

辅酶Q₁₀膜修饰脂质体的制备及其抗上皮细胞SRA 01/04凋亡作用研究^Δ

张婧^{1,2*},李翔^{3#},王思玲²,廖正根¹,韩锡镇¹,倪斌¹(1.江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室,南昌 330004;2.沈阳药科大学药学院,沈阳 110016;3.江西中医学院中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,南昌 330006)

中图分类号 R944.1;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1559-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.09

摘要 目的:制备辅酶Q₁₀(Coenzyme Q₁₀)膜修饰脂质体,并对其体外抗人晶状体上皮细胞(HLECs)SRA 01/04凋亡作用进行研究。方法:采用自制N-三甲基壳聚糖(TMC)为膜修饰材料,乙醇注入法制备TMC修饰辅酶Q₁₀脂质体(TMC-CoQ₁₀-LP),以药物包封率为指标,磷脂用量(A)、磷脂与胆固醇质量比(B)、磷脂与药物质量比(C)及制备温度(D)为考察因素,采用正交设计优化处方;考察优化处方制剂的理化性质;将对数生长期的HLECs SRA 01/04随机分为对照组,模型组,低(38 μmol/L)、高(76 μmol/L)浓度CoQ₁₀给药组,采用MTT法考察制剂对细胞的抗凋亡作用。结果:最优处方为A 2%,B 4:1,C 10:1,D 50℃;脂质体呈球形或近球形,粒径呈双峰分布,Zeta电位为24.5 mV,包封率可达98%;与模型组比较,低、高浓度CoQ₁₀给药组细胞活力分别提高(20.1±6.47)%、(60.6±18.4)%,细胞凋亡率分别降为23.67%、18.35%。结论:本脂质体制备方法简便、处方重现性好、包封率稳定;与低浓度制剂比较,高浓度制剂的抗凋亡作用更为明显。

关键词 N-三甲基壳聚糖;辅酶Q₁₀;膜修饰脂质体;制备;包封率;抗凋亡作用

Preparation of Coenzyme Q₁₀(CoQ₁₀)-loaded Film Modified Liposome and Its Anti-apoptotic Effect of Epithelial Cells SRA 01/04 *in vitro*

ZHANG Jing^{1,2}, LI Xiang³, WANG Si-ling², LIAO Zheng-gen¹, HAN Xi-zhen¹, NI Bin¹(1.Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;2.School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;3.National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation of Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀)-loaded film modified liposome, and to study *in vitro* anti-apoptotic effect. METHODS: Using self-synthesized N-trimethyl chitosan(TMC) as film modified material, CoQ₁₀-loaded TMC-coated liposomes (TMC-CoQ₁₀-LP) were prepared by ethanol injection method. The formula was optimized by orthogonal design with amount of SPC (A), the mass ratio of SPC and cholesterol (B), the mass ratio of SPC and drug (C) and the temperature (D) as factors and using the drug entrapment efficiency as index. The physicochemical properties of optimized formulation were evaluated. Human lens epithelial cell SRA 01/04 at logarithmic growth phase were randomly divided into control group, model group, CoQ₁₀ low-concentration (38 μmol/L) and high-concentration (76 μmol/L) groups. The anti-apoptotic effects of TMC-CoQ₁₀-LP on SRA 01/04 were determined by MTT assay. RESULTS: The optimal formulation was as follows: A 2%, B 4:1, C 10:1 and D 50℃. TMC-CoQ₁₀-LP was spherical-shaped with a bimodal size distribution. Zeta potential was 24.5 mV and the drug encapsulation efficiency achieved 98%. Compared with model group, the cell viability was elevated by (20.1±6.47)% in TMC-CoQ₁₀-LP with low concentration and (60.6±18.4)% in TMC-CoQ₁₀-LP with high concentration. The rates of apoptotic cells were decreased to 23.67% and 18.35%. CONCLUSIONS: The method is simple, reproducible and stable in entrapment efficiency, the anti-apoptotic effect of TMC-CoQ₁₀-LP with higher concentration of CoQ₁₀ was more significant.

KEY WORDS N-trimethyl chitosan;Coenzyme Q₁₀;Film modified liposome;Preparation;Entrapment efficiency;Anti-apoptotic effect

白内障作为一种慢性疾病,往往需要患者长期服用药物以达到治疗的目的。自由基及相关的氧化应激是白内障发生发展过程中改变晶状体生理功能、形成白内障的枢纽^[1]。近20

Δ基金项目:江西省青年科学基金项目资助(No.20114BAB215038);江西省自然(青年)基金计划资助(No.20122BAB215018);江西省教育厅青年基金项目资助(No.GJJ12535、GJJ12536)

* 讲师,博士。研究方向:中药新剂型及新技术。电话:0791-87119011。E-mail:evens_zhang@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:药物新剂型及新技术。电话:0791-87119650。E-mail:sterlinghawk@126.com

年来,将各种具有生理相容性或营养性抗氧化剂用于抗白内障治疗的研究方兴未艾。辅酶Q₁₀(Coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀)是帮助战胜心脏病、癌症、老化等的突破性营养剂,通过稳定线粒体电子传递链,减少各复合物解耦联的几率,从而减少超氧阴离子的产生;同时还还原态的CoQ₁₀可清除自由基^[2],与另一种脂溶性抗氧化剂维生素E(VE)相比,CoQ₁₀抗氧化能力更强^[3],并且参与VE的体内循环再生,对视网膜、角膜光损伤具有预防作用^[4-5],在预防及治疗白内障方面具有广阔的治疗前景。然而由于其分子质量较大、光稳定性差及脂溶性强,导致CoQ₁₀跨生物膜吸收困难、生物利用度低,同时常规眼用制剂具有角

膜前滞留时间短、难以透过角膜特殊脂层交替结构、上皮细胞的紧密连接等问题^[6]。

研究表明具有生物黏附性能的聚合物修饰脂质体可通过脂质体表面理化性质的改变,从而延长药物滞留时间^[7],实现载体的跨细胞转运或诱导的上皮层紧密连接可逆性打开,从而很大程度上提高药物在靶组织的药物浓度,提高其生物利用度^[8-9]。因此,本课题采用自制水溶性、荷电性均优于壳聚糖的*N*-三甲基壳聚糖(*N*-trimethyl chitosan, TMC)为膜修饰材料,利用TMC的生物黏附性及促透作用^[10],以乙醇注入法制备眼用TMC修饰的辅酶Q₁₀脂质体(TMC-modified CoQ₁₀-loaded liposomes, TMC-CoQ₁₀-LP);利用正交设计,以包封率为评价指标,筛选TMC-CoQ₁₀-LP最优处方并对其体外抗氧化损伤能力进行考察。为开发辅酶Q₁₀的新药理作用提供基础资料,并为同类大分子药物(多肽、蛋白及酶)眼部给药传递系统的建立提供借鉴。

1 材料

JEM-1200EX 透射电子显微镜(日本Jeol公司);JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);Nicomp 380 激光粒度测定仪(美国Nicomp公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂);CF-Autoflow CO₂ 细胞培养箱(美国NuAire公司);Biofuge 28RS 低温高速离心机(德国Heraeus公司);680 酶标仪、FACSCalibur 流式细胞仪(美国Bio-Rad公司)。

CoQ₁₀ 对照品(台州市开创化工有限公司,批号:201001S1,纯度:85%);TMC(自制,季铵化程度:67.5%,分子量:450 kD);大豆磷脂(SPC,上海太伟药业有限公司,批号:090515);胆固醇(天津市博迪化工有限公司,批号:20050913);MTT(批号:120601)、碘化丙啶(批号:094K3731)、二甲基亚砜(批号:S16063)均来自美国Sigma公司;其他试剂均为分析纯。

永生性人晶状体上皮细胞(HLECs)SRA 01/04 细胞(中国医学科学院)。

2 方法与结果

2.1 CoQ₁₀的含量测定

2.1.1 色谱条件。色谱柱为Kromasil ODS C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-乙醇(1:1, V/V),流速为1.0 ml/min;检测波长为275 nm;柱温为(25±1)℃;进样量为20 μl。

2.1.2 标准曲线的制备。称取CoQ₁₀对照品适量,以无水乙醇制备标准贮备液。移取适量,用无水乙醇稀释,配制质量浓度分别为0.974、7.792、14.610、21.430、28.250 μg/ml的CoQ₁₀溶液,按“2.1.1”项下色谱条件,以样品的色谱峰峰面积(*A*)对CoQ₁₀质量浓度(*c*, μg/ml)进行线性回归,得标准曲线方程为: $A = 1.793 \times 10^4 c - 0.299 \times 10^4$ ($r = 0.9999$)。可见CoQ₁₀在0.974~28.25 μg/ml范围内,色谱峰峰面积积分值与检测质量浓度呈良好的线性关系。日内精密度平均为14.54 μg/ml, RSD=0.33% ($n=3$);日间精密度平均为14.55 μg/ml, RSD=1.6% ($n=3$);平均加样回收率为100.8%, RSD=1.63% ($n=3$)。

2.1.3 包封率的测定。采用有机溶剂提取法测定药物包封率^[11-12]。①取适量脂质体,加入2 ml吐温80-无水乙醇溶液(10%, *m/V*),充分混匀增溶。加入5 ml正己烷,涡旋混合5 min,经2 000 r/min离心10 min,取正己烷层,重复操作3次,合并。氮气吹干后用无水乙醇溶解至适宜浓度,计算CoQ₁₀总含

量($C_{总}$)。②另取适量脂质体,加入5 ml正戊烷,涡旋混合5 min,经2 000 r/min离心10 min,取上层正戊烷层,重复操作3次,洗脱游离CoQ₁₀,将得到的脂质体,加入2 ml吐温80-无水乙醇溶液(10%, *m/V*),充分混匀增溶。加入5 ml正己烷,涡旋混合5 min,经2 000 r/min离心10 min,取正己烷层,重复操作3次,合并。氮气吹干后无水乙醇溶解至适宜浓度,计算脂质体包裹的CoQ₁₀含量($C_{包}$)。按下式计算包封率(Entrapment efficiency, EE, %)= $C_{包}/C_{总} \times 100\%$ 。

2.2 CoQ₁₀-LP的制备

2.2.1 单因素试验。采用乙醇注入法制备CoQ₁₀-LP。以包封率、放置是否分层、均匀性为指标,考察磷脂用量、磷脂与胆固醇质量比、磷脂与药物质量比、制备温度、搅拌速度与时间。

①磷脂用量:经预试验发现磷脂用量过低,所得脂质体粒径小而均匀,但载药量小;磷脂用量过大,不但脂质体粒径较大,而且可能出现磷脂碎片,易引发絮凝、融合,脂质体放置稳定性差,但载药量大、包封率提高。综合比较分析后,磷脂用量定为1%~5%。

②磷脂与胆固醇质量比:胆固醇被称为膜流动性的调节剂,当制备温度在脂质相变温度以上时,胆固醇可降低酰基链的自由度使脂质双层排列紧密,降低膜的流动性;当制备温度在脂质相变温度以下时,胆固醇可使有序的胶相流动性增加^[13],这种流动性变化与膜的通透性变化相平行。由于胆固醇可镶嵌入膜,使膜的刚性增强、曲率变小,而CoQ₁₀包裹在脂质双分子层膜之间,从而使等量脂质中CoQ₁₀的包封量减少。参考文献及预试验结果,磷脂与胆固醇质量比为2:1~4:1。

③磷脂与药物质量比:药物投量过大会超出磷脂的承载能力,容易在放置过程中析出。预试验结果表明,当磷脂与药物质量比小于3:1时,CoQ₁₀-LP的稳定性较差。

④制备温度:制备温度通常在脂质相变温度以上才能使磷脂分散均匀、保证体系的均一性并加速乙醇挥发,但温度过高容易造成磷脂的氧化,使水分蒸发,往往造成药物析出,故选择40~60℃为制备温度。

⑤搅拌速度与时间:乙醇在注入的同时挥发,搅拌可使形成的囊泡分散并稳定,但搅拌速度过快、时间过长,会使水分蒸发、CoQ₁₀-LP的稳定性下降。通过预试验,搅拌速度设为100~120 r/min,搅拌时间设为30~45 min。

2.2.2 正交设计优化处方。根据单因素考察结果,采用正交设计考察磷脂用量(A)、磷脂与胆固醇质量比(B)、磷脂与药物质量比(C)及制备温度(D)对脂质体包封率的影响。正交设计因素与水平见表1。以包封率为评价指标,CoQ₁₀-LP的正交试验结果见表2,方差分析见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

| 水平 | A, % | B, g/g | C, g/g | D, °C |
|----|------|--------|--------|-------|
| 1 | 1 | 4:1 | 3:1 | 40 |
| 2 | 2 | 3:1 | 5:1 | 50 |
| 3 | 3 | 2:1 | 10:1 | 60 |

由表2及表3可知,各因素对脂质体包封率的影响程度大小为A>B>D>C,最佳处方为A₂B₃C₃D₂,即磷脂用量为2%,磷脂与胆固醇质量比为4:1,磷脂与药物质量比为10:1,制备温度为50℃。

2.2.3 工艺验证试验。按照优化处方制备3批CoQ₁₀-LP,测定其理化性质,结果见表4。

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal experiments

| 水平 | A | B | C | D | EE, % |
|-------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 97.5 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 96.0 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 94.5 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 99.2 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 98.9 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 99.6 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 97.5 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 90.1 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 81.1 |
| \bar{K}_1 | 96.000 | 98.067 | 95.733 | 92.500 | |
| \bar{K}_2 | 99.233 | 95.000 | 92.100 | 97.700 | |
| \bar{K}_3 | 89.567 | 91.733 | 96.967 | 94.600 | |
| R | 9.666 | 6.334 | 4.867 | 5.200 | |

表3 方差分析

Tab 3 Results of variance analysis

| 因素 | 离均差平方和 | 自由度 | F | P |
|----|--------|-----|-------|-------|
| A | 291.6 | 2 | 947.6 | <0.05 |
| B | 120.4 | 2 | 391.1 | <0.05 |
| C | 76.7 | 2 | 249.1 | <0.05 |
| D | 82.2 | 2 | 267.0 | <0.05 |

表4 3批CoQ₁₀-LP的理化性质Tab 4 Physical and chemical properties of 3 batches of CoQ₁₀-LP

| 批次 | 性状 | 电位, mV | 粒径, nm | EE, % |
|----|----------|--------|--------|-------|
| 1 | 透明澄清,有乳光 | -18.2 | 151 | 97.9 |
| 2 | 透明澄清,有乳光 | -18.4 | 148 | 98.9 |
| 3 | 透明澄清,有乳光 | -18.3 | 148 | 97.0 |

表4结果显示,平均EE为(98.0±1.0)%,均在理论预测范围之内,表明优化处方重现性好、EE稳定。

2.3 TMC-CoQ₁₀-LP的制备

室温下以100 r/min转速将制备好的CoQ₁₀-LP以1:1(V/V)加入到1.0% (m/V)的TMC溶液中,搅拌10 min后10℃下孵育60 min^[8],即得TMC-CoQ₁₀-LP。

2.4 修饰脂质体的形态、电位及粒径

将载有Formvar支持膜的铜网置于蜡板上,在膜上滴上CoQ₁₀-LP及TMC-CoQ₁₀-LP样品,滴加0.3% (V/V)磷钨酸,自然晾干后,置于透射电镜下观察,结果见图1。

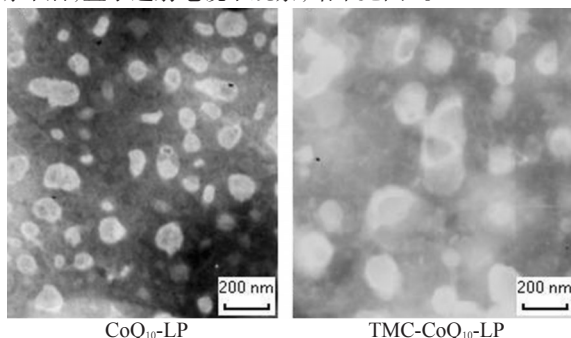


图1 制剂的电镜图(×100 000)

Fig 1 TEM of the preparations(×100 000)

CoQ₁₀-LP及TMC-CoQ₁₀-LP形态均为球形或近球形,TMC-CoQ₁₀-LP粒径较大。

取2种脂质体混悬液适量,稀释至适当倍数,测定脂质体的粒径大小及分布和Zeta电位,结果见表5。

表5 2种脂质体的平均粒径及电位

Tab 5 Mean particle sizes and Zeta potentials of 2 liposomes

| 脂质体 | 平均粒径, nm | | Zeta电位, mV |
|---------------------------|----------------|----------------|------------|
| | D ₁ | D ₂ | |
| CoQ ₁₀ -LP | 149.0 | | -18.36 |
| TMC-CoQ ₁₀ -LP | 78.00 | 334.2 | 24.50 |

由表5可知,TMC-CoQ₁₀-LP相对于CoQ₁₀-LP粒径增大,且呈双峰分布(故粒径有D₁和D₂)。CoQ₁₀-LP经TMC包覆后,Zeta电位由负值变为正值,说明TMC已经包覆在脂质体的表面。

2.5 TMC-CoQ₁₀-LP体外抗SRA 01/04细胞凋亡试验

取对数生长期的SRA 01/04细胞随机分为4组,各组细胞的培养液及试验方案设定如下:(1)空白组:最低必需(MEM)培养液;(2)模型组:含100 μmol/L H₂O₂的MEM培养液作用60 min;(3)低浓度CoQ₁₀给药组:38 μmol/L TMC-CoQ₁₀-LP预先培养细胞24 h后,更换为含100 μmol/L H₂O₂的MEM培养液作用60 min,然后细胞再经38 μmol/L TMC-CoQ₁₀-LP培养24 h;(4)高浓度CoQ₁₀给药组:76 μmol/L TMC-CoQ₁₀-LP预先培养细胞24 h后,更换为含100 μmol/L H₂O₂的MEM培养液作用60 min,然后细胞再经76 μmol/L TMC-CoQ₁₀-LP培养24 h。

2.5.1 细胞活力的测定^[14-15]。细胞以1×10⁴个/ml的密度接种于96孔培养板中,按上述分组处理后,各孔加入0.5 mg/ml MTT的MEM培养液100 μl,37℃孵育4 h。弃去上清液,每孔加入150 μl DMSO溶液,溶解结晶后用酶标仪于570 nm测定吸光度。每个样品做3个平行孔。空白组的细胞活力定为100%,计算模型组与低、高浓度CoQ₁₀给药组的细胞活力,结果分别为(29.5±1.0)%、(35.3±1.2)%、(47.3±5.0)%。由结果可知,100 μmol/L H₂O₂作用60 min,可造成细胞活力下降(70.5±0.73)%;与模型组细胞相比,当氧化损伤细胞经TMC-CoQ₁₀-LP孵育时,低、高浓度CoQ₁₀给药组细胞的活力分别显著提高(20.1±6.47)%、(60.6±18.4)% ,可见TMC-CoQ₁₀-LP可恢复氧化损伤细胞的细胞活力,其中高浓度CoQ₁₀给药组作用更为明显。

2.5.2 细胞凋亡的检测^[16]。细胞按上述分组处理后,制备1×10⁶个/ml的细胞悬液,加入10倍体积的70%冰乙醇,-20℃固定过夜,磷酸盐缓冲液冲洗后使细胞重悬于100 μg/ml核酸内切酶RNase的磷酸盐缓冲液中,37℃恒温反应60 min,然后加入碘化并啶(PI)染液至终质量浓度为100 μg/ml,摇匀后室温避光染色30 min后用流式细胞仪进行细胞周期分析(激发波长为488 nm,低于G₁期DNA含量的细胞群体为凋亡细胞),各组细胞凋亡情况见图2。

由图2可知,H₂O₂可诱导细胞出现“G₁亚峰”,凋亡细胞所占的比例为54.16%。经TMC-CoQ₁₀-LP(38 μmol/L CoQ₁₀、76 μmol/L CoQ₁₀)孵育的氧化受损细胞,其凋亡细胞所占比例均明显降低(分别降为23.67%与18.35%)。

3 讨论

与中性、荷负电脂质体相比,荷正电脂质体与眼组织的亲和力更强,可能由于脂质体与黏膜之间电荷吸引所致^[17]。与壳聚糖相比,TMC荷正电性增强,水溶性显著提高,在较宽pH范围内均有较好的溶解性,原因在于壳聚糖经甲基化修饰后,新引入的甲基阻止了聚合物分子内氢键的形成。

采用乙醇注入法,方法简便、设备简单、重现性也较好。在乙醇溶液中,磷脂可以完全溶解,整个分子充分伸展开来。乙醇在注入过程中挥发,疏水的脂肪链会相互靠近、自动排

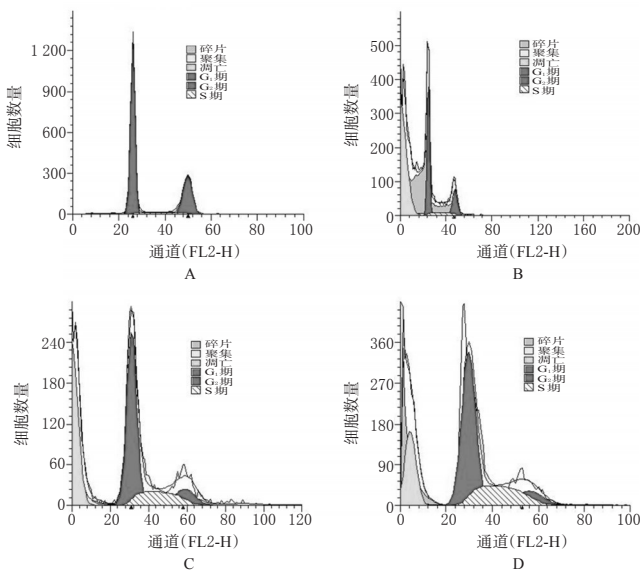


图2 各组SRA 01/04的细胞凋亡情况

A.空白组;B.模型组;C.低浓度CoQ₁₀给药组;D.高浓度CoQ₁₀给药组
Fig 2 Apoptosis of SRA 01/04 in different groups
 A. blank group; B. model group; C. low-concentration CoQ₁₀ treatment group; D. high-concentration CoQ₁₀ treatment group

列,形成单层片状的有序结构;当乙醇量进一步减少时,层与层之间更为紧密闭合形成囊泡状结构^[11,18]。大豆磷脂和胆固醇制备得到的脂质体表面荷负电,TMC可能通过静电作用以环状或尾状物的方式吸附到脂质体的表面,形成TMC-CoQ₁₀-LP^[19]。

本试验制备的TMC-CoQ₁₀-LP粒径变大且呈双峰分布。TMC具有长链结构,易吸附并粘在囊泡表面,其余部分又会与另一囊泡表面结合,形成“化学架桥结构”^[20],可通过以下2个过程描述^[21]:



其中T为TMC,L为脂质体。过程(1)描述TMC与脂质体的相互作用(不可逆包覆),过程(2)描述未完全包覆脂质体之间、未完全包覆脂质体与未包覆脂质体之间的相互作用。过程(1)使脂质体的Zeta电位由负变正,然后脂质体恢复到稳定状态,过程(2)使脂质体的粒径增大。根据Masayuki Hara理论^[22],较小粒径分布的颗粒为部分包覆脂质体,较大粒径分布的颗粒为完全包覆脂质体及因TMC长链而聚集的颗粒。

HLECs凋亡是白内障发生的细胞学基础^[23]。H₂O₂是一种重要的活性氧物质,可使HLECs活性氧代谢失衡最终诱导HLECs凋亡^[24]。本试验以具有高、低CoQ₁₀含量的TMC-CoQ₁₀-LP对氧化损伤HLECs进行孵育,研究TMC-CoQ₁₀-LP对H₂O₂诱导的HLECs细胞凋亡的抑制作用,为验证CoQ₁₀预防或治疗白内障的作用奠定细胞学基础。

细胞凋亡具有独特的生物化学特征。随着凋亡的进程,内源性核酸酶被激活,DNA断裂产生的小分子质量DNA溢出胞外,细胞总DNA量降低,检测细胞周期时在正常G₀/G₁细胞群前出现DNA低染细胞群,即“G₁亚峰”(凋亡细胞群)^[25-26]。采用流式细胞仪检测PI单染细胞的结果表明,与模型组比较,经含药脂质体处理过的氧化损伤细胞的凋亡细胞所占比例降低。

参考文献

[1] Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, *et al.* Global data on visual impairment in the year 2002[J]. *Bull World Health Organ*, 2004, 82(11):844.

[2] Frei B, Kim MC, Ames BN. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(12):4 879.

[3] Siemieniuk E, Skrzdewska E. Coenzyme Q₁₀: its biosynthesis and biological significance in animal organisms and in humans[J]. *Postepy Hig Med Dosw: Online*, 2005, 59: 150.

[4] 文峰,李海涛,陈艳丽,等.黄芩素与辅酶Q₁₀对大鼠视网膜光损伤防护作用的研究[J].*眼科研究*, 2006, 24(5): 468.

[5] 苟春风,刘勤,郝保安,等.辅酶Q₁₀对紫外线致角膜上皮细胞光损伤的保护作用[J].*国际眼科杂志*, 2009, 9(12): 2 286.

[6] Lee VHL, Robinson JR. Mechanistic and quantitative evaluation of precorneal pilocarpine disposition in albino rabbits[J]. *J Pharm Sci*, 1979, 68(6):673.

[7] 曹金娜,邓英杰,孙聚魁,等.*N*-三甲基壳聚糖包覆牛血清白蛋白脂质体的制备及质量影响因素研究[J].*中国药房*, 2009, 20(10): 764.

[8] Takeuchi H, Matsui Y, Sugihara H, *et al.* Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs[J]. *Int J Pharm*, 2005, 303(1/2):160.

[9] Murata M, Nakano K, Tahara K, *et al.* Pulmonary delivery of elcatonin using surface-modified liposomes to improve systemic absorption: Polyvinyl alcohol with a hydrophobic anchor and chitosan oligosaccharide as effective surface modifiers[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 80(2):340.

[10] Verheul RJ, Hagenaaers N, van Es T, *et al.* A step-by-step approach to study the influence of *N*-acetylation on the adjuvanticity of *N, N, N*-trimethyl chitosan (TMC) in an intranasal nanoparticulate influenza virus vaccine[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45(4):467.

[11] 赵宁民,张凯,王豫辉.盐酸莫西沙星即型凝胶滴眼剂的制备及质量控制[J].*中国药房*, 2009, 20(19):1 491.

[12] Jemiotka-Rzemińska M, Latowski D, Strzałka K. Incorporation of plastoquinone and ubiquinone into liposome membranes studied by HPLC analysis: the effect of side chain length and redox state of quinine[J]. *Chem Phys Lipids*, 2001, 110(1):85.

[13] 崔福德.药理学[M].7版.北京:人民卫生出版社, 2011: 404-405.

[14] 王树庆,王彬.低氧状态下As₂O₃对人胃癌细胞SGC-7901抑制作用研究[J].*中国药房*, 2010, 21(1):26.

[15] 庾辉,叶林,张冬颖,等.艾塞那肽预处理对过氧化氢损伤的H9c2心肌细胞的保护作用研究[J].*中国药房*, 2012, 23(21):1 972.

[16] 方敏,张鸿卿,薛绍白,等.抗三尖杉酯碱HL-60细胞的抗程序性细胞死亡及其克服[J].*药学报*, 1994, 29(12):891.

[17] 曹健,陆锦芳.眼用制剂的研究进展[J].*中国药学杂志*,

骨生长肽羧基端5肽衍生物H13D联合阿仑膦酸钠对去卵巢模型大鼠骨代谢的影响

陈玲*, 蔡旺(辽宁医学院附属第一医院, 辽宁锦州 121000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1563-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.10

摘要 目的:探讨骨生长肽羧基端5肽衍生物H13D联合阿仑膦酸钠(Alen)对去卵巢模型大鼠骨代谢的影响。方法:将大鼠随机分为假手术组、模型组、H13D(10 nmol/100 g)组、Alen(10 μg/100 g)组及其联用组,每组8只,皮下注射相应药物,12周后检测各组大鼠腰椎骨(L1~L4)和股骨的骨密度(BMD)、血清生化指标[Ca、P、碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(BGP)]、骨形态学变化。结果:各组大鼠血清中Ca、P水平比较均无明显变化。与假手术组比较,其余各组大鼠ALP、BGP水平均升高,仅模型组和联用组有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,其余各组大鼠ALP、BGP水平均降低,仅H13D组和Alen组有统计学差异($P<0.05$);骨密度和骨形态学比较表明,联用组优于假手术组($P<0.05$),假手术组优于Alen组($P<0.05$),Alen组优于H13D组,H13D组优于模型组($P<0.05$)。结论:H13D联合Alen治疗可明显增加去卵巢模型大鼠骨密度,改善骨微结构,具有明显的协同作用。

关键词 骨质疏松症;大鼠;骨生长肽羧基端5肽衍生物H13D;阿仑膦酸钠;骨密度;骨形态学;骨代谢

Effects of Osteogenic Growth Peptide C-terminal Pentapeptide Derivatives H13D Combined with Alendronate on Bone Metabolism in Ovariectomized Rats

CHEN Ling, CAI Wang (The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Liaoning Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the effect of osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide derivatives H13D combined with alendronate (Alen) on bone metabolism in ovariectomized (OVX) rats. METHODS: SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, H13D (10 nmol/100 g) group, Alen (10 μg/100 g) group and drug combination group with 8 rats in each group. They were given relevant medicine subcutaneously. 12 weeks later, BMD, serum biochemical indicator (Ca, P, ALP, BGP) and bone morphological changes of lumbar spinal segment (L1~L4) and femur were measured. RESULTS: The levels of Ca and P in serum of rats had no significant change. Compared with sham operation group, the levels of ALP and BGP increased in other groups, and there was statistical difference in model group and drug combination group ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with model group, the levels of ALP and BGP decreased in other groups, and there was statistical difference in H13D group and Alen group ($P<0.05$). BMD and bone morphology showed drug combination group was better than sham operation group ($P<0.05$); sham operation group was better than Alen group ($P<0.05$); Alen group was better than H13D group; H13D group was better than model group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: H13D combined with Alen can significantly increase BMD of OVX rats, improve the micro-structure of the bone, which have obvious synergies.

KEY WORDS Osteoporosis; Rats; Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide derivatives H13D; Alendronate; BMD; Bone morphology; Bone metabolism

- 2003, 38(3):161.
- [18] 李国英, 买尔丹·马合木提, 古丽仙·胡加. 新疆紫草提取物脂质体制备工艺的初步筛选[J]. 中国药房, 2010, 21(15):1376.
- [19] Banakar UV. Advances and opportunities in delivery of therapeutic proteins and peptides[J]. *J Biomater*, 1997, 11(4):377.
- [20] Chen L, Wu CL, Chen DH. Pyrene fluorescence study on flocculation mechanism of chitosan[J]. *Environ Prot Sci*, 2002, 28(114):34.
- [21] Heriksen I, Våagen SR, Sande SA, et al. Interactions between liposomes and chitosan II: effect of selected parameters on aggregation and leakage[J]. *Int J Pharm*, 1997, 146(2):193.
- [22] Lal B, Gangopadhyay AK, Gidwani RM, et al. Interaction between a novel amphiphilic polymer and liposomes[J]. *Supermol Sci*, 1989, 5(5):777.
- [23] Vasavada AR, Cherian M, Yadav S, et al. Lens epithelial cell density and histomorphological study in cataractous lenses[J]. *J Cataract Refract Surg*, 1991, 17(6):798.
- [24] 李立梅. 过氧化氢酶基因抑制活性氧诱导晶体上皮细胞凋亡的实验研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2004:16.
- [25] Afanasev VN, Korol BA, Mantsygin YA, et al. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death[J]. *FEBS Lett*, 1986, 194(2):347.
- [26] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry[J]. *Cytometry*, 1992, 13(8):795.

* 主治医师。研究方向:骨代谢。电话:0416-4197451。E-mail: clryq1998@yahoo.com.cn

(收稿日期:2012-05-16 修回日期:2012-11-06)