

转铁蛋白修饰青藤碱脂质体的制备、组织分布及体内抗肝癌作用评价

代永霞¹, 李晓蒙¹, 谈秀凤², 李 萍^{1*}

1. 郑州健康学院, 河南 郑州 450064

2. 上海中医药大学, 上海 200120

摘要: 目的 制备转铁蛋白修饰的青藤碱脂质体 (Tf-Sin-Lips), 考察其体内组织分布特征及抗肝癌活性。方法 以包封率、载药量和粒径为指标, 通过单因素实验结合 Box-Behnken 设计-响应面法优化 Tf-Sin-Lips 处方工艺; 采用透射电镜观察 Tf-Sin-Lips 形貌, 并验证其混悬液的丁达尔效应。采用透析法比较青藤碱原料药和 Tf-Sin-Lips 在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液中的体外释药行为。通过 Hep3B 细胞种植法构建荷瘤小鼠模型, 尾 iv 给予青藤碱和 Tf-Sin-Lips, 考察体内组织分布情况; 以青藤碱注射液的组织药物浓度为参考, 计算 Tf-Sin-Lips 在肿瘤组织中相对摄取率 (RUE) 和峰浓度比值 (Ce)。将 30 只荷瘤小鼠随机分为模型 (0.9%氯化钠溶液) 组、环磷酰胺 (阳性药, 20 mg·kg⁻¹) 组、青藤碱组 (100 mg·kg⁻¹) 及 Tf-Sin-Lips 低、高剂量 (50、100 mg·kg⁻¹) 组, 比较各组小鼠的体内肿瘤生长情况。采用试剂盒法测定小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、尿素氮 (BUN) 和肌酐 (Scr) 水平, 并对小鼠主要脏器进行苏木素-伊红 (HE) 染色病理分析, 评价 Tf-Sin-Lips 体内用药安全性。结果 优化得到 Tf-Sin-Lips 最佳处方为青藤碱投药量 20 mg, 载药用量比 13.85:1.00, 磷脂与胆固醇用量比 6.33:1.00, 水合时间 2 h。Tf-Sin-Lips 平均包封率、载药量、粒径 Zeta 电位分别为 (83.26±1.17) %、(5.39±0.09) %、(196.96±5.19) nm 和 (-22.06±1.20) mV。Tf-Sin-Lips 呈囊泡结构, 混悬液具有明显的丁达尔效应, 体外释药具有明显的缓释特征。体内分布实验结果显示, Tf-Sin-Lips 可有效改变青藤碱的体内组织分布特征, 其肿瘤组织 RUE 与 Ce 分别提升至 3.25 倍、3.57 倍。体内药效结果表明, Tf-Sin-Lips 高剂量组可显著抑制荷瘤小鼠肿瘤生长, 抑瘤率达 65.42%。安全性检测显示, 青藤碱组、Tf-Sin-Lips 组可明显逆转模型小鼠血清 ALT、AST、BUN、Scr 的升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 小鼠主要脏器无显著病理性改变。结论 Tf-Sin-Lips 显著增强了青藤碱的肿瘤组织靶向性和体内抗肿瘤作用, 安全性良好, 具备良好的临床应用潜力。

关键词: 青藤碱; 脂质体; 转铁蛋白修饰; Box-Behnken 响应面法; Hep3B 细胞; 组织分布; 抗肝癌

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2026)07-2393-15

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2026.07.013

Transferrin modified sinomenine liposomes: Preparation, tissue distribution and anti-hepatocellular carcinoma effects evaluation *in vivo*

DAI Yongxia¹, LI Xiaomeng¹, TAN Xiufeng², LI Ping¹

1. Zhengzhou Health College, Zhengzhou 450064, China

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China

Abstract: Objective To prepare transferrin-modified sinomenine liposomes (Tf-Sin-Lips) and investigate their tissue distribution characteristics and anti-hepatocellular carcinoma activity *in vivo*. **Methods** The formulation process of Tf-Sin-Lips was optimized by single-factor experiments combined with Box-Behnken design-response surface methodology, using encapsulation rate, drug loading amount and particle size as indicators. The morphology of Tf-Sin-Lips was observed by transmission electron microscopy, and the Tyndall effect of the suspension was verified. The *in vitro* drug release behavior of sinomenine raw material and Tf-Sin-Lips in pH 7.4 phosphate buffer solution was compared by dialysis. A tumor-bearing mouse model was constructed by implanting Hep3B cells, and sinomenine and Tf-Sin-Lips were administered intravenously via tail vein to investigate the *in vivo* tissue distribution. The relative uptake rate (RUE) and peak concentration ratio (Ce) of Tf-Sin-Lips in tumor tissues were calculated based on the *in vivo* drug

收稿日期: 2026-02-27

基金项目: 河南省科技攻关项目 (242102310571); 河南省科技攻关项目 (252102310080)

作者简介: 代永霞 (1982—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为临床药学及基础医学。E-mail: daiyongxia2025@163.com

*通信作者: 李 萍 (1981—), 女, 硕士, 教授, 研究方向为肿瘤分子学和肿瘤免疫。E-mail: liping@zzsqmc.edu.cn

concentration of Sinomenine Injection. Thirty tumor-bearing mice were randomly divided into model (0.9% sodium chloride solution) group, cyclophosphamide (positive drug, 20 mg·kg⁻¹) group, sinomenine group (100 mg·kg⁻¹), and low and high dose groups of Tf-Sin-Lips (50, 100 mg·kg⁻¹). The tumor growth *in vivo* among different groups of mice were compared. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), and serum creatinine (Scr) in mice were determined by kits, and the main organs of mice were stained with hematoxylin-eosin (HE) for pathological analysis to evaluate the safety of Tf-Sin-Lips *in vivo*. **Results** The optimized Tf-Sin-Lips formulation was determined to be 20 mg of sinomenine dosage, 13.85 : 1.00 drug loading ratio, 6.33 : 1.00 phospholipid to cholesterol ratio, and 2 h of hydration time. The average encapsulation rate, drug loading amount, particle size and Zeta potential of Tf-Sin-Lips were (83.26 ± 1.17)%, (5.39 ± 0.09)%, (196.96 ± 5.19) nm and (-22.06 ± 1.20) mV, respectively. Tf-Sin-Lips presented a vesicular structure, and the suspension had a significant Tyndall effect. The *in vitro* drug release exhibited obvious sustained-release characteristics. The *in vivo* distribution experiments showed that Tf-Sin-Lips could effectively change the *in vivo* tissue distribution characteristics of sinomenine, and the relative uptake rate and peak concentration ratio in tumor tissues were increased by 3.25 times and 3.57 times, respectively. The *in vivo* efficacy results indicated that the high-dose group of Tf-Sin-Lips could significantly inhibit tumor growth in tumor-bearing mice, with an inhibition rate of 65.42%. Safety tests showed that compared with the model group, the serum ALT, AST, BUN and SCR levels of mice in the sinomenine group and Tf-Sin-Lips group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and no obvious pathological damage was observed in the main organs of mice. **Conclusion** Tf-Sin-Lips significantly enhanced the tumor tissue targeting ability and *in vivo* anti-tumor effect of sinomenine, with good safety and potential for clinical application.

Key words: sinomenine; liposomes; transferrin modified; Box-Behnken design-response surface method; Hep3B cells; organ distribution; anti-hepatocellular carcinoma

肝癌是临床高发的恶性肿瘤, 严重威胁人类公共健康。该疾病具有预后不良、复发率高的特征, 是临床治疗难度极大的恶性肿瘤之一。现阶段临床主流化疗药物普遍存在不良反应显著、患者耐受性与治疗依从性较差等问题, 极大限制了临床治疗效果。因此, 具备高效抗癌活性、低不良反应的中药活性成分, 已成为医药领域的研究热点, 获得科研人员的广泛关注与认可^[1-2]。青藤碱是一种从传统中药清风藤 *Menispermum dauricum* DC. 中提取分离的吗啡烷型生物碱。现有研究证实, 青藤碱可通过抑制肝癌细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、调控机体免疫功能、阻断肿瘤细胞侵袭与转移等多种途径发挥抗肝癌作用^[3-4], 是极具开发潜力的高效抗肝癌候选药物。同时, 相较于临床常用化疗药物, 青藤碱的体内毒性更低, 用药安全性更优, 具备极高的科研探索与临床转化价值^[5-6]。但青藤碱自身存在明显的理化性质缺陷, 其水中溶解度仅为 0.45 mg·mL⁻¹, 油水分配系数为 0.75^[7], 且体内易被快速代谢清除^[8], 上述问题直接导致药物生物利用度低下, 严重制约其抗肝癌药效的充分发挥。

纳米递送技术可通过改善药物水溶性、优化释药模式、实现肿瘤靶向递送等方式, 有效克服传统药物的应用短板、提升药物治疗效能。目前已有研究开发出脂质纳米粒、外泌体等多种青藤碱纳米制剂用于抗肿瘤研究^[9], 但此类制剂普遍存在结构稳

定性不足的问题。此外, 体内微环境复杂, 仅依靠肿瘤组织的高通透性和滞留效应 (EPR 效应) 难以实现精准、高效的肿瘤靶向递药, 进一步限制了青藤碱纳米制剂的抗肿瘤疗效及临床推广应用。脂质体是基于磷脂双分子层结构包载药物形成的纳米囊泡载体, 主要成分为磷脂等生物源性物质, 具有优异的生物相容性与可降解性, 是目前药物递送领域的理想载体之一。同时, 脂质体制剂已实现国内工业化量产, 契合临床规模化生产需求, 将青藤碱制备为脂质体制剂具备较强的现实应用价值。但普通脂质体缺乏主动靶向能力, 肿瘤靶向富集效果较差, 难以精准作用于肝癌病灶。研究表明, 对脂质体表面进行功能化基团修饰, 可显著提升其肿瘤靶向递送能力^[10-12]。转铁蛋白 (Tf) 是血浆中核心的含铁转运蛋白, 其对应的转铁蛋白受体 (TfR) 为跨膜糖蛋白, 且肝癌细胞表面存在 TfR 特异性高表达的特性, 可作为肝癌靶向治疗的关键生物靶点^[13-14]。二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-转铁蛋白 (DSPE-PEG 2000-Tf) 兼具 Tf 靶向基团与良好的生物相容性, 原料来源稳定且已实现国内量产, 是理想的脂质体靶向修饰材料。

基于此, 本研究采用 DSPE-PEG 2000-Tf 为靶向修饰剂, 构建转铁蛋白修饰的青藤碱靶向脂质体 (Tf-Sin-Lips), 以青藤碱注射液为对照, 系统探究 Tf-Sin-Lips 的体内组织分布特征及抗肝癌药效, 旨

在为青藤碱新型靶向制剂的研发及临床转化提供实验依据与新思路。

1 材料

1.1 仪器

UMT-500 型超声仪, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; H01-1A 型磁力搅拌器, 上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司; 1200 型高效液相色谱仪、Cary 3500 紫外可见分光光度计, 美国安捷伦公司; BM-20 型电子天平, 日本爱安德仪器公司; ST8R 型高速离心机, 美国赛默飞世尔仪器公司; BeNano 90 型粒度分析仪, 丹东百特仪器有限公司; JEM 2100F 型透射电镜 (TEM), 日本电子株式会社; RC806D 型溶出仪, 天大天发科技有限公司; Eco-85 型真空冻干机, 南京金实仪器设备有限公司; XK96A 型混匀器, 姜堰市新康医疗器械有限公司; CX23 型光学显微镜, 迈时迪科技有限公司。

1.2 材料

对照品青藤碱 (批号 110774-202208, 质量分数 98.2%, 中国食品药品检定研究院); 青藤碱原料药 (批号 220615, 质量分数 97.0%, 长沙上禾生物科技有限公司); 卵磷脂 (批号 220608, 上海辅必成医药科技有限公司); DSPE-PEG 2000-Tf (相对分子质量 80 000, 批号 RD0210711, 西安瑞禧生物科技有限公司); BCA 试剂盒 (批号 240617, 碧云天生物技术有限公司); 乳糖 (批号 20221014, 上海华茂药业有限公司); 血清丙氨酸氨基转移酶试剂盒 (ALT, 批号 20241022)、天冬氨酸氨基转移酶试剂盒 (AST, 批号 20250211)、肌酐试剂盒 (Scr, 批号 20240515) 和尿素氮试剂盒 (BUN, 批号 20240318) 均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 细胞与动物

Hep3B 细胞 (批号 20250616) 购自河南省肿瘤医院研究所。4~6 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 饲养于 SPF 级环境中, 必要时分笼管理, 体质量 18~22 g, 购自河南省实验动物中心, 生产许可证号 [SCXK (豫) 2020-0001], 实验经郑州健康学院伦理委员会审批, 动物伦理号 2023-SQLL-EC-20230915-1007-0000010。

2 方法与结果

2.1 Tf-Sin-Lips 的制备

精密称取 20 mg 青藤碱, 配制处方比例的卵磷脂与胆固醇, 一同置于圆底烧瓶中, 加入 10 mL 乙醇振荡分散, 制得混合混悬液。于 60 °C 水浴条件下恒温磁力搅拌, 直至溶液完全澄清。采用减压

蒸法除去体系中的乙醇, 使烧瓶内壁形成均匀脂质薄膜, 继续减压旋蒸 0.5 h, 彻底去除残留乙醇。随后加入 30 mL pH 6.5 磷酸盐缓冲液 (PBS), 经磁力搅拌、200 W 超声处理适当时间后, 补加纯化水定容至 30 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过除去不溶性杂质, 即得青藤碱脂质体 (Sin-Lips) 混悬液 A。

称取 60 mg DSPE-PEG 2000-Tf, 充分溶于三氯甲烷中, 将溶液置于圆底烧瓶内减压旋蒸成膜, 持续减压旋蒸 0.5 h 以完全除去三氯甲烷, 再加入 10 mL PBS 进行水化处理, 制得 DSPE-PEG 2000-Tf 胶束混悬液 B。将混悬液 A 与混悬液 B 充分混合, 置于 37 °C 恒温振荡器中孵育 3 h。混合液经 1 cm $\times$ 20 cm 的 CL-4B 琼脂糖凝胶柱洗脱, 去除游离的 DSPE-PEG 2000-Tf^[14], 即得 Tf-Sin-Lips。除不添加青藤碱外, 其余实验步骤与上述方法一致, 制备空白脂质体。

2.2 青藤碱含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用岛津 InertSustainTM C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 柱温 35 °C; 检测波长 262 nm; 流动相为乙腈-10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠溶液-乙二胺 (65.0 : 35.0 : 0.5) 等度洗脱; 体积流量 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量 20 μL 。

2.2.2 Tf-Sin-Lips 供试品溶液的制备 精密量取 Tf-Sin-Lips 混悬液 1 mL 至 50 mL 量瓶, 加入适量乙腈超声破坏 Tf-Sin-Lips 后稀释定容。精密取 2 mL, 加乙腈-10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠溶液-乙二胺 (65.0 : 35.0 : 0.5) 稀释定容至 10 mL, 即得 Tf-Sin-Lips 供试品溶液。

2.2.3 专属性考察 取空白脂质体按“2.2.2”项下方法处理, 得空白脂质体溶液, 另取 Tf-Sin-Lips 供试品溶液和质量浓度为 10.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青藤碱对照品溶液分别测定。结果见图 1, Tf-Sin-Lips 处方辅料不干扰青藤碱色谱峰, 专属性高。

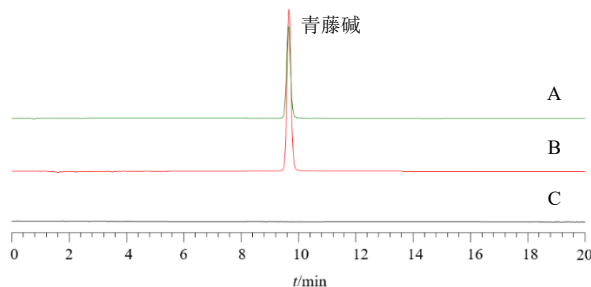


图 1 Tf-Sin-Lips (A)、青藤碱对照品 (B) 和空白脂质体样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of Tf-Sin-Lips (A), sinomenine reference substance (B) and blank liposome sample solution (C)

2.2.4 线性关系考察 取青藤碱对照品适量, 采用乙腈配制质量浓度为 $80.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。采用乙腈- $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠溶液-乙二胺 (65.0 : 35.0 : 0.5) 分别配制青藤碱质量浓度为 80.00、40.00、20.00、10.00、1.00、 $0.50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 进样测定。青藤碱质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 拟合方程 $Y=26.12X+52.02$, $r=0.9999$, 线性范围 $0.50\sim80.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.5 精密度考察 取质量浓度分别为 80.00、20.00、 $0.50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青藤碱对照品溶液分别测定 6 次, 青藤碱峰面积 RSD 分别为 0.60%、0.25%、0.66%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性考察 取 Tf-Sin-Lips 混悬液平行制备成 6 份供试品溶液, 分别测定 Tf-Sin-Lips 中青藤碱含量, 其 RSD 为 1.47% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.2.7 稳定性考察 取 Tf-Sin-Lips 供试品溶液分别于制备 0、3、6、9、12、24 h 测定青藤碱含量, 其 RSD 为 1.45% ($n=6$), 表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率考察 取已知质量浓度的 Tf-Sin-Lips 混悬液 0.5 mL 至 50 mL 量瓶中, 共 6 份。按标示量 100% 加入青藤碱对照品并制备供试品溶液, 测定青藤碱总量。计算得平均加样回收率为 99.07%, RSD 为 1.56% ($n=6$), 表明该方法准确度高。

2.3 Tf-Sin-Lips 包封率、载药量、粒径、多分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位的测定

2.3.1 超滤管吸附性考察 取青藤碱对照品适量, 使用 $10\ \text{mL}\ \text{pH}\ 6.5\ \text{PBS}$ (V_0) 配制质量浓度为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (C_0), 放入超滤管 (截留相对分子质量 8 000), 浸没静置 12 h 后取出, 使用 $\text{pH}\ 6.5\ \text{PBS}$ 冲洗超滤管表面 1 次, 测定 $\text{pH}\ 6.5\ \text{PBS}$ 体积 (V_1) 及青藤碱质量浓度 (C_1), 计算透析袋吸附率。结果显示, 超滤管对青藤碱吸附率仅 2.86%, 对结果影响较小。

$$\text{吸附率}=(C_0\times V_0-C_1\times V_1)/(C_0\times V_0)$$

2.3.2 Tf-Sin-Lips 各指标的测定 取新制备 Tf-Sin-Lips 混悬液, 经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 精密取 1 mL 续滤液至超滤管中, $8\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 6 min, 测定超滤内管中青藤碱含量 (M_1)。精密取 Tf-Sin-Lips 混悬液 1 mL (未经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过), 测定总青藤碱含量 (M), 计算包封率。

根据 Tf-Sin-Lips 辅料与青藤碱总量 (M_0), 计算载药量。取稀释的 Tf-Sin-Lips 混悬液至比色皿中, 擦拭干净后在粒度分析仪上测定 PDI 及粒径。另取稀释的 Tf-Sin-Lips 混悬液至 Zeta 电位专用电槽, 擦拭干净后测定 Tf-Sin-Lips 的 Zeta 电位。

$$\text{包封率}=M_1/M$$

$$\text{载药量}=M_1/M_0$$

2.4 单因素考察 Tf-Sin-Lips 处方工艺

2.4.1 磷脂与胆固醇用量比考察 磷脂和胆固醇作为 Tf-Sin-Lips 的载体。在固定载体-药物用量比 14 : 1、水合时间 2 h、超声时间 20 min, 考察磷脂与胆固醇用量比对 Tf-Sin-Lips 质量指标的影响, 结果见表 1。随着磷脂与胆固醇用量比的增加, 包封率和载药量均先增加后下降, 粒径呈先降低后增长趋势。可能是由于磷脂与胆固醇存在相互作用和协同效应^[15], 合适的磷脂与胆固醇用量比可形成结构稳定、粒径较小的 Tf-Sin-Lips。当磷脂与胆固醇用量比为 6 : 1 时包封率和载药量较高, 同时粒径相对较小, 故后续以 6 : 1 为中心对磷脂与胆固醇用量比 5 : 1~7 : 1 进行优化。

表 1 磷脂与胆固醇用量比的考察 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Investigation of phospholipids to cholesterol amount ratio ($\bar{x}\pm s, n=3$)

磷脂与胆固醇用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
4 : 1	55.63 ± 1.40	3.42 ± 0.15	259.57 ± 4.86
5 : 1	63.03 ± 1.37	4.12 ± 0.09	220.92 ± 7.75
6 : 1	80.37 ± 1.12	5.29 ± 0.08	201.28 ± 6.26
7 : 1	76.43 ± 0.85	4.92 ± 0.08	211.89 ± 2.01
8 : 1	72.87 ± 0.47	4.58 ± 0.04	254.30 ± 9.23

2.4.2 载体-药物用量比考察 固定磷脂-胆固醇质量比 6 : 1、水合时间 2 h、超声时间 20 min, 考察载体与药物用量比对 Tf-Sin-Lips 各项质量指标的影响, 结果见表 2。当载体药物用量比由 10 : 1 逐步提升至 18 : 1 时, Tf-Sin-Lips 包封率随之升高, 载药量则呈持续降低趋势, 需筛选适宜的投料比例。脂质体粒径表现为先减小后增大的变化规律: 药物占比偏低时, 药物多附着于脂质体表面^[10], 致使整体粒径偏大; 药物占比过高时, 体系内脂质体生成量大幅增多, 颗粒间易出现团聚黏连现象^[13], 进而造成粒径回升。结合包封率、载药量及粒径综合评判, 确定后续对投料比 12 : 1~16 : 1 开展优化。

表 2 载体-药物用量比的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Investigation of carrier-drug amount ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

载体-药物 用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
10:1	68.69±1.69	6.23±0.12	248.36±7.04
12:1	73.60±0.87	5.59±0.09	196.39±8.78
14:1	80.21±1.24	5.30±0.06	201.49±10.92
16:1	83.31±0.69	4.72±0.07	231.83±9.78
18:1	83.45±0.54	4.24±0.05	255.36±8.43

2.4.3 水合时间考察 在固定磷脂与胆固醇用量比为 6:1、载体-药物用量比 14:1、超声时间 20 min 条件下,考察水合时间对质量指标的影响,结果见表 3。随着水合时间的增加,Tf-Sin-Lips 包封率和载药量呈先升高后下降的趋势,可能是水合时间不足时影响了磷脂双分子层的形成,因而影响了载药^[13];水合时间过长时导致磷脂理化性质改变及 Tf-Sin-Lips 结构稳定性下降,使药物泄露^[15]。水合时间对 Tf-Sin-Lips 粒径也具有一定影响,时间过短或过长均引起粒径增长。综合考虑包封率、载药量和粒径变化趋势,最终选水合时间 1.5~2.5 h 进行优化。

表 3 水合时间的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Investigation of hydration time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水合时间/h	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
1.0	72.20±1.26	4.52±0.09	255.03±4.61
1.5	75.87±0.29	4.92±0.08	215.35±6.24
2.0	82.04±1.07	5.46±0.06	199.15±8.23
2.5	74.80±1.29	5.12±0.04	212.95±4.63
3.0	71.80±0.75	4.49±0.10	218.69±2.84

2.4.4 超声时间的影响 固定磷脂与胆固醇用量比为 6:1、载体-药物用量比 14:1、水合时间 2.0 h 条件下考察超声时间对质量指标的影响,结果见表 4。随着超声时间的增加,Tf-Sin-Lips 包封率和载药量均先增加后下降,说明适当的超声时间利于 Tf-Sin-Lips;但超声时间过长时可能会对 Tf-Sin-Lips 产生

表 4 超声时间考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Investigation of ultrasonic time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
10	78.39±1.05	5.12±0.06	239.93±7.16
15	81.55±0.79	5.35±0.08	204.79±7.62
20	82.42±1.53	5.42±0.07	207.42±9.37
25	78.35±1.60	5.07±0.05	213.61±8.66
30	73.70±1.44	4.74±0.08	232.86±6.51

破坏作用^[14-15],导致药物泄露。超声时间过短或过长时 Tf-Sin-Lips 粒径均相对较大,由于超声时间为 20 min 时 Tf-Sin-Lips 的 3 个质量指标均相对理想,最终确定 Tf-Sin-Lips 超声时间为 20 min。

2.5 Box-Behnken 响应面 (BBD-RSM) 法优化 Tf-Sin-Lips 处方工艺

2.5.1 实验方案设计及结果 磷脂与胆固醇用量比 (X_1)、载药用量比 (X_2) 和水合时间 (X_3) 对包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2) 和粒径 (Y_3) 影响较大,故将 X_1 、 X_2 、 X_3 作为主要影响因素,将 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 作为优化指标,考虑到 3 个影响因素对 3 个指标的影响趋势不同,故将 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 转为总评归一值 (OD),以获得 Y_1 和 Y_2 较高、 Y_3 较小的 Tf-Sin-Lips 处方工艺。根据 BBD-RSM 进行 3 因素、3 水平共计 17 次实验,对 Tf-Sin-Lips 处方进行优化。实验因素水平、设计及结果见表 5。

$$d_{\text{包封率}} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$$

$$d_{\text{载药量}} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$$

$$d_{\text{粒径}} = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$$

$$\text{OD} = (d_{\text{包封率}} \times d_{\text{载药量}} \times d_{\text{粒径}})^{1/3}$$

M_i 、 $M_{\max}$ 和 $M_{\min}$ 分别为包封率、载药量和粒径实测值、最大值和最小值

2.5.2 模型拟合与方差分析 用 Design Expert (V12.0.2) 软件对表 5 中影响因素 X_1 、 X_2 、 X_3 与实验数据 OD 值 (Y) 进行拟合,得二次多元方程 $Y = 0.89 + 0.10 X_1 - 0.07 X_2 + 0.21 X_3 + 0.07 X_1 X_2 + 0.06 X_1 X_3 - 0.11 X_2 X_3 - 0.15 X_1^2 - 0.35 X_2^2 - 0.43 X_3^2$,作为 OD 的数学模型,该模型系数 $R^2 = 0.989 4$,校正系数 $R_{\text{adj}}^2 = 0.975 7$,两者相差较小且非常接近 1.0,表明数学模型的预测值和实验值之间相关性良好,仅存在 2.43% 的数据异常。方差分析见表 6,该数学模型 $P < 0.000 1$,表明数学模型拟合恰当;失拟项 $P = 0.096 7$ ($P > 0.05$),表明干扰因素不会对拟合结果产生显著性影响,判断该数学模型可用于 Tf-Sin-Lips 处方工艺研究。二次多元方程中 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 具有显著性差异 ($P < 0.05$),而 X_1 、 X_2 、 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 具有极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.5.3 效应面分析及最佳处方工艺调整 响应面见图 2, Tf-Sin-Lips 的 OD 随着 2 因素的增加均呈先增加后减小情况,抛物线的顶点即为 OD 值最大值,也是 Tf-Sin-Lips 处方工艺筛选的目标。在 OD 值取值区间为 0~1 条件下得 Tf-Sin-Lips 最佳处方工艺 X_1 为 6.33:1, X_2 为 13.85:1, X_3 为 2.03 h (为

表 5 BBD-RSM 实验因素水平、设计及结果
Table 5 BBD-RSM factor level, test design and results

序号	X_1	X_2	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD	序号	X_1	X_2	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD
1	6:1(0)	14:1(0)	2.0(0)	82.60	5.33	200.49	0.876	10	6:1	16:1	1.5	74.52	4.32	220.85	0.110
2	5:1(-1)	14:1	1.5(-1)	72.71	4.68	229.15	0.268	11	6:1	12:1	1.5	70.98	5.37	215.96	0.000
3	5:1	16:1(1)	2.0	77.05	4.43	255.98	0.157	12	6:1	14:1	2.0	84.24	5.38	204.85	0.908
4	6:1	16:1	2.5(1)	75.22	4.31	261.72	0.000	13	5:1	14:1	2.5	71.15	4.58	226.78	0.114
5	7:1(1)	14:1	1.5	74.46	4.86	230.14	0.383	14	5:1	16:1	2.0	73.67	5.59	231.08	0.461
6	6:1	12:1(-1)	2.5	72.84	5.54	243.33	0.339	15	7:1	14:1	2.5	72.94	7.76	226.31	0.476
7	6:1	14:1	2.0	83.17	5.40	206.14	0.881	16	7:1	16:1	2.0	76.22	4.41	255.93	0.464
8	7:1	12:1	2.0	74.33	5.59	231.79	0.491	17	6:1	14:1	2.0	83.50	5.44	198.15	0.941
9	6:1	14:1	2.0	82.34	5.28	201.22	0.855								

表 6 方差分析
Table 6 Analysis variance

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.73	9	0.19	72.38	<0.000 1	X_1^2	0.10	1	0.10	35.88	0.000 5
X_1	0.08	1	0.08	31.00	0.000 8	X_2^2	0.51	1	0.51	192.09	<0.000 1
X_2	0.04	1	0.04	14.68	0.006 4	X_3^2	0.78	1	0.78	294.13	<0.000 1
X_3	3.53×10^{-3}	1	3.53×10^{-3}	1.32	0.287 7	残差	0.02	7	2.66×10^{-3}		
X_1X_2	0.02	1	0.02	7.20	0.031 4	失拟项	0.01	3	4.74×10^{-3}	4.29	0.096 7
X_1X_3	0.02	1	0.02	5.75	0.047 6	纯偏差	4.42×10^{-3}	4	1.11×10^{-3}		
X_2X_3	0.05	1	0.05	18.96	0.003 3	总离差	1.75	16			

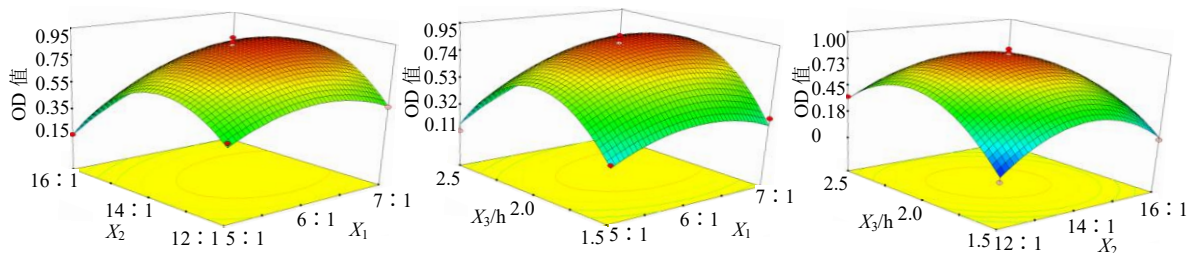


图 2 X_1 、 X_2 、 X_3 对 OD 的响应面图
Fig. 2 Response surface plots of X_1 , X_2 , X_3 for OD value

便于实际操作, 调整为 2.0 h), 预测 OD 值为 0.950。
2.5.4 Tf-Sin-Lips 最佳处方工艺验证 测得 3 批 Tf-Sin-Lips 平均包封率、载药量和粒径分别为 $(83.26 \pm 1.17)\%$ 、 $(5.39 \pm 0.09)\%$ 和 (196.96 ± 5.19) nm。按照“2.5.1”项下公式计算 Tf-Sin-Lips 实测 OD 值为 0.943, 与预测 OD 最大值 0.950 相比实测 OD 值相对偏差仅为 -0.74%, 证明建立的 OD 数学模型适用性较强。另测得 Tf-Sin-Lips 的 PDI 为 0.117 ± 0.009 , Zeta 电位为 (-22.06 ± 1.20) mV, 见图 3。

2.6 Tf-Sin-Lips 中 Tf 表面密度的测定

取 BCA 试剂盒中的标准蛋白对照品, 用纯化水配制成质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准蛋白母液, 并稀释为 0.500、0.400、0.250、0.100、0.050、0.025 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

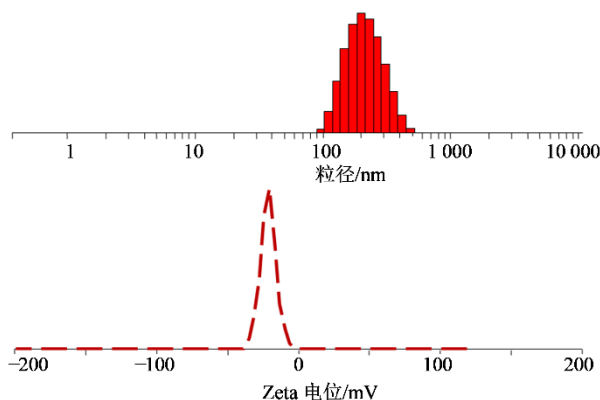


图 3 Tf-Sin-Lips 的粒径和 Zeta 电位
Fig. 3 Particle size distribution and Zeta potential of Tf-Sin-Lips

系列工作液。各取 0.5 mL, 分别加入 5.0 mL 现配 BCA 工作液, 混匀后 37 °C 孵育 30 min, 于紫外分光光度计 560 nm 处测定吸光度 (A), 绘制标准曲线并拟合回归方程。精密量取透析纯化后的 Tf-Sin-Lips 溶液 200 μ L, 依次加入甲醇 400 μ L、三氯甲烷 200 μ L 及纯化水 100 μ L, 涡旋 1 min, 8 500 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 3 min。弃去上层水相, 向下层有机相中加入 400 μ L 甲醇, 涡旋 1 min 并同法离心, 弃去溶剂后氮气吹干。向残渣中加入 200 μ L 纯化水复溶, 再加 2 mL BCA 工作液, 混匀后 37 °C 孵育 30 min, 于 560 nm 处测定 A , 代入标准曲线计算 Tf 含量。结合处方投料量与载体总质量, 计算得 Tf-Sin-Lips 中 Tf 表面密度为 $(68.61 \pm 2.03) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.7 Tf-Sin-Lips 的微观形态

设置 TEM 测试条件为高反差模式, 放大倍数 25 000, 加速电压为 80.0 kV。取 Tf-Sin-Lips 混悬液滴加至铜网上, 1.5% 磷钨酸钠染色, 晾干, 置 TEM 观察。结果见图 4, Tf-Sin-Lips 外观呈囊泡结构。

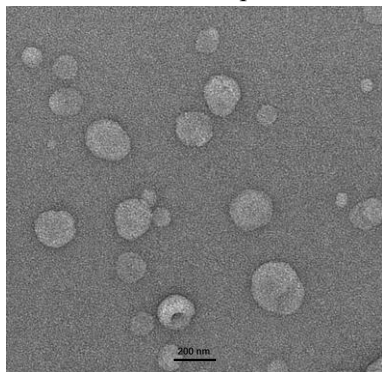


图 4 Tf-Sin-Lips 微观形貌 ($\times 25\ 000$)

Fig. 4 Microscopic morphology of Tf-Sin-Lips ($\times 25\ 000$)

2.8 Tf-Sin-Lips 冻干粉的制备

取乳糖溶于纯化水中, 加入 Tf-Sin-Lips 混悬液, 补加适量纯化水使乳糖质量分数为 4%, 分装至西林瓶中, 经预冻、真空冻干后即得 Tf-Sin-Lips 冻干粉。Tf-Sin-Lips 混悬液、冻干粉及注射用水复溶后外观见图 5。注射用水复溶后测得 Tf-Sin-Lips 包封率、粒径和 Zeta 电位分别为 $(81.16 \pm 0.90) \%$ 、 $(208.87 \pm 5.72) \text{ nm}$ 和 $(-21.76 \pm 0.98) \text{ mV}$ 。按照“2.6”项下分别测定 Tf-Sin-Lips 冻干前后的 Tf 含量, 发现 Tf-Sin-Lips 冻干粉复溶后 Tf 含量下降率为 $(5.92 \pm 0.53) \%$, 可能是在冻干过程中形成的冰晶对 Tf-Sin-Lips 表面 Tf 修饰层产生了一定的破坏作用, 导致包封率下降, 同时也使 Tf 含量下降。

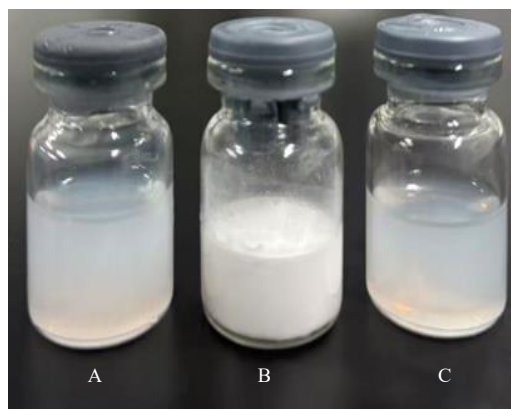


图 5 Tf-Sin-Lips 混悬液 (A)、冻干粉 (B) 及注射水复溶后混悬液 (C) 外观

Fig. 5 Appearance of Tf-Sin-Lips suspension (A), lyophilized powder (B) and redissolution suspension with injection water (C)

将 Tf-Sin-Lips 混悬液和 Tf-Sin-Lips 冻干粉复溶后混悬液分别置于比色皿中, 使用红色激光笔从右边照射, 观察丁达尔现象。结果见图 6, Tf-Sin-Lips 混悬液及冻干粉复溶后混悬液均有丁达尔现象, 说明 Tf-Sin-Lips 混悬液是一种胶体分散体系。

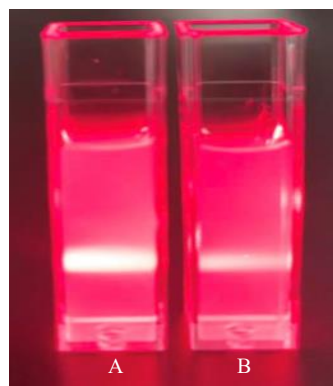


图 6 Tf-Sin-Lips 混悬液 (A) 及复溶后混悬液 (B) 丁达尔效应

Fig. 6 Tyndall effect of Tf-Sin-Lips suspension (A) and suspension after redissolved (B)

2.9 Tf-Sin-Lips 体外释药行为研究

取青藤碱原料药 (乙醇助溶) 和 Tf-Sin-Lips 冻干粉置于透析袋 (截留相对分子质量 8 000~12 000), 加入 pH 7.4 PBS (模拟血浆 pH 值) 5 mL, 扎紧后置于转篮, 放入 200 mL pH 7.4 PBS 中, 于 37 °C、100 $r \cdot \min^{-1}$ 条件下震荡, 于 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 h 取样 3 mL, 并补 3 mL pH 7.4 PBS。测定青藤碱浓度, 根据取样时间点绘

制青藤碱和 Tf-Sin-Lips 的释药曲线, 结果见图 7。Tf-Sin-Lips 在前 2 h 释药相对较快, 随后进入缓慢、持续的释药阶段, 12 h 累积释放率为 86.71%。相比之下, 青藤碱无明显缓释特征, 3 h 累积释放率已达 93.34%, 表明 Tf-Sin-Lips 显著改变了青藤碱的释药行为, 体外释药呈现缓释特征。

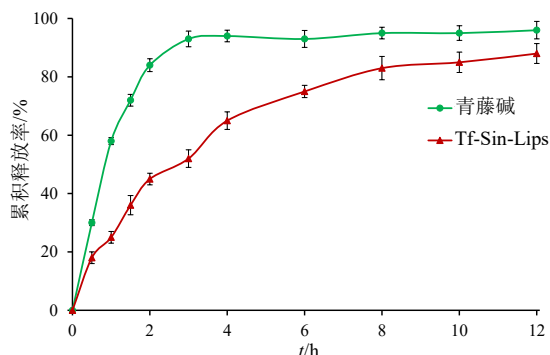
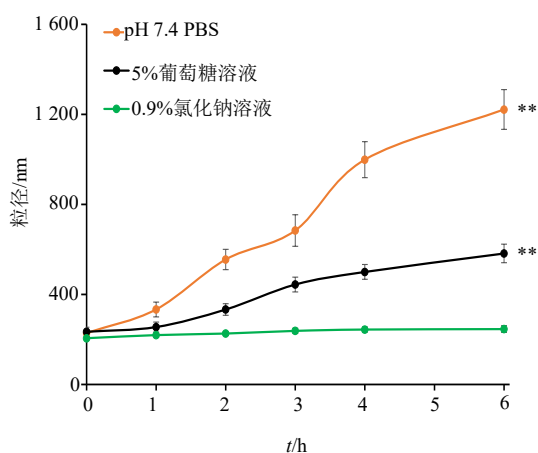


图 7 青藤碱和 Tf-Sin-Lips 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 7 In vitro release curve of sinomenine and Tf-Sin-Lips ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 7 Tf-Sin-Lips 冻干粉稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Results stability study of Tf-Sin-Lips lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间/月	包封率/%	粒径/nm	Zeta 电位/mV	Tf 含量下降率/%
0	81.21 $\pm$ 1.24	206.67 $\pm$ 5.86	21.37 $\pm$ 1.08	5.88 $\pm$ 0.30
1	81.19 $\pm$ 0.92	210.33 $\pm$ 12.89	20.74 $\pm$ 0.78	5.91 $\pm$ 0.59
2	81.01 $\pm$ 0.24	213.00 $\pm$ 11.53	20.81 $\pm$ 0.90	5.87 $\pm$ 0.33
3	80.41 $\pm$ 1.09	211.67 $\pm$ 9.71	20.57 $\pm$ 0.95	5.85 $\pm$ 0.31
6	80.59 $\pm$ 1.00	214.33 $\pm$ 7.50	20.23 $\pm$ 0.60	5.99 $\pm$ 0.32



与 0.9%氯化钠中粒径比较: ** $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs particle size in 0.9% sodium chloride.

图 8 Tf-Sin-Lips 在不同介质中粒径 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 8 Particle size of Tf-Sin-Lips in different media ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.10 Tf-Sin-Lips 冻干粉稳定性考察

取 Tf-Sin-Lips 冻干粉密封于西林瓶中, 置于 65%、35 °C 恒温恒湿箱, 于 0、1、2、3、6 个月取样, 复溶后测定包封率、粒径、Zeta 电位和 Tf 含量下降率, 结果见表 7。Tf-Sin-Lips 冻干粉第 6 个月时包封率、粒径、Zeta 电位和 Tf 含量下降率与第 0 个月相比均未见显著改变 ($P > 0.05$), 可见 Tf-Sin-Lips 冻干粉储存稳定性良好。可能是由于 Tf-Sin-Lips 表面有 Tf 修饰层, 提供了隔离层, 增加了空间位阻^[16-17]; Tf-Sin-Lips 混悬液制成冻干粉, 避免了水分对 Tf-Sin-Lips 结构的侵蚀作用, 最终确保了 Tf-Sin-Lips 冻干粉的稳定性。

2.11 Tf-Sin-Lips 冻干粉介质稳定性研究

取 Tf-Sin-Lips 冻干粉, 分别采用 0.9%氯化钠溶液、5%葡萄糖溶液和 pH 为 7.4 PBS 复溶, 置 37 °C 水浴中孵育, 分别于 0、1、2、3、4、6 h 测定粒径, 结果见图 8。Tf-Sin-Lips 冻干粉在 0.9%氯化钠溶液中粒径变化最小, 故选其作为注射用溶剂。

2.12 Tf-Sin-Lips 体内组织分布研究

2.12.1 Hep3B 肝癌模型的建立 取 Hep3B 细胞按 1.0×10^7 个 $\cdot$ mL⁻¹ 的细胞浓度 sc 0.2 mL 至 Balb/c 小鼠体内, 正常饮食饲养。7 d 后挤压瘤块使之隆起, 测量瘤块的宽 (a) 和长 (b), 计算肿瘤体积 (V)。选择瘤体积 (150 ± 10) mm³ 荷瘤裸鼠进行药效学研究^[18-19]。

$$V = a \times b^2 \times \pi / 6$$

2.12.2 实验方案 取禁食过夜的 72 只荷瘤小鼠, 随机分为青藤碱注射液组和 Tf-Sin-Lips 组, 每组各 36 只, 按 100 mg $\cdot$ kg⁻¹ 剂量^[3] (以青藤碱含量计) 尾 iv 给药, 于 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00 h 分别随机取 6 只荷瘤小鼠, ip 10% 水合氯醛溶液 (3 μ L $\cdot$ g⁻¹) 麻醉, 断颈椎处死, 解剖取出心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织, 加入 3 倍量 0.9%氯化钠溶液后匀浆, 精密吸取 200 μ L 置

离心管中, 加入 1 mL 乙腈, 涡旋 5 min 得混悬液, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 6 min 使蛋白等杂质沉淀。取上清液使用氮气吹干得残渣, 加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 乙腈涡旋复溶, 即得。

2.12.3 各组织对照品溶液配制 选取 1 只荷瘤小鼠, 剥离心、肝、脾、肺、肾及肿瘤组织, 参照“2.12.2”项下方法处理获得组织匀浆。向匀浆中

加入青藤碱对照品, 配制质量浓度依次为 80.00 、 40.00 、 20.00 、 10.00 、 1.00 、 $0.50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列组织对照品溶液。

2.12.4 专属性考察 分别取各组织样品溶液、各组织青藤碱对照品溶液和各空白组织样品溶液, 按“2.2.1”条件分别测定。色谱图见图 9, 青藤碱色谱峰附近无干扰, 专属性高。

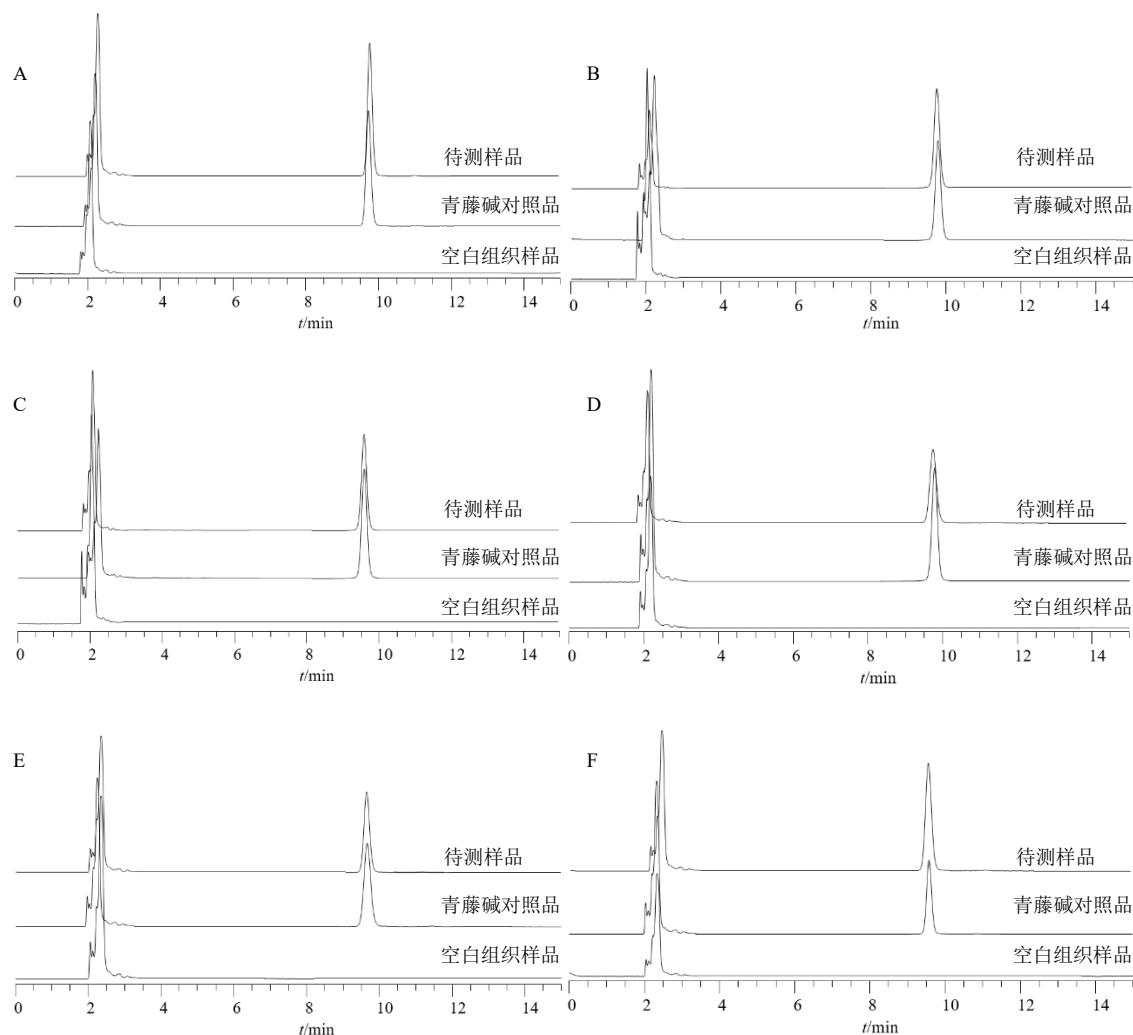


图 9 心 (A)、肝 (B)、脾 (C)、肺 (D)、肾 (E) 及肿瘤组织 (F) 的 HPLC 色谱图

Fig. 9 HPLC chromatograms of heart (A), liver (B), spleen (C), lung (D), kidney (E) and tumor tissue (F)

2.12.5 线性关系考察 取“2.12.3”项下各组织对照品溶液, 按照“2.2.1”项下方法测定, 以质量浓度为自变量 (X)、峰面积为因变量 (Y) 进行线性拟合, 各组织对应的标准曲线方程与相关系数如下: 心脏 $Y=26.18X+48.03$, $r=0.998\,0$; 肝脏 $Y=29.11X+63.09$, $r=0.997\,4$; 脾脏 $Y=26.94X+48.67$; $r=0.996\,8$; 肺组织 $Y=30.42X+62.47$; $r=0.999\,0$;

肾脏 $Y=28.90X+39.53$, $r=0.997\,8$; 肿瘤组织 $Y=30.96X+43.96$, $r=0.996\,6$ 。线性范围均为 $0.50\sim 80.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.12.6 稳定性考察 分别取青藤碱质量浓度为 $20.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织质控样品溶液置于室温, 分别于 0、3、6、12、18、24 h 测定青藤碱峰面积, 其 RSD 分别为 7.03%、4.16%、

5.24%、2.96%、5.14%、4.88% ($n=6$), 表明各组织样品溶液稳定性良好。

2.12.7 精密度和准确度考察 取青藤碱质量浓度为 80.00、20.00、0.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织质控样品溶液, 分别连续测定 6 次, 计算得各个样品峰面积的 RSD 均小于 10%。将测得的峰面积带入相应标准曲线方程计算青藤碱测得质量浓度, 并与实际浓度相比计算得各组织样品溶液的相对偏差 (RE) 均小于 10%, 可见精密度和准确度均较高。

2.12.8 提取回收率考察 分别取心、肝、脾、肺、肾和肿瘤空白组织, 参考按“2.12.2”项方法处理成残渣, 然后加入青藤碱对照品, 分别配制成质量浓度为 80.00、20.00、0.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 测定青藤碱峰面积, 并计算含量。另取 80.00、20.00、0.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青藤碱对照品溶液 (均不含器官及肿瘤组织), 分别测定青藤碱峰面积, 并计算含量。将测得样品质量浓度与青藤碱对照品质量浓度对比, 计算得平均回收率在 96.13%~103.47%, 因此该法可用于组织中

青藤碱的含量测定。

2.12.9 Tf-Sin-Lips 体内组织分布结果 青藤碱注射液和 Tf-Sin-Lips 在各组织中青藤碱质量浓度测定结果分别见图 10-A、B。以青藤碱注射液在各组织中测得质量浓度为参考, 计算 Tf-Sin-Lips 在各组织中相对摄取率 (RUE) 和峰浓度比值 (Ce), RUE 和 Ce 值越大表示 Tf-Sin-Lips 在该组织中靶向性越强。结果见表 8, Tf-Sin-Lips 在肝组织 RUE 和 Ce 值均大于 1.0, 在肿瘤组织 RUE 和 Ce 值均大于 3.0, 证明 Tf-Sin-Lips 能明显增加肝及肿瘤组织的蓄积量。Tf-Sin-Lips 在心、脾、肺、肾 RUE 和 Ce 值均小于 1.0, 说明 Tf-Sin-Lips 减少了青藤碱在这些组织中的分布。

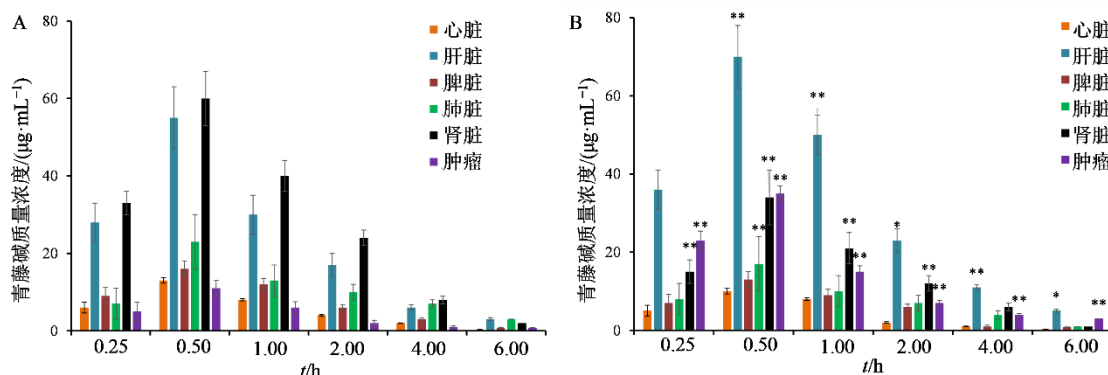
$$\text{RUE} = \text{AUC}_{\text{Tf-Sin-Lips}} / \text{AUC}_{\text{青藤碱注射液}}$$

$$\text{Ce} = C_{\text{max}} (\text{Tf-Sin-Lips}) / C_{\text{max}} (\text{青藤碱注射液})$$

ACU 为各组织药时曲线下面积, C_{max} 为各组织峰浓度

2.13 体内抗肿瘤实验

2.13.1 实验方案 将 30 只荷瘤小鼠随机分成模型组 (0.9%氯化钠溶液)、环磷酰胺 (阳性药, 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组^[19]、青藤碱组 (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[3]、Tf-Sin-Lips 低、



与相同取样时间青藤碱注射剂给药后的组织药物质量浓度比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs tissue drug concentration after administration of same dosage form at same sampling time.

图 10 青藤碱注射剂 (A) 和 Tf-Sin-Lips (B) 在荷瘤小鼠体内组织分布 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 10 Distribution of sinomenine injection (A) and Tf-Sin-Lips (B) in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 8 靶向性参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

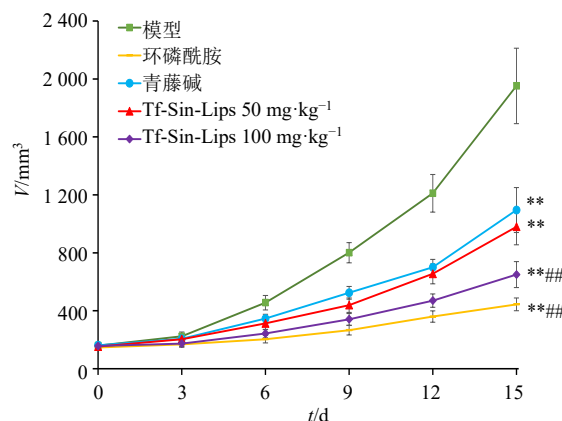
Table 8 Targeting parameter ($\bar{x} \pm s, n=6$)

样品	AUC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$)		RUE	$C_{\text{max}}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$		Ce
	青藤碱注射剂	Tf-Sin-Lips		青藤碱注射剂	Tf-Sin-Lips	
心	22.69 $\pm$ 3.66	16.22 $\pm$ 3.05	0.71	13.27 $\pm$ 2.58	9.44 $\pm$ 2.58	0.71
肝	90.44 $\pm$ 9.10	143.17 $\pm$ 18.17	1.58	54.12 $\pm$ 6.13	69.16 $\pm$ 8.06	1.28
脾	32.92 $\pm$ 4.03	24.06 $\pm$ 1.96	0.73	16.54 $\pm$ 5.02	13.92 $\pm$ 1.93	0.84
肺	52.45 $\pm$ 7.14	35.37 $\pm$ 5.08	0.67	23.01 $\pm$ 3.96	17.13 $\pm$ 3.04	0.74
肾	134.13 $\pm$ 16.38	73.96 $\pm$ 9.03	0.55	59.47 $\pm$ 7.11	34.90 $\pm$ 6.91	0.58
肿瘤	15.69 $\pm$ 2.01	51.07 $\pm$ 4.44	3.25	10.30 $\pm$ 2.79	36.78 $\pm$ 7.15	3.57

高剂量 (50、100 mg·kg⁻¹) 组, 每组 6 只。各组分物共尾 iv 给药 5 次, 每 3 天 1 次, 给药后测量瘤块的宽 (a) 和长 (b), 按“2.12.1”项下方法计算 V。第 5 次给药 3 d 后按 3 μL·g⁻¹ 剂量 ip 10% 水合氯醛溶液, 麻醉后脱颈处死, 取出瘤块, 置于滤纸上, 吸干表面水分后称质量, 计算抑瘤率。

抑瘤率 = 1 - 给药组平均瘤质量 / 模型组平均瘤质量

2.13.2 抑瘤率实验结果 各组小鼠不同时间点 V 变化如图 11 所示, 第 5 次给药 3 d 后各组瘤体外观见图 12, 抑瘤率统计结果见表 9。模型组肿瘤生长迅速, 终末期 V 为 (2 006.47 ± 306.12) mm³, 荷瘤小鼠活动能力与进食量均显著降低。末次给药后, 各给药组 V 较模型组均呈极显著降低 (P < 0.01)。青藤碱组具备一定抑瘤活性, 终末 V 降至 (1 116.95 ± 254.01) mm³, 整体抑瘤效果偏弱。与青藤碱组相比, Tf-Sin-Lips 低剂量组 V、瘤质量略有降低, 但组间差异无统计学意义 (P > 0.05), 提示 Tf-Sin-Lips 可减少青藤碱给药剂量, 与其自身药效优势相关^[19]; Tf-Sin-Lips 高剂量组 V 与瘤质量均极显著下降 (P < 0.01), 小鼠活动、进食及精神状态均得到明显恢复, 证实 Tf-Sin-Lips 可显著提升青藤碱抑瘤功效, 具备良好的研发应用潜力。体质量检测结果显示, 青藤碱及 Tf-Sin-Lips 各给药组小鼠体质量与模型组无明显差异 (P > 0.05); 环磷酰胺组小鼠体质量显著下降 (P < 0.05), 推测该现象由环磷



与模型组比较: **P < 0.01; 与青藤碱组比较: ##P < 0.01。
**P < 0.01 vs model group; ##P < 0.01 vs sinomenine group.

图 11 荷瘤小鼠 V 变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 11 V change of tumor-bearing mice
($\bar{x} \pm s, n=6$)

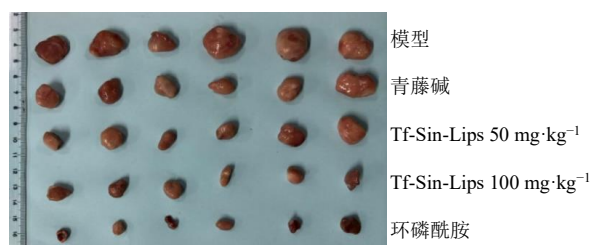


图 12 荷瘤小鼠的瘤体外观 (n=6)

Fig. 12 Tumor appearance of tumor-bearing mice (n=6)

表 9 体内抑瘤率结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 9 Antitumor inhibition rate *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%	体质量/g
模型	—	1.07 ± 0.32	—	37.16 ± 2.64
环磷酰胺	20	0.31 ± 0.14**	71.03	26.15 ± 2.03**
青藤碱	100	0.65 ± 0.21*	39.25	35.87 ± 1.66
Tf-Sin-Lips	50	0.58 ± 0.23*	45.79	36.73 ± 2.23
	100	0.37 ± 0.12***	65.42	34.86 ± 2.62

与模型组比较: *P < 0.05 **P < 0.01; 与青藤碱组比较: ##P < 0.01。

*P < 0.05 **P < 0.01 vs model group; ##P < 0.01 vs sinomenine group.

酰胺自身不良反应所致^[19]。

2.13.3 对荷瘤小鼠肝肾功能生化指标及主要脏器 HE 染色的影响

(1) 血液生化指标的检测: 取 6 只正常 Balb/c 小鼠作为对照组, 在“2.13.1”项给药方案基础上, 分别取各组小鼠全血, 4 °C 下静置 1 h 后 3 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分离上清液, 测定 ALT、AST、BUN 和 Scr^[20], 结果见表 10。与对照组相比, 模型组 ALT、

AST、BUN 和 Scr 均显著性升高 (P < 0.05), 说明荷瘤小鼠存在肝肾损伤。与模型组相比, 青藤碱及 Tf-Sin-Lips 给药组 ALT、AST、BUN 和 Scr 均显著降低 (P < 0.05、0.01), 可能是青藤碱及 Tf-Sin-Lips 具有抑瘤活性, 降低了肝肾损伤。与模型组相比, 环磷酰胺组 ALT、AST、Scr、BUN 水平均显著升高 (P < 0.05、0.01), 表明环磷酰胺进一步加剧了肝肾损伤。

表 10 血液生化指标 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 10 Blood biochemical indexes ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Scr/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	172.33 ± 25.32	31.61 ± 4.46	6.22 ± 0.66	40.96 ± 5.04
模型	—	204.11 ± 42.03**	40.15 ± 6.90**	7.19 ± 0.81**	45.77 ± 6.03*
环磷酰胺	20	281.64 ± 35.17###	76.02 ± 9.25###	8.23 ± 1.89###	53.14 ± 7.47#
青藤碱	100	158.14 ± 19.19###	26.98 ± 5.98###	5.81 ± 0.71###	38.90 ± 4.49###
Tf-Sin-Lips	50	166.59 ± 23.08###	28.54 ± 2.77###	6.34 ± 0.78###	41.77 ± 3.78#
	100	157.97 ± 22.76###	29.37 ± 4.15###	6.29 ± 0.53###	36.83 ± 4.13###

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

(2) 组织苏木素-伊红 (HE) 染色: 分别取各组小鼠的肺脏、肝脏、脾脏、肾脏和心脏, 分别做 HE 染色病理切片。结果见图 13, 模型组肺脏、肝脏、脾脏、肾脏和心脏均有明显的炎症细胞浸润现象, 说明荷瘤小鼠主要脏器存在损伤情况。与模型组肺脏、肝脏、脾脏、肾脏和心脏病理切片相比,

青藤碱及 Tf-Sin-Lips 各剂量组脏器病理结构正常, 未观察到炎症细胞浸润, 说明青藤碱及 Tf-Sin-Lips 各剂量组均未影响机体脏器功能, 初步表明安全性良好^[21]。但环磷酰胺组肺脏、肝脏、脾脏、肾脏和心脏可见炎症细胞浸润, 表明环磷酰胺对各脏器存在损伤作用。

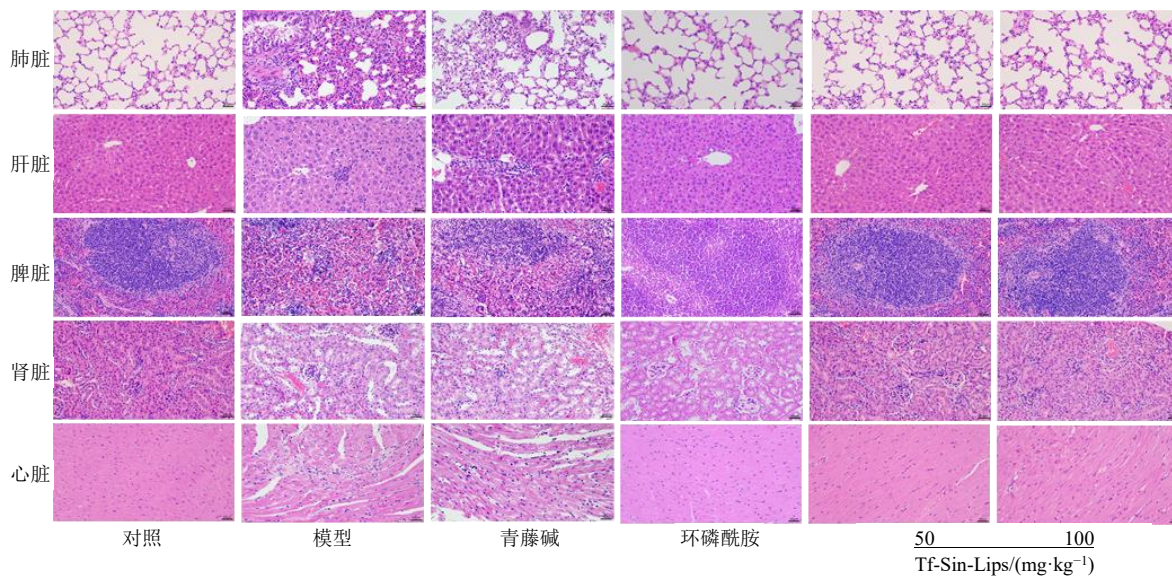


图 13 各组小鼠器官切片的 HE 染色 (×200)

Fig. 13 HE staining of organ sections from mice in each group (×200)

2.14 统计学分析

使用 SPSS 34.0 软件分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较使用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 时判定存在显著性差异。

3 讨论

若直接将 DSPE-PEG2000-Tf、磷脂与胆固醇混合制备 Tf-Sin-Lips, 部分 Tf 基团会朝向脂质体内部排布, 造成表面基团分布不均、修饰量偏低的问题。为此, 本研究采用后插入法构建 Tf-Sin-Lips^[13,16]。空白脂质体与 DSPE-PEG2000-Tf 胶束共孵育过程

中, 二者膜结构发生融合与缔合^[16], 使 DSPE-PEG2000-Tf 的疏水端嵌入脂质体双分子层, Tf 则稳定暴露于载体表面。该制备方式可保证修饰基团有效分布于脂质体外层, 既能提升药物包封率、稳固载体结构, 也为改善青藤碱体内外抗肿瘤活性提供基础条件。

冻干过程中产生的冰晶易破坏脂质体结构, 筛选适宜的冻干保护剂尤为关键。本研究以药物包封率与 Tf 留存率为评价指标, 对比乳糖、甘露醇、蔗糖等常用保护剂的应用效果。结果显示, 乳糖制备

所得冻干粉各项指标损耗最小,原因在于乳糖可降低分子运动能力,促使体系形成玻璃态结构^[21],有效减轻冰晶对载体表面结构的损伤。

游离青藤碱释放速率较快,而 Tf-Sin-Lips 可显著改变药物释放规律,呈现典型缓释特性。一方面,药物被包覆于脂质体内部,释放过程需突破磷脂膜层的屏障阻滞;另一方面,脂质体表面修饰的大分子 Tf 形成空间位阻,进一步延缓药物向外扩散^[16]。缓释特性能够助力载体靶向识别肿瘤组织,减少药物在正常组织中的非特异性释放,进而提升抗肿瘤疗效。血液环境富含多种蛋白与酶类物质,体外释药模型虽无法完全复刻体内真实生理状态,但实验数据仍具备重要参考价值,后续可依托新型技术完善体外释药评价体系。

据文献报道^[8],青藤碱 ip 给药的半数致死量为 $160\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药剂量 $50\sim 150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 可发挥显著抗肿瘤作用^[9],结合预试验结果,本研究选定 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 作为青藤碱药效评价剂量。已有研究将青藤碱制成盐酸盐衍生物,抑瘤率仅 55.13%^[22];青藤碱纳米制剂抑瘤率为 49.62%^[6],二者抗肿瘤效果均低于本研究 Tf-Sin-Lips 的 65.42%。Tf-Sin-Lips 抑瘤优势显著,归因于载体表面的聚乙二醇链可规避机体免疫清除,延长体内循环时长,借助 EPR 效应富集于肿瘤区域;同时 Tf 修饰赋予载体高效肿瘤靶向能力^[13],在被动富集与主动靶向双重作用下,大幅提升病灶部位药物浓度,强化抗肿瘤作用。此外,给药组荷瘤小鼠体质量无明显下降,脏器未出现病理性损伤,证实该制剂毒性较低,具备良好的研发与应用前景^[23-24]。

综上,本研究选用生物相容性优异的 DSPE-PEG2000-Tf 修饰制备 Tf-Sin-Lips,通过 BBD-RSM 法优化处方工艺,所得制备工艺稳定性良好。该脂质体具备优异缓释性能,可提升药物在肿瘤及肝脏组织的富集水平,显著增强体内抗肿瘤效果,且用药安全性可靠,具备深入开发潜力。后续将探究其抗肿瘤相关信号通路机制^[25],完善制剂基础研究体系,以为临床抗肿瘤新药研发提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 申佰轩,郭康雅,郭源辉,等.网络毒理学在中药安全性评价中的研究现状与发展思考[J].药物评价研究,2024,47(1):179-190.
- Shen B X, Guo K Y, Guo Y H, et al. Research status and

development thinking of network toxicology in safety evaluation of traditional Chinese medicine [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(1): 179-190.

- [2] Wu Q, Chen Q M, Yang J Y, et al. Material basis revelation of anti-hepatoma effect of Huachansu (Cinobufacini) through down-regulation of thymidylate synthase [J]. Chin Herb Med, 2025, 17(1): 127-138.
- [3] 王可雅, 仵俊伟, 张彤, 等. 基于 cGAS-STING 信号通路探讨中药活性成分抗肿瘤机制研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2025, 37(5): 983-991.
- Wang K Y, Qi J W, Zhang T, et al. Research progress on the anti-tumor mechanism of active ingredients in traditional Chinese medicine based on the cGAS-STING signaling pathway [J]. Nat Prod Res Dev, 2025, 37(5): 983-991.
- [4] 陈杉, 吴芬, 徐大兴, 等. 青藤碱防治肝癌的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(7): 1932-1936.
- Chen S, Wu F, Xu D X, et al. Research progress on pharmacological effects of sinomenine in prevention and treatment of liver cancer [J]. Drugs Clin, 2024, 39(7): 1932-1936.
- [5] Jiang P Z, Zahra A, Guo X, et al. Recent advances in the therapeutic potential of sinomenine for cancer treatment [J]. Pharmacology, 2024, 109(2): 76-85.
- [6] 王洪刚, 高萌, 张成鸿, 等. 青藤碱 PLGA-TPGS 纳米粒对 HCa-F 细胞在鼠淋巴管内增殖及异位移植瘤的抑制作用研究 [J]. 中国药房, 2016, 27(16): 2229-2232.
- Wang H G, Gao M, Zhang C H, et al. Study on inhibitory effects of sinomenine-loaded PLGA-TPGS nanoparticles on the proliferation of HCa-F cells in lymph tubes and ectopic transplantation tumors in mice [J]. China Pharm, 2016, 27(16): 2229-2232.
- [7] 但武龙, 杨菁, 陈智勇, 等. 白及多糖和甘草酸共稳定的青藤碱纳米乳的制备及其体外抗炎评价 [J]. 中草药, 2026, 57(1): 95-108.
- Dan W L, Yang J, Chen Z Y, et al. Preparation and *in vitro* anti-inflammatory evaluation of sinomenine nanoemulsion co-stabilized by *Bletilla striata* polysaccharide and glycyrrhizic acid [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2026, 57(1): 95-108.
- [8] 张二兵. 盐酸青藤碱安全性评价及不同性别大鼠耐受差异性的药物代谢动力学特征研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- Zhang E B. Safety evaluation of hydrochloride sinomenine and pharmacokinetic characteristics of tolerance differences in rats of different sexes [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2022.

- [9] 徐易琳, 黄莉, 周莉莉, 等. 青藤碱药理作用及临床应用的研究进展 [J]. 华西药学杂志, 2024, 39(2): 209-215.
Xu Y L, Huang L, Zhou L L, et al. Research progress of sinomenine on pharmacological action and clinical application [J]. West China J Pharm Sci, 2024, 39(2): 209-215.
- [10] 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 coloaded liposomes [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(12): 2816-2829.
- [11] 张谊, 王立晖, 刘金春, 等. 长循环脂质体在肿瘤治疗领域的研究进展 [J]. 药学进展, 2025, 49(6): 459-465.
Zhang Y, Wang L H, Liu J C, et al. Research progress of long-circulating liposomes and their application in cancer therapy [J]. Prog Pharm Sci, 2025, 49(6): 459-465.
- [12] 刘艳菊, 闫晓宇, 王永飞, 等. 聚乙二醇修饰大黄素/大黄酸脂质体温敏凝胶的制备、表征及对溃疡性结肠炎的治疗作用 [J]. 中草药, 2025, 56(14): 5006-5018.
Liu Y J, Yan X Y, Wang Y F, et al. Preparation, characterization and therapeutic effects on ulcerative colitis of PEGylated emodin/Rhein-liposomes thermosensitive gel [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(14): 5006-5018.
- [13] 周毓麟. 虫草素及其转铁蛋白靶向脂质体的抗肿瘤活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
Zhou Y L. Studies on the antitumor activity of cordycepin and its transferrin targeted liposomes [D]. Changchun: Jilin University, 2017.
- [14] 张效玮, 王兴芝, 王永安, 等. 常见肝癌细胞系的转铁蛋白受体表达差异分析及主动靶向载体效率比较 [J]. 科学技术与工程, 2024, 24(11): 4439-4445.
Zhang X W, Wang X Z, Wang Y A, et al. Expression of transferrin receptor in hepatocellular carcinoma cell lines and comparison of the efficiency of targeting drug carrier [J]. Sci Technol Eng, 2024, 24(11): 4439-4445.
- [15] 陈晨, 王彦阁, 宋亚男, 等. 冰片修饰金丝桃苷脂质体的制备及经鼻给药药动学行为和脑靶向性考察 [J]. 中草药, 2025, 56(6): 1967-1978.
Chen C, Wang Y G, Song Y N, et al. Preparation of borneol modified hyperoside liposomes and investigate of pharmacokinetic behavior and brain-targeting effects through transnasal administration [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(6): 1967-1978.
- [16] 吴昌旭, 张金武, 彭春子, 等. 转铁蛋白修饰辣蓼黄酮脂质体的制备和体外释放研究 [J]. 中国兽医杂志, 2025, 61(3): 1-11.
Wu C X, Zhang J W, Peng C Z, et al. Preparation and *in vitro* release study of transferrin-modified flavonoid of *Polygonum hydropiper* L. liposomes [J]. Chin J Vet Med, 2025, 61(3): 1-11.
- [17] 侯盼盼, 杨春杰, 苏慧慧, 等. 基于 mPEG-PCL 修饰的多西他赛脂质体的制备及体外抗肿瘤活性评价 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(6): 1546-1556.
Hou P P, Yang C J, Su H H, et al. Preparation and *in vitro* anti-tumor activity evaluation of docetaxel liposomes modified with mPEG-PCL [J]. Drug Eval Res, 2025, 48(6): 1546-1556.
- [18] 何晶晶. 青藤碱抑制肝癌细胞增殖的机制研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
He J J. Moleculars of sinomenine inhibiting proliferation of hepatocellular carcinoma cells: An experimental study [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2021.
- [19] 王涛丽, 张广辉, 张莉, 等. 负载二氢杨梅素 ZIF-8 纳米粒的制备、表征及抗肿瘤评价 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(5): 1224-1235.
Wang T L, Zhang G H, Zhang L, et al. Preparation, characterization and anti-tumor evaluation of dihydromyricetin loaded by ZIF-8 nanoparticles [J]. Drug Eval Res, 2025, 48(5): 1224-1235.
- [20] 李良, 吴华锋, 何碧钻, 等. 鸡参芪抗癌颗粒水提物的体内外抗乳腺癌作用 [J]. 中医药导报, 2025, 31(10): 8-15.
Li L, Wu H F, He B Z, et al. Study on the *ex vivo* and *in vivo* anti-breast cancer effects of compound extracts of ji Shenqi anti-cancer granules [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharmacol, 2025, 31(10): 8-15.
- [21] 高娟, 李伟宏, 李秀芬, 等. pH 敏感/叶酸修饰白藜芦醇脂质体的制备、表征及对子宫内腺癌荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用 [J]. 中草药, 2025, 56(20): 7368-7383.
Gao J, Li W H, Li X F, et al. Preparation, characterization of pH-sensitive/folic acid-modified resveratrol liposomes and its inhibitory effects on tumor of endometrial cancer-bearing mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(20): 7368-7383.
- [22] Li X, Wang K, Ren Y, et al. MAPK signaling mediates sinomenine hydrochloride-induced human breast cancer cell death via both reactive oxygen species-dependent and-independent pathways: An *in vitro* and *in vivo* study [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(7): e1356.
- [23] 窦德虎, 王陈, 鲁静, 等. *N*-乙酰半乳糖胺偶联小干扰 RNA 类药物的非临床毒性研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(12): 2709-2716.
Dou D H, Wang C, Lu J, et al. Advances in non-clinical

- toxicity of *N*-acetylgalactosamine-conjugated small interfering RNA drugs [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(12): 2709-2716.
- [24] 刘子祺, 童卫杭, 宋伟, 等. 某医院 142 例抗肿瘤用药不良反应报告分析 [J]. *解放军药学学报*, 2025, 38(5): 446-451.
- Liu Z Q, Tong W H, Song W, et al. 142 cases of adverse drug reactions induced by antitumor drugs in a hospital [J]. *Pharm J Chin People's Liberation Army*, 2025, 38(5): 446-451.
- [25] 张艺凡, 贾苏杰, 刘静远, 等. 基于网络药理学和动物实验探讨黄连解毒汤通过 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路抗结直肠腺瘤作用机制 [J]. *中医药导报*, 2024, 30(11): 32-40, 47.
- Zhang Y F, Jia S J, Liu J Y, et al. The mechanism of Huanglian Jiedu decoction against colorectal adenoma via bcl-2/bax/Caspase-3 pathway based on network pharmacology and animal experiments [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharmacol*, 2024, 30(11): 32-40, 47.

[责任编辑 孙英杰]