HAIYPRH 修饰鬼臼毒素脂质体处方工艺优化及其脑靶向性评价

谷丽艳[1]，孙朝渭[1]，刘鑫程[1]，李学涛[2, 3]，孔　亮[2, 3*]

1. 辽宁中医药大学 中医脏象理论及应用教育部重点实验室，辽宁 沈阳　110847
2. 辽宁中医药大学药学院，辽宁 大连　116600
3. 沈阳市中药靶向递送重点实验室，辽宁 沈阳　110847

摘　要：目的　制备转铁蛋白受体结合肽 HAIYPRH 修饰的负载鬼臼毒素脂质体（HAIYPRH modified podophyllotoxin-loaded liposomes，T7-Pod-Lip），对其处方工艺进行优化，并初步评估其靶向能力。**方法**　采用薄膜分散法制备 T7-Pod-Lip。通过 Box-Behnken 设计-响应面法（Box-Behnken design-response surface method，BBD-RSM）确定 T7-Pod-Lip 的最优处方及制备工艺，并对优化处方工艺后的 T7-Pod-Lip 的形态、粒径、ζ 电位、体外释放、稳定性进行考察；考察小鼠脑内血管内皮细胞（bEnd.3）、大鼠脑胶质瘤细胞（C6）对 T7-Pod-Lip 的体外摄取能力及体外跨血脑屏障（blood brain barrier，BBB）能力，并利用脑胶质瘤小鼠考察 T7-Pod-Lip 的体内靶向能力。**结果**　T7-Pod-Lip 的最优处方工艺为 EPC 34 mg、胆固醇 6 mg、鬼臼毒素 1 mg、DSPE-PEG$_{2000}$ 2 mg、DSPE-PEG$_{2000}$-HAIYPRH 1 mg、超声功率 630 W；其平均粒径为（90.94±0.95）nm，ζ 电位为（−4.83±0.61）mV，鬼臼毒素包封率为（96.56±0.44）%，且稳定性较好。HAIYPRH 修饰的脂质体在 bEnd.3、C6 细胞中的摄取能力显著增强，且体外跨 BBB 能力显著增强；活体成像结果表明，HAIYPRH 修饰的脂质体在小鼠脑内的荧光信号显著增强，说明具有较好的脑靶向能力。**结论**　成功制备并优化 T7-Pod-Lip，并证明经 HAIYPRH 修饰的 Pod-Lip 具有较强的脑靶向作用，为脑胶质瘤的治疗提供了新方法。

关键词：鬼臼毒素；转铁蛋白受体结合肽；脂质体；Box-Behnken 设计-响应面法；血脑屏障；靶向作用；脑胶质瘤

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2024)24 - 8392 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.008

Optimization of formulation process of HAIYPRH modified podophyllotoxin liposomes and evaluation of brain targeting

GU Liyan[1], SUN Chaowei[1], LIU Xincheng[1], LI Xuetao[2, 3], KONG Liang[2, 3]

1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Viscera Theory and Application, Ministry of Education, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China
2. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China
3. Shenyang Key Laboratory of Targeted Delivery of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: Objective　To prepare transferrin receptor-binding peptide HAIYPRH modified podophyllotoxin-loaded liposomes（T7-Pod-Lip), optimize formulation process and preliminary evaluate the targeting capability. **Methods**　T7-Pod-Lip was prepared by thin film dispersion method. The optimum preparation process of T7-Pod-Lip was determined by Box-Behnken design-response surface method, and the morphology, particle size, ζ potential, *in vitro* release and stability of the optimized T7-Pod-Lip were investigated. *In vitro* uptake and crossing blood brain barrier (BBB) capacities of T7-Pod-Lip by cerebral vascular endothelial cells (bEnd.3) and cerebral glioma cells (C6) were investigated, and *in vivo* targeting ability of T7-Pod-Lip was investigated by glioma mice. **Results** The optimal prescriptions of T7-Pod-Lip were EPC 34 mg, cholesterol 6 mg, podophyllotoxin 1 mg, DPE-PEG$_{2000}$ 2 mg, DSPE-PEG$_{2000}$-HAIYPRH 1 mg, ultrasonic power 630 W. Its particle size was (90.94 ± 0.95) nm, ζ potential was (−4.83 ± 0.61) mV, podophyllotoxin encapsulation rate was (96.56 ± 0.44)%, and the stability was perfect. The uptake capacity of HAIYPRH modified

收稿日期：2024-07-22

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82204629）；辽宁省教育厅科学技术研究重点攻关项目（202064）

作者简介：谷丽艳（1979—），女，辽宁朝阳人，博士后，副教授，从事中医药防治乳腺增生与心血管疾病临床与实验研究。E-mail: syguliyan@163.com

***通信作者：**孔　亮（1990—），男，辽宁沈阳人，博士后，讲师，从事新型纳米给药系统的研究。E-mail: liangkong_sy@163.com

liposomes in bEnd.3 and C6 cells was significantly enhanced, and the trans BBB capacity was significantly enhanced *in vitro*. *In vivo* imaging results showed that the fluorescence signal of HAIYPRH modified liposomes in mouse brain was significantly enhanced, indicating that it had ideal brain targeting ability. **Conclusion** T7-Pod-Lip is successfully prepared and optimized, and it is proved that Pod-Lip modified by HAIYPRH has strong targeting effect, which provides a new method for the treatment of brain glioma.

Key words: podophyllotoxin; transferrin receptor-binding peptide; liposome; Box-Behnken design-response surface method; blood-brain barrier; targeting effect; brain glioma

胶质母细胞瘤（glioblastoma，GBM）是最常见、最致命的颅内恶性肿瘤，通常起源于星形胶质细胞或神经胶质细胞，具有高发病率、高死亡率和低治愈率的特点[1-2]。目前，手术切除肿瘤结合放疗和化疗等辅助治疗措施是最为有效的治疗方法之一[3]。由于存在血脑屏障（blood brain barrier，BBB）[4]，化疗药物难以有效进入，从而导致 GBM 对化疗药物的敏感性低[5]。同时，传统的抗肿瘤药物对肿瘤细胞缺乏足够的特异性，因此在治疗过程中可能对正常组织造成严重的毒副作用[6]。这一现象导致目前针对 GBM 的临床治疗效果相对较差，患者的生存期较短，死亡率较高[7]。因此，如何开发一种安全有效的治疗药物并有效提高其脑内转运效率，是改善 GBM 临床治疗效果不佳的一个有利方向。

鬼臼毒素（podophyllotoxin）为小檗科鬼臼属植物所产生的木脂类成分，对 GBM 等多种肿瘤均具有显著的抑制作用[8-10]。然而，由于其水溶性差、生物利用度低，限制了其在临床中的应用[11]。由天然磷脂和胆固醇组成的脂质体作为纳米药物递送系统在高效输送抗癌药物方面已被广泛应用[12]。这类纳米药物递送具有改善药物水溶性、降低毒副作用和提高生物利用度的能力[13]。同时为了克服 BBB 的阻碍，促进药物跨过 BBB，本课题组利用脑微血管内皮细胞与 GBM 细胞表面均过表达转铁蛋白受体（transferrin receptor，TfR）这一特性[14]，在脂质体表面修饰主动靶向分子 HAYPRH。HAYPRH（His-Ala-Ile-Tyr-Pro-Arg-His，T7）是一种含有 7 个氨基酸能与 TfR 结合的短肽，其与 TfR 有很高的亲和力，能够特异性结合，引发细胞内化，协助药物跨过 BBB 入脑[15]。

根据以上研究背景，拟构建 HAIYPRH 修饰的负载鬼臼毒素的脂质体（HAIYPRH modified podophyllotoxin-loaded liposomes，T7-Pod-Lip），促进药物跨过 BBB，提高其脑靶向作用并增加药物在 GBM 细胞中的积蓄，增强抗脑胶质瘤的能力。为了初步验证上述假说，本研究采用 Box-Behnken 设计-响应面法（Box-Behnken design-response surface method，BBD-RSM）筛选出 T7-Pod-Lip 的最优处方工艺，并对其形态、粒径、ζ 电位、体外释放、稳定性及靶向能力进行考察，为进一步研究该药物在体内外治疗 GBM 方面提供实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ3200E 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；JY92-2D 型超声波细胞破碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司；BSA124S 型电子天平，北京赛多利斯科学仪器有限公司；RE52CS 型旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂；Agress1100 型高效液相色谱仪，大连依利特分析仪器有限公司；TiS 型荧光倒置显微镜，日本尼康公司；IVScope 8500 型小动物活体成像系统，上海勤翔科学仪器有限公司；JEM-1200EX 型透射电子显微镜（TEM），日本电子株式会社（JEOL）。

1.2 药品与试剂

胆固醇（批号 N1018A）、蛋黄卵磷脂（egg phospholipids，EPC，批号 A0203A）、DMEM 培养基（批号 MA0212），购自大连美仑生物技术有限公司；二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000（DSPE-PEG_{2000}），批号 B51152，购自于日本精化株式会社；鬼臼毒素，批号 G2207397，质量分数 98%，购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；DSPE-PEG_{2000}-HAIYPRH，批号 RS0231817，购买于西安瑞禧生物科技有限公司；胰蛋白酶，批号 2277231，购自于美国 Gibco 公司；青链霉素双抗（P/S），批号 J210031，购自于美国 HyClone 公司；胎牛血清（FBS），批号 23313822，购于北京兰杰柯科技有限公司；香豆素，批号 442631，购自于美国 Sigma-Aldrich 公司；DAPI 染色液，批号 C1005，购自于北京碧云天科技有限公司；pH 7.4 的磷酸盐缓冲液（PBS），批号 1022Q021，购自北京索莱宝科技有限公司；DiR 染料，批号 K2307324，质量分数≥95%，大连美仑生物科技有限公司。

1.3 细胞

小鼠脑内血管内皮细胞（bEnd.3）、大鼠脑胶质

瘤细胞（C6），购自赛百慷（上海）生物技术股份有限公司。

2　方法与结果

2.1　脂质体的制备

2.1.1　T7-Pod-Lip　称取处方量的 EPC、胆固醇、DSPE-PEG$_{2000}$、DSPE-PEG$_{2000}$-HAIYPRH、鬼臼毒素，以甲醇为溶剂溶解上述材料并转移至 50 mL 圆底烧瓶中，于 40 ℃水浴下减压旋转蒸发，去除溶剂，加入 5 mL PBS 溶液，超声水化。将得到的溶液放入超声波细胞破碎机中，在冰浴条件下进行超声处理 10 min，每次超声时间 10 s，停顿时间为 5 s。最后过 0.22 μm 微孔滤膜，收集滤液，即得 T7-Pod-Lip。

2.1.2　空白脂质体（blank liposome，B-Lip）　按照“2.1.1”项下方法制备步骤，不加鬼臼毒素和 DSPE-PEG$_{2000}$-HAIYPRH，即得 B-Lip。

2.1.3　HAIYPRH 修饰的负载香豆素的脂质体（HAIYPRH modified coumarin-loaded liposomes，T7-Cou-Lip）　在“2.1.1”项下方法的基础上，将鬼臼毒素换成香豆素（0.1 mg）进行制备，即得 T7-Cou-Lip。

2.1.4　香豆素脂质体（coumarin-loaded liposomes，Cou-Lip）　按上述“2.1.3”项下方法制备步骤，不加 DSPE-PEG$_{2000}$-HAIYPRH，即得 Cou-Lip。

2.2　鬼臼毒素含量测定方法的建立

2.2.1　色谱条件　色谱柱为 Aglient C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）柱；流动相为乙腈-水（70∶30）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 292 nm；进样量 20 μL。

2.2.2　对照品溶液的制备　精密称取鬼臼毒素对照品 1 mg 于 10 mL 量瓶中，加入适量甲醇超声溶解后，定容至 10 mL，即得鬼臼毒素质量浓度为 0.10 mg/mL 的对照品溶液。稀释上述对照品溶液制成质量浓度分别为 180.0、160.0、120.0、80.0、40.0、20.0、10.0、5.0 μg/mL 的系列对照品溶液。

2.2.3　供试品溶液的制备　精密吸取 T7-Pod-Lip 1 mL 于 10 mL 量瓶中，加入一定量甲醇进行超声破乳后（超声功率 100 W），定容至 10 mL，0.45 μm 微孔滤膜滤过，收集滤液，即得供试品溶液。

2.2.4　阴性对照溶液的制备　精密吸取 B-Lip 1 mL，同“2.2.3”项方法制备，即得阴性对照溶液。

2.2.5　专属性实验　分别量取适量对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 20 μL，按照“2.2.1”项下鬼臼毒素的 HPLC 法色谱条件分别进样测定，记录色谱图，结果见图 1。鬼臼毒素色谱峰分离度良好，主峰与杂质峰基线分离，阴性对照溶液对鬼臼毒素测定无干扰，表明本方法专属性良好。

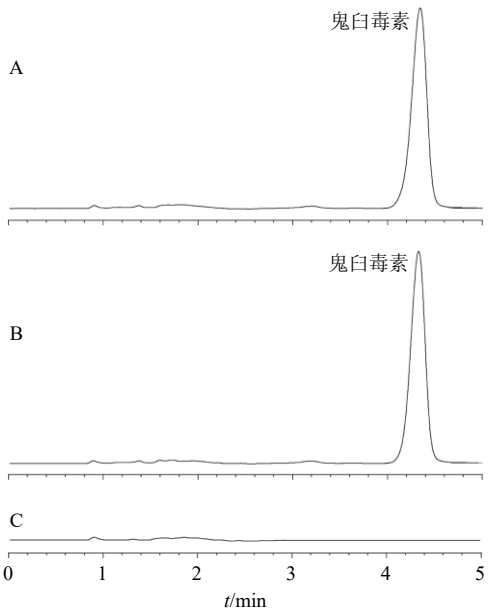


图 1　鬼臼毒素对照品溶液 (A)、T7-Pod-Lip 供试品溶液 (B) 及阴性对照溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1　HPLC diagrams of podophyllotoxin reference solution (A), T7-Pod-Lip test solution (B) and negative control solution (C)

2.2.6　线性关系考察　取“2.2.2”项下各对照品溶液适量，按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定并记录。以鬼臼毒素质量浓度为横坐标（X）、鬼臼毒素峰面积为纵坐标（Y）绘制标准曲线，进行线性回归，即得鬼臼毒素回归方程 Y＝13.630 X＋2.489，R^2＝0.999，结果表明鬼臼毒素在 5.0～180.0 μg/mL 线性关系良好。

2.2.7　精密度试验　取“2.2.2”项下鬼臼毒素对照品溶液，按照“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次，考察精密度。结果显示鬼臼毒素峰面积的 RSD 为 1.51%，表明仪器设备精密度良好。

2.2.8　稳定性试验　取“2.2.3”项下 T7-Pod-Lip 供试品溶液，分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h，按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定并记录色谱图。结果表明鬼臼毒素峰面积的 RSD 为 1.67%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.9　重复性试验　取 T7-Pod-Lip 6 份，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定并记录。结果表明，鬼臼毒素平均质

量浓度为 40 μg/mL，RSD 为 1.67%，表明该方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密吸取 T7-Pod-Lip 6 份，各 0.5 mL，分别加入等体积鬼臼毒素对照品溶液（40 μg/mL），按“2.2.3”项方法制备供试品溶液，按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算加样回收率。结果表明鬼臼毒素的平均加样回收率为 100.76%，RSD 为 2.33%，表明该方法准确度良好。

2.3 包封率的测定

过膜前脂质体药物含量：精密吸取 T7-Pod-Lip 1 mL，加甲醇 9 mL 混合，并进行超声破乳混匀（超声功率 100 W），过 0.45 μm 微孔滤膜，备用。过膜后脂质体药物含量：精密吸取 T7-Pod-Lip 1 mL，0.22 μm 微孔滤膜滤过，加甲醇 9 mL 超声破乳混匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，备用。对上述溶液进行样品分析，计算鬼臼毒素含量，然后用该数据计算脂质体的包封率。

包封率＝W_m/W_n

W_m 为过膜后的鬼臼毒素含量，W_n 为过膜前的鬼臼毒素含量

2.4 处方优化

采用 BBD-RSM，在本实验室前期研究的基础上[16]，选出 3 个主要影响因素：鬼臼毒素/EPC 的质量比（X_1）、鬼臼毒素/胆固醇的质量比（X_2）及超声功率（X_3），以 T7-Pod-Lip 包封率（Y）为响应值进行考察。（X_1 22～44；X_2 4～8；X_3 500～700 W），对每个因素进行平均筛选，并从中确定 3 个水平。因素及其水平、BBD-RSM 试验的设计和结果见表 1。根据表 1 中的结果，通过 Design Expert 13.0 软件建立了 Y 的拟合方程：Y＝95.21＋4.43 X_1＋1.45 X_2＋4.71 X_3＋1.21 X_1X_2－2.23 X_1X_3＋3.05 X_2X_3－16.28 X_1^2－12.15 X_2^2－7.55 X_3^2，R^2＝0.993 5，P＜0.05。

方差分析结果如表 2 所示，表明该模型显著性较好（P＜0.01）；此外，失拟项的 P 值＞0.05，表明其在统计学上无意义；相关系数（R^2）＝0.993 5，说明该模型与实际试验无显著性差异。

表 1 BBD-RSM 试验设计与结果

Table 1 Design and results of BBD-RSM

序号	X_1	X_2	X_3/W	Y/%	序号	X_1	X_2	X_3/W	Y/%	序号	X_1	X_2	X_3/W	Y/%
1	22 (−1)	4 (−1)	600 (0)	62.20	7	22	6	700 (+1)	73.83	13	33	6	600	91.86
2	44 (+1)	4	600	68.55	8	44	6	700	78.33	14	33	6	600	95.66
3	22	8 (+1)	600	62.60	9	33 (0)	4	500	79.85	15	33	6	600	95.06
4	44	8	600	73.78	10	33	8	500	69.22	16	33	6	600	96.08
5	22	6 (0)	500 (−1)	59.97	11	33	4	700	72.34	17	33	6	600	97.40
6	44	6	500	73.39	12	33	8	700	84.77					

表 2 方差分析结果

Table 2 Analysis results of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2 597.90	9	288.66	118.62	0.000 1	X_1^2	1 115.75	1	1 115.75	458.51	＜0.000 1
X_1	157.09	1	157.09	64.55	0.000 1	X_2^2	621.67	1	621.67	255.47	＜0.000 1
X_2	16.76	1	16.76	6.89	0.034 2	X_3^2	240.23	1	240.23	98.72	＜0.000 1
X_3	177.76	1	177.76	73.05	0.000 1	残差	17.03	7	2.43		
X_1X_2	5.83	1	5.83	2.40	0.165 5	失拟项	0.03	3	0.01	0.002 6	0.999 8
X_1X_3	19.89	1	19.89	8.17	0.024 4	误差	17.00	4	4.25		
X_2X_3	37.15	1	37.15	15.27	0.005 8	总离差	2 614.93	16			

通过 Design Expert 13.0 软件绘制的三维响应面图和等高线图，固定其中 1 个因素，观察其他因素对包封率的影响，可以通过曲线的陡峭度来评估这些因素之间相互作用对 Y 的影响程度。从图 2 可以看出，因素 X_1 和 X_2 在响应值 Y 上有显著影响，而因素 X_3 的影响相对较小。X_1 与 X_2、X_1 与 X_3 之间的相互作用呈现出明显的响应面变化，表现出陡峭的特征，而 X_2 与 X_3 之间的响应面则相对较为平缓。

等高线图显示出 X_1 与 X_2、X_1 与 X_3 之间的相互作用高于 X_2 与 X_3 之间的相互作用。进一步比较三个因素对 Y 的影响程度，可以得出影响顺序为 X_1＞X_2＞X_3。根据模型模拟得到的优化处方工艺条件为 X_1＝34.31，X_2＝6.21，X_3＝631.51 W，预测平均包封率为 96.30%。

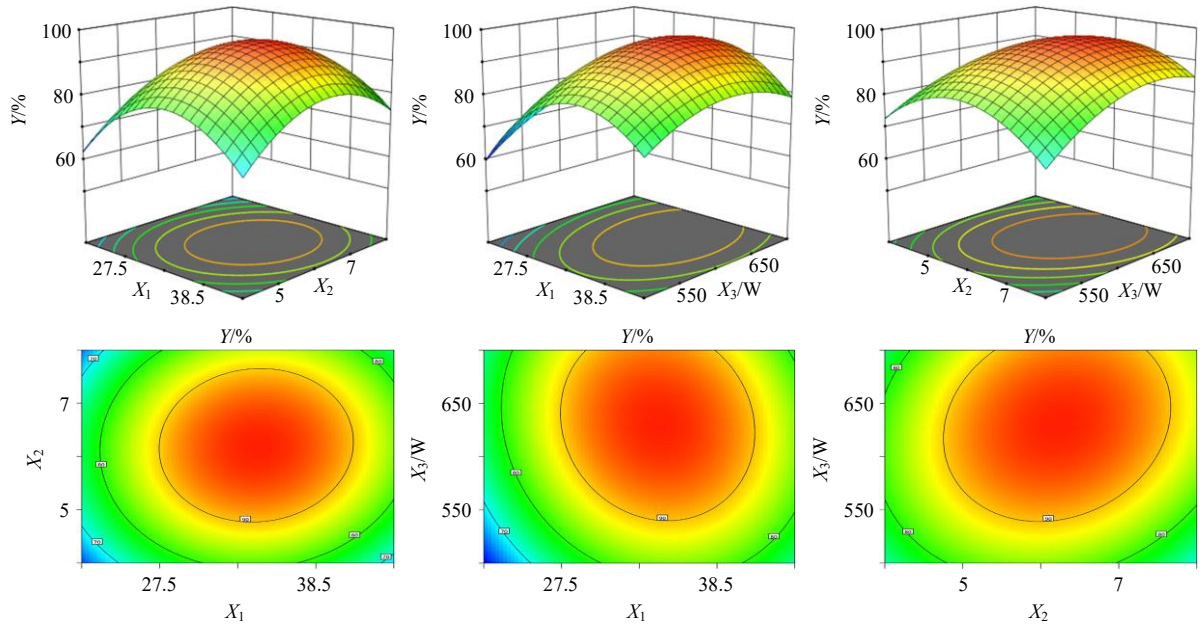


图 2　各因素 X_1、X_2、X_3 对 Y 影响的响应面和等高线图

Fig. 2　Response surfaces and contour graphs of effects of each factor X_1, X_2, X_3 on Y

结合本实验室脂质体处方考察的经验，最终确定脂质体的优化处方工艺为 EPC 34 mg、胆固醇 6 mg、鬼臼毒素 1 mg、DSPE-PEG_{2000} 2 mg、DSPE-PEG_{2000}-HAIYPRH 1 mg、超声功率为 630 W，处方量为 5 mL。

依据上述最优处方工艺，制备 3 批 T7-Pod-Lip。通过 HPLC 检测脂质体中鬼臼毒素的含量并计算出其包封率。结果显示，3 批 T7-Pod-Lip 样品中鬼臼毒素的包封率分别为 96.78%、96.84%、96.05%，平均值为（96.56±0.44）%，与预测包封率（96.30%）的相对误差为（0.43±0.16）%。该结果显示本研究优选的处方工艺稳定可行。

2.5　脂质体表征

2.5.1　微观形态　通过 TEM 观察 T7-Pod-Lip 的微观形态，将稀释至一定浓度的脂质体滴加到铜网上，2%磷钨酸染色后，室温晾干，置于加速电压为 120 kV 的 TEM 上观察形态，重复测量 3 次。结果如图 3 所示，T7-Pod-Lip 呈类圆形，形态规整，具有磷脂双分子层结构，粒径约为 90 nm。

2.5.2　粒径和 ζ 电位　吸取 T7-Pod-Lip 适量，将其置于激光散射粒径测定仪的样品皿中测定脂质体的粒径及 ζ 电位，平行操作 3 次。结果如图 4 所示，T7-Pod-Lip 的平均粒径为（90.94±0.95）nm，多分散性指数（polydispersity index，PDI）为 0.21±0.01，表明该脂质体粒径分布均匀稳定；ζ 电位为（−4.83±0.61）mV，表明该脂质体具有负电性。

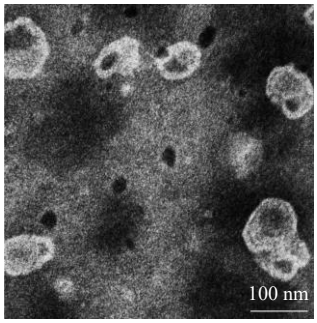


图 3　T7-Pod-Lip 的 TEM 图

Fig. 3　TEM image of a T7-Pod-Lip

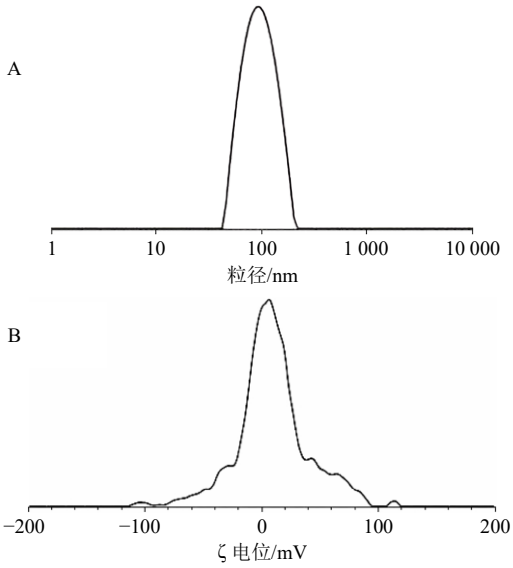


图 4　T7-Pod-Lip 的粒径分布（A）及 ζ 电位（B）

Fig. 4　Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of T7-Pod-Lip

2.6 体外释放考察

利用透析袋法考察脂质体的体外释放行为。分别取 2 mL 已知质量浓度的鬼臼毒素对照品溶液（20.00 μg/mL）、T7-Pod-Lip 于透析袋（截留相对分子质量为 8 000～14 000）中，加入 20 mL 的释放介质（包含有 10% FBS 的 PBS 溶液）中，将释放体系放入摇床中，于 37 ℃，100 r/min 低速振荡，分别于 0.5、2、4、6、12、24、48、72 h）取样 1 mL 释放介质，并及时补充 1 mL 新鲜的释放介质，加入等体积甲醇混匀，按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定，计算 T7-Pod-Lip 在各时间点的药物释放量。并根据如下公式计算体外释放率。结果如图 5 所示，游离鬼臼毒素在释放介质中快速释放，72 h 时，鬼臼毒素溶液的体外释放量为总药量的 90.24%；而 T7-Pod-Lip 稳定缓慢释放，72 h 时，T7-Pod-Lip 的体外释放量为总药量的 43.49%，表明 T7-Pod-Lip 具有一定的缓释作用。

体外释放率＝药物释放量/药物总量

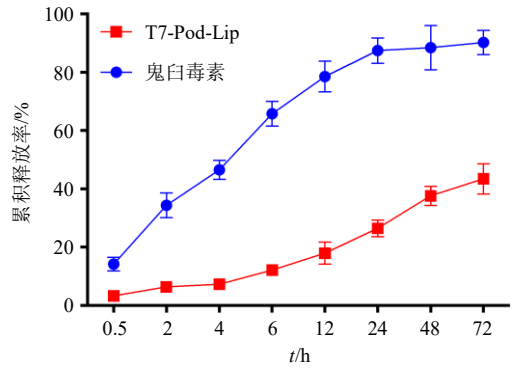


图 5 T7-Pod-Lip 和鬼臼毒素释放曲线（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 5 Release curves of T7-Pod-Lip and podophyllotoxin ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.7 脂质体稳定性考察

2.7.1 储藏稳定性 通过对脂质体在冷藏条件下的粒径、包封率以及渗漏率变化来评估其在低温环境中的稳定性。按最优处方工艺制备脂质体，置于 4 ℃下贮藏，并于 0、4、10、12、15 d 时间点取样进行包封率、渗漏率及粒径测定，按照如下公式计算包封率、渗漏率。

包封率＝W_t/W_0

渗漏率＝$(EE_0-EE_t)/EE_0$

W_0 为 0 d 时脂质体过膜前鬼臼毒素含量，W_t 为 4 ℃储存 t d 时脂质体过膜后鬼臼毒素含量，EE_0 为 0 d 时脂质体的包封率，EE_t 为 4 ℃储存 t d 时脂质体的包封率

储存 15 d 后，T7-Pod-Lip 溶液外观如图 6 所示，T7-Pod-Lip 溶液未出现明显变化，无沉淀产生。由表 3 可知脂质体粒径在冷藏 15 d 内变化较小，脂质体包封率及渗漏率未有显著变化，这表明其在低温环境下具有较好的稳定性。

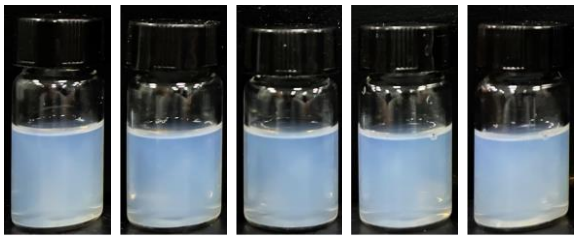


图 6 T7-Pod-Lip 溶液外观

Fig. 6 Appearance of T7-Pod-Lip solution

表 3 储藏稳定性试验（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 3 Storage stability test ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

储藏时间/d	包封率/%	粒径/nm	渗漏率/%
0	96.74±0.30	90.32±1.30	0
4	95.51±0.32	93.53±0.43	1.27
10	93.85±0.66	95.85±0.47	2.98
12	92.85±0.29	98.52±0.27	4.02
15	89.91±0.12	101.15±1.01	7.06

2.7.2 血清稳定性 将 T7-Pod-Lip 与等体积的含 10% FBS 的 PBS 溶液混合，于 37 ℃，100 r/min 孵育，分别于 0、2、4、6、12、24、48 h 取样，测定 T7-Pod-Lip 粒径及 PDI 值变化，考察其血清稳定性。结果如表 4 所示，在 48 h 内，T7-Pod-Lip 粒径及 PDI 值变化均较小，表明本研究所制备的 T7-Pod-Lip 具有较好的血清稳定性。

表 4 T7-Pod-Lip 的血清稳定性结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 4 Results of serum stability of T7-Pod-Lip ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

t/h	粒径/nm	PDI	t/h	粒径/nm	PDI
0	92.46±3.21	0.23±0.02	12	95.36±3.54	0.25±0.02
2	95.34±1.39	0.27±0.03	24	94.28±2.93	0.24±0.01
4	93.26±1.47	0.24±0.01	48	96.25±2.87	0.24±0.01
6	92.85±2.02	0.26±0.03			

2.8 脂质体体外摄取能力及跨越 BBB 能力考察

2.8.1 细胞培养 将 bEnd.3 细胞与 C6 细胞分别接种在含 10% FBS、1% P/S 的 DMEM 完全培养基中，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育。待细胞融合度达到 90%左右时，弃去培养液，加入 0.25%胰蛋白酶消化细胞 2 min，加入完全培养基使消化终止，将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中，1 500 r/min 离心（离心半径为 8.9 cm）3 min，吸去上清液，加入新鲜的

完全培养基使细胞悬浮，再分别转移至 2 个新的培养瓶中，将放于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中传代培养。

2.8.2　荧光显微镜观察脂质体的摄取能力　使用香豆素作为荧光探针代替脂质体内的药物来考察细胞对不同脂质体的摄取能力。将 bEnd.3 细胞/C6 细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种于 48 孔板中培养过夜，分别向各孔中加入 B-Lip、游离香豆素、Cou-Lip 和 T7-Cou-Lip，使各孔香豆素的终浓度为 2 μmol/L，孵育时间 2 h，以 B-Lip 作为对照，每个样品设置 3 个复孔。孵育结束后，弃去上清，用 PBS 洗涤 3 次。细胞采用 4%多聚甲醛固定 10 min，随后进行 3 次 PBS 洗涤。每个孔中添加 200 μL DAPI 染料进行核染色，染色时间为 15 min。随后进行 3 次 PBS 洗涤，最终通过观察各个孔中细胞的荧光强度进行实验结果的评估。C6 细胞处理同上述步骤。

结果如图 7 所示。在 bEnd.3 细胞对脂质体摄取能力考察中，B-Lip 组没有观察到香豆素荧光，游离香豆素组香豆素荧光十分微弱，T7-Cou-Lip 组香豆素荧光强度明显高于 Cou-Lip 组。在 C6 细胞对脂质体摄取能力的考察，B-Lip 组没有观察到香豆素荧光，游离香豆素组香豆素荧光强度也十分微弱，T7-Cou-Lip 组香豆素荧光强度较 Cou-Lip 组显著增强。使用 Image J 软件对图 7 中各组的荧光强度进行统计分析，使用 Graphpad-prism 8.0.2 软件对游离香豆素、Cou-Lip 与 T7-Cou-Lip 荧光摄取量进行方差分析，结果（表 5）发现，bEnd.3 细胞和 C6 细胞中的荧光摄取量顺序均为 B-Lip＜游离香豆素＜Cou-Lip＜T7-Cou-Lip。

2.8.3　荧光显微镜观察脂质体跨越 BBB 能力　bEnd.3 细胞在指数生长期时以 2×10^4 个/孔的密度培养于 Transwell 小室的上室中，将细胞在 37 ℃下孵育。待 bEnd.3 细胞与 Transwell 上室完全融合后，将 C6 细胞以 2×10^4 个/孔的密度接种到 Transwell 小室的下室中。待 bEnd.3 细胞生长成致密细胞层后，将含有 B-Lip、游离香豆素、Cou-Lip 和 T7-Cou-Lip 的新鲜 DMEM 培养基添加到 Transwell 小室的上室中，使得 Cou 的终浓度为每孔 2 μmol/L。37 ℃孵育 2 h 后，弃去培养基，用 PBS 洗涤 3 次。通过荧光显微镜对荧光强度进行分析。结果如图 8 所示，在 C6 细胞中，游离香豆素、Cou-Lip 和 T7-Cou-Lip 均可见绿色荧光，其中 T7-Cou-Lip 的荧光强度明显高于 Cou-Lip 和游离香豆素，表明 HAIYPRH 修饰增强了 Cou-Lip 穿过 BBB 的能力。使用 Image J 软

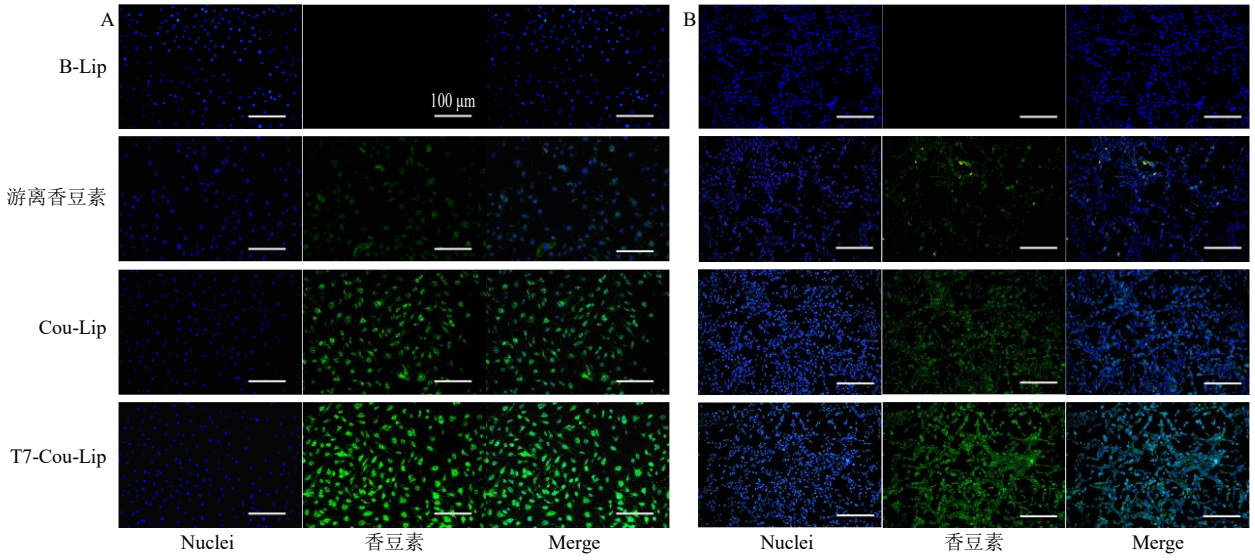


图 7　荧光显微镜观察 bEnd.3 细胞 (A) 和 C6 细胞 (B) 对不同脂质体的摄取能力

Fig. 7　Uptake of different liposomes by bEnd.3 cells (A) and C6 cells (B) was observed by fluorescence microscopy

表 5　bEnd.3 细胞和 C6 细胞对不同脂质体的摄取能力的量化分析 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5　Quantitative analysis of uptake fluorescence of different liposomes by bEnd.3 and C6 ells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ (μmol·L^{-1})	荧光强度	
		bEnd.3 细胞	C6 细胞
B-Lip	−	0	0
游离香豆素	2	33.33±11.68	18.14±7.24
Cou-Lip	2	186.33±13.01*	128.16±17.01*
T7-Cou-Lip	2	295.33±18.15$^{*\#}$	169.65±8.41$^{*\#}$

与游离香豆素组比较：$^{*}P<0.05$；与 Cou-Lip 组比较：$^{\#}P<0.05$。

$^{*}P<0.05$ *vs* free coumarin group; $^{\#}P<0.05$ *vs* Cou-Lip group.

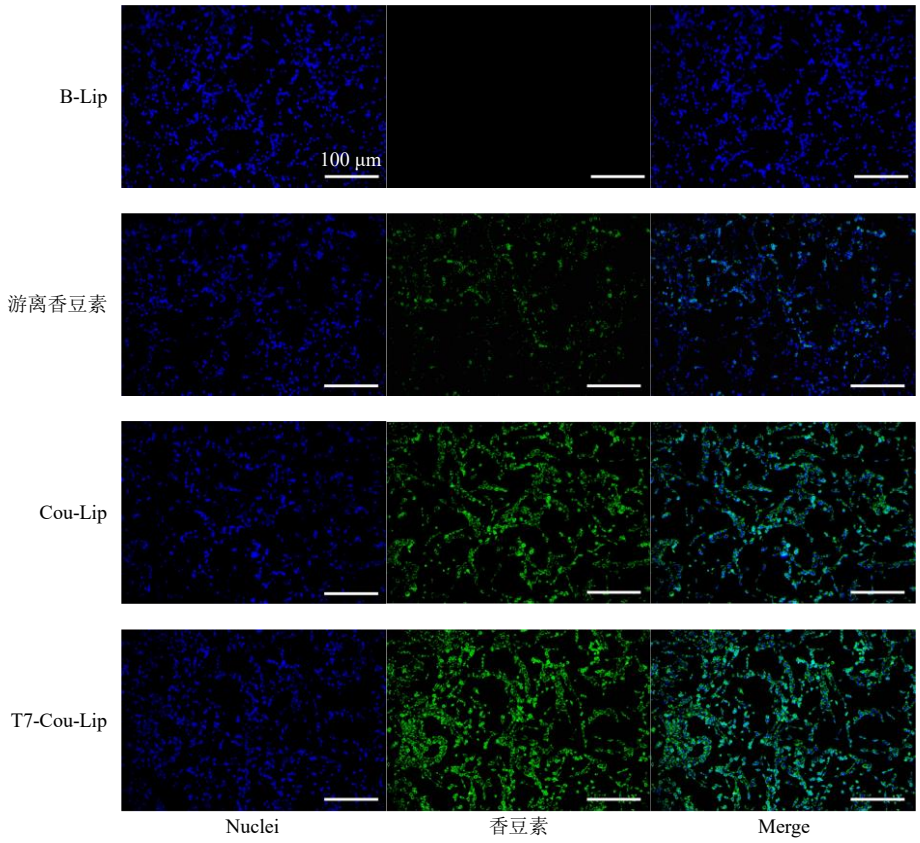


图 8　荧光显微镜观察不同脂质体跨越 BBB 能力

Fig. 8　Ability of different liposomes to cross BBB by fluorescence microscopy

件对图 8 中各组的荧光强度进行统计分析，使用 Graphpad-prism 8.0.2 软件对游离香豆素、Cou-Lip 与 T7-Cou-Lip 荧光摄取量进行方差分析，结果（表 6）发现，T7-Cou-Lip 摄取量明显高于游离香豆素组和 Cou-Lip 组（P＜0.05）。

2.8.4　流式细胞仪测定脂质体的摄取情况　将 bEnd.3 细胞/C6 细胞以 6×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板中培养过夜，分别向各孔中加入 B-Lip、游离香豆素、Cou-Lip 和 T7-Cou-Lip，使各孔香豆素的终浓度为 2 μmol/L，孵育时间 2 h，以 B-Lip 作为对照，每个样品设置 3 个复孔。孵育结束后，弃去上清，0.25%胰蛋白酶消化细胞 2 min，加入完全培养基使消化终止，收集细胞至 15 mL 离心管中，1 000 r/min 离心（离心半径为 6 cm）3 min，弃去上清液，加入 350 μL PBS 吹匀，过流式膜，上机检测。bEnd.3 细胞和 C6 细胞对各组脂质体的流式摄取曲线如图 9-A、B 所示。使用 FlowJo 软件对摄取量进行统计，使用 Graphpad-prism 8.0.2 软件对游离香豆素、Cou-Lip 与 T7-Cou-Lip 摄取量进行方差分析，结果（表 7）发现，bEnd.3 细胞和 C6 细胞中 T7-Cou-Lip 摄取强度明显强于 Cou-Lip 与游离香豆素（P＜0.05），结果与荧光显微镜结果一致。以上结果说明，经 HAIYPRH 修饰的脂质体能够增加 bEnd.3 细胞对药物的摄取能力，使得脂质体对 bEnd.3 细胞和 C6 细胞的靶向性增强。

表 6　不同脂质体跨越 BBB 的荧光信号的量化分析（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Table 6　Quantitative analysis of fluorescence signals of different liposomes to across BBB ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

组别	浓度/(μmol·L^{-1})	荧光强度
B-Lip	−	0
游离香豆素	2	33.33±11.68
Cou-Lip	2	186.33±13.01*
T7-Cou-Lip	2	295.33±18.15$^{*\#}$

与游离香豆素组比较：$^*P$＜0.05；与 Cou-Lip 组比较：$^\#P$＜0.05。

$^*P$ < 0.05 *vs* free coumarin group; $^\#P$ < 0.05 *vs* Cou-Lip group.

2.8.5　流式细胞仪测定脂质体跨越 BBB 能力　bEnd.3 细胞在指数生长期时以 6×10^5 个/孔的密度培养于 Transwell 小室的上室中，将细胞在 37 ℃下孵育。待 bEnd.3 细胞与 Transwell 上室完全融合后，将 C6 细胞以 6×10^5 个/孔的密度接种到 Transwell 小室的下室中。待 bEnd.3 细胞生长成致密细胞层后，将含有 B-Lip、游离香豆素、Cou-Lip 和 T7-Cou-

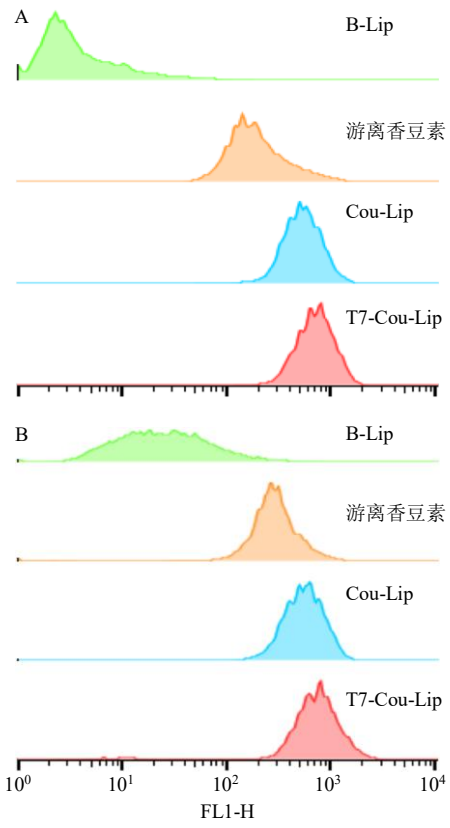


图 9　流式细胞仪检测 bEnd.3 细胞（A）和 C6 细胞（B）对不同脂质体的荧光摄取情况

Fig. 9　Fluorescence uptake of different liposomes by bEnd.3 cells (A) and C6 cells (B) was examined by flow cytometry

表 7　bEnd.3 细胞和 C6 细胞对不同脂质体的摄取荧光的量化分析（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 7　Quantitative analysis of uptake fluorescence of different liposomes by bEnd.3 and C6 ells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/(μmol·L^{-1})	荧光强度	
		bEnd.3 细胞	C6 细胞
B-Lip	−	20.24±20.25	50.20±16.08
游离香豆素	2	202.33±49.22	407.38±61.33
Cou-Lip	2	539.00±51.74*	645.16±103.36*
T7-Cou-Lip	2	707.33±28.85$^{*\#}$	799.40±90.36$^{*\#}$

与游离香豆素组比较：$^{*}P<0.05$；与 Cou-Lip 组比较：$^{\#}P<0.05$。

$^{*}P < 0.05$ *vs* free coumarin group; $^{\#}P < 0.05$ *vs* Cou-Lip group.

Lip 的新鲜 DMEM 培养基添加到 Transwell 小室的上室中，使得香豆素的终浓度为每孔 2 μmol/L。37 ℃孵育 2 h 后，弃去培养基，其余操作同“2.8.4”项下。各组脂质体跨越 BBB 能力的流式摄取曲线如图 10 所示。使用 FlowJo 软件对各组摄取量进行统计，使用 Graphpad-prism 8.0.2 软件对游离香豆素、Cou-Lip 与 T7-Cou-Lip 摄取量进行方差分析，结果（表 8）发现，T7-Cou-Lip 摄取量明显强于 Cou-Lip 与游离香豆素（$P<0.05$），与荧光显微镜结果一致。以上结果表明经过 HAIYPRH 修饰，脂质体能够提高药物跨越 BBB 的能力。

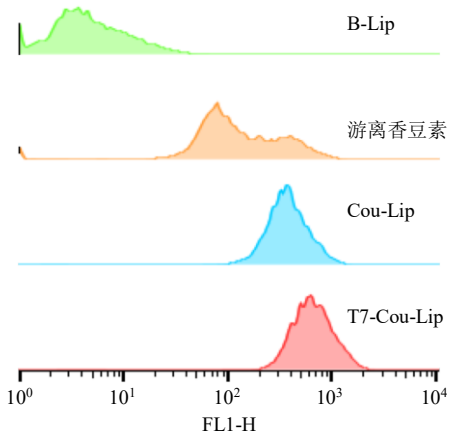


图 10　流式细胞仪检测不同脂质体跨越 BBB 能力

Fig. 10　Ability of different liposomes to cross BBB was measured by flow cytometry

表 8　不同脂质体跨越 BBB 的荧光信号的量化分析（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 8　Quantitative analysis of fluorescence signals of different liposomes to across BBB ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/(μmol·L^{-1})	荧光强度
B-Lip	−	14.25±10.25
游离香豆素	2	215.67±27.43
Cou-Lip	2	383.67±9.07*
T7-Cou-Lip	2	690.00±13.08$^{*\#}$

与游离香豆素组比较：$^{*}P<0.05$；与 Cou-Lip 组比较：$^{\#}P<0.05$。

$^{*}P < 0.05$ *vs* free coumarin group; $^{\#}P < 0.05$ *vs* Cou-Lip group.

2.9　体内靶向性实验

2.9.1　模型的建立　每组随机选取 3 只云南昆明小鼠，ip 戊巴比妥钠麻醉小鼠后将其固定在脑立体定向仪上，沿着正中矢状线纵向切开头皮，暴露颅骨，使用牙科牙钻进行钻孔，使用微量注射器吸 3 μL C6 细胞（2×10^5 个细胞）悬液注射，然后缝合伤口。

2.9.2　体内成像观察　使用荧光探针 DiR 代替脂质体中的药物，制备方法同“2.1”项下，考察不同时间点脂质体在小鼠的体内分布。各组小鼠分别 iv 生理盐水、游离 DiR、DiR-Lip、HAIYPRH-DiR-Lip。采用活体成像系统在不同时间点（0、6、12、24、48 h）对小鼠进行活体成像分析。如图 11 所示，生理盐水组没有检测到荧光信号，游离 DiR 组荧光在 12 h 内逐渐衰减，而 DiR-Lip 和 HAIYPRH-DiR-Lip 组的大脑中均观察到明显的荧光信号。在 48 h 内，

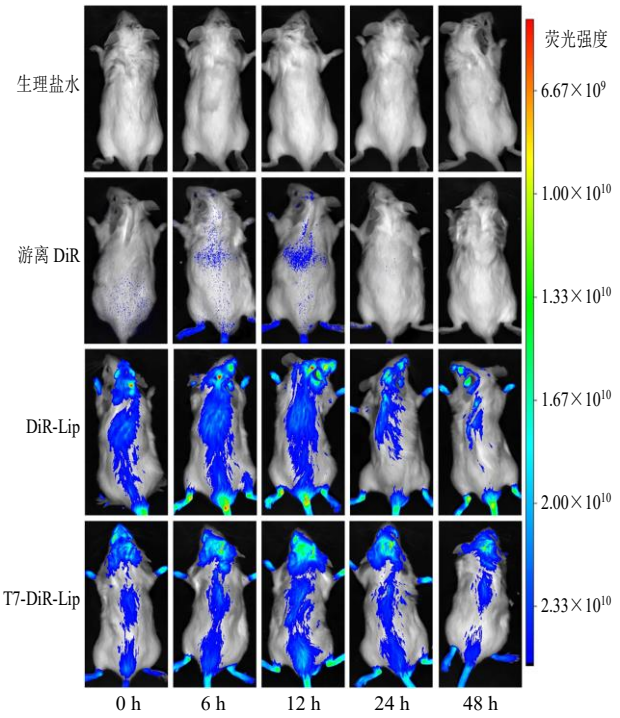


图 11　小鼠的实时成像观察

Fig. 11　Real-time imaging observation of mice

随着时间的推移，DiR-Lip 和 HAIYPRH-DiR-Lip 组的荧光强度都有不同程度的下降，但 HAIYPRH-DiR-Lip 组的荧光强度大于 DiR-Lip 组，这说明经过 HAIYPRH 修饰后，可有效提高药物在脑组织中积蓄。

3　讨论

GBM 是一种在中枢神经系统内发生的恶性肿瘤，在医学领域，GBM 的治疗一直是一个具有挑战性的课题，尤其是在其与 BBB 之间的相互作用下，治疗难度更加显著[17]。BBB 作为保护性屏障，阻止了血液中有害物质进入脑部，但同时也限制了药物的进入，导致了 GBM 治疗的困难[18]。研究发现鬼臼毒素有显著的抗肿瘤活性，但是由于其水溶性差、副作用强、难以跨越 BBB 限制了其应用，导致药物进入脑组织中的实际浓度显著降低，导致治疗效果不佳[19]。HAIYPRH 作为一种转铁蛋白受体结合肽，与在 BBB 和 GBM 细胞上均过度表达的 TfR 有很高亲和力，这有助于提高鬼臼毒素的传递效率，从而增强药物的治疗效果[20-21]。综上所述，本研究采用表面修饰 HAIYPRH 的脂质体包裹鬼臼毒素制成一种靶向制剂，用以提高 GBM 的治疗效果。

本研究采用 BBD-RSM 对 T7-Pod-Lip 的处方进行优化，最终得到最佳处方工艺：EPC 34 mg、胆固醇 6 mg、鬼臼毒素 1 mg、DSPE-PEG_{2000} 2 mg、DSPE-PEG_{2000}-HAIYPRH 1 mg、超声功率 630 W。按照最佳处方工艺制备的脂质体中，鬼臼毒素的平均包封率为（96.56±0.44）%，符合《中国药典》2020 年版关于包封率的要求[22]。此外，通过储藏稳定性与血清稳定性考察发现 T7-Pod-Lip 具有良好的稳定性。由于鬼臼毒素本身不具备荧光性，无法通过荧光显微镜观察 bEnd.3 细胞和 C6 细胞对制剂的摄取情况。因此，选择具有绿色荧光的香豆素作为荧光探针观察不同制剂对 bEnd.3 和 C6 细胞的摄取能力。以评价其体外靶向性[23]。

BBB 主要由脑微血管内皮细胞构成，与 C6 细胞表面均高表达转铁蛋白受体（transferrin receptor，TfR），在脂质体表面修饰 TfR 特异性配体 HAIYPRH 可以利用受体与配体介导的特异性内吞作用，促进脂质体跨越 BBB，从而实现脑靶向能力，这是目前已经被证实可以显著提高药物在脑内积蓄的策略之一[24]。本研究结果表明，T7-Cou-Lip 在 bEnd.3 细胞和 C6 细胞内的荧光强度明显超过了未经修饰的 Cou-Lip；同时，体外跨 BBB 实验结果显示 HAIYPRH 修饰脂质体体外 BBB 渗透能力高于未修饰脂质体。以上结果表明在脂质体表面上修饰 HAIYPRH 可通过受体内吞机制促进药物跨越 BBB，实现主动脑靶向作用。

为了观察不同配方脂质体制剂在体内的实时分布，使用无创光学成像系统捕获小鼠的实时图像。由于添加 DSPE-PEG_{2000} 后，脂质体表面形成了亲水屏障，增加了脂质体的柔韧性和亲水性，逃避了网状内皮系统（reticuloendothelial system，RES）对脂质体的识别和摄取，从而延长脂质体在体内的循环时间[25-26]。且经 HAIYPRH 修饰后，脂质体增加了在脑组织中的积累，实现了药物的主动靶向作用。

综上所述，本实验成功制备了 T7-Pod-Lip，并通过 BBD-RSM 确定了脂质体的最优处方工艺，经验证包封率在 90%以上。按照最优处方制得的脂质体粒径较小，且 15 d 内稳定性良好。通过体外跨越 BBB 能力以及体内活体成像结果得知，靶向材料 HAIYPRH 修饰在脂质体表面，明显提高了脂质体跨越 BBB 的能力和在脑组织的分布，解决了药物不能有效到达病变部位的问题，为后续开展脑部疾病的研究和治疗奠定了基础。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1]　Chandrasekar G, Bansal V S, Panigrahi M, *et al*. An

overview of targets and therapies for glioblastoma multiforme [J]. *J Cancer Res Ther*, 2022, 18(3): 591-598.

[2] Kumari S, Gupta R, Ambasta R K, *et al*. Multiple therapeutic approaches of glioblastoma multiforme: From terminal to therapy [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(4): 188913.

[3] Chavda V, Patel V, Yadav D, *et al*. Therapeutics and research related to glioblastoma: Advancements and future targets [J]. *Curr Drug Metab*, 2020, 21(3): 186-198.

[4] Hempel C, Johnsen K B, Kostrikov S, *et al*. Brain tumor vessels-a barrier for drug delivery [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, 39(3): 959-968.

[5] Wang Z L, Peet N P, Zhang P, *et al*. Current development of glioblastoma therapeutic agents [J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20(9): 1521-1532.

[6] 魏秋红, 刘晓月, 王盼, 等. 抗肿瘤药物的分类和药效学研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(18): 3707-3711.

[7] Lyne S B, Yamini B. An alternative pipeline for glioblastoma therapeutics: A systematic review of drug repurposing in glioblastoma [J]. *Cancers*, 2021, 13(8): 1953.

[8] Sk U H, Dixit D, Sen E. Comparative study of microtubule inhibitors: Estramustine and natural podophyllotoxin conjugated PAMAM dendrimer on glioma cell proliferation [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 68: 47-57.

[9] 谷丽艳, 孙朝渭, 董禹何, 等. 活性氧响应型透明质酸修饰的鬼臼毒素纳米胶束的处方优化与体外评价 [J]. 中草药, 2024, 55(22): 7663-7673.

[10] 王耿焕, 沈和平, 金成胜, 等. 鬼臼毒素聚合物胶团对人胶质瘤细胞的抑制作用 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(10): 1248-1251.

[11] 李珊珊. 鬼臼毒素小分子前药的抗肿瘤活性研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2021.

[12] Huang W, Chen L Q, Kang L, *et al*. Nanomedicine-based combination anticancer therapy between nucleic acids and small-molecular drugs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 115: 82-97.

[13] 张曼玉, 楼晨曦, 曹傲能. 主动靶向载药脂质体在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 生物医学工程学杂志, 2022, 39(3): 633-638.

[14] Su J, Yao Z P, Chen Z X, *et al*. TfR aptamer enhanced blood-brain barrier penetration of biomimetic nano complexes for intracellular transglutaminase 2 imaging and silencing in glioma [J]. *Small*, 2022, 18(40): e2203448.

[15] Tang J J, Wang Q T, Yu Q W, *et al*. A stabilized retro-inverso peptide ligand of transferrin receptor for enhanced liposome-based hepatocellular carcinoma-targeted drug delivery [J]. *Acta Biomater*, 2019, 83: 379-389.

[16] 李学涛, 王为, 符敏, 等. 穿膜肽修饰表阿霉素与五味子乙素脂质体的处方优选及细胞毒性评价 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(1): 8-11.

[17] Hills K E, Kostarelos K, Wykes R C. Converging mechanisms of epileptogenesis and their insight in glioblastoma [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 903115.

[18] Luissint A C, Artus C, Glacial F, *et al*. Tight junctions at the blood brain barrier: Physiological architecture and disease-associated dysregulation [J]. *Fluids Barriers CNS*, 2012, 9(1): 23.

[19] Cheng X B, Yu P, Zhou X, *et al*. Enhanced tumor homing of pathogen-mimicking liposomes driven by R848 stimulation: A new platform for synergistic oncology therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(2): 924-938.

[20] Li S Y, Wang R X, Li J F, *et al*. Revealing the dynamic mechanism by which transferrin promotes the cellular uptake of HAIYPRH peptide-conjugated nanostructures by force tracing [J]. *Mol Pharm*, 2021, 18(3): 1480-1485.

[21] Ramalho M J, Loureiro J A, Coelho M A N, *et al*. Transferrin receptor-targeted nanocarriers: Overcoming barriers to treat glioblastoma [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(2): 279.

[22] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 474-476.

[23] Sun X Y, Liu T, Sun J, *et al*. Synthesis and application of coumarin fluorescence probes [J]. *RSC Adv*, 2020, 10(18): 10826-10847.

[24] Han L, Jiang C. Evolution of blood-brain barrier in brain diseases and related systemic nanoscale brain-targeting drug delivery strategies [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(8): 2306-2325.

[25] Tang Y X, Wang X Y, Li J, *et al*. Overcoming the reticuloendothelial system barrier to drug delivery with a “don’t-eat-us” strategy [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(11): 13015-13026.

[26] Kanamala M, Palmer B D, Ghandehari H, *et al*. PEG-benzaldehyde-hydrazone-lipid based PEG-sheddable pH-sensitive liposomes: Abilities for endosomal escape and long circulation [J]. *Pharm Res*, 2018, 35(8): 154.

[责任编辑 郑礼胜]