

泼尼松龙新型靶向脂质体制剂对嘌呤霉素氨基核苷肾病的疗效

刘丽华^{1,2}, 欧周罗¹, 朱春芳¹, 王磊¹ (1. 复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 上海 200032; 2. 绍兴文理学院医学院生物化学教研室, 浙江 绍兴 312000)

摘要 目的: 观察肾小球向性泼尼松龙新型靶向脂质体制剂对嘌呤霉素氨基核苷性肾病的治疗作用。方法: 选用雄性 Wistar 大鼠, 按照嘌呤霉素氨基核苷 (puromycin amino nucleoside, PAN) 4.0 mg/100g 体重的剂量建立大鼠 PAN 模型, 以泼尼松龙 (prednisolone, PRED) 2mg/100g 体重及泼尼松龙新型靶向脂质体制剂 (liposome-prednisolone, Lip ϕ -PRED) 1.5mg/100g 体重的剂量进行治疗, 观察尿蛋白的排出量、肾组织白细胞浸润等。结果: 泼尼松龙新型靶向脂质体制剂治疗尿蛋白排泄量显著性降低, 肾组织中白细胞浸润减少, 其作用优于泼尼松龙治疗组。结论: 泼尼松龙新型靶向脂质体制剂可显著性抑制 PAN 模型的尿蛋白排泄量和急性期肾间质白细胞浸润。

关键词 泼尼松龙; 泼尼松龙脂质体制剂; 嘌呤霉素氨基核苷; 蛋白尿

中图分类号: R977.1⁺1, R961 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2004)03-0138-03

Therapeutic effect of a new liposome-prednisolone on the puromycin aminonucleoside nephropathy in rats

LIU Li-hua^{1,2}, OU Zhou-luo¹, Zhu Chun-fang¹, WANG Lei¹ (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Department of Biochemistry, Medical College, Shaoxing College of Arts and Sciences, Shaoxing 312000, China)

Abstract **Objective:** To observe the effect of a novel liposome-prednisolone on puromycin aminonucleoside (PAN) nephropathy model in rats. **Methods:** 160~180g BW male Wistar rats were used in this experiment. The rats were given a single injection of PAN at the dose of 4mg/100g BW through right jugular vein to establish the nephrotic syndrome (NS) model. The free-prednisolone (PRED) treated group were given (i. p.) the free-prednisolone at the dose of 2.0mg/100g BW and the liposome-prednisolone (Lip ϕ -PRED) treated group were given (i. v.) the liposome-prednisolone at the dose of 1.5mg/100g BW. Urinary protein excretion examined with the biuret method and the monocyte/macrophage, CD₄⁺ T cells and CD₈⁺ T cells were analyzed by immunohistochemistry. **Results:** The proteinuria of the Lip ϕ -PRED treated group reduced; the infiltration of monocyte/macrophages, CD₄⁺ T cells and CD₈⁺ T cells in the glomeruli and interstitium also remarkably weakened. **Conclusion:** The liposome-prednisolone can remarkably reduce the proteinuria excretion and leukocyte infiltration both in the glomeruli and tubulointerstitium in the PAN model.

KEY WORDS prednisolone; liposome-prednisolone (lip ϕ -PRED); puromycin aminonucleoside (PAN); proteinuria

肾上腺糖皮质激素是治疗肾病综合征等肾疾患的临床常用药物之一, 但因其用量大, 疗程长且有严重不良反应, 使临床应用受到很大的限制。药学界一直致力于研究能将药物送到特定器官、组织或细胞内的靶向性药物载体, 以期降低药物的副作用, 减少用药剂量, 提高药物疗效。脂质体似乎可以满足这一要求, 由于脂质体是磷脂分散在水中定向排列而形成的具有单层或复层膜结构的囊泡, 它可以分别包封脂溶性和水溶性药物, 其结构类似于生物膜, 制备简单, 对机体无毒, 且无免疫原性, 易实现靶向性而倍受医药界青睐。脂质体制剂系指将药物装载于脂质体内而形成的新型药剂, 它具有良好的靶向性, 可以通过在靶细胞、靶组织、靶器官或细胞内的浓集, 达到提高和延长药物疗效, 缓和药物毒性, 提

高药品的安全性、有效性、可靠性和患者服药的依从性的目的。

本实验所用的脂质体在经 Rhodamine 标记, 由尾静脉注入 Wistar 大鼠体内时, 可见其相对特异性地富集于肾小球内, 具有良好的肾小球靶向性^[1, 2]。近半个世纪的大量研究表明, 大鼠嘌呤霉素氨基核苷 (PAN) 肾病模型是研究人类微小病变型肾病综合征 (MCNS)、局灶性肾小球硬化 (FGS) 的可靠模型。PAN 所引起的大量蛋白尿和显著的单核/巨噬细胞、CD₄⁺ T 细胞、CD₈⁺ T 细胞的肾浸润与肾脏病的发生发展呈现良好的相关性^[2-6]。本研究采用大鼠的 PAN 模型观察泼尼松龙新型靶向脂质体制剂的治疗作用, 探索降低肾上腺糖皮质激素用量、提高疗效并减少其不良反应的途径。本制剂为新型制剂,

PAN 模型的研究国内外未见报道。

1 材料和方法

1.1 动物 清洁级、体重 160~180g 的雄性 Wistar 大鼠由复旦大学实验动物科学部提供。

1.2 主要试剂 嘌呤霉素氨基核苷 (PAN) 购自 Sigma 公司, MW 294.3, 批号为 40K4022, 临用前以生理盐水配制, 滤过除菌。泼尼松龙新型靶向脂质体制剂由日本 Terumo 公司提供。小鼠抗大鼠的单克隆抗体 ED-1 (抗大鼠单核/巨噬细胞的抗体) 购自 Chemicon 公司, W3/25 (抗大鼠 CD4⁺ T 细胞的单克隆抗体) 和 OX-8 (抗大鼠 CD8⁺ T 细胞的单克隆抗体) 购自 Serotec 公司, 生物素标记的马抗小鼠 IgG、ABC 试剂盒均购自 Vector 公司, DAB 染色试剂盒购自华美生物工程公司, 其余试剂为国产分析纯。

1.3 模型建立 在戊巴比妥钠 (5mg/100g 体重) 麻醉下, 经右颈静脉插管, 于 5min 内一次性注射 PAN 4.0mg/100g 体重。一次性注射容量为 3.0mL/只, 建立急性期肾病综合征模型。

1.4 实验设计 所有动物随机分为 4 组 (n=8), 对照组同法给予等量灭菌生理盐水。实验组动物按 PAN 4.0mg/100g 体重的剂量建立急性期肾病综合征模型。游离强的泼尼松龙治疗组 (free-PRED) 自注射 PAN 的同日起, 经腹腔注射游离泼尼松龙, 连续 10d (从第 0 天至第 10 天), 剂量为 2.0mg/100g 体重。泼尼松龙脂质体制剂治疗组 (lipo-PRED) 动物在注射 PAN 的当日, 经尾静脉一次性注射泼尼松龙脂质体制剂, 剂量为 1.5mg/100g 体重。

1.5 标本收集 所有动物均给予自由饮食。分别于自由饮食前 1d 及后第 1、3、5、7、10 天入自动冲水式大鼠饲养笼、物理分离式探头饮食型大鼠代谢笼收集 24h 尿, biuret 法测定 24h 尿蛋白排泄量。第

5、7、10 天采血测血 BUN。第 10 天在戊巴比妥钠麻醉下行心脏采血, 经腹主动脉用冷生理盐水进行肾灌注, 摘出肾脏, 做冰冻切片。用免疫组织化学法分析单核/巨噬细胞 (ED-1)、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞在肾组织中的浸润。

1.6 统计学分析 实验数据用 mean ±SD 表示, 资料由 SPSS8.0 统计软件进行 One-way ANOVA 统计分析。

2 结果

2.1 24h 尿蛋白排泄量检测 从手术后第 3 天起, PAN 注射组与生理盐水对照组相比尿蛋白即见增加, 此后持续升高, 至第 10 天时达到 395.5mg/24h 的平均值, 显示模型建立成功。泼尼松龙治疗组在第 5、7、10 天时也有显著性升高。与 PAN 注射组相比较, 泼尼松龙治疗组只在第 3 天和第 5 天尿蛋白降低 (第 3 天 P<0.05; 第 5 天 P<0.01)。而泼尼松龙脂质体制剂治疗组尿蛋白在第 5、7、10 天时均明显减少, 而且在第 10 天时, 其尿蛋白排泄量与泼尼松龙治疗组相比显著性减少 (P<0.01)。见表 1。

2.2 肾组织内白细胞浸润 肾组织免疫组化分析结果显示, 与生理盐水对照组相比, PAN 注射组在第 10 天时肾小球及肾间质中 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞及 ED-1 阳性细胞的数量显著性增高 (P<0.01)。泼尼松龙治疗组 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞计数与 PAN 注射组相比无统计学意义; 但 ED-1 阳性细胞的数量显著性减少 (P<0.05); 而泼尼松龙脂质体制剂治疗组白细胞浸润显著性减少, 与 PAN 注射组相比较, 在第 10 天时肾小球及肾间质中 CD4⁺ T 细胞 (P<0.01)、CD8⁺ T 细胞 (P<0.01)、ED-1 阳性 (P<0.05) 均减少 (表 2)。血 BUN 检测未见明显的变化。

表 1 24h 尿蛋白的排泄量 (mg/24h) ($\bar{x} \pm s$, n=8)

	对照组	PAN 组	free-PRED 组	lipo-PRED 组
第 1 天	2.8 ± 1.1	3.0 ± 2.4	5.7 ± 3.3	5.7 ± 3.2
第 1 天	4.8 ± 3.7	6.9 ± 1.7	6.9 ± 3.5	8.8 ± 1.9
第 3 天	4.2 ± 3.9	13.1 ± 5.6 ¹⁾	6.9 ± 6.9 ²⁾	11.4 ± 2.9 ³⁾
第 5 天	8.8 ± 5.8	113.9 ± 39.8 ¹⁾	38.4 ± 12.5 ^{1), 4)}	33.1 ± 26.1 ⁴⁾
第 7 天	9.5 ± 5.7	269.1 ± 115.4 ¹⁾	197.1 ± 131.3 ³⁾	64.0 ± 39.5 ²⁾
第 10 天	12.7 ± 7.9	395.5 ± 192.5 ³⁾	292.7 ± 161 ³⁾	70.3 ± 63.9 ^{2), 5)}

与对照组相比: ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.05; 与 PAN 组相比: ⁴⁾P<0.01, ³⁾P<0.05; 与 free-PRED 组相比: ⁵⁾P<0.01

3 讨论

药物的靶向脂质体制剂日益广泛地用于临床治疗, 目前主要用作抗癌药物、酶制剂、不耐酸抗生素、激素类、免疫调节剂、核苷酸等的载体, 应用于肿瘤、

寄生虫病、炎症性疾病的治疗, 并显示出良好的疗效。特异性的肾小球向性脂质体制剂的研究将为肾脏疾病的治疗开辟新的有效的用药途径。Liao 等用 Rhodamine 标记的同一脂质体在 ddY 小鼠 IgA 肾炎

模型的研究表明,以 1.0mg/kg 体重的剂量,每周一次,连续注射 16 周(从 45 周到 61 周),尿蛋白排泄量在 61 周与第 44 周相比有所降低,但无统计学意义;免疫荧光检测显示 61 周时脂质体治疗组的肾小球系膜区 IgA、C3 沉淀显著性减少;光镜观察可见与对照组相比肾小球系膜细胞肿胀明显抑制^[3]。本实验的前期实验用 Rhodamine 标记的同一脂质体,注射到用 PAN 颈静脉给药的 Wistar 大鼠体内,发现该脂质体高度富集于肾小球区,具有良好的靶向性。

表 2 不同组的肾组织中白细胞浸润数(cell/mm^2)
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

	CD ₄ ⁺ T 细胞	CD ₈ ⁺ T 细胞	单核/巨噬细胞
对照组	117.9±41.4	46.4±10.7	46.8±13.8
PAN 组	206.4±48.4 ¹⁾	75.9±17.2 ¹⁾	147.8±67.4 ¹⁾
free-PRED 组	162.3±37.8	58.4±22.1	92.0±42.5 ²⁾
lip-PRED 组	148.5±32.3 ²⁾	45.9±18.0 ³⁾	65.9±21.7 ³⁾

与对照组相比: ¹⁾P<0.01; 与 PAN 组相比: ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.05;

大鼠 PAN 肾病模型以大量蛋白尿和显著的肾组织中白细胞浸润为特征^[4,5],且蛋白尿出现早、升高快、幅度大,便于观察和评价药物疗效,并与临床上的肾病综合征非常类似,是研究肾病综合征的常用模型之一。本研究选用该模型重点分析了泼尼松龙新型靶向脂质体制剂对蛋白尿和肾组织中白细胞浸润的影响,结果显示,泼尼松龙新型靶向脂质体制剂对嘌呤霉素氨基核苷肾病的蛋白尿及肾组织中白细胞浸润的抑制作用明显地优于临床常用的泼尼松龙普通制剂,而且用量小,给药次数少。

我们以前的工作提示强烈抑制趋化因子表达和白细胞浸润是糖皮质激素治疗肾病的机制之一,在 PAN 模型进行的本研究的结果同样支持这一观点。以阳离子脂质体双十五基羟苄脒包裹的泼尼松龙新型制剂在远低于游离泼尼松龙总用量的情况下即可显著性地抑制 PAN 模型的尿蛋白,表明其不失为一具有广阔前景的糖皮质激素肾脏靶向性脂质体制剂。

活化的巨噬细胞通过产生细胞因子、活性氧自由基等参与肾病的发生发展过程^[6~9]。有实验显示,巨噬细胞的耗竭或其功能抑制可防止肾小球系膜区高细胞数和肾小球纤维化^[8,9]。在 Wistar Kyoto (WKY) 大鼠的抗 GBM 肾炎模型,抗 CD₈⁺ T 细胞抗体除去 CD₈⁺ T 细胞后尿蛋白和新月体形成被完全抑制^[10]。以可溶性人 CTLA-4 嵌合蛋白干扰 CD28/B7 协同刺激途径而影响 T 细胞的激活也可抑制抗 GBM 肾炎的发病^[11]。提示肾组织中白细胞浸润可能是导致肾损害和蛋白尿出现的关键因素之一,白细胞及白细胞相关因子可能成为肾炎防治

的靶点。临床上应用的泼尼松龙和环磷酰胺等免疫抑制剂主要通过减少循环单核细胞、T 细胞数量以及抑制白细胞在炎症部位的聚集来治疗进行性肾炎,其明显缺点在于削弱患者机体抗感染能力。

尿蛋白可以作为一个独立的因素,与肾功能损害程度呈正相关。现在认为^[12,13]慢性肾疾患时出现的蛋白尿不仅是肾脏损害的标志,更是促进肾脏病进展的因素,可作为判断肾脏损害程度的重要指标。本实验所用泼尼松龙新型靶向脂质体制剂,对大鼠 PAN 模型蛋白尿和肾组织中白细胞浸润的抑制作用显著性优于临床常规用药泼尼松龙普通制剂,充分显示出该脂质体制剂的优越性。

参考文献:

- [1] Ushijima H, Tajima A, Hagjwara H, *et al.* Effects of modified liposome loaded with corticosteroid on Thy 1.1 antibody induced experimental nephritis [J]. *Jpn J Nephrol*, 1999, 41: 335.
- [2] Harigai T, Kondo M, Isozaki M, *et al.* Preferential binding of polyethylene glycol-coated liposomes containing a novel cationic lipid, TRX-20, to human subendothelial cells via chondroitin sulfate [J]. *Pharm Res*, 2001, 18 (9): 1284.
- [3] Liao J, Hayashi K, Horikoshi S, *et al.* Effect of steroid-liposome on immunohistopathology of IgA nephropathy in ddY Mice [J]. *Nephron* 2001, 89(2): 194.
- [4] Ou ZL, Natori Yu, Natori Y. Gene expression of CC chemokines in experimental acute tubulointerstitial nephritis [J]. *J Lab Clin Med*, 1999, 133 (1): 41.
- [5] Ou ZL, Natori Yu, Natori Y. Transient and sequential expression of chemokine mRNA in glomeruli in puromycin aminonucleoside nephrosis [J]. *Nephron*, 2000, 85 (3): 254.
- [6] Cattell V. Macrophages in acute glomerular inflammation [J]. *Kidney Int*, 1994; 45(4): 945.
- [7] Nikolie Paterson DJ, Lan HY, Hill PA, *et al.* Macrophages in renal injury [J]. *Kidney Int*, 1994, 45 (suppl): S79.
- [8] Hooke DH, Gee DC, Atkins RC. Leukocyte analysis using monoclonal antibodies in human glomerulonephritis [J]. *Kidney Int*, 1987, 31 (4): 964.
- [9] Diamond JR, Pesek Diamond I. Sublethal X-irradiation during acute puromycin nephrosis prevents late renal injury: role of macrophages [J]. *Am J Physiol*, 1991, 260 (6 Pt 2): F779.
- [10] Kawasaki K, Yaoita E, Yamamoto T, *et al.* Depletion of CD₈ positive cells in nephrotoxic serum nephritis of WKY rats [J]. *Kidney Int*, 1992, 41 (6): 1517.
- [11] Nishikawa K, Linsley PS, Collins AB, *et al.* Effect of CTLA-4 chimeric protein on rat autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis [J]. *Eur J Immunol*, 1994, 24 (6): 1249.
- [12] Burton C, Harris KP. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure [J]. *Am J Kidney Dis*, 1996, 27 (6): 765.
- [13] Cameron JS, Turner DR, Ogg CS, *et al.* The long-term prognosis of patients with focal segmental glomerulosclerosis [J]. *Clin Nephrol*, 1978, 10(6): 213.