

文章编号: (2005) 01-0023-05

配体组装的促肝细胞生长素冻干脂质体靶向性及初步药效学

姜爱萍¹, 王思玲¹, 程立华¹, 苏德森¹, 张景海²

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学 制药工程学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 利用自制的配体组装于促肝细胞生长素 (PHGF) 冻干脂质体的表面, 考察其体内靶向性及初步药效学。**方法** 采用干燥重建法制备两种 PHGF 冻干脂质体, 并对其进行荧光标记, 利用冷冻切片技术对其体内靶向性与给药后肝组织形态的变化进行研究。**结果** 干燥重建法制备的 PHGF 脂质体 PHGF 包裹率约在 40% (w)。连接有配体的 PHGF 冻干脂质体在肝中的荧光强度明显高于对照脂质体, 而且此脂质体对 CCl₄ 引起的肝损伤有明显的修复作用。**结论** 包裹自制配体的 PHGF 冻干脂质体有显著的肝靶向性, 并且是一种有效的治疗肝系列疾病的新剂型。

关键词: 药剂学; 药效学; 靶向性; 切片; 促肝细胞生长素; 冻干脂质体

中图分类号: R94

文献标识码: A

促肝细胞生长素 (promoting hepatocyte growth factor, PHGF) 系从新鲜乳猪肝中提取的多组份小分子肽类混合物^[1], 为我国治疗重症肝炎的一类生化新药, 静脉注射治疗重型肝炎, 慢性活动性肝炎疗效显著^[2]。目前已有注射用促肝细胞生长素和促肝细胞生长素颗粒剂, 但因其靶向性差, 疗效低。将其制成脂质体, 包封在磷脂形成的囊泡中, 可以对 PHGF 的生物活性与化学稳定性起保护作用, 同时磷脂中的磷脂酰胆碱对损伤的肝细胞也具有修复作用。但因其水溶液稳定性差, 易失活, 因此设计成冻干脂质体这种新剂型。为了提高 PHGF 的疗效, 降低其毒性和不良反应, 载药脂质体的体内靶向作用即寻靶功能已成为关键问题。利用配体分子的特异性专一地与靶细胞表面的互补分子相互作用, 而使脂质体在靶区释放药物的机制, 从而可以提高药物在靶区的作用。在脂质体上连接所谓的配体, 达到靶向给药已引起普遍关注。作者将自制的配体组装于脂质体表面制成 PHGF 冻干脂质体, 利用组织冰冻切片技术研究载药脂质体的体内靶向性, 并直观地观察了 PHGF 在治疗肝组织的形态变化。

1 材料

ZFQ-5A 旋转蒸发仪 (天津玻璃仪器厂), JY92-II 型超声波细胞粉碎机 (宁波新艺科器研究所), 冷冻干燥机 (EYELA, TOKYO RIKAKIKAI CD, LTD), CX-40 荧光显微镜 (奥林巴斯, 日本)。注射用促肝细胞生长素 (20 mg, 长春市生化制药厂, 批号: 040705 2), 配体 (自制、040531), 大豆磷脂 (30 g, 上海油脂一厂, 批号: 030808), 胆固醇 (100 g, 上海生物化学试剂公司, 批号: 000708), 维生素 E (100g, 东北制药总厂, 批号: 021007), 1,1'-双十八烷-3,3',3'-四甲基吡啶羧花青-高氯

收稿日期: 2004-11-02

基金项目: 国家自然科学基金 (30371693)

作者简介: 姜爱萍 (1980-), 女 (汉族), 浙江衢州人, 在读硕士; 王思玲 (1962-), 女 (汉族), 辽宁沈阳人, 教授, 博士, 主要从事生物大分子给药系统及微粒分散药物制剂的研究, Tel: (024) 23843711-3641, E-mail: silingwang@hotmail.com。

酸盐(DiI, 50 mg, Biotium, Inc., 批号: 970807), 组织冻干包埋剂(Triangle Biomedical Sciences Durham, N.C.), 葡聚糖凝胶 G-50 (Sephadex G-50, 上海化学试剂厂进口分装), 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 PHGF 冻干脂质体的制备

称取大豆磷脂 2.56 g、胆固醇 0.14 g 和维生素 E 0.05 g、DiI 0.025 g、配体 0.13 g 溶于无水乙醇中, 于 38~40 °C 恒温水浴减压旋转蒸发回收无水乙醇, 抽至形成均匀的薄膜。将 pH8.0 的 PBS 50 mL 加到磷脂膜中, 搅拌, 超声 10 次 (3 min, 300 W), 加入 PHGF 冻干粉 2.5 g, 溶解后, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 将滤液分装于 2 mL 西林瓶中, 按冻干条件 (-40 °C 预冻 5 h, 冷冻干燥 10 h, 再干燥 5 h) 冷冻干燥, 即得 PHGF 冻干脂质体^[3]。按如上方法制备不加入配体的 PHGF 冻干对照脂质体。

2.2 包封率的测定

利用 Sephadex G-50 微型柱^[4], 分离含药脂质体与游离药物, 以紫外分光光度法于 261 nm 处分别测定被包入脂质体中的 PHGF 量和制剂中总药物量, 求出包封率 (En%), 公式如下:

$$\text{En}\% = \rho_{\text{包}} / \rho_{\text{总}} \times 100\%$$

其中, $\rho_{\text{包}}$: 包入脂质体中 PHGF 的量; $\rho_{\text{总}}$: 制剂中 PHGF 总量。

2.3 PHGF 冻干脂质体的体内分布

取体质量 (25±5) g 小鼠 24 只 (雄雌各半), 分为 8 组。其中 4 组给予 PHGF 冻干脂质体, 另 4 组给予对照脂质体。按 15 mg·kg⁻¹ 给小鼠尾静脉注射, 于给药后 0、10、30、60 min 各时间点分别取其心、肝、脾、肺、肾。于 4% (φ) 福尔马林固定 4、5 h, PBS (pH 7.4) 漂洗, 固定, 于 -18 °C 冷冻, 切片, 样品于载玻片中用 10% (φ) 甘油固定, 备用, 于荧光显微镜下观察^[5]。

2.4 PHGF 冻干脂质体的药效学

2.4.1 大鼠 CCl₄ 急性中毒剂量

CCl₄ 用豆油配成 50% (φ) 溶液。取大鼠 25 只 (雄雌各半), 体质量 (200±10) g, 分为 5 组。第 1 组为对照组, 腹腔注射豆油; 第 2、3、4、5 组分别腹腔注射 50% (φ) CCl₄ 1.5、2.0、3.0 和 3.5 mL·kg⁻¹, 记录大鼠的死亡数, 计算死亡率。

2.4.2 PHGF 脂质体肝细胞的形态学的影响

取健康大鼠 12 只 (雄雌各半), 分为 4 组。第 1 组腹腔注射生理盐水, 4 h 后静脉注射生理盐水; 第 2、3、4 组腹腔注射 50% (φ) CCl₄ 1.5 mL·kg⁻¹, 4 h 后分别静脉注射生理盐水、PHGF 脂质体 100 mg·kg⁻¹、PHGF 水溶液 200 mg·kg⁻¹, 作病理切片观察肝脏组织形态的变化。

3 结果和讨论

3.1 PHGF 冻干脂质体

作者是利用干燥重建法制备的脂质体, 此方法的制备条件温和、脂质和药物能紧密接触, 因此再次混悬时易于获得较高包封率的脂质体, 有利于 PHGF 的稳定性。PHGF 的包封率约为 40% (w)。

3.2 体内靶向性

于荧光显微镜下观察对照脂质体 (Sample 1) 和 PHGF 冻干脂质体 (Sample 2) 的趋肝靶向性见

图 1, 结合图像分析对以下指标进行半定量评分: 荧光面积百分比 (即荧光面积占整个视野面积的百分比)。综合评分即每只小鼠的半定量评分之和的平均值。综合评分分成四个级别, 其对应的趋向强度分别为-、+、++、+++。将不同时间的不同组织的趋向强度列于表 1。

Table 1 Fluorescent strength of the two kinds of PHGF liposomes in tissues ($n=3$)

Sample	<i>t</i> /min				
	0	10	30	60	
Sample 1 (Sample 2)	heart	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
	liver	-(-)	+(++)	+(+++)	++(+++)
	spleen	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)
	lung	-(-)	-(-)	+(-)	+(-)
	kidney	-(-)	-(-)	+(-)	-(+)

从上表直观地看出, PHGF 冻干脂质体在肝中的趋向强度明显强于同时间的普通脂质体, 而且肝中的趋向强度明显高于其他组织。可见 PHGF 冻干脂质体比普通的脂质体有更明显的趋肝靶向性, 到达靶区所需时间更短, 有利于 PHGF 在病变部位对肝疾病的治疗作用。

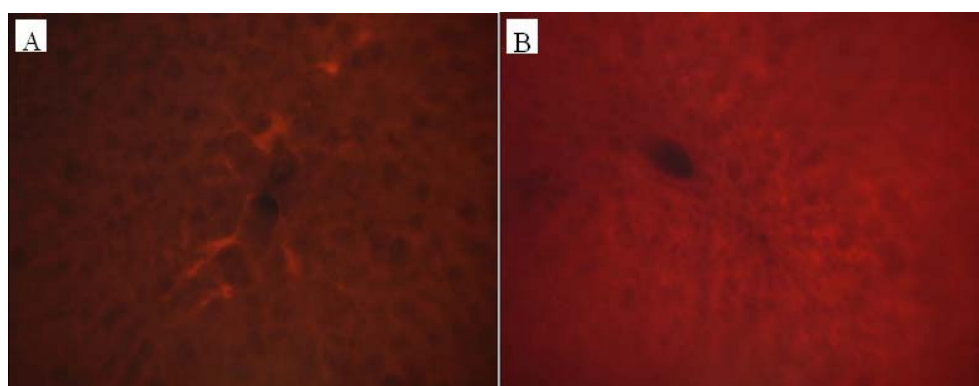


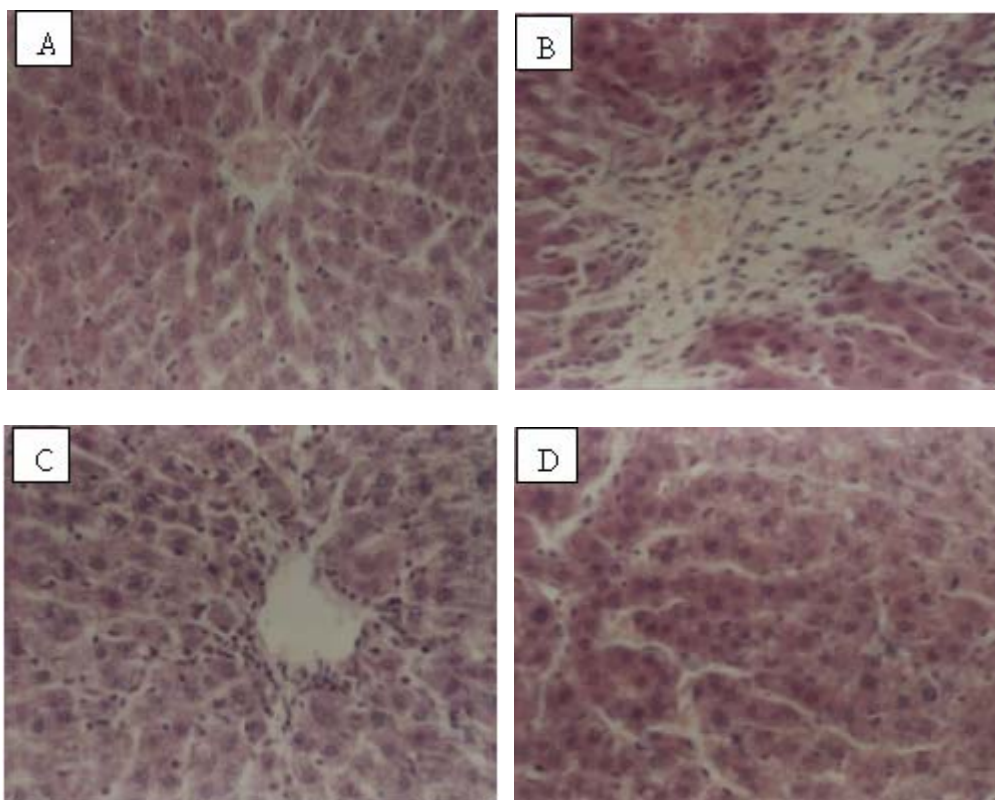
Fig.1 Fluorescent micrographs of frozen liver sections at 30 min

following the administration of an iv injection of control liposomes (panel A) and PHGF liposomes (panel B), respectively($\times 250$)

3. 3 初步药效学观察

a. 结果大鼠注射 50% (ϕ) CCl_4 1.5、2.0、3.0 和 3.5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后的死亡率分别为 0、20%、60% 和 100%, 表明大鼠死亡率与注射 CCl_4 剂量呈明显正相关性。

b. 肝脏组织经 4% (ϕ) 福尔马林固定后, 石蜡包埋切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 显微镜下观察肝组织形态的改变。实验以中央静脉为中心的肝细胞的完整性, 带状坏死和大片坏死为半定量指标进行考察。实验中的 4 组给药方案分别见图 2。



A— Saline control group; B— Hepatic injure group caused by tetrachloromethane; C — PHGF liposome group;
D— PHGF solution control group (×128)

Fig. 2 Livers sections of rats administrated with different medicines

显微镜下观察 CCl_4 诱发的大鼠急性中毒性肝损伤切片, 可见肝细胞变性、坏死、伴有炎症细胞浸润等病变特征, 而 PHGF 脂质体治疗组可见肝细胞变性普遍恢复, 内皮细胞增生活跃, 炎症细胞明显减少, 伴有较多的双核细胞, 这说明 PHGF 脂质体能促进肝细胞生长、增殖, 对受损肝细胞具有良好的修复作用。

参考文献:

- 1 ZHANG Yi-jun. The advances in the study and clinical application of PHGF.[J]. Chinese Journal of Clinical Hepatology (临床肝胆病杂志), 1995, 11(2): 81-82.
- 2 ZHANG Yi-jun, KONG Xiang-ping. The effectiveness of PHGF in 1668 patients with chronic hepatitis.[J]. Chinese Journal of Clinical Hepatology (临床肝胆病杂志), 1995, 11(3): 137-140.
- 3 PING Qineng. Modern Pharmaceutics(现代药剂学).[M]. Beijing: Chinese Medical and Technological Publishing Company (中国医药科技出版社), 1998. 601-602.
- 4 Zadi B, Gregoriadis G. A novel method for high-yield entrapment of solute into small liposomes[J]. J Liposome Research, 2000, 10(1): 73-80.
- 5 Julie, BS, Pierrette G, Andre D, *et al.* Sterically stabilized liposomes bearing anti-HLA-DR antibodies for targeting the primary cellular reservoirs of HIV-1[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1468: 161-171.

Targeting and primary pharmacology of PHGF liposomes by a freeze-drying method

JIANG Ai-ping¹, WANG Si-ling¹, CHENG Li-hua¹, SU De-sen¹, ZHANG Jing-hai²

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To investigate targeting and primary pharmacology of freeze-drying liposomes of PHGF assembling a kind of ligand synthesized by ourselves *in vivo*. **Methods** Two kinds of freeze-drying liposomes of PHGF were made by a dried-reconstituted vesicles method and labeled by a fluorescent probe. By the technique of tissue frozen sections, a study of its *in vivo* targeting of PHGF liposomes and an observation of tissues in rats after administrations was made. **Results** The encapsulation efficiency of PHGF liposomes made by the dried-reconstituted vesicles method was about 40% (*w*). The fluorescent strength of freeze-drying liposomes of PHGF with the ligand was obviously stronger than that of control liposome, and PHGF liposomes had a better effect in protecting hepatic injure induced by CCl₄. **Conclusions** Freeze-drying liposomes of PHGF with the ligand had an extraordinary liver-targeting and is an effective dosage form in treating hepatic disease.

Key words: pharmaceuticals; pharmacology; targeting; section; PHGF; freeze-drying liposomes