牛膝自组装纳米粒的构建及其抗急性痛风性关节炎研究

杨国春[1,2]，喻　锟[1,2]，冯家超[1]，吴占攀[1]，王万存[1]，杨思影[1,2]，严巧凤[1]，侯安国[1,2*]，金文彬[1,2*]

1. 云南中医药大学中药学院，云南 昆明　650500
2. 云南中医药大学 云南省傣医药与彝医药重点实验室，云南 昆明　650500

摘　要：目的　优化牛膝微沉淀自组装纳米粒（*Achyranthis Bidentatae Radix* micro-precipitation self-assembled nanoparticles，ABR-MP-SAN）的制备工艺，将其与牛膝传统水煎自组装纳米粒（*Achyranthis Bidentatae Radix* decoction self-assembled nanoparticles，ABR-D-SAN）进行比较，并基于网络药理学与动物实验评价其抗急性痛风性关节炎（acute gouty arthritis，AGA）的作用与机制。**方法**　采用微沉淀法制备 ABR-MP-SAN，以单因素实验结合响应面法优化提取时间、磁力搅拌时间、生药质量浓度等工艺参数。对优化后的 ABR-MP-SAN 与 ABR-D-SAN 的表征及多糖、甾酮含量进行比较。利用网络药理学预测 ABR-MP-SAN 抗 AGA 的核心成分、关键靶点及信号通路，并进行分子对接验证。将 C57BL/6 小鼠分为空白组、模型组、秋水仙碱（1 mg/kg）组、ABR-D-SAN（1.82 g/kg）组和 ABR-MP-SAN（1.82 g/kg）组，通过踝关节腔处注射尿酸钠混悬液诱导 AGA 模型，ig 给药 7 d 后，以检测关节肿胀度、步态评分、血清炎症因子、踝关节组织病理变化与白细胞介素-17A（interleukin-17A，IL-17A）、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、核因子-κB p65（nuclear factor-κB p65，NF-κB p65）蛋白表达来评价药效与机制。**结果**　ABR-MP-SAN 最优工艺为牛膝加 10 倍量水回流提取 60 min，滤渣加 10 倍量 75%乙醇提取 60 min，合并 2 次提取液，400 r/min、25 ℃条件下磁力搅拌 25 min，减压除醇后浓缩至 0.2 g/mL。所得 ABR-MP-SAN 呈规则球形，其稳定性、均匀性、多糖和甾酮含量都高于 ABR-D-SAN。网络药理学显示核心成分为山柰酚、黄芩素、β-蜕皮甾酮等，关键靶点为 IL-1β、TNF、IL-6，主要富集于 IL-17、TNF 和 NF-κB 信号通路，分子对接表明核心成分与靶点间具有较强亲和力。动物实验结果显示，与空白组相比，模型组小鼠关节肿胀度、步态评分和血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平均明显上升（$P<0.001$），踝关节出现明显病理损伤，IL-17A、TNF-α、NF-κB p65 阳性表达显著升高（$P<0.01$、0.001）；与模型组相比，给药组中上述情况均得到改善，且 ABR-MP-SAN 组效果明显优于 ABR-D-SAN 组。**结论**　微沉淀法制备得到的 ABR-MP-SAN 粒径小、稳定性好且分布均匀，其抗 AGA 疗效好，机制可能与抑制 IL-17/NF-κB 和 TNF/NF-κB 信号通路、减轻炎症反应有关。

关键词：牛膝；自组装纳米粒；工艺优化；急性痛风性关节炎；网络药理学；白细胞介素-17A；核因子-κB；肿瘤坏死因子-α；炎症反应

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2026)21 - 8484 - 15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.21.009

Formation of self-assembled nanoparticles of *Achyranthis Bidentatae Radix* and anti-acute gouty arthritis evaluation

YANG Guochun[1, 2], YU Kun[1, 2], FENG Jiachao[1], WU Zhanpan[1], WANG Wancun[1], YANG Siying[1, 2], YAN Qiaofeng[1], HOU Anguo[1, 2], JIN Wenbin[1, 2]

1. School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China
2. Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective　To optimize the preparation process of *Achyranthis Bidentatae Radix* micro-precipitation self-assembled nanoparticles (ABR-MP-SAN), compare them with ABR decoction self-assembled nanoparticles (ABR-D-SAN), and evaluate their anti-acute gouty arthritis (AGA) effects and mechanisms via network pharmacology and animal experiments. **Methods**　ABR-MP-

收稿日期：2026-06-28

基金项目：云南省傣医药与彝医药重点实验室开放课题（2024SS24077）；云南民族药二次开发关键技术集成及示范项目（202303AC100025）

作者简介：杨国春，女，硕士研究生，研究方向为中药药剂学。E-mail: 1963736501@qq.com

*通信作者：侯安国，男，教授，研究方向为中药制剂技术。E-mail: 1324491101@qq.com

金文彬，男，副教授，研究方向为新药设计与制剂研究。E-mail: 421810873@qq.com

SAN were prepared using a micro-precipitation method. Single-factor experiments combined with response surface methodology were employed to optimize process parameters including extraction time, magnetic stirring time, and crude drug concentration. The optimized ABR-MP-SAN were compared with ABR-D-SAN in terms of characterization, polysaccharide content, and ecdysteroid content. Network pharmacology was used to predict core components, key targets, and signaling pathways of ABR-MP-SAN against AGA, followed by molecular docking validation. C57BL/6 mice were divided into blank group, model group, colchicine (1 mg/kg) group, ABR-D-SAN (1.82 g/kg) group, and ABR-MP-SAN (1.82 g/kg) group. AGA was induced by intra-articular injection of monosodium urate crystals into the ankle joint cavity. After 7 d of intragastric administration, therapeutic efficacy and mechanisms were evaluated by joint swelling degree, gait score, serum inflammatory cytokines, histopathological changes of ankle joint, and protein expression of interleukin-17A (IL-17A), tumor necrosis factor-α (TNF-α), and nuclear factor-κB p65 (NF-κB p65). **Results** The optimal process for ABR-MP-SAN was ABR was reflux-extracted with 10 volumes of water for 60 min, the residue was extracted with 10 volumes of 75% ethanol for 60 min, the two extracts were combined, magnetically stirred at 400 r/min and 25 ℃ for 25 min, then concentrated to 0.2 g/mL after ethanol removal under reduced pressure. The obtained ABR-MP-SAN exhibited regular spherical shape, with higher stability, uniformity, polysaccharide content, and ecdysteroid content all higher than those of ABR-D-SAN. Network pharmacology identified core components including kaempferol, baicalein, and β-ecdysterone; key targets including IL-1β, TNF, and IL-6; major pathways enriched in IL-17, TNF, and NF-κB signaling pathways. Molecular docking demonstrated strong binding affinity between core components and targets. Animal experiments showed that compared with the blank group, the model group exhibited significantly increased joint swelling degree, gait score, serum IL-6, IL-1β, and TNF-α levels ($P < 0.001$), obvious pathological injury of ankle joint, and markedly elevated positive expression of IL-17A, TNF-α, and NF-κB p65 ($P < 0.01$, 0.001). Compared with the model group, all treatment groups showed improvements, with the ABR-MP-SAN group exhibiting significantly better efficacy than the ABR-D-SAN group. **Conclusion** ABR-MP-SAN prepared by the micro-precipitation method possess small particle size, good stability, and uniform distribution. They demonstrate potent anti-AGA effects, and the mechanism may involve inhibition of IL-17/NF-κB and TNF/NF-κB signaling pathways to alleviate inflammatory responses.

Key words: *Achyranthis Bidentatae Radix*; self-assembled nanoparticles; process optimization; acute gouty arthritis; network pharmacology; interleukin-17A; nuclear factor-κB; tumor necrosis factor-α; inflammatory reaction

自组装纳米粒（self-assembled nanoparticles，SAN）是指药物分子通过氢键、π-π 堆积等非共价键作用自发聚集形成的纳米尺度有序结构，近年来在药物递送领域备受关注[1]。中药汤剂作为中医临床治疗复杂疾病的首选剂型，其煎煮过程中多种化学成分在高温水相中发生分子间相互作用，自发形成 SAN[2-3]。研究表明，SAN 较其他分散相态具有更高的溶解度、生物利用度和药效[4-5]。然而，传统水煎条件下形成的 SAN 存在粒径较大、分布不均、稳定性差等不足，且难溶性成分在水相中转移率偏低，限制了药效的充分发挥[6]。

牛膝为苋科牛膝属植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl.的干燥根，具有逐瘀通经、补肝肾、强筋骨等功效。常作为引经药用于急性痛风性关节炎（acute gouty arthritis，AGA）的配伍方中[7-8]。现代研究表明，牛膝主要活性成分为甾酮类化合物，具有抗炎、抗氧化等活性[9]，但其水溶性差，传统水煎转移率低。微沉淀法通过将药材水提液与药渣的适宜浓度乙醇提取液合并，利用过饱和驱动力诱导分子重组装，可显著改善 SAN 的粒径均一性与稳定性，并提高难溶性成分转移率[10-12]。因此，本研究采用微沉淀法构建牛膝新型自组装纳米粒（*Achyranthis Bidentatae Radix* micro-precipitation self-assembled nanoparticles，ABR-MP-SAN），系统比较其与传统水煎自组装纳米粒（*Achyranthis Bidentatae Radix* decoction self-assembled nanoparticles，ABR-D-SAN）在理化表征及活性成分含量方面的差异；进一步借助网络药理学预测 ABR-MP-SAN 抗 AGA 的核心成分、靶点及通路，并通过 AGA 小鼠模型评价其体内药效及初步机制，以期为牛膝纳米给药系统的开发提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

EX125DZH 型十万分之一电子天平，奥豪斯仪器（上海）有限公司；11039A 型紫外可见分光光度计（UV-Vis），上海菁华科技仪器有限公司；DZTW 型调温电热套，上海力辰邦西仪器科技有限公司；RE212BO-B 型旋转蒸发仪，巩义市予华仪器有限公司；LKTC-E 型磁力搅拌器，天津赛得利斯实验分析仪器有限公司；90Plus PALSHT 型纳米激光粒度仪，美国布鲁克海文仪器公司；7800 型透射电子显微镜（TEM），武汉金开瑞生物工程有限公司；C9019

型小动物麻醉机，康森特生物科技有限公司；Chemray240 型全自动生化分析仪，深圳雷杜生命科学股份有限公司；Feyond-A300 型酶联免疫分析仪，杭州奥盛仪器有限公司；JK-TVM 型足跖容积测量仪，杭州简科生命科技有限公司；STP120 型全自动组织脱水机、Histostar 型全自动组织包埋机和 Gemini AS 型全自动病理切片染色机，赛默飞世尔科技有限公司；SQS1000-S 型玻片扫描影像分析系统，昆明纳瑞科技有限公司。

1.2 药品与试剂

牛膝（批号 2024126）购自亳州市福硕堂生物科技有限公司，经云南中医药大学中药学院马云淑教授鉴定为苋科植物牛膝 *A. bidentata* Bl.的干燥根。对照品 β-蜕皮甾酮（批号 111638-202208）和无水葡萄糖（批号 110833-202410）均购自中国食品药品检定研究院，质量分数均≥98%；尿酸钠（批号 S30227）购自上海源叶生物科技有限公司；苯酚（批号 I23113224）购自上海阿拉丁生化科技有限公司；秋水仙碱（批号 S0925F）购自大连美伦生物技术有限公司；白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）、IL-1β 和肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）试剂盒（批号 MM-0163M1、MM-0040M1、MM-0132M1）均购自江苏酶免实业有限公司；苏木素染液、伊红染液、乙二胺四乙酸（ethylene diamine tetraacetic acid，EDTA）脱钙液、天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）、丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）、尿素氮和肌酐检测试剂盒（批号 G1004、G1002、G11105、GM1103、GM1102、GM1110、GM1112）均购自塞维尔生物科技有限公司；甲醇、乙腈为色谱纯，购自美国 Sigma 公司。

1.3 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠，体质量（20±2）g，购自江苏华创信诺医药科技有限公司，动物合格证号 SCXK（苏）2025-0012。动物饲养于室温（23～27 ℃）、相对湿度 45%～55%、12 h/12 h 明暗循环的云南中医药大学动物实验中心，给予无菌蒸馏水和饲料，动物实验设施许可证编号 SYXK（滇）K2022-0004。方案经云南中医药大学实验动物伦理委员会批准，批准号 YNUTCM-XMSS-G-20260036。

2 方法与结果

2.1 ABR-D-SAN 和 ABR-MP-SAN 制备

2.1.1 ABR-D-SAN 的制备 采用传统水煎工艺制备 ABR-D-SAN。取牛膝 10 g，加 10 倍量水浸泡 30 min，回流提取 60 min，滤过，滤渣加 10 倍量水，提取 60 min，趁热滤过，合并 2 次所得滤液，减压浓缩至 0.2 g/mL。

2.1.2 ABR-MP-SAN 的制备 采用微沉淀法[11-12]制备 ABR-MP-SAN。取牛膝 10 g，加 10 倍量水浸泡 30 min，回流提取 60 min，滤过，得水提液，滤渣加 10 倍量 75%乙醇回流提取 60 min，滤过，得醇提液。合并 2 次提取液，400 r/min、25 ℃条件下磁力搅拌 25 min，60 ℃减压旋转除醇，并浓缩至 0.2 g/mL。

2.2 单因素实验优化 ABR-MP-SAN 的制备工艺

2.2.1 乙醇体积分数考察 固定提取时间 30 min，磁力搅拌转速 400 r/min，磁力搅拌温度 25 ℃，磁力搅拌时间 10 min 和生药质量浓度 0.2 g/mL，考察不同乙醇体积分数（25%、50%、75%、100%）下，ABR-MP-SAN 的粒径、ζ 电位和多分散系数（polydispersity index，PDI）的变化。结果如表 1 所示，粒径、ζ 电位和 PDI 随乙醇体积分数的增加而减低，超过 75%后又增加，因此选择乙醇体积分数为 75%。

2.2.2 提取时间考察 固定乙醇体积分数为 75%，磁力搅拌转速 400 r/min，磁力搅拌温度 25 ℃，磁力搅拌时间 10 min 和生药质量浓度 0.2 g/mL，考察不同提取时间（10、20、30、60、90、120 min）下，ABR-MP-SAN 粒径、ζ 电位和 PDI 的变化。结果如表 2 所示，当提取时间为 60 min 时，ABR-MP-SAN

表 1 乙醇体积分数考察结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 1 Ethanol volume fraction investigation results ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

乙醇/%	粒径/nm	ζ电位/mV	PDI
25	199.67±8.67	−15.37±2.09	0.31±0.04
50	159.76±2.08	−17.16±0.99	0.27±0.01
75	154.56±4.99	−18.96±0.20	0.21±0.04
100	184.83±3.24	−17.39±1.01	0.22±0.05

表 2 提取时间考察结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 2 Extraction time investigation results ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

提取时间/min	粒径/nm	ζ电位/mV	PDI
10	151.22±4.79	−9.87±1.17	0.26±0.03
20	120.15±3.70	−15.33±0.75	0.22±0.02
30	136.69±5.76	−18.03±0.90	0.22±0.02
60	129.99±5.15	−19.42±0.46	0.21±0.01
90	125.29±3.41	−13.14±0.65	0.21±0.03
120	128.56±1.60	−11.67±1.64	0.21±0.01

的ζ电位绝对值最大，SAN 最稳定，且粒径适中、分散均匀，因此选择提取时间为 60 min。

2.2.3 磁力搅拌转速考察 固定乙醇体积分数为 75%，提取时间 60 min，磁力搅拌温度 25 ℃，磁力搅拌时间 10 min 和生药质量浓度 0.2 g/mL，考察不同磁力搅拌转速（200、400、600、800 r/min）下，ABR-MP-SAN 粒径、ζ 电位和 PDI 的变化。结果如表 3 所示，不同磁力搅拌转速对粒径和 PDI 影响较小，对电位影响较大，当磁力搅拌转速为 400 r/min 时，ζ 电位绝对值最大，SAN 最稳定，因此选择磁力搅拌转速为 400 r/min。

表 3 磁力搅拌转速考察结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 3 Magnetic stirring speed investigation results ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

磁力搅拌转速/($r \cdot min^{-1}$)	粒径/nm	ζ电位/mV	PDI
200	138.35±2.47	−13.34±0.86	0.24±0.02
400	125.19±3.02	−20.81±1.70	0.21±0.02
600	121.57±3.29	−17.09±0.58	0.21±0.01
800	121.78±1.76	−15.12±1.08	0.22±0.03

2.2.4 磁力搅拌温度考察 固定乙醇体积分数为 75%，提取时间 60 min，磁力搅拌转速 400 r/min，磁力搅拌时间 10 min 和生药质量浓度 0.2 g/mL，考察不同磁力搅拌温度（25、50、75 ℃）下，ABR-MP-SAN 粒径、ζ 电位和 PDI 的变化。结果如表 4 所示，随着温度的增加，粒径、ζ 电位和 PDI 增大，当温度为 25 ℃时，SAN 粒径最小、最稳定，分散最均匀，因此选择磁力搅拌温度为 25 ℃。

表 4 磁力搅拌温度考察结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 4 Magnetic stirring temperature investigation results ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

磁力搅拌温度/℃	粒径/nm	ζ电位/mV	PDI
25	122.30±1.16	−19.36±1.12	0.20±0.01
50	129.91±2.49	−18.02±0.81	0.22±0.01
75	175.97±5.92	−17.71±1.46	0.25±0.01

2.2.5 磁力搅拌时间考察 固定乙醇体积分数为 75%，提取时间 60 min，磁力搅拌转速 400 r/min，磁力搅拌温度 25 ℃和生药质量浓度 0.2 g/mL，考察不同磁力搅拌时间（10、20、30、40 min）下，ABR-MP-SAN 粒径、ζ 电位和 PDI 的变化。结果如表 5 所示，随着搅拌时间增加，粒径、ζ 电位和 PDI 先减小后增大，当时间为 20 min 时，SAN 粒径最小、最稳定、分散最均匀，因此选择磁力搅拌时间为 20 min。

2.2.6 生药质量浓度考察 固定乙醇体积分数为 75%，提取时间 60 min，磁力搅拌转速 400 r/min，磁力搅拌温度 25 ℃和磁力搅拌时间 20 min，考察不同生药质量浓度（0.1、0.2、0.3 g/mL）下，ABR-MP-SAN 粒径、ζ 电位和 PDI 的变化。有研究发现，中药汤剂中的化学成分只有在达到临界生药质量浓度时才会聚集形成 SAN，一旦其质量浓度超过该临界值，小分子会过度聚集，导致粒径增大[13]。由表 6 可知，当质量浓度为 0.2 g/mL 时，ABR-MP-SAN 处于临界生药质量浓度，SAN 粒径较小且最稳定，因此选择生药质量浓度为 0.2 g/mL。

表 5 磁力搅拌时间考察结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 5 Magnetic stirring time investigation results ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

磁力搅拌时间/min	粒径/nm	ζ电位/mV	PDI
10	127.66±3.01	−18.86±0.67	0.20±0.01
20	118.78±2.01	−23.85±1.51	0.19±0.01
30	165.53±1.97	−18.78±1.05	0.24±0.01
40	174.17±4.14	−17.59±1.38	0.26±0.02

表 6 生药质量浓度考察结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 6 Crude drug concentration investigation results ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

生药质量浓度/($g \cdot mL^{-1}$)	粒径/nm	ζ电位/mV	PDI
0.1	153.69±3.34	−17.54±1.16	0.19±0.02
0.2	120.27±1.00	−23.33±1.21	0.17±0.01
0.3	172.63±4.04	−13.67±1.37	0.21±0.02

2.3 响应面试验优化 ABR-MP-SAN 的制备工艺

2.3.1 试验设计与结果 基于上述单因素试验考察结果，选取提取时间（X_1）、磁力搅拌时间（X_2）和生药质量浓度（X_3）3 个影响最大的因素作为考察对象，粒径（Y_1）和 ζ 电位（Y_2）作为评价指标，设计 3 因素 3 水平响应面试验，采用信息熵权法对多指标进行综合评价，计算综合评分（Y）。因素水平、实验设计和响应结果见表 7。

2.3.2 信息熵权法确定各指标权重 熵权法是通过分析多项指标所提供的信息，来确定每个指标的权重。对某一指标而言，熵值越小，数据变异程度就越大，所能提供的信息就越丰富，在综合评价中起到的作用也就越高，相应赋予的权重越大。具体计算方法如下[14-15]。

（1）建立原始数据矩阵：现有 m 个评价项目，

表 7 响应面试验设计与结果

Table 7 Experimental design and results of response surface methodology

序号	X_1/min	X_2/min	X_3/(g·mL^{-1})	Y_1/nm	Y_2/mV	Y
1	90 (+1)	10 (−1)	0.2 (0)	170.88	−14.20	62.30
2	90	20 (0)	0.1 (−1)	165.36	−11.95	58.18
3	60 (0)	30 (+1)	0.1	136.92	−19.09	80.86
4	30 (−1)	10	0.2	175.30	−12.87	58.51
5	60	10	0.3 (+1)	150.21	−18.18	75.48
6	60	20	0.2	125.16	−21.78	90.51
7	60	20	0.2	127.67	−22.97	92.40
8	60	30	0.3	142.99	−22.54	87.12
9	30	20	0.3	169.94	−12.23	57.97
10	30	20	0.1	175.20	−14.10	61.34
11	60	20	0.2	116.11	−23.07	96.63
12	60	20	0.2	131.88	−23.12	91.47
13	90	20	0.3	171.73	−20.08	75.53
14	90	30	0.2	139.87	−14.72	70.13
15	30	30	0.2	146.71	−16.88	73.33
16	60	10	0.1	149.70	−17.08	73.10
17	60	20	0.2	128.75	−24.55	95.67

n 个评价指标，建立原始数据矩阵 $A=(A_{ij})_{m\times n}$，其中 A_{ij} 表示第 i 次试验中第 j 个评价指标。

（2）原始数据矩阵标准化处理：将原始数据矩阵（A）$=(A_{ij})_{m\times n}$ 进行标准化处理，得到标准化数据矩阵（B）$=(B_{ij})_{m\times n}$。本研究中 2 个评价指标均为负向指标，故利用公式（1）进行计算。

$$B_{ij}=(\max A_{ij}-A_{ij})/(\max A_{ij}-\min A_{ij}) \quad (1)$$

B_{ij} 为各指标的标准化值，A_{ij} 表示第 i 个试验中第 j 个指标的原始测定值，$\max A_{ij}$、$\min A_{ij}$ 分别为每个指标下的最大值、最小值

（3）标准化数据矩阵归一化处理：按公式（2）将矩阵 $B=(B_{ij})_{m\times n}$ 进行归一化处理，得到概率矩阵（P）$=(P_{ij})_{m\times n}$，其中，P 表示在第 i 的试验中第 j 个评价指标的概率，且 P 满足 $0\leqslant P\leqslant 1$。

$$P_{ij}=B_{ij}/\sum_{i=1}^{n} B_{ij} \quad (2)$$

P_{ij} 为各个指标的概率

（4）计算各指标信息熵（e_j）：根据公式（3）（4）计算各指标 e_j。经计算，粒径和 ζ 电位的 e_j 依次为 0.933、0.914。

$$k=\ln m \quad (3)$$

$$e_j=-k\times\sum_{i=1}^{m} P_{ij}\ln P_{ij} \quad (4)$$

（5）计算权重系数（w_j）：根据公式（5）计算各指标 w_j。经计算，粒径和 ζ 电位的 w_j 分别为 0.441、0.559。

$$w_j=(1-e_j)/\sum_{j=1}^{m}(1-e_j) \quad (5)$$

（6）Y 的计算：公式见式（6）。

$$Y=(Y_{1\min}/Y_1\times 0.441+Y_{2\min}/Y_2\times 0.559)\times 100 \quad (6)$$

2.3.3 结果分析 通过 Design-Expert 13.0 软件对表 7 中 Y 进行二元多次拟合，得回归方程为 $Y=93.930+1.870X_1+5.260X_2+2.830X_3-1.470X_1X_2+5.180X_1X_3+0.968\,8X_2X_3-21.580X_1^2-5.690X_2^2-8.510X_3^2$，$R^2=0.981\,2$，回归方程线性关系良好，调整后的校正系数 $R^2_{adj}=0.957\,3$，表明模型对变化的贡献率为 95.73%。通过方差分析，对数据与模型的适应度和显著性进行交叉验证，结果见表 8，模型拟合数据的 F 值为 40.89，$P<0.000\,1$，表明实验模型拟合具有高度显著性。失拟项 P 值＞0.05，预测值与实测值的差异无统计学意义，表明模型误差较小，模型选择较为合适。各因素对 Y 的影响程度依次为 $X_2>X_3>X_1$，且 X_2、X_3 有显著影响（$P<0.05$）。利用二维等高线和三维响应面图研究 3 个独立变量对 Y 的相互影响（图 1），可知各交互因素影响程度依次为 $X_1X_3>X_1X_2>X_2X_3$，与表 8 结果一致。

表 8 方差分析

Table 8 ANOVA analysis

方程来源	离均差平方和	自由度	方差	F值	P值
回归模型	3 018.80	9	335.42	40.890	＜0.000 1
X_1	28.07	1	28.07	3.420	0.106 8
X_2	221.00	1	221.00	26.940	0.001 3
X_3	63.98	1	63.98	7.800	0.026 8
X_1X_2	12.17	1	12.17	1.480	0.262 6
X_1X_3	107.36	1	107.36	13.090	0.008 5
X_2X_3	3.75	1	3.75	0.458	0.520 4
X_1^2	1 960.43	1	1 960.43	239.000	＜0.000 1
X_2^2	136.40	1	136.40	16.630	0.004 7
X_3^2	304.58	1	304.58	37.130	0.000 5
残差	57.42	7	8.20	−	−
失拟项	28.75	3	9.58	1.340	0.380 4
纯误差	28.67	4	7.17	−	−
合计	3 076.22	16	−	−	−

根据模型预测，最佳制备工艺参数为提取时间 60.187 min，磁力搅拌时间 24.770 min，生药质量浓度 0.208 g/mL，综合评分为 94.473。结合实际操作，将制备工艺调整为提取时间 60 min，磁力搅拌时间 25 min，生药质量浓度 0.2 g/mL。为了确认模型的准确性，对优化后的工艺进行 3 次验证试验，结果见表 9，预测值与实测值吻合度高，表明该制备工

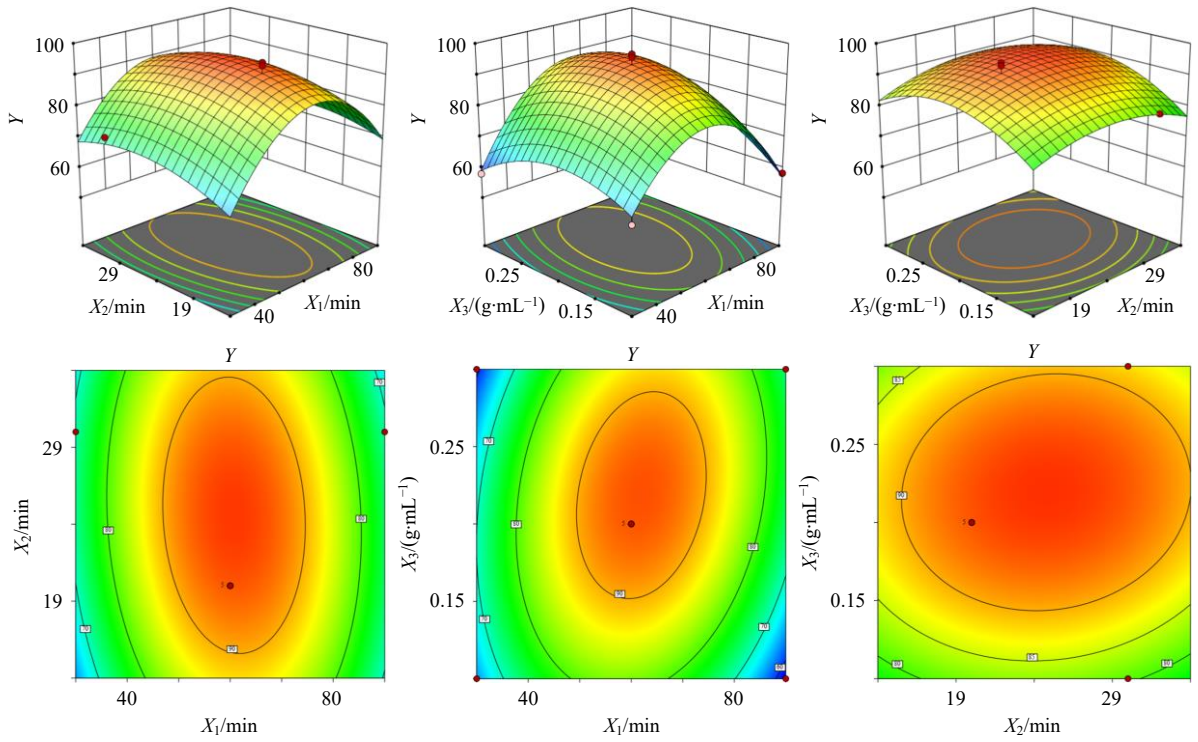


图 1 各因素交互作用图

Fig. 1 Interaction plots of various factors

表 9 验证试验结果

Table 9 Verification test results

项目	Y_1/nm	Y_2/mV	Y
预测值	122.79	−23.35	94.47
实测值	123.95±3.63	−23.08±1.07	93.87±2.69
偏差/%	0.67	0.83	0.45

艺稳定可靠，可用于 ABR-MP-SAN 的制备。

2.4 ABR-D-SAN 与 ABR-MP-SAN 的表征

2.4.1 TEM 形态观察 分别吸取 ABR-D-SAN 和 ABR-MP-SAN 溶液各 10 μL，滴加到 300 目碳膜铜网表面上，上膜 10 min，用蒸馏水充分漂洗后，2% 磷钨酸钠染色液快速染色 2 次，每次 10 s，待染色铜网完全晾干后，利用 TEM 在 80 kV 电压下观察其微观形态。结果见图 2，ABR-MP-SAN 的形态完整，呈规则的圆球形，表面光滑且大小均一；ABR-D-SAN 形态呈圆球形，但大小不一且有聚集现象。

2.4.2 粒径、PDI 和 ζ 电位分析 取适量 ABR-D-SAN 和 ABR-MP-SAN 溶液，加超纯水稀释后，采用纳米激光粒度仪测定其粒径、ζ 电位和 PDI。结果如图 3 所示，ABR-MP-SAN 粒径分布较窄，呈单峰，平均粒径为（123.95±3.63）nm（n=3），平均 ζ 电位为（−23.08±1.07）mV（n=3），表面带负电荷，PDI 为 0.18±0.01（n=3），分散较均匀。ABR-

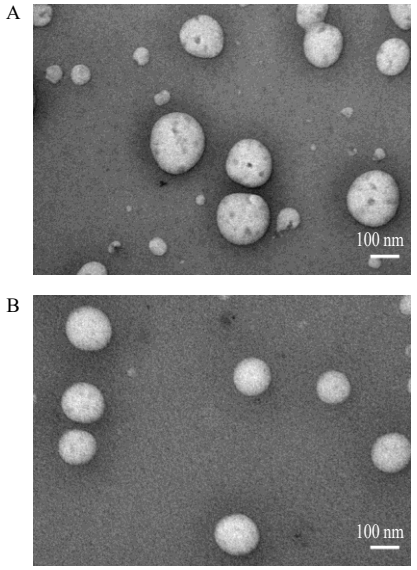


图 2 ABR-D-SAN (A) 和 ABR-MP-SAN (B) 的 TEM 图

Fig. 2 TEM images of ABR-D-SAN (A) and ABR-MP-SAN (B)

D-SAN 的平均粒径为（201.68±5.81）nm（n=3），平均 ζ 电位为（−10.52±1.01）mV（n=3），PDI 为 0.35±0.02（n=3），其稳定性与分散性与 ABR-MP-SAN 相比均降低。

2.5 ABR-D-SAN 和 ABR-MP-SAN 含量测定

2.5.1 UV-Vis 法测定糖类成分的含量 采用苯酚-

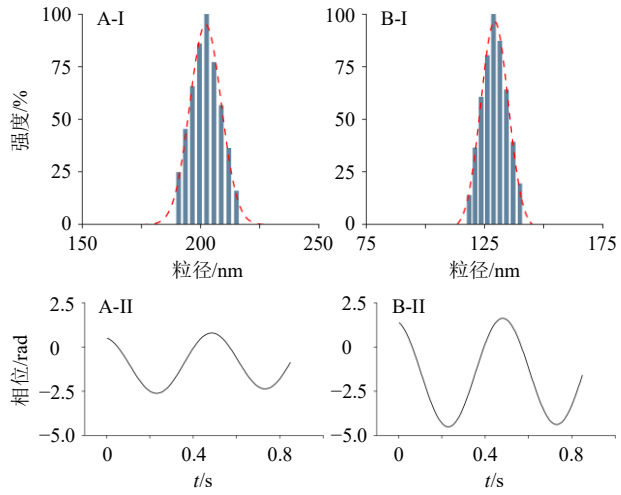


图 3　ABR-D-SAN (A) 和 ABR-MP-SAN (B) 的粒径分布 (I)、ζ 电位 (II)

Fig. 3　Particle size (I) and ζ potential (II) of ABR-D-SAN (A) and ABR-MP-SAN (B)

硫酸法[16]测定 ABR-D-SAN 和 ABR-MP-SAN 中总多糖含量。精密称取无水葡萄糖对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，加水制成含无水葡萄糖 510 μg/mL 的对照品溶液。精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.5、0.7、0.9 mL，分别置于试管中，加水补至 2 mL，加入 6%苯酚 1 mL，摇匀后迅速加入硫酸 5 mL，室温放置 10 min、40 ℃水浴保温 30 min 后，置于冰水浴中冷却 3 min，以相应试剂为空白，于 490 nm 波长处测定吸光度（*A*）值。以无水葡萄糖质量浓度为横坐标（*X*）、*A* 值为纵坐标（*Y*）绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程为 $Y=0.010\,2X+0.097$，$r=0.999\,7$，结果表明，葡萄糖在 25.5～229.5 μg/mL 线性关系良好。取“2.1”项下制备的 ABR-D-SAN、ABR-MP-SAN 溶液 3 份，稀释至适宜质量浓度，照标准曲线的制备方法，自“加入 6%苯酚 1 mL”起，依法测定 *A* 值，计算样品中多糖含量。结果如表 10 所示，ABR-MP-SAN 中多糖类成分含量为 ABR-D-SAN 的 1.29 倍。

2.5.2　UV-Vis 法测定甾酮类成分的含量　精密称取 β-蜕皮甾酮对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇制成含 β-蜕皮甾酮 61 μg/mL 的对照品母液。加甲醇稀释配制成质量浓度分别为 61.0、54.9、24.4、18.3、12.2、6.1 μg/mL 的系列对照品溶液，以甲醇为空白，于 242 nm 波长处测定 *A* 值[17]。以 β-蜕皮甾酮质量浓度为横坐标（*X*）、*A* 值为纵坐标（*Y*）绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程为 $Y=0.028\,4X+0.094\,1$，$r=0.999\,7$，结果表明，β-蜕皮甾酮在 6.1～61.0 μg/mL 线性关系良好。取“2.1”项下制备的 ABR-D-SAN、ABR-MP-SAN 溶液 3 份，水浴蒸干后，残渣加甲醇稀释至适宜质量浓度，于 242 nm 波长处测定 *A* 值，计算样品中甾酮含量，结果如表 10 所示，ABR-MP-SAN 中甾酮类成分含量为 ABR-D-SAN 的 2.03 倍。

表 10　ABR-D-SAN 和 ABR-MP-SAN 含量测定结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 10　Content determination results of ABR-D-SAN and ABR-MP-SAN ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

样品	多糖/(mg·g^{-1})	甾酮/(mg·g^{-1})
ABR-D-SAN	33.20±2.76	1.55±0.17
ABR-MP-SAN	42.67±3.02	3.14±0.26

2.6　ABR-MP-SAN 治疗 AGA 的网络药理学研究

2.6.1　ABR-MP-SAN 成分及靶点收集　在 TCMSP 数据库中，以口服生物利用度（oral bioavailability，OB）≥30%，且类药性≥0.18 为条件检索，筛选 ABR-MP-SAN 活性成分及其靶点，并用 Uniprot 数据库对靶点名称进行校正。共检索得到 19 个活性成分及 204 个相关靶点，活性成分见表 11。

2.6.2　AGA 靶点收集　以 acute gouty arthritis 为关键词，通过 GeneCards 和 OMIM 数据库收集 AGA 相关疾病靶点。GeneCards 数据库中检索得到靶点

表 11　ABR-MP-SAN 活性成分

Table 11　Active components of ABR-MP-SAN

MOL ID	活性成分	OB/%	类药性
MOL001006	海绵甾-7,22*E*-二烯-3β-醇	42.98	0.76
MOL012461	28-去甲齐墩果-17-烯-3-醇	35.93	0.78
MOL012537	司盘苷A	41.75	0.40
MOL012542	β-蜕皮甾酮	44.23	0.82
MOL001454	小檗碱	36.86	0.78
MOL001458	黄连碱	30.67	0.86
MOL000173	汉黄芩素	30.68	0.23
MOL002643	δ$_7$-豆甾烯醇	37.42	0.75
MOL002714	黄芩素	33.52	0.21
MOL002776	黄芩苷	40.12	0.75
MOL002897	表小檗碱	43.09	0.78
MOL000358	β-谷甾醇	36.91	0.75
MOL003847	红厚壳素E	38.81	0.85
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24
MOL004355	菠菜甾醇	42.98	0.76
MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76
MOL000785	巴马汀	64.60	0.65
MOL000085	β-胡萝卜苷	36.91	0.75
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28

330 个，以相关性分数（relevance score）值＞10 为指标，共筛选得到 195 个核心靶点，OMIM 数据库获得相关靶点 202 个，将上述靶点合并后去重，共得到 389 个 AGA 相关靶点。

2.6.3 交集靶点的获取与“成分-交集靶点”网络的构建 将 ABR-MP-SAN 成分靶点与 AGA 相关疾病靶点导入 Venny 2.1.0 数据库，绘制韦恩图，取二者交集靶点，即为 ABR-MP-SAN 抗 AGA 的潜在靶点。共得到交集靶点 35 个，结果见韦恩图（图 4）。运用 Cytoscape 3.8.2 软件对 ABR-MP-SAN 活性成分与交集靶点进行关联性分析，构建“成分-交集靶点”互作网络图，并根据度（degree）值筛选 ABR-MP-SAN 治疗 AGA 的核心成分，结果见图 5，该网络共有 54 个节点，80 条边，度值排名前 5 的核心成分为山柰酚、黄芩素、β-谷甾醇、β-蜕皮甾酮和黄连素。

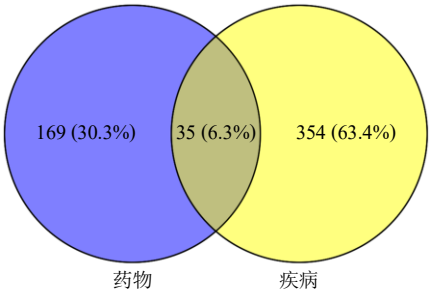


图 4 ABR-MP-SAN 成分靶点与 AGA 相关疾病靶点的韦恩图

Fig. 4 Venn diagram of ABR-MP-SAN component targets and AGA-related disease targets

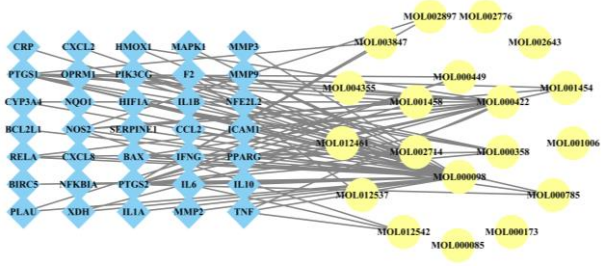


图 5 “成分-交集靶点”网络图

Fig. 5 “Component-intersection target” network diagram

2.6.4 蛋白质互作（protein-protein interaction，PPI）网络的构建 借助 STRING 数据库和 Cytoscape 3.8.2 软件对交集靶点进行分析，构建 ABR-MP-SAN 治疗 AGA 的 PPI 网络图，结果见图 6-A，该网络由 35 个节点和 388 条边构成，节点大小与颜色深度与度值越呈正相关。采用 cytoHubba 插件基于度值筛选核心靶点，绘制可视化网络图，结果见图 6-B，

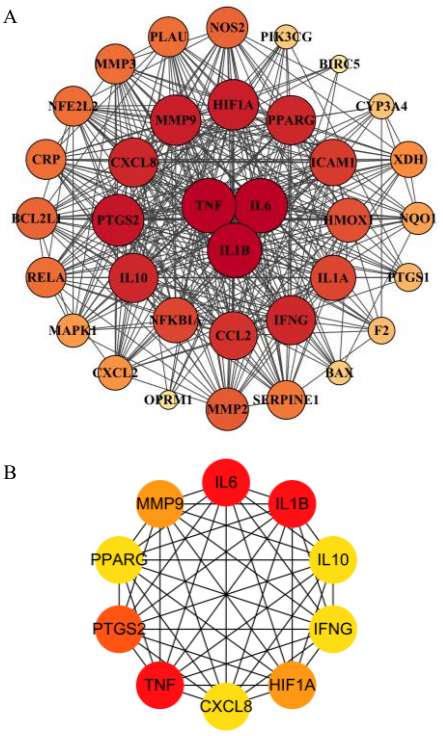


图 6 PPI 网络图（A）和排名前 10 靶点图（B）

Fig. 6 PPI network diagram (A) and top ten targets diagram (B)

该网络共包含 10 个节点，45 条边，度值排名前 10 的靶点为 IL-1β、TNF、IL-6、前列腺素内过氧化物合酶 2（prostaglandin-endoperoxide synthase 2，PTGS2）等，推测 IL-6、IL-1β、TNF 等是 ABR-MP-SAN 治疗 AGA 的关键靶点，同时也是 IL-17/NF-κB、TNF/NF-κB 信号通路的关键蛋白。

2.6.5 基因本体论（gene ontology，GO）功能和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析 借助 DAVID 数据库对交集靶点进行 GO 功能及 KEGG 富集分析。共富集得到生物学过程（biological process，BP）条目 262 条，分子功能（molecular function，MF）条目 29 条，细胞组分（cellular component，CC）条目 13 条，KEGG 通路 89 条，根据 *P* 值大小，分别选取前 10 条条目与通路，通过微生信平台进行可视化分析，绘制气泡图与通路图，结果见图 7、8。由图 7 可知，BP 主要涉及细胞对脂多糖的反应、炎症应答、基因表达的正调控等；CC 主要富集在细胞外空间、胞外区、细胞外基质等；MF 主要参与蛋白结合、细胞因子活性、酶结合等。由图 8 可知，主要涉及 IL-17 信号通路、TNF 信号通路、NF-κB 信号通路等。

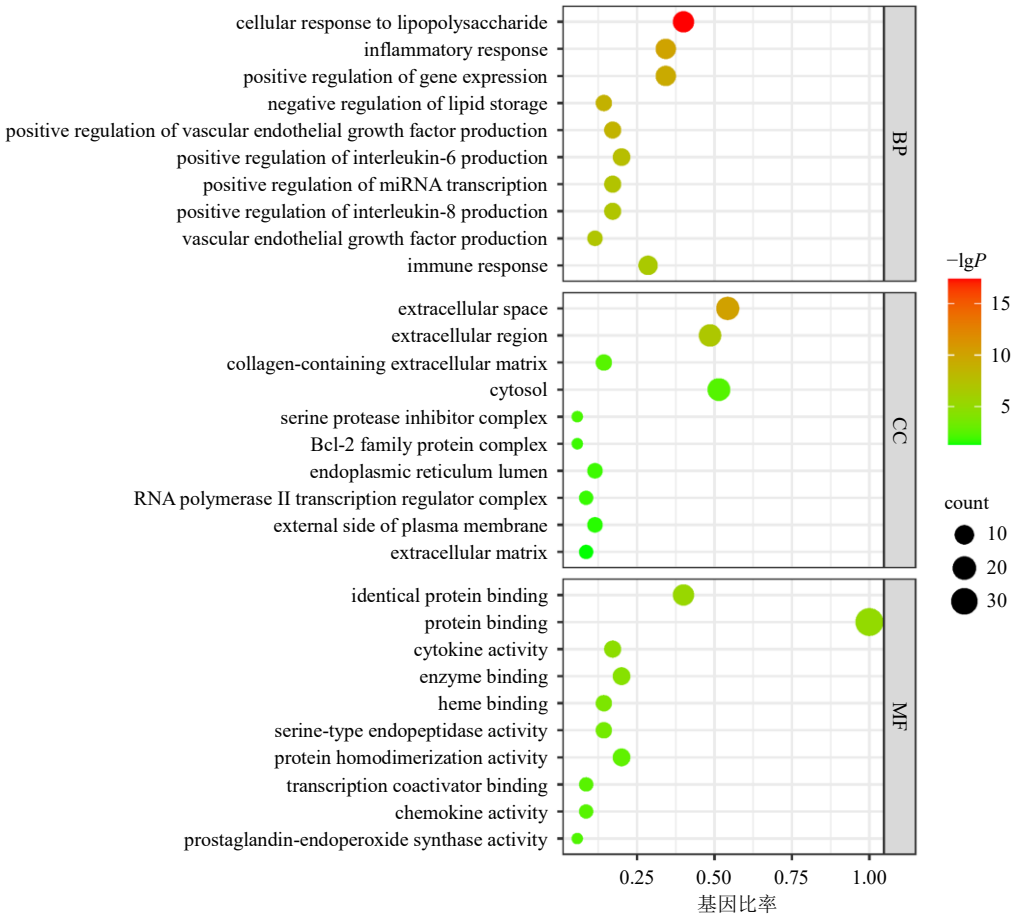


图 7　GO 功能富集结果

Fig. 7　GO functional enrichment results

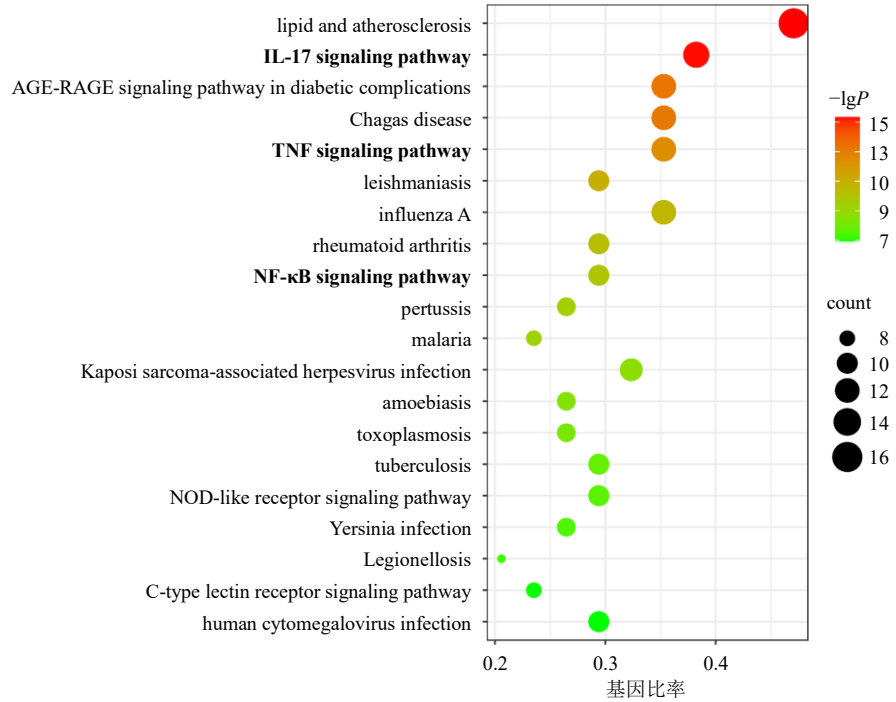


图 8　KEGG 通路富集分析

Fig. 8　KEGG pathway enrichment analysis

2.6.6 分子对接验证 为探究核心成分与靶点蛋白的相关性，将前 5 个核心成分与前 3 个核心靶点及 IL-17、TNF 与 NF-κB 信号通路关键靶点进行分子对接。从 TCMSP 数据库下载核心成分的 2D 结构并保存为 mol2 格式；从 PDB 数据库获取关键靶点的 3D 结构并保存为 pbd 格式，利用 Autodock Tools 软件进行两两分子对接，计算各个组合的结合能，结果见表 12，除 β-蜕皮甾酮与 NF-κB 外，其余成分与靶点的结合能均＜−5 kcal/mol，表明配合物间大多都具有较强的亲和力。使用 PyMOL 软件对结合能力较强的组合进行可视化处理，结果见图 9，

表 12 核心成分与靶点蛋白的分子对接结果（1 kcal = 4.184 kJ）

Table 12 Molecular docking results of core components and target proteins (1 kcal = 4.184 kJ)

靶点	结合能/(kcal·mol^{-1})				
	槲皮素	山柰酚	黄芩素	β-谷甾醇	β-蜕皮甾酮
IL-1β	−6.05	−6.40	−6.46	−7.56	−8.28
TNF	−8.91	−8.12	−8.84	−9.20	−7.98
IL-6	−6.99	−7.00	−6.71	−7.92	−7.33
IL-17	−6.74	−6.77	−6.75	−9.96	−6.31
NF-κB	−5.01	−5.08	−5.47	−5.59	−2.54

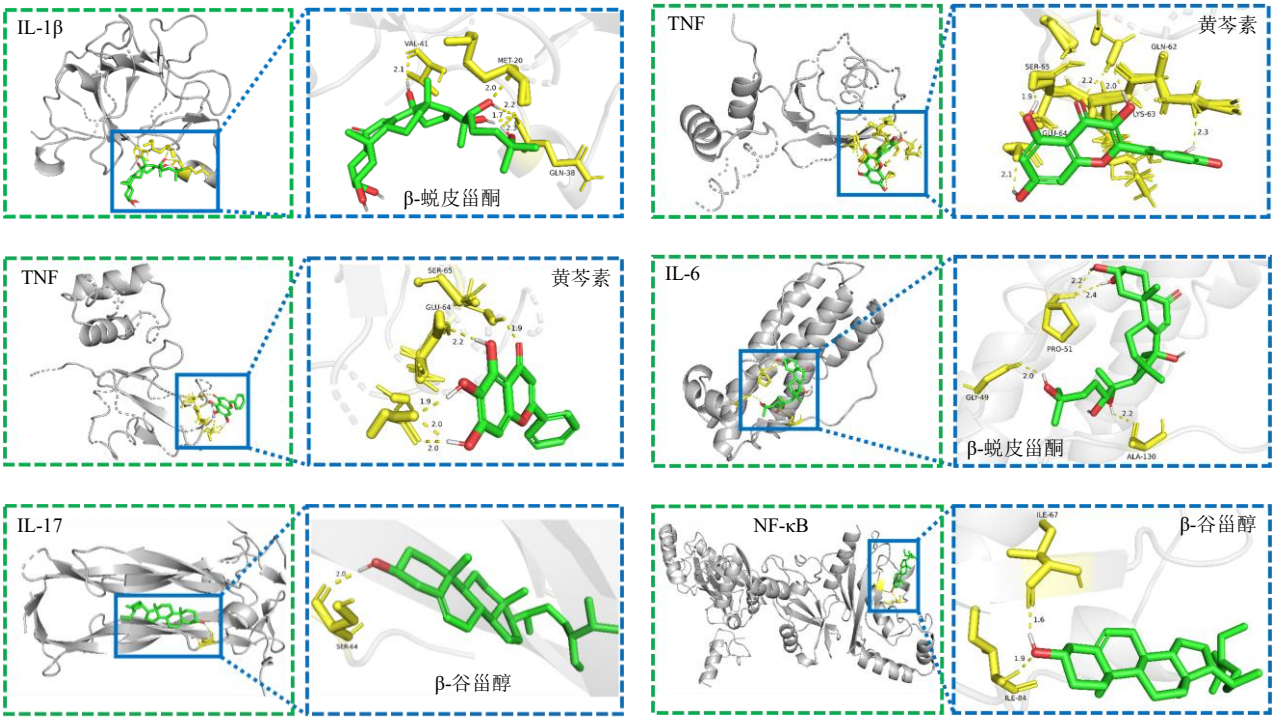


图 9 分子对接模型立体视图

Fig. 9 Three-dimensional view of molecular docking model

成分与靶点间均形成了稳定的氢键，且这些结合位点多位于靶点功能活性区域，提示这些成分与靶点可能是 ABR-MP-SAN 发挥抗 AGA 作用的关键药效物质基础与靶点。

2.7 ABR-MP-SAN 治疗 AGA 的药效评价

2.7.1 动物分组、造模及给药 根据《中国药典》2025 年版牛膝常规临床用量，按体表面积法进行人与小鼠等效剂量换算，得到小鼠给药剂量约为 1.82 g/kg。C57BL/6 雄性小鼠适应性喂养 1 周后，随机分为空白组、模型组、秋水仙碱（1 mg/kg）组、ABR-D-SAN（1.82 g/kg）组和 ABR-MP-SAN（1.82 g/kg）组，每组 6 只。每天 ig 给予相应药物治疗，空白组和模型组小鼠给予等量生理盐水，持续给药 7 d。于第 4 次给药 1 h 后，采用小动物气麻机将各组小鼠麻醉，除空白组外，向其余各组小鼠右后踝关节腔处注射 50 mg/mL 的尿酸钠混悬液 25 μL，建立 AGA 模型[18]，空白组注射等量无菌生理盐水。以关节腔对侧鼓起为注射成功标准，以踝关节出现肿胀、僵硬、缩足等情况为模型建立成功标准。造模结束后，各组小鼠继续给药 3 d 后取材。

2.7.2 各组小鼠关节肿胀度测定 分别于造模前和造模后 4、8、12、24、48、72 h，记录各组小鼠右后肢图像。并采用足趾容积测量仪测定各时间点小鼠右后足趾容积，计算其肿胀度。

肿胀度＝(测定时间点足趾容积－初始足趾容积)/初始足趾容积

结果如图 10 和表 13 所示，空白组小鼠右踝关节注入生理盐水后出现轻微肿胀，8 h 后肿胀逐渐消失；其余组小鼠注入尿酸钠混悬液后，踝关节出现明显红肿，24 h 达到肿胀高峰。模型组小鼠 72 h 时肿胀度为（38.63±4.58）%；与模型组相比，给药组肿胀度均有所下降（P＜0.05、0.01、0.001），其中秋水仙碱组和 ABR-MP-SAN 组治疗效果最佳，且 ABR-MP-SAN 组治疗效果显著优于 ABR-D-SAN 组（P＜0.05、0.01、0.001）。

2.7.3　各组小鼠步态观察与评分　造模后 24 h，对各组小鼠步态进行观察与评分。评分标准为双后肢均匀着地，行走正常则评为 0 分；静止时，双后肢着地无明显差异，活动时，患肢承重减轻，轻度跛行则评为 1 分；静止和活动状态下，患肢承重均明显减轻，存在中度跛行则评为 2 分；患肢不能承重，完全离地，三足步态，跛行较为严重则评为 3 分。结果如表 14 所示，与空白组相比，模型组小鼠态评分显著升高（P＜0.001）；与模型组相比，各给药组小鼠步态评分明显降低（P＜0.05、0.001）；与 ABR-D-SAN 组相比，秋水仙碱组和 ABR-MP-SAN 组步态评分降低（P＜0.05、0.01），表明药物治疗能改善小鼠的步态，且 ABR-MP-SAN 组的效果优于 ABR-D-SAN 组。

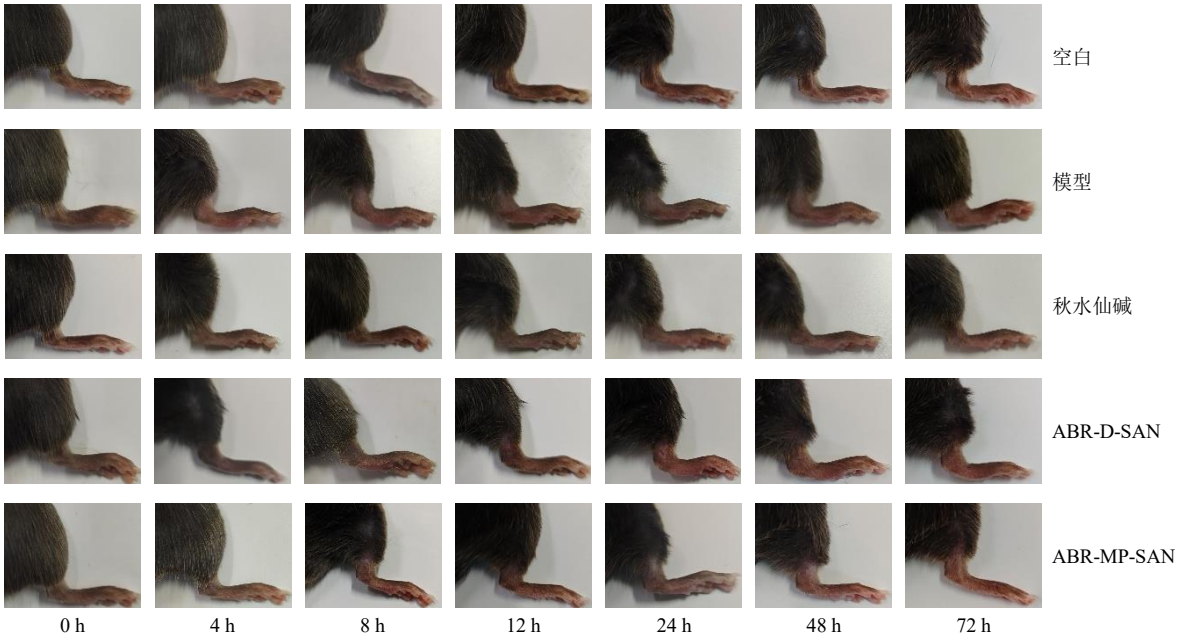


图 10　各组小鼠踝关节肿胀情况比较

Fig. 10　Comparison of ankle joint swelling in each group of mice

表 13　各组小鼠肿胀度比较（$\bar{x} \pm s$，n = 6）

Table 13　Comparison of swelling degree in each group of mice（$\bar{x} \pm s$，n = 6）

组别	剂量/(g·kg^{-1})	肿胀度/%					
		4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
空白	−	4.19±0.70	9.66±0.93	7.44±0.74	5.47±0.84	3.87±1.30	2.01±1.10
模型	−	20.06±2.18***	32.50±2.66***	42.70±5.01***	62.84±7.36***	48.69±6.92***	38.63±4.58***
秋水仙碱	0.001	9.78±1.59$^{\#\#\#\&\&\&}$	17.76±1.07$^{\#\#\#\&\&\&}$	24.65±1.72$^{\#\#\#\&\&\&}$	31.02±2.59$^{\#\#\#\&\&\&}$	22.41±3.19$^{\#\#\#\&\&\&}$	14.25±2.00$^{\#\#\#\&\&\&}$
ABR-D-SAN	1.82	15.48±2.09$^{\#\#}$	25.69±3.61$^{\#\#}$	34.77±3.24$^{\#\#}$	47.72±4.72$^{\#\#}$	39.28±4.89$^{\#}$	28.28±3.08$^{\#\#\#}$
ABR-MP-SAN	1.82	12.09±1.51$^{\#\#\#\&\&}$	21.39±2.32$^{\#\#\#\&}$	29.83±3.36$^{\#\#\#\&}$	38.04±4.22$^{\#\#\#\&\&}$	30.93±3.50$^{\#\#\#\&\&}$	19.69±2.03$^{\#\#\#\&\&\&}$

与空白组比较：$^{**}P$＜0.01　$^{***}P$＜0.001；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05　$^{\#\#}P$＜0.01　$^{\#\#\#}P$＜0.001；与 ABR-D-SAN 组比较：$^{\&}P$＜0.05　$^{\&\&}P$＜0.01　$^{\&\&\&}P$＜0.001；表 14～16 同。

$^{**}P$ < 0.01　$^{***}P$ < 0.001 *vs* control group; $^{\#}P$ < 0.05　$^{\#\#}P$ < 0.01　$^{\#\#\#}P$ < 0.001 *vs* model group; $^{\&}P$ < 0.05　$^{\&\&}P$ < 0.01　$^{\&\&\&}P$ < 0.001 *vs* ABR-D-SAN group; Same as tables 14—16.

2.7.4　ELISA 法测定各组小鼠血清中炎症因子的含量变化　末次给药 12 h 后，采集各组小鼠血清，使用 ELISA 试剂盒，按照检测说明书方法操作，于

表 14 各组小鼠步态评分及血清中炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Table 14 Comparison of gait scores and inflammatory cytokines IL-6, IL-1β, TNF-α in each group of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	步态评分	IL-6/(pg·mL^{-1})	IL-1β/(pg·mL^{-1})	TNF-α/(pg·mL^{-1})
空白	−	0.00±0.00	29.50±4.65	67.23±9.18	419.49±41.70
模型	−	2.67±0.52***	68.71±5.53***	161.39±17.33***	1 030.62±132.56***
秋水仙碱	0.001	0.83±0.41$^{\#\#\#\&\&}$	37.64±3.24$^{\#\#\#\&\&\&}$	91.33±14.54$^{\#\#\#\&\&}$	629.72±38.20$^{\#\#\#\&\&}$
ABR-D-SAN	1.82	1.83±0.41$^{\#}$	52.21±5.63$^{\#\#}$	124.78±13.61$^{\#\#}$	847.49±93.65$^{\#\#}$
ABR-MP-SAN	1.82	1.00±0.63$^{\#\#\#\&}$	42.64±4.91$^{\#\#\#\&}$	95.23±9.05$^{\#\#\#\&\&}$	624.36±86.18$^{\#\#\#\&\&}$

450 nm 下测定 A 值，计算血清中 IL-6、IL-1β、TNF-α 的含量。结果如表 14 所示，与空白组相比，模型组小鼠血清中促炎因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平均显著升高（$P<0.001$）；与模型组相比，所有治疗组 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平显著降低（$P<0.01$、0.001）；与 ABR-D-SAN 组相比，秋水仙碱组和 ABR-MP-SAN 组 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平显著降低（$P<0.05$、0.01、0.001）。结果表明，ABR-MP-SAN 能够有效下调血清中炎症因子的水平，从而减轻关节炎症反应，发挥治疗 AGA 的作用。

2.7.5 各组小鼠踝关节组织病理形态观察 末次给药 12 h 后，采集各组小鼠踝关节，于 4%多聚甲醛溶液中固定 48 h，经脱钙、包埋、切片、苏木素和伊红（hematoxylin-eosin，HE）和番红 O-固绿（safranin O-fast green，SO-FG）染色后，采用玻片扫描影像分析系统采集图像，观察踝关节的形态变化。结果如图 11 所示，空白组小鼠踝关节结构完整，软骨表面光滑整齐，滑膜细胞形态正常；模型组踝关节软骨表面粗糙，滑膜及结缔组织增生，细胞数量减少且形态异常，关节腔内可见大量炎性细胞浸润；秋水仙碱和 ABR-MP-SAN 组小鼠软骨结构正常，表面光滑，关节腔内炎性细胞浸润减轻，滑膜细胞数量增多，滑膜及结缔组织增生情况得到不同程度缓解。表明 ABR-MP-SAN 能够有效缓解 AGA 小鼠的炎症反应，对关节软骨有较好的保护和修复作用。

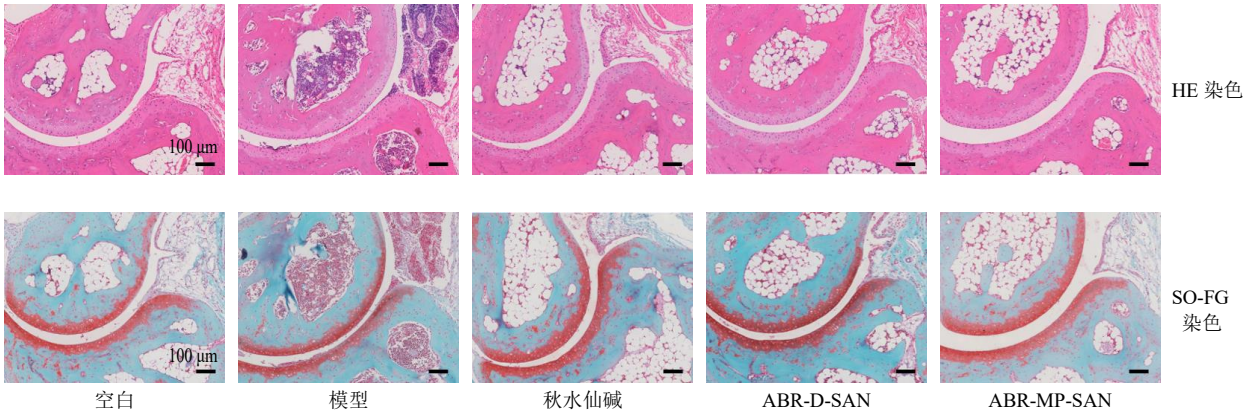


图 11 各组小鼠踝关节组织病理形态变化（×200）

Fig. 11 Histopathological changes of ankle joint in each group of mice (× 200)

2.7.6 ABR-MP-SAN 生物相容性评价 末次给药 12 h 后，采集各组小鼠血清，采用全自动生化仪检测血清中 ALT、AST、肌酐、尿素氮的含量。并采集肝、肾组织，于 4%多聚甲醛溶液中固定 48 h，经包埋、切片、HE 染色后，采用玻片扫描影像分析系统采集图像，观察肝、肾组织形态。血清生化结果如表 15 所示，与空白组相比，模型组中 ALT、AST、肌酐水平均显著升高（$P<0.01$，0.001），尿素氮水平无明显差异；与模型组相比，给药组 ALT、AST、肌酐水平均有不同程度的降低。

HE 染色结果如图 12 所示，各组小鼠肝脏组织中肝细胞数量丰富、形态完好，细胞核大而圆，肝窦与肝索围绕中央静脉呈放射状排列；肾脏组织皮质与髓质分界清晰，肾小球、肾小管和集合管的形态正常、数量丰富，均未见明显病理学损伤。上述结果表明，AGA 模型可导致小鼠血清 ALT、AST、肌酐水平一过性升高，但未引起肝肾组织的病理性形态学改变，而 ABR-MP-SAN 不仅对脏器无损伤，且能降低模型引起的 ALT、AST、肌酐水平升高，体现出良好的生物安全性。

表 15　各组小鼠血清生化功能指标比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Table 15　Comparison of serum biochemical function indicators in each group of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	ALT/(U·L^{-1})	AST/(U·L^{-1})	尿素氮/(mg·L^{-1})	肌酐/(μmol·L^{-1})
空白	−	20.25±3.41	92.88±7.00	2.593±0.241	32.10±2.49
模型	−	28.08±2.80**	157.16±24.55***	2.665±0.262	37.66±2.18**
秋水仙碱	0.001	19.89±1.31$^{\#\#\#\&}$	105.26±7.20$^{\#\#\#\&}$	2.615±0.342	34.41±2.07$^{\#}$
ABR-D-SAN	1.82	23.21±2.71$^{\#}$	123.83±15.84$^{\#\#}$	2.652±0.242	36.35±2.44
ABR-MP-SAN	1.82	21.18±2.68$^{\#\#}$	106.03±11.45$^{\#\#\#\&}$	2.556±0.194	35.27±1.45$^{\#}$

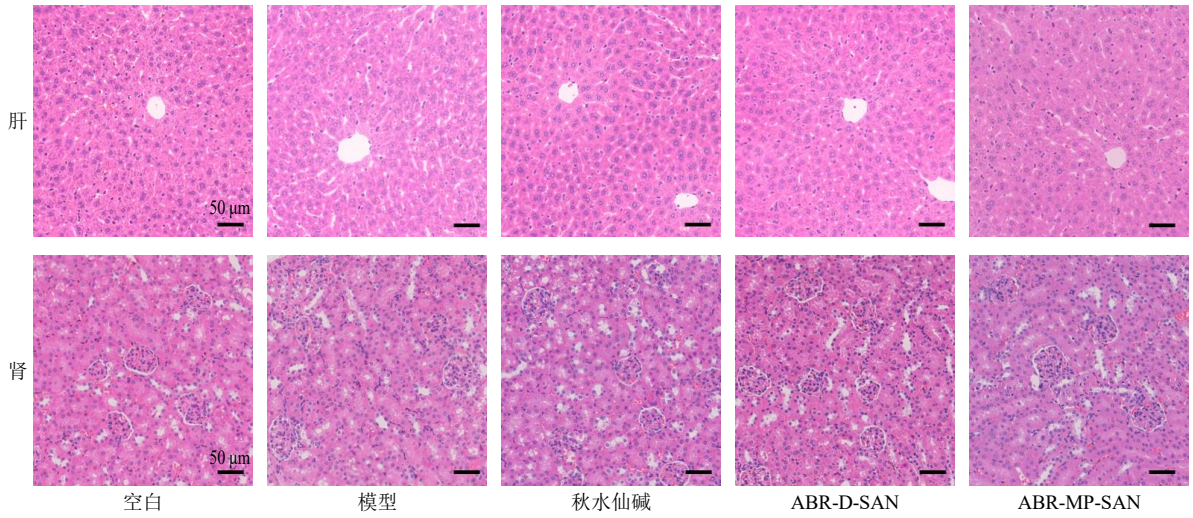


图 12　各组小鼠肝和肾组织病理形态变化（×400）

Fig. 12　Histopathological changes of liver and kidney tissues in each group of mice (× 400)

2.7.7　各组小鼠踝关节组织中 IL-17A、TNF-α、NF-κB p65 阳性表达比较　采用免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）法检测 IL-17/NF-κB 和 TNF/NF-κB 通路中相关蛋白的表达情况。取小鼠踝关节组织，经 4%多聚甲醛固定、脱钙、包埋、切片后，采用二甲苯脱蜡，3% H_2O_2 洗涤 5 min，滴加正常血清封闭 30 min。IL-17A、TNF-α、NF-κB p65 一抗 4 ℃下孵育过夜，HRP 标记二抗 37 ℃下孵育 30 min。滴加 SABC 后 DAB 显色，苏木精复染，脱水并封片，显微镜下观察并采集图像，Image J 软件分析阳性细胞比例。结果见图 13 和表 16，与空白组相比，模型组小鼠踝关节组织中 IL-17A、TNF-α 和 NF-κB p65 阳性表达升高（P＜0.01、0.001）；与模型组相比，秋水仙碱和 ABR-MP-SAN 组中上述蛋白表达均显著减低（P＜0.01、0.001），ABR-D-SAN 组 IL-17A 表达显著降低（P＜0.01），TNF-α 和 NF-κB p65 表达无显著差异；与 ABR-D-SAN 组相比，秋水仙碱和 ABR-MP-SAN 组 IL-17A、TNF-α 和 NF-κB p65 表达均显著降低（P＜0.05、0.01）。结果表明，ABR-MP-SAN 可能通过下调 IL-17/NF-κB 和 TNF/NF-κB 通路中 IL-17A、TNF-α 和 NF-κB p65 蛋白的表达来发挥抗 AGA 的作用。

3　讨论

中药化学成分经煎煮后易发生分子间相互作用，自发形成 SAN，可发挥增溶、增效或减毒等功效。与脂质体、聚合物纳米粒等需外加辅料的纳米制剂相比，SAN 依靠中药成分自身的氢键、疏水作用等非共价键自发组装，体现了“药辅合一”的绿色理念，且可同时递送多种活性成分，实现多组分协同作用[19]。然而传统水煎 SAN 存在粒径大、不稳定、难溶性成分转移率低等问题有待解决。本研究采用微沉淀法改良传统汤剂的自组装过程，系统比较了新型自组装纳米粒 ABR-MP-SAN 及传统水煎自组装纳米粒 ABR-D-SAN 的理化性质与活性成分含量，结果表明与 ABR-D-SAN 相比，ABR-MP-SAN 呈规则圆球形，且粒径小、分布均匀、稳定性好，证实微沉淀法通过水提液与醇提液合并产生过饱和驱动力，诱导分子重排，显著改善了 SAN 的均一性与稳定性。含量测定显示，ABR-MP-SAN 中多糖和甾酮类成分含量均显著高于 ABR-D-SAN，与甘草、波棱瓜子中难溶性成分转移率大幅提升的研究结果一致[11-12]，表明微沉淀法在提高中药难溶性成

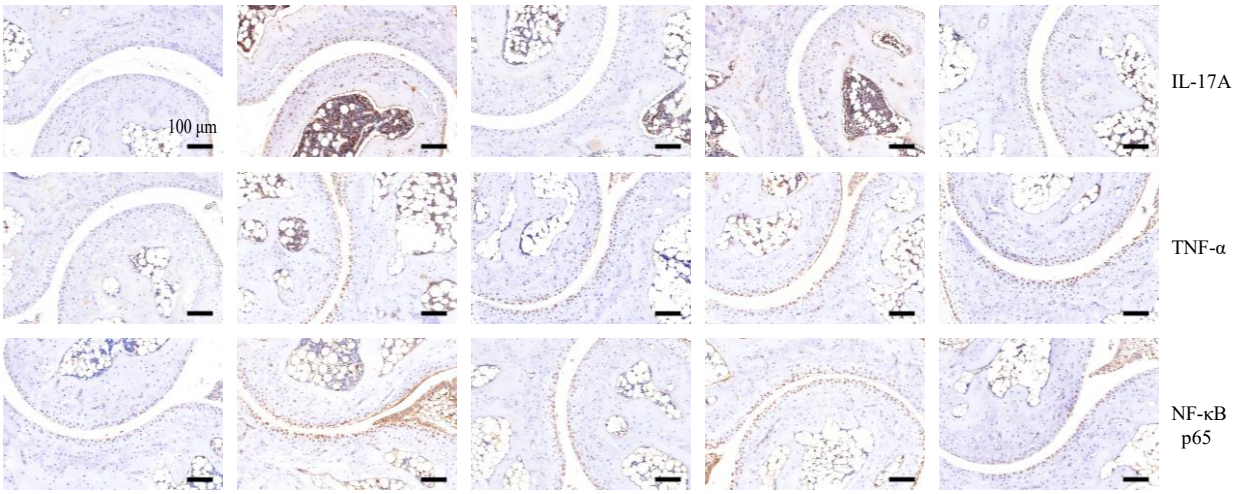


图 13　各组小鼠相关蛋白表达情况（×200）

Fig. 13　Expression of related proteins in each group of mice (× 200)

表 16　各组小鼠踝关节中 IL-17A、TNF-α、NF-κB p65 阳性细胞比率比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 16　Comparison of percentage of IL-17A, TNF-α, and NF-κB p65 positive cells in ankle joint of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	阳性细胞比例/%		
		IL-17A	TNF-α	NF-κB p65
空白	−	6.94±1.22	6.28±0.82	6.67±0.33
模型	−	39.87±2.44***	32.10±4.16**	44.19±5.24***
秋水仙碱	0.001	12.75±2.38$^{\#\#\#\&\&}$	14.49±1.05$^{\#\#\&\&}$	13.39±2.92$^{\#\#\#\&\&}$
ABR-D-SAN	1.82	24.57±3.97$^{\#\#}$	25.15±2.43	34.44±5.58
ABR-MP-SAN	1.82	17.47±0.60$^{\#\#\#\&}$	17.19±1.00$^{\#\#\&\&}$	22.52±2.39$^{\#\#\&}$

分递送效率方面具有通用价值。

AGA 是由尿酸钠晶体沉积于关节腔诱发的急性炎症性疾病，临床表现为关节剧烈疼痛、肿胀和发热[20]。炎症反应是其核心病理环节，因此消除炎症是治疗 AGA 的关键。牛膝具有引经下行之性，临床实践及实验研究证实其单用或配伍均有显著抗炎作用[8]。为探究 ABR-MP-SAN 治疗 AGA 的作用与机制，本研究首先采用网络药理学预测，结果显示 ABR-MP-SAN 抗 AGA 的核心成分为山柰酚、黄芩素、β-蜕皮甾酮等，关键靶点包括 IL-1β、TNF、IL-6，主要富集于 IL-17、TNF 和 NF-κB 信号通路。尿酸钠可激活免疫细胞释放 IL-17 和 TNF-α，二者均可激活 NF-κB 通路，启动 IL-6、IL-1β 等促炎因子转录，形成炎症级联反应；TNF-α 还能促进中性粒细胞浸润和滑膜增生，加剧关节红肿热痛[21-23]。为验证上述预测，本研究进一步通过动物实验考察 ABR-MP-SAN 对相关靶点及通路的调控作用。结果显示，与模型组相比，ABR-MP-SAN 组关节肿胀度和步态评分明显改善，血清 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平显著降低，效果优于 ABR-D-SAN 组；踝关节 HE 和 SO-FG 染色显示，ABR-MP-SAN 组软骨表面光滑，炎性细胞浸润显著减少，滑膜增生得到缓解；免疫组化证实 ABR-MP-SAN 组踝关节组织中 IL-17A、TNF-α 和 NF-κB p65 的阳性表达均显著降低；生物相容性评价显示，ABR-MP-SAN 对小鼠肝肾功能及肝肾组织均未见明显不良影响。

综上所述，本研究采用微沉淀法成功构建了 ABR-MP-SAN，该 SAN 粒径均一、稳定性好，能显著提高难溶性成分的含量，且可通过抑制 IL-17/NF-κB 和 TNF/NF-κB 通路的激活，减少促炎因子释放，从而减轻关节炎症。但本研究仍存在以下不足，ABR-MP-SAN 的自组装过程及其分子间相互作用尚不明确；尚未从细胞水平直接验证 ABR-MP-SAN 的抗炎作用及其机制。未来可利用光谱技术深入解析其自组装机制，并建立脂多糖联合尿酸钠刺激的 THP-1 巨噬细胞炎症模型开展细胞实验，以期为中药 SAN 的临床转化提供更充分的实验依据。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Gao Y, Dong Y Y, Guo Q, *et al*. Study on supramolecules in traditional Chinese medicine decoction [J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3268.

[2] 谢明辉, 张嘉懿, 蒋天晴, 等. 基于化学“组成-含量-相态”综合表征的黄连厚朴汤物质基础挖掘研究 [J]. 中草药, 2025, 56(11): 3879-3892.

[3] Peng A, Lin L Z, Zhao M M. Chemical basis and self-assembly mechanism of submicroparticles forming in *Chrysanthemum tea* infusion [J]. *Food Chem*, 2023, 427: 136745.

[4] 魏欣玲, 张双辰, 张年战, 等. 芍药甘草汤自组装纳米粒的促吸收作用研究 [J]. 中国药房, 2026, 37(6): 713-719.

[5] Wu J J, Yang Y, Yuan X Y, *et al*. Role of particle aggregates in herbal medicine decoction showing they are not useless: Considering *Coptis chinensis* decoction as an example [J]. *Food Funct*, 2020, 11(12): 10480-10492.

[6] Ke L J, Gao G Z, Shen Y, *et al*. Encapsulation of aconitine in self-assembled licorice protein nanoparticles reduces the toxicity *in vivo* [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2015, 10(1): 449.

[7] 程华威, 戴基浩, 董和平, 等. 清热活血逐痹汤联合正清风痛宁对痛风性关节炎炎症反应及生活质量的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52(1): 55-58.

[8] Wu J, Li J Y, Li W, *et al*. *Achyranthis Bidentatae Radix* enhanced articular distribution and anti-inflammatory effect of berberine in Sanmiao Wan using an acute gouty arthritis rat model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 221: 100-108.

[9] 郑曲, 张宇, 杨永菊, 等. 牛膝及其活性成分治疗骨关节炎的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(20): 3032-3036.

[10] Zhang J, Liu M Z, Zeng Z H. The antisolvent coprecipitation method for enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs [J]. *Int J Pharm*, 2022, 626: 122043.

[11] 朱煜文, 邓翔, 陈莉, 等. 波棱瓜子新型自组装纳米粒的构建及评价 [J]. 药学学报, 2024, 59(2): 448-454.

[12] 孟雨婷, 薛玉叶, 刘燕, 等. 甘草新型自组装纳米粒的形成及抗炎作用评价 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 2912-2922.

[13] Duan D, Doak A K, Nedyalkova L, *et al*. Colloidal aggregation and the *in vitro* activity of traditional Chinese medicines [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(4): 978-988.

[14] 梅佳华, 查学志, 柯瑾, 等. 基于 AHP-熵权法及化学计量学的虎力散提取工艺研究 [J]. 中草药, 2025, 56(13): 4643-4653.

[15] 郝佳旭, 查丽春, 范晓, 等. 基于信息熵权法优选香果健消片挥发油羟丙基-β-环糊精包合工艺及其表征 [J]. 中草药, 2022, 53(13): 3962-3971.

[16] 赵玥琪, 郝婧玮, 王镜哲. 单因素法考察川牛膝多糖提取工艺 [J]. 中国林副特产, 2019(4): 17-20.

[17] 张留记, 安鸿志, 陶珠, 等. 不同采收期牛膝茎叶的含量测定研究 [J]. 中医研究, 2023, 36(4): 64-66.

[18] 任璐, 王沁, 潘好莹, 等. 桑黄多糖通过抑制 NLRP3 炎症小体缓解急性痛风性关节炎的作用及机制研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2025, 37(11): 1994-2002.

[19] Xiang J W, Meng Y, Zhao M Y, *et al*. Super-self-assembly extraction from natural herbs [J]. *Nano Res*, 2025, 18(2): 94907094.

[20] 杨鸿雁, 汪世林, 罗孟鲜, 等. 中医外治法治疗急性痛风性关节炎的研究进展 [J]. 医药前沿, 2026, 16(10): 50-54.

[21] 刘洋, 陈荧荧, 魏子茹, 等. IL-17 信号通路调控机制及其在炎症性疾病中的干预策略研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2026, 42(3): 252-258.

[22] Ni X H, Wang Q Q, Ning Y J, *et al*. Anemoside B4 targets NEK7 to inhibit NLRP3 inflammasome activation and alleviate MSU-induced acute gouty arthritis by modulating the NF-κB signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2025, 138: 156407.

[23] Bao J M, Song Y J, Hang M H, *et al*. Huangqi Guizhi Wuwu Decoction suppresses inflammation and bone destruction in collagen-induced arthritis mice [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(2): 274-281.

[责任编辑 郑礼胜]