

叶酸修饰的粉防己碱壳聚糖-硬脂酸纳米胶束的制备、表征及体外抗炎活性考察^Δ

薛飞*, 杨 岚, 常金花, 刘 沛, 王汝兴[#](承德医学院中药研究所/河北省中药研究与开发重点实验室, 河北承德 067000)

中图分类号 R943;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)08-0925-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.08.05



摘要 **目的** 制备叶酸(FA)修饰的粉防己碱(TET)壳聚糖(CS)-硬脂酸(SA)纳米胶束(简称“FA-CS-SA/TET纳米胶束”),并进行表征和体外抗炎活性考察。**方法** 采用超声法制备FA-CS-SA/TET纳米胶束,以包封率(EE)、载药量(DL)、粒径的综合评分为评价指标,FA-CS-SA与TET质量比、超声功率和超声次数为考察因素,根据正交实验确定最优制备工艺并验证;对以最优工艺制备的FA-CS-SA/TET纳米胶束进行表征,并考察其体外释放性能。以RAW264.7细胞为实验对象,考察其体外抗炎活性。**结果** 最优制备工艺为FA-CS-SA与TET质量比2:1,超声功率200 W,超声200次。以最优工艺制备的FA-CS-SA/TET纳米胶束的EE为 $(98.86 \pm 0.30)\%$,DL为 $(28.57 \pm 0.34)\%$,平均粒径为 $(227.0 \pm 9.4)\text{nm}$,多分散性指数为 0.42 ± 0.04 ,Zeta电位为 $(12.6 \pm 2.3)\text{mV}$;该纳米胶束呈类圆形且分布均匀,其在0.5%十二烷基硫酸钠溶液中释放较快,72 h内的累积释放度为 $(79.49 \pm 3.43)\%$,且其抗炎作用强于TET原料药。**结论** 本研究成功制备了FA-CS-SA/TET纳米胶束,其载药性能良好,粒径均匀,且具有较好的体外抗炎活性。

关键词 粉防己碱;纳米胶束;制备工艺;表征;抗炎活性;释放度

Preparation, characterization and *in vitro* anti-inflammatory activity of tetrandrine-loaded chitosan-stearic acid nano micelles modified with folic acid

XUE Fei, YANG Lan, CHANG Jinhua, LIU Pei, WANG Ruxing(Institute of Chinese Materia Medica of Chengde Medical University/Hebei Provincial Key Laboratory of Research and Development for Chinese Materia Medica, Hebei Chengde 067000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare tetrandrine (TET)-loaded chitosan (CS)-stearic acid (SA) nano micelles modified with folic acid (FA) (FA-CS-SA/TET nano micelles), characterize them and study the anti-inflammatory effect *in vitro*. **METHODS** FA-CS-SA/TET nano micelles were prepared by ultrasonic method; the preparation technology was optimized by orthogonal test and validation test was also performed with the mass ratio of FA-CS-SA to TET, ultrasound power and ultrasound times as the factors, using the comprehensive score of entrapment efficiency (EE), drug loading (DL) and particle size as evaluation index. FA-CS-SA/TET nano micelles prepared by the optimal technology were characterized, and their release performance *in vitro* was investigated. RAW264.7 cells were used as subjects to investigate their anti-inflammatory activity *in vitro*. **RESULTS** The optimal preparation technology included that the mass ratio of FA-CS-SA to TET was 2:1, ultrasonic power was 200 W, and the ultrasonic frequency was 200 times. The parameters of FA-CS-SA/TET nano micelles prepared by optimized technology included that EE was $(98.86 \pm 0.30)\%$, DL was $(28.57 \pm 0.34)\%$, the average particle size was $(227.0 \pm 9.4)\text{nm}$, polydispersity index was 0.42 ± 0.04 , and the Zeta potential was $(12.6 \pm 2.3)\text{mV}$, respectively. The nano micelles were uniform in appearance and round in shape. The nano micelles were released quickly in 0.5% sodium dodecyl sulfate solution, with a cumulative release rate of $(79.49 \pm 3.43)\%$ within 72 hours, and its anti-inflammatory effect was stronger than that of TET raw materials. **CONCLUSIONS** FA-CS-SA/TET nano

micelles are prepared successfully in the study, with good drug loading performance, uniform particle size, and good *in vitro* anti-inflammatory activity.

KEYWORDS tetrandrine; nano micelles; preparation technology; characterization; anti-inflammatory activity; release rate

^Δ基金项目 河北省自然科学基金项目(No.H2022406073);河北省高等学校科学技术研究重点项目(No.ZD2021004);承德医学院高层次人才科研启动基金项目(No.201705)

*第一作者 硕士研究生。研究方向:药物新剂型。E-mail: 741376718@qq.com

[#]通信作者 教授,硕士生导师,博士。研究方向:药物新剂型。E-mail: wangru1973@sina.com

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性疾病,以滑膜增生、骨损伤、软骨破坏和关节腔变窄为主要临床特征,最终可导致患者关节变形甚至残疾、死亡,严重降低了患者的生活质量^[1-2]。目前,药物是RA的常规治疗手段,非甾体抗炎药、糖皮质激素和生物制剂常被用于RA的临床治疗^[3]。尽管这些药物有明显的治疗效果,但长期使用毒副作用较大^[4],因此开发新型、高效、低毒的抗RA药物十分必要。

粉防己碱(tetrandrine, TET)是从我国传统中药粉防己中提取而得的活性成分,具有抗炎、抗心律失常、抗肿瘤等药理作用^[5]。相关研究发现,TET可减轻胶原诱导的大鼠关节炎^[6]。但由于TET水溶性差、生物利用度低,使得其临床应用受限^[7]。因此,有必要对TET的溶解性和生物利用度进行改善。壳聚糖(chitosan, CS)是一种可生物降解的聚合物,具有良好的生物相容性,当其作为载体时,可增强药物的控释性、减少药物的毒副作用^[8]。研究发现,巨噬细胞在RA的病理进程中具有重要作用^[9],且被炎症激活的巨噬细胞中存在叶酸(folic acid, FA)受体过表达的现象^[10],由此推测,FA对RA炎症部位的巨噬细胞具有较强的亲和力。基于此,本研究拟制备FA修饰的粉防己碱壳聚糖-硬脂酸(FA-CS-SA/TET)纳米胶束,并进行表征和体外抗炎活性考察,以期抗RA药物的研发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括H-100型透射电镜(日本Hitachi公司)、Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)、ZEN3690型纳米激光粒度分析仪(英国Malvern公司)、BX53型正置荧光显微镜(日本Olympus公司)、CUBIS MSE125P型十万分之一天平(德国Sartorius公司)、D\Max-rA型X射线衍射仪(德国Bruker公司)、DSC-60型差示扫描量热仪(日本Shimadzu公司)、ELX808型酶标仪(美国BioTek公司)等。

1.2 主要药品与试剂

TET原料药(批号20230412,纯度98.9%)购自西安山川生物技术有限公司;TET标准品(批号18080302,纯度99.85%)购自成都普菲德生物技术有限公司;CS(批号180306,分子量2 000)购自济南海得贝海洋生物工程有限公司;硬脂酸(stearic acid, SA;批号20000704)购自天津市东丽区天大化学试剂厂;FA(批号190320)购自上海如吉生物科技发展有限公司;N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)(批号分别为MKBS3566V、STBB7253)均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;三乙胺(TEA,批号095206)购自北京迈瑞达科技有限公司;胎牛血清(FBS,批号8118392)、

DMEM培养基(批号8123435)购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司;CCK-8试剂(批号08137008)购自广州赛库生物技术有限公司;乙腈、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

1.3 细胞

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7细胞,批号20190513)购自上海细胞生物研究所。

2 方法与结果

2.1 FA-CS-SA/TET纳米胶束的制备

称取一定量的CS-SA(本课题组前期合成,CS与SA的摩尔比为1:6.3)^[11],加入水30 mL溶解,再向其中缓慢滴加过滤后的FA活性酯(本课题组前期合成,FA与CS-SA的摩尔比为3:1)^[12],在45℃避光条件下以400 r/min磁力搅拌48 h。反应结束后,将溶液避光透析24 h,以除去未完全反应的FA,即得FA-CS-SA溶液,进一步经冷冻干燥后得淡黄色的FA-CS-SA冻干粉。

精密称取一定量的TET原料药和FA-CS-SA冻干粉,加水适量充分混合,经探头超声(功率200 W,在冰浴条件下工作2 s停3 s)一定时间后,即得FA-CS-SA/TET纳米胶束溶液,进一步经冷冻干燥后得FA-CS-SA/TET冻干粉(临用时,以水复溶成FA-CS-SA/TET纳米胶束溶液)。

2.2 TET定量分析方法的建立

参考文献[13]方法,对TET进行定量分析。

2.2.1 TET标准品溶液的配制

精密称取TET标准品2.00 mg,置于10 mL棕色容量瓶中,加入适量乙腈超声(功率200 W,频率25 kHz)至完全溶解,再以乙腈定容,即得质量浓度为200.00 $\mu\text{g/mL}$ 的TET标准品溶液。

2.2.2 供试品溶液和空白纳米胶束溶液的配制

精密称取适量FA-CS-SA/TET冻干粉,加水超声并定容于10 mL容量瓶中。吸取上述FA-CS-SA/TET纳米胶束溶液1 mL,置于10 mL容量瓶中,以适量甲醇稀释,超声(功率200 W,频率25 kHz)破乳,再以甲醇定容,即得供试品溶液。

精密称取FA-CS-SA冻干粉2.0 mg,加水超声(功率200 W,频率25 kHz)并定容至10 mL容量瓶中,即得空白纳米胶束溶液。

2.2.3 色谱条件

以Agilent ODS C_{18} (4.6 mm $\times$ 200 mm, 5 μm)为色谱柱,以乙腈-10 mmol/L KH_2PO_4 溶液(含0.1%TEA)为流动相进行等度洗脱(80:20, V/V);检测波长为280 nm;流速为1 mL/min;柱温为30℃;进样量为10 μL 。

2.2.4 专属性的考察

取TET标准品溶液、供试品溶液、空白纳米胶束溶液适量,按“2.2.3”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果显示,杂质峰不干扰TET的测定,表明方法专属性良好。结果见图1。

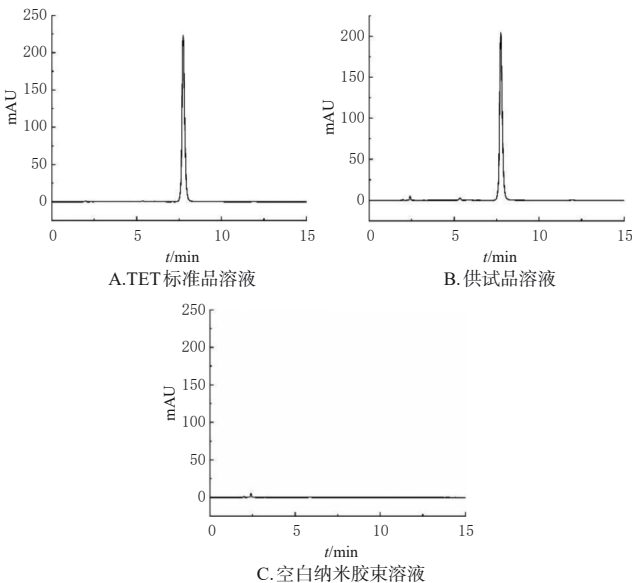


图1 各样品溶液的HPLC图

2.2.5 标准曲线的绘制

取TET标准品溶液适量,以乙腈稀释成质量浓度分别为100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.12 μg/mL的系列溶液,然后按“2.2.3”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。以TET质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)绘制标准曲线,得到回归方程 $y=6.879\ 9x+0.971\ 1$ ($R^2=0.999\ 9$)。TET检测质量浓度的线性范围为3.12~100.00 μg/mL。

2.2.6 方法学考察

(1)精密度试验:按“2.2.1”项下方法分别制备TET低、中、高质量浓度(4.00、50.00、80.00 μg/mL)的标准品溶液,每天进样测定6次,连续测定3 d,记录峰面积,考察日内和日间精密度。结果显示,TET低、中、高质量浓度标准品溶液的日内精密度RSD分别为0.37%、0.10%、0.11% ($n=6$),日间精密度RSD分别为0.63%、0.90%、0.54% ($n=3$),表明仪器精密度良好。(2)稳定性试验:精密吸取TET标准品溶液(50.00 μg/mL)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、8、10、12、24 h时进样测定,记录峰面积。结果显示,TET峰面积的RSD为0.49% ($n=8$),表明该溶液在室温下放置24 h内稳定。(3)重复性试验:取FA-CS-SA/TET纳米胶束溶液适量,按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液6份,再按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并采用外标法计算TET含量。结果显示,TET含量的RSD为0.11% ($n=6$),表明方法重复性良好。(4)回收率试验:取600、800、1 000 μL的TET

标准品溶液(200.00 μg/mL)各3份,置于10 mL容量瓶中,加入空白纳米胶束溶液1.0 mL,以流动相定容,即得TET质量浓度分别为12.00、16.00、20.00 μg/mL的样品溶液共9份,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定并计算回收率。结果显示,上述3个质量浓度样品溶液的回收率分别为100.14%、100.90%、101.28%,RSD分别为0.68%、0.93%、0.76% ($n=3$)。

2.3 FA-CS-SA/TET纳米胶束的封装率和载药量测定

采用超速离心法测定载药纳米胶束的封装率(encapsulation efficiency, EE)和载药量(drug loading, DL)。精密吸取FA-CS-SA/TET纳米胶束溶液1.2 mL,低温离心10 min(转速10 000 r/min),以0.45 μm微孔滤膜过滤;取滤液,按“2.2.3”项下色谱条件进样分析,并采用外标法计算未包入TET的量,记为 $W_{游}$ 。另按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,以0.45 μm微孔滤膜过滤,取滤液,按“2.2.3”项下色谱条件进样测得溶液中TET的总量,记为 $W_{总}$ 。制备过程中,FA-CS-SA空白纳米胶束的量记为 $W_{载体}$,载药纳米胶束的投药量记为 $W_{药}$ 。按下式计算分别EE和DL: $EE=(W_{总}-W_{游})/W_{总}\times 100\%$, $DL=(W_{总}-W_{游})/(W_{载体}+W_{药})\times 100\%$ 。

2.4 FA-CS-SA/TET纳米胶束的制备工艺优化

根据前期预实验和单因素实验结果,本研究选取FA-CS-SA与TET质量比(A)、超声功率(B)和超声次数(C)作为考察因素,以EE(a)、DL(b)和粒径(c)的综合评分[综合评分(Y)= $0.4a/a_{max}+0.4b/b_{max}-0.2c/c_{max}$ (式中, a_{max} 为EE的最大值, b_{max} 为DL的最大值, c_{max} 为粒径的最大值)]为评价指标^[14],采用 $L_9(3^4)$ 正交表优化FA-CS-SA/TET纳米胶束的制备工艺。正交实验的因素与水平见表1,实验结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 正交实验的因素与水平

水平	A	B/W	C/次
1	2:1	200	100
2	3:1	250	200
3	4:1	400	300

表2 正交实验结果

序号	因素				指标			综合评分/分
	A	B	C	D(误差)	a/%	b/%	c/nm	
1	1	1	1	1	99.85	31.02	173.9	0.62
2	1	2	2	2	99.95	32.56	198.7	0.62
3	1	3	3	3	99.88	31.71	194.4	0.61
4	2	1	2	3	99.20	21.97	149.3	0.53
5	2	2	3	1	98.74	23.11	196.8	0.50
6	2	3	1	2	84.91	19.63	152.8	0.44
7	3	1	3	2	98.53	16.80	219.0	0.40
8	3	2	1	3	77.46	12.51	192.7	0.29
9	3	3	2	1	83.22	15.64	137.7	0.40
K_1	0.617	0.518	0.450	0.507				
K_2	0.490	0.469	0.516	0.487				
K_3	0.363	0.484	0.504	0.477				
极差	0.255	0.049	0.066	0.030				

表3 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.097	2	0.049	68.710	0.014
B	0.004	2	0.002	2.673	0.272
C	0.007	2	0.004	5.193	0.161
D(误差)	0.001	2	0.001		

由此可知,各因素对FA-CS-SA/TET纳米胶束综合评分的影响由高到低为 $A>C>B$,即FA-CS-SA与TET质量比为主要影响因素;进一步分析发现,最优工艺为 $A_1B_1C_2$,即FA-CS-SA与TET质量比2:1,超声功率200 W,超声200次。

根据最优工艺重复制备3批FA-CS-SA/TET纳米胶束,并分别测定EE、DL、粒径、多分散性指数(polydispersity index, PDI)和Zeta电位进行工艺验证。结果显示,3批样品的EE为 $(98.86 \pm 0.30)\%$,DL为 $(28.57 \pm 0.34)\%$,平均粒径为 $(227.0 \pm 9.4)\text{nm}$,PDI为 0.42 ± 0.04 ,Zeta电位为 $(12.6 \pm 2.3)\text{mV}$ 。粒径图见图2,Zeta电位图见图3。

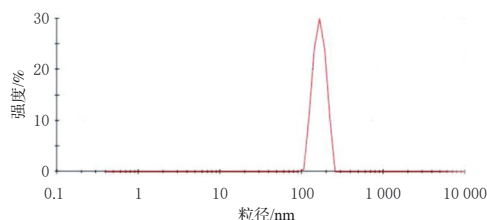


图2 FA-CS-SA/TET纳米胶束的粒径图

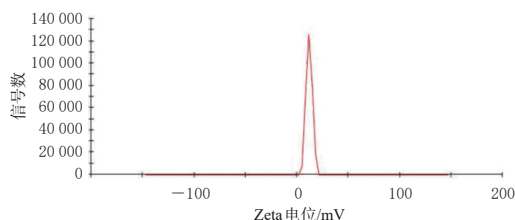


图3 FA-CS-SA/TET纳米胶束的Zeta电位图

2.5 FA-CS-SA/TET纳米胶束的表征

2.5.1 X射线衍射分析

分别称取TET原料药和FA-CS-SA、FA-CS-SA/TET冻干粉以及前两者的物理混合物(简称“PM”)各10 mg,进行X射线衍射分析。采用Cu靶/石墨单色器,设置扫描范围为 $5^\circ \sim 40^\circ$,管电流为100 mA,管电压为45 kV^[15]。结果(图4)显示,TET原料药在 8.5° 、 13.6° 、 15.5° 、 24.1° 、 26.1° 、 27.4° 等处存在衍射峰;FA-CS-SA在 15.1° 、 21.1° 、 23.8° 、 28.2° 等处存在衍射峰;FA-CS-SA/TET在 8.5° 、 13.8° 、 15.5° 、 20.3° 、 21.2° 、 23.1° 、 24.1° 等处存在衍射峰;PM在 8.5° 、 13.7° 、 15.5° 、 24.0° 、 26.1° 、 27.4° 等处存在衍射峰。由此可知,TET原料药存在多处衍射峰,表明其以晶体形式存在;将TET原料药和FA-CS-SA简单混合后,衍射峰均得以保留,表明两者的物理混合并没有改变TET晶体结构;FA-CS-SA/TET在 $30^\circ \sim 40^\circ$ 内存在若干

个弱衍射峰,说明可能有少量TET附着在胶束表面,其余大部分可能以无定型状态包载于纳米胶束中。

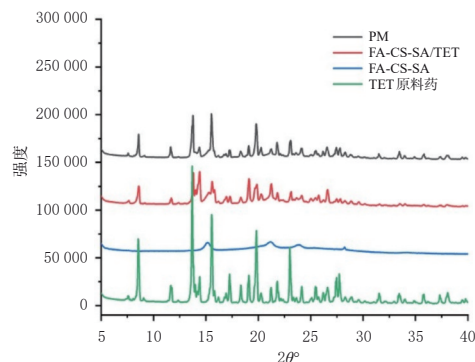


图4 各样品的X射线衍射分析图

2.5.2 差示扫描量热分析

分别称取TET原料药和FA-CS-SA、FA-CS-SA/TET冻干粉以及PM各10 mg,进行差示扫描量热分析。以空白铝坩埚为基准,考察氮气吹扫下加热速率为 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 时样品的热性能,扫描范围为 $0 \sim 300^\circ\text{C}$ ^[16]。结果(图5)显示,TET原料药在 223.27°C 出现吸热峰,峰高为7.98 mW;PM在 222.71°C 出现吸热峰,峰高为2.41 mW;FA-CS-SA和FA-CS-SA/TET没有明显的吸热峰,表明TET已经被包载于纳米胶束中。

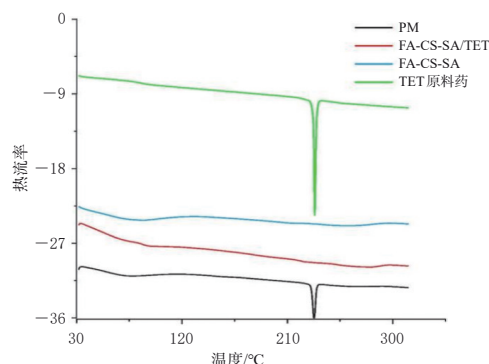


图5 各样品的差示扫描量热图

2.5.3 微观形态观察

将 1.0 mg/mL 的FA-CS-SA/TET纳米胶束溶液滴于覆盖有碳膜的铜网上,以2%磷钨酸染色并干燥后,置于透射电镜下观察样品的微观状态。结果(图6)显示,FA-CS-SA/TET纳米胶束呈类圆形,分布均匀,且粒子间无粘连。

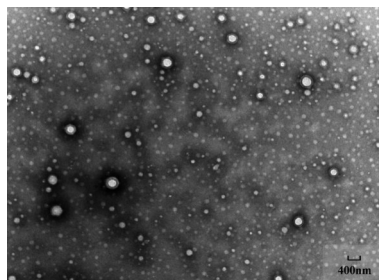


图6 FA-CS-SA/TET的透射电镜图

2.6 FA-CS-SA/TET纳米胶束的体外释放考察

采用透析法进行FA-CS-SA/TET纳米胶束的体外释放研究。取1.0 mg/mL的FA-CS-SA/TET纳米胶束溶液1.5 mL,置于透析袋内,密封后分别浸入装有40 mL释放介质[分别为0.2%、0.5%的十二烷基硫酸钠(SDS)溶液]的离心管中,置于37℃恒温振荡器中均匀振荡,每种浓度的SDS溶液平行3份。分别于0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72 h时从离心管中取样1 mL,并补充等体积的释放介质。将各时间点的样品以0.45 μm微孔滤膜过滤,取滤液,按“2.2.3”项下色谱条件进样分析,并采用外标法计算TET含量,绘制体外累积释放曲线,并按下式计算

TET的累积释放度(L_n):
$$L_n = \frac{(C_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_0)}{W} \times 100\%$$
 (式中, C_n 为第 n 个时间点样品的质量浓度, V 为释放介质的体积, C_i 为第 i 个时间点样品的质量浓度, V_0 为每次取样的体积, W 为透析袋中TET的含量)。

结果(图7)表明,FA-CS-SA/TET纳米胶束在0.2%SDS溶液中释放较慢,72 h内的累积释放度为(37.28 ± 4.36)%;而在0.5%SDS溶液中释放较快,72 h内的累积释放度为(79.49 ± 3.43)%。

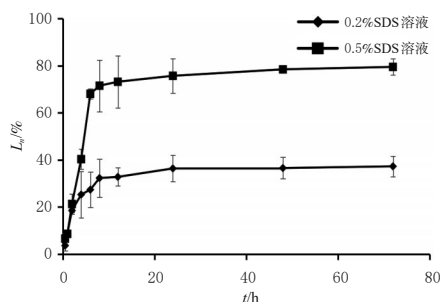


图7 FA-CS-SA/TET的体外释放曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.7 FA-CS-SA/TET纳米胶束的体外抗炎作用考察

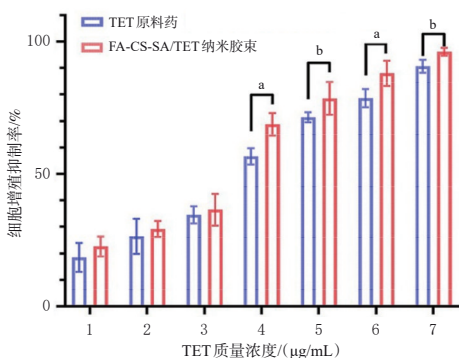
2.7.1 细胞培养

以含10%FBS的DMEM培养基复苏RAW264.7细胞,然后在37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。

2.7.2 细胞增殖抑制率的检测

将对数生长期的RAW264.7细胞,按 8×10^4 个/孔接种于96孔板中,并随机分为对照组(加细胞和培养基,不加药物)、不同质量浓度TET原料药组(1、2、3、4、5、6、7 μg/mL)和不同质量浓度的FA-CS-SA/TET组(1、2、3、4、5、6、7 μg/mL,以TET计),并设置空白组(不加细胞和药物,加培养基),每组设置6个复孔。除对照组和空白组外,其余各组加入相应药物(质量浓度根据预实验结果设置)和1 000 ng/mL脂多糖(以诱导炎症^[17]);培养24 h后,每孔加入CCK-8试剂10 μL,继续培养1 h,采用酶标仪于450 nm波长处测定各孔光密度(optical density, OD)值,并按下式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%) = (对照组OD值 - 实验组OD值) / (对照组OD

值 - 空白组OD值) × 100% (细胞增殖抑制率越大,表明药物的抗炎作用越强)。应用SPSS 22软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。结果(图8)显示,TET原料药和FA-CS-SA/TET纳米胶束对RAW264.7细胞的增殖抑制作用均有浓度依赖趋势;在相同质量浓度下,FA-CS-SA/TET纳米胶束组的增殖抑制率高于TET原料药组[在4~7 μg/mL范围内,两者差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)],表明FA-CS-SA/TET纳米胶束比TET原料药具有更强的抗炎作用。



a: 与相同质量浓度TET原料药相比, $P < 0.01$; b: 与相同质量浓度TET原料药相比, $P < 0.05$ 。

图8 TET原料药和FA-CS-SA/TET纳米胶束的体外抗炎作用考察结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

由于FA本身反应活性较弱,因此本课题组以DCC为缩合剂,利用FA、NHS和DCC制备出FA活性酯,然后以FA活化酯末端的羧基与CS-SA上的氨基进行反应,最终得到偶联物FA-CS-SA。FA-CS-SA作为两亲性载体,可负载难溶性药物以增加其溶解性,因此在本研究中,笔者以FA-CS-SA为载体,采用超声法制备了FA-CS-SA/TET纳米胶束。

以超声法制备载药纳米胶束的影响因素有载体与药物的比例、温度、热处理、超声功率和次数等。本课题组通过预实验发现,FA-CS-SA与TET的质量比、超声功率和次数为主要因素,且FA-CS-SA与TET质量比的影响最大。由于正交实验具有高效性、简洁性、代表性以及数据点分布均匀的优点^[18],因此本研究采用正交实验法,以FA-CS-SA与TET质量比、超声功率和超声次数作为考察因素对FA-CS-SA/TET纳米胶束的制备工艺进行优化。结果显示,以最优工艺制备的FA-CS-SA/TET纳米胶束带有阳离子电荷,粒径较小,EE和DL较高。进一步体外实验发现,FA-CS-SA/TET在0.5%SDS溶液中释放较快,其在72 h时的累积释放度为(79.49 ± 3.43)%。在体外抗炎实验中发现,当TET质量浓度为4~7 μg/mL时,FA-CS-SA/TET纳米胶束对巨噬细胞RAW264.7的增殖抑制率显著高于TET原料药,表明其具有较好的抗炎作用。

综上所述,本研究成功制备了FA-CS-SA/TET纳米胶束,其载药性能良好,粒径均匀,且具有较好的体外抗炎活性。在后续的研究中,本课题组将进一步开展该制剂的药动力学和药效学研究。

参考文献

- [1] AKIYAMA M, KANEKO Y. Pathogenesis, clinical features, and treatment strategy for rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease[J]. *Autoimmun Rev*, 2022, 21(5):103056.
- [2] LEHMANN J, KYBURZ D. Rheumatoid arthritis[J]. *Ther Umsch*, 2022, 80(1):27-33.
- [3] YANG M D, FENG X R, DING J X, et al. Nanotherapeutics relieve rheumatoid arthritis[J]. *J Control Release*, 2017, 252:108-124.
- [4] LITTLE J, PARKER B, LUNT M, et al. Glucocorticoid use and factors associated with variability in this use in the Systemic Lupus International Collaborating Clinics Inception Cohort[J]. *Rheumatology*, 2018, 57(4):677-687.
- [5] NAYAK R R, ALEXANDER M, DESHPANDE I, et al. Methotrexate impacts conserved pathways in diverse human gut bacteria leading to decreased host immune activation[J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(3):362-377.e11.
- [6] JIA Y G, MIAO Y M, YUE M F, et al. Tetrandrine attenuates the bone erosion in collagen-induced arthritis rats by inhibiting osteoclastogenesis via spleen tyrosine kinase[J]. *FASEB J*, 2018, 32(6):3398-3410.
- [7] MO L Y, ZHANG F, CHEN F, et al. Progress on structural modification of tetrandrine with wide range of pharmacological activities[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:978600.
- [8] BASHIR S M, AHMED RATHER G, PATRÍCIO A, et al. Chitosan nanoparticles: a versatile platform for biomedical applications[J]. *Materials*, 2022, 15(19):6521.
- [9] ROSS E A, DEVITT A, JOHNSON J R. Macrophages: the good, the bad, and the gluttony[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:708186.
- [10] XIA W, HILGENBRINK A R, MATTESON E L, et al. A functional folate receptor is induced during macrophage activation and can be used to target drugs to activated macrophages[J]. *Blood*, 2009, 113(2):438-446.
- [11] 孙冰冰, 赵红玲, 李莹莹, 等. 叶酸与端醛基聚乙二醇双重修饰的壳聚糖-硬脂酸纳米胶束的制备[J]. *中国药房*, 2019, 30(21):2926-2931.
- SUN B B, ZHAO H L, LI Y Y, et al. Preparation of chitosan-stearic acid nano-micelles modified with folic acid and mPEG[J]. *China Pharm*, 2019, 30(21):2926-2931.
- [12] MANSOURI S, YAN C E, WINNIK F, et al. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(9):2060-2065.
- [13] 薛飞, 程炳铎, 刘喜纲, 等. 粉防己碱纳米晶体的制备及质量评价[J]. *中成药*, 2022, 44(10):3098-3103.
- XUE F, CHENG B D, LIU X G, et al. Preparation and quality evaluation of tetrandrine nanocrystals[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(10):3098-3103.
- [14] 张亚会, 李喜香, 包强, 等. 甘草次酸-壳聚糖纳米粒的制备及其质量评价[J]. *中草药*, 2015, 46(15):2232-2237.
- ZHANG Y H, LI X X, BAO Q, et al. Preparation and quality assessment of glycyrrhetic acid-chitosan nanoparticles[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2015, 46(15):2232-2237.
- [15] 黄文秀, 周先果, 黄锦平, 等. 汉防己甲素纳米晶的制备及质量评价[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(3):506-512.
- HUANG W X, ZHOU X G, HUANG J P, et al. Preparation and quality evaluation of tetrandrine nanocrystals[J]. *J Guangxi Med Univ*, 2022, 39(3):506-512.
- [16] 郑雅玲, 王夏英, 许雪雅, 等. 载紫杉醇的PEG修饰的大黄酸偶联物胶束的表征、体外释放及药动力学研究[J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(7):865-872.
- ZHENG Y L, WANG X Y, XU X Y, et al. Characterization, *in vitro* release and pharmacokinetics of paclitaxel-loaded PEGylated carboxymethyl chitosan-rhein conjugate micelles[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2023, 40(7):865-872.
- [17] 任改艳, 张步有, 黄剑林. 槲皮素对LPS诱导小鼠RAW264.7细胞炎症的保护作用[J]. *中成药*, 2019, 41(8):1795-1799.
- REN G Y, ZHANG B Y, HUANG J L. Protective effects of quercetin on the inflammation of mice RAW264.7 cells induced by LPS[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2019, 41(8):1795-1799.
- [18] 于慧春, 殷勇, 李欣, 等. 正交试验设计中正交表的特点及正交的意义浅析[J]. *农产品加工*, 2020(5):91-92, 97.
- YU H C, YIN Y, LI X, et al. Analysis of the characteristics and the orthogonal significance of the orthogonal table in orthogonal experimental design[J]. *Farm Prod Process*, 2020(5):91-92, 97.

(收稿日期:2023-10-06 修回日期:2024-01-28)

(编辑:唐晓莲)