

[制 剂]

马钱子碱固体脂质纳米粒在小鼠体内的组织分布

管庆霞， 温美欣， 刘振强， 冯宇飞， 王丽萍， 赵义军， 王艳宏*
(黑龙江中医药大学，黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要：目的 研究马钱子碱固体脂质纳米粒在小鼠体内的组织分布。**方法** 制备马钱子碱固体脂质纳米粒，以异硫氰酸荧光素（FITC）标记。小鼠静脉注射纳米粒混悬液，HPLC 法测定各组织（心、肝、脾、肺、肾、骨）中马钱子碱含量，分析纳米粒体内组织分布，再采用荧光内窥式激光共聚焦显微镜作进一步检测。**结果** 马钱子碱在小鼠肝脏中的相对摄取率（Re）最高（1.64）。纳米粒在各组织中的靶向效率（Te）均大于 1，对肝脏的选择性明显强于马钱子碱溶液。随着时间延长，FITC 标记的纳米粒由细胞外逐渐分布到细胞内，数量亦逐渐增加，并呈正相关性。**结论** 马钱子碱制成固体脂质纳米粒后，可提高其在小鼠肝组织中的分布，具有较明显的肝靶向性。

关键词：马钱子碱；固体脂质纳米粒；组织分布；小鼠；FITC；HPLC；荧光内窥式激光共聚焦显微镜

中图分类号：R969.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2017)04-0714-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.04.010

Tissue distribution of brucine-loaded solid lipid nanoparticles in mice *in vivo*

GUAN Qing-xia, WEN Mei-xin, LIU Zhen-qiang, FENG Yu-fei, WANG Li-ping, ZHAO Yi-jun, WANG Yan-hong*
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the tissue distribution of brucine-loaded solid lipid nanoparticles in mice *in vivo*. **METHODS** Mice were intravenously injected with suspension of prepared brucine-loaded solid lipid nanoparticles and marked by fluorescein isothiocyanate (FITC). The *in vivo* tissue distribution of nanoparticles was analyzed by having the brucine contents in various tissues (heart, liver, spleen, lung, kidney and bone) determined by HPLC, after which fluorescence confocal laser endomicroscopy was used for further detection. **RESULTS** Brucine had its the highest (1.64) relative intake efficiency (Re) in mice liver, and the nanoparticles shared all over one value of targeting efficiencies (Te) in various tissues, manifesting a much stronger selectivity to liver than that of brucine solution. With the extension of time, the FITC-marked nanoparticles displayed a rich extracellular to intracellular distribution indicating a positive correlation. **CONCLUSION** Brucine's increased distribution in the liver tissue of mice due to its solid lipid nanoparticle form shows obvious for liver targeting.

KEY WORDS: brucine; solid lipid nanoparticles; tissue distribution; mice; FITC; HPLC; fluorescence confocal laser endomicroscopy

马钱子碱为马钱科植物马钱子 *Brucine nuxvamica* L. 的主要化学成分之一，是一种弱碱性生物碱，水溶性差，国内外学者发现其具有显著的镇

痛、抗炎、抗肿瘤、中枢神经系统兴奋等作用^[1-3]。但常规马钱子碱溶液对肝脏疾病的治疗效果并不理想，故寻找靶向性好、疗效确切、毒副作

收稿日期：2016-07-20
基金项目：黑龙江中医药中青年科技攻关项目（ZQG-039）；黑龙江省自然科学基金面上项目（H2016076）；黑龙江省教育厅科学技术研究项目（12531624）；哈尔滨市科技创新人才专项基金项目（青年科技创新人才）（2011RFQXS102）
作者简介：管庆霞（1974—），女，博士，副教授，硕士生导师，从事中药新药开发研究。Tel: (0451) 87266893, E-mail: 546105832@qq.com
* 通信作者：王艳宏（1972—），女，博士，教授，硕士生导师，从事中药新药开发研究。Tel: (0451) 82195724, E-mail: wang.yanhong@163.com

用小的新型药物是一个亟待解决的问题^[4]。

纳米技术以其在药物传递方面具有高效、定向、特异性强的优点^[5]，被应用于药物靶向性研究，是药剂学研究的热点领域。马钱子碱固体脂质纳米粒给药系统可改变其在体内的组织分布特征，达到肝靶向目的，并降低不良反应^[6]。杨勇等^[7]报道，蟾酥固体脂质纳米粒冻干针剂的小鼠体内分布具有良好的肝靶向性。

荧光内窥式激光共聚焦显微镜能清楚地显示药物进入组织以及体内消除的过程，其结合了共聚焦显微镜与内窥镜，可实现在活体组织上的实时成像。在图像显示上，它能通过图像重构得到三维细胞图像，提高其分辨率，故该系统成功解决了普通共聚焦显微镜不能对体内组织细胞进行在体实时成像的问题，在临床和科研方面得到广泛应用^[8-14]。本实验为了探讨马钱子碱固体脂质纳米粒的靶向性，对其小鼠体内组织分布及荧光内窥式激光共聚焦显微镜成像进行研究，为其临床应用提供理论依据。

1 试药、仪器与动物

1.1 试药 马钱子碱对照品（含有量 $\geq 98\%$ ，中国食品药品检定研究院）；Poloxamer188（批号 20111002，上海协泰化工有限公司）；大豆卵磷脂（批号 120215，北京奥博星生物技术有限责任公司）；单硬脂酸甘油酯（批号 20120514，天津市光复精细化工研究所）。异硫氰酸荧光素（FITC）（96%，上海谱振生物科技有限公司）；戊巴比妥钠（99%，湖北鼎富化工有限公司）。二氯甲烷（批号 2012，天津市富宇精细化工）；甲醇为色谱纯（美国 Dikma 公司）；其他试剂均为分析纯；水为纯净水（超纯水机制备）。

1.2 仪器 高效液相色谱仪，配置 Waters 2996 检测器（美国 Waters 公司）；Diamonsil C₁₈ 色谱柱（250 mm $\times$ 4.6 mm，5 μ m）；TGL-16C 离心机（上海安亭科学仪器厂）；WH-1 微型涡旋混合器（上海沪西分析仪器厂有限公司）；微量移液器（大龙合资）；AB265-S 电子分析天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；海尔冰箱（青岛海尔股份有限公司）；JJ-2 组织捣碎匀浆机（常州菲普实验仪器厂）；DFNC-5LB 氮吹仪氮气发生器（杭州德克尔实验设备有限公司）；荧光内窥式激光共聚焦显微镜（凯隆国际实业有限公司）。

1.3 动物 昆明种小鼠，雌雄各半，体质量（20 $\pm$ 2）g，由黑龙江中医药大学动物实验中心提供，合格证号 SYXK（黑）2012-001。

2 方法与结果

2.1 纳米粒混悬液制备 按照单甘酯-卵磷脂比例 1:2、药物-单甘酯比例 1:10，称取单硬脂酸甘油酯 50 mg、马钱子碱 5 mg，加入 5 mL 无水乙醇中，超声溶解，再加入处方量卵磷脂，微热构成有机相；另取 0.4% F-68 溶液 10 mL，加热至温度与有机相相同，作为水相。用针头缓慢将有机相注入水相中，加入异硫氰酸荧光素（FITC，0.05 mg/mL）标记，温度保持在 65 $^{\circ}$ C，1 000 r/min 搅拌 1.5 h，浓缩至体积在 5 mL 左右。将所得半透明纳米乳剂在 1 000 r/min 搅拌下快速混于另一低温（0~2 $^{\circ}$ C）水相（10 mL）中，继续搅拌固化 1.5 h，即得。同法制备未标记样品。

2.2 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱（250 mm $\times$ 4.6 mm，5 μ m）；流动相 30% 甲醇-水-乙酸-三乙胺（230:2.4:0.3）（70%）；体积流量 1 mL/min；检测波长 265 nm；柱温 30 $^{\circ}$ C；进样量 20 μ L。

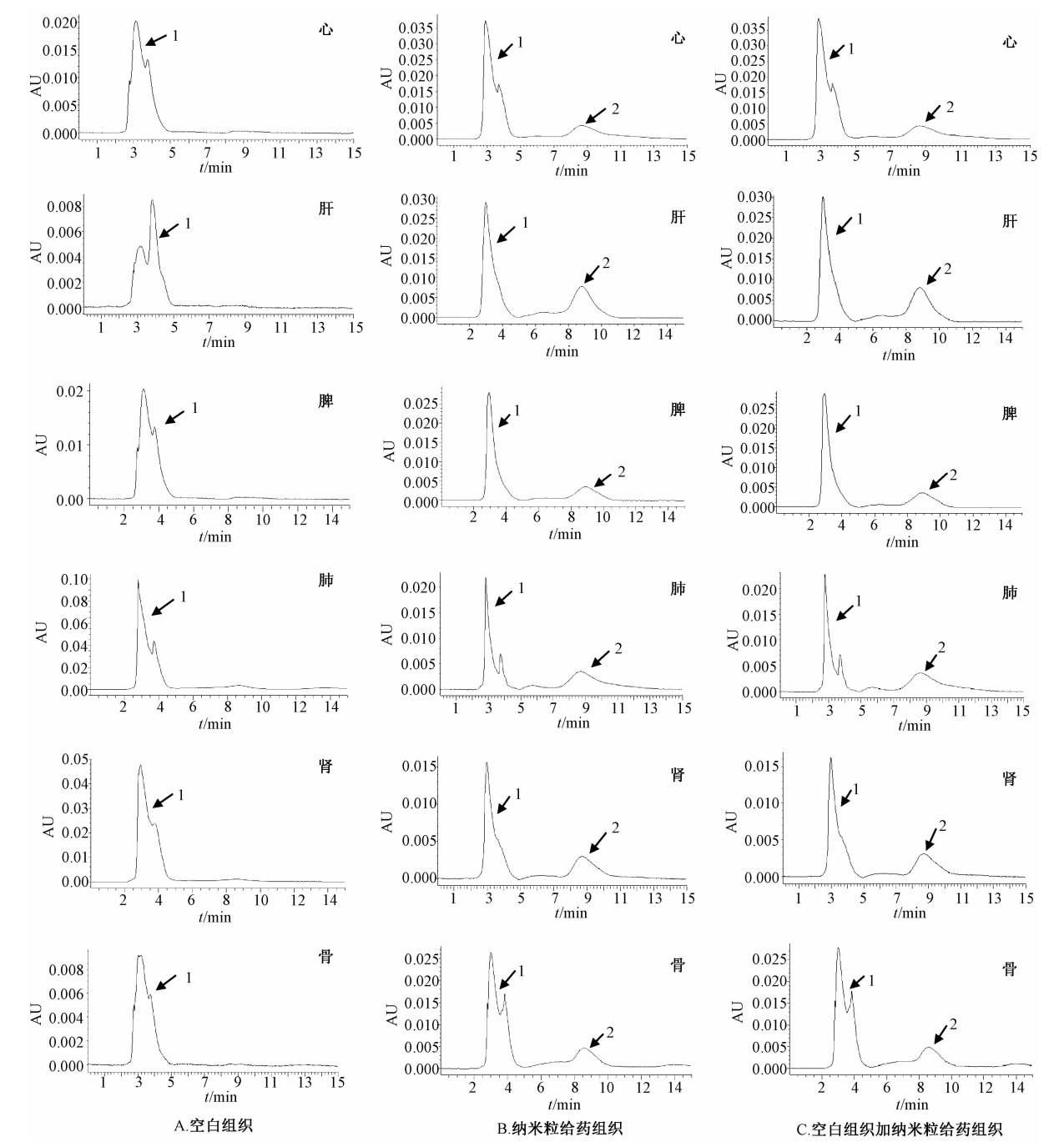
2.3 组织分布研究 将 48 只小鼠随机分为两组，每一时间点 6 只，分别为纳米粒给药组和马钱子碱溶液对照组。实验前禁食 12 h，可自由饮水，尾静脉注射给药（15 mg/kg），于给药后 30、60、90、120 min 眼眶取血，置于涂有肝素的塑料离心管中。处死小鼠，迅速取出心、肝、脾、肺、肾，剥离完整的四肢骨头，生理盐水洗净，滤纸吸干，精密称定质量，于 -20 $^{\circ}$ C 下保存，备用。

2.4 组织样品制备 取出各组织，生理盐水洗去残血，滤纸吸干水分，称定质量，制成 0.1 g/mL 匀浆。分别吸取 1 mL，置于 1.5 mL 离心管中，加入 1 mol/mL 氢氧化钠溶液 0.5 mL，涡旋振荡 5 min，超声 20 min，加入提取液（二氯甲烷：甲醇=9:1）2 mL，涡旋振荡 5 min，超声 20 min，12 000 r/min 离心 15 min，保留下层液，加入 2 mL 提取液再次萃取，合并二氯甲烷层，氮气吹干仪吹干，残渣用 200 μ L 甲醇复溶，涡旋振荡 5 min，12 000 r/min 离心 15 min，在“2.2”项色谱条件下进样 20 μ L，HPLC 法分析。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性试验 制备空白组织、纳米粒给药组织、空白组织加纳米粒给药组织样品溶液，按“2.4”项下方法处理，在“2.2”项色谱条件下测定，结果见图 1。

由图可知，所用液相条件适宜，方法专属性良好，没有干扰性杂质引入，样品中的内源性物质不影响马钱子碱检测。



1. 内源性杂质峰 2. 纳米粒
1. endogenous impurity peak 2. nanoparticles

图 1 样品 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of samples

2. 5. 2 标准曲线制备 取马钱子碱对照品适量，制成 0.10、0.50、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0 $\mu\text{g/mL}$ 工作液，分别量取 0.5 mL，加入组织匀浆液 1 mL，涡旋混合 5 min，按“2.4”项下方法处理，在“2.2”项色谱条件下测定。以马钱子碱质量浓度 (C) 对峰面积 (A) 进行回

归，结果见表 1，均在 0.10 ~ 0.64 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。
2. 5. 3 精密度试验 配制 5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 组织样品溶液，按“2.4”项下方法处理，连续 5 次，计算日内精密度；相同条件下连续操作 5 d，计算日间精密度。结果，各质量浓度的日内及日间

表 1 各组织中的标准曲线

Tab. 1 Standard curves in various tissues

组织	回归方程	<i>r</i>
心	$A = 2\,363C + 723$	0.999 7
肝	$A = 2\,756C + 208$	0.999 3
脾	$A = 2\,145C + 162$	0.999 3
肺	$A = 1\,658C + 513$	0.999 4
肾	$A = 2\,366C + 562$	0.999 6
骨	$A = 1\,532C + 458$	0.999 4

RSD 均小于 5%，符合生物样品分析要求。

2.5.4 提取回收率试验 配制 5、25、50 μg/mL 组织样品溶液各 5 份，按“2.4”项下方法处理，在“2.2”项色谱条件下测定，结果见表 2。

表 2 提取回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab. 2 Results of extraction recovery tests ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组织	加入量/ (μg·mL ⁻¹)	<i>A</i> _{样品溶液}	<i>A</i> _{标准溶液}	回收率/%
心	5	11 070 ± 1 488	12 180 ± 519	90.89
	25	54 325 ± 4 230	56 398 ± 1 622	96.32
	50	122 613 ± 40 322	138 379 ± 26 242	88.61
肝	5	10 964 ± 1 481	12 180 ± 519	90.02
	25	55 242 ± 3 728	56 398 ± 1 626	97.95
	50	111 698 ± 38 857	138 379 ± 26 242	80.72
脾	5	9 947 ± 1 560	12 180 ± 508	81.67
	25	51 200 ± 4 336	56 398 ± 1 626	90.78
	50	115 693 ± 41 286	138 379 ± 26 242	83.61
肺	5	11 999 ± 1 324	12 180 ± 518	98.51
	25	52 218 ± 3 665	56 398 ± 1 626	92.59
	50	119 743 ± 39 198	138 375 ± 26 244	86.54
肾	5	10 641 ± 1 839	12 180 ± 517	87.36
	25	53 928 ± 4 931	56 398 ± 1 624	95.62
	50	133 203 ± 36 567	138 365 ± 26 301	92.27
骨	5	10 974 ± 1 229	12 175 ± 521	90.14
	25	50 748 ± 4 253	56 398 ± 1 619	89.98
	50	132 746 ± 40 421	138 359 ± 26 250	95.94

2.5.5 组织分布图 图 2 显示，纳米粒组和溶液组中马钱子碱均在肝脏分布较多，随着时间延长，其含量在各组织中都有所降低，但纳米粒组降低速度明显慢于溶液组，表明纳米粒能延缓马钱子碱在肝脏中的释放。

2.6 体内靶向性评价 主要评价指标为相对摄取率 (Re) 和靶向效率 (Te)，其中 $Re = (AUC_i)_{\text{纳米粒}} / (AUC_i)_{\text{溶液}}$ ， $Te = AUC_{\text{靶}} / AUC_{\text{非靶}}$ ， AUC_i 表示第 *i* 个组织或器官的药-时曲线下面积，Re 值越大，靶向性越好；Te 值越大，对靶器官选择性越强，结果见表 3。由表可知，马钱子碱在肝脏中的 Re 为 1.64，明显高于其他组织，表明纳米粒具有明显的肝靶向性，可显著提高肝脏对其的吸收。通过分析 Te 值，发现纳米粒组对肝脏的选择

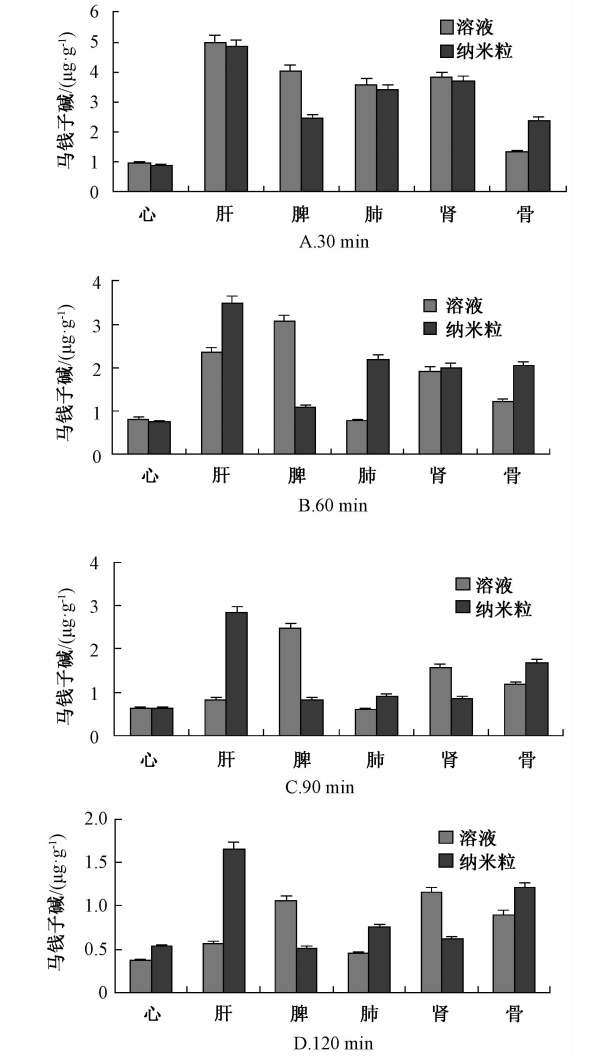


图 2 组织分布图

Fig. 2 Tissue distribution profiles

性明显强于溶液组，即前者对肝脏的靶向性更强。

表 3 靶向性参数 ($n = 6$)

Tab. 3 Targeting parameters ($n = 6$)

组织	$AUC/[\mu g \cdot (mL \cdot min)^{-1}]$		Re	Te	
	溶液组	纳米粒组		溶液组	纳米粒组
心	53.46	52.71	0.98	3.16	5.25
肝	168.81	276.96	1.64	—	—
脾	232.56	92.46	0.40	0.72	3.00
肺	100.71	145.56	1.44	1.68	1.90
肾	175.26	140.76	0.80	0.96	1.97
骨	100.26	155.01	1.54	1.68	1.79

2.7 荧光内窥式激光共聚焦成像实验

2.7.1 肝组织检测 将 24 只小鼠随机分为异硫氰酸荧光素 (FITC) 组和 FITC-纳米粒组，1 h 后采用荧光内窥式激光共聚焦显微镜检测，结果见图 3。由图可知，1 h 后 FITC 组无荧光，看不清肝细

胞的轮廓; FITC-纳米粒组有荧光, 肝细胞轮廓清晰。因此, 可排除游离 FITC 对测定的干扰。

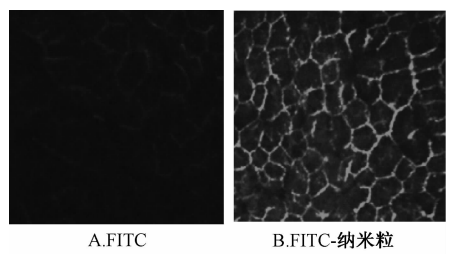
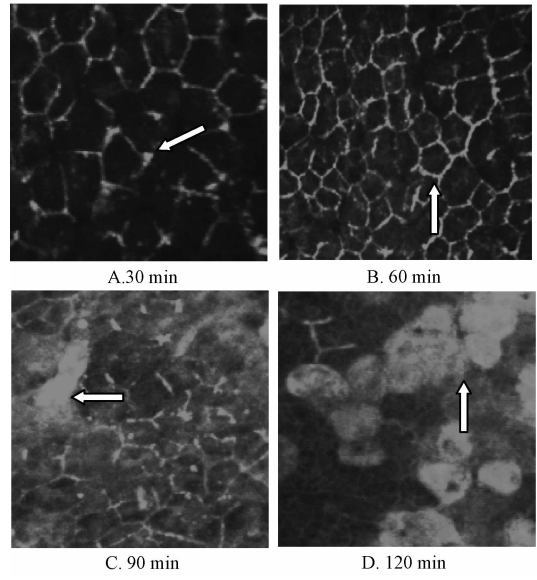


图 3 肝组织检测图 (475 × 475)

Fig. 3 Detection images of liver tissue (475 × 475)

2.7.2 活体肝组织细胞实时监测 取小鼠 16 只, 尾静脉注射 FITC 标记的纳米粒 (10 mg/kg), 实验前腹腔注射戊巴比妥钠 (55 mg/mL) 麻醉 (0.1 mL/10 g), 在小鼠肝脏部位进行微创手术, 于 30、60、90、120 min 拍照, 结果见图 4。由图可知, FITC-纳米粒组在 30 min 时细胞间液有荧光, 60 min 时肝细胞轮廓清晰, 90 min 时纳米粒移动到细胞膜内侧, 数量逐渐增加, 随着时间延长由细胞外进入到细胞内部, 具有正相关性, 2 h 时在肝细胞内大量聚集, 表明其可以靶向于肝细胞内。



注: 箭头表示纳米粒进入细胞处

图 4 实时监测图 (475 × 475)

Fig. 4 Real-time monitoring images (475 × 475)

3 讨论

纳米粒组在血浆中的药物浓度明显低于溶液组, 这可能是由于纳米粒入血后, 很快被网状内皮系统摄取进入肝和脾所致, 表明将马钱子碱制成固体脂质纳米粒后, 能显著地增强其肝靶向性, 并可

以使血液中的药物浓度大大降低, 从而减少其对机体的毒副作用。

内窥式激光共聚焦成像技术是近两年提出的能进行动物体内组织细胞高分辨率、在活体成像的新手段, 可直接观察生命现象的分子机制, 无须处死动物或将组织从活体内摘出。国外已应用其研究微血管结构、肝脏疾病、胃肠疾病、脑黏膜组织、关节组织等, 但尚无在纳米制剂细胞内递药方面的报道, 而本实验进行了相关探索, 可对疾病在体诊疗和靶向制剂研究提供参考。

参考文献:

[1] Jores K, Haberland A, Wartewig S, *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded SLN studied by spectrofluorometry and Raman spectroscopy[J]. *Pharm Res*, 2005, 22(11): 1887-1897.

[2] 汪作良, 袁弘, 章瑾. 环孢素 A 固体脂质纳米粒的制备与理化性质考察[J]. *中国药理学杂志*, 2005, 40(6): 444-447.

[3] Wissing S A, Kayser O, Müller R H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(9): 1257-1272.

[4] 徐广灿. 肝靶向药物研究概况[J]. *贵阳中医学院学报*, 2015, 37(1): 97-100.

[5] 管庆霞, 华晓丹, 李伟男, 等. 载中药肝靶向纳米给药系统的研究进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(7): 1002-1005.

[6] 袁洁, 梁光义, 徐必学. 肝靶向给药系统的研究进展[J]. *中南药学*, 2014, 12(12): 1211-1216.

[7] 杨勇, 奉建芳, 芦洁, 等. 蟾酥固体脂质纳米粒冻干针剂体内药代动力学研究[J]. *中成药*, 2006, 28(6): 787-790.

[8] Knittel J, Schnieder L, Buess G, *et al.* Endoscope-compatible confocal microscope using a gradient index-lens system[J]. *Opt Commun*, 2001, 188(5-6): 267-273.

[9] Watson T F, Neil M A, Juškaitis R, *et al.* Video-rate confocal endoscopy[J]. *J Microsc*, 2002, 207(Pt 1): 37-42.

[10] Karadaglić D, Juškaitis R, Wilson T. Confocal endoscopy via structured illumination[J]. *Scanning*, 2002, 24(6): 301-304.

[11] Rector D M, Ranken D M, George J S. High-performance confocal system for microscopic or endoscopic applications[J]. *Methods*, 2003, 30(1): 16-27.

[12] Karadaglić D, Juskaitis R, Wilson T. Confocal endoscopy[M]. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 2003.

[13] Juškaitis R, Wilson T, Watson T F. Real-time white light reflection confocal microscopy using a fibre-optic bundle[J]. *Scanning*, 1997, 19(1): 15-19.

[14] 葛华勇, 任秋实, 王保华, 等. 共聚焦内窥镜光学成像系统[J]. *激光与光电子学进展*, 2004, 41(8): 32-34.