文章编号:1000-5404(2010)10-1043-04

论著

两性霉素 B 脂质体胶联羊膜药膜的体内外缓释研究

李小丹[1],赵 敏[1],赵 媛[1],杨雨昆[1],李小梅[2] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院眼科,眼科学重庆市重点实验室[1],药学院药物分析教研室[2])

[摘要] **目的** 研究两性霉素 B 脂质体(amphotericin B liposome, AmBL)胶联羊膜药膜的体内外缓释性能。**方法** 将两性霉素 B 脂质体与纤维蛋白胶混合,再与羊膜胶联,制备成两性霉素 B 脂质体胶联羊膜药膜,光镜及扫描电镜观察形态学。将药膜置于生理盐水中,连续 10 d 置换浸出液,高效液相色谱法测定药物浓度。兔右眼眼表行药膜移植,考察房水中药物浓度变化,左眼滴入自制的两性霉素 B 脂质体眼液作为对照。**结果** 药物-纤维蛋白胶与羊膜基底面贴合紧密,药物附着在胶原纤维网状孔隙内。浸出液中前 3 d 药物浓度分别为 59.9、34.1、27.9 μg/ml,以后逐渐减少,第 10 天为 0.78 μg/ml。兔眼表药膜移植后,前 2 d 房水中药物浓度较高,分别为 113.1、61.2 ng/ml,以后逐渐降低;对照组房水中药物浓度维持在较低水平,平均值为 26.1 ng/ml。**结论** 两性霉素 B 脂质体胶联羊膜药膜是一种较好的药物缓释系统。

[关键词] 两性霉素 B 脂质体;胶联羊膜药膜;缓释
[中图法分类号] R945; R961; R978.5 **[文献标志码]** A

Slow-release of amphotericin B liposome-fibrin glue-amniotic membrane *in vivo* and *in vitro*

Li Xiaodan[1], Zhao Min[1], Zhao Yuan[1], Yang Yukun[1], Li Xiaomei[2] ([1]Department of Ophthalmology, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, [2]Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To study the slow-release properties of amphotericin B liposome(AmBL)-fibrin glue(FG)-amniotic membrane(AFAM) *in vivo* and *in vitro*. **Methods** AmBL was added into FG and cross-linked with AM to prepare the AFAM. Morphology of the AFAM was observed under light microscope and scanning electron microscope (SEM). AFAM was placed in saline which was replaced once a day for 10 d. Concentration of the released AmB was assayed by high performance liquid chromatography (HPLC). AFAM was transplanted to the right eyes of rabbits, and changes of AmB concentration in aqueous humor were observed. AmBL solution was dropped into the left eyes which served as controls. **Results** The AmBL-FG was firmly fixed on the basal surface of amniotic membrane. AmBL was attached to the FG meshes. The concentration of AmB in saline was 59.9, 34.1 μg/ml, and 27.9 μg/ml respectively in the initial 3 days and 0.78 μg/ml on day 10, which was then gradually reduced. After transplantation of AFAM, the AmB concentration in aqueous humor was 113.1 and 61.2 ng/ml respectively in the first 2 days, which was then gradually reduced. The AmB concentration in aqueous humor of the control group was relatively low with a mean level of 26.1 ng/ml. **Conclusion** AFAM is a rather good slow-release system of drugs.

[Key words] amphotericin B liposome; fibrin glue-amniotic membrane; slow-release

Supported by the Tackling Project for Sci & Tech Research of Chongqing(CSTC2007-19662). Corresponding author: Zhao Min, Tel:86-23-89012262, E-mail: minzhao2002@yahoo.com.cn

真菌性角膜炎是世界性的常见致盲眼病,近年来其发病率明显上升[1]。两性霉素 B 脂质体(amphotericin B liposome, AmBL)是高效广谱抗真菌药物,具有缓释和低毒性等特点,目前已用于真菌性角膜炎的治疗[2,3]。目前,纤维蛋白胶(fibrin glue, FG)作为药物缓释载体应用于多种研究[4]。羊膜作为一种良好的生物移植材料已广泛应用于眼表重建[5],近年羊膜移

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(CSTC2007-19662)
[通信作者] 赵 敏,电话:(023)89012262,E-mail:minzhao2002@yahoo.com.cn

植也用于治疗真菌性角膜炎[6]。我们前期研究将FG与羊膜胶联,自主研发出一种胶联羊膜[7](中国发明专利授权号CN100479867C),它具有良好的亲水性、柔韧性及组织相容性,临床初步研究已取得满意疗效[8]。本实验在前期研究基础上,利用羊膜作为承载体,纤维蛋白胶作为药物缓释载体与两性霉素B脂质体配制,制备出一种新的药物缓释系统和移植材料——两性霉素B脂质体胶联羊膜药膜(amphotericin B liposome-fibrin glue-amniotic membrane,AFAM),并研究其体内外缓释性能,探讨其治疗真菌性角膜炎的可行性,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品与仪器

纤维蛋白胶(广州倍绣生物技术有限公司,批号:2008007),两性霉素B脂质体(上海新先锋药业有限公司,批号:080802),冷冻干燥机(Christ RLPHR 1-2 LD,德国),光学显微镜(Leica DM RX,德国),扫描电镜(Hitachi S-3000N,日本),高效液相色谱仪(SY-8100,北京)。

1.2 实验动物

健康新西兰大白兔15只,体质量2~2.5 kg,雌雄不拘,双眼屈光介质透明,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.3 方法

1.3.1 AFAM的制备 无菌条件下,取4 ℃无水丙三醇保存的羊膜片,生理盐水浸泡30 min充分复水,平整铺放于超净台上,基底面朝上;精密称取1 000 mg两性霉素B脂质体(Am-BL)冻干粉(含10 mg两性霉素B)溶于2.5 ml纤维蛋白胶催化液中,与2.5 ml主体液用混合注射器混合后,均匀喷涂于3.5 cm×3.5 cm大小羊膜的基底面上,每张羊膜喷涂纤维蛋白胶液体1 ml。用自制羊膜压贴器轻压于表面3 min,确保药物-纤维蛋白胶与羊膜黏合紧密。制备好的AFAM浓度为2 mg/ml(以两性霉素B计算),每片药膜约含有两性霉素B 2 mg。将AFAM置于冰箱预冻4 h,再置于真空冷冻干燥机12 h进行冷冻干燥,处理后的AFAM置于常温下保存。

1.3.2 AFAM的大体形态及扫描电镜观察 大体形态:取上述制备好的AFAM,无水酒精固定,石蜡包埋后连续切片,厚约5 μm,HE染色,光镜下观察。扫描电镜:取制备好的AFAM,用2.5%戊二醛固定,梯度酒精脱水,临界点干燥镀金,扫描电镜观察。

1.3.3 AFAM体外缓释性能 取制备好的AFAM置于无菌试管中,加入5 ml无菌生理盐水,置于37 ℃恒温箱中震荡,每24小时置换1次生理盐水,连续10 d。换出的生理盐水浸出液置于-40℃避光保存,待测。高效液相色谱法测定每天生理盐水浸出液中AmB含量,并绘制药时曲线。

1.3.4 AFAM移植后兔房水药物浓度测定 15只健康新西兰大白兔分为3组,每组5只10眼,右眼为实验眼。左眼为对照眼。实验眼予以直径20 mm两性霉素B脂质体胶联羊膜药膜片缝合固定于角巩膜缘(图1),对照眼滴入配制的浓度2 mg/ml两性霉素B脂质体眼液,3次/d。分别于术后和滴眼后1、2、3、4、5 d双眼同一时间点抽取兔眼房水0.1 ml,各组每个时间点取3只兔(6只眼)。高效液相色谱法检测实验眼和对照眼兔房水中两性霉素B浓度。

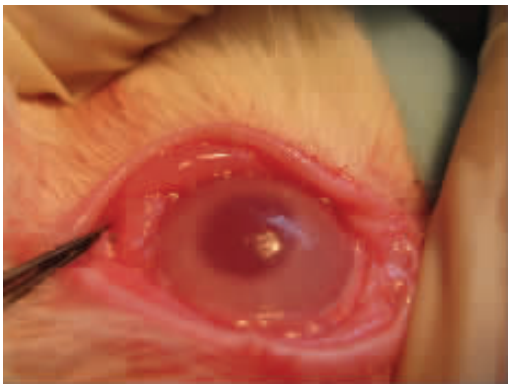
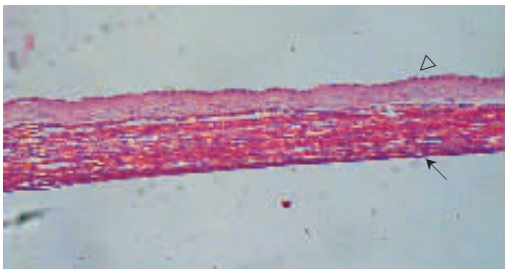


图1 两性霉素B脂质体胶联羊膜药膜移植后兔眼角膜观察

2 结果

2.1 大体形态及扫描电镜观察

2.1.1 大体形态观察 肉眼:两性霉素B脂质体胶联羊膜药膜为淡黄色,平整如纸样半透明薄膜,在平衡盐溶液中复水后仍能保持较好的韧性及抗拉性,药物-纤维蛋白胶与羊膜贴合紧密,难以将其分开。HE染色:药物-纤维蛋白胶与羊膜基底面贴合紧密,药膜平整无皱缩,羊膜上皮面可见排列整齐的单层柱状上皮细胞,药物-纤维蛋白胶呈均质染色,厚度均一,约0.3 mm,胶原纤维呈明显的网状结构(图2)。



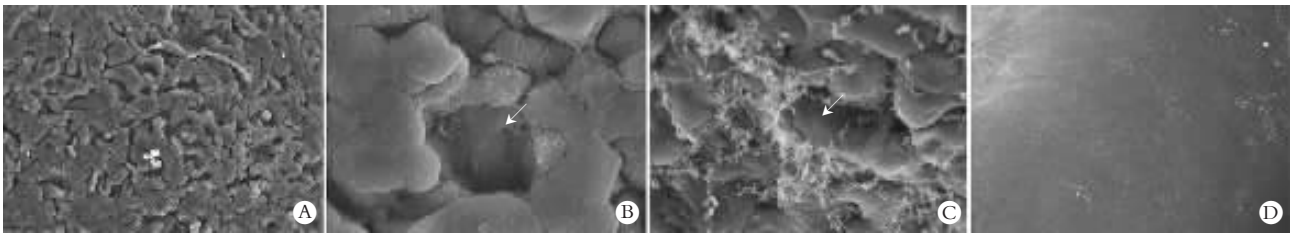
△:羊膜上皮细胞;↑:药物-纤维蛋白胶

图2 两性霉素B脂质体胶联羊膜药膜光镜观察 (HE ×100)

2.1.2 扫描电镜观察 两性霉素B脂质体胶联羊膜药膜基底涂胶面呈明显的胶原纤维网状结构,药物附着在各胶原纤维交错构成的三维网状孔隙内,孔径大小不一,直径6~24 μm。未加药物的胶联羊膜涂胶面也可见明显的胶原纤维三维网状结构,但孔隙内无药物附着,上皮未涂胶面,光滑,无网状孔隙(图3)。

2.2 药膜体外缓释情况

药膜中的纤维蛋白胶缓慢降解,在10 d内完全降解。随着FG的降解,AmB在10 d内均从药膜中持续释放,前3 d释放量较多,第1、2、3天生理盐水浸出液中AmB浓度分别为59.9、34.1、27.9 μg/ml,累积释放率达30.48%,以后药物释放逐渐减少并趋于平稳,第10天AmB浓度为0.78 μg/ml,仍在最低抑菌浓度范围内(图4)。



A:药膜涂胶面(×200);B:纤维蛋白胶网状孔隙,如箭头所示(×1 000);C:药物附着在孔隙,箭头所示为两性霉素 B 脂质体(×1 000);D:上皮未涂胶面(×150)

图 3　两性霉素 B 脂质体胶联羊膜药膜基底涂胶面扫描电镜观察

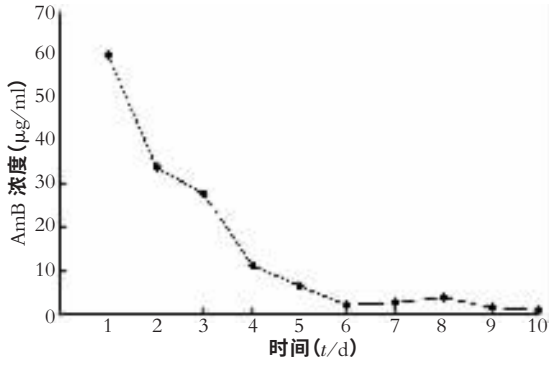


图 4　两性霉素 B 脂质体胶联羊膜药膜体外缓释药物浓度-时间曲线

2.3　药膜移植后房水药物浓度

药膜移植于兔眼表后,纤维蛋白胶缓慢降解,药膜逐渐变薄,到第 5 天胶全部降解。实验眼各时间点房水中均可测出 AmB,其中第 1、2 天房水中 AmB 分别为 113.1、61.2 ng/ml,以后药物浓度逐渐降低并趋于平稳,第 5 天药物浓度为 28.0 ng/ml,但均在最低抑菌浓度范围内,药膜缓释趋势明显可见。对照眼每天房水中 AmB 浓度均维持在稳定水平,平均值为 26.1 ng/ml,均在最低抑菌浓度范围内,但浓度相对较低,药时曲线较平坦(图 5)。

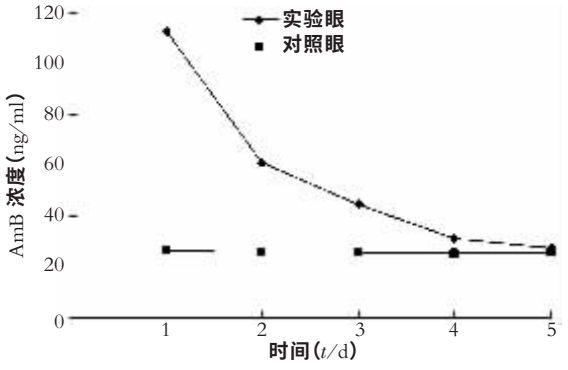


图 5　两性霉素 B 脂质体胶联羊膜药膜体内缓释房水药物浓度-时间曲线

3　讨论

目前对于真菌性角膜炎的治疗包括药物治疗及手术治疗,但疗效均欠佳。AmB 是高效广谱抗真菌药物,对大多数真菌的最低抑菌浓度为 0.02 ~ 1.00 mg/L[9],市售的 AmB 滴眼剂浓度多为 0.15% ~ 0.50%,应用于眼部有较大的刺激性,局部吸收少,生物利用度低。AmBL 是在药物外包裹类似生物膜结构的脂质双分子小囊,其主要有效抗真菌成分还是 AmB,但毒副作用却比 AmB 小[10],且能增加细胞的摄取,延长其在眼表的滞留时间,具有缓释和低毒性等特点,因此临床上使用较多。

近年来,FG 作为药物缓释载体,日益受到人们的重视,其三维网状结构类似一块海绵,其中的网眼可提供较大的承载药物表面积,随着胶的降解与吸收,药物缓慢释放。文献[1]报道将 FG 与脂质体交联后,可改善 FG 的生物物理学性能,比如增加凝胶的速度、粘弹性、抗拉强度,增强胶的缓释性能。本实验在前期研究基础上,将 FG 与 AmBL 交联后,再与羊膜胶联,最后进行冷冻干燥,制备成两性霉素 B 脂质体胶联羊膜药膜,它呈淡黄色半透明薄膜状,复水后仍具有较好的韧性及抗拉性,药物-FG 与羊膜紧密贴合,胶原纤维网状孔隙内容纳有大量的药物,且在体内外均可持续释放,说明这种药膜具有稳定的生物物理学性能。

FG 在体内具有相对稳定性,一般在 1 ~ 2 周内降解吸收,因此,纤维蛋白胶药物缓释系统可提高局部药物浓度,延长药物滞留时间,提高生物利用度[2]。文献[12]报道将纤维蛋白胶抗生素缓释系统进行冷冻干燥后可减慢纤维蛋白胶的降解速率,从而提高药物缓释率。研究[13]发现冻干的胶联羊膜中的胶在体内可持续存在 2 周。本研究体外实验发现 FG 在第 10 天完全降解,与上述结果基本吻合;但体内实验 FG 在第 5 天就完全降解,推测可能与眼表存在的各种可降解胶的蛋白酶有关。关于如何使 FG 存在的时间更长,以增加其在体内的缓释性能,尚有待进一步研究。

体外实验表明,药膜在前 3 d 释放量较多,累积释放率达 30.38%,第 10 天生理盐水中两性霉素 B 浓度为 0.78 μg/ml,仍能达到对大多数真菌的最低抑菌浓度,说明此药膜能持续缓释药物,具有较好的抑菌作用。根据眼部动力学特点,滴眼药物经角膜首先进入房水,房水中的药物浓度间接反映了角膜组织中的药

物浓度[14]。本实验实验眼房水中1～5 d均能保持比较稳定的药物浓度,所以我们推测应用药膜后,角膜中也应维持较稳定的药物浓度,从而有利于真菌性角膜炎的治疗。实验眼房水中药物浓度从第3天开始缓慢下降,主要因为兔眼房水是不断新陈代谢的,房水循环可稀释药物浓度,所以从理论上说,角膜中药物浓度应该更高。与实验眼相比较,对照眼每天房水中的药物浓度均保持在稳定水平,虽均在最低抑菌范围内,但浓度较低。研究[15]表明,两性霉素B脂质体在前房内注药量的安全有效范围为5～10 μg,本实验房水药物浓度为26.2～113.1 ng/ml,能达到对大多数真菌的最低抑菌浓度(20～1 000 ng/ml),对视网膜及角膜无明显毒副作用,也未发现明显的全身毒性反应。说明此药膜应用于兔眼表是安全有效的。

综上所述,两性霉素B脂质体胶联羊膜药膜是一种较好的药物缓释系统,其形态学及体内外缓释研究表明,这种药膜可容纳大量的药物,并能缓慢持续释放,具有稳定的生物物理学性能,为治疗真菌性角膜炎提供了实验理论依据。本课题主要是制备并研究两性霉素B脂质体胶联羊膜药膜的缓释性能,从理论上预见此药膜对真菌性角膜炎可能有一定的应用前景,其对于真菌性角膜炎动物的疗效及分析尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] 张波,谢立信.真菌性角膜炎的动物模型[J].国外医学眼科学分册,2005,29(3):167-170.

[2] 吴洁,高伟,朱海峰,等.两性霉素B脂质体治疗难治性真菌性角膜溃疡的疗效观察[J].第四军医大学学报,2009,30(3):253.

[3] 瞿玲辉,谢汉平,李良毛,等.兔眼角膜基质内注射两性雷素B的安全性评价[J].第三军医大学学报,2009,31(6):530-534.

[4] 杨宇,王文秀.纤维蛋白胶-药物缓释系统的研究进展[J].现代生物医学进展,2006,6(10):126-128.

[5] Azuara-Blanco A, Pillai C T, Dua H S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction[J]. Br J Ophthalmol, 1999, 83(4): 399-402.

[6] Chen H C, Ma D H, Huang S C. Amniotic membrane transplantation for the treatment of acute fungal keratitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45: E-Abstract 4950.

[7] 赵敏,李勤耕,李臻,等.一种胶联羊膜的制备方法:中国,CN100479867C[P].2009-4-22.

[8] 柯宁,赵敏,李臻.胶联羊膜的组织形态、细胞相容性及抗拉力特性研究[J].第三军医大学学报,2009,31(4):322-325.

[9] 王瑞礼.实验室检验指南[M].北京:人民卫生出版社,2005:88-89.

[10] Adler-Moore J P, Chiang S M, Satorius A, *et al*. Treatment of murine candidosis and cryp tococcosiswith a unilamellar liposomal amphotericin B formulation (AmBisome)[J]. J Antimicrob Chemother, 1991, 28(Suppl B): 63-71.

[11] Marx, Gerard. Biologic bioadhesive compositions containing fibrin glue and liposomes, methods of preparation and use: United States, 5651982[P]. 1997-7-29.

[12] Itokazu M, Yamamoto K, Yang W Y, *et al*. The sustained release of antiobiotic from freeze-dried fibrin-antibiotic compound and efficacies in a rat model of osteomyelitis[J]. Infection, 1997, 25(6): 359-363.

[13] Sekiyama E, Nakamura T, Kurihara E, *et al*. Novel Sutureless Transplantation of Bioadhesive-Coated, Freeze-Dried Amniotic Membrane for Ocular Surface Reconstruction[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 4(48): 1528-1534.

[14] 陆肇曾,王斌,孙兴怀.两性霉素B脂质体滴眼液在兔房水中的药动学[J].中国新药与临床杂志,2006,25(11):812-815.

[15] Cannon J P, Fiscella R, Pattharaehayakul S, *et al*. Comparative toxicity and concentrations of intravitreal amphoteriein B formulations in a rabbit model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(5): 2112-2117.

(收稿:2009-10-27;修回:2009-12-28)

(编辑 汪勤俭)

(上接1042页)

PLMT的治疗目前尚无定论。药物治疗中,巴氯芬、苯二氮类、三环抗抑郁药、抗惊厥药、β阻滞剂和皮质甾类都无效。γ氨基丁酸能药物如加巴喷丁、普加巴林通过抑制脊髓和背根神经节突触前电压依赖钙离子通道起到较好的止痛效果,而随着疼痛的减轻,运动也会得到改善[3,4],本例患者在肉毒毒素注射前口服加巴喷丁疼痛减轻不明显,可能是因为用量偏低。

在介入手术中,腰交感神经阻滞术能够使50%患者暂时减轻症状,腰硬膜外阻滞或硬膜外脊髓刺激对PLMT患者作用较小[2],考虑此法疗效不佳易反复且副作用较多,本例患者未采用。

A型肉毒毒素因其肌肉化学性去神经支配效应和镇痛效应已广泛应用于亢进性运动障碍,特别是张力障碍并取得了巨大的成功[5]。本例患者在口服加巴喷丁的基础上进行A型肉毒毒素注射治疗后显著改善了疼痛和足趾不随意运动。目前利用A型肉毒毒素治疗PLMT及其变体获得成功病例逐渐增多,而且A型肉毒毒素具有效力强、疗效确实、少有严重的毒副作用、操作简便易行且可多次进行等特点,在没有新治疗方法提出前,加巴喷丁口服配合A型肉毒毒素注射必将成为PLME治疗的最佳选择。

参考文献:

[1] 高旭光,郭玉璠.腿痛趾动综合征[J].中风与神经疾病杂志,1994,11(4):252-253.

[2] Eisa M, Singer C, Sengun C, *et al*. Treatment of painful limbs/moving extremities with botulinum toxin type A injections[J]. Eur Neurol, 2008, 60(2): 104-106.

[3] Alvarez M V, Driver-Dunckley E E, Caviness J N, *et al*. Case series of painful legs and moving toes: clinical and electrophysiologic observations[J]. Mov Disord, 2008, 23(14): 2062-2066.

[4] Aizawa H. Gabapentin for painful legs and moving toes syndrome[J]. Intern Med, 2007, 46(23): 1937.

[5] 靳西勇,陈哨军,庞书琴.肉毒毒素作用机制[J].中华现代外科学杂志,2006,3(16):1317-1319.

(收稿:2010-04-10;修回:2010-04-21)

(编辑 栾 嘉)