

土贝母皂苷甲长循环脂质体的制备及体外性质考察

董莹莹¹, 余陈欢², 俞冰¹, 俞文英^{2*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江省医学科学院, 杭州 310013)

摘要: 目的 制备土贝母皂苷甲长循环脂质体(tubeimoside A long-circulating liposomes, TA-LC-Lipo), 并进行体外性质考察。方法 乙醇注入法制备 TA-LC-Lipo; 采用 HPLC 测定包封率及体外释放率; 通过 Marlvern 激光粒径分析仪测定粒径和 Zeta 电位; 肉眼观察法和紫外分光光度法评价其溶血作用。结果 确定处方为大豆磷脂浓度 10 mg·mL⁻¹、药脂比 1 : 10、大豆磷脂:胆固醇=4 : 1、DSPE-PEG 2000 的摩尔含量为 5%。制备得到的 TA-LC-Lipo 的平均粒径、PDI、电位、包封率分别为 123.0 nm, 0.134, -1.20 mV, 86.2%。结论 制得的 TA-LC-Lipo 粒度分布均匀, 包封率较高, 有较好的缓释作用, 并能有效改善土贝母皂苷甲的溶血现象。

关键词: 土贝母皂苷甲; 长循环脂质体; 体外释放; 体外溶血

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)07-0832-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.07.011

引用本文: 董莹莹, 余陈欢, 俞冰, 等. 土贝母皂苷甲长循环脂质体的制备及体外性质考察[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(7): 832-836.

Study on the Preparation and *in Vitro* Properties of Tubeimoside A Long-circulating Liposomes

DONG Yingying¹, YU Chenhuan², YU Bing¹, YU Wenying^{2*} (1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare tubeimoside A long-circulating liposomes(TA-LC-Lipo), and to study the *in vitro* properties of TA-LC-Lipo. **METHODS** TA-LC-Lipo was prepared by ethanol injection; encapsulation efficiency and *in vitro* release rate of TA-LC-Lipo were determined by HPLC; particle size and Zeta potential of TA-LC-Lipo were measured by a Marlvern Zetasizer Nano-ZS90; hemolysis of TA-LC-Lipo was assessed by visual observation and UV analysis. **RESULTS** The optimum prescription was as follows: the concentration of soybean phospholipid(SPC) was 10 mg·mL⁻¹, the ratio of drug to SPC was 1 : 10, the ratio of SPC to cholesterol was 4 : 1, and the molar content of DSPE-PEG 2000 was 5%. The average particle size, PDI, Zeta potential, and encapsulation efficiency of the prepared TA-LC-Lipo were 123.0 nm, 0.134, -1.20 mV, and 86.2%, respectively. **CONCLUSION** The prepared TA-LC-Lipo shows uniform particle size distribution, high encapsulation efficiency, sustained release, and low hemolytic activity *in vitro*.

KEYWORDS: tubeimoside A; long-circulating liposomes; *in vitro* release; *in vitro* hemolysis assay

中药土贝母 *Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet. 为葫芦科植物, 是一种广泛应用的传统中药, 清代医学家赵学敏所编《本草纲目拾遗》记载其具有清热解毒、消肿散结的功效^[1]。现代医学研究表明, 土贝母化学成分具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、免疫抑制等作用^[2]。土贝母皂苷甲(tubeimoside A, TA)是从土贝母中提取出来的主要活性成分之一, 近年来研究发现, TA 具有较强的抗肿瘤活性, 且抗癌谱广, 能有效抑制人宫颈癌细胞(Hela)^[3]、肺癌细胞(NSCLC)^[4]、胃癌细胞(BCG823)^[5]、人肝癌细胞(HepG2)^[5]、人鼻咽癌细胞(CNE-2Z)^[5]等的增殖。

TA 为五环三萜类皂苷, 结构式见图 1, 静脉

注射具有很强的溶血性, 无法直接应用于临床。而五环三萜类由于口服吸收较差以及机体代谢作用, 致使其生物利用度普遍较低^[6], 在一定程度上也影响了其剂型设计及评价。

脂质体可通过包埋技术提高药物的稳定性、保护药物免受肠道内酶的降解、改善药物的溶血作用等^[7-8]。其作为抗肿瘤药物的载体, 已得到广泛研究和应用。但普通脂质体易被网状内皮系统识别吞噬而造成其体内循环时间较短, 近年来用硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG)对脂质体膜进行修饰, 发现能显著改善药物在血液中的循环时间, 从而增强药物的疗效^[9]。Chen 等^[10]比较了经 DSPE-PEG2000 修饰的多西紫杉醇脂质

基金项目: 浙江省公益技术应用研究院所专项(2015F50065)

作者简介: 董莹莹, 女, 硕士生 Tel: (0571)88215623 E-mail: 598178329@qq.com

E-mail: 598178329@qq.com

*通信作者: 俞文英, 女, 副研究员

Tel:

(0571)88215623 E-mail: zjywenying@163.com

体(PEGylated docetaxel liposome, PL-DOC)与普通脂质体的体内外释放及分布行为,发现 PL-DOC 能显著降低单核吞噬系统(如肝脏和脾脏)的摄取,同时延长血浆中 DOC 的保留时间。

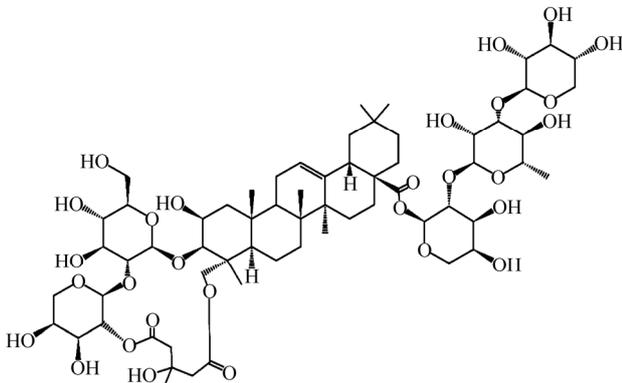


图 1 土贝母皂苷甲的化学结构
Fig. 1 Chemical structure of tubeimoside A

本研究拟采用乙醇注入法制备 DSPE-PEG 2000 修饰的 TA 长循环脂质体(tubeimoside A long-circulating liposomes, TA-LC-Lipo),并对其体外特性进行考察,从而为进一步研究其体内外抗肿瘤作用奠定基础。

1 仪器与试剂

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); HJ-3 控温磁力搅拌器(常州国宇仪器制造有限公司); 超滤管 Amicon Ultra-4(美国 Millipore 公司, MWCO=30 K); DK-S22 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备); HAD-1080 恒温震荡仪(北京恒奥德仪器仪表有限公司); Nano-ZS90 激光粒径分析仪(英国 Marlvern 公司); UV-2600A 紫外分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)。

TA(西安昊轩生物科技有限公司,批号: HXTBM60943; 纯度>98%); 大豆卵磷脂(soybean phospholipids, SPC, 上海艾韦特医药科技有限公司,批号: SY-SI-160101); 胆固醇(cholesterol, CHO, 日本精化株式会社,批号: B41239); DSPE-PEG 2000(德国 Lipoid 公司,批号: 588200-2170082-01); TA 对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 111536-200304; 纯度>99%); 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TA-LC-Lipo 的制备

采用乙醇注入法制备 TA-LC-Lipo。精密称取处方量的 SPC、CHO、TA 及 DSPE-PEG 2000,加入适量乙醇中,待完全溶解后,将溶液缓慢注入

到 pH=7.4 的 PBS 溶液中,恒温(40 °C)磁力搅拌待乙醇完全除尽,依次过 0.80, 0.45 μm 微孔滤膜,得到 TA-LC-Lipo, 4 °C 冰箱保存。

2.2 TA-LC-Lipo 的处方筛选

根据预实验结果及参考相关文献^[11],固定处方中长循环材料 DSPE-PEG 2000 的摩尔含量为 5%,以粒径和包封率为评价指标,通过考察 SPC 浓度、SPC : CHO 质量比、TA : SPC 质量比,筛选出最优处方。

2.2.1 SPC 浓度考察 分别选择 SPC 浓度为 5, 10, 15, 20 mg·mL⁻¹,固定其他条件,制备 TA-LC-Lipo。以粒径和包封率(encapsulation efficiency, EE)为评价指标,筛选出合适的 SPC 浓度,结果见表 1。随着 SPC 浓度的递增,TA-LC-Lipo 的粒径与 EE 也逐渐增大。但 SPC 浓度>10 mg·mL⁻¹时,TA-LC-Lipo 放置 1 周后容易产生沉淀,说明 SPC 浓度太大不利于形成稳定的脂质体,且一般情况下,脂质体粒径>200 nm 时,容易被体内网状内皮系统清除,而粒径在 100~200 nm 时,则具有较好的体内循环时间^[12]。综合考虑,确定处方中的 SPC 浓度为 10 mg·mL⁻¹。

表 1 SPC 浓度对 TA-LC-Lipo 的影响(n=3)

Tab. 1 Effect of the SPC concentration on TA-LC-Lipo (n=3)

SPC 浓度/mg·mL ⁻¹	粒径/nm	PDI	EE/%
5	98.6	0.202	57.9
10	121.5	0.189	80.1
15	189.2	0.268	88.2
20	296.2	0.271	90.8

2.2.2 SPC : CHO 质量比的筛选 分别选取 SPC : CHO 质量比为 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 制备 TA-LC-Lipo,固定处方中 SPC 浓度为 10 mg·mL⁻¹,以粒径和 EE 为评价指标,筛选出合适的比值,结果见表 2。随着处方中 CHO 用量的增加,TA-LC-Lipo 的粒径也随之变大,当 SPC : CHO 质量比为 4 : 1 时,EE 最高。

表 2 SPC : CHO 比例对 TA-LC-Lipo 的影响(n=3)

Tab. 2 Effect of the ratio of SPC to CHO on TA-LC-Lipo(n=3)

SPC : CHO	粒径/nm	PDI	EE/%
1 : 1	307.2	0.223	73.2
2 : 1	289.3	0.169	79.7
4 : 1	122.2	0.198	84.3
6 : 1	92.5	0.176	77.9

2.2.3 TA : SPC 质量比的筛选 分别选取 TA : SPC 质量比为 1 : 5, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20, 制备 TA-LC-Lipo,固定处方中 SPC 浓度为 10 mg·mL⁻¹,

SPC:CHO 质量比为 4:1, 以粒径和 EE 为评价指标, 筛选出合适的药脂比, 结果见表 3。当磷脂比例增大时, TA-LC-Lipo 的粒径和 EE 也随之增大, 而当比例高于 1:10 时, EE 不再显著增加。综合考虑, 确定处方中药脂比为 1:10。

表 3 TA:SPC 对 TA-LC-Lipo 的影响(n=3)

Tab 3 Effect of the ratio of TA to SPC on TA-LC-Lipo(n=3)

TA:SPC	粒径/nm	PDI	EE/%
1:5	117.5	0.232	68.56
1:10	127.4	0.151	86.07
1:15	189.2	0.168	86.26
1:20	205.3	0.197	86.72

2.2.4 优化后的 TA-LC-Lipo 处方 SPC 浓度为 10 mg·mL⁻¹、药脂比 1:10、SPC:CHO=4:1、DSPE-PEG 2000 的摩尔含量为 5%。

2.3 EE 测定方法的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(65:35); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 214 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

2.3.2 对照品溶液及样品溶液的配制 精密称取 TA 对照品 20.00 mg, 于 20 mL 量瓶中加适量甲醇溶解后定容至刻度, 稀释至浓度为 100 μg·mL⁻¹ 的 TA 对照品溶液。精密量取 TA-LC-Lipo 1 mL 于 20 mL 量瓶中, 加甲醇破乳稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 得到样品溶液。

2.3.3 标准曲线的制备 分别精密移取适量 TA 对照品溶液于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇定容稀释成浓度分别为 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 取 20 μL 注入 HPLC 中, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 以浓度(C)为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标进行线性回归, 得标准曲线方程 $A=2\ 324.2C-1\ 681.1$ ($R^2=0.999\ 7$), 说明 TA 在 5.0~100.0 μg·mL⁻¹ 内线性良好。

2.3.4 仪器精密度试验 配制 TA 浓度为 40.0 μg·mL⁻¹ 的 TA 对照品溶液, 进样 6 次测定, 计算 RSD 为 0.72%, 说明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一样品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样, 测定峰面积 RSD 值为 0.97%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.6 重复性试验 取同一批次样品 6 份, 按“2.3.2”项下方法制备样品溶液, 分别进样, 测得其峰面积 RSD 为 0.83%, 说明重复性良好。

2.3.7 回收率试验 精密吸取同一样品溶液 9 份, 分别精密加入低、中、高 3 个浓度的 TA 对照品溶

液, 各 3 份, 用甲醇稀释, 摇匀后进样, 测定峰面积 RSD 为 1.08%, 说明回收率高。

2.4 TA-LC-Lipo 的体外表征

2.4.1 EE 测定 通过超滤离心法^[13]测定 TA-LC-Lipo 的 EE。将适量 TA-LC-Lipo 加入 Ultra-4 超滤离心管(MWCO=30 K)中, 于 5 000 r·min⁻¹ 离心 15 min。将滤液进行 HPLC 分析, 计算得游离 TA 含量(C₁)。同时移取同批 TA-LC-Lipo 适量于甲醇破乳并进行 HPLC 分析, 计算得脂质体中的总 TA 含量(C₀)。根据以下公式计算 EE: $EE(\%)=(1-C_1/C_0)\times 100\%$, 测得其 EE 为 86.2%。

2.4.2 形态观察 制得的 TA-LC-Lipo 为略呈蓝色乳光的半透明液体。取适量滴于铜网表面, 静置 2 min, 使 TA-LC-Lipo 充分吸附在铜网上。用 2% 磷钨酸染液染色 2 min, 置透射电镜下观察, 见图 2, 可见其呈圆形或类圆形, 大小分布较均匀。

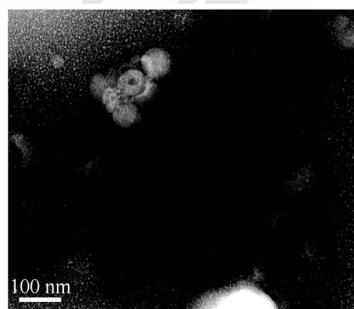


图 2 TA-LC-Lipo 透射电镜照片

Fig. 2 TEM of TA-LC-Lipo

2.4.3 粒径与电位 通过 Nano-ZS90 激光粒径分析仪测定 TA-LC-Lipo 的粒径分布和 Zeta 电位。经处方优化后的 3 批 TA-LC-Lipo 样品平均粒径为 123.0 nm, PDI 为 0.134, Zeta 电位为 -1.20 mV。所制备的 TA-LC-Lipo 粒度分布均匀, 见图 3。

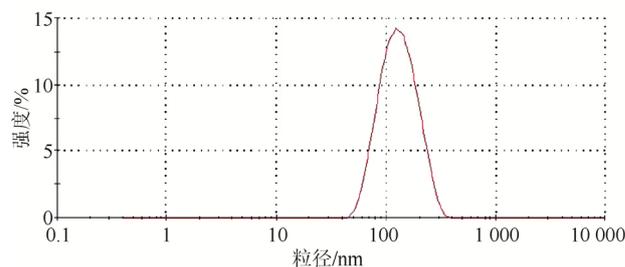


图 3 TA-LC-Lipo 的粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of TA-LC-Lipo

2.5 TA-LC-Lipo 体外释放度测定

2.5.1 体外释放度测定方法建立 TA-LC-Lipo 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 以浓度(C)为横坐标, 以峰面积(A)为纵坐标进行线性回归, 得标

准曲线方程 $A=1\ 884.1C+45.683(R^2=0.999\ 8)$, 说明 TA 在 $0.10\sim 6.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.5.2 体外释放度测定 采用透析袋法考察 TA-LC-Lipo 的体外释放情况, 分别取 TA-LC-Lipo 和 TA 溶液各 1 份置透析袋内。将含药透析袋置 200 mL PBS 缓冲液中, 于恒温振荡仪中振荡 ($37\ ^\circ\text{C}$), 固定转速 $75\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下, 分别于 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h 取样, 每次 3 mL, 同时补加等量恒温的溶出介质, 经微孔滤膜过滤后, 测定 TA 浓度, 计算累积释放度(Q), 结果见图 4。

从释药曲线可见, TA 溶液释药很快, 12 h 时药物已基本释放完全, 累积释放度为 $(100.63\pm 3.79)\%$; 而 TA-LC-Lipo 释放缓慢, 12 h 时累积释放度为 $(42.57\pm 4.61)\%$, 24 h 后释药曲线渐趋平稳, 48 h 时累积释放 $(68.66\pm 4.43)\%$, 可见 TA-LC-Lipo 在体外具有显著的缓释作用。

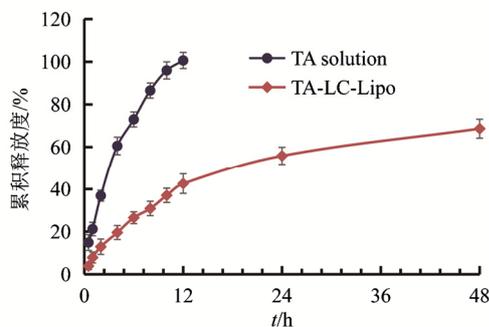


图 4 TA 溶液及 TA-LC-Lipo 体外释放曲线 ($n=3$)
Fig. 4 *In vitro* release curve of TA solution and TA-LC-Lipo ($n=3$)

2.6 TA-LC-Lipo 体外溶血作用

2.6.1 2%红细胞悬液的配制 取新鲜鼠血加入预先装有抗凝剂的离心管中。2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上层血浆。加入约 5~10 倍量的生理盐水, 轻轻摇匀, 于 $4\ ^\circ\text{C}$ 低温离心 ($2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 5~10 min, 弃上清液, 沉淀用生理盐水反复洗涤 2~3 次, 至上清液不再呈红色为止。吸取红细胞 0.2 mL, 用生理盐水稀释至 10 mL, 即得 2%红细胞混悬液。

2.6.2 肉眼观察法 取洁净试管, 编号, 各管分别加入 TA-LC-Lipo 或 TA 溶液, 用生理盐水混匀, 最后每管加入 2% 的红细胞混悬液, 立即置于 $(37\pm 0.5)\ ^\circ\text{C}$ 的恒温水浴中孵育 30 min, 取出后以 $1\ 800\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。判定标准: 若溶液为澄清红色, 管底无细胞残留或仅有少量细胞残留, 表明发生溶血; 若红细胞全部下沉, 上清液无色澄清, 表明无溶血发生。结果表明脂质体可有效

抑制 TA 的溶血作用, 见图 5。

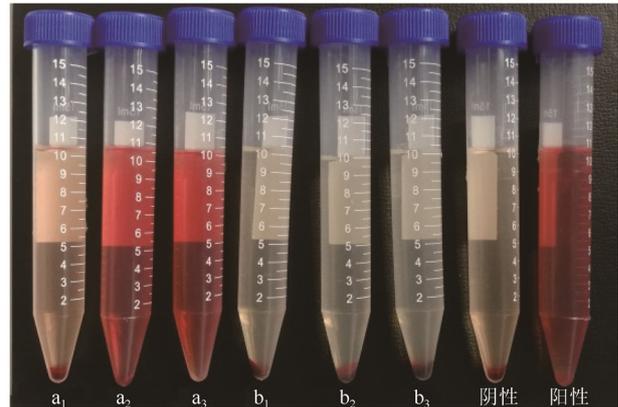


图 5 TA 溶液及 TA-LC-Lipo 溶血作用比较
a₁-5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA 溶液; a₂-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA 溶液; a₃-30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA 溶液; b₁-5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA-LC-Lipo; b₂-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA-LC-Lipo; b₃-30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA-LC-Lipo; 阴性-0.9%氯化钠溶液; 阳性-蒸馏水。
Fig. 5 Comparison of hemolytic activity of TA solution and TA-LC-Lipo

a₁-5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA solution; a₂-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA solution; a₃-30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA solution; b₁-5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA-LC-Lipo; b₂-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA-LC-Lipo; b₃-30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TA-LC-Lipo; negative control-0.9% sodium chloride solution; positive control-distilled water.

2.6.3 分光光度法 通过 UV 对 TA-LC-Lipo 及 TA 溶液的溶血作用进行进一步评价^[14]。每管离心后取上清, 用紫外分光光度计在 575 nm 处测定吸光度(A 值), 将蒸馏水作为空白对照。溶血率计算公式: $\text{溶血率}(\%)=(A_i-A_0)/(A_i-A_0)\times 100\%$, A_i 为各供试品的吸光度, A_0 为阴性对照吸光度, A_i 为阳性对照吸光度, 溶血率 > 5% 表明出现溶血。当 TA 浓度在 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, TA 溶液就已出现严重溶血, 溶血率高达 91.60%; 而脂质体包裹后, TA 浓度高达 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 也未出现溶血, 溶血率仅为 2.12%, 结果见表 4。

表 4 TA-LC-Lipo 和 TA 溶液的体外溶血活性

Tab 4 *In vitro* hemolytic activity of TA-LC-Lipo and TA solution

序号	TA 溶液			TA-LC-Lipo		
	TA 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	吸光度 <i>A</i>	溶血率/ %	TA 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	吸光度 <i>A</i>	溶血率/ %
1	5	0.091	1.61	5	0.039	0.00
2	10	1.023	91.60	10	0.039	0.00
3	30	1.125	101.45	30	0.048	0.00
4	-	-	-	50	0.042	0.00
5	-	-	-	100	0.051	0.00
6	-	-	-	200	0.067	0.00
7	-	-	-	500	0.116	2.12

3 讨论

本研究旨在构建 PEG 修饰的 TA-LC-lipo 递送系统, 并对其体外性质进行评价。DSPE-PEG 2000

是一种兼有亲脂性和亲水性的两亲性聚合物，具长循环特性，并可借助 EPR 效应增加药物在肿瘤部位的蓄积^[15]。体外释放实验可知，TA-LC-lipo 相比 TA 溶液，表现出了较好的缓释效果，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 PEG 长链在脂质体表面形成的水化层能有效阻止药物扩散^[16]。Ahmad 等^[11]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。因此，本研究固定其摩尔含量为 5%。

另外，DSPE-PEG 2000 的用量对脂质体的稳定也具有非常重要的影响，当其在处方中的摩尔百分含量占 5%~7%时，脂质体能达到最佳的热稳定状态，这可能是由于此时 PEG 分子从“蘑菇状”构象转变成“毛刷状”构象，PEG 层几乎完全覆盖表面，使其空间保护作用增强^[17-18]。同时，DSPE-PEG 2000 修饰后，TA-LC-lipo 的电位绝对值接近于零，其原因可能是 PEG 呈中性，可屏蔽脂质体表面部分电荷^[19]，这也为其减弱与巨噬细胞表面的正电荷发生相互作用而被吞噬提供了有利条件^[20]。

体外溶血试验发现，TA 溶液的溶血性较强， $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的溶血率 >90%，其溶血机制主要是三萜皂苷会与生物膜上的胆甾醇形成复合物，产生了离子通道和较大的水性孔道，导致红细胞穿孔破裂，发生溶血^[21]。而将 TA 包裹在含有胆固醇的脂质体中，TA 已经与胆固醇相结合，就不会再与红细胞中的胆甾醇结合而使红细胞破裂。因此，TA 经脂质体包裹后，可有效解决其溶血的不良反应。

本研究采用乙醇注入法制备 TA-LC-Lipo，制备工艺简单，制得的脂质体具有较高的包封率和良好的体外缓释效果，同时显著降低了 TA 的溶血作用，为 TA-LC-Lipo 的体内药动学及药效研究奠定了基础。

REFERENCES

[1] BAO W Q, WANG J X, AN C, et al. Inhibitory effect of fresh tubeimu (*Rhizoma Bolbostemmae*) dichloromethane extract on tumor growth and lung metastasis of human breast cancer MDA-MB-231-GFP nude mice [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*(中医药导报), 2017, 23(23): 18-21.

[2] ISLAM M S, WANG C, ZHENG J, et al. The potential role of tubeimosides in cancer prevention and treatment [J]. *Eur J Med Chem*, 2019(162): 109-121.

[3] FENG X, ZHOU J, LI J, et al. Tubeimoside I induces accumulation of impaired autophagolysosome against cervical cancer cells by both initiating autophagy and inhibiting

lysosomal function [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1117-1132.

[4] SHI H, BI H, SUN X, et al. Tubeimoside-I inhibits the proliferation and metastasis by promoting miR-126-5p expression in non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3126-3134.

[5] ISLAM M S, WANG C, ZHENG J, et al. The potential role of tubeimosides in cancer prevention and treatment [J]. *Eur J Med Chem*, 2019(162): 109-121.

[6] MANAYI A, NIKAN M, NOBAKHT-HAGHIGHI N, et al. Advances in the anticancer value of the ursolic acid through nanodelivery [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(37): 4866-4875.

[7] PANAHY Y, FARSHBAF M, MOHAMMADHOSSEINI M, et al. Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017, 45(4): 788-799.

[8] LI J, GUO Y. Basic evaluation of typical nanoporous silica nanoparticles in being drug carrier: Structure, wettability and hemolysis [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017(73): 670-673.

[9] HUA Y H, WANG W J, WANG G, et al. Preparation and evaluation of oxaliplatin long-circulating liposomes [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2018, 35(3): 335-339.

[10] CHEN Y, CHEN J, CHENG Y, et al. A lyophilized sterically stabilized liposome-containing docetaxel: *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *J Liposome Res*, 2017, 27(1): 64-73.

[11] 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.

[12] YANG Y F, XIE X Y, YANG Y, et al. A review on the influences of size and surface charge of liposome on its targeted drug delivery *in vivo* [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2013, 48(11): 1644-1650.

[13] WANG Y, LIU X, LIU G, et al. Novel galactosylated biodegradable nanoparticles for hepatocyte-delivery of oridonin [J]. *Int J Pharm*, 2016, 502(1/2): 47-60.

[14] KILLILEA D W, ROHNER F, GHOSH S, et al. Identification of a hemolysis threshold that increases plasma and serum zinc concentration [J]. *J Nutr*, 2017, 147(6): 1218-1225.

[15] ZAKIA B, MAN Y, XIE C, et al. Design of Y-shaped targeting material for liposome-based multifunctional glioblastoma-targeted drug delivery [J]. *J Control Release*, 2017, 10(255): 132-141.

[16] KHADEMI F, YOUSEFI-AVARVAND A, DERAKHSHAN M, et al. Formulation and optimization of a new cationic lipid-modified PLGA nanoparticle as delivery system for mycobacterium tuberculosis HspX/EsxS fusion protein: an experimental design [J]. *Iran J Pharm Res*, 2019, 18(1): 446-458.

[17] WEI M Y, ZOU Q, WU C B, et al. *In vitro* targeting effect of lactoferrin modified PEGylated liposomes for hepatoma cells [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2015, 50(10): 1272-1279.

[18] XUE J X, BI H S, LI Y A, et al. Preparation and *in vitro* performance evaluation of doxorubicin loaded lipid calcium phosphate nanoparticles with shell-core structure [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2018, 53(8): 1365-1371.

[19] HIOKI A, WAKASUGI A, KAWANO K, et al. Development of an *in vitro* drug release assay of PEGylated liposome using bovine serum albumin and high temperature [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(9): 1466-70.

[20] RHAESE S, VON BRIESEN H, RUBSAMEN-WAIGMANN H, et al. Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery [J]. *J Control Release*, 2003, 92(1/2): 199-208.

[21] VO N N Q, FUKUSHIMA E O, MURANAKA T. Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and saponinins [J]. *J Nat Med*, 2017, 71(1): 50-58.

收稿日期: 2019-03-14

(本文责编: 曹粤锋)