

灵芝酸 A 脂质体的制备及其体外抗肿瘤活性研究

周歆喻^{1,2}, 夏斐², 邱崇^{2*}, 王继刚^{1,2*}

1. 广西医科大学公共卫生学院, 广西 南宁 530021

2. 中国中医科学院 中药研究所青蒿素研究中心, 北京 100700

摘要: **目的** 通过处方优化构建稳定性高、包封率优的灵芝酸 A 脂质体 (ganoderic acid A liposomes, GA-Lips), 并评价其细胞摄取效率及体外抗肿瘤效应。**方法** 采用薄膜分散法制备 GA-Lips, 通过调控药物、卵磷脂和胆固醇比例进行处方优化, 并开展粒径、 ζ 电位及透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 进行形貌表征。利用超滤离心法考察 GA-Lips 体外释放, 结合介质稳定性、稀释稳定性和长期稳定性评估 GA-Lips 制剂稳定性。通过溶血实验评价血液相容性; 采用共聚焦显微镜与流式细胞术分析细胞摄取行为; 以 CCK-8 法测定体外抗增殖作用, 并采用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** 优化后的 GA-Lips 粒径为 (74.52 ± 1.00) nm、PDI 为 0.26 ± 0.01 、 ζ 电位为 (-46.75 ± 1.61) mV, 形貌均一。制剂呈缓释特性, 在多种介质环境与稀释梯度下均保持良好稳定性, 无显著溶血。GA-Lips 显著提高 HepG2 肿瘤细胞的摄取水平, 共聚焦显微镜及流式细胞术均得到验证。CCK-8 结果显示, GA-Lips 对 HepG2 细胞有显著的细胞毒性; 流式分析表明, GA-Lips 明显提高 HepG2 细胞凋亡比例。**结论** 处方优化构建的 GA-Lips 具有良好稳定性和安全性, 可显著提升灵芝酸 A 的细胞摄取与体外抗肿瘤活性, 为其进一步机制研究及纳米递药系统开发提供实验依据。

关键词: 灵芝酸 A; 脂质体; 薄膜分散法; 处方优化; 抗肿瘤活性; 纳米递药系统

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)08-3061-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.08.019

Preparation of ganoderic acid A liposomes and *in vitro* antitumor activity study

ZHOU Xinyu^{1,2}, XIA Fei², QIU Chong², WANG Jigang^{1,2}

1. School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Artemisinin Research Center, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To develop formulation-optimized ganoderic acid A liposomes (GA-Lips) with improved stability and high encapsulation efficiency, and to evaluate their cellular uptake efficiency and *in vitro* antitumor activity. **Methods** GA-Lips were prepared using the thin-film hydration method, and formulation parameters were optimized by varying the ratios of GAA, phospholipids, and cholesterol. Particle size, ζ potential, and morphology were characterized. *In vitro* drug release and formulation stability were evaluated under different media, dilution, and storage conditions. Hemocompatibility was assessed by hemolysis assays. Cellular uptake efficiency was examined using confocal laser scanning microscopy and flow cytometry. Antiproliferative effects and apoptosis induction in HepG2 cells were analyzed using CCK-8 and Annexin V-FITC/PI assays, respectively. **Results** The optimized GA-Lips exhibited a uniform spherical morphology with a mean particle size of (74.52 ± 1.00) nm, a PDI of 0.26 ± 0.01 , and a ζ potential of (-46.75 ± 1.61) mV. The formulation showed sustained drug release, excellent stability under various test conditions, and negligible hemolytic activity. GA-Lips significantly enhanced cellular uptake efficiency in HepG2 cells compared with free GAA. Moreover, GA-Lips exhibited pronounced cytotoxic effects and markedly increased apoptosis induction. **Conclusion** The optimized GA-Lips demonstrated favorable stability and hemocompatibility, effectively enhancing the cellular uptake efficiency and *in vitro* antitumor efficacy of GAA. These results support the potential of GA-Lips as a promising nanocarrier system for ganoderic acid A and

收稿日期: 2025-12-03

基金项目: 中国科协青年托举工程人才项目 (YESS20240482)

作者简介: 周歆喻, 硕士研究生, 研究方向为流行病学与卫生统计学。E-mail: 18776739339@163.com

*通信作者: 王继刚, 博士, 研究员, 从事中药药理学研究。E-mail: jgwang@icmm.ac.cn

邱崇, 博士, 研究员, 从事中药制剂学研究。E-mail: cqiu@icmm.ac.cn

provide a foundation for further *in vivo* and mechanistic studies.

Key words: ganoderic acid A; liposomes; thin-film dispersion; formulation optimization; antitumor activity; nanocarrier system

灵芝酸 A (ganoderic acid A, GAA) 是存在于多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 中的三萜类天然产物^[1], 具有明确的抗肿瘤^[2-3]、抗炎^[4]及免疫调节活性^[5], 尤其在肝癌^[6-7]、乳腺癌^[8]及肺癌^[9]等多种肿瘤模型中表现出细胞增殖抑制、凋亡诱导和转移抑制等潜在药效^[10-11]。然而, 灵芝酸 A 本身存在水溶性差、膜通透性低、稳定性不足等理化缺陷^[12-13], 导致其在体外研究中生物利用度有限, 难以获得理想作用强度, 也限制了其作为候选抗肿瘤化合物的进一步开发^[14]。

纳米递送系统 (nanocarriers) 为改善天然产物的递送性能提供了有效策略^[15], 其中, 脂质体 (liposomes) 因其生物相容性好、可包封疏水性药物、能够提高药物稳定性和细胞摄取效率^[16], 而被广泛应用于抗肿瘤药物递送^[17]。已有研究表明, 通过脂质体包封疏水性天然产物^[18], 可显著提升其溶解度、改善细胞摄取途径并实现缓释效果^[19], 从而增强体外药效及安全性。但目前, 针对灵芝酸 A 的脂质体制剂研究较少, 缺乏系统的处方优化、结构与理化性质表征, 以及体外抗肿瘤效应的整合性评价研究。基于此, 本研究以薄膜分散法构建灵芝酸 A 脂质体 (ganoderic acid A liposomes, GA-Lips), 通过调节药物、卵磷脂与胆固醇比例进行处方优化, 并对优化后制剂的粒径、 ζ 电位及形貌进行系统表征。在此基础上, 通过体外释放、介质稳定性及稀释稳定性实验全面评价制剂稳定性, 并以溶血实验验证其血液相容性。进一步地, 采用激光共聚焦显微镜和流式细胞术联合分析脂质体的细胞摄取效率; 利用 CCK-8 实验评估其体外抗肿瘤活性, 并通过 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡流式实验探讨其诱导肿瘤细胞凋亡的能力。通过上述研究, 旨在提升灵芝酸 A 的递送效率, 增强其体外抗肿瘤作用, 为该天然产物的纳米制剂开发与机制研究提供新的思路与实验基础。相较于传统游离药物递送模式, 本研究构建的脂质体递送系统可显著改善灵芝酸 A 的稳定性与细胞靶向性, 为中药活性成分的高效递送提供了可借鉴的制剂技术方案。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Nano Drop One 型紫外-可见分光光度计, 美国

赛默飞世尔科技有限公司; KQ5200E 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Zetasizer Nano ZS 型粒度分析仪, 英国马尔文帕纳科有限公司; R206D 型旋转蒸发仪, 上海申生科技有限公司; Dragonfly 200 型高分辨连续光谱激光共聚焦显微镜, 英国 ANDOR 科技有限公司; Cyto Flex 型流式细胞仪, 美国贝克曼库尔特有限公司; UFC501096 型超滤离心管, 截留相对分子质量 10 000, 美国 Millipore 公司; JEM-1230 型透射式电子显微镜, 日本电子株式会社。

1.2 药品与试剂

对照品灵芝酸 A, 批号 C81907622, 质量分数 98%, 购自南京春秋生物工程有限公司; 卵磷脂, 批号 A422416-0100, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 胆固醇, 批号 C40110, 购自艾伟拓 (上海) 医药科技有限公司; 香豆素 6 (coumarin 6, C6), 货号 38215-36-0, 购自美国 Med Chemexpress 生物科技公司。

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒, 货号 E-CK-A211, 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; DMEM 高糖培养基 (货号 MA0212)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 货号 MA0015)、RPMI-1640 培养基 (货号 MA0215)、CCK-8 试剂 (货号 MA0225), 购自大连美仑生物技术有限公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 货号 A5256701, 购自美国赛默飞世尔科技公司。

2 方法与结果

2.1 GA-Lips 的制备

采用薄膜分散法^[20]制备脂质体。将灵芝酸 A、卵磷脂、胆固醇按预定浓度溶解于无水乙醇中, 按照预定比例, 依次加入后超声辅助使各组分完全混合, 并转移至 25 mL 圆底烧瓶中, 加入适量的无水乙醇, 在 40 °C 和 100 r/min 的条件下旋转蒸发, 以除去有机溶剂, 并在烧瓶内壁形成均匀连续的脂质薄膜。待薄膜完全形成后, 加入等量双蒸水, 并在额定超声功率 (200 W) 条件下处理 2 min, 使脂质薄膜充分水化并脱落, 获得脂质体混悬液。脂质体混悬液, 即可得到 GA-Lips, 于 4 °C 下保存。

载体空白脂质体 (blank liposomes, B-Lips) 的制备方法与 GA-Lips 相同, 但不加入灵芝酸 A。

2.2 灵芝酸 A 体外分析方法的建立

2.2.1 检测波长的确定 参照参考文献方法^[21], 选择灵芝酸 A 的检测波长为 252 nm。

2.2.2 线性关系考察 称取适量灵芝酸 A 对照品, 溶于无水乙醇中配制成 1.250 mmol/L 的母液, 随后用无水乙醇将该母液梯度稀释, 得到 0.625、0.313、0.156、0.078 mmol/L 的灵芝酸 A 对照品溶液。在 252 nm 波长处测其吸光度 (A) 值。以灵芝酸 A 浓度为横坐标 (X)、 A 值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=11.724 X$, $R^2=0.9996$, 结果表明灵芝酸 A 在 0.078~1.250 mmol/L 线性关系良好。

2.2.3 精密度考察 取灵芝酸 A 对照品储备液, 用无水乙醇分别稀释为高 (1.250 mmol/L)、中 (0.625 mmol/L)、低 (0.313 mmol/L) 3 个浓度溶液, 在 252 nm 波长处连续测定 6 次 A 值, 计算其 RSD 以考察仪器精密度。结果显示, 3 个浓度溶液 A 值的 RSD 分别为 0.86%、0.94%、1.02%, 表明该方法具有良好的精密度。

2.2.4 稳定性考察 取 GA-Lips 溶液, 在室温条件下分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 在 252 nm 波长处测定其 A 值, 并根据标准曲线计算浓度, 计算其 RSD 值。结果表明 A 值的 RSD 为 1.18%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 重复性考察 平行制备 6 份 GA-Lips 溶液, 在 252 nm 波长处测定其 A 值, 并根据标准曲线计算浓度。结果计算得到灵芝酸 A 浓度的 RSD 为 1.05%, 表明该方法重复性良好。

2.2.6 加样回收率考察 精密吸取 B-Lips 溶液 0.1 mL, 置于 1 mL 离心管中, 分别加入一定量灵芝酸 A 对照品溶液, 使其最终浓度为高 (1.250 mmol/L)、中 (0.625 mmol/L)、低 (0.313 mmol/L) 3 个水平, 每个浓度平行制备 3 份。混匀后在 252 nm 波长处测定其 A 值, 并根据标准曲线计算浓度, 进一步计算加样回收率。结果表明, 灵芝酸 A 在高、中、低 3 个浓度水平下的平均加样回收率分别为 100.92%、99.84%、101.15%, RSD 分别为 1.18%、1.26%、1.34%, 表明该方法准确度良好, 符合检测要求。

2.3 包封率、载药量、粒径、PDI 及 ζ 电位的测定

2.3.1 包封率、载药量的测定 将 GA-Lips 取 100 μ L, 加入截留相对分子质量为 10 000 的超滤离心管中, 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 5 min。滤液即为游离灵芝酸 A 溶液, 收集其体积 ($V_{\text{游离}}$)。取滤液经适

当稀释后, 用紫外-可见分光光度计在 252 nm 处测定 A 值, 代入标准曲线方程 $Y=11.724 X$ 计算游离药物质量浓度 ($C_{\text{游离}}$)。

$$\text{包封率}=(W_{\text{总}}-C_{\text{游离}}V_{\text{游离}})/W_{\text{总}}$$

$$\text{载药量}=(W_{\text{总}}-C_{\text{游离}}V_{\text{游离}})/W_{\text{纳米粒}}$$

$W_{\text{总}}$ 为初始投药量, $C_{\text{游离}}$ 为游离药物质量浓度, $V_{\text{游离}}$ 为滤液体积, $W_{\text{纳米粒}}$ 为纳米粒干质量

2.3.2 粒径及 ζ 电位的测定 取 GA-Lips 制剂 70 μ L 置于粒径样品池中, 采用 Zetasizer nano ZS 型粒度分析仪测定粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI); 再取 GA-Lips 70 μ L, 采用双蒸水稀释后, 混匀, 置于 ζ 电位样品池中, 采用 Zetasizer nano ZS 型粒度分析仪测定 ζ 电位, 每份样品重复测定 3 次。

2.4 单因素考察 GA-Lips 处方工艺

为优化 GA-Lips 的制备工艺, 以包封率、载药量、粒径、PDI 及 ζ 电位为评价指标, 分别考察胆脂比、药脂比、水化温度及超声时间对脂质体的影响。各组分按设定比例进行相应调整。每组处方均独立制备 3 批脂质体样品, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n=3$)。

2.4.1 胆固醇与卵磷脂质量比 (胆脂比) 考察 固定处方中灵芝酸 A (2.5 mmol/L)、卵磷脂 (50.0 mmol/L), 仅调整胆脂比分别为 1:3、1:4、1:5、1:8、1:10、1:20, 制备 GA-Lips, 以包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位作为考察指标对其进行评价, 结果见表 1。本研究以胆脂比 1:4 组为参照, 经独立样本 t 检验后, 在不同胆脂比条件下制备的 GA-Lips 在包封率、载药量、粒径、PDI 及 ζ 电位等指标上均表现出一定差异。综合考虑各评价参数, 当胆脂比为 1:4 时, GA-Lips 表现出相对较高的包封率、合适的粒径与分布 (PDI 较小), 同时 ζ 电位绝对值较大, 体系分散性与稳定性较为理想。因此, 以 1:4 胆脂比作为后续工艺优化与性能研究的参考制备条件。

2.4.2 灵芝酸 A 与卵磷脂质量比 (药脂比) 考察 固定处方中卵磷脂 (50.0 mmol/L)、胆固醇 (12.5 mmol/L) 的用量, 仅调整药脂比分别为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35, 制备 GA-Lips, 以包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位作为考察指标对其进行评价, 结果见表 2。本研究以药脂比 1:20 组为参照, 经独立样本 t 检验后, 在不同药脂比条件下制备的 GA-Lips 在包封率、载药量、粒径、PDI 及 ζ 电位等指标上均表现出一定差异。综合考

表1 胆脂比对 GA-Lips 包封率、载药量、粒径、PDI、ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Investigation on effects of bile to lipid ratio on encapsulation efficiency, drug loading, particle size, PDI, and ζ potential of GA-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胆脂比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
1 : 3	76.87 ± 0.64***	2.15 ± 0.02***	49.50 ± 0.4***	0.31 ± 0.01*	-30.97 ± 3.15**
1 : 4	82.61 ± 0.24	2.39 ± 0.01	60.94 ± 0.15	0.28 ± 0.01	-48.30 ± 1.49
1 : 5	77.04 ± 0.71***	2.28 ± 0.02**	48.54 ± 0.52***	0.31 ± 0.00*	-35.40 ± 3.39**
1 : 8	79.09 ± 0.24***	2.42 ± 0.01*	88.23 ± 0.65***	0.28 ± 0.01	-41.13 ± 3.61*
1 : 10	78.12 ± 0.55***	2.42 ± 0.02	85.95 ± 0.24***	0.28 ± 0.01	-35.93 ± 2.25*
1 : 20	67.18 ± 0.24***	2.13 ± 0.01***	459.57 ± 15.59***	0.98 ± 0.04***	-54.20 ± 1.44*

与胆脂比 1 : 4 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs bile to lipid ratio 1 : 4.

表2 药脂比对 GA-Lips 包封率、载药量、粒径、PDI、ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Investigation on effects of drug-to-lipid ratio on encapsulation efficiency, drug loading, particle size, PDI, and ζ potential of GA-Lip ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药脂比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
1 : 10	76.56 ± 0.69***	4.31 ± 0.04***	85.84 ± 1.44***	0.30 ± 0.04	-32.93 ± 0.31**
1 : 15	75.53 ± 0.26***	2.88 ± 0.01***	90.65 ± 1.75***	0.28 ± 0.01	-28.23 ± 2.31*
1 : 20	82.25 ± 0.23	2.38 ± 0.01	71.65 ± 0.39	0.29 ± 0.01	-20.77 ± 2.30
1 : 25	76.77 ± 0.45***	1.79 ± 0.01***	77.09 ± 1.23*	0.29 ± 0.00	-16.50 ± 1.97
1 : 30	77.43 ± 0.45***	1.51 ± 0.01***	127.60 ± 1.55***	0.29 ± 0.01	-36.43 ± 1.26***
1 : 35	80.55 ± 0.17**	1.35 ± 0.00***	91.06 ± 0.55***	0.28 ± 0.00	-20.40 ± 0.85

与药脂比 1 : 20 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs drug to lipid ratio 1 : 20.

虑各评价参数,当药脂比为 1 : 20 时,GA-Lips 表现出相对较高的包封率、合适的粒径与分布(PDI 较小),同时 ζ 电位绝对值较大,体系分散性与稳定性较为理想。因此,以 1 : 20 药脂比作为后续工艺优化与性能研究的参考制备条件。

2.4.3 水化温度考察固定 固定处方中灵芝酸 A (2.5 mmol/L)、卵磷脂 (50.0 mmol/L)、胆固醇 (12.5 mmol/L) 的用量,仅调整水化温度分别为 30、35、40、45、50、55 °C,制备 GA-Lips,以包封率、载药量、粒径、PDI、ζ 电位作为考察指标对其进行评

价,结果见表 3。本研究以水化温度 45 °C 组为参照,经独立样本 *t* 检验后,在不同水化温度下制备的 GA-Lips 在包封率、载药量、粒径、PDI 及 ζ 电位等指标上均表现出一定差异。综合考虑各评价参数,当水化温度 45 °C 时,GA-Lips 表现出相对较高的包封率、合适的粒径与分布 (PDI 较小),同时 ζ 电位绝对值较大,体系分散性与稳定性较为理想。因此,以水化温度 45 °C 作为后续工艺优化与性能研究的参考制备条件。

2.4.4 超声时间考察固定 固定处方中灵芝酸 A

表3 水化温度对 GA-Lips 包封率、载药量、粒径、PDI、ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Investigation on effect of hydration temperature on encapsulation efficiency, drug loading, particle size, PDI, and ζ potential of GA-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化温度/°C	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
30	82.32 ± 0.28	2.38 ± 0.00	74.79 ± 1.20	0.27 ± 0.01	-43.20 ± 2.10***
35	83.23 ± 0.49	2.41 ± 0.01	77.67 ± 2.27	0.29 ± 0.00	-44.07 ± 1.21***
40	84.03 ± 0.48**	2.43 ± 0.01**	79.54 ± 1.47*	0.28 ± 0.00	-17.57 ± 1.07**
45	82.50 ± 0.17	2.39 ± 0.00	75.11 ± 1.73	0.28 ± 0.00	-23.30 ± 1.06
50	83.18 ± 0.89	2.41 ± 0.03	86.84 ± 2.20*	0.28 ± 0.01	-9.98 ± 1.16***
55	82.21 ± 0.27	2.38 ± 0.01	93.41 ± 0.74***	0.27 ± 0.01	-24.37 ± 1.37

与水化温度 45 °C 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs hydration temperature 45 °C.

(2.5 mmol/L)、卵磷脂 (50 mmol/L)、胆固醇 (12.5 mmol/L) 的用量, 水化温度为 45 °C, 仅调整超声时间分别为 2、4、6、8、10、12 min, 制备 GA-Lips, 以包封率、载药量、粒径、PDI、ζ 电位作为考察指标对其进行评价, 结果见表 4。本研究以超声时间 4 min 组为参照, 经独立样本 *t* 检验后, 在不同超声时间下制备的 GA-Lips 在包封率、载药量、粒径、

PDI 及 ζ 电位等指标上均表现出一定差异。综合考虑各评价参数, 当超声时间 4 min 时, GA-Lips 表现出相对较高的包封率、合适的粒径与分布 (PDI 较小), 同时 ζ 电位绝对值较大, 体系分散性与稳定性较为理想。因此, 以超声时间 4 min 作为灵芝酸 A 脂质体制备的最优超声参数, 用于后续制剂学评价和体外细胞实验。

表 4 超声时间对 GA-Lips 包封率、载药量、粒径、PDI、ζ 电位的影响考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Investigation on effects of sonication time on encapsulation efficiency, drug loading, particle size, PDI, and ζ potential of GA-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
2	82.85 ± 0.13	2.40 ± 0.00	100.34 ± 2.11***	0.28 ± 0.01	-18.40 ± 8.85***
4	82.82 ± 0.22	2.40 ± 0.01	78.19 ± 1.79	0.30 ± 0.04	-41.99 ± 1.39
6	82.22 ± 0.28*	2.38 ± 0.01*	55.00 ± 0.72***	0.34 ± 0.04	-24.29 ± 0.69***
8	82.82 ± 0.22	2.40 ± 0.01	49.38 ± 0.27***	0.32 ± 0.05	-25.27 ± 1.06***
10	81.93 ± 0.07*	2.37 ± 0.00*	54.96 ± 0.79***	0.29 ± 0.01	-30.27 ± 4.47*
12	81.68 ± 0.22*	2.36 ± 0.01*	64.86 ± 0.87***	0.32 ± 0.03	-20.77 ± 1.63***

与超声时间 4 min 比较: **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001。

P*<0.05 *P*<0.01 ****P*<0.001 vs sonication time 4 min.

2.4.5 最佳处方工艺确定及实验验证 综合单因素考察结果, 确定 GA-Lips 的最佳制备条件为胆脂比 1:4, 药脂比 1:20, 水化温度 45 °C, 超声时间 4 min。在该条件下, 灵芝酸 A、卵磷脂和胆固醇的投料浓度分别为 2.5、50.0、12.5 mmol/L, 脂质薄膜形成后, 加入等体积双蒸水进行水化。在单因素考察确定的最佳处方条件 (胆脂比 1:4, 药脂比 1:20, 水化温度 45 °C, 超声时间 4 min) 下, 独立制备 3 批 GA-Lips 样品, 对其粒径、PDI、ζ 电位进行测定, 以评价工艺的稳定性 and 重复性, 结果见表 5。

表 5 最佳处方工艺验证结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Validation results of optimal prescription process ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
1	75.47	0.276	-45.09
2	74.60	0.253	-46.86
3	73.48	0.266	-48.31

2.5 GA-Lips 的制剂学评价

2.5.1 粒径、PDI、ζ 电位的测定 采用最佳处方工艺制备 GA-Lips, 按照前述方法测定粒径、PDI、ζ 电位, 结果 GA-Lips 的平均粒径为 (74.52 ± 1.00) nm, PDI 为 0.26 ± 0.01, ζ 电位为 (-46.75 ± 1.61) mV (图 1)。

2.5.2 透射式电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 形态学观察 采用最佳处方制备

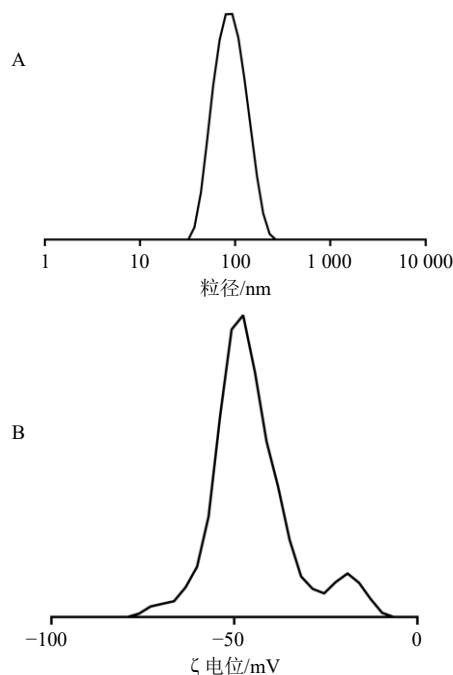


图 1 GA-Lips 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位分布 (B)
Fig. 1 Particle size distribution (A) and ζ potential distribution (B) of GA-Lips

GA-Lips, 用适量纯水稀释后, 取少许滴至铺有碳膜的铜网上, 用 2% 磷钨酸染色, 晾干后用 TEM 观察并拍照。结果如图 2 所示, 可见 GA-Lips 呈近圆球形, 大小较均匀, 分散性好。

2.5.3 体外释放实验 采用超滤离心法评估 GA-Lips 的体外释放行为。首先, 将 GA-Lips 混悬液加

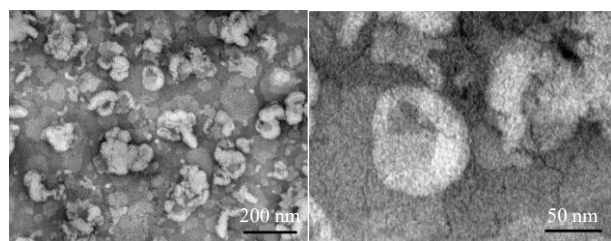


图2 GA-Lips的TEM形态图

Fig. 2 TEM of GA-Lips

入到不同pH值条件的PBS (pH 7.4、6.8、5.0)中,配成1.2 mL体系(PBS与GA-Lips体积比1.1:0.1),置于37℃、100 r/min摇床中孵育。在预定时间点(0、0.5、1、2、4、8、12、24、48 h),取样150 μL转移至超滤离心管中,于4℃、12 000×g离心5 min。收集滤液并测定其A值,通过同一缓冲液标准曲线换算出当次游离药物质量浓度(C_n)。离心后补加等体积预热PBS以维持体系总体积恒定,从而避免因取样导致体系体积减少而影响累积释放量的计算。累积释放量按以下公式计算。

$$M_{cum,n} = V_0 C_n + \sum_{i=1}^{n-1} V_s C_i$$

$$\text{累积释放率} = M_{cum,n} / M_{total}$$

M_{cum,n}为第n个时间点的累积释放量,M_{total}为体系中药物的总量;V₀为初始释放体系总体积(1.2 mL),V_s为每次取样体积(0.15 mL),C_i为各时间点测得的游离药物质量浓度

实验独立重复3次(n=3),结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果如图3所示,GA-Lips在不同pH值条件下均表现出典型的缓释特征。在pH 7.4条件下,0 h即观察到约15%的初始释放,该现象被认为主要来源于少量弱吸附于脂质体表面或分布于脂质双层浅层区域的药物分子,是被动包封型脂质体体系中常见的初始突释行为。

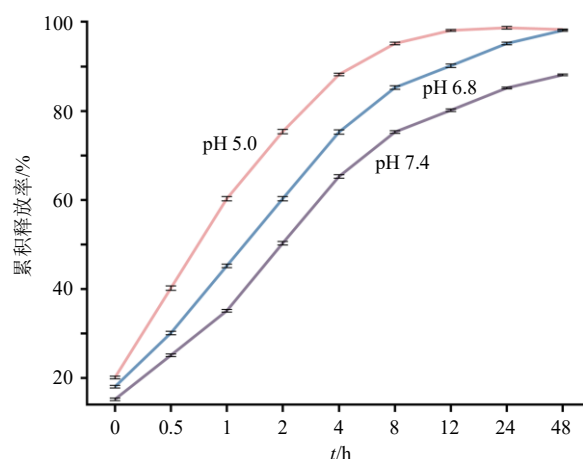


图3 GA-Lips的体外释放曲线($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 In vitro release curves of GA-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

随着时间延长,药物释放速率逐渐减缓。2 h时累积释放约为60%,4 h升至约80%,在8 h之后进入平台期,至24~48 h累积释放稳定在约85%,表明GA-Lips在生理条件下具有较好的结构稳定性和可控的持续释放能力。值得注意的是,GA-Lips的释放行为呈现明显的pH值相关性。在弱酸性条件(pH 6.8)下,药物释放速率较pH 7.4明显加快,而在更强酸性条件(pH 5.0)下,GA-Lips表现出进一步增强的释放行为,24 h内累积释放率接近完全释放。这一结果表明,GA-Lips在模拟肿瘤微环境及内体/溶酶体环境中具有良好的酸响应释放特性,有利于其在肿瘤细胞内实现更高效的药物释放。总体而言,GA-Lips在生理条件下保持相对稳定,而在酸性环境中加速释放,兼具缓释性与环境响应性,为其后续在肝癌细胞(HepG2 cells)中的高效抗肿瘤作用提供了重要的实验依据。

2.5.4 稳定性考察

(1) 介质稳定性:为评价GA-Lips在不同生物相关介质中的稳定性,将GA-Lips按8倍稀释加入以下各体系:DMEM、PBS、RPMI-1640、DMEM+10% FBS、PBS+10% FBS、RPMI-1640+10% FBS,采用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)测定脂质体粒径、PDI,并记录其变化。

(2) 稀释稳定性:为模拟GA-Lips在细胞实验或体内环境中的稀释行为,将GA-Lips按不同倍数加入DMEM中,使最终稀释倍数分别为8、16、32、64、128、256、512倍,测定其粒径与PDI。

(3) 长期稳定性:将GA-Lips置于4℃避光条件下保存,连续7 d测定粒径、PDI与ζ电位变化。上述实验均重复3次。

结果如表6~8所示,GA-Lips在多条件下均表现出良好的物理稳定性。介质稳定性结果显示,GA-Lips在PBS、不同基础培养基及含FBS的培养基中粒径与PDI变化均不显著;稀释稳定性表明,即使

表6 GA-Lips的介质稳定性考察($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Medium stability of GA-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

培养基	粒径/nm	PDI
PBS	60.07±0.21	0.18±0.01
DMEM	63.90±0.81	0.15±0.01
RPMI-1640	60.49±0.74	0.14±0.01
PBS+10% FBS	56.82±0.06	0.16±0.01
DMEM+10% FBS	59.63±0.80	0.21±0.02
RPMI-1640+10% FBS	56.86±0.70	0.19±0.01

表7 GA-Lips的稀释稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Dilution stability of GA-Lips ($\bar{x} \pm s, n=3$)

稀释倍数	粒径/nm	PDI
8	63.90±0.81	0.15±0.01
16	64.60±0.12	0.16±0.00
32	64.63±0.26	0.17±0.02
64	65.14±0.79	0.17±0.03
128	65.77±1.21	0.20±0.03
256	67.87±0.55	0.20±0.02
512	69.32±0.99	0.22±0.01

表8 GA-Lips的长期稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Long-term stability of GA-Lips ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/d	粒径/nm	PDI	t/d	粒径/nm	PDI
1	74.52±1.00	0.26±0.01	5	77.69±0.21	0.30±0.01
2	74.44±1.01	0.27±0.01	6	80.74±2.05	0.29±0.01
3	76.88±1.94	0.28±0.01	7	81.46±2.19	0.30±0.03
4	77.45±0.90	0.29±0.01			

在 8~512 倍的大幅稀释范围内，粒径始终维持在 60~70 nm，分散性稳定；长期稳定性结果显示，制剂在 4 °C 存放 7 d 期间粒径及 PDI 基本保持不变。上述结果说明 GA-Lips 具备优异的介质稳定性、稀释稳定性及短期储存稳定性，为后续细胞及体外实验提供可靠的制剂基础。

2.5.5 溶血实验 本研究制备的 GA-Lips，预期开发为静脉给药制剂，旨在通过增强渗透与滞留 (enhanced permeability and retention, EPR) 效应实现肿瘤组织的被动靶向递送，溶血实验是静脉给药制剂的关键安全性评价指标，因此本研究采用红细胞溶血实验检测 GA-Lips 的血液相容性，以初步验证其静脉给药的安全性潜力。

取新鲜抗凝全血，于 5 000×g, 4 °C 离心 10 min 去除血浆后，用 PBS (pH 7.4) 对红细胞进行 3 次洗涤，直至上清澄清。随后使用 PBS 将红细胞重悬制备 2% 红细胞悬液备用。实验设置阴性对照 (PBS)、阳性对照 (1% TritonX-100)、空白载体脂质体、以及含药脂质体 (GA-Lips)。将各样品按预设终浓度取 20 μL，与 180 μL 2% 红细胞悬液轻柔混匀，使每孔总反应体积为 200 μL。于 37 °C 孵育 3 h，孵育结束后以 3 000×g, 4 °C 离心 5 min，使未裂解红细胞沉淀。小心吸取上清 100 μL 至 96 孔板，于 540 nm 测定吸光度 (A) 值。如设置样品空白，则将其 A 值从对应样品组中扣除，以排除样品颜色干扰。溶血率按以下公式计算。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性}}) / (A_{\text{阳性}} - A_{\text{阴性}})$$

$A_{\text{阴性}}$ 为阴性对照 (PBS), $A_{\text{阳性}}$ 为阳性对照 (1% TritonX-100)

所有实验均进行 3 次独立重复。结果如图 4 和表 9 所示，PBS 阴性对照组几乎无溶血现象，而 1% TritonX-100 阳性对照组呈现完全溶血，验证了实验方法的可靠性。GA-Lips 在检测浓度范围内，未见明显红细胞破裂，溶血率均低于 2%，显著低于生物材料安全评价中一般认可的 5% 溶血安全阈值^[22]。同时，空白载体脂质体亦表现出相似的低溶血水平，说明其脂质组成对红细胞膜具有良好的生物相容性。

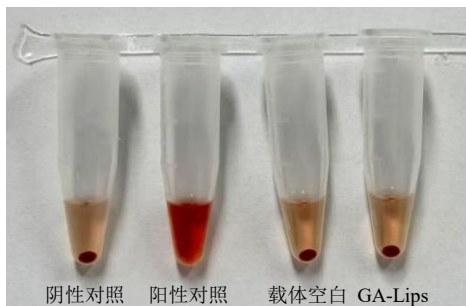


图4 GA-Lips的血液相容性

Fig. 4 Blood compatibility of GA-Lips

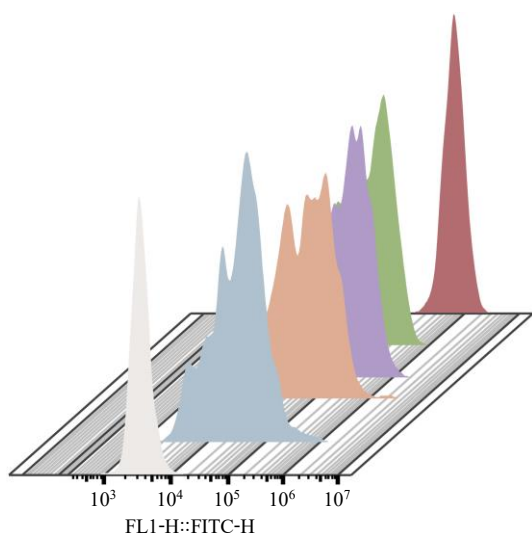
表9 GA-Lips的溶血率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Hemolysis rate of GA-Lips ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	溶血率/%	组别	溶血率/%
阴性对照	0.17±0.29	载体空白	1.19±0.78
阳性对照	100.17±5.89	GA-Lips	1.02±0.51

2.6 GA-Lips的体外抗肿瘤效应

2.6.1 细胞摄取实验 (流式细胞术分析) 为更全面、动态地评估 GA-Lips 介导的细胞摄取行为，采用香豆素-6 (C6) 作为荧光探针，对 HepG2 细胞在不同孵育时间下的摄取情况进行了流式细胞术分析。具体而言，HepG2 细胞接种于 6 孔板 (4×10⁵ 细胞/孔)，贴壁后分别给予对照 (未给药)、游离 C6 (终浓度 0.6 μmol/L) 以及 GA-Lips/C6 (终浓度 0.6 μmol/L) 处理，并在 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 0.5、2、4、6 h。各时间点孵育结束后，细胞经 PBS 清洗以去除细胞外非特异性荧光信号，随后消化、收集并重悬，通过流式细胞仪在 FITC 通道 [E_x 488 nm/E_m (530±30) nm] 采集荧光信号，每组样品至少记录 10 000 个细胞 (events)，并以几何平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 作为定量指标。结果如图 5 和表 10 所示，游离 C6 在 HepG2 细胞中的荧光信号整体较弱，相比之下，GA-Lips/C6 组



流式峰依次为对照组、C6、GA-Lips/C6 (0.5 h)、GA-Lips/C6 (2 h)、GA-Lips/C6 (4 h)、GA-Lips/C6 (6 h)。

The flow peaks were control group, C6, GA-Lips/C6 (0.5 h), GA-Lips/C6 (2 h), GA-Lips/C6 (4 h) and GA-Lips/C6 (6 h) in turn.

图5 GA-Lips 在 HepG2 细胞中的摄取效率 (流式细胞术分析)

Fig. 5 Uptake efficiency of GA-Lips in HepG2 cells (flow cytometry)

表 10 GA-Lips 在 HepG2 细胞中的摄取效率定量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 10 Uptake efficiency quantification of GA-Lips in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	MFI
对照	3 364.33 ± 599.41
C6	56 419.33 ± 3 843.88***
GA-Lips/C6 (0.5 h)	140 200.67 ± 3 397.65***
GA-Lips/C6 (2 h)	203 956.67 ± 10 307.45***
GA-Lips/C6 (4 h)	118 921.67 ± 3 064.89***
GA-Lips/C6 (6 h)	674 666.67 ± 33 852.62***

与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

在不同孵育时间下均表现出显著高于游离 C6 组的荧光信号,表明 GA-Lips 能够有效提高 C6 在 HepG2 细胞中的整体摄取水平。值得注意的是, GA-Lips/C6 组的荧光强度随时间呈现出明显的动态变化特征,在 6 h 时达到相对较高水平,提示其细胞摄取及胞内累积过程并非线性增加,而可能受到内吞、胞内转运及荧光探针释放或外排等多因素的共同调控。

2.6.2 细胞摄取实验 (共聚焦显微成像) 在明确 GA-Lips/C6 在不同孵育时间下的细胞摄取动力学特征后,进一步选择具有代表性的时间点对其细胞

内分布情况进行共聚焦显微成像观察。基于流式细胞术结果,6 h 时 GA-Lips/C6 组表现出显著高于游离 C6 组的细胞内荧光信号水平,因此选取该时间点用于后续共聚焦验证实验。将 HepG2 细胞以每孔 1.5×10^5 个接种于共聚焦专用培养皿,贴壁后分别加入对照 (未给药)、游离香豆素-6 (C6, 终浓度 $0.6 \mu\text{mol/L}$) 以及 GA-Lips/C6 (终浓度 $0.6 \mu\text{mol/L}$) 处理。细胞在 37°C 孵育一定时间后,依次用 PBS 洗涤、4%多聚甲醛固定,并以 DAPI 染核,随后在共聚焦显微镜下采集图像。

结果如图 6 显示,对照组仅有弱背景荧光;游离 C6 组细胞呈现较低水平的绿色荧光;相比之下,GA-Lips/C6 组细胞内荧光信号明显增强,胞质区域呈现更强、更均一的绿色荧光。该结果表明 GA-Lips 能显著提高 C6 在 HepG2 细胞中的摄取效率。

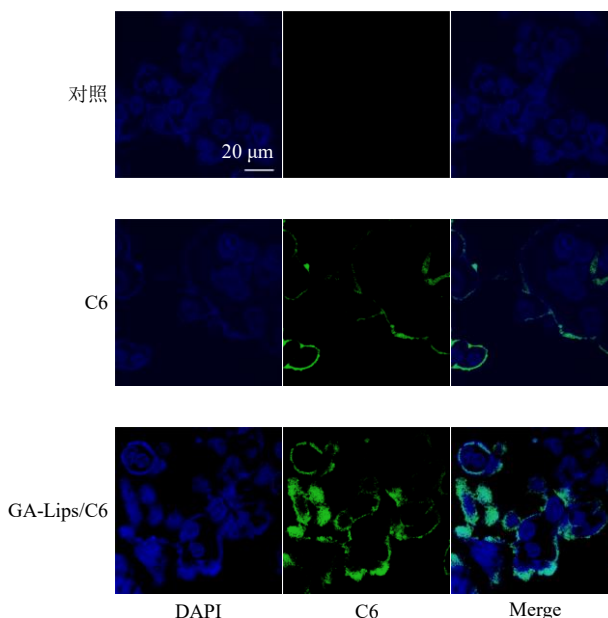


图 6 HepG2 细胞对 GA-Lips 的摄取 (共聚焦显微成像)

Fig. 6 Uptake of GA-Lips by HepG2 cells (confocal microscopy)

2.6.3 细胞毒性实验 采用 CCK-8 法评估灵芝酸 A 脂质体 (GA-Lips) 对 HepG2 细胞的体外增殖抑制作用。将细胞以 5 000 细胞/孔的密度接种于 96 孔板中,培养过夜至贴壁。弃去旧培养基后,分别加入以下处理组: ①对照组 (完全培养基); ②载体空白脂质体 (载体空白); ③游离灵芝酸 A; ④含药脂质体 (GA-Lips)。药物浓度梯度设定为 50、100、150、200、250、300、350 $\mu\text{mol/L}$,所有样品均采用 DMEM 稀释至终浓度。细胞继续孵育 24 h 后,每孔加入 10% CCK-8 试剂,置于 37°C 下孵育 1~2 h。

随后使用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值。细胞相对存活率按下式计算。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

$A_{\text{空白}}$ 为不含细胞的空白孔 A 值, $A_{\text{对照}}$ 为未给药对照组 A 值

所有实验均进行 3 次独立重复。CCK-8 结果如图 7 所示, 载体空白脂质体在所给浓度范围内对 HepG2 细胞几乎不产生明显细胞毒性, 细胞存活率始终保持在较高水平, 表明载体材料具有良好的生物相容性。游离灵芝酸 A 对 HepG2 细胞的增殖表现出一定的抑制作用, 且随浓度升高细胞存活率逐渐下降。相比之下, GA-Lips 在相同药物浓度条件下对 HepG2 细胞的增殖抑制作用更为显著, 尤其在中高浓度范围 ($\geq 200 \mu\text{mol/L}$) 时, 其细胞存活率明显低于游离药物组。上述结果表明, 将灵芝酸 A 负载于 GA-Lips 中可增强其对 HepG2 细胞的体外抗增殖活性, 而载体本身不引入额外细胞毒性。

2.6.4 细胞凋亡实验 为比较 GA-Lips 与游离药物

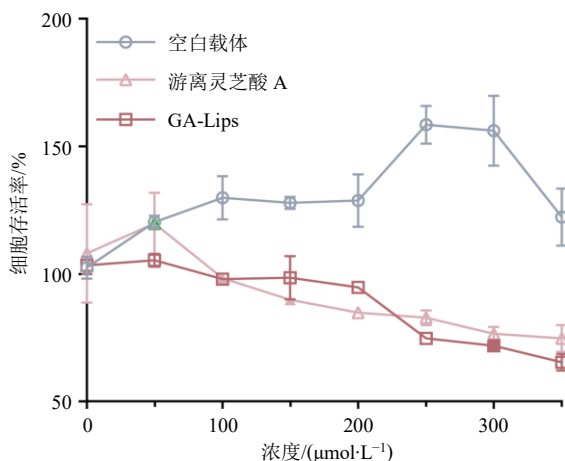


图 7 GA-Lips 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Inhibitory effect of GA-Lips on proliferation of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

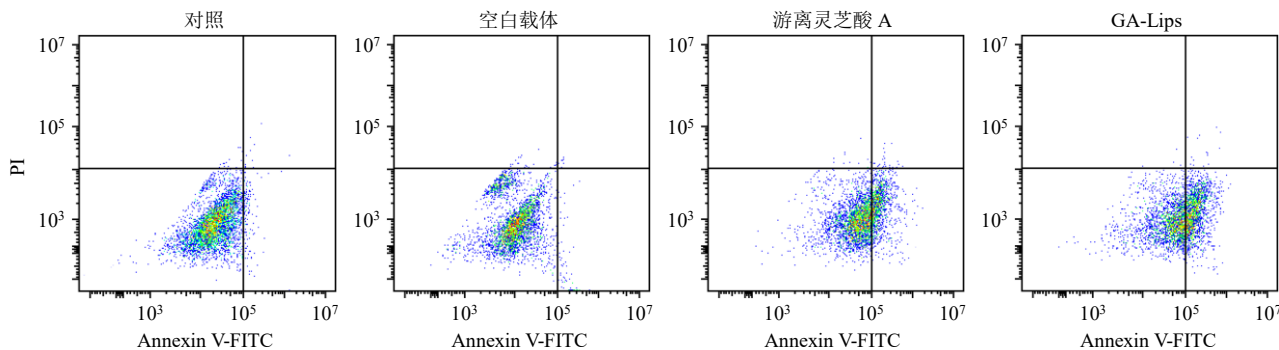


图 8 GA-Lips 对 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig. 8 Effect of GA-Lips on apoptosis in HepG2 cells

在诱导细胞凋亡方面的差异, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法, 对 HepG2 细胞凋亡情况进行流式细胞术分析。将 HepG2 细胞铺于 6 孔板, 每孔接种 4.0×10^5 细胞, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养过夜待贴壁。实验分为对照组 (未处理)、载体空白组 (空载体同体积加入)、游离药物组 (游离灵芝酸 A) 和 GA-Lips 组, 3 组均设置 ≥ 3 复孔。以 $200 \mu\text{mol/L}$ 的浓度处理 24 h 后, 吸除培养基, PBS 轻轻洗涤 2 次; 用 0.25% 胰酶收集细胞, $300 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 重悬于冷 PBS 中。按试剂盒说明配制 Annexin V-FITC 与 PI 溶液。将约 1×10^5 细胞悬于 $100 \mu\text{L}$ 结合缓冲液中, 加入 Annexin V-FITC 与 PI, 室温避光孵育 $10 \sim 15$ min。孵育后加入 $500 \mu\text{L}$ 结合缓冲液, 立即用流式细胞仪检测。使用流式细胞仪, 记录 10 000 个细胞 (events)。结果如图 8 和表 11 所示, 对照组与载体空白组细胞主要分布于 Annexin V-/PI- 象限, 凋亡率均维持在较低水平 ($1\% \sim 2\%$), 表明载体本身对 HepG2 细胞几乎无明显细胞毒性。游离药物处理后, 细胞凋亡比例出现一定程度升高, 提示游离药物对 HepG2 细胞具有一定的促凋亡作用。相比之下, GA-Lips 组中 Annexin V 阳性细胞比例显著增加, 早期与晚期凋亡细胞总比例约达 50% , 显著高于对照组、载体空白组及游离药物组 ($P < 0.001$)。上述结果表明, 在相同药物浓度和作用时间条件下, GA-Lips 较游离药物能够更有效地诱导 HepG2 细胞发生凋亡, 提示纳米载体递送形式有助于增强药物的细胞内作用效果。

3 讨论

灵芝酸 A 是一类来源明确、结构清晰的三萜类化合物, 已有大量研究证明其在抑制肿瘤增殖、诱导凋亡及调控多条信号通路等方面具有显著活性。然而, 由于灵芝酸 A 本身水溶性差、易降解且口服

表 11 GA-Lips 对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	凋亡率/%
对照	—	2.74 \pm 1.19
空白载体	—	2.18 \pm 0.12
灵芝酸 A	200	29.83 \pm 2.01***
GA-Lips	200	45.44 \pm 1.58***

与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。*** $P < 0.001$ vs control group.

吸收受限,其体内应用受到显著制约。纳米递药系统,尤其是脂质体,以其良好的生物相容性、可改善溶解度及延长循环时间等优势,成为提升灵芝酸 A 应用潜力的重要策略。本研究基于薄膜分散法构建并优化 GA-Lips,通过调控处方关键参数实现了粒径小、稳定性高的递药系统,且在 HepG2 肿瘤细胞中展现出优异的细胞摄取效率及增强的体外抗肿瘤效应,为灵芝酸 A 后续纳米化研究提供了新的思路。

在处方优化方面,本研究发现药物、卵磷脂及胆固醇比例对脂质体结构形成与物理性质具有决定作用。适当的胆固醇含量不仅可调节脂双层的流动性与致密性,还可有效提升膜稳定性,避免颗粒在储存及稀释过程中发生聚集或泄漏。优化后的 GA-Lips 粒径约 75 nm, PDI < 0.3 , 电位约 -47 mV,均符合高质量纳米制剂的特征。这类粒径大小既有利于在体内实现良好的肿瘤被动靶向(EPR 效应),又可减少巨噬系统的快速清除,同时保证制剂在细胞内内吞途径中更为易于转运。此外,电位较高的负电荷有助于防止脂质体之间的相互聚集,提高溶液状态下的稳定性。

稳定性研究结果进一步证实,GA-Lips 在多种生理相关环境、不同稀释梯度以及长期储存条件下均能保持较好的物理完整性及粒径均一性。其缓释特性则可减少药物在释放过程中的突释现象,使药物在细胞水平呈现更为平稳的暴露模式,有助于增强抗肿瘤活性并降低潜在毒性。溶血实验显示制剂溶血率低于 5%,符合注射级制剂标准,表明 GA-Lips 具备进一步开展体内研究的安全基础。

在细胞摄取方面,本研究通过共聚焦显微镜与流式细胞术对 GA-Lips 的摄取过程进行了系统评估。结果显示 GA-Lips 能显著促进 HepG2 细胞对药物的摄取,这可能源于脂质体结构易于通过内吞

途径进入细胞,包括网格蛋白介导的内吞、胞饮作用及脂质筏相关内吞等多种方式。相比游离灵芝酸 A,其被动扩散能力有限,而脂质体载体能够显著提升药物的膜通透性,增强细胞摄取效率。值得注意的是,HepG2 属于典型的高内吞活性肿瘤细胞,GA-Lips 在该模型上表现出的高摄取能力也为后续拓展至其他肿瘤类型提供了理论支持。

细胞功能实验进一步表明,GA-Lips 显著增强了灵芝酸 A 对 HepG2 细胞的细胞毒性及促凋亡作用。CCK-8 结果显示 GA-Lips 制剂具有更强的抑制增殖能力,说明脂质体载体能够提升药物在细胞内的有效浓度,并可能延长其细胞内滞留时间。Annexin V-FITC/PI 流式检测发现 GA-Lips 促进凋亡的能力明显增强,这可能与增强药物进入线粒体、促进活性氧生成、调控半胱天冬氨酸蛋白酶(Cysteine aspartate ase, Caspase)级联反应及影响肿瘤细胞内稳态等机制相关。已有研究提示灵芝酸 A 可通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)及信号转导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)等信号通路发挥抗肿瘤作用,因此提高药物摄取后,其信号通路调控效率也会相应提升。

尽管本研究构建的 GA-Lips 在体外展现出良好的稳定性和显著的抗肿瘤潜力,但仍需注意其局限性。首先,本研究主要基于 HepG2 肝癌细胞模型,后续需加入更多肿瘤细胞系以验证其普适性。其次,本研究尚未进行体内药动学与肿瘤靶向研究,而这些结果对于评价脂质体在体内真实表现至关重要。此外,还可进一步结合表面修饰技术,如肽类靶向、叶酸受体靶向或 pH 值响应膜结构等,以提升其在肿瘤微环境中的选择性释放与治疗效果。从转化应用角度来看,基于灵芝酸 A 结构明确、来源稳定且具明确药理活性,其纳米化策略在潜在的临床给药路径中亦具有一定可行性。优化后的 GA-Lips 具有合适的粒径、良好的分散稳定性以及低溶血率,符合静脉给药制剂的基本要求,脂质体能够在体内提供更高的药物暴露水平并减少快速代谢,有望提升灵芝酸 A 的系统递送效率。脂质体具备良好的膜融合能力和组织渗透性,其纳米级结构也适用于局部肿瘤治疗或局部缓释给药途径,可在降低

系统性毒性的同时提高靶部位药物浓度。基于天然产物在制剂开发过程中的质量可控性, GA-Lips 在一致性评价、规模化制备和安全性方面具备良好的可扩展性, 为未来推进至体内研究及临床前开发提供了潜在优势。

综上, 本研究构建的 GA-Lips 在稳定性、细胞摄取及体外抗肿瘤活性方面均表现出优异特征, 为灵芝酸 A 的纳米递药研究提供了新的策略, 也为其后续机制研究和体内应用奠定了坚实基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yuan W, Jiang C J, Wang Q, *et al.* Biosynthesis of mushroom-derived type II ganoderic acids by engineered yeast [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7740.
- [2] 吕俞娇, 周姝婷, 王丽娜, 等. 灵芝活性成分抗肿瘤机制研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2024, 29(8): 947-954.
- [3] Wang M C, Han Q, Zhang X L, *et al.* Ganoderic acid a derivative induces apoptosis of cervical cancer cells by inhibiting JNK pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(4): 756-767.
- [4] 陈茵妮. 灵芝酸 A 对小鼠溃疡性结肠炎的改善作用及其作用机制的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2025.
- [5] 王磊, 梁峰, 赵宏伟, 等. 含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能及安全性评价 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 338-349.
- [6] Jia Y, Li Y, Shang H, *et al.* Ganoderic acid a and its amide derivatives as potential anti-cancer agents by regulating the p53-MDM2 pathway: Synthesis and biological evaluation [J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2374.
- [7] Rahman M, Beg S, Alharbi K S, *et al.* Implications of solid lipid nanoparticles of ganoderic acid for the treatment and management of hepatocellular carcinoma [J]. *J Pharm Innov*, 2021, 16(2): 359-370.
- [8] Zhong C L, Li Y M, Li W L, *et al.* *Ganoderma lucidum* extract promotes tumor cell pyroptosis and inhibits metastasis in breast cancer [J]. *Food Chem Toxicol*, 2023, 174: 113654.
- [9] Fu Y F, Xia F, Sun L L, *et al.* Anti-lung cancer therapy using nano-assembly particles of traditional Chinese Medicine formula [J]. *Mater Today Bio*, 2025, 35: 102502.
- [10] 罗虹建, 鲁国东, 林占燊, 等. 灵芝主要活性成分药理作用及生物合成研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(9): 3366-3379.
- [11] Rahman M, Al-Ghamdi S A, Alharbi K S, *et al.* Ganoderic acid loaded nano-lipidic carriers improvise treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 782-793.
- [12] 黄婷. 灵芝三萜载体材料纳米体的制备研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2015.
- [13] 沈成英. 中药难溶性有效部位灵芝三萜纳米凝胶透皮给药系统的构建与评价 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [14] Mu W W, Chu Q H, Liu Y J, *et al.* A review on nano-based drug delivery system for cancer chemoimmunotherapy [J]. *Nanomicro Lett*, 2020, 12(1): 142.
- [15] 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.
- [16] Qiu C, Xia F, Tu Q C, *et al.* Multimodal lung cancer theranostics via manganese phosphate/querceetin particle [J]. *Mol Cancer*, 2025, 24(1): 43.
- [17] 汪芳, 田莹莹, 曾慧婷, 等. 共载抗肿瘤中药活性成分纳米制剂研究进展 [J]. 中成药, 2025, 47(9): 2964-2970.
- [18] Zhang L L, Shi J P, Zhu M H, *et al.* Liposomes-enabled cancer chemoimmunotherapy [J]. *Biomaterials*, 2025, 313: 122801.
- [19] Wu H Y, Yu M R, Miao Y Q, *et al.* Cholesterol-tuned liposomal membrane rigidity directs tumor penetration and anti-tumor effect [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(4): 858-870.
- [20] Rahman M M, Wang J, Wang G S, *et al.* Chimeric nanobody-decorated liposomes by self-assembly [J]. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19(6): 818-824.
- [21] 王美丹, 胡扬, 宋辉, 等. 灵芝孢子粉化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7918-7933.
- [22] Weber M, Steidle H, Golombek S, *et al.* Blood-contacting biomaterials: *In vitro* evaluation of the hemocompatibility [J]. *Front Bioeng Biotech*, 2018, 6: 99.

[责任编辑 郑礼胜]