

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：超滤法与葡聚糖凝胶法在 Tfn/PCL 胶束纯化中的应用比较
作者：于凌波，张亚东，许瑞，孙钰钰，王慧云，杨金津，崔亚男
网络首发日期：2025-10-28
引用格式：于凌波，张亚东，许瑞，孙钰钰，王慧云，杨金津，崔亚男. 超滤法与葡聚糖凝胶法在 Tfn/PCL 胶束纯化中的应用比较[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20251027.1351.002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

超滤法与葡聚糖凝胶法在 Tfn/PCL 胶束纯化中的应用比较

于凌波^{1,2}, 张亚东^{2,3}, 许 瑞^{1,2}, 孙钰钰², 王慧云², 杨金津¹, 崔亚男²

(¹ 山东第二医科大学药学院, 潍坊 261053; ² 济宁医学院药学院, 日照 276800; ³ 山东第一医科大学药学院, 济南 250100)

摘要 目的 以纯化效率和胶束纯度为指标, 比较超滤法与葡聚糖凝胶法纯化转铁蛋白/聚己内酯(Tfn/PCL)胶束的效果。**方法** 通过薄膜分散法制备载有香豆素-6(C6)的聚己内酯(PCL)胶束, 然后通过成酰胺反应将转铁蛋白(Tfn)修饰到胶束表面。共制备了两种 Tfn 密度的胶束: Tfn/PCL_高和 Tfn/PCL_低; 并对胶束进行了初步制剂学表征。通过超滤法和葡聚糖凝胶法对两种胶束进行了分离纯化, 并对纯化效率进行了分析比较, 计算纯化后胶束表面 Tfn 的修饰密度。**结果** 制备的 PCL 胶束平均粒径为 73 nm, 载药量为 0.046%。经 Tfn 修饰后, Tfn/PCL_高和 Tfn/PCL_低平均粒径分别在 134 nm 和 158 nm, 大小均匀。纯化结果表明, 在超滤法中, 对于 Tfn/PCL_高和 Tfn/PCL_低, 分别滤过 2 次和 1 次后, Tfn 与 C6 浓度比值分别稳定在 23.6 和 3.4; 在葡聚糖凝胶法中, 对于 Tfn/PCL_高, 滤过 2 次后 Tfn 与 C6 浓度比值稳定在 23.7; 而对于 Tfn/PCL_低组, 4 次滤液中的 Tfn/C6 的比值变化呈上升趋势, 滤过第 4 次的 Tfn/C6 比值较滤过第 1 次的 Tfn/C6 比值增大, 存在显著性差异($P=0.0424$)。通过计算 Tfn/PCL_高和 Tfn/PCL_低表面 Tfn 修饰密度, 得出超滤法修饰密度分别为 94.9%和 13.8%, 葡聚糖凝胶法修饰密度分别为 95.6%和 14.4%, 且在 Tfn/PCL_低组两种方法差异具有统计学($P=0.0002$)。**结论** 超滤法和葡聚糖凝胶法的纯化效率相近, 但葡聚糖凝胶法纯化后获得的 Tfn/PCL 胶束更纯, 表面 Tfn 修饰密度更大, 这一差异在 Tfn/PCL_低胶束纯化中表现尤为明显。

关键词 超滤; 葡聚糖凝胶; 分离纯化; 转铁蛋白; 药物递送系统; 配体密度

中图分类号 R 944

文献标志码 A

Comparison between ultrafiltration and dextran gel method in the purification of Tfn/PCL micelles

Yu Lingbo^{1,2}, Zhang Yadong^{2,3}, Xu Rui^{1,2}, Sun Yuyu², Wang Huiyun², Yang Jinjin¹, Cui Yanan²

(¹College of Pharmacy, Shandong Second Medical University, Weifang 261053; ²College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276800; ³School of Pharmacy, Shandong First Medical University, Jinan 250100)

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81903553); 山东省自然科学基金项目(编号: ZR2017QH006); 山东省医药卫生科技项目(编号: 202413020723)

作者简介: 于凌波, 女, 硕士研究生;

王慧云, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 通讯作者, E-mail: wang_huiyun@126.com;

崔亚男, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 通讯作者, E-mail: guancyn@sina.com

Abstract Objective By using purification efficiency and micelle purity as indicators, the effect of ultrafiltration and dextran gel method for purifying transferrin/polycaprolactone (Tfn/PCL) micelles was compared. **Methods** Coumarin-6 (C6) was used as a fluorescent probe and was loaded into HOOC-PEG-PCL to form PCL micelles by the film-dispersion method. Tfn was then conjugated to the surface of PCL micelles via an amidation reaction, resulting in two types of micelles: Tfn/PCL_H and Tfn/PCL_L. The pharmaceutical properties of the two types of micelles were characterized. The micelles were then purified through ultrafiltration method and dextran gel method respectively, and the efficiency of the two methods, along with the purity of the final micelles, was compared. The density of Tfn on the surface of PCL micelles was also calculated. **Results** The hydrated diameter of PCL micelles was approximately 73 nm, and the C6 loading efficiency was around 0.046%. The size increased to 134 nm and 158 nm for Tfn/PCL_L and Tfn/PCL_H, respectively. The micelle population was monodisperse. The purification results showed that, for the ultrafiltration method, after two and one rounds of purification, the Tfn/C6 ratio stabilized at 23.6 and 3.4 for Tfn/PCL_H and Tfn/PCL_L, respectively. For the dextran gel filtration method, the Tfn/C6 ratio reached 23.7 for the Tfn/PCL_H group after two rounds of purification. However, for the Tfn/PCL_L group, the Tfn/C6 ratio increased during four rounds of dextran gel purification, and a significant difference ($P = 0.0424$) was observed between the first and last filtrations. The density of Tfn in the final micelles were calculated. For the ultrafiltration method, the Tfn density of Tfn/PCL_H and Tfn/PCL_L were 94.9% and 13.8%, respectively. For the dextran gel filtration method, the density of the two micelles were 95.6% and 14.4%, respectively. For Tfn/PCL_L group, the density results revealing a statistically significant difference ($P=0.0002$). **Conclusion** The purification efficiency of the two methods is comparable. However, the purity of the final micelles shows a significant difference, with the dextran gel filtration method resulting in higher purity, particularly for the Tfn/PCL_L micelles.

Key words ultrafiltration; sephadex gel; separation and purification; transferrin; drug delivery system; ligand density

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81903553); Project ZR2017QH006 supported by Shandong Provincial Natural Science Foundation (No. ZR2017QH006); Medical and Health Science and Technology Project of Shandong Province (No. 202413020723)

Corresponding author Wang Huiyun, E-mail: wang_huiyun@126.com; Cui Yanan, E-mail: guancyn@sina.com

在肿瘤诊疗领域,受体介导的主动靶向药物递送系统由于其特异性的受体-配体相互作用,可提高药效并降低毒副作用,长期受到药学工作者的青睐^[1-2]。转铁蛋白(transferrin, Tfn)是转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)的特异性配体,其作为靶向配体被广泛应用于肝癌、鼻咽癌、乳腺癌、前列腺癌、白血病、脑胶质瘤等恶性肿瘤的治疗^[3-5]。基于Tfn修饰的纳米给药系统种类繁多,如聚合物胶束、固体脂质纳米粒、纳米囊和脂质体^[6-7]等。Tfn通常

通过成酰胺反应对纳米药物递送系统进行修饰^[8]，随后的纯化方法按原理可分为两类：基于分子量截留的膜分离技术（如透析、超滤）和基于分子排阻的分离技术（如葡聚糖凝胶柱分离）。文献中应用的两种纯化方法原理都有涉及^[7, 9-12]。该文即考察比较了超滤法和葡聚糖凝胶法在纯化效率、纯化所得胶束表面 Tfn 修饰密度方面的异同，以期为今后 Tfn 修饰的纳米药物递送系统的设计及其他配体修饰的纳米递送系统的构建提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

N-1300 型旋转蒸发仪（日本东京理化器械株式会社）、FDU-2110 型冷冻干燥机（上海爱朗仪器有限公司）、Nano-ZS90 型激光粒度仪（英国 Malvern 公司）、F4600 型荧光分光光度计（日本 Hitachi 公司）、JEM-2100PLUS 型透射电镜（日本 JEOL 公司）、Centrifuge5424 型离心机（德国 Eppendorf 公司）、DNM-9602G 型酶标分析仪（北京普特新科技有限公司）、Sorvall ST 16R 型高速冷冻离心机（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

1.2 主要试剂和耗材

端羧基聚乙二醇聚己内酯嵌段共聚物（HOOC-PEG₂₀₀₀-b-PCL₅₀₀₀，批号：MKCM9500）购自德国 Merck 公司；香豆素 6（Coumarin-6, C6，批号：LT60P69）、N-羟基琥珀酰亚胺（N-hydroxysuccinimide, NHS，批号：LA70P85）、1-（3-二甲基氨基丙基）-3-乙基碳二亚胺（ethyl dimethyl aminopropyl carbodiimide, EDC，批号：LUA0P62）均购自北京百灵威科技有限公司；2-（N-吗啡啉）乙磺酸（morpholinoethanesulfonic acid solution, MES，批号：827C021）、葡聚糖凝胶 G-150（批号：20230509）均购自北京索莱宝科技有限公司；乙腈（色谱纯，批号 B2211267，纯度≥99.9%）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；人 Tfn（批号：102436695）、SigmaPrep™ spin column 离心柱套装（批号：1003249901）均购自美国 Sigma-Aldrich 公司；Micro BCA™ Protein Assay Kit 23235（批号：XK358025）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司，Amicon® Ultra-4 超滤离心管（型号：MWCO100K，批号 0000216249）购自美国 Merck Millipore 公司。

1.3 方法

1.3.1 转铁蛋白/聚己内酯（transferrin/ polycaprolactone, Tfn/PCL）胶束的制备与表征

本文制备了两种 Tfn 修饰密度的 PCL 胶束（Tfn/PCL_高、Tfn/PCL_低）。首先通过薄膜水化法制备载有荧光探针 C6 的 PCL 胶束（PEG-PCL-C6）。于 25 mL 茄形瓶中加入 PEG-PCL（1 mg/mL）和 C6（0.5 μg/mL）的乙腈混合液 4 mL，于 60 °C 减压旋蒸至完全成膜后，加入 60 °C 的 PBS 溶液 2 mL，涡旋后超声分散 5 min，12 000 r/min 条件下离心 5 min，除去游离 C6 沉淀，上清液即为 PEG-PCL-C6 胶束的 PBS 分散液。取该分散液 1 mL，依次加入 0.09 mg NHS、0.16 mg EDC 以及 1 mL MES，室温搅拌 20 min 后，加入 Tfn 的 PBS 溶液（10 mg/mL，nPCL: nTfn≈1:2）4.5 mL，调节体系的 pH 值在 8.5 左右，室温避光搅拌 8 h，即得 Tfn 高修饰密度的 PCL 胶束 Tfn/PCL_高。同样的方法制备 Tfn 低修饰密度的 PCL 胶束

Tfn/PCL_低 (nPCL : nTfn ≈ 100 : 15)。最终通过荧光分光光度法, 以 PBS 为稀释剂, 调节两种胶束中 C6 浓度一致, 备用。

采用动态光散射法测定胶束的粒径大小及粒度分布情况。设定粒度测定仪的波长为 633 nm, 入射光与散射光束的夹角为 90°, 测定温度为 25 °C, 每个样品的测定循环数为自动。两种胶束的外观形态通过透射电镜法 (transmission electron microscope, TEM) 进行观察。简言之, 将胶束的水分散液置于铜网上, 静置、负染、晾干后观察并拍照。

1.3.2 胶束中 C6 含量的测定

本文采用荧光分光光度法进行 C6 含量的测定。精密称取 C6 适量, 以甲醇为溶剂系统分别配制成 1、5、10、20、50、100 ng/mL 系列浓度的标准溶液。测定条件如下: 激发/发射波长 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) 为 450 nm/505 nm, 夹缝宽度为 5/5 nm。分别取 0.5 mL 上述标准溶液进行荧光强度测定, 每个浓度平行测定 3 次。以 C6 浓度与荧光强度进行线性回归, 绘制标准曲线。

精密吸取 PCL 胶束悬浊液 2 mL 加入 Amicon® Ultra-4 超滤离心装置中, 于 7 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃去滤液, 于超滤离心装置的浓缩液中再次加入去离子水 3 mL 重悬胶束, 重复离心操作。小心洗涤转移出离心装置中的浓缩液于西林瓶中, 冻干后称重, 即得到载有 C6 的 PCL 胶束的质量。将冻干后的胶束溶于适量甲醇中, 充分涡旋混匀使包载在胶束内部的 C6 完全释放并溶解。按照前述荧光分光光度法条件进行测定, 对照标准曲线计算胶束中 C6 的浓度, 按照如下公式计算载药量。

$$\text{载药量}\% = \frac{\text{测定的胶束中 C6 含量}}{\text{胶束的总质量}} \times 100\%$$

取浓缩液或洗脱液以甲醇稀释适当倍数, 充分涡旋混匀后, 置于四透石英比色皿中, 按 1.3.1 项下方法操作, 进行 C6 荧光强度测定, 记录 Height 值, 带入标准曲线, 计算 C6 浓度。

1.3.3 Tfn/PCL 胶束的纯化

为分离制备 Tfn/PCL 胶束过程中未完全反应的游离 Tfn, 需要对制备的胶束进行分离纯化处理。本文对两种经典的纯化方法进行比较: 超滤法和葡聚糖凝胶法。

1.3.3.1 超滤法

取待纯化的 Tfn/PCL 胶束 1 mL, 加至去离子水润洗后的 Amicon® Ultra-4 超滤离心装置中, 离心条件如下: 转速设置 7 000 r/min, 时长 10 min, 温度 4 °C, 加速/减速系数为 6。离心 1 次后, 收集滤出液记为 a, 小心转移出离心装置中的浓缩液, 以 PBS 缓冲液洗涤离心装置 3 次, 合并浓缩液与洗涤液至最终体积为 1 mL, 记为浓缩液 a; 取 990 μ L 浓缩液 a 进行第 2 次超滤纯化, 收集滤出液记为 b, 同样的操作收集浓缩液记为 b; 以此类推重复该超滤纯化操作, 共计离心纯化 4 次, 得到浓缩液 a、b、c、d, 以及滤出液 I、II、III、IV。

1.3.3.2 葡聚糖凝胶法

葡聚糖凝胶 G-150 提前于去离子水中溶胀 24h 备用。取 1 mL 充分溶胀的葡聚糖凝胶悬

浊液加入 Sigma Prep™离心柱中，于 1 000 r/min 转速下离心 1 min，弃下清液。在形成的葡聚糖凝胶柱表面小心滴加 40 μL 待纯化的 Tfn/PCL 胶束分散液，于 1 000 r/min 转速下离心 4 min，收集离心管底部滤出的胶束分散液。取该滤出液 40 μL，重复上述离心操作，收集滤出的胶束分散液。共计离心纯化 4 次，得到滤出纯化的胶束分散液分别标记为 1、2、3、4。

1.3.4 纯化效果分析

Tfn/PCL 胶束的制备原理是利用 Tfn 分子中的伯氨基与 PEG-PCL 上的羧基通过成酰胺反应进行偶联。纯化效果指的是除去未连接的游离 Tfn 分子的能力。

本文比较了两种纯化分离方法。根据超滤管的分离原理，超滤法的纯化指标是滤出液中不再检出 Tfn，且浓缩液中 Tfn 量与 C6 量的比值趋于恒定时，认为纯化完全；

根据葡聚糖凝胶的分离原理，葡聚糖凝胶法的纯化指标是当滤出液中 Tfn 含量与 C6 量的比值恒定时，可认为胶束被纯化完全。

Tfn 含量的测定方法采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法。简言之，取纯化后的浓缩液以及滤液稀释适当倍数后，冰浴超声分散 5 min，取样 20 μL 加入 96 孔板中，然后加入按照说明书配制的工作液 200 μL/孔，每个样品设置 3 组平行对照，充分混匀后，于 37 °C 避光孵育 30 min，在 540 nm 处用酶标仪测定吸光度，按照标准曲线计算 Tfn 的含量。

1.3.5 统计学处理

本文采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行数据的统计学分析。各数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用双尾 *t* 检验和单因素方差分析 (ANOVA)，*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶束的粒径及外观形态

各胶束粒径及外观形态结果如图 1 所示。PEG-PCL-C6 胶束 (图 1A、1D)、Tfn/PCL 低胶束 (图 1B、1E) 以及 Tfn/PCL 高胶束 (图 1C、1F) 的粒径大小及多分散指数 (polydisperse index, PDI) 分别为 (73.11±1.78) nm (PDI: 0.231±0.057), (134.51±1.03) nm (PDI: 0.296±0.062), (158.20±1.26) nm (PDI: 0.211±0.006)，Tfn 修饰后胶束的水化粒径明显增大，且随着修饰密度的增加，粒径增大。由 TEM 结果可知，制得的胶束外观均为圆整的球形结构。

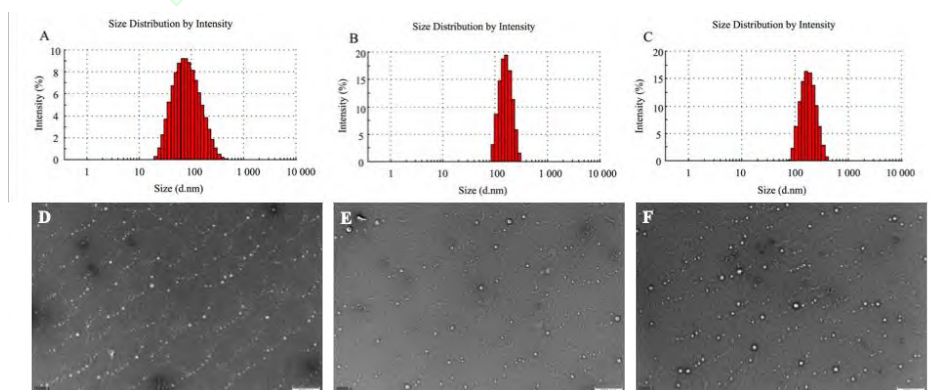


图 1PCL 胶束粒径大小及外观形态 TEM 照片

Fig.1 Particle size and TEM images of the PCL micelles

A,D: PEG-PCL-C6; B,E: Tfn/PCL_{Low}; C,F: Tfn/PCL_{High}.

2.2 胶束的载药量

2.2.1 C6 标准曲线

各浓度 C6 溶液对应的荧光强度数据结果见表 1。以 C6 溶液浓度 C (ng/mL) 为横坐标，对应的荧光强度 Height 值为纵坐标进行线性回归（图 2），得线性方程 $H=0.3691C+0.5127$ ， $R^2=0.9995$ ，结果表明，C6 在 1~100 ng/mL 浓度范围内，浓度与荧光强度线性关系良好。

表 1 不同 C6 浓度对应的荧光强度值

Tab. 1 Fluorescence intensity of C6 solution

C6 (ng/mL)	1	5	10	20	50	100
Height	1.133	2.697	4.119	7.432	18.723	37.631

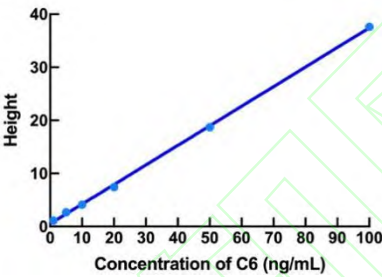


图 2 C6 标准曲线

Fig.2 Standard curve of C6

2.2.2 PCL 胶束载药量

共考察了 3 批样品，获得冻干胶束质量及其中 C6 含量如表 2 所示。根据公式：胶束的载药量 = $\frac{\text{测定的 C6 含量}}{\text{胶束的总质量}} \times 100\%$ ，可得 3 批样品胶束的载药量分别为 0.046%，0.045% 以及 0.047%。由结果可知，在该工艺下，胶束的载药量波动不大，平均载药量为 0.046%，制备工艺稳定，能够为后续纯化方法的评价提供科学依据。

表 2 三批冻干胶束质量及 C6 含量 (n=3)

Tab. 2 The batch quality and C6 content of three batches of lyophilized micelles (n=3)

	Batch No.1	Batch No.2	Batch No.3
Weight of Micelles (mg)	3.523	3.159	3.490
Content of C6 (μg)	1.634	1.436	1.642

2.3 纯化效果评价

2.3.1 超滤法

将制得的胶束用超滤管连续纯化 4 次，对收集的滤出液 I、 II、 III、 IV 进行 Tfn 含量检测，结果见表 3。对浓缩液 a、 b、 c、 d 进行 Tfn 含量测定和 C6 含量测定，并计算

Tfn/C6 的浓度比例，结果见表 4。由结果可知，对于高密度修饰的 Tfn/PCL_高组，滤过 2 次后，滤出液中基本检测不出 Tfn 的存在，同时结合上清液中 Tfn/C6 比值的变化可知，纯化 2 次后，Tfn/C6 比值基本保持不变，可知纯化完全。而对于低密度修饰的 Tfn/PCL_低组，滤过 1 次后，滤出液中检测不出 Tfn 的存在，上清液中 Tfn/C6 的比值基本保持不变，可知离心 1 次后，即可纯化完全。

表 3 超滤法滤出液中 Tfn 含量 (mg/mL)

Tab. 3 Content of Tfn in the filtrate obtained by ultrafiltration method (mg/mL)

Filtrate	Tfn/PCL _{High}	Tfn/PCL _{Low}
I	3.964	0.029
II	0.013	--
III	--	--
IV	--	--

表 4 超滤法浓缩液中 Tfn 含量、C6 含量、Tfn/C6 比值

Tab. 4 Content of Tfn, C6, and the Tfn/C6 ratio in the concentrate obtained by ultrafiltration method

Concentrate	a	b	c	d
Tfn (mg/mL)	27.256	30.255	30.824	31.608
Tfn/PCL _{High}	C6 (μg/mL)	1.144	1.282	1.308
	Tfn/C6	23.825	23.600	23.566
Tfn/PCL _{Low}	Tfn (mg/mL)	9.407	8.227	8.005
	C6 (μg/mL)	2.744	2.405	2.339
	Tfn/C6	3.428	3.421	3.422

注：*** $P<0.001$ vs supernatant a.

2.3.2 葡聚糖凝胶法

将同一批待纯化的 Tfn 修饰胶束，取 40 μL 按 1.3.3.2 项下操作，进行纯化。对收集的滤出液 1、2、3、4 进行 Tfn 和 C6 含量检测，并计算比值。结果见表 5。由结果可知，对于高密度修饰的 Tfn/PCL_高组，滤过 2 次后，滤出液中 Tfn/C6 比值基本保持不变，可初步确定纯化完全，这与超滤法现象一致。有趣的是，对于低密度修饰的 Tfn/PCL_低组，葡聚糖凝胶法与超滤法存在明显不同的现象：葡聚糖凝胶法中，4 次滤液中的 Tfn/C6 的比值变化呈略上升趋势，滤过 3 次后，该比值才趋于基本稳定。Tfn/C6 比值滤过 1 次（3.510）和滤过 4 次（3.571）存在显著性差异（ $t=2.917$ ， $P=0.0434$ ），这一现象引起注意，因此该研究拟通过计算胶束表面 Tfn 的修饰密度来进一步判断。根据胶束的载药量，以及测得的 C6 和 Tfn 的浓度，通过下述公式计算胶束表面 Tfn 的修饰密度。t

$$\text{Tfn}\% = \frac{C_{\text{Tfn}}/80000}{\left(\frac{C_{\text{C}_6}}{0.00046} - C_{\text{C}_6}\right)/7000} \times 1000 \times 100\%$$

结果如表 6 所示。由结果可知，两种纯化方法相比，无论高密度组还是低密度组胶束，葡聚糖凝胶法纯化所得胶束表面 Tfn 修饰密度均高于超滤法纯化所得纯化胶束，但仅在低密度组该差异较明显，滤过 1 次（14.13）和滤过 4 次（14.38）具有统计学差异（ $t=8.134$ ， $P=0.0002$ ）。

表 5 葡聚糖凝胶法滤出液中 Tfn、C6 含量、Tfn/C6 比值

Tab.5 Content of Tfn, C6, and the Tfn/C6 ratio in the filtrate obtained by sephadex gel method

Filtrate		1	2	3	4
Tfn/PCL _{High}	Tfn (mg/mL)	1339.883	541.452	227.917	94.885
	C6 (μg/mL)	55.882	22.809	9.604	4.002
	Tfn/C6	23.977	23.739	23.731	23.709***
Tfn/PCL _{Low}	Tfn (mg/mL)	201.130	79.908	33.270	14.077
	C6 (μg/mL)	57.306	22.567	9.301	3.942
	Tfn/C6	3.510	3.541	3.577	3.571*

* $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs filtrate 1.

表 6 两种方法纯化的 Tfn/PCL 胶束表面 Tfn 的修饰密度（%）

Tab. 6 Surface modification density of Tfn on Tfn/PCL micelles purified by two methods (%)

Density of Tfn		a/1	b/2	c/3	d/4
Tfn/PCL _{High}	ultrafiltration method	95.94	95.03	94.90	94.91
	sephadex gel method	96.55	95.59	95.56	95.47
Tfn/PCL _{Low}	ultrafiltration method	13.80	13.78	13.78	13.74
	sephadex gel method	14.13	14.26	14.40	14.38***

*** $P<0.001$ vs filtrate 1.

3 讨论

从上述结果可以看出，在当前实验条件下，超滤法和葡聚糖凝胶法的纯化效率相近：在 Tfn 过量情况下（nPCL：nTfn=1：2），两种方法均需要不少于 2 次的纯化操作即可将过量的 Tfn 分离完全；在 Tfn 修饰密度较低的情况下（15%），纯化 1 次即可。在纯化后获得 Tfn 修饰胶束的纯度方面，两种方法存在显著性差异：葡聚糖凝胶法纯化后获得的 Tfn/PCL 胶束表面 Tfn 修饰密度更大，这一差异在低密度 Tfn 修饰的 Tfn/PCL 胶束纯化中表现尤为明显。

分析原因主要是与两种方法的分离纯化原理相关。Tfn 修饰胶束一般根据所需的修饰密度进行投料，Tfn 会稍过量，通过成酰胺反应连接到胶束表面，反应结束后将未反应的 Tfn、其他过量或者反应生成的小分子化合物去除，即得 Tfn 修饰的纳米递送系统^[8]。超滤法的原理是膜分离截留技术^[13]，利用待分离纯化物质的分子量差异，截留溶液中的大分子物质，将相对分子量小的物质滤过除去。而葡聚糖凝胶法利用分子排阻色谱原理^[14]，小分子物质可自由进入凝胶内部而被截留，大分子物质因不能进入凝胶内部，则很快通过滤柱而进入滤出液中。Tfn/PCL 胶束随着表面 Tfn 修饰密度的不同，分子大小存在差异。超滤法的膜截流技术

对于该差异不敏感,尤其在低密度 Tfn/PCL 胶束的分离纯化中,对于修饰的和未经修饰的胶束均会截留,所得产物为 Tfn 修饰和未修饰两种 PCL 胶束的混合物;而葡聚糖凝胶法分离的原理是利用分子在凝胶柱中的移动速率的差异,因此,随着通过葡聚糖凝胶柱纯化次数的增多, Tfn 修饰的 PCL 胶束的比例会相应增加,表现在 Tfn 修饰密度上,即 Tfn 修饰密度呈现增加趋势。两种方法在高密度 Tfn/PCL 胶束的纯化中差异不明显,而在低密度 Tfn/PCL 胶束的纯化中表现出明显差异。葡聚糖凝胶法分离所得的 Tfn/PCL 胶束与超滤法获得的胶束相比,前者纯度较高。

另外,从操作以及成本等方面来看,超滤法操作相对更为简单便捷,但超滤管价格相对昂贵,理论上不可重复利用,浓缩后会有部分胶束残留在膜上,收集不完全。葡聚糖凝胶法操作相对复杂,但价格相对便宜,且一定程度上可重复利用葡聚糖凝胶。

文献^[15]报道,给药系统表面配体的修饰密度对于主动靶向药物递送系统的靶向效率具有显著影响^[15]。本文以自制的 Tfn 修饰的胶束为研究对象,考察比较了两种纯化方法——超滤法和葡聚糖凝胶法,二者的纯化效率相近,但葡聚糖凝胶法纯化后获得的 Tfn/PCL 胶束更纯,表面 Tfn 修饰密度更大,这一差异在 Tfn/PCL_低胶束纯化中表现尤为明显。本文的研究结果,将为今后 Tfn 修饰的纳米药物递送系统的设计,以及诸如此类的配体修饰的纳米递送系统的构建提供参考。

参考文献

- [1] Manzari M T, Shamay Y, Kiguchi H, et al. Targeted drug delivery strategies for precision medicines[J]. *Nat Rev Mater*, 2021, 6(4): 351-70. doi: 10.1038/s41578-020-00269-6.
- [2] Li J, Wang Q, Xia G, et al. Recent advances in targeted drug delivery strategy for enhancing oncotherapy[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(9): 2233. doi: 10.3390/pharmaceutics15092233.
- [3] Kawabata H. Transferrin and transferrin receptors update[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 46-54. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037.
- [4] 钟志容, 何 勤, 刘 戟. 转铁蛋白及其受体作为药物载体的研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*, 2006, 23(10): 676-80.
- [4] Zhong Z R, He Q, Liu J. A survey of studies on drug delivery of transferrin and transferrin receptor[J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2006, 23(10): 676-80.
- [5] Ponka P, Lok C N. The transferrin receptor: role in health and disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31(10): 1111-37. doi: 10.1016/s1357-2725(99)00070-9.
- [6] Yari H, Gali H, Awasthi V. Nanoparticles for targeting of prostate cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(42): 5393-

413. doi: 10.2174/1381612826666200721001500.

[7] Zhang D, Zhang S, Shan B, et al. Preparation of transferrin-modified IR820-loaded liposomes and its effect on photodynamic therapy of breast cancer[J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 611. doi: 10.1007/s12672-024-01486-z.

[8] Gabold B, Adams F, Brameyer S, et al. Transferrin-modified chitosan nanoparticles for targeted nose-to-brain delivery of proteins[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2023, 13(3): 822-38. doi: 10.1007/s13346-022-01245-z.

[9] 容 静, 刘彤彤, 尹秀娟, 等. 脂质纳米颗粒共载 miR-145/CPT 肝癌靶向共递送及磁共振成像的初步研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(9): 1501-8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.002.

[9] Rong J, Liu T T, Yin X J, et al. Co-loaded with miR-145/CPT nanoparticles for targeted delivery and magnetic resonance imaging in hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(9): 1501-8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.002.

[10] Hong M, Zhu S, Jiang Y, et al. Efficient tumor targeting of hydroxycamptothecin loaded PEGylated niosomes modified with transferrin[J]. *J Control Release*, 2009, 133(2): 96-102. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.09.005.

[11] Wei Y, Gu X, Sun Y, et al. Transferrin-binding peptide functionalized polymersomes mediate targeted doxorubicin delivery to colorectal cancer *in vivo*[J]. *J Control Release*, 2020, 319: 407-15. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.01.012.

[12] Kursu M, Walker G F, Roessler V, et al. Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer[J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14(1): 222-31. doi: 10.1021/bc0256087.

[13] Toma C M, Imre S, Vari C E, et al. Ultrafiltration method for plasma protein binding studies and its limitations[J]. *Processes*, 2021, 9(2): 382. doi: 10.3390/pr9020382.

[14] Tayyab S, Qamar S, Islam M. Size exclusion chromatography and size exclusion HPLC of proteins[J]. *Biochem Educ*, 1991, 19(3): 149-52. doi: 10.1016/0307-4412(91)90060-L.

[15] Guo Z, He B, Jin H, et al. Targeting efficiency of RGD-modified nanocarriers with different ligand intervals in response to integrin $\alpha_v\beta_3$ clustering[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(23): 6106-17. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.031.