

叶酸修饰的 pH 值响应型去甲斑蝥素脂质体的制备及促 HepG2 细胞凋亡研究

杨 坤^{1,2}, 张海珠³, 张月辉¹, 范科琴^{1,3}, 宋方宇^{1,3}, 马丙锁^{1,3}, 张良明¹, 晏子俊^{1*}

1. 攀枝花市中心医院 药学部, 四川 攀枝花 617067

2. 楚雄彝族自治州人民医院 药剂科, 云南 楚雄 675000

3. 大理大学 药学院, 云南 大理 671000

摘要: 目的 制备叶酸 (FA) 修饰的 pH 值响应型去甲斑蝥素 (Nor) 脂质体 (Nor@LP-CHS-FA), 初步评价其促 HepG2 细胞凋亡活性。方法 应用薄膜分散法制备 Nor@LP-CHS-FA, 采用单因素实验结合星点设计-效应面法设计和优化制剂处方; 研究该载药系统的粒径、 ζ 电位、多分散系数 (PDI)、包封率、载药量, 应用透射电镜、傅里叶变换红外光谱、差式扫描量热仪、X 射线仪进行物理表征; 评价其稳定性及在模拟人工胃液、肠液和肿瘤微环境下的释药情况; 通过溶血性实验考察生物安全性, CCK-8 法评估 Nor@LP-CHS-FA 对 HepG2 细胞的增殖抑制作用, 结合流式细胞术分析其对 HepG2 细胞凋亡、周期的影响。结果 成功制备外观呈黄色的 Nor@LP-CHS-FA, 其最优处方为脂药比 5.05 : 1、磷脂占膜材总质量的 52.85%、FA 用量 13.90 mg; 透射电镜下 Nor@LP-CHS-FA 呈规则球形, 粒径为 (55.48 ± 0.67) nm、 ζ 电位为 (-18.15 ± 0.54) mV、PDI 为 0.42 ± 0.02 、包封率 $(82.72 \pm 0.84)\%$ 、载药量 $(12.25 \pm 0.13)\%$; Nor@LP-CHS-FA 在 4 °C 条件下储存, 包封率、载药量更高, 泄漏率更低。与游离 Nor 相比, Nor@LP-CHS-FA 在模拟胃液、肠液和肿瘤微环境释放速度更快, 以模拟肿瘤微环境中最快, 表明其有 pH 值响应性, 释放行为遵循 Weibull 模型。溶血性实验结果表明 Nor@LP-CHS-FA 有较小的溶血率, CCK-8 结果显示, 给药 24、48、72 h 后 Nor@LP-CHS-FA 对 HepG2 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 8.56、5.89、4.77 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 流式细胞术结果表明 Nor@LP-CHS-FA 可诱导 HepG2 细胞发生凋亡和 G₂/M 期阻滞。结论 Nor@LP-CHS-FA 处方工艺简单, 具备良好的 pH 值响应性, 能增强药物促 HepG2 细胞凋亡效果。

关键词: 去甲斑蝥素; 叶酸; pH 值响应性; 脂质体; 物理表征; 细胞凋亡; HepG2 细胞

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)06-1529-17

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.06.014

Preparation of folic acid-modified pH-responsive norcantharidin liposomes and its promotion apoptosis of HepG2 cells

YANG Kun^{1,2}, ZHANG Haizhu³, ZHANG Yuehui¹, FAN Keqin^{1,3}, SONG Fangyu^{1,3}, MA Bingsuo^{1,3}, ZHANG Liangming¹, YAN Zijun¹

1. Panzhihua Central Hospital, Panzhihua 617067, China

2. Department of Pharmacy People's Hospital of Chuxiong Yi Autonomous Prefecture, Chuxiong 675000, China

3. School of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China

Abstract: Objective To prepare pH-responsive norcantharidin (Nor) liposomes modified with folic acid (FA) (Nor@LP-CHS-FA) and preliminarily evaluate its activity in promoting apoptosis of HepG2 cells. **Methods** Nor@LP-CHS-FA was prepared by the thin-film dispersion method. The formulation recipe was designed and optimized through single-factor experiments combined with central

收稿日期: 2024-12-12

基金项目: 国家卫生健康委医院管理研究所项目 (YLZLXZ24G039); 四川省自然科学基金面上项目 (2025ZNSFSC0684); 云南省科学技术厅地方高校联合专项-面上项目 (202001BA070001-041); 云南省天然药物药理重点实验室开放基金重点项目 (YKLPNP-K2302); 四川省中医药管理局科研课题 (2023MS057, 2023MS207); 四川省医院协会青年药师科研专项资金项目 (22009, YP2202419); 攀枝花市科学技术局项目 (2024ZD-S-28)

作者简介: 杨 坤 (1997—), 女, 硕士研究生, 药师, 研究方向为药学。E-mail: 582596942@qq.com

***通信作者:** 晏子俊 (1989—), 男, 医学博士, 硕士生导师, 副教授、副主任药师, 研究方向为药物新型给药系统与新技术、临床药学。

E-mail: swallowyzj@163.com

composite design-response surface methodology. The particle size, ζ potential, polydispersity index (PDI), encapsulation rate, and drug loading capacity were studied. Physical characterization examinations were conducted using transmission electron microscopy, fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, and X-ray. The stability of the system was evaluated, as well as its drug release behavior in simulated artificial gastric fluid, intestinal fluid, and tumor microenvironment. The biological safety was evaluated through hemolysis experiments. The proliferation inhibitory effect of Nor@LP-CHS-FA on HepG2 cells was assessed using the CCK-8 method, and the effects on HepG2 cell apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry. **Results** The yellow-colored Nor@LP-CHS-FA was successfully prepared. The optimal formulation was a lipid-to-drug ratio of 5.05 : 1, phospholipids accounting for 52.85% of the total mass of the membrane material, and a FA dosage of 13.90 mg. Under transmission electron microscopy, Nor@LP-CHS-FA presented a regular spherical shape, with a particle size of (55.48 ± 0.67) nm, a ζ potential of (-18.15 ± 0.54) mV, a PDI of 0.42 ± 0.02 , a encapsulation rate of $(82.72 \pm 0.84)\%$, and a drug loading of $(12.25 \pm 0.13)\%$. Nor@LP-CHS-FA had a higher encapsulation rate and drug loading and a lower leakage rate when stored at 4 °C. Compared with free Nor, Nor@LP-CHS-FA released more rapidly in simulated gastric fluid, intestinal fluid, and tumor microenvironment, and was the fastest in the simulated tumor microenvironment, indicating its pH responsiveness and release behavior following the Weibull model. The hemolysis experiment results showed that Nor@LP-CHS-FA had a lower hemolysis rate. The CCK-8 results indicated that the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of Nor@LP-CHS-FA on HepG2 cells after 24, 48, and 72 hours of administration was 8.56, 5.89, 4.77 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The flow cytometry results showed that Nor@LP-CHS-FA could induce HepG2 cells to undergo apoptosis and G₂/M phase arrest. **Conclusion** Nor@LP-CHS-FA prescription process is simple, has good pH responsiveness, and can enhance the effect of promoting HepG2 cell apoptosis by the drug.

Key words: norcantharidin; folic acid; pH-sensitive; liposomes; physical characterization; cell apoptosis; HepG2 cells

癌症已成为威胁全球公共健康的重大挑战，是导致人类死亡的第 2 大病因^[1]。近年来，中医药凭借其独特的理论体系与治疗优势，在癌症综合治疗领域的研究价值日益凸显。去甲斑蝥素 (Nor) 作为斑蝥素的去甲基化衍生物，已获批用于肝癌等多种实体肿瘤的临床治疗^[2]，展现出广阔的应用潜力。然而，现有研究表明，Nor 存在水溶性差、体内代谢快、半衰期短等药动学缺陷，同时伴随明显的脏器毒性，且缺乏肿瘤靶向特异性，这些问题严重制约了其在临床上的广泛应用^[3]。

纳米药物递送系统 (NDDS) 凭借其独特的优势，在生物医药领域展现出极为广泛的应用前景。相较于传统给药系统，NDDS 能够显著降低药物毒性，并实现更为理想的药物释放性能。目前，纳米颗粒、脂质体、脂质微球、聚合物胶束和热敏凝胶等多种 NDDS 用于载带 Nor^[4]。其中，脂质体以琥珀酸、胆固醇 (CH) 和表面活性剂构成类似细胞膜的脂质双分子层结构，这种特殊的构造使其在亲水和疏水药物传递方面表现卓越，不仅能够有效提升药物的溶解度和生物利用度，还可显著延长药物的释放时间，因而得到了广泛应用^[5]。

随着 NDDS 研究不断深入，新的载体材料和制备技术不断涌现。其中 pH 值响应型 NDDS 凭借其独特的智能释药特性备受关注。肿瘤组织中，糖酵解增强，刺激乳酸产生，形成酸性微环境。pH 值

响应型 NDDS 在肿瘤酸性微环境中不稳定，其功能基团会随着 pH 值的变化发生质子化/去质子化，促使载带药物释放^[6]。同时，主动靶向给药系统的研发进程中，配体发挥着不可或缺的作用。蛋白质 (如抗体)^[7]、肽^[8]、糖 (如甘露糖、半乳糖、葡萄糖)^[9] 和小生物分子 (如适配体)^[10] 等多种配体均被广泛研究和应用。以叶酸 (FA) 为例，其与肿瘤细胞表面高表达的 FA 受体具有高度亲和力，能够实现药物向肿瘤细胞的精准靶向递送^[11]。

本研究以 Nor 为模型药物，以胆固醇琥珀酸单酯 (CHS) 作为酸敏感脂质体膜材，FA 为配体，制备 FA 修饰的 pH 值响应型去甲斑蝥素脂质体 (Nor@LP-CHS-FA)，并对其表征和质量评价，旨在为肿瘤靶向给药系统的研发提供新的思路与方法。

1 材料

1.1 药品与试剂

Nor (批号 N837936, 质量分数 >99%), 上海麦克林生化科技有限公司; 磷脂酰乙醇胺 (PE, 批号 S30050, 质量分数 >80%)、CH (批号 S11040, 质量分数 >95%) 均购自上海源叶生物科技有限公司; CHS (批号 P900011, 质量分数 >97%), 上海笛柏生物科技有限公司; FA (批号 F809516, 质量分数 >97%), 美国 sigma 公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.2~7.4), 索莱宝生物科技有限公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒, 武汉伊

莱瑞特生物科技; 细胞周期染色试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; CCK-8, 美国 GlpBio 公司; DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶和胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 生命技术公司。

1.2 主要仪器

Agilent 1220 型高效液相色谱仪、Agilent 1220 型扫描电子显微镜, 美国 Agilent 公司; ESJ200-4A 型精密电子天平, 上海龙腾科技股份有限公司; TGL16M 型台式高速冷冻离心机, 湖南凯达科学仪器有限公司; PHS-3C 型 pH 计, 上海康仪仪器有限公司; SHB-IIIAB 型循环水式多用真空泵, 北京中兴伟业仪器有限公司; RE-52A 型旋转蒸发器, 上海亚荣仪器厂; DF-101S 集热式恒温磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; UP-II-60L 型优普纯水系统, 四川优普超纯科技有限公司; SB25-12DT 型 600 W 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; BeNano 90 型 ζ 纳米粒度及 ζ 电位分析仪, 济南丹东百特仪器有限公司; D8 Advance 型 X 射线衍射扫描仪, 德国 Bruker AXS 公司; UV-3100 PC 型紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; Nicolet iS50FT-IR 型傅里叶红外光谱仪, 美国 Thermo Fisher 科技公司; DSC200-F3 型差示量热扫描仪, 德国 Netzsch 公司; MCO-15AC 型二氧化碳培养箱, 日本 SANYO 公司; Nano Drop 2000c 型酶标仪, 美国 BIO-RAD 公司; TD3 型低速自动平衡离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; IX73 型倒置荧光显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; FACS Aria 型流式细胞仪, 美国 BD 公司。

1.3 实验动物及细胞

健康普通级新西兰家兔 3 只, 兔龄 12~14 周, 体质量 2.0~2.5 kg, 购自昆明医科大学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(滇)K2020-0004。实验经昆明医科大学动物实验伦理审查委员会批准(伦理批号 kmmu20221862)。

人肝细胞癌 HepG2 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备

2.1.1 Nor@LP-CHS-FA 的制备 薄膜分散法制备 Nor@LP-CHS-FA^[12]。具体为: 称取适量 PE、CH、CHS 和 Nor 至圆底烧瓶, 加入 10 mL 氯仿, 40 °C 旋蒸得均匀的透明薄膜。加入 10 mL pH 7.4 PBS, 60 °C 水浴中避光搅拌一定时间后, 25 °C 下涡旋和

超声 10 min, 即得 pH 值响应型去甲斑蝥素脂质体(Nor@LP-CHS)。称取适量 FA 加入上述 Nor@LP-CHS, 一定温度下继续避光搅拌一定时间, 即得 Nor@LP-CHS-FA^[13]。

2.1.2 空白脂质体的制备 空白脂质体不加 Nor, 具体制备方法和步骤同“2.1.1”。

2.2 Nor 含量测定

2.2.1 色谱条件 采用 Eclipse Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱; 流动相为乙腈(A)-水(B), (10:90, 磷酸调节 pH 值至 3.1~3.2) 等度洗脱, 体积流量 1 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μ L; 温度: 25 °C; 检测波长 210 nm^[14]。

2.2.2 供试品溶液的制备 量取 Nor@LP-CHS-FA 200 μ L, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度线, 25 °C、600 W 条件下超声处理 10 min, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取 10 mg Nor, 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 即得 1 mg·mL⁻¹ 的 Nor 对照品母液。稀释上述对照品母液制成质量浓度分别为 2、10、40、80、120、240、360 μ g·mL⁻¹ 的系列对照品溶液。

2.2.4 阴性对照品溶液的制备 移取“2.1.2”项下空白脂质体混悬液 200 μ L, 加入色谱甲醇至 5 mL 量瓶, 25 °C、600 W 条件下超声处理 10 min, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得阴性对照品溶液。

2.2.5 专属性考察 分别取供试品溶液、对照品溶液以及阴性对照品溶液 20 μ L, 按照“2.2.1”项下方法进样检测^[15]。结果如图 1 所示, 药物峰与杂质峰分离良好, 保留时间为 6.2~6.3 min, 相同保留时间阴性对照品溶液对 Nor 无干扰, 表明该方法专属性好。

2.2.6 线性关系考察 取“2.2.3”项下对照品溶液适量, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定。以 Nor

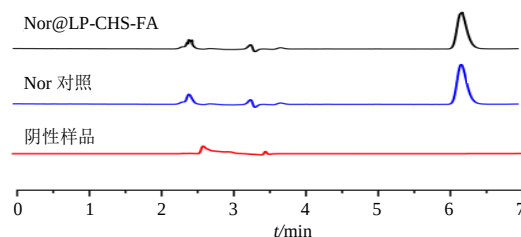


图 1 Nor@LP-CHS-FA 溶液、Nor 对照品和阴性溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of Nor@LP-CHS-FA solution, Nor reference substance and negative solution

质量浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得 Nor 回归方程 $Y=0.6951X+0.8411$, $r=0.9998$, 线性范围 $2\sim360\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.7 精密度考察 分别配制低、中、高质量浓度 (20 、 80 、 $240\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 Nor 溶液, 按照“2.2.1”项下方法 1 d 内连续测定 5 次, 考察日内精密度, 持续测定 5 d 考察日间精密度。结果表明, 日内 Nor 峰面积的 RSD 分别为: 2.23% 、 2.20% 、 0.72% , 日间 Nor 峰面积的 RSD 分别为: 1.12% 、 1.25% 、 0.70% , 表明仪器设备的日内和日间精密度良好。

2.2.8 重复性考察 分别移取 $200\text{ }\mu\text{L}$ Nor@LP-CHS-FA 样品 (Nor 溶液 $220\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 6 份, 按照“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下方法连续进样测得 Nor 质量分数的 RSD 为 0.65% , 表明该方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率考察 取 9 份空白脂质体混悬液各 0.5 mL , 置于 9 个 100 mL 量瓶中, 分为低、中、高 3 组, 加入适量 Nor 对照品, 按照“2.1.1”项下方法配成质量浓度分别为 20 、 80 、 $240\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算 Nor 的平均加样回收率分别为 (94.18 ± 2.20)%、(95.96 ± 1.65)%、(98.34 ± 0.75)%, RSD 分别为 2.33% 、 1.72% 、 0.76% , 表明方法准确度良好。

2.3 包封率和载药量

采用低温高速离心法进行测定^[16]。①上清液游离药量: 精密量取 Nor@LP-CHS-FA 混悬液 0.2 mL 于离心管中, 以 $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 60 min , 取上清液于 5 mL 量瓶, 甲醇定容, 按“2.2.1”项色谱条件进样分析, 计算游离药量 (M_1)。②总药量: 精密量取 0.2 mL Nor@LP-CHS-FA 混悬液于 5 mL 容量瓶中, 甲醇溶解、 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下超声 10 min 后定容, 经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 按“2.2.1”项色谱条件进样分析, 计算总药量 (M_2)^[17]。③脂质体中包载药物 (M_2-M_1) 和投入膜材的质量为脂质体总质量, 记为 M_3 ^[18]。包封率和载药量计算公式如下:

$$\text{包封率} = (M_2 - M_1) / M_2$$

$$\text{载药量} = (M_2 - M_1) / M_3$$

2.4 单因素考察 Nor@LP-CHS-FA 处方及制备工艺

2.4.1 脂药比考察 固定 CH 与 CHS 质量比为 $1:1$ 、磷脂占膜材百分比为 50% 、FA 质量为 10 mg 、水合温度为 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 、水合时间为 30 min , 调整脂药比 (PE:Nor) 分别为 $2:1$ 、 $5:1$ 、 $10:1$ 、 $15:1$ 、

$20:1$, 按照“2.1.1”项下方法制备 Nor@LP-CHS-FA, 以包封率和载药量线性归一化后的 OD 值作为评价依据^[19], 结果如表 1 所示。

$$\text{OD} = (d_1 d_2 \cdots d_k)^{1/k}$$

k 为指标个数

$$d_n = (Y_n - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

表 1 脂药比考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Investigation of lipid drug ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

脂药比	包封率/%	载药量/%	OD 值
2:1	77.81 ± 0.29	6.48 ± 0.02	0.53
5:1	80.93 ± 1.05	6.74 ± 0.09	0.60
10:1	82.36 ± 0.74	6.86 ± 0.06	0.64
15:1	75.54 ± 0.98	6.29 ± 0.08	0.47
20:1	69.65 ± 0.84	5.80 ± 0.07	0.33

随着脂药比的增大, OD 值呈现先增大后降低的趋势, 这表明当 Nor 用量较低时, 并不能被有效地包裹在脂质体内, 部分 Nor 在脂质体空隙间游离。随着投药量的增加, 脂质体的包封率也增加, 但 Nor 的大量增加, 使得脂质体囊泡难以包埋所有的 Nor, 导致过量药物游离, 包封率下降^[20]。脂药比为 $10:1$ 时, 所得 OD 最高, 故选择 PE 与 Nor 质量比 $10:1$ 进行后续实验。

2.4.2 CH 与 CHS 质量比考察 固定脂药比为 $10:1$ 、磷脂占膜材百分比为 50% 、FA 质量为 10 mg , 调整 CH 与 CHS 质量比分别为 $0:1$ 、 $2:3$ 、 $1:1$ 、 $3:2$ 、 $1:0$ 按照“2.1.1”项下方法制备 Nor@LP-CHS-FA, 按照“2.3”项下方法测定包封率、载药量, 计算 OD 值, 结果如表 2 所示。

表 2 CH 与 CHS 质量比考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Investigation of CH and CHS mass ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

CH:CHS	包封率/%	载药量/%	OD 值
0:1	69.84 ± 0.65	5.82 ± 0.05	0.33
2:3	72.50 ± 0.75	6.04 ± 0.06	0.40
1:1	79.09 ± 0.68	6.59 ± 0.06	0.56
3:2	76.44 ± 2.53	6.37 ± 0.21	0.49
1:0	74.08 ± 0.19	6.17 ± 0.20	0.44

CHS 是 CH 的衍生物, 理化性质与 CH 类似, 在类脂囊泡的制备中起到稳定双分子层结构的作用, 同时又兼具 pH 敏感特性, 制剂的酸敏感特性很大程度上是由一定比例的 CHS 和 CH 共同参与完成, 因此, 考察处方中的 CH:CHS 具有重要意

义。CH 与 CHS 质量比为 1：1 时，OD 值最高，故选择 CH 与 CHS 质量比为 1：1 进行后续实验。

2.4.3 PE 占膜材百分比考察 膜材包含 PE、CH 及 CHS。固定脂药比为 10：1、CH 与 CHS 质量比为 1：1、FA 质量为 10 mg、水合温度为 60 ℃、水合时间为 30 min，调整 PE 占膜材百分比分别为 30%、40%、50%、60%、70%，按照“2.1.1”项下方法制备 Nor@LP-CHS-FA，按照“2.3”项下方法测定包封率、载药量，计算 OD 值，结果如表 3 所示。

表 3 PE 占膜材百分比考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$) Table 3 Investigation of proportion of PE in membrane materials ($\bar{x} \pm s, n = 3$)			
PE 占膜材百分比/%	包封率/%	载药量/%	OD 值
30	75.53±0.69	6.29±0.06	0.47
40	76.41±0.96	6.37±0.08	0.49
50	82.33±1.07	6.86±0.09	0.64
60	68.60±0.75	5.72±0.06	0.30
70	60.59±2.28	5.05±0.19	0.11

随着 PE 比例的增加，OD 值先升高后降低，表明 PE 占膜材百分比对包封率、膜刚性和稳定性产生影响，适宜的 PE 比例对包封率产生积极影响^[21]。PE 占膜材百分比为 50%时，所得 OD 值最高，故选择 PE 占膜材百分比 50%进行后续实验。

2.4.4 FA 用量考察 固定脂药比为 10：1、CH 与 CHS 质量比为 1：1、PE 占膜材百分比为 50%、水合温度为 60 ℃、水合时间为 30 min，调整 FA 用量为 2、5、10、15、20 mg，按照“2.1.1”项下方法制备 Nor@LP-CHS-FA，按照“2.3”项下方法测定包封率、载药量，计算 OD 值，结果如表 4 所示。

随着 FA 用量的增加，包封率、载药量及 OD 值先升高后降低，表明该范围内包含能使脂质体包封率和载药量达到最优的 FA 用量^[22]。FA 用量为 10 mg

表 4 FA 用量考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$) Table 4 Investigation of FA dosage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)			
FA 用量/mg	包封率/%	载药量/%	OD 值
2	58.92±2.69	4.91±0.22	0.07
5	67.17±1.75	5.60±0.15	0.27
10	78.95±1.01	6.58±0.08	0.56
15	73.20±2.20	6.10±0.18	0.42
20	64.25±0.47	5.35±0.39	0.20

时，OD 值最高，故选择 FA 用量为 10 mg 进行后续实验。

2.4.5 水合温度考察 固定脂药比为 10：1、CH 与 CHS 质量比为 1：1、PE 占膜材百分比为 50%、FA 用量为 10 mg、水合时间为 30 min，调整水合温度分别为 40、50、60、70、80 ℃，按“2.1.1”项下方法制备 Nor@LP-CHS-FA，按照“2.3”项下方法测定包封率、载药量，计算 OD 值，结果如表 5 所示。

表 5 水合温度考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$) Table 5 Investigation of hydration temperature ($\bar{x} \pm s, n = 3$)			
水合温度/℃	包封率/%	载药量/%	OD 值
40	67.95±2.40	5.66±0.37	0.29
50	78.92±1.60	6.58±1.33	0.55
60	79.79±0.81	6.65±0.07	0.58
70	73.73±1.56	6.14±0.13	0.43
80	72.39±2.25	6.03±0.19	0.40

随着水合温度的增加，包封率、载药量及 OD 值均先升高后降低，表明热稳定性变化对于脂质体的稳定性有着显著影响，水合温度过低不利于脂质膜吸水溶胀，影响药物的包裹效率；水合温度过高时脂质体内的囊泡结构可能会遭到破坏，磷脂材料也会发生氧化变质，进而导致包封率下降^[20]。水合温度为 60 ℃时 OD 值最高，故选择 60 ℃为最佳水合温度。

2.4.6 水合时间考察 固定脂药比为 10：1、CH 与 CHS 质量比为 1：1、PE 占膜材百分比为 50%、FA 用量为 10 mg、水合温度为 60 ℃，调整水合时间分别为 10、20、30、40、50 min，按“2.1.1”项下方法制备 Nor@LP-CHS-FA，按照“2.3”项下方法测定包封率、载药量，并计算 OD 值，结果如表 6 所示。

随着水合时间的增加，包封率、载药量及 OD 值均呈现出先升高后降低的趋势，表明适当的水合时

表 6 水合时间考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$) Table 6 Investigation of hydration time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)			
水合时间/min	包封率/%	载药量/%	OD 值
10	72.45±1.33	6.04±0.11	0.40
20	72.81±0.79	6.07±0.07	0.41
30	80.35±2.42	6.70±0.20	0.59
40	71.36±2.86	5.95±0.24	0.37
50	70.20±0.46	5.85±0.04	0.34

间利于载体材料充分舒展,进而包载药物,而水合时间过长可能影响载体材料稳定性,导致药物泄露,沉降率上升^[23]。水合时间为 30 min 时,OD 值最高,故本实验选取 30 min 为最佳水合时间。

2.5 星点设计-效应面法 (CCD-RSM) 优化处方工艺

2.5.1 试验设计及结果 使用 Design Expert 12.0 软件,根据前期单因素考察结果,选取 X_1 (脂药比)、

X_2 (PE 占膜材百分比)、 X_3 (FA 用量) 为考察因素 (自变量),对 Nor@LP-CHS-FA 包封率 (Y_1) 和载药量 (Y_2) 进行线性归一化后的总评归一值 (OD) 作为评价脂质体质量的指标 (因变量)。通过 CCD-RSM,进行 3 因素 5 水平共 20 次实验^[19, 24],对 Nor@LP-CHS-FA 脂质体处方进行优化。试验设计及结果见表 7。

表 7 CCD-RSM 试验因素水平、试验设计与结果
Table 7 CCD-RSM factor level, test design and results

序号	X_1	$X_2/\%$	X_3/mg	Y_1	Y_2	OD	序号	X_1	$X_2/\%$	X_3/mg	Y_1	Y_2	OD
1	5.0 : 1(-1)	60.0 : 1(1)	5.0(-1)	62.15	9.94	0.46	11	10 : 1	10 : 1	10	83.01	6.92	0.58
2	10.0 : 1(0)	10.0 : 1(0)	1.6(-1.682)	66.01	5.92	0.36	12	15 : 1	60 : 1	5	59.73	3.58	0.16
3	15.0 : 1(1)	40.0 : 1(-1)	5.0	54.16	3.25	0.09	13	5 : 1	40 : 1	15	74.95	11.10	0.71
4	10.0 : 1	66.8 : 1(1.682)	10.0(0)	63.01	5.25	0.29	14	10 : 1	10 : 1	10	83.04	6.92	0.58
5	10.0 : 1	33.2 : 1(-1.682)	10.0	54.78	4.56	0.15	15	10 : 1	10 : 1	10	80.64	6.72	0.55
6	15.0 : 1	60.0 : 1	15.0(1)	70.01	3.85	0.26	16	15 : 1	40 : 1	15	53.90	2.97	0.07
7	1.6 : 1(-1.682)	10.0 : 1	10.0	67.69	15.05	0.72	17	10 : 1	10 : 1	10	79.25	6.60	0.53
8	5.0 : 1	40.0 : 1	5.0	63.67	10.19	0.50	18	5 : 1	60 : 1	15	77.72	11.51	0.76
9	18.4 : 1(1.682)	10.0 : 1	10.0	52.41	2.45	0.02	19	10 : 1	10 : 1	10	81.28	6.77	0.56
10	10.0 : 1	10.0 : 1	18.4(1.682)	83.60	6.51	0.56	20	10 : 1	10 : 1	10	80.79	6.73	0.55

2.5.2 回归模型的建立与方差分析 运用 Design-Expert 8.0.6 软件对 RSM 结果进行模型拟合和数据分析。对表 7 的实验结果进行数据拟合分析,得拟合方程: $Y_1 = 81.3 - 4.86 X_1 + 2.69 X_2 + 4.87 X_3 + 2.55 X_1 X_2 - 2.1 X_1 X_3 + 1.86 X_2 X_3 - 7.32 X_1^2 - 7.73 X_2^2 - 2.1 X_3^2$; $Y_2 = 6.76 - 3.68 X_1 + 0.19 X_2 + 0.25 X_3 + 0.13 X_1 X_2 - 0.31 X_1 X_3 + 0.15 X_2 X_3 - 0.79 X_1^2 - 0.57 X_2^2 + 0.11 X_3^2$; $OD = 0.56 - 0.22 X_1 + 0.037 X_2 + 0.068 X_3 + 0.03 X_1 X_2 - 0.054 X_1 X_3 + 0.026 X_2 X_3 - 0.06 X_1^2 - 0.11 X_2^2 - 0.027 X_3^2$ 。方差分析结果显示相关系数 $R^2 = 0.9910$,说明实际值与模型预测值对应,关联度高,校正系数 $R_{Adj}^2 = 0.9829$,有 1.71% 变异不能用该模型去解释。运用方差分析对模型方程适用性进行评估,证明模型拟合好,预测脂质体包封率是适合的。方差分析结果见表 8,模型 $P < 0.0001$ 极具显著性差异。失拟项 $P = 0.1186$ 不显著,表明模型与实验结果的拟合度比较好。数学模型中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。各因素的一次项回归系数绝对值越高,表明在实验范围内该因素对 OD 值的影响更大^[25],各因素对 OD 值的影响依次为: $X_1 > X_3 > X_2$ 。采用二次模型绘制各因素交互作用等高线图对结果进行分析,如图 2

所示,单因素之间的交互作用也会对 OD 值产生影响,响应面二次系数显著性分析表明 X_1 、 X_2 和 X_3 三者之间两两交互作用对脂质体 OD 值有显著影响 ($P < 0.05$),且以 $X_1 X_3$ 两者之间的相互影响更加显著 ($P < 0.001$)。

2.5.3 CCD-RSM 优化结果及实验验证 由 Design Expert 8.0.6 软件分析得出最优处方工艺为脂药比 5.05 : 1、磷脂占膜材百分比 52.85%、FA 用量 13.90 mg。此时,模型预测包封率为 82.91%,载药量为 11.56%,OD 值为 0.80。在此条件下重复 3 次试验进行验证,模型验证结果如表 9 所示,实测值与预测值接近,RSD 为 1.61%,表明所建立的模型预测性好,具有较高的可靠性^[26]。

2.6 透射电镜 (TEM) 观察

将稀释至一定质量浓度经 0.22 μm 膜滤过的 Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 脂质体滴加到铜网上,采用 2% 磷钨酸染色后,室温晾干,置于加速电压为 120 kV 的 TEM 上放大 13 000 倍观察形态,结果如图 3 所示,Nor@LP-CHS、Nor@LP-CHS-FA 均呈类圆形,形态规整,具有磷脂双分子层结构。

2.7 粒径、 ζ 电位和多分散性指数 (PDI) 测定

分别取适量 Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA,

表 8 回归模型方差分析结果
Table 8 Results of variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1	9	0.110	122.13	<0.000 1	X_1^2	0.053	1	0.053	58.09	<0.000 1
X_1	0.660	1	0.660	730.94	<0.000 1	X_2^2	0.180	1	0.180	196.26	<0.000 1
X_2	0.019	1	0.019	20.88	0.001 0	X_3^2	0.011	1	0.011	11.78	0.006 4
X_3	0.063	1	0.063	69.87	<0.000 1	残差	0.009	10	0.001		
X_1X_2	0.007	1	0.007	7.85	0.018 7	失拟相	0.007	5	0.001	3.12	0.118 6
X_1X_3	0.024	1	0.024	26.16	0.000 5	纯偏差	0.002	5	0.000		
X_2X_3	0.005	1	0.005	5.81	0.036 7	总离差	1.010	19			

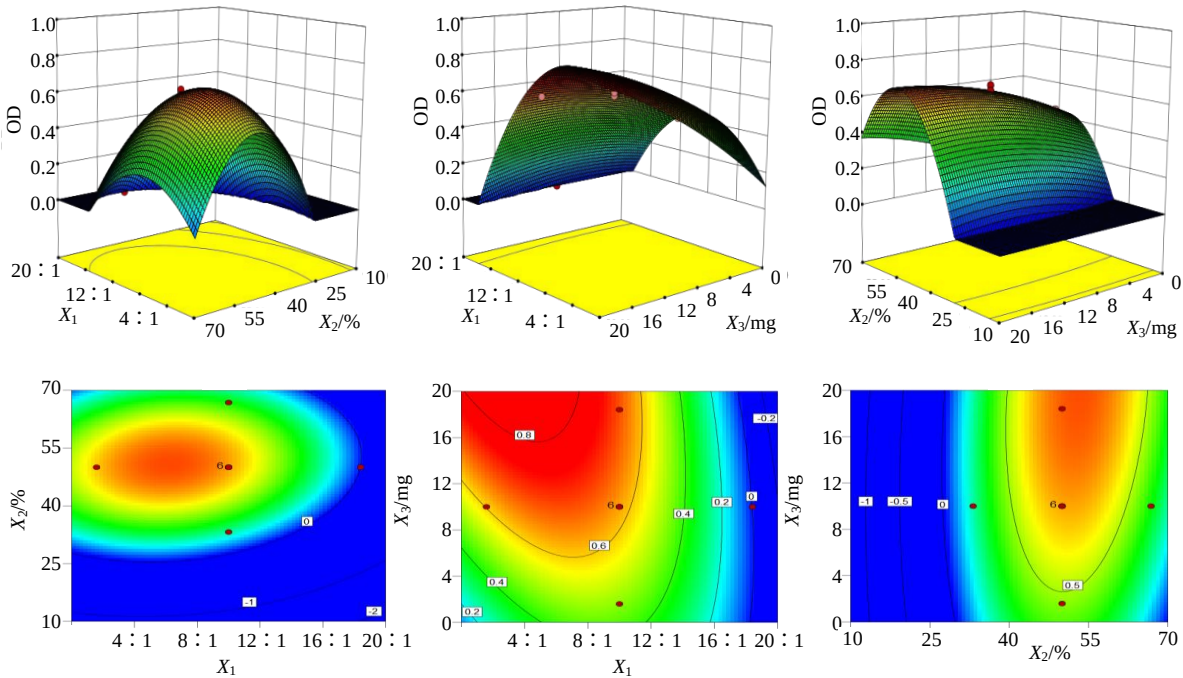


图 2 X_1 、 X_2 、 X_3 对 OD 值影响的响应面和等高线图

Fig. 2 Response surface and contour plot of influence of X_1 , X_2 , and X_3 on the OD value

表 9 最优处方的验证结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 9 Verification results of optimal prescription ($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	预测值	实测值	RSD/%
包封率/%	82.91	82.72±0.84	1.02
载药量/%	11.56	12.25±0.13	1.02
OD 值	0.80	0.86±0.01	1.61

用磷酸盐缓冲液稀释,滴至铜网,自然晾干,2%磷钨酸染色复染,用纳米粒度及 ζ 电位分析仪 25℃下分别测定 Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 的粒径、 ζ 电位和 PDI。如图 4 所示, Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 粒径分别为 (114.72±1.33)、(55.48±0.67) nm,符合纳米制剂的要求^[27],能够穿过肿瘤毛细血管发挥增强渗透和保留(EPR)效应,

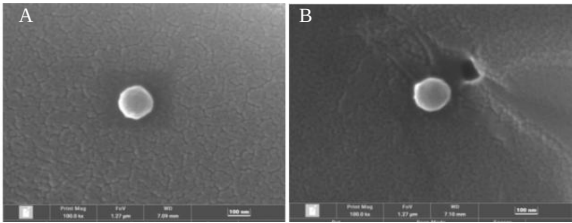


图 3 Nor@LP-CHS (A)和 Nor@LP-CHS-FA (B)的 TEM 图
Fig. 3 TEM image of Nor@LP-CHS (A) and Nor@LP-CHS-FA (B)

实现被动靶向。 ζ 电位分别为 (−19.06±0.43) mV 和 (−18.15±0.54) mV,结果显示该脂质体的表面带有少量的负电荷,有利于脂质体的稳定储存^[28]。尺寸分布用 PDI 描述,说明了纳米颗粒的均匀性,PDI 值为 0.1~0.25 表示尺寸分布窄,PDI>0.5 表示尺

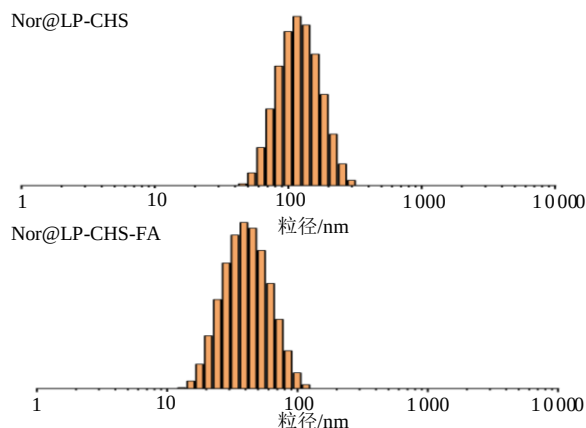


图 4 粒径分布

Fig. 4 Distribution of particle size

寸分布宽, Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 的 PDI 分别为 0.44 ± 0.02 和 0.42 ± 0.02 。表明尺寸分布适宜, 具有较好的粒径和分散度^[29]。上述结果表明所制备制剂粒子分布均匀、电位体系较为稳定。

2.8 傅里叶红外光谱 (FT-IR) 分析

设定扫描范围 $4\,000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 速度 $2\text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, 分辨率为 4 cm^{-1} ^[30-31], 将 Nor、CHS、FA、Nor@LP-CHS、Nor@LP-CHS-FA 和 Nor@LP-CHS 及 Nor@LP-CHS-FA 的物理混合物与 KBr 以 1 : 100 比例混合压片, 结果见图 5。

红外光谱显示, Nor 在 $3\,482.1$ 、 $2\,989$ 、 $1\,419.1$ 、 $1\,723.2$ 、 $1\,685.48\text{ cm}^{-1}$ 处有强烈吸收; FA 在 $1\,735.6$ 、 $1\,641$ 、 $1\,467.3\text{ cm}^{-1}$ 有吸收峰; CHS 在 $1\,706.8\text{ cm}^{-1}$ 出现 C=O 振动峰, 在 $2\,842.4\text{ cm}^{-1}$ 处有亚甲基峰; Nor@LP-CHS-FA 与 Nor@LP-CHS 的物理混合物均出现上述特征吸收峰, 而 Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 的吸收峰有明显变化, 与物理混合物的红外吸收峰明显不同。Nor@LP-CHS-FA 和 Nor@LP-CHS

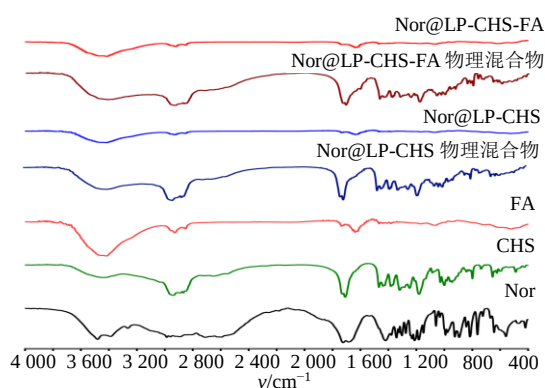


图 5 FT-IR 曲线

Fig. 5 FT-IR curves

相比, 前者在 $2\,930\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰稍有加强, 可能与 FA 包裹 Nor@LP-CHS 有关。因此, Nor@LP-CHS-FA 并非简单物理混合, 而是形成脂质体, 且 FA 表面修饰包裹在最外层^[32]。

2.9 X 射线粉末衍射 (XRD) 分析

使用 UltimaIVx 射线 Cu-K α 辐射衍射仪对 Nor、FA、CHS、Nor@LP-CHS、Nor@LP-CHS-FA 以及 Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 的物理混合物 (混合比例与脂质体相同) 进行 XRD 分析, 以确定在 $5 \sim 90^\circ$ 范围内的晶体结构^[33]。X 射线衍射的测定条件为 Cu-K α 辐射, 管压 40 kV , 石墨单色器, 扫描范围为 $0 \sim 90^\circ$, 管流为 100 mA , 扫描速度 $1^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ ^[34]。如图 6 所示, Nor@LP-CHS-FA 与 Nor@LP-CHS 的物理混合物在 7.96° 、 17.20° 、 18.86° 、 23.78° 附近均有显著的衍射峰, Nor 和 CHS 的特征衍射峰明显。Nor@LP-CHS-FA、Nor@LP-CHS 制剂与其物理混合物相比, Nor 衍射峰消失或强度减弱, 表明 Nor 被很好地包裹在纳米脂质体的脂质基质中或处于分子分散态和稳定的非晶态状态^[35]。

2.10 差式扫描量热 (DSC) 分析

分别取 Nor、FA、CHS、Nor@LP-CHS、Nor@LP-CHS-FA 以及 Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 的物理混合物 (混合比例与脂质体相同) 置于铝制样品盘中压制后, DSC 仪分析样品在 $25 \sim 500^\circ\text{C}$ 温度范围内的结晶度。样品约 5 mg 置于铝锅, 在 N_2 流量下扫描速率为 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ^[33]。结果见图 7。

Nor@LP-CHS-FA 和 Nor@LP-CHS 的物理混合物中在 185.48°C 有 CHS 的熔化峰, 而在 Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 中消失, 表明 CHS 晶体形态发生变化^[36]; Nor 在 133.97°C 和 280.41°C 有两个尖锐吸热峰, 证实其有较强晶体特性, 而在

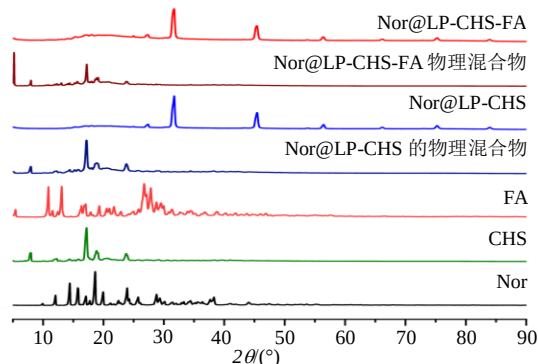


图 6 XRD 曲线

Fig. 6 XRD curves

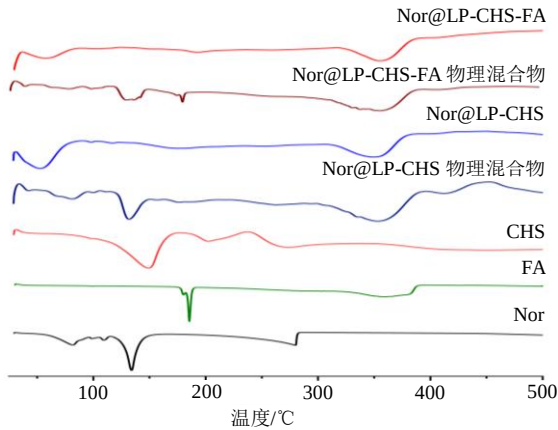


图 7 DSC 曲线

Fig. 7 DSC curves

Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 中完全消失,表明 Nor 的物理状态由晶态变为非晶态,以无定形形式大量嵌入粒体中^[37]。结果与 XRD 的测定相一致,证明 Nor 是以无定型状态被包裹于制剂中,而不是以晶体形式存在^[35]。

2.11 稳定性研究

分别取 Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 于 -20 ℃放置 0、1、2、3 d 后室温解冻以及避光常温 (25 ℃)、冷藏 (4 ℃) 放置 0、1、2、3、7、14、21、28、60 d 后,测定包封率和载药量,并计算渗漏率考察其稳定性^[38-39]。结果见表 10~12。

渗漏率 = (起始包封率 - 储藏后包封率) / 起始包封率

经反复冻融 3 d 后, Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 渗漏率分别高达 10.98±0.94%、7.69±0.40%; 室温储存 60 d 后, Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 渗漏率为 (12.19±1.42)% 和 (9.87±1.50)%; 在 4 ℃冷藏下 60 d 后, Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 渗漏率分别为 (9.24±1.58)%、(7.91±0.33)%。上述结果表明该制剂在冷藏条件下较在冻融和室温条件下渗漏率低,稳定性好。

2.12 体外释药机制研究

动态分析法考察药物在模拟体液[(37±1)℃, pH=7.4 的 PBS 溶液]、胃液[(37±1)℃, pH=1.2 的 HCl 溶液]、肿瘤微环境[(42±1)℃, pH=5.8 的 PBS 溶液]的释药特性^[19]。精密量取 Nor@LP-CHS-FA、Nor@LP-CHS、Nor 溶液,加至预处理透析袋(截流相对分子质量 3 500),释放介质为 pH 为 7.4 的 PBS 溶液。分别于 0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0、36.0、48.0、72.0、96.0、132.0、168.0 h 取释放介质 2 mL,补充同体积释放介质,计算累积释放率,并绘制累积释放率-取样时间图(Q-t)。

如图 8 所示, Nor、Nor@LP-CHS、Nor@LP-CHS-FA 在模拟的体液环境中, 168 h 时累积释放

表 10 冻融稳定性 (x̄ ± s, n=3)

Table 10 Freeze-thaw Stability (x̄ ± s, n=3)

样品	时间/d	包封率/%	载药量/%	渗漏率/%	样品	时间/d	包封率/%	载药量/%	渗漏率/%
Nor@LP-CHS	0	80.09±0.32	11.86±0.05	0.00±0.00	Nor@LP-CHS-FA	0	81.57±0.62	12.09±0.09	0.00±0.00
	1	78.54±0.91	11.63±0.13	1.93±1.39		1	80.94±0.53	11.99±0.08	0.76±0.50
	2	74.67±0.50	11.06±0.07	6.76±1.00		2	77.72±0.64	11.51±0.09	4.72±0.25
	3	71.29±0.46	10.56±0.07	10.98±0.94		3	75.29±0.52	11.15±0.08	7.69±0.40

表 11 常温稳定性 (x̄ ± s, n=3)

Table 11 Stability at room temperature (x̄ ± s, n=3)

样品	时间/d	包封率/%	载药量/%	渗漏率/%	样品	时间/d	包封率/%	载药量/%	渗漏率/%
Nor@LP-CHS	0	82.17±0.09	12.17±0.01	0.00±0.00	Nor@LP-CHS-FA	0	82.52±0.17	12.22±0.03	0.00±0.00
	1	81.37±0.17	12.05±0.03	0.97±0.13		1	81.95±0.06	12.14±0.01	0.69±0.22
	2	80.76±0.32	11.96±0.00	1.71±0.35		2	81.46±0.06	12.06±0.01	1.29±0.27
	3	80.31±0.06	11.89±0.01	2.26±0.09		3	81.16±0.14	12.02±0.02	1.65±0.33
	7	79.11±0.17	11.72±0.03	3.71±0.30		7	80.33±0.19	11.90±0.03	2.65±0.36
	14	78.31±0.14	11.60±0.02	4.69±0.16		14	79.68±0.10	11.80±0.01	3.44±0.27
	21	77.98±0.20	11.55±0.03	5.10±0.27		21	78.78±0.34	11.67±0.05	4.54±0.56
	28	76.94±0.39	11.39±0.06	6.36±0.37		28	77.78±0.10	11.52±0.02	5.75±0.07
	60	70.92±1.42	10.50±0.21	12.19±1.42		60	73.41±1.18	10.87±0.18	9.87±1.50

表 12 冷藏稳定性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 12 Refrigeration stability ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	时间/d	包封率/%	载药量/%	渗漏率/%	样品	时间/d	包封率/%	载药量/%	渗漏率/%
Nor@LP-	0	81.40±0.30	12.06±0.04	0.00±0.00	Nor@LP-	0	82.55±0.57	12.23±0.08	0.00±0.00
CHS	1	80.80±0.07	11.97±0.01	0.75±0.40	CHS-FA	1	81.87±0.18	12.16±0.03	0.81±0.90
	2	80.48±0.25	11.92±0.04	1.13±0.27		2	81.62±0.21	12.09±0.03	1.12±0.45
	3	79.85±0.34	11.83±0.05	1.91±0.06		3	81.36±0.11	12.05±0.02	1.45±0.58
	7	79.62±0.28	11.79±0.04	2.19±0.06		7	80.93±0.17	11.98±0.02	1.96±0.88
	14	79.05±0.36	11.71±0.05	2.89±0.15		14	80.31±0.06	11.89±0.01	2.71±0.64
	21	78.77±0.46	11.66±0.07	3.24±0.65		21	79.95±0.13	11.84±0.02	3.15±0.54
	28	77.34±1.31	11.45±0.19	5.00±1.27		28	78.96±0.76	11.69±0.11	4.35±0.72
	60	73.04±1.35	10.82±0.20	9.24±1.58		60	75.16±0.33	11.13±0.05	7.91±0.33

率分别为 (27.00 ± 0.68)%、(21.89 ± 0.06)%、(12.59 ± 0.10)%；在胃液环境中，168 h 时累积释放率分别为 (68.76 ± 0.18)%、(89.86 ± 0.51)%、(96.21 ± 0.78)%；在肿瘤微环境中，168 h 时累积释放率分别为 (73.77 ± 0.48)%、(91.50 ± 0.11)%、(83.02 ± 0.36)%。Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 在体液环境中释放率低，在胃液环境和肿瘤酸性环境释放率达到 80% 以上，表明 Nor@LP-

CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 具有 pH 值响应性，可实现在肿瘤部位的响应释药。其中，在肿瘤微环境中，Nor@LP-CHS-FA 的累积释放率低于 Nor@LP-CHS，这可能是由于 FA 的包裹一定程度减缓了酸敏感性材料的分解和药物释放。因仅为体外释放度研究，该结果仅证明 Nor@LP-CHS-FA 具有肿瘤酸性微环境响应释放的效果，其对瘤细胞靶向性尚需通过细胞摄取及动物实验验证。

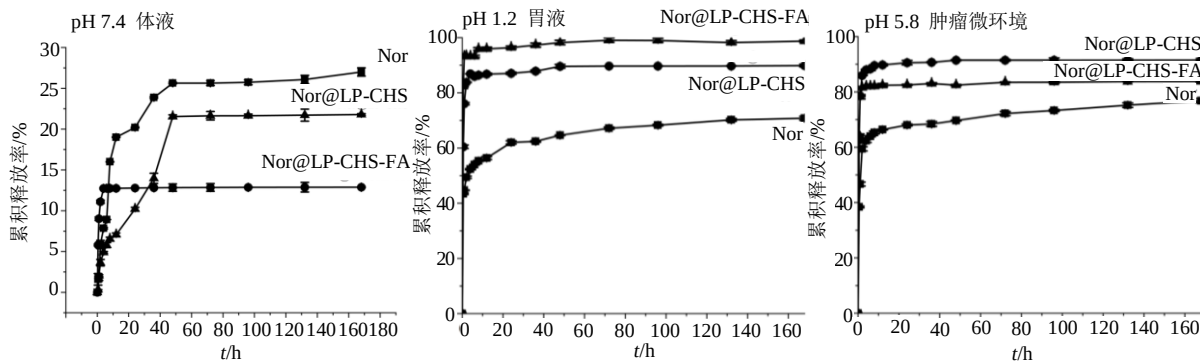


图 8 Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 累积释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Cumulative release curve of Nor@LP-CHS and Nor@LP-CHS-FA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

采用 Origin Pro 2021 软件对 Nor@LP-CHS-FA 的释药数据进行拟合，用相关系数 (r) 判断其拟合程度^[40]。式中 E_r 表示 Nor 的累积释放量； V_e 表示置换的缓冲液的体积； V_0 表示缓冲液总体积； C_i 表示第 i 次取样时样品浓度； M_{Nor} 表示混悬液中 Nor 的质量； n 表示置换缓冲液的次数^[41]。

$$E_r = (V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n) / M_{Nor}$$

如表 13 所示，Nor@LP-CHS-FA 的释药行为在 pH 为 7.4 时，释放曲线符合一级动力学模型，在 pH 为 5.8 和 1.2 时，释放曲线符合 Weibull 模型。

2.13 溶血性实验

新西兰家兔心脏取血，置于离心管，0.9%氯化钠溶液轻柔清洗 3 次。将获得红细胞配成 5% 的兔红细胞悬液，置于 4 °C 保存备用^[42]。将 Nor、Nor@LP-CHS、Nor@LP-CHS-FA 分别用 0.9%氯化钠溶液配成质量浓度分别为 10、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，加入体积分数 5% 的红细胞混悬液与其混合，阴性对照为 0.9%氯化钠溶液与体积分数 5% 的红细胞混悬液混合，阳性对照为纯水与体积分数 5% 的红细胞混悬液混合，3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，离心半径为 7.6 cm，离心 10 min。Nor、Nor@LP-

表 13 Nor@LP-CHS-FA 体外释放模型拟合结果
Table 13 Fitting results of Nor@LP-CHS-FA *in vitro* release model

介质	模型	拟合方程	r	介质	模型	拟合方程	r
pH 7.4	零级释放	$Q=0.000\ 57t+0.20$	0.212 9	pH 7.4	Retigger-peppas	$Q=0.16t^{0.11}$	0.664 2
	一级释放	$Q=0.26(1-e^{-0.62t})$	0.973 2		Weibull	$\ln(1-Q)=-(5.08t-2.54)^{0.09}$	0.873 6
	Higuchi	$Q=0.009\ 8t^{1/2}+0.17$	0.408 3	pH 5.8	Retigger-peppas	$Q=0.84t^{0.04}$	0.534 5
pH 5.8	零级释放	$Q=0.000\ 65t+0.90$	0.099 1		Weibull	$\ln(1-Q)=-(121.28t-58.2144)^{0.15}$	0.949 6
	一级释放	$Q=0.96(1-e^{-2.21t})$	0.936 9				
	Higuchi	$Q=0.012t^{1/2}+0.86$	0.243 7	pH 1.2	Retigger-peppas	$Q=0.81t^{0.04}$	0.561 1
pH 1.2	零级释放	$Q=0.00077t+0.88$	0.112 4		Weibull	$\ln(1-Q)=-(36.25t-17.4)^{0.17}$	0.944 7
	一级释放	$Q=0.95(1-e^{-1.90t})$	0.936 0				
	Higuchi	$Q=0.014t^{1/2}+0.84$	0.266 7				

CHS、Nor@LP-CHS-FA 不同质量浓度均配制 1 组不加红细胞混悬液，作为空白组，用于扣除 Nor 背景，于 540 nm 处测其吸光度 (A) 值，计算其溶血率 (HR)。

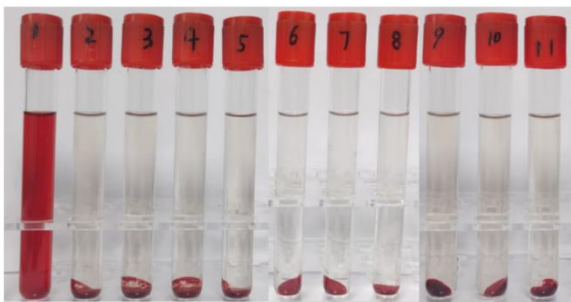
$$HR=(A_s-A_n)/(A_p-A_n)$$

A_s 为样品吸光度； A_n 为 0.9%氯化钠溶液吸光度； A_p 为去离子水吸光度

结果如图 9 所示，阳性对照组有明显溶血现象，阴性对照组未出现溶血和红细胞凝聚现象，说明实验结果可信。Nor 组、Nor@LP-CHS 组、Nor@LP-CHS-FA 组红细胞下沉至管底，未发生溶血和红细胞凝聚。各组实验设计及溶血率结果如表 14 所示，各实验组溶血率均<5%，表明生物安全性良好。

2.14 CCK-8 法检测细胞存活率

采用 CCK-8 法评价 Nor@LP-CHS-FA 对肝癌



从左到右依次为阳性对照组，阴性对照组，Nor 质量浓度 100、50、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，Nor@LP-CHS 质量浓度 100、50、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，Nor@LP-CHS-FA 质量浓度 100、50、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

From left to right were positive group; negative group; Nor concentration 100, 50, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Nor@LP-CHS concentration 100, 50, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Nor@LP-CHS-FA concentration 100, 50, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

图 9 不同给药组的溶血实验结果

Fig. 9 Results of hemolysis experiment in different administered groups

表 14 溶血性实验设计及溶血率结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 14 Design of hemolytic experiment and results of hemolytic rate ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	HR/%
阳性对照	—	100.002 3 $\pm$ 0.003 6
阴性对照	—	0.000 3 $\pm$ 0.004 5
Nor	100	0.088 7 $\pm$ 0.001 8
	50	0.149 8 $\pm$ 0.000 9
	10	0.256 4 $\pm$ 0.001 3
Nor@LP-CHS	100	1.148 9 $\pm$ 0.001 2
	50	0.310 2 $\pm$ 0.003 6
	10	0.006 5 $\pm$ 0.001 4
Nor@LP-CHS-FA	100	4.150 2 $\pm$ 0.088 8
	50	0.638 2 $\pm$ 0.004 6
	10	0.273 5 $\pm$ 0.005 6

HepG2 细胞的增殖抑制作用。取处于对数生长期的 HepG2 细胞，经胰酶消化后，接种于 96 孔板，每孔接种细胞数为 6×10^3 个。接种培养 24 h 后分别加入游离 Nor、Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA (以 Nor 计，质量浓度分别为 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)，设置 6 个复孔，同时设阴性对照 (PBS) 和空白对照 (空白培养基)。孵育 24、48、72 h 后，取出 96 孔板，每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL ，孵育 4 h 后酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (A) 值，计算细胞相对存活率和 IC_{50} 值。

$$\text{细胞相对存活率}=(A_{\text{实验}}-A_{\text{空白}})/(A_{\text{对照}}-A_{\text{空白}})$$

如图 10 所示，Nor、Nor@LP-CHS、Nor@LP-CHS-FA 对肝癌 HepG2 细胞增值抑制作用均有质量浓度和时间相关性，抑制作用随药物质量浓度和作用时间增加而增强。与阴性对照组相比，Nor、

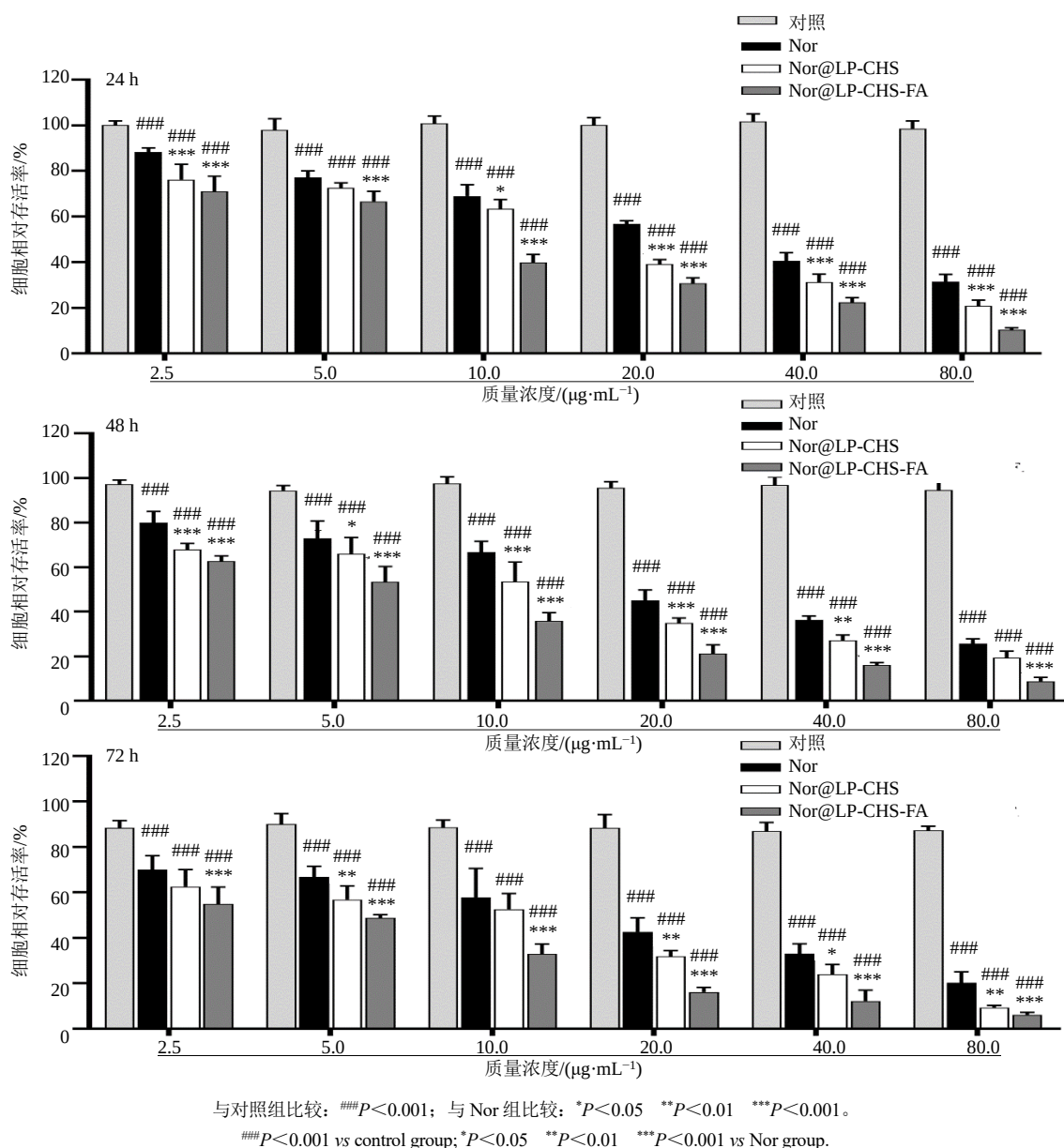


图 10 HepG2 细胞增殖活力影响结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effect on proliferation activity of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Nor@LP-CHS、Nor@LP-CHS-FA 组在给药 24、48、72 h 后细胞存活率均极显著降低 ($P < 0.001$)；与 Nor 组相比，Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 组细胞活力均显著降低 ($P < 0.05$)；Nor@LP-CHS 组与 Nor@LP-CHS-FA 组相比，除低浓度组 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Nor@LP-CHS-FA 与 Nor@LP-CHS 组无明显区别 ($P > 0.05$)，其余浓度组细胞存活率均与 Nor@LP-CHS 组存在显著差异 ($P < 0.05$)。给药 24、48、72 h 后 Nor 的 IC_{50} 值分别为 27.22、17.82、12.89 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；Nor@LP-CHS 的 IC_{50} 值分别为 15.23、11.11、8.45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；Nor@LP-CHS-FA

的 IC_{50} 值分别为 8.56、5.89、4.77 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，Nor@LP-CHS-FA 的 IC_{50} 值最小，在较低质量浓度即可明显抑制肝癌细胞增殖。

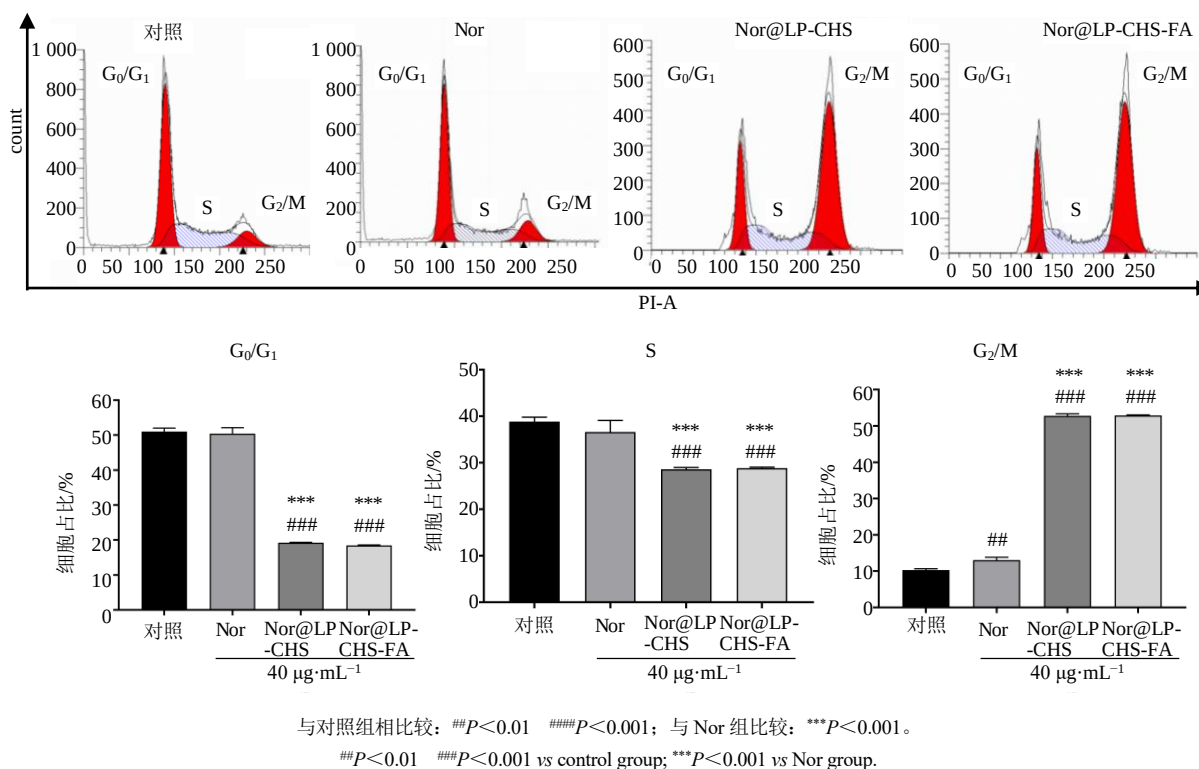
2.15 细胞周期分布检测

HepG2 细胞经解冻复苏后培养于含 10 % FBS、100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青链霉素双抗的 DMEM 培养基，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 、饱和湿度细胞培养箱中培养，每 3 天换培养液 1 次，传代 4 次后取对数生长期的 HepG2 细胞，经 0.25%胰酶消化后，接种 96 孔板，每孔接种细胞数为 6×10^3 个。基于课题组前期研究^[43]和 HepG2 细胞增殖抑制实验结果，选择 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (以

Nor 计) Nor、Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 进行后续实验。HepG2 细胞接种培养 24 h 后分别加入 Nor、Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA, 同时设对照 (PBS) 组, 各组分别设置 3 个复孔, 接种培养 24 h 后, 0.25 %胰酶消化 HepG2 细胞, 转移到离心管中, $2000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞, PBS 洗涤 2 次后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、75 %乙醇固定 1 h, PBS 洗涤 2 次后加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 水解酶, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h 后加入 PI 染液,

避光孵育 30 min, 然后通过流式细胞仪检测各组细胞周期分布。

如图 11 所示, 与对照组和 Nor 组相比, Nor@LP-CHS 组和 Nor@LP-CHS-FA 组 G_1 、S 期所占百分比减少, G_2/M 期所占百分比增多, 表明 Nor@LP-CHS、Nor@LP-CHS-FA 可将 HepG2 细胞阻滞在 G_2/M 期, 从而抑制细胞增殖, 抑制作用显著优于 Nor ($P<0.001$)。



与对照组相比: # $P<0.01$ ### $P<0.001$; 与 Nor 组比较: *** $P<0.001$ 。

$P<0.01$ ### $P<0.001$ vs control group; *** $P<0.001$ vs Nor group.

图 11 脂质体对 HepG2 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 11 Effect of liposomes on the cell cycle of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.16 细胞凋亡检测

各组分别取 3 个复孔 (96 孔板) 药物干预 48 h HepG2 细胞, 经 0.25 %胰蛋白酶 (不含 EDTA) 消化后离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次后重悬细胞, 每孔先避光加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ Annexin V-FITC 轻轻混匀后孵育 15 min, 再加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ PI 染液, 轻轻混匀后孵育 5 min, 通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡水平。如图 12 和表 15 所示, 与对照组和 Nor 组相比, Nor@LP-CHS 组和 Nor@LP-CHS-FA 细胞凋亡明显, Nor@LP-CHS-FA 凋亡最多; 同时, 与对照组相比, Nor、Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 3 个给药组均以发生早期凋亡为主, Nor@LP-CHS-FA 组最明显 ($P<0.05$)。以上结果表明 Nor@LP-CHS-FA

诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡, 有很好的抗肿瘤效果。

3 讨论

脂质体凭借在抗肿瘤药物靶向递送方面的显著优势, 已成为生物医药领域的研究热点。通常情况下, 脂质体由经过修饰的天然二酰基链磷脂成分构成, 常见的成分包括 PE、磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰丝氨酸 (PS) 或油酸 (OA) 等磷脂膜^[44]。Moreira 等^[45]成功开发了基于 DOPE (二烯酰磷脂酰乙醇胺) 和 CHS 的 pH 值响应脂质体。然而, 尽管脂质体作为药物递送系统极具应用潜力, 但其在临床转化中仍面临靶向效率低的关键问题^[46]。FA 受体在肿瘤细胞中的表达量是在正常细胞中的 100~300 倍, 且 FA 对该受体具有高亲和力^[47]。

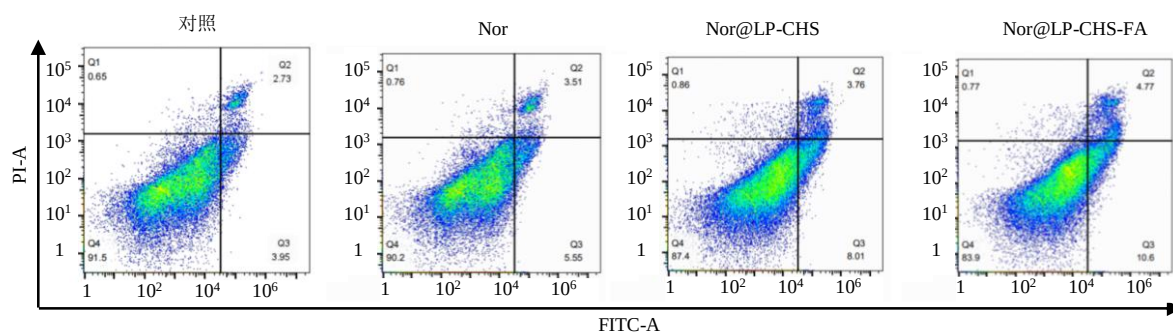


图 12 脂质体对 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig. 12 Effect of liposomes on apoptosis of HepG2 cells

表 15 各组给药后 HepG2 细胞凋亡率结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 15 Results of apoptosis rate of HepG2 cells after administration in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	早期凋亡/ %	晚期凋亡/ %	总凋亡率/%
对照	3.95±0.00	2.86±0.18	6.81±0.18
Nor	4.46±1.54	4.16±0.93	8.63±0.62
Nor@LP-CHS	7.47±0.76	3.79±0.04	11.26±0.72 [#]
Nor@LP-CHS-FA	9.81±1.12 ^{#*}	4.75±0.02	14.57±1.14 ^{###*&}

与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{###} $P<0.01$; 与 Nor 组比较: ^{*} $P<0.05$;
与 Nor@LP-CHS 组比较: [&] $P<0.05$ 。

[#] $P<0.05$ ^{###} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs Nor group;
[&] $P<0.05$ vs Nor@LP-CHS group。

为此,本研究创新性地制备了 pH 值响应脂质体,进一步以靶向配体 FA 进行表面修饰,旨在实现 pH 值敏感释放和 FA 受体靶向的双重协同响应^[48]。

粒径分布是脂质体质量评价的一个非常重要的指标,受到多种因素影响。本研究中 Nor@LP-CHS 粒径为 (114.72 ± 1.33) nm, Nor@LP-CHS-FA 粒径为 (55.48 ± 0.67) nm,后者粒径显著减小。值得注意的是,相较于 Nor@LP-CHS, Nor@LP-CHS-FA 的红外图谱中 FA 吸收峰不明显,提示 FA 可能与磷脂发生分子间相互作用,进而改变其红外吸收特性并导致粒径变小。而目前绝大多数研究均表明有无 FA 修饰对粒径无明显影响^[49-50]。因此,推测 Nor@LP-CHS-FA 粒径小于 Nor@LP-CHS 是由于二者制备工艺存在差别所致^[51]。

药物释放行为对微环境变化高度敏感。研究发现, Nor 在酸性环境下的累积释放率显著高于正常体液环境,这一现象可能与 Nor 在酸性条件下的溶

解度增加有关^[32]。体外释放实验显示, Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 在正常体液环境下的累积释放率低于 Nor,而在 pH 1.2 模拟胃液和 pH 5.8 模拟肿瘤酸性微环境中则显著加速。经推测,这可能是因为酸性环境促使脂质体中 CHS 与 PE 分子自发组装形成的双层相结构变成六方晶象,从而触发药物的释放^[52]。其中 pH 1.2 模拟胃液环境下脂质体释放最快,提示强酸可能导致脂质体结构破坏,这为后续给药途径的选择提供了重要参考,建议规避胃肠道给药方式。

在抗肝癌机制研究方面, Nor 能够通过多种分子生物学途径发挥抗肝癌的功效。包括下调 ISG15、MMP-9、u-PA、Mcl-1 等蛋白表达,调节调节性 T 细胞浸润;同时激活 FAM46C、p21、Waf1 等抑癌基因,调控 MTOR 和 JAK/STAT3 信号通路,逆转 RASSF1A 基因甲基化并激活 R2/DR5 信号转导,最终诱导肿瘤细胞发生有丝分裂阻滞、增殖抑制、转移抑制、凋亡和自噬性死亡^[53]。本研究通过细胞实验证实 Nor@LP-CHS 和 Nor@LP-CHS-FA 能显著降低 HepG2 细胞存活率,将细胞周期阻滞于 G₂/M 期,抑制细胞增殖分裂并诱导细胞凋亡,其抗癌效果显著高于 Nor。进一步的凋亡机制研究显示, HepG2 细胞凋亡以早期凋亡为主,且 Nor@LP-CHS-FA 组展现出最高的细胞抑制率、最低的 IC₅₀ 值及最高的凋亡比例,充分证实其作为抗肝癌纳米靶向制剂的卓越性能。

综上所述,本研究成功制备了具有良好分散性、小粒径和高包封率的 Nor@LP-CHS-FA 脂质体。该制剂不仅具备优异的理化性质和 pH 值响应释放特性,还展现出显著的肝癌细胞增殖抑制能力,为肝癌靶向治疗提供了新策略。后续研究将聚

焦于深入解析其作用机制、拓展临床前应用场景,并开展安全性评估,以期 Nor 类药物的开发提供更坚实的实验依据,推动其在抗肿瘤治疗领域的广泛应用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] Imam S S, Alshehri S, Altamimi M A, et al. Formulation of piperine-chitosan-coated liposomes: Characterization and *in vitro* cytotoxic evaluation [J]. Molecules, 2021, 26(11): 3281.
- [3] Zhai B T, Sun J, Shi Y J, et al. Review targeted drug delivery systems for norcantharidin in cancer therapy [J]. J Nanobiotechnology, 2022, 20(1): 509.
- [4] Liu Q, Sun H L, Li X Y, et al. Strategies for solubility and bioavailability enhancement and toxicity reduction of norcantharidin [J]. Molecules, 2022, 27(22): 7740.
- [5] Yan W, Leung S S, To K K. Updates on the use of liposomes for active tumor targeting in cancer therapy [J]. Nanomedicine (Lond), 2020, 15(3): 303-318.
- [6] Lado-Touriño I, Cerpa-Naranjo A. Coarse-grained molecular dynamics of pH-sensitive lipids [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4632.
- [7] Wathoni N, Puluhalawa L E, Joni I M, et al. Monoclonal antibody as a targeting mediator for nanoparticle targeted delivery system for lung cancer [J]. Drug Deliv, 2022, 29(1): 2959-2970.
- [8] Ochoa R, Cossio P, Fox T. Protocol for iterative optimization of modified peptides bound to protein targets [J]. J Comput Aided Mol Des, 2022, 36(11): 825-835.
- [9] Chen F, Huang G L, Huang H L. Sugar ligand-mediated drug delivery [J]. Future Med Chem, 2020, 12(2): 161-171.
- [10] Wei Z Y, Zhou Y X, Wang R J, et al. Aptamers as smart ligands for targeted drug delivery in cancer therapy [J]. Pharmaceutics, 2022, 14(12): 2561.
- [11] Wang M Q, Long J R, Zhang S M, et al. Folate-targeted anticancer drug delivery via a combination strategy of a micelle complex and reducible conjugation [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2020, 6(3): 1565-1572.
- [12] Shah H, Madni A, Khan M M, et al. pH-responsive liposomes of dioleoyl phosphatidylethanolamine and cholesteryl hemisuccinate for the enhanced anticancer efficacy of cisplatin [J]. Pharmaceutics, 2022, 14(1): 129.
- [13] 王小宁, 闫梦茹, 梁晓燕, 等. 叶酸修饰的 pH 响应型固体脂质纳米粒 [J]. 化工科技, 2020, 28(6): 19-23, 36. Wang X N, Yan M R, Liang X Y, et al. Folic acid modified pH responsive solid lipid nanoparticles [J]. Sci Technol Chem Ind, 2020, 28(6): 19-23, 36.
- [14] Zhu J, Zhang W, Wang D D, et al. Preparation and characterization of norcantharidin liposomes modified with stearyl glycyrrhetinate [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(3): 1639-1646.
- [15] 谷丽艳, 孙朝渭, 刘鑫程, 等. HAIYPRH 修饰鬼臼毒素脂质体处方工艺优化及其靶向性评价 [J]. 中草药, 2024, 55(24): 8392-8402. Gu L Y, Sun C W, Liu X C, et al. Optimization of formulation process of HAIYPRH modified podophyllotoxin liposomes and evaluation of brain targeting [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(24): 8392-8402.
- [16] 刘小芳, 吴仪君, 石玮玮, 等. 叶酸壳聚糖姜黄素 pH 敏感脂质体的制备及靶向性研究 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(19): 2315-2321. Liu X F, Wu Y J, Shi W W, et al. Preparation of folic acid chitosan curcumin pH sensitive liposomes and investigation of their targeting effect [J]. Chin J New Drugs, 2018, 27(19): 2315-2321.
- [17] 熊友香, 汤红霞, 马瑞, 等. 去甲斑蝥素/粉防己碱双载药脂质体的制备工艺及体外释放性质考察 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(12): 2531-2536. Xiong Y X, Tang H X, Ma R, et al. Preparation process of norcantharidin/tetrandrine dual loaded liposomes and their *in vitro* release characteristics [J]. China J Chin Mater Med, 2018, 43(12): 2531-2536.
- [18] 曾勇珠, 郭魏, 张裕彦, 等. 星点设计-效应面法优化 pH 值依赖型岩黄连碱口服结肠靶向纳米粒 [J]. 中草药, 2024, 55(6): 1935-1945. Zeng Y Z, Guo W, Zhang Y Y, et al. Optimization of pH-dependent dehydrocavidine oral colon-targeting nanoparticles by central composite design-response surface methodology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(6): 1935-1945.
- [19] 常国欣, 王婴, 黄晓丹, 等. 基于甘草次酸与细胞穿膜肽修饰的去甲斑蝥素肝靶向脂质体的制备工艺研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(7): 855-861. Chang G X, Wang Y, Huang X D, et al. Preparation process of liver targeting norcantharidin liposomes modified by glycyrrhetinic acid and trans-activator of transcription [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(7): 855-861.
- [20] 张广儒, 孙倩倩, 吕美, 等. 阿仑膦酸钠脂质体的制备

- 及透皮给药性能评价 [J]. 药学研究, 2024, 43(2): 135-141.
- Zhang G R, Sun Q Q, Lyu M, et al. Preparation and evaluation of transdermal drug delivery properties of alendronate sodium liposomes [J]. J Pharm Res, 2024, 43(2): 135-141.
- [21] 汪洁, 顾雪梅, 张思雨, 等. 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 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(12): 2816-2829.
- Wang J, Gu X M, Zhang S Y, et al. Preparation and evaluation of dual-targeting pH-sensitive baicalin/curcumin co-loaded liposomes [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(12): 2816-2829.
- [22] 陈倩. 叶酸偶联的 CyP 白蛋白纳米粒的制备及性质研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2022.
- Chen Q. Preparation and properties of folate-coupled CyP albumin nanoparticles [D]. Chongqing: Chongqing University, 2022.
- [23] 董亚楠, 任书强, 柳超, 等. 蒙花苷巯基化纳米胶束的制备、表征及其口服吸收生物利用度评价 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7776-7787.
- Dong Y N, Ren S Q, Liu C, et al. Buddleoside sulfhydryl-modified nanomicelles: Preparation, characterization and oral bioavailability evaluation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(23): 7776-7787.
- [24] Sağiroğlu A A. Chitosan-coated liposome-containing carbamazepine and coenzyme Q10: Design, optimization and evaluation [J]. J Liposome Res, 2021, 31(4): 389-398.
- [25] 郑炀凡. 壳聚糖-磷虾油纳米脂质体制备及其对抗氧化活性的影响 [D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- Zheng Y F. Preparation of chitosan-krill oil nanoliposomes and its effect on antioxidant activity [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [26] 宁双成, 周莉莉, 王敏, 等. 星点设计-效应面法优化斑蝥素纳米结构脂质载体处方工艺 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4114-4122.
- Ning S C, Zhou L L, Wang M, et al. Optimization of prescription process of cantharidin nanostructured lipid carrier by central composite design-response surface methodology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(17): 4114-4122.
- [27] 张曼玉, 楼晨曦, 曹傲能. 主动靶向载药脂质体在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 生物医学工程学杂志, 2022, 39(3): 633-638.
- Zhang M Y, Lou C X, Cao A N. Progresses on active targeting liposome drug delivery systems for tumor therapy [J]. J Biomed Eng, 2022, 39(3): 633-638.
- [28] 郝艳丽, 林丽, 菜瑜, 等. 齐墩果酸脂质体的制备工艺优化及其质量评价 [J]. 吉林医药学院学报, 2016, 37(6): 401-405.
- Xi Y L, Lin L, Cai Y, et al. Preparation technology optimization of oleanolic acid nanoliposomes and its quality evaluation [J]. J Jilin Med Univ, 2016, 37(6): 401-405.
- [29] Hoseini B, Jaafari M R, Golabpour A, et al. Application of ensemble machine learning approach to assess the factors affecting size and polydispersity index of liposomal nanoparticles [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 18012.
- [30] Huang Y J, Gu J, Yan Z J, et al. Cytomembrane-mimicking nanocarriers with a scaffold consisting of a CD44-targeted endogenous component for effective asparaginase supramolecule delivery [J]. Nanoscale, 2020, 12(22): 12083-12097.
- [31] Alp G, Oztas Y. Facile L-Glutamine delivery to erythrocytes via DOPC-DPPG mixed liposomes [J]. J Liposome Res, 2021, 31(4): 409-419.
- [32] 陈水飏. 去甲斑蝥素-聚乙二醇-聚己内酯嵌段共聚物胶束的研制 [D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- Chen S F. The study of norcantharidin-loaded poly (ethylene glycol)-poly (caprolactone) block copolymeric micelles[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2012.
- [33] Khezri K, Saeedi M, Morteza-Semnani K, et al. A promising and effective platform for delivering hydrophilic depigmenting agents in the treatment of cutaneous hyperpigmentation: Kojic acid nanostructured lipid carrier [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2021, 49(1): 38-47.
- [34] 周伟成, 刘宇灵, 陈颖翀, 等. 去氢骆驼蓬碱包合物脂质体的制备及体外性质评价 [J]. 中草药, 2022, 53(24): 7696-7705.
- Zhou W C, Liu Y L, Chen Y C, et al. Preparation and *in vitro* properties evaluation of harmine drug-in-cyclodextrin-in-liposome [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(24): 7696-7705.
- [35] 宋旭楠, 闫宏丽, 马喆, 等. 叶酸靶向修饰载新藤黄酸纳米结构脂质载体的研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2023, 42(3): 347-354.
- Song X N, Yan H L, Ma Z, et al. Study on folic acid-modified nanostructured lipid carriers loaded with gambogenic acid [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2023, 42(3): 347-354.
- [36] Alyami M H, Musallam A A, Ibrahim T M, et al. The exploitation of pH-responsive eudragit-coated mesoporous silica nanostructures in the repurposing of terbinafine hydrochloride for targeted colon cancer inhibition: Design optimization, *in vitro* characterization, and cytotoxicity

- assessment [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(12): 2677.
- [37] Zheng Z, Lang T Q, Huang X, et al. Calcitriol-loaded dual-pH-sensitive micelle counteracts pro-metastasis effect of paclitaxel in triple-negative breast cancer therapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9(12): e2000392.
- [38] Porgham Daryasari M, Dusti Telgerd M, Hossein Karami M, et al. Poly-l-lactic acid scaffold incorporated chitosan-coated mesoporous silica nanoparticles as pH-sensitive composite for enhanced osteogenic differentiation of human adipose tissue stem cells by dexamethasone delivery [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 4020-4029.
- [39] Holsæter A M, Wizgird K, Karlsen I, et al. How docetaxel entrapment, vesicle size, Zeta potential and stability change with liposome composition-a formulation screening study [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2022, 177: 106267.
- [40] 郭嘉斌, 徐文霞, 李红莲, 等. 香叶木素脂质体的处方优化及其体外释放 [J]. *中国医药工业杂志*, 2022, 53(2): 225-232.
- Guo J B, Xu W X, Li H L, et al. Formulation optimization and in vitro release of diosmetin liposomes [J]. *Chin J Pharm*, 2022, 53(2): 225-232.
- [41] Luo J, Li X B, Dong S Y, et al. Layer-by-layer coated hybrid nanoparticles with pH-sensitivity for drug delivery to treat acute lung infection [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 2460-2468.
- [42] Lin X, Zhang B, Zhang K R, et al. Preclinical evaluations of norcantharidin-loaded intravenous lipid microspheres with low toxicity [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9(12): 1449-1462.
- [43] Yan Z J, Wu X P, Wei P P, et al. Effective platform for enhancing the bioavailability and anti-cancer efficacy of norcantharidin: Nanoemulsion hybrid lipid carriers [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2023, 19(4): 527-542.
- [44] Nsairat H, Khater D, Sayed U, et al. Liposomes: Structure, composition, types, and clinical applications [J]. *Heliyon*, 2022, 8(5): e09394.
- [45] Moreira T D S, Silva A D O, Vasconcelos B R F, et al. DOPE/CHEMS-based EGFR-targeted immunoliposomes for docetaxel delivery: Formulation development, physicochemical characterization and biological evaluation on prostate cancer cells [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 915.
- [46] Zhai L P, Luo C W, Gao H N, et al. A dual pH-responsive DOX-encapsulated liposome combined with glucose administration enhanced therapeutic efficacy of chemotherapy for cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 3185-3199.
- [47] Luiz M T, Dutra J A P, Tofani L B, et al. Targeted liposomes: A nonviral gene delivery system for cancer therapy [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(4): 821.
- [48] Ashrafizadeh M, Delfi M, Zarrabi A, et al. Stimuli-responsive liposomal nanoformulations in cancer therapy: Pre-clinical & clinical approaches [J]. *J Control Release*, 2022, 351: 50-80.
- [49] 张文典, 崔杰, 夏一帆, 等. 两种叶酸偶联物的合成及体外靶向性研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2021, 52(4): 447-454.
- Zhang W D, Cui J, Xia Y F, et al. Synthesis of two folate conjugates and their targeting effect in vitro [J]. *J China Pharm Univ*, 2021, 52(4): 447-454.
- [50] Li Z L, Xiong X Y, Peng S F, et al. Novel folated pluronic F127 modified liposomes for delivery of curcumin: Preparation, release, and cytotoxicity [J]. *J Microencapsul*, 2020, 37(3): 220-229.
- [51] 王晨瑜. 抗多药耐药性肿瘤的叶酸-PEG-脂质体/长春新碱递药系统的研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- Wang C Y. Study on folic acid-PEG- liposome/vincristine delivery system against multidrug-resistant tumors [D]. Shanghai: Fudan University, 2012.
- [52] Fan Y, Chen C, Huang Y H, et al. Study of the pH-sensitive mechanism of tumor-targeting liposomes [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 151: 19-25.
- [53] Qian Z M, Chen Y J, Bao Y X. Pharmacological mechanisms of norcantharidin against hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2023, 13(11): 5024-5038.

[责任编辑 孙英杰]