

• 药剂与工艺 •

TAT 和 PEG 双修饰田蓟苷复合磷脂脂质体的工艺优化及体外评价

曾 诚^{1,2}, 郑瑞芳^{1,2}, 都研文^{1,2}, 刘宣麟², 姜 雯³, 邢建国^{2*}

1. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830004

3. 新疆医科大学第六附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830002

摘要: 目的 筛选细胞穿膜肽 (transcription activator, TAT) 和聚乙二醇 (polyethylene glycols, PEG) 双修饰田蓟苷复合磷脂脂质体 (TAT & PEG tilianin CPL, T&PTCPL) 的最佳制备工艺, 并考察其对心肌细胞 H9C2 的保护作用。方法 采用薄膜分散-超声法制备 T&PTCPL, 利用 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 设计, 分别以总磷脂与田蓟苷质量比 (X_1)、DSPE-PEG₂₀₀₀-TAT 的浓度 (X_2) 和水化体积 (X_3) 为考察对象, 包封率 (Y_1)、粒径 (Y_2) 和多分散系数 (PDI, Y_3) 为主要评价指标筛选 T&PTCPL 最佳配方, 并以 Na₂S₂O₄ 建立 H9C2 细胞缺氧/复氧损伤模型, 以超氧化物歧化酶 (SOD)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、丙二醛 (MDA) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 为指标, 考察 T&PTCPL 对细胞缺氧/复氧损伤的影响, 同时, 考察其体外释放率 (动态透析法) 及人结肠癌 Caco-2 细胞对田蓟苷原料药和 T&PTCPL 的吸收情况。结果 T&PTCPL 的最佳组合为 $X_1=20$, $X_2=1.7\%$, $X_3=3.2$ mL; 包封率为 $(86.62 \pm 2.51)\%$, 粒径为 (149.7 ± 8.2) nm, PDI 为 0.15 ± 0.05 。在体外细胞实验中, 与模型组比较, 原料药组及 T&PTCPL 组能显著提高 SOD 活性, 减少 MDA 的含量及抑制 LDH 和 CK-MB 的释放 ($P < 0.05$), 并且 T&PTCPL 的效果优于原料药。同时, T&PTCPL 在 48 h 基本释放完全, 累积释放率 88.65%, Caco-2 细胞对 T&PTCPL 的吸收效果较佳。结论 Box-Behnken 实验设计法用于 T&PTCPL 的优化筛选是可行的, 数学模型的预测值与实验观察值相符, 并且 T&PTCPL 在体外释放中表现出较好的缓释效果, 能促进田蓟苷在 Caco-2 细胞中的吸收, 同时, 提示 T&PTCPL 具有保护心肌缺血再灌注损伤作用。

关键词: 田蓟苷; 双修饰; 穿膜肽; 聚乙二醇; 复合磷脂脂质体; Box-Behnken 设计; 体外评价

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)21-5061-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.21.017

Optimization and *in vitro* evaluation of TAT and PEG co-modified tilianin-loaded composite phospholipid liposomesZENG Cheng^{1,2}, ZHENG Rui-fang^{1,2}, DU Yan-wen^{1,2}, LIU Xuan-lin², JIANG Wen³, XING Jian-guo²

1. Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China

3. Department of Pharmacy, the Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China

Abstract: Objective To optimize the preparation technology of transcription activator (TAT) and polyethylene glycols (PEG) co-modified tilianin-loaded composite phospholipid liposome (TAT & PEG tilianin CPL, T&PTCPL) and investigate its protective effect on cardiomyocytes. **Methods** The composite phospholipid liposome was prepared by thin film-ultrasonic method. A three-factor, three-level Box-Behnken experimental design was employed. The weight ratio of total phospholipid to tilianin (X_1), the concentration of DSPE-PEG₂₀₀₀-TAT (X_2), and hydration volume (X_3) were observed. The encapsulation efficiency (Y_1), particle size (Y_2), and polydispersion coefficient (Y_3) were evaluated to optimize optimal formula. In addition, hypoxia/reoxygenation model was established with Na₂S₂O₄ in H9C2 cells. Superoxide dismutase (SOD) activity, malonaldehyde (MDA) level and release of lactate

收稿日期: 2018-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (H0203); 新疆维吾尔自治区自然科学基金青年基金项目 (2015211B029)

作者简介: 曾 诚, 男, 在读博士, 研究方向为药物新制剂与新剂型。Tel: (0991)2318172 E-mail: wjzc0312@126.com

*通信作者 邢建国, 男, 博士生导师, 研究员, 研究方向为药物新制剂与新剂型。Tel: (0991)2828537 E-mail: xjguodd@163.com

dehydrogenase (LDH) and creatine kinase-MB (CK-MB) were assessed to evaluate the effect of T&PTCPL, meanwhile, the *in vitro* release rate (dynamic dialysis method) and absorption rate of tilianin and T&PTCPL in Caco-2 cell were examined. **Results** The optimal formula was as following: $X_1 = 20$, $X_2 = 1.7\%$, and $X_3 = 3.2$ mL; The encapsulation efficiency was $(86.62 \pm 2.51)\%$, particle size was (149.7 ± 8.2) nm and PDI was 0.15 ± 0.05 . Compared with model group, T&PTCPL and tilianin groups increased SOD activity, inhibited level of MDA, LDH and CK-MB leakage ($P < 0.05$), and the effect of T&PTCPL group was better than tilianin group, meanwhile, T&PTCPL was completely released at 48 h, with a cumulative release of 88.65%, and Caco-2 cells had better absorption of T&PTCPL. **Conclusion** The Box-Behnken design is suitable for optimizing the formulation of T&PTCPL, and the observed responses are in close agreement with the predicted values of the mathematic models; Moreover, T&PTCPL shows a better sustained release effect *in vitro* release, which promotes the absorption of tilianin in Caco-2 cells and suggests that T&PTCPL may have protective effect on myocardial ischemia reperfusion injury.

Key words: tilianin; co-modified; transcription activator; polyethylene glycols; composite phospholipid liposome; Box-Behnken design; *in-vitro* evaluation

当前,全球冠心病的患者数量和死亡率显示出日趋俱增的趋向,并随年龄增长而提高^[1-2]。尤其是心肌缺血再灌注损伤(MIRI),因冠状动脉闭塞一定时间后,血运重新建立,往往达不到预期效果,甚至加剧了心肌细胞受损,反而引发了一系列对心肌不利的瀑布式连锁性反应,严重影响了患者的预后^[3-4]。近年来,一些天然物质成为保护心肌缺血再灌注损伤领域的研究热点和趋势^[5-12]。根据本课题组前期研究^[13-14],香青兰中的主要活性成分田蓟苷具有多种药理作用,如预防和治疗动脉粥样硬化、高血压、高血脂和保护心肌缺血/再灌注损伤等,既在防治心脑血管疾病方面具有广阔的应用前景,也是当前心血管疾病研究领域非常具有开发前景的天然药物。然而,由于田蓟苷在生物药剂学分类系统中属于第4类药物,其水溶性差,口服生物利用度低,从而极大地限制了其临床应用与疗效^[15-18]。目前中药纳米制剂的开发研究已有相关文献报道^[19-21],但尚在实验阶段,且各种给药系统都或多或少存在缺陷,仍需继续研究。

复合磷脂脂质体(CPL)是一种由2种不同磷脂相间排列和胆固醇组成的类似生物膜结构的拥有不同相区域的磷脂双分子层球型药物载体^[22-24],其特点主要是改善药物的溶解性,提高药物的生物相容性和在胃肠道中的稳定性^[25-27]。此外,聚乙二醇(PEG)可显著延长药物载体在体内的循环时间,但是,当PEG修饰CPL到达损伤部位后,PEG较弱的穿透能力会限制CPL的入胞作用^[28-29]。因此,为了提高药物递送的入胞能力,故引入了细胞穿膜肽(transcription activator, TAT),其能够将各种性质的药物高效率地传递进入细胞,且穿透细胞膜进入细胞质甚至细胞核而不损伤细胞膜结构^[30]。

因此,鉴于PEG和TAT各有优势,为了达到优势互补的目的,本课题将PEG和TAT双修饰复合磷脂脂质体(TAT & PEG tilianin CPL, T&PTCPL)的处方进行了优化,并对T&PTCPL的药效进行了初步评价。

1 仪器与试药

TGL-16K 型台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验仪器开发有限公司;KQ-100 DE 型数控超声波清洗器,美国密理博公司;AB135-S 梅特勒-托利多电子天平,梅特勒-托利多国际股份有限公司;UltiMate3000 型高效液相色谱仪,美国赛默飞世尔科技有限公司;JY92-IIN 超声细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;控温加热磁力搅拌器,德国 IKA 公司;Nano S90 激光粒度仪,英国马尔文公司;H-7500 型透射电镜显微镜(TEM),日本日立公司;Thermo Forma 3111 型 CO₂ 孵箱,美国赛默飞世尔科技有限公司;SW-CJ-1F 型净化工作台,苏州净化设备有限公司;B600 型低速离心机,白洋离心机厂;倒置显微镜,日本奥林匹克公司。

田蓟苷对照品(批号 20170622,质量分数 ≥ 98%)和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-细胞穿膜肽(DSPE-PEG₂₀₀₀-TAT),新疆维吾尔自治区药物研究所;大豆卵磷脂(SPC)、氢化大豆卵磷脂(HSPC)和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG₂₀₀₀),上海艾韦特医药科技有限公司;胆固醇(CHO),中国慧兴生化试剂有限公司;无水乙醇,天津市风船化学试剂有限公司;DMEM 细胞培养基、0.25%胰蛋白酶和胎牛血清(FBS),美国 Gibco 公司;连二亚硫酸钠(Na₂S₂O₄),国药集团化学试剂北京有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒、肌酸激酶同工酶(CK-MB)检测试剂盒、

超氧化物歧化物(SOD)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒,南京建成生物工程有限公司;其他试剂均为分析纯。

大鼠心肌细胞 H9C2 和人结肠癌细胞 Caco-2 均购于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,所用代数均为 20~35 代。

2 方法与结果

2.1 T&PTCPL 的制备

采用薄膜分散-超声法制备复合磷脂脂质体,精密称取适量 SPC、HSPC、CHO、DSPE-PEG₂₀₀₀ 和 DSPE-PEG₂₀₀₀-TAT,溶于混合溶剂(氯仿-乙醇 1:3)中,加入适量的田蓟苷,使其溶解完全后,旋转蒸发至呈均匀薄膜,在 37 ℃条件下减压蒸发除去有机溶剂之后,用 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)在 37 ℃水化、冰浴探头超声 400 W, 100 次,超声结束后逐渐形成带有淡黄色荧光的半透明液体,然后再通过孔径为 220 nm 的聚碳脂膜挤压 3 次,形成均匀的 T&PTCPL。

2.2 田蓟苷的含量测定

2.2.1 检测波长 精密称取适量田蓟苷对照品,用 70%乙醇定容至 10 mL,配制成质量浓度为 20 μg/mL 的田蓟苷溶液,200~400 nm 波长进行紫外扫描,田蓟苷在 330 nm 处有最大吸收,同时,制备空白 T&PCPL,精密量取 1 mL,70%乙醇定容至 10 mL,于紫外下进行扫描,空白 T&PCPL 在 277 nm 处有吸收,结果表明空白 T&PCPL 对田蓟苷的测定无干扰,故选定在 330 nm 处测定其吸光度(A)。

2.2.2 溶液的配制

(1)对照品储备液:精密称取田蓟苷对照品 6.0 mg,置 25 mL 量瓶中,用 70%乙醇超声溶解并定容,摇匀,静置。得 240 μg/mL 的田蓟苷对照品储备液,置于 4 ℃冰箱低温避光保存备用。

(2)供试品储备液:精密量取 T&PTCPL 1 mL,加入甲醇破乳后,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,得供试品储备液,置于 4 ℃冰箱低温避光保存备用。

2.2.3 色谱条件 结合参考文献和实际情况,选择色谱柱为 Shim-pack ODS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.5%甲酸(27:73);检测波长 330 nm;体积流量 1 mL/min;柱温 35 ℃;进样量 10 μL。理论塔板数按照田蓟苷计不小于 2 000,分离度大于 1.5。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取上述储备液用 PBS

进一步稀释得到系列质量浓度的田蓟苷对照品溶液,分别为 1.2、2.4、9.6、48、120、240 μg/mL 的田蓟苷溶液,于波长 330 nm 处,采用 HPLC 进样测定。以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,田蓟苷的线性回归方程为 $Y=2\,276.2X+581.3$, $r^2=0.999\,3$,结果表明田蓟苷质量浓度在 1.2~240 μg/mL 呈良好线性关系。

2.2.5 精密度试验 取质量浓度为 1.2、48、240 μg/mL 的田蓟苷对照品溶液,按“2.2.3”项色谱条件分别于 1 d 内测定 6 次,得到精密度 RSD 分别为 1.27%、1.13%、1.44%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一份 T&PTCPL 6 份,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按照“2.2.3”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算田蓟苷含量的 RSD 为 1.53%,结果表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一份 T&PTCPL,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并分别于 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h,再按照“2.2.3”项色谱条件测定,记录峰面积,计算田蓟苷含量的 RSD 为 1.12%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 精密量取已知含量的同一份 T&PTCPL 6 份,分别加入质量浓度为 1.2、48、240 μg/mL 的田蓟苷对照品溶液 0.5 mL,各 3 份,按照“2.2.3”项色谱条件测定,记录峰面积,计算田蓟苷含量,得到加样回收率分别为 99.32%、100.82%、98.73%,RSD 分别为 0.86%、0.89%、1.22%。结果表明该方法可行,准确度良好。

2.3 增溶作用考察

取适量 T&PTCPL 的冻干粉,置于盛有蒸馏水的 15 mL 离心管中,恒温振荡 24 h,静置后取上清液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,加入甲醇破乳后,在“2.2.3”项色谱条件进样分析,测得 T&PTCPL 中田蓟苷的饱和溶解度为 422.51 μg/mL。

取过量的田蓟苷原料药,按照 T&PTCPL 的冻干条件处理后,置于盛有蒸馏水的 15 mL 离心管中,恒温振荡 24 h,静置后取上清液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,在“2.2.3”项色谱条件进样分析,测得田蓟苷的饱和溶解度为 2.58 μg/mL。

精密称取适量 DSPE-PEG₂₀₀₀、SPC、HSPC、CHO、DSPE-PEG₂₀₀₀-TAT 和田蓟苷,混合均匀后,按照 T&PTCPL 的冻干条件处理,置于盛有蒸馏水的 15 mL 离心管中,恒温振荡 24 h,静置后取上清液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,在“2.2.3”项色谱条

件下进样分析,测得田蓟苷的饱和溶解度为 72.75 $\mu\text{g/mL}$ 。药物水溶性的大小顺序为 T&PTCPL>混合物>田蓟苷原料药。对比田蓟苷原料药, T&PTCPL 在水中的饱和溶解度提高了 163.7 倍,混合物在水中的饱和溶解度提高了 28.2 倍。而对比混合物, T&PTCPL 在水中的饱和溶解度提高了 5.8 倍,结果表明 CPL 对田蓟苷有较好的增溶作用。

2.4 包封率及载药率的测定

采用超滤离心法测定 T&PTCPL 的包封率。取 T&PTCPL 0.5 mL 加入超滤离心管中(截留相对分子质量 30 000),置于离心机中,12 000 r/min 离心 15 min,收集滤膜下层液体,进样, HPLC 测定溶液中游离田蓟苷的量为 W_1 ;另取 T&PTCPL 0.5 mL,甲醇破乳后,过 0.22 μm 微孔滤膜,进样, HPLC

测定田蓟苷的量为 W_2 。采用下列公式计算 T&PTCPL 的包封率和载药量。考察结果显示, T&PTCPL 的包封率为 $(87.55 \pm 2.35)\%$, T&PTCPL 的载药率为 $(4.93 \pm 0.28)\%$ 。

$$\text{包封率} = (W_2 - W_1) / W_2$$

$$\text{载药率} = M_1 / M_2$$

M_1 为 T&PTCPL 中田蓟苷质量, M_2 为 T&PTCPL 的总质量

2.5 星点设计-效应面法优化

在前期预试验的基础上,通过 Box-Behnken Design 响应面进一步考察总磷脂与田蓟苷质量比(X_1)、DSPE-PEG₂₀₀₀-TAT 的用量(X_2)和水化体积(X_3)3 个因素对平均粒径(Y_1)、多分散系数(PDI, Y_2)和包封率(Y_3)的影响,建立数学模型优化 T&PTCPL 处方,因素与水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计及结果 ($n=3$)

Table 1 Box-Behnken design and results ($n=3$)

试验号	X_1	$X_2/\%$	X_3/mL	Y_1/nm	Y_2	$Y_3/\%$	试验号	X_1	$X_2/\%$	X_3/mL	Y_1/nm	Y_2	$Y_3/\%$
1	10 (-1)	0.5 (-1)	2.5 (0)	104.5	0.1	66.24	10	20	2.0	1.0	153.2	0.2	85.24
2	30 (+1)	0.5	2.5	183.2	0.2	87.52	11	20	0.5	4.0	119.8	0.1	77.82
3	10	2.0 (+1)	2.5	159.5	0.2	79.61	12	20	2.0	4.0	168.4	0.2	80.55
4	30	2.0	2.5	216.4	0.2	91.72	13	20	1.25	2.5	121.8	0.1	88.25
5	10	1.25 (0)	1.0 (-1)	133.2	0.2	75.20	14	20	1.25	2.5	147.6	0.1	84.62
6	30	1.25	1.0	197.5	0.2	88.48	15	20	1.25	2.5	123.5	0.1	89.37
7	10	1.25	4.0 (+1)	171.3	0.2	73.69	16	20	1.25	2.5	120.4	0.2	86.91
8	30	1.25	4.0	183.5	0.2	92.27	17	20	1.25	2.5	119.3	0.1	87.85
9	20 (0)	0.5	1.0	113.5	0.2	82.60							

2.5.1 模型拟合 采用 Design-expert 8.04 软件对平均粒径、分散系数和包封率与各因素之间进行方差分析及二次多项式回归拟合,得出最优拟合方程 $Y_1 = 126.52 + 26.51 X_1 + 22.06 X_2 + 5.7 X_3 - 5.45 X_1 X_2 - 13.03 X_1 X_3 + 2.23 X_2 X_3 + 36.02 X_1^2 + 3.36 X_2^2 + 8.84 X_3^2$ ($r^2=0.9433$); $Y_2 = 0.14 + 0.018 X_1 + 0.006375 X_2 + 0.002125 X_3 - 0.013 X_1 X_2 - 0.011 X_1 X_3 + 0.005 X_2 X_3 + 0.031 X_1^2 - 0.00505 X_2^2 + 0.034 X_3^2$ ($r^2=0.9401$); $Y_3 = 87.4 + 8.16 X_1 + 2.87 X_2 - 0.9 X_3 - 2.29 X_1 X_2 + 1.33 X_1 X_3 + 0.023 X_2 X_3 - 2.64 X_1^2 - 3.49 X_2^2 - 2.35 X_3^2$ ($r^2=0.9386$)。

对上述 3 组拟合的一元二次方程的相关系数分别为 0.9433、0.9401、0.9386,表明设计模型拟合程度良好,该模型是合适的,可以用此模型对 T&PTCPL 的处方进行分析和预测。从表 2 回归方差分析的显著性检验可知,模型 Y_1 中 X_1 、 X_2 ($P <$

0.01) 以及二次项 X_1^2 ($P < 0.01$) 极显著, $X_1 X_3$ ($P < 0.05$) 显著,其他不显著;模型 Y_2 中, X_1 、 X_1^2 ($P < 0.01$) 以及 X_3^2 ($P < 0.01$) 极显著, $X_1 X_2$ ($P < 0.05$) 显著,其他不显著;模型 Y_3 中 X_1 和 X_2 ($P < 0.01$) 极显著, X_2^2 ($P < 0.05$) 显著,其他不显著。

2.5.2 效应曲面分析 根据二次多项回归方程拟合结果,以考察指标为纵坐标,固定其中一个因素,另外 2 个因素为横坐标,绘制三维曲线图,结果见图 1。结果表明在一定范围内,因素 X_1 和 X_2 与 T&PTCPL 的包封率呈正态相关,与平均粒径和分散系数呈负相关,二次项 X_1^2 ($P < 0.01$) 极显著,以及 $X_1 X_2$ 和 $X_1 X_3$ ($P < 0.05$) 显著,表明每个自变量和因变量之间属于非线性关系,具有一定的交互作用。综合以上结果,确定最终 T&PTCPL 的最优处方为 $X_1=20.28$ 、 $X_2=1.72\%$ 、 $X_3=3.21 \text{ mL}$ 。考虑实际操作情况修正为 $X_1=20$ 、 $X_2=1.7\%$ 、 $X_3=3.2 \text{ mL}$ 。

表 2 回归方程系数的显著性检验

Table 2 Significance test of coefficient in regression equation

考察项	Y ₁			Y ₂			Y ₃		
	离均差平方和	F 值	P 值	离均差平方和	F 值	P 值	离均差平方和	F 值	P 值
模型	16 687.76	12.94	0.001 4	0.014	12.2	0.001 7	748.16	11.89	0.001 8
X ₁	5 623.30	39.25	0.000 4	0.002 6	21.68	0.002 3	532.20	76.14	0.000 1
X ₂	3 894.03	27.18	0.001 2	0.000 33	2.64	0.147 9	65.78	9.41	0.008 1
X ₃	259.92	1.81	0.220 0	0.000 036	0.29	0.604 6	6.46	0.92	0.368 3
X ₁ X ₂	118.81	0.83	0.392 7	0.000 65	5.29	0.045 0	21.02	3.01	0.126 5
X ₁ X ₃	678.60	4.74	0.046 0	0.000 51	4.12	0.082 0	7.02	1	0.349 6
X ₂ X ₃	19.80	0.14	0.721 0	1.000×10 ⁻⁶	8.135×10 ⁻⁶	0.930 7	0.002	0.000 3	0.986 9
X ₁ ²	5 461.39	38.12	0.000 5	0.003 97	32.28	0.000 7	29.23	4.18	0.080 1
X ₂ ²	47.68	0.33	0.582 1	0.000 11	0.87	0.381 1	51.36	7.35	0.030 2
X ₃ ²	329.03	2.30	0.173 4	0.004 85	39.48	0.000 4	23.35	3.34	0.110 3
残差	1 002.80			0.000 86			48.93		
拟失项	437.45	1.03	0.468 2	0.000 66	4.37	0.094 1	36.16	3.77	0.116 1
纯误差	565.35			0.000 2			12.77		
总差	17 690.56			0.014			797.09		

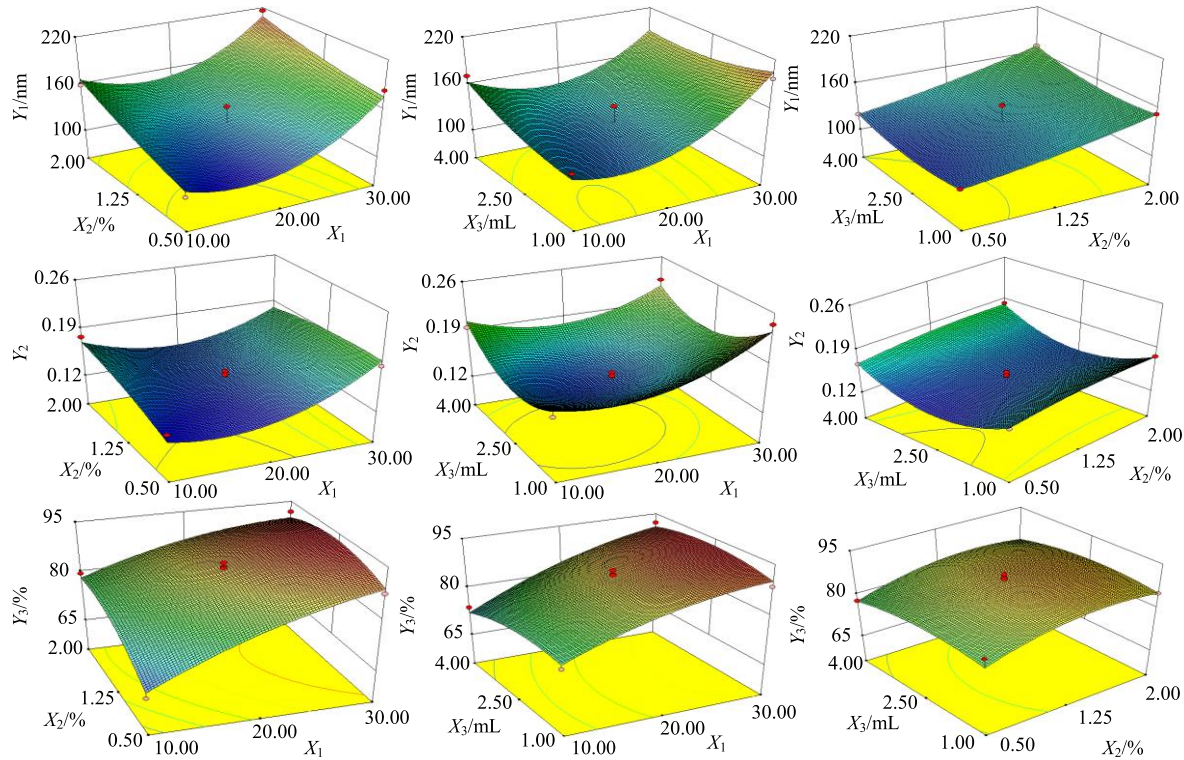


图 1 Box-Behnken 设计的三维曲面图

Fig. 1 Three dimension surface chart by Box-Behnken design

2.5.3 验证试验 按优选的工艺条件进行 3 次验证试验，取均值与二项式方程预测值相比较，结果见表 3，所有实测值与预测值的偏差<3%，说明二项式模型拟合效果良好，可信度高，同时，表明最佳处方的优越性和良好重现性。

2.6 形态学考察

采用透射式电子显微镜观察 T&PTCPL 和空白 CPL 外观形态和分布。将适当稀释后的待测 CPL 滴于 Formwan 膜铜网上（膜面向上），5 min 后，用滤纸片从铜网边缘吸干多余液体。然后，向铜网滴入

1%磷钨酸染液 1~2 滴, 1 min 后, 同样吸干剩余残液。将此铜网晾干后经透射电镜成像, 在镜下可见空白 CPL 和 T&PTCPL 呈圆球型且呈单分散分布, 具有明显双分子层结构, 粒径范围小于 200 nm, 分布均匀, 见图 2。

表 3 实测值与预测值比较 ($n=3$)

Table 3 Comparison of measured and predicted values ($n=3$)

测定值	平均粒径/nm	PDI	包封率/%
预测值	147.4±11.9	0.15±0.05	87.08±2.64
实测值	149.7±8.2	0.15±0.05	86.62±2.51
偏差/%	1.56	0	0.53

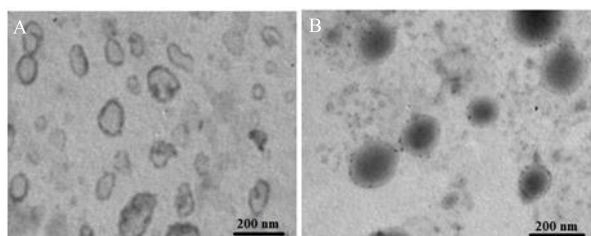


图 2 空白 CPL (A) 和 T&PTCPL (B) 在 TEM 下形态图
Fig. 2 Images of morphology of blank CPL (A) and T&PTCPL (B) under TEM

2.7 平均粒径、PDI 和 Zeta 电位的测定

按照最优配方制备 T&PTCPL, 蒸馏水稀释后使用 NanoS90 激光粒度仪测定各项指标, 经测定, T&PTCPL 的平均粒径为 (149.7±8.2) nm, PDI 为 0.15±0.05 和 Zeta 电位为 (-43.8±3.2) mV, 结果见图 3, 从图 3 中可以看出 T&PTCPL 的粒径较小且分布均匀, 符合纳米制剂规格, Zeta 电位绝对值在 30 mV 以上时, 可防止囊泡间相互聚集, 表明其稳定性较好^[24]。

2.8 体外细胞实验

2.8.1 H9c2 细胞的培养 H9c2 细胞培养条件: 37 ℃ 和 5% CO₂, DMEM 培养基中包括 10% FBS 和 1%青霉素链霉素双抗。细胞贴壁 80%~90%时,

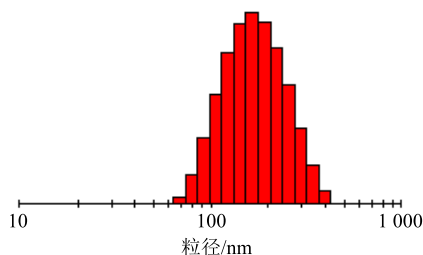


图 3 T&PTCPL 的粒径图
Fig. 3 Particle size of T&PTCPL

用 0.05%胰酶消化, 计数, 以 1:3 的比例进行传代, 每 2~3 天传代 1 次。取对数生长期的细胞用于后续实验。

2.8.2 建立 H9c2 细胞氧化损伤模型 取对数期 H9c2 细胞, 接种于 96 孔培养板, 每孔 8×10^3 个细胞, 每孔 100 μL, 37 ℃、5% CO₂ 条件下继续培养 24 h。弃去原培养液, 分为对照组、模型组、田蓟苷预处理组、T&PTCPL 预处理组, 每组 6 个复孔。其中, 对照组用正常培养液培养 H9c2 细胞; 模型组换为正常培养液, 继续培养 24 h 后加入终浓度为 1 mmol/L Na₂S₂O₄ 培养 1 h, 然后置换正常培养基继续孵育 2 h; 田蓟苷和 T&PTCPL 预处理组分别换为正常培养基配制的田蓟苷和 T&PTCPL 溶液预处理 12 h, 之后操作同模型组。

2.8.3 细胞存活率检测 96 孔板培养细胞, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 继续孵育 4 h, 最后, 在酶标仪 (提前预热 30 min) 450 nm 下检测各组 A 值。将没接种细胞的培养基中添加同体积的 CCK-8 溶液, 依照相同条件检测 A 值, 将其设置为空白对照孔, 计算细胞存活率。

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

结果如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组的细胞存活率显著下降 ($P<0.01$)。与模型组相比, 田蓟苷原料药组和 T&PTCPL 组的细胞存活率显著升高 ($P<0.05$ 、0.01)。

表 4 细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Cell survival rate ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%
对照	—	97.62±2.41
模型	—	55.24±3.73 ^{##}
田蓟苷	0.1	70.58±3.30*
T&PTCPL	2.0	85.67±3.86**

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

2.8.4 生化指标检测 将各组细胞用 0.25%胰酶消化收集, PBS 洗涤 3 次, 超声粉碎得到细胞匀浆液。分别按检测试剂盒说明书步骤, 检测细胞匀浆液中 MDA 含量及 SOD 活性。分别收集各组细胞上清液, 并按检测试剂盒说明书步骤, 检测细胞上清液中 LDH 和 CK-MB 释放量。结果如表 5 所示, 与对照组相比, 模型组的 LDH 和 CK-MB 的释放量及 MDA 的含量显著升高, 而细胞内 SOD 的活性水平显著下降 ($P<0.01$)。与模型组比较, 田蓟苷原料药组

表 5 原料药和 T&PTCPL 对 H9C2 细胞的氧化损伤生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Influence of tilianin and T&PTCPL on MDA, SOD, LDH, and CK-MB in H9C2 cells after oxidative injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	LDH/(U·mL ⁻¹)	CK-MB/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	3.75 ± 2.16	92.53 ± 26.31	45.39 ± 7.64	2.42 ± 1.25
模型	—	9.38 ± 2.81 ^{##}	33.65 ± 8.23 ^{##}	184.62 ± 42.18 ^{##}	6.52 ± 2.81 ^{##}
田蓯苣	0.1	7.33 ± 1.58*	54.82 ± 13.90*	151.48 ± 18.43*	4.87 ± 0.79*
T&PTCPL	2.0	4.52 ± 1.36**	80.81 ± 17.38**	74.72 ± 5.52**	3.32 ± 0.93**

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

和 T&PTCPL 组的 LDH 和 CK-MB 的释放量及 MDA 的含量显著下降, 而细胞内的 SOD 活性水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。

2.9 体外释放实验

采用动态透析法, 分别取田蓯苣原料药溶液和 T&PTCPL 混悬液各 5 mL, 分别置于已活化的透析袋中, 两端扎牢, 绑于桨板上, 置于 50 mL 透析介质中, 37 °C 恒温水浴振荡, 转速 100 r/min, 分别于 0、0.167、0.333、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、10、12、24、48 h 各取 1 mL 置于 EP 管中, 并及时补充等温同体积空白介质, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 采用 HPLC 测定田蓯苣原料药溶液和 T&PTCPL 混悬液, 并根据如下公式计算各时间点累积释放率 [累积释放率 = CPL 磷脂双分子层中包裹的田蓯苣含量/CPL 样品中田蓯苣含量 (包括未包裹与包裹的全部田蓯苣)], 并绘制累积释放曲线, 见图 4。田蓯苣原料药在 6 h 基本释放完全, 累积释放 95.53%, 而 T&PTCPL 需要 48 h 基本释放完全, 累积释放 88.65%, 表现出良好的缓释性, 推测其原因可能是 TCPL 中, DSPE 加入双层膜结构, 使膜结构更加稳定, 从而有效减慢药物的扩散。

2.10 体外吸收实验

Caco-2 细胞在 5% CO₂, 37 °C 恒温密闭式孵箱 (相对湿度 95%) 内培养, 采用含 10% FBS 的 DMEM

完全培养基。在培养瓶中培养, 隔天更换培养液, 细胞生长达融合后, 用 0.05% 胰酶消化, 计数, 接种在 12 孔板中培养, 细胞的接种浓度为 1×10^5 个/mL, 待细胞生长达融合后用于实验。

培养良好的 Caco-2 细胞, 实验前先用 37 °C 的 Hank's 液荡洗 3 次, 最后置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中浸泡 30 min, 以清除细胞表面对测定有干扰的物质。将不同浓度的田蓯苣原料药溶液和 T&PTCPL 混悬液分别加入到细胞表面, 置于 37 °C 恒温箱中吸收 12 h 后, 迅速吸出药物, 并用 37 °C 的 Hank's 液迅速荡洗 3 次。然后破碎细胞, 经离心和过滤, HPLC 法测定药物的吸收量。

从表 6 中可以看出, 田蓯苣原料药随着药物浓度的增加田蓯苣的吸收率变化不明显, 而 T&PTCPL 中田蓯苣的吸收率随着药物浓度的增加而增加, 同时, T&PTCPL 中的田蓯苣吸收率显著高于田蓯苣原料药 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究的主要目的是通过 CPL 技术, 来解决田蓯苣水溶性差的问题。其原理主要是使不同的磷脂材料相间排列, 在双分子层中分成胶晶相与液晶相 (分隔成多个不连续的区域), 抑制了田蓯苣的相

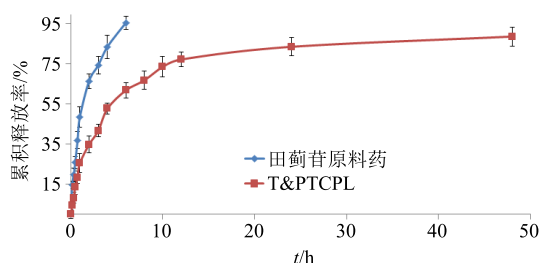


图 4 田蓯苣原料药和 T&PTCPL 的体外释放曲线 ($n = 3$)

Fig. 4 In vitro release of tilianin and T&PTCPL ($n = 3$)

表 6 不同质量浓度原料药及 T&PTCPL 在 Caco-2 细胞的吸收率 ($n = 6$)

Table 6 Absorption rate of different concentrations of tilianin and T&PTCPL in Caco-2 cells ($n = 6$)

田蓯苣给药质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	吸收率/%	
	田蓯苣原料药	T&PTCPL
50	17.82 ± 2.64	66.13 ± 3.31**
100	17.87 ± 2.32	71.59 ± 2.85**
200	16.52 ± 2.55	77.82 ± 3.48**

与田蓯苣原料药组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs tilianin group

互聚集, 不仅增加了田蓟苷在膜内的稳定性, 还减小了剂型在存放过程中的泄漏现象, 形成具有良好韧性的磷脂膜包裹田蓟苷, 从而改善其溶解性, 并且, 可促进田蓟苷的胃肠吸收和吸收后不易被快速代谢, 从而达到提高和改善口服生物利用度和治疗效果的作用。

课题组前期预试验中, 通过单因素实验考察了不同的指标^[24]。其中, 如果磷脂量过低, 可见液面澄清透明, 但由于没有足量的磷脂包含药物, 底部易有药物结晶沉淀, 导致成型制剂稳定性差, 形成较大的平均粒径和分散系数。但是, 当磷脂量过大时, 复合磷脂脂质体的平均粒径和分散较大, 偶见磷脂块, 浊度较大, 易发生复合磷脂脂质体相互间的絮凝和融合, 稳定性差。同时, 还考察了 DSPE-PEG₂₀₀₀-TAT 的用量对复合磷脂脂质体理化性质的影响, 随着 TAT 用量增加, 虽然田蓟苷包封率呈上升趋势, 但是, 平均粒径和 PDI 同样呈上升趋势, 从而导致复合磷脂脂质体的稳定性逐渐下降。此外, 胆固醇在复合磷脂脂质体的制备中起着膜流动性调节剂的作用, 可使相变温度以下处于固态的磷脂转变为液晶态, 防止类脂链结晶化, 可抑制磷脂分子碳氢链的某些运动能力, 降低其流动性, 还能够加固磷脂双分子层膜的坚固性, 防止药物渗漏, 同时, 添加适量的胆固醇, 可使固磷脂双分子层膜的刚性增强, 在同样材质的膜质中, 所形成膜的总表面积减少, 最终可使得平均粒径和分散系数减小^[15]。但是, 据报道胆固醇的含量不宜过低, 含量过低会使复合磷脂脂质体在制备和储存过程中发生严重渗漏, 形成结晶。当胆固醇的用量过大时, 复合磷脂脂质体容易出现絮凝或沉淀现象^[26]。

目前, 已有研究报道, 田蓟苷对心肌缺氧/复氧损伤具有一定保护作用^[31]。本实验以 Na₂S₂O₄ 为缺氧环境建立化学性缺氧/复氧损伤模型, 通过考察同剂量下的田蓟苷原料药和 T&PTCPL 对心肌细胞损伤后细胞活力、LDH 和 CK-MB 漏出量反映细胞受损状态的指标, 以及对 SOD 活性、过氧化物脂质 MDA 的生成量等反映细胞氧化损伤程度指标的影响, 对比田蓟苷原料药和 T&PTCPL 对 H9c2 细胞缺氧/复氧的影响。对比结果表明, T&PTCPL 的药效优于田蓟苷原料药, 具有显著的抗氧化能力。推测其机制主要包括复合磷脂脂质体的表面共同修饰了具有长循环能力的 PEG 和穿膜能力的 TAT, 其中, 长循环材料 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的加入, 使 CPL 的

稳定性得到了改善。长循环 CPL 的表面电位绝对值变大, 粒子间的静电相互作用力增加, 能改善 CPL 易发生聚集、絮凝的现象, 同时, 在体外释放实验中, 表现出更好的缓释效果。而 TAT 不但可以快速将载体跨膜导入细胞内, 同时对细胞的正常结构和功能不产生影响, 在 Caco-2 细胞实验中, 反映出 T&PTCPL 对田蓟苷吸收具有良好的促进作用。

参考文献

- [1] Wood F O, Leonowicz N A, Vanhecke T E, *et al.* Mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction who do not undergo reperfusion [J]. *Am J Cardiol*, 2012, 110(4): 509-514.
- [2] Kerem Y, Eastvold J S, Faragoi D, *et al.* The role of prehospital electrocardiograms in the recognition of ST-segment elevation myocardial infarctions and reperfusion times [J]. *J Emerg Med*, 2014, 46(2): 202-207.
- [3] Altamirano F, Wang Z V, Hill J A. Cardioprotection in ischemia-reperfusion injury: Novel mechanisms and clinical translation [J]. *J Physiol*, 2015, 593(17): 3773-3788.
- [4] Meng G, Wang J, Xiao Y, *et al.* GYY4137 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by attenuating oxidative stress and apoptosis in rats [J]. *J Biomed Res*, 2015, 29(3): 203-213.
- [5] 任建勋, 李 磊, 尹云泽, 等. 通脉养心丸对小型猪心肌缺血再灌注损伤后期气阴两虚证的干预作用 [J]. *中草药*, 2018, 49(7): 1612-1616.
- [6] 春玉虎, 党宏伟, 闫业军. 番茄红素对大鼠心脏缺血再灌注的保护作用及其机制研究 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(9): 974-979.
- [7] 丁海燕, 李运曼, 方伟蓉. 灵仙新苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(4): 547-551.
- [8] 韩 军, 宜佳利, 胡浩然, 等. 金丝桃苷预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用与 PI3K/Akt 信号通路的关系 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(1): 118-123.
- [9] 路 航, 王烁璿, 王秋静. 人参三醇皂苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2016, 47(2): 275-280.
- [10] 王玉姝, 李 欢, 宋东伟, 等. 龙甲血脉通胶囊对大鼠心肌缺血及心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(1): 25-28.
- [11] 徐 丽, 张元媛, 曹军平. 芒果苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(2): 198-201.

- [12] 王雪晶, 罗鑫, 周建明, 等. 大株红景天化学成分及其心肌细胞保护活性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2822-2826.
- [13] Zeng C, Jiang W, Zheng R, *et al.* Cardioprotection of tilianin ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury: Role of the apoptotic signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193845.
- [14] Tan M E, He C H, Jiang W, *et al.* Development of solid lipid nanoparticles containing total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* L. and their therapeutic effect against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12(1): 3253-3265.
- [15] 黄志巧, 邢建国, 王新春, 等. 田蓟苷在 Caco-2 细胞模型中的吸收特征研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1315-1318.
- [16] 戴佩旻. UGT 酶与外排转运蛋白在田蓟苷与刺槐素的肠道循环处置中的作用及机制 [D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [17] 曾诚, 马丽月, 于宁, 等. 香青兰提取物基本理化性质研究 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3817-3823.
- [18] 曾诚, 杨晓艺, 帕依曼·亥米提, 等. 田蓟苷在不同介质中的平衡溶解度及油水分配系数 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 84-87.
- [19] 何嘉辉, 茆睿智, 唐钺, 等. 纳米磁珠辅助红细胞膜垂钓技术及其在当归活性成分筛选中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1041-1047.
- [20] 张宽云, 马燕. 紫杉醇-油酸和鸦胆子油分子配型组装纳米乳给药系统研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1544-1552.
- [21] 常金花, 薛禾菲, 刘沛, 等. 2 种粒径的薯蓣皂苷元纳米混悬液的体外评价 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3529-3536.
- [22] 曾诚, 黄伟, 何承辉, 等. 复合磷脂脂质体的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42(1): 91-95.
- [23] 马敏, 瞿叶清, 爻叶婷, 等. 应用复合磷脂脂质体人工皮肤膜表征香附四物汤活性部位生物药剂学性质 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1048-1055.
- [24] Zeng C, Jiang W, Tan M, *et al.* Optimization of the process variables of tilianin-loaded composite phospholipid liposomes based on response surface-central composite design and pharmacokinetic study [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 85(3): 123-131.
- [25] 姜雯, 曾诚, 于宁, 等. 星点设计-效应面法优化天山雪莲提取物复合磷脂脂质体制备工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 57-64.
- [26] Zeng C, Jiang W, Tan M, *et al.* Improved oral bioavailability of total flavonoids of *Dracocephalum moldavica* via composite phospholipid liposomes: Preparation, *in-vitro* drug release and pharmacokinetics in rats [J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12(48): 313-318.
- [27] Zeng C, Xue G, Yang X, *et al.* Enhancing the *in-vitro* release of total flavonoids extract from *Dracocephalum moldavica* composite phospholipid liposomes optimized by response surface methodology [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2017, 30(4): 1225-1232.
- [28] 赵菊香. 依托泊苷长循环脂质体的稳定性及体内药动学研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [29] Jin S E, Kim I S, Kim C K. Comparative effects of PEG-containing liposomal formulations on *in vivo* pharmacokinetics of streptokinase [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(10): 1822-1829.
- [30] 王欣. PCM 和 TAT 双修饰脂质体心肌靶向传递系统的研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017.
- [31] 谭梅娥, 姜雯, 曾诚, 等. 田蓟苷固体脂质纳米粒的优化及其在 Caco-2 细胞模型中的吸收和转运研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2051-2060.