

pH 敏感/叶酸修饰芹菜素脂质体的制备及体内抗肿瘤作用研究

崔晓鸽*, 李 方, 王颖慧

郑州健康学院药学院, 郑州 450064

摘要:构建 pH 敏感/叶酸修饰芹菜素脂质体(pH-sensitive/folic acid-modified apigenin liposomes, pH/FA-Api-Lips), 进行体内药动学、组织分布及抗肿瘤评价。薄膜-水化法制备 pH/FA-Api-Lips, 并进行理化性质表征。考察 pH/FA-Api-Lips 在不同 pH 值磷酸盐缓冲液中的释药行为。采用 HepG2 细胞建立肝癌荷瘤小鼠模型, 以 20 mg/kg 荷瘤小鼠静脉注射芹菜素和 pH/FA-Api-Lips, 考察荷瘤小鼠体内药动学、分布情况及抗肿瘤效果。结果显示, pH/FA-Api-Lips 平均包封率、载药量、平均粒径和 Zeta 电位分别 $92.26\% \pm 1.72\%$ 、 $7.49\% \pm 0.18\%$ 、 212.69 ± 7.07 nm 和 -21.27 ± 0.59 mV。pH/FA-Api-Lips 外貌呈囊泡状, 体外释药具有明显的 pH 敏感性。pH/FA-Api-Lips 提高了芹菜素生物利用度, 在肿瘤组织中相对摄取率和峰浓度比值分别提高至 2.64 和 1.82 倍。体内药效学实验结果表明, pH/FA-Api-Lips 显著抑制了肝癌荷瘤小鼠的肿瘤体积生长, 体重未见明显下降。pH/FA-Api-Lips 将芹菜素抑瘤率由 26.76% 提高至 66.67%。因此, pH/FA-Api-Lips 提高了芹菜素体内肿瘤组织靶向性, 提高了芹菜素抗肿瘤药效, 有望开发成抗肿瘤药物。

关键词: 芹菜素; pH 敏感; 叶酸修饰; 脂质体; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880(2026)9-1961-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.9.010

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.9.010

Preparation of pH-sensitive/folic acid-modified apigenin liposomes and its *in vivo* anti-tumor effect

CUI Xiao-ge*, LI Fang, WANG Ying-hui

School of Pharmacy, Zhengzhou Health College, Zhengzhou 450064, China

Abstract: This study aims to construct pH-sensitive/folic acid-modified apigenin liposomes (pH/FA-Api-Lips), and to conduct pharmacokinetics, tissue distribution and *in vivo* anti-tumor evaluation. pH/FA-Api-Lips were prepared by film-hydration method, and its physicochemical properties were characterized. Drug release behavior of pH/FA-Api-Lips in phosphate buffer saline solution with different pH values was investigated. HepG2 cells were used to establish the hepatoma-bearing mice model, apigenin and pH/FA-Api-Lips were intravenously injected to the hepatoma-bearing mice at dose of 20 mg/kg. The pharmacokinetics, tissue distribution and anti-tumor effects of pH/FA-Api-Lips *in vivo* were also investigated. The results showed that average envelopment efficiency, drug loading, particle size and Zeta potential were $92.26\% \pm 1.72\%$, $7.49\% \pm 0.18\%$, 212.69 ± 7.07 nm and -21.27 ± 0.59 mV, respectively. The appearance of pH/FA-Api-Lips was vesicular, and the *in vitro* drug release exhibited obvious pH-sensitivity. pH/FA-Api-Lips enhanced the bioavailability of apigenin, the relative uptake efficiency and peak concentration ratio of apigenin in tumor tissue was increased by 2.64-fold and 1.82-fold, respectively. The results of the pharmacological experiments *in vivo* showed that pH/FA-Api-Lips significantly inhibited the tumor volume growth in hepatoma-bearing mice, and there was no significant decrease in body weight. pH/FA-Api-Lips increased the tumor inhibition rate of apigenin from 26.76% to 66.67%. Therefore, pH/FA-Api-Lips improved the tumor targeting of apigenin *in vivo*, and enhanced the anti-tumor efficacy. pH/FA-Api-Lips had the potential to be developed into an anti-tumor drug.

Key words: apigenin; pH-sensitive; folic acid-modified; liposomes; anti-tumor

肝癌是全球常见的恶性肿瘤之一, 复发率高, 生存率低^[1]。化疗是临床治疗肝癌的常用方法, 但化疗药物(如顺铂等)的不良反应和耐药性等不利于

收稿日期: 2025-10-13 接受日期: 2026-04-28

基金项目: 河南省科技攻关项目(232102310384)

* 通信作者 E-mail: cuixg2007@126.com

临床应用。因此毒性小、安全性高的中药活性成分成为抗肿瘤药物的研究热点。芹菜素(apigenin)属于天然黄酮类小分子化合物,可从柏科圆柏叶、伞形科植物旱芹叶、卷柏科卷柏全草中提取得到^[2],毒性极小,开发价值较高。国内外研究证明芹菜素对肝癌、口腔癌、乳腺癌、甲状腺癌、胃癌等具有显著的抗肿瘤活性^[2]。但芹菜素溶解度仅 $1.93\text{ }\mu\text{g/mL}$ ^[3],制备成注射剂时需要添加大量表面活性剂,且体内半衰期短^[4],极大限制了芹菜素临床应用。芹菜素新型纳米技术研究报道有纳米结构脂质载体^[4]、纳米混悬剂^[5]、胶束等^[6],但体内肿瘤靶向递药效率有待提高。

肿瘤部位精准递药一直是抗肿瘤药物临床应用面临的巨大挑战。人体正常组织器官 pH 值约为 7.4,肿瘤部位 pH 值通常在 6.0~6.8 之间,细胞的核内体 pH 值通常在 5.0~6.5 之间,溶酶体 pH 值约为 5.0。基于这种 pH 差异构建 pH 敏感脂质体,可因 pH 值的变化诱导 pH 敏感脂质体结构改变或破坏,进而快速释放抗肿瘤药物^[7]。但正常组织 pH 值与肿瘤部位 pH 值差异较小,影响了肿瘤靶向效率。叶酸受体在正常细胞表面极少或不表达,但在肿瘤细胞表面过度表达^[8]。叶酸(folic acid)是一种偶联蛋白,与叶酸受体亲和力很高^[9],因此叶酸修饰的脂质体有助于提高肿瘤靶向效率。所以构建同时具有 pH 敏感响应和叶酸肿瘤靶向的脂质体有望提高肿瘤靶向递药效率,增强药效^[10]。二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚(2-乙基-2-噁唑啉)-叶酸[dis-tearoyl phosphoethanolamine-poly(2-ethyl-2-oxazoline)-folic acid, DSPE-PEOz-FA]是一种含叶酸的两亲性分子,其中聚(2-乙基-2-噁唑啉)结构在弱酸性环境中稳定性较差,可使 DSPE-PEOz-FA 具有 pH 敏感特点^[7]。本研究在芹菜素脂质体(apigenin liposomes, Api-Lips)处方中引入适量 DSPE-PEOz-FA,构建 pH 敏感/叶酸修饰芹菜素脂质体(pH-sensitive/folic acid-modified apigenin liposomes, pH/FA-Api-Lips),并与 Api-Lips 比较抗肿瘤药效的差异,为后续研究奠定实验基础,也为芹菜素应用于肝癌治疗提供新策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞与动物

HepG2 细胞(批号:240322),购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

108 只 SPF 级 Balb/c 小鼠,体质量为 18~22 g,6 周龄,雌雄兼具,由河南省实验动物中心提供,动物生产许可证号 SCXK(豫)2022-001。饲养在温度为 20~26℃、相对湿度为 50%~60% 环境中,12 h 昼夜交替。本实验经郑州健康学院伦理委员会批准,批准号为 2023-SQLL-EC-20230915-1007-0000076。

1.1.2 材料

芹菜素原料药(批号:20221028,纯度:97.0%,南京泽朗农业发展有限公司);芹菜素对照品(批号:002602,纯度:98.5%,成都乐美天医药科技有限公司);磷脂(批号:SY-SO-230607,纯度:95.0%,上海艾伟拓医药科技有限公司);DSPE-PEOz-FA(批号:20230318,纯度:96.0%,重庆渝偲医药科技有限公司);胆固醇(批号:C20392,纯度:98.7%,上海艾伟拓医药科技有限公司);DMSO(批号:500M0231,纯度:99.6%,美国 AmApico 公司);戊巴比妥钠(批号:11715,纯度:98.0%,美国 Sigma 公司);顺铂(批号 SC8452,纯度:98.5%,上海 Ruibio 公司)。

1.1.3 仪器

MS-105/A 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);99-1A 型磁力搅拌器(常州金坛精达仪器制造有限公司);LOGIQ E9 型实验室超声仪(美国 GE 公司);1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Inspect F50 透射电子显微镜(美国 Thermofisher 公司);Zetasizer Nano ZS90 型粒度测定仪(英国 Malvern 公司);5424R 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);RT61212 型溶出仪(深圳市锐拓仪器设备有限公司);CF40-8 型细胞培养箱(北京昊诺斯科技有限公司);DW-I 型动物手术台(南京嘉玛贸易有限公司生产)。

1.2 芹菜素含量测定色谱条件

流动相为甲醇-水(70:30);流速为 1.0 mL/min ;检测波长为 340 nm;色谱柱为 Shimadzu ODS(4.6 mm×250 mm,5 μm);进样体积为 20 μL ;柱温为 35℃。

1.3 pH/FA-Api-Lips 的制备

薄膜-水化法制备 pH/FA-Api-Lips^[11,12]。取 50 mg 芹菜素置于茄形瓶中,加入 440 mg 磷脂、70 mg 胆固醇、90 mg DSPE-PEOz-FA 和 30 mL 混合溶剂(二氯甲烷:乙醇=1:2),置于 50℃ 水浴中,600 r/min 磁力搅拌至完全溶解。减压条件下(真空度为 0.07 MPa)旋干,使之形成均匀透明的脂质薄膜。

将含脂质薄膜茄形瓶置于 40 ℃ 水浴中,加入 50 mL pH 6.8 磷酸盐缓冲液,600 r/min 转速下磁力搅拌 30 min,超声 5 min(功率为 200 W),依次经 0.80、0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得 pH/FA-Api-Lips 混悬液。

1.4 pH/FA-Api-Lips 表征

1.4.1 包封率和载药量

精密吸取 pH/FA-Api-Lips 混悬液 1 mL(未经 0.45 μm 微孔滤膜过滤),加入甲醇破坏 pH/FA-Api-Lips,测量芹菜素总量(m_0)。精密吸取经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后 pH/FA-Api-Lips 混悬液 1 mL,转移至超滤管中(截留相对分子质量 3 000),8 000 r/min 离心 15 min,测定被包封芹菜素的量(m_1),按公式(1)计算包封率(E)。根据 pH/FA-Api-Lips 中芹菜素及辅料总用量(m_2),按照公式(2)计算载药量(L)。

$$E = m_1 / m_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$L = m_1 / m_2 \times 100\% \quad (2)$$

1.4.2 pH/FA-Api-Lips 粒径及 Zeta 电位测定

取 pH/FA-Api-Lips 混悬液 4 mL 于粒度分析仪上测定粒径、多分散指数(polydispersity index, PDI)和 Zeta 电位,每份样品重复 3 次。

1.4.3 pH/FA-Api-Lips 形貌

取 pH/FA-Api-Lips 混悬液 20 μL 滴于铜网载体表面,轻轻晃动使之铺展均匀,晾干,加入 1.5% 磷钨酸钠溶液 20 μL 染色,置于透射电镜下观察形貌。透射电镜参数:加速电压为 120 kV,放大倍数为 14 500,分辨率为 0.2 nm。

1.5 不同 pH 值介质中的释药行为比较

取 pH/FA-Api-Lips 混悬液(芹菜素含量为 10 mg)至截留相对分子质量为 8 kDa 的透析袋中,加入 pH 5.0 磷酸盐缓冲液 5 mL,尼龙绳扎紧。介质为 1 000 mL,37 ℃ 的 pH 5.0 磷酸盐缓冲液,转篮转速为 75 r/min,于 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、9.0、12.0、18.0、24.0、36.0 和 48.0 h 取样 5 mL,补加 pH 5.0 磷酸盐缓冲液 5 mL,测定样品中芹菜素含量,计算各时间点累积释放度。同法考察 pH/FA-Api-Lips 在 pH 6.0、pH 6.8、pH 7.4 磷酸盐缓冲液中的释药情况。为达到芹菜素的漏槽条件,分别使用含 1.5% 十二烷基硫酸钠的 pH 5.0、pH 6.0、pH 6.8、pH 7.4 磷酸盐缓冲液来考察芹菜素释药情况,由于芹菜素 12 h 累积释放度均达 90% 以上,故取样点调整为 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、9.0、12.0 h。

1.6 pH/FA-Api-Lips 介质稳定性研究

取 pH/FA-Api-Lips 混悬液 10 mL,分别与 10 mL 的 1.8% NaCl 溶液、10% 葡萄糖溶液和 PBS 溶液等体积混合(使介质浓度均被稀释 1 倍),置 37 ℃ 水浴中孵育,于 1.0、2.0、3.0、4.0、6.0 h 取样。测定 pH/FA-Api-Lips 在 0.9% NaCl、5% 葡萄糖和 PBS 溶液中粒径和包封率的变化趋势。选取包封率下降最小,且粒径增长最小的介质作为 pH/FA-Api-Lips 注射用溶剂。

1.7 药动学、体内组织分布及靶向性研究

1.7.1 HepG2 肝癌模型的建立

取 6 周龄的 Balb/c 小鼠,于右侧腋窝皮下注射 HepG2 细胞悬液(密度为 1.0×10^7 个/mL)0.2 mL,建立肝癌肿瘤模型,正常饲养。于瘤体处喷 75% 乙醇,轻轻挤压使之隆起,游标卡尺测量瘤体的长(a)和宽(b),按照公式(3)计算瘤块体积(V),选取瘤块体积 $80 \pm 10 \text{ mm}^3$ 的荷瘤小鼠作为肿瘤模型。

$$V = a \times b^2 \times \pi / 6 \quad (3)$$

1.7.2 实验分组

将 72 只荷瘤小鼠随机分成芹菜素组和 pH/FA-Api-Lips 组,每组 36 只(雌雄各半)。禁食 12 h 后按 20 mg/kg 剂量(以芹菜素计)分别尾静脉注射给药,于给药后 0.17、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00 h 腹腔注射 10% 水合氯醛溶液(给药剂量为 0.3 mL/100g),麻醉后摘眼球取血,置于抗凝离心管中,3 000 r/min 离心 3 min,取血浆冷冻保存。脱颈处死小鼠,摘取心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织。

1.7.3 血浆及组织样品的制备

取 200 μL 血浆置于离心管中,加入 1 mL 甲醇,密封涡旋 5 min,使蛋白析出沉淀,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 40 ℃ 下氮气吹干,加甲醇 200 μL 复溶,8 000 r/min 离心 10 min,即得血浆样品溶液。取心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织,室温解冻后滤纸吸干表面水分,称重,手术刀剪碎,加入等重量 0.9% NaCl 溶液,置于匀浆机中匀浆。精密吸取匀浆液 200 μL 置于离心管中,加入 1 mL 甲醇,密封涡旋 5 min,使蛋白析出沉淀,8 000 r/min 离心 10 min。取上清液于 40 ℃ 下氮气吹干,加甲醇 200 μL 复溶,8 000 r/min 再次离心 10 min,即得各个组织样品溶液。

1.7.4 标准曲线的绘制

取荷瘤小鼠,腹腔注射 10% 水合氯醛溶液(给药剂量为 0.3 mL/100 g),立即心脏取血,得空白血

浆。处死后立即取出心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织,得各个空白组织样品,按“1.7.3”项下处理,分别加入芹菜素对照品,配制浓度均为 0.05、0.50、2.00、5.00、10.00 和 20.00 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液,按“1.2”项下色谱条件测定各个质量浓度(X)的峰面积(Y),绘制血浆及各个组织对照品溶液标准曲线方程。

1.7.5 专属性考察

分别取血浆及各个组织的空白样品溶液、芹菜素对照品溶液和待测样品溶液分别按“1.2”项下色谱条件进行检测,考察分析方法的专属性。

1.7.6 稳定性考察

分别取血浆、心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织质控样品(芹菜素浓度均为 2.0 $\mu\text{g/mL}$),置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,于 0、1、2、3、5、7 d 取样,按“1.7.3”方法处理,测定芹菜素浓度。将血浆、心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织质控样品,按“1.7.3”方法处理后得质控样品溶液,置于室温(25 $^{\circ}\text{C}$),分别于 0、3、6、12、18 和 24 h 测定芹菜素浓度。

1.7.7 精密度和准确度考察

分别取芹菜素浓度为 0.1、2.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆、心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织质控样品,分别按“1.7.3”处理后连续测定 6 次,计算芹菜素浓度的日内相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),代入随行标准曲线计算测得浓度,与实际浓度相比计算相对误差(relative error, RE)。将各质控样品连续测定 6 d,每 d 测定 1 次,分别计算芹菜素浓度日间 RSD 和 RE。

1.7.8 回收率

取空白血浆和心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织的空白匀浆液,分别加入芹菜素对照品,使浓度均为 0.1、2.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$,各浓度均 3 份,按“1.7.3”项下处理后测定。另取 0.1、2.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 芹菜素对照品溶液,同一条件下进行测定。将测得的各个质控样品溶液峰面积与芹菜素对照品溶液的峰面积进行对比,计算回收率。

1.7.9 药动学参数的计算及靶向性评价方法

采用 DAS 2.0 软件非房室模型分别计算芹菜素和 pH/FA-Api-Lips 的时间-血药浓度曲线下面积(area under the curve, AUC)、半衰期(half-life, $t_{1/2}$)、平均驻留时间(mean residence time, MRT)及清除率(clearance, CL)等参数。按照公式(4)计算相对摄取率(E_{RU}),按照公式(5)计算峰浓度比值

(R_{PC}),并将 E_{RU} 和 R_{PC} 作为靶向性评价指标,数值越大表示组织靶向性越强^[12]。

$$E_{\text{RU}} = A_1/A_2 \quad (4)$$

$$R_{\text{PC}} = C_1/C_2 \quad (5)$$

式中, A_1 为 pH/FA-Api-Lips 的 AUC, A_2 为芹菜素的 AUC, C_1 为 pH/FA-Api-Lips 的 C_{max} , C_2 为芹菜素的 C_{max} 。

1.8 pH/FA-Api-Lips 体内抑瘤作用研究

为对比 pH/FA-Api-Lips 体内抗肿瘤药效,故引入 Api-Lips 作为参考。36 只荷瘤小鼠随机分成 6 组即:模型组(0.9% NaCl)、阳性组(顺铂,2.0 mg/kg)、芹菜素组(20 mg/kg)、Api-Lips 组(20 mg/kg)、pH/FA-Api-Lips 低剂量组(10 mg/kg)和 pH/FA-Api-Lips 高剂量组(20 mg/kg)。每次给药前均禁食 12 h,每 3 d 注射给药 1 次,共注射给药 5 次。停药后第 3 d 腹腔注射 10% 水合氯醛溶液(给药剂量为 0.3 mL/100g),脱颈处死小鼠,剥离瘤块、胸腺和脾脏,分别记录重量,按公式(6)计算抑瘤率(R_{T}),按公式(7)计算胸腺指数(I_{T}),按公式(8)计算脾脏指数(I_{S})。

$$R_{\text{T}} = (1 - m_1/m_0) \times 100\% \quad (6)$$

$$I_{\text{T}} = m_{\text{T}}/m_{\text{w}} \quad (7)$$

$$I_{\text{S}} = m_{\text{S}}/m_{\text{w}} \quad (8)$$

式中, m_1 代表给药组平均瘤重(mg), m_0 代表模型组平均瘤重(mg); m_{T} 代表荷瘤小鼠胸腺重量(mg); m_{S} 代表荷瘤小鼠脾脏重量(mg); m_{w} 代表荷瘤小鼠体重(g)。

1.9 统计学分析

使用 SPSS 24.0 软件进行统计分析,数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较使用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 pH/FA-Api-Lips 基本理化性质

按“1.4.1”项下方法测得 pH/FA-Api-Lips 包封率为 $92.26\% \pm 1.72\%$,载药量为 $7.49\% \pm 0.18\%$ 。按“1.4.2”项下测得 pH/FA-Api-Lips 粒径为 212.69 ± 7.07 nm,较小的粒径适合静脉注射给药^[13]。pH/FA-Api-Lips 的 PDI 值为 0.132 ± 0.09 , Zeta 电位为 -21.27 ± 0.59 mV。pH/FA-Api-Lips 粒径分布见图 1A。pH/FA-Api-Lips 形貌见图 1B, pH/FA-Api-Lips 呈囊泡状。由于透射电镜观察到的是干燥后形貌,故粒径略小于粒度分析仪测得的粒径^[14]。

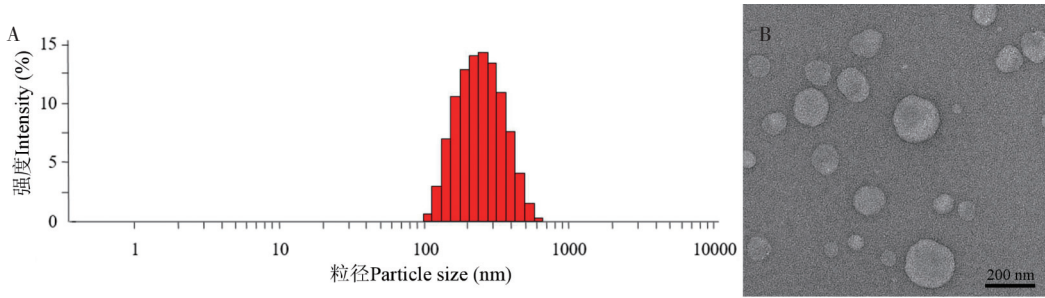


图1 pH/FA-Api-Lips 粒径分布图 (A) 和透射电镜图 (B)

Fig. 1 Particle size distribution (A) and transmission electron microscopy (B) of pH/FA-Api-Lips

2.2 pH/FA-Api-Lips 和芹菜素释药行为比较

pH/FA-Api-Lips 和芹菜素在不同 pH 介质中释药行为见图 2。pH/FA-Api-Lips 随着 pH 值的减小 pH/FA-Api-Lips 释药速率和累积释放度逐渐增大

(见图 2A), 证明 pH/FA-Api-Lips 具有 pH 敏感性, 有利于在肿瘤细胞弱酸性的核内及溶酶体中智能释药, 且表现出一定的缓释作用^[15]; 而芹菜素在体外释药无明显的 pH 敏感性(见图 2B)。

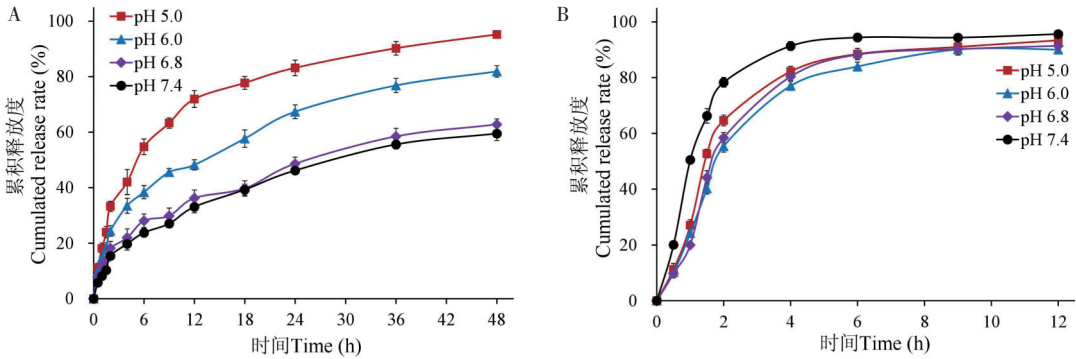


图2 pH/FA-Api-Lips (A) 和芹菜素 (B) 在不同 pH 值磷酸盐缓冲液中体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 *In vitro* release curves of pH/FA-Api-Lips (A) and apigenin (B) in phosphate buffer with different pH values ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.3 pH/FA-Api-Lips 介质稳定性研究

pH/FA-Api-Lips 在 0.9% NaCl 溶液、5% 葡萄糖溶液和 PBS 中包封率分别降低至 90.11% $\pm$ 0.74%、85.19% $\pm$ 0.91% 和 78.10% $\pm$ 1.33%, 说

明 pH/FA-Api-Lips 在 0.9% NaCl 溶液中包封率下降幅度最小。粒径变化情况见图 3, pH/FA-Api-Lips 在 0.9% NaCl 溶液中粒径变化最小, 故选择 0.9% NaCl 溶液为 pH/FA-Api-Lips 注射用介质。

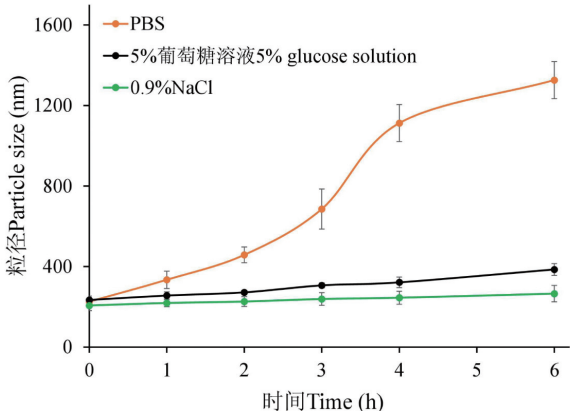


图3 pH/FA-Api-Lips 在不同介质中粒径稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Stability of particle size of pH/FA-Api-Lips in different media ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.4 pH/FA-Api-Lips 体内组织分布研究

2.4.1 血浆及各个组织中标标准曲线

血浆、心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织对照品溶液标准曲线方程分别为 $Y = 388.89 X + 113.46$ ($r = 0.9954$)、 $Y = 382.78 X + 172.25$ ($r = 0.9980$)、 $Y = 386.22 X - 137.78$ ($r = 0.9964$)、 $Y = 406.31 X + 13.36$ ($r = 0.9972$)、 $Y = 381.56 X + 184.43$ ($r = 0.9972$)、 $Y = 403.42 X - 34.49$ ($r = 0.9969$) 和 $Y =$

$407.19 X - 74.90$ ($r = 0.9974$), 因此血浆及各组织样品溶液中芹菜素在 $0.1 \sim 20.0 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好。

2.4.2 专属性考察

分别取血浆及各个组织的空白样品溶液、芹菜素对照品溶液和待测样品溶液分别按“1.2”项下色谱条件进行检测,发现血浆及各个组织中内源性物质未干扰芹菜素的色谱峰,专属性高(见图4)。

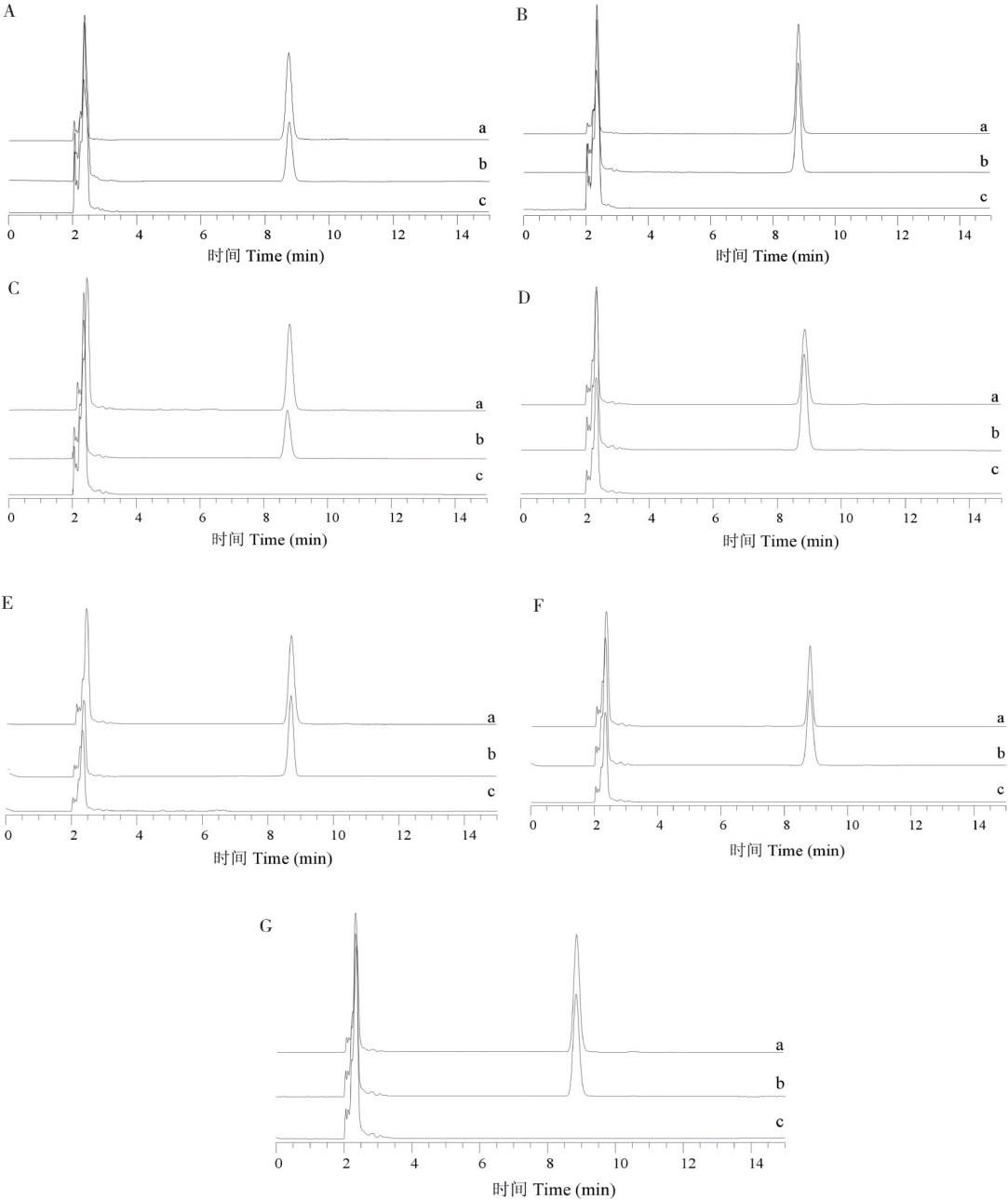


图4 血浆(A)、心(B)、肝(C)、脾(D)、肺(E)、肾(F)和肿瘤组织(G)的HPLC色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of plasma (A), heart (B), liver (C), spleen (D), lung (E), kidney (F) and tumor tissue (G)

注:a. 组织样品;b. 芹菜素对照品;c. 空白样品。Not:a. Tissue sample;b. Apigenin reference substance;c. Blank sample.

2.4.3 稳定性考察

质控样品在-20 ℃中放置 7 d,测得血浆、心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织中的芹菜素浓度 RSD 依次为 4.4%、3.0%、5.0%、3.8%、4.1%、5.7% 和 3.2%;质控样品溶液在室温放置 24 h,测得血浆、心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织中的芹菜素浓度 RSD 依次为 4.0%、2.9%、5.1%、3.9%、6.0%、3.8% 和 3.9%,证明质控样品的稳定性良好。

2.4.4 精密度和准确度考察

结果见表 1,血浆及各个组织中芹菜素浓度的日内 RSD <7.0%,RE 绝对值 <7.0%;日间 RSD <7.0%,RE 绝对值 <9.0%,表明精密度和准确度良好。

2.4.5 回收率

回收率结果见表 1,血浆及各个组织中芹菜素回收率在 93.25%~104.7%之间,RSD 小于 7.0%,

因此该法可用于血浆及组织中芹菜素的含量测定。

2.4.6 药动学结果

芹菜素和 pH/FA-Api-Lips 血药浓度-时间曲线见图 5,药动学参数见表 2。pH/FA-Api-Lips 的 $AUC_{pH/FA-Api-Lips}$ 极显著大于 $AUC_{芹菜素}$ ($P < 0.01$),说明 pH/FA-Api-Lips 有效提高了芹菜素生物利用度。pH/FA-Api-Lips 延长了芹菜素 $t_{1/2}$ 和 MRT,并使芹菜素 CL 下降,均具有极显著性差异 ($P < 0.01$),说明 pH/FA-Api-Lips 改变了芹菜素药动学行为,利于增强药效。

2.4.7 体内组织分布及靶向性评价结果

芹菜素和 pH/FA-Api-Lips 在荷瘤小鼠体内各个组织中的浓度见图 6,靶向性参数结果见表 3。pH/FA-Api-Lips 肿瘤组织 RUE 和 PCR 分别提高到 2.64 和 1.82 倍,说明 pH/FA-Api-Lips 可增加芹菜素中肿瘤组织的蓄积量。pH/FA-Api-Lips 使芹菜素

表 1 精密度、准确度和回收率实验结果
Table 1 Experiment results of precision, accuracy and recovery rate

样品 Sample	芹菜素浓度 Apigenin concentration (μg/mL)	日内 Intra-day		日间 Inter-day		回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)
		RSD (%)	RE (%)	RSD (%)	RE (%)		
血浆 Plasma	0.1	2.8	5.0	5.0	-1.2	104.1	5.1
	2.0	3.6	-3.6	2.8	-4.6	96.98	3.4
	20.0	4.0	-4.1	3.9	3.8	98.12	6.1
心 Heart	0.1	5.1	3.0	4.2	-7.0	96.97	2.9
	2.0	3.0	-6.0	2.7	5.3	93.25	4.2
	20.0	4.2	4.0	5.0	4.8	98.69	5.2
肝 Liver	0.1	2.9	-6.0	5.3	-7.3	103.1	3.3
	2.0	4.9	4.3	3.2	-5.3	100.9	6.0
	20.0	4.1	3.9	3.9	1.1	95.64	2.0
脾 Spleen	0.1	5.3	-6.9	4.0	3.7	99.11	3.2
	2.0	6.1	-2.0	2.4	-4.6	95.69	4.5
	20.0	2.9	3.6	5.9	5.8	102.2	3.0
肺 Lung	0.1	5.3	-4.7	6.2	3.0	104.3	3.2
	2.0	4.1	5.1	3.3	-8.5	98.16	4.6
	20.0	3.9	2.2	4.8	-5.8	93.78	5.2
肾 Kidney	0.1	3.2	-3.6	5.9	4.3	101.0	2.9
	2.0	4.5	-1.0	3.0	2.8	96.87	6.0
	20.0	6.1	2.6	4.8	4.0	102.3	6.2
肿 Tumor	0.1	4.2	-4.2	4.2	-5.2	95.77	4.3
	2.0	3.6	5.0	4.0	-6.0	104.7	3.1
	20.0	5.1	-3.7	5.2	1.2	98.10	6.3

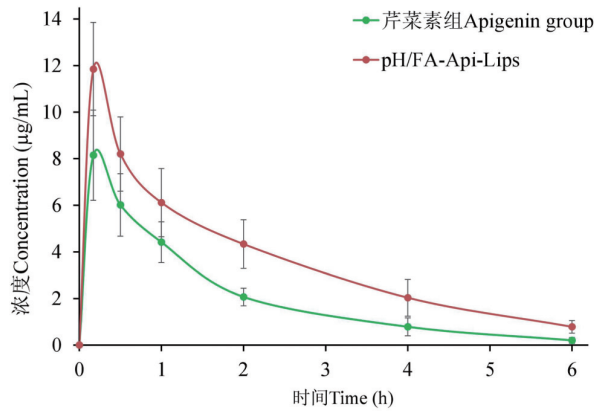


图5 芹菜素和 pH/FA-Api-Lips 血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Blood concentration-time curve of apigenin and pH/FA-Api-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表2 芹菜素和 pH/FA-Api-Lips 药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of apigenin and pH/FA-Api-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	C _{max} (μg/mL)	t _{1/2} (h)	MRT (h)	CL [L/(kg·h)]	AUC (μg·h/mL)
芹菜素组 Apigenin group	8.01 ± 1.85	0.82 ± 0.19	1.82 ± 0.33	2.48 ± 0.72	25.93 ± 4.13
pH/FA-Api-Lips	11.93 ± 2.56 **	2.07 ± 0.26 **	3.78 ± 0.55 **	0.81 ± 0.19 **	44.17 ± 6.23 **

注:与芹菜素组相比, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with apigenin group, ** $P < 0.01$.

在心、肺、肾等器官中分布有所减小,而在肝、脾等器官的分布量增加(RUE 和 PCR 比值均大于 1),说明 pH/FA-Api-Lips 改变了芹菜素在组织器官分布。肝脏是药物代谢和排泄的主要场所,所以使药物在肝脏中蓄积;脾脏中富含巨噬细胞,导致 pH/FA-Api-Lips 被巨噬细胞识别,故使药物在脾脏中蓄积量也有所增加。

2.5 pH/FA-Api-Lips 体内抗肿瘤实验

2.5.1 抑瘤作用实验结果

各组荷瘤小鼠肿瘤体积增长情况结果见图 7, 各组抑瘤率见表 4。各组荷瘤小鼠肿瘤体积均随着

时间延长而增长,但增长速度不同。模型组荷瘤小鼠由于无药物治疗作用,瘤体增长速度最快,芹菜素组荷瘤小鼠瘤体增长变缓,表现出一定的抑瘤作用。与芹菜素(20 mg/kg)相比,Api-Lips 组(20 mg/kg)和 pH/FA-Api-Lips 低剂量组(10 mg/kg)的瘤体积与瘤质量均有显著性下降($P < 0.05$);而 pH/FA-Api-Lips 高剂量组(20 mg/kg)的瘤体积和瘤质量有极显著性下降($P < 0.01$),说明 Api-Lips 和 pH/FA-Api-Lips 提高了芹菜素抗肿瘤药效。与 Api-Lips 组相比,在给药剂量相同的前提下 pH/FA-Api-Lips 瘤体积和瘤质量极显著性下降($P < 0.01$),说明 pH/

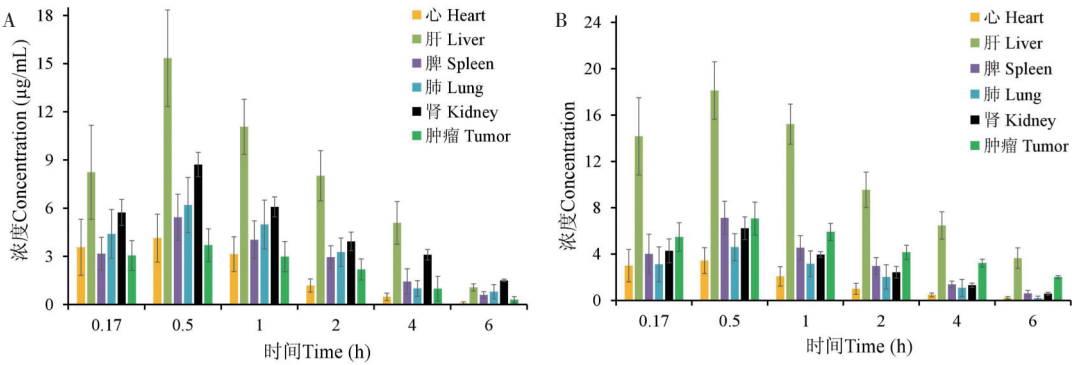


图6 芹菜素(A)和 pH/FA-Api-Lips(B)在荷瘤小鼠体内各个组织中的浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Concentration of apigenin (A) and pH/FA-Api-Lips (B) in each tissue of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 3 芹菜素和 pH/FA-Api-Lips 靶向性参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 3 Targeting parameter of apigenin and pH/FA-Api-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品 Sample	AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)		E_{RU}	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)		R_{PC}
	pH/FA-Api-Lips	芹菜素 Apigenin		pH/FA-Api-Lips	芹菜素 Apigenin	
心 Heart	6.11 ± 1.19 *	7.58 ± 1.28	0.81	3.89 ± 0.84	4.17 ± 1.03	0.93
肝 Liver	51.68 ± 8.26 **	36.72 ± 5.94	1.41	18.04 ± 2.77 *	15.11 ± 3.02	1.19
脾 Spleen	14.93 ± 3.31 *	12.78 ± 3.91	1.17	6.81 ± 1.42 *	5.77 ± 1.36	1.18
肺 Lung	11.62 ± 3.20 **	14.54 ± 4.03	0.80	4.85 ± 1.36 *	6.13 ± 1.65	0.79
肾 Kidney	13.07 ± 3.64 **	22.78 ± 5.58	0.57	6.64 ± 1.52 *	8.76 ± 1.71	0.76
肿瘤 Tumor	24.26 ± 5.23 **	9.18 ± 1.67	2.64	7.09 ± 1.69 **	3.90 ± 0.87	1.82

注:与芹菜素组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note:Compared with apigenin group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

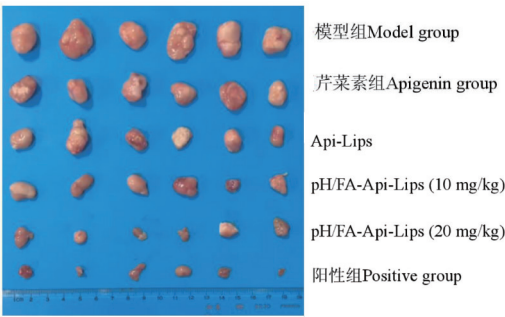
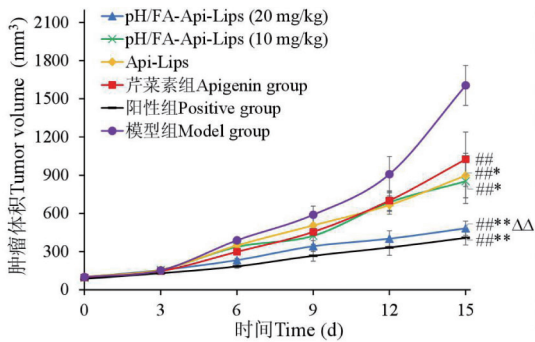


图 7 各组荷瘤小鼠肿瘤体积变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Tumor volume change of tumor-bearing mice in every group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注:与模型组相比, ### $P < 0.01$;与芹菜素组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 Api-Lips 组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。Note:Compared with model group, ### $P < 0.01$;Compared with apigenin group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with Api-Lips group, $\Delta\Delta P < 0.01$.

表 4 各组荷瘤小鼠体内抑瘤率结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 4 Anti-tumor inhibition rate *in vivo* of tumor-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	瘤质量 Tumor weight (g)	抑瘤率 Tumor inhibition rate (%)	体重 Body weight (g)
模型组 Model group	2.13 ± 0.31	—	30.43 ± 2.10
阳性组 Positive group	0.65 ± 0.14### **	69.48	24.77 ± 1.90##
芹菜素组 Apigenin group	1.56 ± 0.22###	26.76	31.06 ± 2.02
Api-Lips	1.16 ± 0.20### *	45.54	32.12 ± 1.94
pH/FA-Api-Lips (10 mg/kg)	1.11 ± 0.28### *	47.89	30.85 ± 2.26
pH/FA-Api-Lips (20 mg/kg)	0.81 ± 0.23### ** $\Delta\Delta$	66.67	31.44 ± 2.31

注:与模型组相比, ### $P < 0.01$;与芹菜素组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 Api-Lips 组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。
Note:Compared with model group, ### $P < 0.01$;Compared with apigenin group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with Api-Lips group, $\Delta\Delta P < 0.01$.

FA-Api-Lips 抗肿瘤药效高于 Api-Lips。与模型组小鼠体重相比,阳性组(顺铂)荷瘤小鼠体重极显著性下降($P < 0.01$),而芹菜素及其各个脂质体给药组荷瘤小鼠体重未发生明显变化,说明毒副作用低于

顺铂。
2.5.2 胸腺指数和脾脏指数评价
胸腺指数和脾脏指数结果见表 5。与模型组相比,阳性组(顺铂)胸腺指数和脾脏指数极显著性下

表 5 各组荷瘤小鼠免疫器官指数的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Comparison of immune organ index of tumor-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	胸腺指数 Thymus index (mg/g)	脾脏指数 Spleen index (mg/g)
模型组 Model group	2.04 ± 0.27	5.89 ± 0.68
阳性组 Positive group	1.29 ± 0.18 ^{##}	3.44 ± 0.46 ^{##}
芹菜素组 Apigenin group	2.23 ± 0.29 ^{&&}	5.72 ± 0.57 ^{&&}
Api-Lips	2.28 ± 0.32 ^{&&}	5.64 ± 0.60 ^{&&}
pH/FA-Api-Lips (10 mg/kg)	2.21 ± 0.32 ^{&&}	5.58 ± 0.69 ^{&&}
pH/FA-Api-Lips (20 mg/kg)	2.26 ± 0.34 ^{&&}	5.53 ± 0.46 ^{&&}

注:与模型组相比, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$;与阳性组相比, ^{&&} $P < 0.01$ 。
Note: Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with positive group, ^{&&} $P < 0.01$.

降 ($P < 0.01$),表明顺铂损伤了免疫器官,具有一定的毒副作用。与阳性组(顺铂)相比,芹菜素组、Api-Lips 组、pH/FA-Api-Lips 低、高剂量组的胸腺指数和脾脏指数均有极显著性增加 ($P < 0.01$),说明使用安全性高远高于阳性组(顺铂)。

3 结论

芹菜素在不同 pH 值介质中释药无明显差异,不利于抗肿瘤药效发挥。本研究使用 DSPE-PEOz-FA 作为 pH 敏感材料制备了 pH/FA-Api-Lips,该材料可使其结构在弱酸性介质中遭到破坏^[7],因而 pH/FA-Api-Lips 在 pH 5.5 和 pH 6.0 中释药速率和累积释放度明显高于 pH 6.8 和 pH 7.4 中的释药速率和累积释放度。在弱碱性环境中 DSPE-PEOz-FA 无 pH 敏感性,故 pH/FA-Api-Lips 结构稳定性高,有利于改变体内组织分布、增强药效。

芹菜素和 Api-Lips 抑瘤作用相对较弱,可能与体内肿瘤靶向性较差有关。pH/FA-Api-Lips 极大地提高了芹菜素抗肿瘤药效,可能是由于叶酸修饰利于提高 pH/FA-Api-Lips 肿瘤靶向性,在叶酸受体介导的内吞作用下促使 pH/FA-Api-Lips 进入肿瘤细胞^[16];pH/FA-Api-Lips 具有 pH 敏感性,在肿瘤细胞弱酸性环境可快速释药,因而提高了芹菜素在肿瘤组织的聚集量,为发挥药效、降低毒副作用奠定基础。芹菜素口服半数致死量 (LD_{50}) 大于 8 g/kg^[17],体内注射其 LD_{50} 的 1/100 即约 80 mg/kg 时动物生存状态良好^[18],未见死亡现象。本研究结合前期预实验,最终确定芹菜素注射剂量为 20 mg/kg 进行 pH/FA-Api-Lips 药效学评价^[4],实验过程中也未出现死亡现象。

与模型组相比,顺铂组荷瘤小鼠体重、胸腺指数和脾脏指数均出现极显著性下降 ($P < 0.01$),这与顺铂自身毒副作用大有关。pH/FA-Api-Lips 组荷瘤小鼠体重未见明显下降,胸腺指数和脾脏指数未见显著性变化,证明 pH/FA-Api-Lips 使用安全性明显高于顺铂,临床推广意义更大。一方面芹菜素本身毒副作用极低,使用安全性高,另一方面 pH/FA-Api-Lips 处方中磷脂作为一种营养物质,具有保护、修复免疫器官的作用^[19]。Wang 等^[4]使用固态和液态脂质制备了芹菜素纳米结构脂质载体,体内抑瘤率仅 37.04%。本研究构建的 pH/FA-Api-Lips 体内抑瘤率达 66.67%,优势更为明显。

综上, pH/FA-Api-lip 包封率达 92.26% ± 1.72%,符合《中华人民共和国药典》2025 年版四部 9014 项下对微粒制剂的要求(大于 80%)。pH/FA-Api-Lips 改变了芹菜素体内组织分布,极大提高了药物在肿瘤部位的蓄积量,提高了抗肿瘤药效,毒副作用远低于临床常用抗肿瘤药物顺铂,因此 pH/FA-Api-Lips 有望作为抗肿瘤药物应用于肝癌的治疗,值得进一步开发研究。芹菜素和 pH/FA-Api-Lips 体内组织分布是否具有剂量依赖性需要进一步确认,另外 pH/FA-Api-Lips 小试及中试研究、非临床安全性评价等也是今后研究重点,后续将做进一步科研报道。

数据可用性声明:本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00106>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Xu RX, Wang N. Mechanism of effective components in traditional Chinese medicine against cisplatin-induced resistance of liver cancer [J]. *Drugs Clin (现代药物与临床)*, 2024, 39: 257-262.
- 2 Jiang JW, Yan PY, Kuang JN, et al. Research advances in antitumor mechanism of apigenin [J]. *China Pharm J (中国药学杂志)*, 2023, 58: 469-474.
- 3 Zhang LC, Li GS, Liu YH, et al. Apigenin solid dispersion gastric floating tablet: preparation, oral pharmacokinetics and *in vitro-in vivo* correlation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2024, 55: 6519-6528.
- 4 Wang FY, Li WH. Preparation and *in vivo* anti-tumor activity of apigenin nanostructured lipid carriers [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2022, 44: 2081-2087.
- 5 Xu SY, Lv C, Li XY, et al. Anti-tumor pharmacodynamics of

apigenin nanosuspension on HepG2 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报),2020,22:40-44.

6 Liu XY,Zhou YQ,Yu EJ,et al. Preparation optimization and quality evaluation of apigenin-loaded soluplus nanomicelles [J]. Cent South Pharm(中南药学),2023,21:386-391.

7 Fan LF,Jin LL,Tang TC,et al. Neutrophil-like pH-responsive pro-efferocytic nanoparticles improve neurological recovery by promoting erythrophagocytosis after intracerebral hemorrhage[J]. Theranostics,2024,14:283-303.

8 Wang J,Gu XM,Zhang SY,et al. Preparation and evaluation of dual-targeting pH-sensitive baicalin/curcumin co loaded liposomes[J]. Drug Eval Res(药物评价研究),2024,47:2816-2829.

9 Yang K,Zhang HZ,Zhang YH,et al. Preparation of folic acid-modified pH-responsive norcantharidin liposomes and its promotion apoptosis of HepG2 cells[J]. Drug Eval Res(药物评价研究),2025,48:1529-1545.

10 Chen XM,Tang XS,Hu B,et al. Pharmacokinetics study of(γ -linolenic acid perilla seed oil and its hepatoprotective effects [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2025,37:1627-1637.

11 Deng MX,Zeng KX,Yan LR,et al. Preparation and evaluation of andrographolide ethosomes[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2025,37:1544-1551.

12 Xue XF,Li HX,Zhang LQ,et al. Galactosylated modified pH-sensitive nanovesicles loaded with artesunate; preparation,tissue distribution and anti-tumor evaluation [J]. Drug Eval Res(药物评价研究),2025,48:2579-2591.

13 Si XF,Liu Y,Zhang JL,et al. Discussion on the pharmaceutical development of generic multivesicular liposome[J]. Chin J Med Guide(中国医药导报),2026,28:22-27.

14 Mao LJ,Zhu JH,Hao HJ. Preparation, characterization and pharmacokinetic study of mangiferin nanovesicles [J]. Drugs Clin(现代药物与临床),2025,40:1389-1397.

15 Wang TL,Zhang GH,Zhang L,et al. Preparation, characterization and anti-tumor evaluation of dihydromyricetin loaded by ZIF-8 nanoparticles [J]. Drug Eval Res(药物评价研究),2025,48:1224-1235.

16 Wang D,Fan ZH,Zhang XC,et al. pH-responsive self-assemblies from the designed folic acid-modified peptide drug for dual-targeting delivery[J]. Langmuir,2020,37:339-347.

17 Liu HB,Sui HX,Zhi Y,et al. Acute toxicity,genetic toxicity and sub-chronic toxicity of apigenin [J]. Chin J Food Hyg (中国食品卫生杂志),2011,23:489-494.

18 Lai LJ,Mo HX. Effect of apigenin on the osteoporosis in ovariectomized rats and its dose [J]. Chin J Tissue Eng Res (中国组织工程研究),2019,24:171-175.

19 Li AY,Zhu GY,Jiang B,et al. Clinical study on probiotics supplement combined with polyene phosphatidylcholine in the treatment of patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Clin Med Eng(临床医学工程),2024,31:1091-1092.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委 (以姓氏笔划为序)

Members

王 扣	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林
WANG Kou	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin
刘相国	孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉
LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li
汪海波	沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊
WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun
欧阳杰	易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛
OUYANG Jie	YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao
夏永刚	高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕
XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan
曾克武	蓝蔚青	廖晨钟	薛永波		
ZENG Kewu	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo		