

• 药剂与工艺 •

载雷公藤红素结肠靶向-酶敏感纳米粒的制备、表征及药效学研究

张唯唯, 刘小铜, 杨林星, 伍西溪, 王思雅, 何聪健, 周玉金, 石金凤*

成都医学院药学院, 四川 成都 610500

摘要: **目的** 构建了一种针对炎症微环境的结肠靶向-酶敏感纳米给药系统以解决雷公藤红素的递送难题。**方法** 合成透明质酸-金刚烷甲酸(hyaluronic acid-adamantanecarboxylic acid, HA-AD)聚合物, 通过 $^1\text{H-NMR}$ 进行结构确认。采用透析法制备装载雷公藤红素(celastrol, Cel)的纳米粒(Cel/NPs), 以包封率为指标, 通过单因素考察和 Box-Behnken 设计-响应面法试验优化改善处方, 并测定纳米粒的粒径分布、 ζ 电位、形态、稳定性、酶敏感性、药物包封率和载药量; 采用透析袋法考察纳米粒的体外释放行为; 激光共聚焦显微镜和流式细胞仪分析 NCM460 细胞对药物的摄取情况; 建立急性溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)小鼠模型, 对比研究 free Cel 和 Cel/NPs 的体内抗 UC 作用。**结果** 最佳制备工艺为 Cel 2.04 mg、环糊精 27.19 mg、HA-AD 7.96 mg、DMSO 3.0 mL、纯水(reverses osmosis, RO) 10 mL、搅拌时间 2 h。所得纳米粒为光滑圆整球形, 平均粒径为 (152.37 ± 1.42) nm, 多分散指数(polydispersity index, PDI)为 0.262 ± 0.009 , ζ 电位为 (-32.1 ± 0.8) mV, Cel 包封率和载药量分别为 $(94.18 \pm 2.36)\%$ 、 $(5.17 \pm 0.13)\%$, 递药体系具有较好的储存稳定性和胃肠道稳定性, 但在结肠微环境 α -淀粉酶的刺激下, 可使环糊精迅速解体, 从而瓦解 Cel/NPs, 快速释放 Cel; Cel/NPs 增加了 NCM460 细胞对药物的摄取。体内抗 UC 结果显示 Cel/NPs 可以显著改善 UC, 降低小鼠疾病活动指数评分, 恢复小鼠结肠组织状态, 增加结肠长度, 降低脾脏质量, 恢复结肠黏膜上皮完整性。**结论** 所制备 Cel/NPs 有利于雷公藤红素抗 UC 靶向递送, 显著改善 UC, 为结肠病变部位药物靶向递送提供新思路。

关键词: 雷公藤红素; 结肠靶向递药系统; 酶敏感; 溃疡性结肠炎; Box-Behnken 设计-响应面法**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)11-3635-12**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.11.007

Preparation, characterization and pharmacodynamics of colon-targeted/enzyme-sensitive nanoparticles loading celastrol

ZHANG Weiwei, LIU Xiaotong, YANG Linxing, WU Xixi, WANG Siya, HE Congjian, ZHOU Yujin, SHI Jinfeng
School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

Abstract: Objective A colonic targeted and enzyme-sensitive nano-delivery system was constructed based on the inflammatory microenvironment to address the delivery challenges of celastrol (Cel). **Methods** Firstly, hyaluronic acid-adamantanecarboxylic acid (HA-AD) polymers were synthesized and confirmed by $^1\text{H-NMR}$. Next, Cel/NPs were prepared by dialysis method and optimized the preparation process with encapsulation efficiency as an index via single factor and Box-Behnken design-response surface method test. Moreover, the particle size distribution, ζ potential, morphology, stability, enzyme sensitivity, drug encapsulation rate and drug loading capacity of the Cel/NPs were determined. The release behavior of Cel/NPs was examined using the dialysis bag method *in vitro*. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and flow cytometry (FCM) were used to analyze the intracellular uptake of drug by NCM460 cells. Finally, an acute ulcerative colitis (UC) mouse model was established to comprehensively study anti-UC effect of free Cel and Cel/NPs *in vivo*. **Results** The best preparation process was Cel 2.04 mg, cyclodextrin 27.19 mg, HA-AD 7.96 mg, DMSO 3.0 mL, reverses osmosis (RO) water 10 mL, stirring time with 2 h. Cel/NPs showed smooth rounded spherical

收稿日期: 2023-11-06**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(82304731); 四川省自然科学基金青年项目(2023NSFSC1784); 成都医学院校基金项目(CYZD21-02); 2022 年国家级大学生创新创业训练计划项目(202213705024)**作者简介:** 张唯唯(2002—), 男, 本科在读, 主要从事中药制剂研究。Tel: 18885814876 E-mail: 2354366342@qq.com***通信作者:** 石金凤, 讲师, 主要从事中药新剂型与新制剂研究。Tel: 18380446808 E-mail: shijinfengss@126.com

shape with an average particle size of (152.37 ± 1.42) nm, polydispersity index (PDI) of 0.262 ± 0.009 , ζ potential of (-32.1 ± 0.8) mV, respectively. Moreover, the encapsulation rate and drug loading capacity of Cel were $(94.18 \pm 2.36)\%$ and $(5.17 \pm 0.13)\%$, respectively. On the one hand, Cel/NPs possessed good storage and gastrointestinal stability. On the other hand, the stimulation of α -amylase in the colonic microenvironment could lead to a rapid disintegration of cyclodextrins, which could destroy the Cel/NPs and release Cel rapidly. Cel/NPs increased intracellular uptake of Cel by NCM460 cells. Furthermore, the anti-UC results showed that Cel/NPs significantly ameliorated UC symptom, decreased the disease activity index score in mice, restored the state of mouse colon tissue, increased the length of the colon, decreased the weight of the spleen, and restored the integrity of the epithelium of the colonic mucosa *in vivo*. **Conclusion** In summary, the Cel/NPs can facilitate targeted delivery of Cel and improve UC symptom, which provides new strategy for drug-targeted delivery at the site of colonic lesions.

Key words: celastrol; colonic-targeted drug delivery system; enzyme-sensitive; ulcerative colitis; Box-Behnken design-response surface method

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种病因未明, 以腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重为主要临床表现, 于结肠和直肠的表浅且连续的慢性非特异性肠道炎症性疾病^[1]。因其病因未明, 病程绵长, 发病机制复杂的病症特点, 属于中医“久痢”的范畴, 并且长期的 UC 是结直肠癌发生的高危因素^[2]。根据最新的专家共识数据推测显示, 在我国 UC 的患病率约为 11.6/10 万, 且近年来医院就诊人数呈现出快速上升的趋势^[3]。但目前临床上主要采用激素、氨基酸水杨酸、免疫抑制剂等西医治疗手段, 存在不良反应较多、疗效甚微、药物价格昂贵、药物靶向性差等不足, 不宜作为长期治疗的最优选择。因此, 亟待研究开发一种新型高效低毒且更具有临床价值的 UC 治疗药物。

近年来关于中医药治疗 UC 的临床研究逐年增多, 因其具有多靶点治疗、复发率低、提高患者生活质量等多项优势, 获得越来越多患者的青睐^[4-5]。中药雷公藤始载于《神农本草经》, 入药部位为卫矛科雷公藤属藤本灌木根的木质部, 味苦、辛, 有大毒, 具有祛风除湿、活血通络、消肿止痛、杀虫解毒等功效。现代药理研究证实, 雷公藤具有抗炎^[6]、免疫抑制、抗肿瘤等多种作用, 临床上多用于治疗类风湿关节炎、紫癜性肾炎皆归因其可抑制炎症反应^[7-9]。而诸多现代研究证实, 雷公藤的主要活性成分雷公藤红素 (celastrol, Cel), 干预 UC 作用显著, 疗效确切^[10-13]。研究报道 Cel 通过降低白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 和髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 水平, 上调 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 的表达水平, 抑制核转录因子- κ B p65 (nuclear transcription factor- κ B p65, NF- κ B p65) 等细胞因子的表达水平, 从而发挥抗 UC 作用^[14-15]。但其口服生物利用度差、水溶性差 [37 °C 时溶解度

为 (13.25 ± 0.83) $\mu\text{g/mL}$] 及靶向性差等不足, 限制了其临床应用^[16]。

纳米递送体系除具有能够提高药物生物利用度、降低用量、提高靶向性、减少不良反应等优势之外, 还能够精确递送药物成分抵达病灶部位以及精确控制其释放^[17-19]。近年来, 越来越多的纳米递送体系用于结肠相关疾病的防治, 比如 pH 敏感、酶敏感、光热敏感等体系^[20], 但纳米载体材料毒性及结肠靶向等实际问题尚未完全解决。多糖是一类由单糖结构通过糖苷键连接形成的生物大分子, 具有原料来源广泛、生物安全性高、成本低及易于功能化修饰等优点, 在针对结肠疾病的靶向递送体系开发中具有独特的应用优势和潜力^[21]。在生物安全性方面, 大多数多糖都存在于人体摄入食物中, 具备优异的生物相容性, 在医药及食品领域已有成功应用案例^[22]。

透明质酸广泛存在于人体中, 具有良好的生物降解性和生物相容性、黏附性较好、安全性较高, 其特性能够防止所包载的药物被胃肠道破坏^[23-25]; 另一方面, 透明质酸能够与炎症部位巨噬细胞表面高表达的 CD44 受体相结合, 提高纳米颗粒的主动靶向作用^[26]。此外, 随着刺激响应式控释系统在药物传递方面受到越来越多的关注, 可以充分利用 UC 炎症部位的微环境特性, 设计药物控释系统。肠道酶是一种独特的刺激物, 由于其底物特异性高, 在控释系统中日益被用作触发器^[27]。环糊精 (cyclodextrin) 是一种由 α -1,4-葡萄糖苷键连接的具有锥形结构的天然环状低聚糖, 具有亲水性的外表面和相对疏水的内腔, 一方面环糊精的疏水空腔使其可同与之空间匹配的客体小分子 [例如金刚烷甲酸 (adamantanecarboxylic acid, AD)] 形成稳定的“主-客体”包合物, 另一方面这种结构的递送优势

在于能将疏水客体药物有效装载于环糊精内部^[28]。同时,环糊精在结肠微生物发酵和酶解作用下打开环状结构,酯键被水解,包载药物在结肠中释放^[1]。

本研究立足于环糊精的“内疏水外亲水”空腔结构特性,充分考虑结肠病变部位的炎症性质,通过酯化反应合成透明质酸-金刚烷甲酸(hyaluronic acid-AD, HA-AD)聚合物,利用环糊精的疏水空腔装载疏水 Cel 客体药物分子,同时利用 AD 与环糊精的主客体结合力引入具有 CD44 靶向的透明质酸,制备出一种新型载 Cel 结肠靶向-酶敏感纳米粒(Cel/NPs)递药系统,以促进 Cel 结肠病灶部位的靶向递送和定位释放,为 Cel 精准递送治疗 UC 提供新思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Avance Neo-700 MHz 型核磁共振仪,瑞士 Bruker 公司;Advantage 2.0 & XL-70 型冻干系统,美国 SP 公司;LC-2030C 型高效液相色谱(HPLC)仪,日本岛津公司;Zetasizer 90 型激光粒度仪,英国马尔文公司;JY 92-IIN 型超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;JEM-1230 型透射电子显微镜(TEM),日本 JEOL 公司;Nikon A1R+SIM 型激光共聚焦显微镜,日本尼康公司;Novo Cyte 型流式细胞仪,艾森生物杭州有限公司;Leica RM2235 型石蜡切片机,成都容信达科技有限公司;Olympus BX41 型正置荧光显微镜,日本奥林巴斯公司。

1.2 药品与试剂

AD(批号 P1937331)、环糊精(批号 P2514301)、 α -淀粉酶(批号 L2008186)、4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine, DMAP, 批号 P1853043),上海阿达玛斯试剂有限公司;透明质酸(相对分子质量 8 000),华熙生物科技股份有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 H2103262)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, EDC, 批号 H2117129],上海阿拉丁生化科技股份有限公司;RPMI 1640 培养基、0.25%胰蛋白酶、青-链霉素溶液,美国 Gibco 公司;Cel,质量分数 $\geq 98\%$,批号 DSTDL00350,成都德思特生物技术有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),杭州四季青公司;苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, H&E)染色试剂盒,广州硕谱生物科技有限公司;葡聚糖硫酸钠

(dextran sulfate sodium, DSS),上海泰坦科技股份有限公司;香豆素 6(coumarin 6, C6),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙腈,色谱纯,上海西格玛奥德里奇贸易有限公司;磷酸,色谱纯,成都诺尔施科技有限责任公司;其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞株及实验动物

人正常结肠上皮 NCM460 细胞,购自广州赛库生物技术有限公司。雄性 ICR(institute of cancer research)小鼠,SPF 级,体质量(20 ± 2)g,动物许可证号:SCXK-2019-0010,购于北京斯贝福生物技术有限公司。饲养条件:温度为 $20 \sim 26$ °C,相对湿度为 $40\% \sim 70\%$ 。实验期间动物自由进食、饮水,昼夜节律正常。动物实验获得成都医学院动物实验伦理委员会的批准,批准号 2023-044。

2 方法与结果

2.1 HA-AD 材料的合成及表征

采用酯化反应合成 HA-AD 聚合物,具体方法如下:准确称取 2 mmol AD、3 mmol EDC 于 20 mL DMSO 中,在 25 °C 条件下,反应 2 h,期间持续通入氮气。然后将 2 mmol 透明质酸(以透明质酸 1 个分子单元计)和 2 mmol DMAP 加入反应液中,继续反应 48 h。待反应完成后,采用透析法(透析袋相对分子质量为 1 000)除去反应液中的杂质,在规定时间内更换介质,透析 3 d 后,冻干产物,白色团块即为 HA-AD,HA-AD 合成路线见图 1。

采用核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)对合成产物进行表征,在核磁管中加入少量待测样品和适量的氘代 DMSO 溶剂,通过 $^1\text{H-NMR}$ 检测相关样品。结果如图 2 所示,HA-AD 的化学结构通过 $^1\text{H-NMR}$ 得到证实。HA-AD 聚合物的 $^1\text{H-NMR}$ 氢谱中,在 δ 3.06~4.90 处识别出透明质酸糖环的特征峰;此外与透明质酸相比, δ 1.74~1.81、1.91~1.93、1.60~1.65 处的特征峰证实 AD 与透明质酸的成功结合,综上,该结果表明 AD 在透明质酸上成功偶联。

2.2 Cel/NPs 的制备

采用透析法制备 Cel/NPs。按处方精密称取 Cel 和环糊精,加入 2.0 mL DMSO,涡旋超声使其充分溶解。取处方量 HA-AD 溶解于 10.0 mL 反渗透水(reverses osmosis, RO)中,将上述 DMSO 溶液逐滴滴入,磁力搅拌器搅拌 2.0 h(400 r/min)。将溶液转移到透析袋中(相对分子质量 3 000),透析除去 DMSO。待有机溶剂除尽后,用超声波细胞破碎仪冰浴探超 5 min(超声 5 s、停 5 s,功率 50%)。

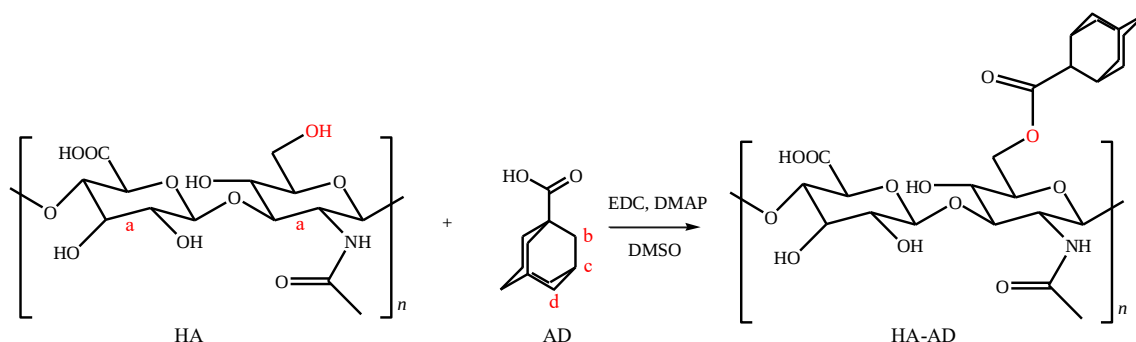
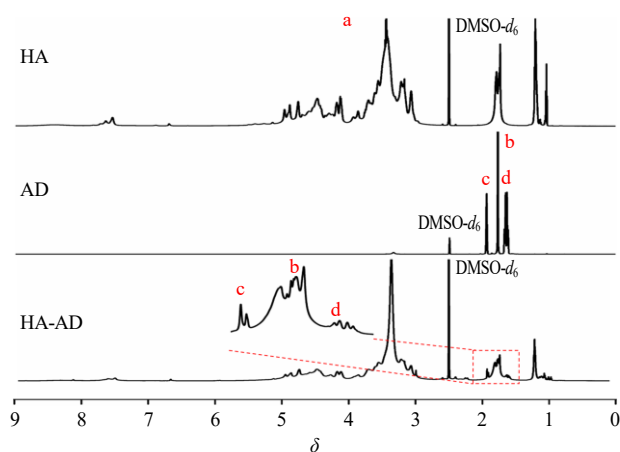


图 1 HA-AD 的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of HA-AD



a~d 与图 1 结构对应。

a—d corresponds to structure in Fig. 1.

图 2 HA-AD 的 $^1\text{H-NMR}$ 图Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of HA-AD

最后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得到橘黄色 Cel/NPs 溶液。

2.3 Cel 含量测定方法建立

2.3.1 HPLC 色谱条件 色谱柱为 DiamonsilTM C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (80:20); 检测波长 425 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。

2.3.2 供试品溶液的制备 取 2.0 mL 甲醇于 1.0 mL Cel/NPs 溶液中, 涡旋、超声破乳, 使得制备的纳米颗粒完全破坏, 过 0.22 μm 有机滤膜, 即得供试品溶液。

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取 Cel 对照品 10.0 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶液定容, 得到 1.0 mg/mL Cel 对照品母液。

2.3.4 专属性考察 取“2.3.2”项下供试品溶液和“2.3.3”项下对照品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样, 结果如图 3 所示, Cel 的保留时间为 11.76 min, 供试品溶液和对照品溶液的出峰时间相同, 供

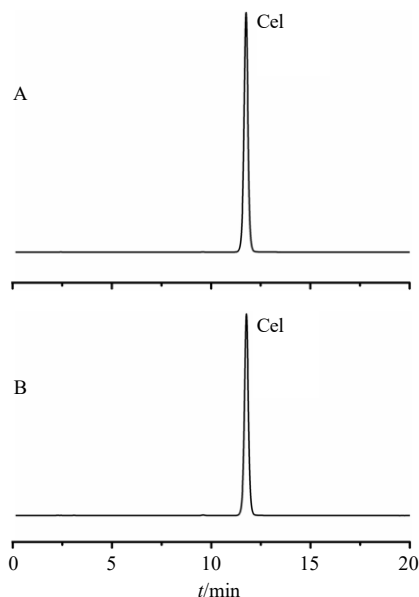


图 3 Cel 对照品 (A) 和 Cel/NPs 样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of Cel reference substance (A) and Cel/NPs sample (B)

试品溶液中的溶剂和辅料对 Cel 的测定无干扰。

2.3.5 线性关系考察 取“2.3.3”项下 Cel 对照品溶液, 用甲醇稀释成质量浓度分别为 500.000、250.000、125.000、62.500、31.250、15.625 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cel 对照品溶液, 过 0.22 μm 有机滤膜, 进样。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到标准曲线回归方程为 $Y=17\,130X+1\,714.5$, $r=0.999\,0$, 线性范围 15.625~500.000 $\mu\text{g/mL}$, 结果表明, Cel 在定量范围内各质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.3.6 精密度试验 分别精密吸取同一对照品溶液 (62.500 $\mu\text{g/mL}$), 按“2.3.1”项下色谱条件分别连续进样 6 次, 进样量 10 μL , 结果 Cel 峰面积的 RSD 为 0.37%, 表明仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 按“2.3.2”项下制备一份供试

品溶液，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 按上述“2.3.1”项下色谱条件进样测定 Cel 的峰面积，结果 Cel 峰面积的 RSD 为 2.52%，表明供试品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.3.8 重复性试验 按照“2.3.2”项下供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液，并且按 Cel 色谱条件分析测定，计算 Cel/NPs 样品中 Cel 质量浓度的 RSD 为 2.15%，表明重复性良好。

2.3.9 加样回收率试验 按照“2.2”项下 Cel/NPs 制备方法制备 Cel/NPs 溶液，分为 6 份，每份取 500 μ L Cel/NPs 溶液，加入 Cel 对照品溶液（1.0 mg/mL）500 μ L，涡旋、超声处理，过 0.22 μ m 有机滤膜。

平行 6 份，进样，计算 Cel 的平均加样回收率为 98.72%，RSD 为 2.19%，表明该方法回收率良好。

2.4 Cel/NPs 处方的单因素实验优化

对透析法制备 Cel/NPs 的处方进行单因素实验，考察 Cel 加入量、环糊精用量、HA-AD 用量、DMSO 用量、RO 水用量、搅拌时间共 6 个因素对 Cel/NPs 包封率的影响。将制得样品加入甲醇破坏纳米颗粒结构释放 Cel，HPLC 进样分析，计算包封率，结果见表 1。根据结果分析，在 Cel 为 2.0 mg、环糊精为 30.0 mg、HA-AD 为 5.0 mg、DMSO 用量为 3.0 mL、RO 水用量为 10.0 mL，搅拌时间为 2.0 h，所得包封率最好。但 DMSO 用量、RO 水用量以及

表 1 单因素实验设计与结果

Table 1 Design and results of univariate experiment

试验号	Cel/ mg	环糊精/ mg	HA-AD/ mg	DMSO/ mL	RO 水/ mL	搅拌 时间/h	包封率/ %
1	2.0	20.0	15.0	3.0	10.0	2.0	67.33
2	3.0	20.0	15.0	3.0	10.0	2.0	65.98
3	4.0	20.0	15.0	3.0	10.0	2.0	50.78
4	3.0	10.0	15.0	3.0	10.0	2.0	42.32
5	3.0	20.0	15.0	3.0	10.0	2.0	65.98
6	3.0	30.0	15.0	3.0	10.0	2.0	75.32
7	3.0	20.0	5.0	3.0	10.0	2.0	70.78
8	3.0	20.0	15.0	3.0	10.0	2.0	65.98
9	3.0	20.0	25.0	3.0	10.0	2.0	50.09

试验号	Cel/ mg	环糊精/ mg	HA-AD/ mg	DMSO/ mL	RO 水/ mL	搅拌 时间/h	包封率/ %
10	3.0	20.0	15.0	2.0	10.0	2.0	43.17
11	3.0	20.0	15.0	3.0	10.0	2.0	65.98
12	3.0	20.0	15.0	4.0	10.0	2.0	62.15
13	3.0	20.0	15.0	3.0	8.0	2.0	63.17
14	3.0	20.0	15.0	3.0	10.0	2.0	65.98
15	3.0	20.0	15.0	3.0	12.0	2.0	65.27
16	3.0	20.0	15.0	3.0	10.0	1.0	64.11
17	3.0	20.0	15.0	3.0	10.0	2.0	65.98
18	3.0	20.0	15.0	3.0	10.0	3.0	65.73

搅拌时间对包封率影响较小。

2.5 Cel/NPs 处方的 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 试验优化

2.5.1 Box-Behnken 响应面法试验 在单因素实验基础上，以 Cel (X_1)、环糊精 (X_2) 和 HA-AD (X_3) 的加入量为自变量，Cel 包封率 (Y) 为因变量，采用 Design-Expert V13 软件进行响应面试验设计，结果见表 2。

2.5.2 模型建立与回归分析 对试验结果进行响应面分析，经过回归拟合后，得出响应值与影响因素 X_1 、 X_2 、 X_3 之间的回归方程为 $Y=68.34-3.89 X_1+18.47 X_2-9.08 X_3-0.892 5 X_1 X_2+3.73 X_1 X_3-10.59 X_2 X_3+6.79 X_1^2-13.35 X_2^2-7.20 X_3^2$ ， $R^2=0.987 1>0.8$ 。方程回归分析见表 3。

Cel 的回归模型 F 值为 59.49 ($P<0.05$)，表明所建立的模型具有显著性；失拟项数值为 1.75， P

表 2 试验设计与结果

Table 2 Design and results of tests

试验号	X_1 / mg	X_2 / mg	X_3 / mg	Y / %
1	3.0	10.0	5.0	29.18
2	3.0	20.0	15.0	65.32
3	4.0	10.0	15.0	38.09
4	3.0	20.0	15.0	71.85
5	3.0	20.0	15.0	66.26
6	2.0	20.0	25.0	58.19
7	2.0	20.0	5.0	85.18
8	4.0	20.0	5.0	70.19
9	3.0	20.0	15.0	70.18

试验号	X_1 / mg	X_2 / mg	X_3 / mg	Y / %
10	4.0	20.0	25.0	58.13
11	3.0	10.0	25.0	33.58
12	4.0	30.0	15.0	77.40
13	3.0	30.0	5.0	83.16
14	3.0	20.0	15.0	68.07
15	2.0	30.0	15.0	87.24
16	3.0	30.0	25.0	45.19
17	2.0	10.0	15.0	44.36

值 >0.05 ，说明失拟项对于误差不显著，回归方程拟合度较好。响应曲面图直观地反映了 Cel、环糊精和 HA-AD 添加量的交互作用对响应值的影响结果见图 4。

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	5 168.17	9	574.24	59.49	<0.000 1	极显著	X_1^2	194.17	1	194.17	20.12	0.002 8	显著
X_1	121.37	1	121.37	12.57	0.009 4	显著	X_2^2	750.89	1	750.89	77.80	<0.000 1	极显著
X_2	2 729.87	1	2 729.87	282.83	<0.000 1	极显著	X_3^2	218.53	1	218.53	22.64	0.002 1	显著
X_3	659.21	1	659.21	68.30	<0.000 1	极显著	残差	67.56	7	9.65			
X_1X_2	3.19	1	3.19	0.33	0.583 6		失拟项	38.34	3	12.78	1.75	0.295 2	不显著
X_1X_3	55.73	1	55.73	5.77	0.047 3	显著	净误差	29.23	4	7.31			
X_2X_3	448.80	1	448.80	46.50	0.000 2	极显著	总离差	5 235.73	16				

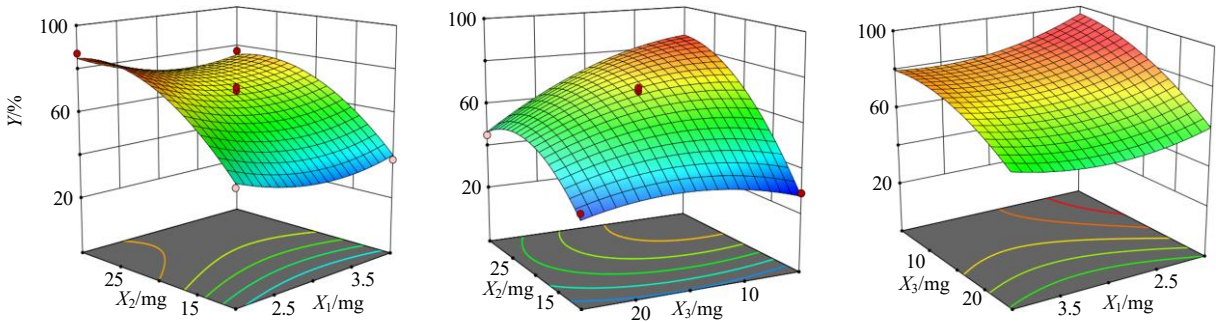


图 4 各因素响应面图

Fig. 4 Response surface plots for various factors

2.5.3 最佳处方工艺确定及其验证 在 Design Expert V13 软件 Responses 项输入包封率测定结果并进行分析, 得到最佳处方工艺为 Cel 2.04 mg、环糊精 27.19 mg、HA-AD 7.96 mg, Cel 包封率为 96.09%, 按此工艺下进行验证试验, 结果 Cel 的包封率为 $(94.18 \pm 2.36) \%$ ($n=3$), 与预测值偏差小于 $\pm 5\%$, 表明该法预测与验证结果基本一致。

2.6 Cel/NPs 的表征

2.6.1 粒径、多分散指数 (polydispersity, PDI) 和电位考察 分别取一定体积的 Cel/NPs 样品溶液于粒径池和电位池中, 采用马尔文粒度仪检测 Cel/NPs 的平均粒径、PDI 和 ζ 电位。

结果如图 5 所示, 测得 Cel/NPs 的平均粒径为 $(152.37 \pm 1.42) \text{ nm}$ ($n=3$), PDI 为 0.262 ± 0.009 ($n=3$); ζ 电位为 $(-32.1 \pm 0.8) \text{ mV}$ ($n=3$), 表明制得 Cel/NPs 粒径较小, 均一性良好。

2.6.2 形态学考察 将稀释后的 Cel/NPs 悬浮液适当转移到铜网格上, 然后用 2% 磷钨酸染色, 待样品在室温下挥干后进行 TEM 观察。结果显示, Cel/NPs 的形态圆整光滑, 分布均匀 (图 6)。

2.6.3 储存稳定性考察 对制备的 Cel/NPs 的体外稳定性进行评价。将制备好的 Cel/NPs 样品溶液密封放置于 4°C 冰箱保存, 连续 7 d 测量其粒径、PDI

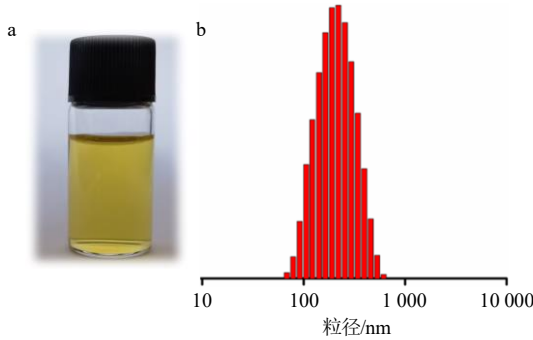


图 5 Cel/NPs 的外观 (a) 和粒径分布 (b)

Fig. 5 Appearance (a) and particle size distribution (b) of Cel/NPs

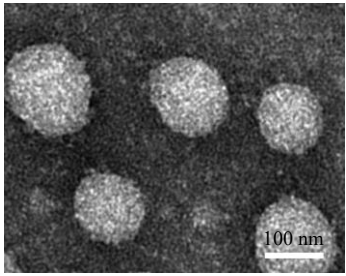


图 6 Cel/NPs 的 TEM 微观形态

Fig. 6 TEM morphology of Cel/NPs

和 ζ 电位值变化, 结果见表 4, 其各项值在低温储存条件下变化不大, 表明制得的 Cel/NPs 具有较稳定的性能。

表 4 Cel/NPs 的平均粒径、PDI 和 ζ 电位变化考察 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Investigation on average particle size, PDI and ζ potential change of Cel/NPs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

t/d	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	152.04 $\pm$ 1.32	0.263 $\pm$ 0.009	-32.10 $\pm$ 0.90
1	152.33 $\pm$ 1.27	0.258 $\pm$ 0.011	-31.80 $\pm$ 0.80
2	153.17 $\pm$ 1.45	0.271 $\pm$ 0.013	-32.30 $\pm$ 1.00
3	150.56 $\pm$ 1.89	0.205 $\pm$ 0.007	-33.70 $\pm$ 1.20
4	151.57 $\pm$ 2.18	0.214 $\pm$ 0.014	-31.80 $\pm$ 0.70
5	153.39 $\pm$ 2.55	0.185 $\pm$ 0.026	-32.70 $\pm$ 1.10
6	154.89 $\pm$ 2.08	0.228 $\pm$ 0.016	-33.19 $\pm$ 0.60
7	156.76 $\pm$ 1.29	0.206 $\pm$ 0.019	-32.90 $\pm$ 0.80

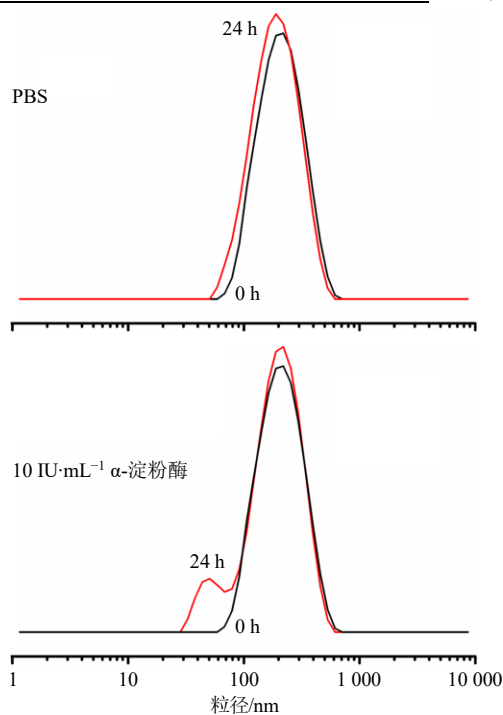


图 7 Cel/NPs 与 PBS 和 10 IU·mL⁻¹ α -淀粉酶孵育 24 h 的粒径分布和 TEM 图

Fig. 7 Size distribution and TEM image of Cel/NPs after 24 h incubation in PBS and 10 IU·mL⁻¹ α -amylase

用 HPLC 测定样品中 Cel 含量, 根据公式分别计算包封率和载药量。计算得到 Cel/NPs 中 Cel 的包封率为 (94.18 $\pm$ 2.36) %, 载药量为 (5.17 $\pm$ 0.13) %。

$$\text{包封率} = W_0 / W_1$$

$$\text{载药量} = W_0 / (W_1 + W_2)$$

W_0 为纳米颗粒中药物含量, W_1 为药物投加量, W_2 为纳米材料量

2.7 Cel/NPs 的体外释放行为考察

2.7.1 Cel/NPs 的胃、小肠、结肠释放行为考察 根据模拟胃肠液动态的 pH 值变化来测试接近生理状态下 Cel/NPs 的体外释放度。采用透析袋法考察

2.6.4 Cel/NPs 酶敏感性考察 将 Cel/NPs 样品溶液与磷酸盐缓冲液 (PBS) 和含有 10 IU/mL α -淀粉酶的 PBS 溶液共孵育, 孵育 24 h 后, 取出样品, 检测其粒径分布, 并采用 TEM 观察刺激后纳米溶液的微观形貌特征。结果如图 7 所示, 采用 α -淀粉酶处理后的粒径分布不均一, 出现了多个粒径不同的峰。从 TEM 图中可以观察到纳米结构在 α -淀粉酶的作用下发生了裂解, 由原来圆整光滑变成了破裂的碎片。因此, 结果可以初步表明所制得的纳米具有酶敏感特性。

2.6.5 包封率和载药量的测定 取 2.0 mL 甲醇于 Cel/NPs 样品溶液 1.0 mL 中, 涡旋、超声破乳, 使制备的纳米颗粒完全破坏, 过 0.22 μ m 有机滤膜,

Cel/NPs 的体外释放行为, 将 2.0 mL 游离 Cel 和纳米溶液装于透析袋 (截留相对分子量 3 000) 中, 扎紧袋口, 置于 30 mL 释放介质中, 按如下时间点进行。介质 A: 人工胃液 (SGF, pH 1.2), 时间 0~2 h; 介质 B: 人工小肠液 (SIF, pH 6.8), 时间 2~6 h; 介质 C: 人工结肠液 (SCF, pH 7.4), 时间 6~48 h。分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、14、18、24、48 h 时, 取 1.0 mL 透析液 (后补充 1.0 mL 透析介质, 维持透析液体积不变), 进行 HPLC 检测透析液中 Cel 含量。以透析时间为横坐标, 透析液中 Cel 的累积释放率为纵坐标, 绘制体外释放曲线。

结果如图 8 所示, 游离 Cel 在 SGF 中累积释放 1.14%, 然而在 Cel/NPs 释放液中未检测到 Cel 的释放; 游离 Cel 在 6 h 内累积释放量达 22.87%, 而 Cel/NPs 的累积释放量明显低于游离 Cel 的释放; 当释放时间达 48 h, 游离 Cel 的累积释放量高达 92.55%, 而 Cel/NPs 的释放量不到 40%。通过对比发现, 通过 HA-AD 和环糊精的装载, 纳米粒中 Cel 得到了保护, 延缓了药物的释放行为。

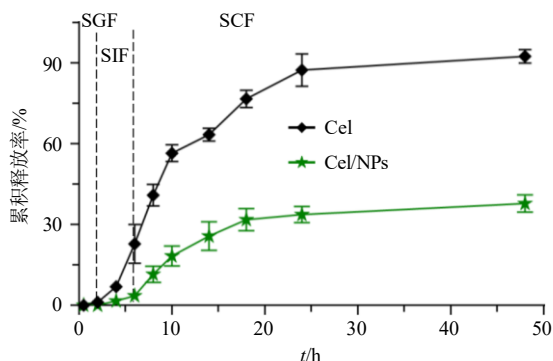


图 8 Cel/NPs 在不同 pH 介质中的释放行为 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 8 Release of Cel/NPs in different pH media ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.7.2 Cel/NPs 的结肠突释行为考察 进一步考察 Cel/NPs 在结肠部位 α -淀粉酶作用下的药物释放情况, 同样采用透析袋法研究 Cel 的释放行为。分别将 2.0 mL 纳米溶液装于透析袋(截留相对分子质量 3 000)中, 扎紧袋口, 置于 30 mL 释放介质中, 介质 A 为含有 0.5% 聚山梨酯 80 的 PBS (pH 7.4), 介质 B 为含有 0.5% 聚山梨酯 80 和 10 IU/mL α -淀粉酶的 PBS (pH 7.4)。分别于 0、2、4、8、12、24、48 h 时, 取 1.0 mL 透析液(后补充 1.0 mL 透析介质, 维持透析液体积不变), 进行 HPLC 检测透析液中 Cel 含量。以透析时间为横坐标, 透析液中 Cel 的累积释放率为纵坐标, 绘制体外释放曲线。结果如图 9 所示, 在 α -淀粉酶的刺激下 4 h 内纳米粒的

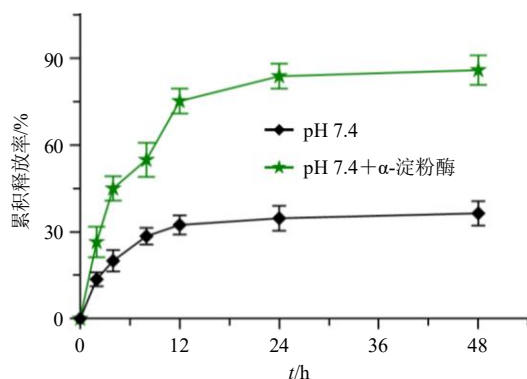


图 9 Cel/NPs 在结肠部位的突释行为 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 9 Stimuli response of Cel/NPs in colon ($\bar{x} \pm s, n=3$)

累积释放量达 45%, 而无 α -淀粉酶的 PBS 组, 纳米粒的累积释放量仅为 20.09%; 当释放时间为 48 h 时, 无 α -淀粉酶的 PBS 组, 纳米粒的累积释放量仅升高到 36.49%, 而在 α -淀粉酶的刺激下, 纳米粒 48 h 的累积释放量可达 85.94%, 远高于无 α -淀粉酶刺激组的累积释放量。因此, 结果表明在结肠微环境 α -淀粉酶的刺激下, 可使环糊精迅速解体, 从而瓦解 Cel/NPs, 快速释放 Cel。

2.8 Cel/NPs 在 NCM460 细胞摄取能力考察

考虑到 Cel 无荧光, 本研究采用带绿色荧光的 C6 作为表征药物, 按照“2.2”项下方法制备 C6/NPs。将 NCM460 细胞以每孔 1×10^5 的密度接种于激光共聚焦培养皿上, 37 °C 孵育过夜。待细胞贴壁后, 将培养基分别更换为含游离 C6、C6/NPs 以及 C6/NPs (5 mg/mL 透明质酸预先孵育细胞 2 h, 以 C6 计为 100 ng/mL) 的无血清新鲜培养基。在 37 °C 孵育 4 h 后, 弃去培养基, 用冷 PBS 洗涤 2 次。加入 DIL 染色液染细胞膜 15 min, 冷 PBS 洗涤 2 次。加入 Hoechst 33342 (终质量浓度为 10 μ g/mL) 染细胞核 10 min, 弃去染色剂, 每孔加入 1.0 mL PBS 洗 3 次。加入 1 滴防荧光猝灭剂, 采用激光共聚焦显微镜观察 NCM460 细胞对药物的摄取情况。

结果如图 10, C6 呈绿色荧光, C6/NPs 的荧光强度显著强于游离 C6, 表明 C6/NPs 可以增加 NCM460 细胞对药物的摄取。但当 NCM460 细胞经过 HA 预处理 2 h 后, 其对 C6/NPs 的细胞摄取量明显减少, 结果初步表明透明质酸的存在可增加细胞对递药系统的摄取能力。

采用流式细胞仪, 定量分析 NCM460 细胞对各药物的摄取情况。将 NCM460 细胞接种于 6 孔板 (3.5×10^5 个/孔)。待细胞贴壁后, 弃去培养基, 分别加入含游离 C6、C6/NPs 以及 C6/NPs (5 mg/mL 透明质酸预先孵育细胞 2 h)(以 C6 计为 100 ng/mL) 的无血清新鲜培养基, 恒温培养箱孵育 4 h。弃去培养基, PBS 洗 3 次, 胰酶消化, 离心收集细胞, 用 PBS 重悬细胞, 采用流式细胞仪进行检测, 定量分析 NCM460 细胞对药物的摄取情况。结果如表 5 所示, NCM460 细胞对 C6/NPs 的摄取量显著高于游离 C6 ($P < 0.01$), 当细胞表面受体被透明质酸饱和后, 细胞摄取量明显降低, 与定性分析结果一致。

2.9 Cel/NPs 的体内抗 UC 作用研究

用 DSS 溶液 (30 mg/mL) ig 7 d 建立 UC 小鼠

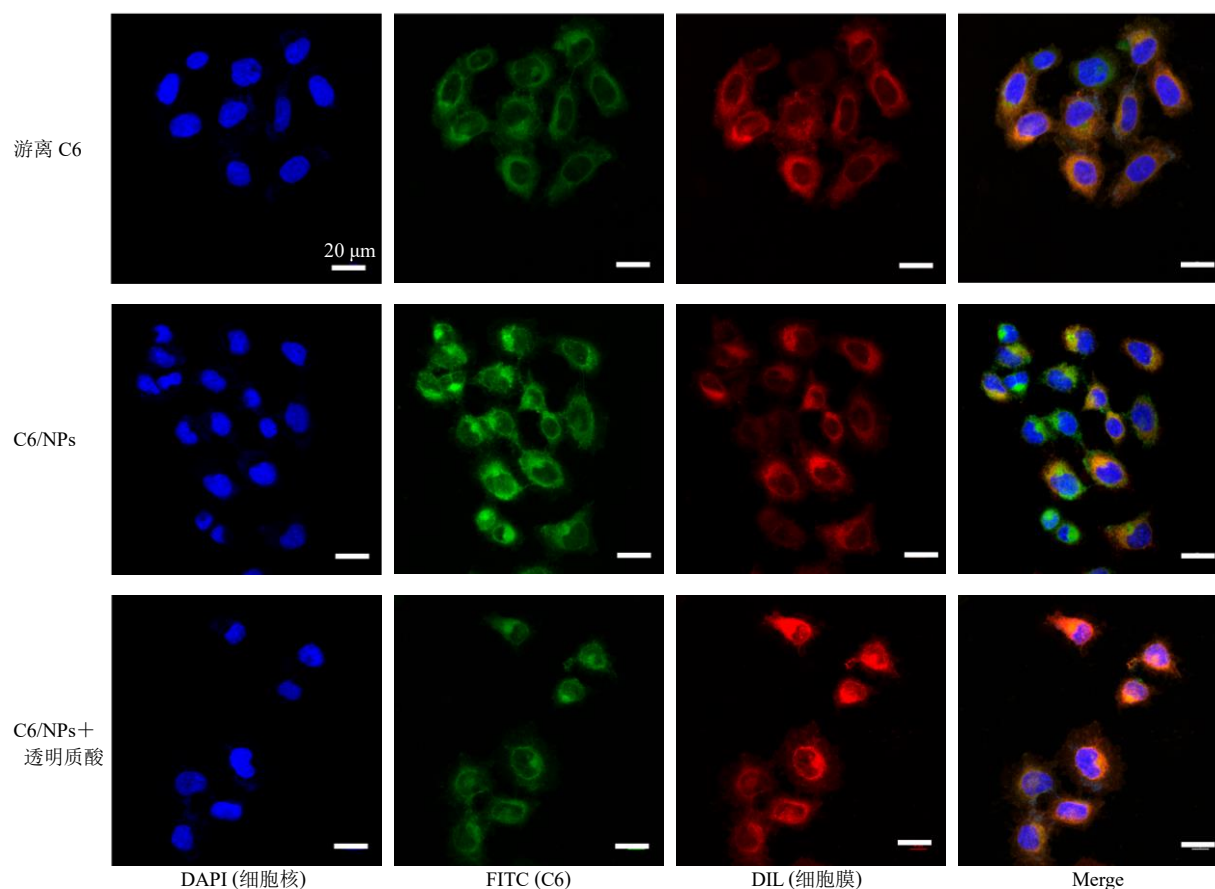


图 10 游离 C6、C6/NPs 和 C6/NPs (透明质酸预处理 2 h) 孵育 4 h 后 NCM460 细胞摄取激光共聚焦显微镜分析图
Fig. 10 Laser confocal microscope analysis image of NCM460 cellular uptake of free C6, C6/NPs and C6/NPs (pre-treatment with hyaluronic acid for 2 h) after incubation for 4 h

表 5 NCM460 细胞内相对荧光强度的流式细胞仪定量分析
结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Quantitative analysis results of intracellular relative fluorescence intensity of NCM460 cells determined by FCM ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对荧光强度	组别	相对荧光强度
对照	100.0 ± 0.0	C6/NPs	105.4 ± 6.7*
游离 C6	87.3 ± 3.8	C6/NPs+HA	85.2 ± 3.0 [#]

与游离 C6 组比较: * $P < 0.05$; 与 C6/NPs 组比较: [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs free C6 group; [#] $P < 0.05$ vs C6/NPs group.

模型。将 ICR 雄性小鼠 (22~25 g) 随机分为 4 组: 对照组、模型组、游离 Cel 组、Cel/NPs 组, 每组 6 只。除对照组外, 实验第 1 天将饮用水换成 3% DSS 水溶液, 自由饮用 7 d 后停止, 换成灭菌水。从第 3 天开始给药, 连续 7 d 每天定时 ig。其中对照组和模型组 ig 生理盐水, 游离 Cel 组和 Cel/NPs 组每只小鼠 ig 2 mg/kg (以 Cel 计) 不同剂型的药物。每日记录小鼠体质量变化, 观察其大便性状, 便血情况, 计算 DAI 评分 (DAI 评分标准见表 6)。实验结束后

表 6 DAI 评分标准

Table 6 DAI scoring criteria

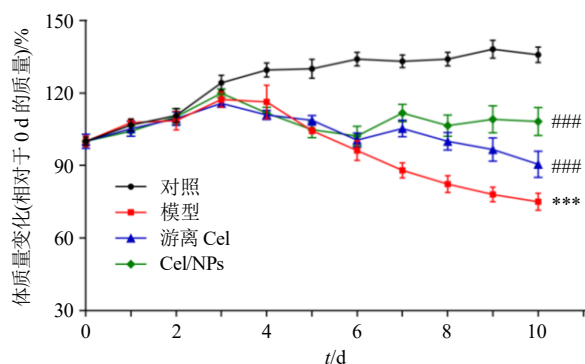
计分	体质量下降/%	粪便性状	便血情况
0	无	正常	阴性
1	1~5	便软, 成形	隐血 (+)
2	6~10	有黏液, 成形	隐血 (++)
3	11~15	便软, 有黏液, 成形	隐血 (+++)
4	>15	便软, 有黏液, 不成形	肉眼血便

解剖小鼠, 取脾脏称定质量, 记录; 剥离小鼠结肠组织, 采用 H&E 染色法对 4% 多聚甲醛固定的小鼠结肠组织进行染色处理。

DAI = 体质量下降分数 + 大便性状分数 + 便血分数

小鼠体质量变化结果 (图 11) 表明, 模型组小鼠体质量明显下降 ($P < 0.001$), 实验结束时体质量下降到 75%; 相比于模型组, 游离 Cel 组使得小鼠体质量下降明显减轻 ($P < 0.001$); Cel/NPs 组实验结束时, 小鼠体质量呈现增长趋势。

DSS 破坏结肠黏膜屏障, 导致肠道炎症发生、



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$; 图 12 同。
*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group; same as Fig. 12.

图 11 小鼠体质量随时间变化趋势 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 11 Trend of changes of mice body weight with time ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

出现体重减轻、便血便稀等临床症状, DAI 评分是 UC 严重程度的一个指标。如图 12 所示, Cel/NPs 组和游离 Cel 组均可以不同程度的降低小鼠 DAI 评分, 缓解小鼠便血便稀等病理学特征, 其中 Cel/NPs 组效果优于游离 Cel 组。

DSS 诱导的 UC 模型容易发生纤维化导致结肠缩短, 可通过测量结肠长度评价药物改善 UC 的效果。实验结果如表 7 所示, 与模型组对比发现, Cel/NPs 组和游离 Cel 组均可以增加小鼠结肠长度。

脾脏作为机体的免疫器官, 当机体发生 UC 炎

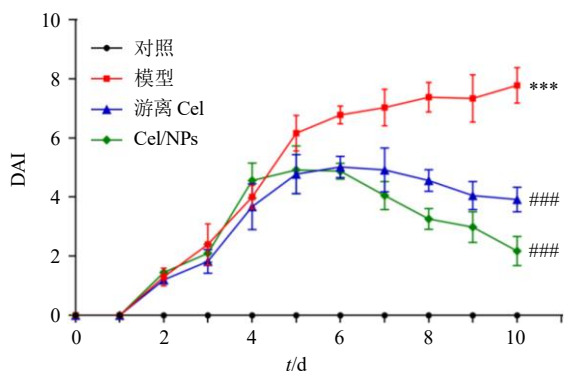
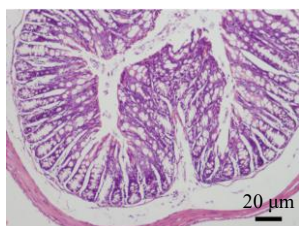
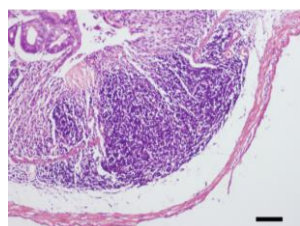


图 12 DAI 评分随时间变化曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

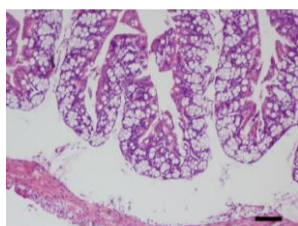
Fig. 12 Variation curves of DAI scores with time ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



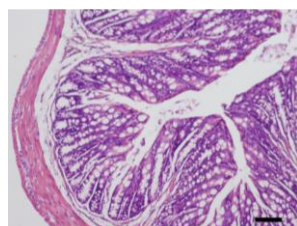
对照



模型



游离 Cel



Cel/NPs

图 14 小鼠结肠组织病理切片 H&E 染色结果

Fig. 14 H&E staining results of pathological sections of mice colon tissue

表 7 UC 小鼠结肠长度和脾脏系数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Colon length and spleen coefficient of UC mice

($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	结肠长度/cm	脾脏系数
对照	9.10 ± 0.12	0.13 ± 0.04
模型	5.50 ± 0.35*	0.31 ± 0.08*
游离 Cel	7.30 ± 0.98*#	0.21 ± 0.04
Cel/NPs	8.20 ± 0.21#	0.15 ± 0.09#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

症时, 脾脏会变得肿大, 因此脾脏系数可作为评估药物改善 UC 的又一指标。结果如表 7 所示, Cel/NPs 组和游离 Cel 组小鼠的脾脏系数相较于模型组下降显著, 且 Cel/NPs 组效果更好, 表明通过纳米载体的递送, 可使 Cel 更有效地改善 UC。

图 13 为小鼠结肠组织拍照结果, 模型组肉眼可见结肠组织呈充血肿胀状态, 结肠内含血性不成形的粪便内容物, 游离 Cel 组形态相较于模型组有一定的好转, Cel/NPs 组与对照组小鼠结肠无明显区别, 表明 Cel/NPs 组恢复结肠组织形态最佳。

从小鼠结肠组织病理切片 H&E 染色结果 (图 14) 分析发现, 对照组小鼠结肠黏膜上皮细胞结构完整, 肠绒毛结构完整, 杯状细胞含量高; 但模型组小鼠结肠糜烂, 腺体结构破损, 杯状细胞缺失, 并伴有大量炎症细胞浸润; 与模型组对比发现, Cel/NPs 组和游离 Cel 组对损伤结肠组织均有明显修复, 其中 Cel/NPs 组修复效果更加明显, 与正常组对比

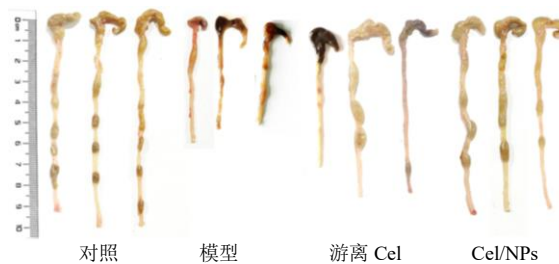


图 13 UC 小鼠离体结肠图片

Fig. 13 *In vitro* colon images of UC mice

相近。

3 讨论

雷公藤主要活性成分 Cel 药理活性广泛, 通过抑制炎症因子的产生, 调节多种细胞的信号途径发挥抗 UC 作用^[14]。但 Cel 存在生物利用度差、溶解性差、靶向病灶组织差等缺点^[29-30], 限制了其临床应用。本研究通过制备一种新型载 Cel 结肠靶向-酶敏感纳米递药系统 (Cel/NPs), 可使 Cel 稳定、高效的聚集在 UC 炎症部位, 从而提高 Cel 抗 UC 作用。本研究通过酯化反应制备 HA-AD 聚合物, 以 Cel 为载体药物, 通过透析法制备 Cel/NPs。其外观光滑圆整, 大小分布比较均一。其平均粒径为 (152.37 ± 1.42) nm, ζ 电位为 (-32.1 ± 0.8) mV, PDI 为 0.262 ± 0.009 , 包封率为 (94.18 ± 2.36) %, 载药量为 (5.17 ± 0.13) %。经稳定性考察, 制得的 Cel/NPs 具有较好的储存稳定性。体外释放实验结果表明递药系统能够保护装载的 Cel 受胃和小肠的破坏, 延缓药物的释放行为。进一步, 酶敏感性实验和结肠突释行为结果表明在结肠微环境 α -淀粉酶的刺激下, Cel/NPs 可快速释放 Cel, 具有较好的酶敏感特性。

体外细胞摄取实验结果显示, Cel/NPs 能够增强 NCM460 细胞对药物的摄取能力。在体内抗 UC 药效学实验中, 结果表明 Cel/NPs 组小鼠体重下降明显减轻, 小鼠结肠组织充血肿胀状态基本消失, DAI 评分明显下降, 并改善脾脏肿大程度。对结肠组织病理切片进行 H&E 染色的结果表明 Cel/NPs 对结肠组织的修复有显著作用。

综上, 本研究成功制备了具有刺激性响应型的结肠靶向-酶敏感性的纳米粒 Cel/NPs, 可控制药物在 UC 结肠病灶部位快速释放, 从而发挥改善 UC 的作用。本研究说明结肠靶向-酶敏感性纳米递送系统在临床治疗 UC 上具有巨大潜力, 为结肠部位药物递送提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Yang Y F, Wang Y, Zhao L, *et al.* Chinese herbal medicines for treating ulcerative colitis via regulating gut microbiota-intestinal immunity axis [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(2): 181-200.

[2] 李沐涵, 李景南. 溃疡性结肠炎癌变相关机制研究进展 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2023, 31(4): 243-249.

[3] 杨慧, 童雨, 廖正根. 姜黄素治疗溃疡性结肠炎及其微纳米粒传递系统研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(11): 3696-3705.

[4] 刘大铭, 王新月. 难治性溃疡性结肠炎中医病因病机探讨 [J]. 中医杂志, 2011, 52(24): 2156-2157.

[5] Yang Z H, Lin S S, Feng W Y, *et al.* A potential therapeutic target in traditional Chinese medicine for ulcerative colitis: Macrophage polarization [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 999179.

[6] 景铭, 王美灵, 张媛媛, 等. 雷公藤红素调控 NLRP3 炎症小体改善大鼠代谢相关脂肪性肝病研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(4): 624-632.

[7] Zhang Y Q, Mao X, Li W J, *et al.* *Tripterygium wilfordii*: An inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(3): 1337-1374.

[8] 崔东晓, 乐世俊, 徐顶巧, 等. 雷公藤多苷及其主要活性成分抑制类风湿性关节炎的作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6913-6921.

[9] 李素英, 郑凯. 雷公藤多苷治疗炎症性肠病的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(3): 159-162.

[10] Xian J, Zhong X M, Gu H, *et al.* Colonic delivery of celastrol-loaded layer-by-layer liposomes with pectin/trimethylated chitosan coating to enhance its anti-ulcerative colitis effects [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(12): 2005.

[11] Li S Y, Jin M F, Wu Y H, *et al.* An efficient enzyme-triggered controlled release system for colon-targeted oral delivery to combat dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 1120-1131.

[12] 王仁萍. 基于代谢组学研究雷公藤红素干预结肠疾病的作用机制 [D]. 上海: 第二军医大学, 2017.

[13] 贾振宇. 雷公藤红素对小鼠实验性结肠炎的作用及机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2015.

[14] 钟点, 陈渊, 赵伟. 雷公藤红素抗炎及免疫抑制的研究进展 [J]. 药物生物技术, 2018, 25(1): 64-69.

[15] 陈海兰, 许少华, 徐伟, 等. 雷公藤红素药理活性与结构修饰研究进展 [J]. 药学研究, 2020, 39(12): 722-732.

[16] Shi J F, Li J X, Xu Z Y, *et al.* Celastrol: A review of useful strategies overcoming its limitation in anticancer application [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 558741.

[17] Liu S S, Cao Y G, Ma L L, *et al.* Oral antimicrobial peptide-EGCG nanomedicines for synergistic treatment of ulcerative colitis [J]. *J Control Release*, 2022, 347: 544-560.

[18] Chen Z J, Chen Y, Hao W, *et al.* Oral delivery of transformable bilirubin self-assembled system for targeted therapy of colitis [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(26): e2300946.

- [19] Qi S S, Luo R F, Han X Q, *et al.* pH/ROS dual-sensitive natural polysaccharide nanoparticles enhance “one stone four birds” effect of rhein on ulcerative colitis [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(45): 50692-50709.
- [20] 侍慧慧, 周美玲, 柳晔, 等. 载姜黄素 pH 敏感聚合物胶束的制备、表征及体内抗非小细胞肺癌研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(19): 6264-6275.
- [21] 黄龙, 曾文, 徐冰, 等. 口服多糖靶向药物递送体系在结肠疾病治疗中的应用研究进展 [J]. *药学学报*, 2022, 57(4): 976-989.
- [22] Wang L H, Huang G Q, Xu T C, *et al.* Characterization of carboxymethylated konjac glucomannan for potential application in colon-targeted delivery [J]. *Food Hydrocoll*, 2019, 94: 354-362.
- [23] 袁枝花, 刘有停, 曲召辉, 等. 基于透明质酸超分子特性对中药小分子化合物功能改进的研究进展 [J]. *药学学报*, 2022, 57(5): 1245-1251.
- [24] 颜红, 高司琪, 骆慧婷, 等. 透明质酸修饰的栀子苷传递体凝胶的制备及其对佐剂型关节炎药效学评价 [J]. *中草药*, 2023, 54(18): 5867-5879.
- [25] Vasvani S, Kulkarni P, Rawtani D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 151: 1012-1029.
- [26] Luo R F, Lin M S, Fu C M, *et al.* Calcium pectinate and hyaluronic acid modified lactoferrin nanoparticles loaded rhein with dual-targeting for ulcerative colitis treatment [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 263: 117998.
- [27] Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery [J]. *Nat Mater*, 2013, 12(11): 991-1003.
- [28] 许丹, 刘建英, 刘玉梅. β -环糊精及其衍生物增加客体分子水溶性的研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2021, 42(16): 404-411.
- [29] 唐科, 谭亲友. 雷公藤红素在胶质细胞瘤中的研究进展及应用 [J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(13): 1881-1888.
- [30] 董立强, 王斌, 苏适, 等. 雷公藤红素抗肿瘤作用及机制研究进展 [J]. *生物技术进展*, 2023, 13(1): 77-82.

[责任编辑 郑礼胜]