

甘草次酸和叶酸共修饰双靶向 pH 敏感黄芩苷/姜黄素共载脂质体的制备及评价

汪洁^{1,2}, 顾雪梅^{1*}, 张思雨¹, 倪思雨¹, 石菲¹, 吕志阳¹, 陈静¹, 高霞², 肖伟²

1. 南京中医药大学 翰林学院, 江苏 泰州 225300

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 优化甘草次酸(GA)和叶酸(FA)共修饰双靶向 pH 敏感黄芩苷/姜黄素共载脂质体 (GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur) 的处方工艺, 并对其进行评价。方法 采用薄膜分散超声法制备 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur, 以包封率、不同 pH 释放介质中溶出曲线相似因子 (f_2)、粒径和分散指数 (PDI) 为评价指标, 使用单因素考察和 Box-Behnken 设计-响应面法筛选出最佳处方工艺; 对 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 的外观形态、粒径、不同 pH 浓度的体外释放度等进行评价; 通过溶血性实验评估 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 的生物相容性; 采用细胞 CCK-8 法考察黄芩苷、姜黄素、黄芩苷/姜黄素(质量比为 5:1)混合溶液、GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 对肝癌细胞 HepG2 的体外增殖抑制作用; 通过小鼠组织药物分布实验, 考察 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 体内的肝靶向性; 探究 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur(120、60、30 mg·kg⁻¹)对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤率、HE 染色后肿瘤组织病理学、血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 水平的影响。结果 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 的最佳制备工艺为: 黄芩苷与姜黄素质量比为 5:1, 琥珀酸胆固醇单酯(CHEMS)与磷脂质量比为 2:10, DSPE-PEG 2000 与磷脂质量比为 4:100, DSPE-PEG-GA 与磷脂质量比为 2:100, 水化体积为 10 mL, 磷脂与药物质量比 7.95:1, 磷脂与胆固醇质量比 6.53:1, 超声破碎时间为 69 s。经响应面优化制得的 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 黄芩苷包封率为 90.90%, 姜黄素包封率为 90.97%, 平均粒径 82.5 nm, 释放行为具有缓释特性。黄芩苷对 HepG2 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)大约是姜黄素的 5 倍, GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 的 IC₅₀ 较混合溶液低。体内药效评价结果表明, GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 抑瘤率与 5-氟脲嘧啶(5-FU)相当; 给药组的肿瘤坏死细胞数量变少, 肿瘤细胞的排列疏松, 细胞呈现不同程度变小; 血清中 TNF- α 和 IL-6 水平均较模型组显著降低($P < 0.01$)。结论 制备的 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 安全性好, 肝靶向性高, 具有良好的抑制肝肿瘤作用。

关键词: 黄芩苷; 姜黄素; pH 敏感脂质体; 叶酸; 甘草次酸; 肝癌; 肝靶向性

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 12-2816-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.12.012

Preparation and evaluation of dual-targeting pH-sensitive baicalin/curcumin co-loaded liposomes

WANG Jie^{1,2}, GU Xuemei¹, ZHANG Siyu¹, Ni Siyu¹, SHI Fei¹, LÜ Zhiyang¹, CHEN Jing¹, GAO Xia², XIAO Wei²

1. Hanlin College of Nanjing University of Chinese Medicine, Taizhou 225300, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To optimize the formulation process of dual-targeted pH-sensitive baicalin/curcumin co-loaded liposomes (GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur) and evaluate their properties. **Methods** GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur was prepared using a thin film dispersion ultrasonication method. The evaluation criteria included encapsulation efficiency, similarity factor (f_2) of release curves in different pH media, particle size, and polydispersity index (PDI). The optimal formulation process was determined through single-factor testing and Box-Behnken design-response surface methodology to evaluate the liposomes' morphology, particle size, and *in vitro*

收稿日期: 2024-07-26

基金项目: 2021 年江苏省高校自然科学基金项目(21KJB360021); 2024 年江苏高校青蓝工程优秀教学团队资助项目; 2021 年国家中医药管理局领军人才基金项目; 泰州市科技支撑项目(TS202232、TS202325); 2023 年江苏省大学生创新创业项目(202313981004Y、202313981011Y、202313981002Y、202313981003Y)

第一作者: 汪洁(1990—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事药物新剂型与新技术研究。E-mail: wangjie199084@126.com

*通信作者: 顾雪梅(1984—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事药物新剂型与新技术研究。E-mail: guxuemei1984@163.com

release profiles at different pH levels. The biocompatibility of GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur was assessed through a hemolysis test. The *in vitro* inhibitory effect of baicalin, curcumin, baicalin/curcumin (mass ratio 5 : 1) mixed solution, GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur on liver cancer cells (HepG2) was examined using the CCK-8 assay. The liver targeting of GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur *in vivo* was investigated through a mouse tissue distribution experiment. Subsequently, pharmacological experiments were conducted to study the antitumor efficacy of GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur on H22 tumor-bearing mice and its impact on histopathological changes of tumor tissue after HE staining, serum TNF- α and IL-6 levels. **Results** The optimal preparation method for GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur was as follows: The ratio of baicalin to curcumin was 5 : 1, the ratio of cholesteryl succinate (CHEMS) to phospholipids was 2 : 10, the ratio of DSPE-PEG 2000 to phospholipids was 4 : 100, the ratio of DSPE-PEG-GA to phospholipids was 2 : 100, the hydration volume was 10 mL, the ratio of phospholipids to drugs was 7.95 : 1, and the ratio of phospholipids to cholesterol was 6.53 : 1, and the ultrasonic crushing time was 69 s. The optimized GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur exhibited an encapsulation efficiency of 90.90% for baicalin and 90.97% for curcumin, with an average particle size of 82.5 nm and sustained-release behavior. The IC_{50} of baicalin for HepG2 cells was approximately five times that of curcumin, and the IC_{50} of GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur was lower than that of the mixed solution. The *in vivo* pharmacodynamic evaluation results show that the tumor inhibition rate of GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur was comparable to that of 5-fluorouracil (5-FU). The number of necrotic cells in the treated group decreased, the arrangement of tumor cells becomes loose, and the cells showed varying degrees of shrinkage, and the levels of TNF- α and IL-6 in the serum were significantly lower than those in the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** The GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur prepared had good safety and high liver targeting, and has good inhibitory effects on liver tumors.

Key words: baicalein; curcumin; pH-sensitive liposomes; folic acid; glycyrrhetic acid; liver cancer; liver targeting

黄芩始载于《神农本草经》，属双子叶唇形科草本植物，常以干燥根部入药，药用历史悠久，具清热燥湿、泻火解毒等功效^[1]。黄芩苷作为黄芩的有效成分之一，具有抑菌、抗炎、抗变态反应等药理作用^[2-5]。近年来，黄芩苷作为抗肿瘤药物的潜力受到了广泛关注，研究发现黄芩苷干预肿瘤细胞与多个机制相关，主要依赖于与肿瘤细胞的直接和间接作用^[6-7]。如黄芩苷可抑制肝细胞癌的细胞增殖、侵袭、转移，同时诱导细胞周期停滞在G₀/G₁期和细胞凋亡^[8]，诱导肿瘤细胞铁死亡^[9]，通过程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)/程序性死亡-配体1(PDL-1)和Toll样受体4(TLR4)-核因子 κ B(NF- κ B)途径缓解肝细胞癌^[10]。

姜黄素是从姜科和天南星科部分植物根茎中提取的二酮类化合物，不溶于水，对癌症有较好的治疗作用。姜黄素具有对正常细胞低毒性的抗肿瘤作用，可调控多种抑癌基因和转录因子及其信号通路^[11]。研究表明姜黄素可通过调节细胞生长^[12]、侵袭^[13]、转移^[14]、凋亡^[15-16]和逆转耐药性^[17]在肝癌中发挥作用。

近年来，中药联用在抗肿瘤的应用研究越来越多^[18-20]，联合用药可作用于多个通路，肿瘤细胞不容易逃避药物治疗作用，同时可以降低用药量和减少不良反应。有研究表明黄芩苷和姜黄素联合使用，可减少单药使用剂量，在抑制肺癌细胞增殖方面比单药使用更有效^[21]，且可显著抑制肺癌小鼠肿瘤生长^[22]。此外，姜黄素和黄芩苷的联合治疗可以显著

逆转乙醇诱导的肝脏氧化损伤，激活核因子-E2相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)通路，比单独使用药物更有效^[23]，还可以通过协同作用，抑制肝纤维化^[24]。

姜黄素与黄芩苷联合使用有可能提高抗肝癌的作用效果，但由于其生物利用度低、稳定性差等缺陷，都会导致药物在肿瘤部位聚集少、治疗效果不佳。而脂质纳米递送系统可以改进药物输送，通过增强渗透和滞留效应被动靶向或配体-受体识别主动靶向作用增加药物在肿瘤部位的积累，最终提高治疗效果和减少不良反应。而普通脂质体在进入循环系统时容易被吞噬细胞系统吞噬，这就影响了其在体循环时间，当脂质体表面被聚乙二醇(PEG)链修饰时，PEG链可以躲避吞噬细胞系统的识别作用，从而可以延长脂质体的半衰期。此外，肿瘤组织与正常组织相比，生长速度过快，糖酵解率高，在有氧和无氧条件下，肿瘤组织的pH值低于正常组织，pH敏感脂质体利用癌细胞周围微环境这一特征，可以高选择性地到达病灶位置，提高药物的靶向性，减少不良反应^[25]。甘草次酸(GA)是来源于豆科植物甘草的活性组分，已证实离体大鼠肝细胞匀浆的细胞膜中含有许多甘草次酸的特异结合位点，而在所有脏器组织中，肝脏的甘草次酸结合位点活性最高，甘草次酸介导的脂质体表现出良好的肝脏疾病治疗靶向作用^[26-27]。叶酸(FA)是一种可被用作靶向配体的维生素，对叶酸受体过度表达的癌细胞具有较好的亲和性，经FA标记的脂

质体有利于增加药物进入肿瘤细胞的靶向程度^[28]。

本研究采用琥珀酸胆固醇单酯(CHEMS)为 pH 敏感材料,以 DSPE-PEG2000 作为长循环脂质体材料,同时采用 GA 和 FA 共修饰脂质体材料,共同包载黄芩苷和姜黄素,最终构建双靶向 pH 敏感黄芩苷/姜黄素共载脂质体(GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur)。通过单因素试验和 Box-Behnken 设计-响应面法优化 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 的制备工艺,并对其抗肝癌作用进行初步研究,以期得到一种改善黄芩苷和姜黄素局限性、提高药物靶向性和安全性的共载脂质体,为后续治疗肿瘤的脂质体研究提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

安捷伦 1260 高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;KH-500B 超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司;Biosafer650-92 超声破碎仪,赛飞(中国)有限公司;PHS-25pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;DF-101D 集热式恒温磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司;ZEN3600 动态光散射粒度分析仪,Malvern 公司;Mco-20AIC 二氧化碳细胞培养箱,Panasonic 公司;生物安全台柜,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;全自动细胞自动计数仪,上海苏生物科技有限公司;多动能酶标仪,TECAN 公司;D3024R 台式高速冷冻型微量离心机,美国赛诺杰克有限公司。

1.2 试剂

黄芩苷原料药,质量分数 92%,批号 XAZX20210210,西安展讯生物科技有限公司。姜黄素原料药,质量分数 95%,批号 M28HS182274;黄芩苷对照品,质量分数 98%,批号 P16M8F31725;姜黄素对照品,质量分数 98%,批号 R08S8S33416;槲皮素对照品,质量分数 98%,批号 S25567;透析袋,相对分子质量 3 500,均购自上海源叶生物科技有限公司。胆固醇,批号 925L031;大豆卵磷脂,批号 12R021,均购自北京索莱宝科技有限公司。DSPE-PEG 2000,批号 YS-DM2305;DSPE-PEG-FA,批号 YS-D82301;DSPE-PEG-GA,批号 YS-D332301,均购自重庆渝德医药科技有限公司;CHEMS,质量分数 97%,批号 C2120059,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;DMEM 基础培养基,武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清,浙江天杭生物科技股份有限公司;青霉素-链霉素溶液、磷酸盐缓冲液(PBS),白鲨生物科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO),索莱

宝生物科技有限公司;CCK-8 细胞增殖试剂盒,上海百赛生物科技股份有限公司;0.25% Trypsin-EDTA, Gibco 公司;小鼠白细胞介素(IL)-6 酶联免疫检测试剂盒,批号 H007-1-1,南京建成生物工程研究所;小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定试剂盒,批号 ZC-39024,茁彩生物科技有限公司;肝素钠、水合氯醛、三氯甲烷、无水乙醇、磷酸、磷酸二氢钠、氢氧化钠、磷酸氢二钠、盐酸、甲醇均为分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 细胞株及动物

肝癌 HepG2 细胞,武汉尚恩生物技术有限公司。

KM 小鼠,6~8 周,体质量 18~22 g,雄性;H22 荷瘤小鼠,6~8 周,体质量 18~22 g,雄性;均购自江苏华创信诺医药科技有限公司,实验动物生产许可证号 SYXK(苏)2023-0077。所有动物实验经南京中医药大学翰林学院伦理委员会批准(批准号 No. 2024031901)。

2 方法与结果

2.1 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 的制备

采用薄膜分散法制备 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur,称取药物(黄芩苷与姜黄素质量比为 5:1,设置依据见“2.10”项药效学结果)、大豆卵磷脂、胆固醇、DSPE-PEG-FA、DSPE-PEG-GA、DSPE-PEG 2000 以及 CHEMS,溶于有机相中(三氯甲烷:无水乙醇为 1:3 的混合溶液)。然后将有机相混合液倒入圆底烧瓶内,使用旋转蒸发仪,50 °C 恒温水浴缓慢除去有机相,形成一层均匀薄膜后,向其中加入适量 pH 7.0 PBS 50 °C 水化形成脂质体混悬液。使用超声破碎仪在超声功率 65 W 的条件下破碎脂质体混悬液。最后将脂质体混悬液 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,过 0.45 μ m 微孔滤膜整粒滤过即得。

2.2 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 包封率和载药量的测定

采用葡聚糖凝胶法^[29]来分离 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 的脂质体与游离药物。称取 10 g G-50 葡聚糖凝胶置于 PBS 中充分溶胀 6 h 后,搅拌均匀,排除残余气泡。将葡聚糖凝胶装入色谱柱中,制得的葡聚糖凝胶色谱柱柱高为 20 cm,柱体积分约 25 mL。上样前用 2~3 个柱体积分的蒸馏水作为洗脱液,平衡凝胶柱,使葡聚糖凝胶柱最上方基线稳定。在色谱柱上方洗脱液即将与基线平行时,加入 0.1 mL GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 至柱中,待基线再次平行时,用蒸馏水开始洗脱,用 2 mL 离心管收

集流出柱子的洗脱液,接连接取35份,每份1 mL。分别将30份的1 mL洗脱液,加入甲醇定容至2 mL,超声60 min,以5 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液滤过沉淀,并过0.22 μm的微孔滤膜后,进高效液相色谱(HPLC)法测定黄芩苷与姜黄素的峰面积。参照已有的文献研究^[24,30],HPLC条件设为色谱柱:XSelect HSS T3(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-磷酸缓冲盐溶液(53:47,磷酸缓冲盐溶液:取磷酸1 mL,加入纯水定至1 L,混合抽滤);体积流量1 mL·min⁻¹,黄芩苷紫外检测波长278 nm;姜黄素检测波长425 nm,柱温35 °C,进样量10 μL。该条件下黄芩苷出峰时间约5 min,姜黄素出峰时间约为18 min,黄芩苷质量浓度为2.5~100.0 μg·mL⁻¹具有良好的线性关系,线性方程为 $A=27.522 C-44.909$ ($R^2=0.999 1$);姜黄素质量浓度为2.5~100.0 μg·mL⁻¹具有良好的线性关系,线性方程为 $A=59.693 C-6.800 5$ ($R^2=0.999 2$)。

由图1可知,流出的洗脱液在6~13 mL时,为凝胶柱中所分离的GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur,在第28毫升时,有游离的黄芩苷和姜黄素流出。因此最终确定从6~13 mL收集洗脱液8 mL为GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur。从8 mL中取1 mL洗脱液,加入甲醇将其定容至2 mL,超声60 min,以5 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液滤过沉淀,并过0.22 μm的微孔滤膜后,进HPLC测定峰面积,计算脂质体内黄芩苷和姜黄素的含量,并计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = W_{\text{包}} / W_{\text{投药}}$$

$$\text{载药量} = W_{\text{包}} / W_{\text{脂质体}}$$

$W_{\text{包}}$ 为脂质体包进去的药量; $W_{\text{投药}}$ 为黄芩苷和姜黄素的投药量, $W_{\text{脂质体}}$ 为脂质体的总质量。

2.3 体外释放度的测定

选择以含有30%乙醇的pH 6.5 PBS溶液和30%乙醇的pH 7.5 PBS溶液作为释放介质^[24],进行

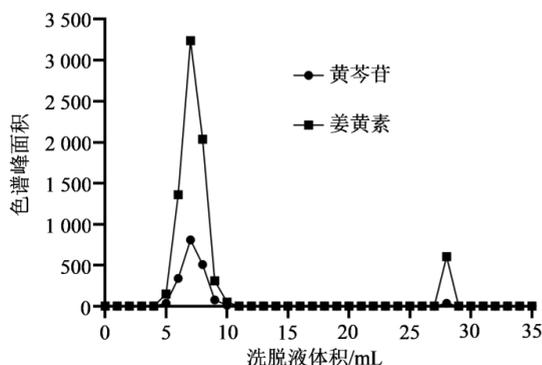


图1 葡聚糖凝胶柱的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of dextran gel column

体外释放度研究,分别精密吸取3 mL的GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur溶液于透析袋,释放介质37 °C,转速100 r·min⁻¹,分别在0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0 h吸取3 mL,同时分别补入3 mL释放介质,分别测定药物的含量,计算累积释放率,绘制释放曲线。以脂质体在pH 7.5释放介质的溶出曲线为参比(R),考察pH 6.5释放介质的溶出曲线(T)与其的差异性,计算溶出曲线相似因子(f_2),当 $50 \leq f_2 \leq 100$ 时,说明2条溶出曲线具有相似性,没有差异;当 f_2 小于50或者大于100时,说明2条溶出曲线有差异。 f_2 计算公式如下:

$$f_2 = 50 \lg \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R - T)^2 \right]^{0.5} \times 100 \right\}$$

2.4 单因素考察

2.4.1 CHEMS 磷脂质量比的考察 CHEMS为pH敏感材料,其用量会影响脂质体在偏酸性释放介质中的释放度。按“2.1”项下条件制备脂质体,其他因素固定不变,分别对CHEMS与磷脂的质量比0.5:10、1.0:10、1.5:10、2.0:10、2.5:10进行考察,测定包封率、粒径、多分散指数(PDI)和 f_2 。粒径和PDI采用ZEN3600动态光散射粒度分析仪检测。由表1可知,当CHEMS与磷脂的质量比达到2.0:10时, f_2 开始小于50,说明脂质体在2种不同pH释放介质中的溶出曲线出现差异性,在pH 6.5的释放介质中明显释放速度变快,出现pH敏感性。经单因素方差分析,不同用量CHEMS对黄芩苷的包封率($P=0.13$)和姜黄素的包封率($P=0.22$)无显著影响。随着CHEMS用量的增加,脂质体的包封率和粒径呈现先降后增的趋势,CHEMS与磷脂的质量比为2:10时,平均粒径较低。综合考虑,确定CHEMS磷脂质量比为2:10进行后续考察。

2.4.2 DSPE-PEG 2000 磷脂质量比的考察 确定CHEMS磷脂质量比为2:10,其他因素固定不变,分别对DSPE-PEG 2000与磷脂质量比1:100、2:100、3:100、4:100、5:100进行考察,测定包封率、粒径、PDI和 f_2 。由表2可知,随着DSPE-PEG 2000磷脂质量比的增加,超过4:100时,包封率出现下降趋势,粒径和PDI呈现升高趋势。 f_2 均小于50,说明该因素各水平条件下,脂质体的释放均能体现出pH敏感性。经单因素方差分析,1:100、2:100、4:100 3个组之间包封率和粒径均无显著差异($P > 0.05$),而4:100、6:100、7:100 3组之间包封率和粒径有显著差异($P < 0.05$)。综合考虑,最终确定DSPE-PEG 2000磷脂质量比为4:100。

表 1 CHEMS 磷脂质量比对脂质体各评价指标的影响 ($n=3$)Table 1 Effect of CHEMS to phospholipid mass ratio on evaluation indicators of liposomes ($n=3$)

CHEMS 磷脂质量比	包封率/%		粒径/nm	PDI	f_2	
	黄芩苷	姜黄素			黄芩苷	姜黄素
0.5:10	80.69±2.21	80.55±0.84	133.40±1.41	0.290±0.017	76.06	74.73
1.0:10	80.33±0.93	79.58±0.81	138.43±0.93	0.244±0.011	81.84	73.57
1.5:10	82.44±1.34	79.03±0.80	132.53±2.51	0.244±0.007	68.59	81.38
2.0:10	82.44±1.34	81.36±1.93	123.70±3.89	0.257±0.004	24.16	23.88
2.5:10	78.93±0.47	78.39±1.09	143.40±1.41	0.293±0.028	24.70	24.82

表 2 DSPE-PEG 2000 磷脂质量比对脂质体各评价指标的影响 ($n=3$)Table 2 Effect of DSPE-PEG 2000 to phospholipid mass ratio on evaluation indicators of liposomes ($n=3$)

DSPE-PEG 2000 磷脂质量比	包封率/%		粒径/nm	PDI	f_2	
	黄芩苷	姜黄素			黄芩苷	姜黄素
1:100	81.17±0.76	81.42±1.88	123.03±1.12	0.341±0.022	23.47	23.68
2:100	82.12±1.38	80.67±1.21	124.47±0.51	0.217±0.026	23.79	23.99
4:100	82.44±1.34	81.36±1.93	123.70±3.89	0.257±0.004	24.16	23.88
6:100	72.57±1.60	71.33±1.97	129.00±1.51	0.291±0.073	23.28	23.99
7:100	71.96±0.72	71.38±1.90	132.80±1.21	0.305±0.028	24.13	23.85

2.4.3 DSPE-PEG-GA 磷脂质量比的考察 确定 CHEMS 磷脂质量比为 2:10, DSPE-PEG 2000 磷脂质量比为 4:100, 其他因素固定不变, 分别对 DSPE-PEG-GA 与磷脂的质量比 1.0:100、1.5:100、2.0:100、2.5:100、3.5:100 进行考察, 测定包封率、粒径、PDI 和 f_2 。由表 3 可知, 随着 DSPE-PEG-GA 的增加, DSPE-PEG-GA 磷脂质量比超过 2:100 时, 包封率降低, 粒径变大, PDI 增大, 粒度分布不均匀。 f_2 均小于 50, 说明该因素各水平条件下, 脂质体均具有 pH 敏感性。经单因素方差分析, DSPE-PEG-GA 磷脂质量比 2.0:100、2.5:100、3.0:100 3 组之间包封率、粒径和 PDI 均有显著差异 ($P<0.05$), 低于 2:100 的水平组之间各评价指标没有显著差异 ($P>0.05$)。为获得高包封率、小粒径且粒度分布均匀的脂质体, 最终确定 DSPE-PEG-GA 磷脂质量比为 2:100。

2.4.4 DSPE-PEG-FA 磷脂质量比的考察 确定

CHEMS 磷脂质量比为 2:10, DSPE-PEG 2000 磷脂质量比为 4:100, DSPE-PEG-GA 磷脂质量比为 2:100, 其他因素固定不变, 分别对 DSPE-PEG-FA 磷脂的质量比 1.0:100、1.5:100、2.0:100、2.5:100、3.5:100 进行考察。由表 4 可知, 随着 DSPE-PEG-FA 的增加, DSPE-PEG-FA 磷脂质量比超过 2:100 时, 包封率开始降低, 粒径变大, PDI 增大, 粒度分布不均匀。该因素各水平条件下, 脂质体均具有 pH 敏感性。经单因素方差分析, DSPE-PEG-FA/磷脂 2:100、2.5:100、3:100 3 组之间对包封率、粒径和 PDI 均有显著差异 ($P<0.05$), 低于 2:100 的因素水平组之间各评价指标没有显著差异 ($P>0.05$)。最终确定 DSPE-PEG-FA 磷脂质量比为 2:100。

2.4.5 磷脂胆固醇质量比的考察 确定 CHEMS 磷脂质量比为 2:10, DSPE-PEG 2000 磷脂质量比为 4:100, DSPE-PEG-GA 磷脂质量比为 2:100, DSPE-

表 3 DSPE-PEG-GA 磷脂质量比对脂质体各评价指标的影响 ($n=3$)Table 3 Effect of DSPE-PEG-GA CHEMS to phospholipid mass ratio on evaluation indicators ($n=3$)

DSPE-PEG-GA 磷脂质量比	包封率/%		粒径/nm	PDI	f_2	
	黄芩苷	姜黄素			黄芩苷	姜黄素
1.0:100	81.68±1.31	81.40±1.28	124.79±1.49	0.247±0.020	24.19	24.27
1.5:100	82.47±0.36	80.65±1.14	123.70±1.24	0.255±0.005	24.61	24.37
2.0:100	82.44±1.34	81.36±1.93	123.70±3.89	0.257±0.004	24.16	23.88
2.5:100	76.38±3.85	72.54±1.35	133.10±0.86	0.277±0.011	23.71	24.55
3.0:100	67.78±2.29	67.16±1.76	134.65±1.25	0.320±0.008	23.50	24.66

表4 DSPE-PEG-FA 磷脂质量比对脂质体各评价指标的影响($n=3$)Table 4 Effect of DSPE-PEG-FA CHEMS to phospholipid mass ratio on evaluation indicators ($n=3$)

DSPE-PEG-FA 磷脂质量比	包封率/%		粒径/nm	PDI	f_2	
	黄芩苷	姜黄素			黄芩苷	姜黄素
1.0:100	82.42±1.55	81.38±1.99	124.38±1.15	0.256±0.017	28.89	29.02
1.5:100	83.84±0.36	81.27±0.61	122.39±0.81	0.261±0.009	28.49	27.33
2.0:100	82.44±1.34	81.36±1.93	123.70±3.89	0.257±0.004	24.16	23.88
2.5:100	75.02±0.99	73.36±1.85	133.89±1.32	0.324±0.008	28.07	27.89
3.0:100	63.54±1.11	62.76±1.00	133.99±0.89	0.326±0.004	28.49	27.81

PEG-FA 磷脂质量比为2:100,其他因素固定不变,分别对磷脂与胆固醇的质量比2:1、4:1、6:1、8:1、10:1进行考察。由表5可知,随着胆固醇占比减少,脂质体的包封率呈现先升高后降低的趋势。当磷脂胆固醇质量比为10:1时,脂质体在pH 7.5释放介质中的释放速度加快, f_2 值升高,可能由于胆固醇占比少,脂质膜流动性增加的缘故。经单因素方差分析,磷脂胆固醇质量比对包封率有显著影响($P<0.05$),但对粒径和PDI无显著影响。综合考虑,选择6:1、7:1、8:1的磷脂胆固醇质量比进行后续优化实验。

2.4.6 磷脂药物质量比考察 确定CHEMS磷脂质量比为2:10,DSPE-PEG 2000磷脂质量比为4:100,DSPE-PEG-GA磷脂质量比为2:100,DSPE-PEG-FA磷脂质量比为2:100,其他因素固定不变,分别对磷脂与药物的质量比4:1、6:1、8:1、10:1、12:1进行考

察。由表6可知,随着药物的占比减少,脂质体的包封率呈现先升高后降低的趋势。经单因素方差分析,磷脂药物质量比对包封率有显著影响($P<0.05$),但对粒径和PDI无显著影响。综合考虑,选择6:1、7:1、8:1的磷脂药物质量比进行后续优化实验。

2.4.7 水化体积的考察 确定CHEMS磷脂质量比为2:10,DSPE-PEG 2000磷脂质量比为4:100,DSPE-PEG-GA磷脂质量比为2:100,DSPE-PEG-FA磷脂质量比为2:100,其他因素固定不变,分别对水化体积6、8、10、12 mL进行考察。由表7可知,随着水化体积的增加,脂质体的包封率呈现先升高后降低的趋势。当水化体积10 mL时,脂质体的包封率最大,粒径最小,且具有pH敏感性。最终确定水化体积为10 mL。

2.4.8 超声破碎时间的考察 确定CHEMS磷脂质

表5 磷脂胆固醇质量比对脂质体各评价指标的影响($n=3$)Table 5 Effect of phospholipid to cholesterol mass ratio on evaluation indicators ($n=3$)

磷脂胆固醇质量比	包封率/%		粒径/nm	PDI	f_2	
	黄芩苷	姜黄素			黄芩苷	姜黄素
2:1	71.01±2.09	69.22±1.03	121.38±1.36	0.252±0.016	32.90	32.33
4:1	79.75±0.29	72.98±3.67	120.89±1.44	0.260±0.031	32.75	32.61
6:1	82.44±1.34	81.36±1.93	123.70±3.89	0.257±0.004	24.16	23.88
8:1	83.73±1.51	83.78±1.04	119.89±1.95	0.253±0.036	33.61	33.05
10:1	62.06±0.61	62.54±1.48	120.28±1.32	0.250±0.008	40.40	42.88

表6 磷脂药物质量比对脂质体各评价指标的影响($n=3$)Table 6 Effect of phospholipid to drug mass ratio on evaluation indicators ($n=3$)

磷脂药物质量比	包封率/%		粒径/nm	PDI	f_2	
	黄芩苷	姜黄素			黄芩苷	姜黄素
4:1	60.99±2.07	60.50±0.96	122.21±2.75	0.223±0.020	31.12	30.35
6:1	85.34±0.66	84.25±2.05	117.36±2.94	0.227±0.022	30.22	30.12
8:1	82.44±1.34	81.36±1.93	123.70±3.89	0.257±0.004	24.16	23.88
10:1	77.32±1.58	77.85±1.17	119.50±1.67	0.217±0.011	30.04	29.65
12:1	57.62±2.05	58.44±1.06	122.87±1.48	0.228±0.008	31.99	30.88

表 7 水化体积对脂质体各评价指标的影响($n=3$)

Table 7 Effect of hydration volume on evaluation indicators ($n=3$)

水化体积/mL	包封率/%		粒径/nm	PDI	f_2	
	黄芩苷	姜黄素			黄芩苷	姜黄素
6	55.86±0.75	54.63±1.92	123.86±1.85	0.243±0.016	24.81	24.33
8	82.44±1.34	81.36±1.93	123.70±3.89	0.257±0.004	24.16	23.88
10	84.65±1.12	84.69±0.81	115.26±3.07	0.240±0.019	23.27	24.54
12	53.47±0.58	52.37±0.59	122.20±1.39	0.216±0.014	24.78	24.72

量比为 2:10, DSPE-PEG 2000 磷脂质量比为 4:100, DSPE-PEG-GA 磷脂质量比为 2:100, DSPE-PEG-FA 磷脂质量比为 2:100, 水化体积 10 mL, 其他因素固定不变, 分别对超声时间 60、80、90、100 s 进行考察。由表 8 可知, 随着超声时

间的增加, 脂质体的粒径越来越小, 但包封率呈现降低的趋势。经单因素方差分析, 超声时间对包封率和粒径均有显著影响($P < 0.05$)。因此选择超声破碎时间 60、70、80 s 进行后续优化实验。

表 8 超声破碎时间对脂质体各评价指标的影响($n=3$)

Table 8 Effect of ultrasound time on evaluation indicators ($n=3$)

超声破碎时间/s	包封率/%		粒径/nm	PDI	f_2	
	黄芩苷	姜黄素			黄芩苷	姜黄素
60	84.65±1.12	84.69±0.81	115.26±3.07	0.240±0.019	23.27	24.54
80	81.06±1.20	81.17±1.05	91.34±3.85	0.220±0.003	24.70	24.75
90	78.15±0.96	76.97±0.91	79.75±2.02	0.214±0.004	23.95	24.11
100	70.33±1.43	70.20±0.87	72.39±0.64	0.206±0.004	25.12	25.08

2.5 Box-Behnken 响应面优化工艺处方

使用 Design Expert 软件, 采用 Box-Behnken 设计原理, 选取磷脂药物质量比(A)、磷脂胆固醇质量比(B)和超声破碎时间(C)作为影响因素, 以黄芩苷包封率(Y_1)、姜黄素包封率(Y_2)、总载药量(Y_3)为评价指标, 进行处方工艺优化, 实验因素水平设计见表 9。以 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 的综合评分(Y)为响应值, 运用独立权重法对 3 个分指标进行组合赋权, 得 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 的权重系数分别为 33.53%、38.73%、27.75%。实验设计结果见表 10、11。通过该软件分析拟合, 得到综合评分 Y 与 3 因素的回归方程 $Y=66.04+3.87A+1.44B-3.23C-4.03AB+1.51AC+4.63BC-1.75A^2-3.49B^2-6.43C^2$ ($R^2=0.9688$)。根据回归模型方差分析, 此模型的 $P_r(>F)$ 值是 0.000 2, 模型显著, 其失拟项的 $P_r(>F)$ 值是

表 9 Box-Behnken 设计的因素水平

Table 9 Factor levels of Box-Behnken design

因素	-1	0	1
磷脂药物质量比(A)	6:1	7:1	8:1
磷脂胆固醇质量比(B)	6:1	7:1	8:1
超声破碎时间(C)/s	60	70	80

0.288 2, 不显著, 说明该模型拟合合理。根据显著性的大小来看, 对综合评分影响极显著的是磷脂药

表 10 Box-Behnken 设计表及结果

Table 10 Box-Behnken design table and results

编号	A	B	C/s	Y_1 /%	Y_2 /%	Y_3 /%	Y
1	8:1	8:1	70	82.05	86.45	8.02	63.22
2	7:1	7:1	70	88.37	85.77	9.46	65.47
3	8:1	7:1	60	86.55	84.41	8.21	63.99
4	8:1	7:1	80	78.29	79.95	7.53	59.30
5	7:1	7:1	70	86.45	86.40	9.31	65.03
6	6:1	6:1	70	69.73	63.50	8.52	50.34
7	7:1	7:1	70	90.59	91.48	9.74	68.51
8	7:1	6:1	80	64.28	64.56	6.94	48.48
9	6:1	7:1	80	64.33	64.24	8.17	48.72
10	6:1	7:1	60	78.99	78.02	9.86	59.44
11	7:1	7:1	70	88.80	87.42	9.52	66.27
12	7:1	6:1	60	83.64	83.77	8.88	62.95
13	7:1	8:1	60	73.34	71.46	8.07	54.51
14	8:1	6:1	70	87.59	89.49	8.21	66.31
15	7:1	7:1	70	85.88	86.60	9.27	64.91
16	7:1	8:1	80	76.95	78.46	8.51	58.55
17	6:1	8:1	70	81.17	85.88	10.37	63.35

表11 回归模型方差分析结果

来源	平方和	自由度	均方和	F值	$P_r(>F)$ 值	显著性
模型	637.82	9	70.87	24.15	0.000 2	显著
A	119.89	1	119.89	40.86	0.000 4	显著
B	16.66	1	16.66	5.68	0.048 7	显著
C	83.46	1	83.46	28.44	0.001 1	显著
AB	64.83	1	64.83	22.09	0.002 2	显著
AC	9.10	1	9.10	3.10	0.121 6	不显著
BC	85.68	1	85.68	29.20	0.001 0	显著
A ²	12.85	1	12.85	4.38	0.074 7	不显著
B ²	51.15	1	51.15	17.43	0.004 2	显著
C ²	174.11	1	174.11	59.33	0.000 1	显著
残差	20.54	7	2.93			
失拟相	11.78	3	3.93	1.79	0.288 2	不显著
纯误差	8.77	4	2.19			
总离差	658.36	16				

物质质量比,各考察因素影响主次为A>C>B。同时也存在两因素交互作用的显著影响,如磷脂药物质量比与磷脂胆固醇质量比的交互作用,磷脂胆固醇质量比和超声破碎时间的交互作用。两两因素对综合评分影响的效应面曲线图见图2。按软件计算分析得出的最佳处方制备工艺条件为:磷脂药物质量比为7.95:1,磷脂胆固醇质量比为6.53:1,超声破碎时间为69 s,预测黄芩苷理论包封率91.27%,姜黄素理论包封率92.63%,理论总载药量8.74%,理论综合评分为68.91。

2.6 工艺验证

按照优化得出的最佳处方工艺制备3批GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur,测定包封率和载药量。如表12所示,黄芩苷和姜黄素的实际包封率、总载药量和综合评分与预测值相对偏差均小于5%,反映了实验设计和数学模型的可靠性和重现性。

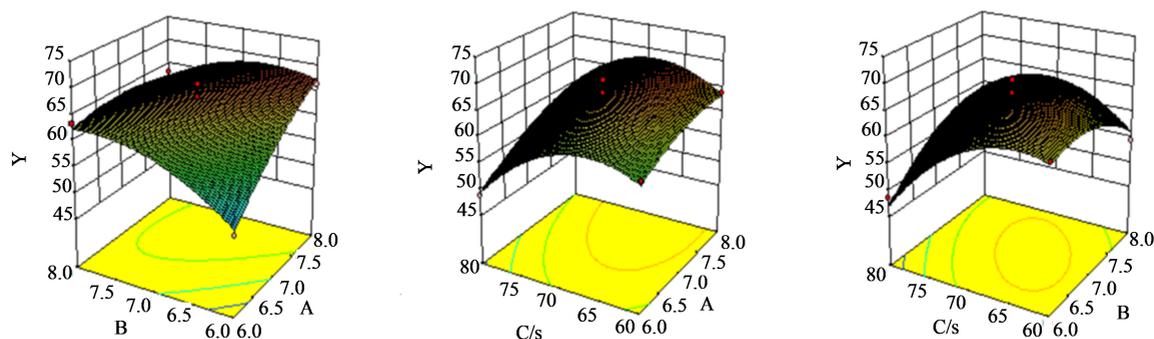


图2 两两因素对Y的3D响应面三维图

Fig. 2 3D response surface plot

表12 工艺验证结果

指标	实测值	预测值	相对偏差/%
黄芩苷包封率/%	90.90±1.82	91.27	4.03
姜黄素包封率/%	90.97±0.79	92.63	1.79
总载药量/%	8.61±0.12	8.74	1.47
综合总分	68.10±0.35	68.91	1.17

2.7 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur的形态观察及粒径测定

取适量GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur滴在200目碳膜铜网上,放置5 min,滤纸吸除多余液体,滴加2%磷钨酸溶液进行染色,挥干,置于透射电镜下观察样品的微观形态,结果见图3,脂质体形态圆整,大小均匀,无黏连与聚集。采用粒度测定仪,测定脂质体的粒度,粒径成正态分布,粒径为(82.50±0.99)nm,PDI为0.215±0.013。

2.8 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur体外释放及释放机制

按照“2.3”项的方法分别对GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur、黄芩苷原料药混悬液、姜黄素原料药混悬液进行体外释放度的测定,绘制药物随时间的释放曲线,结果见图4。黄芩苷和姜黄素原料药在pH 6.5和pH 7.5释放介质的释放行为相似,且在6 h时的累积释放率均达到80%以上。而GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur药物在pH 6.5和pH 7.5释放介质的释放行为明显不相似,在pH 6.5的释放介质中释放加快,说明GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur释放药物具有pH敏感性。同时GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur与原料药相比,具有缓慢释放的特征。采用一级速度方程、Higuchi方程和Baker-Lonsdale球形扩散方程对GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur的释放行为进行模型拟合,分析释药机制,式中 t 代表时间, Q 代表累积释放率,结

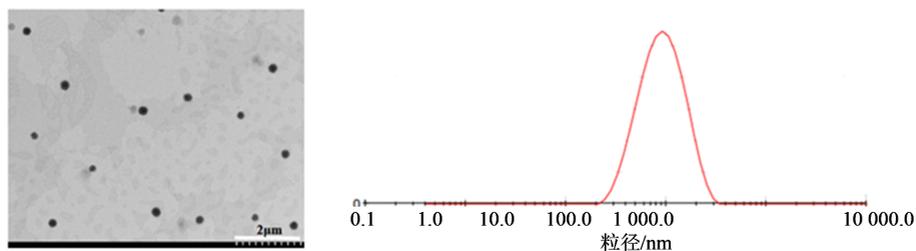


图 3 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 形态及粒径分布图

Fig. 3 Morphology and size distribution of GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur nanoparticles

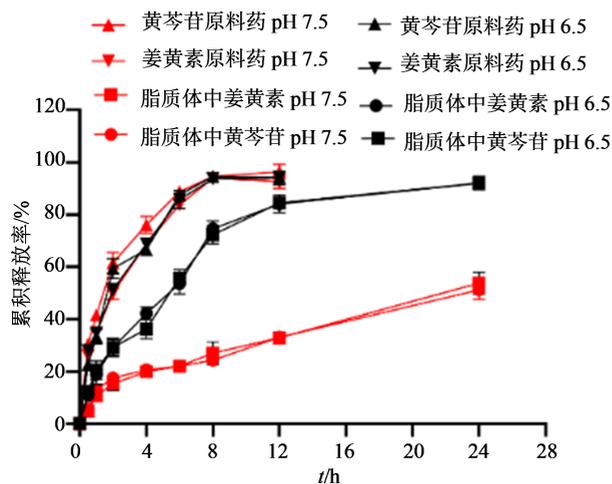


图 4 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Release profiles *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

果见表 13。根据 R^2 的大小判断可知, GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 的释放速度符合一级速度特征, 其次对 Baker-Lonsdale 球形扩散方程也有较好的拟合, 说明药物在 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 中以扩散机制进行释放。

2.9 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 的生物相容性

采用溶血实验考察各种材料制备出的 6 种脂质体 (GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur、GA/FA-pH-Lip、GA-pH-Lip、FA-pH-Lip、pH-Lip 和 Lip) 的生物相容性。按照 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 的最佳制备工艺, 处方中未添加黄芩苷及姜黄素, 即得 GA/FA-pH-Lip; 处方中未添加黄芩苷、姜黄素和 DSPE-PEG-FA, 即得 GA-pH-Lip; 处方中未添加黄芩苷、姜黄素和

表 13 释药模型拟合结果

Table 13 Fitting release model and coefficient

药物	释放介质	模型	方程	R^2
黄芩苷	pH 6.5	First-order 一级方程	$\ln(1-Q) = -0.1076t - 0.1936$	0.9379
		Higuchi 方程	$Q = 0.2118t^{1/2} + 0.0104$	0.9255
		Baker-Lonsdale 方程	$3/2[1 - (1-Q)^{2/3}] - Q = 0.0138t + 0.0007$	0.9284
	pH 7.5	First-order 一级方程	$\ln(1-Q) = -0.0256t - 0.998$	0.9774
		Higuchi 方程	$Q = 0.0977t^{1/2} + 0.0055$	0.9618
		Baker-Lonsdale 方程	$3/2[1 - (1-Q)^{2/3}] - Q = 0.0024t - 0.0023$	0.9614
姜黄素	pH 6.5	First-order 一级方程	$\ln(1-Q) = -0.1083t - 0.1813$	0.9428
		Higuchi 方程	$Q = 0.2096t^{1/2} + 0.0126$	0.9267
		Baker-Lonsdale 方程	$3/2[1 - (1-Q)^{2/3}] - Q = 0.014t - 0.0013$	0.9329
	pH 7.5	First-order 一级方程	$\ln(1-Q) = -0.0258t - 0.0881$	0.9827
		Higuchi 方程	$Q = 0.1001t^{1/2} - 0.0084$	0.9745
		Baker-Lonsdale 方程	$3/2[1 - (1-Q)^{2/3}] - Q = 0.0023t - 0.0026$	0.9676

DSPE-PEG-GA, 即得 FA-pH-Lip; 处方中未添加黄芩苷、姜黄素、DSPE-PEG-FA 和 DSPE-PEG-GA, 即得 pH-Lip; 处方中未添加黄芩苷、姜黄素、DSPE-PEG-FA、DSPE-PEG-GA 和 CHEMS, 即得 Lip。

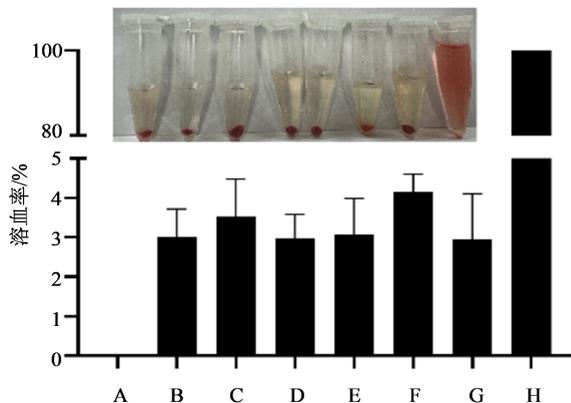
采用溶血实验, 分别取超纯水、PBS、6 种脂质体与 2% 的大鼠红细胞混悬液混合, 在 37 °C 下孵

育 4 h, 再 3 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 观察红细胞是否破裂, 出现溶血现象。同时取上清液 100 μL 于 96 孔板上, 于 570 nm 的波长检测吸光度 (A) 值, PBS 的上清液为阴性对照, 超纯水的上清液为阳性对照, 平行 3 组, 计算溶血率。

$$\text{溶血率} = (\text{脂质体组 } A \text{ 值} - \text{PBS 组 } A \text{ 值}) / (\text{超纯水组 } A$$

值-PBS组A值)

结果见图5,各脂质体组的溶血率低于5%,说明GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur具有生物相容性。



A-PBS; B-GA/FA-pH-Lip@Bai/cur; C-GA/FA-pH-Lip; D-GA-pH-Lip; E-FA-pH-Lip; F-pH-Lip; G-Lip; H-超纯水。

A-PBS; B-GA/FA-pH-Lip@Bai/cur; C-GA/FA-pH-Lip; D-GA-pH-Lip; E-FA-pH-Lip; F-pH-Lip; G-Lip; H-ultrapure water.

图5 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur的生物相容性

Fig. 5 Biocompatibility of GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur

2.10 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur对肝癌细胞增殖抑制作用的考察

将处于对数生长期的HepG2细胞稀释为均匀的细胞悬浮液, 1×10^4 个、100 μL 接种于96孔板中,待细胞贴壁后,加入质量浓度为35、60、70、95、120、170、190、240 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄芩苷溶液, 5、10、15、20、25、30、40、45、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的姜黄素溶液、总药量质量浓度为36、60、72、102、126、180、210、300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄芩苷/姜黄素(质量比为5:1)混合溶液和总药量质量浓度为36、60、72、102、126、180、210、300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur,培养48 h后吸出培养基,PBS洗涤后,加入新鲜的细胞培养基100 μL 和10 μL 的CCK-8溶液,将其轻轻混匀之后,继续培养2 h后,在酶标仪上于450 nm处检测A值,计算半数抑制浓度(IC_{50})。结果见表14,黄芩苷的 IC_{50} 大约是姜黄素 IC_{50} 值的5倍,因此脂质体包载药物时,将黄芩苷与姜黄素的质量比定为5:1。当药物包载在GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur中时, IC_{50} 较混合溶液低,表明双靶向pH敏感的脂质体有助于增加药物对HepG2的增殖抑制作用。

2.11 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur体内组织分布情况

采用小鼠肝组织分布实验考查GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur的肝靶向性。取60只小鼠,适应性饲养1周后,分为两大组进行尾iv给药,两大组分别为

表14 不同样品对HepG2的 IC_{50}

Table 14 IC_{50} of different samples on HepG2

样品	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
黄芩苷溶液	164.93±8.11
姜黄素溶液	32.10±2.97
黄芩苷/姜黄素混合溶液	89.78±3.44
GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur	79.74±2.50

黄芩苷/姜黄素共载普通脂质体(Lip@Bai/Cur)组和GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur组,给药剂量为60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,将小鼠给药后分别在相应的时间点(0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、24.0 h)处死,取心、肝、脾、肺、肾组织,每个时间点平行5只小鼠。将称好质量的小鼠组织放置于EP管中,按组织质量每管分别加入10 $\mu\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ 的70%甲醇进行组织匀浆,并涡旋混合5 min,超声3 min,以12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液800 μL 放于EP管中,40 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥后,加入200 μL 甲醇涡旋至溶解。以12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心25 min,取上清液,并用0.45 μm 微孔滤膜滤过,取滤液按照以下色谱条件进行测定。参照已有的文献研究^[31-33],设定色谱条件为色谱柱:XSelect HSS T3(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈与2%磷酸溶液;梯度洗脱:0~10 min,乙腈:2%磷酸溶液为35:65;10~11 min,乙腈:2%磷酸溶液为65:35;11~18 min,乙腈:2%磷酸溶液为85:15;18~25 min,乙腈:2%磷酸溶液为35:16;体积流量1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;紫外检测波长为278 nm(黄芩苷)、360 nm(内标,槲皮素)、425 nm(姜黄素);柱温35 $^{\circ}\text{C}$,进样量10 μL 。该条件下黄芩苷出峰时间约4 min,内标出峰时间约7 min,姜黄素出峰时间约为14 min,小鼠体内各组织中黄芩苷在0.1~10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $R^2 > 0.994$ 5;日内、日间精密度RSD在0.17%~6.38%;相对回收率在87.09%~113.55%,RSD均小于10%。小鼠体内各组织中姜黄素在0.1~10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ $R^2 > 0.990$ 8,日内、日间精密度RSD在0.16%~4.65%;相对回收率在85.75%~106.12%,RSD均小于10%。

用DAS 2.0软件统计矩模型拟合GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur与普通脂质体的AUC参数,见表15。引入相对摄取效率(TI)来评价GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur在小鼠体内的分布情况。

$$\text{TI} = (\text{AUC}_i)_p / (\text{AUC}_i)_s$$

TI表示在组织内2种不同制剂药物分布情况;TI>1表示在该器官或组织有靶向性,TI越大靶向效果越好;TI<1表示在该器官或组织无靶向性。公式中 AUC_i 是由浓度-时间曲线面积得到的第i器官或组织的药时曲线下面积,脚标p和s

分别代表 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 和普通脂质体。

计算 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 长循环脂质体和普通脂质体的 TI。如表 15 所示, GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 中姜黄素在小鼠心、肝、脾、肺、肾组织中的 TI 大小排序为肝 > 肾 > 脾 > 肺 > 心; GA/FA-pH-Lip@Bai/

Cur 中黄芩苷在小鼠心、肝、脾、肺、肾组织中的 TI 大小排序为肝 > 脾 > 肺 > 肾 > 心; 结果表明, 双靶向脂质体的姜黄素与黄芩苷均对小鼠体内肝脏的靶向性更强。由图 6 可知, 与普通脂质体相比, GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 在肝中药物分布的浓度更高。

表 15 姜黄素与黄芩苷在小鼠组织中的分布结果

Table 15 Distribution of curcumin and baicalin in mouse tissues

组织	姜黄素 AUC _{0-t} /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}$)		姜黄素 TI	黄芩苷 AUC _{0-t} /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}$)		黄芩苷 TI
	Lip@Bai/Cur	GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur		Lip@Bai/Cur	GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur	
心	2.72	2.97	1.09	5.23	6.73	1.29
肝	5.11	51.82	10.14	19.58	307.62	15.71
脾	5.10	16.79	3.29	14.83	55.35	3.73
肺	9.48	23.85	2.51	16.56	45.16	2.73
肾	5.50	20.21	3.68	10.36	27.25	2.63

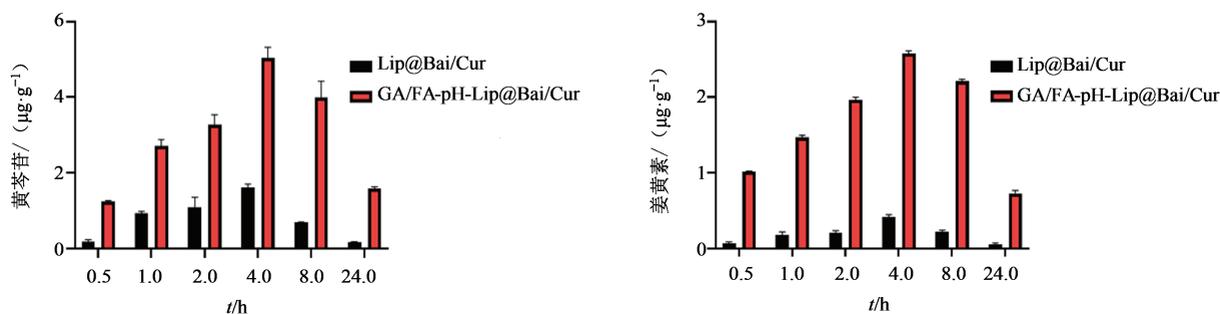


图 6 小鼠在不同时间点内肝组织中黄芩苷、姜黄素的浓度

Fig. 6 Concentration of baicalin and curcumin in mouse liver tissue at different time points

2.12 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 体内抗肝癌活性评价

将处于对数生长期的 H22 细胞, 用无菌 0.9% 氯化钠溶液稀释为 $1.0 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$, ip 0.2 mL 入小鼠腹部, 待腹部明显胀大, 取出腹水, 在小鼠右前肢腋下接种 0.2 mL 腹水, 接种第 5 天, 在接种部位可触摸到黄豆粒大小的肿块, 提示模型构建出 H22 荷瘤小鼠原位模型^[34-35]。取荷瘤小鼠 25 只, 分为 5 组, 每组 5 只, 即模型组、5-氟脲嘧啶 (5-FU, $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 阳性对照组)、GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 高、中、低剂量 (120 、 60 、 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组。每天尾 iv 给药 1 次, 连续给药 14 d 后, 采血处死, 并剥离肿瘤, 取出各组实体瘤, 记录瘤质量, 计算抑瘤率。

抑瘤率 = $1 - (\text{各给药组平均瘤质量} / \text{模型组平均瘤质量})$

结果见图 7, GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 对肿瘤生长有一定抑制作用, 高剂量的抑制作用与阳性药 5-FU 相当。取肿瘤组织处理后进行苏木精-伊红 (HE) 染色, 模型组肿瘤细胞数量多, 排列异常紧

密。与模型组相比, 给药后的 5-FU 组和 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 高、中、低剂量组的肿瘤坏死细胞数量变少, 肿瘤细胞的排列疏松, 根据剂量的不同, 细胞呈现不同程度变小, 其中 5-FU 组与脂质体高剂量组较为明显。各组小鼠血液自然凝固 15 min, $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 收集上清液即得小鼠血清。采用 ELISA 法检测各组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 表达水平, 使用 SPSS 25.0 通过独立样本 T 检验评估给药组与模型组之间的统计差异。与模型组相比, 5-FU 组和 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 高、中、低剂量组的小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.01$), 说明 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 有可能通过减轻炎症反应刺激, 来改善肿瘤免疫微环境, 抑制肿瘤生长。

3 讨论

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一^[32], 我国作为肝癌大国, 近几年来肝癌发病率和死亡率逐年增长, 因此治疗肝癌工作的意义重大。与化学药品和生物药品相比, 中药治疗疾病的独特优势有多成分、

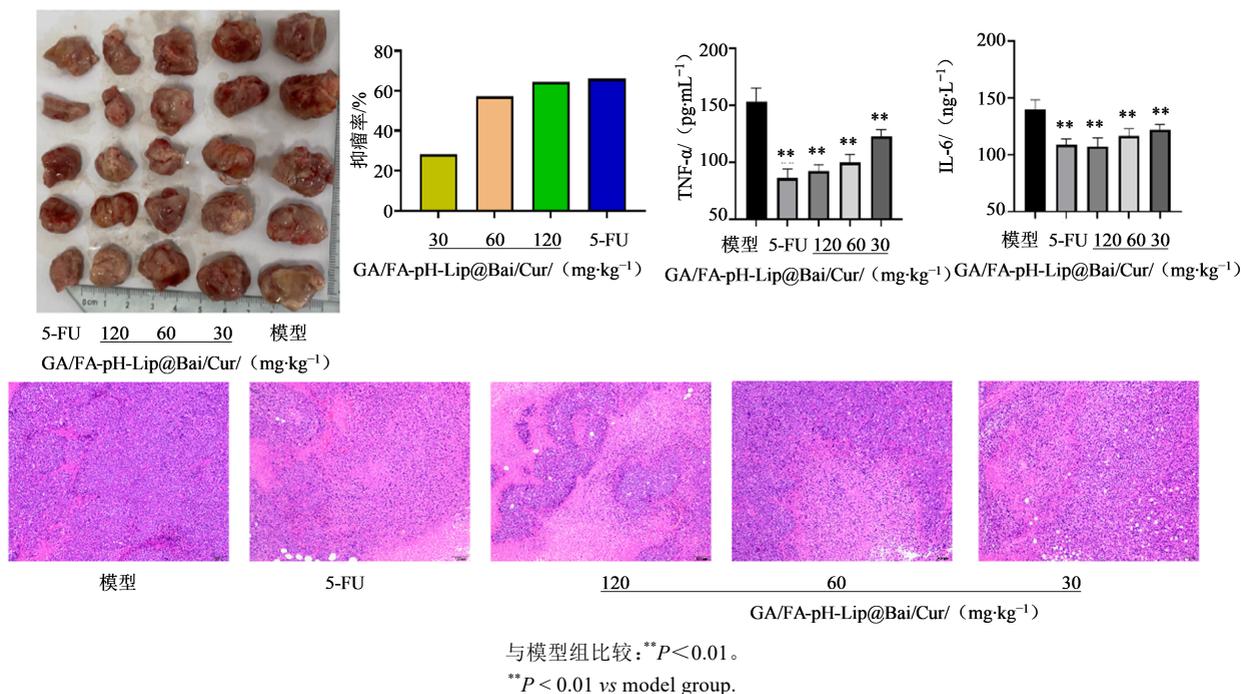


图7 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur抗肿瘤评价
Fig. 7 Anti-tumor evaluation of GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur

多靶点、不良反应少等优点。姜黄素与黄芩苷虽具有抗肝肿瘤的作用,但制成普通制剂时存在口服吸收差、稳定性不高和低靶向性等缺点,限制了药效的充分发挥。脂质体系指将药物包封于类脂质双分子层内而形成的超微球形载体制剂,具有改善药物溶解性,提高药物稳定性、增强体内靶向性等优点。本研究针对黄芩苷和姜黄素共载,构建GA/FA双修饰pH敏感脂质体递药系统,以期实现肝肿瘤靶向,增强药物的治疗效果,提高药物生物利用度,降低不良反应。

由于肿瘤细胞生长速度过快,糖酵解率高,在有氧和无氧条件下,肿瘤组织的pH值低于正常组织,研究表明肿瘤的pH为5.0~6.5,而正常组织与血液的pH为7.0~7.4^[33]。pH敏感脂质体利用癌细胞周围微环境与正常组织的差异性,在癌细胞的内吞作用下,脂质体药物可以高选择性地到达病灶位置,提高药物在靶向位置的富集程度,从而有效的提高治疗效果。因此本实验选择CHEMS为pH敏感材料,化学结构为胆固醇上醇羟基与琥珀酸上的羧基反应形成的单酯,既能与胆固醇一样发挥稳定剂的作用,又兼具酸敏感的功能。在筛选GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur处方工艺时,除了考虑以包封率、粒径和PDI为评价指标外,还引入脂质体在不同pH释放介质中溶出曲线相似因子 f_2 作为评价指标,确保脂质体的pH敏感性。使用单因素考察筛选关

键工艺处方因素,结果表明磷脂药物质量比、磷脂/胆固醇质量比和超声破碎时间具有显著影响,因此选择这3个关键因素做Box-Behnken设计-响应面法优化,得到GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur的最佳处方及工艺为CHEMS与磷脂质量比为2:10、DSPE-PEG 2000与磷脂质量比为4:100、DSPE-PEG-GA与磷脂质量比为2:100、水化体积为10 mL、磷脂与药物质量比7.95:1,磷脂与胆固醇质量比6.53:1,超声破碎时间为69 s。最佳工艺制备出的GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur包封率达到90%,平均粒径82 nm左右,体外释放行为具有pH敏感性及缓释性能,药物释放机制以球形扩散为主。

为保证GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur可用于静脉注射,考察各种脂质材料制备出的脂质体的溶血实验,表明具有生物相容性,符合注射要求。GA修饰的脂质体可以靶向肝组织,FA修饰的脂质体可以靶向叶酸受体过度表达的癌细胞,GA/FA双修饰就是为了脂质体可以高效靶向肝组织中的肿瘤细胞。体外肝癌细胞增殖实验表明,GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur可以增强药物对HepG2的增殖抑制作用,有可能是因其可更好地靶向肝癌细胞,将药物递送到细胞内发挥作用。体内组织分布实验表明,GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur具有很好地肝靶向作用。同时GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur对H22荷瘤小鼠,有抑制肿瘤生长的作用,作用呈现剂量相关性。阳性药物5-

FU 虽然抑制肿瘤生长效果最佳,但小鼠经过 7 d 5-FU 给药后,体形消瘦,体质量明显下降。但 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 给药组的小鼠体质量相对稳定,也说明了 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 的不良反应低。

本研究制备的 GA/FA-pH-Lip@Bai/Cur 安全性好,肝靶向性高,具有良好的抑制肝肿瘤作用,为今后黄芩苷与姜黄素联用,用于抗肿瘤的临床应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 黄烈岩, 聂黎行, 康帅, 等. 黄芩化学成分、药理作用和质量控制的研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(4): 88-96.
Huang L Y, Nie L X, Kang S, et al. Research progress on chemical components, pharmacological effects, and quality control of *Scutellaria baicalensis* [J] J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2024, 26 (4): 88-96.
- [2] Wen Y Q, Wang Y Z, Zhao C X, et al. The pharmacological efficacy of baicalin in inflammatory diseases [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(11): 9317.
- [3] Yang J Y, Li M, Zhang C L, et al. Pharmacological properties of baicalin on liver diseases: A narrative review [J]. Pharmacol Rep, 2021, 73(5): 1230-1239.
- [4] Wang D N, Li Y. Pharmacological effects of baicalin in lung diseases [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1188202.
- [5] 吴缠婷, 周良良, 邹婉清, 等. 黄芩苷的药理特性及其作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 63-67.
Wu C T, Zhou L L, Zou W Q, et al. Research progress on pharmacological properties and mechanism of baicalin [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(2): 63-67.
- [6] 孔邦彦, 魏立彬, 郭青龙. 黄芩苷的抗肿瘤作用研究进展 [J]. 药学学报, 2021, 56(6): 1537-1543.
Kong B Y, Wei L B, Guo Q L. Progress in antitumor activity of baicalin [J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(6): 1537-1543.
- [7] Singh S, Meena A, Luqman S. Baicalin mediated regulation of key signaling pathways in cancer [J]. Pharmacol Res, 2021, 164: 105387.
- [8] Sun J L, Yang X M, Sun H T, et al. Baicalin inhibits hepatocellular carcinoma cell growth and metastasis by suppressing ROCK1 signaling [J]. Phytother Res, 2023, 37(9): 4117-4132.
- [9] 周季青, 黎华建, 曾煜豪, 等. 黄芩苷通过抑制 ROS 介导的 PI3K/Akt/FoxO3a 信号通路诱导 HepG2 细胞铁死亡 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(5): 1327-1334.
Zhou J Q, Li H J, Zeng Y H, et al. Baicalin induces ferroptosis in HepG2 cells by inhibiting ROS-mediated PI3K/Akt/FoxO3a signaling pathway [J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(5): 1327-1334.
- [10] Hu Q C, Zhang W W, Wu Z, et al. Baicalin and the liver-gut system: Pharmacological bases explaining its therapeutic effects [J]. Pharmacol Res, 2021, 165: 105444.
- [11] 嵇昌红, 张道伟, 司国民. 姜黄素及其纳米制剂抗肝癌分子机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10): 184-192.
Zhuo C H, Zhang D W, Si G M. Progress on molecular mechanism of curcumin and its nano-preparation against liver cancer [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(10): 184-192.
- [12] Atia M M, Abdel-Tawab H S, Mostafa A M, et al. Nanocurcumin and curcumin prevent N, N'-methylenebisacrylamide-induced liver damage and promotion of hepatic cancer cell growth [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 8319.
- [13] 何玉娇, 黄茂林, 乐燕, 等. 姜黄素通过调控 microRNA-21 的表达来抑制肝癌细胞的转移和侵袭 [J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(9): 722-727.
He Y J, Huang M L, Le Y, et al. Inhibition effect of curcumin on the invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma by regulating the expression of microRNA-21 [J]. Chin Pharm J, 2020, 55(9): 722-727.
- [14] Harakeh S, Saber S H, Al-Raddadi R, et al. Novel curcumin nanoformulation induces apoptosis, and reduces migration and angiogenesis in liver cancer cells [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2023, 51(1): 361-370.
- [15] Li W Y, Chen Y N, He K, et al. The apoptosis of liver cancer cells promoted by curcumin/TPP-CZL nanomicelles with mitochondrial targeting function [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 804513.
- [16] Srinivas A N, Suresh D, Chidambaram S B, et al. Apoptosis antagonizing transcription factor-mediated liver damage and inflammation to cancer: Therapeutic intervention by curcumin in experimental metabolic dysfunction associated steatohepatitis-hepatocellular carcinoma [J]. J Cell Physiol, 2024, 239(1): 135-151.
- [17] Miyazaki K, Morine Y, Xu C M, et al. Curcumin-mediated resistance to lenvatinib via EGFR signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Cells, 2023, 12(4): 612.
- [18] Miao K Y, Liu W C, Xu J T, et al. Harnessing the power of traditional Chinese medicine monomers and compound prescriptions to boost cancer immunotherapy [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1277243.

- [19] Ghobadi N, Asoodeh A. Co-administration of curcumin with other phytochemicals improves anticancer activity by regulating multiple molecular targets [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(4): 1688-1702.
- [20] Zhang Y Q, Zhang M, Hu G N, et al. Elevated system exposures of baicalin after combinatory oral administration of Rhein and baicalin: Mainly related to breast cancer resistance protein (ABCG2), not UDP-glucuronosyltransferases [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112528.
- [21] Su Q J, Pan J Q, Wang C X, et al. Curcumin and baicalin co-loaded nanoliposomes for synergistic treatment of non-small cell lung cancer [J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16(8): 973.
- [22] Wang B J, Zhang W, Zhou X D, et al. Development of dual-targeted nano-dandelion based on an oligomeric hyaluronic acid polymer targeting tumor-associated macrophages for combination therapy of non-small cell lung cancer [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 1265-1279.
- [23] Wang X X, Chang X H, Zhan H B, et al. Curcumin and Baicalin ameliorate ethanol-induced liver oxidative damage *via* the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44(10): e13425.
- [24] 吴斯宇, 曾盈蓉, 唐聘, 等. RGD 环肽修饰的姜黄素/黄芩苷靶向共递送纳米脂质体的制备工艺优化及表征 [J]. *中草药*, 2021, 52(22): 6834-6844.
- Wu S Y, Zeng Y R, Tang P, et al. Preparation process optimization and characterization of RGD cyclopeptide modified curcumin/baicalin co-delivery targeted liposomes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(22): 6834-6844.
- [25] 昌天鹤, 全姬善. pH敏感脂质体在肿瘤治疗领域的研究进展 [J]. *河南大学学报(医学版)*, 2024, 43(3): 157-161.
- Chang T H, Quan J S. Advances in pH-sensitive liposomes for cancer therapy [J]. *J Henan Univ Med Sci*, 2024, 43(3): 157-161.
- [26] 耿宇婷, 张晓雪, 康荷笛, 等. 甘草次酸修饰细菌纤维素包载紫杉醇口服胶束的构建与评价 [J]. *中草药*, 2022, 53(20): 6451-6461.
- Geng Y T, Zhang X X, Kang H D, et al. Construction and evaluation of loaded paclitaxel oral micelles by glycyrrhetic acid-modified bacterial cellulose [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(20): 6451-6461.
- [27] Speciale A, Muscarà C, Molonia M S, et al. Recent advances in glycyrrhetic acid-functionalized biomaterials for liver cancer-targeting therapy [J]. *Molecules*, 2022, 27(6): 1775.
- [28] 何文丽, 董星, 闫梦, 等. 基于叶酸受体靶向的肿瘤诊断和治疗策略 [J]. *中国新药杂志*, 2023, 32(15): 1531-1537.
- He W L, Dong X, Yan M, et al. Tumor diagnosis and treatment strategies based on targeting folate receptor [J]. *Chin J New Drugs*, 2023, 32(15): 1531-1537.
- [29] 靳雯臻, 檀华进, 汪凯康, 等. 苦参碱固体脂质纳米粒的构建及包封率测定方法研究 [J]. *中国药学杂志*, 2020, 55(12): 1015-1020.
- Jin W Z, Tan H J, Wang K K, et al. Construction of matrine solid lipid nanoparticle and determination of the entrapment efficiency [J]. *Chin Pharm J*, 2020, 55(12): 1015-1020.
- [30] 范世忠, 郭华, 林智. HPLC测定香连金黄软膏中的黄芩苷和姜黄素 [J]. *华西药理学杂志*, 2016, 31(5): 529-530.
- Fan S Z, Guo H, Lin Z. Determination of baicalin and curcumin in Xianglian Jinhuang ointment by HPLC [J]. *West China J Pharm Sci*, 2016, 31(5): 529-530.
- [31] 陈文雅, 李璐, 郭尔楚, 等. 余甘子叶总黄酮对H22荷瘤小鼠免疫功能调节的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44(16): 1851-1859.
- Chen W Y, Li L, Guo E C, et al. Effect of *Phyllanthus emblica* L. total flavonoids on immunomodulatory function in H22 tumor-bearing mice [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2024, 44(16): 1851-1859.
- [32] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [33] 路诗佳, 李国飞. 基于微环境特点构建的纳米递药系统在肝癌治疗中的研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2023, 58(16): 1447-1456.
- Lu S J, Li G F. Research progress of nano-drug delivery systems based on the characteristics of microenvironment in the treatment of liver cancer [J]. *Chin Pharm J*, 2023, 58(16): 1447-1456.

[责任编辑 兰新新]