

白藜芦醇二棕榈酰卵磷脂脂质粉雾剂的制备及其抗菌作用研究

朱李飞¹, 刘晓妍², 陈红君¹, 余自成^{1*}

1. 同济大学附属杨浦医院 药学部, 上海 200090

2. 河北省人民医院 药学部, 河北 石家庄 050000

摘要: 目的 为解决白藜芦醇口服生物利用度低的问题, 研制白藜芦醇二棕榈酰卵磷脂 (DPPC) 脂质粉雾剂。方法 采用薄膜分散法制备白藜芦醇 DPPC 脂质体, 冷冻干燥得粉雾剂。采用正交试验设计优化处方, 并对其粒径、包封率、电位、体外释放及肺部沉积进行研究。采用肉汤稀释法进行体外抗菌活性评价并测定最低抑菌浓度。结果 DPPC 与胆固醇的质量比 3:1、药物与 DPPC 的物质的量比 1:3、水化时间 15 min、甘露醇与 DPPC 质量比 2:1 制备得到白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂, 其包封率为 (69.8±1.6)%, 载药量为 (2.4±0.9)%, 粒径为 (191.5±4.5) nm, Zeta 电位为 (12.4±1.5) mV。粉雾剂的空气动力学粒径为 (3.2±0.2) μm, 体外肺部沉积率为 28.1%。对金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎链球菌和铜绿假单胞菌进行体外抗菌活性评价, 测得白藜芦醇原料药组对金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和肺炎链球菌均无抗菌活性, 而白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂组对金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌有抗菌活性, 最低抑菌浓度分别为 4.0、2.0 mg/mL。结论 制备的白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂粒径小、分布均匀、稳定性良好, 肺部沉积率高, 体外对金黄色葡萄球菌和鲍曼不动杆菌有抗菌活性, 有望成为替代传统抗生素治疗细菌性肺炎的有效制剂。

关键词: 白藜芦醇; 二棕榈酰卵磷脂; 脂质体; 粉雾剂; 抗菌

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)24-5803-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.011

Preparation of resveratrol-DPPC liposomal dry powder inhalations and its antibacterial activities

ZHU Li-fei¹, LIU Xiao-yan², CHEN Hong-jun¹, YU Zi-cheng¹

1. Department of Pharmacy, Yangpu Hospital, Tongji University, Shanghai 200090, China

2. Department of Pharmacy, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective To prepare the resveratrol-DPPC liposomal dry powder inhalations (RDLDPs), and solve the problem of lower bioavailability of resveratrol after oral administration. **Methods** The RDLDPs were prepared by film-dispersion and freeze drying. The formulation was optimized by orthogonal design. The particle size, entrapment efficiency, electric potential, *in vitro* release, and lung deposition were characterized. The broth microdilution method was used to evaluate the antibacterial activity and determine the minimal inhibitory concentration (MIC) *in vitro*. **Results** The optimized ratio of DPPC/cholesterol, resveratrol/DPPC, and mannitol/DPPC was 3:1, 1:3, and 2:1 in the prescription of RDLDPs, respectively; And hydration time was 15 min. The entrapment efficiency of RDLDPs was (69.8±1.6)%, the drug loading was (2.4±0.9)%, the particle size was (191.5±4.5) nm, and the zeta potential was (12.4±1.5) mV. The aerodynamic particle size of the powder was (3.2±0.2) μm and the *in vitro* pulmonary deposition ratio was 28.1% *in vitro*. The antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated *in vitro*. The crude drug group had no antibacterial activity in four species of bacteria, while RDLDPs had antibacterial activity of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*, and MIC was 4 mg/mL and 2 mg/mL, respectively. **Conclusion** The prepared RDLDPs have small size and uniform distribution with good stability and high lung deposition rate and *in vitro* antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*, which is expected to be an substitute for traditional antibiotics for the treatment of bacterial pneumonia.

Key words: resveratrol; dipalmitoyl phosphatidylethanolamine; liposome; dry powder inhalation; antibiosis

收稿日期: 2018-08-09

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会科研课题 (20184Y0227); 上海市同济大学附属杨浦医院院级课题 (Se1201601)

作者简介: 朱李飞 (1988—), 男, 硕士, 药师, 研究方向为肺部给药传递系统。Tel: 13916596277 E-mail: 466617468@qq.com

*通信作者 余自成 (1966—), 男, 硕士生导师, 主任药师, 研究方向为临床药理学和临床药理学。

Tel: (021)65690520-361 E-mail: yzcheng666@qq.com

肺炎是一种临床上常见的疾病, 主要由细菌和真菌感染引起^[1]。随着发展中国家工业化的加剧, 环境污染(雾霾、粉尘)常常会引发大量的呼吸道肺部疾病, 严重的肺炎可能直接导致病人死亡, 尤其是小孩和老人^[2-3]。近年来, 细菌耐药问题日趋严重并威胁人类健康。目前, 临床上抗生素耐药和滥用现象十分严重, 已出现超级细菌, 仅有几种抗生素对其有效^[4]。因此, 研究人员迫切寻找新的抗菌物质, 开发新型给药系统提高细菌性肺炎治疗效果, 减少抗生素耐药。

白藜芦醇(resveratrol)是非黄酮类多酚化合物, 化学名 (*E*)-3,5,4'-三羟基二苯乙烯 [(*E*)-3,5,4'-trihydroxystilbene, C₁₄H₁₂O₃], 最初被发现是作为一种植物抗毒素, 现被医学界广泛重视^[5]。白藜芦醇具有多重药理作用, 如抗氧化、抗菌、抗炎、抗肿瘤、免疫调节、糖尿病及其并发症等^[6-19]。在抗菌方面, 有研究报道白藜芦醇对球菌和杆菌属均有较强的抑制作用^[20], 但白藜芦醇水溶性低, 口服吸收差, 口服生物利用度不足 30%, 限制了其在临床中应用^[21]。而白藜芦醇能否通过肺吸入防治细菌性肺炎, 及其相关机制还有待进一步的研究。

肺泡表面活性物质是由肺泡 II 型细胞分泌, 以单分子层形式覆盖于肺泡液体表面的一种脂蛋白, 主要成分为二棕榈酰卵磷脂(dipalmitoyl phosphatidylethanolamine, DPPC)。它的主要功能是减弱表面张力对肺毛细血管中液体的吸引作用, 避免液体外渗进入肺泡发生肺泡积液, 保持肺中的液体平衡, 建立局部屏障防止外源性感染和吸入颗粒的进入^[22-23]。有研究显示 DPPC 脂质体包裹的胰岛素能增加药物在肺泡表面的释放浓度, 并且提高药物吸收效率^[24]。Tagami 等^[25]证明了肺吸入阿霉素 DPPC 纳米脂质体有利于药物肺部吸收, 提高抗肺癌作用。Meenach 等^[26]制备紫杉醇 DPPC/DPPG 肺表面活性物质多功能颗粒, 并证明其具有良好的抗肺癌效果。因此, 本实验拟将 DPPC 作为脂质生物载体补充因疾病损失的肺泡表面活性物质, 同时包裹并携带药物跨膜转运进入肺泡, 以此提高药物吸收效率, 达到协同治疗、增强疗效的效果。

肺吸入药物治疗细菌性肺炎能提高抗菌药物在肺内浓度, 克服抗菌药物多次给药造成的耐药以及时间依赖性或浓度依赖性的用药依从性问题, 提高患者顺应性。目前, 临床应用的抗菌药物大多不能直接吸入, 需要借助于纳米粒、脂质体、微球等新

型肺吸入给药系统才能实现较好的肺内吸收。由于细菌性肺炎的发生、发展多伴随有巨噬细胞病变, 肺泡内巨噬细胞主要吞噬肺中小于 3 μm 的颗粒或异物(细菌), 生成炎症小体, 分泌多种炎症因子如肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)等, 造成临近细胞损伤, 引发炎症感染^[27-28]。纳米技术能更容易透过细菌细胞膜或靶向病变巨噬细胞, 提高药物聚集程度, 延长存留时间, 充分发挥杀菌效果^[29]。有研究表明肺吸入穿心莲内酯脂质体有良好的治疗效果及安全性^[30]。Patlolla 等^[31]证明了塞来昔布脂质纳米粒给药系统肺吸入后可在局部达到较高的药物浓度。细菌性肺炎吸入治疗研究虽处于起步阶段, 但这些研究充分说明肺吸入成为肺局部疾病治疗新的发展方向。本实验基于白藜芦醇的性质、DPPC 和肺吸入给药特点, 制备了白藜芦醇 DPPC 脂质体, 冻干后筛选得到可肺吸入的粉雾剂, 通过体外抗菌实验探究其抗菌活性, 为临床治疗细菌性肺炎, 提供新的治疗策略和途径。

1 仪器与材料

1.1 仪器

RE-52-2 旋转蒸发仪, 上海青浦西仪器有限公司; Scientz-10N 冻干机, 宁波新芝冻干设备股份有限公司; Zetasizer Nano ZS 纳米激光粒度仪, 英国 Malvern 公司; 高效液相色谱系统, Waters 公司; 包括 1525 二元泵、2489 紫外检测器、2707 自动进样器、智能柱温箱、Breeze TM Software 色谱工作站; 吸入药物粒度碰撞器(Next Generation Impactor, NGI), 英国 Copley 公司; MS204S 电子分析天平, 瑞士 Mettler-Toledo 公司; JEM-2100 透射电镜, 日本电子株式会社; Inspect F50 扫描电镜, 美国 FEI 公司; Synergy UV 系统超纯水仪, 美国 Millipore 公司; Allegra X-30R 超速冷冻离心机, 美国 Beckman 公司; SG603A 超净台, 美国 Baker 公司; THZ-82 恒温振荡器, 天津赛得利斯仪器公司; CKX41 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 标准菌株(二代菌)、鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 标准菌株(二代菌)、铜绿假单胞菌 ATCC 9027 标准菌株(二代菌)、肺炎克雷伯菌 CMCC 4611 标准菌株(二代菌)购自上海鲁微科技有限公司。

1.3 试剂及药物

白藜芦醇, 质量分数 99%, 批号 75877140, 上

海迈瑞尔化学技术有限公司；甘露醇（批号 CM28132630）、胆固醇（批号 CC28143003），北京酷来搏科技有限公司；DPPC，批号 850355P-A-321，美国 Avanti 公司；LB 肉汤干粉培养基，批号 170920，上海博微生物科技有限公司；乙腈，HPLC 级，Merck 公司；其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 白藜芦醇含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取白藜芦醇对照品于量瓶中，用乙醇溶解并定容，制得含白藜芦醇 1.00 mg/mL 储备液。

2.1.2 色谱条件^[21] 色谱柱采用 Phenomenex C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-水 (22 : 78)，等度洗脱；体积流量 1 mL/min；检测波长为 306 nm；柱温 35 °C；进样量 20 μL。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下不同体积的白藜芦醇储备液于量瓶中，用乙醇定容，配制成 3.90、7.81、15.63、31.25、62.5、125 μg/mL 的系列白藜芦醇对照品溶液。按“2.1.2”项下色谱条件进样，以白藜芦醇峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归，得回归方程为 $Y=103\ 326 X-154\ 056$ ， $r=0.999\ 9$ ，结果表明白藜芦醇在 3.90~125 μg/mL 与峰面积的线性关系良好。

2.2 白藜芦醇 DPPC 脂质体制备

2.2.1 白藜芦醇 DPPC 脂质体处方筛选 采用薄膜分散法制备白藜芦醇 DPPC 脂质体。称取适量 DPPC、胆固醇和白藜芦醇，加入乙醚与乙醇 (1 : 15) 混合溶液使溶解，于 60 °C 旋转蒸发器上蒸发 1 h，加入磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4) 水化 30 min，超声 15 min，即得白藜芦醇 DPPC 脂质体。

设计正交试验，选择影响白藜芦醇 DPPC 脂质体包封率的 3 个主要因素，即药物与 DPPC 的物质的量比为 1 : 1、1 : 2、1 : 3，DPPC 与胆固醇的质量比为 2 : 1、3 : 1、4 : 1，PBS 的水化时间 15、30、60 min。以脂质体包封率为考察指标，根据正交试验筛选最优处方。

2.2.2 白藜芦醇 DPPC 脂质体包封率测定 精密量取白藜芦醇 DPPC 脂质体 0.5 mL，加入预先溶胀的葡聚糖凝胶 G-25 色谱柱中分离，顶部加纯化水洗脱，收集洗脱液，每管 2 mL，分别加入无水乙醇定容至 10 mL，按照“2.1.2”项色谱方法测定，计算包封率 (包封率=包封的药物量/投药量)。

2.2.3 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计

学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.2.4 结果 以脂质体包封率为考察指标，选择药物与 DPPC 的物质的量比 (A)、DPPC 与胆固醇的质量比 (B)、水化时间 (C) 为影响因素，每个因素 3 个水平，选用 L₉(3⁴) 正交表进行试验，优化白藜芦醇脂质体的处方工艺 (表 1、2)。各因素对包封率的影响次序为 A>B>C，各因素的最佳水平为 A₃B₂C₁。根据上述实验结果，确定其最佳工艺条件为 A₃B₂C₁，即药物与 DPPC 的物质的量比 1 : 3、DPPC 与胆固醇的质量比 3 : 1、水化时间 15 min。

按最优处方测得白藜芦醇 DPPC 脂质体包封率为 (69.8±1.6)%，表明优选处方得到白藜芦醇 DPPC 脂质体包封率高、工艺稳定。

2.3 白藜芦醇 DPPC 脂质体性质评价

2.3.1 粒径及 Zeta 电位 用纳米激光粒度仪对白藜芦醇 DPPC 脂质体的粒度和 Zeta 电位进行测定，温度为 25 °C，体积为 1 mL，每份样品平行测定 3 次。结果发现白藜芦醇 DPPC 脂质体的平均粒径为 (191.5±4.5) nm (图 1-E)，多分散指数 (PDI) 为

表 1 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C/min	D (空白)	包封率/%
1	1 : 1 (1)	2 : 1 (1)	15 (1)	(1)	45.7
2	1 : 1 (1)	3 : 1 (2)	30 (2)	(2)	41.4
3	1 : 1 (1)	4 : 1 (3)	60 (3)	(3)	47.6
4	1 : 2 (2)	2 : 1 (1)	30 (2)	(3)	46.2
5	1 : 2 (2)	3 : 1 (2)	60 (3)	(1)	55.6
6	1 : 2 (2)	4 : 1 (3)	15 (1)	(2)	49.2
7	1 : 3 (3)	2 : 1 (1)	60 (3)	(2)	52.6
8	1 : 3 (3)	3 : 1 (2)	15 (1)	(3)	67.5
9	1 : 3 (3)	4 : 1 (3)	30 (2)	(1)	60.1
K ₁	134.7	144.5	162.4	161.4	
K ₂	151.0	164.5	147.7	143.2	
K ₃	180.2	156.9	155.8	161.3	
R	45.5	20.0	14.7	18.2	

表 2 方差分析

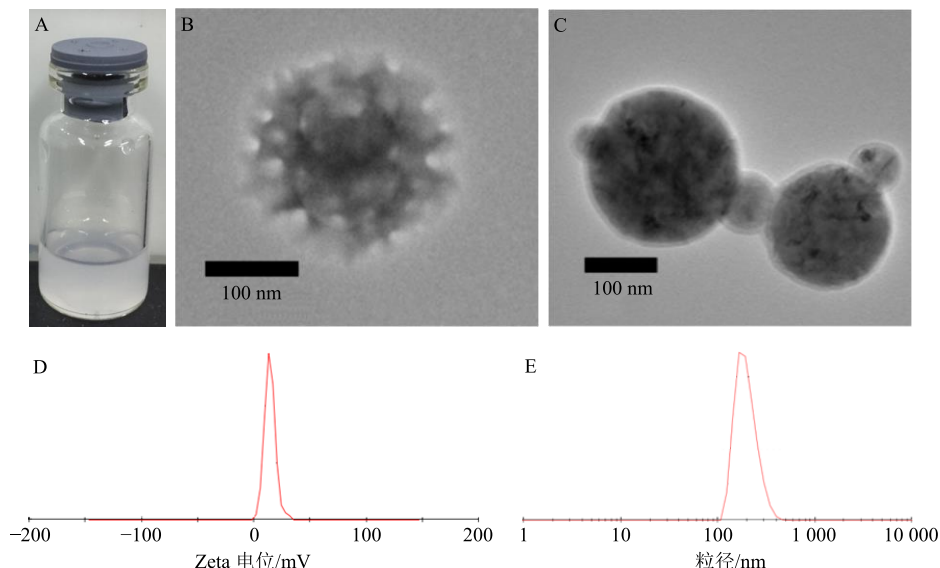
Table 2 Variance analysis

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	354.286 7	2	4.839 5	无
B	67.946 7	2	0.828 1	无
C	36.140 0	2	0.493 7	无
D (误差)	73.206 7	2		

0.3±0.1, 载药脂质体的 Zeta 电位为 (12.4±1.5) mV (图 1-D)。

2.3.2 形态 取 1 mL 白藜芦醇 DPPC 脂质体用纯化水稀释 1 000 倍, 吸取 5 μL 滴至铜网上, 用滤纸吸去多余液体, 滴加体积分数 5% 磷钨酸溶液 (pH 7.0) 负染, 吸去多余负染液, 室温下自然风干, 使脂质体粒子在铜网上浓缩沉积, 在透射电镜下进行观测并拍照。白藜芦醇 DPPC 脂质体和粉雾剂重构

后外观 (图 1-B、C) 均呈类球形, 为多囊结构, 粒度圆整, 分散较好。白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂重构后的平均粒径为 (212.3±5.4) nm, 表明冻干工艺不破坏白藜芦醇 DPPC 脂质体的结构, 不影响稳定性。DPPC 脂质体与肺内表面活性物质同源, 更易携带药物通过肺表面活性物质层, 到达病灶。同时较小的粒径和高分散性有助于提高细胞或细菌对药物吸收, 提高药效。



A-外观 B-白藜芦醇 DPPC 脂质体形态 C-白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂重构后形态 D-Zeta 电位 E-粒径
A-appearance of resveratrol-DPPC liposome B-morphology of resveratrol-DPPC liposome C-reconstructed morphology of dry powder inhalation suspension D-zeta potential of resveratrol-DPPC liposome E-particle size of resveratrol-DPPC liposome

图 1 白藜芦醇 DPPC 脂质体性质评价

Fig. 1 Characterization of resveratrol-DPPC liposome

2.4 白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂制备

根据正交试验结果得到的最优白藜芦醇脂质体处方。于 DPPC 脂质体水化时, 分别加入含有与 DPPC 等质量比的乳糖、蔗糖、葡萄糖、海藻糖、甘露醇的 PBS 水化 30 min, 超声 15 min, 冷冻干燥 48 h, 得白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂。以外观、色泽、再分散性为主要评价指标。外观以饱满、不塌陷、不皱缩、表面光洁为佳; 色泽以均匀无花斑、质地细腻为佳; 再分散性是加入纯化水后能在 30 s 内完全分散得脂质体为佳。优选甘露醇为白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂载体 (表 3)。

进一步筛选不同 DPPC 与甘露醇质量比(1:1、1:2、1:3) 的白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂处方, 通过对外观、流动性和载药量综合比较, 选择甘露醇与 DPPC 质量比为 2:1, 作为粉雾剂最优处方 (图 2)。

表 3 不同类型载体对白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂影响

Table 3 Effect of different supporters on RDLDPis

种类	样品外观	复容速率 (t/s)	复容外观
乳糖	略带黄色, 稀疏萎缩	较慢 (>60)	少量固体颗粒
蔗糖	白色, 贴壁, 萎缩	较慢 (>60)	少量固体颗粒
葡萄糖	乳黄色, 稍微萎缩	较快 (30~60)	均匀良好
甘露醇	白色, 饱满	快 (<30)	均匀良好
海藻糖	白色, 呈聚集的小球	较慢 (>60)	固体颗粒聚沉

2.5 白藜芦醇 DPPC 脂质体粉雾剂性质评价

2.5.1 粉体学性质

(1) 粉末粒径和形态观察: 取 3 份白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂, 用激光粒度仪测定粒子几何粒径 (D_e)。用牙签将粉雾剂涂布在双面导电胶并固定的金属板上。以电子束 40 mA, 20 min 喷金制备可用于扫描电镜观察的样品, 在 5.0 kV 电压条件下观察待测样品的形态、大小等指标。

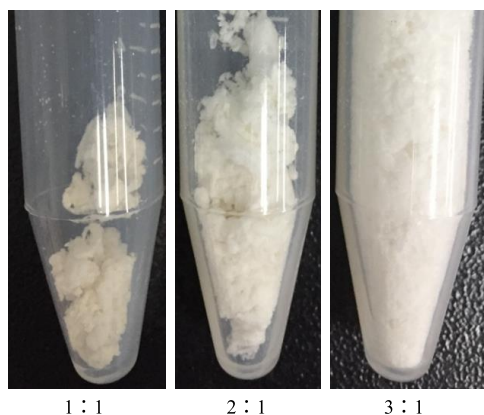
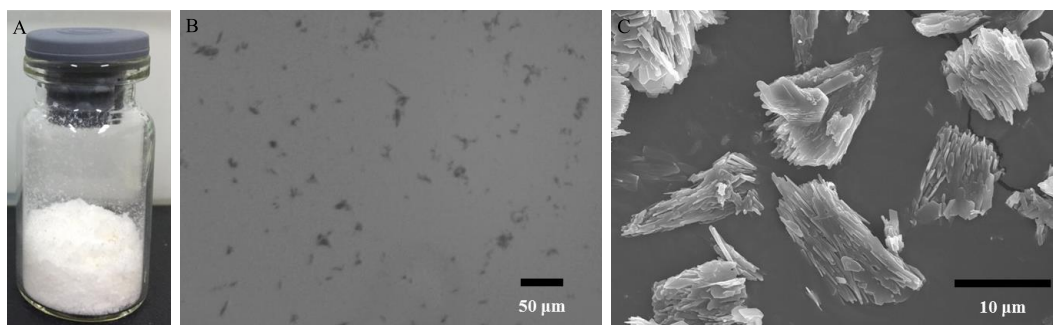


图 2 不同甘露醇与 DPPC 质量比的粉雾剂外观
Fig. 2 Appearance of different mass ratio of mannitol to DPPC



A-外观 B-光镜下形态 C-扫描电镜下形态
A-appearance of RDLDPs B-morphology of RDLDPs by inverted microscope C-morphology of RDLDPs by scanning electron microscope

图 3 白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂形貌

Fig. 3 Morphology of RDLDPs

流动性好, 振实密度为 (0.05 ± 0.01) g/mL, 排空率为 (97.9 ± 1.2) %, 雾化性质为 B 级, 这些性质都说明了白藜芦醇脂质粉末适合用于制备粉雾剂, 通过人主动吸进肺部, 到达细支气管, 不易被排出。在肺部深处肺泡腔中, 补充因炎症或细菌破坏的肺表面活性物质, 恢复其功能, 提高与外界气体交换。同时释放药物, 治疗肺部炎症。

2.5.2 理论空气动力学粒径 根据测得粒子几何粒径, 振实密度, 按下式计算理论空气动力学粒径。

$$D_a = D_c(\rho_{\text{tap}}/\rho_0 X)^{1/2}$$

D_a 和 D_c 分别为空气动力学粒径和几何学粒径; ρ_{tap} 为颗粒密度, 可以用最紧密密度代替即为振实密度, ρ_0 为参照密度, 为 1 g/cm, X 为动态形态因子 (球形时 $X=1$)

粒子的几何粒径、密度和形状都会影响空气动力学粒径^[26]。空气动力学粒径是影响药物沉积部位的最主要因素, 一般认为空气动力学粒径在 1~5 μm 的粒子可以到达肺深部^[27]。

激光粒度仪测得白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂几

(2) 流动性: 将粉末通过下孔径为 5 mm 的玻璃漏斗, 从 10 cm 的高度缓慢、均匀地落入平板上, 形成圆锥体。测量圆锥体的高度 (h) 和基底的半径 (r), 按公式计算休止角 (θ , $\tan\theta = h/r$)。

(3) 振实密度: 称取 3 份粉雾剂, 记录质量 (W), 置于 5 mL 量筒中, 将量筒从 5 cm 高度落下, 反复振实 7 次, 读取粉末体积 (V), 按公式计算振实密度 (ρ_{tap} , $\rho_{\text{tap}} = W/V$)。

(4) 结果: 白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂为白色疏松粉末 (图 3-A)。扫描电镜下, 甘露醇作为载体, 粉雾剂形态为不规则的颗粒, 颗粒表面凹凸不平, 有空隙, 颗粒大小不一, 聚团在一起, 粒径大小约 10 μm (图 3-C)。休止角是 $(26.6 \pm 6.7)^\circ < 37.0^\circ$,

何粒径为 (14.4 ± 2.7) μm , 量筒法测得振实密度为 (0.05 ± 0.01) g/mL, 从而计算出空气动力学粒径是 (3.2 ± 0.2) μm , 在 1~5 μm , 适合肺部吸入的标准。

2.5.3 包封率和载药量 精密量取白藜芦醇 DPPC 脂质体粉雾剂 10 mg, 纯化水复溶, 加入预先溶胀的葡聚糖凝胶 G-25 色谱柱中分离, 顶部加纯化水洗脱, 收集洗脱液, 每管 2 mL, 分别加入无水乙醇定容至 10 mL, 参考“2.1.2”项色谱条件测定。计算包封率、载药量。

$$\text{包封率} = \text{包封的药物量} / \text{投药量}$$

$$\text{载药量} = \text{包封的药物量} / \text{载药 DPPC 脂质粉雾剂总质量}$$

按最优处方测得白藜芦醇 DPPC 脂质体粉雾剂载药量为 (2.4 ± 0.9) %, 加入甘露醇载体的 DPPC 脂质粉雾剂再分散后的包封率为 (68.6 ± 2.1) %。验证了冻干工艺基本不影响 DPPC 脂质体的结构和白藜芦醇的包封。

2.5.4 肺部沉积率的测定 分别称取 20 mg 白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂装入 3 号羟丙甲纤维素胶囊

中,然后取上述胶囊 10 粒,逐粒置于药粉吸入器内,连续吸入 10 粒,每次 10 s,停泵后打开测定仪,用 20 mL 纯化水清洗每个接收盘(装置、喉部、1~8 级共 10 个接收盘),连续 2 次,合并后转入 50 mL 量瓶,将量瓶中的液体用无水乙醇定容。参考“2.1.2”项色谱方法测定每个接收盘中白藜芦醇含量,按公式计算药物肺部沉积率(FPF)。

$FPF = \frac{2 \sim 8 \text{ 级粉末中白藜芦醇的质量}}{\text{射出白藜芦醇的质量}}$

射出百分比(ED) = 射出白藜芦醇的质量/胶囊内白藜芦醇的总质量

采用吸入药物粒度碰撞器(NGI)体外模拟药物吸入肺中分布,白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂在 2~7 级接收盘中 FPF 为 28.1%,明显高于白藜芦醇原料药 13.3%(图 4)。普通的原料药无法满足肺吸入要求,需要制备优化的白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂,提高肺部沉积率,满足粉雾剂给药要求。

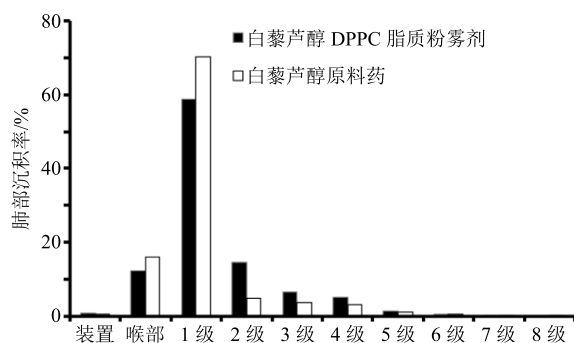


图 4 白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂和原料药肺部沉积 Fig. 4 Lung deposition of RDLDPs and resveratrol

2.6 白藜芦醇 DPPC 脂质体粉雾剂体外释放

称取 3 份白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂,装入透析袋(截留相对分子质量 1 000)中,并加入人工肺液^[32]3 mL,置于 50 mL 含 0.2% 聚山梨酯-80 的人工肺液中,37 °C 恒温振荡,于 0.5、1、2、4、7、24、48 h 取透析袋外溶液 1 mL,13 000 r/min 离心 5 min,并补充相同温度和体积的人工肺液。同法取 3 份白藜芦醇原料药,释药方法同上。参考“2.1.2”项下色谱方法,直接测定介质中药物的量,并根据释药量拟合释药方程 0 级、1 级、Higuchi 和 Ritger-Peppas,确定释药机制^[33]。

在人工肺液中,白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂同原料药相比,具有明显的缓释效果(图 5)。原料药存在明显的突释现象,1 h 内释放接近 60%;相比之下,白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂释放缓慢,没有

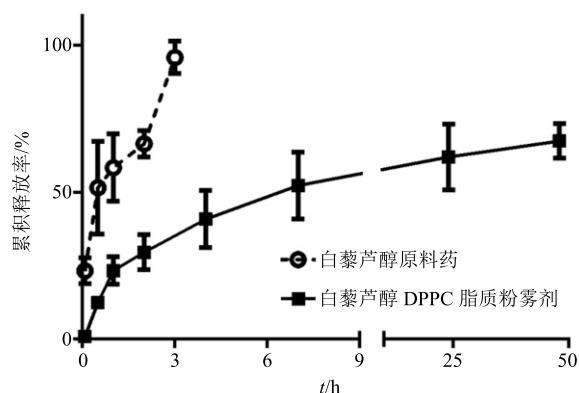


图 5 白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂和原料药在体外释放特性 Fig. 5 Release characterization of RDLDPs and resveratrol

突释现象,释放 24 h 后,累积释放达到 60%。通过释放方程拟合,白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂释放机制符合 Higuchi 释放模型($F_t = 9.346 t^{1/2} + 12.88$, $r^2 = 0.824 2$),即药物以骨架型扩散为主,随着时间推移,脂质体的破裂,药物从脂质空隙中渗漏。白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂释药特点证明 DPPC 脂质体的多囊结构使药物具有缓释效果,在肺内缓慢释药发挥作用,避免突释带来的不良反应。

2.7 白藜芦醇 DPPC 脂质体粉雾剂体外抗菌实验

为测定白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂的抗菌效果,准备 1×10^6 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌菌液,将各菌液与白藜芦醇原料药、白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂在 Luria-Bertani (LB) 培养液中共孵育,于 37 °C、200 r/min 的恒温气浴摇床中培养 24 h,其中白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂用 LB 培养液梯度稀释至白藜芦醇质量浓度 4.00、2.00、1.00、0.50、0.25、0.13 mg/mL。同比稀释白藜芦醇原料药质量浓度。将上述培养液用干净的接种环浸渍,并涂布在培养板上扩散,然后在 37 °C 培养 24 h,观察菌落的生长并取样进行菌落计数,计算最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。

白藜芦醇原料药组对 4 种细菌抗菌活性较低,体外抑菌率均不足 50%,而白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂组在高质量浓度(4.00 mg/mL)下对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌有抗菌作用,且随着药物质量浓度增加,对细菌增殖抑制作用逐渐增强,尤其是对鲍曼不动杆菌抑制作用最强(MIC 为 2.0 mg/mL,图 6)。这表明 DPPC 脂质粉雾剂改善白藜芦醇的溶解性,提高药物扩散效果,同时 DPPC 脂

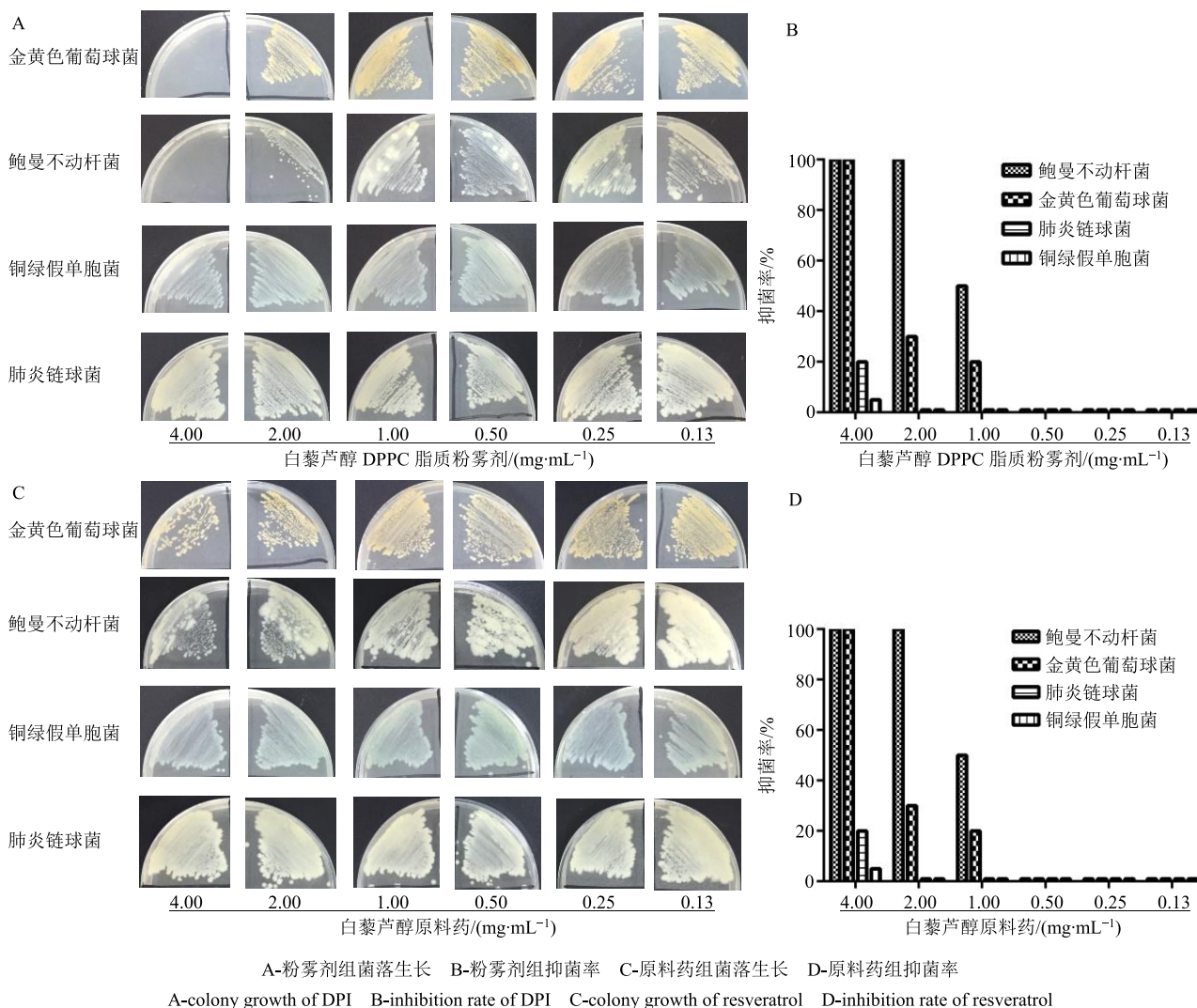


图 6 DPPC 白藜芦醇脂质粉雾剂和原料药体外抗菌活性
 Fig. 6 Antibacterial activity of RDLDPs and resveratrol *in vitro*
 A-粉雾剂组菌落生长 B-粉雾剂组抑菌率 C-原料药组菌落生长 D-原料药组抑菌率
 A-colony growth of DPI B-inhibition rate of DPI C-colony growth of resveratrol D-inhibition rate of resveratrol

图 6 DPPC 白藜芦醇脂质粉雾剂和原料药体外抗菌活性

Fig. 6 Antibacterial activity of RDLDPs and resveratrol *in vitro*

质有助于促进药物穿透细菌细胞壁，提高药物抗菌效果。

3 讨论

白藜芦醇属非黄酮类多酚化合物，其结构为三羟基二苯乙烯。抗菌方面，白藜芦醇具有作用温和、毒副作用小、多靶点、多功能等优势^[22-23]。但白藜芦醇水溶性低，稳定性差，生物利用度低，限制了其临床应用^[24-26]。随着纳米技术、材料科学及中药新剂型等研究领域的学科交叉，为白藜芦醇细菌性肺炎治疗带来了新的希望。

本研究利用低毒性的乙醇、乙醚做溶剂，高相容性肺表面活性物质 DPPC 做载体，通过薄膜分散法将白藜芦醇制备成 DPPC 脂质体。制备得到白藜芦醇 DPPC 脂质体的平均粒径为 (191.5±4.5) nm，Zeta 电位为 (12.4±1.5) mV。透射电镜下白藜芦

醇 DPPC 脂质体和粉雾剂复溶后外观均呈类球形，粒度圆整，分散较好，表明冻干工艺不破坏白藜芦醇 DPPC 脂质体的结构，不影响稳定性。按最优处方制备的白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂包封率为 (69.8±1.6) %，载药量为 (2.4±0.9) %，表明优选处方得到的白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂包封率高、工艺稳定。扫描电镜下，白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂形态为疏松、不规则的颗粒。粉雾剂休止角 (26.6±6.7) °<37.0°，空气动力学粒径 (3.2±0.2) μm，排空率 (97.9±1.2) %，雾化性质 B 级，适合肺部吸入的标准。将 DPPC 与体内肺表面活性物质相结合是一种有效的递送药物的方式，可以避免药物在肺表面活性物质层的隔离和降解，提高药物递送的有效性，到达病灶。同时较小的粒径和高度分散性有助于提高细胞或细菌对药物的吸收，更好地

发挥抗菌、抗炎作用。

体外释放实验验证在人工肺液中白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂具有明显的缓释效果。与原料药相比,白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂具有更好的释放行为,无明显突释,24 h 后,累积释药达 60%。释放方程拟合符合 Higuchi 模型,表明 DPPC 脂质骨架型扩散,有助于药物从脂质空隙中渗漏,从而提高药物的治疗效果。

对白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂进行的体外肺部沉积研究结果表明,甘露醇与 DPPC 质量比为 2:1 时,制备得到的粉雾剂具有优良的粉末性质,有助于药物在肺内不同部位的沉积。在 60 L/min 气流速度条件下,接收盘 2~7 级药物肺部沉积率为 28.1%,明显优于原料药(13.3%)。分析原因,可能由于原料药多为晶体结构相互吸附,流动性欠佳,易于聚集。最优处方制备的白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂更能满足吸入颗粒的要求,易沉积在肺深部。

细菌性肺炎主要发病机制是细菌释放大量内毒素,引起过度失控的炎性反应和促炎抗炎反应失衡,病变巨噬细胞释放促炎性因子 IL-6 和 TNF- α 等,导致肺组织损伤、水肿、表面活性物质失活和透明膜形成^[34]。体外研究发现,与原料药相比,白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂可有效对金黄色葡萄球菌和鲍曼不动杆菌引起的肺炎有较好的抗菌效果, MIC 分别为 4.0、2.0 mg/mL。证明制备成 DPPC 脂质粉雾剂能有效克服白藜芦醇生物利用度低、水溶性差的限制,从而提高肺内药物利用,发挥药效。本实验仅对白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂的制备和体外抗菌进行了相关研究,而白藜芦醇的强抗炎活性^[35],体内治疗细菌性肺炎实现控制细菌生长,同时抑制过度炎症导致的肺实质性损伤及其机制,有待进一步研究。相关药效学实验正在进行,将另文发表。因此,白藜芦醇 DPPC 脂质粉雾剂有望成为替代抗生素治疗细菌性肺炎的有效制剂,克服临床上抗生素耐药的不利窘境。

参考文献

- [1] Magnuson R J, Apostolakis M J. Health care-associated pneumonia [J]. *Hos Med Clin*, 2013, 2(4): 499-508.
- [2] Thomas J M, Thomas M F J. Bacterial pneumonia in older adults [J]. *Clin Geriatr Med*, 2016, 32(3): 459-477.
- [3] Huang C Y, Chang L, Liu C C, et al. Risk factors of progressive community-acquired pneumonia in hospitalized children: A prospective study [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2015, 48(1): 36-42.
- [4] Souza-Oliveira A C, Cunha T M, Passos L B, et al. Ventilator-associated pneumonia: The influence of bacterial resistance, prescription errors, and de-escalation of antimicrobial therapy on mortality rates [J]. *Braz J Infect Dis*, 2016, 20(5): 437-443.
- [5] 李洁,熊兴耀,曾建国,等.白藜芦醇的研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2013, 15(2): 100-108.
- [6] 张翠,王丹枫,张思琪,等.白藜芦醇对肾纤维化大鼠肾组织 ORP150、GRP78、GRP94 蛋白表达的影响 [J]. *中草药*, 2018, 49(2): 406-413.
- [7] 卢佳倩,赵耀鑫,刘晓彤,等.白藜芦醇对糖尿病及其并发症作用机制的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(2): 334-339.
- [8] 张蕊,马寅仲,孙双勇,等.白藜芦醇对阿霉素诱导心脏毒性保护作用的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(4): 752-756.
- [9] Pal S, Sarkar C. Protective effect of resveratrol on fluoride induced alteration in protein and nucleic acid metabolism, DNA damage and biogenic amines in rat brain [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38(2): 684-699.
- [10] Jiang L, Zhang L, Kang K, et al. Resveratrol ameliorates LPS-induced acute lung injury via NLRP3 inflammasome modulation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 130-138.
- [11] Liu S, Zhang X X, Zhuang S, et al. Effect of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* and its ingredient resveratrol on experimental autoimmune myasthenia gravis by suppressing immune response [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(3): 251-258.
- [12] 张黎媛.白藜芦醇及其代谢产物与类似物抗癌转移作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(20): 4346-4352.
- [13] 魏明,甘露,侯进,等.白藜芦醇抑制角蛋白 17 改善银屑病样皮肤损伤 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(1): 37-41.
- [14] Caddeo C, Nacher A, Vassallo A, et al. Effect of quercetin and resveratrol co-incorporated in liposomes against inflammatory/oxidative response associated with skin cancer [J]. *Int J Pharm*, 2016, 513(1/2): 153-163.
- [15] Wang Y, Jiang Y, Fan X, et al. Hepato-protective effect of resveratrol against acetaminophen-induced liver injury is associated with inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of SIRT1-p53 signaling pathways [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 236(2): 82-89.
- [16] Gualdoni G A, Kovarik J J, Hofer J, et al. Resveratrol enhances TNF- α production in human monocytes upon

- bacterial stimulation [J]. *BBA-Gen Subjects*, 2014, 1840(1): 95-105.
- [17] 李先宽, 李赫宇, 李 帅, 等. 白藜芦醇研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2568-2578.
- [18] 刘 顺, 李赫宇, 赵 玲. 白藜芦醇降尿酸、抗炎作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 304-307.
- [19] 钱钧强, 叶因涛, 王 冬, 等. 白藜芦醇治疗阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(6): 924-928.
- [20] Ma D, Tan L, Chan K, *et al.* Resveratrol-potential antibacterial agent against foodborne pathogens [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 102.
- [21] Siu F, Ye S, Lin H, *et al.* Galactosylated PLGA nanoparticles for the oral delivery of resveratrol: enhanced bioavailability and *in vitro* anti-inflammatory activity [J]. *Int J Nanomed*, 2018, 13: 4133-4144.
- [22] Hidalgo A, Cruz A, Pérez-Gil J. Barrier or carrier? Pulmonary surfactant and drug delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 95(Pt A): 117-127.
- [23] Glasser J, Mallampalli R, Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection [J]. *Microbes Infect*, 2012, 14(1): 17-25.
- [24] Chono S, Togami K, Itagaki S. Aerosolized liposomes with dipalmitoyl phosphatidylcholine enhance pulmonary absorption of encapsulated insulin compared with co-administered insulin [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(11): 1892-1898.
- [25] Tagami T, Kubota M, Ozeki T. Effective remote loading of doxorubicin into DPPC/poloxamer 188 hybrid liposome to retain thermosensitive property and the assessment of carrier-based acute cytotoxicity for pulmonary administration [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(11): 3824-3832.
- [26] Meenach S, Anderson K, Hilt J, *et al.* High-performing dry powder inhalers of paclitaxel DPPC/DPPG lung surfactant-mimic multifunctional particles in lung cancer: physicochemical characterization, *in vitro* aerosol dispersion, and cellular studies [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2014, 15(6): 1574-1587.
- [27] Fang X, Zhao W, Xu J, *et al.* CYP1A1 mediates the suppression of major inflammatory cytokines in pulmonary alveolar macrophage (PAM) cell lines caused by *Mycoplasma hyponeumoniae* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2016, 65: 132-138.
- [28] Rodriguez J M M, Soare T, Malbon A, *et al.* Alveolar macrophages are the main target cells in feline calicivirus-associated pneumonia [J]. *Vet J*, 2014, 201(2): 156-165.
- [29] Lee W H, Loo C Y, Traini D, *et al.* Nano-and micro-based inhaled drug delivery systems for targeting alveolar macrophages [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2015, 12(6): 1009-1026.
- [30] Li M, Zhang T, Zhu L, *et al.* Liposomal and rographolide dry powder inhalers for treatment of bacterial pneumonia via anti-inflammatory pathway [J]. *Int J Pharm*, 2017, 528(1/2): 163-171.
- [31] Patlolla R R, Chougule M, Patel A R, *et al.* Formulation, characterization and pulmonary deposition of nebulized celecoxib encapsulated nanostructured lipid carriers [J]. *J Control Release*, 2010, 144(2): 233-241.
- [32] Zhu L F, Li M, Liu X Y, *et al.* Inhalable oridonin-loaded poly (lactic-co-glycolic) acid large porous microparticles for *in situ* treatment of primary non-small cell lung cancer [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(1): 80-90.
- [33] Liu X Y, Zhu L F, Du L N, *et al.* Preparation of asiaticoside-loaded coaxially electrospinning nanofibers and their effect on deep partial-thickness burn injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 33-40.
- [34] Wonnemberg B, Tschernig T, Voss M, *et al.* Probenecid reduces infection and inflammation in acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia [J]. *Inter J Med Microbiol*, 2014, 304(5/6): 725-729.
- [35] Jiang L, Zhang L, Kang K, *et al.* Resveratrol ameliorates LPS-induced acute lung injury via NLRP3 inflammasome modulation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 130-138.