

• 药剂与工艺 •

Box-Behnken 设计-效应面法优化氯化两面针碱脂质体处方工艺及体外抗胆管癌活性研究

黄艳秋^{1,2}, 丘炜桀^{1,3}, 陈海燕¹, 彭诗雅¹, 苏明哲¹, 刘悦^{2*}, 叶勇^{1,4*}

1. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

2. 海军军医大学药理学系 药物分析教研室, 上海 200433

3. 中国药科大学生物药物学院, 江苏 南京 211198

4. 广西生物活性分子研究与评价重点实验室, 广西 南宁 530021

摘要: 目的 优化氯化两面针碱脂质体 (nitidine chloride liposomes, NC-Lips) 的制备工艺, 表征其理化性质并评价体外抗胆管癌活性。方法 采用薄膜分散法制备 NC-Lips, 以二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-mPEG₂₀₀₀) 用量、药脂比和膜材比是关键影响因素, 通过单因素实验结合 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化处方, 以包封率、载药量、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位为评价指标。利用 HPLC 法测定药物含量, 粒度分析仪和透射电子显微镜表征脂质体理化性质, 透析袋法考察体外释药特性, CCK-8 法、流式细胞术和细胞周期分析评价其对胆管癌 TFK-1 细胞的增殖抑制、凋亡诱导及周期阻滞作用。结果 最优处方为 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量 34.79 mg、药脂比 1:15.15、膜材比 17.88。制得的 NC-Lips 呈现典型囊泡状结构, 平均粒径为 (77.67 ± 0.75) nm, PDI 为 0.212 ± 0.01 , ζ 电位为 (-11.43 ± 0.12) mV, 包封率为 $(85.96 \pm 0.61)\%$, 载药量为 $(4.37 \pm 0.03)\%$ 。体外释药中 Ritger-Peppas 模型拟合度最高, NC-Lips 具有明显缓释特性, 4 °C 储存 30 d 稳定性良好, 渗漏率 < 30%。体外细胞实验表明, NC-Lips 对 TFK-1 细胞的增殖抑制率、凋亡诱导率及 G₂/M 期阻滞作用均显著优于游离 NC ($P < 0.01$), 12 μ mol/L 浓度下作用 48 h 细胞存活率仅为 $(8.17 \pm 1.90)\%$, 相同浓度下 24 h 细胞凋亡率达 $(28.90 \pm 2.38)\%$, G₂/M 期占比升至 $(66.23 \pm 3.31)\%$ 。结论 成功制备了工艺稳定、理化性质优良的 NC-Lips, 能够通过诱导细胞凋亡和 G₂/M 期阻滞来发挥优异的体外抗胆管癌活性, 为 NC 的剂型优化与后续机制及体内研究奠定实验基础。

关键词: 氯化两面针碱; Box-Behnken 设计-效应面法; 脂质体; 胆管癌; 细胞凋亡

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)17-6715-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.17.006

Study on formulation optimization of nitidine chloride liposomes by Box-Behnken design-response surface method and anti-cholangiocarcinoma activity *in vitro*

HUANG Yanqiu^{1,2}, QIU Weian^{1,3}, CHEN Haiyan¹, PENG Shiya¹, SU Mingzhe¹, LIU Yue², YE Yong^{1,4}

1. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

3. School of Biopharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

4. Guangxi Key Laboratory of Bioactive Molecules Research and Evaluation, Nanning 530021, China

Abstract: Objective To optimize the preparation process of nitidine chloride liposomes (NC-Lips), characterize their physicochemical

收稿日期: 2026-03-16

基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (2022GXNSFDA035063); 广西自然科学基金资助项目 (2023GXNSFAA026366); 国家自然科学基金面上项目 (82473885); 广西医科大学一流学科创新驱动人才计划

作者简介: 黄艳秋 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail: 3163591319@qq.com

*通信作者: 刘悦 (1987—), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药物分析研究。Tel: (021)8187126 E-mail: lyue2015@163.com

叶勇 (1979—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事民族药药效物质及其新制剂研究。

Tel: (0771)5358014 E-mail: yong-ye@163.com

properties, and evaluate their *in vitro* anti-cholangiocarcinoma activity. **Methods** NC-Lips were prepared by the thin-film dispersion method. Three key formulation variables, namely DSPE-mPEG₂₀₀₀ dosage, drug-to-lipid ratio, and phospholipid-to-cholesterol ratio, were selected. The formulation was optimized via single-factor experiments combined with Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM), with encapsulation efficiency, drug loading, PDI, and ζ potential as the evaluation indices. The drug content was determined by HPLC. The physicochemical properties of NC-Lips were characterized using a particle size analyzer and transmission electron microscopy. The *in vitro* drug release profile was investigated by the dialysis bag method. CCK-8 assay, flow cytometry, and cell cycle analysis were employed to evaluate the proliferation inhibition, apoptosis induction, and cell cycle arrest effects of NC-Lips on cholangiocarcinoma TFK-1 cells. **Results** The optimal formulation was as follows: DSPE-mPEG₂₀₀₀ dosage of 34.79 mg, drug-to-lipid ratio of 1:15.15, and phospholipid-to-cholesterol ratio of 17.88. The prepared NC-Lips exhibited typical liposomal vesicular morphology, with an average particle size of (77.67 ± 0.75) nm, PDI of 0.212 ± 0.01 , ζ potential of (-11.43 ± 0.12) mV, encapsulation efficiency of $(85.96 \pm 0.61)\%$, and drug loading of $(4.37 \pm 0.03)\%$. Among the *in vitro* drug release models, the Ritger-Peppas model showed the highest goodness of fit, indicating that NC-Lips had obvious sustained-release characteristics. The liposomes remained stable during 30 d storage at 4 °C, with a drug leakage percentage of $< 30\%$. *In vitro* cell experiments demonstrated that NC-Lips exerted significantly better effects on proliferation inhibition, apoptosis induction, and G₂/M phase arrest in TFK-1 cells than free nitidine chloride ($P < 0.01$). At a concentration of 12 $\mu\text{mol/L}$, the cell viability was only $(8.17 \pm 1.90)\%$ after 48 h of treatment; at the same concentration, the apoptosis rate reached $(28.90 \pm 2.38)\%$ at 24 h, and the proportion of cells in the G₂/M phase increased to $(66.23 \pm 3.31)\%$. **Conclusion** A stable and optimized NC-Lips formulation with excellent physicochemical properties was successfully prepared. NC-Lips exerted excellent *in vitro* anti-cholangiocarcinoma activity by inducing apoptosis and G₂/M phase arrest. These findings provide an experimental basis for formulation optimization and subsequent mechanistic and *in vivo* studies of nitidine chloride.

Key words: nitidine chloride; Box-Behnken design-response surface method; liposomes; cholangiocarcinoma; apoptosis

胆管癌为起源于胆道上皮的高侵袭性恶性肿瘤,全球范围内其发病率与死亡率均呈上升趋势^[1-2]。作为主要的原发性肝胆恶性肿瘤之一,胆管癌发病占比为 10%~15%,发病率仅次于肝细胞癌^[3]。因早期症状隐匿且缺乏特异性,多数患者确诊时病情已发展至中晚期。常伴有血管侵袭或淋巴结转移,致使仅有 15%~30%的患者符合根治性手术切除条件。然而,即便成功手术,患者预后仍极差,术后复发率高,中位总生存期往往不足 1 年,5 年生存率低于 20%^[4-5]。对于晚期患者,吉西他滨联合顺铂是标准的全身化疗方案,但其疗效常因肿瘤固有的耐药性及显著的骨髓抑制等严重不良反应而受到严重限制^[6-8]。因此,开发能够克服现有治疗瓶颈、更安全有效的新型治疗策略迫在眉睫。在此背景下,基于纳米技术的药物递送系统展现出巨大潜力。其通过改善药物溶解性、提高稳定性、实现靶向递送与可控释放,有望在提升抗肿瘤疗效的同时显著降低全身毒性,为胆管癌的治疗提供了新的突破方向^[9]。

而中药活性成分因多靶点、低毒性等优势,成为抗肿瘤药物研发的重要方向,将其与纳米技术相结合,从中药资源中寻找高效低毒的活性成分并利用纳米技术克服其成药性瓶颈,成为一个有前景的

研究策略。两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 是芸香科花椒属植物两面针的干燥根,又名入地金牛、双面刺、双背针、山椒、下山虎等,该药材主产于广西、福建、湖南、广东、云南等南方省区,为《中国药典》2025 年版正式收载^[10]。

氯化两面针碱(nitidine chloride, NC)是从中分离得到的一种苯并菲啶类生物碱。研究表明 NC 具有抗肿瘤、抗炎、抗溃疡、抗菌、抗心脑血管等药理作用^[11],NC 能抑制乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胃癌和肾癌等多种肿瘤细胞的增殖^[12],本课题组前期研究发现,NC 能抑制胆管癌细胞的增殖,其抗胆管癌机制涉及诱导胆管癌细胞 G₂/M 期阻滞和凋亡、干扰氨基酸和脂质代谢、抑制磷脂酰肌醇-3-羟基激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路以及下调前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、环腺苷酸依赖性蛋白激酶 A α 催化亚基 (protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha, PRKACA) 等靶点^[13]。这表明 NC 在胆管癌治疗方面具有较好开发价值和临床应用前景。

然而,其水溶性差和体内生物利用度低等缺点限制了其临床应用。近年来,研究者围绕 NC 新制

剂开展了大量研究探索, 已将 NC 制备为磷脂复合物^[14]、微球^[15]、纳米粒^[16]、纳米胶束^[17]等新型药物载体。其中磷脂复合物可显著提高 NC 的脂溶性与细胞摄取率, 纳米粒与纳米胶束则能借助高通透性和滞留 (enhanced permeability and retention, EPR) 效应增强肿瘤部位富集。

在众多载体中, 脂质体因其独特的磷脂双分子层结构而备受关注, 作为药物递送载体, 它可同时包载亲水性与疏水性药物, 兼具生物相容性好、载药能力强的优点, 在提高药物生物利用度的同时降低不良反应^[18]。然而, 普通脂质体在体循环中易被网状内皮系统 (reticuloendothelial system, RES) 快速清除^[19]。而通过聚乙二醇等亲水聚合物对脂质体表面进行修饰, 可利用其立体屏障效应减少血浆蛋白的吸附与 RES 的识别, 从而显著延长脂质体在血液中的循环时间^[20]。

已有研究初步实现氯化两面针碱脂质体 (nitidine chloride liposomes, NC-Lips) 的基础制备, 但针对 NC-Lips 的聚乙二醇修饰工艺优化、修饰后载体的体内靶向性调控、抗胆管癌疗效增强机制及长期安全性评估等仍缺乏系统研究, 且聚乙二醇修饰与 NC 抗胆管癌靶点的协同作用尚未明确, 这一研究缺口为本研究聚焦聚乙二醇修饰脂质体的构建、表征及抗胆管癌机制探究提供了明确的创新切入点与核心研究价值。基于此, 本研究旨在制备一种聚乙二醇修饰的 NC-Lips。首先采用单因素实验初步筛选关键处方因素, 进而运用 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 进行系统性优化。最后, 将对最优处方制备的脂质体进行制剂学表征与体外抗胆管癌活性评价, 为 NC 的纳米剂型研发及后续基础研究提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-10AT 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; DHG-9240A 型电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Sartorius SQP 型电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; Zetasizer nano ZS 型粒度分析仪, 英国马尔文公司; KQ-800DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; LDC-5 型台式低速离心机, 上海泰坦科技股份有限公司; HT7800 型透射电子显微镜, 日本 Hitachi 公司; Hera cell 150i 型二氧化碳培养箱, 美国赛默飞世尔科技

有限公司; BCD-450WDENU1 型冰箱, 青岛海尔股份有限公司; R206D 型旋转蒸发仪, 上海申生科技有限公司; 超滤离心管, 截留相对分子质量 3 500, 美国 Millipore 公司; Sonifier 450D 型细胞破碎仪, 美国 Bransan 公司; Aynergy H1 型酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司。

1.2 试药

NC 原料药, 批号 22010702, 质量分数 99.18%, 购自成都普菲德生物技术有限公司; 大豆卵磷脂 (批号 SY-SO-241201)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-mPEG₂₀₀₀, 批号 C40311)、胆固醇 (批号 C40563), 均购自艾伟拓 (上海) 医药科技有限公司; 甲醇 (批号 F24O8C202)、乙腈 (批号 F24O7P205), 均购自赛默飞世尔科技公司; 二甲基亚砜 (批号 20240408)、三氯甲烷 (批号 20240911), 均购自国药集团化学试剂有限公司; 娃哈哈饮用纯净水, 批号 111319SD, 购自杭州娃哈哈集团有限公司; 羧甲基纤维素钠, 批号 589083, 购自上海皓元生物医药科技有限公司; CCK-8 试剂盒 (批号 A095259421)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 061923231130), 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; RPMI1640 培养基, 批号 6123120, 购自美国 Gibco 公司。

2 方法与结果

2.1 NC-Lips 的制备

精密称取 NC 原料药 10.80 mg、大豆卵磷脂 162.97 mg、DSPE-mPEG₂₀₀₀ 34.79 mg 和胆固醇 4.60 mg, 溶于 4 mL 甲醇-三氯甲烷 (体积比 1:1) 中, 并转移至 250 mL 圆底烧瓶中, 于转速 50 r/min、55 °C 下减压蒸发 30 min, 以除去有机溶剂, 使其在圆底烧瓶形成类脂薄膜, 随后将 55 °C 的纯水加入至制成类脂薄膜的圆底烧瓶中, 于转速 100 r/min、55 °C 水浴条件下水化洗膜 30 min, 最后将所得混合液经细胞破碎仪超声处理 (功率 100 W, 超声 2 s, 间隔 2 s) 15 min, 于 0.22 μm 微孔滤膜滤过即得 NC-Lips, 冷藏, 备用。

空白脂质体 (blank liposome, B-Lips) 与 NC-Lips 制备方法一致, 但不加入 NC 原料药。

2.2 HPLC 法测定 NC 的含量

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Shim-Pack VP-ODS C₁₈ 分析柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-含 0.35% 甲酸-0.35% 三乙胺的水 (32:68); 检测波长为 271 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为

30 ℃; 进样量为 20 μL 。

2.2.2 溶液的制备

(1) NC 对照品溶液: 准确称取适量 NC 对照品, 转移至 5 mL 棕色量瓶内。加入适量甲醇, 室温下采用 100 W 功率超声处理 10 min 其充分溶解, 随后用甲醇定容至刻度线。将溶液混合均匀后, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得 NC 对照品储备液。

(2) NC-Lips 供试品溶液: 准确移取 NC-Lips 溶液 0.5 mL, 置于 5 mL 棕色量瓶中。以甲醇为溶剂, 经室温条件采用 100 W 功率超声 10 min 处理使其溶解后, 用甲醇定容至刻度。将溶液充分混匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 得到 NC-Lips 供试品溶液。

(3) B-Lip 供试品溶液: 准确移取 B-Lips 溶液 0.5 mL, 置于 5 mL 棕色量瓶中, 加入甲醇作为溶剂, 室温条件下 100 W 功率超声 10 min 处理助其溶解, 随后加甲醇定容至刻度。将混合液振荡均匀后, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得 B-Lips 供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 将制备的 NC 对照品储备液逐步稀释, 得到质量浓度分别为 5、10、25、50、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$ 的系列梯度对照品溶液。按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析。以 NC 的峰面积 (Y) 对其质量浓度 (X) 进行线性回归分析, 得回归方程为 $Y=70\ 177.5 X+70\ 998.7$, $r=0.999\ 9$; 结果表明, NC 在 5~200 $\mu\text{g/mL}$ 呈现出良好的线性关系。

2.2.4 专属性考察 取 NC 对照品溶液、NC-Lips 供试品溶液、B-Lips 供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 分别记录高效液相色谱图, 结果见图 1。结果表明, 在该色谱条件下, NC 的分离

度大于 1.5, 理论塔板数均在 3 000 以上, 并且空白辅料不干扰 NC 的测定。

2.2.5 精密度考察

(1) 日内精密度: 分别取低、中、高 3 种质量浓度 (80、100、120 $\mu\text{g/mL}$) 的 NC-Lips 供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行分析。在 1 d 内对每份溶液连续进样 6 次, 记录峰面积并计算其 RSD 值。结果显示, 低、中、高质量浓度供试品溶液的 RSD 值分别为 1.59%、1.20%、1.53%, 结果表明该方法的日内精密度良好。

(2) 日间精密度: 分别取低、中、高 3 种质量浓度 (80、100、120 $\mu\text{g/mL}$) 的 NC-Lips 供试品溶液, 参照“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 连续 6 d 进样分析, 记录峰面积并计算其 RSD 值。结果显示, 低、中、高质量浓度供试品溶液的 RSD 值依次为 1.76%、1.21%、1.53%, 结果表明该方法日间精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 分别取低、中、高 3 种质量浓度 (80、100、120 $\mu\text{g/mL}$) 的 NC-Lips 供试品溶液, 分别于制备后的 0、2、4、6、8、16、24 h 各时间点, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积并计算 RSD 值。结果显示, 低、中、高质量浓度溶液的 RSD 值分别为 1.88%、1.35%、2.00%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取低、中、高质量浓度 (80、100、120 $\mu\text{g/mL}$) 的 NC-Lips 供试品溶液各 6 份, 记录峰面积, 计算 RSD 值。结果表明低、中、高质量浓度 (80、100、120 $\mu\text{g/mL}$) 供试品溶液的 RSD 分别为 0.98%、0.73%、0.79%, 结果表明该实验重复性较好。

2.2.8 加样回收率考察 分别移取 500 μL NC-Lips 溶液于 5 mL 棕色量瓶中, 依次加入 400、500、600 μL NC 对照品溶液, 配制成低 (80 $\mu\text{g/mL}$)、中 (100 $\mu\text{g/mL}$)、高 (120 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度组, 以甲醇定容后, 各取 500 μL 溶液置入截留相对分子质量为 3 500 的超滤离心管中, 以 4 000 r/min 离心 (离心半径 6.5 cm) 60 min。收集下层滤液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 参照“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 记录峰面积并计算加样回收率。结果显示, 低、中、高质量浓度组的平均加样回收率分别为 102.36%、95.95%、95.46%, 相应 RSD 值为 1.53%、1.99%、1.31%, 结果表明所建立的加样回收测定方法准确度良好。

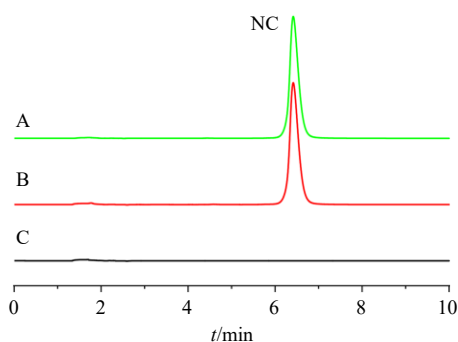


图 1 NC 对照品溶液 (A)、NC-Lips 溶液 (B) 和 B-Lips 溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of nitidine chloride reference solution (A), NC-Lips solution (B), and B-Lips solution (C)

2.2.9 样品测定 取各待测样品,按照“2.2.2”项方法制备供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定,并根据“2.2.3”项下回归方程计算 NC 含量。

2.3 包封率、载药量、粒径及 ζ 电位的测定

2.3.1 包封率、载药量的测定 取 500 μL NC-Lips 溶液置于截留相对分子质量为 3 500 的超滤离心管中,于 4 000 r/min (离心半径 6.5 cm) 条件下离心 60 min。收集续滤液,转移至 5 mL 棕色量瓶中,加甲醇定容至刻度,进行 HPLC 分析,测得 NC 游离药物量 (W_1)。另取 500 μL NC-Lips 溶液直接置于 5 mL 棕色量瓶中,加甲醇定容至刻度,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后进样,测定 NC 总量 (W_2)。最后,根据公式 (1) 和 (2) 分别计算包封率与载药量。

$$\text{包封率} = (W_2 - W_1) / W_2 \quad (1)$$

$$\text{载药量} = (W_2 - W_1) / (W_2 + W_3) \quad (2)$$

W_1 为游离药物的量, W_2 为系统中药物的总量, W_3 为系统中辅料的量

2.3.2 粒径及 ζ 电位的测定 取 NC-Lips 样品 100 μL , 加入粒径样品池中,使用 Zetasizer nano ZS 型粒度分析仪测定其粒径及多分散指数 (polydispersity index, PDI)。另取同批脂质体 100 μL , 用纯水稀释 10 倍并混匀后,转移至 ζ 电位样品池,在同一仪器上测定 ζ 电位。每个样品均平行测定 3 次。

2.4 单因素考察 NC-Lips 处方及制备工艺

2.4.1 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量考察 固定处方中 NC (10.00 mg)、胆固醇 (9.65 mg)、大豆卵磷脂 (166.82 mg) 的用量,仅调整 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量分别为 10、20、30、40、50 mg,按照“2.1”项下条件制备脂质体,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。当 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量为 50 mg 时,NC-Lips 的包封率、载药量、粒径、PDI 及 ζ 电位等指标综合最优,故选择此用量进行后续优化。这可能是因为 DSPE-mPEG₂₀₀₀

的引入实现了对脂质体的 PEG 化修饰。其表面的亲水性 PEG 长链通过产生强大的空间位阻效应,能有效增强脂质双分子层的紧密性与完整性,从而显著减少药物在制备过程中的泄漏,这是包封率与载药量随其用量增加而提升的关键原因^[21]。虽然本单因素 10~50 mg 包封率仍呈上升趋势,但结合本课题组前期预实验,DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量大于 50 mg 会破坏磷脂双分子层平衡,导致包封率下降、粒径与 PDI 恶化。因此本研究上限固定在 50 mg,同时预实验与单因素结果显示,30 mg 之后制剂综合性能提升显著,故后续 BBD-RSM 将该因素考察区间设定为 30~50 mg。

2.4.2 大豆卵磷脂与胆固醇物质的量比 (膜材比) 考察 固定处方中 NC (10.00 mg)、DSPE-mPEG₂₀₀₀ 的用量 (50.00 mg),仅调整膜材比分别为 90:0、86:4、82:8、78:12、74:16,按照“2.1”项下条件制备脂质体,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。随着处方中胆固醇比例的增加,脂质体的包封率与载药量呈现先升高后降低的趋势,在胆固醇比例适中时达到峰值;粒径与 PDI 整体波动较小,PDI 始终维持在较低水平,表明各组脂质体粒径分布均一; ζ 电位均为负值,且在胆固醇比例适中时绝对值相对更大,提示该条件下脂质体的稳定性更优。综合各项指标,当膜材比为 86:4 时,脂质体的包封率与载药量最优,同时粒径分布均一、稳定性良好,因此该比例被确定为后续工艺研究的最佳条件。适量胆固醇可插入磷脂双分子层,增强膜的刚性、降低膜流动性,减少药物渗漏以提升包封率与载药量;过量胆固醇则破坏磷脂有序排列,压缩载药空间,导致包封率与载药量下降^[22-23]。胆固醇用量对脂质体粒径和 PDI 影响较小,各组 PDI 均维持在较低水平,表明不同比例下脂质体粒径分布均一。

2.4.3 NC 与大豆卵磷脂质量比 (药脂比) 考察 固定处方中胆固醇 (7.76 mg)、DSPE-mPEG₂₀₀₀ (50.00

表 1 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Investigation of DSPE-mPEG₂₀₀₀ dosage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

DSPE-mPEG ₂₀₀₀ 用量/mg	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
10	61.98 $\pm$ 2.90	3.17 $\pm$ 0.15	72.48 $\pm$ 0.45	0.235 $\pm$ 0.004	-5.15 $\pm$ 0.41
20	62.65 $\pm$ 1.54	3.31 $\pm$ 0.08	74.68 $\pm$ 0.99	0.223 $\pm$ 0.004	-5.40 $\pm$ 0.91
30	66.00 $\pm$ 2.98	3.17 $\pm$ 0.13	74.59 $\pm$ 1.15	0.227 $\pm$ 0.003	-8.10 $\pm$ 0.34
40	78.25 $\pm$ 2.39	3.55 $\pm$ 0.12	77.88 $\pm$ 0.65	0.219 $\pm$ 0.006	-9.88 $\pm$ 0.68
50	80.91 $\pm$ 2.40	3.66 $\pm$ 0.10	76.65 $\pm$ 1.14	0.218 $\pm$ 0.009	-10.70 $\pm$ 0.16

表 2 膜材比考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Investigation of film material ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

膜材比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
90:0	82.48 $\pm$ 0.77	3.54 $\pm$ 0.05	75.89 $\pm$ 1.14	0.218 $\pm$ 0.008	-10.25 $\pm$ 0.43
86:4	87.94 $\pm$ 0.71	3.69 $\pm$ 0.03	81.17 $\pm$ 0.31	0.208 $\pm$ 0.002	-13.23 $\pm$ 1.44
82:8	85.51 $\pm$ 0.37	3.60 $\pm$ 0.02	77.05 $\pm$ 0.67	0.210 $\pm$ 0.013	-10.53 $\pm$ 0.68
78:12	77.88 $\pm$ 0.82	3.49 $\pm$ 0.02	81.73 $\pm$ 1.18	0.216 $\pm$ 0.010	-10.80 $\pm$ 0.73
74:16	76.18 $\pm$ 0.79	3.44 $\pm$ 0.03	74.83 $\pm$ 0.6	0.196 $\pm$ 0.012	-10.77 $\pm$ 0.33

mg) 的用量, 仅调整药脂比为 1:50、1:25、1:16、1:12、1:10、1:5, 按照“2.1”项下条件制备脂质体, 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。随着 NC 用量增加, NC-Lips 包封率整体呈波动降低, 当药脂比升高至 1:5 时包封率发生骤降。这可能是由于在膜材比不变的情况下, 其对 NC 的载药能力有限。当药脂比为 1:10、1:12 时载药量大, 粒径、PDI 和 ζ 电位绝对值大小也相对较好, 但其制备完成后静置数小时便析出沉淀, 表明其稳定性差, 这可能是由于过高的药脂比, 导致大量 NC 分子插入并过度扰动脂质双分子层, 破坏了膜的有序结构与稳定性, 从而引发药物析出和颗粒聚集沉淀。最后综合考虑, 选择药脂比为 1:16 进行后续工艺优化试验。

表 3 药脂比考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Investigation of drug-to-lipid ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药脂比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
1:50	91.26 $\pm$ 0.65	1.31 $\pm$ 0.01	81.38 $\pm$ 3.58	0.300 $\pm$ 0.016	-15.07 $\pm$ 0.31
1:25	90.27 $\pm$ 3.14	2.53 $\pm$ 0.14	78.48 $\pm$ 0.92	0.241 $\pm$ 0.002	-17.93 $\pm$ 2.20
1:16	86.74 $\pm$ 2.10	3.69 $\pm$ 0.90	77.90 $\pm$ 0.30	0.215 $\pm$ 0.002	-11.43 $\pm$ 0.21
1:12	87.74 $\pm$ 1.92	4.82 $\pm$ 0.14	80.92 $\pm$ 1.73	0.200 $\pm$ 0.003	-21.07 $\pm$ 0.71
1:10	86.87 $\pm$ 0.61	5.78 $\pm$ 0.19	80.66 $\pm$ 1.12	0.202 $\pm$ 0.006	-22.98 $\pm$ 0.03
1:5	41.28 $\pm$ 0.97	5.25 $\pm$ 0.12	82.82 $\pm$ 3.09	0.204 $\pm$ 0.007	-34.23 $\pm$ 1.22

2.4.4 水浴温度考察 固定处方中 NC(10.00 mg)、胆固醇(3.84 mg)、大豆卵磷脂(162.98 mg)、DSPE-mPEG₂₀₀₀(50.00 mg) 的用量, 仅调整水浴温度分别为 45、50、55、60、65 °C, 按照“2.1”项下条件制备脂质体, 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。结果显示, 在考察的温度范围内, 包封率与载药量整体波动较小且维持在较高水平; 随着温度升高, PDI 呈缓慢降低趋势, 粒径无明显变化; ζ 电位的绝对值随温度升高略有减小。在氯仿-甲醇混合溶剂体系

表 4 水浴温度考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Investigation of temperature ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水浴温度/°C	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
40	85.29 $\pm$ 1.08	3.76 $\pm$ 0.04	77.90 $\pm$ 0.23	0.243 $\pm$ 0.009	-13.10 $\pm$ 0.21
45	85.06 $\pm$ 0.01	3.69 $\pm$ 0.05	78.90 $\pm$ 0.03	0.220 $\pm$ 0.002	-12.10 $\pm$ 0.20
50	83.65 $\pm$ 0.55	3.74 $\pm$ 0.09	74.59 $\pm$ 1.15	0.218 $\pm$ 0.006	-12.20 $\pm$ 0.14
55	85.40 $\pm$ 1.94	3.71 $\pm$ 0.05	77.88 $\pm$ 0.65	0.210 $\pm$ 0.013	-11.57 $\pm$ 0.16
60	85.18 $\pm$ 0.02	3.65 $\pm$ 0.14	76.65 $\pm$ 1.14	0.214 $\pm$ 0.009	-10.38 $\pm$ 0.16

中, 55 °C 的水浴温度既接近溶剂沸点, 可保证溶剂快速均匀挥发, 形成致密规整的脂质薄膜, 也能让磷脂膜刚好进入凝胶相向液晶相转变的适宜范围, 既提升药物嵌入效率以获得高包封率, 又避免了温度过高导致的膜结构疏松与药物渗漏, 同时保障了脂质体粒径分布均一和稳定性。因此选择水浴温度为 55 °C 进行后续工艺优化试验。

2.4.5 超声时间考察 固定处方中 NC(10.00 mg)、胆固醇(3.84 mg)、大豆卵磷脂(162.98 mg)、DSPE-mPEG₂₀₀₀(50.00 mg) 的用量, 仅调整超声时间分别为 0、15、30、45、60 min, 按照“2.1”项下条件制备脂质体, 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 5。未超声时包封率与载药量最高, 但粒径显著偏大、分散性差; 超声 15 min 后, 粒径大幅降低且 PDI 处于较低水平, 脂质体分散性与均一性明显改善, 包封率与载药量虽略有下降但仍维持在较高水平; 超声时间超过 15 min 后, 包封率和载药量有所下降, 可能是因为超声时间过长导致部分药物泄漏。综合考量分散效果、载药性能与稳定性, 选择 15 min 作为后续工艺优化的超声时间。

表 5 超声时间考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Investigation of ultrasonic time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	90.54 $\pm$ 0.67	3.99 $\pm$ 0.03	249.17 $\pm$ 1.21	0.234 $\pm$ 0.005	-18.13 $\pm$ 0.58
15	85.01 $\pm$ 1.00	3.75 $\pm$ 0.04	76.54 $\pm$ 1.18	0.211 $\pm$ 0.005	-11.30 $\pm$ 1.67
30	82.07 $\pm$ 3.38	3.62 $\pm$ 0.15	81.38 $\pm$ 0.32	0.218 $\pm$ 0.003	-13.21 $\pm$ 0.75
45	84.16 $\pm$ 1.43	3.71 $\pm$ 0.06	80.41 $\pm$ 2.01	0.210 $\pm$ 0.008	-12.13 $\pm$ 0.82
60	80.24 $\pm$ 0.33	3.54 $\pm$ 0.01	75.29 $\pm$ 2.07	0.211 $\pm$ 0.009	-8.85 $\pm$ 0.23

2.5 BBD-RSM 优化 NC-Lips 处方

2.5.1 优化方案设计 在单因素实验结果的基础上选择 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量(X_1)、药脂比(X_2)和膜材比(X_3)为考察因素, 以包封率(Y_1)、载药量(Y_2)、PDI(Y_3)和 ζ 电位(Y_4)为评价指标, 进行 BBD-RSM 实验设计优化, 各个因素的水平、试验设计及结果见表 6。为了更直观地评价试验结果, 在实验过程中常引入归一化综合值(outside diameter, OD 值), 其目的是将具有不同量纲的多个指标转化为相同的量纲, 以便在同一标准下对它们进行比较和加权求和。因此, 将包封率(Y_1)、载药量(Y_2)、PDI(Y_3)和 ζ 电位(Y_4)转化为 OD 值, 来考察指标的综合效果。

表 6 BBD-RSM 设计实验因素水平及试验结果

Table 6 Experimental factor level and experimental results of BBD-RSM

试验号	X_1/mg	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3	Y_4/mV	OD 值
1	30.0	10.0	20.0	82.72	6.31	0.234	-7.20	0.270
2	50.0	10.0	20.0	70.46	5.14	0.245	-12.96	0.250
3	30.0	25.0	20.0	68.19	2.18	0.224	-13.60	0.240
4	50.0	25.0	20.0	78.03	2.27	0.219	-14.10	0.320
5	30.0	17.5	10.0	66.49	2.93	0.221	-12.03	0.290
6	50.0	17.5	10.0	66.22	2.67	0.187	-10.53	0.300
7	30.0	17.5	30.0	69.45	3.15	0.221	-10.63	0.300
8	50.0	17.5	30.0	67.13	2.78	0.212	-16.26	0.340
9	40.0	10.0	10.0	79.55	5.69	0.200	-6.50	0.000
10	40.0	25.0	10.0	58.74	1.76	0.236	-18.00	0.000
11	40.0	10.0	30.0	76.23	5.59	0.248	-19.80	0.000
12	40.0	25.0	30.0	63.07	1.94	0.226	-13.10	0.150
13	40.0	17.5	20.0	90.06	3.87	0.201	-15.00	0.600
14	40.0	17.5	20.0	83.46	3.59	0.184	-13.20	0.556
15	40.0	17.5	20.0	84.19	3.62	0.190	-13.00	0.545
16	40.0	17.5	20.0	83.45	3.59	0.205	-16.20	0.550
17	40.0	17.5	20.0	84.20	3.61	0.207	-14.70	0.530

$$d_{i\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min}) \quad (3)$$

$$d_{i\min} = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min}) \quad (4)$$

$$\text{OD} = (\prod_{i=1}^n d_i)^{1/n} \quad (5)$$

Y_i 为实际测量值, $Y_{\max}$ 和 $Y_{\min}$ 分别为各指标可接受的最大值和最小值

对于公式(3),当试验中某指标等于或超过 $Y_{\max}$ 将设为 1, 反之小于 $Y_{\min}$ 则设为 0; 对于公式(4),当试验中某指标等于或超过 $Y_{\max}$ 将设为 0, 反之小于或等于 $Y_{\min}$ 则设为 1。

2.5.2 模型及方差分析 采用 Design-Expert V 13.0 软件以综合指标 OD 值对 X_1 、 X_2 、 X_3 进行拟合, 得 OD 值的 2 次多元回归方程为 $Y = 0.556\ 5 + 0.015\ 4 X_1 + 0.024\ 8 X_2 + 0.026\ 6 X_3 + 0.025\ 4 X_1 X_2 + 0.008\ 6 X_1 X_3 + 0.038\ 3 X_2 X_3 - 0.007\ 4 X_1^2 - 0.278\ 5 X_2^2 - 0.239\ 6 X_3^2$, $R^2 = 0.991\ 1$, $P < 0.000\ 1$ 。OD 值方差分析见表 7, 该模型具有较高的拟合优度 ($R^2 = 0.991\ 1$) 及极显著水平 ($P < 0.000\ 1$), 说明模型预测能力良好。失拟项检验结果显示 $P > 0.05$, 表明失拟不显著, 模型可靠性较高, 能够较好地反映实际关系。模型中各项系数的统计学显著性见方差分析表。

2.5.3 效应面评估与预测 采用 Design-Expert V 13.0 软件绘制了因变量与自变量的三维响应曲面图。每次固定 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量 (X_1)、药脂比

表 7 方差分析结果 (OD 值)

Table 7 ANOVA results (OD value)

误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.626 5	9	0.069 6	87.01	<0.000 1	极显著
X_1	0.001 9	1	0.001 9	2.39	0.166 4	
X_2	0.004 9	1	0.004 9	6.16	0.042 0	显著
X_3	0.005 7	1	0.005 7	7.09	0.032 3	显著
$X_1 X_2$	0.002 6	1	0.002 6	3.22	0.115 8	
$X_1 X_3$	0.000 3	1	0.000 3	0.368 9	0.562 8	
$X_2 X_3$	0.005 9	1	0.005 9	7.35	0.030 2	显著
X_1^2	0.000 2	1	0.000 2	0.285 6	0.609 6	
X_2^2	0.326 7	1	0.326 7	408.38	<0.000 1	极显著
X_3^2	0.241 7	1	0.241 7	302.2	<0.000 1	极显著
残差	0.005 6	7	0.000 8			
失拟项	0.002 6	3	0.000 9	1.12	0.439 8	不显著
纯偏差	0.003 0	4	0.000 8			
总离差	0.632 1	16				

(X_2) 和膜材比 (X_3) 中的 1 个因素, 考察其余 2 个因素间的交互作用对综合指标 OD 值的影响, 结果如图 2 所示。通过 BBD-RSM 进行优化分析, 确定最佳处方: DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量为 34.785 4 mg, 药脂比为 1:15.1492, 膜材比为 17.879。考虑到实际可操作性以及仪器的精确度, 将最优条件调整为 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量 34.79 mg, 药脂比 1:15.15, 膜材比 17.88, 最优条件下的包封率为 85.23%, 载药量为 4.34%, 粒径为 78.54 nm, PDI 为 0.203, ζ 电位为 -11.90 mV。在此处方工艺条件下平行制备 3 批脂质体, 结果见表 8。

2.6 NC-Lips 的制剂学评价

2.6.1 外观和丁达尔现象 观察最优处方新制备的 NC、NC-Lips 溶液外观。如图 3 所示, NC 溶液呈淡黄色透明液体, 体系均一澄明, 无肉眼可见的颗粒或沉淀, 当红外激光束照射时, 光束可直接穿透溶液, 未观察到明显的光路, 无丁达尔现象; 而 NC-Lips 脂质体呈淡乳黄色, 其颜色略深于 NC 溶液, 且半透明状, 整体体系均匀、无分层或浑浊, 在红外激光束照射下可清晰观察到红色光路穿过样品, 出现明显的丁达尔效应。这种颜色差异源于脂质体的胶体散射特性及药物包载后的局部浓度变化, 而丁达尔效应的出现则验证了脂质体的成功制备。

2.6.2 粒径和 ζ 电位的测定 取最优处方新制备的 NC-Lips 适量, 于 Zetasizer nano ZS 型粒度分析仪测定其粒径为 $(77.67 \pm 0.75) \text{ nm}$, PDI 为 0.212 ± 0.010 , ζ 电位为 $(-11.43 \pm 0.12) \text{ mV}$ ($n=3$), 结果见图 4。

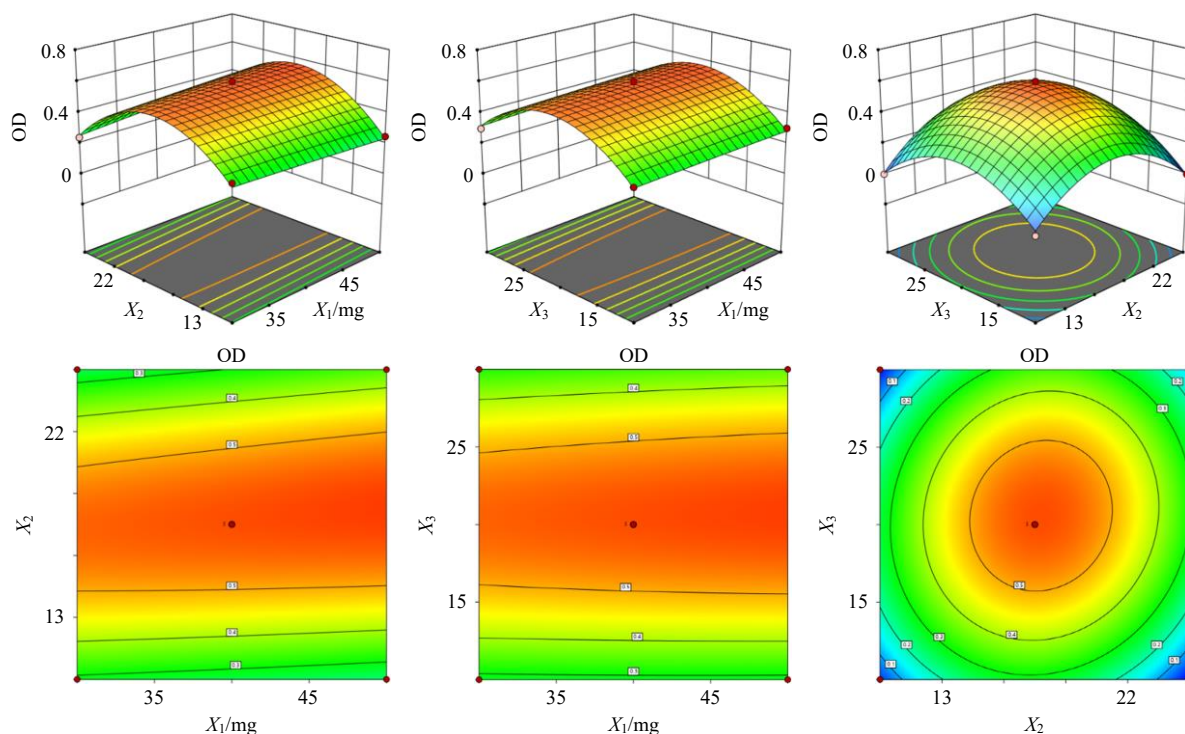


图2 因素间交互作用的响应面 2D 图和 3D 图 (OD 值)

Fig. 2 Response surface 2D plot and 3D plot of interaction between factors (OD value)

表8 最优处方的验证

Table 8 Validation of optimal prescription

验证序号	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	OD 值
1	85.45	4.34	78.72	0.207	-11.40	0.510
2	85.61	4.35	77.10	0.226	-11.60	0.440
3	86.82	4.41	77.18	0.203	-11.30	0.530
均值	85.96	4.37	77.67	0.212	-11.43	0.500
最优处方	85.23	4.34	78.54	0.203	-11.90	0.502
RSD/%	0.86	0.61	1.26	4.49	3.92	0.40

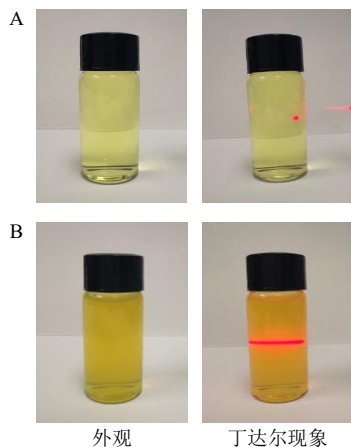


图3 NC 溶液 (A) 和 NC-Lips 溶液 (B) 的外观和丁达尔现象

Fig. 3 Appearance and Tyndall effect of nitidine chloride solution (A) and NC-Lips solution (B)

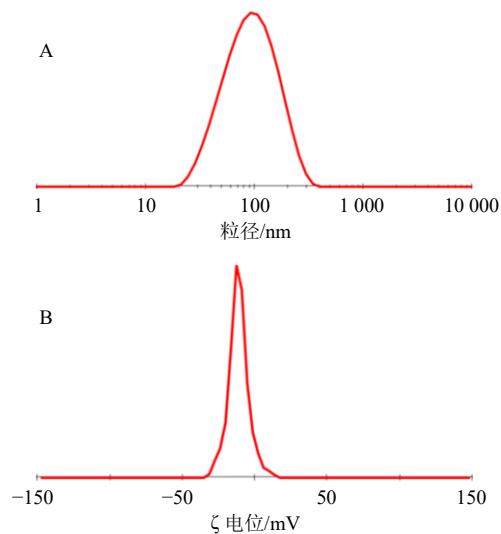


图4 NC-Lips 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 4 Particle size (A) and ζ potential (B) of NC-Lips

2.6.3 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察形态 将新制备的最优处方的脂质体以纯水适度稀释后, 取少许滴加于覆有碳膜的铜网表面, 使用 2% 磷钨酸进行负染色, 自然晾干后置于 TEM 下观察并拍照, 结果见图 5。视野中可观察到脂质体典型的囊泡样结构, 视野内颗粒形态并不均一, 同时伴随少量不规则碎片及轻微聚集现象, 整体符合脂质体微观形貌特征。

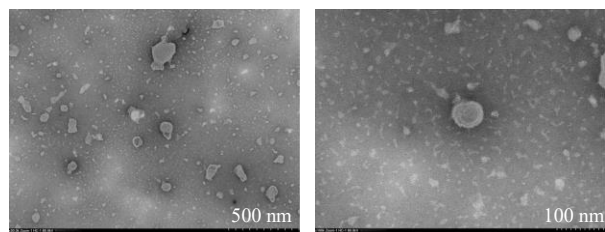


图 5 NC-Lips 的 TEM 图

Fig. 5 TEM of NC-Lips

表 9 储藏稳定性试验 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Storage stability test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	包封率/%	载药量/%	渗漏率/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	83.78±0.56	4.21±0.43	0	77.61±0.28	0.209±0.020	-11.78±0.16
2	83.20±0.17	4.19±0.04	0.28±0.12	77.65±0.83	0.210±0.070	-10.41±0.26
4	81.95±0.32	4.14±0.02	2.70±0.01	77.32±0.14	0.202±0.040	-11.28±0.79
6	81.88±0.10	4.10±0.38	3.95±0.04	78.48±0.48	0.198±0.050	-11.28±0.18
8	78.54±1.70	4.10±0.29	7.20±0.07	76.53±0.97	0.206±0.010	-11.43±0.57
10	77.68±2.34	3.98±0.44	8.85±0.34	78.58±0.69	0.210±0.020	-11.44±0.39
12	76.44±2.33	3.95±0.11	10.10±0.01	78.00±0.13	0.205±0.050	-10.08±0.24
14	74.20±1.90	3.83±0.06	12.80±0.01	78.12±0.22	0.211±0.060	-11.84±0.06
30	64.50±0.22	3.66±0.33	23.70±0.01	78.53±0.36	0.216±0.030	-10.18±0.85

缓慢上升趋势，至第 30 天时渗漏率为 23.70%，小于 30%，处于可接受范围。

脂质体储存过程中磷脂组分易发生氧化降解，可破坏磷脂双分子层膜结构，进而引起粒径增大、电位改变、内容物泄漏升高及体系聚集沉淀。本研究在 4 ℃ 条件下储存期间，脂质体粒径、PDI、ζ 电位及药物泄漏率整体稳定，说明该处方在冷藏条件下磷脂氧化程度较低，膜结构可维持相对完整，具备良好的短期储存稳定性。

渗漏率 = (初始脂质体的包封率 - 贮藏后脂质体的包封率) / 初始脂质体的包封率 (6)

2.6.5 体外释药特性研究 取等药物质量浓度 (1 mg/mL) 的 NC 溶液与 NC-Lips 溶液各 1.5 mL，分别装入已活化的透析袋 (截留相对分子质量 3 500) 内，扎紧两端。将透析袋置于含 40 mL 释放介质的容器中，体系满足漏槽条件。释放介质为 pH 7.4 PBS 溶液，加入 0.5% 羧甲基纤维素钠以增溶、防止药物析出，同时模拟体内生理黏度环境，整个系统在 (37.0±0.5) ℃ 的恒温振荡器中运行。于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、48、72 h 时间点分别取出 1 mL 释放液，并立即补加等温等体积的空白释放介质。取出液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后，按照“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积，计算药物累积释放率

2.6.4 储存稳定性考察 将同批次按最优处方新制备的 NC-Lips 置于 4 ℃ 条件下储存，在 1~14 d 和 30 d 取样，分别观察 NC-Lips 的外观并测定其包封率、载药量、泄漏率、粒径、PDI 以及 ζ 电位，以考察脂质体的稳定性，结果见表 9。结果显示，NC-Lips 在 4 ℃ 条件下储存 30 d 后，外观未见明显变化，仍能保持均一、稳定的物理状态，粒径、PDI 以及 ζ 电位变化幅度较小，渗漏率随储存时间延长呈

(M)，绘制释放曲线，并采用相应数学模型对释放行为进行拟合。结果如图 6 及表 10 所示。释放曲线显示，NC 溶液释放速度相对较快，12 h 累积释放率约达 60%，72 h 达 80%；而 NC-Lips 的释放速率更平缓，12 h 累积释放率约为 40%，72 h 约达 60%，呈现出明显的缓控释特征。对释放数据进行模型拟合后，NC 溶液与 NC-Lips 的释放曲线均与 Ritger-Peppas 动力学释药模型的拟合度最高，提示两者释药过程均为药物扩散与骨架溶蚀协同作用的结果。尽管遵循相似的动力学机制，但 NC-Lips 的

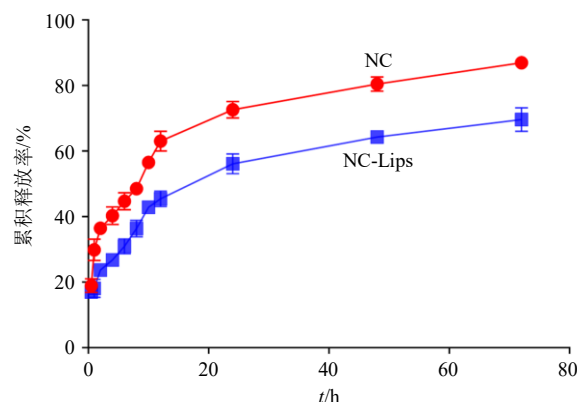


图 6 NC 和 NC-Lips 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Release profiles *in vitro* of nitidine chloride and NC-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 10 NC 和 NC-Lips 的释药模型拟合方程

Table 10 Drug release model fitting equations of NC and NC-Lips

模型	拟合方程	
	NC	NC-Lips
零级方程 $M_t = kt$	$M_t = 0.813\ 0\ t + 38.722\ 7$, $R^2 = 0.721\ 47$	$M_t = 0.707\ 6\ t + 27.598\ 9$, $R^2 = 0.747\ 70$
一级方程 $M_t = a(1 - e^{-kt})$	$M_t = 77.777\ 6(1 - e^{-0.165\ 0\ t})$, $R^2 = 0.769\ 14$	$M_t = 64.103\ 7(1 - e^{-0.125\ 6\ t})$, $R^2 = 0.847\ 26$
Higuchi 方程 $M_t = kt^{1/2}$	$M_t = 8.338\ 7\ t^{1/2} + 24.276\ 0$, $R^2 = 0.905\ 81$	$M_t = 7.187\ 0\ t^{1/2} + 15.265\ 8$, $R^2 = 0.917\ 39$
Ritger-Peppas 方程 $M_t = at^k$	$M_t = 29.390\ 7\ t^{0.263\ 49}$, $R^2 = 0.967\ 70$	$M_t = 20.184\ 9\ t^{0.300\ 7}$, $R^2 = 0.957\ 53$

释放速率显著更平缓, 这些差异结果表明脂质体的磷脂双分子层结构为 NC 提供了释放屏障, 有效实现药物的缓控释特性。游离 NC 为难溶性天然生物碱, 在释放介质中溶解度有限, 易发生缓慢溶解与扩散行为, 因此表现出释药速率偏慢的特征, 而脂质体组则依靠载体缓释效应, 呈现出更为平稳、持久的释药趋势。

2.7 体外抗肿瘤活性研究

2.7.1 细胞毒性检测 采用 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率, 并设置对照组 (B-Lips) 以排除载体非特异性影响。取对数生长期的胆管癌 TFK-1 细胞, 按每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁。弃去上清后, 分别加入浓度为 2、4、6、8、12 $\mu\text{mol/L}$ 的 NC 及其 NC-Lips, 同时设置未加药物的阴性对照组, 另设置空白组 (不接种细胞, 不给药); 每组设 6 个复孔, 继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下分别培养 24、48、72 h, 移除各孔培养基, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 孵育 2 h 后于 450 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 并按下式计算

细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白}}) \quad (7)$$

实验结果如表 11、12 所示。在实验浓度范围内 B-Lips 组细胞存活率均 >90%, 载体生物相容性良好, 对细胞无明显毒性, 不会对后续细胞增殖、凋亡及周期检测结果产生非特异性干扰。与游离 NC 相比, NC-Lips 对 TFK-1 细胞的增殖抑制作用呈时间与浓度相关性增强, 6~12 $\mu\text{mol/L}$ 抑制作用更优 ($P < 0.01$)。12 $\mu\text{mol/L}$ NC-Lips 作用 72 h 细胞存活

表 11 空白脂质体在 24、48、72 h 的 TFK-1 细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 11 TFK-1 cell survival rates of blank liposomes at 24, 48, 72 h ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

空白脂质体/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
2	102.66 $\pm$ 2.05	97.66 $\pm$ 3.68	96.01 $\pm$ 2.16
4	98.33 $\pm$ 4.10	94.33 $\pm$ 2.05	94.66 $\pm$ 2.49
6	96.90 $\pm$ 1.27	96.66 $\pm$ 0.47	92.76 $\pm$ 2.05
8	96.97 $\pm$ 1.39	94.26 $\pm$ 1.03	92.66 $\pm$ 2.05
12	94.40 $\pm$ 1.17	90.66 $\pm$ 1.69	91.40 $\pm$ 0.43

表 12 不同给药组对 TFK-1 细胞增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 12 Inhibitory effect of different administration groups on proliferation of TFK-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	24 h 细胞存活率/%					
	0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
NC	100.00 $\pm$ 0.02	98.23 $\pm$ 4.53	90.24 $\pm$ 3.75	76.77 $\pm$ 2.52	72.20 $\pm$ 5.76	54.05 $\pm$ 3.13
NC-Lips	100.00 $\pm$ 0.02	102.83 $\pm$ 1.23	93.02 $\pm$ 2.03	67.61 $\pm$ 5.78	51.15 $\pm$ 3.39***	39.47 $\pm$ 0.93**
组别	48 h 细胞存活率/%					
	0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
NC	100.00 $\pm$ 0.05	86.30 $\pm$ 0.91	71.21 $\pm$ 4.09	46.60 $\pm$ 3.58	38.12 $\pm$ 2.91	22.90 $\pm$ 2.97
NC-Lips	100.00 $\pm$ 0.74	94.39 $\pm$ 0.88***	65.77 $\pm$ 1.89***	14.83 $\pm$ 4.53***	10.47 $\pm$ 1.73***	8.17 $\pm$ 1.90***
组别	72 h 细胞存活率/%					
	0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
NC	100.00 $\pm$ 0.04	83.69 $\pm$ 4.29	53.29 $\pm$ 0.86	23.05 $\pm$ 0.64	20.83 $\pm$ 1.18	9.39 $\pm$ 1.03
NC-Lips	100.00 $\pm$ 0.03	46.65 $\pm$ 4.06***	7.16 $\pm$ 0.98***	4.32 $\pm$ 0.83***	4.20 $\pm$ 1.20***	3.40 $\pm$ 0.51***

与同一质量浓度下 NC 组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs NC group at the same mass concentration.

率仅为 $(3.40 \pm 0.51)\%$ 。提示将 NC 制备为脂质体可显著增强其对 TFK-1 细胞的毒性作用。2、4 $\mu\text{mol/L}$ 条件下, NC 对 TFK-1 细胞的抑制效果略优于 NC-Lips 组, 这与相关研究结果一致, 推测与脂质体的缓释特性相关, 脂质体表面吸附的少量药物及体系中游离药物耗尽后, 内部包裹的 NC 需通过脂质双分子层屏障缓慢扩散, 或伴随脂质膜重排、融合引发的载体结构破坏实现持续释放, 导致低浓度下药物起效速度略慢于游离药物^[24]。而在中、高浓度 (6~12 $\mu\text{mol/L}$) 下, 尤其在 12 $\mu\text{mol/L}$ 作用 72 h 时, NC-Lips 组细胞存活率 $(3.40 \pm 0.51)\%$ 显著低于游离 NC 组 $(9.39 \pm 1.03)\%$ ($P < 0.001$), 这一结果表明, 将 NC 制备成脂质体可显著增强其对 TFK-1 细胞的毒性作用。

2.7.2 细胞凋亡分析 采用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒对 TFK-1 细胞凋亡情况进行测定。将细胞按 1×10^6 个/皿的密度接种于培养皿中, 贴壁后分别给予 0、3、6、12 $\mu\text{mol/L}$ 的 NC 及其 NC-Lips 制剂处理, 以正常培养、不做任何药物及脂质体处理的 TFK-1 细胞作为阴性对照, 并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养 24 h。处理结束后, 采用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化收集细胞, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 所得细胞沉淀用 195 μL Annexin V 结合缓冲液重悬。随后分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 染色液, 室温避光孵育 15 min。染色后的样本在 1 h 内通过流式细胞仪进行检测, 其中 Annexin V-FITC 阳性细胞即判定为凋亡细胞。

结果如图 7 及表 13 所示, 对照组细胞凋亡率维持在较低水平, 为 $(13.57 \pm 0.11)\%$; 经 NC 处理后, 3、6、12 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 细胞凋亡率分别为 $(18.76 \pm 1.34)\%$ 、 $(18.74 \pm 2.01)\%$ 、 $(21.59 \pm 1.02)\%$, 呈现一定的剂量相关性; 而 NC-Lips 处理组的凋亡率随浓度升高显著上升, 3、6、12 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下分别达 $(18.87 \pm 1.01)\%$ 、 $(25.61 \pm 1.13)\%$ 、 $(28.90 \pm 2.38)\%$ 。相同浓度下 NC-Lips 组的凋亡率显著高于 NC 组, 其中 6、12 $\mu\text{mol/L}$ 时差异具有统计学意义 ($P < 0.001$), 提示 NC-Lips 对 TFK-1 细胞的凋亡诱导作用强于 NC。

2.7.3 细胞周期检测 采用细胞周期检测试剂盒分析 TFK-1 细胞周期分布。将细胞按 1×10^6 个/皿的密度接种于培养皿, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5.0% CO_2 条件下培养至贴壁后, 分别用 3、6、12 $\mu\text{mol/L}$ 的 NC 及相应 NC-Lips 制剂处理 24 h。处理结束后收集细胞,

经 PBS 洗涤, 用 70%乙醇于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。离心去除固定液, 将细胞重悬于含碘化丙啶 (PI) 的细胞周期染色缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。随后使用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测 PI 红色荧光信号, 分析各周期时相细胞比例。

实验结果如图 8 及表 13 所示, 对照组细胞的 G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期占比分别为 $(38.08 \pm 4.59)\%$ 、 $(38.05 \pm 2.53)\%$ 、 $(23.85 \pm 2.46)\%$ 。经 NC 处理后, 随着浓度升高, S 期占比逐渐降低, 12 $\mu\text{mol/L}$ 时降至 $(7.39 \pm 1.74)\%$, G_2/M 期占比逐步上升至 $(50.45 \pm 3.23)\%$ 。NC-Lips 处理组中, 3 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下 G_0/G_1 期、 G_2/M 期占比与 NC 组无显著差异; 6、12 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下周期分布差异更明显, 12 $\mu\text{mol/L}$ 时 G_0/G_1 期占比降至 $(25.93 \pm 1.78)\%$, G_2/M 期占比升至 $(66.23 \pm 3.31)\%$, 且 S 期占比 $(7.46 \pm 0.16)\%$ 高于同期 NC 组, 其中, 12 $\mu\text{mol/L}$ 时 G_0/G_1 期、 G_2/M 期占比的差异具有统计学意义。上述结果提示, NC 与 NC-Lips 均可诱导 TFK-1 细胞发生 G_2/M 期阻滞, 且 NC-Lips 在中高浓度下的阻滞作用强于 NC。

3 讨论

近年来, 纳米递送系统在抗肿瘤领域的应用日益成熟, 通过载体介导的药物靶向递送的方式, 可有效改善疏水性药物的溶解性与生物利用度, 同时降低药物对正常组织的毒性, 为肿瘤治疗提供了高效低毒的新思路^[18]。脂质体作为经典的纳米载体, 凭借磷脂双分子层的独特结构, 既能包载多种类型药物, 又具备良好的生物相容性, 其表面修饰技术的发展进一步解决了体循环中易被网状内皮系统清除的难题, 延长了药物体内循环时间。胆管癌作为高侵袭性肿瘤, 单一药物治疗易因耐药性导致疗效不佳, 而基于纳米载体的药物递送系统可通过调控药物释放动力学、提高肿瘤部位药物富集, 增强对肿瘤细胞增殖、凋亡及周期进程的调控作用^[25-26]。NC 作为具有明确抗胆管癌活性的天然生物碱^[13], 其临床转化受限于水溶性差等缺陷, 将其制备为脂质体制剂, 可借助载体优势克服其缺陷, 同时可能通过协同调控肿瘤细胞死亡通路提升抗肿瘤效果, 为胆管癌的治疗提供新的制剂方案。

本研究采用单因素考察结合 BBD-RSM 优化 NC-Lips 处方工艺, 最终确定最优参数为 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 用量 34.79 mg、药脂比 1 : 15.15、膜材比 17.88。验证实验表明, 最优处方制备的 NC-Lips 呈

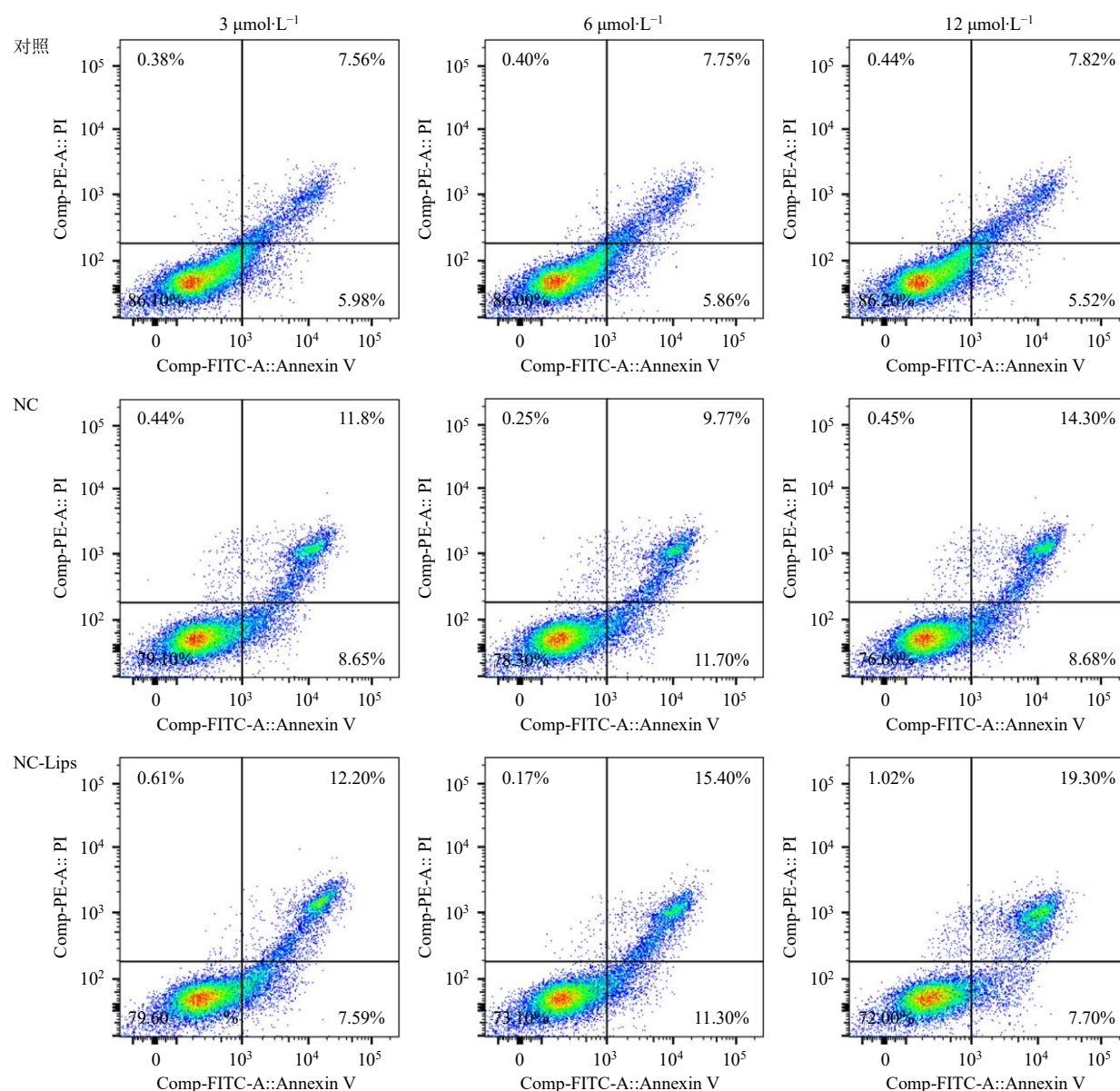


图 7 不同给药组对 TFK-1 细胞凋亡的影响

Fig. 7 Effects of different administration groups on apoptosis of TFK-1 cells

表 13 细胞凋亡分析和细胞周期分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 13 Cell apoptosis analysis and cell cycle analysis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞凋亡率/%	细胞周期分布/%		
			G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	—	13.57±0.11	38.08±4.59	38.05±2.53	23.85±2.46
NC 原料药	3	18.76±1.34**	39.83±4.75	22.43±1.61***	37.83±1.64***
	6	18.74±2.01**	35.02±2.43	19.18±4.53***	45.82±3.42***
	12	21.59±1.02***	41.96±1.86***	7.39±1.74***	50.45±3.23***
NC-Lips	3	18.87±1.01**	44.94±2.35	9.67±0.41***###	45.29±2.35***
	6	25.61±1.13***###	35.00±1.34	8.71±0.50***##	56.28±0.95***##
	12	28.90±2.38***###	25.93±1.78###	7.46±0.16***	66.23±3.31***###

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与同一质量浓度下 NC 组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs NC group at the same mass concentration.

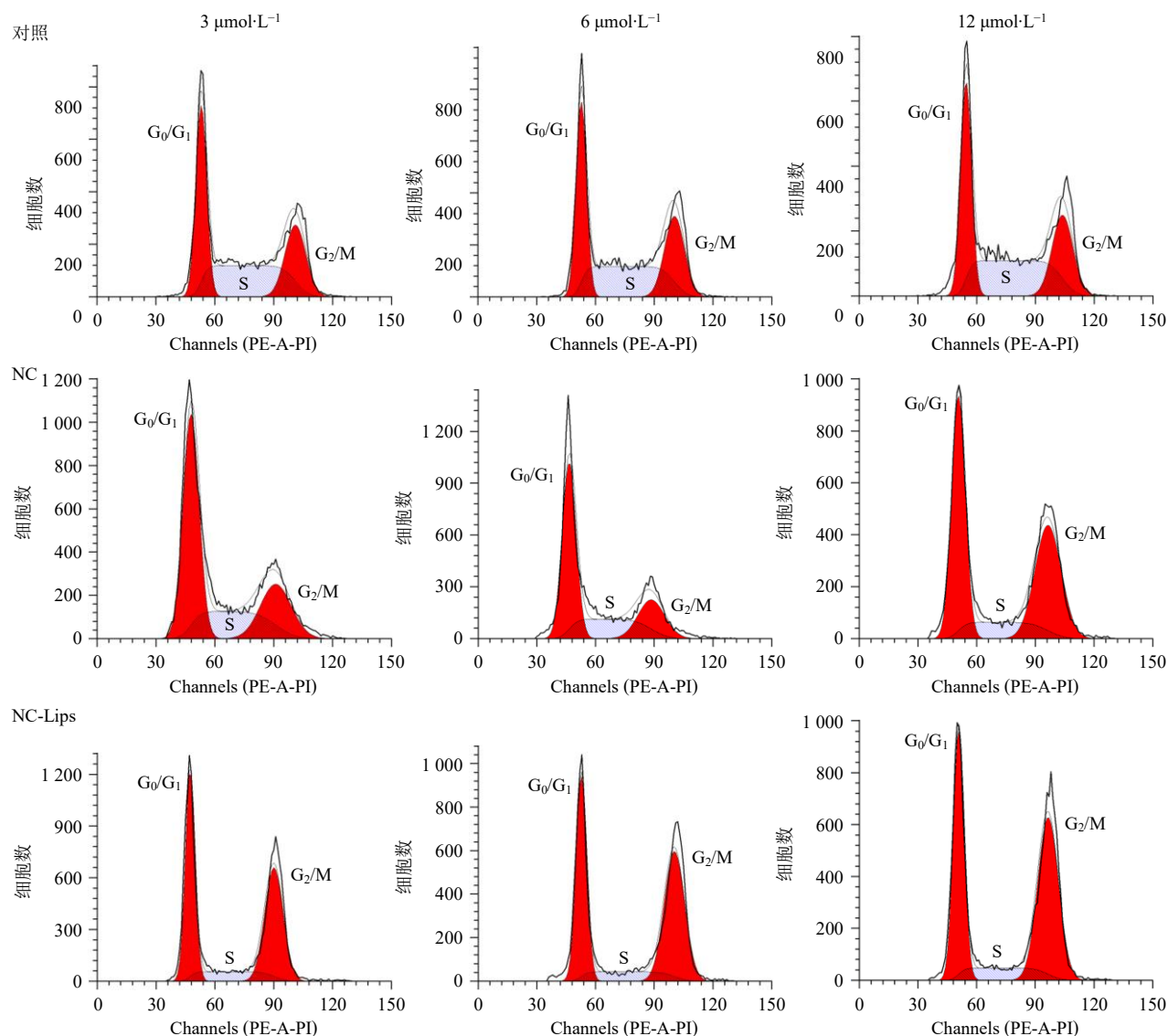


图 8 不同给药组对 TFK-1 细胞周期分布的影响

Fig. 8 Effects of different administration groups on cell cycle distribution of TFK-1 cells

典型的囊泡样结构，粒径均一，包封率和载药量均较优，且 4 ℃ 储存 30 d 稳定性良好，渗漏率维持在较低的水平。其抗渗漏性能的提升，主要源于处方中胆固醇与磷脂的合理配比：胆固醇插入磷脂双分子层后增强了膜刚性，减少了分子间隙，同时 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 的立体屏障效应进一步维持了膜结构的完整性，减少了药物渗漏。

本研究中体外释放实验显示 NC 溶液与 NC-Lips 的体外释放曲线均与 Ritger-Peppas 模型拟合度最高，表明二者释药均为药物扩散与骨架/载体溶蚀协同作用的结果。二者虽动力学机制一致，但 NC-Lips 释放速率更平缓，核心是磷脂双分子层形成的结构屏障，大幅降低药物扩散速率，且其渐进式溶蚀解体进一步调控释药过程，实现药物缓控释。该

结果证实 NC-Lips 作为 NC 载体的有效性，为后续体内药动学及胆管癌靶向药效研究奠定基础，其释药速率仍可通过处方优化进一步调控。

体外抗肿瘤实验证实，NC-Lips 对 TFK-1 细胞的增殖抑制、凋亡诱导及 G₂/M 期阻滞作用均显著优于游离药物，且该优势在中、高浓度下更为突出，其机制一方面是聚乙二醇修饰的 NC-Lips，可以借助肿瘤组织高通透性和滞留效应实现被动靶向富集，提高肿瘤局部药物浓度。脂质体的磷脂双分子层结构更容易被肿瘤细胞通过内吞作用批量吸收，相比游离药物只能被动渗透进入细胞方式。另一方面，NC-Lips 的缓慢释放特性在中、高浓度下更能体现优势，因游离的 NC 会更容易降解失效且可能诱导耐药。

结合本课题组前期研究, NC 可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路、干扰细胞周期调控、诱导线粒体途径凋亡发挥抗胆管癌效应。NC-Lips 凭借脂质体的高胞内摄取、缓释与富集优势, 可在细胞内维持更稳定有效的药物浓度, 进而强化对 PI3K/Akt 等关键通路及下游周期、凋亡相关分子的调控作用, 因此中、高浓度下 NC-Lips 的抗肿瘤效果远优于 NC。本研究中对照组细胞凋亡率高于常规肿瘤细胞培养的空白组凋亡率, 这一现象可能与多因素相关。TFK-1 细胞作为胆管癌高侵袭性细胞系, 其自身代谢活性强, 体外培养过程中易出现自发性凋亡^[27], 细胞分离与接种过程中的机械损伤、培养基营养成分轻微波动等, 可能激活部分凋亡信号通路^[28]。此外, 实验所用血清批次差异也可能影响细胞稳态, 有研究表明血清中微量细胞因子失衡可诱导肿瘤细胞低水平凋亡^[29]。这一结果说明, 在体外抗肿瘤实验操作过程中需严格控制培养条件, 必要时采用空白脂质体组进一步排除非特异性影响。在本研究过程中, 发现在较高浓度时, 制备的脂质体脂质会产生沉降现象, 这可能与磷脂分子的亲疏水平衡破坏以及超过脂质体的负载能力相关, 长期储存过程中脂质氧化也可能影响制剂性能, 因此有研究建议添加维生素 E 等抗氧化剂延长储存周期^[30]。本研究中 NC-Lips 30 d 包封率仍维持在 60% 以上, 表明处方中胆固醇的抗氧化作用在一定程度上延缓了脂质氧化。

然而, 本研究仍存在一定局限性, 目前仅采用 TFK-1 一种胆管癌细胞系开展体外实验, 未在 QBC939、HuCCT1 等其他胆管癌亚型细胞中验证其抗肿瘤活性, 亦未在正常肝细胞中评估其安全性, 导致研究结论的普适性与安全性评价不够全面, 同时仅采用 pH 7.4 PBS (含 0.5% 羧甲基纤维素钠) 作为体外释药介质, 未模拟体内复杂生理环境, 仅考察短期储存稳定性, 未开展长期及冻干制剂稳定性研究, 稳定性数据不够充分, 此外本研究未通过 Western blotting、qPCR 等分子生物学实验深入验证 PI3K/Akt 等信号通路的调控机制, 机制阐释较为浅表, 且缺乏体内药动力学及动物实验数据支撑, 仅通过体外释放曲线推断缓释特性, 后续将扩大细胞系范围、完善长期及冻干制剂稳定性研究, 开展分子机制验证与体内药动力学、动物药效学评价, 从而完善整体研究体系, 为该脂质体制剂的后续开发奠定实验基础。

综上, 本研究构建的 NC-Lips 在理化性质、储存稳定性及体外抗胆管癌活性方面均表现出良好特征, 为 NC 的纳米递药研究提供了新的思路, 也为其后续机制探究与体内进一步评价奠定了实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Banales J M, Marin J J G, Lamarca A, *et al.* Cholangiocarcinoma 2020: The next horizon in mechanisms and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(9): 557-588.
- [2] Bertuccio P, Turati F, Carioli G, *et al.* Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2): 302-309.
- [3] Abou-Alfa G K, Sahai V, Hollebecque A, *et al.* Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: A multicentre, open-label, phase 2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(5): 671-684.
- [4] Bridgewater J, Galle P R, Khan S A, *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(6): 1268-1289.
- [5] Qurashi M, Vithayathil M, Khan S A. Epidemiology of cholangiocarcinoma [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2025, 51(2): 107064.
- [6] Ioka T, Kanai M, Kobayashi S, *et al.* Randomized phase III study of gemcitabine, cisplatin plus S-1 versus gemcitabine, cisplatin for advanced biliary tract cancer (KHBO1401-MITSUBA) [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2023, 30(1): 102-110.
- [7] Kobayashi S, Terashima T, Shiba S, *et al.* Multicenter retrospective analysis of systemic chemotherapy for unresectable combined hepatocellular and cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(8): 2549-2557.
- [8] Cheon J, Lee C K, Sang Y B, *et al.* Real-world efficacy and safety of nab-paclitaxel plus gemcitabine-cisplatin in patients with advanced biliary tract cancers: A multicenter retrospective analysis [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2021, 13: 17588359211035983.
- [9] Kumar V, Rahman M, Gahtori P, *et al.* Current status and future directions of hepatocellular carcinoma-targeted nanoparticles and nanomedicine [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2021, 18(6): 673-694.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 584.
- [11] Cui Y, Wu L H, Cao R X, *et al.* Antitumor functions and mechanisms of nitidine chloride in human cancers [J]. *J*

- Cancer*, 2020, 11(5): 1250-1256.
- [12] Lu Q, Luo S, Shi Z F, *et al.* Nitidine chloride, a benzophenanthridine alkaloid from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC., exerts multiple beneficial properties, especially in tumors and inflammation-related diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1046402.
 - [13] Qiu W A, Yu Q X, He Y P, *et al.* Integrated network pharmacology and metabolomics to investigate the effect and mechanism of nitidine chloride against cholangiocarcinoma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2025, 265: 117063.
 - [14] 叶勇, 章波, 檀燕君, 等. 氯化两面针碱磷脂复合物制备工艺的正交设计研究 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(11): 1839-1843.
 - [15] 张佳毅. 氯化两面针碱长效微球制备工艺与质量标准的研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2019.
 - [16] Lu J M, Zeng Y Z, Zhong H S, *et al.* Dual-stimuli-responsive gut microbiota-targeting nitidine chloride-CS/PT-NPs improved metabolic status in NAFLD [J]. *Int J Nanomed*, 2024, 19: 2409-2428.
 - [17] Li D N, Liu S G, Zhu J H, *et al.* Folic acid modified TPGS as a novel nano-micelle for delivery of nitidine chloride to improve apoptosis induction in Huh7 human hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2021, 22(1): 1.
 - [18] Allen T M, Cullis P R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(1): 36-48.
 - [19] Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, *et al.* Advances and challenges of liposome assisted drug delivery [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 286.
 - [20] Gabizon A, Shmeeda H, Horowitz A T, *et al.* Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(8): 1177-1192.
 - [21] Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(3): 131-135.
 - [22] 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.
 - [23] García M C, Naitlho N, Calderón-Montaña J M, *et al.* Cholesterol levels affect the performance of AuNPs-decorated thermo-sensitive liposomes as nanocarriers for controlled doxorubicin delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(7): 973.
 - [24] 丘炜桢, 卢光照, 俞千雪, 等. 小白菊内酯脂质体的制备工艺优化及体外评价 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2799-2810.
 - [25] Ngernyuang N, Seubwai W, Daduang S, *et al.* Targeted delivery of 5-fluorouracil to cholangiocarcinoma cells using folic acid as a targeting agent [J]. *Mater Sci Eng C*, 2016, 60: 411-415.
 - [26] Mesquita B, Singh A, Prats Masdeu C, *et al.* Nanobody-mediated targeting of zinc phthalocyanine with polymer micelles as nanocarriers [J]. *Int J Pharm*, 2024, 655: 124004.
 - [27] Xu Y C, Cui J, Zhang L J, *et al.* Anti-apoptosis effect of decoy receptor 3 in cholangiocarcinoma cell line TFK-1 [J]. *Chin Med J*, 2018, 131(1): 82-87.
 - [28] Takao S, Taya M, Chiew C. Mechanical stress-induced cell death in breast cancer cells [J]. *Biol Open*, 2019, 8(8): bio043133.
 - [29] Jaura A I, Flood G, Gallagher H C, *et al.* Differential effects of serum from patients administered distinct anaesthetic techniques on apoptosis in breast cancer cells *in vitro*: A pilot study [J]. *Br J Anaesth*, 2014, 113: i63-i67.
 - [30] 郭健, 曾华婷, 陈彦. 氧化苦参碱药理作用及其新型给药系统的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(12): 4633-4643.

[责任编辑 郑礼胜]