

# 雷公藤甲素前药脂质体纳米递送系统的构建及抗胰腺癌活性评价

刘梦梦<sup>1</sup>, 陈行<sup>1,2</sup>, 钱洁成<sup>1</sup>, 冯兰妮<sup>1</sup>, 魏如婷<sup>1</sup>, 陈建明<sup>1</sup>, 武鑫<sup>1,2\*</sup> (1. 福建中医药大学, 福州 350122; 2. 上海维洱实验室, 上海 201712)

**摘要:**目的 制备雷公藤甲素木蜡酸酯脂质体(triptolide lignoceric acid ester liposome, TPL-LA-lip), 对其进行表征, 并考察其对胰腺癌的治疗效果。方法 首先采用薄膜水合法制备 TPL-LA-lip, 以单因素试验与 Box-Behnken 响应面法对方工艺进行优化筛选; 其次对脂质体的形态、粒径分布、Zeta 电位及初步稳定性进行表征, 并评价其在体外介质中的释放行为; 最后采用鼠源胰腺癌细胞(Panc 02) 荷瘤小鼠模型, 评价 TPL-LA-lip 的体内抗胰腺癌活性。结果 制备出的 TPL-LA-lip 呈类球形, 粒径分布均一, 初步稳定性良好。平均粒径为(105.60 ± 0.01) nm, Zeta 电位为(-34.54 ± 0.17) mV, 包封率为(98.30 ± 0.32)%, 载药量为(8.33 ± 0.24)%。在含有 30% 乙醇的磷酸盐缓冲液(PBS) 介质中, 24 h 时前药脂质体的体外累积释放度为 40.35%, 显示出明显的缓释作用。第 15 天药效学实验结束时, 阴性对照、空白脂质体、雷公藤甲素(triptolide, TP) 溶液、Minnelide 溶液和 TPL-LA-lip 各组的小鼠肿瘤体积分别为(849.45 ± 53.72) (880.45 ± 121.45) (602.09 ± 56.80) (265.67 ± 23.12) (237.67 ± 38.30) mm<sup>3</sup>, 体质量变化率分别是 18.12%、21.29%、-3.62%、13.06%、和 19.97%。与阴性对照、TP 溶液两组相比, TPL-LA-lip 组肿瘤体积具有显著统计学差异( $P < 0.05$ ); 此外, TPL-LA-lip 组小鼠体质量及器官指数与阴性对照组无明显差异, 而经 TP 溶液治疗后的小鼠体质量及器官指数明显降低, 初步显示出 TPL-LA-lip 良好的生物安全性。结论 高脂溶性的雷公藤甲素木蜡酸酯前药, 改善了 TP 的制剂成药性, 制成的脂质体具有较高的包封率, 且稳定性良好。前药技术结合脂质体载体递送 TP, 可以显著增强药物的抗胰腺癌作用, 降低毒副作用, 为 TP 前药纳米给药系统的开发提供新的思路与实验基础。

**关键词:** 雷公藤甲素; 脂质体; Box-Behnken 响应面法; 胰腺癌

doi:10.11669/cpj.2024.10.008 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)10-0911-10

## Construction of Triptolide Prodrug Liposome Nanosystem and Evaluation of Its Anti-Pancreatic Cancer Activity

LIU Mengmeng<sup>1</sup>, CHEN Hang<sup>1,2</sup>, QIAN Jiecheng<sup>1</sup>, FENG Lanni<sup>1</sup>, WEI Ruting<sup>1</sup>, CHEN Jianming<sup>1</sup>, WU Xin<sup>1,2\*</sup> (1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Shanghai Wei Er Lab, Shanghai 201712, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare triptolide lignoceric acid ester liposome and characterize it, investigate its therapeutic effect on pancreatic cancer. **METHODS** Firstly, triptolide lignoceric acid ester liposome was prepared by thin film dispersion method, the single factor test and Box-Behnken response surface method were used to optimize the formulation process. Secondly, liposome form was observed using transmission electron microscope, the particle size, the polydispersity index and Zeta potential of the liposome was observed using Malvin particle size instrument and the initial stability of the TPL-LA-lip was investigated. Finally, the anti-pancreatic activity of TPL-LA-lip *in vivo* was evaluated by Panc 02 tumor bearing mouse model. **RESULTS** Triptolide lignoceric acid ester liposome was prepared successfully, and the optimal process and prescription were determined. The liposome was prepared by thin film water method, phospholipid was selected PC-98T, the ratio of drug to phospholipid was 1:10, cholesterol to phospholipid ratio was 1:10, DSPE-mPEG2000 was 0.05%, and the preparation temperature was 55 °C. The liposome was spherical in appearance, the encapsulation rate (EE%) was (98.30 ± 0.32)%, the loading efficiency rate (LE%) was (8.33 ± 0.24)%, the particle size was (105.60 ± 0.01) nm, the Zeta potential was (-34.54 ± 0.17) mV, and had good stability. In PBS medium containing 30% ethanol, the cumulative release of prodrug liposome was 40.35% at 24 h, and it showed good sustained-release effect. At the end of the pharmacokinetics experiment on day 15, the tumor bodies of mice in control, blank lip, TP solution, minnelide and TPL-LA-lip were (849.45 ± 53.72) (880.45 ± 121.45) (602.09 ± 56.80) (265.67 ± 23.12) (237.67 ± 38.30) mm<sup>3</sup>, respectively. The change rates of body weight were 18.12%, 21.29%, -3.62%, 13.06% and 19.97%, respectively. Compared with the control and TP groups, the TPL-LA-lip group tumor volume was significantly different ( $P < 0.05$ ). In addition, there was no significant difference in body

**基金项目:** 国家自然科学基金项目资助(81772749); 福建中医药大学高层次人才科研启动资金项目资助(X2019006-人才); 上海青浦区产学研合作发展资金项目资助(青产学研 2021-7)

**作者简介:** 刘梦梦, 女, 硕士研究生 研究方向: 中药制剂与炮制 \* **通讯作者:** 武鑫, 男, 硕士, 高级工程师, 硕士生导师 研究方向: 纳米靶向给药系统及缓控释给药系统研究 Tel: (021)31198947

weight between the TPL-LA lip group and the negative control group, while the body weight and organs indexes of the mice treated with TP solution were significantly reduced, indicating the good biological safety of TPL-LA-lip. **CONCLUSION** The high lipophilic triptolide lignoceric acid ester prodrug greatly improved the formulation druggability of TP, and the liposome produced had high encapsulation rate and good stability. Prodrug technology combined with liposome carrier delivery of TP can significantly enhance the anti-pancreatic cancer effect of the drug, while reducing toxicity, providing a new idea and experimental basis for the development of triptolide prodrug nano drug delivery system.

**KEY WORDS:** triptolide; liposome; Box-Behnken response surface methodology; pancreatic cancer

雷公藤甲素 (triptolide, TP) 是从卫矛科植物雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 的根、叶、花及果实中提取的一种环氧二萜内酯化合物, 具有抗炎、抗类风湿、免疫抑制及抗癌作用<sup>[1-3]</sup>。大量研究证明, TP 对多种癌症如胰腺癌、肺癌以及白血病等有卓越的抗肿瘤活性, 是极具潜力的候选药物<sup>[4-5]</sup>。然而, TP 溶解性与制剂成药性差, 治疗窗窄、毒副作用大, 限制了其在临床上的应用<sup>[6]</sup>。

随着前药工程研究的深入及纳米药物递送技术的发展, 越来越多的难溶性药物纳米给药系统被开发出来应用于抗肿瘤药物递送领域<sup>[7-8]</sup>。前药技术一方面改善药物的制剂成药性, 一方面可延长体内半衰期, 降低毒副作用<sup>[9]</sup>。纳米载体可在体内稳定转运, 改善药物分布, 通过增强渗透滞留 (EPR) 效应靶向至肿瘤组织发挥高效治疗作用, 减少游离药物对健康组织的直接暴露, 提高用药安全性<sup>[10]</sup>。脂质体作为一种传递系统, 早在 1985 年便已进入了临床研究阶段。从 1995 年第一个被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的脂质体制剂 Doxil<sup>[11]</sup> 上市以来, 约有 20 种脂质体制剂相继被批准上市, 其中 Ambisome 和 Doxil 每年有着数亿的销售额, 这些都充分体现了脂质体制剂的应用前景。目前已有不少抗肿瘤药物脂质体相继应用于临床, 如紫杉醇脂质体、伊立替康脂质体<sup>[12]</sup>、阿糖胞苷脂质体<sup>[13]</sup> 等, 这为 TP 脂质体制剂的开发提供了重要的参考。

本研究采用脂质体技术将高度亲脂的雷公藤甲素木蜡酸酯 (TPL-LA) 制备成 TP 前药脂质体纳米递送系统, 在优选的处方工艺基础上, 评价了其其对 Panc 02 胰腺癌小鼠模型的抗肿瘤效果, 为 TP 前药脂质体的开发提供方法参考与实验基础。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

千分之一分析天平 (型号: JA103, 上海海康电子仪器厂); 十万分之一分析天平 (型号: XPR205/AC, Mettler-Toledo); 水浴超声仪 (SK5210HP 型, 上

海 KUDOS 公司); 高效液相色谱系统 (型号: Agilent 1260 II)、色谱柱 (型号: ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>) (美国 Agilent 公司); 涡旋仪 (型号: MX-S, 美国 SCILOGEX 公司); 电热恒温调速振荡器 (型号: SYC-A, 上海 CIMO 公司); 旋转蒸发仪 (型号: ZX 98-1, 上海 LOOYE 公司); 微射流均质机 (型号: Nano DeBEE, 美国 DeBEE 公司); 过滤挤出器 (型号: NanoAble-150, 美国 PhD 公司); Zetasizer 分析仪 (型号: NANO-ZS 90, 英国 Malvern 公司); 透射电子显微镜 (型号: JEM-1400, 日本电子株式会社); 气套式 CO<sub>2</sub> 培养箱 (型号: Forma 311 气套式, Thermo Fisher Scientific 公司); 超净台 (型号: SW-CJ-2D, 苏州净化设备公司)。

### 1.2 药品与试剂

TPL-LA (纯度 ≥ 95%, 自制); TP (纯度 ≥ 98%, Aktin Chemicals); Minnelide (纯度 ≥ 96%, 广州优瓦科技有限公司); 甲醇 (MeOH) 为色谱纯, 正辛醇为分析纯, 葡聚糖凝胶 (Sephadex G-50, Pharmacia); 蛋黄卵磷脂 (注射级, 艾伟拓医药科技有限公司); 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-mPEG2000) (分析纯, 德国 Lipoid 公司); 胆固醇 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 胎牛血清、DMEM 培养基、双抗溶液 (郑州九龙生物制品有限公司); Panc 02 (中国科学院细胞库)

### 1.3 实验动物

实验动物由福建中医药大学动物实验伦理委员会批准, 并严格遵守实验动物在医学研究过程中应该遵守的所有伦理原则, 选取 ICR 小鼠 50 只, ♂, 4 周龄, 体质量 (20 ± 2) g, 由上海雷根生物科技有限公司提供 [许可证号: SCXK (苏) 2018-006], 实验前动物于环境内适应性饲养 2 ~ 3 d, 室温 26 °C, 相对湿度 50% ~ 60%。

## 2 方法与结果

### 2.1 TP 脂质体的制备<sup>[14-15]</sup>

采用薄膜水合法进行脂质体的制备, 称取适

量 TPL-LA、大豆卵磷脂、胆固醇至圆底烧瓶中,加入适量二氯甲烷溶解,旋转蒸发除去有机溶剂,形成均匀的脂质薄膜,再加入 50 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)振荡水化,置于挤出器中挤出 3 次,0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏备用。同法制备空白脂质体。

## 2.2 方法学考察

**2.2.1 色谱条件** 采用色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus  $\text{C}_{18}$  柱(4.6 mm  $\times$  250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),流动相:100% MeOH,柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ,流速:1.0 mL  $\cdot$  min $^{-1}$ ,进样量:20  $\mu\text{L}$ ,检测波长:218 nm 的色谱条件检测样品。

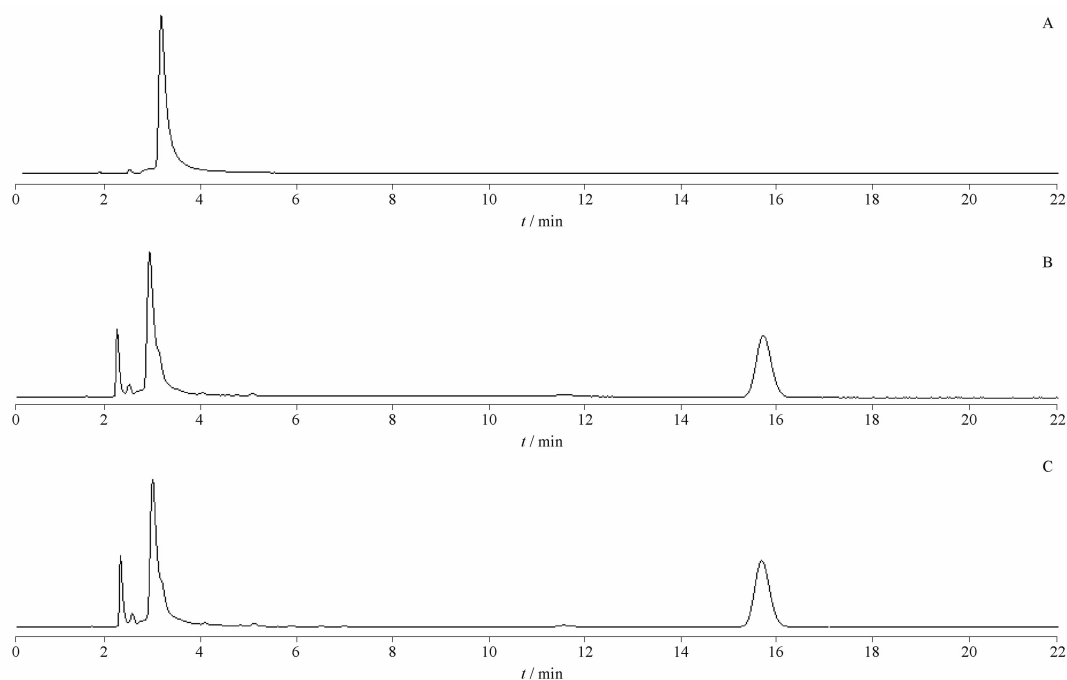
**2.2.2 样品溶液的配制** 对照品储备液:精密称取 10.0 mg TPL-LA 至 10 mL 量瓶中,加入适量

MeOH 超声溶解,并以 MeOH 定容至刻度,涡旋混匀,得 1.0 mg  $\cdot$  mL $^{-1}$  的储备液,于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

供试品溶液:精密吸取 500  $\mu\text{L}$  TPL-LA-lip 至 5 mL 量瓶中,加入适量 MeOH 超声 5 min 至破乳,定容至刻度,涡旋混匀,即得。

空白脂质体溶液:精密吸取空白脂质体至量瓶中,按供试品溶液相同方法进行配制。

**2.2.3 专属性考察** 分别取“2.2.2”项下各溶液 20  $\mu\text{L}$  注入 HPLC,按“2.2.1”项下色谱条件进行分析,结果见图 1。由图 1 可知,在该色谱条件下,TPL-LA 峰形良好,保留时间为 15.720 min,溶剂及脂质成分不会对 TPL-LA 的检测产生干扰,表明该方法专属性良好。



A - 空白脂质体; B - TPL-LA 溶液; C - TPL-LA 脂质体。

A - blank liposome; B - TPL-LA solution; C - TPL-LA liposome.

图 1 雷公藤甲素木蜡酸酯(TPL-LA)的高效液相色谱(HPLC)专属性色谱图

Fig. 1 HPLC specificity spectrum of TPL-LA

**2.2.4 线性关系** 精密吸取不同体积的对照品储备液,分别稀释得质量浓度为 5.0、10.0、25.0、50.0、100.0、250.0 和 500.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列溶液。各吸取 20  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪,按“2.2.1”项下色谱条件进行分析。以质量浓度  $\rho$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标,峰面积  $A$  为纵坐标,进行线性回归,建立 TPL-LA 的标准曲线。

结果可知,TPL-LA 溶液经 HPLC 法测定后,计算 TPL-LA 的线性回归方程分别为: $y = 7.009 2x + 62.039 0$  ( $r^2 = 0.999 9$ )。结果表明,TPL-LA 在

5.0 ~ 500.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内线性关系良好。

**2.2.5 精密度考察** 分别配制质量浓度为 5.0、50.0 和 100.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 TPL-LA 溶液各 5 份,按“2.2.1”项下色谱条件,于 1 d 内连续进样 5 次,记录色谱峰面积,计算日内精密度;连续进样 5 d,计算日间精密度。实验结果见表 1,低、中、高 3 个质量浓度下,日内精密度相对标准偏差(RSD)分别为 0.59%、0.14%、0.79%;日间精密度 RSD 分别为 0.97%、0.32%、1.17%。日内、日间精密度良好,该方法能满足测定需求。

表1 TPL-LA 日内精密度和日间精密度结果.  $n=5, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Intra-day precision and inter-day precision results of TPL-LA.  $n=5, \bar{x} \pm s$

Theoretical concentration / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Intra-day precision		Inter-day precision	
	Actual concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	Actual concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%
5.0	5.05 $\pm$ 0.03	0.59	5.16 $\pm$ 0.05	0.97
50.0	50.11 $\pm$ 0.07	0.14	50.25 $\pm$ 0.16	0.32
100.0	100.67 $\pm$ 0.81	0.79	100.33 $\pm$ 1.17	1.17

**2.2.6 回收率** 分别配制质量浓度为 5.0、50.0 和 100.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 TPL-LA 溶液各 5 份,按“2.2.1”项下色谱条件分别进样,记录色谱峰面积,代入标准曲线计算浓度,与实际浓度进行比较,计算回收率。实验结果见表 2。3 个浓度下的平均回收率均分布在 100.0% ~ 102.0% 之间 (RSD < 2%),该方法可以满足测定需求,用于药物的含量测定。

表2 TPL-LA 的平均回收率.  $n=5, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Results of average recovery of TPL-LA.  $n=5, \bar{x} \pm s$

Theoretical concentration / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Actual concentration / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Recovery /%	RSD /%
5.0	5.12 $\pm$ 0.10	101.79 $\pm$ 1.95	1.92
50.0	50.39 $\pm$ 0.36	100.66 $\pm$ 0.73	0.73
100.0	100.17 $\pm$ 0.11	100.08 $\pm$ 0.11	0.11

### 2.3 脂质体包封率(EE)及载药量(LE)的测定<sup>[16]</sup>

精密吸取 0.2 mL TPL-LA-lip 加入制备好的凝胶柱,1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 min 后,收集洗脱液。另精密吸取 0.2 mL 超纯水,相同条件离心洗涤 3 次,2 次重复操作后分别收集洗脱液于量瓶中,用 MeOH 溶液稀释并定容,照 HPLC 含量测定方法测得 TPL-LA 的浓度,得 TPL-LA 的游离药物质量浓度  $\rho_{\text{游}}$  和游离药物质量  $m_{\text{游}}$ ;另精密吸取 0.2 mL TPL-LA-lip 至相同体积的量瓶中,用 MeOH 溶液稀释并定容,得 TPL-LA 的总质量浓度  $\rho_{\text{总}}$  和总质量  $m_{\text{总}}$ 。取 TPL-LA-lip 溶液 1 mL 直接冻干,取冻干粉体称重,即  $m$ , TPL-LA-lip 的 EE 与 LE 的计算见公式 1~2。

$$\text{EE}(\%) = (\rho_{\text{总}} - \rho_{\text{游}}) / \rho_{\text{总}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

$$\text{LE}(\%) = (m_{\text{总}} - m_{\text{游}}) / m \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

### 2.4 单因素考察

**2.4.1 磷脂种类的筛选** 根据确定的制备工艺,用固定处方:磷脂 10.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、胆固醇 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、DSPE-mPEG2000 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、药物含量 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,考察不同种类磷脂如蛋黄卵磷脂

(PL-100M)、蛋黄卵磷脂(PC-98T)、氢化大豆磷脂(HSPC)、高纯蛋黄卵磷脂(EPCS)对脂质体 EE 的影响。实验结果见图 2A,PC-98T 磷脂对药物具有高包封率,且脂质体粒径与 PDI 均较小,故优选其作为制备脂质体的磷脂。

**2.4.2 药脂比例筛选** 根据相同的制备条件,用固定处方:磷脂 10.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;胆固醇 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;DSPE-mPEG2000 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;药物含量 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,考察药物/磷脂质量比为 1:5、1:10、1:20、1:30 条件对脂质体粒径分布及 EE 的影响,结果见图 2B。随着药脂比的增大,EE 具有明显的提升,当药脂比达到 1:10 时,脂质体粒径分布窄、EE 高,且基本趋于稳定。故选择药脂比为 1:10 作为处方量。

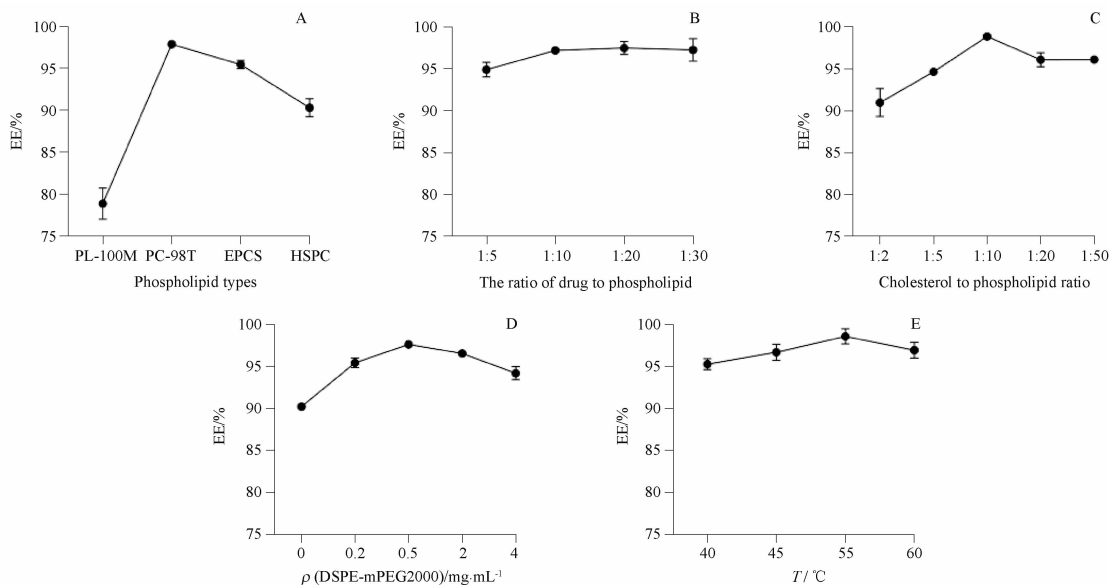
**2.4.3 胆固醇与磷脂的比例筛选** 根据相同的制备条件,用固定处方:磷脂 10.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;胆固醇 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;DSPE-mPEG2000 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;药物含量 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,考察胆固醇/磷脂质量比为 1:2、1:5、1:10、1:20、1:50 条件对脂质体粒径分布及 EE 的影响,结果见图 2C。当脂质体加入胆固醇/磷脂比例为 1:10 时,EE 更高,粒径分布较窄,并且随着胆固醇与磷脂比例的减少,EE、粒径、多分散系数(PDI)趋于稳定。故优选胆固醇/磷脂比例为 1:10 作为处方量。

**2.4.4 DSPE-mPEG2000 的用量筛选** 根据相同的制备条件,用固定处方:磷脂 10.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;胆固醇 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;药物含量 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;DSPE-mPEG2000 为 0、0.2、0.5、2.0、4.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  条件对脂质体粒径分布及 EE 的影响。由图 2D 结果可知,随着 DSPE-mPEG2000 用量的增加,脂质体 EE 呈先上升后下降的趋势。且在制备过程中发现,当加入一定 DSPE-mPEG2000 时,增加了脂质体过膜的顺畅性。而 DSPE-mPEG2000 用量为 0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,EE 更高,粒径分布更窄,因此 0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  DSPE-mPEG2000 用量为优选用量。

**2.4.5 制备温度的筛选** 根据相同的制备条

件,用固定处方:磷脂  $10.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;胆固醇  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; DSPE-mPEG2000  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 药物含量  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,考察脂质体制备温度为 40、45、55、60 °C 对脂质体粒径分布及 EE 的影响,结果见图 2E。当制备温度较低时,TPL-LA-lip 的粒径

和 PDI 偏大,溶液出现浑浊,透明度低;随着温度的上升,TPL-LA-lip 粒径分布和 EE 均较为稳定且符合脂质体制备工艺的要求。但考虑到温度过高可能会造成前药的降解,故选择 55 °C 作为脂质体的最佳制备温度。



A - 磷脂种类对制备 TPL-LA-lip 包封率的影响; B - 不同药脂比例对制备 TPL-LA-lip 包封率的影响; C - 不同胆固醇与磷脂比例对制备 TPL-LA-lip 包封率的影响; D - 不同 DSPE-mPEG2000 用量对制备 TPL-LA-lip 包封率的影响; E - 不同温度对制备 TPL-LA-lip 脂质体包封率的影响。

A - the effect of phospholipid types on the EE of TPL-LA-lip; B - the effect of drug and phospholipid ratio on the EE of TPL-LA-lip; C - the effect of cholesterol to phospholipid ratio on the EE of TPL-LA-lip; D - the effect of DSPE-mPEG2000 dosage on the EE of TPL-LA-lip; E - the effect of preparation temperature on the EE of TPL-LA-lip.

图 2 各影响因素对雷公藤甲素木蜡酸酯脂质体(TPL-LA-lip)包封率的影响.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 The effect of various influencing factors on the EE of TPL-LA-lip.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

## 2.5 Box-Behnken 响应面法优化制剂

### 2.5.1 因素与水平

在脂质体处方工艺的单因素考察基础上,采用 Box-Behnken 效应面法对处方进一步考察优化。固定药物含量 ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),以药脂比 (X1)、胆固醇与磷脂比例 (X2) 和 DSPE-mPEG2000 用量 (X3) 对脂质体粒径分布及 EE 影响较大的 3 个因素,并以 EE 为评价指标,对 TPL-LA-lip 处方进行三因素三水平的试验设计,试验设计见表 3,结果见表 4~5。

表 3 TPL-LA-lip 处方的 Box-Behnken 设计因素及水平

Tab. 3 Box-Behnken factors and levels of TPL-LA-lip prescription

Levels	Factors		
	X1	X2	X3
-1	1:5	1:5	0
0	1:10	1:10	0.05
1	1:20	1:15	0.2

表 4 TPL-LA-lip 处方的 Box-Behnken 响应面试验设计及相应结果表

Tab. 4 Box-Behnken effect surface method test design and corresponding results of TPL-LA-lip prescription

No.	Factors			EE /%
	X1	X2	X3	
1	-1	-1	0	76.15
2	1	-1	0	93.70
3	-1	1	0	72.31
4	1	1	0	91.56
5	-1	0	-1	76.40
6	1	0	-1	94.87
7	-1	0	1	76.40
8	1	0	1	95.60
9	0	-1	-1	92.50
10	0	1	-1	88.65
11	0	-1	1	90.52
12	0	1	1	88.62
13	0	0	0	98.56
14	0	0	0	96.12
15	0	0	0	96.45
16	0	0	0	94.90
17	0	0	0	95.60

表 5 TPL-LA-lip 处方的 Box-Behnken 设计-响应面方法的回归方差分析结果

Tab. 5 Results of regression variance analysis of Box-Behnken design-response surface methodology of TPL-LA-lip prescription

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P
Model	1 145. 35	9	127. 26	102. 17	<0. 000 1
X 1	687. 65	1	687. 65	552. 06	<0. 000 1
X 2	16. 33	1	16. 33	13. 11	0. 008 5
X 3	0. 20	1	0. 20	0. 16	0. 697 2
X1X2	1. 00	1	1. 00	0. 80	0. 400 0
X1X3	0. 13	1	0. 13	0. 11	0. 753 2
X2X3	0. 95	1	0. 95	0. 76	0. 411 3
X1 <sup>2</sup>	312. 35	1	312. 35	250. 76	<0. 000 1
X2 <sup>2</sup>	79. 97	1	79. 97	64. 20	<0. 000 1
X3 <sup>2</sup>	15. 13	1	15. 13	12. 15	0. 010 2
Residual	8. 72	7	1. 25		
Lack of Fit	1. 11	3	0. 37	0. 19	0. 895 1
Pure Error	7. 61	4	1. 90		
Cor Total	1 154. 07	16			

2. 5. 2 模型的建立及其显著性检验 根据 Design-expert 软件绘制的相应三维响应面和二维等高线图 (图 3) 可以看出, 药脂比 (X1) 对 TPL-LA-lip 脂质体

的 EE 影响最为显著, 随着 X1 的增加 EE 明显升高; 而胆固醇/磷脂的比例 (X2) 和 DSPE-mPEG2000 含量 (X3) 对 TPL-LA-lip 脂质体的 EE 影响相对较小。

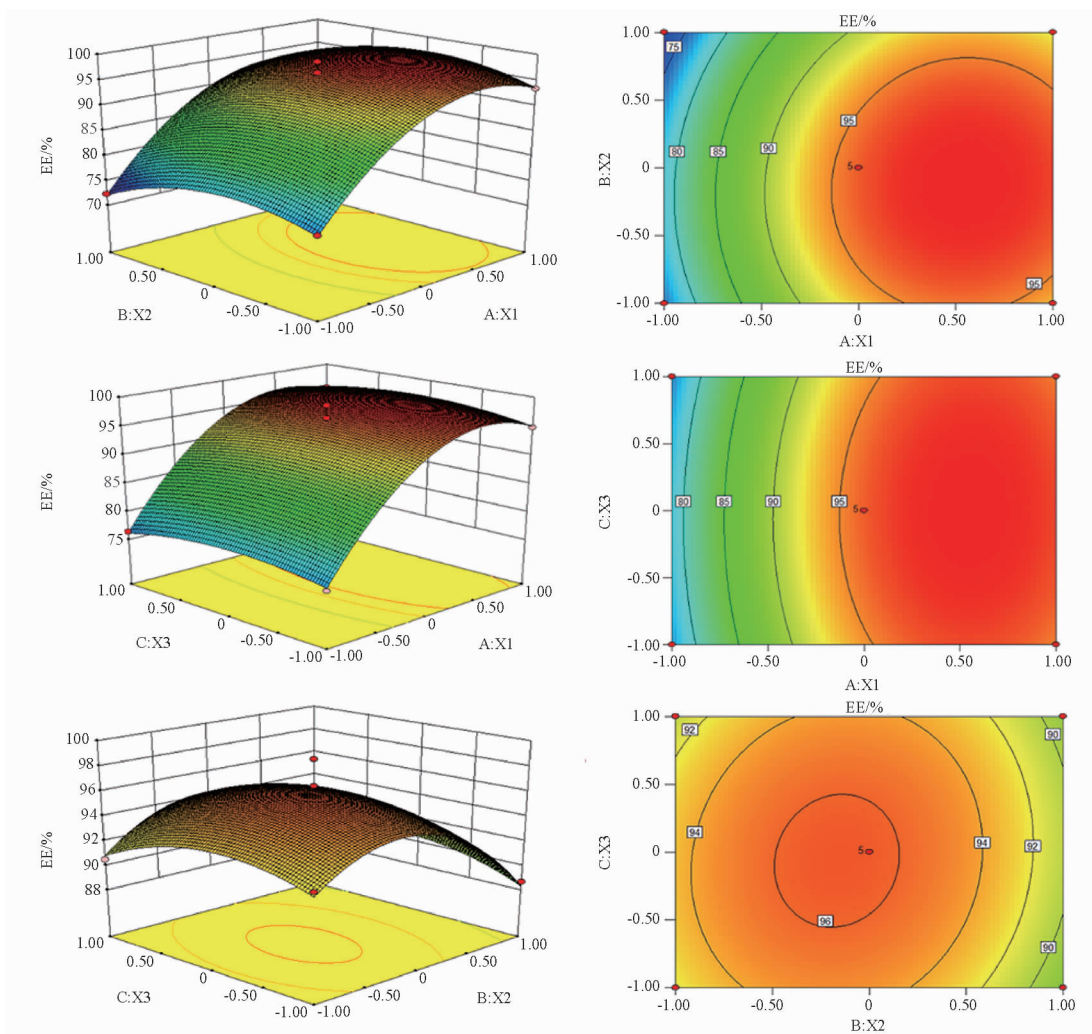


图 3 TPL-LA-lip 处方的各因素相互关系及包封率的三维响应面和等高线图

Fig. 3 The response surface of EE as the function of levels and factors of TPL-LA-lip prescription

**2.5.3 最佳工艺的确定和验证** (利用软件中 Optimization 的 Numerical 功能,以最高 EE% 为出发点,拟合确定最佳处方为药脂比为 12.67,胆固醇/磷脂为 9.79,DSPE-mPEG2000 用量为 0.15。根据预测所得最佳处方进行脂质体的制备,测得脂质体包封率为  $(98.30 \pm 0.32)\%$  ( $n = 3$ ) 与预测值 98.90% 接近),载药量为  $(8.33 \pm 0.24)\%$ ,模型建立可靠。

## 2.6 脂质体表征

**2.6.1 外观及透射电镜(TEM)观察结果** 移取适量 TPL-LA-lip 滴在喷碳铜网表面,使脂质体沉降到铜网中,再用 2% 磷钨酸负染 3 min,自然晾干后在

高分辨透射电子显微镜下观察 TPL-LA-lip 的形态,结果见图 4A。由图 4A 可见,制备得到的 TPL-LA-lip 为均一、稳定的具淡蓝色乳光的半透明至透明的液体。可观察到 TPL-LA-lip 外观呈球形或类球形。

**2.6.2 粒径及电位的测定** 利用马尔文粒度仪测定 TPL-LA-lip 的粒径和 Zeta 电位。测定方法为移取 100  $\mu\text{L}$  TPL-LA-lip 至比色皿中,加入 1 mL 纯化水稀释后重复测定 3 次,记录测得粒径、PDI 以及 Zeta 电位结果,结果见图 4B。TPL-LA-lip 的粒径为  $(105.60 \pm 0.01)$  nm ( $n = 3$ ),呈单峰,PDI 为  $(0.10 \pm 0.02)$  ( $n = 3$ ),Zeta 电位为  $(-34.54 \pm 0.17)$  mV ( $n = 3$ )。

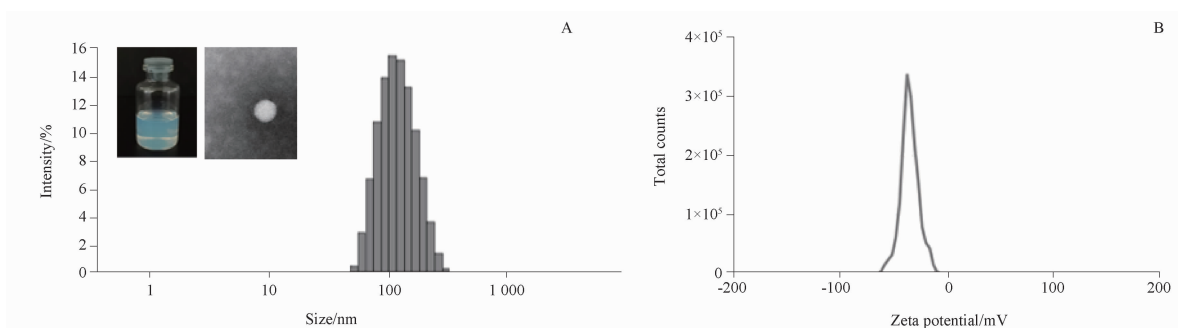


图 4 TPL-LA-Lip 的粒径分布(A)与 Zeta 电位(B)图

Fig. 4 Particles size distribution(A) and Zeta potential map of TPL-LA-lip(B)

## 3 TPL-LA-lip 的初步稳定性研究

对新制备的 TPL-LA-lip 溶液置于常温常压下的稳定性进行了探究,分别于第 0、30、90 天取出,分别测定粒径、PDI 和 EE,通过外观、粒径、PDI 和 EE 的变化初步考察 TPL-LA-lip 的稳定性,结果见表 6。实验表明,90 d 内 TPL-LA-lip 初步稳定性良好。

表 6 TPL-LA-lip 在常温常压下的初步稳定性实验结果。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 6 Preliminary stability of TPL-LA-lip at normal temperature and pressure.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Days	Appearance	Particle size/nm	PDI	EE/%
0	Transparent	109.34 $\pm$ 1.32	0.15 $\pm$ 0.01	98.73 $\pm$ 0.97
30	Transparent	109.07 $\pm$ 0.55	0.14 $\pm$ 0.01	98.62 $\pm$ 0.91
90	Transparent	108.63 $\pm$ 1.82	0.15 $\pm$ 0.01	96.99 $\pm$ 0.94

## 4 TPL-LA-lip 的体外累积释放度研究

通过药物释放试验,定量检测了 TPL-LA-lip 的体外释放动力学。采用含 30% 乙醇的 PBS 作为释放介质,向 200 mL 溶出杯中加入 100 mL 释放介

质,  $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , 搅拌速度为  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 投药前预先使释放介质受热并搅拌均匀,随后用移液器移取脂质体样品(1 mL)置于盛有适量体积释放介质的溶出杯中,恒温匀速搅拌,分别于 0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 各时间点取样 2 mL,并立即补充新鲜释放介质。随后样品用 0.22  $\mu\text{m}$  尼龙滤膜过滤。精密吸取 100  $\mu\text{L}$  供试品溶液于 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释并定容,涡旋混合 1 min 后,20  $\mu\text{L}$  进样量进行含量测定。体外累积释放率( $c_r$ )的计算见公式 3。

$$c_r (\%) = \left[ \frac{c_n}{L/V_2} + \frac{(c_{n-1} + \dots + c_2 + c_1)V_1}{L} \right] \times 100\% \quad \text{公式(3)}$$

式中: $c_n$ 为每个时间点的样品浓度; $L$ 为制剂标示量; $V_1$ 为每个时间点的固定取样体积; $V_2$ 为释放介质体积。实验结果见图 5。采用含 30% 乙醇的 PBS 作为释放介质时,在 8 h 内 TP 释放达到 90% 以上;而 TPL-LA-lip 整体释放较慢,且 24 h 的累积释放度仅为 40.35%,表明前药脂质体有良好的缓释作用。

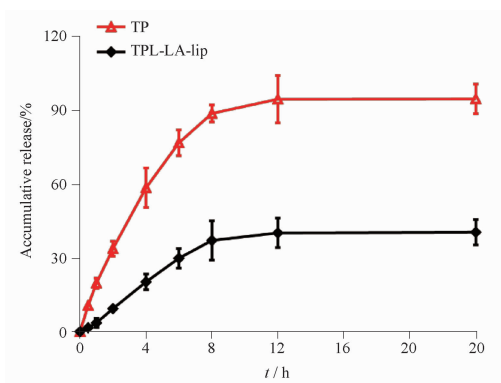


图5 TPL-LA-lip 体外释放研究.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 TPL-LA-lip *in vitro* release study.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

## 5 TP 脂质体药效学评价

### 5.1 肿瘤细胞培养以及胰腺癌模型的构建<sup>[17]</sup>

复苏培养 Panc 02 胰腺癌细胞,培养一段时间后,选取对数生长期的肿瘤细胞,PBS 冲洗 2~3 次,胰酶消化成单细胞悬液,1 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 9 min 后弃上清液,加入定量 PBS 重悬细胞后,调节细胞密度至  $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将 Panc 02 细胞接种于小鼠右侧腋窝,建立小鼠的胰腺癌模型。

### 5.2 分组给药

待肿瘤体积生长至  $100 \sim 150 \text{ mm}^3$  时,将小鼠按瘤体分别随机分为 5 组。小鼠 Panc 02 胰腺癌模型中,每隔 3 d 分别静脉注射生理盐水、Blank lip、TP 溶液、Minnelide 和 TPL-LA-lip,共计 4 次,各治疗组 TP 剂量均为  $0.30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;治疗期间监测荷瘤动物的肿瘤体积[TV,  $\text{TV}(\text{mm}^3) = a \times b^2/2$ ,“a”和“b”分别表示肿瘤的长径和短径]和体质量,在最后一次给药 3~5 d 后,剖取各组小鼠重要器官与肿瘤并称量,最后计算各治疗组的肿瘤抑制率(TIR,公式 4)以及相对肿瘤增殖率(T/C,公式 5)。

$$\text{TIR}(\%) = (m_{\text{control}} - m_{\text{treat}}) / m_{\text{control}} \times 100\% \quad \text{公式(4)}$$

$m_{\text{control}}$  和  $m_{\text{treat}}$  分别代表对照组和治疗组肿瘤的平均质量)。

$$\text{T/C}(\%) = \text{RTV}(\text{治疗组}) / \text{RTV}(\text{对照组}) \times 100\% \quad \text{公式(5)}$$

RTV 为相对肿瘤体积; $\text{RTV} = \text{TV}_t / \text{TV}_0$ ,其中  $\text{TV}_0$  为分组时测量的肿瘤体积, $\text{TV}_t$  代表每次测量时的肿瘤体积。器官指数 = 小鼠器官质量/小鼠质量。

### 5.3 苏木素-伊红(HE)染色

在最后一次给药后隔天处死小鼠,剖取各组肿

瘤组织,并迅速以 4% 多聚甲醛固定液固定,进行石蜡包埋,切片,HE 染色,于显微镜下观察各组肿瘤组织微观结构。

### 5.4 实验结果

如图 6 所示,与接受 TP( $0.30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 的小鼠相比,TPL-LA-lip( $0.59 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,与 TP 等剂量)可显著抑制小鼠 Panc 02 胰腺癌肿瘤的生长。值得注意的是,TPL-LA-lip 组小鼠从治疗第 4 天开始出现肿瘤消退现象,TPL-LA-lip 对肿瘤生长的抑制作用更加显著。

此外,TPL-LA-lip 在小鼠体内的耐受性良好,未出现有体质量减轻现象(图 6F);图 6D~E 说明 TPL-LA-lip 组小鼠脏器质量与阴性对照无明显差异,而经 TP 溶液治疗后的鼠体重及器官指数明显降低,显示出 TPL-LA-lip 良好的生物安全;从表 7 可知,等剂量条件下,TP 溶液组肿瘤抑制率仅 46.15%,而 TPL-LA-lip 组的抑瘤率可达到 83.67%,组间差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );TPL-LA-lip 组与 Minnelide 组相比,其抑瘤率高于 Minnelide,但并无统计学差异,说明与阳性药达到等效的作用,但经脂质体包载后,可以增加生物安全性同时提高了药物的抗肿瘤疗效。

TP 组肿瘤组织切片显示局部有少量肿瘤细胞死亡,Minnelide 也有大量肿瘤细胞凋亡,但其凋亡程度小于 TPL-LA-lip,TPL-LA-lip 导致了大量的瘤内凋亡,肿瘤细胞膜皱缩,细胞核增大或变形,肿瘤组织出现较多坏死;这也进一步体现了 TPL-LA-lip 更显著的抗肿瘤作用(图 6L)。

另外,为了评估 TPL-LA-lip 对荷瘤小鼠长期的治疗作用,实验还记录了动物的总体存活时间。60 d 为观察期限,结果显示,生理盐水组动物在 30 d 内全部死亡,接受 TP 的小鼠在第 17 天出现死亡,在观察期限内无小鼠存活。而接受 TPL-LA-lip 的小鼠 60 d 内均未出现死亡,期限内仅有 2 只小鼠死亡,由 TPL-LA-lip 治疗的荷瘤小鼠生存期得以显著延长(图 6C)。

## 6 讨论

本研究选择薄膜水合法制备脂质体,简单快速、条件温和、成功制备出了雷公藤甲素前药脂质体。将前药技术和脂质体递送技术相结合,不仅改善了 TP 成药性差的问题,还可以更好地发挥抗肿瘤疗效且降低毒副作用。

单因素考察筛选出对 TPL-LA-lip 的 EE 影响

较大的3个因素,通过 Box-Behnken 响应面法,可以减少试验次数,从而得到较优的处方工艺参数。根据最优工艺参数所制备的脂质体,实测值与预测值偏差较小,表明 Box-Behnken 响应面具有

较好的预测性,可用于 TPL-LA-lip 的处方和制备工艺的优化设计。体外释放说明 TPL-LA-lip 具有缓释效果,在 24 h 内的累积释放率为 40.35%。

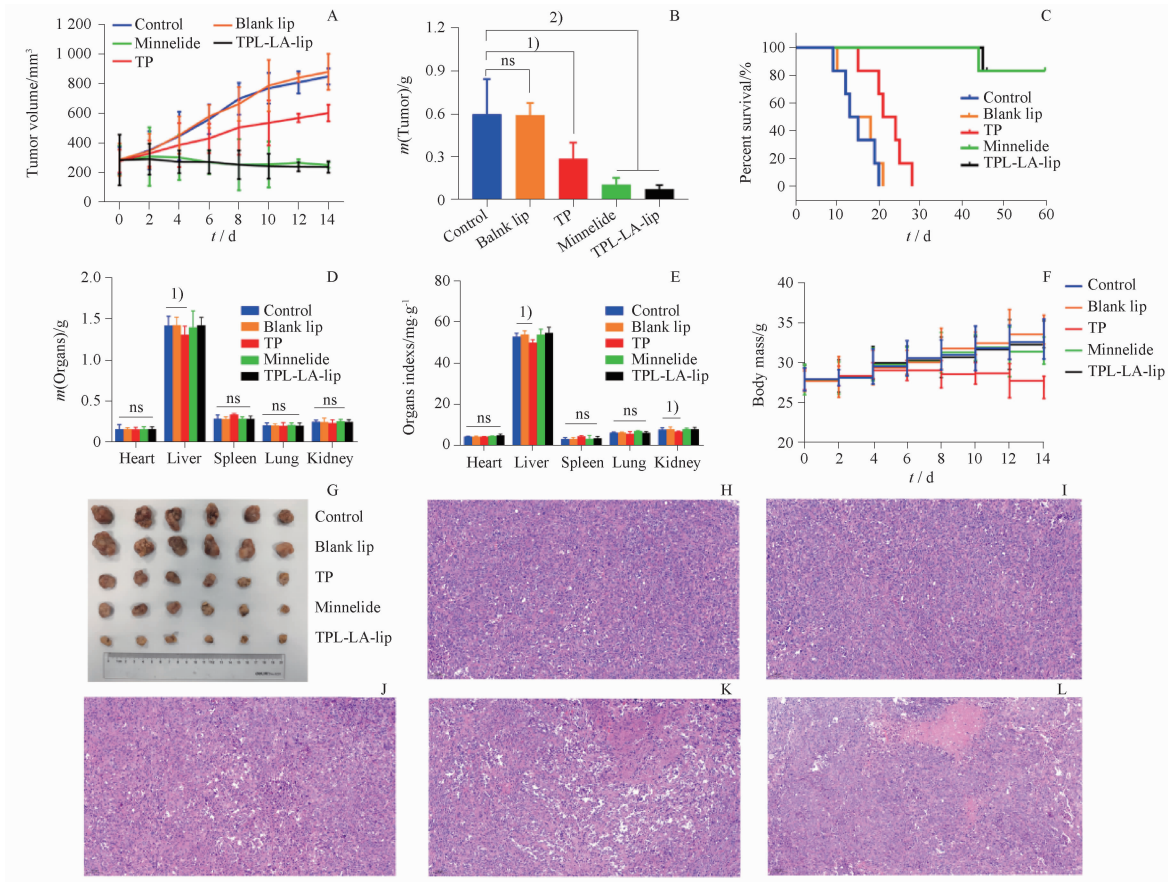


图6 小鼠 Panc 02 胰腺癌模型-体内抗肿瘤效果评价 ( $\times 20$ )。  $n = 6, \bar{x} \pm s$

A - tumor volume in each group of mice growth curve; B - tumor mass of each group mice; C - survival curves of remaining tumor-bearing mice in each group; D - organs mass of each group; E - organs indexes of each group; F - body mass growth curves of mice in each group; G - representative images of tumor tissues in each group; H - HE of tumor tissues of mice in control group; I - HE of tumor tissues of mice in blank lip group; J - HE of tumor tissues of mice in TP group; K - HE of tumor tissues of mice in minnelide group; L - HE of tumor tissues of mice in TPL-LA-lip group; <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , there were significant differences between groups; <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , there are very significant differences between groups.

图6 小鼠 Panc 02 胰腺癌模型-体内抗肿瘤效果评价 ( $\times 20$ )。  $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 Panc 02 pancreatic cancer model-antitumor effect evaluation *in vivo* ( $\times 20$ ).  $n = 6, \bar{x} \pm s$

表7 对 ICR 小鼠 Panc 02 胰腺癌模型的抗肿瘤作用

Tab. 7 Antitumor effect on Panc 02 pancreatic cancer model of ICR mouse

Group	ICR mouse beginning/end	Mass change/%	$m(\text{Tumor})/\text{g}$	Tumor inhibition rate/%	Relative tumor growth rate(T/C)/%
Control	6/6	18.12	$0.52 \pm 0.230$	-	-
Blank lip	6/6	21.29	$0.49 \pm 0.210$	-	-
TP	6/6	-3.62	$0.28 \pm 0.145$	46.15	75.91
Minnelide	6/6	13.06	$0.11 \pm 0.034$	77.55	42.23
TPL-LA-lip	6/6	19.97	$0.08 \pm 0.046^{1), 2)}$	$83.67^{1), 2)}$	36.52

注:与生理盐水组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与 TP 治疗组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; - - 无此项。

Note:<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , compared with the saline group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , compared with the TP group; - - none of this item.

肿瘤组织切片染色结果显示, TPL-LA-lip 导致了大量的瘤内凋亡, 肿瘤细胞膜皱缩, 细胞核增大, 肿瘤组织坏死, 显示了良好的抗肿瘤效果; ICR 小鼠肿瘤模型药效学研究表明, TPL-LA-lip 组脂质体肿瘤体积并未增大且小鼠体质量并未下降, 说明 TPL-LA-lip 能显著抑制肿瘤生长并显示出良好的生物安全性, 表明针对 TP, 经饱和和长链脂肪酸(木蜡酸)修饰制成前药, 并与纳米药物递送技术相结合, 可能更有效的延长了药物在体内的作用时间, 从而使药物的抗肿瘤效果越好。

本试验成功制备了 TPL-LA-lip, 为 TP 前药脂质体的开发提供方法参考与实验基础, 同时具有潜在的临床应用价值, 为胰腺癌后期治疗研究奠定了重要基础。

## REFERENCES

- [ 1 ] CHEN B J. Triptolide, a novel immunosuppressive and anti-inflammatory agent purified from a Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F[J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 42(3):253-265.
- [ 2 ] YANCHUN M, YI W, LU W, *et al.* Triptolide prevents proliferation and migration of Esophageal Squamous Cell Cancer via MAPK/ERK signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 851: 43-51.
- [ 3 ] BANERJEE S, SALUJA A. Minnelide, a novel drug for pancreatic and liver cancer[J]. *Pancreatology*, 2015, 15(Suppl. 4): S39-S43.
- [ 4 ] YAN P, SUN X. Triptolide: a new star for treating human malignancies[J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(Suppl):S271-S275.
- [ 5 ] SONG W, LIU M, WU J, *et al.* Preclinical pharmacokinetics of Triptolide: a potential antitumor drug[J]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20(2):147-154.
- [ 6 ] FU Y, LIN J, ZHANG Z R. Determination of apparent solubility, apparent oil/water partition coefficient and dissociation constant of triptolide and triptolide - glucosamine conjugates[J]. *West China J Pharm*(华西药学杂志), 2017, 32(4): 369-371.
- [ 7 ] PAN X, WANG J W, HU L H. Research progress of Triptolide prodrugs[J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*(南京中医药大学学报), 2020, 36(5): 684-689.
- [ 8 ] HAN T J, HU Y X, FU Z H. Research progress of polymer prodrugs[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2019, 50(4): 397-404.
- [ 9 ] XU H, LIU B. Triptolide-targeted delivery methods[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 164: 342-351.
- [ 10 ] WU J. The enhanced permeability and retention (EPR) effect: the significance of the concept and methods to enhance Its application[J]. *J Pers Med*, 2021, 11(8):1-8.
- [ 11 ] JAMES N D, COKER R J, TOMLINSON D, *et al.* Liposomal doxorubicin (Doxil): an effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS[J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 1994, 6(5): 294-296.
- [ 12 ] DRUMMOND D C, NOBLE C O, GUO Z, *et al.* Development of a highly active nanoliposomal irinotecan using a novel intraliposomal stabilization strategy[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(6):3271-3277.
- [ 13 ] MAYER L D, TARDI P, LOUIE A C. CPX-351: a nanoscale liposomal co-formulation of daunorubicin and cytarabine with unique biodistribution and tumor cell uptake properties[J]. *Int J Nanomed*, 2019, 14: 3819-3830.
- [ 14 ] AN L L, SUN H J, KONG Y H, *et al.* Preparation of andrographolide TPP-PEG-PE liposomes with mitochondrial targeting function and its mechanism in gastric cancer model mice[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2021, 52(7): 1945-1956.
- [ 15 ] HUANG Z J, LI T, GUO X J, *et al.* Technical study of vinpocetine micelles prepared by thin-film hydration method[J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2012, 35(11): 1850-1854.
- [ 16 ] ZHANG Y, HANG T J, SONG M. Progress in research on the determination of entrapment efficiency of liposomes[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2021, 52(2): 245-252.
- [ 17 ] WANG X, ZENG H, ZHU X, *et al.* TP-CSO: a triptolide prodrug for pancreatic cancer treatment[J]. *Molecules*, 2022, 27(12):1-11.

(收稿日期:2023-03-08)