[文章编号] 1003－4684(2025)04-0069-07

复合凝聚法制备包载雷公藤红素的明胶微囊

叶 露[1]，叶 璠[1]，陈 雪[1]，张雨轩[1]，苏江涛[1]，巴 赫[2]

(1 湖北工业大学生物工程与食品学院，湖北 武汉 430068；2 武汉人福药业有限责任公司，湖北 武汉 430205)

[摘 要] 利用复合凝聚技术，制备带有相反电荷的还原乙二胺化硫辛酸明胶和丁二酰氨基苯硼酸明胶的载药明胶微囊，旨在包载疏水性药物——雷公藤红素。通过迈克尔加成技术，将雷公藤红素与还原乙二胺化硫辛酸明胶结合，形成聚合物前药；利用含顺式二醇的前药与带负电的丁二酰氨基苯硼酸明胶形成稳定的硼酸酯键，从而通过共价键的方式将药物结合到明胶上。最后，采用戊二醛作为交联剂，进一步硬化微囊外壳。对微囊的粒径、形态、包封率和载药量进行了研究，并通过傅里叶变换红外光谱确认微囊的结构。实验结果显示，载药明胶微囊在基质金属蛋白酶(MMP)的作用下可以释放约 70％的雷公藤红素。细胞毒性实验证实，载药明胶微囊对药物的释放具有一定的细胞选择性，不仅保留了雷公藤红素对肿瘤细胞的活性，还有效降低了对正常细胞的毒性。这一研究为雷公藤红素在富含 MMP 酶的环境中的应用提供了新的可能性。

[关键词] 复合凝聚；明胶；雷公藤红素；基质金属蛋白酶

[中图分类号] R944 [文献标识码] A

微胶囊化技术是一种将固体、液体或气体(核心物质)巧妙包裹在聚合物材料(即壁或壳)的连续基质中，形成直径介于 1～100 μm 之间的微小球体的技术[1-2]。这一技术通过将天然生物活性化合物精心包裹，有效防止其在各种加工和储存条件下发生降解[3]，并精准控制包衣材料的释放，进而提升生物利用度[4]。因此，微胶囊技术在生物活性物质的包装和防护领域展现出了广阔的应用前景[5]。

复合凝聚过程中，带电大分子间的静电相互作用会促使凝聚体的形成和相分离[6]。这项技术不仅具有高达 99％的有效载荷和高包封率，还具备相对较低的加工成本优势[7]，因此，在制药[8]、食品配料、农业、养殖业、纺织品和电子产品等各行业得到了广泛应用。在复合凝聚过程中，有多种生物聚合物可供选择，其中明胶(GA)因其出色的结构和功能特性，成为最广泛使用的蛋白质来源。然而，聚合物层间存在的离子相互作用往往导致蛋白质凝聚体的机械性能相对较差[9]。为了提升控释性能、机械性能、pH 稳定性、离子强度以及高温稳定性，可以添加交联剂戊二醛(GLU)。戊二醛通过与蛋白质的游离氨基反应，形成共价键[10]，从而有效增强蛋白质的结构稳定性。

复合凝聚技术可用于装载活性药物成分，以实现控释应用[11]。雷公藤红素(CE)是从雷公藤根中提取的有效成分。体外和体内研究均表明，雷公藤红素可抑制黑色素瘤等多种癌症[12]。尤其是，雷公藤红素含有一种独特的迈克尔受体结构，该结构被认为能与其细胞内靶点 S 形成迈克尔加合物，从而在其生物学特性中发挥关键作用[13]。本研究以雷公藤红素作为药物模型，利用迈克尔加成反应原理，将药物嫁接到带正电的明胶衍生物侧链上，成功制备出聚合物前药。同时，加入带负电的明胶衍生物以稳定前药结构，并通过加入交联剂戊二醛(GLU)进行微胶囊外壳的固化处理。通过明胶衍生物将雷公藤红素进行微胶囊化，不仅改善了药物在水溶液中的分散性，还显著降低了药物对正常细胞的毒性，同时保证了其抗肿瘤效果。该一技术有望为制药工业中疏水药物应用提供一种有效的载体[14]。

1 实验

1.1 主要试剂

B 型明胶(GA)、丁二酸酐、3-氨基苯硼酸、乙二胺等，购于国药集团化学试剂有限公司(分析纯)；硫辛酸(LA)、噻唑蓝(MTT)，购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司(分析纯)；雷公藤红素，购于中科院武汉植物园(HPLC＞99％)；1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)，购于苏州昊凡生物科技有限公司(化学

[收稿日期] 2023－10－07

[第一作者] 叶 露(1999－)，女，湖北宜昌人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为新型药物制剂的开发。

[通信作者] 苏江涛(1978－)，男，湖北宜昌人，湖北工业大学教授，研究方向为新型药物制剂的开发。

纯)；三(2-羧乙基)磷(TCEP)，购于罗恩试剂(HPLC＞98%)；胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素(双抗)、RPMI-1640 培养液、MEM 培养液，购于翌圣生物科技股份有限公司(生物制剂)。其他试剂为市售分析纯或色谱纯试剂。

1.2 明胶载体制备

1.2.1 合成丁二酰氨基苯硼酸(BPOA) 参照文献[15]的方法，进行如下实验操作：称取 7.75 g 3-氨基苯硼酸和 5 g 丁二酸酐，将其溶于 40 mL 无水吡啶中。随后，在常温下混合溶液反应 12 h，之后对反应液进行浓缩处理。加入浓缩液 10 mL 冰丙酮中，冷藏 12 h，之后将混合物复溶，并用盐酸将 pH 调至 1.0。在冰浴条件下析出白色固体。过滤收集白色固体，并在沸水中进行重结晶，最终得到类白色针状物，即目标产物丁二酰氨基苯硼酸(BPOA)。

1.2.2 制备丁二酰氨基苯硼酸明胶(GBA) 称取 1.2506 g GA 和 1.002 g BPOA，分别将其溶于 100 mL 60% 乙醇中。向 BPOA 溶液中加入 1.5506 g EDC 和 1.0016 g NHS，室温下反应 15 min，活化羧基。将明胶溶液和活化的 BPOA 溶液混合反应 12 h。反应结束后，用无水乙醇析出类白色沉淀物，复溶沉淀物，冷冻干燥后即得白色固体丁二酰氨基苯硼酸明胶(GBA)。GBA 的合成机理如图 1 所示。

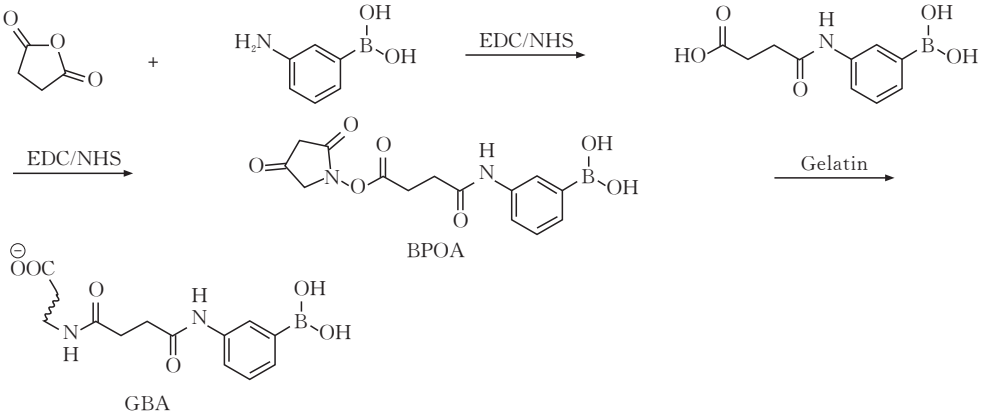


图 1 GBA 的合成机理

1.2.3 制备硫辛酸明胶(GLA) 称取 0.5 g GA 和 0.52 g LA，将其分别溶于 20 mL 60%乙醇溶液中。用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 LA 溶液 pH 至6.0 左右。之后，加入 0.62 g EDC 和 0.4 g NHS，室温下反应 25 min，以活化羧基。将明胶溶液和活化的 LA 溶液混合反应 16 h。反应结束后，用无水乙醇析出类白色沉淀，复溶沉淀物，经冷冻干燥后即得白色固体硫辛酸明胶(GLA)。

1.2.4 制备乙二胺化硫辛酸明胶(E-GLA) 称取 1 g GLA，并将其溶于 pH＝5.0 的磷酸盐缓冲液中，随后滴加 3 mL 乙二胺溶液，并调混合液 pH 值至 5.0。称取 2.146 g EDC 加入混合溶液中反应 24 h，反应结束后透析 72 h。透析结束后，产物经冷冻干燥，得到白色固体乙二胺化硫辛酸明胶(E-GLA)。

1.2.5 还原乙二胺化硫辛酸明胶(GLA-SH) 称取 0.3 g E-GLA，并将其溶于 50 mL、浓度为 0.2 mol/L、pH＝5.0 的磷酸盐缓冲液中。持续搅拌的同时，加入已用 10 mL 超纯水溶解的 0.1 g TCEP。随后，立即通入氮气，在无氧条件下反应 24 h。反应结束后，使用 pH＝3.0 的缓冲液透析处理 48 h，透析结束后，经冷冻干燥获得白色固体产物，即还原乙二胺化硫辛酸明胶(GLA-SH)。GLA 及其衍生物的合成机理如图 2 所示。

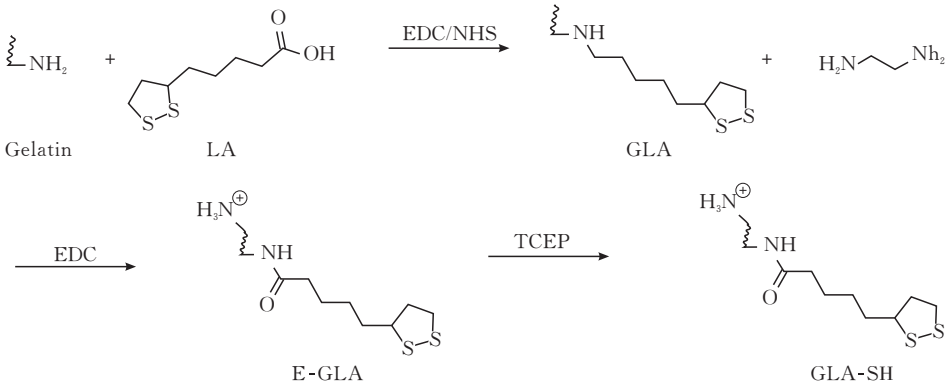


图 2 GLA 及其衍生物的合成机理

1.3　载药明胶微囊制备

先称取 10 mg GLA-SH，并将其溶于 1 mL 浓度为 0.2 mol/L、pH＝5.0 的磷酸盐缓冲液中，再加入 0.25 mL 浓度为 4 mol/L、以大豆油为溶剂雷公藤红素溶液[16]，边搅拌边滴加 1 mol/L 的 NaOH 溶液，直至溶液完全褪色。

接着，称取 20 mg GBA，并将其溶于 2 mL 浓度为 0.2 mol/L、pH＝5.0 的磷酸盐缓冲液中。将此溶液加入到之前的混合溶液中，并继续滴加 1 mol/L的 NaOH 溶液，调节溶液 pH 值至 8.2～8.8范围内。

之后，向反应液滴加 300 μL GLU 溶液，低温反应 24 h。反应结束后，通过离心过滤收取浅粉色固体，并用水洗至无醛味，同时收集水洗溶液。

最后，将固体阴干[17]，即得载药明胶微囊，低温储存备用。对于空载明胶微囊以及未交联载药明胶微囊的制备，除不加 CE 和 GLU，其余步骤均与明胶微囊制备步骤相同。

1.4　明胶微囊表征

1.4.1　颗粒大小和形态的测定　利用 LT2200E 激光粒度分析仪（真理光学）对载药明胶微囊进行动态光散射，以测量其颗粒大小（D50）。测量前，通过涡流振荡将载药明胶微胶囊均匀分散在超纯水中。交联以及未交联载药明胶微胶囊的形态，通过 ST10 光学显微镜（尼康仪器）可视化。光学显微镜图像采集使用配备的相机拍摄，水为流动相。

1.4.2　包封率和载药量的测定　取一次制备的载药明胶微囊均匀分散于 5 mL 乙醇中，轻摇即可回收明胶微囊的表面 CE。然后 5000 r/min 离心过滤悬浮液，得到含有表面 CE 的乙醇溶液。制备时洗涤收集的水溶液为水洗涤的 CE 水溶液。称取 50 mg载药明胶微囊加入 2 mL 乙醇中，超声处理 20 min。超声处理过程中，冰浴保持悬浮液温度。之后，将悬浮液离心处理得到上清。沉淀物再进行 2 轮超声和离心处理，收集 3 轮上清，得到含有总 CE 的乙醇溶液。提取总 CE 和表面 CE 的乙醇溶液用乙醇稀释至合适浓度，与水洗涤的 CE 水溶液一同在 425 nm 处测定吸光度建立校准曲线：

$$Y=11.10X-0.00633,\ R^2=0.999$$

式中：X 为 CE 的质量浓度，Y 为 425 nm 处的吸光度。

包封率

$$E_E=(W_f-W_s-W_w)/W_f\times100\%$$

载药量

$$D_L=W_t/50\times100\%$$

其中：W_f 为明胶微囊中加入 的 CE 总量；W_s 和 W_w 为表面 CE 和水洗涤的 CE 的质量；W_t 为 50 mg 载药明胶微囊总 CE 的质量。

1.4.3　傅里叶变换红外光谱（FTIR）分析　在 FTIR 分析前，将 1 mg GLA-SH、GBA 和载药明胶微囊与溴化钾按 1∶50 的质量比用高压钳制成片剂。样品的 FTIR 光由吸收模式下使用 FTIR 光谱仪获得。扫描范围设置为 4 ～4000 cm^{-1}，扫描次数为 64 次。

1.5　体外药物释放研究

按 2020 年版《中国药典》（四部）附录桨法测定载药明胶微囊的体外释药率[18]。由于明胶微囊对基质金属（MMP）酶响应释放，配置含 400 u/mL Ⅳ型 MMP 酶的 pH＝7.4 的磷酸盐缓冲液。精密称取载药明胶微囊 150 mg 装入 3500 ku 透析袋中，分别加入 7.5 mL 含 MMP 酶的 pH＝7.4 的磷酸盐缓冲液和不含 MMP 酶的 pH＝7.4 的磷酸盐缓冲液，以含 0.5％吐温 80 和 10％乙醇的 pH＝7.4 磷酸盐缓冲液为释放递质，加热待温度稳定在 37±0.5℃时，调节转速为 50 r/min。分别于 1、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 吸取释放液 1 mL，并补加等量等温的磷酸缓冲液。释放液用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过，以释放递质为空白，于 425 nm 处测定吸光度，计算得出微囊累积释放百分率（n＝3）。

1.6　细胞毒性试验

采用 MTT 法测定载药明胶微囊对小鼠黑色素瘤细胞（B16F10）和人类永生化表皮细胞（HaCat）的抗增殖活性。实验中，载药明胶微囊的 CE 梯度浓度分别设定为 0、0.39、0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50 μmol/L。再运用 MTT 法测定 CE 对 B16F10 细胞和 HaCat 细胞的抗增殖活性。细胞培养条件与载药明胶微囊组保持一致，CE 浓度则调整为 0、0.16、0.31、0.63、1.25、2.50、5.00、10.00 μmol/L。用酶标仪测定 490 nm 处吸光度（OD 值）。重复测定 3 次。此外，利用 MTT 法测定空载明胶微囊对 HaCat 细胞的抗增殖活性，空载明胶微囊浓度分别设定为 0、1.17、2.34、4.69、9.38、18.75、37.5、75、150 mg/mL。最后，根据下式计算药物对各细胞的抑制程度：

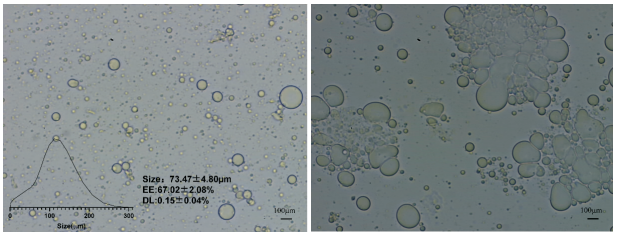
$$\text{细胞存活率}=\frac{\text{加药组 OD}_{490}}{\text{对照组 OD}_{490}}\times100\%$$

2　结果与讨论

2.1　明胶微囊的合成与表征

按上述实验方法制备了戊二醛交联的载药明胶微囊以及未交联载药明胶微囊，运用电子显微镜观察这两种物质的形态。由图 3 可见，在电子显微镜下（4×40），相较于未交联明胶微囊不规则且聚集的

网状结构(图 3b),载药明胶微囊(图 3a)的形态呈现出规则且相对独立的球形微囊,其平均粒径为73.47±4.8 μm,包封率和载药量分别为(67.02±2.08)%和(0.15±0.04)%。这种结构可能归因于戊二醛硬化明胶微囊外壳阻止了微囊与微囊之间发生的复杂凝聚。也由于规则的球形微囊的形成,使得明胶微囊可在水溶液中均匀分散。观察明胶微囊水溶液(图 3c-1)可以发现,载药明胶微囊可以在水溶液中均匀分散,对比雷公藤红素水溶液(图 3c-2)没有表现出特有的红棕色,表明 CE 通过迈克尔加成反应嫁接到带正电的 GLA-SH 侧链上形成聚合物前药的过程中,其长共轭结构被破坏[19],导致红棕色消失。



(a)载药明胶微囊的尺寸及分布　(b)未交联明胶微囊的尺寸及分布



(c)1-载药明胶微囊水溶液; 2-雷公藤红素水溶液

图 3　明胶微囊电子显微图像及水溶液形态

FT-IR(傅里叶变换红外光谱)作为一种广泛应用的分析技术,在检测结构变化、确认官能团间的络合物形成及化学相互作用方面发挥着重要作用[20]。如图 4 所示,1630 cm^{-1} 处的吸收峰为酰胺基团的 C=O伸展,1539 cm^{-1} 处的吸收峰为酰胺基团的 N-H 变形,这两个峰证明了酰胺键的形成。GBA 链上 1398 cm^{-1} 处 B-O 结构的拉伸震动,证明 BPOA 成功连接上明胶链,以及 GBA 链和 GLA-SH 链在 FT-IR 上的差异,确认明胶载体由两种不同明胶衍生物(GLA-SH 和 GBA)构成。在 1380 cm^{-1}、1162 cm^{-1} 和 1095 cm^{-1} 处观察到的峰是由于硼酸酯键的 B-C、C-O 和 B-O 的伸缩,而 729 cm^{-1} 的振动模式进一步证实了硼酸酯键的形成[21]。这些峰的存在证明了 CE 经过 GLA-SH 硫醇修饰其 C-6 位点后,原先的甲基醌结构已经转变为邻苯二酚结构,并且这种衍生物与硼酸之间形成了硼酸酯键,从而实现了 CE 在明胶上的成功嫁接。此外,1749 cm^{-1} 处的吸收峰对应于-CHO(醛基)的伸缩振动,而 2928 cm^{-1} 处的吸收峰则代表了醛基的 C-H 伸缩振动。这两处峰的存在证明了交联剂戊二醛(GLU)已经成功引入到体系中。

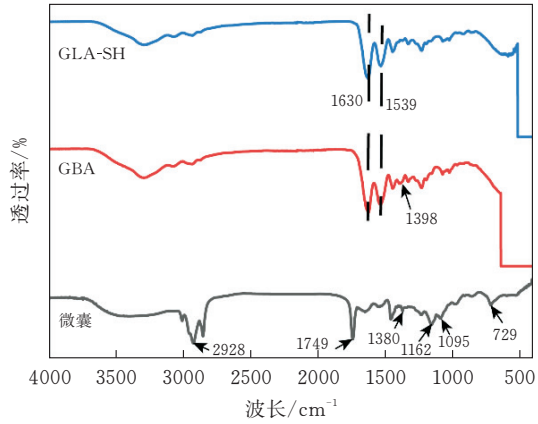


图 4　GLA-SH、GBA 和载药明胶微囊的 FT-IR 光谱

2.2　体外药物释放研究

在含Ⅳ型 MMP 酶 pH=7.4 的条件下,测定了明胶微囊释放 CE 的机制,释药曲线如图 5 所示。明胶微囊的爆发释放发生在初始时间点,约 50%的 CE 在 1 h 内释放,48 h 后逐渐释放至约 70%。与无 MMP 酶参与相比,明胶微囊在 MMP 酶环境中 CE 释放程度远大于其本身。这可能是由于明胶微囊中的 CE 通过迈克尔加成反应嫁接到带正电的 GLA-SH 侧链上形成 C(6)-S 类衍生物,而带负电的 GBA 侧链上的苯硼酸基团可以与含顺式二醇的 C(6)-S 类衍生物可逆结合,在中性条件下与二醇基团高亲和力结合,形成坚固的硼酸酯键[22-23],并经带相反电荷的大分子聚合物发生复合凝聚,将 CE 包裹,且交联剂 GLU 对微囊外壳进一步硬化,改善了载药制剂的控释性能、机械性能和 pH 稳定性。而 MMP 酶能作用于明胶[24-25],能降解蛋白成分,促进明胶微囊中 CE 的释放。

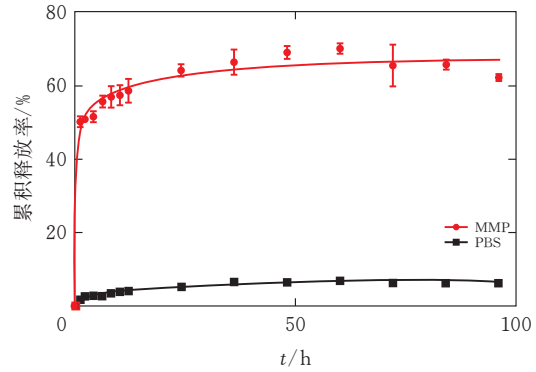
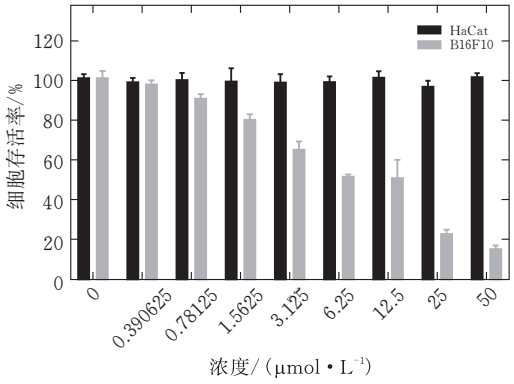


图 5　载药明胶微囊的体外释药量

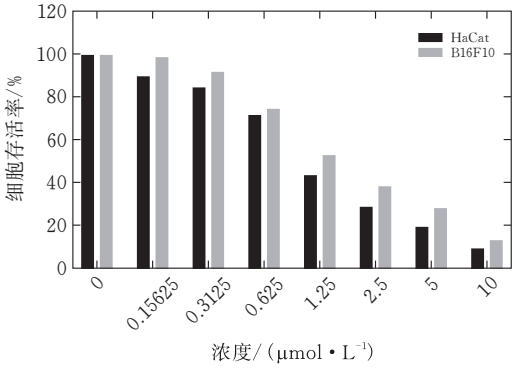
2.3　细胞毒性试验

载药明胶微囊对 B16F10 黑色素瘤细胞和 HaCat 人皮肤角质形成细胞的抗增殖活性如图 6

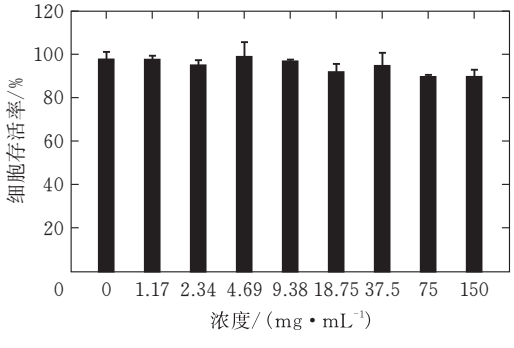
所示。



(a)载药明胶微囊对 HaCat 细胞和 B16F10 细胞存活率的影响



(b)BR 对 HaCat 细胞和 B16F10 细胞存活率的影响



(c)空载明胶微囊对 HaCat 细胞细胞存活率的影响

图 6　微囊对 B16F10 细胞和 HaCat 细胞存活率的影响

图 6a 展示了载药明胶微囊对 B16F10 细胞活力的显著抑制效果，这种抑制效果明显强于对正常皮肤细胞 HaCat 的抑制。通过 GraphPad Prism 软件计算得出的载药微囊对 B16F10 细胞的 IC50 值为 6.573 μmol/L。这一数值之所以低于直接应用 CE 对 B16F10 细胞的 IC50 值 1.088 μmol/L(图 6b)，是因为 CE 原药主要通过自由扩散方式直接进入肿瘤细胞内部，迅速发挥其抑制细胞增殖的作用。而载药明胶微囊则需要依赖基质金属蛋白酶(MMP)对明胶骨架的降解来释放药物，这一过程相对缓慢，且 CE 是通过共价键连接在明胶微囊上，其释放速率和效率受到一定限制。这些因素共同导致了载药微囊对 B16F10 细胞的 IC50 值高于 CE 原药。由图 6a 也可看出，载药明胶微囊对 HaCat 细胞没有显著的细胞毒性，表现出了一定的减毒效果，提高了药物安全范围。如图 6c 所示，在 0～150 mg/mL 的浓度范围内，空载明胶微囊对 HaCat 细胞没有表现出显著的细胞毒性，表明空载明胶微囊具有优秀的细胞相容性，是一种理想的聚合物载体材料。

3　结论

采用复合凝聚技术，成功地将雷公藤红素(CE)封装于携带不同电荷的明胶衍生物中，构建出微胶囊体系。通过迈克尔加成反应，将 CE 与带有正电荷的 GLA-SH 侧链上硫醇化合物结合，生成聚合物前药。该前药凭借其邻苯二酚结构，与携带负电荷的 GBA 侧链上的苯硼酸基团发生反应，形成稳定的硼酸酯键，从而实现了 CE 与明胶侧链之间的共价连接。为进一步增强微囊的稳定性，引入了交联剂戊二醛(GLU)对微囊外壳进行硬化处理。

1)所制备的载药明胶微囊展现出规则的球形形态，且能在水溶液中均匀分散。其粒径分布均匀，平均粒径为 73.47±4.8 μm。此外，该微囊体系具有较高的包封率((67.02±2.08)%)和适宜的载药量(0.15±0.04)%)，这为实现药物的有效递送提供了有力保障。

2)明胶作为一种天然聚合物，由胶原部分水解而成，具有低成本、优异的生物相容性和生物降解性。特别地，明胶能被 MMP 酶降解，而在大多数癌症微环境中，MMP 酶的过度表达是正常组织的 5～7 倍。为了验证明胶的酶响应性，在含有Ⅳ型 MMP 酶的条件下对载药明胶微囊的 CE 释放机制进行了测定。结果显示，在 MMP 酶的作用下，明胶骨架发生降解，从而释放了约 70%的雷公藤红素。这进一步证实了明胶微囊的酶响应性释放特性。

3)在细胞实验方面，考察了载药明胶微囊对小鼠黑色素瘤细胞(B16F10)和人类永生化表皮细胞(HaCat)的抗增殖活性。结果表明，该微囊体系对药物的释放具有一定的细胞选择性，能够在保证对肿瘤细胞具有良好抗增殖活性的同时，降低对正常细胞的毒性，从而提高了雷公藤红素应用的安全性。

[参 考 文 献]

[1] SHARIF N, KHOSHNOUDI-NIA S, JAFARI S M. Nano/microencapsulation of anthocyanins: a systematic review and meta-analysis [J]. Food Research Inter-

national, 2020, 132: 109077.

[2] CHOUDHURY N, MEGHWAL M, DAS K. Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods [J]. Food Frontiers, 2021, 2(04): 426-442.

[3] SZLISZKA E, CZUBA Z P, DOMINO M, et al. Ethanolic Extract of Propolis (EEP) Enhances the Apoptosis- Inducing Potential of TRAIL in Cancer Cells [J]. Molecules, 2021, 14(02): 738-754.

[4] OZKAN G, FRANCO P, DE MARCO I, et al. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications [J]. Food Chemistry, 2019, 272: 494-506.

[5] HUANG K, YUAN Y, BAOJUN X. A critical review on the microencapsulation of bioactive compounds and their application [J]. Food Reviews International, 2021, 39(05): 2594-2634.

[6] XIAO Z, LIU W, ZHU G, et al. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(08): 1482-1494.

[7] TIMILSENA Y P, AKANBI T O, KHALID N, et al. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 1276-1286.

[8] LI Y, LIANG M, DOU X, et al. Development of alginate hydrogel/gum Arabic/gelatin based composite capsules and their application as oral delivery carriers for antioxidant [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 1090-1097.

[9] GHARIBZAHEDI S M T, GEORGE S, GREINER R, et al. New trends in the microencapsulation of functional fatty acid-rich oils using transglutaminase catalyzed crosslinking [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2018, 17 (02): 274-289.

[10] SHENVI S, ISMAIL A F, ISLOOR A M. Preparation and characterization study of PPEES/chitosan composite membrane crosslinked with tripolyphosphate [J]. Desalination, 2014, 344: 90-96.

[11] CALDERóN-OLIVER M, PEDROZA-ISLAS R, ESCALONA-BUENDÍA H B, et al. Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 62: 49-57.

[12] GUO L, ZHANG Y, AL-JAMAL K T. Recent progress in nanotechnology-based drug carriers for celastrol delivery [J]. Biomaterials Science, 2021, 9(19): 6355-6380.

[13] SU D, WEI R Y, YAN Z M, et al. Design, synthesis, and evaluation of antitumor activity of novel C-6 sulfhydryl-substituted and 20-substituted derivatives of celastrol [J]. Chemical Biology & Drug Design, 2023, 102(02): 316-331.

[14] LIU Q, CUI H, MUHOZA B, et al. Mild Enzyme-Induced Gelation Method for Nanoparticle Stabilization: Effect of Transglutaminase and Laccase Cross-Linking [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(04): 1348-1358.

[15] WANG Y, REN J, LIU Y, et al. Preparation and evaluation of folic acid modified succinylated gelatin micelles for targeted delivery of doxorubicin [J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2018, 46: 400-407.

[16] GONG T, TAN T, ZHANG P, et al. Palmitic acid-modified bovine serum albumin nanoparticles target scavenger receptor-A on activated macrophages to treat rheumatoid arthritis [J]. Biomaterials, 2020, 258: 120296.

[17] 余琰,范凌云,高建德,等. 盐酸小檗碱微囊的制备及其体外释放研究 [J]. 中国药房, 2015,26: 109-112.

[18] 王燕萍, 张虹. 维生素 C 微囊缓释片的制备及体外释放度实验 [J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25: 1023-1024.

[19] TANG K, HUANG Q, ZENG J, et al. Design, synthesis and biological evaluation of C(6)-modified celastrol derivatives as potential antitumor agents [J]. Molecules, 2014, 19(07): 10177-10188.

[20] PARK C, VO C L-N, KANG T, et al. New method and characterization of self-assembled gelatin-oleic nanoparticles using a desolvation method via carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) reaction [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015, 89: 365-373.

[21] ŞEKÜRE YILDIRIM H A A Z Ç. Synthesis of glucose/fructose sensitive poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate particles with novel boronate ester bridge crosslinker and their dye release applications [J]. Acta Chimica Slovenica, 2022,69: 30-38.

[22] GENNARI A, GUJRAL C, HOHN E, et al. Revisiting boronate/diol complexation as a double stimulus-responsive bioconjugation [J]. Bioconjugate Chemistry, 2017, 28(05): 1391-1402.

[23] LIU J, ZHENG Z, LUO J, et al. Engineered reversible adhesive biofoams for accelerated dermal wound healing: Intriguing multi-covalent phenylboronic acid/cis-diol interaction [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2023, 221: 112987.

[24] GUO F, FU Q, JIN C, et al. Dual functional matrix metalloproteinase-responsive curcumin-loaded nanop-

articles for tumor-targeted treatment [J]. Drug Delivery, 2019, 26(01): 1027-1038.

[25] HE L, FAN D, LIANG W, et al. Matrix metalloproteinase-responsive PEGylated lipid nanoparticles for controlled drug delivery in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. ACS Applied Bio Materials, 2020, 3(05): 3276-3284.

Preparation of Gelatin Microcapsules Encapsulating Celastrol by Composite Coalescence Method

YE Lu [1], YE Fan[1], CHEN Xue[1], ZHANG Yuxuan[1], SU Jiangtao[1], BA He[2]

(1 *School of Biological Engineering and Food, Hubei Univ. of Tech., Wuhan* 430068, *China*;
2 *Wuhan Renfu Pharmaceutical Co, Ltd, Wuhan* 430205, *China*)

Abstract: Drug-carrying gelatin microcapsules of reduced ethylenediaminated lipoic acid gelatin (GLA-SH) and butanediaminobenzeneboronic acid gelatin (GBA) with opposite charges were prepared using composite coalescence technique for encapsulation of the hydrophobic drug celastrol (CE). The Michael addition technique was used to combine celastrol (CE) with reduced ethylenediaminated lipoic acid gelatin (GLA SH) to form a polymeric prodrug, and the cis-diol-containing prodrug was combined with negatively charged butanediaminophenylboronic acid gelatin (GBA) to form a stable borate ester bond, which resulted in the incorporation of the drug onto gelatin by means of covalent bonding. Finally, glutaraldehyde (GLU) was used as a cross linking agent to harden the microcapsule shell. The particle size, morphology, encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) of the microcapsules were studied and the structure of the microcapsules was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The experimental results showed that the drug loaded gelatin microcapsules could release about 70% of celastrol (CE) in the presence of MMPase. Cytotoxicity experiments demonstrated that the drug carrying gelatin microcapsules were cell selective for the release of the drug, which retained the activity of tretinoin on tumor cells and reduced the toxicity to normal cells. This provides new possibilities for the application of tretinoin in MMP enzyme rich environments.

Keywords: complex coagulation; gelatin; celastrol; MMPase

[责任编校：张　众]