

# 超氧化物歧化酶脂质体在大鼠体内的药代动力学和组织分布

张云龙, 谢英, 王会娟, 侯新朴, 刘艳\*

(北京大学药学院药剂学系, 北京 100083)

**摘要:** 目的 考察 3 种超氧化物歧化酶 (SOD) 脂质体静脉给药后在大鼠体内的药代动力学和组织分布。方法 用反相蒸发法制备 SOD 脂质体, 采用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 活力, 静脉注射给药后, 测定大鼠血中 SOD 含量变化和不同组织中 SOD 含量变化。结果 在血浆中, SOD 水溶液、SOD 普通脂质体、用 DSPE-PEG2000 修饰的 SOD 脂质体、用 Tween 80 修饰的 SOD 脂质体的半衰期分别为 0.25, 0.34, 0.66 和 0.41 h; AUC 分别为 12.48, 24.66, 41.16 和 33.02  $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。与普通脂质体比较, 经过 DSPE-PEG 和 Tween 80 修饰后的脂质体, 使肝、脾中 SOD 的含量有不同程度的降低, 脑中含量有所提高。结论 3 种 SOD 脂质体均可不同程度地延长 SOD 的血浆半衰期, 并以用 DSPE-PEG2000 修饰的 SOD 脂质体效果最好。与普通脂质体相比, 用 Tween 80 修饰的 SOD 脂质体可以提高进入脑中的 SOD 量, 用 DSPE-PEG2000 修饰的 SOD 脂质体可以减少肝脾对 SOD 的摄取。

**关键词:** SOD 脂质体; 药代动力学; 组织分布

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)02 - 0173 - 05

## Pharmacokinetics and distribution of superoxide dismutase liposomes in rats

ZHANG Yun-long, XIE Ying, WANG Hui-juan, HOU Xin-pu, LIU Yan\*

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

**Abstract:** **Aim** To evaluate the effects of surfactants on the pharmacokinetics and distribution in rats after intravenous administration of SOD liposomes. **Methods** The liposomes were prepared by reverse phase evaporation method. The activity of SOD was assayed by method of xanthine oxidase. **Results** The  $T_{1/2}$  of SOD solution, common SOD liposome, SOD liposomes modified by DSPE-PEG2000 and Tween 80 were 0.25, 0.34, 0.66 and 0.41 h, respectively; AUC were 12.48, 24.66, 41.16 and 33.02  $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. Compared with the common liposome, the liposomes modified by DSPE-PEG and Tween 80 decreased the content of SOD in liver and spleen, but increased in brain. **Conclusion** The three kinds of liposomes could increase  $T_{1/2}$  and AUC in some extent, especially in PEG-L group. Tween-L could increase the SOD content in brain, and PEG-L could decrease the SOD content in the liver and spleen compared with the common liposome.

**Key words:** SOD liposomes; pharmacokinetics; tissue distribution

超氧化物歧化酶 (SOD) 是一种催化超氧自由基歧化反应的金属酶, 是氧自由基最有效的清除剂, 其在抗衰老、抗肿瘤、抗炎、抗辐射等方面有着广泛的

应用<sup>[1-3]</sup>。但由于 SOD 在体内的半衰期很短, 且 SOD 分子量大, 不容易透过细胞膜, 因此其应用受到限制。为了降低体内的酶对 SOD 的破坏作用, 延长其半衰期, 文献<sup>[4-6]</sup>曾用脂质体包裹 SOD, 并取得较好效果。本文将 SOD 装载于普通脂质体和表面活性剂修饰的脂质体中, 考察表面活性剂修饰的脂质体对 SOD 在大鼠体内的药代动力学和组织分布

收稿日期: 2004-03-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171114).

\* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 82801508, Fax: 86 - 10 - 62015584,

E-mail: yanliu@mail.bjmu.edu.cn

情况的影响,为 SOD脂质体的临床应用提供理论依据。

## 材料与amp;方法

**药品及试剂** 牛血 SOD(华东理工大学);卵磷脂(上海太伟药业有限公司);胆固醇(北京化学试剂公司);DSPE-PEG2000(日本油脂株式会社);黄嘌呤氧化酶试剂盒(南京建成生物工程研究所);Sephacrose-CL-4B(Pharmacia进口分装)。其他试剂均为分析纯。

**仪器** CQ50型超声波仪(上海超声波仪器厂);6010型紫外可见分光光度计(惠普上海分析仪器公司);JEM1230型电子透射显微镜(日本电子公司)。

**实验动物** SD大鼠,♂,体重(220±20)g,由北京大学医学部实验动物部提供。

**SOD脂质体的制备** 采用反相蒸发法。将一定比例的磷脂、胆固醇溶于氯仿和异丙醚混合溶剂中,按一定比例加入 SOD磷酸盐缓冲液,间歇超声处理 2 min使成均匀乳液,在 20 - 25 °C下旋转蒸发除去有机溶剂,并补加一定量的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4),继续间歇超声处理 3 min,得到均匀的普通 SOD脂质体混悬液(SOD-L)。在上述膜材中分别加入一定量的 DSPE-PEG2000或 Tween 80,分别得到 DSPE-PEG2000修饰的 SOD脂质体(SOD-PEG-L)或 Tween 80修饰的 SOD脂质体(SOD-Tween-L)。透射电镜下可见脂质体粒径约为 100 nm。

**脂质体中 SOD活力的测定** 在 SOD脂质体中加入一定量的 Triton X-100<sup>[7]</sup>,破坏脂膜释放出包载于脂质体中的 SOD。用 PBS稀释一定倍数后,用黄嘌呤氧化酶试剂盒法<sup>[8]</sup>检测其中 SOD的活力。

**SOD脂质体包封率的测定** 采用凝胶柱色谱法。将 SOD脂质体样品通过 Sephacrose-CL-4B葡聚糖凝胶柱,用 PBS洗脱分离 SOD脂质体和游离 SOD,分别收集脂质体和未包封的 SOD,采用黄嘌呤氧化酶试剂盒,测定脂质体中 SOD活力以及未经分离的 SOD脂质体混悬液中 SOD活力。按下式计算脂质体的包封率:

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{脂质体中 SOD活力}}{\text{脂质体混悬液中 SOD总活力}} \times 100\%$$

## 药代动力学研究

**标准曲线的制备** 取大鼠空白血浆离心,取上清液,精密加入一定量 SOD,稀释后得质量浓度为

5.6, 11.3, 16.9, 45.2和 73.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的一系列 SOD标准溶液,分别测定 SOD的活力。以活力  $A$  ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )对浓度  $C$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )回归得标准曲线。

**精密度与回收率考察** 取大鼠空白血离心,取上清液,精密加入一定量 SOD,制得质量浓度分别为 5.6, 16.9和 73.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品,测定 SOD的活力,平行测定 3次计算精密度与回收率。

**药代动力学实验** 取雄性 SD大鼠 20只,随机分成 4组,分别从股静脉注射 SOD水溶液(SOD-SOL)(对照组),SOD-L,SOD-PEG-L和 SOD-Tween-L。给药前尾静脉取空白血并分别于给药后 0.083, 0.333, 1, 1.5, 2, 3, 4和 6 h取血。680 × g离心 10 min,取上清液,同标准曲线的制备方法,分别测定样品中 SOD的活力,并与空白血进行比较计算 SOD的量。

## 组织分布研究

**样品的处理** 大鼠用生理盐水心脏灌流后,取脑、脾、心、肝组织,按每 1 g脏器加入 0.05  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl缓冲液(pH 7.8) 1 mL进行匀浆,离心,取上清液得各组织匀浆液。

**标准曲线制备** 在空白组织匀浆液中加入 SOD,分别制得在脑、脾、心、肝组织匀浆液 SOD质量浓度分别为 11.0 - 88.2, 29.4 - 205.9, 25.2 - 201.6和 59.6 - 414.7  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的一系列样品溶液,测定 SOD的活力,测定方法同“脂质体中 SOD活力的测定”。以活力  $A$  ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )对浓度  $C$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )回归,得 SOD在各组织中的标准曲线。

**精密度与回收率考察** 各空白组织匀浆液,按高、中、低 3个浓度加入一定量 SOD,分别使脑中加入的 SOD为 11.0, 44.1和 88.2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,脾中为 29.4, 117.6和 205.9  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,心中为 25.2, 100.8和 201.6  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,肝中为 59.6, 238.2和 414.7  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。测定其中 SOD的活力,每个浓度平行测定 3次,代入标准曲线,计算回收率与精密度。

**组织分布实验** 取雄性 SD大鼠 50只,5只作为空白对照,打开胸腔以生理盐水进行心脏灌流后,取出脑、脾、心、肝组织。另外 45只随机分成 3组,各组分别从股静脉注射一定剂量的 SOD-L(对照组),SOD-PEG-L和 SOD-Tween-L。给药后分别于 0.25, 0.5和 1.0 h各取 5只大鼠,打开胸腔以生理盐水进行心脏灌流后,取出脑、脾、心、肝组织。以 0.05  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl缓冲液(pH 7.8)制成匀浆,加入一定量 Triton X-100破坏吸收进入组织内的脂

质体,测定各组织匀浆液的 SOD活力,并与空白血进行比较,计算 SOD的增加量。

## 结果

### 1 脂质体的包封率

凝胶柱色谱法测定脂质体包封率的平均方法回收率为  $(105.0 \pm 1.4)\%$  ( $n=3$ )。3种脂质体的包封率分别为:  $(32.8 \pm 2.1)\%$  (SOD-L),  $(28.9 \pm 1.4)\%$  (SOD-PEG-L) 和  $(27.6 \pm 1.2)\%$  (SOD-Tween-L) ( $n=3$ )。结果表明,加入 DSPE-PEG2000 和 Tween 80 会使脂质体的包封率有所降低。

### 2 药代动力学试验

以测得的 SOD活力  $A(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$  为横坐标, SOD浓度  $C(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$  为纵坐标,得标准曲线:  $C=0.0234A-7.308$  ( $r=0.9998$ ),说明在  $5.6-73.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  线性关系良好。高、中、低 3个浓度的日内、日间差分别为  $3.4\%-4.8\%$ ,  $3.4\%-4.4\%$ ,方法回收率为  $95.4\%-102.8\%$ ,符合测定要求。

SOD水溶液和脂质体在大鼠体内的血药浓度数据见表 1,血药浓度-时间曲线见图 1,经房室模型拟合, SOD-SOL, SOD-L, SOD-PEG-L 和 SOD-Tween-L 静脉注射给药后血药浓度随时间的变化均符合二室模型。各主要药代动力学参数见表 2。

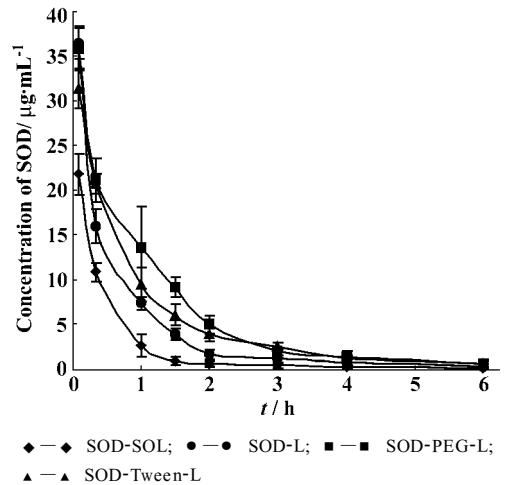
**Table 1** Concentration of SOD in rat plasma at different time after intravenous administration of SOD-SOL, SOD-L, SOD-PEG-L and SOD-Tween-L ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Time/h	$C_{\text{SOD-SOL}} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$C_{\text{SOD-L}} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$C_{\text{SOD-PEG-L}} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$C_{\text{SOD-Tween-L}} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
0.083	$21.8 \pm 2.3$	$36.5 \pm 1.9$	$35.8 \pm 2.4$	$31.3 \pm 2.2$
0.33	$10.9 \pm 1.0$	$16.0 \pm 1.9$	$21.2 \pm 2.5$	$20.8 \pm 1.1$
1.0	$2.7 \pm 1.2$	$7.4 \pm 0.7$	$14 \pm 4$	$9.5 \pm 1.9$
1.5	$1.0 \pm 0.5$	$3.9 \pm 0.6$	$9.2 \pm 1.1$	$6.1 \pm 1.2$
2.0	$0.7 \pm 0.3$	$1.7 \pm 0.5$	$5.0 \pm 1.0$	$3.9 \pm 0.7$
3.0	$0.42 \pm 0.26$	$1.2 \pm 0.4$	$2.1 \pm 0.9$	$2.6 \pm 0.4$
4.0	$0.25 \pm 0.11$	$0.8 \pm 0.3$	$1.4 \pm 0.6$	$1.2 \pm 0.4$
6.0	$0.12 \pm 0.06$	$0.36 \pm 0.20$	$0.64 \pm 0.28$	$0.6 \pm 0.4$

### 3 组织分布试验

SOD在脑、脾、心、肝各组织中的标准曲线分别为  $C=0.0289A-311.2$  ( $r=0.9997$ ),  $C=0.0287A-247.62$  ( $r=0.9986$ ),  $C=0.0304A-771.28$  ( $r=0.9993$ ) 和  $C=0.0283A-1797.5$  ( $r=0.9987$ ),说明在测定范围内线性关系均良好。

SOD在脑、脾、心、肝各组织中高、中、低 3个浓度的日内精密密度分别为:  $2.2\%-7.6\%$ ,  $2.9\%-7.9\%$ ,  $2.1\%-7.2\%$  和  $1.3\%-5.6\%$ ; 日间精密密度分别为:  $2.0\%-7.8\%$ ,  $2.3\%-7.6\%$ ,  $2.9\%-6.7\%$  和  $1.4\%-5.6\%$ ; 方法回收率分别为:  $95.1\%-104.5\%$ ,  $96.8\%-98.3\%$ ,  $98.3\%-99.3\%$  和  $99.0\%-101.0\%$ ,均符合测定要求。



**Figure 1** The  $C-t$  curve in rat plasma after intravenous administration of SOD solution and three kinds of liposomes

**Table 2** Pharmacokinetic parameters of SOD solution and liposomes in rat

Parameter	SOD-SOL	SOD-L	SOD-PEG-L	SOD-Tween-L
$A / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	25.84	32.80	33.16	27.02
$\alpha / \text{h}^{-1}$	2.79	2.02	1.05	1.69
$B / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.22	2.84	1.37	6.97
$\beta / \text{h}^{-1}$	0.38	0.34	0.14	0.41
$V_c / \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	73.92	56.12	57.92	58.83
$T_{1/2\alpha} / \text{h}$	0.25	0.34	0.66	0.41
$T_{1/2\beta} / \text{h}$	1.83	2.06	4.81	1.69
$K_{21} / \text{h}^{-1}$	0.49	0.47	0.18	0.67
$K_{10} / \text{h}^{-1}$	2.17	1.45	0.84	1.03
$K_{12} / \text{h}^{-1}$	0.51	0.44	0.17	0.39
$AUC / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	12.48	24.66	41.16	33.02
$CL / \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	160.20	81.11	48.59	60.56

大鼠静脉注射 3种 SOD脂质体后,于不同时间测定脑、心、肝、脾中 SOD活力,代入标准曲线,计算各组织中的 SOD增量。结果见图 2。

## 讨论

文献<sup>[9]</sup>报道, SOD溶于 PBS后较为稳定,因此本研究用 pH 7.4磷酸盐缓冲液溶解 SOD作为水相制备脂质体。

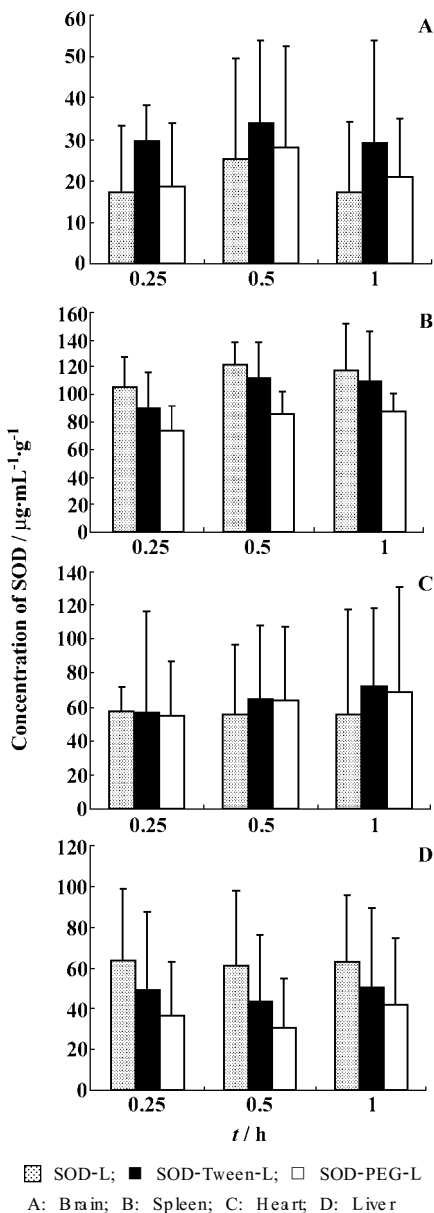


Figure 2 The concentration of SOD in tissues after intravenous administration of liposomes (n = 5)

胆固醇可以增加脂质体膜结构的稳定性,本实验确定将卵磷脂与胆固醇的摩尔比定为 4:1 (质量比接近 8:1)。

常用反相蒸发法制备水溶性大分子药物的大单层脂质体以提高包封率。在脂质体制备过程中,控制转相温度并采用间歇超声法,可以避免 SOD失活并可提高包封率,此部分内容已另文发表<sup>[10]</sup>。

药代动力学研究表明,脂质体组的  $T_{1/2}$ 和 AUC均高于溶液组,用表面活性剂修饰的脂质体组优于未经修饰的脂质体组,溶液组的  $CL$ 大于脂质体组,且 SOD-PEG-L组效果最佳,说明在同剂量条件下,脂质体可使 SOD在体内较长时间保持较高浓度,即

在一定程度上脂质体可延长 SOD在体内的循环时间;溶液组的  $K_0$ 较脂质体组大得多,说明溶液组的 SOD从中央室消除的较快,而脂质体组则较慢,且用表面活性剂修饰的脂质体组优于未经修饰的脂质体组;溶液组的  $K_2$ 较脂质体组大得多,说明溶液组的 SOD从中央室往周边室的转运速度较快,因而中心室药物浓度较低。这些结果都说明 SOD被包封于脂质体后,免于接触体内酶类而降解,并且由于 DSPE-PEG2000和 Tween 80都具有亲水性聚氧乙烯链,可以在脂质体的表面形成水化膜,防止调理素结合到脂质体的表面,从而延长了脂质体的体内循环时间。此外, Tween 80的亲水链长度约为 DSPE-PEG2000的三分之一,较短的亲水链所形成的水化膜也比较薄,因此与 DSPE-PEG2000相比,较易被网状内皮系统识别和吞噬。

脂质体被组织细胞摄取后,有可能仍以完整脂质体形式存在,所以在组织匀浆时,加入 Triton X-100以破坏脂膜,释放出被包封的药物,有利于药物测定的准确性。

在各部分组织的毛细血管中都有一定的血液存在,通过心脏灌流可以将存在于各组织中的血液稀释并排出组织,消除血中 SOD增加量对于测定的干扰,确保测定的准确性。

从大鼠各组织中 SOD的增加量可以看出,未经修饰的 SOD脂质体组 (SOD-L)的 SOD主要分布在脾、肝和心脏中。与 SOD-L相比,应用 DSPE-PEG2000及 Tween 80修饰脂质体后,可以明显降低肝、脾对 SOD的摄取,且 DSPE-PEG2000修饰组比 Tween 80修饰组降低得更多,这也说明在使脂质体避免网状内皮系统吞噬方面,DSPE-PEG2000优于 Tween 80。3种 SOD脂质体经静脉给药后, SOD在心脏中的分布没有显著性差异,这表明脂质体被 DSPE-PEG2000和 Tween 80修饰后,虽然包封率略有下降,但基本不会影响心脏对 SOD的摄取量,这对于治疗心脏缺血再灌注损伤具有临床意义。但是 Tween 80修饰组在大鼠脑中 SOD的浓度显著高于其他两组,说明 Tween 80能显著促进 SOD脂质体进入脑组织,这与 Tween 80能抑制 P糖蛋白的外排功能,促使载体进入脑组织有关<sup>[11]</sup>,这对于治疗脑部缺血再灌注损伤有一定的指导意义。

References:

[1] Vujaskovic Z, Batinic-Haberle I, Rabbani ZN, et al. Catalytic metalloporphyrin antioxidant with superoxide

- dismutase (SOD) mimetic properties protects lungs from radiation-induced injury [ J ]. *Int J Radiat Oncol*, 2002, **56**(2): 221 - 222.
- [ 2 ] Daizoh S, Tomomi O, Kunitaro F, *et al*. Characteristics of plasma extracellular SOD in burned patients [ J ]. *Burns*, 2001, **27**(6): 577 - 581.
- [ 3 ] de Bono S. SOD mimetic minimizes pain [ J ]. *Trends Biochem Sci*, 2001, **26**(5): 283.
- [ 4 ] Li L, Ma YZ, Yan XK, *et al*. The comparison in methods of preparing SOD liposomes [ J ]. *J Jilin Univ (Med Ed)* [ 吉林大学学报 (医学版) ], 2003, **29**(4): 535 - 536.
- [ 5 ] Wu LF, Deng CS. Research on the SOD in the liposome [ J ]. *Acta Acad Med Hubei* (湖北医科大学学报), 1995, **16**(2): 112 - 115.
- [ 6 ] Luisa Corvo M, Jorge JC, van't Hof R, *et al*. Superoxide dismutase entrapped in long-circulating liposomes: formulation design and therapeutic activity in rat adjuvant arthritis [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1564**(1): 227 - 236.
- [ 7 ] Dong JL, Li XG, Zhang GX. The effects of various surfactants on the activity of superoxide dismutase [ J ]. *J Southwest Agri Univ* (西南农业大学学报), 1997, **19**(1): 10 - 12.
- [ 8 ] Ji JP, Wu ZB, Liu QS, *et al*. Fast measurement for ultra-trace superoxide dismutase [ J ]. *J Nanjing Raikw Med Coll* (南京铁道医学院学报), 1991, **10**(1): 27 - 30.
- [ 9 ] Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase [ J ]. *J Clin Invest*, 1984, **73**(1): 87 - 95.
- [ 10 ] Zhang YL, Wang HJ, Yuan Q, *et al*. The effect of the formulation and technique of liposomes on the activity of superoxide dismutase [ J ]. *J Chin Clin Med* (中华临床医药杂志), 2004, **5**(5): 1 - 3.
- [ 11 ] Jong K. Nanoparticulate systems for brain delivery of drug [ J ]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **47**(1): 65 - 81.