PEG 修饰鳖甲肽 HGRFG 脂质体的药动学研究

方大宽,汤晗霄,盛云杰,屠珏,黄宇,赵天文,郑杭生,张永生*(浙江中医药大学,杭州 310053)

摘要:目的 制备鳖甲肽 HGRFG 脂质体以及聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰后的长循环脂质体,考察经修饰的 脂质体较未修饰脂质体在动物体内分布及滞留情况。方法 采用 BLB/c 裸鼠荧光活体成像实验,进行脂质体体内分布及 代谢研究;采用药动学实验,初步探究 2 种载药脂质体在血浆内的滞留时间。结果 2 种载药脂质体均能广泛分布于实 验动物体内。与未经修饰的脂质体载药组相比,经 PEG 修饰的长循环脂质体载药组中裸鼠荧光全部消失的时间明显延长, 药物在血浆滞留时间也明显延长。结论 经 PEG 修饰后的长循环脂质体可以延长药物在实验动物体内的滞留时间,延长 药物半衰期。

关键词:聚乙二醇;长循环;脂质体;半衰期;荧光染料

中图分类号: R944 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)09-1037-05 DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.09.002 引用本文:方大宽、汤晗霄、盛云杰、等. PEG修饰鳖甲肽 HGRFG 脂质体的药动学研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(9):

1037-1041.

Study on Pharmacokinetics of PEG-modified Trionycis Carapax Peptide HGRFG Liposome

FANG Dakuan, TANG Hanxiao, SHENG Yunjie, TU Jue, HUANG Yu, ZHAO Tianwen, ZHENG Hangsheng, ZHANG Yongsheng^{*} (*Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE Trionycis Carapax Peptide HGRFG liposome and its long-circulating liposome modified by polyethylene glycol(PEG) were prepared to study the distribution of modified liposomes and unmodified liposomes in animals. **METHODS** The BLB/c nude mouse fluorescence *in vivo* imaging experiment was used to study the distribution and metabolism of liposomes *in vivo*. The pharmacokinetic experiments were used to investigate the retention time of two different drug-coated liposomes in plasma. **RESULTS** Two different drug-coated liposomes were widely distributed in experimental animals. The retention time of fluorescence disappearance in nude mice of PEG-modified long-circulating liposome-packaging group was significantly higher than that in unmodified liposome-containing drug group. The retention time of the drug in the unmodified liposome group was significantly lower than that in the PEG-modified group. **CONCLUSION** It has been experimental animals and prolong the half-life of the drug.

KEYWORDS: PEG; long circulation; liposomes; half-life; fluorescent dyes

长循环脂质体又称立体稳定脂质体或空间 稳定脂质体(sterically stabilized liposomes, SSL)。 常见的长循环脂质体有糖脂或两亲聚合物[如聚 乙烯醇、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)衍 生物、吐温等]修饰的脂质体^[1],其中 PEG 修饰 的脂质体使用最为广泛。PEG 修饰的长循环脂质 体是通过在脂质体磷酸分子上连接 PEG 及其类 脂衍生物[如聚乙二醇-二硬脂酰磷(distearoyl phosphoethanolamine-PEG, PEG-DSPE)],使脂质 体表面暴露出一些亲水性的基团,减少与血浆中 调理成分的结合,从而增加其在血液中的稳定性^[2]。 PEG-DSPE 是两亲线型聚合物,能在脂质体表面交 叉覆盖成致密的立体位阻层,阻碍单核吞噬细胞 系统(mononuclear phagocyte system, MPS)。且 PEG-DSPE能增强脂质体的溶剂化作用,降低 MPS 对脂质体的亲和力^[3]。传统脂质体虽然也能延长药 物在体内的滞留时间,且制备简单,成本较低;但 其在体内的稳定性较差,本研究在制备脂质体的基 础上,用 PEG 进行修饰,比较 PEG 修饰前后脂质 体在动物体内滞留情况及对药物半衰期的影响。

本研究采用 DiR 碘化物荧光染料分别标记了 PEG 修饰前后的脂质体,并对 BLB/c 裸鼠进行了 不同时间的荧光成像^[4],探究 PEG 修饰前后脂质 体在裸鼠体内的滞留情况。本课题组在前期研究 中发现,鳖甲肽 HGRFG 可抑制大鼠肝星状细胞活 化^[5],但其半衰期很短,需频繁给药,故采用脂质

Chin J Mod Appl Pharm, 2019 May, Vol.36 No.9 • 1037 •

作者简介:国家自然科学基金项目(81573700);浙江省自然科学基金项目(LY16H280004)

作者简介:方大宽,男,硕士生 Tel: 15990165466 E-mail: 839375548@qq.com ^{*}通信作者: 张永生,男,研究员 Tel:

⁽⁰⁵⁷¹⁾⁸⁶⁶¹³⁷⁶³ E-mail: alex.yszhang@zcmu.edu.cn

中国现代应用药学 2019 年 5 月第 36 卷第 9 期

体进行包封,静脉注射给药。HGRFG 为多肽类药物,在血液中不易被检测到,故采用 5-羧基荧光素(5-carboxy fluorescein, 5-FAM)基团对 HGRFG 进行修饰得到 HGRFG-5-FAM(5-FH),以便于采用荧光分光光度法进行检测^[6]。本研究采用 DSPE-PEG2000 修饰的脂质体包封 5-FH,在 SD 大鼠上进行药动学研究,探究其在大鼠体内的代谢情况。

1 材料

1.1 仪器及试剂

MiniExtruder 脂质体挤出仪及聚碳酸酯膜(加 拿大 Avestin 公司); RE 52-99 型旋转蒸发仪(上海 亚荣生化仪器厂); SHB-III型循环水式多用真空水 泵(郑州长城科工贸有限公司); 镀碳支持膜铜网 [中镜科仪(北京)膜科技有限公司]; H-7650 型透射 电子显微镜(日本 Hitachi 公司); Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度分析仪(英国 Malvern 公司); IVIS Lumina LT 型小动物成像系统(美国 Caliper 公司)。

蛋黄卵磷脂 PC-98T(EPC, 上海艾韦特医药科 技有限公司, 批号: AL14015); 胆固醇(Chol, 上 海艾韦特医药科技有限公司, 批号: B40333); mPEG2000-DSPE(上海艾韦特医药科技有限公司, 批号: B50845); DiR(美国 Sigma 公司, 批号: 071M1271V); 氯仿(西陇化工股份有限公司, 批号: 071M1271V); 5-FH(吉尔生化有限公司, 批号: P160704-CQ516315)。

1.2 动物

SD 大鼠, 3, 清洁级, 6 周龄, 200~220 g; BALB/c 裸鼠, 3, SPF 级, 4 周龄, 体质量(20±2)g, 许可证号分别为 SYXK(浙)2013-0184, SCXK(浙) 2013-0058, 经浙江中医药大学实验动物伦理委员 会批准进行动物实验。

2 方法

2.1 脂质体的制备

精密称取 EPC、Chol(物质的量比为 2:1)置于 茄型瓶中,加入适量氯仿,然后加入 DiR 染料, 振摇至溶液澄明。避光,40 ℃水浴旋转蒸干氯仿, 直至茄型瓶中形成一层薄膜。在茄型瓶中加入 2 mL PBS,充分振荡,使薄膜溶解,得到脂质体 混悬液,于 60 ℃水浴孵化 30 min。接着用 MiniExtruder LF-1 进行挤压,通过孔径 50 nm 的 聚碳酸酯膜 15 次,即得含有 DiR 的空白非长循环 脂质体(DiR-LP)。采用后插法将 mPEG2000-DSPE 与 DiR-LP 室温 25 ℃进行孵育 48 h,即得 PEG 修

2.2 DiR-SSL 及 DiR-LP 表征检测

取少量 DiR-SSL 及 DiR-LP 溶液,常温下稀释 一定倍数后,以激光纳米粒度分析仪测定粒径及 多分散系数(polydispersity index, PDI)。

在镀碳支持膜铜网滴加少量稀释后的脂质体 样品,用滤纸吸干多余样品,静置片刻后滴加3% 的磷钨酸(pH 7.0)水溶液于铜网上进行负染,20 s 后立即用滤纸吸干多余染色液,待铜网干燥后, 将其置于透射电子显微镜中进行观察并拍摄。

2.3 HF 及 HFL 中 5-FH 含量的测定

2.3.1 标准曲线的制备 精确称取 5-FH 样品 10 mg,用 PBS 溶解后,转移到 10 mL 量瓶中,加 入 PBS 调整至刻度,配制 1 000 mg·L⁻¹的 5-FH 储 备液。精密吸取 5-FH 储备液,用超纯水释成 2.0, 6.0, 10.0, 20.0, 40.0 mg·L⁻¹的一系列标准液,每 孔 100 μL 吸取至微孔板中,于激发/发射光 492/518 nm 条件下测定荧光强度。以荧光强度(*I*) 为纵坐标,浓度(*c*, mg·L⁻¹)为横坐标,制作 5-FH 标准曲线,得出回归方程。

2.3.2 精密度试验 分别精密量取适量 "2.1"项 下方法所制 HF 和 HFL 标准品储备液,每份样品 在 1 d 内不同时间点测定 5 次,考察日内精密度。 2.3.3 超滤离心法检测 HF 及 HFL 的包封率 在 离心管中加入 "2.1"项下制备的等量稀释后的 HF 和 HFL,充分混匀形成脂质体混悬液,使得最终 体积相同。55 ℃孵育 15 min,冷水降温。接着将 HF 和 HFL 分别加入超滤离心管(100 kDa,4 mL) 在 4 000×g 下离心 25 min。收集滤液,按 "2.3.1" 项下条件测定滤液中 5-FH 含量(C_1),多次试验。 根据药物总浓度 C_0 =1.5 mg·mL⁻¹,计算包封率。 包封率=(1- C_1/C_0)×100%。

2.4 DiR-SSL 在 BALB/c 裸鼠的活体荧光成像

将制备好的 DiR-SSL 和 DiR-LP 用 PBS 适当稀释,按体质量以相同剂量尾静脉注射于正常 BALB/c 裸鼠,分别于注射后 0.25,0.5,1,2,4,8,24,32,48 h 置于活体成像仪仰卧位拍摄(拍摄前/时异氟烷麻醉),在 748/780 nm 的激发/发射波长下进行拍摄。

2.5 HFL在SD大鼠血浆中的定量分析

2.5.1 标准曲线的制备 精确称取 5-FH 样品

10 mg,用 PBS 溶解后,转移到 10 mL 量瓶中,加 入 PBS 调整至刻度,配制 1 000 mg·L⁻¹的 5-FH 储 备液,于 4 ℃条件下保存。准备若干只大鼠自由 摄食和饮水,适应饲养环境 7 d 后,用 10%水合氯 醛麻醉后心脏采血,将血样置于肝素(1:100,下 同)管中抗凝,于 4 ℃,3 000 r·min⁻¹离心 10 min, 取上清液,得空白血浆,置于离心管中可立即使 用。将上述制的 5-FH 储备液用空白血浆稀释得浓 度为 2.5, 5, 10, 20, 25 mg·L⁻¹的系列溶液。每 孔 100 µL,吸取 5-FH 系列溶液至微孔板中,于 "2.3.1"项下条件测定荧光强度。

2.5.2 药动学试验 取 SD 大鼠 12 只,在适应环 境饲养 7 d 后进行试验,给药前禁食 12 h,自由饮 水,分为 2 组,每组 6 只。按 5 mg·kg⁻¹的给药剂 量以及 1 mL·kg⁻¹给药体积(根据"2.3.3"项下方法 所测包封率配置相同浓度的 HF 和 HFL 给药),分 别对 2 组 SD 大鼠尾静脉注射 HF、HFL。于给药 后 0.25,0.5,1,2,4,8,10,24 h 眼眶静脉丛 取血 0.5 mL。将血样置于离心管中,用肝素抗凝, 置于 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清,吸取不同 时间所得上清(每孔 100 μL)至微孔板中,按"2.3.1" 项下条件测定荧光强度。

2.6 统计学分析

实验数据采用 SPSS 20 统计软件进行分析处 理,统计结果用 x ± s 表示,首先进行正态性检验。 符合正态分布的数据,均数比较用单因素方差分 析(One-Way ANOVA),若方差齐,两两比较采用 最小显著差法(LSD),若方差不齐则采用独立样本 t 检验进行两两比较,采用非齐次方差结果;如不 符合正态分布,则用非参数检验进行统计分析。

3 结果

3.1 形态、粒径及多分散系数

DiR-SSL及DiR-LP的形态分布见图1。透射 电镜下观察到2种脂质体大小分布较为均匀,囊 泡间轻微聚集。测得DiR-SSL平均粒径89.07 nm, 多分散系数0.172,Zeta电位-28.4 mV;DiR-LP 平均粒径 84.79 nm,多分散系数 0.071, Zeta 电位 -29.4 mV。



图 1 脂质体显微照片(100 000×) Fig. 1 Liposome photomicrograph(100 000×)

3.2 包封率的测定

求得 5-FH 回归曲线方程为 y=15.95x-5.442 8, R² 值为 0.992 3,同时,精密度试验结果显示,日 内精密度 RSD 为 1.39%。

根据标准曲线计算各组被包封的药物浓度 C₁ 和药物总浓度 C₀,然后根据公式计算 5-FH 的包封 率,结果显示 HF 的平均包封率为 32.50%, RSD 值为 2.68%; HFL 的平均包封率为 28.67%, RSD 值为 3.14%。

3.3 DiR-SSL 活体成像

裸鼠活体成像,荧光分布于裸鼠全身,荧光 区域随着时间延长而缩小。注射 8 h 后,肝脏部位 仍有大面积荧光区域;注射 48 h 后,LP 组裸鼠荧 光基本消失,而 SSL 组仍有较为明显的荧光区域。 结果见图 2。

3.4 药动学参数

▲ 由空白血浆稀释成不同浓度的 5-FH 溶液,测得 的 吸 光 度 值 计 算 得 到 标 准 曲 线 方 程 为 *y*=81.302*x*-10.658;根据标准曲线方程计算各时间 点血浆中 HF 浓度,绘制 HF 及 HFL 给药组血浆中 5-FH 浓度-时间曲线,结果见图 3。采用 DAS 2.0 软件分析,计算药动学统计矩参数,结果见表 1。结果显示 HFL 组的半衰期(*T*_{1/2})比 HF 组的延长了 3.446 h;曲线下面积(AUC_{0-∞})比 HF 组多了 6.882 µg·h·L⁻¹,平均滞留时间(MRT)显著延长。



Tab. 1	Pharmacokinetic	parameters of HF	after administration	of HF and HFL in SD	$rats(\overline{x} \pm s, n=6)$
--------	-----------------	------------------	----------------------	---------------------	---------------------------------

组别	$AUC_{0\text{-}24}/\mu g \!\cdot\! h \!\cdot\! L^{-1}$	$AUC_{0\text{-}\infty}\!/\mu g \!\cdot\! h \!\cdot\! L^{-1}$	AUMC ₀₋₂₄	AUMC _{0-∞}	MRT ₀₋₂₄ /h
HF	16.612±1.606	18.750±2.519	82.004±7.198	170.307±58.445	4.908±0.493
HFL	$20.554 \pm 2.619^{1)}$	$25.632 \pm 3.076^{1)}$	115.301 ± 10.437^{1}	353.024±90.431 ¹⁾	5.703±0.495 ²⁾
组别	$MRT_{0-\infty}/h$	VRT_{0-24}/h^2	$VRT_{0-\infty}/h^2$	<i>T</i> _{1/2} /h	$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$
HF	8.358±1.555	42.075±4.839	191.634±25.158	12.960±1.244	223.104±18.437
HFL	14.511 ± 2.483^{1}	48.632±4.117	478.907±59.610 ¹⁾	16.426±1.463 ²⁾	$180.688 \pm 17.544^{1)}$

注:与HF组比较,¹⁾P<0.01,²⁾P<0.05。

Note: Compared with HF group, ${}^{1)}P < 0.01$, ${}^{2)}P < 0.05$.

中国现代应用药学 2019 年 5 月第 36 卷第 9 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2019 May, Vol.36 No.9 . 1039 •



图 2 DiR-SSL 对 BALB/c 裸鼠活体成像的影响 Fig. 2 Effect of DiR-SSL on live imaging of BALB/c Nude mice



图 3 HF 及 HFL 给药后血浆中 HF 浓度-时间曲线(*x*±*s*, *n*=6)

Fig. 3 Plasma concentration-time curves of HF after administration of HF and HFL($\overline{x} \pm s$, n=6)

4 讨论

本研究采用薄膜分散法制备鳖甲肽 HGRFG 脂质体及其 PEG 修饰后的长循环脂质体,所采用 的鳖甲肽 HGRFG 为中药鳖甲中提取的一种寡肽, 可人工合成制备,在体外水平可显著抑制大鼠肝 星状细胞活化、增殖,对肝纤维化具有潜在的治 疗作用。本研究制备的 2 种脂质体的平均粒径均 <100 nm,分布较为均匀,且电镜下脂质体形态良 好,精密度试验提示制备的 2 种脂质体在 24 h内 较为稳定,包封率测试提示本研究所采用的脂质体 制备方法可得到包封率稳定的脂质体。

BALB/c 裸鼠荧光成像结果显示,荧光分布于 裸鼠全身,且肝脏部位荧光信号强度较强,这可 能是由 PEG 修饰的脂质体的被动靶向导致的,大、 小鼠肝窦内皮细胞窗孔约为 50~150 nm^[7],而 PEG 修饰的脂质体大小在 100 nm 左右,导致 8 h后 2 组的荧光区集中于肝脏部位,且区域大小和荧光 强弱有显著差别。DiR-SSL 组区域明显大于 DiR-LP 组,48 h后 DiR-LP 组荧光区域基本消失, 而 DiR-SSL 组还有明显的荧光区域,即 48 h后 DiR-LP 组注射的药物已清除完毕,而 DiR-SSL 组 部分药物滞留于裸鼠体内。由 BALB/c 裸鼠荧光实 验结果提示,本实验制备的 PEG 修饰后的脂质体 可在裸鼠体内滞留更长时间。

药动学实验结果显示,HF 组的半衰期 *T*_{1/2}为 12.960 h,而 HFL 组的半衰期 *T*_{1/2}长达 16.426 h, 药物 HGRFG 的半衰期明显增强;除此之外,HFL 组的 AUC,MRT 和 VRT 等参数均显著增加。提 示修饰后的脂质体因 PEG 分子中大量的亲水基团 与水结合构成空间位阻,降低网状内皮系统的识 别和吞噬概率,提高了脂质体在体内的稳定性, 降低了 CL, 有效地延长了药物的滞留时间。药动 学实验结果与 BALB/c 裸鼠荧光成像结果相一致, 进一步说明了本研究所制备的 PEG 修饰后的脂质 体能延长鳖甲肽 HGRFG 在动物体内的滞留时间。

随着研究的深入, PEG 修饰的脂质体显露出 一些问题,如因为 PEG 链的空间位阻作用抑制靶 细胞对脂质体的摄取^[8-9];同一动物体内重复注射 PEG 化脂质体诱发"加速血液清除"(accelerated blood clearance, ABC)现象^[10-11]; PEG 修饰后, 脂 质体包载药物长期使用是否会刺激免疫系统,高 浓度的 PEG 修饰的脂质体是否会有毒性或者不良 反应等。在本实验中未涉及以上问题的研究, PEG 修饰后的脂质体仍需进一步研究考察。

REFERENCES

- [1] KRAFT J C, FREELING J P, WANG Z, et al. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems [J]. J Pharm Sci, 2014, $103(1) \cdot 29-52$
- [2] EVJEN TJ, HAGTVET E, MOUSSATOV A, et al. In vivo .a R, .eEGylated ... s [J]. J Control Rele monitoring of liposomal release in tumours following ultrasound stimulation [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2012, 84(3): 526-531
- [3] ALLEN T M, CULLIS P R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications [J]. Adv Drug Deliv Rev,

2013, 65(1): 36-48.

- [4] HU S J, WANG Y, QIU Y Y, et al. Targeted study of bufalin-mPEG-PLGA-PLL-cRGD on colorectal cancer in nude mice [J]. J Med Res(医学研究杂志), 2013, 42(7): 54-57.
- HU C L, TANG Y P. Synthesis of an active peptide from [5] Carapax Trionycis and its inhibitory effect on the proliferation of hepatic stellate cells [J]. J Chin Pharm Sci, 2012, 21(2): 132-135.
- TANG H X, ZHAO T W, HUANG Y, et al. Pharmacokinetics [6] and hepatic targeting of trionycis carapax peptide sterically stabilized liposome [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实 验方剂学杂志), 2017, 23(9): 68-73.
- RABANEL J M, AOUN V, ELKIN I, et al. Drug-[7] loadednanocarriers: passive targeting and crossing of biological barriers [J]. Curr Med Chem, 2012, 19(19): 3070-3102
- MISHRA S, WEBSTER PDAVIS M E. PEGylation [8] significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles [J]. Eur J Cell Biol, 2004, 83(3): 97-111.
- HONG R L, HUANG C J, TSENG Y L, et al. Direct [9] comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: is surface coating with polyethylene glycol beneficial? [J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(11): 3645-3652.
- [10] TAGAMI T, NAKAMURA K, SHIMIZU T, et al. Effect of siRNA in PEG-coated siRNA-lipoplex on anti-PEG IgM production. [J]. J Control Release, 2009, 137(3): 234-240.
- [11] ISHIDA T, MAEDA R, ICHIHARA M, et al. Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections [J]. J Control Release, 2003, 88(1): 35-42.

收稿日期: 2018-07-17 (本文责编: 蔡珊珊)