

金丝桃苷-玉米肽纳米复合物的制备、表征及对肾脏缺血再灌注损伤的改善作用

宋 丽¹, 高敏杰², 决利利^{1*}

1. 周口职业技术学院, 河南 周口 466000

2. 周口师范学院, 河南 周口 466001

摘要: **目的** 制备金丝桃苷-玉米肽纳米复合物 (Hyp-CP-NCs), 考察理化性质及其对肾脏缺血再灌注所致肾损伤的改善作用。**方法** 采用分子对接分析金丝桃苷与玉米肽的结合趋势; 通过单因素实验结合 Box-Behnken 设计-效应面法优化制备工艺; 利用透射电镜、X-射线粉末衍射、差式扫描量热、傅里叶变换红外光谱等技术表征复合物; 测定其饱和溶解度与体外累积释放度; 构建小鼠肾缺血再灌注模型, 设置假手术、模型、缬沙坦 (阳性药, 10 mg·kg⁻¹)、金丝桃苷 (120 mg·kg⁻¹) 及 Hyp-CP-NCs 低、高剂量 (60、120 mg·kg⁻¹) 组, 检测肾脏指数、血清肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 水平, 并观察肾组织病理变化。**结果** 优化后最佳工艺为玉米肽质量浓度 13.66 mg·mL⁻¹、制备温度 65 °C、制备时间 35 min; 复合物包封率 (84.02 ± 0.80) %、载药量 (5.19 ± 0.07) %、粒径 (70.64 ± 4.13) nm, 呈类球形, 金丝桃苷以无定形态存在且与玉米肽以氢键结合; 复合物显著提升金丝桃苷溶解度与体外释放度, 18 h 累积释放度达 87.85%; 动物实验显示, Hyp-CP-NCs 可显著降低肾脏指数、血清 Scr 及 BUN 水平, 明显改善肾小管萎缩、炎性浸润与胶原沉积, 效果优于单用金丝桃苷。**结论** Hyp-CP-NCs 可有效改善金丝桃苷的溶解度与释放度, 显著减轻肾脏缺血再灌注损伤, 具备良好的开发前景。

关键词: 金丝桃苷; 玉米肽; 纳米复合物; 溶解度; 释放度; 肾损伤; 肾脏缺血再灌

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2026)05-1641-14

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2026.05.015

Hyperoside-corn peptide nanocomplexes: Preparation, characterization, and ameliorative effect on renal ischemia-reperfusion injury

SONG Li¹, GAO Minjie², JUE Lili¹

1. Zhoukou Polytechnic, Zhoukou 466000, China

2. Zhoukou Normal University Zhoukou 466001, China

Abstract: Objective To prepare hyperoside-corn peptide nanocomplex (Hyp-CP-NCs) and investigate its physicochemical properties and its therapeutic effect on renal ischemia-reperfusion-induced renal injury. **Methods** Molecular docking analysis was conducted to explore the binding trend between hyperoside and corn peptide; single-factor experiments combined with Box-Behnken design-effect surface method were used to optimize the preparation process; transmission electron microscopy, X-ray powder diffraction, differential scanning calorimetry, and fourier transform infrared spectroscopy were employed to characterize the complex; the saturated solubility and *in vitro* cumulative release rate of the complex were determined; a mouse renal ischemia-reperfusion model was constructed, with sham operation, model group, valsartan (positive drug, 10 mg·kg⁻¹), Hyperoside (120 mg·kg⁻¹), and Hyp-CP-NCs at low and high doses (60, 120 mg·kg⁻¹) groups were set up. Renal index, serum creatinine, and urea nitrogen levels were measured, and renal tissue pathological changes were observed. **Results** The optimized best process was a corn peptide concentration of 13.66 mg·kg⁻¹, a preparation temperature of 65 °C, and a preparation time of 35 min; the encapsulation rate of the complex was (84.02 ± 0.80)%, the drug loading was (5.19 ± 0.07)%, the particle size was (70.64 ± 4.13) nm, presenting a spheroidal shape, hyperoside existed in an amorphous form and was bound to corn peptide by hydrogen bonds; the complex significantly enhanced the solubility and *in vitro* release rate of hyperoside, with a cumulative release rate of 87.85% at 18 h; animal experiments showed that Hyp-CP-NCs could

收稿日期: 2026-03-10

基金项目: 河南省科技攻关项目 (252102230104); 河南省高等学校重点科研项目 (23B310010)

作者简介: 宋 丽 (1981—), 女, 副教授, 研究方向为新型材料研发及在药理学中应用。E-mail: 497130646@qq.com

*通信作者: 决利利 (1984—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为解剖学与药理学。E-mail: 1473749916@qq.com

significantly reduce renal index, serum creatinine, and urea nitrogen levels, significantly improve renal tubular atrophy, inflammatory infiltration, and collagen deposition, and the effect was better than that of using hyperoside alone. **Conclusion** Hyp-CP-NCs can effectively improve the solubility and release rate of hyperoside, significantly alleviate renal ischemia-reperfusion injury, and have a promising development prospect.

Key words: hyperoside; corn peptide; nanocomplexes; solubility; release rate; renal injury; renal ischemia-reperfusion

肾脏移植、血管手术等临床操作均会引发肾脏缺血再灌注损伤,该损伤易对肾脏功能造成严重损害^[1]。目前西医尚无有效的治疗手段,而中医药在改善肾损伤方面具有多靶点、疗效确切、不良反应小的独特优势^[2]。金丝桃苷属于黄酮醇类化合物,可从金丝桃科、夹竹桃科、刺五加科等多种植物中提取得到^[3-4]。研究证实,金丝桃苷可通过靶向核因子 κ B 抑制蛋白 (IkB) /核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路、下调多种炎症因子表达、抑制 Yes 相关蛋白活性等机制,发挥显著的肾损伤改善作用^[3,5-6],其药效确切且口服安全性高。

金丝桃苷为典型的晶型药物,其在蒸馏水及模拟胃肠液中的溶解度均低于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[7],属于极微溶解药物,这一特性导致其溶出速率与溶出度偏低,极大限制了其体内药效的发挥。因此,改善金丝桃苷自身的理化性质缺陷,是增强其体内生物活性的关键环节。目前,针对金丝桃苷的制剂研究主要包括磷脂复合物^[8]、脂质纳米粒^[7]、二氧化硅纳米粒^[8]等,但各类制剂均存在明显局限:磷脂复合物存在黏性大、有机溶剂残留、成药性差等问题;脂质纳米粒处方复杂、影响因素繁多,规模化生产难度较高;二氧化硅纳米粒易在体内蓄积^[9],引发研究者的审慎关注,不利于其临床推广应用。

植物来源的两亲性天然成分具有稳定性高、低抗原性的优势,其在水相中可通过自组装形成高效载药体系,是新型胶体分散系统的研究热点^[10-11],为纳米载体的选择提供了新的方向。玉米肽是源自玉米蛋白的一类活性肽^[12],其分子结构中同时含有疏水性和亲水性氨基酸,赋予其良好的两亲性及自组装潜力^[13],分散于水相后可形成粒径小于 100 nm 的稳定胶体分散系统,并能调控药物的释放行为。此外,玉米肽分子结构中富含酰胺基、羟基等活泼基团,可与药物分子结构中的苯环、羰基等活性基团通过范德华力、氢键等相互作用形成复合物^[13]。该复合物不仅不会破坏药物分子的自身结构,还能继承玉米肽的两亲性自组装特性^[11],进而对药物的溶解度、溶出度及体内药理活性产生积极影响^[14],

是一种极具应用前景的新型药物递送载体。

与价格昂贵的化学合成类药物载体相比,玉米肽具有来源稳定、成本低廉等优势,可显著降低药物研发的风险与成本。基于此,本研究首先采用分子模拟对接技术,探究金丝桃苷与玉米肽之间的结合模式及亲和力,为后续实验设计提供理论指导,减少实验盲目性;随后对金丝桃苷-玉米肽纳米复合物 (Hyp-CP-NCs) 的制备工艺进行系统研究,并采用 X-射线粉末衍射法 (XRPD)、差式扫描量热法 (DSC)、傅里叶变换红外光谱等技术 (FT-IR),对 Hyp-CP-NCs 的理化性质进行表征;最后以金丝桃苷原料药为对照,比较 Hyp-CP-NCs 对肾脏缺血再灌注所致肾损伤的改善作用,期望为金丝桃苷的制剂研发及临床应用提供新的思路与实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1200 型高效液相色谱仪 (HPLC, 美国 Agilent 公司); ZNCL-DL 型磁力搅拌器 (河南爱博科技发展有限公司); MSE125P-CE 型电子分析天平 (瑞士 Sartorius 仪器公司); RE05205 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); 5810R/5424R 型低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); YTLG-10A 型真空冷冻干燥机 (上海叶拓科技有限公司); JEM-7700/FLASH 型透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司); ZS-90 型粒度测定仪 (英国 Malvern 公司); XRD-2 型 X 粉末衍射仪 (北京普析通用仪器有限责任公司); Q20 型差式扫描量热分析仪 (美国 TA 公司); FADT-1202 型溶出仪 (上海富科思分析仪器有限公司); VECTOR-22 型傅里叶变换红外光谱仪 (德国 BRUKER 公司); KBF240 型恒温恒湿箱 (河南捷隆科技有限公司); CM1900 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司); 正置光学显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司)。

1.2 材料

金丝桃苷对照品 (批号 231215, 质量分数 99.0%, 北京世纪奥科生物技术有限公司); 玉米肽 (批号 20240110, 深圳乐芙生物科技有限公司); 金丝桃苷原料药 (批号 PCS0522, 质量分数 97.2%,

成都植标化纯生物技术有限公司); 光谱级溴化钾 (批号 S30390, 上海源叶生物科技有限公司); 缬沙坦胶囊 (批号 X1034, 北京诺华制药有限公司); 肌酐 (Scr) 检测试剂盒 (货号 C011-2-1)、尿素氮 (BUN) 检测试剂盒 (货号 C013-2-2)、苏木精染色液 (货号 C0107)、伊红染色液 (货号 C0109) 和 Masson 染色试剂盒 (货号 D026) 购自南京建成生物工程研究所。

1.3 动物

C57BL/6J 小鼠 (SPF 级), 雌雄兼具, 体质量 18~22 g, 购自河南省动物实验中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (豫) 2020-0001。实验过程遵循周口师范学院实验动物管理规定, 动物伦理批准号 2025-XS-0402。

2 方法与结果

2.1 玉米肽与金丝桃苷分子模拟对接

玉米肽共包含 6 条肽链段, 其中丝氨酸-亮氨酸-异亮氨酸-天冬酰胺-脯氨酸-缬氨酸-亮氨酸-丝氨酸-精氨酸-谷氨酰胺-谷氨酰胺-脯氨酸-异亮氨酸-缬氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丙氨酸 (Ser-Leu-Ile-Asn-Pro-Val-Leu-Ser-Arg-Gln-Gln-Pro-Ile-Val-Gly-Gly-Ala, SLINPVLRSQQPIVGGGA) 链段所含疏水氨基酸数量最多。由于疏水氨基酸是形成纳米复合物的主要基团^[14], 因此选择该链段开展后续分子模拟对接研究。金丝桃苷的三维结构从 PubChem 数据库下载获取, 玉米肽目标肽链段通过 Discovery Studio 2022 软件构建完成。

实验以金丝桃苷为配体、玉米肽 SLINPVLRSQQPIVGGGA 链段为受体, 采用 Autodock tools 1.5.6 软件对玉米肽肽链段进行预处理, 并为其添加极性氢原子。利用 Discovery Studio 2022 软件的半柔性对接模式进行对接模拟, 对接区域的盒子大小设定为 4.4 nm×6.0 nm×5.0 nm, 以完整包裹玉米肽链段; 格点间距设定为 0.037 5 nm, 对接中心坐标为 (-0.485, -0.417, 0.275), 运算次数设为 100 次, 最终采用 LigPlus 软件绘制对接二维示意图。

一般认为, 当受体与配体的对接结合能小于 $-29.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时, 表明两者具有较高的结合活性^[15]。分子模拟对接结果显示, 玉米肽链段与金丝桃苷的结合能为 $-32.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 说明二者之间存在较强的结合趋势。对接示意图见图 1, 由图可知, 玉米肽链段上的 Pro、Arg、Ser、Ile、Asn、Leu 均可能是金丝桃苷的结合位点; 而范德华力、氢键以及各类疏水作用力是驱动二者结合的主要作用力。

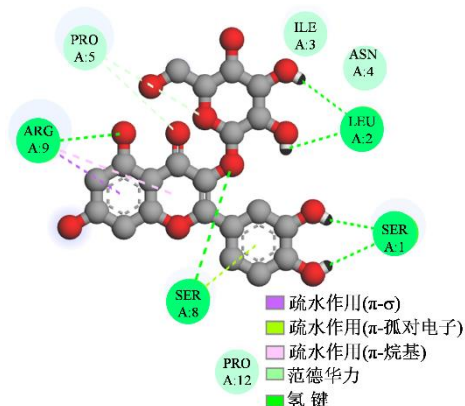


图 1 金丝桃苷和玉米肽分子对接示意图

Fig. 1 Molecular docking schematic diagram of hyperoside and corn peptide

2.2 Hyp-CP-NCs 的制备工艺

取 50 mL 纯化水加入适量玉米肽, 配制一定质量浓度的玉米肽溶液, 作为水相。取金丝桃苷 50 mg 溶于 5 mL 无水乙醇, 作为有机相。在 $600 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 磁力搅拌下将有机相缓慢滴加至含玉米肽的水相中, 反应一定时间使金丝桃苷和玉米肽通过氢键等作用充分结合在一起。将混悬液减压旋蒸 45 min 至无醇味, 使用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 续滤液中补加纯化水至 50 mL, 即得 Hyp-CP-NCs 混悬液。取玉米肽, 不加金丝桃苷同法制备空白纳米复合物混悬液。

2.3 金丝桃苷含量测定方法的建立

2.3.1 Hyp-CP-NCs 供试品的制备 精密取 Hyp-CP-NCs 混悬液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加乙醇 5 mL 超声 5 min, 加入乙醇稀释定容。精密取 1 mL 至 25 mL 量瓶中, 加甲醇-0.5%甲酸 (65:35) 稀释定容即得 Hyp-CP-NCs 供试品溶液, 密封待测。同法制备空白纳米复合物溶液。

2.3.2 色谱条件 采用 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为甲醇-0.5%甲酸 (65:35); 进样量 10 μL, 柱温 35°C; 检测波长 360 nm; 体积流量 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.3.3 线性关系考察 取金丝桃苷适量, 使用甲醇配制质量浓度为 $200.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 金丝桃苷对照品母液, 使用甲醇-0.5%甲酸 (65:35) 稀释成质量浓度为 10.00、5.00、2.50、1.00、0.20、0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的一系列对照品溶液, 按“2.3.2”项下方法测定, 以金丝桃苷各质量浓度 (X) 对峰面积 (Y) 进行线性回归, 拟合方程 $Y=36.1815X+1.2078$, $r=0.9999$, 线性范围 $0.05\sim10.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.4 专属性考察 取 Hyp-CP-NCs 和空白纳米复合物溶液和质量浓度 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的金丝桃苷对照品溶液, 按“2.3.2”项下方法测定, 结果见图 2, 金丝桃苷色谱峰不受玉米肽干扰, 专属性高。

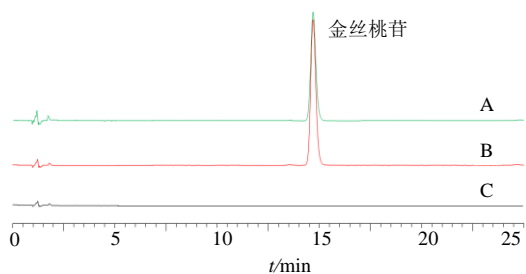


图 2 Hyp-CP-NCs (A)、金丝桃苷对照品 (B) 和空白纳米复合物溶液 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC spectrum of Hyp-CP-NCs (A), hyperoside reference substance (B) and blank nanocomposite solution (C)

2.3.5 精密度考察 取质量浓度分别为 10.00 、 2.50 、 $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的金丝桃苷对照品溶液, 分别连续测定金丝桃苷峰面积 6 次, 计算得 RSD 分别为 0.24% 、 0.61% 和 0.40% , 表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性考察 取同一份 Hyp-CP-NCs 样品, 按“2.3.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 进样测定金丝桃苷含量, 计算得 RSD 为 1.19% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.3.7 稳定性考察 取 Hyp-CP-NCs 供试品溶液于 0、2、4、6、12、24 h 测定金丝桃苷峰面积, 计算得 RSD 值为 0.64% ($n=6$), 表明 Hyp-CP-NCs 供试品溶液稳定性良好。

2.3.8 加样回收率考察 分别精密取 Hyp-CP-NCs 混悬液 0.5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 共 9 份, 分为低、中、高 3 组, 每组 3 份。按金丝桃苷含量的 80% 、 100% 和 120% 分别加入对照品, 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 测定金丝桃苷总含量。计算得金丝桃苷平均回收率分别为 101.24% 、 98.44% 、 100.77% , RSD 值分别为 0.48% 、 1.15% 、 0.82% ($n=$

3), 表明方法准确度较高。

2.4 Hyp-CP-NCs 包封率、载药量、粒径多分散性指数 (PDI) 和 Zeta 电位测定

取 Hyp-CP-NCs 混悬液使用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 精密取 1 mL 续滤液置于超滤管中, $8000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min , Hyp-CP-NCs 被截留在超滤管内, 加入乙醇超声提取, 测定被包封金丝桃苷的量 ($M_{\text{包封量}}$)。根据金丝桃苷总投药量 ($M_{\text{总投药量}}$), 计算包封率。将 Hyp-CP-NCs 混悬液直接冻干后称质量 ($M_{\text{总质量}}$), 计算载药量。取 Hyp-CP-NCs 混悬液置于比色皿中, 擦干外壁水分, 于粒度分析仪上测定粒径和 PDI。适量 Hyp-CP-NCs 混悬液至 Zeta 电位电槽中, 擦干外壁水分, 测定 Zeta 电位。

$$\text{包封率} = M_{\text{包封量}} / M_{\text{总投药量}}$$

$$\text{载药量} = M_{\text{包封量}} / M_{\text{总质量}}$$

2.5 单因素考察 Hyp-CP-NCs 处方工艺

2.5.1 玉米肽质量浓度考察 固定水浴温度为 $65 \text{ }^\circ\text{C}$, 制备时间为 30 min 条件下考察玉米肽质量浓度对 Hyp-CP-NCs 的影响。结果见表 1, 随着玉米肽质量浓度的增加 Hyp-CP-NCs 包封率逐渐增加后趋稳, 说明增加玉米肽质量浓度利于提高包封率, 但玉米肽质量浓度达到一定程度后包封率不再明显增加。载药量总体呈下降趋势, 说明在确保包封率的情况下控制玉米肽质量浓度, 以减少玉米肽用量。粒径呈逐渐增长趋势, 可能是玉米肽质量浓度越大 Hyp-CP-NCs 相互融合趋势越强^[14], 从而使粒径增长, 但 Hyp-CP-NCs 的 Zeta 电位绝对值均小于 25 mV 。综合考虑玉米肽质量浓度对 Hyp-CP-NCs 各指标影响趋势, 后续对其质量浓度 $10\sim 20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行优化。

2.5.2 制备温度的考察 固定玉米肽质量浓度为 $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 制备时间为 30 min 条件下考察制备温度对 Hyp-CP-NCs 的影响。结果见表 2, 随着制备温度的升高 Hyp-CP-NCs 包封率和载药量均呈先增

表 1 玉米肽质量浓度考察 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of concentration of corn peptide ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

玉米肽质量浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	Zeta 电位/mV
5	60.68 ± 0.90	10.02 ± 0.11	70.24 ± 3.77	-24.55 ± 0.87
10	71.45 ± 1.30	6.39 ± 0.05	68.25 ± 3.23	-21.80 ± 0.85
15	84.54 ± 1.49	5.11 ± 0.13	77.95 ± 1.01	-22.74 ± 1.06
20	87.01 ± 1.87	4.18 ± 0.11	81.89 ± 3.01	-23.64 ± 0.99
25	87.30 ± 0.39	3.83 ± 0.08	84.30 ± 2.71	-23.52 ± 1.38

表 2 制备温度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

制备温度/℃	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	Zeta 电位/mV
45	65.97±0.75	4.16±0.06	73.87±2.39	-23.73±0.73
55	72.74±1.51	4.62±0.08	75.56±4.26	-24.91±0.43
65	83.12±1.21	5.19±0.09	74.53±5.90	-23.83±1.67
75	77.77±1.72	4.82±0.06	75.49±4.29	-22.55±0.62
85	73.26±1.07	4.46±0.04	85.92±3.26	-24.38±0.65

加后下降趋势,可见制备温度对 Hyp-CP-NCs 的形成有较大影响,可能是较低的制备温度不利于金丝桃苷与玉米肽之间自组装形成 Hyp-CP-NCs^[11],但制备温度过高可能导致金丝桃苷降解^[12],进而影响包封率和载药量。制备温度过高时 Hyp-CP-NCs 粒径有增长趋势,但制备温度对 Zeta 电位影响程度相对不大。综合考虑制备温度对 Hyp-CP-NCs 各指标影响趋势,后续对制备温度 55~75 °C 进行优化。

2.5.3 制备时间考察 固定玉米肽质量浓度为

15 mg·mL⁻¹,制备温度为 65 °C 条件下考察制备时间对 Hyp-CP-NCs 的影响。结果见表 3,制备时间对 Hyp-CP-NCs 影响较大,随着制备时间的延长包封率和载药量均呈先增加后下降趋势,可能是金丝桃苷与玉米肽之间自组装形成 Hyp-CP-NCs 需要一定时间^[14],但制备时间过长会导致金丝桃苷降解^[12],导致包封率和载药量下降。制备时间对 Hyp-CP-NCs 粒径和 Zeta 电位影响程度相对不大。综合考虑制备时间对 Hyp-CP-NCs 各指标影响趋势,后续对制备时间 15~45 min 进行优化。

表 3 制备时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

制备时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	Zeta 电位/mV
5	64.40±0.71	4.12±0.04	83.35±5.01	-23.23±0.38
15	74.66±1.34	4.60±0.10	85.68±3.97	-23.29±0.71
30	83.71±1.09	5.12±0.06	84.05±2.17	-24.56±1.41
45	76.87±0.26	4.81±0.10	82.11±1.87	-23.59±1.27
60	73.00±0.21	4.39±0.05	87.62±4.31	-22.33±0.72

2.6 Box-Behnken 设计-效应面法 (BBD-RSM) 优化 Hyp-CP-NCs 处方

2.6.1 试验设计及结果

基于单因素实验确定的关键影响因素,以玉米肽质量浓度 (X_1)、制备温度 (X_2) 及制备时间 (X_3) 为自变量。经“2.5”项下考察发现 Hyp-CP-NCs 粒径均小于 90 nm, Zeta 电位绝对值均为 23 mV 左右,为简化试验方案,故粒径和 Zeta 电位不再作为优化指标。选择包封率 (Y_1) 和载药量 (Y_2) 作为 Hyp-CP-NCs 的优化指标,为使 Hyp-CP-NCs 包封率和载药量较高,故这 2 个指标的总评归一值 (OD) 进行评价。分别制备不同处方工艺下的 Hyp-CP-NCs,测定的包封率和载药量,并计算 OD 值。使用实验数据建立数学模型。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。

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

$$OD = 0.5 \times d_{\text{包封率}} + 0.5 \times d_{\text{载药量}}$$

M_i 、 M_{\max} 和 M_{\min} 分别为包封率和载药量的实测值、最大值和最小值

2.6.2 模型拟合及方差分析

使用 Design Expert 软件 (V12.0) 对实验数据进行拟合,得二次三项式方程为: $Y = 0.80 - 0.12 X_1 + 5.09 \times 10^{-3} X_2 + 0.04 X_3 + 8.84 \times 10^{-3} X_1 X_2 + 8.53 \times 10^{-3} X_1 X_3 - 0.10 X_2 X_3 - 0.22 X_1^2 - 0.20 X_2^2 - 0.26 X_3^2$, 作为 OD 的数学模型。方差分析见表 5,模型 $P < 0.0001$,判定系数 (R^2) 和调整判定系数 (R_{adj}^2) 分别为 0.9831 和 0.9615,说明模型具有极显著性意义,且拟合结果与实验值相关性良好。失拟项 $P = 0.0764$,无显著性意义,说明拟合结果可信度较高。OD 二次三项式方程中, X_3 具有显著性差异 ($P < 0.05$), X_1 、 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。根据一次项

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 /(mg·mL ⁻¹)	X_2 /°C	X_3 /min	Y_1 %	Y_2 %	OD	序号	X_1 /(mg·mL ⁻¹)	X_2 /°C	X_3 /min	Y_1 %	Y_2 %	OD
1	15(0)	75(1)	15(-1)	75.12	4.59	0.445	10	20	55	30	74.97	3.59	0.250
2	20(1)	65(0)	15	73.33	3.42	0.167	11	20	65	45	75.46	3.70	0.286
3	20	75	30(0)	74.28	3.55	0.221	12	10	65	45	67.93	5.82	0.456
4	10(-1)	55(-1)	30	69.84	6.05	0.559	13	15	65	30	82.64	5.05	0.765
5	15	75	45(1)	71.57	4.44	0.307	14	15	65	30	83.27	5.13	0.800
6	15	55	15	68.69	4.19	0.170	15	15	65	30	84.09	5.15	0.829
7	15	55	45	74.96	4.63	0.448	16	15	65	30	83.31	5.08	0.791
8	10	75	30	68.13	5.99	0.495	17	10	65	15	68.23	5.85	0.371
9	15	65	30	84.11	5.18	0.835							

表 5 方差分析结果

Table 5 Results of variance analysis

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P	项目	平方和	自由度	均方	F 值	P
模型	0.92	9	0.10	45.36	<0.000 1	X_1^2	0.21	1	0.21	92.88	<0.000 1
X_1	0.11	1	0.11	51.04	0.000 2	X_2^2	0.17	1	0.17	75.40	<0.000 1
X_2	2.07×10^{-4}	1	2.07×10^{-4}	0.09	0.770 0	X_3^2	0.29	1	0.29	128.39	<0.000 1
X_3	2.02	1	2.02	6.58	0.037 3	残差	0.02	7	2.24×10^{-3}		
X_1X_2	3.13×10^{-4}	1	3.13×10^{-4}	0.14	0.719 9	失拟项	0.01	3	4.14×10^{-3}	5.03	0.076 4
X_1X_3	2.91×10^{-4}	1	2.91×10^{-4}	0.13	0.729 3	纯偏差	3.29×10^{-3}	4	8.22×10^{-4}		
X_2X_3	0.04	1	0.04	19.30	0.003 2	总离差	0.93	16			

系数绝对值大小可知, 各因素对 OD 值的影响顺序为 $X_1 > X_3 > X_2$ 。

2.6.3 响应面绘制及处方工艺确定 使用 Design Expert 软件 (V12.0) 绘制自变量 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 与因变量 OD 响应面图, 结果见图 3, 均呈抛物线变化趋势。OD 值越大代表结果越理想, 故在优化 Hyp-CP-NCs 处方时设置 OD 优化目标为最大值, 区间设置为 0~1, 得到 Hyp-CP-NCs 最佳处方为: 玉米肽质量浓度为 13.66 mg·mL⁻¹, 制备温度为 64.86 °C, 制备时间为 34.20 min, 预测 OD 值为 0.847。考虑到实际操作, 将制备温度调整为 65 °C, 制备时间调整为 35 min, 而玉米肽质量浓度仍为

13.66 mg·mL⁻¹。

2.6.4 Hyp-CP-NCs 处方验证 制备 3 批 Hyp-CP-NCs, 各指标测定结果见表 6。以预测 OD 值(0.847)为参考, 3 批处方验证 OD 值的相对偏差仅为 -1.89%, 可见建立的数学模型预测性良好。3 批 Hyp-CP-NCs 平均包封率和载药量分别为 (84.02 ± 0.80) % 和 (5.19 ± 0.07) %, 另测得平均粒径为 (70.64 ± 4.13) nm, PDI 值为 0.073 ± 0.005; Zeta 电位为 (-23.09 ± 0.87) mV, 结果见图 4。

2.7 Hyp-CP-NCs 冻干粉的制备及理化性质研究

2.7.1 Hyp-CP-NCs 粉末的制备 将 Hyp-CP-NCs 混悬液分装至西林瓶中, -30 °C 超低温冰箱中预

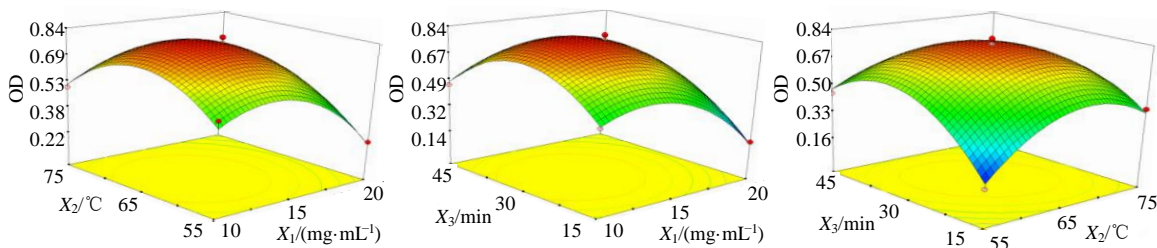


图 3 各因素对 OD 值的影响

Fig. 3 Effect of various factors on OD value

表 6 处方验证结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Results of prescription validation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

批次	包封率/%	载药量/%	OD 值
第 1 批	84.02±0.77	5.17±0.06	0.831
第 2 批	84.13±0.92	5.21±0.08	0.842
第 3 批	83.86±0.74	5.14±0.05	0.820

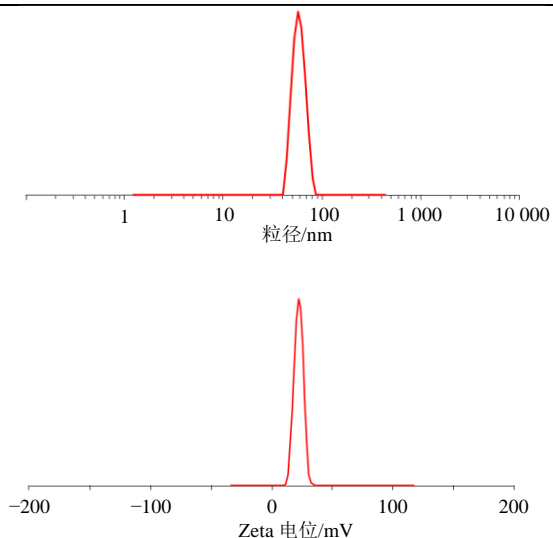


图 4 Hyp-CP-NCs 粒径和 Zeta 电位

Fig. 4 Particle size and Zeta potential of Hyp-CP-NCs

冻 3 d, 立即敞口置冻干机的样品盘中, 固定真空罩后抽真空, 3 d 后取出即得 Hyp-CP-NCs 粉末。加入纯化水, 超声 10 s 重新成混悬液, 测得包封率、载药量、粒径和 Zeta 电位分别为 (84.11 ± 1.03) %、(5.14 ± 0.09) %、(77.03 ± 3.44) nm 和 (-23.61 ± 1.11) mV。与 Hyp-CP-NCs 混悬液冻干前相比, 包封率、载药量、粒径和 Zeta 电位均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.7.2 Hyp-CP-NCs 混悬液丁达尔现象 取 Hyp-CP-NCs 混悬液和 Hyp-CP-NCs 粉末复溶后混悬液, 分别置比色皿中, 使用激光笔侧面照射。结果见图 5, 均可观察到明亮的光路即丁达尔现象, 说明 Hyp-CP-NCs 混悬液和 Hyp-CP-NCs 粉末复溶后混悬液均属于胶体分散体系, 存在大量的纳米颗粒。

2.7.3 Hyp-CP-NCs 粉末溶解度测定 分别取金丝桃苷和玉米肽简单混合, 两者用量比同 Hyp-CP-NCs 粉末, 作为物理混合物。取过量金丝桃苷原料药、物理混合物和 Hyp-CP-NCs 粉末分别置于纯化水中, 25 °C 水浴中磁力搅拌 3 d, $8\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液测定金丝桃苷溶解度。同法测定各样品在 pH 2.0 和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中溶解度。结果见图 6, 物理混合物极大提高了金丝桃苷

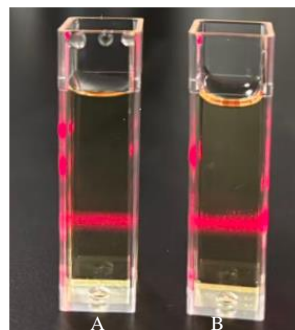
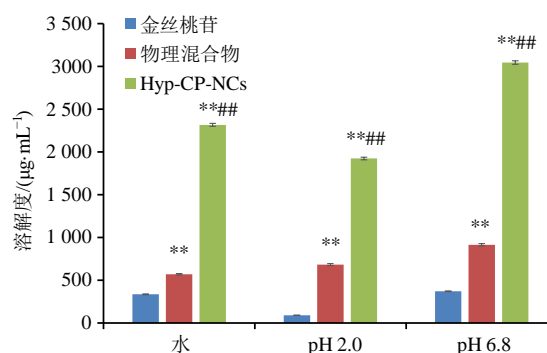


图 5 Hyp-CP-NCs 混悬液 (A) 和 Hyp-CP-NCs 粉末纯化水复溶后混悬液 (B) 的丁达尔现象

Fig. 5 Tyndall effect of Hyp-CP-NCs suspension (A) and suspension of Hyp-CP-NCs powder redissolved by purified water (B)



与金丝桃苷比较: ** $P < 0.01$; 与物理混合物比较: ### $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs hyperoside; ### $P < 0.01$ vs physical mixture.

图 6 金丝桃苷、物理混合物及 Hyp-CP-NCs 粉末在不同介质中的溶解度 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Solubility of hyperoside, physical mixture and Hyp-CP-NCs powder in in different media ($\bar{x} \pm s, n=3$)

中在纯化水、pH 2.0 和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中的溶解度 ($P < 0.01$), 可能是玉米肽本身具有两亲性特性, 具有增溶作用^[13]。与物理混合物相比, Hyp-CP-NCs 对金丝桃苷溶解度的提高幅度仍有极显著性差异 ($P < 0.01$), 说明 Hyp-CP-NCs 更具优势, 一方面 Hyp-CP-NCs 处方中玉米肽本身具有增加金丝桃苷溶解度的作用; 另一方面 Hyp-CP-NCs 粒径较小, 在比表面积效应、扩散速率和表面能的影响下进一步增加了金丝桃苷溶解度。

2.7.4 TEM 观察 Hyp-CP-NCs 外貌 取稀释 50 倍 Hyp-CP-NCs 混悬液 30 μL 加至铜网上, 铺展均匀后使用 1.0% 磷钨酸钠溶液染色, 晾干, 置于 TEM 下观察 Hyp-CP-NCs 形貌 ($\times 11\ 000$), 结果见图 7。Hyp-CP-NCs 混悬液和 Hyp-CP-NCs 粉末纯化水复溶后的混悬液中可观察到大量外貌呈类球形的

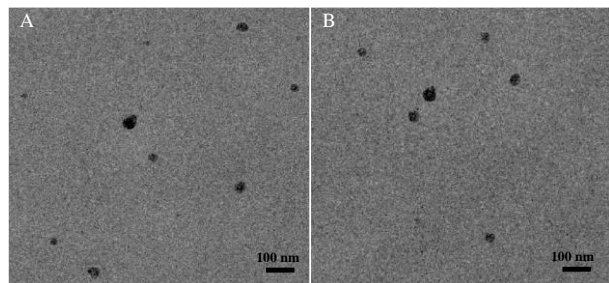


图 7 Hyp-CP-NCs 混悬液 (A) 和 Hyp-CP-NCs 粉末纯化水复溶后混悬液 (B) TEM 图 ($\times 11\ 000$)

Fig. 7 TEM image of Hyp-CP-NCs suspension (A) and suspension of Hyp-CP-NCs powder redissolved by purified water (B) ($\times 11\ 000$)

Hyp-CP-NCs 纳米颗粒。

2.7.5 FT-IR 分析 分别精密称取金丝桃苷、玉米肽、“2.7.3”项下物理混合物及 Hyp-CP-NCs 粉末各 5 mg，置于玛瑙研钵中，各加入 0.5 g 溴化钾，充分研磨混匀后压制成透明薄片，进行红外光谱测定。FT-IR 测试条件：环境湿度 30%，光阑孔径 100.0，背景扫描 2 次，样品扫描 16 次。结果如图 8 所示：金丝桃苷在 $1\ 651\ \text{cm}^{-1}$ 处出现特征性 C=O 伸缩振动峰，在 $3\ 242\ \text{cm}^{-1}$ 处出现酚羟基 O-H 伸缩振动峰；玉米肽在 $3\ 398\ \text{cm}^{-1}$ 和 $3\ 284\ \text{cm}^{-1}$ 处呈现酰胺键 N-H 伸缩振动特征吸收峰。物理混合物的红外图谱仅为金丝桃苷与玉米肽特征峰的简单叠加，表明二者未形成氢键等分子间相互作用。而在 Hyp-CP-NCs 红外图谱中，金丝桃苷 $1\ 651\ \text{cm}^{-1}$ 处 C=O 伸缩振动峰强度显著减弱，玉米肽 $3\ 398$ 、 $3\ 284\ \text{cm}^{-1}$ 处酰胺 N-H 特征吸收峰基本消失，据此推测金丝桃苷分子中的羰基与玉米肽的酰胺键之间可能形成氢键相互作用，进而组装形成 Hyp-CP-NCs。

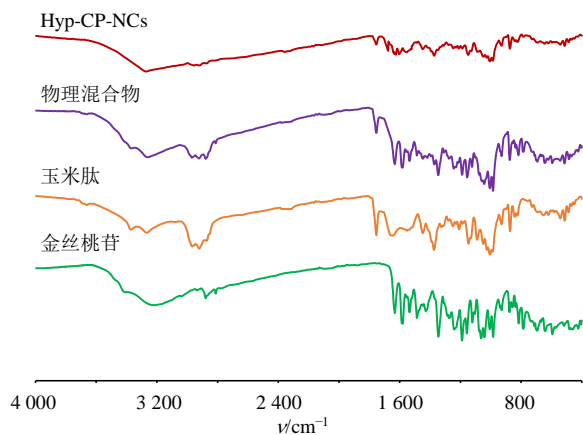


图 8 FT-IR 结果
Fig. 8 FT-IR results

2.7.6 XRPD 分析 分别精密称取金丝桃苷、玉米肽、“2.7.3”项下物理混合物及 Hyp-CP-NCs 粉末适量，进行 XRPD 测定，结果见图 9。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 $3^\circ \sim 45^\circ$ 。金丝桃苷在 7.4° 、 8.3° 、 12.5° 、 18.5° 、 20.7° 、 25.0° 等处均出现尖锐的晶型特征衍射峰，而玉米肽仅呈现 2 处宽钝的弥散衍射峰。物理混合物的 XRPD 图谱中仍可清晰观察到金丝桃苷的特征衍射峰，表明简单物理混合并未改变金丝桃苷的晶型结构。与之相比，Hyp-CP-NCs 粉末的 XRPD 图谱中未出现金丝桃苷的特征衍射峰，提示金丝桃苷的晶态结构发生转变，由晶型转化为无晶格有序排列的无定形态。药物晶型向无定形态的转变，有助于提升药物的溶解度、溶出速率及溶出度^[7]。

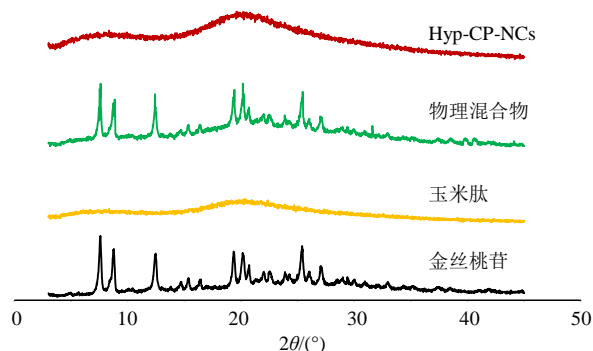


图 9 XRPD 结果

Fig. 9 XRPD results

2.7.7 DSC 分析 取金丝桃苷、玉米肽、“2.7.3”项下物理混合物和 Hyp-CP-NCs 粉末置于铝槽中，盖上铝盖后压制成铝饼，对温度 $30 \sim 330\ ^\circ\text{C}$ 进行测试，参比物为氧化铝。结果见图 10，金丝桃苷在 $268\ ^\circ\text{C}$ 出现尖锐的熔点峰，玉米肽在 $94\ ^\circ\text{C}$ 附近出现宽而钝的熔点峰。在物理混合物 DSC 中，金丝桃苷的熔点峰提前至 $229\ ^\circ\text{C}$ ，可能是玉米肽熔点较低，随着差示扫描量热仪的温度逐渐升高混合物中玉米肽先行熔融成高温液体，进而对金丝桃苷熔点峰产生影响，导致其熔点峰提前。在 Hyp-CP-NCs 的 DSC 图谱中金丝桃苷熔点峰变成宽而钝形态，与金丝桃苷和物理混合物 DSC 图谱区别较大，说明金丝桃苷在 Hyp-CP-NCs 物相发生了变化，可与 XRPD 分析结果相互佐证。

2.8 Hyp-CP-NCs 体外释放度测定

精密称取金丝桃苷 20 mg，置于截留相对分子质量为 $8\ 000 \sim 14\ 000$ 的透析袋中，加入 pH 2.0 磷酸盐缓冲液 5 mL，密封透析袋两端后，将其置于 1.0 L、

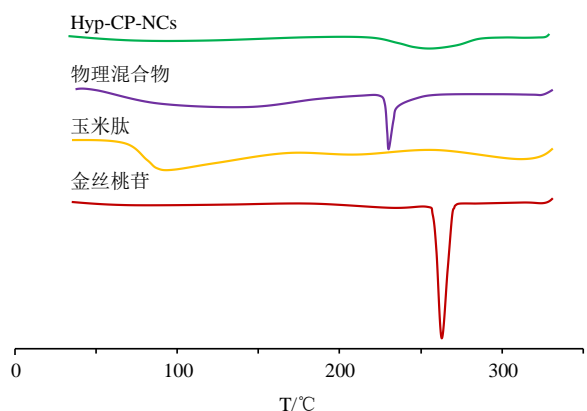


图 10 各样品的 DSC 图谱

Fig. 10 DSC spectrum of each sample

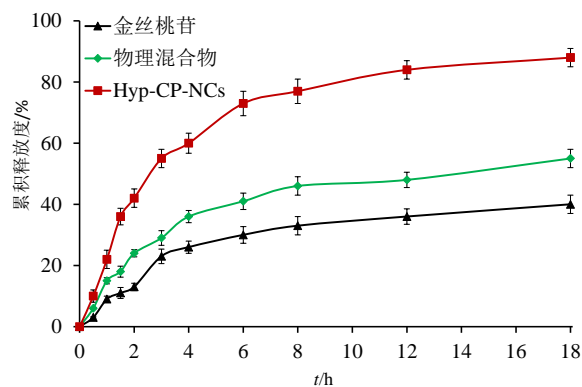


图 11 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 11 *In vitro* release profiles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

37 °C 恒温的 pH 2.0 磷酸盐缓冲液中, 在 75 r·min⁻¹ 的转速下进行体外释放实验。分别于 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 h 取样, 2 h 取样完成后, 立即将释放介质更换为 1.0 L、37 °C 恒温的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液, 继续培养并分别于 3、4、6、8、10、12、18 h 取样。每次取样体积均为 5 mL, 取样后立即向释放体系中补加等量相应温度和 pH 的释药介质, 以维持体系体积恒定。将所取样品置于 8 500 r·min⁻¹ 条件下离心 5 min, 取上清液, 采用相应方法测定其中金丝桃苷的含量。按上述相同方法, 分别考察金丝桃苷物理混合物及 Hyp-CP-NCs 的体外释药行为, 实验结果见图 11。

实验结果显示, 纯金丝桃苷在 18 h 时的累积释放度仅为 40.17%; 而其在物理混合物中的 18 h 累积释放度提升至 55.60%, 推测其原因可能为物理混合物中的玉米肽对金丝桃苷具有增溶作用, 从而促进金丝桃苷的溶解, 进而提高其释药速率及累积释放度。值得注意的是, Hyp-CP-NCs 的 18 h 累积释放度高达 87.85%, 其对金丝桃苷体外释放度的提升效果远优于物理混合物。

2.9 Hyp-CP-NCs 粉末稳定性考察

取新制备 Hyp-CP-NCs 混悬液, 测定金丝桃苷

含量 (m_0)、包封率、载药量、粒径和 Zeta 电位。将 Hyp-CP-NCs 混悬液按“2.7.1”制备成粉末, 密封置于恒温恒湿箱中 (温度和湿度分别设置为 40 °C、75%), 于 0、1、2、3、6 月取适量 Hyp-CP-NCs 粉末, 加纯化水复溶, 使用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 测定金丝桃苷含量 (m_i), 计算沉降率。测定复溶后 Hyp-CP-NCs 混悬液的包封率、载药量、粒径和 Zeta 电位。结果见表 7, 随着储存时间的延长, Hyp-CP-NCs 粉末沉降率逐渐增加, 但第 6 个月沉降率仍小于 1.5%。第 6 个月包封率仍大于 80%, 符合《中国药典》四部微粒指导原则的规定, 且载药量仍大于 5%。与第 0 月相比, 第 6 个月粒径和 Zeta 电位均无显著性差异 ($P>0.05$), 说明 Hyp-CP-NCs 粉末稳定性良好。

$$\text{沉降率} = (m_0 - m_i) / m_0$$

2.10 Hyp-CP-NCs 对肾缺血再灌注所致肾损伤的改善作用

2.10.1 实验方案 将 42 只小鼠随机分为假手术组、模型组、缬沙坦 (阳性药, 10 mg·kg⁻¹) 组^[16-17]、金丝桃苷组 (120 mg·kg⁻¹)^[5]、玉米肽组 (用量同 Hyp-CP-NCs 高剂量组)、Hyp-CP-NCs 低、高剂量 (60、120 mg·kg⁻¹) 组, 每组 6 只。除假手术组外, 其他各

表 7 Hyp-CP-NCs 粉末稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Stability results of Hyp-CP-NCs powder ($\bar{x} \pm s, n=3$)

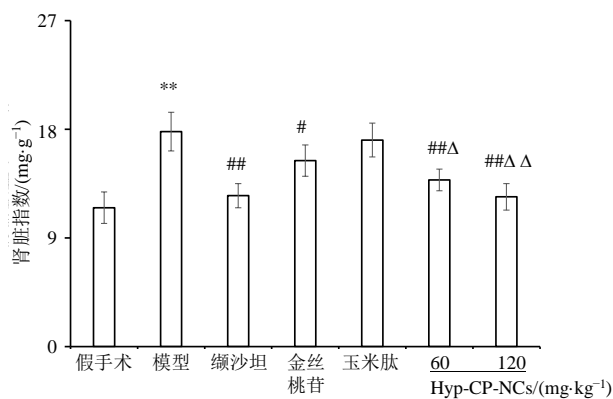
时间/月	沉降率/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	Zeta 电位/mV
0	0.70±0.10	83.98±0.21	5.14±0.04	79.20±3.47	23.55±0.64
1	0.86±0.06	83.74±0.15	5.09±0.03	75.93±3.75	23.42±0.70
2	0.96±0.07	83.49±0.17	5.06±0.08	76.33±2.27	23.71±0.66
3	1.17±0.04	83.18±0.22	5.04±0.03	77.83±3.86	22.91±0.25
6	1.43±0.09	83.10±0.12	5.02±0.10	77.24±6.28	22.95±0.92

组小鼠 ip 戊巴比妥钠,沿正中线用手术刀打开腹腔,使左肾充分暴露,分离左肾蒂,用微血管夹夹住肾蒂,造成阻塞,使左肾缺血 45 min^[18],缓慢松开微血管夹,将肠管复位后缝合腹腔,实验过程中注意消毒。假手术组 ip 戊巴比妥钠,沿正中线用手术刀打开腹腔后分离肾蒂,不用微血管夹夹闭肾蒂,后续操作同其他各组。手术后次日 9:00 开始给药,ig 体积为 10 mL·kg⁻¹,其中假手术组和模型组给予 0.5%羧甲基纤维素钠溶液,其余各组给予 0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制的相应药物。每日 ig 1 次,连续给药 14 d。第 14 天给药 6 h 后,将小鼠置于含乙醚容器中,麻醉后立即摘取眼球取血,3 000 r·min⁻¹离心 2 min 制备血清。颈椎脱臼法处死小鼠,立即取出两侧肾脏,滤纸吸干表面水分后称质量,计算肾脏指数。取左侧肾脏,部分保存于液氮中,部分保存于 4.0%多聚甲醛。

肾脏指数 = 两侧肾脏总质量 / 小鼠体质量

2.10.2 肾脏指数测定结果 结果见图 12。与假手术组相比,模型组肾脏指数极显著性升高 ($P < 0.01$),主要由左肾脏肿大引起,说明建模成功。与模型组相比,玉米肽组肾脏指数有一定下降,但无显著性差异 ($P > 0.05$);而各给药组肾脏指数均显著性或极显著性下降 ($P < 0.05$ 、 0.01),说明左肾脏肿大得到缓解。与金丝桃苷组相比,Hyp-CP-NCs 低剂量组肾脏指数显著性下降 ($P < 0.05$),而 Hyp-CP-NCs 高剂量组肾脏指数极显著性下降 ($P < 0.01$),呈现一定的剂量相关性。

2.10.3 肾功能检测 分别检测各组小鼠 Scr 和 BUN 水平,结果见图 13。与假手术组相比,模型组 Scr 和 BUN 水平均极显著性升高 ($P < 0.01$),说

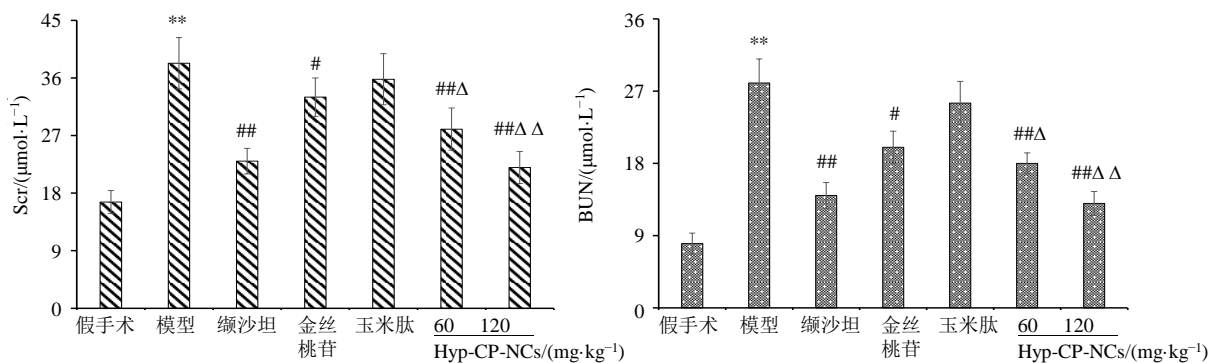


与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与金丝桃苷组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs hyperoside group.

图 12 各组小鼠肾脏指数测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 12 Determination results of kidney index in each mice group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

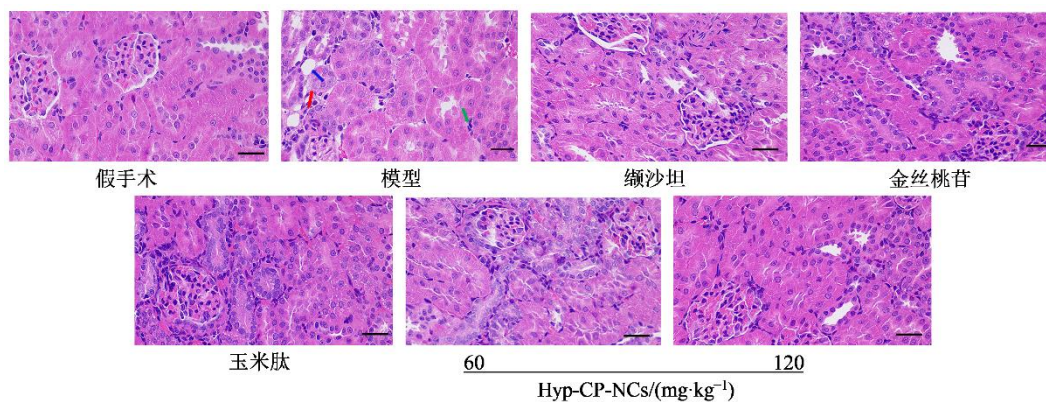
明建模成功。与模型组相比,玉米肽组 Scr 和 BUN 水平有所下降,但无显著性差异 ($P > 0.05$);而各给药组 Scr 和 BUN 水平均显著性或极显著性下降 ($P < 0.05$ 、 0.01),说明肾功能得到改善。与金丝桃苷组相比,Hyp-CP-NCs 低剂量组 Scr 和 BUN 水平均显著性下降 ($P < 0.05$),而 Hyp-CP-NCs 高剂量组 Scr 和 BUN 水平均极显著性下降 ($P < 0.01$),说明 Hyp-CP-NCs 增强了金丝桃苷药效。

2.10.4 苏木精-伊红(HE)染色 取浸泡在 4%多聚甲醛中的肾组织进行脱水,石蜡包埋,切片(厚度约 5 μm),使用苏木精染色 5 min,返蓝冲洗,滴加伊红染色 1 min,乙醇脱水,滴加中性树脂封片。将切片置于光学显微镜下观察肾脏病理情况,拍照,结果见图 14。假手术组小鼠肾脏组织正常;模



与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与金丝桃苷组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs hyperoside group.

图 13 各组小鼠 Scr 和 BUN 测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 13 Determination results of Scr and BUN in each mice group ($\bar{x} \pm s, n=6$)



红色箭头-肾小管萎缩; 蓝色箭头-间质增宽; 绿色箭头-炎性细胞浸润。

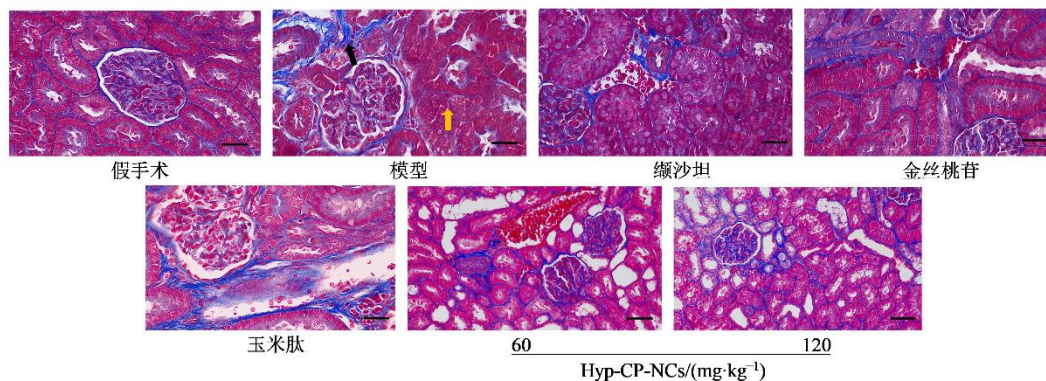
Red arrow-renal tubular atrophy; blue arrow-widened interstitium; green arrow-inflammatory cell infiltration.

图 14 HE 染色结果 (×400)

Fig. 14 Hematoxylin-eosin staining results (×400)

型组小鼠肾组织中出现肾小管萎缩、间质增宽、炎性细胞浸润等病理现象, 是肾损伤的主要表现。金丝桃苷组和玉米肽组肾小管萎缩情况缓解, 但仍可见炎性细胞浸润现象, 治疗效果欠佳。Hyp-CP-NCs 低、高剂量组肾小管间质均较致密, 病理损伤程度随着给药剂量的增加而减轻; Hyp-CP-NCs 高剂量组病理改善情况接近阳性组。

2.10.5 Masson 染色 取小鼠肾组织脱水, 石蜡包埋, 切片 (厚度 $5\ \mu\text{m}$), 参考 Masson 染色试剂盒说明书进行处理^[19], 将切片置于光学显微镜下观察, 拍照, 结果见图 15。假手术组小鼠肾脏组织无胶原沉积; 模型组小鼠肾组织出现明显的胶原沉积, 结构紊乱; 金丝桃苷组和玉米肽组仍见明显的胶原沉积现象, 治疗效果欠佳; 随着 Hyp-CP-NCs 给药剂



黑色箭头-胶原沉积; 黄色箭头-结构紊乱。

Black arrow-collagen deposition; Yellow arrow-structural disorder.

图 15 Masson 染色结果 (×400)

Fig. 15 Masson staining results (×400)

量的增加, 胶原沉积现象随之减轻, 病理损伤情况均低于金丝桃苷组。Hyp-CP-NCs 高剂量组病理改善情况接近于阳性组。

2.11 统计学分析

数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 采用 SPSS 24.0 软件单因素方差分析和 Duncan 多重比较方法进行显著性分析, $P < 0.05$ 判定存在显著差异。

3 讨论

Hyp-CP-NCs 的粒径不足 $80\ \text{nm}$, 采用高速离心

法难以使其有效沉淀, 进而影响分离效果与测定结果的准确性^[20], 因此高速离心法不适用于 Hyp-CP-NCs 包封率及载药量的测定。玉米肽易溶于甲醇、乙醇, 在经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过的 Hyp-CP-NCs 混悬液中, 加入适量醇类试剂可破坏其纳米结构, 使金丝桃苷游离释放, 该方法操作简便且成本低廉。考虑到乙醇基本无毒性, 本研究选择乙醇作为溶剂, 用于包封率与载药量的测定。HPLC 法测定金丝桃苷含量时, 选用 $360\ \text{nm}$ 作为检测波长, 而玉

米肽在该波长下无明显吸收,可有效避免其对金丝桃苷含量测定的干扰,保证检测结果的可靠性。

包封率对纳米制剂的药动学特征及药效发挥具有重要影响^[9-11],而载药量直接关系到制剂的药效强度,载药量越高,越易满足临床治疗需求。因此,包封率与载药量对 Hyp-CP-NCs 而言同等重要,故在 OD 值评价指标中设定相同权重。本研究以 OD 值为响应指标,采用 BBD-RSM 建立数学模型,进而筛选得到 Hyp-CP-NCs 的最佳处方工艺。处方验证实验结果显示,实际测定值与模型预测值拟合度良好,表明所构建的数学模型具有良好的可靠性,可用于指导 Hyp-CP-NCs 处方工艺的优化,同时也为该制剂的小试及中试研究提供了理论参考^[21]。

胶体分散体系的评价通常从粒子大小、光学性质及电学性质 3 个维度展开,一般要求胶体粒径小于 100 nm、具有丁达尔效应等光学特性,且胶体微粒表面带有电荷^[22]。本研究制备的 Hyp-CP-NCs 冻干粉继承了玉米肽的自组装特性,复溶后可形成粒径小于 100 nm 的胶体分散混悬液,丁达尔现象显著,且微粒表面带有负电荷,符合胶体分散体系的基本要求。Hyp-CP-NCs 对金丝桃苷的增溶效果远优于两者的物理混合物,其增溶机制可能与 Hyp-CP-NCs 减小药物粒径、改变药物晶型,以及玉米肽自身的增溶作用等多种因素相关^[10]。金丝桃苷溶解度的提升,有利于加快其溶出速率、提高溶出度,为增强其体内药效奠定了坚实基础。

分子对接研究结果表明,玉米肽与金丝桃苷之间可通过氢键、范德华力等分子间作用力实现络合,具有较强的结合倾向,这为 Hyp-CP-NCs 的制备提供了重要的理论支撑。FT-IR 分析结果显示,金丝桃苷分子结构中的羰基与玉米肽的酰胺键之间可能形成氢键络合作用,进而促使 Hyp-CP-NCs 的形成,这与分子对接预测的氢键作用结果相一致。但由于 FT-IR 无法表征范德华力及各类疏水作用力,因此分子模拟对接结果可作为两者结合机理研究的有益补充,完善 Hyp-CP-NCs 的形成机制。XRPD 与 DSC 分析结果显示,金丝桃苷在 Hyp-CP-NCs 中发生晶型转变,推测其原因可能包括 3 个方面:一是玉米肽本身为无定形物质,且在 Hyp-CP-NCs 处方中用量较大,对金丝桃苷的晶型产生掩蔽作用^[23];二是金丝桃苷的极性基团与玉米肽发生定向结合,干扰了金丝桃苷分子的有序排列,抑制其晶体结构的形成^[10];三是金丝桃苷分子在 Hyp-CP-

NCs 结构中的运动受到限制,阻碍了其有序晶体结构的形成^[24]。晶型转变使金丝桃苷以无定形态存在于 Hyp-CP-NCs 中,同时导致其熔点、溶解度及溶出度发生显著变化,而这些理化性质的积极改变,有利于增强金丝桃苷的药理活性^[11,25],也为其后续临床应用提供了有利条件。

综上所述,本研究以安全性高、来源稳定的玉米肽为载体,成功制备出 Hyp-CP-NCs,有效降低了制剂的研发及生产成本,具有较高的推广价值。Hyp-CP-NCs 显著提升了金丝桃苷的溶解度、溶出速率及溶出度,进而改善了肾脏缺血再灌注所致的肾损伤,具有良好的研究开发前景。未来将进一步开展 Hyp-CP-NCs 的规模化生产工艺、体内药动学、急性及长期毒性等相关研究^[26],不断完善其质量标准及研究资料。同时,由于玉米肽的化学结构及生产工艺等因素,Hyp-CP-NCs 口服时存在明显的苦涩味,影响用药顺应性,后续将通过优化玉米肽制备工艺、添加适宜矫味剂等方式加以改善。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 董凯旋,陈曦,周荣,等. 中医药靶向 IκB/NF-κB 信号通路作为肾小管间质纤维化的潜在治疗策略 [J]. 中国药学报, 2023, 51(10): 92-99.
Dong K X, Chen X, Zhou R, et al. Targeting IκB/NF-κB signaling pathway as a potential therapeutic strategy in renal TIF [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2023, 51(10): 92-99.
- [2] 徐晓敏,卢芳,于栋华,等. 基于 NF-κB/NLRP3/Caspase-1 信号轴探究白藜芦醇对痛风性肾病模型大鼠肾脏的保护作用机制 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(3): 496-504.
Xu X M, Lu F, Yu D H, et al. Exploring protective mechanism of resveratrol on rat kidney in gouty nephropathy model based on NF-κB/NLRP3/Caspase-1 signaling axis [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(3): 496-504.
- [3] 郑一丹,马绍城,马君义,等. 贯叶金丝桃提取物对急性缺氧大鼠肝肾损伤的改善作用 [J]. 甘肃农业大学学报, 2024, 59(1): 22-29.
Zheng Y D, Ma S C, Ma J Y, et al. Ameliorative effect of *Hypericum perforatum* extract on acute hypoxia rats with injury of liver and kidney [J]. J Gansu Agric Univ, 2024, 59(1): 22-29.
- [4] 张娟,冯春艳,卿德刚,等. 白麻叶和罗布麻叶的化学成分与抗炎活性比较研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(4): 711-720.
Zhang J, Feng C Y, Qing D G, et al. Comparative studies

- on component and anti-inflammatory activity of *Apocynum pictum* leaves and *Apocynum venetum* leaves [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(4): 711-720.
- [5] 王俊青, 余惠凡, 黄林生, 等. 金丝桃苷通过抑制 YAP 改善肾小管间质纤维化 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2025, 54(2): 190-197.
- Wang J Q, Yu H F, Huang L S, et al. Hypericin ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis via inhibiting YAP [J]. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong*, 2025, 54(2): 190-197.
- [6] 魏艳华, 李嘉欣, 宋捷, 等. 基于 Nrf2 调控 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬探讨金丝桃苷防治脓毒症相关急性肾损伤的作用机制 [J]. *中草药*, 2026, 57(2): 515-526.
- Wei Y H, Li J X, Song J, et al. Mechanism of hyperoside in preventing and treating sepsis-associated acute kidney injury based on Nrf2-regulated Pink1/Parkin-mediated mitophagy [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2026, 57(2): 515-526.
- [7] 刘艳菊, 武月丹, 位小杰, 等. 包载金丝桃苷的磷脂酰胆碱/壳聚糖自组装纳米粒的制备、表征及其口服药动学研究 [J]. *中草药*, 2025, 56(3): 819-830.
- Liu Y J, Wu Y D, Wei X J, et al. Self-assembled phosphatidylcholine/chitosan nanoparticles loaded with hyperoside: Preparation, characterization and oral pharmacokinetics [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(3): 819-830.
- [8] 李伟宏, 郑伟, 王风云, 等. 金丝桃苷磷脂复合物及其介孔二氧化硅纳米粒的制备和口服药动学研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(13): 4157-4167.
- Li W H, Zheng W, Wang F Y, et al. Preparation of hyperoside phospholipids complex and its mesoporous silica nanoparticles and oral pharmacokinetics study [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(13): 4157-4167.
- [9] 陈晓敏, 曹伶俐, 崔伟锋. 脂质体包裹的辣椒素介孔二氧化硅纳米粒的制备、药动学和胃黏膜刺激性评价 [J]. *中草药*, 2025, 56(15): 5393-5406.
- Chen X M, Cao L L, Cui W F. Liposomes-coated mesoporous silica nanoparticles loaded with capsaicin: Preparation, pharmacokinetic and gastric mucosa irritation evaluation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(15): 5393-5406.
- [10] 吕小改, 张攀, 李梦, 等. 葡聚糖涂层的芹菜素-玉米醇溶蛋白纳米复合物的制备及理化性质评价 [J]. *化学研究与应用*, 2025, 37(10): 2965-2976.
- Lü X G, Zhang P, Li M, et al. Apigenin-zein nanocomposite coated with dextran: Preparation and physicochemical property evaluation [J]. *Chem Res Appl*, 2025, 37(10): 2965-2976.
- [11] 王酪, 张佩琛, 范高洁, 等. 玉米肽负载芹菜素纳米粒的制备、口服药动学及对高血压大鼠的治疗作用 [J]. *药物评价研究*, 2026, 49(2): 603-616.
- Wang M, Zhang P C, Fan G J, et al. Apigenin loaded by corn peptide nanoparticles: Preparation, oral pharmacokinetics and therapeutic effects on hypertensive rats [J]. *Drug Eval Res*, 2026, 49(2): 603-616.
- [12] 王鹏, 王玉, 梅菊, 等. 黄蜀葵花中金丝桃苷的提取工艺研究 [J]. *食品与发酵科技*, 2021, 57(3): 76-80, 89.
- Wang P, Wang Y, Mei J, et al. Study on extraction technology of hyperin from *Abelmoschus Manihot* (L) [J]. *Food Ferment Sci Technol*, 2021, 57(3): 76-80, 89.
- [13] 林媛. 玉米肽基食品胶体结构的构建及应用 [D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- Lin Y. Construction and application of colloidal structure of corn peptide-based food gels [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.
- [14] 尹元元, 耿燕娜, 孙晋鹏, 等. 异甘草素-玉米肽纳米复合物分子模拟对接、制备及体内外评价 [J]. *中草药*, 2025, 56(21): 7749-7761.
- Yin Y Y, Geng Y N, Sun J P, et al. Isoliquiritigenin-corn peptide nano complexes: Molecular simulation docking, preparation and in vitro and in vivo evaluation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(21): 7749-7761.
- [15] 刘洪涛, 陈梦涵, 孙启慧, 等. 基于网络药理学和分子对接的金银花抗新型冠状病毒肺炎活性成分及机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(11): 2459-2474.
- Liu H T, Chen M H, Sun Q H, et al. Anti-COVID-19 active ingredients and mechanism of *Lonicerae Japonicae* Flos based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Drug Eval Res*, 2024, 47(11): 2459-2474.
- [16] 崔方强, 江心灿, 王悦芬, 等. 保肾通络方对糖尿病肾病小鼠肾小管间质纤维化及上皮细胞间充质转化的影响 [J]. *陕西中医*, 2024, 45(8): 1011-1015, 1025.
- Cui F Q, Jiang X C, Wang Y F, et al. Effect of Baoshen Tongluo Decoction on renal tubular interstitial fibrosis and epithelial-mesenchymal transition in DN mice [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2024, 45(8): 1011-1015, 1025.
- [17] 李艳阳, 袁鹏, 王云姣, 等. 基于网络药理学与腹主动脉缩窄模型的芪参益气滴丸肾保护作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(10): 2800-2811.
- Li Y Y, Yuan P, Wang Y J, et al. Research on renal protection of Qishen Yiqi Dripping Pills based on network pharmacology and abdominal aortic coarctation model [J]. *Drug Eval Res*, 2025, 48(10): 2800-2811.
- [18] 王学敏, 庞欣, 王晓蒙, 等. 姜黄素通过 TGF- β /Smads 信号通路对肾缺血再灌注后肾小管间质纤维化抑制作用 [J]. *重庆医科大学学报*, 2021, 46(10): 1158-1162.

- Wang X M, Pang X, Wang X M, et al. Curcumin inhibits tubulointerstitial fibrosis after renal ischemia-reperfusion through TGF- β /Smads signaling pathway [J]. J Chongqing Med Univ, 2021, 46(10): 1158-1162.
- [19] 王丽, 高小玲, 贾文汇, 等. 壳聚糖修饰大黄酸脂质体凝胶的制备及透皮抗光老化活性评价 [J]. 药物评价研究, 2026, 49(1): 202-214.
- Wang L, Gao X L, Jia W H, et al. Preparation and transdermal anti-photoaging activity evaluation of chitosan-modified Rhein liposome gel [J]. Drug Eval Res, 2026, 49(1): 202-214.
- [20] 张朗朗, 戴粤湘, 张涵, 等. 鬼臼毒素脂质体的制备及其质量评价 [J]. 中南药学, 2024, 22(1): 65-70.
- Zhang L L, Dai Y X, Zhang H, et al. Preparation optimization and quality evaluation of podophyllotoxin liposomes [J]. Cent South Pharm, 2024, 22(1): 65-70.
- [21] 张泽宇, 陶振, 王佳, 等. D-最优混料设计法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优化五味益心颗粒成型工艺 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(3): 698-707.
- Zhang Z Y, Tao Z, Wang J, et al. Optimization of Wuwei Yixin Granules forming process based on D-optimal mixture design method combined with Box-Behnken design-response surface method [J]. Drug Eval Res, 2025, 48(3): 698-707.
- [22] 魏美玲, 魏楠, 冯晓华, 等. 姜黄素氧化型前药胶束的制备及表征 [J]. 广东药科大学学报, 2025, 41(6): 1-10.
- Wei M L, Wei N, Feng X H, et al. Preparation and characterization of oxidized curcumin prodrug micelles [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2025, 41(6): 1-10.
- [23] 叶丽娟, 曾棋平, 杨育儒, 等. 二苯乙烯苷磷脂复合物的制备、表征及体外透皮性的研究 [J]. 西北药学杂志, 2026, 41(1): 120-129.
- Ye L J, Zeng Q P, Yang Y R, et al. Preparation, characterization and physicochemical properties of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside phospholipid complex [J]. Northwest Pharm J, 2026, 41(1): 120-129.
- [24] 谢毓敏. 葛根多糖载药纳米复合物的制备表征及其药动学研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2023.
- Xie Y M. Preparation, Characterization and Pharmacokinetic Study of Gegen Polysaccharide Drug-Loaded Nanocomplexes [D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [25] 郭亚利, 董晓函, 李阳杰. 基于“药辅合一”的茶皂素-金合欢素纳米混悬剂制备及其药动学与调血脂作用研究 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(8): 2233-2246.
- Guo Y L, Dong X H, Li Y J. Preparation, pharmacokinetics and hypolipidemic effects of tea saponin-acacetin nanosuspensions based on“combined drug-excipient” [J]. Drug Eval Res, 2025, 48(8): 2233-2246.
- [26] 卢芯仪, 许佑君, 张斗胜. 药物性肾损伤机制及药物肾毒性预测模型的研究进展 [J]. 解放军药科学报, 2025, 41(2): 130-135.
- Lu X Y, Xu Y J, Zhang D S. Advances in mechanisms of drug-induced kidney injury and predictive models for nephrotoxicity of drugs [J]. Pharm J Chin People's Liberation Army, 2025, 41(2): 130-135.

[责任编辑 孙英杰]