

乳铁蛋白修饰党参多糖脂质体的制备及体外评价

安子璇^{1,2,3}, 张奇¹, 史彩云¹, 卢凤坤^{1,2}, 王金^{1,2}, 李炜^{1,2*} (1.河北北方学院药学院, 河北 张家口 075000; 2.河北省神经药理学重点实验室, 河北 张家口 075000; 3.河北省唐山市曹妃甸区医院, 河北 唐山 063200)

摘要: 目的 选用乳铁蛋白(lactoferrin, Lf)为脑靶向配体, 构建受体介导的 Lf 修饰党参多糖脂质体(lactoferrin-modified liposomes of *Codonopsis pilosula* polysaccharide, Lf-CPPS-LCL), 并考察其体外跨越血脑屏障的能力及抗炎作用。方法 通过逆向蒸发法制备党参多糖脂质体(CPPS-Lips), 以包封率为考察指标采用星点设计-响应面法筛选最优处方, 利用 Lf 的氨基与脂质体膜表面 DSPE-PEG2000-COOH 共价结合, 组装得到 Lf-CPPS-LCL, 并对其形态、粒径电位, 以及体外释放情况进行考察; 通过人脐静脉内皮细胞与大鼠脑胶质瘤 C6 细胞共培养建立体外血脑屏障模型, 考察 Lf-CPPS-LCL 的透过能力; 采用脂多糖诱导 BV2 细胞造成炎症模型, 分别给予 CPPS、CPPS-Lips 和 Lf-CPPS-LCL 进行药物干预, 通过 ELISA 法测定肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和 IL-6 的含量, 应用 Western blotting 法测定 BV2 细胞 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的表达水平。结果 确定最优处方为脂药比 31:1, 大豆磷脂:胆固醇=28:5, 超声时间 25 min, DSPE-PEG2000 的摩尔含量为 5%。制得的 Lf-CPPS-LCL 的粒径为(197.5 $\pm$ 0.6)nm, PDI 为(0.2 $\pm$ 0.02), Zeta 电位为(-18.8 $\pm$ 1.1)mV, Lf-CPPS-LCL 与原料药相比体外释放更加缓慢平稳。经 Lf 修饰后的脂质体与未修饰的脂质体相比对血脑屏障模型有更好的透过性; 与模型组相比, Lf-CPPS-LCL 能明显抑制炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 释放, 下调 BV2 细胞 TLR4、NF- κ B、MyD88 的蛋白表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 制得的 Lf-CPPS-LCL 形态圆整、粒径分布均匀、有较好的缓释作用及血脑屏障模型透过能力, Lf-CPPS-LCL 可有效抑制脂多糖诱导的 BV2 炎症反应, 其作用机制可能与下调 TLR4 及其下游的 MyD88、NF- κ B 蛋白表达相关。

关键词: 党参多糖; 脂质体; 乳铁蛋白; 脑靶向; 血脑屏障; 炎症

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)10-1317-13

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221362

引用本文: 安子璇, 张奇, 史彩云, 等. 乳铁蛋白修饰党参多糖脂质体的制备及体外评价[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(10): 1317-1329.

Preparation and *in Vitro* Evaluation of Lactoferrin-modified Liposomes of *Codonopsis Pilosula* Polysaccharide

AN Zixuan^{1,2,3}, ZHANG Qi¹, SHI Caiyun¹, LU Fengkun^{1,2}, WANG Jin^{1,2}, LI Wei^{1,2*} (1.Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2.Hebei Key Laboratory of Neuropharmacology, Zhangjiakou 075000, China; 3.Caofeidian District Hospital of Tangshan City, Hebei Province, Tangshan 063200, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To construct receptor-mediated and lactoferrin-modified liposomes of *Codonopsis pilosula* polysaccharide(Lf-CPPS-LCL) by selecting lactoferrin(Lf) as brain targeting ligand, and to investigate its ability to cross blood-brain barrier and anti-inflammatory effect *in vitro*. **METHODS** CPPS-Lips was prepared by reverse evaporation method. The optimal prescription was screened by the Box-Behnken design-response surface methodology using the encapsulation rate as the index. The amino group of Lf was covalently combined with DSPE-PEG2000-COOH on the surface of the liposome membrane to obtain Lf-CPPS-LCL. Then its morphology, particle size, potential and release degree *in vitro* were investigated. Established an *in vitro* blood-brain barrier model by co culturing human umbilical vein endothelial cells and rat glioma C6 cells to investigate the permeability of Lf-CPPS-LCL. Lipopolysaccharide was used to induce inflammation model in BV2 cells. And the BV2 cells were treated with CPPS, CPPS-Lips, and Lf-CPPS-LCL. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin(IL)-1 β and IL-6 was measured by ELISA. Western blotting was applied to determine the expression levels of Toll-like receptor 4(TLR4), myeloid differentiation factor(MyD88) and nuclear factor- κ B(NF- κ B) in BV2 cells. **RESULTS** The optimal prescription was determined as follows: The ratio of lipid to drug was 31:1, the ratio of soybean phospholipid to cholesterol was 28:5, sonication time was 25 min, and molar content of DSPE-PEG2000 was 5%. The particle size of Lf-CPPS-LCL was (197.5 $\pm$ 0.6)nm, the PDI was (0.2 $\pm$ 0.02), and the Zeta potential was (-18.8 $\pm$ 1.1)mV. Compared with the raw material drug, Lf-CPPS-LCL was released more slowly and smoothly *in vitro*. Compared with unmodified liposomes, Lf-modified liposomes

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(H2020405298)

作者简介: 安子璇, 女, 硕士生 E-mail: 976492690@qq.com

*通信作者: 李炜, 女, 副教授, 硕士

E-mail: leewei318@163.com

had better permeability to the blood-brain barrier model. Compared with the model group, Lf-CPPS-LCL significantly reduced the release of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β and IL-6 and down-regulated the protein expression of TLR4, NF- κ B and MyD88 in BV2 cells($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSION** Lf-CPPS-LCL has a rounded morphology, with uniform particle size distribution, good sustained release and blood-brain barrier model permeability. Lf-CPPS-LCL could effectively inhibit LPS-induced inflammatory response in BV2 cells, and its mechanism of action may be related to the down-regulation of TLR4 and the protein expression of MyD88 and NF- κ B on its downstream.

KEYWORDS: *Codonopsis pilosula* polysaccharide; liposome; lactoferrin; brain targeting; blood-brain barrier; inflammation

神经炎症是发生在中枢神经系统(central nervous system, CNS)的一种炎症反应。近年来研究表明神经炎症与多种神经退行性疾病如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)和肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)等的发生和发展有密切的关系^[1]。由于血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)严密的生理屏障作用使得药物难以在颅内达到有效的治疗浓度,导致神经炎症的临床治疗和药物递送出现了瓶颈,寻找安全有效的抗炎药物及有效载体成为研究热点。党参多糖(*Codonopsis pilosula* polysaccharides, CPPS)作为天然大分子物质,已被证实具有抗炎^[2-3]、抗氧化、提高免疫等多种生物活性,且几乎没有不良反应。但 CPPS 的生物利用度低,将 CPPS 包封于脂质体中,可延缓药物在体内的降解过程,延长在体内的作用时间。将脂质体经过适当修饰,可增加药物对治疗组织的靶向性,降低对正常细胞的毒性,提高药物生物利用度。多种生物 BBB 表面均存在乳铁蛋白(lactoferrin, Lf)受体,能够介导 Lf 通过胞吞转运入脑,而且转运过程为单向转运,有利于修饰的载体跨过 BBB 进入脑组织^[4]。本实验设计利用 Lf 的氨基与脂质体膜表面 DSPE-PEG2000-COOH 共价结合构建乳铁蛋白修饰党参多糖脂质体(lactoferrin-modified liposomes of *Codonopsis pilosula* polysaccharide, Lf-CPPS-LCL),以期通过受体介导的主动转运,提高载体系统跨 BBB 的能力,从而使 CPPS 更易透过 BBB 更好地发挥抗炎作用,为进一步研究 Lf-CPPS-LCL 的有效性与安全性提供实验基础。

1 仪器与试剂

LE225D 电子天平(德国 Sartorius 公司); 3K30 型高速低温离心机(Sigma 公司,离心半径 82 mm); Lab Tech UV2100(北京莱伯泰科有限公司); 7650 透射电子显微镜(日立公司); ZETASIZER Nano series 纳米粒度电位仪(英国马尔文仪器有限公司); RCBCD 溶出仪(天大天发公司); CO₂ 培养箱

(Thermo 公司); Infinite 200 PRO 多功能酶标仪(澳大利亚 Tecan 公司); Mini-Protean Tetra 电泳槽、Mini Trans-Blot 转印槽均来自 Bio-Rad 公司; FM0530 多色荧光和化学发光成像系统(Protein Simple 公司)。

CPPS(西安融升生物科技有限公司,货号: 20061811); 葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,货号: 110833; 纯度 $\geq 99\%$); 胆固醇(国药集团有限公司,货号: 69008214); 大豆卵磷脂(货号: N01006)、DSPE-PEG2000(货号: B41233)、DSPE-PEG2000-COOH(批号: H32668)均购自上海艾韦特有限公司; 吐温-80(注射级,南京威尔化工有限公司,货号: 9005-65-6); Lf(日本和光株式会社,货号: CAQ3770); 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(北京索莱宝生物科技有限公司,货号: L8880); 胎牛血清(Gibco 公司,货号: 10099141); DMEM 基础培养基(源培生物技术有限公司,货号: L130KJ); ECM 内皮培养基(Sciencell 公司,货号: SC-1001); C6 细胞专用培养基(Icell 公司,货号: r004-001b); Anti-TLR4 抗体、Anti-NF- κ B p65 抗体、Anti-MyD88 抗体(Abcam 公司,货号分别为 ab13556, ab16502, ab28763); Mouse TNF- α ELISA Kit、Mouse IL-1 β ELISA Kit、Mouse IL-6 ELISA Kit、CCK-8 试剂盒、NO 检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,货号分别为 PT512, PI301, PI326, C0038, S0021S); BCA 试剂盒(Biosharp 公司,货号: BL521A)。

BV2 小胶质细胞、人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)和大鼠脑胶质瘤细胞(C6)均购自上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 方法

2.1 CPPS 分析方法的建立

2.1.1 检测波长的确定 葡萄糖对照品配制成 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液,取 1 mL 于试管中,再加 5%的苯酚溶液 1 mL,混匀后,加入浓硫酸 5 mL,混匀,静置 5 min,沸水浴 15 min,之后用流水速

冷至室温,将1 mL的蒸馏水按照与葡萄糖对照品相同显色方法作为空白对照,吸光度为360~600 nm内检测最大吸收波长。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取10 mg葡萄糖对照品,用新鲜的蒸馏水溶解并稀释,定容于10 mL量瓶,分别配制成质量浓度为10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,用苯酚-浓硫酸法显色后在490 nm处测定以上溶液的吸光度,以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标确定标准曲线方程。

2.1.3 精密度试验 准确量取质量浓度为20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖对照品溶液1 mL,用苯酚-浓硫酸法显色后于紫外490 nm处在同1 d每隔2 h测定吸光度,共5次,计算日内精密度;同法将溶液在每天同一时间点连续测定5 d,计算日间精密度。

2.1.4 回收率试验 空白脂质体的制备:采用逆向蒸发法,将一定比例的大豆卵磷脂和胆固醇、吐温80溶于氯仿,采用旋转蒸发仪进行减压旋转蒸发,使圆底烧瓶内壁形成一层半透明薄膜,加10 mL乙醚将薄膜溶解,然后加入2 mL磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4),超声振荡,使其充分混匀,然后置于旋转蒸发仪上进行减压蒸馏,至乙醚完全挥发,得到空白脂质体悬液,再加PBS水化2 h。取出,超声25 min,过膜,得到空白脂质体。取空白脂质体溶液各2 mL,分别放入9个10 mL量瓶中,再向量瓶中分别加入20, 40, 80 μL 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 葡萄糖对照品溶液,蒸馏水定容至刻度,用苯酚-浓硫酸法显色在490 nm处检测,记录吸光度,计算回收率。

2.1.5 重复性试验 制备6份质量浓度为60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖对照品溶液,采用苯酚-浓硫酸法显色后,490 nm处测定吸光度值,计算RSD,评价方法的重复性。

2.2 党参多糖脂质体(CPPS-Lips)的制备

按“2.1.4”项下方法,将磷酸盐缓冲溶液换成CPPS磷酸盐缓冲溶液制备CPPS-Lips,装瓶,备用。

2.3 制备处方单因素考察

2.3.1 水化 pH 值对包封率的影响 固定卵磷脂、胆固醇与党参多糖的量,分别考察水化pH为5.8, 6.6, 7.2, 8.0时对包封率的影响,包封率=(投药量-上清中CPPS含量)/投药量 $\times 100\%$ 。

2.3.2 膜材比对包封率的影响 固定卵磷脂的用量,改变胆固醇的用量,使膜材比分别为2:1, 4:1, 8:1, 10:1观察不同膜材比对包封率的影响。

2.3.3 脂药比对包封率的影响 固定卵磷脂的用量、卵磷脂与胆固醇的质量比(8:1),其他条件不变的情况下,改变党参多糖的质量,使脂药比分别为20:1, 40:1, 60:1, 80:1,观察卵磷脂与CPPS的质量比对包封率的影响。

2.3.4 卵磷脂与吐温80的质量比对包封率的影响 固定卵磷脂的用量、卵磷脂与胆固醇的质量比(8:1)、脂药比(33:1)、其他条件不变的情况下,改变卵磷脂与吐温80的质量,使卵磷脂与吐温80的质量比分别为1:1, 3:1, 5:1, 7:1,观察卵磷脂与吐温80的质量比对包封率的影响。

2.3.5 超声时间对包封率的影响 固定卵磷脂的用量、卵磷脂与胆固醇的质量比(8:1)、脂药比(33:1)、卵磷脂与吐温80的质量比为(7:1),其他条件不变的情况下,改变超声时间分别为0, 30, 50, 70 min,观察超声时间对包封率的影响。

2.4 响应曲面设计法优化最佳处方

在单因素试验的基础上,选择卵磷脂与胆固醇的比、脂药比、超声时间,3个对包封率影响较大的因素为自变量,每个因素设置3水平,采用统计软件Design-Expert 12,以包封率为响应值,设计Box-Behnken试验。根据模型拟合结果得出最佳处方条件。

2.5 CPPS-Lips最佳处方条件的验证及表征

采用经Box-Behnken试验确定的最优处方条件重复制备CPPS-Lips,并分别测定3次重复试验的包封率。然后将最佳制备工艺制得的CPPS-Lips稀释50倍,利用马尔文粒度仪测定粒径和电位值。并利用透射电镜观察CPPS-Lips的超微结构,即将该CPPS-Lips用去离子水稀释5倍,滴加1滴于铜网上,用2%磷钨酸染色3 min,吹干水分,放在透射电镜下观察。

2.6 Lf-CPPS-LCL的制备及工艺优化

2.6.1 Lf-CPPS-LCL的制备 采用上述筛选得到的最佳处方条件再次制备CPPS-Lips,将DSPE-PEG2000、DSPE-PEG2000-COOH两者混合后混入CPPS-Lips中,水浴(60 $^{\circ}\text{C}$)搅拌孵育(1 h),制得CPPS-LCL,把1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐、N-羟基丁二酰亚胺和DSPE-PEG2000-

COOH 按比例为 10 : 10 : 1 混入 CPPS-LCL 中, 室温搅拌(10 min), 将 CPPS-LCL 活化, 将 Lf : DSPE-PEG2000-COOH(1 : 4) 加入已经活化的 CPPS-LCL 中, 水浴(37 °C) 孵育(3 h), 放入透析袋中, 透析 22 h(以除去游离的 CPPS、Lf、催化剂), 从而得到纯化的 Lf-CPPS-LCL。

2.6.2 Lf 连接效率的考察 取 Lf-CPPS-LCL 溶液 300 μL , 甲醇(400 μL) 涡旋 30 s 后加氯仿 200 μL 再次涡旋 30 s 后加去离子水 100 μL , 涡旋 30 s, 9 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 除去上层溶液; 再加入 400 μL 甲醇, 涡旋 30 s, 9 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 弃上清, 得白色沉淀, 并利用氮吹仪将其吹干, 备用。利用 BCA 蛋白测定试剂盒, 通过测定 Lf-CPPS-LCL 的蛋白含量, 考察 Lf 的连接效率(CE%)。首先, 制作 BCA 蛋白测定标准曲线: 将 BSA(标准蛋白对照品) 加适量 pH 为 7.4 的 PBS 配制成 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准蛋白母液, 再用 PBS 梯度稀释至 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用; 按照 BCA 试剂盒说明书, 在 560 nm 处测定各梯度稀释溶液的吸光度, 得到标准曲线方程。然后, 将备用的 Lf-CPPS-LCL 白色沉淀溶解于 200 μL PBS(pH=7.4) 中, 加入 BCA 工作液混匀, 孵育(37 °C) 30 min, 560 nm 处测定吸光度, 通过标准曲线方程, 计算蛋白含量。代入上述公式中, 计算连接效率, $\text{CE}\%=(1-C_{\text{游离}}/C_{\text{总}})\times 100\%$ 。

2.6.3 DSPE-PEG2000 与卵磷脂的摩尔比对包封率的影响 参考已有研究^[5-6]的实验, 若 DSPE-PEG2000 : 卵磷脂 > 10%, DSPE-PEG2000 会聚集, 形成“小毛刷”, 阻止 DSPE-PEG2000 插入磷脂双分子层, 因此以 Lf-CPPS-LCL 的包封率为指标, 选取了 DSPE-PEG2000 与卵磷脂的摩尔比 10% 以内的多个比例进行考察, 并比较了 DSPE-PEG2000 与卵磷脂摩尔比分别为 2%, 5%, 7% 时 Lf-CPPS-LCL 的包封率。

2.6.4 Lf-CPPS-LCL 最佳处方条件的验证及表征 综合上述结果, 将 DSPE-PEG2000 与卵磷脂按“2.6.3”项中所得的摩尔比重复制备 3 批 Lf-CPPS-LCL, 并分别测定 Lf-CPPS-LCL 的 Lf 连接效率, 评价此最佳处方条件的重现性和稳定性。然后, 将上述重复制得的 Lf-CPPS-LCL 稀释至 50 倍体积, 利用马尔文粒度仪测定其粒径和电位值。并利用透射电镜观察 Lf-CPPS-LCL 的超微结构,

即将其滴加在铜网上, 用 2% 磷钨酸染色 3 min, 吹干水分, 放在透射电镜下观察; 并采用溴化钾压片法, 利用傅里叶红外光谱仪在 400~4 000 nm 内扫描, 对中间产物 mPEG-CPPL 和终产物 Lf-PEG-CPPL 进行结构分析。

2.6.5 Lf-CPPS-LCL 体外释放度考察 将含药量相同的 CPPS、CPPS-Lips、Lf-CPPS-LCL 各 3 份, 加入到处理过的透析袋中, 用封口夹封口, 在 200 mL pH 为 7.4 的 PBS 中悬挂。溶出仪水浴温度为 37 °C, 转速为 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 于 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 h 时各取 2 mL, 同时补入 2 mL 的溶出介质, 通过紫外分光光度计测定吸光度, 计算各组 CPPS 的含量和累积释放率, 并绘制 CPPS、CPPS-Lips、Lf-CPPS-LCL 的溶出曲线。

2.7 Lf-CPPS-LCL 的 BBB 透过性考察

2.7.1 模型建立 HUVECs 可较好地体外模拟 BBB 相关细胞性状, 因此将 HUVECs 与 C6 细胞非接触式共培养构建体外 BBB 模型。当 HUVECs 和 C6 的生长密度达到 80%~90% 时, 细胞计数, HUVECs 细胞悬液以每孔 1.6×10^4 的细胞密度接种于 24 孔 Transwell 小室上室的 PET 膜上, 加 250 μL 内皮细胞完全培养基。同时, 以每孔 1×10^5 将 C6 细胞接种于 Transwell 六孔板(下室), 加入 C6 专用培养基 1 mL, 维持 2 种细胞培养基的液面相平。设置单细胞组(只含 HUVECS)、空白对照组, 且每组设置 3 个复孔, 置恒温培养箱中静置培养。定时换液, 观察细胞的融合情况。进行后续体外 BBB 模型评价的系列实验。

2.7.2 模型评价 待细胞基本融合后, 除利用倒置显微镜观察 HUVECs 和 C6 生长状态、融合情况, 用 4 h 渗漏试验和跨内皮细胞电阻抗(trans-endothelial electrical resistance, TEER) 试验可进一步评价模型; 4 h 渗漏试验: 在 Transwell 小室上、下两室分别加入 300 μL , 1.5 mL 的培养基, 使上室与下室液面差至少相差 0.5 cm, 在细胞培养箱(37 °C, 5%CO₂) 中培养 4 h, 观察在 4 h 后是否仍能保持 > 0.5 cm 的液面差; TEER 试验: 使用 Millicell.ERS-2 电阻仪, 对本试验中的 BBB 模型进行 TEER 检测。将实验仪器在超净台中紫外照射 30 min, 连接, 打开开关, 静置等到电阻稳定。将上下室中的培养基吸去, 加入适量的 D-HANK's 缓冲溶液至两室中, 让 2 种细胞的缓冲液液面相

平。电极膜片分别垂直置于液面下,不能触碰小室底部及周边,取3个不同位置的电阻值,并根据公式计算出实际电阻值:实际电阻值($\Omega \cdot \text{cm}^2$)=(实验孔测量值-空白孔测量值) $\times$ PET膜面积(cm^2)。

2.7.3 Lf-CPPS-LCL的BBB透过性考察 成功建立体外BBB细胞模型后,更换新鲜培养基,在供体池内分别按 $0.0065 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入药物各1 mL,于培养箱4 h后分别取一部分受体池培养液,通过苯酚-浓硫酸法检测CPPS含量,计算Lf-CPPS-LCL通过体外BBB细胞模型的透膜效率。

2.8 CPPS、CPPS-Lips、Lf-CPPS-LCL对LPS诱导的体外BV2细胞炎症模型的抗炎作用及其机制的初步研究

2.8.1 LPS不同浓度和作用时间对BV2细胞存活率的影响 处于对数生长期的BV2细胞用胰蛋白酶消化,将细胞以每孔 5×10^3 的细胞密度接种于96孔板,培养24 h,然后将不同浓度的LPS(0.1, 1, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) $10 \mu\text{L}$ 加入每个孔中,分别培养8, 12, 24, 48 h,每组设3个复孔,倒置显微镜下观察各组细胞形态。根据CCK-8检测试剂盒说明,向各孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8试剂,放入培养箱中孵育2 h,终止显色,于450 nm处测定各孔吸光度值(OD)。细胞存活率(%)=(实验组OD-空白组OD)/(正常组OD-空白组OD)。

2.8.2 LPS诱导的BV2体外炎症细胞模型释放NO的动态考察 NO是体内十分重要的炎症介质和信号分子,炎症发生时,NO的过度分泌会使机体产生大量自由基,造成细胞损伤,因此通过测定细胞的NO释放量可判断BV2细胞发生炎症反应的情况。取对数生长期的BV2细胞制成细胞悬液,计数并调整细胞密度为每孔 1×10^5 个,接种于24孔板,设置正常对照组,LPS 0.1, 1, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组,每组设4个复孔,每孔 $500 \mu\text{L}$ 。培养24 h,正常对照组加入不完全培养基,其他组加入不同浓度的含药且不含血清的培养基,将24孔培养板置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中分别培养8, 12, 24, 48 h,收集细胞上清液,按Griess法测定上清液中NO含量,利用酶标仪于540 nm处测定吸光度值,计算各孔NO的释放量。

2.8.3 CPPS不同浓度和作用时间对BV2细胞存活率的影响 按“2.8.1”项下方法操作,然后加入 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CPPS继续分别培养12, 24, 36, 48 h,

采用CCK-8法测定不同给药时间对BV2细胞存活率的影响;按“2.8.1”项下方法,分别加入不同浓度的CPPS(0.1, 1, 10, 100, $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),培养24 h,采用CCK-8法测定不同给药浓度对BV2细胞存活率的影响。

2.8.4 空白脂质体对BV2细胞存活率的影响 制备相同浓度的空白脂质体和Lf空白脂质体,首先用去离子水稀释至浓度为5, 50, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,再加入4倍体积的完全培养基,稀释至1, 10, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,备用。按“2.8.1”项下方法,将不同浓度空白脂质体加入继续培养24 h, CCK-8法测定吸光度值,计算各孔细胞存活率。

2.8.5 CPPS、CPPS-Lips、Lf-CPPS-LCL对LPS诱导的BV2炎症模型NO释放的影响 按“2.8.2”项下方法,实验组每孔加入浓度为1, 10, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的CPPS、CPPS-Lips、Lf-CPPS-LCL培养基各 $100 \mu\text{L}$,培养24 h后收集各组细胞培养液,酶标仪于540 nm处测定吸光度值,计算各组NO释放量。

2.8.6 ELISA法检测细胞上清液中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6炎症因子的含量 按“2.8.2”项下方法,实验组每孔加入浓度为1, 10, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的CPPS、CPPS-Lips、Lf-CPPS-LCL培养基各 $100 \mu\text{L}$ 培养24 h后收集各组细胞培养液,以 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,除去细胞碎片,按ELISA试剂盒说明书操作,分别向96孔板加入待测样品与标准品,每孔设置3个复孔,酶标仪450 nm波长处测定吸光度,记录吸光度值,根据标准曲线和线性回归方程,计算细胞上清液中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6炎症因子的含量。

2.8.7 蛋白免疫印迹法检测炎症通路TLR4、NF- κB 、MyD88蛋白的表达 提取总蛋白后采用BCA法进行蛋白定量,经过SDS-PAGE凝胶电泳、转膜、孵育一抗、封闭、孵育二抗、显色等步骤,检测3种蛋白的表达水平,一抗孵育时,anti-TLR4、anti-NF- κB 、anti-MyD88的稀释比例分别为1:1000, 1:10000, 1:1000,于 4°C 摇床上孵育过夜。用HRP标记二抗稀释液(1:1000)于摇床上常温孵育2 h。利用Image-J软件进行条带分析,计算相对灰度值。

2.8.8 统计学方法 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,通过SPSS 26.0软件进行数据处理和统计学分析,各组数据进行单因素方差分析,2组间数据比较使用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 CPPS 分析方法的建立

3.1.1 检测波长的确定 葡萄糖对照品在 490 nm 处有最大吸收峰, 而空白脂质体在此波长处无吸收, 对测定无干扰。因此选择 490 nm 为 CPPS 含量测定的检测波长。

3.1.2 标准曲线的绘制 以浓度为横坐标(X), 吸光度为纵坐标(Y), 制得标准曲线, 标准曲线方程为: $Y=0.0094X+0.0277$, $R^2=0.9995$, 葡萄糖对照品溶液在 $10\sim100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

3.1.3 精密度试验 按“2.1.3”项下方法得到对照品溶液吸光度的日内 RSD 分别为 1.51%, 1.07%, 1.68%($n=5$), 日间 RSD 分别为 1.75%, 1.14%, 1.36%($n=5$), 表明仪器精密度良好。

3.1.4 回收率试验 按“2.1.4”项下方法计算回收率, 得到样品的加样回收率分别为 102.50%(RSD=2.00%, $n=3$), 99.00%(RSD=1.60%, $n=3$), 99.56%(RSD=0.50%, $n=3$), RSD 值均<3%, 符合方法学要求, 表明该方法稳定性良好。

3.1.5 重复性试验 按“2.1.5”项下方法得对照品溶液在 10 h 内重复性良好, RSD=1.90%($n=6$), 表明本方法重复性良好。

3.2 CPPS-Lips 单因素考察

3.2.1 水化 pH 值对包封率的影响 随着 pH 值的增加, CPPS-Lips 的包封率先升高后降低。在 pH 为 7.2 时包封率达到最大, 故本实验的水化 pH 值选择 7.2。结果见图 1。

3.2.2 膜材比对包封率的影响 固定卵磷脂的用

量, 随着膜材比的减少, CPPS-Lips 的包封率先增加后减少, 在膜材比为 4:1 时包封率达到最大, 因此本实验的膜材比选择 4:1。结果见图 1。

3.2.3 脂药比对包封率的影响 随投药量增加, CPPS-Lips 的包封率先升高再降低, 在脂药比为 40:1 时包封率达到最大, 因此将脂药比作为后续处方优化考察因素之一。结果见图 1。

3.2.4 卵磷脂与吐温 80 的质量比对包封率的影响 固定卵磷脂的用量, 随着卵磷脂与吐温 80 的质量比的减少, CPPS-Lips 的包封率先增加后减少, 在卵磷脂与吐温 80 的质量比为 3:1 时包封率达到最大, 因此本实验卵磷脂与吐温 80 的质量比选择 3:1。结果见图 1。

3.2.5 超声时间对包封率的影响 随着超声时间的增加, CPPS-Lips 的包封率先增加后明显减少, 在超声时间为 30 min 时达到最大, 并将超声时间作为后续处方优化考察因素之一。结果见图 1。

3.3 响应曲面设计法优化最佳处方

采用统计软件 Design-Expert 12, 以包封率为响应值, 设计 Box-Behnken 试验。根据模型拟合结果得出最佳处方条件。各因素水平编码见表 1, 试验设计方案与结果见表 2, 方差分析结果见表 3。

表 1 各因素水平编码

Tab. 1 Factors and levels code

水平	因素		
	A 超声时间/min	B 胆固醇/mg	C 党参多糖/mg
-1	0	20	3.3
0	30	25	5
1	50	50	10

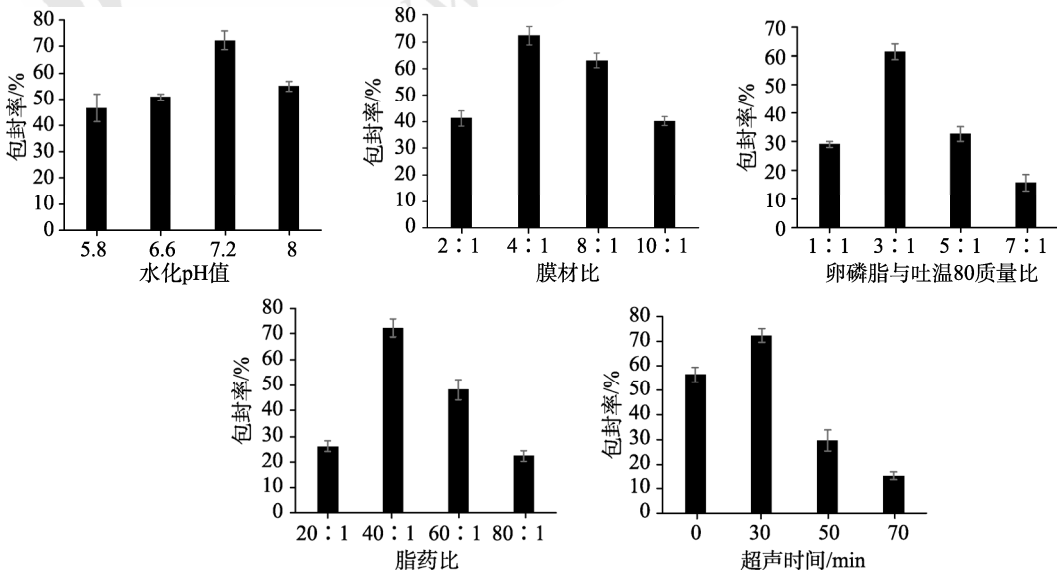


图 1 党参多糖脂质体制备条件单因素考察实验($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Single factor study on preparation conditions of *Codonopsis pilosula* polysaccharide liposomes($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

表 2 Box-Behnken 试验设计方案与结果

Tab. 2 Plan and results of Box-Behnken trials

编号	A 超声时间/min	B 胆固醇/mg	C 党参多糖/mg	包封率/%
1	25	35	6.65	73.6
2	0	35	10	58.4
3	25	50	3.3	55.1
4	50	35	10	52.3
5	50	20	6.65	69.1
6	0	20	6.65	49.8
7	50	35	3.3	59.9
8	25	20	3.3	49.8
9	0	35	3.3	53.4
10	0	50	6.65	69.8
11	50	50	6.65	51.2
12	25	50	10	46.6
13	25	20	10	50.3

表 3 方差分析结果

Tab. 3 Analysis results of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	1 888.45	9	209.83	13.85	0.001 1
A	32.08	1	32.08	2.12	0.189 0
B	1.67	1	1.67	0.109 9	0.750 0
C	6.39	1	6.39	0.421 7	0.536 8
AB	360.24	1	360.24	23.77	0.001 8
AC	230.74	1	230.74	15.23	0.005 9
BC	20.39	1	20.39	1.35	0.284 1
A ²	15.18	1	15.18	1.00	0.350 2
B ²	580.45	1	580.45	38.31	0.000 4
C ²	550.69	1	550.69	36.34	0.000 5
残差	106.07	7	15.15		
失拟合	106.07	3	35.36		
纯误差	0.000 0	4	0.000 0		
总和	1 994.52	16			

利用 Design Expert 12 软件进行 3 因素 3 水平的多元线性及二项式拟合, 确定最优处方参数。结果显示: $Y=73.6+0.1375A+0.4625B-1.32C-9.48AB-3.15AC-2.25BC-4.04A^2-9.59B^2-13.56C^2$ ($R^2=0.9979$), 实验模型的相关系数 $R^2=0.9979$, 说明响应值与各因素之间存在显著的回归关系。对以上二项式拟合方程的方差分析得出回归模型中的包封率的 $P<0.01$, 说明所选的 3 个自变量因素对于包封率有显著性的影响, 方差分析结果见表 3。绘制因变量和自变量的三维效应面图和二维等高图, 结果见图 2。由图 2 可看出, B、C 两因素

对包封率的影响较大。等高线图越扁平, 表示因素之间的相互影响越小, 即 A 对包封率的影响较小。最终确定最优的 3 个因素为 $A=25\text{ min}$, $B=35.4\text{ mg}$, $C=6.47\text{ mg}$, 最优处方为脂药比 31:1、大豆磷脂:胆固醇=28:5、超声时间 25 min, 预测包封率为 73.64%。采用经 Box-Behnken 试验确定的最优处方条件重复制备 CPPS-Lips, 并分别测定 3 次重复实验的包封率, 分别为 73.56%, 69.46%, 69.19%, 平均为 $(70.73\pm2.44)\%$, $RSD<3\%$ 。包封率结果与数学模型预测的数据接近。

3.4 CPPS-Lips 最佳处方条件的验证及表征

采用上述经 Box-Behnken 试验确定的最优处方条件重复制备 3 次 CPPS-Lips, 3 次重复试验的平均粒径为 $(151.2\pm2.2)\text{ nm}$ ($n=3$), PDI 值均 <0.3 , 分布良好; 电位平均值为 $(-17.7\pm0.6)\text{ mV}$ ($n=3$), 分布较均匀, 体系较稳定; CPPS-Lips 在透射电镜下的超微结构见图 3, 10 000 倍镜下清晰可见膜结构, 20 000 倍镜下 CPPS-Lips 大小均一, 分散均匀。

3.5 Lf-CPPS-LCL 的制备及工艺优化

3.5.1 标准曲线的制备 参照试剂盒说明, 经酶标仪检测, 得到的 BCA 标准曲线方程为 $Y=0.0013X+0.1503$, $R^2=0.9907$, 在 $0\sim1\,500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, BCA 标准蛋白溶液的线性关系良好。

3.5.2 Lf 连接效率的考察 制备的 3 批 Lf-CPPS-LCL, 乳铁蛋白的结合效率分别为 68.08%, 65.11%, 70.50%, 证明制备 Lf-CPPS-LCL 的方法和条件稳定。

3.5.3 DSPE-PEG2000 与卵磷脂的摩尔比对包封率的影响 DSPE-PEG2000 与卵磷脂摩尔比 2%, 5%, 7% 的降低值分别为 10.49%, 7.52%, 12.08%, DSPE-PEG2000 浓度为 5% 时, 脂质体在 7 d 内的包封率下降最少, 稳定性最好, 所以选择 DSPE-PEG2000 浓度为 5%。

3.5.4 Lf-CPPS-LCL 最佳处方条件的验证及表征 测定 Lf-CPPS-LCL 平均粒径为 $(197.5\pm0.6)\text{ nm}$, PDI 为 (0.2 ± 0.02) , 平均 Zeta 电位为 $(-18.8\pm1.1)\text{ mV}$, DSPE-PEG2000 的加入使脂质体粒径变大, 由于 DSPE-PEG2000 中磷酸基团的存在使其带负电荷, 所以较 CPPS-Lips 而言, Lf-CPPS 的负电性更明显, 使粒子间相互排斥的作用更强, 表现出更好的稳定性; 超微结构, TEM 镜下观察超微结构见图 4, 粒子呈均匀分散的球形, 表面圆润完整, 外层可见清晰的膜结构; 结构分析, 红外光谱扫描结果见图 5。

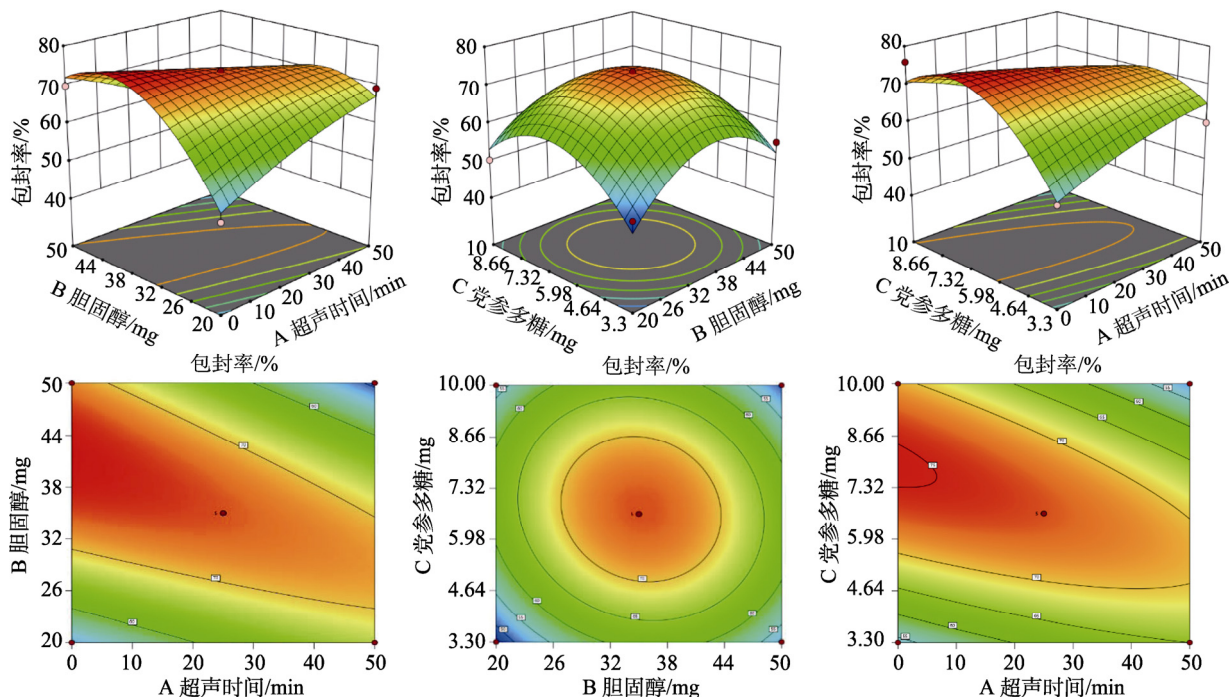


图2 响应面及等高线图

Fig. 2 Response surface and contour diagrams

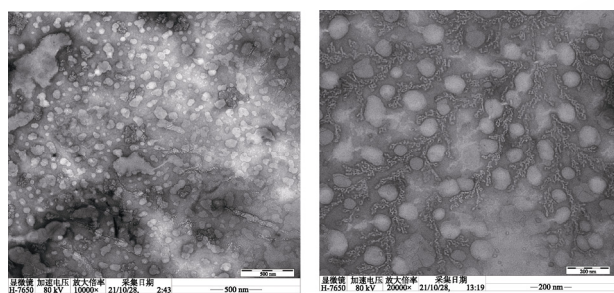


图3 党参多糖脂质体透射电镜图(10 000×, 20 000×)

Fig. 3 Transmission electron microscopy of CPPS-Lips (10 000×, 20 000×)

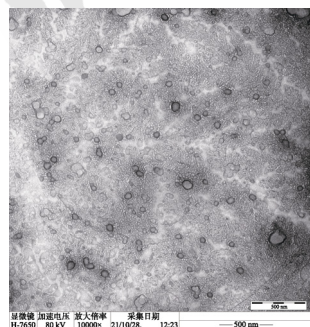


图4 乳铁蛋白修饰党参多糖脂质体透射电镜图(10 000×)

Fig. 4 Transmission electron microscopy of Lf-CPPS-LCL (10 000×)

图5A中 $3\,152.10\,\text{cm}^{-1}$, $930.60\,\text{cm}^{-1}$ 处为-COOH-的特征吸收峰,图5B中-COOH-的特征吸收峰消失, $3\,399.11\,\text{cm}^{-1}$, $1\,654.19\,\text{cm}^{-1}$ 处是仲酰胺-CONH-的特征吸收峰,在 $1\,735.6\,\text{cm}^{-1}$ 处的峰是

DSPE分子中2条脂肪酸链上-COOH-的吸收峰,化合物中也含有DSPE。表明Lf上的-NH₂-与双功能PEG上的-COOH-连接成功。

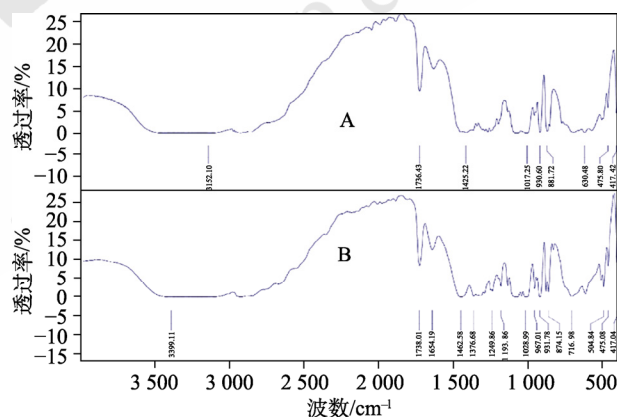


图5 红外光谱图

A-mPEG-CPPS-LCL; B-Lf-CPPS-LCL。

Fig. 5 Infrared spectrum

A-mPEG-CPPS-LCL; B-Lf-CPPS-LCL。

3.5.5 Lf-CPPS-LCL 体外释放度考察 体外释药结果和释放曲线见图6,实验结果显示,游离CPPS在10 h内基本完全释放,累计释放率为94.84%,CPPS-Lips在36 h时累计释放率达到84.69%;CPPS-LCL和Lf-CPPS-LCL则在72 h时累计释放率分别为75.74%和74.47%。可能是由于DSPE-PEG2000在脂质体表面形成了一层水化膜减慢CPPS的释放速度,达到缓释的效果。

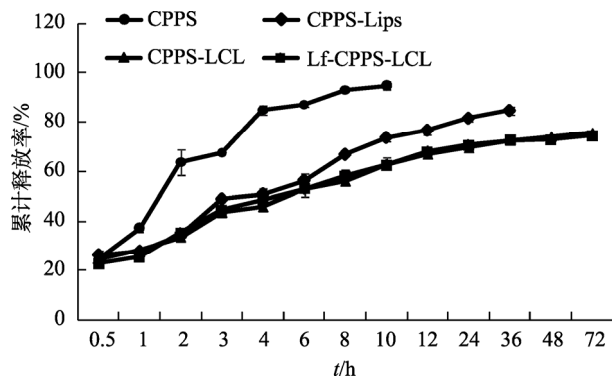


图6 体外释放曲线($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Fig. 6 Release curve *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 Lf-CPPS-LCL 的 BBB 透过性考察

3.6.1 模型评价 形态观察: 倒置显微镜观察到 Transwell 上室中梭形的 HUVECs 细胞, 生长较为缓慢, 逐渐呈现“铺石路”样, 相邻细胞逐渐融合无缝隙, 形成较为致密的单层屏障结构, 结果见图 7。4 h 渗漏试验: 4 h 后可见小室内外仍可维持 >0.5 cm 液面差, 说明体外 BBB 模型对液体具备一定屏障功能, 能够阻拦液体渗漏, 结果见图 8。TEER 试验: HUVECs 和 C6 共培养模型较 HUVECs 单培养模型会形成更高的 TEER 值, 试验后期差别更为明显, 共培养的 TEER 值比单培养模型明显升高 ($P<0.05$), 最后共培养模型 TEER 值为 $206 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 可用于后续试验, 结果见图 9。

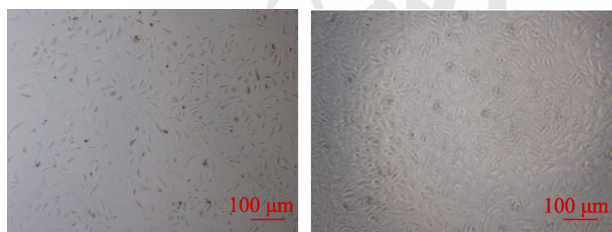


图7 HUVECs 的细胞形态(100×)
Fig. 7 Cell morphology of HUVECs(100×)

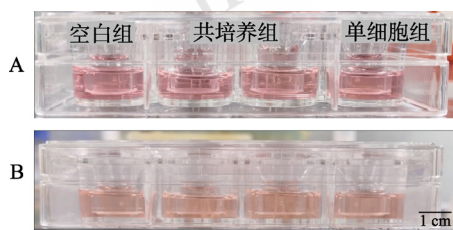


图8 4 h 渗漏试验结果
A—4 h 前; B—4 h 后。
Fig. 8 Results of 4 h leakage test
A—4 h before; B—4 h after.

3.6.2 Lf-CPPS-LCL 的 BBB 透过性考察 CPPS-Lips 和 Lf-CPPS-LCL 在 4 h 后体外 BBB 模型的

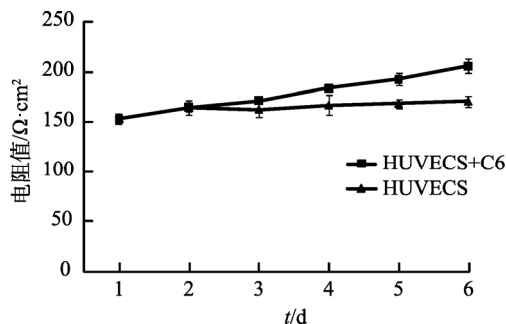


图9 共培养组和单细胞组体外血脑屏障电阻抗值($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Fig. 9 TEER values of *in vitro* blood-brain barrier models in co-culture group and single cell group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

透膜效率分别为 $(41.50 \pm 1.26)\%$, $(50.80 \pm 1.75)\%$, 可知 Lf-CPPS-LCL 透过率与 CPPS-Lips 相比有所提升。

3.7 CPPS、CPPS-Lips、Lf-CPPS-LCL 对 LPS 诱导的体外 BV2 细胞炎症模型的抗炎作用及其机制的初步研究

3.7.1 LPS 不同浓度和作用时间对 BV2 细胞存活率的影响 给予不同质量浓度的 LPS ($0.1, 1, 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 分别诱导培养 8, 12, 24, 48 h, 对 BV2 细胞的存活率无明显影响。结果见表 4。

表4 不同浓度 LPS 诱导不同时间对 BV2 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 4 Effects on the survival rate of BV2 cells induced by different concentrations of LPS for different time lengths ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	存活率/%			
	8 h	12 h	24 h	48 h
正常对照组	100.3±0.41	100.4±1.33	99.9±0.75	100.0±0.28
LPS $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	108.5±0.07	106.4±0.06	99.7±0.12	101.6±0.16
LPS $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	110.1±0.06	98.8±0.25	108.5±0.13	92.0±0.21
LPS $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	104.6±0.04	101.3±0.05	109.7±0.24	94.4±0.25

3.7.2 LPS 诱导的 BV2 体外炎症细胞模型释放 NO 的动态考察 不同浓度的 LPS 刺激细胞 8 h 和 12 h, 细胞释放 NO 的量与正常对照组比较差异无统计学意义; 中、高剂量 LPS ($1, 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 刺激细胞 24 h, 细胞释放 NO 的量与正常对照组比较显著升高 ($P<0.05$)。LPS 浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时培养 24 h 时 NO 浓度已达到造模浓度, 因此选择 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 培养 24 h 进行后续试验, 结果见表 5。

3.7.3 CPPS 不同浓度和作用时间对 BV2 细胞存活率的影响 给予 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CPPS 继续分别培养 12, 36, 48 h, 与正常对照组相比, 细胞存活

率无显著性差异, 培养 24 h, 细胞存活率有所增加($P<0.05$), 结果见图 10。加入不同浓度的 CPPS ($0.1, 1, 10, 100, 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)培养 24 h, 细胞存活率与正常对照组相比无明显影响, 且浓度为 ($1, 10, 100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)时能促进细胞增殖, 结果见图 11。

表 5 不同浓度 LPS 诱导不同时间对 BV2 细胞 NO 释放量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab. 5 Effects on the NO release quantity of BV2 cells induced by different concentrations of LPS for different time lengths($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	NO 释放量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
	8 h	12 h	24 h	48 h
正常对照组	7.50 $\pm$ 0.58	12.01 $\pm$ 0.20	9.47 $\pm$ 1.88	15.80 $\pm$ 1.16
LPS 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10.34 $\pm$ 0.81	11.10 $\pm$ 1.05	14.72 $\pm$ 5.68	35.00 $\pm$ 2.68 ¹⁾
LPS 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	8.70 $\pm$ 0.60	16.29 $\pm$ 1.32	27.90 $\pm$ 4.51 ¹⁾	41.30 $\pm$ 2.96 ¹⁾
LPS 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	8.85 $\pm$ 1.77	18.12 $\pm$ 1.77	35.08 $\pm$ 7.85 ¹⁾	68.90 $\pm$ 5.02 ¹⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$.

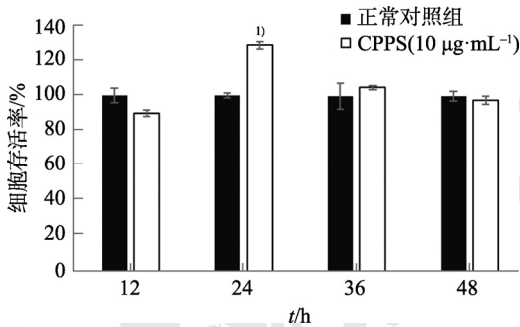


图 10 不同时间对 CPPS 诱导 BV2 细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 10 Effects on the survival rate of BV2 cells induced by CPPS for different time($\bar{x}\pm s, n=3$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$.

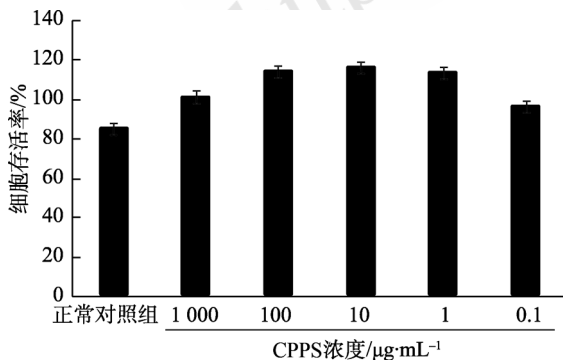


图 11 不同浓度 CPPS 对 BV2 细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 11 Effects on the survival rate of BV2 cells induced by different concentrations of CPPS($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.7.4 空白脂质体对 BV2 细胞存活率的影响 不同浓度的空白脂质体与 Lf 空白脂质体对 BV2 细胞均没有明显毒性, 且随着各组空白脂质体浓度的增加, BV2 的细胞存活率并没有明显的降低, 表明脂质体浓度对于后续实验细胞存活率无明显影响, 结果见图 12。

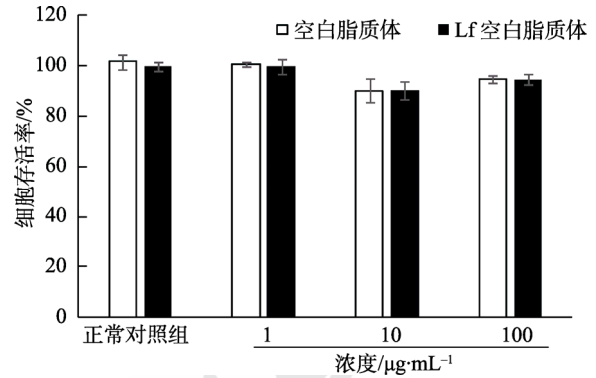


图 12 空白脂质体对细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 12 Effect of blank liposome on cell survival rate($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.7.5 CPPS、CPPS-Lips、Lf-CPPS-LCL 对 LPS 诱导的 BV2 炎症模型 NO 释放的影响 模型组与正常对照组相比有显著性差异($P<0.01$); CPPS、CPPS-Lips 和 Lf-CPPS-LCL 1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组与模型组比较, 细胞 NO 释放量的均显著降低($P<0.01$), 结果见表 6。

表 6 CPPS 及剂型对 BV2 细胞 NO 释放量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab. 6 Effects of CPPS and its formulation on NO release in BV2 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	NO 释放量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		
	CPPS	CPPS-Lips	Lf-CPPS-LCL
正常对照组	13.14 $\pm$ 1.00	14.86 $\pm$ 2.19	17.62 $\pm$ 2.26
模型组	41.73 $\pm$ 4.04 ¹⁾	46.81 $\pm$ 3.73 ¹⁾	50.82 $\pm$ 1.55 ¹⁾
1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	26.59 $\pm$ 1.22 ²⁾	31.94 $\pm$ 1.75 ²⁾	30.38 $\pm$ 2.28 ²⁾
10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	22.93 $\pm$ 1.07 ²⁾	23.50 $\pm$ 0.76 ²⁾	21.44 $\pm$ 1.63 ²⁾
100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	35.94 $\pm$ 2.83 ²⁾	30.80 $\pm$ 2.72 ²⁾	30.75 $\pm$ 1.61 ²⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

3.7.6 ELISA 法检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎症因子的含量 模型组与正常对照组相比, 细胞释放 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 明显增加, 差异具有统计学意义($P<0.001$); CPPS、CPPS-Lips 和 Lf-CPPS-LCL 1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组与模型组比较, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 提示 CPPS 对 LPS 诱导的 BV2 细胞

的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 这些炎症因子的释放具有不同程度的抑制作用, 结果见表 7~9。

表 7 CPPS 对炎症因子的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 7 Effects of CPPS on inflammatory factors($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常对照组	24.26 $\pm$ 1.37	7.07 $\pm$ 1.86	9.47 $\pm$ 1.42
模型组	118.86 $\pm$ 3.89 ¹⁾	24.03 $\pm$ 2.50 ¹⁾	28.85 $\pm$ 3.92 ¹⁾
1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CPPS	96.90 $\pm$ 7.97 ³⁾	19.70 $\pm$ 2.66 ²⁾	20.49 $\pm$ 5.13 ²⁾
10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CPPS	89.95 $\pm$ 7.92 ³⁾	19.46 $\pm$ 2.17 ²⁾	19.14 $\pm$ 4.81 ²⁾
100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CPPS	90.30 $\pm$ 7.89 ³⁾	19.73 $\pm$ 2.28 ²⁾	18.27 $\pm$ 4.66 ²⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

表 8 CPPS-Lips 对炎症因子的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 8 Effects of CPPS-Lips on inflammatory factors($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常对照组	18.18 $\pm$ 3.53	7.29 $\pm$ 1.05	12.91 $\pm$ 3.01
模型组	130.27 $\pm$ 3.06 ¹⁾	25.71 $\pm$ 1.64 ¹⁾	31.11 $\pm$ 5.33 ¹⁾
1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CPPS-Lips	107.84 $\pm$ 3.11 ³⁾	17.14 $\pm$ 1.79 ²⁾	22.00 $\pm$ 1.78 ³⁾
10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CPPS-Lips	103.46 $\pm$ 3.17 ³⁾	19.18 $\pm$ 1.08 ²⁾	19.88 $\pm$ 2.64 ²⁾
100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CPPS-Lips	104.86 $\pm$ 4.76 ³⁾	16.76 $\pm$ 1.19 ²⁾	20.70 $\pm$ 1.59 ³⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

表 9 乳铁蛋白修饰的党参多糖脂质体对炎症因子的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 9 Effects of Lf-CPPS-LCL on inflammatory factors($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常对照组	16.28 $\pm$ 5.79	12.84 $\pm$ 2.47	7.17 $\pm$ 1.85
模型组	126.61 $\pm$ 9.17 ¹⁾	30.07 $\pm$ 6.63 ¹⁾	23.10 $\pm$ 0.87 ¹⁾
1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Lf-CPPS-LCL	109.81 $\pm$ 2.22 ³⁾	21.62 $\pm$ 0.34 ²⁾	17.73 $\pm$ 0.68 ³⁾
10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Lf-CPPS-LCL	103.46 $\pm$ 3.17 ³⁾	20.72 $\pm$ 4.43 ²⁾	20.33 $\pm$ 1.40 ²⁾
100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Lf-CPPS-LCL	106.97 $\pm$ 4.09 ³⁾	20.30 $\pm$ 0.71 ³⁾	16.90 $\pm$ 1.75 ²⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.7.7 蛋白免疫印迹法检测炎症通路 TLR4、NF- κ B、MyD88 相关蛋白的表达 与正常对照组相比, 模型组 TLR4、NF- κ B、MyD88 的表达均不同程度增加, 具有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, CPPS、CPPS-Lips 和 Lf-CPPS-LCL 低中高各剂量组 TLR4、NF- κ B、MyD88 的表达均不同程度减少, 差异均具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 结果见图 13、表 10 和图 14、表 11。

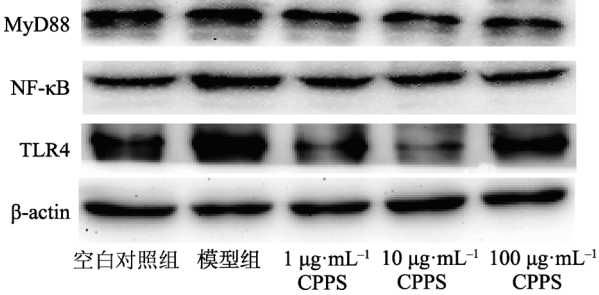


图 13 CPPS 对 TLR-4、NF- κ B、MyD88 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 13 Effects of CPPS on protein expression of TLR-4, NF- κ B and MyD88($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表 10 CPPS 对 TLR4、NF- κ B、MyD88 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 10 Effects of CPPS on protein expression of TLR4, NF- κ B and MyD88($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TLR4/ β -actin	NF- κ B/ β -actin	MyD88/ β -actin
正常对照组	0.95 $\pm$ 0.18	0.98 $\pm$ 0.08	0.84 $\pm$ 0.08
模型组	1.50 $\pm$ 0.39 ²⁾	1.41 $\pm$ 0.27 ¹⁾	1.07 $\pm$ 0.11 ¹⁾
1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CPPS	1.13 $\pm$ 0.16 ³⁾	0.81 $\pm$ 0.22 ³⁾	0.72 $\pm$ 0.10 ³⁾
10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CPPS	0.98 $\pm$ 0.38 ⁴⁾	0.76 $\pm$ 0.23 ⁴⁾	0.77 $\pm$ 0.19 ³⁾
100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CPPS	1.28 $\pm$ 0.30 ³⁾	1.03 $\pm$ 0.18 ³⁾	0.73 $\pm$ 0.21 ³⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

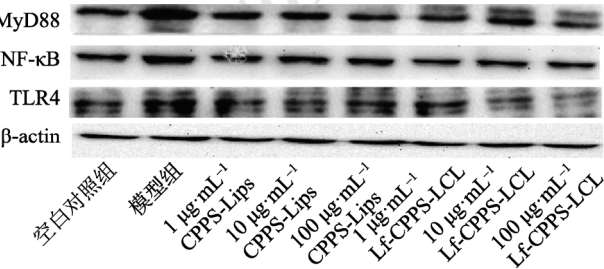


图 14 CPPS-Lips 和 Lf-CPPS-LCL 对 TLR-4、NF- κ B、MyD88 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 14 Effects of CPPS-Lips and LF-CPPS-LCL on protein expression of TLR-4, NF- κ B and MyD88($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

党参为桔梗科植物, 是中国常用的传统中药, 具有健脾益肺、补中益气, 以及调理胃肠运动的效用, 党参中含有多糖、三萜类、生物碱和皂苷类等多种成分, 其中多糖是主要活性成分之一。多糖是许多药用植物的主要成分, 含量高、不良反应小。CPPS 作为党参的重要活性成分之一, 具有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、抗病毒等多种药理活性。近年来许多研究表明 CPPS 具备良好的抗炎效果^[7]。本研究通过乳铁蛋白脂质体载药系统的

表 11 CPPS-Lips 和 Lf-CPPS-LCL 对 TLR4、NF- κ B、MyD88 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 11 Effects of CPPS-Lips and Lf-CPPS-LCL on protein expression of TLR4, NF- κ B and MyD88($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TLR4/ β -actin	NF- κ B/ β -actin	MyD88/ β -actin
正常对照组	0.98 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.08	1.09 $\pm$ 0.08
模型组	1.58 $\pm$ 0.09 ²⁾	0.81 $\pm$ 0.08 ²⁾	1.48 $\pm$ 0.19 ¹⁾
1 μ g $\cdot$ mL ⁻¹ CPPS-Lips	1.22 $\pm$ 0.27 ³⁾	0.59 $\pm$ 0.03 ⁴⁾	0.95 $\pm$ 0.07 ⁴⁾
10 μ g $\cdot$ mL ⁻¹ CPPS-Lips	1.19 $\pm$ 0.28 ³⁾	0.55 $\pm$ 0.15 ⁴⁾	0.80 $\pm$ 0.11 ⁴⁾
100 μ g $\cdot$ mL ⁻¹ CPPS-Lips	1.04 $\pm$ 0.15 ⁴⁾	0.62 $\pm$ 0.07 ³⁾	1.02 $\pm$ 0.14 ³⁾
1 μ g $\cdot$ mL ⁻¹ Lf-CPPS-LCL	1.17 $\pm$ 0.08 ³⁾	0.51 $\pm$ 0.06 ⁴⁾	1.09 $\pm$ 0.19 ³⁾
10 μ g $\cdot$ mL ⁻¹ Lf-CPPS-LCL	1.01 $\pm$ 0.08 ⁴⁾	0.49 $\pm$ 0.05 ⁴⁾	1.07 $\pm$ 0.36 ³⁾
100 μ g $\cdot$ mL ⁻¹ Lf-CPPS-LCL	0.85 $\pm$ 0.38 ⁴⁾	0.50 $\pm$ 0.06 ⁴⁾	0.94 $\pm$ 0.36 ³⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

包载, 可一定程度克服 CPPS 原药水溶液半衰期短、易分解、生物利用度低等缺点。结合天然药物与分子靶向载体的优点构建主动靶向纳米传递系统, 以促进 CPPS 对脑内炎症反应更好地发挥作用。处方中选择常用、安全的大豆卵磷脂和胆固醇作为脂质体材料, 便于后续产品研发、生产放大和临床应用。脂质体 PEG 化的方法主要分为一步法和后插入法 2 种, 一步法是将长循环材料与磷脂、胆固醇等膜材共同成膜制得长循环脂质体; 后插入法是先制备普通脂质体, 再将 DSPE-PEG2000 加入普通脂质体中孵育, 利用 DSPE-PEG2000 中疏水的磷脂头基与脂质体膜表面磷脂的相互作用, 使得 DSPE-PEG2000 的磷脂头基部分自组装插入脂质体的磷脂双分子层中, 形成长循环脂质体。由于后插入法制得的长循环脂质体, 其 DSPE-PEG2000 上的活性基团可以充分暴露在脂质体的表面, 有效增加与靶向配体的偶联效率。因此, 本研究采用后插入法, 构建 DSPE-PEG2000 和 DSPE-PEG2000-COOH 活性基团修饰的靶向脂质体 Lf-CPPS-LCL。处方中加入 DSPE-PEG2000 能够避免静脉给药后血液中巨噬细胞对脂质体的吞噬作用, 提高脂质体的稳定性。但 DSPE-PEG2000 加入量过多则易与磷脂形成混合胶束, 造成脂质体中药物的渗漏^[8]。Ahmad 等^[9]通过比较处方中 DSPE-PEG2000 不同摩尔含量(2%, 5%和 8%)对百里醌体内循环作用的影响, 发现当其含量为 5%时, 药物在血液中的 $T_{1/2}$ 最长。本研究通过包封率测定也得到相同结果, 因此, 固定摩尔含

量为 5%。但在实验中未涉及 DSPE-PEG2000-COOH 用量与 Lf 接枝量对靶向效率的影响, 未来可以此来进一步优化脂质体的与 Lf 的连接效率进而提高脂质体的靶向性。脂质体的粒径大小和 PDI 与脂质体的稳定性和包封率有很大的关系。PDI 越低, 表面系统分散得越好, 团聚的倾向就越小, 较小粒径的脂质体可以明显提高药物的血药浓度和生物利用度^[10]。本研究中制得的 Lf-CPPS-LCL 的粒径较小且粒径的分布较为均匀, 有利于将药物输送到特定的部位且体系较稳定。体外释放实验可知, Lf-CPPS-LCL 相比 CPPS 溶液, 表现出较好的缓释效果, 一方面可能是脂质体作为药物的储存形式, 能使包埋的内含物缓慢释放; 另一方面可能是由于 PEG 长链在脂质体表面形成的水化层能有效阻止药物扩散^[11]。

在建立 BBB 模型时, 采用 0.4 nm 直径的多孔悬挂式 Transwell, 将 HUVECs 和 C6 分隔开, 避免 2 种细胞相互混杂, 但 C6 分泌的相关功能蛋白可以通过微孔作用于 HUVECs。在 C6 对 HUVECs 的作用下, 细胞间可形成广泛的紧密连接复合体进而抑制外加电场下电流的跨内皮运动, 可观察到各脂质体在孵育 4 h 后, Lf-CPPS-LCL 显示出更有效的跨膜能力, 说明 Lf 的修饰, 可能通过 HUVEC/C6 细胞表面的 Lf 受体结合所介导的穿透作用, 显著提高脂质体穿过 BBB 的转运效率, 但是具体的内吞机制还有待进一步研究。脑内 BBB 是由多种细胞构成, 结构更复杂, 因此 Lf-CPPS-LCL 进入体内靶向 BBB 的能力、安全性、稳定性有待进一步在体实验研究。

LPS 作为一种细菌的内毒素可以引起炎症反应, 在以往报道中常在脑室内注射 LPS 模拟神经炎症, 在海马区、脑额叶等部位出现炎症, 所以 LPS 是较好的模拟神经炎症的物质之一。TLR 是一组介导炎症反应的关键跨膜蛋白, 主要在 BV2 细胞中表达, 并在调节应激炎症反应中发挥重要作用^[12], 其中 TLR4 是关键信号传导蛋白之一, 可以通过与相应配体结合活化 NF- κ B, 启动和调控炎症级联反应, MyD88 是 TLR4/NF- κ B 信号通路中重要的接头蛋白分子, 可以通过传导信号激活下游多种转录因子^[13-14]。本研究发现, 在 LPS 诱导的 BV2 细胞神经炎症反应中, CPPS 及其制剂可以降低 BV2 细胞炎症因子的释放, 而进一步研究发现 TLR4 和 NF- κ B 的表达显著下调, 下游

关键蛋白 MyD88 表达亦下调, 这说明, Lf-CPPS-LCL 可有效抑制炎症因子分泌, 其机制可能与调控 TLR/MyD88/NF- κ B 通路有关。

综上所述, 本研究筛选并确定了 Lf-CPPS-LCL 的最优处方, 比较了 CPPS-Lips 与 Lf-CPPS-LCL 跨越 BBB 的作用, 对 Lf-CPPS-LCL 抑制炎症作用的机制进行了初步探讨, 为未来进一步探索 CPPS 及其他多糖类中药有效成分的靶向脂质体新剂型, 以及该类剂型的在体 BBB 透过能力和体内脑靶向性的研究提供实验基础。

REFERENCES

- [1] DOROTHÉE G. Neuroinflammation in neurodegeneration: Role in pathophysiology, therapeutic opportunities and clinical perspectives[J]. J Neural Transm(Vienna), 2018, 125(5): 749-750.
- [2] HUANG Y Y, ZHANG Y, KANG L P, et al. Research progress on chemical constituents and their pharmacological activities of plant from *Codonopsis*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(1): 239-250.
- [3] MENG Y, XU Y J, ZHANG B H, et al. Study on the anti-inflammatory activity and mechanism of different components from *Codonopsis radix* polysaccharides[J]. China Pharm(中国药房), 2020, 31(11): 1348-1352.
- [4] MANCINI S, BALDUCCI C, MICOTTI E, et al. Multifunctional liposomes delay phenotype progression and prevent memory impairment in a presymptomatic stage mouse model of Alzheimer disease[J]. J Control Release, 2017(258): 121-129.
- [5] YU W Y, MA J Q, FANG J, et al. Preparation of PEGylated graphene oxide nanoparticles loaded with oridonin and its inhibitory effects on human colon cancer[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(19): 3954-3960.
- [6] WEI M Y, XU X D, LIN Y J, et al. Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide loaded of PEGylated liposomes[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2019, 39(16): 1614-1619.
- [7] XU Y J. Study on isolation, purification, structure characterization and anti-inflammatory activity of polysaccharide from *Codonopsis tangshen* Oliv[D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2018.
- [8] REN J, ZHANG D S, HOU W S, et al. Preparation and characterization of curcumin long-circulating liposomes[J]. J Hebei Univ Sci Technol(河北科技大学学报), 2018, 39(6): 532-539.
- [9] AHMAD I, AKHTER S, ANWAR M, et al. Supercritical anti-solvent technique assisted synthesis of thymoquinone liposomes for radioprotection: Formulation optimization, *in-vitro* and *in-vivo* studies[J]. Int J Pharm, 2017, 523(1): 398-409.
- [10] 谢佳秀, 巫小媚, 陈红丽, 等. 三七总皂苷脂质体的制备及表征研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 610-613.
- [11] DONG Y Y, YU C H, YU B, et al. Study on the preparation and *in vitro* properties of tubeimoside A long-circulating liposomes[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(7): 832-836.
- [12] HE J H, WEI J, LI D M, et al. Effect of gecko extract on neuroinflammation in rats with reserpine-induced depression via TLR4/NF- κ B pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(9): 56-62.
- [13] SHAN J L, CHENG H Y, WEN L, et al. Advances in research of TLR/MyD88/NF- κ B signaling pathway in different diseases[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2019, 35(4): 451-455.
- [14] WANG L, YAO L, JIN Y W, et al. Activation effect of human TLR4 signaling pathway by polysaccharide from *Phellinus igniarius*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(10): 1178-1182.

收稿日期: 2022-04-17

(本文责编: 曹粤锋)