

淫羊藿次苷 II 纳米乳制备及其改善脑缺血再灌注损伤作用

吴昌静, 陈兴艳, 卢文钊, 吕厚波, 高健美, 龚其海, 张远冬*
遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563000

摘要:目的 制备淫羊藿次苷 II 纳米乳 (icariside II nanoemulsion, NE-ICS II), 以提升口服生物利用度并增强抗脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI) 的能力。方法 采用超声乳化法制备 NE-ICS II, 并对其理化性质进行表征; 系统评价药动学参数及脑内药物分布; 通过在大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型大鼠中检测脑梗死体积、神经功能评分、氧化应激及炎症指标评估其疗效; 结合 RNA 测序解析其作用机制。结果 NE-ICS II 的平均粒径为 (147.59±0.71) nm, 包封率为 (84.85±5.47)%, 可使 ICS II 的口服生物利用度提高 2.4 倍, 显著增加药物在脑部的蓄积。治疗性口服 NE-ICS II 明显改善 MCAO 大鼠的神经功能, 缩小脑梗死体积, 减轻病灶氧化应激和炎症反应; RNA 测序揭示其可能下调氧化应激与炎症相关信号通路。结论 NE-ICS II 显著提升了 ICS II 的口服生物利用度, 在低剂量下即可实现对 CIRI 的有效治疗, 为实现 ICS II 的高效脑递送及中枢神经系统疾病的治疗提供新策略。

关键词: 淫羊藿次苷 II; 纳米乳; 脑缺血再灌注损伤; 氧化应激; 神经炎症

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)12-4609-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.12.009

Preparation of an icariside II nanoemulsion and its effect on improving cerebral ischemia-reperfusion injury

WU Changjing, CHEN Xingyan, LU Wenchai, LYU Houbo, GAO Jianmei, GONG Qihai, ZHANG Yuandong
School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Abstract: Objective To develop an icariside II nanoemulsion (NE-ICS II) to enhance oral bioavailability and improve efficacy against cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI). **Methods** NE-ICS II was prepared by ultrasonic emulsification and its physicochemical properties were characterized. Pharmacokinetic parameters and brain distribution were systematically evaluated. Therapeutic efficacy was assessed in rats subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAO) by measuring infarct volume, neurological deficit scores, and oxidative stress and inflammatory markers. RNA sequencing was performed to elucidate the underlying mechanisms. **Results** NE-ICS II showed a mean particle size of (147.59 ± 0.71) nm and an encapsulation efficiency of (84.85 ± 5.47)%. NE-ICS II increased the oral bioavailability of ICS II by 2.4-fold and significantly enhanced its accumulation in the brain. Therapeutic oral administration of NE-ICS II markedly improved neurological function, reduced infarct volume, and attenuated oxidative stress and inflammatory responses in MCAO rats. RNA sequencing revealed that NE-ICS II may downregulate signaling pathways associated with oxidative stress and inflammation. **Conclusion** NE-ICS II substantially improves the oral bioavailability of ICS II and enables effective treatment of CIRI at a low dose, providing a promising strategy for efficient brain delivery of ICS II and for the treatment of central nervous system diseases.

Key words: icariside II; nanoemulsion; cerebral ischemia-reperfusion injury; oxidative stress; neuroinflammation

脑缺血后, 恢复血流再灌注过程常伴随继发性的损伤, 如引发活性氧过量生成、神经元凋亡和血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 破坏等^[1-2], 被称

为脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)。目前, 针对 CIRI 的改善无明确的治疗方案或药物, 因此, 探索有效的 CIRI 干预策略具

收稿日期: 2025-12-30

基金项目: 中国科协青年人才托举工程 (GASTYESS202420); 遵义医科大学未来科技菁英人才项目 (ZYSE-2022-02); 贵州省科技重大专项 (ZKHHZ[2022]412)

作者简介: 吴昌静, 女, 硕士研究生, 研究方向为纳米药物递送系统的构建及研究。E-mail: wuchangjing@zmu.edu.cn

*通信作者: 张远冬, 女, 博士, 副教授, 主要从事纳米药物递送系统的构建及研究。E-mail: yuandong@zmu.edu.cn

有重要意义。CIRI的病理机制复杂,其中,涉及氧化应激和炎症反应等过程被认为是关键治疗靶点。

淫羊藿次苷II(icariside II, ICS II)是淫羊藿的体内代谢产物,因其在阿尔茨海默病、帕金森病等神经系统疾病中展现了显著的神经保护作用而备受关注^[3-4];研究表明,ICS II通过促进线粒体融合,抑制线粒体氧化应激^[5],可减轻脑卒中后的组织氧化应激损伤^[6];此外,ICS II可调节核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路,从而减轻神经炎症发生、BBB破坏以及神经元死亡等^[7]。这些结果提示,ICS II具有显著的抗炎、抗氧化作用,对CIRI显示潜在的治疗效率。

但ICS II水溶性差(溶解度0.013 mg/mL)、存在显著的肠道外排作用以及较差的生物利用度(约为4.28%)^[8-9],这些因素严重限制了其临床应用。新型药物递送体系如聚合物胶束、磷脂复合物等已被探索用于ICS II递送^[9],但这些制剂多用于静脉给药,口服制剂的系统研究仍十分匮乏。同时,现有口服递送策略如表面活性剂胶束虽然可改善溶解度,但在体液稀释、pH值波动及酶解环境下易解离,导致药物提前释放并削弱疗效^[10]。因此,构建一种兼具高溶解度、良好稳定性与显著口服有效性的递送系统,是促进ICS II临床转化的关键。纳米乳具有优良的生物相容性和高载药能力,能够增强药物跨生物膜的渗透性,可用于多途径给药^[11-12]。

本研究选用角鲨烯(squalene)为油相,并联合大豆磷脂、聚乙二醇15-羟硬脂酸酯(Kolliphor[®] HS15, HS15)及聚氧乙烯氢化蓖麻油40(Kolliphor[®] RH40, RH40)配制复合乳化剂,以制备包载ICS II的纳米乳(ICS II nanoemulsion, NE-ICS II)。角鲨烯具有卓越的生物相容性和内在生物活性。研究显示,角鲨烯通过抗氧化、调节铁死亡以及神经保护作用减轻CIRI^[13]。大豆磷脂能够在油-水界面自组装,并通过氢键作用形成黏弹性稳定膜^[14],但大多数磷脂的两性离子特性,限制了其在水包油乳液中,产生足够的静电或空间位阻排斥力,从而导致液滴易于聚集^[15]。因此,在大豆磷脂体系中加入辅助乳化剂可以提高其稳定性、避免液滴融合。

Kolliphor[®]系列的表面活性剂已获美国食品药品监督管理局批准,可用于口服及静脉给药^[16]。其中,HS15具有优异的增溶与渗透促进作用^[17];RH40则能增强乳化,并抑制P-糖蛋白外排,这一作用能提高药物的口服生物利用度^[18-19]。

本研究制备NE-ICS II并评价其制剂性质、口服生物利用度、脑组织分布,并将NE-ICS II应用于大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型大鼠,于缺血再灌注后给药,考察NE-ICS II对脑梗死体积、神经功能评分及氧化应激水平的影响,以评价该纳米乳在提高药物稳定性及治疗CIRI的潜在价值。为ICS II口服制剂的开发与临床转化拓展提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JEM-1400FLASH型透射电子显微镜(TEM),日本电子株式会社;90Plus PALS型粒径电位分析仪,美国布鲁克海文仪器公司;Moor VMS-LDF1型激光多普勒血流监测仪,英国穆尔仪器有限公司;Acquity 2695型高效液相色谱仪、Acquity UPLC I-Class/Xevo TQ-S型超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪,美国Waters公司。

1.2 材料

ICS II对照品(批号SB8040,质量分数 $\geq 98\%$)、ICS II原料药(批号19083008,质量分数 $\geq 98\%$)、2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC,批号702N031)购自北京索莱宝科技有限公司;角鲨烯(批号S3626)、大豆磷脂(批号BCCF9598)购自德国Sigma-Aldrich公司;HS15(批号61909-81-7)购自美国Med Chem Express公司;RH40(批号R1696-1)购自南京都莱生物技术有限公司;氧化应激指标试剂盒和炎症因子试剂盒均购自上海仁捷生物科技有限公司。

1.3 实验动物

SPF级SD大鼠,雄性,体质量220~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号为SCXK(湘)2019-0004。实验通过遵义医科大学动物伦理委员会审批,实验动物伦理编号为(2021)2-599。

2 方法与结果

2.1 NE-ICS II的制备

选用超声乳化法制备纳米乳^[20],将ICS II溶于二氯甲烷和无水乙醇混合溶剂中,溶解后加入角鲨烯100 mg、大豆磷脂30 mg、RH40 50 mg;涡旋混匀,再加入2 mL 0.5% HS15制成初乳。初乳置于细胞破碎仪下,探头超声(功率260 W、频率20 KHz)5 min,室温旋蒸10 min,除去有机溶剂,即得NE-ICS II。结果见图1,NE-ICS II外观为均一乳白色。



图1 NE-ICS II 的外观

Fig. 1 Appearance of NE-ICS II

2.2 NE-ICS II 的表征

2.2.1 粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位测定 按 1 : 500 比例稀释 NE-ICS II 后, 采用粒径电位分析仪对 NE-ICS II 表征, NE-ICS II 平均粒径为 (147.59 ± 0.71) nm (图 2-A), ζ 电位为 (-48.4 ± 7.2) mV (图 2-B), PDI 为 0.16 ± 0.01 , 表明 NE-ICS II 粒径均一性良好。

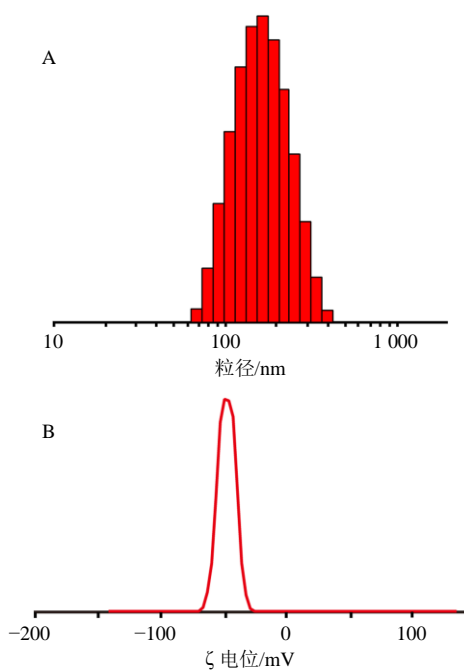


图2 NE-ICS II 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 2 Size distribution (A) and ζ potential (B) of NE-ICS II

2.2.2 形态学观察 取 NE-ICS II 稀释 40 倍, 通过 TEM 观察其形态。结果见图 3, NE-ICS II 形态呈类球形, 粒子间无聚集。

2.2.3 包封率与载药量 采用葡聚糖凝胶 G-75 层析柱分离 NE-ICS II 和游离 ICS II。收集 NE-ICS II, 以无水乙醇-四氢呋喃混合液 (体积比 1 : 1) 破乳后, 于 12 000 r/min 离心 (离心半径 8.5 cm) 10 min, 作为供试品溶液。HPLC-UV 法测定上清中药物含量^[21]。

HPLC-UV 条件: 色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈

柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为 80% 甲醇水溶液, 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 270 nm。色谱图见图 4。

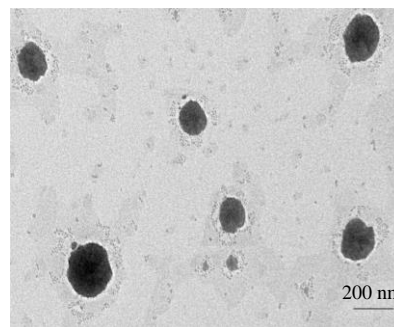


图3 NE-ICS II 的 TEM 图

Fig. 3 TEM image of NE-ICS II

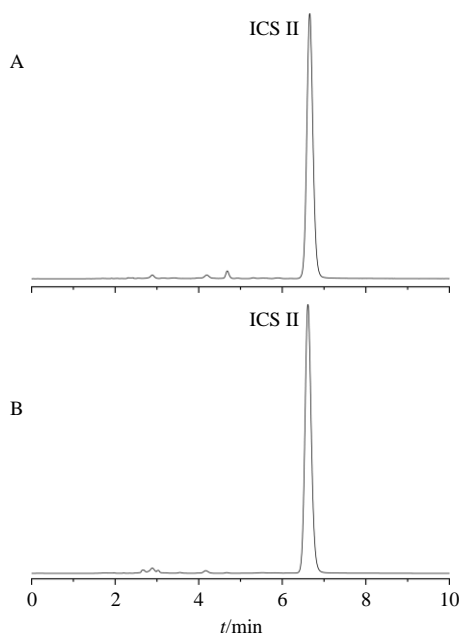


图4 ICS II 对照品 (A) 和 NE-ICS II 样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of ICS II reference substance (A) and ICS II sample (B)

包封率与载药量按以下公式计算, 测得 NE-ICS II 中 ICS II 的包封率为 (84.85 ± 5.47) %, 载药量为 (4.60 ± 0.65) %。

$$\text{包封率} = M_{\text{loaded ICS II}} / M_{\text{total ICS II}}$$

$$\text{载药量} = M_{\text{loaded ICS II}} / (M_{\text{excipients}} + M_{\text{total ICS II}})$$

$M_{\text{total ICS II}}$ 为制剂制备投入 ICS II 的量, $M_{\text{loaded ICS II}}$ 为制剂加载 ICS II 的量, $M_{\text{excipients}}$ 为制剂制备投入的辅料的总质量

ICS II 对照品溶液的配制: 精密称取 ICS II 对照品 5.32 mg 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加入色谱纯甲醇完全溶解并定容, 配制成质量浓度为 0.532 mg/mL 的储备液。

2.2.4 体外释药特性考察 取 NE-ICS II 置于透析

袋，浸入含有 1%十二烷基硫酸钠和 10%无水乙醇的磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS）中，放置于 37 °C、100 r/min 的摇床中。于设定时间点取样，按照“2.2.3”项下色谱条件测定药物含量。结果见图 5，游离 ICS II 呈现快速释药，NE-ICS II 则表现出持续缓慢的释药行为，至 96 h 时累积释药率达到 (81.85±7.44)%，高于游离 ICS II 的平台期释药水平 (61.96±2.70)%。表明 NE-ICS II 具有缓释性能。

2.2.5 稳定性考察 将 NE-ICS II 置于 25、4 °C 下，定时测定其粒径与 PDI，结果如表 1 所示。在 30 d 内，NE-ICS II 的粒径与 PDI 均未发生显著变化，同时未出现药物析出或相分离现象，表明 NE-ICS II 具

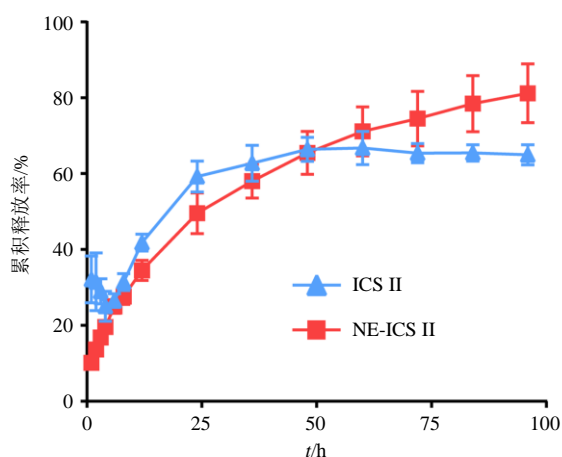


图 5 ICS II 和 NE-ICS II 的体外药物释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 *In vitro* release profiles of ICS II and NE-ICS II ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 1 NE-ICS II 在 25、4 °C 下 30 d 内的平均粒径与 PDI 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Changes of average particle size and PDI of NE-ICS II during 30 d storage at 25, 4 °C ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	25 °C		4 °C	
	粒径/nm	PDI	粒径/nm	PDI
0	156.37±1.13	0.13±0.00	156.38±1.13	0.13±0.01
1	151.48±2.05	0.12±0.02	148.28±4.48	0.12±0.03
2	156.79±2.04	0.09±0.02	147.71±2.51	0.10±0.02
3	160.14±0.67	0.08±0.02	149.36±4.29	0.09±0.01
5	162.08±1.84	0.10±0.01	149.53±4.25	0.10±0.02
8	163.30±1.76	0.11±0.04	150.55±3.66	0.10±0.01
11	167.37±2.45	0.09±0.04	152.25±3.48	0.11±0.02
15	169.90±1.63	0.09±0.02	147.12±0.90	0.11±0.02
21	177.76±1.77	0.07±0.02	152.19±0.48	0.11±0.03
30	180.46±1.18	0.12±0.02	163.27±3.10	0.16±0.03

有较好储存稳定性。

2.3 药动学研究

2.3.1 UPLC/MS-MS 条件^[21] 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱：0~1.2 min, 60%~5%乙腈；1.2~2.6 min, 5%乙腈；2.6~2.7 min, 5%~60%乙腈；2.7~4.0 min, 60%乙腈；采用多反应监测正离子模式进行定量，ICS II *m/z* 515.1→369.2，内标物卡马西平 *m/z* 237.1→194.2。

2.3.2 药动学实验 实验前大鼠禁食 12 h，随机分为 2 组。ICS II 游离组和 NE-ICS II 制剂组分别 ig 相同剂量 ICS II (100 mg/kg)，于给药后 0.17、0.33、0.5、0.75、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、12.00 h 采血。经 12 000 r/min 离心 (离心半径 8.5 cm) 10 min 收集血浆，UPLC-MS/MS 法测定血浆中药物质量浓度，使用 DAS 2.0 软件处理数据，绘制药-时曲线 (图 6)。

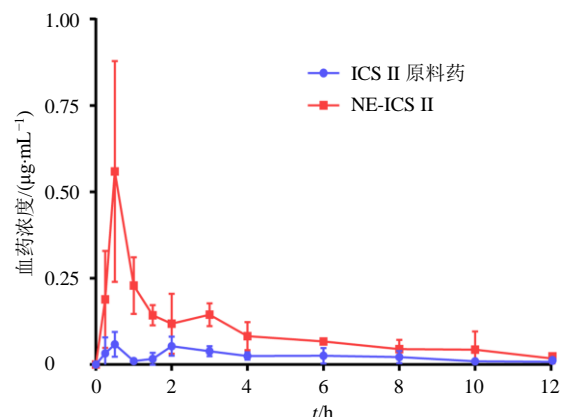


图 6 ICS II 原料药和 NE-ICS II 血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Plasma concentration-time profiles of ICS II bulk drug and NE-ICS II ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

并计算最大血药浓度 (C_{max})、达峰时间 (t_{max}) 及药-时曲线下面积 (AUC_{0-12}) 等药动学参数，计算相对口服生物利用度 (F)，结果如表 2 所示，NE-ICS II 相比游离 ICS II，其 AUC_{0-12} 提升 2.4 倍， C_{max} 增加 7.62 倍；同时，NE-ICS II 组的 t_{max} 和药物半衰期 ($t_{1/2}$) 显著缩短，表明纳米乳可更快速促进药物吸收，有效提升了 ICS II 的 F 。

$$F = \frac{AUC_{待测制剂} \times 剂量_{参比}}{AUC_{参比} \times 剂量_{待测制剂}}$$

2.4 体内组织分布研究

以亲脂性荧光染料 DID 代替 ICS II 包载于 NE 内，制备 NE-DID。按照“2.5.1”项下方法构建 MCAO 模型大鼠，缺血 2 h 并再灌注 4 h 后，立即分别 ig

表2 大鼠口服 ICS II 原料药与 NE-ICS II 后的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of ICS II bulk drug and NE-ICS II after oral administration in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	单位	ICS II	NE-ICS II
AUC _{0~12}	ng·h·L ⁻¹	547.96 ± 130.14	1 313.30 ± 588.39*
AUC _{0~∞}	ng·h·L ⁻¹	583.05 ± 134.61	2 659.36 ± 2 002.66*
MRT _{0~12}	h	5.01 ± 1.90	3.89 ± 1.44
t _{1/2}	h	4.30 ± 0.84	2.40 ± 0.95*
t _{max}	h	1.50 ± 0.50	0.63 ± 0.13**
C _{max}	ng·L ⁻¹	97.95 ± 62.98	746.93 ± 589.83*
F	%	100	240

与 ICS II 组比较: *P<0.05 **P<0.01。

*P<0.05 **P<0.01 vs ICS II group.

给予 NE-DID 和 DID。在给药后 4、6、8 h 时处死大鼠，经小动物活体成像考察各组织的荧光情况，结果见图 7。采用 Living Image 4.3 软件进行数据分析，结果如图 8 和表 3 所示，NE-DID 组脑组织荧光强度明显高于游离 DID 组，且能维持至给药 8 h，而游离药物的脑内荧光信号衰减迅速，清除较快，表明 NE 能够提升 ICS II 的口服生物利用度，促进其脑内渗透并延长滞留时间，显示出增强 ICS II 治疗 CIRI 的潜力。

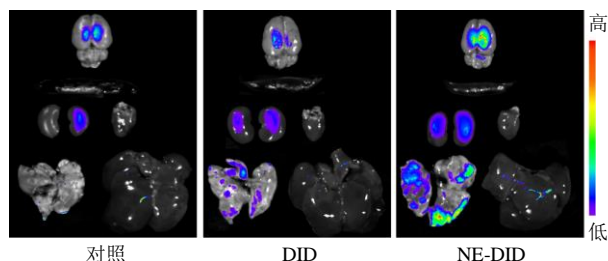


图7 给药后 6 h 大鼠各组织的荧光分布图

Fig. 7 Tissue fluorescence distribution in rats at 6 h after administration

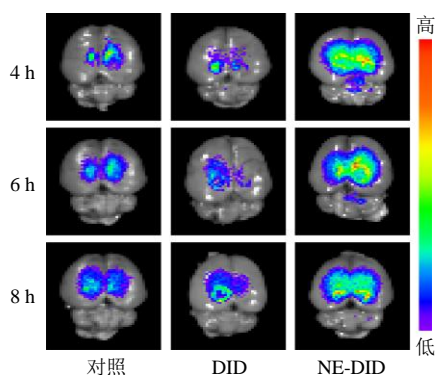


图8 给药后 4、6、8 h 大鼠脑组织荧光成像

Fig. 8 Fluorescence imaging of rat brain tissues at 4, 6, and 8 h after administration

表3 给药后 4、6、8 h 大鼠脑组织荧光成像的半定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Semiquantitative analysis of fluorescence imaging of rat brain tissue at 4, 6, and 8 h after administration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对荧光强度/cps		
	4 h	6 h	8 h
对照	6 931.24 ± 314.72	6 492.25 ± 166.09	6 572.86 ± 63.36
DID	6 645.69 ± 97.76	6 190.21 ± 257.39	6 604.29 ± 438.26
NE-DID	7 533.49 ± 149.86**	6 996.22 ± 322.88*	7 165.19 ± 770.90

与 DID 组比较: *P<0.05 **P<0.01。

*P<0.05 **P<0.01 vs DID group.

2.5 药效学评价

2.5.1 MCAO 模型的构建 采用大脑中动脉闭塞法建立 CIRI 模型^[22]。大鼠经 2%戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉后，置于恒温加热垫上。于颈部正中切口，暴露左侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉；结扎颈总动脉分叉处，夹闭颈总动脉与颈内动脉后，于颈外动脉残端做一小切口，将栓线插入颈内动脉约 1.8 cm 以阻塞大脑中动脉。假手术 (Sham) 组大鼠仅暴露血管，不插入栓线。缺血 2 h 后拔出栓线，恢复血流。采用激光多普勒血流仪检测脑血流量。结果如图 9 和表 4 所示，大鼠缺血期的脑血流量显著下降，仅为正常水平的 50%左右 (P<0.05)，再灌注 4 h 后，缺血区域脑血流量可恢复至正常水平的 80%左右 (P<0.05)，表明 CIRI 模型成功建立。

2.5.2 实验分组与给药方案 将大鼠随机分为 5 组：

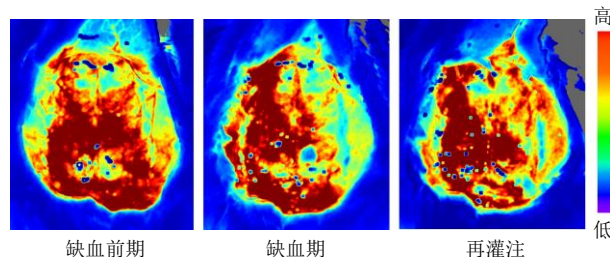


图9 激光散斑成像技术监测脑血流变化

Fig. 9 Laser speckle contrast imaging to monitor changes in cerebral blood flow

表4 激光散斑成像技术监测脑血流变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Laser speckle contrast imaging to monitor changes in cerebral blood flow ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对脑血流量/%
缺血前期	100.00 ± 0.00
缺血期	56.76 ± 5.14*
再灌注	79.23 ± 9.43#

与缺血前期比较: *P<0.05; 与缺血期比较: #P<0.05。

*P<0.05 vs pre-ischemia; #P<0.05 vs ischemia.

假手术组、MCAO 模型组 (MCAO+0.5% CMC-Na)、角鲨烯组 (MCAO+角鲨烯 5 mg/kg); 游离 ICS II 组 (MCAO+ICS II 5 mg/kg, 溶于 0.5% CMC-Na); NE-ICS II 组 (MCAO+NE-ICS II, 含 ICS II 5 mg/kg)。除假手术组外, 其余各组大鼠均先建立 CIRI 模型 (缺血 2 h, 再血流灌注 4 h) 后立即开始给药治疗, 每日 2 次, 连续给药 3 d。

2.5.3 神经功能缺损评分 治疗 3 d 后, 于第 4 天通过尾部悬吊 (距地面 35 cm) 观察大鼠前肢姿势, 并于平坦台面上轻推其肩部以评估肢体阻力, 同时自由观察其整体运动行为。采用 Longa 5 分法^[20]评估大鼠神经功能缺损程度, 评分标准: 0 分, 无神经功能缺损; 1 分, 轻度缺损 (对侧前爪伸展不全); 2 分, 中度缺损 (向对侧转圈); 3 分, 重度缺损 (向对侧倾倒); 4 分, 丧失自主运动能力或意识。

结果如表 5 所示, MCAO 组大鼠神经功能严重受损, 评分为 3.80 ± 0.45 ; 角鲨烯组与游离 ICS II 组仅观察到轻微改善, 评分分别为 3.76 ± 0.22 和 3.32 ± 0.95 ; 而 NE-ICS II 治疗组可显著提升 MCAO 大鼠的运动协调能力, 评分降至 1.38 ± 0.43 , 与 ICS II 组相比差异显著 ($P < 0.001$)。

表 5 神经功能评分和脑梗死体积半定量分析结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	神经功能评分	梗死率/%
假手术	0.14 ± 0.13	0.42 ± 0.41
MCAO	$3.80 \pm 0.45^{***}$	$22.47 \pm 6.30^{***}$
角鲨烯	3.76 ± 0.22	21.61 ± 9.89
ICS II	3.32 ± 0.95	16.44 ± 9.41
NE-ICS II	$1.38 \pm 0.43^{###\Delta\Delta\Delta}$	$3.33 \pm 2.72^{###\Delta}$

与假手术组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与 MCAO 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与 ICS II 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 表 6、7 同。

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs MCAO group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs ICS II group; same as tables 6, 7.

2.5.4 TTC 染色法评价脑梗死体积 治疗 3 d 后, 于第 4 天取大鼠脑组织冷冻后冠状切 2 mm 厚的脑片, 置于 0.4% TTC 溶液中染色 60 min (37 °C), 再经 4% 多聚甲醛固定 48 h 后进行成像与定量分析, 并计算脑梗死体积占比 (梗死率)。

梗死率 = 梗死组织质量/脑组织总质量

结果如图 10 所示, 存活脑组织中线粒体脱氢酶将 TTC 还原, 因而脑组织呈红色; 而脑梗死区域

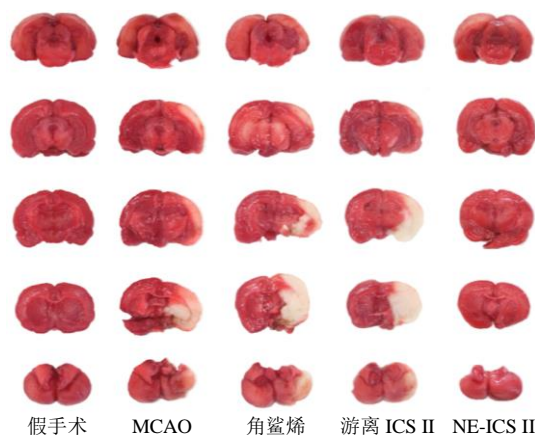


图 10 脑切片 TTC 染色代表性图

Fig. 10 Representative TTC-stained brain sections

细胞受损, 线粒体脱氢酶失活, 无法还原 TTC, 因而呈白色。MCAO 组以及给予角鲨烯、ICS II 处理组, 均可见明显的白色梗死区域, 而 NE-ICS II 处理后, 损伤侧大脑半球基本恢复成红色。

半定量分析结果 (表 5) 显示, MCAO 组脑梗死率为 $(22.47 \pm 6.30)\%$ 。角鲨烯组与 ICS II 组仅呈现轻微下降趋势, 脑梗死率分别为 $(21.61 \pm 9.89)\%$ 和 $(16.44 \pm 9.41)\%$, 而 NE-ICS II 治疗组降低至 $(3.33 \pm 2.72)\%$, 表明 NE-ICS II 明显显著减轻了 MCAO 大鼠的脑组织损伤。

2.5.5 炎症因子水平检测 治疗 3 d 后, 于第 4 天取大鼠脑组织缺血半暗带区域匀浆, 收集脑组织上清液, 采用酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测相关炎症因子水平。结果见表 6。与假手术组相比, MCAO 组促炎因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平显著升高。与 MCAO 组相比, 单独使用 ICS II 或角鲨烯, 均能显著降低 TNF- α 水平, 但对 IL-1 β 、IL-6 无显著调控作用。而 NE-ICS II 治疗组可同时

表 6 各组大鼠脑组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量分数/(pg·mL ⁻¹)		
	TNF- α	IL-1 β	IL-6
假手术	207.91 ± 37.46	20.36 ± 4.40	41.56 ± 10.47
MCAO	$454.94 \pm 62.15^{***}$	$29.49 \pm 1.13^{***}$	$76.82 \pm 11.63^{***}$
角鲨烯	$351.65 \pm 48.43^{##}$	31.30 ± 1.40	85.20 ± 6.94
ICS II	$333.06 \pm 27.91^{##}$	28.37 ± 2.84	77.35 ± 11.90
NE-ICS II	$256.26 \pm 18.52^{###}$	$17.59 \pm 1.02^{###\Delta\Delta\Delta}$	$57.02 \pm 1.18^{\Delta\Delta}$

显著性下调 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的含量，基本恢复至正常水平。结果表明，NE-ICS II 有抑制脑内炎症的作用。

2.5.6 氧化应激指标的测定 按照“2.5.5”项下方法收集脑组织上清液。ELISA 检测核心氧化应激标志物含量，结果见表 7。与假手术组相比，MCAO 组大鼠脑组织出现显著氧化还原失衡，促氧化物活性氧（reactive oxygen species, ROS）、丙二醛

（malondialdehyde, MDA）及过氧化氢（hydrogen peroxide, H₂O₂）水平大幅升高（ $P < 0.05$ 、 0.001 ），而抗氧化物超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、谷胱甘肽（glutathione, GSH）含量明显降低（ $P < 0.05$ 、 0.001 ）；ICS II 组与角鲨烯组也呈现出相似的氧化应激失衡状态，而 NE-ICS II 处理后，MCAO 大鼠脑组织氧化应激失衡得到纠正，其抗氧化物水平升高，促氧化物含量降低。

表 7 各组大鼠脑组织中氧化应激指标 GSH、SOD、ROS、MDA、H₂O₂ 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Levels of oxidative stress index GSH, SOD, ROS, MDA, H₂O₂ in brain tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	GSH/(mmol·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	ROS/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·L ⁻¹)	H ₂ O ₂ /(μ mol·L ⁻¹)
假手术	1 069.18 \pm 73.87	366.38 \pm 32.33	642.23 \pm 87.25	7.31 \pm 0.25	116.44 \pm 12.96
MCAO	696.19 \pm 82.67***	293.95 \pm 9.57*	923.75 \pm 77.62***	8.46 \pm 1.14*	153.74 \pm 13.23***
角鲨烯	614.02 \pm 15.59	312.77 \pm 29.53	914.20 \pm 26.44 Δ	7.38 \pm 0.43 Δ	143.17 \pm 5.33
ICS II	672.12 \pm 91.29	300.85 \pm 25.05	722.14 \pm 123.00 $\#$	8.84 \pm 0.17	139.29 \pm 1.57
NE-ICS II	1 174.06 \pm 17.98 $\#\#\#\Delta\Delta\Delta$	370.53 \pm 19.02 $\#\Delta$	640.24 \pm 26.39 $\#\#\#\$	7.30 \pm 0.23 $\#\Delta\Delta$	112.77 \pm 2.88 $\#\#\#\Delta$

2.6 转录测序分析

取 MCAO 组、ICS II 干预组、NE-ICS II 干预组大鼠的缺血侧大脑皮层组织进行转录测序分析。测序工作由杭州联川生物技术股份有限公司完成。以每百万映射片段中每千碱基外显子的片段数对各样本基因表达水平进行定量，将 $P < 0.05$ 且差异倍数 > 2 的基因定义为差异表达基因（differentially expressed genes, DEGs）。使用联川生物云平台（<https://www.omicstudio.cn/tool>）绘制热图、韦恩图及 KEGG 富集弦图。

DEGs 热图分析显示，ICS II、NE-ICS II 组与 MCAO 组间存在显著的表达差异（图 11）。表 8 结果显示，NE-ICS II 组相较于 MCAO 组存在 1 998 个 DEGs（479 个上调、1 519 个下调），而 NE-ICS II 组相较于游离 ICS II 组存在 171 个 DEGs（77 个上调、94 个下调）。

韦恩图分析结果（图 12）证实，NE-ICS II 可诱导更为特异的转录组表达变化，其中 NE-ICS II 组相较于 MCAO 组的 DEGs 中，存在 522 个独有的非重叠 DEGs，提示纳米乳递送系统能够通过调控多条分子通路，进一步增强 ICS II 的治疗作用。对 MCAO 组与 NE-ICS II 组的 DEGs 进行功能富集分析发现，NE-ICS II 能够显著抑制与氧化应激及炎症反应相关的生物学过程，其调控作用涉及 NF- κ B、抑癌蛋白 P53（protein 53, P53）和磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B（phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K-Akt）等关键信号通路（表 9）。

KEGG 富集弦图进一步直观展示了上述通路与其主要 DEGs 之间的靶向关联（图 13），为阐明 NE-ICS II 的分子调控靶点提供了可视化依据。

2.7 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件中单因素方差分析（ANOVA）结合 Tukey 多重比较法和非配对双尾 t 检验， $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

3 讨论

既往研究多聚焦于 ICS II 的药理活性探索，而针对 ICS II 的制剂探索相对不足。研究较多的胶束体系虽可改善 ICS II 溶解度与生物利用度，但其主要局限于静脉给药途径^[9]。目前，关于 ICS II 口服递送的研究较少，Li 等^[23]采用纳米混悬剂、包合物及固体分散体将 ICS II 口服生物利用度提升 2.3~2.8 倍，与本研究结果基本一致（2.4 倍）；但该研究中制剂同时含大量的淫羊藿苷，在体内转化为 ICS II，故测定的生物利用度可能高于实际值。Ding 等^[24]制备含乙醇的 ICS II 纳米乳，并掺入微晶纤维素、无水乳糖，制备纳米乳微型片剂，使口服生物利用度提高 2.5~3.5 倍。提示多技术融合及促渗剂（乙醇）协同可增强吸收，但多技术融合常伴随复杂的工艺、成本较高。

本研究针对 ICS II 溶解度低及肠道外排强的特点，选用兼具乳化功能与 P-gp 抑制活性的 RH40 和 HS15 作为复合乳化剂^[25]，构建纳米乳递送系统。结果表明，该体系可显著改善 ICS II 的口服生物利用度，但其机制是否涉及 P-gp 抑制及其他摄取途径

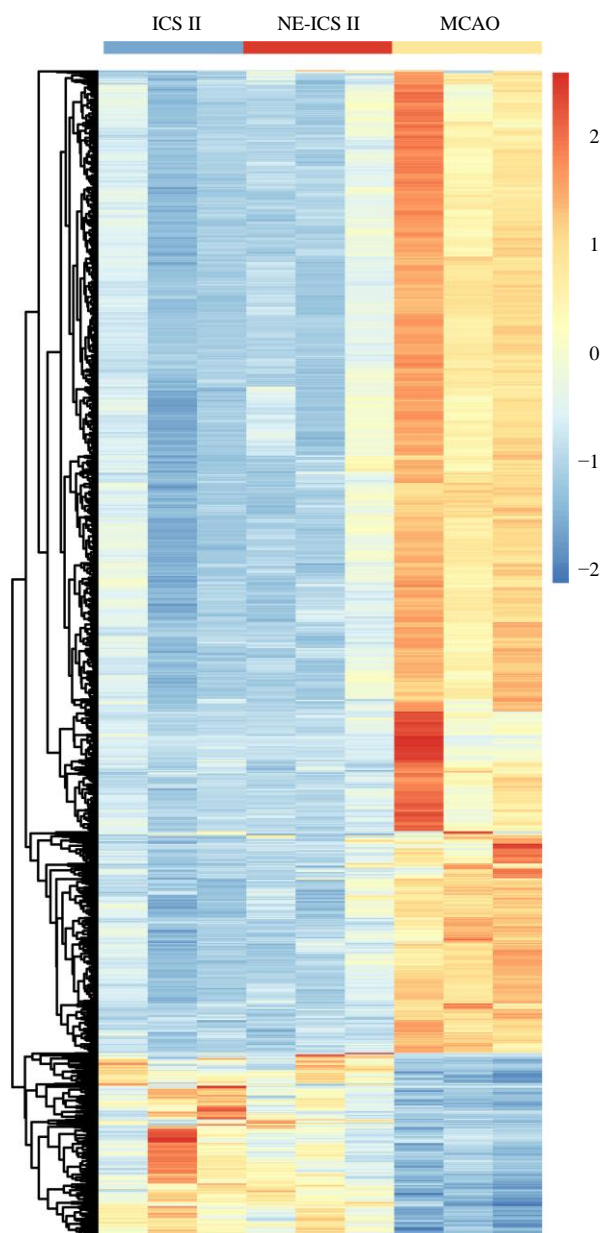


图 11 各组间 DEGs 表达热图

Fig. 11 Heatmap of DEGs expression across groups

表 8 各组 DEGs 数量对比 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Comparison of DEG numbers among groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	显著上调基因数量	显著下调基因数量
ICS II vs MCAO	590	2 044
NE-ICS II vs MCAO	479	1 519
NE-ICS II vs ICS II	77	94

仍有待深入探究。总体而言，该体系工艺简单，所用辅料均为已批准药用辅料，具备潜在的临床转化前景。

与既往 MCAO 模型研究中，需要高剂量 ICS II

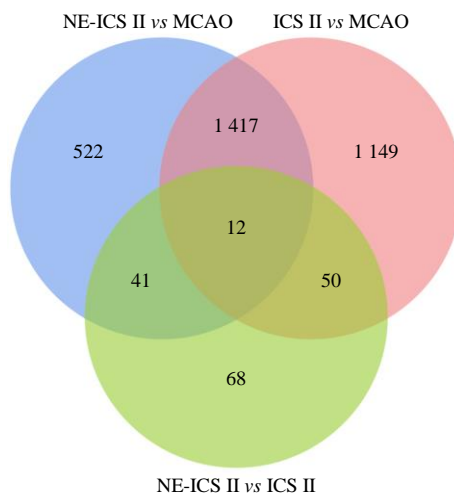


图 12 各组共有与特有靶基因韦恩图

Fig. 12 Venn diagram of shared and unique target genes among groups

表 9 NE-ICS II vs MCAO 的 KEGG 通路富集分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 KEGG enrichment analysis of NE-ICS II vs MCAO ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

序号	通路名称	基因数目	P值
1	NF-κB信号通路	24	$6.948\ 81 \times 10^{-8}$
2	P53信号通路	19	$2.211\ 09 \times 10^{-7}$
3	PI3K-Akt信号通路	50	$4.977\ 29 \times 10^{-7}$
4	血小板活化	24	$6.674\ 71 \times 10^{-6}$
5	ECM-受体相互作用	19	$8.810\ 26 \times 10^{-6}$
6	细胞因子-细胞因子受体相互作用	39	$1.123\ 05 \times 10^{-5}$
7	TNF信号通路	21	$2.872\ 80 \times 10^{-5}$
8	Th17细胞分化	18	$3.870\ 64 \times 10^{-4}$
9	细胞凋亡	21	$3.975\ 42 \times 10^{-4}$
10	MAPK信号通路	35	$1.625\ 13 \times 10^{-3}$

[($\geq 20\ \text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$)] 预防性给药方能起效不同^[26-27]，本研究通过制剂技术显著改善 ICS II 的口服生物利用度 (表 2) 及脑内分布 (图 8)，在模型大鼠中仅以 $5\ \text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的口服剂量即获得与高剂量预处理相当甚至更优的抗 CIRI 疗效 (图 10)。该结果表明，制剂介导的高效递送在保证疗效的同时显著降低给药剂量，有助于提升用药依从性并优化治疗效率。实验结果表明，NE-ICS II 在缓解与氧化应激相关的神经元损伤方面表现出显著疗效 (表 8)。

已有研究指出，ICS II 的抗炎活性与 MAPK、NF-κB、PI3K-Akt 信号通路密切相关。MAPK 通路能刺激巨噬细胞自噬，并促使其发生向抗炎表型的转化，从而减轻神经炎症^[28]。抑制 NF-κB 会减少 IL-6、IL-1β、TNF-α 等炎症因子的释放^[29]。而 PI3K-

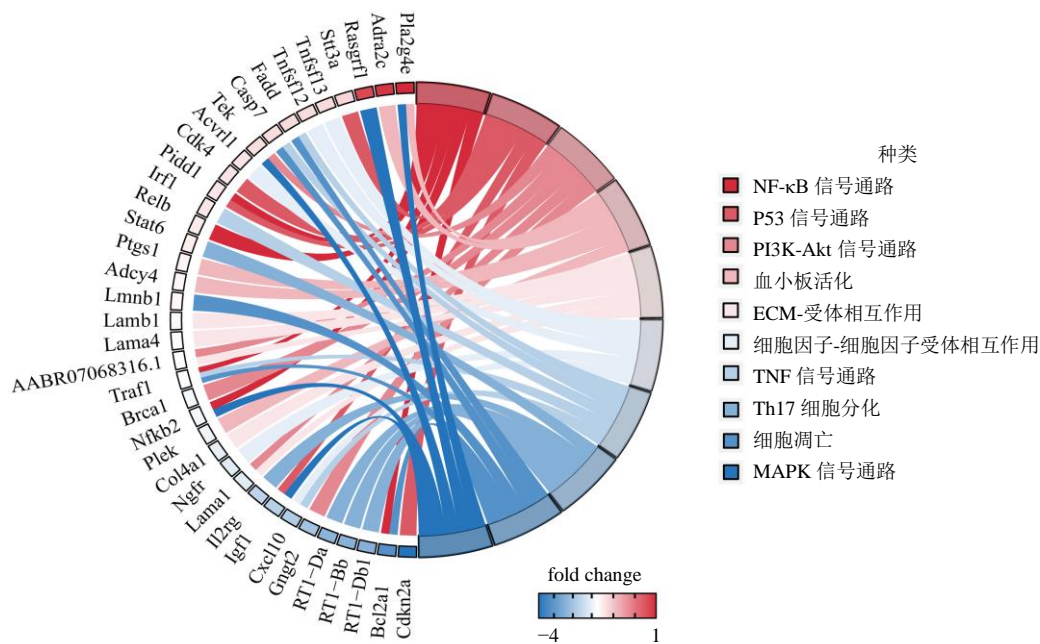


图 13 NE-ICS II vs MCAO 前 10 条显著富集通路与主要 DEGs 的 KEGG 弦图

Fig. 13 KEGG chord diagram of top 10 significantly enriched pathways and major DEGs in NE-ICS II vs MCAO

Akt 信号通路通过发挥抗炎抗氧化及抗凋亡等作用而改善 CIRI 状态^[30]。转录组分析显示，NE-ICS II 的抗 CIRI 作用可能依赖于其对多条氧化应激与炎症相关信号通路的协同调控（图 13），且在纳米乳递送条件下，涉及的作用靶点范围进一步拓展。这些新增的潜在机制及背后的复杂调控网络，仍有待阐明。

尽管本研究结果表明，NE-ICS II 在 CIRI 模型中可有效提高口服生物利用度、改善脑部药物分布并具有显著的神经保护作用，但仍存在局限性。首先，目前的结论仅基于采用 MCAO 大鼠的短期动物实验，仍需开展长期疗效与安全性评估，以进一步确认其治疗适用性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Bathla G, Ajmera P, Mehta P M, *et al.* Advances in acute ischemic stroke treatment: Current status and future directions [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2023, 44(7): 750-758.
 [2] Zhang Q, Jia M, Wang Y F, *et al.* Cell death mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(12): 3525-3542.
 [3] Chen W, Liu G G, Zhang Y. Production of rhamnosyl icariside II by snailase hydrolysis of *Epimedium wushanense* extracts [J]. *Heliyon*, 2024, 10(1): e23805.
 [4] 马正安, 顾万红, 王雪梅, 等. 淫羊藿次苷 II 神经保护

作用机制研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2025, 41(10): 108-112.

[5] Li Y L, Feng L Y, Xie D Y, *et al.* Icariside II mitigates myocardial infarction by balancing mitochondrial dynamics and reducing oxidative stress through the activation of Nrf2/SIRT3 signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 956: 175987.
 [6] Li Y, Meng F J. Effects of icariside II on brain tissue oxidative stress and Nrf2/HO-1 expression in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Acta Cir Bras*, 2019, 34(2): e201900208.
 [7] Liu M B, Wang W, Gao J M, *et al.* Icariside II attenuates cerebral ischemia/reperfusion-induced blood-brain barrier dysfunction in rats via regulating the balance of MMP9/TIMP1 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(12): 1547-1556.
 [8] Cheng T, Zhang Y, Zhang T, *et al.* Comparative pharmacokinetics study of icariin and icariside II in rats [J]. *Molecules*, 2015, 20(12): 21274-21286.
 [9] Hou J, Wang J, Sun E, *et al.* Preparation and evaluation of icariside II-loaded binary mixed micelles using Solutol HS15 and Pluronic F127 as carriers [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(9): 3248-3256.
 [10] Mallory D P, Freedman A, Kaliszewski M J, *et al.* Direct quantification of serum protein interactions with PEGylated micelle nanocarriers [J]. *Biomacromolecules*, 2023, 24(6): 2479-2488.
 [11] Chatzidaki M D, Mitsou E. Advancements in nanoemulsion-based drug delivery across different

- administration routes [J]. *Pharmaceutics*, 2025, 17(3): 337.
- [12] Lochhead J J, Ronaldson P T, Davis T P. The role of oxidative stress in blood-brain barrier disruption during ischemic stroke: Antioxidants in clinical trials [J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 228: 116186.
- [13] Zhang P, Liu N C, Xue M Y, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant properties of squalene in copper sulfate-induced inflammation in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 8518.
- [14] Zhao S Q, Wang Z Y, Wang X F, *et al.* Characterization of nanoemulsions stabilized with different emulsifiers and their encapsulation efficiency for oregano essential oil: Tween 80, soybean protein isolate, tea saponin, and soy lecithin [J]. *Foods*, 2023, 12(17): 3183.
- [15] Rocchio J, Neilsen J, Everett K, *et al.* A solvent-free lecithin-Tween 80 system for oil dispersion [J]. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*, 2017, 533: 218-223.
- [16] Steiner V, Öhlinger K, Corzo C, *et al.* Cytotoxicity screening of emulsifiers for pulmonary application of lipid nanoparticles [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 136: 104968.
- [17] Zhang W, Wan L, Han M Q, *et al.* Nose-to-brain drug delivery by HS15 micelles for brain targeting of insoluble drug [J]. *Acta Mater Med*, 2024, 3(2): 119-132.
- [18] Mohite P, Sule S, Pawar A, *et al.* Development and characterization of a self-nano emulsifying drug delivery system (SNEDDS) for ornidazole to improve solubility and oral bioavailability of BCS class II drugs [J]. *Sci Rep*, 2024, 14: 27724.
- [19] Chae G E, Kim D W, Jin H E. Development of squalene-based oil-in-water emulsion adjuvants using a self-emulsifying drug delivery system for enhanced antigen-specific antibody titers [J]. *Int J Nanomed*, 2022, 17: 6221-6231.
- [20] Huang T T, Wu C J, Lu W C, *et al.* Therapeutic delivery of phloretin by mixed emulsifier-stabilized nanoemulsion alleviated cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Pharmaceutics*, 2025, 17(12): 1599.
- [21] Li B H, Hu S Q, Huang B, *et al.* The design of icariside II oral nanoemulsion dispersed mini-tablets based on nanoparticle dissolution escape mechanism [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2026, 115: 107608.
- [22] Kang Y C, Sun Y P, Li T T, *et al.* Garcinol protects against cerebral ischemia-reperfusion injury *in vivo* and *in vitro* by inhibiting inflammation and oxidative stress [J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 54: 101672.
- [23] Li X C, Wang Y Y, Chen Y X, *et al.* Icariside II alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting lung epithelial inflammatory and immune responses mediated by neutrophil extracellular traps [J]. *Life Sci*, 2024, 346: 122648.
- [24] Ding Z Y, Chen X P, Tang D Y, *et al.* Comparisons of the bioavailability of icariin, icariside II, and epimedin C in rats after oral administration of total flavonoids of *Epimedium brevicornu* Maxim. and its three formulations [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2025, 255: 116631.
- [25] Gurjar R, Chan C Y S, Curley P, *et al.* Inhibitory effects of commonly used excipients on P-glycoprotein *in vitro* [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2018, 15(11): 4835-4842.
- [26] Yan B Y, Pan C S, Mao X W, *et al.* Icariside II improves cerebral microcirculatory disturbance and alleviates hippocampal injury in gerbils after ischemia-reperfusion [J]. *Brain Res*, 2014, 1573: 63-73.
- [27] Deng Y Y, Xiong D Q, Yin C X, *et al.* Icariside II protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats via nuclear factor- κ B inhibition and peroxisome proliferator-activated receptor up-regulation [J]. *Neurochem Int*, 2016, 96: 56-61.
- [28] He L Z, Deng Y Y, Gao J M, *et al.* Icariside II ameliorates ibotenic acid-induced cognitive impairment and apoptotic response via modulation of MAPK pathway in rats [J]. *Phytomedicine*, 2018, 41: 74-81.
- [29] Jover-Mengual T, Hwang J Y, Byun H R, *et al.* The role of NF- κ B triggered inflammation in cerebral ischemia [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 633610.
- [30] Xie X H, Wang F, Ge W X, *et al.* Scutellarin attenuates oxidative stress and neuroinflammation in cerebral ischemia/reperfusion injury through PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 957: 175979.

[责任编辑 郑礼胜]