

# 天冬酰胺酶纳米微球体外活性和稳定性

晏子俊, 李万玉, 胡雪原, 何丹, 谢江川, 张景劼\*

(重庆医科大学 药物高校工程研究中心, 重庆 400016)

**摘要:** 制备自组装天冬酰胺酶(Asparaginase, AAS)透明质酸-聚乙二醇(Hyaluronic acid-graft-poly(ethylene glycol), HA-g-PEG)/羟丙基- $\beta$ -环糊精(Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, HPCD)纳米微球(self-assembly HA-g-PEG / HPCD hollow nanospheres loaded with AAS, AHHPs), 并对 AHHPs 的体外活性及稳定性进行初步研究。制备并测定 AHHPs 的透射电镜、粒径、Zeta 电位和包封率。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、抗胰蛋白酶水解能力和血浆稳定性初步考察 AHHPs 的体外活性和稳定性。测得 AHHPs 的平均粒径为(367.43±2.72) nm, Zeta 电位为(-15.70±1.25) mV, 平均包封率为(66.03±3.81)%。AHHPs 的最适温度为 50 °C, 最适 pH 值为 7.0; 游离 AAS 的最适温度为 60 °C, 最适 pH 值为 7.5。体外稳定性的结果显示, 同样条件下, AHHPs 的体外稳定性明显比游离 AAS 的好。因此 AHHPs 能有效提高 AAS 的体外活性和体外稳定性。

**关键词:** 天冬酰胺酶; 纳米微球; 体外活性; 体外稳定性

中图分类号: Q 556; R 943 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)12-1258-06

## Studies on *in vitro* Activity and Stability of Asparaginase Loaded in Nanospheres

YAN Zijun, LI Wanyu, HU Xueyuan, HE Dan, XIE Jiangchuan, ZHANG Jingqing\*

(Engineering Research Center in University, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** To prepare self-assembly hyaluronic acid-graft-poly(ethylene glycol), (HA-g-PEG) / hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin(HPCD) hollow nanospheres loaded with AAS(AHHPs), and then investigate the *in vitro* activity and stability difference between AHHPs and free AAS. AHHPs was prepared and the transmission electron microscopy, size, zeta potential, entrapment efficiency were detected. We investigated the *in vitro* activity and stability of AHPs and free AN by measuring the optimum temperature, optimum pH, thermal stability, storage stability, pH stabilities, trypsin stabilities and plasma stabilities. The average particle size was(367.43±2.72) nm, zeta potential was (-15.70±1.25) mV, and the entrapment efficiency of UHPHD was (66.03±3.81)%. The optimum

收稿日期: 2015-06-19

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: 张景劼(1973—), 女, 重庆人, 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: 晏子俊, 李万玉, 胡雪原, 等. 天冬酰胺酶纳米微球体外活性和稳定性[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(12): 1258-1263.

temperature and optimum pH of the AHHPs were 50 °C and 7.0, respectively; the optimum temperature and optimum pH of free AAS were 60 °C and 7.5, respectively. The results of stability experiments showed that the stabilities of AHHPs were significantly superior to the free AAS. AHHPs can improve the activity of AAS and significantly enhance the stabilities of AAS *in vitro*.

**Keywords:** asparaginase, nanosphere, activity and stability

天冬酰胺酶(Asparaginase, AAS)是降解天冬酰胺的重要酶<sup>[1]</sup>。天冬酰胺是机体合成蛋白质所需的重要氨基酸,某些肿瘤细胞(如白血病细胞和淋巴瘤细胞等)的天冬酰胺合成酶活性非常低,不能合成天冬酰胺,须依赖宿主供给来合成所需蛋白质<sup>[2]</sup>。AAS就是利用肿瘤细胞的这种机制,通过催化患者体内的天冬酰胺的降解,抑制肿瘤细胞中所需蛋白质的正常合成,从而使白血病细胞死亡<sup>[3-4]</sup>。但AAS存在稳定性差、容易被酶降解、半衰期短和活性低等缺点<sup>[6-7]</sup>,限制了其在临床上的应用。

近来,文献[8-11]报道的自组装纳米载体是一种新型的载体。Ha等<sup>[10]</sup>采用自组装的方法制备了载带L-AAS的海藻酸-PEG/ $\alpha$ -CD纳米微球;Li等<sup>[11]</sup>采用自组装方法制备了载带葡萄糖氧化酶的羧甲基魔芋葡甘聚糖-PEG/ $\alpha$ -CD纳米微球。上述文献报道的微球膜具有半渗透性和生物相似性,催化产物和酶的底物可顺利通过微球膜,而被载带的酶则不能自由通过,故拓宽了酶的最适温度和最适pH,并提高了酶的稳定性。

作者依据上述思路,制备了载带AAS的自组装透明质酸-聚乙二醇(Hyaluronic acid-graft-polyethylene glycol, HA-g-PEG)/羟丙基- $\beta$ -环糊精(Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, HPCD)纳米微球(self-assembly HA-g-PEG/HPCD hollow nanospheres loaded with AAS, AHHPs),并初步考察了AHHPs的体外活性和体外稳定性,为临床研究打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 主要材料、试剂** AAS:以色列Prospec公司, 225 U/mg, 纯度 $\geq 96.0\%$ ; PEG: Sigma-aldrich公司, 规格250 g; HA: 曲阜市广龙生物制品厂, 纯度 $> 99.0\%$ ; HPCD: 成都格雷西亚化学技术有限公司, 纯

度 $> 98.0\%$ ; HA-g-PEG: 作者所在实验室自制, 批号20140519、20140521、20140526; Tris-HCl缓冲液: 50 mmol/L, pH 7.3, 作者所在实验室自配; 其它试剂均为分析纯。

**1.1.2 主要仪器** Milli-Q超纯水系统: 美国Millipore公司; RE-52AA旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂; pH计: 上海精密科学仪器有限公司; 85-2型恒温磁力搅拌器: 上海司乐仪器有限公司; UV-7504 PC紫外分光光度计: 上海欣茂仪器有限公司; Zetasizer Nano zs90激光粒度电位仪: 英国马尔文公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 AHHPs的制备** 采用文献[8-11]报道的自组装方法制备AHHPs。具体如下: 将适量溶有AAS的HA-g-PEG溶液缓慢滴加至HPCD溶液中, 开始滴加时, 溶液出现轻微的浑浊, 即开始有纳米微球形成, 继续一定温度下磁力搅拌2 h后, 即得AHHPs, 批号为20140520、20140523、20140528。

**1.2.2 AHHPs的透射电镜** 取AHHPs适量, 用Tris-HCl缓冲液稀释适当倍数后, 用2%磷钼酸染色后, 滴于铜片上, 在透射电镜下观察AHHPs的形态。

**1.2.3 AHHPs粒径和Zeta电位的测定** 使用马尔文粒度仪检测AHHPs的粒径和Zeta电位。取AHHPs适量, 加入Tris-HCl缓冲液稀释一定倍数后, 测定AHHPs的粒径和Zeta电位。

**1.2.4 AHHPs包封率的测定** 按照葡聚糖凝胶法<sup>[12]</sup>测定AHHPs的包封率。方法如下: 制备过柱后的AHHPs, 在595 nm波长下, 测得吸光度 $A_1$ 。同法处理, 测得未过柱的AHHPs的吸光度 $A_2$ 。由测得的吸收值 $A_1$ 和 $A_2$ 计算出1 mL AHHPs混悬液中制剂所含AAS的量 $W_1$ 和AHHPs混悬液中AAS总量 $W_2$ , 包封率按照如下公式计算:

$$\text{包封率} = (W_1/W_2) \times 100\%$$

式中,  $W_1$ 为AHHPs混悬液中制剂所含AAS的

量,  $W_2$  为 AHHPs 混悬液中 AAS 总量  $W_2$ 。

**1.2.5 最适温度和最适 pH** 将天冬酰胺溶于 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.3)中, 分别在 20、30、40、50、60、70、80 °C 的水浴中预热 10 min 后, 在 37 °C 下按照玛斯本-利斯通法<sup>[13]</sup>测定 AHHPs 和游离 AAS 的活性, 由测定结果得到温度-活性曲线。在 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液体系中分别配制 pH 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 的天冬酰胺溶液, 分别在 37 °C 的水浴中预热 10 min 后, 测定 AHHPs 和游离 AAS 的活性, 由测定结果得到 pH-活性曲线。

**1.2.6 热稳定性的测定** 取适量 AHHPs 和游离 AAS 溶液, 放置于 55 °C 的水浴中<sup>[5]</sup>, 分别于 0、1、2、3、4、5 h 时取出, 测定 AHHPs 和游离 AAS 的活性。

**1.2.7 贮存稳定性的测定** 取适量 AHHPs 和游离 AAS(AAS 的质量浓度为 0.1 mg/mL)溶液, 避光贮存于 4 °C 下, 分别于 0、1、2、5、10、15、20、25、28 d 取出, 测定 AHHPs 和游离 AAS 的活性。

**1.2.8 酸碱稳定性的测定** 取适量 AHHPs 和游离 AAS(AAS 的质量浓度为 0.3 mg/mL)溶液, 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 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液稀释 3 倍后, 于 37 °C 水浴中放置 40 min 后取出, 测定 AHHPs 和游离 AAS 的活性。

**1.2.9 抗胰蛋白酶水解能力的测定** 取适量 AHHPs 和游离 AAS(AAS 的质量浓度为 0.2 mg/mL)溶液, 分别加入等体积的 0.2 mg/mL 胰蛋白酶溶液, 混匀后置于 37 °C 水浴, 分别于 0、10、20、30、40、50、60 min 时取出, 测定 AHHPs 和游离 AAS 的活性。

**1.2.10 血浆稳定性的测定** 按照 Saracino 等<sup>[14]</sup>报道的方法配制体外模拟空白血浆。取适量 AHHPs 和游离 AAS(AAS 的质量浓度为 0.5 mg/mL)溶液, 分别与 5 倍体积的体外模拟空白血浆混匀, 于 37 °C 下孵育 0、1、2、4、8、12、24、48、72 h 后, 测定 AHHPs 和游离 AAS 的活性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 AHHPs 在透射电镜下的形态

透射电镜下观察到 AHHPs 呈均匀分布的圆形或椭圆形, 见图 1。

### 2.2 AHHPs 的粒径和 Zeta 电位

马尔文激光粒度电位仪测得 AHHPs 的粒径为  $(367.43 \pm 2.72)$  nm (见图 2), Zeta 电位为  $(-15.70 \pm$

1.25) mV (见图 3)。说明 AHHPs 分布均匀, 符合实验要求。

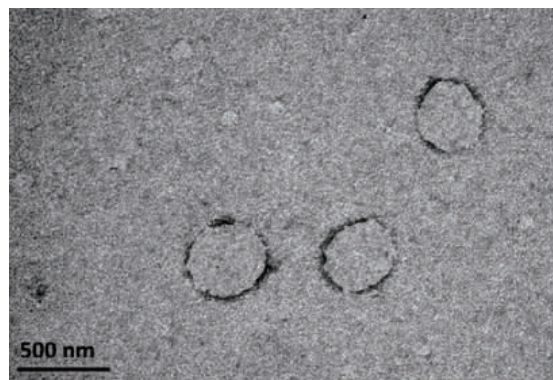


图 1 AHHPs 的透射电镜图

Fig. 1 Transmission electron microscopy image of AHHPs

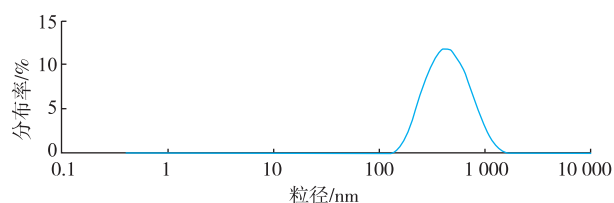


图 2 AHHPs 的粒径分布图

Fig. 2 Particle size distribution of AHHPs

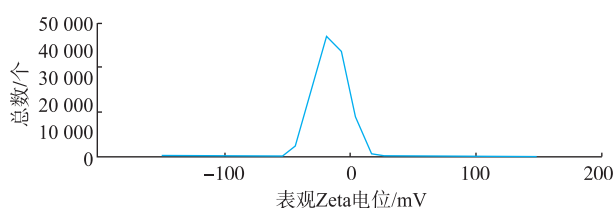


图 3 AHHPs 的 Zeta 电位分布图

Fig. 3 Zeta potential distribution of AHHPs

### 2.3 AHHPs 的包封率

用 excel 2007 进行数据统计, 统计结果用均值 $\pm$ 标准差表示。通过对 3 批 AHHPs 制剂的包封率进行平行测定, 结果得到 AHHPs 的包封率为  $(66.03 \pm 3.81)\%$ 。

### 2.4 最适温度

AHHPs 的最适温度为 50 °C, 游离 AAS 的最适温度为 60 °C, 见图 4。20~50 °C 时 AHHPs 和游离 AAS 的活性均随温度的升高而逐渐增加; 60~80 °C 时 AHHPs 和游离 AAS 的活性则随温度的升高而逐渐降低; 50~60 °C 时 AHHPs 的活性几乎相等, 且 AHHPs 在 20~80 °C 时的活性均大于游离 AAS。

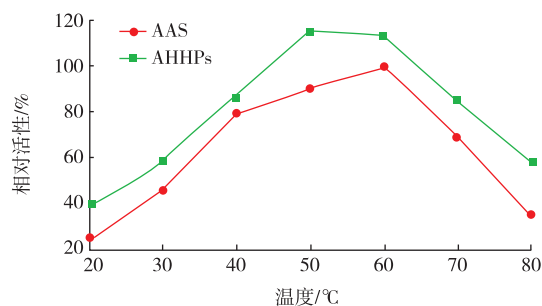


图4 AHHPs和游离AAS的最适温度(n=3)

Fig. 4 Optimal temperature of AHHPs and free AAS(n=3)

### 2.5 最适 pH 值

AHHPs 的最适 pH 为 7.0, 游离 AAS 的最适 pH 为 7.5, 见图 5。由图 5 可知, pH 5.5~7.0 时, AHHPs 和游离 AAS 的活性均随 pH 值升高而逐渐增加; pH 7.5 时, 游离 AAS 的活性虽进一步增加, 之后则开始下降; pH 7.0~9.5 时, AHHPs 的活性虽在一直下降, 但 pH 7.0~8.0 时, AHHPs 的活性均大于游离 AAS 在最适 pH 7.5 时的活性, 说明 AHHPs 最适 pH 的范围较游离 AAS 有所变宽, 且 pH 5.5~9.5 时 AHHPs 的活性均大于游离 AAS。

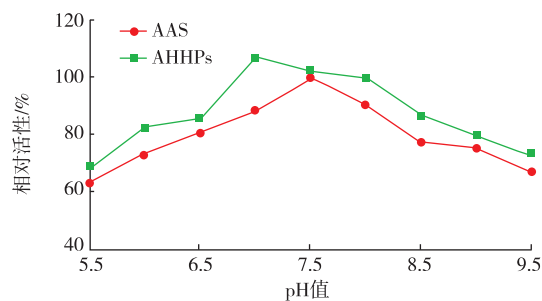


图5 AHHPs和游离AAS的最适pH值(n=3)

Fig. 5 Optimal pH of AHHPs and free AAS(n=3)

### 2.6 热稳定性的测定

AHHPs 和游离 AAS 的热稳定性测定结果见图 6。由图 6 可知, 5 h 时 AHHPs 仍保留有 55% 以上的活性, 而游离 AAS 在相同条件下的热稳定性较差; 3 h 时游离 AAS 已完全失活, 说明 AHHPs 的热稳定性明显好于游离 AAS。

### 2.7 贮存稳定性的测定

AHHPs 和游离 AAS 的贮存稳定性测定的结果见图 7。由图 7 可知, AHHPs 在 4 °C 保存 28 d 后, AHHPs 的活性保留值仍为 45%, 而游离 AAS 的活性保留值则降为 20%, 且 AHHPs 在 4 °C 指定保存时间点的活性均比游离 AAS 好, 说明 AHHPs 的贮

存稳定性比游离 AAS 好。

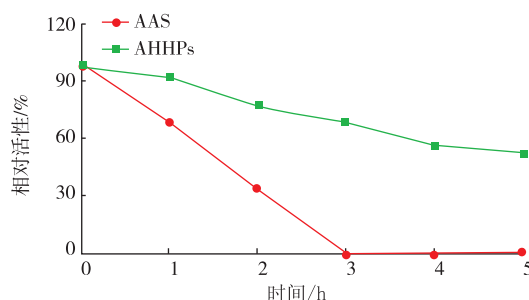


图6 AHHPs和游离AAS的热稳定性(n=3)

Fig. 6 Thermal stabilities of AHHPs and free AAS(n=3)

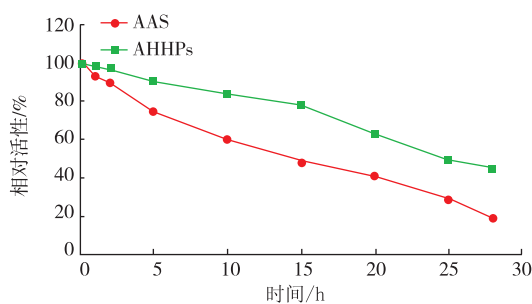


图7 4 °C下AHHPs和游离AAS贮存稳定性的测定(n=3)

Fig. 7 Storage stabilities of AHHPs and free AAS incubated at 4 °C(n=3)

### 2.8 酸碱稳定性的测定

AHHPs 和游离 AAS 的酸碱稳定性测定结果见图 8。由图 8 可知, pH 6.5~8.5 时, AHHPs 的活性保留值约为 95%, 游离 AAS 的活性保留最大值仅为 85%, 即 pH 6.5~8.5 时, AHHPs 的活性均大于游离 AAS 在最大活性 pH 7.5 时的活性; pH 5.5~9.5 时, AHHPs 的活性均比同一 pH 值游离 AAS 的活性高, 说明 AHHPs 极大地提高了 AAS 抗外界环境酸碱变化能力。

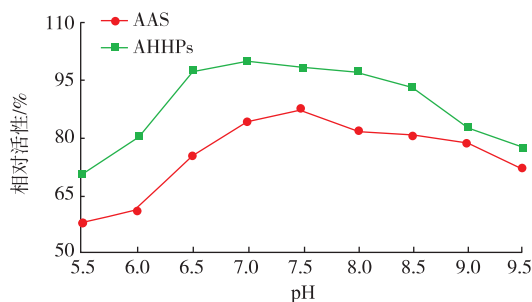


图8 AHHPs和游离AAS酸碱稳定性的测定(n=3)

Fig. 8 pH stabilities of AHHPs and free AAS(n=3)

## 2.9 抗胰蛋白酶水解能力的测定

AHHPs 和游离 AAS 的抗胰蛋白酶水解能力测定结果见图 9。AHHPs 在 20 min 时保留有 80% 左右的活性, 60 min 时其保留活性值仍为 30% 以上。相反, 游离 AAS 的活性则呈快速下降的趋势, 20 min 时已降到了 60% 左右, 50 min 时已全部失活。说明 AHHPs 的抗胰蛋白酶水解能力明显强于游离 AAS。

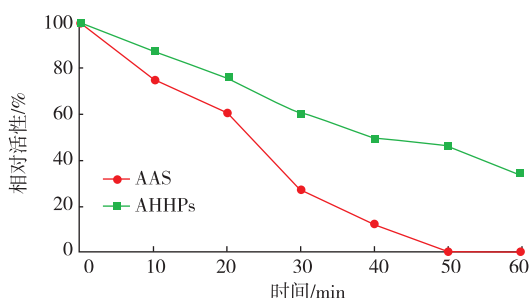


图 9 AHHPs 和游离 AAS 抗胰蛋白酶水解能力的测定 ( $n=3$ )  
Fig. 9 Proteolytic stabilities of AHHPs and free AAS ( $n=3$ )

## 2.10 血浆稳定性的测定

AHHPs 和游离 AAS 的血浆稳定性测定的结果见图 10。由图 10 可知, 8 h 时 AHHPs 的活性保留值为 80% 以上, 72 h 时 AHHPs 的活性保留值约为 20%; 而游离 AAS 在 8 h 时的活性保留值约为 40%, 48 h 时游离 AAS 已全部失活。AHHPs 的最高活性点为 2 h 时, 整个过程中其活性的变化趋势是先降低再升高再降低; 而游离 AAS 的最高活性点为 0 h 时, 整个过程中其活性一直呈下降趋势。说明 AHHPs 在模拟血浆中的稳定性明显比游离 AAS 好。

## 3 结语

在最适温度和最适 pH 实验中, AHHPs 的最适温度和最适 pH 均与游离 AAS 的不同, Ha 等<sup>[12]</sup>制备的 L-AAS 纳米微球和游离 L-AAS 也表现出不同的

## 参考文献:

- [1] PIETERS R, HUNGER S P, BOOS J, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia; a focus on Erwinia asparaginase[J]. *Cancer*, 2011, 117(2): 238-249.
- [2] GRUSON B, VAIDA I, MERLUSCA L, et al. L-asparaginase with methotrexate and dexamethasone is an effective treatment combination in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm[J]. *Br J Haematol*, 2013, 163(4): 543-545.
- [3] WYPIJ J M, PONDENIS H C. *E.coli*-derived L-asparaginase retains enzymatic and cytotoxic activity in vitro for canine and feline lymphoma after cold storage[J]. *Vet Med Int*, 2013, 2013: 786162.

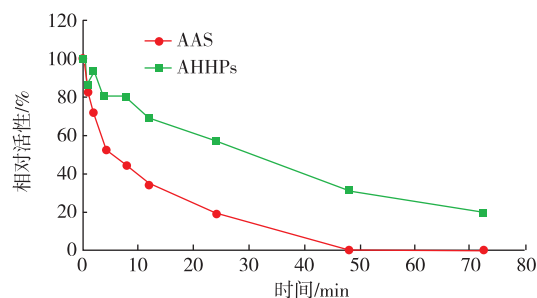


图 10 AHHPs 和游离 AAS 血浆稳定性的测定 ( $n=3$ )  
Fig. 10 Plasma stability of AHHPs and free AAS ( $n=3$ )

最适温度与最适 pH。相对于游离 AAS, AHHPs 的最适温度和最适 pH 的改变及活性的增强可能是由于: 1) AHHPs 的制备过程中, 自组装纳米微球包裹 AAS 的同时, AAS 的结构发生了改变; 2) AAS 与自组装纳米微球的膜通过某种方式相互作用稳定了酶的活性<sup>[15]</sup>。一般情况下, pH 及温度过低或过高都可以影响到酶的稳定性, 从而使其发生不可逆的破坏, 温度、pH 与酶发挥最大活性密切相关, 酶在其最适温度和最适 pH 时, 其活性最高, 酶促反应速度也最快, 而小于或大于这个范围, 其活性都会有所降低。

AHHPs 的热稳定性、贮存稳定性、酸碱稳定性、抗胰蛋白酶水解能力和血浆稳定性均明显好于 AAS, 原因可能是酶蛋白中的一些高级结构或蛋白质中的反应基团裸露于外部环境中, 过低或过高的温度、过碱或过酸的环境、贮存的时间、酶的水解及血浆的存在均使得酶分子的性质和内部结构有所改变, 而导致酶活力的改变甚至丧失。

本研究得到的自组装 HA-g-PEG/HPCD 纳米微球是一种新型的药物载体, 将 AAS 制备成 AHHPs 后, 减少了外界环境变化对酶分子构象的影响, 并对酶蛋白具有一定的保护作用, 因而使得 AAS 的稳定性获得了提高。

- [4] KUBOI R, YOSHIMOTO M, WALDE P, et al. Refolding of carbonic anhydrase assisted by 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes[J]. **Biotechnol Prog**, 1997, 13: 828-836.
- [5] KOTZIA G A, LABROU N E. Engineering thermal stability of L-asparaginase by in vitro directed evolution[J]. **FEBS J**, 2009, 276(6): 1750-1761.
- [6] IKEUCHI H, AHN Y M, OTOKAWA T, et al. A sulfoximine-based inhibitor of human asparagine synthetase kills L-asparaginase-resistant leukemia cells[J]. **Bioorg Med Chem**, 2012, 20(19): 5915-5927.
- [7] HAFSA K E, WU W T, LIU J J, et al. The E. coli L-asparaginase was modified with activated dextran and PEG-2 [J]. **Pharmaceutical Biotechnology**, 1997, 4(2): 118-121. (in Chinese)
- [8] MENG X W, HA W, CHENG C, et al. Hollow nanospheres based on the self-assembly of alginate-graft-poly (ethylene glycol) and  $\alpha$ -cyclodextrin[J]. **Langmuir**, 2011, 23: 14401-14407.
- [9] HA W, FAN M M, ZHANG S, et al. Self-assembly of chitosan-g-PEG and  $\alpha$ -cyclodextrin into hollow spheres in aqueous solution [J]. **J Control Release**, 2011, 152 Suppl 1: e204-205.
- [10] HA W, MENG X W, LI Q, et al. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation[J]. **Soft Matter**, 2010, 6: 1405-1408.
- [11] LI Q, XIA B, BRANHAM M, et al. Self-assembly of carboxymethyl konjac glucomannan-g-poly (ethylene glycol) and ( $\alpha$ -cyclodextrin) to biocompatible hollow nanospheres for glucose oxidase encapsulation[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2011, 86: 120-126.
- [12] WANG Hong, WU Wutong, GU Xueqiu. Preparation of proliposomes and the determination of encapsulation of recombinant-L-asparaginase[J]. **Journal of Shenyang Pharmaceutical University**, 1999, 16(4): 235-238. (in Chinese)
- [13] 施特尔马赫. 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 85-88.
- [14] SARACINO M A, MARCHESELLI C, SOMAINI L, et al. Simultaneous determination of disulfiram and bupropion in human plasma of alcohol and nicotine abusers[J]. **Anal Bioanal Chem**, 2010, 398(5): 2155-22161.

## 会 议 消 息

会议名称(中文): 第五届耶鲁大学食品系统研讨会

会议名称(英文): 5th Annual Yale Food Systems Symposium

所属学科: 生物技术与生物工程, 农林基础, 农作物、林木果实产品贮藏、保鲜与安全

开始日期: 2018-02-23

结束日期: 2018-02-24

所在城市: 美国

具体地点: Yale School of Forestry and Environmental Studies

主办单位: Yale School of Forestry and Environmental Studies

E-MAIL: yfss@yale.edu

会议网站: <https://yalefoodsymposium.org/>

会议背景介绍:

We are pleased to announce the fifth annual Yale Food Systems Symposium will be held on Friday, February 23 and Saturday, February 24, 2018, at the Yale School of Forestry and Environmental Studies.

We invite all interested researchers or practitioners to review our 2018 RFP, and all are welcome to submit a presentation abstract here. Questions about proposal submission or conference registration may be directed to yfss@yale.edu.