

• 药剂与工艺 •

叶酸修饰的斑蝥素/黄芩苷共载脂质体处方工艺优化及其评价

黄莉¹, 夏新华², 杨磊¹, 金凯³, 肖望重¹, 戴冰¹, 蔡嘉洛^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

3. 湖南省教育科学研究院, 湖南 长沙 410005

摘要: 目的 筛选二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-叶酸 (DSPE-PEG 2000 folate, DSPE-PEG_{2k}-FA) 修饰的斑蝥素/黄芩苷共载脂质体 (DSPE-PEG_{2k}-FA-cantharidin & baicalin-liposomes, FA-Can&Bai-Lips) 的处方工艺并对其进行表征及评价。方法 由薄膜分散超声法制备 FA-Can&Bai-Lips, 以药脂比、胆脂比、水化温度及水化时间为考察因素, 以两药包封率、粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位为评价指标, 采用单因素考察和 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化其处方工艺。采用电位粒径仪和透射电子显微镜 (TEM) 分别测定其粒径、 ζ 电位及形态。通过溶血性实验、细胞摄取实验、CCK-8 法实验及活体成像等方法进行安全性、靶向性评价。结果 FA-Can&Bai-Lips 的最佳制备工艺为药脂比 1:11、胆脂比 1:6、DSPE-PEG_{2k}-FA 用量为 10%、溶剂为 50 mL、旋转蒸发及水化温度为 55 °C、水化介质为 pH 6.8 PBS 缓冲液、水化体积为 10 mL、水化时间为 94 min, 超声时间为 8 min。经 BBD-RSM 优化制得的 FA-Can&Bai-Lips 形态规整, 为类球形粒子, 稳定性及安全性好, 斑蝥素与黄芩苷的包封率分别为 (90.19±0.67) %、(81.24±0.72) %, 粒径为 (172.47±4.83) nm, PDI 为 0.268±0.018, ζ 电位为 (-1.07±0.07) mV。体外评价结果表明, FA-Can&Bai-Lips 能有效抑制 HepG2 细胞增殖, 具有良好的抗肿瘤靶向性。结论 FA-Can&Bai-Lips 具有增效减毒作用, 能高效靶向肿瘤组织, 是一种极具开发潜力的抗肝肿瘤纳米递送系统。

关键词: 斑蝥素; 黄芩苷; 共载脂质体; 抗肝癌; 叶酸; 薄膜分散超声法; Box-Behnken 设计-响应面法; 溶血; 细胞摄取; 活体成像; 靶向

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)10-3267-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.006

Optimization and evaluation of preparation process of folate-modified cantharidin/baicalin co-loaded liposomes

HUANG Li¹, XIA Xinhua², YANG Lei¹, JIN Kai³, XIAO Wangzhong¹, DAI Bing¹, CAI Jialuo¹

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Hunan Academy of Education Sciences, Changsha 410005, China

Abstract: Objective To screen the prescription process of DSPE-PEG 2000 folate (DSPE-PEG_{2k}-FA) modified cantharidin/baicalin co-loaded liposomes (FA-Can&Bai-Lips), and to characterize and evaluate it. **Methods** FA-Can&Bai-Lips were prepared by thin-film dispersion sonication, and their prescription process was optimized by one-factor investigation and the Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM) using drug-lipid ratio, bile-lipid ratio, hydration temperature, and hydration time as the investigating factors, and encapsulation rate of the two drugs, particle size, polydispersity index (PDI), and ζ potential as the evaluating indexes. The particle size, potential, and morphology were determined by potentiometric particle sizer and transmission electron

收稿日期: 2023-10-15

基金项目: 湖南省教育厅优秀青年项目 (22B0375); 湖南省卫生健康委员会项目 (202213014042); 湖南省自然科学基金项目 (2022JJ80023); 湖南中医药大学校级科研项目 (2022XJJ04); 湖南省老中医药专家学术经验继承项目 (湘中医药函 (2020) 37 号)

作者简介: 黄莉 (1988—), 女, 博士, 副主任药师, 研究方向为中药新药研发。Tel: (0731)85600544 E-mail: Huanglily0101@163.com

***通信作者:** 蔡嘉洛 (1989—), 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为临床中药学。Tel: (0731)85600544 E-mail: 38692153@qq.com

microscopy (TEM). Safety and targeting were evaluated by hemolytic assay, cell uptake assay, CCK-8, and *in vivo* imaging. **Results** The optimal preparation process of FA-Can&Bai-Lips was as follows: the drug-lipid ratio was 1:11, the bile-lipid ratio was 1:6, the amount of DSPE-PEG_{2k}-FA was 10%, solvent was 50 mL, rotary evaporation and hydration temperature was 55 °C, hydration medium was pH 6.8 PBS buffer, hydration volume was 10 mL, hydration time was 94 min, ultrasonication time was 8 min. The FA-Can&Bai-Lips optimized by the BBD-RSM had regular morphology, spherical particles, good stability and safety, and the encapsulation rates of cantharidin and baicalin were $(90.19 \pm 0.67)\%$ and $(81.24 \pm 0.72)\%$, respectively, and the particle sizes were (172.47 ± 4.83) nm, with a PDI of 0.268 ± 0.018 , and a ζ potential of (-1.07 ± 0.07) mV. The *in vitro* evaluation results showed that FA-Can&Bai-Lips could effectively inhibit the proliferation of HepG2 cells, bearing good liver tumor targeting. **Conclusion** FA-Can&Bai-Lips has potentiation and toxicity reduction effects, can efficiently target tumor tissues, and is an anti-hepatic tumor nano-delivery system with great potential for development.

Key words: cantharidin; baicalin; co-loaded liposomes; anti-hepatocarcinogenic; folate; thin film dispersion ultrasonic method; Box-Behnken design-response surface methodology; hemolysis; cellular uptake; living imaging; target

斑蝥素 (cantharidin) 是斑蝥 *Mylabris* 中含有的一种单萜烯类活性成分与毒性成分。现代药理研究表明,斑蝥素对多种癌症如肝癌、食道癌、胃癌、肺癌、鼻咽癌、皮肤癌、卵巢癌、肾癌、乳腺癌、膀胱癌、胰腺癌等均有抑制作用,斑蝥素在治疗腹水肝癌和原发性肝癌方面优势显著^[1-6]。斑蝥素的抗肝癌作用主要与抑制肝癌细胞增殖及侵袭迁移、诱导细胞凋亡、诱发细胞自噬等有关,但在临床应用中发现其对泌尿系统、消化系统等存较大的不良反应^[7-8]。尽管结构修饰、新剂型、新给药途径等方式在一定程度上降低了斑蝥素的不良反应,但进一步应用于临床仍存在诸多掣肘^[9]。

黄芩苷 (baicalin) 为黄芩 *Scutellariae Radix* 中含有的黄酮类药效活性成分,具抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎、抗肿瘤及逆转多药耐药等多种药理作用,其中保肝作用尤为突出。黄芩苷能通过 B 细胞淋巴瘤-2/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (B-cell lymphoma-2/cysteine aspartic protease-3, Bcl-2/Caspase-3) 信号通路诱导肝癌细胞凋亡,抑制肝癌细胞周期与增殖,参与其氧化应激调节^[10-12]。斑蝥与黄芩配伍应用最早可追溯至明代医家龚廷贤所著典籍《万病回春》一书,其所载琥珀散中“滑石 1 两,白牵牛 (头末) 1 两,斑蝥 3 钱 (去翅足),琥珀 2 钱,黄芩 1 两,甘草 3 钱……”用于内消瘰癧结核具有奇效。而现代研究斑蝥与黄芩配伍应用同样也有迹可循^[13-14],比如斑蝥酸钠维生素 B₆ 注射液与以黄芩为君药的痰热清注射液联合应用于癌性发热,尤其对于肺癌、肝癌等癌性发热临床效果更佳。

共载脂质体是利用脂质体的亲水腔与脂质双分子层将不同性质的 2 种药物同时递送,以此来改

变药物的药动学性质,延长体内作用时间,从而发挥最佳协同治疗功效^[15-16]。基于中医药基础理论与脂质体共载技术,采用薄膜分散超声法将斑蝥素与黄芩苷 2 药配伍分载于脂质体的脂质双分子层及亲水腔,一热一寒,一辛一苦,一升一降,既可协同攻毒,又可以制约斑蝥辛热大毒之偏性,减少不良反应。

近年来,叶酸受体介导的靶向递药系统是目前药物靶向给药的研究热点之一^[17]。肿瘤细胞上高表达的叶酸受体与叶酸或叶酸类似物的结合具有高特异性、高亲和性等特点,以叶酸修饰的纳米载体能提高药物在肿瘤组织的浓度,增强其生物效应^[18]。因此,本课题通过单因素试验以及 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-叶酸 (DSPE-PEG 2000 folate, DSPE-PEG_{2k}-FA) 修饰的斑蝥素/黄芩苷共载脂质体 (DSPE-PEG_{2k}-FA-cantharidin & baicalin-liposomes, FA-Can&Bai-Lips) 制备工艺,并对其体外抗肝癌作用予以初步研究,以期构建一种载药量多、稳定性高、靶向性好,且能提高抗肝肿瘤活性及降低斑蝥素毒性的共载脂质体,为斑蝥素制剂的临床进一步开发提供实验依据。

1 仪器与试剂

XB-220A 型分析天平,美国 Precisa 公司; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限公司; R-3 型旋转蒸发器,瑞士 Buchi 公司; Scientz-IIID 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司; Agilent 1260 infinity II 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司; Zetasize ZS 型激光纳米粒度测定仪,英国马尔文仪器公司; TSQ8000

型气相-质谱联用仪、Tecnai G² Spirit TWIN 型透射电子显微镜 (TEM), 美国赛默飞世尔科技公司; Galaxy170R 型二氧化碳培养箱, 德国 Eppendorf 公司; BY-400C 型医用离心机, 北京白洋医疗器械有限公司; DW-86L388J 型超低温冰箱, 中国海尔集团; SW-CJ-2FD 型超净工作台, 苏州净化设备有限公司; DK-8AD 型电热恒温水槽, 中国 Blue Pard 公司; Enspire 型多功能酶标仪, 美国 Perkinelmer 公司; LSM800 型激光共聚焦扫描显微镜, 德国 Zeiss 公司; ChemiScope 6100 型化学发光成像系统, 中国上海勤翔科学仪器有限公司。

斑蝥素原料药, 批号 TZ180408, 质量分数为 99.4%, 西安通泽生物科技有限公司; 黄芩苷原料药 (批号 C22J7Y9309, 质量分数 90.7%)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-叶酸 (DSPE-PEG_{2k}-FA, 批号 S27890)、大豆卵磷脂 (批号 J27GS155716, 质量分数 >98%)、再生纤维素透析袋 (相对分子质量 1000, 批号 SP132638), 均购自上海源叶生物科技有限公司; 斑蝥素对照品 (批号 110783-201105, 质量分数 98.6%)、黄芩苷对照品 (批号 110715-201720, 质量分数 93.5%)、十八烷 (批号 111636-201804, 质量分数 100.0%), 均购自中国食品药品检定研究院; 胆固醇、三氯甲烷、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸、甲醇均为分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司。

人肝癌 HepG2 细胞, 湖南丰晖生物科技有限公司; 胎牛血清 (FBS, 批号 10270-106)、DMEM 培养基 (批号 8115247)、0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液 (批号 25200-056), 均购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒 (批号 AI09295084), 北京 Bioss 公司; PBS 缓冲液 (批号 08919), 美国 Hyclone 公司; 青霉素-链霉素混合液 (批号 20190928), 北京索莱宝科技有限公司; 异硫氰基荧光素 (FITC, 批号 BS096-50 mg)、4%多聚甲醛/通用型组织固定液 (PFA, 批号 BL539A), 均购自北京兰杰柯科技有限公司; Hoechst 33342 (批号 D-9105)、DiR (批号 D-9111), 均购自北京博奥森生物技术有限公司; 其余耗材均购自美国 Corning 公司。

雌性 BALB/c 裸鼠, 6~8 周龄, 体质量 13~16 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 所有实验动物置于 SPF 级动物房中饲养, 自由进食、饮水, 实验室温度为 20~26 °C, 相对湿度为 40%~70%, 每日 12 h/12 h 交替照明。所有动物实验遵循湖南中

医药大学第一附属医院有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 FA-Can&Bai-Lips 制备方法考察

2.1.1 薄膜分散法 按处方量称取适量斑蝥素、大豆卵磷脂、胆固醇, 置于茄形瓶中, 溶于氯仿与甲醇 (4:1) 混合溶液中, 水浴减压旋转蒸发除去有机溶剂, 形成均匀脂质膜。吸取一定量含黄芩苷的 PBS 缓冲液加入茄形瓶水化至形成脂质体混悬液后置超声波细胞粉碎机下超声 (超声 2 s、停止 2 s), 过 0.22 μm 微孔滤膜整粒, 即得。同法制得不含斑蝥素与黄芩苷的双空白脂质体、分别不含斑蝥素与黄芩苷的单空白脂质体。其中斑蝥素与黄芩苷的含量测定方法同课题组前期研究结果^[19-20]。

2.1.2 逆相蒸发法 按处方量称取适量斑蝥素、大豆卵磷脂、胆固醇, 置于茄形瓶中, 溶于氯仿与甲醇 (4:1) 混合溶液中, 超声使溶解, 向上述茄形瓶中均匀加入取一定量含黄芩苷的 PBS 缓冲液, 超声至形成稳定的 W/O 型白色乳剂, 蒸发除去有机溶剂, 形成可流动的胶态溶液时, 加入一定体积的 PBS 缓冲液继续搅拌水化至形成脂质体混悬液后置超声波细胞粉碎机下超声 (超声 2 s、停止 2 s), 过 0.22 μm 微孔滤膜整粒, 即得。

2.1.3 乙醚注入法 按处方量称取适量斑蝥素、大豆卵磷脂、胆固醇, 置于茄形瓶中, 并超声使其溶于乙醚。在恒温水浴磁力搅拌下, 采用注射器缓慢滴入含黄芩苷的 PBS 缓冲液中, 注入速度保持在 1.0 mL/min, 除去乙醚, 至形成脂质体混悬液后置超声波细胞粉碎机下超声 (超声 2 s、停止 2 s), 过 0.22 μm 微孔滤膜整粒, 即得。

2.1.4 FA-Can&Bai-Lips 包封率测定 精密量取脂质体溶液 500 μL, 加入十八烷内标溶液 100 μL, 加甲醇定容至 5 mL, 静置过夜后, 超声 30 min 破乳, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 分别测定斑蝥素与黄芩苷的总药量 ($m_{\text{总}}$)。精密量取 2 mL 脂质体溶液置透析袋中, 精密移取 5%甲醇 40 mL 作为透析介质, 于 25 °C 磁力搅拌 (300 r/min) 下透析 45 min, 取透析介质 20 mL 旋干, 加入十八烷内标溶液 0.1 mL, 加甲醇定容至 5 mL, 超声 30 min, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 分别测定斑蝥素与黄芩苷的游离量 ($m_{\text{游}}$), 根据公式计算包封率。

$$\text{包封率} = (m_{\text{总}} - m_{\text{游}}) / m_{\text{总}}$$

2.1.5 FA-Can&Bai-Lips 制备方法的确定 结果如

图 1 所示, 3 种方法制备的脂质体混悬液均澄清, 透明, 带淡黄色的乳光, 无絮凝。由表 1 可知, 尽管逆相蒸发法与乙醚注入法制备的共载脂质体粒径小, 粒度分布较为集中, 但斑蝥素与黄芩苷的包封率略低于薄膜分散法。故考虑到斑蝥素的毒性, 选用薄膜分散法作为共载脂质体的制备方法。

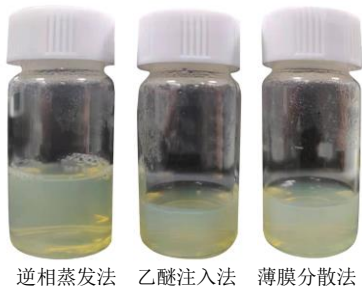


图 1 不同方法制备的脂质体外观图

Fig. 1 Appearance of liposomes prepared by different methods

表 1 FA-Can&Bai-Lips 的不同制备方法考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Results of different preparation methods of FA-Can&Bai-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制备方法	包封率/%		粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
	斑蝥素	黄芩苷			
薄膜分散法	74.19±4.52	73.21±0.80	107.20±1.27	0.221±0.009	1.00±0.07
逆相蒸发法	68.08±3.05	71.03±3.37	86.60±0.63	0.155±0.004	1.39±0.42
乙醚注入法	61.49±1.06	61.52±2.35	102.67±0.74	0.132±0.008	-0.29±0.16

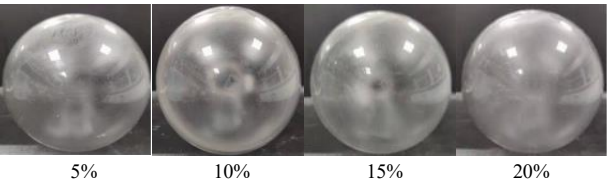


图 2 茄形瓶装载量

Fig. 2 Loading of cigar-shaped bottle

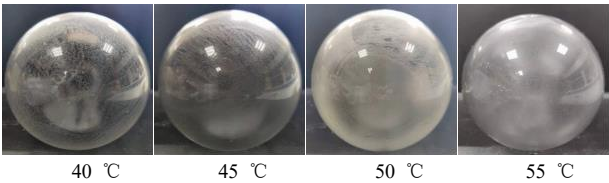


图 3 成膜温度考察

Fig. 3 Examination of film-forming temperature

表 2 总药量对包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of total charge on encapsulation rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

总药量/ mg	包封率/%		粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
	斑蝥素	黄芩苷			
1.5	66.73±2.71	69.43±2.09	103.57±0.85	0.195±0.005	3.21±0.59
3.0	69.01±0.44	69.49±0.39	103.60±1.06	0.215±0.006	2.38±0.66
6.0	72.82±0.94	76.55±0.72	103.40±0.78	0.227±0.012	0.29±0.31
9.0	66.86±2.10	68.01±0.72	110.53±0.86	0.229±0.005	-0.23±0.40
12.0	51.82±7.02	64.28±0.67	107.43±1.19	0.234±0.012	-0.68±0.02

2.2.4 药脂比考察 按“2.1.1”项下条件制备脂质体, 固定其他因素不变, 分别对药脂比 1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25 进行考察, 测定包封率。

2.2 单因素考察

2.2.1 茄形瓶装载量考察 按“2.1.1”项下条件制备脂质体, 固定其他因素不变, 对加入茄形瓶体积 5%、10%、15%、20%的溶剂进行考察, 观察其成膜情况。结果如图 2 所示, 当加入的有机溶剂为 20% 茄形瓶体积时, 脂质膜厚度均匀。

2.2.2 成膜温度考察 按“2.1.1”项下条件制备脂质体, 固定其他因素不变, 分别于 40、45、50、55 °C 条件下减压旋转蒸发除去有机溶剂, 观察其成膜情况。结果如图 3 所示, 确定 55 °C 为成膜温度。

2.2.3 总药量考察 按“2.1.1”项下方法制备 FA-Can&Bai-Lips, 固定其他因素不变, 分别对总药量 ($m_{\text{斑蝥素}} : m_{\text{黄芩苷}} = 1 : 5$) 1.5、3.0、6.0、9.0、12.0 mg 进行考察, 测定包封率。结果如表 2 所示, 当总药量为 6.0 mg 时, 斑蝥素与黄芩苷的包封率最佳, 故选择总投药量为 6.0 mg 进行后续工艺优化试验。

结果如表 3 所示, 随着磷脂量的增加, 包封率呈现先升高后降低的趋势, 且当药脂比为 1 : 10 时, 斑蝥素与黄芩苷的包封率出现了峰值, 故选择 1 : 8、

表 3 药脂比对包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Table 3 Effect of drug-lipid ratio on encapsulation rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药脂比	包封率/%		粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
	斑蝥素	黄芩苷			
1 : 5	59.83±0.24	52.94±2.46	130.17±0.90	0.133±0.007	0.83±0.49
1 : 10	72.76±1.13	72.33±0.61	104.07±1.20	0.214±0.004	1.13±0.51
1 : 15	70.30±2.11	70.63±0.21	98.57±3.50	0.236±0.006	1.00±0.27
1 : 20	68.41±0.64	69.85±0.51	107.90±0.37	0.259±0.009	1.53±0.44
1 : 25	66.25±3.02	67.41±0.81	100.21±0.63	0.258±0.011	2.06±0.71

1 : 10、1 : 12 的药脂比进行后续试验优化。

2.2.5 胆脂比考察 按“2.1.1”项下条件制备脂质体，固定其他因素不变，分别对胆脂比 1 : 1、1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20 进行考察，测定包封率。结果如表 4 所示，随着胆固醇量的减少，斑蝥素与黄芩苷的包封率呈现先增高后降低的趋势，且当胆脂比为 1 : 1 时，脂质体混悬液极不稳定，出现絮凝现象，说明药脂比对脂质体包封率的影响显著，故

选择 1 : 4、1 : 5、1 : 6 的胆脂比进行后续试验优化。

2.2.6 水化温度考察 按“2.1.1”项下条件制备脂质体，固定其他因素不变，分别对水化温度 40、45、50、55、60 ℃进行考察，测定包封率。结果如表 5 所示，随着水化温度的升高，斑蝥素与黄芩苷的包封率呈现逐渐增高的趋势，且 55 ℃的粒度分布更为集中，故选择 50、55、60 ℃的水化温度进行后续试验优化。

表 4 胆脂比对包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Table 4 Effect of cholesterol-lipid ratio on encapsulation rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胆脂比	包封率/%		粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
	斑蝥素	黄芩苷			
1 : 1	63.49±1.72	56.34±1.13	118.93±11.37	0.486±0.024	1.24±0.25
1 : 5	72.55±0.29	73.76±1.38	130.97±0.78	0.150±0.018	1.02±0.59
1 : 10	67.41±0.54	70.63±0.31	103.67±1.08	0.210±0.008	0.96±0.44
1 : 15	66.81±1.52	62.76±0.57	99.72±0.35	0.242±0.016	0.88±0.52
1 : 20	61.79±0.21	60.04±0.45	105.87±0.77	0.250±0.006	1.76±0.46

表 5 水化温度考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Table 5 Results of hydration temperature ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化温度/℃	包封率/%		粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
	斑蝥素	黄芩苷			
40	55.69±0.94	54.09±0.93	111.63±1.65	0.193±0.018	0.96±0.24
45	61.22±1.14	65.00±1.22	104.87±1.67	0.205±0.009	1.23±0.44
50	63.36±0.56	64.16±0.87	105.47±0.76	0.188±0.018	0.83±0.37
55	67.42±0.42	69.63±0.98	102.90±0.54	0.183±0.016	0.55±0.05
60	73.62±0.98	72.61±1.00	104.63±1.33	0.167±0.009	0.61±0.56

2.2.7 水化时间考察 按“2.1.1”项下条件制备脂质体，固定其他因素不变，分别对水化时间 25、50、75、100、125 min 进行考察，测定包封率。结果如表 6 所示，随着水化时间的延长，斑蝥素与黄芩苷的包封率呈现先升高后降低的趋势，其中水化时间为 100 min 时两者包封率均最高；共载脂质体粒径随水化时间变化的趋势与包封率基本一致，且不同

水化时间的粒度分布差别不明显，故选择 80、100、120 min 的水化时间进行后续试验。

2.2.8 水化介质考察 按“2.1.1”项下条件制备脂质体，固定其他因素不变，分别对水化介质纯化水、pH 6.0、pH 6.8、pH 7.0 的 PBS 缓冲液进行考察，测定包封率、平均粒径、PDI、ζ 电位。结果如表 7 所示，不同的水化介质对共载脂质体 ζ 电位的影响

表 6 水化时间考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 6 Results of hydration time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化时间/min	包封率/%		粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
	斑蝥素	黄芩苷			
25	57.76 $\pm$ 2.68	54.96 $\pm$ 0.98	92.35 $\pm$ 0.66	0.176 $\pm$ 0.008	0.51 $\pm$ 0.27
50	57.69 $\pm$ 1.21	61.64 $\pm$ 0.73	100.39 $\pm$ 1.24	0.162 $\pm$ 0.008	0.67 $\pm$ 0.28
75	62.88 $\pm$ 1.13	62.03 $\pm$ 2.06	102.13 $\pm$ 1.02	0.173 $\pm$ 0.020	0.93 $\pm$ 0.46
100	71.43 $\pm$ 2.23	69.92 $\pm$ 1.85	109.43 $\pm$ 1.00	0.190 $\pm$ 0.014	0.69 $\pm$ 0.09
125	65.23 $\pm$ 0.46	68.64 $\pm$ 0.82	103.23 $\pm$ 0.45	0.166 $\pm$ 0.010	0.96 $\pm$ 0.38

表 7 水化介质考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 7 Results of hydration medium study ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化介质	包封率/%		粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
	斑蝥素	黄芩苷			
纯化水	63.71 $\pm$ 0.81	56.90 $\pm$ 0.44	115.43 $\pm$ 0.47	0.409 $\pm$ 0.005	-12.10 $\pm$ 1.68
pH 6.0 的 PBS 缓冲液	60.73 $\pm$ 1.12	56.93 $\pm$ 0.22	117.97 $\pm$ 2.64	0.102 $\pm$ 0.006	-1.90 $\pm$ 0.88
pH 6.8 的 PBS 缓冲液	70.25 $\pm$ 1.40	68.55 $\pm$ 0.89	119.23 $\pm$ 1.88	0.091 $\pm$ 0.012	-0.84 $\pm$ 0.73
pH 7.0 的 PBS 缓冲液	69.99 $\pm$ 1.22	67.75 $\pm$ 0.76	120.20 $\pm$ 1.85	0.091 $\pm$ 0.019	0.09 $\pm$ 0.44

较大, 粒径随着 pH 值的增加而增加, 但分布更集中, 但在 pH 6.8 的 PBS 缓冲液水化介质中形成的共载脂质体的斑蝥素与黄芩苷的包封率最高, 故选择 pH 6.8 的 PBS 缓冲液作为水化介质。

2.2.9 水化体积考察 按“2.1.1”项下条件制备脂质体, 固定其他因素不变, 分别对水化体积 5、10、15、20 mL 进行考察, 测定包封率、平均粒径、PDI、 ζ 电位。结果如表 8 所示, 随着水化体积的增加,

共载脂质体粒子更为分散, ζ 电位则有所增加。当水化体积为 10 mL 时, 斑蝥素与黄芩苷的包封率最高, 且粒径较适宜, 粒度分布相对均匀, 故选择 10 mL 作为水化体积。

2.2.10 超声时间考察 按“2.1.1”项下条件制备脂质体, 固定其他因素不变, 分别超声 2、3、5、8、10 min (超声 2 s、停止 2 s) 进行考察, 测定包封率、平均粒径、PDI、 ζ 电位。结果如表 9 所示, 随

表 8 水化体积考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 8 Results of hydration volume study ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化体积/mL	包封率/%		粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
	斑蝥素	黄芩苷			
5	35.63 $\pm$ 3.62	41.20 $\pm$ 1.23	127.13 $\pm$ 1.82	0.192 $\pm$ 0.018	-0.13 $\pm$ 0.33
10	70.30 $\pm$ 2.16	69.66 $\pm$ 1.81	110.60 $\pm$ 2.04	0.095 $\pm$ 0.008	0.67 $\pm$ 0.28
15	65.92 $\pm$ 2.97	60.54 $\pm$ 1.68	121.63 $\pm$ 1.47	0.107 $\pm$ 0.008	1.74 $\pm$ 0.15
20	64.25 $\pm$ 2.03	50.89 $\pm$ 1.44	129.00 $\pm$ 1.63	0.225 $\pm$ 0.024	1.50 $\pm$ 0.28

表 9 超声时间考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 9 Results of ultrasound time study ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	斑蝥素包封率/%		黄芩苷包封率/%		粒径/nm		PDI		ζ 电位/mV	
	超声前	超声后	超声前	超声后	超声前	超声后	超声前	超声后	超声前	超声后
2	68.52 $\pm$ 1.34	60.33 $\pm$ 1.78	70.23 $\pm$ 2.11	62.45 $\pm$ 2.72	228.90 $\pm$ 2.31	213.26 $\pm$ 1.47	0.547 $\pm$ 0.015	0.412 $\pm$ 0.018	0.76 $\pm$ 0.29	-0.42 $\pm$ 0.17
3	71.17 $\pm$ 1.56	65.84 $\pm$ 2.17	72.85 $\pm$ 3.03	68.62 $\pm$ 1.05	213.66 $\pm$ 1.03	168.20 $\pm$ 1.29	0.562 $\pm$ 0.007	0.381 $\pm$ 0.023	0.57 $\pm$ 0.13	-0.37 $\pm$ 0.09
5	70.38 $\pm$ 1.49	63.49 $\pm$ 1.52	73.61 $\pm$ 1.74	69.21 $\pm$ 2.58	225.82 $\pm$ 2.44	128.51 $\pm$ 1.75	0.521 $\pm$ 0.013	0.243 $\pm$ 0.011	0.83 $\pm$ 0.15	-0.56 $\pm$ 0.18
8	71.65 $\pm$ 2.41	70.06 $\pm$ 0.98	72.92 $\pm$ 2.36	71.34 $\pm$ 1.57	215.73 $\pm$ 1.67	121.18 $\pm$ 0.85	0.508 $\pm$ 0.025	0.140 $\pm$ 0.010	0.65 $\pm$ 0.28	-0.66 $\pm$ 0.48
10	73.01 $\pm$ 1.03	60.62 $\pm$ 1.75	71.44 $\pm$ 1.87	68.41 $\pm$ 2.75	220.42 $\pm$ 1.10	113.23 $\pm$ 0.52	0.525 $\pm$ 0.038	0.105 $\pm$ 0.029	0.71 $\pm$ 0.33	-0.37 $\pm$ 0.06

着超声时间的延长, 脂质体粒径逐渐减小, 粒度分布更集中。当超声 8 min 时, 斑蝥素与黄芩苷的包封率前后变化较小, 故选择 8 min 作为其超声时间。

2.3 BBD-RSM 优化共载脂质体处方工艺

2.3.1 实验设计与结果 结合上述单因素考察试验结果, 发现药脂比、胆脂比、水化温度、水化时间对共载脂质体的制备影响较大, 故采用响应面法对共载脂质体制作工艺进行进一步优化, 以药脂比 (X_1)、胆脂比 (X_2)、水化温度 (X_3)、水化时间 (X_4) 为考察因素, 以斑蝥素 (Y_1) 和黄芩苷 (Y_2) 包封率、PDI (Y_3) 和 ζ 电位 (Y_4) 综合评分 (Y) 为评价指

标, 设计 4 因素 3 水平进行试验。因素与水平及结果见表 10。

2.3.2 模型拟合及验证 采用 EvaGear 软件的熵权法对 4 个分指标进行赋权, 得斑蝥素包封率、黄芩苷包封率、PDI、 ζ 电位的权重系数分别为 0.42、0.34、0.10、0.14, 根据实验结果, 采用 Design Expert 8.0 软件, 进行 2 次多项回归分析, 回归方程为 $Y=63.850+2.650 X_1+7.740 X_2-0.705 X_3-1.270 X_4-0.344 X_1 X_2-0.397 X_1 X_3-1.850 X_1 X_4+0.705 X_2 X_3+1.240 X_2 X_4+0.588 X_3 X_4-12.630 X_1^2-1.860 X_2^2-4.160 X_3^2-4.410 X_4^2$, $R^2=0.9128$ 。对回归模型

表 10 BBD-RSM 实验因素水平安排及结果

Table 10 Horizontal arrangement and result of experimental factors of BBD-RSM

序号	X_1	X_2	$X_3/^\circ\text{C}$	X_4/min	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3	Y_4/mV	Y
1	1 : 8 (-1)	1 : 5 (0)	55 (0)	80 (-1)	52.47	60.24	0.127	-0.662	42.44
2	1 : 10 (0)	1 : 4 (-1)	55	120 (+1)	59.60	70.30	0.294	-1.109	48.81
3	1 : 12 (+1)	1 : 5	55	120	50.40	68.65	0.149	-0.766	44.42
4	1 : 10	1 : 4	60 (+1)	100 (0)	53.42	67.96	0.541	-0.209	45.57
5	1 : 10	1 : 6 (+1)	60	100	89.64	86.23	0.159	-0.353	66.93
6	1 : 10	1 : 5	55	100	85.14	88.27	0.171	-0.171	65.76
7	1 : 10	1 : 6	55	80	90.20	89.20	0.274	-0.265	68.20
8	1 : 12	1 : 5	50 (-1)	100	66.30	77.28	0.327	-0.149	54.13
9	1 : 10	1 : 5	55	100	82.26	84.71	0.165	-0.337	63.32
10	1 : 10	1 : 6	55	120	91.21	89.81	0.315	-0.214	68.85
11	1 : 12	1 : 5	60	100	61.60	68.58	0.292	-0.409	49.16
12	1 : 8	1 : 5	60	100	53.75	66.25	0.274	-0.131	45.11
13	1 : 8	1 : 5	55	120	53.41	58.26	0.291	-0.387	42.21
14	1 : 10	1 : 5	50	120	70.11	69.76	0.318	-0.493	53.13
15	1 : 10	1 : 5	50	80	71.76	76.50	0.249	-0.115	56.16
16	1 : 10	1 : 5	55	100	82.84	87.61	0.155	-0.333	64.55
17	1 : 8	1 : 4	55	100	51.40	58.34	0.228	-0.460	41.38
18	1 : 10	1 : 4	55	80	70.50	69.10	0.232	-0.148	53.11
19	1 : 12	1 : 5	55	80	65.95	71.71	0.363	-0.586	52.04
20	1 : 10	1 : 5	55	100	78.22	75.83	0.166	-0.717	58.55
21	1 : 12	1 : 4	55	100	56.50	69.14	0.253	-0.324	47.21
22	1 : 8	1 : 6	55	100	63.33	71.67	0.388	-0.292	50.96
23	1 : 12	1 : 6	55	100	75.43	69.78	0.270	-0.108	55.42
24	1 : 10	1 : 5	60	80	75.82	68.23	0.229	-0.217	55.03
25	1 : 10	1 : 4	50	100	59.73	64.78	0.203	-0.353	47.08
26	1 : 8	1 : 5	50	100	69.20	57.31	0.202	-0.554	48.49
27	1 : 10	1 : 5	55	100	89.37	87.30	0.186	-1.030	67.09
28	1 : 10	1 : 6	50	100	87.86	84.46	0.303	-0.158	65.63
29	1 : 10	1 : 5	60	120	72.44	70.41	0.170	-0.185	54.36

进行方差分析, 回归模型 $P < 0.000\ 1$, 失拟项 $P > 0.05$, 说明模型选择合理, 拟合度好; 其中 X_2 、 X_1^2 极显著, X_1 、 X_3^2 、 X_4^2 显著, 其他项不显著。方差分析结果见表 11。

采用 Design Expert 8.0 软件绘制因素与响应值

关系的三维效应面图, 结果见图 4。随着各因素的增大, Y 值呈现先增大后减小的趋势, 且各因素对 Y 值影响大小为胆脂比 > 药脂比 > 水化时间 > 水化温度, 考虑到水化温度对脂质体的影响较小, 最终确定最佳工艺为药脂比 1 : 11、胆脂比 1 : 6、水化

表 11 方差分析结果

Table 11 Results of variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 936.30	14	138.31	10.47	<0.000 1	X_3X_4	1.39	1	1.39	0.10	0.750 8
X_1	84.14	1	84.14	6.37	0.024 3	X_1^2	1 034.88	1	1 034.88	78.36	<0.000 1
X_2	718.14	1	718.14	54.38	<0.000 1	X_2^2	22.43	1	22.43	1.70	0.213 6
X_3	5.96	1	5.96	0.45	0.512 5	X_3^2	112.07	1	112.07	8.49	0.011 3
X_4	19.28	1	19.28	1.46	0.247 0	X_4^2	126.14	1	126.14	9.55	0.008 0
X_1X_2	0.47	1	0.47	0.04	0.852 4	残差	184.90	14	13.21		
X_1X_3	0.63	1	0.63	0.05	0.830 2	失拟项	141.86	10	14.19	1.32	0.424 8
X_1X_4	13.66	1	13.66	1.03	0.326 4	纯误差	43.04	4	10.76		
X_2X_3	1.99	1	1.99	0.15	0.703 9	总离差	2 121.19	28			
X_2X_4	6.11	1	6.11	0.46	0.507 4						

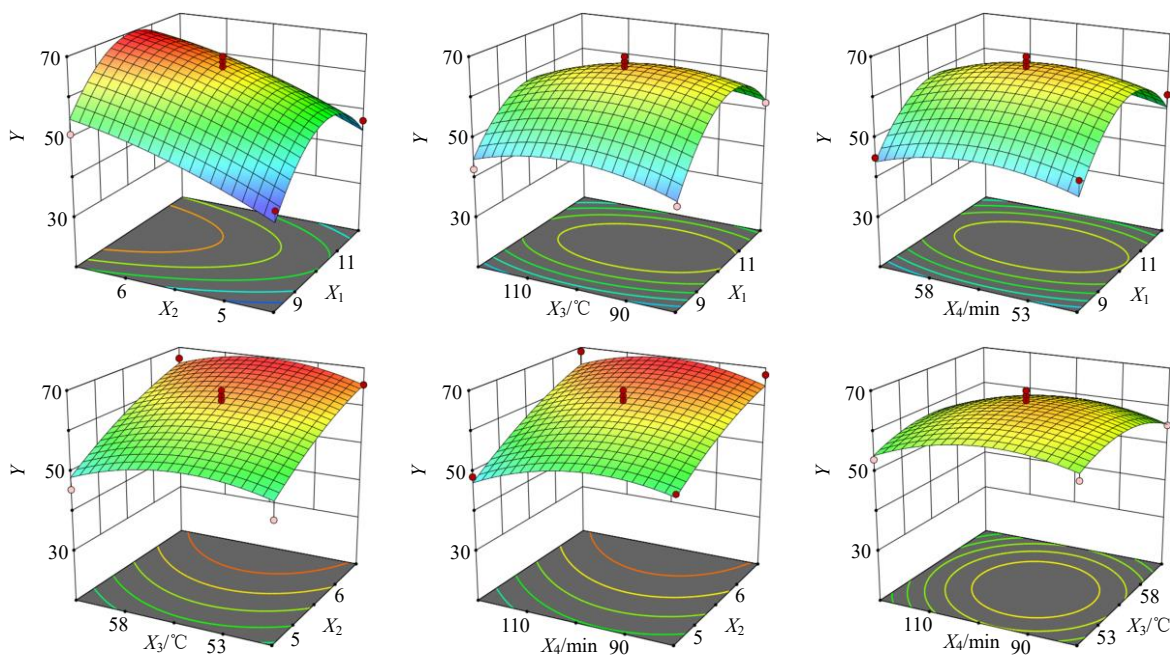


图 4 各因素对 Y 的三维效应图

Fig. 4 Three-dimensional effect of various factors on Y

温度 55 °C、水化时间 94 min。对优化后的制备工艺进行验证实验, 结果见表 12, 斑蝥素与黄芩苷的包封率均高于 85%, 且实际值与预测值相对偏差小于 5%, 说明采用 BBD-RSM 实验优化的共载脂质体具有良好的预测性及可靠性。

2.4 靶向分子投入量考察

按照“2.3.2”项下最佳处方工艺制备脂质体,

分别对磷脂总量 5%、10%、15%、20%的 DSPE-PEG_{2K}-FA 投入量进行考察, 测定其平均粒径、PDI、 ζ 电位、包封率。结果见表 13, 当靶向分子投入量的增大, 粒径有所增加, 脂质体外观与粒度分布呈负相关, 且投入量为 10%时, 脂质体外观澄清, 透明, 带淡黄色乳光, 斑蝥素、黄芩苷的包封率均在 85%以上, ζ 电位适宜, 粒径稳定, 粒度分布均匀。

表 12 实测值与预测值比较
 Table 12 Comparison of measured and predicted values

序号	包封率/%		PDI	ζ 电位/ mV	Y		相对偏 差/%	RSD/ %
	斑蝥素	黄芩苷			实际值	预测值		
1	88.24	83.17	0.189	-0.444	65.30			
2	86.23	88.55	0.208	-0.099	66.33	68.87	4.05	0.86
3	86.94	88.66	0.194	-0.377	66.63			

表 13 DSPE-PEG_{2K}-FA 投入量的考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Table 13 Results of examination of amount of DSPE-PEG_{2K}-FA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

用量/%	包封率/%		粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	外观
	斑蝥素	黄芩苷				
5	85.48±0.83	86.65±0.85	119.57±2.19	0.203±1.068	-0.81±0.35	澄清, 半透明, 淡黄色乳光
10	89.78±0.53	90.06±0.36	114.63±2.70	0.159±0.024	-0.09±0.23	澄清, 透明, 淡黄色乳光
15	84.68±1.88	89.47±2.24	123.20±2.30	0.193±0.019	0.06±0.07	澄清, 透明, 淡黄色乳光
20	90.80±0.34	91.25±2.94	124.00±2.55	0.198±0.007	-0.08±0.21	澄清, 半透明, 淡黄色乳光

2.5 脂质体的表征

2.5.1 粒径分布及 ζ 电位考察 取少量脂质体样品, 采用蒸馏水稀释 10 倍左右置于比色皿中, 利用纳米粒度仪测定其粒径分布及 ζ 电位情况。粒径分布及 ζ 电位图如图 5 所示, 可见, FA-Can&Bai-Lips 粒径在 100 nm 左右, 分布均匀, 带负电荷。

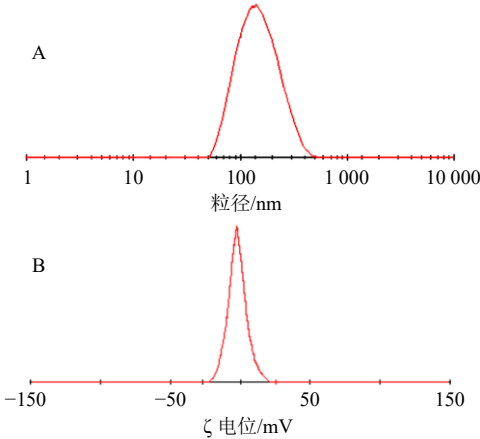


图 5 FA-Can&Bai-Lips 的粒径 (A) 及 ζ 电位图 (B)
 Fig. 5 Particle size (A) and ζ potential (B) of FA-Can&Bai-Lips

2.5.2 粒径分布及 ζ 电位 取少量 FA-Can&Bai-Lips 滴于附有支撑膜的 200 目铜网上, 静置 3 min 后, 用滤纸吸去多余液体, 再滴加 2% 磷钨酸进行染色, 低温烘干溶液, 置于 TEM 下观察脂质体的微观形态, 结果见图 6, 脂质体外观圆整, 大小均匀, 为类球形粒子。

2.5.3 稳定性考察 将脂质体放置于 4 ℃、避光保存 28 d, 以第 1 周每天、每隔 7 d 检测 1 次的频率

采用动态光散射粒度仪测定粒径变化情况。结果见表 14, 在 4 ℃、避光条件下, FA-Can&Bai-Lips 在 1 周时间内保持稳定, 粒径没有明显变化, 具有较好的稳定性。

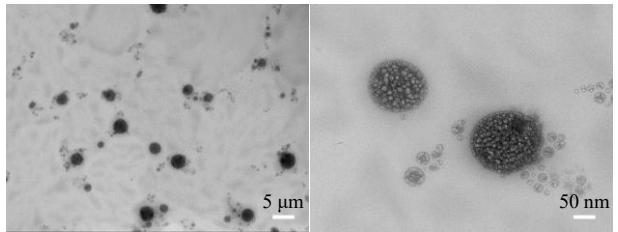


图 6 FA-Can&Bai-Lips 的透射电镜图
 Fig. 6 TEM images of FA-Can&Bai-Lips

表 14 FA-Can&Bai-Lips 的稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Table 14 Stability results of FA-Can&Bai-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	粒径/nm	t/d	粒径/nm
1	166.38±3.41	6	173.20±2.03
2	166.10±5.23	7	173.38±2.30
3	168.96±2.05	14	191.07±4.17
4	171.01±1.80	21	196.09±2.63
5	172.37±3.32	28	198.38±2.13

2.6 脂质体的评价

2.6.1 溶血性评价 将一定量供试品与 2% 的家兔红细胞混悬液混合, 温育一定时间后, 观察其对红细胞状态是否产生影响。

取洁净 EP 管 9 支并编号, 其中, 1~6 号管为供试品管, 7 号管为阴性对照管, 8 号管为阳性对照管, 9 号管为供试品对照管, 分别加入规定量的 2%

红细胞悬液、0.9%氯化钠溶液、去离子水，混匀，立即置 $(37.0\pm0.5)^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中进行温育 3 h 后，将其低温离心 $(4^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min) 10 min，以上清液颜色和底部红细胞剩余量为指标，观察溶血和凝聚反应并拍照，结果见图 7。取上清液，以第 9 管作为参比溶液，于 576 nm 处测定吸光度 (A) ，计算溶血率。各试验组方案及溶血率结果见表 15，FA-Can&Bai-Lips 各组溶血率均低于 5%，符合注射剂的要求。

溶血率 $=\frac{(A_{\text{样}}-A_{\text{阴}})}{(A_{\text{阳}}-A_{\text{阴}})}$
 $A_{\text{样}}$ 为样品的吸光度值， $A_{\text{阴}}$ 为阴性对照的吸光度值， $A_{\text{阳}}$ 为阳性对照的吸光度值

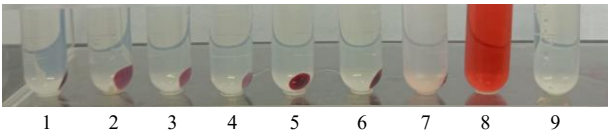


图 7 FA-Can&Bai-Lips 的溶血性
Fig. 7 Hemolysis of FA-Can&Bai-Lips

2.6.2 细胞摄取评价 将对数生长期的 HepG2 细胞以 1×10^5 个/孔密度，接种于 12 孔培养板中，培养 24 h 细胞贴壁，分别加入 FITC-Lips 和 FA-FITC-Lips 溶液，使 FITC 质量浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ ，共同孵育

表 15 溶血性试验方案及结果						
Table 15 Scheme and results of hemolysis						
编号	脂质体 体积/mL	0.9% NaCl 溶液/mL	2%红细胞 悬液/mL	去离子 水/mL	A 值	溶血 率/%
1	0.2	2.3	2.5	0.0	0.008	2.57
2	0.3	2.2	2.5	0.0	0.019	3.98
3	0.4	2.1	2.5	0.0	0.007	2.44
4	0.5	2.0	2.5	0.0	0.003	1.93
5	0.6	1.9	2.5	0.0	0.014	3.34
6	0.7	1.8	2.5	0.0	0.013	3.21
7	0.0	2.5	2.5	0.0	-0.012	-
8	0.0	0.0	2.5	2.5	0.766	-
9	0.7	4.3	0.0	0.0	0.0	-

1、2、3、4、5 h 后，采用 PBS 多次洗涤除去吸附在细胞外的 FITC，采用 PFA 进行固定 20 min，以 1 mg/mL Hoechst 33342 染细胞核 15 min，PBS 洗涤多次后，置 CLSM $(100\times)$ 下观察脂质体（绿色）进入细胞的情况，并以 Image J 软件进行半定量计算 FITC 平均荧光强度。

图 8 结果显示，FA-FITC-Lips 组中绿色荧光的亮度比 FITC-Lips 组高，说明叶酸受体阳性表达的

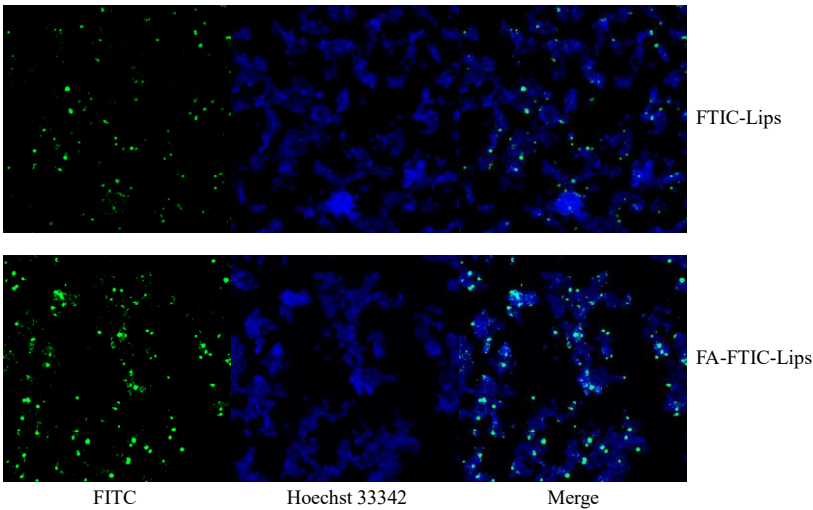


图 8 细胞摄取 CLSM 图 (4 h)
Fig. 8 CLSM of cellular uptake (4 h)

HepG2 细胞对叶酸受体靶向脂质体的摄取效率高于非靶向脂质体；表 16 结果显示，与 1 h 相比，HepG2 细胞在处理 4 h 后对 FA-FITC-Lips 的摄取具有统计学意义 $(P<0.05)$ ，且 4 h 后基本达到平衡，说明由叶酸受体介导的主动摄取具有饱和性。

2.6.3 细胞毒性评价 将对数生长期 HepG2 细胞 1×10^4 个/100 μL 接种于 96 孔板中，加入总药量为

质量浓度为 0.6、3.0、6.0、15.0、18.0、30.0、45.0、60.0、72.0、90.0 $\mu\text{g/mL}$ 的斑蝥素溶液、斑蝥素/黄芩苷混合溶液($m_{\text{斑蝥素}}:m_{\text{黄芩苷}}=1:5$)和 FA-Can&Bai-Lips，培养 48 h 后吸出含药培养基，并用 100 μL PBS 缓冲液洗涤 1 次后，每孔加入 100 μL 完全培养基和 10 μL CCK-8 溶液，置细胞培养箱中孵育 2 h 后，在酶标仪上检测 A 值 (450 nm) ，以空白培养基

表 16 不同时间点的细胞荧光摄取强度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 16 Fluorescence uptake intensity of cells in different time points ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/h	荧光强度/AU	
	FITC-Lips	FA-FITC-Lips
1	11.83 ± 1.60	24.26 ± 6.02
2	15.88 ± 1.45	35.53 ± 5.61
3	18.11 ± 2.95	41.92 ± 2.16
4	20.41 ± 0.60	46.06 ± 15.06*
5	21.45 ± 3.44	47.12 ± 7.02*

与 1 h 比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs 1 h group.

为对照, 计算细胞存活率, 并用 GraphPad Prism 8.0 软件计算半数抑制浓度 (IC_{50} , 以药物总量计算)。

表 17 结果显示, 斑蝥素溶液、斑蝥素/黄芩苷混合溶液和 FA-Can& Bai-Lips 对 HepG2 细胞的 IC_{50} 值分别为 (11.40 ± 3.28)、(15.79 ± 4.07)、(12.62 ± 1.45) $\mu\text{g/mL}$, 结果表明, 在对 HepG2 细胞发挥相同毒性效应时, 斑蝥素/黄芩苷混合溶液所需的斑蝥素剂量, 较单独斑蝥素溶液降低了 76.9%, FA-Can& Bai-Lips 中斑蝥素剂量降低了 81.6%, 说明黄芩苷的加入与 DSPE-PEG_{2K}-FA 的修饰, 能增加脂质体对 HepG2 细胞增殖的抑制作用。

表 17 斑蝥素溶液、斑蝥素/黄芩苷混合溶液和 FA-Can& Bai-Lips 在 48 h 对 HepG2 细胞的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 17 IC_{50} of free cantharidin, cantharidin/baicalin solution and FA-Can& Bai-Lips on HepG2 cells at 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$IC_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
斑蝥素溶液	11.40 ± 3.28
斑蝥素/黄芩苷混合溶液	15.79 ± 4.07
FA-Can& Bai-Lips	12.62 ± 1.45

2.6.4 靶向性评价 BALB/c 裸鼠动物适应性饲养 7 d 后, 在每只小鼠右侧腋下接种 8×10^6 个/mL 的 HepG2 细胞悬液 0.1 mL, 待小鼠右腋下皮下肿瘤大小为 $8 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$ 后, 将 5 只 BALB/c 裸鼠随机分成 3 组, 其中对照组 1 只、FA-DiR-Lips 2 只、DiR-Lips 2 只, 给药前小鼠禁食不禁水 12 h 后, 按 0.1 mL/20 g iv 2%戊巴比妥溶液, 待麻醉后, 尾 iv 含质量浓度为 1 mg/mL 的 DiR 标记脂质体 0.1 mL, 置于活体成像仪中, 于 6 h 时拍照, 对照组注射同体积生理盐水。拍照模式为荧光模式。激发波长 748 nm, 发射波长为 780 nm, 曝光时间为 7 s, 观察两

者在体内的分布情况。从图 9 可以看出, FA-DiR-Lips 组肿瘤组织部位荧光强度明显强于身体其他部位, DiR-Lips 组肿瘤组织部位暂无明显荧光, 但肝脏部位荧光较强。结果表明, 叶酸修饰的共载脂质体能够有效增加肿瘤组织的靶向能力。

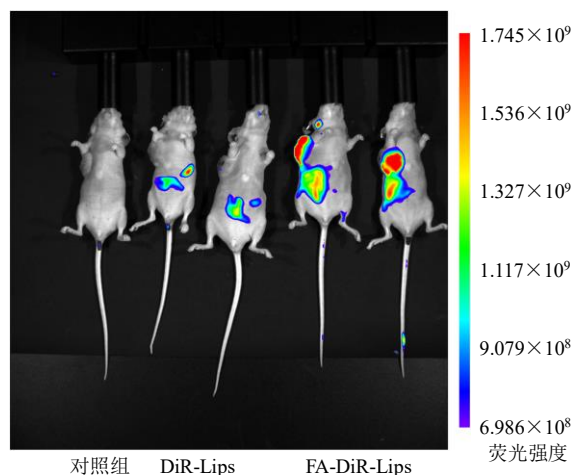


图 9 DiR-Lips 及 FA-DiR-Lips 活体成像图

Fig. 9 In vivo imaging of DiR-Lips and FA-DiR-Lips

3 讨论

一种良好纳米载体需要具备有高药物包载量、高靶向部位蓄积能力、高自身稳定性等多方面的性质, 选择适宜的制备方法并通过控制膜组分比例、外界温度、pH 值、离子强度等因素对纳米载体性能起着关键影响作用^[21-22]。常见的脂质体制备方法中, 注入法虽能避免使用有毒溶剂, 但其操作过程长, 易产生溶剂残留, 在选择乙醚做溶剂时会产生沸腾现象, 使成膜不均匀; 逆相蒸发法适合于包载水溶性药物或大分子药物, 经过超声整粒后易致水腔中药物发生泄露, 且重复性较差; 薄膜分散法包裹脂溶性药物的能力强, 操作过程简单可控, 缺点在于易产生溶剂残留^[23-27]。

通过对比 3 种方法制得脂质体的粒径大小及分布、 ζ 电位、包封率等, 确定选择薄膜分散-超声法制备共载脂质体。采用单因素实验与 Box-Behnken 试验优化最佳处方工艺为总药量为 6 mg、药脂比 1:11、胆脂比 1:6、DSPE-PEG_{2K}-FA 用量为 10%、溶剂为 50 mL、旋转蒸发及水化温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 、水化介质为 pH 6.8 PBS 缓冲液、水化体积为 10 mL、水化时间为 94 min, 超声时间为 8 min。

纳米载体实现不同部位靶向的首要条件是适宜的粒径, 50~200 nm 的脂质体, 能有效减少单核巨噬细胞的摄取, 通过毛细血管孔隙重新进入体循环,

从而能进一步增加其在靶向部位的蓄积, 保证包载药物的药效^[28-29]。研究表明, 聚合物材料载体或脂质材料载体作为给药载体必须要求 PDI 至少小于 0.2 或小于 0.3^[30]。FA-Can&Bai-Lips 的粒径小于 200 nm, PDI 小于 0.2, 2 药包封率均在 85%以上, 且粒径、PDI 及 ζ 电位较为适宜。通过对 FA-Can&Bai-Lips 的外观、形态、稳定性及溶血性进行初步评价, 证实其符合后续体内实验的静脉注射要求。

理想的脂质体是能在达到靶部位前与药物保持稳定且完整的结合体, 达到靶部位后, 在酶或者靶部位内环境的作用下, 释放药物, 使药物发挥治疗作用^[31]。脂质体在血液中的稳定性是发挥其载体作用的关键, 如何有效避免脂质体因酶类物质降解或巨噬细胞吞噬一直是脂质体的主要研究方向^[32]。经聚乙二醇修饰的长循环脂质体能在表面形成构象云而不被血液中调理素所识别, 从而减慢清除速率^[33]。细胞毒性试验及活体成像结果表明, 利用叶酸受体在肝癌细胞表面高表达特性, 经叶酸修饰的共载脂质体能高度识别肝癌细胞, 高效靶向肿瘤组织, 增加药物蓄积而发挥抗肝癌作用。

综上所述, Box-Behnken 法优化制备得 FA-Can&Bai-Lips 包封率高、稳定性及安全性好, 能显著增加对 HepG2 细胞增殖的抑制作用, 且靶向性高, 为该制剂的进一步开发及应用提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li C C, Yu F S, Fan M J, *et al.* Anticancer effects of cantharidin in A431 human skin cancer (Epidermoid carcinoma) cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32(3): 723-738.
- [2] Feng I C, Hsieh M J, Chen P N, *et al.* Cantharidic acid induces apoptosis through the p38 MAPK signaling pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. *Environ Toxicol*, 2018, 33(3): 261-268.
- [3] Wang W J, Wu M Y, Shen M, *et al.* Cantharidin and norcantharidin impair stemness of pancreatic cancer cells by repressing the β -catenin pathway and strengthen the cytotoxicity of gemcitabine and erlotinib [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5): 1912-1922.
- [4] Ren Y, Zhang S W, Xie Z H, *et al.* Cantharidin induces G₂/M arrest and triggers apoptosis in renal cell carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 5614-5618.
- [5] Huan S K, Lee H H, Liu D Z, *et al.* Cantharidin-induced cytotoxicity and cyclooxygenase 2 expression in human bladder carcinoma cell line [J]. *Toxicology*, 2006, 223(1/2): 136-143.
- [6] Zhang Y, Yang S L, Zhang H R, *et al.* Combination radiotherapy and cantharidin inhibits lung cancer growth through altering tumor infiltrating lymphocytes [J]. *Future Oncol*, 2017, 13(13): 1173-1180.
- [7] 安中原, 王正, 赵越. 斑蝥素及其衍生物的抗肿瘤研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2009, 5(1): 128-130.
- [8] 邹建军, 张胜强, 冯瑞祥. 斑蝥素毒性及其药(毒)动力学研究 [J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(5): 40-43.
- [9] 袁礼, 钟思雨, 夏新华. 斑蝥素的研究现状 [J]. 中医药导报, 2017, 23(3): 79-82.
- [10] 章宝燕, 林拥华, 林志强. 黄芩及其有效成分的肝脏保护作用研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(12): 129-133.
- [11] 罗燕子. 中药黄芩的化学成分及药理作用的相关研究进展 [J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(30): 180-181.
- [12] 李津津. 中药黄芩药理作用的研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2018, 37(10): 117-118.
- [13] 李敏. 斑蝥酸钠维生素 B₆ 注射液联合痰热清注射液治疗癌性发热 [J]. 华西医学, 2010, 25(4): 753-754.
- [14] 戴薇. 高效液相色谱法测定复方斑蝥胶囊中野黄芩苷含量 [J]. 中国药业, 2011, 20(1): 23-24.
- [15] Kamra M, Maiti B, Dixit A, *et al.* Tumor chemosensitization through oncogene knockdown mediated by unique α -tocopheryl cationic geminis [J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(4): 1555-1566.
- [16] Misra S K, Kondaiah P, Bhattacharya S, *et al.* Coliposomes comprising a lipidated multivalent RGD-peptide and a cationic gemini cholesterol induce selective gene transfection in $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ integrin receptor-rich cancer cells [J]. *J Mater Chem B*, 2014, 2(35): 5758-5767.
- [17] Narmani A, Rezvani M, Farhood B, *et al.* Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems [J]. *Drug Dev Res*, 2019, 80(4): 404-424.
- [18] Low P S, Henne W A, Doorneweerd D D. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases [J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41(1): 120-129.
- [19] 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.
- [20] 周容, 周莉莉, 钟思雨, 等. 甘草次酸修饰的黄芩苷脂质体的制备工艺研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(4): 373-377.
- [21] Patel A S, Lakshmibalasubramaniam S, Nayak B, *et al.* Improved stability of phycobiliprotein within liposome stabilized by polyethylene glycol adsorbed cellulose

- nanocrystals [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163: 209-218.
- [22] Sherry M, Charcosset C, Fessi H, *et al.* Essential oils encapsulated in liposomes: A review [J]. *J Liposome Res*, 2013, 23(4): 268-275.
- [23] López-Cano J J, González-Cela-Casamayor M A, Andrés-Guerrero V, *et al.* Liposomes as vehicles for topical ophthalmic drug delivery and ocular surface protection [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2021, 18(7): 819-847.
- [24] Large D E, Abdelmessih R G, Fink E A, *et al.* Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 176: 113851.
- [25] Kiaie S H, Mojarad-Jabali S, Khaleseh F, *et al.* Axial pharmaceutical properties of liposome in cancer therapy: Recent advances and perspectives [J]. *Int J Pharm*, 2020, 581: 119269.
- [26] Ajeeshkumar K K, Aneesh P A, Raju N, *et al.* Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2021, 20(2): 1280-1306.
- [27] Has C, Sunthar P. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes [J]. *J Liposome Res*, 2020, 30(4): 336-365.
- [28] Penoy N, Grignard B, Evrard B, *et al.* A supercritical fluid technology for liposome production and comparison with the film hydration method [J]. *Int J Pharm*, 2021, 592: 120093.
- [29] Ren H W, He Y W, Liang J M, *et al.* Role of liposome size, surface charge, and PEGylation on rheumatoid arthritis targeting therapy [J]. *ACS Appl Mater Interf*, 2019, 11(22): 20304-20315.
- [30] Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(2): 57.
- [31] Tanaka M. Applications of synthetic polymer discoidal lipid nanoparticles to biomedical research [J]. *Chem Pharm Bull*, 2022, 70(8): 507-513.
- [32] Esposto B S, Pinho S G B, Thomazini M, *et al.* TPP-chitosomes as potential encapsulation system to protect carotenoid-rich extract obtained from carrot by-product: A comparison with liposomes and chitosomes [J]. *Food Chem*, 2022, 397: 133857.
- [33] Zhang H Y, Wei S R, Zhang Y, *et al.* Improving cellular uptake and bioavailability of periplocymarin-linoleic acid prodrug by combining PEGylated liposome [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 2491-2497.

[责任编辑 郑礼胜]