

pH 敏感/叶酸修饰白藜芦醇脂质体的制备、表征及对子宫内膜癌荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用

高娟¹, 李伟宏¹, 李秀芬¹, 董莹莹¹, 户富栋², 郝海军³, 王风云^{1*}

1. 河南应用技术职业学院, 河南 郑州 450042

2. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450002

3. 上海市中药研究所, 上海 201401

摘要: 目的 构建 pH 敏感/叶酸修饰白藜芦醇脂质体 (pH-sensitive/folic acid-modified resveratrol liposomes, pH/FA-Res-Lips), 并进行理化性质和抗肿瘤评价。方法 单因素法考察 pH/FA-Res-Lips 主要影响因素, 使用 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 pH/FA-Res-Lips 处方工艺。采用紫外-可见光吸收光谱 (ultraviolet-visible absorption spectroscopy, UV)、傅里叶变换红外光谱法 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 进行表征, 考察 pH/FA-Res-Lips 在不同 pH 值磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的释药行为。采用 MTT 法和 Annexin V/PI 双染法考察 pH/FA-Res-Lips 对人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的生长抑制及促凋亡作用。采用 Ishikawa 细胞建立子宫内膜癌荷瘤小鼠模型, 分为模型对照组 (生理盐水)、阳性对照组 (顺铂, 2.0 mg/kg)、白藜芦醇组 (15 mg/kg)、白藜芦醇脂质体组 (Res-Lips, 15 mg/kg)、pH-Res-Lips 组 (15 mg/kg)、FA-Res-Lips 组 (15 mg/kg)、pH/FA-Res-Lips 低剂量组 (10 mg/kg) 和 pH/FA-Res-Lips 高剂量组 (15 mg/kg), 比较 pH/FA-Res-Lips 体内抗肿瘤效果。通过血液生化指标和小鼠主要脏器 HE 染色来评价 pH/FA-Res-Lips 安全性。结果 pH/FA-Res-Lips 最佳处方为磷脂与白藜芦醇用量比为 5.80:1, 磷脂与胆固醇用量比为 5.00:1, 磷脂与 DSPE-PEOz-FA 用量比为 5.30:1。pH/FA-Res-Lips 平均包封率、载药量、平均粒径和 ζ 电位分别为 $(85.74 \pm 1.09)\%$ 、 $(8.77 \pm 0.11)\%$ 、 (192.25 ± 5.38) nm 和 (-28.12 ± 1.20) mV。pH/FA-Res-Lips 未影响白藜芦醇化学结构, 白藜芦醇与脂质材料之间存在氢键络合作用。pH/FA-Res-Lips 外貌呈囊泡状。pH/FA-Res-Lips 在 pH 5.5、6.0 PBS 中累积释放度较高, 具有明显的 pH 敏感性。MTT 法结果显示, 白藜芦醇和 pH/FA-Res-Lips 对 Ishikawa 细胞半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 98.14、48.43 $\mu\text{g/mL}$, 并有效诱导细胞凋亡。pH/FA-Res-Lips 显著抑制了子宫内膜癌荷瘤小鼠肿瘤生长, 体质量未见显著性下降, pH/FA-Res-Lips (15 mg/kg) 将白藜芦醇 (15 mg/kg) 抑瘤率由 17.35% 提高至 66.67%。pH/FA-Res-Lips 未对荷瘤小鼠各个脏器产生影响, 使用安全性较高。结论 pH/FA-Res-Lips 显著提高了白藜芦醇抗肿瘤作用, 为进一步开发成抗肿瘤药物提供了实验依据。

关键词: 白藜芦醇; pH 敏感; 叶酸修饰; 子宫内膜癌; 抗肿瘤; 安全性评价

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)20-7368-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.20.010

Preparation, characterization of pH-sensitive/folic acid-modified resveratrol liposomes and its inhibitory effects on tumor of endometrial cancer-bearing mice

GAO Juan¹, LI Weihong¹, LI Xiufen¹, DONG Yingying¹, HU Fudong², HAO Haijun³, WANG Fengyun¹

1. Henan Vocational College of Applied Technology, Zhengzhou 450042, China

2. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China

3. Shanghai Institute of Chinese Medicine, Shanghai 201401, China

Abstract: Objective The pH-sensitive/folic acid-modified resveratrol liposomes (pH/FA-Res-Lips) was prepared, its physicochemical properties and antitumor effects were also studied. **Methods** The main influencing factors of pH/FA-Res-Lips were investigated by

收稿日期: 2025-05-17

基金项目: 2025 年度河南省科技攻关项目 (252102310468); 河南省高等学校重点科研项目计划 (23B320013); 河南应用技术职业学院 2023 年度校级课题 (2023-KJ-54); 河南省医学科技攻关计划 (SBGJ202102153)

作者简介: 高娟 (1985—), 女, 汉族, 硕士, 讲师, 研究方向为临床药学及妇科肿瘤治疗。Tel: (0371)67673862 E-mail: 446589899@qq.com

*通信作者: 王风云 (1973—), 女, 汉族, 硕士, 教授, 研究方向为妇科肿瘤治疗。Tel: (0371)67673862 E-mail: 1346709427@qq.com

single factor experiments, Box-Behnken response-surface design method (BBD-RSM) was employed to optimize prescriptions of pH/FA-Res-Lips. pH/FA-Res-Lips was characterized by ultraviolet-visible absorption spectroscopy (UV), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and transmission electron microscopy (TEM). Drug release behavior of pH/FA-Res-Lips in phosphate buffer saline solution (PBS) with different pH values was investigated. MTT method and Annexin V/PI double staining method were used to investigate the inhibitory and proapoptotic effects of pH/FA-Res-Lips on Ishikawa cells, respectively. Ishikawa cells were used to establish the mouse model of endometrial cancer, and divided into model control group (normal saline), positive control group (cisplatin, 2.0 mg/kg), resveratrol group (15 mg/kg), resveratrol liposomes (Res-Lips, 15 mg/kg) group, pH-sensitive resveratrol liposomes (pH-Res-Lips, 15 mg/kg) group, FA-modified resveratrol liposomes (FA-Res-Lips, 15 mg/kg) group, low-dose pH/FA-Res-Lips (10 mg/kg) group and high-dose pH/FA-Res-Lips (15 mg/kg) group, the *in vivo* antitumor effects of pH/FA-Res-Lips were compared. Safety evaluation of pH/FA-Res-Lips was performed by blood biochemical indexes and HE staining of the main organs of mice. **Results** Optimal formulation of pH/FA-Res-Lips nanoparticles as follows: phospholipids to resveratrol ratio was 5.80:1, phospholipids to cholesterol ratio was 5.00:1, and phospholipids to DSPE-PEOz-FA ratio was 5.30:1. Average envelopment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were $(85.74 \pm 1.13)\%$, $(8.77 \pm 0.16)\%$, (192.25 ± 7.61) nm and (-28.12 ± 1.20) mV, respectively. pH/FA-Res-Lips did not affect the structure of resveratrol, and there was a hydrogen bond complexation between resveratrol and lipid materials. The appearance of pH/FA-Res-Lips was vesicular. pH/FA-Res-Lips existed higher cumulative release in PBS of pH 5.5 and 6.0, which demonstrated that pH/FA-Res-Lips had obvious pH-sensitivity. MTT method results showed that IC₅₀ of resveratrol and pH/FA-Res-Lips on Ishikawa cells were 98.14, 48.43 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and effectively induced apoptosis of Ishikawa cells. pH/FA-Res-Lips significantly inhibited the tumor growth of endometrial cancer-bearing mice, and there was no significant decrease in body weight. pH/FA-Res-Lips (15 mg/kg) increased the tumor inhibition rate of resveratrol (15 mg/kg) from 17.35% to 66.67%. pH/FA-Res-Lips did not affect the organs of tumor-bearing mice, which showed that the safety was relatively high. **Conclusion** pH/FA-Res-Lips significantly enhanced the anti-tumor efficacy of resveratrol, which had the potential to be developed into an antitumor drug.

Key words: resveratrol; pH-sensitive; folic acid-modified; endometrial carcinoma; antitumor; safety evaluation

子宫内膜癌是发生于子宫内膜上皮的一种妇科恶性肿瘤,发病率逐年攀升^[1-2]。激素治疗、化疗等是临床治疗子宫内膜癌主要方法,但毒副作用较高,所以毒副作用小、活性高的中药抗肿瘤活性成分成为该领域的研究热点^[3]。白藜芦醇(resveratrol)属于非黄酮类多酚化合物,是藜芦、虎杖等植物中主要活性成分。国内外研究证明白藜芦醇具有显著的抗子宫内膜癌作用^[4-5],且毒性极小,具有较大的开发价值。但白藜芦醇溶解度仅 42.28 $\mu\text{g/mL}$ ^[6],导致溶出度极低,极大限制了白藜芦醇抗肿瘤药效。为使白藜芦醇充分发挥抗肿瘤作用,应解决其溶解度、溶出度等问题。目前关于白藜芦醇新型纳米制剂研究报道有脂质纳米粒^[7]、脂质体^[8]、纳米乳等^[9],虽然这些制剂解决了白藜芦醇溶解度及溶出度问题,但无法使药物在偏酸性的肿瘤部位智能释药,抗肿瘤药效仍不大理想。

人体正常组织 pH 值一般在 7.4 左右,但由于肿瘤细胞旺盛的糖酵解能力导致肿瘤组织呈弱酸性^[10-11],因此,基于这种 pH 差异构建 pH 敏感给药系统利于增强药效。pH 敏感脂质体(pH-sensitive liposomes)是通过普通脂质体处方中引入 pH 敏感材料,在弱碱性环境中可保持结构相对稳定,但对

肿瘤组织 pH 值异常变化具有敏锐反应,触发 pH 敏感脂质体结构改变或破坏,进而快速释放抗肿瘤药物^[12]。肿瘤组织环境与正常组织 pH 值差异较小^[10],仅靠 pH 值差异并不能有效实现在肿瘤组织中智能释药^[13],导致抗肿瘤药效仍不理想。

叶酸受体在肿瘤细胞表面过度表达,但在正常细胞表面极少表达^[14]。叶酸(folic acid)是一种糖基磷脂酰肌醇偶联蛋白,与叶酸受体有很高的亲和力,因此,叶酸受体的介导作用也可作为提高药物抗肿瘤药效的策略,但仍然受到肿瘤部位药物释放量不足的限制,进而影响了抗肿瘤药效。将 pH 敏感响应和叶酸受体介导 2 种策略联合应用于肿瘤治疗,可实现优势互补,有望进一步提高抗肿瘤药效。二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚(2-乙基-2-噁唑啉)-叶酸(DSPE-PEOz-FA)是一种由 DSPE、PEOz 和叶酸基团构成的两亲性分子,生物相容性良好,其中 PEOz 与 PEG 具有相似的理化性质,可以替代 PEG 作为新型长循环材料^[15],PEOz 结构具有显著的 pH 敏感特性^[12,15]。故本研究采用 DSPE-PEOz-FA 作为脂质体修饰材料,构建 pH 敏感/叶酸修饰白藜芦醇脂质体(pH-sensitive/folic acid-modified resveratrol liposomes, pH/FA-Res-Lips),Box-Behnken 设计-效

应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 pH/FA-Res-Lips 的处方工艺, 并与白藜芦醇脂质体 (resveratrol liposomes, Res-Lips)、pH 敏感白藜芦醇脂质体 (pH-sensitive resveratrol liposome, pH-Res-Lips)、叶酸修饰白藜芦醇脂质体 (folic acid modified resveratrol liposome, FA-Res-Lips) 比较其在理化性质、储存稳定性、体内外抗肿瘤药效等方面差异, 为后续研究奠定实验基础, 也为白藜芦醇应用于子宫内膜癌的治疗提供参考资料。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MS-105/A 型电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; SONICA 型实验室超声仪, 意大利 SOLTEC 公司; Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Hei-Mix S 型磁力搅拌器型磁力搅拌器, 德国 Heidolph 公司; Zetasizer Nono ZS-90 型粒度测定仪, 英国马尔文公司; C5050 型高速离心机, 上海元析仪器有限公司; RT61212 型溶出仪, 深圳市锐拓仪器设备有限公司; UV-3600 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; 20S-TWIN 型透射电子显微镜, 美国 FEI 公司; Nicolet iS10 型傅里叶变换红外光谱仪, 上海柜谷科技发展有限公司; MDF-436 型超低温冰箱, 日本 SANYO 公司; Aiphal-2L 型真空冷冻干燥机, 德国 CHRIST 公司; CF40-8 型细胞培养箱, 北京昊诺斯科技有限公司; JF-1506 型酶标仪, 杭州旌斐仪器科技有限公司; CX23LEORFS1C 型光学显微镜, 迈时迪科技有限公司; LSR Fortessa 型流式细胞仪, 美国 BD 仪器公司; BSC-150 型恒温恒湿箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.2 材料

白藜芦醇原料药, 批号 T20220220, 质量分数为 97.0%, 东明格鲁斯生物科技有限公司; 白藜芦醇对照品, 批号 111535-202117, 质量分数为 99.4%, 中国食品药品检定研究院; DSPE-PEOz-FA (批号 20230318)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-叶酸 (DSPE-PEG-FA, 批号 20250317)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚(2-乙基-2-噁唑啉) (DSPE-PEOz, 批号 20250409), 重庆渝德医药科技有限公司; 胆固醇, 批号 9328010130, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 磷脂, 批号 20220317, 上海辅必成医药科技公司; 甘露醇, 批号 GLC22042604, 青岛明月海藻集团有限公司; 乳糖, 批号 K65478, 美国

Sigma 公司; 戊巴比妥钠, 批号 MCK19228, 南京北鱼生物科技有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 批号 500M0231, 美国 Amresco 公司; RPMI1640 培养基, 批号 BC20231121, 南京生航生物技术有限公司; 顺铂, 批号 SC8452, 上海 Ruibio 公司; Annexin V/PI 试剂盒, 批号 20250322, 碧云天生物技术有限公司。

1.3 细胞与动物

人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。Balb/c 小鼠体质量为 18~22 g, 雌性, 4~6 周龄, 购自河南省实验动物中心, 动物生产许可证号 SCXK (豫) 2022-001。动物实验经河南应用技术职业学院伦理委员会批准, 批准号为 202310-017。

2 方法与结果

2.1 pH/FA-Res-Lips 的制备

取 50 mg 白藜芦醇置于茄形瓶中, 加入处方量的磷脂、胆固醇和 DSPE-PEOz-FA, 再加入 30 mL 混合溶剂 (二氯甲烷-乙醇 1:2), 600 r/min 磁力搅拌至溶解澄清, 置于 50 °C 水浴中旋蒸除去有机溶剂, 使之在茄形瓶内壁形成均匀透明的脂质薄膜, 敞口置于 30 °C 真空干燥箱中过夜, 以除尽有机溶剂。将含脂质薄膜的茄形瓶置于 35 °C 水浴中, 加入一定体积的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS), 600 r/min 转速下磁力搅拌水化一定时间, 超声 (功率为 200 W) 5 min, 0.45 μm 水膜滤过, 即得 pH/FA-Res-Lips 混悬液。不含白藜芦醇的阴性样品同法制备。

2.2 pH/FA-Res-Lips 中白藜芦醇含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (50:50); 体积流量为 1.0 min/mL; 柱温为 30 °C; 检测波长为 306 nm; 进样体积为 10 μL。

2.2.2 白藜芦醇对照品溶液配制 精密称取白藜芦醇对照品 20.44 mg 置于 100 mL 量瓶中, 加乙腈溶解后定容, 即得 204.4 μg/mL 白藜芦醇对照品储备液。

2.2.3 线性关系考察 取“2.2.2”项下白藜芦醇对照品储备液, 采用乙腈-水 (50:50) 稀释成白藜芦醇质量浓度分别为 10.220 0、5.110 0、2.044 0、1.022 0、0.511 0、0.051 1 μg/mL 的系列对照品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定各个白藜芦醇质量浓度 (X) 的峰面积 (Y), 进行线性回归, 得标准曲线回归方程 $Y=26.004\ 8\ X+1.002\ 6$, $r=0.999\ 6$, 结果

表明,白藜芦醇在 0.051 1~10.220 0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.4 pH/FA-Res-Lips 供试品溶液的制备 精密吸取 pH/FA-Res-Lips 混悬液 1 mL,置于 50 mL 量瓶中,乙腈-水(50:50)混合溶剂 40 mL,超声 5 min 破坏 pH/FA-Res-Lips,放冷后用乙腈-水(50:50)稀释定容。8 000 r/min 离心(离心半径为 6.4 cm)6 min,精密吸取 2 mL 置于 10 mL 量瓶中,加乙腈-水(50:50)稀释定容,即得 pH/FA-Res-Lips 供试品溶液。

2.2.5 专属性考察 吸取不含白藜芦醇的阴性样品混悬液 1 mL,置于 50 mL 量瓶中,按照“2.2.4”项下方法制备阴性样品溶液。另取白藜芦醇对照品溶液(1.022 0 $\mu\text{g/mL}$)和 pH/FA-Res-Lips 供试品溶液,分别按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定,色谱图见图 1。pH/FA-Res-Lips 处方中辅料未对白藜芦醇色谱峰产生干扰,专属性高。

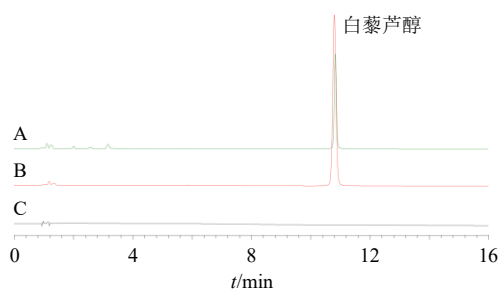


图 1 pH/FA-Res-Lips (A)、白藜芦醇对照品 (B) 和阴性样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of pH/FA-Res-Lips (A), resveratrol reference substance (B) and negative sample solution (C)

2.2.6 精密度考察 取质量浓度 10.220 0、1.022 0、0.051 1 $\mu\text{g/mL}$ 白藜芦醇对照品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定 6 次,白藜芦醇峰面积的 RSD 分别为 0.81%、0.44%、0.76%;各质量浓度连续测试 6 d,每天测试 1 次,白藜芦醇峰面积的 RSD 分别为 0.50%、0.33%、0.69%;表明日内、日间精密度良好。

2.2.7 稳定性考察 吸取 pH/FA-Res-Lips 供试品溶液置于室温下,于 0、3、6、9、12、24 h 分别按照“2.2.1”项下色谱条件测定白藜芦醇峰面积,计算得其 RSD 为 1.01%,结果表明 pH/FA-Res-Lips 供试品溶液稳定性良好。

2.2.8 重复性考察 吸取 pH/FA-Res-Lips 混悬液 1 mL,按照“2.2.4”项下方法制备 pH/FA-Res-Lips 供试品溶液 6 份,按照“2.2.1”项下色谱条件进行测

定,白藜芦醇质量浓度的 RSD 为 1.62%,表明该实验重复性良好。

2.2.9 加样回收率考察 精密吸取 pH/FA-Res-Lips 混悬液 0.5 mL,置于 50 mL 量瓶中,共 9 份,分成低、中、高 3 组,按标识量分别加入白藜芦醇对照品 50%、100%、150%,按照“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件测定白藜芦醇总量,计算得白藜芦醇的平均加样回收率为 101.06%,RSD 为 1.84%,表明该方法可用于测定 pH/FA-Res-Lips 中白藜芦醇含量。

2.2.10 样品测定 取待测 pH/FA-Res-Lips 样品,按照“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件测定,计算白藜芦醇含量。

2.3 pH/FA-Res-Lips 包封率、载药量、粒径及 ζ 电位的测定

精密吸取 pH/FA-Res-Lips 混悬液,按照“2.2.10”项下方法测定白藜芦醇总量(W_0)。精密吸取 pH/FA-Res-Lips 混悬液 1 mL,至超滤管内管(截留相对分子质量 10 000)中,8 000 r/min 离心(离心半径为 6.4 cm)6 min,测定外管液中游离白藜芦醇的量(W_1)。精密吸取 pH/FA-Res-Lips 混悬液 1 mL,置于-60 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中预冻 3 d,立即置于-30 $^{\circ}\text{C}$ 冻干机中,3 d 后取出即得 pH/FA-Res-Lips 冻干粉(不含冻干保护剂),称定质量,即为白藜芦醇、磷脂、胆固醇和 DSPE-PEOz-FA 的总质量($W_{\text{总}}$)。计算 pH/FA-Res-Lips 的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (W_0 - W_1) / W_0$$

$$\text{载药量} = (W_0 - W_1) / W_{\text{总}}$$

取 pH/FA-Res-Lips 混悬液,加入纯化水稀释 40 倍,置一次性比色皿中,于粒度分析仪上测定粒径和多分散指数(polydispersity index, PDI)。另取适量 pH/FA-Res-Lips 混悬液至专用电槽中测定 pH/FA-Res-Lips 的 ζ 电位。

2.4 pH/FA-Res-Lips 处方工艺单因素考察

2.4.1 磷脂和白藜芦醇用量比的考察 在磷脂与胆固醇用量比为 5:1,磷脂与 DSPE-PEOz-FA 用量比为 5:1,水相体积为 50 mL,水化时间为 60 min 条件下,考察磷脂和白藜芦醇用量比对 pH/FA-Res-Lips 的影响,结果见表 1。pH/FA-Res-Lips 包封率随着磷脂和白藜芦醇用量比的增加呈先增加后趋稳情况,说明适当增加磷脂用量利于提高包封率,磷脂和白藜芦醇用量比超过 6:1 后包封率增加趋势渐缓,但磷脂用量过大时导致材料浪费,故使载药量

表 1 磷脂和白藜芦醇用量比对包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of phospholipids and resveratrol amounts ratio on envelopment efficiency, drug loading and particle size ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷脂和白藜芦醇 用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
4 : 1	42.17±0.94	6.47±0.18	206.46±12.11
5 : 1	60.61±1.03	7.03±0.10	213.13±8.24
6 : 1	77.94±1.19	8.69±0.20	208.85±8.94
7 : 1	78.10±0.97	7.66±0.17	224.70±10.27
8 : 1	78.27±1.16	6.93±0.15	256.16±13.02

下降。pH/FA-Res-Lips 粒径随着磷脂和白藜芦醇用量比的增加呈增大趋势,可能是磷脂用量越大 pH/FA-Res-Lips 之间发生粘连、融合的几率越大。当磷脂和白藜芦醇用量比为 6 : 1 时,pH/FA-Res-Lips 包封率和载药量相对较大,粒径相对较小,故以磷脂和白藜芦醇用量比 6 : 1 为中心继续对两者用量比 5 : 1~7 : 1 区间进行筛选^[6]。

2.4.2 磷脂与胆固醇用量比的考察 在磷脂和白藜芦醇用量比 6 : 1,磷脂与 DSPE-PEOz-FA 用量比为 5 : 1,水相体积为 50 mL,水化时间为 60 min 条件下考察磷脂与胆固醇用量比对 pH/FA-Res-Lips 的影响,结果见表 2。pH/FA-Res-Lips 包封率和载药量随着磷脂与胆固醇用量比的增加呈先增加后减小趋势,可能是胆固醇用量比例较大时部分胆固醇占据了 pH/FA-Res-Lips 载药空间,导致白藜芦醇被排挤出去,影响了 pH/FA-Res-Lips 载药,故包封率及载药量较低^[6];磷脂与胆固醇用量比过大时导致胆固醇用量比例较小,不足以维持 pH/FA-Res-Lips 结构稳定性,容易使白藜芦醇发生泄漏^[7],故包封率及载药量下降。pH/FA-Res-Lips 粒径随着磷脂与

表 2 磷脂与胆固醇用量比对包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of phospholipids to cholesterol amounts ratio on envelopment efficiency, drug loading and particle size ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷脂与胆固醇 用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
3 : 1	60.84±1.08	6.21±0.23	262.96±10.43
4 : 1	71.18±0.94	7.77±0.15	236.23±9.83
5 : 1	78.43±1.07	8.73±0.16	210.41±11.05
6 : 1	75.71±1.26	8.49±0.24	214.51±13.17
7 : 1	69.76±1.33	7.96±0.13	211.97±9.69

胆固醇用量比的增加总体呈减小趋势,当磷脂与胆固醇用量比为 5 : 1 时,pH/FA-Res-Lips 包封率和载药量相对较大,粒径相对较小,故以磷脂与胆固醇用量比 5 : 1 为中心继续对两者用量比 4 : 1~6 : 1 区间进行筛选。

2.4.3 磷脂与 DSPE-PEOz-FA 用量比的考察 在磷脂和白藜芦醇用量比 6 : 1,磷脂与胆固醇用量比 5 : 1,水相体积为 50 mL,水化时间为 60 min 条件下考察磷脂与 DSPE-PEOz-FA 用量比对 pH/FA-Res-Lips 的影响,结果见表 3。随着磷脂与 DSPE-PEOz-FA 用量比的增加包封率和载药量呈先增大后下降趋势,可能是 DSPE-PEOz-FA 用量较大时 pH/FA-Res-Lips 表面的 PEOz 和叶酸基团空间排斥效应影响了脂质体表面致密性^[7],导致浅表层药物容易发生泄漏,且粒径也较大;DSPE-PEOz-FA 用量过低时 pH/FA-Res-Lips 表面 PEOz 及叶酸基团较少,无法有效阻止浅表层药物泄漏,故包封率和载药量较低。磷脂与 DSPE-PEOz-FA 用量比为 5 : 1 时包封率和载药量相对较大,粒径相对较小,故以两者用量比为 5 : 1 中心继续对两者用量比 4 : 1~6 : 1 进行筛选。

表 3 磷脂与 DSPE-PEOz-FA 用量比对包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of phospholipids to DSPE-PEOz-FA amounts ratio on envelopment efficiency, drug loading and particle size ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷脂与DSPE- PEOz-FA用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
3 : 1	56.81±1.00	5.43±0.21	264.55±13.14
4 : 1	64.90±0.97	6.64±0.11	243.20±10.79
5 : 1	78.25±1.14	8.33±0.14	206.19±9.92
6 : 1	71.77±0.91	7.80±0.10	207.89±11.73
7 : 1	66.56±1.33	7.19±0.15	208.04±8.98

2.5 BBD-RSM 优化 pH/FA-Res-Lips 处方

2.5.1 实验方案 选择磷脂和白藜芦醇用量比、磷脂与胆固醇用量比和磷脂与 DSPE-PEOz-FA 用量比分别作为 pH/FA-Res-Lips 主要影响因素 $X_1 \sim X_3$,根据单因素考察结果各因素水平设置见表 4。包封率、载药量和粒径分别作为 pH/FA-Res-Lips 质量指标 $Y_1 \sim Y_3$,为从整体上控制 pH/FA-Res-Lips 质量,将 $Y_1 \sim Y_3$ 转换为总评归一值(overall desirability, OD),OD 值计算过程为采用 $d_{\max} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$ 计算 pH/FA-Res-Lips 的包封率 $d_{\text{包封率}}$ 和载药量 $d_{\text{载药量}}$;

表 4 BBD-RSM 试验影响因素、水平及考察结果 (n = 3)

Table 4 Influencing factors, levels and investigation results of BBD-RSM test (n = 3)

序号	X_1	X_2	X_3	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	OD值	序号	X_1	X_2	X_3	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	OD值
1	7 : 1 (+1)	5 : 1 (0)	6 : 1 (+1)	74.81	7.21	240.57	0	10	6 : 1 5 : 1 5 : 1	83.62	8.72	190.86	0.946		
2	6 : 1 (0)	5 : 1	5 : 1 (0)	83.72	8.57	193.16	0.909	11	6 : 1 5 : 1 5 : 1	75.33	8.79	191.45	0.961		
3	6 : 1	6 : 1 (+1)	4 : 1 (-1)	81.54	7.48	224.62	0	12	7 : 1 4 : 1 5 : 1	76.94	6.84	214.63	0.192		
4	5 : 1 (-1)	4 : 1 (-1)	5 : 1	75.22	8.51	198.27	0.580	13	7 : 1 6 : 1 5 : 1	77.26	7.37	209.45	0.426		
5	5 : 1	5 : 1	4 : 1	71.94	8.43	204.83	0.258	14	6 : 1 5 : 1 5 : 1	82.48	8.64	194.97	0.877		
6	6 : 1	6 : 1	6 : 1	74.87	7.79	234.14	0.251	15	6 : 1 4 : 1 4 : 1	74.19	7.28	227.97	0.231		
7	6 : 1	5 : 1	5 : 1	84.37	8.61	196.56	0.909	16	5 : 1 5 : 1 6 : 1	72.84	8.23	233.76	0.211		
8	5 : 1	6 : 1	5 : 1	75.16	7.49	210.82	0.511	17	6 : 1 4 : 1 6 : 1	75.45	6.88	237.02	0.103		
9	7 : 1	5 : 1	4 : 1	74.62	6.77	230.57	0								

采用 $d_{\min}=(M_{\max}-M_i)/(M_{\max}-M_{\min})$ 计算 pH/FA-Res-Lips 粒径 $d_{\text{粒径}}$, 其中 M_i 、 $M_{\max}$ 和 $M_{\min}$ 分别为实测值、最大值和最小值; $OD=(d_{\text{包封率}}\times d_{\text{载药量}}\times d_{\text{粒径}})^{1/3}$ 。不同处方测得包封率、载药、粒径及 OD 值结果见表 4。

2.5.2 模型拟合与方差分析 使用 Design Expert V 12.0.1 软件对 pH/FA-Res-Lips 总评归一值 OD 进行拟合, 得 OD 多元二次项方程: $OD=0.800+0.068 X_1-0.140 X_2-0.110 X_3-0.057 X_1 X_2-0.130 X_1 X_3+3.840\times 10^{-3} X_2 X_3-0.310 X_1^2-0.200 X_2^2-0.290 X_3^2$ 。方差分析结果见表 5, 数学模型方程 P 值 $<0.000 1$, 说明该模型具有极显著性意义; 模型系数 R^2 和修正系数 R_{adj}^2 分别为 0.992 5 和 0.982 8, 说明拟合值和实际测定值之间具有良好的相关性。OD 数学模型的失拟项 $P=0.135 2$ ($P>0.05$), 说明拟合结果可信度较高。据 F 值数值可知磷脂和白藜芦醇用量比对 OD 值影响程度最大, 据 P 值数值可知 OD 多元二次项方程中 $X_1 X_2$ 项具有显著性差异 ($P<0.05$), X_1 、 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 项均具有极显著差异 ($P<0.01$)。

2.5.3 响应面分析及 pH/FA-Res-Lips 最佳处方 分别绘制磷脂与白藜芦醇用量比 (X_1)、磷脂与胆固醇用量比 (X_2)、磷脂与 DSPE-PEOz-FA 用量比 (X_3) 对 OD 值的响应面图, 结果见图 2。响应面图均呈抛

表 5 包封率方差分析

Table 5 Variance analysis of encapsulation rate

项目	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	2.09	9	0.23	102.71	$<0.000 1$
X ₁	0.11	1	0.11	49.20	0.000 2
X ₂	8.21×10^{-4}	1	8.21×10^{-4}	0.36	0.565 4
X ₃	7.19×10^{-4}	1	7.19×10^{-4}	0.32	0.590 2
X ₁ X ₂	0.02	1	0.02	10.15	0.015 4
X ₁ X ₃	5.59×10^{-4}	1	5.59×10^{-4}	0.25	0.634 1
X ₂ X ₃	0.04	1	0.04	15.87	0.005 3
X ₁ ²	0.29	1	0.29	127.04	$<0.000 1$
X ₂ ²	0.23	1	0.23	100.22	$<0.000 1$
X ₃ ²	1.24	1	1.24	548.17	$<0.000 1$
残差	0.02	7	2.26×10^{-3}		
失拟项	0.01	3	3.78×10^{-3}	3.38	0.135 2
绝对误差	4.47×10^{-4}	4	1.12×10^{-3}		
总和	2.10	16			

物线形, 所以 OD 值存在理论最大值。在确定 pH/FA-Res-Lips 处方时选择 OD 值最大值作为优化目标, 取值范围为 0~1, 得 pH/FA-Res-Lips 最佳处方为磷脂与白藜芦醇用量比 (X_1) 为 5.77 : 1, 磷脂与胆固醇用量比 (X_2) 为 4.96 : 1, 磷脂与 DSPE-PEOz-FA 用量比 (X_3) 为 5.32 : 1, 预测 OD 值为 0.972。

为便于操作, 将磷脂与白藜芦醇用量比调整为 5.80 : 1, 磷脂与胆固醇用量比调整为 5.00 : 1, 磷脂

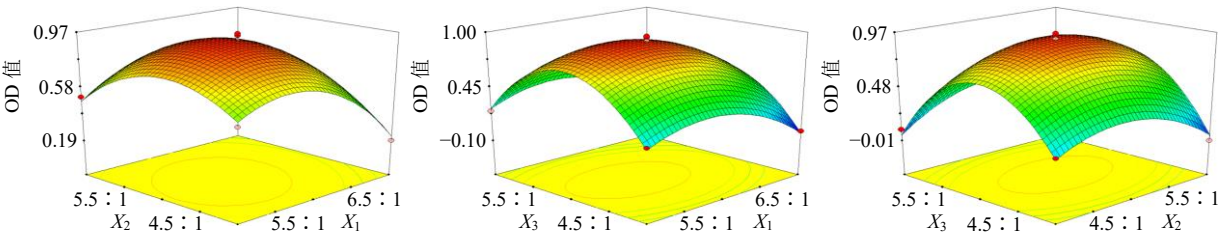


图 2 自变量与响应值三维图

Fig. 2 Three-dimensional plots of independent factors and response values

与 DSPE-PEOz-FA 用量比调整为 5.30 : 1。

2.5.4 工艺验证 按照“2.5.3”项下最佳处方平行制备 3 批 pH/FA-Res-Lips, 测定其包封率、载药量、粒径和 OD 值, 结果如表 6 所示, 平均包封率、载药量和粒径分别为 $(85.74 \pm 1.09)\%$ 、 $(8.77 \pm 0.11)\%$ 和 (192.25 ± 5.38) nm, OD 值为 0.969 ± 0.004 。根据预测 OD 值(0.978), 实测 OD 值相对偏差为 -0.92% , 说明建立的 OD 值数学模型预测性良好, 可用于 pH/FA-Res-Lips 处方工艺研究。另测得 pH/FA-Res-Lips 的 ζ 电位 (-28.12 ± 1.20) mV。

表 6 处方验证结果

Table 6 Prescription verification results

批次	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	OD值
第1批	86.74	8.89	197.54	0.973
第2批	84.58	8.67	186.79	0.965
第3批	85.91	8.75	192.42	0.970

2.6 pH/FA-Res-Lips 光谱分析

2.6.1 UV 分析 取适量白藜芦醇和 pH/FA-Res-Lips 冻干粉(不含冻干保护剂), 加甲醇溶解, 于 190~450 nm 内进行扫描。结果见图 3, pH/FA-Res-Lips 紫外图谱与白藜芦醇趋势基本相同, 说明白藜芦醇与 DSPE-PEOz-FA、磷脂和胆固醇之间没有形成新的化学键, 白藜芦醇化学结构未发生变化, 不影响药物的活性。

2.6.2 FT-IR 分析 FT-IR 测试条件: 扫描次数为 16 次, 扫描范围为 400~4 000 cm^{-1} , 分辨率为 4 cm^{-1} 。取白藜芦醇、胆固醇、磷脂、DSPE-PEOz-FA、物理混合物(白藜芦醇与辅料比例同 pH/FA-Res-Lips)和 pH/FA-Res-Lips 适量, 按照 1 : 100 质量比加入 KBr 研细后压片, 样品片须呈透明状, 各个样品的 FT-IR 测试结果见图 4。在白藜芦醇 FT-IR 图谱中, 3 207.77 cm^{-1} 处吸收峰由酚羟基引起的-OH 伸缩振

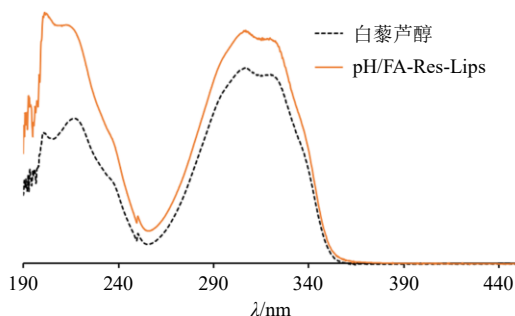


图 3 白藜芦醇与 pH/FA-Res-Lips 紫外吸收光谱

Fig. 3 UV absorption spectroscopy of resveratrol and pH/FA-Res-Lips

动, 1 588.09、1 509.11 cm^{-1} 处吸收峰由白藜芦醇苯环上 C=C 伸缩振动引起^[18]。在 DSPE-PEOz-FA 的 FT-IR 图谱中, 1 033.78 cm^{-1} 处吸收峰是 DSPE 基团上 P=O 键的特征振动峰, 1 607.19 cm^{-1} 处吸收峰是由 PEOz 基团上 C=N 伸缩振动峰和 DSPE 基团上 C=O 伸缩振动峰重叠在一起; 1 735.74 cm^{-1} 处吸收峰是叶酸基团上-NH₂ 的伸缩振动吸收峰, 证明 DSPE-PEOz-FA 是由 DSPE、PEOz 和叶酸基团组成的高分子聚合物。物理混合物的 FT-IR 图谱仅是白藜芦醇、胆固醇、磷脂和 DSPE-PEOz-FA 吸收峰的简单叠加。在 pH/FA-Res-Lips 的 FT-IR 图谱中, 白藜芦醇在 3 207.77 cm^{-1} 处的特征吸收峰已消失, 1 607.19 cm^{-1} 处吸收峰发生红移, 因此, 推测白藜芦醇与 pH/FA-Res-Lips 中囊材之间存在氢键络合作用。另外, pH/FA-Res-Lips 的 FT-IR 图谱与物理混合物的 FT-IR 图谱存在较大差别, 说明 pH/FA-Res-Lips 并非白藜芦醇与囊材的简单混合物。

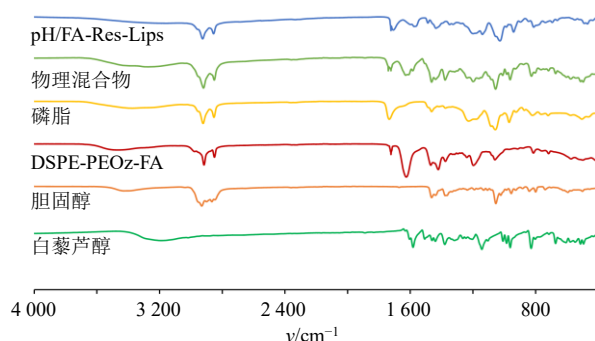


图 4 各个样品的红外光谱图

Fig. 4 FT-IR spectrum of each sample

2.7 Res-Lips、pH-Res-Lips 和 FA-Res-Lips 的制备及理化性质比较

2.7.1 各个脂质体的制备及溶解度测定 除不加 DSPE-PEOz-FA 外, 其余参考 pH/FA-Res-Lips 处方工艺制备 Res-Lips; 分别采用 DSPE-PEG-FA 和 DSPE-PEOz, 参考 pH/FA-Res-Lips 处方工艺分别制备 FA-Res-Lips 和 pH-Res-Lips。将各个脂质体混悬液分别加至西林瓶中(2 mL/瓶), 于 -60 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱预冻 3 d, 立即于 -30 $^{\circ}\text{C}$ 冻干机中, 3 d 后取出即得冻干粉。取过量白藜芦醇原料药、Res-Lips、pH-Res-Lips、FA-Res-Lips 和 pH/FA-Res-Lips 冻干粉置于蒸馏水中(底部仍有药物沉淀), 超声 15 min, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中磁力搅拌 2 d, 8 000 r/min 离心(离心半径为 6.4 cm) 6 min, 取上清液测定溶解度。结果(表 7)显示, 白藜芦醇原料药溶解度仅为 $(47.66 \pm$

表 7 各个脂质体各项指标的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Comparison of various indicators of various liposomes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	溶解度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI值	ζ 电位/mV
Res-Lips	411.71 ± 4.16	81.53 ± 0.94	9.02 ± 0.13	186.71 ± 8.13	0.114 ± 0.011	-28.65 ± 1.29
pH-Res-Lips	419.32 ± 3.25	84.07 ± 0.82	8.82 ± 0.19	191.94 ± 6.17	0.119 ± 0.013	-27.80 ± 1.01
FA-Res-Lips	415.94 ± 3.37	83.62 ± 1.33	8.74 ± 0.10	189.22 ± 7.62	0.106 ± 0.009	-27.12 ± 0.94
pH/FA-Res-Lips	423.60 ± 3.82	85.43 ± 1.07	8.70 ± 0.15	193.36 ± 7.74	0.121 ± 0.013	-26.87 ± 1.03

0.70) $\mu\text{g/mL}$, 各个脂质体均极大地提高了白藜芦醇的溶解度。

2.7.2 各个脂质体包封率、载药量、粒径等各项指标的比较 各项指标测定结果见表 7。Res-Lips 包封率低于 pH-Res-Lips、FA-Res-Lips 和 pH/FA-Res-Lips, 可能与脂质体表面修饰 PEOz 和叶酸有关^[17], 在一定程度上阻止了表层药物泄漏, 同时也使粒径和 PDI 略大于 Res-Lips。pH-Res-Lips、FA-Res-Lips 和 pH/FA-Res-Lips 载药量低于 Res-Lips, 这与处方中引入一定量修饰材料有关; ζ 电位绝对值均低于 Res-Lips, 可能是脂质体表面修饰 PEOz 和叶酸基团对电荷有一定的屏蔽作用所致^[17]。各个脂质体粒径分布和 ζ 电位图分别见图 5-A、B。

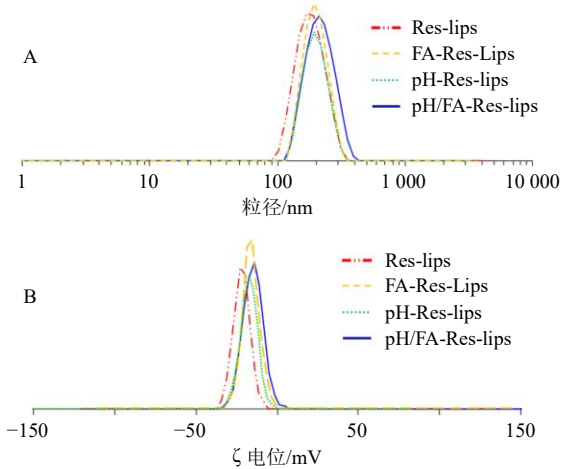


图 5 各个脂质体粒径 (A) 及 ζ 电位图 (B)

Fig. 5 Particle size (A) and ζ potential (B) of liposomes

2.7.3 各个脂质体的 TEM 观察 取 Res-Lips 混悬液, 加入纯化水稀释 50 倍, 涂敷在铜网上, 加入 1.5% 磷钨酸钠染色后自然晾干, 于 TEM 下观察 Res-Lips 微观形貌, 同法采用 TEM 观察 pH-Res-Lips、FA-Res-Lips 和 pH/FA-Res-Lips 形貌。结果见图 6, Res-Lips、pH-Res-Lips、FA-Res-Lips 和 pH/FA-Res-Lips 均为囊泡形貌。

2.7.4 各个脂质体在不同 pH 介质中的释药行为比较 取 pH/FA-Res-Lips 混悬液(白藜芦醇含量为 10 mg)至透析袋(截留相对分子质量 8 000), 分别加

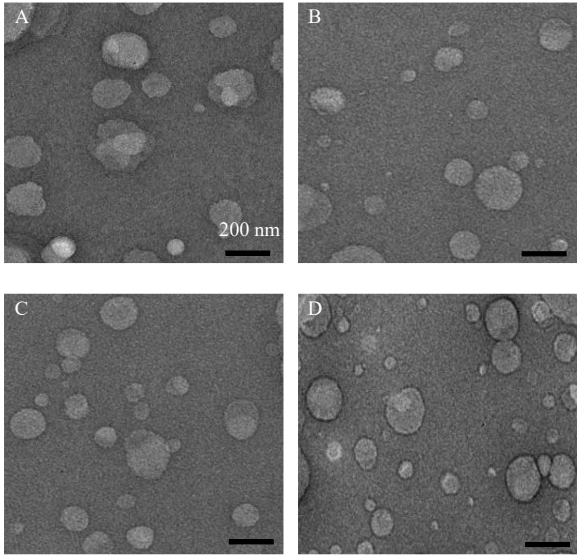


图 6 Res-Lips (A)、pH-Res-Lips (B)、FA-Res-Lips (C) 和 pH/FA-Res-Lips (D) 的 TEM 图

Fig. 6 TEM of Res-Lips (A), pH-Res-Lips (B), FA-Res-Lips (C) and pH/FA-Res-Lips (D)

入 pH 5.5、6.0、6.8、7.4 PBS 5 mL, 尼龙绳将透析袋两端扎紧并放入转篮中, 分别置于 1 000 mL、(37.0 $\pm$ 0.2) $^{\circ}\text{C}$ 的空白释药介质中, 转篮转速设置为 75 r/min。分别于 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、9.0、12.0、18.0、24.0、36.0、48.0 h 取样 5 mL, 并立即补加空白介质 5 mL, 测定样品中白藜芦醇含量, 计算各时间点累积释放度。

同法考察 Res-Lips、pH-Res-Lips 和 FA-Res-Lips 在 pH 5.0、5.5、6.0、6.8 PBS 中释药情况, 结果见图 7。随着 pH 值的减小, pH/FA-Res-Lips 和 pH-Res-Lips 释药速率和释放度逐渐增大, 在弱酸性介质中 (pH 5.5、6.0) 释药明显较快, 证明 pH/FA-Res-Lips 和 pH-Res-Lips 具有 pH 敏感性^[13], 而 FA-Res-Lips 和 Res-Lips 体外释药无明显的 pH 敏感性。

释药模型及其拟合方程见表 8, 白藜芦醇的 4 种脂质体释药行为均与 Weibull 模型拟合度最高。

2.8 Res-Lips 和 pH/FA-Res-Lips 溶血试验

2.8.1 2% 红细胞悬液的制备 取健康 Balb/c 小鼠

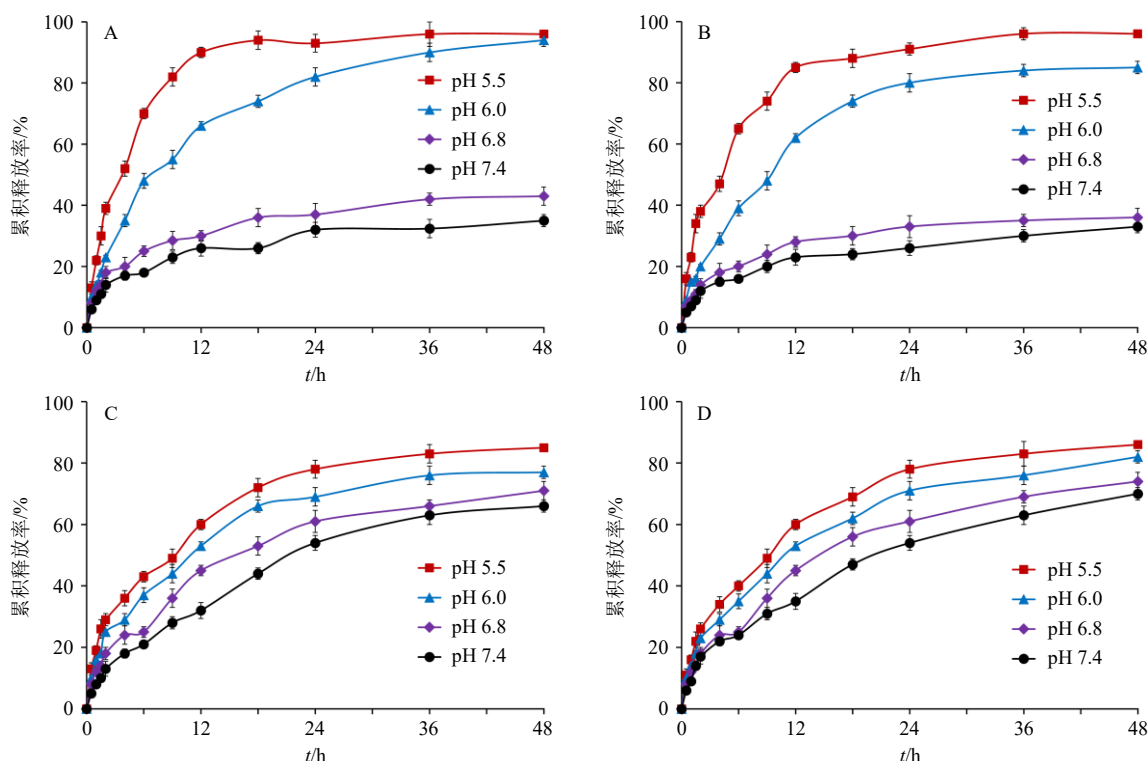


图 7 pH/FA-Res-Lips (A)、pH-Res-Lips (B)、FA-Res-Lips (C) 和 Res-Lips (D) 在不同 pH 值 PBS 中体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 *In vitro* release curves of pH/FA-Res-Lips (A), pH-Res-Lips (B), FA-Res-Lips (C) and Res-Lips (D) in PBS with different pH values ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 8 释药模型和相关系数

Table 8 Release model and coefficient

样品	介质pH值	Weibull模型拟合方程	R^2	样品	介质pH值	Weibull模型拟合方程	R^2
Res-Lips	pH 5.5 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.649 8 \ln t - 1.751 5$	0.993 4	FA-Res-Lips	pH 5.5 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.710 1 \ln t - 1.216 2$	0.976 7
	pH 6.0 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.646 6 \ln t - 1.917 2$	0.996 4		pH 6.0 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.760 4 \ln t - 1.883 4$	0.998 9
	pH 6.8 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.629 2 \ln t - 2.100 3$	0.993 6		pH 6.8 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.605 4 \ln t - 1.841 5$	0.969 5
	pH 7.4 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.652 9 \ln t - 2.365 8$	0.995 1		pH 7.4 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.598 1 \ln t - 1.589 3$	0.986 9
pH-Res-Lips	pH 5.5 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.430 9 \ln t - 2.512 6$	0.975 7	pH/FA-Res-Lips	pH 5.5 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.710 1 \ln t - 1.216 2$	0.936 7
	pH 6.0 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.413 6 \ln t - 2.251 3$	0.979 8		pH 6.0 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.760 4 \ln t - 1.883 4$	0.998 9
	pH 6.8 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.693 9 \ln t - 1.862 9$	0.982 6		pH 6.8 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.395 7 \ln t - 2.024 3$	0.988 3
	pH 7.4 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.683 3 \ln t - 1.285 3$	0.990 2		pH 7.4 PBS	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.398 5 \ln t - 2.279 6$	0.974 4

M_t 为 t 时间累积释放率, M_∞ 为 ∞ 时累积释放率, M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率。

M_t and M_∞ are the cumulative release rate at time t and ∞ , M_t/M_∞ is the cumulative release percentage at time t .

1 只, ip 1%戊巴比妥钠溶液 0.2 mL, 眼眶后静脉丛取血 0.5 mL 置于离心管中, 加入 10 mL 生理盐水混匀, 1500 r/min 离心 3 min, 收集红细胞沉淀, 重复洗涤至上清液澄清。取红细胞沉淀, 采用生理盐水稀释配制成体积分数为 2% 的红细胞悬液, 置于 8 °C 冰箱中。

2.8.2 试验方法 取 8 个离心管, 分别加入 2% 红细胞悬液 5.0 mL, 1~6 号管分别加入不同体积的 Res-Lips 混悬液, 加入适量生理盐水, 使总体积为

5 mL, 7 号管加入 5.0 mL 生理盐水 (阴性对照), 8 号管加入 5.0 mL 纯化水 (阳性对照), 同法制备 pH-Res-Lips、FA-Res-Lips、pH/FA-Res-Lips 各个实验样品。将各个实验样品置于 37 °C 恒温水浴孵育 1 h, 以 3000 r/min 离心 3 min, 于紫外-可见分光光度计 416 nm 波长测定吸光度 (A) 值, 计算溶血率, 结果见表 9, 各个脂质体溶血率均小于 5%, 适合 iv 给药。

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

表9 溶血试验设计及结果
Table 9 Design and results of hemolysis test

编号	2%红细胞悬液/mL	样品体积/mL	生理盐水/mL	纯化水/mL	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	溶血率/%			
						Res-Lips	pH-Res-Lips	FA-Res-Lips	pH/FA-Res-Lips
1	5.0	0.1	4.9	0.0	75.0	1.88	1.26	1.57	1.43
2	5.0	0.2	4.8	0.0	150.0	1.92	1.75	1.80	1.45
3	5.0	0.4	4.6	0.0	300.0	2.13	1.29	1.89	1.69
4	5.0	0.8	4.2	0.0	600.0	2.72	1.89	2.11	1.93
5	5.0	1.6	3.4	0.0	1 200.0	2.79	2.50	2.34	2.42
6	5.0	3.2	1.8	0.0	2 400.0	2.98	3.01	2.76	2.68
7	5.0	0.0	5.0	0.0	0.0	0.20	0.24	0.23	0.24
8	5.0	0.0	0.0	5.0	0.0	100.00	100.00	100.00	100.00

2.9 pH/FA-Res-Lips 冻干粉的制备及稳定性考察

pH/FA-Res-Lips 是本研究的重点对象,故对 pH/FA-Res-Lips 冻干粉制备工艺及稳定性进行了考察。采用注射用水配制质量分数为 15%冻干保护剂溶液(乳糖和甘露醇质量比为 1:1),按体积比 1:2 加入 pH/FA-Res-Lips 混悬液,振荡混匀。加至西林瓶中(2 mL/瓶),于-60 ℃超低温冰箱预冻 3 d,立即置于-30 ℃冻干机中,3 d 后取出即得 pH/FA-Res-Lips 冻干粉。同法制备 Res-Lips 冻干粉,外观见图 8, pH/FA-Res-Lips 和 Res-Lips 冻干粉外观饱满,色泽均匀。

将 pH/FA-Res-Lips 和 Res-Lips 冻干粉分别置于

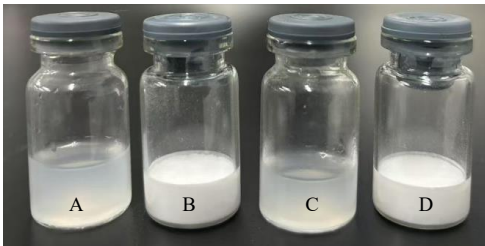


图8 Res-Lips (A) 及其冻干粉 (B) 和 pH/FA-Res-Lips (C) 及其冻干粉 (D) 外观

Fig. 8 Appearance of Res-Lips (A) and its lyophilized powder (B), pH/FA-Res-Lips (C) and its lyophilized powder (D)

湿度 60%、温度 30 ℃恒温恒湿箱中,分别 0、1、2、3、6 月取样,复溶后分别测定包封率、粒径 ζ 电位,结果见表 10。pH/FA-Res-Lips 冻干粉放置 6 个月后包封率仍大于 80%,粒径仍小于 200 nm,表明 pH/FA-Res-Lips 以冻干粉状态储存时稳定性较高。Res-Lips 冻干粉放置 6 个月后包封率低于 80%,粒径接近 250 nm,表明 Res-Lips 冻干粉储存稳定性低于 pH/FA-Res-Lips 冻干粉,可能是 pH/FA-Res-Lips 表面的叶酸等修饰基团增加了稳定性有关^[17]。

2.10 体外抗肿瘤实验

2.10.1 子宫内膜癌 Ishikawa 细胞培养及体外肿瘤细胞生长抑制研究 子宫内膜癌 Ishikawa 细胞表面叶酸受体异常高表达^[14],故选为研究对象。常规复苏子宫内膜癌 Ishikawa 细胞,置于含 10%胎牛血清及 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,制成浓度为 2.0×10⁶ 个/mL 的细胞悬液,按每孔 100 μL 接种至 96 孔板,置于 5% CO₂、37 ℃ 的培养箱内培养 48 h。采用培养液稀释配制不同质量浓度白藜芦醇及其各个脂质体的药液,设置空白组(培养基、0.5% MTT 和 DMSO)、对照组(Ishikawa 细胞、培养基、0.5% MTT 和 DMSO)、白藜芦醇组、Res-Lips 组、pH-Res-Lips 组、FA-Res-Lips 组和 pH/FA-Res-Lips 组,白藜芦醇及各个脂质体给药组质量

表 10 pH/FA-Res-Lips 和 Res-Lips 冻干粉稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 10 Results of lyophilized powder of pH/FA-Res-Lips and Res-Lips stability study ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/月	pH/FA-Res-Lips冻干粉			Res-Lips冻干粉		
	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
0	83.80±1.06	8.56±0.12	195.24±9.19	77.71±0.96	8.23±0.14	204.82±9.11
1	83.41±1.11	8.53±0.16	196.08±10.01	77.52±1.30	8.13±0.17	206.11±11.24
2	82.77±0.93	8.37±0.10	193.33±8.52	76.80±0.98	8.01±0.13	213.75±13.25
3	82.62±1.07	8.40±0.18	195.94±8.98	76.02±1.17	7.98±0.08	215.03±12.56
6	82.15±0.89	8.29±0.23	198.80±10.21	74.64±1.24	7.75±0.10	243.87±16.08

浓度均为 20、70、120 $\mu\text{g/mL}$ ，各质量浓度设 6 个复孔。孵育 72 h 后空白组、对照组及各个样品中分别加 0.5% MTT 溶液 20 μL ，孵育 4 h，弃去培养液，分别加 150 μL DMSO，振荡后在 490 nm 酶标仪上测定吸光度 (A)，计算细胞存活率。结果见表 11，白藜芦醇、Res-Lips、pH-Res-Lips、FA-Res-Lips 和 pH/FA-Res-Lips 对 Ishikawa 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 98.14、75.14、71.06、72.90、48.43 $\mu\text{g/mL}$ ，表明白藜芦醇的各个脂质体均可增强白藜

表 11 白藜芦醇及其各个脂质体对 Ishikawa 细胞的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	细胞存活率/%		
	20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
白藜芦醇	91.11 $\pm$ 1.85	70.05 $\pm$ 1.93	42.92 $\pm$ 2.41
Res-Lips	86.19 $\pm$ 0.94	58.77 $\pm$ 1.13	36.56 $\pm$ 1.76
pH-Res-Lips	81.80 $\pm$ 1.17	50.16 $\pm$ 1.90	31.22 $\pm$ 2.11
FA-Res-Lips	83.54 $\pm$ 1.04	51.59 $\pm$ 1.87	29.66 $\pm$ 2.52
pH/FA-Res-Lips	80.06 $\pm$ 1.16	43.54 $\pm$ 1.93	18.03 $\pm$ 1.41

芦醇抗肿瘤作用，而 pH/FA-Res-Lips 的 IC_{50} 值最小，表明其抗肿瘤活性最强。

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

2.10.2 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期 Ishikawa 细胞接种于 6 孔板，每孔 2.0×10^6 个，置 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养 24 h。设置空白组（等量 DMSO）、白藜芦醇组、Res-Lips 组、pH-Res-Lips 组、FA-Res-Lips 组和 pH/FA-Res-Lips 组，孵育 48 h，各给药组白藜芦醇质量浓度均为 70 $\mu\text{g/mL}$ 。使用无 EDTA 胰酶消化并收集细胞悬液，3 000 r/min 离心（离心半径为 6.4 cm）5 min，弃去上清液，加 PBS 清洗后再次 3 000 r/min 离心（离心半径为 6.4 cm）5 min，弃去上清液。加结合缓冲液（binding buffer）100 μL 重悬，加入 FITC 标记的 Annexin-V 10 μL ，避光条件下孵育 30 min，加入碘化丙啉（propidium iodide, PI）5 μL 孵育 5 min，加结合缓冲液 500 μL ，立即使用流式细胞仪检测。结果见图 9，白藜芦醇组凋亡率为 27.48%，表明白藜芦醇本身具有一定的促凋亡作用。Res-Lips、pH-Res-Lips、FA-Res-Lips 和 pH/FA-Res-Lips 组细胞凋亡率分别

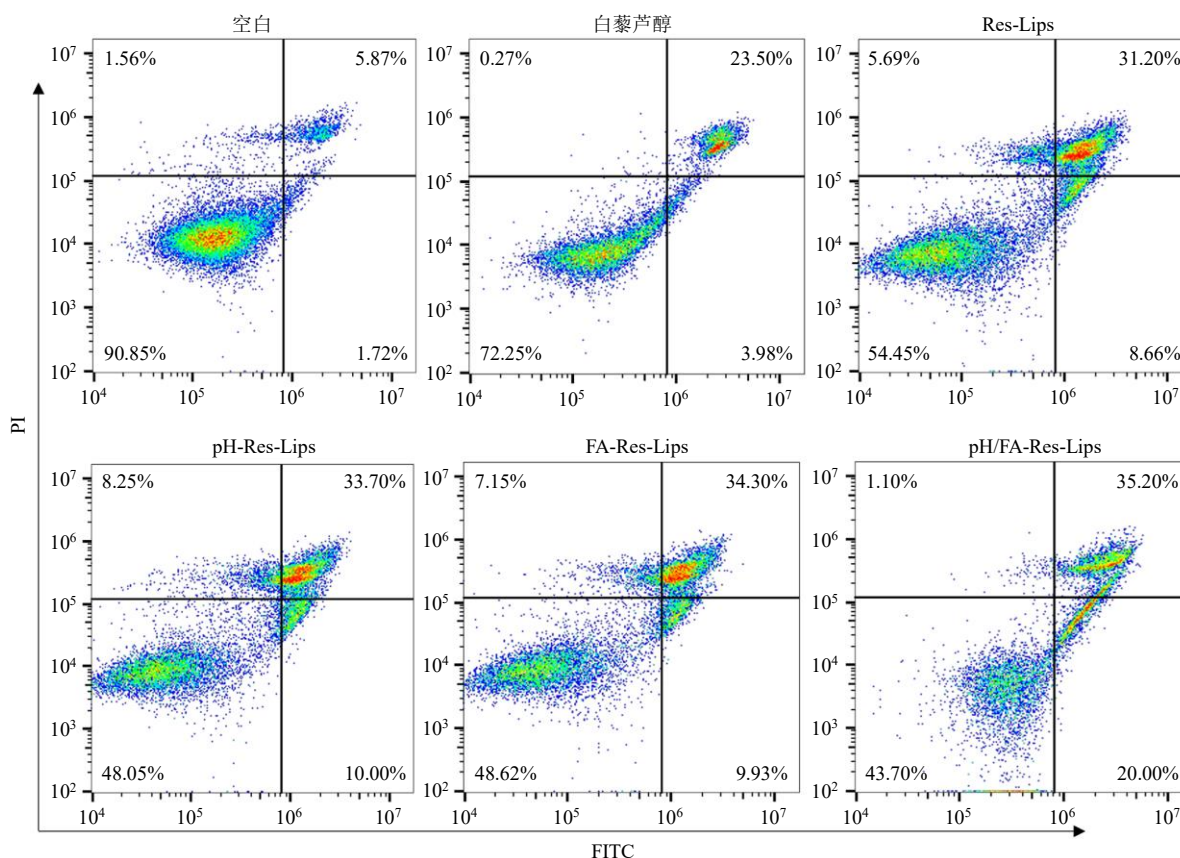


图 9 白藜芦醇及其各个脂质体对 Ishikawa 细胞凋亡的影响

Fig. 9 Effects of resveratrol and its various liposomes on Ishikawa cell apoptosis

增加至 39.86%、43.70%、44.23%和 55.20%，证明白藜芦醇各个脂质体进一步增强了抗肿瘤作用，但 pH/FA-Res-Lips 作用最强。

2.11 pH/FA-Res-Lips 体内抗肿瘤实验

2.11.1 肿瘤模型的建立 取 Balb/c 小鼠，于右腋 sc Ishikawa 细胞悬液 0.1 mL (2.0×10^6 个/mL)，建立子宫内膜癌荷瘤小鼠模型。接种 1 周后，在接种部位出现圆形或椭圆形凸起的瘤块，喷以 70%乙醇至瘤块区域，游标卡尺测量长 (*a*) 和宽 (*b*)，瘤块体积 ($V = \pi ab^2/6$)，选取瘤体体积约 150 mm³ 的荷瘤小鼠进行后续实验。

2.11.2 实验方案 48 只荷瘤小鼠随机分成 8 组，即模型组 (生理盐水)、阳性对照组 (顺铂，2.0 mg/kg)、白藜芦醇组 (15 mg/kg)、Res-Lips 组 (15 mg/kg)、pH-Res-Lips 组 (15 mg/kg)、FA-Res-Lips 组 (15 mg/kg)、pH/FA-Res-Lips 低 (10 mg/kg) 和 pH/FA-Res-Lips 高剂量组 (15 mg/kg) [5]。每 2 天 ip 给药 1 次，共注射 7 次。各组荷瘤小鼠停药后第 2 天后处死荷瘤小鼠，分别剥离瘤块、胸腺和脾脏，

记录质量，计算抑瘤率和胸腺指数、脾脏指数。

抑瘤率 = $1 - \frac{\text{给药组平均瘤质量}}{\text{模型组平均瘤质量}}$

胸腺指数 = $\frac{\text{胸腺质量}}{\text{体质量}}$

脾脏指数 = $\frac{\text{脾脏质量}}{\text{体质量}}$

2.11.3 实验结果 荷瘤小鼠在各个时间点的肿瘤体积增长情况见表 12，各组抑瘤率见表 13，末次给药后瘤体外观见图 10。模型组小鼠瘤体增长最快，14 d 时肿瘤体积达 ($1\,284.57 \pm 261.04$) mm³，白藜芦醇组表现出一定的抑瘤作用，但肿瘤体积生长仍较快。与白藜芦醇相比，各个脂质体组肿瘤体积增大趋势变缓，给药 12 d 后肿瘤体积均存在显著性或极显著性差异变小 ($P < 0.05$ 、 0.01)；第 14 天时 Res-Lips、pH-Res-Lips 组、FA-Res-Lips 和 pH/FA-Res-Lips 低剂量组瘤质量显著性下降 ($P < 0.05$)，pH/FA-Res-Lips 高剂量组瘤质量呈极显著性下降 ($P < 0.01$)。与 Res-Lips (15 mg/kg) 相比，相同剂量的 pH/FA-Res-Lips 瘤体积和瘤质量均有显著性差异 ($P < 0.05$)，而相同剂量 Res-Lips、pH-Res-Lips 和 FA-Res-Lips 组无显著性差异 ($P > 0.05$)，说明 pH/FA-Res-Lips 有

表 12 各组荷瘤小鼠肿瘤体积变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Table 12 Tumor volume change of tumor-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

样品	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肿瘤体积/mm ³							
		0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d
模型	—	154.26±8.14	178.92±10.25	244.16±19.58	371.28±62.80	489.07±96.34	733.53±148.97	925.91±216.70	1 284.57±261.04
顺铂	2.0	146.90±12.11	169.12±33.60	189.73±39.72*	220.04±45.16**	256.34±46.89**	298.77±62.43**	357.89±78.91**	402.98±89.90**
白藜芦醇	15.0	162.33±11.26	168.45±30.25	221.41±44.09	281.07±56.17	385.79±70.22*	521.64±94.15*	703.02±148.20*	819.84±166.91*
Res-Lips	15.0	156.82±9.25	169.71±26.17	198.63±33.29	248.79±46.10*	342.98±72.16*	475.26±96.08**	625.04±136.19**#	694.50±153.38**#
pH-Res-Lips	15.0	165.28±11.13	170.01±32.09	186.17±36.54	223.44±52.15*	309.71±65.04*	426.24±89.77*	580.09±123.90**#	651.85±158.32**#
FA-Res-Lips	15.0	158.11±9.04	169.42±26.79	180.23±36.02	266.79±49.17*	314.08±63.08**	412.14±82.44**	563.89±121.31**#	623.07±146.99**#
pH/FA-Res-Lips	10.0	153.39±13.16	176.40±35.42	225.66±44.07	256.19±53.16*	342.93±65.75**	437.99±74.92**	523.07±107.90**#	664.51±133.41**#
	15.0	156.78±11.94	173.23±30.27	212.36±36.90*	207.19±48.73**	288.43±56.04**#	339.62±64.52**#Δ	402.31±81.78***#Δ	501.74±104.69***#Δ

与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与白藜芦醇组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ；与 Res-Lips 组比较：Δ $P < 0.05$ ；表 13 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group；# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs resveratrol group；Δ $P < 0.05$ vs Res-Lips group；same as table 13.

表 13 体内抑瘤率结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 13 Antitumor inhibition rate *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

样品	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%	体质量/g
模型	—	2.19±0.32	—	31.77±2.24
顺铂	2.0	0.40±0.16**	81.74	23.50±2.10**
白藜芦醇	15.0	1.81±0.24*	17.35	30.85±2.29
Res-Lips	15.0	1.57±0.15**#	28.31	31.19±1.93
pH-Res-Lips	15.0	1.40±0.19**#	36.07	30.64±2.07
FA-Res-Lips	15.0	1.19±0.12**#	45.66	31.13±1.86
pH/FA-Res-Lips	10.0	1.24±0.17**#	43.38	30.25±2.41
	15.0	0.73±0.25***#Δ	66.67	29.91±2.17

效提高了抗肿瘤作用。与模型组小鼠的体质量相比，阳性对照顺铂组荷瘤小鼠的体质量极显著性下降 ($P < 0.01$)，表明顺铂毒副作用较大，而白藜芦醇及各个脂质体组荷瘤小鼠的体质量未发生明显变化 ($P > 0.05$)，毒副作用远小于顺铂。

2.11.4 胸腺指数和脾脏指数评价 取 6 只正常 Balb/c 小鼠作为空白组。各组荷瘤小鼠胸腺指数和脾脏指数结果见表 14。与空白组相比，模型组胸腺指数和脾脏指数显著性下降 ($P < 0.05$)，说明机体免疫功能下降；阳性组胸腺指数和脾脏指数极显著性下降 ($P < 0.01$)，表明顺铂对免疫器官损伤较大；

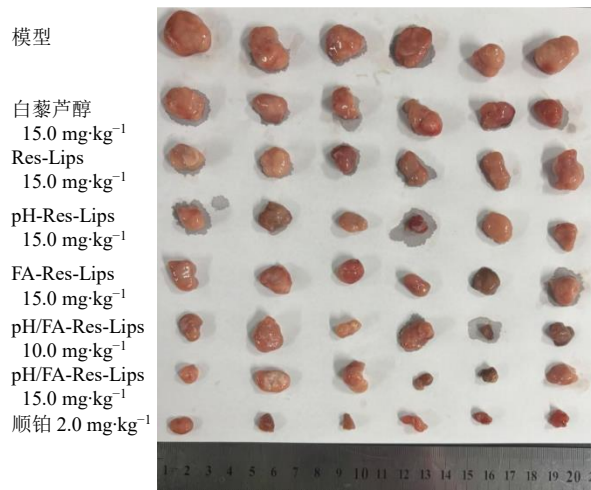


图 10 荷瘤小鼠的肿瘤外观

Fig. 10 Tumor appearance of tumor-bearing mice

表 14 各组荷瘤小鼠免疫器官指数的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 14 Comparison of immune organ index of tumor-bearing mice in various groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	胸腺指数	脾脏指数
空白	—	2.51 ± 0.54	6.79 ± 0.83
模型	—	2.03 ± 0.30*	5.77 ± 0.46*
顺铂	2.0	1.13 ± 0.22**	3.16 ± 0.42**
白藜芦醇	15.0	2.20 ± 0.27###	6.11 ± 0.58###
Res-Lips	15.0	2.67 ± 0.37###	6.95 ± 0.63###
pH-Res-Lips	15.0	2.62 ± 0.33###	6.86 ± 0.61###
FA-Res-Lips	15.0	2.60 ± 0.27###	6.93 ± 0.49###
pH/FA-Res-Lips	10.0	2.52 ± 0.30###	7.07 ± 0.45###
	15.0	2.63 ± 0.38###	7.13 ± 0.47###

与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与顺铂组比较: ### $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank group; ### $P < 0.01$ vs cis-platinum group.

而白藜芦醇及各个脂质体组的胸腺指数和脾脏指数无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明白藜芦醇及各个脂质体毒副作用远小于顺铂。

2.12 安全性评价

2.12.1 血液生化指标的检测 取 6 只正常 Balb/c 小鼠作为空白组。取各组小鼠全血, 以 3 500 r/min 离心 (离心半径为 6.8 cm) 15 min, 取上清测定丙氨酸氨基转移酶 (alanine transaminase, ALT)、天氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和肌酐, 结果见表 15。ALT、AST、BUN 和肌酐均未发生显著性变化, 说明各给药组无明显的毒性作用。

2.12.2 组织 H&E 染色 分别取出荷瘤小鼠肺脏、肝脏、脾脏、肾脏和心脏, 并进行 HE 染色病理切

表 15 血液生化指标 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 15 Blood biochemical indexes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

给药组	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	肌酐/ (μmol·L ⁻¹)
空白	—	166.14 ± 26.05	28.16 ± 3.14	6.04 ± 0.62	37.43 ± 4.13
白藜芦醇	15.0	159.77 ± 18.24	26.94 ± 2.01	5.91 ± 0.56	35.89 ± 1.59
Res-Lips	15.0	154.64 ± 21.26	27.15 ± 1.56	5.89 ± 0.18	36.22 ± 3.36
pH-Res-Lips	15.0	160.05 ± 15.10	27.56 ± 2.97	5.88 ± 0.46	35.71 ± 4.04
FA-Res-Lips	15.0	162.17 ± 17.97	28.00 ± 3.01	5.97 ± 0.35	35.87 ± 2.73
pH/FA-Res-Lips	15.0	159.83 ± 20.47	27.23 ± 2.78	5.86 ± 0.39	36.49 ± 3.15

片, 考察白藜芦醇、Res-Lips、pH-Res-Lips、FA-Res-Lips 和 pH/FA-Res-Lips 的生物安全性。结果见图 11, 各脏器病理结构正常, 无异常细胞核聚集, 也未观察到其他损伤现象, 说明白藜芦醇及其各个脂质体未影响机体脏器功能, 表明安全性良好。

3 讨论

纳米递药系统是抗肿瘤药物应用最多的载药方式, 通过增强渗透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 使纳米药物实现被动靶向, 发挥治疗作用, 如固体脂质纳米粒、纳米结构脂质载体、脂质体、纳米复合物等^[13]。生物相容性、安全性等是临床转化需要满足的关键指标, 极大影响着纳米递药系统将来在临床应用的程度。磷脂及胆固醇等是生物膜的主要成分, 因而采用磷脂及胆固醇作为囊材制备的脂质体具有较高的生物相容性及安全性, 故本研究选用脂质体作为白藜芦醇递药载体。

由于 DSPE-PEOz-FA 母核结构与磷脂母核结构相似^[17], 因此, 本研究制备的 pH/FA-Res-Lips 也具有较高的生物相容性及安全性, 利于将来临床推广及应用。另外, 制备 pH/FA-Res-Lips 时水化条件 (如水化时间、水化体积) 相较于其他条件影响不大, 工艺参数窗口较宽, 利于工业化生产。

释药结果显示, pH/FA-Res-Lips 在 pH 5.5 和 6.0 中释药速率和累积释放度明显高于 pH 6.8 和 7.4 中的释药速率和累积释放度, 证明 pH/FA-Res-Lips 具有良好的 pH 敏感性。这是由于 pH/FA-Res-Lips 囊材中 DSPE-PEOz-FA 上 PEOz 基团的叔胺在弱酸性环境中发生质子化, 使羧基具有未共用电子对, 与 H⁺ 结合后使氮原子形成氮离子, 导致 PEOz 基团带正电荷, 进而诱导 DSPE-PEOz-FA 结构被破坏^[19], 留下释药孔道, 从而触发药物释放。在弱碱性环境中 DSPE-PEOz-FA 结构稳定性较高, 利于阻止释药、

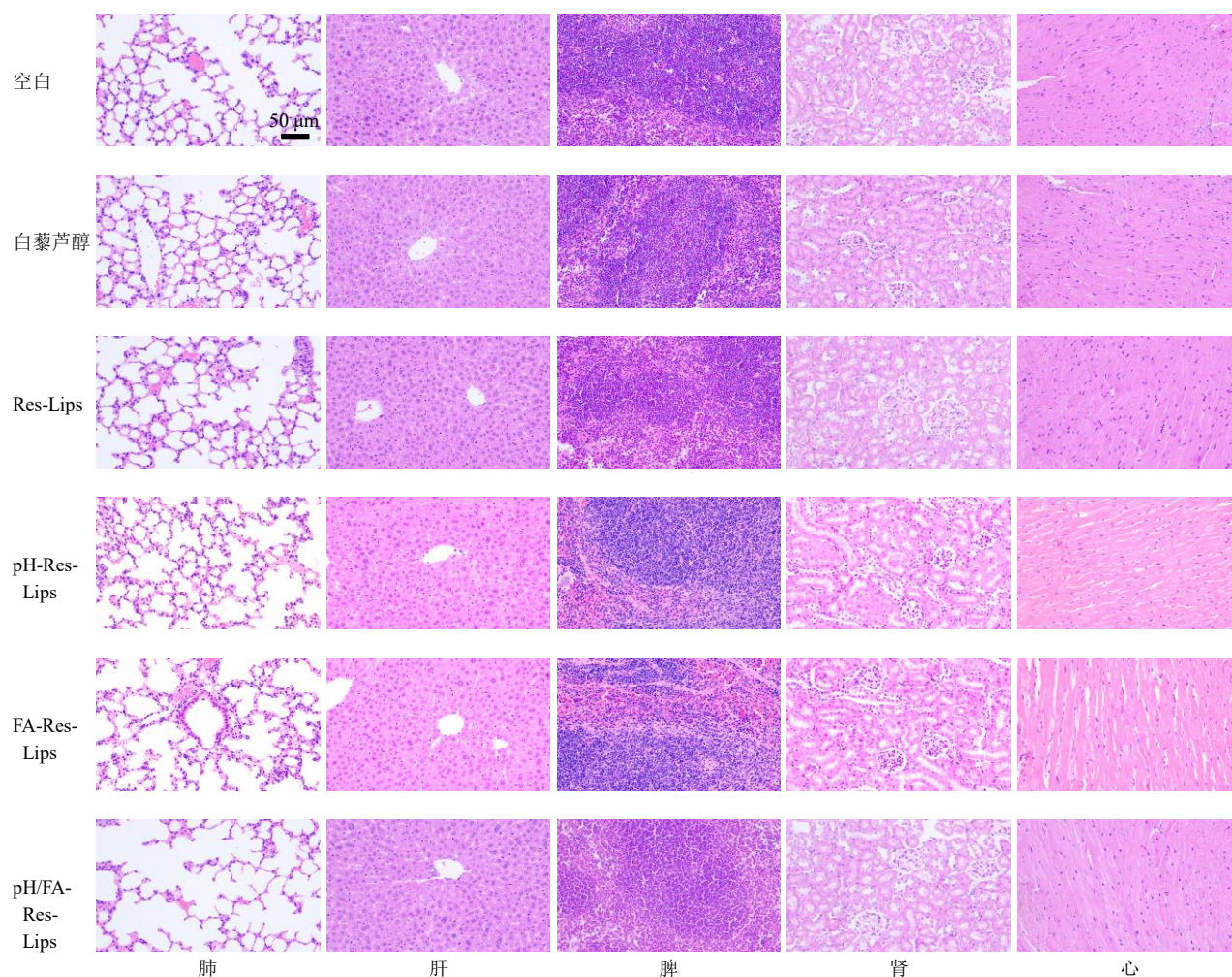


图 11 各组小鼠重要器官切片的 HE 染色

Fig. 11 HE staining of important organ sections from mice in each group

降低不良反应、提高药效。

pH/FA-Res-Lips 混悬液易发生霉变、沉淀等，故将 pH/FA-Res-Lips 混悬液制备成冻干粉以提高储存稳定性^[16]。前期研究表明，以乳糖作为冻干保护剂时 pH/FA-Res-Lips 下降幅度最小，这可能是由于乳糖能诱导玻璃态的形成^[17]，降低预冻时形成的冰晶插入 pH/FA-Res-Lips 磷脂双分子层膜的概率，使之免受冰晶的机械破坏；同时乳糖也可作为间隔基质，有效阻止了 pH/FA-Res-Lips 之间相互融合及聚集等，因而最大程度上维持了 pH/FA-Res-Lips 结构。但仅采用乳糖作为冻干保护剂时冻干粉外观不饱满，存在塌陷现象。甘露醇具有优良的支撑能力，容易获得外观饱满的冻干粉。经过考察发现，当乳糖与甘露醇质量比为 1 : 1 制备的 pH/FA-Res-Lips 冻干粉具有饱满均一的外观，且包封率下降幅度及粒径增长幅度最小^[20]。pH/FA-Res-Lips 冻干粉在加速条件下储存 6 个月时包封率、载药量及粒径仍可

保持较高的稳定性，为评价 pH/FA-Res-Lips 冻干粉成药性提供了参考资料。pH/FA-Res-Lips 冻干粉储存稳定性高于 Res-Lips 冻干粉，可能与 pH/FA-Res-Lips 处方中引入适量 DSPE-PEOz-FA 有关，PEOz 和叶酸修饰至 pH/FA-Res-Lips 表面后提供了较大的空间位阻^[21]，一方面利于阻止 pH/FA-Res-Lips 之间相互融合、聚集，另一方面包覆在 pH/FA-Res-Lips 表面后可减少易氧化的磷脂与空气直接接触，利于提高稳定性。

白藜芦醇和 Res-Lips 抑制子宫内膜癌荷瘤小鼠瘤块生长作用相对较弱，说明抗肿瘤药效未能充分发挥^[22]。顺铂组荷瘤小鼠体质量、胸腺指数和脾脏指数出现显著性下降，表明顺铂对机体具有较高的毒副作用，而 pH/FA-Res-Lips 无显著性差异，使用安全性明显高于顺铂，主要与白藜芦醇本身毒性较小有关^[23]。与 Res-Lips、pH-Res-Lips 和 FA-Res-Lips 相比，pH/FA-Res-Lips 极大提高了白藜芦醇抑制子

宫内膜癌荷瘤小鼠瘤块的生长,可能是由于叶酸修饰利于 pH/FA-Res-Lips 在叶酸受体介导的内吞作用下进入肿瘤细胞^[24-25];同时 pH/FA-Res-Lips 具有一定的 pH 敏感性,利于在肿瘤细胞内 (pH 4~6) 弱酸性环境智能释药^[26-27],这种叶酸受体介导入胞联合 pH 敏感智能释药的策略可有效提高抗肿瘤药效,也得到相关研究证实^[24]。李伟宏等^[7]构建了白藜芦醇 mPEG-PLGA 纳米粒,体内抑瘤率为 46.82%。张朵朵^[28]采用金纳米粒负载了白藜芦醇,体内抑瘤率为 57.20%。王凯悦^[29]构建了白藜芦醇与水飞蓟宾共载纳米载药体系,体内抑瘤率为 51.05%。而本研究构建的 pH/FA-Res-Lips 体内抑瘤率达 66.67%,优势明显。pH/FA-Res-Lips 未影响肺脏、肝脏、脾脏、肾脏和心脏功能,表明安全性良好。

综上,本研究采用单因素结合 Box-Behnken 设计-效应面法筛选出 pH/FA-Res-Lips 最佳处方工艺,包封率大于 80%,极大提高了在弱酸性介质中释药速率及释放度,具有一定的 pH 敏感性。pH/FA-Res-Lips 极大提高了白藜芦醇体内抗肿瘤药效,未影响机体各个脏器功能,使用安全性高于临床常用抗肿瘤药物顺铂,因此 pH/FA-Res-Lips 有望作为抗肿瘤药物应用于子宫内膜癌的治疗,值得进一步开发研究。本研究主要对 pH/FA-Res-Lips 制剂工艺、理化性质、体内外抗肿瘤药效、安全性评价进行了研究,将来继续对该制剂的注射药动学、组织分布(靶向性评价)、抗肿瘤机制等进行考察,进一步丰富研究数据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 邵佳琪,宋捷,何惠,等. 子宫内膜癌治疗药物的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(9): 2028-2035.
- [2] 王艳青,张鑫淼. 右美托咪定对子宫内膜癌细胞增殖、凋亡及 Wnt/ β -catenin 通路的影响 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(12): 2929-2937.
- [3] 孟祥伟,曹原,张剑桥,等. 中药活性成分含笑内酯的结构修饰和抗肿瘤活性研究进展 [J]. 化学研究与应用, 2024, 36(5): 931-941.
- [4] 王真,陈立伟. 白藜芦醇抗肿瘤药理作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(2): 445-451.
- [5] 李元昆,鲁笑钦,胡滨,等. 白藜芦醇对子宫内膜癌荷瘤裸鼠的抑瘤作用及对免疫功能的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(3): 617-624.
- [6] 李珏,姜飞,李慧丽,等. 白藜芦醇-牛磺脱氧胆酸钠共无定形体系改善溶解度和物理稳定性 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7248-7256.
- [7] 李伟宏,王风云. 白藜芦醇 mPEG-PLGA 纳米粒的制备及其体内药动学、抗肿瘤活性研究 [J]. 中成药, 2022, 44(11): 3409-3415.
- [8] 王新敏,黄丽珍,岳鹏飞,等. 白藜芦醇脂质体的制备及经鼻腔给药评价 [J]. 中草药, 2024, 55(16): 5428-5436.
- [9] Jaisamut P, Wana S, Limsuwan S, *et al.* Enhanced oral bioavailability and improved biological activities of a quercetin/resveratrol combination using a liquid self-microemulsifying drug delivery system [J]. *Planta Med*, 2021, 87(4): 336-346.
- [10] Zhu J M, Yang Y M, Wang J, *et al.* Dual responsive magnetic drug delivery nanomicelles with tumor targeting for enhanced cancer chemo/magnetothermal synergistic therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 7647-7660.
- [11] 顾宏霞,何冰,谭鸿舟,等. 7-羟基-香豆素-3-羧酸衍生物的合成及抗肿瘤活性 [J]. 化学研究与应用, 2023, 35(11): 2711-2717.
- [12] Ding J, Zhang X, Chen C Q, *et al.* Ultra pH-sensitive polymeric nanovesicles co-deliver doxorubicin and navitoclax for synergetic therapy of endometrial carcinoma [J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(8): 2264-2273.
- [13] 邓蓓,戴红,朱梦月,等. 基于酶敏感的双响应型聚合物纳米载体在抗肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 广州化工, 2024, 52(24): 5-7.
- [14] 李晓丽. 黄精皂苷 dioscin 抗子宫内膜癌的分子机制及其纳米颗粒的靶向递送研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2023.
- [15] Wu B W, Wang Z Q, Liu J Y, *et al.* Dual rectification of metabolism abnormality in pancreatic cancer by a programmed nanomedicine [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 10526.
- [16] 刘万路. 牛血清白蛋白/壳聚糖双层包覆染料木素脂质体的制备、表征和口服药动学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 8018-8030.
- [17] 姚杰,姬新颖,张体鹏,等. 聚乙二醇和八聚精氨酸双修饰漆黄素脂质体的制备、表征及体内外评价 [J]. 中草药, 2025, 56(5): 1564-1579.
- [18] 王立红,吴文丽,罗永明,等. 白藜芦醇温敏型凝胶剂的制备及抗膀胱癌细胞研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(10): 2334-2342.
- [19] Wang D S, Zhou Y X, Li X R, *et al.* Mechanisms of pH-sensitivity and cellular internalization of PEOz-b-PLA micelles with varied hydrophilic/hydrophobic ratios and intracellular trafficking routes and fate of the copolymer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(8): 6916-6930.
- [20] 张体鹏,决利利. 白屈菜红碱 2 种脂质体的制备和口服

- 生物利用度比较 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5568-5579.
- [21] 那婕. 叶酸修饰两亲性紫杉醇胶束载药系统的构建及对宫颈癌靶向递药性研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2021.
- [22] 赵辉, 王秋梅, 冯跃庆. 改良多柔比星脂质体 TAC 方案治疗 HER2 阴性乳腺癌的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(8): 1793-1799.
- [23] 刘峰成, 孟田田, 郅可欣, 等. 白藜芦醇对热应激诱导肉鸡脾脏淋巴细胞增殖及凋亡的作用研究 [J]. 动物营养学报, 2023, 35(7): 4604-4616.
- [24] Wang D, Fan Z H, Zhang X C, *et al.* pH-responsive self-assemblies from the designed folic acid-modified peptide drug for dual-targeting delivery [J]. *Langmuir*, 2021, 37(1): 339-347.
- [25] Fan L F, Jin L L, Tang T C, *et al.* Neutrophil-like pH-responsive pro-efferocytic nanoparticles improve neurological recovery by promoting erythrophagocytosis after intracerebral hemorrhage [J]. *Theranostics*, 2024, 14(1): 283-303.
- [26] 王涛丽, 张广辉, 张莉, 等. 负载二氢杨梅素 ZIF-8 纳米粒的制备、表征及抗肿瘤评价 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(5): 1224-1235.
- [27] 李伟宏, 张涛, 高娟, 等. 白藜芦醇 pH 敏感介孔二氧化硅纳米粒的制备、表征和体外抗肿瘤活性 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(8): 1934-1942.
- [28] 张朵朵. 金纳米荷载白藜芦醇的制备表征及抗肝癌作用研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [29] 王凯悦. 基于药辅同源构建白藜芦醇与水飞蓟宾共载纳米载药体系及其抗肿瘤研究 [D]. 南充: 川北医学院, 2024.

[责任编辑 郑礼胜]