

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.05.0435

论著

pH 敏感黄芩苷脂质体的制备及其口腔抗炎评价

王雪清¹, 马一弋², 刘颖², 吴伯岳², 朱彧¹

(1.天津医科大学三中心临床学院, 天津 300170; 2.天津医科大学医学技术学院生物化学系, 天津 300203)

摘要 目的: 制备 pH 敏感的黄芩苷脂质体(pH-Bai-Lips), 探讨其体外抗炎效果。方法: 采用薄膜分散法制备 pH-Bai-Lips 混悬液后, 首先系统性考察脂质体的形貌、粒径、包封率(EE)、载药率(LE)、酸响应性以及体外释放率等关键理化性质。在完成基础理化表征的基础上, 采用 MTT 法检测 pH-Bai-Lips 对 RAW264.7 细胞 24 h 活力的影响, 评估其体外生物安全性。基于安全性验证结果, 进一步通过脂多糖(LPS)刺激 RAW264.7 细胞构建炎症模型, 运用流式细胞术定量分析 pH-Bai-Lips 对促炎因子[肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6]和抗炎因子(IL-10)表达的调控作用。结果: 结果显示, 脂质体在电镜下呈类圆形, 平均粒径为(220.0 \pm 2.6) nm, EE 为 94.94%, LE 为 26.37%。MTT 实验结果显示, pH-Bai-Lips 在 1~100 μ g/mL 浓度梯度处理 RAW264.7 细胞时, 各浓度组与对照组相比细胞活力差异无统计学意义($t=0.25, 0.29, 0.26$, 均 $P>0.05$)。抗炎结果显示, 在 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型中, 与 LPS 组相比, 1 μ g/mL pH-Bai-Lips 组、10 μ g/mL pH-Bai-Lips 组和 100 μ g/mL pH-Bai-Lips 组可呈浓度依赖性降低促炎因子 IL-6($t=11.78, 22.47, 21.37$, 均 $P<0.001$)、TNF- α 水平($t=7.76, 23.28, 23.41$, 均 $P<0.001$); 同时升高抗炎因子 IL-10 水平($t=7.65, 20.35, 6.45$, 均 $P<0.001$)。结论: 采用薄膜分散法制备的 pH-Bai-Lips 具有良好的生物安全性和体外细胞抗炎效果。

关键词 黄芩苷; pH 敏感脂质体; 抗炎; 牙周炎

中图分类号 [R932]

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)05-0435-06

Preparation of pH sensitive baicalin liposomes and evaluation of oral anti-inflammatory effects

WANG Xueqing¹, MA Yiyi², LIU Ying², WU Boyue², ZHU Yu¹

(1. The Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China; 2. Department of Biochemistry, College of Medical Technology, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

Abstract Objective: To prepare of pH sensitive baicalin liposomes (pH-Bai-Lips) and investigate their anti-inflammatory effects *in vitro*. **Methods:** pH-Bai-Lips suspension was prepared using the thin-film dispersion method. The key physicochemical properties of the liposomes including morphology, particle size, encapsulation efficiency(EE), drug loading capacity(LE), pH responsiveness, and release rate *in vitro* were systematically characterized. Following basic physicochemical characterization, biological safety *in vitro* of pH-Bai-Lips was assessed via MTT assay by measuring its impact on RAW264.7 cell viability after 24 h exposure. Based on the safety validation results, an inflammatory model was further established using lipopolysaccharides (LPS)-stimulated RAW264.7 cells. Flow cytometry was employed to quantitatively analyze the regulatory effects of pH-Bai-Lips on the expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) and the anti-inflammatory cytokine(IL-10). **Results:** The study demonstrated that the liposomes exhibited a spherical morphology under electron microscopy, with an average particle size of (220.0 \pm 2.6) nm, an EE of 94.94%, and a LE of 26.37%. In the MTT assay, RAW264.7 cells treated with pH-Bai-Lips at concentrations ranging from 1 to 100 μ g/mL showed no statistically significant differences in cell viability compared with the control group ($t=0.25, 0.29, 0.26$, all $P>0.05$). These results indicated that pH-Bai-Lips did not exhibit significant cytotoxicity within this concentration range. The anti-inflammatory results showed that in the LPS-induced RAW264.7 cell inflammation model, compared with the LPS group, pH-Bai-Lips treatment at concentrations of 1, 10, and 100 μ g/mL significantly and dose-dependently reduced pro-inflammatory cytokine IL-6 levels($t=11.78, 22.47, 21.37$, all $P<0.001$) and TNF- α levels ($t=7.76, 23.28, 23.41$, all $P<0.001$). Meanwhile, the treatment significantly increased the anti-inflammatory cytokine IL-10 level ($t=7.65, 20.35, 6.45$, all $P<0.001$). **Conclusion:** pH-Bai-Lips prepared by film dispersion method have good biological safety and cellular anti-inflammatory effects *in vitro*.

Key words baicalin; pH-sensitive liposomes; anti-inflammatory; periodontitis

牙周炎是一种常见的口腔慢性炎症疾病, 通常由细菌感染引起, 分泌的毒素会刺激牙龈及周围组

织, 导致牙龈肿胀、疼痛和出血。如果不及时进行治疗, 会进一步破坏牙齿的周围结构, 最终导致牙齿

基金项目 天津市中医药重点领域科研项目(2022008)

作者简介 王雪清(1997-), 女, 硕士在读, 研究方向: 医学检验技术; 通信作者: 朱彧, E-mail: zhuyutj@126.com。

松动甚至脱落。因此,抗炎是牙周炎治疗中的重要环节之一。随着生物技术的发展,中药的有效单体和成分被成功分离和鉴定,中药治疗日益受到关注,药性缓和、不良反应小、价格廉惠、药源丰富都是其优势所在。

黄芩苷是从中药黄芩根中提取纯化而来,是一种重要的天然药物成分^[1],具有多种药理作用,可用于抗菌、抗病毒^[2]、抗肿瘤^[3]、抗氧化应激^[4]、抗凋亡^[5]和抗炎^[6-7]治疗。然而,黄芩苷分子结构中糖基的存在导致它在水和有机溶剂^[8]中的溶解度均较低。研究表明,黄芩苷的最大溶解度为 91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[9],其口服生物利用度仅为 2.2%^[10],其临床应用和治疗效果受到较大限制,因此,为改善黄芩苷的溶解度和生物利用率,本研究综合牙周炎患者局部酸性环境和脂质体靶向药物递送特点构建了一种 pH 敏感的黄芩苷脂质体,评估其细胞抗炎效果,为今后黄芩苷的研究和应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 黄芩苷(纯度 95%)购自希恩思生化科技有限公司(中国);胆固醇(CHOL,生物技术级)购自毕得医药科技股份有限公司(中国); CH_3Cl (纯度 99%)购自安徽泽升科技股份有限公司(中国);二油酰基磷脂酰乙醇胺(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine,DOPE,生物技术级)购自阿拉丁生化技术有限公司(中国);胆固醇琥珀酸单酯(CHEMS,生物技术级)由美亚生物技术有限公司提供(中国);多重液相蛋白定量技术自由组合试剂(BD CBA Flex Set)购自江苏赛图生物技术有限公司(中国)。

1.2 方法

1.2.1 空白脂质体与 pH 敏感黄芩苷脂质体的制备 采用薄层分散法制备 pH-Bai-Lips 和空白脂质体(Blank-Lips)^[8,11]。准确称取 DOPE(7 mg)、CHEMS(4 mg)、CHOL(2 mg)、黄芩苷(5 mg),溶于 37℃的 6 mL CH_3Cl 中,100 W 超声水浴 10 min 使黄芩苷完全溶解。使用旋转蒸发器(IKA[®] RV-10,德国)在 40℃,150 r/min 条件下减压旋蒸,形成脂质薄膜^[12]。加入 10 mL PBS,37℃,100 W 超声水浴以水化脂质膜,最后使用超声波细胞破碎机(S-250D,美国)超声破碎 2 min(60 W,工作 3 s/3 s),得到 pH-Bai-Lips。Blank-Lips(不加黄芩苷成分)以同样的方式制备,样品 4℃储存备用。

1.2.2 脂质体的表征 (1)形貌特征:在黑色背景的自然光下拍摄 pH-Bai-Lips 和 Blank-Lips 的外观。脂质体的微观结构和形态通过透射电子显微镜(TEM,Talos TML120C,美国)观察^[13]。在室温下使用

PBS(0.01 mol/L,pH=7.2~7.4)将样品稀释 10 倍后放置在铜网格上,随后用 1%磷钨酸负染 3~5 min,用滤纸从边缘吸走多余的液体,在脂质体溶液风干前使用 TEM 检查拍摄脂质体图像。

(2)粒径与 Zeta 电位:在室温条件下,以 90°为测量角度,通过动态光散射分析仪(Zetasizer Nanos90,Malvern,UK)评估 pH-Bai-Lips 和 Blank-Lips 的粒径和 Zeta 电位^[14]。在测量之前,使用 PBS(0.01 mol/L,pH=7.2~7.4)将样品稀释 10 倍以降低多重散射的影响。每个样品重复测量 3 次。

(3)包封率和载药率:通过离心技术检测黄芩苷在脂质体中的 EE^[3]。将 pH-Bai-Lips 在 4℃下 14 000 r/min 离心 20 min 后,吸取 100 μL 上清液,加入 1.9 mL 的甲醇乳化脂质体。通过 UV-vis 分光光度计(UV-1800,Shimadzu,Japan)280 nm 下测量上清液中黄芩苷的吸光度。制备黄芩苷标准溶液(3.125、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄芩苷溶解在甲醇中),并建立标准曲线。黄芩苷浓度与吸光度的校准曲线表示为 $y=0.042 4x+0.006 9$ ($r^2=0.999 9$)。根据公式(1)计算脂质体的 EE,根据公式(2)计算 LE。

$$EE = \frac{m_E}{m_T} \times 100\% \quad (1)$$

$$LE = \frac{m_E}{m_T + m_C} \times 100\% \quad (2)$$

其中 m_T 是脂质体系统中黄芩苷的总量; m_E 是包封在脂质体中的黄芩苷含量; m_C 是脂质体中载体的总量。

(4) pH-Bai-Lips 的稳定性评价:将 pH-Bai-Lips 储存在避光容器中,分别放置在 4℃和 25℃的环境中,每天固定时间检测脂质体粒径和 Zeta 电位,连续 30 d。

(5) pH-Bai-Lips 的酸响应性评价:分别使用 100 μL pH=7.0 的 PBS 和 pH=6.5 的 PBS 将黄芩苷脂质体原液稀释至 1 mL,在 37℃水浴中孵育 30 min 后检测粒径^[15]。

(6) pH-Bai-Lips 的体外释放评价:采用透析法研究黄芩苷在不同 pH 条件下从脂质体中的释放速率^[16-17]。将每个样品(总量 1 mL)放入透析袋(截留分子量大小=100 kD)中,透析袋的顶部和底部封口,分别放入含有 40 mL PBS(含 0.5%甲醇,pH=7.0 和 pH=6.5)的两个烧杯中,整个装置放置在温度为(37.0 \pm 0.5)℃的培养箱中。分别于 1、2、3、4、5、6、7、8 h 收集 1 mL 释放介质,并补充新鲜的相同介质 1 mL,样品在每个时间点取样 3 次。采用紫外可见分光光度法测定黄芩苷浓度。根据以下公式(3)计算累积释放率。

$$Q = \frac{V_c \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_T C_n}{M} \quad (3)$$

其中 Q 是累积释放率; V_c 是 PBS 的补充体积; V_T 是 PBS 的总体积; C_i 是第 i 个样品释放的药物浓度; C_n 是第 n 个样品释放的药物浓度; M 是脂质体的总药物浓度。

1.2.3 细胞实验 (1) 细胞培养: 实验选取小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 为模型, 考察材料的细胞毒性及载药系统的抗炎能力。RAW264.7 细胞来源于天津医科大学免疫学实验室。RAW264.7 细胞培养于 DMEM 培养基中(含 10% 的胎牛血清和 1% 青霉素和链霉素溶液), 并放置在 37°C、5% CO₂ 的加湿培养箱中, 每两天更换 1 次培养基。

(2) MTT 实验: 采用 MTT 法评估 pH-Bai-Lips 的细胞毒性^[18-19]。将 100 μL 的 RAW264.7 细胞以适当密度(1.5×10⁵ 个/mL)接种到 DMEM 完全培养基 96 孔板中孵育 24 h。按照对照(a)组、Blank-Lips(b)组、1 μg/mL pH-Bai-Lips(c)组、10 μg/mL pH-Bai-Lips(d)组、100 μg/mL pH-Bai-Lips(e)组、200 μg/mL pH-Bai-Lips(f)组分为 6 组, 每组 6 个复孔。孵育 24 h 后, 去除培养基上清液, 然后加入 MTT(10 μL, 5 g/L)孵育 4 h, 随后用 150 μL DMSO 溶解甲瓩晶体, 使用微孔板读数器(Synergy TMNEO, Bio-Tek, USA)在 490 nm 处测量每孔吸光度。RAW264.7 细胞的细胞存活率按以下公式(4)计算。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Control}} - A_{\text{Blank}}} \times 100\% \quad (4)$$

其中 A_{Sample} 代表用药物干预后各孔吸光度; A_{Blank} 代表无 RAW264.7 细胞的空白孔吸光度; A_{Control} 代表未用药物干预的各孔吸光度。

(3) pH-Bai-Lips 的抗炎效果评价: 将 RAW264.7 细胞以适当密度(1.5×10⁵ 个/mL)接种在 24 孔板中并培养 24 h。随后用含有 100 μg/mL LPS 的培养基替换旧培养基, 通过脂多糖(LPS)刺激 RAW264.7 细胞, 模拟体内的炎性环境^[6-7,9,20]。继续孵育 24 h 后, 移除含 LPS 的培养基, 分别对实验组细胞进行药物干预。实验分组如下: 对照(a)组、LPS(b)组、1 μg/mL pH-Bai-Lips(c)组、10 μg/mL pH-Bai-Lips(d)组、100 μg/mL pH-Bai-Lips(e)组。药物干预 24 h 后, 收集细胞上清液, 使用流式细胞仪检测细胞上清液中细胞因子[白细胞介素(IL)-6、IL-10、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)]的含量。

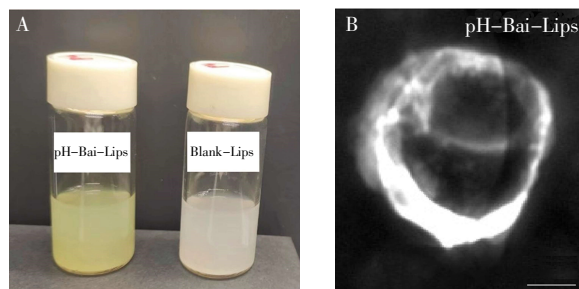
1.3 统计学处理 使用 Graphpad Pism V9.5 软件分析数据, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),

$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脂质体的表征

2.1.1 形貌特征 在白光下, pH-Bai-Lips 和 Blank-Lips 呈现出均匀的混悬液状态(图 1A)。TEM 结果显示, pH-Bai-Lips 呈规则的双层膜状结构(图 1B)。

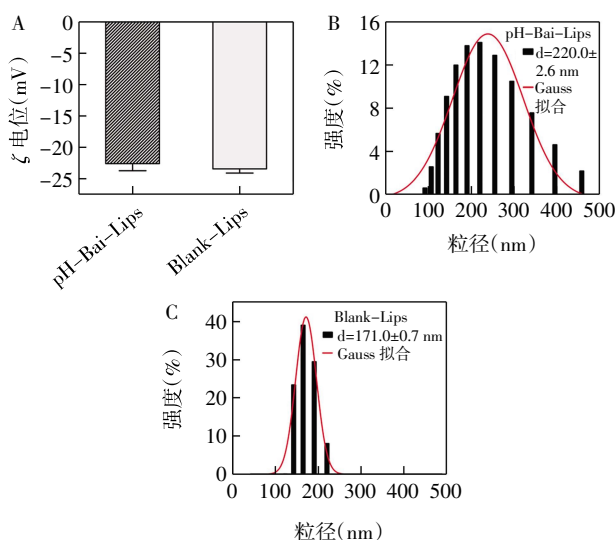


注: pH-Bai-Lips: pH 敏感的黄芩苷脂质体; Blank-Lips: 空白脂质体; A: 自然光下 pH-Bai-Lips(左)和 Blank-Lips(右)的图像; B: pH-Bai-Lips 的 TEM 图像; 比例尺: 50 nm

图 1 脂质体的形貌特征

Fig.1 The morphological characteristics of liposomes

2.1.2 粒径与 Zeta 电位 pH-Bai-Lips 和 Blank-Lips 的 Zeta 电位如图 2A 所示。结果表明, 脂质体表面存在均匀负电荷, 相互排斥, 保证了脂质体系统在介质中的稳定性。如图 2B、2C 所示, pH-Bai-Lips 和 Blank-Lips 的平均粒径分别为(220.0±2.6)nm 和 (171.0±0.7)nm, pH-Bai-Lips 的平均粒径显著大于 Blank-Lips, 表明黄芩苷已被成功包封。



注: pH-Bai-Lips: pH 敏感的黄芩苷脂质体; Blank-Lips: 空白脂质体; A: pH-Bai-Lips 和 Blank-Lips 的 Zeta 电位; B: pH-Bai-Lips 的粒径分布; C: Blank-Lips 的粒径分布

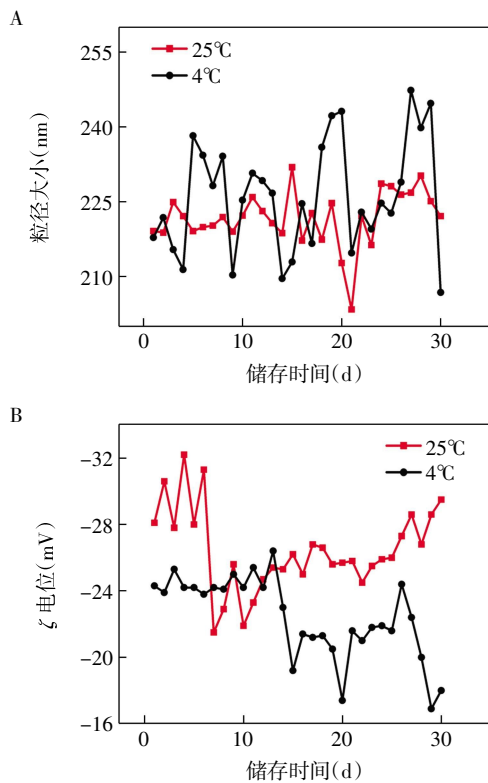
图 2 脂质体的粒径与电位

Fig.2 The particle size and zeta potential of liposomes

2.1.3 包封率与载药率 经测量可知包封在脂质体脂溶性双层中的黄芩苷含量为 474.7 μg/mL, 脂质

体系统中黄芩苷的总量为 500 μg/mL, pH-Bai-Lips 的 EE 为 94.94%; 脂质体中载体的总量为 1 300 μg/mL, pH-Bai-Lips 的 LE 为 26.37%。

2.1.4 pH-Bai-Lips 的稳定性评价 图 3A 表示 pH-Bai-Lips 平均粒径的波动, 4°C 时从 206.8 nm 至 243.1 nm, 25°C 时从 203.4 nm 至 230.2 nm, 其平均粒径在合理范围内波动。如图 3B 所示, 在 4°C 储存时, 最高电位为 -16.9 mV, 最低电位为 -26.4 mV; 25°C 储存时, 最高电位为 -21.5 mV, 最低电位为 -32.2 mV, 其电位变化范围均为 10 mV 左右, 以上结果表明样品在低温和室温下能够长时间储存。



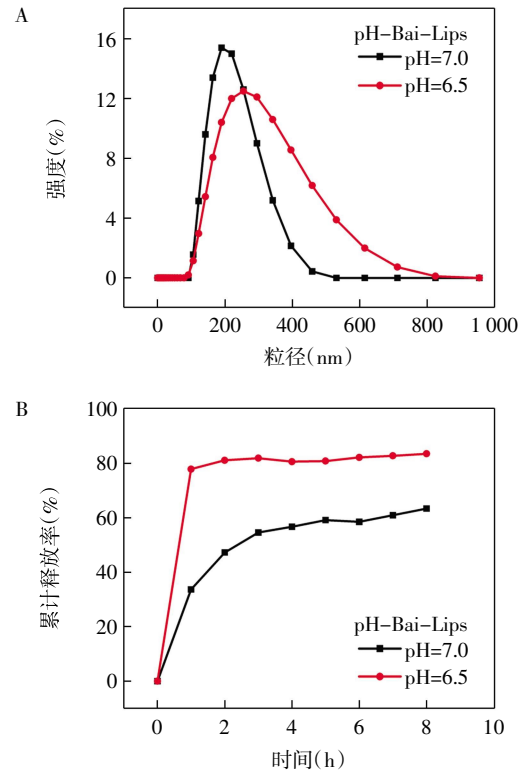
注: pH-Bai-Lips; pH 敏感的黄芩苷脂质体; ζ 电位: Zeta 电位; A: pH-Bai-Lips 的粒径变化; B: pH-Bai-Lips 的 Zeta 电位变化

图 3 脂质体的稳定性评价

Fig.3 Evaluation of liposomes stability

2.1.5 pH-Bai-Lips 的酸响应性与药物释放评价 图 4A 显示了不同 pH 条件下 pH-Bai-Lips 的粒径分布。与在 pH=7.0 的 PBS 中相比, pH=6.5 中的 pH-Bai-Lips 的粒径分布变宽, 峰值向右移动。粒径峰值的变化表明 pH-Bai-Lips 具有良好的酸响应特性。如图 4B 所示, 在 PBS 溶液 (pH=6.5 和 pH=7.0, 37°C) 中测量 pH-Bai-Lips 的累积释放速率, 其拟合方程分别为 $y=81.8 \times (1 - \exp(-3x))$ 和 $y=60.8 \times (1 - \exp(-0.77x))$ ($r^2 > 0.99$)。在 pH=6.5 的 PBS 中, 超过 70% 的黄芩苷在 1 h 内释放, 随后在接下来的 7 h 内逐渐平稳释放; 8 h 后, 共有 83.48% 的黄芩苷被释放出

来。pH=7.0 的 PBS 溶液中 pH-Bai-Lips 表现出类似的释放曲线, 但释放速率明显较慢, 累积释放量也较低。两种不同 pH 条件下的释放速率表明 pH-Bai-Lips 具有良好的酸反应性。

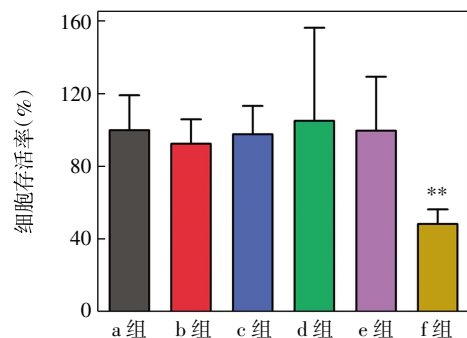


注: pH-Bai-Lips; pH 敏感的黄芩苷脂质体; A: 在 pH=6.5 和 pH=7.0 的 PBS 溶液中 pH-Bai-Lips 的粒径变化; B: 在 pH=6.5 和 pH=7.0 的 PBS 溶液中 pH-Bai-Lips 的累积释放率

图 4 脂质体的 pH 响应性与药物释放评价

Fig.4 Evaluation of pH responsiveness and drug release of liposomes

2.2 MTT 实验 如图 5 所示, 与对照组相比, 1、10、100 μg/mL pH-Bai-Lips 组 RAW264.7 细胞存活率处于相同水平, 差异没有统计学意义 ($t=0.25、0.29、$



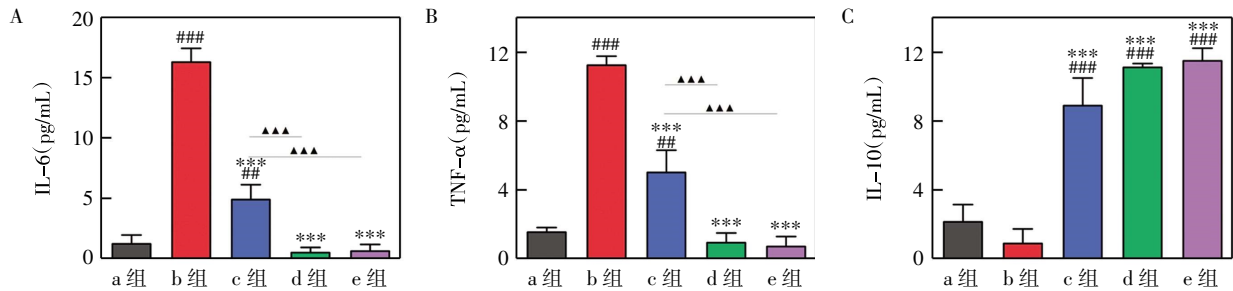
注: 与对照组相比, ** $P < 0.01$; a 组: 对照组; b 组: Blank-Lips 组; c 组: 1 μg/mL pH-Bai-Lips 组; d 组: 10 μg/mL pH-Bai-Lips 组; e 组: 100 μg/mL pH-Bai-Lips 组; f 组: 200 μg/mL pH-Bai-Lips 组

图 5 不同浓度实验组孵育 24 h 后 RAW264.7 的细胞存活率 Fig.5 Cell viability of RAW264.7 cells after incubation with different concentration groups for 24 h

0.26, 均 $P>0.05$), 200 $\mu\text{g/mL}$ pH-Bai-Lips 组细胞存活率明显降低 ($t=6.40$, $P<0.01$)。与对照组相比, Blank-Lips 组对 RAW264.7 细胞也没有表现出明显的细胞毒性 ($t=0.79$, $P>0.05$)。

2.3 抗炎效果评价 如图 6A 所示, 与 LPS 组相比, 1、10、100 $\mu\text{g/mL}$ pH-Bai-Lips 组 IL-6 水平显著降

低 ($t=11.78$ 、22.47、21.37, 均 $P<0.001$); 图 6B 所示, 与 LPS 组相比, 1、10、100 $\mu\text{g/mL}$ 的 pH-Bai-Lips 组 TNF- α 水平显著降低 ($t=7.76$ 、23.28、23.41, 均 $P<0.001$); 图 6C 所示, 与 LPS 组相比, 1、10、100 $\mu\text{g/mL}$ 的 pH-Bai-Lips 组 IL-10 水平显著升高 ($t=7.65$ 、20.35、6.45, 均 $P<0.001$)。



注:与对照组相比, # $P<0.01$, ### $P<0.001$;与 LPS 组相比, *** $P<0.001$;与治疗组相比, ▲▲ $P<0.001$; TNF- α : 肿瘤坏死因子- α ; IL-6: 白细胞介素-6; IL-10: 白细胞介素-10; A: 不同浓度的 pH-Bai-Lips 对促炎因子 IL-6 的影响; B: 不同浓度的 pH-Bai-Lips 对促炎因子 TNF- α 的影响; C: 不同浓度的 pH-Bai-Lips 对抗炎因子 IL-10 的影响; a 组: 对照组; b 组: LPS 组; c 组: 1 $\mu\text{g/mL}$ pH-Bai-Lips 组; d 组: 10 $\mu\text{g/mL}$ pH-Bai-Lips 组; e 组: 100 $\mu\text{g/mL}$ pH-Bai-Lips 组

图 6 不同浓度 pH-Bai-Lips 的抗炎作用

Fig.6 The anti-inflammatory effects of pH-Bai-Lips at different concentrations

3 讨论

黄芩苷的溶解度差、生物利用度低, 严重限制了其在生物医学方面的应用, 为解决黄芩苷临床应用存在的技术问题, 并结合牙周炎患者龈沟液内 pH 偏低 (5.0~6.5) 的特殊微生态环境, 本研究以 DOPE 和 CHEMS 为主要原料, 制备出一种具有抗炎治疗潜力的 pH 敏感的黄芩苷脂质体。CHEMS 是一种含有羧基的 pH 敏感化合物, 在中性条件下呈头大尾小的结构, 与头小尾大的 DOPE 形成互补结构。然而, 在酸性环境中, CHEMS 脂肪酸链羧基质子化导致构象改变, 形成了头小尾大的结构, 无法与 DOPE 形成互补结构稳定脂质双层膜, 脂质体溶胀破裂, 达到局部释放药物的效果。

包封和载药特性是脂质体药物递送中最重要的环节, 本研究制备出的脂质体 EE 为 94.94%、LE 为 26.37%, 与其他文献报道的 EE 为 42%^[11]、60.11%^[11] 和 LE 为 5.7% 和 10%^[3] 的脂质体相比, 其包封效率和载药效率相对较高。对比其他黄芩苷脂质体的制备, 本研究通过 37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 w 超声水浴最大限度提高其在有机溶剂中的溶解度, 从而提高旋蒸后脂溶性双层中黄芩苷的含量, 同时根据文献报道^[21-22], 胆固醇成分可以通过降低脂膜的流动性提高脂质体的稳定性, 防止药物外泄, 因此将其掺入脂质体中。本研究通过改进实验操作和加入胆固醇成分显著提高了脂质体的包封率和载药量, 最大限度提高了局部药物递送量。

根据已有文献研究结果^[1, 21], 本研究选择 1~200 $\mu\text{g/mL}$ 的 pH-Bai-Lips 进行细胞安全性实验, 结果表明 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 的 pH-Bai-Lips 是安全无毒的。因此, 将 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 的 pH-Bai-Lips 用于后续细胞抗炎实验, 结果表明, 在安全浓度范围内的 pH-Bai-Lips 可以满足临床治疗和缓解牙周炎症的需要^[1, 3, 11]。

LPS 是革兰阴性细菌细胞壁的主要成分^[23], 是一种强效炎症诱导剂, 诱导巨噬细胞表型发生改变并释放炎症因子。巨噬细胞可以极化成具有促炎特性的经典活化的 M1 型巨噬细胞和具有抗炎特性的选择性活化的 M2 型巨噬细胞。巨噬细胞表型的调节影响炎症的发生、发展和消退, 在病理条件下, M1 型巨噬细胞被慢性激活, 分泌 TNF- α 、IL-6 等促炎细胞因子, 导致慢性炎症和组织破坏^[24], 而 M2 型巨噬细胞分泌抗炎因子 IL-10, 能够减轻炎症^[25]。因此, 在牙周炎的临床治疗中, 抑制促炎因子 IL-6、TNF- α 的分泌, 促进抗炎因子 IL-10 的分泌, 对牙周炎的治疗具有积极的意义^[26-28]。本实验结果表明, 与黄芩苷溶液组相比, pH-Bai-Lips 组具有调节炎症细胞因子分泌的作用, 提示临床局部应用 pH-Bai-Lips 会减轻牙周炎的炎症, 促进牙周炎患者康复。

综上所述, pH-Bai-Lips 作为一种安全、高效的药物递送载体, 有效解决了黄芩苷水溶性差的缺点, 实现了针对牙周炎酸性病灶区的靶向释放, 提高了药物递送效率。体外细胞实验证实 pH-

Bai-Lips 可以有效调控炎症因子水平,表现出较强的抗炎功效,该策略为牙周炎的靶向治疗提供了新范式,后续将通过动物模型验证其临床转化价值。

参考文献:

- [1] WEI Y, LIANG J, ZHENG X, et al. Lung-targeting drug delivery system of baicalin-loaded nanoliposomes: development, biodistribution in rabbits, and pharmacodynamics in nude mice bearing orthotopic human lung cancer[J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12(8): 251-261.
- [2] GENG P, ZHU H, ZHOU W, et al. Baicalin inhibits influenza A virus infection via promotion of M1 macrophage polarization[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11(7): 01298.
- [3] CHEN Y, MINH L V, LIU J, et al. Baicalin loaded in folate-PEG modified liposomes for enhanced stability and tumor targeting[J]. *Colloids Surf B*, 2016, 140(28): 74-82.
- [4] ZHANG P, HOU J, FU J, et al. Baicalin protects rat brain microvascular endothelial cells injured by oxygen-glucose deprivation via anti-inflammation[J]. *Brain Res Bull*, 2013, 97(4): 8-15.
- [5] XU M, CHEN X, GU Y, et al. Baicalin can scavenge peroxynitrite and ameliorate endogenous peroxynitrite-mediated neurotoxicity in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(1): 116-124.
- [6] FU Y J, XU B, HUANG S W, et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF- κ B p65 pathway and inflammation in mice via inhibiting the expression of CD14[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(1): 88-96.
- [7] AN H J, LEE J Y, PARK W. Baicalin modulates inflammatory response of macrophages activated by LPS via Calcium-CHOP pathway[J]. *Cells*, 2022, 11(19): 3076.
- [8] XIANG Y, LONG Y, YANG Q, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity of Baicalin liposome on cerebral ischemia reperfusion injury rats via intranasal administration[J]. *Brain Res*, 2020, 1726(14): 146503.
- [9] XING J, CHEN X, ZHONG D. Absorption and enterohepatic circulation of baicalin in rats[J]. *Life Sci*, 2005, 78(2): 140-146.
- [10] ZHANG S, WANG J, PAN J. Baicalin-loaded PEGylated lipid nanoparticles: characterization, pharmacokinetics, and protective effects on acute myocardial ischemia in rats[J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(9): 3696-3703.
- [11] LI N, FENG L, TAN Y, et al. Preparation, characterization, pharmacokinetics and biodistribution of baicalin-loaded liposome on cerebral ischemia-reperfusion after i.v. administration in rats[J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1747-1750.
- [12] SLEPUSHKIN V A, SIMÕES S, DAZIN P, et al. Sterically stabilized pH-sensitive liposomes. Intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation *in vivo*[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(4): 2382-2388.
- [13] YANAR F, KIMPTON H, CRISTALDI D A, et al. Synthesis and characterization of liposomes encapsulating silver nanoprisms obtained by millifluidic-based production for drug delivery[J]. *Mater Res Express*, 2023, 10(8): 085008.
- [14] JASIM A J, ALBUKHATY S, SULAIMAN G M, et al. Liposome nanocarriers based on γ oryzanol: preparation, characterization, and *in vivo* assessment of toxicity and antioxidant activity[J]. *ACS omega*, 2024, 9(3): 3554-3564.
- [15] ETTOUMI F E, ZHANG R, XU Y, et al. Synthesis and characterization of fucoidan/chitosan-coated nanoliposomes for enhanced stability and oral bioavailability of hydrophilic catechin and hydrophobic juglone[J]. *Food Chem*, 2023, 423(16): 136330.
- [16] SOLOMON D, GUPTA N, MULLA N S, et al. Role of *in vitro* release methods in liposomal formulation development: challenges and regulatory perspective[J]. *AAPS J*, 2017, 19(6): 1669-1681.
- [17] SONG Z, YIN J, XIAO P, et al. Improving breviscapine oral bioavailability by preparing nanosuspensions, liposomes and phospholipid complexes[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(2): 132.
- [18] JIN X, LIU M Y, ZHANG D F, et al. Baicalin mitigates cognitive impairment and protects neurons from microglia-mediated neuroinflammation via suppressing NLRP3 inflammasomes and TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Cns Neurosci Ther*, 2019, 25(5): 575-590.
- [19] LI Y, LIU T, LI Y, et al. Baicalin ameliorates cognitive impairment and protects microglia from LPS-induced neuroinflammation via the SIRT1/HMGB1 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020(9): 4751349.
- [20] LI C G, YAN L, MAI F Y, et al. Baicalin inhibits NOD-Like receptor family, pyrin containing domain 3 inflammasome activation in murine macrophages by augmenting protein kinase A signaling[J]. *Front Immunol*, 2017, 8(5): 1409-1411.
- [21] SIMÕES S, MOREIRA J N, FONSECA C, et al. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2004, 56(7): 947-965.
- [22] KRAFT J C, FREELING J P, WANG Z, et al. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems[J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(1): 29-52.
- [23] LI M, HUANG X, ZHUO Q, et al. Clinical significance of miR-129-5p in patients with neonatal sepsis and its regulatory role in the LPS-induced inflammatory response[J]. *Bosnia J Basic Med*, 2021, 22(2): 185-190.
- [24] KASRAIE S, WERFEL T. Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis[J]. *Mediat Inflamm*, 2013, 2013(4): 942375.
- [25] KELLY C, JEFFERIES C, CRYAN S A. Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages[J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2011, 2011(5): 727241.
- [26] OZMA M A, KHODADADI E, PAKDEL F, et al. Baicalin, a natural antimicrobial and anti-biofilm agent[J]. *JHM*, 2021, 27(7): 105-109.
- [27] JEONG G H, LEE H, LEE H K, et al. Inhibitory effect of gamma-ray-modified hydroxymethylated baicalins on NO production[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2023, 96(3): 129491.
- [28] ZHANG Q, GUO S, GE H, et al. The protective role of baicalin regulation of autophagy in cancers[J]. *Cytotechnology*, 2025, 77(1): 33.