文章编号:1000-5404(2011)07-0719-04

论著

mEGF 乙醇脂质体的制备和特性研究

邢晓婧,宋秋荷,钟白玉,郝 飞 (400038 重庆,第三军医大学西南医院皮肤科)

【摘要】 **目的** 制备 mEGF 乙醇脂质体,并研究 mEGF 乙醇脂质体囊泡的包封率和物理性质。**方法** 采用高效液相色谱法(HPLC)测定 mEGF 乙醇脂质体的包封率、精密度、回收率、稳定性,运用扫描电镜、原子力显微镜、透射电镜和激光粒度分析仪观察和分析 mEGF 乙醇脂质体囊泡的外观、粒径和均一度。**结果** mEGF 乙醇脂质体的包封率大约为38%,精密度小于5%,30 d 内包封率波动在36% ~38%之间。运用原子力显微镜和透射电镜观察到粒径分布于40 ~60 nm 的乙醇脂质体囊泡。并且在激光动态光散射仪下测定显示囊泡的粒度分布较为均一,mEGF 乙醇脂质体的折光度为4.6,囊泡粒径大约分布在100 ~500 nm 之间。**结论** 成功制备了 mEGF 乙醇脂质体,建立了测定包封率的色谱方法,该给药系统稳定性较好,乙醇脂质体囊泡粒径分布均匀。

【关键词】 表皮生长因子;乙醇脂质体;高效液相色谱法;原子力显微镜
【中图法分类号】 R943;R961 【文献标志码】 A

Preparation of mEGF ethosome and its properties

Xing Xiaojing, Song Qiuhe, Zhong Baiyu, Hao Fei (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To prepare an ethosomal delivery system containing mouse epidermal growth factor (mEGF) and investigate its entrapment efficiency and physical properties. **Methods** The entrapment efficiency of mEGF ethosome (10 μg/g) was determined by high pressure liquid chromatography (HPLC). The mEGF ethosome vesicles were visualized by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM). And the size distribution of ethosome vesicles was investigated using dynamic light scattering (DLS). **Results** The mEGF ethosome had an entrapment efficiency of 38% and the RSD was less than 5%. The entrapment efficiency of mEGF ethosomal carriers ranged from 36% to 38% during 30 d after having been prepared. mEGF ethosomal carriers had rather small vesicles in a size ranging from 40 nm to 60 nm visualized by AFM and TEM. And the size of the mEGF ethosomal delivery system had uniform distribution ranging from 100 nm to 500 nm. Also, the refractive index of the mEGF ethosomal delivery system was 4.6. **Conclusion** A mEGF ethosomal delivery system is successfully prepared. A HPLC method is developed to determine mEGF content in ethosomal delivery system. The delivery system shows a well stability and a narrow particle size distribution.

【**Key words**】 epidermal growth factor; ethosome; high pressure liquid chromatography; atomic force microscope

Supported by the Tackling Program for Sci&Tech Research of Chongqing (SWH2008003). Corresponding author: Hao Fei, E-mail: haofei62@medmail.com.cn

表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)是一种由53个氨基酸组成,相对分子质量为6.0×10^3的多肽,存在于人类的多种组织细胞和体液中。研究表明EGF对毛囊的生长具有促进作用,被认为是毛囊生长期的生物学开关[1]。还有一些研究表明EGF可以促进创面的愈合[2-3]。常规的皮肤外用药给药系统,难以渗透通过皮肤角质层,较难将药物渗透进入皮肤深层以及毛囊,从而限制了其作用的发挥。乙醇脂质体给药系统作为新型的外用药给药系统,近十年备受药学界和皮肤学家关注,该系统的配方中含有相对高浓度的乙醇,可以突破皮肤角质层的屏障作用,封包及携带各种药物渗透到达皮肤深层和皮肤附属器[4],其渗透性明显优于传统的外用药给药系统。为了使EGF更好的渗透进入皮肤深层,发挥生物学效应,我们制备了mEGF乙醇脂质体,并研究mEGF乙醇脂质体囊泡的包封率和物理学性质。

【基金项目】 重庆市科技攻关计划项目(SWH2008003)
【通信作者】 郝 飞,E-mail:haofei62@medmail.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 药品与试剂 mEGF(Mouse Epidermal growth factor,

California Bioscience, USA),大豆卵磷脂(Avanti Polar Lipids Inc,USA)、乙氰、三氟乙酸(色谱纯,美国 Fisher 公司),无水乙醇,超纯水,98% 氮气(西南医院中心摆药室)。

1.1.2 仪器 高效液相色谱仪(HLPC,Waters,USA,810 系列),配备 510 泵,U&K 进样器,410 示差检测器;TECNAI-10 透射电镜(Philips, Netherlands);SPI3800N 型原子力显微镜(Seiko, Japan);S-3400N Ⅱ型扫描电镜(Hitachi,Japan);激光力度分析仪(Mastersizer,USA);电子天平(北京赛多利斯有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 mEGF 乙醇脂质体制作方法(乙醇注入法) 我们选用大豆卵磷脂质量分数为 5%,无水乙醇体积分数 30%,超纯水体积分数为 65%,mEGF 的浓度为 10 μg/g。卵磷脂置于玻璃瓶中用乙醇溶解,置于磁力搅拌器下充分搅拌 30 min,再边搅拌边将 mEGF 水溶液以 25 μl/min 的速度加入乙醇卵磷脂溶液中,继续搅拌 30 min,用 0.45 μm 一次性过滤器过滤即得乙醇脂质体。实验所有过程在氮气环境下操作。将得到的乙醇脂质体 4 ℃遮光密闭保存[5]。

1.2.2 mEGF 乙醇脂质体包封率的测定方法 mEGF 乙醇脂质体采用超速离心法分离未包封的部分。将制备完毕的 mEGF 乙醇脂质体在 4 ℃过夜,倾入 1 ml 离心管中,使用高速冷冻离心机在 4 ℃ 15 000 r/min 离心 30 min。取上清液待测。药物含量采用高效液相色谱法检测。包封率用以下公式计算。包封率 = (DT – DS)/DT × 100%,DT 是 mEGF 乙醇脂质体中药物的总量,DS 是离心后上清液检测到的药物量。重复 3 次。

色谱条件:色谱柱 Hypersil C18 柱,5 μm(410 mm × 250 mm),流动相:乙腈-水(35∶65,体积比),乙腈(乙腈 35%,三氟乙酸 0.1%);流速为 1.0 ml/min;检测波长:210 nm;灵敏度:0.01;时间常数:1.0;进样量:10 μl;柱温:25 ℃。

标准曲线的绘制:取 mEGF 标准液为 25、50、100、250、500 ng/μl,每种浓度进样 3 次,峰面积 R 与相应浓度 C 进行线性回归分析[6]。

精密度测定:选择包封率最高的 mEGF 乙醇脂质体,将该浓度的 mEGF 乙醇脂质体的包封率反复测量 6 次,计算精密度[7]。

稳定性测定:选择包封率最高的 mEGF 乙醇脂质体,分别在制备完毕后 1、7、15、30 d 测量包封率,每个时间点重复测定 5 次[8]。

1.2.3 扫描电镜下观察 mEGF 乙醇脂质体的大体外观 将制备完毕的 mEGF 乙醇脂质体与超纯水 1∶20 稀释,混合均匀后取 10 μl 滴于无菌的盖玻片上,自然风干过夜。然后将样品喷金后自然风干,镜下观察。

1.2.4 透射电镜下观察 mEGF 乙醇脂质体外观的方法 取 1 ml 乙醇脂质体,用超纯水 1∶1稀释;取稀释均匀后的乙醇脂质体 50 μl 滴在蜡板上;将铜网用镊子夹入蜡板的稀释液中,充分接触 10 min;从稀释液中取出铜网,在滤纸上吸干多余液体;在铜网上滴一滴醋酸铀溶液,染色 3 min 后,在透射电镜下观察。

1.2.5 原子力显微镜下测定 mEGF 乙醇脂质体粒径的方法 将制备完毕的 mEGF 乙醇脂质体用超纯水稀释 50 ~ 60 倍;取 100 μl 稀释液滴于无菌的盖玻片上,将稀释液于无菌、室温条件下干燥过夜,在原子力显微镜下观察粒径。

1.2.6 激光动态光散射仪测定 mEGF 乙醇脂质体的粒度分布 乙醇脂质体粒径分析采用激光动态散射仪检测粒度分布。要求乙醇脂质体在制备完毕后,马上使用蒸馏水 1∶2稀释后立即进行粒径检测。测定不同批次的醇质体,计算平均粒径。

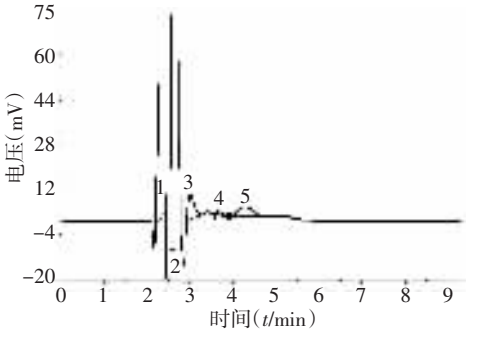
2 结果

2.1 HPLC 测定乙醇脂质体的包封率

2.1.1 标准曲线 建立的标准曲线线性关系良好,其回归方程为:Y = –11.738 07 + 0.830 17X,相关系数 0.999 8。

2.1.2 精密度 加入 mEGF 浓度为 10.000 0 μg/g 样品 6 次,6 次测量结果的 RSD 为 4.56%。6 次测量的包封率的峰面积比依次为 8.72、9.15、8.14、9.04、8.36、8.48。计算精密度,其精密度在 5% 以内,符合生物样品分析要求。

2.1.3 mEGF 乙醇脂质体样品包封率的测定 总共制备 mEGF 乙醇脂质体质量为 2 g,体积为 1.8 ml,离心后上清液的体积为 1.4 ml,上清液中总 mEGF 的量为 12.42 μg,包封率 = 38%(图 1)。



峰 1 ~ 4:未知组分,浓度 0.000 0(pg/μl);4 min 出现的峰 5 代表 mEGF,浓度 8.875 7(pg/μl)

图 1 mEGF 乙醇脂质体包封率的色谱图像

2.1.4 mEGF 乙醇脂质体的稳定性 将含有 mEGF 总浓度为 10 μg/g 的 mEGF 乙醇脂质体,在制备完毕后 1、7、15、30 d 测得的封包率分别为(38.14 ± 0.29)%、(36.94 ± 0.82)%、(36.20 ± 0.72)%、(36.34 ± 0.88)%。

2.2 扫描电镜下乙醇脂质体的大体外观观察

图 2 示 mEGF 乙醇脂质体,可以观察到粒径大小较为均匀的囊泡结构。但是每一个囊泡的粒径大小难以测量,囊泡的外观大体为半球形。

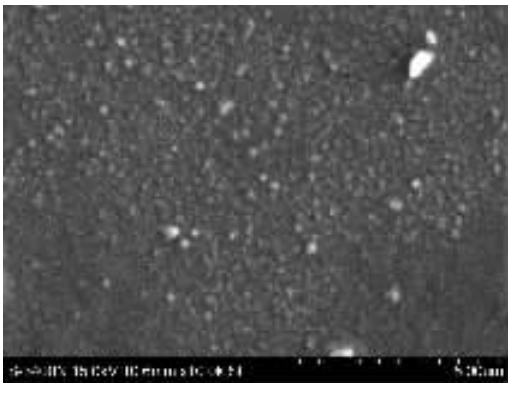
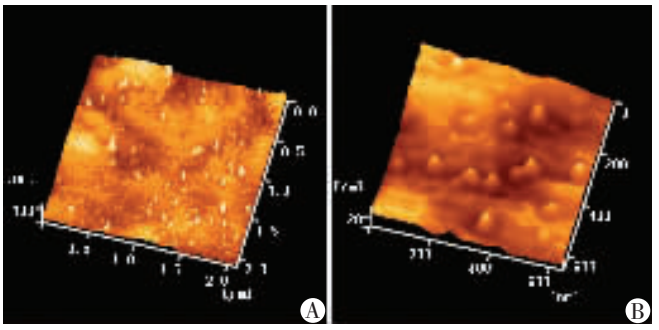


图 2 扫描电镜下 mEGF 乙醇脂质体观察

2.3 原子力显微镜测得的 mEGF 乙醇脂质体的形状及均质化

图 3A 示 mEGF 乙醇脂质体在低倍视野下的图像，我们观察到囊泡的大小较为均匀；图 3B 示 mEGF 乙醇脂质体在高倍视野下的图像，可以观察到单个囊泡呈半球形、圆锥形结构，囊泡的大小较为均匀，平均粒径为 40～60 nm。



A：低倍视野下观察 mEGF 乙醇脂质体的分布图；B：高倍视野下观察 mEGF 乙醇脂质体的囊泡状外观和粒径大小

图 3 mEGF 乙醇脂质体的原子力显微镜观察

2.4 透射电镜下观察 mEGF 乙醇脂质体的外观

在透射电镜下，可以观察到呈完整圆球形或椭圆形的单室囊泡，粒径较均匀，为 40～60 nm（图 4）。

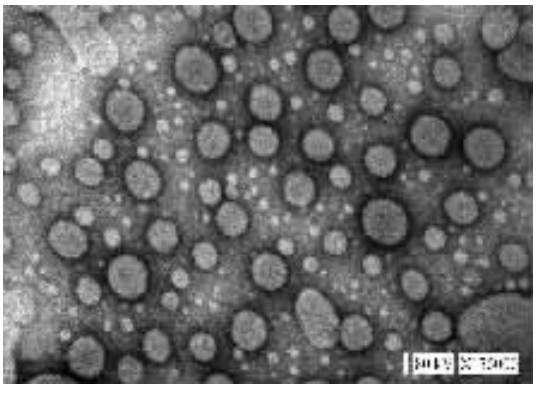


图 4 透射电镜下 mEGF 乙醇脂质体形态观察

2.5 激光动态光散射仪乙醇脂质体的粒径分布

mEGF 乙醇脂质体的折光度为 4.6，可以得到一个底面积较窄，波峰尖锐的曲线。囊泡粒径大约分布在 100～500 nm 之间（图 5）。

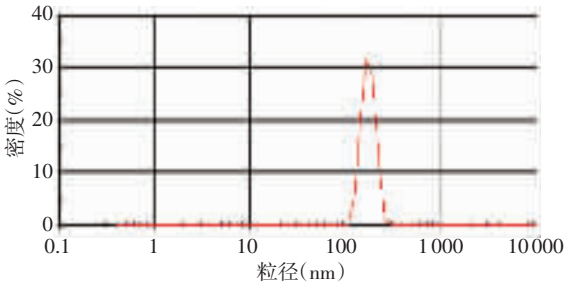


图 5 mEGF 乙醇脂质体粒径分布范围的激光动态光散射仪检测结果

3 讨论

乙醇脂质体给药系统可以包封脂溶性、水溶性药物以及多肽/蛋白类药物，对脂溶性药物的包封率较高，对于水溶性及蛋白多肽类药物的包封率偏低。乙醇脂质体给药系统的配方中可以含有体积分数 20%～50% 的无水乙醇，乙醇是有效的促渗剂。蛋白质/多肽类杆菌肽，多肽类抗生素，其乙醇脂质体给药系统的配方中含有 25% 的无水乙醇，可以穿透进入细胞质内，发挥抗菌功效[9]。环孢素 A 作为一种多肽类免疫抑制剂，其含醇脂质体给药系统中含有 20% 的无水乙醇，可以促进环孢素 A 透过皮肤角质层的吸收率[10]。将 2 种反义寡核苷酸包封进入含醇磷脂囊泡给药系统中，各自所含乙醇的浓度为 30%～50%，局部外用可以在毛乳头部位达到有效的药物浓度[11]。鼠表皮生长因子（mEGF），是一种多肽类、水溶性的细胞因子。为了保存多肽的活性和乙醇脂质体的渗透能力，我们选择了乙醇的含量为 30%。我们通过观察 mEGF 乙醇脂质体在扫描电镜下图像，只能观察到大体磷脂囊泡粒径分布较为均匀，单个磷脂囊泡的图像模糊。所以，认为普通的扫描电镜运用于观察纳米脂质体囊泡的外观和粒径的价值不大，但是，可以尝试使用场发射扫面电镜。场发射扫描电镜可以清晰观察每一个脂质体囊泡的形态。

原子力显微镜具有纳米级的分辨率，对纳米生物材料的研究新颖而有效，而且可以获得生物膜表面的结构。原子力显微镜近几年较多的被运用于测量和观察脂质体囊泡的粒径。在低倍视野下，我们可以观察到纳米脂质体囊泡粒径大小的均匀度。在高倍视野下，我们可以观察单个纳米脂质体囊泡的外观，并且测量纳米囊泡的粒径大小。原子力显微镜的工作模式大体分为 2 种，即摩擦模式的 AFM 和轻敲模式的 DFM。我们在制作待测脂质体样品时，一般将样品滴于玻片上后干燥，使样品从原来的乳液状变成固体状，在样品被扫描的过程中，容易被探针刺破，而得到凹陷性的半球形外观或者整个囊泡都破坏。所以我们在使用原子力显微镜观察纳米脂质体囊泡的过程中，优先选择探针与样品之间作用较小的轻敲模式，即 DFM 模式。透射电镜下观察到大小、形状较为均一单室囊泡，图片清晰，所以透射电镜是观察纳米脂质体囊泡的有效工具。激光动态光散射仪测定的 mEGF 乙醇脂质体的粒度分布范围和我们的原子力显微镜、透射电镜的测量结果存在偏差，因为光散射测定的流体力学半径包含附着于脂质体囊泡表面的水分子、乙醇分子，所以较难检测到单一的乙醇脂质体囊泡的粒径。由于乙醇脂质体

囊泡之间、囊泡与水分子之间等分别带有不同的电荷，可以发生团聚现象[12]。团聚现象将导致我们检测得到的并非是单一、分散的乙醇脂质体囊泡的粒度。但是我们观察所得的曲线，底面积较小，曲线波峰较尖锐，说明待测溶液分布较为均匀。

综上所述，成功制备了mEGF乙醇脂质体，建立了测定包封率的色谱方法，该给药系统稳定性较好，乙醇脂质体囊泡粒径分布均匀，发现原子力显微镜和透射电镜是研究乙醇脂质体囊泡物理性质的有效仪器。

参考文献：

[1] Mak K K, Chan S Y. Epidermal growth factor as a biologic switch in hair growth cycle[J]. J Biol Chem, 2003, 278(28): 26120-26126.

[2] Hong J P, Jung H D, Kim Y W. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers[J]. Ann Plast Surg, 2006, 56(4): 394-398.

[3] Tarnawski A S, Jones M K. The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways[J]. J Clin Gastroenterol, 1998, 27(Suppl 1): S12-S20.

[4] Touitou E, Dayan N, Bergelson L, *et al*. Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties[J]. J Control Release, 2000, 65(3): 403-418.

[5] 陈文浩，刘玉玲. 含醇脂质体ethosomes的特性、透皮机制及应用[J]. 中国药学杂志，2003，38(7)：490-493.

[6] 何颖娜，尚京川，张晓萍，等. 高效液相色谱法测定人血浆中甲苯咪唑含量[J]. 第三军医大学学报，2005，27(20)：2086-2087.

[7] 桂莉，田洪，郑健，等. 高效液相色谱荧光法同时测定小鼠脑组织中4种氨基酸类神经递质[J]. 第三军医大学学报，2009，31(8)：675-678.

[8] Dave V, Kumar D, Lewis S, *et al*. Ethosome for Enhanced Transdermal Drug Delivery of Aceclofenac[J]. International Journal of Drug Delivery, 2010, 2(1): 81-92.

[9] Godin B, Touitou E. Mechanism of bacitracin permeation enhancement through the skin and cellular membranes from an ethosomal carrier[J]. J Control Release, 2004, 94(2/3): 365-379.

[10] Verma D D, Fahr A. Synergistic penetration enhancement effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporin A[J]. J Control Release, 2004, 97(1): 55-66.

[11] Lieb L M, Liimatta A P, Bryan R N, *et al*. Description of the intrafollicular delivery of large molecular weight molecules to follicles of human scalp skin *in vitro*[J]. J Pharm Sci, 1997, 86(9): 1022-1029.

[12] 王雪梅，吴敏，张雄. 脂质体在鼻腔给药中的应用[J]. 医药导报，2006，25(1)：46-48.

（收稿：2010-10-26 修回：2010-12-08）

（编辑 张 维）

（上接718页）

2 讨论

甲磺酸伊马替尼是慢性粒细胞白血病患者的第一线治疗方案[1]。甲磺酸伊马替尼是BCR-ABL酪氨酸激酶的抑制剂，半衰期为18 h，主要通过肝脏代谢，CYP3A4诱导剂（如地塞米松、利福平、苯巴比妥等）可使甲磺酸伊马替尼的血浆浓度降低，体质量和性别对药物代谢动力学无影响。临床常见药物副作用为恶心、皮疹、肌肉痉挛、骨痛、关节痛、腹泻、水肿，这些反应大多轻微，对症处理后可控制；重度骨髓抑制、严重肝脏毒性罕见[2]。

Ⅰ期研究结果显示甲磺酸伊马替尼的最低有效剂量为300 mg/d[3]；当剂量≥800 mg/d时，剂量相关的副作用增加，如恶心、呕吐、水肿和皮疹；最大用量可以达到1 000 mg/d，并不出现显著的毒副作用，但是随着剂量的增大，恶心、呕吐、水肿、乏力、腹泻等不良反应发生率增大[4]。

根据NCCN 2010指南，对新诊断的CML慢性期患者推荐甲磺酸伊马替尼的初始剂量为400 mg/d[1]。Cortes等[5]对CML慢性期患者进行了甲磺酸伊马替尼800 mg/d *vs* 400 mg/d作为初始剂量的Ⅲ期随机对照试验，发现与400 mg/d治疗的结果相比，接受800 mg/d治疗的患者能更快地获得完全细胞遗传学反应和主要分子学反应，但是1年的主要分子学反应2组剂量没有明显差异。

本例患者因为语音沟通障碍，误服甲磺酸伊马替尼1 200 mg/d，并且未服用任何影响甲磺酸伊马替尼血药浓度的药物，误服期间患者无明显不良反应，误服10 d后bcr/abl(+)细胞明显下降，达到部分细胞遗传学缓解；1个月后骨髓正常，非血液学实验室检查无异常。该患者bcr/abl(+)细胞下降明显，且骨髓迅速缓解，可能与服用甲磺酸伊马替尼的剂量大有关；患者误服后无明显药物副作用，可能与患者个体、种族差异有关。

总之，甲磺酸伊马替尼临床应用安全性较高，对于慢性粒细胞白血病慢性期患者是否可以提高初始剂量使其更早达到遗传学和分子学缓解，缓解速度是否是长期无事件生存的重要因素还有待进一步的临床试验研究。

参考文献：

[1] National Comprehensive Cancer Network (2010). NCCN clinical practice guidelines in oncology—Chronic myelogenous leukemia, v. 2. 2010.

[2] Mughal T I, Schrieber A. Principal long-term adverse effects of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase[J]. Biologics, 2010, 4: 315-323.

[3] Peng B, Hayes M, Racine-Poon A, *et al*. Clinical investigation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for Glivec (STI571): a novel inhibitor of signal transduction[J]. Am Soc Clin Oncol, 2001, 280.

[4] Druker B J, Talpaz M, Resta D J, *et al*. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2001, 344(14): 1031-1037.

[5] Cortes J E, Baccarani M, Guilhot F, *et al*. Phase Ⅲ, randomized, open-label study of daily imatinib mesylate 400 mg versus 800 mg in patients with newly diagnosed, previously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase using molecular end points: tyrosine kinase inhibitor optimization and selectivity study[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(3): 424-430.

（收稿：2011-01-08 修回：2011-02-20）

（编辑 张 维）