壳聚糖修饰的 L-天门冬酰胺酶脂质体的稳定性

万胜利， 何 丹， 晏子俊， 张严方， 张景勍 *
（重庆医科大学 高校药物工程研究中心，重庆 400016）

摘要： 考察壳聚糖修饰的 L-天门冬酰胺酶脂质体在体外的稳定性。分别从最适 pH、最适温度、储存稳定性、酸碱稳定性、热稳定性，以及抗胰蛋白酶水解的能力等方面，对比游离 L-天门冬酰胺酶及壳聚糖修饰的 L-天门冬酰胺酶脂质体。结果表明：游离 L-天门冬酰胺酶和壳聚糖修饰的 L-天门冬酰胺酶脂质体的最适 pH 分别为 7.5 和 7.0，最适温度分别为 60 ℃和 50 ℃，壳聚糖修饰的 L-天门冬酰胺酶脂质体的储存稳定性、酸碱稳定性、热稳定性，以及抗胰蛋白酶水解的能力均优于游离酶。因此，壳聚糖修饰的 L-天门冬酰胺酶脂质体能明显提高游离酶的稳定性。

关键词： L-天门冬酰胺酶；脂质体；壳聚糖；稳定性
中图分类号： Q 556，R 392-33 **文献标志码：** A **文章编号：** 1673—1689(2016)10—1041—04

Preliminary Study on the Stability of Chitosan-Modified Liposomes Containing L-Asparaginase

WAN Shengli， *HE Dan*， *YAN Zijun*， *ZHANG Yanfang*， *ZHANG Jingqing**
（Engineering Research Center in University，Chongqing Medical University，Chongqing 400016，China）

Abstract： To investigate the in vitro stability of chitosan-modified liposomes containing L-asparaginase (LACL)，the optimal pH，temperature，storage stability，pH stability，thermal stability and proteolytic stability were investigated in this study. The optimal pH values of L-ASP and LACL were at 7.5 and 7.0，respectively. The optimal temperatures of L-ASP and LACL were at 60 ℃ and 50 ℃，respectively. The stabilities of LACL were higher than that of L-ASP. The results shown that the stability of L-ASP was significantly enhanced by the LACL.

Keywords： L-asparaginase，liposome，chitosan，stability

L-天门冬酰胺酶(L-asparaginase，L-ASP)是一种大分子蛋白质类生化药物，能将肿瘤细胞生长所需要的 L-天冬酰胺水解为氨和 L-天冬氨酸，从而有效地抑制肿瘤细胞的生长[1]。L-ASP 对急性淋巴细胞白血病及非何杰淋巴瘤有较好的疗效，是一种重要的治疗白血病的药物。但 L-ASP 稳定性差，易被蛋白酶分解等缺点限制了 L-ASP 的应用[2]。脂质体是一种新型的药物载体，具有类生物膜的双分子层结构，可提高被包封药物的稳定性，现已广泛应用到抗癌药物、蛋白多肽类中[3]。壳聚糖是一种高分子天然多糖，具有易化学修饰性和独特分子结构，对脂质体表面进行修饰的同时，能提高其稳定性[4]。

收稿日期： 2015-03-07
基金项目： 国家自然科学基金项目(30973645)。
* **通信作者：** 张景勍(1973—)，女，上海人，理学博士，教授，博士研究生导师，主要从事新药研究与开发。E-mail：zjqrae01@163.com

本研究首次将 L-ASP 制备成壳聚糖修饰的 L-ASP 脂质体（Chitosan modified liposomes containing L-asparaginase，LACL），以期提供增强酶类稳定性的方法，对 L-ASP 有重要意义，同时也为其他酶类稳定性的研究奠定了科学理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 主要材料、试剂 L-ASP，以色列 Prospec 公司产品；壳聚糖，浙江金壳生物化学有限公司产品；卵磷脂，德国 Lipoid 公司产品；胆固醇，美国 Sigma 公司产品；L-天门冬酰胺，美国 Sigma 公司产品；奈斯勒指示剂，作者所在实验室自制。

1.1.2 主要仪器 KQ 2200 B 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司制造；RE-52AA 旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂制造；pH 计，上海精密科学仪器有限公司制造；85-2 型恒温磁力搅拌器，上海司乐仪器有限公司制造；UV-7504 PC 紫外分光光度计，上海欣茂仪器有限公司制造。

1.2 试验方法

1.2.1 LACL 的制备 采用逆向蒸发法制备 L-ASP 脂质体，取处方量的卵磷脂、胆固醇溶于二氯甲烷中，旋转蒸发至形成均匀透明薄膜，加入乙醚和 10 mL 含 L-ASP 的缓冲液，超声处理后继续分散得 L-ASP 脂质体；将 L-ASP 脂质体滴加到一定浓度的壳聚糖溶液中，搅拌 3 h 后 4 ℃静置 12 h 即得 LACL[5-6]。

1.2.2 L-ASP 活性的测定 在 50 mmol/L Tris-HCL 的缓冲液中（pH7.3），以 L-天门冬酰胺为底物，加入 0.1 mL L-ASP，于 37 ℃水浴中保温 10 min，加 0.1 mL 三氯醋酸溶液，终止反应。离心后，取 0.5 mL 上清液滴入 7.0 mL 蒸馏水中，再加 1.0 mL 奈斯勒指示剂，放置 10 min 后，在 480 nm 处比色测定生成的氨。酶的活性单位定义：每分钟催化 L-天门冬酰胺水解释放 1 μmol 氨所需的酶量[7-8]。

1.2.3 L-ASP 和 LACL 最适 pH 的选择 在 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 及 9.0 的条件下，分别测定 L-ASP 及 LACL 的活性。以 L-ASP 在最适 pH 下的活性为 100%，计算其余各点的相对活性。

1.2.4 L-ASP 和 LACL 最适温度的选择 在温度为 20、30、40、50、60、70 ℃的环境下，分别测定 L-ASP 及 LACL 的活性。以 L-ASP 在最适温度下的活性为 100%，计算其余各点样品的相对活性。

1.2.5 L-ASP 和 LACL 储存稳定性的考察 L-ASP 和 LACL 在 4 ℃下避光密封贮存，分别于 0、1、2、5、10、15、20、28 d 测定其活性，结果以活性保留百分率进行计算。

1.2.6 L-ASP 和 LACL 酸碱稳定性的考察 取适量 L-ASP 和 LACL，分别在 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 及 9.0 的一系列缓冲液中孵育 40 min，测定其活性。以 LACL 在 pH 7.5 时的酸碱稳定性结果为 100%，计算其余各点样品的相对活性。

1.2.7 L-ASP 和 LACL 热稳定性的考察 将 L-ASP 和 LACL 置于 55 ℃的水浴中，分别于 0、1、2、3、4 h 测定其活性，结果以活性保留百分率进行计算。

1.2.8 L-ASP 和 LACL 抗胰蛋白酶水解能力 取适量 L-ASP 和 LACL，分别加入适量质量浓度为 0.1 mg/mL 的胰蛋白酶液，混合均匀后，放置于 37 ℃的水浴中，在 60 min 内测定其活性，结果以活性保留百分率进行计算。

2 结果与讨论

2.1 L-ASP 和 LACL 的最适 pH

测定结果见图 1，L-ASP 和 LACL 的最适 pH 分别为 7.5 和 7.0。pH 6~8 时，LACL 的活性都高于 L-ASP，当 L-ASP 和 LACL 都在最适 pH 时，LACL 的活性约为 L-ASP 的 1.4 倍，在 pH7.5（约等于血浆的生理 pH 7.4）时，LACL 的活性也明显高于 L-ASP。

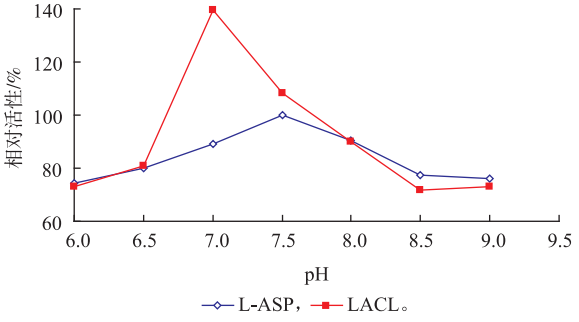

图 1 L-ASP 和 LACL 最适 pH（n=3）

Fig. 1 Optimum pH of L-ASP and LACL（n=3）

2.2 L-ASP 和 LACL 的最适温度

测定结果见图 2，L-ASP 的最适温度为 60 ℃，LACL 的最适温度为 50 ℃，更接近人体体温，在 30~60 ℃时，LACL 的活性明显高于 L-ASP。

2.3 L-ASP 和 LACL 的储存稳定性

测定结果见图 3，大约在 18 d 时，L-ASP 的活性降至 50%，而此时，LACL 仍存约有 80%的活性；在

28 d 时，L-ASP 仅保留有 33.10%的活性，LACL 仍保留有 61.18%的活性。结果显示，LACL 的储存稳定性明显优于 L-ASP。

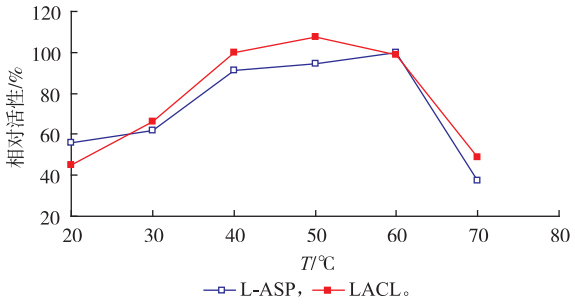

图 2　L-ASP 和 LACL 最适温度（n=3）

Fig. 2　Optimum temperature of L-ASP and LACL（n=3）

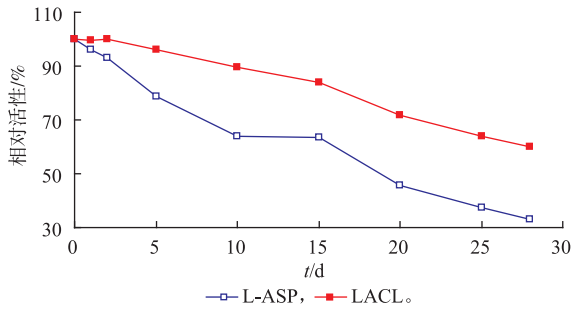

图 3　L-ASP 和 LACL 的储存稳定性（n=3）

Fig. 3　Storage stabilities of L-ASP and LACL（n=3）

2.4　L-ASP 和 LACL 的酸碱稳定性

在 pH 6.0~9.0 时，LACL 的活性保留值均高于 L-ASP，见图 4，LACL 的酸碱稳定性优于 L-ASP。在 pH 6.5~8.5 时，LACL 保留有 90%以上的活性；在 pH 7.5 时，LACL 和 L-ASP 都保留有最大活性，但此时 LACL 的活性保留值明显比 L-ASP 高。结果表明，LACL 有更好的抗外界环境酸碱变化的能力。

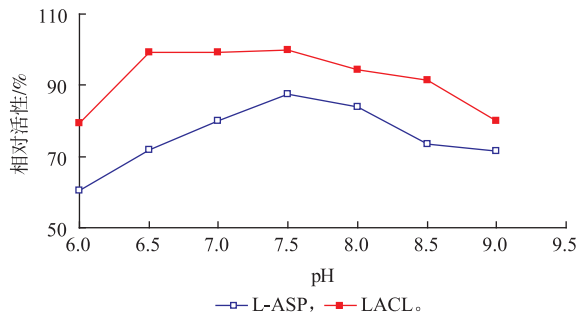

图 4　L-ASP 和 LACL 的酸碱稳定性（n=3）

Fig. 4　pH stabilities of L-ASP and LACL（n=3）

2.5　L-ASP 和 LACL 的热稳定性

L-ASP 在 3 h 时，活性消失，而此时 LACL 仍保留有约 60%的活性，见图 5，结果表明 LACL 的热稳定性比 L-ASP 好。

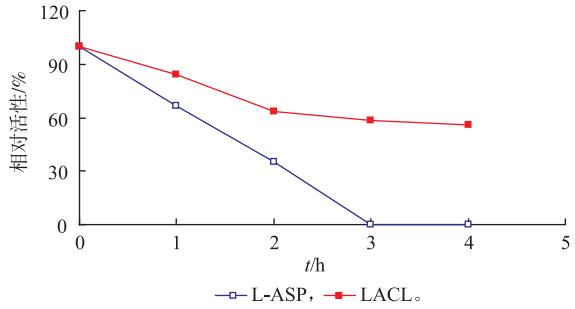

图 5　55 ℃条件下 L-ASP 和 LACL 的稳定性（n=3）

Fig. 5　Stability of L-ASPand LACL incubated at 55 ℃（n=3）

2.6　L-ASP 和 LACL 抗胰蛋白酶水解的能力

L-ASP 在有胰蛋白酶的环境中，活性快速下降，30 min 时活性降至约 50%，此时 LACL 仍保留有约 70%的活性；50 min 时，L-ASP 的活性消失，此时 LACL 仍保留有约 53%的活性。见图 6，结果显示，LACL 比 L-ASP 有更好的抗胰蛋白酶水解的能力。

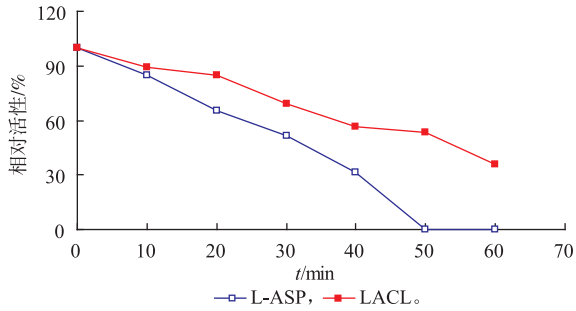

图 6　L-ASP 和 LACL 抗胰蛋白酶水解的能力（n=3）

Fig. 6　Proteolytic stabilities of L-ASP and LACL（n=3）

3　结　语

L-ASP 作为一种酶蛋白质药物，其不稳定性和易被蛋白酶降解等缺点，在一定程度上限制了其被广泛应用[2,9]。壳聚糖是自然界中一种带正电的阳离子多糖，具有无毒性和良好的生物相容性，对生物分子、有机物及许多离子有很好的螯合、吸附和离子交换能力[4,6]。本研究中首次将 L-ASP 制备成 LACL，LACL 的稳定性较游离的 L-ASP 有明显提高。无论是 4 ℃的储存条件下，还是 55 ℃的加热环境下，LACL 都能保持较好的活性。结果表明，LACL 与 L-ASP 比较，LACL 有更好的抗外界温度变化的

能力。在 pH 6.0~9.0 时，LACL 的活性保留值均高于 L-ASP，LCAL 较 L-ASP 有更好的抗外界酸碱变化的能力。游离的 L-ASP 易被胰蛋白酶水解，半衰期短，而 LCAL 则表现出良好的抗胰蛋白酶水解的能力。LACL 优越的稳定性可能是壳聚糖脂质体对酶起保护作用的结果[10-11]。L-ASP 的最适温度为 60 ℃，而 LACL 的最适温度为 50 ℃，更接近人体体温；在 40 ℃（接近人体体温）时 LACL 的活性约为 L-ASP 的 1.1 倍。pH6.0~8.0 时，LACL 的活性高于 L-ASP；当 L-ASP 和 LACL 都在最适 pH 下时，LACL 的活性约为 L-ASP 的 1.4 倍。结果表明，将 L-ASP 制备成 LACL 可在一定程度上提高 L-ASP 的活性，这可能是酶和脂质体膜及壳聚糖相互作用的结果[5,10-11]。

本研究结果显示，LACL 有提高游离酶活性，增强其稳定性的优点，为蛋白酶类药物的深入研究提供了理论依据。

参考文献：

[1] Kim M, Kim T M, Kim K H, et al. Ifosfamide, methotrexate, etoposide, and prednisolone (IMEP) plus L-asparaginase as a first-line therapy improves outcomes in stage III/IV NK/T cell-lymphoma, nasal type (NTCL)[J]. **Ann Hematol**, 2015, 94(3): 437-444.

[2] Anqiolillo A L, Schore R J. Devidas M, et a1. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of calaspargase pegol Escherichia coli L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia: results from Children's Oncology Group Study AALL07P4[J]. **J Clin Oncol**, 2014, 32(34): 3874-3882.

[3] Miao Z L, Deng Y J, Du H Y, et al. Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin [J]. **Exp Ther Med**, 2015, 9(3): 941-946.

[4] 贾海红，周洪英，王雪松. 生物吸附剂壳聚糖对刚果红的吸附[J]. 食品与生物技术学报，2013，32(6)：651-655.
JIA Honghai, ZHOU Hongying, WANG Xuesong. Study on the biosorption of congo red by chitosan [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(6): 651-655.(in Chinese)

[5] 王娜，赵春景，黄开顺，等. 产朊假丝酵母尿酸酶脂质纳米粒的制备及其药效学特性分析[J]. 中国生物制品学杂志，2013，26(8)：1147-1150.
WANG Na, ZHAO Chunjing, HUANG Kaishun, et al. Preparation and pharmacodynamics of lipid nanoparticles containing uricase from candida utilis[J]. **Chinese Journal of Biologicals**, 2013, 26(8): 1147-1150.(in Chinese)

[6] Chen H, Wu J, Sun M, et al. N-trimethyl chitosan chloride-coated liposomes for the oral delivery of curcumin [J]. **J Liposome Res**, 2012, 22(2): 100-109.

[7] Ha W, Meng X W, Li Q, et al. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation[J]. **Soft Matter**, 2010(6): 1405-1408.

[8] 施特尔马赫(德). 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊 译. 北京：中国轻工业出版社，1992：85-88.

[9] Borqhorst S, Hempel G, Poppenborq S, et al. Comparative pharmacokinetic/pharmacodynamic characterisation of a new pegylated recombinant *E. coli* L-asparaginase preparation (MC0609) in Beagle dog[J]. **Cancer Chemoth Pharm**, 2014, 74(2): 367-378.

[10] 郭健新，平其能，董隽，等. 壳聚糖包衣脂质体对 α- 糜蛋白酶降解醋酸亮丙瑞林的保护作用[J]. 中国药学杂志，2005，40(1)：47-50.
GUO Jianxin, PING Qineng, DONG Jun, et al. Protection effect of chitosan-coated liposome on the degradation of leuprolide by α -chymotrypsin[J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 2005, 40(1): 47-50.(in Chinese)

[11] Rescia V C, Ramos H R, Takata C S, et al. Diphtheria toxoid conformation in the context of its nanoencapsulation within liposomal particles sandwiched by chitosan[J]. **J Liposome Res**, 2011, 21(1): 116-123.