

## 聚乙二醇修饰大黄素/大黄酸脂质体温敏凝胶的制备、表征及对溃疡性结肠炎的治疗作用

刘艳菊<sup>1</sup>, 闫晓宇<sup>1</sup>, 王永飞<sup>2</sup>, 李晓婷<sup>1</sup>, 张景亮<sup>1</sup>, 杨 筱<sup>1</sup>, 崔 锋<sup>3\*</sup>

1. 郑州工业应用技术学院, 河南 郑州 451100

2. 新郑华信民生医院, 河南 郑州 451150

3. 山西锦烁生物医药科技有限公司, 山西 晋中 030600

**摘要:** 目的 制备聚乙二醇修饰的大黄素/大黄酸脂质体 (PEGylated emodin/rhein-liposomes, PEG-Emo/Rhe-Lips) 温敏凝胶, 考察其对溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 模型小鼠的治疗作用。方法 薄膜水化法制备 PEG-Emo/Rhe-Lips, 采用 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化处方; 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 PEG-Emo/Rhe-Lips 微观形貌; 将 PEG-Emo/Rhe-Lips 混悬液制备成温敏凝胶, 考察其体外释药行为。建立小鼠 UC 模型, 考察 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶对 UC 模型小鼠的治疗作用。结果 PEG-Emo/Rhe-Lips 最佳处方: 磷脂与胆固醇用量为 10.4:1, 总脂质和总药物用量比为 9.2:1, 磷脂与 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量比为 3.9:1。PEG-Emo/Rhe-Lips 的包封率、载药量、粒径及  $\zeta$  电位分别为 (83.72±1.09)%、(7.51±0.12)% 和 (199.22±9.06) nm 和 (-17.64±0.58) mV, 其形态近似球形。PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶表现出明显的缓释特征, 大黄酸和大黄素在 24 h 累积释放率分别为 88.16% 和 89.90%, 释药机制均为扩散与溶蚀共同协调。药效学结果显示, PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶高剂量组 (大黄素、大黄酸均为 25 mg/kg) 结肠长度、结肠湿质量、结肠指数和胸腺指数显著性增加 ( $P<0.05$ ), 疾病活动指数 (disease activity index, DAI)、肠黏膜损伤评分和脾脏指数显著性下降 ( $P<0.05, 0.01$ ), 其 UC 治疗效果更佳。结论 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶极大地提高了大黄素和大黄酸对 UC 的治疗作用, 无明显刺激性, 值得进一步开发。

**关键词:** 大黄酸; 大黄素; 聚乙二醇; 脂质体; 温敏凝胶; 溃疡性结肠炎; 薄膜水化法; Box-Behnken 设计-效应面法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)14-5006-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.14.007

## Preparation, characteration and therapeutic effects on ulcerative colitis of PEGylated emodin/rhein-liposomes thermosensitive gel

LIU Yanju<sup>1</sup>, YAN Xiaoyu<sup>1</sup>, WANG Yongfei<sup>2</sup>, LI Xiaoting<sup>1</sup>, ZHANG Jingliang<sup>1</sup>, YANG Xiao<sup>1</sup>, CUI Feng<sup>3</sup>

1. Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451100, China

2. Xinzheng Huaxin People's Hospital, Zhengzhou 451150, China

3. Shanxi Jinshuo Biopharmaceutical Technology Co., Ltd., Jinzhong 030600, China

**Abstract: Objective** To prepare PEGylated emodin/rhein-liposomes (PEG-Emo/Rhe-Lips) thermosensitive gel, and to investigate its therapeutic effects on ulcerative colitis (UC) model mice. **Methods** PEG-Emo/Rhe-Lips was prepared by film hydration method. Box-Behnken design-response surface method (BBD-RSM) was used to optimize preparations of PEG-Emo/Rhe-Lips. Micromorphology of PEG-Emo/Rhe-Lips was observed by transmission electron microscopy (TEM). PEG-Emo/Rhe-Lips suspension was prepared into thermosensitive gel, drug release *in vitro* of PEG-Emo/Rhe-Lips thermosensitive gel was also studied. UC model was established, the therapeutic effects of PEG-Emo/Rhe-Lips on colitis was studied. **Results** Optimal formulations of PEG-Emo/Rhe-Lips: dosage ratio of phospholipids to cholesterol was 10.4:1, dosage ratio of total lipids was 9.2:1, dosage ratio of phospholipids to DSPE-mPEG<sub>2000</sub> was 3.9:1. Encapsulation efficiency, drug loading, particle size and zeta potential of PEG-Emo/Rhe-

收稿日期: 2025-01-20

基金项目: 2024 年省科技攻关项目 (242102310456); 河南省高等学校重点科研项目 (24B416004); 河南省医学教育研究项目 (WJLX2023153); 山西省中央引导地方科技发展资金项目 (YDZJSX2024B014)

作者简介: 刘艳菊 (1983—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为临床药学及康复医学。Tel: (0371)62623433 E-mail: Ljiaoxue@163.com

\*通信作者: 崔 锋 (1982—), 男, 副研究员, 研究方向为制药新技术。Tel: (0354)3983668 E-mail: CuiF1982@qq.com

Lips were  $(83.72 \pm 1.09)\%$ ,  $(7.51 \pm 0.12)\%$ ,  $(199.22 \pm 9.06)$  nm and  $(-17.64 \pm 0.58)$  mV, respectively. The morphology of PEG-Emo/Rhe-Lips was approximately spherical. PEG-Emo/Rhe-Lips thermosensitive gel exhibited obvious sustained-release characteristics, and the cumulative release rate of emodin and rhein were 88.16% and 89.90% in 24 h, respectively. Drug release mechanism was coexistence of diffusion and matrix erosion. Pharmacodynamics showed that the length of colon, colon wet weight, colon index and thymus index of PEG-Emo/Rhe-Lips temperature-sensitive gel were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the disease activity index (DAI), intestinal mucosal damage score and spleen index were significantly decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ), which showed that the UC therapeutic effects of PEG-Emo/Rhe-Lips temperature-sensitive gel was better. **Conclusion** PEG-Emo/Rhe-Lips temperature-sensitive gel greatly enhanced the therapeutic effects of emodin and rhein on colitis with no obvious irritation. Therefore, it was worth further developing.

**Key words:** rhein; emodin; polyethyleneglycol; liposomes; thermosensitive gel; ulcerative colitis; film hydration method; Box-Behnken design-response surface method

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 主要表现为直肠出血、腹泻、体质量下降等, 被世界卫生组织列为难治性疾病之一<sup>[1]</sup>。目前, 治疗 UC 化学药物存在呕吐反应、血糖紊乱等不良反应<sup>[2]</sup>, 柳氮磺胺吡啶等药物还存在一定的致癌风险<sup>[2]</sup>, 因此医药研究者逐步将研发重心转向疗效好、安全性高的中医药领域。临床经验表明, 中药大黄可有效降低 UC 损伤<sup>[3-4]</sup>, 深入研究发现, 大黄药材中主要成分大黄酸 (rhein, Rhe) 和大黄素 (emodin, Emo) 对 UC 均具有良好治疗作用<sup>[5-6]</sup>, 2 种成分联合用药后可进一步提高 UC 治疗效果, 其作用机制可能与多靶点调控作用、下调促炎因子、抑制 PI3K/AKT 通路等有关<sup>[4]</sup>。但大黄酸和大黄素的溶解度分别仅为  $3.89 \mu\text{g/mL}$ <sup>[7]</sup> 和  $9.21 \mu\text{g/mL}$ <sup>[8]</sup>, 导致其溶出度较低, 油水分配系数分别为  $2.79$ <sup>[7]</sup> 和  $1.58$ <sup>[9]</sup>, 属于生物药剂学分类系统中 II 类药物。大黄酸和大黄素首关效应明显<sup>[10]</sup>, 口服给药会极大影响药效发挥。因此为确保大黄酸和大黄素治疗 UC 药效, 需要改变给药途径, 并改善其溶解度、溶出度等。大黄酸和大黄素有固体脂质纳米粒<sup>[10]</sup>、纳米混悬剂<sup>[11]</sup>、脂质体<sup>[12]</sup> 等制剂研究报道, 暂未见大黄酸和大黄素双载药纳米制剂研究报道。

脂质体 (liposomes, Lips) 是以胆固醇和磷脂为载体制得的一种纳米囊泡<sup>[13-14]</sup>, 可同时包载多种药物<sup>[15-16]</sup>。但普通脂质体结构稳定性差, 穿透肠道屏障能力较弱, 制约了药效发挥。PEG 修饰脂质体 (PEGylated liposomes, PEG-Lips) 可在其表面形成一层水化膜及“构象云”, 有利于增加其结构的稳定性<sup>[13,16]</sup>; PEG 修饰后可赋予脂质体亲水性, 使其易于透过肠道屏障而发挥治疗作用<sup>[17]</sup>。治疗 UC 时灌肠给药可显著提高病灶部位药物浓度, 但普通灌肠液在肠道内无法滞留, 易回流至体外。温敏凝胶

(thermosensitive gel, TG) 在低温环境中呈溶液状态, 当温度达到胶凝温度后即可变为凝胶状态, 从而赋予灌肠液较强的肠道黏附力, 解决了灌肠液易回流的缺陷, 是治疗 UC 的理想给药剂型<sup>[18-19]</sup>。本研究筛选了聚乙二醇修饰大黄素/大黄酸脂质体 (PEGylated emodin/rhein-liposomes, PEG-Emo/Rhe-Lips) 处方工艺, 使用泊洛沙姆作为温敏材料, 将 PEG-Emo/Rhe-Lips 混悬液制备成温敏凝胶。建立小鼠 UC 模型, 考察 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶对 UC 模型小鼠的治疗作用, 为后续研究开发奠定实验基础。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

MSE125P-CE 型电子天平, 德国 Sartorius 公司; SCO-1 型磁力搅拌器, 上海小聪科技有限公司; Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (HPLC), 美国 Agilent 公司; KQ-800DM 型超声仪, 昆山市超声仪器有限公司; Mastersizer 3000 型粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; FC5714 型高速离心机, 上海奥豪斯国际贸易有限公司; Talos F200i S/TEM 型透射电子显微镜, RS1 型高剪切流变仪, 赛默飞世尔上海仪器有限公司; System-4000 型溶出仪, 上海禄巨仪器设备有限公司; NWC-4 型旋转黏度计, 上海思尔达科学仪器有限公司; MarCal 16 GN 型游标卡尺, 上海首立实业有限公司; RM2016 型病理切片机, 德国 LEICA 公司; NIKON ECLIPSE CI 型光学显微镜, 日本尼康公司。

### 1.2 材料

对照品大黄素 (批号 110756-202112, 质量分数 96.2%)、大黄酸 (批号 110757-202104, 质量分数 99.2%), 中国食品药品检定研究院; 原料药大黄素 (批号 20220620, 质量分数 96.0%)、大黄酸 (批

号 20220711, 质量分数 98.0%), 南京景竹医药科技有限公司; DSPE-mPEG<sub>1000</sub> (批号 R054126)、DSPE-mPEG<sub>2000</sub> (批号 R053501) 和 DSPE-mPEG<sub>4000</sub> (批号 R145526) 均购自上海罗恩试剂有限公司; 大豆卵磷脂 (批号 SY-SO-220209)、胆固醇 (批号 C00373), 上海艾维拓医药科技公司; 泊洛沙姆 407 (P407, 批号 GNG06521B)、泊洛沙姆 188 (P188, 批号 GNG21488A), 德国 BASF 公司; 美沙拉嗪, 批号 SS0905CA24, 上海源叶生物科技有限公司; 葡聚糖硫酸钠, 相对分子质量 36 000~50 000, 批号 S5648, 美国 Biomedicals 公司; 多聚甲醛, 批号 BL539A, 美国 Biosharp 公司; 苏木素-伊红染液, 批号 B1002, 武汉百仟度生物科技有限公司。

### 1.3 动物

健康昆明小鼠 (SPF 级), 雄性, 体质量 18~22 g, 购自河南省动物实验中心, 生产许可证号 SCXK (豫) 2020-0001。实验过程遵循郑州工业应用技术学院有关实验动物管理规定, 均符合 3R 原则, 动物伦理批准号 20240318。

## 2 方法与结果

### 2.1 PEG-Emo/Rhe-Lips 的制备

前期研究表明, 大黄酸和大黄素用量比为 1:1 时治疗 UC 效果最佳<sup>[4-6]</sup>, 故制备 PEG-Emo/Rhe-Lips 时两者用量比定为 1:1。取 20 mg 大黄酸和 20 mg 大黄素置于茄形瓶中, 加入处方量的卵磷脂、胆固醇和 DSPE-mPEG<sub>2000</sub>, 加入有机溶剂 (氯仿-乙醇 3:1) 50 mL, 密封置于 45 °C 水浴中, 磁力搅拌至溶解澄清, 减压旋蒸后即得透明、均匀的脂质薄膜。取一定体积的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为水相, 恒温至 45 °C 后加至含脂质薄膜的茄形瓶中, 置于 45 °C 水浴中, 于 700 r/min 转速下磁力搅拌一定时间, 200 W 功率下超声 10 min, 过 0.45 μm 水膜即得 PEG-Emo/Rhe-Lips 混悬液<sup>[20-21]</sup>。不含大黄素和大黄酸的阴性样品 (PEG-Lips) 同法制备。

### 2.2 HPLC 法测定大黄素和大黄酸含量

**2.2.1 色谱条件** 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (70:30); 检测波长为 254 nm; 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 进样量为 10 μL; 柱温为 35 °C; 体积流量为 1.0 mL/min。

**2.2.2 PEG-Emo/Rhe-Lips 供试品溶液的制备** 精密吸取 PEG-Emo/Rhe-Lips 混悬液 1 mL 至 50 mL 量瓶中, 加入有机溶剂 (氯仿-乙醇 3:1) 约 30 mL, 超声 5 min 使大黄素和大黄酸游离出来, 加乙腈-0.1%

磷酸水溶液 (70:30) 稀释定容。取续滤液 2.5 mL 至 10 mL 量瓶中, 加乙腈-0.1%磷酸水溶液 (70:30) 稀释定容, 即得 PEG-Emo/Rhe-Lips 供试品溶液。

**2.2.3 线性关系考察** 精密称取 20 mg 大黄酸对照品和 20 mg 大黄素对照品至 50 mL 量瓶中, 加乙腈超声溶解后定容, 得大黄酸和大黄素质量浓度均为 400 μg/mL 的混合对照品储备液。采用乙腈-0.1%磷酸水溶液 (70:30) 将大黄酸和大黄素混合对照品储备液稀释, 配制成质量浓度分别为 10.00、5.00、2.50、1.00、0.50、0.05 μg/mL 的系列对照品溶液。按照“2.2.1”项下色谱条件测定大黄酸和大黄素各质量浓度 (X) 的峰面积 (Y), 进行线性回归, 得标准曲线线性回归方程分别为大黄酸  $Y=26.1547X+0.2882$ ,  $r=0.9999$ ; 大黄素  $Y=28.1540X+0.1569$ ,  $r=0.9998$ , 结果表明大黄酸和大黄素均在 0.05~10.00 μg/mL 线性关系良好。

**2.2.4 专属性考察** 取阴性样品, 按照“2.2.2”项下方法处理得阴性样品溶液, 另取大黄酸和大黄素混合对照品溶液 (质量浓度均为 1.00 μg/mL) 和 PEG-Emo/Rhe-Lips 供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测试, 结果见图 1, 结果表明辅料及溶剂对大黄酸和大黄素色谱峰无干扰, 专属性高。

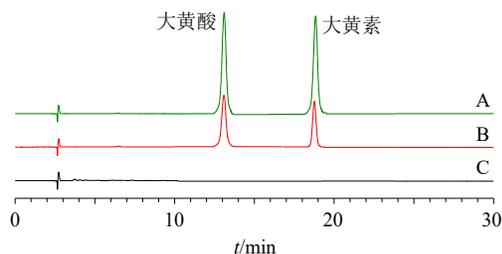


图 1 PEG-Emo/Rhe-Lips 样品 (A)、大黄酸和大黄素混合对照品 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of PEG-Emo/Rhe-Lips (A), rhein and emodin mixed reference substances (B) and negative sample (C)

**2.2.5 精密度考察** 取大黄酸和大黄素质量浓度分别为 0.05、1.00、10.00 μg/mL 的混合对照品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 计算得大黄酸低、中、高质量浓度峰面积的 RSD 分别为 0.68%、0.26%、0.20%; 大黄素低、中、高质量浓度峰面积的 RSD 分别为 0.44%、0.38%、0.24%, 结果表明该仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性考察** 取 PEG-Emo/Rhe-Lips 供试品溶液, 分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 进样 10 μL, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定大黄酸和大黄

素峰面积, 计算得大黄酸、大黄素峰面积的 RSD 分别为 1.26%、0.81%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.2.7 重复性考察** 取同一份 PEG-Emo/Rhe-Lips 混悬液, 按照“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定大黄酸和大黄素峰面积, 计算得大黄酸和大黄素质量浓度的 RSD 分别为 0.76%、1.24%, 结果表明该方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率考察** 分别精密吸取 PEG-Emo/Rhe-Lips 混悬液 0.5 mL 至 9 个 50 mL 量瓶中, 随机分成低、中、高 3 组。分别加入大黄酸和大黄素质量浓度均为 200 μg/mL 的混合对照品溶液 0.50、0.75、1.00 mL, 按照“2.2.2”项下方法制备 PEG-Emo/Rhe-Lips 供试品溶液, 测定大黄酸和大黄素总量。计算得大黄酸的平均加样回收率为 101.04%, RSD 为 0.94%; 大黄素的平均加样回收率为 99.48%, RSD 为 1.17%, 结果表明该方法准确度较高。

### 2.3 PEG-Emo/Rhe-Lips 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位测定

取 PEG-Emo/Rhe-Lips 混悬液, 过 0.45 μm 微孔水膜, 取 1 mL 置于超滤管(截留相对分子质量为 8 500)中, 12 500 r/min 离心(离心半径 6.4 cm) 15 min, 测定超滤液中游离大黄酸和大黄素的总药量 ( $M_{总游离}$ )<sup>[21]</sup>。根据大黄酸和大黄素的总投药量 ( $M_{总药量}$ ) 计算包封率。根据大黄素、大黄酸及各辅料总用量 ( $W_{总用量}$ ) 计算载药量。采用纯化水将 PEG-Emo/Rhe-Lips 混悬液稀释 20 倍, 摇匀后于粒度仪上测定粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位。

$$\text{包封率} = (M_{总药量} - M_{总游离}) / M_{总药量}$$

$$\text{载药量} = (M_{总药量} - M_{总游离}) / W_{总用量}$$

### 2.4 单因素考察 PEG-Emo/Rhe-Lips 处方及制备工艺

总脂质指的是磷脂、胆固醇和 DSPE-mPEG 总量, 总药量指的是大黄酸和大黄素的总投药量。PEG-Emo/Rhe-Lips 的基础处方为总脂质和总药量比(脂药比)为 10:1、磷脂与胆固醇用量比为 10:1、磷脂与 DSPE-mPEG 用量比为 4.0:1、水化体积为 30 mL、水化时间为 30 min, 每次单因素考察仅改变 1 个条件, 其他条件均保持不变。

**2.4.1 DSPE-mPEG 型号选择** 参考基础处方, 考察 DSPE-mPEG 型号对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响, 结果见表 1。随着 mPEG 相对分子质量的增

表 1 DSPE-mPEG 型号对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effects of DSPE-mPEG model on preparation of PEG-Emo/Rhe-Lips ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

DSPE-mPEG 型号	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
DSPE-mPEG <sub>1000</sub>	65.46 ± 1.10	5.78 ± 0.21	250.32 ± 13.16
DSPE-mPEG <sub>2000</sub>	73.01 ± 1.29	6.49 ± 0.18	244.15 ± 10.45
DSPE-mPEG <sub>4000</sub>	60.76 ± 0.78	5.17 ± 0.15	349.71 ± 26.22

加, PEG-Emo/Rhe-Lips 包封率和载药量均呈先增加后下降, 可能是因为 mPEG 相对分子质量较小时, PEG-Emo/Rhe-Lips 表明致密性不足, 浅表层药物易泄漏, 故其包封率和载药量较低; mPEG 相对分子质量较大时, PEG-Emo/Rhe-Lips 粒径较大, 脂质体稳定性较差<sup>[20]</sup>, 使其包封率和载药量下降。故采用 mPEG 相对分子质量适中的 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 来制备 PEG-Emo/Rhe-Lips。

**2.4.2 磷脂与胆固醇用量比考察** 参考 PEG-Emo/Rhe-Lips 基础处方, 考察磷脂与胆固醇用量比对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响, 结果见表 2。PEG-Emo/Rhe-Lips 包封率和载药量均随着磷脂与胆固醇用量比下降呈先增加后减小趋势, 可能是因为磷脂与胆固醇用量比较大时, 胆固醇竞争占据 PEG-Emo/Rhe-Lips 载药空间, 使其包封率和载药量较低<sup>[15]</sup>; 当磷脂与胆固醇用量比较小时, PEG-Emo/Rhe-Lips 稳定性较低<sup>[16]</sup>, 大黄素和大黄酸易泄露出去; 粒径随着磷脂与胆固醇用量比下降总体呈减小趋势。综合考虑, 选择磷脂与胆固醇用量比 8:1~12:1 进行后续响应面优化。

**2.4.3 脂药比考察** 参考 PEG-Emo/Rhe-Lips 基础处方, 考察脂药比对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响, 结果见表 3。PEG-Emo/Rhe-Lips 包封率随着脂药比的增加呈先增加后趋稳情况, 这可能是由于增加脂质用量, 为药物提供了更多载药空间<sup>[22]</sup>, 有利

表 2 磷脂与胆固醇用量比对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effects of phospholipids to cholesterol ratio on preparation of PEG-Emo/Rhe-Lips ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

磷脂与胆固醇 用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
6:1	65.02 ± 0.78	5.84 ± 0.23	248.71 ± 12.40
8:1	72.66 ± 1.14	6.47 ± 0.15	237.62 ± 10.83
10:1	78.29 ± 0.97	7.11 ± 0.16	219.48 ± 9.95
12:1	74.89 ± 0.96	6.69 ± 0.24	210.20 ± 11.84
14:1	70.81 ± 1.05	6.34 ± 0.13	211.92 ± 10.77

表3 脂药比对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 3 Effects of lipid-drug ratio on preparation of PEG-Emo/Rhe-Lips ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

脂药比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
6 : 1	64.19±0.68	9.07±0.19	194.58±9.36
8 : 1	72.81±1.14	8.11±0.14	203.79±11.24
10 : 1	79.34±0.99	7.19±0.22	207.23±13.04
12 : 1	80.50±1.07	6.06±0.15	234.84±10.88
14 : 1	80.97±0.86	5.44±0.13	253.69±11.75

于提高其包封率,但继续提高脂药比时,不能使其包封率进一步增加。载药量随着脂药比的增加而逐渐下降,表明脂质用量过大时导致原料浪费;粒径随着脂药比的增加而呈现增长趋势,可能是因为脂质用量过大时,PEG-Emo/Rhe-Lips 之间容易发生黏连<sup>[15]</sup>。综合考虑,选择脂药比 8 : 1~12 : 1 进行后续响应面优化。

**2.4.4 磷脂与 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量比考察** 参考 PEG-Emo/Rhe-Lips 基础处方,考察磷脂与 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量比对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响,结果见表 4。随着磷脂与 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量比的增加,包封率和载药量均呈先增大后下降趋势,可能是因为适度增加 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量,有利于减少浅表层药物泄漏<sup>[15]</sup>,使其包封率和载药量提高;但 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量较大时,由于其 PEG 长链的排斥效应,影响了 PEG-Emo/Rhe-Lips 表明致密性<sup>[18]</sup>,导致药物易泄漏。综合考虑,选择磷脂与 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量比 3.5 : 1~4.5 : 1 进行后续响应面优化。

**2.4.5 水化体积考察** 参考 PEG-Emo/Rhe-Lips 基础处方,考察水化体积对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响,结果见表 5。随着水化体积的增加,PEG-Emo/Rhe-Lips 包封率和载药量均先增加后下降,可能是

表4 磷脂与 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量比对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 4 Effects of phospholipids to DSPE-mPEG<sub>2000</sub> ratio on preparation of PEG-Emo/Rhe-Lips ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

磷脂与 DSPE-mPEG <sub>2000</sub> 用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
3.0 : 1	69.48±0.94	6.33±0.24	234.89±10.58
3.5 : 1	74.17±1.17	6.74±0.13	226.10±11.24
4.0 : 1	78.69±0.90	7.23±0.17	208.00±12.09
4.5 : 1	73.07±1.11	6.53±0.19	217.23±9.74
5.0 : 1	70.16±1.13	6.37±0.20	216.01±10.18

表5 水化体积对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 5 Effects of hydration volume on preparation of PEG-Emo/Rhe-Lips ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

水化体积/mL	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
20	68.27±1.06	6.14±0.13	268.10±21.66
25	75.16±0.95	6.77±0.24	249.72±15.47
30	77.43±1.08	6.96±0.17	197.57±10.94
35	74.19±0.98	6.54±0.10	198.94±11.23
40	72.56±0.87	6.29±0.24	194.45±12.61

因为水化体积较小时,不利于磷脂的充分水化及载药空间的形成<sup>[16]</sup>,故影响了其包封率和载药量,且粒径也较大;水化体积较大时,影响了 PEG-Emo/Rhe-Lips 的结构稳定性<sup>[13]</sup>,易使药物进入水相;粒径随着水化体积增加呈下降趋势。当水化体积为 30 mL 时,PEG-Emo/Rhe-Lips 包封率及载药量相对较高,粒径小于 200 nm,故确定水化体积为 30 mL。

**2.4.6 水化时间考察** 参考 PEG-Emo/Rhe-Lips 基础处方,考察水化时间对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响,结果见表 6。随着水化时间的延长,包封率和载药量均呈先增大后下降趋势,可能是因为适当的水化时间,有利于 PEG-Emo/Rhe-Lips 载药,但水化时间过长时,可能对磷脂化学稳定性及 PEG-Emo/Rhe-Lips 结构稳定性产生影响,导致其包封率和载药量下降,粒径增长。由于水化时间为 25 min 时,包封率及载药量相对较高,粒径相对较小,故确定水化时间为 25 min。

表6 水化时间对 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 6 Effects of hydration time on preparation of PEG-Emo/Rhe-Lips ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

水化时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
20	76.69±1.13	6.79±0.13	216.22±10.12
25	82.56±0.89	7.34±0.22	196.25±9.94
30	78.99±0.94	6.98±0.18	204.78±12.07
35	73.12±1.16	6.52±0.13	215.71±12.62
40	70.78±0.94	6.20±0.16	247.43±14.47

## 2.5 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 PEG-Emo/Rhe-Lips 处方

**2.5.1 试验设计及结果** 选择磷脂与胆固醇用量比、脂药比、磷脂与 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量比作为 PEG-Emo/Rhe-Lips 制备的主要影响因素  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ , 各因素水平设置见表 7。包封率、载药量和粒径作为

PEG-Emo/Rhe-Lips 优化指标  $Y_1$ 、 $Y_2$  和  $Y_3$ ，为使包封率和载药量相对较高，且粒径相对较小，故将  $Y_1$ 、 $Y_2$  和  $Y_3$  转换为总评归一值 (overall desirability, OD)。其中，包封率  $d_{\text{包封率}}$  和载药量  $d_{\text{载药量}}$  计算公式均为  $d_{\text{max}}=(M_i-M_{\text{min}})/(M_{\text{max}}-M_{\text{min}})$ ，粒径  $d_{\text{粒径}}$  计算公式为  $d_{\text{min}}=(M_{\text{max}}-M_i)/(M_{\text{max}}-M_{\text{min}})$ ， $M_i$ 、 $M_{\text{max}}$  和  $M_{\text{min}}$  分别为实测值、最大值和最小值，则  $OD=(d_{\text{包封率}}d_{\text{载药量}}d_{\text{粒径}})^{1/3}$ 。实验结果见表 7。

**2.5.2 模型拟合与方差分析** 使用 Design Expert V 13.0 软件对 PEG-Emo/Rhe-Lips 的 OD 进行拟合，得 OD 多元二次项方程： $OD=0.800+0.068X_1-0.140X_2-0.110X_3-0.057X_1X_2-0.130X_1X_3+3.840\times 10^{-3}X_2X_3-0.310X_1^2-0.200X_2^2-0.290X_3^2$ ，模型系数  $R^2$  和修正系数  $R_{\text{adj}}^2$  分别为 0.955 3 和 0.907 9，均大于

0.9；数学模型  $P=0.000 6$ ，方差分析结果见表 8，表明该模型具有极显著性意义；失拟项  $P=0.073 1$  ( $P>0.05$ )，表明预测结果可信度较高。据  $F$  值数值可知，主要影响因素大小顺序为脂药比  $X_2>$  磷脂与 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量比  $X_3>$  磷脂与胆固醇用量比  $X_1$ 。从 OD 方差分析结果可知， $X_3$ 、 $X_1X_3$  均具有显著性差异 ( $P<0.05$ )， $X_2$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  均具极显著差异 ( $P<0.01$ )。

**2.5.3 效应面结果、优化结果及最佳处方确定** 响应面图见图 2，随着任意两因素用量比的增加，OD 值均呈先增加后下降趋势。选择 OD 值优化目标为最大值，取值范围为 0~1，得 PEG-Emo/Rhe-Lips 最佳处方为磷脂与胆固醇用量比  $X_1$  10.39：1，脂药比  $X_2$  9.21：1，磷脂与 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量比  $X_3$

表 7 BBD-RSM 试验设计及结果 (n = 3)

Table 7 Design and results of BBD-RSM test (n = 3)

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3/\%$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\text{nm}$	OD	试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3/\%$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\text{nm}$	OD
1	10 : 1 (0)	10 : 1 (0)	4.0 : 1 (0)	83.74	7.21	198.22	0.856	10	8 : 1	12 : 1	4.0 : 1	73.28	5.54	224.84	0.154
2	12 : 1 (+1)	10 : 1	3.5 : 1 (-1)	74.17	6.69	211.41	0.451	11	8 : 1	8 : 1	4.0 : 1	70.64	7.64	210.77	0.204
3	10 : 1	10 : 1	4.0 : 1	81.43	7.33	207.26	0.768	12	12 : 1	12 : 1	4.0 : 1	75.42	5.72	219.64	0.278
4	10 : 1	10 : 1	4.0 : 1	81.13	7.24	206.89	0.755	13	10 : 1	10 : 1	4.0 : 1	83.18	7.36	197.38	0.872
5	8 : 1 (-1)	10 : 1	4.5 : 1 (+1)	72.57	6.49	238.27	0.228	14	10 : 1	8 : 1	4.5 : 1	72.47	7.89	224.96	0.398
6	10 : 1	8 : 1 (-1)	3.5 : 1	74.62	8.21	205.71	0.642	15	10 : 1	10 : 1	4.0 : 1	82.46	7.18	209.54	0.757
7	10 : 1	12 : 1 (+1)	4.5 : 1	71.97	5.44	248.24	0.000	16	8 : 1	10 : 1	3.5 : 1	71.63	6.47	242.36	0.156
8	12 : 1	10 : 1	4.5 : 1	70.45	6.28	227.66	0.000	17	12 : 1	8 : 1	4.0 : 1	73.14	7.86	198.11	0.558
9	10 : 1	12 : 1	3.5 : 1	76.41	5.55	214.29	0.228								

表 8 OD 值方差分析

Table 8 Variance analysis of OD value

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.38	9	0.15	16.62	0.000 6	$X_1^2$	0.39	1	0.39	42.73	0.000 3
$X_1$	0.04	1	0.04	4.02	0.084 9	$X_2^2$	0.16	1	0.16	17.82	0.003 9
$X_2$	0.16	1	0.16	17.70	0.004 0	$X_3^2$	0.35	1	0.35	37.63	0.000 5
$X_3$	0.09	1	0.09	9.82	0.016 5	残差	0.07	7	$9.22\times 10^{-3}$		
$X_1X_2$	0.01	1	0.01	1.42	0.271 9	失拟项	0.05	3	0.02	5.18	0.073 1
$X_1X_3$	0.07	1	0.07	7.41	0.029 7	纯偏差	0.01	4	$3.30\times 10^{-3}$		
$X_2X_3$	$5.90\times 10^{-5}$	1	$5.90\times 10^{-5}$	$6.40\times 10^{-3}$	0.938 5	总离差	1.44	16			

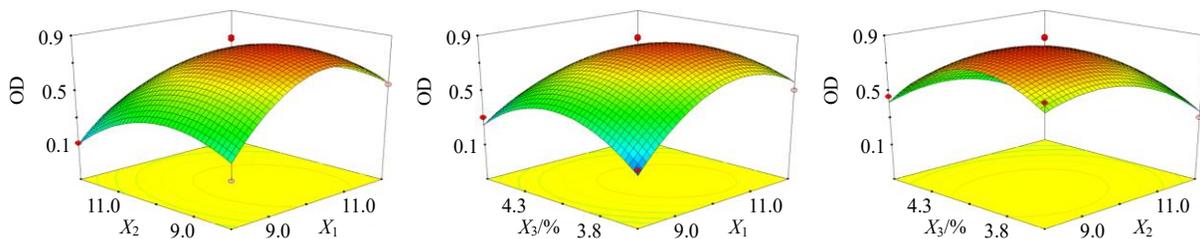


图 2 两因素之间交互作用的响应面图

Fig. 2 Response surface diagram of interaction effects between two factors

3.88 : 1, OD 值为 0.902。为便于操作, 将磷脂与胆固醇用量比调整为 10.4 : 1, 脂药比调整为 9.2 : 1, 磷脂与 DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 用量比调整为 3.9 : 1。

**2.5.4 PEG-Emo/Rhe-Lips 最佳处方验证** 平行制备 3 批 PEG-Emo/Rhe-Lips, 测得其平均包封率、载药量和粒径分别为 (83.72 ± 1.09) %、(7.51 ± 0.12) % 和 (199.22 ± 9.06) nm (图 3-A); 按照“2.5.1”项下方法计算得实际 OD 值为 0.896, 根据预测 OD 值 (0.902), 计算得实际 OD 相对偏差为 -0.67%, 表明该数学模型预测性良好。

另外, 测得 PEG-Emo/Rhe-Lips 平均 PDI 值为 0.089 ± 0.009, 平均 ζ 电位为 (-17.64 ± 0.58) mV (图 3-B)。按照“2.3”项下方法, 测得 PEG-Emo/Rhe-Lips 中大黄酸的平均包封率和载药量分别为 (85.16 ± 0.88) % 和 (3.87 ± 0.16) %, 大黄素的平均包封率和载药量分别为 (81.14 ± 1.43) % 和 (3.40 ± 0.10) %。

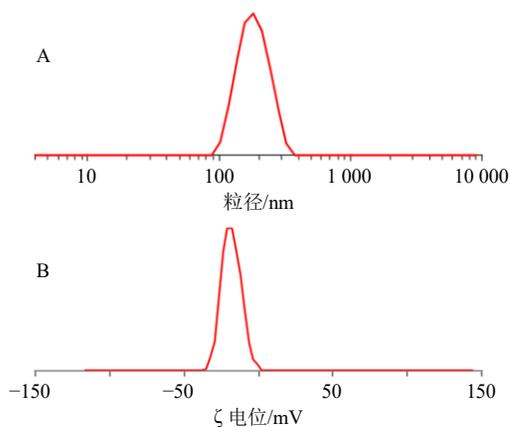


图 3 PEG-Emo/Rhe-Lips 粒径 (A) 和 ζ 电位 (B)  
Fig. 3 Particle size (A) and ζ potential (B) of PEG-Emo/Rhe-Lips

### 2.6 PEG-Emo/Rhe-Lips 的 TEM 观察

TEM 测试条件: 放大倍数为 14 500, 加速电压为 200 kV, 线分辨率为 0.14 nm。取 PEG-Emo/Rhe-Lips 混悬液滴至铜网上, 轻轻摇晃使之铺展, 1.5% 磷钨酸钠染色, 晾干, TEM 观察 PEG-Emo/Rhe-Lips 形貌。同法测试空白介质的 TEM, 结果未观察到囊泡结构 (图 4-A); 而 PEG-Emo/Rhe-Lips 可观察到囊泡结构, 形态近似球形 (图 4-B)。

### 2.7 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶的制备

**2.7.1 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶制备工艺** 分别称取处方量 P407 和 P188 置于烧杯, 加入 PEG-Emo/Rhe-Lips 混悬液 100 mL (大黄素 + 大黄酸总质量浓度为 1.10 mg/mL), 冰浴中搅拌均匀, 密封, 置于 4 °C 冰箱中溶胀 12 h, 即得 PEG-Emo/Rhe-Lips

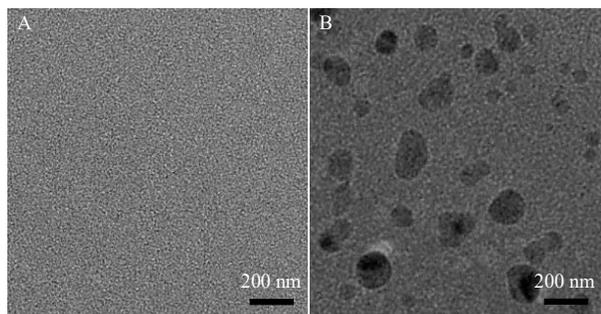


图 4 空白介质 (A) 和 PEG-Emo/Rhe-Lips (B) 的 TEM 图 (×15 000)

Fig. 4 TEM of blank medium (A) and PEG-Emo/Rhe-Lips (B) (×15 000)

温敏凝胶。大黄酸温敏凝胶、大黄素温敏凝胶和大黄酸 + 大黄素温敏凝胶同法制备。

**2.7.2 胶凝温度的测定** 取 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶, 置于试管中, 置于水浴中, 使水浴液面超过样品液面 1 cm, 以 0.2 °C/min 缓慢升温, 每升温 0.5 °C 倒置试管观察, 将凝固时温度作为胶凝温度。为了使温敏凝胶在给药部位迅速胶凝, 胶凝温度应低于体温 (37 °C); 为确保凝胶在室温 (25 °C) 下不胶凝, 胶凝温度应大于 30 °C, 故选择 33 °C 作为最佳胶凝温度<sup>[23]</sup>。

**2.7.3 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶处方筛选** 结果见表 9, 当 P407 质量分数均为 18% 时, 随着 P188 质量分数的升高, 胶凝温度逐渐升高; P188 质量分数均为 3% 时, 随着 P407 质量分数的升高, 胶凝温度逐渐下降。P407 和 P188 质量分数分别为 18% 和 3% 时, 所用辅料量相对较小, 胶凝温度与筛选目标 (33 °C) 较为接近, 外观见图 5。

### 2.8 PEG-Emo/Rhe-Lips-TG 温敏凝胶流变学研究

测试条件: 温度设定为 35 °C (使之发生胶凝), 振荡模式下应变设置为 1%, 范围设置为 0.01 ~ 100.00 Hz。结果见图 6, 储能模量 (G') 始终大于损耗模量 (G''), 表明 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶在

表 9 P407 和 P188 质量分数对 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶胶凝温度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 9 Effects of mass fraction of P407 and P188 on gelation temperature of PEG-Emo/Rhe-Lips thermosensitive gel ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

P407/%	P188/%	胶凝温度/°C	P407/%	P188/%	胶凝温度/°C
18	2	31.34 ± 0.25	19	3	32.91 ± 0.42
18	3	33.57 ± 0.32	20	3	31.74 ± 0.26
18	4	35.63 ± 0.38			



图5 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶在不同温度下的外观  
Fig. 5 Appearance of PEG-Emo/Rhe-Lips thermosensitive gel at different temperatures

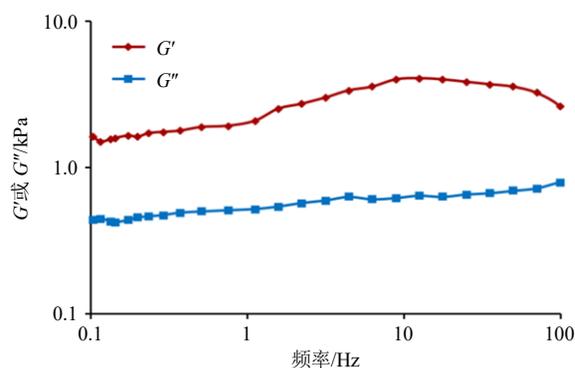


图6 频率扫描考察

Fig. 6 Investigation of frequency scanning

33 °C 发生胶凝后具有明显的黏弹性固体性质,可能与温敏凝胶形成的三维网状结构有关<sup>[24]</sup>。

### 2.9 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶体外释药行为研究

取大黄酸温敏凝胶和 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶适量(大黄酸含量均为 15 mg),加入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液(含 1% SDS),密封于透析袋(截留相对分子质量为 8 000)中。pH 7.4 磷酸盐缓冲液(含 1% SDS)900 mL 作为释放介质,仪器转速 75 r/min,介质温度为 37 °C,分别于 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00、18.00、24.00 h 取 5 mL 样品,立即补充 5 mL 空白释放介质。测定大黄酸质量浓度,分别计算累积释放率,结果见图 7-A。同法比较大黄素温敏凝胶和 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶体外释药行为,结果见图 7-B。大黄酸温敏凝胶和大黄素温敏凝胶在 4 h 累积释放率均大于 90%,而 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶表现出缓释特征,大黄酸和大黄素的 24 h 累积释放率分别为 88.16%和 89.90%。

PEG-Emo/Rhe-Lips 释药模型拟合结果见表 10,大黄酸和大黄素的释药行为均符合 Weibull 模型。

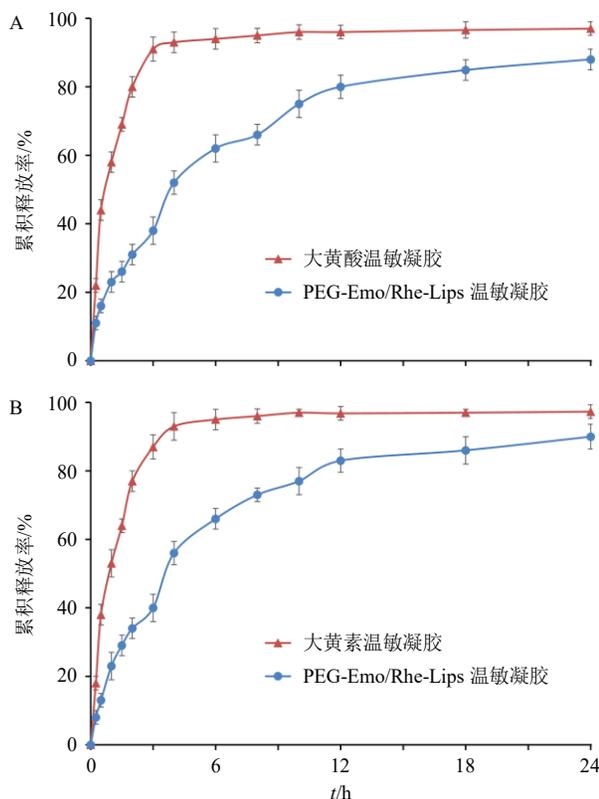


图7 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶中大黄酸 (A) 和大黄素 (B) 体外释药行为 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 *In vitro* drug release behavior of rhein (A) and emodin (B) from PEG-Emo/Rhe-Lips thermosensitive gel ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶中大黄酸和大黄素 Ritger-Pepps 系数  $n$  分别为 0.491 0 和 0.491 9,由于  $0.45 < n < 0.89$ ,表明 2 种成分释药机制为扩散与溶蚀共存<sup>[25]</sup>。

### 2.10 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶稳定性研究

取 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶,密封后存放于 4 °C 冰箱中,分别于 0、1、2、3、6 个月取适量温敏凝胶观察外观,并测试其胶凝时间、粒径及溶液的 pH 值<sup>[26]</sup>。分别测定新制备和储存过程中 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶的包封率,计算渗漏率<sup>[27]</sup>。结果(表 11)显示,PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶外观和胶凝时间未发生明显变化,渗漏率均低于 2%,粒径略增大,pH 值基本不变,表明 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶在低温、密封储存时稳定性良好。

渗漏率 = (新制备样品包封率 - 储存过程中样品包封率) / 新制备样品包封率

### 2.11 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶药效学研究

2.11.1 建模、分组与给药 小鼠于实验室适应 1 周,每天按 0.2 g/kg 剂量 ig 给予葡聚糖硫酸钠溶液(质

表 10 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶中大黄酸和大黄素累积释放模型拟合和相关系数

Table 10 Fitting release model and coefficient of rhein and emodin in PEG-Emo/Rhe-Lips thermosensitive gel

模型	拟合方程	
	大黄酸	大黄素
零级释放	$M_t/M_\infty=0.032\ 2\ t+0.273\ 0, R^2=0.711\ 9$	$M_t/M_\infty=0.032\ 7\ t+0.298\ 1, R^2=0.673\ 1$
一级释放	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.086\ 7\ t-0.285\ 4, R^2=0.918\ 9$	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.094\ 6\ t-0.321\ 2, R^2=0.901\ 8$
Higuchi	$M_t/M_\infty=0.191\ 0\ t^{1/2}+0.071\ 5, R^2=0.935\ 2$	$M_t/M_\infty=0.197\ 2\ t^{1/2}+0.086\ 2, R^2=0.913\ 7$
Weibull	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.695\ 6\ \ln t-1.350\ 2, R^2=0.985\ 9$	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.718\ 8\ \ln t-1.287\ 7, R^2=0.983\ 2$
Ritger-Pepps	$\ln(M_t/M_\infty)=0.491\ 0\ t-1.396\ 7, R^2=0.952\ 3$	$\ln(M_t/M_\infty)=0.491\ 9\ t-1.342\ 5, R^2=0.934\ 5$

$M_t$ 和 $M_\infty$ 为 $t$ 和 $\infty$ 时间累积释放率,  $M_t/M_\infty$ 为 $t$ 时间累积释放百分率。

$M_t$  and  $M_\infty$  are accumulative drug-release at time  $t$  and  $\infty$ ,  $M_t/M_\infty$  is accumulative release rate at time  $t$ .

表 11 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶稳定性考察结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 11 Stability investigation results of PEG-Emo/Rhe-Lips thermosensitive gel ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

取样时间/月	性状	胶凝时间/s	泄漏率/%	粒径/nm	pH 值
0	质地细腻、外观均一	17.84±1.54	1.26±0.14	207.12±8.16	6.66±0.15
1	质地细腻、外观均一	17.56±2.05	1.18±0.16	201.88±7.86	6.70±0.20
2	质地细腻、外观均一	18.03±2.20	1.42±0.09	203.19±10.24	6.59±0.18
3	质地细腻、外观均一	17.75±1.85	1.67±1.17	208.90±10.63	6.74±0.13
6	质地细腻、外观均一	17.79±1.93	1.69±1.25	215.48±9.97	6.71±0.17

量浓度为 35 mg/mL), 连续 8 d, 记录小鼠造模前后大便情况及体质量, 按表 12 方法评价疾病活动指数 (disease activity index, DAI), 选择 DAI 大于 5 分的小鼠作为 UC 模型, 共 56 只。随机分为模型组 (等体积 0.9%氯化钠溶液)、阳性组 (美沙拉嗪, 0.5 g/kg)、大黄酸温敏凝胶组 (25 mg/kg)、大黄素温敏凝胶组 (25 mg/kg)、大黄酸+大黄素温敏凝胶组 (大黄酸、大黄素均为 25 mg/kg)、PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶低剂量组 (大黄酸、大黄素均为 15 mg/kg) 和 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶高剂量组 (大黄酸、大黄素均为 25 mg/kg), 每组均 8 只, 另取 8 只正常小鼠作为对照组 (等体积 0.9%氯化钠溶液), 各

表 12 DAI 评分标准

Table 12 DAI scoring criteria

指标	0分	1分	2分	3分	4分
体质量下降幅度	无变化	1%~5%	6%~10%	11%~15%	大于 15%
大便形状	正常	松软	松散	稀便	水样便
大便隐血情况	无血便	极少	较少	较多	大量

组小鼠每天灌肠 1 次, 连续治疗 14 d。

2.11.2 治疗后各组小鼠 DAI 评分结果 DAI 评分结果见表 13。与对照组相比, 模型组第 1 天 DAI 评分有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 表明建模成功。与模型组相比, 各给药组第 7、14 天 DAI 评分均有显著性或极显著性下降 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 表明各给药

表 13 各组小鼠 DAI 评分结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 13 Results of DAI score in different rat groups ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	DAI 评分		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
对照	-	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	-	6.19±1.83**	5.53±1.64**	4.27±1.48**
阳性药 (美沙拉嗪)	500	6.54±1.77	2.82±1.19###	0.86±0.67###
大黄酸温敏凝胶	25	6.24±1.60	4.43±1.01#	3.72±0.99#
大黄素温敏凝胶	25	6.40±1.85	4.58±1.43#	3.49±0.86#
大黄酸+大黄素温敏凝胶	25+25	6.23±1.27	2.72±1.16###	1.53±0.89###
PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶	15+15	6.58±1.66	2.34±1.42###	1.88±0.97###
	25+25	6.47±1.55	1.84±0.97###Δ	0.71±0.64###Δ

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与大黄酸+大黄素温敏凝胶组比较: Δ $P < 0.05$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group; Δ $P < 0.05$  vs rhein + emodin thermosensitive gel group.

组均可缓解模型小鼠 UC 症状。与大黄素+大黄酸温敏凝胶组相比, PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶低剂量组第 7、14 天无显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 表明 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶有助于降低大黄素和大黄酸给药剂量; PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶高剂量组在给药剂量相同的条件下 (大黄酸、大黄素均为 25 mg/kg), 第 7、14 天 DAI 评分显著性下降 ( $P < 0.05$ ), 表明 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶增强了二者药效。

**2.11.3 结肠长度、湿质量、结肠指数、肠黏膜损伤评分、胸腺指数及脾脏指数的测定** 颈椎脱臼处死小鼠后取出结肠, 记录长度。采用 0.9%氯化钠溶液冲洗结肠, 滤纸吸干水分, 记录结肠湿质量, 计算结肠指数。

$$\text{结肠指数} = \text{结肠湿质量} / \text{体质量}$$

对肠黏膜损伤程度进行评分, 全肠正常评分为 0; 轻度充血, 无损伤时评分为 1; 结肠水肿充血, 存在损伤、肠粘连情况时评分为 2; 结肠充血严重,

肠黏膜表明及肠壁表明有坏死现象, 损伤最大直径小于 1 cm 时评分为 3; 结肠严重充血, 黏膜表明及肠壁表明有大面积坏死现象, 损伤最大直径大于 1 cm 时评分为 4。结果见表 14。与对照组相比, 模型组结肠长度、结肠湿质量和结肠指数均极显著性下降 ( $P < 0.01$ ), 肠黏膜损伤评分极显著性增加 ( $P < 0.01$ ), 表明模型组小鼠结肠损伤严重。与模型组相比, 各给药组结肠长度、结肠湿质量和结肠指数均有显著性或极显著性增加 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 肠黏膜损伤评分有显著性下降 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 表明各给药组均发挥了治疗作用。与大黄素+大黄酸温敏凝胶组相比, PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶低剂量组各个指标无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 表明 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶有助于降低大黄素和大黄酸给药剂量; PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶高剂量组结肠长度、结肠湿质量和结肠指数显著性增加 ( $P < 0.05$ ), 肠黏膜损伤评分极显著性下降 ( $P < 0.01$ ), 表明 PEG-Emo/Rhe-Lips 增强了二者药效。

表 14 各组小鼠结肠长度、结肠湿质量、结肠指数、肠黏膜损伤评分、胸腺指数与脾脏指数 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 14 Colon length, colon wet weight, colon index and intestinal mucosal injury, thymus index and spleen index of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	结肠长度/ cm	结肠湿 质量/g	结肠指数/ %	肠黏膜损伤 评分	胸腺指数	脾脏指数
对照	-	9.79 ± 0.88	0.47 ± 0.11	1.16 ± 0.21	0.00 ± 0.00	2.64 ± 0.33	2.72 ± 0.28
模型	-	7.10 ± 0.57**	0.22 ± 0.03**	0.73 ± 0.10**	2.94 ± 0.52**	1.16 ± 0.26**	7.71 ± 1.21**
阳性药 (美沙拉嗪)	500	9.04 ± 0.68##	0.34 ± 0.08##	0.99 ± 0.12#	1.19 ± 0.25##	1.70 ± 0.28#	4.99 ± 0.78##
大黄酸温敏凝胶	25	7.86 ± 0.63#	0.28 ± 0.03#	0.86 ± 0.09#	2.19 ± 0.49#	1.97 ± 0.29##	5.82 ± 0.48#
大黄素温敏凝胶	25	7.91 ± 0.71#	0.27 ± 0.04#	0.84 ± 0.13#	2.22 ± 0.56#	1.87 ± 0.26##	6.23 ± 0.33#
大黄酸+大黄素温敏凝胶	25+25	8.46 ± 0.89##	0.30 ± 0.07##	0.94 ± 0.18#	1.15 ± 0.23##	2.21 ± 0.17##	4.18 ± 0.37##
PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶	15+15	8.31 ± 0.55##	0.28 ± 0.09##	1.02 ± 0.19#	1.33 ± 0.20##	2.08 ± 0.20##	4.37 ± 0.32##
	25+25	9.23 ± 0.69##Δ	0.41 ± 0.09##Δ	1.09 ± 0.22##Δ	0.80 ± 0.24##ΔΔ	2.41 ± 0.23##Δ	3.05 ± 0.33##ΔΔ

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与大黄酸+大黄素温敏凝胶组比较: Δ $P < 0.05$  ΔΔ $P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group; Δ $P < 0.05$  ΔΔ $P < 0.01$  vs rhein + emodin thermosensitive gel group.

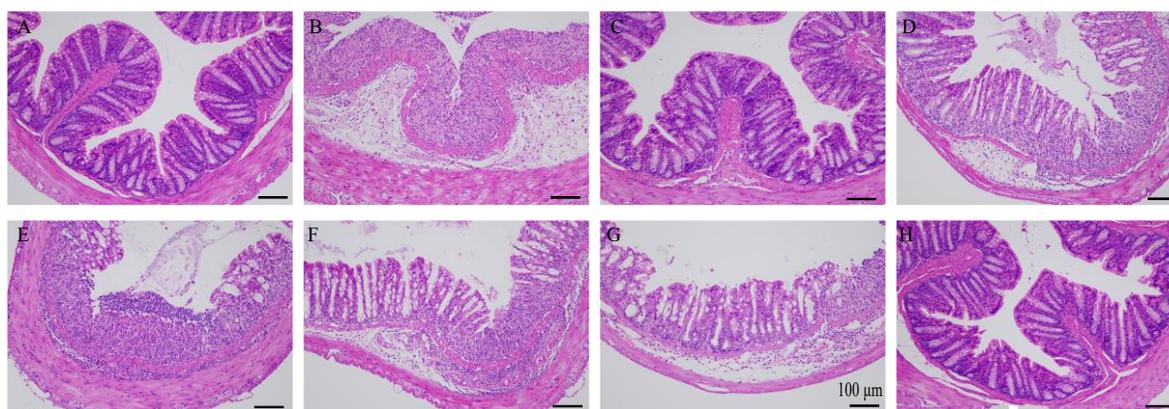
**2.11.4 胸腺、脾脏指数** 取出胸腺和脾脏, 滤纸吸干水分后称定质量, 计算胸腺和脾脏指数, 结果见表 14。与对照组相比, 模型组胸腺指数极显著性下降 ( $P < 0.01$ ), 脾脏指数极显著性升高 ( $P < 0.01$ ), 表明造模成功。与模型组相比, 各给药组胸腺指数有显著性或极显著性增大 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 脾脏指数有显著性或极显著性下降 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 表明各给药组均可改善 UC 所致脏器损伤。与大黄素+大黄酸温敏凝胶组相比, PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶低剂量组胸腺指数和脾脏指数无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 而 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶高剂量组胸

腺指数显著性升高 ( $P < 0.05$ ), 脾脏指数极显著性差异下降 ( $P < 0.01$ ), 可见 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶显著提高了大黄酸和大黄素对免疫器官的修复作用。

$$\text{胸腺指数} = \text{胸腺质量} / \text{体质量}$$

$$\text{脾脏指数} = \text{脾脏质量} / \text{体质量}$$

**2.11.5 病理学组织观察** 取治疗 14 d 后的结肠置于 4%多聚甲醛中 3 d, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 置显微镜下观察病理学情况, 结果见图 8。对照组小鼠结肠富含杯状细胞, 隐窝结构完整 (图 8-A), 无任何异常; 模型组小鼠结肠组织杯状细胞消失,



A~H 依次为对照组、模型组、阳性组(美沙拉嗪,  $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、大黄酸温敏凝胶组 ( $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、大黄素温敏凝胶组 ( $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、大黄酸+大黄素温敏凝胶组(大黄酸、大黄素均为  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶低剂量组(大黄酸、大黄素均为  $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶高剂量组(大黄酸、大黄素均为  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。

A—H were control group, model group, positive group (mesalazine,  $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), rhein thermosensitive gel ( $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), emodin thermosensitive gel ( $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), rhein + emodin thermosensitive gel (rhein and emodin were both  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), PEG-Emo/Rhe-Lips low-dose group (rhein and emodin were both  $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and PEG-Emo/Rhe-Lips high-dose group (rhein and emodin were both  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) respectively.

图8 药效学考察中结肠组织病理切片

Fig. 8 Pathological section of colon tissue in pharmacodynamic investigation

隐窝结构严重破坏, 炎性细胞浸润严重(图 8-B), 病理情况与对照组差别巨大, 表明造模有效。阳性药组杯状细胞增加, 结肠组织损伤的治疗效果明显(图 8-C)。大黄酸温敏凝胶组和大黄素温敏凝胶组杯状细胞增加, 但仍可见大量炎性细胞浸润(分别见图 8-D、E), 隐窝结构仍受损严重。大黄酸+大黄素温敏凝胶组杯状细胞明显增加, 隐窝结构得到一定修复(图 8-F), 治疗效果优于大黄酸温敏凝胶组或大黄素温敏凝胶组。PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶低剂量组也可见大量炎性细胞浸润(图 8-G), 治疗效果接近于大黄酸+大黄素温敏凝胶组。PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶高剂量组隐窝结构明显, 杯状细胞增加(图 8-H), 结肠组织的病理学情况接近对照组, 治疗效果相对较优。

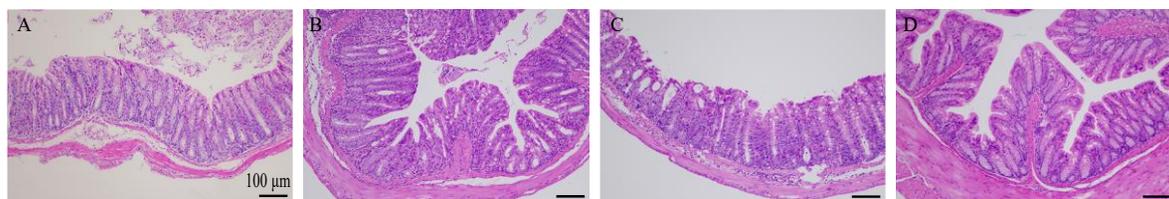
2.12 刺激性评价

取 32 只小鼠, 将其分成对照组、生理盐水组、阴性样品组(不含大黄酸、大黄素, 辅料比例同 PEG-Emo/Rhe-Lips) 和 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶高

剂量组(大黄酸、大黄素均为  $25\text{ mg}/\text{kg}$ ), 灌肠 14 d, 按照“2.11.5”项下同法观察病理学情况。根据炎性细胞浸润及隐窝结构情况进行计分, 即无症状、极轻、轻度、中度、重度, 分别记作 0、1、2、3、4 分, 将两者总和作为刺激性反应分值。结果显示, 对照组(图 9-A)、生理盐水组(图 9-B)、阴性样品(图 9-C)和 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶高剂量组(图 9-D)分别计分 0、1、2、0 分, 其中生理盐水组仅见少量炎性细胞浸润; 而阴性样品组可见少量炎性细胞浸润, 隐窝结构稍缺失, 但杯状细胞仍大量存在。PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶组未见明显异常, 故判定 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶对结肠组织黏膜无刺激性, 可能与大黄酸和大黄素的保护、修复作用有关<sup>[4-8]</sup>。

2.13 统计学方法

数据均以  $\bar{x} \pm s$  值表示, 采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。组间差异通过单因素方差分析进行检验,  $P < 0.05$  时判定组间具有显著性差异,  $P < 0.01$



A~D 依次为对照组、生理盐水组、阴性样品组和 PEG-Emo/Rhe-Lips 温敏凝胶高剂量组(大黄酸、大黄素均为  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。

A—H were control group, saline group, negative sample group and high-dose PEG-Emo/Rhe-Lips group (rhein and emodin were both  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), respectively.

图9 刺激性实验中结肠组织病理切片

Fig. 9 Pathological section of colon tissue in stimulation experiment

时判定组间具有极显著性差异。

### 3 讨论

DSPE-mPEG<sub>2000</sub>具有良好的生物相容性,已被美国FDA批准应用于医药领域,将DSPE-mPEG<sub>2000</sub>修饰至脂质体表明可提高其稳定性及透过生理屏障能力<sup>[15,18]</sup>。DSPE-mPEG<sub>2000</sub>亲脂端与磷脂亲脂端结构极为相似,两者之间亲和性良好,因而与磷脂共同构成脂质体外壳,有助于防止脂质体浅表层药物泄漏,提高其包封率<sup>[18]</sup>;DSPE-mPEG<sub>2000</sub>亲水端位于脂质体表面,不仅增加了脂质体的亲水性,也可提供巨大的空间位阻从而防止脂质体之间融合,提高了脂质体的稳定性。前期分别比较了薄膜水化法、乳化-溶剂挥发法、乙醇注入法等制备方法,发现薄膜水化法制得的PEG-Emo/Rhe-Lips包封率远高于其他方法,可能是由于乳化-溶剂挥发法和乙醇注入法容易产生有机溶剂残留,进而可能会溶解脂质体囊材,导致其包封率下降,而薄膜水化法易将有机溶剂除尽,因而避免了有机溶剂对脂质体的破坏<sup>[15]</sup>,故本实验采用薄膜水化法制备PEG-Emo/Rhe-Lips。

泊洛沙姆由一定比例的亲水链段聚氧乙烯(plasma electrolytic oxidation, PEO)和一定比例的疏水链段聚氧丙烯(polyphenylene oxide, PPO)构成,胶凝温度与泊洛沙姆结构中PEO/PPO比例密切相关<sup>[19]</sup>。P407由70%的PEO和30%的PPO组成,但P407胶凝温度较低;P188是由80%的PEO链段和20%的PPO链段组成,在P407中引入适量的P188时可使胶凝温度发生变化,这可能是因为加入P188时改变了温敏凝胶体系中PPO/PEO比例所致<sup>[19,23]</sup>。经考察,P407和P188质量分数分别为18%和3%时PEG-Emo/Rhe-Lips温敏凝胶的胶凝温度满足灌肠需求,与相关研究报道处方基本一致<sup>[23]</sup>。

与大黄素或大黄酸温敏凝胶相比,PEG-Emo/Rhe-Lips温敏凝胶具有明显的缓释特征,分析原因可能是由于包封于PEG-Emo/Rhe-Lips内部的大黄素和大黄酸释放出去需克服脂质体胆固醇、磷脂及DSPE-mPEG<sub>2000</sub>等脂质载体阻滞作用;脂质体表面的mPEG长链提供了巨大的空间位阻,增加了药物释放阻力;凝胶层对大黄素和大黄酸释放也具有阻滞作用<sup>[20]</sup>,在多种因素共同影响下,使PEG-Emo/Rhe-Lips温敏凝胶释药表现出缓释特点,有利于维持药物浓度,提高治疗UC效果。与大黄素+大黄酸温敏凝胶相比,在给药剂量相同的条件下(大

黄素、大黄素均为25 mg/kg),EG-Emo/Rhe-Lips温敏凝胶的结肠长度、结肠湿质量、结肠指数等指标均得到明显增加( $P<0.05, 0.01$ ),DAI评分和肠黏膜损伤评分得到明显下降( $P<0.05, 0.01$ ),可能是因为PEG-Emo/Rhe-Lips增加了大黄素和大黄酸溶解度,促进了肠道屏障渗透;PEG-Emo/Rhe-Lips粒径较小,有利于增加大黄素和大黄酸药效<sup>[17]</sup>;mPEG长链上醚氧原子和黏蛋白上的糖基之间可发生氢键作用,从而赋予PEG-Emo/Rhe-Lips肠黏膜的黏附性;PEG-Emo/Rhe-Lips表明修饰的mPEG长链增加了其亲水性,从而可使之“隐身”于黏液中,利于PEG-Emo/Rhe-Lips在黏液中快速扩散并发挥药效<sup>[28]</sup>;PEG-Emo/Rhe-Lips处方中磷脂经体内消化吸收后,其产物可用于修复机体器官及肠黏膜组织损伤等<sup>[29]</sup>,从而达到辅助治疗作用。

综上,本研究完成了PEG-Emo/Rhe-Lips的处方优化、表征及稳定性等研究,为评价PEG-Emo/Rhe-Lips成药性提供了实验数据。药效学结果显示,PEG-Emo/Rhe-Lips温敏凝胶具有明显的治疗UC药效,毒性低于阳性药美沙拉嗪组,对结肠组织黏膜无明显刺激性,推广意义较大,因此值得进一步开发研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 惠翀. 维得利珠单抗联合柳氮磺吡啶治疗中重度溃疡性结肠炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(9): 2354-2359.
- [2] Wei S C, Sollano J, Hui Y T, et al. Epidemiology, burden of disease, and unmet needs in the treatment of ulcerative colitis in Asia [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 15(3): 275-289.
- [3] Luo S, Wen R Y, Wang Q, et al. Rhubarb Peony Decoction ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating gut microbiota to restoring Th17/Treg balance [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 231: 39-49.
- [4] 高飞, 钟辉云, 陈可禧, 等. 大黄有效组分“大黄酸-大黄素”联合治疗溃疡性结肠炎作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(15): 4148-4155.
- [5] Luo R F, Lin M S, Fu C M, et al. Calcium pectinate and hyaluronic acid modified lactoferrin nanoparticles loaded rhein with dual-targeting for ulcerative colitis treatment [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 263: 117998.
- [6] Chen Q Y, Luo R F, Han X Q, et al. Entrapment of macrophage-target nanoparticles by yeast microparticles for rhein delivery in ulcerative colitis treatment [J].

- Biomacromolecules*, 2021, 22(6): 2754-2767.
- [7] 钦富华, 蔡雁, 俞佳丹. 大黄酸平衡溶解度和油水分配系数的测定 [J]. 医药导报, 2018, 37(1): 88-91.
- [8] 谢青璇, 李小芳, 谢龙, 等. Box-Behnken 效应面法优化大黄素/小檗碱-壳聚糖双载药纳米粒的处方工艺研究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1614-1622.
- [9] 顾晨露. 基于 Caco-2 细胞的难溶性中药活性成分增溶及吸收行为研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2021.
- [10] 李楠, 邓艳平. 基于质量源于设计(QbD)制备大黄素固体脂质纳米粒 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2216-2226.
- [11] 王梦琳, 胡宇峰, 马思媛, 等. 微型化介质研磨法制备大黄素纳米混悬剂及其体外评价 [J]. 中草药, 2024, 55(20): 6918-6928.
- [12] 祝沐娟. 脂质体结构稳定化及用于大黄素口服递送可行性研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2022.
- [13] 张体鹏, 决利利. 白屈菜红碱2种脂质体的制备和口服生物利用度比较 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5568-5579.
- [14] 柳超, 董亚楠, 李伟宏, 等. 冰片修饰根皮素脂质体凝胶的制备、表征及其离体皮肤渗透特性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7288-7299.
- [15] 翟芷淇, 付悦, 张馨月, 等. 槲皮素脂质体抑制小鼠肺组织炎症作用的研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(1): 50-55.
- [16] 李燕红, 张春燕, 陈乾. DSPE-mPEG<sub>2000</sub> 修饰荷叶碱脂质体制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(8): 2457-2464.
- [17] Xu Q G, Ensign L M, Boylan N J, *et al.* Impact of surface polyethylene glycol (PEG) density on biodegradable nanoparticle transport in mucus *ex vivo* and distribution *in vivo* [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(9): 9217-9227.
- [18] 王立红, 吴文丽, 罗永明, 等. 白藜芦醇温敏型凝胶剂的制备及抗膀胱癌细胞研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(10): 2334-2342.
- [19] 赵奇, 赵祥宇, 刘岩, 等. 基于壳聚糖/海藻酸钠-聚乙烯醇的双层复合水凝胶膜伤口敷料研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(11): 2321-2329.
- [20] 陈琳. PEG 修饰的白藜芦醇脂质体稳定性及抗肿瘤活性研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2016.
- [21] 苏琪君. 姜黄素-黄芩苷双载药纳米脂质体的制备表征与功能评价 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2024.
- [22] 敖惠, 李好文, 王一安, 等. 地塞米松脂质体的制备及其对乳腺癌作用的体内外研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(2): 222-228.
- [23] 杨东亮, 马瑞丽, 赵宇郁, 等. 布地奈德直肠用脂质体温敏凝胶制备工艺的研究 [J]. 中南药学, 2022, 20(5): 999-1004.
- [24] 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.
- [25] 周敬, 郑宝玉, 李阳杰, 等. 白屈菜红碱介孔二氧化硅纳米粒缓释片的制备及体外释药考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(2): 159-165.
- [26] 裴大婷, 曾志文, 周小雁, 等. 原位酶交联羧甲基壳聚糖/葡萄糖水凝胶的制备与表征 [J]. 化学研究与应用, 2022, 34(5): 1061-1069.
- [27] 孙丽, 李瑞华, 吉媛媛, 等. 高良姜素自胶束化固体分散体的制备、口服药动学和降血糖作用评价 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(1): 143-156.
- [28] 吕风梅, 随力, 刘哲鹏. 黏膜给药中的黏液屏障及相关递送策略研究进展 [J]. 药理学学报, 2022, 57(3): 670-680.
- [29] 王章铁. 磷脂对骨骼肌损伤修复的影响及南极磷虾油的应用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.

[责任编辑 郑礼胜]