

藤黄有效成分的纳米囊制备及其抗糖尿病活性评价[△]

战 鹤^{1*}, 韩 璐¹, 何忠梅¹, 时 坤¹, 赵 岩¹, 宗 颖¹, 陈维佳^{1#}, 杜 锐^{1,2,3} (1. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2. 教育部动物生产及产品质量安全重点实验室, 长春 130118; 3. 吉林省梅花鹿高效养殖和产品开发技术工程研究中心, 长春 130118)

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)09-1075-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.09.09



摘 要 目的 制备藤黄酸(GA)、新藤黄酸(NGA)的纳米囊(GA-LNCs、NGA-LNCs), 并进行其抗糖尿病活性评价。方法 以水为水相、中链甘油三酯为油相、聚乙二醇单硬脂酸酯为表面活性剂, 采用相转换法制备GA-LNCs、NGA-LNCs。以包封率和载药量为指标, 利用单纯型网格设计法优化上述2种纳米囊的处方工艺, 并对其理化性质进行考察。建立糖尿病小鼠模型, 灌胃给予GA-LNCs、NGA-LNCs(剂量分别为1.92、2.42 mg/kg), 每天1次, 连续给药6周, 检测小鼠空腹血糖值和血清中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性以及丙二醛(MDA)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量。结果 这2种纳米囊的最优处方均为60%水、10%中链甘油三酯、30%聚乙二醇单硬脂酸酯(三者总量固定为2 g)以及35 mg GA或NGA。以最优处方制得的GA-LNCs、NGA-LNCs的包封率分别为(92.01±0.68)%、(93.12±2.11)%, 载药量分别为(0.99±0.21)%、(1.21±0.22)%; 两者均为黄色均一透明液体, 无沉淀, 微观形态均为类球形, 且具有明显的壳膜结构, 粒径分别为(28.11±9.76)、(22.06±6.84) nm, Zeta电位分别为(-4.09±1.00)、(-17.40±1.32) mV, 多分散系数分别为0.93±0.06、0.74±0.12。动物实验结果显示, GA-LNCs、NGA-LNCs均可显著升高模型小鼠血清中SOD、GSH-Px活性和HDL-C含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 显著降低模型小鼠空腹血糖值和血清中MDA、TC、TG、LDL-C含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 本研究制得的GA-LNCs、NGA-LNCs理化性质良好, 且具有良好的抗糖尿病活性。

关键词 藤黄酸; 新藤黄酸; 纳米囊; 糖尿病; 制备

Preparation of nanocapsules of active ingredients of *Garcinia hanburyi* and evaluation of their antidiabetic activity

ZHAN He¹, HAN Lu¹, HE Zhongmei¹, SHI Kun¹, ZHAO Yan¹, ZONG Ying¹, CHEN Weijia¹, DU Rui^{1, 2, 3} (1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Key Laboratory of Animal Production, Product Quality and Security, Ministry of Education of China, Changchun 130118, China; 3. Jilin Provincial Engineering Research Center for Efficient Breeding and Product Development of Sika Deer of China, Changchun 130118, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare Gambogic acid (GA) nanocapsules (GA-LNCs) and Neogambogic acid (NGA) nanocapsules (NGA-LNCs), and to evaluate their antidiabetic activities. **METHODS** Using water as the aqueous phase, medium-chain triglyceride as the oil phase and polyethylene glycol monostearate as the surfactant, GA-LNCs and NGA-LNCs were prepared by phase inversion method. Using entrapment efficiency and drug-loading amount as index, the formulation technologies of above 2 nanocapsules were optimized by simplex lattice design. Its physical and chemical properties were investigated. The diabetic mice model was established. GA-LNCs and NGA-LNCs (1.92 and 2.42 mg/kg respectively) were given intragastrically, once a day, for consecutive 6 weeks. The fasting blood glucose of mice, the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), the contents of malondialdehyde (MDA), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were all detected. **RESULTS** The optimal formulation of 2 kinds of nanocapsules included 60% water, 10% medium-chain triglyceride, 30% polyethylene glycol monostearate (total amount of the three was 2 g) and 35 mg GA or NGA. The encapsulation efficiencies of GA-LNCs and NGA-LNC obtained by the optimal formulation were (92.01±0.68)% and (93.12±2.11)%; the drug-loading amount were (0.99±0.21)% and (1.21±0.22)%, respectively. GA-LNCs and NGA-LNCs were yellow, homogeneous and transparent liquid without precipitation. They were

[△] 基金项目: 吉林省科技发展规划项目(No.20200404090YY); 吉林省教育厅科学技术研究项目(No.JJKH20210372KJ)

* 硕士研究生。研究方向: 植物药。E-mail: zhanhe0108@163.com

通信作者: 讲师, 博士。研究方向: 中药有效成分治疗疾病的作用机制。E-mail: chenweijia_jlau@163.com

spherical in microscopic shape, and had obvious shell-membrane structure. The particle sizes were (28.11±9.76) and (22.06±6.84) nm; Zeta potential were (-4.09±1.00) and (-17.40±1.32) mV, and polydispersity were 0.93±0.06 and 0.74±0.12. The results of animal experiments showed that both GA-LNCs and NGA-LNCs could significantly increase

the activities of SOD and GSH-Px and the serum content of HDL-C ($P<0.05$ or $P<0.01$) in model mice, and significantly decreased the fasting blood glucose and the serum contents of MDA, TC, TG and LDL-C ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** GA-LNCs, NGA-LNCs prepared in this study are good in physical and chemical properties and have good anti-diabetes activity.

KEYWORDS gambogic acid; neogambogic acid; nanocapsules; diabetes; preparation

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种由遗传、环境和自身免疫等复合病因所引起的慢性代谢性疾病,其可诱发微血管和大血管病变、神经系统并发症等^[1]。2020年全国流行病学统计显示,我国糖尿病患者总人数约1.298亿,且患病率保持持续增长的趋势^[2]。目前,治疗DM的药物只能短暂地使患者血糖水平正常化^[3]。因此,从天然产物中寻找治疗DM且毒副作用小的药物是当今研究的热点。

藤黄为双子叶植物藤黄科藤黄属植物藤黄 *Garcinia hanburyi* Hook. f.的胶状树脂^[4],早在《海药本草》中就有记载,现收录于《中药大辞典》中,其味酸涩、性凉、有毒,具有治疗痈疽肿毒、顽癣恶疮、损伤出血等功效^[5-6]。现代研究表明,藤黄还具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、神经保护等作用^[7-11];其主要含有以藤黄酸(gambogic acid, GA)和新藤黄酸(neogambogic acid, NGA)为代表的笼状氧杂蒽酮类成分^[12-13]。这2种成分均具有较好的抗肿瘤效果,可通过多途径抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移,并诱导细胞凋亡^[14]。另外,本课题组也首次发现,GA和NGA均具有降血糖作用,且该项研究成果已获国家授权发明专利(专利号为ZL 2014 1 0092956.9)^[15]。但这2种成分均具有一定刺激性,且难溶于水、生物利用度较低、血管刺激性较大^[16-17],因此极大地限制了其临床应用。

纳米制剂包括纳米粒、纳米囊等,粒径介于1~1 000 nm,性质稳定、制备简便^[18];且其对人体无毒,生物相容性较好,包载药物后可降低对正常器官、组织及全身的副作用,并改善难溶性药物的溶解度^[19-21]。纳米囊根据成囊材料的不同可分为聚合物纳米囊和类脂纳米囊^[22-23]。其中,类脂纳米囊是核-壳结构的新型载药系统,类似脂蛋白的结构,主要包裹亲脂药物^[24]。基于此,本研究采用相转换法^[25]将GA、NGA制成纳米囊(即类脂纳米囊),对其粒径、微观形态、Zeta电位、X-射线衍射等理化性质以及体外抗DM活性进行考察,以期DM新药开发提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),2489型紫外可见分光光度计(美国Waters公司),BS210S型万分之一电子天平(德国Sartorius公司),FD-IC50型真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),MIX15 eco型磁力加速搅拌器(常州市国旺仪器制造有限公司),FEI G2 120KV型透射电镜、m3000型马尔文激光粒度分析仪、BeNano 90 Zeta

型纳米粒度电位仪(丹东百特仪器有限公司),TGL-16M型低速离心机(上海科雅生物科技有限公司),DNM-9602型酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司),活力型罗氏血糖仪(杭州欧英米电子商务有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

GA、NGA原料药由本实验室自制(质量分数均大于98%);本研究所用其他药品与试剂有:大孔吸附树脂D101(天津市光复精细化工研究所,批号1021Q011),中链甘油三酯、葡聚糖凝胶G-50、二甲双胍(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为20111028、413B052、H20051277),聚乙二醇单硬脂酸酯(上海麦克林生化科技有限公司,批号20150905),D-甘露醇(北京酷来博科技有限公司,批号20110603),链脲佐菌素(streptozocin, STZ,美国Sigma公司,批号WXBC6558V),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20180608、20210417、20120323、20181129、20181116、20181129、20181116);GA、NGA对照品(成都德思特生物技术有限公司,批号分别为DT0015、DX0071,纯度均大于98%);其余试剂为实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级C57BL/6J小鼠,共60只,雄性,体质量为18~22 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0008。将小鼠饲养于温度20~26℃、相对湿度40%~70%的条件下,期间自由饮水与摄食,适应性饲养1周后进行实验。

2 方法与结果

2.1 GA、NGA的含量测定

2.1.1 溶液的配制 (1)对照品溶液的配制:分别精密称取GA、NGA对照品2.00 mg,置于10 mL量瓶中,以乙腈定容,分别制成GA、NGA质量浓度均为0.20 mg/mL的对照品溶液,备用。(2)供试品溶液的配制:分别精密吸取“2.2.1”项下GA纳米囊(GA-LNCs)、NGA纳米囊(NGA-LNCs)0.1 mL至不同10 mL量瓶中,以乙腈定容,即得GA-LNCs、NGA-LNCs供试品溶液。

2.1.2 色谱条件 色谱柱为Silversil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(90:10, V/V);

流速为 1 mL/min;检测波长为 360 nm;柱温为 30 ℃;进样量为 10 μL。

2.1.3 专属性试验 取“2.1.1”项下 GA、NGA 对照品溶液和 GA-LNCs、NGA-LNCs 供试品溶液适量,按“2.1.2”项下色谱条件进行分析,记录色谱图。结果显示,各样品中 GA 和 NGA 的峰形均较好,且不受辅料及空白溶剂的影响,结果见图 1。

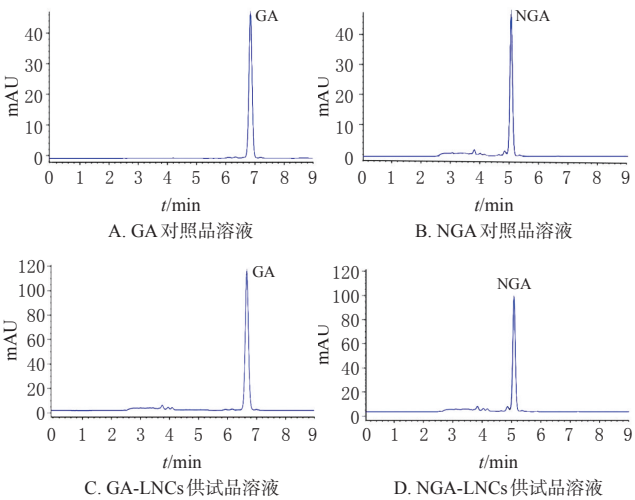


图 1 GA、NGA 含量测定的专属性试验色谱图

2.1.4 线性关系考察 取“2.1.1”项下 GA、NGA 对照品溶液适量,分别制成质量浓度均为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.12、0.16、0.20 mg/mL 的系列溶液,再按“2.1.2”项下色谱条件进样分析,以各对照品的质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归。结果显示,GA、NGA 的回归方程分别为 $Y=14\,970X-33(R^2=0.999\,6)$ 、 $Y=10\,050X-17(R^2=0.999\,6)$,检测质量浓度线性范围均为 0.01~0.20 mg/mL。

2.1.5 精密度试验 分别精密吸取“2.1.1”项下 GA、NGA 对照品溶液适量,按“2.1.2”项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果显示,GA、NGA 峰面积的 RSD 分别为 0.87%、0.99% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取 GA-LNCs、NGA-LNCs 适量,各 6 份,分别按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.2”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,根据标准曲线计算 GA、NGA 的含量。结果显示,GA-LNCs、NGA-LNCs 中 GA、NGA 的平均含量分别为 9.01、8.64 mg/g, RSD 分别为 0.88%、1.42% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取 GA-LNCs、NGA-LNCs 适量,分别按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,然后于室温放置 0、4、6、12、24、48 h 后,按“2.1.2”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果显示,GA、NGA 峰面积的 RSD 分别为 0.98%、1.66% ($n=6$),表明这 2 种供试品溶液在室温放置 48 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 吸取已知 GA、NGA 含量的

GA-LNCs、NGA-LNCs 供试品溶液,各 6 份,分别加入 GA 对照品 760.47 μg、NGA 对照品 526.48 μg,然后按“2.1.2”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,并计算加样回收率。结果显示,GA、NGA 的平均加样回收率分别为 98.94%、97.63%, RSD 分别为 2.05%、3.69% ($n=6$)。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验的测定结果($n=6$)

成分	样品中含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
GA	821.00	760.47	1 561.21	97.30	98.94	2.05
	806.40	760.47	1 548.20	97.54		
	810.69	760.47	1 549.50	97.10		
	813.20	760.47	1 589.22	102.00		
	794.44	760.47	1 560.35	100.72		
	802.64	760.47	1 554.21	98.83		
	568.29	526.48	1 056.66	97.33		
NGA	579.02	526.48	1 097.24	97.54	97.63	3.69
	556.44	526.48	1 067.76	97.16		
	587.00	526.48	1 104.76	102.04		
	566.98	526.48	1 102.11	100.72		
	568.33	526.48	1 065.49	98.83		

2.2 GA-LNCs、NGA-LNCs 的制备工艺研究

2.2.1 纳米囊的制备 采用相转化法^[25]进行制备。以中链甘油三酯为油相、水为水相、聚乙二醇单硬脂酸酯为表面活性剂^[26],按相应比例混合后,加入 GA 或 NGA 原料药 35 mg,于室温下匀速搅拌至药物溶解;控制搅拌温度使其匀速上升或下降,完成室温→85 ℃→60 ℃→85 ℃→60 ℃→85 ℃→72 ℃的循环,以形成稳定的均相体系;当温度下降至 70 ℃左右时,立即加入适量冰水并搅拌均匀,形成均一稳定的透明溶液,即得相应纳米囊。

2.2.2 载药量和包封率的测定 将葡聚糖凝胶 G-50 充分溶胀在水中 24 h,然后填入注射器使水分自然滤出,再将注射器置于 15 mL 离心管中,以 500 r/min 离心 1 min,除去多余的水分,即得凝胶柱。取所制得的纳米囊 100 μL 均匀加入凝胶柱,洗脱 5 次,每次用 0.1 mL 水洗脱,收集洗脱液,置于 5 mL 量瓶中,加入乙腈定容,按“2.1.2”项下色谱条件进样分析,并计算包入的药量 W_1 。另取 100 μL 纳米囊,加入乙腈定容至 5 mL,按“2.1.2”项下色谱条件进样分析,并计算总药量 W_2 。然后根据公式计算载药量和包封率:载药量= $W_1/W_3\times 100\%$ (W_3 为纳米囊的总质量),包封率= $W_1/W_2\times 100\%$ 。

2.2.3 网格法优化 GA-LNCs、NGA-LNCs 的处方 以包封率和载药量为优化指标,以水相、油相、表面活性剂的比例为考察因素(固定总量为 2 g),采用 {3,2} 单纯型网格设计法对 GA-LNCs、NGA-LNCs 的处方工艺进行优化^[26]。GA-LNCs、NGA-LNCs 单纯型网格法实验设计和结果见表 2、表 3。进一步通过 Origin 作图分析,得到载药量和包封率的三维图和等高线图,两者等高线图的叠加部分为载药量和包封率均较高的区域,即形成纳米囊的最优处方,结果见图 2、图 3。结果显示,当油相比例越小、水相比例越大时,GA-LNCs、NGA-LNCs 的载药量和

包封率均越高。由此可知,GA-LNCs、NGA-LNCs的最优处方均为60%水、10%中链甘油三酯、30%聚乙二醇单硬脂酸酯(三者总量固定为2 g)以及35 mg GA或NGA。

表2 GA-LNCs单纯型网格法的实验设计和结果

序号	处方比例			包封率/%	载药量/%
	水相/%	油相/%	表面活性剂/%		
1	60	10	30	94.68±1.65	1.46±0.35
2	50	10	40	91.24±3.54	1.01±0.55
3	40	10	50	86.45±4.22	1.21±0.54
4	35	15	50	92.06±0.96	0.54±0.62
5	30	35	35	84.25±2.33	0.87±0.48
6	50	20	30	88.01±1.96	0.78±0.60
7	20	40	40	79.06±4.00	1.14±0.36
8	25	45	20	86.22±3.66	0.55±0.58

表3 NGA-LNCs单纯型网格法的实验设计和结果

序号	处方比例			包封率/%	载药量/%
	水相/%	油相/%	表面活性剂/%		
1	60	10	30	95.66±1.86	1.26±0.54
2	50	10	40	88.31±3.41	1.02±0.11
3	40	10	50	82.87±2.01	0.98±0.22
4	35	15	50	90.14±0.99	0.87±0.31
5	30	35	35	82.42±5.32	0.77±0.95
6	50	20	30	88.22±2.01	0.72±0.53
7	20	40	40	84.35±3.65	1.11±0.35
8	25	45	20	85.26±4.01	0.53±0.14

2.2.4 处方验证 按“2.2.3”项下优化的处方工艺,制备GA-LNCs、NGA-LNCs,平行3批,然后测定其包封率和载药量。结果显示,GA-LNCs的包封率和载药量分别为(92.01±0.68)%、(0.99±0.21)%,NGA-LNCs的包封率和载药量分别为(93.12±2.11)%、(1.21±0.22)%。

2.3 GA-LNCs、NGA-LNCs的理化性质考察

2.3.1 外观性状观察 取“2.2.4”项下制备的GA-LNCs、NGA-LNCs 适量,加入冰水,于室温条件下放置24 h后,观察其是否有沉淀。结果显示,GA-LNCs、NGA-LNCs均为黄色均一透明液体,且均无沉淀。

2.3.2 透射电镜观察 取“2.2.4”项下制备的GA-LNCs、NGA-LNCs 适量,以水稀释后,滴加至铜网,再以2%磷钨酸染色,待自然晾干后,采用透射电镜进行观察。结果显示,GA-LNCs、NGA-LNCs均为类球形,大小均匀,且具有明显的壳膜结构。结果见图4。

2.3.3 粒径、Zeta 电位、多分散系数的测定 取“2.2.4”项下制备的GA-LNCs、NGA-LNCs 适量,采用马尔文激光粒度分析仪和纳米粒度电位仪测定其粒径、Zeta 电位、多分散系数(polydispersity, PDI)。结果显示,GA-LNCs、NGA-LNCs的粒径分别为(28.11±9.76)、(22.06±6.84) nm, Zeta 电位分别为(−4.09±1.00)、(−17.40±1.32) mV, PDI分别为0.93±0.06、0.74±0.12。

2.3.4 X-射线衍射分析 X-射线衍射分析是研究药物晶体结构的有效手段,不同的晶体结构在不同位置会有强吸收峰。本研究选择甘露醇作为冻干保护剂,在GA-LNCs制备完成后加入甘露醇搅拌至溶解,以保护GA-LNCs的形态结构。取GA原料药、甘露醇、GA-LNCs(以甘露醇冻干)、甘露醇与GA-LNCs的物理混合物进行X-射线衍射分析。设置管压为40 kV,管流为40 mA,衍射角2θ范围为10°~70°,扫描速度为4°/min。结果显示,GA存在晶型结构,主要衍射峰在

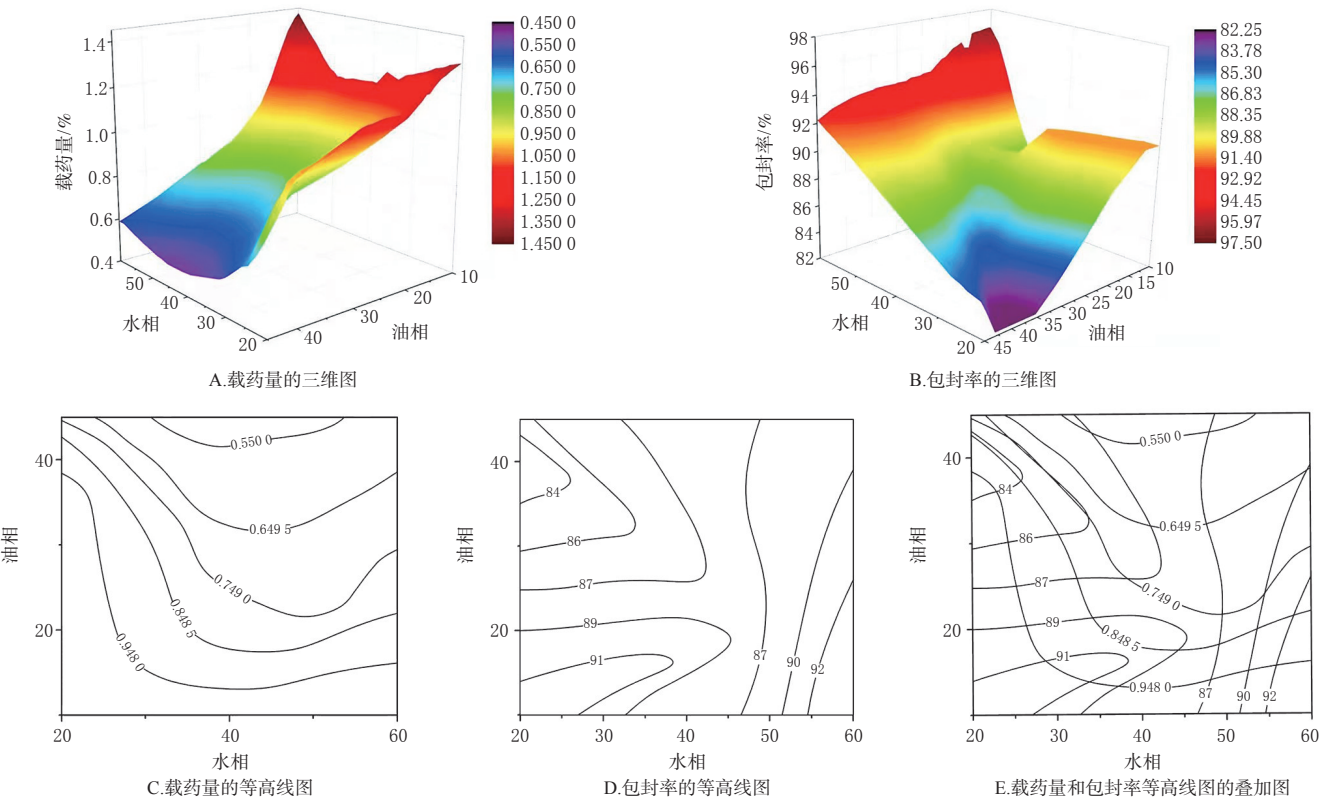


图2 GA-LNCs载药量和包封率的三维图和等高线图

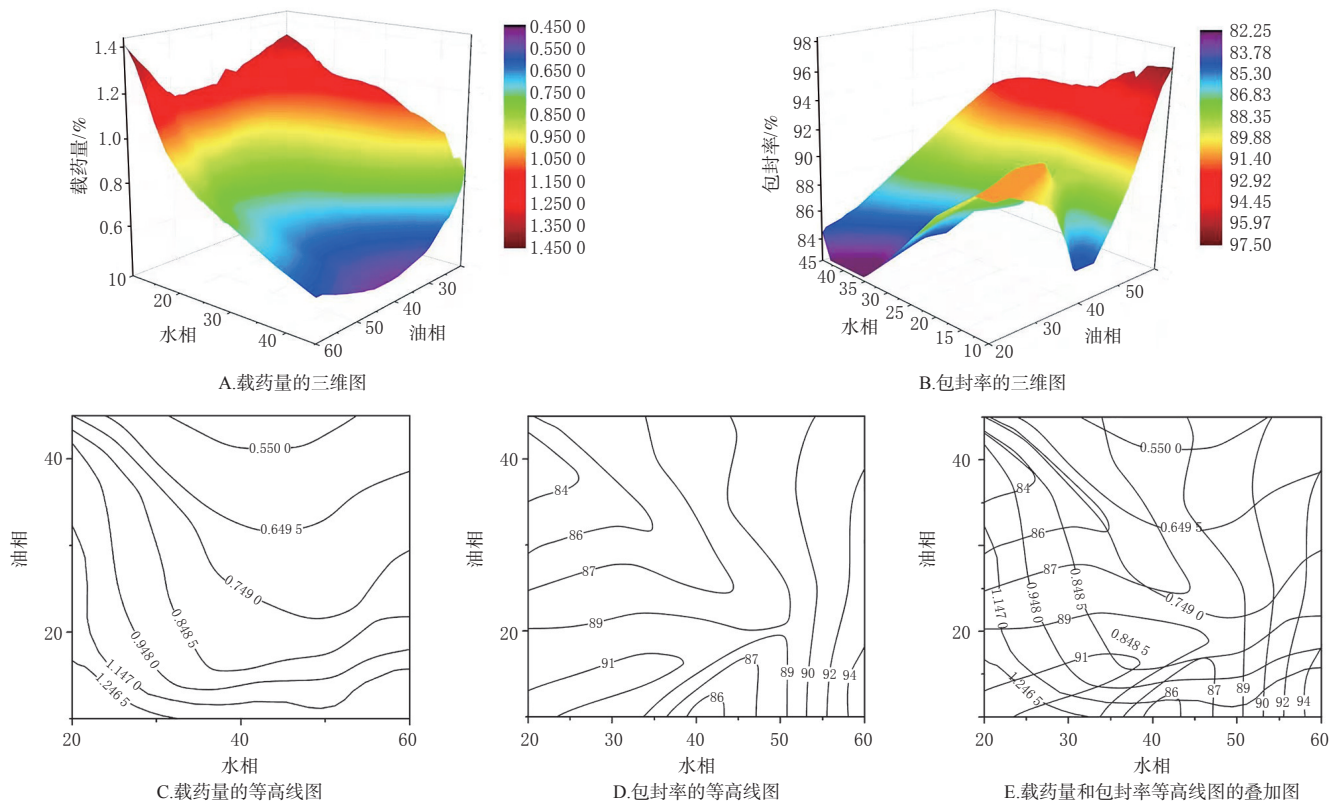


图3 NGA-LNCs载药量和包封率的三维图和等高线图

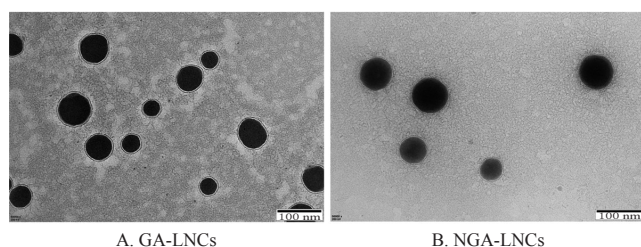
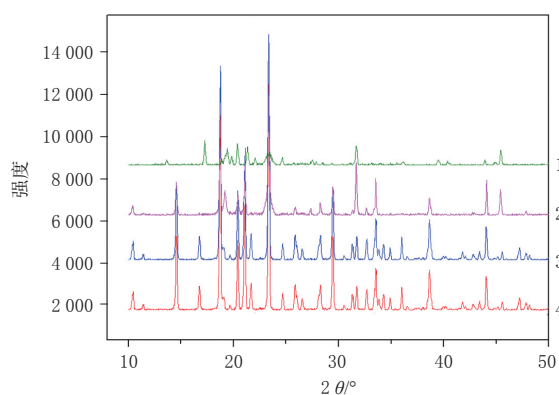


图4 GA-LNCs、NGA-LNCs的透射电镜显微镜图

23.15°,甘露醇衍射峰在18.26°,二者的吸收峰峰形均较为尖锐。在物理混合物中GA与甘露醇均以晶体形式存在,所以同时显示二者的吸收峰。GA-LNCs在冻干前加入甘露醇来防止纳米囊结构被破坏,使GA被包裹进纳米囊中,所以GA-LNCs的X-射线衍射图谱中没有GA的吸收峰,这说明GA被有效地包裹在纳米囊中。结果见图5。

2.4 GA-LNCs、NGA-LNCs抗DM活性评价

将小鼠随机分为对照组(以普通饲料饲养)和造模组(以高脂高糖饲料饲养),饲养期间每隔7 d对小鼠空腹血糖值(fasting blood glucose, FBG)进行检测。5周后,各组小鼠禁食不禁水12 h,造模组小鼠腹腔注射100 mg/kg STZ溶液,对照组同法注射等量柠檬酸缓冲液,72 h后,检测小鼠FBG,当FBG>11.1 mmol/L时,表明造模成功^[27]。将造模成功的小鼠随机分为模型组、阳性对照组(二甲双胍200 mg/kg,剂量根据文献^[27]设置)、GA-LNCs组(1.92 mg/kg,剂量根据预实验结果设置,以GA计)、NGA-LNCs组(2.42 mg/kg,剂量根据预实验结



1: GA-LNCs;2:甘露醇与GA-LNCs的物理混合物;3:甘露醇;4: GA原料药
图5 X-射线衍射分析结果

果设置,以NGA计),每组8只。对照组和模型组小鼠灌胃生理盐水,其余各组小鼠灌胃相应药物,每天1次,连续给药6周。末次给药12 h后(禁食),取血,离心取上清液备用,采用相应试剂盒检测各组小鼠血清中SOD、GSH-Px活性和MDA、TC、TG、LDL-C、HDL-C含量。采用SPSS 20.0统计学软件对数据进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果显示,与对照组比较,模型组小鼠血清中SOD、GSH-Px活性和HDL-C含量均显著降低($P<0.01$),FBG和MDA、TC、TG、LDL-C含量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠血清中SOD、GSH-Px活性和HDL-C含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),FBG(从给药第2周

起)和MDA、TC、TG、LDL-C含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表4、图6。

表4 各组小鼠FBG的检测结果($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	给药后第1周	给药后第2周	给药后第3周	给药后第4周	给药后第5周	给药后第6周
对照组	4.80±0.44	4.93±0.67	4.81±0.26	5.10±0.26	5.12±0.55	4.80±0.52
模型组	13.83±0.76 ^a	15.63±0.32 ^a	15.80±0.92 ^a	16.03±0.70 ^a	17.17±0.76 ^a	17.40±0.36 ^a
阳性对照组	14.47±0.55	12.13±0.25 ^b	10.20±0.61 ^b	8.33±0.45 ^b	7.47±0.50 ^b	6.40±0.69 ^b
GA-LNCs组	14.77±0.60	14.00±0.10 ^b	12.33±1.03 ^c	9.70±0.72 ^b	9.10±0.26 ^b	7.97±0.55 ^b
NGA-LNCs组	15.10±0.79	14.07±0.59 ^c	13.23±0.71 ^c	11.03±0.25 ^b	9.80±0.46 ^b	9.00±0.79 ^b

a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$;c:与模型组比较, $P<0.05$

3 讨论

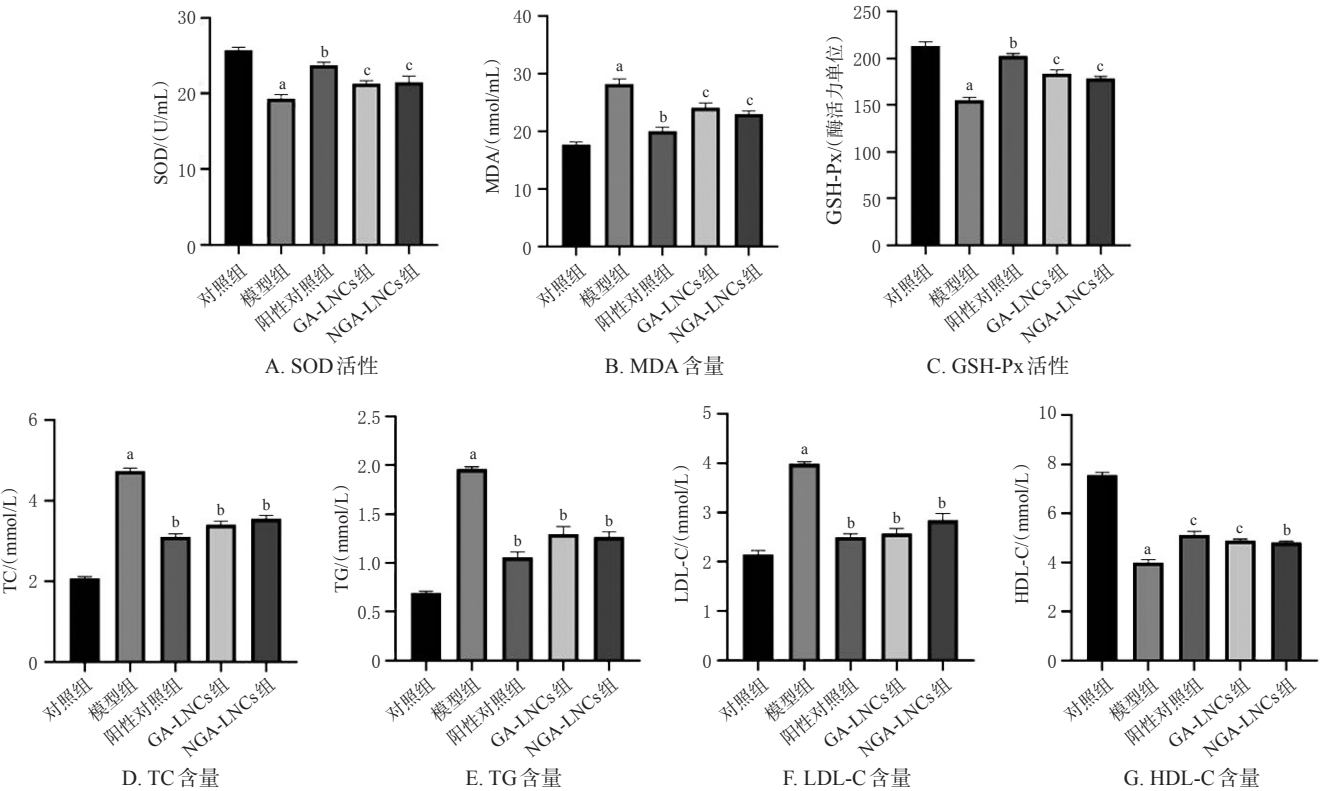
本研究将GA和NGA通过相转换法制成纳米囊,以改善两者的口服生物利用度,以期DM新药开发提供参考。在相转换法中,以不同比例水相、油相、表面活性剂制备的纳米囊呈不同色泽,按部分比例制得的纳米囊为混悬液而非澄清溶液。基于此,本研究固定纳米囊总量,以包封率和载药量为指标,采用单纯型网格法,优化GA-LNCs、NGA-LNCs水相、油相、表面活性剂的比例。结果表明,当水相为60%、油相为10%、表面活性剂为30%时,制得的纳米囊较为稳定。进一步观察其外观形态、粒径、Zeta电位、PDI等理化性质发现,GA-LNCs、NGA-LNCs均为黄色均一透明液体,无沉淀,且在透射电镜下显示为类球形,具有明显壳膜结构,粒子间分散状态也较为良好;粒径在20~30 nm范围内,这可能是由

于GA和NGA中的酚羟基可与表面活性剂上的羧基发生酯化作用,使得粒径较小。

本课题组前期检测发现,NGA在检测范围内没有衍射峰,所以本研究仅考察了GA原料药及其纳米囊制剂的衍射图谱。结果发现,GA与甘露醇物理混合后,其图谱中同时存在甘露醇和GA的衍射峰,而在GA-LNCs(含有冻干保护剂甘露醇)图谱中未检测到GA的衍射峰,这表明GA被稳定地包封在纳米囊中,而不是单独存在。

DM引发的并发症与氧化应激反应有关,氧化应激可导致MDA含量升高以及SOD、GSH-Px活性降低,其中MDA可造成DNA和蛋白质的损伤,而SOD和GSH-Px可清除体内自由基,从而抑制氧化应激反应,提高机体抗氧化能力^[28]。本研究结果显示,与模型组比较,GA-LNCs组和NGA-LNCs组小鼠血清中SOD、GSH-Px活性均显著升高,MDA含量均显著降低,这表明GA-LNCs、NGA-LNCs均可通过抗氧化途径发挥抗DM作用。

DM患者胰岛功能不足,体内脂质代谢酶活性随之下降,从而促进血脂升高,进而导致心血管疾病的发生^[29]。本研究结果显示,与模型组比较,GA-LNCs组和NGA-LNCs组小鼠血清中HDL-C含量均显著升高,TC、TG、LDL-C含量均显著降低,表明GA-LNCs、NGA-LNCs均可有效调节DM模型小鼠的脂质代谢紊乱。



a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$;c:与模型组比较, $P<0.05$

图6 各组小鼠生化指标的检测结果($\bar{x}\pm s,n=8$)

综上所述,本研究成功制备了藤黄2种有效成分的纳米囊,这2种纳米囊的理化性质良好,且具有较好的抗DM活性,可为藤黄的进一步合理开发及应用提供参考。

参考文献

- [1] 房姝余,李梦芳,黄厚强,等.糖尿病患者体位性低血压的护理研究进展[J].护士进修杂志,2020,35(13):1180-1183.
- [2] LI Y Z, TENG D, SHI X G, et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: national cross sectional study[J]. BMJ, 2020, 369: m997.
- [3] 程智刚.蜂胶提取活性黄酮及酯萜类新工艺和其纳米制剂:蜂胶总黄酮硬脂酸固态脂质纳米粒制备及药理学研究[D].长沙:中南大学,2005.
- [4] 郑赵倩,张莉,沈凯凯,等.藤黄的研究进展[J].世界中医药,2016,11(7):1180-1188.
- [5] 张莉,蔡双璠,孔思远,等.中国藤黄属植物的药理作用研究进展[J].世界中医药,2016,11(7):1189-1194.
- [6] 马静,成志平,赵梦中,等.藤黄中藤黄酸和新藤黄酸的提取分离及药理毒理研究[J/OL].临床医药文献电子杂志,2020,7(23):161[2022-03-24]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFDLAST-2020&filename=LCWX202023155&uniplatform=NZK-PT&v=TMhQVzmDaQtIvDkp-pnyyI1FcKrO5Oq8mIM-mI0kOQNYowokP1XJwEewakBvyRUNN>. DOI: 10.16281/j.cnki.jocml.2020.23.155.
- [7] 杨莉,王梅,程卉,等.新藤黄酸诱导细胞凋亡抑制A549细胞裸鼠移植瘤增长的研究[J].中国中药杂志,2011,36(9):1217-1221.
- [8] LI Q L, CHENG H, ZHU G Q, et al. Gambogenic acid inhibits proliferation of A549 cells through apoptosis-inducing and cell cycle arresting[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(3): 415-420.
- [9] YAN F G, WANG M, CHEN H, et al. Gambogenic acid mediated apoptosis through the mitochondrial oxidative stress and inactivation of Akt signaling pathway in human nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 652(1/2/3): 23-32.
- [10] 全雷,王世广,杨占峰,等.藤黄酸通过核因子 κ B抑制剂 α p65信号通路抑制人胃癌细胞系SGC-7901的侵袭[J].解剖学报,2020,51(1):46-50.
- [11] CASCÃO R, VIDAL B, RAQUEL H, et al. Potent anti-inflammatory and antiproliferative effects of gambogic acid in a rat model of antigen-induced arthritis[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 195327.
- [12] 杨虹,丛晓东,王峥涛.药用藤黄化学成分的研究[J].中国药理学杂志,2008,43(12):900-902.
- [13] HATAMI E, JAGGI M, CHAUHAN S C, et al. Gambogic acid: a shining natural compound to nanomedicine for cancer therapeutics[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1874(1): 188381.

- [14] 何忠梅,赵昱玮,郜玉钢,等.藤黄酸、新藤黄酸及其组合物的医药用途:CN103816147A[P]. 2014-05-28.
- [15] LIU Y L, CHEN Y C, LIN L F, et al. Gambogic acid as a candidate for cancer therapy: a review[J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15: 10385-10399.
- [16] 唐校柱.新藤黄酸PEG化脂质体的制备、体内外抗肿瘤药效学、初步药动学研究[D].合肥:安徽中医药大学,2019.
- [17] LIN T Y, FANG Q Y, PENG D Y, et al. PEGylated non-ionic surfactant vesicles as drug delivery systems for gambogic acid[J]. Drug Deliv, 2013, 20(7): 277-284.
- [18] 李光华.微粒给药系统在体内分布的特点及制剂研究进展[J].天津药学,2013,25(2):47-49.
- [19] GUPTA A, ERAL H B, HATTON T A, et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications[J]. Soft Matter, 2016, 12(11): 2826-2841.
- [20] LAXMI M, BHARDWAJ A, MEHTA S, et al. Development and characterization of nanoemulsion as carrier for the enhancement of bioavailability of artemether[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2015, 43(5): 334-344.
- [21] 周闻舞,顾海铮.壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究[J].药物评价研究,2010,33(4):290-295.
- [22] 尹孝莉,周思敏,吴方雨,等.新藤黄酸纳米乳的制备、表征以及体外抗肿瘤药效学的研究[J].中南药学,2021,19(4):565-572.
- [23] JANAGAM D R, WU L F, LOWE T L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 122: 31-64.
- [24] BINKHATHLAN Z, LAVASANIFAR A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multi-drug resistance in cancer: current status and future perspectives[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(3): 326-346.
- [25] ANTON N, GAYET P, BENOIT J P, et al. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion[J]. Int J Pharm, 2007, 344(1/2): 44-52.
- [26] 翟英杰.罗哌卡因类脂纳米囊制剂及其经皮给药研究[D].济南:山东大学,2015.
- [27] 孙宏莱,刘悦,刘德江,等.毛水苏多糖对糖尿病小鼠肾脏的保护作用[J].食品工业科技,2021,42(17):373-380.
- [28] 美娜·斯拉木江,李娜,张明珠,等.苍柏逐瘀汤治疗糖尿病周围神经病变痰瘀阻络证临床观察[J].山西中医,2021,37(4):19-21,24.
- [29] FILIPPATOS T, TSIMIHODIMOS V, PAPPAS E, et al. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2017, 15(6): 566-575.

(收稿日期:2021-12-03 修回日期:2022-03-25)

(编辑:唐晓莲)