

多相脂质体人干扰素- α (HuIFN- α) 包封率和渗漏的测定

单 风 平

(中国医科大学微生物学教研室, 沈阳 110001)

关键词 多相脂质体人干扰素- α , 包封率, 抗病毒活性

脂质体是类脂双分子薄膜在一定条件下形成的超微球体^[1]。1971 年 Ryman 等人将药物包入脂质体, 研究了脂质体的载体作用, 发现脂质体具有降低药物毒副作用, 减少剂量和变态反应, 增强药物对淋巴系统靶向性和靶组织滞留性等优点。干扰素- α 为有效抗病毒制剂, 但由于其半衰期短, 大量长期使用可产生某些危险副作用, 所以七十年代起, 国外开展了脂质体干扰素的研究^[2,3]。我们在对脂质体干扰素- α 抵抗胰蛋白酶降解研究基础上, 又进行了脂质体干扰素- α 包封率和渗漏的测定。

材 料 与 方 法

1. 材料

人白细胞干扰素- α (HuIFN- α): 成都生物制品所, 批号: 890116 1.5×10^4 U/支。

MEM 培养液: 日本日水制药株式会社, 使用时加入 1% 谷氨酰胺, 10% 小牛血清。

葡聚糖凝胶 Sephadex G-50: 瑞典 Pharmacia 公司。

滤泡性口炎病毒 (VSV): 本教研室保存的新近传代毒株。

其它大豆磷脂、脑磷脂等均由沈阳药学院物理化学教研室苏德森教授惠赠。A.R 纯度。

2. 方法

(1) 脂质体干扰素- α 制备 由于干扰素- α 为活性蛋白质, 高温条件下容易失活, 所以在制备上采用特殊方法在低温下制成。

(2) 微型柱制备 取 5ml 注射器外套一个, 底部放一略小于内径的圆形尼龙网, 然后加入适量 (5cm 高), 经 pH 7.2 磷酸缓冲液浸泡的 Sephadex G-50 凝胶, 将装好的注射器放入干燥离心管内, 于 4℃ 下 1500 r/min 离心 5min 备用。

(3) 微型柱对游离人干扰素- α 分离试验 取一定量游离干扰素- α 液体加到微型柱顶部, 以 1500r/min

理。

2.1 将自来水, 去离子水, 蒸馏水分别静置在磁场中处理, 磁感应强度 0.17T, 处理时间为 12min, 在温度为 13℃ 下测试, 实验结果: 三种样品磁处理后电导都减小, pH 值都增大, 除去离子水 pH 值上升不大外, 其他差别均有极显著意义。见表 4。

2.2 将去离子水及自来水分别静置在不同强度的恒定磁场中处理, 保持测试温度为 10℃, 测试各样品的粘度。结果: 0.34T 处理 12min 时自来水粘度不变, 其它几种磁处理条件下磁处理后样品粘度都降低。见表 5。

实验结果说明: 文献报道磁处理水理化性质的差异是由于磁处理条件不同引起的; 水不管是切割磁力线流动还是静置在磁场中处理都能引起水的理化性质变化; 加热不影响磁水效应, 与文献报道一致^[1,2,3]。

参 考 文 献

- 1 李国栋·中华物理医学杂志, 1979; (2): 103
- 2 刘庭等·物理, 1980; (3): 282
- 3 马定祥·中华物理医学杂志, 1987; (2): 89
- 4 王树春等·中华物理医学杂志, 1988; (1): 27
- 5 李宜贵·医学物理, 1989; (1): 23
- 6 Joch KM *et al.* *J India Chem Soc.* 1966; 43:620
- 7 曾昭炜等·中华物理医学杂志, 1986; (1): 33
- 8 Lielmezs *J et al.* *Z Phys Chem*, 1976; 99: 117
- 9 Muller K *et al.* *Z Chem*, 1970; 10:79
- 10 吴士彬等·中华物理医学杂志, 1986; (3): 108
- 11 张敬贵等·中华物理医学杂志, 1989; (3): 182
- 12 杨煜荣等·中华物理医学杂志, 1988; (3): 142
- 13 周润琦等·自然杂志, 1985; (4): 318

[本文于 1990 年 3 月 12 日收到,

6 月 12 日修回]

离心 5min, 收集滤液过滤除菌, 测定其中的干扰素- α 效价。

(4) 脂质体干扰素- α 包封率测定 取一定量脂质体干扰素- α 缓缓加入另一微柱顶部, 再按游离干扰素- α 分离法做同样处理。收集滤液, 加适量 0.4% 脱氧胆酸钠, 4℃ 下 3000r/min 离心 30min, 取下层液体过滤除菌、测定干扰素- α 效价, 再与包裹时加入的游离干扰素- α 比较, 计算包封率。

(5) 脂质体干扰素- α 渗漏的测定 将脂质体干扰素- α 置 4℃ 分别放置 2, 4, 6h, 取样按脂质体干扰素- α 包封率测定法处理, 测定其中干扰素- α , 观察渗漏情况。

(6) 干扰素效价测定^[4] 干扰素测定采用细胞病变抑制法, 效价计算采用 Muench-Reed 算法, 攻击病毒采用滤泡性口炎病毒、剂量为 300TCID₅₀。

结果与讨论

1. 游离干扰素- α 过柱前后效价比较 将过柱前后的游离干扰素- α 分别测定效价, 结果表明过柱前效价为 10⁴U/ml, 过柱后为 0, 说明该柱在此条件能将干扰素全部滞留在柱上。

2. 脂质体干扰素- α 包封率 包封率系指药物在脂质体中的量与包裹时加入药物总量之比(百分率)。

将过脂质体干扰素- α 处理测定效价, 计算包封率。结果为 28%, 仍有大部分干扰素- α 没能被包入脂质体内。

3. 脂质体干扰素- α 渗漏情况 将不同时间下的脂质体干扰素- α 取样过柱分离测定效价, 结果表明, 6 小时内脂质体中的干扰素- α 没有渗漏情况。

微型柱离心法是一种快速简便分离脂质体内外中药物的方法, 其特点已有文献报道^[5]。我们的研究表明, 以 Sephadex G-50 分离干扰素- α 这样的大分子蛋

白质是有效的。

本实验中脂质体干扰素- α 包封率较低(28%), 其原因可能有多种: 1) 处方设计及制备方法还不是最佳; 尚未找到包裹干扰素- α 这样大分子的脂质体最佳组成和制备方法。2) 我们现在制备脂质体是一种复合分散体系, 在混悬液中除了含有单室及多室脂质体外, 还有少量油包水或水包油型乳剂, 这些乳剂能以不同形式与干扰素- α 相连, 因而影响包裹效果。

脂质体干扰素- α 在 6h 内基本没有渗漏。我们认为, 干扰素为大分子蛋白质, 一旦包入脂质体内, 则很难从脂质体内渗出。我们在制备脂质体过程中加入少量聚乙烯吡咯烷酮(PVP), PVP 不仅对干扰素起分散作用, 而且由于它是高分子物质, 在液态时粘滞性很大, 包在脂质体中间水膜中, 使双分子层流动性降低, 防止干扰素渗出脂质体, 保证了脂质体中干扰素缓慢释放。

对脂质体干扰素的研究是七十年代以来一项引人注目的课题。我们仅仅做了初步的探索, 还有很多问题有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Leafu Huang. In: Ray Wu ed. *Proceedings of 1984 Symposium On Genetic Engineering and Biotechnology Beijing State Science and technology commission of PRC*, 1984: 447
- 2 Eppstein D A et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 3599
- 3 单风平. 国外医学免疫学分册, 1988; 5: 262
- 4 杜平. 医用实验病毒学. 上海: 上海微生物学会, 1982: 241—248
- 5 David et al. *Anal Biochem*, 1975; 90: 809

[本文于 1990 年 3 月 9 日收到,

10 月 10 日修回]

(上接第 235 页)

- 3 丁宗铁. 国外医学(中医中药), 1980; 2(6): 24
- 4 王维光. 植物生理学通讯, 1982; 4: 38
- 5 Nikolaus. A. *Ann Rev Plant Physiol*, 1977; 28: 123
- 6 易健华. 生物化学与生物物理进展, 1981; (3): 40
- 7 Bressan R A et al. *Plant Physiol*, 1976; 57: 29
- 8 Pittman U J *Can J Plant Sci*, 1979; 59(4): 1007

- 9 赵树仁等. 生物化学与生物物理进展, 1980; (5): 77
- 10 Бондаренко Н Ф и др. *Доклады Академии Сель Хозяйств Наук* 1986; 1: 6
- 11 张政为. 西山大学学报, 1988; 1: 77

[本文于 1990 年 4 月 10 日收到,

7 月 3 日修回]