·药剂与工艺·

厚朴挥发油纳米乳凝胶的制备及其对溃疡性结肠炎小鼠的药效评价

张　倩，刘　芳*，张芮苑，邓鸿丹，杨璐萍，任　虹

成都中医药大学 西南特色中药资源国家重点实验室，四川 成都　611137

摘　要：目的　制备厚朴 *Magnoliae Officinalis Cortex*（MOC）挥发油纳米乳凝胶（MOC volatile oil nanogel，MNG），评价其结肠靶向释放性能，并考察其对葡聚糖硫酸钠（dextran sodium sulfate，DSS）诱导溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）小鼠的治疗作用。**方法**　采用自乳化法制备厚朴挥发油纳米乳（MOC volatile oil nanoemulsion，MN），并对其形貌、粒径、电位等理化性质进行表征；以成胶时间为指标优选透明质酸和海藻酸钠的质量浓度，将最优比的透明质酸和海藻酸钠溶于 MN 中形成 MNG，对得到的 MNG 进行理化性质表征，并评价其结肠靶向和对 DSS 诱导的 UC 小鼠的治疗作用。**结果**　所制得的 MN 外观澄清、透明、微泛蓝光，透射电镜观察纳米乳呈球形，平均粒径为（61.56±1.67）nm，ζ 电位为（−21.37±0.45）mV，包封率为（85.25±0.50）%；在最佳 MN 配方的基础上，以海藻酸钠和透明质酸质量浓度分别为 30 mg/mL 和 40 mg/mL 作为凝胶基质，制得最佳 MNG；药效学实验证明 MNG 对 UC 小鼠具有较好的治疗作用。**结论**　成功制备 MNG，提高厚朴挥发油稳定性的同时，使其具有结肠靶向释放能力。

关键词：厚朴挥发油；溃疡性结肠炎；结肠靶向；纳米乳；纳米乳凝胶；稳定性

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2024)03 - 0746 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.006

Preparation of *Magnoliae Officinalis Cortex* volatile oil nanogel and its efficacy evaluation on ulcerative colitis mice

ZHANG Qian, LIU Fang, ZHANG Ruiyuan, DENG Hongdan, YANG Luping, REN Hong

State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources with Southwest Characteristics, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective　To prepare Houpo (*Magnoliae Officinalis Cortex*, MOC) volatile oil nanogel (MNG), evaluate its colon targeted release performance, and investigate its therapeutic effect on dextran sodium sulfate (DSS) induced UC mice. **Methods**　MOC volatile oil nanoemulsion (MN) was prepared by self emulsification method, and its morphology, particle size, potential and other physicochemical properties were characterized; The concentration of hyaluronic acid and sodium alginate was optimized with the gelation time as the index. The optimal ratio of hyaluronic acid and sodium alginate powder was dissolved in the MN to form MNG. The physical and chemical properties of the obtained MNG were characterized, and its colon targeting and therapeutic effects on DSS induced UC mice were evaluated. **Results**　The prepared MN has a clear, transparent, and slightly bluish appearance. According to transmission electron microscopy, the nanoemulsion is spherical with an average particle size of (61.56 ± 1.67) nm, a ζ potential of (−21.37 ± 0.45) mV, and an encapsulation efficiency of (85.25 ± 0.50)%; On the basis of the best formula of MN, the optimal MNG was prepared with the mass concentration of sodium alginate and hyaluronic acid of 30 mg/mL and 40 mg/mL respectively as the gel matrix; The pharmacodynamic experiments had shown that MNG has a good therapeutic effect on UC mice. **Conclusion**　The MNG was successfully prepared, which improved the stability of MOC volatile oil and made it have colon targeted release capacity.

Key words: *Magnoliae Officinalis Cortex* volatile oil; ulcerative colitis; colon targeting; nanoemulsion; nanogel; stability

收稿日期：2023-07-18

基金项目：四川省自然科学基金项目（2023NSFSC0661）；成都市科技局项目（2022-YF05-01112-SN）

作者简介：张　倩（1999—），女，硕士研究生，主要从事中药炮制与中药制剂研究。E-mail: 1490351756@qq.com

***通信作者：**刘　芳（1986—），女，博士，高级实验师，主要从事中药炮制与中药制剂研究。E-mail: bittercaffe1@126.com

厚朴为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.或凹叶厚朴 *M. officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils.的干燥干皮、根皮及枝皮，具有下气除满、燥湿消痰之功[1]。厚朴主要含有木脂素、苷类、生物碱、挥发油等成分[2]，研究表明厚朴挥发油中石竹烯[3]、柠檬烯[4]、萜品烯-4-醇[5]等成分与抗溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）紧密相关，课题组前期研究证明厚朴挥发油对葡聚糖硫酸钠（dextran sodium sulfate，DSS）诱导的 UC 小鼠具有治疗作用[6]。

然而厚朴挥发油具有易挥发、稳定性差、无明确结肠靶向作用等特点，在口服递送中易受肝脏首过效应及肠道黏膜的代谢而降低其疗效[7]，因此如何改善厚朴挥发油稳定性和将其有效递送到炎症肠道部位，成为厚朴挥发油治疗 UC 需解决的关键问题。纳米乳凝胶兼具纳米乳和凝胶的双重优点，纳米乳能够显著改善药物的溶解度，提高药物稳定性，凝胶则能提高纳米乳的黏附性，增强药物在结肠中的滞留，实现持续药物释放的作用[8]。因此，本实验制备了厚朴挥发油纳米乳（*Magnoliae Officinalis Cortex* volatile oil nanoemulsion，MN）和厚朴挥发油纳米乳凝胶（*Magnoliae Officinalis Cortex* volatile oil nanogel，MNG），并对其理化性质进行表征，同时考察了 MNG 在小鼠消化道内的靶向释药行为，验证了其对 UC 小鼠模型的治疗效果，以期为厚朴挥发油新剂型和抗 UC 新药的开发提供候选方案。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CPA225D 型电子天平，美国奥豪斯仪器有限公司；Spectra MAX Plus384 型酶标仪，美谷分子仪器有限公司；KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪，武汉赛维尔生物科技有限公司；UPH-II-10T 型优普超纯水制造系统，成都超纯科技有限公司；BA410 型显微镜，麦克奥迪实业集团有限公司；DZKW-4 型电子恒温水浴锅，北京中兴伟业仪器有限公司；IVIS Spectrum 型小动物三维光学活体成像仪，珀金埃尔默企业管理有限公司；JEM-1400plus 型透射电子显微镜，日本电子株式会社；Axio Imagerm2 EVO10 型光电联用成像系统，上海准权仪器设备有限公司。

1.2 药材与试剂

厚朴干皮收采于四川省都江堰市虹口乡，经成都中医药大学药学院高级实验师连艳老师鉴定为木兰科厚朴属植物厚朴 *M. officinalis* Rehd. et Wils.的干燥干皮；柳氮磺胺吡啶肠溶片，批号 09220207，购自上海信谊天平药业有限公司；白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）试剂盒（批号 20230512E19）、白细胞介素-10（interleukin-10，IL-10）试剂盒（批号 20230512E11）、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）试剂盒（批号 20230505E03），均购自上海茁彩生物科技有限公司；Servicebio® ZO-1 抗体，批号 L14OC15，购自武汉赛维尔生物科技有限公司；Meilunbio®葡聚糖硫酸钠（dextran sodium sulfate，DSS），批号 M0508D，购自大连美仑生物技术有限公司；聚山梨酯 80，批号 2018022801，购自成都市科龙化工试剂厂；Zenbio® Claudin-1 抗体，批号 M11AP01，购自苏州四正柏生物科技有限公司；无水乙醇（批号 2023022401）、海藻酸钠（批号 2021123001）、丙三醇（批号 2021110201）、聚乙二醇-400（批号 2022092901）、醋酸乙酯（批号 2022033101）、正丁醇（批号 2019120301），均购自成都市科隆化学品有限公司；蓖麻油聚氧乙烯醚-40（EL-40，批号 109896007100）、聚氧乙烯氢化蓖麻油（CO-40，批号 109607008240），均购自山东优素华工科技有限公司；细胞膜近红外荧光探针（1,1′-dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethylindotricarbocyanine iodide，DiR），批号 D4006，购自上海百赛生物技术股份有限公司；透明质酸钠，批号 S12034，购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 动物

7～9 周龄雄性 ICR 小鼠 84 只，购自北京斯贝福生物技术有限公司，许可证号为 SCXK（京）2019-0010，于成都中医药大学实验动物中心进行实验。所有动物实验遵循成都中医药大学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 厚朴挥发油的制备

将厚朴按照前期研究[9]进行发汗处理，随后将发汗厚朴打粉，用水蒸气蒸馏法提取挥发油，大火煮沸后微火加热至无挥发油产生为止，收集挥发油，密封后保存于 4 ℃冰箱。

2.2 标准曲线的建立

以正己烷为空白参照[10]，于 200～400 nm 进行紫外扫描，测定得到厚朴挥发油正己烷溶液于 361 nm 处存在最大吸收，故选择 361 nm 作为厚朴挥发油紫外检测波长。将厚朴挥发油溶液稀释至标准系列质量浓度（48.24、24.12、12.06、6.03、3.02、1.51

mg/mL），以正己烷为空白，在厚朴挥发油最大吸收波长 361 nm 处测定标准溶液的吸光度（*A*）值，以 *A* 值为纵坐标、厚朴挥发油质量浓度为横坐标（*C*）绘制厚朴挥发油标准曲线，得回归方程为 $A=0.055\ 4C-0.013\ 1$，$R^2=0.999\ 1$，结果表明厚朴挥发油在 1.51～48.24 mg/mL 线性关系良好。

2.3　MN 的制备

2.3.1　厚朴挥发油在不同助乳化剂中溶解度的测定　由于厚朴挥发油的溶解性较差，故以厚朴挥发油在不同辅料中的溶解度为前提筛选助乳化剂，比较溶解度的大小。取各辅料 0.50 g 于 2 mL 离心管中，分别加入过量厚朴挥发油，涡旋混匀 5 min 后超声 4 h 助溶，静置过夜后，5 000 r/min 离心 10 min，取上清液用正己烷稀释至适当质量浓度，在 361 nm 处测定厚朴挥发油在各辅料中的平衡溶解度[11]。结果见表 1，无水乙醇对挥发油的溶解能力较强，故选用无水乙醇做助乳化剂。

2.3.2　乳化剂的筛选　以无水乙醇为助乳化剂，厚朴挥发油为油相，乳化剂与助乳化剂的质量比（K_m）为 3∶1，分别以聚山梨酯 80、CO-40、EL-40 为乳化剂，制备 MN，绘制伪三元相图。结果如图 1 所示，与聚山梨酯 80 和 CO-40 形成的乳区面积相比，EL-40 作为乳化剂时所形成的 MN 区域面积更大，因此，选择 EL-40 作为乳化剂进行以下实验。

表 1　厚朴挥发油在不同助乳化剂中的溶解度

Table 1　Solubility of *Magnoliae Officinalis Cortex* volatile oil in different co-emulsifier

助乳化剂	溶解度/(mg·g^{-1})	助乳化剂	溶解度/(mg·g^{-1})
聚乙二醇 400	0.223	醋酸乙酯	0.102
无水乙醇	3.124	正丁醇	1.236
丙三醇	0.615		

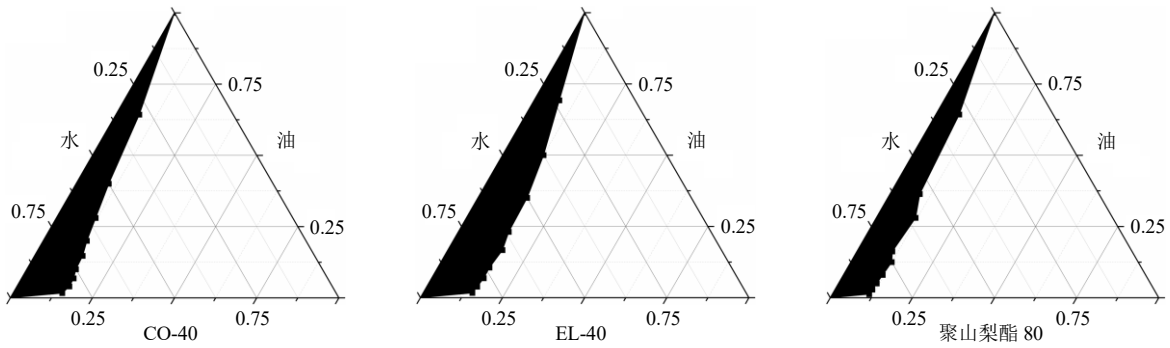


图 1　乳化剂 (CO-40、EL-40、聚山梨酯 80) 筛选的伪三元相图

Fig. 1　Pseudo-ternary phase diagram for selection of emulsifier (CO-40, EL-40, polysorbate 80)

2.3.3　伪三元相图的绘制及 K_m 值的确定　根据“2.3.2”项乳化剂的试验结果，将乳化剂 EL-40 和助乳化剂无水乙醇按照 K_m 分别为 2∶1、3∶1、4∶1 混合，再将该混合物（S_{mix}）与厚朴挥发油以 9∶1、8∶2、7∶3、6∶4、5∶5、4∶6、3∶7、2∶8、1∶9 的质量比配制成混合溶液，在磁力搅拌下加超纯水滴定，观察各溶液的颜色、乳光和澄明度，判断临界点，记录体系由浑浊变澄清时的加水量，计算临界点时各组分的比例。用 OriginPro 8.5 软件绘制伪三元相图，图中各临界点连线下方的区域即为 MN 区域，比较该区域面积大小，确定乳化剂与助乳化剂的质量比。结果如图 2 所示，K_m 值为 3∶1 时，

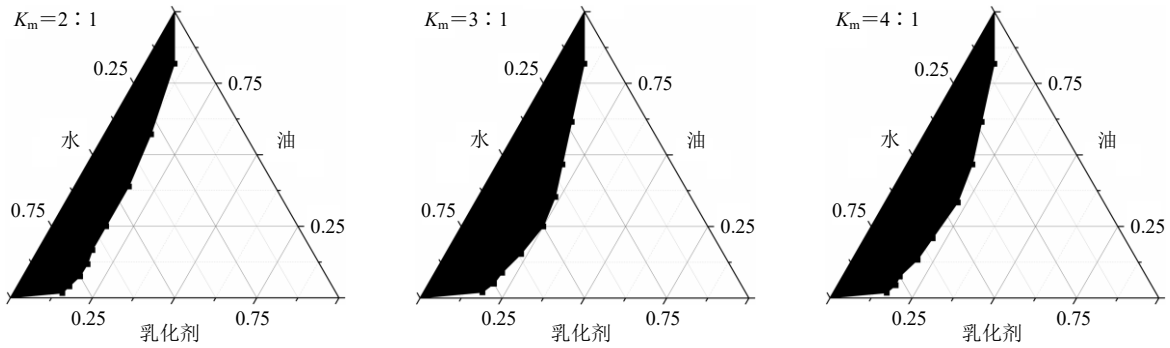


图 2　K_m 值筛选的伪三元相图

Fig. 2　Pseudo-ternary phase diagram for selection of K_m

该体系形成的 MN 面积最大，故确定 EL-40 与无水乙醇的比例为 3∶1。

2.3.4 MN 的制备 按照最优 K_m 值制备 S_{mix}，分别以 S_{mix} 与油相比例为 9∶1、8∶2、7∶3、6∶4、5∶5、4∶6、3∶7、2∶8、1∶9 的质量比配制成混合溶液，使其总质量为 1 g，于磁力搅拌下加超纯水滴定，观察不同比例的油相形成的 MN 放置 7 d 后乳液的形态，选取形成的乳液最稳定、不出现分层的 MN，记录各组分的比例。结果见表 2，S_{mix} 与厚朴挥发油的比例为 8∶2 时，形成的乳液更加稳定，没有出现分层、絮凝或粒径增大的情况，最终确定 MN 的最佳处方为 EL-40-无水乙醇-厚朴挥发油的质量比为 6∶2∶2。

表 2 S_{mix} 与油相比例筛选结果

Table 2 Ratio screening result of S_{mix} and oil

S_{mix} 与油相比值	外观性状	是否有丁达尔效应
9∶1	乳液分层，有少量絮凝状沉淀析出	否
8∶2	乳液不分层，清澈透明，微泛蓝光	是
7∶3	乳液分层，有少量絮凝状沉淀析出	否
6∶4	乳液分层，有少量絮凝状沉淀析出	否
5∶5	乳液分层，有大量絮凝状沉淀析出	否
4∶6	乳液分层，有大量絮凝状沉淀析出	否
3∶7	乳液分层，有大量絮凝状沉淀析出	否
2∶8	乳液分层，有大量絮凝状沉淀析出	否
1∶9	乳液分层，有大量絮凝状沉淀析出	否

2.4 MN 的质量评价

2.4.1 宏观和微观形态观察 采用透射电子显微镜对 MN 的微观形态进行表征，取适量制备好的 MN，用去离子水适当稀释，滴在覆盖有碳膜的铜网上，滴加质量分数为 1%的磷钨酸溶液进行负染 2 min，用滤纸吸取多余的溶液，自然晾干后在透射电子显微镜下观察纳米乳液的形态。结果如图 3 所示，MN 经透射电子显微镜观察发现，纳米乳外观澄清、透明、微泛蓝光，符合纳米乳的制剂特征。

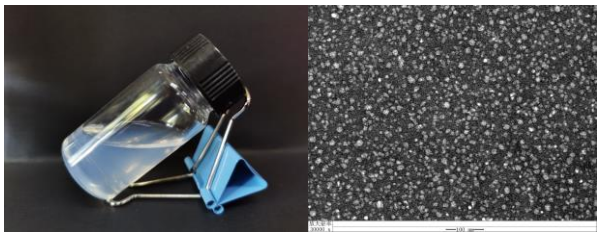


图 3 纳米乳的宏观和微观形态

Fig. 3 Macroscopic and microscopic morphology of nanoemulsion

2.4.2 粒径、多分散指数（polydispersity index，PDI）和 ζ 电位 按优化后处方制备 MN 3 批，取 0.1 mL MN 并稀释 100 倍，在室温下使用纳米粒度仪测量纳米乳液的平均粒径、多分散系数（polydispersity index，PDI）以及 ζ 电位。结果如图 4、5 所示，MN 平均粒径为（61.56±1.67）nm，PDI 为 0.16±0.37，ζ 电位为（−21.37±0.45）mV，呈正态分布。

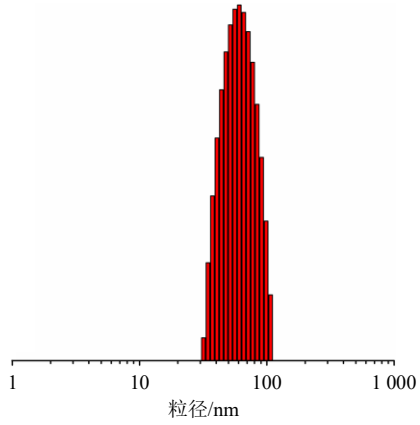


图 4 MN 的粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of MN

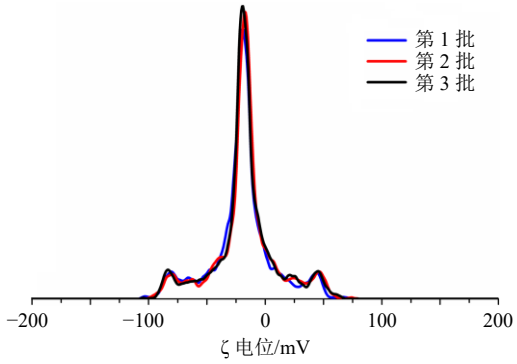


图 5 MN 的 ζ 电位分布

Fig. 5 ζ potential distribution of MN

2.4.3 pH 值及黏度 按最优处方平行制备 3 批 MN，使用 pH 计和旋转黏度计于室温条件下测定其 pH 值，各平行 3 次。测量结果表明，最优处方 MN 的 pH 值为 6.07±0.07，黏度为（54.49±0.99）mPa·s。

2.4.4 包封率的测定 参照文献方法[12]，测定了 MN 中游离油和总油的含量，并根据以下方程计算纳米乳的包封率。将 2 mL MN 加入 5 mL 正己烷中，振荡 1 min，静置分层后取上层有机相，在 361 nm 处测定其 *A* 值，所得值为游离油含量；取 4 mL MN 在 400 W 超声破碎 10 min，使其破乳，加入 10 mL 正己烷后振荡 1 min，静置分层，取上层有机相在 361 nm 处测定其 *A* 值[13]，所得值为总油含量。

将游离油含量和总油含量代入标准曲线，用公式计算得到 MN 的包封率为（85.25±0.50）%。

包封率＝(总油量－游离油量)/总油量

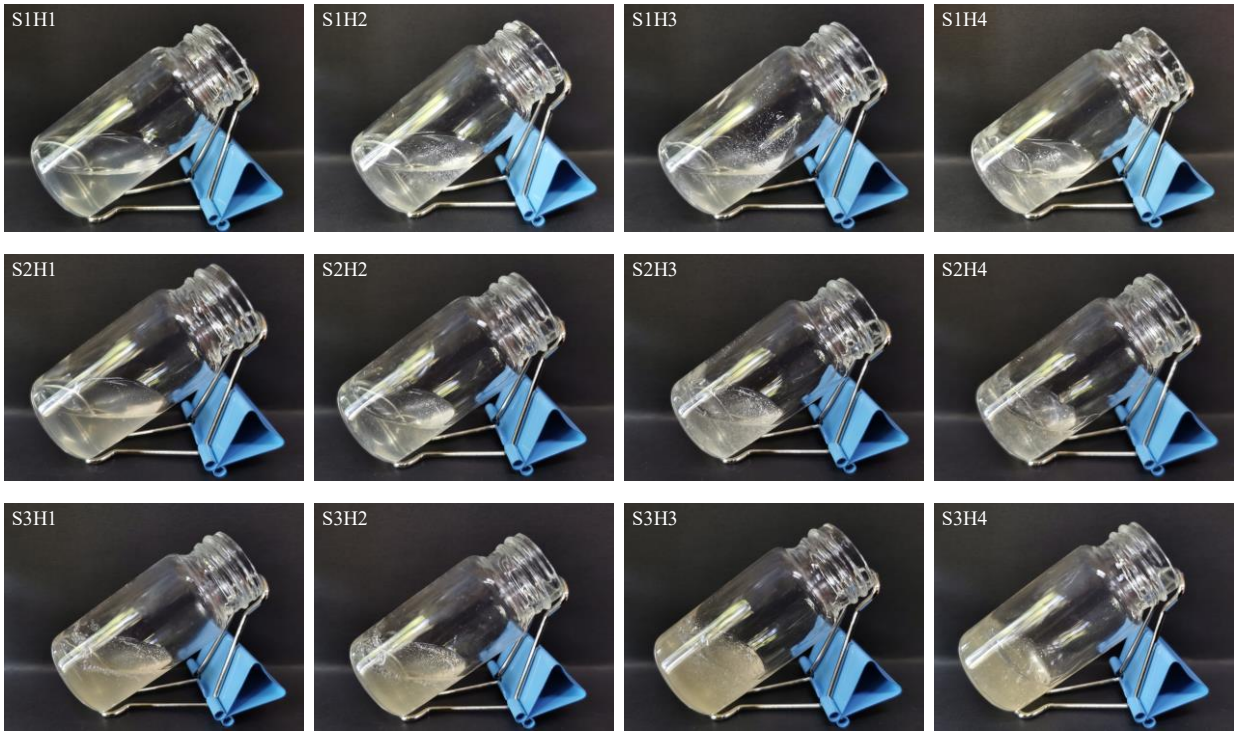
2.5　MNG 的制备

2.5.1　成胶时间的测定　采用倾斜法测定成胶时间，海藻酸钠和透明质酸溶液接触后开始计时，然后倾斜西林瓶，观察溶液的流动情况，待倾斜西林瓶时体系不再流动则停止计时，该时间即为成胶时间。

2.5.2　空白水凝胶基质的选择　以成胶时间为评价指标，优化水凝胶的处方比例。取透明质酸溶解在蒸馏水中，形成质量浓度为 10、20、30 mg/mL 的均匀溶液；海藻酸钠溶解在蒸馏水中，形成质量浓度为 10、20、30、40 mg/mL 的均匀溶液。

将等体积的海藻酸钠和透明质酸溶液混合均匀，并直至成胶。形成的空白水凝胶基质根据组成基质的初溶液质量浓度进行命名（例如 20 mg/mL 的海藻酸钠溶液和 30 mg/mL 的透明质酸溶液形成的空白基质命名为 S2H3），优选最优成胶比。各组水凝胶混合 1 min 时的成胶状态见图 6，可以发现海藻酸钠和透明质酸的质量浓度均对水凝胶的成胶状态有显著影响，随着二者质量浓度的增大，1 min 时水凝胶越来越稳定。

当海藻酸钠质量浓度和透明质酸质量浓度均为 10 mg/mL 时，无法形成稳定的水凝胶。当海藻酸钠质量浓度为 10 mg/mL 时，随着透明质酸的质量浓度由 20 mg/mL 增大到 40 mg/mL，成胶时间由 301.67 s 缩短至 216.17 s，水凝胶趋于稳定。当海藻酸钠质量浓度为 30 mg/mL 时，随着透明质酸的质量浓度由 10 mg/mL 增大至 40 mg/mL，成胶时间进一步由 172.34 s 缩短至 26.91 s，水凝胶趋于稳定且在透明质酸质量浓度为 40 mg/mL 时达到最佳水凝胶状态。



S*x*H*y* 表示 *x*×10 mg·mL^{-1} 海藻酸钠溶液与 *y*×10 mg·mL^{-1} 透明质酸溶液形成的空白基质

S*x*H*y* represents blank matrix formed by *x* × 10 mg·mL^{-1} sodium alginate solution with *y* × 10 mg·mL^{-1} hyaluronic acid solution

图 6　1 min 时各组水凝胶的状态

Fig. 6　Hydrogel status of each group at 1 min

2.5.3　载药纳米乳水凝胶的制备　取最优比透明质酸和海藻酸钠粉末用 MN 溶解，并继续搅拌 15 min，即得 MNG。

2.6　MNG 的质量评价

2.6.1　微观形态特征　将冻干后的样品进行喷金处理，通过光电联用成像系统观察其表面形态、支架结构。结果如图 7 所示，水凝胶的孔隙与孔隙之间相互贯通，结构整齐，形成的三维网格孔洞结构均匀分布。

2.6.2　pH 值及黏度测定　按最优处方平行制备 3 批

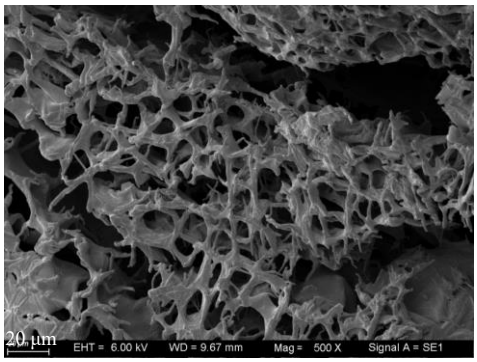


图 7 扫描电镜图

Fig. 7 Scanning electron image

MNG，应用 pH 计和旋转黏度计于室温条件下测定其 pH 值，各平行 3 次。测量结果表明，MNG 的 pH 值为 6.07±0.07，黏度为（54 392.33±809.52）mPa·s。

2.6.3 体外模拟药物释放度测定 参考《中国药典》2020 年版中的方法[14]配制人工模拟胃液（simulated gastric fluid，SGF）、人工模拟小肠液（simulated intestinal fluid，SIF）和人工模拟结肠液（simulated colonic fluid，SCF）来模拟人体消化。分别取 MN 和 MNG 各 1.0 g 置于透析袋中，放入 SGF 中 2 h，取出水洗后接着放入 SIF 中消化 4 h，最后放入 SCF 中 42 h。前 6 h 每隔 0.5 h 取样，后 42 h 每隔 1 h 取样[15]，整个过程中溶液放置在 37 ℃恒温水浴锅中并以 100 r/min 振荡，每次吸取 5 mL 模拟液测定 1 次厚朴挥发油的含量，同时补足对应的新鲜模拟液 5 mL。使用正己烷萃取厚朴挥发油并根据 *A* 值计算出厚朴挥发油的含量，计算释放率（R），*R* 的计算公式如下。

$$R=R_t/M_i$$

R_t 为厚朴挥发油在 t 时刻的累积释放量，M_i 为最开始加入的厚朴挥发油的原始质量

结果从图 8 中可得 MN 和 MNG 的最终累积释放率分别为（89.83±0.50）%和（61.68±1.15）%，其结果表明，这 2 种制剂最终释放度有显著性差异，MN 在 SGF 消化过程中释放较为明显，累积释放率为（34.32±0.89）%，MNG 在 SGF 中释放减少，累积释放率为（19.37±1.39）%（0～2 h），其结果表明，这 2 种制剂在 0～2 h 释放度有显著性差异；MN 在 SIF 消化过程中释放率为（53.48±0.13）%，MNG 在 SIF 中释放较少，释放率为（32.85±0.89）%（2～6 h），其结果表明，这 2 种制剂在 2～6 h 释放度有显著性差异；MN 在 SCF 消化过程中释放明显，消化至 24 h 释放率为（89.05±0.20）%，而 MNG 在 SCF 消化过程中呈缓慢逐渐释放趋势，至 24 h 释放率为（50.16±0.80）%，其结果表明，这 2 种制剂在 24 h 释放度有显著性差异。结果显示，MN 在口服递药中易在胃和小肠中释放，使其递送至结肠部位时含量降低，而 MNG 在胃和小肠内相对稳定，可以减少挥发油受胃和小肠侵蚀，达到结肠靶向的作用。

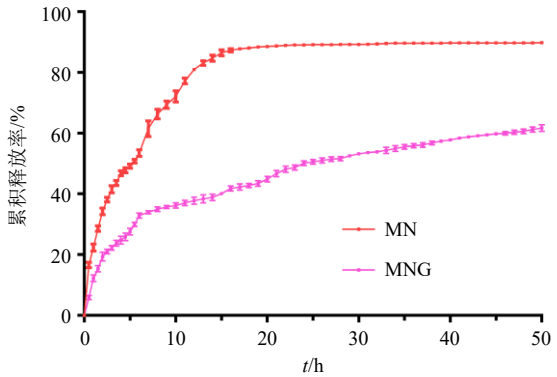


图 8 体外缓释累积释放曲线

Fig. 8 Cumulative release curve of sustained release *in vitro*

2.6.4 小鼠活体生物分布评价 24 只 ICR 小鼠通过在 7 d 内自由饮用 3% DSS 来诱导 UC 小鼠模型，而后将其随机分为 MN 组、MNG 组、Free-DiR 组，每组 8 只。制备含有相同质量浓度 DiR 的各组制剂，使用酶标仪检测其 DiR 荧光含量，分别以 DiR 0.5 mg/kg 的剂量给小鼠 ig，小鼠分别在 ig 给药后 4 个不同时间点（3、6、12、24 h），使用活体成像系统对小鼠进行成像，并在 24 h 处死剩余全部小鼠，从体内分离结肠后立即检测荧光。

结果如图 9 所示，给药 3 h 或 6 h 后，各组荧光差异非常小。在 12 h 时，MNG 组的结肠部位荧光强度最强，其次是 MN 组和 Free-DiR 组，这种状态一直持续到 24 h 结束，且在 24 h 解剖小鼠后结肠中凝胶组的荧光强度依然很强，如图 10 所示。然而，MN 组和 Free-DiR 组的荧光值趋势非常相似，可能由于没有凝胶外层保护的情况下而过早降解，继而不能再体内凸显纳米乳凝胶的靶向作用。因此，小鼠全身荧光变化的结果突出了纳米乳凝胶可以在口服递送中保护挥发油减少胃和小肠侵蚀的优势。

2.7 MNG 对 UC 的治疗作用

2.7.1 分组与造模 60 只小鼠适应性喂养 7 d，称定质量并标号，随机分为空白组（10 只）以及造模组（50 只）。空白组给予自由饮用蒸馏水，造模组自由饮用配制的 3% DSS 水溶液，饮用 3 d，隔天更换新鲜 DSS 溶液。在第 3 天造模结束后，根据疾病

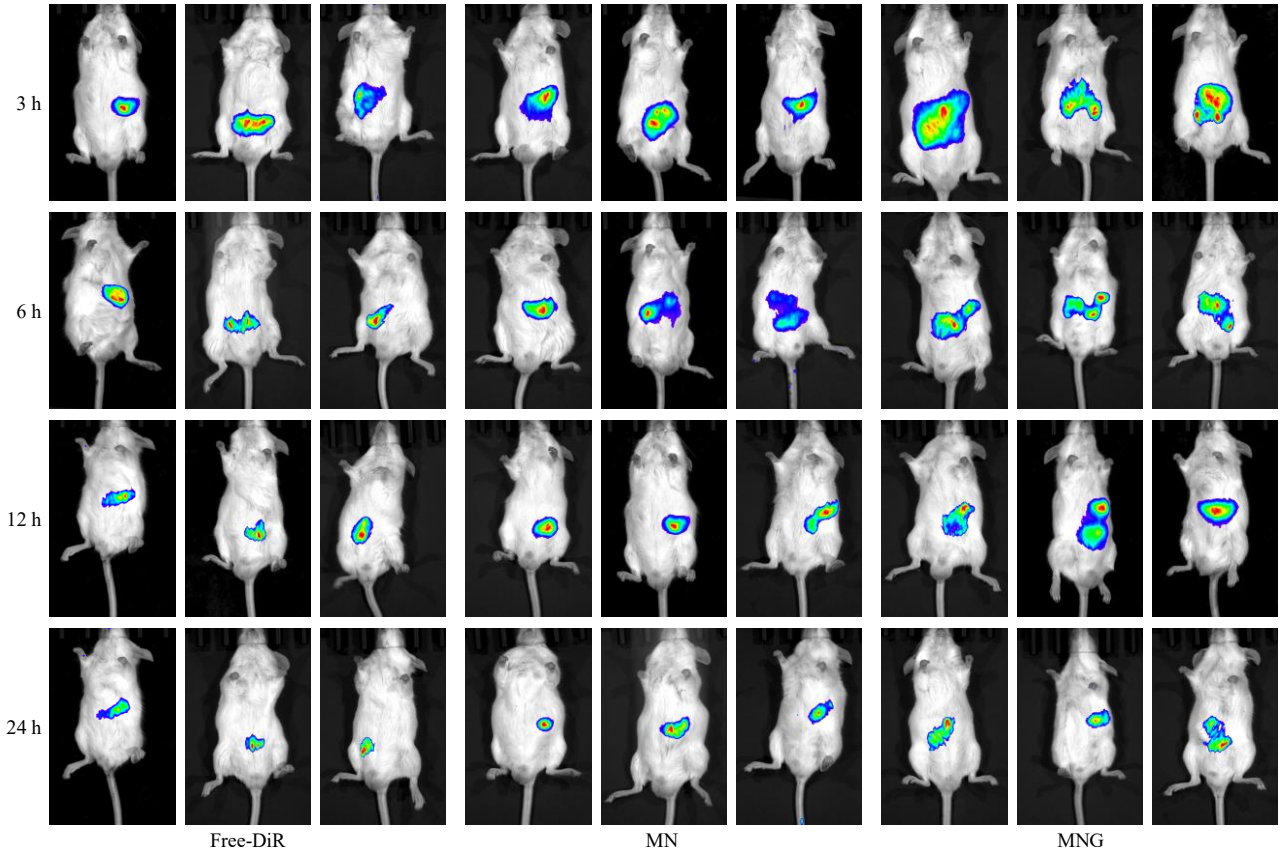


图 9　活体生物分布图

Fig. 9　Living organisms distribution maps

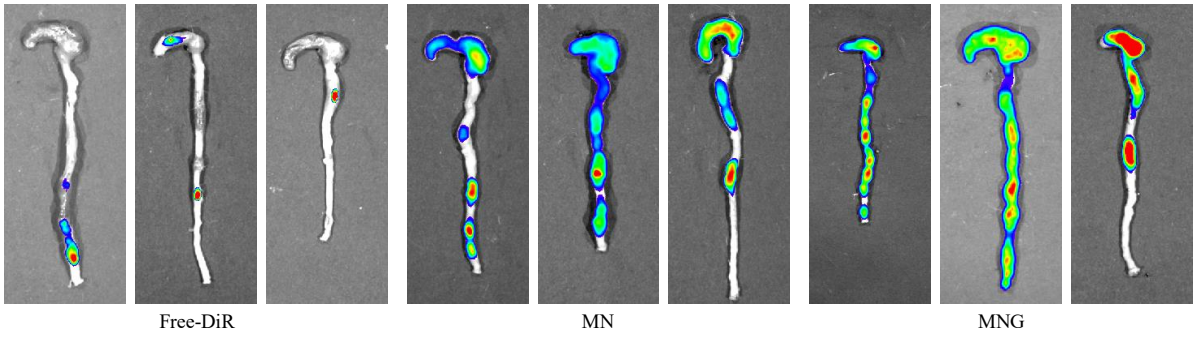


图 10　荧光结肠分布图

Fig. 10　Fluorescent colon distribution maps

活动指数（disease activity index，DAI）评分对模型进行评价，DAI 评分＞1 分为造模成功[16]。50 只小鼠均造模成功，再将其随机分为模型组、柳氮磺吡啶组、空白挥发油组、MN 组、MNG 组，每组 10 只，继续给予 3% DSS 水溶液自由饮用 4 d。

2.7.2　药物处理　依据《中国药典》2020 年版[14]，规定厚朴饮片用量为 3～10 g，以成人体质量 70 kg 用药剂量为 10 g 计，参照《中药药理研究方法学》[17]，结合厚朴挥发油得率（约为 0.25%），根据预试验结果，按照厚朴挥发油最高给药剂量为 26 mg/kg，使制得的 MN、MNG 中发汗厚朴挥发油的含药量为 26 mg/kg，从造模第 3 天开始，分别给予小鼠 ig，柳氮磺吡啶组 ig 给予柳氮磺吡啶混悬液（200 mg/kg），空白组和模型组 ig 给予等体积的蒸馏水，所有小鼠 ig 体积均为 10 mL/kg，每天 1 次，连续给药 7 d，每天早晨观察小鼠一般情况，记录 DAI 评分。

2.7.3　标本制备与采集　第 9 天完成给药，第 10 天脱颈处死小鼠，再将小鼠的结肠从腹腔中完整取出，测量结肠长度拍照后取出肠内容物，称取结肠质量，注意不要将结肠弄破，将其分为两端段，一段用冰

PBS 漂洗后用锡箔纸包裹，冻存于−80 ℃超低温冰箱中，用于 Elisa 实验；另一段置于 4%多聚甲醛溶液中固定，常温放置，用于结肠组织 HE 染色和免疫荧光实验。

2.7.4 统计学分析 使用 SPSS 25.0 统计软件对实验数据进行处理，各组间比较采用单因素方差分析比较，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2.7.5 小鼠的粪便性状、便血情况及 DAI 评分的影响 自实验第 1 天起，每天于相同时间段内，观察记录小鼠的体质量、腹泻、便血、活动状态和死亡情况。结肠炎小鼠的疾病活动指数评分标准见表 3。

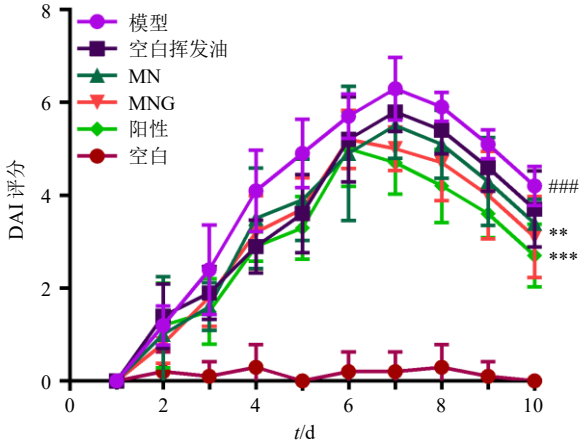
DAI＝(体质量丢失评分＋腹泻评分＋便血评分)/3

结果如图 11 显示，在第 10 天治疗结束时，空白组小鼠精神状态良好，毛发有光泽，大便正常，肛门无出血。与空白组相比，模型组小鼠 DAI 评分明显升高（$P<0.001$），精神萎靡，食欲减退，毛发暗淡，出现腹泻、血便。与模型组相比，柳氮磺吡啶组的小鼠 DAI 评分显著降低（$P<0.001$），MNG 组的小鼠 DAI 评分明显降低（$P<0.01$），小鼠精神状态良好，食欲有增加，毛发更有光泽，腹泻及血便情况好转。结果表明，相比于空白挥发油及 MN 组，MNG 具有更好的治疗效果，药效更佳。

表 3 DSS 小鼠 DAI 评分标准

Table 3 DAI scoring standard of DSS mice

计分	体质量下降率/%	粪便性状	便血情况
0	无	正常	阴性
1	1～5	便软，成形	隐血(+)
2	6～10	有黏液，成形	隐血(++)
3	11～15	便软，有黏液，成形	隐血(+++)
4	＞15	便软，有黏液，不成形	肉眼血便



与空白组比较：$^{###}P<0.001$；与模型组比较：$^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$。

$^{###}P<0.001$ *vs* blank group; $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ *vs* model group.

图 11 DAI 评分的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Fig. 11 Effect on DAI score ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

2.7.6 对小鼠结肠长度、结肠单位长度质量和脾脏系数的影响 末次给药后处死小鼠，取小鼠结肠和脾脏。直尺测量结肠自然长度，并拍照。滤纸吸干结肠及脾脏外表面血液，称量并记录小鼠结肠及脾脏质量。

脾脏系数＝小鼠脾脏质量/小鼠体质量

结肠单位长度质量＝结肠质量/结肠长度

结果如图 12 和表 4 显示，与正常组相比，模型组小鼠结肠长度显著缩短（$P<0.001$），脾脏系数和单位长度结肠质量显著升高（$P<0.001$）。与模型组比较，柳氮磺吡啶组及 MNG 组的小鼠结肠长度显著增加（$P<0.01$、0.001）；MNG 组及柳氮磺吡啶组脾脏系数显著降低（$P<0.001$），MN 组及空白挥发油组脾脏系数明显降低（$P<0.05$、0.01）；柳氮磺吡啶及 MNG 组单位结肠质量系数显著降低（$P<0.01$、

图 12 对结肠长度的影响

Fig. 12 Effect on colon length

表 4 对结肠长度、结肠单位长度质量和脾脏指数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 4 Effect on colon length, colon unit length weight and spleen index ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	脾脏系数	结肠长度/cm	结肠单位长度质量/(μg·cm^{-1})
空白	3.02±0.67	8.33±0.44	26.65±5.78
模型	7.04±0.70$^{###}$	5.69±1.00$^{###}$	43.12±2.10$^{###}$
空白挥发油	5.76±1.05*	6.22±0.90	38.71±2.10
MN	5.49±0.83**	6.32±0.90	38.13±4.38
MNG	3.98±0.98***	6.95±0.38**	33.06±5.44**
阳性	3.85±0.55***	7.45±0.91***	30.90±4.91***

与空白组比较：$^{###}P<0.001$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$；表 5 同。

$^{###}P<0.001$ *vs* blank group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ *vs* model group; same as table 5.

0.001）。结果表明，相比于空白挥发油及 MN 组，MNG 组具有更好的治疗效果，药效更佳。

2.7.7　HE 染色观察小鼠结肠黏膜病理变化　取多聚甲醛固定的结肠组织，经脱水、石蜡包埋和组织切片后，HE 染色。光学显微镜下观察小鼠结肠组织结构、黏膜、杯状细胞、绒毛排列和炎性细胞浸润等形态表现并拍照。结果如图 13 显示，空白组小鼠肠道组织细胞饱满且排列整齐，黏膜完整，杯状细胞明显，腺体排列规则，隐窝结构清晰可见。与空白组相比，模型组小鼠肠道组织细胞出现上皮细胞破损且排列紊乱，肠道黏膜受损，腺体排列紊乱，隐窝有不同程度的损坏，存在有大量的炎性细胞浸润现象。与模型组相比，各给药组小鼠的结肠黏膜受损情况有所改善，炎性细胞浸润减少，腺体排列规则，杯状细胞明显增多，隐窝结构恢复，且 MNG 组恢复情况优于空白挥发油及 MN 组。

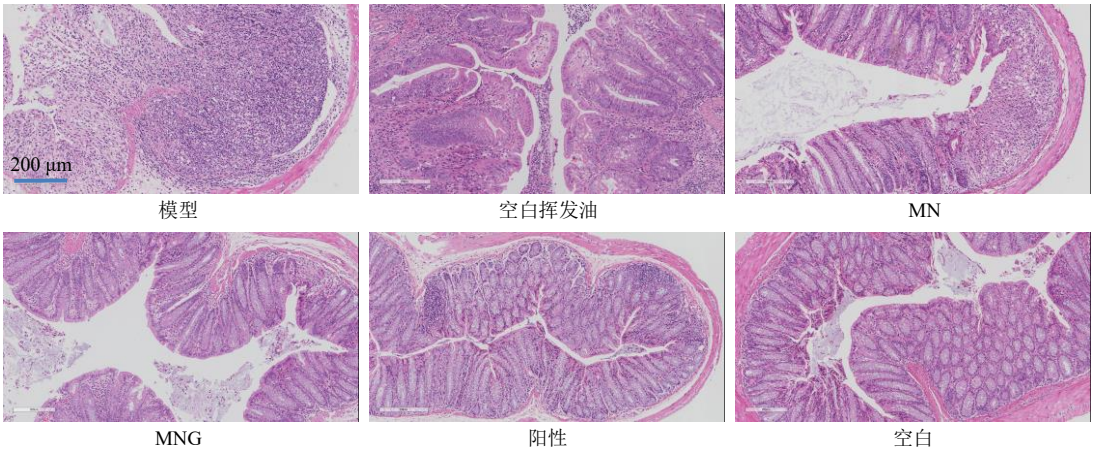


图 13　对小鼠结肠组织病理的影响 (HE 染色)

Fig. 13　Effect on colon histopathology of mice (HE staining)

2.7.8　对小鼠结肠组织中炎症因子水平的影响　取各组小鼠结肠组织，称定质量，加适量 PBS，匀浆，离心，收集上清液，按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、IL-10、TNF-α 水平。结果表 5 显示，与空白组比较，模型组小鼠结肠组织中的 TNF-α、IL-6 水平显著升高（P＜0.001），IL-10 的水平显著降低（P＜0.001）。与模型组比较，柳氮磺吡啶组及 MNG 组小鼠结肠组织中的 TNF-α、IL-6 水平显著降低（P＜0.001），IL-10 水平明显升高（P＜0.05、0.01）；MN 组 TNF-α、IL-6 水平明显降低（P＜0.01）。结果表明，MNG 可有效抑制促炎因子分泌、增强抗炎因子的分泌来抑制肠道炎症。

表 5　各组小鼠结肠组织中 TNF-α、IL-6、IL-10 含量 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 5　Contents of TNF-α, IL-6 and IL-10 in colon tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	IL-6/(pg·mL^{-1})	IL-10/(pg·mL^{-1})	TNF-α/(pg·mL^{-1})
空白	19.84±1.76	67.89±6.85	87.44±8.04
模型	30.71±3.40$^{###}$	44.85±10.09$^{###}$	127.59±20.14$^{###}$
空白挥发油	28.90±4.00	52.01±5.25	113.65±13.50
MN	26.05±2.30**	53.76±9.87	103.07±9.73**
MNG	22.86±2.04***	57.64±8.13*	100.07±10.68***
阳性	22.37±2.05***	59.67±8.71**	100.98±10.68***

2.7.9　免疫荧光法观察小鼠结肠组织中 claudin-1 和 ZO-1 蛋白的表达　取结肠组织石蜡切片脱蜡至水；柠檬酸盐缓冲液 80 ℃修复抗原 20 min，PBS 冲洗 5 min×3；滴加山羊血清室温封闭 20 min，PBS 冲洗 5 min×3；滴加一抗 claudin-1 和 ZO-1，4 ℃冰箱孵育过夜，PBS 冲洗 5 min×3，滴加对应二抗，37 ℃孵育 30 min，PBS 冲洗 5 min×3；滴加 DAPI 室温孵育 10 min，PBS 冲洗 5 min×3 后，使用抗荧光衰减封片剂进行封片，于荧光显微镜下观察并采集图像。

结果如图 14 显示，空白组小鼠结肠组织中 claudin-1 和 ZO-1 蛋白在结肠黏膜呈连续性高表达，充满整个视野，模型组小鼠组织中 claudin-1 和 ZO-1 蛋白在结肠黏膜的表达呈间断性，荧光强度明显下降；与模型组相比，空白挥发油组和 MN 组小鼠结肠组织紧密连接蛋白 claudin-1 和 ZO-1 表达范围增加，但荧光强度较弱，MNG 组和阳性组小鼠结肠组织紧密连接蛋白 claudin-1 和 ZO-1 在结肠荧光强度明显增加，荧光较强。结果表明，MNG 可以提高 claudin-1、ZO-1 紧密连接蛋白的表达改善结肠黏膜屏障损伤。

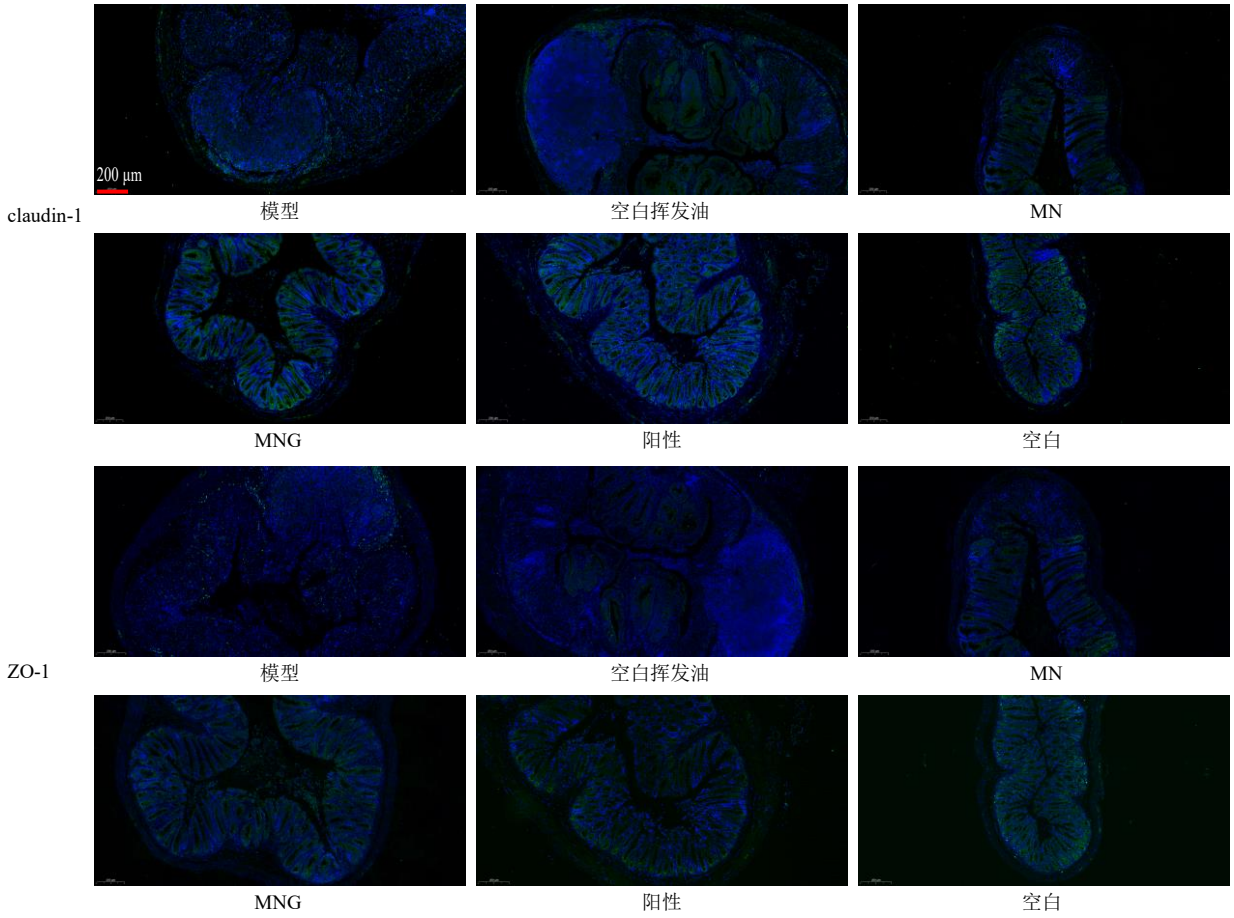


图 14　各组中 claudin-1 和 ZO-1 蛋白表达

Fig. 14　Expression of claudin-1 and ZO-1 proteins in each group

3　讨论

厚朴主要化学成分包括生物碱类、木脂素类、挥发油等，现代药理学研究表明厚朴挥发油具有明显的抗炎[18]、抗氧化[19]、抗菌[20]等生物活性，具有广阔的应用前景。但厚朴挥发油理化性质不稳定，遇光、氧气、高温会发生活性成分的降解、挥发现象，这与其所含主要活性成分倍半萜、萜烯及含氧衍生物[21]等有关。与此同时，口服递送厚朴挥发油受胃肠道 pH 值、首过效应及在肠道代谢的影响，会降低其疗效，因此，如何提高厚朴挥发油稳定性并将其有效递送到炎症部位，成为利用厚朴挥发油治疗 UC 亟待解决的关键问题。为改善挥发油理化性质稳定性差、易降解的问题，本实验将挥发油制成纳米乳，增加其稳定性和溶解度，外层用海藻酸钠和透明质酸制备了一层水凝胶，调控药物在结肠释放。透明质酸[22]是一种表面带负电荷的理想的结肠靶向药物递送材料，它可以通过静电吸附粘附在炎症粘膜上，提高纳米乳的黏附性，增强药物在结肠中的滞留；同时，海藻酸钠[23]是一种对酸敏感的天然多糖材料，可以将更多的药物递送到结肠部位，大大提高药物的生物利用度，实现局部、持续的药物释放作用。

在体外模拟胃肠道 pH 值环境的药物释放结果表明，外层水凝胶的包裹能有效减少在胃和小肠的药物突释，并在结肠下持续释放药物。小动物活体成像实验证明了 MNG 具有结肠靶向的趋势，提示外层水凝胶可以保护药物过早释放，并达到药物缓释作用。药效学等结果表明，MNG 能调节炎症因子的分泌，提高 claudin-1、ZO-1 紧密连接蛋白的表达改善结肠黏膜屏障损伤。

综上，本实验制备的 MNG 不仅制备简单、工艺成熟，解决厚朴挥发油易挥发、稳定性差的制剂难题的同时，可以增强了药物在胃肠道稳定性，实现结肠靶向释放，其缓释作用可使药物延长治疗结肠黏膜炎症的时间，因而赋予 MNG 具有缓释与靶向的双重功能，为厚朴挥发油综合开发利用和抗 UC 新药的开发提供解决候选方案。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 张佳旭, 黄成凤, 朱兴龙, 等. 基于 CRITIC 结合 Box-Behnken 响应面法的厚朴产地趁鲜加工与炮制一体化工艺研究 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5560-5567.

[2] 曹迪, 徐照辉, 王芳芳. 厚朴挥发油化学成分及其抗炎作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2015, 22(6): 647-649.

[3] Cho J Y, Chang H J, Lee S K, *et al*. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of beta-caryophyllene, a sesquiterpene [J]. *Life Sci*, 2007, 80(10): 932-939.

[4] Yu L H, Yan J, Sun Z G. *D*-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 2339-2346.

[5] 张泽财. 花椒不同提取物对溃疡性结肠炎模型小鼠的保护作用及机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.

[6] 张倩, 张芮苑, 邓鸿丹, 等. 中药厚朴产地加工发汗前后所含挥发油抗氧化活性及治疗溃疡性结肠炎药效研究 [J/OL]. 中华中医药学刊, (2023-10-17) [2023-12-25]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20231016.0904.010.html.

[7] 田春雨, 秦之琦, 汤洪萍, 等. 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 [J]. 中草药, 2022, 53(21): 6734-6740.

[8] 谢明华, 葛敏, 高建青. 微乳凝胶经皮给药制剂的研究与应用进展 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(6): 764-768.

[9] 刘畅, 王潇, 刘芳, 等. 基于多指标质量差异关键属性优化厚朴产地加工“发汗”工艺 [J]. 中草药, 2021, 52(3): 677-684.

[10] 陈程, 杜远东, 廉婷, 等. 基于白芨多糖的牡丹籽油纳米乳凝胶的制备与质量评价 [J]. 中国油脂, 2020, 45(12): 84-87.

[11] 汤小涵, 王哲, 闫巧, 等. 基于羧甲基壳聚糖-氧化透明质酸自组装行为构建的 pH 响应型纳米乳水凝胶给药系统 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 4992-5000.

[12] 农家慧, 蒋倩, 孔令艳, 等. 基于凹凸棒稳定的姜精油纳米乳的性质表征和结肠靶向研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(11): 13-19.

[13] Tang M M, Liu F, Wang Q, *et al*. Physicochemical characteristics of ginger essential oil nanoemulsion encapsulated by zein/NaCas and antimicrobial control on chilled chicken [J]. *Food Chem*, 2022, 374: 131624.

[14] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 263.

[15] 林传舟. 亚麻籽油多层乳液及其微胶囊的制备研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2015.

[16] Murano M, Maemura K, Hirata I, *et al*. Therapeutic effect of intracolonically administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1): 51-58.

[17] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1103.

[18] 曹迪, 徐照辉, 王芳芳. 厚朴挥发油化学成分及其抗炎作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2015, 22(6): 647-649.

[19] 蹇顺华, 苗丽坤, 李星, 等. 厚朴挥发油萃取工艺优化、成分分析及抗氧化性分析 [J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(3): 165-174.

[20] 唐飞, 刘美辰, 张世洋, 等. 广藿香、厚朴配伍前后挥发油化学成分及抗菌活性对比研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(4): 478-483.

[21] 杨红兵, 石磊, 詹亚华, 等. 湖北恩施州产厚朴的挥发油分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(1): 42-44.

[22] Zhang Y, Ma R R, You C Y, *et al*. Hyaluronic acid modified oral drug delivery system with mucoadhesiveness and macrophage-targeting for colitis treatment [J]. *Carbohydr Polym*, 2023, 313: 120884.

[23] Li J, Pu Y, Li S, *et al*. Orally administrated olsalazine-loaded multilayer pectin/chitosan/alginate composite microspheres for ulcerative colitis treatment [J]. *Biomacromolecules*, 2023, 24(5): 2250-2263.

[责任编辑 郑礼胜]