

豆甾醇糖苷/聚乙二醇衍生物修饰的阳性脂质体 体内分布和肝实质细胞靶向性

石 靖, 严文伟, 齐宪荣*, 杨 莉, 张 鹏

(北京大学 药学院 药剂教研室, 北京 100083)

摘要: 目的 研究经豆甾醇糖苷 (sterylglucoside, SG) 修饰的以 DC-Chol 为阳性脂材的脂质体体内分布情况和达到小鼠肝实质细胞靶向的可能性。方法 合成阳性脂材 3β [N-(N', N'-二甲基氨基乙基)氨基甲酰基]胆固醇 (DC-Chol), 制备 ^3H 胆固醇标记的阳性脂质体 (cationic liposome, CL), SG 和聚乙二醇-二硬脂酰磷酸酰乙醇胺 (PEG-DSPE) 修饰的阳性脂质体 (SG/PEG-CL), 以及包封 ^{125}I 标记的硫代反义寡核苷酸 (asODN) 的阳性脂质体 (SG/PEG-CL-asODN), 分别测定 CL, SG/PEG-CL, SG/PEG-CL-asODN 和 asODN 溶液 (asODN) 在小鼠不同器官及 CL, SG/PEG-CL 肝内不同细胞中的分布。结果 CL 和 SG/PEG-CL 表现较高肝脏聚集性, SG/PEG-CL 在肝实质细胞中浓度显著高于 CL ($P < 0.01$), 非实质细胞中浓度明显小于 CL ($P < 0.01$)。SG/PEG-CL-asODN 相对于 asODN 表现出明显的肝脾聚集性 ($P < 0.01$)。结论 用阳性脂质体包载基因药物能改善药物的体内分布, SG 的修饰则能提高脂质体肝实质细胞选择性。

关键词: 阳性脂质体; DC-Chol; 豆甾醇糖苷; 组织分布; 肝实质细胞

中图分类号: R943.4; R943.42 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)07-0551-05

Biodistribution and hepatocytes targeting of cationic liposomes surface modified with sterylglucoside and polyethylene glycol

SHI Jing, YAN Wen-wei, QI Xian-rong*, YANG Li, ZHANG Li

(Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Aim** To investigate the biodistribution and the hepatocytes targeting of cationic liposome containing 3β [N-(N', N'-dimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol (DC-Chol) and surface-modified liposomes with sterylglucoside (SG) and polyethylene glycol-distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE). **Methods** Cationic liposomes (CL) composed of DC-Chol and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), SG/PEG modified cationic liposome (SG/PEG-CL), both contained trace ^3H cholesterol (^3H Chol) as radiolabel, were prepared. The liposomes encapsulating ^{125}I labeled antisense oligodeoxynucleotide (^{125}I -asODN) (SG/PEG-CL-asODN) were also prepared. The biodistribution of CL, SG/PEG-CL, SG/PEG-CL-asODN as well as ^{125}I asODN solution, were studied. The radioactivities in hepatocytes and non-hepatocytes after administration of CL and SG/PEG-CL were determined by infusing method. **Results** CL and SG/PEG-CL significantly aggregated in liver. The distribution of SG/PEG-CL was significantly higher in hepatocytes ($P < 0.01$) and lower in non-hepatocytes ($P < 0.01$) than that of CL. The concentrations of SG/PEG-CL-asODN in liver and spleen were significantly higher than that of asODN solution ($P < 0.01$). **Conclusion** Cationic liposome modified with SG/PEG changed the distribution of asODN. Cationic liposome can target hepatocytes more effectively after being modified with SG.

Key words: cationic liposome; DC-Chol; sterylglucoside; biodistribution; hepatocytes

阳性脂质体(cationic liposome)又称阳离子脂质体,正电荷脂质体(positively charged liposome)^[1],由中性磷脂和一种或多种阳性成分组成。阳性脂材成分是具有不同化学结构的两性分子,为整个脂质体提供正电荷。由于带有正电荷,其作为荷负电的生物活性物质(如寡核苷酸类物质及DNA, RNA等)的载体具有显著的优越性,制备工艺简单,可以达到较高的包封率。阳性脂质体在体外表现较高基因转染效率,作为基因转导系统成为人们关注的焦点之一,被美国癌症协会批准为临床基因治疗的第一方案^[2]。

虽然阳性脂质体表现良好的体外转染活性,但其体内作为基因转导的研究还处于起步阶段,体内外相关性数据尚不具备。有关阳性脂质体体内分布的研究结果表明,阳性脂质体静脉给药后多呈现肺聚集性和肝脏聚集性,而肝脏聚集多位于非实质性的kupffer细胞中^[3,4]。大部分肝脏的病变(肝癌、肝炎、肝硬化等)都发生于实质细胞,只有增加生物活性物质在肝实质细胞中的浓度,才能起到预防、治疗的作用,因此提高阳性脂质体制剂的实质细胞靶向将对肝脏病变的基因治疗具有重要的意义^[5]。SG(sterylglucoside)是一种含有胆固醇 β -D-葡糖苷(steryl- β -D-glucosides)的天然混合物,可以与肝实质细胞上的无唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor)特异性结合,用于脂质体膜材,可以使脂质体能更多的聚集于肝实质细胞,达到主动靶向的作用^[6]。本研究将SG与阳性脂质体结合,希望能改善阳性脂质体的体内过程,为SG修饰的阳性脂质体作为靶向到肝实质细胞的基因药物载体提供理论基础。

材料和方法

材料和仪器 Pharmacia-Wallac 410 液体闪烁计数器(Turku, Finland); SN-695B 型智能放免 γ 测量仪(上海原子核研究所日环仪器一厂)。

^3H [N (N' , N' -二甲基氨基乙基)氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)(本室合成); ^3H 胆固醇(由中国原子能研究所氙标记室标记); ^{125}I -抗乙肝病毒反义寡核苷酸序列 GAT GAC TGT CTC TTA(由中国原子能研究所碘标记室标记); 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)(日本油脂株式会社); 胆固醇(Chol)(特级,日本和光纯药工业株式会社); 豆甾醇糖苷(SG)(日本龙角散株式会社); 聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)(日本油脂株式会社); 其他试剂均为分

析纯。

昆明种小鼠,体重1825 g, δ ,由中国科学院动物研究所实验动物部提供。

脂质体的制备 按比例称取脂材,用氯仿溶解,氮气吹干成膜,旋转蒸发器上继续除去残留有机溶剂。加入5%葡萄糖溶液(5% Glu),涡旋振荡,水浴中超声10 min制成小粒径脂质体(SG/PEG-CL-asODN按电荷比1:1加入asODN的5% Glu)。脂质体用磷酸染色法染色,电子显微镜下观察脂质体形态,激光散射粒度测定仪测定不同脂质体的粒径分布。

脂质体包封率的测定 取asODN 33 μg ,加入超纯水1 mL作为标准贮备液。精密吸取asODN贮备液,逐级稀释,以介质溶液为空白对照,在260 nm波长处测定吸光度,以吸光度对浓度作线性回归,计算线性范围。用透析法测定SG/PEG-CL-asODN的包封率。测定接受液在260 nm波长处的吸光度,代入标准曲线回归方程,计算脂质体的包封率。

阳离子脂质体的体外释放 分别取5% Glu或人血浆与SG/PEG-CL-asODN等体积混合均匀,置透析袋中,以5% Glu 10 mL为接受液,定时取样,紫外分光光度法于260 nm处测定溶液asODN的含量。

小鼠体内组织分布研究^[4,5,7] 雄性昆明种小鼠42只,随机均分为两组,分别尾静脉注射CL, SG/PEG-CL,注射剂量为5 $\mu\text{Ci}/20\text{ g}$ 小鼠体重。于给药后不同时间,每组小鼠断颈处死3只,取血肝素抗凝,摘取心、肝、脾、肺、肾等器官,滤纸吸干残留血液并称量。血浆100 μL 及各器官组织50100 mg,加入高氯酸0.2 mL及60%过氧化氢0.5 mL,温浴至颜色消退。样品溶液100 μL ,加入闪烁液(PP0-POPOP-二甲苯-无水乙醇(0.3 g/4 g/700 mL/300 mL)) 8 mL, β 计数器上计数1 min。

另取雄性昆明种小鼠42只,随机均分为两组,分别尾静脉注射asODN, SG/PEG-CL-asODN,注射剂量为 $1.11 \times 10^4\text{ Bq} \cdot \text{g}^{-1}$,给药后不同时间,每组小鼠断颈处死3只,取血,并摘取心、肝、脾、肺、肾等器官,滤纸吸干残留血液称重,取血浆100 μL ,组织 γ 计数器计数1 min。

肝内细胞选择性^[5,8,10] 雄性昆明种小鼠12只,随机均分为两组,分别尾静脉注射CL, SG/PEG-CL,注射剂量为 $9.25 \times 10^3\text{ Bq} \cdot \text{g}^{-1}$ 。于给药后0.5, 4 h将小鼠麻醉,肝门静脉插管注射生理盐水,将肝中血液除净,取下肝脏,剪碎至1 mm^3 左右小块,加0.05%胶原酶溶液37 $^\circ\text{C}$ 摇床消化30 min,取出消化

块,加0.05%胶原酶溶液37℃摇床消化30min,取出消化液纱布过滤,滤液500 r·min⁻¹离心3min,沉淀以等渗磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗3次,即得肝实质细胞;上清1500 r·min⁻¹离心10min,沉淀同法洗涤3次,得非实质细胞。取实质细胞和非实质细胞样品各100 μL,同上³H样品处理方法处理,β计数器上计数1min。

统计学处理 药物在血液及各器官浓度经时变化的曲线下面积AUC采用梯形法计算,公式如下:

$$AUC_{0-\infty} = \sum_{i=1}^n \frac{(c_{i-1} - c_i)}{2} (t_i - t_{i-1}) + \frac{C_n}{k}$$

比较两组数据差异均采用双样本正态总体均数双侧*t*检验方法。

结果

1 阳离子脂质体的形态学特征

不同脂质体的形态见图1(A, B)。SG/PEG-CL, SG/PEG-CL-asODN(过0.45 μm滤膜)平均粒径分别为138.3 nm, 186.3 nm。

2 阳离子脂质体的包封率

asODN紫外吸收度与asODN浓度的线性回归方程为: $A = 0.0423C - 0.0038$ ($r^2 = 0.9999$);线性范围为1.29 ~ 16.96 mg·L⁻¹。SG/PEG-CL-asODN

包封率为70.19%。

3 阳离子脂质体的体外释放

SG/PEG-CL-asODN在5% Glu和人血浆中的释放曲线见图2。从实验结果可以看出,载药脂质体在血浆中asODN的泄漏现象明显强于在葡萄糖溶液中的泄露。

4 脂质体在小鼠体内分布情况

上述4种制剂在小鼠体内的心、肝、脾、肺、肾各器官及血液的分布情况见图3。

通过梯形法求得各制剂不同器官的药物经时变化的曲线下面积(AUC_{0-∞}),列于表1,其中,asODN和SG/PEG-CL-asODN在血,肝脏,脾脏AUC_{0-∞}有显著性差异。

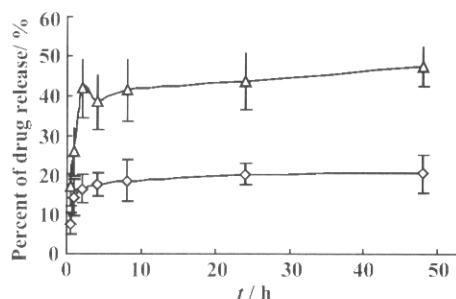
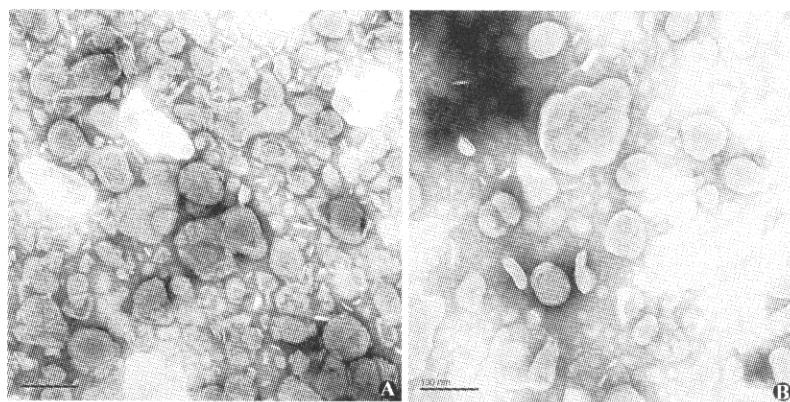


Figure 2 Drug release profile in plasma ($\Delta-\Delta$) and 5% glucose solution ($\diamond-\diamond$) *in vitro*



A: SG/PEG-CL; B: SG/PEG-CL-asODN

Figure 1 Morphology of liposomes by the scanning electron microscope (SEM)

Table 1 AUC_{0-∞} of different organs of the liposomes in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

	Blood	Liver	Spleen	Lung	Kidney	Heart
CL	3.90 ± 0.14	5.9 ± 0.7	1.18 ± 0.13	0.92 ± 0.10	0.79 ± 0.10	0.23 ± 0.03
SG/PEG-CL	3.8 ± 0.4	6.95 ± 0.05	1.14 ± 0.05	0.88 ± 0.06	0.68 ± 0.07	0.210 ± 0.010
as-ODN	1.49 ± 0.06 **	0.53 ± 0.03 **	0.080 ± 0.010 **	0.92 ± 0.10	0.30 ± 0.10	0.23 ± 0.03
SG/PEG-CL-asODN	0.89 ± 0.25	0.88 ± 0.05	0.270 ± 0.010	0.88 ± 0.06	0.23 ± 0.06	0.210 ± 0.010

** $P < 0.01$ vs SG/PEG-CL-asODN

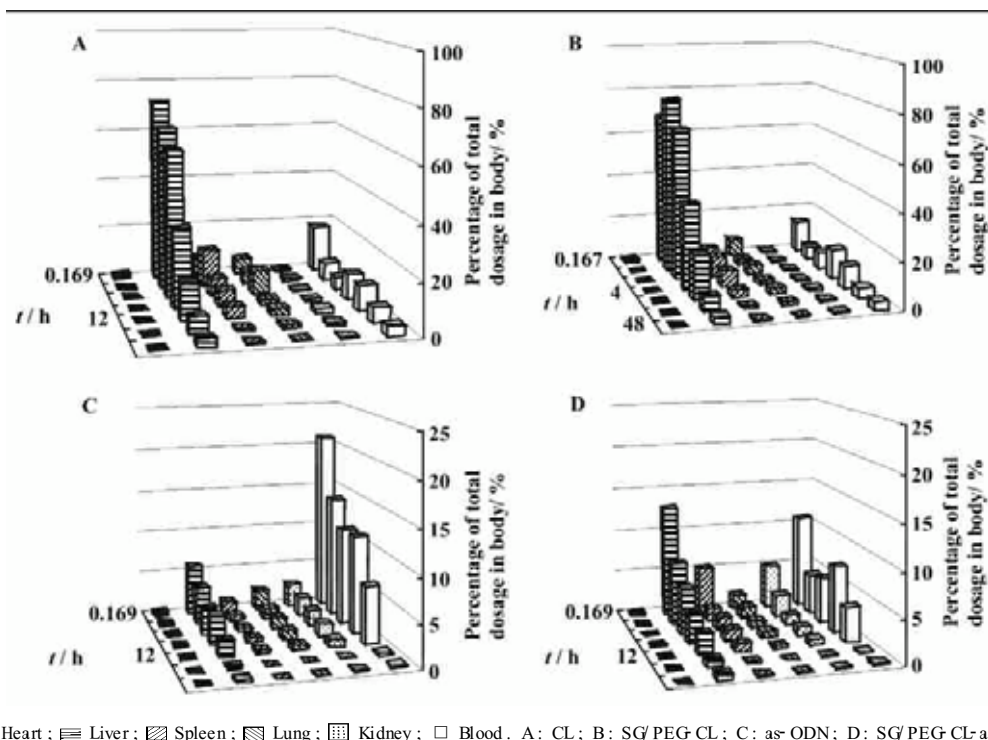


Figure 3 Biodistribution of liposomes in different organs at 0.167, 0.5, 1, 4, 12, 24, 48 hours after injection *via* tail vein in mice

3 脂质体在小鼠肝内的细胞选择性

表 2 为两种脂质体在肝实质细胞和非实质细胞中的分布情况,并分别对各组数据进行双样本方差 *t* 检验。

Table 2 Distribution of liposomes in hepatocytes and non hepatocytes ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

<i>t</i> / h	Hepatocytes / min^{-1}		Non hepatocytes / min^{-1}	
	CL	SG/PEG-CL	CL	SG/PEG-CL
0.5	2 068 ± 170	3 488 ± 512*	1 863 ± 286	1 197 ± 168**
4	926 ± 211	1 141 ± 316	1 035 ± 115	654 ± 5**

* $P < 0.01$ vs CL in hepatocytes at 0.5 h; ** $P < 0.01$ vs CL in non hepatocytes

讨论

在一般脂质体制备中,在脂质体膜中掺入 PEG 衍生物能延长脂质体的血循环时间,这是由于 PEG 分子的长链高度亲水,在脂质双层外形成了位阻层并提高了亲水性,减少单核巨噬细胞对脂质体的识别和吞噬,因而具有了“长循环性和隐形性”。本实验中两种空白脂质体在体内的动力学、生物分布方面没有表现显著的差异,SG/PEG 的掺入在提高阳性脂质体的长循环作用和肝脏聚集性方面作用不明显,说明阳性脂质体表面的正电荷可能在脂质体的

动力学和生物分布方面起主导作用。在各器官的分布曲线中,在 0.5 h 和 1.0 h,SG/PEG 修饰的阳性脂质体在脾、肺中的分布值小于未修饰的脂质体,统计分析虽然未显示显著性差异,是由于样本量较小,不排除经修饰的脂质体具有降低肺、脾器官药物峰浓度从而减小药物毒性的潜在可能性,需进一步研究证明。

从脂质体在各组织中的分布可以看出,部分器官药物浓度随时间变化存在多个峰-谷值。分析可能的原因:阳性脂质体表面荷正电,易于与细胞表面通过静电作用结合,在给药初期,一部分脂质体与细胞结合尚未产生内吞或融合作用,也可能从细胞表面解离,重新与其他组织器官的细胞膜结合,故产生血液-器官-血液之间的再分布。肺表面积大,使其与脂质体结合的机会增加,故其分布曲线表现出更大的波动性。

asODN,SG/PEG-CL-asODN 与 CL,SG/PEG-CL 阳性脂质体的分布有较大的差别,两制剂的总分布量均较小($< 35\%$),这可能是由于脂质体不稳定造成的。包封率测定和体外试验结果表明,阳性脂质体虽然有较高的包封率,但在血浆蛋白存在的情况下表现极大的不稳定性,发生药物的泄漏,因此,载药脂质体在体内大量血液的存在下不稳定,很快将药

药物释出,故而预计会有一些药物呈现与核酸溶液同样的消除快、半衰期短等分布特性,而仍然包裹于脂质体中的药物则表现出与核酸溶液不同的情况(图3C,D),具有血液浓度低,肝脾聚集的现象。

从肝细胞选择性实验结果看,SG/PEG-CL在肝中表现出明显的实质细胞靶向性。在体内分布 $AUC_{0-\infty}$ 无明显差别情况下(表1),SG/PEG-CL在肝实质细胞中的浓度高于非实质细胞中的SG/PEG-CL浓度(表2),说明SG修饰的脂质体由于与肝实质细胞膜的特异性作用而增加了肝实质细胞的摄取量,证明了SG介导阳性脂质体具有达到细胞水平靶向的可能性。由于大部分肝脏的病变(肝癌、肝炎、肝硬化等)都发生于实质细胞,提高阳性脂质体制剂的实质细胞靶向将为肝脏病变的基因治疗提供广阔的应用前景。

References:

- [1] Ping QN, Guo JX. The application of liposome in gene therapy [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 1998, **22**(2):69.
- [2] Wu XM, Zhang FB, Deng YH, *et al.* Cationic liposome and the gene transfection with cationic liposome [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1999, **34**(4):217 - 220.
- [3] David CL, Jeffrey MB, Iwona W, *et al.* Fate of cationic liposomes and their complexes with oligonucleotide *in vivo* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1281**(2):139 - 149.
- [4] Ishiwata H, Suzuki N. Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes [J]. *J Controlled Release*, 2000, **69**(2):139 - 148.
- [5] Wang L, Shu GM, Wang XT, *et al.* Study on targetability of asialofetuin-linked liposomes to hepatocytes in mice [J]. *J Peking Univ (Health Sci)* (北京大学学报医学版), 2001, **33**(3):251 - 254.
- [6] Shimizu K, Xiang RQ, Maitani Y, *et al.* Targeting of soybean-derived sterylglucoside liposomes to liver tumors in rat and mouse models [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, **21**(7):741 - 748.
- [7] Bennett CF, Zuckerman JE, Brust DK, *et al.* Pharmacokinetic in mice of a [3 H]-labeled phosphorothioate oligonucleotide formulated in the presence and absence of a cationic lipid [J]. *J Controlled Release*, 1996, **41**(2):121 - 130.
- [8] Aoki H, Tottori T, Sakurai F, *et al.* Effect of positive charge density on the liposomal surface on disposition kinetics of liposomes in rats [J]. *Int J Pharm*, 1997, **156**:163 - 174.
- [9] Zhang YH, Peng RX, Zhang ZS, *et al.* Isolation and characterization of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells from rats [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2000, **16**(3):341 - 343.
- [10] Wu J, Liu P, Zhu JL, *et al.* Increased liver uptake of liposomes and improved targeting efficiency by labeling with asialofetuin in rodents [J]. *Hepatology*, 1998, **27**:772 - 780.