPs 中 AN 的活性。

1.2.12 酸碱稳定性的测定 取 AHRPs 溶液适量，分别用 pH 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、8.0、9.5 的 Tris-HCl 缓冲液稀释后，于 37℃水浴中放置 40 min，取出，按照“1.2.5 AN 活性测定”的方法测定游离 AN 及 AHRPs 中 AN 的活性。

1.2.13 血浆稳定性的测定 按照文献[15]的方法配制体外模拟空白血浆样品，取等体积 AHAPs 和游离 AN 溶液，分别与 5 倍体积的体外模拟空白血浆混匀，于 37 ℃下孵育 0、1、2、4、8、12、24、48、72、96 h 后，按照“1.2.5 AN 活性测定”的方法分别测定游离 AN 及 AHRPs 中 AN 的活性。

2 结 果

2.1 AHRPs 的分离结果

经计算，AHRPs 分离得到的纯度为（64.71±2.04）%。

2.2 AHRPs 的透射电镜

如图 1 所示，透射电镜下观察到 AHRPs 呈均匀分布的圆形或椭圆形。

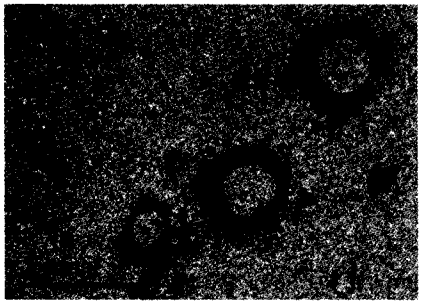


图 1 AHRPs 的透射电镜图

Fig.1 The transmission electron microscopy image of AHRPs

2.3 AHRPs 的粒径和 Zeta 电位

经计算，AHRPs 的粒径为(410.30 ± 3.20) nm；Zeta 电位为(−31.40 ± 1.65) mV。

2.4 最适温度的测定

最适温度测定结果见图 2。如图 2 所示，AHRPs 的最适温度为 50 ℃，游离 AN 的为 60 ℃。AHRPs 在 50 ℃(AHRPs 的最适温度)的活性高于游离 AN 在 60 ℃(AN 的最适温度)的活性。且 AHRPs 的活性在温度为 20 ℃~30 ℃以及 40 ℃~80 ℃时均比游离 AN 高。

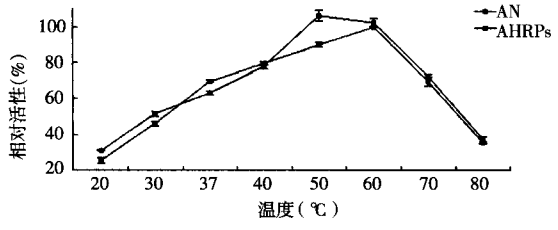


图 2 游离 AN 与 AHRPs 最适温度的测定（n=3）

Fig. 2 The activity of free AN and AHRPs at different temperature（n=3）

2.5 最适 pH 的测定

最适 pH 结果见图 3(37 ℃)。如图 3 所示，AHRPs 与游离 AN 的最适 pH 均为 7.5。相同 pH 值下，AHRPs 的活性均高于游离 AN。

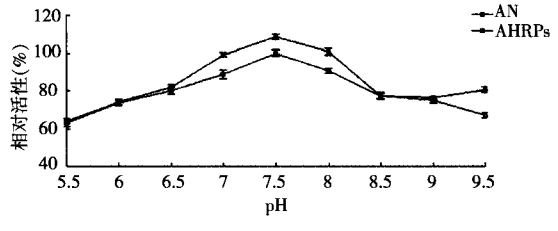


图 3 游离 AN 与 AHRPs 最适 pH 的测定（n=3）

Fig.3 The activity of free AN and AHRPs at different pH（n=3）

2.6 贮存稳定性

以 AHRPs 与游离 AN 的初始活性为 100%计算的相对活性见图 4。如图 4 所示，相同条件下，AHRPs 的活性均高于游离 AN。15 d 时，游离 AN 的活性已降至 50%以下，而 AHRPs 的活性仍保持在 60%以上；28 d 时，游离 AN 的活性降至 20%以下，而 AHRPs 的活性仍保持在 30%以上。结果表明，AHRPs 提高了 AN 的贮存稳定性。

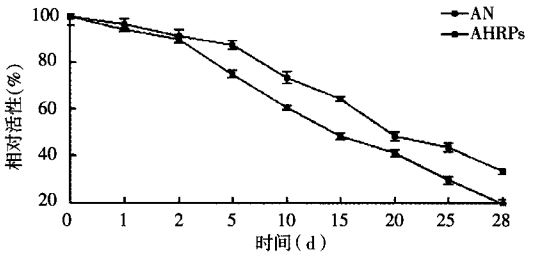


图 4 4 ℃下游离 AN 与 AHRPs 贮存稳定性的测定（n=3）

Fig.4 Time courses of remaining activity of AN and AHRPs during storage at 4 ℃（n=3）

2.7 抗胰蛋白酶水解能力

以 AHRPs 和游离 AN 的初始活性为 100%计算的相对活性见图 5。如图 5 所示，在胰蛋白酶的作用下，游离 AN 的活性降低较快，30 min 时，仅保持了约 20%，此时 AHRPs 的活性仍高于 60%。50 min 时 AHRPs 的活性仍保持 50%左右，到 70 min 才失活。结果显示，AHRPs 比游离 AN 具有更好的抗酶解的能力。

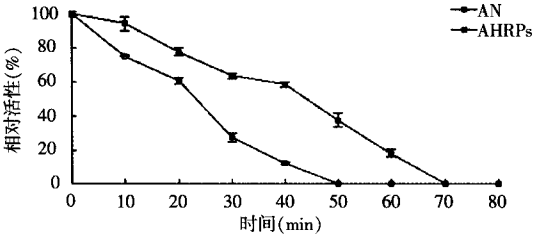


图 5 游离 AN 与 AHRPs 抗胰蛋白酶水解能力能力的测定（n=3）

Fig.5 Proteolytic stabilities of free AN and AHRPs（n=3）

2.8 抗部分金属离子及有机化合物能力

以 AHRPs 和游离 AN 初始活性为 100%计算的相对活性见图 6。如图 6 所示，对游离 AN 及 AHRPs 活性影响最大的为 PEG2000，在 PEG2000 的作用下，游离 AN 和 AHRPs 的活性都提高了 30%以上；其次是吐温-80，使游离 AN 及AHRPs 的活性提高了 10%~20%。而山梨醇、KCl、NaF 和 NH4Cl 对游离 AN 及 AHRPs 的活性无明显影响。结果表明，AHRPs 比游离 AN 更能抵抗金属离子及有机化合物的影响。

2.9 热稳定性的测定

以 AHRPs 和游离 AN(100 μg/ml)最初的活性为 100%计算的相对活性见图 7(55 ℃)。如图 7 所示，2 h 时游离 AN 就已完全失活，而 AHRPs 此时仍保持有约 80%的活性，并且在 5 h 时，AHRPs 仍保持有 30%以上的活性。结果表明，AHRPs 大大提高了游离 AN 的热稳定性。

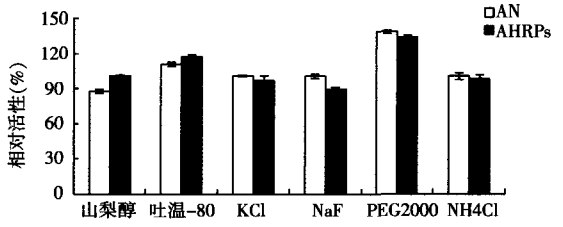


图 6 游离 AN 与 AHRPs 抗部分金属离子及有机化合物能力的测定（n=3）

Fig.6 Effect of several metal ions and organic compounds on activity of free AN and AHRPs（n=3）

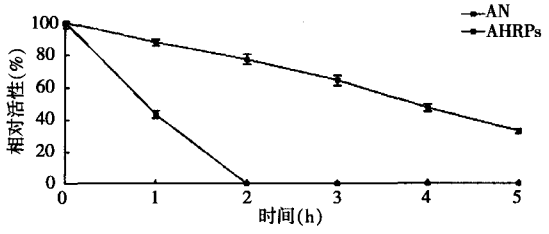


图 7 游离 AN 与 AHRPs 在 55℃条件下稳定性的测定（n=3）

Fig.7 Temperature stabilities of free AN and AHRPs at 55℃（n=3）

2.10 酸碱稳定性

以 pH8.5 时的 AHRPs 与游离 AN 活性为 100%计算的相对活性见图 8。如图 8 所示，AHRPs 的最高活性接近 100%，而游离 AN 的最高活性仅为 80%左右。在 pH 7.0~9.5 中 AHRPs 都保持了 80%以上的活性。除 pH 6.5 外，其余相同 pH 值下 AHRPs 的活性都明显高于游离 AN。结果表明，AHRPs 较游离 AN 具有更好的耐溶液酸碱变化的能力。

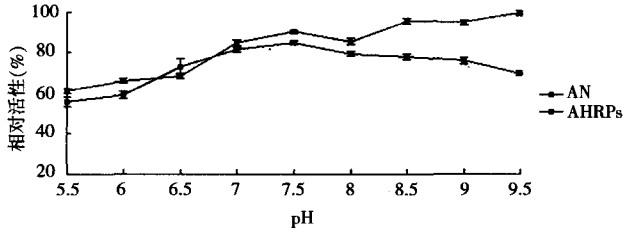


图 8 游离 AN 与 AHRPs 酸碱稳定性的测定（n=3）

Fig.8 pH stabilities of AN and AHRPs（n=3）

2.11 血浆稳定性

以 AHRPs 与游离 AN 的初始活性为 100%计算的相对活性见图 9。如图 9 所示，游离 AN 失活较快，1 min 时活性就已快速降至 80%左右，而此时 AHRPs 的活性仍保持在 100%以上；48 min 时，游离 AN 已完全失活，而到此时 AHRPs 仍保持有 20%左右的活性。整体来看，相同条件下 AHRPs 的活性均高于游离 AN。由此表明，AHRPs 较游离 AN 具有更好的血浆稳定性。

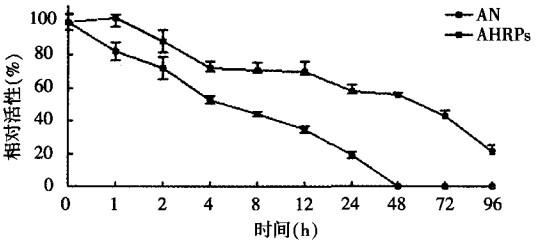


图 9 游离 AN 与 AHRPs 血浆稳定性的测定（n=3）

Fig.9 Plasma stability of free AN and AHRPs（n=3）

3 讨 论

AN 是一类酶类抗肿瘤药物，其稳定性受到诸多因素的影响。本文作者尚未见 AHRPs 相关的任何报道，因此首次采用自组装法成功制备了 AHRPs，并从贮存稳定性、抗胰蛋白酶水解能力、抗部分金属离子及有机化合物、热稳定性、酸碱稳定性和血浆稳定性这几个方面，对游离 AN 和 AHRPs 在体外的稳定性差异进行了考察。贮存稳定性实验结果显示，相同条件下相比游离 AN，AHRPs 能更好的保持活性。从抗胰蛋白酶水解能力实验结果可知，空心纳米囊结构能有效的保护胰蛋白酶对 AN 的影响。抗部分金属离子及有机化合物实验结果可知，相同条件下，空心纳米囊结构能有效的保护游离 AN 受到外界环境的影响。热稳定性实验结果显示，AHRPs 具有更好的对抗外界温度变化的能力。酸碱稳定性实验结果说明，在相同条件下，AHRPs 能提高 AN在血浆中的稳定性。血浆稳定性实验结果表明，AHRPs 能很好的保护 AN 免受外界 pH 变化的干扰。AHRPs 的稳定性是其质量控制的关键因素，良好的稳定性也是临床应用的必要条件[16]。

综上所述，AHRPs 提高 AN 活性的同时也增强了 AN 在体外的稳定性。本实验为 AN 在体内的研究奠定了良好的实验基础。而 AHRPs 在体内的情况、以及 AHRPs 的免疫反应、毒副作用等[17-18]还有待进行进一步的研究。

参 考 文 献

[1] 吴晓英，吴振强，林 影，等. L-天冬酰胺酶的研究进展[J]. 广东药学，2003，13(6)：42-44.

[2] Narta UK，Kanwar SS，Azmi W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia[J]. Crit Rev Oncol

技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000781

小鼠仙台病毒 LAMP 快速检测方法的建立

王会娟[1],王 蕾[1],严 磊[1],皮广禄[2],王 胜[1],谭 毅[1],赖国旗[1]
(1. 重庆医科大学实验动物中心,重庆 400016;2. 重庆市渝中区动物卫生监督中心,重庆 400013)

【摘 要】目的:建立一种实验小鼠仙台病毒(Sendai virus,SeV)的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)检测方法。**方法**:采用 LAMP 技术,以小鼠 SeV(gi:9627219)F 蛋白的基因序列为靶基因,采用 PrimerExploer V4 软件设计 LAMP 的 6 条特异性引物,应用病毒 RNA 提取试剂盒提取 SeV RNA,通过优化 LAMP 反应体系条件建立小鼠 SeV 特异性的 LAMP 检测方法(SeV/LAMP)。同时,对该方法的特异性、稳定性、重复性、灵敏度进行验证,并初步用于临床检测。**结果**:所建立的 SeV/LAMP 方法可特异性的检测出 SeV RNA,其他常见病原体均为阴性。SeV/LAMP 能检测出不同批次同一时间或同一批次不同时间的 SeV RNA;SeV/LAMP 检测 SeV RNA 的最低检测含量为 0.33 pg,与 ELISA 检测方法相比较,其灵敏度高(分别为 5/30 和 2/30)。临床检测,SeV 的阳性率为 27.5%(11/40);全部反应可在 1 h 内完成。通过添加荧光染料 SYBR Green I 可直观目测实验结果。**结论**:建立的 LAMP 方法,具有特异、准确、灵敏、快速、简便的特点,可用于实验小鼠 SeV 的快速检测。

【关键词】小鼠;仙台病毒;环介导等温扩增
【中图分类号】R450 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-06-05

作者介绍:王会娟,Email:920128765@qq.com,
研究方向:实验动物学。
通信作者:赖国旗,Email:a68895078@21cn.com。
基金项目:重庆市科委重大资助项目(编号:CSTC2013yykfc1005);
重庆市科委面上资助项目(编号:CSTC2014YYKFA110033)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151013.2302.002.html
(2015-10-13)

Hematol,2007,61(3):208-221.
[3] Khushoo A,Pal Y,Mukher jee KJ. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in E scherichia coli in shake-flask and bioreactor[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2005,68(2):189-197.
[4] Kotzia GA,Labrou NE. Cloning expression and characterisation of E rwinia carotovora Lasparaginase[J]. J Biotechnol,2005,119(4):309-323.
[5] 李晓媛,陈建华,吴梧桐. PEG-L-天冬酰胺酶的临床研究近况[J].药学进展,2009,33(11):503-510.
[6] Kotzia GA,Labrou NE. Cloning,expression and characterisation of Erwinia carotovoral L-asparaginase[J]. J Biotechnol,2005,119(4)309-323.
[7] Molineux G. Engineering improved biopharmaceuticals for oncology [J]. Pharmacotherapy,2003,23(8Pt 2):3s-8s.
[8] Aaronson SA. Cancer medicine[M]. 5th ed. H amilton:B.C.Decker-Inc.2000:2140.
[9] Ashrafi H,Amini M,Mohammadi-Samani S. Nanostructure AA Saraginase-fatty acid bioconjugate:Synthesis,preformulation study and biological assessment[J]. Int J Biol Macromol,2013,62C:180-187.
[10] 张雨青,相入丽,阎海波,等. 丝素纳米颗粒的制备及应用于L-天冬酰胺酶的固定化[J]. 高等学校化学学报,2008,3(10):25-36.
[11] Ha W,Meng XW,Li Q,et al. Self-assembly hollow nanophere for enzyme encapsulation[J]. Soft Matter,2010(6):1045-1408.
[12] 施特尔马赫. 酶的测定方法. 钱嘉渊译. 北京:中国轻工业出版社,1992:85-88.
[13] Aravind A,Jeyamohan P,Nair R,et al. AS1411 aptamer tagged PLGA-lecithin-PEG nanocapsules for tumor cell targeting and drug delivery[J]. Biotechnol Bioeng,2012,109(11):2920-2931.
[14] Ha W,Fan MM,Peng SL,et al. Self-assembly of chitosan-g-PEG and α-cyclodextrin into hollow spheres in aqueous solution[J]. J Control Release,2011,152(S1)e204-e205.
[15] Saracino MA,Marcheselli C,Somaini L,et al. Simultaneous determination of disulfiram and bu -propion in human plasma of alcohol and nicotine abusers[J]. Anal Bioanal Chem,2010,398(5):2155-2161.
[16] 张 敉,杨 林,周云莉,等. 脂质纳米粒提高尿酸氧化酶体外稳定性的初步研究[J]. 重庆医科大学学报,2014,39(10):1452-1455.
[17] Choi KY,Min KH,Yoon HY,et al. PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo[J]. Biomaterials,2011,32(7):1880-1889.
[18] Choi KY,Yoon HY,Kim JH,et al. Smart nanocarrier based on PE-Gylated hyaluronic acid for cancer therapy[J]. ACS Nano,2011,5(11):8591-8599.

(责任编辑:冉明会)