

直肠用靛蓝-靛玉红纳米泡沫气雾剂的制备及体内外评价

王成¹, 盛华¹, 杨明⁴, 张定堃², 贺亚男², 盛艳梅¹, 韩丽^{3*}, 谢兴亮^{1,2*}

1. 成都医学院药学院, 四川 成都 610500

2. 成都中医药大学现代中药产业学院/天府中医药创新港, 四川省经典名方二次创新开发工程研究中心, 四川 成都 611930

3. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

4. 江西中医药大学, 经典名方现代中药创制全国重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 制备一种用于溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的直肠用靛蓝-靛玉红纳米泡沫气雾剂 (indigo-indirubin nano-foam aerosol, Ind/INB-NFA), 并对其进行体内外评价。方法 通过球磨技术制备靛蓝-靛玉红纳米混悬液 (indigo-indirubin nanosuspensions, Ind/INB-NS), 对其粒径、多分散度指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位、稳定性、微观形貌、红外吸收、体外释放度等进行考察。以 Ind/INB-NS 为中间体, 采用中心复合设计-效应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 优化制备 Ind/INB-NFA, 并考察泡沫理化性能、黏膜渗透性; 建立葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的 UC 大鼠模型, 以体质量、DAI 评分、结肠长度、肠质量系数、组织病理评分等指标考察该泡沫剂的药效。结果 Ind/INB-NS 粒径为 (117.5 ± 0.8) nm, PDI 为 0.249 ± 0.013 , ζ 电位为 (-32.3 ± 1.0) mV; 60 d 内稳定性良好; 纳米化过程中傅里叶变换红外吸收光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIS) 无明显变化; 同原料药相比, 纳米混悬液中靛蓝、靛玉红体外 12 h 的累积释放度分别提高了 30.46% 和 21.39%。该泡沫剂泡沫基础液的最优处方为 Ind/INB-NS 28.25%、月桂酰肌氨酸钠 2.26%、Brij[®] S10 1.00%、十六醇 1.50%、十六十八醇 1.26%、丙二醇与用水量比 4.72:5.28; 制剂中抛射剂 HFA-134a 20%。喷出物呈淡蓝色细密泡沫, 发泡倍率达 14.38 ± 1.10 , 4 h 内能稳定维持泡沫形态且仅流动 (0.23 ± 0.03) cm。同原料药相比, 该泡沫剂中靛蓝、靛玉红 24 h 的黏膜透率分别提高了 60.05% 和 14.53%。所得泡沫剂能改善 DSS 诱导的 UC 模型大鼠腹泻、便血症状; 降低 DAI 评分 ($P < 0.01$) 及肠质量系数 ($P < 0.01$); 增加结肠长度 ($P < 0.05$); 减少炎症细胞浸润, 降低结肠组织病理损伤评分 ($P < 0.01$)。结论 成功制备了一种新型靛蓝-靛玉红纳米泡沫气雾剂, 有利于充分发挥靛蓝、靛玉红治疗 UC 的疗效, 具有良好的应用前景。

关键词: 溃疡性结肠炎; 靛蓝; 靛玉红; 纳米混悬液; 纳米泡沫气雾剂; 药效学; 球磨技术; 中心复合设计-效应面法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)18-6580-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.18.008

Preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation of indigo-indirubin nano-foam aerosol for rectum

WANG Cheng¹, SHENG Hua¹, YANG Ming⁴, ZHANG Dingkun², HE Yanan², SHENG Yanmei¹, HAN Li³, XIE Xingliang^{1,2}

1. School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

2. College of Modern Traditional Chinese Medicine Industry/Tianfu Traditional Chinese Medicine Innovation Port, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Provincial Engineering Research Center for Secondary Innovative Development of Classic Famous Formulas, Chengdu 611930, China

3. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

4. State Key Laboratory for the Chinese Medicine Modernization of Classical and Famous Prescriptions, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

收稿日期: 2025-04-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82173976)

作者简介: 王成, 硕士研究生, 研究方向为药物制剂新技术。E-mail: 1209406379@qq.com

*通信作者: 韩丽, 教授, 博士生导师, 从事中药新型递药系统研究。E-mail: hanliy@163.com

谢兴亮, 教授, 博士生导师, 从事中药新制剂研究。E-mail: 421733038@qq.com

Abstract: Objective To prepare a rectal indigo-indirubin nano-foam aerosol (Ind/INB-NFA) for ulcerative colitis (UC) and evaluate its performance through *in vitro* and *in vivo* studies. **Methods** Indigo-indirubin nanosuspensions (Ind/INB-NS) was prepared by ball milling technology and characterized for particle size, polydispersity index (PDI), ζ potential, stability, micromorphology, infrared absorption, and *in vitro* release. Ind/INB-NFA was optimized using central composite design-response surface methodology (CCD-RSM), with Ind/INB-NS as the intermediate. Its physicochemical properties and mucosal permeability were evaluated. A dextran sulfate sodium (DSS)-induced UC rat model was established to assess therapeutic effects through body weight, disease activity index (DAI) score, colorectal length, colon weight coefficient, and histopathological scoring. **Results** Ind/INB-NS had a particle size of (117.5 ± 0.8) nm, PDI of 0.249 ± 0.013 , and ζ potential of (-32.3 ± 1.0) mV. It remained stable for 60 d. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIS) showed no significant changes during the nanonization process. Compared with raw active pharmaceutical ingredients (APIs), the 12 h *in vitro* release of indigo and indirubin from nanosuspensions increased by 30.46% and 21.39%, respectively. The optimal formulation of the foam base solution contained 28.25% Ind/INB-NS, 2.26% sodium lauroyl sarcosinate, 1.00% Brij® S10, 1.50% cetyl alcohol, 1.26% cetearyl alcohol, and a 4.72:5.28 propylene glycol/water ratio. The propellant HFA-134a content in this formulation was 20%. The ejecta formed light blue, finely textured foam with an expansion ratio of 14.38 ± 1.10 , which maintained stable morphology with only (0.23 ± 0.03) cm of flow displacement over 4 h. Compared with raw APIs, mucosal permeation rates of indigo and indirubin increased by 60.05% and 14.53% at 24 h. The foam aerosol alleviated diarrhea and hematochezia in DSS-induced UC rats. It significantly reduced DAI scores ($P < 0.01$) and colon weight coefficients ($P < 0.01$), increased colorectal length ($P < 0.05$), diminished inflammatory infiltration ($P < 0.01$), and reduced the pathological injury score of colon tissue ($P < 0.01$). **Conclusion** The novel Ind/INB-NFA was successfully developed, which is conducive to giving full play to the therapeutic effect of indigo and indirubin in the treatment of UC and has a good application prospect.

Key words: ulcerative colitis; indigo; indirubin; nanosuspension; nano-foam aerosol; pharmacodynamics; ball milling technology; central composite design-response surface methodology

青黛 *Indigo Naturalis* 入药始于唐代, 在中国有着悠久的历史, 具有清热解毒, 凉血定惊的功能, 常用于治疗银屑病、急性早幼粒细胞白血病和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) [1]。现代研究发现青黛可改善 UC 患者腹痛、便溏、便脓血等症状, 促进肠黏膜愈合 [2-3], 即使在常规药物无效的患者中也展现出显著疗效 [4]。靛蓝、靛玉红作为青黛治疗 UC 的药效成分, 两者互为同分异构体, 合用可协同发挥作用, 能够调节免疫和肠道菌群, 减少炎性细胞的浸润, 修复肠黏膜损伤 [5]。

但靛蓝、靛玉红都属于生物药剂学分类系统 (biopharmaceutical classification system, BCS) 第 IV 类药物, 其溶解性、渗透性差, 难以穿透结肠黏液层被固有层炎性细胞摄取发挥疗效, 限制了其临床使用。纳米化技术可通过减小粒径, 提高药物溶解度, 以增强药物吸收利用 [6-8], 提高药物的生物利用度和生物活性 [9]。本研究拟采用辅料与球磨技术结合, 表面修饰并纳米化靛蓝、靛玉红, 以改善药物的溶解性、渗透性, 增强其局部抗炎及促黏膜愈合作用。

直肠给药治疗 UC 可直接作用于病灶, 局部药物浓度高, 起效快, 且疗效显著, 可避免口服的不良反应 [10]。然而目前中药直肠给药的灌肠液、栓剂

等常规剂型, 存在易泄露, 异物感强且药物分布面积有限, 难以达到肠内更深层及散在分布的溃疡病灶, 临床仍缺乏适应 UC 治疗需求的新剂型。直肠用泡沫气雾剂以抛射剂使药液泡沫化, 利用泡沫膨胀效应, 可显著提高药物在结直肠的分布范围, 使药物更充分地与健康黏膜接触, 提高泡沫在黏膜表面的作用时间, 且泡沫柔和, 大大降低给药对黏膜的机械刺激, 提高患者用药依从性 [11-13]。本研究综合 UC 用药需求以及靛蓝、靛玉红的理化性质, 拟制备靛蓝-靛玉红纳米混悬液 (indigo-indirubin nanosuspensions, Ind/INB-NS) 为中间体, 优化适宜起泡辅料处方, 制备一种用于 UC 治疗的新型靛蓝-靛玉红纳米泡沫气雾剂 (indigo-indirubin nano-foam aerosol, Ind/INB-NFA)。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Emax 型球磨仪, 德国 Retsch 公司; Nano ZS 型激光粒径测定仪, 英国 Malvern 公司; SU8020 型扫描电子显微镜 (SEM), 日本日立公司; WS70-1 型傅里叶变换红外光谱仪, 上海锦凯科学仪器有限公司; Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; MS105 型十万分之一天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; DP73 型光学显微镜, 日本 Olympus

公司; TP-6 型 Franz 扩散池, 天津市精拓仪器科技有限公司; Panoramic Desk 型全景切片扫描仪, 匈牙利 3DHISTECH 公司; WQH 型微型气雾灌封口机, 上海胜华气雾机械有限公司。

1.2 药品与试剂

靛蓝(质量分数 98%, 批号 C13663169)、泊洛沙姆 188 (Poloxamer 188, P188, 批号 C15179922)、月桂酰肌氨酸钠(sodium lauroyl sarcosinate, SLS, 批号 C15035570)均购自上海麦克林生化科技股份有限公司; Brij® S10(批号 BCCJ1735), 默克 Sigma-Aldrich 公司; 十六醇(批号 20211103)、十六十八醇(批号 20220401)均购自江西阿尔法高科药业有限公司; 靛玉红(质量分数 98%, 批号 22031001), 成都普菲德生物技术有限公司; 美沙拉嗪灌肠液(批号 230077A), 瑞士 Vifor Pharma 公司; 丙二醇(批号 F108C211101), 湖北葛店人福药用辅料有限责任公司; 葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS, 批号 C16013701), 山东科源生化有限公司; 多聚甲醛(批号 23250131), 中国 Biosharp 公司。

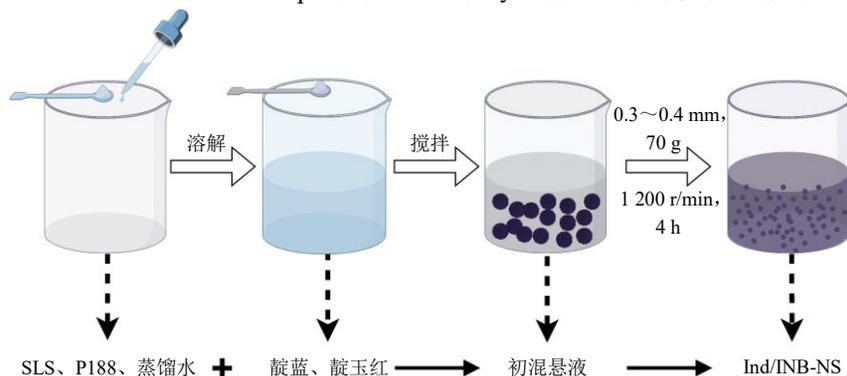


图 1 Ind/INB-NS 制备流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of preparation process of Ind/INB-NS

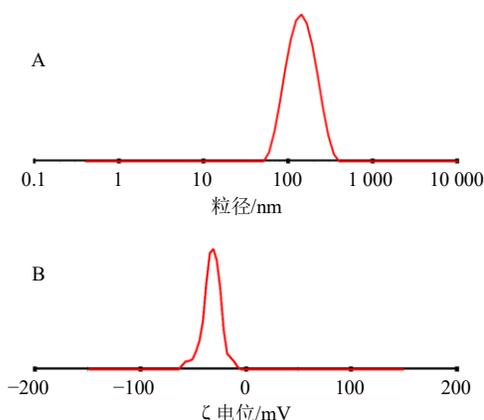


图 2 Ind/INB-NS 的粒径分布 (A) 及 ζ 电位 (B)

Fig. 2 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of Ind/INB-NS

1.3 动物

健康 SD 雄性大鼠 50 只, 体质量 180~220 g, 实验动物由成都达硕实验动物有限公司提供, 合格证号: SCXK(川)2020-030。本实验已通过成都医学院实验动物中心伦理审查, 伦理编号为成医动伦[2024]第 003 号。

2 方法与结果

2.1 Ind/INB-NS 的制备

称取 0.89% P188 和 2.63% SLS 溶于蒸馏水中, 加入 7.96% 靛蓝-靛玉红(靛蓝-靛玉红为 7.5:1)^[5], 充分搅拌混合, 得初混悬液。取适量初混悬液至球磨缸内, 加入 70 g 的 0.3~0.4 mm 氧化锆研磨珠, 采用球磨机, 在 1 200 r/min 条件下研磨 4 h, 即得 Ind/INB-NS。制备流程示意图见图 1。

2.2 Ind/INB-NS 的表征

2.2.1 粒度、PDI 和 ζ 电位考察 取适量 Ind/INB-NS, 以蒸馏水稀释至适宜的浓度, 使用激光粒径仪测定粒径、多分散度指数(polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位^[4]。结果如图 2 所示, Ind/INB-NS 的粒径

为 (117.5 ± 0.8) nm, PDI 为 0.249 ± 0.013 , 粒径分布相对集中; ζ 电位为 (-32.3 ± 1.0) mV, 表明其具有负电性。

2.2.2 稳定性考察 各取 2 份 Ind/INB 原料药物混合物、Ind/INB 初混悬液、Ind/INB-NS, 分别置于西林瓶中密封, 室温放置 60 d。1 份分别于第 0、3、7、15、30、60 天测定 Ind/INB-NS 的粒径、PDI 以及 ζ 电位; 另 1 份在相同时间点, 观察是否有沉降和聚集现象。结果如表 1 和图 3 所示, 可见, 60 d 内, Ind/INB-NS 的粒径、PDI、 ζ 电位均无明显变化; Ind/INB 原料药、Ind/INB 初混悬液颜色逐渐变浅, 瓶底沉淀逐渐增多, Ind/INB-NS 第 60 天时无明显色泽变化, 瓶底仅少量颗粒聚集和沉淀, 表明

该纳米混悬液稳定性良好。

2.2.3 形貌分析 取适量靛蓝、靛玉红、Ind/INB 原料药和 Ind/INB-NS，均匀分散于附有导电胶的样品板上，真空镀金后采用 SEM，选择最佳拍照倍数观察其形貌，结果如图 4 所示。靛蓝呈不规则片状结

表 1 Ind/INB-NS 的粒径、PDI、ζ 电位 60 d 变化结果
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Results of 60 d changes in Ind/INB-NS particle size, PDI, ζ potential ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	粒径/nm	PDI	电位/mV
0	117.5 ± 0.8	0.249 ± 0.013	-32.3 ± 1.0
3	117.3 ± 1.2	0.245 ± 0.017	-31.7 ± 0.6
7	118.0 ± 1.7	0.253 ± 0.017	-33.0 ± 1.6
15	119.0 ± 2.6	0.252 ± 0.018	-33.5 ± 0.6
30	120.0 ± 1.4	0.253 ± 0.011	-34.2 ± 0.4
60	122.9 ± 0.9	0.246 ± 0.016	-31.4 ± 0.3

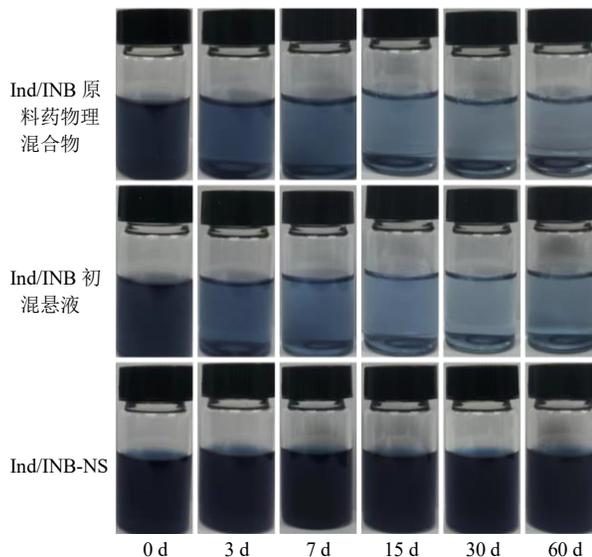


图 3 稳定性考察结果
Fig. 3 Stability test results

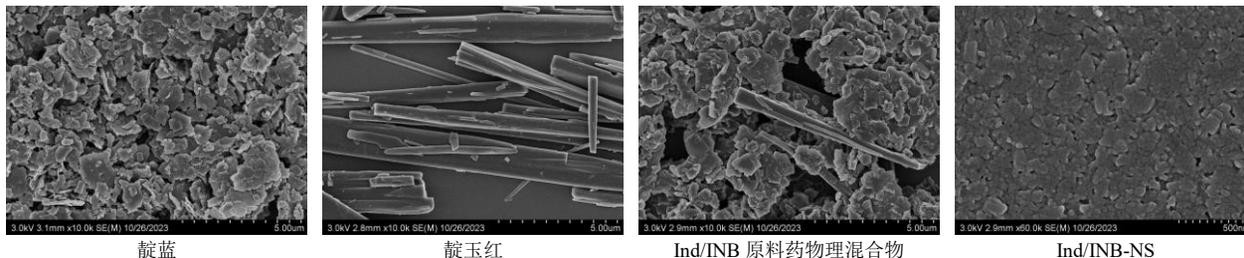


图 4 靛蓝、靛玉红、Ind/INB 原料药物理混合物和 Ind/INB-NS 的 SEM 图

Fig. 4 SEM of indigo, indirubin, Ind-INB active pharmaceutical ingredients (APIs) physical mixture and Ind/INB-NS

构，而靛玉红呈棒晶状；Ind/INB 原料药为两者的物理聚集；Ind/INB-NS 呈类球形的块状结构，粒径在纳米级，纳米颗粒因检测所需烘干处理后混悬液中 SLS、P188 析出而呈现聚集黏连状。

2.2.4 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIS) 分析 将 Ind/INB-NS 冷冻干燥后粉碎得到 Ind/INB-NS 冻干粉，采用 KBr 压片法，在扫描范围为 400~4 000 cm^{-1} 的傅里叶变换红外光谱仪中，分别测定 P188、SLS、Ind/INB 原料药、原辅料物理混合物、Ind/INB-NS 冻干粉的红外吸收情况，结果如图 5 所示。Ind/INB-NS 冻干粉和原辅料物理混合物、Ind/INB 原料药具有相似的特征吸收峰，无峰位移，说明靛蓝、靛玉红在纳米化工艺过程中未发生化学变化，未改变靛蓝、靛玉红的化学结构。

2.2.5 体外释放研究 取适量 Ind/INB 原料药、Ind/INB-NS 于透析袋中，以模拟肠液为溶出介质，随后放入溶出仪中，150 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ ，分别在 0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 取 1 mL 样品过 0.22 μm 微孔

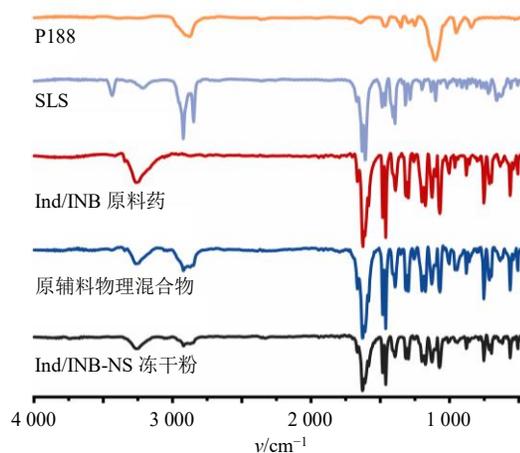


图 5 FTIS 分析结果

Fig. 5 Analysis results of FTIS

滤膜，同时补充 1 mL 相同温度的溶出介质。通过高效液相色谱仪测定靛蓝、靛玉红含量，采用公式 (1) 计算靛蓝、靛玉红的累积释放率 (Q_n) [15]。

$$Q_n = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_{n-1} V_{n-1}) / W \quad (1)$$

C_n 为第 n 个采样点的浓度， V 为溶出介质的体积， C_{n-1} 为第 $n-1$ 个采样点的浓度， V_{n-1} 为第 $n-1$ 个采样点的采样体

积, W 为样品中靛蓝或靛玉红质量

图 6 为 Ind/INB-NS 的体外释放研究结果, 纳米混悬液中靛蓝体外 12 h 累积释放 88.10%, 靛玉红累积释放 94.42%, 2 个成分的 Q_n 都基本达到 90%; Ind/INB 原料药中靛蓝体外 12 h 累积释放 67.53%, 靛玉红累积释放 77.78%。同原料药组相比, 纳米混悬液中靛蓝、靛玉红体外 12 h 的释放度分别提高了 30.46%和 21.39%, 且释放曲线斜率更大, 释药速率明显提高。

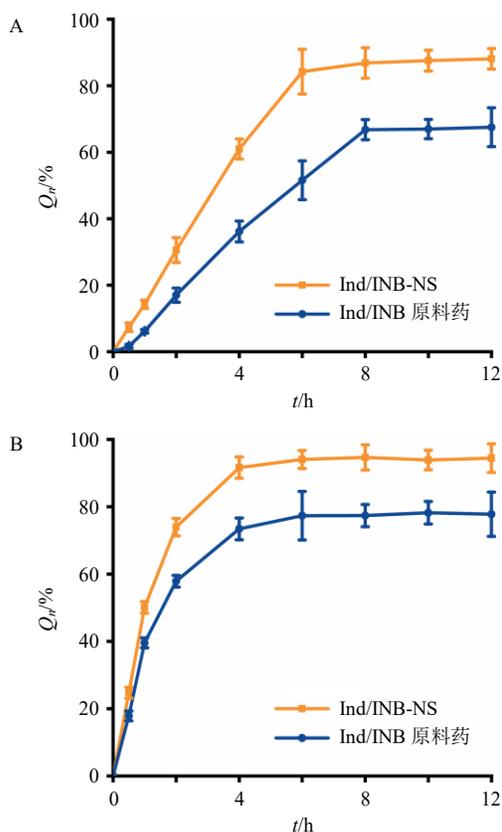


图 6 靛蓝 (A) 和靛玉红 (B) 的体外释放结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 *In vitro* release results of indigo (A) and indirubin (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.3 Ind/INB-NFA 的制备

称取处方量的 SLS、Brij® S10、十六醇、十六十八醇, 加入丙二醇后 70 °C 水浴下搅拌 5 min 使其充分溶解, 加入 Ind/INB-NS, 补加水至足量, 70 °C 水浴下搅拌 30 min 使其充分乳化, 得泡沫基础液。取上述适量泡沫基础液于铝制气雾瓶中, 封口, 罐装 20% 的 HFA-134a, 即得 Ind/INB-NFA。

2.4 Ind/INB-NFA 的处方优化

根据前期单因素实验结果, 确定了处方中 Brij® S10 用量为 1.00%, 十六醇用量为 1.50%, 而处方中

SLS、十六十八醇用量及丙二醇与水的比例 (以下简称丙水比) 对泡沫综合评分影响更大, 因此选取处方中 SLS 用量 (X_1)、十六十八醇用量 (X_2) 及丙水比 (X_3) 作为考察因素, 三者优化范围分别为 0.50%~3.00%、0.30%~3.00%、3.00:7.00~7.00:3.00, 采用 AHP-CRITIC 主客观加权法对各处方的泡沫特征、泡沫稳定性和发泡倍率 (V_{EF}) 进行综合评分, 以综合评分为响应变量, 采用 3 因素 5 水平中心复合设计实验优化纳米泡沫气雾剂处方, 水平代码为 -1.681、-1、0、+1、+1.681。因素与水平见表 2。采用 Design-Expert 13.0 软件, 对各自变量和变量的关系进行 2 次多项式回归, 以拟合方程的相关系数 (r^2) 和置信度 (P) 作为模型判定的标准, 数学模型如下: $Z = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1^2 + b_5X_2^2 + b_6X_3^2 + b_7X_1X_2 + b_8X_1X_3 + b_9X_2X_3$ 。根据得到的拟合模型绘制三维响应面图和二维等高线图, 以综合评分为优化目标, 对模型预测的最优处方进行实验验证, 并计算实测值与预测值之间的偏差率, 从而评价该模型预测能力。

中心复合设计实验的 20 个处方及综合评分见表 2。根据实测数据计算得 V_{EF} 、泡沫稳定性、泡沫特征的客观权重系数 (W_{CRITIC}) 依次为 0.32、0.26、0.42, 主观权重系数 (W_{AHP}) 为 0.33、0.33、0.33, 计算得三者混合权重系数 ($W_{AHP-CRITIC}$) 依次为 0.32、0.26、0.42。

采用 Design-Expert 13.0 软件对数据进行处理, 以 V_{EF} 、泡沫稳定性和泡沫特征的综合评分为因变量, 处方中 SLS 用量 (X_1)、十六十八醇用量 (X_2)、丙水比 (X_3) 为自变量, 进行 2 次多元回归拟合得到数学模型: $Z = -59.89 + 50.34X_1 + 36.59X_2 + 29.64X_3 - 5.20X_1X_2 + 1.17X_1X_3 - 1.83X_2X_3 - 10.93X_1^2 - 6.45X_2^2 - 3.18X_3^2$, $r^2 = 0.9396$, $P < 0.001$, 根据 r^2 和 P 值结果可知, 该模型拟合良好。

根据此模型, 绘制各因素对综合评分的三维效应图和等高图, 结果见图 7。通过模型拟合函数得到最佳处方: SLS 2.26%、十六十八醇 1.26%、丙水比 4.72:5.28。将优选处方平行制备 3 份进行试验验证, 结果见表 3, 最优处方的综合评分偏差均小于 5%, 提示该模型方程预测性良好。

2.5 泡沫性能测定

2.5.1 外观性状 Ind/INB-NFA 用力振摇后, 将内容物喷出至表面皿中, 观察泡沫的外观性状, 结果见图 8。Ind/INB-NFA 喷出物呈淡蓝色泡沫状, 手触

表2 中心复合设计-效应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 实验设计与结果

Table 2 Experimental design and results of CCD-RSM

序号	$X_1/\%$	$X_2/\%$	X_3	V_{EF}	泡沫稳	泡沫	综合	序号	$X_1/\%$	$X_2/\%$	X_3	V_{EF}	泡沫稳	泡沫	综合
					定性	特征	评分						定性	特征	评分
1	2.49 (+1)	0.85 (-1)	3.81 : 6.19 (-1)	31.86	19.69	30.16	81.71	11	2.49	0.85	6.19 : 3.81 (+1)	27.08	17.06	37.87	82.01
2	1.75 (0)	1.65 (0)	5.00 : 5.00 (0)	23.08	23.94	40.49	87.50	12	1.75	1.65	3.00 : 7.00 (-1.681)	29.80	25.19	24.72	79.70
3	1.01 (-1)	2.45 (+1)	3.81 : 6.19	19.55	19.52	33.17	72.24	13	1.75	1.65	5.00 : 5.00	22.49	22.66	42.39	87.54
4	1.75	3.00 (+1.681)	5.00 : 5.00	15.13	17.93	37.59	70.66	14	1.75	1.65	5.00 : 5.00	21.69	23.72	38.11	83.52
5	1.75	0.30 (-1.681)	5.00 : 5.00	24.19	24.60	31.78	80.57	15	1.75	1.65	5.00 : 5.00	23.50	24.11	35.71	83.33
6	0.50 (-1.681)	1.65	5.00 : 5.00	10.37	12.45	32.47	55.28	16	1.75	1.65	5.00 : 5.00	26.13	25.74	40.12	91.99
7	1.75	1.65	5.00 : 5.00	21.77	22.76	40.42	84.96	17	2.49	2.45	6.19 : 3.81	12.47	16.12	36.83	65.42
8	3.00 (+1.681)	1.65	5.00 : 5.00	27.50	21.18	36.63	85.31	18	2.49	2.45	3.81 : 6.19	22.53	19.22	36.41	78.16
9	1.01	0.85	3.81 : 6.19	22.33	20.48	26.63	69.44	19	1.01	2.45	6.19 : 3.81	9.87	9.32	42.22	61.42
10	1.75	1.65	7.00 : 3.00 (+1.681)	9.47	20.95	39.19	69.61	20	1.01	0.85	6.19 : 3.81	13.99	11.86	33.67	59.52

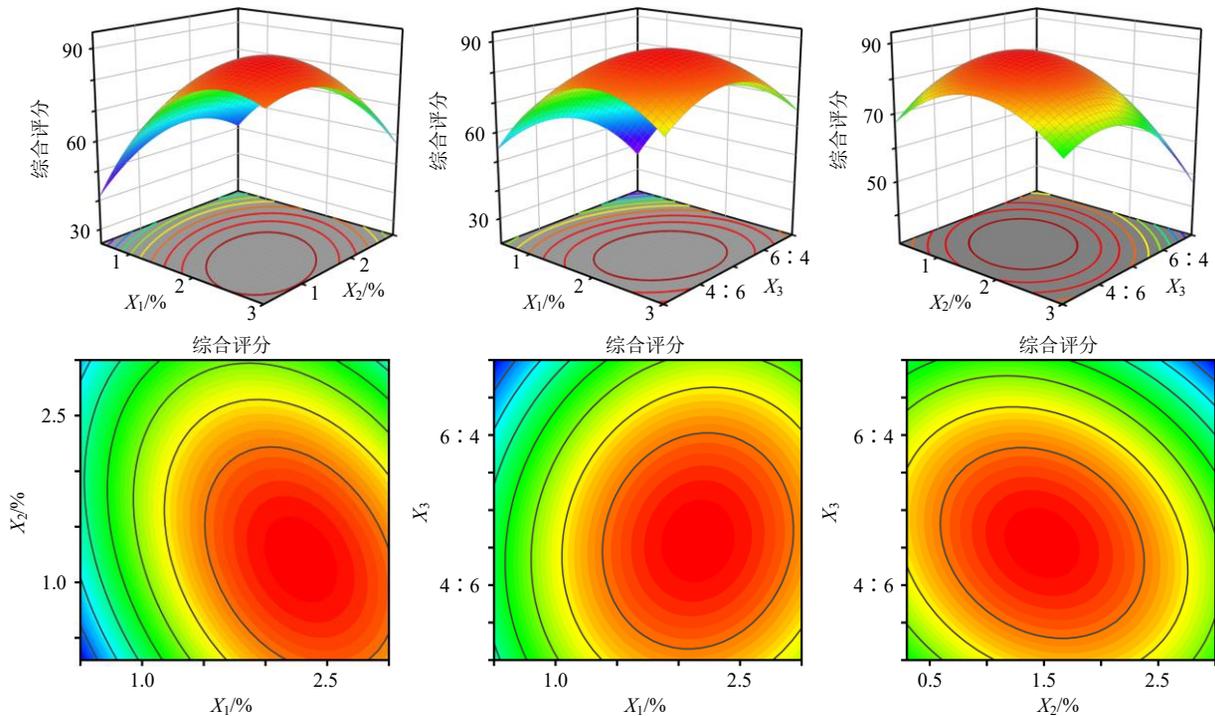


图7 各因素对综合评分的三维效应图和等高图

Fig. 7 Three-dimensional effect plots and contour plots of each factor on composite scores

表3 优选处方验证结果

Table 3 Verification results of preferred prescriptions

实验号	V_{EF}	泡沫稳 定性	泡沫 特征	预测 评分	实测 评分	偏差/ %
1	28.51	24.20	36.34	89.90	89.06	0.94
2	27.94	24.59	36.06		88.58	1.46
3	28.72	22.98	39.13		90.82	-1.03

感细腻光滑，无颗粒感。

2.5.2 V_{EF} 发泡后记录泡沫体积，待泡沫完全破灭后，记录溶液体积，并根据公式(2)计算 V_{EF} ，结果见表4。平均 V_{EF} 达 14.38 ± 1.10 。



图8 Ind/INB-NFA 及喷出物外观性状

Fig. 8 Ind/INB-NFA and appearance of ejecta

$$V_{EF} = V_F / V_L \quad (2)$$

V_F 为泡沫体积， V_L 为泡沫基础液体积

2.5.3 泡沫特征和泡沫稳定性 分别于发泡后 0、1、2、4h 取适量泡沫于光学显微镜 400 倍镜下观察泡

表 4 V_{EF} 测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Measurement results of V_{EF} ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

实验号	每喷泡沫体积/cm ³	每喷液体体积/cm ³	V_{EF}
1	4.20	0.32	13.13
2	4.00	0.29	13.79
3	4.30	0.32	13.44
4	5.60	0.36	15.56
5	5.50	0.35	15.71
6	4.40	0.30	14.67
平均值	4.67±0.70	0.32±0.03	14.38±1.10
RSD/%	14.95	8.45	7.65

沫特征并记录显微下泡沫图像, 结果如图 9 所示。喷出 0 h, 泡沫丰富, 平均直径小, 泡沫之间连接紧密。4 h 大泡沫逐渐合并小泡沫, 泡沫直径变大, 数量减少, 但泡沫之间连接仍较紧密, 说明 Ind/INB-NFA 喷出泡沫 4 h 内能稳定维持泡沫形态, 满足直肠给药需求。

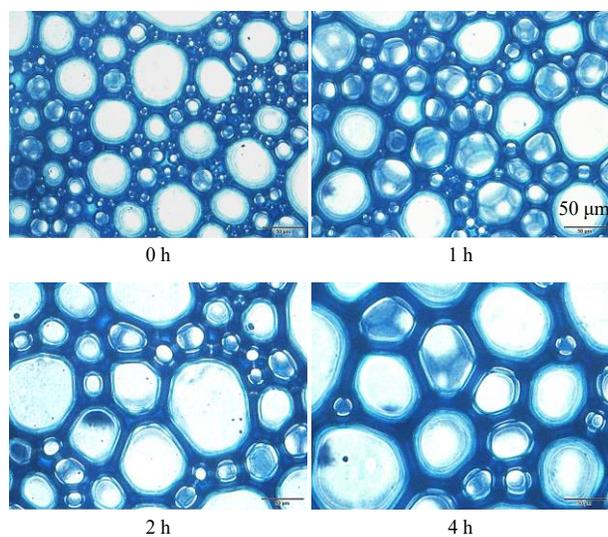


图 9 不同时间的泡沫显微图像

Fig. 9 Microscopic images of foam at different time

2.5.4 泡沫流动性 取适量泡沫于 90°垂直放置的玻璃板上, 0 min 时在泡沫最低端做好标记为原点, 分别在 5、15、30、45、60、120、240 min 时测定记录泡沫最低端离原点的距离, 结果如表 5 所示。第 240 min, 泡沫最低端距原点的平均距离为 (0.23±0.03) cm, 表明 Ind/INB-NFA 喷出泡沫 4 h 内的流动性不强, 能够滞留在给药部位较长时间。

2.6 离体直肠黏膜渗透性

取 SD 大鼠新鲜直肠组织, 生理盐水冲洗干净后浸入接收介质 30 min。加入 25 mL 保温至 37 °C 的模拟肠液至 Franz 接收池中, 用浸泡处理过的离体直肠膜将样品池和接收池隔离。将 Franz 扩散池

表 5 泡沫流动性测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Foam fluidity measurement results ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

t/min	距离/cm						平均值
	1	2	3	4	5	6	
5	0.05	0	0	0.10	0	0	0.03±0.04
15	0.05	0.05	0.05	0.10	0.05	0.05	0.06±0.02
30	0.05	0.10	0.10	0.15	0.10	0.10	0.10±0.03
45	0.10	0.15	0.20	0.20	0.15	0.10	0.15±0.04
60	0.15	0.15	0.25	0.20	0.20	0.15	0.18±0.04
120	0.15	0.20	0.25	0.20	0.20	0.15	0.19±0.04
240	0.20	0.25	0.25	0.20	0.25	0.20	0.23±0.03

放入智能透皮扩散仪中, 设置转速为 400 r/min, 温度为 37 °C, 向样品池中分别加入 2 g 的 Ind/INB 原料药、Ind/INB-NFA, 分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 取样 1 mL, 取样后立即补充释放介质 1 mL, 测定靛蓝、靛玉红含量, 按公式 (1) 计算靛蓝、靛玉红的累积黏膜透过率, 结果如图 10 所示。Ind/INB-NFA 中靛蓝、靛玉红 24 h 的累积黏膜透过率分别为 55.81%和 93.16%, 原料药中靛蓝、靛玉红 24 h 的累积黏膜透过率分别为 34.87%和 81.34%。同原料药相比, Ind/INB-NFA 中靛蓝、靛玉红 24 h 的累积黏膜透过率分别提高了 60.05%和 14.53%, 表明

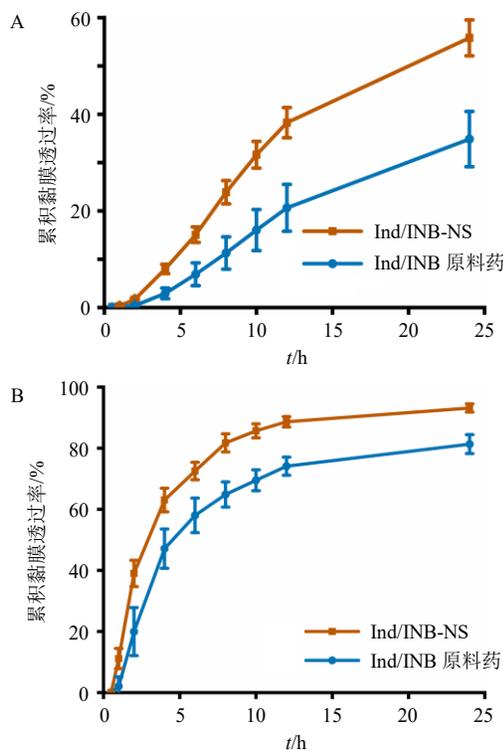


图 10 靛蓝 (A) 和靛玉红 (B) 的离体直肠黏膜渗透曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Isolated rectal mucosal penetration curves of indigo (A) and indirubin (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Ind/INB-NFA 能促进靛蓝、靛玉红透过直肠黏膜。

2.7 药效学评价

2.7.1 UC 动物模型建立 将 48 只成年健康 SD 大鼠随机分为 6 组，每组 8 只，雌雄各半，分别为空白组、模型组、美沙拉嗪组、Ind/INB-NFA 低剂量组、Ind/INB-NFA 中剂量组、Ind/INB-NFA 高剂量组。48 只大鼠适应性喂养 1 周后，空白组连续 7 d 饮用蒸馏水，除空白组外，其他各组大鼠自由饮用 4% 的 DSS 溶液，每 2 天更换 DSS 溶液，连续饮用 7 d。建立 DSS 诱导的 UC 大鼠模型。

2.7.2 给药方案 造模 3 d 后开始给药，具体给药方法为预先将药物装入连接特制直肠给药导管（直径 2 mm）的定量注射器内，使药物充盈导管腔，将导管缓慢置入大鼠肛门以上 6 cm，准确推注规定体积的药物至肠腔。空白组和模型组每天给予 1.5 mL 生理盐水灌肠；美沙拉嗪组每天给予 1.5 mL 美沙拉嗪灌肠液灌肠；Ind/INB-NFA 低剂量组每天给予 0.75 mL 的 Ind/INB-NFA 灌肠；Ind/INB-NFA 中剂量组每天给予 1.50 mL 的 Ind/INB-NFA 灌肠；Ind/INB-NFA 高剂量组每天给予 3.00 mL 的 Ind/INB-NFA 灌肠；每组均每日给药 2 次，连续给药 7 d。

2.7.3 统计学分析 所有实验数据采用 SPSS 27.0.1 软件进行分析处理，均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用单因素 ANOVA 分析各组数据， $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义， $P < 0.01$ 为差异极具统计学意义。采用 Origin 2018 软件作图。

2.7.4 一般状况 在实验期间每天观察大鼠有无活动减少、毛色异常及给药结束 1 d 后各组大鼠肛周情况。空白组大鼠毛色光洁，大便正常，肛周洁净无血便；模型组精神萎靡，软稀便伴随脓血，肛周处遗留粪便和血迹；美沙拉嗪组和 Ind/INB-NFA 低、中、高剂量组在药物干预后，腹泻便血情况得到明显改善。

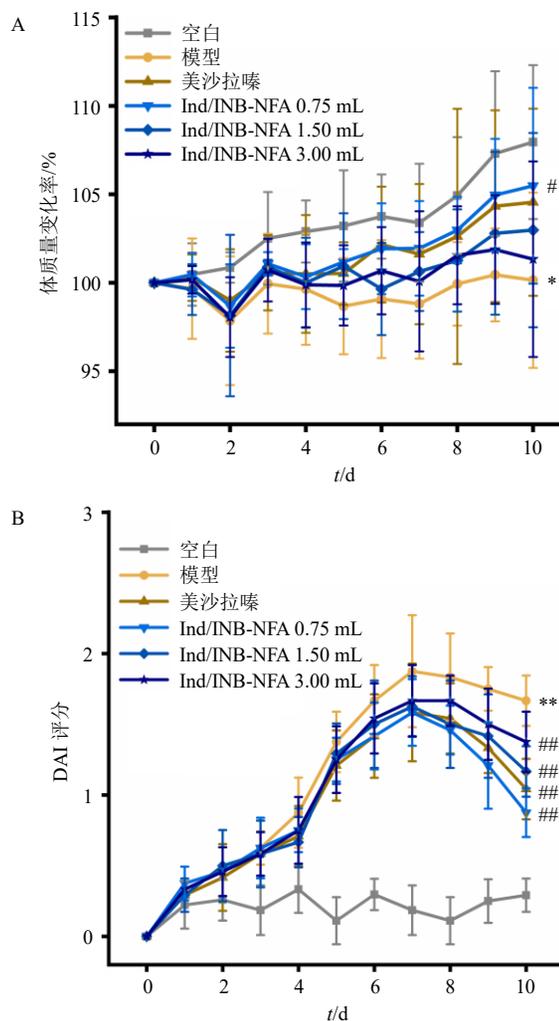
2.7.5 体质量及 DAI 评分 实验期间每日同一时间称取各组大鼠体质量，观察其大便性状及便血状况，按表 6 进行疾病活动指数（disease active index, DAI）评价， $DAI = (\text{体质量下降分数} + \text{大便性状分数} + \text{便血分数}) / 3^{[16]}$ 。

体质量变化趋势和 DAI 评分变化趋势如图 11 所示，空白组大鼠体质量逐渐上升，与空白组相比，模型组大鼠体质量下降 ($P < 0.05$)；与模型组相比，Ind/INB-NFA 低剂量组大鼠体质量变化率显著升高 ($P < 0.05$)，接近空白组。DAI 评分结果表明，模型

表 6 DAI 评分标准

Table 6 DAI scoring criteria

体质量下降率/%	大便性状	便血情况	评分
<1	正常	正常	0
[1, 5)	非常软但成型	隐血阳性	1
[5, 10)	半稀便	隐血阳性	2
[10~15)	稀便	隐血阳性	3
≥15	较重稀便	肉眼便血	4



与空白组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与模型组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group.

图 11 体质量 (A) 及 DAI 评分 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 11 Weight (A) and DAI score (B) ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组在第 5 天出现大量稀便、便血现象，DAI 评分显著升高，说明造模成功。第 10 天时，与模型组相比，所有药物干预组的评分均降低 ($P < 0.01$)。此外，由于第 7 天开始停止了 DSS 造模，导致第 8 天后模型组 DAI 评分也有小幅降低。

2.7.6 结直肠长度和肠质量系数 第 7 天给药结束

后，大鼠禁食不禁水 24 h，将各组大鼠处死，取出完整结肠记录结肠长度。而后解剖取自肛门往上约 10 cm 肠段，去除结肠的内容物并用生理盐水冲洗干净，滤纸吸干表面水分后，取 5 cm 肠段称定质量，按照公式 (3) 计算肠质量系数，结果见图 12 和表 7。与空白组相比，模型组的结肠长度明显减小 ($P < 0.05$)；与模型组相比，Ind/INB-NFA 低、中剂量组的结肠长度均有显著性增加 ($P < 0.05$)。与空白组相比，模型组的肠质量系数明显增加 ($P < 0.01$)；与模型组相比，所有给药组的肠质量系数均明显降低 ($P < 0.01$)。

$$C_{cw} = W_c / W_B \quad (3)$$

C_{cw} 为结肠质量系数， W_c 为结肠质量， W_B 为体质量



图 12 大鼠结肠长度代表性图像

Fig. 12 Representative image of colorectal length in rats

表 7 结肠长度统计和肠质量系数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Statistics of colorectal length and intestinal weight coefficient ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mL	直肠长度/cm	肠质量系数
空白	-	20.41 ± 1.13	0.106 ± 0.014
模型	-	18.74 ± 1.79*	0.175 ± 0.029**
美莎拉嗪	1.50	19.88 ± 0.64	0.134 ± 0.022##
Ind/INB-NFA	0.75	20.26 ± 1.69#	0.127 ± 0.023##
	1.50	20.36 ± 0.90#	0.115 ± 0.006##
	3.00	19.85 ± 0.90	0.128 ± 0.014##

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 9 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; same as table 9.

2.7.7 结肠 HE 染色 使用显微镜对 HE 染色切片进行扫描拍照，并且采用 Cooper 标准评估整个结肠的病变或组织病理改变，评分标准见表 8。组织病理学检测结果见表 9 和图 13，空白组肠组织中黏膜上皮主要由单层柱状上皮和杯状细胞组成，固有

表 8 结肠病理评分标准

Table 8 Scoring criteria for colon pathology

分值	现象
0	正常肠黏膜
1	黏膜层轻度炎症和水肿，基底部 1/3 隐窝消失
2	黏膜层中度炎症，基底部 2/3 隐窝消失
3	黏膜层中度炎症，隐窝完全消失，但上皮层尚完整
4	黏膜层、黏膜下层、肌层重度炎症，隐窝和上皮层消失

表 9 各组大鼠病理评分 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 9 Pathological scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mL	病理评分
空白	-	0.38 ± 0.52
模型	-	3.38 ± 0.52**
美莎拉嗪	1.50	1.63 ± 0.74##
Ind/INB-NFA	0.75	1.50 ± 0.53##
	1.50	2.13 ± 0.35##
	3.00	2.75 ± 0.71##

层内隐窝数量丰富，排列密集，未见其他明显异常；模型组与空白组相比，可见大范围溃疡，隐窝与肠黏膜上皮破坏，损伤处可见多量结缔组织增生，并伴有大量淋巴细胞与粒细胞浸润，结肠组织病理损伤评分显著高于空白组 ($P < 0.01$)；与模型组相比，美莎拉嗪组和 Ind/INB-NFA 低、中、高剂量组炎症细胞浸润减少，肠黏膜上皮细胞完整，隐窝数量增多，结肠组织病理损伤评分显著降低 ($P < 0.01$)。可见，Ind/INB-NFA 可显著降低结肠组织的病理损伤评分，对 UC 大鼠的结肠黏膜显示出良好保护作用。

3 讨论

靛蓝和靛玉红是青黛治疗 UC 的药效成分，为芳香烃受体 (aromatic hydrocarbon receptor, AhR) 的配体^[17]，可通过黏膜固有淋巴细胞的 AhR 促进 IL-10/IL-22 的释放发挥治疗作用，从而减少炎症细胞的浸润，修复肠黏膜损伤^[18]。靛蓝可降低血清中促炎因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 和 TNF- α 水平，提高抑炎因子 IL-10 水平^[19]，靛玉红可上调 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞 Foxp3 表达和抑制效应 T 细胞增殖与分化来减轻肠道炎症反应，同时增加紧密连接蛋白 ZO-1 表达，改善肠上皮屏障功能^[20]。然而，靛蓝和靛玉红的溶解性、渗透性均很低，是制约其疗效价值发挥的关键问题。本研究通过球磨技术和辅料表面修饰，成功制得可改善靛蓝、靛玉红溶解性和渗透性的 Ind/INB-NS，显著改善了其成药性。

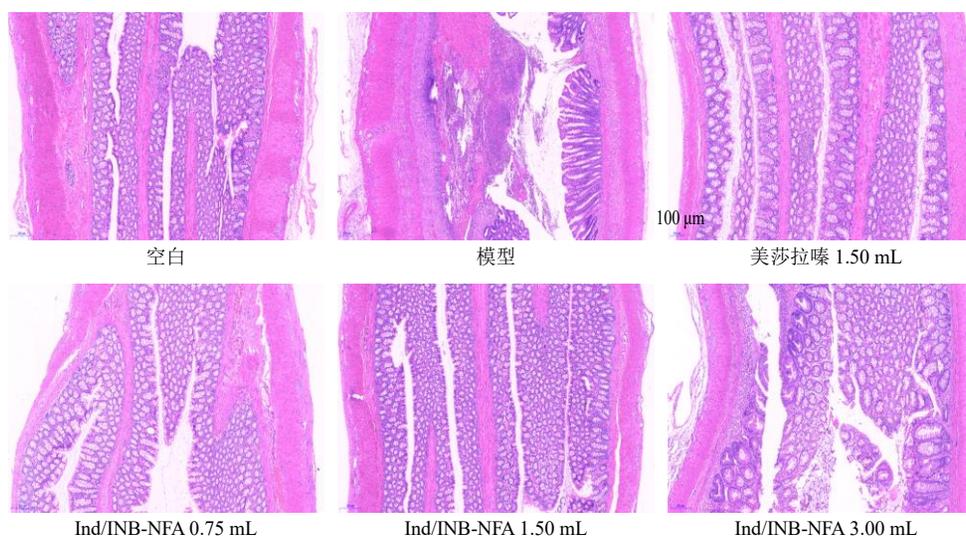


图 13 结肠 HE 染色代表性图像

Fig. 13 Representative image of colon HE staining

相较于常规直肠用剂型存在的易泄露、药物分布不均、异物感强、机械刺激大等问题，泡沫气雾剂利用抛射剂产生的泡沫膨胀效应，极大地扩展了药物在结直肠的覆盖面积和均匀性，使药物能更有效接触深层溃疡病灶；且泡沫具有黏附性，显著延长了药物在黏膜表面的滞留时间，增强局部作用时效；此外，泡沫能无创地深入肠腔，轻柔地贴合黏膜皱襞和溃疡面，大幅降低给药不适感，显著提升患者依从性，并确保药物在广泛病灶区域达到高浓度，从而实现更高效的治疗^[11-12]。本研究开发的纳米泡沫气雾剂以纳米混悬体为药物载体，结合泡沫气雾剂的递送优势，不仅解决了靛蓝、靛玉红生物利用度低的问题，更充分发挥了该剂型效能，从而协同增强靛蓝、靛玉红的疗效。

泡沫因轻质、机械强度低和大比表面积导致其热力学不稳定，主要表现为重力排液、液膜破裂、气体扩散等^[21-22]。在 Ind/INB-NFA 制剂处方中，组分辅料间存在多元相互作用机制。SLS 和 Brij® S10 均具有低刺激性和优异起泡能力，二者混合后亲水端与疏水端通过分子间作用力可协同降低液体表面张力^[23]。十六醇及十六十八醇作为长链脂肪醇，其分子结构与 SLS 相似，可在气液界面形成致密混合吸附膜，通过增强液膜机械强度提升泡沫稳定性^[24]。由于十六醇与十六十八醇的水溶性极低，前期实验发现以纯水为分散介质时体系存在显著相分离倾向。引入 SLS 和 Brij® S10 进行乳化增溶虽可实现初始分散，但冷却过程中仍出现白色结晶析出。经优化，采用丙二醇为溶剂预溶解 SLS、Brij® S10、

十六醇及十六十八醇构成疏水基质，再于高温条件下与 Ind/INB-NS 搅拌乳化均匀，所得泡沫基质液呈现均一稳定状态。在压灌 20% 的 HFA-134a 后喷出泡沫性能良好，满足直肠使用需求。

直肠给药的黏膜与组织穿透性是制约药效发挥的关键，本研究所构建的 Ind/INB-NFA 中靛蓝、靛玉红 24 h 的累积黏膜透过率分别为 55.81% 和 93.16%，靛蓝的透过率仍不高。靛蓝因对称的分子平面结构，其偶极矩相对较低，靛玉红为非对称和非平面的结构，其偶极矩较高^[25-26]。较高的偶极矩可能使靛玉红与膜脂质极性头部基团或膜蛋白的亲水区域产生更有利的瞬时相互作用，有助于其在膜界面定位或促进其“溶解”在膜结构中，从而促进跨膜转运，而靛蓝较低的偶极矩降低了其跨膜渗透效率。此外，直肠黏膜表面的极性黏液层也可能阻滞了偶极矩更低的靛蓝渗透扩散。因此，针对靛蓝的低渗透问题，后续可考虑通过分子结构修饰或前药设计等策略以进一步提高其渗透性。

综上，本研究制备得到了靛蓝-靛玉红纳米混悬液，改善了靛蓝与靛玉红溶解度低、渗透性差的问题，并以此为中间体，成功制备了靛蓝-靛玉红纳米泡沫气雾剂，对 DSS 诱导建立的 UC 大鼠模型有显著疗效。本研究为推动靛蓝、靛玉红治疗 UC 应用开发提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张曦, 徐小婷, MOHAMMED Ismail, 等. 青黛及其有效成分抗溃疡性结肠炎药理作用及机制的研究进展

- [J]. 药物评价研究, 2022, 45(5): 997-1002.
- [2] Wu D Z, Huang Q, Xu Y B, *et al.* Clinical efficacy and future application of indigo naturalis in the treatment of ulcerative colitis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt 1): 118782.
- [3] Yang Q Y, Ma L L, Zhang C, *et al.* Exploring the mechanism of indigo naturalis in the treatment of ulcerative colitis based on TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway and gut microbiota [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 674416.
- [4] Saiki J P, Andreasson J O, Grimes K V, *et al.* Treatment-refractory ulcerative colitis responsive to indigo naturalis [J]. *BMJ Open Gastroenterol*, 2021, 8(1): e000813.
- [5] Xie J, Tian S M, Liu J, *et al.* Combination therapy with indigo and indirubin for ulcerative colitis via reinforcing intestinal barrier function [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023: 2894695.
- [6] Kakran M, Shegokar R, Sahoo N G, *et al.* Long-term stability of quercetin nanocrystals prepared by different methods [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(10): 1394-1402.
- [7] Fontana F, Figueiredo P, Zhang P, *et al.* Production of pure drug nanocrystals and nano co-crystals by confinement methods [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 131: 3-21.
- [8] Li J R, Wang Z M, Zhang H, *et al.* Progress in the development of stabilization strategies for nanocrystal preparations [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 19-36.
- [9] Stahr P L, Grewal R, Eckert G P, *et al.* Investigating hesperetin nanocrystals with tailor-made sizes for the prevention and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2021, 11(2): 659-674.
- [10] Naganuma M, Sugimoto S, Suzuki H, *et al.* Adverse events in patients with ulcerative colitis treated with indigo naturalis: A Japanese nationwide survey [J]. *J Gastroenterol*, 2019, 54(10): 891-896.
- [11] 余红芳, 吴仁杰, 邹佳峰, 等. 黄芩苷脂质纳米泡沫气雾剂的制备工艺优化 [J]. 中国药房, 2022, 33(8): 943-949.
- [12] 张星贤, 侯玉婷, 曹杰, 等. 两性霉素 B 阴道用纳米泡沫剂的制备及评价 [J]. 中国药学杂志, 2019, 54(13): 1078-1085.
- [13] 陈美婉, 陈昕, 潘昕, 等. 药用泡沫气雾剂的研究和应用概况 [J]. 药学进展, 2009, 33(12): 549-552.
- [14] 陈永顺, 杨斌. 马来酰亚胺修饰的柠檬苦素纳米粒的制备、表征及其口服药动力学研究 [J]. 中草药, 2025, 56(2): 487-498.
- [15] Xie J, Huang Q, Xie H J, *et al.* Hyaluronic acid/inulin-based nanocrystals with an optimized ratio of indigo and indirubin for combined ulcerative colitis therapy via immune and intestinal flora regulation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 252: 126502.
- [16] Lin Y K, See L C, Huang Y H, *et al.* Comparison of refined and crude indigo naturalis ointment in treating psoriasis: Randomized, observer-blind, controlled, inpatient trial [J]. *Arch Dermatol*, 2012, 148(3): 397-400.
- [17] Yoshimatsu Y, Sujino T, Miyamoto K, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor signals in epithelial cells govern the recruitment and location of Helios⁺ Tregs in the gut [J]. *Cell Rep*, 2022, 39(6): 110773.
- [18] Hubbard T D, Murray I A, Perdew G H. Indole and tryptophan metabolism: Endogenous and dietary routes to ah receptor activation [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(10): 1522-1535.
- [19] 王婷, 吴柯楠, 吴冬芝, 等. 靛蓝对葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群作用研究 [J]. 中国微生物生态学杂志, 2022, 34(12): 1374-1382.
- [20] 何新颖, 唐志鹏, 马贵同, 等. 靛玉红对 DSS 诱导结肠炎小鼠紧密连接蛋白 ZO-1 表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(4): 7-10.
- [21] Hoc D, Haznar-Garbacz D. Foams as unique drug delivery systems [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2021, 167: 73-82.
- [22] Zhao Y J, Brown M B, Jones S A. Pharmaceutical foams: Are they the answer to the dilemma of topical nanoparticles? [J]. *Nanomedicine*, 2010, 6(2): 227-236.
- [23] 刘泽晖, 陈蔚燕. 非离子表面活性剂复配体系泡沫性的研究 [J]. 现代化工, 2022, 42(S2): 329-331.
- [24] 蒋平, 郑玉飞, 陈文征, 等. 十二烷基硫酸钠-长链醇体系泡沫性能与表面参数关系研究 [J]. 中国石油大学学报: 自然科学版, 2014, 38(1): 143-147.
- [25] Mollica Nardo V, Cassone G, Ponterio R C, *et al.* Electric-field-induced effects on the dipole moment and vibrational modes of the centrosymmetric indigo molecule [J]. *J Phys Chem A*, 2020, 124(51): 10856-10869.
- [26] Ju Z X, Sun J, Liu Y P. Molecular structures and spectral properties of natural indigo and indirubin: Experimental and DFT studies [J]. *Molecules*, 2019, 24(21): 3831.

[责任编辑 郑礼胜]