

## • 药剂与工艺 •

## 关节腔注射剂青藤碱纳米晶自稳定 Pickering 乳液的制备及药效学研究

张筠昊<sup>1</sup>, 梁 霄<sup>1</sup>, 白皓天<sup>1</sup>, 李娅兰<sup>1</sup>, 孙淑慧<sup>1</sup>, 张倩倩<sup>1</sup>, 杨 婧<sup>2</sup>, 王 锐<sup>1,3\*</sup>

1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040
2. 黑龙江中医药大学基础医学院, 黑龙江 哈尔滨 150040
3. 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

**摘要:** **目的** 通过制备青藤碱纳米晶自稳定 Pickering 乳液 (sinomenine nanocrystals self-stabilized Pickering emulsions, Sin-NSSPE) 关节腔注射剂, 在关节腔内形成药物贮库, 缓慢释放以提高生物利用度, 降低药物毒副作用, 以青藤碱纳米晶 (sinomenine nanocrystal, Sin-NCs) 自身为稳定剂制备 Sin-NSSPE 关节腔注射剂, 用药效学实验考察其对类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的治疗效果。 **方法** 通过药物质量浓度、油水相比和水相 pH 值等因素对 Sin-NSSPE 进行优化, 运用福氏佐剂关节炎方法建立 RA 大鼠模型, 以关节肿胀度、关节炎指数、脾指数、酶联接免疫吸附剂测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、组织病理学检查、Western blotting 法作为指标进行检测。 **结果** 结果显示 Sin-NSSPE 的粒径均匀, 载药量良好, Sin-NCs 的平均粒径为 (121.49±18.26) nm、Sin-NSSPE 的粒径为 (159.60±160.15) nm、载药量 4.92 mg/mL; 药效学实验结果显示, 与青藤碱 ig 组相比, Sin-NSSPE 关节腔注射组能有效降低关节肿胀度和炎症指数, 改善滑膜组织的病变、抑制关节炎。青藤碱关节腔注射组和 Sin-NSSPE 关节腔注射组均能明显改善大鼠关节肿胀, 降低滑膜组织中炎症因子白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 且 Sin-NSSPE 关节腔注射组治疗效果优于青藤碱关节注射组, 同时剂型稳定性提高并形成药物贮库, 使药效更加平稳。 **结论** 制备的 Sin-NSSPE 性质稳定, Sin-NSSPE 关节腔注射对大鼠 RA 有良好的疗效。

**关键词:** 青藤碱; 纳米晶自稳定 Pickering 乳液; 关节腔注射; 类风湿性关节炎; 贮库效应; 巨噬细胞释药

**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)20-6412-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.013

## Preparation and pharmacodynamics of sinomenine nanocrystals self-stabilized Pickering emulsions injected into articular cavity

ZHANG Jun-hao<sup>1</sup>, LIANG Xiao<sup>1</sup>, BAI Hao-tian<sup>1</sup>, LI Ya-lan<sup>1</sup>, SUN Shu-hui<sup>1</sup>, ZHANG Qian-qian<sup>1</sup>, YANG Jing<sup>2</sup>, WANG Rui<sup>1,3</sup>

1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China
2. College of Basic Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China
3. Key Laboratory of Basic and Applied Research of Northern Medicine, Ministry of Education, Harbin 150040, China

**Abstract: Objective** Sinomenine nanocrystals self-stabilized Pickering emulsions (Sin-NSSPE) injection was prepared for joint cavity, and a drug depot was formed in the joint cavity, which was slowly released to improve the bioavailability and reduce the toxic and side effects of the drug. Sin-NSSPE injection was prepared with sinomenine nanocrystalline (Sin-NCs) itself as a stabilizer, and the therapeutic effect on rheumatoid arthritis (RA) was investigated by pharmacodynamic experiments. **Methods** Sin-NSSPE was optimized by factors such as drug concentration, oil-water ratio and pH of water phase, and RA model was established in SD rats with Freund's adjuvant arthritis method. Toe swelling, arthritis index, spleen index, histopathological examination and Western blotting

收稿日期: 2022-05-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074271); 国家自然科学基金资助项目 (81603418); 黑龙江省属本科高校中央支持地方高校改革发展项目 (2020YQ05)

作者简介: 张筠昊, 硕士研究生, 研究方向为新药及新剂型研究。Tel: 17745127916 E-mail: 1175389015@qq.com

\*通信作者: 王 锐, 教授, 硕士生导师, 博士, 研究方向为新药及新剂型研究。Tel: (0451)87266893 E-mail: wrdx@sina.com

method were used as indicators for detection. **Results** The results showed that Pickering emulsion had uniform particle size and good drug loading, the average particle size of Sin-NCs was  $(121.49 \pm 18.26)$  nm, the particle size of Sin-NSSPE was  $(159.60 \pm 160.15)$  nm, and the drug loading was 4.92 mg/mL. Pharmacodynamics experiments showed that, compared with the intragastric administration of sinomenine, Sin-NSSPE joint cavity injection group can effectively reduce joint swelling and inflammation index, improve synovial tissue lesions and inhibit joint inflammation. Both the sinomenine intra-articular injection group and the Sin-NSSPE intra-articular injection group could significantly improve the toe swelling of rats, reduce the expression of inflammatory factors and relieve the RA condition. However, the experimental results showed that Sin-NSSPE had a better therapeutic effect, and the stability of the dosage form was improved, which formed a drug reservoir, making the drug effect more stable. **Conclusion** The above results indicated that the prepared Sin-NSSPE had stable properties, and intra-articular injection of Sin-NSSPE had a good therapeutic effect on RA in rats.

**Key words:** sinomenine; submicron Pickering nanoemulsion; joint cavity injection; rheumatoid arthritis; reservoir effect; macrophage drug release

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性、侵袭性自身免疫疾病, 以对称性、破坏性的关节滑膜病变为主要特征, 病理性改变表现为滑膜炎, 急性期滑膜肿胀、渗出、中性粒细胞浸润<sup>[1]</sup>, 慢性期滑膜增生肥厚, 形成血管翳, 同时会导致关节变形、关节破坏和功能性障碍, RA 的发生是由很多因素导致<sup>[2-3]</sup>, 包括免疫因素、遗传因素、环境因素等, 并且对疾病机制还在不断地发展和研究之中。现阶段非甾体抗炎药是治疗 RA 的一线药物, 例如阿司匹林肠溶剂、吲哚美辛栓剂等, 但具有复杂的体内代谢过程, 使药物无法直接到达 RA 局部, 降低了药物治疗效果, 因此可直达病变部位、快速起效、毒副作用小、生物利用度高的剂型是 RA 药物研究的新方向。青藤碱是从防己科防己属植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 中提取出的生物碱单体, 具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、免疫调节等药理作用<sup>[4]</sup>, 被广泛应用于临床治疗 RA 和神经痛, 研究表明<sup>[5-6]</sup>, 青藤碱对运动系统炎症、消化系统炎症、神经系统炎症等疾病具有明确的治疗作用。其主要以口服和注射制剂应用于临床, 但存在着药物溶解度低、生物半衰期较短和生物利用度低等问题<sup>[5]</sup>, 且服用剂量大, 易引起胃肠道不良反应、肝肾损伤和严重的心脏毒性, 所以临床用药对给药剂量小、包封率和载药量高、生物半衰期长的制剂有着迫切的需求。

Pickering 乳液是以二氧化硅、纤维素纳米晶等固体颗粒作为稳定剂, 固体颗粒在油-水相之间的乳化层形成乳化膜来稳定乳滴, 进而阻止乳滴的聚集, 而药物纳米晶自稳定 Pickering 乳液 (nanocrystals self-stabilized Pickering emulsions, NSSPE) 则是以难溶药物固体颗粒自身作为稳定剂的乳液。NSSPE

药物输送系统优点具有小粒径、分散均匀度高、药物分散度高, 可提高肠胃膜的通透性, 促进药物吸收, 提高其生物利用度、延长生物半衰期、降低不良反应和毒性反应<sup>[7-9]</sup>, 同时药物固体颗粒作为稳定剂, 以油、水和药物为 3 相, 从而避免表面活性剂和异相稳定剂的药物毒性, 降低 Pickering 乳液的不良反应, 同时难溶性药物即溶解于油相, 也被乳化层所吸附, 发挥药物贮库效应提高载药量。NSSPE 自身可通过注射、透皮吸收等多种途径给药的独特优势, 使其在临床应用中有广阔的前景。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

ASP200S 型石蜡包埋机、RM2235 型切片机、HI1220 型烤片台、HI1220 型水浴缸、G1150 H 型加热石蜡包埋系统、DM3000 型显微镜, 德国 Leica 公司; Nano-ZS90 型粒径分析仪, 马尔文仪器有限公司; IID 型超声细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; FA30D 型小型高速剪切机, 上海弗鲁克科技发展有限公司; APV-1000 型高压均质仪, 北京汉默泰克流体技术有限公司; DF-101Z 型磁力搅拌器, 郑州长城科工贸有限公司; Waters H-Class e2695 型超高效液相色谱仪, 沃特世科技(上海)有限公司; TD5 型离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; SPARK 10M 型酶标仪, TECAN 公司; DY CZ-2DN 型电泳仪、WD-9405F 型脱色摇床、WD-9423B 型化学发光分析仪, 北京六一生物科技股份有限公司。

### 1.2 药品和试剂

青藤碱原料药 (批号 DT0110522A, 质量分数 98%), 购自陕西大田生物科技有限公司; 泊洛沙姆 (批号 C13279022)、氧化锆 (批号 C13665082) 购

自上海麦克林生化科技有限公司；中链脂肪酸甘油三酯（批号 G107437）、聚乙二醇硬脂酸酯（批号 P139716）、聚乙二醇 400（批号 P103735），购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；普朗尼克 F127（F127，批号 P822479）购自上海麦克林生化科技有限公司；青藤碱对照品（批号 B20995，质量分数 98%）、油酸聚乙二醇甘油酯（Labrafil M1944 CS，批号 S23148）购自上海源叶生物科技有限公司；弗氏完全佐剂（批号 SLCC73365），购自美国 Sigma 公司；灭活卡介苗佐剂（批号 R19017）购自上海瑞楚生物科技有限公司；苏木精-伊红染料（批号 ZM52036），购自上海紫铭试剂厂；白细胞介素-1（interleukin-1, IL-1, 批号 SP10178）ELISA 试剂盒、IL-6（批号 SP10234）ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子- $\alpha$ （tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , 批号 SP240246）ELISA 试剂盒，武汉赛培生物科技有限公司；ECL 超敏化学发光液试剂盒，批号 GC10AA0055，购自生工生物工程（上海）股份有限公司；BCA 试剂盒（批号 20220415），购自 Bio-Swamp Life Science Lab； $\beta$ -actin 抗体（批号 F200050）、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗（批号 F300508）购自 Abways Technology 公司；IL-1 $\beta$  抗体（批号#85m5763）、IL-6 抗体（批号#86m6953）、TNF- $\alpha$  抗体（批号#84g4358）购自 Affinity BiOSciences 公司。

### 1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，平均体质量 205.40 g，6 周龄，购自黑龙江中医药大学实验动物中心，许可证号 SYXK（黑）2022-006，经黑龙江中医药大学实验动物管理和使用委员会批准，编号为 2022032701。

## 2 方法和结果

### 2.1 青藤碱纳米晶（sinomenine nanocrystal, Sin-NCs）和 Sin-NSSPE 的制备

**2.1.1 Sin-NCs** 采用介质研磨法<sup>[10-11]</sup>制备 Sin-NCs，经预实验考察得到制备方法如下：称取青藤碱原料药 0.2 g 及稳定剂 F127 40 mg，置于 100 mL 烧杯中，加入 50 mL 超纯水、磁力转子及氧化锆（粒径在 0.4~0.6 mm），置于磁力搅拌器研磨 24 h，滤过除去氧化锆，将溶液在超声波细胞破碎仪中超声（1200 W，工作 5 s，间歇 5 s）30 min，即得 Sin-NCs 混悬液。

**2.1.2 Sin-NSSPE** 将按照“2.1.1”项下方法制备的 Sin-NCs 混悬液与 10 mL 中链脂肪酸甘油三酯混合，加入 1.0 mL Labrafil M1944 CS 和 100 mL 纯水，

使用高压剪切机 15 000 r/min 剪切 3 min，100 MPa 下循环均质 10 次，超声细胞破碎仪在油水相界面处探头超声 10 min，即得 Sin-NSSPE。

**2.1.3 空白 NSSPE** 在“2.1.2”项方法下，不加入 Sin-NCs 制备 NSSPE，即得到空白 NSSPE。

### 2.2 青藤碱含量测定

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Acquity UPLC HSS T<sub>3</sub>（50 mm×2.1 mm，1.8  $\mu$ m）；流动相为乙腈-水-乙二胺（30：70：0.25）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 262 nm；柱温 30  $^{\circ}$ C；进样量 10  $\mu$ L。

**2.2.2 对照品溶液的配制** 精密称取减压干燥至恒定质量的青藤碱对照品 10 mg，置于 100 mL 量瓶中，振摇得到质量浓度为 100  $\mu$ g/mL 对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的配制** 精密移取 Sin-NSSPE 100  $\mu$ L，甲醇定容至 10 mL 量瓶，得到供试品溶液。

**2.2.4 阴性对照溶液的配制** 将空白 NSSPE 经过“2.2.3”项方法处理，得到阴性对照溶液。

**2.2.5 专属性考察** 取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液，在“2.2.1”项色谱条件下各进样 10  $\mu$ L，记录色谱图（图 1），结果表明此色谱条件下，阴性对照溶液在青藤碱的保留时间内未出现色谱峰，表明其他成分对青藤碱的检测无干扰。

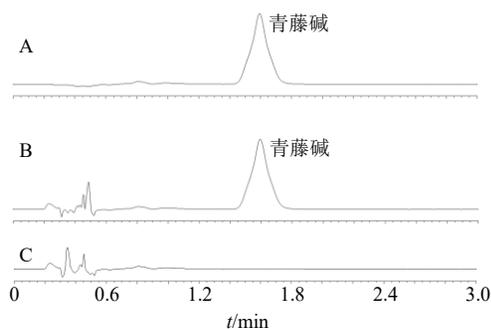


图 1 青藤碱对照品溶液 (A)、Sin-NSSPE 供试品溶液 (B) 和阴性对照溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of sinomenine control solution (A), Sin-NSSPE test solution (B), and negative control solution (C)

**2.2.6 线性关系考察** 取一定量的青藤碱对照品，使用甲醇稀释为质量浓度 5.2、2.6、1.04、0.52、0.104、0.052、0.031 2  $\mu$ g/mL 的系列对照品溶液，进样并记录色谱图。以峰面积值为纵坐标 (Y)，以进样质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归，求得回归方程  $Y=7\ 897.1 X+2\ 033.3$ ， $R^2=0.999\ 9$ ，结果表明，青藤碱在 0.031 2~5.20  $\mu$ g/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

**2.2.7 精密度试验** 取“2.2.6”项下高、中、低质

量浓度 (0.031 2、0.520 0、5.20 μg/mL) 的对照品溶液, 分别连续进样 5 次, 记录峰面积。计算得高、中、低质量浓度的对照品溶液中青藤碱峰面积的 RSD 依次为 1.14%、2.072%、2.52%, 表明仪器精密密度良好。

**2.2.8 重复性试验** 按照“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别进行测定, 记录峰面积, 计算得 Sin-NSSPE 中青藤碱质量浓度的 RSD 为 1.42%, 表明该方法重复性较好。

**2.2.9 稳定性试验** 按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在制备后 0、2、4、6、8、10、12、14 h 进样分析, 计算得青藤碱峰面积的 RSD 为 1.98%, 结果表明供试品溶液在 14 h 内稳定性良好。

**2.2.10 加样回收率试验** 精密吸取 Sin-NSSPE 和对照品溶液各 0.5 mL, 混匀, 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2.1”项色谱条件进行测定, 计算青藤碱加样回收率, 结果得到青藤碱的平均加样回收率为 99.17%, RSD 为 1.17%。

**2.3 Sin-NSSPE 乳化指数和粒径分布测定**

将新配制的 Sin-NSSPE 在 30 °C 条件下静置, 分别于 0、14 d 观察乳液的絮凝、分层等不稳定状态, 记录乳液层高度, 测得 0 d 样品总高度 ( $H_0$ )

和放置  $t$  h 后乳液层高度 ( $H_t$ ), 计算乳化指数 (creaming index, CI)。当乳液明显出现絮凝、分层、沉淀等现象时, 乳化指数为 0。

$$CI = H/H_0$$

在试管中加入 2 mL 新配置的 Sin-NSSPE, 并加入到 40 mL 纯化水中 (稀释 20 倍), 用激光粒度测定仪检测 Sin-NSSPE 粒径和粒径分布。

**2.4 Sin-NSSPE 处方工艺的单因素考察**

**2.4.1 不同油相种类对青藤碱溶解度的影响** 取肉豆蔻酸异丙酯、单油酸甘油酯、辛酸/癸酸甘油一酯二酯、油酸乙酯、中链脂肪酸甘油三酯各 3 mL, 加入过量青藤碱原料药, 超声处理 2 h, 离心 (转速 4000 r/min, 离心半径为 6.3 cm) 30 min, 取上清液置于 10 mL 量瓶中, 定容。以聚乙二醇硬脂酸酯和聚乙二醇 400 作为乳化剂和助乳化剂, 并按照 1:1 比例得到混合乳剂。设定油相和混合乳剂 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 的比例进行混合, 在磁力搅拌 (温度 37 °C) 的条件下缓慢滴加蒸馏水, 观察各体系溶液状态 (颜色、澄清度等) 的变化。记录溶液由澄清-浑浊-澄清所需的蒸馏水体积, 绘制混合乳化剂-油相-水的伪三元相图和 3D 图, 结果见图 2、3, 可见青藤碱在中

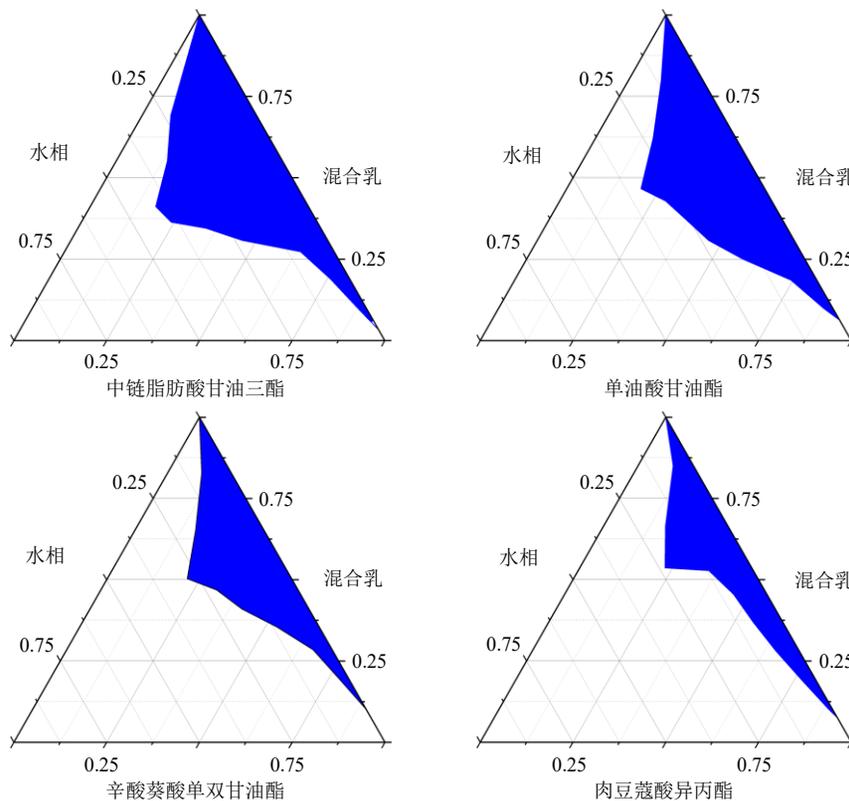


图 2 不同油相比率的伪三元相图

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagram of different oil phase ratios

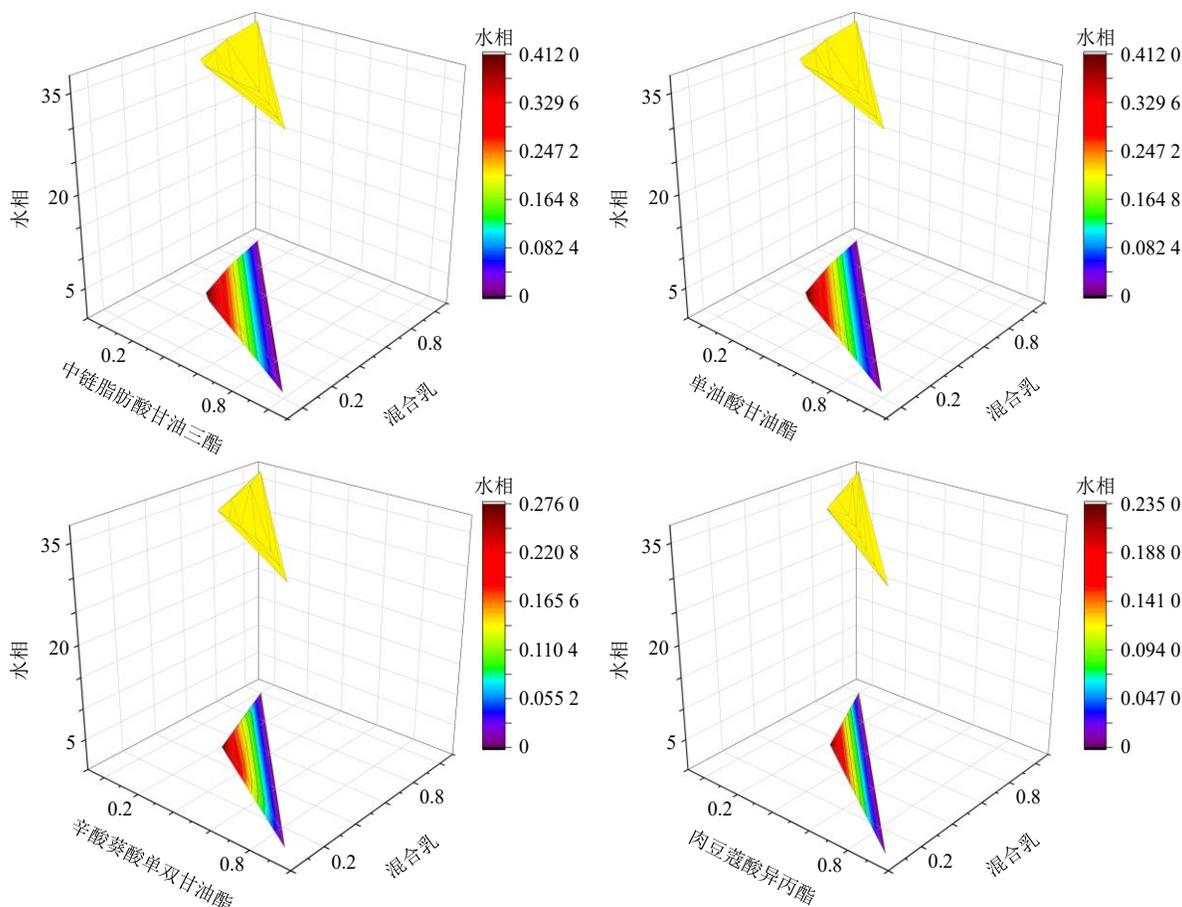


图3 不同油相比例的3D映射图

Fig. 3 3D mapping diagram of different oil phase ratios

链脂肪酸甘油三酯中具有良好的溶解度，以中链脂肪酸甘油三酯为油相制备 Sin-NSSPE。

**2.4.2 水相 pH 值对 Sin-NSSPE 的影响** 调节青藤碱粗混悬液 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0，制得不同 pH 值的 Sin-NCs。在不同 pH 值的 Sin-NCs 中加入中链脂肪酸甘油三酯制备 Sin-NSSPE，测定粒径分布和 ζ 电位。当 pH 值为 4 时，Sin-NSSPE 粒径为 1 159.60 nm，ζ 电位为 -32.36 mV，且随着 pH 值的升高，粒径不断增大，ζ 电位绝对值减小。原因可能是随着 pH 值的增加，青藤碱之间相互聚集增加，导致粒径增大。因此选择水相 pH 值为 4，粒径最小且均匀。结果见表 1。

**2.4.3 青藤碱质量分数对 Sin-NSSPE 的影响** 称取适量的青藤碱原料药，设定青藤碱粗混悬液的质量分数为 0.1%~2.0%，制备 Sin-NCs (pH 4)，并加入 5.5 mL 中链脂肪酸三酰甘油，按照“2.1.2”项下方法制得不同青藤碱质量分数的 Sin-NSSPE，以 CI 进行评价。结果如图 4 所示，青藤碱质量分数在 0.1%~0.5% 时，粒径下降趋势明显，质量分数在

表1 不同 pH 值条件下 Sin-NSSPE 的粒径和 ζ 电位 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

Table 1 Particle size and ζ potential of Sin-NSSPE under different pH conditions ( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

pH 值	粒径/nm	ζ 电位/mV
4	1 159.60 ± 160.15	-32.36 ± 1.08
5	1 316.93 ± 98.46	-30.72 ± 1.39
6	1 549.26 ± 183.61	-28.13 ± 1.26
7	1 873.52 ± 106.72	-26.23 ± 0.74

0.5%~2.0% 时，粒径并无明显的变化，放置后出现药物沉淀，是因为此时油水相载药层已达到饱和，导致药物析出降低了载药量。当青藤碱质量分数为 0.1%~0.5% 时，CI 出现明显下降，而青藤碱质量分数为 0.5% 时，CI 无明显变化。因此选择青藤碱质量分数为 0.5% 时，该质量浓度下粒径适宜，乳液稳定性最好，并且可以避免药物饱和析出提高载药量。

**2.4.4 油相比例对 Sin-NSSPE 构建的影响** 以油相占总体积的比例为考察因素进行单因素考察，称取青藤碱原料药制备 Sin-NCs (pH 4)，加入不同比例

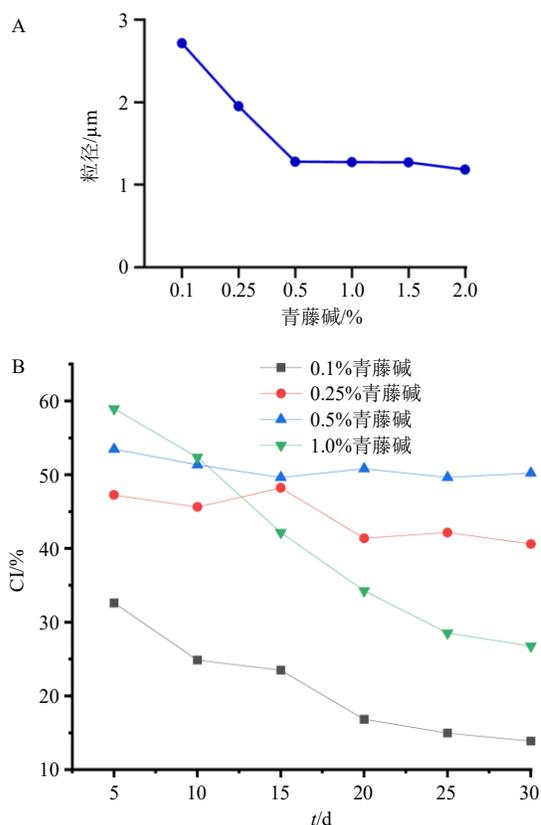


图4 青藤碱不同质量分数时 Sin-NSSPE 粒径变化 (A) 和 CI 时间变化 (B)

Fig. 4 Particle size change diagram (A) and CI time change diagram (B) of Sin-NSSPE under different concentrations

的甘油三酯,使油相占比分别为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5,参照“2.1.2”项下方法制备 Sin-NSSPE (含药量0.5%),通过 CI 进行评价。

结果(图5)表明,测得不同油相比例 Sin-NSSPE 的 CI 分别为 19.72%、38.67%、44.39%、52.16%、62.75%,放置 30 min 后分别为 5.12%、9.17%、32.55%、40.16%、17.25%。CI 随着放置时间的增加呈现降低趋势,当油相比例为 0.4 时,CI 变化平稳,乳液状态最稳定,说明油相比例过高时,破坏了乳液的整体稳定性,因此制备 Sin-NSSPE 油相比例为 0.4 时最佳。

### 2.5 最佳工艺确定和验证

期望以青藤碱溶解度处于最大值, Sin-NSSPE 的粒径和  $\zeta$  电位处于最小值,乳液稳定性良好为优化指标,最终确定 Sin-NSSPE 最佳的工艺条件是选择中链脂肪酸甘油三酯为油相,水和中链脂肪酸甘油三酯的质量比为 6:4,同时设定水相 pH 值 4 和药物质量分数为 0.5%。在该条件下青藤碱在中链脂肪酸甘油三酯中溶解性能最佳,粒径为 1 159.6 nm,

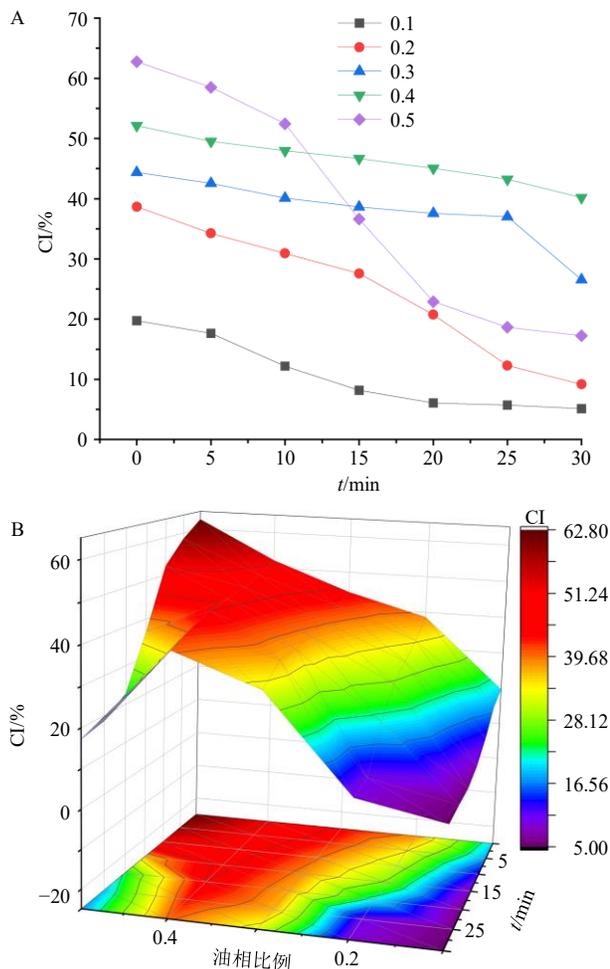


图5 不同油相比例的 CI 随时间变化 (A) 和 3D 曲面映射图 (B)

Fig. 5 Change of CI with time in different oil phase ratios (A) and 3D surface mapping (B)

$\zeta$  电位为  $-26.2 \text{ mV}$ ,乳液稳定性良好,说明单因素考察工艺优化是合理的。

对最佳工艺进行验证,进行 3 次重复测定,平均粒径为  $(1\ 086.70 \pm 66.30) \text{ nm}$  ( $n=3$ ), $\zeta$  电位为  $(-25.4 \pm 0.3) \text{ mV}$  ( $n=3$ ),表明所得结果合理。

### 2.6 Sin-NCs 和 Sin-NSSPE 质量评价

**2.6.1 Sin-NCs 粒径和多分散指数 (polydispersity index, PDI)** 制备 3 批不同批次的 Sin-NCs,分别取 Sin-NSs 适量,加水稀释 50 倍,采用激光粒度仪测定粒径和 PDI,取平均值,结果见图 6。粒径为  $(121.49 \pm 18.26) \text{ nm}$ ,PDI 为  $0.154 \pm 0.016$  ( $n=3$ ),表明 SIN-NSs 粒径均一,稳定性良好。

**2.6.2 Sin-NSSPE 与青藤碱普通乳液稳定性比较** 称取 0.2 g 的青藤碱原料药加入 5 mL 中链脂肪酸甘油三酯,1.0 mL Labrafil M1944 CS,0.5 mL 聚山梨酯-80,加入 50 mL 纯化水搅拌,使用高压剪切机

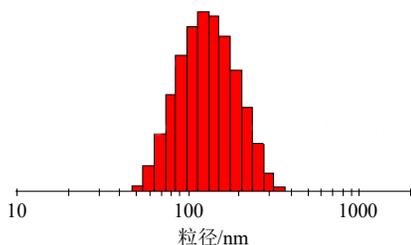


图6 SIN-NCs 粒径分布

Fig. 6 Diameter diagram of Sin-NCs

15 000 r/min 剪切 3 min, 100 MPa 下循环均质 3 min, 即得青藤碱普通乳液。

将新制备的 Sin-NSSPE 和青藤碱普通乳液在常温常压下密封保存, 静置 30 d。分别于 0、15、30 d 取出, 测定乳液 CI。结果 (表 2) 表明, Sin-NSSPE 以乳剂形态存在时间更长, 稳定性良好。

表2 Sin-NSSPE 和青藤碱普通乳液的 CI 比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 2 Comparison of CI of Sin-NSSPE and sinomenine ordinary milk ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

放置时间/d	CI/%	
	Sin-NSSPE	青藤碱普通乳液
0	65.15 ± 2.54	59.15 ± 1.87
15	62.49 ± 1.25	51.49 ± 2.15
30	60.12 ± 2.36	48.72 ± 1.13

**2.6.3 Sin-NSSPE 初步稳定性考察** 将 Sin-NSSPE 室温静置 30 d, 分别于 0、15、30 d 取出, 加入甲醇超声破乳并稀释定容后离心, 吸取上清液加甲醇稀释得到样品溶液, 0.22 μm 滤膜滤过, 测定青藤碱质量浓度。通过粒径等指标的变化, 初步考察 Sin-NSSPE 的常温放置稳定性。粒径、青藤碱质量浓度和 ζ 电位与 0 d 相比, 差异不具有统计学意义, 结果 (表 3) 表明, 30 d 内 Sin-NSSPE 常温常压下稳定性良好。

**2.7 Sin-NSSPE 药效实验**

**2.7.1 佐剂性关节炎大鼠模型的建立** SD 健康大鼠

表3 Sin-NSSPE 室温静置后的粒径、药物质量浓度、ζ 电位 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Particle size, drug concentration and ζ potential of Sin-NSSPE after standing at room temperature ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

放置时间/d	粒径/μm	青藤碱质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	ζ 电位/mV
0	1.58 ± 0.31	4.92 ± 0.31	-29.60 ± 2.21
15	2.21 ± 0.19	4.84 ± 0.42	-27.79 ± 1.76
30	2.45 ± 0.25	4.68 ± 0.26	-26.42 ± 1.83

25 只, 随机选取 5 只大鼠于右后足底 sc 0.1 mL 生理盐水, 剩余大鼠通过弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA, 10 mg/mL) 诱导法建立 RA 模型。当大鼠足部出现急性炎症肿胀, 全身性多发性的关节炎, 表现为前肢或对侧肢体甚至耳、尾部红肿或炎性结节出现, 表明造模成功。

**2.7.2 实验动物分组及给药方案** 注射生理盐水的 SD 大鼠设为对照组, 而注射 CFA 的大鼠分为 4 组, 即模型组、青藤碱混悬液 ig 组、青藤碱混悬液关节腔注射组和 Sin-NSSPE 关节腔注射组。模型组在造膜后不给药; ig 组在造膜 3 d 后 ig 青藤碱混悬液, 给药剂量为 18 mg/kg, 连续给药 28 d; 青藤碱混悬液关节腔注射组和 Sin-NSSPE 关节腔注射组, 于造膜 3 d 后在大鼠右后踝关节腔分别注射 50 μL 青藤碱混悬液和 Sin-NSSPE, 给药剂量为 1.2 mg/只, 每周给药 1 次, 连续 4 周。

**2.7.3 Sin-NSSPE 对大鼠体质量及关节肿胀度的影响** 将造膜当天定为第 1 天, 每隔 7 d 测量大鼠体质量。结果 (表 4) 表明, 各组大鼠体质量之间并无显著性差异。

参考文献方法<sup>[12]</sup>每隔 7 d 对大鼠的足容积进行测定, 按照公式计算关节肿胀度。结果 (表 5) 表明, 与对照组比较, 模型组关节肿胀度持续升高, 关节活动严重受限, 具有 RA 患者相似的病理学特征,

表4 Sin-NSSPE 对大鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Effects of Sin-NSSPE on body weight of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/(mg·只 <sup>-1</sup> )	体质量/g				
		1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照	0	205.15 ± 5.31	218.35 ± 8.69	225.69 ± 7.15	232.39 ± 5.16	236.23 ± 6.79
模型	0	202.39 ± 6.02	215.49 ± 9.15	219.42 ± 7.65	238.51 ± 6.21	246.15 ± 5.15
青藤碱混悬液 ig	3.8	208.59 ± 6.23	217.56 ± 7.19	227.83 ± 8.61	234.86 ± 4.54	241.37 ± 3.39
青藤碱混悬液关节腔注射	1.2	201.32 ± 5.72	213.55 ± 8.53	225.45 ± 6.39	239.12 ± 5.34	249.43 ± 5.79
Sin-NSSPE 关节腔注射	1.2	209.54 ± 4.95	221.41 ± 9.23	232.72 ± 6.47	239.72 ± 3.92	247.78 ± 6.24

表5 Sin-NSSPE对SD大鼠关节肿胀度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 5 Effect of Sin-NSSPE on joint swelling of SD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ (mg·只 <sup>-1</sup> )	关节肿胀度/%				
		1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照	0	1.59±1.20	2.14±1.14	1.86±1.39	2.35±1.55	2.08±1.99
模型	0	1.83±1.67	56.18±6.71**	62.52±8.61**	65.42±7.13**	58.71±7.90**
青藤碱混悬液 ig	3.8	1.64±1.16	52.57±7.75##	46.59±8.34##	48.16±9.25##	42.55±6.06##
青藤碱混悬液关节腔注射	1.2	2.15±1.36	50.72±7.96##	42.28±5.32##	41.26±6.59##	32.13±7.81##
Sin-NSSPE 关节腔注射	1.2	2.61±1.10	48.29±6.56##	37.67±7.35##	35.74±7.34##	22.59±7.61##

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 下表同  
\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group; same as below tables

表明造模成功。给药组均可显著降低大鼠关节肿胀度 ( $P < 0.01$ )。7 d后, Sin-NSSPE 关节腔注射组大鼠关节肿胀度低于青藤碱混悬液 ig 组和青藤碱混悬液关节腔注射组, 表明 Sin-NSSPE 关节腔注射治疗 RA 具有更显著的效果。

关节肿胀度=(造模后每周足容积-初始足容积)/初始足容积

**2.7.4 Sin-NSSPE对关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分的影响** 根据参考文献方法<sup>[13]</sup>, 采用关节炎评分及计数标准 (表6) 对大鼠进行 AI 评分 (右后足)。结果如表7所示, 与对照组相比, 模型组 AI 评分显著增高 ( $P < 0.01$ ), 表明模型成功; 与模型组相比, 各实验组大鼠 AI 评分呈现下降趋势 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 其中 Sin-NSSPE 关节腔注射组可更显著

降低 AI 评分 ( $P < 0.01$ ), 并抑制 RA 病情的进一步发展。

**2.7.5 Sin-NSSPE对大鼠脾指数的影响** ip 水合氯醛 (7%, 5 mL/kg) 麻醉大鼠, 立即取出脾脏洗净后, 滤纸吸干, 称定脾的质量, 计算大鼠的脾指数, 结果见表8。与对照组比较, 造模会刺激大鼠体内

表6 AI评分评价

Table 6 AI index evaluation

评分	症状
0	关节正常, 无肿胀
1	足趾关节或踝关节轻度肿胀
2	踝关节至跖关节或掌关节轻度肿胀
3	踝关节至跖关节或掌关节中度肿胀
4	全足严重肿胀, 关节僵直变形

表7 Sin-NSSPE对SD大鼠关节炎的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 7 Effect of Sin-NSSPE on joint inflammation in SD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ (mg·只 <sup>-1</sup> )	AI 评分				
		1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照	0	0	0	0	0	0
模型	0	0	2.45±0.57**	2.85±0.26**	3.45±0.56**	3.65±0.43**
青藤碱混悬液 ig	3.8	0	2.35±0.71#	2.57±0.42#	2.52±0.32##	2.32±0.25##
青藤碱混悬液关节腔注射	1.2	0	2.31±0.44#	2.16±0.33#	2.19±0.65##	1.87±0.37##
Sin-NSSPE 关节腔注射	1.2	0	2.32±0.55#	2.05±0.28##	2.08±0.41##	1.46±0.29##

表8 Sin-NSSPE对SD大鼠脾指数以及血清中IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 8 Effect of Sin-NSSPE on spleen index, and IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum of SD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ (mg·只 <sup>-1</sup> )	脾指数/ (mg·g <sup>-1</sup> )	血清细胞因子水平/(ng·L <sup>-1</sup> )		
			IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
对照	0	2.13±0.67	13.95±2.16	14.52±3.62	95.82±11.62
模型	0	3.57±0.54**	28.16±3.63**	19.97±5.43**	231.90±10.59**
青藤碱混悬液 ig	3.8	3.06±0.23##	21.35±2.56##	17.56±4.21##	152.73±15.99##
青藤碱混悬液关节腔注射	1.2	2.68±0.52##	19.53±2.50##	16.43±5.12##	141.09±9.65##
Sin-NSSPE 关节腔注射	1.2	2.46±0.38##	16.36±3.32##	15.19±3.55##	113.67±14.83##

免疫系统,使免疫细胞大量增殖,导致脾质量增加和脾损伤 ( $P<0.01$ ),而青藤碱混悬液 ig 组和青藤碱混悬液关节腔注射组可显著改善脾组织损伤程度 ( $P<0.01$ )。而 Sin-NSSPE 关节腔注射组的脾损伤程度最轻,趋近于对照组,表明 Sin-NSSPE 治疗作用良好且可显著改善大鼠脾损伤。

**2.7.6 大鼠血清中指标检测** 取大鼠血清,依照 ELISA 试剂盒说明书,检测大鼠血清中 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平,结果如表 8 所示。与对照组相比,模型组 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平显著升高

( $P<0.01$ ),表明造模成功;与模型组相比,实验组中 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达水平明显下降 ( $P<0.01$ ),而 Sin-NSSPE 关节腔注射组大鼠血清中 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量更趋近于对照组。

**2.7.7 踝关节滑膜组织病理形态学观察** 取各组大鼠膝关节滑膜组织,在 4%中性多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋后切片,苏木素-伊红 (HE) 染色,显微镜下观察组织病理变化。如图 7 所示,对照组滑膜组织形态完整,未见滑膜组织水肿及炎症细胞浸润,而模型组滑膜组织明显增生,且滑膜细胞发生

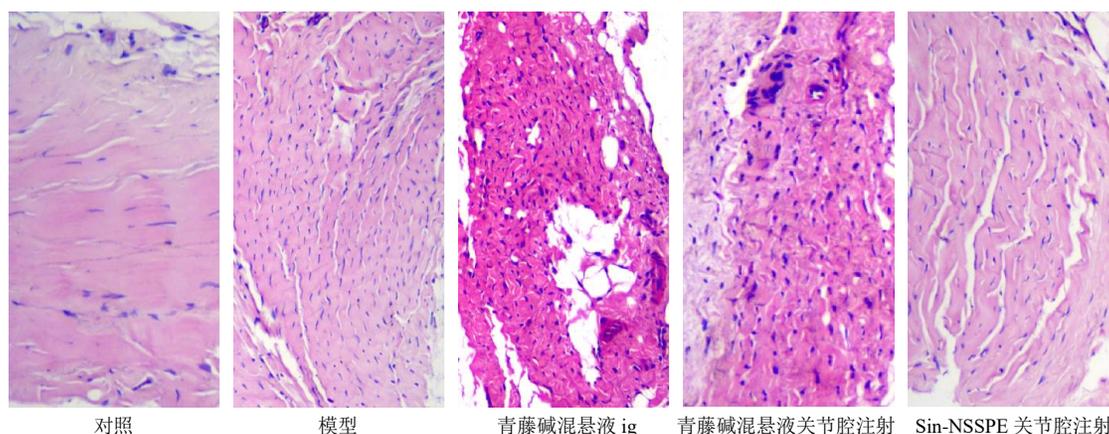


图 7 Sin-NSSPE 治疗 28 d 后 SD 大鼠关节滑膜的组织学分析

Fig. 7 Representative histological analysis of joint synovial tissues in SD rats after 28 d treatment of Sin-NSSPE

病理性改变,淋巴细胞发生浸润并伴随着血管翳的生成。与 ig 组和青藤碱关节腔注射组相比, Sin-NSSPE 注射组能降低组织水肿及炎症,抑制炎症细胞的浸润和血管翳的生成,与对照组水平相近。表明关节腔注射 Sin-NSSPE 对 RA 具有显著疗效,可使大鼠关节恢复正常的活动功能。

**2.7.8 Western blotting 检测滑膜组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达** 加入 RIPA 裂解液后,将滑膜组织进行研磨,冰上裂解 30 min, 10 000 r/min 离心 (离心半径为 6.3 cm) 30 min 提取总蛋白,用 BCA 法检测蛋白含量。蛋白变性后上样,进行 SDS-PAGE 电泳 (电压 80~110 V) 2 h,转膜 (电流 320 mA) 3 h,用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 一抗,4  $^{\circ}$ C 下培养 12 h, TBST 洗膜 3 次,加入二抗 (辣根过氧化物酶标记) 室温下孵育 2 h, TBST 洗膜后在 ECL 显影液中成像,Image J 软件获得实验结果。

如图 8 和表 9 所示,将内参蛋白的表达量设为 1,与模型组相比, Sin-NSSPE 关节腔注射组显著降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),

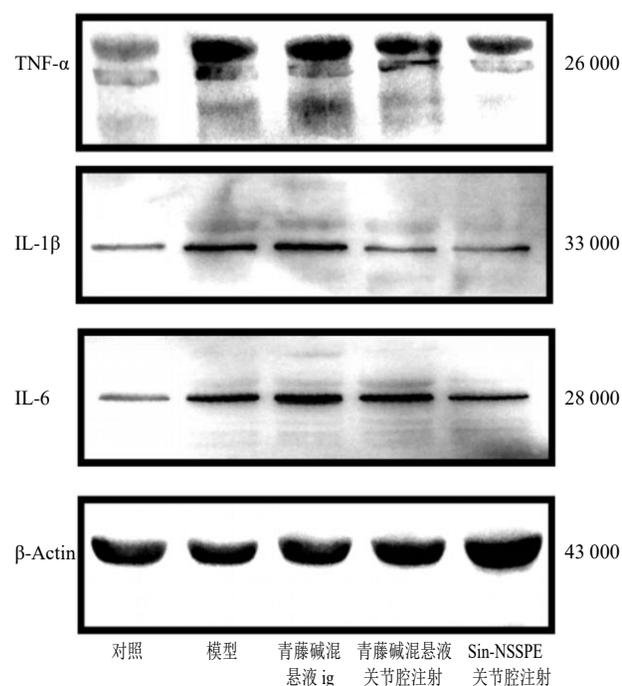


图 8 滑膜组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和  $\beta$ -actin 蛋白表达水平

Fig. 8 Expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and  $\beta$ -actin proteins in synovial tissue

表9 Sin-NSSPE对滑膜组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6表达分析( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Table 9 Analysis of expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in synovial tissue by Sin-NSSPE ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/ (mg·只 <sup>-1</sup> )	蛋白相对表达量			
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	$\beta$ -actin
对照	0	0.78 $\pm$ 0.02	0.63 $\pm$ 0.04	0.65 $\pm$ 0.01	1.00
模型	0	1.31 $\pm$ 0.03**	1.14 $\pm$ 0.01**	1.22 $\pm$ 0.03**	1.00
青藤碱混悬液 ig	3.8	1.25 $\pm$ 0.05	1.09 $\pm$ 0.04	1.26 $\pm$ 0.05	1.00
青藤碱混悬液关节腔注射	1.2	1.08 $\pm$ 0.02#	0.87 $\pm$ 0.01#	1.18 $\pm$ 0.04	1.00
Sin-NSSPE 关节腔注射	1.2	0.96 $\pm$ 0.06##	0.71 $\pm$ 0.02##	1.02 $\pm$ 0.04#	1.00

表明关节腔注射 Sin-NSSPE 可通过下调标志性蛋白的表达从而抑制 RA。

### 3 讨论

从青藤中提取出的青藤碱具有多种药理作用,它对 RA、肿瘤、心血管系统疾病等均具有较好的疗效<sup>[14-15]</sup>。但青藤碱口服给药方式具有药物利用度低、口服剂量大、不良反应增加等缺点,这限制了其对局部 RA 的治疗效果。而关节腔注射给药是指在关节腔直接给药,使药物积蓄在关节内,以恒定、接近恒定或需要的速度释药,在局部或者是全身维持药物有效浓度从而产生治疗效果,能避免口服给药引起的血药浓度峰谷和半衰期短等问题。本研究改变了传统给药方式,通过关节腔注射给药的方式,使药物迅速、高效的富集在病灶部位,从而提高了青藤碱的用药安全性,达到减毒增效的治疗目的。

本研究成功制备新的青藤碱剂型, Sin-NSSPE 剂型使药物利用度得到增加,究其原因,相比于青藤碱原料药,药物在 Sin-NCs 和 Sin-NSSPE 中以纳米形态存在,更有利于药物的吸收,从而增加了药物利用度,同时相较于 Sin-NCs,药物溶解于 Sin-NSSPE 油相中形成药物贮库效应,有更高的载药量的同时缓慢释放药物,提高了药物利用率。而相比于传统口服给药方式,关节注射给药使药物在关节腔内缓慢释放并增加滞留时间,获得了药物利用度和治疗效果的提高。而粒径是影响滞留时间的关键因素,同时研究表明,关节腔内药物粒径小于 250 nm,药物会直接在关节腔内逃逸,而过大的粒径会在关节腔内摩擦病理组织,导致关节腔内炎症进一步恶化<sup>[16-17]</sup>,而粒径在 1~4  $\mu$ m 时会被关节内的巨噬细胞所吞噬,药物可通过巨噬细胞系统的控制释放达到持续释放的目的。所以在巨噬细胞释药和贮库效应的双重作用下, Sin-NSSPE 可提高治疗效果,因此,在剂型制备过程中,对油相比例、水相 pH 值和青藤碱质量浓度进行单因素考察,以期实现最

小粒径和药物贮库效应,最佳工艺确定在水相 pH 值为 4 时粒径最小且均匀,中链脂肪酸甘油三酯比例为 0.5 和青藤碱质量分数为 0.5% 时,乳液稳定性和载药量最好。

本研究通过 SD 大鼠进行 CFA 造膜,评价和比较 Sin-NSSPE 注射组和其他给药组的抗炎效果,实验结果证明,与青藤碱的 ig 组和关节腔注射组相比, Sin-NSSPE 关节腔注射组药效指标存在显著性差异, Sin-NSSPE 注射组可显著降低大鼠关节肿胀度和 AI 水平,并改善脾组织损伤程度,显著性下调大鼠滑膜组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白的表达,同时有效缓解大鼠关节的组织水肿、关节炎和滑膜组织增生,控制了新血管的生成和炎症细胞的浸润,表明关节腔注射 Sin-NSSPE 可有效改善 RA 的病症,提高治疗效果,但对于注射 Sin-NSSPE 的安全性和体内药物代谢仍需进一步的研究。

Sin-NSSPE 的制备验证新剂型的可行性,推动青藤碱新剂型的发展,为临床用药提供更多选择,与其他纳米乳剂相比, Pickering 乳液剂避免了异种颗粒作为稳定剂从而降低了不良反应,同时在关节腔内形成药物贮库效应,缓慢释放药物以提高了药物疗效,因此对于青藤碱来说, NSSPE 是一种潜在的给药系统。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Smolen J S, Aletaha D, McInnes I B. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [2] McInnes I B, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [3] Scott D L, Wolfe F, Huizinga T W. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- [4] Yin N N, Xiong Y, Tao W T, et al. Sinomenine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42(2): 147-155.

- [5] 周莹莹, 刘宇灵, 林龙飞, 等. 青藤碱及其新剂型治疗类风湿性关节炎的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7709-7717.
- [6] 刘继红, 李卫东, 滕慧玲, 等. 青藤碱治疗类风湿性关节炎免疫作用和机制 [J]. 药学学报, 2005, 40(2): 127-131.
- [7] Wu J, Ma G H. Recent studies of Pickering emulsions: Particles make the difference [J]. *Small*, 2016, 12(34): 4633-4648.
- [8] 王艳华. 口服新剂型药物纳米晶自稳定 Pickering 乳用于通脉方组分中药的探索 [D]. 重庆: 西南大学, 2021.
- [9] Gokhale J P, Mahajan H S, Surana S J. Quercetin loaded nanoemulsion-based gel for rheumatoid arthritis: *In vivo* and *in vitro* studies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108622.
- [10] 申宝德, 连王权, 沈成英, 等. 微型化介质研磨法制备难溶性黄酮类化合物纳米混悬剂 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4413-4418.
- [11] 刘肖, 刘娟, 庞建云, 等. 微型化介质研磨法制备槲皮素纳米混悬剂 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(15): 2984-2988.
- [12] 林婉娜, 苏慧琳, 李慧敏, 等. 黄芪桂枝五物汤抗类风湿性关节炎的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 9-15.
- [13] Hu Y P, Yang Y, Luo B. Evaluation of destruction in a collagen-induced arthritis rat model: Bony spur formation [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3): 2563-2567.
- [14] Zhang M W, Wang X H, Shi J, *et al.* Sinomenine in cardio-cerebrovascular diseases: Potential therapeutic effects and pharmacological evidences [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 749113.
- [15] 姜宇懋, 王丹巧. 青藤碱抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(11): 1866-1870. 15
- [16] Levick J R. A method for estimating macromolecular reflection by human synovium, using measurements of intra-articular half lives [J]. *Ann Rheum Dis*, 1998, 57(6): 339-344.
- [17] Bonanomi M H, Velvart M, Stimpel M, *et al.* Studies of pharmacokinetics and therapeutic effects of glucocorticoids entrapped in liposomes after intraarticular application in healthy rabbits and in rabbits with antigen-induced arthritis [J]. *Rheumatol Int*, 1987, 7(5): 203-212.

[责任编辑 郑礼胜]