N-三甲基壳聚糖包覆茵陈总黄酮脂质体的制备及对小鼠急性肝损伤的保护作用

倪 斌，高 畅，方春云，李 燕，郭春钰*
（赣南医学院第一附属医院，江西赣州 341000）

摘要：使用乙醇注入法制备茵陈总黄酮脂质体，再利用带正电荷的 *N*- 三甲基壳聚糖对脂质体进行包覆。为了增强脂质体的贮存稳定性，采用冷冻干燥工艺制备冻干品。单因素试验结果显示，采用6%海藻糖作冻干保护剂时冻干品表面光滑平整、再分散性能良好。冻干前后药物包封率为（91.8±0.5）%和（92.5±0.3）%，平均粒径为（164.0±4.2）和（165.5±5.9）nm，多分散性指数（PDI）为0.255±0.007和0.361±0.030，ζ电位为（23.8±0.2）和（21.6±0.4）mV。冻干脂质体复溶后在透射电镜下呈均匀类球形。进一步采用四氯化碳致小鼠急性肝损伤模型考察本品的肝保护作用。结果显示，与模型组相比，本品可明显降低小鼠血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶及肝组织中丙二醛的水平，对急性肝损伤保护作用显著。本研究可为难溶性中药成分口服给药系统的设计提供新思路。

关键词：茵陈；总黄酮；三甲基壳聚糖；脂质体；冻干；稳定性；急性肝损伤
中图分类号：R944.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)06-0857-05
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.06.013

Preparation of *N*-Trimethyl Chitosan-coated Liposomes Loaded with Total Flavones of *Artemisia capillaris* Thunb. and Protective Effect on Acute Hepatic Injury in Mice

NI Bin, GAO Chang, FANG Chunyun, LI Yan, GUO Chunyu*
(*First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000*)

ABSTRACT: The liposomes loaded with total flavones of *Artemisia capillaris* Thunb. were prepared by ethanol injection method, and *N*-trimethyl chitosan with positive charge was used to coat on the liposomes. Then, lyophilization was adopted to enhance the storage stability of the prepared liposomes. The results of single factor tests showed that lyophilized liposomes with good appearance and reconstitution profiles were obtained by using 6% of trehalose as a lyoprotectant. The encapsulation efficiency, particle size, polydispersity index (PDI) and ζ potential of the liposomes before and after lyophilization were (91.8±0.5)% and (92.5±0.3)%, (164.0±4.2) and (165.5±5.9) nm, 0.255±0.007 and 0.361±0.030, (23.8±0.2) and (21.6±0.4) mV, respectively. Under the transmission electron microscope, the reconstituted liposomes were spherical in shape. Furthermore, the liver protection effect of the liposomes was investigated with carbon tetrachloride-induced acute liver injury in murine models. Compared with model group, the levels of alanine aminotransferase (ALT), glutamic-oxaloacetic transaminase (AST) in serum and malonaldehyde in liver tissue of the liposomes treated group were significantly reduced, which demonstrated the title liposomes had a remarkable protective effect on acute hepatic injury in mice. This study can provide a new idea for the oral delivery of traditional Chinese medicine components with low solubility.

Key Words: *Artemisia capillaris* Thunb.; total flavones; *N*-trimethyl chitosan; liposome; lyophilization; stability; acute hepatic injury

茵陈为茵陈蒿（*Artemisia capillaris* Thunb.）干燥的地上部分，全国各地资源丰富[1]，主要药效成分为黄酮类化合物，其中羟基取代的黄酮类化合物具有抗氧化、清除自由基能力，能避免自由基引起肝细胞的变化导致肝损伤，从而起到保肝利胆作用[2]。由于茵陈总黄酮（total flavones of *Artemisia capillaris* Thunb.，**1**）相对分子质量大、难溶于水、渗透性差，在胃肠道的溶出与吸收受限，导致生物利用度低。因此，如何提高其口服生物利用度，开发构建稳定性高、能促进药物跨膜吸收的口服新剂型具有重要的研究与开发的价值。

基于 **1** 的物理化学性质、脂质体的特点及肝损伤临床防治的需求，本研究制备了 *N*- 三甲基壳聚糖（*N*-trimethyl chitosan，TMC）包覆的 **1** 脂质体，利用带正电荷的修饰材料与带负电荷的黏液蛋白之间氢键、静电力等作用，促进载药微粒在黏液层中的滞留，以延长药物保留时间、增大局部浓度、增加药物在肠道上皮细胞的渗透量[3]。将脂质体冻干可降低磷脂和药物的水解和氧化速度，克服脂质体聚集、融合及药物渗漏等不稳定因素，提高贮存稳定性。本研究还考察了制品对小鼠急性肝损伤的保护作用，期望为 **1** 新剂型的开发提供研究基础。

1　仪器与试药

JY92-IIN 型超声波细胞粉碎机（宁波新艺超声设备有限公司）；Nano ZS90 型纳米粒度仪（英国马尔文公司）；JEM-1200 EX 型透射电镜（日本 JEOL 公司）；UV-2550 型紫外 - 可见分光光度计（日本 Shimadzu 公司）；3-18K 型冷冻高速离心机（德国 Sigma 公司）；LGJ-30FD 型真空冷冻干燥机（北京松源华兴科技发展有限公司）。

茵陈［四川新荷花中药饮片股份有限公司，药材产地为陕西，批号 190404，由赣南医学院药学院卢小路讲师鉴定为菊科茵陈的干燥茎叶，茵陈标本（编号 20200201）存放于赣南医学院科研中心］；芦丁（rutin，**2**）对照品（中国食品药品检定研究院，纯度 91.7%，批号 100080-201811）；大豆磷脂［艾伟拓（上海）医药科技有限公司］；胆固醇［西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司］；TMC（照文献自制[4]，季铵化程度 37.5%）；谷丙转氨酶（ALT）测定试剂盒、谷草转氨酶（AST）测定试剂盒、丙二醛（MDA）测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）；海藻糖（日本旭化成公司）；甘露醇（西陇化工股份有限公司）；葡萄糖（天津市大茂化学试剂厂）；阿拉伯胶（北京金诺欣成化工有限公司）；乳糖（天津市福晨化学试剂厂）；其余试剂为分析纯，水为自制双蒸水。

BALB/c 小鼠（雄性，18 ～ 22 g，由湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物合格证编号 430727200101163412）。

2　方法与结果

2.1　1 的提取

取茵陈药材，经 60 ℃干燥、粉碎、过筛（孔径 850 μm），加入 10 倍体积的 50% 乙醇，回流提取 3 次，每次 1.5 h。提取液合并后离心（1 728×*g*）10 min，上清液用双层滤纸抽滤，滤液减压回收乙醇并水浴挥干溶剂，得 **1** 提取物粉末 1.44 g，其含量约 14.4%。

2.2　脂质体的制备

采用经预试验优化得到的处方参数，以乙醇注入法制备 **1** 脂质体。照大豆磷脂质量分数 4%、胆固醇：大豆磷脂质量比 1 ∶ 7 称取辅料，加入 **1** 5.20 mg，溶于无水乙醇 2.0 ml 中，搅拌下将类脂溶液缓慢匀速地注入水（50 ℃）10.0 ml 中，保温除去乙醇，超声均化（100 W，3 min），即得 **1** 脂质体混悬液。取 1% TMC 水溶液 1.0 ml，缓慢匀速地注入到 **1** 脂质体 1.0 ml 中，室温下搅拌 30 min，即得 TMC 包覆 **1** 脂质体混悬液。

2.3　脂质体包封率的测定

检测条件及线性范围：精密称取 **2** 对照品 15.65 mg，精密加入 70% 乙醇 50.0 ml 制成标准溶液。分别精密取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml，各置 25 ml 量瓶中，加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 ml，摇匀后静置 6 min；加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 ml，摇匀后静置 6 min；再加 4% 氢氧化钠溶液 4.0 ml，用

收稿日期：2021-06-02

基金项目：江西省教育厅青年基金项目（GJJ170884）、赣州市科技局项目（GZ2019ZSF003）

作者简介：倪　斌（1989—），男，硕士，从事药物新剂型与新技术研究。

通信作者：郭春钰（1974—），女，教授，从事药物新剂型与新技术研究。

E-mail：guochunyu0309@163.com

70%乙醇定容，摇匀，静置 12 min。分别在 506 nm 处测定吸光度 D。本法 D 与质量浓度 c 线性关系良好，标准曲线方程为 D=10.556c+0.003（R^2= 0.999 2），线性范围 12.52 ～ 62.60 mg/L。

采用过膜法测定包封率[5]。取 **1** 脂质体混悬液 100 μl 过 0.22 μm 滤膜，将滤液用乙醇破乳并定容至 5 ml，按上述条件测定吸光度，并计算得到包封药物的药量 A_1；另取 **1** 脂质体混悬液 100 μl 直接用乙醇破乳并定容至 5 ml，得到药物总药量 A_2。计算脂质体包封率（即 A_1/A_2×100%）。

2.4 冻干保护剂的筛选

在冻干过程中，冰晶的形成、渗透压的改变、相分离及相转变等因素均可导致脂质体膜折叠、融合、破裂及药物渗漏[6]。因此，加入适宜的冻干保护剂可以减少脂质体结构的破坏，防止药物的失活、分解问题。然而冷冻干燥保护剂的种类较多，不同冻干保护剂对脂质体在冷冻干燥及贮存过程中稳定性的影响需要进一步研究。以外观、色泽、粒径、多分散性指数（PDI）、ζ 电位和包封率为考察指标，分别考察乳糖、葡萄糖、甘露醇、海藻糖、阿拉伯胶等常用冻干保护剂对 TMC 包覆 **1** 脂质体的保护作用。分别称取各冻干保护剂，加至 TMC 包覆 **1** 脂质体混悬液中，使冻干保护剂浓度为 4%，混匀后于 －80 ℃超低温冰箱中预冻 4 h，再迅速放入冷冻干燥机中冷冻干燥 30 h（－20 ℃，6 h，0.10 ℃ /min；－15 ℃，6 h，0.10 ℃ /min；－5 ℃，6 h，0.10 ℃ /min；5 ℃，6 h，0.10 ℃ /min；20 ℃，6 h，0.2 ℃ /min），即得 TMC 包覆 **1** 脂质体冻干粉末。各冻干样品用相同体积的水溶解，每种 6 份，检测上述指标。结果表明，海藻糖对脂质体的保护优于其他保护剂（表 1）。因此选择海藻糖作为冻干保护剂，并进一步考察其浓度影响。

2.5 不同浓度海藻糖对脂质体的影响

考察不同浓度的海藻糖对 TMC 包覆 **1** 脂质体的保护作用，以确定最佳浓度。结果表明，海藻糖浓度为 6%时，冻干前后脂质体的粒径、PDI、ζ 电位及包封率无明显差异（表 2），所以 6%为海藻糖的最佳浓度。

表 2 海藻糖浓度对 TMC 包覆 1 脂质体的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Tab.2 Effect of Trehalose Concentration on TMC-coated Liposomes Loaded with **1** ($\bar{x}\pm s$, n=6)

海藻糖/%	粒径/nm	PDI	ζ电位/mV	包封率/%
0	1 060.0±3.2	0.853±0.059	18.7±0.5	28.3±14.6
2	231.5±9.3	0.585±0.064	23.1±1.7	36.4±12.3
4	169.3±4.7	0.438±0.029	20.4±0.9	74.9±12.1
6	165.5±5.9	0.361±0.030	21.6±0.4	92.5±0.3
8	170.6±3.5	0.361±0.011	19.8±1.1	88.0±6.8
10	795.6±10.3	0.758±0.042	28.8±0.3	86.0±8.4

2.6 冻干产品理化性质考察

将 TMC 包覆 **1** 脂质体冻干品用适量水复溶后置载有 Formvar 支持膜的铜网上，滴加 0.3%磷钨酸溶液染色，自然晾干后，置透射电镜（TEM）下观察脂质体的形态。结果（图 1）可见脂质体呈球形或类球形，表面光滑，形态圆整，分散性良好，粒度分布均匀。

2.7 冻干脂质体稳定性考察

以脂质体冻干品复溶后的形态、透明度、粒径、PDI、ζ 电位及包封率作为考察指标，观察脂质体冻干品在室温（25 ℃）条件下贮存 1 个月及 3 个月的稳定性。结果（表 3）表明，TMC 包覆 **1** 脂质体冻

表 1 冻干保护剂种类对 TMC 包覆 1 脂质体的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Tab.1 Effect of Type of Lyoprotectant on TMC-coated Liposomes Loaded with **1** ($\bar{x}\pm s$, n=6)

保护剂	外观	复溶性	粒径/nm	PDI	ζ电位/mV	包封率/%
冻干前	–	–	164.0±4.2	0.255±0.007	23.8±0.2	91.8±0.5
乳糖	褐色，表面高度塌陷	浑浊液体，少量沉淀	524.6±20.1	0.766±0.030	16.6±1.2	23.2±18.1
葡萄糖	褐色，底部萎缩	溶解均匀	300.3±9.4	0.734±0.043	20.1±0.2	54.0±22.8
甘露醇	褐色，表面塌陷	呈现浑浊液体	497.7±23.0	0.777±0.054	24.3±0.9	54.4±24.1
海藻糖	褐色，表面光洁平整，饼块状	快速溶解均匀，半透明均匀液体	169.3±4.7	0.438±0.029	20.4±0.9	74.9±12.1
阿拉伯胶	褐色，高度萎缩	难以复溶，浑浊液体，有块状沉淀	5 502.5±93.2	0.775±0.039	21.4±1.3	18.2±9.8

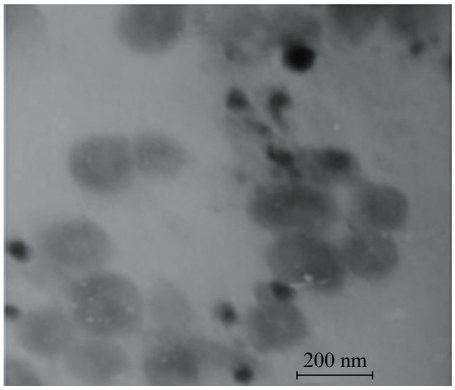


图 1　冻干脂质体复溶后的 TEM 照片（×50 000）

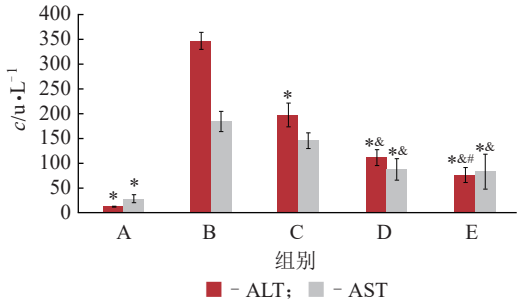
Fig.1　TEM Image of the Reconstituted TMC-coated Liposomes Loaded with **1**（×50 000）

干品室温贮存一段时间后复溶，脂质体的透明度、粒径、PDI、ζ电位及包封率无明显变化，稳定性良好。

2.8　冻干脂质体对小鼠急性肝损伤的保护作用

小鼠急性肝损伤时会生成自由基，导致肝细胞脂质过氧化或坏死；羟基取代的黄酮类化合物具有抗氧化、清除自由基的活性，推测可通过抗氧化途径保护自由基导致的肝损伤。因此，本研究建立了小鼠急性肝损伤模型以考察制品的药效。

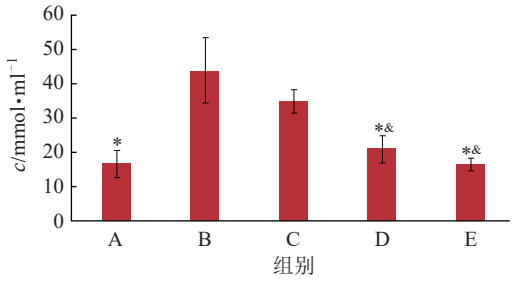
取雄性小鼠 50 只，按体质量随机分为 5 组，分别为空白组（A）、模型组（B）、阳性对照组（C）、**1** 脂质体组（D）、TMC 包覆 **1** 脂质体组（E）。A 和 B 组灌胃给予生理盐水；C 组是 **1** 的混悬液，D 和 E 组为冻干脂质体复溶得到的混悬液；均以 50 mg/kg 的剂量灌胃给药，每日 1 次，连续 7 d 给药。末次给药后 1 h，除空白组外，按 0.01 ml/g 腹腔注射 0.5% 四氯化碳豆油溶液进行造模；空白组腹腔注射等量豆油。造模后禁食 16 h，眼眶采血 0.5 ml，分离血清测定 ALT、AST；采血后处死，解剖取同一位置小块肝脏称重，用生理盐水制成 10% 肝组织匀浆，离心取上清液测定 MDA 值。血清和肝脏生化指标照试剂盒方法检测，结果（图 2、图 3）表明，小鼠生成急性肝损伤时，血清中 ALT、AST 及肝脏中的 MDA 含量显著升高，造模成功。**1** 混悬液组除能使 ALT 活力显著降低外，AST 与 MDA 与模型组比较无显著性差异，提示其药理活性不显著。2 种脂质体组小鼠的 ALT、AST 活力及 MDA 含量下降明显，其中 TMC 包覆 **1** 脂质体对 ALT 活力影响优于 **1** 脂质体，提示其可能具有清除过氧化物的作用。



* 表示与 B 组比较，P<0.05；& 表示与 C 组比较，P<0.05；# 表示与 B 组比较，P<0.01

图 2　ALT 和 AST 测定结果（n=10）

Fig.2　Determination Results of ALT and AST（n=10）



* 表示与 B 组比较，P<0.05；& 表示与 C 组比较，P<0.05

图 3　MDA 测定结果（n=10）

Fig.3　Determination Results of MDA（n=10）

表 3　脂质体冻干品的贮存稳定性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3　Storage Stability of Lyophilized TMC-coated Liposomes Loaded with **1**（$\bar{x}\pm s$, n=3）

制剂	外观	粒径/nm	ζ电位/mV	PDI	包封率/%
脂质体混悬液	澄清透明褐色	164.0±4.2	23.8±0.2	0.255±0.010	91.8±0.5
1个月后复溶	澄清透明褐色	167.3±3.7	23.6±0.5	0.213±0.031	90.3±1.3
3个月后复溶	澄清透明褐色	170.2±6.4	24.2±0.8	0.221±0.026	91.4±0.8

3 讨论

四氯化碳诱导急性肝损伤是经典的肝损伤模型。造模成功后，随着时间的变化，血浆中 ALT、AST 等生化指标会逐渐恢复，因此如果造模成功后再给药，无法判定指标水平的回复是因为自愈作用还是药物作用。本试验结果表明，在腹腔注射四氯化碳前给予 TMC 包覆 **1** 脂质体，可抑制 ALT 和 AST 增加、降低肝组织 MDA 含量。与 **1** 脂质体相比，TMC 包覆 **1** 脂质体对肝损伤的保护作用更加显著。TMC 通过多糖结构与组织和黏液层的离子相互作用，表现出良好的生物膜黏附性，改善了药物在小肠的局部滞留效果[7]，季铵化程度越高就越容易打开黏膜细胞的紧密结构，促进药物穿过小肠上皮细胞，增加药物在细胞旁路的吸收[8]，推测 TMC 包覆 **1** 脂质体由于 TMC 的作用而提高了 **1** 的吸收，从而提高疗效。

脂质体的磷脂固醇结构属于热力学不稳定体系，物理稳定性差，pH 值、温度、粒子间相互作用等因素都可以影响其稳定性[9]，在贮存、使用过程中常常会出现沉降、聚集、药物泄漏等现象，从而降低药效，甚至产生毒性[10]。本研究利用冷冻干燥法提高脂质体的贮存稳定性，冻干前加入 6% 的海藻糖，冻干前后脂质体的形态、粒径及包封率等均无显著变化，减轻甚至消除了冻干对脂质体的破坏。海藻糖可在无水条件下保护生物膜功能、维持钙离子的正常膜转运，使脂质体在完全脱水时保持完整形态。

综上所述，本研究针对 **1** 生物利用度低的问题，制备了高载药量的 **1** 脂质体，并通过生物膜材料 TMC 包覆脂质体，延长 **1** 在胃肠道滞留时间、减轻胃肠道膜生物屏障作用、增强载体在胃酸中的稳定性；将脂质体制备成冻干粉，解决了脂质体系统热力学不稳定问题，使其使用和携带更加方便。TMC 包覆 **1** 脂质体冻干品能够高效清除肝组织中的脂质过氧化物，保护肝脏，具有潜在的临床应用价值，为同类中药的难溶性成分口服给药系统的建立提供了借鉴。

参考文献：

[1] 洪 敏, 吴祥瑞, 华永庆, 等. 绵茵陈与茵陈蒿保肝作用比较研究[J]. 中药药理与临床, 2009, **25**(6): 73-75.

[2] 黄丽平, 许远航, 邓敏贞, 等. 茵陈的化学成分、药理作用机制与临床应用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2021, **33**(4): 676-690.

[3] ANDERSKI J, MAHLERT L, MULAC D, *et al*. Mucus-penetrating nanoparticles: promising drug delivery systems for the photodynamic therapy of intestinal cancer [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, **129**: 1-9.

[4] 倪 斌, 李 翔, 张 婧, 等. 齐墩果酸膜修饰脂质体的制备及其在大鼠体内药动学[J]. 中国医院药学杂志, 2014, **34**(18): 1566-1571.

[5] 任 瑾, 方正杰, 印晓星, 等. 槲皮素前体脂质体的质量考察[J]. 中国现代应用药学, 2013, **30**(1): 39-42.

[6] 王 健, 李明轩. 冷冻干燥对提高脂质体稳定性的研究概况[J]. 中国医药工业杂志, 2005, **36**(9): 576-580.

[7] DU X J, WANG J L, IQBAL S, *et al*. The effect of surface charge on oral absorption of polymeric nanoparticles [J]. *Biomater Sci*, 2018, **6**(3): 642-650.

[8] WONG C Y, AL-SALAMI H, DASS C R. Potential of insulin nanoparticle formulations for oral delivery and diabetes treatment [J]. *J Control Release*, 2017, **264**: 247-275.

[9] 朱雨晴, 石森林. 中药脂质体稳定性的研究进展[J]. 药学学报, 2009, **44**(11): 1211-1215.

[10] 袁 松, 孙会敏, 丁丽霞. 脂质体物理化学稳定性研究进展 [J]. 中国药事, 2011, **25**(4): 384-388.