

脂质体肝实质细胞靶向性研究

侯新朴*, 王黎, 王向涛, 李沙

(北京大学药学院药剂系, 北京 100083)

摘要: 目的 脂质体经配体修饰后介导受体细胞, 以达靶向给药。方法 肝实质细胞上无唾液酸糖蛋白受体 (ASGP-R) 的配体无唾液酸胎球蛋白 (AF) 修饰脂质体得 AF-SSL。将 ASGP-R 重组于脂质双分子膜 (BLM) 得 ASGP-R-BLM, 与 AF-SSL 相互作用, 监测 BLM 膜电参数变化, 确定受体-配体间识别反应; 用³H 标记方法测 AF-SSL 与肝实质细胞在体内外靶向性; 将 AF-SSL 包抗癌药阿霉素 (ADM), 考察其抗癌药效。结果 ASGP-R-BLM 稳定时间随 AF-SSL 加入量增加而缩短, 表现出明显的量效关系, 证明在 ASGP-R-BLM 与 AF-SSL 之间有特异识别反应; 体外 AF-SSL 与肝实质细胞结合率明显高于无 AF 修饰脂质体 SSL (在第 10 和 90 min 时 $P < 0.05$, 在第 30 和 60 min 时 $P < 0.01$); 抗肝癌疗效, AF-SSL 组大鼠存活期显著长于无 AF 修饰组, 且对心、肾、肺的毒副作用小。结论 配体修饰脂质体达到主动靶向对应受体细胞是可行的, 本文为脂质体细胞水平靶向给药提供依据。

关键词: 肝实质细胞; 脂质体; 细胞靶向性; 无唾液酸糖蛋白受体; 配体介导

中图分类号: R943.42; R945.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)02-0143-04

Study on the hepatocytic cell targetability of liposomes

HOU Xin pu, WANG Li, WANG Xiang-tao, LI Sha

(Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Aim** To target for hepatocytic cell, liposomes was modified by special ligand. **Methods** Sterically stabilized liposomes (SSL) was conjugated with asialofetacin (AF), the ligand of asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) of hepatocyte. ASGP-R-BLM is the ASGP-R reconstructed on bilayer lipid membrane (BLM). The recognition reaction between AF-SSL and ASGP-R-BLM can be monitored by the varieties of membrane electrical parameters. The targetability of AF-SSL mediated to hepatocyte was detected by radioisotopic labeled *in vitro* and *in vivo*. The therapeutic effect of antihepatocarcinoma was observed also. **Results** The lifetime of ASGP-R-BLM decreased with the added amount of AF-SSL. It was demonstrated that there was recognition reaction between AF-SSL and ASGP-R-BLM. The combination of AF-SSL with hepatocyte was significantly higher than that of SSL without AF modified *in vitro* and *in vivo*. The survival time of rat for AF-SSL carriered ADM (adriamycin) group was much longer and the toxicities on heart, kidney and lung were lower than those SSL carried ADM group. **Conclusion** It is possible to actively target the cell with specific receptor by ligand modified liposomes. The result provide scientific basis of hepatocyte targeted liposomes.

Key words: liposomes; cell targetability; membrane receptor; ligand mediated; hepatocyte; asialofetacin

肝脏由实质细胞和非实质细胞(内皮细胞、枯否细胞)组成,肝多数病变(如肝癌、肝炎)都发生于肝实质细胞。药物与载体结合(如脂质体)进入血液循

环后,很快被网状内皮系统识别并清除,极少到达肝实质细胞,因此,研究靶向肝实质细胞的脂质体是有意义的。无唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGP-R)^[1]是肝实质细胞的特异性受体,专一识别半乳糖或末端有半乳糖残基的无唾液酸胎球蛋白(asialofetacin, AF)等。本研究将脂质体表面与 AF 偶联,使脂质体对肝实质细胞具有主动寻靶

收稿日期: 2002-02-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29992590)

* 通讯作者 Tel: 86-10-62091508, Fax: 86-10-62015584,

E-mail: houxinpu@mail.bjmu.edu.cn

功能。

双层脂膜(bilayer lipid membrane, BLM)可作为人工细胞膜^[2]。将肝实质细胞膜上受体(ASGP-R)重组于BLM上^[3],经测定BLM膜的电参数(如膜电阻 R_m)的变化,监控受体-配体间的识别反应,探讨用此模型作为配体AF修饰脂质体寻靶功能的体外实验的可行性。

材料与amp;方法

试剂 氯化卵磷脂(HEPC),从新鲜蛋黄中提取,纯化,钨碳催化氢化制得;胆固醇(Chol),北京化学试剂公司,重结晶纯化;聚乙二醇-硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG),Shearwater Polymer Inc;N-戊二酰硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-NG)^[4]本室合成;N-羟基磺基琥珀酰亚胺(S-NHS),无唾液酸胎球蛋白(AF),Sigma公司;³H-胆固醇十六烷基醚(³H-CHE)^[5],本室合成,中国原子能研究所氚标记;阿霉素(adriamycin, ADM),浙江海正制药集团;胶原酶,GIBCO-BRL公司。

仪器 ZFQ-85型旋转蒸发器,上海医械专机厂;CXP-50型浴式超声仪,北京医疗设备厂;Pharmacia-wallac 1410液闪计数仪,Turku Finland;激光散射粒度测定仪370型,Santa Barbara, USA;JF-100型多功能弱电特性分析仪,天津津科电子有限公司。

长循环脂质体(SSL)制备 精密称取氯化卵磷脂(HEPC)、胆固醇(Chol)、聚乙二酸-硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE-PEG)(2:1:0.2,摩尔比)溶于氯仿,40℃旋转蒸发成透明薄膜,加入0.120 mol (NH₄)₂SO₄溶液适量,旋涡振荡使脂膜完全脱落,60℃搅拌1 h使水化完全,60℃浴式超声30 min,得长循环脂质体SSL。

精密称取HEPC, Chol, DSPE-PEG, DSPE-NG(N-戊二酰硬脂酰磷脂酰乙醇胺)(2:1:0.2:0.2,摩尔比)溶于氯仿,其余操作同SSL。将制备的脂质体按N-羟基磺基琥珀酰亚胺(S-NHS)与脂质摩尔比10:1加入,室温反应10 min,加入AF,4℃搅拌过夜,以Sephacryl S-400柱分离,收集脂质体部分,得AF修饰长循环脂质体AF-SSL。

将SSL(或AF-SSL)按阿霉素(ADM)与脂质(1:20)加入,60℃温育30 min,得载阿霉素的脂质体ADM-SSL(或ADM-AF-SSL)。

在制备SSL(或AF-SSL)的成膜组分中加入少量³H-胆固醇十六烷基醚(³H-CHE),其余操作同SSL(或AF-SSL),得³H标记脂质体³H-SSL和³H-AF-SSL。

肝实质细胞膜上受体(ASGP-R)重组于双层脂膜(BLM),受体-配体识别反应^[6] 将大鼠肝洗净、匀浆,离心,上清液2 000 g再离心,沉淀经蔗糖梯度离心,分离纯化出肝实质细胞膜,冷冻干燥。

将EPC和Chol(5:3)溶于正癸烷,加入肝实质细胞干膜1 mg,分散均匀为成膜液。用聚乙烯小管填充饱和氯化钾琼脂盐桥,在管的另一端切得新鲜的断面,立即浸蘸成膜液少许,待溶剂挥发后,形成由盐桥支撑的重组肝实质细胞受体的BLM,即ASGP-R-BLM,介质溶液中加入脂质体AF-SSL,用微电性测定仪测定膜稳定存在的时间,以监控受体-配体识别反应。

脂质体与肝实质细胞的体外结合^[7] 大鼠麻醉后剖腹,分离门静脉及肝下腔静脉,插管,用预冷的无Ca²⁺的灌注液灌流至肝脏呈淡黄色,以除去残血并降低肝细胞间的钙离子浓度。然后将肝下腔静脉结扎,用蠕动泵使胶原酶溶液在门静脉与肝上腔静脉间循环灌流,37℃消化10 min,使肝细胞离散。取出肝脏,分离Hepa肝实质细胞,台盼蓝染色鉴别活细胞,加培养液调整细胞数为10⁴·L⁻¹。取离心管30支,每支加肝细胞悬液150 μL,随机分为两组,分别加入³H-SSL和³H-AF-SSL 150 μL,摇床37℃恒温振荡。于5, 10, 30, 60和90 min取出3支试管,加冰浴降温的PBS 5 mL,离心洗涤1次。取细胞沉淀,加入HClO₄ 0.2 mL,密闭过夜,然后加H₂O₂ 0.3 mL于80℃水浴消化2 h,再加入闪烁液10 mL,振摇均匀,β计数器测定1 min。

脂质体对肝实质细胞的体内寻靶^[8] δ昆明小鼠30只,随机分为两组,分别尾iv ³H-SSL及³H-AF-SSL(剂量为3.7×10³ Bq·g⁻¹)。给药后0.5, 8和24 h每组各取5只小鼠,麻醉,门静脉插管注射生理盐水除尽肝中残血。取肝脏,加胶原酶溶液于37℃摇床消化。消化液离心,沉淀洗涤3次,分别得肝实质细胞和非实质细胞。

取实质细胞与非实质细胞样品各100 μL,加HClO₄ 0.2 mL浸渍过夜,加入H₂O₂ 0.3 mL于80℃消化2 h,加入闪烁液10 mL,β计数器测定1 min。

脂质体对肝癌的疗效 δ幼龄大鼠20只,⁶⁰Co照射抑制其免疫排斥反应。照射次日麻醉,剑突下开口,暴露肝脏,将癌细胞CBRH-7971数以10⁷/只直接注入肝脏,缝合。接种后3 d,将大鼠随机分为两组,分别尾iv ADM-SSL和ADM-AF-SSL,按4 mg·kg⁻¹(以ADM计算)单剂量给药,记录大鼠存活情况。

结果

1 脂质体的制备

激光散射测定粒度,SSL的平均粒径为69.3 nm,90%的脂质体粒径小于114.4 nm。对阿霉素的包封率,ADM SSL为(92.9 ± 1.7)%(n=3),ADM AF-SSL为(94 ± 4)%(n=3)。

2 ASGP-R BLM上受体-配体识别反应

将肝实质细胞膜连同细胞膜上的无唾液酸蛋白受体ASGP-R重组于BLM上,构成肝实质细胞体外模型ASGP-R BLM,介质中加入带有对应受体的脂质体AF-SSL和游离的受体AF,监测ASGP-R BLM稳定存在的时间,见表1。

Table 1 The change of stability time of hepacyte receptor reconstituted bilayer lipid membrane (BLM) after addition of liposomes

Liposomes	Amount added	Lifetime of ASGP-R BLM/ s
AF-SSL	100 μ L	703
	200 μ L	486
	500 μ L	379
SSL	200 μ L	> 3 000
	500 μ L	> 3 000
Free AF	4 μ g	665
	20 μ g	80
	200 μ g	< 30

AF: Asialofetacin; SSL: Long circulation liposome; ASGP-R: Asialoglycoprotein receptor

从表1结果可知,随AF-SSL及游离AF加入量的增加,ASGP-R BLM的稳定时间缩短,存在量效关系,说明存在受体-配体的识别反应;相反,改变SSL加入量,ASGP-R BLM的稳定性无变化,说明不存在识别反应。

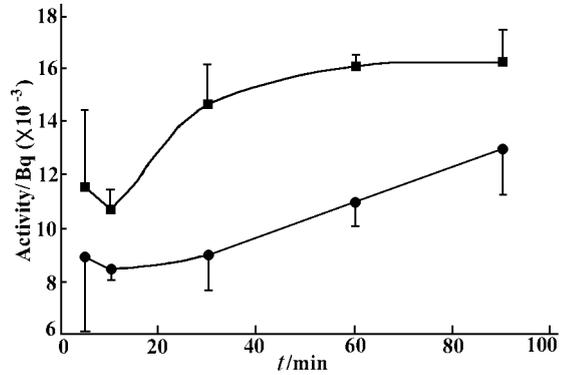
结果证明,用受体重组BLM技术,以电参数测定可快速灵敏监控受体-配体识别反应。作为体外靶细胞模型,对脂质体靶向研究提供了初步信息。

3 脂质体与肝实质细胞的体外结合

将分离的大鼠肝实质细胞,与 ^3H 标记的有AF或无AF修饰的脂质体AF-SSL和SSL分别相互结合,结果见图1。

体外结合实验表明,AF-SSL及SSL与肝实质细胞的结合从10 min开始,存在显著性差异;经60,90 min后,差异的显著性依然存在,说明脂质体经AF

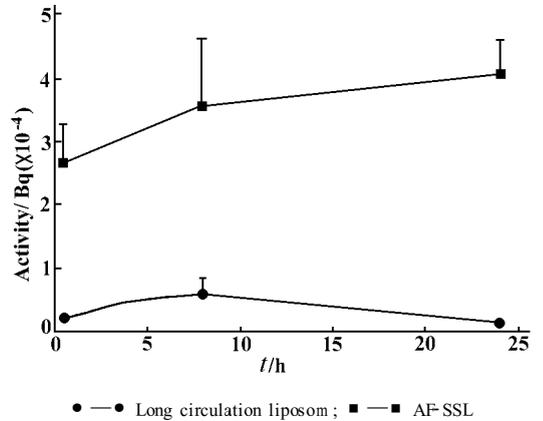
修饰后,确实能增加对肝实质细胞的结合能力。



•—• Long circulation liposome (SSL); ■—■ Asialofetacin (AF)-SSL
Figure 1 Incorporation of liposomes by isolated hepatocytes

4 脂质体对肝实质细胞的体内寻靶

结果证实,经AF修饰后,脂质体与肝实质细胞膜上ASGP-R特异相互作用而增加了被肝实质细胞的摄取量,说明AF介导脂质体达到细胞水平靶向性的可能性。



•—• Long circulation liposome; ■—■ AF-SSL
Figure 2 Distribution of liposomes in hepatocyte *in vivo*

5 脂质体的抗癌效果

单剂量给药后各组大鼠的存活情况:ADM AF-SSL组平均存活10 d,ADM SSL组平均存活7.74 d。大鼠解剖结果,ADM SSL组肝脏有微小瘤(图3),肺部出现多灶性转移,心肌有轻微水肿,肾小管有瘀血,表现出明显的毒副作用;ADM AF-SSL组肝脏凋亡小体增多,肿瘤坏死(图4),心、肾无明显异常。

综上所述,ADM AF-SSL对肝实质细胞有很好的靶向作用,抗癌效果良好,是一种有希望的细胞水平的靶向制剂。

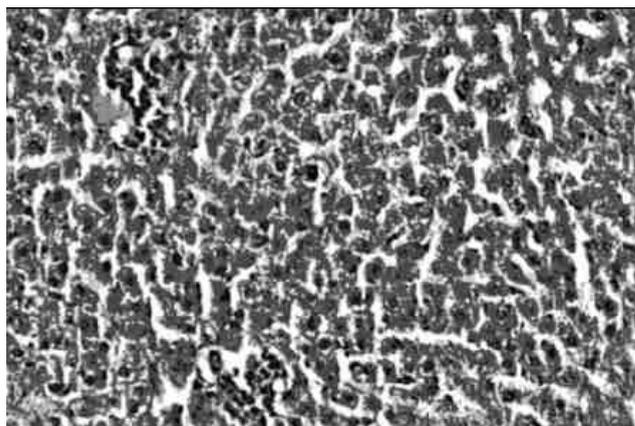


Figure 3 Small carcinoma in liver of rat iv injected ADM-SSL

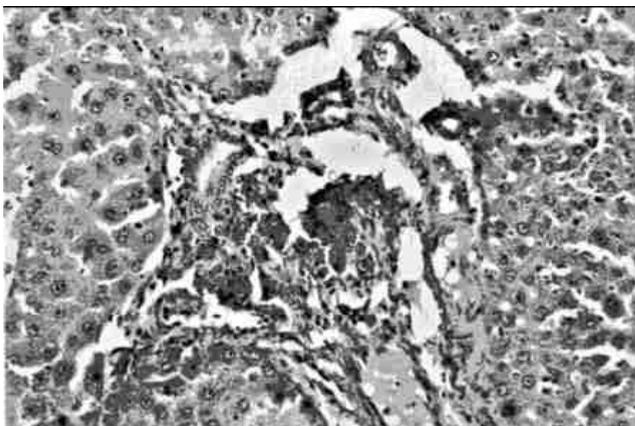


Figure 4 Carcinoma necrosis and lipid particles deposition in liver of rat iv injected ADM-AF-SSL

References :

- [1] Hashida M, Nishikawa M, Takakura Y. Hepatic targeting of drugs and proteins by chemical modification [J]. *J Controlled Release* , 1995 ,**36** :99 .
- [2] Tien HT, Ottova AL. *Membrane Biophysics : as Viewed from Experimental Bilayer Lipid Membranes (Planar Lipid Bilayers and Spherical liposomes)* [M]. Amsterdam : Elsevier , 2000 . Chaps , 4 , 10 .
- [3] Zhang YF , Wang L , Hou XP , *et al* . The effects of interactions in bilayer lipid membranes (BLM) on its electrical properties [J]. *Acta Biophys Sin (生物物理学报)* , 2000 ,**16**(4) :694 - 700 .
- [4] Wang L , Shu GM , Hou XP , *et al* . Study on targetability of asialofectuin-linked liposomes to hepatocytes in mice [J]. *J Peking Univ (Health Sci)* [*北京大学学报(医学版)*] , 2001 ,**33**(3) :251 - 254 .
- [5] Zhang YF , Xie SS , Hou XP , *et al* . Study on preparation and biodistribution of PEG-immunoliposomes with active carboxylic terminals [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)* , 2000 ,**35**(11) :854 - 859 .
- [6] Wang L , Hou XP , Ottova A , *et al* . Receptor-ligand interaction in a reconstituted bilayer lipid membrane [J]. *Electrochem Commun* , 2000 ,**2** :287 - 289 .
- [7] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells [J]. *Methods Cell Biol* , 1976 ,**13** :29 .
- [8] Wu J , Liu P , Zhu JL . Increased liver uptake of liposomes and improved targeting efficiency by labeling with asialofectuin in rodents [J]. *Hepatology* , 1998 ,**27** :772 .