

绿原酸-黄芩苷共载纳米粒鼻腔原位凝胶的制备及增强鼻黏膜免疫作用

梁达均¹, 林宇建¹, 时 军^{1,2*}, 吴欣颖¹, 刘锐萍¹

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东省局精准递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006

摘要: 目的 制备绿原酸-黄芩苷共载纳米粒鼻腔原位凝胶(chlorogenic acid-baicalin co-loaded nanoparticles *in situ* nasal gel, CA&B-NPs/ISNG), 初步考察其对上呼吸道黏膜免疫功能低下(upper airway immunity dysfunction, UAID)小鼠的影响。方法 以包封率和胶凝温度为评价指标, 制备出 CA&B-NPs/ISNG, 表征其形态、粒径分布、 ζ 电位、体外释药量及凝胶溶蚀量; 采用牛蛙上颌离体法考察 CA&B-NPs/ISNG 对纤毛的毒性; 建立 UAID 小鼠模型, 测定小鼠唾液的分泌型免疫球蛋白 A(secretory immunoglobulin A, SIgA) 含量和溶菌酶活性, 考察 CA&B-NPs/ISNG 增强鼻黏膜免疫的作用。结果 优选处方: 取绿原酸和黄芩苷各 11.0 mg, 加入 10 mL 聚乙二醇(PEG)400 溶解成 CGA-BC 溶液, 磁力搅拌下缓慢滴入到 25 mL 2.72 mg/mL 壳聚糖溶液中, 调节 pH 至 5.0, 然后磁力搅拌下缓慢滴加 10 mL 1.00 mg/mL 三聚磷酸钠(tripolyphosphate, TPP) 溶液, 得 CA&B-NPs 混悬液; 往 CA&B-NPs 混悬液中加入体系 18.5% 泊洛沙姆 407(Poloxamer 407, P407), 溶胀分散均匀后, 加入体系 1% 泊洛沙姆 188(Poloxamer 188, P188), 待完全溶胀分散均匀, 调节 pH 至 5.5, 得 CA&B-NPs/ISNG。纳米粒形态规则, 平均粒径(536.10 ± 16.24) nm, 粒子分散系数 0.310 ± 0.053 , ζ 电位(24.39 ± 0.27) mV, 绿原酸和黄芩苷包封率分别为(44.67 ± 0.43)%和(55.25 ± 0.61)%; 胶凝温度为(32.03 ± 0.31) °C。CA&B-NPs/ISNG 表现出持续缓慢释药和无明显的纤毛毒性, 且能显著提高 SIgA 的含量和溶菌酶的活性($P < 0.05$)。结论 制备的 CA&B-NPs/ISNG 均一稳定, 包封率高, 适用鼻用制剂要求, 可提高 UAID 小鼠的鼻黏膜免疫功能。

关键词: 绿原酸; 黄芩苷; 纳米粒; 原位凝胶; 鼻黏膜免疫

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)16-5001-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.16.009

Preparation of chlorogenic acid-baicalin co-loaded nanoparticles *in situ* nasal gel and investigation on enhancing nasal mucosal immunity

LIANG Da-jun¹, LIN Yu-jian¹, SHI Jun^{1,2}, WU Xin-ying¹, LIU Rui-ping¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Engineering & Technology Research Center of Topical Precise Drug Delivery System, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To prepare for chlorogenic acid and baicalin co-loaded nanoparticles *in situ* nasal gel (CA&B-NPs/ISNG) and to investigate its effect on upper airway immunity dysfunction (UAID) mice. **Methods** To use encapsulation rate and gelation temperature as evaluation index, CA&B-NPs/ISNG was prepared. Then it was characterized by morphology, particle size distribution, ζ potential, drug release *in vitro* and gel corrosion amount. The toxicity of CA&B-NPs/ISNG to cilia was investigated by using toad palate mucosa *in vitro*. The UAID mice was established and the enhancement effect of CA&B-NPs/ISNG on nasal mucosal immunity was detected by measuring the SIgA content and lysozyme activity in saliva of mice. **Results** The preferred prescription is to take 11.0 mg each of chlorogenic acid and baicalin, 10 mL PEG400 was added to dissolve into chlorogenic acid-baicalin solution and slowly dropped into 25 mL 2.72 mg/mL chitosan solution with magnetic stirring. Adjusted the pH to 5.0. Then 10 mL 1.00 mg/mL TPP solution was slowly added dropwise under magnetic stirring to obtain CA&B-NPs suspension; CA&B-NPs was added to system 18.5% P407, swollen and dispersed well, then added system 1% P188, completely swollen and dispersed well, and the pH was adjusted to 5.5 to obtain CA&B-NPs/ISNG. Nanoparticles showed regular morphology with particle size ($536.10 \pm$

收稿日期: 2022-04-08

基金项目: 全国中医药创新骨干人才培养对象项目[国中医药人教函(2019)128号]

作者简介: 梁达均(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂研究与开发。Tel: 15913444215 E-mail: 15913444215@163.com

*通信作者: 时 军(1980—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药新剂型与制剂新技术研究。E-mail: shijun8008@163.com

16.24) nm, ζ potential (24.39 ± 0.27) mV, particle dispersion coefficient 0.310 ± 0.053 , chlorogenic acid and baicalin encapsulation rates of (44.67 ± 0.43)% and (55.25 ± 0.61)%, respectively. The gelling temperature was (32.03 ± 0.31) °C. CA&B-NPs/ISNG showed sustained slow drug release and no obvious ciliary toxicity, and significantly increased SIgA content and lysozyme activity ($P < 0.05$). **Conclusion** The prepared CA&B-NPs/ISNG was stable and had high encapsulation rate. It was suitable for nasal preparation requirement and can improve nasal mucosal immune function in UAID mice.

Key words: chlorogenic acid; baicalin; nanoparticles; *in situ* gel; nasal mucosal immunity

上呼吸道感染 (upper respiratory tract infection, URTI), 是临床常见的呼吸道传染病, 大部分由病毒引起^[1]。中医将 URTI 归于伤风范畴, 认为外感六淫之邪, 以风邪为主、入里化热、肺失宣降为伤风的主要病机^[2]。同时, 肺开窍于鼻, 鼻黏膜可以介导黏膜及全身免疫反应^[3-5]。鼻腔给药对防治 URTI 有较大应用价值。以金银花-黄芩 2 药相配为基础的制剂, 具有良好的抗感染能力, 被广泛用于治疗 URTI^[6-7]。绿原酸和黄芩苷分别是金银花和黄芩的主要有效成分, 均具有抗菌、抗病毒^[8-9]等作用。研究发现, 两者均可促进分泌型免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, SIgA) 的合成及分泌, 增强机体的免疫屏障^[10-11], 同时, 提高溶菌酶的活力, 增强其对细菌的杀灭作用^[12-13]。绿原酸-黄芩苷 2 药联用, 以期协同调节机体的免疫功能, 增强机体的抗病原体能力。

壳聚糖纳米粒 (chitosan nanoparticles) 携带正电荷, 易与带负电的鼻黏膜产生电荷吸引, 可以促进药物的吸收^[14]。温敏型原位凝胶 (thermosensitive *in situ* gels) 液态时有助于精确的用药量, 固态时可以减少鼻纤毛对药物的清除和提高药物在鼻腔内的滞留性^[15], 具有温度触变性。本研究将绿原酸-黄芩苷共载壳聚糖纳米粒中, 并应用于温敏原位凝胶, 制备绿原酸-黄芩苷共载纳米粒鼻腔原位凝胶 (chlorogenic acid-baicalin co-loaded nanoparticles *in situ* nasal gel, CA&B-NPs/ISNG), 以期延长药物的鼻腔滞留时间, 增强上呼吸道黏膜免疫功能, 为绿原酸-黄芩苷鼻用制剂防治 URTI 提供新的思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Dionex UltiMate 3000 HPLC 系统, 赛默飞世尔科技公司; JEM-1200EX 型扫描电子显微镜 (SEM), 日本电子株式会社; 85-2A 型数显恒温磁力搅拌器, 江苏金坛金城国胜实验仪器厂; Delso Nano C 型激光粒度电位仪, 美国 Beckman Coulter 公司; TGL-16 型高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; PHS-25 型 pH 计, 上仪电科学仪器股份有限公司;

TP-6 型透皮扩散仪, 天津市精拓仪器科技有限公司; SHA-B 型恒温振荡器, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; E100 型正置光学显微镜, 上海成贯仪器有限公司; Olympus CKX41 型倒置式生物显微镜, 北京中仪光科科技发展有限公司; RT-6100 型自动酶标仪, 雷杜生命科学股份有限公司。

1.2 试剂

绿原酸 (批号 PS0132-1000MG)、黄芩苷 (批号 PS010447), 质量分数均 $\geq 98\%$, 成都普思生物科技股份有限公司; 壳聚糖 (批号 C105799)、三聚磷酸钠 (批号 S100099), 阿拉丁试剂有限公司; 聚乙二醇 (PEG) 400, 批号 20200515, 天津市大茂化学试剂厂; 波洛沙姆 188 (P188, 批号 GND17422B)、波洛沙姆 407 (P407, 批号 GND11321B), 巴斯夫有限公司; 脱氧胆酸钠, 批号 S31095, 上海源叶生物科技有限公司; 小鼠 SIgA ELISA 试剂盒、溶菌酶测试盒, 江苏酶免实业有限公司; 色谱纯 (甲醇、乙腈), 默克股份两合公司。

1.3 动物

牛蛙 36 只, 体质量 40~60 g, 购于广州市白云区穗北实验动物养殖场; 健康昆明小鼠 40 只, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 南方医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (粤) 2016-0041。所有动物实验遵循广东药科大学实验动物伦理委员会有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 CA&B-NPs 的制备及包封率的测定

取绿原酸和黄芩苷各 10.0 mg, 加入 10 mL PEG400 溶解成绿原酸-黄芩苷溶液, 磁力搅拌下缓慢滴入到 25 mL 含 2%醋酸的 2 mg/mL 壳聚糖溶液中, 继续搅拌 10 min, 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 5.0, 然后磁力搅拌下以 2 滴/s 的速率缓慢滴加 10 mL 1 mg/mL TPP 溶液, 继续搅拌 20 min, 得 CA&B-NPs 混悬液 (V1) ^[16]。取 5 mL CA&B-NPs 混悬液置离心管中, 12 000 r/min 离心 (离心半径为 9.98 cm) 30 min 后, 收集上清液, 经 0.22 μ m 滤膜滤过。精密量取滤液 1 mL, 加入 50%甲醇定容至

10 mL, 混匀, 得含有未包封药物的混悬液 (V2)。采用 HPLC 法测定 V1 和 V2 中药物的质量浓度 (C_{V1} 和 C_{V2})。按包封率 $= (C_{V1} - C_{V2}) / C_{V1}$, 分别计算绿原酸和黄芩苷的包封率。

2.2 单因素实验考察 CA&B-NPs 制备工艺

2.2.1 药物投料质量 按“2.1”项下方法制备 CA&B-NPs, 固定壳聚糖与 TPP 质量浓度比为 5:1、壳聚糖溶液 pH 值为 5.0 和磁力搅拌转速为 1000 r/min (离心半径为 6.30 cm), 考察药物投料质量 2.5、5.0、10.0、15.0 mg 对包封率的影响。结果 (表 1) 显示, 当投放量较少时, 包封率较低, 当投放量 10.0 mg 时, 包封率较高, 但投放量 15.0 mg 时, 包封率下降, 说明投药量对包封率影响较大。

表 1 药物投料质量对包封率的影响

Table 1 Effects of drug feeding quality on encapsulation efficiency

药物投料 质量/mg	包封率/%	
	绿原酸	黄芩苷
2.5	14.33±0.52	24.25±0.88
5.0	20.23±0.25	36.26±0.90
10.0	32.04±0.86	44.71±0.99
15.0	23.03±0.40	35.33±0.49

2.2.2 壳聚糖与 TPP 质量浓度比 按“2.1”项下方法制备 CA&B-NPs, 固定药物投料质量为 10.0 mg、壳聚糖溶液 pH 值为 5.0 和磁力搅拌转速为 1000 r/min (离心半径为 6.30 cm), 考察壳聚糖与 TPP 质量浓度比 3:1、5:1、7:1、9:1 对包封率的影响。结果 (表 2) 显示, 5:1 和 7:1 时, 包封率较高。而 9:1 时, 观察到纳米粒不稳定, 容易沉降, 可能是 TPP 质量浓度过高, 与壳聚糖形成的粒径较大且分布不均匀导致。

2.2.3 壳聚糖溶液 pH 值 按“2.1”项下方法制备 CA&B-NPs, 固定药物投料质量为 10.0 mg、壳聚糖

表 2 壳聚糖与 TPP 质量浓度比对包封率的影响

Table 2 Effects of mass concentration ratio of chitosan to TPP on encapsulation efficiency

壳聚糖与 TPP 质量浓度比	包封率/%	
	绿原酸	黄芩苷
3:1	19.58±0.42	27.99±0.77
5:1	32.04±0.86	44.71±0.99
7:1	27.51±0.33	41.90±1.34
9:1	29.33±0.69	39.82±0.18

与 TPP 质量浓度比为 5:1 和磁力搅拌转速为 1000 r/min (离心半径为 6.30 cm), 考察壳聚糖溶液 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0 对包封率的影响。结果如表 3 所示, pH 值为 5.0 和 6.0 时, 包封率较为理想, 而 pH 值为 6.0 时溶液较浑浊, pH 值为 3.0 和 4.0 时包封率较低, 说明 pH 值对包封率影响较大。

表 3 壳聚糖溶液 pH 值对包封率的影响

Table 3 Effects of pH value of chitosan solution on encapsulation efficiency

壳聚糖溶液 pH 值	包封率/%	
	绿原酸	黄芩苷
3	17.44±0.51	25.87±0.49
4	22.04±0.43	34.71±0.45
5	32.04±0.86	44.71±0.99
6	30.65±0.84	43.89±0.98

2.2.4 搅拌速率 按“2.1”项下方法制备 CA&B-NPs, 固定药物投料质量为 10.0 mg、壳聚糖与 TPP 质量浓度比为 5:1 和壳聚糖溶液 pH 值为 5.0, 考察用磁力搅拌器调节滴入 TPP 时的转速分别为 600、800、1000、1200 r/min (离心半径为 6.30 cm) 对包封率的影响。结果 (表 4) 显示, 搅拌速度对包封率影响不大, 因此不把搅拌速度纳入考察范围, 实验选用 1000 r/min (离心半径为 6.30 cm) 转速。

表 4 搅拌速率对包封率的影响

Table 4 Effects of stirring rate on encapsulation efficiency

搅拌速度/ (r·min ⁻¹)	包封率/%	
	绿原酸	黄芩苷
600	31.57±0.59	42.87±0.98
800	31.84±0.42	44.80±0.74
1000	32.04±0.86	44.71±0.99
1200	32.11±1.13	43.88±1.29

2.3 Box-Behnken 响应面法优化 CA&B-NPs 制备工艺及最优处方验证

在单因素考察的基础上, 选取药物投料质量 (X_1)、壳聚糖与 TPP 质量浓度比 (X_2) 和壳聚糖溶液 pH 值 (X_3) 为考察因素, 绿原酸包封率 (Y_1) 和黄芩苷包封率 (Y_2) 为考察指标, 采用 Box-Behnken 响应面法对 CA&B-NPs 的制备进行处方优化, 实验设计和结果见表 5。

采用 Design-Expert 10.0 软件对结果进行分析见表 6, 得出绿原酸和黄芩苷 2 次多项回归方程模

表 5 响应面实验设计优化

Table 5 Optimization of response surface experiment design

序号	X_1/mg	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	序号	X_1/mg	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	序号	X_1/mg	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	15 (+1)	5 (0)	3 (-1)	9.56	29.98	7	15	7	4	22.54	39.11	13	5	7	4	18.45	38.34
2	5 (-1)	5	5 (+1)	28.78	44.44	8	10	5	4	29.97	39.68	14	5	3	4	12.35	32.98
3	10 (0)	5	4 (0)	31.23	36.66	9	10	3 (-1)	5	42.98	49.98	15	15	3	4	15.58	26.89
4	5	5	3	10.65	28.57	10	10	3	3	9.36	27.99	16	10	7	5	44.73	55.32
5	10	7 (+1)	3	19.89	38.78	11	10	5	4	28.88	37.88	17	10	5	4	30.67	38.78
6	15	5	5	39.79	48.35	12	10	5	4	30.28	37.97						

表 6 方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis

方差来源	自由度	Y_1			Y_2			方差来源	自由度	Y_1			Y_2		
		平方和	F 值	P 值	平方和	F 值	P 值			平方和	F 值	P 值	平方和	F 值	P 值
模型	9	2 079.87	96.17	<0.000 1	991.56	97.37	<0.000 1	X_1^2	1	421.83	175.55	<0.000 1	86.10	76.09	<0.000 1
X_1	1	37.07	15.43	0.005 7	18.57	16.42	0.004 9	X_2^2	1	37.06	15.42	0.005 7	1.84	1.62	0.243 3
X_2	1	80.20	33.38	0.000 7	142.13	125.61	<0.000 1	X_3^2	1	16.90	7.03	0.032 9	72.97	64.49	<0.000 1
X_3	1	1 426.05	593.46	<0.000 1	661.93	584.98	<0.000 1	残差	7	16.82			7.92		
X_1X_2	1	0.18	0.08	0.789 5	7.05	6.23	0.041 2	失拟项	3	13.74	5.94	0.059 0	2.87	0.76	0.573 8
X_1X_3	1	36.72	15.28	0.005 8	1.56	1.38	0.278 4	纯误差	4	3.08			5.05		
X_2X_3	1	19.32	8.04	0.025 2	7.43	6.56	0.037 5	总回归	16	2 096.69			999.48		

型为 $Y_1=30.21+2.15 X_1+3.17 X_2+13.35 X_3+0.22 X_1X_2+3.03 X_1X_3-2.20 X_2X_3-10.01 X_1^2-2.97 X_2^2+2.00 X_3^2$, $Y_2=38.19+1.52 X_1+4.22 X_2+9.10 X_3-1.33 X_1X_2+0.63 X_1X_3-1.36 X_2X_3-4.52 X_1^2+0.66 X_2^2+4.16 X_3^2$, 2 个模型都有显著性差异 ($P<0.05$), 失拟项都无显著性差异, 且相关系数 $R_1^2=0.992 0$ 和 $R_2^2=0.992 1$, 模型中 X_3 、 X_1^2 有极显著差异 ($P<0.001$)。表明该回归方程拟合度良好, 符合本实验的要求, 能够准确预测绿原酸和黄芩苷的包封率。

根据模型绘制二维等高线和三维响应面图。二维等高线图的形状可反应 2 个因素的交互作用, 等高线呈椭圆形则表示两因素交互作用较强, 而圆形则表示 2 因素交互作用较弱; 三维响应面图的倾斜度可反应各因素的交互作用, 倾斜度越大则表示交互作用越强。结果见图 1、2, 均显示 X_3 与 X_1 、 X_2 两两因素的等高线图趋向椭圆形, 以及响应面图倾斜度较高, 故对载药工艺的影响显著; X_1 与 X_2 交互作用不明显, 故对载药工艺的影响不显著。

优选处方为 $X_1=11$, $X_2=6.8$, $X_3=5$, 预测值绿原酸包封率为 44.72%, 黄芩苷包封率为 55.32%。重复测定 3 次, 绿原酸包封率为 $(44.67\pm 0.43)\%$, 黄芩苷包封率为 $(55.25\pm 0.61)\%$, 和预测值接近,

表明该处方对 CA&B-NPs 的包封率预测可靠, 具有一定的指导意义。

2.4 CA&B-NPs 的性状考察

取 CA&B-NPs 适量, 加水稀释 10 倍, 通过激光粒度电位仪测定其平均粒径、粒径分散指数和 ζ 电位。另取纳米粒稀释样品滴至铜网上, 滴加 2% 磷钨酸溶液进行负染, 在 TEM 下观察其形貌特征。结果如图 3 所示, 所制备的纳米粒的平均粒径为 $(536.10\pm 16.24)\text{nm}$, 粒径分散指数为 0.310 ± 0.053 , ζ 电位为 $(24.39\pm 0.27)\text{mV}$, 表明纳米粒粒径较小且分布均匀, ζ 电位稳定, 不易发生絮凝。电镜下纳米粒呈类球形, 形状规则, 形态饱满。

2.5 CA&B-NPs/ISNG 的制备

称取 18.5% P407, 加入到 CA&B-NPs 混悬液中, 磁力搅拌使其分散均匀, 4 °C 静置过夜, 至 P407 充分溶胀分散均匀。在磁力搅拌下, 缓慢加入 1% P188, 继续 4 °C 静置过夜, 至 P188 完全溶胀分散均匀。最后在磁力搅拌下逐滴滴加 1 mol/L NaOH 调节体系 pH 值至 5.5 左右, 得 CA&B-NPs/ISNG^[17]。

2.6 CA&B-NPs/ISNG 的质量评价

2.6.1 胶凝效果 取凝胶适量加入试管中, 并置于 15 °C 的恒温水浴锅, 以 1.0 °C/min 的速度缓慢加

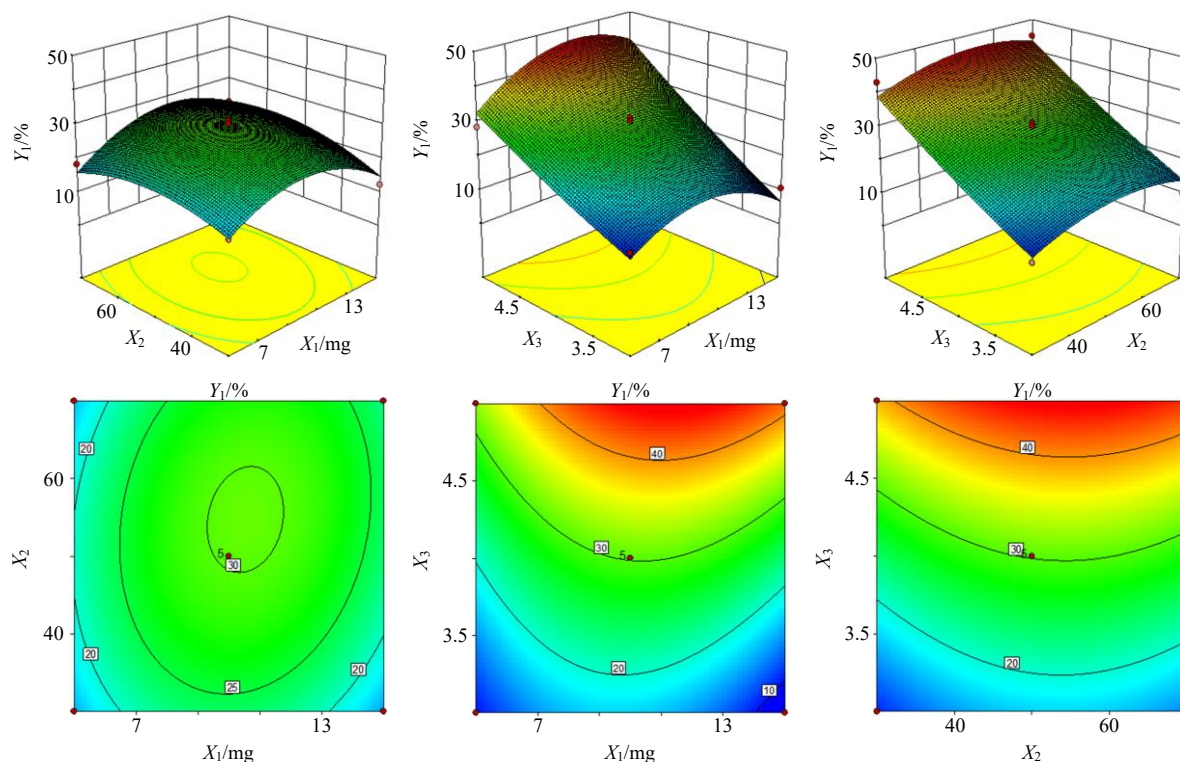


图 1 药物投料质量、壳聚糖与 TPP 质量浓度比和壳聚糖溶液 pH 对绿原酸包封率的二维等高线和三维响应面图

Fig. 1 Two dimensional contour and three-dimensional effect surface plots of drug quality, chitosan to TPP mass concentration ratio, and chitosan solution pH on CGA encapsulation efficiency

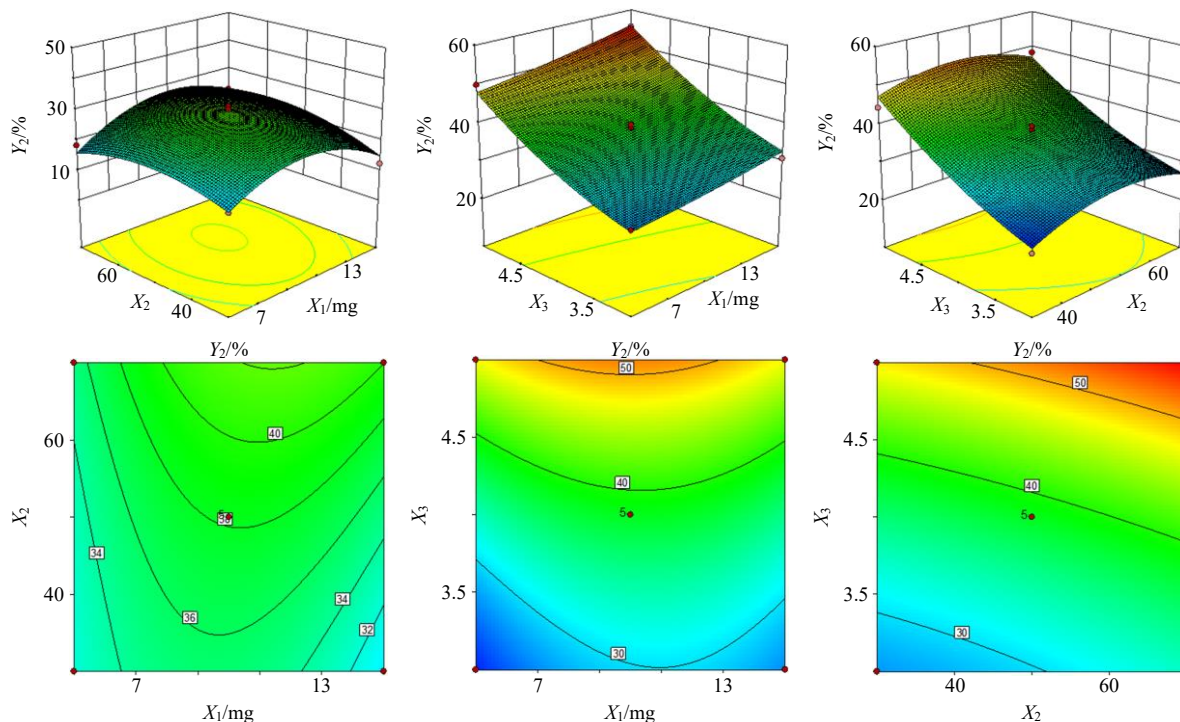


图 2 药物投料质量、壳聚糖与 TPP 质量浓度比和壳聚糖溶液 pH 对黄芩苷包封率的二维等高线和三维响应面图

Fig. 2 Two dimensional contour and three-dimensional effect surface plots of drug quality, chitosan to TPP mass concentration ratio, and chitosan solution pH on BC encapsulation efficiency

热水浴，每升高 0.1 ℃，将试管倾斜 90°，观察液面直至其不再流动，记录此时的温度，重复 3 次结

果为 $(32.0 \pm 0.3)^\circ\text{C}$ ，表明其符合鼻腔温度 $(32 \sim 35^\circ\text{C})$ 的范围。取适量凝胶加入试管中，并置于

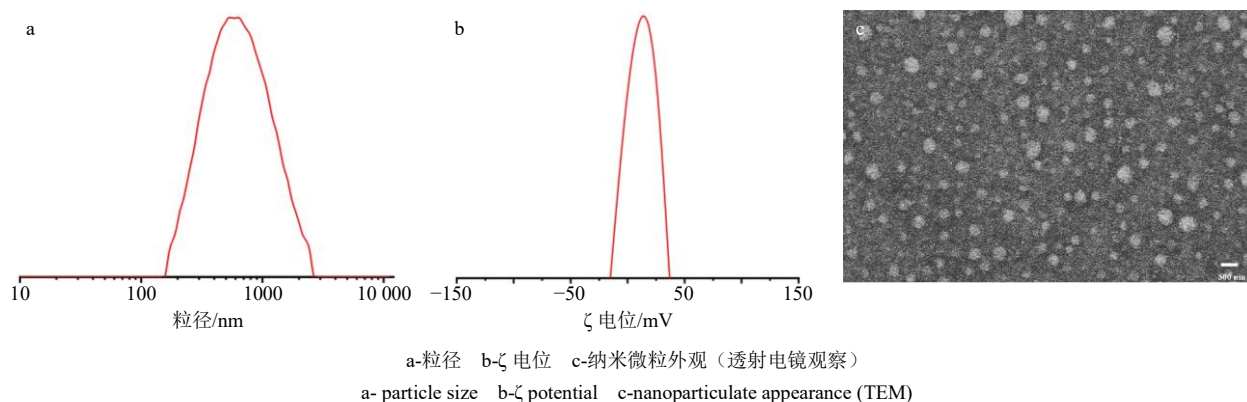


图3 CA&B-NPs 性状特征

Fig. 3 Properties and characteristics of CA&B-NPs

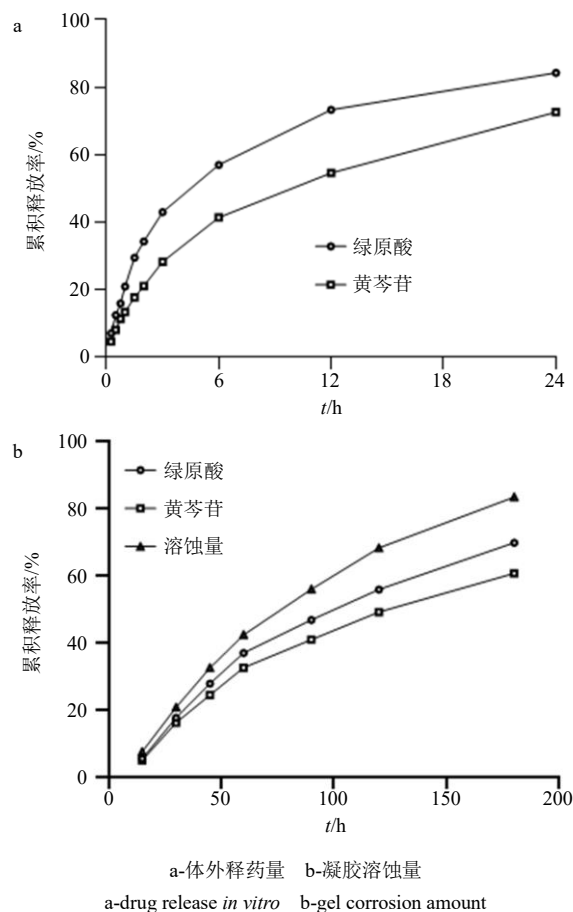
32 ℃ 的恒温水浴锅, 观察液面直至其不再流动, 记录胶凝时间, 重复 6 次结果为 (5 ± 1) s, 表明其在 32 ℃ 凝胶速度较快。将凝胶分别放置于 25 ℃ 和 34 ℃ 2 周, 取出, 3000 r/min 离心 (离心半径为 6.30 cm) 10 min, 观察凝胶均无分层, 表明其性质稳定。

2.6.2 体外释药量的测定 精密称取 2 g CA&B-NPs/ISNG 置透析袋内, 悬于 200 mL 释放介质中, 于 32 ℃ 水浴以 150 r/min 振摇, 分别在 0.5、1、1.5、2、3、6、10、12、24 h 移取 2 mL 释放液 (V_n) 经 0.22 μm 滤过备用, 并及时补充同温度的释放介质 2 mL, HPLC 法测定释放液中绿原酸和黄芩苷质量浓度 (C_n), 按公式计算体外累积释放率 ($Q_{\text{绿原酸或黄芩苷}}$)。结果如图 4-a 所示, 前 6 h 释放较快, 绿原酸和黄芩苷累积释放率分别为 57% 和 41%, 随后 24 h 持续缓慢释药, 具有良好的缓释作用。绿原酸释放曲线与一级方程拟合度最好, $Q_{\text{绿原酸}} = 0.793 44 (1 - e^{-0.266 49 t})$, $R^2 = 0.950 1$; 黄芩苷释放曲线与 Higuchi 方程拟合度最好, $Q_{\text{黄芩苷}} = 0.157 82 t^{1/2} - 0.014 77$, $R^2 = 0.959 1$ 。

$$Q_{\text{绿原酸或黄芩苷}} = (C_n V_n + \sum_{i=0}^{n-1} C_i V_i) / W_n$$

W_n 是凝胶中绿原酸或黄芩苷的总含量

2.6.3 凝胶溶蚀量的测定 称取 CA&B-NPs/ISNG 1 g 置于已精密称定质量的离心管 (W_0) 中, 于 32 ℃ 水浴以 150 r/min 振摇使其完全形成凝胶后, 精密称定凝胶和离心管的总质量 (W_0)。加入同温度的生理盐水 1 mL, 继续恒温振荡, 分别于 15、30、45、60、90、120、180 min 将离心管中的溶液全部倾倒入, 精密称定剩余质量 (W_n), 并及时补充同温度的生理盐水 1 mL。2 个时间点的质量差即为溶蚀量

图4 凝胶释药曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Gel drug release profiles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$$Y = (W_0 - W_n) / (W_0 - W_1)$$

分别吸取上述时间点倾倒入的溶液于 5 mL 量瓶中, 加入甲醇稀释至刻度, 经 0.22 μm 滤过备用, HPLC 法测定释放液中绿原酸和黄芩苷质量浓度, 即体外累积释放率 ($Y_{\text{绿原酸或黄芩苷}}$) [18]。结果如图 4-b 所示, 绿原酸和黄芩苷的释放随凝胶的不断溶蚀同时进行, 表明药物释放速率主要受到凝胶溶蚀速率

的控制, 180 min 时绿原酸和黄芩苷累积释放率均超过 60%。回归方程分别为 $Y_{\text{溶蚀}} = 0.0045t + 0.0978$, $R^2 = 0.9646$; $Y_{\text{绿原酸}} = 0.0036t + 0.0846$, $R^2 = 0.9378$; $Y_{\text{黄芩苷}} = 0.0032t + 0.0791$, $R^2 = 0.9351$ 。

2.7 CA&B-NPs/ISNG 的鼻黏膜纤毛毒性评价

2.7.1 牛蛙上颌黏膜的直观考察 随机分为空白组、阳性组、空白凝胶组和 CA&B-NPs/ISNG 组, 每组 6 只牛蛙。固定牛蛙, 依次往每组牛蛙上颌黏膜处分别滴加 0.5 mL 生理盐水、1% 脱氧胆酸钠、空白凝胶和 CA&B-NPs/ISNG; 30 min 后, 用生理盐水洗净, 分离出黏膜约 2 mm×2 mm; 分离后立即洗净血迹等杂物, 纤毛面朝上平铺于载玻片上, 黏膜表面滴加适量生理盐水, 盖上盖玻片, 得样本玻片, 于显微镜下观察黏膜形态^[19]。

结果给予生理盐水的黏膜面齐整, 纤毛保存完好及其有序运动 (图 5-a); 给予 1% 脱氧胆酸钠 30 min 后观察到黏膜表面零碎残缺, 纤毛完全脱落, 已观察不到纤毛运动, 说明其对黏膜组织纤毛运动有严重影响 (图 5-b); 给予空白凝胶、CA&B-NPs/ISNG 的黏膜面较齐整, 纤毛数量较多, 个别纤毛运动略减弱, 表明 CA&B-NPs/ISNG 在一定程度上减弱纤毛运动, 但影响不大, 具有良好的安全性 (图 5-c 和图 5-d)。

2.7.2 纤毛持续运动时间和输送速率的测定 将“2.7.1”项的样本玻片置于蒸馏水饱和的密闭层析缸中, 温度 20~25 °C, 每隔 30 min 取出载玻片在显微镜下观察, 如纤毛继续运动则放回层析缸中, 直

至纤毛运动停止。记录从滴加药物开始至纤毛运动停止所持续的时间, 即纤毛持续运动时间 (persistent vibration duration, PVD), 给药组 PVD 除以空白组 PVD, 即得纤毛持续运动百分率。按“2.7.1”项方法, 将牛蛙分组给药, 5 min 后, 在上颌靠前方位置用棉签轻沾甲基红颗粒以作标记, 将刻度尺平行放置在旁观察, 甲基红颗粒将在黏膜表面缓慢向咽部移动划下明显痕迹, 记录颗粒移动 1 cm 所需时间, 即纤毛输送速率 (mucoiliary transport rate, MTR), 给药组 MTR 除以空白组 MTR, 即得纤毛输送速率百分率。结果如表 7 所示, 空白凝胶组和 CA&B-NPs/ISNG 组的 PVD 百分率小于 90, 说明凝胶对纤毛运动有一定影响, 可能与 P407、P108、壳聚糖等辅料具有黏度有关; 空白凝胶组和 CA&B-NPs/ISNG 组的 MTR 百分率大于 95, 说明 CA&B-NPs/ISNG 无明显纤毛毒性, 可用于鼻腔给药。

表 7 牛蛙上颌黏膜纤毛持续运动及纤毛输送速率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

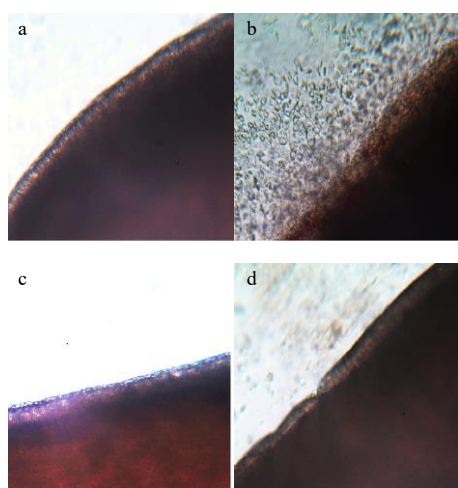
Table 7 Sustained movement and transport rate of cilia in bullfrog maxillary mucosa ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	PVD/min	PVD 百分率	MTR/ (cm·min ⁻¹)	MTR 百分率
空白	552.5±31.6	100.0	0.885±0.025	100.0
阳性	0	0	0	0
空白凝胶	491.7±18.2	89.0	0.850±0.033	96.0
CA&B-NPs/ISNG	485.8±23.3	87.9	0.843±0.031	95.2

2.8 CA&B-NPs/ISNG 的鼻黏膜免疫评价

2.8.1 UAID 小鼠模型的建立 随机分为空白组、模型组、银翘组、CA&B-NPs/ISNG 低剂量组和高剂量组, 共 5 组, 每组 8 只小鼠。除空白组外, 其余各组小鼠置-20 °C 寒冷环境 60 min, 1 次/d, 连续冷刺激 3 d, 以小鼠唾液中 SIgA 含量及溶菌酶活性作为评价指标, 建立 UAID 小鼠模型^[20-21]。

2.8.2 鼻黏膜给药 寒冷刺激前 1 h, 按小鼠体质量进行给药, 空白组和模型组滴鼻 5.0 μL/g 生理盐水, 银翘组 ig 21.84 g/kg 银翘散, 低剂量组及高剂量组分别滴鼻 2.5 μL/g 和 5.0 μL/g CA&B-NPs/ISNG; 第 3 天冷刺激后, 室温适应 60 min, 每只小鼠 ip 0.1% 毛果芸香碱注射液 0.5 mL, 2 min 后移取其唾液, ELISA 试剂盒测定唾液中 SIgA 含量和溶菌酶活性。结果如表 8 所示, 模型组与空白组小鼠相比, 唾液中 SIgA 含量和溶菌酶活性显著降低, 表明-20 °C



a-空白组 b-阳性组 c-空白凝胶组 d-CA&B-NPs/ISNG 组
a-blank group b-positive group c-blank gel group
d-CA&B-NPs/ISNG group

图 5 牛蛙上颌纤毛直观图 (×400)

Fig. 5 Visual diagram of bullfrog maxillary cilia (×400)

表 8 小鼠上呼吸道黏膜免疫功能 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 8 Mucosal immunity in the upper respiratory tract of mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量	SIgA/(g·L ⁻¹)	溶菌酶/(μg·L ⁻¹)
空白	—	4.89±0.46	7.67±1.50
模型	—	3.98±0.51 ^{##}	5.97±0.96 [#]
银翘散	21.84 g·kg ⁻¹	4.85±0.71 [*]	7.70±1.19 ^{**}
CA&B-NPs/ISNG	2.5 μL·g ⁻¹	4.47±0.64	7.11±0.76 [*]
	5.0 μL·g ⁻¹	4.89±0.63 ^{**}	7.46±1.49 [*]

与空白组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs blank group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

寒冷刺激可以建立小鼠上呼吸道黏膜免疫功能低下模型; CA&B-NPs/ISNG 高剂量组和银翘组小鼠, 与模型组小鼠相比, SIgA 含量、溶菌酶活性均有显著性升高, 而与空白组小鼠相比无显著差异, 表明高剂量 CA&B-NPs/ISNG 和银翘散均能抵抗寒冷刺激致上呼吸道黏膜免疫功能的下降; CA&B-NPs/ISNG 高剂量组与低剂量组相比, SIgA 含量、溶菌酶活性有升高趋势, 但无显著差异, 表明 CA&B-NPs/ISNG 发挥药效无显著剂量相关性。

3 讨论

金银花-黄芩 2 药配伍被广泛用于治疗上呼吸道感染, 如银黄、金花清感、清开灵、双黄连方等, 具备优良的抗感染能力。2 药常以整体使用, 也有以其有效成分使用, 在银黄注射液, 2 药有效成分绿原酸和黄芩苷以 1:1~1:2 质量比进行配伍用药。与全身给药治疗上呼吸道感染相比, 鼻腔给药方便并且作用可靠。鼻为肺之窍, 鼻作为身体与外界空气相通的器官, 是为肺把关的重要关卡, 同时, 成人近 80% 免疫细胞与黏膜表面相关, 鼻腔给药能够诱导全身和黏膜免疫反应, 增强机体抗感染能力。

人体鼻腔黏膜面积仅约 150 cm², 加上普通滴鼻剂给药滞留时间较短, 以及鼻腔黏膜纤毛清除作用, 会极大地限制鼻腔给药的疗效。壳聚糖具备高生物相容性和促渗透性, 其带正电荷的胺残基和带负电荷的鼻黏液层之间存在相互作用, 使之具有一定的黏附能力, 能够充当滴鼻制剂的优良载体材料; 温敏原位凝胶给药系统有着独特的鼻腔给药优势, 表现为在环境温度下呈流体状, 作为滴鼻制剂可高剂量精度给药, 在进入鼻腔后受鼻腔温度刺激迅速

经历液体-凝胶转变, 从而能够延长药物与黏膜的接触时间并能实现缓慢释放。因此本研究将绿原酸和黄芩苷共载于纳米粒, 结合温敏凝胶, 以期提高药物的鼻腔滞留能力。

鼻黏膜毒性评价是鼻腔给药安全性研究的重要内容。其中鼻黏膜毒性最常见的表现是鼻黏膜纤毛毒性, 主要是影响纤毛运动, 更甚者可导致纤毛脱落。牛蛙上腭的纤毛与哺乳动物的鼻腔黏膜纤毛相似, 因此, 常常用于代替哺乳动物的鼻腔黏膜纤毛毒性研究。SIgA 和溶菌酶是机体免疫防御重要成分, 前者可有效中和入侵病毒, 后者可引起细菌溶解^[22-23], 两者是 UAID 小鼠鼻黏膜免疫的重要评价指标。预实验中, 将制备好的 CGA-BC 纳米粒鼻腔原位凝胶以 5.0 μL/g 滴入 UAID 模型小鼠的鼻腔^[24], 观察发现其行为正常, 无明显不适, 试剂盒检测其唾液中 SIgA 含量和溶菌酶活性, 相比未滴鼻给药的模型小鼠有显著升高, 因此以 5.0 μL/g 作为鼻黏膜免疫评价实验的高剂量。

本研究所制备的 CA&B-NPs/ISNG 具有良好的生物相容性, 可延长药物的作用时间, 对寒冷刺激诱导小鼠上呼吸道黏膜免疫低下有提升的作用, 为临床用于防治 URTI 提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会, 中华医学会杂志社, 中华医学会全科医学分会, 等. 急性上呼吸道感染基层诊疗指南 (2018 年) [J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(5): 422-426.
- [2] 梅雪, 彭衡阳, 刘天强, 等. 上呼吸道感染研究综述 [J]. 亚太传统医药, 2012, 8(2): 187-188.
- [3] 李立浩, 陈利娟, 吴勇, 等. 鼻腔冲洗辅助治疗儿童急性上呼吸道感染的效果 [J]. 广东医学, 2015, 36(2): 219-221.
- [4] 栗昀, 赖艳妮, 李向阳, 等. 冰香散挥发油黏膜免疫抗流感病毒效果评价 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(4): 535-539.
- [5] Shibuya M, Tamiya S, Kawai A, et al. Nasal-subcutaneous prime-boost regimen for inactivated whole-virus influenza vaccine efficiently protects mice against both upper and lower respiratory tract infections [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 554: 166-172.
- [6] 冯群, 关永霞, 姚景春, 等. 银黄制剂抗感染作用与临床应用进展 [J]. 中国药物评价, 2020, 37(3): 211-214.
- [7] Li M W, Wang Y X, Jin J, et al. Inhibitory activity of honeysuckle extracts against influenza A virus *in vitro* and *in vivo* [J]. *Virol Sin*, 2021, 36(3): 490-500.

- [8] 樊荣, 羿国娟, 鲁兰, 等. 绿原酸及其 13 种体内主要代谢物的体外抗菌作用研究 [J]. 中草药, 2020, 51(24): 6239-6245.
- [9] 龙宇, 向燕, 谭裕君, 等. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6142-6148.
- [10] Chen J L, Xie H M, Chen D W, *et al.* Chlorogenic acid improves intestinal development via suppressing mucosa inflammation and cell apoptosis in weaned pigs [J]. *ACS Omega*, 2018, 3(2): 2211-2219.
- [11] Cheng K B, Wu Z H, Gao B L, *et al.* Analysis of influence of baicalin joint resveratrol retention enema on the TNF- α , SIgA, IL-2, IFN- γ of rats with respiratory syncytial virus infection [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(2): 1305-1309.
- [12] 王多伽, 畅丽芳, 迟玉杨, 等. 日粮中添加不同水平绿原酸对獭兔血清免疫指标的影响 [J]. 饲料研究, 2013(3): 33-36.
- [13] Cheng X Y, Cao Z Y, Luo J R, *et al.* Baicalin ameliorates APEC-induced intestinal injury in chicks by inhibiting the PI3K/AKT-mediated NF- κ B signaling pathway [J]. *Poult Sci*, 2022, 101(1): 101572.
- [14] 杨梦璐, 张娜, 王方远, 等. 壳聚糖在纳米药物递送载体领域的应用现状 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(28): 4546-4552.
- [15] 何朝星, 王欣, 高淑颖, 等. 白藜芦醇眼用纳米乳-离子敏感型原位凝胶的制备与质量评价 [J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(2): 124-131.
- [16] 吴瑛, 李阳, 李凤琴, 等. 黄芩苷壳聚糖纳米粒的制备及表征 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15): 15-19.
- [17] 孙健. 壳聚糖纳米粒的复合法制备及其在温敏凝胶中的应用 [D]. 南京: 南京师范大学, 2015.
- [18] 谢锦. 去氢骆驼蓬碱纳米晶体原位凝胶给药系统的构建及其鼻腔给药研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.
- [19] 谢伟容. 黄连解毒鼻用温敏凝胶对蟾蜍上颌黏膜纤毛毒性作用的研究 [J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31(2): 85-87.
- [20] 李爽, 杨居崩, 廖陈, 等. 解表方对寒冷刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下模型的作用 [J]. 中成药, 2022, 44(1): 227-230.
- [21] 李娟, 雷娜, 段小花, 等. 寒冷刺激致小鼠上呼吸道黏膜免疫功能低下模型的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(8): 1662-1664.
- [22] 关景平, 孔春燕, 李霞. 泻脾散加减对脾胃伏火型复发性阿弗他溃疡患者口腔菌群及唾液免疫指标的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(27): 3035-3039.
- [23] 刘洪, 李海文, 刘凤斌. 唾液成分与消化道疾病相关性研究及中医药防治思路 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(3): 460-465.
- [24] 陈秀秀, 周红霞, 元文宝, 等. 甘草酸联合利巴韦林体内抗甲型 H1N1 流感病毒作用 [J]. 药学报, 2015, 50(8): 966-972.

[责任编辑 郑礼胜]