

蛇床子素纳米混悬温敏凝胶的制备、质量评价及对特应性皮炎小鼠的药效作用研究

陈文静, 王晓宇, 毛易凡, 姜明瑞, 张新宁, 徐 鹏, 王英姿*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 制备蛇床子素纳米混悬温敏凝胶 (osthole nanosuspension thermosensitive gel, Ost-NS-TG), 进行质量评价, 并对其治疗特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 的药效作用进行研究。方法 以胶凝温度为评价指标, 采用单因素实验结合正交设计优化温敏凝胶的处方; 并对制备的 Ost-NS-TG 的性状、胶凝温度、胶凝时间、pH 值、黏度、 ζ 电位、载药量、释放度以及皮肤刺激性进行质量评价, 通过小鼠背部皮损评价、小鼠抓挠行为评价、组织病理学观察以及小鼠血清与皮损组织中的炎症因子检测评价 Ost-NS-TG 治疗 AD 的药效作用。结果 Ost-NS-TG 的最佳制备工艺为泊洛沙姆 407 用量 18%, 泊洛沙姆 188 用量 4%, Ost-NS 冻干粉用量 5%; Ost-NS-TG 的胶凝温度为 $(32.67 \pm 0.06)^\circ\text{C}$; 胶凝时间为 $(60.88 \pm 1.62) \text{ s}$; pH 值为 6.68 ± 0.03 ; ζ 电位为 $(-32.90 \pm 0.89) \text{ mV}$; Ost-NS-TG 载药量为 $(6.96 \pm 0.01) \text{ mg/mL}$ 。Ost-TG 和 Ost-NS-TG 在 144 h 时的累积释放率分别为 60.67% 和 86.54%, 表明 Ost-NS-TG 显示出更优的释放特性; 质量评价结果显示, Ost-NS-TG 具有良好的皮肤安全性。药效学实验结果表明, Ost-NS-TG 能够改善小鼠皮损情况, 并能降低小鼠血清与皮损组织中炎症因子免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)、白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 的表达水平。

结论 Ost-NS-TG 的处方工艺简单, 具有良好的缓释与透皮性能, 并对 AD 有一定的治疗作用。

关键词: 蛇床子素; 纳米混悬剂; 温敏凝胶; 药效学; 正交设计; 皮肤安全性; 特应性皮炎

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)14-5511-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.14.014

Preparation, quality evaluation, and pharmacodynamic effects of osthole nanosuspension thermosensitive gel on atopic dermatitis mice

CHEN Wenjing, WANG Xiaoyu, MAO Yifan, JIANG Mingrui, ZHANG Xinning, XU Peng, WANG Yingzi

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To prepare osthole nanosuspension thermosensitive gel (Ost-NS-TG), evaluate its quality, and study for its pharmacodynamics in the treatment of atopic dermatitis. **Methods** A single-factor experiment combined with orthogonal design was used to optimize the prescription of the temperature-sensitive gel using the gelling temperature as the evaluation index; and quality evaluation of the prepared Ost-NS-TG in terms of properties, gelling temperature, gelling time, pH value, viscosity, ζ potential, drug loading capacity, release and skin irritation was carried out. Finally, the pharmacodynamics of Ost-NS-TG for the treatment of atopic dermatitis was evaluated by dorsal skin lesion scoring, scratching behavior observation, histopathological examination, and detection of inflammatory factors in serum and skin lesion tissues of mice. **Results** The optimal preparation process of Ost-NS-TG was 18% of Poloxamer 407, 4% of Poloxamer 188, and 5% of Ost-NS lyophilized powder. The gelation temperature of Ost-NS-TG was $(32.67 \pm 0.06)^\circ\text{C}$. The gelation time was $(60.88 \pm 1.62) \text{ s}$; pH value was 6.68 ± 0.03 ; the ζ potential was $(-32.90 \pm 0.89) \text{ mV}$. The drug loading of Ost-NS-TG was $(6.96 \pm 0.01) \text{ mg/mL}$. The cumulative release rates of Ost-TG and Ost-NS-TG at 144 h were 60.67% and 86.54%, respectively, indicating that Ost-NS-TG exhibits better release characteristics. The results of the quality evaluation showed that Ost-NS-TG had good dermal safety. The results of pharmacodynamic experiments showed that Ost-NS-TG was able to improve the skin lesions in mice and reduce the expression levels of inflammatory factors immunoglobulin E (IgE), interleukin-4 (IL-4), and interferon- γ (IFN- γ) in serum and skin lesion tissues of mice. **Conclusion** Ost-NS-TG has a simple and stable prescription process, good slow

收稿日期: 2026-02-28

基金项目: 国家中医药管理局高水平建设学科 (zyydzxk-2023272)

作者简介: 陈文静 (2002—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂新技术与新剂型研究。E-mail: chenwj1331@163.com

*通信作者: 王英姿 (1975—), 女, 教授, 博士生导师, 博士, 研究方向为中药制剂新技术与新剂型研究。E-mail: wangyzi@sina.com

release and transdermal properties, and has a certain therapeutic effect on atopic dermatitis.

Key words: osthole; nanosuspension; thermosensitive gel; pharmacodynamics; orthogonal design; skin safety; atopic dermatitis

蛇床子素为蛇床子的主要活性成分之一,属于香豆素类化合物^[1-2],具有抗血栓、抗过敏、抗炎止痛、抗菌杀虫止痒、抗肿瘤等多种药理作用^[3-5]。特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种常见的过敏性炎症性皮肤病,以湿疹反复发作、皮肤干燥和剧烈瘙痒为主要特征,显著降低患者的生活质量^[6-7]。现代研究发现,蛇床子素可以抑制 AD 导致的瘙痒,改善皮肤屏障受损情况,进而治疗 AD^[8]。但蛇床子素在水中难以溶解,在生物体内溶解度低,半衰期较短,生物利用度差,限制了其临床应用^[9-11]。近年来,国内外学者采用脂质体^[12]、微乳^[13]、环糊精包合物^[9]、固体分散体^[14]、磷脂复合物^[15]等新技术,在一定程度上改善了蛇床子素的水溶性,提高了其生物利用度。

纳米混悬技术是将难溶性药物制备成的纳米大小的药物颗粒,能够增加药物的比表面积,提高难溶性药物的溶解度,改善难溶性药物的生物利用度^[16-17]。温敏凝胶在室温条件下为液态,在人体温度下为半固体状态,可延长药物在用药部位的滞留时间^[18-19]。纳米混悬温敏凝胶既具有纳米混悬剂可增加难溶性药物溶解度、提高难溶性药物生物利用度等特点,同时具有温敏凝胶黏附性及生物相容性好等优点,有利于经皮给药,提高药物溶出度,促进药物透皮吸收。因此,本研究以蛇床子素为模型药物研制蛇床子素纳米混悬温敏凝胶(osthole nanosuspension thermosensitive gel, Ost-NS-TG),以胶凝温度为指标,筛选优化纳米混悬温敏凝胶的处方工艺,并对其质量进行评价,通过初步药效学研究探索其治疗 AD 的效果,以期对蛇床子素的临床应用提供新的思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BS110S 型电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;HH-S6A 型数显恒温水浴锅,北京科伟永兴仪器有限公司;HAAKE™ Viscotester™ iQ 型流变仪、UltiMate 3000 型 HPLC(配 Chromeleon 工作站),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;MMS4pro 型多联磁力搅拌器,群安科学仪器(浙江)有限公司;pH 检测计,东莞市希玛仪表有限公司;NDJ-8S 型旋转式黏度计,上海精天电子仪器有限公司;

RM2016 型病理切片机,上海徕卡仪器有限公司;TG16W 型微量高速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;TYXH-II 型涡旋混合器,南京天悦电子科技有限公司;Nikon DS-U3 型成像系统、E100 型生物显微镜、ECLIPSE-Ci 型拍照显微镜,尼康株式会社;HNS-50B 型全自动智能恒温恒湿培养箱,北京市恒诺利兴科技有限公司;JT-12S 型脱水机、JB-L5 型包埋机、JB-L5 型冻台,武汉俊杰电子有限公司;KD-P 型组织摊片机,浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;352 型酶标仪,芬兰 Labsystems Multiskan MS;AC8 型洗板机,芬兰 Thermo Labsystems;GNP-9080 型隔水式恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;MCE302E 型流变仪,奥地利 Anton Paar 公司。

1.2 试药

Ost-NS 冻干粉(自制);蛇床子素对照品(批号 M29IB216001, HPLC 质量分数>98.0%)、泊洛沙姆 407(P407,批号 J24GS155964)、泊洛沙姆 188(P188,批号 M11GS148056)、甲基纤维素(MC,批号 H19O11H128058)、卡波姆-940(Carbomer-940,批号 Y15M10S83143)、2,4-二硝基氯苯(DNCB,批号 JW332549)、橄榄油(批号 A01IS221450)均购自上海源叶生物科技有限公司;聚山梨酯-80(TW-80,批号 C15122420)购自上海麦克林生化科技有限公司;羟丙基甲基纤维素(HPMC,批号 D1908084)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;海藻酸钠(SA,批号 20200416)购自天津市永大化学试剂有限公司;水溶性氮酮(批号 20220928)购自天津市瑞金物化化学品有限公司;无水乙醇(批号 20230901)、丙二醇(批号 20190512)购自福晨化学试剂厂;丙酮(批号 20240229)购自北京市通广精细化工公司;即用型透析袋(批号 131276-2104)购自赛谱锐思(北京)科技有限公司;甲醇(色谱纯,批号 214804)、乙腈(色谱纯,批号 F2407A209)购自美国 Fisher Scientific 公司;脱毛膏(批号 C220323002)购自法国 Veet 公司;75%酒精(批号 20220517)购自山东利尔康医疗科技股份有限公司;复方醋酸地塞米松乳膏(批号 2403030S)购自桂林华诺威基因药业有限公司;4%多聚甲醛通用型组织固定液(批号 23257838)购自兰杰柯科技

有限公司;二甲苯(批号 10023418)、中性树胶(批号 10004160)购自国药集团化学试剂有限公司;HE 染液(批号 B1003)、甲苯胺蓝染色试剂盒(批号 S191032)均购自皮诺飞生物科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS, 批号 B0002)、小鼠 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)、免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)ELISA 试剂盒(批号分别为 20250110、20250110、20250110)购自江苏科特生物科技有限公司。

1.3 动物

SPF 级健康昆明种小鼠 60 只, 雄性 30 只, 雌性 30 只, 质量 (20 ± 2) g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2019-0010。本研究经北京中医药大学动物伦理委员会批准, 伦理审批编号为 BUCM-2024121605-4242。

2 方法与结果

2.1 Ost-NS-TG 的制备及胶凝温度的测定

2.1.1 Ost-NS 冻干粉的制备 按照本课题组前期研究结果^[20-22], 采用微型化介质研磨法制备 Ost-NS。称取蛇床子素原料药与茶皂素, 置于 10 mL 西林瓶中, 加入纯化水 5 mL, 直径为 0.4~0.6 mm 的氧化锆珠 5 mL 及磁力搅拌子, 于磁力搅拌器上以 1 300 r/min 转速下研磨 3 h, 取出, 除去氧化锆珠及搅拌子, 加入冻干保护剂制备成 Ost-NS 冻干粉, 置于 4 °C 下保存, 备用。

2.1.2 Ost-NS-TG 及蛇床子素温敏凝胶(osthole TG, Ost-TG)的制备 采用冷溶法^[23]制备凝胶溶液。分别称取 P407、P188 及 HPMC, 于 4 °C 下溶胀 24 h, 室温下分别加入相同含药量的 Ost-NS 冻干粉及蛇床子素原料药, 即得 Ost-NS-TG 与 Ost-TG。同法制备空白凝胶(不加 Ost-NS 冻干粉及蛇床子素原料药)。

2.1.3 胶凝温度的测定 胶凝温度测定方法选用搅拌子法^[24]。取一定量温敏凝胶置于西林瓶中, 加入搅拌子后固定于磁力搅拌器上, 将体系初始温度调整为 20 °C, 开始实验, 升温速率为 0.5 °C/min, 转速为 50 r/min, 记录搅拌子停止转动时的温度, 即为温敏凝胶的胶凝温度。

2.2 Ost-NS-TG 单因素考察

2.2.1 P407 用量考察 固定 P188 用量为 3%, HPMC 用量为 0.6%, Ost-NS 冻干粉用量为 5%, 水溶性氮酮的用量为 3%。根据“2.1.2”项下方法分别配制温

敏凝胶, 按照“2.1.3”项下方法测定 P407 不同用量(16%、17%、18%、19%、20%)制备得到的 Ost-NS-TG 的胶凝温度, 每组实验平行测定 3 次。结果温敏凝胶的胶凝温度分别为 (40.00 ± 0.44) 、 (35.20 ± 0.10) 、 (31.87 ± 0.12) 、 (29.93 ± 0.12) 、 (28.93 ± 0.15) °C, 随着 P407 用量的不断升高, 温敏凝胶的胶凝温度不断降低。根据人体表皮温度, 选择胶凝温度 32 °C 作为筛选目标, 当皮肤存在一定破损时, 其体表温度会升高 0.5~1.0 °C, 因此选择 P407 的用量为 18%。

2.2.2 P188 用量考察 固定 P407 用量为 18%, HPMC 用量为 0.6%, Ost-NS 冻干粉用量为 5%, 水溶性氮酮的用量为 3%。根据“2.1.2”项下方法分别配制温敏凝胶, 按照“2.1.3”项下方法测定 P188 不同用量(0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%)制备得到的 Ost-NS-TG 的胶凝温度, 每组实验平行测定 3 次。结果温敏凝胶的胶凝温度分别为 (29.93 ± 0.21) 、 (30.77 ± 0.21) 、 (31.73 ± 0.15) 、 (32.70 ± 0.17) 、 (33.43 ± 0.06) °C, 当其他因素固定时, 胶凝温度随着 P188 用量的提高而升高, 根据人体皮肤温度最终选择 P188 的用量为 3%。

2.2.3 HPMC 用量考察 固定 P407 用量为 18%, P188 用量为 3%, Ost-NS 冻干粉用量为 5%, 水溶性氮酮的用量为 3%。根据“2.1.2”项下方法分别配制温敏凝胶, 按照“2.1.3”项下方法测定 HPMC 不同用量(0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5%)制备得到的 Ost-NS-TG 的胶凝温度, 每组实验平行测定 3 次。结果温敏凝胶的胶凝温度分别为 (33.33 ± 0.06) 、 (32.43 ± 0.06) 、 (31.83 ± 0.25) 、 (30.47 ± 0.12) 、 (29.40 ± 0.30) °C, 温敏凝胶的胶凝温度随着 HPMC 用量的增加呈下降趋势, 当 HPMC 的用量为 0.6% 时更接近于人体体表温度, 因此优选 HPMC 用量为 0.6%。

2.2.4 Ost-NS 冻干粉用量考察 固定 P407 用量为 18%, P188 用量为 3%, HPMC 用量为 0.6%, 水溶性氮酮的用量为 3%, 根据“2.1.2”项下方法分别配制温敏凝胶, 按照“2.1.3”项下方法测定不同 Ost-NS 冻干粉用量(1%、3%、5%、7%、9%)制备得到的 Ost-NS-TG 的胶凝温度, 平行 3 次。结果温敏凝胶的胶凝温度分别为 (28.83 ± 0.15) 、 (31.20 ± 0.20) 、 (32.27 ± 0.15) 、 (29.90 ± 0.26) 、 (29.27 ± 0.25) °C, 随着 Ost-NS 冻干粉用量的增大, 胶凝温度先升高后降低。根据人体表皮温度确定其温度为

32 ℃, 因此选择 Ost-NS 冻干粉的用量为 5%。

2.2.5 促透剂种类及用量考察 固定 P407 用量为 18%, P188 用量为 3%, HPMC 用量为 0.6%, Ost-NS 冻干粉用量为 5%, 根据“2.1.2”项下方法分别配制丙二醇用量为 1%、3%、5%、7%、9%和水溶性氮酮用量为 1%、3%、5%、7%、9%的温敏凝胶, 并根据“2.1.3”项下方法测定胶凝温度, 平行 3 次。结果温敏凝胶的胶凝温度分别为 (33.23±0.40)、(33.43±0.06)、(33.57±0.12)、(33.87±0.15)、(34.27±0.67) ℃和 (31.07±0.15)、(32.43±0.12)、(33.97±0.15)、(34.67±0.25)、(35.80±0.26) ℃, 当使用丙二醇作为促透剂时, 胶凝温度高于体表温度, 使用水溶性氮酮作为促透剂时, 胶凝温度随着水溶性氮酮的增加不断升高, 当水溶性氮酮用量为 3%时, 胶凝温度接近于人体表温度, 因此选择水溶性氮酮作为促透剂, 用量为 3%。

2.3 正交试验设计优化 Ost-NS-TG 的处方

2.3.1 正交试验因素水平与试验设计和结果 在单因素试验中, 本研究制备了加入不同用量 HPMC、氮酮的纳米混悬温敏凝胶, 结果显示不同用量的 HPMC 或氮酮, 对纳米混悬温敏凝胶的胶凝温度无重要影响, 综合考虑, 选取 0.6% HPMC 及 3%氮酮为单因素实验最优条件, HPMC 及氮酮用量不纳入正交试验考察范围。

基于前期单因素试验结果和实际制备需求, 在固定其他工艺条件的前提下, 以 P407 用量 (A)、P188 用量 (B)、Ost-NS 冻干粉用量 (C) 这 3 个 Ost-NS-TG 制备工艺中的重要影响因素作为自变量, 以温敏凝胶的胶凝温度为评价指标, 基于单因素试验确定的最优参数组合, 采用 3 水平正交试验设计 (低、中、高) 对制备工艺参数进行系统优化。因素与水平见表 1, 正交试验设计、方差分析结果分别见表 1、2。

由正交试验结果的直观分析 (表 1) 可知, 各因素对 Ost-NS-TG 胶凝温度的影响大小依次为 P407 用量 (A) > Ost-NS 冻干粉用量 (C) > P188 用量 (B)。方差分析结果 (表 2) 进一步表明, 其中因素 A 和因素 C 对温敏凝胶的胶凝温度具有显著性影响 ($P < 0.05$), 因素 B 的用量对温敏凝胶的胶凝温度的影响不显著。因此, Ost-NS-TG 的最佳制备处方为 A₂B₃C₂, 即泊洛沙姆 407 用量为 18%, 泊洛沙姆 188 的用量为 4%, Ost-NS 冻干粉的用量为 5%。

2.3.2 最优处方工艺验证 固定其他工艺参数不变,

表 1 Ost-NS-TG 制备工艺的因素与水平、正交试验设计与结果 ($n = 3$)

Table 1 Factors and levels, orthogonal test design and results for preparation process of Ost-NS-TG ($n = 3$)

试验号	A/%	B/%	C/%	D (空白)	胶凝温度/℃
1	17 (1)	2 (1)	3 (1)	(1)	33.1
2	17 (1)	3 (2)	7 (3)	(2)	33.3
3	17 (1)	4 (3)	5 (2)	(3)	34.6
4	18 (2)	2 (1)	7 (3)	(3)	31.1
5	18 (2)	3 (2)	5 (2)	(1)	32.5
6	18 (2)	4 (3)	3 (1)	(2)	31.6
7	19 (3)	2 (1)	5 (2)	(2)	29.5
8	19 (3)	3 (2)	3 (1)	(3)	28.0
9	19 (3)	4 (3)	7 (3)	(1)	28.5
K ₁	101.0	93.7	92.7	94.1	
K ₂	95.2	93.8	96.6	94.4	
K ₃	86.0	94.7	92.9	93.7	
R	15.0	1.0	3.9	0.7	

表 2 方差分析结果

Table 2 Analysis of variance results

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
A	38.142 2	2	19.071 1	463.891 9	0.002
B	0.202 2	2	0.101 1	2.459 5	0.289
C	3.215 6	2	1.607 8	39.108 1	0.025
D (误差)	0.082 2	2	0.041 1		

根据上述确定的最佳处方工艺, 制备 3 批 Ost-NS-TG, 测定胶凝温度, 评价正交试验优选出的处方工艺的准确性。结果表明 3 批 Ost-NS-TG 的胶凝温度分别为 32.7、32.6、32.7 ℃, 验证结果与正交试验优选方案具有良好的一致性, 说明优选得到的最佳处方工艺合理, 制备方法简单易行, 可用于温敏凝胶处方工艺的优化。

2.4 Ost-NS-TG 的质量评价

2.4.1 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察温敏凝胶的形貌 将 Ost-NS-TG 制成冻干粉, 取适量凝胶粉末, 喷金处理, 通过 SEM 观察凝胶形貌, 结果见图 1, 结果显示, 样品排列呈疏松多孔状。

2.4.2 形状考察 采用目测法对 Ost-NS-TG 相转变前后的物理性状变化进行评价。其在室温条件下表现为可流动的乳白色液体, 当温度升至生理温度时即转变为乳白色半固态凝胶, 相变具有可逆性。

2.4.3 胶凝温度考察 根据“2.1.3”项下胶凝温度测定方法对 Ost-NS-TG 的胶凝温度进行测定, 结果

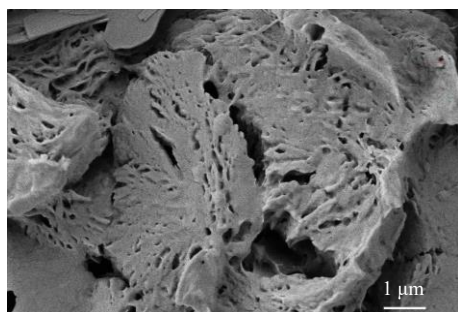


图 1 Ost-NS-TG 的 SEM 图 (×10 000)

Fig. 1 SEM image of Ost-NS-TG (×10 000)

显示, 3 批温敏凝胶的平均胶凝温度为 $(32.67 \pm 0.06)^\circ\text{C}$, 其相变温度与受损皮肤表面温度相近, 证实该制剂能在皮肤表面实现由可流动液态向半固态凝胶态的智能相变。

2.4.4 胶凝时间考察 取 2 mL 温敏凝胶置于加入搅拌子的西林瓶中, 放置在 32.7°C 下的恒温水浴锅中, 每 15 s 倾斜 1 次西林瓶, 倾斜角度约 90° 记录凝胶不再流动的时间, 即为胶凝时间。结果表明 3 批温敏凝胶的平均胶凝时间为 (60.88 ± 1.62) s。

2.4.5 pH 值测定 根据《中国药典》2025 版四部通则凝胶剂项下规定, 对制备的 3 批 Ost-NS-TG 样品进行 pH 值测定。结果表明所制 3 批温敏凝胶平均 pH 值为 6.68 ± 0.03 。

2.4.6 黏度测定 称取适量按处方制备好的 Ost-NS-TG, 根据预实验采用旋转黏度计 4 号转子, 转速为 60 r/min, 分别于室温 (25°C)、胶凝温度 (32.7°C) 条件下测定温敏凝胶的黏度。3 批 Ost-NS-TG 的黏度测定结果见表 3, 可见室温状态黏度较小, 温度升高达体温条件后黏度增大。

表 3 Ost-NS-TG 的黏度 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Viscosity of Ost-NS-TG ($\bar{x} \pm s, n=3$)

批次	黏度/(mPa·s)	
	25 $^\circ\text{C}$	33 $^\circ\text{C}$
20241125	372.2 ± 5.8	$27\ 932.0 \pm 118.2$
20241126	364.8 ± 4.9	$28\ 513.7 \pm 184.6$
20241127	363.7 ± 3.9	$30\ 790.3 \pm 196.5$

2.4.7 ζ 电位测定 取适量按处方制备好的 Ost-NS-TG, 使用马尔文激光粒度分析仪测定其 ζ 电位分布, 结果测得 3 批 Ost-NS-TG 的平均 ζ 电位为 (-32.90 ± 0.89) mV。

2.4.8 含量测定

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水

(65:35); 检测波长 322 nm; 柱温 30°C ; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL 。

(2) 对照品溶液的制备: 精密称取蛇床子素对照品 2.58 mg, 加甲醇溶解并定容至 5 mL, 配制成蛇床子素质量浓度为 0.516 mg/mL 的对照品溶液。

(3) 供试品溶液的制备: 取 50 μL Ost-NS-TG, 加入 1 mL 甲醇充分稀释, 后加入甲醇定容至 10 mL, 用 0.22 μm 滤膜滤过, 即得供试品溶液。

(4) 专属性考察: 按照“2.4.8 (1)”项下色谱条件分别对空白凝胶甲醇溶液、蛇床子素对照品溶液、Ost-NS-TG 甲醇溶液各 10 μL , 进行 HPLC 测定。结果见图 2, 表明蛇床子素在该色谱条件下的专属性良好。

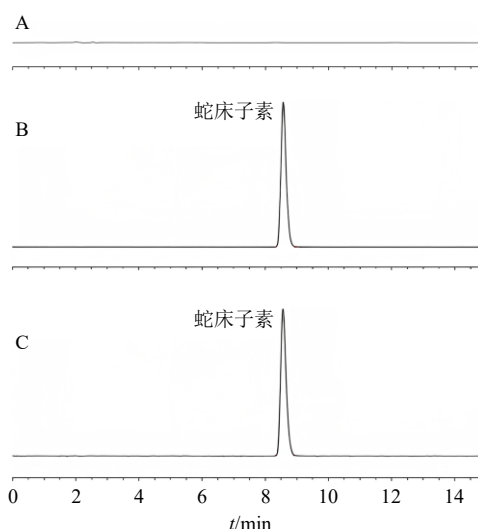


图 2 空白凝胶 (A)、蛇床子素对照品 (B) 和 Ost-NS-TG 样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of blank gel (A), osthole reference substance (B) and Ost-NS-TG sample (C)

(5) 线性关系考察: 精密吸取“2.4.8 (2)”项下蛇床子素对照品溶液 31.3、62.5、125.0、250.0、500.0、1 000.0、2 000.0 μL , 置于 2 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得系列对照品溶液。按照“2.4.8 (1)”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 色谱峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线并计算线性回归方程, 得到线性回归方程为 $Y=549.49 X-0.397\ 5$, $R^2=0.999\ 8$, 结果表明蛇床子素在 8.1~516.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

(6) 精密度考察: 精密吸取“2.4.8 (2)”项下蛇床子素对照品溶液 10 μL , 按照“2.4.8 (1)”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 结果显示, 蛇床子素

峰面积的 RSD 为 0.43%，结果表明该方法的精密度高。

(7) 稳定性考察：精密吸取 Ost-NS-TG 供试品溶液 10 μ L，按照“2.4.8 (1)”项下色谱条件，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录峰面积，计算得蛇床子素峰面积的 RSD 为 2.19%，结果表明，Ost-NS-TG 供试品溶液在 24 h 内的稳定性良好。

(8) 重复性考察：取同一批 Ost-NS-TG 样品 6 份，分别按照“2.4.8 (3)”项下方法制备供试品溶液，按照“2.4.8 (1)”项下色谱条件进样测定，结果显示，蛇床子素质量浓度的 RSD 为 2.67%，结果表明该方法重复性满足样品测定要求。

(9) 加样回收率试验：精密称取已测知蛇床子素含量的 Ost-NS-TG 对照品溶液 9 份，分为 3 组，每组 3 份，按照样品中质量浓度的 80%、100%、120% 的比例加入各对照品，涡旋混合均匀后，按照“2.4.8 (1)”项下色谱条件进样测定蛇床子素的含量。蛇床子素低、中、高 3 个质量浓度的加样回收率分别为 98.1%、98.9%、98.55%，RSD 分别为 0.62%、0.40%、0.46%，表明该方法回收率良好。

(10) 含量测定：按优选工艺制备 3 批 Ost-NS-TG，按照“2.4.8 (3)”项下方法对 Ost-NS-TG 进行处理，按照“2.4.8 (1)”项下色谱条件进样测定，计算温敏凝胶中蛇床子素的含量。结果显示，3 批 Ost-NS-TG 中蛇床子素质量浓度分别为 6.96、6.95、6.96 mg/mL，平均质量分数为 (6.96 ± 0.01) mg/mL。

2.4.9 体外释放度考察 采用透析袋法测定 Ost-TG 及 Ost-NS-TG 的体外释放度。称取 Ost-TG 与 Ost-NS-TG，置于预处理好的透析袋（截留相对分子质量 8 000~10 000）中，密封后置于 50 mL 含 0.5% 聚山梨酯-80 的 PBS 接收液中，加入磁力搅拌转子，在 37 $^{\circ}$ C、100 r/min 搅拌条件下进行释放试验，分别于释放开始后 0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144 h 时间点取 0.2 mL 接收液，同时补加等温等量新鲜接收液，经 0.22 μ m 滤膜滤过后，按照“2.4.8 (1)”项下色谱条件测定药物质量浓度，每组实验平行 3 次，绘制累积释放曲线，结果如图 3 所示。结果表明，在 144 h 内 Ost-TG 的体外累积释放率为 60.67%，Ost-NS-TG 的体外累积释放率为 86.54%。

采用零级、一级、Higuchi、Ritger-Peppas 等数学模型进行释放动力学拟合，结果如表 4 所示，由

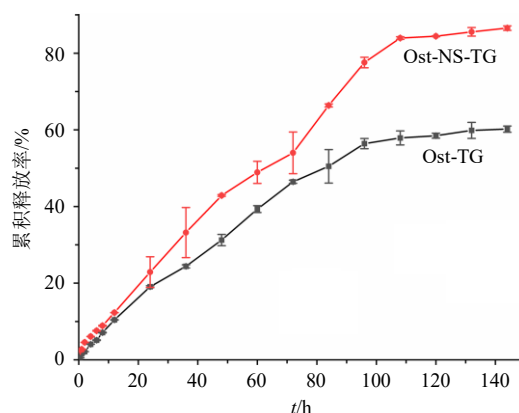


图 3 Ost-TG 和 Ost-NS-TG 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 In vitro release curves of Ost-TG and Ost-NS-TG

($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 4 Ost-TG 和 Ost-NS-TG 的体外释放模型拟合结果

Table 4 In vitro release model fitting results of Ost-TG and Ost-NS-TG

剂型	释放模型	拟合方程	R^2
Ost-TG	零级	$Q=0.654\ 73\ t+0.997\ 58$	0.914\ 18
	一级	$Q=64.862\ 01(1-e^{-0.016\ 27\ t})$	0.955\ 41
	Higuchi	$Q=3.188\ 84\ t^{1/2}-1.855\ 21$	0.861\ 07
	Ritger-Peppas	$Q=1.392\ 22\ t^{0.789\ 86}$	0.982\ 17
Ost-NS-TG	零级	$Q=0.702\ 31\ t+3.087\ 72$	0.984\ 62
	一级	$Q=127.141\ 90(1-e^{-0.009\ 02\ t})$	0.969\ 32
	Higuchi	$Q=6.065\ 49\ t^{1/2}-5.057\ 81$	0.849\ 24
	Ritger-Peppas	$Q=1.819\ 95\ t^{0.798\ 65}$	0.989\ 51

释放模型的 R^2 可知，2 种温敏凝胶的释放行为均最符合 Ritger-Peppas 动力学模型，且 Ost-NS-TG 显示出更优的释放特性。体外释放动力学分析结果显示，该温敏凝胶制剂呈现典型的双相释放特征：在初始 0~96 h 内表现为快速释放阶段，96 h 后进入释放平台期，释放趋于平稳。

2.4.10 流变学性质考察

(1) 应变扫描分析：设置仪器振幅扫描参数，剪切应变 (γ) 为 0.1%~100%，频率为 10 rad/s，测定样品的线性黏弹区。Ost-NS-TG 的线性黏弹区结果见图 4，当 $\gamma < 1\%$ 时，储能模量 (G') $>$ 损耗模量 (G'')，表明样品内部结构弹性大于黏性，表现出凝胶结构；当 $\gamma > 1\%$ 时， G'' 开始下降，表明凝胶结构开始被破坏，稳定性下降；当 $G' = G''$ 时，凝胶结构完全被破坏； $G' < G''$ 时，黏性占主体，表现为流体性质。因此，所有的动态振荡实验都需控制 γ 在 1% 以内。

(2) 相变温度的测定：设置温度变化为 20~50 $^{\circ}$ C，升温速率为 2 $^{\circ}$ C/min，测试 G' 、 G'' 随温度变化

的曲线，测定相变温度，曲线交点处温度即视为胶凝温度。结果见图 5，由图 5 可知，当温度为 32.6 °C 时， $G' = G''$ ，即为 Ost-NS-TG 相变温度。

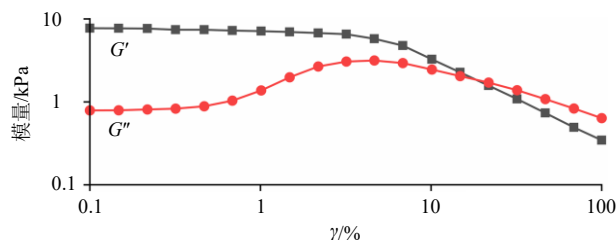


图 4 Ost-NS-TG 的 G' 和 G'' 随 γ 变化曲线

Fig. 4 Variations of G' and G'' of Ost-NS-TG with γ

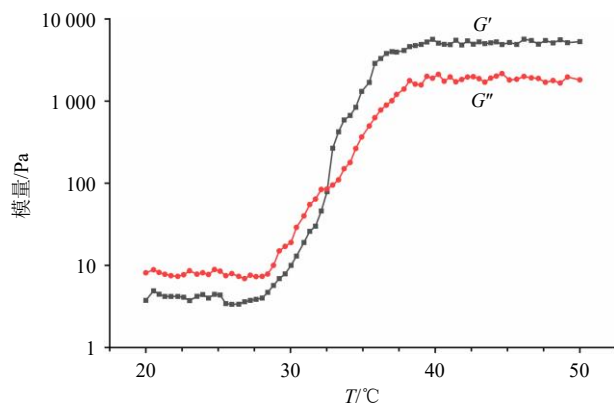


图 5 Ost-NS-TG 的 G' 和 G'' 随温度变化曲线

Fig. 5 Variations of G' and G'' of Ost-NS-TG with temperature

表 5 Ost-NS-TG 的黏附力测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Adhesion test results of Ost-NS-TG ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	位移值/cm						
	0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h	3.0 h	4.0 h	5.0 h
20241125	0.18 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.51 ± 0.04	0.65 ± 0.02	0.78 ± 0.01	0.91 ± 0.02	0.98 ± 0.03
20241126	0.19 ± 0.04	0.37 ± 0.05	0.49 ± 0.03	0.66 ± 0.03	0.79 ± 0.03	0.92 ± 0.01	1.01 ± 0.02
20241127	0.17 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.49 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.76 ± 0.04	0.87 ± 0.04	0.96 ± 0.03

2.4.12 离心、耐寒、耐热稳定性考察

(1) 离心稳定性试验：取制备好的 Ost-NS-TG 适量，置离心管中，以 3 000 r/min 转速离心（离心半径 10 cm）30 min，观察离心后凝胶的性状与外观变化。

(2) 耐寒稳定性试验：取制备好的 Ost-NS-TG 适量，置具塞 EP 管中，再置 -20.0 °C 冰箱中 24 h，取出，待其恢复至常温后，观察凝胶的胶凝温度、pH 值、外观性状。

(3) 耐热稳定性试验：取制备好的 Ost-NS-TG 适量，置具塞 EP 管中，再置 60.0 °C 恒温干燥箱中 24 h，取出，待其恢复至常温后，观察凝胶的胶凝温度、pH 值、外观性状。

(3) 频率扫描分析：振荡模式下设置参数为 1%，频率扫描范围为 0.1~100 Hz。结果见图 6，在扫描频率为 0.1~100 Hz 时， G' 始终大于 G'' ，表明在此条件下，Ost-NS-TG 具有明显的黏弹性固体性质，能够保持良好的黏弹性和机械强度，凝胶强度较好。

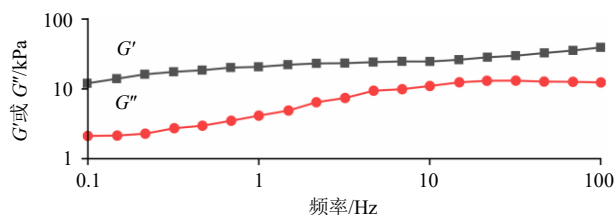


图 6 Ost-NS-TG 的 G' 和 G'' 随频率变化曲线

Fig. 6 Variations of G' and G'' of Ost-NS-TG with frequency

2.4.11 黏附力测定 采用位移法^[25]测定其黏附力：制备猪黏蛋白（2%）-琼脂（1%）凝胶均匀涂抹于玻璃板上，4~8 °C 放置 3 h 后，取出玻璃板，在 22 °C、相对湿度 75% 的条件下平衡 1 h。Ost-NS-TG 滴于玻璃板的一端，将玻璃板 90° 放置，测定凝胶在不同时间（0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 h）移动的距离，凝胶的黏附力和距离成反比。由表 5 可知，Ost-NS-TG 在玻璃板上移动的距离 5 h 之内仅移动 1 cm 左右，表明该凝胶黏附力强。

(4) 稳定性考察结果：结果显示，离心试验、低温试验、高温试验中的 Ost-NS-TG 均未出现分层现象，外观性状、pH 值、胶凝温度均无明显变化，表明其稳定性良好。

2.5 Ost-NS-TG 皮肤刺激性考察

2.5.1 单次给药皮肤刺激性试验 选用 12 只昆明小鼠，雌雄各半，在实验前，采用脱毛膏脱去小鼠背部毛发，多次用温水冲洗干净，随机分为 2 组，即完整皮肤组、破损皮肤组，每组 6 只。破损皮肤组清洁皮肤，碘伏消毒后用注射器针头划“井”字破口，至角质层破损并有轻微渗血，划痕间距 1 cm。在背部区域划分 3 个部分，分别涂抹 0.5 mL 空白凝胶、Ost-NS-TG 及蒸馏水。在凝胶完全固化后，

使用无菌纱布覆盖处理区域。6 h 后以 37 ℃ 无菌生理盐水轻柔清洗皮肤表面,并用无菌滤纸吸干残留水分。停药后分别于 1 h 及 1、2、3 d 4 个时间点观察处理部位皮肤反应,重点记录红斑和水肿等刺激症状的出现情况,根据《中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则》评分细则:皮肤刺激性分值=(出现红斑总分+出现水肿总分)/每组动物总数,皮肤刺激强度分值在 0~0.49 为无刺激性,0.50~2.99 为轻度刺激性,3.00~5.99 为中度刺激性,6.00~8.00 为强刺激性。单次给药实验结果显示,小鼠用药部位外观未见明显改变,且未检测到显著的水肿症状,评分均为 0 分。

根据皮肤刺激性评价标准,无论是空白凝胶载体还是 Ost-NS-TG,在单次给药条件下对正常及受损皮肤模型均未引发明显的刺激性反应,皮肤表面未见红斑、水肿等刺激症状。

2.5.2 多次给药皮肤刺激性试验 选用 12 只昆明小鼠,雌雄各半,参照急性皮肤刺激试验的给药部位和剂量方案进行多次给药实验。每日定时在相同部位涂抹样品,给药 24 h 后以生理盐水擦净给药部位,连续给药 7 d,末次给药后用生理盐水清除残留凝胶,分别于清除后 1 h 及 1、2、3 d 观察凝胶给药部位皮肤反应,重点监测红斑、水肿等刺激症状,记录现象并评分。结果显示,在多次给药实验中,给药部位皮肤维持正常形态学特征,既无红斑形成,也无显著水肿,评分均为 0 分,根据皮肤刺激评价标准,连续 7 d 使用载药凝胶和空白凝胶在长期使用条件下均具有良好的皮肤安全性。

2.6 Ost-NS-TG 的药效学实验

2.6.1 小鼠 AD 模型的建立与给药 适应性饲养 1 周后,随机将 36 只昆明小鼠分为空白组、模型组、阳性对照组以及 Ost-NS-TG 低、中、高剂量组。在实验前一天将小鼠背毛剔除并清理干净,大小约 2 cm×2 cm。模型组及各给药组用 100 μL 5% DNCB [溶解在丙酮-橄榄油(3:1)中]进行致敏,持续 2 d,第 4 天开始,每间隔 1 d 同法涂抹 100 μL 0.5% DNCB 基质溶液于小鼠背部相同位置,进行激发致敏。空白组涂抹相同体积丙酮-橄榄油(3:1)^[26-27],从第 4 天开始,空白组和模型组涂抹 PBS,阳性对照组涂抹复方醋酸地塞米松软膏 7.5 mg/kg (以醋酸地塞米松计),Ost-NS-TG 按照体表面积转换系数进行等效换算,小鼠体表面积系数为 0.002 6^[28],得给药剂量 36 mg/kg,即中剂量,高、低剂量分别为中剂量的 2.0、0.5 倍,即 72、18 mg/kg,持续 13 d。在第 17 天麻醉并处死所有小鼠,收集血液样本及皮损组织。

2.6.2 小鼠背部皮损评价 经 DNCB 造模后,分别于第 1、4、8、12、16 天按照皮损面积和严重程度(psoriasis area and severity index, PASI)评分标准对皮损部位红斑、水肿/丘疹、表皮剥脱/抓痕、鳞屑(干燥)4 个方面进行评分。PASI 评分标准如下:“0”,无明显症状;“1”,轻度;“2”,中度;“3”,重度。症状评分之和即为皮损严重程度,得分越高,皮损越严重^[29]。背部皮损图及评分如图 7 以及表 6 所示。空白组小鼠未表现出皮损症状,模型组小鼠背部出现水肿、鳞屑及苔藓状病变,与 AD 典型症状

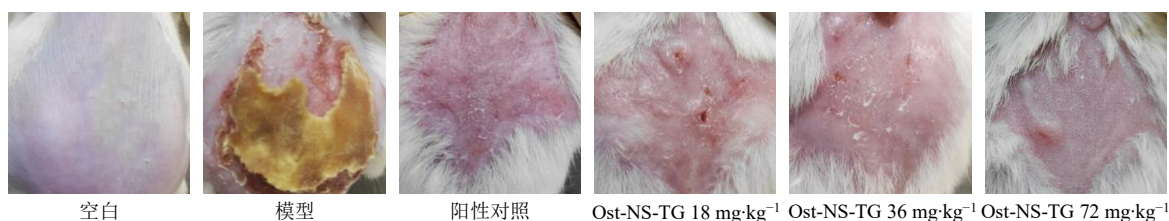


图 7 各组小鼠 AD 治疗图

Fig. 7 Treatment diagram of atopic dermatitis of each group

相符,且皮损评分显著高于空白组($P<0.01$),说明 DNCB 能有效诱导小鼠 AD,造模成功。经给药 13 d 治疗后,与模型组相比,其余各组小鼠皮损症状均有不同程度的改善($P<0.05$ 、 0.01)。

2.6.3 小鼠抓挠行为评价 AD 临床的主要症状之一为瘙痒难耐,本实验选用小鼠抓挠次数作为评价 Ost-NS-TG 改善小鼠 AD 症状的指标之一,通过观

察小鼠抓挠后背次数评定制剂的止痒效果。末次给药 24 h 后,将各组小鼠单独放入全透明笼子内,记录小鼠在 10 min 内抓挠行为的次数,连续抓挠直至爪子重新放回地板上记作 1 次抓挠行为^[30]。结果见表 6。结果表明,与空白组相比,模型组小鼠抓挠次数显著增加($P<0.01$);与模型组相比,阳性对照组、Ost-NS-TG 中、高剂量组小鼠抓挠次数减少,

表 6 各组不同时间点的小鼠皮损评分及小鼠抓挠次数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Lesion scoring at different time points and numbers of scratches of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	PASI评分					平均抓挠 次数
		1 d	4 d	8 d	12 d	16 d	
空白	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.00±1.41
模型	—	0.00±0.00	3.83±0.41**	3.50±1.22**	3.33±1.03**	3.67±0.82**	14.67±2.50**
阳性对照	7.5	0.00±0.00	3.83±0.75**	2.50±0.55***	2.33±0.82**	1.67±1.21#	7.50±4.23#
Ost-NS-TG	18	0.00±0.00	3.83±0.98**	3.33±0.52**	2.50±1.38**	1.83±0.98*#	14.33±5.28**
	36	0.00±0.00	3.67±1.21**	3.17±0.41**	2.33±1.03**	1.50±1.22###	7.17±1.47###
	72	0.00±0.00	3.67±0.82**	2.73±0.41**	2.17±0.75**	0.83±0.98###	2.33±1.97###

与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$; 表 7、8 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ vs model group; Same as tables 7, 8.

差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

2.6.4 小鼠脏器指数测定 处死小鼠后,解剖各组小鼠并精密称取小鼠脾脏及胸腺,按照公式计算各组小鼠的脏器指数,结果见表 7。模型组小鼠的脾脏指数、胸腺指数均显著高于空白组 ($P < 0.01$),与模型组相比,阳性对照组小鼠的脾脏指数、胸腺指数显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),Ost-NS-TG 高剂量组的胸腺指数及其低、中、高剂量组的脾脏指数均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

脏器指数=脏器质量/体质量

表 7 各组小鼠脏器指数及组织切片肥大细胞数量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Organ indexes and numbers of mast cells in tissue sections of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	胸腺指数/ (mg·g ⁻¹)	脾脏指数/ (mg·g ⁻¹)	肥大细胞 数量/个
空白	—	0.15±0.07	0.19±0.02	6.67±1.15
模型	—	0.41±0.12**	0.67±0.10**	59.00±2.65**
阳性对照	7.5	0.24±0.12#	0.15±0.04###	16.67±3.51***
Ost-NS-TG	18	0.30±0.08	0.50±0.11***	29.67±1.53***
	36	0.29±0.06	0.47±0.13***	21.33±2.08***
	72	0.24±0.06#	0.28±0.08###	12.33±2.52***

2.6.5 组织病理学观察 于实验第 17 天将小鼠处死,剪下皮损组织,剥除皮下脂肪及黏膜,用于后续实验,皮肤组织样本采集后,立即将其中 50%的组织置于 4%多聚甲醛固定液中,于 4℃条件下固定 24 h。随后,固定后的组织依次经过梯度乙醇脱水、二甲苯透明处理,最后进行石蜡包埋和切片制备,用于苏木素-伊红 (hematoxylin and eosin stain, HE) 染色、甲苯胺蓝 (toluidine blue stain, TB) 染色,作组织病理学检查,用显微镜在不同倍数下观察组织切片并拍照,观察皮损组织的病理学特征。

另一半组织速冻后保存于-80℃冰箱备用。

(1) HE 染色: 通过皮肤组织病理 HE 染色进一步评估小鼠的皮肤改变情况,图 8 为各组小鼠皮肤的 HE 染色结果。空白组表皮、真皮结构正常,未见明显炎性细胞浸润,模型组表皮角化过度及角化不全,真皮层可见明显的炎性细胞浸润,与模型组相比,阳性对照组与 Ost-NS-TG 小鼠皮损情况均有一定的改善,表明 Ost-NS-TG 在一定程度上可以抑制小鼠皮肤的病理性增厚。

(2) TB 染色: 小鼠 AD 的主要特征之一为大量的肥大细胞浸润。为了评估 Ost-NS-TG 对肥大细胞的影响,对皮肤组织切片进行 TB 染色,结果见图 9 及表 7。图 9 所示为各组小鼠的 TB 染色结果,肥大细胞被染色后为蓝紫色。表 7 为各组小鼠组织切片中肥大细胞的数量。结果显示,空白组小鼠皮损组织中可见零星肥大细胞,模型组中肥大细胞浸润明显,数量增多 ($P < 0.01$);与模型组相比,阳性对照组和 Ost-NS-TG 低、中、高剂量组小鼠肥大细胞数量明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。说明 Ost-NS-TG 能够改善 DNCB 导致的小鼠 AD 皮肤组织炎症浸润,降低肥大细胞数量。

2.6.6 ELISA 法检测小鼠血清与皮损组织中的炎症因子 IgE、IL-4、IFN- γ 表达水平 采用 ELISA 法检测小鼠血清与皮损组织中的炎症因子 IgE、IL-4、IFN- γ 表达水平,结果见表 8。与空白组相比,DNCB 诱导的模型组小鼠血清及皮损组织中 IgE 表达水平显著上调 ($P < 0.01$)。阳性药组及蛇床子素高剂量组均能降低血清中 IgE 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01),Ost-NS-TG 高剂量组皮损组织中 IgE 表达水平显著低于模型组,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

与空白组相比,模型组小鼠血清中 IL-4 表达水平有所提高 ($P < 0.05$),阳性药与 Ost-NS-TG 高剂

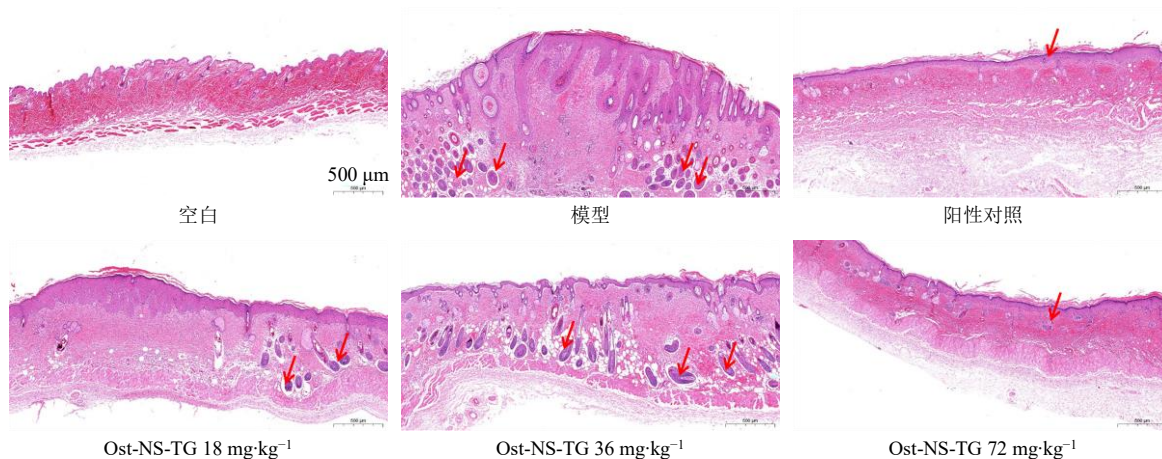


图 8 各组小鼠皮肤创面组织切片 HE 染色显微照片 (×100, 红色箭头表示炎性细胞浸润)

Fig. 8 Photomicrographs of HE staining of tissue sections of skin wounds of each group of mice (× 100, red arrows indicate inflammatory cell infiltration)

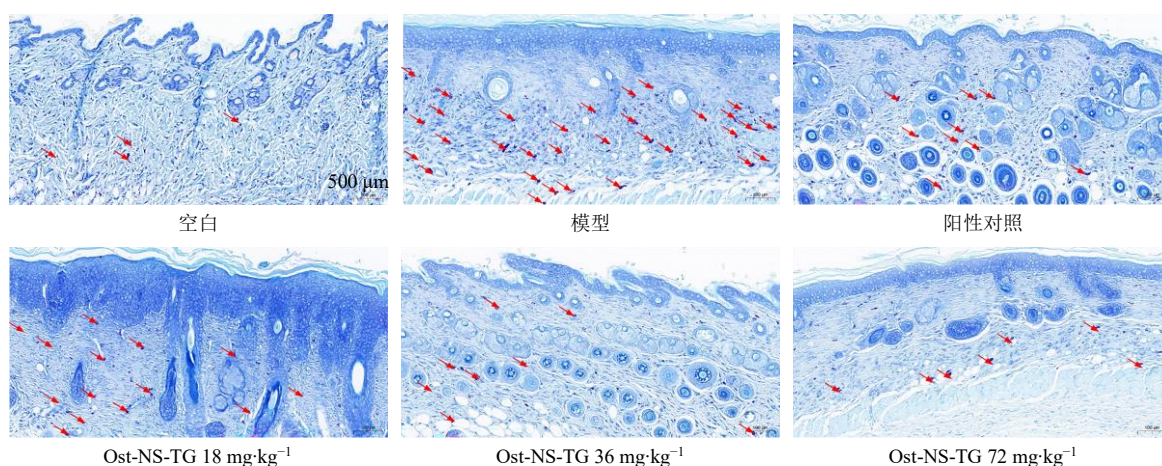


图 9 各组小鼠皮肤创面组织切片 TB 染色显微照片 (×300, 红色箭头表示肥大细胞)

Fig. 9 Photomicrographs of TB staining of tissue sections of skin wounds of each group of mice (× 300, red arrows represent mast cells)

表 8 各组小鼠血清和皮损组织中 IgE、IL-4、IFN-γ 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 8 Serum expression levels of IgE, IL-4 and IFN-γ in mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	血清			皮损组织		
		IgE/(ng·mL ⁻¹)	IL-4/(ng·mL ⁻¹)	IFN-γ/(ng·mL ⁻¹)	IgE/(ng·mL ⁻¹)	IL-4/(ng·mL ⁻¹)	IFN-γ/(ng·mL ⁻¹)
空白	—	269.82 ± 2.10	247.42 ± 3.86	1 074.81 ± 10.45	231.05 ± 3.46	234.93 ± 4.89	890.43 ± 9.24
模型	—	283.03 ± 6.20**	259.20 ± 5.96*	1 118.46 ± 16.70	246.11 ± 3.72**	240.45 ± 6.04	1 004.56 ± 7.29**
阳性对照	7.5	266.70 ± 4.35#	247.79 ± 1.50#	1 089.38 ± 12.64	243.58 ± 1.97**	237.90 ± 2.19	887.79 ± 5.65##
Ost-NS-TG	18	277.84 ± 4.72	256.92 ± 2.81	1 108.54 ± 20.62	241.98 ± 0.91**	237.50 ± 4.41	955.79 ± 4.99***
	36	273.29 ± 3.82	255.12 ± 1.06	1 027.67 ± 5.17##	242.36 ± 1.39**	230.08 ± 2.03	937.88 ± 4.01***
	72	265.70 ± 4.05##	244.81 ± 4.50##	1 037.13 ± 5.80##	233.96 ± 1.76##	224.85 ± 2.81##	896.63 ± 7.07##

量组小鼠血清中 IL-4 表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, 0.01$), Ost-NS-TG 高剂量组小鼠皮损组织中 IL-4 表达水平与模型组相比有显著降低 ($P < 0.01$), 模型组与空白组小鼠血清内 IFN-γ 表达水平无明显差异, 可能是由于皮损局部产生的 IFN-

γ 在向血管内弥散的过程中, 会迅速与血管内皮表面的硫酸乙酰肝素结合并发生羧基末端水解, 导致该细胞因子失活^[31], 减少了血清中 IFN-γ 的累积程度。与模型组相比, Ost-NS-TG 高、中剂量组血清中 IFN-γ 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。模型组小鼠

皮损组织内 IFN- γ 表达水平显著高于空白组 ($P < 0.01$), 阳性药组及 Ost-NS-TG 低、中、高剂量组小鼠皮损组织中 IFN- γ 表达水平降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

蛇床子素水溶性差, 在生物体内溶解度低, 生物利用度差, 限制了其临床应用^[32]。本课题组前期研究发现, 将蛇床子素制备成纳米混悬剂后, 有效地改善了药物的溶出行为, 可能与其粒径减小引起的表面积、溶解度增加有关^[33]。本研究制备的 Ost-NS-TG 能够直接作用于病变部位, 增强局部黏附性, 延长作用时间, 具有缓释功能, 患者顺应性好等优势^[34-35]。

以温敏凝胶的胶凝温度为评价指标, 采用单因素实验法对温敏凝胶的处方进行了筛选, 包括泊洛沙姆 407 的用量、泊洛沙姆 188 的用量、生物黏附剂的用量、Ost-TG 冻干粉的用量以及促透剂的用量, 根据单因素试验结果, 通过正交设计优化了 Ost-NS-TG 的处方工艺并进行验证, 最终得到了简单、合理、可行的制备工艺。对所制的 Ost-NS-TG 的质量进行了综合评价, 结果表明制备处方工艺简单可行, 温敏凝胶质量可控且皮肤用药安全。

体外释放是衡量透皮给药系统中药物释放能力的主要参数, 药物首先从凝胶中释放出来, 到达皮肤表面, 进而经皮渗透吸收进入体内发挥作用, 采用透析袋法测定凝胶的体外释放行为, 结果显示 Ost-NS-TG 的体外释放特性优于 Ost-TG, 采用零级、一级、Higuchi、Ritger-Peppas 等数学模型对两者进行释放动力学拟合, 二者均符合 Ritger-Peppas 模型。

采用 DNCB 构建小鼠 AD, 评价 Ost-NS-TG 治疗 AD 的效果, 结果表明 Ost-NS-TG 能够改善小鼠皮损情况, 并能降低小鼠血清与皮损组织中炎症因子 IgE、IL-4、IFN- γ 的表达水平, 已有研究表明 IL-4 是诱导 2 型辅助性 T 细胞 (type 2 helper T cell, Th2) 反应最重要的细胞因子, 在 AD 的发展过程中增加, IFN- γ 是 1 型辅助性 T 细胞 (type 1 helper T cell, Th1) 细胞因子, 能够促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化。

另有研究发现, AD 发病机制与 Th1/Th2 失衡、多种细胞因子的表达有密切关系, 而蛇床子素具有调节 Th1/Th2 细胞比例的作用, 且可介导多种炎症因子, 通过调节蛋白激酶 B/紧密连接蛋白 3 (protein

kinase B/zonula occludens protein 3, Akt/ZO-3) 等信号通路, 缓解皮肤损伤并抑制慢性瘙痒^[36-38], 但其相关制剂在 AD 中是否有相同的作用仍不明确。本研究结果表明 Ost-NS-TG 可能通过下调 IgE、IL-4、IFN- γ 等细胞因子的表达, 进而缓解 AD 引起的皮肤损伤症状。

综上, 本研究制备得到的 Ost-NS-TG 展现出优异的体外释放特性和良好的经皮给药安全性, Ost-NS-TG 具有明显的治疗 AD 药效, 后期将继续开展 Ost-NS-TG 制剂系统全面的药效学评价研究, 期为 Ost-NS-TG 的临床应用提供更精确的基础支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 田斌, 瞿孝兰, 林义平, 等. 蛇床子化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药与临床, 2020, 11(1): 70-73.
- [2] 江英桥. 蛇床子中香豆素类成分的 HPLC-ESI-MS 分析 [J]. 中药材, 2006, 29(10): 1033-1035.
- [3] 都梦帆, 向汝, 范好, 等. 蛇床子素的药理作用及抗炎活性机制研究进展 [J]. 云南中医学院学报, 2020, 43(6): 92-98.
- [4] 宋宜蕾, 侯雪芹, 郝吉福. 蛇床子现代药理学作用及临床应用的研究进展 [J]. 神经药理学报, 2019, 9(6): 58-63.
- [5] 覃小燕, 胡珍, 张花美, 等. 蛇床子素药理作用及相关机制研究进展 [J]. 天津中医药, 2018, 35(11): 877-880.
- [6] 吴启航, 杨洁, 赵一丁, 等. 基于 TLRs/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨镇心安神方对特应性皮炎小鼠皮肤免疫屏障的作用及机制 [J]. 中医药学报, 2025, 53(10): 10-15.
- [7] 孙静怡, 高明萱, 姚新宇, 等. 特应性皮炎瘙痒机制研究进展 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2025, 41(10): 765-770.
- [8] 陈姣蓉, 洪小平, 段妍君, 等. 蛇床子素对特异性皮炎小鼠皮肤屏障及慢性瘙痒的作用 [J]. 中成药, 2021, 43(12): 3489-3492.
- [9] 恽菲, 徐晓琰, 狄留庆, 等. 蛇床子素不同环糊精包合物的制备及其生物利用度比较研究 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 341-348.
- [10] 张智超, 杨静涵, 张丹参. 蛇床子素药动学特征及其代谢产物研究进展 [J]. 神经药理学报, 2021, 11(4): 26-31.
- [11] 胡小娟, 陈维良, 俞洋, 等. *N*-脂酰-*N*-三甲基壳聚糖的合成及其对蛇床子素的增溶作用 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 674-680.
- [12] 程岚, 孔亮, 杨静娴, 等. 转铁蛋白修饰蛇床子素长循环脂质体的处方筛选与体外跨血脑屏障研究 [J]. 辽

- 宁中医杂志, 2021, 48(11): 150-154.
- [13] 张亚莉. 眼用蛇床子素微乳的制备及其抗小鼠角膜新生血管的研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2023.
- [14] 王梦颜, 高丹, 杨岚, 等. 调释型蛇床子素固体分散体的制备、表征及体外释放研究 [J]. 中草药, 2025, 56(6): 1979-1988.
- [15] 王震芳, 张智强, 葛振华. 蛇床子素 3 种制剂的制备、表征及药动学比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3615-3621.
- [16] 徐浩, 高艺璇, 王向涛. 槲皮素纳米混悬剂的制备、表征及抗乳腺癌研究 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 42-51.
- [17] 连王权, 沈成英, 申宝德, 等. 微型化介质研磨法制备延胡索乙素纳米混悬剂 [J]. 沈阳药科大学学报, 2020, 37(3): 202-209.
- [18] 范冉冉, 刘原兵, 张婷, 等. 基于临床需求的温敏凝胶在不同给药部位的应用研究进展 [J]. 药学学报, 2022, 57(5): 1235-1244.
- [19] 王超君, 卓阳, 卢芳芳, 等. 温敏凝胶材料成胶机制的研究进展 [J]. 中国药房, 2013, 24(37): 3545-3547.
- [20] 胡宇峰, 马思媛, 王梦琳, 等. 延胡索乙素纳米混悬剂制备及体外评价 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(8): 18-24.
- [21] 张俊丽, 朱海婷, 陈文静, 等. 大黄素纳米混悬温敏凝胶的制备及其对大鼠皮肤创面愈合的研究 [J/OL]. 辽宁中医药大学学报, 1-12 (2025-11-12) [2026-01-04]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1543.R.20251112.0952.005>.
- [22] 朱海婷, 张俊丽, 王晓宇, 等. 延胡索乙素纳米混悬温敏凝胶的制备、质量评价及药效学研究 [J]. 中草药, 2025, 56(12): 4227-4237.
- [23] 甘慧琴, 梅陈松, 关志宇, 等. 葛根多糖载葛根素纳米粒温敏凝胶的制备及其药动学研究 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7238-7247.
- [24] 梁浩明, 龙晓英, 卢彬. 黄芩苷外用温敏凝胶的处方设计及优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 34-38.
- [25] 曾春玉. 用于 OSF 治疗的姜黄素温敏型口腔凝胶制备及其性能研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2023.
- [26] 王萌萌. 盐酸小檗碱脂质体凝胶的制备及其对湿疹的初步药效学评价 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
- [27] 王欣欣, 李思佳, 关洪全, 等. DNCB 对 BALB/c 小鼠特异性皮炎的诱导作用及其机制 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2020, 46(3): 439-443.
- [28] 段海丽, 陈豫凤, 张长城, 等. 基于 Notch1/HES1 通路探讨淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸支持细胞胶质细胞源性神经营养因子表达的影响 [J]. 中草药, 2025, 56(18): 6620-6631.
- [29] 刘畅. 黄连解毒汤抗特异性皮炎药效学研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2024.
- [30] 李康, 何羨霞, 贺智玲, 等. 土槿乙酸脂质体凝胶的制备、质量评价及对特异性皮炎小鼠的治疗作用 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31(16): 1623-1630.
- [31] Lortat-Jacob H, Baltzer F, Grimaud J A. Heparin decreases the blood clearance of interferon- γ and increases its activity by limiting the processing of its carboxyl-terminal sequence [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(27): 16139-16143.
- [32] 高永荣, 张力, 张丹参, 等. 蛇床子素包合物的制备及其兔体内生物利用度测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(12): 1143-1146.
- [33] 胡宇峰, 朱海婷, 张俊丽, 等. 基于响应面法、BP 神经网络结合 GA 的蛇床子素纳米混悬剂制备工艺优化及体外评价 [J]. 中国现代中药, 2026, 28(3): 565-574.
- [34] 管咏梅, 张煜薇, 陶颖, 等. 参柏温敏凝胶的制备及其对痔疮模型大鼠的药效作用 [J]. 中草药, 2024, 55(23): 7999-8010.
- [35] 朱卫丰, 刘水婷, 王万春, 等. 黄白温敏型原位凝胶的处方筛选与评价 [J]. 中草药, 2021(7): 1914-1923.
- [36] 张红梅, 邢建军, 陈慧, 等. 蛇床子素调节 Th1/Th2 平衡缓解特异性皮炎 [J]. 中国中西医结合杂志, 2025, 45(9): 1114-1119.
- [37] Hu X Q, Zhou Y, Shi J X, *et al*. Osthole relieves skin damage and inhibits chronic itch through modulation of Akt/ZO-3 pathway in atopic dermatitis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 947: 175649.
- [38] 龚慧, 赵信科, 蒋虎刚, 等. 蛇床子素药理作用及纳米递药系统研究进展 [J]. 药学研究, 2026, 45(2): 192-203.

[责任编辑 郑礼胜]