

• 药剂与工艺 •

星点设计-效应面法优化 pH 值响应及线粒体靶向双功能金丝桃苷脂质体的处方及其体外评价

冯宇飞¹, 常书源¹, 秦国昭¹, 井中旭², 王艳宏^{1*}

1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江省中医药管理局, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 优化线粒体靶向金丝桃苷脂质体 (DLD/Hyp-Lip) 制备的最佳处方, 并研究其在胎牛血清中的稳定性及体外释放行为, 考察其线粒体靶向性。方法 采用薄膜分散法制备 DLD/Hyp-Lip, 以包封率和载药量为考察指标进行单因素实验, 考察磷脂总量与金丝桃苷 (hyperoside, Hyp) 用量比、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 (DSPE-PEG) 与 DLD 用量比等条件对 DLD/Hyp-Lip 的影响, 结合星点设计-效应面法优化 DLD/Hyp-Lip 处方。使用透射电子显微镜和粒径仪观察测定脂质体粒子外观、平均粒径和 Zeta 电位, 采用血清稳定性实验和体外释药、线粒体靶向性对该载药系统进行评价。结果 DLD/Hyp-Lip 最佳处方为磷脂总量和金丝桃苷用量比为 12.50:1, 磷脂总量与胆固醇用量比为 6.00:1, DSPE-PEG 与 DLD 用量比为 3:5; 测得金丝桃苷包封率为 $(95.57 \pm 0.56)\%$, 载药量为 $(8.55 \pm 0.57)\%$ 。所制备的 DLD/Hyp-Lip 外观良好, 平均粒径为 (124.9 ± 3.4) nm, Zeta 电位为 (-6.2 ± 1.9) mV; 在胎牛血清中性质稳定, 在体外释放介质中 24 h 累积释放量达到 40%。线粒体靶向实验表明 DLD/Hyp-Lip 可以促进药物聚集在线粒体部位。结论 采用此方法能够精准有效的优化 DLD/Hyp-Lip 的制备工艺, 该方法操作简单方便, 可以用于 DLD/Hyp-Lip 制备与处方的优化, 制备的 DLD/Hyp-Lip 包封率高, 粒径小, 分布均匀, 且具有良好的缓释作用, 为 DLD/Hyp-Lip 的进一步体内研究奠定了基础。载金丝桃苷的 DLD/Hyp-Lip 具有良好的肝癌细胞线粒体靶向性, 是一种潜在高效的肝癌细胞线粒体靶向给药系统。

关键词: 金丝桃苷; 脂质体; 星点设计-效应面法; 处方优化; 体外评价; pH 值响应; 线粒体靶向; 薄膜分散法; 稳定性

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)23-5934-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.004

Optimization of pH response and mitochondrial targeting bifunctional hyperoside liposomes by central composite design response surface methodology and its *in vitro* evaluationFENG Yu-fei¹, CHANG Shu-yuan¹, QIN Guo-zhao¹, JING Zhong-xu², WANG Yan-hong¹

1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Heilongjiang Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To optimize preparation of mitochondrial targeting hyperoside liposomes (DLD/Hyp-Lip), and study its stability in fetal bovine serum, *in vitro* release behavior and mitochondrial targeting. **Methods** DLD/Hyp-lip was prepared by film dispersion method. Single factor experiment was carried out with entrapment efficiency and drug loading as indexes to investigate the effects of the ratio of phospholipids to hyperoside (Hyp) and DSPE-PEG (distearoyl phosphoethanolamine-polyethylene glycol) to DLD on DLD/Hyp-Lip. The formulation of DLD/Hyp-Lip was further optimized by central composite design response surface methodology. The appearance, size and potential of liposomes were observed by transmission electron microscope and particle size

收稿日期: 2020-07-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703944); 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目 (YQ2019H031); 2018 年黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目; 2020 年博士后研究人员落户黑龙江科研启动资助金

作者简介: 冯宇飞 (1982—), 女, 副教授, 博士后, 从事中药新剂型和新技术研究。Tel: (0451)87266893 E-mail: fuf-00216@163.com

***通信作者** 王艳宏, 女, 教授, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0451)87266893 E-mail: 799378826@qq.com

analyzer. The stability and drug release rate of liposomes in fetal bovine serum were evaluated by serum stability test and *in vitro* drug release test. The drug delivery system was evaluated by mitochondrial targeting. **Results** The optimal formula of DLD/Hyp-Lip was as follows: the ratio of total phospholipids to hyperoside was 12.50:1, the ratio of total phospholipids to cholesterol was 6.00:1, and the dosage ratio of DSPE-PEG to DLD was 3:5, the encapsulation efficiency was $(95.57 \pm 0.56) \%$, the drug loading was $(8.55 \pm 0.57) \%$. The prepared liposomes had good appearance, the particle size of the lip was $(124.9 \pm 3.4) \text{ nm}$, and the potential was $(-6.2 \pm 1.9) \text{ mV}$. It was stable in fetal bovine serum and accumulated *in vitro* release medium for 24 h. Mitochondrial targeting experiments showed that DLD/Hyp-Lip could promote the accumulation of drugs in the mitochondria. **Conclusion** This method is simple and convenient, and can accurately and effectively optimize the preparation process of DLD/Hyp-Lip. The prepared DLD/Hyp-Lip has high encapsulation efficiency, small particle size, uniform distribution and good sustained-release effect, which lays the foundation for further *in vivo* research of DLD/Hyp-Lip. DLD/Hyp-Lip with hyperoside has good mitochondrial targeting of liver cancer cells and is a potentially efficient mitochondrial targeted drug delivery system for liver cancer cells.

Key words: hyperoside; liposome; central composite design response surface method; prescription optimization; *in vitro* evaluation; pH response; mitochondrial targeting; thin film dispersion method; stability

恶性肿瘤仍然是严重危害人类健康的常见病、多发病。随着环境污染的加剧、生活节奏的加快以及生活方式和饮食结构的改变,恶性肿瘤的发病率与死亡率都有不同程度的增长。2015 年我国新发肿瘤病例达 429 万,占当年全球新发病例 2 145 万的 20%;同年全球肿瘤死亡病例达 880 万,其中我国肿瘤死亡病例高达 281 万,死亡率更是高居世界榜首^[1-2]。

近几十年来,随着医学科学的发展,恶性肿瘤的临床与基础研究取得了可喜的成就,形成了手术治疗、放射治疗、化学治疗、生物疗法、中医药治疗共 5 大治疗体系^[3]。近年来,应用纳米技术递药系统治疗恶性肿瘤已成为该领域的研究热点。纳米技术包括包合物、微乳剂、纳米囊、纳米球、纳米粒、脂质体、纳米混悬剂^[4],其中,脂质体凭借其具有生物相容性、磷脂无毒可生物降解,既能运载脂溶性药物,又能运载水溶性药物,延长药物在体内的作用时间,防止药物在抵达靶组织前被代谢降解的特点逐渐引起研究人员的关注^[5-7]。但普通脂质体在进入体循环时迅速被网状内皮系统(RES)摄取,从而在血液中被清除;靶向效果不理想,不能完全靶向于亚细胞器,严重降低药物疗效;体内作用时间短,迅速被降解排泄出体外^[8]。基于普通脂质体的不足,多功能靶向脂质体已成为肿瘤制剂中的研究热点,其中以 pH 值响应性同时结合线粒体靶向性为特点构建的脂质体递药系统逐渐成为了靶向给药系统的研究主流。

从植物中提取的天然化合物是肿瘤治疗药物的一个宝贵来源。金丝桃苷(hyperoside, Hyp)又名槲皮素-3-O- β -D-吡喃半乳糖苷,属于黄酮醇苷类化合物。研究表明金丝桃苷能够明显抑制恶性肿瘤的

增殖,金丝桃苷对眼睑鳞状癌细胞、胃癌 BGC-823 细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞、人肺腺癌 A549 细胞、结肠癌 HCT8/VCR 细胞、肝癌 HepG2 细胞、人前列腺癌 PC3 细胞等均具有治疗作用^[9]。金丝桃苷抗肿瘤的作用机制主要是通过调控钙离子相关的线粒体通路,当线粒体内 Ca^{2+} 超载可诱导线粒体膜通透性转运孔开放,导致细胞色素 C 和凋亡诱导因子从线粒体释放到细胞质中^[10-11],最终导致细胞凋亡。同时,金丝桃苷还可通过 Ca^{2+} 可通过 Caspase 途径诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期及对一些其他细胞信息转导通路进行调控。

本实验采用新型 pH 值响应性材料二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-赖氨酸-2,3-二甲基马来酸酐(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-lysine-2,3-dimethylmaleic anhydride, DSPE-Lys-DMA, DLD),将金丝桃苷制成线粒体靶向脂质体,在 pH 7.4 条件下,脂质体带负电荷。当脂质体积聚在肿瘤组织中时,微环境中的弱酸性破坏结构中的酰胺键,从而释放带正电的氨基,氨基促使脂质体细胞内化。带正电荷的脂质体引起“质子海绵效应”以触发封装的药物的释放。同时,本实验采用单因素实验结合星点设计-效应面法优化处方,并对优化后 DLD/Hyp-Lip 的粒子外观、粒径和电位,稳定性及体外释放特征进行了考察,采用线粒体靶向性对该载药系统进行评价,为 DLD/Hyp-Lip 的进一步体内研究奠定了基础,也为抗肿瘤药物研究及开发提供新的思路。

1 仪器与材料

LC-20AT 岛津高效液相色谱仪, SPD-20A 型二极管阵列检测器,日本岛津公司; OSB-2200 型旋转蒸发仪,上海爱郎仪器有限公司; FA-2004 型电

子分析天平,上海良平仪器仪表有限公司; Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪,英国马尔文仪器有限公司; CM-120 型透射电子显微镜,荷兰飞利浦公司。金丝桃苷对照品,批号 111521-201708,中国食品药品检定研究院; 大豆卵磷脂 (SPC),批号 S100,上海吉至生化科技有限公司; 胆固醇,批号 150800,上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol, DSPE-PEG)、DLD,上海梵圣生物科技有限公司; 胎牛血清,浙江天杭生物科技股份有限公司; 色谱乙腈,北京迪科马科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 DLD/Hyp-Lip、SPC/Hyp-Lip 和 DLD-Lip 的制备

2.1.1 DLD/Hyp-Lip 的制备 采用薄膜分散法,按处方量精密称定大豆卵磷脂、胆固醇、金丝桃苷、DSPE-PEG、DLD,溶于混合溶剂(三氯甲烷-甲醇 2:1)中,超声溶解后在 35 °C 下减压旋转蒸发除去有机溶剂,待瓶底形成均匀的薄膜后,加入 PBS,超声水化 5 min,探头超声 5 min,过 0.22 μm 有机滤膜后,即得 DLD/Hyp-Lip。

取新鲜制备的 DLD/Hyp-Lip 溶液,加入 10% 的甘露醇作为冻干保护剂,-20 °C 条件下预冻 24 h 后于冷冻干燥机中冻干 48 h,即得 DLD/Hyp-Lip 冻干粉末。

2.1.2 SPC/Hyp-Lip 的制备 按处方量精密称定 SPC、胆固醇、金丝桃苷原料药,制备方法同“2.1.1”项方法。

2.1.3 DLD-Lip 的制备 采用薄膜分散法,按处方量精密称定大豆卵磷脂、胆固醇、DSPE-PEG、DLD,溶于混合溶剂(三氯甲烷-甲醇 2:1)中,超声溶解后在 35 °C 下减压旋转蒸发除去有机溶剂,待瓶底形成均匀的薄膜后,加入 PBS,超声水化 5 min,探头超声 5 min,过 0.22 μm 有机滤膜后,即得 DLD-Lip。

2.2 DLD/Hyp-Lip 包封率和载药量的测定

采用高速离心法测定。取 DLD/Hyp-Lip 0.5 mL,加入 2.0 mL 甲醇,超声破乳 10 min,过 0.22 μm 有机滤膜后,进行 HPLC 分析测定金丝桃苷质量浓度 ($C_{\text{游}}$)。

色谱条件:色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水

溶液 (22:78); 检测波长为 360 nm; 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μL。

取 0.5 mL DLD/Hyp-Lip,加入 2.0 mL 超纯水,置于超滤离心管中,12 000 r/min 离心 (10 °C) 20 min 后,取下层溶液,过 0.22 μm 有机滤膜后,进行 HPLC 分析测定金丝桃苷质量浓度 ($C_{\text{游}}$)。按照公式计算 DLD/Hyp-Lip 的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = 1 - C_{\text{游}}/C_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = W_{\text{药}}/W_{\text{脂}}$$

$W_{\text{药}}$ 代表金丝桃苷的质量, $W_{\text{脂}}$ 代表大豆卵磷脂、金丝桃苷、胆固醇、DSPE-PEG、DLD 和甘露醇的总质量

2.3 单因素试验考察

以包封率和载药量为评价指标,以有机溶剂与 PBS 体积比 (油水比)、DSPE-PEG 与 DLD 用量比、磷脂总量与金丝桃苷用量比、磷脂总量与胆固醇用量比进行单因素试验考察。

2.3.1 油水比考察 按“2.1”项下 DLD/Hyp-Lip 的制备方法,设置油水比 1:1、1:2、1:5,保持其他条件恒定,考察不同油水比对脂质体包封率和载药量的影响,结果见表 1,综合考虑确定油水比 1:1。

2.3.2 DSPE-PEG 与 DLD 用量比考察 按“2.1”项下 DLD/Hyp-Lip 的制备方法,设置 DSPE-PEG 与 DLD 用量比为 1:1、1:2、1:3,保持其他条件恒定,考察 DSPE-PEG 与 DLD 用量比对脂质体包封率和载药量的影响,结果见表 2,综合考虑确定

表 1 油水比对 DLD/Hyp-Lip 包封率和载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of oil-water ratio on DLD/Hyp-Lip entrapment efficiency and drug loading ($\bar{x} \pm s, n=3$)

油水比	包封率/%	载药量/%
1:1	90.78±1.69	8.52±0.56
1:2	87.04±1.97	8.19±0.38
1:5	88.02±0.98	7.94±0.59

表 2 DSPE-PEG 与 DLD 用量比对 DLD/Hyp-Lip 包封率和载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of DSPE-PEG and DLD mass ratio on DLD/Hyp-Lip entrapment efficiency and drug loading ($\bar{x} \pm s, n=3$)

DSPE-PEG 与 DLD 用量比	包封率/%	载药量/%
1:1	80.23±1.26	7.56±0.37
1:2	89.52±2.03	8.64±0.46
1:3	70.95±1.45	6.99±0.41

DSPE-PEG 与 DLD 用量比为 1:2。

2.3.3 磷脂总量与胆固醇用量比考察 按“2.1”项下 DLD/Hyp-Lip 的制备方法, 设置磷脂总量与胆固醇用量比 2:1、5:1、10:1, 保持其他条件恒定, 考察磷脂总量与胆固醇用量比对脂质体包封率和载药量的影响, 结果见表 3, 综合考虑确定磷脂总量与胆固醇用量比为 2:1。

2.3.4 磷脂总量与金丝桃苷用量比的考察 按“2.1”项下 DLD/Hyp-Lip 的制备方法, 设置磷脂总量与金丝桃苷用量比 5:1、10:1、20:1, 保持其他条件恒定, 考察磷脂总量与金丝桃苷用量比对脂质体包封率和载药量的影响, 结果见表 4, 综合考虑确定磷脂总量与金丝桃苷用量比为 10:1。

表 3 磷脂总量与胆固醇用量比对 DLD/Hyp-Lip 包封率和载药量影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of total phospholipids and cholesterol mass ratio on DLD/Hyp-Lip entrapment efficiency and drug loading ($\bar{x} \pm s, n=3$)

磷脂总量与胆固醇用量比	包封率/%	载药量/%
2:1	93.89±0.56	8.73±0.36
5:1	85.92±1.84	7.92±0.54
10:1	81.02±1.25	8.18±0.63

表 5 DLD/Hyp-Lip 处方优化的星点试验安排

Table 5 Central composite design arrangement for DLD/Hyp-Lip prescription optimization

试验号	X_1	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	试验号	X_1	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	8.00 (-1)	3.62 (-1)	0.44 (-1)	79.35	6.95	11	12.50 (0)	2.00 (-1.682)	0.65	83.24	7.42
2	17.00 (+1)	3.62	0.44	85.56	7.32	12	12.50	10.00 (+1.682)	0.65	88.32	6.49
3	8.00	8.38 (+1)	0.44	75.41	6.43	13	12.50	6.00	0.30 (-1.682)	76.84	6.64
4	17.00	8.38	0.44	82.42	7.23	14	12.50	6.00	1.00 (+1.682)	86.98	6.65
5	8.00	3.62	0.86 (+1)	85.87	7.46	15	12.50	6.00	0.65	93.79	8.16
6	17.00	3.62	0.86	88.64	7.75	16	12.50	6.00	0.65	94.92	8.44
7	8.00	8.38	0.86	83.78	7.13	17	12.50	6.00	0.65	94.88	8.67
8	17.00	8.38	0.86	87.43	7.65	18	12.50	6.00	0.65	94.46	8.79
9	4.93 (-1.682)	6.00 (0)	0.65 (0)	88.54	7.63	19	12.50	6.00	0.65	95.57	8.93
10	20.07 (+1.682)	6.00	0.65	79.35	6.58	20	12.50	6.00	0.65	95.45	8.83

$X_1 - 0.33 X_2 + 0.85 X_3 + 0.23 X_1 X_2 - 0.14 X_1 X_3 + 0.072 X_2 X_3 - 1.24 X_1^2 - 1.41 X_2^2 - 2.24 X_3^2$, $R^2 = 0.818 4$, $P < 0.000 1$ 。从拟合方程的 R^2 与 P 值可知, 2 次多项式拟合较好, 可用此模型对 DLD/Hyp-Lip 进行预测和分析。 Y_1 、 Y_2 回归方程的方差分析见表 6。结果发现 Y_1 、 Y_2 模型项均 $P < 0.000 1$, 说明回归方程

表 4 磷脂总量与金丝桃苷的用量比对 DLD/Hyp-Lip 包封率和载药量影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of total phospholipids and Hyp mass ratio on DLD/Hyp-Lip entrapment efficiency and drug loading ($\bar{x} \pm s, n=3$)

磷脂总量与金丝桃苷用量比	包封率/%	载药量/%
5:1	74.53±1.48	6.73±0.43
10:1	89.12±1.29	8.44±0.57
20:1	83.93±1.67	8.11±0.53

2.4 星点设计-效应面法优化 DLD/Hyp-Lip 处方

2.4.1 星点设计-效应面试验设计 在单因素考察试验基础上, 选择磷脂总量与金丝桃苷用量比(X_1)、磷脂总量与胆固醇用量比(X_2)、DSPE-PEG 与 DLD 用量比(X_3)为考察因素, 每个因素设定 5 个水平(-1.682、-1、0、+1、+1.682), 以包封率(Y_1)和载药量(Y_2)为考察指标, 试验安排及结果见表 5。

2.4.2 模型拟合及方差分析 采用 Design-Expert 8.0.6 软件, 以 Y_1 、 Y_2 为响应参数对因素 X_1 、 X_2 、 X_3 进行二次多项式回归方程拟合, 得拟合方程分别为 $Y_1 = 93.87 + 0.85 X_1 - 0.42 X_2 + 9.74 X_3 + 0.59 X_1 X_2 - 2.7 X_1 X_3 + 1.51 X_2 X_3 - 10.45 X_1^2 - 8.81 X_2^2 - 16.55 X_3^2$, $R^2 = 0.848 9$, $P < 0.000 1$; $Y_2 = 8.55 + 0.044$

的关系是极显著的。对于 Y_1 、 Y_2 模型方程, X_1 、 X_2 、 X_3 、 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 都是显著项, 是 Y_1 、 Y_2 的显著影响因素, 交互影响因素 3D 效果图与等高线图见图 1、2。

2.4.3 响应面优化与预测 结合实验要求, 公共区域中响应面值较高部分为最佳的区域, 并选择最佳

表 6 DLD/Hyp-Lip 包封率和载药量回归方程的方差分析

Table 6 Variance analysis of DLD/Hyp-Lip envelopment rate and drug loading regression equation

方差来源	自由度	包封率			载药量			方差来源	自由度	包封率			载药量		
		平方和	F 值	P 值	平方和	F 值	P 值			平方和	F 值	P 值	平方和	F 值	P 值
模型	9	663.682	6.242	0.004 2	10.834	5.013	0.009 5	X_2X_3	1	1.792	0.153	0.705 5	4.050×10^{-3}	0.017	0.899 3
X_1	1	3.221	0.271	0.613 0	8.651×10^{-3}	0.036	0.853 3	X_1^2	1	204.210	17.290	0.002 0	2.862	11.911	0.006 2
X_2	1	0.760	0.065	0.804 6	0.482	1.992	0.188 5	X_2^2	1	139.951	11.852	0.006 3	3.583	14.913	0.003 2
X_3	1	290.812	24.621	0.000 6	2.221	9.251	0.012 4	X_3^2	1	291.642	24.690	0.000 6	5.341	22.233	0.000 8
X_1X_2	1	0.354	0.030	0.866 2	0.0541	0.230	0.644 2	残差	10	118.133			2.402		
X_1X_3	1	5.781	0.492	0.500 2	0.016	0.067	0.800 4								

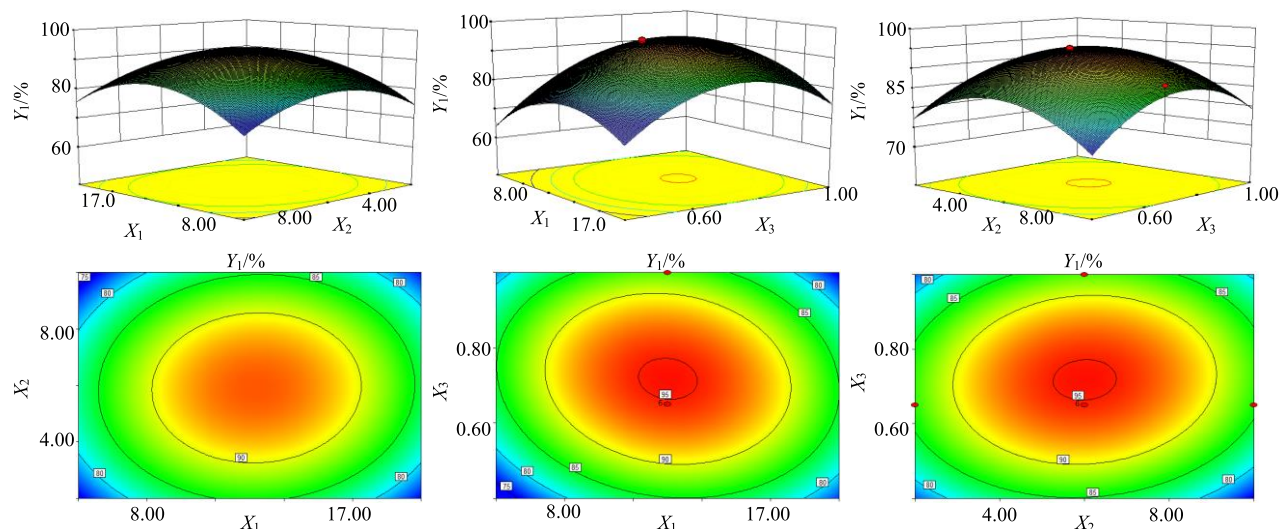


图 1 各因素对 DLD/Hyp-Lip 包封率影响的响应面和等高线

Fig. 1 Response surface and contour of influence of various factors on DLD/Hyp-Lip entrapment efficiency

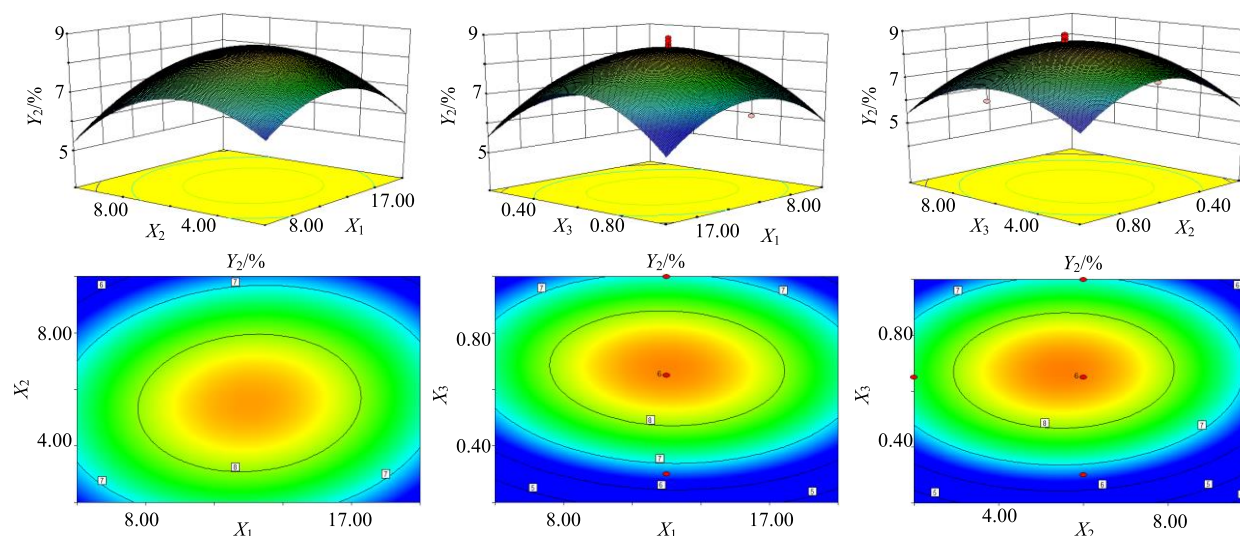


图 2 各因素对 DLD/Hyp-Lip 载药量影响的响应面和等高线

Fig. 2 Response surface and contour of influence of various factors on drug loading of DLD/Hyp-Lip

范围, 确定最佳范围是 $11.00 \leq X_1 \leq 14.00$, $4.00 \leq X_2 \leq 8.00$, $0.40 \leq X_3 \leq 0.80$ 。采用 Design-Expert 8.0.6 软件优化考察因素范围。最终确定 DLD/Hyp-Lip 处

方为 $X_1 = 12.50$, $X_2 = 6.00$, $X_3 = 0.60$, 此时 $Y_1 = (95.57 \pm 0.56) \%$, $Y_2 = (8.55 \pm 0.57) \%$ 。

2.4.4 优化后的处方验证 综上所述, 确定 DLD/

Hyp-Lip 最优处方工艺为磷脂总量与金丝桃苷用量比为 12.50 : 1, 卵磷脂与胆固醇的用量比为 6.00 : 1, DSPE-PEG 与 DLD 用量比为 3 : 5。按该工艺条件制备 3 批 DLD/Hyp-Lip 样品, 将检测结果与拟合方程的预测值进行对比, 按公式相对偏差=(预测值-实测值)/预测值计算相对偏差, 以评估模型方程的可靠性。各批样品包封率预测值为 94.90%、载药量预测值为 8.5%, 实测值分别为 95.52%、94.84%、96.02% ($n=3$) 和 8.67%、8.52%、8.43% ($n=3$), 实测平均值分别为 95.46% 和 8.54%, 实测值与预测值之间的相对偏差 $<5\%$, 说明优选的处方工艺稳定可行。

2.5 DLD/Hyp-Lip 的外观

取 DLD/Hyp-Lip 冻干粉末 3 批, 对其颜色进行观察; 取 DLD/Hyp-Lip, 稀释至一定倍数后, 滴至专用铜网上, 用磷钨酸染色后, 自然晾干, 于透射电子显微镜 (TEM) 下观察粒子的形态并拍照, 结果见图 3。结果表明, 制备的 DLD/Hyp-Lip 冻干粉末为淡黄色粉末, TEM 下观察脂质体圆整, 呈类球形, 外观良好。

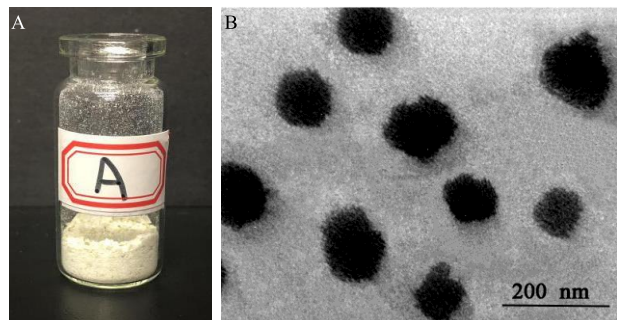


图3 DLD/Hyp-Lip 的外观形态 (A) 和 TEM 图 ($\times 20\,000$, B)
Fig. 3 Appearance (A) and TEM diagram ($\times 20\,000$, B) of DLD/Hyp-Lip

2.6 DLD/Hyp-Lip 粒径、Zeta 电位的测定

制备 3 批 DLD/Hyp-Lip, 用粒径仪测定其粒径和 Zeta 电位, 结果见图 4。结果表明, DLD/Hyp-Lip 的粒径为 (124.9 ± 3.4) nm; 多分散指数 (PDI) 为 0.164 ± 0.062 , 表明各脂质体的粒度分布较为均匀; Zeta 电位为 (-18.2 ± 1.9) mV。

2.7 pH 值诱导时的电位变化

考察 DLD-Lip 在不同 pH 值缓冲溶液中的 Zeta 电位变化, 取 1 mL DLD-Lip 加入到 15 mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4、6.8) 和醋酸缓冲溶液 (pH 5.5、4.5) 中, 并于 37 °C 下孵育。0、2、4、6、8、12 h 时, 取 1.5 mL 样品进行 Zeta 电位测定。结果见表 7, DLD-Lip 在 pH 7.4 下带负电荷; 当 pH 值降至 6.8 时, DLD-Lip 表面电荷至中性, 并在 2 h 后达到稳定水平; 当 pH 值降至 5.5 及 4.5 时, DLD-Lip 表面电荷翻转至正电荷, 电位稳定后高达 10~20 mV。

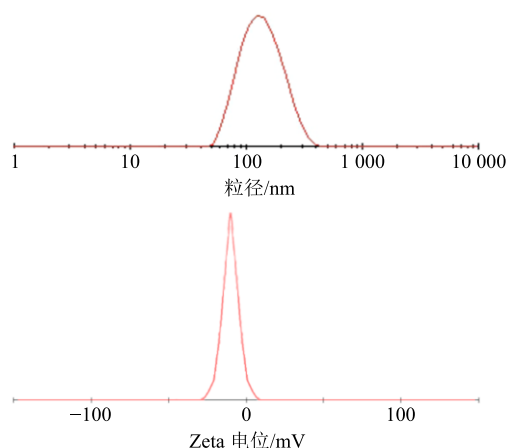


图4 DLD/Hyp-Lip 的粒径分布图 (A) 和 Zeta 电位图 (B)
Fig. 4 Diameter diagrams (A) and Zeta potential diagrams (B) of DLD/Hyp-Lip

表 7 DLD-Lip 在不同 pH 值诱导时的 Zeta 电位值 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 7 Zeta potential values of DLD-Lip induced by different pH values ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

pH 值	Zeta 电位值/mV					
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
7.4	-18.5 ± 1.2	-8.2 ± 0.98	-7.4 ± 0.49	-7.3 ± 0.52	-7.5 ± 0.99	-7.3 ± 1.02
6.8	0.1 ± 0.02	4.9 ± 0.45	5.0 ± 0.46	5.0 ± 0.45	5.1 ± 0.56	5.1 ± 0.60
5.5	5.2 ± 0.49	11.8 ± 1.12	10.6 ± 0.98	11.7 ± 0.99	10.3 ± 0.89	10.1 ± 0.91
4.5	7.2 ± 0.48	18.5 ± 1.95	17.5 ± 1.89	18.8 ± 1.80	18.9 ± 1.72	17.3 ± 1.49

2.8 血清稳定性研究

通过测定 DLD/Hyp-Lip 在胎牛血清中的粒径变化, 以评估脂质体在血清中的稳定性。取磷脂质量浓度为 5 mg/mL 的脂质体与等体积的胎牛血清混

合后于 37 °C 下进行孵育模拟生理条件。于 1、4、8、24 h 时, 取 100 μ L 样本进行粒径测定, 结果见图 6。脂质体 0 h 粒径为在 pH 7.4 的 PBS 溶液中测定得到的粒径。结果表明, DLD/Hyp-Lip 在 0~1 h 粒径有

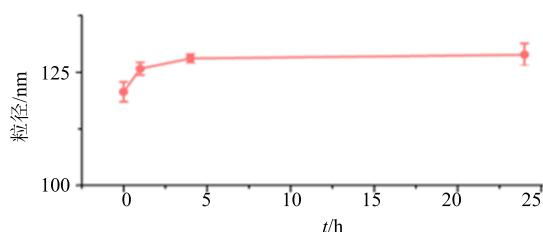


图 6 胎牛血清中 DLD/Hyp-Lip 的粒径变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 6 Changes in particle size of DLD/Hyp-Lip in fetal bovine serum ($\bar{x} \pm s, n=3$)

明显增加, 1~5 h 粒径增加缓慢, 5~24 h 粒径几乎不再增加, 性状稳定。

2.9 体外释药速率的测定

采用透析法测定 DLD/Hyp-Lip 在释放介质中的体外释放度。精密量取 0.1 mL DLD/Hyp-Lip 及游离金丝桃苷溶液 (金丝桃苷质量为 0.5 mg/mL), 置于预先处理好的透析袋 (截留相对分子质量为 6 000~8 000) 中, 并置于 50 mL 的释放介质中, 保持转速为 50 r/min, 释放介质的温度为 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 释放介质分别为含有 0.1% 聚山梨酯 80 的 PBS 溶液 (pH 7.4、6.8) 和含有 0.1% 聚山梨酯 80 的醋酸缓冲溶液 (pH 5.5、4.5)。分别于 0.5、1、2、4、8、12、24 h 时, 取 0.5 mL 的释放介质溶液, 然后加入等体积的新鲜释放介质继续释放行为的测定。测定样品中金丝桃苷的含量, 按照公式计算各时间点的累积释放量 (Q_n), 并绘制释放曲线。

$$Q_n = (V_c \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n) / M_{\text{药}}$$

V_c 代表释放介质的置换体积, C_i 代表第 i 次置换取样时释放出的药物浓度, V_0 代表释放介质体积, C_n 代表第 n 次取样时释放介质中的药物浓度, $M_{\text{药}}$ 代表脂质体中金丝桃苷含量

DLD/Hyp-Lip 和游离金丝桃苷溶液在含 0.1% 聚山梨酯 80 的 PBS 缓冲溶液 (pH 7.4、6.8) 和含 0.1% 聚山梨酯 80 的醋酸缓冲溶液 (pH 5.5、4.5) 的释放介质中的体外释放结果见图 7。结果表明, 在 4 种释放介质中, 游离金丝桃苷溶液中金丝桃苷在 12 h 时的 Q_n 达 75% 左右, 而 DLD/Hyp-Lip 在 12 h 时的 Q_n 达到 27% 左右, 24 h 内的 Q_n 达到 40% 左右, 与游离金丝桃苷溶液的释放曲线相比, DLD/Hyp-Lip 具有良好的缓释效果。

2.10 线粒体中金丝桃苷含量测定

将 CBRH-7919 细胞以每孔 1×10^5 个平行接种于 6 孔板中将培养板置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 24 h, 待细胞贴壁后吸去原培养液, 加入

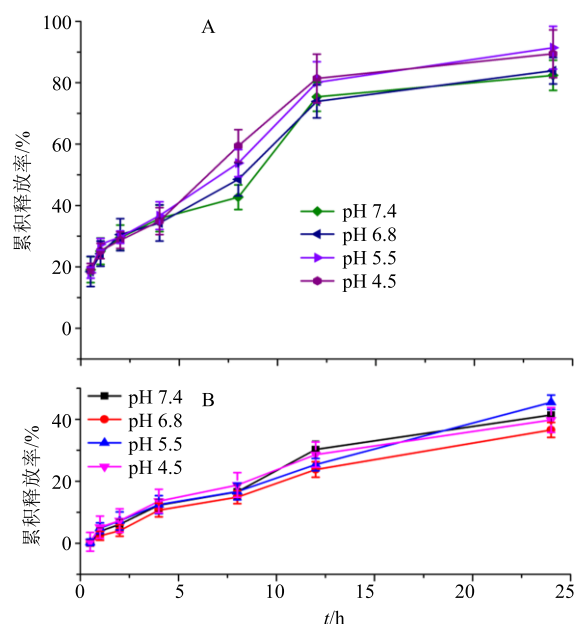


图 7 游离金丝桃苷溶液 (A) 和 DLD/HYP-Lip (B) 在释放介质中的累积释放量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Cumulative release of DLD/HYP-Lip and free HYP solution in release medium ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2 mL PBS 溶液, 清洗 2 次, 弃去 PBS 后加入浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 的 SPC/Hyp-Lip、DLD/Hyp-Lip 溶液, 并设置不加任何药物的新鲜培养基做对照组, 细胞培养箱孵育 24 h, 孵育结束后, 吸去原培养液, 用冷的 4°C PBS 清洗 2 次, 然后采用线粒体剥离试剂盒提取细胞的线粒体。将细胞重新分散在线粒体剥离缓冲溶液中, 在均质器中匀浆 15 s, 将获得的悬浮溶液 $13\ 000 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 收集上清液后, 再次 $11\ 000 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 进行线粒体分离, 沉淀物即为所需线粒体, 吸走上清后将线粒体重新分散在 $300 \mu\text{L}$ PBS 中。使用流式细胞仪对线粒体中摄取的金丝桃苷含量进行测定。采用流式细胞仪测定经 SPC/Hyp-Lip 及 DLD/Hyp-Lip 给药后的线粒体中金丝桃苷的含量, 比较各实验组之间的差异现象, 流式分析结果。其中对照组中金丝桃苷含量平均值为 1, SPC/Hyp-Lip 溶液组中金丝桃苷含量平均值为 21, DLD/Hyp-Lip 溶液组中金丝桃苷含量平均值可达 59, 表明 DLD/Hyp-Lip 可进入肿瘤细胞线粒体中, 且含量显著高于 SPC/Hyp-Lip 溶液组。由图 8 可知, DLD/Hyp-Lip 溶液组的荧光强度要显著高于 SPC/Hyp-Lip 溶液组, 该实验结果进一步表明了 DLD/Hyp-Lip 能够进入肿瘤细胞线粒体中。

2.11 Caspase-3、9 的活性测定

将 CBRH-7919 细胞以每孔 1×10^5 个平行接种

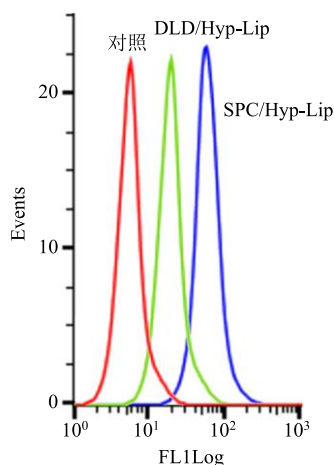


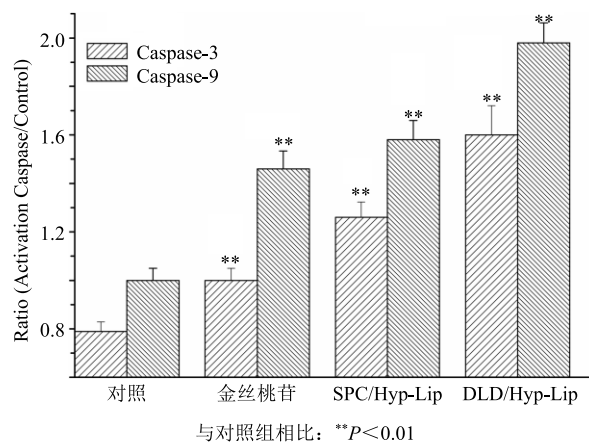
图 8 CBRH-7919 细胞线粒体中金丝桃苷的荧光强度

Fig. 8 Fluorescence intensity of Hyp in mitochondria of CBRH-7919 cells

于 6 孔板中, 将培养板置于 37 °C、5 %CO₂ 细胞培养箱中孵育 24 h, 待细胞贴壁后吸去原培养液, 加入 2 mL PBS, 清洗 2 次, 弃去 PBS 后加入浓度为 20 μg/mL 的 SPC/Hyp-Lip、DLD/Hyp-Lip 及金丝桃苷溶液, 并设置不加任何药物的新鲜培养基做对照组, 细胞培养箱孵育 12 h。根据 Caspase-3、9 活性检测试剂盒说明, 吸取细胞培养液, 备用。用 500 μL 胰酶消化贴壁细胞, 并收集至备用的细胞培养液中。1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加入 2 mL PBS 洗涤细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液后, 加入 100 μL 裂解液后转移至 600 μL 离心管中, 冰浴裂解 15 min。4 °C 下 16 000 r/min 离心 15 min。将上清液转移到冰浴预冷的离心管中。同时取 5 μL 样品用 Bradford 法测定蛋白浓度。取适量样品分别加入 Caspase-3、9 底物, 37 °C 避光孵育过夜, 酶标仪 405 nm 检测计算 Caspase-3、9 的活性。结果见图 9, Caspase-3 结果显示, 与对照组细胞相比, 经 DLD/Hyp-Lip 处理后, Caspase-3 的活性增加了近 1.6 倍, Caspase-9 结果显示, 与对照组细胞相比, 经 DLD/Hyp-Lip 处理后, Caspase-9 的活性增加了近 2 倍, 与其他实验组相比, DLD/Hyp-Lip 能够显著增加 Caspase 酶活性, 说明 DLD/Hyp-Lip 能够增加细胞的摄取, 同时 DLD 能够更快地激活线粒体凋亡通路, 诱导细胞凋亡。

3 讨论

本实验构建了基于电荷翻转的线粒体靶向金丝桃苷脂质体给药系统, 并对所制备的 DLD-Hyp-Lip 进行制剂学、表征、血清稳定性、体外释放及线粒体靶向性进行评价。

图 9 CBRH-7919 细胞的 Caspase-3 与 Caspase-9 活性测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 8 Caspase-3 and Caspase-9 activity in CBRH-7919 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

首先, 基于对肿瘤细胞微环境的特点及线粒体靶向优势, 本课题构建了一种新型脂质体。将具有 pH 值响应性的 2,3-二甲基马来酸酐 (DMA) 引入到二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE) 中, 以赖氨酸 (Lys) 为连接点, 得到 DSPE-Lys-DMA (即 DLD)。在 pH 7.4 条件下, 由于 DMA 中的羧基而使脂质体带负电荷。当脂质体聚集在肿瘤组织中时, 微环境中的弱酸性破坏二甲基马来酰胺键, 从而释放带正电的氨基。脂质体的表面电荷由负电荷翻转为正电荷, 继而和肿瘤细胞膜产生静电吸引作用, 增加了对肿瘤细胞的摄取。随着胞吞作用进入溶酶体中, 引起“质子海绵效应”, 导致溶酶体破裂。具有高正电荷的脂质体与线粒体膜 (130~150 mV, 内部负电荷) 的静电相互作用, 使其在线粒体中积聚以实现线粒体靶向作用, 最后触发封装药物的释放。

DLD-Lip 在不同 pH 值缓冲溶液中的电位变化结果表明, DLD-Lip 在 pH 7.4 下带负电荷; 当 pH 值降至 6.8 时, DLD-Lip 表面电荷至中性, 并在 1 h 后达到稳定水平; 当 pH 值降至 5.5 及 4.5 时, DLD-Lip 表面电荷翻转至正电荷, 此现象可以说明 DLD-Lip 可以翻转脂质体的表面电荷, DLD-Lip 在血液循环过程中 (pH 7.4) 表面荷载负电荷, 可以减少与负电性的血浆蛋白的相互作用, 从而减少对非特异性蛋白的吸附^[12-14]并增加载体在血液循环中的稳定性。由于肿瘤细胞膜表面通常为负电性, 当 DLD-Lip 通过高通透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 在肿瘤部位 (pH 6.8) 聚集后, DLD-Lip 的电荷翻转效应会增加

其细胞内的摄取^[15-16]。

本实验在构建 pH 响应及线粒体靶向的双功能 DLD/Hyp-Lip 时,发现包封率随着磷脂总量与胆固醇比例的增加而减少,加入适当的胆固醇可以改变磷脂膜的通透性和流动性特征,便于脂质体的制备。同时发现随着磷脂药物比的减小,脂质体包封率先增加后降低,开始阶段加大投药量导致包封率增加是由于脂质体对药物的包覆未达饱和;后来由于被包封药物逐渐增多,使脂质双分子层变形,从而造成脂质体体系不稳定,包封率降低。通过单因素试验筛相关影响因素,发现 DSPE-PEG 与 DLD 用量比、磷脂总量与金丝桃苷用量比、磷脂总量与胆固醇用量比这 3 个因素对 Lip 的包封率、载药量影响大,呈显著相关性。结合星点设计-效应面法对 DLD/Hyp-Lip 处方进行优化,经处方验证试验结果表明,实测值与预测值趋势基本一致,说明建立的模型预测效果良好,可以描述响应面和影响因素之间的关系^[17-19]。所制备的 DLD/Hyp-Lip 通过外观观察、血清稳定性实验及体外药物释放实验的测定。结果可以看出脂质体圆整,呈类球形,外观良好,在牛血清中具有足够的稳定性,具有良好的缓释效果。最优处方制备的 DLD/Hyp-Lip 对金丝桃苷具有很强的包载能力和载药能力。

DLD-Lip 的血清稳定性结果表明,在 50%血清中,DLD-Lip 能够在 24 h 内保护脂质体结构完整。体外释放试验结果表明与游离金丝桃苷溶液的释放曲线相比,DLD/Hyp-Lip 具有良好的缓释效果。据此初步推测,金丝桃苷作为亲脂性小分子药物,包裹在功能性脂质体中,故金丝桃苷表现为释药非常缓慢,有助于延长药物的体内循环时间,提高药物的生物利用度。线粒体中金丝桃苷的含量测定结果进一步表明了 DLD/Hyp-Lip 具有线粒体靶向性,载金丝桃苷的双功能脂质体进入细胞后,大部分聚集在线粒体部位。Caspase-3、9 活性测定发现,Caspase-3 的活性增加了近 1.6 倍,Caspase-9 的活性增加了近 2 倍,说明 DLD/Hyp-Lip 能够增加细胞的摄取,同时 DLD 能够更快地激活线粒体凋亡通路,诱导细胞凋亡。在后期实验研究中,进一步考察动物抗肿瘤的药效学试验和体内毒性试验等,综合评价 DLD/Hyp-Lip 的双功能纳米体系设计的有效性、合理性与安全性。

参考文献

[1] 孙可欣,郑荣寿,张思维,等. 2015 年中国分地区恶性

- 肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2019, 28(1): 1-11.
- [2] 高 婷, 李 超, 梁 铎, 等. 中国癌症流行的国际比较 [J]. 中国肿瘤, 2016, 25(6): 409-414.
- [3] 徐久东. 乳腺恶性肿瘤外科治疗方法与进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(90): 10-11.
- [4] 徐秀丽, 马金柱. 乳腺癌干细胞化学抗性 & 纳米载体的应用 [J]. 实用药物与临床, 2019, 22(2): 198-204.
- [5] 韩 旭, 丁冠宇, 董 青, 等. 基于脂质体的纳米基因载体的研究进展 [J]. 应用化学, 2018, 35(7): 735-744.
- [6] 祝造成, 栾立标. 脂质体天然高分子水凝胶给药系统的研究进展 [J]. 药学进展, 2018, 42(5): 380-387.
- [7] 姜雅萌, 朱妍妍, 赵轶男, 等. 抗肿瘤靶向脂质体的研究进展 [J]. 生命科学, 2016, 28(9): 1016-1024.
- [8] 盛竹君, 徐维平, 徐婷娟, 等. 脂质体药物传输系统的研究新进展 [J]. 中国药业, 2015, 24(23): 6-9.
- [9] 杨诗婷, 王晓倩, 廖广辉. 金丝桃苷的药理作用机制研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 947-951.
- [10] 代培培, 陈剑群. 金丝桃苷抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(11): 1979-1981.
- [11] Duchon M R. Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new mitochondrial biology [J]. *Mol Aspects Med*, 2004, 25(4): 365-451.
- [12] Du J Z, Sun T M, Song W J, *et al*. A tumor-acidity-activated charge-conversional nanogel as an intelligent vehicle for promoted tumoral-cell uptake and drug delivery [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49(21): 3621-3626.
- [13] Zhou Z X, Shen Y Q, Tang J B, *et al*. Charge-reversal drug conjugate for targeted cancer cell nuclear drug delivery [J]. *Adv Funct Mater*, 2009, 19(22): 3580-3589.
- [14] Gratton S E, Ropp P A, Pohlhaus P D, *et al*. The effect of particle design on cellular internalization pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(33): 11613-11618.
- [15] Cho E C, Xie J W, Wurm P A, *et al*. Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant [J]. *Nano Lett*, 2009, 9(3): 1080-1084.
- [16] Jiang T Y, Zhang Z H, Zhang Y L, *et al*. Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(36): 9246-9258.
- [17] 陆 珞, 关 键, 蔡恩博, 等. 星点设计-效应面法优选短梗五加叶中金丝桃苷的提取工艺 [J]. 食品科学, 2010, 31(18): 46-49.
- [18] 李传灵, 石晓晴, 黄月英, 等. 星点设计-效应面法优化叶黄素脂质体的处方及制备工艺 [J]. 药学服务与研究, 2019, 19(4): 244-249.
- [19] 孙利伟, 刘伟芬, 蒲晓辉. 星点-效应面法优化阿苯达唑脂质体的制备工艺 [J]. 华西药学期刊, 2019, 34(1): 33-37.