

氧化甾醇 - 磷脂脂质囊泡的制备及特性研究^{*}

汤文星¹, 郑思嘉¹, 王荣昌¹, 游秀华¹, 冷田东², 胡海燕¹, 颜光美²

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006; 2. 中山大学中山医学院, 广东 广州 510080)

摘要: 氧化甾醇 3, 19 - 二羟基 - 胆甾烷 - 24 - 酮 (DHCO) 和 3 β , 5 α , 6 β - 胆甾烷三醇 (Triol) 替代胆甾醇与大豆磷脂形成脂质囊泡的性质研究。采用乙醇注入法制备脂质囊泡, 通过测定脂溶性及水溶性荧光探针在脂质囊泡中的荧光强度变化, 考察囊泡膜流动性及通透性; 通过测定脂质囊泡中游离 DHCO 及结合 DHCO 的浓度考察 DHCO 与磷脂的结合率; 考察 DHCO/磷脂比例、超声条件对脂质囊泡粒径大小和分布的影响。结果表明, DHCO、Triol 与磷脂形成的脂质囊泡与胆甾醇 (CHOL) - 磷脂脂质囊泡的膜流动性无明显差异, 但膜通透性稍有增大。DHCO 与磷脂的结合率为 82.58%。DHCO、Triol 与大豆磷脂经简单工艺即可形成脂质囊泡。可通过调节 DHCO/磷脂比例、超声条件获得具理想粒径和外观的脂质囊泡。氧化甾醇数量庞大, 其作为脂质囊泡的新型“流动性缓冲剂”有巨大的发展潜力。

关键词: 氧化甾醇; 大豆磷脂; 脂质囊泡; 特性研究

中图分类号: R944.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529 - 6579 (2009) 04 - 0073 - 05

Preparation and Characteristics of Oxysterol-Phospholipid Vesicles

TANG Wenxing¹, ZHENG Sijia¹, WANG Rongchang¹, YOU Xiuhua¹,
LENG Tiandong², HU Haiyan¹, YAN Guangmei²

(1. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

2. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: To study characteristics of oxysterol-phospholipid vesicles using 3, 19-hydroxyl-cholestane - 24 - one (DHCO) and 3 β , 5 α , 6 β -cholestane-triol (Triol) as oxysterols, respectively. Oxysterol-phospholipid vesicles were prepared by the ethanol-inpouring method. To measure fluidity and permeability of vesicles membrane, fluorescent intensities of lipophilic and hydrophilic fluorescence probes in the vesicles were determined. The binding percentage of DHCO and phospholipid to form vesicles was obtained by determining free and combined DHCO in DHCO-phospholipid vesicles solution. The effect of the ratio of DHCO to phospholipids and ultrasonic condition on the vesicle particle sizes and polydispersion index (PDI) was also investigated. DHCO-vesicles and Triol-vesicles had no significant difference in membrane fluidity from cholesterol (CHOL) -vesicles, but resulted in larger permeability than CHOL-vesicles. The binding percentage of DHCO and phospholipid was 82.58%. The DHCO-vesicles and Triol-vesicles can be easily prepared by simple preparing process. DHCO-vesicles with desired sizes and PDI could be obtained by optimizing the ratio of DHCO to phospholipid and the ultrasound condition. Depending on a huge database of numerous steroids, oxysterols could be viewed as potential "flowability buffers" in the development of vesicles.

Key words: oxysterols; phospholipid; lipid vesicles; characteristics

* 收稿日期: 2009 - 03 - 30

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2006AA090502); 广东省医学科学基金资助项目 (B2007032)

作者简介: 汤文星 (1985 年生), 男, 硕士; 通讯作者: 胡海燕; E-mail: bird-flying73@163.com

在新型给药系统中,脂质囊泡一直是药剂学研究十分活跃的领域。脂质囊泡中最典型的代表是脂质体。脂质体是由磷脂和胆甾醇形成的脂质双分子层构成的封闭膜。磷脂是构成双分子层的主要成分;胆甾醇则具有调节双分子层(脂膜)流动性的作用,被称为脂质体的“流动性缓冲剂”。选择不同性质的磷脂,或对磷脂进行结构改造,可以制备不同理化及生理特性的脂质体。20世纪60年代,Rahman等人首先将脂质体作为药物载体,之后天然卵磷脂、脑磷脂、大豆磷脂以及合成磷脂,如二棕榈酰-DL- α 磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸等作为膜材均被广泛研究。近年来又发展了PEG修饰的合成磷脂,由这种磷脂制备的脂质体经静脉注射具有长循环的特点^[1]。

与磷脂丰富而深入的研究相比,被称为脂质体“流动性缓冲剂”的胆甾醇的研究却十分有限。3,19-二羟基胆甾烷-24-酮(DHCO)和3 β ,5 α ,6 β -胆甾烷三醇(Triol)是我们在新药研究中合成的两种氧化甾醇。其结构与胆甾醇类似(均具有胆甾烷母核结构),所不同的是母核及侧链上某些氢原子被羟基或酮基取代。我们用大豆磷脂为模材,采用乙醇注入法制备DHCO-脂质囊泡和Triol-脂质囊泡,通过测定脂溶性荧光探针芘及水溶性荧光探针钙黄绿素在脂质囊泡中的荧光强度的变化考察囊泡的膜流动性及通透性;通过测定脂质囊泡中游离及结合DHCO的多少考察氧化甾醇DHCO与磷脂的结合率。并研究了DHCO/磷脂比例、超声时间对DHCO脂质囊泡粒径大小和分布的影响。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JB-3型磁力搅拌机(上海雷磁新泾仪器有限公司);R205星海旋转蒸发器(无锡市星海王有限公司);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(无锡市星海王有限公司);JY92-2D超声波细胞粉碎机(宁波新芝);Zetasizer Nano ZS90激光粒度仪(英国马尔文公司);高效液相色谱仪(Waters1525双泵,2487双波长检测器,717 plus自动进样器,美国Waters公司);Gemini C18色谱柱(250 mm × 4.60 mm i. d. 5 μ m,美国phenomenex公司);荧光分光光度计(美国Perkin Elmer公司)。

1.2 材料

DHCO, Triol(由中山大学药学院合成,纯度>98%),注射用大豆磷脂(上海太伟药业有限公司,批号060628),胆甾醇(广州器化医疗设备有

限公司进口分装,批号060216);钙黄绿素(天津市天新精细化工开发中心);芘(Acros Organics, Belgium);氯化钴(天津市福晨化学试剂厂);Triton X-100(AMRESCO, USA);灭菌注射用水(广东神州制药厂);Sephadex G-50(Amersham Biosciences, Sweden);甲醇(色谱纯, SIGMA-ALDRICH);其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 脂质囊泡的制备^[2]

2.1.1 胆甾醇(CHOL)-脂质囊泡的制备 称取大豆磷脂0.16 g和胆甾醇0.02 g,加无水乙醇6 mL溶解,搅拌下滴入10 mL蒸馏水中,滴毕,继续搅拌5 min,减压旋转除去乙醇,加水至10 mL,加 $w=5\%$ 蔗糖溶解,探头超声匀化(200 W,超声10 s,间歇10 s,共6次),即得半透明的胶体溶液。

2.1.2 DHCO-脂质囊泡的制备 以DHCO取代胆甾醇,制备方法同2.1.1。

2.1.3 Triol-脂质囊泡的制备 以Triol取代胆甾醇,制备方法同2.1.1。

2.2 膜流动性的测定^[3]

由于芘的亲脂性较强,易分配进入脂质双分子层中。故可通过研究芘在脂质囊泡中偏振度的变化表征脂质双分子层膜流动性的变化。配制一定浓度的芘溶液,将其加入上述脂质囊泡胶体溶液中,使其最终浓度为 1.2×10^{-6} mol/L。荧光偏振的测量在LS-55型荧光分光光度计中进行,选择发射波长为373 nm,激发波长为338 nm,直接读取稳态偏振值 P 。 P 值大小与膜流动性呈反比。

2.3 膜通透性的测定

参照2.1.1,称取大豆磷脂和胆甾醇,加无水乙醇溶解后,搅拌下滴入0.01 mol/L的钙黄绿素水溶液中,滴毕,继续搅拌5 min,减压旋转除去乙醇,加pH7.4磷酸缓冲液至10 mL,加 $w=5\%$ 蔗糖溶解,探头超声匀化即得半透明的胶体溶液。分别于0,10,20,30,40,50,60 min,测定其荧光强度。根据以下公式计算泄漏率。

$$R(\%) = \frac{I_t - I_0}{I_\infty - I_0} \times 100\% \quad (1)$$

I_t 为实验过程中泄漏出钙黄绿素的荧光强度, I_0 为实验开始时的初始荧光强度,该实验中通过加入一定量的 CoCl_2 溶液对未被包封进脂质囊泡的钙黄绿素进行猝灭,然后记录背景荧光强度。 I_∞ 为加入Triton X-100(终质量分数3 g/kg)使膜结构

完全破坏后测得的总荧光强度。利用荧光光谱仪测量脂质囊泡中渗出的钙黄绿素的荧光强度, 激发波长为 490 nm, 在 520 nm 处记录钙黄绿素的发射强度。

2.4 DHCO 含量测定

2.4.1 色谱条件及系统适应性 色谱柱 Phenomenex C18 柱 (150 mm × 4.60 mm, i. d. 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (80:20); 检验波长: 203 nm; 检测温度: 35 °C; 流速: 1.00 mL/min。精密吸取 DHCO 溶液 40 μL 进样测定。

2.4.2 线性关系考察 精密称取 DHCO 10.4 mg, 置 50 mL 的容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 得 0.208 mg/mL 的 DHCO 贮备液。精密量取 DHCO 贮备液适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 DHCO 3.25, 6.50, 13.0, 26.0, 52.0, 104 μg 的对照品溶液。按以上色谱条件进样 40 μL, 以峰面积 A 对药物质量浓度 ρ (μg/mL) 作图, 得到标准曲线方程。

2.4.3 仪器精密度 精密吸取同一供试品溶液 40 μL, 重复进样 6 次, 记录 DHCO 的峰面积。

2.4.4 方法精密度 取同一批脂质囊泡 6 份, 按 2.5.3 测定 $\rho_{\text{总}}$ 的方法, 记录峰面积, 计算 DHCO 的含量。

2.4.5 加样回收率的测定 精密量取已知 DHCO 含量的脂质囊泡 2 mL, 精密加入约 8.4 mg DHCO, 混匀, 平行 6 份, 按 2.5.3 测定 $\rho_{\text{总}}$ 的方法, 计算 DHCO 的回收率。

2.5 DHCO 与磷脂结合率

2.5.1 层析柱的制备^[4-5] 称取 Sephadex G-50 约 1 g, 加约 20 mL 水, 浸泡 48 h 使其充分溶胀后, 湿法装于层析柱 (200 mm × 10 mm) 中, 填装过程避免分层。用水以 0.2 mL/min 低流速淋洗 1 h, 备用。

2.5.2 游离与结合 DHCO 的分离 分别精密量取 DHCO 脂质囊泡 1 mL 上柱, 开启蠕动泵, 用水 1 mL/min 洗脱。用试管以 1 mL/管为单位收集。每管收集液精密吸取 0.5 mL, 分别加入 1.5 mL 甲醇溶解稀释, 取 40 μL 注入 HPLC 仪进行测定。以洗脱体积为横坐标, 吸收峰面积 A 为纵坐标绘制洗脱曲线。

2.5.3 结合率的测定 精密量取 DHCO 脂质囊泡 1 mL 上柱, 用水 1 mL/min 洗脱, 收集第 4~12 mL 带有乳光的洗脱液, 水定容至 10 mL, 精密吸取 1 mL 用甲醇稀释并定容至 5 mL。用 HPLC 法测定 DHCO 质量浓度, 得到与磷脂结合的 DHCO 质量浓度 $\rho_{\text{结}}$ 。

另精密量取 DHCO 脂质囊泡 1 mL, 用甲醇稀释并定容于 50 mL 容量瓶中。用 HPLC 测定得脂质囊泡胶体溶液中 DHCO 总质量浓度 $\rho_{\text{总}}$ 。

按下式计算 DHCO 与磷脂结合率 B :

$$B(\%) = \frac{\rho_{\text{结}}}{\rho_{\text{总}}} \times 100\% \quad (2)$$

2.6 DHCO 脂质囊泡的成型性

2.6.1 DHCO: 磷脂对粒径的大小和分布的影响 选择 DHCO: 磷脂为 1:6、1:8 和 1:12, 采用乙醇注入法制备脂质囊泡。测定脂质囊泡的粒径大小和分布。

2.6.2 超声时间对粒径的大小和分布的影响 选择不同超声时间、超声次数 (间隔时间为 10 s) 制备脂质囊泡。测定脂质囊泡的粒径大小和分布。

3 结果

3.1 膜流动性

对 3 种脂质囊泡进行膜流动性测定, 其稳态偏振值 P 的平均值如表 1 所示。

表 1 CHOL 脂质囊泡、DHCO 脂质囊泡、Triol 脂质囊泡的稳态偏振值 P ($X \pm SD$, $n = 15$)

Table 1 The polarizations of CHOL-Vesicles, DHCO-Vesicles and Triol-Vesicles ($X \pm SD$, $n = 15$)

Vesicles	P
CHOL-Vesicles	0.161 ± 0.004
DHCO-Vesicles	0.160 ± 0.003
Triol-Vesicles	0.162 ± 0.006

DHCO-脂质囊泡、Triol-脂质囊泡和 CHOL-脂质囊泡的稳态偏振值 P 无显著差异 ($P > 0.05$), 表明用 DHCO 或 Triol 代替 CHOL 作为“流动性缓冲剂”制成脂质囊泡, 其膜流动性与 CHOL-脂质囊泡相似。

3.2 膜通透性

脂质囊泡的通透性采用钙黄绿素在脂质囊泡中的泄漏率 R 表示。由实验测得 $I_0 = 7.813$ 、 $I_{\infty} = 375$, 根据测得 I_t , 代入公式 (1) 得泄露率 R (图 1)。

CHOL-脂质囊泡、DHCO-脂质囊泡、Triol-脂质囊泡的平衡泄露率分别为 18.7%、30.4%、28.1%。DHCO-脂质囊泡和 Triol-脂质囊泡膜通透性略大于 CHOL-脂质囊泡。

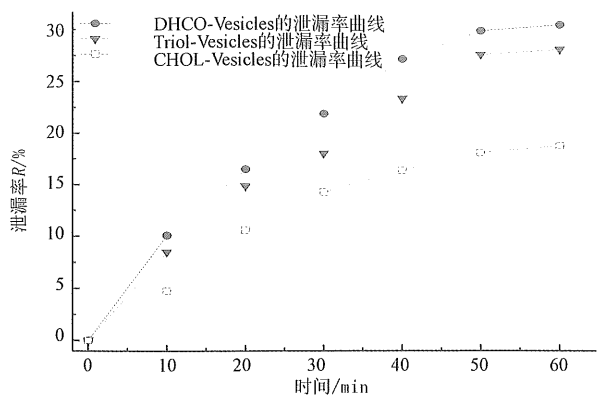


图 1 CHOL 脂质囊泡、DHCO 脂质囊泡和 Triol 脂质囊泡的泄露率

Fig. 1 The leakage percentage of CHOL-Vesicles, DHCO-Vesicles and Triol-Vesicles

3.3 DHCO 的含量测定

DHCO 的保留时间约为 6.7 min，溶剂及空白脂质囊泡对测定无干扰。DHCO 在 3.25 ~ 104 μg/mL 范围内线性关系良好。标准曲线方程为 $A = 22428\rho + 804.3$ ($r_2 = 0.9998$)。仪器精密度 RSD = 0.70%，方法精密度 RSD = 1.14%，DHCO 平均加样加收率为 102.36% (RSD = 1.28%)，结果表明该方法可行。

3.4 DHCO 与磷脂的结合率

图 2 中单峰为结合 DHCO 的洗脱特征。由于 DHCO 相对分子质量比较小，可扩散进入葡聚糖凝胶颗粒内的孔隙，被吸附于 SephadexG-50 柱上不被水洗脱。收集第 4-12 管洗脱液既能保证样品收集完全又能节约时间。

将收集的洗脱液按照 2.5.3 的方法测定并计算，DHCO 与磷脂结合率为 82.58%。

3.5 脂质囊泡的成型性

3.5.1 DHCO: 磷脂对粒径的大小和分布的影响

DHCO: 磷脂对脂质囊泡粒径和大小影响较大。

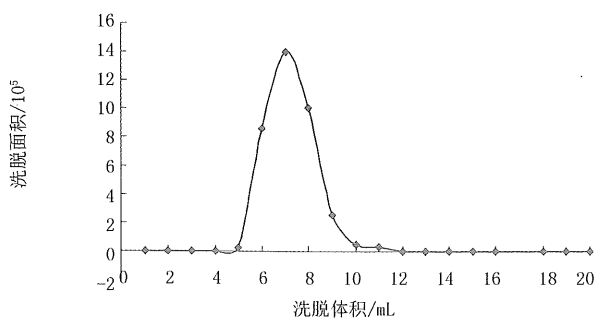


图 2 DHCO 脂质囊泡在 SephadexG-50 上的洗脱曲线

Fig. 2 The washout curve of DHCO vesicles in SephadexG-50

调整 DHCO: 磷脂为 1:8，可获得理想的脂质囊泡 (表 2)。

3.5.2 超声条件对粒径的大小和分布的影响 超声 6 次，每次 10 s，间隔 10 s 得到脂质囊泡粒径和分布较理想，在此基础上增加超声时间和次数，粒径大小和分布变化不明显 (表 3)。

表 2 DHCO/磷脂对脂质囊泡粒径大小和分布的影响 ($X \pm SD, n = 3$)

Table 2 The effects of the ratio of DHCO to phospholipid on appearance, drop sizes and PDI of vesicles ($X \pm SD, n = 3$)

DHCO: 磷脂	粒径/nm	PDI
1:6	122.0 ± 34.3	0.419
1:8	105.6 ± 18.1	0.197
1:12	101.3 ± 17.8	0.205

表 3 超声条件对脂质囊泡粒径大小和分布的影响 ($X \pm SD, n = 3$)

Table 3 The effects of ultrasound condition on the particle sizes and PDI of vesicles ($X \pm SD, n = 3$)

超声时间/(s. 次 ⁻¹)	超声次数	粒径/nm	PDI
10	3	191.8 ± 35.3	0.319
10	6	162.7 ± 28.3	0.235
10	8	156.3 ± 27.6	0.226
15	6	168.7 ± 25.9	0.261
15	8	162.3 ± 31.4	0.251

4 讨论与结论

(1) 本研究利用芘作为荧光探针来研究脂质囊泡的流动性，该探针的亲脂性较强，容易分配进入类脂双层膜中，故而可以研究脂质囊泡膜在不同组成成分下的偏振度，借以表征脂质囊泡膜流动性的变化^[2,6]。

(2) 在对脂质囊泡通透性研究过程中，我们发现，用 DHCO、Triol 代替胆甾醇后，脂质囊泡的通透性明显提高，主要原因在于对与胆固醇的结构相比，DHCO、Triol 的结构中增加了羟基等功能基团，可能由于亲水性的增加了其亲水性导致通透性稍有提高^[7]。由于氧化甾醇家族成员众多，此次实验仅做初步探索，接下来还有待对其通透性做进一步的研究。

(3) 本文所制备的 DHCO 脂质囊泡平均粒径较小且较为均匀，超速离心无法将脂质囊泡完全沉降下来。用葡聚糖凝胶柱层析法，水为洗脱液脱，DHCO 脂质囊泡可被完全洗脱，游离药物由于相对

分子质量小被吸附于凝胶柱上,从而达到分离目的。

实验中 DHCO 和 Triol 均显示具有类似胆甾醇“流动性缓冲剂”的作用。氧化甾醇胆甾烷母核羟基或酮基取代位置与数量同氧化甾醇与磷脂结合率及膜流动性与通透性等性质的“构效关系”正在进一步研究中。研究结果将促进新型脂质囊泡作为“流动性缓冲剂”的开发与运用。

参考文献:

- [1] 武博达. 影响脂质体稳定性的主要因素及对策[J]. 养殖与饲料, 2007, 6(6): 59-62.
WU Boda. The main factors affecting the stability of liposomes and the corresponding strategy [J]. Animals Breeding and Feed, 2007, 6(6): 59-62.
- [2] 史向阳, 孙曹民, 吴世康. 胶原、壳聚糖包覆的小单层脂质体的体外稳定性评价[J]. 生物物理学报, 1998, 14(4): 635-641.
SHI Xiangyang, SUN Caomin, WU Shikang, et al. The stability evaluation of Collagen, chitosan-coated small unilamellar liposomes in vitro[J]. Acta Biophysica Sinica, 1998, 14(4): 635-641.
- [3] SHINITZKY M, BARENHOLZ Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1978, 515(4): 367-394.
- [4] 姚殿军, 俞路. 脂质体及其在化妆品中的应用[J]. 日用化学工业, 1994, 6: 32-35.
YAO Dianjun, YU Lu. Liposomes and their application in cosmetics[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 1994, 6: 32-35.
- [5] 纪俊敏, 谢文磊. 脂质体作为药物载体的研究进展[J]. 郑州工程学院学报, 2002, 23(4): 68-72.
JI Junmin, XIE Wenlei. Progress in the study of liposome as drug carrier[J]. Journal of Zhengzhou Grain College, 2002, 23(4): 68-72.
- [6] LIU W Y, GUO R. The interaction between morin and CTAB aggregates [J]. J Colloid Interf Sci, 2005, 290(2): 564-573.
- [7] YOKOYAMA S, TAKEDA T, ABE M. Preparation of ganglioside GM3 liposomes and their membrane properties [J]. Colloid Surf B, 2003, 27(2-3): 181-187.
- (上接第72页)
- [10] 罗景慧. 海洋天然产物的药理学活性及西洛他唑的作用与机制研究 [D]. 广州: 中山大学, 2004.
- [11] FRISCH M J, TRUCKS G W, SCHLEGEL H B, et al. Gaussian 03, Revision C. 02 [P]. Gaussian, Inc Pittsburgh, PA, 2004.
- [12] CATTERALL W A. Structure and regulation of voltage-gated calcium channels [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000, 16: 521.
- [13] SYLVAIN R, FLORENCE L. Ca^{2+} currents in compensated hypertrophy and heart failure [J]. Cardio Res, 1998, 37: 300.
- [14] 俞庆森, 邹建卫, 胡艾希, 等. 药物设计 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 128.
- [15] KARALSON M, LOBANOV V S, KATRITZKY A R. Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies [J]. Chem Rev, 1996, 96(3): 1027.
- [16] 张朝, 翟溯澜. 心肌细胞 L 型钙离子通道分子结构与疾病 [J]. 河南大学学报: 医学版, 2007, 26(3): 1.
ZHANG Chao, ZHAI Sulan. Myocardial cells L-type calcium ion channel molecular structure and disease [J]. J Henan Univ: Med Sci, 2007, 26(3): 1.
- [17] CATTERALL W A, STRIESSNIG J. Receptor sites for Ca^{2+} channel antagonists [J]. Trend in Pharmacol Sci, 1992, 13(6): 256.