

雷公藤红素脂质体的制备及其对 U87 MG 肿瘤细胞增殖的抑制作用

杨钦磊^{1,2}, 韩秋惠¹, 王秀敏^{2*}

(1. 厦门大学附属福州市第二医院药剂科, 福建 福州 350000; 2. 厦门大学药学院, 福建 厦门 361102)

摘要: 建立雷公藤红素的高效液相色谱分析方法, 采用薄膜分散法制备雷公藤红素脂质体, 并通过正交实验优化处方, 对雷公藤红素脂质体的粒径、Zeta 电位、形态、体外释放度和体外对 U87 MG 肿瘤细胞增殖的抑制作用进行考察。结果显示雷公藤红素脂质体的体外分析方法简单可行, 制备雷公藤红素脂质体最佳处方为: 药脂质量比 1:40, 磷脂与胆固醇质量比 6:1, 水化介质为 10% (质量分数) 海藻糖溶液。最优处方制备的脂质体的粒径约 160 nm, Zeta 电位为 -35 mV, 包封率达到 80% 以上。体外释放实验表明雷公藤红素脂质体具有缓释作用, 且雷公藤红素脂质体抑制 U87 MG 细胞增殖的作用强于雷公藤红素溶液, 半抑制浓度 (IC_{50}) 为 7.93 $\mu\text{mol/L}$ 。综上, 制备雷公藤红素脂质体的方法稳定可行, 脂质体理化性质良好并具有良好的抑制 U87 MG 肿瘤细胞增殖作用。

关键词: 雷公藤红素; 脂质体; 薄膜分散法; 抑制增殖

中图分类号: R 94

文献标志码: A

脑胶质瘤是最常见的脑瘤, 约占颅内常见的原发性恶性肿瘤的 40%^[1]。手术切除是治疗脑胶质瘤的主要手段, 但手术无法彻底切除, 单纯手术治疗 5 年生存率小于 25%, 治愈率低^[2]。除手术切除外, 临床上急需有效的抗胶质瘤化疗药物^[3]。但是由于血脑屏障的存在, 它不仅能够维持脑内部环境相对稳定^[4], 还使许多药物很难通过血脑屏障作用与脑肿瘤细胞, 一定程度上降低了药物的生物利用度。脂质体作为临床常用的靶向药物传递系统, 具有靶向性、脂溶性、副作用低等优势^[5-6], 常用脂质体装载抗肿瘤药物^[7], 使其能够利用脂质体的磷脂双分子层, 通过血脑屏障作用于脑胶质瘤细胞, 提高抗肿瘤药物的生物利用度。

雷公藤红素 (celastrol) 是雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook.f.) 植物中提取物的有代

收稿日期: 2019-04-02 录用日期: 2019-11-05

基金项目: 福建省科技计划项目 (2011Y0051); 中央高校基本科研业务费 (2011121057)

*通信作者: wangxm@xmu.edu.cn

表意义的五环三萜醌类化合物，为雷公藤抗肿瘤主要有效成分之一^[8]。近年来报道其具有较强的抗脑胶质瘤增殖作用，体外较低剂量的雷公藤红素即可抑制脑胶质瘤细胞增殖（如脑胶质瘤 SHG44 细胞、C6 细胞、U251 细胞和 U87 MG 细胞）^[9-10]，免疫组化法表明雷公藤红素主要通过促使胶质瘤细胞 Bax 表达增加，Bcl-2 表达下降从而促进细胞凋亡^[11]。

雷公藤红素为水难溶性物质，体外释放度小^[12]，渗透性差，且毒性较大，口服吸收极差，且易产生全身性的不良反应^[13]。因此，本研究选择以脂质体为载体，制备雷公藤红素脂质体，旨在提高药物溶解性，促进药物吸收，降低药物毒性，达到缓慢释放和良好的生物相容性；并对制备的雷公藤红素脂质体进行理化性质评价及体外抑制 U87 MG 细胞增殖作用研究，为进一步研究雷公藤红素及其制剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

雷公藤红素（厦门大学药学院邱彦老师赠送，纯度 99%）；大豆卵磷脂（分析纯，上海太伟药业股份有限公司）；胆固醇（分析纯，国药集团上海化学试剂有限公司）；海藻糖（二水，高纯度，南宁中诺生物工程有限责任公司）；甲醇（色谱纯，TEDIA 公司）；胎牛血清（杭州四季青生物工程材料有限公司）；四甲基偶氮唑盐（MTT，SunShine 公司）；DMEM 培养基（美国 Thermo scientific 公司）；胰蛋白酶溶液（美国 Gibco 公司）；二甲基亚砜（DMSO，南京化学试剂有限公司）；2%（质量分数）磷钨酸（上海君瑞生物科技有限公司水为重蒸水）；其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

电子天平（德国赛多利斯）；酶标仪（MK3，Thermo Fisher 公司）；恒温培养箱（FORANT），液相色谱仪（LC-20AD，日本岛津公司）；马尔文纳米粒度及电位分析仪（Zetasizer Nano ZS，英国马尔文仪器公司）；透射电镜（JEM-1200HC，日本 JEOL 公司）；超声波细胞粉碎机（SCIENTZ-II D，宁波新芝生物科技股份有限公司）；挤出仪（加拿大 Northern Lipids 公司）；旋转蒸发仪（N-1001，德国 EYELA 公司）。

1.3 细胞系

人脑星形胶质母细胞瘤细胞（U87 MG 细胞，中科院上海细胞库）

1.4 雷公藤红素体外分析方法的建立

1.4.1 液相色谱条件

精密称取雷公藤红素适量，加入甲醇溶解并定容到 50 mL 的容量瓶中，以甲醇为空白对照，于 200~600 nm 波长内扫描，结果显示在 425 nm 出现最大吸收峰，故选 425 nm 为检测波长。色谱柱为 C18 柱（250 mm×4.6 mm, 5 μm），流动相为甲醇-水（10 mL/L 醋酸溶液）（体积比 87:13）；流速 1.0 mL/min，进样量 20 μL，柱温为室温。分别取空白脂质体、雷公藤红素脂质体和雷公藤红素甲醇溶液各 20 μL 注入液相色谱仪，记录色谱图。

1.4.2 标准曲线绘制

精密称取雷公藤红素标准品 10 mg（实际称量值 0.010 13 g），置于 50 mL 容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 0.2 mg/mL 的雷公藤红素标准品贮备液。再依次稀释为 100, 50, 20, 10, 5, 1, 0.5 μg/mL，每个浓度分别进样 3 次，各进样 20 μL，依次测定峰面积，以峰面积 Y 对质量浓度 X 进行线性回归。

1.4.3 精密度和相对回收率计算

量取雷公藤红素标准品贮备液，配制成低、中、高 3 个浓度（0.5, 10, 100 μg/mL）的溶液，在一天内重复进样 5 次，计算日内精密度；连续 5 d 进样，每天 1 次，计算日间精密度。将测得的浓度与实际的浓度比较得到相对回收率。

1.4.4 重复性实验

取雷公藤红素对照品贮备液，分别精密配制成 0.5, 50, 100 μg/mL 各 3 份（低、中、高 3 种浓度），重复进样 5 次，每次 20 μL，计算峰面积的 RSD。

1.4.5 稳定性试验

取雷公藤红素对照品贮备液，分别精密配制成 0.5, 50, 100 μg/mL 各 3 份（低、中、高 3 种浓度），每份 10 mL，于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 测定峰面积，并计算峰面积的 RSD。

另取雷公藤红素对照品溶液各 3 份，分别精密配制成 0.5, 50, 100 μg/mL 各 3 份（低、中、高 3 种浓度），每份 10 mL，一份在 4℃ 冰箱下存放 3 d，1 份于室温保存 10 h，一份在 -20℃ 冰箱下存放 20 d。考察样品的稳定性。

1.4.6 检测限和定量限

在选定的色谱条件下，将雷公藤红素溶液稀释成不同浓度进行高效液相色谱（HPLC）分析，以信号噪音比（S/N）为指标，测量其检测限和定量限。

1.5 脂质体的制备及包封率的测定

1.5.1 薄膜分散法制备雷公藤红素脂质体、空白脂质体

将处方量的磷脂 60 mg、胆固醇 10 mg 和雷公藤红素 1.5 mg 溶于 10 mL 甲醇/氯仿（体积比 1:4）的混合溶剂中，置于 250 mL 茄形瓶中，待溶解后，在 40 °C 水浴下于旋转蒸发仪（转速 100 r/min）上减压除去有机溶剂，制备磷脂膜，于 -20 °C 冻存 24 h 后取出放置至室温，加入适量玻璃珠于具膜茄形瓶中，并置于 40 °C 水浴下预热，然后加入预热水化介质 10 mL，于旋转蒸发仪（转速 100 r/min）上水化 30 min，然后将超声细胞粉碎仪探头置于冰浴的脂质体混悬液中，超声 2 s，间隙 3 s，共作用 180 s，功率 100 W，然后将粉碎后的脂质体混悬液通过挤出仪，依次经过 0.45 μm 和 0.22 μm 的微孔滤膜挤出，使脂质体粒径匀化，即得雷公藤红素脂质体。同法制备不含雷公藤红素的空白脂质体。

1.5.2 包封率的测定

取 100 μL 雷公藤红素脂质体，用色谱甲醇破乳，并定容于 5 mL 容量瓶中，涡旋混匀后，10 000 r/min 离心 5 min，取上清液 20 μL 进样。HPLC 测定药物总浓度（ C_0 ）；另取雷公藤红素脂质体溶液 100 μL 于葡聚糖凝胶柱（Sephadex G50），用磷酸盐缓冲液（PBS）洗脱，收集脂质体部分，冻干浓缩，并用甲醇定容于 5 mL 容量瓶中，涡旋混匀后，10000 r/min 离心 5 min，取上清液 20 μL 进样，测定浓度 C_1 ，根据公式 $R_{EE}=C_1/C_0\times 100\%$ 计算包封率 R_{EE} 。

1.6 处方筛选与优化

1.6.1 单因素考察

薄膜分散法是传统的脂质体制备方法，方法简单，且常用于脂溶性药物的制备^[14]，雷公藤红素难溶于水^[12]，因此选择薄膜分散法制备雷公藤红素脂质体，制备脂质体时影响雷公藤红素脂质体形成的因素有磷脂的种类、水化介质的种类、磷脂的浓度、药脂质量比（雷公藤红素：磷脂）、磷脂与胆固醇质量比等，采用单因素实验的方法，以脂质体的包封率为指标，进行处方优化。

1) 磷脂种类

精密称取处方量的胆固醇 10 mg 和雷公藤红素 1.5 mg，然后再分别称取 60 mg 大豆卵磷脂、氢化大豆磷脂、蛋黄卵磷脂为膜材，以 10%（质量分数）海藻糖 10 mL 为水化介质，其他条件不变按照 1.5.1 小节的方法制备脂质体。以不同磷脂制备脂质体的性状和冷藏放置的稳定性作为考察指标。

2) 水化介质的选择

精密称取处方量的磷脂 60 mg、胆固醇 10 mg 和雷公藤红素 1.5 mg，固定其他条件，水化时分别选择 PBS（pH 7.4）、生理盐水、10% 海藻糖、5%（质量分数）葡萄糖、9%（质

量分数)蔗糖 10 mL, 按照 1.5.1 小节的方法制备脂质体, 并考察不同水化介质下脂质体的性状及冷藏放置下的稳定性。

3) 磷脂含量

分别称取处方量的磷脂 20、40、60、80 mg, 按照药脂质量比为 1: 40, 磷脂与胆固醇质量比为 6: 1 称取处方量的胆固醇和雷公藤红素, 水化介质为 10%海藻糖溶液 10 mL, 按照按照 1.5.1 小节的方法制备脂质体, 检测脂质体制备过程磷脂溶解情况和制备的脂质体性状、包封率。

4) 药脂质量比

分别称取处方量的磷脂 60 mg, 胆固醇 10 mg, 按照药脂比(质量比)为 1:5、1:10、1:20、1:30、1:40 称取雷公藤红素, 水化介质为 10%海藻糖溶液 10mL。其他条件不变, 按照 1.5.1 小节的方法制备脂质体, 检测不同药脂比下脂质体的粒径和包封率。

5) 磷脂与胆固醇质量比

分别称取处方量的磷脂 60 mg, 雷公藤红素 1.5 mg, 按照磷脂与胆固醇比为 3:1、4:1、6:1、8:1 称取胆固醇, 水化介质为 10%海藻糖溶液 10 mL, 其他条件不变, 按照 1.5.1 小节的方法制备脂质体, 检测制备的脂质体的粒径和包封率。

1.6.2 正交试验优化

依据单因素考察试验, 对磷脂, 药脂比, 磷脂胆固醇比, 水化介质的选择都有了一定的范围, 然后为了优化处方, 我们利用正交试验法考察磷脂与胆固醇的比(A)、药脂比(B)、水化介质(C)三因素三水平对雷公藤红素脂质体包封率的影响, 按照 1.5.1 小节处方和方法制备 10 mL 脂质体, 并检测不同处方脂质体的包封率。因素和水平设计见表 1。

表 1 正交试验因素和水平

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal experiment			
水平	A	B	C
1	3: 1	1: 40	10%海藻糖
2	4: 1	1: 30	生理盐水
3	6: 1	1: 20	PBS (pH=7.4)

1.7 最优处方制备雷公藤红素脂质体及雷公藤红素溶液

1.7.1 雷公藤红素脂质体制备

根据正交试验优化得到的最佳处方按照 1.5.1 小节的方法制备 3 批雷公藤红素脂质体,用于最佳处方的验证、后续脂质体理化性质的考察和抑制 U87 MG 肿瘤细胞增殖作用的研究。

1.7.2 雷公藤红素溶液制备

精密称取雷公藤红素 7.2 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 先加适量二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 然后加 10% 海藻糖溶液, 定容至刻度, 配制成 320 $\mu\text{mol/L}$ 的母液。吸取母液分别配制成浓度为 1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{mol/L}$ 的雷公藤红素溶液。

1.8 脂质体理化性质考察

1.8.1 粒径及 Zeta 电位测定

吸取一定量脂质体用蒸馏水稀释到一定倍数, 采用马尔文激光粒度电位分析仪测定雷公藤红素脂质体、空白脂质体的平均粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI) 和 Zeta 电位。

1.8.2 形态观察

采用负染法^[15]制备样品: 将脂质体稀释 10 倍, 取稀释液 1 mL, 加两滴 0.02% (体积分数) 甘油, 涡旋混匀。用移液枪加一滴脂质体混悬液于支撑网的铜网, 停留 2~3 min, 用 2% 磷钨酸染色 2~3 min, 滤纸吸走多余液体, 自然干燥。样品置透射电镜下观察。

1.8.3 脂质体稳定性实验

将制备好的雷公藤红素脂质体置于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 和 20 d 后, 分别测定脂质体的粒径和药物包封率, 考察在这一段时间内的稳定性。

1.9 雷公藤红素脂质体的体外释放评估

精密吸取雷公藤红素含量相同的雷公藤红素脂质体、雷公藤红素溶液, 置透析袋中, 以乙醇质量分数为 20% 的 PBS (pH=7.4) 为透析介质, 释放介质体积为 100 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 r/min 低速搅拌, 重复 3 次。每隔一定时间取出一定量的透析介质, 并补充相应的新鲜介质, 继续操作, 取出的介质用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液在氮气下吹干, 用甲醇复溶, 离心取上清液进高效液相, 计算释放量评估不同剂型的体外释放效果。

1.10 抑制 U87 MG 细胞增殖作用检测

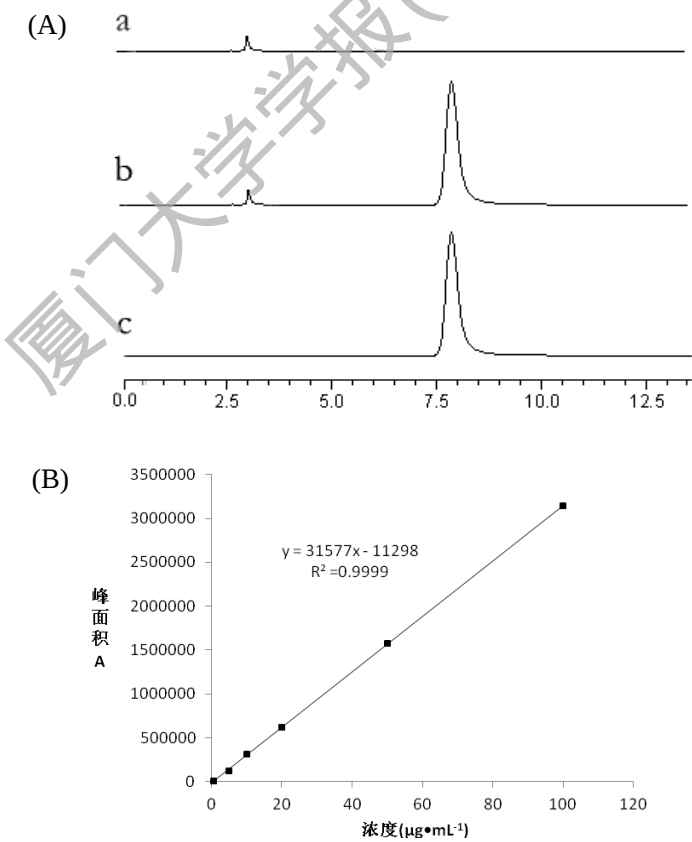
MTT 法^[16]考察雷公藤红素对细胞增殖作用。取对数期 U87 MG 细胞, 胰酶消化后调整细胞悬液浓度, 细胞计数后用 DMEM 培养基 (含胎牛血清 10%) 调整细胞浓度为 $10^4/\text{mL}$, 接种于 96 孔板, 每孔加入 200 μL , 于 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育下 12 h 后, 分别加入含有一系列浓度的雷公藤红素脂质体或雷公藤红素溶液的培养基 (雷公藤红素脂质体和雷公藤红素以培

培养基稀释成浓度为 0, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{mol/L}$), 继续培养 24 h 后, 移除培养基, 每孔加入 20 μL 0.5% MTT 溶液, 避光培养 4 h, 终止培养, 小心吸去孔内培养液。每孔加入 100 μL DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪测量各孔 550 nm 处的吸光度值。同时设置调零孔(培养基、细胞、DMSO), 对照孔(培养基、细胞、MTT、DMSO)。细胞存活率= $(A_{\text{样品孔}}/A_{\text{对照孔}}) \times 100\%$ 。应用 SPSS 软件进行方差分析, $p < 0.05$ 时为显著差异, $p < 0.01$ 时为非常显著, 以时间为横坐标, 以吸光值为纵坐标绘制细胞生线, 计算半抑制浓度 (IC_{50}) 值。

2 结果与分析

2.1 雷公藤红素体外分析方法的建立

如图1(A)所示, 雷公藤红素脂质体与溶液均在保留时间7.855 min处显示雷红素的特征峰, 空白脂质体无此特征峰, 可见脂质体的辅料不会影响雷公藤红素的检测。图1(B)所示为标准曲线图, 回归方程 $Y = 31\,577X - 11\,298$ ($r = 0.999\,9$), 雷公藤红素在0.500~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系。



a. 空白脂质体; b. 雷公藤红素脂质体; c. 雷公藤红素溶液。

图 1 专属性分析的 HPLC 谱图 (A) 与标准曲线 (B)

Fig.1 HPLC chromatograms of specificity analysis (A) and standard curve (B)

表2所示日内、日间精密度均小于2%，且回收率都在95%～105%之间，RSD小于2%，表明该分析方法的精密度和回收率符合HPLC测定方法要求，该方法准确可行，可为雷公藤红素脂质体的含量检测提供方法学依据。

表 2 精密度、回收率测定结果

Tab. 2 Results of precision and recovery rate

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内精密度/%	日间精密度/%	回收率/%	RSD%
0.5	1.13	0.82	99.2±1.32	0.68
10	1.51	0.76	101.2±2.35	1.07
100	0.74	0.87	96.8±1.86	0.96

重复性实验峰面积的RSD为0.32%，稳定性试验的峰面积RSD小于3%，检测限和定量结果分别为50和150 ng，因此表明该分析方法的重复性和稳定性符合HPLC测定方法要求，该方法准确可行，可为雷公藤红素脂质体的含量检测提供方法学依据。

2.2 雷公藤红素脂质体处方的筛选与优化

2.2.1 单因素试验

1) 磷脂种类

氢化大豆磷脂、蛋黄磷脂所制备的脂质体平均粒径较大，放置极易沉降分层，振摇后亦沉降，而且包封率会偏低；而大豆卵磷脂制备的脂质体粒径相对较小，放置不易沉降，稳定性好；以蛋黄磷脂为膜材的脂质体颜色为淡黄色，而大豆磷脂为膜材的脂质体颜色为乳白色，外观较为良好；综上所述，实验中选用大豆卵磷脂作为膜材。

2) 水化介质

PBS (pH 7.4)、生理盐水、10% 海藻糖作为水化介质制备的脂质体粒径均比较均匀，在 4℃放置 3 d 均没有分层现象，而且制得脂质体包封率均达到 75%以上，其余介质制备的脂质体不仅粒径大而且还会容易聚沉分层，因此后续试验选择上述水化介质。

3) 磷脂含量

磷脂的浓度太高，制得的脂质体粘稠容易沉降、聚集，且磷脂在有机溶剂中溶解缓慢。

磷脂浓度太低，载药量就会降低。实验结果表明在一定浓度范围内，随着磷脂含量的增加，包封率升高，而且脂质体的稳定性良好，但是当磷脂用量 80 mg 时，磷脂在有机溶剂中溶解相对较慢，制备脂质体相对较粘稠，放置会有沉淀析出。因此，最终选择 60 mg 的磷脂含量进行其他因素的考察。

4) 药脂质量比

脂质体的包封率和稳定性与药脂比有直接关系，投药量过多，超出磷脂的承载能力，可能会破坏脂质体双层结构，降低包封率。本试验考察了药脂质量比为 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 范围内制备脂质体的包封率情况。在 1:5 时脂质体的包封率明显低于其余 3 组，且放置一段时间会观察到析出的雷公藤红素，因而药脂质量比 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 范围内，随着磷脂含量增加，包封率不断增加。

5) 磷脂与胆固醇质量比

脂质体的稳定性也与胆固醇得含量有关。胆固醇具有双向调节膜稳定性的作用，用量适中，能够改善内相渗漏的现象，降低渗漏率，用量过多容易渗漏，还会使脂质体粒径增大；用量太少脂质体流动性太差药物很难释放出来。因此，在实验中发现，随着胆固醇的增加，脂质体的包封率有所降低且胆固醇溶解时较费时。但磷脂与胆固醇质量比在 3:1, 4:1, 6:1, 8:1 时，包封率都很稳定，最终正交试验选用以上比例。

2.2.2 正交试验

以包封率为考察指标，进行正交实验，结果见表 3，由结果表明三个因素的主次关系是 $B>A>C$ ，确定最佳处方为 $B_1A_3C_1$ ，即药脂比为 1:40，磷脂与胆固醇之比为 6:1，水化介质为 10%海藻糖。

表 3 正交试验结果

Tab. 3 The results of orthogonal experiment

实验编号	A	B	C	$R_{EE}/\%$
1	1	1	1	82.81±1.13
2	1	2	2	70.08±0.89
3	1	3	3	59.04±1.21
4	2	1	2	86.00±0.83
5	2	2	3	67.60±1.35
6	2	3	1	61.80±1.52
7	3	1	3	87.52±0.50
8	3	2	1	84.75±1.46

9	3	3	2	64.68±1.72
k1	70.64	85.44	76.45	
k2	71.80	74.38	73.58	
k3	78.98	61.84	71.42	
r	8.34	23.6	5.03	

2.3 雷公藤红素脂质体的包封率

按照正交试验优化得到的处方，制备 3 个批次的雷公藤红素脂质体，测定得脂质体包封率分别为 81.41%，83.54%，84.29%，平均粒径为 83.08%。由此结果可知，正交试验得到的最佳处方制备的脂质体包封率均达到 80%以上，处方稳定可行。

2.4 雷公藤红素脂质体的理化性质

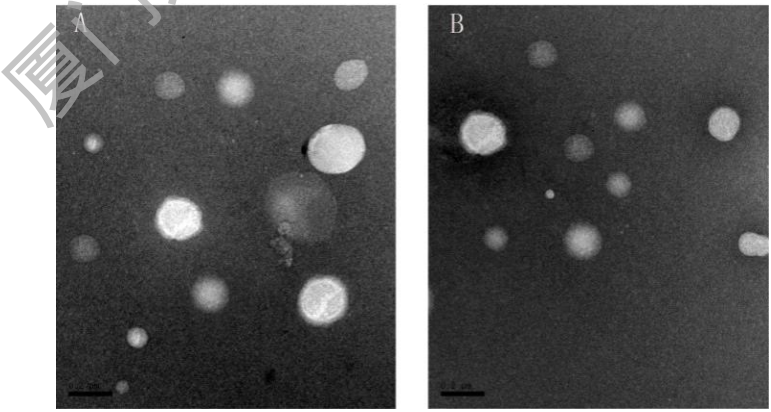
2.4.1 粒径及形态

由表 4 可知，两种类型脂质体的粒径在 160 nm 左右，由分散系数可以看出粒径分布比较均匀。由图 2 透射电镜检测结果也可以看出，包载雷公藤红素的脂质体与空白脂质体一样，都成规则的类球形，而且其粒径分布比较均匀，说明载药脂质体形态良好。

表 4 雷公藤红素脂质体的包封率、粒径和 Zeta 电位 (n=3)

Tab. 4 Entrapment efficiency, particle size and zeta potential of Celastrol-loaded liposome (n=3)

剂型	R _{EE} /%	平均粒径/nm	PdI	Zeta 电位/mV
空白脂质体		159.5±1.78	0.260±0.072	-30.96±0.26
雷公藤红素脂质体	83.08±1.26	163.7±2.20	0.302±0.046	-35.05±0.28



(A)空白脂质体；(B)雷公藤红素脂质体。

图 2 不同脂质体的透射电镜图

Fig.2 TEM image of different liposomal formulations

2.4.2 脂质体稳定性

如图 3 所示：在低温 2~8 °C 贮存的 20 d 内，脂质体的 的粒径基本维持在 160 nm 左右，没有发生明显 的变化，但脂质体的包封率随着贮存时间的延长略有下降，20 d 后包封率降低到 75%以下，说明在 20 d 内具有较好的稳定性。

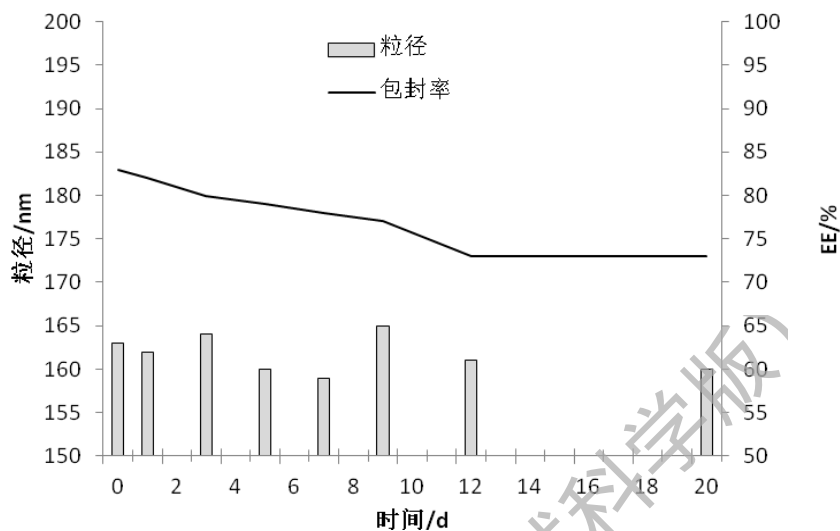


图 3 脂质体在低温下的稳定性

Fig.3 Stability of liposomes at low temperature

2.4.3 体外释放效果

雷公藤红素的体外释放曲线如图 4 所示。对于雷公藤红素溶液，在 12 h 内突释以后，雷公藤红素的释放达到 80%以上，24 小时后释放量达到了 90%。而雷公藤红素脂质体，在 12 h 内没有突释现象，72 h 内呈现零级释放，在 96 h 内，释放率达到 $(86.0\pm 2.1)\%$ ，表明雷公藤红素脂质体具有缓释作用。

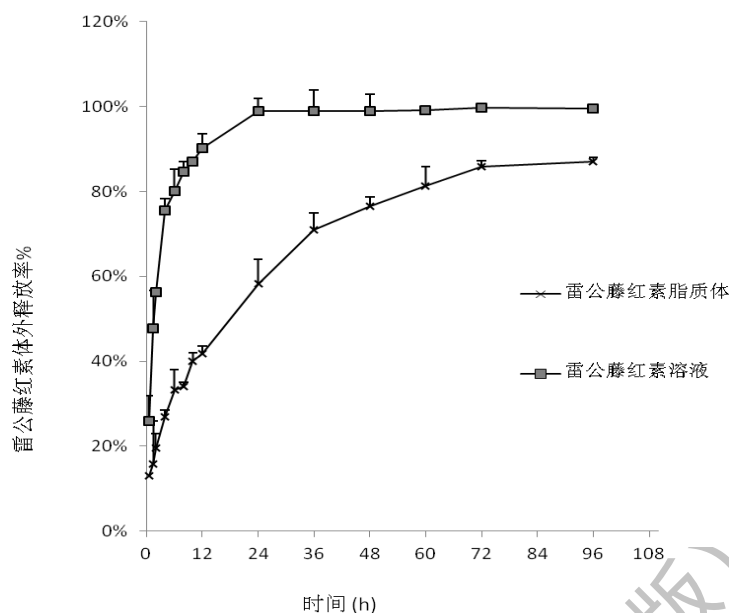


图 4 雷公藤红素的体外释放曲线 ($n=3$)

Fig.4 *In vitro* release curves of celastrol ($n=3$)

2.5 雷公藤红素脂质体抑制 U87 MG 肿瘤细胞增殖的作用

通过 MTT 试验评估雷公藤红素脂质体和雷公藤红素溶液抑制脑胶质瘤细胞 U87 MG 细胞的增殖作用。如图 5 所示,在一定浓度范围内,雷公藤红素脂质体抑制 U87 MG 细胞增殖作用强于雷公藤红素溶液。雷公藤红素溶液和雷公藤红素脂质体对 U87 MG 细胞的 IC_{50} 值分别为 15.86 和 7.93 $\mu\text{mol/L}$,雷公藤红素脂质体的 IC_{50} 值比雷公藤红素溶液的低了近 50%。表明雷公藤红素制成脂质体后有利于细胞的摄取和药物渗透进入细胞,进而提高了其对 U87 细胞的抑制作用。可能是脂质体的磷脂成分易与细胞膜相容的特性,更多的药物在脂质体的包裹下进入细胞内,达到更好的抑制细胞增殖作用。

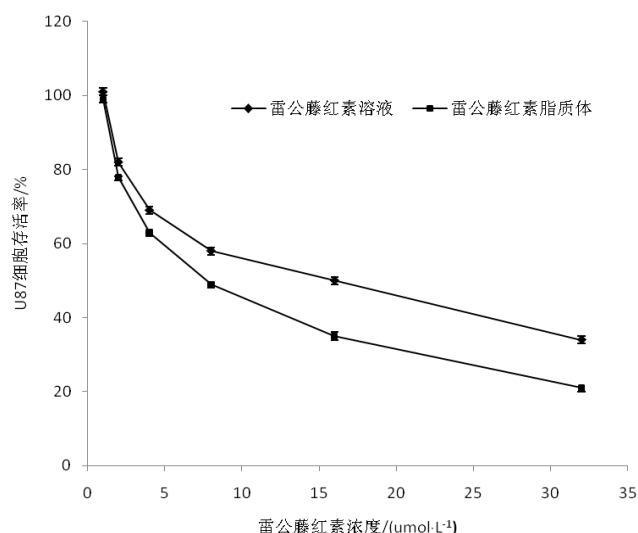


图 5 不同浓度的雷公藤红素脂质体和雷公藤红素溶液作用 24 h 后对 U87 MG 细胞的抑制性 ($n=3$)

Fig.5 *In vitro* inhibition of U87 MG cells proliferation by different concentrations of celastrol liposome and celastrol solution after 24 h treatment ($n=3$)

3 讨论与结论

本研究建立了雷公藤红素脂质体的体外 HPLC 分析方法,在线性范围内,结果准确,灵敏度高,方便快捷。脂质体作为一种新的载药系统提出也有 50 多年的历史,脂质体制备的传统方法主要是薄膜分散法,注入法,挤出法,逆向蒸发法等^[17],在雷公藤红素脂质体的制备过程中,制备方法的选择尤其重要。逆向蒸发法主要适用于水溶性药物,适于包裹水溶性药物大分子生物活性物质如抗生素、蛋白、核酸等,制备的脂质体内水腔较大,但残留大量的有机溶剂^[17];乙醇注入法简单快速,条件温和,但是脂质在乙醇中溶解度低限制了分散脂质的量,环境温度较低时膜材容易在注入的过程中析出,而且采用注入法制备的脂质体通常粒径较大,不适于静脉注射给药,由于使用有机溶剂,且除去有机溶剂的温度较高,不适用于对热敏感的药物^[18]。而薄膜分散法比较简单,适合小剂量制备,适用于脂溶性大的药物,雷公藤红素为难溶性药物^[19],脂溶性大,适用与本方法,但是该法同样也会用到有机溶剂,不过在制成薄膜时通过不断的旋转蒸发,残留的有机溶剂较逆向蒸发和注入法少,本实验采用的采用混合溶剂,不仅增大了膜材和药物的溶解度,而且挥发较快,虽然该法制备的脂质体粒度不均匀,可通过超声和加压挤出等手段,降低脂质体的粒度和层数^[12],综合以上因素,我们选择薄膜分散法制备雷公藤红素脂质体,提高其水溶性及生物利用度。

雷公藤红素是脂溶性药物,位于脂质体的磷脂双分子层中,不影响脂质体的形态及粒径,因此成规则类球形,而且粒径在 160 nm 左右,有研究^[20]报道,脂质体的粒径 100 nm 内具有高透膜性,100~200 nm 内有较高的透膜性。然而,本文制备的脂质体粒径 160 nm 左右,利于药物进入循环系统进而穿透细胞膜,更容易进入肿瘤细胞内,抑制肿瘤细胞的增殖。

有实验研究^[21]显示制备的雷公藤红素脂质体包封率为 71%,本实验制备的脂质体包封率在 80%以上,提高了药物的包封率。

在体外释放度试验中,由于雷公藤红素难溶于水,易溶于热乙醇,所以在透析介质中加入乙醇,有利于提高雷公藤红素的透析。脂质体包载上雷公藤红素后,不仅提高了雷公藤红素水溶性,而且还具有了一定的缓释效果,延长半衰期。有研究显示^[22],雷公藤红素对脑胶质瘤 U87MG 细胞具有抑制作用,24 h 的 IC_{50} 为 16.83 $\mu\text{mol/L}$,而本实验将雷公藤红素制成脂质体,对 U87MG 细胞 24 h 的 IC_{50} 仅为 7.93 $\mu\text{mol/L}$,明显低于雷公藤红素溶液,可见雷公藤红素制成脂质体后,水溶性增加,脂质体以其独有的磷脂双分子层和细胞膜的生物相容性,提高药物进入细胞的量,提高了生物利用度,进而提高了药物抑制 U87MG 肿瘤细胞的增殖作用。

综上,本研究制备了雷公藤红素脂质体,并建立了雷公藤红素体外分析方法;通过正交实验优化处方,最佳处方为:药脂质量比 1:40,磷脂与胆固醇质量比 6:1,水化介质为 10% 海藻糖。该制剂理化性质良好,具有一定缓释效果,且抑制 U87 MG 肿瘤细胞增殖作用显著。可见雷公藤红素脂质体具有缓释和增强抑制脑胶质瘤细胞增殖的作用,具有良好的临床应用前景。

参考文献:

- [1] GRIER J T, BATCHELOR T. Low-grade gliomas in adults[J]. *Oncologist*, 2006, 11: 681-693.
- [2] 顾科, 张军宁. 脑胶质瘤放疗研究进展[J]. *实用癌症杂志*, 2005, 20(6): 665-667.
- [3] GALANIS E, BUCKNER J. Chemotherapy for high-grade gliomas[J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(8):1371-1380.
- [4] LIEBNER S, DIJKHUIZEN R M, REISS Y, et al. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease[J]. *Acta Neuropathologica*, 2018, 135(3):311-336.
- [5] 张华明, 罗顺忠, 魏洪源. 纳米核药的研究进展[J]. *同位素*, 2018, 31(5):326-334.
- [6] 孙欣欣, 金楠. 脂质体研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2009, 38(12):20-21.
- [7] 郭宇, 翟美芳, 于莲. 脑胶质瘤靶向递药系统研究现状[J]. *广东化工*, 2018, 45(7):177-178.

- [8] GULLETT N P, RUHUL-AMIN A R, BAYRAKTAR S, et al. Cancer prevention with natural compounds[J]. *Int J Oncol*. 2010, 37: 20-26.
- [9] 边心超, 孟繁凯, 杨福伟, 等. 雷公藤红素对 C6 胶质瘤细胞凋亡及细胞周期阻滞的影响[J]. *中华神经外科杂志*, 2012, 28(3):291-294.
- [10] 马春阳, 万小平, 杨堃, 等. 雷公藤单体抑制结缔组织生长因子对脑胶质瘤细胞增殖的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(19):1952-1954.
- [11] 陈铭祥, 冯玉静, 王定勇, 等. 雷公藤红素的研究进展 [J]. *中成药*, 2010, 32(3): 473.
- [12] 张登海, 杨春欣, 秦万章, 等. 雷公藤红素研究, 20 年回顾 [C]//第四次全国雷公藤红素会议论文汇编. 上海: 中国中西医结合学会, 2004:1-5.
- [13] 夏玲红, 崔岚. 雷公藤红素的药理作用研究进展 [J]. *医药报*, 2009, 28(6): 730-732.
- [14] 盛竹君, 徐维平, 徐婷娟, 等. 脂质体药物传输系统的研究新进展[J]. *中国药业*, 2015, 24(23):6-9.
- [15] XIN H, JIANG X, GU J, et al. Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles as dual-targeting drug delivery system for brain glioma[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(18):4293-4305
- [16] 龙白, 张阳德, 张洋, 等. 槲皮素脂质体纳米粒对肝癌 HepG2 细胞生长的抑制作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2007(08):911-913.
- [17] 张斌, 谷克仁, 潘丽, 等. 脂质体的性质及制备方法的研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2015, 28(10):17-20.
- [18] 刘晓谦, 王锦玉, 仝燕, 等. 脂质体制备技术及其研究进展[J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(14):1084-1088.
- [19] 袁菱, 童德银. 雷公藤红素及其制剂的抗肿瘤研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(14):1224-1229.
- [20] DESAI M P, LABHASETWAR V, AMIDON G L, et al. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size [J]. *Pharm Res*, 1996, 13: 1838-1845.
- [21] 黄煜伦. 雷公藤红素纳米脂质体的制备及抗胶质瘤的实验研究[D]. 苏州大学, 2009.
- [22] 龚建军, 胡永胜. 雷公藤红素对神经胶质瘤 U87 细胞增殖、凋亡和迁移的影响[J]. *中草药*, 2017, 48(24):5194-5199.

Preparation of the celastrol liposome and its anti-proliferative effects against U87 MG glioma cells

YANG Qinlei^{1,2}, HAN Qiuhui¹, WANG Xiumin^{2*}

(1. Pharmacy Department, Fuzhou Second Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350000, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: We establish a HPLC method *in vitro* for celastrol determination, and celastrol-loaded liposome were prepared by the thin film-hydration method. Orthogonal experiments were conducted to optimize the prescription. Entrapment efficiency, particle size, zeta potential and the anti-proliferative effects of celastrol-loaded liposome were evaluated. The results show that the best optimization prescription is as following: the mass ratio of drug and lipid is 1:40, the mass ratio of phospholipids and cholesterol is 6:1 with 10% (by mass) trehalose solvent as hydration medium. The entrapment efficiency of celastrol-loaded liposome is above 80%, the average particle size is about 160 nm, and the zeta potential is -35 mV. celastrol-loaded liposome were generally spherical and vesicle-like shape and owned a good release behavior. Release profiles *in vitro* demonstrated that celastrol-loaded liposome possessed a preferred release feature. Furthermore, the MTT assay showed that celastrol-loaded liposome had better anti-proliferative effect to U87 MG cells than free celastrol, the IC_{50} value of celastrol liposome is 7.93 $\mu\text{mol/L}$. In conclusion, the celastrol-loaded liposome have good properties of anti-proliferative effects against U87 MG glioma cells.

Keywords: celastrol; liposome; thin film-hydration method; anti-proliferative