柠檬烯阴离子脂质体的制备及初步药效评价

黎　娜[1]，邹　娅[2]，郑晓艳[1]，董定国[1]，陈柳葵[1]*

（1. 湛江中心人民医院药学部，广东湛江 524045；2. 成都市第二人民医院临床药学科，四川成都 610017）

摘要：采用乙醇注入法构建了载柠檬烯的二棕榈酰磷脂酰甘油（DPPG）阴离子长循环脂质体，并以脂质体的粒径和 PDI 作为评价指标，优化处方。所得优化处方为氢化大豆磷脂、DPPG、*N*-（羰基 - 甲氧基聚乙二醇 2000）-1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 磷酰乙醇胺钠盐和胆固醇的物质的量比例 46.5 ∶ 10 ∶ 38.5 ∶ 5。优化脂质体的粒径为（62.84±2.36）nm，PDI 为 0.241±0.012；并且，在透射电镜下呈球形，粒度分布相对均一，具有明显的磷脂双分子层结构。载药阴离子脂质体的血清稳定性和血液相容性良好，并能在 4 ℃条件下稳定保存 4 d；在 PBS 中前 12 h 内的累积释放率约为 50%，48 h 累积释放率约为 80%，呈现出缓慢释放的现象。在小鼠模型中的药效学研究表明，该柠檬烯阴离子脂质体可改善胆固醇沉着症小鼠胆囊体积增大、胆汁混浊和胆石增多的情况，对肝脏和胆囊部位的炎症反应也具有一定的抑制作用。

关键词：柠檬烯；阴离子脂质体；缓释；胆囊；保护

中图分类号：R944.9；R975^{+}.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2024）12-1686-07

引用：黎　娜，邹　娅，郑晓艳，等．柠檬烯阴离子脂质体的制备及初步药效评价［J］．中国医药工业杂志，2024, 55（12）：1686-1692．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.12.011

Preparation and Preliminary Pharmacodynamic Evaluation of Anionic Liposomes Loaded with Limonene

LI Na[1], ZOU Ya[2], ZHENG Xiaoyan[1], DONG Dingguo[1], CHEN Liukui[1]*

(*1. Dept. of Pharmacy, Zhanjiang Central People's Hospital, Zhanjiang 524045; 2. Dept. of Clinical Pharmacology, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu 610017*)

ABSTRACT: Limonene-loaded dipalmitoyl phosphatidylglycerol（DPPG） anionic long cycle liposomes were constructed by ethanol injection, and the formulation of the liposomes were optimized with particle size and PDI as the evaluation indexes. The results showed that the optimal liposomes were prepared in a 46.5 ∶ 10 ∶ 38.5 ∶ 5 molar ratio of hydrogenated soybean phospholipid, DPPG, *N*-（carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000）-1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine sodium and cholesterol. The particle size and PDI of the optimized liposomes were（62.84±2.36）nm and 0.241±0.012, respectively. Moreover, the products appeared spherical with relatively uniform distribution and obvious phospholipid bilayer structure in the TEM images. The serum stability and blood compatibility of the drug-loaded anionic liposomes were good and could be stably stored at 4 ℃ for 4 d. The cumulative release rate within the first 12 h in PBS was about 50 % , and was about 80 % at 48 h, showing a slow release characteristics. Pharmacodynamic studies in mouse models showed that the limonene anionic liposomes could improve the enlargement of gallbladder size, bile turbidity and gallstones in cholesterolosis mice, and also inhibit the inflammation in liver and gallbladder sites.

Key Words: limonene; anionic liposome; sustained-release; gallbladder; protection

胆囊切除术，包括开放式胆囊切除术、腹腔镜胆囊切除术、单孔腹腔镜胆囊切除术和经自然腔道胆囊切除术等，常用于治疗直径大于 1 cm 的胆囊息肉样病变或弥漫性伴有临床症状的胆囊胆固醇沉着症[1]。然而，所有手术方法都有可能引起并发症，尤其是胆囊缺失本身也会引起各种胃肠道症状[2]。因此，药物干预治疗可能是更有效的胆囊胆固醇沉着症治疗手段。

柠檬烯（limonene，**1**）胶囊治疗胆囊炎已有一定的临床应用史。**1** 是自然界中的常见萜烯之一[3]，对胆石具有一定的溶解作用。本实验室前期利用豚鼠胆囊炎模型和 RAW264.7 细胞炎症模型验证了 **1** 的体内外抗炎效果和溶石能力，对胆固醇结石性胆囊炎具有良好的疗效，为进一步的 **1** 制剂设计及二次开发奠定了理论基础。经过对国内外相关专利的检索，发现 **1** 制剂主要有 **1** 胶囊和 **1** 滴丸等口服制剂；通过查询美国 FDA 药品数据库、欧盟药品注册 HMA 数据库、日本 PMDA 药品数据库和国家药品监督管理局可知，国外暂无 **1** 相关上市产品，国内上市的仅 **1** 原料药和 **1** 胶囊。

本研究采用 1,2- 二棕榈酰磷脂酰甘油（dipalmitoyl phosphatidylglycerol，DPPG）构建阴离子长循环脂质体，期望能用于临床上不必行胆囊切除术患者的治疗。阴离子脂质体能将 **1** 靶向递送至胆囊，避免口服后 **1** 在其他非疾病部位产生不良反应，更高效地发挥药效。并且，该脂质体具有缓释作用，可减少给药次数和剂量，有利于提高患者依从性。

1 仪器与试药

Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度仪（英国 Malvern 公司）；TGL-16M 型台式高速冷冻离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；Varioskan LUX 型全波长多功能酶标仪（美国 Thermo Scientific 公司）；SCIENTZ-650E 型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；H-600 型透射电镜（日本 Hitachi 公司）；LC-10AT 型高效液相色谱仪（日本 Shimadzu 公司）。

1 原料药（上海麦克林生化科技股份有限公司，含量 95%，批号 C12024426）；氢化大豆磷脂（hydrogenated soybean phospholipid，HSPC）、DPPG、*N*-（羰基 - 甲氧基聚乙二醇 2000）-1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 磷酰乙醇胺钠盐［*N*-（carbonyl-methoxypolyethylene glycol2000）-l,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine，sodium salt（mPEG2000-DSPE）］、胆固醇（Chol）［艾伟拓（上海）医药科技有限公司］。

C57 小鼠［SPF 级，雌雄各半，18 ～ 30 g，购于成都达硕动物实验有限公司，动物合格证编号 SCXK（川）2017-0010］，所有动物试验均经过四川大学伦理委员会批准（伦理审批号：KS2023512）。

2 方法与结果

2.1 DPPG 阴离子脂质体及长循环脂质体的制备

本研究采用乙醇注入法制备阴离子脂质体，能避免在制备过程中使用毒性较强的有机溶剂，从而降低细胞毒性。照表 1 分别精密称取不同处方的脂质体组分，置 5 mL 聚丙烯离心管中，加入无水乙醇，在 70 ℃水浴中充分溶解，得到脂类成分最终浓度为 150 mmol/L 的油相。另取 **1**，溶于氯化钠溶液（pH 7.4）中，得到浓度为 150 mmol/L 的水相。立即通过细针以 10% 的体积分数将乙醇相注射到水相（70 ℃）中[4]。轻轻搅拌脂质分散体 1 h。在此阶段生成的多层囊泡经探头超声（80 W，超声 5 s，停 5 s，3 min），然后用 220 μm 的微孔滤膜过滤。将滤液（脂质体）转移到截留分子量 8 000 ～ 14 000 的透析袋中，置 150 mmol/L 氯化钠溶液（pH 7.4）中，使透析内液、外液的体积比为 1 ∶ 1 000，在室温下透析 24 h（每 6 h 换液 1 次），以去除未包封的 **1**。每种处方脂质体平行试验 3 次。采用动态光散射法测量各处方脂质体的粒径和 PDI。

结果如表 1 所示，4 种 DPPG 含量不同的脂质体处方的粒径均在 70 nm 以内，PDI 均约 0.25。大多数治疗性纳米脂质体被设计成 50 ～ 100 nm，且 50 ～ 80 nm 的纳米脂质体可减少被单核吞噬细胞系统摄取[5]；PDI 小于 0.3 被认为是稳定，表明磷脂

收稿日期：2024-02-27
作者简介：黎　娜（1984—），女，硕士研究生，专业方向：临床药学。
通信作者：陈柳葵（1984—），女，副主任药师，从事医院药学的研究。E-mail：530895857@qq.com

表 1　4 种不同处方脂质体的粒径和 PDI（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1　Particle Size and PDI of 4 Different Liposome Formulations（$\bar{x}\pm s$, n=3）

DPPG 含量 /%	n（HSPC）：n（DPPG）：n（mPEG2000-DSPE）：n（Chol）	粒径 /nm	PDI
0	56.5 ： 0 ： 38.5 ： 5	42.08±1.32	0.276±0.012
10	46.5 ： 10 ： 38.5 ： 5	62.73±3.76	0.241±0.011
20	36.5 ： 20 ： 38.5 ： 5	58.30±2.98	0.265±0.018
30	26.5 ： 30 ： 38.5 ： 5	44.86±4.39	0.242±0.021

囊泡的粒径分布较为均匀。

2.2　脂质体处方的优化

影响纳米粒粒径及其分布的因素主要有化合物浓度、有机相与水相的体积比和药脂比等。文献[6]报道采用乙醇注入法制备 DPPG 阴离子脂质体时，脂质浓度对脂质体的粒径无显著影响。因此，本研究以 DPPG 含量为 10% 的脂质体处方为基础，考察有机相和水相的体积比及药脂比对脂质体粒径和 PDI 的影响，结果如表 2 所示。

由表 2 可见，随着乙醇用量的增加，脂质体的粒径逐渐增大；且乙醇用量大时，易有较多的乙醇残留在体系中，需要较长时间才能去除，而残留的乙醇会破坏脂质体双分子层，导致药物泄漏[7]。因此，乙醇相和水相的体积比选择为 1 ： 10。当有机相和水相的比例为 1 ： 10 时，药脂比的比值越小则粒径越大，因此药脂比选择为 1 ： 10。

2.3　优化处方的评价

“**2.2**”项下的优化处方中，HSPC、DPPG、mPEG2000-DSPE 和 Chol 的物质的量比例为 46.5 ： 10 ： 38.5 ： 5，乙醇相和水相比 1 ： 10，药脂比 1 ： 10。照此处方制备 3 批脂质体，测得某粒径分别为（60.28±3.62）、（62.04±2.37）和（61.85±2.77）nm，PDI 分别为 0.214±0.006、0.235±0.021 和 0.241±0.019。

精密量取上述优化载药阴离子脂质体溶液 2 mL，置截留分子量为 3 500 的超滤管中，离心（4 193×g）30 min。收集上清液，加入正己烷 1 mL 充分萃取；收集萃取液，再加入正己烷 1 mL 充分萃取。合并 2 次萃取液，用流动相稀释后按文献[8]方法［色谱条件：色谱柱 Waters Symmetry C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相 乙腈和水（体积比 85 ： 15）；检测波长 205 nm；流速 1 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。］进样测定，测得的脂质体中 **1** 含量为 m_{load}，**1** 的投料量为 m_{total}，2 mL 脂质体的质量为 m_{NP}。照下式计算脂质体的包封率（EE）和载药量（DL）。重复测量 3 次，计算得优化载药阴离子脂质体的包封效率为（85.17±1.53）%，载药量（26.21±1.98）%。

$$EE=m_{load}/m_{total}\times 100\%$$

$$DL=m_{load}/m_{NP}\times 100\%$$

2.4　脂质体的稳定性考察

取一定量的载药阴离子脂质体，溶于去离子水 1 mL 中，分装至 5 个 1.5 mL 聚丙烯离心管中，于 4 ℃保存，分别在 0、1、2 和 4 d 时取样测定其粒径和 PDI，结果如图 1 所示。同时，观察该溶液的外观变化，如是否产生沉淀等。

结果表明，载药阴离子脂质体在 4 ℃的贮存稳定性较好，粒径和 PDI 的变化均较小，溶液外观澄清、透明，说明该脂质体在 4 ℃下贮存稳定性良好。

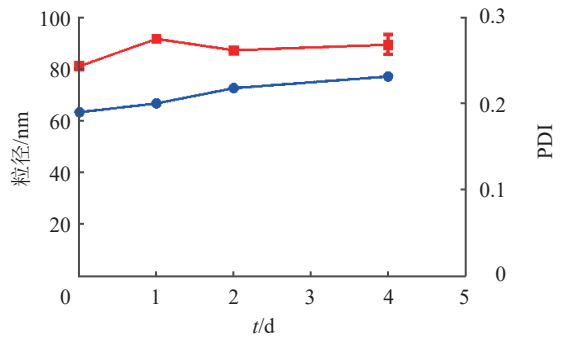
2.5　脂质体血清稳定性测定

照“**2.1**”项下方法以 HSPC 为脂质材料制备 **1**、HSPC、mPEG2000-DSPE 和 Chol 物质的量比例为 1 ： 56.5 ： 38.5 ： 5 的普

表 2　脂质体的处方筛选结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.2　Formulation Screening Results of the Liposomes（$\bar{x}\pm s$, n=3）

评价指标	V（无水乙醇）：V（水）			药脂比［n（**1**）：n（脂质体）］		
	1 ： 10	2 ： 10	3 ： 10	1 ： 10	1 ： 20	1 ： 30
粒径 /nm	60.62±3.87	71.88±5.98	85.39±4.45	58.76±3.62	76.73±3.17	83.42±2.13
PDI	0.259±0.015	0.174±0.023	0.265±0.012	0.253±0.012	0.295±0.017	0.242±0.033

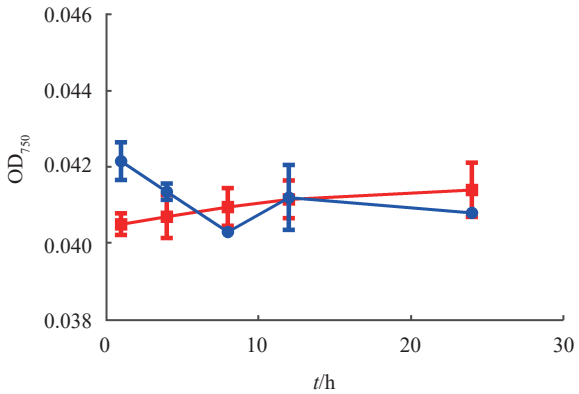


●—粒径；■—PDI。

图 1 载药阴离子脂质体的稳定性（*n*=3）

Fig.1 Stability of the Drug-loading Anionic Liposomes (*n*=3)

通脂质体。另取优化的载药阴离子脂质体[*n*(**1**)∶*n*(HSPC)∶*n*(DPPG)∶*n*(mPEG2000-DSPE)∶*n*(Chol)=1∶46.5∶10∶38.5∶5]。2种脂质体分别在55 ℃条件下旋转蒸发30 min除去有机溶剂，补加适量PBS(0.01 mmol/L，pH 7.40，下同)至原体积，得质量浓度为1 mg/mL的脂质体复溶液。取上述2种脂质体复溶液各0.3 mL，分别加至50%的胎牛血清(fetal bovine serum，FBS)溶液1.2 mL中，混合后在恒温振荡器(100 r/min，37 ℃)上孵育24 h。在各时间点分别取混合溶液0.1 mL于96孔板中，用酶标仪测定其在750 nm处的吸光度值(OD_{750})，考察2种脂质体复溶液在模拟血清中的稳定性[9]。每个样品设置2个复孔。检测结果如图2所示。



●—普通脂质体；■—阴离子脂质体。

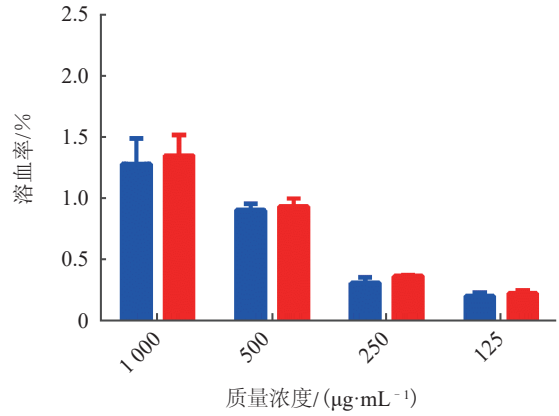
图 2 脂质体在50% FBS溶液中的稳定性（*n*=3）

Fig.2 Stability of the Liposomes in 50% FBS Solution (*n*=3)

由图2可见，2种脂质体在血清中的稳定性均良好。有研究[8]表明，DPPG含量为(30%)的脂质体体外毒性较高，而在含量为10%时，本品的血清稳定性较好，有利于提高动物的存活率。因此，载药阴离子脂质体中DPPG含量宜选作10%。

2.6 脂质体血液相容性试验

取“**2.5**”项下2种脂质体溶液各0.1、0.08、0.06、0.04 mL，分别与0、0.02、0.04、0.06 mL的PBS(0.01 mmol/L，pH 7.40)混合，再分别加入2% C57小鼠的红细胞(red blood cell，RBC)悬液0.1 mL，37 ℃孵育1 h，离心(377×*g*)10 min。取上清液100 μL于96孔板中，在540 nm波长处测定样品吸光度($OD_{样品}$)。另外，分别以PBS和1% Triton X-100溶液作为阴性和阳性对照组，同上进行溶血试验，测定阴性和阳性对照的吸光度(即$OD_{阴性}$和$OD_{阳性}$)。每个浓度制备3个复孔。计算溶血率，结果如图3所示。



■—普通脂质体；■—阴离子脂质体。

图 3 脂质体的血液相容性（*n*=3）

Fig.3 Blood Compatibility of the Liposomes (*n*=3)

如图3所示，2种脂质体的溶血率均较低，即使质量浓度为1 000 μg/mL，溶血率也均在2%以下。根据美国材料与试验协会(American Society of Testing Materials，ASTM)的E2524-08标准[10]，合成的纳米载体在血液中长循环时处于相对安全的状态，且随着浓度的降低，溶血率逐渐降低。脂质体的结构与细胞膜相似，血液相容性好。本试验结果与上述结论相符。

2.7　脂质体体外释放度考察

采用透析法考察 **1** 原料药、普通脂质体和阴离子脂质体溶液在释放介质（PBS）中的释放情况。

1 原料药溶液：精密称取 **1** 原料药 1 mg，加入释放介质 1 mL，超声使其充分溶解。

分别将上述 **1** 原料药溶液和 2 种载药脂质体溶液（均约含 **1** 1 mg）加至含 PBS 的透析袋（截留分子量 8 000 ～ 14 000）中，并使透析袋中 PBS 的终体积为 2 mL。透析袋两端用细线扎紧，置 PBS（30 mL）中，在 100 r/min、37 ℃条件下进行体外释放试验。分别于 0.5、1、2、4、8、12、24 和 48 h 时吸取释放介质 1 mL（同时补充同温、等量的空白释放介质），用正己烷萃取（1 mL×2），萃取液合并后经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，滤液采用 HPLC 法进样分析，计算药物的累积释放率。结果如图 4 所示。

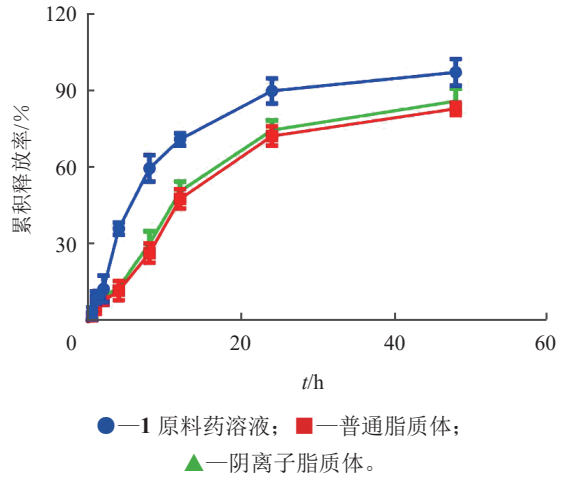


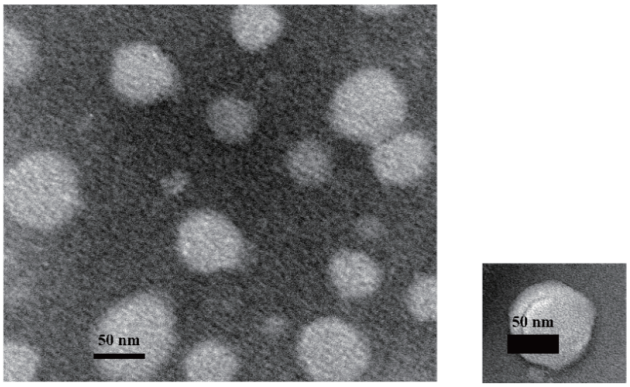
图 4　不同样品的累积释放曲线（*n*=3）

Fig.4　Cumulative Release Curves of Different Samples（*n*=3）

结果表明，**1** 原料药在 24 h 内累积释放率达到 82%左右，前 8 h 时累积释放率接近 60%；普通脂质体和阴离子脂质体的体外释放行为相似，表现出一定的缓释性，2 种脂质体前 12 h 内的累积释放率约为 50%，48 h 累积释放率约为 80%，呈现出缓慢释放的现象，表明脂质体作为纳米载体具有一定的缓释效应。

2.8　脂质体的微观形态观察

取适当稀释的阴离子脂质体溶液，滴在火棉胶作为支持膜的铜网上，滴加 2%磷钨酸溶液复染 3 min 后取出，自然晾干，在透射电镜下观察其微观形态与结构，结果如图 5 所示。



A—整体图；B—局部放大图。

图 5　脂质体的透射电镜图（×400）

Fig.5　TEM Images of the Liposomes（×400）

由图 5 可见，阴离子脂质体的微观形态较为均一，大多分布在 60 ～ 70 nm；由放大图可清晰见到脂质体磷脂双分子层的特征结构。

2.9　药效学考察

2.9.1　C57 小鼠胆固醇沉着症模型的建立

60 只 C57 小鼠适应性喂养 1 周后，随机分为 6 组，即正常组、模型组、PBS 组、**1** 原料药组、普通脂质体组、阴离子脂质体组，每组 10 只。正常组继续喂饲正常饲料，其余 5 组均采用含 1% 胆固醇、0.5% 胆酸和 15% 脂肪的致石饲料造模。3 周以后，随机解剖 1 只正常组小鼠、1 只模型组小鼠，取出完整胆囊。正常组胆囊和模型组小鼠胆囊体积如图 6 所示，正常组小鼠胆囊体积较小，胆汁呈淡黄色，澄清、透亮；模型组小鼠胆囊体积较大，胆汁淤积，呈黄绿色，内有颗粒状胆固醇结石。上述结果表明，C57 小鼠在饲喂致石饲料 3 周后成功形成胆固醇沉着症模型。

2.9.2　脂质体对胆囊体积的影响

给药组小鼠分别给予 2 种脂质体溶液 0.2 mL，模型组小鼠和 PBS 组小鼠分别给予相同体积的 PBS 溶液；**1** 原料药组给予等量的 **1** 原料药溶液。各组隔天给药 1 次，共 5 次。给药结束后，照 0.01 mL/g 的剂量腹腔注射 4%水合氯醛麻醉小鼠，仰卧位固



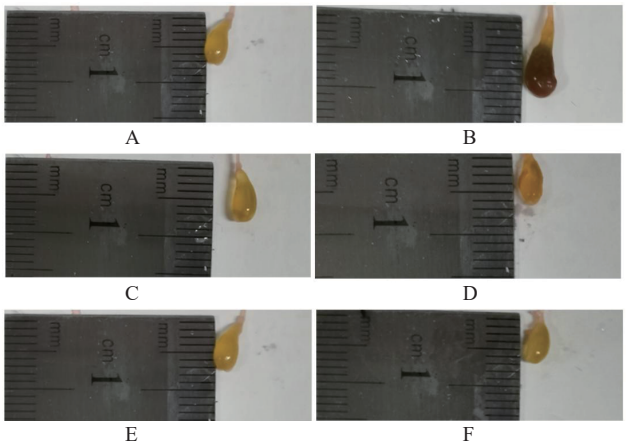
A B

A—正常组；B—模型组。

图 6 C57 小鼠胆囊炎模型的建立

Fig.6 Establishment of C57 Mouse Model of Cholecystosis

定于手术台上。在同一时间将 6 组小鼠处死后进行解剖，结扎胆总管，将胆囊完整取下，观察胆囊体积的变化情况。各组小鼠的胆囊体积如图 7 所示。



A B C D E F

A—正常组；B—模型组；C—PBS 组；D—**1** 原料药组；E—普通脂质体组；F—阴离子脂质体组。

图 7 各组 C57 小鼠的胆囊体积

Fig.7 Gallbladder Volume of C57 Mouse in Each Group

由图 7 可见，模型组小鼠的胆囊组织较正常组体积增大，胆汁呈墨绿色，里面有肉眼可见的胆固醇结石；PBS 组小鼠胆囊中的胆汁里面仍有肉眼可见的胆固醇结石；**1** 原料药对胆囊体积的影响较小，胆汁呈深黄色浑浊样，有少许胆固醇结石；普通脂质体能改善胆囊肿大的情况，胆汁呈黄色澄清样，胆固醇结石基本消失；阴离子脂质体能显著改善胆囊的肿大情况，胆汁呈澄清、透明的淡黄色，胆固醇结石完全消失。上述结果说明载 **1** 的 DPPG 阴离子脂质体对胆固醇有较好的溶解效果。

2.9.3 脂质体对肝脏、胆囊病理组织学的影响

取“**2.9.2**”项下各组小鼠的肝脏和胆囊，进行 HE 染色，并观察各组小鼠肝脏和胆囊切片的病理组织学变化。结果如图 8 所示。正常组小鼠胆囊和肝脏组织正常，未见肿大，显微镜下观察未见病理学改变。胆石症小鼠通常伴有慢性炎症病变，而模型组小鼠胆囊以及肝脏组织明显肿大，显微镜下观察可见典型的炎症病理改变，如黏膜水肿、渗血、炎性细胞浸润、组织疏松等。胆石症小鼠经阴离子脂质体治疗后，胆囊和肝脏组织的淋巴细胞、浆细胞浸润不明显，水肿减轻，表明阴离子脂质体对致石饲料致胆石症模型小鼠有较好的治疗作用。

3 讨论

不同磷脂的性能各不相同，对脂质体的性能也会产生不同的影响。例如：磷脂的相变温度决定了脂质体膜的流动性，进而影响脂质体的稳定性；阳离子脂质可作为带负电荷的基因药物的载体；有些磷脂具有 pH 敏感性，能响应 pH 值的变化而发生相转变。本研究采用的脂质材料 DPPG 能与胆囊上皮细胞上的清道夫Ⅰ类 B 型受体特异性结合，发挥靶向递药的作用[11]。由相同材料制备的脂质体，组分比例的不同也可以影响脂质体的性能。例如，脂质体中胆固醇的含量可影响脂质体的形成和稳定性；亲水性高分子聚合物的比例可影响脂质体的包封率和表面电势等。本研究中，阴离子脂质体中的 DPPG 含量对脂质体的粒径和 PDI 也有一定影响。

药效研究中，动物造模采用了自制的高脂饲料，一是因为固体高脂饲料易保存，喂食方便；二是动物自愿摄入，可避免对动物造成惊吓等精神刺激[12]。与林可霉素诱导豚鼠胆囊炎的方法相比，本法的造模周期相对较长，但动物存活率较高。然而，因为小鼠的胆囊体积较小，呈现出的胆结石和胆汁体积变化较为模糊。

本研究成功构建了载 **1** 的 DPPG 阴离子脂质体，所得制品的稳定性较好、溶血率较低，具有一定的

溶石、抗炎作用。后续将深入研究其在细胞和动物层面的胆囊靶向作用，以期为胆固醇沉着症患者的治疗提供新的思路和策略，并推动中成药产品的二次开发和再利用。

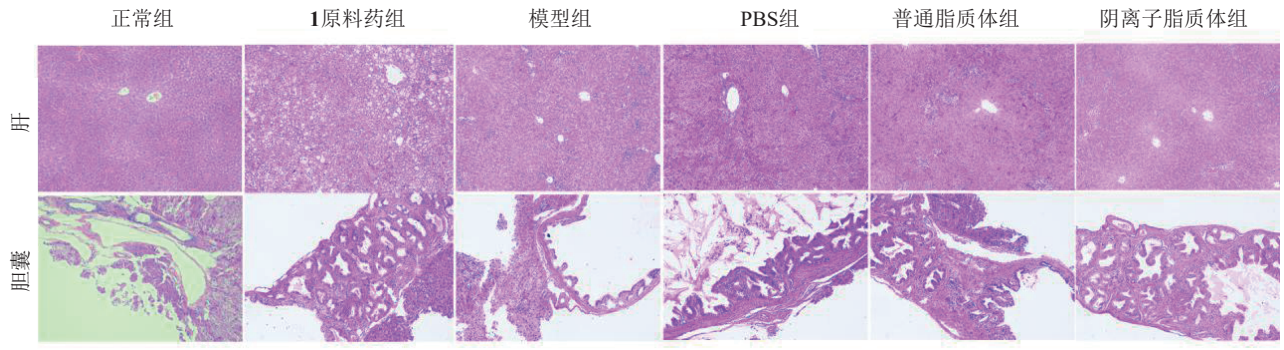


图 8　各组 C57 小鼠肝和胆囊组织的病理切片

Fig.8　Histopathological Sections of Liver and Gallbladder of C57 Mice in Each Group

参考文献：

[1] FOLEY K G, LAHAYE M J, THOENI R F, *et al*. Management and follow-up of gallbladder polyps: updated joint guidelines between the ESGAR, EAES, EFISDS and ESGE [J]. *Eur Radiol*, 2022, **32**(5): 3358-3368.

[2] NSINGWANE Z, NAICKER P, OMOSHORO-JONES J, *et al*. Inhibition of the complement pathway induces cellular proliferation and migration in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *J Biol Reg Homeos Ag*, 2024, **38**(2): 1181-1192.

[3] BICAS J L, FONTANILLE P, PASTORE G M, *et al*. A bioprocess for the production of high concentrations of *R*-(+)-α-terpineol from *R*-(+)-limonene [J]. *Process Biochem*, 2010, **45**(4): 481-486.

[4] MARZBAN E, ALAVIZADEH S H, GHIADI M, *et al*. Optimizing the therapeutic efficacy of cisplatin PEGylated liposomes via incorporation of different DPPG ratios: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, **136**: 885-891.

[5] DANAEI M, DEHGHANKHOLD M, ATAEI S, *et al*. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems [J]. *Pharmaceutics*, 2018, **10**(2): 57-74.

[6] GENTINE P, BOUREL-BONNET L, FRISCH B. Modified and derived ethanol injection toward liposomes: development of the process [J]. *J Liposome Res*, 2013, **23**(1): 11-19.

[7] MARTIN M S, KLEINHENZ M D, VISCARDI A V, *et al*. Comparison of lidocaine alone or in combination with a local nerve block of ethanol, bupivacaine liposome suspension, or oral meloxicam to extend analgesia after scoop dehorning in Holstein calves [J]. *JDS Commun*, 2022, **3**(3): 189-194.

[8] ZOU Y, ZHOU Z, YIN S, *et al*. Targeting of gallbladder megalin receptors with DHA-conjugated limonene albumin nanoparticles [J]. *Nanoscale*, 2022, **14**(16): 6052-6065.

[9] DING J, FENG M, WANG F, *et al*. Targeting effect of PEGylated liposomes modified with the Arg-Gly-Asp sequence on gastric cancer [J]. *Oncol Rep*, 2015, **34**(4): 1825-1834.

[10] GUO Z, ZHENG K, TAN Z, *et al*. Overcoming drug resistance with functional mesoporous titanium dioxide nanoparticles combining targeting, drug delivery and photodynamic therapy [J]. *J Mater Chem B*, 2018, **6**(46): 7750-7759.

[11] MOJARAD-JABALI S, MAHDINLOO S, FARSHBAF M, *et al*. Transferrin receptor-mediated liposomal drug delivery: recent trends in targeted therapy of cancer [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2022, **19**(6): 685-705.

[12] BODARSKI R, KINAL S, ORDA J, *et al*. Fat supplementation of high-yielding dairy cows' rations: the effect on feed intake as well as fat and protein concentration in milk [J]. *Med Weter*, 2013, **69**(4): 231-234.