DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.032
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
552 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

技术方法

文章编号:1000-5404(2004)06-0552-03

温度对冻干脂质体物理化学稳定性的影响研究

Effects of temperature on the physicochemical stability of freeze-dried liposomes

蔡明志,王 昆,黄复生 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究温度对冻干脂质体物理化学稳定性的影响。方法 应用激光粒度仪检测冻干脂质体水化后的粒径变化,评价其物理稳定性;通过检测脂质二级过氧化物与硫代巴比妥酸反应物的吸光度和滴定分析脂质水解产物棕榈酸的方法,观察其化学稳定性。25 d内,分别对以密闭闭光形式分别储存于-18、4、25、40 ℃等条件下的冻干脂质体氧化、水解和粒径等性质进行观察。结果 冻干脂质体在40 ℃条件下时氧化程度明显高于-18、4、25 ℃,随着温度的升高,氧化速度有升高的趋势;4种条件下的冻干脂质体产生的游离脂肪酸虽然都有一定程度升高,但变化较小,且没有明显差异。粒径在40 ℃、第25天时变化较大,其它经统计学处理没有显著性差异。结论 温度对冻干脂质体的化学稳定性影响较大,而对物理稳定性影响较小,是一种很有前途的脂质体制剂形式。

近年来,脂质体作为载体在药物研究开发和分子生物学等领域的研究应用中取得了很大进展。但随着研究应用的逐步深入,人们发现脂质体药物在体外易氧化、水解渗漏、甚至颗粒凝结,不能很好地储存,因此阻滞了脂质体药物的广泛应用。从而使从事这项研究领域的部分学者对其实用性产生疑虑,并开始寻求对其进行改良的方法和路径[1]。

脂质体过氧化和水解过程是一个链式反应,高温、光照、不适的pH、磷脂酶、过氧化物酶、一些金属离子、次氯酸盐和氧化自由基等物质的存在是加速诱导脂质体氧化和水解反应的重要因素。磷脂不饱和双键氧化断裂生成的过氧化物、丙二醛(malondialdehyde, MDA),水解产生的游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)及溶血卵磷脂等,可进一步水解成甘油磷酸复合物及脂肪酸等都对人体有一定毒性。同时磷脂的氧化、水解使脂质体膜流动性降低,药物渗漏加剧,药物滞留性变差,产生聚集沉淀等现象。且这些化学不稳定性会导致脂质体颗粒聚集、破裂等物理不稳定的产生[2]。

氧化和水解反应可发生于脂质体的制备、储存和应用过程中,研究表明脂质体在液体状态下的理化性质不稳定性尤其突出。如使脂质体以固态形式存在,在临床应用前加入分散介质再形成脂质体悬液,这样不但解决了上述存在的问题,且便于运输、储存,也适用于工业化生产。本实验主要研究了冻干脂质体在一些常用储存和应用温度下的物理和化学稳定性的部分特征,以求为脂质体制剂研究提供一些指导。

基金项目:中关村科技生物医药创新研究基金资助项目(2002-2)
Supported by the Research Foundation for Innovation of Science and Technology of Biomedicine in Zhongguanchun (Beijing, China, 2002-2)
作者简介:蔡明志(1976-),男,河南省淮滨县人,硕士,医师,主要从事脂质体的制备改良及稳定性方面的研究。电话:(023)68752243
通信作者:黄复生,E-mail:fushengh@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-09-07;修回日期:2004-02-16

1 材料和方法

1.1 试剂

磷脂和胆固醇(美国Demporo公司),硫代巴比妥酸(2-thiobarbitursaure, TBA,德国Merk公司),尼罗蓝(nile blue A,美国ACROS公司),棕榈酸(palmitic acid,美国Sigma公司),其它有机溶剂和试剂均为国产(分析纯)。

1.2 仪器

旋转蒸发器RE-52AA(上海亚荣),冷冻干燥机(BenchTop,美国Virtis),紫外分光光度仪(英国Ultrospec 2100 pro),激光粒度仪(photon correlation spectroscopy zeta/sizer 3000 HSA,英国Malvern),高压微射流(美国,Microfluids)。

1.3 方法

1.3.1 冻干脂质体的制备 磷脂和胆固醇摩尔比2∶1溶于氯仿中,逆向蒸发溶剂后,再溶于一定量的蒸馏水中,经高压微射流处理为粒径均匀的脂质体,最后经24 h冷冻干燥制备成冻干脂质体。

1.3.2 样品处理 将制备的冻干脂质体迅速封口密闭于棕色瓶中;然后分成四组,分别置于-18、4、25、40 ℃的条件下闭光储存。

1.3.3 过氧化产物(2-thiobarbituric acid reaction with the secondary lipid peroxidation products, TBARS)的测定 取1 ml脂质体悬液(冻干脂质体在生理盐水中水化后形成),加入3 ml 1%(v/v)磷酸和1 ml TBA,100 ℃孵育45 min,冷却后加入4 ml正丁醇,剧烈震荡45 s,3 000 r/min离心15 min,取上层液在532 nm测吸光度,以吸光度值或MDA值表示TBARS的变化,假定MDA-TBA复合物摩尔消退系数等于1.56×10^5 mol·L^{-1}·cm^{-1},本研究以吸光度表示[3,4]。

1.3.4 FFA的测定 参照脂肪乳注射液游离脂肪酸测定方法(2000年中华人民共和国卫生部标准)。精密量取对照品溶液(1.2 mmol/L棕榈酸)和脂质体悬液各1 ml置于20 ml带塞试管中,加异丙醇-正庚烷-0.5 mol/L硫酸混合液(40∶10∶1)5.0 ml,振摇1 min,放置10 min;分别加入正庚烷2 ml,去离子水4 ml。闭塞后上下翻转10次,静置15 min以上;量取上清液3 ml于离心管中,加尼罗蓝指示剂1 ml;用0.01 mol/L氢氧化钠滴定

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

溶液由粉红色变为紫色。供试品消耗氢氧化钠体积不能大于对照品(40 mmol/L)。

1.3.5　粒度测定　　将水化后的脂质体悬液稀释到合适浓度后, 然后把样品加到比色杯中, 安放于激光粒度仪(photon correlation spectroscopy, PCS)检测槽中进行检测。

1.4　统计学处理

采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　不同温度条件下的 TBARS 变化

在 25 d 内对冻干脂质体进行了 5 次 TBARS 分析, 可以看出 40 ℃条件下冻干脂质体 TBARS 明显较－18、4、25 ℃升高的快。同时可以看出在－18、4、25 ℃条件下冻干脂质体 TBARS 均保持在较低水平, 说明只有温度升高到一定程度才会对冻干脂质体的氧化产生明显影响, 见图 1。

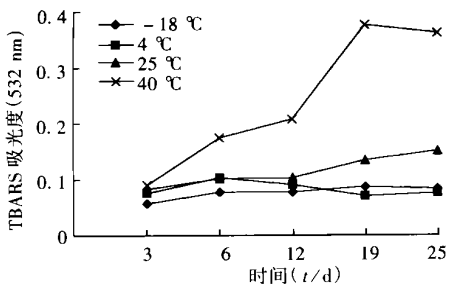


图 1　不同温度下冻干脂质体 **TBARS** 含量变化

2.2　不同温度条件下的 FFA 变化

25 d 内, 将冻干脂质体重新水化后, 进行了 5 次 FFA 滴定分析, 结果表明随着时间的延长, 冻干脂质体 FFA 含量在 4 种条件温度下都有一定程度升高, 但升高趋势并不明显; 且 4 种温度条件下 FFA 含量变化没有明显区别, 说明冻干脂质体能很好地抑制温度对脂质体水解的影响, 见图 2。

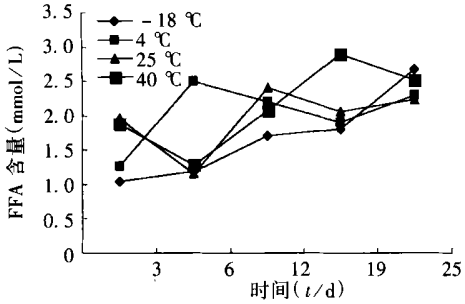


图 2　温度对冻干脂质体水解的影响

2.3　不同温度条件下的粒径变化

PCS 对生理盐水水化后的冻干脂质体粒径检测结果显示, 不同温度条件下, 储存的冻干脂质体水化后的粒径除了 40 ℃在第 25 天时由于一些理化性质改变未能检测出信号外。经 SPSS 不同温度条件下, 在考察的天数内脂质体的粒径没有显著性差异($P > 0.05$), 见表 1。

表 1　不同温度、时间冻干脂质体粒径变化(**nm**)

温度	时间				
	3 d	6 d	12 d	18 d	25 d
－18 ℃	86.3	83.7	89.2	91	89.6
4 ℃	88.4	90.6	86.8	89.2	87.8
25 ℃	92.3	88.4	84.4	90.5	89.1
40 ℃	88.7	93.2	90.1	87.2	无信号

3　讨论

目前制备脂质体的方法常见有经典镜壁法、反向抽提法、超声波法、排挤法、脱水-再水化循环法和冻融法等。以上方法有一些共同缺点, 即在脂质体制备完成前已加入药物, 需与脂质体一起以悬液形式储存, 且许多药物液态保存时易失效, 加上液态脂质体保存、运输较困难, 易凝结、沉淀和发生氧化水解等化学变化。我们的研究结果可以看到, 冻干脂质体在从－18 ℃到 40 ℃ 25 d 的时间内, 随着时间的延长, 脂质体的水解反应虽然在一定程度上有上升的趋势, 但总体看来水解都维持在较低的水平。进一步证实和说明了冻干脂质体能很好地抑制、避免脂质体水解发生、发展的理论。

磷脂分子中含有的不饱和共价键, 是其过氧化降解的关键部位。脂质氧化达到一定程度后, 会引起磷脂双分子膜断裂、脂质体融合聚集、粒径变大等一系列物理特征变化, 最终导致包封物质的泄漏、甚至产生一定毒性[5,6]。一般通过在脂质体制备过程中加入抗氧化剂如维生素 E、维生素 C 等, 改变磷脂双分子膜成分如加入胆固醇、光敏剂-姜黄素等物质, 以及避光、低温等储存方式来抑制脂质体氧化的发生程度。我们采取冻干法制备的脂质体, 在密闭、闭光－18、4、25 ℃保存时, 氧化程度都保持在较低的程度。只有在 40 ℃的条件下随着时间的延长, 脂质体氧化水平才会明显改变升高。说明冻干脂质体在一般的温度条件下, 闭光、密闭储存能很好地抑制脂质体的氧化反应。

我们制备的冻干脂质体由于采取了高压微射流的方法进行了预处理, 故脂质体的粒径能很好地保持在 90 nm 左右, 且在－18、4、25、40 ℃条件下在 25 d 内没有什么变化。但结果也显示随着脂质体氧化程度的加剧, 脂质体颗粒间开始聚集、粘附甚至融合。在 40 ℃第 25 天时 PCS 检测上体现最为明显, 由于脂质体氧化程度的升高, 导致 PCS 无法对水化后的脂质体粒径进行检测。冻干脂质体虽然较好地抑制了脂质体理化不稳定现象, 但随着温度的升高, 脂质体的氧化、水解和颗粒的聚集等性质也会发生变化。其中像磷脂的相变温度(Tc, 一般在 40 ℃左右)等就是引起这些变化的主要因素, 如环境温度超过或接近磷脂的 Tc, 磷脂脂肪酰链伸缩、弯曲、弯扭和侧向运动加速, 膜结构处于"流

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

体态”和“液晶态”，双分子膜从原来的紧密排列状态开始紊乱，膜刚性和膜厚度降低，膜通透性增加，从而使其理化稳定性发生很大的变化。另外冻干脂质体的制备工艺流程也会对其稳定性产生一定的影响，如冻干过程中的温度和降温速率都会对产生的脂质体产生很大影响[7]。

总之，冻干脂质体在适宜的温度条件下（－18、4、25 ℃）经过一定时间的储存，氧化和水解程度维持在较低的水平；重新水化后粒径分布比较稳定，是一种很好的脂质体制剂形式。由于冻干法制备的脂质体可单独制备、储存，使用时迅速地将相应药物包载进去，这样制备的载药脂质体可以有效地延长药品在体内的作用时间，降低药品的毒副作用，提高药品在体内的有效生物利用度，使脂质体原有作为药物载体的优点进一步扩大，为药物研发开辟了一个崭新的空间。

关键词：脂质体；冻干；稳定性；脂质氧化；水解
中图法分类号：R913　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Lasic D D, Papahadjopoulos D. Liposomes revisited[J]. Science, 1995, 267(5202): 1275－1276.
[2] Suggy S C, Murari R, Imran A. Liposomes(a review)[J]. Biopharm, 2001, 11(13): 10－14.
[3] Huang Y Y, Chung T W, Wu C I. Effect of saturated/unsaturated phosphatidylcholine ratio on the stability of liposome-encapsulated hemoglobin[J]. Int J Pharm, 1998, 172(5): 161－167.
[4] Panasenko O M, Evgina S A, Driomina E S, *et al*. Hypochlorite induces lipid peroxidation in blood lipoproteins and phospholipid liposomes[J]. Free Radic Biol Med, 1995, 19(2): 133－140.
[5] Fomuso L B, Corredig M, Akoh C C. Metal-Catalyzed oxidation of a structured lipid model emulsion[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(24): 7114－7119.
[6] Tang D, Borchman D. Temperature induced structural changes of beta-crystalline and sphingomyelin binding[J]. Exp Eye Res, 1998, 67(1): 113－118.
[7] Crowe J H, Crowe L M. Factors affecting the stability of dry liposomes[J]. Biochim Biophy Acta, 1988, 939(2): 327－334.

（编辑　冯崇英）

技术方法

文章编号：1000-5404(2004)06-0554-02

血管内皮-平滑肌细胞双层联合培养模型的改进

Modified co-culture model of vascular endothelial cells and smooth muscle cells

于学军，何作云，王晓燕，高凌云，牟　娇，杨生平，董琼兰　（第三军医大学新桥医院心血管内科，全军心血管内科中心，重庆 400037）

提　要：目的　建立并改进血管内皮和平滑肌细胞双层联合培养模型，为进一步研究血管内皮和平滑肌细胞间的信号传递奠定基础。方法　先分别单独培养大鼠主动脉血管内皮和平滑肌细胞，然后分别培养在聚乙烯细胞培养微孔滤膜两面，并以不同的比例重叠。结果　两种细胞重叠 1/3、2/3 和 100%，以孔径分别为 1.0 或 3.0 μm 微孔滤膜对两种细胞进行双层联合培养后，对内皮细胞的影响不明显，但对平滑肌细胞的影响则十分显著，细胞形态以“收缩型”为主，肌纤维增多，生长速度较单独培养时慢，形成单层贴壁细胞的时间延长 12～18 h，无明显“峰-谷”状态形成。结论　改进后的联合培养方法经济、简便，更适合于研究血管内皮和平滑肌细胞间的信号传递。

血管内皮和平滑肌细胞的培养，传统上多采用单种细胞培养或单层细胞联合培养的方法，这些方法与体内生理状态差异较大，且存在细胞鉴别的困难。20 世纪 90 年代以来，有人利用双层细胞培养模型，较好地解决了这些问题[1,2]。这一方法比较符合体内的生理状况，既可以观察两种细胞间信号传递情况，又可分别收集细胞，检测其它指标。但用这一模型检测 $[Ca^{2+}]i$ 在两种细胞间的运动情况时，因用于培养的微孔滤膜较薄，两层细胞的信号可能互相干扰；在进行细胞微注射时，可能刺破对面的细胞而造成伪像；此外，在上述实验中，采用牛主动脉或不同动物的血管内皮和平滑肌细胞，或取材比较昂贵，或与生理状态差异较大。为此，本实验在这些模型的基础上加以改进，采用大鼠主动脉的血管内皮和平滑肌细胞进行培养，并使两层细胞按不同比例重叠，使之更加简便、经济，并可以较好地实时检测两种细胞间 $[Ca^{2+}]i$ 信号传递的情况。

作者简介：于学军（1968－），男，河北省承德市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事高血压、冠心病方面的研究。发表论文 10 余篇。电话：(023)68774767

收稿日期：2003-12-30；修回日期：2004-02-26

1　材料和方法

1.1　实验动物

20 周龄 Wistar 大鼠 10 只，体质量 180～220 g，雌雄不拘（购自第三军医大学实验动物中心）。每次原代细胞培养取 5

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net