维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-1000-03

IL-2 免疫靶向脂质体的制备及稳定性研究

朱 莉,胡春梅,赵俊义,潘黎军,王 驰

(重庆医科大学药学院药剂教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:寻求一种简便、快速、结合率高的制备白介素-2(Interleukin-2,IL-2)免疫脂质体的方法。方法:分别用戊二醛法、十一醛法、衍生化法制备 IL-2 免疫脂质体。对上述几种制备方法进行分析比较,Bradford 比色法测定 IL-2 的结合效率;离心加速实验考察脂质体稳定性。结果:十一醛法通过席夫碱一对一的结合 IL-2 和脂质体,不会引起 IL-2、脂质体自身相互交联,结合率高,稳定性好。结论:拟采用十一醛法作为后期细胞实验中 IL-2 免疫脂质体的制备方法。

【关键词】IL-2;免疫脂质体;制备;结合率;稳定性

【中图分类号】R392.33;R943 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-13

Preparation of IL-2 conjugated immunoliposomes and study on its stability

ZHU Li, et al

(*Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To search for a simple and rapid method of preparating the IL-2 conjugated immunoliposomes with high conjugate rate. *Methods*: The IL-2 conjugated immunoliposomes were prepared by Glutaraldhyde, Undecanal or Derivatization. All methods were analyzed and compared. The conjugate rate of IL-2 was determined by Bradford Assay. Centrifugal acceleration experiment served to prove the liposome stability. *Results*: IL-2 conjugated liposome by shiff's base through Undecanal didn't cause IL-2-self or liposme-self inter-cross link, and conjugate rate was high and stability was good. *Conclution*: Undecanal is suggested to prepare the IL-2 conjugated immunoliposomes for the anaphase cell experiment.

【Key words】 IL-2; Immunoliposome; Preparation; Conjugate rate; Stability

肝移植手术后,IL-2 与 IL-2 受体(IL-2R)高表达,两者结合并刺激 T 细胞克隆增殖是引发急性排斥反应(Acute rejection,AR)的关键环节。抑制 IL-2 产生及其与 IL-2R 结合的措施均可干预急性排斥反应。然而临床上应用的大多数抑制药物由于无选择性,抑制过度或不足对患者都十分不利。

IL-2 免疫脂质体是一种新型的靶向药物递送载体[1](Drug delivery system,DDS),利用该 DDS 载药,进入体内与 IL-2R 靶向结合,竞争性抑制自分泌 IL-2 与受体的结合,能有效干扰 T 细胞的活化和增殖,从而预防或降低急性排斥反应的发生率。本文就 IL-2 免疫脂质体的制备方法及稳定性进行了探讨,成功制备结合率高、稳定性好的 IL-2 免疫脂质体,为下一步进行细胞学及动物实验奠定了良好基础,同时也为进一步发展靶向 DDS 提供了实验数据。

作者介绍:朱 莉(1981-),女,硕士,研究方向:靶向制剂

通讯作者:王 驰,男,副教授,E-mail:Wchi639@163.com。

1 材料和方法

1.1 材料

蛋黄卵磷脂(上海试剂公司);胆固醇(广州天马试剂公司);IL-2(PRERO TECH);25%的戊二醛(上海生工试剂公司);十一醛(上海晶纯试剂公司);吐温-80(重庆川东化工有限公司);磷脂酰乙醇胺;(4-马来酰亚胺苯基丁酸酯)-磷脂酰乙醇胺(4-(p-maleimi dophenylbutyrylphosphatidylethanolamine,MPB-PE);琥珀酰亚胺-S-乙酰硫代乙酸酯(Succinimidyl S-acetylthioace tate,SATA);Sepharose CM 聚糖凝胶均购于美国 SIGMA 公司;Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(海门市碧云天生物技术研究所);其余试剂均为分析纯。真空旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);KQ2200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);318MC 酶标仪(上海精密仪器仪表有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 戊二醛交联法制备 IL-2 免疫脂质体 将适量卵磷

维普资讯 http://www.cqvip.com

脂、磷脂酰乙醇胺、胆固醇、吐温 -80 溶于氯仿当中，采用逆向蒸发法制备空白脂质体。取空白脂质体 1.0ml 加入 25%的戊二醛 20μl，室温静置 2h，过量的戊二醛经透析去除，透析时间 2h。加入 0.1mg/ml 的 IL-2 溶液，4℃放置 24h。2×10^4 r/min 转速下，4℃离心 30min，重复洗涤离心 2 次分离游离的 IL-2，收集沉淀脂质体重悬于 Tris-HCl 缓冲液中，置 4℃冰箱保存[2]。

1.2.2 十一醛法制备 IL-2 免疫脂质体 将适量十一醛（磷脂胆碱 / 十一醛质量比为 15 ∶ 1），卵磷脂，胆固醇，吐温 -80 溶于氯仿当中，采用逆向蒸发法制备十一醛脂质体。取 1.0ml 该脂质体加入 0.1mg/ml 的 IL-2 溶液，4℃过夜。过 Sepherose CM 柱，收集脂质体部分，置 4℃冰箱保存[3]。

1.2.3 衍生化法制备 IL-2 免疫脂质体 制备含 MPB-PE 的脂质体：取适量 MPB-PE、卵磷脂、胆固醇、吐温 -80 溶于氯仿中，采用逆向蒸发法制备 MPB-PE 脂质体。SATA 修饰 IL-2：将 IL-2 与 SATA 溶于二甲基甲酰胺（IL-2 与 SATA 的摩尔比和体积比分别为 1 ∶ 20，1 ∶ 100），25℃下反应 25min，未反应的 SATA 通过透析去除[4]。制备 IL-2 免疫脂质体：将 SATA-IL-2 加入 1.0ml 含 MPB-PE 的脂质体中（脂质与 IL-2 的摩尔比为 290 ∶ 1），充氮气，4℃下反应过夜。过 Sepherose CM 柱，收集脂质体部分，置 4℃冰箱保存。

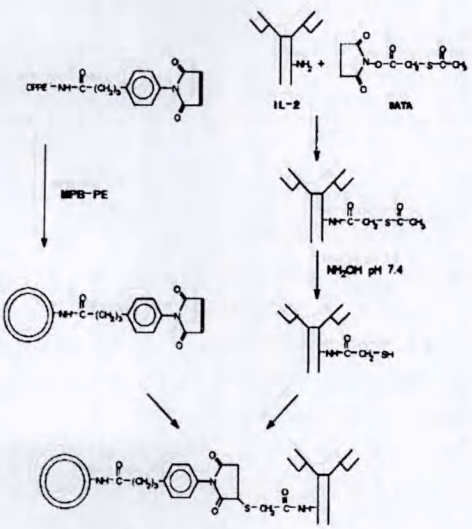


图 1 衍生化法制备 IL-2 免疫脂质体

1.2.4 IL-2 活性检测 IL-2 标准曲线的绘制：用 Bradford 比色法 [5] 制备 IL-2 标准曲线，得标准曲线方程 y=0.018 5x × 0.032 5，r=0.999 1（n=3），表明在 0.001~0.1mg/ml 的浓度范围内，线性关系良好。免疫脂质体中 IL-2 的检测：3 种方法制备的 IL-2 免疫脂质体各取一份，用 Bradford 比色法测定样本吸光度，根据 IL-2 标准曲线算出各样本中 IL-2 浓度。

1.2.5 IL-2 免疫脂质体稳定性考察 将样品于（4 ± 2）℃，相对湿度（75 ± 5）%条件下放置 1、2、3、4、5、6 周观察有无分层、凝聚等现象。并采用离心加速试验[6]，测定脂质体中 IL-2 离心前后吸光度的变化。根据公式 $K_E=(A_0-A)/A_0$ 计算稳定性参数 K_E（A_0：离心前脂质体中 IL-2 的吸光度值，A：离心后脂质体中 IL-2 的吸光度值），K_E 值越小，IL-2 免疫脂质体越稳定。

2 结 果

2.1 不同制备方法的比较

本实验对戊二醛法、十一醛法和衍生化法制备 IL-2 免疫脂质体进行了比较。以戊二醛法制备 IL-2 免疫脂质体时，随着戊二醛浓度的增加 IL-2 偶联效率也不断提高。但如果戊二醛浓度过大，会引起脂质体，IL-2 自身相互交联，还会破坏脂质体的形态[7]。选用一定浓度的戊二醛（1ml 脂质体加 25%的戊二醛 20μl）可取得相对满意的效果。十一醛法采用一定比例的磷脂胆碱 / 十一醛制备脂质体，使脂质体表面获得功能性的醛基，可直接与 IL-2 中的氨基形成席夫碱而交联，这样可完全避免脂质体，IL-2 自身相互交联。衍生化法先用 SATA 对 IL-2 进行修饰，这样IL-2 就能直接和脂质体上的 MPB-PE 结合，可通过调节 MPB-PE 的量来调节 IL-2 的量。

2.2 不同制备方法的 IL-2 结合率（见表 1）

表 1 不同制备方法的 IL-2 结合率（n=3）

方法	结合脂质体的 IL-2（mg/ml）	IL-2 结合率
戊二醛法	0.012	19.7%
十一醛法	0.037	57.6%
衍生化法	0.042	59.2%

2.3 稳定性考察结果

十一醛法和衍生化法制备的 IL-2 脂质体于（4 ± 2）℃放置 1、2、3、4、5、6 周后均未见分层、凝聚等现象，仍为均匀混悬液，稳定性良好；而戊二醛法制备的 IL-2 脂质体于第 4 周出现白色絮状漂浮物，且随时间延长而增多，但轻轻摇晃又可重新混悬。各

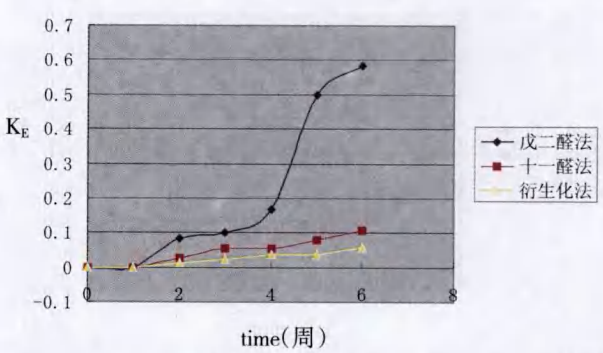


图 2 3 种方法制备的 IL-2 免疫脂质体稳定考察结果（n=3）

维普资讯 http://www.cqvip.com

样本 K_E 值变化见图 2。

3 讨 论

脂质体与 IL-2 的结合是制备 IL-2 靶向免疫脂质体的关键，本实验分别用戊二醛法、十一醛法、衍生化法 3 种方法制备 IL-2 免疫脂质体，并对其制备方法、IL-2 结合率及稳定性进行了考察。戊二醛为一种双功能交联剂，通过其醛基分别与脂质体膜材磷脂酰乙醇胺和 IL-2 上的氨基共价结合，形成脂质体 - 戊二醛 -IL-2 结合物，但制备过程中难免存在 IL-2、脂质体自身相互交联，不易定量脂质体表面功能基团，且稳定性差，随着保存时间的延长，IL-2 浓度逐渐降低。十一醛法通过双层脂质分子中暴露在水相的亲水醛基与 IL-2 上的氨基形成席夫碱而结合，防止了 IL-2、脂质体自身相互交联，并能通过改变最初与脂质混合时所使用的醛量来改变表面覆盖的范围。所制备的免疫脂质体抗体活性大大提高，且成本低，稳定性好。衍生化法是目前较先进的制备方法，结合率高，稳定性好，但 MPB-PE、SATA 成本较高，限制了该方法的推广。故本实验室拟采用十一醛法作为 IL-2 免疫脂质体的制备方法，并进一步对该方法制备的免疫脂质体的载药情况和对 IL-2 受体阳性细胞的生物学特性进行考察。

参 考 文 献

[1] Konigsberg PJ, Godtel R, Kissel T, et al. The development of IL-2 conjugated liposomes for therapeutic purposes[J]. Biochim Biophy Acta, 1998; 1370(2): 243-251.

[2] 黄锦江，黄文方，刘小琦，等.包裹碱性磷酸免疫脂质体的制备[J]. 重庆医科大学学报，2005; 30(1): 92-94.

[3] 郭 迪，潘 力，韩 璐，等.脂质体磷脂与抗体蛋白的偶联方法[J]. 华南理工大学学报(自然科学版)，2005; 33(3): 91-94.

[4] Chung-Gyu P, Natalie WT, Kyung-Mil, et al. Targeting and blocking B7 costimulatory molecules on antigen-presenting cells using CTLA4Ig-conjugated liposomes: in vitro characterization and in vivo factors affecting biodistribution[J]. Pharmaceutical Research, 2003; 20(8): 1239-1248.

[5] 叶伟民，韩焕兴，范列英，等.Bradford 比色法简便、快速测定微量蛋白[J]. 上海医学检验杂志，1996; 11(4): 207-208.

[6] 张 奇，邓英杰.冻融法制备 5- 氟尿嘧啶脂质体及其稳定性考察[J]. 沈阳药科大学学报，2000; 17(2): 87-89.

[7] 汪 冰，杨翰仪.单克隆抗体偶联脂质体的制备及其与胃癌细胞特异结合研究[J]. 沈阳药学院学报，1994; 11(1): 17-20.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 972 页)

京：科学出版社，2002.1713-1726

[4] 李志芳，林庚金.幽门螺杆菌对胃上皮细胞的凋亡作用[J].上海医科大学学报，2000; 27(2): 98-901

[5] 黄国栋，李家邦，黄媛华，等.健胃愈疡颗粒干预下大鼠胃溃疡粘膜乳腺癌相关肽和血小板活化因子的表达及与胃粘膜疏水性的相关性研究[J].中国组织工程研究与临床康复，2007; 50(12): 4169-4173.

[6] 李兆申，湛先保，许国铭.胃粘膜损伤与保护 - 基础与临床[M]. 上海：上海科技出版社，2004.107-111.

[7] Sobhani I, Denizol Y, Moizol L, et al. Regulation of platelet-activating factor production in gastric epithelial cells[J]. Eur J Clin Invest, 1996; 26(1): 53-58.

[8] Suzuki H, Miura S, Imaeda H, et al. Enhanced levels of chemiluminescence and platelet activating factor in urease-positive gastric ulcers[J]. Free Radic Biol Med, 1996; 20(3): 449-454.

[9] Yoshida N, Yoshikawa T, Ando T, et al. Pathogenesis of platelet-activating factor-induced gastric mucosal damage in rats[J]. Scand J Gastroenerol, 1989; 162(supp): 210-214.

[10] 段义民，李兆申，湛先保，等.应激性溃疡时血浆、胃粘膜组织 ET1 的变化及其意义[J]. 第二军医大学学报，1998; 5(19): 455-457.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 999 页)

完善，更具有实时性、实用性、真实性、新颖性，也能够使用户更加方便地检索信息。此外，如何与现有的 HIS 或 LIS 系统集成，实现实时自动提示警告，更好地为临床服务，也需要进一步探索。

参 考 文 献

[1] 贺 勇，涂植光. 药物对实验室检验项目的干扰[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册，2003; 24(2): 122-123.

[2] 董辉苒，苗瑞睿，苗健伟. 药物对常用临床检验指标的影响[J]. 首都医药，2006; 13(20): 37-38.

[3] Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests[M]. 5th ed. Washington: AACC Press, 2000.

[4] 王诗瑾，钱庆文，钱书虹，主编. 实验诊断与药物干扰[M]. 郑州：郑州大学出版社，2002.

[5] 李 娜，张文举. 浅谈知识化医学图书馆[J]. 中华医学图书情报杂志，2006; 15(3): 7-9.

(责任编辑：谭乐勤)