

• 药剂与工艺 •

唾液酸修饰绿原酸脂质体制备及其体外抗肿瘤活性研究

朱顺耀¹, 来银芳¹, 李晓稳², 李晶晶¹, 石森林^{1*}, 张 婷^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 江苏万邦医药科技有限公司, 江苏 徐州 221000

摘要: 目的 响应面设计制备唾液酸(sialic acid, SA)修饰的绿原酸(chlorogenic acid, CA)脂质体(CA-SAL), 考察其体外细胞毒性和摄取。方法 采用改良逆相乙醇注入法制备 CA-SAL, 以葡聚糖凝胶 G-50 柱离心法分离脂质体和游离药物, 并通过 HPLC 法测定药物质量浓度, 计算包封率。以包封率和载药量为考察指标, 通过 Box-Behnken 响应面设计实验优化 CA-SAL 的处方和工艺, MTT 法评价其对肺癌 A549 细胞的细胞毒性, 倒置荧光显微镜观察 A549 细胞对 CA-SAL 的摄取情况。结果 优化后的 CA-SAL 制备条件: 氢化大豆磷脂与绿原酸的质量比为 15:1, 水化温度 60 °C, 超声功率 400 W。CA-SAL 平均粒径为 (90.13 ± 0.51) nm, 多分散指数(PDI)为 0.16 ± 0.01 , Zeta 电位为 (-25.3 ± 0.5) mV; 包封率为 57.8%, RSD 为 0.1%。MTT 实验结果显示, CA-SAL 对 A549 细胞的增殖抑制作用显著强于绿原酸脂质体(CA-CL), 细胞摄取实验表明 A549 细胞对唾液酸修饰脂质体的摄取更高。结论 通过响应面优化制备的 CA-SAL 粒径小、性质稳定。经唾液酸修饰后的脂质体可以增强人肺癌 A549 细胞的细胞摄取及体外细胞毒性。

关键词: 唾液酸; 绿原酸; 脂质体; 响应曲面; 细胞毒性; 细胞摄取

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)24-6178-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.006

Preparation of sialic acid-modified chlorogenic acid liposomes and its anti-tumor activity *in vitro*ZHU Shun-yao¹, LAI Yin-fang¹, LI Xiao-wen², LI Jing-jing¹, SHI Sen-lin¹, ZHANG Ting¹

1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Jiangsu Wanbang Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Xuzhou 221000, China

Abstract: Objective Sialic acid (SA)-modified chlorogenic acid (CA) liposomes (CA-SAL) was prepared by response surface design to investigate its *in vitro* cytotoxicity and uptake. **Methods** CA-SAL was prepared by a modified reverse-phase ethanol injection method. Sephadex G50 column was used to separate the CA-loaded liposomes and the free CA. The drug concentration was determined by HPLC method and the encapsulation efficiency was calculated. With encapsulation efficiency and drug loading as indicators, Box-Behnken response surface design experiments were used to optimize the prescription process of CA-SAL. The MTT method was used to evaluate the cytotoxicity of CA-SAL on human lung cancer cells A549. Inverted fluorescence microscope was used to investigate the uptake of CA-SAL by A549 cells. **Results** The optimized preparation conditions: hydrogenated soybean lecithin-CA ratio at 15:1, hydration temperature 60 °C, ultrasonic power 400 W. The average particle size of CA-SAL was (90.13 ± 0.51) nm, the polydispersity index (PDI) was 0.16 ± 0.01 , the zeta potential was (-25.3 ± 0.5) mV, the encapsulation efficiency was 57.8%, RSD was 0.1%. MTT results showed that the inhibitory effect of CA-SAL on A549 cells was significantly greater than CA-CL. Greater cellular uptake of CA-SAL was observed compared with CA-CL. **Conclusion** CA-SAL prepared by response surface optimization has a uniform particle size and good stability. SA-modified CA-loaded liposomes could enhance cellular uptake and cytotoxicity of human

收稿日期: 2020-07-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81903808); 浙江省自然科学基金资助项目(LY21H280004)

作者简介: 朱顺耀(1996—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: 17826866744 E-mail: zsy@zcmu.edu.cn

*通信作者 张 婷, 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0571)61768158 E-mail: zhangting55@163.com
石森林, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0571)86613756 E-mail: pjstone@163.com

lung cancer cell A549 *in vitro*.

Key words: sialic acid; chlorogenic acid; liposomes; response surface; cellular cytotoxicity; cellular uptake

绿原酸 (chlorogenic acid, CA) 是金银花、杜仲等药材的重要活性成分^[1-3], 是由反式肉桂酸与奎尼酸组成的多酚类化合物, 具有抗氧化、抗菌、抗癌、抗紫外光与辐射、免疫调节、调血脂、降血糖等药理作用^[4-6], 具有重要应用开发前景。但绿原酸为极性有机酸, 受热见光易氧化, 结构不稳定, 生物利用度低^[7-8]。纳米脂质体作为药物载体具有良好的生物相容性^[9], 脂质体包裹的药物可以有效地防止药物氧化、提高药物光稳定性和体内的吸收^[10]。脂质体包载绿原酸可以克服绿原酸的不稳定和难以透过细胞膜的不足, 通过高渗透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 增加其靶向性, 降低了治疗剂量进而提高其体内生物利用度^[11-12]。近年来唾液酸 (sialic acid, SA) 的结合蛋白相继被发现, 其中 Siglec-1 又被称为唾液酸黏附素^[13], 在巨噬细胞促炎症反应中起着重要作用, 已有研究表明其在肿瘤相关巨噬细胞表面高表达^[14], 在肿瘤靶向治疗中可作为抗肿瘤药物的靶点^[15], 将唾液酸修饰在脂质体上, 增加制剂靶向效果, 可以更好地发挥疗效。

本实验采用改良逆相乙醇注入法制备唾液酸修饰绿原酸脂质体 (sialic acid modified chlorogenic acid liposomes, CA-SAL), 通过响应面设计优化处方制剂工艺, 对其形态、粒径及其分布和包封率进行评价, 并进一步通过细胞毒性和细胞摄取实验考察了唾液酸修饰绿原酸脂质体的体外抗肿瘤活性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 杭州博研仪器设备有限公司; Agilent1200 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; 艾本德 5810R 台式离心机, 德国 Eppendorf 有限公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技有限公司; UV-vis2450 紫外分光光度计, 日本 Shimadzu 有限公司; XS105 分析天平, 梅特勒-托利多有限公司; Nano-zs90 激光粒度 Zeta 电势测定仪, 英国马尔文仪器有限公司; DS-Ri2 荧光倒置显微镜, 日本 Nikon 有限公司; Infinite 200 多功能酶标仪, 瑞士帝肯有限公司; Nicolet IS50 红外光谱仪, 赛默飞世尔科技公司; Avance II 600MHz 核磁共振波谱仪, 瑞士布鲁克有限公司。

1.2 材料

氢化大豆磷脂 (HSPC, 批号 B60455)、胆固醇 (Cho, 批号 B80859)、双饱和卵磷脂 (DSPC, 批号 B51276), 注射级, 上海艾伟拓医药有限公司; 大豆卵磷脂 (SPC, 批号 8002435), 诺维博美医药科技有限公司; 蛋黄卵磷脂 (EPC, 上海源叶生物科技有限公司, 批号 T18A9F58540); 绿原酸原料药, 批号 N1904131664, 质量分数 >98%, 上海乔羽生物有限公司; 香豆素 6 (C6, 上海源叶生物科技有限公司, HPLC 级, 批号 Z14M10H88284); 透析袋 MWCO3500-4000 (上海源叶生物有限公司); 葡聚糖凝胶 G-50 (批号 C10692375)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl, 批号 C10476444)、*N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 批号 C10490891), 上海麦克林生化科技有限公司; 十八胺 (ODA, 批号 FY28643H9410), 南通飞宇生物科技有限公司; MTT 试剂盒 (批号 A100793-0001)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 批号 E607303), 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, 批号 20180820), 广东光华科技股份有限公司; 无水乙醇为分析纯; 甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 SA-ODA 的合成^[16]

室温下使用 DMF 10 mL 溶解唾液酸 184 mg (0.60 mmol), 之后加入 NHS 140 mg 和 EDC·HCl 228 mg, 室温下磁力搅拌 1 h 进行活化。活化完成后向反应体系中加入 ODA 54 mg (0.20 mmol), 氮气保护下 60 °C、240 r/min 搅拌 12 h。反应完成后用超纯水将反应体系稀释至 4 倍体积, 并使用超纯水进行充分透析 (截留相对分子质量 3 500), 冻干得 SA-ODA 纯品。唾液酸和 SA-ODA 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 见图 1, SA-ODA 核磁共振氢谱 (¹H-NMR) 见图 2。通过图 1 中 2 918、2 850 cm⁻¹ 处烷基和 1 117、1 030 cm⁻¹ 处醇羟基的存在以及随着 1 725、1 756 cm⁻¹ 处羧酸基团的消失, 验证了 SA 与 ODA 的连接。

2.2 绿原酸定量分析方法的建立

2.2.1 溶液的配制

(1) 空白脂质体破乳液: 精密吸取空白脂质体

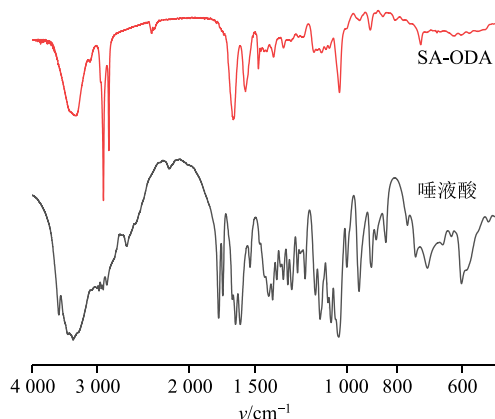


图 1 唾液酸和 SA-ODA 的 FT-IR 光谱
Fig. 1 FT-IR spectrum of SA and SA-ODA

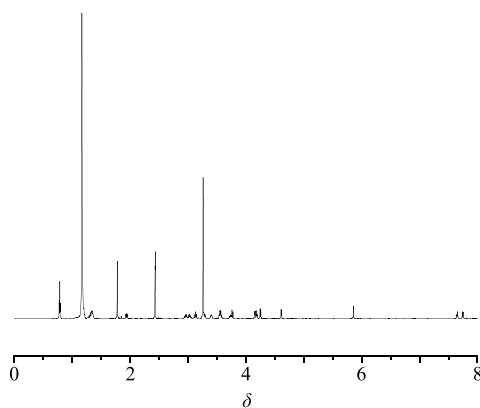


图 2 SA-ODA 核磁共振氢谱
Fig. 2 ¹H-NMR spectrum of SA-ODA

混悬液 0.2 mL, 加 50% 甲醇超声溶解定容至 5.0 mL, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得空白脂质体破乳液。

(2) 绿原酸对照品溶液: 取绿原酸对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加 50% 甲醇超声溶解定容至 25 mL, 制成绿原酸对照品溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得绿原酸对照品溶液。

(3) CA-SAL 破乳液: 精密吸取 CA-SAL 0.2 mL, 加 50% 甲醇超声溶解定容至 5.0 mL, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得 CA-SAL 破乳液。

2.2.2 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.4% 磷酸水溶液-乙腈 (82:18); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 327 nm; 进样量 10 μL; 柱温 25 °C。

2.2.3 专属性考察 取空白脂质体破乳液、绿原酸对照品溶液、CA-SAL 破乳液各进样 10 μL, 分别记录高效液相色谱图, 在此条件下, 绿原酸色谱峰峰形良好, 辅料对药物的测定无干扰, 见图 3。

2.2.4 线性关系考察 取绿原酸对照品溶液, 分别稀释制成质量浓度为 60.48、120.96、181.44、241.92、

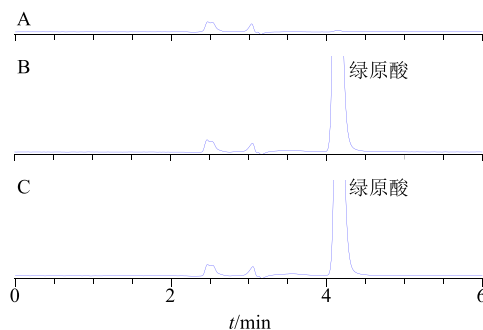


图 3 空白脂质体破乳液 (A)、绿原酸对照品 (B) 和 CA-SAL 破乳液 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC of blank liposome (A), CA reference substance (B) and CA-SAL (C)

302.40 μg/mL 的系列对照品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以绿原酸质量浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得线性回归方程 $Y=27.327 X-665.82$, $r=0.999 8$, 结果表明绿原酸在 60.48~302.40 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 取绿原酸对照品溶液重复进样测定 6 次, 记录峰面积, 计算得其 RSD 为 0.45%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取 CA-SAL 破乳液, 分别于放置 0、2、4、8、16、24 h 时进样测定, 结果 CA-SAL 破乳液绿原酸峰面积 RSD 为 1.22%, 表明 CA-SAL 破乳液 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批 CA-SAL 0.2 mL, 平行 6 份, 置于 5 mL 量瓶, 用 50% 甲醇定容, 摇匀, 按“2.2.2”项下色谱条件进样测定。结果绿原酸平均质量浓度为 1.60 mg/mL, RSD 为 2.2%, 表明该方法重复性好。

2.2.8 加样回收率试验 取“2.2.1”项下空白脂质体 6 份, 每份 0.2 mL, 每份分别加入绿原酸对照品溶液 (2.03 mg/mL) 0.2 mL, 涡旋混匀, 50% 甲醇溶解定容至 5 mL, 涡旋混匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 按照“2.2.2”项下色谱条件进行测定, 结果平均回收率为 99.30%, RSD 为 2.71%。

2.3 脂质体包封率的测定方法

选用葡聚糖凝胶柱法进行脂质体与游离药物的分离^[17-18]。取葡聚糖 G-50 凝胶用超纯水浸泡充分溶胀后填充于具有 2 层滤纸片的 2.5 mL 注射器内, 待水分自然流下, 514×g 离心 3 min 除去多余水分, 即得柱高约 3.5 cm 的微柱待用。

精密量取 2 份 CA-SAL 0.2 mL, 其中 1 份加于

微型凝胶柱的顶端, 514×g 离心 3 min, 继续加入 0.2 mL 超纯水于微型凝胶柱的顶端, 514×g 离心 3 min, 分别连续操作 3 次, 合并收集离心洗脱液于 5 mL 量瓶, 用 50% 甲醇超声溶解定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜。按“2.2.2”项下色谱条件进行检测, 测定上柱后的峰面积, 计算绿原酸质量浓度 ($C_{\text{离心后}}$)。另 1 份加于 5 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇超声溶解定容, 按“2.2.2”项下色谱条件测定上柱前的峰面积, 计算绿原酸质量浓度 ($C_{\text{离心前}}$), 计算包封率, 公式为包封率 = $C_{\text{离心后}}/C_{\text{离心前}}$ 。

2.4 脂质体制备方法选择

2.4.1 薄膜分散法 按课题组前期预实验比例称取脂质体膜材, 即 HSPC、胆固醇、SA-ODA 质量比为 73:22:5 溶于三氯甲烷中, 50 °C 减压蒸发除去有机溶剂, 形成均匀脂质膜, 加入 3 mL 相同温度质量浓度为 1.67 mg/mL 绿原酸溶液, 50 °C 水合 20 min 过 0.80、0.45、0.22 μm 微孔滤膜, 即得 CA-SAL。

2.4.2 改良逆相乙醇注入法 按课题组前期预实验比例称取脂质体膜材, 即 HSPC、胆固醇、SA-ODA 质量比为 73:22:5, 加入制剂终体积 10% 的无水乙醇并于 50 °C 水浴中搅拌速度为 320 r/min 搅拌溶解。待膜材完全溶解后, 继续搅拌, 挥去大部分无水乙醇。将预热至相同温度的质量浓度为 1.67 mg/mL 绿原酸溶液注入膜材中, 50 °C 水浴搅拌 20 min, 得到 CA-SAL 初品。将初品超声分散处理 6 min (功率 400 W, 工作 1 s 间歇 1 s) 后, 依次通过 0.80、0.45、0.22 μm 的微孔滤膜, 即得 CA-SAL。

2.4.3 筛选结果 由于薄膜分散法制备的脂质体粒径大、包封率低 (表 1), 因此选择改良逆相乙醇注入法。

表 1 CA-SAL 制备方法考察

Table 1 Preparation method investigation of CA-SAL

制备方法	平均粒径/nm	PDI	包封率/%
薄膜分散法	142.9±1.1	0.272±0.018	37.8±2.1
改良逆相乙醇注入法	118.7±0.3	0.288±0.010	48.3±1.4

2.5 单因素实验

2.5.1 磷脂与药物比例考察 固定处方中的药量为 5 mg, 设定磷脂与药物的比例分别为 5:1、10:1、15:1、20:1、25:1, 按“2.4.2”项下改良逆相乙醇注入法制备脂质体, 结果包封率分别为 (28.9±1.4) %、(35.9±1.2) %、(47.8±2.1) %、(45.2±3.6) %、(46.3±3.4) %, 由以上结果可知, 包封率

随着磷脂与药物比例的增大而增大, 但是当磷脂与药物比例达到 15:1 时, 包封率不再提升, 出于成本考虑选择磷脂与药物比例 15:1 进行载药。

2.5.2 水化温度考察 设定水化温度分别为 25、35、45、55、65 °C, 其他条件不变, 按“2.4.2”项下方法制备脂质体, 结果包封率分别为 (20.9±2.3) %、(30.3±1.4) %、(40.6±1.1) %、(46.3±2.6) %、(44.6±2.4) %, 由以上结果可知, 包封率随着水化温度的升高而增大, 但是当水化温度达到 55 °C 时, 包封率不再升高, 反而有所下降。因为当温度升高到相变温度以上磷脂流动性增强, 有利于药物包封, 而温度过高流动性太强导致药物漏出, 对绿原酸的稳定性也会造成影响。在达到相变温度的情况下考虑选择 55 °C 为水化温度。

2.5.3 水化时间考察 设定水化时间分别为 20、30、40、50、60 min, 其他条件不变, 按“2.4.2”项下方法制备脂质体, 结果包封率分别为 (45.3±1.3) %、(46.7±1.2) %、(46.6±2.4) %、(40.5±2.3) %、(39.6±1.6) %, 由以上结果可知, 包封率在水化时间到达 50 min 后有所下降, 可能是因为当包封的药物达到饱和, 水化时间过长会导致药物泄漏。在药物包封完全的情况下考虑选择 30 min 为水化时间。

2.5.4 超声功率考察 设定超声功率分别为 100、200、300、400、500 W, 其他条件不变, 按“2.4.2”项下方法制备脂质体, 结果包封率分别为 (40.5±3.1) %、(43.7±2.2) %、(45.4±2.4) %、(44.5±1.3) %、(38.6±1.4) %, 由以上结果可知, 包封率随着超声功率的增加而增大, 但是当超声功率到了 300 W 时, 包封率不再升高, 反而下降, 可能是因为超声功率过高导致部分药物泄漏。在考虑超声分散均匀的情况下选择超声功率为 300 W。

2.5.5 超声时间考察 设定超声时间分别为 2、4、6、8、10 min, 其他条件不变, 按“2.4.2”项下方法制备脂质体, 结果包封率分别为 (42.6±1.1) %、(45.8±3.2) %、(45.4±2.1) %、(39.5±2.3) %、(35.6±1.7) %, 由以上结果可知, 包封率开始随着超声时间的增加而变化不大, 但是当超声时间到了 8 min 时, 包封率开始出现了明显的下降, 可能是因为超声时间过长导致部分药物泄漏。考虑选择超声时间为 6 min。

2.5.6 磷脂种类考察 分别采用 HSPC、SPC、EPC、DSPC 4 种不同的磷脂, 其他条件不变, 按“2.4.2”

项下方法制备脂质体, 结果包封率分别为 (46.4±3.1) %、(38.8±2.5) %、(39.4±1.5) %、(44.4±2.8) %, 结果表明 HSPC 和 DSPC 的效果较好。在考虑到 HSPC 较为经济的情况下选择磷脂种类为 HSPC。

2.6 Box-Behnken 响应面法优化脂质体制备工艺及处方

2.6.1 响应面实验设计及结果

应用 Design Expert 12.0 软件进行响应面设计, 在前期单因素试验的基础上, 以 CA-SAL 包封率 (Y_1) 和载药量 (Y_2) 为响应值, 影响较为显著的磷脂与药物质量比 (X_1)、水化温度 (X_2)、超声功率 (X_3) 3 个因素为考察对象, 采取 3 因素 3 水平 Box-Behnken 响应面优化法, 确定最佳制备工艺。考察因素水平、试验设计及结果见表 2。

2.6.2 模型的建立及其显著性检验

通过 Design-

Expert 12.0 软件对表 2 数据进行拟合, 得到方程为 $Y_1 = 157.23 - 5.06 X_1 - 3.94 X_2 - 0.12 X_3 + 0.069 X_1 X_2 + 8.70 \times 10^{-3} X_1 X_3 - 1.53 \times 10^{-3} X_2 X_3 - 2.50 \times 10^{-3} X_1^2 + 0.037 X_2^2 + 3.51 \times 10^{-4} X_3^2$, $Y_2 = 13.359 37 - 0.930 5 X_1 - 0.192 25 X_2 - 7.725 \times 10^{-3} X_3 + 3 \times 10^{-3} X_1 X_2 + 5 \times 10^{-5} X_1 X_3 - 1 \times 10^{-4} X_2 X_3 + 0.024 9 X_1^2 + 1.975 \times 10^{-3} X_2^2 + 3.225 \times 10^{-5} X_3^2$ 。方差分析表见表 3。模型 $P < 0.05$, 具有显著性影响, 而失拟项 $P > 0.05$, 表明失拟不显著。模型的相关系数 (r^2) 分别为 0.984 5、0.991 8, 调整确定系数 (r_{adj}^2) 分别为 0.964 6、0.981 2, 该模型与实际试验拟合程度良好, 用该模型分析和预测脂质体制备是合适的。

2.6.3 响应面分析

通过 Design-Expert 12.0 软件对各因素之间的交互作用进行响应面分析, 绘制响应面曲线图, 响应曲面陡峭程度越大, 则对包封率和载药量的影响也越大。结果见图 4、5。

表 2 试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results

试验号	X_1	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/W	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	试验号	X_1	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/W	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	试验号	X_1	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/W	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	5	65	300	32.0	4.7	7	15	55	400	57.8	2.9	13	15	65	300	54.7	2.7
2	10	45	400	50.3	3.7	8	10	55	300	34.5	2.6	14	10	65	400	55.0	4.1
3	5	55	200	29.8	4.4	9	10	55	300	35.9	2.7	15	15	45	300	40.4	2.8
4	10	45	200	28.4	2.1	10	5	45	300	31.5	4.6	16	10	55	300	35.5	2.6
5	15	55	200	31.3	1.6	11	10	55	300	36.5	2.7	17	10	65	200	39.2	4.4
6	5	55	400	38.9	5.6	12	10	55	300	37.6	2.8						

表 3 包封率和载药量方差分析

Table 3 Analysis of variance of encapsulation efficiency and drug loading

来源	自由度	包封率				载药量			
		离均差平方和	均方	F 值	P 值	离均差平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	1 373.54	152.62	49.43	<0.000 1	19.320 0	2.150 0	93.64	<0.000 1
A	1	338.00	338.00	109.47	<0.000 1	12.750 0	12.750 0	556.13	<0.000 1
B	1	114.76	114.76	37.17	0.000 5	0.500 0	0.500 0	21.81	0.002 3
C	1	671.61	671.61	217.53	<0.000 1	3.510 0	3.510 0	153.14	<0.000 1
AB	1	47.61	47.61	15.42	0.005 7	0.090 0	0.090 0	3.93	0.088 0
AC	1	75.69	75.69	24.51	0.001 7	0.002 5	0.002 5	0.11	0.750 9
BC	1	9.30	9.30	3.01	0.126 2	0.040 0	0.040 0	1.74	0.228 1
A ²	1	0.02	0.02	5.33×10^{-3}	0.943 9	1.630 0	1.630 0	71.16	<0.000 1
B ²	1	58.03	58.03	18.80	0.003 4	0.164 2	0.164 2	7.16	0.031 7
C ²	1	51.95	51.95	16.83	0.004 6	0.437 9	0.437 9	19.10	0.003 3
残差	7	21.61	3.09			0.160 5	0.022 9		
失拟项	3	16.29	5.43	4.08	0.103 8	0.132 5	0.044 2	6.31	0.053 6
纯误差	4	5.32	1.33			0.028 0	0.007 0		
总差	16	1 395.16				19.480 0			

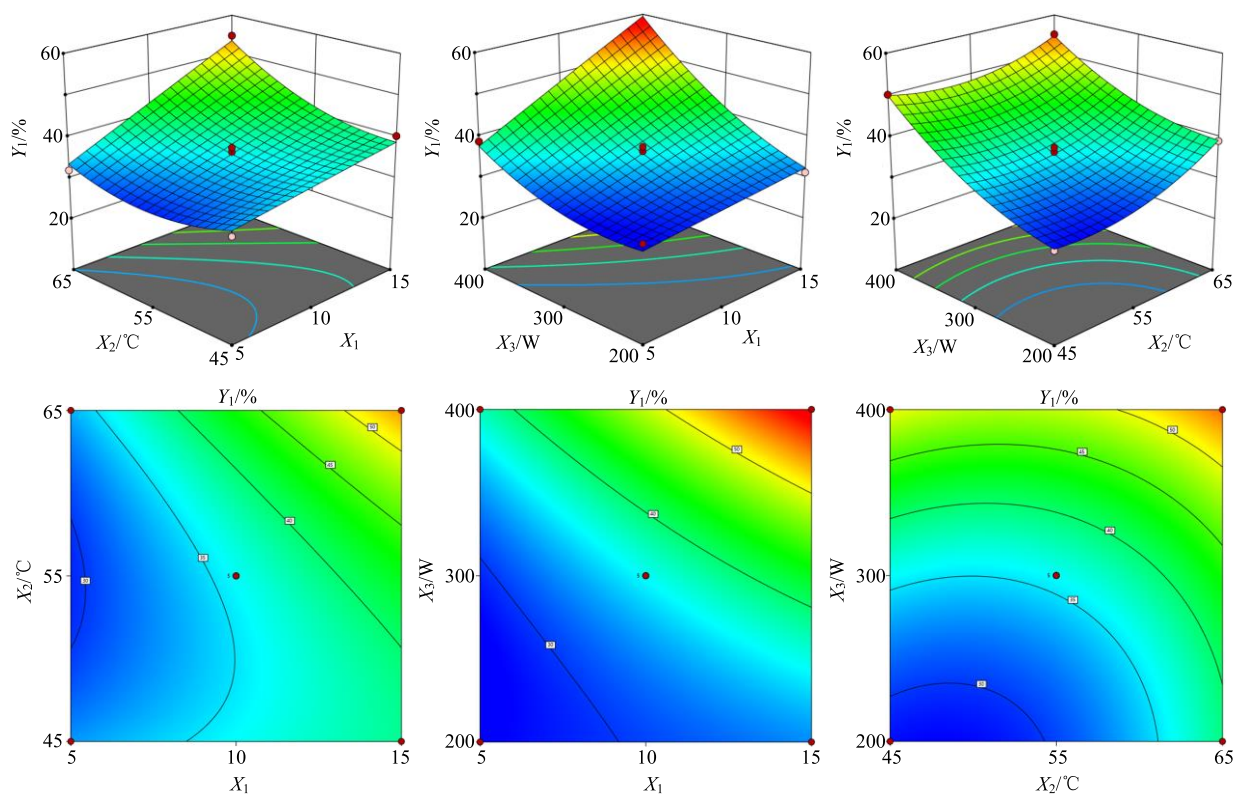


图 4 基于响应曲面法不同因素对包封率的影响

Fig. 4 Effects of different factors on encapsulation efficiency based on response surface method

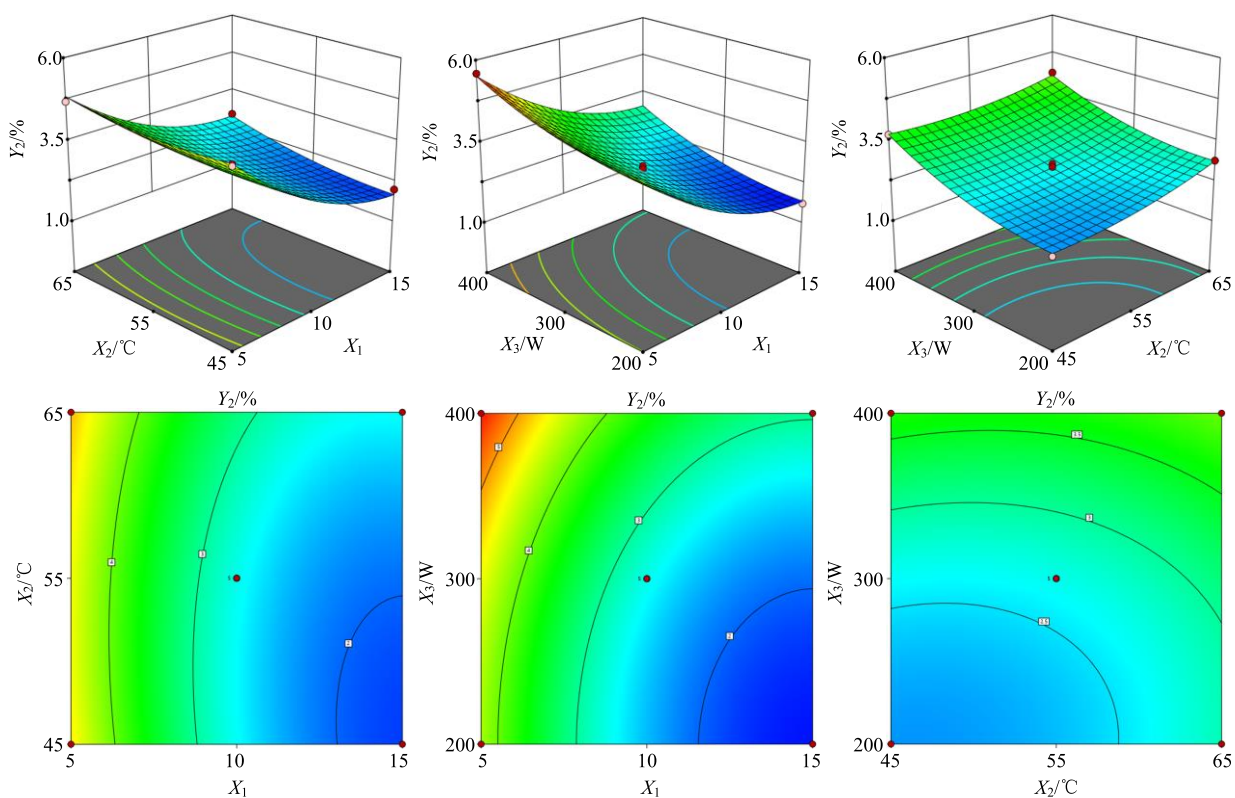


图 5 基于响应曲面法不同因素对载药量的影响

Fig. 5 Effects of different factors on drug loading based on response surface method

2.6.4 最佳工艺的确定和验证 期望脂质体包封率和载药量处于最大值为优化指标,通过 Design-Expert 12.0 软件分析,最终确定 CA-SAL 制备的最佳工艺条件为磷脂与药物质量比为 15:1,水化温度为 60 °C,超声功率为 400 W。在该条件下 CA-SAL 的理论包封率为 60.5%,说明利用 Box-Behnken 建立的模型是合理的。对结果进行验证,重复 3 次,CA-SAL 的平均包封率为 57.8%,RSD 为 0.1%,载药量为 2.3%,RSD 为 0.5%,说明该模型得到的结果可靠。

按照上述 CA-SAL 最佳制备工艺制备绿原酸脂质体 (CA-CL),膜材中不加入 SA-ODA。

2.7 脂质体理化性质的初步研究

2.7.1 脂质体形态的观察 本实验制备得到的脂质体均外观澄清透明,呈淡蓝色乳光,结果见图 6。将脂质体混悬液滴入铜网,然后用 2%磷钨酸染色制备样品。然后对样品进行干燥,置于透射电镜下观察。如图 7 示,CA-CL 和 CA-SAL 均呈类球型,圆整。



图 6 CA-CL (A) 和 CA-SAL (B) 的外观

Fig. 6 Appearance of CA-CL (A) and CA-SAL (B)

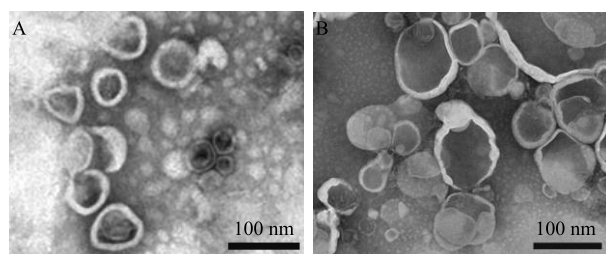


图 7 CA-CL (A) 和 CA-SAL (B) 透射电镜图

Fig. 7 TEM of CA-CL (A) and CA-SAL (B)

2.7.2 粒度及 Zeta 电位考察 将取适量制备的脂质体稀释一定倍数后,于激光粒度分析仪测定粒径、Zeta 电位及多分散系数 (PDI)。测得 CA-SAL 的数据。CA-SAL 平均粒径为 (90.13 ± 0.51) nm, PDI 为 0.16 ± 0.01 , Zeta 电位为 (-25.3 ± 0.5) mV。

2.7.3 放置稳定性 取制备的脂质体 3 批,于 4 °C 条件下放置保存,分别于第 0、1 个月取样,观察是否有分层、沉淀现象,考察粒径及包封率变化情况。

结果见表 4, CA-SAL 在 4 °C 条件下存放 1 个月,有少量沉淀和絮凝产生,经振摇可复原,均匀性良好,包封率和粒径均无显著性变化。结果表明,CA-SAL 在 4 °C 条件下稳定性较好。

表 4 CA-SAL 在 4 °C 条件下的稳定性 ($n = 3$)

Table 4 Stability of CA-SAL at 4 °C ($n = 3$)

时间/月	外观	粒径/nm	PDI	包封率/%
0	无沉淀	90.13 ± 0.51	0.160 ± 0.01	57.8 ± 0.1
1	有少量沉淀,经振摇可复原	92.47 ± 2.16	0.177 ± 0.11	56.2 ± 0.5

2.8 体外释放

分别取 1 mL CA-CL、CA-SAL、绿原酸溶液(均含绿原酸 4 mg)置入透析袋中,加入释放介质(PBS, pH 6.8) 25 mL,于 37 °C、100 r/min 恒温振荡。分别于 0.5、1、2、4、6、12 h 取样 1 mL (同时补充等温等量释放介质),用 HPLC 法测定绿原酸质量浓度,计算 3 组样品各时间点累积释药分数并作图。结果如图 8 所示,绿原酸溶液在最初 0.5 h 释放已达到 71.2%,4 h 时绿原酸溶液的累积释放率为 99.8%,已经基本释药完全。而 CA-CL 和 CA-SAL 无明显突释现象,在 0.5 h 的累积释放率分别为 15.6%、17.8%。12 h 时,CA-CL 和 CA-SAL 的累积释放率分别为 60.1%、58.4%。综上所述,CA-CL 和 CA-SAL 与游离药物相比,具有一定的缓释作用,且二者的释放曲线相似,说明 SA 的修饰对药物释放无明显影响。

2.9 CA-SAL 的细胞毒性实验

培养 A549 细胞并接种于 96 孔板中,当孔板中细胞完全贴壁且处于对数生长期时,以含 10% FBS

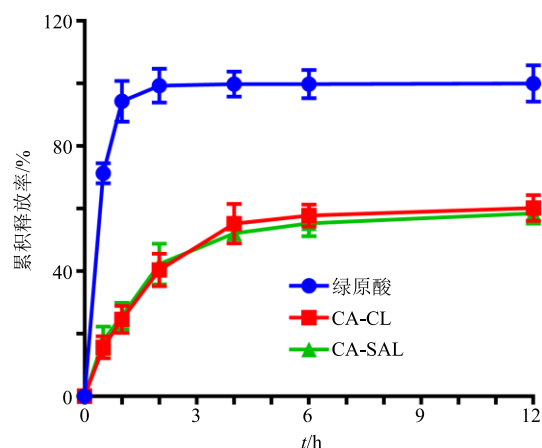


图 8 CA 不同制剂体外释药曲线

Fig. 8 In vitro release curve of different CA preparations

的培养基为空白对照组,以未经药物处理过的细胞悬液为阴性对照组,加入 3 个质量浓度(300、600、900 $\mu\text{g/mL}$)的游离绿原酸、CA-CL 及 CA-SAL。继续培养 48 h 后,采用 MTT 法检测各组 490 nm 处吸光度(A)值,计算细胞存活率,结果见图 9。在低质量浓度时 CA-CL 和 CA-SAL 对 A549 细胞没有出现抑制,CA-CL 和 CA-SAL 随着药物质量浓度的增加对 A549 细胞的增殖抑制率增强。在相同给药浓度下,CA-SAL 对 A549 细胞的增殖抑制作用显著强于 CA-CL。

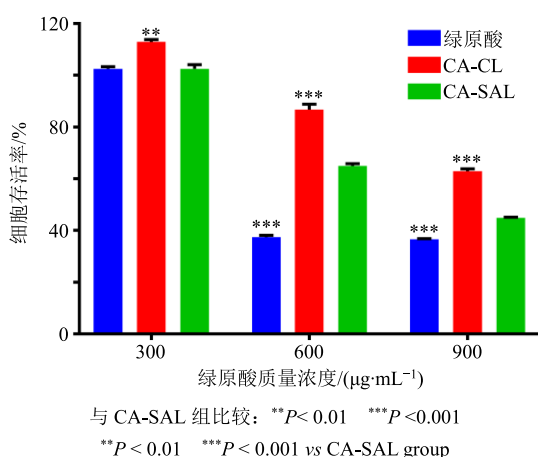


图 9 脂质体外细胞毒性实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 9 Results of *in vitro* cytotoxicity tests for liposomes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.10 细胞摄取实验

2.10.1 香豆素-6 储备液制备 精密称取香豆素-6 适量于 5 mL 量瓶中,无水乙醇溶解定容至刻度,制成 0.6 mg/mL 的香豆素-6 溶液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.10.2 载香豆素-6 脂质体 (C6-CL) 制备 取脂质体膜材 HSPC-胆固醇 (10:3),加入 0.5 mL 香豆素-6 储备液,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,继续搅拌,挥除大部分溶剂。将预热至相同温度超纯水注入膜材中,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴搅拌 20 min,得到 C6-CL 初品。将初品超声分散处理 6 min (功率 400 W,工作 1 s 间歇 1 s) 后,依次通过 0.80、0.45、0.22 μm 的微孔滤膜,即得 C6-CL。

2.10.3 载香豆素-6 唾液酸修饰脂质体 (C6-SAL) 制备 按质量比 73:22:5 称取 HSPC、胆固醇、SA-ODA,加入 0.5 mL 香豆素-6 储备液,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中搅拌溶解。待膜材完全溶解后,继续搅拌挥除大部分溶剂。将预热至相同温度的超纯水注入膜材中,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴搅拌 20 min,得到 C6-SAL 初品。将

初品超声分散处理 6 min (功率 400 W,工作 1 s 间歇 1 s) 后,依次通过 0.80、0.45、0.22 μm 的微孔滤膜,即得 C6-SAL。

C6-CL、C6-SAL 的粒径和 PDI 测定结果见表 5。

表 5 C6-CL、C6-SAL 表征

Table 5 Characterization of C6-CL and C6-SAL

组别	粒径/nm	PDI
C6-CL	101.4 $\pm$ 1.1	0.272 $\pm$ 0.005
C6-SAL	113.4 $\pm$ 1.7	0.268 $\pm$ 0.002

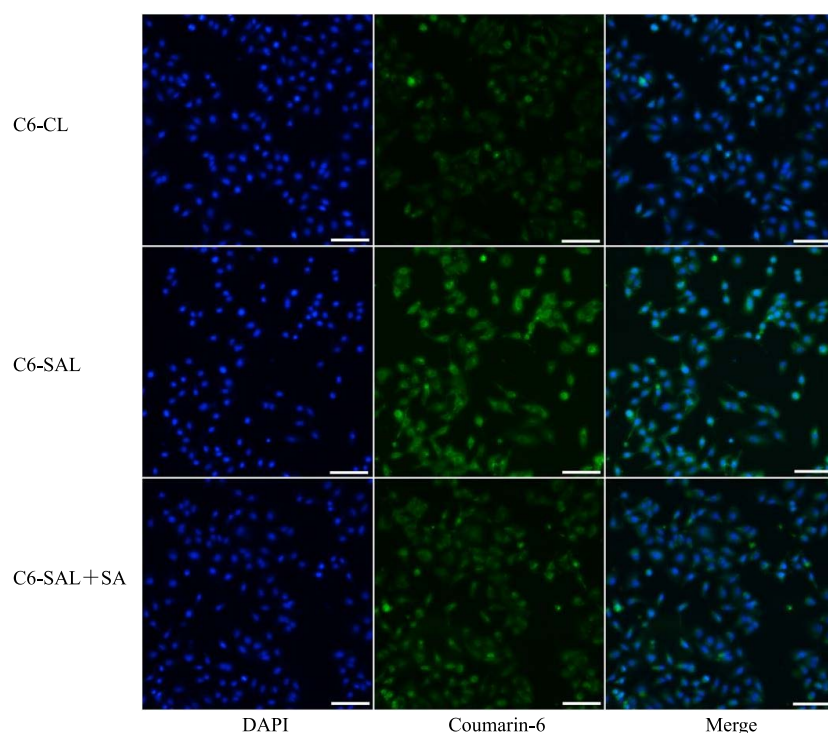
2.10.4 细胞摄取 将 A549 细胞按照 1×10^5 /孔接种于 24 孔板中,培养 24 h 后弃去培养基,替换为分别含 C6-CL、C6-SAL, SA+C6-SAL 的培养基,于 CO₂ 培养箱中分别孵育 4 h,弃去培养基,加入适量 PBS 清洗 3 次,加入 2 $\mu\text{g/mL}$ DAPI 溶液,室温孵育 20 min,加冰 PBS 漂洗 3 次,加 4% 多聚甲醛固定 15 min,弃去多聚甲醛,用冰 PBS 保存。倒置荧光显微镜观察细胞摄取情况。A549 细胞对各组脂质体的摄取情况见图 10。可以观察到 A549 细胞在 C6-SAL 和 SA+C6-SAL 组的荧光亮度明显高于 C6-CL 组,SA+C6-SAL 组的荧光亮度较 C6-SAL 组有所下降,是由于游离 SA 的竞争受体减少了 A549 细胞对 C6-SAL 的摄取。

3 讨论

本实验采用改良逆相乙醇注入法制备绿原酸脂质体,与薄膜分散法所制备的绿原酸脂质体^[19-20]相比其粒径更小分散的更为均匀。

影响 CA-SAL 制备的因素有很多,如磷脂种类、药脂比、水化时间、超声时间及功率等,为了考察各因素综合影响,需要进行多因素多水平试验。Box-Behnken 是近年来常用的响应面设计方法^[21-22],响应面设计可以将复杂的未知的函数关系在小区域内用简单的 1 次或 2 次多项式模型来拟合,计算比较简便,与正交试验相比,可以在试验条件寻优过程中连续的对试验的各个水平进行分析^[23-24],得到最优的条件。包封率和载药量是评价脂质体质量的重要指标^[25-26],绿原酸作为水溶性小分子药物,本身包封率较低^[27],通过响应面优化制备工艺后,提高了脂质体的包封率。

研究表明绿原酸具有良好的抗肿瘤活性^[28]。本研究将绿原酸制备成脂质体来提高绿原酸的稳定性,并考察其抗肿瘤活性。细胞毒性实验显示,绿原酸脂质体对 A549 细胞增殖具有一定的抑制作用,

图 10 细胞摄取荧光图 (标尺: 100 μm)Fig. 10 Cell uptake fluorescence (scale bar: 100 μm)

唾液酸修饰后的绿原酸脂质体相比于普通脂质体对 A549 细胞的抑制作用明显增强。为考察肿瘤细胞对唾液酸修饰绿原酸脂质体的摄取能力,以香豆素-6 为荧光标记来显示唾液酸修饰前后的脂质体的体外摄取。细胞摄取实验结果显示, C6-SAL 组的荧光强度明显强于 C6-CL 组,其与细胞毒性实验结果一致。而通过竞争抑制实验,验证了 C6-SAL 摄取的增加是由于唾液酸的修饰,从结果可知与 C6-SAL 相比, C6-SAL+SA 组的细胞摄取显著减少,这可能是因为唾液酸的预先过饱和孵育结合了 A549 细胞上的唾液酸受体,导致 SA 修饰脂质体无法利用表面修饰的唾液酸与细胞表面的受体进行配体-受体介导的特异性反应增加其细胞摄取。

综上所述,本研究通过响应面优化制备了粒径小、稳定性好的唾液酸修饰的绿原酸脂质体,并具有一定的体外抗肿瘤活性。在后期实验研究中将进一步考察其体内的药效学以及体内靶向能力。

参考文献

- [1] Wang Z, Clifford M N. Comparison of the profiles of chlorogenic acids and their derivatives from three Chinese traditional herbs by LC-MSⁿ [J]. *Acta Pharm Sin*, 2008, 43(2): 185-190.
- [2] 尚海花, 王 淼, 刘 颖, 等. HPLC 法测定不同产地刺五加中原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷 E

和异嗪皮啶 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(6): 1324-1328.

- [3] 王庆华, 杜婷婷, 张智慧, 等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展 [J]. *药学学报*, 2020, 55(10): 2273-2280.
- [4] Naveed M, Hejazi V, Abbas M, *et al.* Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 67-74.
- [5] Bagdas D, Gul Z, Meade J A, *et al.* Pharmacologic overview of chlorogenic acid and its metabolites in chronic pain and inflammation [J]. *Curr Neuroparmacol*, 2020, 18(3): 216-228.
- [6] Miao M S, Xiang L L. Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid [J]. *Adv Pharmacol*, 2019, 87: 71-88.
- [7] 刘东东, 孟盈盈, 叶 军, 等. 绿原酸长循环脂质体中绿原酸含量测定方法的建立 [J]. *中国药师*, 2019, 22(3): 429-433.
- [8] 郭满满, 肖卓炳, 于华忠, 等. 热重法研究绿原酸的热稳定性、分解动力学及贮存期 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(5): 348-352.
- [9] Qin Y, Chen H L, Zhang Q Y, *et al.* Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals [J]. *Int J Pharm*, 2011, 420(2): 304-312.
- [10] 吴慧琴, 兰 天, 许玉珍, 等. 白藜芦醇三甲醚脂质体的制备及其质量评价 [J]. *中草药*, 2012, 43(9):

- 1746-1750.
- [11] McClements D J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2015, 219: 27-53.
- [12] Jhaveri A, Deshpande P, Pattni B, *et al.* Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma [J]. *J Control Release*, 2018, 277: 89-101.
- [13] Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2009, 19(5): 507-514.
- [14] Nath D, Hartnell A, Happerfield L, *et al.* Macrophage-tumour cell interactions: Identification of MUC₁ on breast cancer cells as a potential counter-receptor for the macrophage-restricted receptor, sialoadhesin [J]. *Immunology*, 1999, 98(2): 213-219.
- [15] Oetke C, Vinson M C, Jones C, *et al.* Sialoadhesin-deficient mice exhibit subtle changes in B- and T-cell populations and reduced immunoglobulin M levels [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(4): 1549-1557.
- [16] She Z N, Zhang T, Wang X L, *et al.* The anticancer efficacy of pixantrone-loaded liposomes decorated with sialic acid-octadecylamine conjugate [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(19): 5216-5225.
- [17] 陈丹萍, 张 涵, 索绪斌. 葡聚糖凝胶微柱离心-HPLC法测定紫杉醇-PEG 功能化多壁碳纳米管的包封率 [J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(5): 537-540.
- [18] 赵天文, 汤晗霄, 盛云杰, 等. 微柱离心结合 HPLC 法测定鳖甲肽脂质体的包封率 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1376-1379.
- [19] Feng Y S, Sun C Y, Yuan Y Y, *et al.* Enhanced oral bioavailability and *in vivo* antioxidant activity of chlorogenic acid via liposomal formulation [J]. *Int J Pharm*, 2016, 501(1/2): 342-349.
- [20] 赵玉玺, 张 帆, 杨 琴, 等. 透明质酸修饰的绿原酸脂质体的制备及细胞学研究 [J]. 重庆医学, 2018, 47(4): 449-452.
- [21] 张 丹, 廖 芳, 周 洁, 等. Box-Behnken Design-响应面优化法优化芍药总苷脂质体的制备工艺及体外释放研究 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 359-364.
- [22] 冯玲玲, 李 楠, 谭裕君. Box-Behnken 优化黄芩苷脂质体的制备工艺及体外释放模型拟合的研究 [J]. 中药材, 2017, 40(12): 2902-2907.
- [23] 王文俊, 严晓敏, 陈自强, 等. 木香炔内酯与去氢木香内酯共包封聚乙二醇化长循环脂质体的制备及表征 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4068-4075.
- [24] 吴艳婷, 郭思旖, 时 军, 等. 穿膜肽 TAT 修饰载丹酚酸 B 脂质体的制备及其抑制人皮肤成纤维细胞增殖与迁移初步研究 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 59-68.
- [25] 邹蔓姝, 钟思雨, 周莉莉, 等. 斑蝥素半乳糖化脂质体制备工艺研究 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2809-2816.
- [26] 李秀英, 李学涛, 王颖莉. 氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体的制备工艺研究 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1569-1575.
- [27] Li Y, Ren X C, Lio C, *et al.* A chlorogenic acid-phospholipid complex ameliorates post-myocardial infarction inflammatory response mediated by mitochondrial reactive oxygen species in SAMP8 mice [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 130: 110-122.
- [28] 周佳彬, 陈 俊, 刘 臣, 等. 绿原酸对人胶质瘤细胞 U251 的抗肿瘤活性及其促凋亡机制 [J]. 肿瘤防治研究, 2019, 46(5): 389-394.