

• 药剂与工艺 •

酶促合成 3 种半乳糖-胆固醇配体及其与肝靶向性的构效关系研究

聂 华, 丘 波, 杨琪璿, 赵 莹, 江硕硕, 张声源

嘉应学院医学院, 广东 梅州 514031

摘要: 目的 酶促法构建 3 种不同类型的半乳糖-胆固醇配体修饰的阿霉素 (doxorubicin, DOX) 脂质体, 研究其在小鼠体内的药动学及组织分布特征。方法 利用脂肪酶在非水相中合成了 3 种不同结构的半乳糖-胆固醇配体: CHS-C8-GalNAc、CHS-C8-GAL、CHS-C8-LA; 利用 MS、NMR 鉴定产物结构; 采用薄膜分散-梯度载药法制备 DOX 脂质体并对其理化性质进行表征; 以小鼠为实验对象, 采用尾 iv 给药, 通过比较 3 种配体修饰的 DOX 脂质体在小鼠体内的药动学与组织分布特征来阐明配体中半乳糖基的结构与去唾液酸糖蛋白受体之间的构效关系。结果 产物经 MS、NMR 鉴定均为目标产物, 产率均 >90%; 采用薄膜分散-梯度载药法制备的 DOX 脂质体粒径 <90 nm, PDI <0.1, 包封率 >99%, 24 h 渗漏率 <5%, Zeta 电位接近于 0; 3 种配体分子对肝脏亲和力大小依次为 CHS-C8-GalNAc > CHS-C8-LA > CHS-C8-Gal; 肝脏对 CHS-C8-GalNAc 修饰的脂质体的摄取几乎完全被预注射的 asialofetuin 所抑制 ($P < 0.01$), 而对 CHS-C8-Gal 及 CHS-C8-LA 修饰的脂质体无显著的抑制效果 ($P > 0.05$)。结论 含有 *N*-乙酰半乳糖胺基 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc) 为末端的配体分子能被去唾液酸糖蛋白受体高效识别, 而含有 *D*-半乳糖基 (*D*-galactose, Gal) 或乳糖醇基 (lactitol, LA) 为末端的配体分子易被肝枯否细胞上的半乳糖粒子受体所竞争性结合。

关键词: 半乳糖-胆固醇衍生物; 酶催化; 去唾液酸糖蛋白受体; 阿霉素; 肝靶向; 抗肿瘤药物; 药动学

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)16-3804-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.012

Enzymatic synthesis of three kinds of galactose-cholesterol ligands and their structure-activity relationship with liver targeting

NIE Hua, QIU Bo, YANG Qi-xuan, ZHAO Ying, JIANG Xin-xin, ZHANG Sheng-yuan

Medical College of Jiaying University, Meizhou 514031, China

Abstract: **Objective** To construct three kinds of doxorubicin liposomes modified with cholesterol-galactose ligand by lipase-catalyzed method and compare their characteristic of pharmacokinetics and tissue distribution *in vivo*. **Methods** Three types of cholesterol-galactose ligands, CHS-C8-GalNAc, CHS-C8-GAL, and CHS-C8-LA were synthesized by lipase-catalyzed method in nonaqueous phase. The structure characterizations of products were obtained by MS and NMR. Conventional liposomes (CL DOX) and ligand-coupled liposomes (NGal-LP DOX, Gal-LP DOX, and LA-LP DOX) were prepared by thin film dispersion-ammonium sulphate gradient method. Structure-activity relationship between asialoglycoprotein receptor (ASGPr) and the chemical structure of the glycolipids was explored through the pharmacokinetics and tissue distribution parameters of ligand-coupled liposomes *in vivo*. **Results** The desired compounds with a high yield of above 90% were confirmed by MS and NMR. The liposomes average size was lower than 90 nm, polymer dispersity index was lower than 0.1, encapsulation efficiency was greater than 99%, leakage rate was lower than 5% with 24 h, and zeta potential closed to zero. The affinity of the three ligand molecules to liver was the following order: CHS-C8-GalNAc > CHS-C8-LA > CHS-C8-Gal. However, only the liposomes modified with CHS-C8-GalNAc could significantly be inhibited by the preinjection of asialofetuin for hepatic uptake rate ($P < 0.01$), but the liposomes modified with CHS-C8-LA and

收稿日期: 2018-02-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81703662); 广东省自然科学基金项目 (2017A030307025); 广东省中医药局科研项目 (20171268); 广东省“攀登计划”大学生科技创新培育专项资金重点项目 (pdjha0466)

作者简介: 聂 华, 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向为靶向给药系统及抗肿瘤药物研究。Tel: 14715048656 E-mail: niehua007@163.com

*通信作者 张声源, 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向为中药及天然药物活性成分研究。Tel: 13750543826 E-mail: mcdullzhang@yeah.net

CHS-C8-Gal could not be inhibited by the preinjection of asialofetuin for hepatic uptake rate ($P > 0.05$). **Conclusion** The ligand with *N*-acetylgalactosamine residue showed high targeting efficiency for hepatocytes, while the ligand with *D*-galactose (Gal) or lactitol residue could competitive bind with Gal particle receptor on kupffer cells.

Key words: galactosylated cholesterol; enzyme catalysis; asialoglycoprotein receptor; doxorubicin; liver targeting; anti-tumor drug; pharmacokinetics

去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPr) 是数量丰富的一种异源低聚物的内吞型受体, 只存在于肝脏实质细胞朝向窦状隙一侧的细胞膜表面, 能特异性地识别与结合具有 *D*-半乳糖 (*D*-galactose, Gal) 或 *N*-乙酰半乳糖胺 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc) 作为末端糖基的配体分子^[1-3]。经半乳糖修饰的纳米粒子可作为药物载体运送药物至肝脏细胞, 如 β -环糊精^[4]、微乳^[5]、脂肪乳^[6]、脂质体^[7-8]、聚合物^[9]等。

迄今为止, 种类众多的天然或合成的半乳糖基衍生物被用作配体分子修饰载体而靶向于 ASGPr。被修饰的载体是否能高效靶向 ASGPr, 与修饰的配体分子的化学结构和物理特性密切相关。就配体分子的结构设计而言, 末端糖基取代位置至关重要。首先, 当末端糖基在 C-1 或 C-6 位取代时, 两者都具有对 ASGPr 高亲和力, 但肝实质细胞介导的内吞途径却不同: C-1 取代的配体首先到达初级内体, 而后到达次级内体, 最终到达溶酶体; 而 C-6 取代只进入初级内体, 不会经过次级内体而到达溶酶体, 这提示经 C-6 取代半乳糖配体修饰的载体可避免因溶酶体的分解作用而导致的药物失活^[10]。其次, 当末端半乳糖基取代为 C-3 或 C-4 位时, 配体分子对 ASGPr 亲和力急剧下降^[11]。而且, 当配体端基糖结构为 GalNAc 时, 其对 ASGPr 亲和力是端基为 Gal 的 50 倍^[12-13], 但其对肝枯否细胞 (kupffer cells, KC) 上的半乳糖粒子受体 (Gal particle receptor, GPr) 的亲和力却远低于 Gal 为端基的配体^[14], 这

提示经 GalNAc 修饰的载体能高效靶向于肝实质细胞 (parenchymal cells, PC) 而非 KC。

目前已有文献报道的 Gal 或 GalNAc 为端基的配体大都为 C-1 取代, 极少见端基为 C-6 取代的半乳糖配体^[12,15-16]。为探究端基为 C-1 取代与 C-6 取代的半乳糖配体在动物体内的肝靶向效率是否存在差异, 本课题组设计并合成了一系列 C-1 取代或 C-6 取代的半乳糖-胆固醇基衍生物。乳糖醇^[17]、半乳糖^[10]、乙酰氨基半乳糖^[18], 由于都含有半乳糖结构单元, 通常被设计为配体的“靶头”。胆固醇作为脂质体的重要成分之一, 常被设计成配体的亲脂性“锚”用于固定“靶头”于脂质体表面^[6,19]。为提高“靶头”在脂质体的表面的暴露程度, 减少空间位阻, 提供最优空间构像以利于被细胞表面的 ASGPr 所识别, 采用含有 8 个 $-(CH_2)-$ 的癸二酸二乙烯脂 [bis (ethenyl) decanedioate] 作为“桥”连接“靶头”和“锚”。半乳糖配体分子结构设计如图 1 所示。

大多数文献报道的半乳糖-胆固醇基衍生物合成采用多步化学反应来完成^[6,20-21]。然而化学法在合成糖酯类衍生物时存在诸多弊端: 糖环上的羟基众多, 且化学环境相似, 故采用化学方法直接酰化时, 区域选择性差, 副产物多, 产物纯化困难。为得到确定位置的酰化产物, 需对糖环上特定羟基进行反复的保护与去保护等操作, 步骤繁多、工艺复杂, 而利用酶在非水介质中催化合成糖酯可有效地克服上述缺点。酶催化法条件温和, 能在常温下高效催化酰化反应, 且区域选择性高, 可根据需要选择不

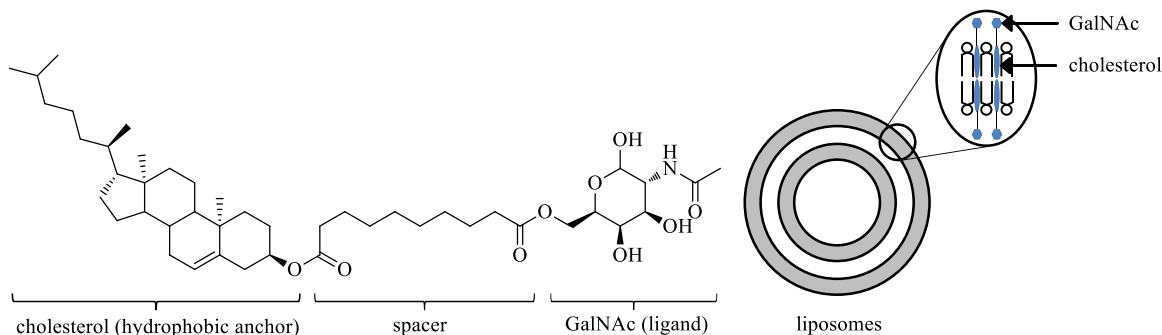


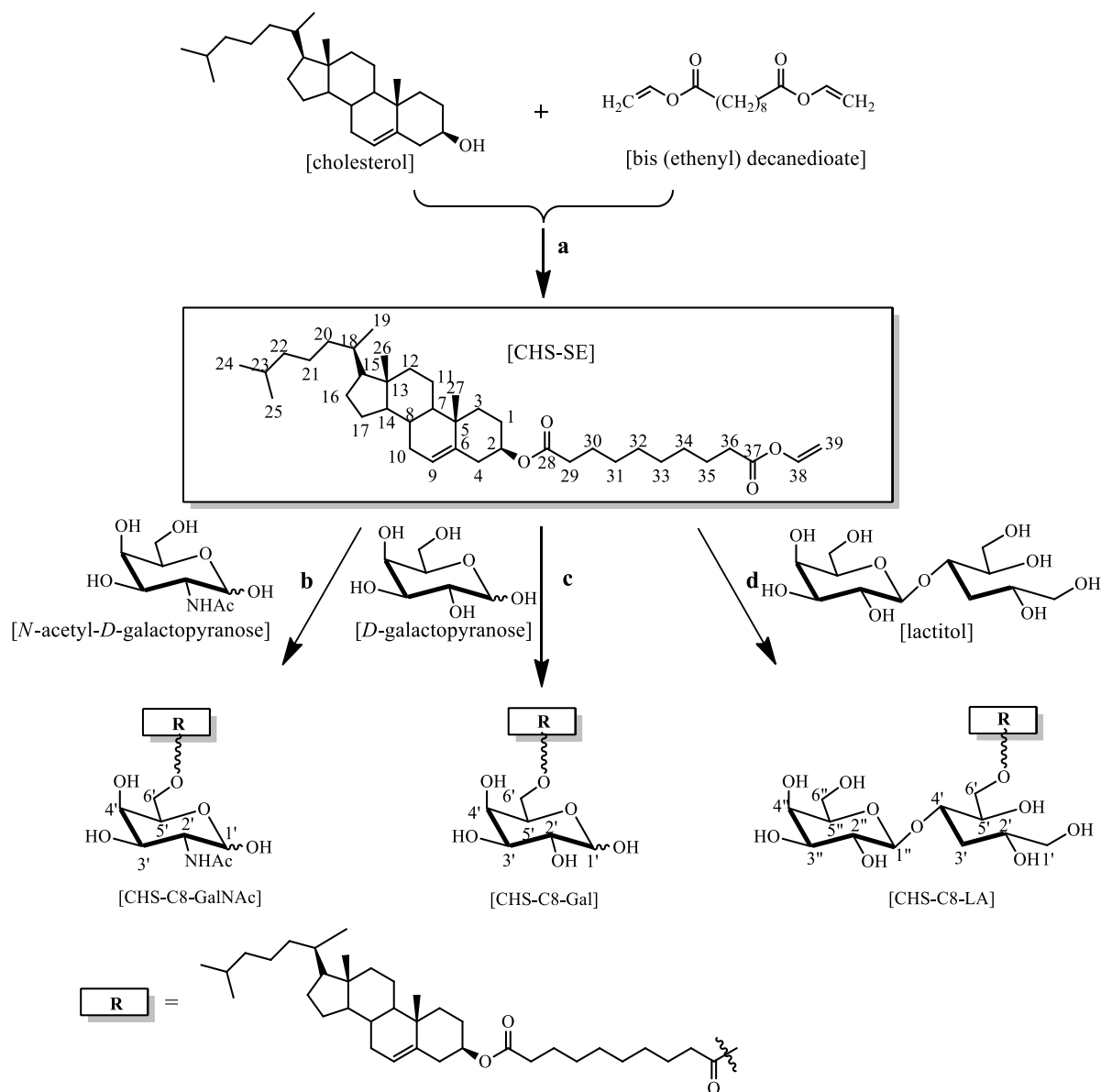
图 1 乙酰氨基半乳糖-胆固醇配体分子结构及在脂质体中分布示意图

Fig. 1 Structure of CHS-C8-GalNAc ligands and its distribution in liposomes

同种类的酶以合成特定结构的酯类衍生物且工艺简单、环境友好^[22-23]。在前期研究中本课题组已成功利用酶促法合成含葡萄糖基团的胆固醇衍生物 (5-cholesten-3 β -yl)(*D*-glucopyranose-6) sebacate^[24]。在本研究中拟同样采用生物酶催化法 2 步合成半乳糖-胆固醇配体分子, 反应路线见图 2。

阿霉素 (doxorubicin, DOX) 是目前临床应用最为广泛和最有效的抗肿瘤药物之一, 但其稳定性

差, 血浆半衰期极短, 给药后伴有骨髓抑制、心脏毒性及消化系统毒性等严重不良反应, 而且反复给药后可引起肿瘤多药耐药, 这些都限制了 DOX 在临床上的应用^[25]。将 DOX 包载于脂质体内, 可显著提高其半衰期, 延长体内循环滞留时间, 同时减少对心脏、肾和胃肠的毒性^[26]。采用 pH 梯度法可将 DOX 高效包载于脂质体内, 并在内水相形成凝胶状而不易泄漏, 可长期稳定保存^[27]。同时, 由于



a-CHS 1.3 mmol、癸二酸二乙烯酯 11.6 mmol、CRL 200 mg、异辛烷 50 mL, 35 °C, 250 r/min, 11.5 h; b-GalNAc 0.4 mmol、CHS-SE 0.8 mmol、Lipozyme TL IM 100 mg、丙酮 50 mL, 45 °C, 250 r/min, 24 h; c-Gal 0.4 mmol、CHS-SE 0.8 mmol、Novozym 435 100 mg、丙酮 50 mL, 45 °C, 250 r/min, 24 h; d-乳糖醇 0.4 mmol、CHS-SE 1.5 mmol、Novozym 435 228 mg、吡啶-丙酮 (2 : 1) 21 mL, 55 °C, 250 r/min, 31.1 h
a-CHS 1.3 mmol、bis (ethenyl) decanedioate 11.6 mmol、CRL 200 mg、isooctane 50 mL, 35 °C, 250 r/min, 11.5 h; b-GalNAc 0.4 mmol、CHS-SE 0.8 mmol、Lipozyme TL IM 100 mg、acetone 50 mL, 45 °C, 250 r/min, 24 h; c-Gal 0.4 mmol、CHS-SE 0.8 mmol、Novozym 435 100 mg、acetone 50 mL, 45 °C, 250 r/min, 24 h; d-lactitol 0.4 mmol、CHS-SE 1.5 mmol、Novozym 435 228 mg、pyridine-acetone (2 : 1) 21 mL, 55 °C, 250 r/min, 31.1 h

图 2 酶促合成半乳糖配体路线图

Fig. 2 Enzymatic synthesis route of galactosylated cholesterol ligands

DOX 自发光特性方便地跟踪其在体内的分布情况^[20]。在本研究中, DOX 被选择作为模型药物包封于脂质体内, 并作为荧光示踪剂研究脂质体在小鼠体内的分布情况。本研究的目的在于采用酶法构建一种半乳糖修饰的主动肝靶向脂质体, 并评价其在动物体内的肝靶向效率, 为开发新型的治疗肝脏疾病的药物提供理论依据和实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo TSQ Quantum ACCESS 三重四极杆液质联用仪, 赛默飞世尔科技有限公司; Bruker 500 MHz 核磁共振仪, 瑞士布鲁克公司; RE-5299 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; TGL-16MC 冷冻离心机, 长沙湘锐离心机有限公司; TBX 001 高压挤出机, 加拿大 ATS Engineering Inc.; Alliance 2695 高效液相色谱仪, 包括四元梯度输液泵、自动进样器、可降温柱温箱、2475 FLR 多波长荧光检测器, 美国沃特世公司; Zetasizer Nano ZS90 粒度测定仪, 英国马尔文仪器有限公司; UV-1800 紫外分光光度计, 日本岛津公司; BS110s 型电子分析天平, 德国 Sartorius 公司。

1.2 实验药品

皱褶假丝酵母脂肪酶 (*Candida rugosa* lipase, CRL, VII 型, 酶活力 ≥ 700 U/mg)、胶原酶 I (collagenase type I)、去唾液酸胎球蛋白 (asialofetuin)、Sephadex G-50, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 胆固醇 (cholesterol, CHS), 质量分数 $>98.5\%$, 生产批号 A90719, 日本精化株式会社; 氢化大豆磷脂 (hydrogenated soya phosphatide, HSPC), 1-棕榈酰基-2-硬脂酰基卵磷脂质量分数 $>98.0\%$, 生产批号 B40932, 日本丘比株式会社; 二硬脂酰磷脂酰甘油钠 (distearoyl phosphatidylglycerole sodium salt, DSPG-Na), 注射级, 艾伟拓(上海)医药科技有限公司; 盐酸阿霉素 (doxorubicin, DOX), 质量分数 $>98.0\%$, 大连美仑生物技术有限公司; *N*-乙酰半乳糖胺 (GalNAc, 质量分数 $>98.0\%$)、*D*-半乳糖 (*D*-galactosamine, Gal, 质量分数 $>99.0\%$)、*D*-乳糖醇 (*D*-lactitol, LA, 质量分数 $>98.0\%$), 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Lipozyme TL IM 脂肪酶 (酶活力 >250 IUN/g)、Novozym 435 固定化脂肪酶 (酶活力 $>10\,000$ PLU/g), 均购自丹麦诺维信; 超滤离心管, 1 mL, 截留相对分子质量 100 000, 美国 PALL

公司; 透析袋, 截留相对分子质量 10 000, Spectrum Laboratories, Inc., CA, 美国; 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 实验动物

昆明种小鼠 200 只, 体质量 (20 ± 2) g, 雄性, 由广东省医学实验动物中心提供, 动物使用许可证号 SCXK (粤) 2013-0002。

2 方法与结果

2.1 酶促合成肝靶向配体及其结构鉴定

2.1.1 酶促合成 (5-cholesten-yl)vinyl decanedioic acid (CHS-SE) CHS-SE 的合成采用本课题组前期的实验方法^[19,28]。精密称量 CHS 1.3 mmol、癸二酸二乙烯酯 11.6 mmol、CRL 200 mg、异辛烷 50 mL, 加入具塞锥形瓶中, 置于空气浴摇床中 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 反应 11.5 h。反应结束后, 取反应液抽滤除去酶, 滤液真空旋干后加入适量甲醇, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h 重结晶, 即得白色固体产物 CHS-SE 3.57 g (1.2 mmol), 质量分数为 92.8%。合成路线见图 2-a。

2.1.2 酶促合成 CHS-C8-GalNAc GalNAc 0.4 mmol, CHS-SE 0.8 mmol, Lipozyme TL IM 脂肪酶 100 mg, 丙酮 50 mL 加入具塞锥形瓶中, 置于空气浴摇床中 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 反应 24 h。反应结束后, 取反应液抽滤除去酶, 滤液真空旋干后加入适量醋酸乙酯, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h 重结晶, 即得白色固体产物 CHS-C8-GalNAc 0.282 g (0.365 mmol), 质量分数为 91.1%。合成路线见图 2-b。

2.1.3 酶促合成 CHS-C8-LA *D*-乳糖醇 0.4 mmol, CHS-SE 1.5 mmol, Novozym 435 228 mg, 吡啶-丙酮 (2:1) 21 mL, 加入具塞锥形瓶中, 置于空气浴摇床中 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 反应 31.1 h。反应结束后, 取反应液抽滤除去酶, 滤液真空旋干后加入适量异辛烷, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h 重结晶, 即得白色固体产物 CHS-C8-LA 0.341 g (0.380 mmol), 质量分数为 94.3%。合成路线见图 2-d。

2.1.4 酶促合成 CHS-C8-Gal Gal 0.4 mmol, CHS-SE 0.8 mmol, Novozym 435 100 mg, 丙酮 50 mL, 加入具塞锥形瓶中, 置于空气浴摇床中 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 反应 24 h。反应结束后, 取反应液抽滤除去酶, 取反应液抽滤除去酶, 滤液真空旋干后加入适量醋酸乙酯, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h 重结晶, 即得白色固体产物 CHS-C8-Gal 0.271 g (0.37 mmol), 质量分数为 92.1%。合成路线见图 2-c。

2.1.5 产物的结构鉴定 CHS-SE、CHS-C8-GalNAc、

CHS-C8-LA 和 CHS-C8-Gal 产物结构见图 2 所示, 质谱及核磁谱数据分别如下。

CHS-SE: ESI-MS m/z : 619.51 $[M+Na]^+$ 。
 ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 173.6 (C-37), 171.2 (C-28), 141.5 (C-38), 140.0 (C-6), 122.9 (C-9), 97.8 (C-39), 74.0 (C-2), 57.0 (C-14), 56.4 (C-15), 50.3 (C-7), 42.6 (C-13), 40.0 (C-12), 39.8 (C-22), 38.5 (C-4), 37.3 (C-3), 36.9 (C-5), 36.5 (C-20), 36.1 (C-18), 35.0 (C-29), 34.2 (C-36), 32.2 (C-10), 32.2 (C-8), 29.3 (C-31), 29.3 (C-32, 33), 29.3 (C-34), 28.5 (C-16), 28.3 (C-23), 28.1 (C-1), 25.3 (C-30), 24.8 (C-35), 24.6 (C-17), 24.1 (C-21), 23.1 (C-25), 22.9 (C-24), 21.3 (C-11), 19.6 (C-27), 19.0 (C-19), 12.2 (C-26); 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.28 (1H, m, H-38), 5.37 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-9), 4.87 (1H, dd, $J = 14.0, 1.5$ Hz, H-39a), 4.61 (1H, m, H-2), 4.56 (1H, dd, $J = 6.3, 1.5$ Hz, H-39b), 2.38 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-4), 2.31 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-29), 2.26 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-36), 1.99 (2H, m, H-10), 1.78~1.04 (36H, m), 1.02 (3H, s, H-27), 0.91 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-19), 0.86 (6H, dd, $J = 2.3, 6.6$ Hz, H-24, 25), 0.67 (3H, s, H-26)。

CHS-C8-GalNAc: ESI-MS m/z : 796.50 $[M+Na]^+$ 。
 ^{13}C -NMR (100 MHz, pyridine- d_5) δ : 173.9 (C-37), 173.5 (C-28), 171.3 (C-7'), 140.4 (C-6), 123.2 (C-9), 93.3 (C-1'), 74.3 (C-2), 70.8 (C-4'), 69.9 (C-3'), 69.6 (C-5'), 65.7 (C-6'), 57.2 (C-14), 56.7 (C-15), 52.6 (C-2'), 50.6 (C-7), 42.9 (C-21), 40.3 (C-12), 40.1 (C-22), 39.0 (C-4), 37.6 (C-3), 37.2 (C-5), 36.9 (C-20), 36.4 (C-18), 35.2 (C-29), 34.7 (C-36), 32.6 (C-10), 32.4 (C-8), 29.7 (C-32, 33), 29.7 (C-31, 34), 28.9 (C-16), 28.6 (C-23), 28.6 (C-1), 25.8 (C-30), 25.6 (C-35), 24.9 (C-17), 24.6 (C-21), 23.7 (C-8'), 23.4 (C-25), 23.1 (C-24), 21.7 (C-11), 19.8 (C-27), 19.4 (C-19), 12.4 (C-26); 1H -NMR (400 MHz, pyridine- d_5) δ : 5.99 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-1' α), 5.43 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9), 5.33 (1H, m, H-1' β), 4.93 (1H, t, $J = 4.9$ Hz, H-2), 4.91 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6'a), 4.90 (1H, s, H-2'), 4.89 (1H, s, H-5'), 4.86 (1H, m, H-6'b), 4.64 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-3'), 4.50 (1H, s, H-4'), 2.54 (2H, m, H-4), 2.41 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-29), 2.33 (2H, td, $J = 1.6, 7.4, 7.3$ Hz, H-36), 2.13 (3H, s, H-8'), 2.03~1.07 (38 H, m), 1.03 (3H, s, H-27), 0.99 (3H, d,

$J = 6.5$ Hz, H-19), 0.91 (6H, dd, $J = 1.1, 6.6$ Hz, H-24, 25), 0.68 (3H, s, H-26)。

CHS-C8-LA: ESI-MS m/z : 919.50 $[M+Na]^+$ 。
 ^{13}C -NMR (100 MHz, pyridine- d_5) δ : 174.0 (C-37), 173.4 (C-28), 140.4 (C-6), 123.1 (C-9), 106.8 (C-1''), 85.3 (C-4'), 77.4 (C-5''), 75.6 (C-3''), 74.2 (C-2), 73.3 (C-2'), 73.3 (C-2''), 72.0 (C-5'), 70.7 (C-3'), 70.2 (C-4''), 67.1 (C-6'), 64.2 (C-1'), 62.2 (C-6''), 57.1 (C-14), 56.1 (C-15), 50.6 (C-7), 42.8 (C-4), 40.3 (C-13), 40.1 (C-12), 38.9 (C-22), 37.6 (C-3), 37.2 (C-5), 36.8 (C-20), 36.4 (C-18), 35.1 (C-29), 34.7 (C-36), 32.5 (C-10), 32.4 (C-8), 29.7 (C-31, 34), 29.6 (C-32, 33), 28.8 (C-1), 28.6 (C-16), 28.5 (C-23), 25.7 (C-30), 25.5 (C-35), 24.8 (C-17), 24.5 (C-21), 23.3 (C-25), 23.0 (C-24), 21.6 (C-11), 19.7 (C-27), 19.3 (C-19), 12.3 (C-26); 1H -NMR (400 MHz, pyridine- d_5) δ : 5.42 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-9), 5.15 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 4.91~4.82 (2H, m), 4.81~4.62 (4H, m), 4.59 (1H, t, $J = 5.4$ Hz), 4.54~4.28 (7H, m), 4.10 (1H, dd, $J = 9.4, 3.3$ Hz), 4.04 (1H, t, $J = 6.2$ Hz), 2.54 (2H, t, $J = 9.7$ Hz, H-4), 2.41 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-29), 2.33 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-36), 2.03~1.04 (38H, m), 1.02 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.90 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, H-24, 25), 0.68 (3H, s, H-26)。

CHS-C8-Gal: ESI-MS m/z : 755.50 $[M+Na]^+$ 。
 ^{13}C -NMR (100 MHz, pyridine- d_5) δ : 174.0 (C-37), 173.4 (C-28), 140.4 (C-6), 123.2 (C-9), 99.9 (C-1' β), 94.9 (C-1' α), 75.6 (C-3' β), 74.5 (C-5' β), 74.2 (C-2), 74.1 (C-2' β), 71.7 (C-4' α), 71.5 (C-3' α), 71.3 (C-2' α), 70.8 (C-4' β), 69.6 (C-5' α), 65.6 (C-6' α), 65.5 (C-6' β), 57.2 (C-14), 56.8 (C-15), 50.7 (C-7), 42.9 (C-4), 40.3 (C-13), 40.1 (C-12), 39.0 (C-22), 37.6 (C-3), 37.2 (C-5), 36.9 (C-20), 36.4 (C-18), 35.2 (C-29), 34.8 (C-36), 32.6 (C-10), 32.4 (C-8), 29.7 (C-31, 34), 29.7 (C-32, 33), 28.9 (C-1), 28.6 (C-16), 28.6 (C-23), 25.8 (C-30), 25.8 (C-30), 25.6 (C-35), 24.9 (C-17), 24.6 (C-21), 23.4 (C-25), 23.1 (C-24), 21.7 (C-11), 19.8 (C-27), 19.4 (C-19), 12.4 (C-26); 1H -NMR (400 MHz, pyridine- d_5) δ : 5.99 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1' α), 5.43 (1H, m, H-9), 5.26 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1' β), 4.96 (1H, m, H-6'a), 4.92 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-5' α), 4.89 (1H, m, H-2), 4.85 (1H, m, H-6'b), 4.70 (1H, m,

H-2'α), 4.69 (1H, m, H-4'α), 4.56 (1H, m, H-5'β), 4.53 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-3'α), 4.42 (1H, dd, $J = 1.0, 3.4$ Hz, H-4'β), 4.22 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-2'β), 4.20 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-3'β), 2.54 (2H, m, H-4), 2.41 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-29), 2.33 (2H, m, H-36), 2.03~1.06 (38H, m), 1.05 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-27), 0.92 (6H, dd, $J = 1.2, 6.6$ Hz, H-24, 25), 0.70 (3H, s, H-26)。

2.2 脂质体的制备及表征

2.2.1 阿霉素脂质体的制备 阿霉素脂质体的制备采用梯度载药法^[20]。将 HSPC、CHS、DSPG-Na 按一定比例混合,溶于氯仿中,置于 55 ℃水浴旋转蒸发仪中,挥干氯仿至瓶内壁上形成一层脂质薄膜,置真空干燥器内干燥过夜(12 h),然后加入硫酸铵溶液(300 mmol/L)水化,55 ℃缓慢搅拌,孵育 1 h,然后用高压挤出器过 0.1、0.05、0.03 μm 聚碳酸

酯膜各 10 次,即得空白脂质体。然后将空白脂质体过 Sephadex G-50 柱除去未包封的硫酸铵,最后加入 DOX 溶液,65 ℃孵育 1 h 即得载 DOX 普通脂质体(CL DOX)。采用上述工艺,在脂质材料中分别加入一定比例的 CHS-C8-GalNAc、CHS-C8-Gal、CHS-C8-LA,分别得到阿霉素靶向脂质体:NGal-LP DOX、Gal-LP DOX、LA-LP DOX。

2.2.2 脂质体粒径及 Zeta 电位测量 分别取上述脂质体溶液 100 μL,用超纯水稀释至 2 mL,混合均匀,采用激光散射粒径测定仪对其粒径分布、Zeta 电位、聚合物分散性指数(polymer dispersity index, PDI)进行分析。实验数据均表示为 $\bar{x} \pm s$,采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,各组间的粒径、PDI 和 Zeta 电位的均数比较采用方差分析。结果见表 1。

2.2.3 脂质体包封率的测定 DOX 含量采用 HPLC

表 1 脂质体的粒径、PDI、Zeta 电位、包封率及渗漏率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Particle size, PDI, Zeta potential, encapsulation efficiency, and leakage rate of liposomes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂质体类别	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%	24 h 渗漏率/%
CL DOX	76.27±0.29 ^d	0.049±0.036	-5.42±1.53 ^a	>99.0	<5.0
NGal-LP DOX	80.06±0.56 ^c	0.053±0.021	-4.99±1.31 ^a	>99.0	<5.0
Gal-LP DOX	85.07±0.69 ^a	0.070±0.024	-3.71±0.22 ^a	>99.0	<5.0
LA-LP DOX	83.05±1.39 ^b	0.060±0.010	-4.81±1.16 ^a	>99.0	<5.0

同列不同小写字母表示不同处理组之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 同列相同字母表示不同处理组之间无显著差异 ($P > 0.05$)

Different letters in same column indicate that differences are significant at 0.05 level among different groups, same letters in same column indicate differences are not significant at 0.05 level among different groups

酯测定^[29]。色谱柱为 XBridge Peptide BEH C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Waters 公司);流动相为甲醇-乙腈-水-冰醋酸(30:20:50:0.25);体积流量 1.0 mL/min;检测激发波长为 470 nm,发射波长为 580 nm。以柔红霉素为内标,进样量 10 μL,测定峰面积,内标法计算样品中 DOX 的含量。

阿霉素脂质体包封率测定采用超滤法^[30]。平行取脂质体混悬液 0.4 mL 3 份,分别装入 1 mL 超滤离心管上层,放入离心机中以 6 000 r/min 离心 30 min,分别测量脂质体混悬液及超滤管中下层滤液中 DOX 的质量浓度,计算脂质体混悬液中总 DOX 质量 ($[DOX]_{total}$) 及未包封的 DOX 质量 ($[DOX]_{supernatant}$),按下列公式计算脂质体包封率。为验证超滤管中游离 DOX 能否完全透过超滤膜而不被截留,称取适量 DOX 溶于水中制备游离 DOX 溶液 ($[DOX]_{total free}$),其质量浓度为脂质体混悬液总 DOX 质量浓度的 1%。将上述 DOX 溶液加入超

滤管中以 6 000 r/min 离心 30 min,取下层滤液测定 DOX 浓度 ($[DOX]_{transmissivity}$),按公式计算 DOX 透过率。结果显示超滤离心管对游离 DOX 截留率为 <5%,RSD 为 1.58% ($n = 3$),说明超滤法可用于阿霉素脂质体包封率的测定。

$$\text{包封率} = ([DOX]_{total} - [DOX]_{supernatant}) / [DOX]_{total}$$

$$\text{透过率} = [DOX]_{transmissivity} / [DOX]_{total free}$$

$$\text{渗漏率} = [DOX]_{24 h \text{ 透析介质中药量}} / [DOX]_{\text{透析前脂质体包封药量}}$$

阿霉素脂质体的渗漏率采用透析法测定^[16]。平行取脂质体混悬液 0.2 mL 3 份,分别装入透析袋中,密封两端,放入盛有 100 mL 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 烧杯中,以 37 ℃缓慢搅拌 24 h。在规定的时间内隔取样测定透析液中 DOX 质量浓度。

脂质体的包封率及渗漏率考察结果见表 1。

2.3 小鼠体内 DOX 含量测定的方法学考察

2.3.1 样品处理方法 血浆样品和肝组织样品预处理方法采用文献报道的方法^[31]并稍做修改,具体如

下:取 0.8 mL 盐酸乙醇溶液 (0.3 mol/L HCL) 和 0.1 mL 柔红霉素溶液 (5 $\mu\text{g/mL}$) 加入到 0.1 mL 血浆中,超声混匀,于暗处 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,然后 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液进高效液相按“2.2.3”项下方法测定 DOX 含量。组织样品洗净血液后,吸干水分,精密称定质量,按组织质量的 2 倍量加入生理盐水匀浆,取 0.1 mL 组织匀浆液按上述血浆样品处理方法处理。

2.3.2 测定方法的专属性考察 分析方法的专属性见图 3,由图 3 可知,在上述色谱条件下,DOX 与内标柔红霉素的分离度符合要求,血浆和组织中内源性成分对测定无干扰。

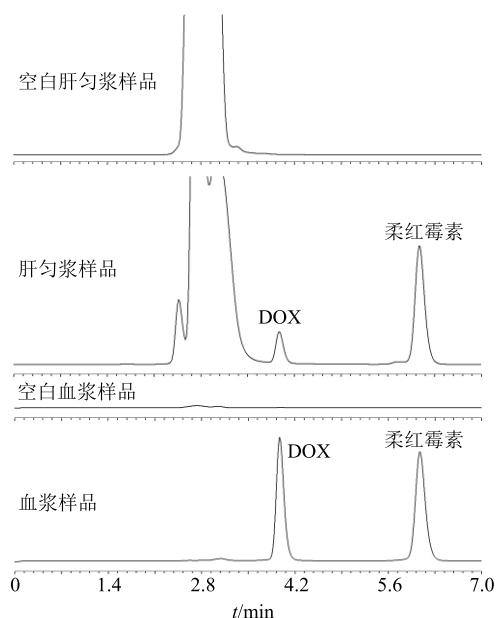


图3 肝匀浆样品和血浆样品的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of liver homogenate sample and plasma sample

取空白血浆,精密加入 DOX 对照品,配制成 DOX 质量浓度为 10、8、7、5、3、1、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆对照品溶液,按“2.3.1”项下血浆样品处理方法操作,以 DOX 与内标峰面积之比为纵坐标 (Y_B),血浆中 DOX 质量浓度为横坐标 (X_B),绘制标准曲线,得回归方程 $Y_B = 0.001\ 7\ X_B - 0.019\ 8$, $r^2 = 0.999\ 7$ 。结果表明,血浆中 DOX 在 50~1 000 ng/mL 线性关系良好。

取空白肝匀浆液,精密加入 DOX 对照品,配制成 DOX 质量浓度为 10、8、6、5、3、1 $\mu\text{g/mL}$ 的肝匀浆液对照品溶液。按“2.3.1”项下组织样品处理方法操作,以 DOX 与内标峰面积之比为纵坐标 (Y_L),肝组织中 DOX 质量浓度为横坐标 (X_L),绘

制标准曲线,得回归方程 $Y_L = 0.001\ 7\ X_L - 0.045\ 4$, $r^2 = 0.999\ 0$ 。结果表明,肝组织中 DOX 在 100~1 000 ng/mL 线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 分别取“2.3.2”项下 10、5、1 $\mu\text{g/mL}$ 3 个质量浓度的 DOX 血浆和肝匀浆液对照品溶液,按“2.3.1”项下方法制备血浆样品和肝组织样品并测定 DOX 含量,计算精密度,结果 RSD 均 < 3% ($n=6$)。

2.3.4 稳定性试验 分别取“2.3.2”项下 10、5、1 $\mu\text{g/mL}$ 3 个质量浓度的 DOX 血浆和肝匀浆液对照品溶液,按“2.3.1”项下方法制备血浆样品和肝组织样品,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,定时取样测定,结果样品在 5 d 内保持稳定 (RSD < 3%, $n=5$)。

2.3.5 回收率试验 分别取“2.3.2”项下 10、5、1 $\mu\text{g/mL}$ 3 个质量浓度的 DOX 血浆和肝匀浆液对照品溶液,按“2.3.1”项下方法制备血浆样品和肝组织样品,带入“2.3.3”项下标准曲线计算含量,计算回收率。血浆样品中 3 种质量浓度的回收率在 99.3%~112.2% (RSD < 2%, $n=3$),肝组织样品中 3 种质量浓度的回收率在 98.3%~110.0% (RSD < 2%, $n=3$)。

2.4 DOX 脂质体在小鼠体内药动学和组织分布实验

2.4.1 实验操作 取 168 只小鼠,给药前 12 h 禁食不禁水,将小鼠随机分为 4 组,分别为组 I (CL DOX)、组 II (NGal-LP DOX)、组 III (Gal-LP DOX)、组 IV (LA-LP DOX)。每只小鼠按 10 mg/kg 剂量(以磷脂质量计)尾 iv 给药。

另从各组别小鼠中分取一半用于抑制实验:于给药前 1 min 注射 asialofetuin (50 mg/kg)。每组 42 只小鼠分别于给药后 0.083、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2 h 眼内眦取血至肝素化的 EP 管中,并处死,解剖,取心、肝、脾、肺、肾等器官。取血 0.5 mL,4 000 r/min 离心 10 min,分取血浆,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。血样和组织样品处理及 DOX 含量测定按“2.3.1”项下方法操作。

2.4.2 DOX 脂质体药动学及组织分布的药物浓度-时间曲线 小鼠尾 iv CL DOX、NGal-LP DOX、Gal-LP DOX 及 LA-LP DOX 后 DOX 的平均血药浓度-时间曲线和 DOX 平均肝脏药物浓度-时间曲线见图 4。实验数据均表示为 $\bar{x} \pm s$,采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,两样本均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示显著性检验水平。由结果可知,

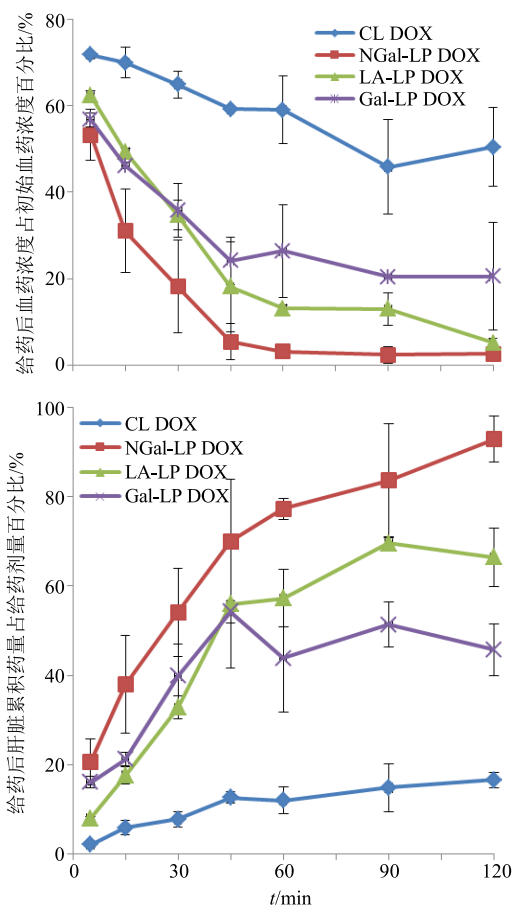


图 4 小鼠尾 iv CL DOX、NGal-LP DOX、Gal-LP DOX 及 LA-LP DOX 后 DOX 的平均血药浓度-时间曲线 (A) 和平均肝脏药物浓度-时间曲线 (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Time course of concentration in blood (A) and accumulation in liver (B) of CL DOX, Gal-LP DOX, NGal-LP DOX, and LA-LP DOX after iv injection in mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

相对于 CL DOX, 3 种配体修饰的脂质体血药浓度在 45 min 内急速下降, 说明脂质体快速从血液中清除, 其清除速率从小到大依次为 CL DOX < Gal-LP DOX < LA-LP DOX < NGal-LP DOX。与此同时经配体修饰的脂质体在肝脏中快速蓄积, 说明靶向脂质体在血液中消除后, 迅速被肝脏所摄取, 其摄取速率大小与血液清除速率大小正好相反, 依次为 NGal-LP DOX > LA-LP DOX > Gal-LP DOX > CL DOX。

为验证肝脏快速摄取配体修饰的脂质体是否由于 ASGPr 介导下主动内吞作用, 预先给部分小鼠给药前 1 min 注射 asialofetuin, 然后检测 30 min 后小鼠肝脏中 DOX 的累积浓度, 结果见图 5。由结果可知, asialofetuin 显著抑制了肝脏对 NGal-LP DOX 的摄取 ($P < 0.01$), 而对其他脂质体无显著抑制效果。

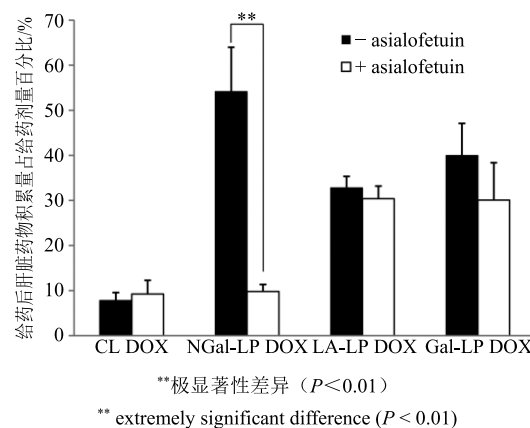


图 5 小鼠尾 iv 给药后 30 min 肝脏 DOX 累积浓度及 1 min 预注射 asialofetuin 后小鼠尾 iv 给药后 30 min 肝脏 DOX 累积浓度 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Liver DOX accumulation of rats iv injection and preinjection of asialofetuin 1 min before injection of liposomal DOX after 30 min ($\bar{x} \pm s, n=3$)

说明肝脏对 NGal-LP DOX 的摄取是由于肝实质细胞膜表面 ASGPr 介导下内吞的结果。

3 讨论

大量研究证明, 胆固醇与半乳糖环异头碳(C1-)偶联的两亲性脂质分子可用于制备脂质体, 并显著提高脂质体在肝脏的蓄积率^[6,18,32-33]。但极少有文献报道半乳糖基 C-6 位与胆固醇偶联的配体在动物体内的药动学和组织分布的研究数据。在本研究中, 设计并采用酶促法在非水相中合成了一系列新的半乳糖-胆固醇肝靶向材料 CHS-C8-LA、CHS-C8-Gal、CHS-C8-GalNAc, 并探究半乳糖的取代位置是否会影响其小鼠体内的肝靶向特性。

糖环存在从多化学性质相近的羟基, 因而需要区域选择性酯化才能得到单一位置取代的产物。对纯化后的产物通过 ^{13}C -NMR 进行结构鉴定, 发现 CHS-C8-Gal、CHS-C8-GalNAc、CHS-C8-LA 中糖基部分的 C-6'信号向低场移动, 分别从 δ 63.34、63.26、64.87 移至 δ 65.65、65.68、67.08, 而其相邻的 C-5'则向高场移动, 分别从 δ 72.59、72.48、73.46 移至 δ 69.63、69.56、72.05。通常, 糖分子中的羟基被乙酰化会使其烷甲基碳 ($\alpha\text{-C}$) 信号向低场位移 ($\delta +2 \sim +4$), 它的邻位碳 ($\beta\text{-C}$) 信号向高场位移 ($\delta -2 \sim -6$), 即存在苷化位移现象^[17,34]。利用这个规律, 判定酯化反应只发生在糖基部分的 C-6'位。

本实验合成的两亲性靶向材料, 其胆固醇基可牢固镶嵌于脂质体双分子层中, 而糖基部分则暴露于脂质体外层亲水区。通过对比普通脂质体与配体

修饰脂质体的粒径、Zeta 电位发现配体修饰脂质体的粒径相比普通脂质体均略有增大 ($P < 0.05$)，可能是由于偶联于脂质体表面的糖基增加了外层亲水区的厚度，但 Zeta 电位无显著改变 ($P > 0.05$)，这是由于合成的靶向材料不含可电离基团，因而不会改变脂质体的表面电性。通过硫酸铵梯度载药法可实现 DOX 高效包载于脂质体内水相，所得 DOX 脂质体包封率 $> 99\%$ ，24 h 渗漏率 $< 5\%$ ，说明 DOX 跨膜入脂质体内水相后，与 SO_4^{2-} 结合形成不溶性凝胶而滞留于脂质体内部，从而实现高包封率和高稳定性，这一结果与文献报道一致^[35]。肝窦状隙内皮细胞的孔隙一般约为 150 nm，足够小的小单室脂质体 (< 100 nm) 才可通过肝窦状隙接近肝实质细胞^[36]。本实验采用薄膜分散-高压挤出法制备的脂质体粒径达纳米级 (< 90 nm)，且粒径呈单相分布 ($\text{PDI} < 0.1$)，更容易被肝实质细胞所摄取。而且脂质体 Zeta 电位值接近中性，可有效避免被 RES (reticuloendothelial system) 所清除，延长体内清除半衰期，提高肝组织靶向效率。

DOX 装载于脂质体后 (CL DOX)，显著提高了 DOX 在小鼠血液循环的滞留时间，延长消除半衰期，有利于药物在病变组织的蓄积，但在体内组织分布仍无特异性，特别是在肝脏部位 DOX 蓄积的药量仍然偏低，2 h 仅有 $< 20\%$ 的给药剂量分布于肝脏。但当脂质体掺入一定比例的肝靶向材料后，DOX 迅速从血液中清除，其中清除速率最快的是 CHS-C8-GalNAc 修饰的脂质体，45 min 时血液中仅剩约 5% 的药量，2 h 后，血液中几乎检测不到 DOX，而此时肝脏中 DOX 分布达到了 92%，说明注射体内的 DOX 大部分被肝脏所摄取。Gal-LP DOX 和 LA-LP DOX 给药后 2 h，肝脏 DOX 累积药量也分别达到了 45% 和 66%，显著高于 CL DOX，但明显低于 NGal-LP DOX，由此推断，3 种配体分子对肝脏亲和力大小依次为 CHS-C8-GalNAc $>$ CHS-C8-LA $>$ CHS-C8-Gal。

为考察肝靶向材料修饰的脂质体被肝脏快速摄取是否是由于 ASGPr 介导的肝实质细胞主动内吞所导致，给药前 1 min 预注射 asialofetuin 来验证。Asialofetuin 是一种内源性的糖蛋白，它的每条末端糖链都有几个半乳糖残基，因此很容易被肝细胞表面的 ASGPr 所识别，并内吞进入细胞。Asialofetuin 可竞争性接合 ASGPr 而抑制半乳糖配体被肝实质细胞摄取^[6,18,20]。由图 5 可知，肝脏对 NGal-LP

DOX 的摄取几乎完全被预注射的 asialofetuin 所抑制 ($P < 0.01$)，而对 Gal-LP DOX 及 LA-LP DOX 无显著的抑制效果。

基于上述实验结果，可以推断：(1) 本实验合成的 3 种配体分子都可显著提高脂质体在肝脏的分布，说明半乳糖环的取代位置无论是在 C-6 位 (CHS-C8-Gal 和 CHS-C8-GalNAc) 或者 C-1 位 [CHS-C8-LA, 因 LA 的结构为 β -Gal (1 $\rightarrow$ 4) sorbitol, 可以看作是半乳糖环 C-1 取代]，对肝脏的亲和力无显著影响。(2) 以 GalNAc 为靶头的配体对肝脏的亲和力显著高于 Gal，这一结果与文献报道的基本一致^[12-13]，不同之处在于文献中合成的配体中 GalNAc 取代位置在 C-1 位，而本研究中取代位置在 C-6 位，这也从侧面印证了上述推断 (1) 中的结论。(3) CHS-C8-GalNAc 配体修饰的脂质体能高效的被肝实质细胞膜表面的 ASGPr 所识别并内吞，这与 Rensen 等^[18]报道的结果一致，而以 Gal 和 lactitol 为“靶头”的配体修饰脂质体却无法被 ASGPr 识别，可能藉由另一种受体 GPr 所识别并结合进入肝 KC 细胞^[37]。但也有文献报道经胆固醇-半乳糖类似结构配体修饰脂质体也可被 ASGPr 识别而大量分布肝实质细胞。出现相反的实验结果的原因，推测可能与肝脏中 ASGPr 和 GPr 两种受体相互竞争性结合含半乳糖基团的配体有关，而脂质体表面的半乳糖环结构、半乳糖基密度^[6]、空间排列^[38]，脂质体粒径大小^[18]、表面所带电荷性质^[14]等因素都可以影响载体表面半乳糖基配体对两种受体的亲和力，但究竟是哪种因素起主导作用，有必要进一步深入研究。

4 结论

针对目前抗肝肿瘤药物 DOX 体内肝靶向差、组织分布无特异性，全身毒副作用大的弊端，本研究利用肝实质细胞表面特异分布的 ASGPr 为靶点，设计并采用酶促法成功合成了 3 种不同类型的半乳糖基-胆固醇配体：CHS-C8-LA、CHS-C8-Gal、CHS-C8-GalNAc；小鼠体内药动学和组织分布实验结果表明：3 种配体修饰的 DOX 脂质体均可显著提高肝脏对 DOX 的摄取率，其中 CHS-C8-GalNAc 肝靶向效率最高；通过预注射 asialofetuin 抑制 ASGPr 实验，肝脏仅对 NGal-LP DOX 的摄取被显著抑制，说明 NGal-LP DOX 是通过 ASGPr 介导的主动内吞转运至肝实质细胞。本研究采用酶促法合成的肝靶向半乳糖基-胆固醇配体分子，具有工艺简单、产率高、绿色环保等优点，极具工业化前景。

参考文献

- [1] Franssen E J, Jansen R W, Vaalburg M, *et al.* Hepatic and intrahepatic targeting of an anti-inflammatory agent with human serum albumin and neoglycoproteins as carrier molecules [J]. *Biochem Pharmacol*, 1993, 45(6): 1215-1226.
- [2] 陈 静, 程 怡, 郑品劲, 等. 去唾液酸糖蛋白受体配体胆固醇-半乳糖苷的酶促合成优化研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(4): 502-506.
- [3] 聂 华, 郑品劲, 罗利华, 等. 有机相脂肪酶催化合成脂质体修饰物胆固醇癸二酸单烯酯 [J]. *中草药*, 2013, 44(23): 3289-3295.
- [4] Bernardes G J, Kikkeri R, Maglinao M, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of carbohydrate-functionalized cyclodextrins and liposomes for hepatocyte-specific targeting [J]. *Org Biomol Chem*, 2010, 8(21): 4987-4996.
- [5] 刘明健, 瞿 鼎, 陈 彦, 等. 丁酰半乳糖酯修饰的薏苡仁组分微乳的制备及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(18): 2696-2702.
- [6] Managit C, Kawakami S, Yamashita F, *et al.* Uptake characteristics of galactosylated emulsion by HepG2 hepatoma cells [J]. *Int J Pharm*, 2005, 301(1/2): 255-261.
- [7] Wang S L, Yu F B, Jiang T Y, *et al.* Design and synthesis of novel galactosylated polymers for liposomes as gene drug carriers targeting the hepatic asialoglycoprotein receptor [J]. *J Drug Target*, 2008, 16(3): 233-242.
- [8] Yamamoto M, Ichinose K, Ishii N, *et al.* Utility of liposomes coated with polysaccharide bearing 1-amino-lactose as targeting chemotherapy for AH66 hepatoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(1): 107-111.
- [9] Rozema D B, Lewis D L, Wakefield D H, *et al.* Dynamic Polyconjugates for targeted *in vivo* delivery of siRNA to hepatocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(32): 12982-12987.
- [10] Sun P, He Y, Lin M, *et al.* Glyco-regioisomerism effect on lectin-binding and cell-uptake pathway of glycopolymer-containing nanoparticles [J]. *Acs Macro Lett*, 2014, 3(1): 96-101.
- [11] Wong T C, Townsend R R, Lee Y C. Synthesis of *D*-galactosamine derivatives and binding studies using isolated rat hepatocytes [J]. *Carbohydr Res*, 1987, 170(1): 27-46.
- [12] Khorev O, Stokmaier D, Schwardt O, *et al.* Trivalent, Gal/GalNAc-containing ligands designed for the asialoglycoprotein receptor [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(9): 5216-5231.
- [13] Rensen P C, van Leeuwen S H, Slidregt L A, *et al.* Design and synthesis of novel *N*-acetylglucosamine-terminated glycolipids for targeting of lipoproteins to the hepatic asialoglycoprotein receptor [J]. *J Med Chem*, 2004, 47(23): 5798-5808.
- [14] D'Souza A A, Devarajan P V. Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting-strategies and applications [J]. *J Control Release*, 2015, 203: 126-139.
- [15] Hattori Y, Kawakami S, Yamashita F, *et al.* Controlled biodistribution of galactosylated liposomes and incorporated probucol in hepatocyte-selective drug targeting [J]. *J Control Release*, 2000, 69(3): 369-377.
- [16] Dube D, Khatri K, Goyal A K, *et al.* Preparation and evaluation of galactosylated vesicular carrier for hepatic targeting of silibinin [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2010, 36(5): 547-555.
- [17] Miura Y, Ikeda T, Kobayashi K. Chemoenzymatically synthesized glycoconjugate polymers [J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4(2): 410-415.
- [18] Rensen P C, Slidregt L A, Ferns M, *et al.* Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(40): 37577-37584.
- [19] Nie H, Cheng Y, Zheng P J, *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of novel galactosylated cholesterol [J]. *Chin Chem Lett*, 2015, 26(5): 543-546.
- [20] Wang S N, Deng Y H, Xu H, *et al.* Synthesis of a novel galactosylated lipid and its application to the hepatocyte-selective targeting of liposomal doxorubicin [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 62(1): 32-38.
- [21] Yu F, Jiang T, Zhang J, *et al.* Galactosylated liposomes as oligodeoxynucleotides carrier for hepatocyte-selective targeting [J]. *Pharmazie*, 2007, 62(7): 528-533.
- [22] Simerská P, Pišvejcová A, Kuzma M, *et al.* Regioselective enzymatic acylation of *N*-acetylhexosamines [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2004, 29(1): 219-225.
- [23] Ren K, Lamsal B P. Synthesis of some glucose-fatty acid esters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions [J]. *Food Chem*, 2017, 214: 556-563.
- [24] 聂 华, 梁 香, 赵 莹, 等. 酶促构建葡萄糖修饰靶向载紫杉醇脂质体制备处方及其工艺优化 [J]. *中草药*, 2016, 47(11): 1867-1874.
- [25] Tacar O, Sriamornsak P, Dass C R. Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(2): 157-170.
- [26] 贾晋斌, 韦青燕. 阿霉素脂质体的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2011, 20(5): 372-377.

- [27] Drummond D C, Meyer O, Hong K, *et al.* Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors [J]. *Pharmacol Rev*, 1999, 51(4): 691-743.
- [28] Nie H, Zheng P J, Luo L H, *et al.* Optimization of lipase-catalyzed synthesis of novel galactosyl ligands for selective targeting of liposomes to the asialoglycoprotein receptor [J]. *Biocatal Biotransfor*, 2015, 33(2): 130-139.
- [29] 李天傲, 杨建苗, 许东航, 等. 多柔比星-五味子乙素共载脂质体克服肿瘤多药耐药的研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(20): 1832-1836.
- [30] Varshosaz J, Hassanzadeh F, Sadeghi H, *et al.* Galactosylated nanostructured lipid carriers for delivery of 5-FU to hepatocellular carcinoma [J]. *J Liposome Res*, 2012, 22(3): 224-236.
- [31] Bally M B, Nayar R, Masin D, *et al.* Liposomes with entrapped doxorubicin exhibit extended blood residence times [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1023(1): 133-139.
- [32] Gupta S, Agarwal A, Gupta N K, *et al.* Galactose decorated PLGA nanoparticles for hepatic delivery of acyclovir [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39(12): 1866-1873.
- [33] Pranatharthihran S, Patel M D, Malshe V C, *et al.* Asialoglycoprotein receptor targeted delivery of doxorubicin nanoparticles for hepatocellular carcinoma [J]. *Drug Delivery*, 2017, 24(1): 20-29.
- [34] Chopineau J, Mccafferty F D, Therisod M, *et al.* Production of biosurfactants from sugar alcohols and vegetable oils catalyzed by lipases in a nonaqueous medium [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1988, 31(3): 208-214.
- [35] Mayer L D, Tai L C, Ko D S, *et al.* Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice [J]. *Cancer Res*, 1989, 49(21): 5922-5930.
- [36] Wu J, Zern M A. Modification of liposomes for liver targeting [J]. *J Hepatol*, 1996, 24(6): 757-763.
- [37] Shimada K, Kamps J A, Regts J, *et al.* Biodistribution of liposomes containing synthetic galactose-terminated diacylglycerol-poly(ethyleneglycol)s [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1326(2): 329-341.
- [38] Sliedregt L A, Rensen P C, Rump E T, *et al.* Design and synthesis of novel amphiphilic dendritic galactosides for selective targeting of liposomes to the hepatic asialoglycoprotein receptor [J]. *J Med Chem*, 1999, 42(4): 609-618.