

2种自乳化递送系统的制备及其对斑马鱼炎症损伤部位“引药”作用

刘欢欢¹, 吴采栋¹, 李琪琪¹, 吴兴杰¹, 陈英¹, 沈祥春¹, 魏茂陈^{1,2*}, 陶玲^{1*}

1. 贵州省特色天然药物高效利用工程中心, 贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室, 贵州医科大学天然药物资源优效利用重点实验室, 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025
2. 贵阳新天药业股份有限公司贵州, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 以橄榄油和芝麻油分别作为油相进行自乳化递送系统 (self-emulsifying drug delivery system, SEDDS) 载体构建, 考察 2 种 SEDDS 载体的药剂学性能及对斑马鱼体内炎症损伤部位递送差异。初步阐明辅料的“引药”效应, 拟为炎症损伤部位有效递送材料的选择和辅料“引药达所”提供实验参考。**方法** 结合相转变法和伪三元相图法筛选乳化剂、助乳化剂、乳化剂与助乳化剂质量比 (K_m), 星点设计-效应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 优化 2 种 SEDDS 载体处方; 通过布鲁克海文纳米粒径仪测定 2 种 SEDDS 载体的中位径 (D_{50}) 和 ζ 电位; 利用立体荧光显微镜观察 2 种 SEDDS 载体在斑马鱼体内炎症损伤部位的递送差异。**结果** 2 种 SEDDS 最佳乳化剂和助乳化剂均为聚山梨酯 80-无水乙醇 (2:1), 最佳处方油相与 K_m 值均为 1:1, 滴加适量纯水后呈半透明略带蓝色乳光液体; 橄榄油和芝麻油 SEDDS 最佳处方 D_{50} 分别为 (219.36 ± 14.86)、(225.06 ± 13.66) nm, ζ 电位分别为 (-3.13 ± 0.55)、(3.58 ± 0.10) mV。与正常组比较, 2 种 SEDDS 在炎症损伤斑马鱼体内的总荧光强度具有极显著性差异 ($P < 0.001$), 相比于橄榄油 SEDDS, 芝麻油 SEDDS 在炎症损伤部位富集效果更为突出, 二者主要分布在心脏和肝脏部位。**结论** 2 种 SEDDS 载体制备方法简单, 外观良好。阐明油相因素带来的递送差异, 可以为不同炎症损伤部位的有效递送材料选择、为辅料发挥“引药”作用提供实验参考。

关键词: 引药; 炎症损伤; 斑马鱼; 自乳化递送系统; 递送效应; 橄榄油; 芝麻油; 油相; 药剂学性能; 相转变法; 伪三元相图法; 星点设计-效应面法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)16-5204-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.16.009

Preparation of two self-emulsifying delivery systems and its medicinal usher effect on zebrafish with inflammatory injury

LIU Huan-huan¹, WU Cai-dong¹, LI Qi-qi¹, WU Xing-jie¹, CHEN Ying¹, SHEN Xiang-chun¹, WEI Mao-chen^{1,2}, TAO Ling¹

1. Guizhou Engineer Center for Efficient Utilization of Natural Drugs, Key Laboratory of Pharmacology and Druggability Evaluation of Natural Drugs in Colleges and Universities of Guizhou Province, Key Laboratory of Excellent Utilization of Natural Drug Resources of Guizhou Medical University, School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China
2. Guiyang Xintian Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To construct the self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) carriers using olive oil and sesame oil as the oil phase to investigate the pharmacologic properties and delivery differences of two SEDDS carriers to the inflammation injured sites in zebrafish. The medicinal usher effect of excipients was preliminaries elucidated, so as to provide experimental reference for the selection of effective delivery materials for the site of inflammatory injury and the medicinal usher effect of excipients. **Methods** The

收稿日期: 2023-03-21

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK[2022]一般 380); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK[2023]一般 303); 贵州省高层次人才百层次人才项目 (贵州省科技厅黔科合人才 [2015] No.4029); 贵州医科大学药学院国际科技合作基地 (黔科合平台人才 [2017] 5802)

作者简介: 刘欢欢, 女, 硕士, 主要从事中药制剂工艺与质量标准研究。Tel: 15585139987 E-mail: 1187689582@qq.com

***通信作者:** 陶玲, 女, 教授, 从事药物新剂型和新技术、中药民族药新药开发研究。Tel: (0851)88416160 E-mail: 649511230@qq.com

魏茂陈, 博士, 主任药师, 从事中药制剂工艺与质量标准研究。Tel: 18685182437 E-mail: wmc@xyyao.com

emulsifier, coemulsifier and K_m value were screened by phase transition method and pseudo-ternary phase diagram method. The carrier prescription of SEDDS was optimized by central composite design-response surface method. The partical size (D_{50}) and ζ potential of two SEDDS carriers were determined by Brookhaven nanosize analyzer. Three-dimensional fluorescence microscopy was used to observe its delivery difference in inflammatory injury site of zebrafish. **Results** The emulsifying effect was the best when the oil phase and K_m value of the two SEDDS were 1:1. The best emulsifier and coemulsifier was Tween 80-anhydrous ethanol (2:1), which was translucent and bluish milky liquid after adding proper amount of pure water. The optimal D_{50} of self-emulsifying carriers of olive oil and the sesame oil were (219.36 ± 14.86) nm and (225.06 ± 13.66) nm, respectively. The ζ potentials were (-3.13 ± 0.55) mV and (3.58 ± 0.10) mV, respectively. The total fluorescence intensity of the two SEDDS carriers in the inflammatory zebrafish was stronger than that in the normal group ($P < 0.001$). Compared with the olive oil self-emulsifying, the enrichment effect of the sesame oil SEDDS was more prominent in the injured site of inflammation. They were mainly distributed in the heart and liver. **Conclusion** The preparation methods of the two SEDDS carriers were simple and good in appearance. The difference in delivery caused by oil phase factors can provide material selection for effective delivery to different inflammatory injury sites, which provide experimental reference for excipients to play the role of medicinal usher.

Key words: medicinal usher; inflammation damages; zebrafish; self-emulsifying delivery system; delivery effect; olive oil; sesame oil; oil phase; pharmaceutical properties; phase transition method; pseudo-ternary phase diagram; central composite design-response surface method

引药, 亦称引经药、药引、或引经报使, 是在中医方剂的君、臣、佐、使配伍原则和中药药物归经理论基础上产生和发展起来的, 主要是指处方中佐使药可以发挥“向导”的作用^[1], 改变其他药物的作用方向和部位, 引导诸药直达病所, 更好地发挥药物的治疗效应^[2], 是传统中药独特的用药理念, 也是“药辅合一”的重要表现形式之一^[3], 如牛膝引药下行、冰片引药上行^[4]。传统中药药剂学“药辅合一”理论认为, 部分辅料具有药理活性, 可以发挥一定的治疗作用, 如蜂蜜在蜜丸中具有黏合、矫味的作用, 而在补中益气丸、二母宁嗽丸、麻仁丸、活血跌打丸中分别发挥补气、止咳、通便、止痛的作用。但是辅料的“引药”作用在传统中药药剂学理论中的探讨尚不多见。

靶向药物递送系统(target drug delivery system, TDDS)指的是采用适宜的辅料——“载体”材料, 在恰当的时机将适量的药物更多的引导至病灶部位, 从而增加药物的利用效率, 提高疗效, 降低成本, 减少毒副反应, 与“引药”的含义不谋而合。近年来, 随着载体材料性能对递送效应和药效协助作用的影响开始受到重视^[5-7], 采用现代实验技术挖掘辅料作为“药辅合一”中“引药”的深层次内涵, 对于促进中药传统理论现代化发展具有一定意义。

自乳化递送系统(self-emulsifying drug delivery system, SEDDS), 指含有药物、表面活性剂和油相的各向同性混合物, 可以在临用前加水或接触体液后自动形成透明或半透明的均相分散体系, 中位径(D_{50})为 10~500 nm, 还可作为软胶囊等基础剂型

而倍受关注^[8]。橄榄油(olive oil, OO)来源于天然、富含不饱和脂肪酸以及大量脂质伴随物, 具有抗炎^[9]、降血压^[10]、抗癌等功效^[11], 是人类目前发现油脂中最适合人体营养的油之一, 并成为了目前临床应用的脂肪乳剂首选油相之一。芝麻油(sesame oil, SO)是中药药剂学传统常用的主要油相之一, 具有较高的营养价值, 不饱和脂肪酸质量分数达到 84%以上, 具有抗炎^[12]、抗氧化^[13]、降血脂^[14]等作用, 并受到现代乳剂递送研究的关注。课题组前期成功制备了多个以挥发油为主体的“药辅合一”SEDDS^[15-17], 本研究在前期基础上, 选用橄榄油、芝麻油作为油相, 分别进行橄榄油自乳化递送系统(OO@SEDDS)和芝麻油自乳化递送系统(SO@SEDDS)2种不含药空白载体最佳处方的构建, 考察2种油相因素对 SEDDS 在炎症损伤斑马鱼幼鱼(zebrafish)不同器官的分布差异, 拟为后期炎症损伤的 SEDDS 油相载体材料提供选择, 为中药药剂学中辅料的“引药”作用现代延伸提供实验参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

KQ3200 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; ME104/02 型分析电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; UPW 型实验室专用纯水仪, 成都天萃宁科技有限公司; NanoBrook 90 Plus PALS 型纳米电位粒度分析仪, 美国布鲁克海文有限公司; PLI-100 型显微注射仪, Harvard Apparatus 公司; 循环水系统斑马鱼养殖系统, 北京爱生科技有限公司; SMZ25 型体视荧光显微镜, 日本尼康有限公司。

1.2 试剂

精制橄榄油,批号 210701-2-01,辽宁新兴药业股份有限公司;芝麻油,批号 MX20210803,浙江田雨山药用油有限公司;聚山梨酯 80 (Tween 80, T80),批号 No.1215E013,索莱宝试剂有限公司;聚乙二醇 400 (PEG 400),批号 20200725,西陇科学股份有限公司;聚乙二醇-15-羟基硬脂酸酯 (HS15),批号 54844856P0,上海协泰化工有限公司;甘油,批号 20191213,浙江遂昌惠康药业有限公司;泊洛沙姆 188 (F68),批号 WBAK539B,德国巴斯夫公司;香豆素 6,批号 5RP6IML,质量分数 >98%,梯希爱化成工业发展有限公司;无水乙醇,批号 20200918,国药集团化学试剂有限公司;三卡因,批号 J2114551,阿拉丁试剂有限公司;羧甲基纤维素,批号 SLCD2238,美国 Sigma-Aldrich 贸易有限公司;苯基硫脲,德国默克有限公司;亚甲基蓝,美国 Sigma-Aldrich 贸易有限公司;其他的试剂和化学品均为分析纯。

1.3 动物

模式生物野生型斑马鱼 (Wild Type, WT) Tübingen 品系,该品系由贵州医科大学细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室提供,批件号为伦审 2100182,合格证号 SYXK (黔) 2018-0001。

2 方法与结果

2.1 伪三元相图的绘制

固定体系质量为 1 g,乳化剂与助乳化剂质量比 (K_m) 为 2:1,混匀形成混合乳化剂,取适量的油相与混合乳化剂分别以 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 的质量比混合,采用水滴定法进行制备,并观察乳液的透明度,肉眼观察乳液形成透明且易于流动分散的低黏度 O/W 乳液为宜。通过相转变法绘制伪三元相图,每一相代表三角形的一边,相图中的每一个角代表该特定组分的 100%,最大比值涵盖在研究范围内,从而精确描绘相图中形成的相的边界。用 Origin 9.0 软件绘制伪三元相图,以乳化区域面积大小为考察指标,进行 OO@SEDDS、SO@SEDDS 最佳处方考察,所有处方重复 3 次。

2.2 乳化剂种类的考察

固定助乳化剂为无水乙醇, K_m 值为 2:1,进行 T80、F68、HS15 3 种乳化剂考察。固定体系质量为 1 g,将油相与 K_m 值分别按照 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 的比例称量

后,置于 EP 管中,涡旋混匀,逐滴加入纯水,观察乳化现象,记录各相质量,进行伪三元相图的绘制。结果表明,2 种自乳化载体成乳区域面积由大到小依次为 T80>HS15>F68,故选择 T80 作为乳化剂,结果见图 1。

2.3 助乳化剂考察

根据乳化剂种类考察的实验结果,固定乳化剂为 T80, K_m 值为 2:1,进行 PEG 400、甘油、无水乙醇 3 种助乳化剂考察。油相与 K_m 分别按 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 比例混合,涡旋混匀,逐滴加入纯水,观察乳化现象,记录各相质量,进行伪三元相图的绘制。结果显示,3 种不同助乳化剂成乳区域面积由大到小依次为无水乙醇>甘油>PEG 400,故选择无水乙醇作为助乳化剂,结果见图 2。

2.4 不同 K_m 值考察

在上述实验结果基础上,以 T80 为乳化剂,无水乙醇为助乳化剂,固定总质量为 1 g,设置油相与 K_m 的比例分别为 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1, K_m 值分别为 1:2、1:1、2:1、3:1,考察不同 K_m 值的伪三元相图乳化面积变化。由伪三元相图可知,2 种 SEDDS 在不同 K_m 值下乳化面积由大到小依次为 2:1>3:1>1:2>1:1。因此选择 K_m 值为 2:1 进行后续实验,结果见图 3。

2.5 油相与 K_m 比例的选择

实验结果表明,2 种油相与 K_m 值比例在 4:6 和 5:5 时乳化效果较好,室温下静置不易分层,且考虑到乳化剂用量越少安全性越高,因此确定油相与 K_m 值比例为 5:5 (图 4)。

2.6 星点设计-响应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 优化 SEDDS 处方

为了更好的评价 OO@SEDDS、SO@SEDDS 的处方,在伪三元相图筛选基础上,选择对 SEDDS 性质影响较显著的油相质量分数 (X_1) 和 K_m 值 (X_2) 作为考察因素,以中位径 (Y) 为评价指标,采取 CCD-RSM 优化法^[18],对处方进行优化。经前期实验考察得知,油相质量分数在 20%~80%, K_m 为 2:1 时有利于自乳化体系的形成和稳定,成乳效果较好,故将油相质量分数的范围设置为 20%~80%, K_m 的范围设为 1:1~3:1。使用 Design Expert 软件对各成分进行多元线性回归和二项式的拟合,并

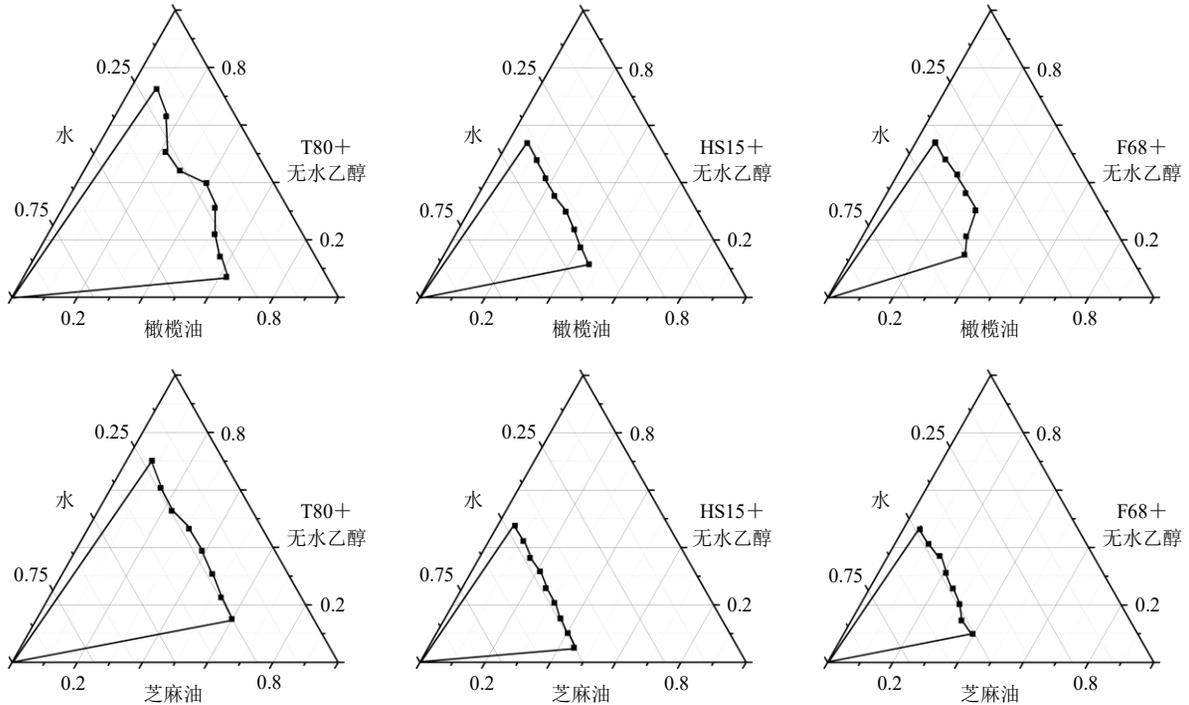


图1 不同乳化剂伪三元相图

Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagrams of different emulsifiers

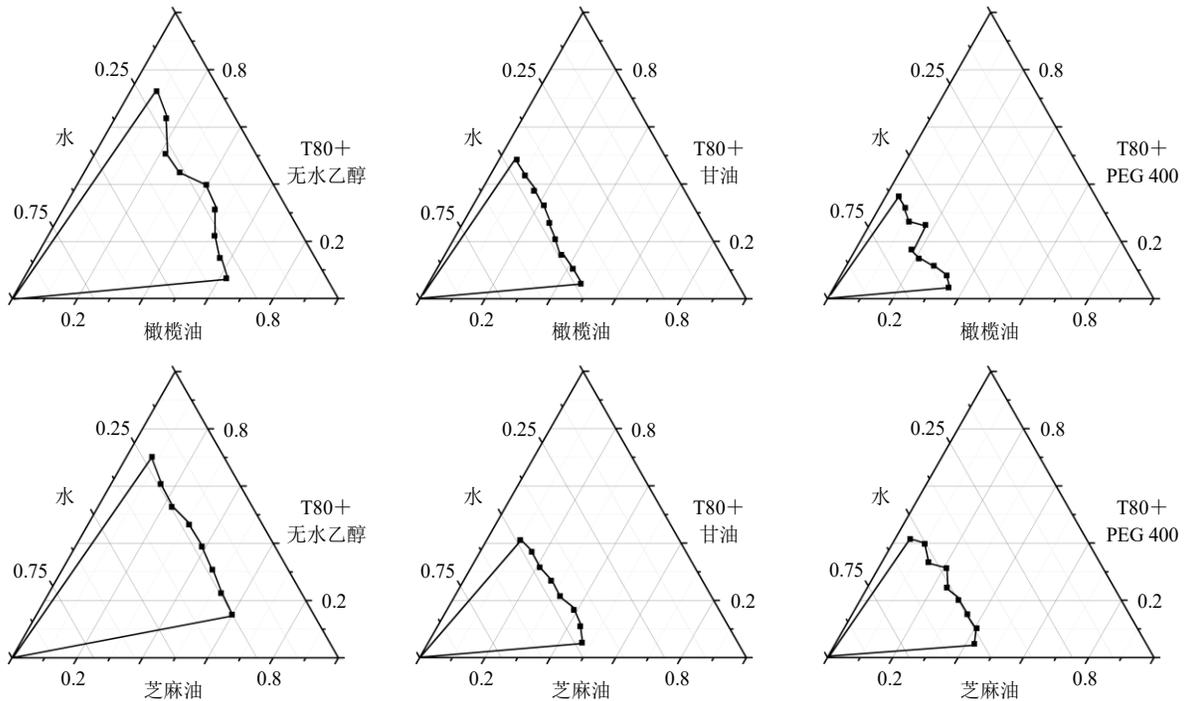


图2 不同助乳化剂伪三元相图

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagrams of different co-emulsifiers

遵循拟合方程绘制表达各指标与各成分之间关系的三维效应面图，根据曲线图进行响应面优化。设计2因素与5水平CCD-RSM实验，OO@SEDDS、SO@SEDDS的CCD-RSM实验设计与结果见表1、2。分别得到2种SEDDS的拟合方程如下：OO@

SEDDS $D_{50} = 217.60 + 213.43 X_1 + 42.58 X_2 + 113.13 X_1 X_2 + 217.68 X_1^2 + 66.17 X_2^2$, $R^2 = 0.948 0$, $P = 0.000 2$; SO@SEDDS $D_{50} = 217.32 + 134.97 X_1 - 28.56 X_2 + 23.12 X_1 X_2 + 97.87 X_1^2 + 8.81 X_2^2$, $R^2 = 0.922 6$, $P = 0.000 9$ 。

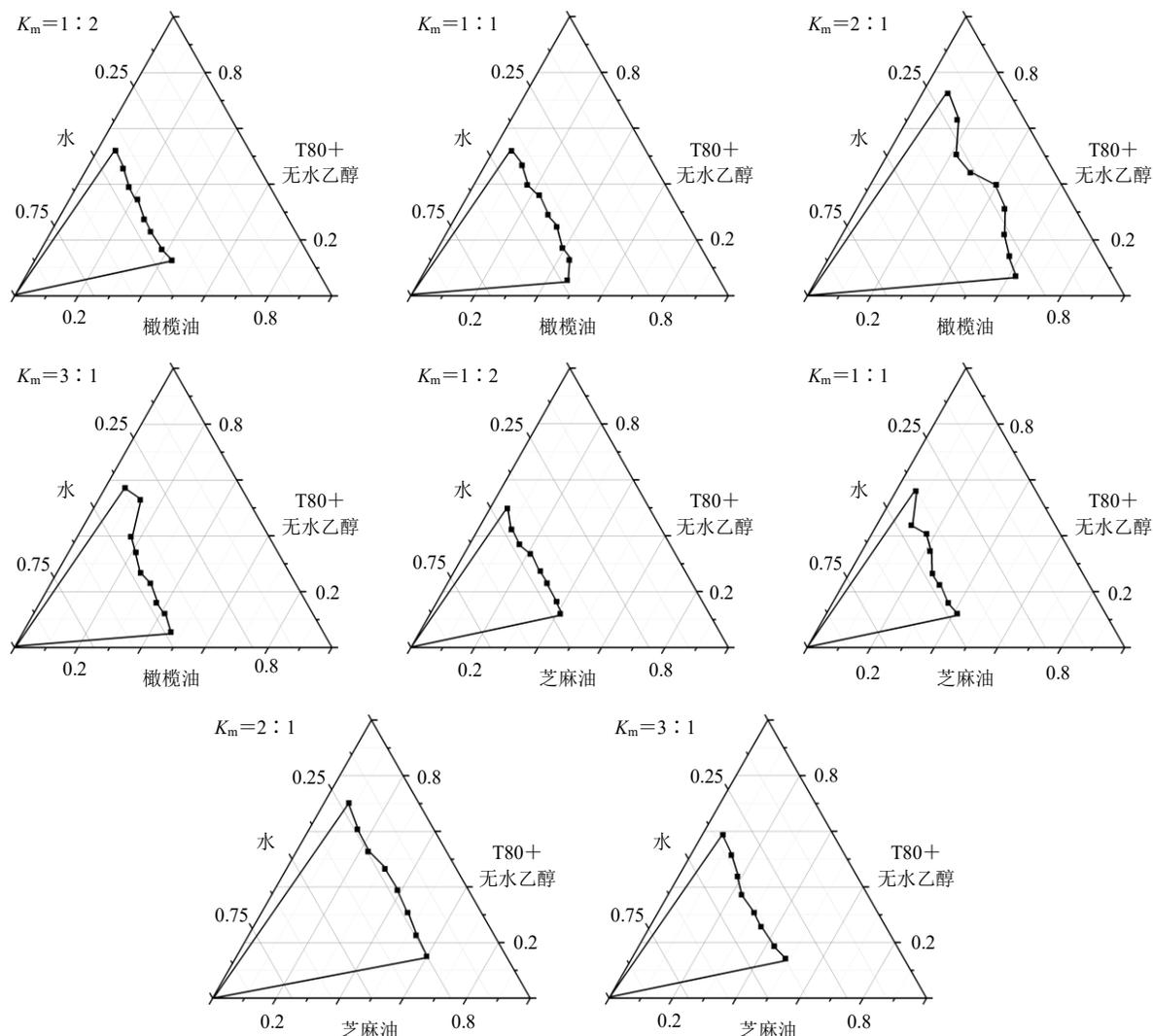


图3 不同 K_m 值伪三元相图

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagrams of different K_m values

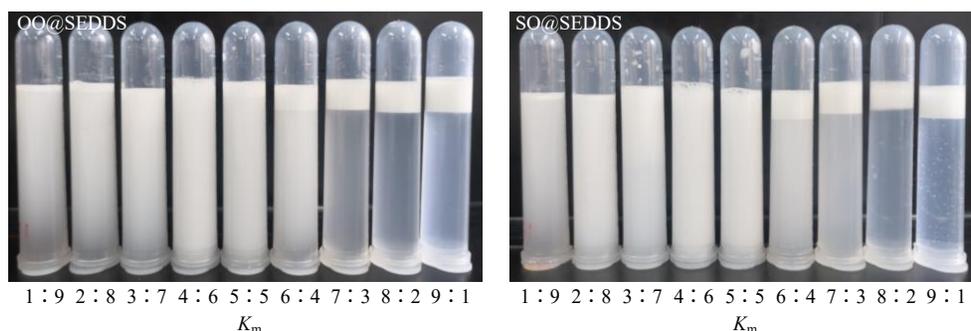


图4 不同油相与 K_m 值比例图片

Fig. 4 Ratio of different oil phase and K_m values

由上述方程可知, 2种 SEDDS 的 D_{50} 均符合多元线性方程, 非线性拟合效果良好, 相关系数均较高, 结果具有统计学意义。

2.7 CCD-RSM 分析

在 2 种 SEDDS 中, 油相质量分数对 D_{50} 的影

响较大, 均呈正比关系; 在 OO@SEDDS 中, K_m 与 D_{50} 呈正比关系, 而在 SO@SEDDS 中, K_m 与 D_{50} 呈反比关系。通过软件预测、拟合方程及三维效应面图综合分析, 以 D_{50} 为考察指标, 得到理论最佳处方为油相 50.0%, $K_m=2:1$, 即油 50%、T80 33.3%、

表 1 OO@SEDDS 的 CCD-RSM 实验设计与结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 CCD-RSM experimental design and results of OO@SEDDS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

试验号	$X_1/\%$	X_2	D_{50}/nm	试验号	$X_1/\%$	X_2	D_{50}/nm	试验号	$X_1/\%$	X_2	D_{50}/nm
1	80.0 (+1)	3.0 (+1)	904.56 ± 2.77	6	50.0 (0)	0.6 (-1.414)	369.83 ± 2.69	11	50.0 (0)	2.0 (0)	167.50 ± 2.15
2	92.0 (+1.414)	2.0 (0)	967.21 ± 14.47	7	50.0 (0)	3.4 (+1.414)	333.15 ± 6.11	12	50.0 (0)	2.0 (0)	304.23 ± 2.78
3	50.0 (0)	2.0 (0)	157.51 ± 6.81	8	20.0 (-1)	3.0 (+1)	286.80 ± 12.50	13	80.0 (+1)	1.0 (-1)	494.98 ± 8.76
4	7.5 (-1.414)	2.0 (0)	340.57 ± 9.24	9	20.0 (-1)	1.0 (-1)	311.45 ± 4.17				
5	50.0 (0)	2.0 (0)	230.43 ± 2.91	10	50.0 (0)	2.0 (0)	232.91 ± 1.22				

表 2 SO@SEDDS 的 CCD-RSM 实验设计与结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 CCD-RSM experimental design and results of SO@SEDDS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

试验号	$X_1/\%$	X_2	D_{50}/nm	试验号	$X_1/\%$	X_2	D_{50}/nm	试验号	$X_1/\%$	X_2	D_{50}/nm
1	80.0 (+1)	3.0 (+1)	477.99 ± 8.25	6	50.0 (0)	2.0 (0)	238.03 ± 1.87	11	20.0 (-1)	1.0 (-1)	221.27 ± 4.83
2	50.0 (0)	0.6 (-1.414)	326.89 ± 7.60	7	50.0 (0)	2.0 (0)	262.17 ± 4.65	12	80.0 (+1)	1.0 (-1)	421.74 ± 7.98
3	50.0 (0)	2.0 (0)	210.07 ± 1.40	8	92.0 (+1.414)	2.0 (0)	632.10 ± 8.56	13	50.0 (0)	3.4 (+1.414)	148.16 ± 2.73
4	20.0 (-1)	3.0 (+1)	187.47 ± 1.33	9	7.5 (-1.414)	2.0 (0)	206.73 ± 6.53				
5	50.0 (0)	2.0 (0)	215.12 ± 3.14	10	50.0 (0)	2.0 (0)	163.07 ± 6.47				

无水乙醇 16.7%，结果见图 5。

2.8 处方验证

按照最优处方，分别精密称取橄榄油或芝麻油 500.0 mg，T80 333.3 mg，无水乙醇 166.7 mg，同法平行制备 3 批 SEDDS。混匀后逐滴加入纯水至 10 mL，得半透明略带蓝色乳光的 OO@SEDDS、SO@SEDDS。预测值与实测值的偏差结果表明，最优处方 D_{50} 的真实值与预测值之间没有显著差异，且指标的相对误差 [相对误差=(预测值-实测值)/预测值] 均较小。结果表明本实验所应用的 CCD-RSM 拟合方程预测效果良好。结果见表 3。

表 3 Design-Expert 8.0.6 预测 D_{50} 实测值与预测值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Measured and predicted values of D_{50} by Design-Expert 8.0.6 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	D_{50}/nm		相对误差/ %
	实测值	预测值	
OO@SEDDS	215.4 ± 5.37	217.6	1.01
SO@SEDDS	213.5 ± 2.00	217.3	1.75

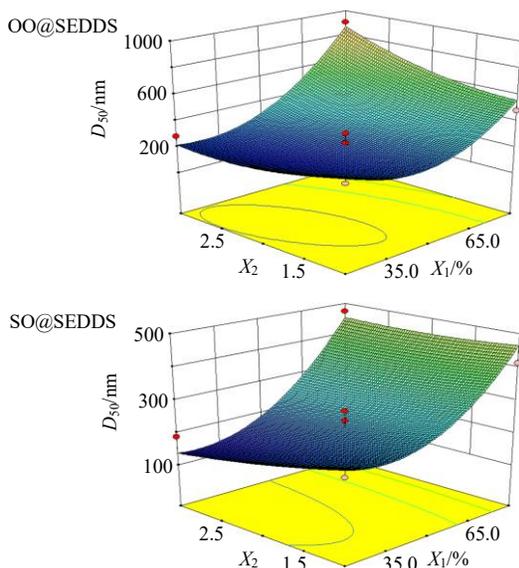


图 5 D_{50} 的三维效应面图

Fig. 5 Three-dimensional effect surface of particle size

2.9 最佳处方的确定

综上所述，OO@SEDDS 和 SO@SEDDS 分别得到的最佳处方：乳化剂均为 T80 (33.3%)，助乳化剂为无水乙醇 (16.7%)， $K_m=2:1$ ，油相与 K_m 值比例为 1:1。

2.10 外观形态

将制备得到的 OO@SEDDS、SO@SEDDS 用蒸馏水适量稀释后，观察外观及流动性。制备所得的 OO@SEDDS 和 SO@SEDDS 稀释后呈半透明状，带有淡蓝色乳光，流动性良好，具有丁达尔效应，如图 6 所示。

2.11 D_{50} 和 ζ 电位

分别将 OO@SEDDS、SO@SEDDS 用蒸馏水适量稀释后，测定 D_{50} 和 ζ 电位。 D_{50} 和 ζ 电位的测定结果表明，OO@SEDDS 的 D_{50} 为 (219.36 ± 14.86) nm， ζ 电位为 (-3.13 ± 0.55) mV；SO@SEDDS 的 D_{50} 为 (225.06 ± 13.66) nm， ζ 电位为 (3.58 ± 0.1) mV。结果如图 7 所示。

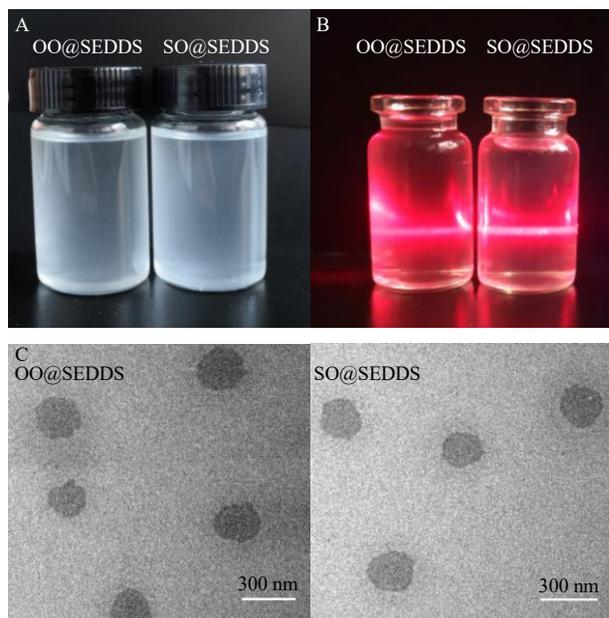


图 6 2 种自乳化载体外观 (A)、丁达尔效应 (B) 和 TEM 结果 (C)

Fig. 6 Two kinds of SEDDS appearance morphology (A), Dyndall effect (B) and TEM pictures (C)

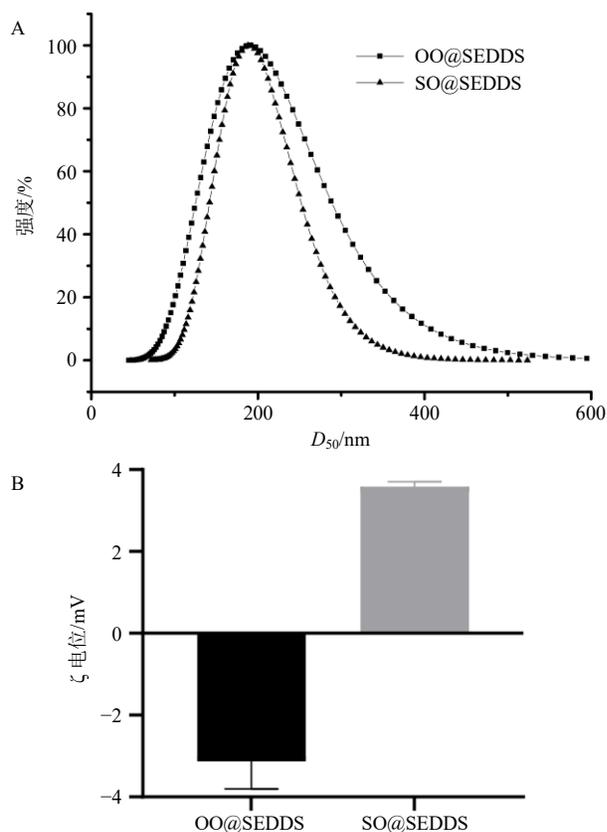


图 7 2 种自乳化载体的 D_{50} (A) 与 ζ 电位 (B)

Fig. 7 D_{50} (A) and ζ potential (B) of OO@SEDDS and SO@SEDDS

2.12 稳定性考察

使用 DLS 分析仪分别测定 2 种 SEDDS 与 pH

值为 7.4 的 PBS 和含有 10%胎牛血清的溶液孵育 0、2、4、6、8、12、24 h 后, 监测 2 种 SEDDS 的粒径大小和 ζ 电位变化。结果证明 2 种 SEDDS 在 pH 值为 7.4 的 PBS 和 10%胎牛血清的溶液中 24 h 内具有良好的稳定性, 表明它们适用于静脉注射。结果如表 4、5 所示。

表 4 2 种自乳化递送系统的 PBS 稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 PBS stability of two SEDDS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/h	OO@SEDDS		SO@SEDDS	
	D_{50}/nm	ζ 电位/mV	D_{50}/nm	ζ 电位/mV
0	230.56±15.91	-2.89±1.39	221.23±4.97	2.96±0.75
2	259.57±21.36	-0.77±2.35	212.92±10.65	1.95±0.75
4	267.16±2.19	-3.01±1.60	223.71±6.29	4.54±1.46
6	231.08±6.82	-3.41±0.22	228.01±8.89	2.31±0.99
8	232.68±2.80	-2.12±1.28	210.00±11.59	2.98±1.02
12	256.01±16.76	-4.65±2.29	230.26±1.21	2.02±1.16
24	245.37±10.67	4.14±1.33	212.23±7.90	3.08±0.86

表 5 2 种自乳化递送系统的 10%血清稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 10% Serum stability of two SEDDS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/h	OO@SEDDS		SO@SEDDS	
	D_{50}/nm	ζ 电位/mV	D_{50}/nm	ζ 电位/mV
0	288.19±14.29	-3.99±2.29	273.62±11.51	0.71±1.27
2	275.32±22.35	-5.15±2.14	279.52±8.77	1.22±0.69
4	282.65±20.20	-2.42±2.37	265.19±11.76	3.82±1.40
6	288.20±6.01	-0.29±1.47	267.27±1.18	-1.43±2.14
8	294.42±6.28	-2.89±0.99	270.87±18.20	2.08±3.03
12	290.87±14.73	-1.75±2.25	279.68±4.82	-2.01±2.60
24	305.04±12.42	-2.56±1.52	276.22±10.44	-3.59±0.56

2.13 斑马鱼饲养及繁育

鱼房饲养系统为北京爱生斑马鱼养殖系统, 养殖水温为 26~29℃, pH 值为 7.0~7.5, 电导率为 500~550 $\mu S/cm$, 光周期为 12 L : 12 D (12 h 光照, 12 h 黑暗)。斑马鱼通常 1 d 喂养 2 次, 配种时需提前将雌鱼与雄鱼的比例设为 1 : 1 或 2 : 1, 用挡板隔开, 待第 2 天早上光照后, 拔去挡板。收集鱼卵并转入胚胎水中, 培养 6 h 后, 用含 PTU 的胚胎水进行培养。培养 3~5 d 后, 选择状态良好、大小基本相近的斑马鱼进行实验。

2.14 2 种自乳化载体毒性范围考察

为了选择合适的给药质量浓度, 首先检测了 2 种自乳化递送系统对斑马鱼的毒性。将受精后 3~5 d 的野生型斑马鱼, 利用显微注射仪分别以尾静脉

注射给予 2.0、1.0、0.5 mg/mL 的 OO@SEDDS、SO@SEDDS，注射剂量为 3 nL。同时设置对照组，给予相应体积的 PBS，每个组各使用 30 只斑马鱼幼体。将注射后的鱼单独放入培养孔板中，每条鱼加入 2 mL 胚胎水。考察在 28 °C 下 24 h 内的存活状态，计算死亡数，考虑致死和亚致死表型，例如水肿、畸形和血流微弱。结果显示，与对照组相比，在 0.5、1.0 mg/mL 孵育 24 h 后，斑马鱼心率稳定，血流正常，表明 2 种 SEDDS 对斑马鱼没有明显的毒性^[19]，而在 2.0 mg/mL 下，OO@SEDDS、SO@SEDDS 组死亡率分别为 76.67% 和 86.67%，与对照组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$)，并伴有部分心脏增大、畸形和弱血流量。表明这 2 种 SEDDS 在低于 1.0 mg/mL 质量浓度下对斑马鱼并未造成明显损伤，较为安全，结果见表 6。

2.15 炎症模型的制备

卵黄囊注射脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 0.5 mg/mL) 2 nL，造模 12 h，利用三卡因进行麻醉后，在立体荧光显微镜观察结果显示，斑马鱼幼鱼出现椎体弯曲、心脏出血、心包肿大、卵黄皱缩，说明 LPS 所致炎性斑马鱼幼体模型构建成功，如图 8 所示。

表 6 2 种 SEDDS 对斑马鱼毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 6 Toxicity of two kinds of SEDDS to zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	存活率/%
对照	-	100.00 ± 0.00
OO@SEDDS	0.5	100.00 ± 0.00
	1.0	96.60 ± 4.71
	2.0	76.70 ± 4.71*
SO@SEDDS	0.5	100.00 ± 0.00
	1.0	100.00 ± 0.00
	2.0	86.70 ± 4.71*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

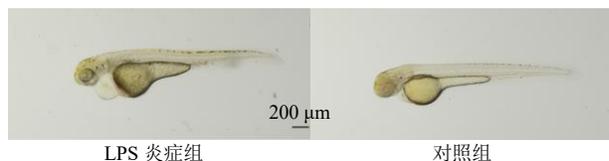


图 8 LPS 炎症组和对照组斑马鱼幼体模型的表型比较
Fig. 8 Comparison of phenotypes between LPS inflammatory group and control group of zebrafish larva model

2.16 斑马鱼的体内生物分布

将含荧光染料香豆素 6 的 OO@SEDDS 和 SO@SEDDS 分别通过尾静脉注射到正常和 LPS 致炎症斑马鱼体内。每组 10 只。给药后，将幼鱼在经三卡因麻醉后，放置在琼脂糖支架，使用立体荧光显微镜在 0.5、1.0、3.0、6.0、12.0、24.0 h 时进行成像采集。结果显示，2 种 SEDDS 在静脉注射后都能随血液分布在斑马鱼全身组织器官中，主要积聚在脑、心脏、肝脏和卵黄囊区域。此外，对应的统计图显示，2 种 SEDDS 均能对 LPS 引起的炎症损伤部位进行有效富集；与正常组比较，SO@SEDDS 组有极显著性差异 ($P < 0.001$)，OO@SEDDS 组只有在给药 1 h 时，LPS 组荧光强度增强具有统计学意义 ($P < 0.05$)，在给药 3 h 后，LPS 组荧光强度明显减小，与正常组基本一致，可能与 2 种油相中含的化合物种类不同有关^[20]。SO@SEDDS 组在正常对照组体内分布显著少于 OO@SEDDS 组。结果见图 9 和表 7。

3 讨论

新山地明(环孢素 A)自微乳软胶囊(ciclosporin soft capsules)的成功上市是 SEDDS 发展中的标志性事件^[8]，同时，SEDDS 也受到中药药剂学工作者们的重视。其中，油相作为 SEDDS 中常用的赋形剂，具有辅助乳剂形成、装载亲脂药物、来源广泛、价格低廉、易得等优点^[21]，部分油相还是人体必须补充的营养物质，生理活性显著，但是不同油相由于理化性质不同，其组织和器官递送效应——“引药”作用的“药辅合一”相关性尚未得到充分的研究。

炎症是免疫系统对感染和损伤做出的反应^[21]，如果没有及时得到解决，将会演变成慢性疾病，对机体组织器官功能造成损害，并已成为递送系统研究关注的焦点^[22]。斑马鱼作为脊椎动物，在分子水平上 85% 与人相同^[23]，同时斑马鱼胚胎幼鱼具有身体透明的特点，可以使用非侵入性方法直接观察其内部结构，尤其是将斑马鱼麻醉后，在显微镜下可以清晰地看见其心脏搏动及血液循环，因此，在研究递送系统分布方面具有显著优势^[24]。另外，斑马鱼的免疫系统高度保守，具有中性粒细胞、单核巨噬细胞、淋巴细胞等与人类相似的免疫细胞类型和形态，被广泛应用于炎症模型^[25-26]。

在正常斑马鱼体内，SO@SEDDS 的器官荧光强度显著低于 OO@SEDDS，可能在正常情况下，SO@SEDDS 的分布可能主要在血液中；炎症损伤后 2 种 SEDDS 总荧光强度均增强，表明 2 种 SEDDS

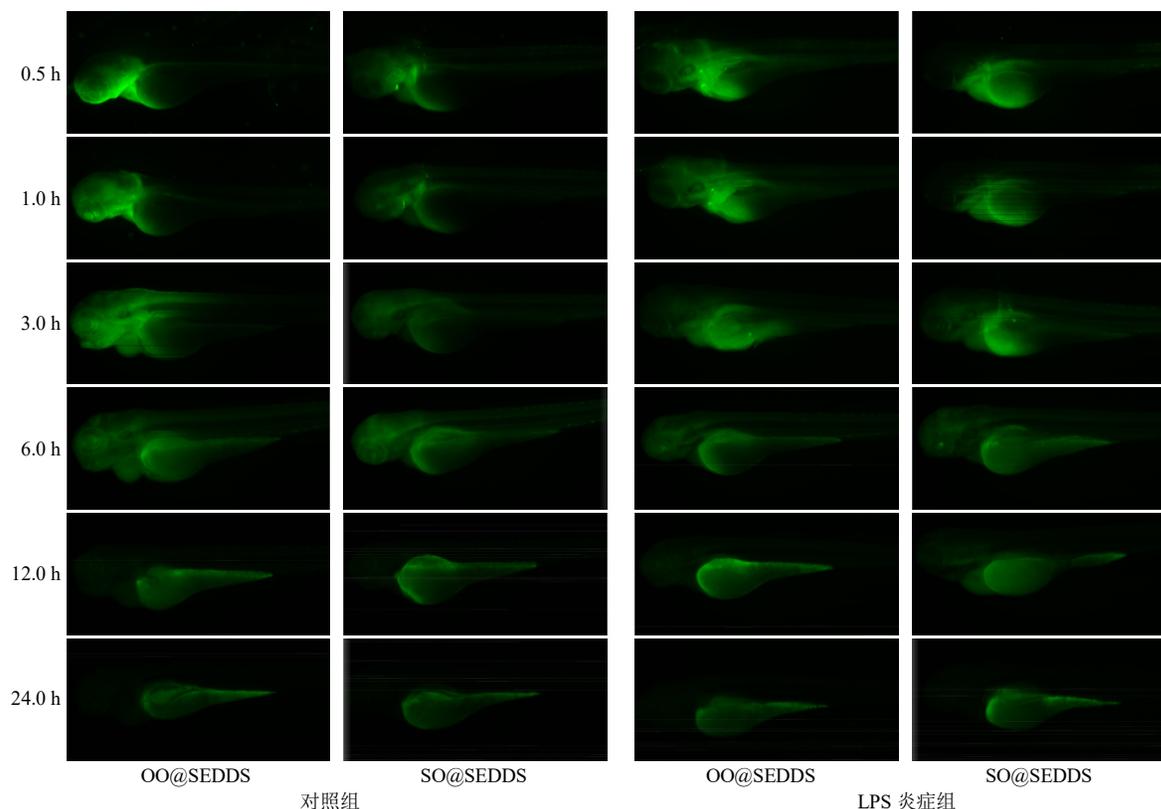


图 9 2 种 SEDDS 在斑马鱼幼体中的生物分布

Fig. 9 Biological distribution of two kinds of SEDDS in zebrafish larvae

表 7 2 种 SEDDS 在斑马鱼幼体中的总荧光强度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 7 Total fluorescence intensity of two kinds of SEDDS in zebrafish larvae ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

t/h	OO@SEDDS		SO@SEDDS	
	对照组	LPS 炎症组	对照组	LPS 炎症组
0.5	10.78±2.90	15.47±2.21	3.13±1.29	14.19±2.48***
1.0	9.76±4.10	17.29±3.29*	5.91±2.33	15.19±3.42***
3.0	12.21±4.78	14.68±4.62	3.47±1.35	14.76±2.99***
6.0	8.64±3.54	8.64±2.46	4.07±1.42	11.94±3.95***
12.0	7.22±2.42	7.68±1.66	2.92±1.77	10.27±4.06**
24.0	4.81±1.22	3.54±0.71	1.36±0.89	4.51±1.54***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

均能对 LPS 引起的炎症损伤部位进行有效富集,可能是由于 LPS 刺激引起巨噬细胞的增加,易于吸收中位径较小的自乳化液。

此外,由于炎症部位的细胞排列不像正常组织那样密集,SEDDS 在炎症部位具有增强的渗透和滞留作用,能够迅速分布并实现靶向聚集。SO@SEDDS 与正常组比较所有时间点均有极显著性差异 ($P < 0.001$), OO@SEDDS 组只有 1 h 时有显著性差异,

这说明可能 SO@SEDDS 更适宜用于炎症药物载体,2 种油相化学成分的差异可能是产生分布差异的主要原因。同时,有文献报道, ω -3 多不饱和脂肪酸的存在更有利于炎症的治疗^[27],而芝麻油中 ω -3 多不饱和脂肪酸含量较高,可以作为后期深入考察辅料对炎症损伤保护作用的“药辅合一”理论提供参考。本研究还为实验室后期添加不同药物进行药物对油相递送的影响研究提供前期实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李嘉昕,张铁甲,李晶芳,等.引药达所,中药的“向导”:药引的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 3004-3011.
- [2] 张定堃,傅超美,林俊芝,等.中药制剂的“药辅合一”及其应用价值 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1921-1929.
- [3] 方亮,陶文康,程红艳,等.中药引药上行的作用机制及其靶向制剂研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(10): 3312-3321.
- [4] 赵圣轩,夏庆梅.柴胡引经作用现代研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18(3): 228-232.
- [5] Shao S Q, Zhou Q, Si J X, et al. A non-cytotoxic dendrimer with innate and potent anticancer and anti-metastatic activities [J]. Nat Biomed Eng, 2017, 1(9): 745-757.
- [6] Boehnke N, Strachla J P, Safford H C, et al. Massively

- parallel pooled screening reveals genomic determinants of nanoparticle delivery [J]. *Science*, 2022, 377(6604): eabm5551.
- [7] Mitra D. Microemulsion and its application: An inside story [J]. *Mater Today*, 2023, 83: 75-82.
- [8] Survase S A, Kagliwal L D, Annapure U S, *et al.* Cyclosporin A: A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications [J]. *Biotechnol Adv*, 2011, 29(4): 418-435.
- [9] 杜建. 橄榄油脂肪乳对 TPN 大鼠肝功能的影响 [D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- [10] Sankar D, Sambandam G, Ramakrishna Rao M, *et al.* Modulation of blood pressure, lipid profiles and redox status in hypertensive patients taking different edible oils [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 355(1/2): 97-104.
- [11] 周晓丹, 王妍, 刘晶, 等. 橄榄油、葵花籽油和米糠油的氧化稳定性 [J]. *食品科学*, 2011, 32(13): 119-121.
- [12] 马丛丛, 许继取, 赵思琪, 等. 芝麻酚抗炎机制研究进展 [J]. *中国油脂*, 2019, 44(9): 109-113.
- [13] Park S H, Ryu S N, Bu Y, *et al.* Antioxidant components as potential neuroprotective agents in sesame (*Sesamum indicum* L.) [J]. *Food Rev Int*, 2010, 26(2): 103-121.
- [14] 曹梦晔, 巩江, 高昂, 等. 芝麻油药学研究概况 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(5): 93-94.
- [15] Jiang F, Wu G P, Li W R, *et al.* Preparation and protective effects of 1,8-cineole-loaded self-microemulsifying drug delivery system on lipopolysaccharide-induced endothelial injury in mice [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 127: 14-23.
- [16] 李婉蓉, 王菲, 陈建波, 等. 1,8-桉叶油素自微乳给药系统的制备及质量评价和细胞摄取研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(9): 2418-2426.
- [17] 杨佳佳, 韦世权, 张科, 等. 香茅醇自乳化递送系统的制备及其体外抗肿瘤活性评价 [J]. *中草药*, 2020, 51(5): 1196-1204.
- [18] 王华华, 陈家琦, 直炜炜, 等. 星点设计-效应面法优化莪术油纳米乳的处方工艺及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中国药师*, 2022, 25(4): 566-572.
- [19] 周红玲, 杨丽玲, 刘东依, 等. 斑马鱼内毒素炎症模型构建及及中药抗内毒素炎症活性筛选 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(9): 732.
- [20] Souza P, Marcadenti A, Portal V. Effects of olive oil phenolic compounds on inflammation in the prevention and treatment of coronary artery disease [J]. *Nutrients*, 2017, 9(10): 1087.
- [21] 杨志欣, 张蕾, 王鑫, 等. 自乳化药物递送系统研究概述 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(3): 563-569.
- [22] Chen Y C, Gad S F, Chobisa D, *et al.* Local drug delivery systems for inflammatory diseases: Status quo, challenges, and opportunities [J]. *J Control Release*, 2021, 330: 438-460.
- [23] MacRitchie N, Di Francesco V, Ferreira M F M M, *et al.* Nanoparticle theranostics in cardiovascular inflammation [J]. *Semin Immunol*, 2021, 56: 101536.
- [24] Howe K, Clark M D, Torroja C F, *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [25] Rességuier J, Levraud J P, Dal N K, *et al.* Biodistribution of surfactant-free poly(lactic-acid) nanoparticles and uptake by endothelial cells and phagocytes in zebrafish: Evidence for endothelium to macrophage transfer [J]. *J Control Release*, 2021, 331: 228-245.
- [26] Belo M A A, Oliveira M F, Oliveira S L, *et al.* Zebrafish as a model to study inflammation: A tool for drug discovery [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 144: 112310.
- [27] Brugman S. The zebrafish as a model to study intestinal inflammation [J]. *Dev Comp Immunol*, 2016, 64: 82-92.
- [28] Farley G, Daniel W R, Bhatnagar A, *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids modify the inverse association between systemic inflammation and cardiovascular fitness [J]. *Clin Nutr*, 2021, 40(6): 4097-4105.

[责任编辑 郑礼胜]