

## • 药剂与工艺 •

## 大黄-牡丹皮新型自组装纳米粒的构建及其抗结直肠癌作用

李杰<sup>1</sup>, 薛亮亮<sup>2</sup>, 刘汉静<sup>3</sup>, 陈士林<sup>1\*</sup>

1. 成都中医药大学本草基因组学研究院, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学基础医学院, 四川 成都 611137

3. 成都中医药大学医学技术学院, 四川 成都 611137

**摘要:** 目的 采用微沉淀法制备大黄-牡丹皮新型自组装纳米粒 (*Rhei Radix et Rhizoma-Moutan Cortex* novel self-assembled nanoparticles, RMN-SAN) 并开展表征、形成机制与抗结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 药效作用探究。方法 通过单因素实验优化工艺参数, 开展动态光散射、 $\zeta$  电位和透射电子显微镜等表征; 利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术鉴定核心活性成分, 借助傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 与 UV 光谱揭示 RMN-SAN 自组装机理; 通过体外 CT26 细胞实验与体内荷瘤小鼠模型验证其抗 CRC 药效。结果 优化后 RMN-SAN 最佳制备方法为大黄、牡丹皮各 10 g, 加 10 倍量水, 浸泡 30 min, 回流提取 30 min, 滤过。药渣加 8 倍 70% 乙醇回流提取 30 min, 滤过。合并 2 次提取液, 600 r/min、25 °C 条件下磁力搅拌 30 min, 60 °C 旋转蒸发除醇, 并浓缩至 0.2 g/mL, 梯度离心 (4 °C, 6 000、8 000、10 000 r/min 各 10 min) 后透析 (截留相对分子质量 3 500) 12 h, 即得 RMN-SAN。RMN-SAN 的平均粒径为 (109.30±4.20) nm, PDI 为 0.353±0.009,  $\zeta$  电位为 (-24.5±1.3) mV, 呈均一球状结构; 共鉴定出大黄酸、芦荟大黄素、番泻苷 B、丹皮酚和芍药苷 5 种核心成分, 其自组装依赖氢键与  $\pi$ - $\pi$  堆积作用驱动并得到了分子对接验证。体外实验证实 RMN-SAN 可浓度相关性抑制 CT26 细胞增殖、诱导凋亡和 G<sub>1</sub> 期阻滞; 体内实验中 RMN-SAN 高剂量 (6.0 g/kg) 组抑瘤作用显著高于传统煎煮法组, 且能更高效地调节免疫炎症因子水平。结论 通过现代工艺赋能中药配伍优势, 为中药自组装纳米粒的制备优化提供了新思路, 也为 CRC 的中医药治疗提供了高效稳定的新型制剂。

**关键词:** 大黄; 牡丹皮; 药对; 新型自组装纳米粒; 微沉淀; 抗结直肠癌; UPLC-Q-TOF-MS; 大黄酸; 芦荟大黄素; 番泻苷 B; 丹皮酚; 芍药苷;  $\pi$ - $\pi$  堆积作用

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)13-5002-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.13.006

## Construction of novel self-assembled nanoparticles loaded with *Rhei Radix et Rhizoma-Moutan Cortex* and its anti-colorectal cancer effect

LI Jie<sup>1</sup>, XUE Liangliang<sup>2</sup>, LIU Hanjing<sup>3</sup>, CHEN Shilin<sup>1</sup>

1. Institute of Herbgonomics, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. School of Basic Medicine Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. School of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** Novel self-assembled nanoparticles (RMN-SAN) of Dahuang (*Rhei Radix et Rhizoma*) and Mudanpi (*Moutan Cortex*) were prepared by the micro-precipitation method, and their characterization, formation mechanism and anti-colorectal cancer (CRC) efficacy were investigated. **Methods** The process parameters were optimized through single-factor experiments, and

收稿日期: 2026-03-03

基金项目: 2024 年度博士后创新人才支持计划 “A 档” (原国家 “博新计划”, BX20240048); 国家自然科学基金青年项目 (82505368); 中国博士后科学基金第 77 批面上项目 (2025M773871); 四川省科学技术厅青年项目 (2024NSFSC1821); 成都市科技局技术创新研发项目 (2026-YF05-01025-SN); 成都中医药大学 2024 年度 “杏林学者” 学科人才科研提升计划 (BSZ2024033)

作者简介: 李杰, 副研究员, 中药药剂学博士, 中西医结合博士后, 研究方向为中药新制剂与新剂型。E-mail: Jie.L@cdutcm.edu.cn

\*通信作者: 陈士林, 中国工程院院士, 成都中医药大学首席教授, 研究方向为本草基因组学及以 GPCR 为底层核心的新药研发。

Tel: (028)61800231 E-mail: slchen@cdutcm.edu.cn

characterization methods such as dynamic light scattering,  $\zeta$  potential and transmission electron microscopy were performed. The core active components were identified by UPLC-Q-TOF-MS, and the self-assembly mechanism of RMN-SAN was revealed by FTIR and UV spectroscopy. The *in vitro* CT26 cell experiments and *in vivo* tumor-bearing mouse models were used to verify its anti-CRC efficacy. **Results** The optimized preparation method for RMN-SAN involves taking 10 g each of *Rhei Radix et Rhizoma* and *Moutan Cortex*, adding 10 times their volume of water, soaking for 30 min, and refluxing for 0.5 h, followed by filtration. The residue is then refluxed with 8 times its volume of 70% ethanol for 0.5 h and filtered again. The two extracts are combined, magnetically stirred at 600 r/min and 25 °C for 30 min, and the alcohol is removed by rotary evaporation at 60 °C, concentrating to a final concentration of 0.2 g/mL. The solution is subjected to gradient centrifugation (4 °C, 6 000, 8 000, and 10 000 r/min, each for 10 min), followed by dialysis (cut-off molecular weight 3 500) for 12 h, yielding the final product. The results showed that the average particle size of the optimized RMN-SAN was (109.30 ± 4.20) nm, the PDI was 0.353 ± 0.009, and the  $\zeta$  potential was (-24.5 ± 1.3) mV, presenting a uniform spherical structure. Five core components such as rhein, aloe-emodin, sennoside B, paeonol, and paeoniflorin were identified, and their self-assembly was driven by hydrogen bonds and  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions, which was verified by molecular docking. The *in vitro* experiments confirmed that RMN-SAN could inhibit the proliferation of CT26 cells in a concentration-dependent manner, induce apoptosis and block the cell cycle at the G<sub>1</sub> phase. In the *in vivo* experiments, the tumor suppression effect of the high-dose RMN-SAN group (6.0 g/kg) was significantly higher than that of the traditional decoction group, and it could regulate the levels of immune and inflammatory factors more efficiently. **Conclusion** This study enabled the utilization of the therapeutic advantages of traditional Chinese medicine through modern processing, providing new ideas for the optimization of the preparation of self-assembled nanoparticles of traditional Chinese medicine, and also providing an efficient and stable new formulation for the treatment of CRC with traditional Chinese medicine.

**Key words:** *Rhei Radix et Rhizoma*; *Moutan Cortex*; herb pair; novel self-assembled nanoparticles; microprecipitates; anti-colorectal cancer; UPLC-Q-TOF-MS; rhein; aloe-emodin; sennoside B; paeonol; paeoniflorin;  $\pi$ - $\pi$  stacking

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 在中医范畴属“肠覃”“积聚”“便血”等范畴, 其发病机制与湿热蕴结、瘀血阻滞、正气亏虚密切相关<sup>[1]</sup>。《黄帝内经》有云:“百病生于气也”“积之成也, 正气不足, 而后邪气踞之”, 指出 CRC 的发生发展是正气亏虚为本、湿热瘀毒为标的虚实夹杂过程<sup>[2]</sup>, 临床治疗多以“清热利湿、化瘀解毒、健脾益气”为核心治法<sup>[3-4]</sup>, 而大黄牡丹汤作为张仲景《金匮要略》中治疗“肠痈”的经典方剂, 恰合此治则<sup>[5-6]</sup>。方中大黄泻热通便、凉血解毒、逐瘀通经, 牡丹皮清热凉血、活血化瘀, 二者相须为用, 共奏清热利湿、化瘀解毒之功, 历代医家多用于湿热瘀毒型 CRC 的治疗, 疗效确切<sup>[7]</sup>。

中医药治疗肿瘤的核心优势在于“整体观念”与“辨证论治”, 强调从机体整体出发, 调节气血阴阳平衡, 而非单纯针对局部病灶<sup>[8]</sup>。现代研究发现, 中药方剂在煎煮过程中, 其有效成分可通过氢键、疏水作用、 $\pi$ - $\pi$  堆积等非共价相互作用自发形成纳米粒, 这类天然纳米载体是中药“多成分、多靶点”协同作用的重要物质基础——它既能保护有效成分免受体内酶解, 又能实现多种活性成分的同时递送, 契合中医“协同施治”的配伍智慧<sup>[9-10]</sup>。然而, 传统煎煮法受工艺局限, 存在有效成分溶解分散不

均、生物利用度不足等问题, 导致中药临床疗效未能充分挖掘<sup>[11]</sup>。如何继承和发扬中药配伍优势, 通过工艺改良提升制剂质量, 成为中医药现代化面临的重要课题。

大黄-牡丹皮药对作为大黄牡丹汤的核心配伍, 其配伍机制蕴含深刻的中医理论内涵: 大黄苦寒, 主入大肠经, 善泻大肠之湿热瘀毒, 为君药; 牡丹皮辛苦微寒, 入血分, 能清血分之热、散瘀消肿, 为臣药, 二者一泻气分之实热、一清血分之瘀毒, 气血同治、湿热瘀并除, 完美契合 CRC “湿热瘀毒互结”的核心病机<sup>[12]</sup>。现代药理学研究表明, 大黄-牡丹皮活性成分大黄素、大黄酸与丹皮酚、芍药苷等, 不仅存在明确的抑瘤效应, 更具备天然的自组装潜力, 可自发形成纳米尺度的聚集体 (即自组装纳米粒)<sup>[13]</sup>。基于此, 本研究立足中医“药对协同”理论, 针对传统煎煮法的缺陷, 改良制备工艺, 采用微沉淀法构建大黄-牡丹皮新型自组装纳米粒 (*Rhei Radix et Rhizoma-Moutan Cortex* novel self-assembled nanoparticles, RMN-SAN), 旨在通过现代制药技术赋能传统中药配伍, 提升制剂的均一性、生物利用度与疗效<sup>[14]</sup>。

本研究首先通过优化制备条件, 以平均粒径、多分散性指数 (polydispersity index, PDI) 为评价指

标, 筛选最佳工艺参数; 其次结合粒径分析、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)、 $\zeta$  电位测定等技术进行形貌学表征, 揭示 RMN-SAN 的物理化学特性; 然后利用 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定 RMN-SAN 中的核心活性成分, 借助傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 与 UV 光谱技术阐明 RMN-SAN 自组装形成机制, 验证中医“药对协同”的物质基础<sup>[15]</sup>; 最后通过体内外实验系统验证 RMN-SAN 的抗 CRC 活性, 比较其与传统煎煮法制备纳米粒 (*Rhei Radix et Rhizoma-Moutan Cortex* decoction self-assembled nanoparticles, RMD-SAN) 的药效差异, 探讨现代工艺如何强化中药的核心功效。本研究不仅为中药自组装纳米粒的制备工艺优化提供新思路, 更致力于搭建中医药理论与现代制药技术的桥梁, 让传统方剂的配伍智慧在纳米尺度下充分发挥, 为 CRC 的中医药治疗提供高效、稳定的新型制剂, 同时为中药复方的现代化开发与临床转化奠定科学基础。

## 1 仪器和材料

### 1.1 仪器

TCSSP8SR 型激光共聚焦显微镜, 德国徕卡 (Leica) 仪器有限公司; FACSVerse 型流式细胞仪, 美国 BD 公司; SQP-224-1CN 型万分之一电子天平, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; UPS 台式型纯水仪, 四川优普超纯科技有限公司; RE-2000 型旋转蒸发仪, 郑州科泰实验设备有限公司; SHZ-D (III) 型循环水真空泵, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; Allegra<sup>®</sup> X-I5R 型离心机, 贝克曼库尔特 (美国) 股份有限公司; Spark 型多功能微孔板测试平台, 帝肯 (上海) 实验器材有限公司; BeNano 90 Zeta 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 丹东百特仪器有限公司; FD-1C-50 型真空冷冻干燥机, 博医康 (北京) 仪器有限公司; JEM1200X 型透射电子显微镜, 日本捷欧路公司; Q-6PS 型紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; Nicolet 6700/iS20 型傅里叶近红外显微镜, 美国 Thermo Scientific 公司; SynaptXS 型高分辨液质联用分析仪, 美国 Waters 公司; 再生纤维素透析袋, 截留相对分子质量 (molecular weight cut-off,  $M_w$ ) 3 500, 密理博中国有限公司 (上海)。

### 1.2 药物与试剂

大黄 (甘肃平凉市庄浪县, 批号 2502018)、牡丹皮 (安徽铜陵市, 批号 2503027) 饮片均购自四

川省新荷花中药饮片有限公司, 经成都中医药大学裴瑾教授鉴定, 大黄为蓼科大黄属植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎, 牡丹皮为毛茛科芍药属植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 均符合《中国药典》2025 年版 (一部) 相关标准。

CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒 (批号 C0005)、活/死细胞染色试剂盒 (Calcein AM/PI, 批号 C2025M), 碧云天生物技术有限公司; 青霉素-链霉素 (批号 234137)、DMEM 培养基 (批号 6125503), 美国 Gibco 公司; Annexin-V/FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 20250814)、苏州四正柏生物科技有限公司; 细胞周期试剂盒, 批号 E-CK-A351, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 结晶紫, 批号 P3512302, 上海泰坦科技股份有限公司; 戊巴比妥钠, 批号 MYM\_MP0787, 成都博奥派克科技有限公司; 5-氟尿嘧啶, 批号 51-21-8, 山东科源生化有限公司; 无水乙醇, 批号 64-17-5, 成都科隆化学品有限公司。

### 1.3 细胞

CT26 细胞株购于中科院干细胞库。采用含有 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 青霉素-链霉素 (100 U/mL) 的 DMEM 分别培养 CT26 细胞。细胞在 37 °C 下含 5% CO<sub>2</sub> 的含水环境中培养<sup>[16]</sup>。

### 1.4 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 体质量 18~22 g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK (京) 2024-0001。小鼠购入后饲养 1 周, 期间自由饮水进食; 实验前禁食 12 h, 自由饮水。该实验研究获得成都中医药大学实验动物伦理委员会批准, 批准号 2024044<sup>[17]</sup>。

## 2 方法与结果

### 2.1 大黄-牡丹皮自组装纳米粒制备方案的筛选

**2.1.1 传统煎煮法** 取大黄、牡丹皮各 10 g, 剪碎, 加 10 倍量超纯水, 浸泡 30 min, 回流提取, 趁热滤过; 药渣加 8 倍超纯水回流提取 30 min, 趁热滤过; 合并 2 次滤液, 减压浓缩至 0.2 g/mL, 用 0.45、0.22  $\mu$ m 的水系微孔滤膜滤过、梯度离心 (4 °C, 6 000、8 000、10 000 r/min, 各 10 min) 或以  $M_w$  3 500 的透析袋透析 12 h, 每 4 小时换水 1 次去除杂质, 冻干后即得<sup>[18]</sup>。

**2.1.2 醇提法** 取大黄、牡丹皮各 10 g, 剪碎, 加 10 倍量 70% 乙醇, 浸泡 30 min, 回流提取, 趁热滤

过; 药渣加 8 倍 70%乙醇回流提取 30 min, 滤过, 得醇提液。合并 2 次提取液, 600 r/min、25 °C 条件下磁力搅拌 30 min, 60 °C 旋转蒸发除醇, 并浓缩至 0.2 g/mL, 用 0.45、0.22 μm 的水系微孔滤膜滤过、梯度离心 (4 °C, 6000、8000、10000 r/min, 各 10 min) 或以  $M_w$  3 500 的透析袋透析 12 h, 每 4 小时换水 1 次, 去除杂质, 冻干后即得<sup>[18]</sup>。

**2.1.3 微沉淀法** 取大黄、牡丹皮各 10 g, 剪碎, 加 10 倍量超纯水, 浸泡 30 min, 回流提取, 趁热滤过; 药渣加 8 倍 70%乙醇回流提取 30 min, 滤过, 得醇提液。合并 2 次提取液, 600 r/min、25 °C 条件下磁力搅拌 30 min, 60 °C 旋转蒸发除醇, 并浓缩至 0.2 g/mL, 用 0.45、0.22 μm 的水系微孔滤膜滤过、梯度离心 (4 °C, 6000、8000、10000 r/min, 各 10 min) 或以  $M_w$  3 500 的透析袋透析 12 h, 每 4 小时换水 1 次, 去除杂质, 冻干后即得<sup>[18]</sup>。

**2.1.4 筛选结果** 结果如表 1 所示, 3 种不同制备工艺下的纳米粒子呈现出不同的粒径分布。在相同条件下, 粒径分布趋势整体上呈现传统煎煮法>醇提法>微沉淀法。同时, 还考察了同一工艺下, 不同的纳米粒子纯化分离方案, 粒径分布整体趋势表现为离心法>过滤法>透析法, 且受到滤膜孔径、离心转速和透析袋孔径的影响。尤其是微沉淀工艺下制备的纳米粒, 经透析后粒径分别为 (189 ± 1.26)、(146.58 ± 3.70) nm, 符合纳米粒的最佳粒径 (100~200 nm) 区间。综上所述, 以微沉淀法作为 RMN-SAN 的制备工艺, 并进行后续工艺优化。

**2.2 单因素实验考察 RMN-SAN 制备工艺**

前期实验初步表明, 微沉淀法提取之后, 形成的 RMN-SAN 更集中, 大小分布更均一。为进一步

表 1 3 种不同工艺制备的纳米粒特征对比 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

制备方案	处理	0.45 μm		0.22 μm	
		平均粒径/nm	PDI	平均粒径/nm	PDI
传统煎煮	过滤	607.22 ± 35.55	0.277 ± 0.016	385.75 ± 8.96	0.377 ± 0.017
	离心	624.73 ± 9.64	0.343 ± 0.016	656.28 ± 6.82	0.340 ± 0.047
	透析	298.89 ± 3.11	0.374 ± 0.013	258.41 ± 2.57	0.376 ± 0.013
醇提法	过滤	342.15 ± 11.59	0.294 ± 0.063	300.71 ± 12.21	0.115 ± 0.049
	离心	412.08 ± 15.35	0.169 ± 0.088	201.10 ± 12.45	0.312 ± 0.093
	透析	242.56 ± 5.74	0.064 ± 0.051	199.68 ± 6.04	0.110 ± 0.025
微沉淀法	过滤	327.31 ± 6.82	0.181 ± 0.008	241.24 ± 4.64	0.191 ± 0.061
	离心	269.19 ± 12.73	0.172 ± 0.092	345.61 ± 8.68	0.165 ± 0.022
	透析	189.13 ± 1.26	0.309 ± 0.011	146.58 ± 3.70	0.380 ± 0.007

考察自组装纳米粒形成条件, 以平均粒径、PDI 为评价指标, 对煎煮时间、磁力搅拌转速、透析时间进行单因素考察, 初步筛选对 RMN-SAN 制备过程影响较大的实验因素<sup>[9]</sup>。

**2.2.1 煎煮时间的考察** 固定磁力搅拌转速 600 r/min、磁力搅拌时间 30 min、磁力搅拌温度 25 °C、旋转蒸发温度 60 °C 和生药质量浓度 0.2 g/mL, 考察煎煮时间分别为 30、60、120 min 时对 RMN-SAN 平均粒径和 PDI 的影响。结果如表 2 所示, 不同煎煮时间对纳米粒的平均粒径影响较大。当煎煮时间 30 min 时, 纳米粒的平均粒径为 (294.10 ± 9.60) nm, 且 PDI 为 0.154 ± 0.028, 纳米粒整体分布均匀; 当煎煮时间 60 min 时, 平均粒径开始增大, 为 (379.90 ± 16.00) nm, 且 PDI 为 0.199 ± 0.057; 当煎煮时间 120 min 时, 平均粒径为 (505.10 ± 98.20) nm, PDI 升高至 0.242 ± 0.083。且还检测到另 1 个信号峰。尽管纳米粒分布依旧较为均匀, 但呈现扩大趋势。经分析, 煎煮时间过长可能会导致大量杂质溶出, 影响原有效成分的自组装。故选择煎煮时间 30 min。

表 2 煎煮时间考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Investigation of decocting time ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

煎煮时间/min	平均粒径/nm	PDI
30	294.10 ± 9.60	0.154 ± 0.028
60	379.90 ± 16.00	0.199 ± 0.057
120	505.10 ± 98.20	0.242 ± 0.083

**2.2.2 磁力搅拌转速的考察** 固定煎煮时间为 60 min, 磁力搅拌时间 30 min、磁力搅拌温度 25 °C、旋转蒸发温度 60 °C 和生药质量浓度 0.2 g/mL, 考察磁力搅拌转速为 400、600、800 r/min 时对 RMN-SAN 平均粒径和 PDI 的影响<sup>[9]</sup>。结果如表 3 所示, 当磁力搅拌转速从 400 r/min 增至 600 r/min 时, 平均粒径和 PDI 显著减小且分布更加均匀; 继续增加磁力搅拌速度至 800 r/min, 平均粒径增加, 并且均匀性降低。故选择磁力搅拌转速为 600 r/min。

**2.2.3 透析时间的考察** 固定煎煮时间为 60 min,

表 3 磁力搅拌转速考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Investigation of magnetic stirrer speed ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

磁力搅拌转速/(r·min <sup>-1</sup> )	平均粒径/nm	PDI
400	480.70 ± 17.20	0.244 ± 0.055
600	377.90 ± 7.20	0.184 ± 0.079
800	443.50 ± 51.20	0.214 ± 0.063

磁力搅拌时间 30 min、磁力搅拌转速 600 r/min、磁力搅拌温度 25 ℃、旋转蒸发温度 60 ℃和生药质量浓度 0.2 g/mL，考察透析时间分别为 6、12、24 h 对 RMN-SAN 平均粒径和 PDI 的影响。结果如表 4 所示，不同透析时间对纳米粒的平均粒径影响同样较大。当透析 6 h 时，平均粒径为 (173.70±27.90) nm，且 PDI 为 0.341±0.030；当透析 12 h 时，平均粒径减小，为 (162.30±1.30) nm，且 PDI 为 0.285±0.008；当透析 24 h 时，平均粒径为 (125.60±0.40) nm，PDI 升高至 0.325±0.020。尽管透析 24 h 后纳米平均粒径最小，但其 PDI 更大，且期间需要多次更换透析介质，从制备层面考虑，其不如透析 12 h 工艺性价比更高（更加省时省力，且均匀度更强；工艺扩大及转化性更高）。故选择透析 12 h。

表 4 透析时间考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Investigation of dialysis time ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

透析时间/h	平均粒径/nm	PDI
6	173.70±27.90	0.341±0.030
12	162.30±1.30	0.285±0.008
24	125.60±0.40	0.325±0.020

### 2.3 优化工艺与验证

通过单因素分析优化了微沉淀法制备工艺，最终得出大黄-牡丹皮药对自组装纳米粒的最佳制备方法为取大黄、牡丹皮各 10 g，剪碎，加 10 倍量纯水，浸泡 30 min，回流提取 30 min，滤过。药渣加 8 倍 70%乙醇回流提取 30 min，滤过。合并 2 次提取液，600 r/min、25 ℃条件下磁力搅拌 30 min，60 ℃旋转蒸发除醇，并浓缩至 0.2 g/mL，梯度离心 (4 ℃，6 000、8 000、10 000 r/min 各 10 min) 后以  $M_w$  3 500 的透析袋透析 12 h，即得。

### 2.4 自组装纳米粒的表征与稳定性考察

**2.4.1 粒径、PDI、 $\zeta$  电位测定** 将所制备得到的纳米粒子注入粒度分析仪的样品池中，将测定温度设置为 25 ℃，检测角度为侧向散射 90°，以测定纳米

溶液的粒径和 PDI；将样品注入电泳池中，调整适当的电压测定  $\zeta$  电位<sup>[19]</sup>。RMN-SAN 的粒径分布如图 1 所示，可见，RMN-SAN 的粒径分布较为均一，平均粒径为 (109.30±4.20) nm，PDI 为 0.353±0.009， $\zeta$  电位为 (-24.5±1.3) mV。RMD-SAN 的平均粒径为 (258.41±2.57) nm，PDI 为 0.376±0.013， $\zeta$  电位为 (-15.3±0.6) mV。

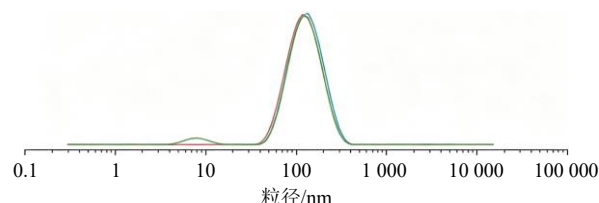


图 1 RMN-SAN 的粒径分布

Fig. 1 Size distribution of RMN-SAN

**2.4.2 TEM 形貌观察** 将自组装纳米粒样本分散在纯水中，取 2  $\mu$ L 分散液滴加在铜网（带有碳膜）上，用吸水滤纸轻轻吸去多余液体，留下薄层样品。将样品在空气中自然干燥，确保含量测定纳米粒子不因溶剂残留而聚集。为了提高图像对比度，采用 2  $\mu$ L 磷钨酸负染 60 s，等待风干后即可将制备好的样品放入电镜样品架上，确保样品平整，避免倾斜和样品破损，设置合适的加速电压和放大倍率。通过调整显微镜的焦距、对比度等参数，获取高质量的图像，观察纳米粒子的形态、粒径分布以及是否存在聚集现象<sup>[19]</sup>。结果如图 2 所示，所制备的 RMN-SAN 和 RMD-SAN 粒径均在 100~200 nm，形态完整，呈不规则的圆球形，分布较为均匀。

**2.4.3 RMN-SAN 的稳定性考察** 为考察优化工艺后 RMN-SAN 的稳定性，将新鲜制备的 RMN-SAN 样品密封后置于 4 ℃冷藏条件下保存，分别于制备后第 1、2、3、4、5、6、7 天取样，按照“2.4.1”项下的粒径、PDI 及  $\zeta$  电位测定方法，平行测定 3 份样品的相关指标，记录数据并计算平均值与标准偏差，系统考察 RMN-SAN 在 7 d 储存期内的物理

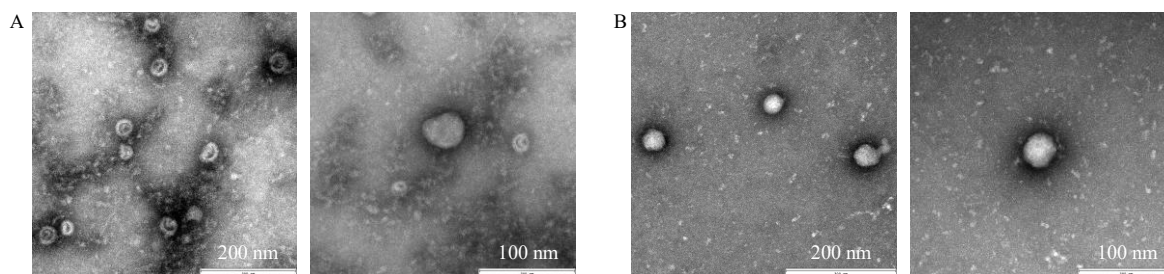


图 2 RMN-SAN (A) 和 RMD-SAN (B) 的微观形态

Fig. 2 Microscopic morphology of RMN-SAN (A) and RMD-SAN (B)

稳定性变化情况。结果如表 5 所示, RMN-SAN 在 7 d 储存期内的平均粒径、PD 及  $\zeta$  电位无显著性突变, 表明其稳定性良好。

表 5 RMN-SAN 稳定性考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Stability investigation of RMN-SAN ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

t/d	平均粒径/nm	PDI	$\zeta$ 电位/mV
1	109.30±4.20	0.353±0.009	-24.5±1.3
2	109.00±1.10	0.357±0.029	-19.4±2.2
3	110.70±3.90	0.363±0.026	-19.9±1.2
4	113.80±3.70	0.349±0.019	-17.5±0.9
5	110.40±2.70	0.381±0.013	-22.1±1.3
6	111.40±6.30	0.343±0.012	-13.0±0.5
7	109.60±4.40	0.345±0.003	-14.3±0.3

## 2.5 纳米粒自组装成分与机制剖析

2.5.1 成分鉴定 采用 UPLC-Q-TOF-MS 对 RMN-SAN 与 RMD-SAN 进行非靶向成分鉴定。其质谱条件如下: 采用电喷雾离子源, 分别在正、负离子条件下扫描, 通道扫描范围  $m/z$  50~1 200, 扫描时间

0.3 s, 检测时间 30 min; 低碰撞能量电压 10 eV; 高碰撞能量电压 30 eV; 正、负离子模式的毛细管电压 2.5、2.0 kV; 离子源温度 150 °C; 锥孔电压 40 V; 辅助喷雾电离与去溶剂气体为 N<sub>2</sub>; 去溶剂化温度 450 °C; 锥孔气体积流量 50 L/h; 去溶剂化气体积流量 800 L/h。

在正、负离子模式下的总离子基础上, 通过对比各组分的 MS 数据, 同时与软件数据库中的化学成分进行对照分析<sup>[18]</sup>。RMN-SAN 的 UPLC-Q-TOF-MS 正、负离子模式下的总离子流图如图 3-A 所示。结果(图 3-B)表明, RMN-SAN 中共鉴定出 5 种大黄-牡丹皮药对核心特征活性成分, 包括大黄蒽醌类化合物(大黄酸  $m/z$  283.02 [M-H]<sup>-</sup>、芦荟大黄素  $m/z$  271.06 [M+H]<sup>+</sup>)、大黄二蒽酮苷类化合物(番泻苷 B  $m/z$  861.19 [M-H]<sup>-</sup>); 牡丹皮单萜酚类化合物(丹皮酚  $m/z$  167.07 [M+H]<sup>+</sup>)、牡丹皮单萜苷类化合物(芍药苷  $m/z$  481.19 [M+H]<sup>+</sup>)。

而 RMD-SAN 经 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定出儿茶

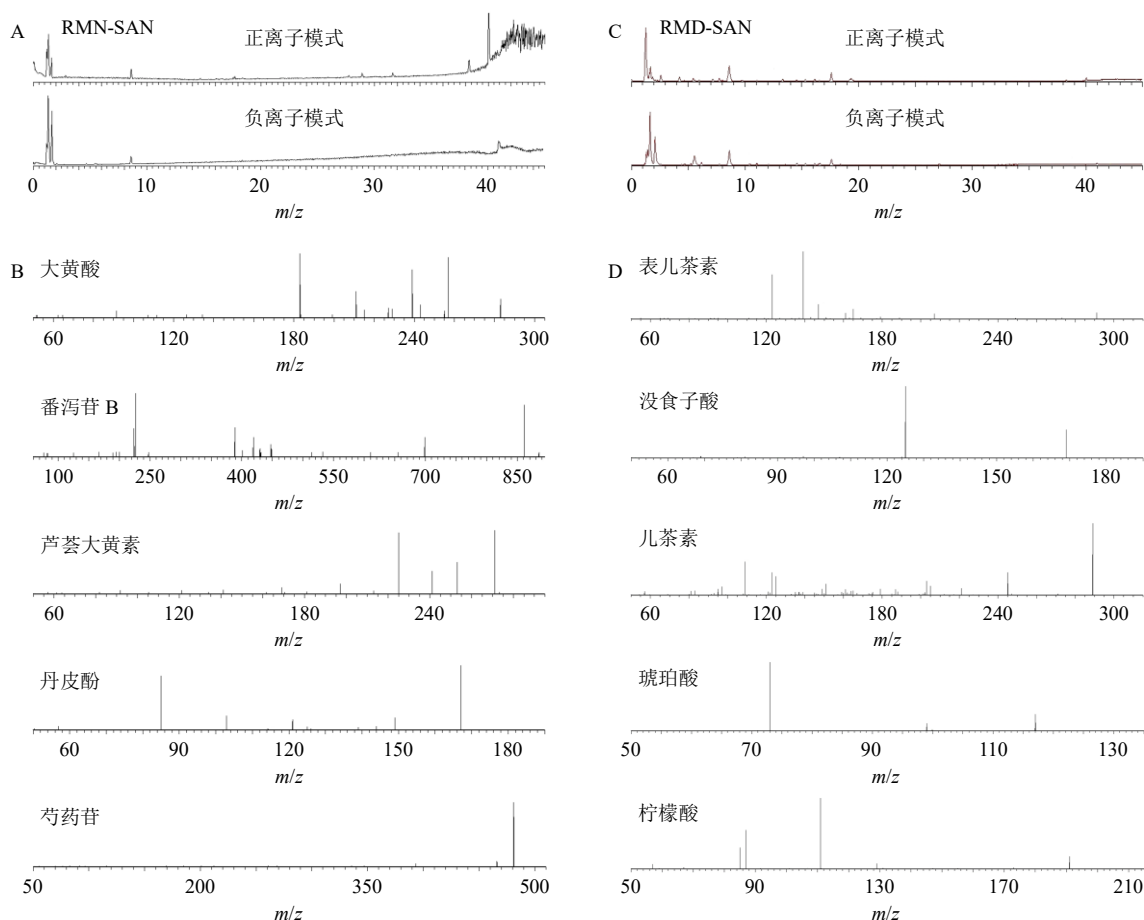


图 3 RMN-SAN 与 RMD-SAN 总离子流图 (A, C) 及各特征成分的二级质谱图 (B, D)

Fig. 3 Total ion current diagram (A, C) and secondary mass spectra (B, D) of characteristic components of RMN-SAN and RMD-SAN

素、表儿茶素、没食子酸、琥珀酸、柠檬酸等非特征性成分，这些成分普遍存在各类中药材中，结果如图 3-C、D 所示。综上，UPLC-Q-TOF-MS 定性分析结果表明，微沉淀提取体系可同时检出大黄、牡丹皮特征蒽醌类、丹皮酚、芍药苷等药效成分，化学成分谱较为全面完整，所形成的 RMN-SAN 真实承载了药对的关键活性物质；反之传统提取仅能获得表儿茶素、没食子酸、琥珀酸等水溶性非特征性成分，导致大黄、牡丹皮关键药效物质大量丢失。成分组成的显著差异直接印证，RMN-SAN 是由大黄-牡丹皮真正的活性成分通过自组装形成的纳米聚集体，而 RMD-SAN 更偏向水溶性小分子的物理聚集，不能代表药对的核心物质基础。

**2.5.2 FTIR 表征** 采用 FTIR 对 RMD-SAN 与 RMN-SAN 进行表征，以定性分析自组装过程中的分子间相互作用及体系聚集状态变化。具体方法：将 1~2 mg 样本与 200 mg 纯 KBr 混合。将混合物放入模具中，然后用油压机压成透明的薄片。使用傅里叶变换红外光谱仪对这些薄片进行分析，波数范围为 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$ ，分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ ，扫描次数为 32 次<sup>[20]</sup>，结果如图 4 所示。在 3 500~3 000  $\text{cm}^{-1}$  羟基伸缩振动区，RMN-SAN 的特征峰相较于 RMD-SAN 更趋平缓且宽化，表明大黄中蒽醌类成分的酚羟基、牡丹皮中芍药苷的糖苷羟基之间形成了分子间氢键，自由羟基数量减少，分子由分散态向缔合态转变。在 2 000~1 500  $\text{cm}^{-1}$  羰基与苯环骨架振动区，RMN-SAN 中羰基 (C=O) 及苯环骨架振动峰强度明显降低、峰形趋于平缓，提示大黄蒽醌类的共轭羰基与丹皮酚、芍药苷中的苯环结构之间发生  $\pi$ - $\pi$  堆积作用，共轭体系电子云分布趋于平均化。在 1 500~500  $\text{cm}^{-1}$  指纹区，RMN-SAN 与 RMD-SAN 的谱图差异显著，RMN-SAN 特征峰数量减少、峰形更为规整，表明体系由小分子自由分

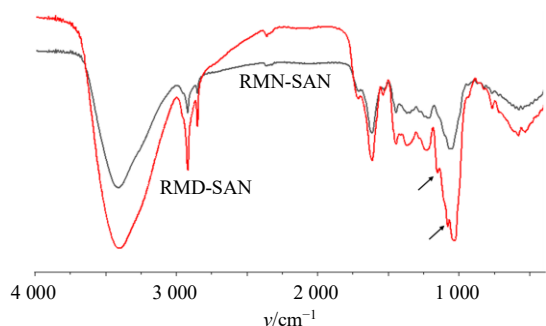


图 4 自组装纳米粒的 FTIR 表征

Fig. 4 FTIR characterization of self-assembled nanoparticles

散的分子态转变为多成分有序结合的纳米聚集态。综上，FTIR 结果定性证实，大黄与牡丹皮中的活性成分主要通过分子间氢键与  $\pi$ - $\pi$  堆积作用驱动自组装，最终形成稳定的纳米聚集体。

**2.5.3 UV 表征** 采用紫外全波长扫描表征自组装纳米粒形成机制。取适量 RMD-SAN、RMN-SAN 样品，分别装入两面透光的比色皿中，用紫外-可见分光光度计测其在 190~400 nm 的吸收曲线<sup>[20]</sup>。结果如图 5 所示，RMN-SAN 和 RMD-SAN 二者吸收峰均集中于 300 nm 附近，对应大黄蒽醌类（大黄酸、芦荟大黄素）的  $\pi$ - $\pi$  电子跃迁（蒽醌母核特征吸收区），也涵盖牡丹皮成分（如丹皮酚）的吸收区间，说明检测对象为体系核心活性成分。并且 RMD-SAN 吸光度峰值 ( $\approx 5$ ) 高于微沉淀 ( $\approx 4.5$ )，源于成分存在形式的改变：RMD-SAN 中成分以“分子分散态”存在，紫外吸收是单个分子独立电子跃迁的叠加；RMN-SAN 中成分自组装为纳米粒（聚集态），分子间氢键、 $\pi$ - $\pi$  堆积削弱了电子跃迁的吸收强度。

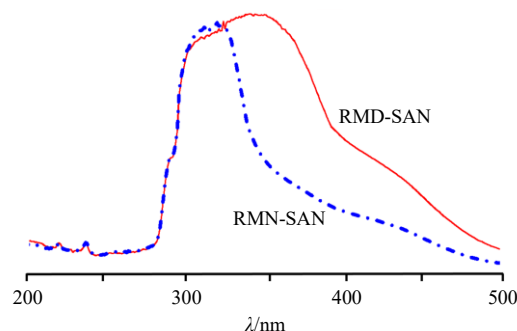


图 5 自组装纳米粒的紫外光谱表征

Fig. 5 Ultraviolet spectral characterization of self-assembled nanoparticles

此外，RMD-SAN 的峰更宽，是因为分子分散态下成分分子与水分子形成不同强度的溶剂化氢键，且单个分子存在多种构。这些“不同溶剂化状态、不同构象”的分子，电子跃迁能量存在细微差异，信号叠加后表现为峰更宽；而 RMN-SAN 的纳米粒聚集态中，分子通过有序相互作用形成稳定环境，电子跃迁能量分布更集中，因此峰更窄。该图谱峰宽和吸光度的双重差异，直接体现了成分从“分子分散”到“纳米粒聚集”的状态转变，与 FTIR 结果共同佐证了大黄-牡丹皮成分在微沉淀中发生自组装的结论。

**2.5.4 分子对接研究** 为从分子水平验证大黄-牡丹皮核心活性成分间的自组装驱动力，采用分子对

接技术对 RMN-SAN 中 5 种关键成分（大黄酸、芦荟大黄素、丹皮酚、芍药苷、番泻苷 B）进行两两对接分析，以结合能及非共价作用类型评价成分间结合能力。采用 AutoDock Vina 1.2.3 软件对从 RMN-SAN 中鉴定出的核心活性成分进行对接分析。从 PubChem 数据库获取各成分 3D 结构，经 AutoDock Tools 预处理加氢、添加电荷、定义可旋转键并保存为 PDBQT 格式；以全覆盖分子表面设置对接网格，穷尽度设为 20，计算结合能与分子间作用力；选取结合能最低构象，采用 PyMOL 与 Discovery Studio 进行可视化，标记氢键及距离 <math><0.5\text{ nm}</math> 的  $\pi$ - $\pi$  堆积作用，以结合能与作用力类型评价成分间自组装相互作用<sup>[18]</sup>。

结果如图 6 所示，氢键与  $\pi$ - $\pi$  堆积为主要结合

作用力，与 FTIR 及 UV 表征结论一致。各组对接结合能为  $-5.1 \sim -2.4\text{ kcal/mol}$  ( $1\text{ kcal/mol} = 4.184\text{ kJ/mol}$ )，其中大黄酸-芦荟大黄素结合能最低 ( $-5.1\text{ kcal/mol}$ ，即  $-21.34\text{ kJ/mol}$ )，结合能力最强，二者可同时形成稳定氢键与  $\pi$ - $\pi$  堆积；大黄酸-番泻苷 B、芦荟大黄素-番泻苷 B 结合能均为  $-4.2\text{ kcal/mol}$  ( $-17.57\text{ kJ/mol}$ )，属于中等强度结合；含丹皮酚的组合结合能普遍偏弱 ( $-3.3 \sim -2.4\text{ kcal/mol}$ )。分子对接结果从分子间作用力层面证实：大黄蒽醌类成分之间、蒽醌类与番泻苷 B 之间可通过强氢键与  $\pi$ - $\pi$  堆积优先组装，是 RMN-SAN 形成稳定纳米结构的核心分子基础；芍药苷、丹皮酚则通过弱相互作用参与组装，起到稳定与协同作用。该结果为自组装机制提供了直接的分子模拟证据。

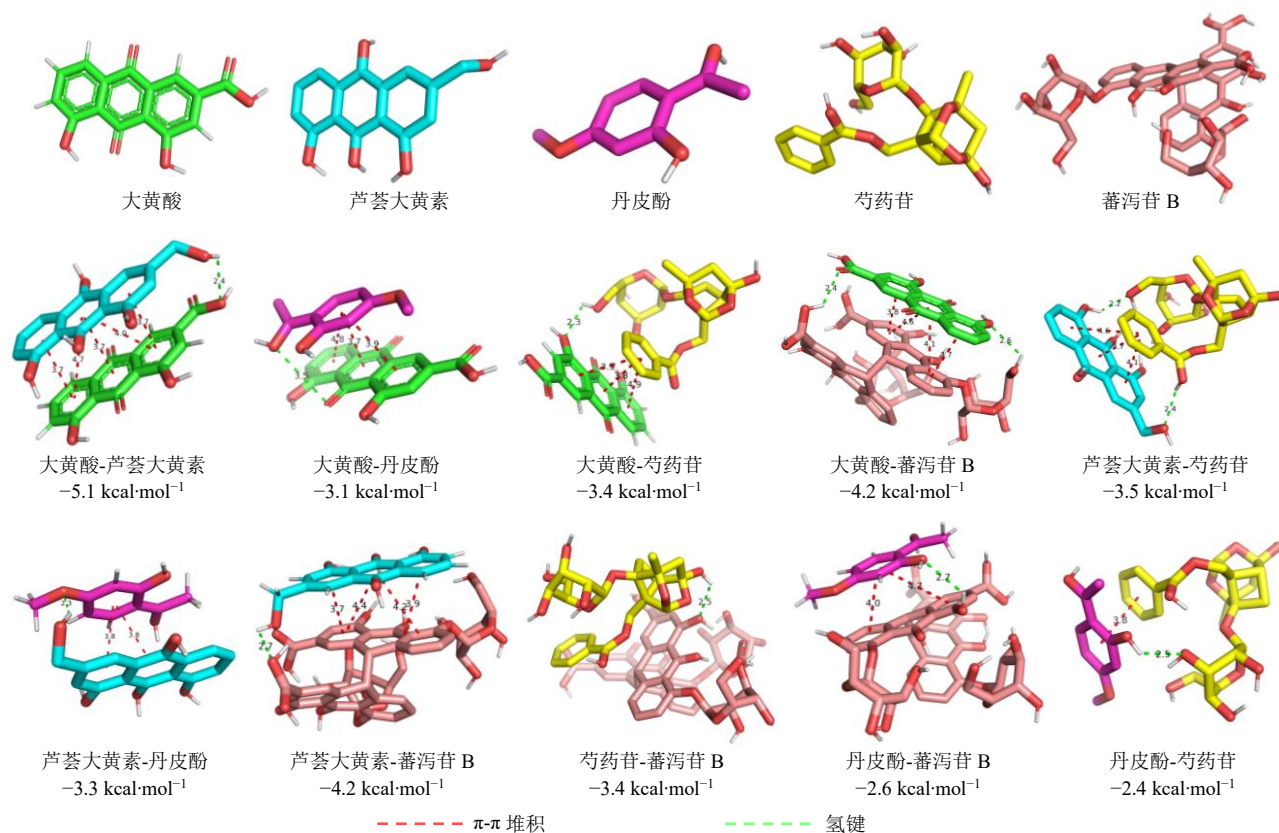


图 6 RMN-SAN 核心成分分子对接可视化结果

Fig. 6 Molecular docking results of core components of RMN-SAN

## 2.6 体外抗 CRC 药效学作用

### 2.6.1 细胞毒性作用研究

将 CT26 细胞以 8 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中，过夜贴壁后移除旧的培养基，分别加入不同质量浓度的 RMN-SAN 和 RMD-SAN 样本（质量浓度 15.0~90.0 mg/mL，以生药量计），对照组给予等量不含药培养基。37 °C 培养箱中孵育 24 h 后，实验终点，移除培养基，并向

每个孔中加入含 10  $\mu$ L CCK-8 溶液的培养基。在 37 °C 孵育 2 h 后，使用多功能酶标仪测定细胞活力<sup>[21]</sup>。结果如图 7 所示，给药 48 h 后，对照组 CT26 细胞密度超过 90%，说明 CT26 细胞状态良好且处于对数生长期。给药后，RMD-SAN 和 RMN-SAN 对 CT26 的毒性作用随着浓度的增加而增强，其细胞密度在质量浓度  $\geq 22.5\text{ mg/mL}$  后具有明显的细胞毒性。与

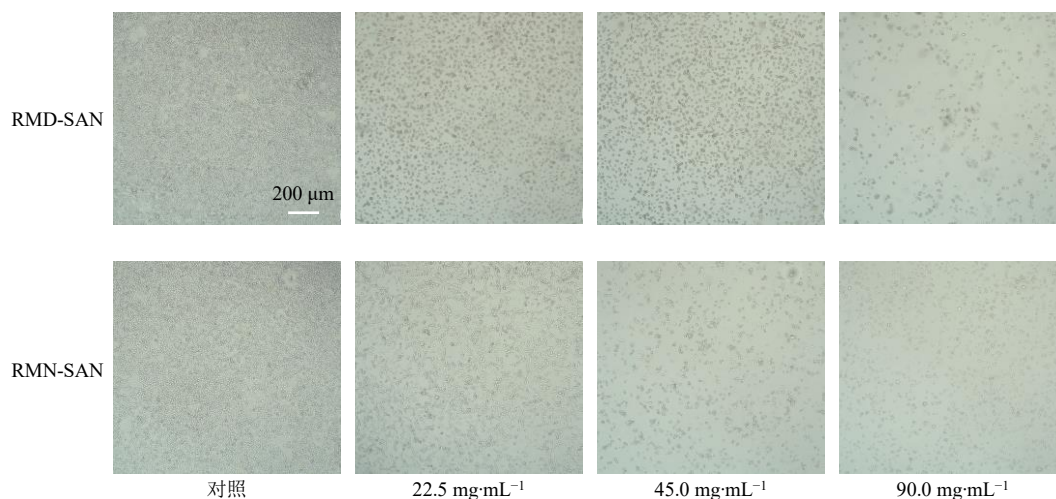


图7 CCK-8法评价RMD-SAN和RMN-SAN对CT26的细胞毒性作用(×50)

Fig. 7 Cytotoxicity of RMS-SAN and RMN-SAN against CT26 cells evaluated by CCK-8 assay (× 50)

RMD-SAN [半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) = 46.7 mg/mL] 相比, RMN-SAN ( $IC_{50}$  = 30.0 mg/mL) 对 CT26 有更显著的杀伤作用, 其细胞密度在质量浓度  $\geq 45.0$  mg/mL 后显著降低且形态更圆 (大量漂浮, 接近死亡状态), 推测这样的现象是因为 RMN-SAN 由大量粒径小于 200 nm 的自组装纳米粒子组成, 更容易被肿瘤细胞摄取而发挥更强的肿瘤细胞杀伤作用。

同时, 使用细胞活/死染色试剂盒评估 RMN-SAN 和 RMD-SAN 样本对癌细胞的毒性作用。Calcein-AM 是一种常用于活细胞荧光标记的染料, 能发出绿色荧光, 可以穿过活细胞膜。一旦进入细胞, Calcein-AM (在未被激活时不发荧光) 会被细胞内的酯酶水解, 转化为极性分子 Calcein, 这一转化使其无法穿透细胞膜, 从而被滞留在细胞内并发出明亮的绿色荧光。

碘化丙啶 (propidine iodide, PI) 不能穿透完好的活细胞膜, 仅能穿过死细胞膜的破损区域, 进入细胞核并结合 DNA, 从而发出红色荧光。因此, PI 可用于标记死细胞。根据上述原理, 取对数期 CT26 细胞以 8 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 将质量浓度为 30.0 mg/mL (以生药量计) 的 RMN-SAN 和 RMD-SAN 溶液分别和 CT26 细胞共孵育 24 h 后, 弃去培养基, 使用 PBS 轻柔洗涤 2 遍后, 每孔加入 100  $\mu$ L Calcein AM/PI 检测工作液, 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后于荧光显微镜下观察拍照 (AM 为绿色荧光, 标记活细胞; PI 为红色荧光, 标记死细胞), 整个过程注意避光操作<sup>[22]</sup>。结果如图 8 所示, 当质量浓度为 30.0 mg/mL 时, RMN-SAN 对 CT26 细胞

的杀伤作用显著强于 RMD-SAN。

**2.6.2 对细胞凋亡的影响** 将 CT26 细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中, 贴壁过夜后弃去旧培养基, 将质量浓度为 30 mg/mL (以生药量计) 的 RMN-SAN 和 RMD-SAN 溶液分别和 CT26 细胞共孵育 24 h 后, 小心吸取细胞培养液转移至干净离心管后, 加入胰蛋白酶消化细胞, 在  $1\ 000 \times g$ 、4  $^{\circ}$ C 下离心 5 min; 然后用移液器小心吸除上清后, 加入约 1 mL 4  $^{\circ}$ C 预冷的  $1 \times$  PBS 缓冲液重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清; 用  $1 \times$  结合缓冲液重悬细胞, 将细胞密度调节至  $1 \sim 5 \times 10^5$  个/mL; 取 100  $\mu$ L 的细胞悬液于 5 mL 流式管中, 加入 5  $\mu$ L Annexin-V/FITC, 用移液器轻柔吹吸混匀, 室温避光孵育 5 min; 加入 10  $\mu$ L PI, 并加 400  $\mu$ L  $1 \times$  PBS 缓冲液, 1 h 内用 FCM 检测细胞凋亡情况<sup>[23]</sup>。

结果如图 9 和表 6 所示, 30 mg/mL 的 RMD-SAN 处理 CT26 细胞 24 h 后, 可使  $(90.84 \pm 0.76)\%$  的细胞发生凋亡 [早期凋亡率  $(87.02 \pm 0.02)\%$ 、晚期凋亡率  $(3.82 \pm 0.02)\%$ ]; 而 RMN-SAN 处理 CT26 细胞 24 h 后, 可使  $(99.96 \pm 0.04)\%$  的细胞发生凋亡 [早期凋亡率  $(16.71 \pm 0.04)\%$ 、晚期凋亡率  $(83.25 \pm 0.04)\%$ ], 表明 RMN-SAN 具有更高效的 CT26 细胞凋亡诱导作用。

**2.6.3 对细胞周期的影响** 将 CT26 细胞分别以  $5 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中, 贴壁过夜后弃去旧培养基, 将质量浓度为 30 mg/mL (以生药量计) 的 RMN-SAN 和 RMD-SAN 溶液分别和 CT26 细胞共孵育 24 h 后, 弃上清, 用胰蛋白酶消化细胞, 预冷 PBS 将细胞洗涤 2 次, 然后在  $1\ 000 \times g$  下离心

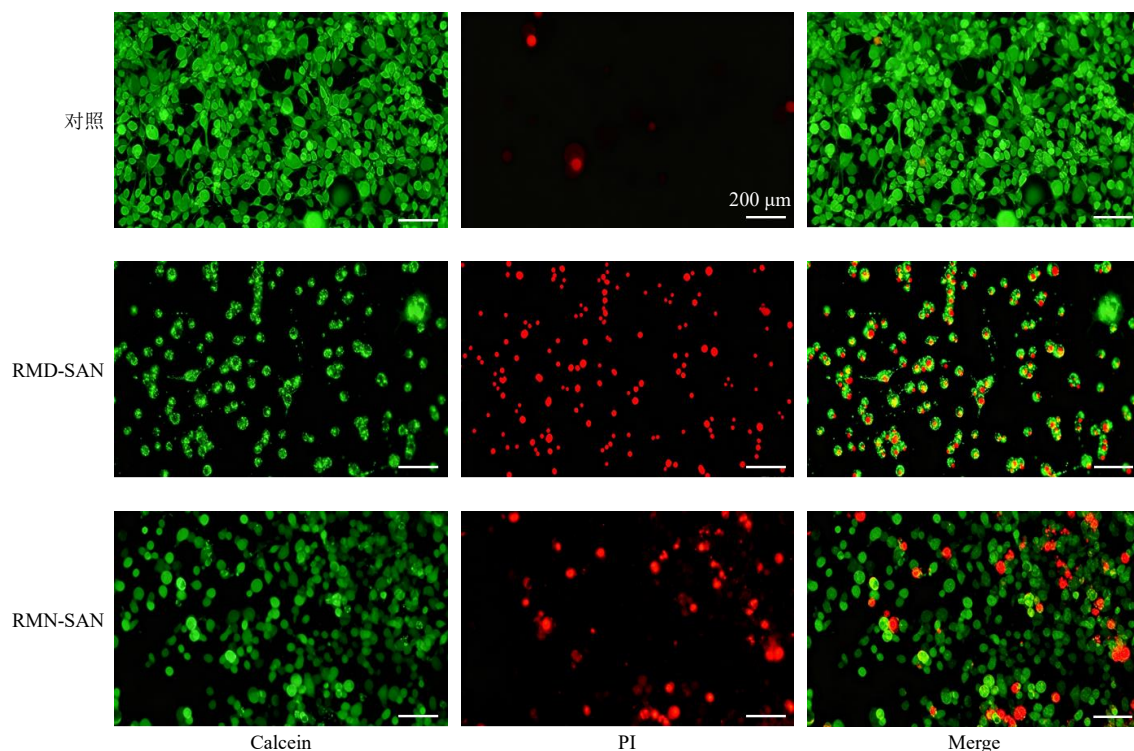


图 8 活/死染色法评价 RMD-SAN 和 RMN-SAN 对 CT26 的细胞毒性作用

Fig. 8 Cytotoxicity of RMS-SAN and RMN-SAN against CT26 cells by live/dead staining assay

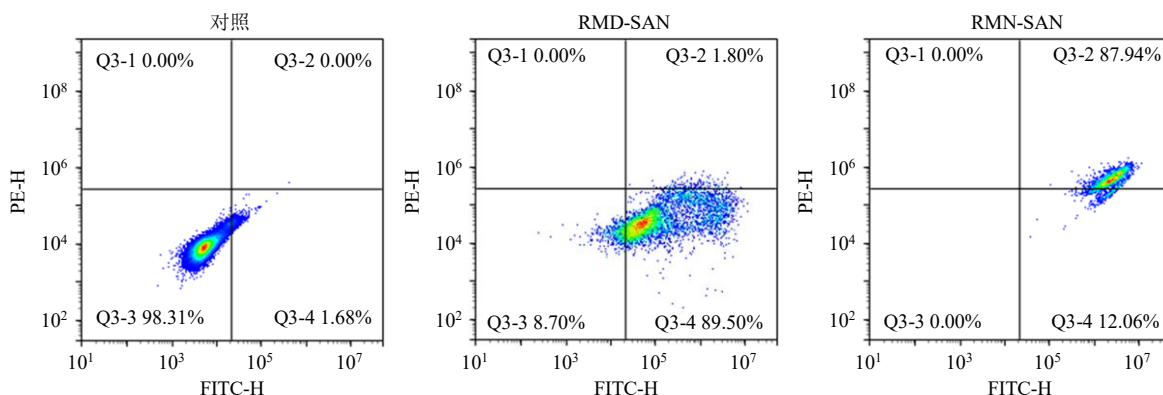


图 9 RMD-SAN 和 RMN-SAN 的促凋亡效应

Fig. 9 Pro-apoptotic effects of RMS-SAN and RMN-SAN

表 6 RMD-SAN 和 RMN-SAN 的促凋亡效应与对细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Pro-apoptotic effects and impact on cell cycle of RMS-SAN and RMN-SAN ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	凋亡率/%	细胞各周期占比/%		
			G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>
对照	—	2.65 ± 0.08	33.54 ± 0.84	48.52 ± 0.39	16.56 ± 0.70
RMD-SAN	30	90.84 ± 0.76	19.44 ± 0.55	35.46 ± 2.51	44.98 ± 2.68
RMN-SAN	30	99.96 ± 0.04	42.71 ± 2.01	39.53 ± 2.71	17.29 ± 1.28

5 min, 小心吸除上清 (可以残留约 50 μL), 轻弹离心管以适当分散细胞, 避免细胞成团。加入 1.2 mL 的 -20 °C 无水乙醇, 充分混匀后置于 -20 °C 冰箱中过夜; 300×g 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 mL 的

PBS 重悬细胞, 室温放置 15 min; 300×g 离心 5 min, 弃上清, 加入 100 μL 的 RNase A Reagent 并充分悬浮细胞, 37 °C 水浴 30 min; 加入 400 μL 的 PI Reagent (50 μg/mL) 并充分混匀, 2~8 °C 避光

孵育 30 min 后于 FCM 测定<sup>[24]</sup>。结果如表 6 和图 10 所示, 30 mg/mL 的 RMN-SAN 处理 CT26 细胞后能增强性诱导细胞 G<sub>1</sub> 期阻滞。由于对 G<sub>1</sub> 期的阻滞增

强, 导致 G<sub>2</sub> 期的细胞数量减少, 从而更加显著地降低 CT26 细胞的增殖速率。

### 2.6.4 对细胞迁移的影响 使用细胞划痕实验评估

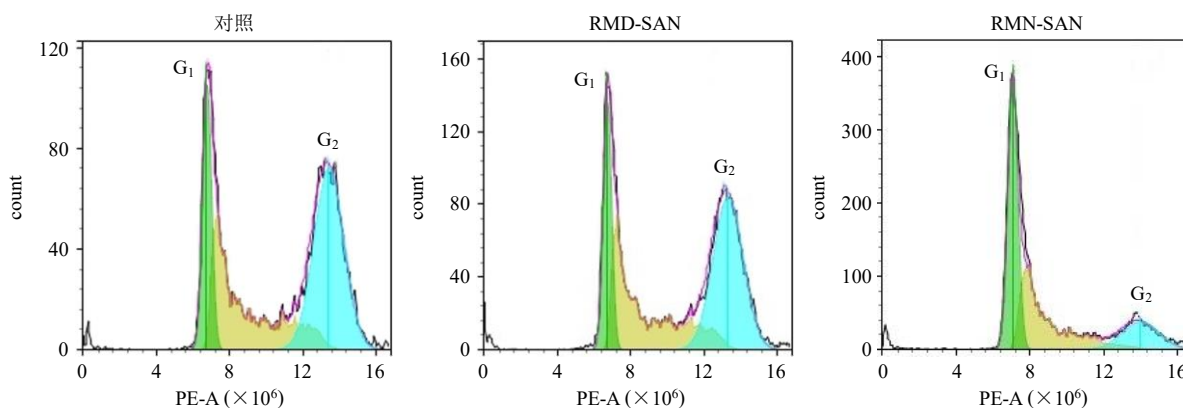


图 10 RMN-SAN 对细胞周期的影响

Fig. 10 Effect of RMN-SAN on cell cycle

RMN-SAN 和 RMD-SAN 样本对细胞迁移能力的影响。将 CT26 细胞以合适的密度接种于 6 孔板中, 培养细胞至单层融合度为 80% 左右, 使用无菌 200  $\mu$ L 移液枪头在细胞中央垂直划线, 形成划痕。轻轻用 PBS 清洗 2 次, 以去除刮离的细胞碎片。使用含血清培养基, 分别配制质量浓度为 30 mg/mL (以生药量计) 的 RMN-SAN 和 RMD-SAN 溶液处理细胞, 含血清培养基处理组作为对照, 将细胞培养于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中, 分别在 0、12、24 h 使用显微镜拍摄细胞划痕区域的图像, 比较不同处理组之间的细胞迁移能力<sup>[25]</sup>。结果如图 11 所示, RMN-SAN 处理 12、24 h 后, CT26 细胞的愈合率分别为 15.75%、20.61%, 而 RMD-SAN 的愈合

率为 29.42%、45.72%。划痕后愈合率越低, 其对肿瘤细胞的迁移抑制率越强。该结果证实, RMD-SAN 和 RMN-SAN 能有效抑制 CT26 细胞的迁移, 但 RMN-SAN 迁移抑制作用更优于 RMD-SAN。

### 2.7 体内抗 CRC 药效学作用

**2.7.1 造模** 小鼠适应性喂养后, 通过在小鼠一侧前肢腋部皮下接种 CT26 细胞, 并构建 CRC 皮下移植瘤模型。具体操作: 选取对数生长期的 CT26 细胞, 消化后制成单细胞悬液, 密度为  $1 \times 10^8$  个/mL, 于每只小鼠一侧前肢腋窝处注射 100  $\mu$ L 的细胞悬液。待肿瘤体积增长至 50~100 mm<sup>3</sup>, 将小鼠随机分组后开始实验<sup>[26]</sup>。

**2.7.2 分组及给药** 荷瘤小鼠随机分为模型组、阳性组 [5-氟尿嘧啶, 20 mg/(kg·d)]、RMD-SAN 组 [3.0 g/(kg·d)]、RMN-SAN 低剂量组 [1.5 g/(kg·d)]、RMN-SAN 中剂量组 [3.0 g/(kg·d)] 和 RMN-SAN 高剂量组 [(6.0 g/(kg·d))] 6 组, 每组 6 只。实验组小鼠隔日 ig 给药; 模型组小鼠每日 ig 给予等体积生理盐水, 阳性组 ip 给药。给药 7 次后进行动物标本取材, 检测<sup>[27]</sup>。

**2.7.3 移植瘤体积与体质量测量** 实验期间定期测量小鼠瘤体的长径 (a) 和短径 (b), 测量频率为 2 d/次。每次测量后, 依据公式肿瘤体积 =  $ab^2/2$  计算移植瘤的体积<sup>[28]</sup>。给药结束后剥除肿瘤组织, 测定肿瘤的最终体积, 并拍照记录, 直观地展示抗 CRC 疗效, 结果如图 12 和表 7 所示。首次给药治疗时, 各组小鼠肿瘤体积无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 表明分组恰当。之后, 模型组小鼠肿瘤体积随时间

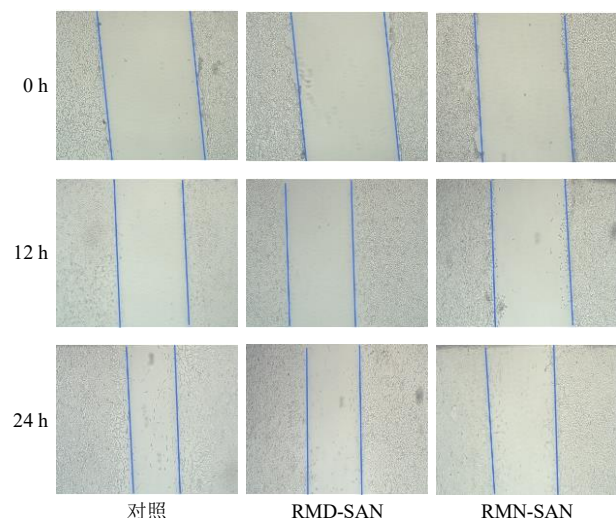


图 11 RMN-SAN 对 CT26 细胞迁移的抑制情况

Fig. 11 Inhibitory effect of RMN-SAN on CT26 cell migration

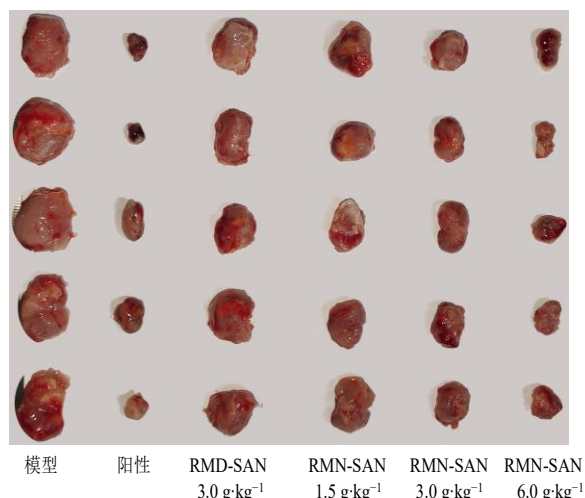


图 12 RMN-SAN 体内抗 CRC 作用与效果

Fig. 12 *In vivo* anti-CRC effect and outcome of RMN-SAN

变化迅速增长。与模型组相比,各实验组小鼠肿瘤均得到了抑制。RMN-SAN 高剂量组、RMN-SAN 中剂量组和阳性组抑制效果较为明显。尤其是最后一次治疗后, RMN-SAN 高剂量组小鼠肿瘤体积为  $(334.31 \pm 42.10) \text{ mm}^3$ , 显著低于模型组小鼠肿瘤体积  $[(1405.22 \pm 240.75) \text{ mm}^3, P < 0.05]$ , 表明高剂量的 RMN-SAN 对 CRC 荷瘤小鼠具有明确的抑瘤作用。同时,对小鼠体质量进行监测,结果如表 8 所示。首次给药治疗时,各组小鼠体质量无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),表明分组恰当。模型组、RMD-SAN 组和 RMN-SAN 低剂量组荷瘤小鼠体质量自治疗第 5 天起明显降低;而 RMN-SAN 高剂量组和阳性组体质量,在给药后 13 d 内均呈显著增加 ( $P < 0.05、0.01$ ),表明 RMN-SAN 能够有效改善荷瘤小鼠的身

表 7 RMN-SAN 对 CRC 小鼠肿瘤体积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 7 Effects of RMN-SAN on tumor volume in CRC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	肿瘤体积/mm <sup>3</sup>						
		第1天	第3天	第5天	第7天	第9天	第11天	第13天
模型	-	83.26±8.33	283.64±33.99	457.08±47.44	626.84±45.67	831.70±109.30	1047.36±145.64	1405.22±240.75
阳性	0.02	85.18±10.12	99.69±11.59*	147.29±24.53*	161.57±40.03*	180.30±41.81**	189.77±49.22**	193.20±34.18**
RMD-SAN	3.0	80.41±18.34	188.44±34.07	258.66±14.23	353.77±26.54	481.16±47.05	575.05±78.34	717.53±126.57
RMN-SAN	1.5	75.03±12.26	205.54±24.84	337.21±33.02	472.85±59.59	537.03±51.98	627.20±57.29	759.66±113.97
	3.0	81.36±8.86	161.24±21.16	227.16±20.38	293.69±15.60	335.50±29.02*	395.99±46.66*	467.90±55.98*
	6.0	78.68±9.85	130.84±10.99	174.57±14.34*	214.58±22.71	244.94±32.95*	261.67±43.09**	334.31±42.10*

与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group.

表 8 RMN-SAN 对 CRC 小鼠体质量和肿瘤相关因子的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 8 Effects of RMN-SAN on body weight and tumor-associated factors of CRC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	体质量/g							质量浓度/(pg·mL <sup>-1</sup> )			
		第1天	第3天	第5天	第7天	第9天	第11天	第13天	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	IL-1 $\beta$	IL-6
模型	-	21.6±0.7	21.6±0.7	23.4±0.8	22.0±0.7	21.5±0.6	21.0±0.9	20.3±0.3	9.33±1.85	10.11±1.22	263.89±46.09	2.39±0.28
阳性	0.02	22.7±0.9	23.1±0.9	23.9±0.8	25.1±0.6*	25.1±0.7*	25.4±0.6*	26.0±0.6**	39.81±4.77***	28.33±4.89***	114.91±22.07***	0.37±0.09***
RMD-SAN	3.0	21.6±1.0	21.6±1.0	23.3±1.0	22.4±0.7	21.7±0.5	21.1±0.5	20.4±0.4	14.83±2.50	12.41±1.06	247.26±15.36	2.07±0.20
RMN-SAN	1.5	21.7±0.7	23.2±0.6	23.5±0.6	22.8±0.9	21.1±0.8	21.4±0.8	20.3±0.3	19.62±2.22	13.34±1.13	223.55±15.95*	1.50±0.17*
	3.0	21.7±0.5	23.2±0.6	23.5±0.6	23.7±1.0	22.7±0.8	24.4±0.8*	23.6±0.9*	25.54±2.02*	15.42±1.59	180.99±17.67**	0.51±0.10**
	6.0	21.3±0.9	22.5±0.6	22.9±0.7	23.7±0.5	24.1±0.4*	25.0±0.4*	25.3±0.5**	35.11±2.67**	21.34±2.62**	150.43±11.85***	0.67±0.09**

与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group.

体状况。

2.7.4 动物取材 完成给药后,采用 1%戊巴比妥钠麻醉并处死小鼠,收集小鼠血液,离心后取血清,并通过 ELISA 法测定白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、 $\gamma$  干扰素 (interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和 IL-

6 用以分析 RMN-SAN 的抗 CRC 效果<sup>[28]</sup>。结果如表 8 所示, RMN-SAN 通过上调 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  等抗肿瘤细胞因子水平,同时下调 IL-1 $\beta$ 、IL-6 等促肿瘤炎症因子的表达 (与模型组相比具有显著性差异,  $P < 0.05、0.01、0.001$ ) 进而发挥抗 CRC 作用。其作用趋势与图 12 和表 7 相符。

## 2.8 统计分析

通过 SPSS 21.0 软件将均匀设计的结果进行多种回归分析,求得多元回归方程。使用 Student's *t* 检验来分析 2 组数据之间的差异,实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差比较分析;多组间两两比较采用最小显著性差异 (LSD) 法检验<sup>[18]</sup>。

## 3 讨论

中医药现代化的核心命题之一,是通过现代科学技术解码传统配伍的智慧,实现疗效与制剂质量的双重提升。中药自组装纳米粒作为天然形成的“多成分载体”,其结构与功能天然契合中医“多成分、多靶点”的治疗特点,已成为中药制剂创新的重要方向<sup>[14,29]</sup>。本研究以大黄-牡丹皮药对为对象,通过微沉淀法改良制备工艺,构建 RMN-SAN 并从工艺逻辑、组装机理、药效价值 3 个维度展开深入分析,结合现有研究成果探讨其科学内涵与未来方向,以期对中药纳米制剂的开发提供更具深度的参考。传统煎煮法是中药制剂的经典工艺,但其“一锅煮”的模式易导致有效成分溶出不完全、纳米粒聚集不均,本质上未能充分释放药对“相须为用”的配伍潜力。本研究筛选的微沉淀法,通过“水提-醇提-除醇”的分步策略,实现了制剂质量的显著提升,其工艺逻辑具有科学依据:水相提取优先溶出大黄蒽醌、芍药苷等极性活性成分,醇相提取则促进丹皮酚等中等极性成分释放,二者协同使药对中各类型成分充分暴露,为“相须”发挥疗效提供更全面的自组装物质基础<sup>[9]</sup>。后续旋转蒸发除醇过程调节体系极性,恰好模拟了中药配伍的动态平衡,推动成分通过非共价作用有序聚集,最终形成粒径均一、稳定性强的纳米粒。值得注意的是,微沉淀法制备的 RMN-SAN 经透析后粒径为 (109.30 ± 4.20) nm,集中于 100~200 nm 的最佳粒径区间,显著优于传统煎煮法与单纯醇提法。这一结果证实,工艺改良并非对传统的否定,而是通过现代技术手段,让中医配伍的“协同效应”在纳米尺度下得到更精准的实现<sup>[30]</sup>。

中药自组装纳米粒的形成并非成分的随机聚集,而是基于成分结构特性的选择性相互作用,这一过程与中医“药有个性之特长,方有合群之妙用”的配伍理论高度契合<sup>[31]</sup>。本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定出 RMN-SAN 中的 5 种核心成分,涵盖大黄蒽醌类、二蒽酮苷类及牡丹皮单萜类、单萜苷类,其结构特性为自组装提供了分子基础:大黄酸、芦

荟大黄素的酚羟基与芍药苷的糖苷羟基形成分子间氢键,大黄蒽醌的共轭羰基与丹皮酚、芍药苷的苯环结构发生  $\pi$ - $\pi$  堆积,这 2 种非共价作用共同驱动了纳米粒的形成。该类作用力虽相对温和,但可通过多位点协同作用显著提升组装体的结构稳定性。FTIR 与 UV 光谱的特征变化均预示了这一机制。值得注意的是,本研究未出现新的化学键特征峰,表明该自组装属于弱相互作用驱动的物理聚集,而非化学结构改变,这更贴近中药汤剂天然自组装的真实状态,也为其体内温和的、多成分协同起效的治疗模式提供了合理解释<sup>[32]</sup>。

分子对接结果从分子水平直观证实大黄酸、芦荟大黄素、番泻苷 B 可形成强结合构象,与 FTIR、UV 结果相互印证,共同阐明自组装分子机制。此外,体内药效结果显示, RMN-SAN 可浓度相关性抑制 CT26 细胞增殖、诱导凋亡并将细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期,同时显著抑制细胞迁移;且高剂量组抑瘤效果显著优于传统煎煮组,且可上调 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  表达,下调 IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达。上述趋势均与纳米粒更小、更易被细胞摄取的理论相符。

尽管本研究取得了阶段性成果,但仍存在一定局限性。其一,成分鉴定仅聚焦于 5 种特征化合物。RMN-SAN 中可能还存在其他参与自组装与抗肿瘤作用的微量成分,需进一步通过非靶向代谢组学技术全面解析。其二,抗 CRC 作用机制的研究尚未深入到分子靶点层面。RMN-SAN 如何调控凋亡、周期、迁移相关信号通路,如磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路 (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway, PI3K/Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 等,仍需后续验证。其三,体内实验仅采用皮下移植瘤模型,未考察其对 CRC 转移模型的治疗效果,且缺乏长期毒性评价数据。其四,本研究尚未开展独立的 RMN-SAN 体外释放行为或溶出评价。

与单一化学药物不同,中药自组装纳米粒是由多种活性成分通过氢键、 $\pi$ - $\pi$  堆积等非共价作用形成的超分子聚集体,其体内药效的发挥更倾向于“纳米粒整体摄取-胞内逐步解离-多成分协同作用”的递药模式。研究表明,蒽醌-多酚类自组装体的解离速率受 pH 值、离子强度及酶环境调控。传统透析法测得的累计释放率难以区分游离成分与纳米结合态,且单一指标无法反映多成分的不同步释放行

为,目前,尚缺乏适用于中药自组装纳米粒的标准释放评价方法。

针对上述局限性,未来研究可从以下方向展开:一是采用 qRT-PCR、Western blotting、免疫荧光等技术,深入阐明 RMN-SAN 中核心成分协同抗 CRC 的分子机制;二是构建 CRC 原位移植瘤与转移模型,系统评价其体内靶向性与长期治疗效果;三是建立基于荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 或 LC-MS/MS 多组分同步检测的释放测定方法,并结合荷瘤小鼠的药动学研究,系统阐明 RMN-SAN 的体内释药规律与作用模式;四是开展 RMN-SAN 制剂的长期毒性评价,为其临床转化提供更全面的科学依据。同时,可基于中医辨证论治思想,针对不同证型的 CRC 患者,优化 RMN-SAN 的成分比例,实现“个体化制剂”的开发,让传统中医理论与现代纳米技术的结合更为紧密。

综上,本研究通过工艺改良构建的 RMN-SAN,不仅实现了制剂质量与药效的双重提升,更重要的是揭示了“中医理论-工艺优化-组装机理-药效价值”的内在逻辑关联:工艺改良是手段,核心是通过现代技术释放中医配伍的协同潜力;自组装机理是桥梁,将中药成分的结构特性与中医“相须为用”的理论内涵相连接;药效价值是目标,实现了多成分协同抑瘤、调节免疫炎症、改善机体状态的整体效应。这一研究模式为中药纳米制剂的开发提供了新的范式,即“以中医理论为指导,以工艺优化为突破,以现代技术为支撑,以临床价值为导向”,最终推动中医药从“经验医学”向“精准医学”的跨越。未来,随着研究的不断深入,中药自组装纳米粒有望成为中西医结合治疗肿瘤的重要载体,为中医药的现代化与国际化提供更坚实的科学依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 刘然, 钱紫星, 王欣, 等. 480 例结肠腺瘤患者发病特点、中医证候及影响因素分布规律研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2025, 48(11): 1569-1577.
- [2] 陈思吟, 马理园, 贾庆雅, 等. 中药抗结肠癌关键可视化分析及其作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2026, 57(8): 3173-3188.
- [3] 刘家齐, 王甜, 朱文劲, 等. 抗癌平丸联合阿帕替尼治疗晚期结肠癌的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2026, 41(5): 1364-1369.
- [4] Huang B, An H L, Gui M X, *et al.* Qingjie Fuzheng Granule prevents colitis-associated colorectal cancer by inhibiting abnormal activation of NOD2/NF- $\kappa$ B signaling pathway mediated by gut microbiota disorder [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(3): 500-512.
- [5] 阮天音, 陈含璐, 诸青苗, 等. 《金匱要略》辨治痢脓思路探析 [J]. 中华中医药杂志, 2025, 40(2): 819-822.
- [6] 吴洁. 《金匱要略》痢脓辨治探讨 [J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(4): 376-378.
- [7] Su Z Q, Li Y L, Zhou Z H, *et al.* Herbal medicine for colorectal cancer treatment: Molecular mechanisms and clinical applications [J]. *Cell Prolif*, 2025, 58(10): e70065.
- [8] 王峥, 张春泽. 基于整体观念对中药治疗结肠癌相关研究的多层次分析 [J]. 药学学报, 2025, 60(3): 559-572.
- [9] 孟雨婷, 薛玉叶, 刘燕, 等. 甘草新型自组装纳米粒的形成及抗炎作用评价 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 2912-2922.
- [10] Zheng X E, Shi C, Xie Y, *et al.* Bioactive components of Jiedu Sangen Decoction against colorectal cancer: A novel and comprehensive research strategy for natural drug development [J]. *Phytomedicine*, 2025, 142: 156795.
- [11] 艾彦伶, 华桦, 陈春英, 等. 方剂纳米体原理: 中药汤剂如何从复杂暗盒到清晰透明 [J]. 中药药理与临床, 2026, 42(1): 2-14.
- [12] 张传凤. 从 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B-p65 信号通路探讨大黄牡丹汤及其有效成分防治炎症相关性结直肠癌的作用 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.
- [13] Yang L, Wan Y, Li W W, *et al.* Targeting intestinal flora and its metabolism to explore the laxative effects of rhubarb [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(4): 1615-1631.
- [14] 袁海龙, 朱煜文. 中药制剂研究新方向: 改良自组装纳米粒的构建及应用 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(13): 3569-3573.
- [15] Wang Y L, Mu Y, Zhang Y L, *et al.* Accessible and effective nanomedicines: Self-assembly products from Chinese herbal medicines (CHMs) [J]. *Adv Funct Mater*, 2025, 35(9): 2416151.
- [16] Li J, Zeng H M, You Y, *et al.* Active targeting of orthotopic glioma using biomimetic liposomes co-loaded elemene and cabazitaxel modified by transferritin [J]. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 289.
- [17] 于淼, 裴晓华, 路夷平. 大黄溶液灌肠对腹腔镜结肠癌根治术后胃肠功能恢复的疗效研究 [J]. 中国科学: 生命科学, 2024, 54(7): 1292-1303.
- [18] 宋思宇, 傅舒, 吴学渊, 等. 三黄泻心汤主要有效成分间自组装纳米粒的构建及其抗胃溃疡作用评价 [J].

- 中草药, 2025, 56(11): 3819-3830.
- [19] Zhang J, Wang F, Yalamarty S S K, *et al.* Nano silver-induced toxicity and associated mechanisms [J]. *Int J Nanomed*, 2022, 17: 1851-1864.
- [20] 赵文通. 大黄酸: 壳聚糖原位水凝胶促进糖尿病小鼠创面愈合研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2025.
- [21] Yin L Z, University S P, Han S W, *et al.* Probiotic-drug conjugates achieve synchronized site-specific probiotic colonization and on-demand drug release against ulcerative colitis and its complication [J]. *J Am Chem Soc*, 2025, 147(34): 30924-30942.
- [22] Xia L Y, Yang Q F, Fu K Z, *et al.* Unveiling the renoprotective mechanisms of self-assembled herbal nanoparticles from *Scutellaria barbata* and *Scleromitrion diffusum* in acute kidney injury: A nano-TCM approach [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2025, 15(8): 4265-4284.
- [23] Xu Y, Zhang X G, Han X, *et al.* Sensitized mast cells for targeted drug delivery and augmented cancer immunotherapy [J]. *Cell*, 2026, 189(3): 872-886.
- [24] Wang Y Q, Lu J L, Carisey A F, *et al.* Innate immune and metabolic signals induce mitochondria-dependent membrane lysis via mitoxyperiosis [J]. *Cell*, 2025, 188(25): 7155-7174.
- [25] Zhang W, Gong C N, Chen Z Q, *et al.* Tumor microenvironment-activated cancer cell membrane-liposome hybrid nanoparticle-mediated synergistic metabolic therapy and chemotherapy for non-small cell lung cancer [J]. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 339.
- [26] Pan C, Wang Y, Zhang M, *et al.* *Akkermansia muciniphila*-inspired oral siRNA delivery by active matrix-penetration and intracellular endoplasmic reticulum accumulation [J]. *Adv Mater*, 2026, 38(7): e15901.
- [27] 左星博, 冯雪, 张彩娟, 等. 黄芩汤对结肠炎相关性结肠癌结肠炎-癌转变过程中代谢稳态的调控作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(22): 21-28.
- [28] 王炎炎, 杨世发, 孙维义, 等. 黄芪多糖调控 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路及上皮间充质转化抑制结肠癌肝转移 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2861-2868.
- [29] 冯梦梦, 李从虎, 季栋栋, 等. 壳寡糖-肉桂醛自组装纳米粒制备及其对乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(10): 2879-2889.
- [30] 黄菊, 朱禹, 肖航, 等. 中药自组装纳米策略在肿瘤治疗中应用的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(24): 185-193.
- [31] 冯星星, 谢琪, 杨丛莲, 等. 基于中药活性成分自组装的无载体纳米制剂 [J]. 药学报, 2021, 56(12): 3203-3211.
- [32] 赵军宁, 蒋建东, 陈春英, 等. 方剂纳米体药物发现 (FDD): 多靶点药物技术创新与新药发现的新策略 [J]. 中国药学杂志, 2025, 60(16): 1661-1672.

[责任编辑 郑礼胜]