

穿膜肽 TAT 修饰载丹酚酸 B 脂质体的制备及其抑制人皮肤成纤维细胞增殖与迁移初步研究

吴艳婷, 郭思旖, 时 军*, 陈桂添, 许小琪, 张婷琼, 吴 芸

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, 广东 广州 510006

摘要: 目的 制备具有防治增生性瘢痕(HS)作用的载丹酚酸 B 的穿膜肽 TAT 修饰脂质体(SAB-TAT-LIP), 建立其质量评价方法, 并初步考察其对体外人皮肤成纤维(HSF)细胞增殖和迁移的影响。方法 采用 pH 梯度逆向蒸发法制备脂质体, 超滤法测其包封率, 以包封率为评价指标, 采用 Box-Behnken 响应面法优化脂质体的处方工艺; 考察其形态、粒径、Zeta 电位、体外释放、体外透皮吸收和稳定性等理化性质; 在此基础上采用 MTT 法考察其对 HSF 细胞增殖的作用, 采用划痕法和 Transwell 小室法考察其对 HSF 细胞迁移和侵袭的作用。结果 SAB-TAT-LIP 的药物包封率为(86.70±0.85)%, 平均粒径为(219.90±5.09) nm, Zeta 电位(-9.25±0.92) mV, 体外 24 h 累积释放率为 62.49%, 无突释效应, 体外 32 h 皮肤累积透过率为 17.21%, 透过速率为(28.33±4.9) μg/(cm²·h), 真皮层滞留量为(44.39±6.87) μg/cm², 4 °C 放置 10 d 稳定性良好。SAB-TAT-LIP 能够显著地抑制 HSF 细胞的增殖、迁移和侵袭, 与对照组相比, 差异显著(P<0.01)。结论 优化得到的 SAB-TAT-LIP 包封率较高、粒径较小, 体外释放和透皮行为均满足局部透皮给药剂剂的体外释放和透皮规律, 对体外 HSF 细胞的增殖、迁移和侵袭具有抑制作用。

关键词: 丹酚酸 B; 穿膜肽 TAT; 脂质体; 人皮肤成纤维细胞; 增生性瘢痕

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)01-0059-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.011

Preparation of cell penetrating peptide TAT-modified liposomes loaded with salvianolic acid B and its effect on proliferation and migration of human skin fibroblasts

WU Yan-ting, GUO Si-yi, SHI Jun, CHEN Gui-tian, XU Xiao-qi, ZHANG Ting-qiong, WU Yun

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

Abstract: Objective To prepare the liposomes of salvianolic acid B modified with cell penetrating peptide TAT (SAB-TAT-LIP), of which has effects on preventing and treating hypertrophic scars (HS), and establish the method of quality evaluation, as well as preliminarily investigate the effect on the proliferation and migration of human skin fibroblasts (HSF). **Methods** Liposomes were prepared by pH gradient reverse-phase evaporation method, and the entrapment efficiency was measured by ultrafiltration. Box-Behnken design was performed to optimize the formulation of liposomes by using encapsulation rate as evaluating index. The physicochemical properties of liposomes including morphology, entrapment efficiency, particle size, zeta potential, *in vitro* release and transdermal absorption, and stability were studied. In addition, the effect of liposomes on proliferation of HSF was examined by MTT assay, and the effect of liposomes on migration of HSF was investigated by scratching method and Transwell assay. **Results** Based on the optimal formulation of SAB-TAT-LIP, the entrapment efficiency of salvianolic acid B was (86.70±0.85)%, the average particle size was (219.90±5.09) nm, and the zeta potential was (-9.25±0.92). The *in vitro* 24 h cumulative release was 62.49% of the total drug with no burst effect. The *in vitro* 32 h cumulated skin penetration rate was 17.21%, the permeance rate was (28.33±4.9) μg/(cm²·h), and the retention volume of dermis was (44.39±6.87) μg/cm². The stability was good when placed at 4 °C for 10 d. The *in vitro* cell studies showed that SAB-TAT-LIP can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of human skin fibroblasts,

收稿日期: 2018-07-31

基金项目: 广东省高等学校优秀青年教师培养计划项目(YQ2015099); 广东省自然科学基金资助项目(2018A0303130234)

作者简介: 吴艳婷(1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药新剂型及制剂新技术研究。E-mail: 13437871411@sina.cn

*通信作者 时 军(1980—), 男, 博士, 副教授, 从事中药新药及制剂新技术研究。Tel: (020)39352169 E-mail: shijun8008@163.com

compared with the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The optimized SAB-TAT-LIP have higher encapsulation efficiency, smaller particle size, good sustained release effect, and good dermal retention effect which all satisfy the *in vitro* release and transdermal regulation of local transdermal preparation, and it can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of human skin fibroblasts *in vitro*.

Key words: salvianolic acid B; cell penetrating peptide TAT; liposomes; human skin fibroblasts; hypertrophic scars

增生性瘢痕 (hypertrophic scars, HS) 是一种临床常见但治愈率低的皮肤纤维化疾病, 目前以手术和药物注射治疗为主^[1]。HS 手术治疗复发率较高, 会给患者带来痛楚, 激素类药物注射给药副作用较大且费用相对昂贵^[2-3]。现代研究表明 HS 和皮肤炎症过度反应有关, 表皮再生延迟、新生血管形成增强, 引起成纤维细胞过度增殖、迁移、凋亡, 以及细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 的合成、沉淀和重塑^[4-5]。许多细胞参与了 HS 的形成, 以皮肤成纤维细胞为关键效应细胞, 因此在细胞学水平上治疗 HS, 皮肤成纤维细胞是重要的靶点^[6]。

丹酚酸 B (salvianolic acid B, SAB) 是活血化瘀中药丹参中含量最高的活性成分, 具有明显的抗肝、肾、心肌纤维化作用^[7]。现代药理研究表明, SAB 拮抗自由基过氧化损伤, 调节体液和细胞免疫, 抑制成纤维细胞增殖及胶原合成, 抑制信号转导通路, 在细胞、分子、基因 3 个水平上抑制纤维化疾病的形成, 作用于纤维化发病机制中多个环节从而发挥综合的抑制作用^[8-13]。国内外目前尚无 SAB 应用于防治 HS 的相关报道, 因此, 进行 SAB 的经皮递药研究, 作用于皮肤深度创伤炎症期起始阶段, 高效防治 HS, 对临床用药具有重要意义。

脂质体的结构类似生物膜, 作为经皮给药载体具有诸多优势^[14-16]。细胞穿膜肽 (TAT) 是一种具有高度细胞穿透能力的小分子多肽, 能转运药物透过皮肤、携带较其本身相对分子质量大 20 倍的药物进入细胞, 又能促进药物跨膜转运而不会改变转导物质生物活性或造成细胞伤害, 作为一种新型促进药物转运的佐剂, 在大分子、亲水性药物经皮转运方面具有常规促渗剂无可比拟的优势^[17-18]。但 TAT 具有非特异性, 无法直接作用于病变部位, 在体内易被清除, 聚乙二醇 [Poly (ethylene glycol), PEG] 修饰的脂质体能够形成具有立体空间屏障的柔性亲水表面, 屏蔽和保护 TAT, 并且能够延缓药物释放, 提高药物的透皮生物利用度。本研究拟构建 PEG 和 TAT 共同修饰的 SAB 脂质体透皮给药体系 (SAB-TAT-LIP), 整合 TAT 和 PEG 的优点, 使脂质体具有可控的入胞能力, 高效透过皮肤角质层屏障,

增强真皮层的药物递送和细胞摄取能力, 从而发挥防治 HS 的作用 (图 1)。

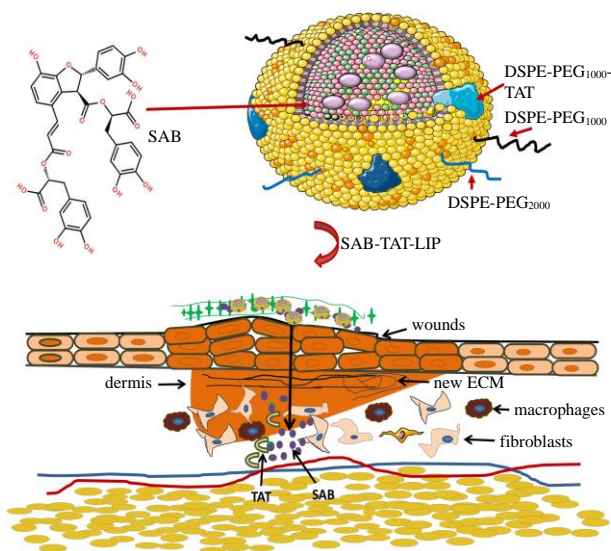


图 1 SAB-TAT-LIP 防治 HS 的作用机制

Fig. 1 Anti-scarring mechanism of SAB-TAT-LIP

1 仪器与材料

1.1 仪器

UltiMate3000 型高效液相色谱仪, 赛默飞世尔科技公司; BP211D 型十万分之一电子天平, 德国 Sartorius 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; ELX800 全自动酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; Optec BDS400 倒置显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; PHS-25 型电子数显 pH 计, 上海雷磁仪器厂; SC-D4 低速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; MCO-18AIC (UV) 细胞培养箱, 三洋电机株式会社。

1.2 药品与试剂

丹酚酸 B 原料药, 南京泽朗生物科技有限公司, 质量分数 >99%; 丹酚酸 B 对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号 110708-201710, 质量分数 ≥98%; 大豆卵磷脂 S100 (S100), 德国 Lipoid 公司, 批号

57-1140045-10; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 1000 (DSPE-PEG₁₀₀₀, 批号 115CCG0212)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀, 批号 115CCG0442)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 1000 与穿膜肽 TAT 的化学耦合物 DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT (TAT 的氨基酸序列为 Cys-AYGRKKRRQRRR, 批号 115CCG0451), 美国 NANOCS 公司; 胆固醇 (Chol), 上海艾韦特医药科技有限公司, 批号 B01221; 四甲基偶氮唑盐细胞活性检测试剂盒 (MTT), 美国 Sigma 公司; 胎牛血清 (FBS, 批号 42G5163K)、高糖 DMEM (批号 C11995500BT)、胰酶 TrypLE Express Enzyme (批号 12605-028), 美国 Gibco 公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号 SH30256.01)、链霉素青霉素 (P/S) 双抗 (批号 SV30010), 美国 HyClone 公司; 0.5% 结晶紫染液 (Matrigel), 美国 BD 公司; 牛血清白蛋白 (BSA), 澳大利亚 Serana 公司; 水为屈臣氏超纯水, 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞与动物

人皮肤成纤维 HSF 细胞株, 购自中国科学院上海生命科学研究院, 用含有 10% FBS 和 1% 双抗

(100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素) 的高糖培养基 (DMEM) 于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 0.25% 胰酶消化传代, 取第 3~8 代细胞用于实验。健康雌性 Wistar 大鼠 6 只, 体质量 (200 ± 10) g, 清洁级, 由南方医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (粤) 2018-0052。本研究涉及的动物相关操作均在广东药科大学试验动物伦理委员会的批准下进行。

2 方法与结果

2.1 丹酚酸 B 的含量测定

色谱条件: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-质量分数 0.5% (pH 2.3) 磷酸水溶液体积比 (22 : 78); 体积流量 1.2 mL/min; 检测波长 286 nm; 柱温 30 °C; 进样量 15 μL^[7,19]。在此条件下, 各样品的色谱图见图 2, SAB 的保留时间为 (16.25 ± 0.60) min, 峰拖尾因子在 0.95~1.05, 理论塔板数不低于 6 000, 表明方法专属性强, 其他物质无干扰。以 SAB 峰面积 (A) 对其质量浓度 (C) 进行线性回归, 得标准曲线 $A = 0.380 9 C - 1.341$, $r^2 = 0.999 5$, 表明 0.706~272.3 μg/mL 内 SAB 质量浓度与峰面积的线性关系良好。

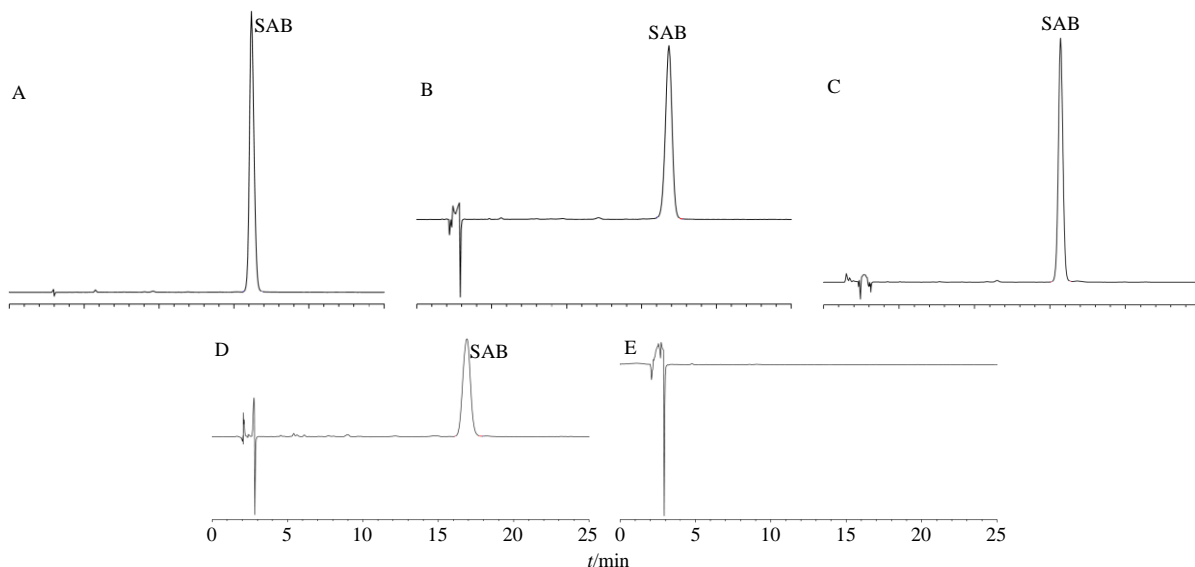


图 2 SAB 对照品 (A)、SAB-TAT-LIP (B)、体外释药接收液 (C)、体外透皮接收液 (D) 和空白脂质体 (E) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of free SAB reference (A), SAB-TAT-LIP (B), released SAB (C), transdermal SAB (D), and blank-LIP SAB (E)

2.2 包封率的测定

采用超滤法作为脂质体包封率的测定方法, 精密量取脂质体 1 mL, 加入甲醇超声破乳, 稀释至一定质量浓度, 过 0.22 μm 滤膜, 采用 HPLC 法检测 SAB 的质量浓度 (C_总)。另精密量取脂质体 1 mL, 置于相对分子质量 50 000 的再生纤维素膜超滤离心

管内, 4 000 r/min 离心 30 min 后取下层滤液, 加甲醇稀释至一定质量浓度, 采用 HPLC 法检测 SAB 的质量浓度 (C_游)。计算 SAB 的包封率 (EE)^[20]。

$$EE = (C_{总} - C_{游}) / C_{总}$$

2.3 SAB-TAT-LIP 的制备

采用 pH 梯度逆向蒸发法^[21]。精密称取处方量

的 S100、Chol、DSPE-PEG₁₀₀₀、DSPE-PEG₂₀₀₀、DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT(物质的量比为 100 : 33.33 : 2 : 1 : 1) 溶于有机溶剂(氯仿-甲醇 2 : 1), SAB 溶于 1% 甘氨酸-盐酸缓冲盐溶液。将两相体系混合后置于磁力搅拌器中(转数为 800 r/min, 温度为 50 °C) 搅拌 10 min, 充分混匀制备成均匀的油包水乳液, 将混合物转移入 250 mL 茄形瓶中, 置于旋转蒸发器(转数为 50 r/min, 温度为 50 °C) 旋干有机溶剂, 在氮气氛围下放置过夜吹干残留的有机溶剂, 加入适量的 PBS 缓冲盐溶液调至 pH 值为 6.0, 继续孵育 30 min 形成脂质体乳液, 在冰浴条件下移入细胞破碎仪中探头超声 180 次(功率 300 W, 超声 1 s 间隔 1 s), 过 0.8 μm 的微孔滤膜, 然后用 400 nm 脂质体挤出仪来回挤出 15 次整粒, 即得 SAB-TAT-LIP。同法制备不含 SAB 的空白脂质体(blank-LIP), 不含 PEG 成分的 SAB 常规脂质体(SAB-LIP)。

2.4 脂质体制备工艺的优化

2.4.1 实验设计与结果 根据前期单因素试验结果, 选取对脂质体包封率影响最显著的 4 个因素: 磷脂质量浓度 (X_1)、药脂比 (X_2)、有机相与内水相体积比 (X_3)、内水相 pH 值 (X_4)。根据 Box-Behnken 效应面法设计的原理, 每个因素选取 3 个水平, 以 SAB 包封率 (Y) 为评价指标, 因素水平和试验结果见表 1。

2.4.2 回归分析 以 Y 为评价指标, 利用 Design-Expert 10.0 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: $Y=83.05+3.68 X_1+1.79 X_2-0.36 X_3-2.41 X_4+1.48 X_1X_2+1.27 X_1X_3+0.35 X_1X_4+0.14 X_2X_3+0.11 X_2X_4+3.33 X_3X_4-2.74 X_1^2-3.61 X_2^2-6.43 X_3^2-5.66 X_4^2$, 其方差分析见表 2, 结果发现所选二次多项模型有显著性差异 ($P < 0.05$), 失拟项无显著性差异 ($P > 0.05$), 且相关系

表 1 SAB-TAT-LIP 制备工艺星点设计-效应面试验分析

Table 1 Experimental runs and observed responses for Box-Behnken design

试验号	$X_1/(mg \cdot mL^{-1})$	X_2	X_3	X_4	$Y/\%$	试验号	$X_1/(mg \cdot mL^{-1})$	X_2	X_3	X_4	$Y/\%$	试验号	$X_1/(mg \cdot mL^{-1})$	X_2	X_3	X_4	$Y/\%$
1	8	0.050	3	3.3	73.14	11	8	0.075	2	3.3	71.34	21	10	0.050	4	3.3	69.74
2	12	0.050	3	3.3	77.78	12	12	0.075	3	3.0	79.72	22	10	0.075	4	3.0	70.06
3	10	0.075	3	3.3	82.22	13	10	0.075	2	3.6	65.35	23	12	0.075	2	3.3	77.05
4	8	0.075	3	3.0	74.20	14	10	0.050	3	3.0	74.33	24	10	0.075	3	3.3	83.91
5	10	0.050	2	3.3	72.14	15	12	0.075	3	3.6	75.35	25	10	0.075	2	3.0	76.43
6	10	0.075	3	3.3	83.61	16	10	0.100	3	3.6	73.80	26	8	0.075	3	3.6	68.44
7	12	0.075	4	3.3	79.29	17	10	0.100	2	3.3	75.55	27	10	0.050	3	3.6	69.13
8	10	0.075	3	3.3	83.19	18	10	0.075	4	3.6	72.28	28	8	0.100	3	3.3	72.78
9	8	0.075	4	3.3	68.52	19	10	0.100	4	3.3	73.71	29	10	0.075	3	3.3	82.34
10	12	0.100	3	3.3	83.36	20	10	0.100	3	3.0	78.54						

表 2 回归方程的方差分析

Table 2 Variance analysis of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	754.960	14	53.930	74.36	<0.000 1	X_3X_4	44.220	1	44.220	60.98	<0.000 1
X_1	162.290	1	162.290	223.78	<0.000 1	X_1^2	48.710	1	48.710	67.17	<0.000 1
X_2	38.450	1	38.450	53.02	<0.000 1	X_2^2	84.610	1	84.610	116.66	<0.000 1
X_3	1.510	1	1.510	2.09	0.170 7	X_3^2	268.110	1	268.110	369.69	<0.000 1
X_4	69.750	1	69.750	96.17	<0.000 1	X_4^2	207.640	1	207.640	286.31	<0.000 1
X_1X_2	8.820	1	8.820	12.16	0.003 6	残差	10.150	14	0.730	—	—
X_1X_3	6.400	1	6.400	8.83	0.010 1	失拟项	7.890	10	0.790	1.39	0.401 4
X_1X_4	0.480	1	0.480	0.67	0.428 1	净误差	2.270	4	0.570	—	—
X_2X_3	0.078	1	0.078	0.11	0.747 2	总误差	765.120	28	—	—	—
X_2X_4	0.053	1	0.053	0.07	0.791 0						

数 $r^2=0.9867$, 表明该回归方程拟合度良好, 符合本实验的要求, 能够准确预测 SAB 的包封率。通过软件的处理, 预测出 4 个因素的最佳水平为 $X_1=11.78$ mg/mL; $X_2=0.094$; $X_3=3.04$; $X_4=3.28$, SAB 包封率的预测值为 88.60%。

2.5 验证实验

根据最优工艺制备 3 批 SAB-TAT-LIP 样品, 测得载药量为 (6.31 ± 0.34) mg/mL, 包封率为 $(86.70 \pm 0.85)\%$ 。处方量扩大 5 倍后, 测得包封率为 $(86.22 \pm 0.97)\%$, 载药量为 (6.27 ± 0.51) mg/mL ($n=6$)。结果表明处方工艺稳定可靠。

2.6 SAB-TAT-LIP 的质量评价

按最优处方制备 SAB-TAT-LIP, PBS 稀释至适宜浓度, 滴至铜筛网上, 用 4% 磷钨酸负染, 自然干燥后, 置于电镜下观察形态并拍照, 见图 3。取 SAB-TAT-LIP 用 PBS 稀释至适宜浓度, 置于激光散射粒度分布分析仪中, 测定其平均粒径、PDI 值和 Zeta 电位, 见图 4。结果脂质体大小较均匀, 呈球状或近球状, 分散性较好。测得其平均粒径为 (219.9 ± 5.09) nm, 多分散系数 (PDI) 值为

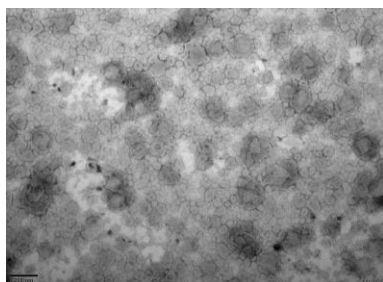


图 3 SAB-TAT-LIP 透射电镜图 ($\times 5000$)

Fig. 3 Transmission electron micrograph of SAB-TAT-LIP ($\times 5000$)

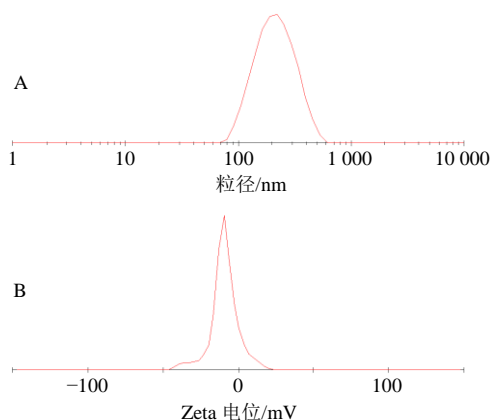


图 4 SAB-TAT-LIP 的粒径分布 (A) 和 Zeta 电位 (B)

Fig. 4 Particle size distribution (A) and Zeta potential (B) of SAB-TAT-LIP

0.190 ± 0.013 , Zeta 电位为 (-9.25 ± 0.92) mV, 说明 PEG 长链屏蔽掉了 TAT 的正电荷, 有利于减少对细胞的毒副作用。

2.7 脂质体的体外释放

采用透析法考察脂质体在 0.9% 氯化钠溶液中的体外释放行为。精密吸取 3 mL 脂质体混悬液, 置于已处理好的截留相对分子质量为 12 000 的透析袋中, 扎紧后缚于溶出仪的杯子中, 加入 150 mL 的释放介质, 并于 37 °C 水浴中以 100 r/min 恒速旋转 24 h, 按预定时间间隔, 分别于 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、18、24 h 吸取 3 mL 释放介质, 立即补加等量同温的释放介质, HPLC 法测定每个样品中 SAB 的质量浓度, 计算游离 SAB 的累积释放率。另精密吸取 3 mL 空白脂质体与 SAB 的物理混合液 (blank-LIP+SAB), 同上进行物理混合物的体外释放试验。另精密吸取 3 mL SAB 水溶液 (free SAB, 与脂质体中的 SAB 质量浓度相当), 同上条件分别于 10、20、30、40、50、60、90、120、180、210、240 min 吸取释放介质, 计算游离 SAB 的累积释放率, 所有样品平行 3 份。结果见图 5, free SAB 在 3 h 时已完全释放, blank-LIP+SAB 在 24 h 释放率达到 96.12%, 释放速率低于 free SAB。SAB-TAT-LIP 在 1 h 内的释放量小于 40%, 无突释效应, 24 h 时该脂质体释放率为 62.49%, 释放速率略低于 SAB-LIP, 具有明显的缓释作用。

2.8 脂质体的体外透皮吸收

2.8.1 皮肤的预处理 取雄性大鼠麻醉处死, 剥取

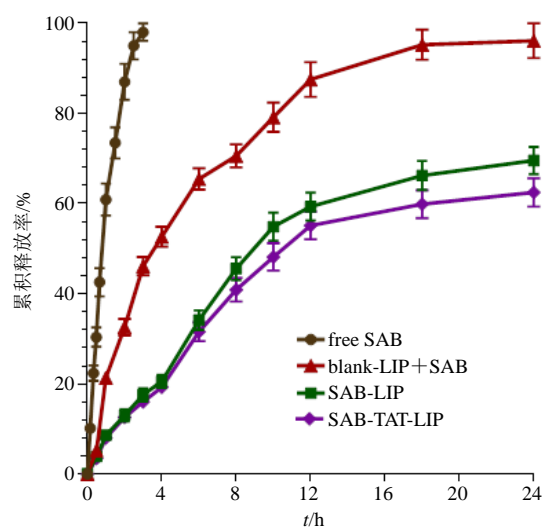


图 5 SAB-TAT-LIP 的体外释药曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 *In vitro* release curve of SAB-TAT-LIP in 24 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

腹部皮肤，小心刮净腹部鼠毛，以避免损伤皮肤角质层，用生理盐水洗净，滤纸吸干，将皮肤铺平，-20 °C 冰箱保存，1 周内用完。

2.8.2 透皮吸收实验 将离体鼠皮恢复至室温，用生理盐水冲洗几次，用滤纸吸干表面液体，置于 Franz 扩散池（有效释药面积为 1.766 cm²，接收池体积为 15 mL）的供给室与接收室之间，真皮层朝向接收室。扩散池的接收室中注满接收介质 20% 乙醇-PEG400（9：1）溶液，排尽气泡，使接收介质与皮肤紧密接触。接收介质温度为（37.0±0.5）°C，磁力搅拌速度为 100 r/min。分别在供给室中加入 free SAB、blank-LIP、SAB-LIP、SAB-TAT-LIP 各 2 mL。用封口膜密封以防止溶剂蒸发，分别于试验后 0.5、1、2、4、6、8、10、12、22、24、26、28、30、32 h 从接收室取样管中精密吸取接收液 1 mL，立即补充等量等温的接收介质。接收液用氮气吹干，残渣用 50 μL 50% 甲醇溶解，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，按“2.1”项下色谱条件进样分析，分别按公式计算各时间点的单位面积累积透过量（ Q_n ）、稳态透皮速率常数（ J ）和表观透皮系数（ P_{app} ），绘制透皮吸收曲线，见图 6。拟合 Q_n-t 方程，见表 3，SAB 在水溶液中的 Q_n 符合零级方程及 Hixon-crowell 方程模型。SAB 在 SAB-TAT-LIP 中的 Q_n 符合零级方程模型， J 、 P_{app} 和累积透皮率均高于 free SAB 组和 SAB-LIP 组。

$$Q_n = (VC_n + \sum_{i=1}^n C_{i-1}V_i)/A$$

$$J = V/3600 A \times dC_n/dt$$

$$P_{app} = J/C_0$$

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 为第 i ($i=n-1$) 个取样点的药物质量浓度， A 为扩散池有效接触面积（1.766 cm²）， V 为接收池体积（15 mL）， V_i 为取样体积， J 为模拟方程直线部分的斜率， P_{app} 为药物的表观透皮系数， C_0 为供给池初始浓度

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洗净，将鼠皮剪碎，置于研钵研磨成浆，加 50% 甲醇 2 mL 使溶解，超声 30 min，3 000 r/min 离心 10 min，取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取 15 μL 滤液按“2.1”项下色谱条件进样分析，计算真皮滞留量，见表 3。结果表明有 SAB-TAT-LIP 具有良好的角质层穿透能力，同时具有显著的皮肤滞留效果，能将药物集中于皮肤病灶，以贮库的形式持续释放。

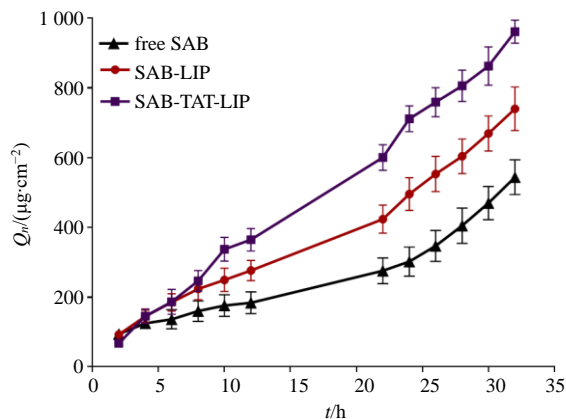


图 6 SAB-TAT-LIP 的透皮吸收曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Accumulative transdermal curve of SAB-TAT-LIP in 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 3 SAB-TAT-LIP 体外透皮实验结果 ($n = 6$)

Table 3 Transdermal experiment results of SAB-TAT-LIP in vitro ($n = 6$)

组别	透皮释药方程	r^2	$P_{app}/$ ($\times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$J/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$	皮肤滞留量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	累积透 皮率/%
free SAB	$Q = 0.03 X^3 - 1.14 X^2 + 19.73 X + 58.92$	0.999 4	1.37	13.02 ± 1.34	17.82 ± 1.35	9.09
SAB-LIP	$Q = 19.83 X + 51.19$	0.982 2	2.13	19.83 ± 2.01	35.09 ± 3.44	12.63
SAB-TAT-LIP	$Q = 28.33 X + 22.61$	0.995 7	3.19	28.33 ± 4.99	44.39 ± 6.87	17.21

2.9 稳定性考察

将 SAB-TAT-LIP 分别于室温和 4 °C 条件下放置 10 d，分别于 0、1、2、3、4、6、10 d 测定其包封率、泄漏率和粒径，初步评价 SAB-TAT-LIP 的稳定性。结果见表 4，SAB-TAT-LIP 在室温下放置 10 d 粒径没有明显变化，但包封率下降明显，药物泄漏率增加。SAB-TAT-LIP 在 4 °C 条件下放置 10 d

粒径、包封率和泄漏率均没有明显变化。由于 SAB 在水溶液中较不稳定，应冷冻干燥后贮存。

2.10 脂质体对 HSF 增殖的影响

收集生长状态良好的 HSF，经 0.25% 胰酶消化离心后，按每孔 1×10^4 个、200 μL 将 HSF 接种于 96 孔板，于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养 24 h，分别设置对照组，blank-LIP 组、free SAB 组、

表 4 SAB-TAT-LIP 在 10 d 内的包封率和粒径稳定性考察
Table 4 Stability of SAB-TAT-LIP for encapsulation efficiency and vesicle size in 10 d

t/d	室温			4 °C		
	包封率/%	泄漏率/%	粒径/nm	包封率/%	泄漏率/%	粒径/nm
0	86.55	—	219.8	86.55	—	219.8
1	86.49	0.07	221.2	86.58	-0.03	220.3
2	86.12	0.50	223.0	86.40	0.17	218.2
3	84.83	1.99	214.8	85.89	0.76	221.4
4	83.14	3.94	225.7	85.66	1.03	222.9
6	82.02	5.23	221.0	85.43	1.29	218.5
10	78.45	9.40	226.3	83.94	2.86	214.9

SAB-LIP 组 (含 SAB 80 μmol/L)、SAB-TAT-LIP L 组 (含 SAB 40 μmol/L)、SAB-TAT-LIP M 组 (含 SAB 80 μmol/L)、SAB-TAT-LIP H 组 (含 SAB 160 μmol/L)。分别干预 24、48、72 h 后,采用 MTT 法检测各组 490 nm 处吸光度 (A) 值,计算细胞存活率,每组平行 6 份。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

结果见表 5,与对照组相比,blank-LIP 对 HSF 的增殖没有影响,脂质体材料对 HSF 没有毒副作用。SAB 的 2 种脂质体对 HSF 增殖都有明显的抑制作用,且相比于 free SAB,体现一定的缓释效果。SAB-TAT-LIP 对 HSF 增殖抑制作用呈现一定的剂量和时间依赖关系。

2.11 脂质体对 HSF 迁移的影响

2.11.1 划痕法 收集生长状态良好的 HSF,胰酶消化离心后,按每孔 5×10^5 个、2 mL 接种于 6 孔板,于培养箱中培养 24 h,使细胞密度达到 80%~

表 5 SAB-TAT-LIP 对 HSF 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 5 Effect of SAB-TAT-LIP on proliferation of HSF cell ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	细胞存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
对照	100.00 ± 8.75	100.00 ± 2.65	100.00 ± 3.59
free SAB	60.84 ± 6.81**	57.69 ± 5.42**	39.74 ± 3.43**
blank LIP	102.14 ± 6.42	101.03 ± 3.91	100.72 ± 2.86
SAB-LIP	66.31 ± 7.92**	63.94 ± 5.07**	49.59 ± 2.94**
SAB-TAT-LIP L	79.90 ± 8.75**	71.27 ± 4.75**	53.74 ± 3.60**
SAB-TAT-LIP M	70.17 ± 6.81**	62.13 ± 3.69**	44.01 ± 3.60**
SAB-TAT-LIP H	59.17 ± 6.03**	48.27 ± 4.72**	34.91 ± 3.76**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

90%后,用 200 μL 无菌的加样枪头比着尺子在每孔长满细胞的单层细胞中迅速划线,每孔划两条竖线,两条横线,呈“井”字状,用无菌 PBS 洗 3 次,洗去细胞残片,并换新鲜的完全培养基,显微镜下选取不同视野进行拍照,以这一时间作为零时间点,拍照完毕,降低血清浓度至 3%,给药及分组同“2.9”项,每组设 2 个平行孔,加药后分别于 12、24、48、60 h 对同一视野拍照,每组细胞选择 4 个不同视野,观察细胞的恢复情况。结果见图 7,对照组和 blank-LIP 组在 48 h 时已经恢复划痕的宽度并长满,其他 SAB 给药组在 60 h 时仍然没有恢复划痕的宽度,可判断为 SAB 及其脂质体皆能降低 HSF 的迁移能力,目测可粗略观察到 SAB-TAT-LIP M 组抑制 HSF 迁移的效果优于 SAB-LIP 组。SAB-TAT-LIP H 组可明显地观察到细胞变小,细胞间的间隙变大,细胞核破碎的现象,即含高剂量的 SAB-TAT-LIP 能促使 HSF 凋亡,丧失迁移的能力。

2.11.2 Transwell 小室实验 收集生长状态良好的 HSF,胰酶消化离心后,按每孔 3.5×10^5 个接种于 6 孔板,培养 24 h 待细胞生长至 60%~70%后,根据不同组别进行给药处理,给药及分组同“2.9”项,培养 48 h 后进行侵袭实验,预先在 Transwell 小室上表面涂上 20 μL 经 8 倍稀释的 matrigel 基质胶,使其在冰上风干 2 h,吸去多余液体,每孔加入 50 μL 10 g/L 牛血清白蛋白 BSA 的无血清培养基,置于培养箱平衡 30 min。胰酶消化给药后的细胞,用无血清培养基制备单细胞悬液,调整细胞密度至 6×10^5 个/mL,向上述准备好的 Transwell 小室的上室中加入 100 μL 无血清细胞悬液,下室加入 500 μL 完全培养基,置于培养箱中培养 24 h 后,弃去培养基,用 500 μL 0.1%结晶紫染液 (100 μL 0.5%结晶紫染色液 + 400 μL PBS) 固定染色 30 min,染色结束后用 PBS 轻轻冲洗 3 次,洗净残余染液,用棉签小心地擦拭掉上室的细胞,在显微镜下随机选取 5 个视野拍照,计数,计算每个视野平均值。结果见图 8 和图 9,与对照组相比,blank-LIP 组的侵袭细胞个数没有显著性差异,即脂质体材料对 HSF 的侵袭能力没有影响。含等剂量 SAB 的各给药组均表现出明显地抑制 HSF 侵袭的作用,抑制效果 free SAB 组 > SAB-TAT-LIP 组 > SAB LIP 组,且与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。以上结果表明 SAB-TAT-LIP 可以显著地抑制 HSF 在三维水平上的迁移,且与 SAB 的质量浓度呈正相关。

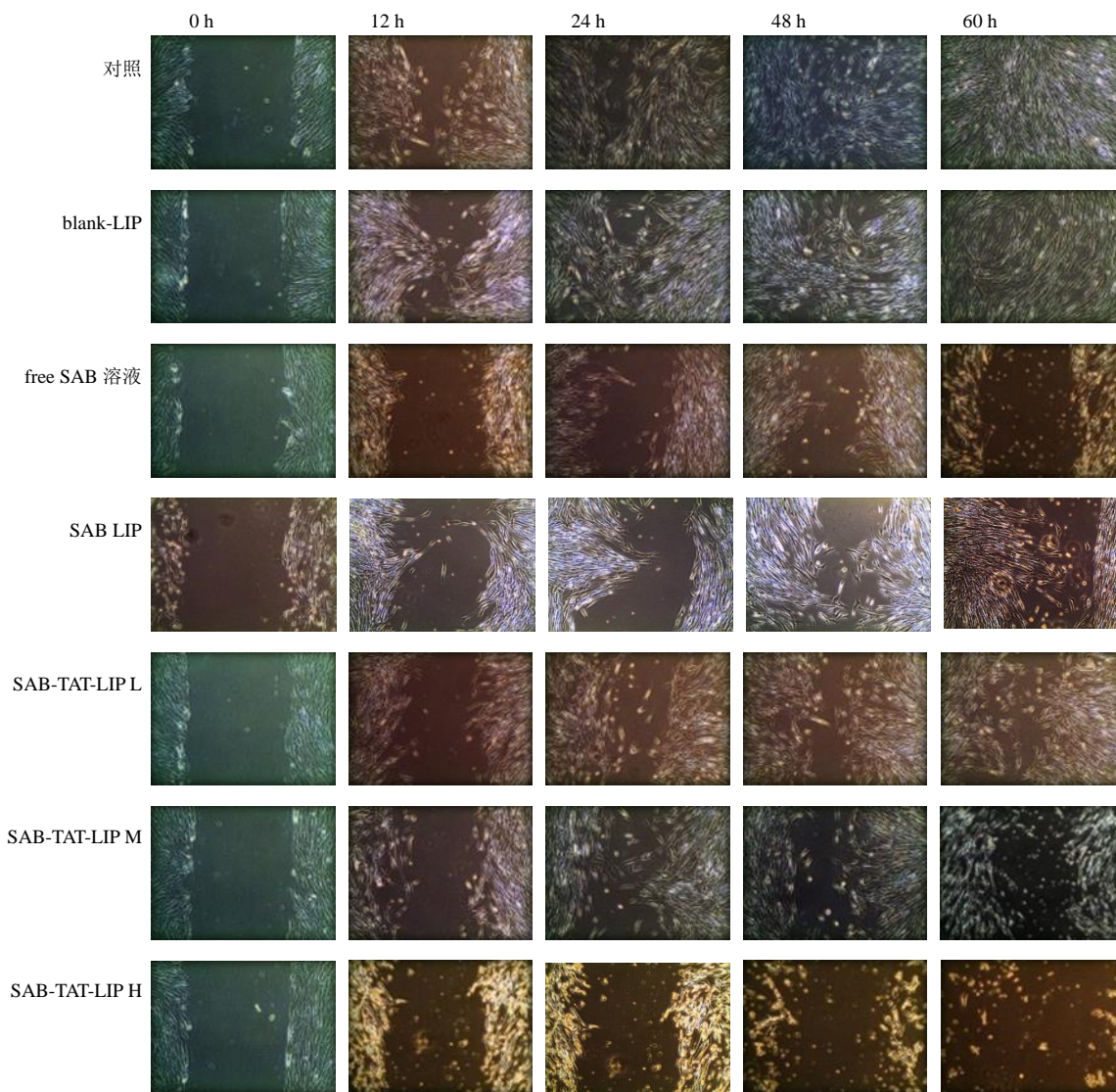


图 7 SAB-TAT-LIP 对 HSF 细胞迁移的影响

Fig. 7 Effect of SAB-TAT-LIP on migration of HSF cell

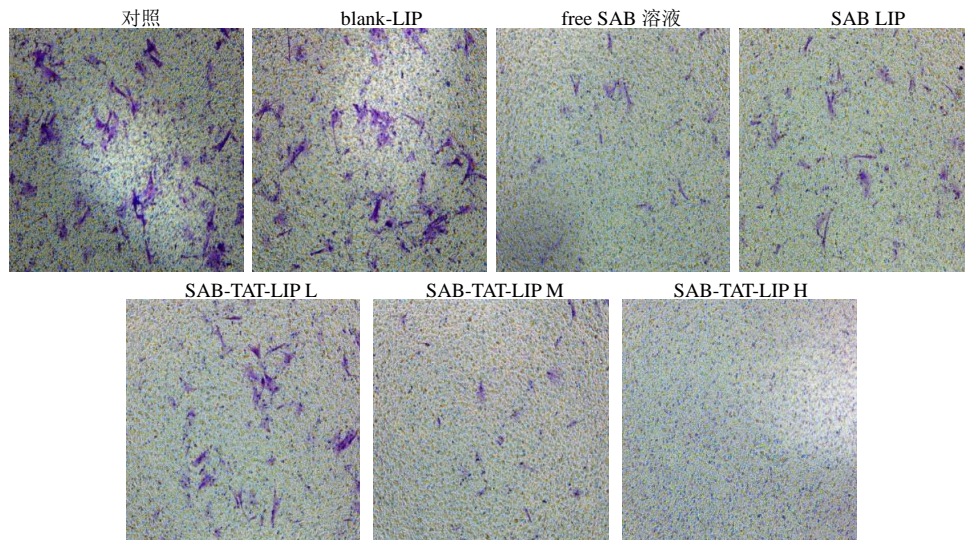


图 8 SAB-TAT-LIP 对 HSF 细胞侵袭的影响

Fig. 8 Inhibition effect of SAB-TAT-LIP on invasion of HSF cell

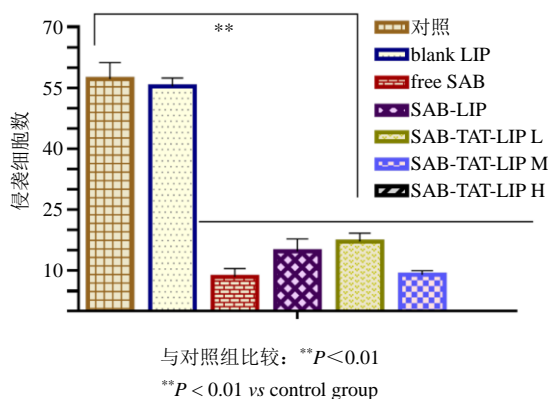


图 9 SAB-TAT-LIP 对 HSF 细胞侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Fig. 9 Effect of SAB-TAT-LIP on invasion of HSF cell ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

SAB 属于水溶性弱酸性药物，其油水分配系数受 pH 值的影响较大。为了克服水溶性好的药物包封率较低的缺点，本实验采用 pH 梯度主动载药法结合逆向蒸发法制备 SAB 脂质体，根据 Henderson-Hasselbalch 理论，每个 pH 单位的变化，会产生分子形式与离子形式药物的物质的量浓度 10 倍之差，pH 6.0 的外水相与 pH 3.2 的内水相形成 pH 梯度差，使 SAB 不断地以分子形式跨越磷脂膜进入到脂质体内，然后顺着 pH 梯度以离子形式被包封在内水相中，而无法重回到膜外，SAB 动态流动直至膜内外的 SAB 分子达到平衡状态^[22]。同时，SAB 是一类含有羟基苯和羧基官能团的多酚化合物，其强极性基团可以和磷脂的极性头发生相互作用，增强其与磷脂双分子层之间的相容性，从而更容易地包封在小尺寸脂质体的内部水相中^[21]。本法制备得到的 SAB-TAT-LIP 包封率高，粒径较小，分散性较好。初步稳定性考察结果表明，SAB-TAT-LIP 于室温放置，包封率较不稳定，于 4 °C 条件下贮存 10 d 无沉淀、絮凝现象，包封率较稳定，粒径大小无明显变化。但由于 SAB 是由 3 个分子丹参素和一个分子咖啡酸通过酯键缩合而成的二元有机弱酸，在 pH 为 3.0~6.0 的弱酸条件下较稳定，在水溶液中易降解和氧化。因此，在后期实验中将把 SAB-TAT-LIP 冷冻干燥制备成冻干粉贮存，并深入考察冻干保护剂的种类等条件，进一步提高脂质体的稳定性。

多肽具有良好的生物相容性、无免疫原性、低毒性、可降解等优点，在药物递送系统中的作用日益重要。TAT (Cys-AYGR-KKRRQRRR) 的末端具有半胱氨酸，是最常用的细胞穿膜肽 (CPPs) 之

一。国内外已有多篇文献报道，TAT 修饰的脂质体能够提高药物在体内的生物利用度，减少药物的毒副作用，提高药物的治疗指数^[23-26]。同时，TAT 能够增加皮肤角质层中的细胞间隙，改善皮肤的渗透性，提高脂质体的透皮递送能力，将药物运载至皮肤的更深层而发挥疗效^[27-28]。TAT 作为基本无细胞毒性的体内药物运输载体和渗透促进剂，在生物大分子物质经皮给药领域有着良好的研究价值和应用前景。

本研究结果表明，相比于游离 SAB 溶液，SAB-TAT-LIP 具有明显的缓释作用，且缓释效果优于 SAB-LIP；空白脂质体与 SAB 物理混合物的释放慢于游离 SAB，可能是由于物理混合过程中有一部分 SAB 被吸附于脂质体表面或主动载入脂质体中，导致 SAB 释放减慢。SAB-TAT-LIP 能够显著增强亲水型药物 SAB 向皮肤深层递送，形成含量较高的药物贮库，持久发挥药物疗效，其皮肤渗透和真皮层滞留能力优于 SAB-LIP。脂质材料对 HSF 的生长增殖没有毒副作用。SAB-TA-LIP 能以剂量-时间依赖性显著性地抑制 HSF 的生长和增殖，与 SAB 溶液相比，抑制作用呈现一定的延缓效果，该结果与 SAB-TAT-LIP 体外释药的延缓释放特征相呼应。SAB-TA-LIP 能显著地抑制 HSF 的迁移和侵袭（三维水平上的迁移），抑制作用优于 SAB-LIP。

在后期实验研究中，进一步考察 SAB-TA-LIP 对 HSF 的细胞周期、细胞凋亡和相关细胞因子表达的影响，并结合动物抑癍的药效学试验和皮肤刺激性试验等，综合评价 SAB-TAT-LIP 透皮给药体系设计的合理性与安全性。

参考文献

- [1] Finnerty C C, Jeschke M G, Branski L K, et al. Hypertrophic scarring: The greatest unmet challenge following burn injury [J]. *Lancet*, 2016, 388(10052): 1427-1436.
- [2] Chawla S, Ghosh S. Regulation of fibrotic changes by the synergistic effects of cytokines, dimensionality and matrix: Towards the development of an *in vitro* human dermal hypertrophic scar model [J]. *Acta Biomater*, 2018, 69(15): 131-145.
- [3] 张慧迪, 时 军, 陈桂添, 等. 丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体的制备及其真皮滞留效应考察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(3): 19-24.
- [4] Curran T A, Ghahary A. Evidence of a role for fibrocyte and keratinocyte-like cells in the formation of

- hypertrophic scars [J]. *J Burn Care Res*, 2013, 34(2): 227-231.
- [5] Shu B, Xie J L, Xu Y B, *et al.* Directed differentiation of skin-derived precursors into fibroblast-like cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(4): 1478-1486.
- [6] Li G, Zhou R, Zhang Q, *et al.* Fibroproliferative effect of microRNA-21 in hypertrophic scar derived fibroblasts [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 345(1): 93-99.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] 鞠爱春, 耿诗涵, 杨欣鹏, 等. 丹酚酸 B 鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠学习记忆能力及神经再生的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48(12): 2481-2485.
- [9] 夏 杨, 张惠军, 聂亚莉. 丹酚酸 B 预处理对心肌缺血/再灌注损伤能量代谢的影响 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(12): 2210-2213.
- [10] Liu Q, Chu H, Ma Y, *et al.* Salvianolic acid B attenuates experimental pulmonary fibrosis through inhibition of the TGF- β signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(9): 27610.
- [11] Liu M, Xu H, Zhang L, *et al.* Salvianolic acid B inhibits myofibroblast transdifferentiation in experimental pulmonary fibrosis via the up-regulation of Nrf2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 325-331.
- [12] Zhang J, An S J, Fu J Q, *et al.* Mixed aqueous extract of *Salvia Miltiorrhiza* reduces blood pressure through inhibition of vascular remodelling and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(1/2): 347-360.
- [13] Wang M, Sun G B, Sun X, *et al.* Cardioprotective effect of salvianolic acid B against arsenic trioxide-induced injury in cardiac H9c2 cells via the PI3K/Akt signal pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 216(2/3): 100-107.
- [14] Akhtar N, Khan R A. Liposomal systems as viable drug delivery technology for skin cancer sites with an outlook on lipid-based delivery vehicles and diagnostic imaging inputs for skin conditions [J]. *Prog Lipid Res*, 2016, 64(10): 192-230.
- [15] 马 敏, 瞿叶清, 刁叶婷, 等. 应用复合磷脂脂质体人工皮肤膜表征香附四物汤活性部位生物药剂学性质 [J]. *中草药*, 2018, 49(5): 1048-1055.
- [16] 高 迪, 王保军, 裴 玉, 等. 脂质体平衡透析与液质联用技术筛选脊痛宁片物质基础研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(4): 668-672.
- [17] Fu H, Hu G L, He Q. Preparation of cell penetrating peptide TAT and cleavable PEG co-modified liposomes loaded with paclitaxel and its *in vitro* apoptosis assay [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2014, 49(7): 1054-1061.
- [18] Fu H, Shi K, Hu G, *et al.* Tumor-targeted paclitaxel delivery and enhanced penetration using TAT-decorated liposomes comprising redox-responsive poly(ethylene glycol) [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(3): 1160-1173.
- [19] Isacchi B, Fabbri V, Galeotti N, *et al.* Salvianolic acid B and its liposomal formulations: Anti-hyperalgesic activity in the treatment of neuropathic pain [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 44(4): 552-558.
- [20] 马金鹏, 舒乐新, 刘志东. 丹酚酸 B 脂质体的制备及其体外释药的研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(1): 65-68.
- [21] Zhang L, Han L, Sun X, *et al.* The use of PEGylated liposomes to prolong the circulation lifetime of salvianolic acid B [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(4): 678-679.
- [22] Constable P D. Acid-base assessment: When and how to apply the Henderson-Hasselbalch equation and strong ion difference theory [J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2014, 30(2): 295-316.
- [23] Yuan D F, Zong T L, Gao H L, *et al.* Cell penetrating peptide TAT and brain tumor targeting peptide T7 dual modified liposome preparation and *in vitro* targeting evaluation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 50(1): 104-110.
- [24] Fu H, Shi K, Hu G, *et al.* Tumor-targeted paclitaxel delivery and enhanced penetration using TAT-decorated liposomes comprising redox-responsive poly (ethylene glycol) [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(3): 1160-1173.
- [25] Wang R H, Cao H M, Tian Z J, *et al.* [Retracted] efficacy of dual-functional liposomes containing paclitaxel for treatment of lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(2): 783-791.
- [26] Qin Y, Zhang Q, Chen H, *et al.* Comparison of four different peptides to enhance accumulation of liposomes into the brain [J]. *J Drug Target*, 2012, 20(3): 235-245.
- [27] Kwon S S, Kim S Y, Kong B J, *et al.* Cell penetrating peptide conjugated liposomes as transdermal delivery system of *Polygonum aviculare* L. extract [J]. *Int J Pharm*, 2015, 483(1/2): 26-37.
- [28] Wang Y, Su W, Li Q, *et al.* Preparation and evaluation of lidocaine hydrochloride-loaded TAT-conjugated polymeric liposomes for transdermal delivery [J]. *Int J Pharm*, 2013, 441(1/2): 748-756.