

丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体的制备及其真皮滞留效应考察

张慧迪, 时军*, 陈桂添, 吴艳婷, 郭思琦

(广东药科大学 中药学院, 广东省局部精准递药制剂工程技术研究中心, 广州 510006)

[摘要] **目的:**制备具有防治增生性瘢痕作用的丹皮酚血管内皮生长因子(VEGF)抗体修饰脂质体,建立其质量评价方法并考察其真皮滞留效应。**方法:**采用薄膜分散-超声法制备脂质体,以包封率为评价指标,采用 Box-Behnken 响应面法优选丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体的制备工艺,通过透射电镜观察脂质体形态,激光粒度仪测定粒径及 Zeta 电位, Franz 扩散池法考察该脂质体的真皮滞留效应。**结果:**丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体的最佳制备工艺为磷脂质量浓度 $7.36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,按卵磷脂-胆固醇-丹皮酚-(对硝基苯酯基-聚乙二醇 3000-二油酰磷脂酰乙醇胺)-(贝伐单抗-聚乙二醇 3000-二油酰磷脂酰乙醇胺) (14:5:4:0.28:0.05),成膜温度 $41 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.5 的磷酸二氢钠缓冲液脱膜,超声 3 min (超声时间 2 s,间隔 3 s,功率 300 W);包封率 $(73.61 \pm 2.36)\%$,平均粒径 $(235.7 \pm 4.67) \text{ nm}$,Zeta 电位 $-(5.13 \pm 0.25) \text{ mV}$,丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体透皮速率缓慢,真皮滞留效应显著。**结论:**丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体的制备工艺合理可行、包封率较高、体外透皮性能良好且具有缓释效果;药物真皮滞留量显著高于丹皮酚原料药和丹皮酚脂质体。

[关键词] 丹皮酚; 血管内皮生长因子; 脂质体; 真皮滞留效应; 贝伐单抗

[中图分类号] R283.6;R945;R285.5;R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0019-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030019

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171114.1156.036.html>

[网络出版时间] 2017-11-14 11:56

Preparation of Liposomes of Paeonol Modified with VEGF Antibody and Investigation of Its Dermal Retention Effect

ZHANG Hui-di, SHI Jun*, CHEN Gui-tian, WU Yan-ting, GUO Si-yi

(Guangdong Engineering & Technology Research Center of Local Precision Drug Delivery System, School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare liposomes of paeonol modified with vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody for preventing and treating hypertrophic scars, and establish its quality evaluation method, as well as study on its dermal retention effect. **Method:** The liposomes of paeonol modified with VEGF antibody were prepared by thin-film dispersion-ultrasonic method. Taking encapsulation efficiency as index, Box-Behnken response surface methodology was used to optimize the preparation process. The morphology of the liposomes was observed by transmission electron microscopy, particle size and Zeta potential were measured by particle size analyzer, dermal retention effect of the liposomes was determined by Franz diffusion cell method. **Result:** The optimal preparation conditions were as follows: phospholipid concentration of $7.36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, lecithin-cholesterol-paeonol- (pNP-PEG3000-DOPE) - (BVE-PEG3000-DOPE) (14:5:4:0.28:0.05), film forming temperature of $41 \text{ }^\circ\text{C}$, stripping with pH 7.5 sodium dihydrogen phosphate buffer solution, ultrasonic time of 3 min (ultrasonic time of 2 s, the interval of 3 s, power of 300 W); under these conditions, encapsulation efficiency of the

[收稿日期] 20170703(002)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2014A020212417);广东省高等学校优秀青年教师培养计划项目(YQ2015099);广东省普通高校特色创新项目(2015KTSCX071)

[第一作者] 张慧迪,在读硕士,从事中药新剂型及制剂新技术研究,Tel:15521066189,E-mail:zhanghuidi3@163.com

[通信作者] *时军,博士,副教授,从事中药新剂型及制剂新技术研究,Tel:020-39352169,E-mail:shijun8008@163.com

liposomes was $(73.61 \pm 2.36)\%$, particle size was (235.7 ± 4.67) nm and Zeta potential was $- (5.13 \pm 0.25)$ mV. Transdermal rate of liposomes of paeonol modified with VEGF antibody was slow and its dermal retention effect was remarkable. **Conclusion:** This optimized preparation process is reasonable and feasible with high encapsulation efficiency, good *in vitro* transdermal properties and sustained release effect. Liposomes of paeonol modified with VEGF antibody has obvious retention effect in the dermis layer, which is significantly higher than paeonol liposomes and paeonol raw material.

[**Key words**] paeonol; vascular endothelial growth factor; liposomes; dermal retention effect; bevacizumab

增生性瘢痕(HS)的治疗仍然是世界难题,瘢痕增生严重者可影响体表美观并导致功能障碍,给患者身心带来了巨大伤害^[1]。烧伤、烫伤后 HS 平均发病率高达 80%,但治疗效果并未随科技进步而得到显著改善^[2]。目前,HS 的临床治疗手段主要有手术切除和药物治疗。手术治疗通常需要植皮,并结合放射线或激光照射,费用较高,且复发率达 50%。而目前主要应用于临床抑制 HS 的药物如激素类及细胞因子类药物,副作用大。因此,研制安全有效的防治瘢痕增生药物是该领域的当务之急^[3]。

HS 主要由真皮过度纤维化造成。组织发生创伤后,在伤口愈合过程中,转化生长因子- β (TGF- β)和血管内皮生长因子(VEGF)等系列细胞因子共同作用,促使真皮层大量微血管生成、成纤维细胞增殖及胶原过度沉积,最终导致瘢痕增生^[4]。因此,药物在真皮层的滞留量成为 HS 防治的关键。

贝伐单抗(BEV)是全世界第 1 个被批准的单克隆免疫球蛋白 G1(IgG1)抗 VEGF 抗体阻断药,能特异性阻断 VEGF 的生物效应,抑制血管过度增生,延缓成纤维细胞生长及转移,从而达到抑制瘢痕增生的目的^[5]。丹皮酚为毛茛科植物牡丹皮根皮和萝藦科植物徐长卿全草的主要活性成分^[6]。丹皮酚能抑制 TGF- β ,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及细胞内氧自由基产生,能有效抑制微血管过度增殖、减少炎症组织中白细胞介素-1 β (IL-1 β)和 IL-8 含量以及避免色素沉积^[7-8]。丹皮酚目前有片剂、注射剂及软膏剂等剂型,丹皮酚软膏临床上可用于治疗瘢痕瘙痒,有一定抑制瘢痕增生的作用,但局部应用不能达到较好的效果,这与皮肤的角质层以及瘢痕缺乏皮肤附件而阻碍了药物进入真皮层有关。脂质体作为一种透皮给药微粒载体,具有组织靶向性、缓释性和细胞亲和性的特性。本实验拟将 BEV 通过聚乙二醇与磷脂相连,制备成丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体,以增强药物在真皮层的滞留效应。

1 材料

UltiMate3000 型高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技公司),JY-96IIN 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),LF-50 型脂质体挤出仪(加拿大 Avestin 公司),JEM-2100F 型场发射透射电子显微镜(日本电子株式会社),LA-960S 型激光散射粒度分布分析仪(日本 Horiba 公司),PHS-25 型电子数显 pH 计(上海雷磁仪器厂),TP-6 型透皮扩散仪(天津市精拓仪器科技有限公司),BP211D 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司)。

大豆卵磷脂 S100 和二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)(德国 Lipoid 公司),胆固醇(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),丹皮酚原料药(南京泽朗生物科技有限公司,质量分数 >99%),丹皮酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110708-201506,纯度 $\geq 98\%$),贝伐单抗(BEV,武汉日升科技发展有限公司),聚乙二醇-对硝基苯酯[PEG-(pNP)₂,苏州宜百奥生物科技有限公司],葡聚糖凝胶(Sephadex) LH-20 和 G-150(上海蓝季科技发展有限公司),水为屈臣氏超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

健康雄性 KM 种小鼠 18 只,体重 (20 ± 2) g,清洁级,由广东药科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2016-0041。动物试验经广东药科大学实验动物伦理委员会批准。

2 方法与结果

2.1 pNP-PEG3000-DOPE 合成 将 DOPE 32 μmol 溶于三氯甲烷中,配成 50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,加入三乙胺 80 μL ,加入 200 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG-(pNP)₂ 三氯甲烷溶液,氩气保护下室温搅拌孵育过夜。减压蒸发三氯甲烷,在 0.15 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液(盐酸调节 pH 2.0)中水浴超声,得 pNP-PEG3000-DOPE 胶束,用 Sephadex LH 20 柱分离与纯化,用三氯甲烷萃取 pNP-PEG3000-DOPE(纯度 >95%),通过 MS 进行结构鉴定,见图 1,合成物相对分子质量 4 090,与目标

产物 pNP-PEG3000-DOPE 吻合。

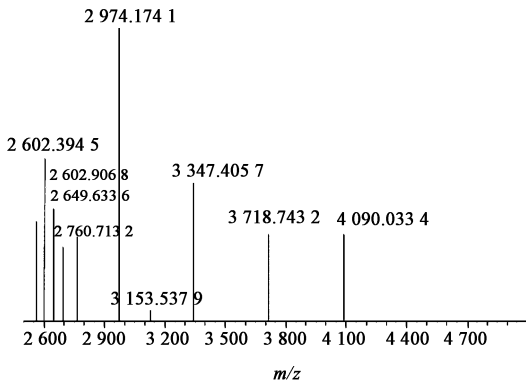


图 1 pNP-PEG3000-DOPE 的 MS
Fig.1 MS of pNP-PEG3000-DOPE

2.2 BEV 与 pNP-PEG3000-DOPE 偶联 取适量 pNP-PEG3000-DOPE 溶于乙醇中,将适量 BEV 溶于 pH 5.3 的磷酸二氢钠缓冲液介质中,采用注入法将乙醇溶液注入至缓冲盐中,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节 pH 8.3,室温孵育反应 2 h,使 BEV 与 pNP-PEG3000-DOPE 充分连接,得纯度 63.72% 的偶联物 BEV-PEG3000-DOPE。用 Sephadex G-150 柱进行分离与纯化,BEV-PEG3000-DOPE 冷冻干燥, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。利用红外光谱 (IR) 进行结构鉴定,见图 2,凝胶渗透色谱 (GPC) 对相对分子质量进行测定,见图 2。结果 IR 中官能团分别为 2924.16 ($-\text{CH}_3$), 2855.26 ($-\text{CH}_2-$), 1738.88 ($-\text{COOR}$), 1634.25 ($-\text{CO-N-}$), 1147.59 ($\text{P}=\text{O}$), 1054.96 ($-\text{P-O-C-}$) cm^{-1} ; BEV-PEG3000-DOPE 的重均相对分子质量 226 570,与目标产物 BEV-PEG3000-DOPE 吻合。

2.3 丹皮酚的含量测定

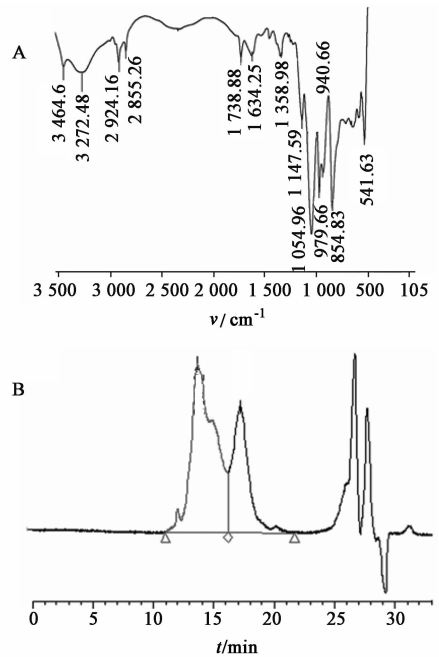
2.3.1 色谱条件 Cosmosil C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m}$),检测波长 274 nm ,柱温 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,流动相甲醇-水 ($55:45$),进样量 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。

2.3.2 供试品溶液的制备 取丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体 0.2 mL 于 10 mL 量瓶中,加入含 5% 曲拉通 X-100 的乙醇溶液 0.5 mL ,超声破乳并加 55% 甲醇定容,即得。

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取丹皮酚对照品 8.24 mg ,加 55% 甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中,制成 $824 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹皮酚对照品溶液。

2.3.4 空白样品溶液的制备 精密量取空白脂质体 0.2 mL ,按 2.3.2 项下方法制备,即得。

2.3.5 系统适应性和专属性考察 分别吸取供试

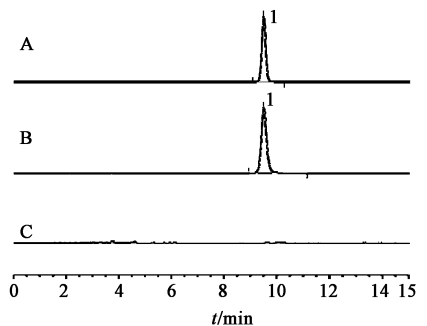


A. IR 谱; B. GPC 谱

图 2 BEV-PEG3000-DOPE 的结构鉴定

Fig.2 Structural identification of BEV-PEG3000-DOPE

品溶液、空白样品溶液、对照品溶液各 $10 \text{ } \mu\text{L}$,按 2.3.1 项下色谱条件测定,结果丹皮酚色谱峰拖尾因子在 $0.95 \sim 1.05$,理论板数不低于 5 000,表明在该色谱条件下峰型稳定,与杂峰分离度良好,见图 3。



A. 对照品; B. 供试品; C. 空白样品; 1. 丹皮酚

图 3 丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体的 HPLC

Fig.3 HPLC of liposomes of paeonol modified with VEGF antibody

2.3.6 线性关系考察 取 $824 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹皮酚对照品溶液,加 55% 甲醇配成质量浓度分别为 $8.24, 16.48, 32.96, 65.92, 82.4, 164.8, 329.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 0.9757X - 0.141$ ($r = 0.9999$),线性范围 $8.24 \sim 329.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.7 方法学考察 取高 ($49.44 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),中

(32.96 mg·L⁻¹), 低(16.48 mg·L⁻¹) 质量浓度的丹皮酚对照品溶液, 每个质量浓度样品按 2.3.1 项下色谱条件于 1 d 内重复测定 5 次, 计算日内稳定性的 RSD 分别为 0.1%, 0.1% 和 0.2%, 连续测定 5 d, 计算日间稳定性的 RSD 分别为 0.1%, 0.1% 和 0.5%; 取高(247.2 mg·L⁻¹), 中(164.8 mg·L⁻¹), 低(82.4 mg·L⁻¹) 质量浓度的丹皮酚对照品溶液各 1 mL, 各加入空白脂质体 1 mL, 混匀, 用曲拉通 X-100 破乳, 用流动相定容, 平行 3 份, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算回收率分别为 97.95%, 102.20%, 102.40%, RSD 依次为 0.9%, 1.1%, 0.9%。结果发现仪器精密度良好、样品较稳定及方法回收率良好, 符合含量测定要求。

2.4 包封率的测定 采用鱼精蛋白沉淀法测定。精密移取丹皮酚脂质体 0.1 mL 于 4 mL 离心管中, 加入 10 g·L⁻¹ 鱼精蛋白溶液 0.1 mL, 3 min 后加入生理盐水 2.8 mL, 立刻于 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 精密移取上清液 1 mL, 加流动相定容于 5 mL 量瓶中, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 记录丹皮酚质量浓度 ($C_{游}$); 取同一份脂质体 0.1 mL 于 5 mL 量瓶中, 同 2.3.2 项下方法破乳, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 记录丹皮酚总质量浓度 ($C_{总}$), 按公式包封率 = $(C_{总} - C_{游}) / C_{总} \times 100\%$ 计算^[9]。

2.5 丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体制备 称取处方量卵磷脂、胆固醇、丹皮酚和 pNP-PEG3000-DOPE 于烧杯中, 加入适量三氯甲烷使溶解, 移至 500 mL 茄型瓶中, 适宜温度的水浴加热, 转速 60 r·min⁻¹ 旋转蒸干, 取下茄型瓶, 通高纯氮 20 min, 使溶剂彻底挥干, 加入适量 pH 7.5 的磷酸二氢钠缓冲液, 加入适量 BEV-PEG3000-DOPE 溶液, 于 140 r·min⁻¹ 脱膜, 得丹皮酚真皮靶向脂质体, 超声 3 min (每次时间 2 s, 间隔 3 s, 功率 300 W), 使用 LF-50 型脂质体挤出仪 400 nm 整粒。同法制备不含丹皮酚的空白脂质体及不含 BEV 的丹皮酚脂质体, 分别用于空白溶液的制备和真皮滞留量的考察。

2.6 脂质体制备工艺的优选^[10] 通过前期单因素试验考察, 确定对脂质体包封率影响显著的因素分别为磷脂质量浓度、磷脂-胆固醇、药脂比和温度。根据 Box-Behnken 效应面法设计的原理, 每因素设置 3 个水平, 以脂质体包封率为评价指标, 试验安排及结果见表 1。

2.6.1 回归分析 以包封率为考察指标, 利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对数据进行统计分析, 各因素进行二项式拟合后, 得回归方程 $Y = 72.74 -$

表 1 丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体制备工艺的响应面试验分析
Table 1 Response surface test analysis of preparation process of liposomes of paeonol modified with VEGF antibody

No.	X_1 磷脂质量浓度 /g·L ⁻¹	X_2 磷脂-胆固醇	X_3 药脂比	X_4 温度 /°C	包封率 /%
1	5	3:1	1:4	35	61.68
2	10	3:1	1:6	40	56.23
3	10	3:1	1:2	40	63.61
4	7.5	3:1	1:4	40	72.53
5	7.5	2:1	1:4	45	65.73
6	10	3:1	1:4	45	67.87
7	7.5	3:1	1:4	40	73.68
8	10	4:1	1:4	40	70.46
9	7.5	3:1	1:2	45	61.24
10	7.5	2:1	1:2	40	64.19
11	7.5	3:1	1:2	35	56.33
12	7.5	4:1	1:4	35	61.66
13	5	3:1	1:6	40	54.17
14	7.5	3:1	1:6	45	50.44
15	7.5	3:1	1:4	40	73.41
16	7.5	3:1	1:6	35	47.75
17	7.5	3:1	1:4	40	71.74
18	5	4:1	1:4	40	69.16
19	10	2:1	1:4	40	70.92
20	7.5	4:1	1:6	40	55.95
21	10	3:1	1:4	35	60.23
22	5	3:1	1:4	45	66.19
23	7.5	4:1	1:4	45	65.43
24	5	2:1	1:4	40	69.14
25	7.5	3:1	1:4	40	72.33
26	7.5	4:1	1:4	35	61.51
27	5	3:1	1:2	40	67.93
28	7.5	4:1	1:6	40	53.96
29	7.5	4:1	1:2	40	64.92

$0.079X_1 + 0.012X_2 - 5.14X_3 + 2.15X_4 - 0.12X_1X_2 + 1.59X_1X_3 + 1.28X_1X_4 - 1.18X_2X_3 - 0.11X_2X_4 - 0.56X_3X_4 - 1.03X_1^2 - 1.60X_2^2 - 11.14X_3^2 - 7.47X_4^2$, 其方差分析见表 2。结果发现所选二次多项模型的 $P < 0.05$, 失拟项 $P > 0.05$, 且相关系数 $R^2 = 0.9934$, 说明该回归方程拟合度良好, 符合试验要求, 能够准确预测药物的包封率。

表 2 回归方程的方差分析

Table 2 Variance analysis of regression equation

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1 429.400	14	102.100	151.580	<0.000 1
X_1	0.075	1	0.075	0.110	0.743 2
X_2	0.002	1	0.002	0.003	0.958 7
X_3	317.450	1	317.450	471.280	<0.000 1
X_4	55.210	1	55.210	81.970	<0.000 1
X_1X_2	0.058	1	0.058	0.086	0.774 3
X_1X_3	10.180	1	10.180	15.110	0.001 6
X_1X_4	6.580	1	6.580	9.770	0.007 4
X_2X_3	5.570	1	5.570	8.270	0.012 2
X_2X_4	0.051	1	0.051	0.075	0.788 0
X_3X_4	1.230	1	1.230	1.830	0.197 7
X_1^2	6.920	1	6.920	10.270	0.006 4
X_2^2	16.660	1	16.660	24.740	0.000 2
X_3^2	805.190	1	805.190	1 195.380	<0.000 1
X_4^2	362.340	1	362.340	537.930	<0.000 1
残差	9.430	14	0.670		
失拟项	6.890	10	0.690	1.080	0.512 5
净误差	2.540	4	0.640		
总误差	1 438.830	28			

2.6.2 验证试验 根据 Box-Behnken 效应面设计结果,得最佳制备工艺为 $X_1 = 7.36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $X_2 = 2.82$, $X_3 = 3.51$, $X_4 = 41.08 \text{ }^\circ\text{C}$, 即磷脂质量浓度 $7.36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 卵磷脂-胆固醇-丹皮酚-(pNP-PEG3000-DOPE)-(BEV-PEG3000-DOPE) (14:5:4:0.28:0.05), 成膜温度 $41 \text{ }^\circ\text{C}$; 脂质体包封率的预测值 72.74%。按该最优工艺制备 3 批丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体, 计算包封率 (73.61 ± 2.36)%, 经 GC 检测三氯甲烷残留量在检测限以下。

2.7 丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体的质量评价

2.7.1 形态 取适宜浓度的丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体, 用 2% 磷钨酸负染, 干燥后置于电镜下观察形态, 见图 4。结果发现该脂质体微粒呈圆形或椭圆形, 大小适宜且分散均匀。

2.7.2 粒径及 Zeta 电位 使用 LA-960S 型激光散射粒度分布分析仪测定丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体的粒径大小及分布, 结果平均粒径 (235.7 ± 4.67) nm, 测得该脂质体的 Zeta 电位 (-5.13 ± 0.25) mV。

2.8 真皮滞留效应考察

2.8.1 皮肤的预处理 取雄性 KM 小鼠麻醉处死, 剥取腹部皮肤, 刮净腹部鼠毛, 破坏皮肤角质层, 用生理盐水洗净, 滤纸吸干, 将皮肤铺平, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 1 周内用完。

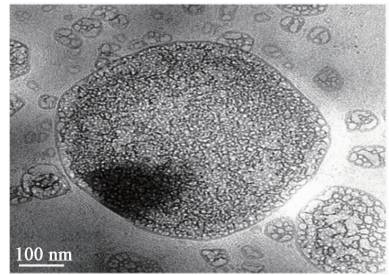


图 4 丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体的透射电镜 ($\times 10\ 000$)

Fig. 4 TEM of liposomes of paeonol modified with VEGF antibody ($\times 10\ 000$)

2.8.2 透皮吸收试验^[11] 将离体鼠皮恢复至室温, 用生理盐水冲洗, 用滤纸吸干表面液体, 置于 Franz 扩散池 (有效释药面积 1.766 cm^2 , 接收池体积 15 mL) 的供给室与接收室之间, 角质层朝向供给室。扩散池的接收室中加满 30% 乙醇为接受介质, 排尽气泡, 使接收介质与皮肤紧密接触。接收介质温度 (33 ± 0.5) $^\circ\text{C}$, 磁力搅拌速度 $350 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。分别在供给室中加入丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体、丹皮酚脂质体及丹皮酚原料药 2.8 mg, 以充分溶胀的卡波姆 940 为载体, 分别于试验后 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 从接收室取样管中精密吸取接收液 1 mL, 同时补充等量等温 30% 乙醇。接收液经 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 精密量取滤液 $10 \text{ }\mu\text{L}$ 进样测定, 计算各时间点的单位面积累积透过量, 绘制透皮吸收曲线, 见图 5。

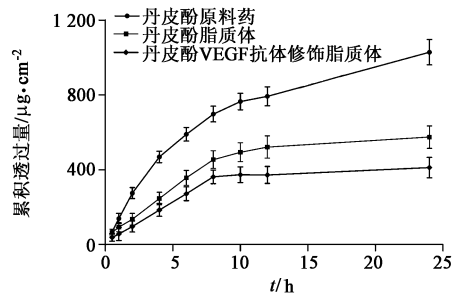


图 5 不同药物的透皮吸收曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Transdermal absorption curves of different drugs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

$$Q_n = \frac{C_n \times 15 + \sum_{i=1}^n C_{i-1} \times 1}{A}$$

式中 Q_n 为 n 时间点的单位面积累积透过量, C_n 为 n 时间点的取样质量浓度, C_i 第 i 个取样点的药物质量浓度, A 为扩散池有效扩散面积。

2.8.3 真皮滞留量 透皮试验结束后, 将鼠皮取出, 用生理盐水将鼠皮表面残留的药物擦净, 将鼠皮剪碎, 置于研钵中, 研磨成浆, 加甲醇 5 mL 使溶解, 超声 10 min , $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 取处理后的上清液

1 mL 置于 5 mL 量瓶中,加流动相定容,按 2.3.1 项下色谱条件测定,计算真皮滞留量,见表 3。在进行数据拟合时,比较了零级动力学、一级动力学和 Higuchi

方程,结果一级动力学方程拟合效果最好。结果表明丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体有缓释效果,较丹皮酚原料药及丹皮酚脂质体的真皮滞留效果好。

表 3 不同药物的体外透皮效果比较 (n = 6)

Table 3 Comparison of *in vitro* transdermal effects of different drugs (n = 6)

组别	透皮吸收方程	R ²	透皮速率 /μg·cm ⁻² ·h ⁻¹	真皮滞留量($\bar{x} \pm s$) /μg·cm ⁻²
丹皮酚原料药	$Q = 1.037e^{-0.1387X}$	0.993 6	1 037.0	8.86 ± 1.46
丹皮酚脂质体	$Q = 482.3e^{-0.1798X}$	0.978 2	482.3	26.43 ± 2.77
丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体	$Q = 437.4e^{-0.1654X}$	0.974 9	437.4	33.98 ± 5.72

3 讨论

免疫脂质体是单克隆抗体修饰的脂质体,其表面修饰的抗体能与靶细胞特异性结合,赋予脂质体主动靶向性^[12]。常规脂质体很难使药物富集在保留药物的组织中,而本实验借助抗体的特异识别功能,将药物富集于患病部位,避免了对正常组织及细胞的损伤,可达到增效减毒的作用^[13]。本研究拟将抗体连接在聚乙二醇末端,聚乙二醇与脂质体相连。通过 IR 和 GPC 分析 BEV-PEG3000-DOPE 的主要官能团及相对分子质量,确定已成功制得靶向前体。与脂质体结合后制得丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体,寻靶效果好,且聚乙二醇对脂质体及抗体具有空间保护作用,4 ℃ 贮存 2 周无沉淀、絮凝现象,能够得到较稳定的脂质体溶液。

本实验通过体外透皮试验初步探究丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体的透皮速率及真皮滞留效应。通过透皮速率可知,该脂质体具有缓释作用,且在真皮层滞留量要明显高于丹皮酚原料药及丹皮酚脂质体,表明丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体具有真皮靶向作用,能够更好的滞留在真皮层中。BEV 相对分子质量大,难以透过小鼠皮肤角质层,且本实验主要考察药物在真皮层中的滞留效果,所以在进行体外透皮试验时,将所得小鼠腹部皮肤角质层部分破坏。本文初步证明丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体质量、性质稳定,体外释药性能较好,能够穿过破损皮肤,具有缓释的效果,且丹皮酚在真皮层中的滞留量较高,具有潜在的真皮靶向性。该结果尚待进一步考察其体内靶向性、抗瘢痕增生活性和安全性,以全面验证该脂质体的靶向递药能力。

的最新进展[J]. 组织工程与重建外科杂志,2015,11(3):216-220.

[3] 周俊,马慧群. 瘢痕的临床类型及治疗进展[J]. 中国医学文摘:皮肤科学,2015,32(1):16-23.

[4] LIAN N, LI T. Growth factor pathways in hypertrophic scars: molecular pathogenesis and therapeutic implications [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 42-50.

[5] Kwak D H, Bae T H, Kim W S, et al. Anti-vascular endothelial growth factor (bevacizumab) therapy reduces hypertrophic scar formation in a rabbit ear wounding model[J]. Arch Plast Surg,2016,43(6):491-497.

[6] 时军,王芳,滕希峰,等. 丹皮酚阳离子脂质体凝胶剂的稳定性及离体皮肤渗透试验研究[J]. 中药材,2012,35(5):803-807.

[7] 张保刚,王晓晔,董亮,等. 丹皮酚体外抑制 TGF-β 诱导的成纤维细胞增殖的研究[J]. 天津医药,2008,36(9):704-705.

[8] 胡云飞,徐国兵. 牡丹皮及其主要成分丹皮酚的药理作用研究进展[J]. 安徽医药,2014,18(4):589-592.

[9] 唐涛,臧巧真,龙凯花,等. 壳聚糖修饰的丹皮酚 PEG-PLGA 纳米粒的制备及其体外释药性能考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(6):8-11.

[10] SHI J, MA F, WANG X, et al. Formulation of liposomes gels of paeonol for transdermal drug delivery by Box-Behnken statistical design[J]. J Liposome Res,2012,22(4):270-278.

[11] 时军,张慧迪,黄嗣航,等. 咪喹莫特油水分分配系数及其与透皮吸收速率常数的相关性研究[J]. 广东药学院学报,2016,32(6):671-674.

[12] Paul J W, HUA S, Ilicic M, et al. Drug delivery to the human and mouse uterus using immunoliposomes targeted to the oxytocin receptor [J]. Am J Obstet Gynecol,2016,216(3):283.

[13] Kim J S, KANG S J, Jeong H Y, et al. Anti-EGFR immunonanoparticles containing IL-12 and salmosin genes for targeted cancer gene therapy[J]. Int J Oncol, 2016,49(3):1130-1138.

[参考文献]

[1] 胡大海,刘佳琦. 任重道远:进一步加强瘢痕的基础与临床研究[J]. 中华烧伤杂志,2011,27(6):407-410.

[2] Perdanasari A T,张铮,章一新. 病理性瘢痕注射治疗

[责任编辑 刘德文]