

## 半乳糖配体介导多烯紫杉醇脂质体靶向性研究

吴 卫<sup>1,2</sup>,程 怡<sup>1\*</sup>,吴 琼<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>广州中医药大学中药学院,广东 广州 510006;<sup>2</sup>桂林医学院药学院,广西 桂林 541004)

**[摘要]** 目的:研究经半乳糖配体修饰后的多烯紫杉醇脂质体(docetaxel liposomes modified with galactose ligand, Gal-DOC-L)在小鼠体内的组织分布,探讨 Gal-DOC-L 对肝脏的靶向作用。方法:采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定各组织中多烯紫杉醇的药物浓度,以多烯紫杉醇普通脂质体(docetaxel liposomes, DOC-L)为对比,分别采用相对摄取率  $r_e$ 、峰浓度比  $C_e$  和靶向效率  $t_e$  作为评价参数,对 Gal-DOC-L 的肝靶向性进行评价。结果:DOC-L 和 Gal-DOC-L 的  $r_e$  分别为 2.80 和 4.34,  $C_e$  分别为 1.67 和 2.38,  $t_e$  分别为 28.44% 和 38.91%。结论:药物经脂质体包封后对肝脏具有一定的靶向效应,而半乳糖配体的引入可进一步提高脂质体对肝脏的靶向性。

**[关键词]** 多烯紫杉醇;脂质体;半乳糖配体;靶向给药

**[中图分类号]** R943

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)02-168-04

### A targetability study of docetaxel liposomes mediated with galactose ligand

WU Wei<sup>1,2</sup>, CHENG Yi<sup>1\*</sup>, WU Qiong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006;

<sup>2</sup>School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the tissue distribution of docetaxel liposomes modified with galactose ligand (Gal-DOC-L) in mice after intravenous injection, and to discuss the liver targeted effects of Gal-DOC-L. **Methods:** The determination of drug tissue distribution in mice was measured by HPLC, relative uptake rate ( $r_e$ ), peak concentration ratio ( $C_e$ ) and targeting efficiency ( $t_e$ ) were used as the evaluation parameters to evaluate the DOC-L, Gal-DOC-L's liver targeted effect. **Results:** The relative uptake rates of DOC-L and Gal-DOC-L were 2.80 and 4.34, peak concentration ratios of DOC-L and Gal-DOC-L were 1.67 and 2.38, targeting efficiency percentages of DOC-L and Gal-DOC-L were 28.44% and 38.91%. **Conclusion:** The drug encapsulated by liposomes has a certain effect of targetability, and liposomes modified with galactose ligand-targeted could further improve the hepatic targeted effect.

**[Key words]** docetaxel; liposomes; asialoglycoprotein receptor; targeted drug delivery

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 168-171]

在哺乳动物肝实质细胞表面存在半乳糖受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR),可专一性地识别末端含有半乳糖或半乳糖残基的糖蛋白。用半乳糖或其衍生物作为靶向配体来修饰脂质体,可增加脂质体在肝脏的分布。通过半乳糖配体的介导作用,从而把药物更加准确地定向输送到靶部位。目前评价药物靶向性的主要方法是药物体内分布,对于主动靶向的配体脂质体,在给定磷脂组成及粒径范围固定的条件下,脂质体的体内分布及代谢主要

依赖于导向物质(如半乳糖配体)的存在<sup>[1]</sup>,即具有肝靶向活性的导向物质的修饰是脂质体能否主动靶向分布到肝组织的关键环节。为探讨载药配体脂质体在体内分布和对组织器官的靶向性,本研究以昆明种小鼠为研究对象<sup>[2-3]</sup>,利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测手段,分别对多烯紫杉醇注射液、普通脂质体、配体脂质体的体内分布情况进行了考察,并对其体内肝脏靶向性进行评价。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(30772790)

\*通讯作者, E-mail: ncchengyi@21cn.com

多烯紫杉醇注射液(DOC-I, 20 mg/瓶, 江苏恒瑞医药股份有限公司);多烯紫杉醇普通脂质体(docetaxel liposomes, DOC-L, 实验室自制);多烯紫杉醇半乳糖配体脂质体(docetaxel liposomes modified with galactose ligand, Gal-DOC-L, 实验室自制);炔诺酮对照品(批号:100053-200705, 中国药品生物制品检定所);多烯紫杉醇(批号:100129, 纯度>99%, 北京诺瑞医药技术有限公司);甲醇、乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂为分析纯。

Dionex 高效液相系统(P680 型泵, PDA-100 型检测器, ASI-100 自动进样器, Chromeleon 色谱工作站);BS110S 型电子分析天平(德国 Satorius 公司);ZH-2 旋涡混合仪(天津药典标准仪器厂);TLL-C 冷冻离心机(北京四环科学仪器厂有限公司);BF2000 型氮气(N<sub>2</sub>)吹干仪(上海勇规分析仪器有限公司)。

昆明种小鼠 72 只, 体重(20 ± 2) g, 雌雄各半, 广州中医药大学实验动物中心提供。

## 1.2 方法

### 1.2.1 DOC-L、Gal-DOC-L 的制备

采用乙醇注入法制备 DOC-L、Gal-DOC-L。精密称定磷脂、胆固醇、维生素 E、药物(质量比 6:2:1:0.3), 溶于无水乙醇中, 水浴加热溶解, 所得类脂溶液缓慢匀速的注入到恒温 55℃ 的磷酸盐缓冲液(pH7.4, 33.23 mmol/L)中, 注入过程中通入 N<sub>2</sub> 除去乙醇。注入完毕后, 45℃ 孵育 20 min, 超声处理 6 min, 依次经 0.45、0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 制备得 DOC-L;精密称定磷脂、胆固醇、维生素 E、药物(质量比 6:2:1:0.3), 加入 10% 的半乳糖配体, 同法制备得 Gal-DOC-L。

### 1.2.2 血浆及组织样品的制备

血浆样品:小鼠眼内眦静脉取血 0.3 ml, 置于预先加入肝素的 1 ml 离心管中, 在 3 000 r/min 条件下离心 10 min, 分离血浆。取血浆 100 μl, 置于离心管中, 精密加入炔诺酮对照液(500 μg/ml)50 μl, 涡旋混匀 2 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 取出上清液, 加入乙醚 2 ml, 萃取 2 次, 乙醚液 N<sub>2</sub> 流下挥干, 残渣加入流动相 100 μl。

组织样品:将小鼠脱颈椎处死, 剖取心、肝、脾、肺、肾脏器, 用生理盐水冲尽表面残留血液, 滤纸吸干水分, 称取 0.1 g 组织样品(不足 0.1 g 取全部), 加乙腈-水(1:1)1 ml 制成匀浆<sup>[4]</sup>, 再加 0.5 ml 洗涤匀浆器, 转入离心管, 精密加入炔诺酮对照品溶液(500 μg/ml)50 μl, 涡旋混匀 2 min, 3 000 r/min 离

心 10 min, 取出上清液, 加入乙醚 2 ml, 萃取 2 次, 乙醚液 N<sub>2</sub> 流下挥干, 残渣加入流动相 100 μl。

### 1.2.3 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub>(250.0 mm × 4.6 mm, 5 μm), 预柱为 Upehurch C<sub>18</sub> 柱(10 mm × 4 mm), 流动相为乙腈-水(55:45), 柱温 30℃;流速 1.0 ml/min, 紫外检测波长 230 nm, 进样量 20 μl。

### 1.2.4 方法专属性检验

在上述色谱条件下, 对空白生物样品分别加入内标物炔诺酮、待测生物样品进行 HPLC 分析, 考察分析方法的专属性。

### 1.2.5 标准曲线的绘制

分别取适量多烯紫杉醇对照品溶液加入血浆或组织样品匀浆液中, 精密配制一系列生物样品标准溶液。按前述方法处理后, 测定其药物含量, 以多烯紫杉醇与炔诺酮的峰面积比值  $A_{\text{DOC}}/A_{\text{NOR}}(y)$  对多烯紫杉醇浓度  $C(x)$  进行线性回归。

### 1.2.6 精密度测定

分别取适量多烯紫杉醇对照品溶液加入到血浆或组织样品匀浆液中, 配制成 2.5、5.0 和 10.0 μg/ml(低、中、高)3 种不同浓度多烯紫杉醇溶液, 1 d 内各浓度重复测定 5 次, 连续 5 d 内各浓度重复测定 5 次, 分别计算日内及日间精密度(RSD)。

### 1.2.7 回收率测定

分别取适量多烯紫杉醇对照品溶液加入到血浆或组织样品匀浆液中, 配制成高、中、低浓度多烯紫杉醇溶液, 按照血浆及组织处理方法处理后进样分析, HPLC 测定后计算多烯紫杉醇回收率。

### 1.2.8 体内各组织的分布

取昆明种小鼠 72 只, 平均分为 24 组, 每组 3 只, 分别尾静脉注射 DOC 注射剂、DOC-L 和 Gal-DOC-L(10 mg/kg), 分别于 10、20、30 min 及 1、2、4、6、12 h 时间点毛细管眼眦取血后处死小鼠, 取出心、肝、脾、肺、肾等脏器, 按血浆及组织处理方法处理各样品, HPLC 测定药物浓度, 计算血浆或组织中的药物量(μg/g)。

## 1.3 统计学方法

采用 DAS2.0 药代动力学分析软件, 计算主要药动学参数并进行统计分析。

评价药物制剂靶向性的方法很多, 一般可由相对摄取率( $r_e$ )、峰浓度比( $C_e$ )、靶向效率( $t_e$ )进行衡量<sup>[5-6]</sup>。 $r_e$  的计算式为: $r_e = (AUC_i)_p / (AUC_i)_s$ , 在式中,  $AUC_i$  是由浓度-时间曲线求得的第  $i$  个器官或组织的药时曲线下面积; 脚标  $p$  和  $s$  分别表示药物制剂

及药物溶液。 $C_e$  可根据公式： $C_e = (C_{max})_p / (C_{max})_s$  进行计算,在式中, $C_{max}$  为峰浓度。 $t_e$  根据 Gupta 等<sup>[7]</sup>的方法,用靶组织药时曲线下面积占各组织药时曲线下面积总和的百分比,即  $t_e = AUC_{\text{靶组织}} / AUC_{\text{各组织总和}} \times 100\%$ ,来评价多烯紫杉醇脂质体的靶向性。本研究分别采用  $r_e$ 、 $C_e$  和  $t_e$  作为评价参数,对 DOC-L、Gal-DOC-L 的肝靶向性进行评价。

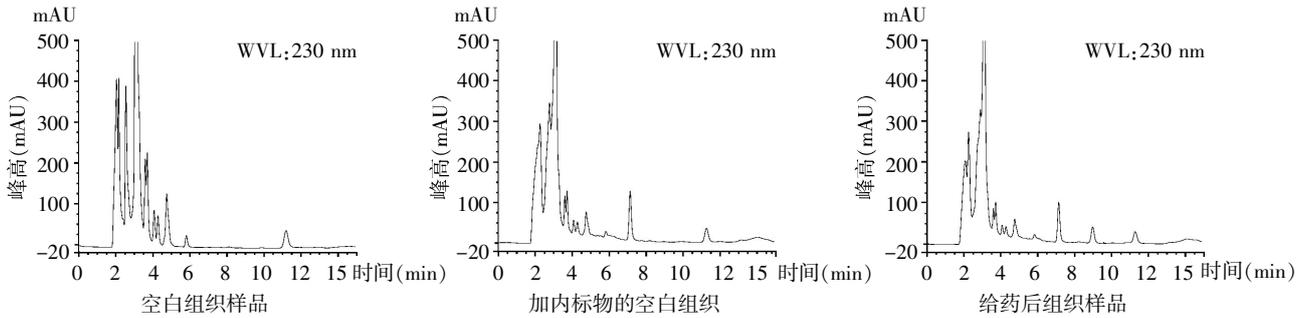


图 1 小鼠肝组织样品高效液相色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of liver tissue sample in mice

### 2.2 标准曲线的绘制

以多烯紫杉醇与炔诺酮的峰面积比值  $A_{\text{doc}}/A_{\text{nor}}$  对多烯紫杉醇浓度  $C(x)$  进行线性回归,得到血浆及各组织样品中的标准曲线(表 1)。结果表明,在 0.1~20.0  $\mu\text{g/ml}$  范围内,多烯紫杉醇浓度与峰面积比值有良好的线性关系。

表 1 多烯紫杉醇在不同组织中的标准曲线

Table 1 Standard curve equation of docetaxel in different tissues

组织样品	标准曲线方程	r 值
血浆	$y = 0.0567x - 0.0012$	0.9994
心脏	$y = 0.0473x + 0.0113$	0.9985
肝脏	$y = 0.0496x + 0.0101$	0.9971
脾脏	$y = 0.0480x + 0.0114$	0.9952
肺脏	$y = 0.0477x + 0.0060$	0.9992
肾脏	$y = 0.0527x + 0.0064$	0.9988

### 2.3 精密度及回收率测定

精密度测定结果表明,血浆及各组织样品的日内 RSD 均 < 5%,日间 RSD 均 < 10%,符合生物样品测定要求。回收率测定结果显示,血浆及各组织样品的平均回收率在 85%~100%,符合生物样品测定的要求。

### 2.4 肝靶向性评价

分别采用  $r_e$ 、 $C_e$  和  $t_e$  作为评价参数,对 DOC-L、Gal-DOC-L 的肝靶向性进行评价。用 DAS2.0 药代动力学程序计算 DOC、DOC-L 和 Gal-DOC-L 在各组织中的  $AUC_{0-12}$  和  $C_{max}$ ,见表 2。对表 2 中数据进行分

## 2 结果

### 2.1 方法专属性

检测样品包括小鼠血浆和各组织,结果表明,空白血浆和组织样品不干扰炔诺酮和多烯紫杉醇的测定,炔诺酮和多烯紫杉醇的保留时间分别为 7.6 min 和 9.7 min,如图 1 所示。

析,计算靶向性评价参数(表 3、4)。

由表 2 可见,将药物多烯紫杉醇制备成脂质体制剂后,相比于多烯紫杉醇单纯注射液给药,药物在体内分布行为有所改变,在血浆、肝、肺中分布增加,其中以肝脏中增加最多,表明 DOC-L 具有一定的肝靶向性。其原因可能是药物被脂质体包封后,在体内主要被单核-巨噬细胞所吞噬而摄取,而单核-巨噬细胞较为丰富地聚集分布在肝脏组织,从而使多烯紫杉醇药物在肝脏组织中的累积量得到提高。

当脂质体表面被半乳糖配体修饰后,药物在肝脏的分布进一步增多,DOC-L 在肝组织的  $AUC_{0-12}$  和  $C_{max}$  分别为多烯紫杉醇药物注射液的 2.80 倍和 1.67 倍,相对于各组织器官的总和,对肝脏的靶向效率  $t_e$  为 28.44%,而 Gal-DOC-L 在肝组织的  $AUC_{0-12}$  和  $C_{max}$  分别为多烯紫杉醇药物注射液的 4.34 倍和 2.38 倍,靶向效率  $t_e$  为 38.91%,在肝中的  $t_e$  值愈大,说明对肝的选择性愈强,表明 Gal-DOC-L 与 DOC-L 相比具有更好的肝靶向性。

## 3 讨论

采用受体介导的靶向给药方式,可以将药物有效地运送至组织或细胞的特定部位,减少了药物对正常组织和细胞的伤害,提高治疗效果,同时降低药物的不良反应。肝实质细胞膜上存在去唾液酸糖蛋白受体,本课题制备得到的半乳糖化脂质体利用肝实质细胞膜表面有大量半乳糖受体这一特性,通

表 2 DOC、DOC-L 和 Gal-DOC-L 在不同组织中的 AUC<sub>0-12</sub> 和 C<sub>max</sub>

Table 2 The AUC<sub>0-12</sub> and C<sub>max</sub> of DOC, DOC-L and Gal-DOC-L in different tissues

		血浆	心脏	肝脏	脾脏	肺脏	肾脏
AUC <sub>0-12</sub> (h·μg/g)	DOC	30.69	16.37	22.72	9.70	35.35	31.21
	DOC-L	55.41	11.60	63.51	8.78	55.12	28.90
	Gal-DOC-L	57.07	11.12	98.52	9.32	49.50	27.69
C <sub>max</sub> (μg/g)	DOC	20.15	9.65	10.42	7.73	13.43	11.47
	DOC-L	18.16	7.46	17.38	6.49	16.19	9.02
	Gal-DOC-L	19.04	7.11	24.77	6.54	15.43	8.97

表 3 DOC-L 在不同组织中的靶向参数

Table 3 Targeting parameters of DOC-L in different tissues

	血浆	心脏	肝脏	脾脏	肺脏	肾脏
r <sub>e</sub>	1.81	0.71	2.80	0.91	1.56	0.93
C <sub>e</sub>	0.90	0.77	1.67	0.84	1.21	0.79
t <sub>e</sub>	24.81	5.19	28.44	3.93	24.68	12.94

表 4 Gal-DOC-L 在不同组织中的靶向参数

Table 4 Targeting parameters of Gal-DOC-L in different tissues

	血浆	心脏	肝脏	脾脏	肺脏	肾脏
r <sub>e</sub>	1.86	0.68	4.34	0.96	1.40	0.89
C <sub>e</sub>	0.95	0.74	2.38	0.85	1.15	0.78
t <sub>e</sub>	22.53	4.39	38.91	3.68	19.55	10.94

过半乳糖与半乳糖受体这种配体与受体结合的方式,达到增强半乳糖化脂质体肝靶向作用。一些文献也证实,半乳糖修饰的脂质体在小鼠体内主要被肝实质细胞膜上的去唾液酸糖蛋白受体识别而摄取<sup>[8]</sup>,经半乳糖化的脂质体可显著提高药物制剂的肝靶向性及肝实质细胞靶向性<sup>[9]</sup>。因此,经半乳糖修饰脂质体具有更强的靶向性,从而保证了足够的药物在病变部位充分释放。但是修饰的脂质体增加了药物在体内循环的时间,在血液中存在的时间相对延长,进入靶组织或靶细胞的药量相对减少。

脂质体作为药物载体主要的目的是利用其将药物导向于靶组织,而制剂是否具有靶向性常用体内药物分布试验来评价,一般以小鼠作为试验对象,将药物包入脂质体中,通过静脉注射给药,测定不同时间血药浓度,并定时将小鼠处死,剖取脏器或组织,捣碎分离取样并测定药物含量,与同剂量药物溶液给药进行比较,评价药物对各组织的靶向性。

本实验建立小鼠血浆及组织中多烯紫杉醇药物浓度测定的 HPLC 方法,研究了多烯紫杉醇在小鼠体内的组织分布及肝靶向性,为进一步研究 DOC-L、Gal-DOC-L 体内药物代谢及作用机制、临床合理用药提供参考及理论依据。

[参考文献]

[1] Torchilin V, Narula J, Halpern E, et al. Poly (ethylene glycol)-coated anti-cardiac myosin immunoliposomes; factors influencing targeted accumulation in the infarcted

myocardium [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1279(1): 75-83

[2] Marchettini P, Stuart OA, Mohamed F, et al. Docetaxel: pharmacokinetics and tissue levels after intraperitoneal and intravenous administration in a rat model [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002, 49(6): 499-503

[3] Mohamed F, Stuart OA, Sugarbaker PH. Pharmacokinetics and tissue distribution of intraperitoneal docetaxel with different carrier solutions [J]. *J Surg Res*, 2003, 113(1): 114-120

[4] Crosasso P, Ceruti M, Brusa P, et al. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes [J]. *J Control Release*, 2000, 63(1-2): 19-30

[5] Gallo JM, Gupta PK, Hung CT, et al. Evaluation of drug delivery following the administration of magnetic albumin microspheres containing adriamycin to the rat [J]. *J Pharm Sci*, 1989, 78(3): 190-194

[6] 毕殿洲. 药剂学[M]:北京:人民卫生出版社,2000:450

[7] Gupta PK, Hung CT. Quantitative evaluation of targeted drug delivery systems [J]. *Int J Pharm*, 1989, 56(3): 217-226

[8] Kawakami S, Wong J, Sato A, et al. Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1524(2-3): 258-265

[9] 王绍宁, 邓意辉, 吴红兵, 等. 半乳糖化脂质体在小鼠体内肝靶向性评价 [J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(14): 1076-1079

[收稿日期] 2011-10-08