

## 荷载甘草酸 EL100-55/PLGA 肠溶纳米粒的制备及其对葡聚糖硫酸钠诱导结肠炎的治疗作用

田春雨, 秦之琦<sup>#</sup>, 汤洪萍, 郝吉福\*

山东第一医科大学(山东省医学科学院)药学院, 山东 泰安 271016

**摘要:** 目的 制备荷载甘草酸 Eudragit L100-55/聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物肠溶纳米粒 [glycyrrhizic acid loaded Eudragit L100-55/poly(lactic-co-glycolic acid) enteric nanoparticles, GA@EL100-55/PLGA NPs], 并考察其对葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导结肠炎模型小鼠的治疗作用。方法 采用复乳化溶剂蒸发法制备 GA@EL100-55/PLGA NPs, 并对其形貌、粒径大小、表面  $\zeta$  电位等理化性质进行表征; 以体质量及结肠长度变化为指标, 考察其对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠的治疗效果。以细胞膜红色荧光染料 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine,4-chlorobenzenesulfonate salt (DiD) 为探针, 探讨纳米粒在肠道的滞留情况。**结果** GA@EL100-55/PLGA NPs 外观呈圆球状, 平均粒径为 (166.0 $\pm$ 3.4) nm,  $\zeta$  电位为 (-7.17 $\pm$ 0.22) mV; 包封率及载药量分别为 (91.51 $\pm$ 0.26) % 和 (5.35 $\pm$ 0.01) %。体外释放结果提示, GA@EL100-55/PLGA NPs 具有 pH 值响应特性及缓释效果。药效学实验证明 GA@EL100-55/PLGA NPs 能够对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠具有保护作用。**结论** GA@EL100-55/PLGA NPs 为甘草酸在治疗溃疡性结肠炎提供新的递送形式。**关键词:** 甘草酸; 聚合物 Eudragit L100-55; 聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物; 纳米粒; 溃疡性结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 复乳化溶剂蒸发法

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)21-6734-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.010

## Preparation of glycyrrhizic acid-loaded EL100-55/PLGA enteric nanoparticles and evaluation of their effect on dextran sodium sulfate induced ulcerative colitis

TIAN Chun-yu, QIN Zhi-qi, TANG Hong-ping, HAO Ji-fu

School of Pharmacy, Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences), Taian 271016, China

**Abstract: Objective** To prepare glycyrrhizic acid loaded Eudragit L100-55/poly(lactic-co-glycolic acid) enteric nanoparticles, GA@EL100-55/PLGA NPs, and evaluate their effect on dextran sodium sulfate (DSS) induced ulcerative colitis. **Methods** GA@EL100-55/PLGA NPs were prepared by double-emulsion and solvent-evaporation method, and their physicochemical properties, such as morphology, particle size distribution as well as  $\zeta$  potential, were characterized; In light of the changes of body weight and colon length, the therapeutic effect on ulcerative colitis induced by DSS in mice was investigated. The retention of GA@EL100-55/PLGA NPs in the gastrointestinal tract was determined using 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine,4-chlorobenzenesulfonate salt (DiD) as fluorescent probe. **Results** The morphology of GA@EL100-55/PLGA NPs were spherical with the average particle size of (166.0 $\pm$ 3.4) nm and  $\zeta$  potential of (-7.17 $\pm$ 0.22) mV. The encapsulation efficiency and drug loadings were (91.51 $\pm$ 0.26)% and (5.35 $\pm$ 0.01)%, respectively. The *in vitro* drug release of GA@EL100-55/PLGA NPs showed pH-responsive and sustained release properties. In addition, pharmacodynamics experiments demonstrated that GA@EL100-55/PLGA NPs had better protection on DSS induced colitis model mice. **Conclusion** GA@EL100-55/PLGA NPs can provide a novel delivery system of glycyrrhizic acid for treatment of ulcerative colitis disease.

**Key words:** glycyrrhizic acid; Eudragit L100-55; poly(lactic-co-glycolic acid); nanoparticles; ulcerative colitis; dextran sodium sulfate; double-emulsion and solvent-evaporation method

收稿日期: 2022-05-22

基金项目: 山东第一医科大学 2021 年山东省大学生创新创业训练计划项目 (S202110439008)

作者简介: 田春雨 (1998—), 女, 硕士研究生, 从事药物新剂型与新技术研究。E-mail: 568508277@qq.com

\*通信作者: 郝吉福 (1976—), 男, 教授, 从事药剂学教学及药物新剂型研究与开发。E-mail: haojifu@163.com

#共同第一作者: 秦之琦 (2001—), 男, 本科生, 从事药物新剂型的研究。E-mail: 1025889216@qq.com

炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)为限定在回肠和结肠粘膜部位的慢性炎症疾病,根据炎症的发生位置和进展模式可分为克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC) 2 种类型,患者会出现腹痛、腹泻及血便等症状,甚至会恶变成直肠癌<sup>[1-2]</sup>。目前通常采用抗炎、免疫调节剂、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 抑制剂及抗生素等治疗 UC<sup>[3]</sup>,但存在较严重的不良反应和免疫原性,且复发率较高。甘草酸为甘草中的主要活性成分,具有抗炎镇痛、抗溃疡、抗氧化等作用<sup>[4-5]</sup>。然而口服递送甘草酸受肝脏首过效应及肠道黏膜的代谢会降低其疗效<sup>[6-8]</sup>。如何将甘草酸有效递送到炎症肠道部位,成为利用甘草酸治疗 UC 亟待解决的关键问题。

聚合物 Eudragit L100-55 (EL100-55) 为聚丙烯酸类肠溶材料,呈典型的 pH 值相关性,能够响应胃肠道生理环境,在较高的 pH 值下降解,调控药物在肠道释放。聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 作为生物可降解材料,具有缓释作用<sup>[9]</sup>。两者被广泛用作药物递送系统的载体材料<sup>[10-12]</sup>。纳米制剂可增加所承载药物的稳定性和溶解度,促进跨膜转运,提高其安全性和有效性。有研究证明纳米制剂在小鼠结肠炎模型中具有结肠部位聚集的特性<sup>[13-15]</sup>。因此,利用 EL100-55 及 PLGA 2 种材料制备荷载甘草酸的肠溶纳米颗粒,可实现药物在肠道的定位及控释释放,增强甘草酸对肠道炎症组织的渗透性和滞留性,实现对炎症性肠病的治疗。

本课题拟以甘草酸为模型药物,EL100-55 及 PLGA 分别作为肠溶材料及缓释载体材料,采用复乳化溶剂蒸发法制备荷载甘草酸的肠溶纳米粒 [glycyrrhizic acid loaded Eudragit L100-55/poly(lactic-co-glycolic acid) enteric nanoparticles, GA@EL100-55/PLGA NPs], 并对其理化性质表征。ig 给药后评价 GA@EL100-55/PLGA NPs 对 DSS 诱导小鼠 UC 模型的治疗作用,以期甘草酸治疗 UC 提供新的递送形式。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

BT25S 型电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司; EYELA FDU-1200 型冷冻干燥机,日本东京理化株式会社; 85-2 型恒温磁力搅拌器,金坛市城东新瑞仪器厂; UV-8000A 型紫外可见分光光度计,

上海元析仪器有限公司; Zetasizer 型纳米粒度和电位仪,英国马尔文公司; IRAffini 型傅里叶变换红外光谱仪,日本岛津株式会社制作所; JEM1200EX 型透射电子显微镜(TEM),日本 JEOL 公司; JY92-2D 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司; In-Vivo Master 型多区荧光成像光谱仪,武汉光映美科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

PLGA, 乳酸和羟基乙酸的质量比为 75 : 25, 相对分子质量 15 000~23 000, 批号 20200625, 购自济南岱罡生物工程有限公司; 聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA), 相对分子质量为 30 000~40 000, 批号 BCBG8296V, 购自默克 Sigma-Aldrich 公司; 甘草酸, 批号 E1909076, 相对分子质量 822.93, 购自上海阿拉丁试剂有限公司; 透析袋, 相对分子质量 8000~14 000, 批号 408D023, 购自北京索莱宝科技有限公司; EL100-55, 批号 B111204040, 购自 Evonik Industries AG 公司; 细胞膜红色荧光染料 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetra-methylindocarbocyanine,4-chlorobenzenesulfonate salt (DiD), 批号 10048, 购自上海睿铂赛生物科技有限公司; 葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium salt, DSS), 相对分子质量 40 000, 批号 20210126, 购自美伦生物技术有限公司。

### 1.3 动物

雄性 SPF 级健康昆明小鼠, 体质量 (22±5) g, 由山东省实验动物中心提供, 实验动物许可证号 SYXK(鲁)20120005。动物实验经山东第一医科大学实验动物临床委员会批准, 审查编号 W202203040129。

## 2 方法与结果

### 2.1 GA@EL100-55/PLGA NPs 的制备

采用复乳化溶剂蒸发法制备 GA@EL100-55/PLGA NPs<sup>[16-17]</sup>。将 50.0 mg EL100-55 及 100.0 mg PLGA 溶于无水乙醇和醋酸乙酯(体积比为 1 : 3)的混合溶剂中, 作为有机相; 将 10.0 mg 甘草酸溶于 1.0 mL 蒸馏水中, 调节 pH 值至 2.7, 作为水相, 在冰浴条件下, 将 2 相混合置于探头超声仪中, 超声 2 min (功率 400 W), 形成 W/O 型乳剂。随后将该 W/O 型乳剂分散到 10.0 mL 含有 0.5% PVA 的水溶液 (pH 4) 中, 继续超声 3 min (功率 400 W), 形成 W/O/W 型复乳, 置于磁力搅拌器上搅拌除去有机溶剂。随后采用 12 000 r/min 超速离心 15 min

去除游离药物, 将沉淀用蒸馏水洗涤 2 次, 即得 GA@EL100-55/PLGA NPs, 经冷冻干燥后备用。荷载甘草酸的 PLGA 纳米粒 (GA@PLGA NPs) 及荧光探针 DiD 的 PLGA 纳米粒 (DiD@PLGA NPs) 制备方法同上。所制备的纳米粒呈乳白色, 略带淡蓝色乳光, 具有明显的丁达尔效应, 外观如图 1 所示。

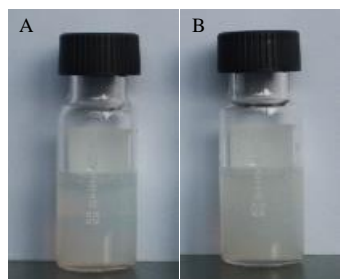


图 1 GA@EL100-55/PLGA NPs (A) 和 GA@PLGA NPs (B) 的外观特征

Fig. 1 Appearance of GA@EL100-55/PLGA NPs (A) and GA@PLGA NPs (B)

## 2.2 GA@EL100-55/PLGA NPs 理化性质表征

**2.2.1 粒径、 $\zeta$  电位及形貌观察** 所制备纳米粒的粒径、 $\zeta$  电位结果见图 2。GA@EL100-55/PLGA NPs、GA@PLGA NPs 的粒径分别为  $(166.0 \pm 3.4)$ 、 $(144.1 \pm 2.8)$  nm, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 分别为  $0.21 \pm 0.01$ 、 $0.12 \pm 0.03$ 。表明粒径大小均匀, 呈正态分布, 分散性良好。GA@EL100-55/

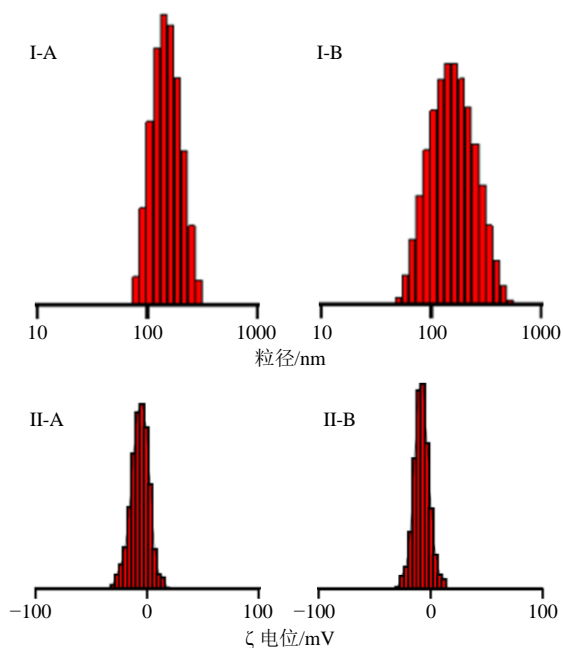


图 2 GA@PLGA NPs (A) 和 GA@EL100-55/PLGA NPs (B) 的粒径分布 (I) 和  $\zeta$  电位 (II)

Fig. 2 Particle size distribution (I) and  $\zeta$  potential (II) of GA@PLGA NPs (A) and GA@EL100-55/PLGA NPs (B)

PLGA NPs 的  $\zeta$  电位  $(-7.17 \pm 0.22)$  mV 低于 GA@PLGA NPs  $(-6.15 \pm 0.22)$  mV, 这与 EL100-55 带有较多的负电荷, 从而降低纳米粒的  $\zeta$  电位有关。

另将所制备的纳米粒滴于覆盖有碳膜的铜网上, 经 2% 磷钨钼酸负染后采用 TEM 观察形貌, 结果见图 3。所制备的纳米粒外观呈圆整、规则的球状结构, 表面无粘连。

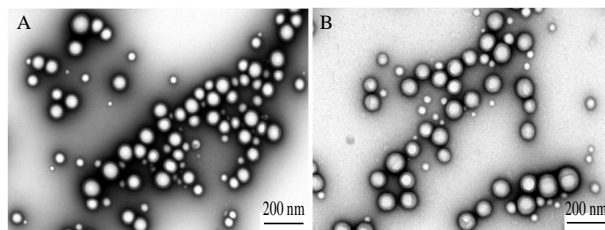


图 3 GA@PLGA NPs (A) 和 GA@EL100-55/PLGA NPs (B) 的形貌

Fig. 3 Morphology of GA@PLGA NPs (A) and GA@EL100-55/PLGA NPs (B)

**2.2.2 溶解性能评价** 根据 EL100-55 及 PLGA 在不同溶剂中溶解性能, 探讨 2 种载体材料在纳米颗粒表面的分布情况。取 5.0 mg 所制备的 GA@EL100-55/PLGA NPs 和 GA@PLGA NPs 冻干粉, 分别加入到无水乙醇和醋酸乙酯中, 涡旋混匀后观察在不同溶剂中的溶解情况。

结果表明 GA@EL100-55/PLGA NPs 冻干粉在无水乙醇部分溶解, 呈现浑浊状态, 在醋酸乙酯中不能溶解, 溶液呈无色透明, 纳米粒沉降在底部; 而 GA@PLGA NPs 的溶解性则相反, 在无水乙醇中不溶, 在醋酸乙酯中全部溶解。这与 EL100-55 能够溶于无水乙醇而不溶于醋酸乙酯, PLGA 溶于醋酸乙酯而不溶于无水乙醇有关, 表明纳米粒的表面存在 EL100-55, 能够赋予纳米粒肠溶性能。

**2.2.3 包封率及载药量的测定** 采用超速离心法测定纳米粒的包封率及载药量<sup>[18-19]</sup>。分别精密量取 2.0 mL GA@EL100-55/PLGA NPs 及 GA@PLGA NPs 混悬液, 各加入 0.3 g 硫酸铵沉淀纳米粒, 10 000 r/min 离心 (离心半径 5 cm) 15 min, 于 252 nm 处测定上清液的吸光度 (A) 值, 根据标准曲线方程  $A = 12.792 C - 0.005 4$  ( $r^2 = 0.999 6$ ) 计算甘草酸质量, 作为未被包封的游离药物量 ( $W_1$ ); 制备纳米粒时甘草酸的总投药量为  $W_0$ ,  $W_1$  为 GA@EL100-55/PLGA NPs 或 GA@PLGA NPs 的总质量。根据下列公式计算包封率和载药量, 结果见表 1。

$$\text{包封率} = (W_0 - W_1) / W_0$$

表 1 包封率和载药量测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Results of encapsulation efficiency and drug loading ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

制剂	包封率/%	载药量/%
GA@EL100-55/PLGA NPs	91.51±0.26	5.35±0.01
GA@PLGA NPs	84.70±2.21	6.71±0.03

$$\text{载药量} = (W_0 - W_1) / W_1$$

与 GA@PLGA NPs 相比较, GA@EL100-55/PLGA NPs 具有较高的包封率, 与其制备过程中调节 pH 值有关。通过调节内水相 pH 值至 2.7, 可抑制甘草酸解离, 使其以分子形式包载到聚合物材料中, 并防止药物泄漏到外水相中; 调节外水相 pH 值至 4 可防止 EL100-55 因 pH 值过高而发生解离。

**2.2.4 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析** 精密称取 2.0 mg 甘草酸、PLGA、EL100-55 及 GA@EL100-55/PLGA NPs 冻干品, 与 20 mg KBr 研磨混匀后压片, 在 400~4000  $\text{cm}^{-1}$  进行 FTIR 扫描, 结果见图 4。可知, 甘草酸的 O-H 键伸缩振动在 3401  $\text{cm}^{-1}$  附近存在较宽的伸缩振动峰, 在 2947、2855  $\text{cm}^{-1}$  处为  $-\text{CH}_2$  不对称伸缩振动峰, 1730、1646  $\text{cm}^{-1}$  为 C=O 的伸缩振动峰, 1459  $\text{cm}^{-1}$  为  $-\text{CH}_2$  的弯曲振动峰, O-H 平面弯曲在 1279、1032  $\text{cm}^{-1}$  为仲环醇 C-O 的特征吸收峰, C-C 峰在 979、700  $\text{cm}^{-1}$  处, N-H 弯曲振动在 615  $\text{cm}^{-1}$  处。PLGA 的 FTIR 图谱在 3517  $\text{cm}^{-1}$  处为羟基中 O-H 键伸缩振动峰, 2926、2855  $\text{cm}^{-1}$  处为 C- $\text{CH}_2$  振动峰, 1746、1629  $\text{cm}^{-1}$  处为 C=O 峰, C-OH 面内弯曲在 1427  $\text{cm}^{-1}$ 。EL100-55 聚合物在 1357、1427  $\text{cm}^{-1}$  处有 C-H 振动峰。GA@EL100-55/

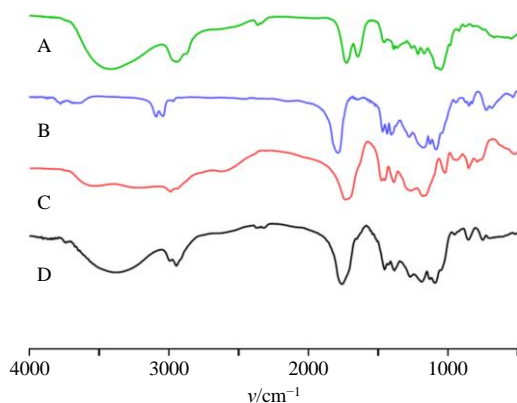


图 4 甘草酸 (A)、PLGA (B)、EL100-55 (C) 及 GA@EL100-55/PLGA NPs (D) 的 FTIR 图谱

Fig. 4 FTIR spectra of glycyrrhizic acid (A), PLGA (B), EL100-55 (C) and GA@EL100-55/PLGA NPs (D)

PLGA NPs 的 FTIR 图谱显示, 在 3383  $\text{cm}^{-1}$  处 O-H 吸收峰变宽, 在 1037  $\text{cm}^{-1}$  处显示仲环醇 C-O 的伸缩振动峰, 2 者为甘草酸的特征峰。同时在 1300~1400  $\text{cm}^{-1}$  处出现 EL100-55 的特征峰以及 PLGA 与 EL100-55 的叠加峰。提示药物与聚合物之间良好的相容性, 能够被包载到聚合物中形成骨架型纳米粒。

**2.2.5 体外释药性能研究** 采用透析法考察所制备纳米粒的体外释放行为, 以评价其是否具有 pH 值响应性的释放特征<sup>[20]</sup>。精密量取 GA@EL100-55/PLGA NPs 和 GA@PLGA NPs 混悬液各 2.0 mL, 封装于预处理好的透析袋中, 先将其浸入 50 mL 人工胃液 (pH 值为 1.2) 中, 并置于 37 °C 恒温空气振荡浴内, 调节振荡频率为 100 r/min, 在 0~2 h 时间间隔内, 分别于 0.5、1.0、2.0 h 吸取释放介质 2.0 mL, 在 2.0 h 后取出透析袋并用蒸馏水冲洗 2 次以除去残留的人工胃液。随后将透析袋转移到 50 mL 人工肠液中 (pH 值为 7.4), 分别于 4、6、24、48、72 h 取样 2.0 mL, 每次取样后补加等量的释放介质。于 252 nm 处测定各时间点释放介质中甘草酸的 A 值根据下列公式计算甘草酸的体外累积释放率 ( $Q_n$ )。

$$Q_n = (V_0 C_n + V \sum_{i=1}^{n-1} C_i) / W$$

$Q_n$  为药物不同时刻的累积释放率,  $V_0$  为释放介质的总体积,  $n$  为取样次数,  $C_i$  为第  $i$  次取样时测得的药物质量浓度,  $V$  为每次取样体积,  $W$  为投入药物总质量

体外药物释放结果如图 5 所示, 当释放介质为 pH 1.2 的人工胃液时, 在 0~2 h 内, GA@EL100-55/PLGA NPs 2 h 累积释放率仅为 3.71%, 而 GA@PLGA NPs 的累积释放率可达到 17.80%, 这与 GA@EL100-55/PLGA NPs 表面存在着肠溶材料有关, 在酸性环境下不降解而阻滞药物释放。当释放介质替

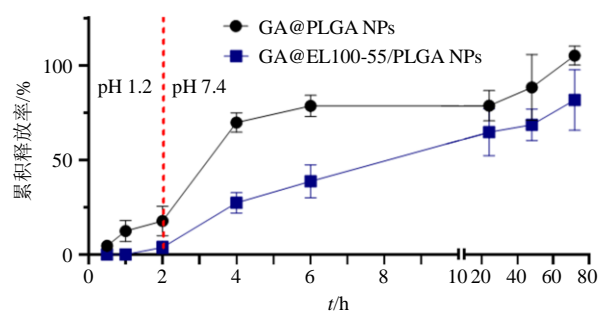


图 5 GA@EL100-55/PLGA NPs 和 GA@PLGA NPs 体外释放特性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 *In vitro* release of GA@EL100-55/PLGA NPs and GA@PLGA NPs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

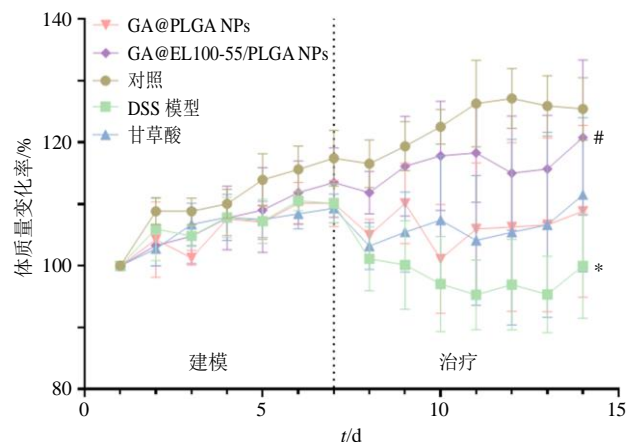


换为 pH 值 7.4 人工肠液时, GA@EL100-55/PLGA NPs 的累积释放率呈持续增加趋势, 这与肠溶材料溶解导致药物释放有关, 表现出与 pH 值相关的释放特征。

### 2.3 GA@EL100-55/PLGA NPs 对 DSS 诱导 UC 的治疗作用

**2.3.1 实验动物分组及模型的建立** 将实验小鼠随机分为 5 组, 每组 6 只, 即对照组、DSS 模型组、甘草酸组、GA@PLGA NPs 组和 GA@EL100/PLGA NPs 组, 适应喂养 1 周后进行实验。除对照组给予蒸馏水外, 其他各实验组连续 7 d 自由饮用 4% DSS 溶液, 以建立小鼠 UC 模型。从第 8 天开始撤去 4% DSS 溶液, 更换为蒸馏水, 随后甘草酸组、GA@PLGA NPs 组和 GA@EL100/PLGA NPs 组按照 10 mg/kg 的剂量每日 ig 给药 1 次, DSS 模型组按照等剂量每日 ig 蒸馏水 1 次, 连续 7 d。

**2.3.2 小鼠日常状况观察** 实验进行期间, 观察各实验组小鼠的活动情况、精神状态、饮食饮水情况、体质量变化、粪便状态及是否有便血等异常情况。将每只小鼠体质量与其初始时的体质量进行比较, 记录各组小鼠每日体质量变化率。如图 6 所示, 从各组小鼠体质量变化情况可见, 对照组小鼠在整个实验过程中体质量呈增加趋势。在建模过程中, 各实验组之间体质量没有组间差异。实验结束时, 与对照组相比, DSS 模型组体质量显著减轻 ( $P < 0.05$ ), 并出现稀溏便。在治疗过程中, 与 DSS 模型组比较, 甘草酸组、GA@PLGA NPs 组和 GA@EL100/PLGA NPs 组小鼠体质量均有所增加, 其中经 GA@EL100-55/PLGA NPs 治疗后小鼠体质量显



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 DSS 模型组比较: # $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs DSS model group

图 6 小鼠体质量变化情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 6 Body weight assessment of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

著增加, 表现出较好的治疗效果 ( $P < 0.05$ )。

**2.3.3 组织标本的收集及评估** 药物干预结束后, 将各组小鼠脱颈椎处死, 剪开腹腔, 分取胃至肠道末端的组织, 测量从回盲部到肛门边缘的结肠长度并称定质量, 以结肠长度及结肠质量与长度比的变化作为炎症评价的指标。由于脾脏作为炎症调节的重要器官, 其质量变化也可作为衡量炎症程度的指标。取各组小鼠脾脏并称定质量, 以脾脏质量/体质量计算脾脏系数<sup>[21-22]</sup>。脾脏质量变化结果见表 2, 与对照组比较, DSS 模型组小鼠脾脏质量明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与 DSS 模型组比较, 各给药组脾脏质量均有所减小, 相对于 GA@PLGA NPs 组和甘草酸组, GA@EL100-55/PLGA NPs 组的脾脏质量减小的更明显, 且与 DSS 模型组的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, DSS 模型组的脾脏系数明显增加 ( $P < 0.05$ ), 提示 DSS 能够诱导炎症; 与 DSS 模型组比较, 各给药组脾脏系数均有所减小, 相对于 GA@PLGA NPs 组和甘草酸组, GA@EL100-55/PLGA NPs 组的脾脏系数减小的更明显, 且与 DSS 模型组的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 这表明其对结肠炎症具有较好的免疫调节作用, 有效地降低结肠炎症程度。

小鼠结肠长度变化情况见表 3。与对照组相比,

表 2 小鼠脾脏变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Changes of mouse spleen ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	脾脏质量/g	脾脏系数
对照	0.112 ± 0.027	0.048 7 ± 0.014 2
DSS 模型	0.224 ± 0.043**	0.098 9 ± 0.015 4*
GA@EL100-55/PLGA NPs	0.147 ± 0.019#	0.058 7 ± 0.004 3#
GA@PLGA NPs	0.184 ± 0.019	0.077 8 ± 0.009 8
甘草酸	0.188 ± 0.012	0.079 2 ± 0.003 2

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与 DSS 模型组比较: # $P < 0.05$ , 下表同

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs DSS model group, same as below tables

表 3 小鼠结肠变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Changes of mouse colon ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	结肠长度/cm	结肠质量与长度比/(g·cm <sup>-1</sup> )
对照	10.40 ± 0.85	0.137 3 ± 0.014 3
DSS 模型	6.33 ± 1.10**	0.229 6 ± 0.040 5*
GA@EL100-55/PLGA NPs	8.93 ± 0.38#	0.156 0 ± 0.012 8#
GA@PLGA NPs	7.33 ± 0.95	0.189 8 ± 0.030 2
甘草酸	6.77 ± 1.25	0.205 1 ± 0.044 8

DSS 模型组小鼠结肠长度明显缩短 ( $P < 0.01$ )。与 DSS 模型组相比, 给予 GA@EL100-55/PLGA NPs 治疗后结肠变化具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 不论结肠长度还是结肠质量/长度都更接近于对照组, 表明给予 GA@EL100-55/PLGA NPs 能有效减轻结肠炎症的程度。

### 2.4 GA@EL100-55/PLGA NPs 胃肠道的滞留

为示踪口服给药后纳米粒在胃肠道的行为, 以 DiD 为荧光探针, 制备 DiD@EL100-55/PLGA 和 DiD@PLGA NPs<sup>[23]</sup>。小鼠 ig 给予荷载荧光探针的纳米粒后, 分别于给药 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 h

处死, 分取胃至肠道末端部分, 采用荧光成像仪观察纳米粒在小鼠胃肠道不同位置的滞留情况 (激发波长 644 nm/发射波长 664 nm), 以评估纳米粒在消化道内的分布, 结果见图 7。由图 7 可知, 随时间推移, 荧光探针会从胃部向肠道转运。DiD@PLGA NPs 在胃部显示出较强的荧光, 这与 DiD@PLGA 在胃中降解导致荧光探针 DiD 释放有关。在 0~2 h 内, DiD@EL100-55/PLGA NPs 在胃部的荧光强度较弱, 表明其在胃部不发生降解, 而在 4 h 时结肠部位显现较强荧光信号, 表明 DiD@EL100-55/PLGA NPs 能够在结肠部位定位释放。

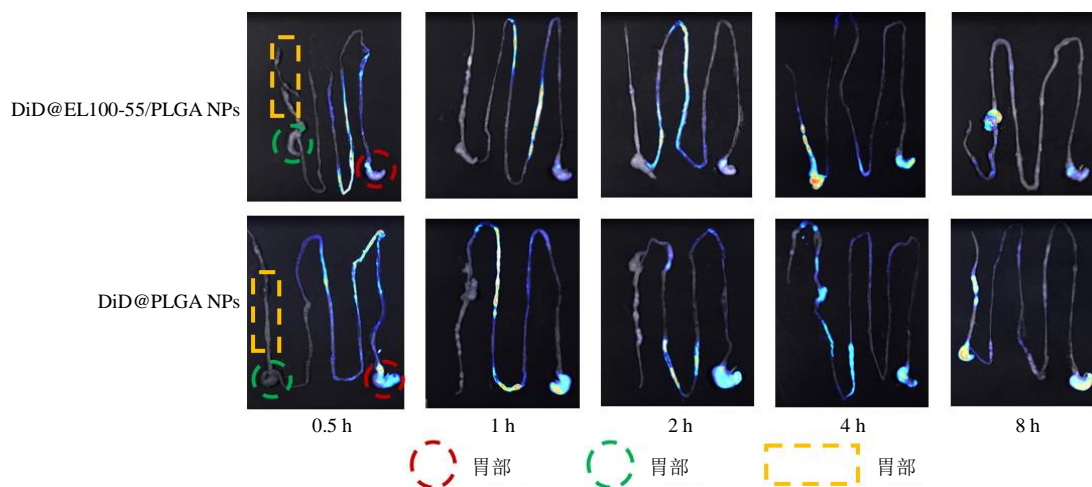


图 7 小鼠胃肠道部位荧光成像

Fig. 7 Fluorescence imaging in mouse gastrointestinal tract

上述结果证实了 DiD@EL100-55/PLGA NPs 能够避免药物在胃部的降解, 通过响应 pH 值的变化到达肠道释放药物, 实现定位释放的目的。

### 3 讨论

甘草酸具有黏膜保护、抗氧化和抗炎等作用<sup>[24]</sup>, 然而口服递送甘草酸胃肠道 pH 值、首过效应及在肠道代谢的影响, 常规制剂难以有效地将甘草酸递送药物到炎症结肠部位, 无法达成对 UC 的有效治疗, 如何将甘草酸递送到炎症肠道部位并防止其代谢成为亟待解决的关键问题。因此, 实现靶向定位给药, 成为治疗 UC 的关键策略。本实验通过复乳化溶剂蒸发法构建 GA@EL100-55/PLGA NPs, 利用纳米制剂的纳米尺度效应能够促进纳米粒在炎症结肠部位聚集性及渗透性; 同时, 借助于 EL100 及 PLGA 分别作为肠溶材料及缓释材料, 可减少药物在胃部的释放, 使更多药物到达结肠部位, 并借助 PLGA 实现缓释效果, 进而提高疗效。

溶解性实验和红外光谱分析证明, GA@EL100-

55/PLGA NPs 表面存在 EL100, 且药物与聚合物之间具有良好的相容性, 能够被包载到聚合物中形成骨架型纳米粒。在模拟胃肠道 pH 值环境的体外药物释放结果表明, GA@EL100-55/PLGA NPs 能有效减少在胃部环境 (pH 1.2) 的药物突释, 并在结肠环境 (pH 7.4) 下持续释放药物直至完全。采用小动物成像实验证明了 GA@EL100-55/PLGA NPs 结肠靶向的趋势, 提示 GA@EL100-55/PLGA NPs 能够在结肠部位聚集, 并达到药物缓释作用。药效学实验结果表明, GA@EL100-55/PLGA NPs 能够对 DSS 诱导的结肠炎模型小鼠产生保护作用, 结肠长度、脾脏指数等结果显示良好的抗炎作用。

综上所述, GA@EL100-55/PLGA NPs 可以根据结肠 pH 值环境实现结肠定位释放药物, 其缓释作用可使药物延长治疗结肠黏膜炎症的时间, 因而, 利用 2 种不同性质的聚合物材料制备成纳米粒, 可以赋予纳米粒具有缓释与定位的双重功能, 能够为结肠炎症疾病的治疗提供了新的递送方式。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Sairenji T, Collins K L, Evans D V. An update on inflammatory bowel disease [J]. *Prim Care*, 2017, 44(4): 673-692.
- [2] Faye A S, Dodson J A, Shaikat A. Safety and efficacy of anti-TNF therapy in older adults with ulcerative colitis: A new path forward [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(6): 1762-1764.
- [3] Danese S, Vuitton L, Peyrin-Biroulet L. Biologic agents for IBD: Practical insights [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(9): 537-545.
- [4] 罗子宸, 张雯, 杨瑞, 等. 甘草“调和诸药”生物药剂学机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(1): 267-277.
- [5] 王骞, 龚学忠. 从仲景方看甘草的临床应用 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2013, 8(4): 327-329.
- [6] Bernela M, Ahuja M, Thakur R. Enhancement of anti-inflammatory activity of glycyrrhizic acid by encapsulation in chitosan-katira gum nanoparticles [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 105: 141-147.
- [7] 朱君君, 沈成英, 王镜, 等. 甘草酸-F127/TPGS 混合纳米胶束的制备及其大鼠在体肠吸收研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(7): 1845-1851.
- [8] 鲜静, 张晨, 钟雪梅, 等. 中药活性成分口服结肠靶向纳米系统治疗溃疡性结肠炎的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1816-1826.
- [9] 吴仁杰, 余红芳, 颜星星, 等. pH 响应三氧化二磷聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2021, 52(15): 4528-4536.
- [10] Wu C S, Wang X Q, Meng M, et al. Effects of pH-sensitive nanoparticles prepared with different polymers on the distribution, adhesion and transition of Rhodamine 6G in the gut of rats [J]. *J Microencapsul*, 2010, 27(3): 205-217.
- [11] Su Y, Zhang B L, Sun R W, et al. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: Recent advances in research and application [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 1397-1418.
- [12] 马舒伟, 刘兴艳, 辛杨, 等. 银杏内酯 K 的 PLGA-PEG 纳米粒制备、表征和神经保护活性评价 [J]. *中草药*, 2019, 50(7): 1562-1568.
- [13] Hua S S, Marks E, Schneider J J, et al. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue [J]. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 2015, 11(5): 1117-1132.
- [14] Zhang M Z, Merlin D. Nanoparticle-based oral drug delivery systems targeting the colon for treatment of ulcerative colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(7): 1401-1415.
- [15] Huang M C, Su J, Lou Z H, et al. Application of a DSS colitis model in toxicologically assessing norisoboldine [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2020, 30(2): 107-114.
- [16] Qi P, Bu R X, Zhang H, et al. Goserelin acetate loaded poloxamer hydrogel in PLGA microspheres: Core-shell di-depot intramuscular sustained release delivery system [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16(8): 3502-3513.
- [17] 吴仁杰, 余红芳, 颜星星, 等. pH 响应三氧化二磷聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2021, 52(15): 4528-4536.
- [18] Zeeshan M, Ali H, Khan S, et al. Glycyrrhizic acid-loaded pH-sensitive poly-(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for the amelioration of inflammatory bowel disease [J]. *Nanomedicine*, 2019, 14(15): 1945-1969.
- [19] Naeem M, Bae J, Oshi M A, et al. Colon-targeted delivery of cyclosporine A using dual-functional Eudragit® FS30D/PLGA nanoparticles ameliorates murine experimental colitis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 1225-1240.
- [20] Rajan T S, Read T L, Abdalla A, et al. Ex vivo electrochemical pH mapping of the gastrointestinal tract in the absence and presence of pharmacological agents [J]. *ACS Sens*, 2020, 5(9): 2858-2865.
- [21] Tang S, Liu W, Zhao Q Q, et al. Combination of polysaccharides from *Astragalus membranaceus* and *Codonopsis pilosula* ameliorated mice colitis and underlying mechanisms [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113280.
- [22] Viennois E, Xiao B, Ayyadurai S, et al. Micheliolide, a new sesquiterpene lactone that inhibits intestinal inflammation and colitis-associated cancer [J]. *Lab Invest*, 2014, 94(9): 950-965.
- [23] Hu C M, Zhang L, Aryal S, Cheung C, et al. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108(27): 10980-10985.
- [24] 张明发, 沈雅琴. 甘草及甘草酸类成分抗病毒性肺炎的药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(7): 1452-1468.

[责任编辑 郑礼胜]