

· 药物代谢 ·

活体成像系统检测甘草次酸修饰脂质体 在小鼠体内的分布

陈志鹏^{1,2}, 肖璐^{1,2}, 李伟东^{1,2}, 肖衍宇⁴, 蔡宝昌^{1,3*}

(1. 南京中医药大学 药学院, 南京 210046;

2. 南京中医药大学 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210029;

3. 南京海昌中药集团, 南京 210061; 4. 中国药科大学, 南京 210009)

[摘要] **目的:**研究胆固醇-聚乙二醇-甘草次酸(Chol-PEG-GA)修饰脂质体(CPGL)在小鼠体内的长循环型和分布情况,为肝肿瘤的靶向治疗提供理论依据。**方法:**将普通脂质体(LP)和CPGL分别包裹荧光显像剂NIRD-15,通过NIRD-15跟踪检测LP和CPGL在小鼠体内分布情况。将小鼠随机分为LP组和CPGL组,分别尾静脉注射,与药物注射后5,10,15,30,60,120,180,360,600 min采用活体成像系统观察小鼠活体及离体器官中药物荧光强度。**结果:**尾静脉注射LP后随循环系统迅速分布到各器官,肝靶向性较差。尾静脉注射CPGL 15 min后,药物开始聚集在肝脏,600 min后在肝脏中的药物浓度仍显著高于LP组,说明用Chol-PEG-GA修饰的脂质体能主动靶向于肝细胞,并延长其在肝组织的滞留时间。**结论:**CPGL在体内有明显的长循环性和肝靶向性,延长其在体内的半衰期,减少药物代谢率,靶向到达肝脏,延长在肝脏的滞留时间。

[关键词] 胆固醇-聚乙二醇-甘草次酸; 脂质体; NIRD-15; 肝靶向; 活体成像

[中图分类号] R284.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0148-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1745.037.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:45

In vivo Imaging System in Detecting Distribution of Liposomes Modified with Glycyrrhetic Acid

CHEN Zhi-peng^{1,2}, XIAO Lu^{1,2}, LI Wei-dong^{1,2}, XIAO Yan-yu⁴, CAI Bao-chang^{1,3*}

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

3. Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Corporation, Nanjing 210061, China;

4. College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To prove the long-circulating and distribution of liposome which is modified with cholesterol-poly (ethylene glycol)₂₀₀₀-glycyrrhetic acid (Chol-PEG-GA) (CPGL) *in vivo* and provide theoretical basis for targeting therapy of tumor. **Method:** The biodistribution of NIRD-15 labeled liposome was studied in mice by fluorescence animal imaging. The mice were randomly separated in conventional liposomes (LP) group and CPGL group. The fluorescence intensities *in vivo* and in isolated organs were measured 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 360, 600 min after injection. **Result:** LP faded away quickly through metabolism in organs of body, transferred by circulation system, while few phenomenon of NIRD-15's enrichment in liver occurred. After

[收稿日期] 20120302(002)

[基金项目] 教育部新教师基金项目(20093237120016);南京中医药大学青年自然科学基金项目(09XZR16)

[通讯作者] *蔡宝昌, Tel:025-86798281, E-mail: bccai@126.com

injected CPGL into body, the content ratio of NIRD-15 in the body was increased slowly. The phenomenon of NIRD-15 enrichment occurred in the liver 15 min after administration, and the concentration was still higher than LP after 600 min, which suggested liposomes modified with Chol-PEG-GA can target to the liver and extend its residence time in liver. **Conclusion:** CPGL can control the release of the drug *in vivo*, prolong the biological half life, and improve the liver targeting effect.

[**Key words**] Chol-PEG-GA; liposome; NIRD-15; liver targeting; animal imaging

肝脏由肝实质细胞和非实质细胞组成,研究表明肝癌等疾病多发生于肝实质细胞^[1-2],而肝非实质细胞是机体防御系统的主要组成部分,因此,普通载体进入肝脏后往往会优先被非实质细胞吞噬,不能较好地发挥药效,所以肝实质细胞靶向是目前肝靶向制剂的研究热点^[3-5]。由于肝实质细胞表面存在特异性的甘草次酸受体^[6],作者前期研究设计并合成了胆固醇(Chol)、聚乙二醇(PEG)和甘草次酸(GA)相连的一新型高分子材料(Chol-PEG-GA),并利用此高分子材料修饰脂质体(CPGL)^[7-8],以期通过CPGL表面的甘草次酸与肝实质细胞表面的甘草次酸受体主动结合方式增加药物到达肝实质细胞的浓度^[9-10],进一步提高治疗效果。

小动物活体成像技术是采用高灵敏度制冷CCD配合特制的成像暗箱和图像处理软件,使其可以直接监控活体生物体内药物的分布情况,由于该技术不涉及放射性物质和方法,非常安全。其操作极其简单,所得结果直观、灵敏度高,实验成本低等特点,目前已广泛应用于生命科学及药物研发等方面^[11-12]。本实验选择荧光显像剂NIRD-15作为标记物(NIRD-15是一种不溶于水,易溶于乙醇的荧光剂,在760 nm处有最大吸收波长),将NIRD-15包裹于脂质体内,选用紫外分光光度计的可见光部分对脂质体进行含量测定^[13],并尾静脉注射小鼠体内研究CPGL在小鼠体内分布情况,并以没有修饰材料的普通脂质体(LP)作为对照,证明CPGL对肝脏的靶向性,为其作为化疗药物的载体达到靶向治疗肝脏肿瘤的目的提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂 昆明种小鼠,雄性,体质量(20±2)g,购自南京中医药大学动物中心,合格证号SCXK(苏)2008-0003。NIRD-15购自辽宁华海蓝帆化工科技有限公司。大豆磷脂(德国Lipoid公司,批号790549-1),胆固醇(分析纯,中国慧兴生化试剂有限公司),其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 活体成像系统(日本Olympus公司),BS124S型电子天平(德国赛多利斯公司),752型紫

外分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),HP 1100 Series(Agilent公司),RE-52AA型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),JY92-II型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),RYJ-6A型药物透皮扩散仪(上海黄海药检仪器厂),磁力搅拌器(江苏金坛荣华仪器制造有限公司),原子力显微镜(Veeco Dimension 3100,ALPHACONTEC公司,德国)。

1.3 CPGL和LP的制备方法 采用硫酸铵梯度法制备甘草次酸修饰脂质体^[14],具体如下:称取处方量的磷脂、胆固醇和Chol-PEG-GA置于茄形瓶中,加入无水乙醇,超声溶解至澄清,在磁力搅拌下,以5 mL·min⁻¹的速度注入硫酸铵溶液中,减压蒸发除去乙醇,探头超声后,用pH 7.4 PBS溶液透析除去外水相硫酸铵,制得空白修饰脂质体。取适量NIRD-15与空白修饰脂质体混匀,恒温孵育,即得载NIRD-15的CPGL。按照上述操作步骤,不加Chol-PEG-GA,制得载NIRD-15的LP。

1.4 脂质体中NIRD-15含量和包封率测定 取脂质体混悬液适量,经0.45 μm微孔滤膜过滤除去未包封的药物,精密移取续滤液0.1 mL于10 mL量瓶中,甲醇定容,超声使其完全溶解,以同批次的空白脂质体按同法处理作为空白校正,测定760 nm处的吸光度,带入标准曲线计算NIRD-15的浓度。另精密吸取未过滤的脂质体混悬液0.1 mL于10 mL量瓶中,甲醇定容,超声使其完全溶解,在760 nm处测吸光度,带入标准曲线计算NIRD-15的浓度,按如下公式计算包封率:

$$\text{包封率} = \frac{\text{脂质体中药物量}}{(\text{脂质体中药物量} + \text{游离药物量})} \times 100\%$$

1.5 原子力显微镜(AFM) 将LP和CPGL稀释400倍后,薄薄的涂抹在载玻片上,待样品干燥后,置于Digital Instruments Nanoscope原子力显微镜上测试,测试在室温进行,湿度为50%~60%。探针为Si₃N₄,悬臂的弹性常数为0.06 N/M。

1.6 释放度测定 精密吸取LP和CPGL 2 mL,分别放入透析袋中,置于装有100 mL 30%乙醇溶液的

烧杯中,恒温磁力搅拌,温度(37 ± 0.5) °C,转速 400 r·min⁻¹,于不同时间点取样 5 mL,紫外分光光度计测定浓度,带入标准曲线计算累积释放度,并立即补充 30% 乙醇溶液 5 mL。

1.7 小鼠活体成像 取 10 只雄性昆明种小鼠,分成 2 组,每组 5 只,分别将包裹 NIRD-15 的 LP 和 CPGL 进行小鼠尾静脉注射,剂量为 20 mg·kg⁻¹,分别于药物注射后 5,10,15,30,60,120,180,360,600 min 给予小鼠乙醚麻醉,采用活体成像系统,在相同曝光强度及曝光时间下,获得荧光显像。

1.8 小鼠离体脏器成像 为了进一步证实活体成像结果,进行小鼠离体脏器成像实验。将 LP 和 CPGL 进行小鼠尾静脉注射,剂量为 20 mg·kg⁻¹,于第 600 min 处死老鼠,立即解剖心、肝、脾、肺、肾、脑,置于透明玻璃器皿中,蒸馏水洗净残存血液,滤纸吸干后置于活体成像系统,在相同曝光强度、曝光时间条件下获得荧光显像。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的制备 精密称取 5 mg NIRD-15 对照品置于 10 mL 量瓶中,加 30% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配成质量浓度为 500 mg·L⁻¹ 的溶液,再精密吸取 1 mL 置于 50 mL 量瓶中,30% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配成质量浓度为 10 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,加 4 °C 冷藏备用。

分别精密吸取 1.6,2,2.4,2.8,3.2,4.8 mL 对照品溶液置于 10 mL 量瓶中,加入 30% 乙醇稀释至刻度,使其质量浓度分别为 1.6,2,2.4,2.8,3.2,4.8 mg·L⁻¹ 建立标准曲线,以 30% 乙醇溶液作为空白,采用紫外分光光度计在 760 nm 处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标,NIRD-15 质量浓度(C,mg·L⁻¹)为横坐标绘制标准曲线,得线性回归方程 A = 0.175 5C - 0.015 6 (R² = 0.999 7),可见 NIRD-15 在 1.6 ~ 4.8 mg·L⁻¹ 与吸收度呈线性关系。

2.2 精密度试验 取 1.6,2.8,4.8 mg·L⁻¹ (低、中、高浓度)的 NIRD-15 标准溶液,在 760 nm 处测定吸光度,计算日内和日间精密度。结果见表 1。

表 1 NIRD-15 的日内、日间精密度 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

质量浓度/mg·L ⁻¹	日内精密度/%	日间精密度/%
1.6	2.44 ± 0.15	2.05 ± 2.68
2.8	2.69 ± 0.17	1.13 ± 1.32
4.8	1.22 ± 0.36	1.18 ± 3.11

2.3 回收率试验 配置 1.6,2.8,4.8 mg·L⁻¹ NRID-15 溶液各 6 份,用紫外分光光度计进行分析,

其得到的吸光度带入标准曲线,计算测得药物浓度,与实际加入量比较,考察样品的方法回收率,结果表明 S/N ≤ 3,见表 2。

表 2 NIRD-15 的方法回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

质量浓度/mg·L ⁻¹	方法回收率/%
1.6	2.45 ± 2.57
2.8	2.69 ± 2.58
4.8	2.22 ± 2.63

2.4 LP 和 CPGL 中 NIRD-15 的包封率和粒径的测定 见表 3。

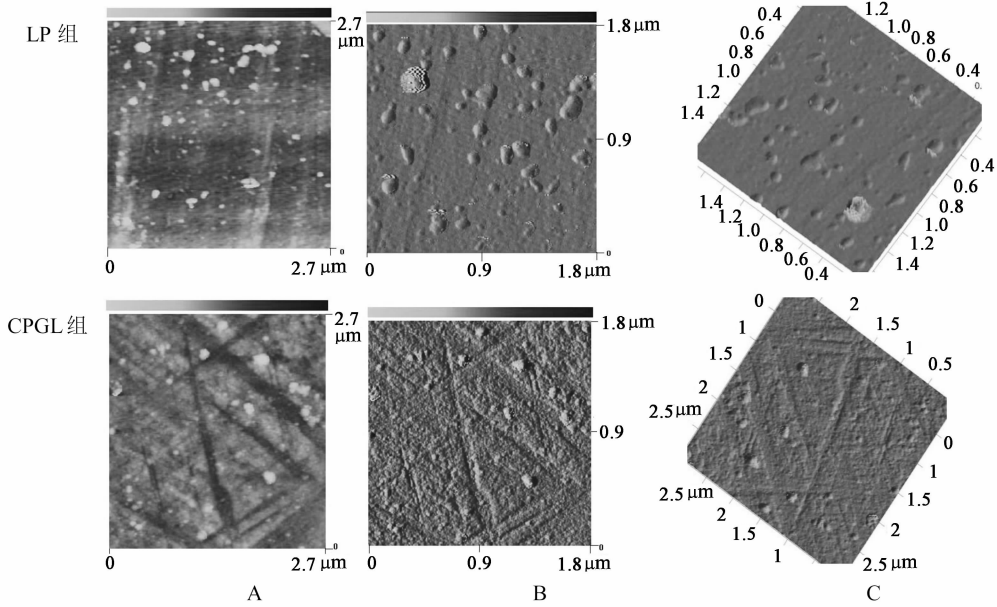
表 3 LP 和 CPGL 的包封率测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	包封率/%	粒径/nm
LP	75.70 ± 2.36	135.70 ± 11.34
CPGL	70.18 ± 1.89	149.10 ± 13.65

2.5 NIRD-15 脂质体的 AFM 影像 AFM 的探针在脂质体吸附层的表面扫描时,与 NIRD-15 脂质体产生了一定作用力,导致有点黏针,但仍能较为明显的观察到一些球形、椭圆形的脂质体颗粒,在 AFM 的照片中,较大的球形脂质体的直径约为 200 nm;较小的球形脂质体的直径约为 100 nm;从原子力显微镜高度图可以看到,脂质体发生部分聚集形成的少数粒径较大的颗粒,这可能是因为脂质体涂抹在载玻片上时的不均一性,也可能是探针与脂质体作用力导致的(图 1)。

2.6 体外释放度的研究 由图 2 可见,CL 和 CPGL 体外释放度在最初呈上升趋势,随时间增长,当释放达到 600 min 时,CL 的累积释放度已超过 80%,之后趋势渐缓,1 440 min 后基本释放完全;CPGL 的累积释放度明显较 CL 慢,1 440 min 释放量为 60%。

2.7 小鼠活体成像 给药 5 min 后,LP 和 CPGL 组尾巴处仍能观察到药物荧光,同时在肝脏中已有荧光出现,30 min 后 CPGL 组肝脏中的荧光强度明显高于 LP 组,而 LP 组在肾脏和膀胱处均有较强的荧光,说明 LP 组的药物已开始代谢,60 min 后药物随循环系统分布至全身,LP 组可明显在心、肝、脾、肺、肾处看到荧光,且肝脏中荧光强度越来越弱,心、脾、肺和肾的荧光强度越来越强,CPGL 组肝脏中的荧光强度比其他组织强。120 min 时,CPGL 组肝脏中的药物荧光强度仍然比 LP 组强,且肾和膀胱的荧光强度均低于 LP 组,600 min 后,CPGL 组肝脏中仍具有较高浓度,取出两组小鼠离体内脏进行荧光强度比对,很明显 CPGL 组肝脏荧光强度最强,心和肺



A. 平面图; B. 高度图; C. 三维图

图1 原子为显微镜下脂质体观察

的荧光强度较弱,脑中无荧光强度,而 LP 组除脑以外,其他 5 个内脏中均有荧光,其中肝脏中荧光强度较弱,说明 600 min 后,药物在 LP 组基本代谢完全,

CPGL 组比 LP 组有较强的肝靶向性(图 3)。

3 结论

本研究显示:用脂质体包裹 NIRD-15,可跟踪小鼠体内药物分布及代谢情况,LP 组随循环系统迅速到达全身,且代谢迅速;CPGL 组在体内缓释的效果明显,半衰期延长,肝靶向性明显强于 LP 组;小鼠离体器官实验同样证实:CPGL 组在肝脏内的滞留时间最长,且滞留量大于其他器官。利用活体成像技术,可直观的观察到的 Chol-PEG-GA 修饰的脂质体具有优良的肝靶向性和长循环型,为进一步研究肝实质细胞靶向奠定了基础。

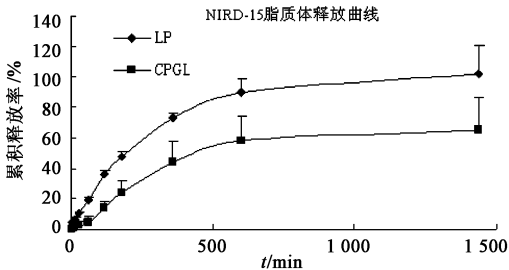


图2 LP 和 CPGL 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

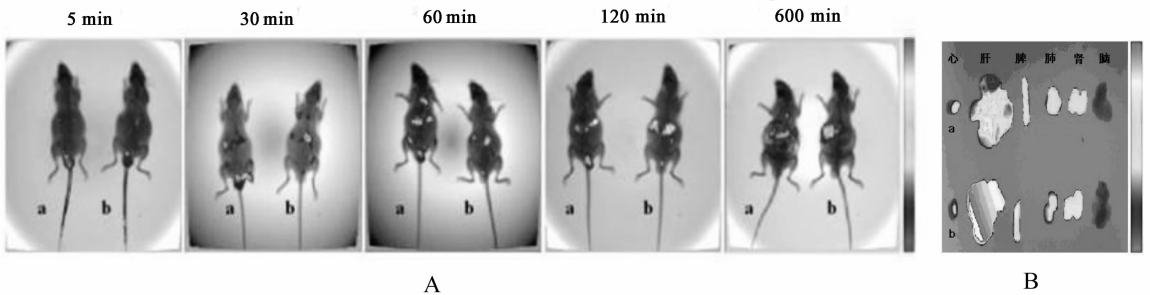


图3 (A) 给药后不同时间 LP 组(a)与 CPGL 组(b)小鼠活体成像;
(B) 给药 600 min LP 组(a)与 CPGL 组(b)600 min 小鼠离体脏器成像

[参考文献]

[1] 汤钊猷. 肝癌研究进展[J]. 中国肿瘤, 2001, 10 (1):37.
 [2] 冯晓玲. 原发性肝癌的诊治现状和展望[J]. 实用肝脏病杂志, 2005, 8(5):313.
 [3] Pütz G, Schmider W, Nitschke R, et al. Synthesis of

phospholipid-conjugated bile salts and interaction of bile salt-coated liposomes with cultured hepatocytes [J]. J Lip Res, 2005, 46:2325.
 [4] Moghimi S M, Patel H M. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system—The concept of tissue specificity [J]. Drug Delivery Rev, 1998, 32: 45.

荧光凝胶色谱法测定大鼠单次口服 麦冬多糖 MDG-1 排泄变化

谢华通¹, 王硕¹, 阮克峰¹, 冯怡¹, 徐德生^{2*}

(1. 上海中医药大学中药现代制剂技术教育部工程中心, 上海 201203;

2. 上海中医药大学曙光医院, 上海 200003)

[摘要] 目的:探讨单次口服麦冬多糖 MDG-1 后排泄量的变化。方法:采用异硫氰酸荧光素(FITC)对麦冬多糖 MDG-1 进行标记(F-MDG-1),测定取代度。采用高效凝胶色谱法(HPGPC)对粪便及尿液内 MDG-1 含量进行测定。SD-雄性大鼠,给药组按照 300 mg·kg⁻¹给予 F-MDG-1,空白组给予纯水,分别在 0, 4, 12, 24, 48, 72 h 收集尿液及粪便。测定含量。结果:在单次给予 F-MDG-1 量 300 mg·kg⁻¹后,尿液中含量测定在 12 h 时达到最大排泄量 0.808 7 mg,而后逐渐减少,至 72 h 最低 0.105 3 mg;在粪便测定中在 12 h 达到最大排泄量为 21.332 4 mg,而后逐渐减少,至 72 h 最低 0.506 5 mg。结论:采用 FITC 对 MDG-1 进行标记,并采用荧光色谱法对 MDG-1 在排泄物内的含量变化进行研究是可行的。MDG-1 基本不被人体吸收,其主要经粪便排泄。

[关键词] 麦冬多糖; 均一分子量多糖; 异硫氰酸荧光素; 高效凝胶色谱法; 尿液; 粪便

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0152-05

[收稿日期] 20120329(009)

[第一作者] 谢华通, 博士研究生, 从事中药大分子组分生物活性研究, E-mail: xiehuatong@sohu.com

[通讯作者] * 徐德生, 博士生导师, Tel: 021-53825761, E-mail: Xudes1953@126.com

- [5] Dan C, Wake K. Modes of endocytosis of latex-particles in sinusoidal endothelial and kupffer cells of normal and perfused rat-liver[J]. Cell Res, 1985, 158: 75.
- [6] LEE K J, KIM J R, LEE C H. Effect of 2-methylaminoethyl-4, 4'-dimethoxy-5, 6, 5', 6'-dimethylenedioxybiphenyl-2-carboxylic acid-2'-carboxylate monohydrochloride (DDB-S) on indocyanine green (ICG) clearance in rats [J]. Arch Pharm Res, 2005, 28 (1): 115.
- [7] 王燕. 新型脂质体作为中药靶向载体在肿瘤治疗中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (16): 212.
- [8] 瞿叶清, 陈军, 林爱华, 等. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的抗肿瘤作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 143.
- [9] WANG S N, DENG Y H, XU H, et al. Synthesis of a novel galactosylated lipid and its application to the hepatocyte-selective targeting of liposomal doxorubicin [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2006, 62(1): 32.
- [10] 冷静, 邹亮, 胡一冰, 等. 中药引经理论与药物靶向性的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (13): 277.
- [11] Minn A J, Gupta G P, Siegel P M, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung [J]. Nature, 2005, 436 (7050): 518.
- [12] Tavazoie S F, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. Nature, 2008, 451 (7175): 147.
- [13] Jia Liu, Hongxia Li, Daquan Chen, et al. In vivo evaluation of novel chitosan graft polymeric micelles for delivery of paclitaxel [J]. Drug Delivery, 2011, 18 (3): 181.
- [14] 陈军, 苏璇, 蔡宝昌. 马钱子总生物碱脂质体的含量与包封率测定[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20 (3): 249.

[责任编辑 邹晓翠]