

• 制剂与炮制 •

甘草次酸衍生物受体介导的复方脂质体肝靶向性研究及对肝星状细胞的影响

王秀丽^{1*}, 管辉达¹, 曲舒显¹, 薛博文², 李耿^{3*}, 刘兴余⁴, 陈莉莎⁴, 顾衡^{5*}

(1. 北京中医药大学, 北京 102488; 2. 西南大学, 重庆 400715; 3. 中国中医科学院 国家药监局中药监管科学研究中心, 北京 100700; 4. 上海烟草集团有限责任公司 技术中心北京工作站, 北京 101121; 5. 昆明市中医医院, 云南 昆明 650011)

[摘要] 将 3-琥珀酸-30-硬脂基甘草次酸(18-GA-Suc)插入甘草次酸(GA)-丹参酮 II_A(TSN)-丹酚酸 B(Sal B)脂质体(GTS-lip), 制备甘草次酸(GA)受体介导的肝靶向复方脂质体(Suc-GTS-lip); 通过 UPLC 比较 Suc-GTS-lip 与 GTS-lip 的药代动力学和组织分布, 并对 Suc-GTS-lip 进行活体成像追踪; 考察 Suc-GTS-lip 对肝星状细胞(HSC)增殖抑制的影响, 并探究其改善肝纤维化的分子机制。药代动力学研究表明, Sal B 的 AUC 由 $(636.06 \pm 27.73) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降至 $(550.39 \pm 12.34) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, TSN 的 AUC 由 $(1.08 \pm 0.72) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降至 $(0.65 \pm 0.04) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, GA 的 AUC 由 $(43.64 \pm 3.10) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增至 $(96.21 \pm 3.75) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; 组织分布结果表明, Suc-GTS-lip 组肝脏中 Sal B 的 AUC 和 $C_{\max}$ 分别是 GTS-lip 组的 10.21、4.44 倍, Suc-GTS-lip 组中 Sal B、TSN、GA 对肝脏的靶向效率分别为 40.66%、3.06%、22.08%; 体内成像研究显示, 修饰后的脂质体有肝脏积聚的趋势; MTT 实验结果显示, Suc-GTS-lip 能显著抑制 HSC 的增殖; RT-PCR 结果显示, 各给药组 MMP-1 的表达均显著增加; 各给药组 TIMP-1 与 TIMP-2 表达显著降低; 各给药组 I 型胶原(collagen-I)与 III 型胶原(collagen-III)的 mRNA 表达显著降低。实验结果表明, Suc-GTS-lip 具有肝脏靶向性, 且能够抑制 HSC 增殖和诱导其凋亡, 为 Suc-GTS-lip 靶向治疗肝纤维化提供了实验依据。

[关键词] 3-琥珀酸-30-硬脂醇甘草次酸酯; 复方脂质体; 肝星状细胞; 肝靶向

Liver targeting of compound liposomes mediated by glycyrrhetic acid derivative receptor and its effect on hepatic stellate cells

WANG Xiu-li^{1*}, GUAN Hui-da¹, QU Shu-xian¹, XUE Bo-wen², LI Geng^{3*}, LIU Xing-yu⁴, CHEN Li-sha⁴, GU Heng^{5*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. Chinese Medicine Regulatory Scientific Research Center of NMPA, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4. Technical Center Beijing Workstation, Shanghai Tobacco Group Co., Ltd., Beijing 101121, China; 5. Kunming Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650011, China)

[Abstract] The 3-succinate-30-stearyl glycyrrhetic acid (18-GA-Suc) was inserted into glycyrrhetic acid (GA)-tanshinone II_A (TSN)-salvianolic acid B (Sal B) liposome (GTS-lip) to prepare liver targeting compound liposome (Suc-GTS-lip) mediated by GA receptors. Next, pharmacokinetics and tissue distribution of Suc-GTS-lip and GTS-lip were compared by UPLC, and *in vivo* imaging tracking of Suc-GTS-lip was conducted. The authors investigated the effect of Suc-GTS-lip on the proliferation inhibition of hepatic stellate cells (HSC) and explored their molecular mechanism of improving liver fibrosis. Pharmacokinetic results showed that the $AUC_{\text{Sal B}}$ decreased from $(636.06 \pm 27.73) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $(550.39 \pm 12.34) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the AUC_{TSN} decreased from $(1.08 \pm 0.72) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $(0.65 \pm 0.04) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the AUC_{GA} increased from $(43.64 \pm 3.10) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $(96.21 \pm 3.75) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$. Tissue distribution results showed that the AUC and $C_{\max}$ of Sal B in the liver of the Suc-GTS-lip group were 10.21 and 4.44 times those of the GTS-lip group, respectively. The targeting efficiency of Sal B, TSN, and GA in the liver of the Suc-GTS-lip group was 40.66%, 3.06%, and 22.08%, respectively. In vivo imaging results showed that the modified liposome had a tendency to accumulate in the liver. MTT experimental results showed that Suc-GTS-lip could significantly inhibit the proliferation of HSC. RT-PCR results showed that the expression of MMP-1 was significantly increased in each dosing group, and the expression of TIMP-1 and TIMP-2 was significantly decreased. The mRNA expression of type I collagen (collagen-I) and type III collagen (collagen-III) was significantly decreased in each dosing group. The experimental results showed that Suc-GTS-lip has liver targeting properties and can inhibit HSC proliferation and induce its apoptosis, providing experimental basis for the targeted treatment of liver fibrosis by Suc-GTS-lip.

[收稿日期] 2023-03-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202928); 北京市自然科学基金项目(7123118); 上海烟草集团有限责任公司科技项目(K2021-1-043P)

[通信作者] *王秀丽, 副研究员, 主要从事药物新型递药系统研究, E-mail: Lnwangxiuli@163.com; *李耿, 副主任药师, 主要从事中药质量信息化研究、中药产业及政策战略研究, E-mail: 13810507641@163.com; *顾衡, 副主任药师, 主要从事中药研究, E-mail: gh1016994211@163.com

·mL⁻¹ to (0.65±0.04) μg·h·mL⁻¹, but the AUC_{GA} increased from (43.64±3.10) μg·h·mL⁻¹ to (96.21±3.75) μg·h·mL⁻¹. The results of tissue distribution showed that the AUC_{Sal B} and C_{max} of Sal B in the liver of the Suc-GTS-lip group were 10.21 and 4.44 times those of the GTS-lip group, respectively. The liver targeting efficiency of Sal B, TSN, and GA in the Suc-GTS-lip group was 40.66%, 3.06%, and 22.08%, respectively. In vivo imaging studies showed that the modified liposomes tended to accumulate in the liver. MTT results showed that Suc-GTS-lip could significantly inhibit the proliferation of HSC, and RT-PCR results showed that the expression of MMP-1 was significantly increased in all groups, but that of TIMP-1 and TIMP-2 was significantly decreased. The mRNA expressions of collagen-I and collagen-III were significantly decreased in all groups. The experimental results showed that Suc-GTS-lip had liver targeting, and it could inhibit the proliferation of HSC and induce their apoptosis, which provided the experimental basis for the targeted treatment of liver fibrosis by Suc-GTS-lip.

[Key words] 3-succinate-30-stearyl glycyrrhetic acid ester; compound liposome; hepatic stellate cell; liver targeting

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230605.301

大鼠的肝细胞膜上有许多甘草次酸受体^[1-2],若将甘草次酸(glycyrrhetic acid,GA)分子中的3-羟基或-30-羧基进行衍生化可能增强对受体的亲和力,提高载体的肝靶向效率^[3-4]。因此,基于实验室前期合成的3-琥珀酸-30-硬脂基甘草次酸(3-succinic-30-stearyl glycyrrhetic acid,18-GA-Suc)配体,进一步制备了以其介导的复方脂质体3-琥珀酸-30-硬脂基甘草次酸酯修饰的甘草次酸-丹参酮Ⅱ_A-丹酚酸B复方脂质体(salvianolic acid B compound liposomes with 3-succinic-30-stearyl glycyrrhetic acid, Suc-GTS-lip),并考察该脂质体的肝脏靶向性及探究其对肝纤维化的作用机制。肝纤维化是肝脏中胶原蛋白等细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的增生与降解失去平衡,继而导致肝脏内纤维结缔组织异常沉积的可逆性病理过程;而ECM的分子来源包括肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)、骨髓前体细胞、门脉肌成纤维细胞等具有成纤维样细胞特征表型的细胞^[5-8];其中,活化的肝星状细胞是产生ECM最主要来源^[9];因此,选择肝星状细胞作为模型来考察Suc-GTS-lip对肝纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

Waters UPLC:二元溶剂管理系统、在线脱气机、自动进样器、PDA 检测器(美国沃特世有限公司);BS110S 型万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);G16 型医用高速离心机(北京白洋离心机有限责任公司);TTL-DC 型多功能氮吹仪(北京同泰联科技发展有限公司);S10 型高速匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);FXPRO 多模式活体小动物成像系统(美国锐珂医疗器材有限公司);

SCIENTZ-IID 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);40C 型低速医用离心机(安心县白洋离心机厂);Model 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);BB16UV/BB5060UV 型 CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司);Eclipse TE2000-5 型电子显微镜(日本尼康公司);PCR 仪(杭州博日科技有限公司)。

1.2 试剂

实验室自制甘草次酸-丹参酮Ⅱ_A-丹酚酸B复方脂质体(glycyrrhetic acid-tanshinoneⅡ_A-salvianolic acid B compound liposomes,GTS-lip)、Suc-GTS-lip 冻干品;甘草次酸(GA,批号 110723-200411,纯度 98%),丹参酮Ⅱ_A(tanshinoneⅡ_A,TSN,批号 110766-200417,纯度 98%),丹酚酸B(salvianolic acid B,Sal B,批号 10113-081107,纯度 98%),氯霉素(IS,批号 130303-200614)购于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技公司);娃哈哈纯净水;乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司);其余试剂为分析纯;胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 30084);DMEM 液体培养基、PBS 缓冲液(美国康宁公司,批号分别为 2014655、20140516);胰蛋白酶(美国 ScienCell 公司,批号 K771-100);胰酶终止液(美国 ScienCell 公司);超纯 RNA 提取试剂盒(江苏康为世纪生物科技股份有限公司,货号 CW0581);MTT 试剂盒(北京天恩泽基因技术有限公司);HiFi-MMLVcDNA 第一链合成试剂盒(江苏康为世纪生物科技股份有限公司,货号 CW0744);PCR Mixture(江苏康为世纪生物科技股份有限公司,货号 CW0956);DNaseI(江苏康为世纪生物科技股份有限公司,货号 CW2090)。

1.3 动物与细胞

雄性 5 周龄 SPF 级昆明种小鼠(体质量 20~22

g) 150 只,购于北京斯倍福实验动物科技有限公司,合格证号 SCXK(京)2016-0002,动物伦理批准号 BUCM-4-2016011003-1003;人 HSC 细胞株由北京市望京医院病理科提供。实验经北京中医药大学动物伦理委员会批准。

2 方法

2.1 Suc-GTS-Lip 的制备

利用实验室前期合成的靶向配体 3-琥珀酸-30-硬脂醇甘草次酸酯配体(18-GA-Suc)和复方脂质体制备方法制备 Suc-GTS-Lip^[10-11],即精密称取适量 18-GA-Suc 与处方量大豆卵磷脂、胆固醇、GA、TSN 超声共溶于无水乙醇,水浴减压旋蒸以除去无水乙醇,形成均一透明的薄膜后加入适量纯水水合。经水合得到的脂质体混悬液在水浴条件下,以 380 W 探头超声进一步均匀加工处理,然后逐滴加入 Sal B 的甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 3.32),摇匀后 30 ℃ 水浴孵化 30 min 即得。

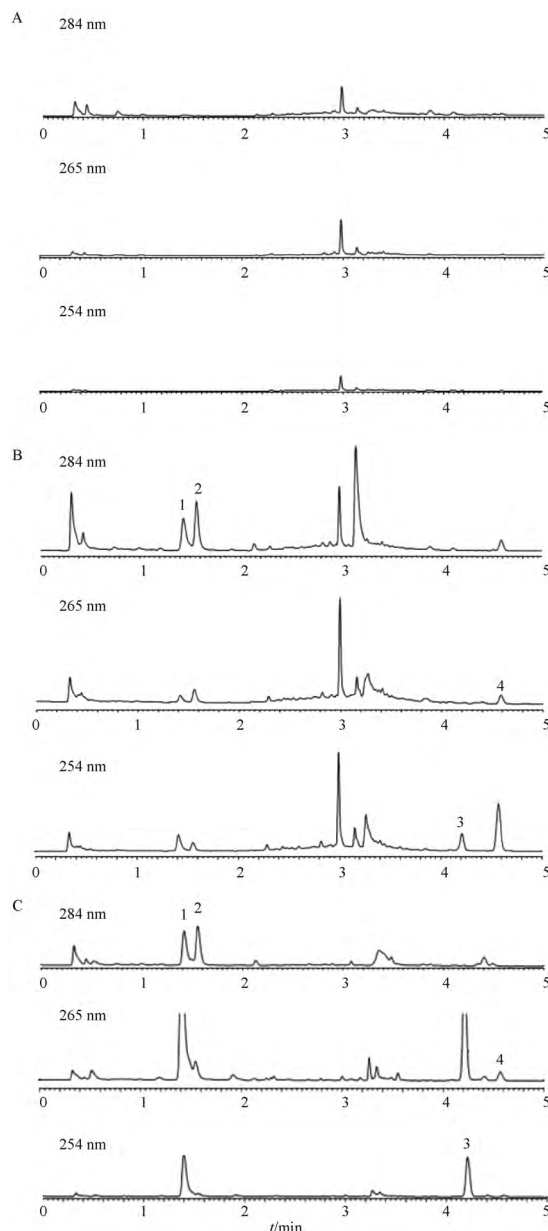
2.2 小鼠血浆样品 UPLC 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm);流动相乙腈(A)-0.5%甲酸水(B),梯度洗脱(0~1.5 min, 20%~25% A; 1.5~3 min, 25%~64% A; 3~5.1 min, 64% A; 5.1~5.8 min, 64%~90% A; 5.8~6.0 min, 90% A),流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 1 μL;样品室温度 4 ℃;检测波长 284 nm (Sal B)、265 nm (TSN)、254 nm (GA)。

2.2.2 血浆与组织样品的制备 精密吸取小鼠血浆 150 μL(或组织匀浆,肝、肾 500 μL,心、脾 150 μL,肺 250 μL)置 1.5 mL EP 管中,加入 0.2 mg·mL⁻¹的 IS 10 μL,适量甲酸-水 1:3 混合溶液(血浆 50 μL,肝、肾 70 μL,脾、肺、肾 50 μL),乙酸乙酯 1 mL,涡旋振荡 3 min,15 000 r·min⁻¹离心 10 min,将上清液全部转移至另一 EP 管中,剩余沉淀继续加入乙酸乙酯溶液 1 mL 同法第 2 次萃取后合并上清液,37 ℃ 水浴条件下于氮吹仪上挥干,残渣用 100 μL 甲醇复溶,涡旋振荡 1 min 后于 15 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液 1 μL 进样 UPLC 分析。

2.2.3 专属性试验 取小鼠空白血浆,按 2.2.2 项下处理,按 2.2.1 项下 UPLC 条件检测,空白血浆的内源性物质不干扰各成分和内标的测定,该法获得的色谱图具有较高的专属性,见图 1。

2.2.4 标准曲线的制备 分别精密吸取 Sal B、TSN、GA 系列标准溶液和 IS 对照溶液 10 μL,挥干



A. 空白血浆样品;B. 空白血浆+混合对照品;C. 静脉注射给药后血浆样品;1. 丹酚酸 B;2. 氯霉素;3. 甘草次酸;4. 丹参酮 II_A。

图 1 小鼠血浆中各样品 UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of each mouse plasma sample

溶剂后,加入空白血浆 150 μL(或加入各脏器空白匀浆液若干(肝、肾 500 μL,心、脾 150 μL,肺 250 μL)),按 2.2.2 项制得系列标准血浆样品(或系列标准组织样品),以待测成分峰面积与内标峰面积的比值(γ)对样品浓度(x)进行线性回归,得标准曲线方程,浓度范围内线性良好。考察检测方法的专属性、回收率试验、日内精密度与日间精密度、稳定性试验均良好,见表 1~3。

表 1 各脏器组织和血浆中丹酚酸 B 的标准曲线

Table 1 Standard curves of salvianolic acid B in tissues and plasma

分组	标准曲线	线性范围/mg·mL ⁻¹	r
心	y=12.507x-0.014 1	0.002 5~0.200 0	0.994 8
肝	y=12.544x+0.013 4	0.002 5~0.200 0	0.999 4
脾	y=13.718x-0.014 4	0.002 5~0.200 0	0.999 9
肺	y=26.472x-0.078 3	0.001 0~0.200 0	0.999 1
肾	y=9.450 5x+0.013 9	0.002 5~0.200 0	0.999 1
血浆	y=18.412x-0.363 6	0.010 0~0.600 0	0.995 9

表 2 各脏器组织和血浆中丹参酮 II_A 的标准曲线

Table 2 Standard curves of tanshinone II_A in tissues and plasma

分组	标准曲线	线性范围/mg·mL ⁻¹	r
心	y=66.625x+0.083 0	0.000 25~0.050 0	0.999 2
肝	y=70.438x+0.021 6	0.000 50~0.050 0	0.997 0
脾	y=75.229x+0.014 5	0.000 25~0.050 0	0.997 2
肺	y=71.148x+0.016 0	0.000 25~0.025 0	0.999 0
肾	y=61.981x+0.017 0	0.000 25~0.050 0	0.999 8
血浆	y=82.369x+0.071 1	0.000 25~0.100 0	0.999 4

表 3 各脏器组织和血浆中甘草次酸的标准曲线

Table 3 Standard curves of glycyrrhetic acid in tissues and plasma

分组	标准曲线	线性范围/mg·mL ⁻¹	r
心	y=34.833x+0.290 3	0.000 75~0.150 0	0.998 9
肝	y=40.514x-0.258 7	0.003 00~0.750 0	0.997 6
脾	y=35.883x+0.200 0	0.001 50~0.300 0	0.991 3
肺	y=49.291x+0.110 7	0.000 75~0.150 0	0.997 9
肾	y=37.524x-0.046 1	0.001 50~0.300 0	0.999 7
血浆	y=28.877x+0.115 9	0.000 75~0.300 0	0.999 7

2.3 分组给药与样品采集

取 100 只体质量 20~22 g 雄性昆明小鼠随机分为 2 组,每组 50 只,分别为普通脂质体组(GTS-lip)与修饰脂质体组(Suc-GTS-lip)。2 组小鼠分别尾静脉注射脂质体 0.25 mL/只,给药剂量折合小鼠剂量含药物浓度为 Sal B 48.25 mg·kg⁻¹, TSN 4.88 mg·kg⁻¹, GA 26.12 mg·kg⁻¹。给药后,分别于 0.083、0.17、0.33、0.5、0.75、1、1.5、2、4、6 h 摘眼球取血,置于涂有肝素的离心管中,15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,分离血浆于-20℃冻存备用;取血后处死立即采集心、肝、脾、肺、肾等脏器,用生理盐水冲洗表面及内部血液后用滤纸吸干多余水分,称重并记录后装入密封袋,-20℃冻存备用。

2.4 小鼠活体成像追踪

将荧光探针 DiR 碘化物(1,1-dioctadecyl-3,3,3-tetramethylindotricarbocyanine iodide, DiR)染料与脂溶性药物混合,按 2.1 项下制备方法制备含

DiR 染料标记过的 Suc-GTS-lip(DiR-Suc-GTS-lip)。取雄性昆明小鼠,10%乌拉坦麻醉后,尾静脉注射 DiR-Suc-GTS-lip 0.2 mL(折合小鼠剂量含 DiR 10 μg·kg⁻¹),分别于给药后 10、30、60、120、240、360 min 采用小动物活体成像仪,在相同曝光强度及曝光时间下对实验动物进行荧光成像。与此同时每个时间点取心、肝、脾、肺、肾进行离体脏器荧光成像观察组织分布情况。

2.5 Suc-GTS-lip 对肝星状细胞的增殖抑制与诱导凋亡作用

2.5.1 细胞培养 人 HSC 细胞用含 10%胎牛血清的培养液,于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中贴壁生长,取对数生长期的细胞用于实验。细胞计数后,用完全培养基稀释成浓度为 1×10⁵ 个/mL 的单细胞悬液,接种于相应的细胞培养板中,细胞铺满培养板 80%左右时,即可用于实验给药。

2.5.2 MTT 实验 取对数生长期的细胞,以浓度为 1.0×10⁵ 个/mL 的单细胞悬液 200 μL 接种于 96 孔板中,细胞培养至铺满培养板 80%左右时,根据载药脂质体药物剂量分为 Suc-GTS-lip1、Suc-GTS-lip2、Suc-GTS-lip3、Suc-GTS-lip4、Suc-GTS-lip5、空白脂质体及空白对照组,见表 4,每组均设 6 个平行复孔,于 37℃和 5% CO₂ 培养箱中继续孵育培养,分别在 24、48 h 取出 96 孔板,去除各孔中的培养基后,再加入 100 μL 新鲜培养基和 10 μL 溶液 A(含 MTT 成分),用锡箔纸包裹 96 孔板后放入 37℃、5% CO₂ 条件下继续培养 4 h。4 h 后吸弃孔内培养基,每孔加入 110 μL 溶液 B,置摇床上低速振荡 10 min,立即在酶联免疫检测器上选择 490 nm 测定吸光度,计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率=(A₀-A_i)/A₀×100%,A_i 表示实验组的细胞吸光度,A₀ 表示对照组细胞吸光度。

2.5.3 Annexin V-FITC/PI 测定 HSC 凋亡率 取对数生长期的细胞,以浓度为 1.0×10⁵ 个/mL 的单细胞悬液 2 mL 接种于 6 孔板中,细胞培养至铺满培养板 80%左右时,分组给药,见表 5,每组均设 3 个平行复孔,置于 37℃和 5% CO₂ 培养箱中培养,在 24 h 后监测各给药组 HSC 形态。取培养 24 h 后的细胞,弃去原培养液,用不含 EDTA 的 0.25%胰酶消化收集细胞,取 1 mL 细胞,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 预冷的 PBS,轻轻振荡使细胞悬浮,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,重复步

表4 实验分组与载药脂质体药物剂量

Table 4	Experimental grouping versus drug-loaded liposomal drug dose			
分组	丹酚酸 B	丹参酮 II _A	甘草次酸	3-琥珀酸-30-硬脂基甘草次酸
Suc-GTS-lip1	600	80	300	300
Suc-GTS-lip2	300	40	150	150
Suc-GTS-lip3	150	20	75	75
Suc-GTS-lip4	75	10	37.5	37.5
Suc-GTS-lip5	37.5	5	18.75	18.75
空白脂质体	—	—	—	—
空白对照	—	—	—	—

注:Suc-GTS-lip. 甘草次酸-丹参酮 II_A-丹酚酸 B 复方脂质体(表5~11,图2~8、10同)。

骤2次后,将细胞重悬于200 μL binding buffer,加入10 μL Annexin V-FITC 和10 μL PI,轻轻混匀,避光室温反应15 min,在1 h内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

表5 实验分组与载药脂质体药物剂量

Table 5	Experimental grouping versus drug-loaded liposomal drug dose			
分组	丹酚酸 B	丹参酮 II _A	甘草次酸	3-琥珀酸-30-硬脂基甘草次酸
Suc-GTS-lip 高剂量	300	40	150	150
Suc-GTS-lip 中剂量	150	20	75	75
Suc-GTS-lip 低剂量	75	10	37.5	37.5
空白对照	—	—	—	—

2.6 real-time PCR 实验

用超纯 RNA 提取试剂盒提取细胞样本中总 RNA,取8 μL RNA 用1%琼脂糖凝胶进行电泳,按照 HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒产品说明

书进行逆转录,得到的 cDNA 按照实验操作按 PCR Mixture 产品说明书进行扩增,用 BIOER PCR 仪,采用灰度分析法进行数据的相对定量分析,所用引物序列信息见表6。

表6 引物序列信息

引物名称	引物序列(5'-3')
MMP-1	F: CCTCTGGCTTTCTGGAAGGG R: CCACATCAGGCACTCCACAT
TIMP-1	F: CTCGTCATCAGGGCCAAGTT R: GTAGGTCTTGCTGAAGCCCC
TIMP-2	F: TGCACATCACCCTCTGTGAC R: TGGACCAGTCGAAACCCCTTG
collagen- I	F: AGAGGTCGCCCTGGAGC R: GGAGAGCCATCAGCACCTTT
collagen-III	F: GAGCTGGCTACTTCTCGCTC R: CCTTGACCATTAGGAGGGCG
beta-actin	F: TGACCTGGACATCCGCAAAG R: CTGGAAGGTGGACAGCGAGG

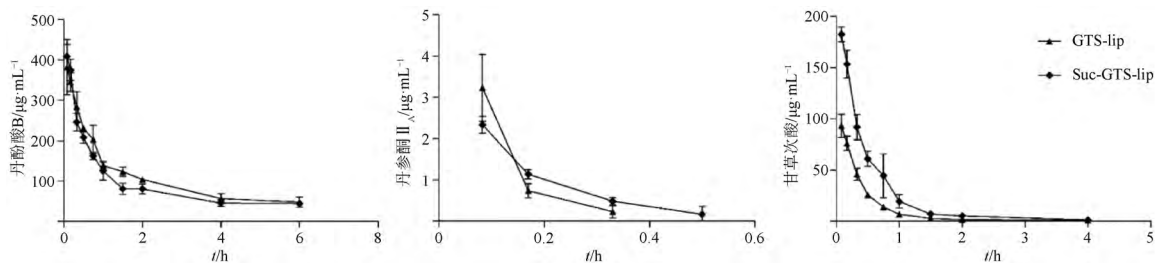
2.7 数据处理与分析

采用 WinNonlin 5.2 药代动力学软件按非房室模型进行处理,绘制血药浓度-时间曲线并计算药动学参数。real-time PCR 实验定量灰度值所得数据均经采用 SPSS 17.0 统计软件处理,两样本间的比较采取 t 检验,多组间两两比较采取 One-way ANOVA。

3 结果

3.1 Suc-GTS-lip 血药浓度-时间曲线

以取血时间点为横坐标,分别以 Sal B、TSN、GA 3个药物的血浆浓度为纵坐标,绘制药时曲线,见图2。

图2 尾静脉注射 GTS-Lip 和 Suc-GTS-lip 后小鼠血浆中药物浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 2 Drug concentration-time curve in mouse plasma after tail vein injection of GTS-Lip and Suc-GTS-LIP($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.2 药代动力学参数

将给药小鼠不同时间点血药浓度数据代入 WinNonlin 5.2 药代动力学软件计算相应药动学参

数,与 GTS-lip 相比,Suc-GTS-lip 组血浆中 Sal B 与 TSN 的 AUC 有所下降,Suc-GTS-lip 组血浆中 GA 的 AUC 较 GTS-lip 组有大幅增加,见表7。

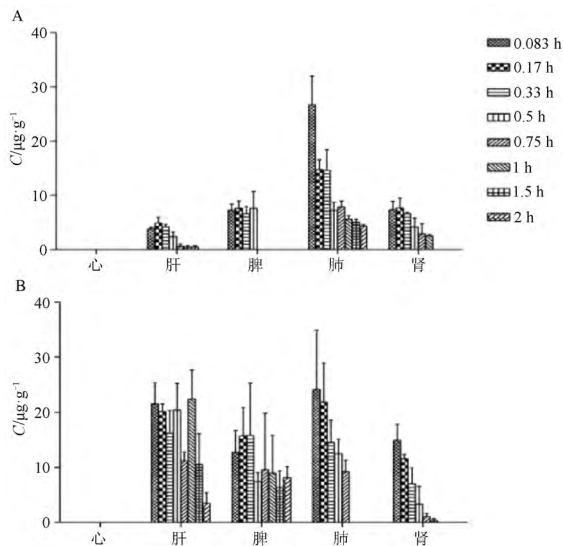
表 7 GTS-lip 与 Suc-GTS-lip 中药物的药代动力学参数 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

成分	分组	$t_{1/2}$ /h	AUC_{0-4} / $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	$AUC_{0-\infty}$ / $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	MRT_{0-4} /h	$MRT_{0-\infty}$ /h
丹酚酸 B	GTS-lip	2.73 $\pm$ 0.11	636.06 $\pm$ 27.73	816.14 $\pm$ 56.81	1.97 $\pm$ 0.09	3.66 $\pm$ 0.60
	Suc-GTS-lip	3.39 $\pm$ 1.36	550.39 $\pm$ 12.34 ¹⁾	806.53 $\pm$ 53.25	1.85 $\pm$ 0.08 ²⁾	5.01 $\pm$ 0.91 ²⁾
丹参酮 II _A	GTS-lip	0.06 $\pm$ 0.02	1.08 $\pm$ 0.72	1.12 $\pm$ 0.72	0.05 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
	Suc-GTS-lip	0.05 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.04 ¹⁾	0.65 $\pm$ 0.04 ¹⁾	0.13 $\pm$ 0.03 ¹⁾	0.13 $\pm$ 0.03 ¹⁾
甘草次酸	GTS-lip	0.21 $\pm$ 0.01	43.64 $\pm$ 3.10	44.06 $\pm$ 3.29	0.50 $\pm$ 0.10	0.53 $\pm$ 0.12
	Suc-GTS-lip	1.00 $\pm$ 0.50 ²⁾	96.21 $\pm$ 3.75 ¹⁾	98.50 $\pm$ 3.70 ¹⁾	0.52 $\pm$ 0.07	0.58 $\pm$ 0.09

注:与普通脂质体组相比¹⁾ $P<0.01$,²⁾ $P<0.05$ 。

3.3 小鼠组织分布

根据不同时间点测定心、肝、脾、肺、肾中 Sal B、TSN、GA 的浓度,绘制不同脏器的药物条形分布图,与 GTS-lip 组相比,Suc-GTS-lip 组中的 Sal B 在肝脏中的分布量较 GTS-lip 有显著增加,提示 Suc-GTS-lip 中的 Sal B 被包裹于脂质体的内水相,并通过肝靶向载体被肝实质细胞摄取;Suc-GTS-lip 组中的 TSN 在肝脏中 1 h 后检测不出,而 GTS-lip 组在 6 h 仍能检测到,Suc-GTS-lip 中的 TSN 可能随肝靶向载体较快进入到肝脏中并被代谢,见图 3~5。



A. GTS-lip;B. Suc-GTS-lip(图 4,5 同)。
图 3 尾静脉注射 GTS-lip 和 Suc-GTS-lip 后丹酚酸 B 在小鼠体内组织分布 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Fig. 3 Map of salvianolic acid B tissue distribution in mouse tissue after tail vein injection of GTS-lip and Suc-GTS-lip ($\bar{x}\pm s, n=5$)

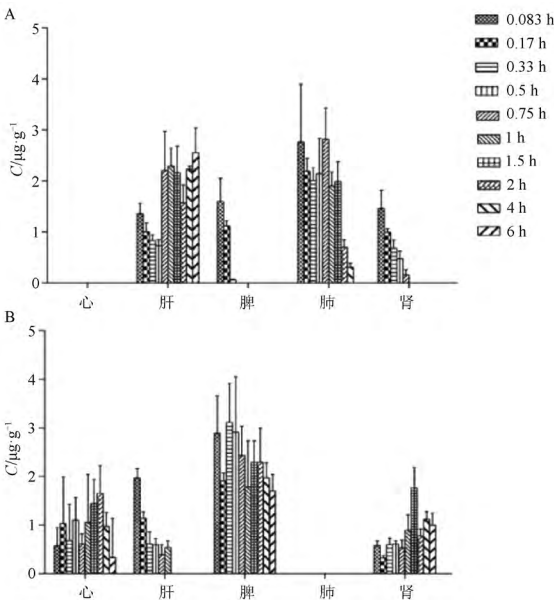


图 4 尾静脉注射 GTS-lip 和 Suc-GTS-lip 后丹参酮 II_A 在小鼠体内组织分布 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Fig. 4 Tanshinone II_A tissue distribution in mouse tissue after tail vein injection of GTS-lip and Suc-GTS-lip($\bar{x}\pm s, n=5$)

3.4 Suc-GTS-lip 与 GTS-lip 在小鼠体内的肝脏靶向性评价

以相对摄取率(Re),最大峰浓度之比(Ce)和靶向效率(Te)作为靶向性评价指标,对 Suc-GTS-lip 组和 GTS-lip 组中 3 种药物的肝脏靶向性进行评价, $Re = AUC_{\text{Suc-GTS-lip}}/AUC_{\text{GTS-lip}}$, $Ce = C_{\text{max Suc-GTS-lip}}/C_{\text{max GTS-lip}}$, $Te = AUC_{\text{肝脏}}/AUC_{\text{总}}$ 。

Suc-GTS-lip 组肝脏中 Sal B 的 AUC 与 C_{max} 分别是 GTS-lip 组的 10.21、4.44 倍,见表 8。

靶向效率结果显示,Sal B 在肝脏中具有更高的

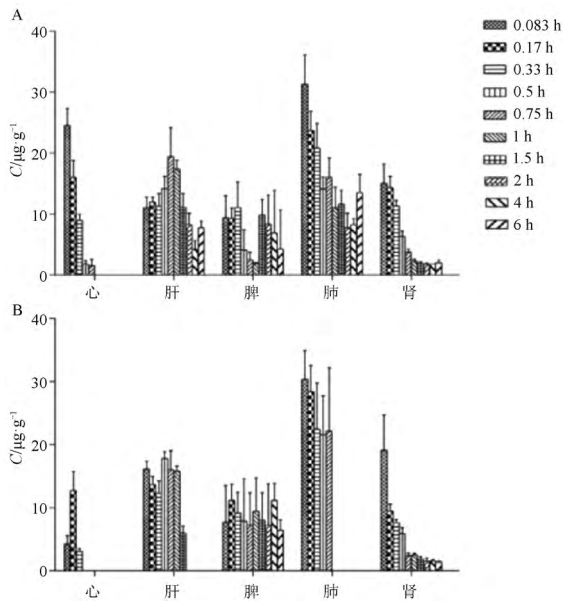


图5 尾静脉注射 GTS-lip 与 Suc-GTS-lip 后甘草次酸在小鼠体内组织分布 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 5 Glycyrrhetic acid distribution in mouse tissue after tail vein injection of GTS-lip and Suc-GTS-lip ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

表8 Suc-GTS-lip 和 GTS-lip 在肝脏中相对摄取率与最大峰浓度之比 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 8 Ratio of relative uptake of Suc-GTS-lip and GTS-lip to maximum peak concentration in liver ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

参数	丹酚酸 B	丹参酮 II _A	甘草次酸
AUC _{Suc-GTS-lip}	26.03±4.66 ¹⁾	0.84±0.10 ¹⁾	24.54±2.27
AUC _{GTS-lip}	2.55±0.63	1.44±0.25	26.63±1.15
Re	10.21	0.58	0.92
C _{max} Suc-GTS-lip	22.40±3.15 ¹⁾	1.97±0.19 ²⁾	18.16±0.95
C _{max} GTS-lip	5.05±0.76	2.29±0.75	19.40±0.36
Ce	4.44	0.86	0.93

注:与普通脂质体组相比¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$ 。

靶向性,分别为脾、肺、肾的 1.35、1.95、4.70 倍,而 TSN 和 GA 表现出更高的脾脏靶向性,见表 9。

表9 Suc-GTS-lip 的脏器靶向效率 ($n=5$)

Table 9 Organ targeting efficiency of Suc-GTS-LIP ($n=5$) %

组别	肝	心	脾	肺	肾
Te _{Sal B}	40.66	0	30.10	20.73	8.54
Te _{TSN}	3.06	27.81	43.67	0	25.46
Te _{GA}	22.08	0	47.02	16.78	14.13

3.5 小鼠活体成像

小鼠尾静脉给药 10 min 后,可见制剂迅速随血液分布于全身,在 30 min 内制剂有向胸腹部蓄积的趋势,60 min 后制剂中荧光物质慢慢开始代谢,全身的荧光强度越来越弱。体外组织荧光成像表明 Suc-GTS-lip 具有一定的肝靶向性,见图 6、7。

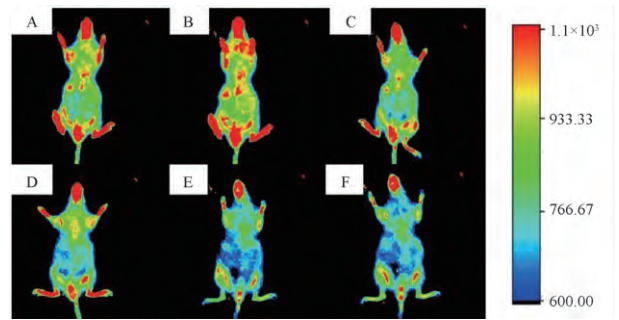


图6 DiR-Suc-GTS-lip 尾静脉给药后荧光活体分布
A. 10 min; B. 30 min; C. 60 min; D. 120 min; E. 240 min; F. 360 min (图 7 同)。

图6 DiR-Suc-GTS-lip 尾静脉给药后荧光活体分布

Fig. 6 Fluorescence distribution *in vivo* after tail vein injection of DiR-Suc-GTS-lip

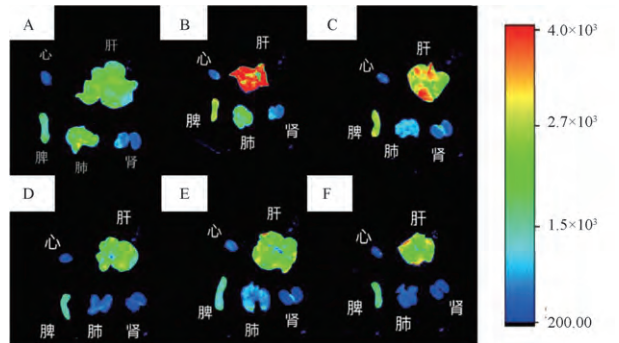


图7 DiR-Suc-GTS-lip 尾静脉给药后荧光组织分布

Fig. 7 Fluorescent tissue distribution after tail vein injection of DiR-Suc-GTS-lip

3.6 Suc-GTS-lip 对 HSC 的增殖抑制作用

Suc-GTS-lip 给药 24、48 h 后,对 HSC 细胞的增殖抑制作用结果:空白脂质体组对 HSC 基本无增殖抑制作用,而 Suc-GTS-lip 组对 HSC 的抑制作用随药物浓度的增加而升高,其中 24 h 时呈现出一定的量效关系,见表 10。

3.7 Suc-GTS-lip 诱导 HSC 凋亡作用

3.7.1 Suc-GTS-lip 诱导 HSC 凋亡形态学监测

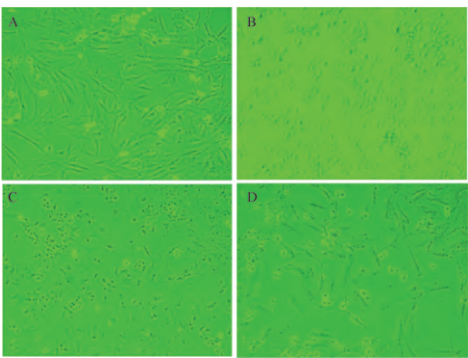
Suc-GTS-lip 给药 24 h 后,对 HSC 的形态进行检测,

表 10 Suc-GTS-lip 对 HSC 的增殖抑制作用($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 10 Proliferation inhibition of HSC by Suc-GTS-lip($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	细胞增殖抑制率/%	
	24 h	48 h
Suc-GTS-lip1	77.08±1.95	81.78±1.26
Suc-GTS-lip2	77.32±1.67	83.04±1.09
Suc-GTS-lip3	44.13±4.22	83.22±1.13
Suc-GTS-lip4	18.97±4.67	40.65±3.39
Suc-GTS-lip5	12.74±5.22	7.21±3.51
空白脂质体	2.90±4.43	4.52±5.86
空白对照	—	—

Suc-GTS-lip 给药组能不同程度诱导 HSC 凋亡,且随浓度增大,凋亡更加明显,主要表现为星状触角逐渐萎缩、细胞皱缩、间隙增大,见图 8。

3.7.2 Annexin V-FITC/PI 法测定 HSC 凋亡率
流式细胞仪检测细胞凋亡结果可见空白对照组细胞凋亡率为 $4.20\%\pm 1.04\%$,与空白对照组相比,高、中、低 3 个剂量组的 Suc-GTS-lip 均不同程度起到了诱导 HSC 凋亡的作用,分别为 $75.23\%\pm 2.56\%$ 、 $27.60\%\pm 0.95\%$ 、 $20.77\%\pm 3.97\%$,可以看出中、低剂量组凋亡率比较接近,高剂量组诱导凋亡作用最为明显,见表 11、图 9。



A. 空白对照组; B. Suc-GTS-lip 高剂量组; C. Suc-GTS-lip 中剂量组; D. Suc-GTS-lip 低剂量组(图 9 同)。

图 8 Suc-GTS-lip 给药 24 h 后 HSC 的形态(×200)
Fig. 8 Morphologies of HSCs after 24 h of Suc-GTS-lip injection(×200)

表 11 HSC 细胞凋亡率的流式细胞仪分析($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 11 Flow cytometer analysis of apoptosis rates in HSC($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	凋亡率/%
Suc-GTS-lip 高剂量	75.23±2.56
Suc-GTS-lip 中剂量	27.60±0.95
Suc-GTS-lip 低剂量	20.77±3.97
空白对照	4.20±1.04

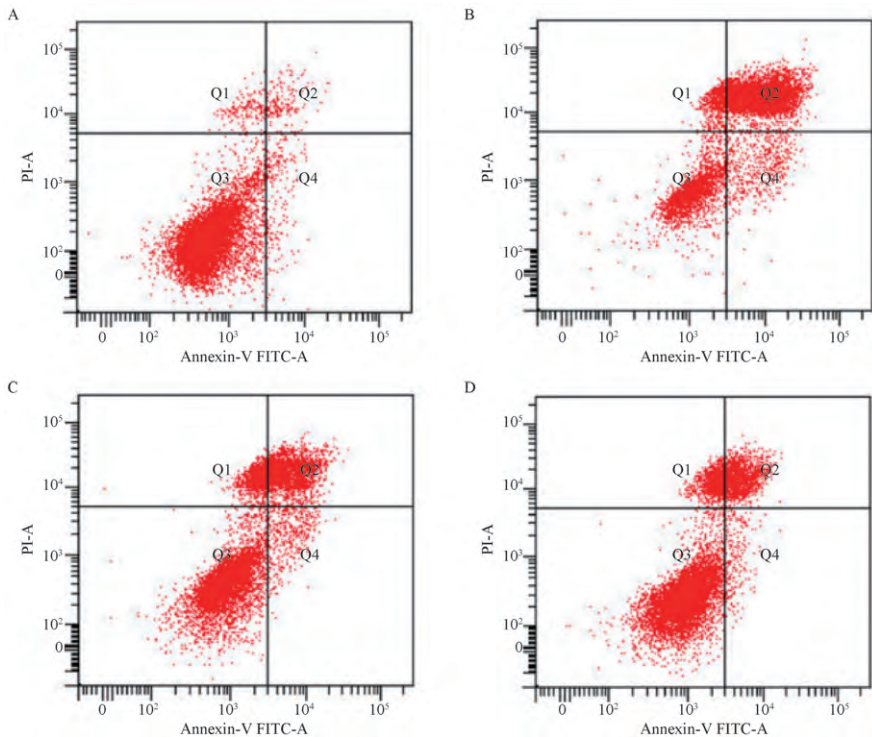
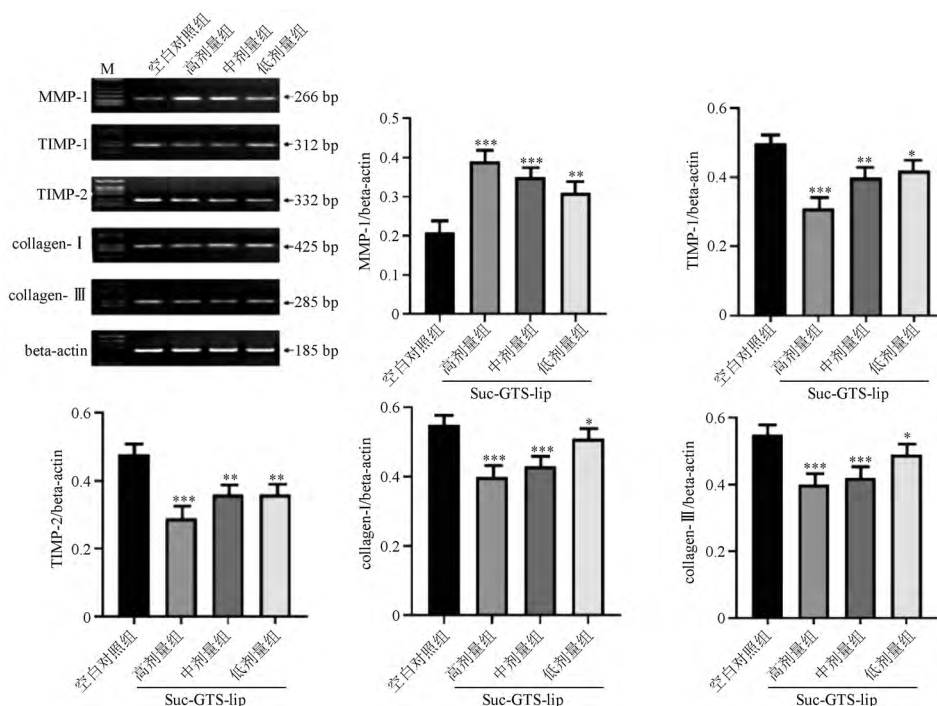


图 9 Annexin V-FITC/PI 测定 HSC 凋亡率流式分析($\bar{x}\pm s, n=3$)
Fig. 9 Flow cytometry analysis of Annexin V-FITC/PI for determining apoptosis rates of HSC ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.8 Suc-GTS-lip 对 HSC 凋亡的分子机制研究

通过凝胶电泳和 RT-PCR 实验结果考察 Suc-GTS-lip 对 HSC 外基质中 MMP-1、TIMP-1、TIMP-2、collagen-I 和 collagen-III mRNA 表达的影响,凝胶电泳

结果显示,HSC 外基质中 MMP-1、TIMP-1、TIMP-2、collagen-I 和 collagen-III 的 mRNA 条带清晰可见,可用于灰度定量分析。Suc-GTS-lip 高、中、低剂量组分别干预 HSC 24 h 后,RT-PCR 检测结果见图 10。



与对照组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 10 Suc-GTS-lip 对 HSC 中 MMP-1、TIMP-1、TIMP-2、collagen-I 和 collagen-III 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effects of Suc-GTS-lip on MMP-1, TIMP-1, TIMP-2, collagen-I and collagen-III expressions in HSC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

药代动力学显示 Suc-GTS-lip 组血浆中 Sal B 与 TSN 的 AUC 较 GTS-lip 组有所下降,提示可能进入组织脏器中的 Sal B 与 TSN 含量增加;而血浆中甘草次酸的 AUC 较 GTS-lip 组有大幅增加,其原因可能是甘草次酸衍生物(18-GA-Suc)在血液产生分解,使甘草次酸含量增加。与相关研究报道^[12]采用甘草次酸衍生物甘氨酸丁二酸甘草次酸十八烷酯作为配体修饰脂质体搭载 TSN 与 Sal B 相比,复方脂质体中 Sal B 在脾和肺中的含量较高与文献报道一致,但是 18-GA-Suc 表现出更好的肝脏靶向性,能够显著提高 Sal B 在肝脏中的 AUC;Suc-GTS-lip 中的脂溶性药物并未能体现出良好的肝脏靶向性,推测原因为药物包载于脂质体的外脂层,较快进入肝脏后随即被代谢,导致测定结果较低。因此本实验选

择脂溶性荧光染料 DiR, DiR 不易被肝脏快速代谢,360 min 内仍能保持较强的荧光强度,其分布情况有可能表现出与脂质体中脂溶性药物 TSN 与 GA 相似的性质。实验中发现 DiR 染料由于脂溶性较强,配制 DiR 溶液对照组时,使用聚山梨酯 80 作为增溶剂无法达到与 Suc-GTS-lip 中所含 DiR 相同的荧光强度,因此不具有可比性。但通过预实验发现 DiR 溶液对照组在小鼠体内分布情况为肺脏中荧光强度最强,因而可得出结论, Suc-GTS-lip 具有改变药物分布性质的作用,活体成像显示 Suc-GTS-lip 在肝脏中的分布量高于其他各脏器,体现出一定的肝脏靶向性。

[参考文献]

- [1] NEGISHI M, IRIE A, NAGATA N, et al. Specific binding of glycyrrhetic acid to the rat liver membrane[J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1066(1): 77.



- [2] 杨山麦,周方成,顾云娣,等. 离体鼠肝细胞膜上甘草次酸和甘草酸受体的表达[J]. 中华肝脏病杂志,1999, 7(S1):27.
- [3] 米雪,赵岩,杨慧. 甘草次酸及其衍生物在肝靶向药物中的应用[J]. 天津药学,2014,26(1):41.
- [4] 张钰欣. 甘草次酸衍生物修饰脂质体的制备及肝靶向性评价[D]. 唐山:华北理工大学,2020.
- [5] DRANOFF J A, WELLS R G. Portal fibroblasts: underappreciated mediators of biliary fibrosis[J]. Hepatology,2010,51(4):1438.
- [6] NOVO E, BUSLETTA C, BONZO L V, et al. Intracellular reactive oxygen species are required for directional migration of resident and bone marrow-derived hepatic pro-fibrogenic cells[J]. J Hepatol,2011,54(5):964.
- [7] KISSELEVA T, UCHINAMI H, FEIRT N, et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis[J]. J Hepatol,2006,45(3):429.
- [8] ZEISBERG M, YANG C, MARTINO M, et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition[J]. J Biol Chem,2007,282(32):23337.
- [9] 黄倩,杨燕,曾锐,等. 基质金属蛋白酶/基质金属蛋白酶水解酶对肝纤维化的调控及相关治疗药物研究进展[J]. 临床肝胆病杂志,2022,38(6):1420.
- [10] 管辉达,王秀丽,林珈好,等. 甘草次酸衍生物受体靶向复方脂质体的制备及其体外释放研究[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2014,16(10):2190.
- [11] 林珈好,王秀丽,王玉蓉,等. 甘草次酸-丹参酮Ⅱ_A 复方脂质体处方优化及制备工艺研究[J]. 中草药,2013,44(7):816.
- [12] 金粟,王秀丽,李耿. 甘草次酸衍生物 18-GA-Gly 介导肝主动靶向脂质体的制备及体内相关研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(21):4120.

[责任编辑 孔晶晶]