DOI:10.16016/j.2097-0927.202402025

尼达尼布纳米脂质体的制备及其表征研究

饶 乐[1],郭梦雨[2],徐国纲[1] 100853 北京,解放军总医院第二医学中心健康医学科[1];100190 北京,国家纳米科学中心,中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室[2]

[摘要] **目的** 探讨4种不同方法制备尼达尼布脂质体的关键理化特性,筛选出尼达尼布脂质体的最佳制备方法。**方法** 采用薄膜分散法、逆向蒸发法、乙醇注入法和改良版乙醇注入法制备尼达尼布脂质体;利用透析法测定尼达尼布脂质体的包封率,并进行粒径大小、分散性、表面电位和形貌表征,在室温放置7 d后评估其稳定性。**结果** 薄膜分散法、逆向蒸发法、乙醇注入法和改良版乙醇注入法均制备了类圆形尼达尼布脂质体,粒径大小分别为(285.1±12.3)、(271.4±5.9)、(226.3±14.8)、(197.2±11.2)nm;包封率分别为(15.82±1.26)%、(16.71±1.35)%、(25.12±3.21)%和(32.5±3.61)%;与其他3种方法相比,改良版乙醇注入法制备尼达尼布脂质体粒径大小显著减小,包封率显著增加($P<0.05$)。室温放置7 d后,薄膜分散法和逆向蒸发法粒径明显增大($P<0.01$),乙醇注入法和改良版乙醇注入法粒径大小无明显差异($P>0.05$)。**结论** 改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体关键理化特性表现优异,可作为制备尼达尼布脂质体的优选方法。

[关键词] 尼达尼布乙磺酸盐;脂质体;粒径大小;乙醇注入法

[中图法分类号] R944; R961; R977.3 [文献标志码] A

Preparation and characterization of nintedanib nano-liposomes

RAO Le[1], GUO Mengyu[2], XU Guogang[1] [1]Department of Health Medicine, Second Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853; [2]Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety of Chinese Academy of Sciences, National Center for Nanoscience and Technology of China, Beijing, 100190, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the key physical and chemical properties of nintedanib liposomes prepared by 4 different methods in order to screen out the best preparation method of nintedanib liposomes. **Methods** Firstly, nintedanib liposomes were prepared by thin film dispersion, reverse evaporation, ethanol injection and modified ethanol injection, respectively. The entrapment efficiency of nintedanib liposomes was then determined by dialysis and characterized for particle size, dispersibility, surface potential, and morphology. Their stability was evaluated after being placed at room temperature for 7 d. **Results** Circular nintedanib liposomes were respectively prepared by thin film dispersion, reverse evaporation, ethanol injection and modified ethanol injection, with a particle size of (285.1±12.3), (271.4±5.9), (226.3±14.8) and (197.2±11.2) nm, an encapsulation rate of (15.82±1.26)%, (16.71±1.35)%, (25.12±3.21)% and (32.5±3.61)%, respectively. The nintedanib liposomes prepared by modified ethanol injection had significantly smallest particle size and highest encapsulation efficiency than the liposomes by the other 3 methods ($P<0.05$). In 7 d after being placed at room temperature, the particle sizes of the liposomes prepared by film dispersion and reverse evaporation were increased notably ($P<0.01$),

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82341089, 82370083);国家自然科学基金青年项目(82200091)

[通信作者] 徐国纲,E-mail: gxu@301hospital.com.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议( )

but no such change was observed in the liposomes prepared by ethanol injection and modified ethanol injection ($P>0.05$). **Conclusion** Nintedanib liposomes prepared by modified ethanol injection have excellent key physical and chemical properties, and this method is an optical one for preparing nintedanib liposomes.

[**Key words**] nintedanib esylate; liposome; particle sizes; ethanol injection method

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82341089, 82370083) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82200091). Corresponding author: XU Guogang, E-mail: gxu@301hospital.com.cn

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种原因不明的进行性纤维化肺疾病[1-2],预后差且病程复杂多变,确诊患者的中位生存期3~5年[3]。尼达尼布(nintedanib esylate,nintedanib)是临床上用于治疗IPF的主要药物之一,主要通过竞争性结合酪氨酸激酶受体,抑制肺纤维化发生发展[4]。口服尼达尼布容易导致患者肝功能受损,同时还可能引起腹泻、恶心等胃肠道不良反应[5],其机制主要为尼达尼布在肝脏组织的蓄积,而尼达尼布靶器官是肺组织。因此,减少药物在非靶器官的蓄积,降低药物副作用,是提升治疗安全性和患者耐受性的重要考虑。随着纳米技术的发展,研究者通过构建脂质体递送载体促进药物靶向肺组织[6-7],脂质体是脂质双分子层构成的类圆形囊泡,通过将药物包载其中增强药物靶向性,降低尼达尼布的毒性。相较于游离药物,脂质体穿透黏液的能力更强,是一种极好的药物载体。LI等[8]体内体外实验均发现,相较于游离尼达尼布和游离二甲双胍,载有尼达尼布和二甲双胍的脂质体在提高肺部蓄积和抗肺纤维化方面效果更好。ZHAO等[9]对比分析了吸入等量的游离荧光分子和载有荧光分子的脂质体,结果发现相较于吸入游离的1,1'-双十八烷基四甲基吲哚三碳青氨酸碘化物(1,1′-dioctadecyltetramethyl indotricarbocyanine iodide, DiR)荧光分子,吸入负载DiR荧光分子的阳性、阴性和中性的脂质体均能提高小鼠肺部蓄积,并且可以显著减轻肝脏的蓄积。WANG等[10]模拟肺泡表面活性剂合成的仿生脂质体可通过肺表面活性物质中的表面活性蛋白A、D,靶向小鼠的肺泡巨噬细胞。因此,将尼达尼布包载于脂质体内可提升其生物利用度,增强药物治疗效果。脂质体的粒径大小、电势和稳定性是影响药物发挥作用的关键因素[11],而这些因素与脂质体的制备方法密切相关。因此,本研究采用4种不同的方法制备尼达尼布脂质体,旨在通过对比分析这些脂质体的关键物理化学特性(包括粒径大小、电位、稳定性和包封率),筛选出最佳的制备方法,对于确保脂质体在体内的有效递送、提高药物的生物利用度以及减少副作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

1,2-棕榈酰磷脂酰甘油钠盐(1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-PG sodium,DPPG)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇{1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethyleneglycol)-2000],DPPE-PEG2000}、1,2-二十六烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,DPPC)购置于北京益弘广捷生物科技有限公司。胆固醇(cholesterol, Chol)购置于上海源叶生物科技有限公司。尼达尼布乙磺酸盐购于上海笛柏生物科技有限公司。水浴超声使用超声KQ-300DE数控超声波清洗器(300 W),仪器购置于昆山市超声仪器有限公司。生物透射电镜采用120 kV HT7700型透射电子显微镜,仪器购置于日本Hitachi High-Tech公司。粒径大小、表面电位测量采用纳米粒径及电位分析仪,纳米粒径及电位分析仪购置于英国马尔文仪器有限公司;紫外/可见/近红外分光光度计,型号为Lambda 950,仪器购置于美国珀金埃尔默股份有限公司;透析袋和超滤膜分别为:透析袋MD25截留分子质量为5×10^3,购置于科晶(宁波)生物科技有限公司;超滤管4 mL/100×10^3,购置于德国默克密理博公司。

1.2 尼达尼布脂质体的制备

1.2.1 薄膜分散法制备尼达尼布脂质体 取DPPC 10 mg、DPPG 1 mg、DPPE-PEG2000 1 mg和胆固醇1.5 mg于50 mL的茄形瓶中,加入2 mL无水乙醇溶解后,50 ℃的恒温水浴中减压旋转蒸发60 min,茄形瓶上形成一层均匀透明的薄膜;称取1.8 mg尼达尼布乙磺酸盐(后均称尼达尼布)溶于3 mL纯水,配制成浓度为0.6 mg/mL的尼达尼布溶液,将尼达尼布溶液加入到茄形瓶中水化30 min后,置于超声波清洗器(100 W)中行冰水浴超声10 min,将超声后的溶液通过200 nm过滤器过滤3次后,利用截留相对分子质量为10×10^3透析袋透析去除游离药物,即得尼达尼布脂质体。

1.2.2 逆向蒸发法制备尼达尼布脂质体 取

DPPC 10 mg、DPPG 1 mg、DPPE-PEG2000 1 mg 和胆固醇 1.5 mg 于 50 mL 的茄形瓶中,加入 2 mL 无水乙醇溶解后,随后加入 0.7 mL 的 0.6 mg/mL 尼达尼布溶液,将茄形瓶置于超声波清洗器(200 W)水浴超声 30 min 后,形成 W/O 油水混合物,减压旋转蒸发(60 min)除去无水乙醇后加入纯水水化 30 min,将水化后的溶液通过 200 nm 过滤器过滤 3 次,利用截留相对分子质量为 10×10^3 透析袋透析去除游离药物,即得尼达尼布脂质体。

1.2.3 乙醇注入法制备尼达尼布脂质体 取 DPPC 10 mg、DPPG 1 mg、DPPE-PEG2000 1 mg 和胆固醇 1.5 mg 于 10 mL EP 管内,加入 2 mL 无水乙醇超声(20 min)溶解。将装有 0.6 mg/mL 尼达尼布溶液的烧杯置于恒温(40 ℃)搅拌水浴锅内,用 5 mL 注射器将混合脂质溶液缓慢注入烧杯,边注入边搅拌,脂质溶液注入后搅拌 1 h 除去无水乙醇,利用 10×10^3 透析袋透析去除游离药物,即得尼达尼布脂质体。

1.2.4 改良版乙醇注入法制备尼达尼布脂质体 取 DPPC 10 mg、DPPG 1 mg、DPPE-PEG2000 1 mg 和胆固醇 1.5 mg 于 20 mL 样品瓶内,加入 1 mL 无水乙醇溶解后,将样品瓶置于超声波清洗器(200 W)水浴恒温(20 ℃)超声 20 min,用 5 mL 注射器向样品瓶内快速注入 3 mL 的 0.6 mg/mL 尼达尼布溶液,边注入边超声,超声 20 min 后,利用 10×10^3 透析袋透析去除游离药物和无水乙醇,即得尼达尼布脂质体。

1.3 尼达尼布脂质体的表征

1.3.1 尼达尼布脂质体的粒径、分散系数和 Zeta 电位 使用纳米粒度及电位分布仪对不同方法制备的尼达尼布脂质体进行粒径和电位的测定,分别取适量的采用不同方法制备的尼达尼布脂质体溶液,并用超纯水进行适当稀释,在室温下测定其流体动力学尺寸,Zeta 电位和分散系数。

1.3.2 尼达尼布脂质体生物透射电镜样本的制备 取适量的采用不同方法制备的尼达尼布脂质体溶液,用超纯水进行适当稀释,超声 1 min,保持粒径分布均匀。将 10 μL 样品滴在碳纤维膜上,静置 10 min。用滤纸或者枪头除去多余样品,静置 2~3 min(待到铜网快干的时候),再加入体积为 10 μL 的 2%醋酸双氧铀染料,静置 8~10 min。用滤纸或者枪头除去多余的 2%醋酸双氧铀,然后用超纯水清洗碳纤维膜 3 次,静置 3 h 以上,使样品完全干燥,即可得不同方法制备的尼达尼布脂质体生物透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)样品。

1.3.3 尼达尼布脂质体稳定性的测定 按照上述方法合成尼达尼布脂质体,将不同方法制备的尼达尼布脂质体置于在室温(25 ℃)和 4 ℃温度条件下 7 d,检测尼达尼布脂质体的粒径大小、Zeta 电位和分散系数,评估不同方法制备尼达尼布脂质体的稳定性。

1.4 尼达尼布脂质体中药物含量的测定

1.4.1 尼达尼布紫外吸收峰 取尼达尼布用超纯水配制 60 μg/mL 的尼达尼布溶液,进行全波长(300~700 nm)扫描,得到紫外光谱图;取适量尼达尼布脂质体溶液和空白脂质体溶液,加入无水乙醇超声破乳,随后进行全波长(300~700 nm)扫描,比较脂质对尼达尼布吸收峰的影响。

1.4.2 尼达尼布标准曲线的制定 根据实验摸索发现尼达尼布紫外吸收峰值超过 2.0 后,峰值与尼达尼布浓度不呈线性关系。因此,本研究用超纯水稀释尼达尼布,分别配制 15.0、22.5、30.0、45.0、60.0、90.0 μg/mL 的浓度梯度,在 96 孔板中通过酶标仪测定其 390 nm 处的荧光值。以尼达尼布浓度作为横坐标、光学密度(optical density,OD)值作为纵坐标,建立尼达尼布的标准曲线回归方程,$R^2>0.99$。

1.4.3 尼达尼布包封率和载药量的测定 按照不同方法制备尼达尼布脂质体后,分别取等体积未过滤游离尼达尼布的初始溶液和过滤后的溶液,加入无水乙醇超声破乳,随后进行全波长(300~700 nm)扫描,记录不同方法制备的尼达尼布脂质体溶液在 390 nm 处的 $D(390)$ 值,并将测得的 $D(390)$ 值带入到尼达尼布的标准曲线中,计算尼达尼布药物浓度。通过以下公式对尼达尼布包封率和载药量的计算[12]。

$$\text{包封率}=\frac{\text{脂质体中药物的量}}{(\text{脂质体中药物的量}+\text{游离的药物})}\times100\%$$

$$\text{载药量}=\frac{\text{脂质体中药物的量}}{(\text{脂质体中药物的量}+\text{脂质体的量})}\times100\%$$

1.5 统计分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。使用双侧 Student t 检验来分析 2 组之间的差异。采用单因素方差分析进行实验组之间的比较。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同方法制备的尼达尼布脂质体的表征

2.1.1 改良版乙醇注入法制备尼达尼布脂质体的粒径和分散系数减低 4 种方法制备出的尼达尼布脂质体粒径、分散系数、Zeta 电位见表 1。与薄膜分散法、逆向蒸发法和乙醇注入法相比,改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体水合粒径更小(图 1),分散系数更低($P<0.05$),表明改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体更为均一且分散性更好;不同方法制备的尼达尼布脂质体 Zeta 电位均为负电位,差异无统计学意义。

表 1　动态光散射表征 4 种方法制备的尼达尼布脂质体的粒径、分散性和 Zeta 电位（$n=3$, $\bar{x}\pm s$）

制备方法	粒径/nm	分散系数	Zeta 电位/mV
薄膜分散法	285.1±12.3	0.24±0.01	−30.37±5.23
逆向蒸发法	271.4±5.9	0.22±0.03	−29.88±5.63
乙醇注入法	226.3±14.8	0.19±0.02	−29.59±1.26
改良版乙醇注入法	197.2±11.2[a]	0.15±0.02[a]	−29.95±2.15

a：$P<0.05$,与薄膜分散法/逆向蒸发法/乙醇注入法比较

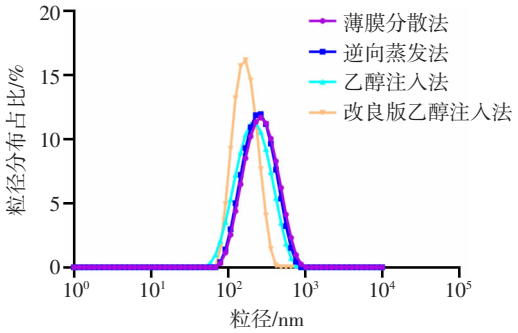


图 1　4 种方法制备的尼达尼布脂质体粒径分布图

2.1.2　改良版乙醇注入法制备尼达尼布脂质体形貌更加均一　　由 4 种方法制备出的尼达尼布脂质体溶液肉眼观察均为半透明液体,呈淡黄色,无明显沉淀。通过生物透射电镜观察尼达尼布脂质体可发现,薄膜分散法和逆向蒸发法制备的脂质体为粒径偏大类圆形单室,且大小不均;而乙醇注入法和改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体为粒径偏小的类圆形单室,其中改良乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体直径大小基本一致,表明乙醇注入法和改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体均一性较好(图 2)。

2.1.3　不同方法制备的尼达尼布脂质体的稳定性比较　　如图 3 所示,薄膜分散法和逆向蒸发法制备的尼达尼布脂质体粒径放置前后粒径大小差异具有统计学意义($P<0.01$),逆向蒸发法制备的尼达尼布脂质体分散系数差异具有统计学意义($P<0.05$),而乙醇注入法和改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体放置前后差异无统计学意义($P>0.05$),表明乙醇注入法和改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体稳定性更好。

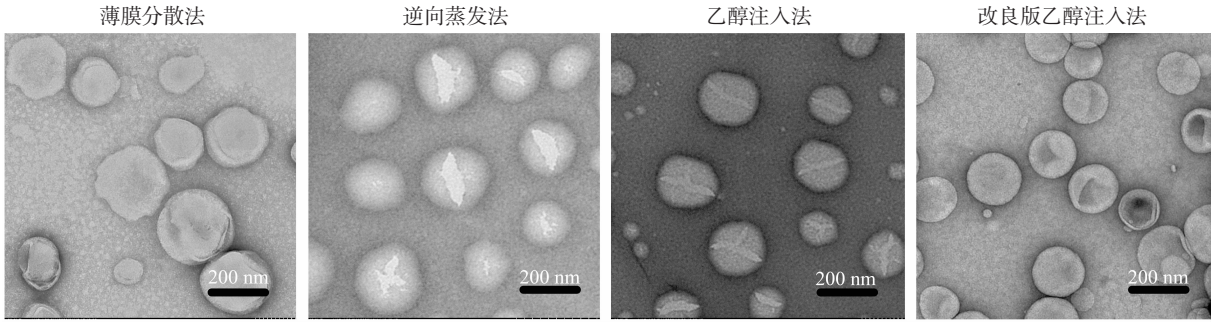
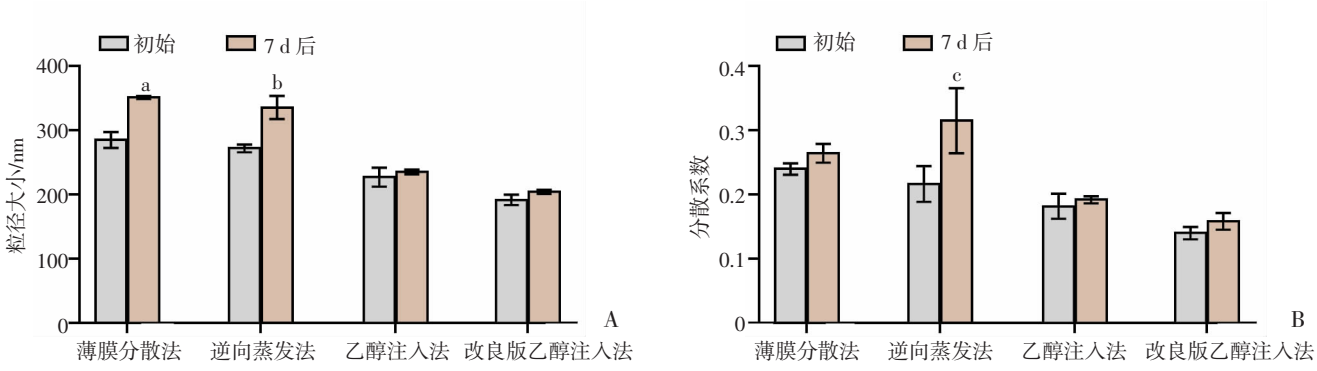


图 2　4 种方法制备的尼达尼布脂质体的生物透射电镜图



a:$P<0.001$,b: $P<0.01$,c: $P<0.05$,与初始比较

A:室温放置 7 d 前后粒径变化;B:室温放置 7 d 前后分散系数变化

图 3　4 种方法制备的尼达尼布脂质体室温放置 7 d 后的粒径和分散系数

2.2 不同方法制备尼达尼布脂质体的尼达尼布含量测定

2.2.1 尼达尼布紫外吸收峰 尼达尼布溶液和尼达尼布脂质体溶液在390 nm处有明显的峰值,有紫外吸收峰;而空白脂质体溶液全波长扫描为一条低平的曲线,无紫外吸收峰。说明了尼达尼布在390 nm有紫外吸收峰(图4)。

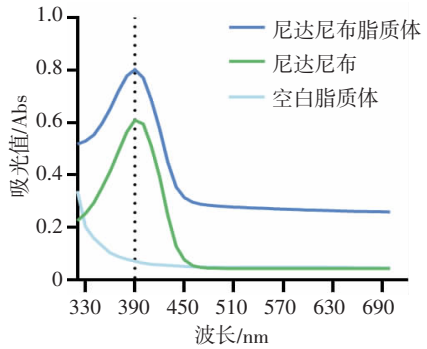


图4 紫外-可见分光光度法全波长扫描

2.2.2 尼达尼布标准曲线 以尼达尼布标准样品浓度为横坐标、D(390)值为纵坐标,线性回归分析制作标准曲线(图5),Y = 0.011 89X + 0.060 07,R^2 = 0.998 9。结果表明,尼达尼布溶液在15~90 μg/mL浓度的范围内线性关系较好。

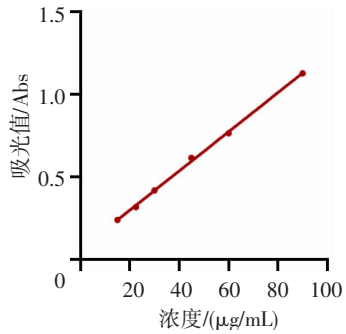


图5 尼达尼布浓度标准曲线

2.2.3 改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体具有更好的包封率和载药量 为了筛选适合制备尼达尼布脂质体的方法,本研究检测了不同方法制备的尼达尼布脂质体包封率。测得的薄膜分散法、逆向蒸发法、乙醇注入法和改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体的包封率和载药量见表2。相较于薄膜分散法、逆向蒸发法和乙醇注入法,改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体具有更好的包封率和载药量(P<0.05)。

表2 4种方法制备的尼达尼布脂质体的包封率和载药量

(n=3, %, $\bar{x}\pm s$)

制备方法	包封率	载药量
薄膜分散法	15.82±1.26[a]	3.96±0.32[a]
逆向蒸发法	16.71±1.35[a]	4.18±0.34[a]
乙醇注入法	25.12±3.21[a]	6.28±0.80[a]
改良版乙醇注入法	32.50±3.61	8.13±0.90

a: P<0.05,与改良版乙醇注入法比较

3 讨论

脂质体载药技术是近年来兴起的一种先进的药物递送系统,利用脂质体的类球形囊泡作为载体,将药物封装在其内部或与其脂质双层相结合,提高药物的稳定性、生物利用度和疗效,同时减少药物的毒副作用[13-14]。脂质体由天然或合成的脂质(如磷脂)构成,能够在水中自发形成闭合的双层结构,其内部可以包含水溶性药物,而脂溶性药物则可以嵌入脂质双层中。合成的载药脂质体的粒径大小、电位、稳定性均影响药物的递送效率和生物利用[15]。

3.1 改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体具有好的稳定性

脂质体的稳定性是评价其性能和应用潜力的一个重要指标[16],主要与脂质体的粒径大小、分散系数和表面电荷有关[17-18],小而均一的脂质体可提升药物的稳定性和生物利用度。本研究通过不同方法制备了尼达尼布脂质体,并比较了脂质体的结构和性能。生物透射电镜显示改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体在形貌上表现为直径偏小的类圆形单室,直径的均一性的表现明显优于薄膜分散法、逆向蒸发法和乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体;动态光散射检测显示薄膜分散法和逆向蒸发法制备的尼达尼布脂质体粒径和分散系数较大,而改良版乙醇注入法粒径和分散系数最小;同时,生物透射电镜结果与动态光散射测量脂质体水合粒径结果一致,均表明改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体具有更强的稳定性。

载药纳米颗粒应用于临床需要在储存和运输过程中保持稳定,大多数需要低温(4 ℃)保存,而室温粒径易增大,从而发生聚集,制约其在临床方面的应用[19]。室温放置7 d后,薄膜分散法和逆向蒸发法制备的尼达尼布脂质粒径显著增大,而乙醇注入法和改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体粒径无显著差异。逆向蒸发法制备的尼达尼布脂质体分散系数显著增大,而乙醇注入法和改良版乙醇注入法粒径无明显变化,

表明改良版乙醇注入法室温储存仍具有较好的稳定性。因此,采用改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体具有更好的稳定性,更适合用于尼达尼布高效递送。

3.2 改良版乙醇注入法制备的尼达尼布脂质体具有更高的包封率和载药量

包封率也是脂质体性能常用的评价指标之一,对于发挥脂质体高效性具有关键作用[20]。经对比发现,乙醇注入法和改良版乙醇注入法包封率较高,而薄膜分散法和逆向蒸发法包封率较低。LI 等[8]通过薄膜分散法制备的尼达尼布脂质体包封率为 9.11%,与本研究薄膜分散法制备的尼达尼布脂质体包封率基本一致。薄膜分散法和逆向蒸发法更易于制备水溶性的药物,乙醇注入法更易于制备脂溶性的药物,而尼达尼布在乙醇中溶解度较水中溶解度更高,因此改良版乙醇注入法具有更高的包封率。

除了不同制备方法可能影响脂质体的包封率,包载的药物浓度、磷脂与胆固醇的比值以及溶液 pH 均可影响脂质体的包封率[21-22]。磷脂与胆固醇的比值模拟肺表面活性物质组成成分,减少尼达尼布脂质体导致的副作用,提高其生物安全性,但包载尼达尼布的浓度也是影响尼达尼布脂质体包封率的因素之一。因此,尼达尼布脂质体包封率的提高还需要进一步探索来优化。

3.3 改良版乙醇注入法制备尼达尼布脂质体的工艺简单,耗时更短

脂质体的大规模生产是一个漫长而费力的过程,包括磷脂溶液制备、缓冲液制备、脂质体制备、过滤等一系列复杂程序[23]。优化程序、节省时间,是脂质体大规模生产的关键因素。本研究中薄膜分散法、逆向蒸发法、乙醇注入法制备时间均超过了 80 min,且制备工艺较复杂;而改良版乙醇注入法制备时间仅仅需 40 min,制备工艺简单。因此,改良版乙醇注入法制备尼达尼布脂质体大幅度降低了制备时间,简化了制备工艺,有利于尼达尼布脂质体的大规模制备。

综上所述,本研究通过对比 4 种制备方法得到的尼达尼布脂质体的粒径大小、电位、稳定性和包封率,筛选出了改良版乙醇注入法为其中较佳的制备办法,该方法制备的尼达尼布脂质体粒径小、均一性强、稳定性好且包封率高,同时在生产成本、规模化生产的可行性方面具有更优表现,为尼达尼布脂质体应用于临床治疗提供了较好的理论基础。

参考文献:

[1] PELJTO A L, BLUMHAGEN R Z, WALTS A D, *et al*. Idiopathic pulmonary fibrosis is associated with common genetic variants and limited rare variants[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2023, 207(9): 1194-1202. DOI: 10.1164/rccm.202207-1331OC.

[2] RAJAN S K, COTTIN V, DHAR R, *et al*. Progressive pulmonary fibrosis: an expert group consensus statement[J]. Eur Respir J, 2023, 61(3): 2103187. DOI: 10.1183/13993003.03187-2021.

[3] SPAGNOLO P, KROPSKI J A, JONES M G, *et al*. Idiopathic pulmonary fibrosis: Disease mechanisms and drug development[J]. Pharmacol Ther, 2021, 222: 107798. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107798.

[4] GHAZIPURA M, MAMMEN M J, HERMAN DD, *et al*. Nintedanib in progressive pulmonary fibrosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Ann Am Thorac Soc, 2022, 19(6): 1040-1049. DOI: 10.1513/AnnalsATS.202103-343OC.

[5] TOMIOKA H, IWABAYASHI M, YOKOTA M, *et al*. Weight loss in nintedanib-treated patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2023, 80: 102213. DOI: 10.1016/j.pupt.2023.102213.

[6] BARTHOLD S, KUNSCHKE N, MURGIA X, *et al*. Overview of inhaled nanopharmaceuticals[J]. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2023, 36(3): 144-151. DOI: 10.1089/jamp.2023.29089.sb.

[7] FU L Y, ZHANG Y, FAROKHZAD R A, *et al*. 'Passive' nanoparticles for organ-selective systemic delivery: design, mechanism and perspective[J]. Chem Soc Rev, 2023, 52(21): 7579-7601. DOI: 10.1039/d2cs00998f.

[8] LI D J, ZHAO A, ZHU J F, *et al*. Inhaled lipid nanoparticles alleviate established pulmonary fibrosis[J]. Small, 2023, 19(30): e2300545. DOI: 10.1002/smll.202300545.

[9] ZHAO J, QIN L, SONG R X, *et al*. Elucidating inhaled liposome surface charge on its interaction with biological barriers in the lung[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2022, 172: 101-111. DOI: 10.1016/j.ejpb.2022.01.009.

[10] WANG J, LI P Y, YU Y, *et al*. Pulmonary surfactant-biomimetic nanoparticles potentiate heterosubtypic influenza immunity[J]. Science, 2020, 367(6480): eaau0810. DOI: 10.1126/science.aau0810.

[11] PRAPHAWATVET T, PETERS J I, WILLIAMS R O 3rd. Inhaled nanoparticles-An updated review[J]. Int J Pharm, 2020, 587: 119671. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119671.

[12] WANG Z, XIANG L, LIN F, *et al*. Inhaled ACE2-engineered microfluidic microsphere for intratracheal neutralization of COVID-19 and calming of the cytokine storm[J]. Matter, 2022, 5(1): 336-362. DOI: 10.1016/j.matt.2021.09.022.

[13] GANDHI S, SHASTRI D H. Lipid-based nanoparticulate drug delivery[J]. Pharm Nanotechnol, 2024, 12: 1-26. DOI: 10.2174/0122117385275514231127062730.

[14] HE H S, LU Y, QI J P, *et al*. Adapting liposomes for oral drug delivery[J]. Acta Pharm Sin B, 2019, 9(1): 36-48. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.06.005.

[15] GUIMARAES D, CAVACO-PAULO A, NOGUEIRA E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications[J]. Int J Pharm, 2021, 601: 120571. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120571.

[16] CHOUDHARY M, CHAURAWAL N, BARKAT M A, *et al*. Proliposome-based nanostrategies: challenges and development as drug delivery systems[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2022, 23(8): 293. DOI: 10.1208/s12249-022-02443-1.

[17] MARITIM S, BOULAS P, LIN Y Q. Comprehensive analysis of liposome formulation parameters and their influence on encapsulation, stability and drug release in glibenclamide liposomes[J]. Int J Pharm, 2021, 592: 120051. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120051.

[18] DADPOUR S, MEHRABIAN A, ARABSALMANI M, *et al*. The role of size in PEGylated liposomal doxorubicin biodistribution and anti-tumour activity[J]. IET Nanobiotechnol, 2022, 16(7/8): 259-272. DOI: 10.1049/nbt2.12094.

[19] WANG X, LIU M, LUTZ H, *et al*. Exosomes decorated with a recombinant SARS-CoV-2 receptor-binding domain as an inhalable COVID-19 vaccine[J]. Nat Biomed Eng., 2022, 6(7): 791-805. DOI: 10.1038/s41551-022-00902-5.

[20] BIAN J, GIROTTI J, FAN Y C, *et al*. Fast and versatile analysis of liposome encapsulation efficiency by nanoParticle exclusion chromatography[J]. J Chromatogr A, 2022, 1662: 462688. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462688.

[21] WU Z, GUAN R, LYN F, *et al*. Optimization of preparation conditions for lysozyme nanoliposomes using response surface methodology and evaluation of their stability[J]. Molecules, 2016, 21(6): 741. Doi: 10.3390/molecules21060741.

[22] ZHANG X, WU Z, ZHANG W, *et al*. Surface modification by chitosan for improving stability and antioxidative activity of astaxanthin-loaded liposomes[J], LWT, 2024, 198: 116033, DOI: 10.1016/j.lwt.2024.116033.

[23] SANKET S, VIVEK D, RENE H, *et al*. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process[J], Adv Drug Deliv Rev. 2020, 154-155: 102-122. DOI: 10.1016/j.addr.2020.07.002.

(收稿:2024-02-05;修回:2024-03-14)

(编辑 李 玥)