

基于“药辅合一”的香菇多糖-土木香内酯纳米晶制备、药动学及对H1N1流感病毒感染小鼠的治疗作用

郑妩媚¹, 谢燕¹, 范明松², 崔晓鸽^{1*}

1. 郑州健康学院 药学院, 河南 郑州 450064

2. 上海市中药研究所 药学部, 上海 201203

摘要: 目的 以香菇多糖为稳定剂制备土木香内酯纳米晶(Len-Ala-NCs), 考察其口服相对生物利用度及对H1N1流感病毒感染小鼠的治疗作用。方法 采用高速剪切联合高压均质法制备Len-Ala-NCs, 选取香菇多糖质量分数、均质压力、均质次数为主要影响因素, 通过单因素试验结合Box-Behnken设计-响应面法(BBD-RSM)优化处方工艺, 测定其粒径、多分散系数(PDI)及Zeta电位; 采用扫描电镜(SEM)观察微观形貌, X射线粉末衍射法(XRPD)分析晶型, 饱和溶剂法测定溶解度, 透析法考察释药行为。*ig*给予SD大鼠土木香内酯及Len-Ala-NCs(均以土木香内酯计, $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 比较药动学特征并计算口服相对生物利用度。通过滴鼻接种H1N1病毒构建小鼠流感感染模型, 考察Len-Ala-NCs对模型小鼠生存率和肺组织H1N1流感病毒M2 mRNA相对表达量的影响。采用HE染色法观察肺组织病理学变化。结果 Len-Ala-NCs的最佳处方工艺为香菇多糖质量分数0.26%、均质压力85.00 MPa、均质次数8次。所得纳米晶平均粒径为(214.62 ± 3.83) nm, PDI为 0.115 ± 0.007 , Zeta电位为(-13.80 ± 0.93) mV, 微观形貌呈椭圆形; 土木香内酯在Len-Ala-NCs中结晶度显著降低。Len-Ala-NCs可显著提高土木香内酯在pH 2.0、6.8磷酸盐缓冲液及水中的溶解度, 12 h累积释放度达88.61%。与土木香内酯相比, Len-Ala-NCs的达峰时间(t_{\max})提前至(0.52 ± 0.16) h, 达峰浓度(C_{\max})增至(892.15 ± 113.61) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 口服相对生物利用度提高至3.99倍。Len-Ala-NCs($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)可显著提高H1N1感染模型小鼠的存活率, 且对肺组织M2 mRNA相对表达量的降低效果显著优于土木香内酯($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)($P<0.01$), 与磷酸奥司他韦组比较无统计学差异($P>0.05$)。HE染色结果显示, Len-Ala-NCs($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)极大缓解了肺组织淤血及炎症反应, 治疗效果趋近于磷酸奥司他韦组及对照组。

结论 Len-Ala-NCs可显著提高土木香内酯的口服相对生物利用度, 并增强对流感病毒感染小鼠的治疗作用。

关键词: 土木香内酯; 香菇多糖; 纳米晶; Box-Behnken设计-效应面法; 生物利用度; H1N1病毒

中图分类号: R944.9; R978.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)12-3627-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.018

Preparation, pharmacokinetics and therapeutic effect of H1N1 influenza virus infection in mice of lentinan-alantolactone nanocrystals based on “unification of medicines and excipients”

ZHENG Wumei¹, XIE Yan¹, FAN Mingsong², CUI Xiaoge¹

1. School of Pharmacy, Zhengzhou Health College, Zhengzhou 450064, China

2. Institute of Pharmacy, Shanghai Institute of Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective Lentinan-alantolactone nanocrystals (Len-Ala-NCs) was prepared using lentinan as stabilizer, and investigated its relative oral bioavailability and therapeutic effect of H1N1 influenza virus infection in mice. **Methods** High-speed shear combined with high-pressure homogenization method were employed to prepare Len-Ala-NCs. Lentinan concentration, homogenization power and times were selected as main influencing factors, single factor experiments and Box-Behnken response surface design method (BBD-RSM) was used to optimize the optimal prescription process of Len-Ala-NCs. Particle size, polymer dispersity index (PDI) value and Zeta potential of Len-Ala-NCs were determined. Microscopic morphology of Len-Ala-NCs was observed by scanning electron

收稿日期: 2025-07-29

基金项目: 河南省科技攻关项目(232102310384); 骨干教师培养计划(2023zygg08)

作者简介: 郑妩媚(1991—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事药学研究。E-mail: zhengliang5113@126.com

*通信作者: 崔晓鸽(1983—), 女, 副教授, 主要从事药学研究。E-mail: cuixg2007@126.com

microscope (SEM), crystal form was analyzed by X-ray powder diffraction (XRPD), solubility was determined by saturated solvent method and drug release behavior was investigated by dialysis method. Alantolactone and Len-Ala-NCs were administered orally ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, calculated by alantolactone), pharmacokinetic characteristic was compared and the oral relative bioavailability was calculated. The influenza infection model in mice was constructed by intranasal inoculation of H1N1 virus, and studied the effects of Len-Ala-NCs on the survival rate and relative expression level of M2 mRNA of H1N1 influenza virus in lung tissue. The pathology changes in lung tissue were observed by HE staining method. **Results** Optimal prescription process of Len-Ala-NCs: Lentinan concentration was 0.26%, homogenization power was 85.00 MPa and homogenization times was 8 times. Particle size, PDI and Zeta potential of Len-Ala-NCs were $(214.62 \pm 3.83) \text{ nm}$, 0.115 ± 0.007 and $(-13.80 \pm 0.93) \text{ mV}$, respectively. Morphology of Len-Ala-NCs were ellipsoidal nanoparticles, and the crystallinity of alantolactone decreased significantly in Len-Ala-NCs. Len-Ala-NCs greatly improved the solubility of alantolactone in pH 2.0, 6.8 phosphate buffer and water, and the cumulative release rate reached 88.61% in 12 h. The t_{\max} of Len-Ala-NCs was advanced to $(0.52 \pm 0.16) \text{ h}$, C_{\max} was enhanced to $(892.15 \pm 113.61) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and relative oral bioavailability was enhanced to 3.99 times. Len-Ala-NCs ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) effectively improved the survival rate of H1N1-infected mice and reduced H1N1 viral load in lung tissue, its effect was significantly better than that of alantolactone ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and there was no statistically significant difference with oseltamivir group ($P > 0.05$). The results of HE staining showed that Len-Ala-NCs ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) greatly relieved the bloodstasis and inflammatory response in lung tissue, and the therapeutic effect approached that of oseltamivir group and control group. **Conclusion** Len-Ala-NCs effectively improved oral bioavailability of alantolactone, and enhanced the therapeutic effect of influenza virus infection in mice.

Key words: alantolactone; lentinan; nanocrystals; Box-Behnken response surface design method; bioavailability; H1N1 virus

流行性感冒由流感病毒感染引发，表现为全身乏力、咽痛、咳嗽、鼻塞等症状。目前临床应用的抗病毒药物仍存在自身不良反应及病毒突变导致的耐药性等问题^[1]。中药注重探究病毒与机体的相互作用，通过增强机体免疫功能（扶正）、直接抑制或损伤病毒（祛邪）等机制，可有效规避药效下降、病毒变异等问题^[2]，从而更好地发挥其抗病毒活性。

土木香内酯 (Ala) 是从菊科植物土木香 *Inula helenium* L. 干燥根中提取的倍半萜内酯类化合物，具有抗病毒、抗菌、抗炎、增强免疫力等多种活性^[3-5]，且毒性极低^[6]，具备研究开发价值。但该成分溶解度极差，油水分配系数为 $1.52 \sim 1.84$ ^[7]，属于生物药剂学分类系统 (BCS) IV 类药物；其强疏水性导致溶出度极低，大鼠口服生物利用度仅 3.39%^[8]，严重制约药效发挥。改善 Ala 的溶解度、溶出速率及溶出度等缺陷，有助于提高其口服吸收程度、增强药效，然而目前关于 Ala 制剂新技术的研究鲜见报道。

纳米晶是采用适宜稳定剂制备的胶体药物微粒分散体系，可通过大幅降低药物粒度使其以纳米状态存在，从而有效提高药物的溶解度、溶出速率及生物利用度等^[9-11]；且无需使用脂质载体，处方组成简单，易于工业化生产。目前已有多款纳米晶药物获批上市，如 Verelan PM (维拉帕米，美国 Schwarz 公司)、ZanaflexTM (替扎尼定，美国 Acorda 公司)、Aristada

InitioTM (阿立哌唑，美国 Alkermes 公司) 等。

稳定剂是纳米晶的重要组成部分，采用具有“药辅合一”特性的中药成分作为稳定剂，可进一步提升药物的生物利用度与药效^[12-14]，因此成为中医药领域的研究热点。香菇是我国产能最大的食用菌品种之一，富含多种营养成分，其中香菇多糖 (Len) 的药用与营养价值最为突出。研究表明，Len 具有抗病毒、抗炎、免疫调节等药理作用^[15]，与 Ala 的药理活性基本一致；其相对分子质量较大且具备一定表面活性，具有作为纳米晶稳定剂的潜力^[16]，属于典型的“药辅合一”成分，但目前尚未见将其应用于纳米晶制备的相关报道。

本研究以 Len 为稳定剂制备土木香内酯纳米晶 (Len-Ala-NCs)，通过单因素实验结合 Box-Behnken 设计-效应面法 (BBD-RSM) 筛选最优处方，考察其体外释药特性、储存稳定性及药动学行为，并评价其体内抗 H1N1 病毒作用，为评价 Len-Ala-NCs 的成药性提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Finnigan LCQ 液质联用仪、U3000 型高效液相色谱仪、Corona Veo 型电喷雾检测器，赛默飞仪器公司；MSE 125P-CE 型电子天平，德国 Sartorius 公司；FM300 型高速剪切机，上海弗鲁克科技发展有限公司；Ti-Lab 型均质机，上海泰坦科

技股份有限公司; MS-H200-pro型磁力搅拌器, 美国SCILOGE公司; S-8600型扫描电子显微镜, 日本日立公司; WJ-BX型超低温冰箱, 宁波五嘉仪器设备有限公司; winner-3型粒度分析仪, 济南微纳颗粒仪器股份有限公司; D8型X射线粉末衍射仪(XRPD), 瑞士BRUKER公司; RCZ-8M型溶出仪, 天津市天大天发科技有限公司; LHJ型冷冻干燥机, 北京松源华兴科技有限公司; JXDC-20UHPLC型号氮气吹扫仪, 上海净信实业发展有限公司; TL988实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪, 西安天隆科技有限公司; RM2016型病理切片机, 上海徕卡仪器有限公司; CX43型光学显微镜, 美国Olympus公司。

1.2 材料

Ala原料药(批号20220723,质量分数98.2%),上海贝万塔生物科技有限公司; Len(批号20220515,相对分子质量 $5.60 \times 10^4 \sim 1.52 \times 10^5$),陕西慈缘生物技术有限公司; 对照品 Ala(批号110760-201811,质量分数99.4%),中国食品药品检定研究院; 补骨脂素(批号P8399,质量分数99.0%),上海西格玛奥德里奇贸易有限公司; 甘露醇(批号20231107),镇江市康富生物工程有限公司; TriQuick Reagent总RNA提取试剂(批号20240521)、qRT-PCR反转录试剂盒(批号20240124),北京索莱宝科技有限公司; 肌酐(CRE)试剂盒(批号20240515)、尿素氮(BUN)试剂盒(批号20240318),南京建成生物工程研究所; 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(批号分别为AUZ3166、AUZ3178),美国Beckman Coulter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; 4%甲醛固定液(批号22192875),武汉博士德生物公司。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,体质量(180 ± 20)g; SPF级ICR小鼠,体质量(14 ± 1)g,雌雄兼具,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,生产许可证号SCXK(豫)2020-0005。遵循郑州健康学院有关实验动物管理和使用的规定,实验动物伦理号DW-202404-6,均符合3R原则。

2 方法与结果

2.1 Len-Ala-NCs制备工艺

高速剪切联合高压均质法制备Len-Ala-NCs^[17]。取处方量的Len置于茄形瓶中,加入50mL蒸馏水,在200W、37kHz条件下超声使之溶解至

澄清,作为水相。取25mg Ala加至含Len的水相中,以 $15\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速剪切90s,置于高压均质机中在30MPa下预均质5次,然后增加均质压力继续循环均质数次,得混悬液。迅速置冰箱中降温冷却,经0.80μm微孔滤膜滤过,补加蒸馏水至50mL,摇匀即得Len-Ala-NCs混悬液。取Len,不加Ala同法制备空白纳米晶。

2.2 Ala含量测定方法的建立

2.2.1 供试品溶液的制备 精密吸取Len-Ala-NCs混悬液1.0mL至100mL量瓶中,加入10mL乙腈超声2min破坏Len-Ala-NCs结构,使Ala溶解后加入0.2%磷酸水溶液-乙腈(75:25)稀释定容,摇匀,即得Len-Ala-NCs供试品溶液。同法制备空白纳米晶溶液。

2.2.2 色谱条件 采用Agilent SB C₁₈(250mm×4.6mm, 5μm)色谱柱;流动相为0.2%甲酸水溶液-乙腈(65:35);进样量10μL;检测波长225nm;柱温35℃;体积流量1.0mL·min⁻¹。

2.2.3 线性关系考察 精密称取Ala适量,采用乙腈配制质量浓度为104.00 μg·mL⁻¹的对照品储备液,采用流动相稀释成质量浓度分别为10.400、5.200、2.600、1.040、0.520、0.052 μg·mL⁻¹的Ala对照品溶液,按“2.2.2”项下色谱条件测定。以Ala质量浓度(X)对峰面积(Y)进行回归,拟合回归方程为 $Y=32.155\,7X+1.006\,9$, $r=0.999\,8$,线性范围0.052~10.400 μg·mL⁻¹。

2.2.4 专属性考察 取质量浓度为1.040 μg·mL⁻¹的Ala对照品溶液、Len-Ala-NCs和空白纳米晶供试品溶液,按“2.2.2”项下方法进样测定,结果见图1, Ala色谱峰专属性良好。

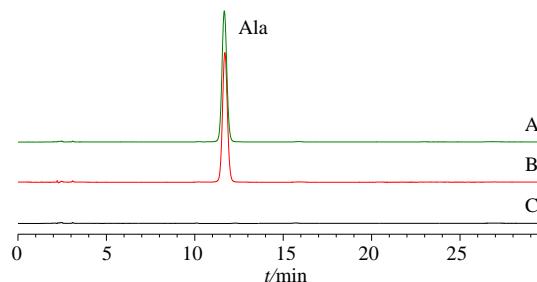


图1 Len-Ala-NCs供试品(A)、Ala对照品(B)和空白纳米晶(C)溶液的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of test solution of Len-Ala-NCs (A), reference solution of Ala (B), and blank nanocrystals solution (C)

2.2.5 精密度考察 取质量浓度分别为 0.052、1.040、10.400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Ala 对照品溶液, 按“2.2.2”项下方法进样测定, 测得 Ala 峰面积的 RSD 分别为 0.60%、0.43%、0.48% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性考察 取 Len-Ala-NCs 混悬液, 按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份 Len-Ala-NCs 供试品溶液, 测得 Ala 质量分数 RSD 值为 1.71% ($n=6$), 表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性考察 取 Len-Ala-NCs 供试品溶液于 0、4、8、12、18、24 h 进样检测, 测得 Ala 峰面积 RSD 值为 1.02% ($n=6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密取 9 份 Len-Ala-NCs 混悬液, 每份 0.5 mL, 分别置于 100 mL 量瓶中, 分成低、中、高 3 组。按 Ala 标示量 50% (低)、100% (中) 和 150% (高) 加入对照品, 同法制备供试品溶液, 测定 Ala 总质量分数。计算得 Ala 平均回收率分别为 98.96%、100.85%、101.73%, RSD 值分别为 1.91%、1.77%、1.82%, 表明该方法准确度较高。

2.3 Len-Ala-NCs 粒径、多分散指数 (PDI) 值及 Zeta 电位测定

取 Len-Ala-NCs 混悬液, 采用纯化水稀释 30 倍, 取适量至比色皿中, 擦拭除去比色皿表面水分, 分别测定粒径和 PDI 值。另取适量 Len-Ala-NCs 混悬液至电槽中, 测定 Zeta 电位。

2.4 单因素优化 Len-Ala-NCs 处方工艺

2.4.1 Len 质量分数的考察 固定 Ala 用量 25 mg, 均质压力为 80 MPa, 均质次数为 8 次, 考察 Len 质量分数对 Len-Ala-NCs 粒径和 PDI 值的影响, 结果见表 1。随着 Len 质量分数的增加, Len-Ala-NCs 的粒径及 PDI 呈现先减小后增大的趋势。分析其原因: 当 Len 质量分数较低时, 其在 Len-Ala-NCs 表面的覆盖量不足, 纳米晶易发生再聚集^[17], 导致粒径偏大且分布不均; 而当 Len 质量分数过高时, 其在纳米晶表面的覆盖量过大, 易引发颗粒间黏连, 进而使粒径及 PDI 增大。由此可见, Len 质量分数对 Len-Ala-NCs 的理化性质影响显著。当 Len 质量分数为 0.25% 时, 纳米晶的粒径及 PDI 相对较小; 为确定 Len 最佳用量, 后续实验将以 0.25% 为中心, 在 0.20%~0.30% 进一步优化。

2.4.2 均质压力的考察 固定 Ala 用量为 25 mg, Len 质量分数 0.25%, 均质次数为 8 次, 考察均质

表 1 Len 质量分数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of mass fraction of Len ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Len 质量分数/%	粒径/nm	PDI
0.15	947.18±67.81	0.477±0.022
0.20	468.62±39.65	0.338±0.022
0.25	240.80±8.37	0.171±0.011
0.30	264.04±9.95	0.196±0.010
0.45	273.49±13.59	0.227±0.014

压力对 Len-Ala-NCs 粒径和 PDI 值的影响。结果见表 2。随着均质压力的增加, Len-Ala-NCs 的粒径及 PDI 均呈现先减小后增大的趋势。推测其原因在于: 均质压力较低时, 体系获得的能量不足^[10], 难以有效减小 Len-Ala-NCs 的粒径, 且 PDI 较高, 粒径均匀性较差; 而当均质压力过大时, 体系能量过剩, Len-Ala-NCs 的碰撞概率急剧增加, 易引发颗粒间黏连^[10], 进而导致粒径及 PDI 增大。综上, 均质压力对 Len-Ala-NCs 的理化性质影响显著。当均质压力为 80 MPa 时, 纳米晶的粒径及 PDI 相对较小; 为确定适宜的均质压力, 后续实验将以 80 MPa 为中心, 在 60~100 MPa 进一步优化。

表 2 均质压力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effects of homogeneous power ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

均质压力/MPa	粒径/nm	PDI
40	760.40±42.90	0.417±0.025
60	444.91±28.50	0.255±0.020
80	225.41±21.52	0.155±0.011
100	245.94±11.45	0.188±0.014
120	275.67±12.66	0.213±0.013

2.4.3 均质次数的考察 固定 Ala 用量为 25 mg, Len 质量分数 0.25%, 均质压力为 80 MPa, 考察均质次数对 Len-Ala-NCs 粒径和 PDI 值的影响。结果见表 3。Len-Ala-NCs 的粒径及 PDI 随均质次数增加呈先下降后上升趋势。推测原因在于: 均质次数较少时, 体系获得的能量有限^[16-17], 均质效果不足, 导致 Len-Ala-NCs 粒径未能有效减小, 且粒径均匀性差, PDI 较大; 而均质次数过多时, 易引发 Len-

表 3 均质次数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effects of homogeneous times ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

均质次数/次	粒径/nm	PDI
4	581.38±18.51	0.319±0.021
6	416.47±18.61	0.196±0.006
8	218.06±18.27	0.125±0.007
10	233.64±16.62	0.146±0.012
12	266.14±10.64	0.183±0.010

Ala-NCs 聚集, 导致粒径增大及 PDI 上升^[10]。综上, 均质次数对 Len-Ala-NCs 的理化性质影响显著。当均质次数为 8 次时, 纳米晶的粒径及 PDI 相对较小; 为确定适宜的均质次数, 后续实验将以 8 次为中心, 在 6~10 次进一步优化。

2.5 BBD-RSM 优化 Len-Ala-NCs 处方工艺

2.5.1 试验设计及结果 基于前期单因素实验筛选的关键影响因素, 以 Len 质量分数 (X_1)、均质压力

(X_2) 和均质次数 (X_3) 为自变量, 粒径 (Y_1) 和 PDI 值 (Y_2) 的总评归一值 (OD) 为因变量, 采用 BBD-RSM 进行 3 因素 3 水平共计 17 次实验, 以优化 Len-Ala-NCs 处方工艺, 因素水平、设计及结果见表 4。

$$d = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$$

$$OD = 0.5 \times d_{\text{粒径}} + 0.5 \times d_{\text{PDI}}$$

M_i 、 M_{\max} 和 M_{\min} 分别为粒径和 PDI 的实测值、最大值和最小值

表 4 BBD-RSM 试验因素水平、设计及结果
Table 4 BBD-RSM factor level, test design and results

序号	$X_1/\%$	X_2/MPa	$X_3/\text{次}$	Y_1/nm	Y_2	OD	序号	$X_1/\%$	X_2/MPa	$X_3/\text{次}$	Y_1/nm	Y_2	OD
1	0.30 (1)	60 (-1)	8 (1)	279.14	0.201	0.135	10	0.20	80	10	263.17	0.190	0.295
2	0.25 (0)	100 (1)	10 (1)	253.55	0.194	0.341	11	0.25	80	8	221.64	0.131	0.857
3	0.25	60	10	273.71	0.193	0.210	12	0.30	80	6	261.12	0.149	0.504
4	0.25	80 (1)	8	213.29	0.122	0.956	13	0.30	80	10	256.43	0.194	0.322
5	0.20 (-1)	60	8	284.36	0.222	0.000	14	0.25	80	8	216.55	0.117	0.958
6	0.20	80	6 (-1)	276.95	0.177	0.264	15	0.25	60	6	260.64	0.165	0.432
7	0.30	100	8	263.18	0.206	0.219	16	0.25	80	8	222.72	0.123	0.887
8	0.20	100	8	254.68	0.158	0.505	17	0.25	80	8	210.29	0.124	0.967
9	0.25	100	6	250.92	0.143	0.601							

2.5.2 模型拟合及方差分析 利用 Design Expert V12.0.2 软件对实验数据进行拟合, 并建立数学模型。OD 值的二次多元回归方程为: $OD = 0.92 + 0.01 X_1 + 0.11 X_2 - 0.08 X_3 - 0.11 X_1 X_2 - 0.05 X_1 X_3 - 9.72 \times 10^{-3} X_2 X_3 - 0.38 X_1^2 - 0.33 X_2^2 - 0.20 X_3^2$, 模型 R^2 和 R_{Adj}^2 分别为 0.9659 和 0.9219, 均大于 0.9, 说明模型的预测值与实测值相关性良好。由 OD 值方差分析结果可知, 模型 P 值为 0.0002, 具有极显

著性差异 ($P < 0.01$), 说明该模型具有较强的指导意义; 模型失拟项 P 值为 0.0551, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明由误差导致模型拟合结果异常的可能性很小。OD 值方差分析结果可知 (表 5), 数学模型中 X_3 、 $X_1 X_2$ 具有显著性差异 ($P < 0.05$), 而 X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均具极显著差异 ($P < 0.01$)。根据一次项系数绝对值大小可知, 各因素对 OD 值的影响顺序为 $X_2 > X_3 > X_1$ 。

表 5 方差分析结果
Table 5 Results of variance analysis

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	1.57	9	0.17	22.00	0.0002	X_1^2	0.62	1	0.62	76.50	<0.0001
X_1	1.68×10^{-3}	1	1.68×10^{-3}	0.21	0.6595	X_2^2	0.46	1	0.46	57.81	0.0001
X_2	0.10	1	0.10	12.49	0.0095	X_3^2	0.17	1	0.17	20.90	0.0026
X_3	0.05	1	0.05	6.32	0.0402	残差	0.06	7	7.94×10^{-3}		
$X_1 X_2$	0.04	1	0.04	5.58	0.0496	失拟项	0.05	3	0.02	6.21	0.0551
$X_1 X_3$	0.01	1	0.01	1.44	0.2695	纯偏差	9.83×10^{-3}	4	2.46×10^{-3}		
$X_2 X_3$	3.81×10^{-3}	1	3.81×10^{-3}	0.05	0.8328	总离差	1.63	16			

使用 Design Expert V12.0.2 绘制相应曲面图, 结果见图 2, OD 值随着任意两因素增加均呈抛物线变化趋势, 说明 OD 值存在理论上的最大值。以 OD 值最大值作为筛选目标, 得 Len-Ala-NCs 最佳处方为

Len 质量分数为 0.26%、均质压力为 83.39 MPa, 均质次数为 7.59 次, 预测 OD 值为 0.988。为便于实际操作, 对工艺参数进行微调: Len 质量分数保持不变, 均质压力调整为 85.00 MPa, 均质次数调整为 8 次。

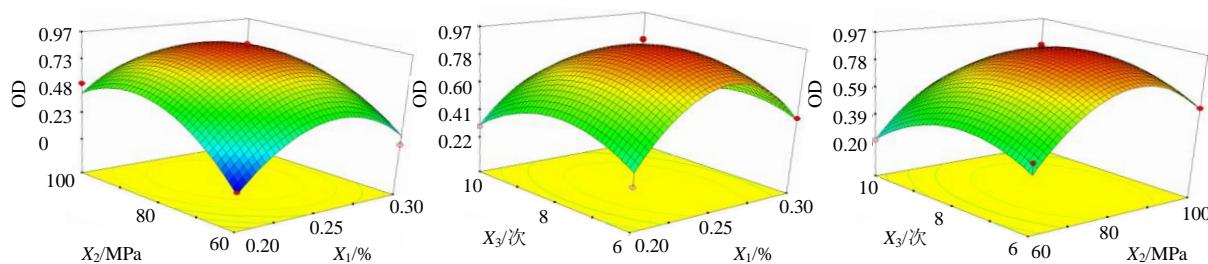


图 2 各因素对 OD 值的影响
Fig. 2 Effect of various factors on OD value

2.5.3 Len-Ala-NCs 处方工艺确定及验证 根据数学模型给出的工艺参数, 平行制备 3 批 Len-Ala-NCs, 测定粒径和 PDI 值, 结果见图 3。Len-Ala-NCs 平均粒径为 (214.62 ± 3.83) nm, PDI 值为 0.115 ± 0.007 , Zeta 电位为 (-13.80 ± 0.93) mV。粒径分布及 Zeta 电位见图 3, 说明 Len-Ala-NCs 表面带负电荷, 在静电排斥作用下利于维持 Len-Ala-NCs 体系稳定。根据测得粒径和 PDI 值, 计算得实际平均 OD 值为 0.980, 与预测 OD 值 (0.988) 非常接近, 相对偏差为 -0.81%, 说明预测值与实测值相关性良好。

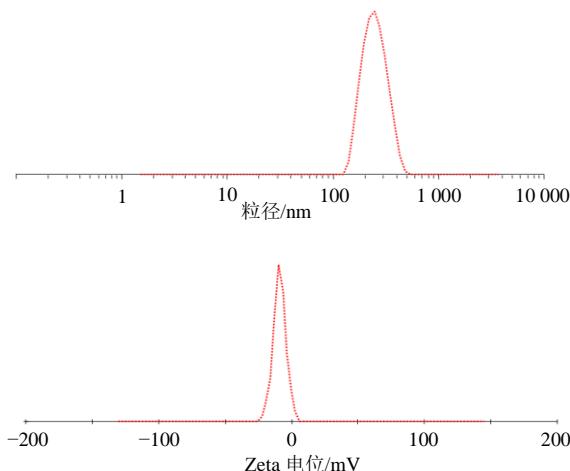


图 3 Len-Ala-NCs 的粒径和 Zeta 电位

Fig. 3 Particle size and Zeta potential of Len-Ala-NCs

2.6 SEM 观察 NCs 外貌

取 Len-Ala-NCs 混悬液, 滴至导电胶上, 晃动使之铺展, 晾干, 喷金 1 min, 置于扫描电镜下观察 Len-Ala-NCs 微观形貌, 选取典型形貌区域并拍照记录。结果见图 4, Len-Ala-NCs 之间无黏连现象, 形貌呈椭圆形纳米颗粒。

2.7 Len-Ala-NCs 冻干粉晶型研究

为避免冻干保护剂 (甘露醇) 的自身晶型衍射

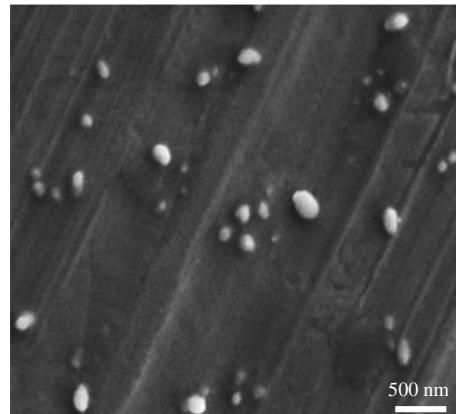


图 4 Len-Ala-NCs 扫描电镜图
Fig. 4 SEM image of Len-Ala-NCs

峰干扰分析, 实验直接对 Len-Ala-NCs 混悬液进行冻干处理后再开展晶型检测。具体操作如下: 取 Len-Ala-NCs 混悬液 (不加冻干保护剂), 于 -65°C 超低温冰箱中冷冻 3 d 至完全结冰, 随即转移至冷冻干燥机中冻干 3 d, 制得 Len-Ala-NCs 粉末。

XRPD 检测采用 Cu-K α 靶, 扫描速度为 $4^{\circ} \cdot \text{min}^{-1}$, 扫描角度 (2θ) 范围为 $3^{\circ} \sim 45^{\circ}$ 。分别取 Ala 原料药、Len、物理混合物 (Ala 与 Len 的比例同 Len-Ala-NCs) 及 Len-Ala-NCs 粉末适量进行 XRPD 扫描, 结果见图 5。Ala 在 6.4° 、 12.3° 、 14.7° 、 12.8° 、 14.6° 、 15.2° 、 17.5° 、 18.1° 等处出现特征晶型峰; 物理混合物的 XRPD 图谱中仍可见 Ala 的主要特征晶型峰, 表明单纯物理混合未改变 Ala 的晶型。而 Len-Ala-NCs 粉末的 XRPD 图谱中, Ala 的特征晶型峰强度显著降低, 提示 Len-Ala-NCs 的制备对 Ala 晶型产生了显著影响。

2.8 Len-Ala-NCs 冻干粉的制备、载药量及溶解度测定

2.8.1 冻干粉末制备工艺 取 Len-Ala-NCs 混悬液, 加入 4.0% 甘露醇, 涡旋混匀后分装于西林瓶中,

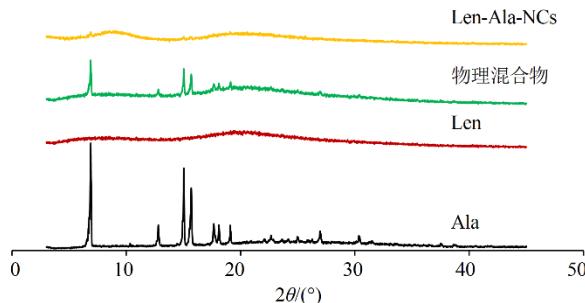


图5 XRPD结果

Fig. 5 Results of XRPD

控制液面高度为1.0 cm。于-65 °C超低温冰箱中冷冻3 d至完全结冰，随即转移至冷冻干燥机中冻干3 d，制得Len-Ala-NCs冻干粉。外观如图6所示，Len-Ala-NCs混悬液略带乳光，冻干粉外观饱满。复溶后的Len-Ala-NCs混悬液无肉眼可见不溶性颗粒，测得平均粒径、PDI及Zeta电位分别为(231.47±7.06) nm、0.138±0.015和(-13.07±0.59) mV。

2.8.2 Len-Ala-NCs冻干粉载药量测定 精密称取Len-Ala-NCs冻干粉约20 mg，加纯化水复溶，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.2”项下色谱条件测定Ala质量浓度，依据体积计算质量(M_1)，根据Len-Ala-NCs冻干粉称样量(M_0)计算载药量(M_1/M_0)为(1.14±0.05)%。

2.8.3 溶解度测定 取过量Ala原料药、物理混合物(Ala、Len和甘露醇比例同Len-Ala-NCs冻干

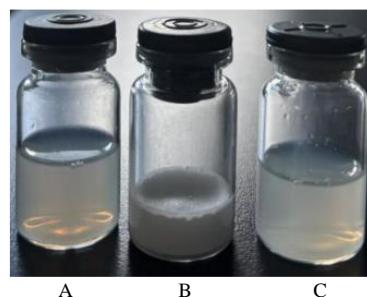


图6 Len-Ala-NCs混悬液(A)、冻干粉(B)及其蒸馏水复溶(C)外观

Fig. 6 Appearance of Len-Ala-NCs suspension (A), lyophilized powder (B) and lyophilized powder sample redissolved by water (C)

粉)和Len-Ala-NCs冻干粉置于茄形瓶中，加纯化水适量，在200 W、37 kHz条件下超声30 min，于800 r·min⁻¹转速下避光磁力搅拌2 d。8 000 r·min⁻¹离心5 min，取上清液测定Ala溶解度。同法测定各样品在pH 2.0和pH 6.8磷酸盐缓冲液中的溶解度，结果见表6。物理混合物有效提高Ala溶解度($P<0.01$)，可能与Len自身的增溶作用有关^[16]。Len-Ala-NCs冻干粉极大增加了Ala的溶解度($P<0.01$)，与物理混合物相比Len-Ala-NCs冻干粉在各个介质中溶解度均存在极显著性差异($P<0.01$)，说明Len-Ala-NCs溶解度的提高幅度远大于物理混合物。

表6 溶解度测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 6 Results of solubility determination ($\bar{x}\pm s, n=3$)

样品	溶解度/(μg·mL ⁻¹)		
	水	pH 2.0	pH 6.8
Ala	1.16±0.05	1.30±0.07	1.25±0.08
物理混合物	22.24±0.04**	24.38±0.07**	27.34±0.06**
Len-Ala-NCs	106.72±3.59***##	109.24±4.12***##	113.58±4.03***##

与Ala比较：** $P<0.01$ ；与物理混合物比较：## $P<0.01$ 。

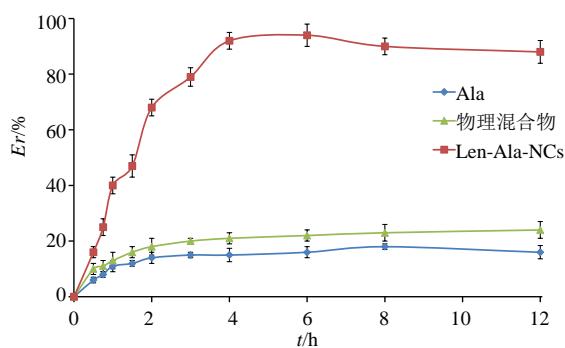
** $P<0.01$ vs alantolactone；## $P<0.01$ vs physical mixture.

2.9 体外释药行为考察

分别取Len-Ala-NCs冻干粉、物理混合物和Ala原料药适量(Ala均为20 mg)，分别置于透析袋(截留相对分子质量8 000)，平行制备3份。加入5 mL pH 2.0磷酸盐缓冲液[(含1%的十二烷基硫酸钠(SDS)]^[18]，扎紧。取pH 2.0磷酸盐缓冲液(含1%的SDS)1.0 L超声10 min后置溶出杯中，在温度为(37±0.5) °C、转速为75 r·min⁻¹，于0、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00 h取样5 mL，

并补加5 mL pH 2.0磷酸盐缓冲液(含1%的SDS)。2 h取样后将释药介质更换为pH 6.8磷酸盐缓冲液(含1%的SDS)1.0 mL，于3、4、6、8、12 h取样5 mL，并补加5 mL pH 6.8磷酸盐缓冲液(含1%的SDS)。样品经0.45 μm滤膜滤过，按“2.2.2”项下条件测定Ala含量，计算累积释放度(Er)，结果见图7。

Ala原料药12 h Er 仅16.63%，物理混合物在一定程度上增加了Ala释放度(23.40%)，可能与

图 7 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 7 Release curve *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Len 的增溶作用有关^[16]。Len-Ala-NCs 极大提高了 Ala 释药速率, 12 h Er 达 88.61%, 可能与 Len-Ala-NCs 极大降低了 Ala 粒度、提高了溶解度等因素有关^[14]。

$$E_r = \left(V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n \right) / M_{\text{Ala}}$$

V_e 表示置换的缓冲液的体积; V_0 表示缓冲液总体积; C_i 表示第 i 次取样时样品浓度; M_{Ala} 表示混悬液中 Ala 的质量; n 表示置换缓冲液的次数

2.10 Len-Ala-NCs 冻干粉稳定性考察

取密封于西林瓶中的 Len-Ala-NCs 冻干粉, 置于 35 °C、相对湿度 65% 的恒温恒湿箱中储存, 分别于 0、1、2、3、6 个月取样, 加蒸馏水复溶后测定粒径及 PDI 值, 结果见表 7。该冻干粉在加速储存条件下放置 6 个月后, 平均粒径虽略有增大, 但仍小于 250 nm; PDI 值虽略有上升, 但仍小于 0.15, 表明 Len-Ala-NCs 冻干粉具有良好的储存稳定性。将纳米混悬液制备为冻干粉是提升其稳定性的常用手段, 主要因其能显著降低 Len-Ala-NCs 的成核概率, 并抑制粒子运动与聚集^[10]。

2.11 口服药动学研究

2.11.1 色谱条件 采用 ZORBAX C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 流动相为 0.2% 甲酸水溶液-乙腈 (65:35); 体积流量 0.2 mL·min⁻¹; 进样量

表 7 Len-Ala-NCs 冻干粉稳定性研究 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 7 Stability study of Len-Ala-NCs lyophilized powder
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

取样时间/个月	粒径/nm	PDI 值
0	232.81±7.77	0.139±0.008
1	238.79±6.43	0.139±0.006
2	238.06±6.80	0.141±0.003
3	239.68±7.42	0.143±0.005
6	245.33±5.75	0.145±0.006

5 μL; 柱温 30 °C。

2.11.2 质谱条件 采用多反应监测 (MRM) 与电喷雾正离子源 (ESI⁺) 模式检测, 锥孔气流为 80 L·h⁻¹, 检测温度 400 °C, 质谱范围 m/z 50~900, 去溶剂气体流量为 800 L·h⁻¹, 气帘气为 240 kPa, 毛细管电压为 3 kV, 检测离子对分别为 m/z 233.1→104.9 (Ala) 和 m/z 187.0→131.1 [补骨脂素 (内标)]。

2.11.3 实验方案 取 Ala 原料药、物理混合物 (Ala、Len 与甘露醇仅作简单混合, 用量比例同 Len-Ala-NCs 冻干粉) 和 Len-Ala-NCs 冻干粉末适量, 置于 0.5% 的 CMC-Na 水溶液, 涡旋 2 min 使之混匀, 备用。取 18 只 SD 大鼠 (12 h 内未进食, 可自由饮水), 随机分为 Ala 组、物理混合物组和 Len-Ala-NCs 组, 每组雌雄各 3 只, 按 100 mg·kg⁻¹ 剂量 (以 Ala 计) ig 给药。分别于给药前及给药后 0.10、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00 h 乙醚麻醉后立即尾静脉取血约 200 μL, 置于肝素化离心管, 3 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 取血浆, 冷冻保存。

2.11.4 内标溶液的配制及血浆样品溶液的制备 精密称取补骨脂素对照品, 用乙腈溶解, 配制成质量浓度为 300 ng·mL⁻¹ 的内标溶液。分别精密量取解冻后的血浆样品 100 μL 和内标溶液 200 μL, 置于离心管中, 涡旋 3 min 沉淀蛋白; 再加入 0.5 mL 醋酸乙酯, 涡旋 3 min 进行萃取, 8 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 使蛋白等杂质完全沉淀。取上清液转移至另一离心管, 经氮吹仪缓慢吹干有机溶剂; 加入 100 μL 乙腈, 密封后涡旋 3 min 复溶, 再次以 8 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 即得含内标补骨脂素的血浆样品溶液。

2.11.5 线性关系考察 使用空白血浆配制质量浓度为 1 200、600、300、200、20、5 ng·mL⁻¹ 的 Ala 血浆对照品, 分别取 100 μL, 按照“2.11.4”项下方法制备 1 200、600、300、200、20、5 ng·mL⁻¹ 血浆对照品溶液 (补骨脂素质量浓度均为 600 ng·mL⁻¹), 按“2.11.1”“2.11.2”项下色谱及质谱条件进行检测。计算 Ala 与补骨脂素面积比值 (Y), 并与 Ala 质量浓度 (X) 线性回归, 得方程: $Y=0.0056 X - 0.1008$, $r=0.9980$, 线性范围 5~1 200 ng·mL⁻¹。

2.11.6 专属性考察 取空白血浆溶液、Ala 质量浓度为 5 ng·mL⁻¹ 的血浆对照品溶液, Len-Ala-NCs ig 8.00 h 血浆样品溶液, 分别按“2.11.1”“2.11.2”项下条件检测, 结果见图 8, Ala 和补骨脂素专属性好。

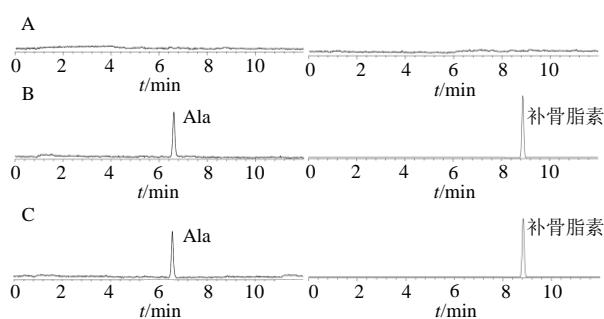


图8 空白血浆(A)、血浆对照品溶液(含内标,B)、血浆样品溶液(含内标,C)的UPLC-MS/MS色谱图

Fig. 8 UPLC-MS/MS chromatograms of blank plasma (A), plasma reference solution (including internal standard, B) and plasma sample solution (including internal standard, C)

2.11.7 室温稳定性考察 取质量浓度为 $300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的Ala质控样品(补骨脂素质量浓度为 $600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)，于0、3、6、9、12、24 h测定Ala及补骨脂素峰面积，计算得Ala浓度RSD值为8.03% ($n=6$)，表明血浆样品室温稳定性良好。

2.11.8 精密度考察 取质量浓度分别为5、300、 $1200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的Ala血浆对照品溶液(补骨脂素质量浓度为 $600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)，连续测试6次，记录Ala及补骨脂素峰面积，计算得Ala质量浓度RSD值依次为4.19%、6.64%和5.70% ($n=3$)。每天测试1次，连续测试6 d，记录Ala及补骨脂素峰面积，计算得Ala浓度RSD值分别为2.08%、6.19%和4.33% ($n=3$)，表明日内及日间精密度良好。

2.11.9 重复性考察 取质量浓度为 $300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的Ala质控样品(补骨脂素质量浓度为 $600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)，按“2.11.4”平行处理得到6份样品溶液，并进样测试，记录Ala及补骨脂素峰面积，计算得Ala质量浓度RSD值为4.80%，表明方法重复性良好。

2.11.10 提取回收率和基质效应考察 取5(低)、300(中)、 $1200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (高)的Ala质控血浆样品溶液(补骨脂素质量浓度为 $600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)，按“2.11.4”项下方法处理，记录Ala及补骨脂素峰面积(A_1)；取空白血浆 $100 \mu\text{L}$ ，不加补骨脂素内标，按“2.11.4”处理得空白样品，再加入Ala对照品，配制质量浓度为5、300、 $1200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (补骨脂素质量浓度为 $600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)，测定峰面积(A_2)。以 A_1/A_2 计算得低、中、高质量浓度Ala提取回收率分别为98.10%、103.77%、96.78%，补骨脂素提取回

收率为102.06%。取质量浓度为5(低)、300(中)、 $1200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (高)Ala对照品溶液(不含血浆，补骨脂素质量浓度为 $600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)，测定Ala和补骨脂素峰面积(A_3)。采用 A_2/A_3 计算得低、中、高质量浓度Ala的基质效应分别为101.78%、97.70%、102.53%，补骨脂素基质效应为100.01%。表明建立的血浆样品溶液制备方法可有效提取Ala和补骨脂素，且基质效应较小，利于准确测定血药浓度。

2.11.11 药动学结果 Ala、物理混合物和Len-Ala-NCs药-时曲线见图9。根据测得的实验数据，采用DAS 2.0软件非房室模型进行分析，结果见表8。与Ala相比，物理混合物 t_{\max} 、 $t_{1/2}$ 、 C_{\max} 均无显著性差异($P>0.05$)，而 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 显著性增加($P<0.05$)，根据 AUC_{0-t} 结果计算得物理混合物的相对生物利用度增加至1.29倍，说明Len等辅料对Ala体内吸收具有一定的增益作用。与Ala相比，Len-Ala-NCs的 t_{\max} 极显著性提前($P<0.01$)， C_{\max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 得到极显著提高($P<0.01$)，根据 AUC_{0-t} 结果计算得Len-Ala-NCs相对生物利用度增加至3.99倍。与物理混合物相比，Len-Ala-NCs的 t_{\max} 极显著性提前($P<0.01$)， C_{\max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 有极显著性增加($P<0.01$)，说明Len-Ala-NCs显著增加了Ala体内吸收，证明Len-Ala-NCs促吸收作用优于物理混合物。

2.12 Ala、Len及Len-Ala-NCs对流感病毒感染小鼠的治疗作用评价

2.12.1 流感病毒半数致死量(LD₅₀)的测定 60只小鼠随机分成6组，每组10只，采用异氟烷麻醉，用4℃预冷PBS将H1N1病毒新鲜尿囊液按10倍梯度逐步稀释，分别为 1×10^{-1} ~ 1×10^{-6} ，将稀释好的H1N1病毒分别以每只 $50 \mu\text{L}$ 的剂量对小

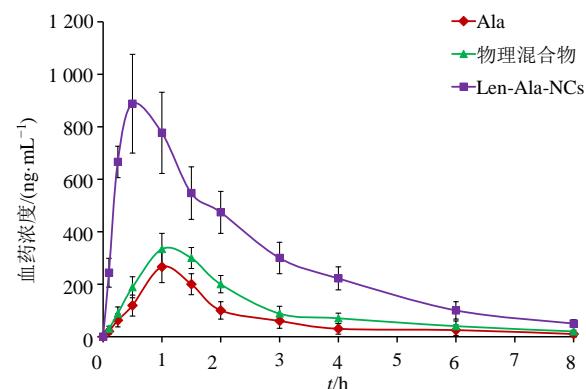


图9 药-时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Fig. 9 Plasma concentration-time curves ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 8 主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 8 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

参数	单位	Ala	物理混合物	Len-Ala-NCs
t_{max}	h	0.96±0.22	1.27±0.29	0.52±0.16**#
C_{max}	ng·mL ⁻¹	266.37±57.74	324.11±64.16	892.15±113.61**##
$t_{1/2}$	h	1.88±0.39	2.14±0.52	2.26±0.67
AUC_{0-t}	h·ng·mL ⁻¹	1 034.90±68.16	1 338.16±84.71*	4 128.03±377.58**##
$AUC_{0-\infty}$	h·ng·mL ⁻¹	1 052.24±72.07	1 366.03±93.05*	4 304.11±398.26**##

与 Ala 比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与物理混合物比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs alantolactone; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs physical mixture.

鼠进行滴鼻感染。感染后连续观察 14 d, 记录各组小鼠死亡数并计算死亡率, 采用 Reed-Muench 法^[19]计算病毒 LD₅₀ 为 10^{-4.25}, 结果见表 9。

表 9 LD₅₀ (n=10)Table 9 LD₅₀ (n=10)

稀释倍数	死亡数/只	存活数/只	死亡累计/%
1×10 ⁻¹	10	0	100
1×10 ⁻²	10	0	100
1×10 ⁻³	10	0	100
1×10 ⁻⁴	6	4	60
1×10 ⁻⁵	2	8	20
1×10 ⁻⁶	0	10	0

2.12.2 分组及给药 105 只小鼠, 在实验室环境(温度 25 °C, 湿度 55%)适应性喂养 1 周后。随机分为对照组、模型组、磷酸奥司他韦 (40 mg·kg⁻¹, 阳性药)组^[4]、Ala(100 mg·kg⁻¹)组^[4]、Len 组(520 mg·kg⁻¹, 根据 Len-Ala-NCs 高剂量处方计算得出)、Len-Ala-NCs 低、高剂量组 (50、100 mg·kg⁻¹, 以 Ala 计)。除对照组外, 其他各组小鼠均滴鼻接种 50 μL H1N1 病毒 (预冷 PBS 稀释至 4 个 LD₅₀), 保持仰卧姿势 20 s 后翻身, 建立流感病毒感染小鼠模型^[19]。采用 0.5% 的 CMC-Na 水溶液配制 ig 液, 对照组和模型组给予 0.5% 的 CMC-Na 水溶液, 其余各组实验动物 ig 给与相应药物, 每天 1 次, 连续 14 d。第 7 天各组动物随机取 5 只, 乙醚麻醉后立即脱颈处死小鼠, 取出肺组织, Trizol 法提取总 RNA^[20], 用反转录酶试剂盒反转录为 cDNA, qRT-PCR 法检测肺组织中 H1N1 病毒的 M2 mRNA 表达水平。GAPDH 作为内参基因作归一化处理, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 M2 mRNA 相对表达量, 引物信息见表 10。取部分肺组织置于福尔马林固定, 脱水处理, 浸泡于 4% 多聚甲醛以提高透明度, 石蜡包埋, 切成 5 μm 的薄片, 贴片后烘干, HE 染色, 光学显微镜下观察病理情况。

统计剩余小鼠死亡数量及存活天数, 计算存活率。

2.12.3 生存率结果 生存率结果见图 10。对照组全程无动物死亡; 模型组感染后第 5 天开始出现死亡, 至第 10 天全部死亡, 提示模型构建成功。磷酸奥司他韦组于第 9 天出现死亡, 14 d 生存率达 90%, 表明其对流感病毒感染具有显著治疗效果。Ala 组第 7 天出现死亡, 14 d 生存率为 70%; Len-Ala-NCs 低剂量组 14 d 生存率为 60%, 高剂量组则提升至 80%, 呈现出明显的剂量相关性。此外, Len 组 14 d 生存率为 40%, 说明 Len 本身有助于提高感染动物生存率, 体现了“药辅合一”的特点。

2.12.4 各组小鼠 M2 mRNA 表达 结果见图 11。与对照组相比, 模型组 M2 mRNA 表达量极显著升高 ($P<0.01$), 证实流感病毒感染模型构建成功。

表 10 引物序列

Table 10 Primers sequence

引物	序列 (5'→3')
M2	F: GACCRATCCTGTCACCTCTGAC R: GGGCATTYTGGACAAKCGTCTACG
GAPDH	F: GACCAGGAGTGGAGGAAACA R: AGGCCTCGGAGGGCCCCCTC

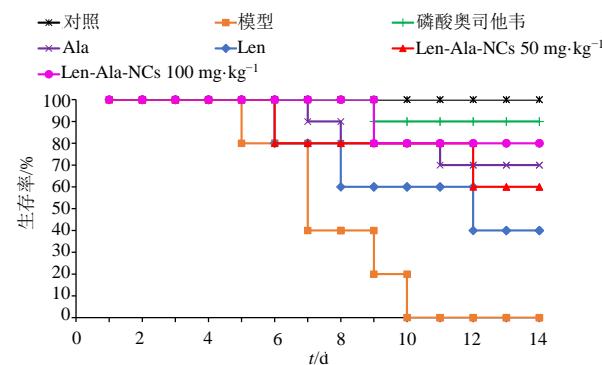
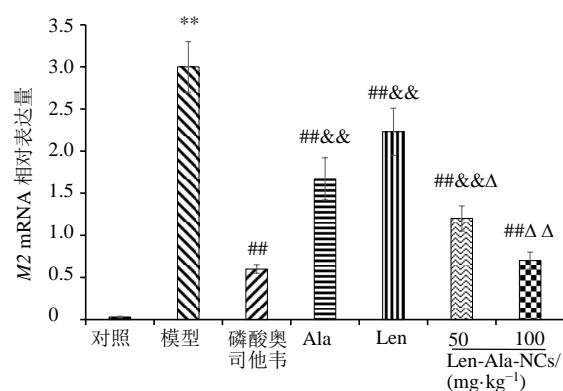


图 10 各组小鼠生存率 (n=10)

Fig. 10 Survival rate of mice in each group (n=10)



与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ## $P<0.01$; 与 Ala 组比较: ^ $P<0.05$ ^& $P<0.01$; 与磷酸奥司他韦组比较: ^&& $P<0.01$ 。

* $P<0.01$ vs control group; # $P<0.01$ vs model group; ^ $P<0.05$
^& $P<0.01$ vs Ala group; ^&& $P<0.01$ vs oseltamivir phosphate group.

图 11 各组小鼠肺组织 M2 mRNA 相对表达量
($\bar{x} \pm s$, n=5)

与模型组相比, 磷酸奥司他韦组、Ala 组、Len 组及 Len-Ala-NCs 低、高剂量组的 M2 mRNA 表达量均极显著下降 ($P<0.01$), 提示上述各组均能有效抑制体内流感病毒复制, 进而发挥治疗作用。

与 Ala 组相比, Len-Ala-NCs 低剂量组 M2 mRNA 表达量显著下降 ($P<0.05$), 高剂量组则极显著下降 ($P<0.01$), 这一差异主要源于 Len-Ala-NCs 可显著提高 Ala 的生物利用度。与磷酸奥司他韦

韦组相比, Ala 组、Len 组及 Len-Ala-NCs 低剂量组的 M2 mRNA 表达量极显著升高 ($P<0.01$), 提示其治疗效果不及阳性组; 而 Len-Ala-NCs 高剂量组与磷酸奥司他韦组无显著差异 ($P>0.05$), 表明该剂量组可达到与磷酸奥司他韦相当的治疗效果。此外, Len 单独使用也能有效降低 M2 mRNA 表达量, 发挥抗病毒治疗作用, 进一步体现了其“药辅合一”的特性。

2.12.5 各组小鼠肺组织病理切片结果 结果见图 12。对照组小鼠肺组织无淤血、炎症等病理改变, 组织结构完整。模型组肺组织淤血显著, 肺间质可见大范围炎症渗出, 提示肺组织受损严重。Ala、Len 组肺组织的淤血及炎症反应均得到一定程度缓解, 说明 Ala 与 Len 对 H1N1 感染所致的肺组织病变均具有一定治疗效果, 同时体现了 Len 的辅助治疗作用。Len-Ala-NCs 低剂量组、高剂量组的病理切片显示, 随着给药剂量增加, 肺组织病变的改善效果愈发显著, 呈现明显剂量相关性。其中, Len-Ala-NCs 高剂量组的治疗效果趋近于磷酸奥司他韦组及对照组。

3 讨论

化学类稳定剂(如 SDS、波洛沙姆 188、聚山梨酯 80 等)存在潜在不良反应^[21], 减少其用量时难以有效降低纳米晶粒径, 且易影响粒径均一性。本研究基于 Ala 与 Len 具有相似药理活性, 且 Len

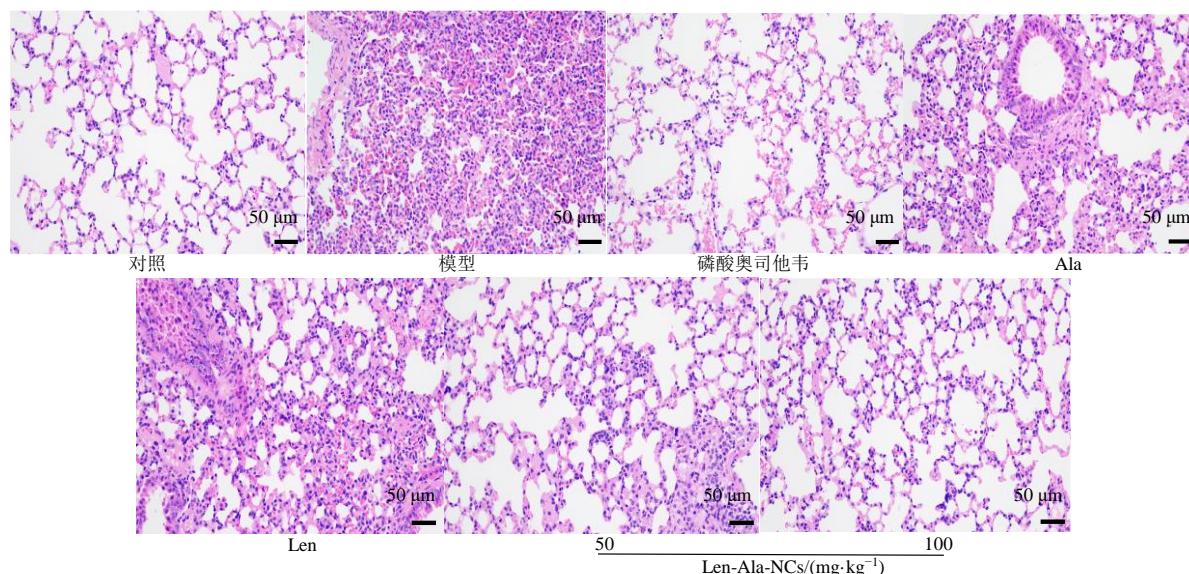


图 12 各组小鼠肺组织病理切片 ($\times 200$)
Fig. 12 Pathological section of lung tissue in each group of mice ($\times 200$)

具备作为稳定剂的潜力,选择 Len 作为稳定剂制备 Len-Ala-NCs。通过单因素试验结合 BBD-RSM 筛选最优处方工艺,所得 Len-Ala-NCs 具有粒径小、分布均匀等优势,既提升了制剂使用安全性,也为促进体内吸收、增强药效奠定了基础^[22]。

Len 以 β -(1-3)-D-葡聚糖为主链,侧链为 β -(1-6)-连接的葡萄糖基,具有较大相对分子质量与空间位阻。当其包覆于 Len-Ala-NCs 表面时,可通过显著的空间位阻效应实现稳定;同时测得 Len-Ala-NCs 的 Zeta 电位为负值,提示静电排斥作用可能是其稳定体系的另一重要因素。为进一步提升 Len-Ala-NCs 混悬液的稳定性,将其制备为冻干粉,加速储存条件下仍保持较高稳定性。这一方面得益于冻干保护剂的屏障效应,显著抑制了纳米晶的运动与聚集;另一方面,Len-Ala-NCs 处方中的 Len 本身具有较强的抑菌、抗氧化活性^[23],共同保障了冻干粉的储存稳定性。

Ala 体内安全性良好,基本无不良反应^[6],对大鼠 ig 给予 $30\sim180 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量后即可发挥抗病毒、抗炎等药理活性^[4,8]。结合药动学血药浓度实际检测结果,最终选择 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量进行药动学研究。结果显示,Ala 与 Len 的物理混合物相对生物利用度提升至 1.29 倍,推测与 Len 的增溶作用相关^[24],其可提高 Ala 溶解度,进而促进体内吸收。与单独使用 Ala 相比,Len-Ala-NCs 的 t_{max} 显著提前,主要因 Len-Ala-NCs 大幅提高了 Ala 的溶出速率,缩短了体内吸收时间^[25],利于药物快速起效。此外,Len-Ala-NCs 的 C_{max} 、 $AUC_{0\sim\infty}$ 、 $AUC_{0\sim\infty}$ 均极显著升高($P<0.01$),其原因可能包括:Len-Ala-NCs 显著增加 Ala 的溶解度与溶出度,扩大体内药物浓度差,在浓度梯度驱动下促进药物吸收^[26];Len 包覆于纳米晶表面,可降低胃肠道 pH、消化酶对药物的破坏,增加吸收量;Len-Ala-NCs 比表面积大,能与胃肠道吸收部位充分接触,提升吸收效率;处方中 Len 等辅料本身也具有促进药物吸收的作用。在上述多因素协同作用下,Ala 的生物利用度大幅提升,为药效增强提供了保障。

不同途径接种流感病毒可引发相似症状,但对器官的损伤程度存在显著差异^[20]。由于流感病毒主要通过呼吸道传播,本研究选择鼻腔接种建模,更贴合病毒自然传播途径。用于攻击小鼠的病毒体积常见为 $10\sim100 \mu\text{L}$,林晓静等^[27]通过生物发光成像技术研究发现,病毒体积过低会导致感染效率显著

降低,体积过大则影响模型稳定性;而 $50 \mu\text{L}$ 病毒体积既能保证感染效率,又能维持较高模型稳定性。药效学研究表明,Len 不仅可提高流感病毒感染小鼠的生存率,还具有一定抗病毒作用,这与 Len 本身具有增强机体免疫力、抗病毒等生物活性相关^[15]。Len-Ala-NCs 显著增强了 Ala 的体内抗病毒效果,一方面因其能有效促进 Ala 体内吸收,提高口服生物利用度,进而增强 Ala 的抗病毒药效,延长模型小鼠生存率;另一方面,Len 本身的免疫增强、抗病毒作用可辅助提升药效,实现“药辅合一”。因此,选择 Len 作为 Len-Ala-NCs 的稳定剂,具有较高的创新性与研究价值^[28]。

综上,本研究以天然来源、安全性高的 Len 为稳定剂,成功制备 Len-Ala-NCs。该制剂显著改变了 Ala 的晶型,提升了 Ala 的溶解度与体外释放度,且冻干粉储存稳定性良好,有助于保障有效期。Len-Ala-NCs 经口服后可大幅提高 Ala 的体内吸收效率,增强抗病毒药效,具备进一步开发研究的价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 阮桂英,陈卡蒙,章新辉,等.复方芩兰口服液联合奥司他韦治疗流行性感冒的多中心随机双盲双模拟对照研究 [J].现代药物与临床,2023,38(11): 2756-2762.
Ruan G Y, Chen K M, Zhang X H, et al. A multicenter randomized double-blind double-simulation study of Compound Qinlan Oral Liquid combined with oseltamivir in treatment of influenza [J]. Drugs Clin, 2023, 38(11): 2756-2762.
- [2] 刘日慧,刘晓凤,伍晓乐,等.中药抗病毒作用机制的研究进展 [J].国外医药(抗生素分册),2024,45(4): 226-238.
Liu R H, Liu X F, Wu X L, et al. Research progress on antiviral mechanism of effects of traditional Chinese medicine preparations against viral diseases [J]. World Notes Antibiot, 2024, 45(4): 226-238.
- [3] 任怡静,岳备,于之伦,等.土木香内酯药理作用研究进展 [J].上海中医药大学学报,2019,33(6): 82-87.
Ren Y J, Yue B, Yu Z L, et al. Research progress on pharmacological effects of alantolactone [J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2019, 33(6): 82-87.
- [4] 李艺颖,初英杰,孔令东,等.土木香内酯抗病毒作用的体内外研究 [J].中草药,2024,55(7): 2248-2258.
Li Y Y, Chu Y J, Kong L D, et al. Antiviral effects of alantolactone *in vitro* and *in vivo* [J]. Chin Tradit Herb

- Drugs, 2024, 55(7): 2248-2258.
- [5] 孔令东, 刘霞, 李艺颖, 等. 异土木香内酯体外抗病毒作用与机制研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(3): 521-528.
Kong L D, Liu X, Li Y Y, et al. *In vitro* antiviral function and mechanism of isoalantolactone [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(3): 521-528.
- [6] 丽丽. 蒙药土木香四味汤安全性评价研究 [D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2022.
Li L. Study on safety evaluation of mongolian medicine TuMuXiangSiWeiTang [D]. Tongliao: Inner Mongolia Minzu University, 2022.
- [7] Lee J Y, Kim S B, Chun J, et al. High body clearance and low oral bioavailability of alantolactone, isolated from *ula Helenium*, in rats: Extensive hepatic metabolism and low stability in gastrointestinal fluids [J]. Biopharm Drug Dispos, 2016, 37(3): 156-167.
- [8] 张男. 蒙药“四味土木香散”主要成分的药代动力学研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021.
Zhang N. Pharmacokinetic study on the main components of mogolian medicine “SiWei Tumuxiang” [D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2021.
- [9] 潘新彤, 王立夫, 陈潇, 等. 基于 ACQ 探针示踪槲皮素纳米晶的体内外行为 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(12): 2844-2851.
Pan X T, Wang L F, Chen X, et al. Investigation of *in vivo* and *in vitro* behaviors of quercetin nanocrystals tracked by ACQ probe [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(12): 2844-2851.
- [10] 李瑞华, 吴书凯, 孙丽, 等. PEG 化壳聚糖葫芦素 B 纳米混悬剂的制备及其冻干粉药动学评价 [J]. 中草药, 2024, 55(15): 5050-5060.
Li R H, Wu S K, Sun L, et al. Preparation of cucurbitacin B nanosuspensions with PEGylated chitosan and pharmacokinetics evaluation of its lyophilized powder [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(15): 5050-5060.
- [11] 周洁, 刘云, 冯菊红, 等. 依鲁替尼纳米晶的制备工艺研究 [J]. 化学与生物工程, 2024, 41(4): 50-54, 63.
Zhou J, Liu Y, Feng J H, et al. Preparation of ibrutinib nanocrystals [J]. Chem Bioeng, 2024, 41(4): 50-54, 63.
- [12] 魏文静, 朱梨梨, 潘娇娇, 等. 基于“药辅合一”的甘草次酸-蓖麻油亚微乳研究 [J]. 中南药学, 2023, 21(4): 876-881.
Wei W J, Zhu L L, Pan J J, et al. Glycyrrhetic acid-Castor oil submicron emulsion based on combination medicine and adjuvant [J]. Cent South Pharm, 2023, 21(4): 876-881.
- [13] 尚丹, 张广辉, 李晓婷, 等. 基于“药辅合一”的甜菊素-隐丹参酮自胶束化固体分散体制备、表征及体内评价 [J]. 中草药, 2025, 56(13): 4621-4633.
Shang D, Zhang G H, Li X T, et al. Preparation, characterisation and *in vivo* evaluation of steviosin-cryptotanshinone self-micellizing solid dispersions based on “combined drug-excipient” strategy [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(13): 4621-4633.
- [14] 孙丽, 李瑞华, 吉媛媛, 等. 高良姜素自胶束化固体分散体的制备、口服药动学和降血糖作用评价 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(1): 143-156.
Sun L, Li R H, Ji Y Y, et al. Preparation, oral pharmacokinetic and glucose-decreasing effects evaluation of galangin-loaded self-micelle solid dispersion [J]. Drug Eval Res, 2025, 48(1): 143-156.
- [15] 董浩然, 姜宁, 陆欢, 等. 香菇多糖结构与功能研究进展 [J]. 生物技术进展, 2024, 14(6): 911-919.
Dong H R, Jiang N, Lu H, et al. Research progress on structure and function of lentinan [J]. Curr Biotechnol, 2024, 14(6): 911-919.
- [16] 索自立. 香菇多糖作为天然材料制备药物纳米凝胶与药物纳米混悬剂的研究 [D]. 成都: 四川大学, 2022.
Lentinan as a natural material for preparation of drug nanogels and nanosuspensions [D]. Chengdu: Sichuan University, 2022.
- [17] 龙家英, 李小芳, 王娟, 等. 茶皂素用于稳定橙皮苷纳米混悬剂及其机制研究 [J]. 药学学报, 2021, 56(11): 3159-3165.
Long J Y, Li X F, Wang X, et al. Tea saponin stabilizing hesperidin nanosuspensions and its mechanism [J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(11): 3159-3165.
- [18] 张婧, 李翔, 廖正根, 等. 高载药量二十五味肺病微丸的制备及其性能考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 1-5.
Zhang J, Li X, Liao Z G, et al. Preparation and evaluation of Ershiwuwei Feibing Pellets with high drug loading [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2016, 22(1): 1-5.
- [19] 包蕾, 刘燕, 耿子涵, 等. 天山堇菜提取物对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠的抗病毒及免疫调节作用研究 [J]. 病毒学报, 2024, 40(4): 695-704.
Bao L, Liu Y, Geng Z H, et al. Study on the antiviral and immunomodulatory effects of *Viola tianshanica* maxim extract on mice infected with influenza a H1N1 virus [J]. Chin J Virol, 2024, 40(4): 695-704.
- [20] 王浩嘉, 李森, 连瑞, 等. 小檗碱的体外抗病毒作用及基于I型干扰素通路的机制研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(6): 1185-1192.
Wang H J, Li S, Lian R, et al. Antiviral effect *in vitro* and mechanism study based on type I interferon pathway of

- berbamine [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(6): 1185-1192.
- [21] 张韬, 李玉囡, 钱占寅, 等. 基于藻酸双酯钠的阿霉素/塞来昔布纳米药物晶体的制备及其抗肿瘤作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(11): 2475-2481.
Zhang T, Li Y N, Qian Z Y, et al. Preparation and its antitumor effect of doxorubicin/celecoxib drug nanocrystals based on polysaccharide sulfate [J]. *Drugs Clin*, 2022, 37(11): 2475-2481.
- [22] 曹伶俐, 刘素梅. 甜菊糖苷-高良姜素纳米复合物的制备及其理化性质评价 [J]. 化学研究与应用, 2025, 37(6): 1506-1514.
Cao L L, Liu S M. Preparation and physicochemical property evaluation of stevioside-galangin nanocomposites [J]. *Chem Res Appl*, 2025, 37(6): 1506-1514.
- [23] 李琪, 李盈盈, 罗姣姣, 等. 双水相萃取茯苓多糖的工艺优化及其抗氧化活性评价 [J]. 化学研究与应用, 2024, 36(4): 787-794.
Li Q, Li Y Y, Luo J J, et al. Optimization of two aqueous phase extraction of *Poria* polysaccharide and evaluation of its antioxidant activity [J]. *Chem Res Appl*, 2024, 36(4): 787-794.
- [24] Zhang J, Shen L M, Li X, et al. Nanoformulated codelivery of quercetin and alantolactone promotes an antitumor response through synergistic immunogenic cell death for microsatellite-stable colorectal cancer [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(11): 12511-12524.
- [25] 陈永顺, 李静, 蒋建平, 等. 叶黄素纳米混悬剂制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(10): 3180-3186.
Chen Y S, Li J, Jiang J P, et al. Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of lutein nanosuspensions [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2023, 45(10): 3180-3186.
- [26] 李晓蒙, 郑妩媚, 张智强. 柚皮素磷脂复合物纳米混悬剂制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2024, 46(1): 41-48.
Li X M, Zheng W M, Zhang Z Q. Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of nanosuspensions of naringenin phospholipids complex [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2024, 46(1): 41-48.
- [27] 林晓静. H3N2 亚型流感病毒感染小鼠活体成像模型的构建及应用 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2023.
Lin X J. Establishment and applications of an *in vivo* imaging mouse of influenza subtype H3N2 virus infection [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [28] 张子琪, 王向涛. 山慈姑葡甘露聚糖硒纳米粒的制备、表征及抗肿瘤研究 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(5): 1211-1223.
Zhang Z Q, Wang X T. Preparation, characterization, and anti-tumor study of *Pleione bulbocodioides* glucomannan-selenium nanoparticles [J]. *Drug Eval Res*, 48(5): 1211-1223.

[责任编辑 孙英杰]