

蛇床子素巯基化纳米胶束的制备、药动学及对阿霉素诱导心肌损伤大鼠的保护作用

郭亚利¹, 王 皓¹, 郭娟娟¹, 李 亘², 崔晓鸽^{1*}

1. 郑州健康学院, 河南 郑州 450064

2. 郑州市第二人民医院, 河南 郑州 450006

摘要: **目的** 制备蛇床子素巯基化纳米胶束 (Ost-SH-NMs), 考察其口服药动学特征及对阿霉素诱导大鼠心肌损伤的保护作用。**方法** 采用单因素实验结合 Box-Behnken 设计-响应面法优化 Ost-SH-NMs 处方工艺; 通过透射电镜观测 Ost-SH-NMs 微观形貌, 借助 X-射线粉末衍射法分析药物晶型状态; 检测并对比游离蛇床子素与 Ost-SH-NMs 的溶解度, 采用体外透析法考察二者释药行为。将游离蛇床子素与 Ost-SH-NMs 分别 ig 给药 SD 大鼠, 测定不同时间点血药浓度, 计算主要药动学参数。通过 ip 阿霉素构建大鼠心肌损伤模型, 分组 ig 给予游离蛇床子素与 Ost-SH-NMs, 检测大鼠左心室射血分数 (LVEF)、左心室短轴缩短率 (LVFS) 及血清肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 相关指标; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色与 Masson 染色观察心肌组织形态结构及纤维化病变程度。**结果** 优化得到 Ost-SH-NMs 最佳制备处方: 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG2000-SH) 与蛇床子素投料比 10.3 : 1.0, 水相体积 19.5 mL, 水合时间 1.9 h。优化制备的 Ost-SH-NMs 包封率、载药量、沉降率、粒径及 Zeta 电位分别为 (87.60±0.92) %、(7.83±0.07) %、(4.17±0.22) %、(66.95±3.87) nm、(-22.07±0.82) mV。微观形貌显示 Ost-SH-NMs 呈类球形, 且蛇床子素在纳米胶束中以无定型状态存在。Ost-SH-NMs 可极显著提升蛇床子素水溶性, 12 h 药物累积释放率可达 87.19%。药动学结果表明, Ost-SH-NMs 可将蛇床子素口服相对生物利用度提升至 4.64 倍。药效学实验显示, 与同剂量 (60 mg·kg⁻¹) 游离蛇床子素组相比, Ost-SH-NMs 组大鼠 LVEF、LVFS 及 SOD 水平极显著升高 ($P<0.01$), LDH、CK、CK-MB、MDA 水平极显著降低 ($P<0.01$); 同时可有效改善心肌组织炎症浸润与胶原沉积, 心肌保护效果显著优于游离蛇床子素。**结论** Ost-SH-NMs 可显著改善蛇床子素的口服吸收效率, 对阿霉素诱导的大鼠心肌损伤具有显著保护作用, 具备良好的开发前景。

关键词: 蛇床子素; 巯基修饰; 纳米胶束; 药动学; 心肌损伤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2026)10-3687-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.10.024

Osthole sulfhydryl-modified nanomicelles: Preparation, pharmacokinetics and protective effect on adriamycin-induced myocardial injury in rats

GUO Yali¹, WANG Ming¹, GUO Juanjuan¹, LI Gen², CUI Xiaoge¹

1. Zhengzhou Health College, Zhengzhou 450064, China

2. The Second People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450006, China

Abstract: Objective To prepare osthole thiolated nanomicelles (Ost-SH-NMs) and evaluate its oral pharmacokinetic characteristics and protective effects against doxorubicin-induced myocardial injury in rats. **Methods** The formulation process of Ost-SH-NMs was optimized using single-factor experiments combined with Box-Behnken design-response surface methodology. Transmission electron microscopy was used to observe the microstructure of Ost-SH-NMs, while X-ray powder diffraction was employed to analyze the crystalline state of the drug. The solubility of free osthole and Ost-SH-NMs was measured and compared, and drug release behavior was evaluated by *in vitro* dialysis. Free osthole and Ost-SH-NMs were ig administered to SD rats, and blood concentrations at different time points were determined to calculate key pharmacokinetic parameters. A rat model of myocardial injury was established via

收稿日期: 2026-06-05

基金项目: 河南省科技攻关项目 (232102310384)

作者简介: 郭亚利 (1991—), 女, 硕士, 讲师, 从事中医药相关研究。E-mail: 773407035@qq.com

*通信作者: 崔晓鸽 (1983—), 女, 副教授, 研究方向为药理学。Email: cuixg2007@126.com

intraperitoneal injection of doxorubicin. Rats were divided into groups and treated orally with either free osthole or Ost-SH-NMs. Left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS), and serum levels of creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), CK-MB, superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) were measured. Histopathological changes and fibrosis were assessed using hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. **Results** The optimal preparation formula for Ost-SH-NMs was obtained: A ratio of distearoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol 2000-thiol (DSPE-PEG2000-SH) to osthole of 10.3 : 1.0, an aqueous phase volume of 19.5 mL, and a hydration time of 1.9 h. The optimized Ost-SH-NMs exhibited encapsulation efficiency, drug loading, sedimentation rate, particle size, and zeta potential of $(87.60 \pm 0.92)\%$, $(7.83 \pm 0.07)\%$, $(4.17 \pm 0.22)\%$, (66.95 ± 3.87) nm, and (-22.07 ± 0.82) mV, respectively. Microscopic observation revealed that Ost-SH-NMs had a nearly spherical morphology, and osthole existed in an amorphous state within the nanomicelles. Ost-SH-NMs significantly enhanced the water solubility of osthole, achieving a cumulative drug release of up to 87.19% over 12 h. Pharmacokinetic results showed that Ost-SH-NMs increased the relative bioavailability of osthole after oral administration by 4.64-fold. In pharmacodynamic studies, compared with the group receiving free osthole at the same dose ($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), the Ost-SH-NMs group showed significantly higher LVEF, LVFS, and SOD levels ($P < 0.01$), and significantly lower LDH, CK, CK-MB, and MDA levels ($P < 0.01$). Moreover, Ost-SH-NMs effectively alleviated inflammatory infiltration and collagen deposition in myocardial tissue, demonstrating stronger cardioprotective effects compared to free osthole. **Conclusion** Ost-SH-NMs significantly improve the oral absorption efficiency of osthole and exhibit significant protective effects against doxorubicin-induced myocardial injury in rats, indicating promising potential for further development.

Key words: osthole; sulfhydryl-modified; nanomicelles; pharmacokinetics; myocardial injury

蛇床子素是从伞形科植物蛇床子 *Cnidium monnieri* (L.) Cusson 中提取分离得到的主要活性成分。国内外多项研究证实,蛇床子素对多种因素诱发的心肌损伤具有确切的保护作用^[1-3],同时兼具脏器损伤修复、增强机体免疫力、缓解药物毒性等多重药理活性^[4],在保护抗肿瘤药物所致心肌损伤、降低化疗不良反应方面具备良好的应用前景。阿霉素作为临床常用广谱抗肿瘤药物,广泛用于乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤治疗,其用药后引发的不可逆性心肌损伤是临床公认的治疗短板^[5-7],而蛇床子素可有效拮抗该类心脏毒性,是极具开发价值的心肌保护候选药物。结合中医药多靶点、多通路的调控特点优势^[8-9],开展蛇床子素制剂优化研究,对推进其临床应用具有重要意义。但蛇床子素溶解度仅 $(5.74 \pm 0.05) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[10],极大影响了溶出率及溶出度,该成分肝脏首关效应达 78%^[11],大幅降低药物体内吸收度与生物利用度,严重制约其心肌保护及减毒药理活性的充分发挥。为解决上述问题,陆续研发出固体分散体、磷脂复合物、纳米混悬剂、白蛋白纳米粒^[12-13]等多种递药系统,但相对生物利用度的提升效果有限,仍存在明显优化空间,亟需开发更为高效的新型递药系统。

纳米胶束是由两亲性高分子材料在水相中自发形成核-壳结构的纳米载体,其疏水性嵌段可构成胶束内核,为药物提供载药空间;亲水性嵌段形成胶束外壳,可有效屏蔽胃肠道 pH 变化、消化酶等

外界因素对药物的破坏。纳米胶束能够显著提升药物的溶解度与溶出速率,促进药物体内吸收、降低给药剂量、增强药理活性^[14-15],是目前极具研究价值的新型口服递药载体。

口服药物除了受胃肠道消化酶、pH 值等因素影响外,还受到胃肠道黏液屏障的制约。黏液屏障主要由高度糖基化的黏蛋白构成,可将药物识别为异物并快速清除,影响了药物经胃肠道黏膜渗透吸收,是限制口服生物利用度提高的瓶颈。二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG2000-SH) 是一种两亲性聚合物^[16],结构上巯基可与黏液层中半胱氨酸残基形成牢固的二硫共价键,进而增加载体的黏液黏附能力,延长药物在胃肠道的滞留时间^[17]、降低药物排泄损耗,从而有助于进一步增加药物体内吸收效率。基于此,本研究以 DSPE-PEG2000-SH 为载体,将蛇床子素制备成疏基化纳米胶束 (Ost-SH-NMs),并采用单因素结合 Box-Behnken 设计-响应面法 (BBD-RSM) 对制剂处方工艺进行优化。以游离蛇床子素为对照,考察 Ost-SH-NMs 的体内药动学行为及阿霉素致心肌损伤大鼠的保护作用,旨在为蛇床子素新型递药系统的开发与临床转化提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1200 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); XU-10U-60C 型磁力搅拌器 (上海龙跃仪器有限公

司); DS-5510DTH 型超声仪(上海生析超声仪器有限公司); FA805N 型电子天平(上海菁海仪器有限公司); Hei-VAP 型旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); ZS-90 型粒度分析仪(英国马尔文公司); FRESCO21 型高速离心机(赛默飞世尔科技公司); RT61212 型溶出仪(深圳市锐拓仪器设备有限公司); UGC-12MF 型氮吹仪(北京优晟联合科技有限公司); JEM-2100 透射电子显微镜(TEM, 日本电子株式会社); FD-1D-80 型真空冷冻干燥机(江苏天翎仪器有限公司); D/max2500/PC 型 X-射线粉末衍射仪(XRPD, 日本理学公司); DY89-II 型组织匀浆机(青岛聚创环保集团有限公司); FDC6000A 型超声诊断仪(济南泰医生物技术有限公司); Axio Scope A1 型正置光学显微镜(德国 Carl Zeiss 公司); Infinite F50 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.2 材料

蛇床子素对照品(批号 PRF21020321, 质量分数 98.6%, 成都普瑞法科技开发有限公司); 丹皮酚(批号 C13763542, 质量分数 99.2%, 上海麦克林生化科技有限公司); 蛇床子素原料药(批号 202440601, 质量分数 97.6%, 山西玉宁生物科技有限公司); 疏基修饰二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG2000-SH, 批号 20230525, 广州碳水科技有限公司); 磷酸二氢钾(批号 20201015, 国药集团化学试剂有限公司); 十二烷基苯磺酸钠(SDS, 批号 20230710, 天津大茂试剂有限公司); 磷酸(批号 C12747030, 上海麦克林生化科技有限公司); 乳糖(批号 23030301, 湖南华日制药有限公司); 阿霉素(批号 R034347, 质量分数 97.8%, 上海易恩化学技术有限公司); 卡托普利片(批号 23080111, 常州制药厂有限公司); 肌酸激酶同工酶(CK-MB, 批号 E006-1-1)、乳酸脱氢酶(LDH, 货号 A020-1-2)、肌酸激酶(CK, 货号 A032-1-1)、丙二醛(MDA, 货号 A003-1-2)、超氧化物歧化酶(SOD, 货号 A001-3-2)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司; Masson 三色染色试剂盒(货号 G1340)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(货号 G1120)购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠, 体质量 180~200 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, 雌雄兼具。在实验室适应 1 周后

使用, 本实验遵循郑州健康学院实验动物管理规定, 动物伦理批准号 2023-SQLL-EC-20230915-1007-0000076。

2 方法与结果

2.1 Ost-SH-NMs 的制备

取 30 mg 蛇床子素溶于 10 mL 乙醇; 另取 DSPE-PEG2000-SH 溶于 10 mL 三氯甲烷, 合并 2 种有机相至茄形瓶中, 置于 35 °C 水浴中磁力搅拌 30 min。随后将茄形瓶固定在旋转蒸发仪上, 在 45 °C 水浴减压旋蒸以除去乙醇和三氯甲烷, 即得均匀透明薄膜。保持茄形瓶于 45 °C 水浴中, 加入适量纯化水进行水合; 设置超声功率 250 W, 超声一定时间, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得 Ost-SH-NMs。

2.2 蛇床子素含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用 Symmetry-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为甲醇-水(40:60)等度洗脱; 检测波长 320 nm; 进样体积 20 μL; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL·min⁻¹。

2.2.2 Ost-SH-NMs 供试品溶液的制备 精密量取 Ost-SH-NMs 混悬液 2 mL 至 50 mL 量瓶中, 加入 20 mL 乙醇-氯仿混合溶剂(1:1), 超声 5 min 破坏 Ost-SH-NMs 结构, 放冷后使用甲醇-水混合溶剂(40:60)稀释定容; 精密量取上述溶液 1 mL 至 10 mL 量瓶, 加甲醇-水混合溶剂(40:60)稀释定容, 即得。

2.2.3 线性关系考察 精密称取蛇床子素对照品适量, 使用甲醇配制成质量浓度为 0.2 mg·mL⁻¹ 的母液, 采用甲醇-水混合溶剂(40:60)稀释成质量浓度分别为 10.00、5.00、2.00、1.00、0.50、0.05 μg·mL⁻¹ 的蛇床子素对照品溶液, 按“2.2.1”项下方法分析, 以质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 拟合线性方程 $Y=18.1145X+0.6847$, $r=0.9999$, 线性范围 0.05~10.00 μg·mL⁻¹。

2.2.4 专属性考察 取 DSPE-PEG2000-SH, 除不加蛇床子素外按照“2.1”项下方法制备空白样品, 按“2.2.2”项下方法制备成空白样品溶液。取空白样品溶液, Ost-SH-NMs 供试品溶液和质量浓度为 2.00 μg·mL⁻¹ 的蛇床子素对照品溶液按“2.2.1”项下方法进样测定。结果见图 1, DSPE-PEG2000-SH 未干扰蛇床子素色谱峰, 专属性较高。

2.2.5 精密度考察 取质量浓度分别为 10.00、2.00、0.05 μg·mL⁻¹ 的蛇床子素对照品溶液, 按

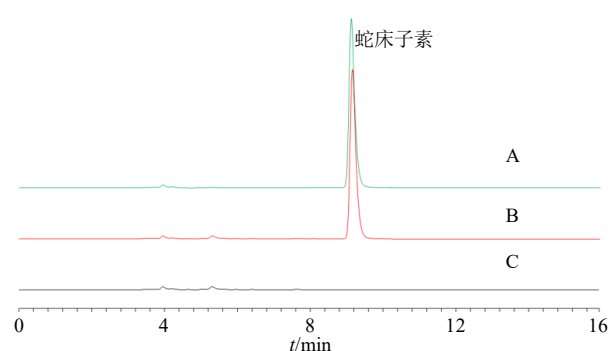


图 1 蛇床子素对照品 (A)、Ost-SH-NMs 供试品 (B) 和空白样品 (C) 溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of osthole reference substance (A), Ost-SH-NMs sample (B), and blank sample (C)

“2.2.1”项下方法分别测定 6 次, 蛇床子素峰面积的 RSD 依次为 0.40%、0.56%、0.47% ($n=6$), 表明方法精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 Ost-SH-NMs 供试品溶液于制备 0、2、4、8、12、24 h, 按“2.2.1”项下方法进样测定, 蛇床子素含量的 RSD 为 1.02% ($n=6$), 表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 平行制备 6 份 Ost-SH-NMs 供试品溶液, 按“2.2.1”项下方法进样, 测得蛇床子素含量 RSD 为 1.80% ($n=6$), 表明该法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 取 9 份 Ost-SH-NMs 混悬液 1.0 mL, 分别置于 9 个 50 mL 量瓶中, 分成低、中、高 3 组, 每组 3 份。根据蛇床子素质量浓度分别加入 50%、100%、150%对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液后, 测定蛇床子素总含量。结果表明低、中、高质量浓度平均加样回收率分别为 98.44%、100.16%、101.04% ($n=3$), 表明方法准确度较高。

2.3 包封率、载药量及沉降率的测定

取适量 Ost-SH-NMs 混悬液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 精密吸取 1 mL 滤液, 置于截留相对分子

质量 3 000 超滤管中, 以 6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集外管滤液中游离蛇床子素的含量 ($M_{\text{游离}}$)。根据投药量 ($M_{\text{投药量}}$) 测定包封率。根据蛇床子素和 DSPE-PEG2000-SH 总量 (M), 计算载药量。取新制备的 Ost-SH-NMs 混悬液, 测定其中蛇床子素初始含量 (M_0), 于 8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 1 周, 使用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 除去析出的蛇床子素, 取续滤液测定蛇床子素的含量 (M_7), 计算 Ost-SH-NMs 沉降率^[16]。

$$\text{包封率} = (M_{\text{投药量}} - M_{\text{游离}}) / M_{\text{投药量}}$$

$$\text{载药量} = (M_{\text{投药量}} - M_{\text{游离}}) / M$$

$$\text{沉降率} = (M_0 - M_7) / M_0$$

2.4 粒径、多分散指数 (PDI) 及 Zeta 电位测定

取 Ost-SH-NMs 混悬液 1.0 mL 加入 5 mL 纯化水中, 摇匀后取适量置于比色皿, 排净气泡后在激光粒度仪上测定粒径和 PDI 值。取 Ost-SH-NMs 混悬液置于专用样品池中, 排净气泡后在激光粒仪上测定 Zeta 电位。

2.5 单因素考察 Ost-SH-NMs 处方工艺

2.5.1 DSPE-PEG2000-SH 与蛇床子素用量比考察 固定水相体积 20 mL、水合时间 2 h、超声时间 15 min, 考察 DSPE-PEG2000-SH 与蛇床子素用量比对 Ost-SH-NMs 包封率、载药量和沉降率的影响, 结果见表 1。随 DSPE-PEG2000-SH 用量增加, 包封率升高、沉降率降低 (提示稳定性增加)^[16], 载药量则逐渐下降, 提示增加载体材料用量虽有利于提高包封率与稳定性, 但会牺牲载药量。当用量比为 10 : 1 时, 包封率 > 80%, 符合《中国药典》2025 年版四部对微粒制剂的规定; 此后继续增加 DSPE-PEG2000-SH 用量, 包封率增幅趋缓。为兼顾 3 项指标, 选择 8 : 1 ~ 12 : 1 进行优化。

2.5.2 水相体积考察 固定 DSPE-PEG2000-SH 与蛇床子素用量比 10 : 1、水合时间 2 h、超声时间 15 min, 考察水相体积对 Ost-SH-NMs 包封率、

表 1 DSPE-PEG2000-SH 与蛇床子素用量比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of DSPE-PEG2000-SH to osthole amounts ratio ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

DSPE-PEG2000-SH 与蛇床子素用量比	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
6 : 1	61.13 $\pm$ 0.94	8.72 $\pm$ 0.04	22.58 $\pm$ 1.52
8 : 1	71.78 $\pm$ 0.83	7.75 $\pm$ 0.12	14.92 $\pm$ 0.94
10 : 1	83.54 $\pm$ 0.64	7.51 $\pm$ 0.06	5.61 $\pm$ 0.18
12 : 1	84.35 $\pm$ 1.40	6.55 $\pm$ 0.06	4.23 $\pm$ 0.09
14 : 1	85.66 $\pm$ 1.29	5.69 $\pm$ 0.08	3.64 $\pm$ 0.20

载药量和沉降率的影响, 结果见表 2。DSPE-PEG2000-SH 材料充分水化需要一定的水相体积, 体积过小致水化不充分^[14], 导致载药能力不足, 包封率和载药量较低; 体积过大则使 DSPE-PEG2000-SH 浓度降低, 可能影响 Ost-SH-NMs 结构稳定性, 导致蛇床子素易游离进入水相。水相体积对沉降率影响不大, 均在 5% 左右。当水相体积为 20 mL 时包封率和载药量均较高, 为兼顾 3 项指标, 选择 15~25 mL 进行优化。

表 2 水相体积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 2 Effects of hydration volume ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

水相体积/mL	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
10	70.02±0.94	6.38±0.08	5.21±0.61
15	74.44±0.33	6.74±0.09	5.23±0.43
20	82.75±0.86	7.45±0.04	5.19±0.61
25	76.27±0.62	6.90±0.03	4.82±0.56
30	72.32±0.15	6.50±0.07	5.25±0.34

2.5.3 水合时间考察 固定 DSPE-PEG2000-SH 与蛇床子素用量比 10:1、水相体积 20 mL、超声时间为 15 min, 考察水合时间对 Ost-SH-NMs 包封率、载药量和沉降率的影响, 结果见表 3。DSPE-PEG2000-SH 材料充分水化、舒展需要一定时间^[15], 因此水合时间过短时包封率和载药量较低。DSPE-PEG2000-SH 载体材料稳定性不高, 水合时间过长时可能影响 DSPE-PEG2000-SH 理化性质, 进而影响包封率和载药量, 同时沉降率上升。当水合时间为 2 h 时, 包封率和载药量相对较大, 同时沉降率相对较低, 后续选择 1.5~2.5 h 进行优化。

表 3 水合时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 3 Effects of hydration time ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

水合时间/h	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
1.0	71.85±0.81	6.45±0.08	6.68±0.77
1.5	75.01±0.85	6.86±0.05	5.01±0.22
2.0	84.04±0.93	7.40±0.08	4.72±0.41
2.5	76.20±0.76	6.88±0.03	9.11±0.78
3.0	72.67±1.32	6.50±0.07	13.62±1.09

2.5.4 超声时间考察 固定 DSPE-PEG2000-SH 与蛇床子素用量比 10:1、水相体积 20 mL、水合时间 2.0 h, 考察超声时间对 Ost-SH-NMs 包封率、载药量和沉降率的影响, 结果见表 4。超声时间 9~18 min 时, Ost-SH-NMs 包封率均>80%, 载药量均>7.0%; 超声时间达 21 min 时, 包封率和载药量均明显下降, 沉降率>10%。超声时间为 12 min 时, 包封率

表 4 超声时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 4 Effects of ultrasonic time ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
9	85.81±0.61	7.63±0.07	4.21±0.81
12	87.04±0.91	7.79±0.06	4.98±0.71
15	83.69±0.90	7.50±0.05	5.75±0.82
18	82.20±1.04	7.29±0.08	8.65±0.49
21	76.02±0.81	6.99±0.08	12.52±0.93

和载药量相对较高, 沉降率低于 5%, 且耗时相对较短, 故确定制备 Ost-SH-NMs 的超声时间为 12 min。

2.6 BBD-RSM 优化处方工艺

2.6.1 试验设计及结果 参考单因素实验结果 DSPE-PEG2000-SH 与蛇床子素用量比 (X_1)、水相体积 (X_2) 和水合时间 (X_3) 作为 Ost-SH-NMs 主要影响因素, 为在较少实验次数下建立可靠、实用的数学模型, 故将每个因素设置 3 个水平。包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2) 和沉降率 (Y_3) 分别作为因变量, 期望 Ost-SH-NMs 包封率和载药量较大, 同时沉降率较小, 故采用 Hassan 法将 3 个因变量分别转变为归一值 (即 $d_{\text{包封率}}$ 、 $d_{\text{载药量}}$ 、 $d_{\text{沉降率}}$), 并以 3 个因变量的总评归一值 (OD), 为评价指标。BBD-RSM 实验设计及结果见表 5。

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

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

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

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

M_i 、 $M_{\max}$ 和 $M_{\min}$ 分别为包封率、载药量和沉降率实测值、最大值和最小值

2.6.2 模型拟合及方差分析 使用 Design Expert V11.0.1 软件建立自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 和因变量 OD 之间的数学关系模型, 拟合方程 $OD = 0.91 + 0.069 X_1 - 0.053 X_2 - 0.093 X_3 + 0.079 X_1 X_2 - 0.046 X_1 X_3 - 0.081 X_2 X_3 - 0.43 X_1^2 - 0.25 X_2^2 - 0.34 X_3^2$, 其中 $R^2 = 0.988 6$, $R_{\text{adj}}^2 = 0.983 8$, 说明该模型可根据实验数据拟合出较为准确的预测值, 参考价值较高。方差分析见表 6, 模型 P 值<0.000 1、失拟项 $P>0.05$, 说明数学模型可用于 Ost-SH-NMs 处方工艺优化。数学模型中 X_1 、 X_2 、 $X_1 X_2$ 、 $X_2 X_3$ 具有显著性意义 ($P<0.05$), 而 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 有极显著性差异 ($P<0.01$)。

2.6.3 响应面及 Ost-SH-NMs 最佳处方工艺确定 使用 Design Expert V11.0.1 软件绘制响应面图, 结果见图 2, 随着 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 增加, OD 值均呈

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/mL	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	OD 值	序号	X_1	X_2/mL	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	OD 值
1	10 : 1 (0)	20 (0)	2.0 (0)	86.14	7.74	4.48	0.892	10	10 : 1	20	2.0	86.66	7.59	4.42	0.878
2	8 : 1 (-1)	20	2.5 (1)	70.69	7.77	13.67	0	11	12 : 1	25	2.0	79.37	6.12	4.37	0.341
3	12 : 1 (1)	15 (-1)	2.0	75.55	6.15	4.15	0.304	12	10 : 1	25	1.5	74.85	6.73	6.88	0.408
4	10 : 1	20	2.0	87.83	7.90	4.52	0.948	13	10 : 1	15	2.5	75.19	6.76	8.19	0.394
5	8 : 1	25 (1)	2.0	70.07	7.63	11.94	0	14	8 : 1	20	1.5	73.04	8.14	13.37	0.174
6	10 : 1	20	2.0	85.96	7.72	4.63	0.881	15	12 : 1	20	2.5	78.44	5.95	6.59	0
7	10 : 1	20	2.0	87.91	7.87	4.65	0.940	16	10 : 1	15	1.5	73.48	6.57	6.94	0.337
8	12 : 1	20	1.5 (-1)	79.68	6.14	4.22	0.359	17	8 : 1	15	2.0	72.69	7.89	12.08	0.279
9	10 : 1	25	2.5	73.74	6.38	13.03	0.140								

表 6 方差分析结果
Table 6 Results of variance analysis

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.89	9	0.21	67.20	<0.000 1	X_1^2	0.78	1	0.78	250.91	<0.000 1
X_1	0.04	1	0.04	12.14	0.010 2	X_2^2	0.25	1	0.25	81.01	<0.000 1
X_2	0.02	1	0.02	7.23	0.031 1	X_3^2	0.50	1	0.50	158.33	<0.000 1
X_3	0.07	1	0.07	22.18	0.002 2	残差	0.02	7	3.13×10^{-3}		
X_1X_2	0.03	1	0.03	7.98	0.025 6	失拟项	0.02	3	5.79×10^{-3}	5.14	0.073 8
X_1X_3	8.60×10^{-3}	1	8.60×10^{-3}	2.75	0.141 1	纯误差	4.51×10^{-3}	4	1.13×10^{-3}		
X_2X_3	0.03	1	0.03	8.48	0.022 6	总和	1.91	16			

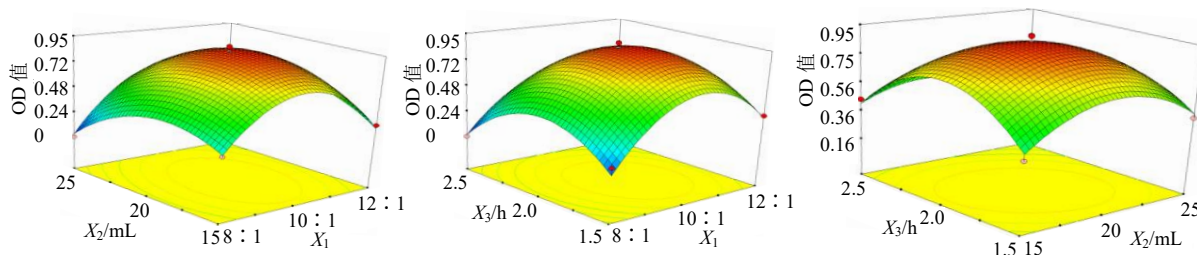


图 2 各因素对 OD 值的响应面图
Fig. 2 Response surface images of each factor on OD value

先升高后降低的趋势。选择 OD 值最大值作为优化目标，得到 Ost-SH-NMs 最佳处方工艺为 DSPE-PEG2000-SH 与蛇床子素用量比为 10.3 : 1.0，水相体积 19.5 mL，水合时间 1.9 h，在此条件下预测 OD 最大值为 0.958。

2.6.4 工艺验证 平行制备 3 批 Ost-SH-NMs，测定结果见表 7，实际 OD 值均值为 0.944 与预测 OD 值相对偏差仅为-1.46%，因此建立的数学模型可靠性较高。Ost-SH-NMs 平均包封率、载药量、沉降率、粒径、PDI 值和 Zeta 电位分别为 (87.60±0.92) %、(7.83±0.07) %、(4.17±0.22) %、(66.95±3.87) nm、(0.085±0.007) 和 (-22.07±0.82) mV。

表 7 验证试验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 7 Results of verification test ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

批次	包封率/%	载药量/%	沉降率/%	OD 值
第 1 批	87.40±0.57	7.83±0.06	4.17±0.25	0.941
第 2 批	87.08±0.98	7.84±0.05	4.23±0.25	0.934
第 3 批	88.32±0.91	7.82±0.12	4.10±0.22	0.958

Ost-SH-NMs 粒径和 Zeta 电位见图 3。

2.7 TEM 观察 Ost-SH-NMs 外貌

取 Ost-SH-NMs 混悬液 100 μL 滴至 5 mL 纯化水，将碳膜铜网浸没 3 min 后取出，晾干后用 1.5% 磷钨酸钠 (pH 6.5) 染色，晾干后置于 TEM 观察 Ost-SH-NMs 微观外貌，结果见图 4。Ost-SH-NMs

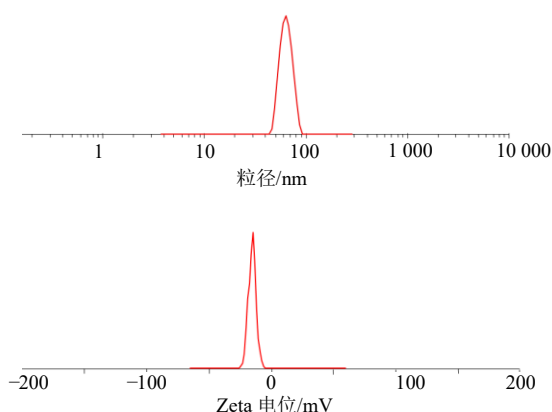


图 3 Ost-SH-NMs 粒径分布和 Zeta 电位

Fig. 3 Particle size distribution and Zeta potential diagram of Ost-SH-NMs

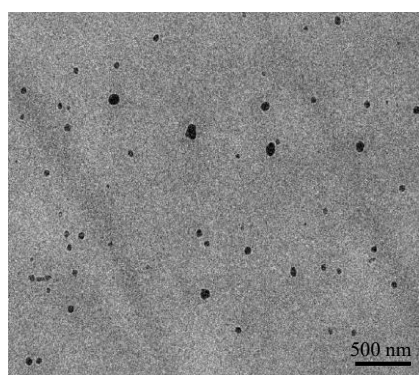


图 4 Ost-SH-NMs 混悬液 TEM 图 (×13 000)

Fig. 4 TEM diagram of Ost-SH-NMs suspension (×13 000)

分散性良好, 形貌近似球形。由于制备 TEM 样品时需经历 2 次干燥失水过程, 故 TEM 观察到的粒径小于粒度仪测得的粒径。

2.8 Ost-SH-NMs 晶型研究

按 DSPE-PEG2000-SH 与蛇床子素用量比 10.3 : 1.0 制备物理混合物, 仅作简单混合。另取 Ost-SH-NMs 混悬液, 不加乳糖直接冻干。采用 XRPD 法分别对蛇床子素、DSPE-PEG2000-SH、物理混合物和 Ost-SH-NMs 冻干粉进行晶型表征, 扫描角度(2θ)范围为 $3^\circ \sim 45^\circ$, 扫描速度为 $4^\circ \cdot \text{min}^{-1}$, 结果见图 5。蛇床子素在 $5^\circ \sim 35^\circ$ 出现众多特征衍射峰, DSPE-PEG2000-SH 仅在 19.6° 、 22.8° 出现 2 处衍射峰。物理混合物 XRPD 图谱仅为 2 者衍射峰的简单叠加, 各衍射峰位置均未改变, 表明蛇床子素晶型未发生变化。Ost-SH-NMs 粉末的 XRPD 图谱中仅见 DSPE-PEG2000-SH 的衍射峰, 蛇床子素衍射峰消失, 提示其可能转变为无定形状态。

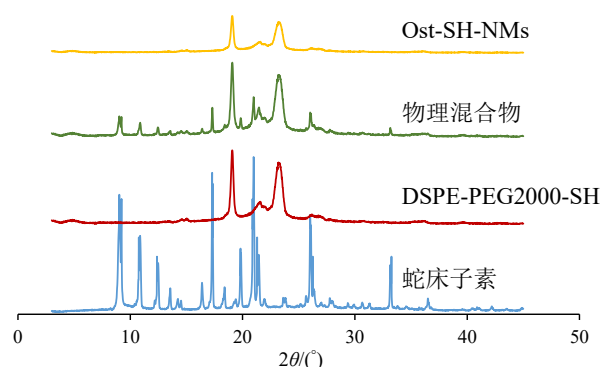


图 5 各样品 XRPD 结果

Fig. 5 XRPD results of each sample

2.9 Ost-SH-NMs 冻干粉制备、溶解度及体外释药测定

2.9.1 Ost-SH-NMs 冻干粉制备 于 Ost-SH-NMs 混悬液中加入 4%乳糖, 溶解后置于 -40°C 超低温冰箱预冻 3 d, 随即转入 -25°C 冻干机冻干, 2 d 后即得 Ost-SH-NMs 冻干粉。Ost-SH-NMs 混悬液与冻干粉复溶后外观见图 6。冻干粉复溶后平均包封率、沉降率、粒径、PDI 值及 Zeta 电位分别为 $(85.91 \pm 1.04)\%$ 、 $(4.23 \pm 0.17)\%$ 、 $(72.06 \pm 5.02) \text{ nm}$ 、 0.089 ± 0.007 、 $(-22.15 \pm 0.77) \text{ mV}$ 。与冻干前混悬液相比, 冻干粉各质量指标均无显著性差异。

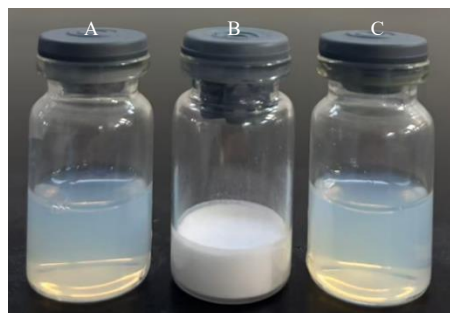


图 6 Ost-SH-NMs (A)、冻干粉 (B) 和纯化水复溶样品 (C) 外观

Fig. 6 Appearance of Ost-SH-NMs (A), lyophilized powder (B) and reconstitute sample by distilled water (C)

2.9.2 溶解度的测定 取过量蛇床子素分别置于 10 mL pH 2.0、4.0、5.5、6.8、7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 于 25°C 水浴中以 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 磁力搅拌 48 h, 再以 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 使未溶解的蛇床子素充分沉降, 取上清液测定其饱和溶解度。同法测定 Ost-SH-NMs 在 pH 2.0~7.4 PBS 中的溶解度,

结果见图 7。蛇床子素在各 pH PBS 中的溶解度为 $5.8 \sim 6.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，Ost-SH-NMs 则提高至 $95.4 \sim 102.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，表明 Ost-SH-NMs 可显著增加蛇床子素的溶解度。

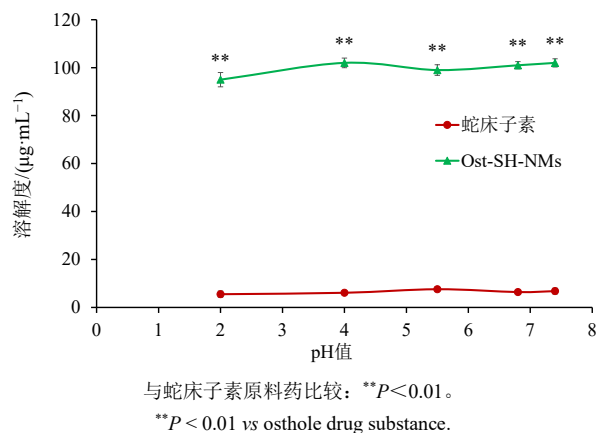


图 7 各样品溶解度测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Solubility determined results of each sample ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.9.3 体外释药情况比较 取蛇床子素原料药和 Ost-SH-NMs 冻干粉适量，置于截留相对分子质量为 2 500 的透析袋中，使蛇床子素含量均为 10 mg，加入 4 mL pH 2.0 PBS (含 0.5% SDS)，扎紧透析袋两端并固定于搅拌桨上。溶出杯中加入 1.0 L pH 2.0 PBS (含 0.5% SDS)，搅拌桨转速 $75 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，介质温度 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ，于 0.50、0.75、1.00、1.50、2.00 h 取样 5 mL，并补加等量空白释药介质。随后将释药介质更换为 1.0 L pH 6.8 PBS (含 0.5% SDS)，分别于 3、4、6、8、12 h 同法取样并补液。各样品

以 $10\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min，采用 HPLC 测定含量，结果见图 8。12 h 时，蛇床子素原料药与 Ost-SH-NMs 的累积释放率分别为 23.64%、87.19%，表明 Ost-SH-NMs 可促进蛇床子素的释放。

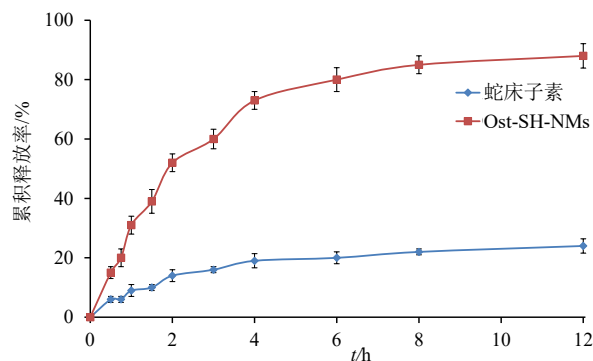


图 8 蛇床子素和 Ost-SH-NMs 体外释放曲线
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Release profiles *in vitro* of osthole and Ost-SH-NMs
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.10 Ost-SH-NMs 冻干粉储存稳定性

取新制备的 Ost-SH-NMs 冻干粉 (密封在西林瓶中)，使用纯化水复溶后测定包封率、沉降率、粒径、PDI 值和 Zeta 电位。将 Ost-SH-NMs 冻干粉置于 35°C 、70% 恒温恒湿箱中，分别于 1、2、3、6 月取样同法测定各质量指标。结果见表 8，与第 0 月相比，第 6 个月包封率有所下降，沉降率有所上升，粒径有所增长，PDI 值基本未变，Zeta 电位绝对值有所下降，但均无显著性差异 ($P > 0.05$)，表明 Ost-SH-NMs 冻干粉稳定性良好。

表 8 稳定性研究结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

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

时间/月	包封率/%	沉降率/%	粒径/nm	PDI 值	Zeta 电位/mV
0	85.72 ± 1.07	4.15 ± 0.10	72.38 ± 4.46	0.083 ± 0.007	-22.90 ± 0.68
1	85.80 ± 0.94	4.13 ± 0.13	73.18 ± 5.09	0.091 ± 0.009	-23.09 ± 0.90
2	85.13 ± 1.16	4.07 ± 0.16	72.90 ± 5.98	0.084 ± 0.007	-22.92 ± 1.01
3	84.86 ± 0.89	4.24 ± 0.09	74.56 ± 4.71	0.079 ± 0.008	-23.04 ± 0.95
6	83.95 ± 0.92	4.36 ± 0.15	74.73 ± 6.02	0.083 ± 0.008	-22.75 ± 1.13

2.11 药动学研究

2.11.1 实验方案 分别取蛇床子素和 Ost-SH-NMs 适量，各分散于 4 mL CMC-Na 水溶液 (质量分数 0.5%) 中，即得混悬液，于 ig 前 10 min 配制。取 12 只 SD 大鼠，随机分为蛇床子素组和 Ost-SH-NMs 组，每组雌雄各半，按 $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以蛇

床子素计) ig 给药。结合前期预试验结果，分别于给药后 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、3.00、6.00、8.00、10.00、12.00 h 经眼眶后静脉丛取血 0.25 mL，抗凝处理后以 $3\,500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min，取血浆冷冻保存。

2.11.2 内标溶液配制及血样的处理 使用甲醇配制质量浓度为 $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丹皮酚对照品溶液，作

为内标溶液。精密取血浆样品和丹皮酚对照品溶液 ($500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 各 $100\text{ }\mu\text{L}$ 至离心管中, 加入 2 mL 乙腈, 密封, 涡旋 5 min 。 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 使蛋白等杂质完全沉淀。取上清液, 氮气吹干, 残渣中加入甲醇 $100\text{ }\mu\text{L}$, 密封, 超声 5 min , 涡旋 1 min , $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 取上清液进样测定。

2.11.3 血浆对照品溶液的配制及标准曲线 以空白血浆配制蛇床子素质量浓度分别为 $1\,200$ 、 600 、 300 、 150 、 100 、 $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆对照品, 各精密量取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 置于离心管中, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 丹皮酚对照品溶液 ($500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 按“2.11.2”项下方法处理后进样测定。以蛇床子素与丹皮酚峰面积比 (Y) 为纵坐标、蛇床子素浓度 (X) 为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.002\,4X-0.040\,3$, $r=0.997\,8$, 线性范围 $20\sim1\,200\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.11.4 专属性考察 取空白血浆溶液、蛇床子素质量浓度为 $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 血浆对照品溶液 (丹皮酚质量浓度为 $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 Ost-SH-NMs 12 h 血浆样品溶液 (丹皮酚质量浓度为 $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 按“2.2.1”项下色谱条件分析, 色谱图见图 9, 蛇床子素和丹皮酚色谱峰专属性均较高。

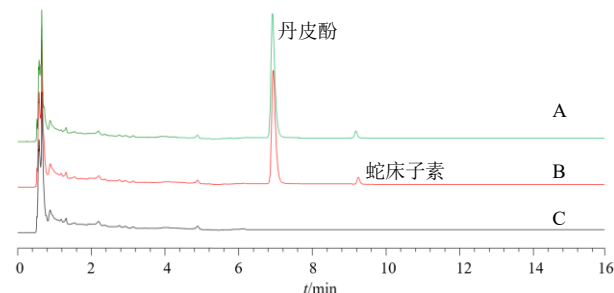


图 9 血浆样品 (A)、血浆对照品溶液 (B) 和空白血浆 (C) 的 HPLC 图

Fig. 9 HPLC spectrum of plasma sample (A), plasma reference substance (B) and blank plasma (C)

2.11.5 精密度考察 以空白血浆配制质量浓度分别为 $1\,200$ 、 300 、 $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质控样品溶液 (丹皮酚质量浓度为 $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 连续进样 6 次, 蛇床子素和丹皮酚峰面积比 RSD 分别为 3.13% 、 4.03% 、 4.16% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.11.6 重复性考察 取质量浓度为 $300\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质控样品 (丹皮酚质量浓度为 $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 制备 6 份质控样品溶液, 测得蛇床子素浓度 RSD 为 7.04% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.11.7 稳定性考察 取质量浓度为 $300\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质

控样品 (丹皮酚质量浓度为 $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 分别于 0 、 2 、 4 、 8 、 12 、 24 h 测定蛇床子素和丹皮酚峰面积, 计算蛇床子素质量浓度 RSD 为 5.46% ($n=6$), 表明血浆样品稳定性良好。

2.11.8 提取回收率和基质效应考察 取质量浓度分别为 $1\,200$ (高)、 300 (中)、 $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (低) 质控样品 (丹皮酚质量浓度均为 $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 按“2.11.2”项下方法制备质控样品溶液, 测定蛇床子素和丹皮酚峰面积 (A_1); 取空白血浆 $100\text{ }\mu\text{L}$, 按“2.11.2”项下方法处理得残渣, 加入蛇床子素和丹皮酚对照品适量, 使蛇床子素质量分别浓度为 $1\,200$ 、 300 、 $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 丹皮酚质量浓度均为 $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 测定蛇床子素和丹皮酚峰面积 (A_2), 计算高、中、低质量浓度质控样品中蛇床子素提取回收率 (A_1/A_2) 分别为 96.77% 、 95.19% 、 103.20% , 丹皮酚提取回收率为 102.16% 。取蛇床子素质量浓度为 $1\,200$ 、 300 、 $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 (均不含血浆, 丹皮酚质量浓度均为 $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 测定蛇床子素和丹皮酚峰面积 (A_3), 计算高、中、低质量浓度蛇床子素基质效应 (A_2/A_3) 分别为 101.04% 、 103.83% 、 96.69% , 丹皮酚基质效应为 101.45% 。可见该方法提取回收率高, 同时基质效应小。

2.11.9 药动力学结果 蛇床子素和 Ost-SH-NMs 药动力学曲线见图 10, 用 DAS 2.0 软件非房室模型对数据分析, 蛇床子素和 Ost-SH-NMs 主要药动力学参数结果见表 9。与蛇床子素原料药相比, Ost-SH-NMs 的达峰时间 ($t_{\max}$) 显著性延后 ($P<0.05$), 半衰期 ($t_{1/2}$) 极显著性延长 ($P<0.01$), 峰浓度 ($C_{\max}$)、药时曲线下面积 (AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$) 极显著性增加 ($P<0.01$),

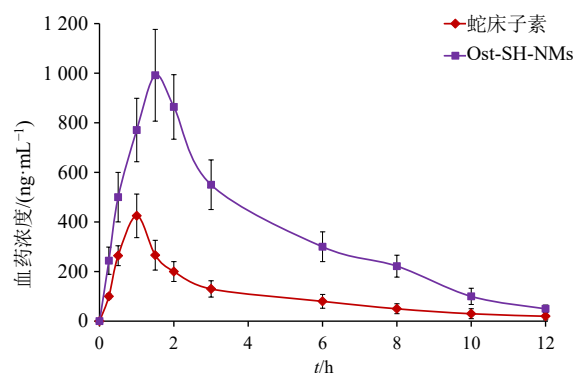


图 10 蛇床子素和 Ost-SH-NMs 血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 10 Profiles of plasma concentration-time of osthole and Ost-SH-NMs ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 9 蛇床子素和 Ost-SH-NMs 主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 9 Main pharmacokinetic parameters of osthole and Ost-SH-NMs ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

参数	单位	蛇床子素	Ost-SH-NMs
$t_{\max}$	h	0.96 ± 0.27	$1.63 \pm 0.39^*$
$t_{1/2}$	h	2.77 ± 0.53	$5.74 \pm 0.81^{**}$
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	425.73 ± 84.12	$992.46 \pm 283.70^{**}$
AUC_{0-t}	ng·mL ⁻¹ ·h	$1\,039.48 \pm 289.86$	$4\,824.35 \pm 960.63^{**}$
$AUC_{0-\infty}$	ng·mL ⁻¹ ·h	$1\,084.41 \pm 303.36$	$5\,008.15 \pm 1\,050.78^{**}$

与蛇床子素原料药比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs osthole drug substance.

相对口服吸收生物利用度提高至 4.64 倍。说明 Ost-SH-NMs 对蛇床子素口服药动学行为产生较大影响, 且增加了蛇床子素体内吸收

2.12 对阿霉素诱导心肌损伤大鼠的保护作用研究

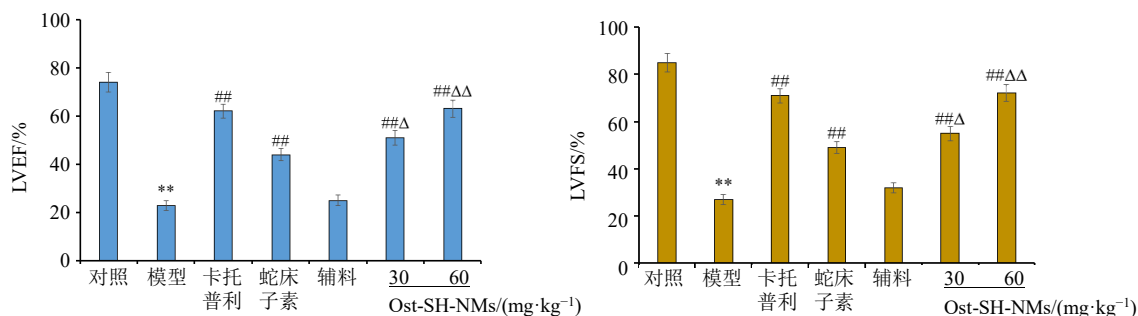
2.12.1 阿霉素诱导心肌损伤模型的建立 取 SD 大鼠, 按 $3\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 ip 阿霉素, 每 2 天 ip 1 次, 连续 ip 4 次。末次注射 24 h 后, 通过吸入乙醚对各组大鼠进行麻醉, 仰卧固定后使用超声诊断仪测定大鼠心脏的左心室短轴缩短率 (LVFS) 和左心室射血分数 (LVEF) [8]。选择反应迟钝、毛发紊乱、精神低迷等现象, 同时 $\text{LVFS} \leq 50\%$, $\text{LVEF} \leq 50\%$ 的大鼠作为心肌损伤模型[18-19]。

2.12.2 实验方案 实验设对照组、模型组、卡托普利(阳性药, $20\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组[20]、蛇床子素($60\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组[7]、辅料组(参考 Ost-SH-NMs 高剂量组中 DSPE-PEG2000-SH 用量, $618\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)及 Ost-SH-NMs 低、高剂量 (30 、 $60\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组。对照组和模型组给予等量 0.9% 氯化钠溶液, 其他各组大鼠连续给药 2 周, 每天 1 次。末次给药后禁食 12 h, 通过吸入乙醚对各组大鼠进行麻醉, 仰卧固定后使用超声诊断仪测定大鼠心功能参数 LVEF 和 LVFS。腹动脉采血 1.0 mL , $3\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 取血清测定

LDH、CK、CK-MB、SOD、MDA 水平。取出左心室心肌组织, 使用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明处理, 石蜡包埋后切片, 分别行 HE 和 Masson 染色, 于光学显微镜下观察心肌病理改变。

2.12.3 心功能参数的影响 各组动物 LVEF、LVFS 测定结果见图 11。与对照组相比, 模型组心功能参数 LVEF、LVFS 均极显著性下降 ($P < 0.01$), 证明阿霉素诱导心肌损伤模型成功建立。与模型组相比, 除了辅料组外, 各给药组 LVEF、LVFS 均极显著性升高 ($P < 0.01$), 说明各给药组均改善了心功能参数。与蛇床子素组相比, Ost-SH-NMs 低剂量组的 LVEF、LVFS 均显著性提高 ($P < 0.05$), 而 Ost-SH-NMs 高剂量组 LVEF、LVFS 均极显著性提高 ($P < 0.01$), 表现出剂量相关性。

2.12.4 血清中 LDH、CK、CK-MB、SOD 和 MDA 水平测定结果 结果见表 10。与对照组相比, 模型组 LDH、CK、CK-MB、MDA 极显著性升高 ($P < 0.01$), SOD 极显著性下降 ($P < 0.01$), 说明模型组大鼠心肌组织损伤严重, 处于氧化应激失衡状态[21-22]。与模型组相比, 除辅料组外, 各给药组 LDH、CK、CK-MB 和 MDA 均极显著性降低 ($P < 0.01$), SOD 极显



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$; 与蛇床子素组比较: Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group; Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$ vs osthole group.

图 11 各组大鼠 LVEF 和 LVFS 结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 11 Results of LVEF and LVFS of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

表 10 各组大鼠 LDH、CK、CK-MB、MDA、SOD 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 10 LDH, CK, CK-MB, MDA and SOD levels in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)
对照	—	202.03±20.12	504.35±48.17	548.73±42.71	2.05±0.26	201.60±16.54
模型	—	433.52±42.05**	757.58±85.03**	848.13±54.63**	8.13±0.55**	47.47±5.55**
卡托普利	20	253.77±21.07 ^{###}	564.38±53.10 ^{###}	594.45±80.40 ^{###}	3.53±0.39 ^{###}	183.13±13.37 ^{###}
蛇床子素	60	364.85±54.03 ^{###}	652.43±68.07 ^{###}	762.40±55.14 ^{###}	5.27±0.51 ^{###}	108.88±12.59 ^{###}
辅料	618	415.08±18.92 ^{ΔΔ}	720.85±76.38 ^{ΔΔ}	839.62±90.22 ^{ΔΔ}	7.88±0.28 ^{ΔΔ}	50.53±5.14 ^{ΔΔ}
Ost-SH-NMs	30	310.58±30.57 ^{###Δ}	635.07±58.93 ^{###}	705.63±44.57 ^{###}	5.13±0.48 ^{###}	114.07±8.89 ^{###}
	60	265.57±36.39 ^{###ΔΔ}	545.35±55.16 ^{###ΔΔ}	583.85±45.75 ^{###ΔΔ}	3.67±0.39 ^{###ΔΔ}	168.35±11.87 ^{###ΔΔ}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{###} $P<0.01$; 与蛇床子素组比较: ^Δ $P<0.05$ ^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

^{**} $P<0.01$ vs control group; ^{###} $P<0.01$ vs model group; ^Δ $P<0.05$ ^{ΔΔ} $P<0.01$ vs osthole group.

著性升高 ($P<0.01$), 提示各给药组的心肌损伤及心肌氧化应激状态得到缓解。与蛇床子素组相比, Ost-SH-NMs 低剂量组 CK、CK-MB、MDA、SOD 均无显著性差异 ($P>0.05$), 但 LDH 水平显著性下降 ($P<0.05$); Ost-SH-NMs 高剂量组 LDH、CK、CK-MB、MDA、SOD 均极显著性下降 ($P<0.01$), 表现出剂量相关性。

2.12.5 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果 结果见图 12。对照组的心肌细胞排列整齐, 形态规则。模型组

部分心肌细胞坏死, 部分心肌纤维结构破坏, 炎症细胞浸润现象明显。卡托普利组心肌细胞排列趋于规整, 炎症细胞浸润明显减轻。蛇床子素组炎症细胞浸润和心肌细胞坏死现象得到一定程度的缓解, 治疗效果较为有限。辅料组对心肌组织病理损伤保护效果甚微, 仍可见大量心肌细胞坏死及炎症细胞浸润现象。随着 Ost-SH-NMs 给药剂量增加, 心肌组织病理损伤保护效果随之增加, 表现出剂量相关性, 其中 Ost-SH-NMs 高剂量组与卡托普利组病理损伤情况较为接近。

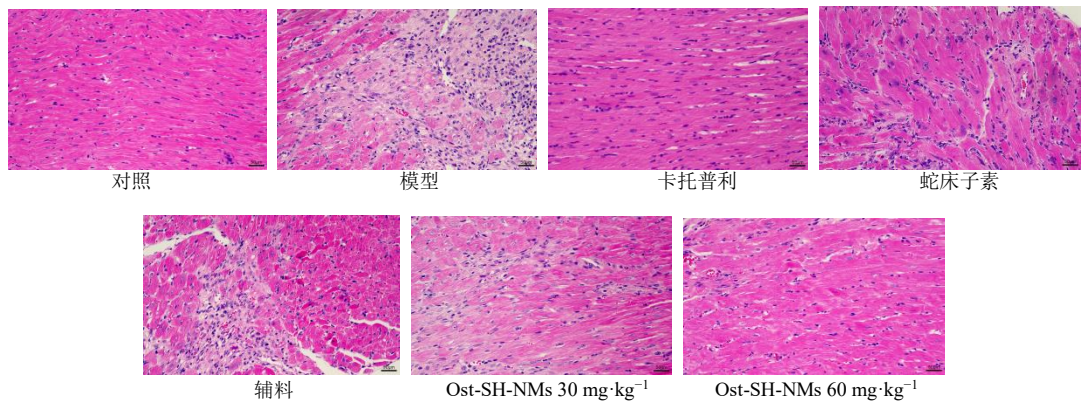


图 12 各组大鼠 HE 染色结果 ($\times 200$)

Fig. 12 HE staining results of rats in each group ($\times 200$)

2.12.6 各组大鼠心肌 Masson 染色结果 结果见图 13。对照组心肌细胞胞质呈均匀红色, 排列紧密有序。模型组胶原纤维显著增生, 纤维化程度明显高于对照组。卡托普利组心肌组织胶原纤维沉积现象改善明显。蛇床子素组仍见胶原纤维沉积现象, 治疗效果有限。辅料组对心肌组织心肌胶原纤维沉积现象改善效果甚微。随着 Ost-SH-NMs 给药剂量增加, 心肌胶原纤维沉积现象保护效果随之增加, 表现出剂量相关性, 且 Ost-SH-NMs 高剂量组与卡托普利组病理损伤改善情况较为接近。

2.13 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 满足正态分布及方差齐性两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (oneway ANOVA), 然后使用 Tukey's 进行事后检验, $P<0.05$ 判定组间存在显著差异。

3 讨论

纳米胶束制备方法主要有溶剂蒸发法、自组合法、薄膜分散法等^[23-24], 前期分别对 Ost-SH-NMs 制备方法进行了考察, 结果发现薄膜分散法包封率及

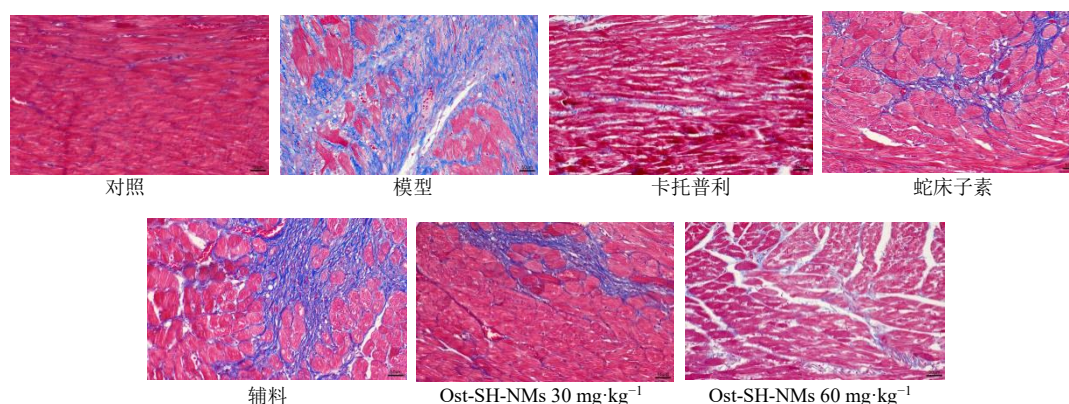


图 13 各组大鼠 Masson 染色结果 (×200)

Fig. 13 Masson staining results of each group of rats (×200)

载药量相对最高,这可能是因为蛇床子素与 DSPE-PEG2000-SH 均具有一定的亲脂性,2 者相容性良好,成膜后易发生分子链间纠缠、缔合等作用^[16],从而在水合过程中形成结构稳定的 Ost-SH-NMs。

蛇床子素在 Ost-SH-NMs 中由晶型状态转变为无定型状态,由于缺乏晶格束缚作用,利于提高其溶解度及释放率。根据 Ostwald-Freundlich 方程,药物粒度对自身溶解度有很大影响,Ost-SH-NMs 粒径仅 70 nm,极大增加了蛇床子素的比表面积,从而使药物溶解度得到明显提高,进而改变了其释放行为。Ost-SH-NMs 释药过程包含快速释药期(0~3 h)和缓慢释药期(3~12 h),快速释药期可能与其粒径小有关:小粒径可使蛇床子素与释药介质充分接触,加之蛇床子素在胶束内为无定形态,晶格束缚降低、自由能大,利于快速释药,故 3 h 内累积释放率 60%。3~12 h 释药速率明显下降,12 h 累积释放率为 87.19%,可能因胶束对蛇床子素包载作用以及蛇床子素与 DSPE-PEG2000-SH 之间的氢键等缔合作用,对药物释放产生明显阻滞^[16],从而表现出缓释特征。

Ost-SH-NMs 的 $t_{\max}$ 显著性延后,可能是 DSPE-PEG2000-SH 的巯基可与胃肠道黏液层富含半胱氨酸区域形成二硫键,增加了 Ost-SH-NMs 在黏液层的黏附力及滞留时间^[16-17]。相较于其他纳米给药系统,胶束结构稳定性较高^[25],因而 Ost-SH-NMs 可能以整体形式进入血液循环,不仅降低了胃肠道内消化酶、pH 值等对蛇床子素稳定性的影响,同时在 Ost-SH-NMs 表面的 PEG 长链(由 DSPE-PEG2000-SH 提供)的长循环作用下延长 $t_{1/2}$,最终改变蛇床子素的药动学行为。Ost-SH-NMs 相对口服吸收生

物利用度明显提高,可能涉及以下因素:其一,Ost-SH-NMs 改变了蛇床子素晶型、增加了溶解度及溶出度;其二,表面巯基利于增加其在胃肠道黏液层的黏附力^[26],减少药物直接排泄,促进胃肠道吸收;其三,粒径较小,可通过细胞旁路转运、派伊尔氏结 M 细胞等特殊途径实现高效吸收^[27],降低了首关效应对蛇床子素体内吸收的影响。在上述因素共同作用下,蛇床子素体内吸收增加。据文献报道,蛇床子素固体分散体、磷脂复合物、纳米混悬剂和白蛋白纳米粒分别将蛇床子素生物利用度提高至 1.65、1.38、2.59、3.29 倍^[11-12],均低于 Ost-SH-NMs 的 4.64 倍。

DSPE-PEG2000-SH 本身对大鼠心肌损伤未见保护作用,而由其构建的 Ost-SH-NMs 明显增加了蛇床子素对心肌损伤大鼠的保护作用:一方面,Ost-SH-NMs 表现出的缓释特点利于维持大鼠体内有效的血药浓度,增加治疗效果;另一方面 Ost-SH-NMs 有效促进了蛇床子素体内吸收,从而增强其心肌保护作用。本研究为评价 Ost-SH-NMs 成药性提供了必要的支持。

综上,本研究完成了 Ost-SH-NMs 处方工艺研究,促进了蛇床子素口服吸收,增强了蛇床子素对阿霉素诱导心肌损伤大鼠的保护作用,值得进一步研究。由于 Ost-SH-NMs 增加了蛇床子素体内吸收,后续需对 Ost-SH-NMs 急性毒性及长期毒性进行评价^[28-29]。另外 Ost-SH-NMs 作用机制、规模化生产、影响因素及长期稳定性等也是今后研究重点,可进一步丰富 Ost-SH-NMs 研究资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 袁雯, 杨昕宇, 杨华. 蛇床子素调控 circ_0084043/miR-338-3p 对高糖诱导的心肌细胞损伤的影响 [J]. 河北医药, 2022, 44(9): 1307-1311.
Yuan W, Yang X Y, Yang H. Effects of osthole on cardiomyocyte damage induced by high glucose and its regulatory effects on circ_0084043/miR-338-3p molecular axis [J]. Hebei Med J, 2022, 44(9): 1307-1311.
- [2] Hou H, Yang Y P, Chen R, et al. Osthole protects H9c2 cardiomyocytes against trastuzumab-induced damage by enhancing autophagy through the p38MAPK/mTOR signaling pathway [J]. Toxicol Vitro, 2023, 93: 105704.
- [3] 岳华. 蛇床子素对甲亢致心肌损伤的保护作用及机制研究 [D]. 泰安: 山东第一医科大学, 2019.
Yue H. Protective effect and mechanism of osthole on hyperthyroidism-induced myocardial injury [D]. Tai'an: Shandong First Medical University, 2019.
- [4] 龚慧, 赵信科, 蒋虎刚, 等. 蛇床子素药理作用及纳米递药系统研究进展 [J]. 药学研究, 2026, 45(2): 192-203.
Gong H, Zhao X K, Jiang H G, et al. Research progress on the pharmacological effects and nano drug delivery systems of osthole [J]. J Pharm Res, 2026, 45(2): 192-203.
- [5] 张涛, 南子涵, 刘丽霞, 等. 阿霉素与脓毒症所致心肌损伤的机制: 差异性与趋同性 [J]. 协和医学杂志, 2026, 17(1): 23-32.
Zhang T, Nan Z H, Liu L X, et al. Mechanism exploration of doxorubicin and sepsis induced myocardial injury: Differences and convergences [J]. Med J Peking Union Med Coll Hosp, 2026, 17(1): 23-32.
- [6] 井晶, 蒋友旭, 张卫国. 黄连碱通过抑制 Rho/ROCK 通路改善心力衰竭大鼠心律失常的心肌保护作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(12): 2965-2971.
Jing J, Jiang Y X, Zhang W G. Myocardial protective mechanism of coptisine in improving arrhythmia in rats with heart failure by inhibiting the Rho/ROCK pathway [J]. Drugs Clin, 2025, 40(12): 2965-2971.
- [7] Li W J, Li X, Huang C Y, et al. Huashi Baidu formula may attenuate adriamycin-induced myocardial injury via modulating NRF2-ATF3-SRXN1 axis-mediated ferroptosis [J]. Chin Herb Med, 2026, 18(3): 621-634.
- [8] 于漫亚, 崔兴. 炙甘草汤保护阿霉素诱导心肌损伤的作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(11): 2795-2805.
Yu M Y, Cui X. Protective effect and mechanism of Zhigancao Decoction on doxorubicin-induced myocardial injury [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2026, 30(11): 2795-2805.
- [9] 王意程, 黄欣桐, 符挺, 等. 中药调控 Cx43 减轻心肌缺血损伤作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(10): 2434-2442.
Wang Y C, Huang X T, Fu T, et al. Research progress of traditional Chinese medicine regulating CX43 to alleviate myocardial ischemia injury [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(10): 2434-2442.
- [10] 柳超, 董亚楠, 李佳蒂, 等. 透皮肽修饰蛇床子素脂质体凝胶的制备、表征及药效学评价 [J]. 中草药, 2026, 57(11): 4183-4195.
Liu C, Dong Y N, Li J D, et al. Preparation, characterization and pharmacodynamic evaluation of transdermal peptide-modified osthole liposomes [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2026, 57(11): 4183-4195.
- [11] 张磊. 从有效成分生物利用度角度探讨两个抗中药复方的有效性研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
Zhang L. The study on effectiveness of two Chinese herbal prescriptions based on bioavailability of active ingredient in it [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2014.
- [12] 王震芳, 张智强, 葛振华. 蛇床子素 3 种制剂的制备、表征及药动学比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3615-3621.
Wang Z F, Zhang Z Q, Ge Z H. Comparative study of preparation, characterization and pharmacokinetics of three preparations of osthole [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(15): 3615-3621.
- [13] 辛娟, 易华, 李明, 等. 蛇床子素白蛋白纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2022, 44(10): 3104-3110.
Xin J, Yi H, Li M, et al. Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of osthole albumin nanoparticles [J]. Chin Tradit Pat Med, 2022, 44(10): 3104-3110.
- [14] 李禄辉, 郭允, 余文洁, 等. 坎地沙坦-雷公藤红素共载还原敏感胶束的制备及制剂学评价 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(6): 1557-1567.
Li L H, Guo Y, Yu W J, et al. Formulation and assessment of pharmaceutical properties of candesartancetrol co-loading reduction sensitive micelles [J]. Drug Eval Res, 2025, 48(6): 1557-1567.
- [15] 王丽, 高小玲, 李思翰, 等. 高良姜素 pH 敏感胶束的构建及体外抗肿瘤活性研究 [J]. 化学与生物工程, 2026, 43(5): 57-64.
Wang L, Gao X L, Li S H, et al. Construction and *in vitro* anti-tumor activity of galangin pH-sensitive micelles [J]. Chem Bioeng, 2026, 43(5): 57-64.
- [16] 董亚楠, 任书强, 柳超, 等. 蒙花苷疏基化纳米胶束的制备、表征及其口服吸收生物利用度评价 [J]. 中草药,

- 2023, 54(23): 7776-7787.
- Dong Y N, Ren S Q, Liu C, et al. Buddleoside sulfhydryl-modified nanomicelles: Preparation, characterization and oral bioavailability evaluation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(23): 7776-7787.
- [17] 龙桑. 肠道黏附型双修饰糊精基胶束的构建及应用 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2025.
- Long S. Construction of intestinal adhesive dual-modified dextrin-based micelles and application [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2025.
- [18] 谢月敏, 韩爱子, 陈乾, 等. 人参皂苷 Rg₁ 调节 SIRT1/AMPK/PGC1 α 信号通路对阿霉素心肌损伤大鼠的影响 [J]. 河北医学, 2025, 31(8): 1263-1269.
- Xie Y M, Han A Z, Chen Q, et al. Effects of ginsenoside Rg₁ regulating SIRT1/AMPK/PGC1 α signaling pathway on adriamycin-induced myocardial injury in rats [J]. Hebei Med, 2025, 31(8): 1263-1269.
- [19] 郭慧琳, 韩雯, 王敏, 等. 原儿茶酸对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠及缺氧/复氧 H9c2 细胞的保护作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(10): 2776-2785.
- Guo H L, Han W, Wang M, et al. Study on protective effect and mechanism of protocatechuic acid on myocardial ischemia-reperfusion injury model rats and hypoxia/reoxygenation H9c2 cells [J]. Drug Eval Res, 2025, 48(10): 2776-2785.
- [20] 石立鹏, 杨若谷, 王洁, 等. 基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨桂枝五苓汤治疗心肌纤维化的机制 [J]. 中国药理学通报, 2026, 42(8): 1550-1557.
- Shi L P, Yang R G, Wang J, et al. Mechanism of Guizhi Wuling decoction against myocardial fibrosis based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation [J]. Chin Pharmacol Bull, 2026, 42(8): 1550-1557.
- [21] 谭宏强, 景临林, 张汝学. 当归提取物对低压低氧致小鼠心肌组织损伤的保护作用 [J]. 解放军药学报, 2023, 36(4): 287-294.
- Tan H Q, Jing L L, Zhang R X. Protective effect of *Angelica sinensis* extract against myocardial tissue damage caused by hypobaric hypoxia in mice [J]. Pharm J Chin People's Liberation Army, 2023, 36(4): 287-294.
- [22] 周露, 李冰艳, 顾霞飞, 等. nNOS 抑制剂亚胺基烯丁基-L-鸟氨酸对心肌缺血再灌注损伤的影响及机制 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(10): 2159-2164.
- Zhou L, Li B Y, Gu X F, et al. Effect of nNOS inhibitor N-5-(1-imino-3-butenyl)-L-ornithine on myocardial ischemia-reperfusion injury and its mechanism [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(10): 2159-2164.
- [23] 艾丹, 万莉莉, 张琦, 等. 紫杉醇/低分子肝素-胱胺-维生素 E 琥珀酸酯胶束的制备及其体外细胞毒性 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(12): 2984-2989.
- Ai D, Wan L L, Zhang Q, et al. Preparation and *in vitro* cytotoxicity of PTX/LMWH-cys-TOS micelles [J]. Drugs Clin, 2023, 38(12): 2984-2989.
- [24] 王酪, 张佩琛, 范高洁, 等. 玉米肽负载芹菜素纳米粒的制备、口服药动力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.
- [25] 李方, 崔晓鸽, 张梦飞, 等. 香菇多糖-胡桃醌纳米复合物制备及其理化性质评价 [J]. 化学研究与应用, 2026, 38(4): 969-979.
- Li F, Cui X G, Zhang M F, et al. Preparation and physicochemical property evaluation of lentinan-juglone nanocomposite [J]. Chem Res Appl, 2026, 38(4): 969-979.
- [26] 方桂花. 巯基化纳米结构脂质载体提高多西他赛口服吸收的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2016.
- Fang G H. Thiolated nanostructured lipid carriers for improving oral absorption of docetaxel [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2016.
- [27] 陈海珍. 共载水飞蓟宾与厚朴酚口服纳米粒的构建及体内外性质评价 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2022.
- Chen H Z. Development of oral nanoparticles co-loaded with silibinin and honokiol and *in vitro* and *in vivo* evaluation [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2022.
- [28] 李晓蒙, 高青, 王改利, 等. 香菇多糖-蒙花苷自组装纳米粒的制备、药动学和急性毒性评价 [J]. 中草药, 2026, 57(10): 3778-3791.
- Li X M, Gao Q, Wang G L, et al. Lentinan-buddleoside self-assembled nanoparticles: Preparation, pharmacokinetics and acute toxicity evaluation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2026, 57(10): 3778-3791.
- [29] 汪祺, 邵子轩, 文海若. 类器官在药物筛选及安全性评价中的应用进展 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(8): 2065-2074.
- Wang Q, Shao Z X, Wen H N. Advances of organoids applied in drug screening and safety evaluation [J]. Drug Eval Res, 2025, 48 (8): 2065-2074.

[责任编辑 孙英杰]