三分枝天麻素修饰的脂质递药系统构建及其抗脑胶质瘤初步研究

吴均彤, 罗宗源, 吴世琼, 刘理涵*, 李 翀*

(南方医科大学药学院, 广东 广州 510515)

摘要: 本文初步探究了将天麻素 (gastrodin, GAS) 作为脑靶向配体, 构建一种经葡萄糖转运体 1 (glucose transporter type 1, GLUT1) 介导的新型脑靶向脂质递药系统, 实现跨屏障–靶肿瘤级联增效。采用薄膜水化法成功制备了天麻素修饰的脂质体, 并对其理化性质、药物释放特性及体内外靶向性进行了初步评价。特别探讨了采用三分枝偶联方式后的天麻素修饰脂质体 (GAS_3-Lip) 体内外性能。天麻素修饰脂质体针对 bEnd.3 脑血管内皮细胞和 GL261 脑胶质瘤细胞显示出良好靶向性, 体内亦呈现明显的病灶蓄积。在体内外药效评价中, 相比经典的谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 修饰脑靶向脂质体, 三分枝天麻素载药脂质体 (GAS_3-Lip/DOX) 对脑胶质瘤表现出更强的抑制效果, 相关动物实验均获得了南方医科大学动物实验伦理委员会批准 (伦理号: SMUL202412013)。综上所述, 该策略有望为靶向治疗脑胶质瘤的药物递送研究提供有益思路。

关键词: 天麻素; 葡萄糖转运体; 脑靶向; 脑胶质瘤; 脂质体

中图分类号: R943 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)06-2275-11

Construction of a tri-branched gastrodin-modified lipid drug delivery system and preliminary study on its anti-glioma efficacy

WU Jun-tong, LUO Zong-yuan, WU Shi-qiong, LIU Li-han*, LI Chong*

(*School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China*)

Abstract: This study preliminarily explored the application of gastrodin (GAS) as a brain-targeting ligand for the construction of a novel glucose transporter (glucose transporter type 1, GLUT1) mediated brain-targeted lipid drug delivery system, aiming to achieve cascade-enhanced effects across the blood brain barrier and subsequent tumor targeting. Gastrodin-modified liposomes were successfully prepared using the thin-film hydration method, and their physicochemical properties, drug release characteristics, as well as *in vitro* and *in vivo* targeting abilities were preliminarily evaluated. Particular attention was paid to the *in vitro* and *in vivo* performance of gastrodin-modified liposomes prepared *via* a tri-branched conjugation strategy (GAS_3-Lip). The gastrodin-modified liposomes exhibited favorable targeting to bEnd.3 brain microvascular endothelial cells and GL261 glioma cells, as well as significant accumulation at the lesion site *in vivo*. In both *in vitro* and *in vivo* pharmacodynamic evaluations, the tri-branched gastrodin-modified doxorubicin-loaded liposomes (GAS_3-Lip/DOX) demonstrated stronger inhibitory effects against glioma compared with the classic glutathione (glutathione, GSH) modified brain-targeting liposomes, and the relevant animal experiments were approved by the Animal Experiment Ethics Committee of Southern Medical University (No: SMUL202412013). In conclusion, this strategy may provide a valuable approach for drug delivery research targeting glioma therapy.

Key words: gastrodin; glucose transporter; brain targeting; glioma; liposome

收稿日期: 2026-04-10; 修回日期: 2026-04-17.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82373808).

*通讯作者 E-mail: liulihan@smu.edu.cn; chongli2009@gmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2026-0405

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤, 占颅内原发性肿瘤的40%～60%[1]。现阶段临床治疗主要以手术切除为主, 并联合替莫唑胺等药物进行放化疗[2-4]。然而, 胶质母细胞瘤具有较强的侵袭特性与遗传异质性, 致使其治疗后复发率高, 患者中位生存期仅为15个月[5,6]。血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 作为大脑的天然屏障, 限制了多数化疗药物进入脑实质; 加之现有疗法因靶向选择性不足而产生的不良反应, 共同构成了脑胶质瘤患者预后不良的关键原因[7,8]。因此, 开发新型药物递送策略, 在提升化疗药物BBB穿透能力的同时, 实现其在胶质瘤病灶区域的有效蓄积, 对于改善脑胶质瘤的治疗效果具有重要意义[9]。

葡萄糖转运蛋白1 (glucose transporter type 1, GLUT1) 是血脑屏障内皮细胞上高表达的特异性转运蛋白[10], 主要负责葡萄糖跨血脑屏障转运供能, 其具有底物特异性强、转运效率高、表达稳定等特点, 是目前脑靶向递药系统研究的靶点之一[11-13]。同时, 脑胶质瘤细胞往往过表达GLUT1, 这是由于Warburg效应上调GLUT1来维持自身的能量代谢和快速增殖[7,14]。因此, 可借助GLUT1介导的跨膜转运机制构建主动靶向递药系统, 突破血脑屏障限制, 实现药物在脑肿瘤内高效富集[15,16]。

天麻素 (gastrodin, GAS) 是从传统中药天麻中提取的有效成分, 具有镇静催眠、神经保护、抗肿瘤等作用, 临床常用于脑部相关疾病治疗[17-19]。天麻素分子结构中含有葡萄糖基单元[20], 具有GLUT1底物特异性, 有望通过GLUT1介导跨血脑屏障转运。因此, 本文探讨以GAS作为脑靶向配体修饰在脂质体表面, 构建一种新型脑靶向脂质递药系统, 并将其与被广泛报道的谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 脑靶向配体[21]进行体内外比较研究。

材料与方法

材料与试剂 对羟基苯甲醇、2,3,4,6-四乙酰氧基-*α*-*D*-吡喃葡萄糖溴化物、三(羟甲基)氨基甲烷、4-丁酸马来酰亚胺、四丁基溴化铵 (TBAB)、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基脲六氟磷酸酯 (HATU)、无水碳酸钾、四甲基氯代脲六氟磷酸酯 (TCFH) (ELAXB、EGL110、EGA836、GLU035、GK2516、FGL559、A2224343、GPW438, 上海毕得医药科技股份有限公司); 盐酸阿霉素 (doxorubicin hydrochloride, DOX)、1-甲基咪唑 (NMI)、二异丙基乙胺 (DIPEA)、三乙胺 (TEA)、香豆素6 (coumarin 6, C6) (C18040321、C18031158、C18054266、C16649572, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 氘代二甲基亚砜 (L1016593, 上海皓鸿生物医药科技有限公司); *N*,*N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、二氯甲烷、甲醇 (20250731、EODHREEC、20250820, 安耐吉化学); 三氯甲烷 (20240302, 上海穗试化工科技有限公司); 蛋黄卵磷脂 (egg phosphatidylcholine, EPC)、DSPE-mPEG$_{2000}$ (C30128、A19506, 艾伟拓上海医药科技有限公司); 胆固醇 (cholesterol, Chol, S181S226039, 上海源叶生物科技有限公司); DSPE-PEG$_{2000}$-NH$_2$、DSPE-PEG$_{2000}$-SH (由渝锶医药有限公司赠送); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA溶液 (012E-0508A、20250313, 苏州依科赛生物科技股份有限公司); DiR、DiD、DMEM培养基 (20250216、20250124、20250418, 江苏凯基生物技术股份有限公司); BAY-876 [814507, MedChemExpress(MCE中国)]。

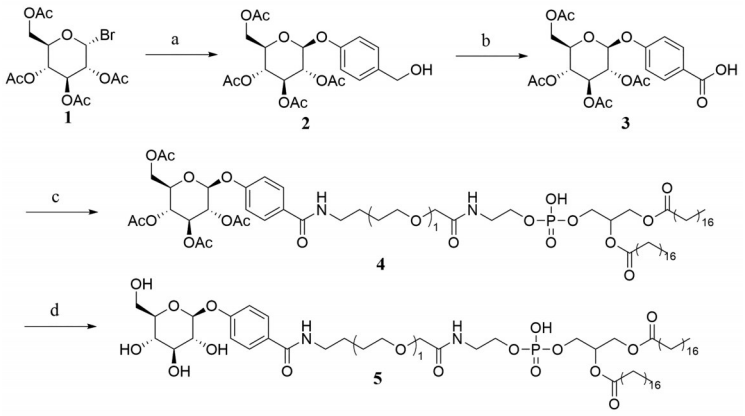
实验仪器 激光粒度仪 (Zetasizer Nano ZS, 英国, UK); 荧光分光光度计 (RF-6000, 日本, Shimadzu); 倒置荧光显微镜 (MF53-N, 广州市明美光电技术有限公司); 流式细胞仪 (FACSCantoII, BD, USA); 激光共聚焦显微镜 (LSM 880 with Airyscan, 德国, Zessi); 小动物活体成像仪 (IVIS Luminall, 美国, Caliper)。

细胞培养 bEnd.3脑微血管内皮细胞、GL261及GL261-Luc脑胶质瘤细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中, 置于饱和湿度的细胞培养箱中培养 (37 ℃、5% CO_2), 汇合度达到约60%～80%时, 使用含EDTA的0.25% (*w*/*v*) 胰蛋白酶消化传代。

实验动物 BALB/C小鼠 (雌性, 6～8周龄) 购自南方医科大学实验动物中心。实验按照南方医科大学实验动物伦理委员会及国际动物实验的指导原则进行, 所有动物实验均获得了南方医科大学动物实验伦理委员会批准 (伦理号: SMUL202412013)。

天麻素脑靶向配体的合成及表征 单链脑靶向配体DSPE-PEG$_{2000}$-GAS的合成如路线1所示, 以化合物**1**和对羟基苯甲醇为原料, 通过相转移催化法[22]合成中间体**2**, 即乙酰天麻素 (aGAS)。随后将中间体**2**羧基化得到中间体**3**, 再与DSPE-PEG$_{2000}$-NH$_2$以酰胺键连接, 得到中间体**4**。最后用K_2CO_3/MeOH体系脱乙酰基得到目标产物**5**。

三分枝脑靶向配体DSPE-PEG$_{2000}$-GAS$_3$的合成如合成路线2所示, 将4-丁酸马来酰亚胺作为主链氨基上的碳链延长保护基, 与化合物**7**进行缩合反应生成化合物**8**, 在三氟乙酸作用下脱去叔丁基, 得到化合物**9**, 将化合物**9**与化合物**10-2**在TCFH、NMI催化下缩合得到化合物**11**。在TEA条件下, 化合物**11**与DSPE-PEG$_{2000}$-SH反应得到化合物**12**, 将化合物**12**在K_2CO_3/



Scheme 1 Synthesis of compound **5**. Reagents and conditions: (a) 4-Hydroxybenzyl alcohol, TBAB, K_2CO_3, $CHCl_3$, 45 ℃, 5 h; (b) Jones reagent, acetone, 0 ℃−rt, 4 h; (c) DSPE-PEG_{2000}-NH_2, HATU, DIPEA, DMF, rt, 24 h; (d) K_2CO_3, MeOH, rt, 12 h

MeOH体系下脱乙酰基时得到目标产物**13** (DSPE-PEG_{2000}-GAS_3)。

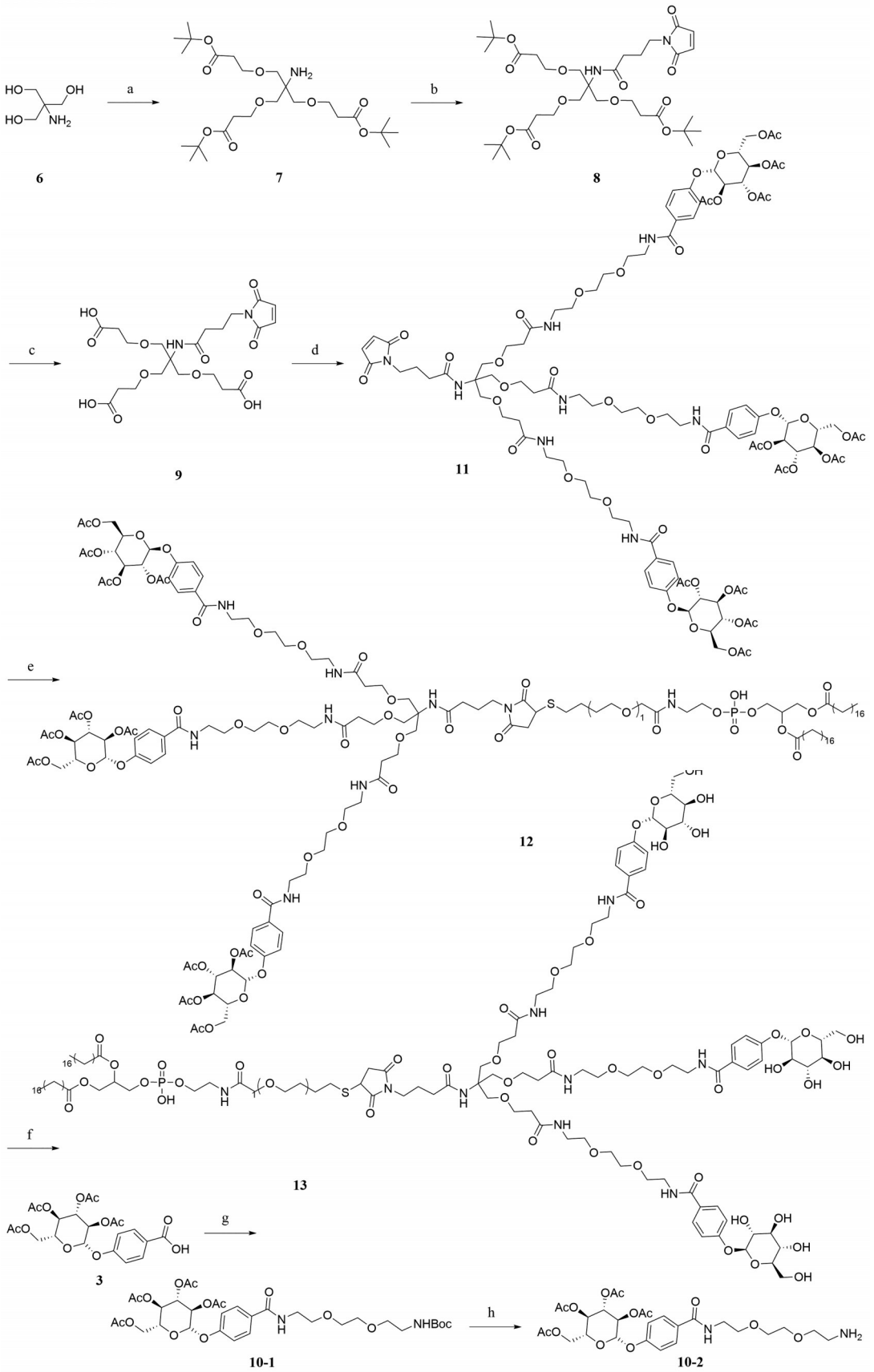
配体修饰的脂质体制备及表征 使用薄膜水化法制备各配体修饰的脂质体, 按66∶26∶8摩尔比精密称取EPC、Chol、DSPE-mPEG2000, 用氯仿和甲醇的等比混合溶剂溶解后, 置于圆底烧瓶中, 使用旋转蒸发仪在37 ℃、80 r·min^{-1}条件下减压蒸发除去有机溶剂, 接着往烧瓶中加入PBS溶液并在37 ℃水浴条件下轻微摇晃进行水化, 将水化好的乳白色脂质体溶液转移至离心管中, 然后使用超声破碎仪在功率为405 W的条件下超声2 min。采用相同的方法, 将部分DSPE-$mPEG_{2000}$替换成DSPE-PEG_{2000}-GAS、DSPE-PEG_{2000}-GAS_3、DSPE-PEG_{2000}-GSH。为保持表面修饰的配体密度一致, 按66∶26∶6.4∶1.6摩尔比精密称取EPC、Chol、DSPE-$mPEG_{2000}$、DSPE-PEG_{2000}-GAS_3制备三分枝GAS_3修饰的脂质体 [GAS_3-Lip (1)]。随后按66∶26∶3∶5摩尔比精密称取EPC、Chol、DSPE-$mPEG_{2000}$、DSPE-PEG_{2000}-GAS/GAS_3/GSH制备各配体修饰的脂质体 [GAS-Lip、GAS_3-Lip (2) 和GSH-Lip]。上述材料成膜后用50 mg·mL^{-1}的硫酸铵溶液进行水化, 使用超声波细胞粉碎仪超声 (405 W, 2 min) 至溶液澄清透亮。接着用超纯水透析4 h, 除去外水相的硫酸铵, 按药脂比1∶5 (*w*/*w*) 在60 ℃下搅拌滴加DOX水溶液 (10 mg·mL^{-1}), 孵育30 min, 降至室温, 过葡聚糖凝胶柱除去游离DOX, 即得载DOX脂质体Lip/DOX、GAS-Lip/DOX、GAS_3-Lip/DOX (1)、GAS_3-Lip/DOX (2)、GSH-Lip/DOX。用马尔文激光粒度仪对脂质体的粒径大小、zeta电位进行测定。

按上述方法制备包载C6脂质体 (Lip/C6、GAS-Lip/C6、GAS_3-Lip/C6、GSH-Lip/C6)、DiD的脂质体 (Lip/DiD、GAS-Lip/DiD、GAS_3-Lip/DiD、GSH-Lip/DiD) 及DiR的脂质体 [Lip/DiR、GAS-Lip/DiR、GAS_3-Lip/DiR (1)、GAS_3-Lip/DiR (2)、GSH-Lip/DiR], 其药脂比均为1∶200 (*w*/*w*)。

稳定性考察 将各配体修饰的脂质体分别置于PBS (pH7.4) 溶液和含10% FBS的DMEM培养基中, 在37 ℃、100 r·min^{-1}条件下共孵育72 h, 并于0、12、24、48、72 h使用马尔文激光粒度仪监测并记录各脂质体的粒径变化, 以评估其体外稳定性。

体外释放 采用透析法对各载药脂质体的体外释放特性进行评估。首先将截留分子质量为3 500 Da的透析袋于超纯水中进行活化, 精密量取500 μL载药脂质体样品注入透析袋内。将含载药脂质体的透析袋浸入pH7.4的磷酸盐缓冲液中, 在37 ℃恒温条件下以100 r·min^{-1}转速在空气浴振荡器中振荡孵育, 以模拟人体内部液体环境。随后分别在不同时间点 (0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48 h) 取样1 mL液体, 再补加等量的PBS。将各时间点取的液体采用多功能酶标仪测定荧光值, 计算DOX的含量。

各配体修饰脂质体的体内外靶向性评价 分别将处于对数生长期的bEnd.3细胞和GL261细胞用胰蛋白酶-EDTA溶液消化后, 离心弃上清, 用含10% FBS的DMEM培养基重悬后, 接种至含爬片的24孔细胞培养板中, 使细胞接种数为每孔1×10^5个细胞, 然后将孔板置于37 ℃、5% CO_2的细胞培养箱培养24 h。吸出旧培养基, 加入C6标记的各配体修饰的脂质体Lip/C6、GSH-Lip/C6、GAS-Lip/C6、GAS_3-Lip/C6, 用完全培养基稀释至C6终质量浓度为2 μg·mL^{-1}。随后放置于细胞培养箱里避光孵育2 h。随后用PBS浸洗3次, 除去未结合的脂质体。加入4%多聚甲醛溶液固定30 min, PBS浸洗3次。最后加入DAPI溶液进行细胞核染色, 孵育10 min后用PBS浸洗3次, 使用倒置荧光显微镜拍摄荧光摄取结果。或者将细胞接种于6孔板中给药孵育完后, 加入胰酶消化细胞, 离心弃上清后, 再加入PBS清洗, 最后用200 μL的PBS重悬细胞, 然



Scheme 2 Synthesis of compound **13**. Reagents and conditions: (a) *tert*-Butyl acrylate, NaOH, DMSO, 0 ℃−rt, 12 h; (b) 4-Maleimidobutyric acid, HATU, DIPEA, DMF, rt; (c) TFA, DCM, rt; (d) TCFH, NMI, MeCN, rt; (e) DSPE-PEG_{2000}-SH, TEA, DMF, rt; (f) K_2CO_3, MeOH, rt; (g) Boc-1-amino-3,6-dioxa-8-octanediamine, HATU, DIPEA, DMF, rt; (h) TFA, DCM, rt

后使用流式细胞仪测定各孔细胞的荧光强度。

细胞摄取机制考察　将处于对数生长期的bEnd.3和GL261细胞用胰蛋白酶-EDTA溶液消化后, 离心弃上清, 用含10% FBS的DMEM培养基重悬后, 调整细胞密度, 使细胞接种数为每孔3×10^5个细胞, 接种到6孔细胞培养板中, 将孔板置于细胞培养箱 (37 ℃、5% CO_2) 培养过夜后。加入GLUT1抑制剂 (BAY876, 1 nmol·L^{-1}) 继续孵育24 h后, 将C6标记的各配体修饰的脂质体 (Lip/C6、GAS-Lip/C6、GAS_3-Lip/C6) 用培养基稀释至C6终浓度为2 μg·mL^{-1}, 然后加入到孔板中孵育2 h。随后加入胰酶消化细胞, 离心弃上清后, 再加入PBS清洗, 离心弃上清, 用PBS重悬细胞, 接着使用流式细胞仪测定各孔细胞的荧光强度。

体外跨BBB转运实验　将对数生长期的bEnd.3细胞用胰酶消化, 用培养基重悬后按5×10^4个/孔接种于24孔Transwell板上室中 (每孔200 μL), 下室加入800 μL完全培养基。在细胞培养箱 (37 ℃、5% CO_2) 培养7～10天后, 通过渗漏实验及使用细胞电阻仪监测转移上皮电阻 (transendothelial electrical resistance, TEER) 来评价BBB模型是否建立成功。在培养一定时间后, 通过调整下室与上室的液体高度, 使上下室形成0.5 cm的液面高度差, 在孵育一定时间观察液面差的变化。当液面差无明显变化及TEER值高于150 Ω·cm^2时, 表明体外BBB模型建立成功, 可用于后续实验。

将DiD标记各配体修饰的脂质体 (Lip/DiD、GSH-Lip/DiD、GAS-Lip/DiD、GAS_3-Lip/DiD) 用培养基稀释至DiD终浓度为4 μg·mL^{-1}。然后往构建成功的体外BBB模型Transwell孔板的上室中加入DiD标记各配体修饰的脂质体, 放入培养箱避光孵育。对于定量实验, 使用多功能酶标仪建立DiD含量标准曲线, 然后分别于0.5、1、2、4、8 h取出100 μL下室培养基, 并补足体积, 所取100 μL培养基样品中加入300 μL甲醇, 涡旋混匀, 超声10 min, 使用多功能酶标仪测定DiD荧光强度, 根据标准曲线计算样品中DiD的含量, 分析各制剂穿透体外BBB模型情况。对于定性实验, 在与各DiD标记脂质体孵育2 h后弃去培养基, PBS浸洗3次, 加入4%多聚甲醛室温固定30 min, PBS浸洗3次, 加入DAPI溶液进行细胞核染色, 孵育10 min后用PBS浸洗3次, 取下Transwell小室的聚碳酸酯膜于载玻片上, 封片, 采用共聚焦显微镜下进行z轴扫描进行荧光成像。

体内脑靶向性评价　将小鼠随机分为5组, 尾静脉给予DiR剂量为0.5 mg·kg^{-1}的各配体修饰的脂质体[Lip/DiR、GSH-Lip/DiR、GAS-Lip/DiR、GAS_3-Lip/DiR (1)、GAS_3-Lip/DiR (2)], 在给药后1、2、4、6 h时间点采用小动物活体成像系统采集小鼠脑部荧光信号并记录, 观察各载DiR脂质体在小鼠体内的分布情况。在给药后2 h和6 h进行处死, 解剖分离主要脏器和脑组织, 通过离体荧光成像分析DiR标记的各组脂质体在小鼠脑部及其他脏器中的分布情况。

GAS_3-Lip/DOX抗脑胶质瘤体内外药效评价及安全性考察

细胞药效评价　采用MTT比色法评估各载药制剂的体外抗肿瘤活性。将GL261细胞以3×10^3个/孔的密度接种于96孔板, 放置37 ℃培养箱培养过夜。将载药脂质体Lip/DOX、GAS_3-Lip/DOX、GSH-Lip/DOX及游离DOX用细胞培养基梯度稀释。每孔加入100 μL稀释后的制剂溶液, 对照组则添加100 μL无药培养基, 孵育48 h后, 用MTT法进行测定。结果用GraphPad Prism 9软件拟合计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

GAS_3-Lip/DOX抗脑胶质瘤体内药效及安全性评价造模第7日, 将原位脑胶质瘤荷瘤小鼠随机分为5组 (saline、DOX、Lip/DOX、GAS_3-Lip/DOX、GSH-Lip/DOX), 每组按照5 mg·kg^{-1} DOX的剂量经尾静脉注射给药, 每3天给药1次, 累计给药4次。治疗期间, 每天监测荷瘤小鼠的生存状态和体重变化并使用小动物活体成像仪在治疗后0、3、5、9、13、15天监测荷瘤小鼠脑部肿瘤生长情况。在第23天, 解剖收集部分荷瘤小鼠脑组织和主要器官, 分别进行Ki67免疫组化染色和苏木精–伊红 (hematoxylin and eosin, H&E) 染色, 评估各治疗组抗脑胶质瘤活性。此外, 通过体外溶血实验、各组主要器官组织切片病理学考察及血生化指标考察评价各组给药制剂的安全性。

统计学分析　使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析。通过方差分析 (one-way ANOVA) 进行多组之间比较, 定量数据均以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。$P < 0.05$被认为具有统计学意义。

结果与讨论

1　天麻素脑靶向配体的表征

1.1　DSPE-PEG_{2000}-GAS的结构表征　DSPE-PEG_{2000}-GAS的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight, MALDI-TOF) 表征结果如图1A、B所示, 合成的产物DSPE-PEG_{2000}-GAS相较于DSPE-PEG_{2000}-NH_2的分子质量分别大约多300 Da, 表明DSPE-PEG_{2000}-GAS合成成功。

1.2　DSPE-PEG_{2000}-GAS_3的结构表征　如图2A～C所示, ^{1}H NMR δ_H: 8.44～7.88 (6H, NH), 7.84～7.10 (7H, Ar-H), 6.98 (2H, =CH), 5.66～5.06 (12H, CH), 4.28～4.08 (12H, CH_2), 3.50 (33H, OCH_2CH_2O), 3.18～2.30 (14H, CH_2), 2.00 (27H), 1.97 (s, 9H)。结果表明带

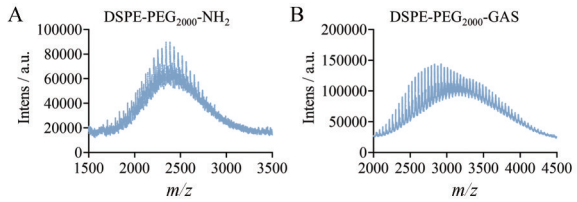


Figure 1 Synthesis of DSPE-PEG_{2000}-GAS. A: Matrix assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry of DSPE-PEG_{2000}-NH_2; B: MALDI-TOF of DSPE-PEG_{2000}-GAS

马来酰亚胺的三分枝 $aGAS_3$ 合成成功。在 DSPE-PEG_{2000}-$aGAS_3$ 的 ^{1}H NMR 结果中可以找到三分枝 $aGAS_3$ 特征氢，化学位移 δ 为 3.50 是 PEG_{2000} 的特征氢，化学位移 δ 为 1.25 的氢是 DSPE 的特征氢，结果表明 DSPE-PEG_{2000}-$aGAS_3$ 合成成功。DSPE-PEG_{2000}-GAS_3 与 DSPE-PEG_{2000}-$aGAS_3$ 的 ^{1}H NMR 结果对比显示，只在化学位移 δ_H: 2.00 处不同，说明乙酰基被脱除，表明 DSPE-PEG_{2000}-GAS_3 合成成功。MALDI-TOF 表征结果如图 2D～F 所示，合成的产物 DSPE-PEG_{2000}-GAS_3 相较于 DSPE-PEG_{2000}-SH 的分子质量大约多 1 740 Da，相较于 DSPE-PEG_{2000}-$aGAS_3$ 的分子质量大约少 505 Da，表明 DSPE-PEG_{2000}-GAS 合成成功。

2 各配体修饰脂质体的表征

2.1 各配体修饰脂质体的粒径及电位 结果如表 1 所示。所制得的各配体修饰脂质体粒径均控制在 110 nm 左右，粒径分布呈现出良好的均一性，PDI 数值小于 0.3。所有脂质体的 zeta 电位值均为负值，且绝对值超过 10 mV。

2.2 各载药脂质体的包封率及载药量 酶标仪结果显示，Lip/DOX 载药量为 (14.97 ± 0.18)%，包封率 (95.83 ± 1.06)%；GAS_3-Lip/DOX (1) 载药量为 (16.08 ± 0.18)%，包封率为 (96.49 ± 1.10)%；GAS_3-Lip/DOX (2) 载药量为 (15.24 ± 0.31)%，包封率为 (97.49 ± 1.10)%；GSH-Lip/DOX 载药量为 (15.28 ± 0.27)%，包封率为 (96.57 ± 1.16)%。表明 GAS_3 和 GSH 的修饰未影响脂质体的载药性能。

2.3 各配体修饰体外释放情况及稳定性考察 通过图 3A 可知，72 h 内各配体修饰的脂质体粒径无明显变化，初步显示稳定性较好。测定不同时间点释放介质内 DOX 的浓度。结果如图 3B 所示，各载药修饰的脂质体表现出持续而缓慢的 DOX 释放，未发生突释现象。

3 各配体修饰脂质体的体内外靶向性评价

3.1 不同细胞体外摄取脂质体的定性评价 将 bEnd.3 细胞和 GL261 细胞分别与 C6 标记的各配体修饰脂质体孵育 2 h 后，观察结果如图 4A、B 所示。在相同时间

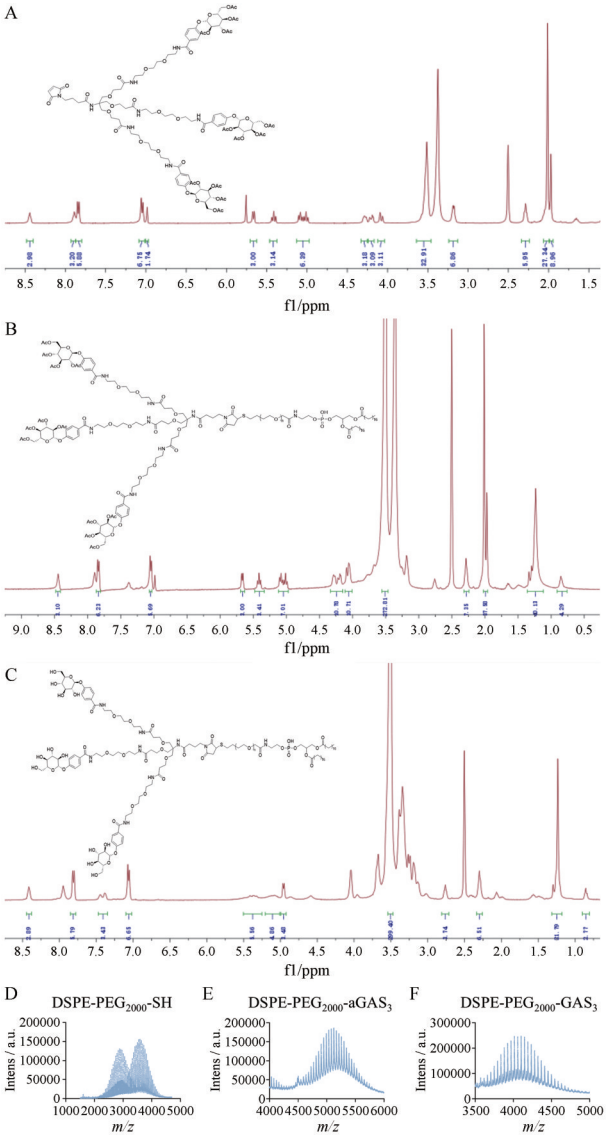


Figure 2 Characterization data of DSPE-PEG_{2000}-GAS_3. A: ^{1}H NMR of compound **11**; B: ^{1}H NMR of compound **12**; C: ^{1}H NMR of DSPE-PEG_{2000}-GAS_3; D: MALDI-TOF of DSPE-PEG_{2000}-SH; E: MALDI-TOF of DSPE-PEG_{2000}-$aGAS_3$; F: MALDI-TOF of DSPE-PEG_{2000}-GAS_3

Table 1 Size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of different liposomes. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Liposome	Size/nm	PDI	Zeta potential /mV
Lip	107.63 ± 1.57	0.20 ± 0.03	−12.92 ± 0.13
GAS-Lip	94.58 ± 1.56	0.23 ± 0.02	−18.17 ± 1.24
GAS_3-Lip (1)	95.53 ± 0.60	0.24 ± 0.02	−17.85 ± 0.17
GAS_3-Lip (2)	95.07 ± 1.07	0.17 ± 0.01	−18.15 ± 0.05
GSH-Lip	106.40 ± 1.06	0.23 ± 0.02	−13.56 ± 0.54
Lip/DOX	105.96 ± 1.24	0.18 ± 0.23	−13.64 ± 0.03
GAS-Lip/DOX	95.24 ± 1.33	0.24 ± 0.02	−18.24 ± 0.13
GAS_3-Lip/DOX (1)	96.39 ± 1.42	0.19 ± 0.01	−18.32 ± 0.29
GAS_3-Lip/DOX (2)	97.35 ± 1.13	0.19 ± 0.04	−18.46 ± 0.15
GSH-Lip/DOX	112.87 ± 1.03	0.25 ± 0.02	−14.28 ± 0.84

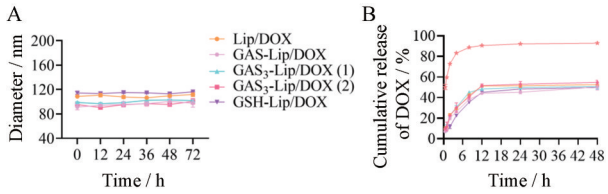


Figure 3 Stability profiles of liposomes. A: Particle size stability of the liposomes; B: *In vitro* DOX cumulative profiles of the liposomes. $n = 3, \bar{x} \pm s$

内，bEnd.3细胞和GL261细胞对各配体修饰脂质体的摄取量明显多于对照组，且相较于GAS-Lip及GSH-Lip，GAS_3-Lip表现出更高效的摄取率。以上实验结果表明各配体修饰均明显增强了bEnd.3细胞和GL261细胞对脂质体的摄取。三分枝GAS_3-Lip比单链GAS-Lip的荧光强度显著增强，表明当表面修饰的配体密度相同时，分枝状配体相较于传统单链配体，其介导载体的主动靶向能力更强。

3.2 不同细胞体外摄取脂质体的定量评价 将bEnd.3细胞和GL261细胞分别与C6标记的各配体修饰脂质体孵育2 h后，用流式细胞仪定量检测荧光信号。结果如图4C、D所示，在bEnd.3细胞中，与Lip组相比，GAS-Lip组的平均荧光强度提升至1.63倍，GAS_3-Lip组提升至2.26倍，GSH-Lip组提升至1.58倍。在GL261细胞中，与Lip组相比，GAS-Lip组的平均荧光强度提升至1.51倍，GAS_3-Lip组提升至1.77倍，GSH-Lip组提升至1.43倍。以上实验结果表明各配体修饰均明显增强了bEnd.3细胞和GL261细胞对脂质体的摄取。其中GAS_3-Lip组的脑靶向效果最佳。

3.3 细胞摄取机制考察 BAY-876是一种对GLUT1高选择性的小分子抑制剂，具有良好的体外代谢稳定性及较高的口服生物利用度，同时具有良好的细胞渗透性，能够有效发挥GLUT1抑制作用。图5A、B流式结果表明，经过BAY-876处理后，GAS和GAS_3修饰的脂质体在两种细胞中的荧光强度均显著下降，说明GAS修饰的脂质体通过GLUT1介导转运进入脑血管内皮细胞及脑胶质瘤细胞。

3.4 体外跨BBB转运实验 如图6A所示，用bEnd.3细胞构建体外单层BBB模型，考察各配体修饰的脂质体在单层BBB模型上的转运效率。通过在不同时间点取下室溶液测其荧光值来定量评价各配体修饰脂质体的跨膜情况，如图6B所示，随着时间的增加，各组脂质体到达下室的量也逐渐增加。尤其是2 h后，各组脂质体转运效率快速上升，其中在8 h时，Lip组的累计透过量为(26.35 ± 1.71)%，GAS-Lip组的累积渗透量为(30.75 ± 1.96)%，GAS_3-Lip组的累计透过量为(45.69 ± 2.41)%，GSH-Lip组的为(29.77 ± 1.66)%。如图6C所示，相较于普通脂质体组，其他配体修饰的脂质体制剂均表现出更强的血脑屏障穿透能力，其中GAS_3-Lip组的荧光强度在各组别中最为显著。结果表明，GAS、GAS_3、GSH均可促进脂质体穿透BBB，特别是改变GAS的修饰方式——由直链变成分枝状，可显著增强脂质体透BBB的能力。这可能是由于三分枝通过将配体

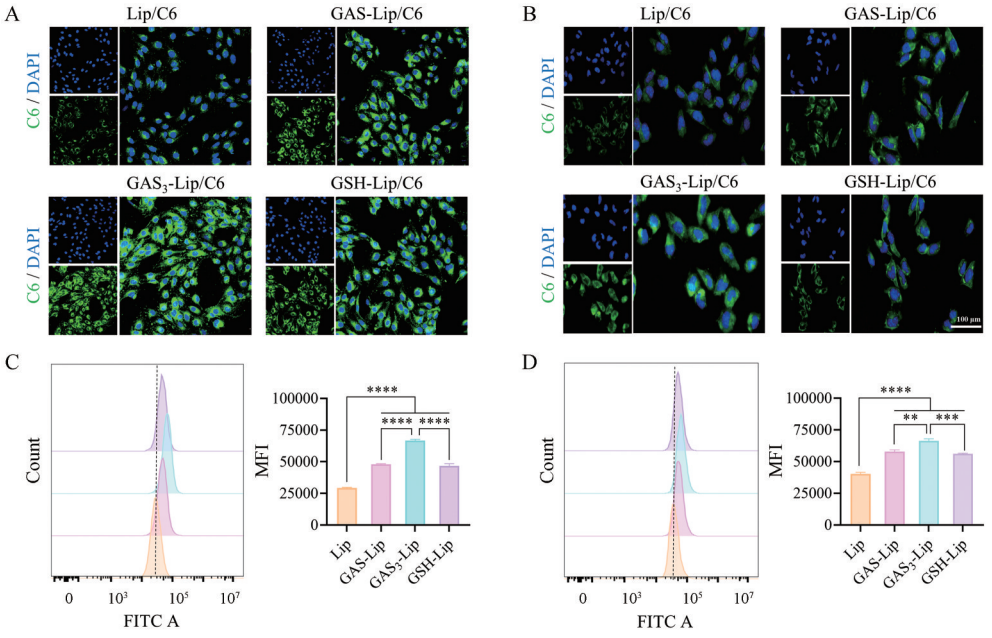


Figure 4 Cellular uptake of different formulations by bEnd.3 cells and GL261 cells. A: Fluorescence microscopy images of bEnd.3 cells uptake (Scale bar: 100 μm); B: Fluorescence microscopy images of GL261 cells uptake (Scale bar: 100 μm); C: Flow cytometric quantification of bEnd.3 cell uptake; D: Flow cytometric quantification of GL261 cell uptake. $n = 3, \bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$

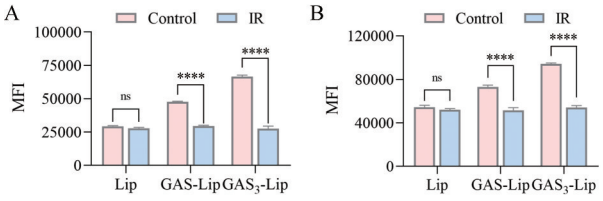


Figure 5 Uptake of various liposomes after treatment with BAY-876. A: bEnd.3 cells; B: GL261 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{****}P < 0.000\ 1$. ns: No significance

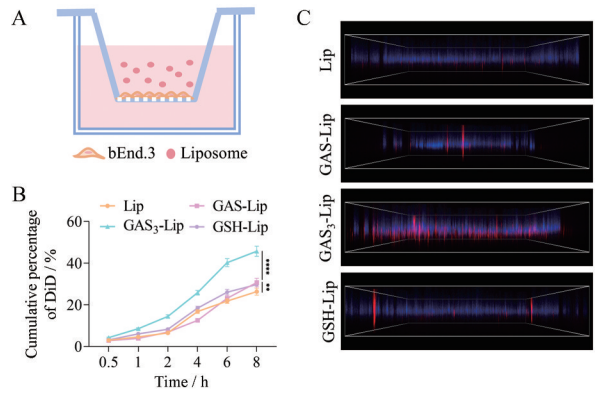


Figure 6 The efficiency of liposomes with different ligand modifications across *in vitro* BBB models. A: Schematic diagram of the *in vitro* BBB model; B: Cumulative percolation of DiD in the lower chamber; C: *Z*-axis scanning fluorescence imaging. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.000\ 1$

“簇集”在同一个分子骨架上, 与GLUT1形成多触点锚定, 触发多价协同效应, 增强脂质体的跨细胞转运[23,24]。

3.5 体内脑靶向性评价 上述体外实验结果表明天麻素修饰的脂质体具有跨血脑屏障能力, 其中GAS_3-Lip的效果最显著。在此基础上采用体内实验方法验证各配体修饰脂质体跨BBB的能力。利用活体成像系统示踪DiR标记脂质体在小鼠脑部的分布情况。如图7所示, 在各时间点, GAS、GAS_3及GSH修饰脂质体的荧光信号均显著高于未修饰脂质体组, 表明GAS、GAS_3及GSH修饰均能促使脂质体有效跨越BBB。其中, GAS_3-Lip (2) 的脑靶向能力最强, 这是由于GAS_3-Lip (2) 的配体修饰密度达到了GAS_3-Lip (1) 的3倍, 从而进一步提高了脂质体的脑靶向能力。

4 GAS_3-Lip/DOX抗脑胶质瘤体内外药效评价及安全性考察

4.1 体外药效评价 以DOX作为对照组, 通过MTT法考察Lip/DOX、GSH-Lip/DOX和GAS_3-Lip/DOX对GL261细胞的增殖抑制效果。结果如图8所示, 各组制剂对GL261细胞的细胞毒性都具有浓度依赖性, 其中游离DOX、Lip/DOX、GSH-Lip/DOX和GAS_3-Lip/DOX的IC_{50}值分别为0.026、0.063、0.048、0.015 μg·mL^{-1}。

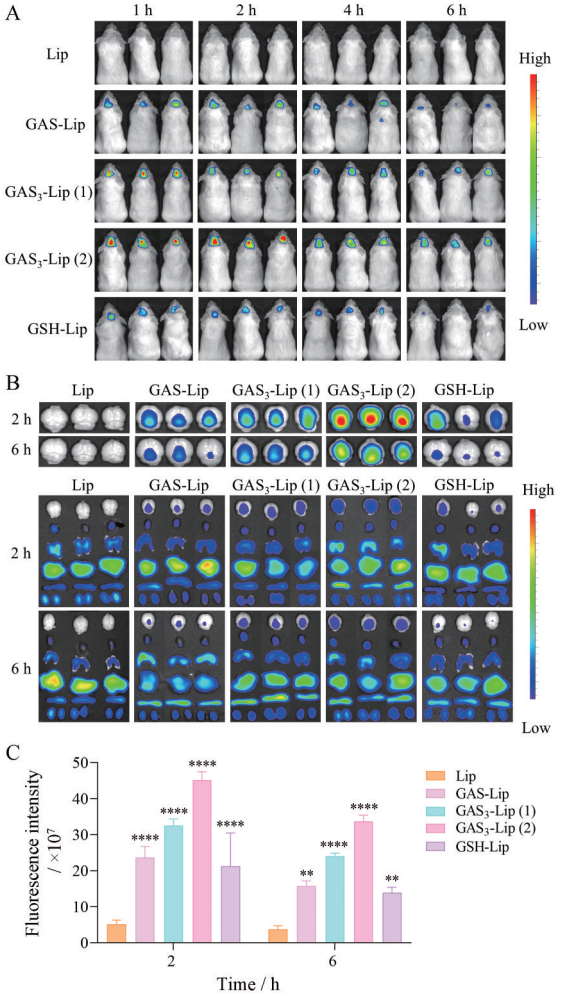


Figure 7 Fluorescence distribution for *in vivo* and *ex vivo* imaging of mice ($n = 3$). A: *In vivo* imaging results of mice; B: *Ex vivo* imaging results of mouse tissues; C: Fluorescence intensity of brain tissue of mice. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* Lip group

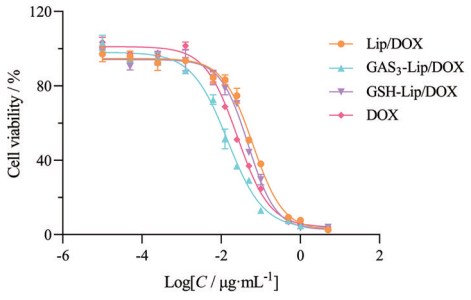


Figure 8 *In vitro* evaluation of the efficacy of different drug-loaded liposomes on GL261 cells. $n = 3$

4.2 体内药效评价 构建的原位GL261-Luc荷瘤小鼠模型对各载药脂质体进行体内药效考察。通过小动物活体成像在不同时间点可视化监测各组小鼠胶质瘤部位的生物发光信号并进行脑部半定量荧光强度分

析, 以评估各组载药脂质体的胶质瘤治疗效果。结果如图9A、B所示, Lip/DOX和生理盐水组小鼠的脑部生物发光信号随时间迅速增强, 表明这两组的脑胶质瘤生长迅速。而GAS_3-Lip/DOX组的脑部生物发光信号增强速度明显缓于其他治疗组, 说明该组的脑胶质瘤生长受到有效抑制。如图9C、D所示, 与生理盐水组相比, 各给药组的中位生存期均延长, 其中GAS_3-Lip/DOX组的中位生存期从24天延长到52天。且GAS_3-Lip/DOX组的荷瘤小鼠在治疗期间的体重下降比其他组下降得更为缓慢, 说明GAS_3修饰脂质体在有效抑制肿瘤生长的同时还降低了药物毒性反应。

4.3 脑胶质瘤切片组织学观察 如图10A所示, GAS_3-Lip/DOX组Ki67免疫组化阳性率低于其他组, 并且发现其大部分的肿瘤细胞核已经出现明显溶解现象, 表明其可以有效抑制胶质瘤的恶性增殖。H&E染色结果如图10B所示, GAS_3-Lip/DOX组的小鼠大脑中肿瘤体积小于GSH-Lip/DOX组, 与生物发光成像结果一致, 表明GAS_3-Lip/DOX有更强的抑制脑胶质瘤增殖作用。

4.4 安全性评价 如图11A所示, 在10～400 μg·mL^{-1}浓度范围内, 各载药脂质体在不同药物浓度下, 均未发生溶血现象, 溶血率低于5.0%。表明各载药制剂组均符合静脉注射制剂溶血率标准, 具有良好的生物相容

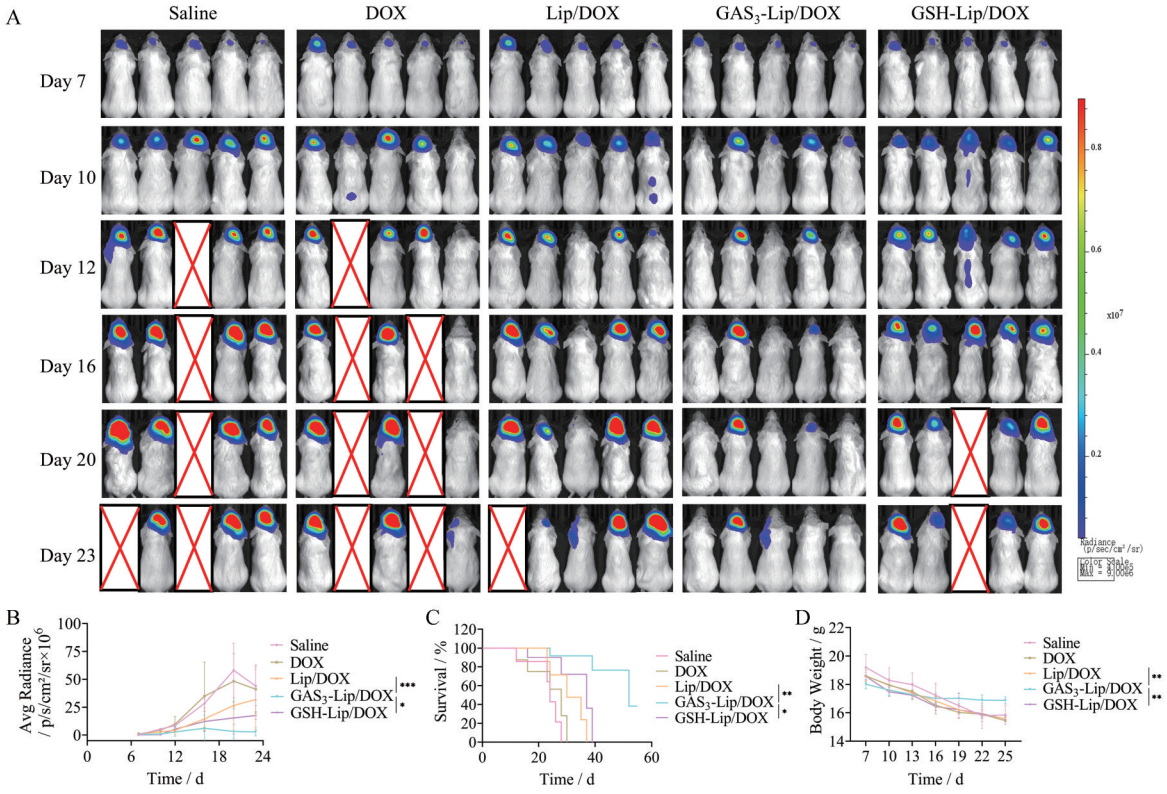


Figure 9 *In vivo* anti-glioma effects of different drug-loaded liposomes. A: Bioluminescent images of GL261-luc glioma-bearing mice in different groups; B: Semiquantitative bioluminescent signal intensity in the brain; C: Survival-time line chart of mice after administration of different formulations; D: Body weight changes of tumor-bearing mice during treatment. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. $^{***}P < 0.001$

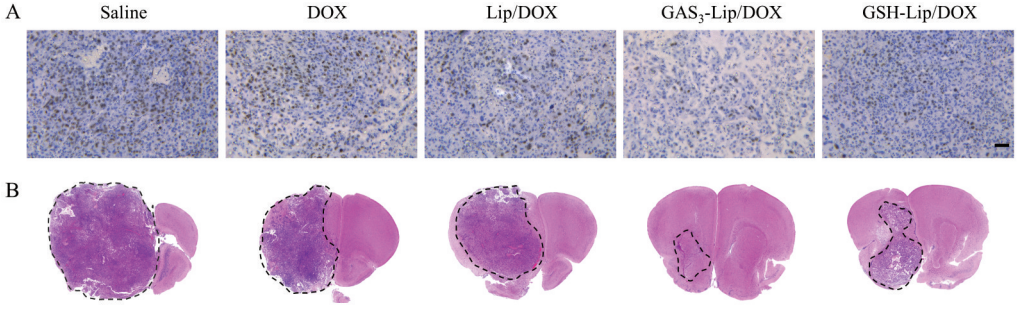


Figure 10 Histological observation of glioma tissue sections. A: Ki67 immunohistochemistry of glioma (Scale bar: 50 μm); B: H&E staining of brain sections

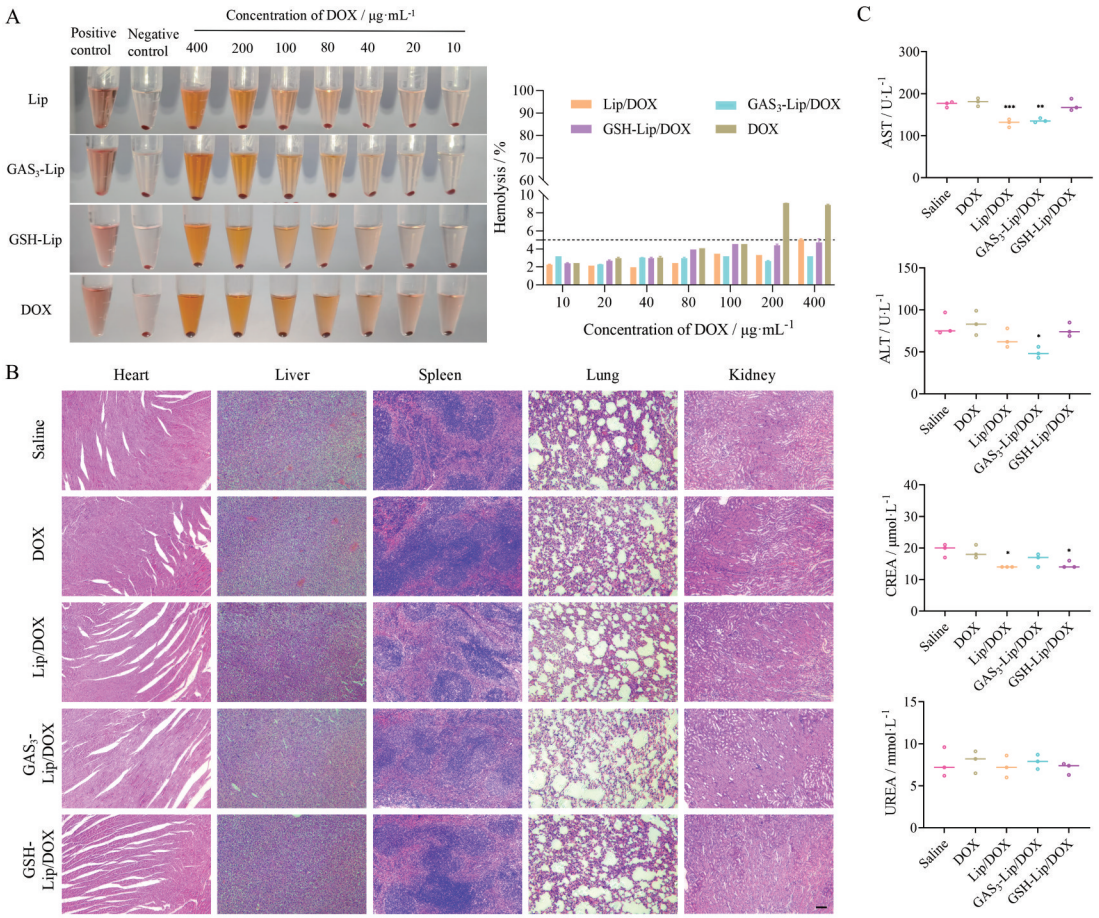


Figure 11 Safety evaluation of various drug-loaded liposomes. A: Hemolysis ratio of different liposomes; B: Histological analysis of the main organs in mice after administration (Scale bar: 100 μm); C: Results of serum biochemical indexes in mice after administration of different formulations. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. $^{***}P < 0.001$ *vs* saline group

性。对治疗后的荷瘤小鼠的主要脏器进行病理学分析和血生化指标考察结果如图11B、C所示，各载药脂质体的各组织并无明显病理变化，天冬氨酸氨基转移酶(AST)和肌酐(CREA)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、尿素(UREA)4项检测指标均在正常范围内波动、表明各给药组具有一定的安全性。

结论

本研究利用GLUT1在血脑屏障及脑胶质瘤细胞表面均高表达的特点，探索将活性天然产物天麻素开发为一种新型GLUT1底物及跨血脑屏障功能配体，并构建了脑靶向脂质体递药系统。通过考察不同偶联方式对脑靶向能力的影响，优选出三分枝天麻素(GAS_3)作为新型配体。进一步以多柔比星为模型药物，制备了GAS_3修饰的载药脂质体(GAS_3-Lip/DOX)，系统评价其体内外抗脑胶质瘤药效。实验结果表明，在相同配体修饰密度下，三分枝GAS_3修饰脂质体的脑靶向效率显著优于直链GAS修饰脂质体。与经典的谷胱甘肽脑靶向配体相比，GAS_3促进脂质体跨血脑屏障的能力更强。本研究将天麻素修饰于脂质体表面以赋予其“葡萄糖类似物”的分子特性，实现入脑效率与抗肿瘤能力双重提升，为脑靶向递药系统提供了新的配体选择，并为各类脑部疾病的治疗提供了有益思路。

作者贡献：吴均彤负责实验研究过程并撰写论文；刘理涵和李翀提出实验思路、设计研究方案并修改论文；罗宗源和吴世琼协助进行实验数据采集与分析；所有作者均阅读并参与修改了本论文。

利益冲突：本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Price M, Ballard CAP, Benedetti JR, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2018-2022 [J]. Neuro Oncol, 2025, 27: iv1-iv66.

[2] Schaff LR, Mellinghoff IK. Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults: A review [J]. JAMA, 2023, 329: 574-587.

[3] van den Bent MJ, Geurts M, French PJ, et al. Primary brain tumours in adults [J]. Lancet, 2023, 402: 1564-1579.

[4] Wen X, Zhao DM, Chen FH. *In vitro* anti-tumor activities and mechanisms of phenothiazines in combined treatment with temozolomide in human glioma cell lines [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 918-929.

[5] Miller KD, Ostrom QT, Kruchko C, et al. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021 [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71: 381-406.

[6] Zhang X, Jiang A, Hu ZR, et al. Brain and central nervous system tumors in the world and China: Epidemic status in 2022 [J]. Acad J Nav Med Univ (海军军医大学学报), 2025, 46: 1035-1041.

[7] Li J, Zheng M, Shimoni O, et al. Development of novel therapeutics targeting the blood-brain barrier: From barrier to carrier [J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8: 2101090.

[8] Liu HJ, Xu P. Strategies to overcome / penetrate the BBB for systemic nanoparticle delivery to the brain / brain tumor [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2022, 191: 24.

[9] Cao WX, Yang YH, Yang H, et al. Research progress in drug carriers across the blood-brain barrier [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 3222-3231.

[10] Jiang XY, Xin HL, Ren QY, et al. Nanoparticles of 2-deoxy-*D*-glucose functionalized poly(ethylene glycol)-*co*-poly(trimethylene carbonate) for dual-targeted drug delivery in glioma treatment [J]. Biomaterials, 2014, 35: 518-529.

[11] Nikan M, Osborn MF, Coles AH, et al. Synthesis and evaluation of parenchymal retention and efficacy of a metabolically stable *O*-phosphocholine-*N*-docosahexaenoyl-*L*-serine siRNA conjugate in mouse brain [J]. Bioconjug Chem, 2017, 28: 1758-1766.

[12] Zhao Y, Zhao Z, Cui YM, et al. Redox-responsive glycosylated combretastatin A-4 derivative as novel tubulin polymerization inhibitor for glioma and drug delivery [J]. Drug Dev Res, 2021, 82: 1063-1072.

[13] Allen DD, Smith QR. Characterization of the blood-brain barrier choline transporter using the *in situ* rat brain perfusion technique [J]. J Neurochem, 2001, 76: 1032-1041.

[14] Wang J, Ye CY, Chen C, et al. Glucose transporter GLUT1 expression and clinical outcome in solid tumors: A systematic review and meta-analysis [J]. Oncotarget, 2017, 8: 16875-16886.

[15] Duan Q, Liu R, Luo JQ, et al. Virus-inspired glucose and polydopamine (GPDA) -coating as an effective strategy for the construction of brain delivery platforms [J]. Nano Lett, 2023, 24: 402-410.

[16] Min HS, Kim HJ, Naito M, et al. Systemic brain delivery of antisense oligonucleotides across the blood-brain barrier with a glucose-coated polymeric nanocarrier [J]. Angew Chem Int Ed, 2020, 59: 8173-8180.

[17] Xiao GR, Tang R, Yang N, et al. Review on pharmacological effects of gastrodin [J]. Arch Pharm Res, 2023, 46: 744-770.

[18] Wang YL, Bai MT, Wang X, et al. Gastrodin: A comprehensive pharmacological review [J]. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2024, 397: 3781-3802.

[19] He XR, Chen XF, Yang Y, et al. The role of gastrodin in the management of CNS-related diseases: Underlying mechanisms to therapeutic perspectives [J]. Phytother Res, 2024, 38: 5107-5133.

[20] Xu CB, Guo QL, Wang YN, et al. Gastrodin derivatives from *Gastrodia elata* [J]. Nat Prod Bioprospect, 2019, 9: 393-404.

[21] Kerklaan BM, Jager A, Aftimos P, et al. Phase 1/2a study of glutathione pegylated liposomal doxorubicin (2b3-101) in breast cancer patients with brain metastases (BCBM) or recurrent high grade gliomas (HGG) [J]. Neuro Oncol, 2014, 16: v163.

[22] Huang ML, Pan ZX, Zhang L, et al. Synthesis of gastrodin by phase transfer catalysis [J]. Shandong Chem Ind (山东化工), 2025, 54: 6-8.

[23] Qu BY, Li XC, Guan M, et al. Design, synthesis and biological evaluation of multivalent glucosides with high affinity as ligands for brain targeting liposomes [J]. Eur J Med Chem, 2014, 72: 110-118.

[24] Liu QJ, Zhou L, Lu RX, et al. Biotin and glucose co-modified multi-targeting liposomes for efficient delivery of chemotherapeutics for the treatment of glioma [J]. Bioorg Med Chem, 2021, 29: 115852.