

• 药剂与工艺 •

三乌胶提取物水凝胶的制备及其对类风湿性关节炎治疗作用研究

肖素芸^{1,2}, 罗才琴^{1,2}, 吕冬^{1,2}, 王承潇^{1,2}, 崔秀明^{1,2,3*}

1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

2. 云南省三七资源可持续利用重点实验室, 云南 昆明 650500

3. 国家中药材产业技术体系昆明综合试验站, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 制备三乌胶提取物水凝胶并进行表征及考察其对类风湿性关节炎的治疗作用。方法 采用 Franz 池法考察三乌胶提取物中二苯乙烯苷、苯甲酰新乌头碱、8-去乙酰滇乌碱、去乙酰粗茎乌头碱甲、草乌甲素和大黄素的体外渗透效果, 制备出三乌胶提取物水凝胶并对其理化性质进行表征; 同时, 建立胶原诱导的类风湿性关节炎 (collagen-induced rheumatoid arthritis, CIA) 大鼠模型, 研究经皮递送模式下三乌胶提取物对类风湿性关节炎的治疗作用。结果 制备的三乌胶提取物水凝胶在常规情况下始终保持凝胶状态; 并且其三维交联网状结构可使药物更好的持续性地释放, 从而达到缓释效果。体内药理实验表明, 三乌胶提取物水凝胶显著降低 CIA 大鼠的足厚度、足体积、关节炎指数水平和血清中类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 和 B 细胞淋巴瘤因子-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 的水平及升高 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 水平; 与口服相比, 水凝胶能降低谷氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、肌酐和尿素氮水平和脏器病变程度。结论 采用经皮递送的局部给药模式, 三乌胶提取物在保留治疗作用的同时降低了由于口服给药引起的脏器毒性, 为今后三乌胶提取物外用制剂的研究提供了可能性。

关键词: 三乌胶提取物; 水凝胶; 经皮药物递送; 体外渗透; 类风湿性关节炎; 生物毒性; 二苯乙烯苷; 苯甲酰新乌头碱; 8-去乙酰滇乌碱; 去乙酰粗茎乌头碱甲; 草乌甲素; 大黄素; 类风湿因子; C 反应蛋白; B 细胞淋巴瘤因子-2; Bcl-2 相关 X 蛋白; 谷氨酸转氨酶; 丙氨酸转氨酶; 肌酐; 尿素氮

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)13-3929-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.006

Preparation of Sanwujiao extract-hydrogel and its therapeutic effect on rheumatoid arthritis

XIAO Su-yun^{1,2}, LUO Cai-qin^{1,2}, LYU Dong^{1,2}, WANG Cheng-xiao^{1,2}, CUI Xiu-ming^{1,2,3}

1. School of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

2. Key Laboratory of *Panax notoginseng* Resources Sustainable Development and Utilization, Kunming 650500, China

3. National Chinese Herbal Medicine Industry Technology System Kunming Comprehensive Test Station, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To prepare and characterize Sanwujiao extract-hydrogel and investigate its therapeutic activity on rheumatoid arthritis. **Methods** Franz cell method was used to investigate the *in vitro* permeation effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene 2-O- β -D-glucoside, benzoylmesaconine, 8-deacetylyunaconitine, sinapic acid crassicauline, crassicauline A and emodin in the Sanwujiao extract. The Sanwujiao extract-hydrogel was prepared and its physical and chemical properties were characterized; At the same time, the CIA rat model was established to study the therapeutic activity of Sanwujiao extract on rheumatoid arthritis under percutaneous delivery mode. **Results** The Sanwujiao extract-hydrogel was always in the state of gel under normal conditions; And its three-dimensional cross-linked network structure can make the drug release better and continuously, so as to achieve the

收稿日期: 2022-01-13

基金项目: 国家重大科技专项 (202002AA100004-2); 国家重大科技专项 (202102AA310045); 国家重大科技专项 (202002AA1000056)

作者简介: 肖素芸 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为新型中药制剂。Tel: 13766227297 E-mail: xsy13766227297@163.com

*通信作者: 崔秀明 (1963—), 男, 研究员, 主要从事中药资源研究。Tel: 18387186037 E-mail: sanqi37@vip.sina.com

sustained-release effect. In vivo pharmacological tests showed that the Sanwujiao extract-hydrogel significantly decreased the foot thickness, foot volume, arthritis index level, RF, CRP and Bcl-2 levels in serum and increased Bax levels in CIA rats; It can also reduce the levels of AST, ALT, creatinine and blood urea nitrogen and the degree of organ lesions. **Conclusion** Using the local delivery mode of percutaneous delivery, Sanwujiao extract can retain the therapeutic activity and reduce the organ toxicity caused by oral administration, which provides the possibility for the study of external preparations of Sanwujiao extract in the future.

Key words: Sanwujiao extract; hydrogel; transdermal drug delivery; topical application; rheumatoid arthritis; biological toxicity; 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene 2-O- β -D-glucoside; benzoylmesaconine; 8-deacetylunaconitine; sinapic acid crassicauline; crassicauline A; emodin; rheumatoid factor; C-reactive protein; B-cell lymphoma-2; Bcl-2-associated X protein; aspartate aminotransferase; alanine aminotransferase; creatinine; blood urea nitrogen

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以滑膜增生和慢性炎症为特征的慢性全身性自身免疫性疾病^[1]。RA 的主要症状是炎症、关节肿胀、伴随关节软骨进行性损伤,甚至功能障碍^[2-4]。目前临床上 RA 的主要治疗药物是疾病修饰抗风湿药物 (disease modifying antirheumatic drugs, DMARDs),但是副作用较为明显,长期或大剂量服用会损伤胃肠道和产生过敏反应,甚至肝肾功能异常和骨髓抑制^[5-6],因此,开发抗 RA 的天然药物尤为重要。

临床上常用乌头类中药及炮制品治疗风湿类疾病。三乌胶丸是云南黑药的品种之一,由黄草乌 *Aconitum vilmorinianum* Kom.、川乌 *A. carmichaelii* Debx.、何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb.、附片 (黑顺片) *A. carmichaelii* Debx. 和白附子 *Typhonium giganteum* Engl. 组成;其主要用于风寒湿邪、风痰、瘀血引起的风湿麻木、中风偏瘫、口眼歪斜及风湿性关节炎、RA 等^[7-8]。有关研究表明,三乌胶丸中乌头碱类成分能够影响细胞的增殖和凋亡,且具有免疫调节特性,可能是治疗自身免疫性疾病的潜在有效药物^[9-10],但其原料药对脏器具有毒性作用^[11-13]。因此,为提高三乌胶丸用药安全性,对其传统口服给药治疗方式进行改良,针对其局部病症的特点,寻找一种能维持血药浓度相对稳定的给药方式具有重要意义。

经皮给药系统 (transdermal drug delivery, TDDS) 具有避免肝肠首过效应、提高用药安全、提高患者依从性和维持血药浓度稳定性等特点,其中新型载体水凝胶不仅能够满足三乌胶提取物的给药需求,而且能增加水难溶性药物的溶解度,其交联的网状结构能延长药物滞留时间,从而达到缓释作用^[14-15]。据此,本研究首先考察了三乌胶提取物中 6 种指标性成分的体外渗透能力,以皮肤透过量为指标,对三乌胶提取物溶剂种类和促渗剂用量进行筛选;基于此,制备三乌胶提取物水凝胶并对其

进行表征,同时采用胶原诱导型 RA 大鼠为模型,进一步评估三乌胶提取物水凝胶经皮递送对 RA 的治疗效果和生物毒性,为三乌胶丸后续深入研究提供新的研究思路和策略。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-2030Plus 型高效液相色谱仪,日本岛津公司;梅特勒 AL-104 型电子天平,梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司;KQ5200E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;RYJ-12B 型 Franz 扩散测定仪,上海黄海药检仪器有限公司;UPT-I-20T 型优普系列超纯水器,成都超纯科技有限公司;RCT 基型磁力搅拌加热器,德国艾卡有限公司;SM600 型酶标仪,上海永创医疗器械有限公司;DMO-412 型低速离心机,美国 Scilogex 公司;SU8100 型扫描电子显微镜 (SEM),日本 Hitachi 公司。

1.2 药品与试剂

三乌胶提取物是参照云南金乌黑药制药有限公司优化后的煎煮制备流程,并按照三乌胶丸处方比例,将 9 g 黄草乌、6 g 川乌、1.5 g 黑顺片、4.5 g 何首乌和 3 g 生白附子提取制备成干浸膏,相当于原生药 1.71 g/g;对照品二苯乙烯苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene 2-O- β -D-glucoside, TSG, 批号 Yz021521)、苯甲酰新乌头碱 (benzoylmesaconine, BMA, 批号 wkq20041701)、8-去乙酰滇乌碱 (8-deacetylunaconitine, 8-DCA, 批号 Yz0201221)、草乌甲素 (crassicauline A, 批号 Yz042122)、大黄素 (emodin, 批号 Yz080920),质量分数均为 98%,购自南京源植生物科技有限公司;对照品去乙酰粗茎乌头碱甲 (sinapic acid crassicauline, SAC, 批号 19112201),质量分数为 98%,购自成都普菲德生物技术有限公司;二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethylformamide, DMF, 批号 D111999)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 016897),

均购自上海百舜生物科技有限公司；聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)，批号 8598479，购自武汉卡诺斯科技有限公司；聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP)，批号 20190404，购自天津市大茂化学试剂厂；羧甲基纤维素钠 (carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na)，批号 20180718，购自天津市致远化学试剂有限公司；甲氨蝶呤 (批号 RH221275)、牛 II 型胶原蛋白 (CII，批号 L22S11C125306) 购自上海源叶生物科技有限公司；完全弗氏佐剂 (CFA，批号 SLCH4887) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司；类风湿因子 (rheumatoid factor, RF，批号 202109)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP，批号 202109)、B 细胞淋巴瘤因子 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2，批号 202109) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax，批号 202109) 的试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司；谷氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST，批号 C010-2-1)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT，批号 C009-2-1)、肌酐 (批号 C011-2-1) 和尿素氮 (批号 C013-2-1) 的试剂盒购自南京建成生物工程研究所；所用的化学药品和试剂都是分析纯级别。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物许可证号 SCXK (湘) 2019-0004，体质量 160~200 g。动物在恒定的室温 (25 °C，相对湿度 70%~75%) 下饲养。所有动物研究经昆明理工大学动物实验伦理委员会批准，批准号为 PZWH (滇) K2021-0004。

2 方法与结果

2.1 提取物中 6 种指标性成分分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 参考本课题组前期发表的文献方法^[16]。色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为 0.2% 二乙胺 (磷酸调节 pH 为 4.0) 水溶液-乙腈，流动相梯度为 0~15 min, 10%~20% 乙腈；15~45 min, 20%~40% 乙腈；45~55 min, 40%~70% 乙腈；55~70 min, 70% 乙腈；体积流量为 1.0 mL/min；进样量为 25 μL；检测波长为 245 nm；柱温为 30 °C；理论塔板数按照所有峰计算均不低于 3000。

2.1.2 线性关系考察 精密称取 TSG、BMA、8-DCA、SAC、草乌甲素、大黄素各适量，用酸性甲醇溶液制成质量浓度分别为 700、800、700、800、

500、200 μg/mL 的混合对照品储备液；分别精密移取混合对照品溶液加酸性甲醇稀释至刻度，摇匀，即得系列混合对照品溶液。照“2.1.1”项色谱条件进行 HPLC 检测，以进样质量浓度为横坐标 (X)，峰面积值为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线并进行线性回归，得回归方程分别为 TSG $Y=11\,727\,831.648\,4\,X-57\,860.619\,3$, $r=0.999\,1$, 线性范围 0.007~70.000 μg/mL；BMA $Y=9\,523\,875.004\,0\,X-21\,540.034\,1$, $r=0.999\,8$, 线性范围 0.008~80.000 μg/mL；8-DCA $Y=14\,880\,359.851\,2\,X-24\,512.274\,0$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.007~70.000 μg/mL；SAC $Y=22\,665\,612.465\,5\,X-42\,921.655\,5$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.008~80.000 μg/mL；草乌甲素 $Y=30\,000\,947.232\,9\,X-42\,758.540\,0$, $r=0.999\,8$, 线性范围 0.005~50.000 μg/mL；大黄素 $Y=41\,750\,102.139\,7\,X-21\,304.199\,6$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.002~20.000 μg/mL。

2.1.3 供试品溶液的配制 取各个时间点的透皮接收液，吹干，残渣加甲醇定容至 1 mL，0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得透皮供试品溶液。

2.1.4 精密度试验 精密吸取 6 种指标性成分的混合对照品储备液 25 μL，照上述色谱条件测定，重复进样 6 次，进行精密度试验，结果 TSG、BMA、8-DCA、SAC、草乌甲素、大黄素峰面积的 RSD 分别为 1.08%、1.19%、0.75%、1.06%、0.19%、0.49%，结果表明仪器系统精密度良好。

2.1.5 重复性试验 精密吸取 6 份同一时间点的透皮供试品溶液 25 μL，照上述色谱条件测定，进行重复性试验，结果 TSG、BMA、8-DCA、SAC、草乌甲素、大黄素质量浓度的 RSD 分别为 0.80%、0.92%、0.70%、0.94%、1.25%、1.07%，结果表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取透皮供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、6、12、24 h 进行 HPLC 测定，进行稳定性试验，结果 TSG、BMA、8-DCA、SAC、草乌甲素、大黄素峰面积的 RSD 分别为 0.77%、1.08%、1.66%、0.75%、1.75%、0.80%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密取 6 种指标性成分含量已测定的透皮供试品溶液 25 μL，加入适量混合对照品储备液，进 HPLC 测定 6 种指标性成分的总含量，计算得平均加样回收率，结果 TSG、BMA、8-DCA、SAC、草乌甲素、大黄素的平均加样回收率分别为 96.96%、97.50%、96.43%、99.57%、

96.71%、95.38%，RSD 分别为 2.44%、1.62%、1.74%、1.86%、1.35%、2.39%，结果表明该方法的加样回收率良好。

2.1.8 样品测定 精密吸取混合对照品储备液、透皮供试品溶液、空白溶剂各 25 μL ，按“2.1.1”项色谱条件测定，结果表明该方法专属性良好，HPLC 图见图 1。

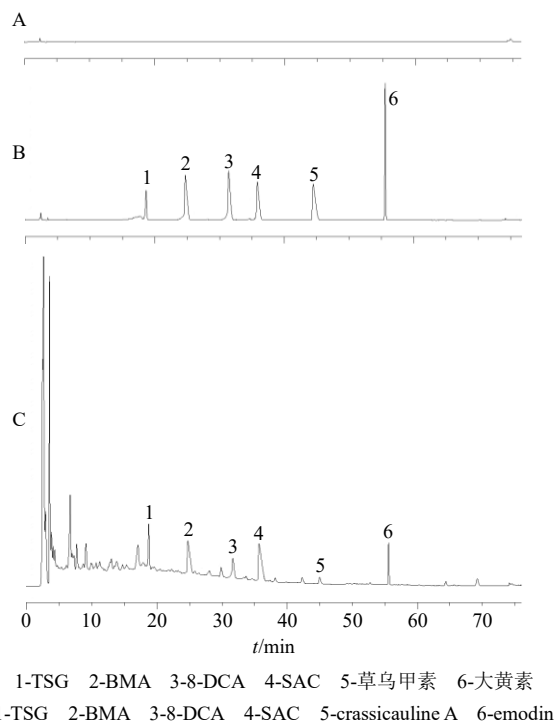


图 1 空白溶剂 (A)、混合对照品溶液 (B) 和透皮供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC diagram of blank solvent (A), mixed reference solution (B) and transdermal test solution (C)

2.2 数据处理与分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，SPSS 19.0 软件进行显著性分析，相同指标不同处理进行 Duncan 0.05 多重分析，不同字母表示存在差异性， $P < 0.05$ ；GraphPad Prism 8.0 软件用于对数据进行 t 检验和制图。

2.3 提取物溶解度的测定

分别称取 1.2 g 提取物加入 5 种不同的溶剂 10 mL，超声处理（功率 300 W、频率 40 kHz、水温 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下）2 h，放冷，12 000 r/min 离心（离心半径为 6.3 cm）10 min，取上清液，吹干，加入 1 mL 酸性甲醇，0.22 μm 微孔滤膜滤过，按“2.1.1”项色谱条件进行 HPLC 测定，考察 5 种不同溶剂对提取物中 6 种指标性成分溶解度的影响，结果如表 1 所示，TSG、8-DCA、SAC、草乌甲素和大黄素在 10%乙醇中溶解度最高，BMA 在水溶液中溶解度最高。综合可知，提取物中 6 种指标性成分溶解度总和在 10%乙醇中最高，分别为 40.41、60.01、25.72、12.62、5.84、1.71 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 体外透皮试验

2.4.1 溶剂考察 分别取 1.2 g 提取物加入 10 mL 5 种不同的溶剂，超声处理（功率 300 W、频率 40 kHz、水温 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下）2 h，放冷，12 000 r/min 离心（离心半径为 6.3 cm）10 min，取上清液，即得供给池溶液。参考有关文献方法^[17]进行离体鼠皮的制备和体外透皮实验，以 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液（PBS）为接收液，转速约 600 r/min，保持透皮仪内温度恒定为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，接收池体积为 7 mL，透皮扩散面积 2.8 cm^2 。在 24 h 时取 1.0 mL 接收液样品，离心、滤过，

表 1 不同溶剂下 6 种指标性成分的溶解度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Solubility of six index components in different solvents ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

溶剂	溶解度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$						总和
	TSG	BMA	8-DCA	SAC	草乌甲素	大黄素	
水	37.01 ± 0.84^b	60.77 ± 0.45^a	24.46 ± 0.18^a	12.16 ± 0.73^a	5.69 ± 0.17^{ab}	1.68 ± 0.07^a	141.76 ± 0.61^b
10%乙醇	40.41 ± 0.64^a	60.01 ± 0.48^a	25.72 ± 0.25^a	12.62 ± 0.81^a	5.84 ± 0.11^a	1.71 ± 0.10^a	146.31 ± 1.81^a
DMSO	40.06 ± 0.34^a	59.53 ± 0.52^a	19.32 ± 0.28^b	11.42 ± 0.58^a	4.07 ± 0.19^d	1.54 ± 0.18^b	135.94 ± 1.40^c
DMF	39.36 ± 0.95^b	51.43 ± 0.49^b	17.50 ± 0.22^b	12.38 ± 0.69^a	5.11 ± 0.16^c	1.53 ± 0.12^b	127.31 ± 1.19^d
PEG	35.16 ± 0.84^c	27.73 ± 0.33^c	12.53 ± 0.16^c	8.78 ± 0.21^b	5.40 ± 0.15^{bc}	1.54 ± 0.12^b	91.14 ± 1.75^e

不同字母表示相同指标不同处理差异显著 ($P < 0.05$)，下表同

different letters indicate that the same index is significantly different from different treatments ($P < 0.05$), same as below tables

取上清液，通过“2.1”项下方法进行分析，根据 6 种指标性成分的峰面积，计算透皮供试品溶液中各成分药物质量浓度，并按公式计算各时间点 6 种指标性成分的皮肤透过量 (ΔM)。

$$\Delta M = C_n V / A_e$$

C_n 为某一时间点透皮接收液中的药物质量浓度， V 为接收液的体积， A_e 为扩散池的有效面积

由表 2 可知，提取物中 6 种指标性成分的皮肤

渗透作用在不同溶剂中呈现不同的变化规律,如 TSG、BMA、SAC 和大黄素的 ΔM 在 10%乙醇中最多,而 8-DCA 在 DMSO 中最多;因此本研究以 6 种指标性成分 ΔM 的总和来确定提取溶剂。结果表明采用 10%乙醇作为溶剂时 ΔM 最高,因此,选择 10%乙醇作为提取溶剂进行后续研究。

2.4.2 促渗剂用量考察 根据前期预试验结果,选择氮酮作为促渗剂。采用“2.4.1”项下方法,对氮酮用量进行考察。结果如表 3 所示,在 3%氮酮作用下,有效成分的 ΔM 均相对较高,比 10%乙醇提高约 2 倍。根据上述研究,在 10%乙醇作为溶剂和 3%氮酮作为促渗剂的情况下,提取物具有较强的经

皮渗透能力。

2.5 提取物水凝胶的制备

选择以上条件制备水凝胶。参考文献报道的方法^[18],取 1.2 g 提取物,加入 10 mL 10%乙醇溶液,超声离心,得上清液并浓缩为 2 g,再加入氮酮 0.06 g,即得提取物 10%乙醇储备液。精密称取 0.15 g PVP 置于 50 mL 烧杯中,每份加入 0.2 g CMC-Na,混合均匀后,加入 0.5 g 甘油,加入 5 mL 去离子水,室温放置溶胀 12 h 后,制得空白基质;随后取提取物 10%乙醇储备液,与空白基质混合均匀,补足去离子水至凝胶体系为 10 g,即得提取物水凝胶,水凝胶制备流程图见图 2-A,水凝胶示意图见图 2-B。

表 2 不同溶剂下 6 种指标性成分的 $\Delta M (\bar{x} \pm s, n=3)$

Table 2 ΔM of six index components in different solvents ($\bar{x} \pm s, n=3$)

溶剂	$\Delta M/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$						总和
	TSG	BMA	8-DCA	SAC	草乌甲素	大黄素	
水	$1.23 \pm 0.16^{\text{ab}}$	$2.15 \pm 0.30^{\text{a}}$	$0.31 \pm 0.10^{\text{b}}$	$0.29 \pm 0.02^{\text{b}}$	$0.16 \pm 0.02^{\text{a}}$	$0.22 \pm 0.03^{\text{ab}}$	$4.36 \pm 0.63^{\text{b}}$
10%乙醇	$1.56 \pm 0.32^{\text{a}}$	$2.20 \pm 0.13^{\text{a}}$	$0.38 \pm 0.07^{\text{b}}$	$0.58 \pm 0.03^{\text{a}}$	$0.17 \pm 0.01^{\text{a}}$	$0.27 \pm 0.04^{\text{a}}$	$5.16 \pm 0.56^{\text{a}}$
DMSO	$0.82 \pm 0.22^{\text{bc}}$	$1.08 \pm 0.26^{\text{b}}$	$0.29 \pm 0.02^{\text{a}}$	$0.11 \pm 0.01^{\text{c}}$	$0.16 \pm 0.01^{\text{b}}$	$0.17 \pm 0.01^{\text{ab}}$	$2.63 \pm 0.47^{\text{c}}$
DMF	$1.05 \pm 0.12^{\text{cd}}$	$0.89 \pm 0.12^{\text{b}}$	$0.78 \pm 0.04^{\text{b}}$	$0.18 \pm 0.01^{\text{c}}$	$0.13 \pm 0.01^{\text{a}}$	$0.22 \pm 0.01^{\text{b}}$	$3.25 \pm 0.10^{\text{c}}$
PEG	$0.63 \pm 0.09^{\text{a}}$	$0.13 \pm 0.03^{\text{c}}$	$0.44 \pm 0.03^{\text{b}}$	$0.02 \pm 0.00^{\text{d}}$	$0.04 \pm 0.00^{\text{c}}$	$0.06 \pm 0.00^{\text{c}}$	$1.32 \pm 0.11^{\text{d}}$

表 3 不同用量的氮酮对 6 种指标性成分的 $\Delta M (\bar{x} \pm s, n=3)$

Table 3 ΔM of six index components by different concentrations of azone ($\bar{x} \pm s, n=3$)

用量/%	$\Delta M/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$						总和
	TSG	BMA	8-DCA	SAC	草乌甲素	大黄素	
1	$1.20 \pm 0.07^{\text{a}}$	$4.83 \pm 0.05^{\text{c}}$	$0.46 \pm 0.01^{\text{d}}$	$0.98 \pm 0.07^{\text{bc}}$	$0.35 \pm 0.06^{\text{b}}$	$0.20 \pm 0.06^{\text{b}}$	$8.02 \pm 0.13^{\text{b}}$
2	$1.31 \pm 0.04^{\text{a}}$	$5.22 \pm 0.07^{\text{ab}}$	$0.53 \pm 0.04^{\text{c}}$	$0.95 \pm 0.06^{\text{c}}$	$0.43 \pm 0.06^{\text{ab}}$	$0.25 \pm 0.06^{\text{b}}$	$8.69 \pm 0.16^{\text{b}}$
3	$1.53 \pm 0.08^{\text{a}}$	$5.83 \pm 0.77^{\text{a}}$	$0.68 \pm 0.06^{\text{a}}$	$1.41 \pm 0.11^{\text{a}}$	$0.51 \pm 0.11^{\text{a}}$	$0.32 \pm 0.06^{\text{a}}$	$10.28 \pm 0.90^{\text{a}}$
4	$1.49 \pm 0.09^{\text{b}}$	$5.19 \pm 0.73^{\text{b}}$	$0.61 \pm 0.01^{\text{b}}$	$1.09 \pm 0.04^{\text{b}}$	$0.44 \pm 0.04^{\text{ab}}$	$0.24 \pm 0.07^{\text{b}}$	$9.06 \pm 0.91^{\text{b}}$
5	$1.43 \pm 0.02^{\text{b}}$	$5.23 \pm 0.66^{\text{b}}$	$0.56 \pm 0.03^{\text{bc}}$	$1.07 \pm 0.05^{\text{bc}}$	$0.23 \pm 0.05^{\text{c}}$	$0.25 \pm 0.02^{\text{b}}$	$8.77 \pm 0.65^{\text{b}}$

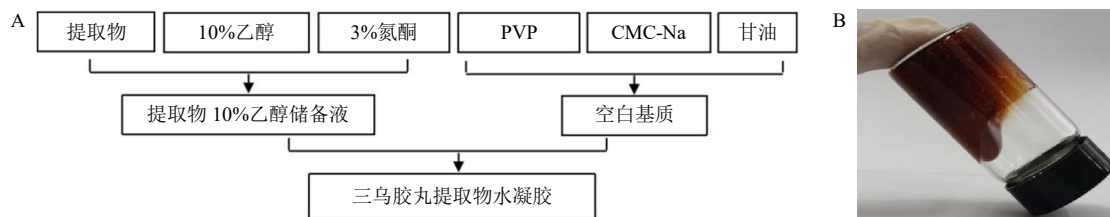


图 2 提取物水凝胶制备流程图 (A) 和示意图 (B)

Fig. 2 Preparation flow chart (A) and schematic diagram (B) of extract-hydrogel

2.6 提取物水凝胶中 6 种指标性成分含量的测定

按“2.5”项下方法制备 3 批提取物水凝胶溶解于 10 mL 超纯水中,12 000 r/min 离心(离心半径为 6.3 cm)10 min,滤过,吹干,加入 1 mL 酸性甲

醇,0.22 μm 微孔滤膜滤过,进行 HPLC 检测。结果表明,6 种指标性成分 TSG、BMA、8-DCA、SAC、草乌甲素和大黄素的质量浓度分别为 (25.53 ± 0.52)、(58.01 ± 6.80)、(12.46 ± 0.33)、($11.62 \pm$

0.81)、 (5.26 ± 0.31) 、 (1.42 ± 0.09) $\mu\text{g/mL}$ 。

2.7 提取物水凝胶的表征

2.7.1 pH 值的测定 取 3 批提取物水凝胶, 分别称取 1 g 置于小烧杯中, 并加入 25 mL 水稀释, 分别测定其 pH 值。结果 pH 值分别为 5.60、5.65、5.55, 与皮肤 pH 值相接近, 刺激性较小, 符合皮肤局部外用制剂对 pH 值的要求。

2.7.2 流变学测试

(1) 振幅扫描: 在凝胶线性黏弹区 (linear viscoelastic region of gel, LVER) 内进行动态振荡试验, 其测试结果可得到凝胶结构被破坏所能承受的最大形变。在剪切应变 (γ) 为 0.01%~100%, 温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、角频率 (ω) 为 1 rad/s 的振幅扫描

条件下测定样品的 LVER 的结果。如图 3-A 所示, $\gamma < 45\%$, 储能模量 (G') $>$ 损耗模量 (G''), 弹性占主体, 即样品表现出凝胶结构; 当 $G' = G''$ 时, 凝胶结构完全被破坏; 当 $\gamma > 45\%$, $G' < G''$, 黏性占主体, 表现出流体性质。证明 γ 控制在 45% 以内, 提取物水凝胶呈凝胶状态。

(2) 频率扫描: 在非破坏性变形范围内, 样品的时间相关特性用频率扫描来描述。在 γ 为 1%, 温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, ω 为 0.1~100 rad/s 条件下对凝胶进行频率扫描。如图 3-B 所示。在整个频率扫描中, G' 曲线始终高于 G'' 曲线, 明显表现出以弹性为主的特性, 始终呈现凝胶状态; 且 G' 较稳定, 未出现显著的频率依赖性, 表明该提取物凝胶具有稳定结构。

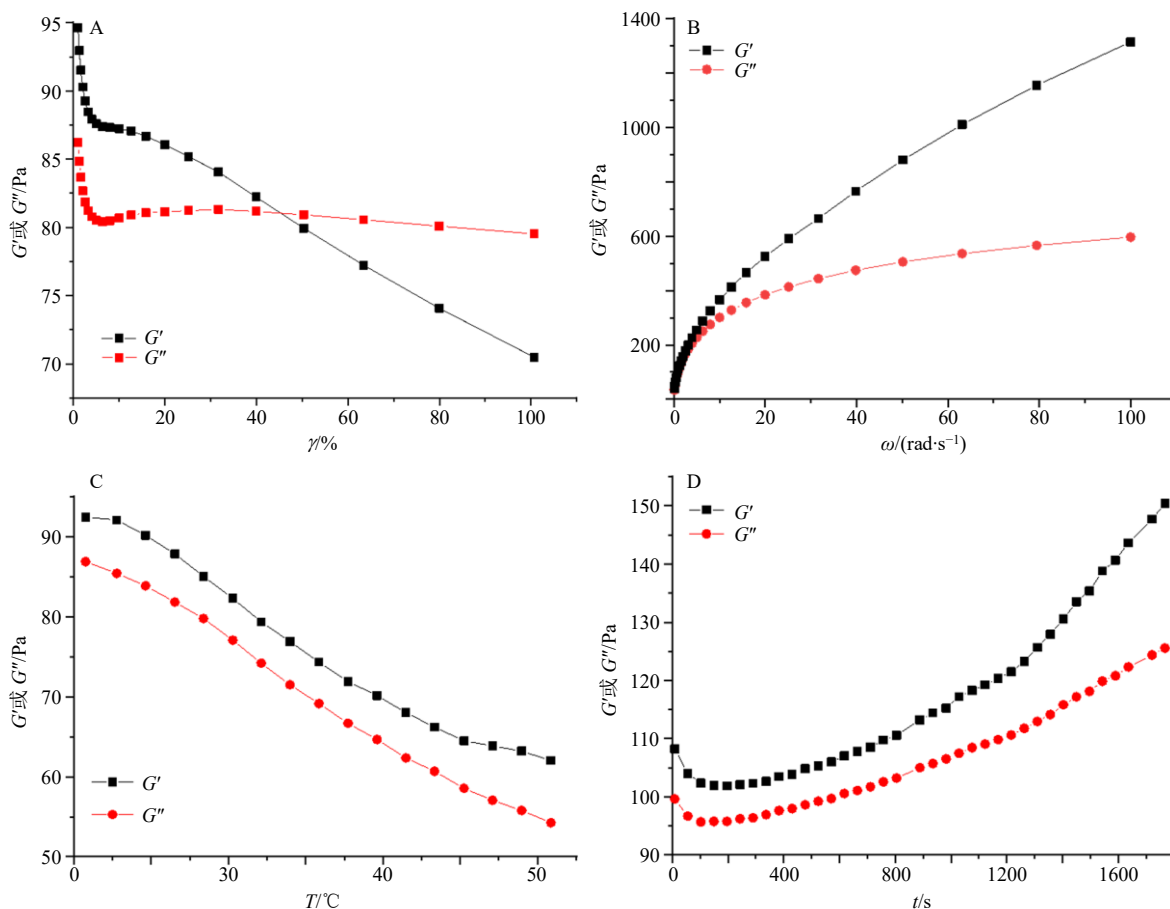


图 3 振幅 (A)、频率 (B)、温度 (C)、时间 (D) 的扫描曲线

Fig. 3 Sweep curve of amplitude (A), frequency (B), temperature (C), and time (D)

(3) 温度扫描: 在动态模式下, 固定 ω 为 1 rad/s , γ 为 1%, 样品以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率加热, 温度在 20~50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下对凝胶进行温度扫描。如图 3-C 所示, 在 20~50 $^{\circ}\text{C}$, 随着温度升高, G' 一直大于 G'' , 呈凝胶状态; 但 G' 和 G'' 呈不断下降趋势, 这可能是由于温度升高, 分子热运动程度加剧, 高分子链之

间网络结构被破坏造成的, 表明在常规温度下, 该凝胶始终保持凝胶状态。

(4) 时间扫描: 在动态模式下, 固定 ω 为 1 rad/s , γ 为 1%, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 在 0~30 min 内对凝胶进行时间扫描。如图 3-D 所示, 在 0~30 min, 随着时间增加, G' 一直大于 G'' , 明显表现出以弹性

为主的特性,表明该凝胶始终呈凝胶状态。

2.7.3 SEM 测试 将提取物水凝胶真空冷冻干燥,取适量冻干粉末,喷金处理,利用 SEM 观察凝胶微观形貌。结果如图 4 所示,凝胶内部为三维交联网状结构,这使其具有较好的延展能力及皮肤滞留特性,也为经皮递送提供了稳定的物化环境,药物可更好的持续性地释放,从而达到缓释效果。

2.7.4 初步稳定性考察 将 4 批提取物水凝胶分别

置于不同温度(4、25、35、45 ℃)下,考察 0、5、10 d 凝胶中 6 种指标性成分含量总和、pH 值的变化情况,以确定提取物水凝胶最佳存放条件。由表 4 可知,温度对提取物水凝胶的稳定性影响显著,随着时间的推移,提取物水凝胶中 6 种指标性成分含量不断减少,且 pH 值也随之增加。4 ℃ 的存放环境对提取物水凝胶的稳定性影响较小,因此,该凝胶贮藏于 4 ℃ 为宜。

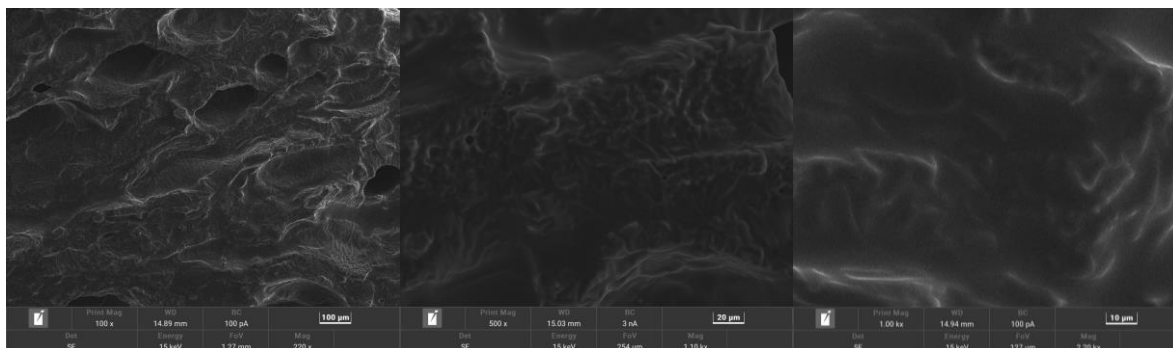


图 4 不同放大倍数下提取物水凝胶 SEM 图

Fig. 4 SEM image of extract-hydrogel at different magnification times

表 4 提取物水凝胶初步稳定性考察

Table 4 Stability investigation of extract-hydrogel

t/d	6 种指标性成分含量的总和/%				pH 值			
	4 ℃	25 ℃	35 ℃	45 ℃	4 ℃	25 ℃	35 ℃	45 ℃
0	101.03±1.03	99.90±2.30	99.98±2.06	99.83±3.88	5.59±0.02	5.67±0.01	5.63±0.02	5.77±0.02
5	98.47±3.94	99.23±2.77	98.89±2.95	98.16±5.54	5.58±0.03	5.63±0.02	5.52±0.03	5.67±0.02
10	94.84±11.29	93.94±7.22	94.35±3.82	93.31±6.69	5.68±0.03	5.65±0.02	5.69±0.04	5.72±0.02

2.8 提取物水凝胶对 RA 治疗作用的研究

2.8.1 RA 模型的建立 参考相关文献进行胶原诱导的类风湿性关节炎(collagen-induced rheumatoid arthritis, CIA)大鼠模型的建立^[19]。将 CII 冻干粉溶解于 0.1 mol/L 的醋酸中,制成 2 mg/mL 的 CII 醋酸溶液,与等体积 CFA 置于冰上研磨乳化至滴入水中不散开为止,即得 1 mg/mL 乳剂 I;同法与等体积 IFA 配成乳剂 II。开始对每只大鼠进行尾根部皮内 2 个位点共注射配制好的乳剂 I 0.1 mL,第 21 天,每只大鼠相同部位重复注射相同剂量的乳剂 II 以加强免疫(二次免疫),空白对照组大鼠在相同的部位每次注射相同体积的生理盐水代替胶原蛋白混合物。

2.8.2 分组及给药 第 21 天后,将造模成功大鼠随机分为模型组(等剂量生理盐水, ig),提取物灌胃组(1.05 g/kg, ig, 根据三乌胶丸成人服用剂量换算成大鼠给药剂量;以下简称口服组)、提取物水凝

胶组(1 g/只,关节涂抹;以下简称水凝胶组),甲氨蝶呤(1 mg/kg, ig)组,每组 6 只。甲氨蝶呤组 3 d/次,其余各组 1 次/d。二次免疫当天开始给药,直到第 48 天,结束给药。治疗结束时,各组大鼠踝关节状态见图 5。

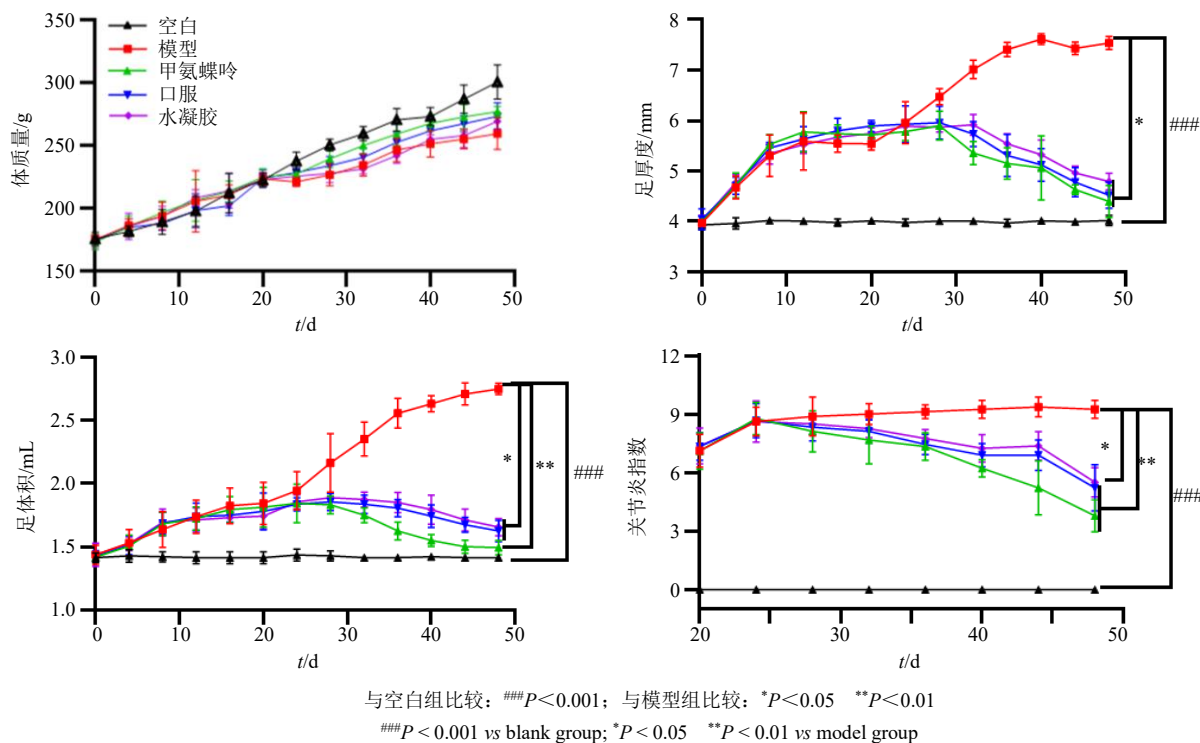
2.8.3 关节炎疗效的评估 将造模当天定为第 0 天,每隔 4 d 称定大鼠体质量,右后肢的足厚度和足体积进行测定;参考有关文献方法^[19]每隔 4 d 对给药后大鼠的关节炎程度进行临床评分。处死大鼠,收集胸腺和脾进行称定质量,计算各组脏器指数。并收集血液,取上清液按 ELISA 试剂盒说明书的操作测定 RF、CRP、Bcl-2 和 Bax 的含量。

实验结果(图 6)表明,各组之间大鼠体质量无显著性差异;与空白组相比,模型组大鼠足厚度和足体积显著升高,表明造模成功。持续给药一段时间后,甲氨蝶呤组可显著降低足厚度、足体积和关节炎指数水平;提取物经过口服和经皮给药均可降



图 5 各组大鼠给药结束后踝关节情况

Fig. 5 Ankle joint of rats in each group after administration

图 6 不同处理对大鼠关节炎程度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 6 Effects of different treatments on the degree of arthritis in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

低降低足厚度、足体积和关节炎指数水平, 且与甲氨蝶呤相比, 无显著性差异; 表明采用局部经皮给药的模式, 未降低提取物对 CIA 大鼠的治疗作用。

同时进一步计算脏器指数, 根据胸腺指数和脾脏指数评价提取物对 RA 的治疗作用; 结果 (图 7) 表明, 与空白组相比, 模型组胸腺和脾脏指数均显著升高。与模型组相比, 各给药组均能显著降低胸腺和脾脏的脏器指数。随后测定血清中炎症相关因子 RF 及蛋白 CRP, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 的含量, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 RF、CRP 和 Bcl-2 的水平显著升高, Bax 的水平显著降低; 与模型组比较, 甲氨蝶呤组可显著降低 RF、CRP 和 Bcl-2 水平和升高 Bax 水平, 口服和水凝胶组均可显著降低 RF、CRP 和 Bcl-2 水平和升高 Bax 水平, 且效果与甲氨蝶呤相比无显著差异; 这表明各给药组可能通过降低炎症, 抑制滑膜组织的异常

增生和增加凋亡来起到治疗关节炎的作用。

2.8.4 毒性评估 进一步研究各给药组对大鼠毒性的影响, 按照试剂盒说明书中使用标准测定大鼠血清中与肝毒性相关指标 AST 和 ALT 及肾毒性相关指标尿素氮和肌酐水平, 从而评价不同给药组对 CIA 大鼠的肝肾损伤情况。如表 5 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠肝脏中 ALT、AST、肌酐和尿素氮水平显著升高; 与模型组比较, 持续口服甲氨蝶呤和提取物, ALT、AST、肌酐和尿素氮水平均升高; 通过在炎症部位进行提取物水凝胶局部给药, ALT、AST、肌酐和尿素氮的升高趋势均得到了有效抑制。与口服组相比, 水凝胶组能显著降低 ALT、AST、肌酐和尿素氮水平, 表明提取物水凝胶经皮给药能通过降低 ALT、AST、肌酐和尿素氮水平, 减轻对 CIA 大鼠毒性作用。

同时, 取各组大鼠心、肝、脾、肺、肾和胸腺

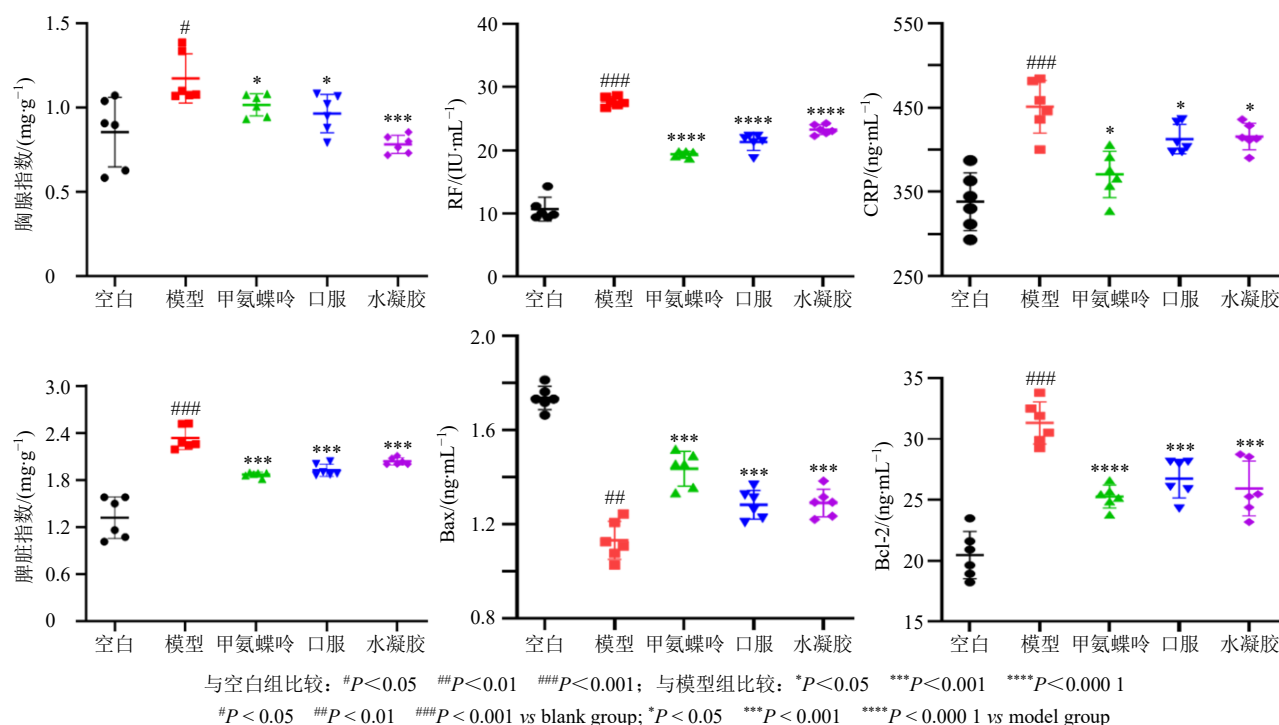


图 7 不同处理对大鼠胸腺、脾脏器指数及血清中的 RF、CRP、Bax 和 Bcl-2 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effects of different treatments on organ index of thymus and spleen and RF, CRP, Bax and Bcl-2 in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 5 不同处理对 CIA 大鼠血清中 ALT、AST、肌酐和尿素氮水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effects of different treatments on the levels of ALT, AST, creatinine and blood urea nitrogen in serum of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	肌酐/(μmol·L ⁻¹)	尿素氮/(mmol·L ⁻¹)
空白	—	27.32 ± 2.49	18.66 ± 1.83	43.88 ± 2.18	7.72 ± 0.69
模型	—	30.73 ± 2.08 [#]	22.79 ± 2.09 [#]	47.89 ± 2.28 [#]	8.95 ± 0.59 [#]
甲氨蝶呤	1 mg·kg ⁻¹	33.67 ± 2.53 [*]	31.41 ± 1.88 ^{***}	55.94 ± 3.41 ^{***}	10.38 ± 1.33 [*]
口服	1.05 g·kg ⁻¹	33.18 ± 0.91 [*]	28.20 ± 3.67 [*]	54.98 ± 2.36 ^{***}	9.71 ± 0.46 [*]
水凝胶	1 g·只 ⁻¹	28.49 ± 1.42 ^{*ΔΔΔ}	20.14 ± 0.70 ^{*ΔΔΔ}	44.96 ± 1.88 ^{*Δ}	8.11 ± 0.53 ^{*ΔΔ}

与空白组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与口服组比较: Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$ ΔΔΔ $P < 0.001$

$P < 0.05$ vs blank group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group; Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$ ΔΔΔ $P < 0.001$ vs oral group

组织,于 4%多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,于显微镜下观察组织病理变化,见图 8。空白对照组大鼠各脏器组织的病理形态改变无明显差异;如图中圈出部分所示,模型组大鼠心脏组织断裂、血管扩张瘀血;肝小叶中度水肿,脾小结内淋巴细胞增生、髓索增粗纤维化;肺泡间隔增厚,色素沉着,纤维结缔组织增生;肾皮质内可见多发静脉管腔扩张,瘀血,提示瘀血性疾病形成;胸腺相邻小叶皮质之间纤维间隔明显扩张,可见静脉扩张瘀血。与模型组比较,甲氨蝶呤组和口服组对各脏器病理组织损伤程度有所缓和,而水凝胶组病变损伤程度最轻,表明提取物水凝胶

对 CIA 大鼠毒性作用最小,经皮给药可降低提取物的毒性。

3 讨论

三乌胶丸口服给药方式具有复杂的体内代谢和整体的调控机制,这限制了其对局部关节炎的治疗效果。而经皮给药是指在皮肤或黏膜表面给药,使药物按恒定、接近恒定或需要的速率通过皮肤各层或黏膜,进入体循环,在全身和局部病灶维持有效的药物浓度而产生治疗作用,能够避免口服给药等引起的血药浓度峰谷现象和有效解决生物大分子在体内易失活及半衰期短等问题的一种给药方式^[20]。因此,本研究改变传统给药途径,通过局部经皮给

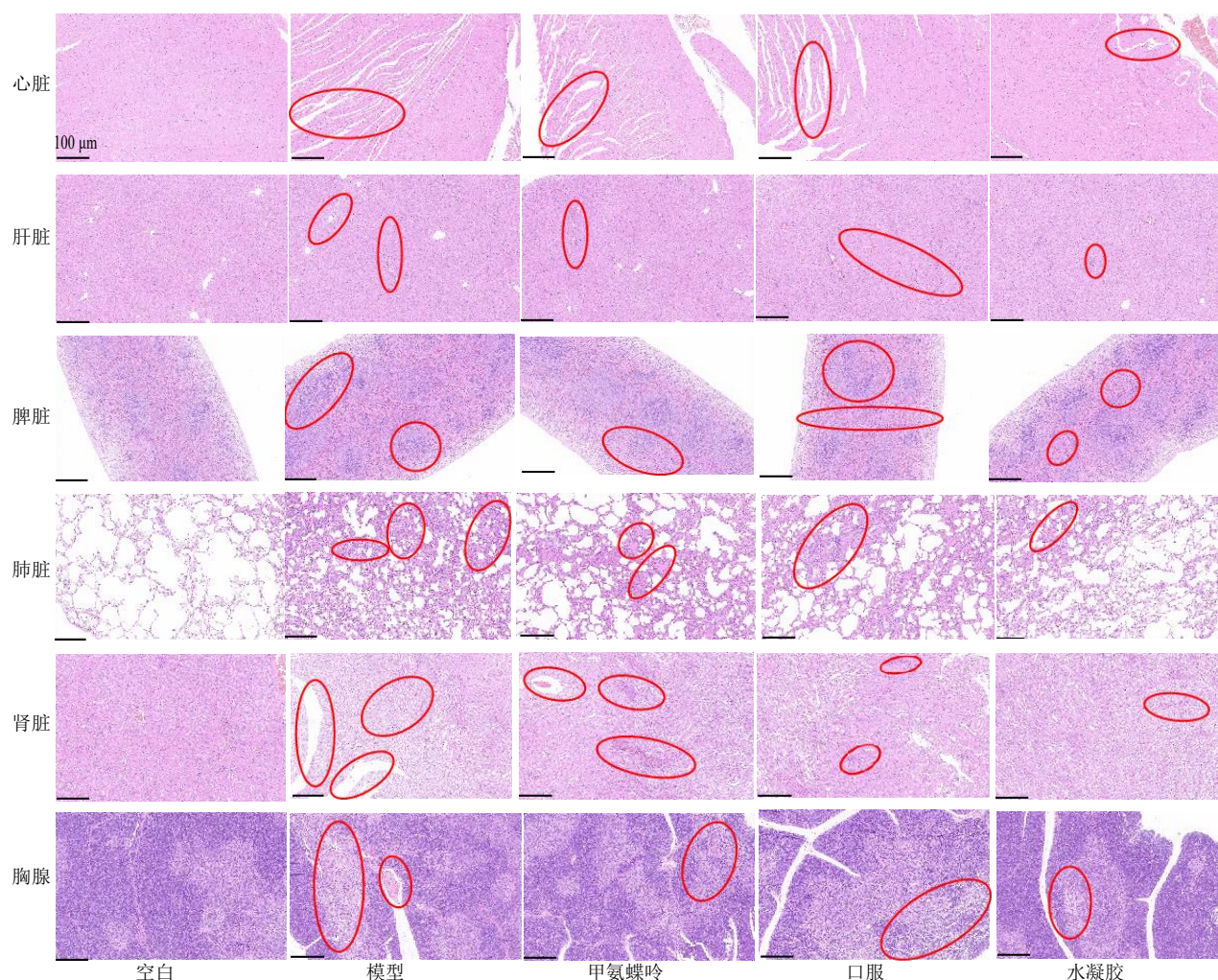


图 8 不同处理对大鼠脏器 HE 病理学的影响 (×200)

Fig. 8 Effects of different treatments on HE pathology of rat organs (× 200)

药模式,使药物高效、迅速地在病变部位富集和积累,从而提高三乌胶提取物的用药安全性,获得减毒增效的治疗效果。

三乌胶提取物活性成分多且复杂,因此选择 6 种指标性成分进行系统考察,而不是单一成分。经皮给药制剂关键在于提高药物的透皮速率,药物促渗透作用与选择适宜的溶剂和促渗剂有密不可分的关系^[21],则本实验以皮肤透过量为考察指标来筛选溶剂种类和氮酮用量,结果表明,以 10%乙醇作为溶剂和 3%氮酮作为促渗剂,6 种活性成分的整体经皮渗透性最好。

考虑到无法采用溶液直接进行关节炎局部给药,并且提取物中既有水溶性成分又有脂溶性成分,因此,利用水凝胶是具有三维网状交联结构的高分子体系,具有优越的生物相容性等特点^[22],选择水凝胶为剂型载体进行经皮给药。

本研究结果显示,与模型组比较,水凝胶组与

甲氨蝶呤阳性药都可显著降低 CIA 大鼠血清中 RF、CRP 和 Bcl-2 水平及显著升高 Bax 水平,表明提取物水凝胶对 RA 具有治疗作用;与口服组比较,水凝胶组可显著性降低 AST、ALT、肌酐和尿素氮水平并且各脏器病变程度更轻,表明其毒性有所降低。综上,本实验制备的提取物水凝胶具有良好渗透性能且在保证活性的同时能降低毒性,这为今后三乌胶提取物新剂型的开发和应用提供一定的理论参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yuan X S, Tong B, Dou Y N, *et al.* Tetrandrine ameliorates collagen-induced arthritis in mice by restoring the balance between Th17 and Treg cells via the aryl hydrocarbon receptor [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 101: 87-99.
- [2] Wu P Y, Zhou J Y, Wu Y F, *et al.* The emerging role of

- Interleukin 37 in bone homeostasis and inflammatory bone diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107803.
- [3] Law Y Y, Lee W F, Hsu C J, *et al.* miR-let-7c-5p and miR-149-5p inhibit proinflammatory cytokine production in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Aging*, 2021, 13(13): 17227-17236.
- [4] Tsutomu T, Hiroto Y, Sakae T. Role of interleukin-6 in bone destruction and bone repair in rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20(9): 102884.
- [5] Tuulikki S, Minja E, Theodore P. Treatment of rheumatoid arthritis: A global perspective on the use of antirheumatic drugs [J]. *Mod Rheumatol*, 2008, 18(3): 228-239.
- [6] Shahnaz B, Ahmadzadeh A, Ardekani M R S, *et al.* Does regular use of a complementary medicine of *Olea Europe* and *Ficus carica* have adverse effects on lipid profile and fasting blood glucose of rheumatoid arthritis (RA) patients under treatment with DMARD regimens containing methotrexate? [J]. *Iran J Pharm Res*, 2016, 15(4): 933-940.
- [7] 曾家顺, 武鹏佳, 张爱飞. 三乌胶丸联合甲氨蝶呤、艾拉莫德治疗类风湿关节炎临床观察 [J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(12): 44-46.
- [8] 陶启, 乐丽花, 柏克岗, 等. 三乌胶丸联合⁹⁹Tc]亚甲基二膦酸盐注射液治疗类风湿性关节炎的临床观察 [J]. 实用中西医结合临床, 2021, 21(8): 18-19.
- [9] 邵鑫, 袁叶双, 蒋先虹, 等. 乌头碱对类风湿性关节炎成纤维细胞样滑膜细胞增殖、凋亡及自噬的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(24): 3066-3070.
- [10] Zhou Y R, Zhao Y, Bao B H, *et al.* SND-117, a sinomenine bivalent alleviates type II collagen-induced arthritis in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 26(2): 423-431.
- [11] 温玉莹, 王丽苹, 沈志滨, 等. 黄草乌及其炮制品对心脏毒性的作用和机制研究 [J]. 中药材, 2019, 42(6): 1277-1282.
- [12] He Y N, Ou S P, Xiong X, *et al.* Stems and leaves of *Aconitum carmichaelii* Debx. as potential herbal resources for treating rheumatoid arthritis: Chemical analysis, toxicity and activity evaluation [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(9): 644-652.
- [13] 许晓丽, 任晶, 翟文泽, 等. HPLC 指纹图谱评价何首乌和制何首乌不同提取部位肝毒性 [J]. 中成药, 2020, 42(3): 792-795.
- [14] Bashir S, Hina M, Iqbal J, *et al.* Fundamental concepts of hydrogels: Synthesis, properties, and their applications [J]. *Polymers*, 2020, 12(11): 1-60.
- [15] Ujith S K M B, Sundararajan V. Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications [J]. *J Appl Polym Sci*, 2021, 138(19): 1-23.
- [16] 罗才琴, 肖素芸, 吕冬, 等. 三乌胶丸 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量分析研究 [J]. 云南大学学报, 2022, 44(1): 150-159.
- [17] 王启隆, 刘超, 权鹏, 等. 炮制对草乌中乌头类生物碱经皮吸收的影响及其贴剂的设计与评价 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3201-3208.
- [18] 杨春苗. 甲元卿成膜凝胶的制备及其药效学研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [19] 周小清, 廖理曦, 姜勇, 等. 苏木酮 A 对大鼠类风湿性关节炎的治疗作用 [J]. 中草药, 2021, 52(3): 744-748.
- [20] 王晓红. 微乳的促渗机制及在局部经皮给药中的应用研究 [J]. 中国药物与临床, 2011, 11(4): 435-437.
- [21] 李春雪, 曾锐, 高元平, 等. 粗茎秦艽醇提物体内经皮渗透性研究 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 2914-2921.
- [22] Deng P P, Yao L C, Chen J J, *et al.* Chitosan-based hydrogels with injectable, self-healing and antibacterial properties for wound healing [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 276: 118718.

[责任编辑 郑礼胜]