DOI:10.16016/j.2097-0927.202405014

金银花总黄酮脂质体的制备及对 MRSA 的抑制作用

熊 瑞[1],倪 睿[2],刘恒旭[1],张世鹏[1],王 璐[1],来小丹[1] 400020 重庆,陆军军医大学第一附属医院江北院区(陆军第九五八医院)药剂科[1];400042 重庆,陆军特色医学中心(大坪医院)药剂科[2]

[摘要] **目的** 制备金银花总黄酮(*Lonicerae Japonicae* Flos total flavonoids,LJFTF)脂质体,并评价其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,MRSA)的抑制作用。**方法** 采用乙醇注入法制备 LJFTF 脂质体(LJFTF liposome,LJFTFL),以磷脂浓度、磷脂与胆固醇质量比(脂胆比)、LJFTF 质量浓度为考察因素,以包封率、载药量为评价指标,通过星点设计-效应面法优化制备工艺。通过观察性状、利用激光粒度仪测定粒径、多分散指数(Polymer dispersity index,PDI)和 Zeta 电位对 LJFTFL 进行表征,并通过高效液相色谱法测定其体外释放率。采用平板法和细菌活死染色实验观察 LJFTFL 对 MRSA 的抗菌活性,采用结晶紫染色观察 LJFTFL 对 MRSA 生物膜的抑制作用。**结果** 经过优化和验证确定 LJFTFL 的最佳处方为:磷脂浓度 35.00 mg/mL,脂胆比 15.00,LJFTF 浓度 5.74 mg/mL;制得的 LJFTFL 呈淡黄色乳状液,测得其平均包封率为 86.37%(RSD=0.37%,n=3),平均载药量为 11.69%(RSD=0.09%,n=3),粒径为(173.60±1.07)nm,PDI 值为 0.15±0.05,Zeta 电位为(-4.86±0.60)mV;游离的 LJFTF 在 4 h 内释放完全,LJFTFL 在体外 12 h 的累计释放率为(59.44±3.58)%,在 30 h 的累计释放量为(63.58±5.78)%。平板法和细菌活死染色实验表明,LJFTFL 可显著抑制 MRSA 生长并促进其死亡;结晶紫染色结果显示,LJFTFL 可显著抑制 MRSA 生物膜形成,且 LJFTFL 干预组与同浓度游离的 LJFTF 干预组相比差异具有统计学意义(P<0.001)。**结论** 本研究成功制得 LJFTFL 并对其处方工艺进行了优化,LJFTFL 在体外对 MRSA 呈显著的抗菌增效活性。

[关键词] 金银花总黄酮;脂质体;星点设计-效应面法;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌
[中图法分类号] R285.5; R378.11; R944.9 [文献标志码] A

Preparation of total flavonoid-liposomes of *Lonicerae Japonicae* flos and their inhibitory effect on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

XIONG Rui[1], NI Rui[2], LIU Hengxu[1], ZHANG Shipeng[1], WANG Lu[1], LAI Xiaodan[1] [1]Department of Pharmacy, Jiangbei Campus of the First Affiliated Hospital of Army Medical University/No. 958th Hospital of PLA Army, Chongqing 400020; [2]Department of Pharmacy, Army Medical Center of PLA/Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To prepare the liposomes of total flavonoids from *Lonicerae Japonicae* flos (LJFTF) and evaluate their inhibitory effect on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods** LJFTF liposomes were prepared by ethanol injection. Then the preparation process was optimized by star point design-effect surface method, with the concentrations of phospholipid, mass ratio of phospholipid to cholesterol and mass concentration of LJFTF as the influencing factors, and the encapsulation rate and drug-loading rate as evaluation indicators. The obtained liposomes were characterized by observing their properties, measuring particle size, polymer dispersity index (PDI) and Zeta potential through laser particle size analyzer. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the release rate of the

[基金项目] 重庆市科卫联合医学科研项目(2022MSXM187)
[通信作者] 来小丹,E-mail:laixiaodan0926@sina.com

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(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

liposomes. The antibacterial activity of the liposomes against MRSA was observed by plate method and live/dead staining, and the inhibitory effect of the liposomes on MRSA biofilm was observed by crystal violet staining. **Results** After optimization and verification, the best preparation process was as follows: phospholipid concentration 35.0 mg/mL, phospholipid to cholesterol mass ratio 15.0, and LJFTF concentration 5.7 mg/mL. The prepared liposomes were light yellow emulsion, with an average encapsulation rate of 86.37% (RSD=0.37%, n=3), and an average drug-loading rate of 11.69% (RSD=0.09%, n=3), a particle size of 173.60±1.07 nm, a PDI value of 0.15±0.05, and a Zeta potential of −4.86±0.60 mV. The free LJFTF was completely released within 4 h from the dialysis bag, and the *in vitro* cumulative release of LJFTF was (59.44±3.58)% at 12 h and (63.58±5.78)% at 30 h. Plate and live/dead staining showed that the prepared liposomes significantly inhibited the growth and promoted the death of MRSA strain. Crystal violet staining displayed that the liposomes significantly inhibited the formation of MRSA biofilm (P<0.001), with significant difference in comparison with same dose of LJFTF (P<0.001). **Conclusion** LJFTF liposomes are successfully prepared, and the formulation process has been optimized. The liposomes show significant anti-MRSA activity *in vitro*.

[**Key words**] total flavonoids of *Lonicerae Japonicae* flos; liposome; star point design-effect surface method; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Supported by the Joint Medical Research Project of Chongqing Science and Technology Commission and Chongqing Health Commission (2022MSXM187).
Corresponding author: LAI Xiaodan, E-mail: laixiaodan0926@sina.com

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是一种常见的多重耐药菌,可引起感染性休克、心内膜炎、重症肺炎等一系列感染性疾病[1]。MRSA 对氨基糖苷类、大环内酯类、磺胺类和四环素类等经典抗菌药物具有多重耐药性,给临床的抗 MRSA 治疗带来较大挑战[2]。目前临床抗 MRSA 的常用药物主要包括万古霉素(vancomysin, VAN)、利奈唑胺和达托霉素,但有研究发现 VAN 对 MRSA 的最低抑菌浓度出现向上漂移,并且上述药物的不良反应(腹泻、头痛、恶心等)及安全风险(肾损害等)在一定程度上影响了 VAN 使用[3-4]。因此,积极探寻有效且安全的抗 MRSA 药物对于临床抗感染治疗意义重大。

金银花具有清热解毒、凉散风热的功效,中医临床上主要用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、温病发热[5]。现代研究表明,金银花含有黄酮、有机酸、皂苷、萜类等成分,其中金银花中的总黄酮(*Lonicerae Japonicae* Flos total flavonoids, LJFTF)具有显著的抗菌、抗病毒和抗炎活性,提示其在创伤和感染性疾病中具有良好的应用前景[6-8]。然而,目前 LJFTF 尚未被开发成制剂应用于临床。

脂质体是一种利用类脂质双分子层薄膜包载药物的超微球形载体制剂,其对亲水和疏水性药物均具有良好的包载能力,并能提高药物的稳定性、改变药物在体内的分布、增强靶向性,同时还具有一定的缓释作用[9]。脂质体作为最重要的药物载体之一已被广泛用于肿瘤、感染、神经和精神等疾病的药物制剂开发,同时,在食品和化妆品领域也被广泛研究和应用[10-11]。由于 LJFTF 成分复杂,最大程度地保留其成分种类和含量在其制剂过程中十分重要。本研究选用脂质体作为载体,有利于 LJFTF 中的亲水和疏水性药物同时负载其中,从而最大程度地保留 LJFTF 中的成分种类。本研究通过星点设计-效应面法优化 LJFTF 脂质体(LJFTF liposome, LJFTFL)的制备工艺,并在体外评价其抗 MRSA 活性,以期为 LJFTF 的进一步开发利用和新型抗 MRSA 药物研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

本研究主要采用的试剂有:LJFTF(中国西安天一生物技术有限公司);大豆磷脂[N01006,中国艾伟拓(上海)医药科技有限公司];胆固醇(中国北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);木犀草苷(含量≥98%,中国食品药品检定研究院);乙腈(色谱纯,美国霍尼韦尔公司);磷酸(分析纯,中国成都科龙化工试剂厂);无水乙醇[分析纯,中国重庆川东化工(集团)有限公司];磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS,中国上海碧云天生物技术有限公司);水解酪蛋白(mueller-hinton, MH)肉汤(HB6231,中国青岛海博生物技术有限公司);MH 琼脂(HB6232,中国青岛海博生物技术有限公司);细菌活死染色试剂盒(L7012,美国 Invitrogen 公司);VAN(德国 BioFroxx 公司);

MRSA 菌株(ATCC43300,中国重庆恩诺医疗设备有限公司)。

本研究主要采用的仪器有:激光粒度仪(Zetasizer Nano-ZS90,英国马尔文仪器有限公司);超声破碎仪(Q500,中国基因有限公司);磁力搅拌器[MS-H-Pro$^+$,中国大龙兴创实验仪器(北京)有限公司];低温离心机(Allegra X-30R,美国贝克曼库尔特公司);高效液相色谱仪(LC-M20A,日本岛津公司);恒温培养摇床(THZ-300,中国上海一恒科技有限公司);恒温培养箱(GPH-9270N,中国上海一恒科技有限公司);荧光显微镜(DM4B,德国徕卡公司)。

1.2 *方法*

1.2.1 LJFTFL 的制备

本研究采用乙醇注入法制备脂质体。按处方配比称取 LJFTF、大豆磷脂和胆固醇,将 LJFTF 溶于 30 mL 纯水并置于磁力搅拌器上预热至 40 ℃。将大豆磷脂和胆固醇溶于 5 mL 无水乙醇中,在 500 r/min 搅拌下,用 1 mL 注射器缓慢将无水乙醇溶液注入 LJFTF 水溶液中。在搅拌下挥干乙醇后,用超声破碎仪以 40% 超声能量超声 10 min,即得 LJFTFL。

1.2.2 LJFTF 含有量测定

1.2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取木犀草苷对照品适量,用甲醇溶解配制成 50 μg/mL 的对照品溶液。

1.2.2.2 供试品溶液的制备 取“1.2.1”项下制得的脂质体适量,室温下 15 000 r/min 离心 30 min 后,取上清液即得。

1.2.2.3 色谱条件 色谱柱为迪马 PlatisilC18 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B);梯度洗脱(0~30 min,15%A→40%A);流速为 1 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 10 μL;检测波长 254 nm。

1.2.2.4 方法学考察 精密吸取木犀草苷对照品溶液,用甲醇梯度稀释 6 个浓度,然后按照“1.2.2.3”项下色谱条件进样检测,记录木犀草苷色谱峰峰面积,以木犀草苷的质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。取供试品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次进行检测,根据测得的峰面积计算木犀草苷含量,考察精密度。将供试品溶液放置 0、2、4、6、8、12 h 后进样检测,根据峰面积计算木犀草苷含量,考察稳定性。取 6 份 LJFTFL,按“1.2.2.2”项下方法制备供试品溶液,然后进样检测,根据峰面积计算木犀草苷含量,考察重复性。取已知木犀草苷含量的供试品溶液 6 份,分别按 1∶1的比例精密加入木犀草苷对照品,按相同色谱条件进样检测,记录峰面积并计算加样回收率。

1.2.3 LJFTFL 包封率及载药量的测定 取 1 mL LJFTFL 至离心管中,室温下 15 000 r/min 离心 30 min,取上清液按“1.2.2.3”项下色谱条件测定木犀草苷色谱峰峰面积,代入“1.2.2.4”项下标准曲线所得回归方程计算木犀草苷含量,即为木犀草苷游离量($M_{游离}$)。根据木犀草苷在 LJFTF 中的含量百分比换算出木犀草苷的总投料量($M_{总}$)。根据下列公式计算包封率和载药量:包封率(%)=(1-$M_{游离}/M_{总}$)×100%,载药量(%)=(LJFTF 投料量×包封率/LJFTF 及载体投料量之和)×100%。

1.2.4 LJFTFL 处方优化

1.2.4.1 单因素试验 磷脂浓度:将磷脂与胆固醇质量比(脂胆比)固定为 6,LJFTF 浓度固定为 2 mg/mL,分别将磷脂浓度设置为 10、20、30、40 mg/mL,按“1.2.1”项下方法制备 LJFTFL,并按“1.2.2.2”项下方法制备供试品测定上清液含量,根据“1.2.3”项下方法计算包封率,考察不同磷脂浓度对包封率的影响。将磷脂浓度固定为上一步实验确定的最佳值,LJFTF 浓度固定为 2 mg/mL,分别将脂胆比设置为 2、5、10、15,按照上述相同方法制备脂质体测定包封率,考察不同脂胆比对包封率的影响。将磷脂浓度和脂胆比固定为最佳值,分别将药物浓度设置为 0.5、2、4、6 mg/mL,按照上述相同方法制备脂质体测定包封率,考察不同药物浓度对包封率的影响。

1.2.4.2 星点设计-效应面法优化处方 在单因素试验的基础上,选择磷脂浓度(A)、脂胆比(B)和 LJFTF 浓度(C)为考察因素,以 LJFTFL 包封率(Y1)和载药量(Y2)为效应值,应用 Design Expert 8.0.6.1 软件进行星点设计-效应面法优化脂质体处方,采取 3 因素 5 水平的星点设计-效应面优化法,确定最佳处方工艺,考察因素及水平见表 1。

表 1 星点设计-效应面法的因素水平

因素	水平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
A/磷脂浓度(mg/mL)	13.18	20	30	40	46.82
B/脂胆比	1.59	5	10	15	18.41
C/LJFTF 浓度(mg/mL)	0.64	2	4	6	7.36

1.2.4.3 最优处方验证 按照最佳处方配比制备 3 批 LJFTFL,按照“1.2.3”项下方法测定其包封率和载药量,并根据公式计算偏差:偏差(%)=(预测值-实际值)/预测值×100%。

1.2.5 LJFTFL 外观观察和粒径、Zeta 电位测定

按照“1.2.4”项下确定的最优处方制备 3 批 LJFTFL,

观察其外观特征,并利用激光笔观察其丁达尔现象。利用激光粒度仪分别测定 3 批样品的粒径和 Zeta 电位。

1.2.6 LJFTFL 体外释药曲线测定 平行制备 3 批 LJFTFL 和相同浓度的游离 LJFTF 溶液,各分别取 2 mL 装入分子截留量为 7 000 的透析袋中,将透析袋浸泡于 200 mL PBS(含 10 mmol/L Na_2HPO_4、2 mmol/L NaH_2PO_4、135 mmol/L NaCl、4.7 mmol/L KCl,pH = 7.3±0.1)中,在 37 ℃、100 r/min 的摇床上进行透析,分别于 1、2、3、4、6、9、12、24、30 h 从透析液中取出 1 mL,同时补充 1 mL 新的 PBS,对取出的透析液进行含量测定,计算释放率。

1.2.7 LJFTFL 对 MRSA 生长和存活的影响 取 MRSA 菌液 100 μL 加至 96 孔板,于 600 nm 处测定吸光度值(OD_{600}),并用 MH 肉汤培养基调整菌液浓度,使 OD_{600} 为 0.4,稀释 10^4 倍备用。利用 MH 肉汤培养基分别将 LJFTFL 浓度调整为 1、2、4 mg/mL(以 LJFTF 计),同时用 MH 肉汤培养基分别将游离的 LJFTF 和 VAN 浓度调整为 4 mg/mL 和 10 μg/mL,取上述药液各 1 mL 并加入 100 μL 已稀释的菌液,混匀后取 100 μL 滴加至 MH 琼脂平板中央用涂布器涂匀。将平板置于 37 ℃恒温培养箱培养 24 h 后观察细菌生长情况。利用细菌活死染色实验观察 LJFTFL 对 MRSA 存活的影响。将 OD_{600} 为 0.4 的 MRSA 菌液稀释 100 倍备用,然后分别向 1、2、4 mg/mL 的 LJFTFL(1 mL)中加入菌液 100 μL,混匀后置于摇床上 100 r/min、37 ℃培养 8 h。培养结束后,利用细菌活死染色检测试剂盒中的 SYTO9 和 PI 染料按照说明书进行染色并用荧光显微镜采集图像。

1.2.8 结晶紫染色 将 OD_{600} 为 0.4 的 MRSA 菌液用 MH 肉汤培养基稀释 100 倍备用。按照“1.2.7”的方法利用 MH 肉汤培养基将 LJFTFL、LJFTF、VAN 调整至相应浓度,然后向药液中加入十分之一体积的菌液混匀后加至 96 孔板中,每孔 100 μL,置于摇床上 100 r/min、37 ℃培养 24 h。培养结束后弃菌液,用生理盐水清洗各孔 2 次,然后向每孔加 100 μL 甲醇固定 5 min,弃甲醇后用生理盐水清洗 2 次,滴加 0.5%结晶紫染液于室温染色 20 min。弃染液,生理盐水清洗至溶液无色后加 200 μL 95%乙醇复溶后测定 590 nm 处吸光度值,计算生物膜抑制率。生物膜抑制率(%)=(1−$OD_{实验孔}$/$OD_{对照孔均值}$)×100%。

1.3 统计学分析

星点设计-效应面法中的模型拟合和方差分析在 Design Expert 8.0.6.1 软件中完成,LJFTFL 的抗菌实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组数据经正态检验后采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 含量检测的方法学考察结果

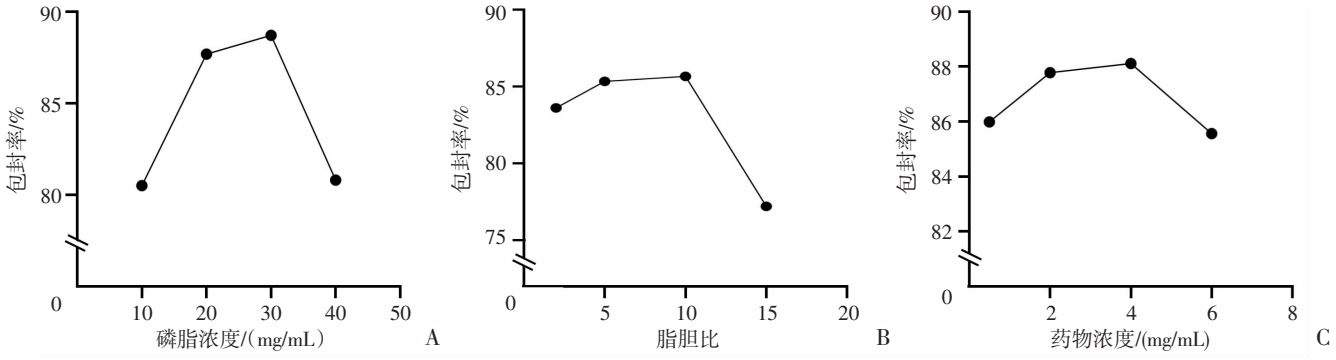
以木犀草苷的质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,所得线性回归方程为:Y = 27 272X−13 542(R^2 = 0.999 7),线性范围为 0.8~50.0 μg/mL,表明木犀草苷在该浓度范围内呈良好的线性关系。精密度试验相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.28%,表明精密度良好。稳定性试验 RSD 为 1.05%,表明该试品溶液在 12 h 内稳定性良好。重复性试验 RSD 为 1.38%,表明该方法重复性良好。加样回收率试验结果显示,木犀草苷的平均加样回收率为 101.14%,RSD 为 1.95%,表明该方法准确度较好。因此,本方法可用于后续实验的含量测定。

2.2 单因素考察结果

结果显示,随着磷脂浓度升高,包封率呈先升高后降低趋势,因此后续实验选择磷脂浓度为 30 mg/mL 作为磷脂浓度的中心点(图 1A)。固定磷脂浓度和 LJFTF 浓度,考察不同脂胆比对包封率的影响,结果显示,随着脂胆比升高,包封率呈先升高后降低趋势,因此后续实验选择脂胆比为 10 作为脂胆比的中心点(图 1B)。将磷脂浓度和脂胆比固定,考察不同药物浓度对包封率的影响,结果显示,随着药物浓度升高,包封率呈先升高后降低趋势,因此后续实验选择 LJFTF 浓度为 4 mg/mL 作为药物浓度的中心点(图 1C)。

2.3 星点设计-效应面法优化处方结果

根据 3 因素 5 水平的星点设计-效应面法的实验设计逐一进行 LJFTFL 的制备,并测定包封率和载药量,实验设计和测定结果显示,包封率最高为 88.55%,最低为 70.47%,载药量最高为 17.06%,最低为 1.62%(表 2)。以包封率(Y1)、载药量(Y2)为效应面,对星点设计实验结果进行拟合,得到回归方程:Y1 = 86.03+4.47A+1.37B−1.65C+0.16AB+1.99AC−0.26BC−2.11A^2−0.46B^2−2.26C^2;Y2 = 9.37−2.58A+0.75B+3.94C−0.13AB−0.71AC+0.16BC+0.69A^2−0.44B^2−0.42C^2。由方差分析可知,模型 $P<0.001$,具有极显著影响,而失拟项 $P>0.05$,可认为无失拟因素存在(表 3)。包封率、载药量的模型相关系数 R^2 分别为 0.934、0.991,调整 R^2 分别为 0.875、0.983,表明模型拟合度良好,该模型可用于分析和预测 LJFTFL 的制备工艺。在 3 个因素中,A、B、C 均对包封率和载药量有显著影响($P<0.05$),在两两交互项中,AC 有显著影响($P<0.05$)。



A:磷脂浓度对包封率的影响;B:脂胆比对包封率的影响;C:药物浓度对包封率的影响

图 1 LJFTFL 处方优化的单因素试验结果

表 2 星点设计-效应面法的实验设计及结果

编号	A/磷脂浓度(mg/mL)	B/脂胆比	C/药物浓度(mg/mL)	Y1/包封率(%)	Y2/载药量(%)
1	40.00	5.00	6.00	84.73	9.64
2	30.00	10.00	4.00	85.57	9.43
3	20.00	15.00	2.00	83.12	7.39
4	30.00	10.00	7.36	75.56	14.68
5	30.00	10.00	4.00	87.59	9.48
6	46.82	10.00	4.00	87.83	6.29
7	20.00	5.00	6.00	73.71	15.41
8	30.00	10.00	4.00	87.05	9.79
9	30.00	10.00	4.00	88.55	9.52
10	20.00	15.00	6.00	75.10	17.06
11	30.00	10.00	4.00	84.64	9.15
12	13.18	10.00	4.00	70.47	16.28
13	30.00	1.59	4.00	81.59	6.31
14	40.00	5.00	2.00	83.76	3.44
15	40.00	15.00	6.00	87.93	10.78
16	30.00	18.41	4.00	86.03	9.83
17	20.00	5.00	2.00	79.54	6.33
18	40.00	15.00	2.00	86.84	3.93
19	30.00	10.00	4.00	83.09	8.87
20	30.00	10.00	0.64	81.92	1.62

固定其中 1 个因素,用 Design Expert 8.0.6.1 软件绘制另外 2 个因素对包封率和载药量的三维曲面图。结果显示,在包封率和载药量中,因素 A 与因素 C 的曲面交互影响作用均最强,曲面陡峭(图 2)。根据模型预测得到 LJFTFL 的最佳处方配比为:磷脂浓度 35.05 mg/mL,脂胆比 15.00,药物浓度 5.74 mg/mL,预测包封率为 86.24%、载药量为 11.42%。结合实际操作,确定 LJFTFL 的最佳处方配比为:磷脂浓度 35.00 mg/mL,脂胆比 15.00,药物浓度 5.70 mg/mL。

按照最优处方制备 3 批 LJFTFL 的包封率分别为 85.96、86.74、86.40(RSD=0.37%,n=3),平均包封率为 86.37%,偏差为 0.15%;载药量分别为 11.67、11.70、11.68(RSD=0.09%,n=3),平均载药量为 11.69%,偏差为 2.36%。可见 3 批 LJFTFL 包封率和载药量无显著差别,并且与模型预测值接近,偏差小于 5%,说明采用效应面分析得到处方工艺准确可靠。

表 3 包封率和载药量的方差分析

来源	自由度	包封率				载药量			
		离均差平方和	均方	*F*	*P*	离均差平方和	均方	*F*	*P*
模型	9	492.67	54.74	15.72	<0.001	328.14	36.46	126.37	<0.001
A	1	272.28	272.28	78.21	<0.001	90.69	90.69	314.32	<0.001
B	1	25.62	25.62	7.36	0.022	7.72	7.72	26.74	<0.001
C	1	37.07	37.07	10.65	0.009	211.77	211.77	733.98	<0.001
AB	1	0.22	0.22	0.06	0.809	0.14	0.14	0.50	0.495
AC	1	31.65	31.65	9.09	0.013	4.07	4.07	14.10	0.004
BC	1	0.53	0.53	0.15	0.704	0.19	0.19	0.67	0.432
A^2	1	64.22	64.22	18.45	0.002	6.96	6.96	24.11	<0.001
B^2	1	3.11	3.11	0.89	0.367	2.80	2.80	9.72	0.011
C^2	1	73.41	73.41	21.09	0.001	2.48	2.48	8.61	0.015
残差	10	34.81	3.48			2.89	0.29		
失拟项	5	14.20	2.84	0.69	0.654	2.37	0.47	4.65	0.059
纯误差	5	20.61	4.12			0.51	0.10		
总差	19	527.48				331.02			

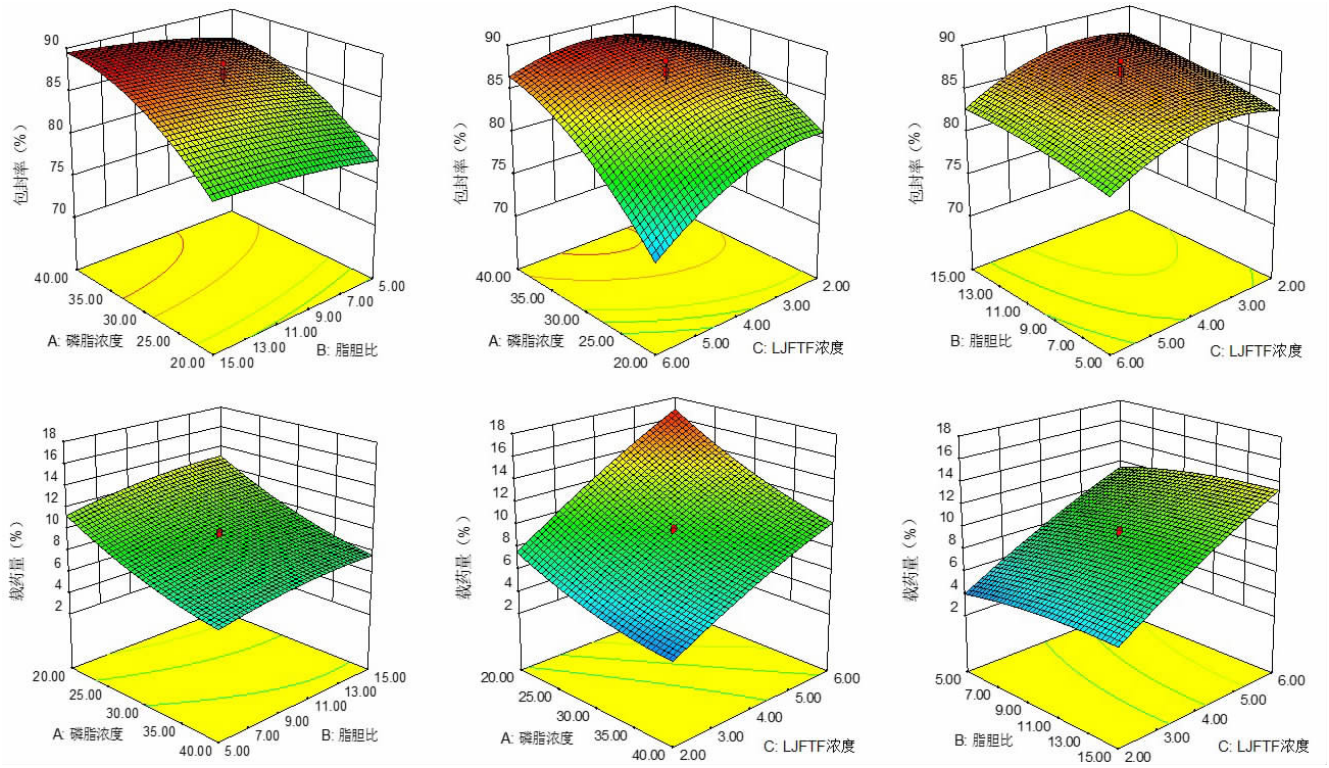


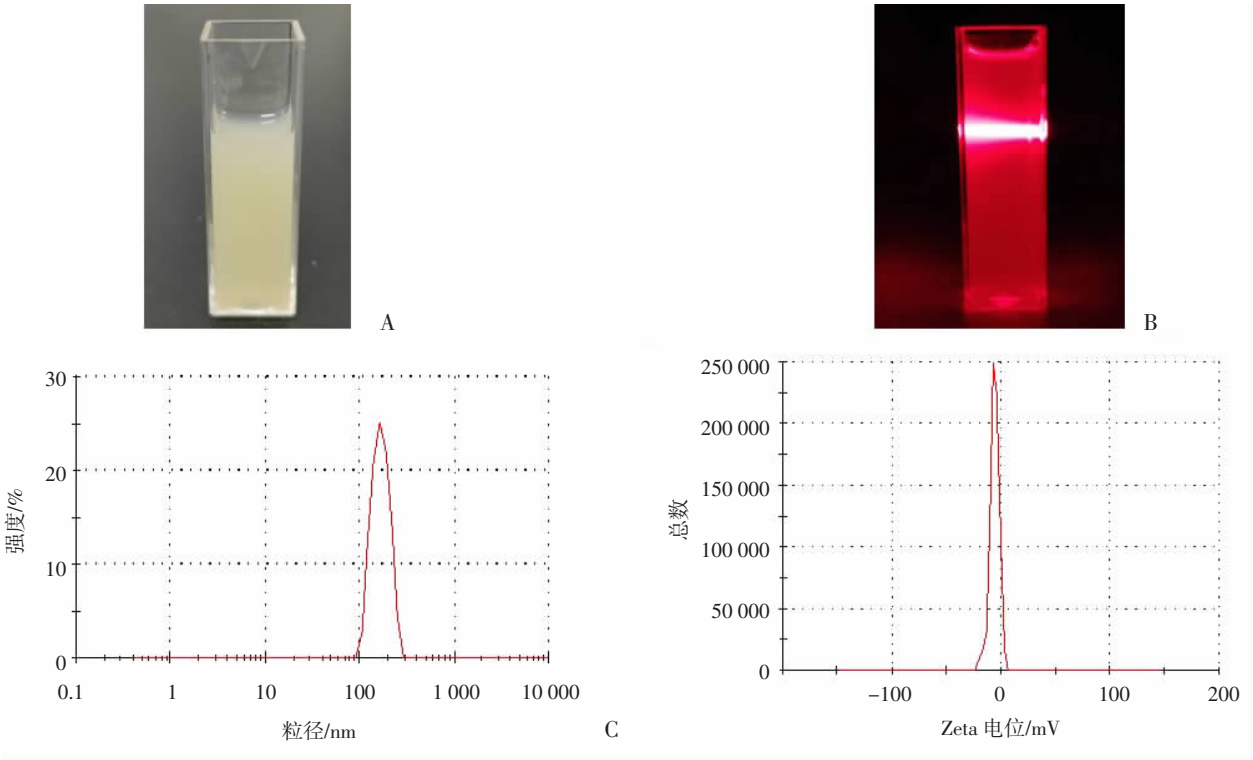
图 2 各因素对包封率和载药量的效应面图

2.4 LJFTFL 的外观观察、粒径和 Zeta 电位测定结果

按照最佳处方制得的 LJFTFL 外观呈淡黄色的乳状液(图 3A),并在暗室可观察到丁达尔现象(图 3B)。测得粒径为(173.60±1.07)nm(图 3C),多分散性指数(polydispersity index, PDI)值为 0.15±0.05,Zeta 电位为(-4.86±0.60)mV(图 3D)。

2.5 LJFTFL 体外释放测定结果

结果显示,游离的 LJFTF 溶液在 3 h 内快速释放,并在 4 h 左右释放完全;LJFTFL 相比于游离的 LJFTF 溶液总体释放较慢,但在前 4 h 内释放相对较快,4~12 h 释放减慢,12 h 的累计释放率为(59.44±3.58)%,在 12 h 以后释放速率显著降低,在 30 h 的累计释放率为(63.58±5.78)%(图 4)。可见,LJFTFL 具有一定的缓释作用。



A:LJFTFL 外观;B:LJFTFL 的丁达尔现象;C:LJFTFL 的粒径分布图;D:LJFTFL 的 Zeta 电位图

图 3 LJFTFL 的外观、粒径和 Zeta 电位

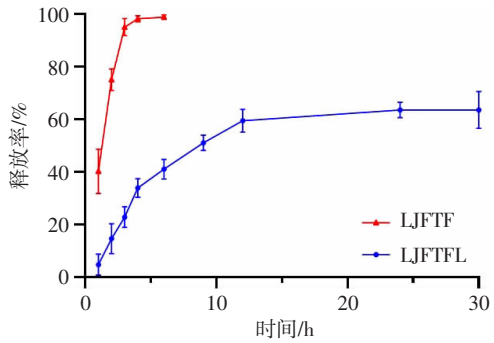


图 4 LJFTFL 的释药曲线

2.6 LJFTFL 对 MRSA 生长和存活的影响结果

结果显示,对照组平板上细菌生长繁殖比较旺盛,菌落分布密集,1 mg/mL LJFTFL 的平板上菌落数显著减少,提示细菌生长受到抑制,2 mg/mL 和 4 mg/mL LJFTFL 平板上菌落数进一步减少,其中 4 mg/mL LJFTFL 平板上的菌落数与 VAN 组接近。游离的 LJFTF 平板上菌落数与对照组相比略有减少,但仍显著多于同浓度的 LJFTFL,提示 LJFTFL 对 MRSA 具有抑菌增效作用(图 5A)。细菌活死染色结果显示,绿色荧光显示活菌,红色荧光显示死菌,对照组活菌较多,镜下可见零星存在的死菌,而用 LJFTFL 处理 MRSA 后,活菌数量减少、死菌数量显著增多,且 4 mg/mL 的 LJFTFL 的死菌数量显著多于同浓度的游离 LJFTF(图 5B),提示 LJFTFL 抑制 MRSA 存活、促进其死亡。

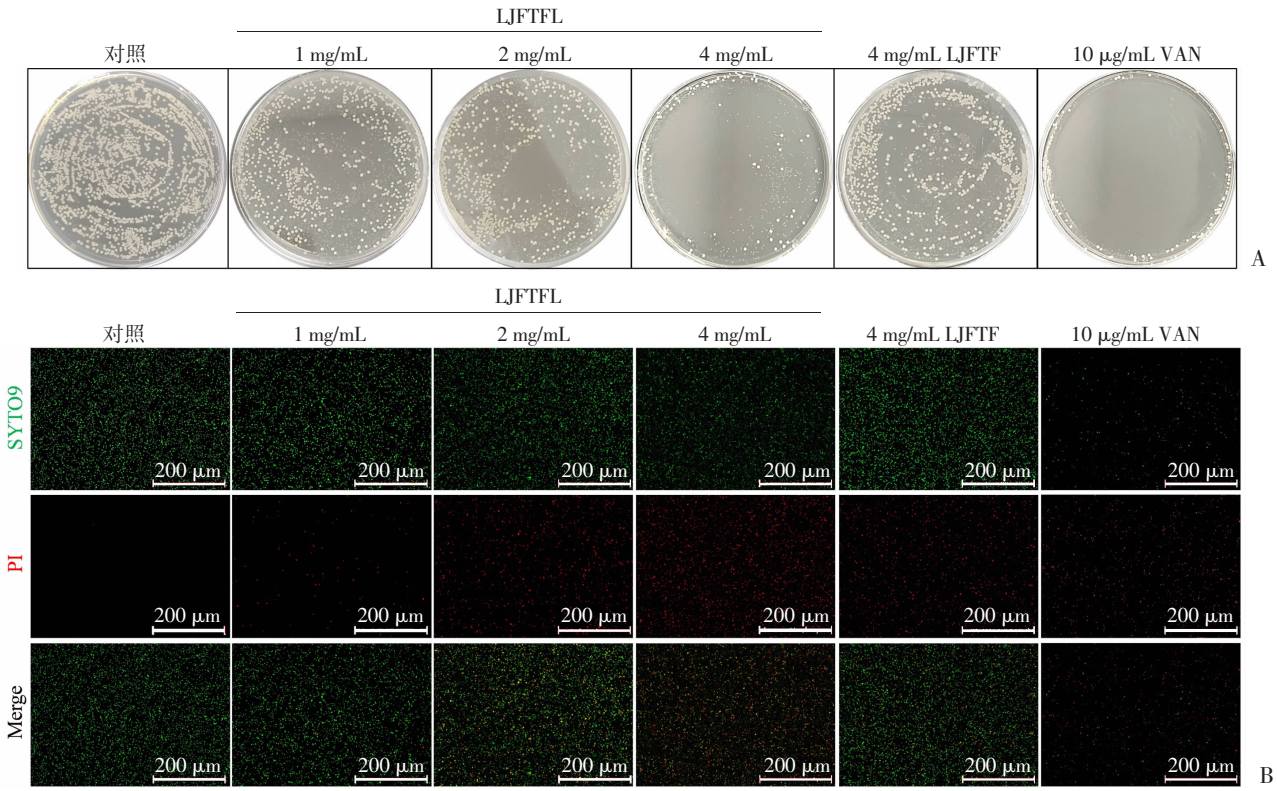
2.7 LJFTFL 对 MRSA 生物膜形成的影响结果

如图 6 所示,LJFTF 呈剂量依赖性抑制 MRSA 生物膜形成,且 4 mg/mL 的 LJFTFL 对生物膜的形成作用显著强于同浓度的游离 LJFTF,并与 VAN 组接近,提示 LJFTFL 可显著抑制 MRSA 生物膜形成。

3 讨论

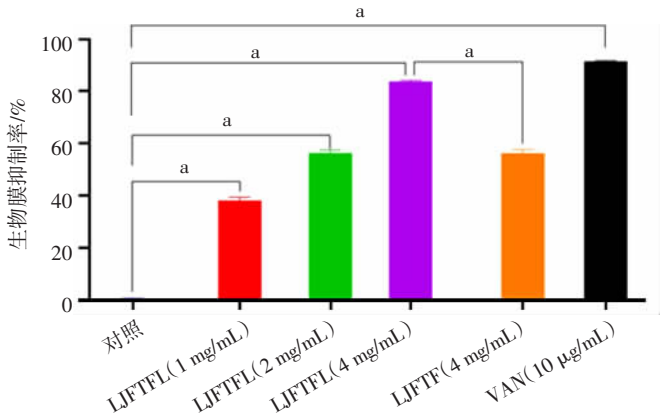
3.1 制备方法及优化

脂质体的制备方法包括溶剂注入法、薄膜分散法、逆向蒸发法、pH 梯度法等多种方法,其中溶剂注入法常采用乙醇注入法和乙醚注入法,此法是将类脂等脂质溶于有机溶剂(乙醇或乙醚),然后将有机溶剂匀速注入含药的水相中,搅拌挥干有机溶剂后超声即可得到脂质体[12]。本研究所用的乙醇注入法操作简便、条件温和、制备过程中所用无水乙醇的量较少,制备得到的脂质体包封率高、粒径较小且均一。



A：LJFTFL 对 MRSA 菌落形成的影响；B：细菌活死染色观察 LJFTFL 对 MRSA 存活的影响

图 5 LJFTFL 对 MRSA 生长和存活的影响



a：$P<0.001$

图 6 结晶紫染色测定 LJFTFL 对 MRSA 生物膜形成的影响

在处方优化时，单因素实验发现，LJFTFL 的包封率随着磷脂浓度、脂胆比的升高均先升高后降低，可能是不同浓度和比例的磷脂与胆固醇形成的膜的流动性不同，从而影响包封率[13]。研究表明，适量胆固醇可使脂质体膜的流动性增加，提高药物的包封率，但过量胆固醇或磷脂可使膜的通透性增加，造成药物泄漏[14]。药物浓度对脂质体的包封率也有一定影响，药物浓度过高时，载体不能完全包载药物，导致包封率降低，而药物浓度过低时则会导致载体材料浪费。在药物制剂过程中，通常需要对处方和制剂工艺进行优化，当考察的因素和水平较多时需要采用实验次数少、精度高的设计方案，其中以正交设计和均匀设计最为常用，而星点设计-效应面法相比于正交设计和均匀设计，具有更少的实验次数、更高的精度和预测性[15]。本研究在单因素实验结果的基础上，采用星点设计-效应面法优化了 LJFTFL 的处方，可最大程度提高 LJFTF 在脂质体中的包封率和载药量，结果也表明所制得的脂质体粒径较小、大小均一、包封率较高，但 Zeta 电位偏低，可能是残留的微量乙醇影响了脂质体的稳定性，也可能与 LJFTF 中的化学成分有关。此外，Zeta 电位较低也可能与胆固醇比例较低有关，有研究发现，Zeta 电位的绝对值随着胆固醇与磷脂质量比的升高而增大，可能是因为脂质体膜中胆固醇含量的提高使带电磷脂在脂质体膜表面暴露程度提高，从而使脂质体表面的负电荷增多，但胆固醇比例过高会占据脂质体磷脂膜中的空间，使磷脂膜厚度增加，从而影响了脂质体粒径的大小和载药量[16]。从体外释药曲线可以看出，本研究制得的 LJFTFL 具有一定缓释效果，这对于维

持药物在靶组织的稳定浓度具有重要意义。

3.2 抗菌活性评价

本研究通过平板法和细菌活死染色评价了LJFTFL对MRSA的抗菌活性,结果显示,LJFTFL在体外可显著抑制MRSA的生长,并促进MRSA死亡,其效果优于同浓度的游离LJFTF,表明LJFTFL对MRSA具有显著的抗菌增效活性。细菌生物膜是指细菌黏附于接触表面后分泌的多糖基质、脂质蛋白、纤维蛋白,生物膜可将细菌包裹从而免受抗生素、抗菌肽和宿主免疫反应(包括吞噬细胞)的影响[17]。细菌生物膜的形成是导致细菌耐药的重要原因,因此,抑制生物膜形成是应对细菌耐药的重要途径[2]。本研究发现,LJFTFL可显著抑制MRSA生物膜形成,且效果优于同浓度游离的LJFTF。这些结果表明LJFTFL在抗MRSA方面具有潜在的应用价值。

综上所述,本研究利用乙醇注入法将LJFTF制备成脂质体,并通过星点设计-效应面法对制备工艺进行了优化,所制得的脂质体包封率和载药量较高、粒径较小且均一,在体外具有一定的缓释效果,并且表现出对MRSA的抗菌增效活性。不足的是,由于LJFTFL呈不透明的淡黄色乳状液,本研究未能测定其最低抑菌浓度,但通过平板实验可以推测其最低抑菌浓度在4 mg/mL左右;此外,本研究也未评价LJFTFL的体内安全性和有效性,下一步拟建立皮肤感染动物模型以评价LJFTFL对MRSA的抗菌增效活性,并对其抗菌机制进行深入研究。

参考文献:

[1] WANG B J, XU Y L, ZHAO H L, *et al*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in China: a multicentre longitudinal study and whole-genome sequencing[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 532-542. DOI: 10.1080/22221751.2022.2032373.

[2] 刘婧怡, 蔡仑, 段浩, 等. 大黄素抑制MRSA生物膜活性及其作用机制研究[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(7): 684-690. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202112068.
LIU J Y, CAI L, DUAN H, *et al*. Inhibitory effect of emodin on MRSA biofilm and its mechanism[J]. J Army Med Univ, 2022, 44(7): 684-690. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202112068.

[3] HSIEH R C, LIU R, BURGIN D J, *et al*. Understanding mechanisms of virulence in MRSA: implications for antivirulence treatment strategies[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2023, 21(9): 911-928. DOI: 10.1080/14787210.2023.2242585.

[4] TONG S Y C, LYE D C, YAHAV D, *et al*. Effect of vancomycin or daptomycin with vs without an antistaphylococcal β-lactam on mortality, bacteremia, relapse, or treatment failure in patients with MRSA bacteremia: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2020, 323(6): 527-537. DOI: 10.1001/jama.2020.0103.

[5] 吴娇, 王聪, 于海川. 金银花中的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(4): 225-234. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20190408.
WU J, WANG C, YU H C. Chemical constituents and pharmacological effect of *Lonicerae japonicae Flos*[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(4): 225-234. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20190408.

[6] SHANG X F, PAN H, LI M X, *et al*. *Lonicera japonica* Thunb.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(1): 1-21. DOI: 10.1016/j.jep.2011.08.016.

[7] 罗旋, 王薇, 胡本祥, 等. 金银花抗病毒化学成分及作用研究进展[J]. 陕西中医药大学学报, 2024, 47(2): 138-143. DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2024.02.027.
LUO X, WANG W, HU B X, *et al*. Research progress on antiviral chemical constituents and functions of honeysuckle[J]. J Shaanxi Univ Chin Med, 2024, 47(2): 138-143. DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2024.02.027.

[8] LI Y K, LI W, FU C M, *et al*. *Lonicerae japonicae Flos* and *Lonicerae flos*: a systematic review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology[J]. Phytochem Rev, 2020, 19(1): 1-61. DOI: 10.1007/s11101-019-09655-7.

[9] MENG Y N, NIU X, LI G L. Liposome nanoparticles as a novel drug delivery system for therapeutic and diagnostic applications[J]. Curr Drug Deliv, 2022, 20(1): 41-56. DOI: 10.2174/1567201819666220324093821.

[10] AJEESHKUMAR K K, ANEESH P A, RAJU N, *et al*. Advancements in liposome technology: preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: a review[J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2021, 20(2): 1280-1306. DOI: 10.1111/1541-4337.12725.

[11] BOAFO G F, MAGAR K T, EKPO M D, *et al*. The role of cryoprotective agents in liposome stabilization and preservation[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(20): 12487. DOI: 10.3390/ijms232012487.

[12] 王兴芝, 代英辉, 王东凯. 脂质体的制备方法及应用的研究进展[J]. 中国药剂学杂志(网络版), 2024, 22(1): 14-24. DOI: 10.14146/j.cnki.cjp.2024.01.003.

WANG X Z, DAI Y H, WANG D K. Research progress in preparation methods and applications of liposomes[J]. Chin J Pharm Online Ed, 2024, 22(1): 14-24. DOI: 10.14146/j.cnki.cjp.2024.01.003.

[13] SHEORAN R, KHOKRA S L, CHAWLA V, *et al*. Recent patents, formulation techniques, classification and characterization of liposomes[J]. Recent Pat Nanotechnol, 2019, 13(1): 17-27. DOI: 10.2174/1872210513666181127110413.

[14] 马晓星, 隋小宇, 刘畅, 等. Box-Behnken 响应面法优化厚朴酚与小檗碱共载脂质体的处方工艺[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(7): 796-801, 858. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2024.07.08.
MA X X, SUI X Y, LIU C, *et al*. Formulation optimization of berberine and magnolol co-loaded liposomes by Box-Behnken response surface method[J]. Chin J Hosp Pharm, 2024, 44(7): 796-801, 858. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2024.07.08.

[15] 苏艳莹, 雷小小, 桂卉, 等. 星点设计-效应面法优化山茱萸总环烯醚萜苷脂质体的制备工艺[J]. 中国药房, 2018, 29(19): 2612-2616. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.19.05.
SU Y Y, LEI X X, GUI H, *et al*. Optimization of preparation technology of total iridoid glycosides liposome of *Cornus officinalis* by central composite design-response surface methodology[J]. China Pharm, 2018, 29(19): 2612-2616. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.19.05.

[16] 邰克东, 赵苏茂, 杨紫恒, 等. 高压均质对脂质体囊泡特性和稳定性的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(17): 169-177. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20180916-158.
TAI K D, ZHAO S M, YANG Z H, *et al*. Effect of high-pressure homogenization on vesicle characteristics and stability of liposomes[J]. Food Sci, 2019, 40(17): 169-177. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20180916-158.

[17] LE K Y, OTTO M. Approaches to combating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm infections[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2024, 33(1): 1-3. DOI: 10.1080/13543784.2024.2305136.

(**收稿**:2024-05-06;**修回**:2024-07-20)

(编辑 邓强庭)