

托法替尼醇质体温敏凝胶的制备及其对溃疡性结肠炎模型小鼠的治疗作用

冯顺利¹, 王 会¹, 李振东², 崔 锋^{3*}

1. 河南应用技术职业学院, 河南 郑州 450042

2. 河南省人民医院, 河南 郑州 450001

3. 山西锦烁生物医药科技有限公司, 山西 晋中 030600

摘要: **目的** 制备托法替尼醇质体温敏凝胶 (Tof-ES-TG), 考察其对溃疡性结肠炎 (UC) 模型小鼠的治疗作用。 **方法** 薄膜分散法制备托法替尼醇质体 (Tof-ES)。根据单因素实验结果, 选择磷脂与胆固醇用量比、脂药比、水化体积为 Tof-ES 主要影响因素, 采用 Tof-ES 包封率、载药量和粒径的总评归一值 (OD) 为评价指标, 应用 Box-Behnken 设计-效应面法优化 Tof-ES 处方, 泊洛沙姆 188 和泊洛沙姆 407 作为基质将 Tof-ES 制备成 Tof-ES-TG。透射电镜 (TEM) 观察微观外貌。透析法考察体外释药行为, 并对 Tof-ES-TG 进行流变学研究。采用葡聚糖硫酸钠建立 UC 模型, 实验动物分为对照组、模型组、美沙拉嗪 (阳性药, $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组、Tof-TG ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组及 Tof-ES-TG 低、高剂量组 (25 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 测定疾病活动指数 (DAI)、结肠长度、结肠湿质量、结肠指数和肠黏膜损伤评分评价药效, 苏木精-伊红 (HE) 染色观察结肠病理变化。 **结果** Tof-ES 最佳处方为磷脂与胆固醇用量比 $12.5:1$, 脂药比 $9.6:1$, 水化体积 16.0 mL 。Tof-ES 形态为椭圆形或球形, 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位分别为 $(84.02 \pm 1.11) \%$ 、 $(7.64 \pm 0.17) \%$ 、 $(182.41 \pm 7.52) \text{ nm}$ 和 $(-18.16 \pm 0.40) \text{ mV}$ 。Tof-ES-TG 释药行为符合 Weibull 模型, 24 h 累积释放率为 85.71% , 流变学研究显示 Tof-ES-TG 具有固体弹性性质。体内实验结果表明, 与 Tof-TG 组相比, Tof-ES-TG 高剂量组 DAI 评分和肠黏膜损伤评分显著性下降, 结肠长度、结肠指数和结肠湿质量显著性增加, 治疗效果显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与美沙拉嗪组相比, Tof-ES-TG 高剂量组胸腺指数极显著性升高, 脾脏指数极显著性下降, UC 模型小鼠胸腺和脾脏的修复效果显著提高。 **结论** Tof-ES-TG 制备工艺稳定, 缓释特征明显, 极大提高了 Tof 对结肠炎模型小鼠的治疗作用, 值得进一步开发研究。

关键词: 托法替尼; 醇质体; 温敏凝胶; 释药机制; 溃疡性结肠炎

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)07-1880-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.07.017

Preparation of tofacitinib alcohol-based thermosensitive gel and its therapeutic effect on ulcerative colitis model mice

FENG Shunli¹, WANG Hui¹, LI Zhendong², CUI Feng³

1. Henan Vocational College of Applied Technology, Zhengzhou 450042, China

2. People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450001, China

3. Shanxi Jinsuo Biomedical Technology Co., Ltd., Jinzhong 030600, China

Abstract: **Objective** To prepare tofacitinib ethanolosome thermosensitive gel (Tof-ES-TG) and investigate its therapeutic effect on ulcerative colitis (UC) model mice. **Methods** Tofacitinib ethosomes (Tof-ES) was prepared by film dispersion method. Based on the results of single-factor experiments, dosage ratio of phospholipid to cholesterol, dosage ratio of lipids to drug and hydration volume were selected as main influencing factors, overall desirability (OD) of entrapment efficiency, drug loading and particle size were acted as response values, Box-Behnken design-response surface method was used to optimize preparations of Tof-ES, and its micromorphology was observed by transmission electron microscopy (TEM). Poloxamer 188 and poloxamer 407 were used as the matrix to formulate Tof-ES into Tof-ES-TG, drug release *in vitro* was studied by dialysis method, and rheology of Tof-ES-TG was

收稿日期: 2025-01-05

基金项目: 河南省科技攻关项目 (242102310469); 河南省教育厅人文社会科学研究项目 (2024-ZDJH-495); 山西省中央引导地方科技发展资金项目 (YDZJSX2024B014); 河南应用技术职业学院青年骨干教师资助项目 (2024-GGJS-Y001)

作者简介: 冯顺利 (1987—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为临床药学及临床用药监护。E-mail: fengshunli@163.com

*通信作者: 崔 锋 (1982—), 男, 学士, 副研究员, 研究方向为制药新技术。E-mail: CuiF1982@qq.com

also studied. UC model was induced by dextran sulfate sodium salt, the experimental animals were divided into normal group, model group, mesalazine (positive drug, $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, Tof-TG ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group and Tof-ES-TG low and high dose ($25, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups. Disease activity index (DAI), colon length, colon wet weight, colon index and intestinal mucosal damage score were measured to evaluate the efficacy, and the colon pathological changes were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** Optimal formulations of Tof-ES: phospholipid to cholesterol ratio was $12.5 : 1$, lipids to drug ratio was $9.6 : 1$ and a hydration volume was 16.0 mL . Morphology of Tof-ES was elliptical or spherical, with an encapsulation efficiency, drug loading, particle size and ζ potential of Tof-ES is $(84.02 \pm 1.11) \%$, $(7.64 \pm 0.17) \%$, $(182.41 \pm 7.52) \text{ nm}$ and $(-18.16 \pm 0.40) \text{ mV}$, respectively. Drug release behavior of Tof-ES-TG conformed to Weibull model, with a cumulative release rate of 85.71% at 24 h . Rheological studies showed that Tof-ES-TG had solid elastic properties. Compared with Tof-TG group, the DAI score and intestinal mucosal damage score of the Tof-ES-TG high dose group were significantly decreased, and the colon length, colon index and colon wet weight significantly increased, which indicating that therapeutic effects of Tof-ES-TG was better than that of the Tof-TG group ($P < 0.05, 0.01$). Compared with mesalazine group, the thymus index of the Tof-ES-TG high dose group was significantly increased, and the spleen index was significantly decreased, indicating a significant improvement in the repair of the thymus and spleen in UC model mice. **Conclusion** Preparation process of Tof-ES-TG is stable, with obvious sustained-release characteristics, and significantly improves the therapeutic effect of Tof on colitis model mice, which is worthy of further development and research.

Key words: tofacitinib; ethosomes; thermosensitive gel; release mechanism; ulcerative colitis

溃疡性结肠炎 (UC) 是一种高发的肠道黏膜炎症性疾病, 以非特异性肠道炎症为核心病理特征, 典型临床表现包括直肠出血、腹痛、腹泻及消瘦等。这些症状不仅严重影响患者生理机能, 还显著降低其心理状态与生活质量^[1]。从疾病危害角度来看, 持续的炎症反应会诱导大量炎症细胞因子释放, 进而增加肠黏膜组织细胞癌变风险; 加之其庞大的患病人口基数, UC 已成为全球医疗及临床监护领域亟待解决的重要公共卫生问题。目前 UC 的一线药物治疗主要依赖免疫抑制剂 (如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤)、糖皮质激素及氨基水杨酸盐等。尽管这些药物可通过抑制炎症反应缓解症状, 但临床应用存在明显缺陷, 一方面治疗普适性不足, 仅部分患者对传统药物敏感; 另一方面不良反应显著, 如糖皮质激素可引发血糖紊乱, 免疫抑制剂常伴随胃肠道反应^[2], 导致患者用药依从性下降。

近年来, 靶向 Janus 激酶 (JAK) 信号转导及转录激活因子 (STAT) 通路成为 UC 治疗的研究热点。该通路已被证实是 UC 发病机制中的核心信号轴, 其过度激活与炎症级联反应、肠黏膜屏障破坏密切相关^[3-4]。托法替尼 (Tof) 作为首个获批的 JAK 抑制剂, 可通过抑制 JAK 及促炎因子、调节 STAT 信号、修复肠黏膜发挥治疗作用^[5]。其多靶点抑制特性提升了治疗普适性, 但 Tof 水溶性差 (溶解度 $183.11 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、脂溶性低 (油水分配系数 1.48)^[5], 严重影响药物吸收; 且口服后易引发感染、胃肠道反应等不良反应^[6], 导致患者停药率升高, 临床应

用受限。针对口服给药的局限性, 灌肠给药成为优化 UC 治疗的重要策略。该途径具有双重优势: 药物经直肠直接作用于结肠炎症部位, 既能避免肝脏首关效应、提高局部药物浓度, 又能减少药物全身暴露、显著降低系统性不良反应发生率^[7-8], 成为优化 UC 治疗的重要方向。

醇质体 (ES) 是在脂质体处方中引入适量醇类物质 (如丙二醇、乙醇等) 制备而成的纳米囊泡体系^[9]。其微观形态与脂质体相似, 由于多数药物在醇类溶剂中具有较高溶解度, ES 可有效解决 Tof 溶解度差的难题, 且纳米级药物递送特性有助于增强药效。然而, 传统 ES 混悬液缺乏生物黏附性, 在肠道生理蠕动作用下易发生药液回流, 导致药物损失, 难以满足 UC 的治疗需求。温敏凝胶 (TG) 在低温或室温条件下呈液态, 当温度达到胶凝阈值时迅速转变为半固体凝胶状态, 可显著增强肠道黏附力, 有效解决普通灌肠液的回流问题。经灌肠给药后, 温敏凝胶体系能够实现靶向定位治疗, 显著提升局部药物浓度, 同时避免药物对胃肠道的刺激及肝脏首关效应^[10-12]。

基于上述背景, 本研究通过单因素考察结合 Box-Behnken 设计-效应面法 (BBD-RSM) 优化托法替尼醇质体 (Tof-ES) 的处方工艺, 并以泊洛沙姆 188、407 为凝胶基质, 将优化后的 Tof-ES 进一步制备成托法替尼醇质体温敏凝胶 (Tof-ES-TG)。对 Tof-ES-TG 的理化性质进行系统表征, 考察其流变学特性、体外释药行为、释药机制及

储存稳定性;采用葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导建立 UC 动物模型,通过灌肠给药途径对比 Tof 与 Tof-ES-TG 对 UC 的治疗效果,为该制剂的后续成药性评价提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;506-41100-05 型磁力搅拌器,德国 Heidolph 公司;KQ-800DM 型超声仪,昆山市超声仪器有限公司;MSE125P-CE 型电子天平,德国 Sartorius 公司;DH-1600 型高速离心机,上海德洋意邦仪器有限公司;Mastersizer 3000 型粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;UDT-818A-8 型溶出仪,东南科仪科技有限公司;DV1400 型旋转黏度计,荷兰 TQC 科学仪器公司;Talos F200i S/TEM 型透射电子显微镜,赛默飞世尔上海仪器有限公司;RS1 型高剪切流变仪,赛默飞世尔上海仪器有限公司;RM2016 型病理切片机,德国 LEICA 公司;JB-L5 型冻台,武汉俊杰电子有限公司;NIKON ECLIPSE CI 型光学显微镜,日本尼康公司。

1.2 药品与试剂

对照品 Tof (批号 PBN2022588,质量分数 99.2%),南京药石科技股份有限公司;Tof 原料药(批号 201202,质量分数 98.0%),深圳振强生物技术有限公司;大豆卵磷脂(批号 SY-SO-220209),上海艾维拓医药科技公司;胆固醇(批号 P221001),西安晋湘药用辅料有限公司;葡聚糖凝胶 G-50 (批号 R24S11D65891),上海源叶生物科技有限公司;丙二醇(批号 20230822),国药集团化学试剂有限公司;泊洛沙姆 407(批号 GNG06521B),德国 BASF 公司;聚山梨酯-80 (批号 20230517),国药集团化学试剂有限公司;泊洛沙姆 188 (批号 GNG21822B),德国 BASF 公司;美沙拉嗪(批号 20240220),上海源叶生物科技有限公司;DSS (批号 C12598451),上海麦克林生化科技有限公司;多聚甲醛(批号 CR2309044),武汉塞维尔生物科技有限公司;苏木素-伊红(HE)染液(批号 B1002),武汉百仟度生物科技有限公司。

1.3 动物

SPF 级健康昆明小鼠,体质量 18~22 g,雌雄兼具,购自河南省动物实验中心[生产许可证号 SCXK(豫)2020-0001]。实验过程遵循河南应用技术职业学院有关实验动物管理规定,动物实验伦理

批准号为 DWLL-2024-013。

2 方法与结果

2.1 Tof-ES 的制备

取 20 mg 的 Tof、处方量的卵磷脂和胆固醇置于圆底烧瓶,加入乙醇 30 mL,密封,置 60 °C 水浴中 700 r·min⁻¹ 磁力搅拌至澄清,以 40 r·min⁻¹ 减压旋蒸除去乙醇,即得均匀透明的脂质薄膜。加入一定体积分数的丙二醇水溶液,密封,置于 60 °C 水浴中以 700 r·min⁻¹ 磁力搅拌 25 min,使之充分水化,探头超声(200 W、40 kHz)10 min,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得 Tof-ES 混悬液。采用相同方法制备不含 Tof 的空白凝胶(BG)。

2.2 Tof 含量测定

2.2.1 色谱条件 采用 Waters Symmetry ShieldTM RP₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为乙腈-0.27% KH₂PO₄ 水溶液(30:70);检测波长为 210 nm;进样量为 10 μL;体积流量为 1.0 mL·min⁻¹;柱温为 40 °C。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取 Tof-ES 混悬液 1 mL 至 50 mL 量瓶中,加入适量乙腈超声破坏 Tof-ES,放冷后加乙腈-0.27% KH₂PO₄ 水溶液(30:70)定容,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 2 mL 至 10 mL 量瓶中,加乙腈-0.27% KH₂PO₄ 水溶液(30:70)定容,即得 Tof-ES 供试品溶液。同法制备不含 Tof 的 BG 溶液。

2.2.3 Tof 对照品溶液的制备 精密称取 16.800 mg 的 Tof 对照品至 50 mL 量瓶中,加乙腈定容至刻度线,配制成质量浓度为 336.000 μg·mL⁻¹ 的 Tof 对照品储备液。

2.2.4 专属性考察 取 BG 溶液、Tof 对照品溶液和 Tof-ES 供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果见图 1, Tof 色谱峰无干扰,专属性高。

2.2.5 线性关系考察 取“2.2.3”项下对照品储备液,用乙腈-0.27% KH₂PO₄ 水溶液(30:70)稀释配制成质量浓度为 13.440、6.720、3.360、0.336、0.168、0.042 μg·mL⁻¹ 对照品溶液。按“2.2.1”项下方法测定。以 Tof 质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标,拟合回归方程 $Y=24.6158X+0.2149$, $r=0.9999$,表明 Tof 在 0.042~13.440 μg·mL⁻¹ 线性关系良好。

2.2.6 稳定性考察 取 Tof-ES 供试品溶液于配制 0、2、4、8、12、24 h 后测定 Tof 峰面积,峰面积 RSD 值为 1.09% ($n=6$),表明 Tof-ES 供试品溶液

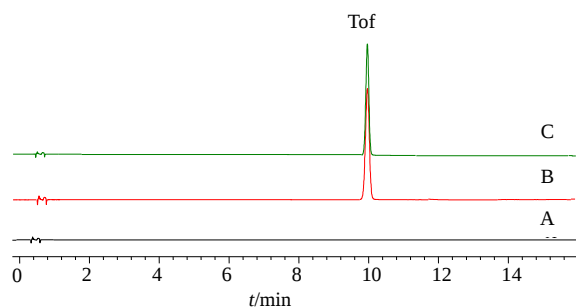


图 1 空白凝胶溶液 (A)、Tof 对照品 (B) 和 Tof-ES 样品 (C) 溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank gel solution (A), Tof reference substance (B), and Tof-ES sample (C) solutions

稳定性良好。

2.2.7 精密度考察 取质量浓度为 13.440、0.336、0.042 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Tof 对照品溶液，分别测试 6 次，测得 Tof 峰面积的 RSD 分别为 0.40%、0.26% 和 0.58%，表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性考察 取 Tof-ES 混悬液，按“2.2.2”项下制备 6 份 Tof-ES 供试品溶液，测得 Tof 含量 RSD 值为 1.44%，表明方法重复性较好。

2.2.9 加样回收率考察 精密取 9 份 Tof-ES 混悬液各 0.5 mL 至 9 个 50 mL 量瓶中，分成 3 组，分别按 Tof 含量的 80%、100% 和 120% 加入 Tof 对照品，按“2.2.2”项下测定 Tof 总含量。计算得 Tof 回收率分别为 $(100.24 \pm 1.18)\%$ 、 $(99.27 \pm 1.09)\%$ 、 $(100.56 \pm 1.40)\%$ ；RSD 分别为 1.18%、1.10% 和 1.39%，表明该方法准确度良好。

2.3 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位测定

取葡聚糖凝胶 G-50 加纯化水充分溶胀，制备微柱，装入离心管中。精密量取 0.2 mL Tof-ES 混悬液加入微柱，3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min，加 0.2 mL 纯化水重复洗脱 3 次，合并洗脱液，加入 5 mL 乙醇，探头超声 10 min（功率 200W，频率 20 kHz），加乙醇稀释至 10 mL。测定包封 Tof 的量 (M_1)，根据 Tof 投药总量 (M) 计算包封率。根据 Tof、胆固醇、卵磷脂总用量 (W) 计算 Tof-ES 载药量。取 Tof-ES 混悬液 0.1 mL 加至 4 mL 纯化水中，混匀后采用 Mastersizer 3000 型粒度仪测定粒径、多分散指数 (PDI) 和 ζ 电位，各样品平行测试 3 次。

$$\text{包封率} = M_1 / M$$

$$\text{载药量} = M_1 / W$$

2.4 单因素考察 Tof-ES 处方

2.4.1 磷脂与胆固醇用量比的考察

在脂药比为

10 : 1、丙二醇体积分数为 35%、水化体积（丙二醇水溶液）为 15 mL 条件下，按照“2.1”项下方法制备 Tof-ES，考察磷脂与胆固醇用量比对 Tof-ES 包封率、载药量和粒径的影响，结果见表 1。

表 1 磷脂与胆固醇用量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of phospholipids to cholesterol ratio ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

磷脂与胆固醇用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
8 : 1	60.11 ± 0.91	5.33 ± 0.13	233.65 ± 10.52
10 : 1	68.73 ± 1.02	6.02 ± 0.22	216.22 ± 7.94
12 : 1	76.94 ± 1.17	6.95 ± 0.19	187.40 ± 7.03
14 : 1	67.48 ± 1.36	5.89 ± 0.20	183.91 ± 9.82
16 : 1	64.44 ± 0.89	5.54 ± 0.15	180.75 ± 11.14

随着胆固醇在脂质载体中用量比例的逐渐下降，Tof-ES 包封率和载药量呈先增加后下降趋势，可能是胆固醇用量比例过小时 Tof-ES 结构稳定性较差^[13]，导致药物易泄露，故包封率和载药量下降；胆固醇用量比例较大时胆固醇与 Tof 竞争占据磷脂双分子层载药空间^[13-14]，进而影响了 Tof-ES 载药。由于胆固醇插入磷脂双分子层时会使 Tof-ES 粒径变大，故随着胆固醇用量比例的减小 Tof-ES 粒径随之减小。磷脂与胆固醇用量比为 12 : 1 时，Tof-ES 包封率和载药量相对较大，粒径小于 200 nm，故后续以磷脂与胆固醇用量比 12 : 1 为中心，对 10 : 1~14 : 1 区间进行优化。

2.4.2 脂药比的考察 在磷脂与胆固醇用量比为 12 : 1、丙二醇体积分数为 35%、水化体积为 15 mL 条件下，按照“2.1”项下方法制备 Tof-ES，考察脂药比对 Tof-ES 的影响，结果见表 2。

表 2 脂药比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effects of lipids to drug ratio ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

脂药比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
6 : 1	60.20 ± 0.91	8.47 ± 0.13	180.24 ± 5.27
8 : 1	68.14 ± 1.03	7.42 ± 0.24	183.72 ± 6.69
10 : 1	78.13 ± 1.29	6.91 ± 0.16	191.56 ± 7.52
12 : 1	79.56 ± 1.04	6.09 ± 0.18	226.90 ± 12.14
14 : 1	79.47 ± 0.95	5.57 ± 0.20	245.55 ± 10.91

适当增加脂药比有利于提高 Tof-ES 包封率，这是由于脂质用量增加为 Tof 提供了更多载药空间^[15]，当脂药比大于 10 : 1 时包封率增加幅度趋缓，表明载药已达饱和，但过多的脂质用量导致 Tof-ES 载药量下降。脂质用量越大时 Tof-ES 之间发生黏

连、融合的几率也越大^[15], 导致 ToF-ES 粒径随着脂药比的增加而变大。脂药比为 10:1 时 ToF-ES 包封率和载药量相对较大, 粒径小于 200 nm, 故后续以脂药比 10:1 为中心, 对 8:1~12:1 区间进行优化。

2.4.3 水化体积考察 在磷脂与胆固醇用量比为 12:1, 丙二醇体积分数为 35%、脂药比 10:1 条件下, 按照“2.1”项下方法制备 ToF-ES, 考察水化体积对 ToF-ES 的影响, 结果见表 3。

表 3 水化体积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 3 Effects of hydration volume ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

水化体积/mL	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
5	60.58±0.86	5.34±0.22	277.17±24.15
10	72.16±0.92	6.47±0.17	229.04±13.44
15	77.80±1.14	7.04±0.12	185.26±9.61
20	71.43±1.18	6.24±0.16	180.11±8.14
25	68.17±0.90	5.92±0.21	176.35±8.65

ToF-ES 包封率和载药量随着水化体积的增加呈先增加后下降趋势, 可能是水化体积较小时磷脂的水化效果差, 影响了磷脂双分子层的载药空间, 故 ToF-ES 包封率和载药量较低, 同时较小的水化体积导致 ToF-ES 之间容易碰撞融合, 故粒径较大。水化体积较大时可能影响 ToF-ES 的结构稳定性, 也增加了 ToF 进入水相的量, 故使 ToF-ES 包封率及载药量下降。由于较大的水化体积降低了 ToF-ES 之间发生碰撞融合、粘连几率, 故粒径下降^[16]。水化体积为 15 mL 时 ToF-ES 包封率和载药量相对较大, 粒径小于 200 nm, 故后续以水化体积 15 mL 为中心, 对 10~20 mL 进行优化。

2.4.4 丙二醇体积分数考察 在磷脂与胆固醇用量比 12:1、脂药比 10:1、水化体积 10 mL 条件下, 按照“2.1”项下方法制备 ToF-ES, 考察丙二醇体积分数对 ToF-ES 的影响, 结果见表 4。

随着丙二醇体积分数的增加 ToF-ES 包封率和载药量呈先增大后下降趋势, 可能是 ToF 在丙二醇中溶解度良好, 适度增加丙二醇体积分数利于 ToF-ES 包载 ToF, 但丙二醇体积分数过高时可能会溶解磷脂及胆固醇等脂质载体, 进而影响 ToF-ES 结构稳定性, 导致药物泄漏^[13]。丙二醇体积分数对 ToF-ES 粒径影响不大, 由于丙二醇体积分数为 30%时 ToF-ES 包封率大于 80%, 载药量相对较高, 粒径相对较

表 4 丙二醇体积分数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Effects of volume fraction of propylene glycol ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

丙二醇体 积分数/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
20	63.08±1.03	5.77±0.19	184.26±7.12
25	78.54±1.37	6.84±0.12	178.93±6.24
30	81.78±1.61	7.28±0.25	180.78±7.52
35	77.96±1.55	6.92±0.18	185.04±8.69
40	70.15±1.14	6.15±0.17	177.90±6.48

小, 故确定 30%为丙二醇最佳体积分数。

2.5 BBD-RSM 优化 ToF-ES 处方

2.5.1 实验设计及结果 根据“2.4”项考察结果, 选择磷脂与胆固醇用量比 (X_1)、脂药比 (X_2) 和水化体积 (X_3) 为自变量; 包封率、载药量和粒径是纳米制剂主要质量参数, 故分别作为优化指标 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 。为从整体上控制 ToF-ES 质量, 采用 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 总评归一值 (OD) 作为响应值, 根据 BBD-RSM 进行 3 因素、3 水平共计 17 次实验, 对 ToF-ES 处方进行优化。实验设计及结果见表 5。

$$d_{\text{包封率}} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$$

$$d_{\text{载药量}} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$$

$$d_{\text{粒径}} = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$$

M_i 、 $M_{\max}$ 和 $M_{\min}$ 分别为包封率、载药量和粒径实测值、最大值和最小值

$$\text{OD} = (d_{\text{包封率}} \times d_{\text{载药量}} \times d_{\text{粒径}})^{1/3}$$

2.5.2 模型拟合与方差分析 使用 Design Expert V 12.0 对表数据进行数据拟合分析, 得 OD 多元二次项方程: $\text{OD} = 0.85 + 0.14 X_1 - 0.072 X_2 + 0.053 X_3 - 0.022 X_1 X_2 + 0.068 X_1 X_3 - 0.21 X_2 X_3 - 0.29 X_1^2 - 0.320.32 X_2^2 - 0.32 X_3^2$, 复相关系数 R^2 和修正复相关系数 R_{Adj}^2 分别为 0.990 5 和 0.978 3, 两者均接近 1, 提示该数学模型因变量和响应值的相关性良好。方差结果见表 6, 模型 $P < 0.000 1$, 说明构建的数学模型有极显著性意义; 失拟项 $P = 0.069 0$, 说明未知或干扰因素不影响结果, 因此该数学模型对 ToF-ES 处方研究具有借鉴意义和指导价值。数学模型中, X_3 、 $X_1 X_3$ 具有显著性差异 ($P < 0.05$), X_2 、 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 、 $0.32 X_2^2$ 、 X_3^2 均具极显著差异 ($P < 0.01$)。据 F 值判断, 各因素对 OD 影响大小顺序为 $X_1 > X_2 > X_3$ 。

采用 Design Expert V12.0 绘制 X_1 、 X_2 、 X_3 对 OD 值的三维曲面图(图 2), 随着其中两因素的增加 OD

表 5 BBD-RSM 实验因素水平、设计及结果
Table 5 BBD-RSM factor level, test design and results

序号	X ₁	X ₂	X ₃ /mL	Y ₁ /%	Y ₂ /%	Y ₃ /nm	OD
1	10 : 1(-1)	8 : 1(-1)	15(0)	72.84	7.92	224.44	0.172
2	12 : 1(0)	10 : 1(0)	15	83.65	7.54	184.21	0.876
3	12 : 1	10 : 1	15	81.18	7.33	180.87	0.809
4	14 : 1(1)	8 : 1	15	73.14	8.04	197.04	0.521
5	14 : 1	12 : 1(1)	15	77.62	5.89	206.14	0.260
6	14 : 1	10 : 1	10(-1)	72.59	6.36	215.52	0.227
7	10 : 1	10 : 1	10	73.54	6.44	225.05	0.101
8	12 : 1	10 : 1	15	84.22	7.58	186.74	0.876
9	10 : 1	10 : 1	20(1)	71.86	6.41	224.33	0.106
10	12 : 1	12 : 1	20	76.44	5.71	190.08	0
11	12 : 1	10 : 1	15	82.83	7.46	183.94	0.848
12	12 : 1	10 : 1	15	81.71	7.38	179.22	0.839
13	12 : 1	8 : 1	10	69.84	7.49	188.37	0
14	12 : 1	8 : 1	20	72.57	7.85	194.26	0.490
15	10 : 1	12 : 1	15	77.46	5.93	225.64	0
16	12 : 1	12 : 1	10	78.52	6.07	204.58	0.348
17	14 : 1	10 : 1	20	74.85	6.72	186.77	0.502

表 6 回归模型方差分析结果
Table 6 Results of variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.79	9	0.20	81.00	<0.000 1	X ₁ ²	0.36	1	0.36	147.96	<0.000 1
X ₁	0.16	1	0.16	65.08	<0.000 1	X ₂ ²	0.43	1	0.43	173.29	<0.000 1
X ₂	0.04	1	0.04	16.86	0.004 5	X ₃ ²	0.44	1	0.44	178.19	<0.000 1
X ₃	0.02	1	0.02	9.09	0.019 5	残差	0.02	7	2.45×10 ⁻³		
X ₁ X ₂	1.97×10 ⁻³	1	1.97×10 ⁻³	0.80	0.400 1	失拟项	0.01	3	4.66×10 ⁻³	5.81	0.061 1
X ₁ X ₃	0.02	1	0.02	7.44	0.029 5	纯偏差	3.21×10 ⁻³	4	8.01×10 ⁻⁴		
X ₂ X ₃	0.18	1	0.18	71.68	<0.000 1	总离差	1.18	16			

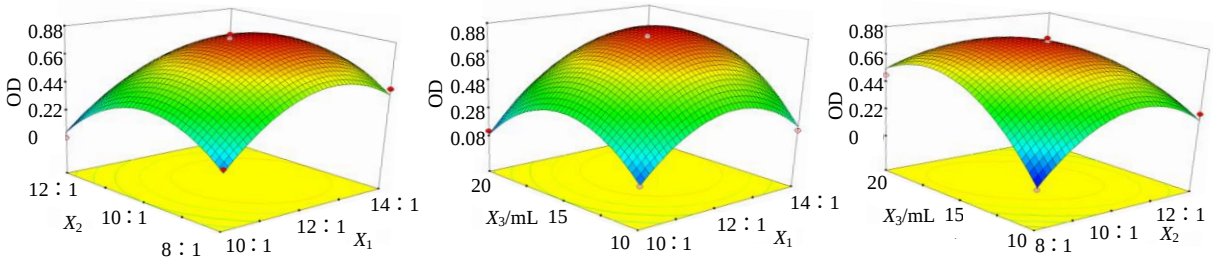


图 2 X₁、X₂、X₃ 对 OD 值影响的响应面图
Fig. 2 Response surface plot of X₁, X₂ and X₃ on OD value

值均呈先增加后下降趋势，响应面二次系数显著性分析表明 X₁X₃、X₂X₃ 交互作用对 OD 值有较显著影响 ($P<0.05$)，且以 X₂X₃ 两者之间的相互影响更加显著 ($P<0.000\ 1$)。设定 OD 取值范围为 0~1，得到 ToF-ES 最佳处方为 X₁=12.53 : 1，X₂=9.64 : 1，

X₃=15.94 mL，OD 值为 0.919。考虑到实际制备时便捷性，将 X₁ 调整为 12.5 : 1，X₂ 调整为 9.6 : 1，X₃ 调整为 16.0 mL。

2.6 ToF-ES 最佳处方验证

平行制备 3 批 ToF-ES，测得平均包封率、载

药量和粒径分别为 $(84.02 \pm 1.11) \%$ 、 $(7.64 \pm 0.17) \%$ 和 $(182.41 \pm 7.52) \text{ nm}$ (图 3-A), 计算得实际 OD 值为 0.913。以预测 OD 值 (0.919) 为参考, 计算得实际 OD 相对偏差仅为 -0.66% , 证明构建的 OD 数学模型适用于 Tof-ES 处方工艺研究。另测得 Tof-ES 的 PDI 值为 (0.092 ± 0.007) , ζ 电位为 $(-18.16 \pm 0.40) \text{ mV}$ (图 3-B)。

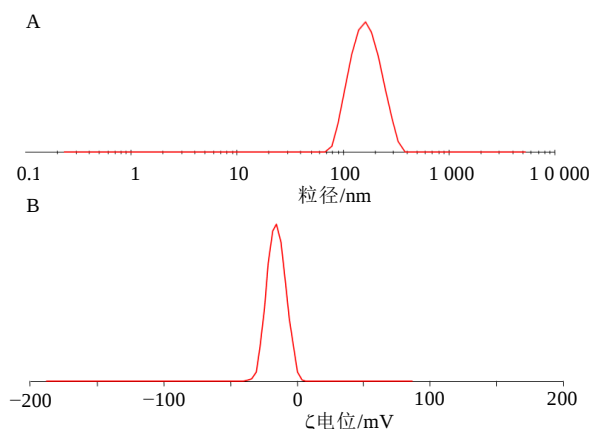


图 3 Tof-ES 粒径 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 3 Particle size (A) and ζ potential (B) of Tof-ES

2.7 透射电镜观察

取稀释至一定质量浓度的 Tof-ES 混悬液和空白介质涂敷在铜网上, 加 1.5% 磷钨酸钠染色, 晾干, 置于加速电压 200 kV 的 TEM 上, 放大 13 500 倍观察 Tof-ES 形貌。Tof-ES 形貌为球形 (图 4-A), 无黏连, 观察到的粒径大小与粒度仪测得结果基本一致, 均小于 200 nm, 空白介质未见任何纳米粒子 (图 4-B)。

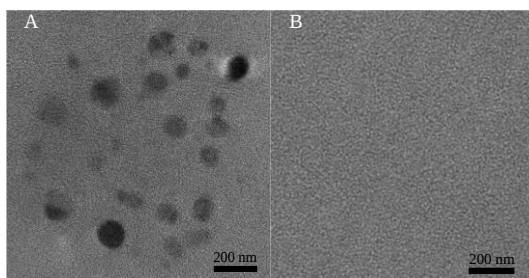


图 4 Tof-ES (A) 和空白介质 (B) 透射电镜图

Fig. 4 TEM of Tof-ES (A) and blank medium (B)

2.8 Tof-ES-TG 的制备工艺

温敏凝胶基质研究较为成熟, 参考文献方法^[17], 并略作调整。分别精密称取 4.5 g 泊洛沙姆 188、27.0 g 泊洛沙姆 407 和 2.0 g 聚山梨酯-80 置于烧

杯, 加入 Tof-ES 混悬液 150 mL (Tof 质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 冰浴中搅拌均匀, 密封置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱溶胀 12 h, 即得 Tof-ES-TG。参考文献方法^[17], 测得 Tof-ES-TG 相变温度为 $(32.94 \pm 0.20) \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。Tof-ES-TG 在室温环境中 ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 呈液态, 倒置时流淌现象明显; Tof-ES-TG 在 $33 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时可迅速胶凝成半固体状, 倒置时不发生流淌, 见图 5。

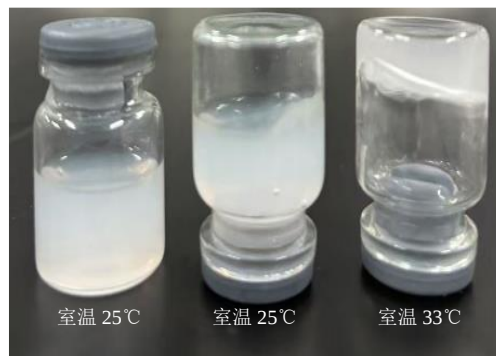


图 5 Tof-ES-TG 在不同温度下外观性状

Fig. 5 Appearance characteristics of Tof-ES-TG at different temperatures

2.9 Tof-ES-TG 流变学研究

2.9.1 线性应变扫描分析 振荡模式下, 设置角频率为 $10 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 测试温度为 $33 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 应变区间为 0.01% ~ 100% , 平板直径为 35 mm, 分别测试 Tof-ES-TG 储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 随剪切应变变化的曲线, 结果见图 6。当应变小于 1% 时 G' 始终大于 G'' , 表明凝胶弹性占主导地位。随着应变持续增大, G' 迅速小于 G'' , 表明 Tof-ES-TG 内部交联结构破坏, 凝胶转变为溶液状态。因此所有的动态振荡实验均需控制应变小于 1% 以保证结构完整性。

2.9.2 频率扫描分析 测试条件: 振荡模式下, 应变设置为 1% , 温度设定为 $33 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 范围设置为

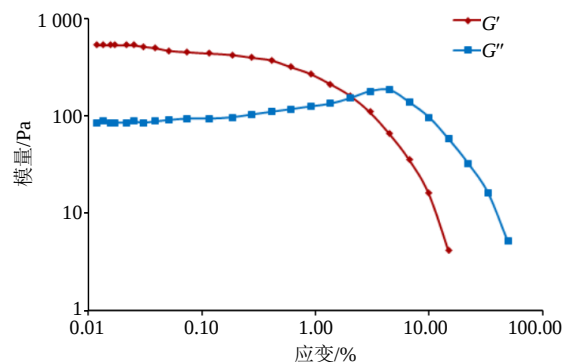


图 6 线性应变扫描考察

Fig. 6 Investigation of linear strain scanning

0.01~100 Hz。结果见图 7, G' 始终大于 G'' , 表明 Tof-ES-TG 具有明显的黏弹性固体性质, 主要与温敏凝胶形成的稳定三维网状结构有关^[11]。

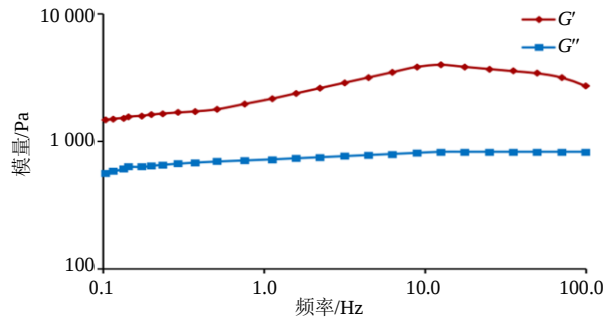


图 7 频率扫描考察

Fig. 7 Investigation of frequency scanning

2.10 Tof-ES-TG 体外释药行为研究

取 Tof 原料药, 参考“2.8”项下方法制备成 Tof 温敏凝胶 (Tof-TG)。取 Tof-TG 和 Tof-ES-TG 适量 (Tof 含量均为 15 mg), 加入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液, 密封于透析袋中 (截留相对分子质量 3.5×10^3)。为模拟结肠环境, 选择 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 500 mL 作为介质, 介质恒温 37 °C, 仪器转速 $75 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。于 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00、18.00、24.00 h 取 5 mL 溶出介质, 立即补充空白介质以保持介质的总体积不变, 按照“2.2”项下方法测定 Tof 质量浓度, 并计算 Tof-TG 和 Tof-ES-TG 各取样点累积释放率, 结果见图 8。Tof-TG 6 h 累积释放率达 95% 以上, 而 Tof-ES-TG 表现出明显的缓释特征, 24 h 累积释放率为 85.71%。分别采用零级、一级、Higuchi、Weibull 模型对 Tof-ES-TG 释药行为进行拟合^[18], 结果见表 7, 其体外释药行为与 Weibull 模型拟合度最高 ($r=0.9973$)。

2.11 Tof-ES-TG 稳定性研究

Tof-ES-TG 稳定性实验需要考察其理化性质

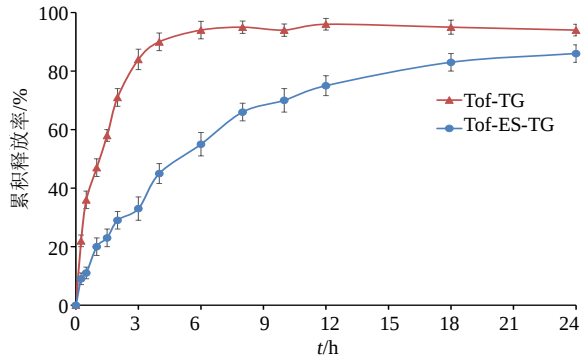


图 8 体外释药结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Results of drug release ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 7 Tof-ES-TG 药物释放模型和相关系数

Table 7 Fitting release model and coefficient of Tof-ES-TG

模型	拟合方程	r
零级模型	$M_t/M_\infty=0.0322t+0.2405$	0.7527
一级模型	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.0805t-0.2258$	0.9072
Higuchi 模型	$M_t/M_\infty=0.1876t^{1/2}+0.0465$	0.9543
Weibull 模型	$\ln \ln [1/(1-M_t/M_\infty)]=0.7616 \ln t-1.5511$	0.9973

M_t 和 M_∞ 为 t 和 ∞ 时间累积释放率, M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率。

M_t and M_∞ are accumulative drug-release at time t and ∞ , M_t/M_∞ is accumulative release rate at time t .

稳定性, 故 Tof-ES-TG 性状、胶凝时间、黏度及 pH 值也纳入稳定性考察范围。取 Tof-ES-TG 密封于医用塑料软管, 存放于 4 °C 冰箱中, 于放置 0、1、2、3、6 个月分别取样, 并挤出适量 Tof-ES-TG, 观察外观, 测试胶凝时间, 并于 37 °C 下测试包封率、载药量、粒径、黏度及 pH 值。结果如表 8 所示, 放置 6 个月后性状和胶凝时间未发生变化, 与第 0 个月相比, 第 6 个月 Tof-ES-TG 粒径略有增长, 但仍小于 200 nm, 而黏度和 pH 值基本保持不变, 表明 Tof-ES-TG 在低温储存时稳定性良好。

表 8 稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Results of stability ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间/月	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	性状	胶凝时间/s	黏度/(Pa·s)	pH 值
0	82.83±1.08	7.24±0.14	189.27±10.21	均一、质地细腻	24.52±2.44	13.56±1.14	6.85±0.21
1	82.14±0.71	7.16±0.19	187.70±11.14	均一、质地细腻	23.66±1.84	12.98±0.98	6.71±0.17
2	81.75±1.26	7.09±0.11	187.61±9.88	均一、质地细腻	25.03±2.19	13.94±1.08	6.89±0.12
3	81.32±1.08	7.08±0.13	193.99±10.06	均一、质地细腻	24.78±1.27	13.71±1.31	6.80±0.19
6	81.56±0.95	7.11±0.10	190.18±12.94	均一、质地细腻	24.19±2.23	13.65±1.20	6.76±0.23

2.12 Tof-ES-TG 对 UC 的治疗作用

2.12.1 造模与分组 将昆明小鼠于实验室饲养 1 周（环境温度为 25 ℃，湿度为 55%）。取 40 只小鼠分别 ig 给予 3.5% DSS 水溶液（0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹），连续 14 d，按表 9 方法评价疾病活动指数（DAI）^[19]，选择体质量下降幅度、大便形状和大便隐血 3 项 DAI 总评分大于 5 分的小鼠作为 UC 模型小鼠。根据 Tof 临床使用剂量及安全性^[2]，并结合前期动物预试验，确定 Tof-TG 给药剂量为 50 mg·kg⁻¹。将 UC 模型小鼠随机分为模型组（0.9%氯化钠溶液）、阳性药组（ig 给予美沙拉嗪^[19]，0.5 g·kg⁻¹）、Tof-TG 组（50 mg·kg⁻¹）以及 Tof-ES-TG 低、高剂量组（25、50 mg·kg⁻¹），每组均 8 只，另取 8 只正常小鼠作为对照组（0.9%氯化钠溶液）。造模成功后经直肠给药，每天 1 次，操作过程为：固定小鼠，将软管从肛门缓慢插入约 3.5 cm，注入灌肠液，15 s 后缓慢拔出，擦拭肛门后将小鼠倒置 30 s，连续 14 d。

2.12.2 DAI 结果 结果见表 10，与对照组相比，模型组 DAI 评分显著升高（*P*<0.01），表明建模成功。与模型组相比，各给药组第 7 天和第 14 天 DAI 评分均有显著或极显著下降（*P*<0.05、0.01），表明各给药组均可显著缓解模型小鼠 UC

表 9 DAI 评分标准

Table 9 DAI scoring criteria			
评分	指标		
	体质量下降幅度/%	大便形状	大便隐血
0	无变化	正常	无血便
1	[1, 6]	松软	极少
2	(6, 10]	松散但不粘肛周	较少
3	(10, 15]	稀便	较多
4	>15%	水样便（可见血便）	大量

损伤症状^[19]。与 Tof-TG 组相比，Tof-ES-TG 低剂量组第 7 天和第 14 天无显著性差异（*P*>0.05），表明适当降低 Tof-ES-TG 给药剂量可达到 Tof 治疗效果。与 Tof-TG 组相比，Tof-ES-TG 高剂量组在给药剂量相同条件下第 7 天 DAI 评分显著性下降（*P*<0.05），第 14 天 DAI 评分极显著性下降（*P*<0.01），证明 Tof-ES-TG 进一步增强了 Tof 缓解 UC 的药效。与阳性组相比，Tof-TG 组和 Tof-ES-TG 低剂量组第 7 天和第 14 天 DAI 评分显著性高于阳性组（*P*<0.05），但 Tof-ES-TG 高剂量组第 7 天和第 14 天 DAI 评分与阳性组相比无显著性差异（*P*>0.05），说明 Tof-ES-TG 高剂量可达到美沙拉嗪阳性组的治疗效果。

表 10 各组小鼠 DAI 评分结果（ $\bar{x} \pm s$ ，*n*=8）

Table 10 Results of DAI score in different rat groups ($\bar{x} \pm s$ ，*n*=8)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	DAI 评分		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
对照	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	—	6.06±1.67**	5.11±1.43**	4.36±1.50**
阳性药	500	6.11±1.28	3.86±1.39 ^{##}	2.17±0.63 ^{##}
Tof-TG	50	5.89±1.15	4.38±0.96 [#]	3.27±0.88 [#]
Tof-ES-TG	25	6.00±1.43	4.24±1.11 [#]	3.42±0.91 [#]
	50	6.07±1.25	3.64±0.97 ^{##Δ}	2.26±0.87 ^{##ΔΔ}

与对照组比较：***P*<0.01；与模型组比较：[#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01；与 Tof-TG 组比较：^Δ*P*<0.05 ^{ΔΔ}*P*<0.01；与阳性组比较：[§]*P*<0.05。

***P*<0.01 vs normal group; [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01 vs model group; ^Δ*P*<0.05 ^{ΔΔ}*P*<0.01 vs Tof-TG group; [§]*P*<0.05 vs positive group.

2.12.3 结肠长度、湿质量、结肠指数及肠黏膜损伤评分 脱臼处死小鼠，剖取结肠，用游标卡尺测量长度。0.9%氯化钠溶液冲洗结肠，滤纸吸干，记录结肠湿质量。计算结肠指数。用 0.9%氯化钠溶液冲洗结肠，观察结肠黏膜损伤状况，进行肠黏膜损伤评分，评分标准为：全肠正常评分为 0；水肿，轻度充血，无糜烂时评分为 1；水肿充血，有糜烂或肠黏连时评分为 2；水肿充血严重，黏膜表面有坏死，溃疡最大直径小于 1 cm，肠壁表面有坏死时评

分为 3；水肿充血严重，黏膜表面有坏死，溃疡最大直径大于 1 cm 或全肠壁坏死时评分为 4，结果见表 11。

结肠指数=结肠湿质量/体质量

与对照组相比，模型组结肠长度、结肠湿质量和结肠指数极显著性下降（*P*<0.01），肠黏膜损伤评分极显著性增加（*P*<0.01），表明建模成功。与模型组相比，各给药组结肠长度、结肠湿质量和结肠指数均具有显著性或极显著性增加（*P*<0.05、

表 11 各组小鼠结肠长度、结肠湿质量、结肠指数和肠黏膜损伤评分 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 11 Colon length, colon wet weight, colon index and intestinal mucosal injury ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	结肠长度/cm	结肠湿质量/g	结肠指数/%	肠黏膜损伤评分
对照	—	9.92 ± 0.61	0.42 ± 0.09	1.08 ± 0.19	0.13 ± 0.35
模型	—	$7.26 \pm 0.52^{**}$	$0.21 \pm 0.03^{**}$	$0.70 \pm 0.08^{**}$	$2.06 \pm 0.30^{**}$
阳性药	500	$9.17 \pm 0.57^{###}$	$0.38 \pm 0.07^{###}$	$1.06 \pm 0.11^{\#}$	$1.07 \pm 0.28^{###}$
Tof-TG	50	$8.78 \pm 0.49^{###\$}$	$0.34 \pm 0.03^{###}$	$0.92 \pm 0.05^{\#\$}$	$1.55 \pm 0.37^{\#\$}$
Tof-ES-TG	25	$8.65 \pm 0.55^{###\$}$	$0.32 \pm 0.06^{###}$	$0.87 \pm 0.10^{\#\$}$	$1.58 \pm 0.60^{\#\$}$
	50	$9.43 \pm 0.62^{###\Delta}$	$0.39 \pm 0.04^{###\Delta}$	$1.04 \pm 0.11^{###\Delta}$	$0.96 \pm 0.23^{###\Delta}$

与对照组比较: $^{**}P<0.01$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{###}P<0.01$; 与 Tof-TG 组比较: $^{\Delta}P<0.05$; 与阳性组相比: $^{\$}P<0.05$ 。

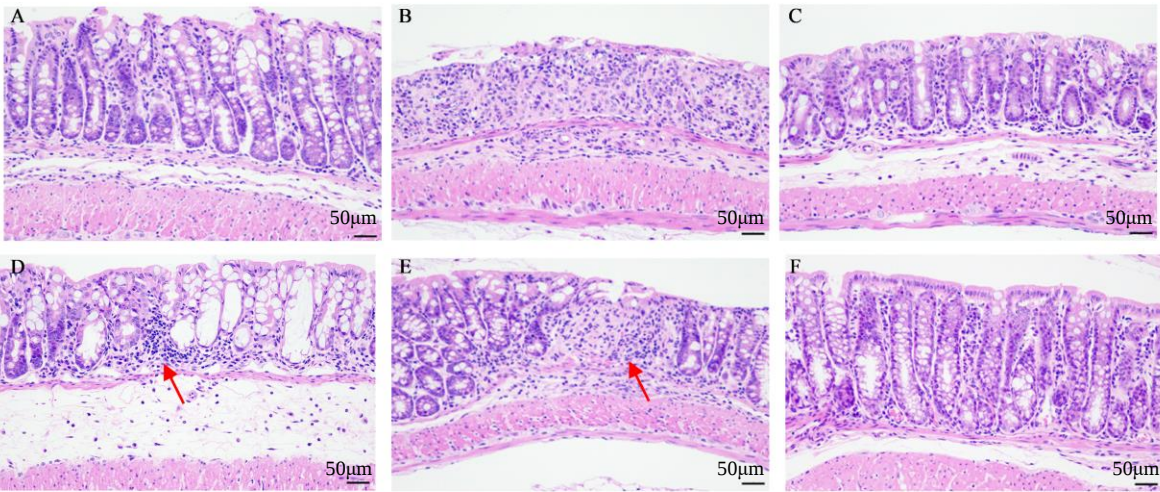
$^{**}P<0.01$ vs normal group; $^{\#}P<0.05$ $^{###}P<0.01$ vs model group; $^{\Delta}P<0.05$ vs Tof-TG group; $^{\$}P<0.05$ vs positive group.

0.01), 肠黏膜损伤评分均具有显著性或极显著性下降 ($P<0.05$ 、 0.01), 表明各给药组均可显著改善小鼠 UC 损伤。与 Tof-TG 组相比, Tof-ES-TG 低剂量组各个指标无显著性差异 ($P>0.05$), 提示适当降低 Tof-ES-TG 给药剂量可达到 Tof 治疗效果, Tof-ES-TG 高剂量组在给药剂量相同的条件下, 结肠长度、结肠湿质量和结肠指数显著性增加 ($P<0.05$), 肠黏膜损伤评分显著性下降 ($P<0.05$), 证明 Tof-ES-TG 增强了 Tof 治疗 UC 的效果。Tof-TG 组和 Tof-ES-TG 低剂量组结肠长度和结肠指数显著性低于阳性组 ($P<0.05$), 而肠黏膜损伤评分显著性高于阳性组 ($P<0.05$), 说明治疗效果低于美沙拉嗪阳性组治疗效果。Tof-ES-TG 高剂量组各个指标与阳性组相比无显著性差异 ($P>0.05$), 说明 Tof-ES-TG 高剂量可达到美沙拉嗪阳性组的治疗效果。

2.12.4 病理组织学观察 取各组小鼠结肠, 置于

4%多聚甲醛中 72 h, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 置显微镜下观察小鼠结肠组织的病理学情况。结果见图 9, 对照组小鼠隐窝完整, 富含杯状细胞 (图 9-A); 模型组小鼠隐窝结构破坏严重, 杯状细胞消失, 炎症细胞浸润严重 (图 9-B), 证明建模成功。阳性药组结肠组织损伤大大减轻, 杯状细胞增加 (图 9-C), 表明美沙拉嗪发挥了治疗作用, 但仍见细胞浸润现象。Tof-TG 组可见炎症细胞浸润 (红色箭头), 含杯状细胞, 隐窝结构得到修复 (图 9-D), 证明 Tof 具有治疗 UC 作用。Tof-ES-TG 低剂量组也可见炎症细胞浸润 (红色箭头), 杯状细胞增加 (图 9-E)。Tof-ES-TG 高剂量组隐窝结构明显 (图 9-F), 结肠组织的病理学情况接近对照组, 治疗效果明显优于相同灌肠剂量的 Tof-TG 组。

2.12.5 胸腺和脾脏指数 记录各只小鼠体质量, 脱颈处死小鼠后剥离胸腺和脾脏, 置于滤纸上吸



A-对照; B-模型; C-美沙拉嗪; D-Tof-TG; E-Tof-ES-TG ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); Tof-ES-TG ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).
A-Control; B-Model; C-Mesalazine; D-Tof-TG; E-Tof-ES-TG ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); Tof-ES-TG ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

图 9 结肠组织病理切片

Fig. 9 Pathological of colon

干, 记录胸腺和脾脏质量, 计算胸腺和脾脏指数。结果见图 10, 与对照组相比, 模型组胸腺指数极显著性下降 ($P<0.01$); 脾脏肿大, 导致脾脏指数极显著性升高 ($P<0.01$), 说明模型组小鼠体内炎症升高^[19], 证明造模成功。与模型组相比, Tof-TG 组胸腺指数显著性增大 ($P<0.05$), Tof-ES-TG 低、高剂量组胸腺指数极显著性增大 ($P<0.01$); Tof-TG 组、Tof-ES-TG 低剂量和高剂量组脾脏指数均极显著性下降 ($P<0.01$), 说明 Tof-TG 和 Tof-ES-TG 改善了 UC 小鼠的胸腺和脾脏损伤。与 Tof-TG 组相比, Tof-ES-TG 低、高剂量组胸腺指数显著性升高 ($P<0.05$), 脾脏指数显著下降 ($P<0.05$), 使之接近于正常小鼠的水平, 这可能是 Tof-ES-TG 处方中含大量磷脂, 磷脂可通过修复机体器官、增加隐窝深度、促进杯状细胞生长、改变炎症因子代谢途径、抑制炎症因子上调等机制发挥辅助治疗作用^[20-22], 进一步降低了机体组织器官损伤。与阳性组相比, Tof-ES-TG 低、高剂量组的胸腺指数和脾脏指数均有极显著性差异 ($P<0.01$), 表明 Tof-ES-TG 在修复胸腺和脾脏损伤方面更具优势。

胸腺指数 = 胸腺质量/体质量

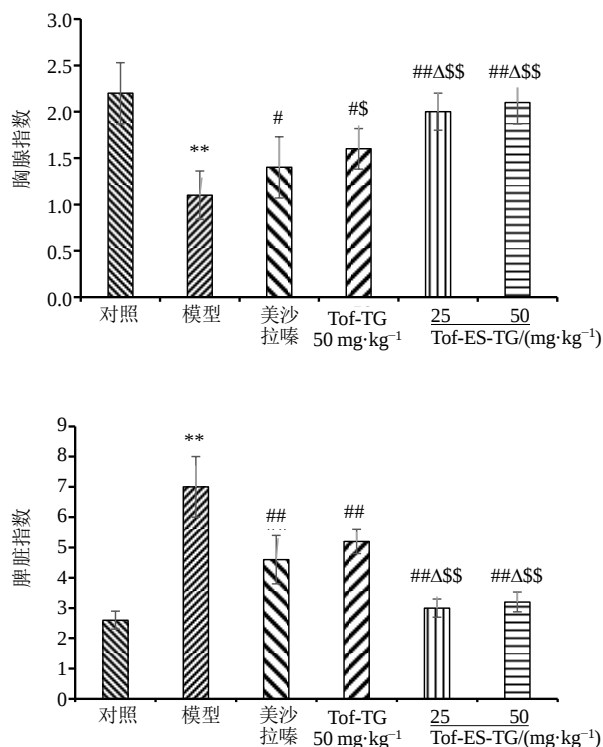
脾脏指数 = 脾脏质量/体质量

2.13 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较使用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 时判定组间存在显著差异。

3 讨论

前期在频率为 40 kHz 的条件下, 分别对超声时间和功率进行了考察, 发现超声时间超过 12 min 或超声功率大于 250 W 时会影响 Tof-ES 结构稳定性, 造成 Tof 泄漏, 故确定超声时间和超声功率分别为 200 W、10 min。前期曾采用超速离心法测定 Tof-ES 包封率, 发现高速离心时也会影响 Tof-ES 结构稳定性, 造成 Tof-ES 包封率和载药量测定结果偏低, 这是由于在 Tof-ES 处方中引入醇类物质后磷脂双分子层流动性较强, 机械稳定性下降, 故分离游离药物时应避免高速离心。本研究采用葡聚糖凝胶柱来分离游离 Tof 和 Tof-ES, 这是由于游离药物极易进入凝胶内部, 在凝胶阻力的影响下极大增加了洗脱时间; Tof-ES 比游离 Tof 分子大, 不易进入凝胶内部, 由于洗脱阻力很小, 故洗脱时间较短。在分离游离药物时增加了低速离心操作, 有助于缩短测试时间, 但不会影响 Tof-ES 结构稳定性^[13]。



与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与 Tof-TG 组比较, Δ $P<0.05$; 与阳性组比较; \$ $P<0.05$ \$ $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group, Δ $P<0.05$ vs Tof-TG group, \$ $P<0.05$ \$ $P<0.01$ vs positive group.

图 10 各组小鼠胸腺指数与脾脏指数 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Fig. 10 Thymus index and spleen index of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

泊洛沙姆是由疏水链段聚氧丙烯 (PPO) 和亲水链段聚氧乙烯 (PEO) 组成, 泊洛沙姆 407 (含 70% 的 PEO 链段和 30% 的 PPO 链段) 和泊洛沙姆 188 (含 80% 的 PEO 链段和 20% 的 PPO 链段) 水溶液均具有温敏性质, 其胶凝温度与 PPO/PEO 比例密切相关^[11]。机体肛门温度一般为 37 °C, 为使温敏凝胶快速胶凝, 故胶凝温度应低于 37 °C; 但为保证温敏凝胶在常温下呈液体状态, 故胶凝温度应高于 30 °C。结合相关研究^[10-11], 选择胶凝温度 33 °C 作为筛选目标。课题组通过调整泊洛沙姆 407 与泊洛沙姆 188 用量, 发现两者用量比为 6:1 时可达胶凝温度 33 °C 要求。

与 Tof-TG 相比, Tof-ES-TG 具有明显的缓释特征, 释药行为符合 Weibull 模型。这可能由于 2 方面原因^[13, 23]: 一是由于包封于 Tof-ES 内部的 Tof 释放出去需克服磷脂双分子层及胆固醇的阻滞作用, 另一方面温敏凝胶阻滞层对药物释放也有较大的

阻滞作用^[10],随着凝胶逐渐被溶蚀后药物才能缓慢扩散出去,因而使 Tof-ES-TG 表现出缓释效果,利于维持病灶部位的药物质量浓度,为发挥长效治疗作用奠定基础。大多数研究者常用无水乙醇来制备醇质体^[14],但乙醇挥发性较强,影响醇质体的稳定性,不利于长期储存,且乙醇对黏膜刺激性较强,故本研究采用挥发性较弱、刺激性极低的丙二醇制备了 Tof-ES-TG。前期对 Tof-ES-TG 在低温(4℃)、常温(25℃)及高温(40℃)条件下的稳定性进行了考察,发现 Tof-ES-TG 在 4℃ 中稳定性最高,提示 Tof-ES-TG 应低温储存。

与 Tof-TG 相比,Tof-ES-TG 高剂量组的 DAI 评分、结肠长度、结肠湿质量、结肠指数和肠黏膜损伤等指标均得到明显改善,可能是 Tof-ES-TG 改善了 Tof 理化性质,解决了黏膜渗透瓶颈;Tof-ES-TG 处方中丙二醇、磷脂等辅料具有促进药物黏膜吸收的作用^[11],增加了药物吸收量;Tof-ES-TG 粒径较小,为药物经黏膜渗透提供了便利;Tof-ES-TG 磷脂双分子层结构与黏膜组织中生物膜类似,利于药物克服黏膜屏障并顺利吸收^[9];处方中磷脂可起到修复机体器官及肠黏膜组织损伤、抑制炎症因子等作用^[11],进而为降低给药剂量、增强治疗 UC 药效等奠定坚实基础。综上,本研究进行了 Tof-ES-TG 的制备、表征、释药行为和机制、稳定性等考察,为评价 Tof-ES-TG 成药性提供了参考资料^[24],Tof-ES-TG 可有效改善模型小鼠的 UC 症状,药效明显优于同剂量的 Tof-TG,对胸腺和脾脏损伤的修复作用明显优于美沙拉嗪,值得进一步开发研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵绪稳,胡博,王金虎,等.枯草杆菌二联活菌颗粒联合美罗培南治疗新生儿坏死性小肠结肠炎的临床研究[J].现代药物与临床,2023,38(2):368-372.
Zhao X W, Hu B, Wang J H, et al. Clinical study on combined *Bacillus Subtilis* and *Enterococcus Faecium* Granules with multivitamines, live combined with meropenem in treatment of neonatal necrotizing enterocolitis [J]. Drugs Clin, 2023, 38(2): 368-372.
- [2] 卫晶,王茜,周秀彦.托法替尼治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J].胃肠病学和肝病学杂志,2022,31(6):701-704.
Wei J, Wang X, Zhou X Y. Research progress of Tofacitinib in the treatment of ulcerative colitis [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2022, 31(6): 701-704.
- [3] Pérez-Jeldres T, Tyler C J, Boyer J D, et al. Targeting cytokine signaling and lymphocyte traffic via small molecules in inflammatory bowel disease: JAK inhibitors and S1PR agonists [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 212.
- [4] Yang Y F, Wang Y, Zhao L, et al. Chinese herbal medicines for treating ulcerative colitis via regulating gut microbiota-intestinal immunity axis [J]. Chin Herb Med, 2023, 15(2): 181-200.
- [5] 于芹.托法替尼纳米脂质载体经皮给药系统的研究[D].杭州:浙江大学,2017.
Yu Q. Studies on tofacitinib loaded nanostructured lipid carriers as transdermal drug delivery system [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [6] Yadav V, House A, Matiz S, et al. Ileocolonic-targeted JAK inhibitor: A safer and more effective treatment for inflammatory bowel disease [J]. Pharmaceutics, 2022, 14(11): 2385.
- [7] 刘怡婧,张梦媛,朱磊.中药灌肠修复肠黏膜屏障治疗溃疡性结肠炎研究进展[J].中国中医药图书情报杂志,2024,48(2):239-243.
Liu Y J, Zhang M Y, Zhu L. Research progress in the repair of intestinal mucosal barrier by TCM Enema for the treatment of ulcerative colitis [J]. Chin J Libr Inf Sci Tradit Chin Med, 2024, 48(2): 239-243.
- [8] 汪昌雄,张伟,罗金菊,等.清肠灌肠液保留灌肠辅助治疗溃疡性结肠炎临床观察[J].实用中医药杂志,2024,40(11):2202-2204.
Wang C X, Zhang W, Luo J J, et al. Clinical observation on retention Enema with Qingyang Enema for adjuvant treatment of ulcerative colitis [J]. J Pract Tradit Chin Med, 2024, 40(11): 2202-2204.
- [9] 冯连晶,陈筱瑜,黄庆德,等.星点设计-响应面法优化石杉碱甲二元醇质体处方及其理化性质考察[J].中国现代应用药学,2022,39(2):181-186.
Feng L J, Chen X Y, Huang Q D, et al. Optimization of the formulation of huperzine a binary ethosomes by central composite design-response surface methodology and its physicochemical properties[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2022, 39(2): 181-186.
- [10] 王立红,吴文丽,罗永明,等.白藜芦醇温敏型凝胶剂的制备及抗膀胱癌细胞研究[J].药物评价研究,2024,47(10):2334-2342.
Wang L H, Wu W L, Luo Y M, et al. Preparation of resveratrol temperature sensitive gel for chemotherapy via bladder perfusion [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(10): 2334-2342.
- [11] 管咏梅,张煜薇,陶颖,等.参柏温敏凝胶的制备及其

- 对痔疮模型大鼠的药效作用 [J]. 中草药, 2024, 55(23): 7999-8010.
- Guan Y M, Zhang Y W, Tao Y, et al. Preparation of Shenbo thermosensitive gel and its pharmacodynamic effect on hemorrhoid model rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(23): 7999-8010.
- [12] 张蕊, 于青, 陈民辉, 等. 基于 AQbD 理念的吡罗昔康凝胶体外释放研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(5): 1039-1046.
- Zhang R, Yu Q, Chen M H, et al. Analytical quality by design (AQbD) approach to development of in vitro release test for piroxicam gel [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(5): 1039-1046.
- [13] 柳超, 董亚楠, 李伟宏, 等. 冰片修饰根皮素醇质体凝胶的制备、表征及其离体皮肤渗透特性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7288-7299.
- Liu C, Dong Y N, Li W H, et al. Preparation, characterisation and their ex vivo transdermal permeation properties of borneol-modified phloretin ethosomes gel [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(21): 7288-7299.
- [14] 霍雨佳, 谷娟, 呼胜楠, 等. 冰片修饰的胡椒碱醇质体的制备、表征及透皮吸收研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(6): 663-670.
- Huo Y J, Gu J, Hu S N, et al. Preparation, characterization and transdermal absorption of borneol-modified piperine ethosomes [J]. Chin J Hosp Pharm, 2024, 44(6): 663-670.
- [15] 张体鹏, 决利利. 白屈菜红碱 2 种脂质体的制备和口服生物利用度比较 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5568-5579.
- Zhang T P, Jue L L. Preparation of two kinds of chelerythrine liposomes and oral bioavailability comparison [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(17): 5568-5579.
- [16] 孟东东. 姜黄素前药胶束递送紫杉醇用于抗结直肠癌活性研究 [D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2024.
- Meng D D. Study of curcumin prodrug micellar delivery of paclitaxel for anticolorectal cancer activity [D]. Jiamusi: Jiamusi University, 2024.
- [17] 潘娇娇, 李娇, 丁杨, 等. 直肠用美沙拉嗪温敏凝胶的制备及质量评价 [J]. 中南药学, 2024, 22(5): 1164-1169.
- Pan J J, Li J, Ding Y, et al. Preparation and quality evaluation of mesalazine thermosensitive gel for rectal use [J]. Cent South Pharm, 2024, 22(5): 1164-1169.
- [18] 张留超, 李高申, 刘勇华, 等. 芹菜素固体分散体胃漂浮片制备、药动力学评价及体内外相关性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(19): 6519-6528.
- Zhang L C, Li G S, Liu Y H, et al. Apigenin solid dispersion gastric floating tablet: Preparation, oral pharmacokinetics and *in vitro-in vivo* correlation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(19): 6519-6528.
- [19] 赵宇郁, 杨东亮, 徐楠, 等. 布地奈德脂质体温敏凝胶对溃疡性结肠炎模型小鼠的药效研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(14): 1426-1430.
- Zhao Y Y, Yang D L, Xu N, et al. Efficacy of budesonide liposome thermosensitive gel on ulcerative colitis model mice [J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(14): 1426-1430.
- [20] 朱帅, 黄梦玲, 吴倩倩, 等. 蛋黄卵磷脂的结构、提取、功能与脂质体研究进展 [J]. 粮油食品科技, 2020, 28(3): 18-25.
- Zhu S, Huang M L, Wu Q Q, et al. State-of-the-art of egg yolk lecithin: Molecular structure, extraction strategies, bio-activities and liposome application [J]. Sci Technol Cereals Oils Foods, 2020, 28(3): 18-25.
- [21] Majdollahseini L, Ghasemi H A, Hajkhodadadi I, et al. Nutritional and physiological responses of broiler chickens to dietary supplementation with de-oiled soyabean lecithin at different metabolisable energy levels and various fat sources [J]. Br J Nutr, 2019, 122(8): 863-872.
- [22] Nemati M, Ghasemi H A, Hajkhodadadi I, et al. De-oiled soy lecithin positively influenced growth performance, nutrient digestibility, histological intestinal alteration, and antioxidant status in turkeys fed with low energy diets [J]. Br Poult Sci, 2021, 62(6): 858-867.
- [23] 李喻. 夫西地酸微乳凝胶的制备与体外抗菌活性研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(11): 2269-2275.
- Li Y. Preparation and *in vitro* antibacterial activity evaluation of fusidic acid microemulsion gels [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(11): 2269-2275.
- [24] 陈琴, 张志云, 朱云婴, 等. 基于国家专利的中药复方治疗溃疡性结肠炎用药规律研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(1): 171-178.
- Chen Q, Zhang Z Y, Zhu Y Y, et al. Study on dosage pattern of Chinese herbal medicine compound for ulcerative colitis based on national patent [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(1): 171-178.

[责任编辑 孙英杰]