

本文引用: 骆慧婷, 欧阳威, 王旭易, 颜红, 陈姿延, 吴慧, 李涛, 肖丹. 叶酸修饰蟾毒灵阳离子脂质体的制备及体外评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(5): 822–829.

叶酸修饰蟾毒灵阳离子脂质体的制备及体外评价

骆慧婷, 欧阳威, 王旭易, 颜红*, 陈姿延, 吴慧, 李涛, 肖丹
湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410000

〔摘要〕 **目的** 制备叶酸修饰蟾毒灵阳离子脂质体(FA-BF-CLs), 并对其进行质量评价及抗肝癌研究。**方法** 采用薄膜-超声分散法制备 FA-BF-CLs, 以粒径、Zeta 电位及包封率等指标, 采用单因素和 Box-Behnken 响应面分析法对方剂及工艺进行优化。透射电镜观察脂质体显微形态, 并考察其体外释放过程、溶血性及空白阳离子脂质体体外细胞安全性。采用 CCK-8 法比较 FA-BF-CLs、BF-CLs(未加叶酸修饰的蟾毒灵阳离子脂质体)及 BF-solution(蟾毒灵溶液)的体外细胞毒性。**结果** 最佳条件为磷脂与药物质量比 14.17:1、磷脂与胆固醇质量比 3.8:1、超声时间 13 min, 制备得到脂质体粒径(135.5 ± 1.40) nm, 多分散系数 0.192 ± 0.025 , Zeta 电位(16.23 ± 0.46) mV, 包封率 $69.42\% \pm 2.18\%$ 。体外释放研究表明, FA-BF-CLs 具有明显的缓释效果, 溶血试验结果显示该载体材料无溶血现象。体外细胞安全性结果显示阳离子脂质体浓度在 0~20 $\mu\text{mol/L}$ 范围内安全无毒。体外细胞毒性表明 FA-BF-CLs 对 HepG2 肝癌细胞的抑制作用大于 BF-CLs 和 BF-solution($P < 0.01$)。**结论** 制备得到的 FA-BF-CLs 外观均一稳定、具有缓释性能, 空白阳离子脂质体安全无毒, FA-BF-CLs 具有更强的体外抗肝癌研究, 可用于进一步的研究。

〔关键词〕 蟾毒灵; 阳离子脂质体; 叶酸; Box-Behnken 响应面分析法; 肝癌

〔中图分类号〕 R283.6

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.05.010

Preparation and evaluation in vitro of folic acid-modified bufalin cationic liposomes

LUO Huiting, OUYANG Wei, WANG Xuyi, YAN Hong*, CHEN Ziyang, WU Hui, LI Tao, XIAO Dan
College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410000, China

〔Abstract〕 **Objective** To prepare folic acid-modified bufalin cationic liposomes (FA-BF-CLs) and to evaluate their quality and anti-liver cancer. **Methods** FA-BF-CLs were prepared by thin-film ultrasonic dispersion method. Moreover, the formulation and process of FA-BF-CLs were optimized by single factor and Box-Behnken response surface analysis with particle size, Zeta potential and encapsulation rate as indexes. The micromorphology of liposomes was observed by transmission electron microscopy, and the in vitro release process, hemolysis and in vitro cell safety of blank cationic liposomes were investigated. The in vitro cytotoxicity of FA-BF-CLs, BF-CLs (bufalin cationic liposomes without folic-acid modification) and BF-solution (bufalin solution) was compared by the CCK-8 method. **Results** The optimum conditions were as follows: the mass ratio of phospholipid to drug was 14.17:1, the mass ratio of phospholipid to cholesterol was 3.8:1, and the ultrasonic time was 13 min. The particle size of liposomes was (135.5 ± 1.40) nm, the polydispersity index was 0.192 ± 0.025 , the Zeta potential was (16.23 ± 0.46) mV, and the encapsulation rate was $69.42\% \pm 2.18\%$. The in vitro release study showed that FA-BF-CLs had an obvious sustained release effect, and hemolysis test showed that the carrier material had no hemolysis. The in vitro cell safety result showed that the cationic liposomes were safe and non-toxic in the concentration range from 0 to 20 $\mu\text{mol/L}$, and the in vitro cytotoxicity tests demonstrated that the inhibitory effects of FA-BF-CLs

〔收稿日期〕 2022-11-17

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30444); 长沙市自然科学基金项目(Kq2007066); 湖南省研究生科研创新项目(CX20220791); 湖南省大学生创新创业训练计划项目(S202210541068); 中药学一级学科开放基金项目(2020ZYX09)。

〔第一作者〕 骆慧婷, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型与新技术。

〔通信作者〕 * 颜红, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: yh8632@126.com。

on HepG2 hepatoma cells were greater than those of BF-CLs and BF-solution ($P<0.01$). **Conclusion** The prepared FA-BF-CLs appears uniform and stable, and possesses sustained release properties, of which the blank cationic liposomes are safe and non-toxic. Moreover, FA-BF-CLs have stronger anti-liver cancer in vitro and can be used for further research.

[**Keywords**] bufalin; cationic liposomes; folic acid; Box-Behnken response surface analysis; anti-liver cancer

肝癌,包括原发性和继发性肝癌,是最为常见的恶性肿瘤之一,目前临床常采用化疗和手术治疗肝癌,虽然显著延长了患者的生存时间,但可能会引起其他正常细胞的死亡以及多药耐药性等毒副作用^[1]。蟾毒灵(Bufalin, BF)是从蟾酥干燥皮中提取的有效的抗肿瘤单体^[2],研究表明,蟾毒灵可诱导肝癌细胞凋亡、分化和自噬,抑制肝癌的侵袭和转移,对治疗肝肿瘤效果更为显著^[3-5]。阳离子脂质体是一种新型给药载体,主要由阳离子型材料、中性磷脂及胆固醇组成,可有效地包载药物^[6]。因其表面带有正电荷,能与带负电荷的细胞膜脂质产生静电吸附作用,通过细胞内吞或膜融合的方式将药物导入细胞从而发挥作用^[7]。叶酸受体是一种糖基化磷脂酰肌醇连接的膜糖蛋白,其在大多肿瘤细胞表面过度表达,而在正常细胞表面少量表达甚至不表达^[8]。叶酸及其衍生物与叶酸受体之间具有高度亲和力,两者可特异性结合形成复合物,从而实现对肿瘤的主动靶向。此外,有研究^[9]显示阳离子脂质体除了可包载药物,还可作为基因递送载体,具有生产成本低、安全性高、生物相容性好等优点,是非常具有发展前景的递送基因载体之一。

本研究以叶酸为靶向分子,阳离子脂质体为纳米载体,制备叶酸修饰蟾毒灵阳离子脂质体(FA-BF-CLs),优化了其处方及工艺条件,对其外观、显微形态、粒径、药物释放特性等进行质量评价,并开展了体外抗肝肿瘤活性的研究,为后续共递送蟾毒灵及基因的阳离子脂质体的研究提供实验依据,同时为探索蟾毒灵肝靶向新型给药系统的研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱仪系统(美国安捷伦公司);01A418型超声细胞粉碎(宁波新芝生物科技股份有限公司);Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司);HT-7800 透射电镜[日立科学仪器(北京)有限公司];Varioskan Flash 多功能酶标仪、Forma Steri-Cycle

i250 高温灭菌 CO₂ 培养箱(赛默飞世尔科技公司);倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.2 试剂与药物

蟾毒灵对照品(批号:111981-201501,质量分数99.2%,中国食品药品检定研究院);蟾毒灵原料药(质量分数98%宝鸡市辰光生物科技有限公司);大豆卵磷脂(批号:SY-SO-20081)、胆固醇(CHO-HP,批号:C0073)、DOTAP [(2,3-二油酰基-丙基)-三甲基氯化铵,批号:RD-01917](上海艾韦拓医药科技有限公司);叶酸(FA-PEG2000-DSPE)(上海梵硕生物有限公司);乙腈(色谱纯,美国斯百全公司);三氯甲烷、甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 细胞

人肝癌 HepG2 细胞株(批号:CL-0103,武汉普诺赛生命科技有限公司);人正常肝细胞 L-02 细胞株,上海生博生物医药公司(批号:SEC1048)。CCK-8 试剂盒(批号:E-CK-A362)(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);胎牛血清(FBS,批号:164210-50)、DMEM 高糖培养基(批号:PM150210)、青链霉素双抗(批号:PB180120)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC 测定蟾毒灵含量

2.1.1 色谱条件 Waters Xselect HSS T3 反相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸二氢钾溶液(50:50);检测波长296 nm;流速 1.0 mL/min;柱温 30 °C;进样量 20 μL。

2.1.2 蟾毒灵对照品、FA-BF-CLs 供试品及阴性溶液的制备 精密称取蟾毒灵对照品 2.00 mg,甲醇定容至 10 mL,即得 200 μg/mL 的蟾毒灵对照品溶液;精密移取叶酸修饰蟾毒灵阳离子脂质体(FA-BF-CLs)样品 1.0 mL,加入甲醇定容至 10 mL 破乳,静置过夜,超声 30 min,过 0.45 μm 有机微孔滤膜,备用。同样方法处理空白阳离子脂质体(CLs)样品作为阴性溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密移取蟾毒灵对照品溶

液,用甲醇定容,得到系列质量浓度为10、20、40、60、80、100、120 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,按照“2.1.1”项色谱条件进样。以峰面积(A)为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,得到其回归方程 $A=17.65C-10.776$, $r^2=0.9991$ 。结果表明,蟾毒灵在10~120 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积具有良好的线性关系。

2.1.4 专属性考察 按照“2.1.1”项色谱条件分别进样蟾毒灵对照品溶液、FA-BF-CLs供试品溶液、阴性溶液。结果显示,该处方其他辅料成分对蟾毒灵测定无干扰,对照品溶液与供试品溶液的峰形良好,出峰时间一致,表明该测定方法专属性良好。

2.1.5 精密度试验 精密吸取“2.1.4”项下对照品溶液,按照“2.1.1”项色谱条件连续进样6次,计算蟾毒灵的RSD值。结果显示BF的RSD值为0.29%($n=6$),该仪器精密度良好,符合相关要求。

2.1.6 稳定性试验 精密移取FA-BF-CLs供试品溶液1 mL,用甲醇破乳后,于室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h,按照“2.1.1”项色谱条件进样,计算蟾毒灵的RSD值。结果显示,蟾毒灵的RSD值为1.75%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 精密吸取FA-BF-CLs样品1 mL,共6份,按照“2.1.2”项方法制备供试品溶液,按照“2.1.1”项色谱条件进样,并计算蟾毒灵的平均含量与RSD值。测定蟾毒灵平均含量为19.86 $\mu\text{g/mL}$,RSD值为0.22%($n=6$),表明该测定方法的重现性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密吸取9份空白CLs溶液,每份0.5 mL,分为3组,精密加入适量蟾毒灵对照品溶液,摇匀,加入甲醇破乳定容,配成低、中、高质量浓度10、60、120 $\mu\text{g/mL}$,测定峰面积,计算平均加样回收率与RSD值。高、中、低3个质量浓度的平均回收率分别为100.87%、99.00%、101.88%,RSD值分别为1.31%、0.44%、0.11%。

2.2 阳离子脂质体的制备

采用薄膜分散-超声法^[10]制备FA-BF-CLs,精密称取处方量大豆卵磷脂、胆固醇、DOTAP[(2,3-二油酰基-丙基)-三甲基氯化铵]、叶酸(FA-PEG2000-DSPE)、蟾毒灵于250 mL茄形瓶中,加入三氯甲烷-甲醇(8:2)溶解完全后,于50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下减压旋转蒸发至溶剂完全挥干,瓶壁上形成均匀的脂质薄膜,向其中加入pH 6.4 PBS缓冲液,55 $^{\circ}\text{C}$ 下水

合,于超声波细胞粉碎机下探头超声,过0.22 μm 微孔滤膜得到FA-BF-CLs。同样方法制备不加叶酸的阳离子脂质体(BF-CLs)、空白阳离子脂质体(CLs)样品。

2.3 阳离子脂质体包封率测定

经过文献研究和摸索实验发现,透析法在测定FA-BF-CLs包封率时具有准确性高、简单快捷等优势^[11-12]。精密移取pH 6.4的PBS 100 mL作为透析介质,吸取FA-BF-CLs 1 mL放入透析袋中,于30 $^{\circ}\text{C}$ 、磁力搅拌(300 r/min)下透析,透析6 h后吸取3 mL透析介质,加适量甲醇,混匀,过0.45 μm 微孔滤膜,按“2.1.1”项下进行HPLC测定,计算包封率。包封率 $=[(\text{总药量}-\text{游离药量})/\text{总药量}]\times 100\%$

2.4 FA-BF-CLs制备工艺的单因素考察

2.4.1 DOTAP与磷脂质量比 称取30.00 mg磷脂,为DOTAP与磷脂的质量比1:1、2:1、3:1,并称取处方量蟾毒灵2.000 mg、胆固醇7.500 mg、FA-PEG2000-DSPE 2.000 mg溶于15 mL三氯甲烷-甲醇(8:2)中,按照“2.2”项下制备FA-BF-CLs,考察粒径、电位及包封率等变化。结果显示,随着DOTAP与大豆卵磷脂质量比增大,电位分别为108.5、112.7、1175 mV,呈现逐渐上升的趋势;包封率分别为66.93%、61.61%、58.25%,包封率逐渐减小,因而选用质量比为1:1进行后续的实验。

2.4.2 磷脂与药物质量比 以脂质体粒径、电位、包封率及外观为指标,称取2.000 mg蟾毒灵,依次设定磷脂与蟾毒灵的质量比为5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1,称取处方量DOTAP 30.00 mg、胆固醇、FA-PEG2000-DSPE溶于15 mL三氯甲烷-甲醇(8:2)中,按照“2.2”项下制备FA-BF-CLs,结果表明当磷脂与蟾毒灵质量比为5:1、10:1、15:1时,包封率逐渐增大至58.86%;20:1时包封率下降至最小值23.9%,随后包封率逐渐增大。此外,随着磷脂与蟾毒灵质量比逐渐增大,当15:1时,粒径最小103.0 nm,随后粒径逐渐增大。综上所述,选用比例15:1进行后面的处方优化。

2.4.3 磷脂与胆固醇质量比 称取磷脂30.00 mg,依次设定磷脂与胆固醇的质量比为2:1、4:1、6:1、8:1、10:1、12:1,称取处方量蟾毒灵、DOTAP、FA-PEG2000-DSPE溶于15 mL三氯甲烷-甲醇(8:2)中,按照“2.2项下”制备FA-BF-CLs,考察脂质体粒径、电位及包封

率的变化。结果显示,随着比例增大,包封率逐渐减小,粒径分别为 141.4、126.1、110.1、100.5、120.6、123.6 nm,综合考虑采用比例为 4:1 来进行后续的处方优化。

2.4.4 超声时间 超声是脂质体整粒的过程,合适的粒径大小(100~200 nm)可为后续实验奠定重要基础。以粒径、电位及包封率的变化为指标,称取处方量蟾毒灵、DOTAP、磷脂、胆固醇、FA-PEG2000-DSPE 溶于 15 mL 三氯甲烷-甲醇(4:1)中,按照“2.2”项下以不同超声时间(15、20、25、30 min)制备 FA-BF-CLs。结果显示超声时间为 15、20、25 min 时,粒径逐渐减小,超声时间 30 min 时,粒径增大至 146.3 nm,且随着超声时间增加,包封率逐渐减小,故采用超声时间为 15 min。

2.4.5 水合时间 称取处方量蟾毒灵、DOTAP、磷脂、胆固醇、FA-PEG2000-DSPE 溶于 15 mL 三氯甲烷-甲醇(8:2)中,改变水合时间(30、45、60 min),按照“2.2”项下制备 FA-BF-CLs,考察脂质体粒径、电位及包封率的变化。结果显示,随着水合时间增加,包封率分别为 65.91%、66.93%、65.27%,粒径与电位相差不大,故选用水合时间 45 min。

2.4.6 水合介质 以粒径、电位及包封率的变化为指标,称取处方量蟾毒灵、DOTAP、磷脂、胆固醇、FA-PEG2000-DSPE 溶于 15 mL 三氯甲烷-甲醇(8:2)中,按照“2.2”项下以水合介质(水、pH 6.4 PBS、pH 6.8 PBS、pH 7.0 PBS、pH 7.2 PBS、pH 7.4 PBS)

制备 FA-BF-CLs。结果显示,水合介质种类的不同对粒径以及电位影响不显著,包封率先增大后减小,综合粒径、电位及包封率等采用 pH 6.4 PBS 水合介质。

2.4.7 FA 与磷脂质量比 称取磷脂 30.00 mg,依次设定 FA-PEG2000-DSPE 与磷脂质量比为 1:5、1:10、1:15、1:20,并称取处方量蟾毒灵、DOTAP、胆固醇、FA-PEG2000-DSPE 溶于 15 mL 三氯甲烷-甲醇(8:2)中,按照“2.2 项下”制备 FA-BF-CLs,考察脂质体粒径、电位及包封率的变化。结果显示,粒径及电位相差不大,包封率分别为 55.94%、61.47%、62.56%、54.22%,故采用比例为 1:15。

2.5 Box-Behnken 响应面分析法

2.5.1 试验设计 根据文献及单因素考察结果,选择对 FA-BF-CLs 评价指标较显著的 3 个因素作为考察对象,即磷脂与药物质量比(X_1)、磷脂与胆固醇质量比(X_2)、超声时间(X_3),以包封率(Y)作为评价指标进行实验。实验设计与结果见表 1—2。

表 1 实验因素及其水平数设计

水平	磷脂与药物质量比(X_1)	磷脂与胆固醇质量比(X_2)	超声时间(X_3)
-1	10:1	3:1	10
0	15:1	4:1	15
+1	20:1	5:1	20

2.5.2 模型拟合及方差分析 采用 Design-Expert V12.0 软件,以包封率(Y)对 X_1 、 X_2 、 X_3 进行二次项

表 2 实验设计与结果

实验号	X_1	X_2	X_3	Y
1	15:1(0)	3:1(-1)	20(+1)	58.88
2	15:1	4:1(0)	15(0)	66.30
3	20:1(+1)	4:1	10(-1)	52.82
4	10:1(-1)	4:1	10	62.21
5	15:1	3:1	10	61.19
6	15:1	4:1	15	67.90
7	10:1	5:1(+1)	15	48.86
8	10:1	4:1	20	49.10
9	20:1	5:1	15	52.30
10	15:1	5:1	10	61.80
11	20:1	3:1	15	52.30
12	10:1	3:1	15	59.80
13	15:1	5:1	20	45.61
14	15:1	4:1	15	67.90
15	15:1	4:1	15	70.22
16	15:1	4:1	15	68.61
17	20:1	4:1	20	48.80

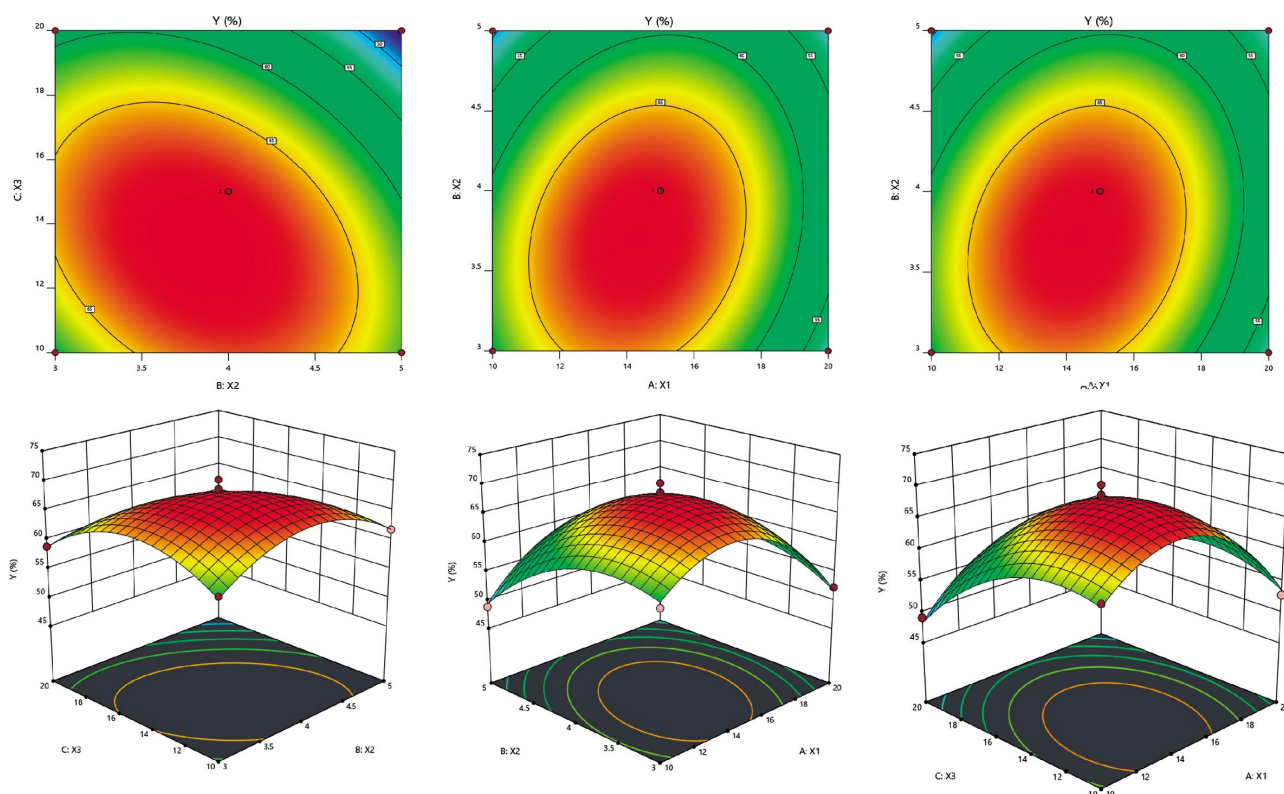


图1 各因素间交互作用的响应图

式回归方程拟合。回归方程为： $Y=68.19-1.72X_1-2.95X_2-4.45X_3+2.73X_1X_2+2.27X_1X_3-3.47X_2^2X_3-9.25X_1^2-5.62X_2^2-5.70X_3^2$ 。方差分析结果表明，回归模型 $P<0.0001$ ，失拟项水平不显著 ($P>0.05$)，说明模型拟合良好。此外，磷脂与药物质量比 (X_1)、磷脂与胆固醇质量比 (X_2)、超声时间 (X_3) 对包封率均具有显著影响 ($P<0.05$)，各因素之间交互作用不显著 ($X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 的 $P>0.05$)，且各因素均不是单纯的一次关系，而是二次关系。以包封率为评价指标的各因素交互作用响应图，见图 1。利用 Design-Expert V12.0 软件对上述所建立的数学模型进行综合分析，保证 Y 与拟合度均最高的前提下，最终确定了各因素的最佳取值：磷脂与药物质量比 14.17:1、磷脂与胆固醇质量比 3.8:1、超声时间 13 min。

2.5.3 验证试验 按上述优化后的处方，采用薄膜-超声分散法以 DOTAP 与磷脂比 1:1、磷脂与药物质量比 14.17:1、磷脂与胆固醇质量比 3.8:1 及 FA 与磷脂比 1:1，用三氯甲烷:甲醇 (8:2) 溶解，于 50 °C 水浴条件下减压旋转蒸发至溶剂完全挥干，瓶壁上形成均匀的脂质薄膜，向其中加入 pH 6.4 PBS，55 °C 下水合 45 min，于超声波细胞粉碎机下探头超声 13 min，过 0.22 μm 微孔滤膜得到 FA-BF-CLs。测得平均包封率为 69.35% ($n=3$)，接近理论包封率 69.42% ($n=3$)，

实测值与预测值较为接近，相对偏差低于 3%，说明 Box-Behnken 响应面预测结果可靠，该工艺优化方法具有可行性。

2.6 FA-BF-CLs 的质量评价

2.6.1 FA-BF-CLs 的外观及形态 在室温下观察最佳工艺制备得到的 FA-BF-CLs，其外观澄清透明，呈淡蓝色乳光。取 FA-BF-CLs 适量，滴到铜网上 5 min 后，用滤纸吸去上面的多余液体，再向铜网滴上 1% 的磷钨酸负染 2 min，吸干多余液体后在透射电子显微镜 (TEM) 下观察脂质体的显微形态。FA-BF-CLs 呈规则的球形。详见图 2。

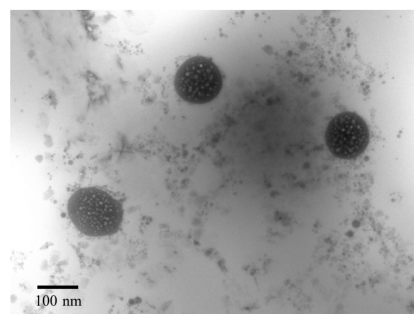


图2 FA-BF-CLs 的 TEM 图

2.6.2 FA-BF-CLs 的粒径与电位考察 取 FA-BF-CLs 适量，用马尔文粒度测定分析仪测定脂质体粒径、多分散系数 (PDI)、Zeta 电位的大小及分布情况，平行测定 3 次，得到脂质体粒径为 (135.50 ± 1.40) nm，多

表 3 方程拟合

拟合方程	BF-溶液	BF-CLs	FA-BF-CLs
零级方程	$Q=1.358t+55.74$ $R^2=0.374$	$Q=1.363t+49.77$ $R^2=0.685$	$Q=1.139t+47.96$ $R^2=0.714$
一级方程	$\ln(1-Q)=-16.15t-44.50$ $R^2=0.927$	$\ln(1-Q)=-14.63t-42.43$ $R^2=0.965$	$\ln(1-Q)=-13.45t-47.44$ $R^2=0.957$
Higuchi 方程	$Q=12.21t^{1/2}+39.82$ $R^2=0.608$	$Q=11.63t^{1/2}+32.79$ $R^2=0.856$	$Q=9.606t^{1/2}+34.08$ $R^2=0.873$

分散系数为(0.19±0.03),Zeta 电位为(16.23±0.46) mV。

2.6.3 体外释放性能考察 采用透析扩散法^[13]测定考察 FA-BF-CLs、BF-CLs、蟾毒灵溶液的体外释放性能。取上述样品 1 mL,分别装入透析袋中,放置于装有 100 mL 释放介质为 PBS 溶液(pH=7.4)中,置于 37 ℃ 水浴恒温振荡器中进行释放,转速为 100 r/min,分别于 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24、36、48 h 取出 1 mL 溶出介质,加入甲醇溶液破乳,并立即补加相同体积的 37 ℃ 空白溶出介质,按照“2.1.1”下测定 BF 含量并按照以下公式计算累积释放率($Q/\%$)。以累积释放率($Q/\%$)对时间/ t 绘制曲线并进行方程拟合,见表 3、图 3。结果显示游离 BF 溶液 12 h 的累积释放率达到 97.86%±0.04%以上,而 FA-BF-CLs 和 BF-CLs 12 h 累积释放率分别为 75.70%±0.12%、82.59%±0.06%;48 h 后 FA-BF-CLs、BF-CLs 的累积释放率分别为 93.94%±0.04%和 99.11%±0.03%,达到最大累积释放量。相比于游离 BF 溶液,FA-BF-CLs、BF-CLs 两种阳离子脂质体均表现出一定的缓释特性。此外,根据表中可知 FA-BF-CLs 更符合一级动力学模型($R^2=0.956\ 9$),具有缓释性能。

$$Q\%=(V_{\text{补}}\sum_{i=1}^{n-1}C_i+C_nV_{\text{总}})/M$$

式中 $V_{\text{补}}$ 表示释放介质补加的体积(mL); V_n 表示释放介质的总体积(mL); C_i 表示第 i 次取样时释放介质中药物的浓度 ($\mu\text{g/mL}$); C_n 表示第 n 次取

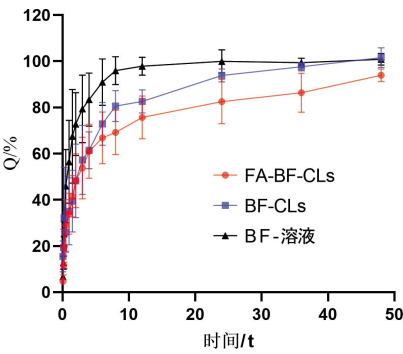


图 3 游离 BF 溶液、BF-CLs 和 FA-BF-CLs 的体外释放曲线($n=3$)

样时释放介质中药物的浓度($\mu\text{g/mL}$); M 表示传递体中药物的含量(μg)。

2.6.4 溶血试验 根据 2020 版《中华人民共和国药典》四部通则“1148 溶血与凝聚检查法”考察 FA-BF-CLs、BF-CLs、CLs 对红细胞的溶血情况,为后续静脉给药奠定实验基础。取洁净透明试管 27 只,分为 3 组,每组 9 只,编号,每组中 1~6 号管为供试品管,7 号管为阴性对照管,8 号管为阳性对照管,9 号管为供试品对照管。依次加入 2%红细胞悬液、生理盐水、去离子水,混匀后,立即置于(37±0.5) ℃ 的恒温箱中进行温育。通过紫外分光光度法测定溶血率,结果见表 4。结果显示三种制剂溶血率均小于 5%,三种制剂均符合 2020 版《中华人民共和国药典》对静脉注射给药的要求。

2.6.5 体外细胞安全性考察 阳离子脂质体作为最

表 4 溶血实验设计方案

试管	FA-BF-CLs		BF-CLs		CLs	
	吸光度(A)	溶血率/%	吸光度(A)	溶血率/%	吸光度(A)	溶血率/%
1	0.01	0.29	0.013	0.66	0.027	0.28
2	0.009	0.15	0.012	0.53	0.02	0.19
3	0.01	0.29	0.01	0.26	0.013	0.95
4	0.012	0.58	0.014	0.79	0.011	0.68
5	0.013	0.72	0.013	0.66	0.01	0.54
6	0.011	0.44	0.015	0.92	0.009	0.41
7	0.008	0	0.008	0	0.006	0
8	0.698	100	0.765	100	0.737	100

常用的非病毒基因载体之一,具有低免疫原性、组织靶向性等优点,但其本身与负电荷的细胞膜发生静电吸附作用,可能会引起细胞膜的毒性^[14],故采用 CCK-8 法考察含 DOTAP 的空白阳离子脂质体对 L-02 和 HepG2 细胞的毒性作用。取对数生长期的 L-02、HepG2 细胞以 5000 个/孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,加入不同培养基稀释的含 DOTAP 的空白阳离子脂质体(浓度为 0、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$),每个浓度 6 个复孔,继续放入培养箱中培养 24 h 后,每孔加 CCK-8 溶液,继续于恒温培养箱中培养。采用酶标仪在 450 nm 下检测各孔的吸光度值(OD),结果见图 4。不同浓度的空白阳离子脂质体作用 24 h 后,L-02 细胞未出现明显的抑制作用,且经 SPSS 26.0 软件分析组间差异无统计学意义($P>0.05$)。浓度为 0~20 $\mu\text{mol/L}$ 的空白阳离子脂质体作用 24 h 后,HepG2 细胞未出现明显的抑制作用,组间差异无统计学意义($P>0.05$);当浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,相较于其他组有统计学意义($P<0.001$)。综上所述,空白阳离子脂质体在浓度为 0~20 $\mu\text{mol/L}$ 范围内对 L-02 及 HepG2 细胞无明显的毒性作用。

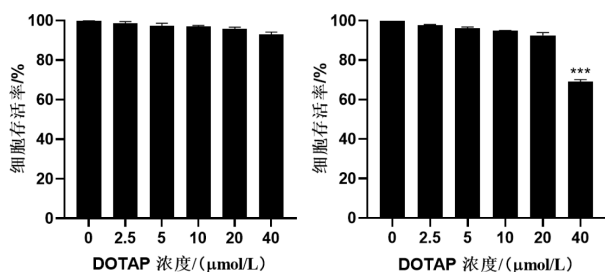


图 4 空白阳离子脂质体对细胞活性的影响

注:A. L-02 细胞;B. HepG2 细胞。与浓度 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,*** $P<0.001$ 。

2.7 体外细胞毒性试验

采用 CCK-8 法考察 FA-BF-CLs、BF-CLs、BF-solution(蟾毒灵药液组,用 0.1%二甲基亚砷溶解)对肝癌细胞的毒性。取对数生长期的 HepG2 细胞以 5000 个/孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,加入不同培养基稀释的 FA-BF-CLs、BF-CLs、BF-solution(蟾毒灵浓度为 0.2、0.5、1.0、10、20 $\mu\text{mol/L}$),每个浓度 6 个复孔,放入培养箱中培养 48 h 后,每孔加 CCK-8 溶液,继续于恒温培养箱中培养。采用酶标仪在 450 nm 下检测各孔的吸光度值(OD),计算细胞存活率及 IC_{50} ,结果见图 5。结果显示,给药 48 h 后,与 BF-solution 相比,FA-BF-CLs、BF-CLs 浓度

为 0.5~20 $\mu\text{mol/L}$ 时 HepG2 细胞的存活率均显著性降低($P<0.05$),表明两种载药阳离子脂质体对细胞生长抑制作用明显优于蟾毒灵药液组,且经过叶酸修饰的载药阳离子脂质体的 HepG2 细胞活性明显低于未修饰的载药阳离子脂质体。

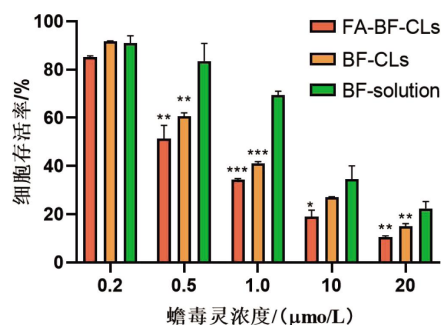


图 5 蟾毒灵不同制剂组对 HepG2 细胞活性的影响

注:与 BF-solution 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

3 讨论

根据文献,蟾毒灵在 pH 5.8 环境中油水分分配系数 $\log P$ 值为 3.36,属于疏水性药物^[15]。薄膜-超声分散法是脂溶性药物制备脂质体的常用方法,结合预实验结果采用此方法制备 FA-BF-CLs。单因素考察结果表明,随着 DOTAP 与大豆卵磷脂质量比增大,电位逐渐升高,参考相关文献^[16],并综合考虑 DOTAP 的价格,采用比例为 1:1 进行制备。当大豆磷脂与药物质量比为 15:1 和 30:1 时,两者的粒径、包封率等结果相差不大,考虑大豆磷脂组成复杂,加入过多可能影响脂质体的稳定性,故而选用大豆磷脂与药物质量比为 15:1。胆固醇可防止磷脂氧化,对提高脂质体稳定性起到重要作用^[17],结合单因素考察的结果选用大豆磷脂与胆固醇质量比为 4:1。薄膜-超声分散法制备得到的阳离子脂质体粒径较大,且分布不均匀^[18],在制备过程中探头超声起着至关重要的作用,其目的是使阳离子脂质体分散均匀,增加其稳定性,但因探头超声过程中会释放一定的能量造成局部产热影响脂质体的形成,故选用超声时间为 15 min。

包封率是脂质体重要的评价指标之一,常用的测定方法有透析法、离心法、葡聚糖凝胶柱层析法、超滤离心法等。预试验中比较了透析法、离心法以及葡聚糖凝胶柱层析法,但离心法和葡聚糖凝胶柱法均不能使包载药物的脂质体与游离药物分离,故对透析法进行方法学考察,结果显示透析法的加样回收率均在 95%~105%范围内,且 RSD 值小于 3%,故

选用此法测定阳离子脂质体的包封率。体外释放实验中,两种阳离子脂质体均体现了药物在模拟人体液中缓慢释放的性能,达到药物缓释的效果。溶血试验显示空白阳离子脂质体、BF-CLs、FA-BF-CLs均没有出现棕红色或红棕色絮状沉淀,无溶血现象,为后续动物体内注射给药提供了实验依据。

研究显示^[9]阳离子脂质体与细胞膜静电作用可能会显示出细胞毒性,因此对其进行体外细胞安全性考察,结果显示空白阳离子脂质体浓度为0~20 μmol/L范围内,L-02、HepG2细胞均未出现明显毒性作用,该载体安全无毒,为后续与基因结合时提供实验依据。体外细胞毒性结果显示两种载药阳离子脂质体对细胞生长抑制作用明显优于蟾毒灵药液组,表明阳离子脂质体能更精准靶向 HepG2 细胞,从而诱导细胞凋亡;经过叶酸修饰的载药阳离子脂质体的 HepG2 细胞活性明显低于未修饰的载药阳离子脂质体,可能是 FA-BF-CLs 携带的叶酸与 HepG2 细胞膜上的叶酸受体结合,通过受体介导的内吞作用介导该载体细胞内转运,从而将药物释放。

综上所述,本实验结果为后续制备叶酸修饰共递送蟾毒灵和基因阳离子脂质体奠定了良好的实验基础。

参考文献

- [1] 陈成,刘毅,许汉林. 土田七醇提取物抑制肝癌细胞增殖活性部位筛选及其对肝癌细胞侵袭迁移的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(6): 930-933.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 401-402.
- [3] WANG H Y, ZHANG C Y, XU L T, et al. Bufalin suppresses hepatocellular carcinoma invasion and metastasis by targeting HIF-1α via the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20193-20208.
- [4] YANG Z G, TAO Y Q, XU X, et al. Bufalin inhibits cell proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells via APOBEC3F induced intestinal immune network for IgA production signaling pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 503(3): 2124-2131.
- [5] SHENG X, ZHU P F, QIN J M, et al. The biological role of autophagy in regulating and controlling the proliferation of liver cancer cells induced by bufalin[J]. *Oncology Reports*, 2018, 39(6): 2931-2941.
- [6] 华雪莲, 张树彪, 肖义, 等. 新型阳离子脂质体制备及应用研究[J]. 化学研究与应用, 2019, 31(2): 177-183.
- [7] 李双双, 吕佳琦, 李媛, 等. 帕布昔利布和氟维司群共载药阳离子脂质体的制备和性质评价[J]. 天津科技大学学报, 2021, 36(4): 8-13, 31.
- [8] 余汪洋, 李长军, 李勇刚. 叶酸修饰的纳米结构脂质载体用于基因靶向癌症治疗的研究[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(6): 692-697.
- [9] LI W J, YAN R C, LIU Y, et al. Co-delivery of Bmi1 small interfering RNA with ursolic acid by folate receptor-targeted cationic liposomes enhances anti-tumor activity of ursolic acid in vitro and in vivo[J]. *Drug Delivery*, 2019, 26(1): 794-802.
- [10] HATTORI Y, SHIMIZU S, OZAKI K I, et al. Effect of cationic lipid type in folate-PEG-modified cationic liposomes on folate receptor-mediated siRNA transfection in tumor cells[J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(4): 181.
- [11] 蔡晓瑶, 张莉, 任翔, 等. 离心法和透析法测定蟾皮提取物固体脂质纳米粒包封率的比较[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(4): 744-747.
- [12] 张艺, 杭太俊, 宋敏. 载药脂质体包封率测定方法的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(2): 245-252.
- [13] 高司琪, 骆慧婷, 彭志荣, 等. 肝主动靶向给药系统研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(2): 312-317.
- [14] ZHAO Y C, ZHENG H L, WANG X R, et al. Preparation and biological property evaluation of novel cationic lipid-based liposomes for efficient gene delivery[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 22: 1-10.
- [15] 刘丹, 奉建芳. 蟾酥中3种蟾毒配基组合物的表观溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1256-1258.
- [16] SUN M, DANG U J, YUAN Y, et al. Optimization of DOTAP/chol cationic lipid nanoparticles for mRNA, pDNA, and oligonucleotide delivery[J]. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 2022, 23(5): 135.
- [17] 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.
- [18] 侯丽芬, 谷克仁, 吴永辉. 不同制剂脂质体制备方法的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37(5): 118-124.
- [19] KOLAŠINAC R, BIER D, SCHMITT L, et al. Delivery of the radionuclide ¹³¹I using cationic fusogenic liposomes as nanocarriers[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(1): 457.

(本文编辑 苏维)