

仙人掌 SOD 脂质体的制备研究^①

余旭亚, 赵声兰, 李 涛, 张荣庆, 陈朝银

(昆明理工大学 生物与化学工程学院, 云南 昆明 650224)

摘要 采用逆相蒸发法制备仙人掌 SOD 脂质体. 最佳工艺为: 卵磷脂与胆固醇的质量比为 2: 1, 乙醚与 SOD 酶液的比为 3: 1, 经超声乳化和旋转蒸发可制得包封率为 56% 的脂质体. 包封后的 SOD 在胃蛋白酶的作用及高温下, 比游离的 SOD 稳定.

关键词: 仙人掌 SOD; 脂质体; 逆相蒸发; 稳定性

中图分类号: R945

文献标识码: A

文章编号: 1007- 855X(2002)01- 103- 03

超氧化物歧化酶(SOD)是一类能特异地清除超氧离子的金属酶,目前在动物的许多病理模型上和临床试验中都表现了良好的防治效果.然而,SOD是一种生物蛋白,作为药用酶用于临床将受以下因素的影响:(1) $T_{1/2}$ 短(6~ 10 min);(2)分子量大,不易透过细胞膜;(3)抗原性;(4)如用于口服,易被蛋白酶水解.鉴于这些不利因素,对SOD进行改造就显得十分必要^[1,2].脂质体作为药物转运系统,不仅克服了上述缺点,而且能改变SOD的体内药动学行为,控制药物释放到达靶器官^[3].因此,SOD的脂质体剂型是其作为药用酶应用的发展方向.

1 材料与试剂

仙人掌 SOD,按照文献^[4]的方法制备;大豆卵磷脂(Sigma 公司),氧化指数 < 0.18 ;胃蛋白酶(Sigma 公司);胆固醇、甘氨酸、乙醚、邻苯三酚、HCl、Tris、正丙醇均为国产生化或分析纯试剂.

2 实验仪器

紫外分光光度计(PE 公司),超声波细胞粉碎机(宁波新芝),高速冷冻离心机(湘西仪器仪表总厂),冻干机(Heto 公司).

3 实验方法

3.1 SOD 的活性测定

根据文献^[5],采用邻苯三酚法测定 SOD 的活性.

3.2 脂质体活性包封率的测定

将脂质体混悬液用高速冷冻离心机于 19 000 r/min 离心 40 min,倾去上清液,加入正丙醇使其破碎^[6],用邻苯三酚法测定 SOD 的活性,计算活性包封率.

3.3 脂质体 SOD(L- SOD)的制备方法及其工艺实验

参照文献^[7]的逆相蒸发法进行.取一定量的胆固醇、卵磷脂,加乙醚溶解,再加入 pH 7.2,4 mM 磷酸缓冲液溶解的 SOD 酶液,用超声细胞破碎仪超声乳化(功率 100 W,总时间:2 min,处理 0.5 min,间歇 0.5 min),使之成为油包水型,即 W/O 型乳液,于旋转蒸发器 25℃减压蒸馏除去低沸点有机溶剂,即得到 SOD 脂质体混悬液,用高速冷冻离心机 19 000 r/min 离心 40 min,除去上清液,使未包入的 SOD 与脂质体分离,沉淀冷冻干燥得到 SOD 脂质体(L- SOD).

① 收稿日期: 2001- 05- 21;

基金项目: 云南省校企合作项目(98YQ018)资助;

第一作者简介: 余旭亚,男,1969年生,硕士,工程师,主要研究方向:酶工程.

据文献^[8]报道,卵磷脂和胆固醇的质量比(脂胆比)、乙醚和 SOD 水溶液的体积比(油水比)是影响脂质体包封率的主要因素,本实验对此进行了探索.

3.3.1 卵磷脂和胆固醇比例对包封率的影响

取 5 只洁净试管,分别加入 pH 7.2 4 mM 磷酸缓冲液溶解的 SOD 酶液、乙醚、卵磷脂和胆固醇,使脂胆比(质量比)分别为 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 1:2 按照上述方法制备脂质体,测定各管活性包封率.

3.3.2 油水比例对包封率的影响

取 5 只洁净试管,分别加入 pH 7.2 4 mM 磷酸缓冲液溶解的 SOD 酶液、乙醚、卵磷脂和胆固醇,使油水比[O/W(V/V)]分别为 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 按照上述方法制备脂质体,测定各管活性包封率.

3.4 L- SOD 的稳定性研究

3.4.1 胃蛋白酶对 L- SOD 稳定性的影响

参照文献^[9, 10]进行,将胃蛋白酶溶于 pH 1.5 0.05 M 的 Gly-HCl 缓冲液,使胃蛋白酶活力为 2 000 U/mL.取 2 只洁净试管,加入胃蛋白酶 1.0 mL,再分别加入游离 SOD 及 L- SOD 各 1.0 mL;另取一只试管,加入重蒸水 1.0 mL 和 L- SOD 1.0 mL 作为对比,将 3 只试管放入 37 ± 1.0 °C 水浴保温 10 min 后,取出测定三管中 SOD 活性.

3.4.2 温度对 L- SOD 稳定性的影响

取 2 只洁净试管,加入等量 L- SOD 混悬液,一只放入 70 °C 水浴中维持 2 小时后取出测定 SOD 活性,另一只加入正丙醇使之破碎,平行测定 SOD 活性.

4 结果与讨论

4.1 脂胆比对包封率的影响

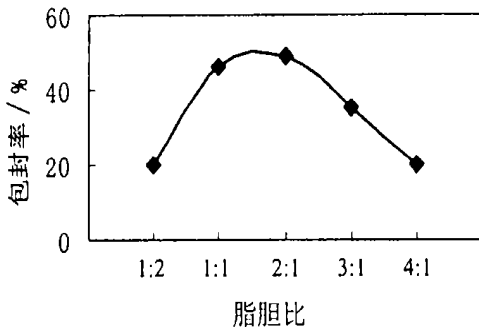


图 1 脂胆比对包封率的影响

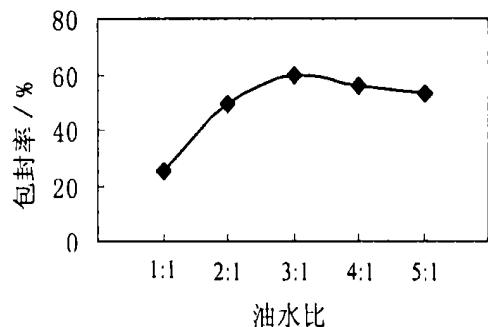


图 2 油水比对包封率的影响

脂胆比对包封率的影响见图 1.胆固醇在脂质体制备中,由于其具有亲水亲油双亲性,起表面活性剂作用,不仅能提高脂质体的稳定性,而且与磷脂能良好相容,并组成接近皮肤生理的细胞间质脂质,更易透入皮肤角质层内.图 1 表明,脂胆比为 2:1 时,SOD 脂质体的包封率最高.胆固醇比例大,包封率高,系胆固醇的表面活性剂作用使油包水乳液能稳定形成所致.胆固醇比例过大时,组成脂质体的磷脂的量太少,脂质体微囊膜形成困难,而且不牢固,反而包封 SOD 比较困难.另外,胆固醇过高,形成的脂质体膜亲水性太强,膜容易破坏,包进去的 SOD 也容易渗漏出来.

4.2 油水比对包封率的影响

改变油相(胆固醇、磷脂、乙醚)与水相(SOD 缓冲水溶液)比例对包封率的影响见图 2.当油相比例少时,趋向于反相形成水包油型乳液,不能很好形成油包水型乳液,包进的 SOD 比较少,当油水比例为 3:1 ~ 4:1 时,包封率比较高.油水比例过高,则脂质体中包入的 SOD 绝对量太少,因此选择 3:1 的油水比例制备 SOD 脂质体比较合适.

4.3 综合投料实验结果

确定脂胆比和油水比后,取卵磷脂 200 mg,胆固醇 100 mg,加入乙醚 30 mL 及酶液 10 mL,按上述方法制得 L- SOD,其包封率为 56%.

据报道^[11], SOD 溶于磷酸盐缓冲液后较为稳定, 能减轻有机溶剂对其活性的影响; 在制备过程中采用间歇超声处理, 可以减少 SOD 的失活, 有利于提高包封率。

4.4 胃蛋白酶对 L- SOD 稳定性的影响

表 1 胃蛋白酶对 L- SOD 和 SOD 活性影响实验加样表及结果

编号	SOD 酶液 / mL	L- SOD / mL	胃蛋白酶 / mL	加胃蛋白酶 之前活性 / U · mL ⁻¹	加胃蛋白酶 之后活性 / U · mL ⁻¹	残余活性 / %
1	—	1.0	0	23.5	—	100
2	—	1.0	1.0	23.5	15	64
3	1.0	—	1.0	751	25	3.3

从表 1 的实验结果可知, 经胃蛋白酶作用 10 min (37 ± 1 °C) 后, 游离 SOD 的活性丧失 96.7%, SOD 脂质体(L- SOD) 活性丧失 36%, 表明脂质体包封的 SOD 对胃蛋白酶的稳定性增加。L- SOD 的这种稳定性可促使药物进入细胞, 药物与生物体内环境隔绝, 减轻蛋白酶的破坏作用而延长其半衰期, 有助于药物进入机体组织后逐渐破膜缓释出 SOD, 其生物活性才表现出来。

4.5 温度对 L- SOD 稳定性的影响

在 70 °C 水浴恒温 2 小时后, L- SOD 的残余活力为 90%, 而游离 SOD 在同样条件下的残余活力为 58.3%, 说明脂质体对 SOD 具有很好的保护作用。

参考文献:

- [1] Yin M, Boon Chock P, Stadtman E. Enzyme function of copper zinc superoxide dismutase as a free radical generator[J]. J Biol Chem, 1993, 268(6): 4099.
- [2] 董荣生, 时松柏, 陆彬. 超氧化物歧化酶脂质体的研究概况[J]. 中国药理学通报, 1996, 12(3): 218.
- [3] Crommelin DJA, Grit M, Talsma H, et al. Liposome as carriers for drugs and antigens: approaches to preserve their long term stability[J]. Brug Dev Ind Pharm, 1994, 20(4): 547.
- [4] 余旭亚, 赵声兰, 李涛, 陈朝银, 郭勇. 仙人掌超氧化物歧化酶的分离 纯化及鉴定[J]. 云南化工, 2000, 27(3): 17~ 19.
- [5] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 连苯三酚法测定超氧化物歧化酶活性的改进[J]. 医药工业, 1988, 19(5): 217~ 219.
- [6] 赵学兰, 张天民. 超氧化物歧化酶冻干制剂及脂质体制剂的研究[J]. 山东医科大学学报, 1986, 24(1): 42~ 48.
- [7] Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposome with large internal aqueous space and high capture by reverse- phase evaporation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75(9): 4194.
- [8] 董荣生, 陆彬, 叶松柏. 超氧化物歧化酶脂质体的制备[J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(9): 400~ 403.
- [9] 袁勤生, 崔玉敏, 张炳然. 口服 SOD 的稳定性及吸收途径研究[J]. 药学生物技术, 1994, 1(1): 24~ 29.
- [10] 张建, 张天民. 超氧化物歧化酶脂质体的制备及其药物动力学[J]. 中国医药工业杂志, 1991, 22(7): 296~ 298.
- [11] Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome entrapped catalase and superoxide dismutase[J]. J Clin Invest, 1984, 73: 87~ 95.

Studies on the Preparation of Liposome of SOD from Cactus

YU Xu- ya, ZHAO Sheng- lan, LI Tao, ZHANG Rong- qing, CHEN Chao- yin

(Faculty of Biochemistry, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract Liposome SOD from cactus is prepared by reverse- phase evaporation. The preparing technology of liposome SOD from cactus is that the proportion of lecithin and cholesterol is 2: 1 (m/m), and that of the aether and SOD is 3: 1 (V/V). With ultrasonic wave emulsification and rotary evaporation, the encapsulation efficiency of liposome- SOD is 56%. The SOD of liposome is more stable than free SOD while imposed pepsin or at high temperature.

Key words: SOD from cactus; liposome; reverse- phase; stability