技术方法 文章编号:0253-3626(2009)06-0747-05

乳糖脂修饰苦参碱脂质体的肝靶向性和体外抑瘤作用研究

张方宇,何 松
（重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010）

【摘 要】目的:制备乳糖酰磷脂酰乙醇胺修饰的苦参碱脂质体(Lactosaminated matrine liposomes,LML),考察其在小鼠体内的肝靶向性,并研究其对人肝癌细胞系 HepG2 细胞的体外抑制作用。方法:采用逆向蒸发－短时超声法制备苦参碱脂质体 Matrine liposomes,ML),合成乳糖酰磷脂酰乙醇胺并用其修饰苦参碱脂质体得到乳糖脂苦参碱脂质体。考察其包封率及粒径,应用反相高效液相色谱法测定小鼠体内各组织中的苦参碱含量,通过 MTT 法检测 LML 对人肝癌细胞系 HepG2 的体外抑制作用。结果:LML 形态均匀,粒径分布范围为 80～150 nm,包封率为 48.1%。与苦参碱溶液(Matrine solution,M-sol)相比,普通苦参碱脂质体及乳糖脂苦参碱脂质体的体内循环时间明显延长,且乳糖脂苦参碱脂质体的肝脏药—时曲线下面积(Area under curve,AUC)值相对于苦参碱脂质体和苦参碱溶液具有显著性差异（$P<0.05$）。LML 组中的肝脏相对于其它脏器的靶向效率（Targeting efficiency,Te)值均大于 1,是脾脏的 2.7 倍,是肺脏的 3 倍,是肾脏的 6.6 倍,是心脏的 8.5 倍,具有显著性差异($P<0.01$)。MTT 法分析发现,当浓度为 0.5 mg/ml 时,LML、ML 及 M-sol 对人肝癌 HepG2 细胞的杀伤率分别为 51.97%、31.89%和 28.34%,前一组与后两组之间有显著差异($P<0.05$)。结论:本研究制备的乳糖脂苦参碱脂质体具有较好的体内肝靶向性和体外抑瘤作用,有望成为一种新型靶向抗肝癌药物。

【关键词】乳糖酰磷脂酰乙醇胺;苦参碱;脂质体;肝靶向性;肝癌细胞系 HepG2
【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-08

Study on targetability of lactosaminated matrine liposomes to liver in vivo and inhibition to HepG2 cells in vitro

ZHANG Fang-yu, et al
(*Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare lactosaminated matrine liposomes and to study its targetability to liver in mice and efficacy of anti-tumor activities on human hepatoma cell line HepG2 in vitro. *Methods*: The matrine liposomes were prepared using the reverse-phase evaporation-ultrasonic technique. Lactosylphosphatidy-lethanolamine(Lac-PE) was synthesized and used for modified matrine liposomes..the diameter and entrapment efficiency of it were determined. The RP-HPLC was used for the determination of matrine concentration in mice tissue. The cytotoxic effect of LML on human hepatoma cell line HepG2 in vitro was detected by thiazolyl blue (MTT)assay. *Results*: The LML were nice and uniform, the particle diameter was between 80 and 150 nm and envelopment rats was 48.1%. Compared with matrine solution, ML and LML exhibited long circulation time. Tissue distribution results proved that the area under curve of liver was significantly difference among modified matrine liposomes, regular matrine liposomes and matrine solutions($P<0.05$). The accumulation of LML in the mice liver was 2.7 times as in the spleen, 3 times as in the lung, 6.6times as in the kidney, and 8.5 times as in the heart($P<0.01$). The inhibitory rate of LML、ML and M-sol on HepG2 ceells were 51.97%, 31.89% and 28.34% at the concentrations of 0.5mg/ml, respectively. And there were markd difference between the former and the latter two($P<0.05$). *Conclusion*: The preparation method of LML is simple and repeatable. LML showed a good liver-targeted efficiency in mice and high killing effects on hepatic carcinoma cells in vitro.

【Key words】Lactosylphosphatidylethanolamine(Lac-PE); Matrine; Liposome; Liver targeting; Hepatic carcinoma cell line HepG2

苦参碱(Matrine)是中药苦参、山豆根、苦豆子的主要活性成分,具有抗炎、抗心律失常、抗动脉粥样硬化、免疫调节、抗病毒等多种药理作用[1]。特别是在治疗病毒性肝炎方面取得了良好疗效,临床结果显示对慢性乙型肝炎,肝纤维化等具有良好的治疗效果[2,3]。但临床常用的苦参碱制剂在体内吸收分

作者介绍:张方宇(1982-),男,住院医师,硕士,研究方向:肝癌的靶向治疗。
通讯作者:何 松,男,教授,E-mail:hedoctor65@sina.com。
基金项目:重庆市卫生局科技基金项目(06-2-076 和 2006-B-31)。

布广泛，半衰期短，到达肝脏的药物浓度低，有一定副作用的缺点。制备苦参碱的肝脏靶向制剂，可减少药物不良反应，提高药物浓度，增强疗效，是目前苦参碱临床应用研究中的热点课题。

脂质体（Liposome）是一种良好的药物载体[4]，具有缓释作用、降低药物毒性、保护药物免受酶的降解等优点，未经修饰的脂质体进入人体内主要被网状内皮系统吞噬，而在肝、脾、肺、骨髓等组织器官中蓄积，有一定的系统靶向性，但器官靶向性差。为进一步提高肝靶向性，本实验根据肝实质细胞膜上存在能够专一性识别含有半乳糖基或乳糖基化合物的去唾液糖蛋白受体（Asialoglycoprotein receptor，ASGP-R）[5,6]，合成了乳糖酰磷脂酰乙醇胺（Lactosylphosphatidylethanolamine，Lac-PE）修饰苦参碱脂质体，期望通过 Lac-PE 与 ASGP-R 特异性结合使载药脂质体具有主动肝靶向效果，为靶向治疗肝脏疾病提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪及 Agilend 1100UV 检测器及色谱数据处理系统（美国 Agilent 公司）；RE-52A 型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；KQ2000B 超声波发生器（江苏昆山市超声仪器有限公司）；乳糖，磷脂酰乙醇胺（北京奥博星生物技术有限公司）；磷脂酰胆碱，胆固醇（上海生物化学试剂公司）；硼氢化钠（国药集团化学试剂有限公司）；苦参碱（广州白云山明兴制药有限公司）；葡聚糖凝胶 G-50（瑞典 Pharmacia 公司）；小牛血清（杭州四季青生物工程研究所）；RPMI1640 培养基（美国 Gibeco 公司）；其余试剂均为分析纯或化学纯。

实验动物：昆明种小白鼠，体重（20 ± 2）g，雌雄各半（重庆医科大学实验动物中心）。

人肝癌细胞株 HepG2 及人卵巢癌细胞株 Skov3 均由重庆医科大学附一院神经内科实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 Lac-PE 的合成和纯化[7,8] 将磷脂酰乙醇胺 50 mg 溶解于 4 ml 2:1 的氯仿 - 甲醇中，然后加入 13 ml，0.2 mol/L、pH 9.0 的碳酸氢钠缓冲液，在 40℃条件下用旋转蒸发器除去有机溶剂，加入乳糖 500 mg 及硼氢化钠 250 mg 彻底混匀，在 25℃恒温箱中温育 400 h。将反应液装入透析袋，磁力搅拌下室温透析 3 d。应用硅酸柱纯化，洗脱液为氯仿 - 甲醇的梯度配比液（9:1、7:3、5:5、3:7）最后用甲醇洗脱。收集 3:7 所得洗脱液，即为糖脂（Lac-PE）溶液，经冰冻干燥得白色粉末，低温冰箱保存备用。

1.2.2 LML 的制备 称取适量磷脂酰胆碱、胆固醇、磷脂酰乙醇胺（7:2:1 摩尔比）加 10% 摩尔比的 Lac-PE 溶于氯仿，另称取苦参碱加 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液溶解，将上述油水两相混于梨形瓶中置超声仪中水浴超声乳化形成稳定的 W/O 乳液。所得乳剂在旋转蒸发仪上减压旋转蒸发除去氯仿，再进行短时超声分散，得淡乳白色均匀液体即乳糖脂苦参碱脂质体（Lactosaminated matrine liposomes，LML）。脂质体用磷钼酸染色法染色，电子显微镜下观察形态、粒径。

1.2.3 脂质体包封率的测定 采用葡聚糖凝胶柱色谱法进行测定。分别取 LML 3 批各 0.5 ml 上葡聚糖凝胶 G-50 柱分离，取游离药物部分，过微孔滤膜后进样测定峰面积。色谱条件为：Kromasil C18 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm），乙腈 -0.01 mol/L 磷酸二氢钾（5:95）为流动相，流速 1.0 ml/min，检测波长为 215 nm，进样量为 20 μl，柱温 25℃。方法学考察显示在 0.5 ~ 50 μg/ml 内，呈良好线性关系。回归方程：Y=65.594x-2.552 1，r=0.999 8。

根据峰面积计算得到的游离苦参碱的量，以 0.5 ml LML 中苦参碱的总投药量作为总药量。按照公式：

包封率 =（W 总 -W 游离）/W 总 × 100%

计算脂质体的包封率。式中 W 总为总药量，W 游离为游离药物量。

1.2.4 LML 在小鼠体内组织分布研究

1.2.4.1 小鼠给药方案 小鼠 54 只，随机分为 18 组，每组 3 只，其中 6 组为 M-Sol，6 组为 ML，6 组为 LML。注射剂量为 20 mg/kg，尾静脉给药。分别于 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h，小鼠眼眶静脉取血，肝素抗凝，1 h 内 3 000 r/min 离心分离出血浆，然后断颈处死小鼠，取出肝、脾、肾、心、肺，生理盐水冲洗干净，滤纸吸干，-20℃保存备用。

1.2.4.2 样品预处理 血浆样品预处理：小鼠血浆 0.2 ml，加入 20% 高氯酸 0.2 ml，旋涡 3 min 混匀后，10 000 r/min，离心 10 min，取上清液加 3 ml 氯仿，漩涡混合 3 min，4 000 r/min 离心 15 min，取下层有机层，氮气吹干，残渣用 0.2 ml 流动相溶解，混匀，取 20 μl 进样，按 2.3 进行高效液相测定。计算血浆中苦参碱含量。

组织样品预处理：取小鼠肝、脾、肾、心、肺等组织，加入 1 ml 生理盐水制成匀浆，取 0.2 ml 匀浆液，加入 20% 高氯酸 0.2 ml，按血浆样品处理同法处理。计算各组织中苦参碱含量。

1.2.5 靶向性评价 通过梯形法求得各制剂在不同组织中的药物浓度 - 时间曲线下面积（AUC）值。并根据 Gupta[9] 的方法。用靶向效率（Targeting efficiency，Te），来评价 LML 的靶向性。

Te=（AUC）靶 /（AUC）非靶

1.2.6 LML 的体外细胞毒试验 取人肝癌细胞系 HepG2 稀释成 25 000/ml 的细胞悬液，接种于 96 孔板中，每孔 200 μl，加入 LML、ML、M-sol 及 1640 液（作为对照组）共 4 组。苦参碱浓度每组设 5 个，分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml，每个浓度组设 3 个复孔。37℃，5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后加 MTT（5 mg/ml）20 μl/ 孔，4 h 后吊蓝离心弃上清，加入 DMSO

200 μl/孔溶解深蓝色结晶物，振荡 10 min，放置 1 h 后在 DG3022 酶标仪上测 OD 值，测定波长 570 nm，计算杀伤率。同法用人卵巢癌细胞系 Skov3 作对照重复上述实验。

杀伤率=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%

1.2.7 统计学分析 采用 SAS 8.1 软件包进行多个样本均数比较的 F 检验和进一步两两比较的 q 检验。

2 结 果

2.1 Lac-PE 合成结果

乳糖与磷脂酰乙醇胺反应 400 h 后，测定偶联率为 45.8%，所得产物经冰冻干燥后为白色粉末状物，即 Lac-PE，合成路线见图 1。

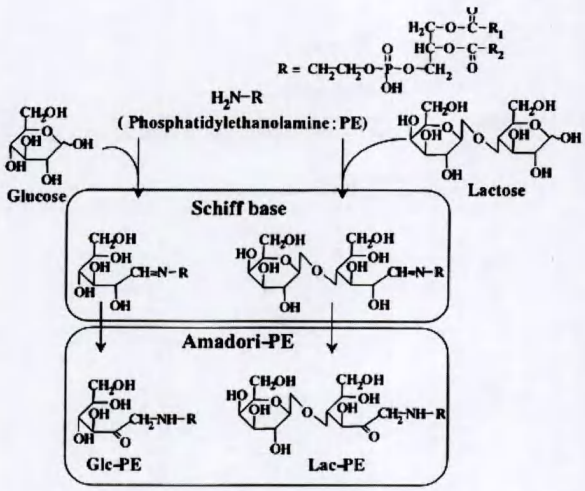


图 1 Lac-PE 合成路线

2.2 LML 制备结果

LML 为均匀、稳定的淡乳白色混悬液，电镜下观察为圆形或椭圆形小单层脂质体，粒径范围为 80 ~ 150 nm。见图 2。

2.3 LML 的包封率测定结果

LML 的包封率为 48.1%，具体结果见表 1。

2.4 LML 小鼠体内分布

小鼠尾静脉注射 M-sol、ML、LML 后，苦参碱在小鼠体内各组织中的药物浓度 - 时间曲线见图 3。在各组织药 - 时曲线下面积(AUC)值的 SNK-q 检验结果 Te 值见表 2。

2.5 LML 对人肝癌 HepG2 细胞的体外杀伤作用

LML、ML、M-sol 对人肝癌 HepG2 细胞的生长

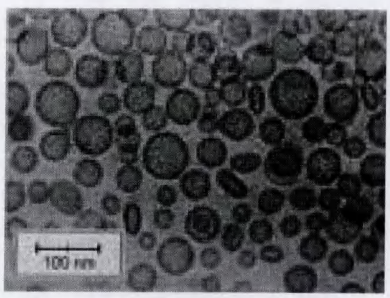


图 2 脂质体电镜照片(60 000×)

表 1 LML 的包封率测定结果

样本	包封率(%)	变异系数(%)	平均包封率(%)
1	45.6	0.42	
2	48.0	0.63	48.1
3	50.7	0.98	

表 2 不同苦参碱制剂在小鼠体内各组织药-时曲线下面积 AUC 值和 Te 值 n=3

组织	M-sol AUC(μgmin/g)	ML AUC(μgmin/g)	LML AUC(μgmin/g)	Te
肝脏	1 454.82	2 176.29*	3 034.80**	
心脏	512.35	373.65*	356.35*	8.5 △
肺脏	380.65	1 108.20**	1 013.10**	3.0 △
肾脏	909.42	635.86*	459.45*	6.6 △
脾脏	530.92	920.43*	1 108.44**	2.7△

注：*P<0.05，**P<0.01，与 M-sol 比较，△P<0.01，靶组织(肝)与非靶组织(心、肺、肾、脾)比较

表 3 不同苦参碱浓度下对 HepG2 细胞的 72 h 抑制率

苦参碱浓度 (mg/ml)	72 h 抑制率 M-sol	ML	LML
0.1	0.092 5	0.060 3	0.0914
0.2	0.128 5	0.070 5	0.1149
0.3	0.160 8	0.132 1	0.2591△
0.4	0.221 3	0.229 4	0.3189△
0.5	0.283 4	0.318 9△	0.5197△△

注：△P<0.05，△△P<0.01，与 M-sol 比较

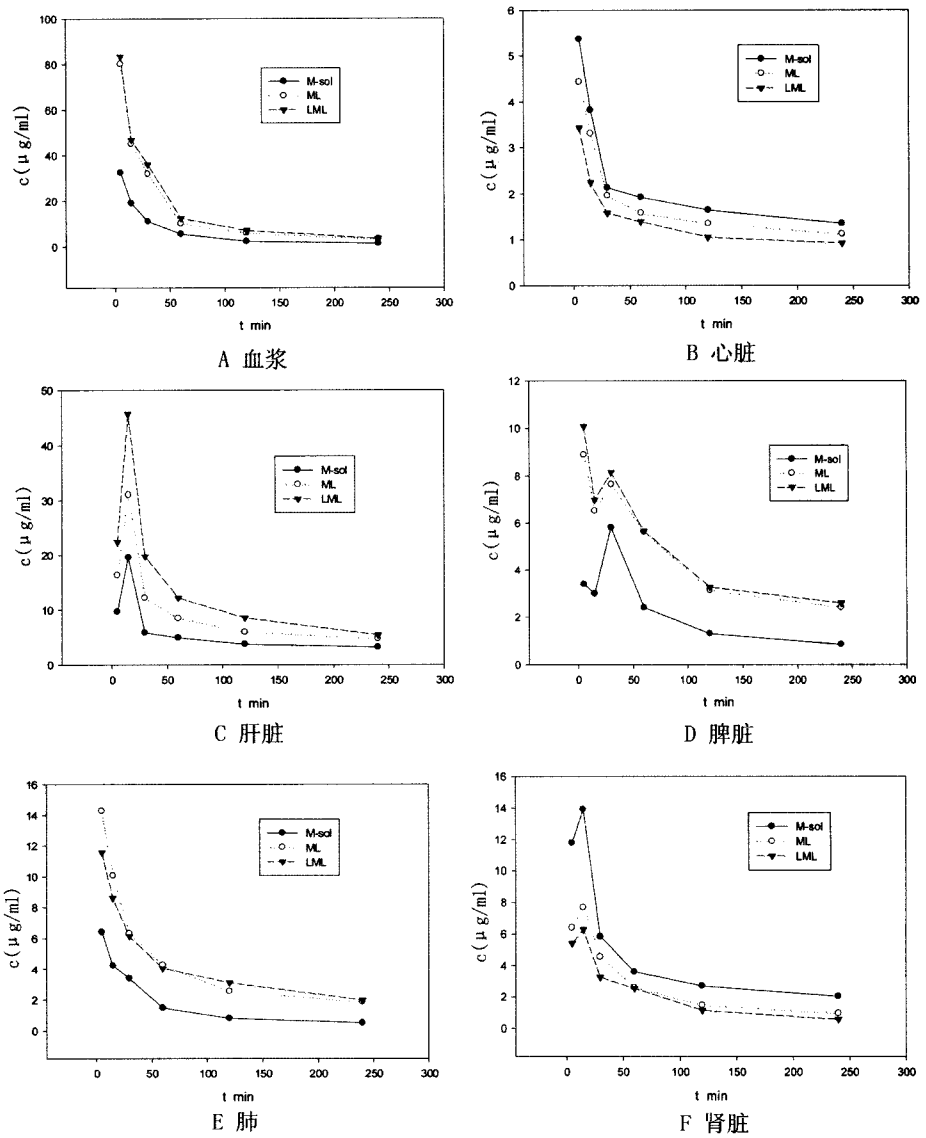


图 3　不同苦参碱制剂在小鼠体内不同组织的浓度-时间曲线（n=3）

均有抑制作用，随着苦参碱浓度的升高，抑制率亦逐渐升高，二者呈正相关。当浓度为 0.1 mg/ml 时，M-sol、ML、LML 的抑制率分别为 0.092 5、0.060 3、0.091 4，三者之间无明显差别，而浓度为 0.5 mg/ml 时，抑制率分别为 0.283 4、0.318 9、0.519 7，LML 杀伤力明显高于 ML 及 M-sol，差异具有统计学意义（P<0.05）。而上述 3 组对人卵巢癌 Skov3 的 72 h 细胞毒试验结果，在相同浓度下细胞抑制率无显著差别（P>0.05）。在不同浓度下处理 72 h 后 HepG2 细胞的抑制率见表 3

3　讨　论

脂质体作为治疗药物的载体，已进行了广泛的研究。但未加修饰的脂质体通过被动靶向过程只能达到系统水平的靶向，虽具有一定的靶向性，但没有达到器官或细胞水平的精确靶向，存在着肝脏靶向性差的缺点。为提高脂质体的肝靶向性，人们对其组成及其表面修饰进行了大量研究，如热敏脂质体的靶向传递，Ph 敏感脂质体以及表面结合特异性成分等。其中用强化材料修饰脂质体膜表面是提高其肝靶向性的一种有效途径。

哺乳动物肝细胞膜上存在有 ASGP-R，能专一性识别末端含有半乳糖或半乳糖神经酰胺、半乳糖磷脂酰乙醇胺的糖蛋白。将半乳糖基嵌入脂质体膜上，能特异性与 ASGP-R 结合，有较强的肝靶向性。乳糖与半乳糖结构上仅相差一分子葡萄糖，其肝靶向作用也得到了证实。本实验制备了乳糖酰磷脂酰

乙醇胺(Lac-PE),其为两亲性分子,具有糖基亲水头部和一个长链疏水基团能够插入脂质双分子层,而糖残基暴露在脂质体表面与 ASGP-R 特异性结合。有文献报道[10],脂质体表面的半乳糖密度必须大于一定的阈值才能达到靶向效果,我们通过单因素实验对占脂质总浓度的 5%、10%、20%(摩尔比)的包覆浓度进行了考察,结果表明,10%的 Lac-PE 对苦参碱脂质体进行包覆各方面指标最好,肝靶向性最强。

脂质体的制备工艺主要包括薄膜分散法、逆向蒸发法、乙醇注入法、冷冻干燥法等,其中薄膜分散法适用于包裹脂溶性物质,逆向蒸发法适用于包裹水溶性物质,大分子生物活性物质,如抗生素、胰岛素、免疫球蛋白等,包封率较高,制备工艺简单,重复性好。苦参碱极易溶于水,因此,本实验采用逆向蒸发法制备脂质体,而对脂质体进行短时超声能使脂质体很好地分散于水相中,提高包封率,且可使多室大脂质体变为小单层脂质体。根据文献报道[11],脂质体微粒的大小对其体内分布有直接的影响,一般认为:粒径<50 nm,可透过肝内皮,通过淋巴转入脾、骨髓等组织;粒径为 100 ~ 300 nm,被巨噬细胞吞噬,集中于肝脏;粒径为 1 ~ 12 μm 多被肺摄取。现制备的脂质体粒径为 80 ~ 150 nm,有利于实现肝靶向。

从小鼠体内药物浓度 - 时间曲线可以看出,与苦参碱溶液相比,脂质体包覆后的苦参碱在体内前期为快速释药,后期缓慢释药,且在体内的循环时间明显延长,表明脂质体到达靶部位后可释放出较多药物,迅速达到有效治疗浓度,然后缓慢释放出剩余药物,维持有效剂量,从而达到了提高疗效,减少药物剂量的作用。

从小鼠体内组织分布结果可以看出,经脂质体包覆后,苦参碱在心,肾两组织中的含量有较大的降低,表明脂质体可以降低药物的心,肾毒性。LML在肝脏的 AUC 值相对于 ML 和 M-sol 具有显著性差异($P<0.05$),而 LML 组中的肝脏相对于其它脏器的 Te 值均大于 1,是脾脏的 2.7 倍,肺脏的 3 倍,肾脏的 6.6 倍,心脏的 8.5 倍,具有显著性差异($P<0.01$),表明 LML 具有良好的肝脏靶向性。

肝细胞癌是一种癌变的肝实质细胞,其细胞膜上仍具有 ASGP-R,能够与乳糖脂修饰的脂质体特异性结合。体外试验结果表明,随着苦参碱浓度的升高,抑制率亦随之升高,在 0.5 mg/ml 时,LML 杀伤肝癌细胞的能力明显强于 ML 和 M-sol,而对非靶细胞 Skov3 卵巢癌细胞三者接近。表明 LML 对肝癌细胞有靶向杀伤作用。

本实验研究表明,乳糖脂修饰的苦参碱脂质体具有良好的体内外肝细胞靶向作用,对肝癌细胞具有特异性,高效性杀伤作用,在提高癌灶的药物有效浓度,增强药物疗效的同时,减轻了对心,肾的毒副作用,有望成为一种新型的靶向肝癌治疗药物。

参 考 文 献

[1] 刘 梅,刘雪英,程建峰.苦参碱的药理研究进展[J].中国中药杂志,2003,28(9):801-804.

[2] 李常青,李小鏖.氧化苦参碱治疗肝病的研究进展[J].热带医学杂志,2003,3(2):243-246.

[3] 熊建中,葛勤利,弥建平,等.苦参碱治疗慢性肝病之研究进展[J].中西医结合肝病杂志,2004,14(4):254-256.

[4] Manosroi A, Podjanasoonthon K, Manosroi J. Development of novel topical tranexamic acid liposome formulations[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 235(1-2):61-70.

[5] Nag A, Ghosh P C. Assessment of targeting potential of galactosylated and mannosylated sterically stabilized liposomes to different cell types of mouse liver[J]. J Drug Targeting, 1999, 6(6):427-438.

[6] Higuchi Y, Nishikawa M, Kawakami S, et al. Enhanced hepatocyte-selective in vivo gene expression by stabilized galactosylated liposome/plasmid DNA complex using sodium chloride for complex formation [J]. Mol Ther, 2004, 10(4):719-729.

[7] Oak J H, Nakagawa K, Miyazawa T. UV analysis of Amadoriglycated Phosphatidylethanolamine in foods and biological samples[J]. J. Lipid Res, 2002, 43(3):523-529.

[8] 常桂民,段芳龄,杨淑英,等.乳糖脂修饰的阿霉素脂质体体外杀伤肝癌细胞的实验研究[J].胃肠病学和肝病学杂志,1999,8(1):23-26.

[9] Gupia P K, Hungc T. Quantitative evaluation of targeted drug delivery systems[J]. Int Pham, 1989, 56(3):217-226.

[10] Rensen P C N, Sliedregt L A J M, Ferms M, et al. Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein recepter on hepatocytes in vitro and in vivo[J]. J Biol Chem, 2001, 276(40):37577-37584.

[11] Nagayasu A, Uchiyama K, Kiwada H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs[J]. Advanced Drugs Delivery Reviews, 1999, 40 (1-2):75.

(责任编辑:关蕴良)