

姜黄素纳米晶混悬液制备、表征及体内外药剂学性质评价

梁新丽,鲁永锋,汪新婵,廖正根,赵国巍,董伟

(江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室,南昌 330004)

[摘要] **目的:**为提高姜黄素的口服生物利用度,采用“Top-down”法中的高压均质法制备姜黄素纳米晶混悬液(Cur-NCS),并对其进行物性表征、体外释放、体内生物利用度及内外抗炎活性研究。**方法:**以粒径、Zeta 电位等为评价指标,优化处方和工艺参数;采用透射电镜对样品形态进行表征,HPLC 法测定姜黄素纳米混悬液体外释放,LC-MS/MS 法检测大鼠体内姜黄素的血药浓度;RAW264.7 炎症细胞模型考察其抗炎活性,支气管哮喘气道炎症小鼠模型考察姜黄素纳米混悬液对小鼠气道炎症的治疗作用。**结果:**制备工艺:姜黄素 $16\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下高速剪切 2 min,800 bar 循环 40 次。处方:姜黄素用量为 0.2%,维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS)用量为 0.20%,大豆卵磷脂用量为 0.16%;原料药与 Cur-NCS 累积释药量分别为 11.67% 和 27.44%;大鼠灌胃后,Cur-NCS 生物利用度提高了 1.86 倍;在体外炎症细胞模型和体内支气管哮喘小鼠模型中,Cur-NCS 显著抑制炎症因子 NO,IL-6,TNF- α 的表达及 MDA,IgE 和 ICAM-1 水平,提高 IL-10 的表达与 SOD 的水平。**结论:**所确定的制备工艺和处方可满足姜黄素纳米混悬剂的制备需要,且体外释放、体内生物利用度、抗炎活性均显著优于原料药,姜黄素纳米混悬剂可为后续剂型研究提供思路。

[关键词] 姜黄素;纳米晶;生物活性;生物利用度;抗炎

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)21-2198-12

Preparation and characterization of curcumin nanocrystalline suspension and evaluation of its pharmaceutical properties *in vitro* and *in vivo*

LIANG Xin-li, LU Yong-feng, WANG Xin-li, LIAO Zheng-gen, ZHAO Guo-wei, DONG Wei

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** In order to improve the oral bioavailability of curcumin, curcumin nanocrystalline suspension (Cur-NCS) was prepared by the high-pressure homogenization method in “top-down” method. Its physical properties, *in vitro* release, *in vivo* bioavailability and anti-inflammatory activity were studied. **Methods:** The prescription and process parameters were optimized using particle size and zeta potential as evaluation indexes; the sample morphology was characterized by transmission electron microscopy, the *in vitro* release of curcumin nanocrystallines suspension was determined by HPLC, and the blood concentration of curcumin in rats was measured by LC-MS/MS; the anti-inflammatory activity was investigated in RAW264.7 inflammatory cell model, and curcumin was investigated in a mouse model of bronchial asthma airway inflammation nanosuspension on the therapeutic effect of curcumin on airway inflammation in mice. **Results:** Preparation process: curcumin was sheared at high speed for 2 min at $16\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ and cycled 40 times at 800 bar. Prescription: curcumin dosage was 0.2%, TPGS dosage

[基金项目] 江西省科技厅重大科技研发专项(20194ABC28009, X202310412159);江西中医药大学中药制剂技术与装备创新团队(CXTD22006)

[作者简介] 梁新丽,女,副教授,主要从事中药药效物质基础研究。联系电话:(0791)87118658,E-mail: paln7@163.com。鲁永锋,硕士研究生,主要方向:药物新剂型与新制剂。E-mail: lusan18870954216@163.com。

[通讯作者] 董伟,男,博士,讲师,主要从事中药药效物质基础研究。联系电话:(0791)87118658,E-mail: sober96@foxmail.com。赵国巍,女,副教授,硕士生导师,从事药物新剂型与新技术研究。联系电话:(0791)87118658,E-mail: weiweihaoyunqi@163.com。

was 0.20% and soy lecithin dosage was 0.16%; the cumulative drug release of API and Cur-NCS was 11.67% and 27.44%, respectively. After gavage in rats, Cur-NCS bioavailability was increased by 1.86-fold after gavage in rats. In an *in vitro* inflammatory cell model and *in vivo* bronchial asthma mouse model, Cur-NCS significantly inhibited the expression of inflammatory factors NO, IL-6, TNF- α and the levels of MDA, IgE and ICAM-1, and increased the expression of IL-10 and the level of SOD. **Conclusion:** The identified preparation process and prescription can meet the preparation requirements of curcumin nanosuspension, and the *in vitro* release, *in vivo* bioavailability and anti-inflammatory activity are significantly better than those of API, and curcumin nanosuspension can provide ideas for subsequent dosage form studies.

[**Key words**] curcumin; nanocrystals; bioactivities; bioavailability; anti-inflammatory

姜黄素 (curcumin, Cur) 是从姜黄等根茎中分离出的二酮类活性物质之一, 具有抗炎、降血脂、抗氧化、抗肿瘤、利胆、抗动脉粥样硬化等多种药理活性, 不良反应小, 临床试验结果显示姜黄素在 $8.0 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量仍然安全^[1]。但姜黄素为 BCS IV 类药物, 口服几乎不吸收, 极大限制了其在临床中的应用^[2-3]。

纳米晶技术是一种只需加入少量稳定剂, 通过物理方法将难溶性药物的粒径降低至纳米级, 从而提高药物本身溶出度的新型制剂技术。具有无需载体材料、载药量高、无需使用过量有机试剂等特点^[4]。其制备技术包括“Top-down”技术、“Bottom-up”技术和二者联用技术。“Bottom-up”技术基于药物形成沉淀的过程, 包括有沉淀法、超临界流体技术、乳化法和微乳化法等; “Top-down”技术则通过机械力将药物粉碎至纳米级别, 包括介质研磨法、高压均质法等。其中高压均质法操作简单、制得纳米粒粒度分布窄, 且易于用于工业放大生产, 在提高药物的溶解度和溶出速率、促进药物体内释放从而提高生物利用度方面具有明显优势^[4]。

本研究前期利用高压均质法优化了姜黄素纳米晶 (Cur-NCS) 的工艺和处方, 对制备的 Cur-NCS 进行了物理表征, 并通过体外透析法评价药物体外释放行为; 大鼠药动学评价 Cur-NCS 口服生物利用度; 通过 1,1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH) 自由基清除活性评价 Cur-NCS 体外抗氧化活性; 采用 LPS 与 IFN- γ 联合诱导 RAW 264.7 巨噬细胞炎症模型探讨 Cur-NCS 细胞毒性及其体外抗炎作用。通过 OVA 诱发 BALB/c 小鼠支气管哮喘模型探讨 Cur-NCS 对支气管哮喘的抗炎抗过敏作用。

材料与方 法

1 仪器

Nano-S 型 Malvern 纳米粒度仪 (英国 Malvern

公司); Panda plus 2000 型高压均质机 (意大利 Niro Soavi); jem2100 透射电镜 [日本电子株式会社 (JEOL)]; QTRAP 4500 三重四极杆液质联用仪 (美国 ABSCIEX 公司); ECLIPSE TS100-F 型倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); Spark 10M 型多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); 空气压缩雾化器 (湖南可孚医疗科技发展有限公司); BC-2800Vet 型兽用全自动血液细胞分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); MD1000 型正置显微镜、RM2016 型病理切片仪 (徕卡显微系统有限公司); JY96-IIN 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技有限公司)。

2 试药

姜黄素 (西安昊轩生物科技有限公司, 批号: HXJHS20200710, 纯度: 98%); 姜黄素对照品 (成都埃法生物科技有限公司, 批号: AF9102903, 纯度 $\geq 98\%$); 维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (TPGS, 大连美仑生物技术有限公司, 批号: 01003A); 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, 大连美仑生物技术有限公司, 批号: G26A10B86940); 吐温 80 (TW 80, 上海源叶生物科技有限公司, 批号: Z17D9Y77731); 吐温 20 (TW 20, 上海源叶生物科技有限公司, 批号: Z14F10Y0890); 大豆卵磷脂 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: T30M10F84483); 泊洛沙姆 188 (P188, 上海昌为医药辅料技术有限公司, 批号: WPAK324B); 卵清蛋白 (OVA, 苏州美仑生物技术有限公司, 批号: MO228A); 氢氧化铝凝胶 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号: WB317588); 克咳片 (中山市恒生药业有限公司, 批号: 20201003); 一氧化氮检测试剂盒 (批号: S0021S)、脂质氧化 (MDA) 检测试剂盒 (批号: 080521211115)、总 SOD 活性检测试剂盒 (批号: 071521211011) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; TNF- α ELISA 试剂盒 (批号: 22A250)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号: 22A256)、IL-10 ELISA 试剂盒

(批号:22A267)均购自上海 ExCell 公司;小鼠免疫球蛋白 E 试剂盒 (IgE, 南京建成生物工程研究所, 批号:20210922);小鼠细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) Elisa 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司, 批号:202112)。

3 动物与细胞

SD 大鼠, 雄性, 体质量 180 ~ 220 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (湘) 2019-004, 标准环境下饲养 1 周; 小鼠 100 只, 6 周龄, 体质量 18 ~ 22 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2019-0010 标准环境下饲养 1 周; RAW264.7 细胞购自中科院细胞库。

本研究中动物实验方案已获得江西中医药大学实验动物伦理委员会的批准。

4 处方工艺

通过高压均质法制备 Cur-NCS, 以粒径为指标, 在剪切时间为 2 min 的条件下, 考察高速剪切机速率、高压均质机的均质压力及循环次数; 以粒径及电位为指标, 筛选 Cur 用量、稳定剂种类、复配及用量, 优化 Cur-NCS 制备工艺和处方。

5 粒径分布、Zeta 电位和微观形态观察

吸取 Cur-NCS 混悬液 1 mL 加入适量体积的蒸馏水稀释, 以 Malvern 纳米粒度仪测定 Cur-NCS 混悬液的粒径、粒径分布以及 Zeta 电位; 将 Cur-NCS 稀释到适当浓度, 滴在喷碳铜网上, 放置 10 min 使 Cur-NCS 吸附于铜网上, 再滴加 1% 磷钨酸将其负染 2 min, 置于透射电镜下观察形态。

6 体外释放

选用透析法研究 Cur-API 及 Cur-NCS 混悬液的体外释放特性研究, 以 1% TW 80 的 pH 7.4 PBS 为释放介质。取浓度相同的原料药混悬液及 Cur-NCS 混悬液各 1 mL, 置于透析袋内, 放入 100 mL、(37 ± 0.5) °C 的释药介质中, 平行 3 份, 在温度为 (37 ± 0.5) °C、转速为 100 r·min⁻¹ 的漏槽条件下, 研究药物从胶束中的释放行为。固定时间点取样 2 mL, 同时补足新鲜介质^[5-6]。样品用 0.22 μm 滤膜过滤后, 取滤液 100 μL, 加入内标 10 μL, 涡旋 1 min, 加 90 μL 甲醇, 涡旋 2 min, 混匀。12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, LC-MS/MS 进样测定, 计算药物释放百分率。

7 体内药动学

取健康雄性 SD 大鼠 30 只, 体重为 (200 ± 20) g, 随机分为 2 组, 每组 6 只。实验前禁食 12 h, 分别灌胃 (ig) 给予 Cur 不同制剂: Cur 原料药 0.5% CMC-

Na 混悬液 (Cur-API) 和 Cur-NCS 混悬液, ig 剂量均为 Cur 60 mg·kg⁻¹。分别在给药后 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h 于大鼠眼眶处静脉取血约 0.5 mL, 置抗凝 EP 管中, 4 °C、10 000 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min, 收集血浆。取血浆样品 60 μL, 内标替硝唑 10 μL, 涡旋 1 min, 混匀, 再加入甲醇 170 μL, 涡旋 2 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 120 μL 加入新 EP 管中, 二次离心 5 min, 取上清液 80 μL, LC-MS/MS 法测定。

8 体外抗氧化

通过 1,1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH) 自由基清除活性评价 Cur-API 和 Cur-NCS 的抗氧化能力。分别用双蒸水配制原料药和纳米晶系列浓度为 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 50, 100 μmol·L⁻¹ 的溶液。称取 4 mg 的 DPPH 粉末, 无水乙醇溶解定容至 100 mL, 4 °C 避光保存。

将 100 μL 样品与 100 μL 的 DPPH 溶液混合, 避光静置并在室温下低速振荡 30 min, 测定其在 517 nm 处的吸光度 (A_i)。将 100 μL 样品与 100 μL 的无水乙醇溶液混合, 避光静置并在室温下低速振荡 30 min, 测定其在 517 nm 处的吸光度 (A_j)。将 100 μL 的 DPPH 溶液与 100 μL 的无水乙醇溶液混合, 避光静置并在室温下低速振荡 30 min, 测定其在 517 nm 处的吸光度 (A_0), 按公式 (1) 计算 DPPH 清除率^[7]。

$$\text{DPPH 清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

公式 (1)

9 体外抗炎

收集培养的 RAW264.7 细胞, 以 2×10^5 个·mL⁻¹ 细胞接种于 24 孔板中, 每孔加入 500 μL, 培养 24 h 后, 设置空白对照组、OVA 组、阳性对照组 (2 μmol·L⁻¹ 的地塞米松 DEX)、药物组 (5 μmol·L⁻¹ 的 Cur-API, Cur-NCS), 阳性对照组及药物组加入阳性药或对应药物预处理 1 h, 空白对照组加入不含药物的培养基, 其他组以 LPS (1 μg·mL⁻¹) 与 INF-γ (20 ng·mL⁻¹) 联合刺激, 造成细胞炎症模型, 培养 24 h 后, 收集各组细胞上清液^[8-12]。

采用 Griess 法检测细胞上清液中 NO 水平; 按 Elisa 试剂盒说明书测定细胞上清液中 IL-6, TNF-α 和 IL-10 水平。

10 细胞毒性研究

MTT 法测定 Cur-API 和 Cur-NCS 对 RAW264.7 细胞毒性影响。取对数生长期、状态良好的细胞, 预

冷 PBS 清洗 2 遍,加入完全培养基吹打,制成细胞悬液,调整细胞密度至 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,96 孔板边缘孔每孔加入 100 μL 的 PBS,其余各孔加入 100 μL 细胞悬液,培养 24 h 后,弃培养基,用 DMEM 基础培养基配制浓度为 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的制剂,每孔加入 100 μL ,每个浓度设 6 个复孔,继续培养 24 h,丢弃培养基,PBS 清洗细胞 2 次。每孔加入 100 μL 的 5% MTT 溶液,继续孵育 4 h,弃 MTT 溶液,加入 150 μL 的 DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,在酶标仪检测 OD 490nm 处各孔的吸光值,按照公式(2)计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{调零组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{调零组}}} \times 100\%$$

公式(2)

$\text{OD}_{\text{实验组}}$, $\text{OD}_{\text{对照组}}$, $\text{OD}_{\text{调零组}}$ 分别为给药组、未加入药物溶液对照组与未接种细胞对照组的吸光值。

11 体内药效学评价

11.1 哮喘模型建立与给药

选 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠 100 只,体重为 20 ~ 22 g,适应性饲养 1 周后,随机分为空白对照组、模型(OVA)组、阳性药组(1.4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 克咳片^[13])、Cur 组(20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、Cur-NCS 组(20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。除空白对照组以外,在 d 1, d 7, d 14 通过腹腔注射 50 μg 的 OVA(250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 2 mg 氢氧化铝的 200 μL 生理盐水混合液致敏。分别在 d 16, d 17, d 19, d 21, d 23 给予生理盐水配制的 5 mL 的 OVA 溶液(50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)持续雾化 30 min。在第 1 次激发哮喘前 30 min,药物组 *ig* 给药,之后连续给药 *qd*,空白组与 OVA 组 *ig* 等体积生理盐水。最后一次给药完成 24 h 后,处死小鼠取材^[11,14-16]。

11.2 血液样本测定

末次给药 24 h 后,处死小鼠,取小鼠眼球血(约 1 mL),100 μL 置于 EDTA 抗凝管内,其余置于普通 EP 管室温静 1 h,分离血清。① 血细胞分析仪分析小鼠全血中淋巴细胞、单核细胞、粒细胞数量。② 采用吉姆萨染色法制备血涂片,于倒置显微镜下观察嗜酸性粒细胞数目情况。③ 采用 Elisa 法检测小鼠血清 OVA 特异性 IgE 水平。

11.3 肺泡灌洗液样本中的细胞因子的检查

各组小鼠在末次雾化后 24 h,眼眶取血,钝性解剖打开其胸腔,暴露肺脏,结扎左侧肺门,取左侧肺叶(病理切片用)。分离气管,在气管上做一个“V”字形的切口,用手术缝合线一端从小鼠气管与食管

间的缝隙贯穿而出,结扎右主支气管,从主支气管注入取一只 1 mL 的注射器,系紧手术线并用止血夹固定,将 0.3 mL 的 0.9% NaCl 溶液注入小鼠右肺内,轻轻按压后慢速抽出,来回灌洗 3 次后,将收集的肺泡灌洗液(BALF)注入准备好的 EP 管中,再次抽取 0.3 mL 生理盐水重复 2 次上述操作,最后吸取 0.1 mL 的 NaCl 溶液洗净注射器残留的 BALF。将回收的 BALF 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下离心 10 min,取上清液用 Elisa 方法测量肺泡灌洗液中 IL-6 与 TNF- α 的水平^[17-18]。

11.4 小鼠肺组织病理

11.4.1 肺组织 HE 染色 将小鼠左肺中叶用 4% 多聚甲醛固定 48 h,逐级酒精脱水,二甲苯透明、浸蜡,石蜡包埋,常规切片,进行 HE 染色。显微镜下观察肺部炎症细胞浸润情况,评估组织炎症水平。

11.4.2 小鼠 MDA, SOD 含量检测 取适量小鼠右肺组织将其剪碎,分别按照组织重量占匀浆液的比例为 10% 加入 PBS, SOD 样品制备液,在冰浴中匀浆后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min 取上清作为待测样品。按照脂质氧化(MDA)与总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒说明书测定样本中 MDA 浓度与 SOD 的酶活力。

11.4.3 胞间黏附因子-1(ICAM-1)水平 取适量小鼠右肺组织将其剪碎,按组织重量与 pH 7.2 ~ 7.4 PBS 比为 1:9 的比例加入对应的 PBS。在冰浴中进行匀浆,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 20 min,去除上清,用 PBS 小心洗涤沉淀的细胞 3 遍,用适量 PBS 重悬细胞沉淀,使细胞浓度达到 10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 左右;在冰浴中进行超声波破碎,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 20 min,收集上清作为待测样品。按照小鼠细胞间 ICAM-1 酶联免疫分析试剂盒说明书测定并计算 ICAM-1 浓度。

12 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0.1 分析所有数据。数据使用单向方差分析(one-way ANOVA),并进行 Dunnet *t* 检验。

结 果

1 姜黄素纳米混悬剂制备工艺处方的优化

通过高压均质法制备 Cur-NCS,以粒径及机器损耗为指标,考察高速剪切机速率、高压均质机的均质压力及循环次数,优化 Cur-NCS 制备工艺。在考虑减小 Cur-NCS 的粒径及防止机器损耗方面,选择

16 000 r·min⁻¹ 转速下高速剪切 2 min,800 bar 循环 40 次为最优制备工艺,见图 1。

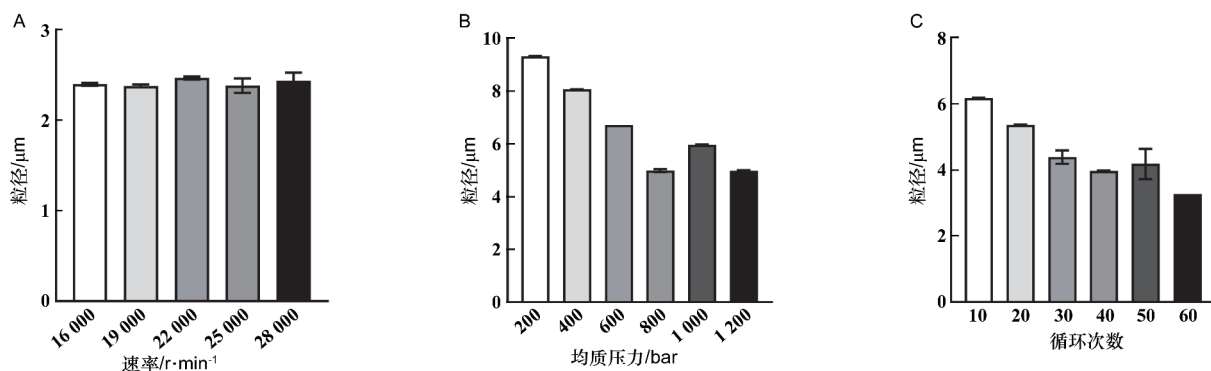
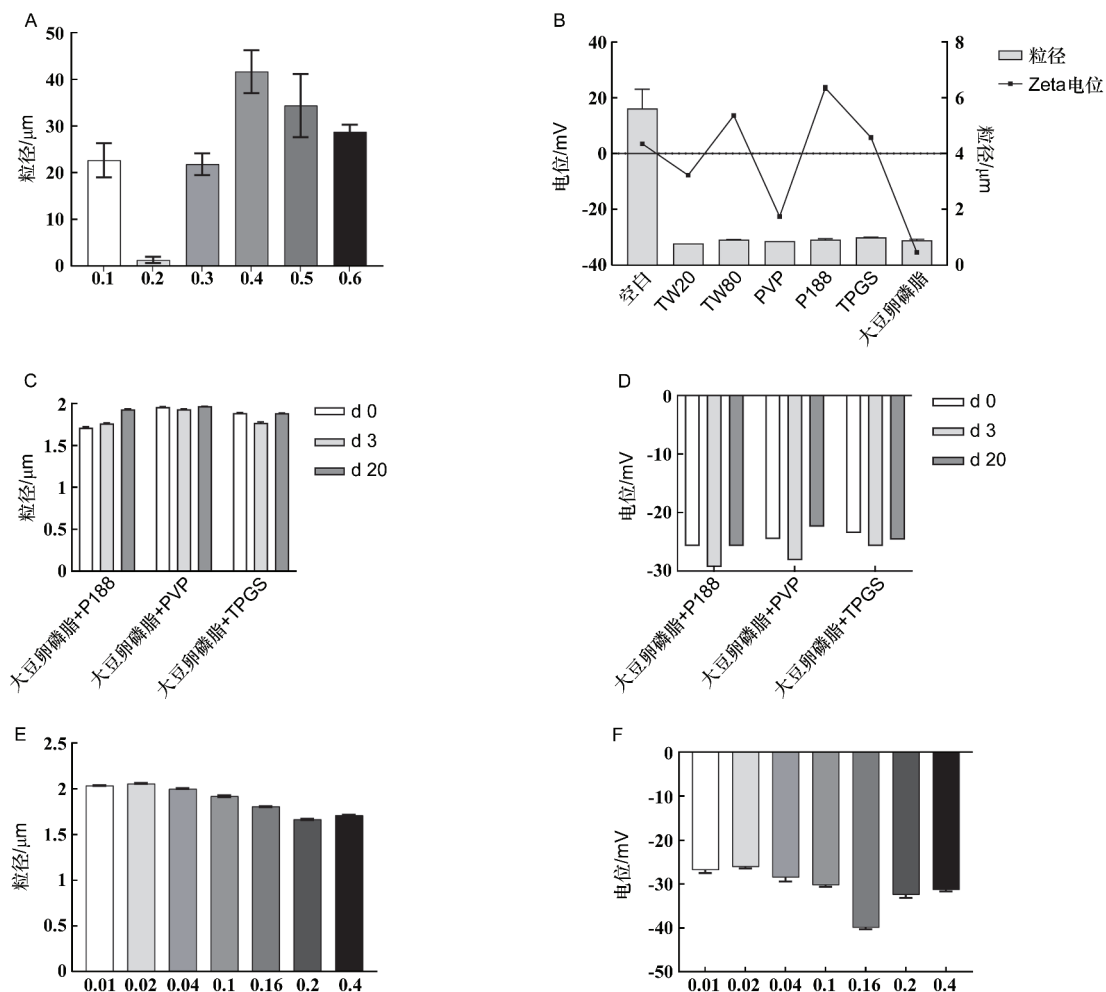


图 1 高压均质法中剪切速率(A)、均质压力(B)和循环剪切次数(C)对 Cur-NCS 混悬液粒径的影响

以粒径、Zeta 电位为指标,筛选 Cur 用量、稳定剂种类及用量,优化 Cur-NCS 制备工艺和处方,最终

确定原料药 Cur 为 0.2%,稳定剂为 TPGS 0.2% 和大豆卵磷脂 0.16%,见图 2。



Cur 浓度(A)、混合稳定剂(C)和 TPGS 浓度(E)对 Cur-NCS 混悬液粒径的影响;不同稳定剂(B)、混合稳定剂(D)和对大豆卵磷脂(E)Cur-NCS 混悬液 Zeta 电位的影响

图 2 Cur 浓度和稳定剂种类对 Cur-NCS 混悬液的粒径和 Zeta 电位的影响

2 粒径分布、Zeta 电位和微观形态

Cur-NCS 平均粒径为 (126.2 ± 1.16) nm, Zeta 电位为 $-(29.5 \pm 0.67)$ mV, 且两者都呈现良好的

正态分布;透射电镜下 Cur 原料药呈不规则晶块状, Cur-NCS 呈球形颗粒,且分布均匀。

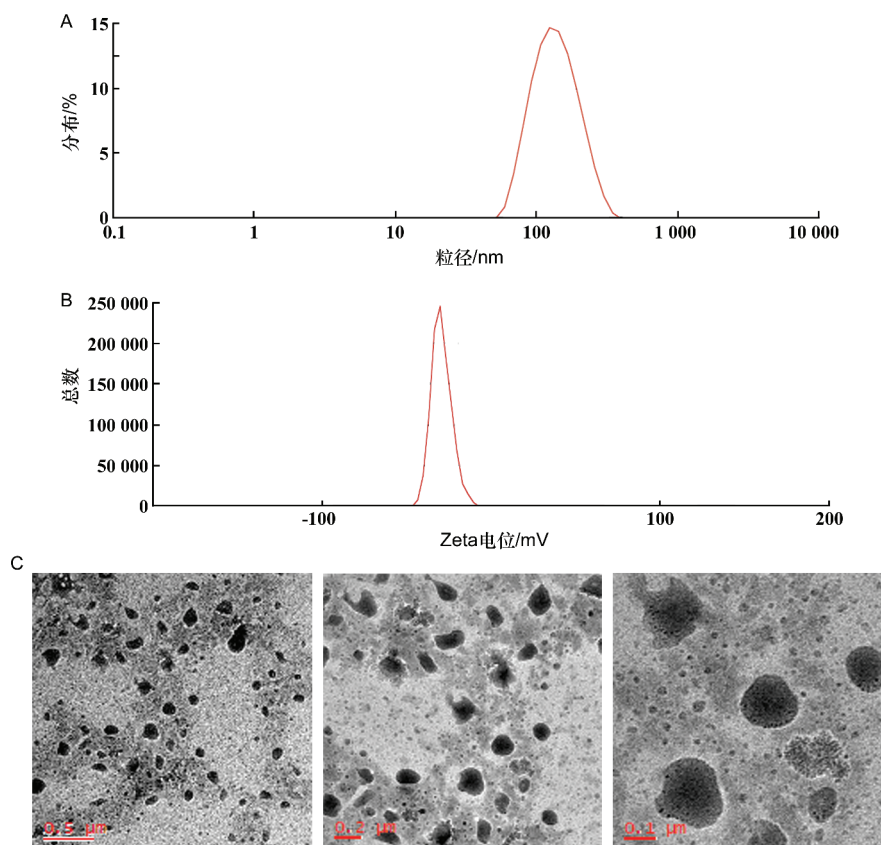


图3 Cur-NCS 混悬液的 Zeta 电位(A)、粒径分布(B)和透射电镜图片(C)

3 体外释放

Cur-API 及 Cur-NCS 在 1% TW-80 的 pH 7.4 PBS 中的累积释放率释放曲线如图 4。可看出在 6 h 内各制剂的释放量未优于 Cur-API, Cur-API, Cur-

NCS 分别释放 3.32% 和 2.51%。8 h 时, Cur-NCS 的释放优势逐渐明显;72 h 时, Cur-NCS 的 Cur 释放量均已接近平衡,继续释放 24 h,最终, Cur-API, Cur-NCS 的累积释药量分别为 11.67% 及 27.44%。

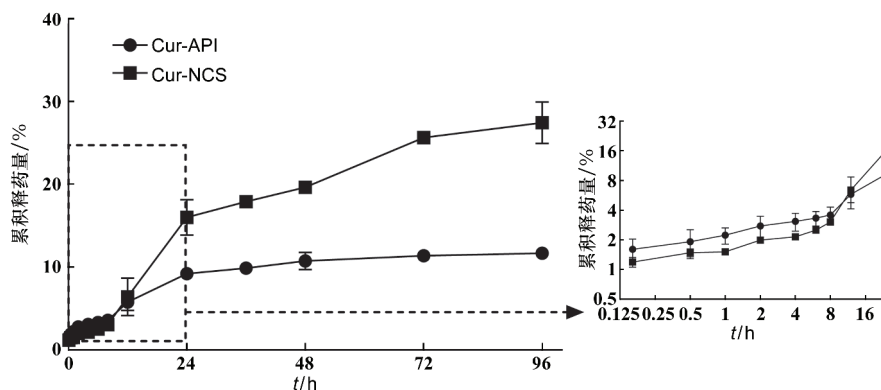


图4 Cur 的体外释放曲线($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 体内药动学

与 Cur-API 相比, Cur-NCS 的 Cur 血药浓度显著提高, Cur-NCS 的 C_{max} 为原料药的 1.51 倍 ($P < 0.01$); Cur-NCS 的 AUC_{0-1} 为原料药的 1.86 倍 ($P < 0.05$); Cur-NCS 的 $AUC_{0-\infty}$ 为原料药的 1.48 倍。 T_{max} 显著延迟, $T_{1/2}$ 无显著性差异。

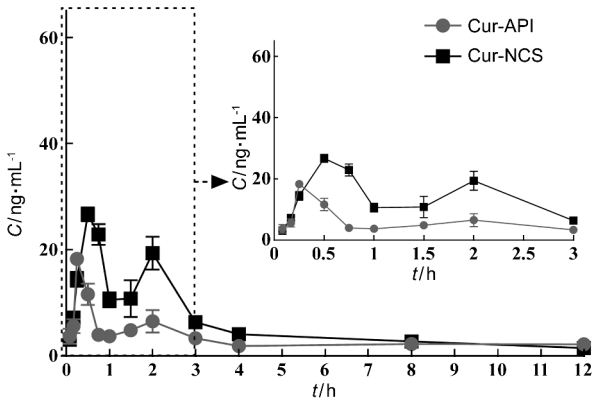
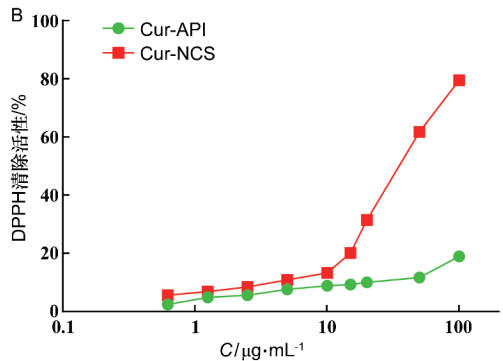
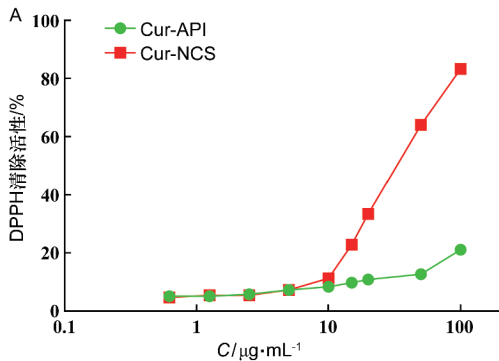


图 5 Cur 口服后血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



B: 用紫外线 (UV-C) 30 W 灯照射约 10 h 后

图 6 Cur 对 DPPH 清除能力的影响

6 体外抗炎

6.1 细胞毒性研究

RAW264.7 细胞毒性结果见图 7(A), Cur-NCS 在高浓度时细胞毒性较大, Cur-NCS 在 Cur 浓度为

表 1 大鼠 $ig\ 60\ mg \cdot kg^{-1}$ Cur 后的体内药动学参数

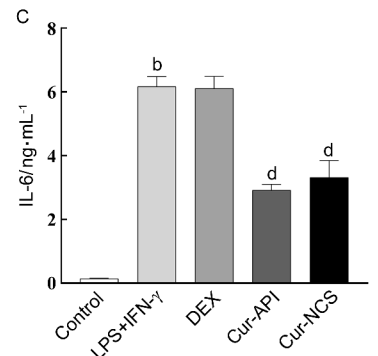
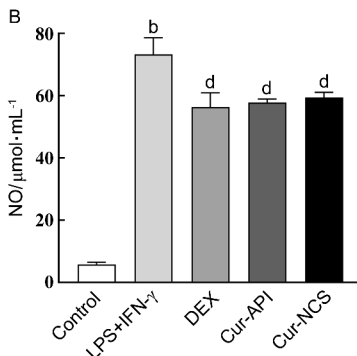
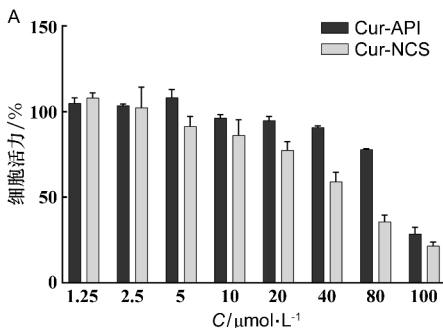
参数	$\bar{x} \pm s, n = 6$	
	Cur-API	Cur-NCS
T_{max}/h	0.31 ± 0.13	0.56 ± 0.13^a
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	18.50 ± 1.81	27.95 ± 2.50^b
$T_{1/2}/h$	5.16 ± 2.76	4.62 ± 1.32
$AUC_{0-1}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	37.7 ± 17.22	70.1 ± 13.26^a
$AUC_{0-\infty}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	54.21 ± 28.6	80.48 ± 20.25
MRT_{0-1}/h	4.37 ± 0.88	3.30 ± 0.50

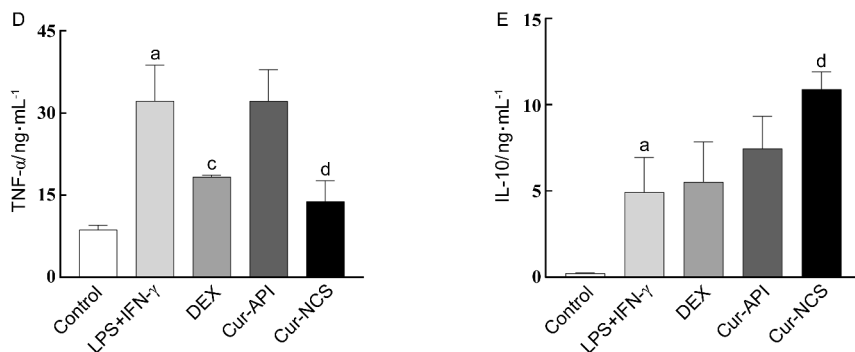
与 Cur-API 组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

5 体外抗氧化

Cur-API, Cur-NCS 的 DPPH 自由基清除活性趋势与未照射紫外线的趋势一致。Cur 浓度为 $100\ \mu mol \cdot L^{-1}$ 时, Cur-NCS 原先的 DPPH 自由基清除活性为 83.27%, 照射紫外后, Cur-NCS 的 DPPH 自由基清除活性为 79.43%, 相比之下, Cur-NCS 的 DPPH 自由基清除活性没有明显降低, 见图 6。

$1.25 \sim 5\ \mu mol \cdot L^{-1}$ 时的细胞存活率均 $\geq 90\%$, 表明在对应浓度下的安全性较好。因此选定 Cur 浓度为 $5\ \mu mol \cdot L^{-1}$ 时对 Cur-API, Cur-NCS 进行药物抗炎实验。





A:Cur 对 RAW264.7 细胞毒性($\bar{x} \pm s, n = 6$);Cur 对 LPS 与 INF- γ 联合诱导的 RAW264.7 细胞上清液中 NO(B), IL-6(C), TNF- α (D) 和 IL-10(E) 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$);与 Control 组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$;与 LPS + INF- γ 组相比, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

图 7 细胞毒性研究结果

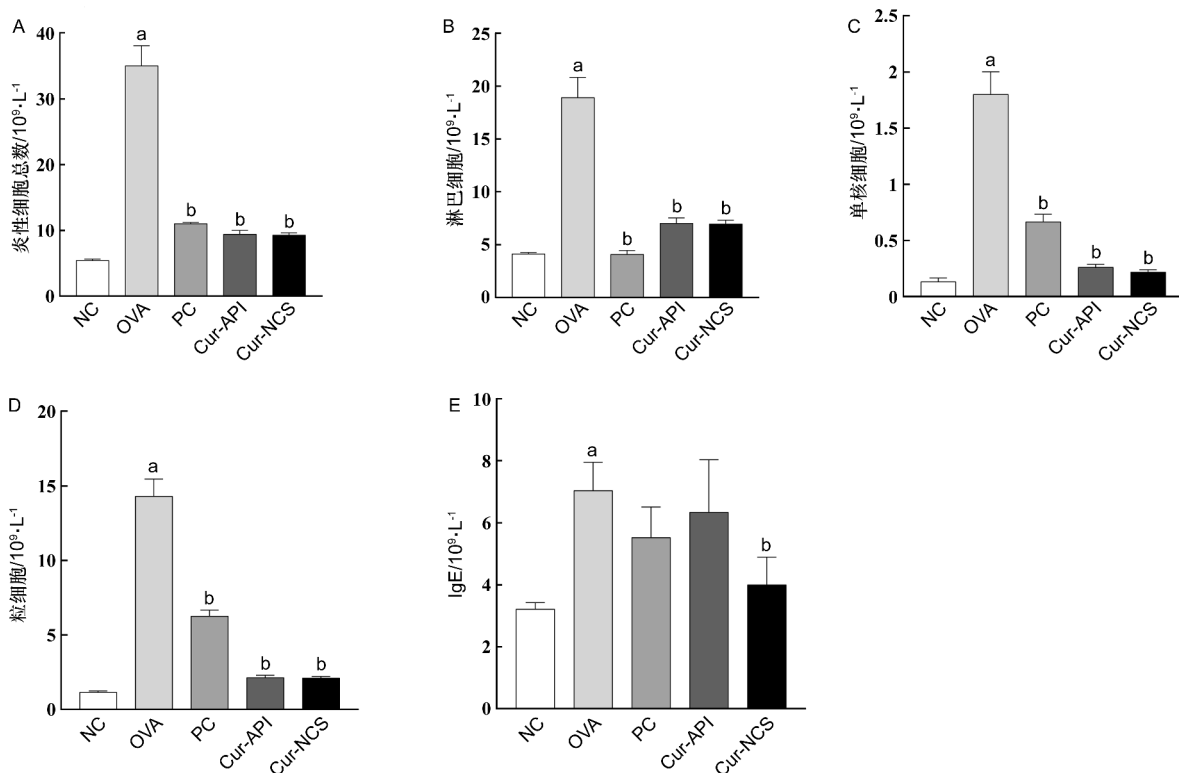
6.2 Cur-NCS 对细胞炎症的影响

结果显示与 OVA 组比较,地塞米松、Cur-API 及 Cur-NCS 组细胞上清液中 NO, IL-6 和 TNF- α 水平均有不同程度的降低, Cur-NCS 处理后, IL-10 的水平仍显著提高, 见图 7。

7 Cur 对哮喘小鼠气道炎症的影响

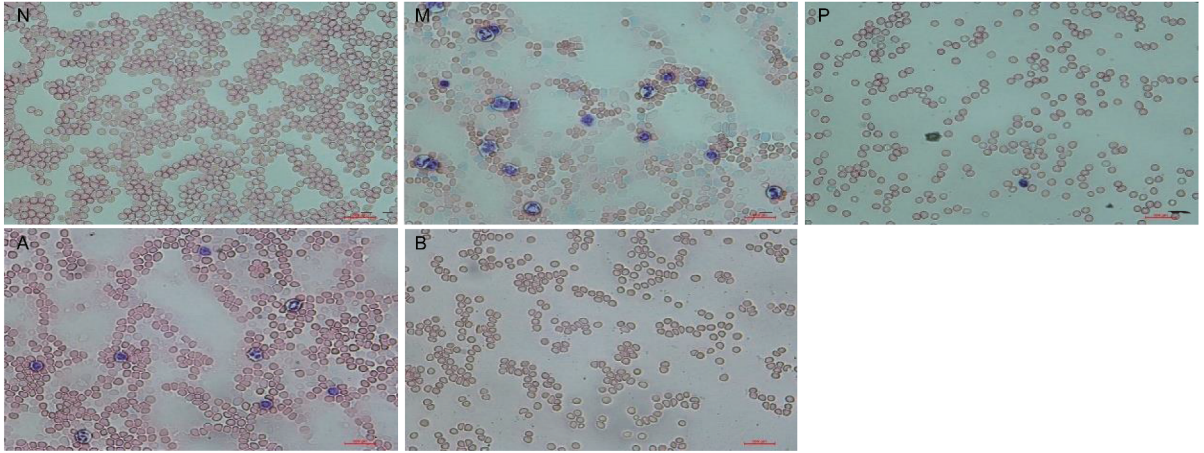
7.1 对小鼠血液细胞的影响

采用血细胞分析仪分析小鼠全血中淋巴细胞、单核细胞、粒细胞数量, 结果表明与空白对照组小鼠相比, OVA 组小鼠的各种类炎性细胞及总数均明显升高($P < 0.01$), 药物治疗组均能显著降低哮喘小鼠炎症细胞和细胞总数($P < 0.01$), 见图 8。这与小鼠血细胞吉姆萨染色图中嗜酸性粒细胞数量趋势一致, 见图 9。



与空白对照组相比, a: $P < 0.01$;与 OVA 组相比, b: $P < 0.01$

图 8 Cur 对哮喘小鼠细胞数量和组成的影响及对小鼠血清 OVA 特异性 IgE 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)



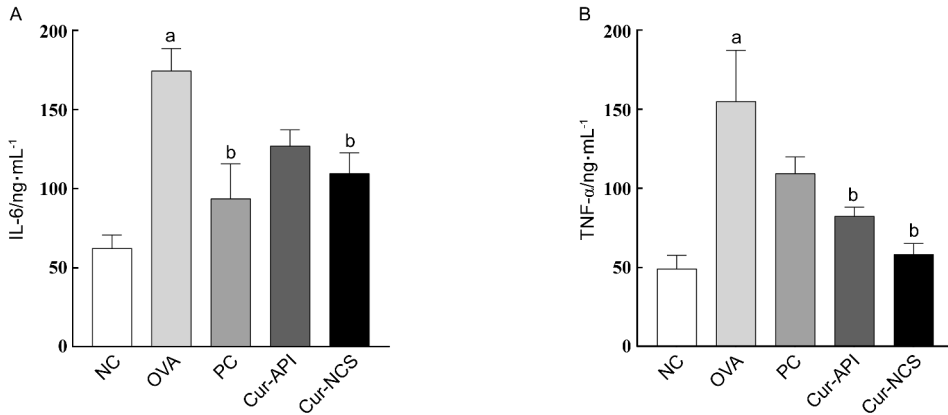
A: Cur-API/0.5% CMC 生理盐水组; B: Cur-NCS 组; N: 空白对照组; M: OVA 组; P: 阳性药组

图9 小鼠血细胞吉姆萨染色图

7.2 Cur 对小鼠肺泡灌洗液 (BALF) 中 IL-6 与 TNF- α 的水平影响

如图 10 所示, 相对于对照组, OVA 组小鼠 BALF 中的 IL-6 与 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$), 药物

组治疗后, IL-6 与 TNF- α 水平均有不同程度的降低, 在同一浓度 Cur 的干预下, Cur-NCS 降低 IL-6 与 TNF- α 水平程度均优于 Cur-API。



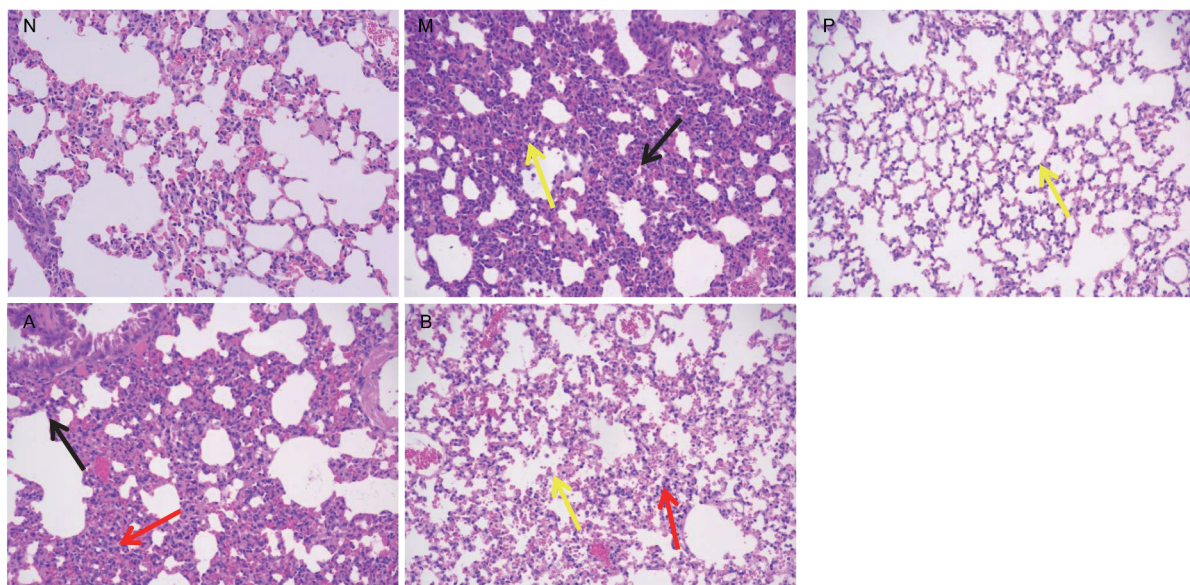
与空白对照组相比, a: $P < 0.01$; 与 OVA 组相比, b: $P < 0.01$

图 10 Cur 对小鼠 BALF 中 IL-6 (A) 与 TNF- α (B) 的水平影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

7.3 Cur 对小鼠肺组织的影响

7.3.1 Cur 对小鼠肺组织 HE 切片病理学变化的影响 如图 11 所示, 空白对照组小鼠气道上皮排列整齐, 气道周围未见炎症细胞聚集 (N)。与对照组相比, OVA 处理的肺组织显示出明显的病理变化, 肺组织整体结构异常, 组织肺泡结构清晰, 组织可见少量肺泡萎缩, 肺泡壁明显增厚, 明显实质化 (如黄色箭头所示), 组织肺间质未见明显充血扩张, 组织可

见大量炎症细胞浸润 (如黑色箭头所示)。阳性药及姜黄素治疗后, 这些病理变化均有较大改善。姜黄素原料药治疗后, 炎症细胞浸润状态有所改善, 但效果不佳 (见图 11A)。Cur-NCS 治疗后, 肺组织整体结构异常的病理状态未有改善, 且组织可见较多肺泡上皮细胞脱落坏死 (黄色箭头所示), 间质可见大面积淤血 (红色箭头所示), 但组织未见明显炎症细胞浸润 (见图 11B)。

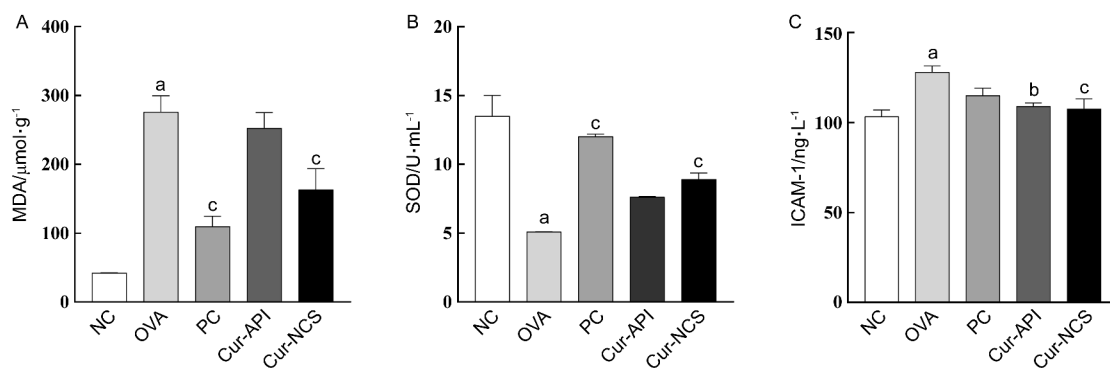


A: Cur-API/0.5% CMC 生理盐水组, B: Cur-NCS 组; 黑色箭头: 肺泡; 红色箭头: 间质炎症细胞; 黄色箭头: 肺泡; N: 空白对照组, M: OVA 组, P: 阳性药组

图 11 哮喘小鼠肺组织病理学变化 ($\times 200$)

7.3.2 Cur 对小鼠肺组织氧化应激及 ICAM-1 的影响 哮喘患者体内存在氧化应激失衡^[19], 将小鼠肺组织匀浆, 测定肺脂质过氧化产物 MDA、抗氧化物 SOD 的水平来评价 OVA 诱导的氧化应激。与空白对照组相比, OVA 诱导的肺组织脂质过氧化物 MDA

的含量显著升高 ($P < 0.01$), SOD 含量显著降低 ($P < 0.01$)。相比之下, 药物治疗组均能不同程度下调 MDA 水平, 上调 SOD 水平。且在 Cur 浓度一致的情况下, Cur-NCS 表现出比 Cur-API 更明显的优势 (见图 12B)。



与空白对照组比较, a: $P < 0.01$; 与 OVA 组比较, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$

图 12 Cur 对小鼠肺组织 MDA (A), SOD (B) 和 ICAM-1 (C) 的水平影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

ICAM-1 早已被认为在抗原呈递和细胞内外信号通路中介导细胞间的相互作用。ICAM-1 介导的炎症升高与哮喘有关^[20]。由图 12 C 可看出, 与空白对照组相比, OVA 诱导的小鼠肺组织 ICAM-1 的水平显著升高 ($P < 0.01$), 相比之下, 药物治疗组均能不同程度下调 ICAM-1 水平。且在 Cur 浓度一致的情况下, Cur-NCS 表现出比 Cur-API 更明显的优势。

讨 论

本研究基于纳米晶混悬液, 以 TPGS 和大豆卵磷脂为稳定剂, 通过高压均质法制备了 Cur-NCS 混悬液, 并对其处方工艺进行了优化。优化后的 Cur-NCS 显示出比原料药更小的粒径, 能显著提高 Cur 体外释放速度与累计释放量, 但在漏槽条件下, 其累

释放量低于 50%,可能与 Cur 本身的低水溶性、低渗透性的性质有关。

哮喘是多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病^[21],其被过敏原或其他环境因素激发后,大量嗜酸性粒细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等炎症细胞被释放^[22-25],因此,细胞因子被发现在过敏性气道炎症的发生中起重要作用^[26],姜黄素可能通过降低炎症细胞因子水平而发挥抗哮喘治疗作用^[27]。巨噬细胞是在哮喘发病期间肺中最丰富的免疫细胞,当巨噬细胞受到炎症刺激时,它们会分泌细胞因子,如肿瘤坏死因子(TNF- α)、IL-1、IL-6 等^[28-30],同时巨噬细胞活化时会释放 NO^[31]。因此,为进一步确认 Cur-NCS 有效性,本文采用 LPS 与 IFN- γ 联合刺激小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 建立体外炎症细胞模型,考察 Cur-NCS 对细胞因子及 NO 等炎症介质的影响,评价其抗炎效果。结果证实了其可降低炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 及炎症介质 NO 的生成。

采用 OVA 诱导建立小鼠哮喘模型^[32-33],考察 Cur-NCS 对小鼠哮喘模型气道炎症的作用。本研究发现 Cur-NCS 可降低 OVA 诱导的哮喘小鼠全血中白细胞、单核细胞、淋巴细胞、粒细胞及嗜酸粒细胞数量以及血清中 IgE 水平,同时又降低了 BALF 中炎症细胞因子 IL-6 的释放和 TNF- α 水平,表明 Cur-NCS 可改善 OVA 致敏支气管哮喘造成的小鼠免疫系统 Th1/Th2 的失衡。此外,肺组织 HE 切片也验证了 Cur-NCS 可减轻组织炎性渗出,且 ICAM-1 水平也显著下调,表明 Cur-NCS 可减轻 OVA 致敏的小鼠支气管哮喘诱发的炎症。

近年来研究发现,过氧化物及其诱导的脂质过氧化反应参与哮喘肺组织的炎症反应过程,加重肺组织病理学变化^[34]。本研究显示 Cur-NCS 可明显降低小鼠肺组织中 MDA 含量,提高 SOD 活性,缓解脂质过氧化反应而保护肺组织免受哮喘气道引起的炎症损伤。

[参 考 文 献]

- [1] BANSAL SS, GOEL M, AQIL F, *et al.* Advanced drug delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011, 4(8): 1158-1171.
- [2] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展[J]. *中草药*, 2010, 41(5): 854-857.
- [3] QIAN HR, YANG Y, WANG XF. Curcumin enhanced adriamycin-induced human liver-derived Hepatoma G2 cell death through activation of mitochondria-mediated apoptosis and autophagy[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 43(3): 125-131.
- [4] LEE GJ, SON HA, CHO JW, *et al.* Stabilization of Pickering emulsions by generating complex colloidal layers at liquid-liquid interfaces[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2014, 413: 100-105.
- [5] 冉娅, 张良珂. 难溶性药物姜黄素作为纳米晶稳定剂制备 Pickering 乳剂的研究[J]. *中草药*, 2017, 48(9): 1773-1777.
- [6] 侯文书, 张丹参, 张力, 等. PEG 修饰姜黄素固体脂质纳米粒的制备、表征及溶出特征[J]. *中草药*, 2019, 50(8): 1927-1934.
- [7] KONG ZL, KUO HP, JOHNSON A, *et al.* Curcumin-loaded mesoporous silica nanoparticles markedly enhanced cytotoxicity in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2918.
- [8] 唐蕾, 吴坚, 于顾然, 等. 益气养阴逐瘀方对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型体外抗炎活性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(1): 141-148.
- [9] LIN XY, BAI DP, WEI ZX, *et al.* Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216711.
- [10] CHEN FY, GUO N, CAO GF, *et al.* Molecular analysis of curcumin-induced polarization of murine RAW264.7 macrophages[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 63(6): 544-552.
- [11] CAPUTO LS, CAMPOS MIC, DIAS HJ, *et al.* Copaiba oil suppresses inflammation in asthmatic lungs of BALB/c mice induced with ovalbumin[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106177.
- [12] ZHANG BC, LI Z, XU W, *et al.* Luteolin alleviates NLRP3 inflammasome activation and directs macrophage polarization in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(1): 265-273.
- [13] 巫晓慧, 王君明, 宋玲玲, 等. 炮制增强黄药子抗炎镇痛祛痰药效的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(11): 2649-2652.
- [14] CHEN YQ, CHEN BL, MA BH, *et al.* Curcumin attenuates allergic airway inflammation of young mice through inhibiting the Activation of p38 MAPK and AKT[J]. *J Sun Yat Sen Univ*, 2017, 38: 833.
- [15] SUBHASHINI, CHAUHAN PS, DASH D, *et al.* Intranasal curcumin ameliorates airway inflammation and obstruction by regulating MAPKinase activation (p38, Erk and JNK) and prostaglandin D2 release in murine model of asthma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 31: 200-206.
- [16] SHAHID H, SHAHZAD M, SHABBIR A, *et al.* Immunomodulatory and anti-inflammatory potential of curcumin for the treatment of allergic asthma: effects on expression levels of pro-inflammatory cytokines and aquaporins[J]. *Inflammation*, 2019, 42(6): 2037-2047.
- [17] 李海龙, 罗庆波, 何静江, 等. 大蒜素对哮喘小鼠肺组织 p38MAPK、PI3K、Akt 及 VEGF 表达水平的影响[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(3): 43-46.
- [18] 李蕴, 梁宗安, 李素云, 等. 复方黄龙汤对哮喘小鼠气道炎症的影响与机制[J]. *西部医学*, 2012, 24(11): 2051-2056.
- [19] MISHRA V, BANGA J, SILVEYRA P. Oxidative stress and cellular pathways of asthma and inflammation; therapeutic strategies and pharmacological targets[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 181: 169-182.
- [20] MUKHOPADHYAY S, MALIK P, ARORA SK, *et al.* Intercellular adhesion molecule-1 as a drug target in asthma and rhinitis

- [J]. *Respirology*, 2014, 19(4): 508 – 513.
- [21] BOCHNER BS, BUSSE WW. Allergy and asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115(5): 953 – 959.
- [22] SUBHASHINI, CHAUHAN PS, DASH D, *et al.* Intranasal curcumin ameliorates airway inflammation and obstruction by regulating MAPKinase activation (p38, Erk and JNK) and prostaglandin D2 release in murine model of asthma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 31: 200 – 206.
- [23] HART PH. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products[J]. *Immunol Cell Biol*, 2001, 79(2): 149 – 153.
- [24] RADERMECKER C, SABATEL C, VANWINGE C, *et al.* Locally instructed CXCR4hi neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(11): 1444 – 1455.
- [25] DASH B, SUN X. Eosinophils set DNA traps in allergic asthma[J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(10): 1057 – 1059.
- [26] CONDE E, BERTRAND R, BALBINO B, *et al.* Dual vaccination against IL-4 and IL-13 protects against chronic allergic asthma in mice[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2574.
- [27] BALLANTYNE SJ, BARLOW JL, JOLIN HE, *et al.* Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120(6): 1324 – 1331.
- [28] SARADNA A, DO DC, KUMAR S, *et al.* Macrophage polarization and allergic asthma[J]. *Transl Res*, 2018, 191: 1 – 14.
- [29] MARUTHAMUTHU V, HENRY LJK, RAMAR MK, *et al.* Myxopyrum serratum ameliorates airway inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and OVA-induced murine model of allergic asthma[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 255: 112369.
- [30] WU D, LI SQ, LIU X, *et al.* Alpinetin prevents inflammatory responses in OVA-induced allergic asthma through modulating PI3K/AKT/NF- κ B and HO-1 signaling pathways in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89(Pt A): 107073.
- [31] DE LAS CASAS-ENGEL M, CORBÍ AL. Serotonin modulation of macrophage polarization: inflammation and beyond[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 824: 89 – 115.
- [32] 乔晓红. 生命早期抗生素暴露对儿童过敏性疾病的影响[J]. *世界临床药物*, 2021, 42(12): 1025 – 1030.
- [33] 姚玥, 吴灏, 张家硕, 等. 咳嗽治疗靶点及其新药研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2023, 32(15): 1538 – 1545.
- [34] 阎玥, 李春雷, 史琦, 等. 哮喘氧化应激模型大鼠支气管肺泡灌洗液中炎症因子表达及温通方干预作用研究[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(4): 1366 – 1369.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-04-25