中 国 科 学
1992年2月 B 辑 第2期

脂质体导向给药治疗缺血性心脏病的可行性研究(I)

唐朝枢 苏静怡 李兆萍 张灵芝
杨 军 齐 鸣 刘福安 汤 健

(北京医科大学病理生理教研室,心肺内分泌研究室,北京 100083)

摘 要

本工作在离体大鼠心肌细胞、离体灌流大鼠和家兔心脏模型上,对脂质体作为药物载体导向治疗缺血性心脏病的可行性进行了基础研究. 结果表明,心肌细胞可通过融合(Fusion)、内吞(Endocytosis)、吸附(Adsorption)和磷脂分子交换(Exchange)四种方式与脂质体相互作用. 细胞摄取脂质体的方式主要取决于脂质体的理化性质. 缺氧改变了心肌细胞对脂质体的摄取方式并增加其摄取能力. 缺血心肌组织对脂质体、尤其对带正电荷脂质体的摄取显著增加. 其摄取量按序为缺血-再灌注区 > 梗塞边缘区 > 非缺血区 > 梗塞区. 上述实验结果提示: 脂质体作为药物载体可将药物输送到缺血心肌组织和心肌细胞内.

关键词: 心脏、心肌细胞, 心肌缺血,缺氧,脂质体

目前,缺血性心脏病的治疗取得了重大进展,重点是重建缺血区血流灌注,缩小梗塞面积. 但是如何保护缺血损伤心肌仍是急待解决的问题. 如能将某些心肌细胞保护剂定向输送到缺血区心肌组织和细胞内,对于治疗缺血性心脏病将具有非常重要的临床意义.

脂质体(Liposome)是用人工方法制备的、由磷脂双分子层膜形成的微球(Vesicles). 作为药物载体导向治疗缺血性心脏病,脂质体必须尽可能多的到达心脏(器官靶向性)、缺血心肌(组织靶向性)、易把药物输送给心肌细胞或特定亚细胞部位,如质膜、溶酶体或胞浆内(细胞及亚细胞靶向性). 本工作在离体心肌细胞和灌流的心脏模型上,针对上述基本问题进行了系统研究.

一、材 料 和 方 法

1. 材料

(1)仪器和试剂 Liposomate (Dianorm), 液体闪烁计数仪(Beckman LS 8000), 生理四导仪(Sanei 2G66)、原子吸收分光光度计(GGX-1), 紫外分光光度计(UV-120);磷

本文1991年3月2日收到,1991年8月15日收到修改稿.

脂购于 Avanti Inc., ^{14}C- 磷脂和 ^{3}H- 菊粉为 Amersham 产品; 胶元酶等生化试剂系Sigma Co. 产品; 一般试剂为市售分析纯商品.

(2)脂质体 在 Liposomate 仪上制备脂质体[1],用去污剂控制透析法. 不同成分的磷脂(含 ^{14}C- 磷脂)溶于氯仿: 甲醇(4:1 v/v)溶剂中,在室温下氮气吹干,加入含胆酸钠(与磷脂量呈 5:1 mol 比)的磷酸缓冲液(PBS). ^{3}H-菊粉为脂质体水相标识(Marker),共溶于含 胆酸钠的 PBS 中. PBS (mmol/L): NaCl 154.3, NaH_2PO_4 0.4, Na_2HPO_4 1.5, pH 7.3. 磁力搅拌过夜后,在高于所用磷脂相变温度(Transition temperature, Tc)条件下,持续用 PBS 透析 3h 制成脂质体. 经检测, 其脂质体内残余的去污剂少于初始水平的0.5%. 电子显微镜检查各种脂质体为均匀的大单层脂质体, 脂质体的成分不同,其直径在 42±2 — 79±4 nm.

2. 方法

(1)大鼠心肌细胞分离和细胞摄取脂质体测定 按改良的 Farmer 方法,用胶元酶灌流分离成年大鼠耐受钙的心肌细胞[2]. 收获量 5.2±0.2×10^6 个细胞/心脏, 2.0×10^5 个细胞/mg 蛋白(Pr). 细胞悬浮于 Krebs-Henseleit (KH)(mmol/L: NaCl 111.8, KCl 4.7, $KH_2PO_4$0.9, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 25.0, $CaCl_2$ 2.0, Glucose 10.0, pH 7.4)液中,室温下, 89.4±1.0% 为杆形细胞且排斥台盼蓝染色, 其乳酸脱氢酶释放率为6.5±0.6%.

心肌细胞摄取脂质体测定: 新分离心肌细胞(10^6 细胞/2ml)与新制备的双标记脂质体(2mg 磷脂/2ml)在恒温水浴振荡器上(60 beats/min 37°C), 与 95% O_2-5% CO_2 平衡孵育,用冷KH 液冲洗细胞三次终止孵化,每次冲洗均换新试管以去除脂质体对试管壁非特异性粘附,最后将离心沉淀的细胞用空气吹干,10% Triton X-100 溶解, 在液体闪烁计数仪上测定^{14}C 和 ^{3}H 放射强度.

1)心肌细胞内吞摄取脂质体 按 Post & Papahadjopoulos 方法[3],将心肌细胞置糖酵解和细胞呼吸的联合抑制剂中(5mmol/L NaN_3, 50 mmol/L Deoxyglucose)在37° 预孵化30min,然后与含 ^{14}C- 磷脂的脂质体 37°C 孵育 30min; 对照组在预孵育时不加代谢抑制剂. 按 ^{14}C 放射强度计算,对照组与处理组细胞摄取脂质体差值,即为内吞摄入量.

2) 心肌细胞与脂质体的稳定吸附 按 Pagano & Takeichi 方法[4],心肌细胞悬液与 ^{14}C-脂质体37°C 孵育 30min, KH 液洗三次. 然后再用KH 液混悬心肌细胞,与结晶胰蛋白酶(终浓度为0.01%)25°C 再次孵育10 min,加入大豆胰蛋白酶抑制剂终止反应. 对照组的心肌细胞二次孵育时均不加胰蛋白酶 处理.胰蛋白酶处理后心肌细胞释放 ^{14}C- 脂质量与对照组心肌细胞释放 ^{14}C- 脂质量的差值为心肌细胞吸附脂质体的量.

3)心肌细胞膜与脂质体膜磷脂分子交换 按 Pagano & Huang 方法[5], 心肌细胞与双标记脂质体(^{14}C- 脂质和 ^{3}H- 菊粉)孵育 1h 后冲洗三次,测定沉淀细胞中的 ^{14}C 和 ^{3}H 的放射性. 心肌细胞结合^{3}H- 菊粉表示细胞摄取的整个脂质小体 Vesicles, 包括内吞,吸附和融合三种作用方式. 心肌细胞摄取^{14}C- 脂质和 ^{3}H- 菊粉的差值表示磷脂分子从脂质体转移(交换)到心肌细胞膜的量.

4)膜融合 按 Pagano & Huang 方法[5],测定心肌细胞摄取脂质体总量,然后用总量减去内吞、吸附和膜磷脂分子交换量,称为膜融合量.

5)心肌细胞与脂质体膜磷脂的可逆交换 心肌细胞悬液与 ^{14}C- 脂质体 37°C 孵育 30min 后, 用室温 KH 液冲洗三次,心肌细胞重悬于无^{14}C- 标记的脂质体(终浓度 2mg/2ml)

或无脂质体KH液(对照组)在恒温水浴振荡器上再次37°C孵育2h. 首次孵育时,心肌细胞以各种方式摄取^{14}C-脂质体,再次孵育时已含^{14}C-磷脂的心肌细胞以膜交换方式将^{14}C-磷脂转移到原无标记的脂质体上,离心分离心肌细胞后测定脂质体^{14}C-放射强度为可逆性交换量.

(2)缺氧心肌细胞摄取脂质体　分离的成年大鼠心肌细胞在37°C不同条件下孵育;30min. 对照组: 用95% O_2-5% CO_2平衡孵育; 缺氧组:95%N_2-5% CO_2孵育. 用室温含2%白蛋白的KH液冲洗三次后,KH液重悬心肌细胞, 与^{24}C-磷脂脂质体在37°C,95% O_2-5% CO_2再孵育30min, 按方法(1)测定心肌细胞摄取脂质体的量.

(3)缺氧心肌摄取脂质体

1)离体大鼠心脏缺氧灌流200 — 250 g雄性Wistar大鼠,腹腔注射20%乌拉坦5ml/kg麻醉,摘取心脏悬挂于Langendorff灌流装置上,以95%O_2-5% CO_2平衡的37°C KH液行主动脉逆行灌流, 蠕动泵控制流量为8ml/min, 预灌流15min,待心脏收缩稳定后随机分组,分别用30ml含1, 2-Di-(1-^{14}C)-Oleoyl phosphatidyl-choline(114m Ci/mmol)标记的中性(DOPC)、负电(DOPC/DCP,8 : 2 mol)和正电(DQPC/SA, 8:2mol)脂质体的KH液(终浓度为0.33mg磷脂/ml)循环灌流15min. 每种脂质体灌流心脏都分对照组($n=4$)和缺氧组($n=4$). 对照组的灌流液用95% O_2-5% CO_2平衡,缺氧组的灌流液中不含葡萄糖并用95%N_2-5% CO_2平衡. 结束灌流时取下心脏, 用冷生理盐水从主动脉冲洗后, 称取50mg心尖组织, 甲酸消化, 加入闪烁液(0.4% TP, 0.03% POPOP二甲苯: 无水乙醇70:30 v/v)在液体闪烁计数仪上测定心肌组织结合的^{14}C放射强度,换算成心肌组织摄取脂质体的量.

另取16只大鼠按上述方法分为对照组与缺氧组,循环灌流DOPC/SA脂质体液不同时间,观察心肌摄取脂质体的时间过程.

2)结扎冠状动脉的离体家兔心脏灌流　1.5 — 1.7 kg雄性健康灰兔12只,静脉注射20%乌拉坦5ml/kg麻醉,开胸后,将动物分三组($n=4$), (i)梗塞组: 高位结扎冠状动脉前降支,10min后摘取心脏按上述方法在Langendorff上恒压(8.0 kPa)灌流2 min后,换用50ml含Di-(1-^{14}C)-Oleoyl PC并包裹^{3}H-菊粉的脂质体(DOPC/Chole/SA 7:2:1 mol) KH液(100μg磷脂/ml)循环灌流30min, 再用无脂质体的KH液开放灌流2min, 洗净血管内脂质体; (ii)再灌流组: 方法同(i)组,但在用含脂质体的KH液循环灌流20min时剪开冠状动脉结扎线,再继续循环灌流10min; (iii)对照组: 冠状动脉仅穿线不结扎,其他操作同(i)组. 分别剪取灌流后心脏的梗塞区(无收缩,颜色发暗), 边缘区(梗塞区边缘颜色花斑),再灌区(原梗塞区的中心)和非缺血区(左心室后壁)心肌组织, 按上述方法测定^{14}C和^{3}H放射强度,换算为心肌摄取脂质体的量(μg磷脂/g · W · W).

(4)脂质体在缺血再灌注心肌的亚细胞分布　2.0 — 2.5 kg雄性家兔, 1%普鲁卡因局部麻醉下开胸摘取心脏,悬挂于Langendorff装置上,行主动脉逆行恒压灌流(7.8 kPa),灌流液为经95% O_2 - 5% CO_2平衡的KH液(37°C). 预灌流15min后随机分组: (i)缺血再灌(I/R)组: $n=6$, 心脏停止灌流,保温、保湿旷置30min, 再用50 ml ^{14}C-DOPC (114 mCi/mmol)的脂质体(POPC/Chol/Stearylamine 7:2:1 mol)(终浓度60μg磷脂/ml)的KH液循环再灌流30min. 结束灌流时用30ml冷生理盐水从主动脉逆行冲洗心脏; (ii)不缺血不再灌组: $n=4$, 除心脏不旷置持续用KH液开放灌流外,操作同(i)组.

结束灌流后,取心室肌制作组织匀浆,差速离心分离心肌肌膜[6]、溶酶体[7]和线粒体[8].

Commassia 亮蓝法进行蛋白定量. 上述亚细胞成分经Triton X-100 消化后,按前述方法测定 ^{14}C 放射强度, 换算为所摄取脂质体量(μg 磷脂 / mg Pr).

资料分析: 实验结果以均数 ± 标准误表示,Student's t 检验作统计学处理.

二、结 果

1. 离体大鼠心肌细胞与脂质体的相互作用

在本实验条件下,心肌细胞与脂质体孵育 30min,细胞存活率(排斥台盼蓝染色和LDH 释放)无明显变化. 心肌细胞对带正电脂质体的摄取比负电脂质体高 1 倍以上, 且均高于中性脂质体. 心肌细胞与脂质体相互作用方式: 液态脂质体(Tc 低于 38° C)主要是融合,固态脂质体(Tc 高于 38° C), 主要是内吞和膜磷脂成分的交换,结果见表 1.

表 1 心肌细胞与不同脂质体相互作用方式*

脂质体组分	摄取总量 (nmol/ mg Pr)	内吞 (%)	吸附 (%)	交换 (%)	融合 (%)	磷脂可逆交换 (nmol/mg Pr)
DOPC/ SA (F+)	23.3±2.2	11.8±1.9	9.4±2.3	15.9±2.5	62.9±4.2	2.9±0.5
DOPC/ DPPA(F−)	14.7±1.0	10.0±1.3	6.8+0.4	14.4±0.6	69.0±5.2	1.8±0.3
EggPC(FO)	4.5±0.2	16.0±1.0	14.1±0.6	17.9±2.6	52.0±3.8	0.8±0.1
DSPC/ SA(S+)	220.9±10.2	23.0±3.0	15.7±1.9	39.6±2.4	21.7±2.5	20.3±1.8
DSPC/ DCP(S−)	29.9±1.1	23.3±1.8	13.9±0.6	21.5±1.2	44.3±3.1	3.7±0.3

* $n=6$, F 为 37℃ 液态脂质体, S 为固态脂质体, − 为负电荷, + 为正电荷, % 指占总摄取量的百分数.

表 2 缺氧对心肌细胞相互作用的影响*

脂质体组分	摄取总量 (nmol/ mg Pr)	内吞 (%)	吸附 (%)	交换 (%)	融合 (%)
POPC/ SA(F+)					
对照	21.1± 1.3	10.3±1.2	9.6±0.1	13.6±1.3	66.5±4.4
缺氧	25.7±1.3**	15.5±1.1***	7.3±0.9	11.2±1.3	66.0±4.0
POPC / DPPA (F−)					
对照	17.1±0.6	9.2±1.0	8.8±0.9	18.5±1.1	63.5±3.5
缺氧	19.2±0.9	18.8±2.0***	11.0±1.1	17.2±1.2	53.1±3.0
DSPC/ SA(S+)					
对照	173.3±11.8	27.6±2.0	16.6±1.5	29.3±2.1	26.5±1.1
缺氧	203.4±12.7	32.0±2.3	9.4±0.9***	24.0±2.0	34.7±2.3***
DSPC/ DCP (S−)					
对照	25.1±0.3	9.4±0.7	19.7±1.4	20.1±1.3	50.9±3.1
缺氧	29.2±0.3	14.5±1.0***	9.1±0.8***	18.2±1.4	58.2±2.3

* 表中F 为 37°C 液态脂质体;S 为固体脂质体;+ 为正电荷;− 为负电荷;% 指占总摄取量的;百分数;与对照组比较.
** $p<0.05$. *** $p<0.01$.

脂质体的物理特性,固态或液态和所带电荷是影响心肌细胞与脂质体相互作用的决定因素. 如维持脂质体物理状态不变,改变脂质体成分,将 egg PC(Tc= −15°C)换为 Soybean PC (Tc= −7°C), DOPC (Tc= −22°C)换为 POPC(Tc= −5°C), 仍保持脂质体为液态;DCP

换为 PA 或PS (脂质体均带负电荷)仅轻度影响细胞摄取脂质体总量,并不改变摄入方式的比值(结果未列出).

2. 缺氧对心肌细胞与脂质体相互作用的影响

缺氧不但使心肌细胞对不同脂质体的摄取量增加(增加幅度为 12—22%),而且改变心肌细胞摄取脂质体的方式,增加了融合方式摄取固态脂质体,吸附摄取减少,而对各种脂质体的内吞摄取都明显增加(表 2).

3. 缺氧对心肌摄取脂质体的影响

(1)离体大鼠心脏缺氧灌流的结果见表 3. 正常心肌(对照组)摄取正电脂质体 > 中性脂质体 > 负电脂质体. 离体心脏灌流无能量底物和经 95%N_2-5% CO_2 平衡(氧分压<1.0 kPa)的 KH 液,心肌对带正电、中性和负电脂质体的摄取均明显增加,分别增加 31.7%, 50.1% 和 65.5%.

表 3　缺氧对心肌摄取不同脂质体的影响($n=4$)*

脂质体组分	对照组 (μgPL/ g · W · W)	缺氧组 (μgPL/ g · W · W)
DOPC/ SA (+)	1066.7±41.4	1399.3±69.7
DOPC (0)	206.4±14.1	309.8±24.0
DOPC/ DCP (−)	118.0±7.2	195.3±4.7

* 表中+ 为正电荷, − 为负电荷, 0 为中性.缺氧组与对照组比较,缺氧组 $p<0.01$

心肌摄取脂质体呈时间依赖性关系如图 1所示. 灌流 5min 时,对照组摄取量为 15min (饱和值)的 65.8%, 而缺氧组为 81.8% ($p<0.01$), 表明缺血心肌摄取脂质体的过程更迅速.

(2)冠状动脉结扎和再灌注对家兔心肌摄取脂质体的影响,见图 2. 用含 ^{3}H- 菊粉的 ^{14}C-磷脂脂质体灌注冠状动脉结扎的离体家兔心脏,发现梗塞区摄取的脂质体仅为非缺血区的 69.8%(按 ^{14}C 计算)和70.1%(按 ^{3}H 计算);而梗塞边缘区心肌(血流供应不足)摄入量较非缺血区增加 17.2%(^{14}C) 和 9.8%(^{3}H)($p<0.01$). 缺血心脏再灌注时,心肌摄取脂质体显著增加,再灌区心肌摄入比非缺血区增加18.0% (^{14}C)或23.3% (^{3}H).

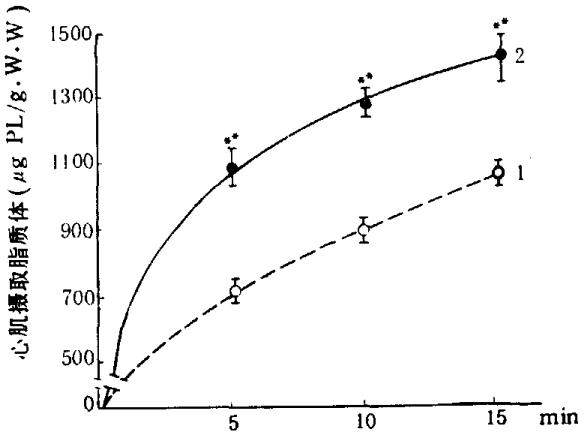


图 1　离体大鼠心肌摄取DOPC/ SA 脂质体时间曲线

(1 —— 对照组, 2 —— 缺氧组, $^{**}p<0.01, n=4$)

梗塞组心脏与对照组比较, 虽然梗塞区心肌摄取脂质体明显减少,但非缺血区心肌摄入脂质体(^{3}H)较对照组心肌增加 11.3% ($p<0.01$). 再灌组心脏不仅再灌区心肌摄入脂质体较对照组心肌增加 52.6%(^{14}C)或 64.8%(^{3}H)($p<0.01$), 而且非缺血区的摄入也明显增加,分别为 25.3% 和 37.8%($p<0.01$) (见表 4).

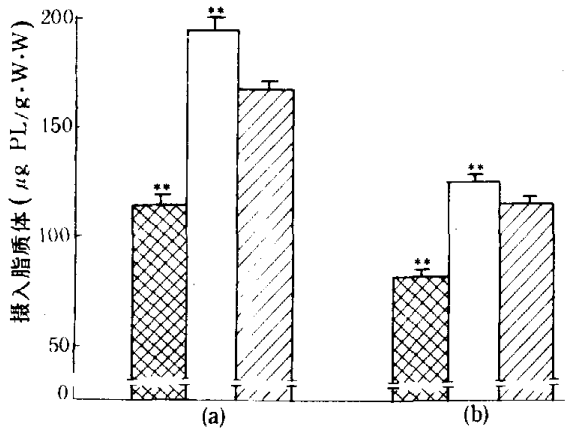


图2 梗塞区(▨)、梗塞边缘区(□)和非缺血区(▨)心肌摄取脂质体比较
((a)按 ^{14}C 标记计算, (b)按 ^{3}H 标记计算与非缺血区比较 $^{**}p<0.01, n=4$)

表4 实验各组心脏不同部位心肌摄取脂质体比较

	梗塞区或再灌区(μg/g·W·W)		非缺血区(μg/g·W·W)	
	^{14}C 标记	^{3}H 标记	^{14}C 标记	^{3}H 标记
1.梗塞组	115.3+3.8	81.0±2.5	165.3 ±3.7	115.5±1.0
2 再灌组	236.5±4.0	176.3±7.3	200.5±3.5	143.0±1.2
3 对照组	155.0±10.5	107.0±1.7	160.0±9.4	103.8±1.1
$P1-2$	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
$P2-3$	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
$P1-3$	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01

4. I/R 对心肌摄取脂质体亚细胞分布的影响

心肌摄入脂质体的亚细胞分布见表5. I/R 时,脂质体在心肌组织的分布量增加,其主要是肌膜分布增加.

表5 I/R 对心肌摄取脂质体亚细胞分布的影响*

组别	n	组织匀浆	心肌肌膜	溶酶体	线粒体
不缺血不再灌	4	1.6±0.1	4.8±0.5	4.8±0.9	5.8±0.8
I/R	6	2.4±0.3**	12.8±1.2***	6.8±0.9	6.3±0.6

* 单位: μg 磷脂/mg 蛋白, ** $p<0.05$, *** $p<0.01$.

三、讨 论

心肌缺血的治疗至今仍颇为棘手,探寻将细胞保护剂特异地运载到缺血心肌,作为治疗心肌缺血的新措施是非常有意义的. 脂质体作为抗肿瘤和抗感染药物的载体已试用于临床并取得较满意的效果,但作为心血管药物载体尚未受到足够重视. 1977年 Caride[9] 在狗急性心肌梗塞模型上,观察到静脉注射的脂质体聚集于缺血心肌; 1981年 Muller[10] 在分离的心肌

细胞上发现,高钾去极化的细胞摄入脂质体显著增加,因而推测脂质体作为载体运送药物到达缺血心肌部位的心肌细胞(具有去极化损伤)是可行的.

脂质体对机体无毒和无免疫原性,作为载体可携载各种药物(脂溶性或水溶性),输送药物到特定的组织和细胞内,可减少药物用量,降低药物毒性和副作用,提高药效,是非常有前途的治疗措施.

腊质体能否将药物送入心肌细胞内? 本工作在细胞水平上实验结果表明,不同成分的脂质体可将药物送入不同的亚细胞部位,如以融合方式可将脂质体水相内的水溶性药物送入胞浆,脂相内的亲脂性药物送入质膜; 内吞使药物到达溶酶体; 膜交换可将某些成分掺入质膜,吸附方式有利于药物在细胞局部浓度的提高. 有意义的是缺氧显著促进心肌细胞摄取脂质体,尤其是使融合摄取增加,降低了吸附的比例. 因此脂质体作为药物载体将药物送入心肌细胞,尤其是缺氧损伤的心肌细胞是可行的.

缺血心肌组织供血减少,脂质体能否为缺血心肌所摄取? 离体灌流的大鼠心脏,其心肌摄取脂质体量取决于脂质体的物理特性,对带正电脂质体摄取量最大,与文献 报道相符[11]. 在模拟缺血条件下(缺 O_2 和能量底物)灌流的心脏对带不同电荷脂质体的摄取均显著增加. 在冠状动脉结扎的离体家兔心脏灌流模型上,心肌摄取脂质体,缺血再灌区 > 梗塞边缘区 > 非缺血区. 缺血再灌的心肌摄取脂质体显著增加,主要是在肌膜的分布增加. 结果提示: 心肌对脂质体的摄取不完全取决于冠状动脉血流的供应,也与组织缺血损伤状态有关. 用 ^{14}C- 磷脂作为脂质体的脂相标记,^{3}H- 菊粉作为水相标记,证实脂质体作为载体不论是运载亲脂性或/和亲水性药物都可有效地输送到缺血损伤的心肌组织.

关于缺血心肌摄取脂质体能力增强的机制、静脉注射脂质体能否到达心脏(器官靶向性)以及脂质体作为药物载体治疗缺血有关的心脏疾病是否有效等将另文发表.

本文中部分工作是作者在美国 St. Louis 大学生理系M-S Liu 教授指导下并在 Liu 教授实验室完成, 谨此致谢.

参　考　文　献

[1] Zumbuehl, T. & Weder, H. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **640**(1981), 252.
[2] 唐朝枢等, 北京医科大学学报, **19**(1987), 299.
[3] Poste, G. & Papahadjopoulos, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**(1976), 1603.
[4] Pagano, E. R. & Takeichi, M., *J. Cell Biol.*, **74**(1977), 531.
[5] Pagano, E. R. & Huang, L., *ibid.*, **67**(1975), 49.
[6] Maisel, A. S. et al., *Am. J. Physiol.*, **253**(1987), H1159.
[7] Ferguson, W. W. et al., *ibid.*, **222**(1972), 450.
[8] Sayeed, M. M. & Baue, A. E., *ibid.*, **220**(1971), 1275.
[9] Garide, V. J., *Science*, **198**(1977), 735.
[10] Mueller, T. M., *Circ. Res.*, **49**(1981), 405.
[11] Kayawake, S. & Kako, K. J., *Basic. Res. Cardiol.*, **77**(1982), 668.