

三磷酸腺苷二钠脂质体的制备及其对心肌缺血小鼠组织能量状态的影响

皮凤梅, 屠锡德*, 吴悦

(中国药科大学, 江苏 南京 210009)

摘要: 采用离子对复合物方法制备三磷酸腺苷二钠 (ATP-2Na) 脂质体以提高包封率, 并考察其对心肌缺血小鼠组织能量状态的影响。ATP-2Na 与十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyl trimethyl ammonium bromide, HTAB) 形成离子对复合物后用乙醇注入法制备脂质体, 测定载药脂质体的粒径、表面电位等理化参数; 以 ATP-2Na 溶液为对照, 测定给药后心肌缺血小鼠血液及各组织中 ATP 浓度, 评价脂质体对提高心肌缺血小鼠组织能量状态的作用。结果表明, ATP-2Na 脂质体的平均粒径为 (144.0 ± 2.7) nm, 表面电位为 $(+16.2 \pm 1.6)$ mV, 包封率为 $(85.02 \pm 2.31)\%$, 体外释药遵循 Weibull 方程。ATP-2Na 脂质体与 ATP-2Na 溶液相比显著地提高了心肌缺血小鼠血液中的 ATP 浓度; ATP-2Na 脂质体与生理盐水相比显著提高了缺血心肌及肝组织中的 ATP 浓度, 而游离 ATP-2Na 却无此效果。表明 ATP-2Na 脂质体对提高心肌缺血动物的组织能量状态有一定的应用价值。

关键词: 三磷酸腺苷; 脂质体; 正交设计; 疏水性离子对; 缺血心肌

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1322-05

Preparation of ATP-2Na loaded liposome and its effect on tissues energy state in myocardial ischemic mice

PI Feng-mei, TU Xi-de*, WU Yue

(China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: The aim of this study is to improve liposome encapsulation efficiency of water soluble drug ATP-2Na with hydrophobic ion pairing method, and evaluate its effect on tissues energy state in myocardial ischemia mice. Ion pair complex of ATP-2Na with HTAB was prepared first; then the liposomes were prepared by ethanol injection method. The size and zeta potential of ATP-2Na liposome were investigated. Its effect on tissues energy state in myocardium ischemia mice was evaluated by detecting ATP-2Na concentration in tissues and blood after injection in comparison to ATP-2Na solution. The diameters and zeta potential of ATP-2Na liposomes were (144.0 ± 2.7) nm and $(+16.2 \pm 1.6)$ mV, respectively. The encapsulation efficiency was $(85.02 \pm 2.31)\%$. The *in vitro* drug release pattern from liposomes matches with Weibull equation. Compared with ATP-2Na solution, ATP-2Na liposome increased the ATP concentration of blood in myocardial ischemic mice very significantly; compared with blank, ATP-2Na liposome increased ATP content of myocardium and liver in myocardial ischemic mice significantly, but ATP-2Na solution didn't show this effect. ATP-2Na liposome might have an advantage in improving tissue energy state on myocardial ischemic animals.

Key words: ATP; liposome; orthogonal design; hydrophobic ion pairing; myocardial ischemia

收稿日期: 2010-06-08.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-83225350, E-mail: xidetunew@126.com

ATP 作为多种疾病的辅助治疗普遍应用于临床, 外源性 ATP 不仅能增加心肌细胞内 ATP 含量, 还可以改善缺血心肌的机械功能。但注射到体内后快速降解为腺苷, 疗效不是很令人满意^[1]。脂质体对缺血组织具有天然的保护作用, 因为缺血组织对微粒的渗透性和滞留能力比正常组织高。脂质体还可以插入或密封受损的肌细胞膜, 保护细胞免受缺血和再灌注的损伤^[2]。已有大量关于 ATP 脂质体的研究证明以脂质体作为 ATP 的药物传递系统, 可以提高药物对细胞膜的通透性及提高药物在体内的稳定性, 并提高 ATP 对心肌缺血等疾病的疗效^[3-8]。但是 ATP 半衰期短, 油水分配系数低, 脂质体制剂包封率低且容易泄漏。文献报道采用逆相蒸发法或冻融法可以得到分别为 36% 和 38% 的相对较高的包封率^[9, 10]。离子对是带相反电荷的离子在溶液中由于静电引力形成的中性物质, 通常具有足够的亲脂性能溶解到非水溶剂中。离子对的形成是由于离子最外层作用或分子间作用, 并没有形成化学键。形成离子对复合物可以不改变药物的化学结构而提高其在体内外的亲脂性^[11]。已有文献报道, 十六烷基三甲基溴化铵 (HTAB) 与反义寡核苷酸结合形成离子对复合物后制备复合物纳米粒, 可显著抑制寡核苷酸的酶代谢, 并增强细胞摄取^[12]。本文将 ATP-2Na 与阳离子表面活性剂 HTAB 形成离子对复合物后, 用乙醇注入法制备成脂质体, 显著提高了药物的包封率; 对制备的 ATP-2Na 脂质体进行了粒径分布、体外释放的考察; 以 ATP-2Na 注射液为参照, 评价了 ATP-2Na 脂质体对提高心肌缺血小鼠组织能量状态的作用。

材料与方法

药品与试剂 三磷酸腺苷二钠 (上海太平洋制药厂, 原料药); 卵磷脂 (EPIKURON200, 德固赛公司); 胆固醇 (广州化学试剂分公司, 进口分装); 十六烷基三乙基溴化铵 (南京青北科技有限公司); 葡聚糖凝胶 (Sephadex-G50, 台州市路桥桥四甲生化塑料厂); 透析袋 (上海绿鸟科技发展有限公司, MWCO10000); 甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

主要仪器 安捷伦 8453 扫描可见紫外分光光度计 (美国 Agilent 公司); LC-6A 型高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 岛津制作所); Zetasizer 3000HS 激光粒径仪 (英国 Malvern 公司); Labcomac 冷冻干燥机 (美国 Labcomac 公司); ZRS-4 智能溶出仪 (天津大学

无线电厂) 等。

动物 健康昆明种雄性小鼠, 体重 (20 ± 2) g, 由中国药科大学实验动物中心提供。

疏水性离子对复合物的制备 将 HTAB 用适量蒸馏水溶解, 加入 ATP-2Na 搅拌形成沉淀, 离心分离得到 ATP-HTAB 的离子对复合物。考察不同比例的 ATP-2Na 与 CTAB 在水中形成离子对复合物的收率。测定形成沉淀后上清液的 ATP 浓度 (C_1)、水的总体积 (V_1) 和加入的 ATP-2Na 总量 (M_1), 计算离子对复合物的收率 (收率 = $\frac{M_1 - C_1 V_1}{M_1} \times 100\%$)。

ATP-2Na 脂质体的制备 将离子对复合物与磷脂、胆固醇和十八胺按处方比例用乙醇溶解作为有机相; pH 7.5 磷酸盐缓冲液 (10 mmol·L⁻¹) 加入冻干保护剂作为水相。通过 7 号针头将有机相注入 55 °C 恒温 1 000 r·min⁻¹ 电磁搅拌的水相溶液中, 以 1 : 4 体积比混合有机相与水相, 1 h 后停止搅拌; 通过 0.22 μm 纤维素微孔滤膜过滤得到 ATP-2Na 脂质体混悬液。

脂质体粒径和表面电位的测定 用激光粒径测定仪测定脂质体的粒径及表面电位。为了优化处方中十八胺的含量, 测定了处方中十八胺与磷脂的质量比分别为 0 : 1, 0.045 : 1 和 0.09 : 1 时脂质体的表面电位。

脂质体包封率的测定 将葡聚糖凝胶柱 (Sephadex G50) 用 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 洗脱平衡后, 吸取脂质体样品 2.5 mL 上柱, 用 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液以 0.8 mL·min⁻¹ 流速洗脱, 按照洗脱曲线已确定的方法收集游离药物部分, 参考中国药典中 ATP-2Na 的含量测定 HPLC 法测定游离部分药物浓度 (C_f); 吸取脂质体 0.25 mL 于 10 mL 量瓶中, 加入 2% 曲拉通 X-100 水溶液 4 mL, 95% 乙醇 1 mL 破乳, 再用磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 定容至刻度, 测定总药物浓度 (C_t)。脂质体的包封率 = $(C_t - C_f)/C_t \times 100\%$ 。

ATP-2Na 体外释放 与人血浆等渗的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液作为释放介质^[13], 其中含有 137 mmol·L⁻¹ NaCl、3 mmol·L⁻¹ KCl、8 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 和 1 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄。采用动态透析法进行脂质体混悬液中药物的体外释放研究^[14]。精密移取 1 mg·mL⁻¹ ATP-2Na 脂质体混悬液 4 mL 于透析袋中, 两端扎牢后放入转篮中, 量取释放介质 100 mL 于 ZRS-4 智能溶出仪的小杯中, 在 37 °C、转速 100 r·min⁻¹ 下, 分别于 0、0.5、1、2、3、5、7、9、16、20 和 24 h 取

样测定介质中 ATP 浓度, 计算累计释放百分率。同时取 ATP-2Na 的磷酸盐溶液 4 mL 于透析袋中, 于 0、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、5、6 和 7 h 取样测定药物浓度, 计算 ATP-2Na 溶液在各时间点的累积释放百分率作为对比。然后用 SPSS11.5 软件处理数据并拟合释放曲线方程。

心肌缺血小鼠组织 ATP 含量测定 将 18 只健康昆明种雄性小鼠随机分为 3 组, 分别尾静脉注射生理盐水 0.2 mL, ATP-2Na 注射液 (10 mg·kg⁻¹) 和 ATP-2Na 脂质体注射液 (10 mg·kg⁻¹); 给药 3 min 后, 按 20 U·kg⁻¹ 剂量腹腔注射垂体后叶素构造急性心肌梗死小鼠模型^[15]。给药 15 min^[16]后摘眼球取血。处死动物取心、肝和脑组织, 分别按下述方法处理生物样本后, 参照中国药典 2005 版中三磷酸腺苷二钠含量测定法 (HPLC 法) 测定各组织中的 ATP 浓度。ATP-2Na 在生物样品中的浓度和其被检测到的峰面积具有较好的线性关系, 各生物样品的平均萃取回收率均在 80%~120% 内, RSD 均小于 15%, 符合生物样品分析的要求。通过 SPSS11.5 软件对测得各组织和血液中 ATP 含量进行独立样本 *t* 检验比较组间均数。

血浆样品的处理方法 血样经 3 000 r·min⁻¹ 离心分离血浆, 取上清液 100 μL 至离心管中, 加入 0.42 mol·L⁻¹ 高氯酸溶液 100 μL, 涡旋混匀以沉淀血浆蛋白, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清液约 200 μL, 加入 0.2 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 80 μL 使上清液的 pH 至 7.5, 4 °C 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后弃上清液, HPLC 法测定血浆中药物浓度。

组织样品的处理方法 用生理盐水冲洗小鼠组织后用吸水纸擦干。取适量组织精确称重于匀浆器中, 加入 0.66 mol·L⁻¹ 高氯酸 1 mL, 匀浆, 转移匀浆液至离心管中, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清液 100 μL, 加入 0.2 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 40 μL 混匀, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后再取上清液进样^[17], HPLC 法测定各组织中 ATP 的浓度。

结果

1 离子对复合物的组成

本文比较了不同的 ATP-2Na 与 HTAB 组成比例对 ATP-2Na 的收率及脂质体包封率的影响, 结果如图 1 所示。增加 HTAB 的比例可以提高最终制得脂质体的 ATP 得率和脂质体的包封率, 但高浓度的 HTAB 对于脂质体的形成不利, 故选择了 ATP-2Na 与 HTAB 的比例 1 : 1 进行下一步研究。

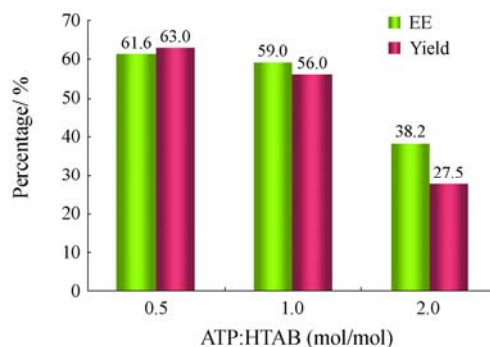


Figure 1 Effect of ATP : HTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) ratio on liposome encapsulation efficiency (EE) and ATP-2Na yield

2 脂质体处方筛选及优化

2.1 十八胺与表面电位 固定处方中胆固醇的用量, 当十八胺与磷脂的重量比分别为 0 : 1、0.045 : 1 和 0.09 : 1 时, 脂质体的表面电位分别为 (1.6 ± 0.3)、(16.2 ± 1.6) 和 (20.0 ± 1.9) mV。考虑到十八胺的安全性, 选择了十八胺与磷脂比例 0.045 : 1 为最终处方。

2.2 正交实验设计优化脂质体的基本处方 在预实验的基础上, 选择药脂比、磷脂与胆固醇比例及水相磷酸盐缓冲液的浓度为影响脂质体包封率的 3 个主要因素, 因素 4 作为误差项, 采用 4 因素 3 水平正交试验表 (表 1) 优化处方。以脂质体的包封率为指标应用正交实验设计进行了处方优化试验 (表 2)。由表 2 可知, 由各因素对应的 *K*₁、*K*₂ 和 *K*₃ 值推断得到的理论最佳处方为 A₃B₁C₁。将上述结果进行方差分析, 均方差与误差项相比进行 *F* 检验, 结果显示: 处方中药脂比、磷脂与胆固醇的比例对脂质体包封率均无显著影响; 磷酸盐缓冲液浓度对脂质体包封率影响显著。极差分析结果显示降低磷酸盐缓冲液浓度可以提高脂质体包封率。最佳处方为药物、磷脂和胆固醇重量比为 0.135 : 2.7 : 1, 磷酸盐缓冲液浓度为 10 mmol·L⁻¹。按照上述方法制备脂质体, 测得该处方 ATP-2Na 脂质体包封率为 (85.02 ± 2.31)%。

Table 1 Factors and levels of orthogonal design. A: Drug: phosphatidylcholine (weight ratio); B: Phosphatidylcholine: cholesterol (weight ratio), C: Concentration of phosphate buffer (mmol·L⁻¹)

Factor	Level		
	1	2	3
A	1 : 10	1 : 15	1 : 20
B	2.7 : 1	3.7 : 1	4.7 : 1
C /mmol·L ⁻¹	15	25	35

Table 2 Results of orthogonal design. EE: Encapsulation efficiency; K_1 , K_2 and K_3 are the average scores of level 1, level 2 and level 3 for the different factors; R is the range among the average sum scores of level 1, level 2 and level 3 for the different factors. F is the F test value of analysis of variance among factors

No	Factor				Result EE/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	63.7
2	1	2	2	2	42.5
3	1	3	3	3	28.8
4	2	1	2	3	50.7
5	2	2	3	1	30.5
6	2	3	1	2	50.8
7	3	1	3	2	52.0
8	3	2	1	3	58.5
9	3	3	2	1	62.2
K_1	45.0	55.5	57.7	52.1	
K_2	44.0	43.8	51.8	48.4	
K_3	57.6	47.3	37.1	46.0	
R	13.6	11.6	20.6	6.1	
F	6.9	4.3	13.5	-	

3 脂质体的表面电位与粒径

测得由最佳处方制得的 ATP-2Na 脂质体的表面电位为 $(+16.2 \pm 1.6)$ mV, 粒径分布如图 2 所示。平均粒径 144 nm, 多分散指数 0.198。

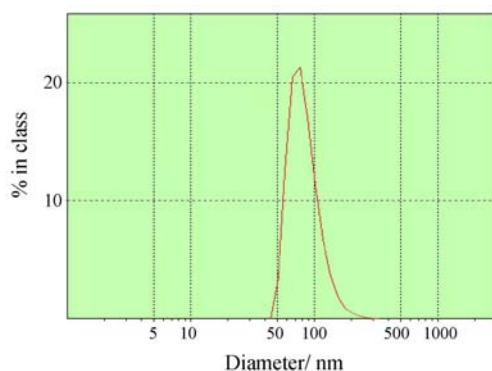


Figure 2 Particle size distribution for ATP-2Na liposome

4 脂质体的体外释放

ATP-2Na 溶液及脂质体的体外释放曲线如图 3 所示。ATP-2Na 溶液通过半透膜 7 h 左右达到平衡, 累积释放度为 $(100.07 \pm 1.13)\%$; 表明带负电荷的硝酸纤维素膜对 ATP-2Na 没有截留, 但对药物扩散有一定的阻碍作用。而脂质体混悬液释放 10 h 左右达到平衡, 24 h 后累积释放度为 $(20.76 \pm 0.34)\%$ 。表明脂质体对药物有一定的缓释作用, 同时也说明脂质体对药物包封稳定, 可充分发挥其载体作用而在体内释药。推测 24 h 后释药不完全是因为包封于脂质

体中的离子对复合物已与释放介质中游离态 ATP 形成了解离平衡状态。虽然该体外释药动力学实验不完全成功, 但在一定程度上揭示了 ATP-2Na 脂质体的缓释特征, 有待进一步研究。

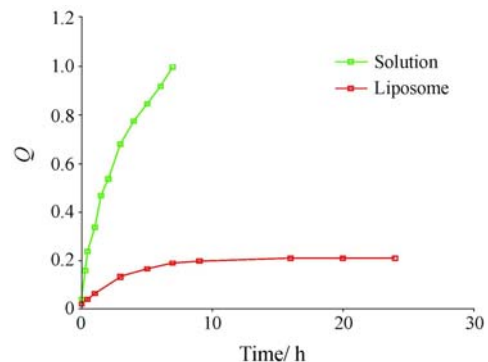


Figure 3 ATP-2Na solution and liposomes release from dialysis bag in pH 7.4 PBS. Q : Cumulative release ratio of ATP-2Na

以一级动力学、Higuchi 方程、Niebergull 平方根定律、Hixson-Crowell 立方根定律及 Weibull 方程分别对在动态透析及反相透析实验中释药的累积释放百分率 (Q) 对时间 (t) 进行拟合。结果表明, ATP-2Na 溶液中药物的释放曲线用 Higuchi 方程拟合相关性较好, 拟合方程为 $Q = 0.378 7t^{1/2} - 0.007 1$, 而 ATP-2Na 脂质体中药物的释放以 Weibull 方程拟合相关性较好, 拟合方程为 $\ln[1/(1-Q)] = 0.051 8 \ln t + 0.073 5$ 。

5 ATP-2Na 脂质体对心肌缺血小鼠组织的保护作用

给药后 15 min 心肌缺血模型小鼠体内各组织 ATP 含量测定结果如表 3 所示。结果显示, 与空白组比较, ATP-2Na 脂质体显著增加了心肌缺血小鼠血液中 ATP 浓度 ($P < 0.001$)、心肌及肝组织的 ATP 浓度 ($P < 0.05$); 与 ATP-2Na 溶液组相比, ATP-2Na 脂质体显著增加了心肌缺血小鼠血液中的 ATP 浓度 ($P < 0.001$)。

讨论

本文应用 ATP-2Na 与 HTAB 形成疏水性离子对复合物的方法提高了亲水性药物 ATP-2Na 脂质体的包封率 $(85.02 \pm 2.31)\%$ 。离子对的形成是由于离子最外层作用或者分子间作用, 并没有形成化学键。形成的离子对复合物不改变药物的化学结构而提高其在体内外的亲脂性^[11]。ATP-2Na 在生理条件下带负电荷, 在水中易溶, 乙醇中不溶; 与 HTAB 形成离子对复合物后在水中不溶, 乙醇中易溶, 故推断脂质体制备过程中有机相的 ATP-HTAB 离子对复合物主要以

Table 3 ATP content of tissue at 15 min in myocardial ischemic mice ($n = 6$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Blank; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs ATP-2Na injection

Sample	Blood/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Myocardium/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	Liver/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	Brain/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
Blank	10.21 \pm 0.00	0.66 \pm 0.15	0.15 \pm 0.05	0.18 \pm 0.07
ATP-2Na injection	10.28 \pm 0.18	0.70 \pm 0.15	0.17 \pm 0.04	0.20 \pm 0.05
ATP-2Na liposome	38.42 \pm 14.96 $\Delta\Delta\Delta$	0.83 \pm 0.12*	0.22 \pm 0.04*	0.21 \pm 0.03

非解离状态存在。

粒径分析的结果显示乙醇注入法制备的脂质体粒径分布窄, 较均匀, 且工艺简单易行。文献^[18]报道, 粒径 100 nm 左右带负电荷的脂质体能够靶向缺血脑组织, 带正电荷脂质体能够靶向缺血心肌组织。ATP-2Na 脂质体的表面电位为 (+16.2 \pm 1.6) mV, 预示该脂质体可能会对缺血心肌有一定的靶向性。

体外释放实验显示, 离子对复合物法制备的 ATP-2Na 脂质体具有一定的缓释特征, 对小鼠心肌缺血组织能量状态影响的研究结果显示, ATP-2Na 脂质体与游离 ATP-2Na 溶液相比能显著增加血液中的 ATP 浓度; 与空白相比显著增加了缺血心肌及肝组织中的 ATP 浓度, 而游离 ATP-2Na 溶液无此效果。研究报道^[15], 提高缺血组织 ATP 含量可以加快组织功能恢复, ATP-2Na 脂质体在缺血组织功能恢复方面可能会有良好的应用前景。在治疗早期动脉粥样硬化、用于器官移植维持移植器官的能量状态以提高移植的成活率^[2]等方面, ATP-2Na 脂质体可能也有良好的应用前景。

References

- [1] Sun P, Cong PJ, Cong PJ, et al. Intravenous injection low dosage ATP caused supraventricular tachycardia supraventricular tachycardia [J]. Clin Focus (临床荟萃), 1996, 11: 809-810.
- [2] Pi FM, Tu XD, Zhou JP. Recent development in ATP-loaded liposomes [J]. Pharm Clin Res (药学与临床研究), 2007, 15: 1-5.
- [3] Singer P, Cohen J, Cynober L. Effect of nutritional state of brain-dead organ donor on transplantation [J]. Nutrition, 2001, 17: 948-952.
- [4] Tang CS, Qi M, Li ZP. The effect of liposome on *in vitro* rat liver cell combination with ATP [J]. Physiol Sci (生理科学), 1989, 9: 46-49.
- [5] Neveux N, De Bandt JP, Fattal E, et al. Cold preservation injury in rat liver: effect of liposomally-entrapped adenosine triphosphate [J]. J Hepatol, 2000, 33: 68-75.
- [6] Chaib S, Charrueau C, Neveux N, et al. Effect of apoE /ATP containing liposomes on hepatic energy state [J]. Liver Int, 2003, 23: 379-385.
- [7] Laham A, Claperon N, Durussel JJ, et al. Liposomally-entrapped ATP: improved efficiency against experimental brain ischemia in the rat [J]. Life Sci, 1987, 40: 2011-2016.
- [8] Zang DL, Zheng DS, Huang DJ. ATP liposome distribution in experiment caused ischemia myocardium [J]. Chin J Cardiol (中华心血管病杂志), 1988, 16: 48-51.
- [9] Hartner WC, Verma DD, Levchenko TS, et al. ATP-loaded liposomes for treatment of myocardial ischemia [J]. Wires Nanomed Nanobiotech, 2009, 1: 530-539.
- [10] Xu GX, Xie XH. Research on ATP liposome [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1989, 24: 133-138.
- [11] Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H, et al. Application of the ion-pair concept to hydrophilic substances with special emphasis on peptides [J]. Pharm Res, 1997, 14: 119-122.
- [12] Zimmer A. Antisense oligonucleotide delivery with poly-hexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers [J]. Methods, 1999, 18: 286-295.
- [13] Gupta PK, Hung CT, Perrier DG. Quantization of the release of doxorubicin from colloidal dosage forms using dynamic dialysis [J]. J Pharm Sci, 1987, 76: 141-145.
- [14] Stewart JC. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrioxalate [J]. Anal Biochem, 1980, 104: 10-14.
- [15] Si QJ, Qiu SL. Preliminary investigation of pituitrin caused myocardium damaged mice free radical metabolism [J]. Chin J Mod Trad Chin Med West Med (中华现代中西医杂志), 2003, 1: 303-304.
- [16] Li WJ, Jia GL, Guo WY. Effects of liposome-entrapped ATP on stunned myocardium in dogs [J]. J Fourth Mil Med Univ (第四军医大学学报), 2002, 23: 1235-1238.
- [17] Zhang YW, Long C. HPLC method to determine ATP content in pulmonary tissue [J]. J Cardiovasc Pulm Dis (心肺血管病杂志), 2004, 23: 112-113.
- [18] Tang CS, Su JY, Tang J. Targeting treatment of cardiovascular medicine [J]. J Beijing Med Univ (北京医科大学学报), 1990, 22: 454.