

# 五肽 YIGSR 修饰的半边旗提取物 5F 脂质体的制备及理化性质研究<sup>Δ</sup>

黄青燕<sup>1,2\*</sup>, 吕应年<sup>1#</sup>, 邓小云<sup>2</sup>, 刘明星<sup>2</sup>, 纪周新<sup>1</sup>, 刘琳琳<sup>1</sup>, 吴科锋<sup>1</sup>, 梁念慈<sup>1</sup>(1.广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东湛江 524023; 2.广东医学院药学院, 广东东莞 523808)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1842-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.33

**摘要** 目的:制备五肽 YIGSR 修饰的半边旗提取物 5F 脂质体(YIGSR-5F-LP)并研究其理化性质。方法:采用薄膜分散-超声法制备 5F-LP,以包封率为指标,通过正交试验考察磷脂胆固醇质量比、药脂质量比、超声时间及反应温度对脂质体制备工艺的影响;采用后插入法修饰载药脂质体表面,制备表面含 YIGSR 的 5F-LP。透射电镜法观察脂质体的形态和粒径;鱼精蛋白沉淀法测定脂质体包封率;高效液相色谱法测定脂质体中 5F 含量;透析法评价载药脂质体的体外释放性能。结果:优选的最优制备工艺为磷脂胆固醇质量比 6:1、药脂质量比 1:10、超声时间 10 min、反应温度 45 ℃。所制 YIGSR-5F-LP 呈球形或类球形,平均粒径为 174.8 nm,包封率为 88.9%,载药量为 8.2%;其体外释放比 5F 溶液慢,在 48 h 释放完全。结论:成功制得 YIGSR-5F-LP,其具有缓释特性。

**关键词** 半边旗提取物 5F;脂质体;制备工艺;正交试验;包封率;粒径;体外释放度

## Preparation of *Pteris semipinnata* Extract 5F-liposome Modified by Pentapeptide YIGSR and Physicochemical Property Study

HUANG Qingyan<sup>1,2</sup>, LYU Yingnian<sup>1</sup>, DENG Xiaoyun<sup>2</sup>, LIU Mingxing<sup>2</sup>, JI Zhouxin<sup>1</sup>, LIU Linlin<sup>1</sup>, WU Kefeng<sup>1</sup>, LIANG Nianci<sup>1</sup>(1.Guangdong Key Lab for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524023, China; 2. School of Pharmacy, Guangdong Medical College, Guangdong Dongguan 523808, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare *Pteris semipinnata* extract 5F-liposome modified by pentapeptide YIGSR (YIGSR-5F-LP) and study its physicochemical property. METHODS: 5F-LP were prepared by film-dispersion and ultrasonic method. Using encapsulation efficiency as index, orthogonal test was adopted to investigate the effects of phospholipid-cholesterol mass ratio, drug-lipid mass ratio, ultrasonic reaction time and temperature on the preparation of liposome. The appearance of drug-loaded liposome was modified by post-insertion method, and 5F-LP modified with pentapeptide YIGSR was prepared. The morphology and particle size of the liposome were also observed by TEM, and encapsulation efficiency of liposome was determined by protamine precipitation method. The content of 5F in liposome was determined by HPLC, and *in vitro* drug release of liposome was evaluated by dialysis method. RESULTS: The optimal preparation technology was as follows as phospholipid-cholesterol mass ratio of 6:1, mass ratio of drug-lipid 1:10, ultrasonic time 10 min, temperature 45 ℃. The prepared YIGSR-5F-LP was sphere or sphere type in shape with average particle size of 174.8 nm, encapsulation efficiency of 88.9% and drug-loading amount of 8.2%. The release of liposome *in vitro* was slower than that of 5F solution and released completely at 48 h. CONCLUSIONS: YIGSR-5F-LP is prepared successfully; and the YIGSR-5F-LP has sustained release property.

**KEYWORDS** *Pteris semipinnata* extract 5F; Liposome; Preparation technology; Orthogonal test; Entrapment efficiency; Particle size; Release *in vitro*

岭南草药半边旗(*Pteris semipinnata* L.)系凤尾蕨属植物,收载于《中药大辞典》,民间认为有生肌、解毒、消肿及治疗蛇伤的功效。从中提取分离的二萜类成分 Ent-11  $\alpha$ -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid(5F)具有抗肿瘤活性,其中的  $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和环戊酮结构是发挥抗肿瘤作用的重要基团,目前在治疗非小细胞性肺癌(NSCLC)中备受关注<sup>[1]</sup>。半边旗 5F 在肺癌细胞中通过线粒体凋亡途径诱导凋亡,能有效抑制肿瘤细胞,然而由于其体内代谢快、全身副作用大等缺点限制了该化合物的临床应用<sup>[2-3]</sup>。

脂质体载药系统是一种新型给药系统,可以改善药物的溶解性,利于药物的吸收、分布,并能在病灶部位控制释放,提

高作用浓度,延长作用时间,增强治疗作用。在纳米颗粒表面用靶向性基团修饰,可以使载药纳米粒子在肿瘤组织高浓度聚集,发挥靶向治疗作用,减少全身代谢的毒副作用<sup>[4]</sup>。现代分子生物学研究发现,在多种不同的癌细胞中存在分子质量为 67 kD 的层黏连蛋白受体(67 kD Lamnin receptor, 67LR),该受体与肿瘤组织的扩散及转移有关<sup>[5]</sup>。特定序列的五肽 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg(YIGSR),衍生自层黏连蛋白 B1 链,已经被证实能特异性键合到癌细胞细胞表面的 67LR 受体上<sup>[6]</sup>。本研究以特定序列的五肽 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg(YIGSR)作为癌细胞 67LR 的靶向物,修饰载药 5F 脂质体表面,制备五肽 YIGSR 修饰的半边旗提取物 5F 脂质体(YIGSR-5F-LP)制剂,并研究其质量及体外释放度,为岭南特色植物半边旗药用资源的开发利用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

MIKRO12-24 型高速离心机(德国 Hettich 公司,离心半径:7 cm);1200 Series 型高效液相色谱(HPLC)仪(美国 Agi-

<sup>Δ</sup> 基金项目:广东省自然科学基金项目(No.S2012010008163);广东高校优秀青年创新人才培养计划(No.LYM10083)

\* 硕士研究生。研究方向:中药制剂。E-mail: 876334150@qq.com

# 通信作者:副研究员。研究方向:中药制剂新剂型。E-mail: lyn7591@hotmail.com

lent公司);JEM-1400型透射电镜(日本Tokyo公司)。

## 1.2 药品与试剂

大豆卵磷脂(百灵威科技有限公司,批号:15675,纯度: > 97%);胆固醇(武汉华美华科技集团有限公司,批号:LR600108,纯度:99%);5F对照品[广东天然药物研究与开发重点实验室分离纯化,批号:20130602,纯度(经HPLC检测峰面积归一化法计算):98%];二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-马来酰亚胺(DSPE-PEG2000-Mal,美国Avanti Polar Lipids科技公司);五肽YIGSR(上海强耀生物技术公司合成);DSPE-PEG2000-YIGSR(广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室按活性磷脂反应说明书自制,批号:20141101, Sephadex-G50凝胶色谱柱分离纯化至单一峰);甲醇为色谱纯,其他化学试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 5F-LP的制备

采用薄膜分散-超声法<sup>[7]</sup>。精密称取处方量的大豆卵磷脂、胆固醇、5F对照品,用二氯甲烷-甲醇(2:1, V/V)溶解,减压旋蒸除去有机溶剂,瓶壁形成脂膜。烧瓶中加入磷酸盐缓冲溶液(pH 6.5),45℃保温旋转使脂膜溶入水相,充分溶胀水合,超声(60 kHz, 800 W)分散成脂质体混悬液,依次通过0.8、0.45、0.22 μm微孔滤膜过滤,即得5F-LP混悬液。

### 2.2 包封率的测定

采用鱼精蛋白沉淀法<sup>[8]</sup>。取制得的各脂质体混悬液,摇匀,取0.5 ml,置于50 ml量瓶中,用甲醇破乳后定容,测定药物的质量浓度,计算总质量( $m_1$ )。另取0.5 ml,置于5 ml离心管中,加入10 g/L鱼精蛋白溶液0.5 ml,搅匀,静置5 min后滴加生理盐水4.0 ml,以20 000×g离心20 min,小心吸取上清液1.0 ml,甲醇定容至10.0 ml,测定游离药物质量浓度,计算其质量( $m_2$ )。按公式计算包封率= $(m_1 - m_2) / m_1 \times 100\%$ 。

### 2.3 工艺优选

2.3.1 正交试验设计 在预试验基础上,以磷脂胆固醇质量比(A)、药脂质量比(B)、超声时间(C, min)、反应温度(D, ℃)为因素,以包封率为指标,采用正交试验设计优化处方。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A	B	C, min	D, ℃
1	3:1	1:5	10	45
2	6:1	1:10	20	50
3	9:1	1:20	30	55

2.3.2 正交试验结果分析 采用薄膜分散-超声法制备脂质体。按正交设计精密称取适量大豆卵磷脂、胆固醇、半边旗5F,加二氯甲烷-甲醇混合溶液(2:1, V/V)30 ml使溶解,转移至500 ml茄形瓶中,减压干燥使成膜。成膜后加入磷酸盐缓冲溶液(pH 6.5),水化超声使之均匀分散,依次过0.80、0.45、0.22 μm微孔滤膜3次,整粒后得5F-LP混悬液。按“2.2”项下方法测定包封率。正交试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

由表2结果可知,各因素的影响程度依次为:A>C>D>B。由表3结果可知,因素A对包封率有显著影响,即磷脂胆固醇质量比对包封率影响显著。试验结果显示,最优制备工艺为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>,但从脂质体的制备综合考虑,减少脂用量,但又不能与最优结果相差太大,因此最优制备工艺为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>,即磷脂胆固醇比6:1、药脂比1:10、超声时间10 min、温度45℃。

2.3.3 处方验证 按照最优处方制备5F-LP混悬液3批,其平

均包封率为88.9%,RSD为2.51%(n=3)。

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	包封率, %
1	1	1	1	1	75.9
2	1	2	2	2	70.2
3	1	3	3	3	69.2
4	2	1	2	3	74.9
5	2	2	3	1	81.0
6	2	3	1	2	83.4
7	3	1	3	2	77.2
8	3	2	1	3	81.1
9	3	3	2	1	80.5
K <sub>1</sub>	71.8	76.0	80.1	79.1	
K <sub>2</sub>	79.8	77.4	75.2	76.9	
K <sub>3</sub>	79.6	77.7	75.8	75.1	
R	8.0	1.7	4.9	4.1	

表3 方差分析结果

Tab 3 Variance analysis result

变异来源	离均差平方和	自由度	F	F临界值	P
A	125.39	2	24.99	19.00	<0.05
B	5.01	2	1.00	19.00	
C	43.47	2	8.67	19.00	
D	24.87	2	4.95	19.00	
误差	5.02	2			

### 2.4 YIGSR-5F-LP的制备

采用后插入法<sup>[9-10]</sup>。将“2.3.3”项下制备的5F-LP置于45℃水浴锅中恒温搅拌,按总磷脂量的2%(摩尔比)加入DSPE-PEG2000-YIGSR水溶液,孵育3 h后,置于透析袋(截留分子量:8 000)以生理盐水透析24 h,去除未插入的配体肽,即得YIGSR-5F-LP混悬液。

### 2.5 形态观察

取少量YIGSR-5F-LP混悬液,用磷酸盐缓冲液稀释后滴至载玻片上,用3%磷钨酸钠溶液(pH 7.0)负染后滴至有支持膜的铜网上,自然挥干后在透射电子显微镜下观察脂质体形态。结果显示,YIGSR-5F-LP结构完整,外观呈球形或类球形,分布均匀,测得平均粒径为174.8 nm。透射电镜图见图1。

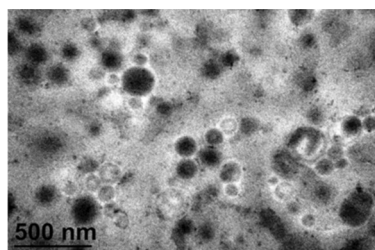


图1 透射电镜图

Fig 1 TEM

### 2.6 含量测定

2.6.1 色谱条件与专属性试验 色谱柱:Hypersil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:35℃;流动相:甲醇-0.5%乙酸(55:45, V/V),流速:0.8 ml/min;检测波长:242 nm;进样量:20 μl。该色谱条件下,空白辅料不影响5F的含量测定。

2.6.2 线性关系考察 取5F对照品,制备成0.15、0.3、0.6、1.2、2.4、3.0 μg/ml系列对照品溶液,进样检测。以5F的峰面积(y)对质量浓度(x)进行线性回归,得回归方程为 $y = 53.66x - 0.466$  ( $r = 0.9984$ )。结果表明,5F检测质量浓度的线性范围为0.15~3.0 μg/ml,定量限为0.15 μg/ml。

2.6.3 精密度试验 分别制备0.15、0.6、2.4 μg/ml 3个质量浓度的样品5份,进样检测,考察日内精密度。取同一样品连续3 d进样检测,考察日间精密度。结果显示,在低、中、高质量浓度样品中5F的日内、日间RSD均小于15%,表明方法精密度良好。

2.6.4 准确度试验 分别取“2.6.2”项下质量浓度为0.15、0.6、2.4 μg/ml的5F对照品溶液,进样测定,每个浓度测定5次,根据标准曲线求得实测浓度,以其与理论浓度的比值计算方法回收率,结果见表4。

表4 回收率试验结果(n=5)

Tab 4 Results of recovery test(n=5)

质量浓度, μg/ml	回收率( $\bar{x} \pm s$ ), %	RSD, %
0.15	92.38 ± 1.76	1.91
0.6	96.86 ± 1.84	1.89
2.4	99.23 ± 1.63	1.64

## 2.7 载药量的测定

取YIGSR-5F-LP混悬液1.0 ml,加乙醇破乳定容至5.0 ml,按照“2.6.1”项下条件测定5F含量,按公式计算载药量:载药量(%) = 脂质体中所含药物总量(mg)/脂质体总量(mg) × 100%。测得3批YIGSR-5F-LP中5F的平均载药量为8.2%。

## 2.8 体外释放度的测定

分别取5F对照品溶液和YIGSR-5F-LP混悬液各5.0 ml,装入预处理透析袋中,按照2010年版《中国药典》溶出度第三法测定释放度。在指定时间点各取样1.0 ml,检测5F含量并计算累积释放度。YIGSR-5F-LP及5F溶液的体外释放曲线见图2。

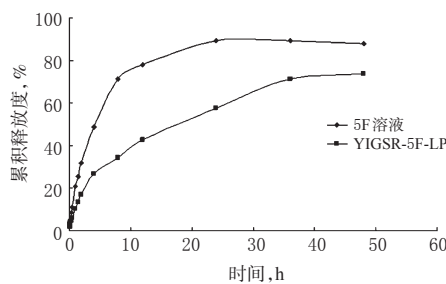


图2 YIGSR-5F-LP及5F溶液的体外释放曲线

Fig 2 Release curves of YIGSR-5F-LP and 5F solution *in vitro*

由图2可知,5F溶液在前8 h的累积释放度达到76.2%;而YIGSR-5F-LP的累积释放度达到70%需36 h,并在48 h才能释放完全,表明YIGSR-5F-LP的体外释放有缓释作用。

## 3 讨论

脂质体的主要成分是磷脂,在磷脂中加入胆固醇可以改变磷脂的相变温度,对脂质膜的流动性产生双向调节作用<sup>[11]</sup>。此外,胆固醇具有表面活性剂作用,能使W/O型乳剂稳定形成,故在一定比例范围内,胆固醇比例越高,脂质体包封率越高。但胆固醇的含量增加,会使脂质体刚性增大,难以通过微孔滤膜挤出整粒;且胆固醇含量过高时,组成脂质体的磷脂量过少,脂质体膜形成困难,包封率降低<sup>[12]</sup>。本研究以薄膜分散-超声法制备的脂质体,在磷脂胆固醇比为6:1时,包封率最高。

脂质体的表面可修饰各类蛋白抗体及多肽类配体作为靶头<sup>[13]</sup>,靶向脂质体的制备方法有一步法和后插入法。一步法即靶向配体-PEG-磷脂与脂质体磷脂和胆固醇共同旋转成膜,按照薄膜分散法制备靶向脂质体,该法缺点在于成膜不均,批间差异大,配体分布于脂质体内外两侧造成靶头浪费等。本文采用的后插入法不仅方便快捷,而且不同配体修饰密度的脂质体可来源于同一批普通脂质体,在工业化生产时批间差异

可控。后插入法还可避免成膜中所用有机溶剂对蛋白类配体活性的影响。后插入法在脂质体表面修饰的多肽类配体只占脂质体总量的1%左右,不影响脂质体的包封率及释放度<sup>[14]</sup>。本课题组在普通脂质体的工艺条件上,通过后插入法制备了YIGSR-5F-LP。电镜显示该脂质体呈球形或类球形,粒径均匀,包封率为88.9%,载药量为8.2%,体外释放结果表明载药脂质体具有缓释作用。

人类肿瘤组织中层黏连蛋白受体的表达远高于正常组织,该受体可以与具有YIGSR的细胞外基质相互作用。Dubey PK等<sup>[15]</sup>将YIGSR连接到空白脂质体,考察载体对肿瘤组织周围过表达黏连蛋白的血管内皮细胞的选择性,结果表明,YIGSR修饰的脂质体对各种转移性肿瘤有靶向性。本文研究了YIGSR-5F-LP的制备工艺及体外释放度,该载药制剂的肿瘤靶向性及在动物体内的释放、分布、代谢等药效学及药动学研究有待进一步开展。

## 参考文献

- [1] 李立,吕应年,刘义,等.半边旗提取物5F诱导HepG2细胞凋亡与p53活化及血管内皮生长因子抑制有关[J].中草药,2010,41(2):241.
- [2] 刘义,陈功,梁念慈,等.半边旗活性物质5F对非小细胞肺癌NCI-H460细胞IκKβ、IκB、p65及p50 mRNA表达的影响[J].中草药,2010,41(3):425.
- [3] Lu Y, Wu KF, Liang N, *et al.* LC Method for quantification of ent-11α-hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid in rabbit plasma: validation and application to a pharmacokinetic study[J]. *Chromatographia*, 2009, 70(11/12): 1599.
- [4] 杨文秀.脂质体主动载药的研究与应用进展[J].现代医药卫生,2011,27(17):2647.
- [5] 刘贵秋,王玉学.层黏连蛋白受体与肿瘤的侵袭和转移[J].实用肿瘤学杂志,2007,21(2):155.
- [6] Sarfati G, Dvir T, Elkabets M, *et al.* Targeting of polymeric nanoparticles to lung metastases by surface-attachment of YIGSR peptide from laminin[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(1):152.
- [7] 冯硕,徐丽,赵骏.薄膜超声法制备龙胆苦苷脂质体[J].现代中药研究与实践,2012,26(1):48.
- [8] 刘卫斌,薛彦宁,秦永刚.鱼精蛋白凝聚法测定和厚朴酚脂质体的包封率[J].中国药房,2010,21(39):3695.
- [9] Allen TM, Sapra P, Moase E. Use of the post-insertion method for the formation of ligand-coupled liposomes[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2002, 7(3):889.
- [10] 袁东芬,孙敏捷,王宇,等.奥曲肽靶向阿霉素脂质体的制备及其体外性质[J].中国药科大学学报,2011,42(3):223.
- [11] 郭海燕,莫穗林.脂质体物理稳定性和包封率的影响因素[J].中国新药杂志,2004,13(6):498.
- [12] 左勇亮,肖人钟,王蓉蓉.主动靶向脂质体研究进展[J].中国现代应用药学,2013,30(10):1151.
- [13] 崔召元,孙勇.配体修饰脂质体的研究进展[J].中国药房,2012,23(41):3924.
- [14] 周正源,唐海玲,徐宇虹,等.多肽靶向脂质体的表面配体修饰密度及其体内肿瘤靶向效果的研究[J].生物物理学报,2010,26(3):216.
- [15] Dubey PK, Singodia D, Vyas SP. Liposomes modified with YIGSR peptide for tumor targeting[J]. *J Drug Target*, 2010, 18(5):373.

(收稿日期:2015-08-01 修回日期:2015-09-21)

(编辑:邹丽娟)