

• 药剂与工艺 •

转铁蛋白修饰雷公藤甲素脂质体的制备与体外评价

杨一帆, 梁艺瑶, 刘保保, 苏雪蓉, 乔 萍, 狄留庆, 赵晓莉*

南京中医药大学药学院, 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 制备转铁蛋白(transferrin, Tf)修饰的雷公藤甲素(triptolide, TP)脂质体(Tf-TP@Lip), 并对其质量评价和体外靶向性研究。方法 采用薄膜分散法制备 Tf-TP@Lip, 以包封率和载药量为考察指标, 通过单因素考察和星点设计-效应面优化法筛选处方和最佳制备工艺; 采用超滤离心法测定药物包封率; 透射电子显微镜(TEM)观察脂质体微观形态; 激光粒度仪测定脂质体的粒径、多分散指数(polydispersity index, PDI)和 Zeta 电位; 并对其体外释放情况进行考察; 采用流式细胞仪和荧光显微镜探究细胞摄取情况。结果 优化后 Tf-TP@Lip 的处方和工艺: 脂药比为 5.72:1, 脂胆比为 8.11:1, 磷脂与 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的质量比为 6:1, 成膜溶剂为无水乙醇, 成膜温度 60 °C。制得的 Tf-TP@Lip 平均粒径为 (130.33±1.89) nm, PDI 为 0.19±0.03, Zeta 电位为 (-23.20±0.64) mV, 包封率和载药量分别为 (85.33±0.41)% 和 (9.96±0.21)%, TEM 下呈球形, 大小均匀、圆整。体外释放研究表明, Tf-TP@Lip 相比游离 TP 具有一定缓释效果。与非靶向雷公藤甲素脂质体(TP@Lip)相比, 转铁蛋白的修饰明显增加了 SMMC-7721 对脂质体的摄取效率。结论 制备 Tf-TP@Lip 稳定、可行, 粒径小、外观圆整且具备较高的包封率和载药量, 可用于进一步的实验研究。

关键词: 雷公藤甲素; 转铁蛋白; 修饰; 脂质体; 星点设计-效应面法; 质量评价; 细胞摄取; 体外靶向性; 薄膜分散法; 超滤离心法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)03-0687-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.006

Preparation of transferrin modified triptolide liposome and *in vitro* evaluation

YANG Yi-fan, LIANG Yi-yao, LIU Bao-bao, SU Xue-rong, QIAO ping, DI Liu-qing, ZHAO Xiao-li

Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To prepare transferrin (Tf) modified triptolide (TP) liposome (Tf-TP@Lip) and evaluate the quality and *in vitro* targeting. **Methods** The Tf-TP@Lip were prepared by thin-film dispersion method. With encapsulation efficiency and drug loading as indicators, single factor experiments and CCD-RSM were used to optimized the formulation and optimum preparation of Tf-TP@Lip; The drug entrapment efficiency was determined by ultrafiltration centrifugation; And the microscopic morphology of liposomes were observed under the transmission electron microscope (TEM); The particle size, polydispersion index (PDI), and Zeta potential were determined by laser particle size analyzer, and investigating the *in vitro* release of liposomes; flow cytometry and microscope were utilized for exploring the cellular uptake. **Results** The optimized preparation process and formulation were as follow: lipid/drug ratio was 5.72:1, lipid/cholesterol ratio was 8.11:1, the mass ratio of phospholipid to DSPE-PEG₂₀₀₀ was 6:1, the film-forming solvent was absolute ethanol and the temperature was 60 °C. The mean particle size, PDI and Zeta potential of optimized TP@Lip were (130.33 ± 1.89) nm, 0.19 ± 0.03, (-23.2 ± 0.64) mV, respectively. The encapsulation efficiency and drug loading were (85.33 ± 0.41)% and (9.96 ± 0.21)%, respectively. The resulting liposomes exhibited spherical shape and were narrow in size distribution. The *in vitro* release studies showed that Tf-TP@Lip has sustained-release effect compared with free TP. And in

收稿日期: 2021-08-30

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81102815)

作者简介: 杨一帆(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物药剂学与药代动力学。E-mail: 773429209@qq.com

*通信作者: 赵晓莉, 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药高效给药系统剂型设计与评价研究。

Tel: (025)85811517 E-mail: xlee_zhao@njucm.edu.cn

contrast of non targeted triptolide liposomes (TP@Lip), Tf modification significantly increased the uptake efficiency of liposomes by SMMC-7721. **Conclusion** The preparation is stable and feasible, the obtained liposomes have a uniform particle size, round appearance and high encapsulation efficiency and drug loading, which can be used for further research.

Key words: triptolide; transferrin; modified; liposomes; central composite design-response surface method; quality evaluation; cellular uptake; *in vitro* targeting; thin-film dispersion method; ultrafiltration centrifugation

雷公藤甲素 (triptolide, TP), 又称雷公藤内酯醇, 是从卫矛科植物雷公藤中分离纯化得到的一种环氧二萜内酯类化合物。现代研究表明, 雷公藤甲素具有广泛高效的抗肿瘤活性^[1], 但存在水溶性差、生物利用度低以及治疗窗窄等问题^[2], 导致其对体内靶器官产生不同程度的毒性作用^[3]。为克服以上问题, 研究者通过增强 TP 水溶性的结构修饰^[4], 也尝试改进剂型或改变给药方式^[5]以提高 TP 的水溶性, 减缓 TP 体内释放, 增加 TP 的靶向性。脂质体具备磷脂双分子层结构, 能够增加难溶性药物的溶解度, 降低血液清除率, 延长药物在体内的半衰期, 从而提高生物利用度^[6]。

通过在脂质体表面引入与肿瘤细胞有特异性结合的靶向分子 (如多肽、单糖、多糖、叶酸、抗体、抗体片段等), 可促进纳米药物在肿瘤组织处的滞留, 从而增强纳米药物的内吞效率和肿瘤细胞内的富集^[7]。由于铁代谢异常, 多种肿瘤细胞包括人肝癌 SMMC-7721 细胞、人乳腺癌 MDA-MB 231 细胞、人神经胶质瘤 U87-MB 细胞和人肺癌 A549 细胞均过表达转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TfR)^[8]。目前, 已经报道转铁蛋白 (transferrin, Tf) 修饰的纳米制剂包括脂质体^[9]、聚合物囊泡^[8]、聚合物纳米粒^[10]等。本实验采用薄膜分散法制备转铁蛋白修饰雷公藤甲素脂质体 (transferrin modified triptolide liposome, Tf-TP@Lip), 通过响应面设计优化处方制剂工艺, 对其形态、粒径、包封率以及体外释放进行评价, 并进一步通过细胞摄取实验考察 Tf-TP@Lip 的体外靶向性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

梅特勒 MS105 十万分之一电子天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SHB-III 循环水式多用真空泵, 南京文尔仪器设备有限公司; SM-1000D 超声波细胞破碎仪, 南京舜玛仪器设备有限公司; ZS90 型纳米粒径测定仪, 英国马尔文仪器有限公司; Waters 2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; 高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; HT7800 透射电子显微

镜 (TEM), 日本日立公司; Nikon Ti 倒置显微镜, 日本 Nikon 有限公司; Gallios 流式细胞仪, 美国贝克曼库尔特公司。

1.2 材料

雷公藤甲素对照品, 质量分数 98%, 批号 FY105B201, 南通飞宇生物科技有限公司; 氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC, 批号 B60455)、胆固醇 (CHO-HP, 批号 B80859)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀, 批号 B90396), 上海艾伟拓医药科技有限公司; Traut 试剂, 批号 4781-83-3, 南京金益柏生物科技有限公司; 磷脂聚乙二醇马来酰亚胺 (Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE, 批号 RD0200708), 西安瑞禧生物科技有限公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号 P1010), 索莱宝生物科技有限公司; 聚山梨酯 80 (批号 9005-65-6)、MTT (批号 I1810035), 南京晚晴化玻仪器有限公司; 香豆素-6, 碧云天有限公司; DMEM 培养液、0.25%胰蛋白酶、青-链霉素溶液, 美国 Hyclone 公司; 胎牛血清, 美国 Gibco 公司。无水乙醇、甲醇、氯仿为分析纯; 乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 DSPE-PEG₂₀₀₀-Tf 的合成与鉴定^[11]

称取约 20 mg 转铁蛋白溶于 2 mL pH 8 的 PBS 中, 在 PBS 中加入 EDTA, 螯合溶液中的二价金属, 防止巯基氧化。另称取 4 mg Traut 试剂溶于 1 mL 的 pH 8.0 的 PBS 中, 向转铁蛋白溶液中加入 20 倍物质的量过量的 Traut 试剂, 避光摇床内反应 1 h。取 9.0 mg Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE 溶于 2.5 mL pH 6.5 的 PBS 中, 按一定的物质的量比例将硫醇化的转铁蛋白与 Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE 在避光条件下反应过夜, 即获得 DSPE-PEG₂₀₀₀-Tf (合成流程见图 1)。通过 SDS-PAGE 电泳法和紫外-可见光谱法对合成物进行表征, 结果见图 2, DSPE-PEG₂₀₀₀-Tf 电泳条带在 100 000 左右, 而转铁蛋白条带在 77 000 左右, 证明合成物中包含转铁蛋白, 图 3 表明合成物具有与转铁蛋白相似的紫外吸收曲线, 其中转铁蛋白最大吸收波长为 280 nm, DSPE-PEG₂₀₀₀-Tf 最大波长在 278 nm 发生了蓝移, 以此证明转铁蛋白偶联成功。

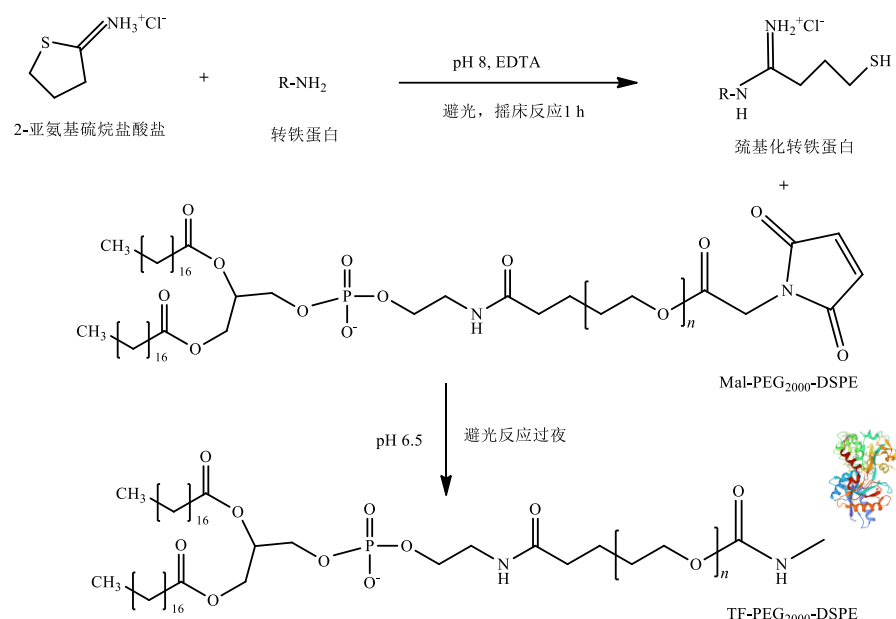


图 1 DSPE-PEG₂₀₀₀-Tf 的合成流程

Fig. 1 Synthetic process of DSPE-PEG₂₀₀₀-Tf

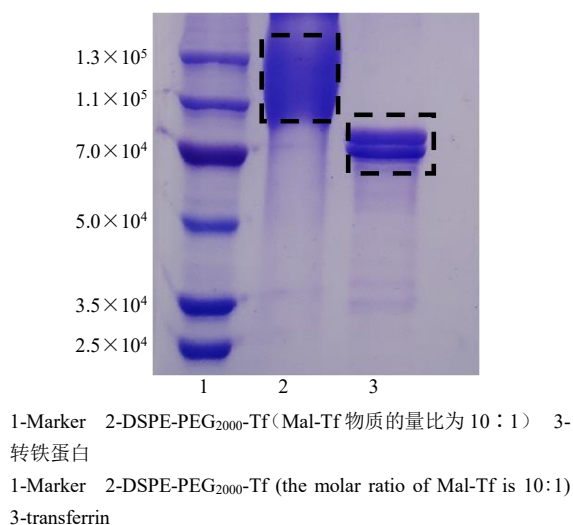


图 2 合成物的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoretogram of reaction products

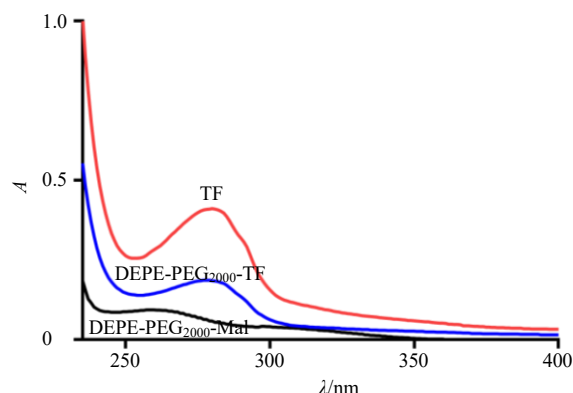


图 3 合成物的紫外吸收曲线

Fig. 3 UV-vis absorption spectrum of reaction products

2.2 雷公藤甲素脂质体 (triptolide liposomes, TP@Lip) 和 Tf-TP@Lip 的制备

采用薄膜分散法制备载药脂质体, 精密称取适量氢化大豆卵磷脂、胆固醇、DSPE-mPEG₂₀₀₀ 和雷公藤甲素于茄形瓶中, 加入适量有机溶剂超声使其全部溶解, 在一定温度下减压旋转蒸发, 形成均匀类脂薄膜后继续抽真空 30 min, 并放置过夜, 以除尽残留的痕量有机溶剂; 再加入适量去离子水, 常压旋转水化 30 min 后, 置于超声波细胞粉碎机中超声依次经过 0.2、0.1 μm 聚碳酸纤维脂膜挤压 6 次, 即得 TP@Lip 脂质体溶液, 于 4 °C 冰箱中保存, 备用^[12]。将制得的 TP@Lip 脂质体与 Tf-PEG₂₀₀₀-DSPE 在 60 °C 温育 2 h, 制备 Tf-TP@Lip。

2.3 脂质体包封率的测定

通过超滤离心法将未包封的药物与脂质体溶液分离, 并采用“2.4.1”项下色谱条件检测并计算 Tf-TP@Lip 的包封率^[13]: 精密量取 40 μL 脂质体溶液, 加入 20 倍量的甲醇, 超声 20 min 破乳, 测定 TP 的总量 (T_{drug})。另精密量取 0.2 mL 脂质体溶液于超滤离心管 (截留相对分子质量 30 000), 4500 r/min 离心 (离心半径 9 cm) 5 min, 得到游离的 TP, 测定游离的药物含量 (F_{drug}), 计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (T_{\text{drug}} - F_{\text{drug}}) / T_{\text{drug}}$$

$$\text{载药量} = (T_{\text{drug}} - F_{\text{drug}}) / \text{脂质总量}$$

2.4 TP 含量测定方法建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Waters X-Bridge C₁₈ 柱

(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (35 : 65); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 218 nm; 柱温 28 °C; 进样量 20 μL。

2.4.2 对照品溶液制备 精密称取 TP 对照品 2.45 mg, 置于 2 mL 量瓶中, 加入适量无水乙醇超声溶解并稀释至刻度, 配制成质量浓度为 1.225 mg/mL 的对照品储备液, 备用。

2.4.3 供试品溶液制备 精密量取 40 μL TP@Lip 溶液, 加入 20 倍量的甲醇, 超声破乳 20 min, 12 000 r/min 离心 (离心半径 11 cm) 15 min, 取上清液, 即得 TP@Lip 破乳液。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取“2.4.2”项下 TP 对照品储备液, 用无水乙醇稀释配制成质量浓度分别为 12.25、6.12、3.06、1.53、0.77、0.38 μg/mL 的系列对照品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以 TP 对照品溶液的质量浓度为横坐标 (X), 峰面积的积分值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得 TP 线性回归方程 $Y=84\,273\,X+8\,031.6$, $R^2=0.999\,9$ 。结果表明 TP 在 0.38~12.25 μg/mL 线性关系良好。

2.4.5 精密度试验 精密量取适量的 TP 对照品储备液, 加适量甲醇配制低、中、高 (5、50、250 μg/mL) 3 个质量浓度的对照品溶液。按“2.4.1”项下色谱条件进样 6 次, 考察其精密度。结果低、中、高 3 个质量浓度 TP 峰面积的 RSD 分别为 0.61%、0.36%、0.28%, 表明仪器精密度良好。

2.4.6 重复性试验 取同一批 TP@Lip 样品 6 份, 按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定。结果 TP 峰面积的 RSD 为 2.90%, 表明该方法重复性良好。

2.4.7 加样回收率试验 取空白脂质体 6 份, 每份 0.2 mL, 分别加入 TP 对照品溶液 (1.02 mg/mL) 0.2 mL, 涡旋混匀, 取 40 μL, 按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定。结果平均回收率为 93.3%, RSD 为 1.84%。

2.4.8 稳定性试验 取 TP@Lip 破乳液, 分别于放置 0、2、4、8、16、24 h 时进样测定, 结果 TP@Lip 破乳液峰面积 RSD 为 2.6%, 表明 TP@Lip 破乳液 24 h 内稳定性良好。

2.5 Tf-TP@Lip 制备工艺及处方的单因素考察

2.5.1 成膜条件考察 薄膜分散法制备脂质体的关键是成膜性的好坏^[4]。固定其他因素不变, 选取不同的成膜溶剂对应适宜的成膜温度, 按“2.2”项

下方法制备脂质体, 按“2.3”项下方法计算包封率, 结果如表 1 所示, 在 3 种条件下脂质体成膜性均良好且包封率无明显差异, 出于安全性考虑, 选择成膜溶剂为无水乙醇, 温度为 60 °C。另由于药物及膜材在无水乙醇中溶解度小, 需进行恒温 (45 °C) 超声处理, 可较快溶解。

表 1 薄膜分散法成膜条件及结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Film forming conditions and results of film dispersion method ($\bar{x} \pm s, n=3$)

成膜溶剂	成膜温度/°C	包封率/%
无水乙醇	60	78.2±1.6
氯仿	40	79.2±2.4
甲醇	55	76.5±1.9

2.5.2 磷脂质量浓度的考察 设置水化溶剂的体积为 2.5 mL, 固定处方组成比例及其他制备工艺条件, 磷脂质量浓度分别设置为 0.5、1.0、2.0 mg/mL, 按“2.2”项下方法制备脂质体, 各平行试验 3 份, 包封率分别为 (83.9±2.2)%、(74.8±1.4)%、(67.5±1.6)%。以上结果表明, 当磷脂浓度过高, 包封的药物达到饱和, 包封率反而下降, 因此, 选择磷脂质量浓度为 0.5 mg/mL。

2.5.3 药脂比的考察 固定处方的其他条件不变, 改变投药量, 设定药脂比为 1 : 30、1 : 20、1 : 10、1 : 5、1 : 2。按“2.1”项下方法制备脂质体, 各平行试验 3 份, 结果包封率分别为 (59.2±1.9)%、(75.2±1.6)%、(82.9±0.4)%、(80.0±1.2)%、(62.9±2.5)%。由以上结果可知, 当药脂比小于 1 : 5 时, 其包封率随着投药量的增加而增大, 但由于氢化大豆卵磷脂对 TP 的负载能力有限, 当药脂比大于 1 : 5 时, 负载达到饱和, 继续增加投药量, 其包封率开始下降, 因此选择药脂比 1 : 5 左右范围继续考察。

2.5.4 脂胆比的考察 胆固醇是脂质体中重要组成部分, 具有维持脂质体稳定等作用, 但过量存在影响人体健康的隐患^[5]。固定处方其他条件不变, 改变脂胆比, 设置磷脂与胆固醇的质量比为 10 : 1、5 : 1、2 : 1, 按“2.2”项下方法制备脂质体, 各平行试验 3 份, 结果包封率分别为 (75.2±1.6)%、(71.2±2.7)%、(66.5±1.8)%。

2.5.5 磷脂与 DSPE-PEG₂₀₀₀ 质量比的考察 处方中加入 DSPE-PEG₂₀₀₀ 能够避免静脉给药后血液中巨噬细胞对脂质体的吞噬作用, 提高脂质体的稳定性。但 DSPE-PEG₂₀₀₀ 加入量过多则易与磷脂形成混

合胶束,造成脂质体中药物的渗漏^[16]。固定其他条件不变,改变 DSPE-PEG₂₀₀₀ 加入量,设置磷脂与其比例分别为 8:1、4:1、1:1,按“2.2”项下方法制备脂质体,各平行试验 3 份,结果包封率分别为 (73.2±0.7)%、(75.9±0.4)%、(69.9±1.1)%。

2.6 星点设计优化处方

2.6.1 星点试验设计表及结果 应用 Design Expert 8.0.6.1 软件进行响应面设计,在前期单因素试验的基础上,以雷公藤甲素脂质体包封率 (Y_1) 和载药量 (Y_2) 为响应值,影响较为显著的药脂比 (X_1)、脂胆比 (X_2) 和磷脂与 DSPE-PEG₂₀₀₀ 质量比 (X_3)

3 个因素为考察对象,采取 3 因素 5 水平的星点设计-效应面优化法,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 模型拟合 以包封率、载药量为响应面,对星点试验结果进行拟合,得到方程为 $Y_1=29.9199+12.12256X_1+2.76169X_2-3.41407X_3-0.12660X_1X_2+0.29350X_1X_3+0.16675X_2X_3-0.80986X_1^2-0.16174X_2^2+0.17134X_3^2$; $Y_2=2.14855-0.056398X_1+0.67142X_2+1.83433X_3-0.054100X_1X_2+0.021250X_1X_3-0.048125X_2X_3-0.018588X_1^2-8.67758\times10^{-3}X_2^2-0.082519X_3^2$ 。方差分析见表 3。

表 2 星点试验设计与结果

Table 2 Design and results of CCD method

试验号	X_1	X_2	X_3	包封率/%	载药量/%	试验号	X_1	X_2	X_3	包封率/%	载药量/%
1	5.0 (0)	10 (0)	7.36 (+1.682)	84.99	11.09	11	5.0 (0)	10 (0)	4 (0)	76.96	9.08
2	5.0 (0)	10 (0)	4 (0)	78.73	8.91	12	5.0 (0)	10 (0)	4 (0)	80.38	10.52
3	7.5 (+1)	15 (+1)	6 (+1)	78.97	6.60	13	5.0 (0)	10 (0)	0.64 (-1.682)	76.31	4.36
4	5.0 (0)	10 (0)	4 (0)	74.99	8.88	14	2.5 (-1)	5 (-1)	2 (-1)	58.96	8.66
5	9.2 (+1.682)	10 (0)	4 (0)	81.42	5.99	15	5.0 (0)	1.59 (-1.682)	4 (0)	69.32	6.90
6	2.5 (-1)	15 (+1)	2 (-1)	55.75	10.28	16	7.5 (+1)	5 (-1)	2 (-1)	81.17	5.48
7	5.0 (0)	10 (0)	4 (0)	76.40	9.06	17	7.5 (+1)	15 (+1)	2 (-1)	66.16	5.05
8	5.0 (0)	18.41 (+1.682)	4 (0)	65.23	9.19	18	0.8 (-1.682)	10 (0)	4 (0)	47.37	10.67
9	5.0 (0)	10 (0)	4 (0)	74.11	8.05	19	2.5 (-1)	5 (-1)	6 (+1)	59.23	11.71
10	7.5 (+1)	5 (-1)	6 (+1)	81.84	9.61	20	2.5 (-1)	15 (+1)	6 (+1)	57.22	12.06

表 3 包封率和载药量方差分析

Table 3 Analysis of variance of entrapment 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	2 095.09	232.79	28.31	<0.000 1	84.65	9.41	9.14	0.000 9
A	1	1 319.61	1 319.61	160.50	<0.000 1	41.62	41.62	40.45	<0.000 1
B	1	65.81	65.81	8.00	0.017 9	0.42	0.42	0.40	0.539 5
C	1	65.10	65.1	7.92	0.018 3	34.89	34.89	33.91	0.000 2
AB	1	20.03	20.03	2.44	0.149 6	3.66	3.66	3.56	0.088 7
AC	1	17.23	17.23	2.10	0.178 3	0.09	0.09	0.088	0.773 1
BC	1	22.24	22.24	2.71	0.131 0	1.85	1.85	1.80	0.209 3
A ²	1	369.22	369.22	44.91	<0.000 1	0.19	0.19	0.19	0.672 9
B ²	1	235.61	235.61	28.66	0.000 3	0.68	0.68	0.66	0.435 8
C ²	1	6.77	6.77	0.82	0.385 5	1.57	1.57	1.53	0.245 0
残差	10	82.22	8.22			10.29	1.03		
失拟项	5	55.08	11.02	2.03	0.227 9	7.09	1.42	2.21	0.202 1
纯误差	5	27.14	5.43			3.20	0.64		
总差	19	2 177.30				94.94			

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) 为 0.962 2、0.891 6, 表明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的制备工艺是合适的。

2.6.3 效应面分析 通过 Design Expert 8.0.6.1 软件对各因素之间的交互作用进行效应面分析, 绘制效应面曲线图。结果见图 4~5。

2.6.4 效应面优化与预测 为了得到最佳处方, 以脂质体包封率和载药量处于最大值为优化指标, 权重设置 1:1。通过 Design Expert 8.0.6.1 软件进行分析优化, 得到最佳处方为脂药比为 5.72:1, 脂胆比为 8.11:1, 磷脂与 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的质量比为 6:1。

2.7 最佳工艺验证

确定 Tf-TP@Lip 最优处方为脂药比为 5.72:1, 脂胆比为 8.11:1, 磷脂与 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的质量比为 6:1。按照该处方工艺条件制备 3 批雷公藤甲素脂质体样品, 各批样品包封率分别为 84.98%、86.14%、84.86%, 载药量为 10.21%、9.55%、10.11%。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, 结果表明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。

2.8 Tf-TP@Lip 的质量评价

2.8.1 Tf-TP@Lip 的外观与形态 在日光下检视,

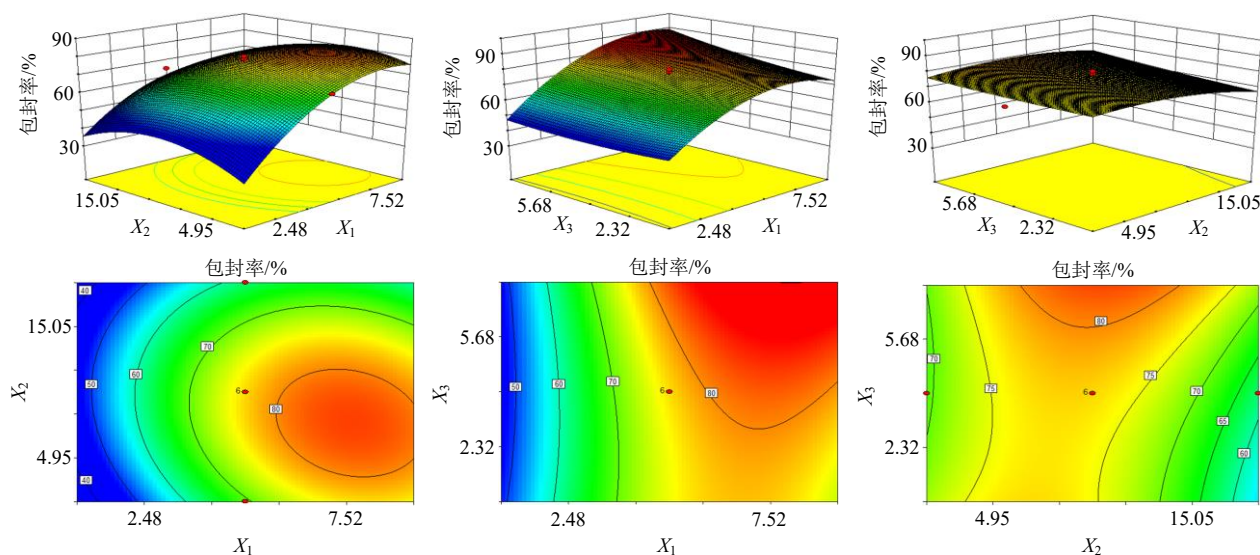


图 4 基于效应曲面法不同因素对包封率的影响

Fig. 4 Influence of different factors on encapsulation efficiency based on CCD method

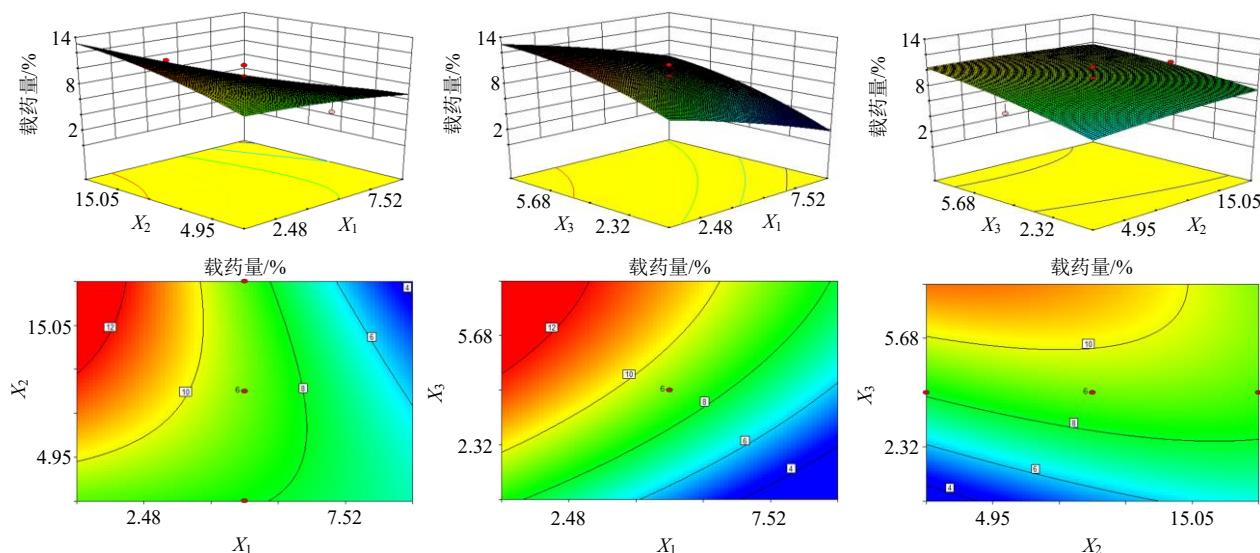


图 5 基于效应面法不同因素对载药量的影响

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

按最佳工艺制备得到的 Tf-TP@Lip 外观澄清透明，呈淡蓝色乳光，结果见图 6（左）。将 Tf-TP@Lip 混悬液滴入铜网，然后用 2% 磷钨酸染色制备样品，在台灯下对样品进行干燥处理后，置于 TEM 下观察。Tf-TP@Lip 呈球形，圆整，分布均匀，如图 6（右）所示。

2.8.2 粒径与电位考察 将适量最优工艺制备所得脂质体稀释一定倍数后，于激光粒度分析仪下测定粒径、多分散系数（PDI）及 Zeta 电位，平行测定 3 次。Tf-TP@Lip 的平均粒径和 PDI 分别为 (130.33 ± 1.89) nm 和 0.19 ± 0.03 （图 7），Zeta 电位为 (-23.20 ± 0.64) mV（图 7）。结果表明，该脂质体粒径分布均匀且具备良好的负电性。

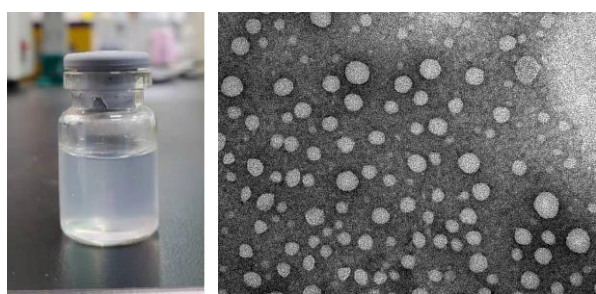


图 6 Tf-TP@Lip 的表现形态 (左) 和 TEM 图 (右)
Fig. 6 Apparent morphology (left) and TEM (right) of Tf-TP@Lip

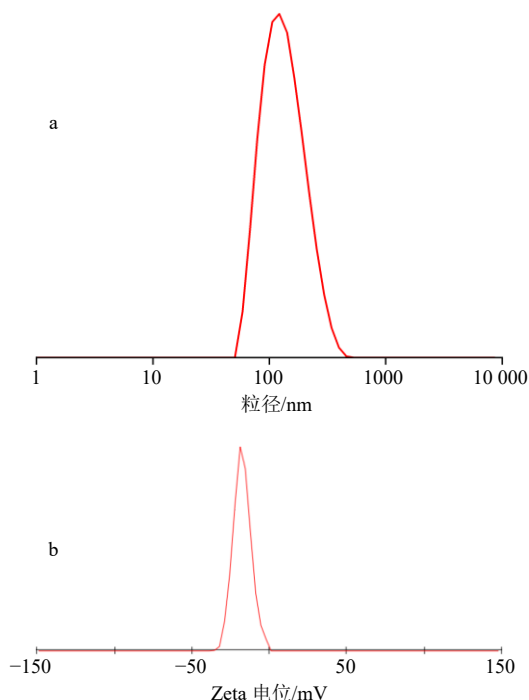


图 7 Tf-TP@Lip 的粒径分布 (a) 和 Zeta 电位 (b)
Fig. 7 Particle size distribution (a) and Zeta potential (b) of Tf-TP@Lip

2.8.3 体外释放 采用透析袋法考察游离 TP、TP@Lip 和 Tf-TP@Lip 的体外释放情况^[17]。取 5 mL 脂质体溶液置于透析袋中，加入释放介质（含 1% 吐温 80 的 PBS 溶液，pH 7.4）200 mL，于 37 °C、100 r/min 恒温震荡。分别于 0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 取样 2 mL（同时补充等温等量释放介质），用 HPLC 法测定雷公藤甲素含量，计算各时间点的累积释放率并作图（ $n=3$ ）。结果如图 8 所示，由于脂质体表面携带的雷公藤甲素迅速释放，使药物存在突释阶段，1 h 之后进入缓释期，4 h 后药物释放基本平稳，12 h 测得的累积释放率为 70.8%，表明药物在体外释放呈先快后慢的规律，能够维持较长的释放周期，呈现缓释现象。

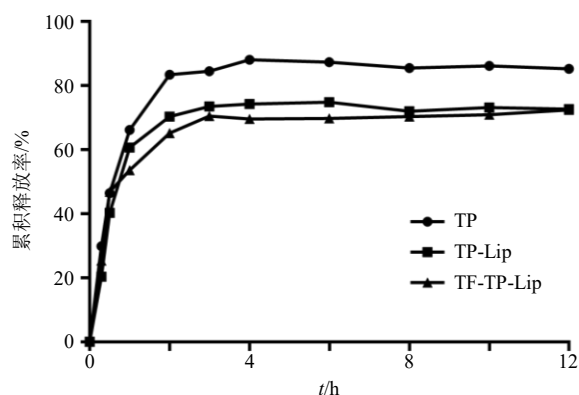


图 8 Tf-TP@Lip 的释放曲线
Fig. 8 Release profile of Tf-TP@Lip

2.9 细胞摄取实验

2.9.1 香豆素-6 储备液制备 精密称取香豆素-6 适量于 2 mL 量瓶中，三氯甲烷溶解定容至刻度，制成 2 mg/mL 的香豆素-6 溶液，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.9.2 荧光脂质体的制备 取脂质体膜材 HSPC、CHO 和 DSPE-PEG₂₀₀₀，加入用无水乙醇稀释至一定浓度的香豆素-6 溶液溶解完全，按照“2.2”项下制备方法分别制备得到靶向荧光脂质体（Tf-C6@Lip）、非靶向荧光脂质体（C6@Lip）。

2.9.3 细胞摄取 将靶向荧光脂质体（Tf-C6@Lip）、非靶向荧光脂质体（C6@Lip）与肝癌 SMMC-7721 细胞在 5% CO₂、37 °C 环境中孵育 4 h。之后，用 PBS 洗涤细胞，DAPI 染色 10 min。使用流式细胞仪对细胞进行分析，同时使用荧光显微镜观察细胞，以验证流式细胞仪的分析结果。流式细胞术测试结果显示（图 9-A），靶向脂质体在 SMMC-7721 细胞中的荧光强度明显高于非靶向脂质体，荧光显

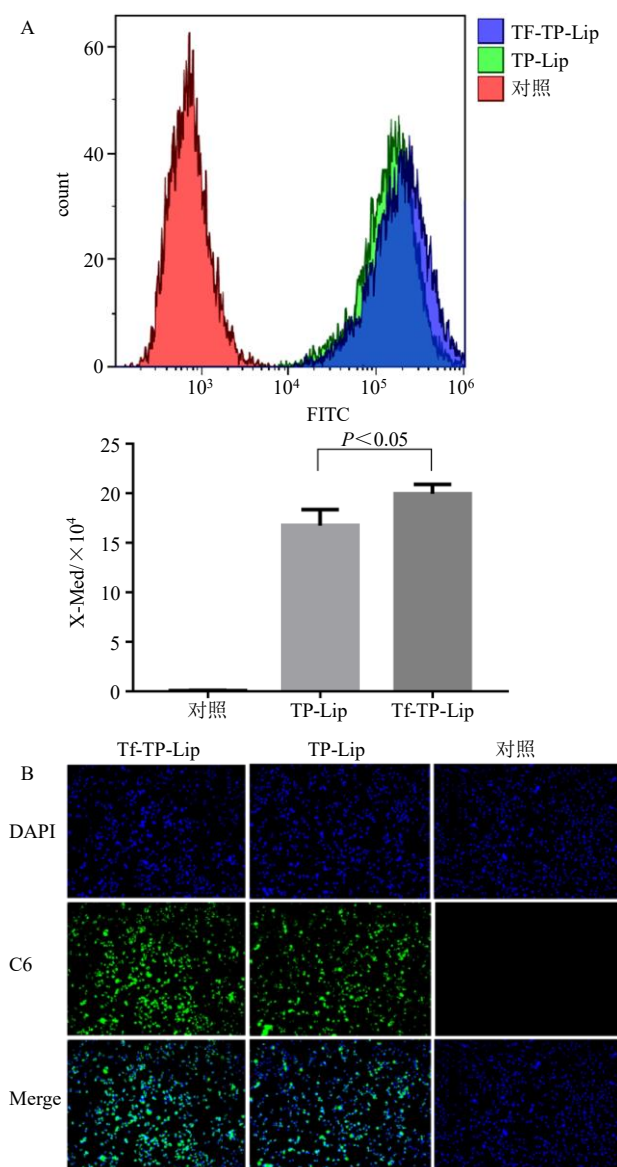


图 9 Tf-TP@Lip 的流式细胞仪分析 (A) 和荧光显微镜图像 (B)

Fig. 9 Flow cytometry analysis (A) and CLSM images (B) of Tf-TP@Lip

显微镜的测试结果与流式细胞仪一致 (图 9-B), 说明转铁蛋白的修饰增强了 SMMC-7721 细胞对脂质体的摄取。

3 讨论

转铁蛋白靶向脂质体递送化合物载药系统是一种有潜力的肿瘤治疗药物。筛选得到有良好抗肿瘤活性的化合物, 通过转铁蛋白脂质体载药系统的包载能克服原化合物难于吸收, 直接给药效果差等缺点, 达到延长循环时间, 肿瘤靶向的作用效果。本研究将转铁蛋白与雷公藤甲素脂质体相结合, 构建主动靶向纳米传递系统, 结合了天然药物与分子靶

向药物的优点, 并且处方中选用常用、安全的氢化大豆卵磷脂和胆固醇作为脂质体材料, 价廉易得, 便于后续产品放大和临床应用。

本实验采用薄膜分散法制备 Tf-TP@Lip, 制备脂质体的过程中成膜性的好坏是关键, 应注意成膜性的考察。选取无水乙醇、氯仿、甲醇 3 种成膜溶剂研究其对脂质体包封率的影响。不同溶剂在相同的成膜温度下成膜效果差异大, 为防止旋蒸过程中溶剂暴沸影响成膜效果, 某些溶剂如氯仿, 在成膜时, 温度需控制在磷脂相变温度 (55 °C) 之下后采用脂质体挤出器控制粒径^[18], 与超声破碎法相比粒径更小分散更均匀, 稳定性好。在转铁蛋白修饰脂质体方法上, 文献报道^[19]有 3 种与脂质体偶联的方法, 本实验中利用活化 DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL 中的马来酰胺基团为巯基与转铁蛋白中的氨基反应从而将转铁蛋白连接到磷脂分子上, 并通过 SDS-PAGE 以及紫外分光光度法等评价手段证明合成物偶联成功。

在细胞摄取实验中, 利用荧光显微镜和流式细胞术考察 SMMC-7721 细胞对不同脂质体的摄取情况。结果显示转铁蛋白修饰的脂质体的摄取显著高于未修饰的脂质体, 这是由于转铁蛋白与 SMMC-7721 细胞中丰富的 TfR 能够特异性结合, 转铁蛋白修饰在脂质体表面通过受体介导的内吞作用透过细胞, 但是具体的内吞机制还有待进一步研究。综上所述, 本研究通过响应面法优化制备了粒径小、分布均匀、负电性好的 Tf-C6@Lip, 具备一定的缓释特性和良好的体外靶向性, 为该制剂体内外的进一步研究等工作打下了坚实的基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 黄宇, 马全鑫, 凌云. 雷公藤甲素抗肿瘤药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(2): 328-333.
- [2] 宋基正, 刘宇灵, 林龙飞, 等. 雷公藤甲素抗肿瘤新型给药系统研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1269-1275.
- [3] 宋祎, 刘琰, 方冰倩, 等. 雷公藤甲素抗肿瘤作用及其配伍减毒机制的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(3): 457-464.
- [4] Noel P, von Hoff D D, Saluja A K, et al. Triptolide and its derivatives as cancer therapies [J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40(5): 327-341.
- [5] 余雅婷, 朱卫丰, 金晨, 等. 雷公藤甲素的剂型改进及给药方式研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(12): 1359-1362.
- [6] 郝宁, 于佳. 基于叶酸表面修饰的蓝萼甲素长循环脂

- 质体的制备与药效学评价 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(6): 553-558.
- [7] 罗尧尧, 石金凤, 陈梁, 等. 雷公藤甲素功能化纳米递药系统用于抗肿瘤的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(21): 4566-4572.
- [8] Wei Y H, Gu X L, Cheng L, *et al.* Low-toxicity transferrin-guided polymersomal doxorubicin for potent chemotherapy of orthotopic hepatocellular carcinoma *in vivo* [J]. *Acta Biomater*, 2019, 92: 196-204.
- [9] Wang K, Shang F, Chen D, *et al.* Protein liposomes-mediated targeted acetylcholinesterase gene delivery for effective liver cancer therapy [J]. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 31-46.
- [10] Sakpakdeejaroen I, Somani S, Laskar P, *et al.* Regression of melanoma following intravenous injection of plumbagin entrapped in transferrin-conjugated, lipid-polymer hybrid nanoparticles [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 2615-2631.
- [11] 周毓麟. 虫草素及其转铁蛋白靶向脂质体的抗肿瘤活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [12] 关延彬, 韩冰, 田雨冬, 等. 姜黄素脂质体的制备及质量评价 [J]. 中药材, 2019, 42(2): 385-389.
- [13] 庄英华, 张中文, 韩伟, 等. 超滤离心法测定连翘酯苷脂质体包封率 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(18): 2209-2211, 2216.
- [14] 黄念. 负载蜂毒素和蟾毒灵的复方免疫脂质体的构建及其抑制肝癌 Sorafenib 耐药协同效应机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.
- [15] 陈李霞, 丁越, 沈征武, 等. 胆固醇在脂质体中作用及甾醇、皂苷对其替换的研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(24): 6396-6404.
- [16] 任婧. 转铁蛋白修饰姜黄素脂质体的制备及神经保护作用的研究 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2019.
- [17] 李思敏, 吴文瀚, 高丽娜, 等. 柠檬苦素脂质体的制备和制剂学评价 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 5957-5962.
- [18] 任婧. 转铁蛋白修饰姜黄素脂质体的制备及神经保护作用的研究 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2019.
- [19] Kong L, Li X T, Ni Y N, *et al.* Transferrin-modified osthole PEGylated liposomes travel the blood-brain barrier and mitigate Alzheimer's disease-related pathology in APP/PS-1 mice [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 2841-2858.

[责任编辑 郑礼胜]