复合碳酸钙空腔纳米粒的制备及性能评价

赵健辉, 雷宇, 刘江, 蒋香云, 刘占军*(华北理工大学药学院, 河北 唐山 063210)

摘要:目的 制备甘草次酸/海藻酸钠修饰碳酸钙空腔纳米粒并进行性能评价。方法 以可溶性淀粉为模板剂制备中空球状碳酸钙纳米粒(CaCO₃ nanoparticles, CaCO₃ Nps);在非均相体系中合成了甘草次酸/海藻酸钠聚合物(glycyrrhetinic acid/sodium alginate copolymer, GA-ALG);并以 GA-ALG 为壳,以中空结构的 CaCO₃ Nps 为核,合成了壳核结构的 GA-ALG-CaCO₃ Nps。采用 Malvern 粒度分析仪测定纳米粒子的粒度分布和 Zeta 电位,并通过 SEM 对纳米粒的形态进行表征。应用荧光分光光度计评价载盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride,DOX)纳米粒的载药量、包封率及体外释放特征。结果 GA-ALG-CaCO₃ Nps 分布均一,平均粒径为(425.4±31.1)nm,PDI 为 0.289;Zeta 电位为(-17.0 ± 0.3)mV;其载药量为(13.06 ± 0.51)%,包封率为(78.35 ± 3.08)%。体外释放结果显示,纳米粒具有一定的缓释作用。肝靶向研究结果显示DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps 的靶向效率为 68.2%,远高于 DOX 对照组 24.2%。结论 GA-ALG-CaCO₃ Nps 作为新型的药物载体,具有良好的 pH 响应性,并能显著提高载药量,还具有明显的缓释效果及良好的肝靶向能力。

关键词:碳酸钙;甘草次酸;海藻酸钠;纳米粒

中图分类号: R941 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)20-2469-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.20.007

引用本文: 赵健辉, 雷宇, 刘江, 等. 复合碳酸钙空腔纳米粒的制备及性能评价[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(20): 2469-2475.

Preparation and Properties Evaluation of Composite Calcium Carbonate Hollow Nanoparticles

ZHAO Jianhui, LEI Yu, LIU Jiang, JIANG Xiangyun, LIU Zhanjun* (College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare surface modified calcium carbonate nanoparticles with glycyrrhetinic acid/sodium alginate and to evaluate its properties. METHODS The hollow spherical calcium carbonate nanoparticles(CaCO₃ Nps) were prepared using soluble starch as organic templates. Glycyrrhetinic acid/sodium alginate copolymer(GA-ALG) was synthesized in heterogeneous system. GA-ALG-CaCO₃ Nps with shell-core structure were synthesized by using GA-ALG as shell and hollow CaCO₃ nanoparticles as core. The particle size distribution and Zeta potential of nanoparticles were measured by Malvern particle size analyzer, and the morphology of nanoparticles was characterized by SEM and TEM. The drug loading, entrapment efficiency and *in vitro* release characteristics of nanoparticles loaded with doxorubicin hydrochloride(DOX) was evaluated by fluorescence spectrophotometer. RESULTS The average size of GA-ALG-CaCO₃ Nps was (425.4±31.1)nm, PDI was 0.289, Zeta potential was (-17.0±0.3)mV, drug loading was (13.06±0.51)%, encapsulation efficiency was (78.35±3.08)%. *In vitro* release results showed that nanoparticles had a certain sustained release effect. The results of studies on liver-targeting showed that the targeting efficiency of DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps was 68.2%, which was much higher than the DOX control group's 24.2%. CONCLUSION As a new drug carrier, GA-ALG-CaCO₃ Nps has good pH responsiveness, can significantly increase drug loading, and has obvious sustained release effect and a better liver-targeting capacity.

KEYWORDS: CaCO₃; glycyrrhetinic acid; sodium alginate; nanoparticle

近年来,空腔纳米球作为一种新型控释材料 受到了越来越多的关注。空腔结构的碳酸钙具有 优越的生物相容性,可生物降解,很好的酸度响 应性等优点^[1]。利用碳酸钙制备成空腔纳米球用于 载药,可缓释抗肿瘤药物释放,减少不良反应,提 高治疗效果,具有比其他的无机材料更大的优势。

海藻酸钠是一种电荷密度很高的阴离子聚电

解质,具有良好的生物降解性和相容性^[2]。海藻酸钠具有凝结性、高黏性和稳定性,且成膜性好、无毒无害等优点。用海藻酸钠对碳酸钙空腔纳米粒进行表饰,海藻酸钠溶液与钙离子能形成稳定的网状结构,提高纳米粒的稳定性^[3]。

甘草次酸(glycyrrhetinic acid, GA)作为一种肝靶向物质,大量研究^[4-6]表明,将 GA 引入纳米载

基金项目:河北省自然科学基金项目(H2018209347)

作者简介: 赵健辉, 男, 硕士生 Tel: (0315)8805809 E-mail: 1095403300@qq.com *通信作者: 刘占军, 男, 博士, 教授 Tel:

(0315)8805809 E-mail: liuzhanjun929@sina.com

体中,能够明显地增加对肝癌细胞的亲和性,并 能够有效抑制肿瘤的生长,在肝靶向治疗中是一 种非常有前景的药物载体材料^[7]。

在过去几十年的研究工作中所设计的药物载体通常只具有缓释、环境响应性、靶向性、联合载药等功能中的一到两种,但如何将这些功能都集合在药物载体之中,是近年来药剂领域的研究重点之一^[8]。尤其是对于抗肿瘤药物的设计,努力通过某些方式,将这些功能材料集合在同一药物载体上,形成一种多功能的药物载体。本研究以具有 pH 响应性的无机碳酸钙、生物可降解且能提高碳酸钙稳定性的海藻酸钠以及具有肝靶向作用的 GA,制备一种壳核结构同时具有缓释、酸响应性、靶向性、联合载药功能的新型复合纳米载体,为新型的纳米给药系统的深入研究提供参考。

1 仪器与试剂

FA1004 电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司); PHS-3C pH 计(上海 LIDA 仪器公司); 3K30 高速离心机(德国 Sigma 公司); RET 不锈钢加热磁力搅拌器[艾卡(广州)仪器设备有限公司], JEM-2800F 扫描电镜(美国 FEI 仪器有限公司); JEM-2800F 场发射投射电子显微镜(日本电子株式会社)。

碳酸钠(分析纯, 天津河西工业气体有限公司); 氯化钙(分析纯, 天津市江天化工技术有限公司; 可溶性淀粉(分析纯, 上海阿拉丁试剂有限公司); GA(西安瑞林生物科技有限公司,纯度:98%); 海藻酸钠(分析纯, 天津市兴复精细化工研究所); 无水乙醇(色谱纯, 北京迈瑞达科技有限公司); 盐酸阿霉素(doxorubian hydrochloride, DOX, 上海阿拉丁试剂有限公司, 批号: G1823064; 纯度:98%); 其他试剂皆为分析纯。

昆明小鼠,购买自华北理工大学动物实验中心,实验动物生产许可证号:华阜康 SCXK(京)2014-0004。对动物实验设施的使用规程,动物饲养管理和动物实验操作符合《华北理工大学实验动物管理条例》等法规的要求,并遵循华北理工大学伦理委员会相关规定。

2 方法与结果

- 2.1 CaCO3 空腔纳米粒的制备及表征
- **2.1.1** CaCO₃ 空腔纳米粒的制备 参考魏炜等^[9] 的方法。首先配制 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl₂, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na₂CO₃ 和 100 mL 0.25%的淀粉溶液。制备时,向

100 mL 0.25%的淀粉溶液中加入 0.4 mL CaCl₂储备液,置于烧杯中 10 ℃剧烈搅拌 30 min。然后迅速加入 0.4 mL Na₂CO₃储备液,继续 10 ℃剧烈搅拌 10 min 后,将烧杯静置在安静的环境中过夜。析出的晶体经过离心法进行收集。再用蒸馏水反复洗涤 3 次,放入 80 ℃烘箱干燥 24 h。

- 2.1.2 CaCO₃ 纳米粒的粒径及 Zeta 电位 取适量 CaCO₃ 纳米粒混悬液,用去离子水分散并稀释一定倍数后,用 Malvern 粒度分析仪测定 CaCO₃ 空腔纳米粒的粒径及 Zeta 电位,重复 3 次取平均值。所得 CaCO₃ 空腔纳米粒分布均匀,平均粒径为(181.8±23.7)nm,PDI 为(0.362±0.07); Zeta 电位为(-18.9±0.4)mV,CaCO₃ 纳米粒结果见图 1。
- 2.1.3 CaCO₃ 纳米粒的形态学观察 将冷冻干燥后的纳米粒分散于去离子水后,扫描电镜观察样品外观,透射电镜观察样品结构。结果见图 2。结果显示,CaCO₃ 空腔纳米粒呈球形,粒径均一,分散均匀。外直径为(194.41±8.34)nm,内直径为(82.17±5.72)nm。

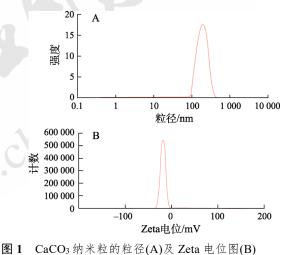


Fig. 1 Particle size(A) and Zeta potential(B) picture of CaCO₃ Nps

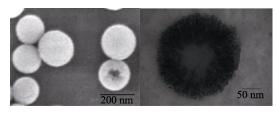


图 2 CaCO3 纳米粒的扫描电镜及透射电镜图 Fig. 2 SEM diagram and TEM diagram of CaCO3 Nps

- 2.2 甘草次酸-海藻酸钠聚合物(glycyrrhetinic acid/sodium alginate copolymer, GA-ALG)的制备及表征
- 2.2.1 甘草次酸乙二胺的制备 参考 Guo^[10]、

Zhang 等[11]的方法。25 ℃条件下,将 4.70 g (10 mmol) GA 完全溶解于 20 mL 的无水四氢吠喃 (THF)中,加人 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC) 2.47 g 搅拌 0.5 h,再加人 N-羟基琥珀酸亚胺(NHS) 1.38 g 搅拌 1 h。过滤,将滤液逐滴加至 50 mL 含乙二胺 70%的无水 THF 溶液中,搅拌 24 h。水沉淀、过滤、干燥。经硅胶柱层析进一步纯化 ($V_{\text{Z}酸Z}^{\text{m}}:V_{\text{P}\vec{p}}=1:2$),得到甘草次酸乙二胺(GANHCH2CH2NH2)。

2.2.2 GA-ALG 的制备 室温条件下,将 200 mg 海 藻 酸 钠 的 和 一 定 量 的 EDC·HCl 和 NHS (MOL_{ALG}: MOL_{EDC·HCl}: MOL_{NHS}=1:1.5:1.5)加 至 100 mL DMSO 溶液中用恒温磁力搅拌器充分溶解,静置 2 h,将海藻酸钠上存在的羧基活化。然后在上述溶液中加入 500 mg 甘草次酸乙二胺,充分搅拌溶解,在室温下反应 24 h。将反应后的溶液混合溶液透析 48 h。离心,抽滤,得到白色固体,分别再用无水乙醇和去离子水洗涤 3 次,烘干得到 GA-ALG。随后将所得的聚合物再溶于DMSO 中,放入透析袋中透析纯化,得到纯净干燥的 GA-ALG。

2.2.3 GA-ALG 的表征

2.2.3.1 GA-ALG的 IR 表征 取 ALG和 GA-ALG 样品,加入适量 KBr 晶体,玛瑙研钵中研磨成细小、均匀的粉末,压片,用傅立叶变换红外光谱仪分辨率 4 cm⁻¹,扫描波数 400~4 000 cm⁻¹ 进行红外表征。结果见图 3。

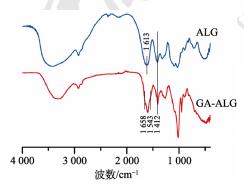


图 3 ALG 和 GA-ALG 红外光谱图 Fig. 3 Infrared spectra of ALG and GA-ALG

图中 1 613 cm⁻¹(s)为-COO⁻的反对称的伸缩振动带、1 412 cm⁻¹(s)为-COO⁻的对称伸缩振动带,这 2 个吸收峰是羧酸盐的特征谱带; GA-ALG 与ALG 相比,位于 1 658 cm⁻¹ 和 1 543 cm⁻¹处出现了较明显的酰胺特征吸收峰,且与 Zhang 等[11]的

结果基本一致,证明 ALG 上已经成功偶联了 GA 分子。

2.2.3.2 GA-ALG中GA取代度的测定 紫外分光 光度计对 0.1 mg·mL⁻¹的 GA 乙醇溶液进行 200~800 nm 全波长扫描,检测出 GA 在 248 nm 处为最大吸收波长。

按参考文献^[12]的方法,取 GA 粉末精密称量 9.4 mg (0.02 mmol),置 10 mL 量瓶中,加乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,得浓度为 2 mmol·L⁻¹的 GA 贮备液;分别精密量取 0.25,0.50,0.75,1.0,1.25,1.50 mL 贮备液置 10 mL 量瓶中,加乙醇定容,摇匀,得浓度分别为 50,100,150,200,250,300 μ mol·L⁻¹的 GA 对照品溶液。置石英皿中,以乙醇为参比,紫外分光光度计测定 248 nm 处吸光值,以吸光值对浓度(μ mol·L⁻¹)进行线性回归,得 GA 的回归方程 ν =0.002 ν 4 ν +0.002 9, ν =0.999 3。根据回归方程和公式(1)计算 GA-ALG 中 GA 的取代度:

$$SD(\%) = \frac{(C1 - C0) \times M}{C} \times 100\%$$
 (1)

式中 C1、C0 分别为测得 GA-ALG、ALG 中 GA 的浓度(μ mol·L⁻¹),C 为 GA-ALG 的浓度(μ g·L⁻¹),M 为 ALG 重复单元的分子量。

通过计算得 GA-ALG 聚合物中 GA 取代度为 (8.83±0.21)%。

- 2.3 GA-ALG-CaCO₃ Nps 的制备及表征
- **2.3.1** GA-ALG-CaCO₃ Nps 的制备 精密称取 $CaCO_3$ 空腔纳米粒 1.00 mg 加至 200 mL 0.005 mg·mL⁻¹ 的 GA-ALG 的水溶液中室温搅拌 24 h,过 1.0 μ m 微孔滤膜,冷冻干燥,收集固体得 GA-ALG-CaCO₃ Nps。
- **2.3.2** GA-ALG-CaCO₃ Nps 的粒径及 Zeta 电位 取适量 GA-ALG-CaCO₃ NPs,用去离子水分散并稀释一定倍数后,用 Malvern 粒度及电位分析仪测定 GA-ALG-CaCO₃ NPs 的粒径及 Zeta 电位,重复 3 次取平均值。所得 GA-ALG-CaCO₃ NPs 分布均匀,平均粒径为(425.4±31.1)nm,PDI 为 0.289;Zeta 电位为(-17.0±0.3)mV,GA-ALG-CaCO₃ NPs 结果见图 4。
- **2.3.3** GA-ALG-CaCO₃ NPs 的形态学观察 将冷冻干燥后的纳米粒分散于去离子水后,扫描电镜观察样品外观,透射电镜观察样品结构。结果见图 5。结果显示, GA-ALG-CaCO₃ NPs 呈球形,

GA-ALG 成功包裹了空心 CaCO₃, 外直径为 (401.65±10.42)nm, 包裹厚度为(72.46±16.83)nm。

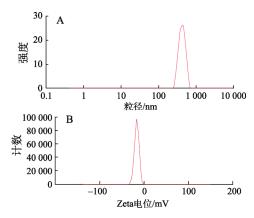


图 4 GA-ALG-CaCO₃ NPs 的粒径(A)及 Zeta 电位图(B) Fig. 4 Particle size(A) and Zeta potential(B) of GA-ALG-CaCO₃ NPs

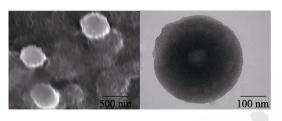


图 5 GA-ALG-CaCO₃ NPs 的扫描电镜及透射电镜图 Fig. 5 SEM diagram and TEM diagram of GA-ALG-CaCO₃ NPs

2.4 DOX/GA-ALG-CaCO3 Nps 的制备及表征

2.4.1 载 DOX 的 GA-ALG-CaCO₃ Nps 的制备精确称量一定量的 GA-ALG-CaCO₃ Nps 加入适量的 DOX 溶液, 200 r·min⁻¹ 避光搅拌 24 h, 12 000 r·min⁻¹高速离心 30 min,收集固体,冻干即得到载 DOX 的 DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps。

2.4.2 DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps 的粒径及 Zeta 电位 取适量 DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps, 用去离子水分散并稀释一定倍数后,用 Malvern 粒度及电位分析仪测定 DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps 的粒径及 Zeta 电位,重复 3 次取平均值。所得 DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps 分布均匀,平均粒径为(435.7±16.32)nm, PDI 为 0.357; Zeta 电位为(-13.6±0.8)mV, DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps 结果见图 6。

2.4.3 DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps 的形态学观察 将冷冻干燥后的纳米粒分散于去离子水后,透射电镜观察样品结构。结果见图 7。结果显示,该 DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps 在外部成功负载了 DOX,外直径为(430.38±11.03)nm,载药厚度为(20.34±4.21)nm。

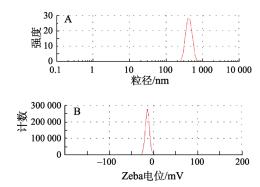


图 6 DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 的粒径(A)及 Zeta 电位图(A)

Fig. 6 Particle size(A) and Zeta potential(A) of DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs

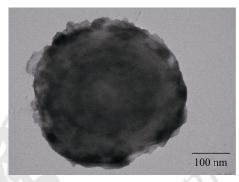


图 7 DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 的透射电镜图 Fig. 7 TEM diagram of DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs

2.5 药物包封率及载药量的测定

2.5.1 DOX 荧光标准曲线 避光条件下,精密称取 DOX 2.00 mg 用去离子水定容到 25 mL量瓶中,得浓度为 80 μg·mL⁻¹ 的 DOX 水溶液,精密量取 1 mL 用去离子水定容到 10 mL 量瓶中,得浓度为 8 μg·mL⁻¹ 的 DOX 储备液。分别量取 0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1.000 mL 的储备液用去离子水定容到 10 mL 量瓶中,得 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 μg·mL⁻¹ 的 DOX 对照品溶液,置石英皿中,荧光分光光度计检测各样品的荧光强度(EX=470 nm,EM=585 nm,狭缝宽 5 nm),以样品浓度为横坐标,荧光强度为纵坐标,绘制 DOX 荧光标准曲线。结果线性方程为: y=442.87x+13.365, r=0.999 5。

2.5.2 方法专属性 配制一定浓度的 GA-ALG-CaCO₃ Nps 和 DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps 溶液,用 荧光分光光度计检测荧光强度(EX=470 nm, EM=585 nm, 狭缝宽 5 nm)。见图 8。

2.5.3 药物包封率及载药量的测定 参考文献^[13]的方法使用荧光分光光度计测定包封率及载药量。精确称量 GA-ALG-CaCO₃ Nps 1.0 mg 加入 DOX 水溶液 $(0.02 \text{ mg·mL}^{-1})10 \text{ mL}$,避光搅拌 24 h,

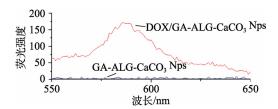


图 8 GA-ALG-CaCO₃ Nps 和 DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps 的荧光光谱图

Fig. 8 Fluorescence spectra of GA-ALG-CaCO₃ Nps and DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps

12 000 r·min⁻¹ 高速离心 30 min,取上清液稀释到适当浓度,用荧光分光光度计在 EX=470 nm, EM=585 nm,狭缝宽 5 nm 的条件下测定上清液的荧光强度,并根据线性方程,计算样品中 DOX 的浓度。包封率与载药量按如下公式计算:

载药量(%)=(投样量-游离药量)/(投样量+材料量)×100%。

包封率(%)=(投样量 - 游离药量)/投样量×100%;

平行制备 3 组 DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps 检测 其载药量和包封率,结果显示载药量为(13.06± 0.51)%,包封率为(78.35±3.08)%。

2.6 体外释放

将 1 mg·mL⁻¹ 的 DOX、DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 分别量取 1.5 mL 置于 30 mL 不同 pH 的释放介质(含 0.1%吐温 80 的 PBS 溶液)中,放入 37 $^{\circ}$ C 水浴摇床(100 r·min⁻¹),每个样品平行 3 份。分别于 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 取出 4 mL 释放介质,并用等体积的新鲜 PBS 补充^[14]。用荧光分光光度计在 EX=470 nm,EM=585 nm,狭缝宽 5 nm 的条件下测定取出介质的荧光强度,计算累积释放率,绘制释放曲线。结果见图 9。

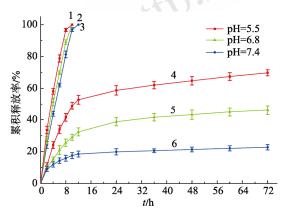


图 9 DOX 在不同 pH 下的释放率 1~3-DOX; 4~6-DOX/GA-ALG-CaCO₃。 **Fig. 9** Release profiles of DOX in different pH

1-3-DOX; 4-6-DOX/GA-ALG-CaCO₃.

中国现代应用药学 2020 年 10 月第 37 卷第 20 期

图中可以看到,在接近生理 pH 的环境中释放速度是非常慢的,而在酸性 pH 环境下,可以较快地释放纳米粒中 DOX 药物。在 48 h 内, DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 在 pH 为 7.4, 6.8, 5.5 的环境中累积释放率分别为(22.66±1.73)%, (46.09±2.82)%, (69.81±1.92)%, 纳米粒在整个释放过程中具有明显的缓释特征。这种现象主要是由于在低 pH 值下,纳米载体和 DOX 发生解离,促进了DOX 的释放。对于肝靶向主动给药体系,这种 pH 特性能够使聚集在肿瘤组织中的药物更好的释放,达到抑制肿瘤细胞的效果,降低药物对正常细胞的毒副作用。

2.7 DOX/GA-ALG-CaCO3 NPs 在小鼠体内分布及肝靶向性评价

将36只(20±2)g的含清洁级昆明小鼠随机分为 2组,每组设6个时间点,每个时间点3个平行。 实验前禁食不禁水, 12 h 后将 DOX 溶液和 DOX/GA-ALG-CaCO3 NPs 于尾静脉注射到小鼠 体内,给药量为 DOX 8 mg·kg⁻¹ 小鼠。给药后分别 在 0.25, 1, 3, 6, 12, 24 h 摘眼球取血 1 mL, 放 入抗凝管中, 离心(3 000 r·min-1, 5 min), 吸取上 清液, -80 ℃保存待测; 然后颈椎脱臼处死, 解 剖取肝、心、脾、肺、肾和脑,分别称重记录, 称取(0.1±0.02)g 各组织分别加至匀浆器中,加入 1 mL 细胞裂解液,冰浴中匀浆 10 min,再向匀浆 器中加入 1 mL 6%盐酸乙醇溶液,继续匀浆 10 min, 将各组织匀浆液转入到离心管中, 于快速 混匀机上旋振 1 min, 离心(3 000 r·min⁻¹, 5 min), 吸取上清液,-80 ℃保存待测。根据文献[15-16]方 法,采用荧光分光光度法检测小鼠血浆和各组织 中 DOX 浓度(EX=470 nm, EM=585 nm, 狭缝宽 5 nm), 结果见表 1 和表 2。

根据无房室法计算总药时曲线面积 $AUC_{0-\infty}$, 公式计算体内分布特征的指标: 靶向效率(T_e)相对 摄取率(R_e)定量评价 $DOX/GA-ALG-CaCO_3$ NPs 的 肝靶向性。

$Te(\%)=(AUC)t/(AUC)s\times100\%$

其中,(AUC)t 表示所考察制剂在某一器官中的药时曲线下面积,(AUC)s 表示同一制剂在小鼠体内总的药时曲线下面积。

Re=(AUC)m/(AUC)n

其中,(AUC)m表示 DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 在某一器官中的药一时曲线下面积,(AUC)n表示对照组 DOX 溶液在小鼠体内同一器官中的药一时曲线下面积。

从表 1 和表 2 中可以看出 DOX 溶液组小鼠血 浆中,除了在 0.25 h 时检测到了少量 DOX 的存在,在之后的时间点上都没有检测到 DOX,说明 DOX

Tab. 1 DOX concentrations in plasma and tissues of mice after i.v. administration of DOX solution at dose of 8.0 mg·kg⁻¹ (n=3)

| t/h | DOX 浓度 | | | | | | | |
|------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--|--|
| | 血浆/μg·mL ⁻¹ | رن/μg·g ⁻¹ | 肝/µg·g ⁻¹ | 脾/μg·g ⁻¹ | 肺/μg·g ⁻¹ | 肾/µg·g ⁻¹ | | |
| 0.25 | 0.21±0.12 | 14.67±2.55 | 29.72±7.28 | 10.10±2.33 | 17.49±5.94 | 35.68±5.34 | | |
| 1 | - | 12.92±2.08 | 28.33 ± 6.11 | $8.36{\pm}2.09$ | 14.27 ± 3.70 | 25.9±4.43 | | |
| 3 | - | 13.22±4.71 | 23.08 ± 5.50 | 7.26 ± 2.02 | 11.27±3.22 | 15.07±3.33 | | |
| 6 | - | 11.71±2.86 | 14.45±5.99 | 5.88 ± 2.44 | 8.10 ± 2.44 | 10.51 ± 3.70 | | |
| 12 | - | 10.86 ± 1.49 | 11.14±4.96 | 4.22 ± 1.87 | $6.38{\pm}1.86$ | 8.14±1.24 | | |
| 24 | - | 8.21±1.24 | 7.86 ± 4.19 | $3.79{\pm}1.02$ | 3.99 ± 0.92 | 6.99 ± 0.91 | | |

表 2 小鼠尾静脉注射 8.0 mg·kg-1 DOX/GA-ALG-CaCO3 Nps 溶液后在血浆及各组织中的药物浓度(n=3)

Tab. 2 DOX concentrations in plasma and tissues of mice after i.v. administration of DOX/GA-ALG-CaCO₃ Nps at dose of 8.0 mg·kg⁻¹(*n*=3)

| t/h | DOX 浓度 | | | | | | | |
|------|------------------|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|--|--|
| | 血浆/μg·mL-l | 心/µg·g ⁻¹ | 肝/µg·g ⁻¹ | ルg·g ⁻¹ | 肺/μg·g ⁻¹ | 肾/µg·g ⁻¹ | | |
| 0.25 | 24.11±5.46 | 5.24±2.62 | 58.79±8.11 | 14.40±2.95 | 6.33±1.80 | 30.35±3.12 | | |
| 1 | 10.76 ± 2.93 | 4.77±1.91 | 49.49±6.77 | 12.96±2.38 | 2.02±0.94 | 21.94±3.64 | | |
| 3 | 3.68 ± 1.04 | 3.79 ± 1.44 | 42.98 ± 6.32 | 9.94±3.02 | 1.27±0.71 | 13.09±2.43 | | |
| 6 | 1.88 ± 0.61 | 1.91±1.17 | 40.80±5.99 | 7.69±2.61 | 0.28±0.24 | 7.41±2.29 | | |
| 12 | 0.24 ± 0.13 | 1.15±0.99 | 36.54±5.14 | 4.74±1.33 | - | 5.32±1.68 | | |
| 24 | _ | 0.34 ± 0.28 | 27.66±6.11 | 1.79±1.00 | _ | 1.99±0.90 | | |

进入血液循环后,能够迅速地从血液中清除。而 DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 组明显延长了在血液中的滞留时间。在心脏中 DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 组 DOX 浓度与 DOX 对照组相比 DOX 浓度明显较低,对心脏负荷较低。在肝脏中 DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 组 DOX 浓度与 DOX 对照组相比在同一时间点内浓度较高且下降速度较低,说明 DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 能显著提高药物在肝脏的分布,可见 GA-ALG-CaCO₃ NPs 具有肝靶向作用。

表 3 小鼠注射不同 DOX 制剂后在 24 h 内的靶向效率 Te(%)和相对摄取率 Re 值

Tab. 3 Targeting efficiency and Relative targeting efficiency of different DOX formulations in different tissues under periods of 24 h

| | $AUC_{(0\text{-}\infty)}\!/mg\!\cdot\! L^{-1}\!\cdot\! h$ | | | Te/% | Re |
|----|---|---|------|--|--|
| 组织 | DOX | DOX/GA- ALG-CaCO ₃ Nps | DOX | DOX/GA- ALG- CaCO ₃ Nps | DOX/GA- ALG- CaCO ₃ Nps |
| 心 | 197.83 | 60.42 | 19.8 | 5.0 | 0.25 |
| 肝 | 241.79 | 824.11 | 24.2 | 68.2 | 2.82 |
| 脾 | 132.88 | 101.50 | 13.3 | 8.4 | 0.63 |
| 肺 | 174.85 | 31.42 | 17.5 | 2.6 | 0.15 |
| 肾 | 234.80 | 173.28 | 23.5 | 14.3 | 0.61 |
| 血浆 | 16.99 | 18.13 | 1.7 | 1.5 | 0.90 |

从表 3 中可以更明显地看出 DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 在肝脏的分布显著提高,而在其他组织中的分布均出现降低。24 h 内 DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 对肝组织的靶向效率高达 68.2%,明显高于 DOX 对照组的 24.2%,说明 DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 的肝靶向性良好。

3 讨论

本实验所制备空腔 CaCO₃ 的原理可能是由于不同浓度的 Ca²⁺会影响淀粉的构象发生不同的变化,而再引入 CO₃-后,不同构象的淀粉会影响 CaCO₃ 的结晶过程,淀粉的不同构象引导 CaCO₃ 结晶的排列,并作为"黏合剂"形成各种形状的 组装体。在超低浓度的条件下,会形成空心结构 的球体。用海藻酸钠包裹 CaCO₃ 的原理可能是由于在中性和碱性溶液中,海藻酸钠分子链会由于去质子化的羧基之间的斥力而呈现伸展状,海藻酸钠分子能够和 Ca²⁺发生交联,由于 Ca²⁺的存在,减小了海藻酸钠分子链上羧基之间的静电斥力,所以海藻酸钠分子链会在碳酸钙空腔纳米球表面聚集,进而形成壳核结构的复合纳米载体。本实验所制备的复合纳米粒,外观近似为圆球形,且表面光滑,大小均一,纳米粒的粒径主要分布在

300~400 nm 左右。通过比较不同 pH 环境下 DOX/GA-ALG-CaCO₃ NPs 的 DOX 的释放,结果 表明载药纳米粒具有明显的缓释作用,在正常的 生理条件(pH=7.4)下比肿瘤环境(pH=6.8)和细胞内溶酶体环境(pH=5.5)DOX 释放量低,释放速度慢,说明载药纳米粒能降低对正常细胞组织的毒副作用。体内分布和靶向性研究证明了该载体具有良好的肝靶向能力。而且该复合纳米粒子没有传统的有机高分子纳米粒材料本身毒性大的问题,也没有无机二氧化硅纳米粒体内不可降解的问题,合成材料海藻酸钠及碳酸钙均是无毒无害生物体内可降解的,作为载体材料具有明显优势。在药剂领域,随着研究的深入,这种新型复合纳米载体的潜在应用价值逐步受到研究者的肯定,使其在药物载体领域具有优良的研究前景。

本课题组将继续考察复合纳米粒的协同转运大分子生物药与化疗药的效果、体内药效及细胞毒性,为新型复合纳米载体在肿瘤治疗中的应用研究提供更广阔的思路和丰富的理论基础。

REFERENCES

- [1] WEI W, MA G H, HU G, et al. Preparation of hierarchical hollow CaCO₃ particles and the application as anticancer drug carrier [J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(47): 15808-15810.
- [2] YANG J S. Effect of surfactants on the shear viscosity of dilute aqueous solutions of sodium alginate [J]. Acta Phys-Chim Sin, 2009, 25(4): 752-756.
- [3] CHEN Z Q, WANG N H, HAN EN SH, et al. The effects of calcium ion, pH value on the rheological properties of sodium alginate solution [J]. Acta Chim Sin, 1991, 49(5): 462-467.
- [4] NEGISHI M, IRIE A, NAGATA N, et al. Specific binding of glycyrrhetinic acid to the rat liver membrane [J]. Biochim et Biophys Acta BBA - Biomembr, 1991, 1066(1): 77-82.
- [5] ISHIDA S, SAKIYA Y, ICHIKAWA T, et al. Uptake of glycyrrhizin by isolated rat hepatocytes [J]. Biol Pharm Bull, 1993, 16(3): 293-297.

- [6] WANG W, YUAN Z. Recent development of liver targeted drug delivery system based on nanotechnology [J]. Polymer Bull(高分子通报), 2013(1): 137-154.
- [7] CHEN H X, LI M, WAN T, et al. Design and synthesis of dual-ligand modified chitosan as a liver targeting vector [J]. J Mater Sci: Mater Med, 2012, 23(2): 431-441.
- [8] QIAO D, LU N, QIN J Y, et al. Applications of pH sensitive nanoparticle drug delivery system for antitumor targeting therapy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(2): 288-292.
- [9] WEI W, MA G H, HU G, et al. Preparation of hierarchical hollow CaCO₃ particles and the application as anticancer drug carrier [J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(47): 15808-15810.
- [10] GUO H, YANG C L, HU Z P, et al. Ethylene glycol oligomer modified-sodium alginate for efficiently improving the drug loading and the tumor therapeutic effect [J]. J Mater Chem B, 2013, 1(43): 5933.
- [11] ZHANG C N, WANG W, WANG C H, et al. Cytotoxicity of liver targeted drug-loaded alginate nanoparticles [J]. Sci China Ser B-Chem, 2009, 52(9): 1382-1387.
- [12] SHI L L, TANG C, YIN C H. Glycyrrhizin-modified O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as drug vehicles targeting hepatocellular carcinoma [J]. Biomaterials, 2012, 33(30): 7594-7604.
- [13] HUANG P W, CHEN S P, WEI X H, et al. Chitosan oligosaccharide/salicylic acid nanoparticles for doxorubicin delivery [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(1): 61-66.
- [14] WANG M, HUANG M L, WANG J T, et al. Facile one-pot synthesis of self-assembled folate-biotin-pullulan nanoparticles for targeted intracellular anticancer drug delivery [J/OL]. J Nanomater, 2016, 2016: 1-10. Doi: 10.1155/2016/5752721.
- [15] ZHANG C N, WANG P, LAI Q Y, et al. Qualitative and quantitative evaluation of glycyrrhetinic acid modified alginate liver targeting drug delivery systems [J]. Acta Polym Sin, 2011, 11(8): 817-823.
- [16] YU T T, ZHENG Y, DING Z S, et al. Research on tissue distribution of novel curcumin nanoparticles in mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(3): 261-268.

收稿日期: 2019-10-09 (本文责编: 曹粤锋)