

半乳糖修饰 pH 敏感型青蒿琥酯纳米囊泡的制备、组织分布与抗肿瘤评价

薛晓菲¹, 李会晓¹, 詹丽倩², 许梦雅³, 吕全军^{1,4}, 梅永霞^{4*}

1. 郑州健康学院, 河南 郑州 450064

2. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450000

3. 郑州大学第二附属医院, 河南 郑州 450014

4. 郑州大学, 河南 郑州 450001

摘要: **目的** 构建半乳糖修饰的 pH 敏感型青蒿琥酯纳米囊泡 (Gal-Art-NVs), 考察其体内组织分布及抗肿瘤作用。**方法** 采用乙醇注入法制备 Gal-Art-NVs。以包封率、载药量、粒径为指标, 通过单因素实验结合 Box-Behnken 响应面法优化 Gal-Art-NVs 处方工艺, 并将其制备成冻干粉。透射电镜观察 Gal-Art-NVs 微观形态, 体外透析法考察其在 pH 5.0、5.5、6.5、7.4 磷酸盐缓冲液中的释药行为。建立肝癌大鼠模型, 采用尾 iv 给药, 测定不同时间点青蒿琥酯注射液和 Gal-Art-NVs 在各组织中的药物质量浓度, 计算相对摄取率 (RUE) 和峰浓度比值 (Ce), 评价该给药系统的体内靶向性; 同时计算抑瘤率以评价 Gal-Art-NVs 的体内抗肿瘤效果。**结果** Gal-Art-NVs 最佳处方为: 青蒿琥酯质量浓度为 $0.98 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 失水山梨醇单油酸酯与胆固醇琥珀酸单酯用量比为 1.93 : 1.00, 囊材与青蒿琥酯用量比为 20.77 : 1.00, 半乳糖硬脂酸酯用量为囊材总质量的 8%。优化后 Gal-Art-NVs 平均包封率为 $(85.68 \pm 1.07) \%$, 载药量为 $(3.91 \pm 0.14) \%$, 粒径为 $(183.76 \pm 7.60) \text{ nm}$, ζ 电位为 $(-26.79 \pm 1.04) \text{ mV}$, 呈椭圆形囊泡状。该纳米囊泡在 pH 5.0、5.5 磷酸盐缓冲液中可显著提高青蒿琥酯的释药速率及累积释放率, 表现出明显的 pH 敏感性。与青蒿琥酯注射液相比, Gal-Art-NVs 在肿瘤组织的 RUE 和 Ce 分别增至 3.02 倍和 1.95 倍; 与模型组相比, Gal-Art-NVs 可显著抑制荷瘤裸鼠的肿瘤生长, Gal-Art-NVs 组 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 抑瘤率达 64.21%。**结论** Gal-Art-NVs 具有 pH 敏感性, 能增加青蒿琥酯在肿瘤部位蓄积, 从而有效提高其抗肿瘤药效。

关键词: 青蒿琥酯; 纳米囊泡; pH 敏感性; 组织分布; 抗肿瘤

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)09-2579-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.09.018

Galactosylated modified pH-sensitive nanovesicles loaded with artesunate: Preparation, tissue distribution and anti-tumor evaluation

XUE Xiaofei¹, LI Huixiao¹, ZHAN Liqian², XU Mengya³, LÜ Quanjun^{1,4}, MEI Yongxia⁴

1. Public Health Department, Zhengzhou Health College, Zhengzhou 450064, China

2. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

3. The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China

4. Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To construct galactose-modified pH-sensitive artesunate nanovesicles (Gal-Art-NVs) and investigate their *in vivo* tissue distribution and anti-tumor efficacy. **Methods** Gal-Art-NVs were prepared by the ethanol injection method. The formulation process was optimized based on the encapsulation efficiency, drug loading, and particle size through single-factor experiments combined with the Box-Behnken response surface method, and then freeze-dried. The microscopic morphology of Gal-Art-NVs was observed by transmission electron microscopy, and their drug release behavior in phosphate buffer solutions at pH 5.0, 5.5, 6.5, and 7.4 was investigated by *in vitro* dialysis. A rat model of liver cancer was established, and tail intravenous administration was used to determine the drug concentration in various tissues at different time points for artesunate injection and Gal-Art-NVs, and

收稿日期: 2025-06-05

基金项目: 2024 年河南省科技发展计划资助项目 (242102310295); 2024 年河南省医学科技攻关计划项目 (LHGJ20240330); 2025 年度校级重点科研项目 (2025-XJKY-50)

作者简介: 薛晓菲 (1989—), 女, 学士, 讲师, 研究方向为临床药学及肿瘤康复治疗。E-mail: yibing0401@126.com

*通信作者: 梅永霞 (1988—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为基础医学。E-mail: myx@zzu.edu.cn

the relative uptake rate (RUE) and peak concentration ratio (Ce) were calculated to evaluate the *in vivo* targeting of the drug delivery system. Meanwhile, the tumor inhibition rate was calculated to evaluate the *in vivo* anti-tumor effect of Gal-Art-NVs. **Results** The optimal formulation of Gal-Art-NVs was as follows: Artesunate concentration of $0.98 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the ratio of sorbitan monooleate 80 to cholesterol succinate was 1.93 : 1.00, the ratio of the carrier to artesunate was 20.77 : 1.00, and the amount of galactose stearate was 8% of the total carrier mass. After optimization, the average encapsulation efficiency of Gal-Art-NVs was $(85.68 \pm 1.07)\%$, the drug loading was $(3.91 \pm 0.14)\%$, the particle size was $(183.76 \pm 7.60) \text{ nm}$, and the ζ potential was $(-26.79 \pm 1.04) \text{ mV}$, presenting an elliptical vesicular shape. The nanovesicles significantly increased the drug release rate and cumulative release rate of artesunate in phosphate buffer solutions at pH 5.0 and 5.5, demonstrating obvious pH sensitivity. Compared with artesunate injection, the RUE and Ce of Gal-Art-NVs in tumor tissues increased by 3.02 times and 1.95 times, respectively. Compared with the model group, Gal-Art-NVs significantly inhibited tumor growth in nude mice bearing tumors, with an inhibition rate of 64.21% in the Gal-Art-NVs group ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). **Conclusion** Gal-Art-NVs have pH sensitivity and can increase the accumulation of artesunate in tumor sites, thereby effectively enhancing its anti-tumor efficacy.

Key words: artesunate; nanovesicles; pH-sensitive; tissue distribution; antitumor

原发性肝癌主要包括肝细胞癌和肝内胆管癌等类型, 其中肝细胞癌最为常见。因其具有高度异质性及耐药性, 且预后差、复发率高, 已成为临床治疗难度最大的恶性肿瘤之一。目前临床应用的化疗药物不良反应显著, 给患者带来极大痛苦, 因此, 医药工作者正将研究重心转向不良反应较小、药效高的中药活性成分^[1-2]。

青蒿琥酯(Art)是黄花蒿植物的主要活性成分之一^[3], 属于倍半萜内酯类化合物。研究表明, Art可通过影响DNA损伤诱导蛋白45A(GADD45A)及其上游转录因子叉头核相关蛋白1(NACCI)的基因表达抑制, 以及下调HOX反义转录RNA(lncRNA HOTAIR)的表达等途径, 有效抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[4], 是一种具有较高活性的抗肝癌候选药。此外, Art毒性较低^[5], 使用安全性远高于常用化疗药物, 具有较高的开发价值。然而, Art原料药粒度较大, 在水中溶解度仅为 $314.74 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[6-7], 注射后的半衰期仅为 $(0.21 \pm 0.08) \text{ h}$ ^[6], 且在体内易被广泛代谢^[8], 这些因素限制了其在临床上的广泛应用。目前, 关于Art抗肝癌靶向制剂已有脂质体^[9]、pH敏感胶束^[6]等研究报道, 但脂质体中含易氧化的磷脂, 不利于长期储存; 肿瘤部位pH值略低于正常组织^[10], 仅靠pH敏感特性的纳米制剂难以有效实现肿瘤靶向递药^[11-12], 从而限制抗肿瘤药效的提升幅度。因此构建一种处方工艺简单、稳定性高、肿瘤靶向性强的Art新型纳米制剂是非常必要的。

非离子表面活性剂是一种两亲性嵌段共聚物, 在水相中可通过自组装作用形成纳米囊泡(NVs)^[13], 为提高NVs的韧性及稳定性, 需加入一定量的胆固醇。NVs在结构上类似于脂质体, 但其稳定性优于

脂质体^[13-14], 具有更大的临床推广价值。胆固醇琥珀酸单酯(CH)是胆固醇的衍生物, 具有良好的生物相容性, 不仅是一种pH敏感材料, 还具有良好的亲脂性和膜稳定作用^[15-16]。采用CH代替胆固醇制备NVs, 可赋予NVs pH敏感性^[17], 有利于靶向递药。

半乳糖配体能增加肝靶向识别能力, 使药物富集于肝脏病变区, 减少药物在正常组织的分布, 有助于进一步提高肿瘤靶向性^[18]。本研究使用半乳糖硬脂酸酯(Gal)作为半乳糖配体材料, CH作为pH敏感材料来构建半乳糖修饰pH敏感纳米囊泡负载青蒿琥酯(Gal-Art-NVs), 期望通过半乳糖修饰和pH敏感的双靶向作用, 提高Art在肿瘤部位的递药效率。本研究采用Box-Behnken响应面(BBD-RSM)法优化Gal-Art-NVs处方工艺, 并以Art原料药为对照, 比较Gal-Art-NVs体外释药行为、体内组织分布情况及抗肝癌药效, 旨在为Art临床应用提供一种新型制剂。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; H01-1A型磁力搅拌器, 上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司; UMT-500型超声仪, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; BSA224S型电子天平, 赛多利斯仪器有限公司; BeNano 90型粒度分析仪, 丹东百特仪器有限公司; Sorvall ST8R型高速离心机, 美国ThermoFisher Scientific公司; SCTENTZ-10ND型真空冻干机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; RC806D型溶出仪, 天大天发科技有限公司; JEM 2100F型透射电镜(TEM), 日本电子株式会社; XK96A型混匀器, 姜

堰市新康医疗器械有限公司; TL-2010S 型组织匀浆机, 北京鼎昊源科技有限公司。

1.2 材料与试剂

Art 对照品 (批号 B20992, 质量分数 98.5%, 上海源叶生物技术有限公司); Art 原料药 (批号 20220408, 质量分数 98.0%, 浙江贝克诺顿制药有限公司); 失水山梨醇单油酸酯 (S-80, 批号 20190412, 北京金克隆生物技术有限公司); CH (批号 C12811017, 上海麦克林生化科技有限公司); Gal (批号 20241022, 西安瑞禧生物科技有限公司); 乳糖 (批号 202106-1, 江苏星德药用辅料有限公司); 甘露醇 (批号 E257H, 法国 Roquette Freres 公司); 磷酸 (批号 C12747030, 上海麦克林生化科技有限公司); 磷酸二氢钾 (批号 20220516, 国药集团化学试剂有限公司); 青蒿琥酯注射液 (批号 20241023, 桂林南药股份有限公司)。

1.3 细胞与动物

H22 肝癌腹水细胞购自河南省肿瘤研究所。雄性 SD 大鼠 (SPF 级), 体质量 (200±20) g, 购自河南省动物实验中心, 生产许可证号 SCXK (豫) 2020-0001。实验过程遵循郑州健康学院动物伦理委员会相关规定, 伦理批准号 DWLL-2024020。

2 方法与结果

2.1 Gal-Art-NVs 的制备

使用 S-80 和 CH 作为囊材, 乙醇注入法^[14]制备 Gal-Art-NVs。取处方量的 Art、S-80、CH 和 Gal 置于圆底烧瓶, 置于 60 °C 水浴中, 加入 10 mL 乙醇磁力搅拌至溶解澄清, 并缓慢滴至体积为 20 mL、温度为 60 °C 纯化水中, 持续搅拌至无醇味。置于超声波细胞破碎仪上超声 10 min, 补加纯化水至 20 mL, 并置于冰浴中 20 min, 使 Gal-Art-NVs 快速成型, 采用 0.45 μm 微孔滤膜除去不溶性颗粒, 即得 Gal-Art-NVs 混悬液。同法不加 Art, 制备空白纳米囊泡。

2.2 Art 含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用 Agilent SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 检测波长 210 nm; 柱温 35 °C; 流动相为乙腈-pH 3.0 磷酸盐缓冲液 (65:35); 进样量 20 μL; 体积流量 1 mL·min⁻¹。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密取 Gal-Art-NVs 混悬液 1 mL 至 50 mL 量瓶中, 加 30 mL 乙腈超声 5 min 破坏 Gal-Art-NVs, 加流动相稀释定容。精密取 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释定容, 即

得 Gal-Art-NVs 供试品溶液。同法制备空白纳米囊泡供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 精密称取 Art 对照品, 采用乙腈稀释至质量浓度为 50.00 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液。采用流动相分别配制质量浓度为 10.00、5.00、1.00、0.50、0.25、0.05 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 并按“2.2.1”项下条件进行测定。以 Art 质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 拟合得方程为 $Y=406.15 X-20.58$, $r=0.999 9$, 线性范围 0.05~10.00 μg·mL⁻¹。

2.2.4 专属性考察 取 Art 对照品、Gal-Art-NVs 供试品及空白纳米囊泡溶液, 按“2.2.1”项下方法进行检测, 见图 1, 对 Art 色谱峰无干扰, 表明该方法专属性良好。

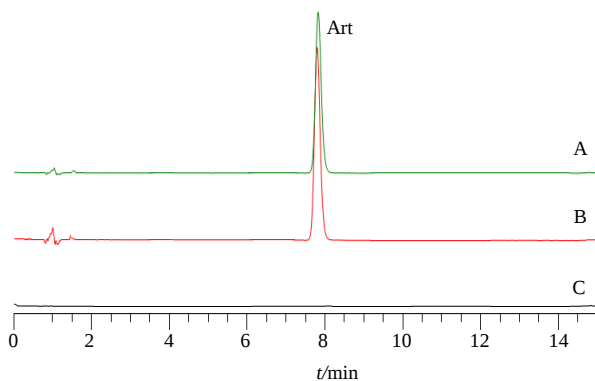


图 1 Gal-Art-NVs 样品(A)、Art 对照品 (B)、空白纳米囊泡 (C) 溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of Gal-Art-NVs sample (A), Art reference substance (B) and blank NVs (C) solution

2.2.5 精密度考察 取 0.05、1.00、10.00 μg·mL⁻¹ 的 Art 对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续检测 6 次, Art 峰面积 RSD 分别为 0.36%、0.40%、0.24% ($n=6$), 表明精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 Gal-Art-NVs 供试品溶液分别于 0、3、6、9、12、24 h 检测, Art 峰面积 RSD 为 1.69% ($n=6$), 表明供试品溶液稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取 Gal-Art-NVs 混悬液按“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 测得 Art 质量浓度 RSD 为 1.45% ($n=6$), 表明重复性良好。

2.2.8 回收率考察 精密吸取 Gal-Art-NVs 混悬液 0.5 mL 至 50 mL 量瓶中, 共 9 份, 分成低、中、高 3 组。按 Art 含量 80%、100%和 120%分别加入对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 并测定 Art 总含量, 计算得加样回收率分别为 101.27%、

98.43%、99.62%，RSD 分别为 1.12%、1.80%、0.74%，表明该方法准确度高。

2.3 包封率、载药量、粒径、多分散指数（PDI）及 ζ 电位的测定

取 Gal-Art-NVs 混悬液，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，精密取 1 mL 续滤液至超滤管中（截留相对分子质量 8 000），于 4 ℃以 8 500 r·min⁻¹ 离心 10 min，测定外管滤液中游离 Art 质量（*M*₁）。精密取 Gal-Art-NVs 混悬液 1 mL，测定总 Art 质量（*M*），计算包封率及载药量。

$$\text{包封率} = (M - M_1) / M$$

$$\text{载药量} = (M - M_1) / M_0$$

*M*₀ 代表 Art、CH、S-80 和 Gal 的总质量

取 Gal-Art-NVs 混悬液 0.1 mL 滴至含有 4 mL 纯化水的离心管中，混匀，取适量至比色皿中，测定粒径及 PDI；另取适量 Gal-Art-NVs 混悬液至电槽中，测定 ζ 电位。

2.4 单因素考察 Gal-Art-NVs 处方工艺

2.4.1 Art 质量浓度考察 固定 S-80 与 CH 用量比为 2.0：1.0，囊材与 Art 用量比为 20：1，Gal 占囊材质量 8%，按“2.1”项方法制备 Gal-Art-NVs，考察 Art 质量浓度对包封率、载药量和粒径的影响，结果见表 1。

表 1 Art 质量浓度考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Investigation of Art concentration ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Art 质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
0.6	83.28±1.37	3.77±0.05	256.55±4.00
0.8	84.44±1.30	3.81±0.07	229.76±7.48
1.0	82.42±1.98	3.77±0.06	183.39±5.79
1.2	78.45±1.24	3.57±0.09	171.89±7.31
1.4	74.13±1.48	3.34±0.07	171.81±7.65

当 Art 质量浓度低于 1.0 mg·mL⁻¹ 时，Gal-Art-NVs 包封率均大于 80%，当 Art 质量浓度超过 1.2 mg·mL⁻¹ 时，Gal-Art-NVs 包封率出现明显下降（低于 80%），表明囊材对 Art 的包载作用是有限的，同时也影响了载药量。Art 质量浓度大于 0.8 mg·mL⁻¹ 时，粒径大于 200 nm，可能是 Art 质量浓度过大时体系的水相体积较小，导致 Gal-Art-NVs 之间容易融合、聚集^[3]，从而使粒径较大。因此 Art 质量浓度对 Gal-Art-NVs 影响较大，由于 Art 质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 时包封率大于 80%，载药量相对较大，且粒径小于 200 nm，故后续以 1.0 mg·mL⁻¹ 为中心对 Art 质量浓度 0.8～

1.2 mg·mL⁻¹ 进行优化。

2.4.2 S-80 与 CH 用量比考察 固定 Art 质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹，囊材与 Art 用量比为 20：1，Gal 占囊材质量 8%，按“2.1”项方法制备 Gal-Art-NVs，考察 S-80 与 CH 用量比对包封率、载药量和粒径的影响，结果见表 2。

表 2 S-80 与 CH 用量比考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Investigation of S-80 to CH ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

S-80 与 CH 用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
1.0：1.0	72.97±1.52	3.39±0.08	242.70±3.95
1.5：1.0	78.26±0.68	3.74±0.08	219.36±7.71
2.0：1.0	84.28±1.25	3.98±0.07	188.97±6.72
2.5：1.0	77.61±0.87	3.62±0.08	201.51±12.98
3.0：1.0	73.38±0.82	3.34±0.05	215.64±9.50

随着 S-80 与 CH 用量比的增加，Gal-Art-NVs 包封率和载药量呈先增加后下降趋势，而粒径呈先变小后增长趋势，可能是适当的 S-80 与 CH 用量比利于包载药物，使 Gal-Art-NVs 结构致密^[17]。因此 S-80 与 CH 用量比对 Gal-Art-NVs 影响较大，当用量比为 2.0：1.0 时包封率和载药量相对较高，且粒径小于 200 nm，后续以 2.0：1.0 为中心对 S-80 与 CH 用量比 1.5：1.0～2.5：1.0 进行优化。

2.4.3 囊材与 Art 用量比考察 固定 Art 质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹，S-80 与 CH 用量比 2.0：1.0，Gal 占囊材质量 8%，按“2.1”项方法制备 Gal-Art-NVs，考察囊材与 Art 用量比对包封率、载药量和粒径的影响，结果见表 3。

表 3 囊材与 Art 用量比考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Investigation of vesicles material to Art ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

囊材与 Art 用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
10：1	64.26±1.23	6.17±0.04	255.66±6.15
15：1	78.15±1.64	4.74±0.08	230.16±6.71
20：1	84.36±0.98	4.00±0.08	187.75±11.18
25：1	82.88±1.09	3.16±0.06	176.86±6.44
30：1	86.31±0.73	2.81±0.04	172.65±8.00

随着囊材与 Art 用量比的增加，Gal-Art-NVs 包封率总体呈增加趋势，而载药量逐渐下降、粒径逐渐变小。因此囊材与 Art 用量比对 Gal-Art-NVs 影响较大，由于囊材与 Art 用量比为 20：1 时包封率大于 80%，粒径小于 200 nm，为兼顾载药量故以

20 : 1 为中心对囊材与 Art 用量比 15 : 1~25 : 1 进行优化。

2.4.4 Gal 用量占囊材百分比考察 固定 Art 质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹, S-80 与 CH 用量比 2.0 : 1.0, 囊材与 Art 用量比 20 : 1, 按“2.1”项方法制备 Gal-Art-NVs, 考察 Gal 用量占囊材质量比对包封率、载药量和粒径的影响, 结果见表 4。

表 4 Gal 用量占总囊材百分比考察 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 4 Investigation of Gal amounts in total vesicles material percentage ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Gal 用量占囊材比/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
4	85.58±0.60	4.01±0.09	188.31±5.23
6	82.81±0.95	3.95±0.06	182.28±4.52
8	83.64±0.43	3.95±0.15	186.35±5.91
10	77.79±1.06	3.80±0.06	210.91±5.81
12	71.95±0.64	3.63±0.08	227.11±8.26

Gal 用量占囊材质量百分比小于 8%时, Gal-Art-NVs 包封率均大于 80%, 且粒径小于 200 nm, 根据《中国药典》2020 年版四部 9014 微粒制剂指导原则的要求 (包封率不低于 80%), 同时考虑到 Gal-Art-NVs 肝靶向需求, 期望 Gal 用量越大越好,

故最终确定 Gal 用量为囊材质量的 8%, 以同时满足 Gal-Art-NVs 包封率和肝靶向需求。

2.5 BBD-RSM 法优化 Gal-Art-NVs 处方工艺

2.5.1 实验方案设计及结果 根据《中国药典》2020 年版四部 9014 微粒制剂指导原则规定, 微粒制剂包封率不得低于 80%。可见包封率对纳米制剂的重要性, 直接关系着纳米制剂的安全性、有效性, 因此选择包封率作为优化指标。在单因素实验的基础上, 选择 Art 质量浓度 (X_1)、S-80 与 CH 用量比 (X_2)、囊材与 Art 用量比 (X_3) 作为 Gal-Art-NVs 主要影响因素, 包封率 (Y) 作为评价指标, 根据 BBD-RSM 进行 3 因素 3 水平, 共计 17 次实验, 设计方案及结果见表 5。

应用 Design Expert V10.0 软件, 对表 5 中 17 组实验数据进行拟合, 得拟合方程为: $Y=84.54-0.94 X_1-1.07 X_2+1.32 X_3-0.42 X_1 X_2-0.78 X_1 X_3-0.18 X_2 X_3-4.80 X_1^2-3.56 X_2^2-4.70 X_3^2$, 决定系数 $R^2=0.9778$, 校正系数 $R_{adj}^2=0.9493$, 两者均大于 0.9, 表明预测结果可信度较高。方差分析见表 6, 数学模型 $P<0.0001$, 表明建立的数学模型具有极显著性意义; 失拟项 $P=0.8074$, 表明干扰因素无显著性意义 ($P>0.05$), 对预测结果影响较小。二次多

表 5 BBD-RSM 因素水平、实验方案设计与结果
Table 5 Factor levels, design and results of BBD-RSM

序号	X_1 /(mg·mL ⁻¹)	X_2	X_3	Y/%	序号	X_1 /(mg·mL ⁻¹)	X_2	X_3	Y/%
1	0.8(-1)	2.0 : 1.0(0)	15 : 1(-1)	74.17	10	1.0	2.5 : 1.0	15 : 1	74.30
2	1.0(0)	2.5 : 1.0(1)	25 : 1(1)	76.83	11	1.0	2.0 : 1.0	20 : 1	83.53
3	1.2(1)	2.0 : 1.0	15 : 1	73.52	12	0.8	1.5 : 1.0	20 : 1	77.97
4	1.2	2.0 : 1.0	25 : 1	74.36	13	1.0	1.5 : 1.0	25 : 1	78.62
5	1.0	2.0 : 1.0	20 : 1(0)	84.19	14	1.0	2.0 : 1.0	20 : 1	85.87
6	0.8	2.0 : 10.	25 : 1	78.14	15	1.0	2.0 : 1.0	20 : 1	83.41
7	0.8	2.5 : 10.	20 : 1	75.94	16	1.2	2.5 : 1.0	20 : 1	73.56
8	1.2	1.5 : 1.0(-1)	20 : 1	77.26	17	1.0	1.5 : 1.0	15 : 1	75.38
9	1.0	2.0 : 1.0	20 : 1	85.71					

表 6 回归模型方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis of regression model

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	304.76	9	33.86	34.26	<0.000 1	X_1^2	96.90	1	96.90	98.03	<0.000 1
X_1	7.07	1	7.07	7.15	0.031 8	X_2^2	53.43	1	53.43	54.05	0.000 2
X_2	9.25	1	9.25	9.35	0.018 4	X_3^2	92.91	1	92.91	93.98	<0.000 1
X_3	13.99	1	13.99	14.16	0.007 1	残差	6.92	7	0.99		
$X_1 X_2$	0.70	1	0.70	0.71	0.428 7	失拟项	1.36	3	0.45	0.33	0.807 4
$X_1 X_3$	2.45	1	2.45	2.48	0.159 5	纯偏差	5.56	4	1.39		
$X_2 X_3$	0.13	1	0.13	0.13	0.731 6	总离差	311.68	16			

元方程中 X_1 、 X_2 具有显著性差异 ($P < 0.05$), X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 具有极显著差异 ($P < 0.01$), 根据 F 值判断各因素对包封率影响的顺序为 $X_3 > X_2 > X_1$ 。

应用 Design Expert V10.0 软件绘制自变量对因变量的三维响应面图。结果如图 2 所示, 包封率均

随着 2 因素的增加呈先增加后减小趋势。设置包封率最大值作为优化目标, 得 Gal-Art-NVs 最佳处方工艺为: Art 质量浓度为 $0.98 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, S-80 与 CH 用量比为 1.93 : 1.00, 囊材与 Art 用量比为 20.77 : 1.00, 预测最高包封率为 86.92%。

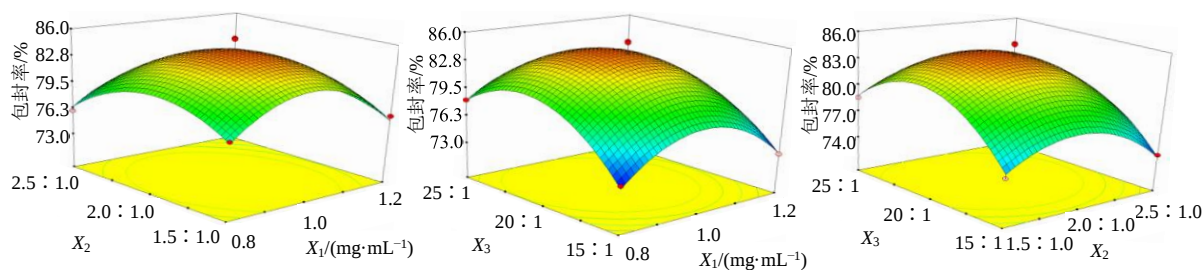


图 2 各因素对包封率的影响

Fig. 2 Effect of various factors on encapsulation efficiency

2.5.2 最佳处方工艺验证 制备 3 批 Gal-Art-NVs, 测得 Gal-Art-NVs 平均包封率为 $(85.68 \pm 1.07) \%$, 根据预测包封率 (86.92%), 计算相对偏差 (RE) 为 -1.43% , 证明建立的包封率数学模型适用于 Gal-Art-NVs 处方工艺研究。测得 Gal-Art-NVs 载药量为 $(3.91 \pm 0.14) \%$, 粒径为 $183.76 \pm 7.60 \text{ nm}$, PDI 为 0.103 ± 0.015 , ζ 电位为 $(-26.79 \pm 1.04) \text{ mV}$ 。粒径分布和 ζ 电位分别见图 3-A、B。

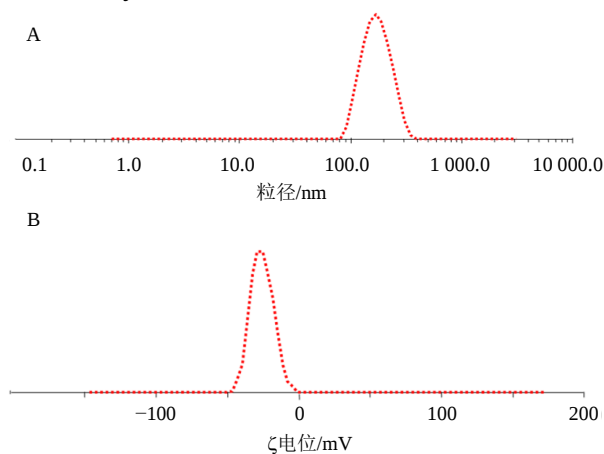


图 3 Gal-Art-NVs 的粒径 (A) 及 ζ 电位 (B)

Fig. 3 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of Gal-Art-NVs

2.6 TEM 观察

取 Gal-Art-NVs 混悬液滴加至铜网上, 铺展均匀, 加 1.5% 磷钨酸钠染色, 置 45°C 真空干燥箱中进行干燥, 采用高反差模式, 80.0 kV 加速电压, 放大倍数为 50 000。结果见图 4, Gal-Art-NVs 外观呈类圆形囊泡结构。

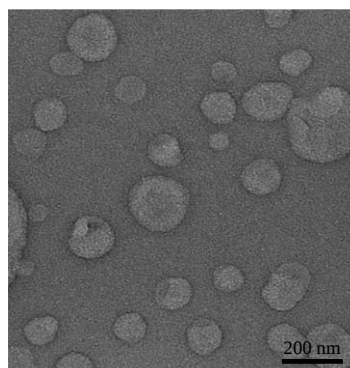


图 4 Gal-Art-NVs 的 TEM 图

Fig. 4 TEM images of Gal-Art-NVs

2.7 Gal-Art-NVs 冻干粉制备

取 Gal-Art-NVs 混悬液加入 4% 冻干保护剂 (乳糖: 甘露醇 = 1 : 1) 震荡溶解, 以每瓶 2 mL 分装至西林瓶中 (未封口), -50°C 预冻 3 d, 立即于 -40°C 冷冻干燥机中 (真空度 0.3 MPa) 放置 2 d, 即得 Gal-Art-NVs 冻干粉, 并立即密封保存。Gal-Art-NVs 冻干粉及注射用水复溶后外观分别见图 5。Gal-Art-



图 5 Gal-Art-NVs 冻干粉 (A) 及注射水复溶后 (B) 外观
Fig. 5 Appearance of Gal-Art-NVs lyophilized powder (A) and redissolution with injection water (B)

NVs 冻干粉复溶后包封率为 $(84.06 \pm 1.02)\%$ ，粒径 (190.22 ± 6.41) nm，PDI 值 0.111 ± 0.010 ， ζ 电位 (-25.10 ± 0.84) mV。

2.8 Gal-Art-NVs 体外释药行为研究

取 Art 原料药和 Gal-Art-NVs 冻干粉 (Art 含量均为 20 mg)，分别置于透析袋 (截留相对分子质量 8 000~12 000)，各加入 pH 5.0 磷酸盐缓冲液 5 mL，两端用尼龙绳扎紧后置于转篮中。取 pH 5.0 磷酸盐缓冲液 1 000 mL 作为介质，在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、转速为 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下进行实验，分别于 0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、9.0、12.0 h 取样 5 mL，并补 5 mL 空白介质。样品经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过，测定含量；同法测定 Art 和 Gal-Art-NVs 冻干粉在 pH 5.5、6.5、7.4 磷

酸盐缓冲液中释药情况。结果显示，Art 在 pH 5.0、5.5 磷酸盐缓冲液中溶解度较差^[7]，因此释药速率和累积释放率均较低；而其在 pH 6.5、7.4 磷酸盐缓冲液溶解度高于 pH 5.0、5.5 条件^[7]，故释药速率和累积释放率相对较高 (图 6-A)。Gal-Art-NVs 极大改变了 Art 的释药行为，在 pH 5.0、5.5 条件下，其释药速率和累积释放率均明显提高 (图 6-B)，这主要与 Gal-Art-NVs 处方中引入的 pH 敏感材料 CH 有关：该材料在酸性环境中极不稳定，会导致 Gal-Art-NVs 结构破坏^[17]，从而利于 Art 在肿瘤微酸性环境中快速释药并发挥药效。此外，Gal-Art-NVs 在一定程度上降低了 Art 在 pH 6.5、7.4 磷酸盐缓冲液中释药速率和释放率，有利于减少不良反应。

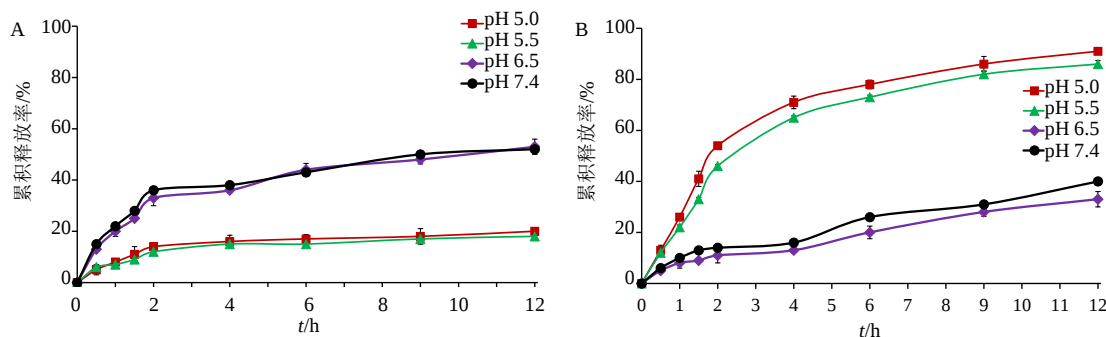


图 6 Art (A) 和 Gal-Art-NVs (B) 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 6 *In vitro* release curve of Art (A) and Gal-Art-NVs (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.9 Gal-Art-NVs 渗漏率及稳定性考察

2.9.1 Gal-Art-NVs 渗漏率的测定 取 Gal-Art-NVs 混悬液按“2.2.2”项下测定 Art 总含量 (M_0)。将 Gal-Art-NVs 混悬液按“2.8”项下方法制成冻干粉，加入纯化水复溶，经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过，除去析出的 Art，测定续滤液中 Art 含量 (M_i)，计算 Gal-Art-NVs 渗漏率^[19]。

$$\text{渗漏率} = (M_0 - M_i) / M_0$$

2.9.2 稳定性考察 取 Gal-Art-NVs 冻干粉 (密封于西林瓶中)，置于湿度为 75%、温度为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温恒湿箱，分别于 0、1、2、3、6 个月取样分别测

定渗漏率、包封率、粒径及 ζ 电位，结果见表 7。

Gal-Art-NVs 冻干粉渗漏率逐渐增加，包封率有下降趋势，但第 6 个月渗漏率仍小于 2.0%，包封率仍大于 80%；复溶后粒径呈增长趋势，第 6 个月平均粒径仍小于 200 nm； ζ 电位有一定波动，但无明显改变，说明 Gal-Art-NVs 冻干粉储存稳定性良好。可能是由于 Gal-Art-NVs 处方中 CH 具有稳定囊泡结构的作用^[16]，提高了韧性；Gal-Art-NVs 表面有半乳糖基修饰层，提供了较大的空间位阻^[17]，利于阻止囊泡之间相互融合；将 Gal-Art-NVs 混悬液制成冻干粉，避免了水相对囊泡结构的破坏，最终

表 7 Gal-Art-NVs 冻干粉稳定性考察 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 7 Stability study of lyophilized powder of Gal-Art-NVs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

时间/月	渗漏率/%	包封率/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
0	1.09 ± 0.05	84.11 ± 1.04	194.80 ± 5.43	-25.15 ± 1.28
1	1.17 ± 0.07	83.79 ± 0.92	192.46 ± 7.73	-24.86 ± 0.97
2	1.30 ± 0.12	83.82 ± 0.85	189.58 ± 6.58	-24.57 ± 1.11
3	1.67 ± 0.09	82.46 ± 1.12	196.73 ± 5.81	-25.00 ± 1.38
6	1.89 ± 0.18	82.25 ± 1.24	195.27 ± 8.08	-24.83 ± 0.76

使 Gal-Art-NVs 冻干粉稳定性得到极大提高。

2.10 组织分布研究

2.10.1 H22 肝癌模型的建立^[18] 取雄性 SD 大鼠，ip 水合氯醛溶液 ($3 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$)，麻醉后取仰卧位，剔除大鼠剑突下沿腹部的体毛，安尔碘液消毒，沿腹白线做约 2 cm 切口，逐渐剥离肌肉层，暴露腹腔；轻压腹腔使肝脏上浮，于肝叶内注射 H22 肝癌腹水 $50 \mu\text{L}$ 。采用连续缝合法缝合肌肉层，独立缝合法缝合皮肤层，用青霉素钠 ($8 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对手术部位及周围进行消毒。大鼠苏醒后正常饲养，术后 2 d ip 0.5 mL 青霉素钠 ($8 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)，以预防感染。1 周后选择瘤体体积大于 180 mm^3 荷瘤大鼠进行后续实验。

2.10.2 实验分组 将 72 只荷瘤大鼠随机分为 Art 注射液组和 Gal-Art-NVs 组，给药前禁食 12 h，期间自由饮水。按 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量^[6]经尾 iv 给药，分别于给药后 0.17、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00 h ip 水合氯醛溶液麻醉，随即采用脱颈法处死大鼠，迅速摘取心、肝、脾、肺、肾、脑和肿瘤组织，冷冻保存。

2.10.3 组织样品溶液的制备 取心、肝、脾、肺、肾、脑和肿瘤组织，0.9%氯化钠溶液洗净后称质量，加入等量的 0.9%氯化钠溶液，用匀浆机匀浆。精密吸取匀浆液 $200 \mu\text{L}$ 置于离心管中，加入 1 mL 乙腈后密封，涡旋 5 min， $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液于 35°C 温度下经氮气吹干，加入 $100 \mu\text{L}$ 乙腈复溶残渣，再以 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，即得。

2.10.4 线性关系考察 取健康大鼠 ip 水合氯醛溶液麻醉，随即采用脱颈法处死大鼠，迅速摘取心、

肝、脾、肺、肾和脑组织（肿瘤组织用肝代替），将各个空白组织样品按“2.10.3”项下处理，并分别加入 Art 对照品，配制成 0.1 、 0.5 、 2.0 、 5.0 、 10.0 和 $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件测定各个质量浓度 (X) 的峰面积 (Y)，拟合得心、肝、脾、肺、肾、脑和肿瘤组织对照品溶液方程分别为 $Y_1 = 397.68 X_1 + 23.16$ ($r = 0.9956$)、 $Y_2 = 401.89 X_2 - 18.95$ ($r = 0.9968$)、 $Y_3 = 428.84 X_3 - 32.42$ ($r = 0.9942$)、 $Y_4 = 432.21 X_4 - 66.11$ ($r = 0.9970$)、 $Y_5 = 416.95 X_5 - 58.47$ ($r = 0.9982$)、 $Y_6 = 421.05 X_6 - 99.53$ ($r = 0.9975$) 和 $Y_7 = 409.37 X_7 - 93.68$ ($r = 0.9964$)，线性范围 $0.1 \sim 20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.10.5 专属性考察 分别取各个组织的空白样品、待测样品和 Art 对照品溶液分别按“2.10.3”项下处理，按“2.2.1”项下色谱条件检测，色谱图见图 7，组织器官的内源性杂质未对 Art 色谱峰产生干扰，专属性良好。

2.10.6 稳定性考察 取 Art 质量浓度为 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的心、肝、脾、肺、肾、脑和肿瘤组织质控样品，置于 -20°C 冰箱中储存，分别于 0、1、2、3、5、7 d 取样，按“2.10.3”方法处理，按“2.2.1”方法测定。结果显示，各组织样品中 Art 质量浓度的 RSD 依次为 3.26%、4.11%、2.59%、4.05%、3.79%、5.12%、5.49% ($n = 6$)，表明上述质控样品在 -20°C 条件下储存 7 d 内稳定性良好。另取 Art 质量浓度为 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的心、肝、脾、肺、肾、脑和肿瘤组织质控样品，按“2.10.3”方法处理，将质控样品溶液置于室温条件下，于 0、3、6、12、15、24 h 按“2.2.1”方法测定。结果显示，各溶液中 Art 质量浓

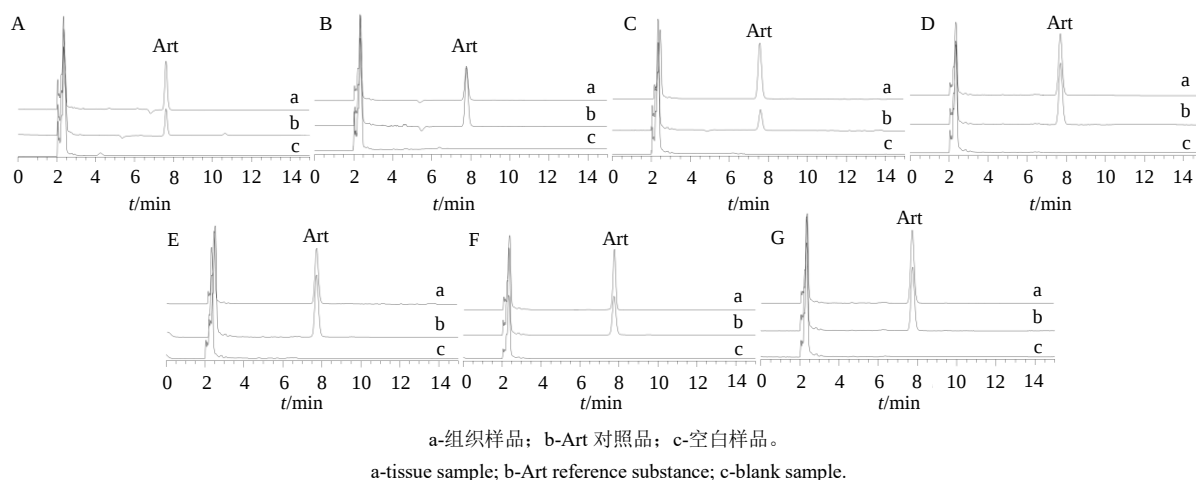


图 7 心 (A)、肝 (B)、脾 (C)、肺 (D)、肾 (E)、脑 (F) 和肿瘤组织 (G) 的 HPLC 色谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms of heart (A), liver (B), spleen (C), lung (D), kidney (E), brain (F) and tumor tissue (G)

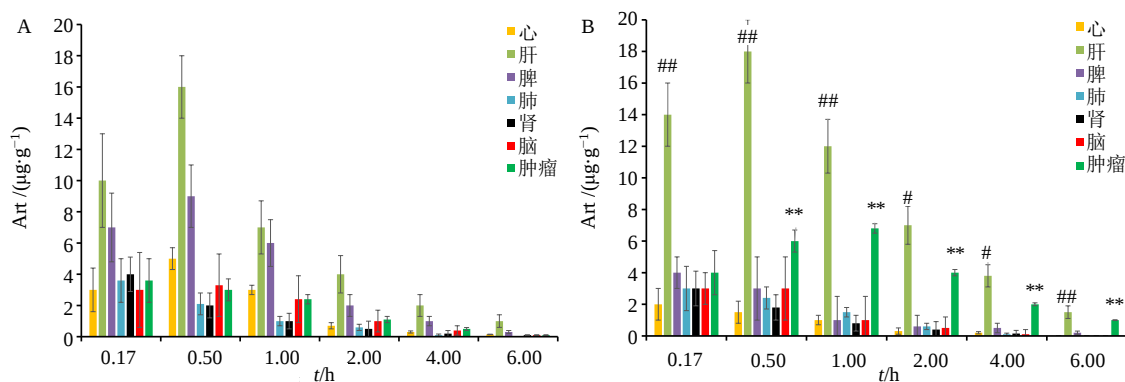
度的 RSD 依次为 6.04%、3.85%、6.07%、4.26%、5.28%、4.99%、3.80% ($n=6$)，表明组织样品溶液在室温条件下放置 24 h 内基本稳定。

2.10.7 精密度和准确度考察 分别取 Art 质量浓度为 0.1、2.0、20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的心、肝、脾、肺、肾、脑和肿瘤组织质控样品，分别按“2.10.3”方法处理后同 1 d 内连续测定 6 次，计算日内精密度的 RSD 值，代入随行标准曲线计算 Art 质量浓度，将测得质量浓度与实际质量浓度相比计算 RE。连续测定 6 d，计算日间精密度的 RSD 值和 RE。结果表明，日内、日间精密度良好 ($\text{RSD}<8\%$)，且准确度较高 (RE 绝对值 $<8\%$)。

2.10.8 加样回收率考察 取心、肝、脾、肺、肾、脑和肿瘤组织的空白组织样品，按“2.10.3”项下处理，加入 Art 对照品，分别配制成质量浓度为 0.1、2.0、20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，各浓度均 3 份，进样测定。另取质量浓度为 0.1、2.0、20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Art 对照品溶液，同一条件下进行测定。将测得样品溶液峰面积

与 Art 对照品溶液峰面积对比，计算回收率。结果表明，各质量浓度平均回收率为 98.46%~104.25%，RSD 小于 6%，因此该法准确度良好，可用于组织中 Art 的含量测定。

2.10.9 体内组织分布结果 Art 注射液和 Gal-Art-NVs 在各组织中不同时间点的 Art 浓度测定结果分别见图 8-A 和图 8-B，结果显示，与 Art 注射剂相比，尾 iv 给予 Gal-Art-NVs 0.17 h 后，各时间点肝脏中 Art 质量浓度均显著升高 ($P<0.05$ 、0.01)；尾 iv 给予 Gal-Art-NVs 0.50 h 后，各时间点肿瘤组织中 Art 质量浓度均显著升高 ($P<0.01$)。采用相对摄取率 (RUE) 和峰浓度比值 (Ce) 评价 Gal-Art-NVs 肿瘤靶向性，RUE 和 Ce 值越大表示靶向性越强^[20]。结果见表 8，Gal-Art-NVs 在肝部位及肿瘤组织的 RUE 和 Ce 值均大于 1.0，证明 Gal-Art-NVs 能明显增加肝部位及肿瘤组织的药物蓄积量，有助于增加 Art 抗肿瘤药效，并降低对其他组织器官的毒性。



与 Art 注射剂肿瘤组织中药物浓度比较：** $P<0.01$ ；与 Art 注射剂肝脏中药物浓度比较：# $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。
** $P<0.01$ vs drug concentration in tumor tissue of Art injection; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs drug concentration in liver of Art injection.

图 8 Art 注射剂 (A) 和 Gal-Art-NVs (B) 在荷瘤大鼠体内组织分布 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Fig. 8 Distribution of Art injection (A) and Gal-Art-NVs (B) in tumor-bearing rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

表 8 靶向性参数 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 8 Targeting parameter ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组织	AUC/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$)		RUE	C _{max} /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		Ce
	Art 注射剂	Gal-Art-NVs		Art 注射剂	Gal-Art-NVs	
心	4.31±0.99	2.24±0.43	0.52	5.06±1.01	1.95±0.40	0.39
肝	20.46±3.71	29.06±5.01	1.42	16.11±3.32	18.16±3.11	1.13
脾	14.19±3.24	8.26±1.16	0.58	8.94±1.87	3.92±0.74	0.44
肺	3.32±0.55	3.02±0.72	0.91	3.62±0.60	3.17±0.47	0.88
肾	4.49±0.68	3.15±0.49	0.70	4.07±0.57	3.54±0.52	0.87
脑	3.77±0.43	3.59±0.53	0.95	3.85±0.77	3.66±0.63	0.95
肿瘤	6.39±1.19	19.27±3.69	3.02	3.64±0.59	7.09±1.46	1.95

$RUE = AUC(\text{Gal-Art-NVs}) / AUC(\text{Art 注射液})$

$C_e = C_{\max}(\text{Gal-Art-NVs}) / C_{\max}(\text{Art 注射液})$

AUC 为药时曲线下面积, $C_{\max}$ 为峰浓度

2.11 体内抗肿瘤实验

2.11.1 实验方案 将 30 只荷瘤大鼠随机分成模型组 (0.9%氯化钠溶液)、环磷酰胺组 (阳性药, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) [6]、Art ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、Gal-Art-NVs 低、高剂量 (15 、 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组。每 3 天给药 1 次, 共 5 次, 末次给药 3 d 后 ip 水合氯醛溶液, 并脱颈处死荷瘤大鼠, 取出瘤体, 采用滤纸吸干表面水分后称质量, 计算抑瘤率。

抑瘤率 = $1 - \text{给药组平均瘤质量} / \text{模型对照组平均瘤质量}$

2.11.2 实验结果 瘤体外观见图 9, 肿瘤体积变化见图 10, 抑瘤率结果见表 9。模型组肿瘤体积增长较快, 最终肿瘤体积达 $(3\,429.75 \pm 546.30) \text{ mm}^3$ 。Art 组表现出一定的抑瘤作用[4], 但由于溶解度、溶出度等缺陷限制了药效[6]。与 Art 组相比, Gal-Art-NVs 低剂量组肿瘤体积和肿瘤质量均无显著性差异 ($P > 0.05$); Gal-Art-NVs 高剂量组和环磷酰胺组肿瘤体积均具有极显著性下降 ($P < 0.01$), 可见 Gal-Art-NVs 极大提高了 Art 抗肿瘤药效。与模型组相比, 环磷酰胺组荷瘤大鼠体质量极显著性下降 ($P < 0.01$), 这与环磷酰胺具有较大的不良反应有关; 而 Art 及其 Gal-Art-NVs 低、高剂量组体质量未见明显

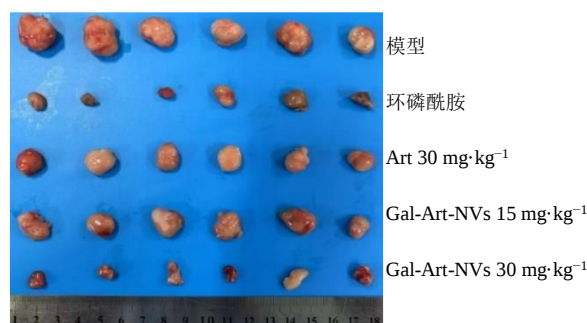
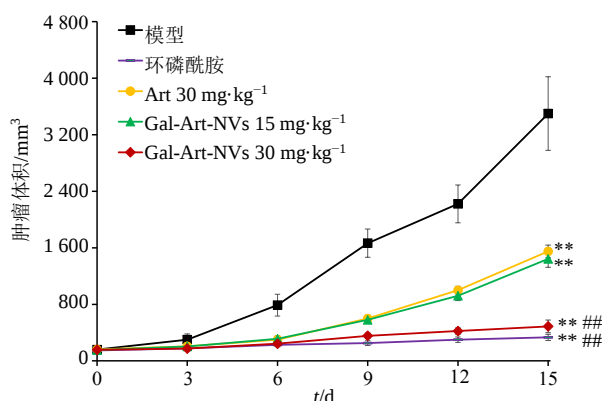


图 9 荷瘤大鼠的瘤体外观

Fig. 9 Tumor appearance of tumor-bearing rats



与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与 Art 组比较: ### $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs model group; ### $P < 0.01$ vs Art group.

图 10 荷瘤大鼠肿瘤体积变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 10 Tumor volume change of tumor-bearing rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 9 体内抑瘤率结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

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

分组	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	瘤质量/g	抑瘤率/%	体质量/g
模型	—	0.95 ± 0.26	—	35.84 ± 2.28
环磷酰胺	20	$0.27 \pm 0.15^{***}$	71.58	$25.69 \pm 2.67^{**}$
Art	30	$0.61 \pm 0.17^*$	35.79	36.02 ± 1.74
Gal-Art-NVs	15	$0.65 \pm 0.20^*$	31.58	34.75 ± 2.11
	30	$0.34 \pm 0.12^{***}$	64.21	33.90 ± 2.34

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 Art 组比较: ### $P < 0.01$ 。

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

下降 ($P > 0.05$), 说明 Art 和 Gal-Art-NVs 减轻体质量的不良反应比环磷酰胺低。此外, Gal-Art-NVs 低、高剂量组与环磷酰胺组的肿瘤体积及肿瘤质量均无显著性差异 ($P > 0.05$), 提示两组在抗肿瘤药效方面具有相当的作用强度。

2.12 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 34.0 软件进行数据处理分析, 两组间比较使用独立样本 t 检验, $P <$

0.05 时判定组间存在显著性差异。

3 讨论

非离子表面活性剂的亲水亲油平衡值 (HLB) 在 4~7 时易于形成纳米囊泡[21], S-80、60、40 的 HLB 值均在这个区间, 但由于 S-80 的不饱和长链最长, 有助于提高 Gal-Art-NVs 包封率[13,17], 故将 S-80 选为 Gal-Art-NVs 囊材。薄膜分散法制备 Gal-Art-NVs 时 S-80 易形成干燥薄膜, 难以充分水化,

导致包封率较低,说明薄膜分散法不适合制备 Gal-Art-NVs,故本研究最终采用乙醇注入法制备 Gal-Art-NVs^[22]。前期曾将包封率、载药量和粒径一同纳入 BBD-RSM 法优化指标,但优化后 Gal-Art-NVs 最佳处方包封率低于 80%。本研究为确保 Gal-Art-NVs 包封率符合《中国药典》2020 年版对微粒制剂包封率的要求,故在 BBD-RSM 优化中仅将包封率作为指标筛选 Gal-Art-NVs^[23]最优处方,其冻干粉在加速条件下放置 6 个月后包封率仍大于 80%。

不同介质中释药结果显示, Gal-Art-NVs 改变了 Art 释药行为,极大提高了 Art 在 pH 5.0、5.5 释药速率和累积释放率,可能是 Gal-Art-NVs 极大降低了 Art 粒度,使之转变为纳米级别,利于增加 Art 释药速率和释放率; Gal-Art-NVs 处方中含有 pH 敏感材料,在弱酸性介质中 Gal-Art-NVs 结构易遭到破坏,利于 Art 在弱酸性环境中快速释药,从而使累积释放率得到明显提高。Gal-Art-NVs 在弱碱性介质中稳定性较高,在 Gal-Art-NVs 囊材的阻滞作用下利于降低 Art 在正常组织中释药,从而降低不良反应并提高药效。

一般认为中药抑瘤率大于 30%时具有抗肿瘤活性^[24],预试验考察发现 Art 注射剂量为 30 mg·kg⁻¹ 时抑瘤率大于 30%,结合文献报道^[6],此剂量安全性较高,故选择 30 mg·kg⁻¹ 剂量进行体内研究。金美华等^[9]构建了 Art 脂质体,并考察了体内裸鼠皮下移植瘤的抑制作用(给药剂量为 45 mg·kg⁻¹),结果显示 Art 脂质体对肝癌抑瘤率仅 32.70%。陈永顺等^[6]构建了 pH 值敏感型 Art 纳米制剂,给药剂量为 30 mg·kg⁻¹ 时体内抑瘤率为 54.05%,抑瘤率仍低于 60%,说明普通纳米制剂或仅依靠 pH 敏感特性的纳米制剂不能有效提高 Art 抗肿瘤药效。周奕等研究显示^[10],半乳糖修饰/pH 敏感双修饰纳米制剂抑瘤率药效远大于仅半乳糖修饰纳米制剂,说明半乳糖修饰/pH 敏感双修饰策略是非常必要的。基于此,本研究构建了 Gal-Art-NVs,在给药剂量为 30 mg·kg⁻¹ 条件下将 Art 的抑瘤率由 35.79%提高至 64.21%,明显高于相关报道^[6,9]。可能与 Gal-Art-NVs 处方中 CH 引起的 pH 敏感性^[25]、Gal 诱导的肝靶向等因素有关^[17-18],且 Gal-Art-NVs 组荷瘤大鼠体质量未见明显下降,表明 Gal-Art-NVs 毒性作用较低,推广价值较高。

综上所述,本研究采用 BBD-RSM 法筛选了 Gal-Art-NVs 最佳处方工艺,工艺重复性良好。Gal-

Art-NVs 显著增加了 Art 在酸性介质中的释药速率和释放率,在碱性介质中释放率未见明显增加,具有明显的 pH 值响应特征。Gal-Art-NVs 冻干粉储存稳定性高,注射给药后提高了 Art 肿瘤组织中的蓄积浓度,在其他组织中浓度有所下降,利于提高抗肿瘤药效、降低不良反应等。本研究也为评价 Gal-Art-NVs 成药性提供了依据。

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] 徐瑞雪,王宇.中药有效成分逆转肝癌顺铂耐药机制的研究进展[J].现代药物与临床,2024,39(1):257-262.
Xu R X, Wang Y. Mechanism of effective components in traditional Chinese medicine against cisplatin-induced resistance of liver cancer [J]. Drugs Clin, 2024, 39(1): 257-262.
- [3] 吕鹏飞.黄花蒿提取物青蒿琥酯对运动性心肌损伤大鼠心肌铁代谢和铁死亡相关蛋白表达的调控作用[J].分子植物育种,2024,22(21):7222-7229.
LV PF. Regulatory effects of artesunate on myocardial iron metabolism and ferroptosis-related protein expression in EIMI rats [J]. Mol Plant Breed, 2024, 22(21): 7222-7229.
- [4] 沈冠彤,董金垚,冯璟,等.青蒿琥酯通过调控 GADD45A、NACC1 的表达抑制肝癌细胞的作用[J].中国药理学通报,2024,40(6):1089-1097.
Shen G T, Dong J Y, Feng J, et al. The inhibitory effect of artesunate on hepatocellular carcinoma cells by regulating expression of GADD45A and NACC1 [J]. Chin Pharmacol Bull, 2024, 40(6): 1089-1097.
- [5] 张志刚.抗环状泰勒虫裂殖体增殖药物的筛选[D].北京:中国农业科学院,2023.
Zhang Z G. Screening of drugs against the proliferation of theileria annulata schizonts [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2023.
- [6] 陈永顺,杨斌.青蒿琥酯纳米胶束制备及其体内药理学、抗肿瘤活性研究[J].中成药,2024,46(5):1457-1465.
Chen Y S, Yang B. Preparation, *in vivo* pharmacokinetics and anti-tumor activity of artesunate nanomicelles [J].

- Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(5): 1457-1465.
- [7] 沈硕, 刘淑芝, 杜茂波, 等. 青蒿琥酯平衡溶解度和表观油水分配系数的测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 9-12.
Shen S, Liu S Z, Du M B, et al. Determination of equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient of artesunate [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2013, 19(19): 9-12.
- [8] 谷文莉. 青蒿素及其衍生物类药物对疟疾的临床治疗研究进展 [J]. 抗感染药学, 2021, 18(4): 463-466.
Gu W L. Research progress on clinical medication of anti-malarial in artemisinin and its derivatives [J]. Anti Infect Pharm, 2021, 18(4): 463-466.
- [9] 金美华. 青蒿琥酯纳米脂质体抗肝癌作用及其线粒体途径诱导凋亡机制的研究 [D]. 桂林: 桂林医学院, 2012.
Jin M H. Research on the anti-hepatoma effect of artesunate nano-liposomes and the mechanisms of mitochondria inducing apoptosis [D]. Guilin: Guilin Medical University, 2012.
- [10] 周奕, 叶建林. 乳糖化-去甲斑蝥素磷脂复合物 pH 敏感型脂质体肝靶向抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2803-2808.
Zhou Y, Ye J L. Liver targeting anti-tumor activity of pH-sensitive liposomes loaded with lactosyl-norcantharitin phospholipids complex [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(19): 2803-2808.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 王美丽, 唐静, 方晓东, 等. 冬凌草甲素类脂囊泡制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(10): 3387-3391.
Wang M L, Tang J, Fang X D, et al. Preparation of oridonin lipid vesicle and its pharmacokinetics *in vivo* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(10): 3387-3391.
- [14] Poinot V, Pizzinat N, Ong-Meang V. Engineered and mimicked extracellular nanovesicles for therapeutic delivery [J]. Nanomaterials (Basel), 2024, 14(7): 639.
- [15] Kanamala M, Palmer B D, Ghandehari H, et al. PEG-benzaldehyde-hydrazone-lipid based PEG-sheddable pH-sensitive liposomes: Abilities for endosomal escape and long circulation [J]. Pharm Res, 2018, 35(8): 154.
- [16] 赵莹, 曾佳裕, 刘小敏, 等. 酶促合成己二酸胆固醇基单乙烯基酯的研究 [J]. 化学研究与应用, 2022, 34(11): 2630-2635.
Zhao Y, Zeng J Y, Liu X M, et al. Study on enzymatic synthesis of (5-cholesten-yl) vinyl adipic acid [J]. Chem Res Appl, 2022, 34(11): 2630-2635.
- [17] 胡熙曦. 半乳糖修饰 pH 敏感型丹参酮II_A 类脂囊泡的制备及其抗肝癌作用的研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
Hu X X. Preparation of galactose-modified pH-sensitive niosomes loaded with tanshinone II_A and study of its anti-hepatocarcinoma effect [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2021.
- [18] 李文杰. 莪术醇肝靶向脂质体的制备及其抗肿瘤研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
Li W J. Preparation of curcumenol liver-targeting liposomes and its anti-tumor research [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2014.
- [19] 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, characteratation and therapeutic effects on ulcerative colitis of PEGylated emodin/Rhein-liposomes thermosensitive gel [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(14): 5006-5018.
- [20] 王雪莹, 张翔珂, 陈铭, 等. 染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束在荷瘤小鼠中靶向性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(7): 26-30.
Wang X Y, Zhang X K, Chen M, et al. Study on targetability of MePEG-PLGA copolymer micelles in tumor-bearing mice [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2023, 25(7): 26-30.
- [21] 毛利紧, 朱家豪, 郝海军. 芒果苷纳米囊泡的制备、表征和药动学研究 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(6): 1389-1397.
Mao L J, Zhu J H, Hao H J, et al. Preparation, characterization and pharmacokinetic study of mangiferin nanovesicles [J]. Drugs Clin, 2025, 40(6): 1389-1397.
- [22] 左春玲, 邓庆芳, 宋伟明. CTAB/SDBS 水基囊泡相磁流体制备及稳定性研究 [J]. 化学研究与应用, 2024, 36(6): 1400-1405.
Zuo C L, Deng Q F, Song W M. Preparation and stability of CTAB/SDBS water-based vesicular phase magnetic

- fluid [J]. Chem Res Appl, 2024, 36(6): 1400-1405.
- [23] 柳超, 董亚楠, 李伟宏, 等. 冰片修饰根皮素醇质体凝胶的制备、表征及其离体皮肤渗透特性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7288-7299.
- Liu C, Dong Y N, Li W H, et al. Preparation, characteratation and their *ex vivo* transdermal permeation properties of borneol-modified phloretin ethosomes gel [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(21): 7288-7299.
- [24] 王鑫, 关雪, 陈大忠. 苦白蹄化学成分及抗肿瘤作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(4): 897-903.
- Wang X, Guan X, Chen D Z. Research progress on chemical constituents and anti-tumor effects of *Fomitopsis officinalis* [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(4): 897-903.
- [25] 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.

[责任编辑 孙英杰]