

尿酸酶自组装空心纳米微球体外稳定性

邓雪, 胡雪原, 何丹, 晏子俊, 周云莉, 张景勍*

(重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

摘要: 制备载尿酸酶(Uricase, UOX)聚乙二醇-透明质酸(Hyaluronic acid-graft-poly(ethylene glycol), HA-g-PEG)/羟丙基-β-环糊精(Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, HPCD)自组装空心纳米微球(HA-g-PEG/HPCD self-assembly hollow spheres encapsulated uricase, UHPHD), 并研究其体外稳定性。制备 UHPHD, 并测定其包封率、粒径及 Zeta 电位。再分别从最适温度、最适 pH、热稳定性、贮存稳定性、酸碱稳定性和抗胰蛋白酶水解能力初步考察游离 UOX 和 UHPHD 的差异。结果: UHPHD 的包封率为 $(62.17 \pm 2.94)\%$, 粒径和 Zeta 电位分别为 (299.60 ± 13.05) nm 和 (-45.10 ± 2.75) mV。UHPHD 和 UOX 最适温度均为 40 °C, 最适 pH 均为 8.5。体外稳定性结果显示, UHPHD 的体外稳定性明显高于 UOX。

关键词: 尿酸酶; 稳定性; 自组装空心纳米微球

中图分类号: R 944.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)09-0933-05

In Vitro Stability of Uricase Self-Assembly Hollow Nanospheres

DENG Xue, HU Xueyuan, HE Dan, YAN Zijun, ZHOU Yunli, ZHANG Jingqing*

(College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: To prepare the self-assembly hollow nanospheres of hyaluronic acid-graft-poly(ethylene glycol)(HA-g-PEG) and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPCD) containing uricase (UHPHD) and study their stability *in vitro*. UHPHD were prepared and the entrapment efficiency, size and zeta potential of UHPHD were detected. The optimum temperature, optimum pH, thermal stability, storage stability, pH stabilities and proteolytic stabilities of UOX and UHPHD were measured. The entrapment efficiency of UHPHD was $(62.17 \pm 2.94)\%$. The average particle size was (299.60 ± 13.05) nm, and the zeta potential was (-45.10 ± 2.75) mV. The optimal temperatures for UHPHD and UOX were 40 °C, the optimal pH values were 8.5. UHPHD significantly enhanced the stability of free UOX *in vitro*.

Keywords: uricase, stability, self-assembly hollow nanosphere

收稿日期: 2015-04-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(30973645); 重庆市首批高等学校优秀人才资助计划项目(渝教人(2009)2号文件)。

* 通信作者: 张景勍(1973—), 女, 重庆市人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物新剂型与新技术方面的研究。

E-mail: zjqrae01@163.com

引用本文: 邓雪, 胡雪原, 何丹, 等. 尿酸酶自组装空心纳米微球体外稳定性[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(09): 933-937.

尿酸是机体嘌呤代谢的终产物,经肾脏随尿液排出体外。尿酸及其盐类在水中溶解度很低,在某些病理情况下,由于嘌呤代谢紊乱,血液中尿酸积累过多,会导致高尿酸血症,继而引发痛风综合征^[1]。尿酸酶(Uricase, UOX)能够催化尿酸氧化生成尿囊素、过氧化氢和二氧化碳^[2]。UOX 专一性强,催化效率高,能够在短时间内有效降低患者体内的尿酸水平^[3]。20 世纪 90 年代,尿酸酶已作为治疗痛风的药物首先在欧洲上市。但是作为一种外源性的蛋白质, UOX 存在着易被体内酶水解,稳定性低、半衰期短等蛋白质药物的共同缺点,更严重的是它还存在着抗原性较强,易产生过敏反应等问题,因此大大限制了其临床使用^[4]。

自组装空心纳米微球是一种新型的药物载体。Ha 等^[5]人将 L-天冬酰胺酶包载于海藻酸钠-聚乙二醇/ α -CD 形成的空心纳米囊中。由于形成的囊膜具有半渗透性,酶的底物和催化产物能顺利通过囊膜,而酶不能自由通过从而提高了酶的稳定性、拓宽了酶的最适温度和最适 pH。为了克服 UOX 的缺点,扩大其临床应用,作者以聚乙二醇-透明质酸(Hyaluronic acid-graft- poly ethylene glycol, HA-g-PEG)/羟丙基- β -环糊精(Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HPCD)为载体,自组装形成空心纳米微球(HA-g-PEG/HPCD self-assembly hollow spheres encapsulated uricase, UHPHD),并着重考察了 UHPHD 的体外稳定性,为临床用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

UOX:美国 Sigma 公司;尿酸:英国 Alfa Aesar 公司;羟丙基- β -环糊精:武汉国邦达医药化工有限公司;乙醚为分析纯。

AB204S 电子分析天平:瑞士 Mettler Toledo 仪器公司;RE 52 AA 旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;TGL-16B 台式高速离心机:上海安亭科学仪器厂;SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵:巩义市予华仪器有限责任公司;UV-7504 PC 型紫外分光光度计: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;PHS-3C 型 pH 计:上海精密科学仪器有限公司;KQ-2200B 型水浴型超声仪:江苏昆山市超声仪器有限公司;Sephadex G-200 层析柱:上海楷洋生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 UHPHD 的制备 采用 Meng 等^[6]的方法制备 UHPHD。先配制 1.0%的 HA-g-PEG 溶液和 6.0 % 的 HPCD 溶液;将一定量的 UOX 加入到 2 mL 的 HA-g-PEG 溶液中,缓慢溶解;然后将 2 mL 含有 UOX 的 HA-g-PEG 溶液缓慢滴加入 6 mL 的 HPCD 溶液中。开始滴加时,溶液变轻微的浑浊,表明开始有空心纳米球形成,继续在 10 ℃条件下磁力搅拌 2 h,即得 UHPHD。

1.2.2 UHPHD 的包封率的测定 按照参考文献报道方法,采用凝胶柱分离-考马斯亮蓝法^[7]测定包封率。吸取 0.5 mL 的 UHPHD,上 Sephadex G-200 层析柱,用 pH 8.5 的 Bicine-NaOH 缓冲液以 1 mL/min 流速洗脱分离 UHPHD 和 UOX。接收 UHPHD 部分,取其中 100 μ L,加入乙醚破乳后,再加入考马斯亮蓝,在 595 nm 波长处测定吸收度值(A_{UHPHD})。以同法处理的未过柱的 UHPHD,同法测定吸收度值($A_{\text{总}}$)。包封率(%) = $A_{\text{UHPHD}}/A_{\text{总}} \times 100\%$,重复 3 次。

1.2.3 UHPHD 的粒径和 Zeta 电位的测定 取少量 UHPHD 混悬液,以 1:10 比例稀释 3 倍后,在 25 ℃下用激光粒度电位仪测定 UHPHD 的粒径和 Zeta 电位。

1.2.4 UHPHD 和 UOX 最适温度和最适 pH 的测定

将尿酸溶于 50 mmol/L 硼酸-硼砂(pH 8.5)缓冲液中,分别于 20~70 ℃的水浴中预热 10 min 后,在 25 ℃下按照 Zhou 等^[8]方法测定 UHPHD 和 UOX 的活性,绘制温度-活性曲线图。在硼酸缓冲体系中分别配制 pH 6.5~9.5 的尿酸溶液,分别在最适温度条件下预热 10 min 后测定 UHPHD 和 UOX 的活性,绘制 pH-活性曲线图。

1.2.5 UHPHD 和 UOX 热稳定性的测定 分别取 UHPHD 和 UOX 各 2 mL,置于 55 ℃的水浴中,在第 0、1、2、3、4、5 小时取 200 μ L,测定 UHPHD 和 UOX 的活性,结果以活性保留百分数进行计算。

1.2.6 UHPHD 和 UOX 贮存稳定性的测定 将 UHPHD 和 UOX(UOX 的质量浓度为 0.1 mg/mL)避光密封贮存于 4 ℃条件下,分别于第 0、1、2、4、7、10、14、20、28 天取出,测定 UHPHD 和 UOX 的活性,结果以活性保留百分数进行计算。

1.2.7 UHPHD 和 UOX 酸碱稳定性的测定 分别取 UHPHD 和 UOX(UOX 的质量浓度为 0.3 mg/mL) 100 μ L,加入 pH 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、

9.0、9.5 的缓冲液稀释 3 倍,置于 40 ℃水浴中放置 40 min,取出测定 UHPHD 和 UOX 的活性。以 UHPHD 在 pH 8.5 时的酸碱稳定性测定结果为 100%,计算其余各点的相对活性。

1.2.8 UHPHD 和 UOX 抗胰蛋白酶水解能力的测定 分别取 1 mL UHPHD 和 UOX (UOX 质量浓度为 0.2 mg/mL),加入等体积 0.2 mg/mL 胰蛋白酶溶液混合,然后置于 37 ℃水浴中,在 0、10、20、30、40、50、60 min 分别取出,测定 UHPHD 和 UOX 的活性,结果以活性保留百分数进行计算。

2 结果与讨论

2.1 UHPHD 的包封率、粒径及 Zeta 电位

制备 3 批 UHPHD,经检测,平均包封率为 $(62.17 \pm 2.94)\%$,平均粒径为 (299.60 ± 13.05) nm,Zeta 电位为 (-45.10 ± 2.75) mV。UHPHD 的粒径分布和电位见图 1。

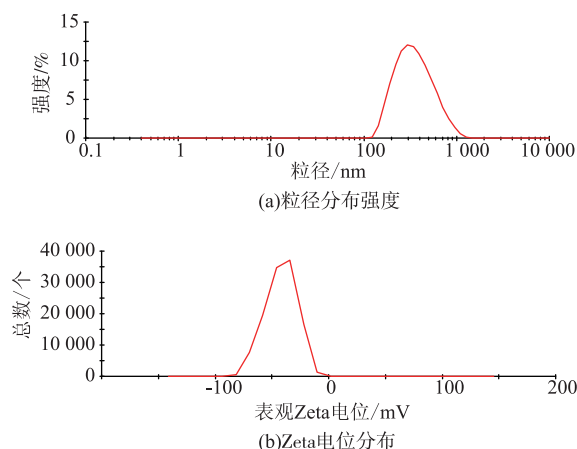


图 1 UHPHD 的粒径分布图和 zeta 电位分布图

Fig. 1 Size distribution profiles and zeta potential profiles of UHPHD

2.2 UHPHD 和 UOX 的最适温度

UHPHD 和 UOX 的最适温度均为 40 ℃,如图 2 所示。结果显示,UHPHD 在 20~70 ℃时活性均高于 UOX,其中 40 ℃时 UHPHD 活性是 UOX 的 116.31%。

2.3 UHPHD 和 UOX 的最适 pH 值

pH 测定结果见图 3。UHPHD 和 UOX 的 pH 从 5.0 到 8.5 时,活性逐渐升高,从 pH 8.5 到 pH 9.5 时活性逐渐降低,故 UHPHD 和 UOX 的最适 pH 值为 8.5。此时,UHPHD 活性是 UOX 的 1.4 倍。在 pH

5.0~9.5 范围内,UHPHD 的活性均高于游离 UOX,表明 UHPHD 能明显提高 UOX 的活性。

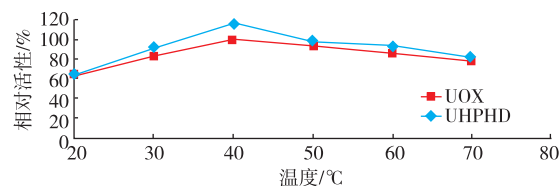


图 2 UHPHD 和游离 UOX 的最适温度 ($n=3$)

Fig. 2 Optimal temperature of UHPHD and free UOX, ($n=3$)

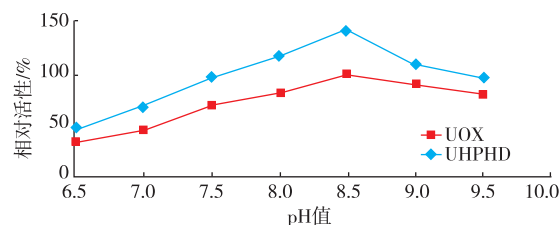


图 3 UHPHD 和游离 UOX 的最适 pH ($n=3$)

Fig. 3 Optimal pH of UHPHD and free UOX ($n=3$)

2.4 UHPHD 和 UOX 热稳定性的测定

UHPHD 和 UOX 的热稳定性测定结果见图 4,UHPHD 在 55 ℃水浴中放置 5 h 后,酶活性仍保持为 80%以上,而 UOX 在相同的条件下,活性由 100%下降到 16.76%。3 h 时,UOX 活性下降到 50%以下,而 UHPHD 酶活性仍保留为 85.31%。

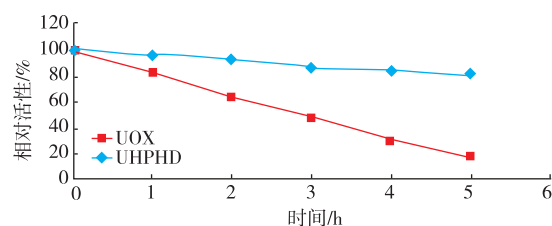


图 4 UHPHD 和游离 UOX 的热稳定性 ($n=3$)

Fig. 4 Thermal stabilities of UHPHD and free UOX ($n=3$)

2.5 UHPHD 和 UOX 贮存稳定性的测定

UHPHD 和 UOX 的贮存稳定性测定的结果见图 5。在 4 ℃避光密封贮存条件下,UHPHD 的稳定性明显优于 UOX。当游离 UOX 在第 28 天活性保留值降至 23.72%时,UHPHD 仍保留有 57.78%的活性;UHPHD 在第 10 天时活性保留值为 81.66%时,游离 UOX 则低于 50%。综上,UHPHD 有更好的贮存稳定性。

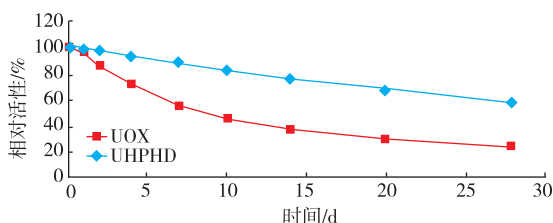


图5 4 °C条件下 UHPHD 和 UOX 贮存稳定性的测定 ($n=3$)
Fig. 5 Storage stabilities of UHPHD and free UOX incubated at 4 °C ($n=3$)

2.6 UHPHD 和 UOX 酸碱稳定性的测定

UHPHD 和 UOX 的酸碱稳定性测定结果见图 6。结果显示,在 pH 5.0~9.5 中,UHPHD 活性保留最小值为 55.64%, 游离 UOX 活性保留最大值仅为 66.77%, 最小值为 20.47%。在此 pH 范围内, UHPHD 活性保留值均高于 UOX。表明 UHPHD 较游离 UOX 有更好的耐溶液酸碱变化的能力。

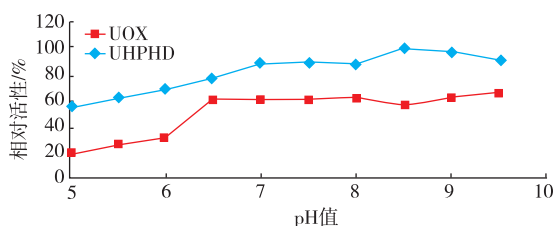


图6 UHPHD 和 UOX 酸碱稳定性的测定 ($n=3$)
Fig. 6 pH stabilities of UHPHD and free UOX ($n=3$)

2.7 UHPHD 和 UOX 抗胰蛋白酶水解能力的测定

UHPHD 和 UOX 的抗胰蛋白酶水解能力测定见图 7。UOX 的酶活性快速下降,在 60 min 时,活性仅保留了 10.33%,几乎丧失活性。相反,UHPHD 活性仍保留在 50%以上,表明 UHPHD 相比于 UOX 有更好的抗酶解能力。

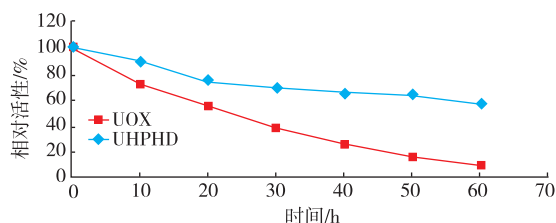


图7 UHPHD 和 UOX 抗胰蛋白酶水解能力的测定
Fig. 7 Proteolytic stabilities of UHPHD and free UOX

3 结 语

本研究表明,UOX 热稳定性、贮存稳定性、酸碱稳定性和抗胰蛋白酶水解能力均明显低于 UHPHD,其原因可能是酶蛋白中的反应基团或者蛋白质中的一些高级结构直接暴露于外部环境中。过高或者过低的温度、过酸或者过碱的环境、贮存时间的延长以及胰蛋白酶的水解使得酶分子的内部结构和性质改变,导致酶活力的降低甚至丧失。据报道,Li 等^[9]将葡萄糖氧化酶包裹于羧甲基魔芋葡聚糖-聚乙二醇/ α -环糊精自组装形成的纳米球中,提高了葡萄糖氧化酶的稳定性,且载体膜具有半渗透性及生物相容性。作者制备的 HA-g-PEG/HPCD 自组装空心纳米微球是一种新型的药物载体,将 UOX 包裹于 HA-g-PEG/HPCD 自组装空心纳米微球后,由于载体对酶蛋白具有一定的保护作用,降低了外界环境变化引起的酶分子构象改变的几率,因而使得酶的稳定性获得了提高。

作者从热稳定性、贮存稳定性、酸碱稳定性和抗胰蛋白酶水解能力方面分别对 UHPHD 和 UOX 的体外稳定性进行了研究,丰富了 UOX 的研究内容,也为 UHPHD 的体内研究奠定了良好的基础。由本研究可看出,UHPHD 有提高 UOX 体外稳定性的优点。

参考文献:

- [1] NANDA P, BABU P E. Isolation, screening and production studies of uricase producing bacteria from poultry sources[J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2014, 44(8): 811-821.
- [2] SUPRIYA D, BEEDKAR C N, RAGINI G, et al. Comparative structural modeling and docking studies of uricase: possible implication in enzyme supplementation therapy for hyperuricemic disorders[J]. *Comput Biol Med*, 2012, 42(6): 657-666.
- [3] BOMALASKI J S, HOLTSBERG F W, ENSOR C M, et al. Uricase formulated with polyethylene glycol (uricase-PEG 20): biochemical rationale and preclinical studies[J]. *J Rheumatol*, 2002, 29(9): 1942-1949.
- [4] GUO Yuan, TIAN Fa, GAO Xiangdong. Effect of PEGylation on properties of uricase[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2011, 18(6): 488-491. (in Chinese)

- [5] HA W, MENG X W, LI Q, et al. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation[J]. **Soft Matter**, 2010, 6(7): 1405-1408.
- [6] MENG X W, HA W, CHENG C, et al. Hollow nanospheres based on the self-assembly of alginate-graft-poly (ethylene glycol) and α -cyclodextrin[J]. **Langmuir**, 2011, 27(23): 14401-14407.
- [7] TAN Q, ZHANG J, WANG N, et al. Uricase from *Bacillus fastidious* loaded in alkaline enzymosomes; enhanced biochemical and pharmacological characteristics in hypouricemic rats[J]. **Eur J Pharm Biopharm**, 2012, 82(1): 43-48.
- [8] ZHOU Y L, YANG L, WU J Y, et al. Primarily study on pharmacokinetics of uricase in uricase-catalase liposome[J]. **Chinese Journal of Hospital Pharmacy**, 2014, 34(21): 1805-1808. (in Chinese)
- [9] LI Q, XIA B, MICKEY B, et al. Self-assembly of carboxymethyl konjac glucomannan-g-poly(ethyleneglycol) and cyclodextrin to biocompatible hollow nanospheres for glucose oxidase encapsulation[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2011, 86(10): 120-126.

会 议 消 息

会议名称(中文): 第九届中国工业生物技术发展高峰论坛

所属学科: 生物技术与生物工程

开始日期: 2017-11-06

结束日期: 2017-11-08

所在城市: 天津市 和平区

主办单位: 中国科学院科技促进发展局、中国生物工程学会

承办单位: 中国科学院天津工业生物技术研究所、中科育成(天津)科技发展有限公司

联系人: 吴崇明

联系电话: 022-24828776

E-MAIL: biocap@tib.cas.cn

会议网站: http://www.cas.cn/xs/201707/t20170710_4608053.shtml

会议背景介绍: “中国工业生物技术发展高峰论坛”是中国科学院科技促进发展局联合国家发改委高技术产业司、科技部中国生物技术发展中心、中国生物工程学会等部门和单位共同精心打造的国内唯一集政府、企业、科研、教育、金融等元素为一体的工业生物技术领域品牌盛会。“中国生物工业投资大会”由中国科学院天津工业生物技术研究所策划发起,国内首个生物工业领域以资本、技术、产业为核心的专业性、商务型投资会议,为促进工业生物技术领域“技术、产业、资本”深度融合搭建崭新平台。2017年,中国工业生物技术发展高峰论坛专注深耕工业生物技术领域第十年,将与中国生物工业投资大会合并召开,力求办成特色互补、效应倍增的行业盛会!

“第九届中国工业生物技术发展高峰论坛暨第二届中国生物工业投资大会”将组织“技术创新”和“项目路演”、“企业展览”三大板块内容,着重探讨工业生物技术领域“合成生物技术”、“酶工程与生物催化”、“细胞工厂”、“生物计算与设计”、“高通量筛选装备与技术”等议题,并甄选处于不同阶段的优秀生物工业项目进行路演,发布《中国工业生物技术白皮书暨中国生物工业投资分析报告 2017》,还将设立“年度创新先锋奖”、“年度科技转化奖”及“年度绿色企业奖”等奖项,同时开展小组讨论、一对一洽谈等活动。大会将采取多种组织形式,加强互动交流,欢迎在线注册报名参会!