雷公藤红素白蛋白纳米粒的制备及抗类风湿性关节炎药效评价Δ

闫汉语*，张永萍，徐　剑，刘　耀，曹国琼，汪祖华，宋信莉，郭　玲#（贵州中医药大学药学院/国家苗药工程技术研究中心/贵州省中药民族药炮制与制剂工程技术研究中心，贵阳　550025）

中图分类号　R943；R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）21-2597-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.21.07

摘　要　目的　制备雷公藤红素白蛋白纳米粒（CLT-AN），并考察其体内抗类风湿性关节炎（RA）活性。**方法**　采用超声法制备CLT-AN，以粒径、分散指数（PDI）和稳定性为评价指标，以CLT投药量、大豆油用量和超声功率为考察因素，通过单因素实验优化处方工艺。利用透射电镜、激光粒度测定仪等考察CLT-AN的理化性质，并研究其体外稳定性和体外释放特性。构建佐剂诱导关节炎大鼠模型，考察CLT-AN对模型大鼠关节肿胀、血清中炎症因子[肿瘤坏死因子α（TNF-α）和白细胞介素1β（IL-1β）]水平以及关节组织病理状态的影响。**结果**　优化的处方为CLT 6.5 g、大豆油45 mg、超声功率490 W、超声时间8 min。按最佳处方制备的CLT-AN外观形态圆整，平均粒径为（96.8±1.1）nm，PDI为0.174±0.020，Zeta电位为（－18.6±1.7）mV，包封率为（94.61±0.46）%，载药量为（2.42±0.21）%。在室温条件下，CLT-AN储存5 d内的粒径、PDI、Zeta电位和包封率均无显著变化。CLT-AN体外释放缓慢，72 h的累积释放量可达到73.56%；与游离CLT相比，CLT-AN可明显抑制模型大鼠的关节肿胀，降低其血清中TNF-α、IL-1β水平，并且显著改善炎症关节组织的病理状态。**结论**　超声法制备的CLT-AN粒径适中、稳定性良好，具有显著的缓释特征和优良的抗RA活性。

关键词　雷公藤红素白蛋白纳米粒；处方工艺；理化性质；类风湿性关节炎

Preparation of celastrol-loaded albumin nanoparticles and their efficacy against rheumatoid arthritis

YAN Hanyu, ZHANG Yongping, XU Jian, LIU Yao, CAO Guoqiong, WANG Zuhua, SONG Xinli, GUO Ling (School of Pharmacy/National Engineering Technology Research Center of Miao Medicine/Guizhou Engineering Technology Research Center for Processing and Preparation of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To prepare celastrol-loaded albumin nanoparticles (CLT-AN), and to investigate their activity against rheumatoid arthritis (RA) *in vivo*. **METHODS** CLT-AN was prepared by ultrasonic method. The formulation technology was optimized by single-factor test by taking particle size, polydispersity index (PDI) and stability as indexes, with the dosage of CLT, the dosage of soybean oil and the ultrasonic power as factors. The physical and chemical properties of CLT-AN were investigated by transmission electron microscopy (TEM) and laser particle size analyzer; *in vitro* stability and release profile were studied. A rat model of adjuvant-induced arthritis was constructed to investigate the effects of CLT-AN on joint swelling, the levels of serum inflammatory factors [tumor necrosis factor α (TNF-α) and interleukin-1β (IL-1β)] and pathological state of joint tissue. **RESULTS** The optimized formulation was CLT 6.5 g, soybean oil 45 mg, ultrasonic power 490 W, ultrasonic time 8 min. CLT-AN prepared by the best formulation showed uniform and spherical morphology. Its particle size, PDI, Zeta potential were (96.8±1.1) nm, 0.174±0.020, and (－18.6±1.7) mV, respectively. The encapsulation efficiency and drug-loading efficiency were (94.61±0.46)% and (2.42±0.21)%. There were no significant changes in particle size, PDI, Zeta potential and encapsulation efficiency of CLT-AN within 5 days of storage at room temperature. CLT-AN was slowly released *in vitro*, and the cumulative release reached 73.56% in 72 h. Compared with CLT, CLT-AN could significantly inhibit the joint swelling of model rats, reduced the levels of inflammatory factors TNF-α and IL-1β in serum, and improved the pathological state of inflammatory joint tissue. **CONCLUSIONS** CLT-AN prepared by ultrasonic method has the appropriate particle size, good stability, significant sustained-release characteristics, and excellent therapeutic efficacy against RA.

KEYWORDS　celastrol-loaded albumin nanoparticles; for- mulation technology; physicochemical properties; rheumatoid arthritis

类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种伴有炎症细胞浸润与进行性关节损伤的慢性自身免疫性疾病[1]。由于炎症的反复发作以及关节软骨、肌腱的持续破坏，最终会造成关节功能障碍，甚至残废，严重影响患者的生活质量和寿命。雷公藤红素（celastrol，CLT）是

Δ**基金项目**　国家自然科学基金资助项目（No.81960650）；贵州省高层次创新型“百”层次人才培养项目（No.黔科合人才〔2015〕4030号）；贵州省科技计划项目（No.黔科合平台人才〔2017〕5655）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药及民族药新制剂、新剂型与新技术。E-mail：1689700428@qq.com

＃**通信作者**　副教授，硕士生导师，博士。研究方向：中药及民族药新制剂、新剂型与新技术。E-mail：glgwz1989@163.com

从我国传统中草药卫矛科植物雷公藤中提取得到的五环三萜类化合物[2]，具有广泛且明确的抗炎、免疫抑制、抗氧化及抗肿瘤活性[3]。CLT已被证实对RA有显著的治疗效果[4—5]，其可通过调节中性粒细胞胞外陷阱[6]和Th17/Tregs比例[7]、抑制破骨细胞的形成和功能[8]以及抑制成纤维样滑膜细胞的异常增殖和迁移[9]来治疗RA。然而，CLT水溶性差、生物利用度低，且容易产生全身性毒副作用[10]，极大地限制了其临床应用。

有文献报道，RA炎症关节特殊的病理生理特征会增强炎症部位的血管通透性和炎症细胞的摄取作用，即ELVIS（extravasation through leaky vasculature and subsequent inflammatory cell-mediated sequestration）效应[11]，其类似于肿瘤的强渗透滞留效应。也就是说，粒径适宜的纳米粒可以借助RA炎症部位通透性增大的血管向病变部位分布，并可在局部炎症细胞的内吞作用下滞留于病灶部位，从而实现被动靶向作用。人血清白蛋白（human serum albumin，HSA）是纳米给药系统的常用载体，具有无免疫原性、生物可降解、生物相容性良好等特点[12]。事实上，与穿透健康组织相比，白蛋白可更好地穿透RA的炎症部位[13]，在炎症组织中蓄积，调节其生理功能和代谢[14]。基于此，本研究拟使用安全无毒的HSA作为负载CLT的载体，采用超声法制备雷公藤红素白蛋白纳米粒（celastrol-loaded albumin nanoparticles，CLT-AN），通过单因素实验优化处方工艺，并考察该纳米制剂的理化性质及治疗RA的疗效，以期利用白蛋白的炎症靶向能力和纳米制剂的ELVIS效应实现CLT在病灶部位的靶向蓄积，进而为CLT的临床推广提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有Nano ZS90型激光粒度分析仪（英国Malvern公司）、H-600型透射电子显微镜（日本Hitachi公司）、1260型高效液相色谱仪（美国Agilent公司）、Axiovert 40C型倒置荧光显微镜（德国Zeiss公司）、SB-4200D型超声波细胞粉碎仪（宁波新芝超声设备有限公司）、LQ-C2002型电子天平（上海瑶新电子科技有限公司）、TGL-16B型高速离心机（上海安亭科学仪器厂）、SY501P10型测厚仪（德清盛泰芯电子科技有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

CLT对照品（批号19041101，纯度＞98.0%）购自成都普菲德生物科技有限公司；HSA（批号20201021）购自四川远大蜀阳药业有限公司；大豆油（批号H21024303）购自铁岭北亚药用油有限公司；聚山梨酯80（批号437597）购自北京百灵威科技有限公司；大鼠肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）ELISA试剂盒和大鼠白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）ELISA试剂盒（货号分别为CT075A、400-01B-50UG）均购自北京达科为生物技术有限公司；弗氏完全佐剂（货号7027）购自美国Chondrex公司；甲醇、乙酸为色谱纯，无水乙醇、氯化钠等试剂均为分析纯及以上级别，水为纯水或屈臣氏蒸馏水。

1.3 动物

本研究所用的动物为SPF级健康雄性SD大鼠，体质量为180～200 g，购于长沙市天勤生物技术有限公司，生产合格证号为SCXK（湘）2019-0014。大鼠饲养在SPF级环境下，室内温度为（25±2）℃、相对湿度为（50±10）%，自由饮水及进食。本实验经贵州中医药大学实验动物伦理委员会审核通过后实施（批件号为20210070）。

2 方法与结果

2.1 CLT-AN的处方工艺

在2 mL混合溶剂[V（二氯甲烷）：V（乙酸乙酯）=7∶3]中加入处方量的CLT和大豆油作为油相；取处方量的HSA，加纯水溶解，得水相；将油、水两相混合，冰浴条件下超声粉碎，旋转蒸发除去有机溶剂，即得CLT-AN溶液。

2.2 处方工艺的优化及确定

在预实验基础上，重点选取CLT投药量、大豆油用量和超声功率为考察因素，以纳米粒的粒径、分散指数（polydispersity index，PDI）（测定方法均同“2.3.1”项下）及稳定性[纳米粒贮存在室温条件下析出沉淀的时间，即$T_{stability}$（室温）]为评价指标，通过单因素实验优化CLT-AN的处方工艺。

2.2.1 CLT投药量的考察 固定大豆油用量为45 mg、超声功率为490 W、超声时间为8 min，考察CLT投药量分别为6、7、8、10、15 mg时对纳米粒粒径、PDI和稳定性的影响，结果见表1。如表1所示：随着CLT投药量的增加，CLT-AN的粒径和PDI有增大的趋势，纳米体系变得不稳定；当CLT投药量为6 mg或者7 mg时，纳米粒的粒径、PDI和稳定性均较好。为保证后期药效实验的给药剂量，同时考虑CLT的用量成本，本研究最终确定CLT的投药量为6.5 mg。

表1 CLT投药量对纳米粒性质的影响

CLT投药量/mg	粒径/nm	PDI	$T_{stability}$（室温）/h
6	95.5	0.179	>48
7	97.7	0.188	>48
8	109.1	0.369	<4
10	117.2	0.407	<4
15	153.2	0.671	<4

2.2.2 大豆油用量的考察 固定CLT投药量为6.5 mg、超声功率为490 W、超声时间为8 min，考察大豆油用量分别为0、20、30、45、55 mg时对纳米粒粒径、PDI和稳定性的影响，结果见表2。如表2所示：当油相中不加大豆油（0 mg）时，无法形成纳米粒；随着大豆油用量的增加，CLT-AN的粒径减小，稳定性提高。综合考虑大豆油的

用量成本及纳米粒的载药量，本研究最终确定大豆油用量为45 mg。

表2　大豆油用量对纳米粒性质的影响

大豆油用量/mg	粒径/nm	PDI	$T_{stability}$（室温）/h
0	－	－	－
20	127.0	0.400	<4
30	118.0	0.247	<8
45	96.9	0.169	>48
55	98.4	0.190	>48

－：不能形成纳米粒，故无相关数据

2.2.3　超声功率的考察　固定CLT投药量为6.5 mg、大豆油用量为45 mg、超声时间为8 min，考察超声功率分别为330、400、490、520 W时对纳米粒粒径、PDI和稳定性的影响，结果见表3。如表3所示：随着超声功率的增大，纳米粒的粒径随之减小，稳定性随之增加；但过高的超声功率会导致纳米粒PDI变大、稳定性变差，故本研究最终确定超声功率为490 W。

表3　超声功率对纳米粒性质的影响

超声功率/W	粒径/nm	PDI	$T_{stability}$（室温）/h
330	205.8	0.625	<4
400	122.8	0.246	<8
490	96.6	0.173	>48
520	75.8	0.389	<4

2.2.4　最佳处方工艺的确定　根据上述实验结果，最终确定CLT-AN的处方工艺如下：在2 mL混合溶剂[V（二氯甲烷）：V（乙酸乙酯）=7∶3]中加入6.5 mg CLT和45 mg大豆油作为油相；取20%HSA 1 mL，加纯水溶解至10 mL，得到2%HSA溶液，作为水相；两相混合后，在冰浴中经超声波细胞粉碎仪超声（功率490 W）处理8 min，旋转蒸发除去有机溶剂，即得CLT-AN溶液。

2.3　CLT-AN的表征

2.3.1　粒径、PDI和Zeta电位的测定　取适量按最佳处方工艺制备的CLT-AN，用纯水稀释至1 mL，采用激光粒度分析仪测定其粒径、PDI和Zeta电位，每份样品平行检测3次。结果显示，CLT-AN的粒径为（96.8±1.1）nm，PDI为0.174±0.020，Zeta电位为（－18.6±1.7）mV。CLT-AN的粒径分布呈单峰且峰形较窄，说明粒径分布较均一。CLT-AN的粒径和Zeta电位分布见图1。

2.3.2　形态学观察　取适量按最佳处方工艺制备的CLT-AN滴至覆有支持膜的铜筛网上，用2%磷钨酸染色10 s，用滤纸吸去多余的染液，等自然干燥后，在透射电镜下观察CLT-AN的轮廓和形态。结果显示，所制CLT-AN呈类球形，形态较规则、圆整，大小较均一，详见图2。

2.4　CLT的含量测定

2.4.1　色谱条件　色谱柱为Kromasil-C_{18}（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇-10%乙酸溶液（95∶5，V/V）；流速为1.0 mL/ min；检测波长为425 nm；柱温为35 ℃；进样量为10 μL。

2.4.2　溶液的制备　取不含CLT的空白纳米粒和CLT-AN，分别加入5 mL甲醇，超声（频率400 W，功率53 kHz，下同）10 min破乳，然后以13 000 r/min离心10 min，取上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤，收集滤液，即得空白对照溶液和供试品溶液。精密称取CLT对照品，用甲醇溶解并定容至50 mL，即得对照品溶液。

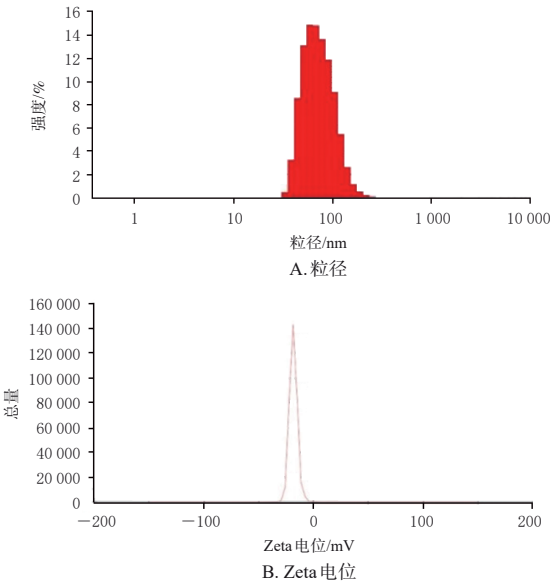


图1　CLT-AN的粒径和Zeta电位分布

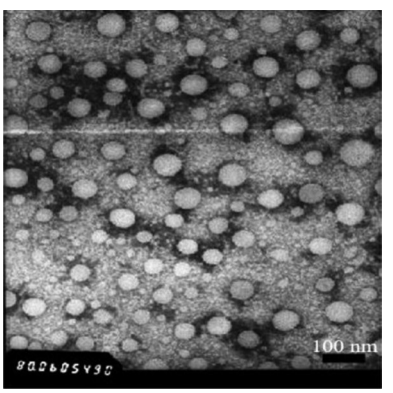


图2　CLT-AN的透射电镜图

2.4.3　方法学考察　专属性考察结果显示，CLT对照品及CLT-AN在相同保留时间处均有类似的色谱峰，而空白纳米粒中的辅料在CLT的出峰位置没有峰，表明辅料不会干扰CLT的测定，专属性较好（图略）。用峰面积（A）对CLT的质量浓度（c）进行线性回归，得到回归方程为A=12.431c+0.844 8（R^2=0.999 3），表明CLT在1～20 g/mL内线性关系良好。精密度考察结果显示，低、中、高质量浓度对照品溶液峰面积的RSD分别为0.98%、1.07%、0.55%（n=5），表明仪器精密度良好。重复性考察结果显示，供试品溶液中CLT含量的RSD为1.49%（n=6），表明该方法重复性良好。稳定性考察结果显示，供试品溶液在室温放置0、4、8、12、24 h时峰面积的RSD为1.28%（n=5），表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。精密量取适量已知含量的CLT-AN，共9份，分别按已知含量的80%、100%、120%加入CLT对

照品（每个浓度3份）并依法测定，结果80%、100%、120%加样量样品的平均加样回收率分别为98.51%、100.59%、98.76%，RSD分别为0.66%、0.51%、0.43%（n=3），表明该方法准确度较好。

2.5 包封率及载药量测定

取0.2 mL按最佳处方工艺制备的新鲜CLT-AN，过G50葡聚糖凝胶柱分离CLT-AN和游离CLT。分离出的CLT-AN用甲醇超声10 min破乳，然后以13 000 r/min离心10 min，取上清液经0.22 μm滤膜过滤，取滤液10 μL，按“2.4”项下方法测定CLT-AN中包载的CLT含量（W_e）。另取未过凝胶柱的样品0.2 mL，直接用甲醇破乳，然后以13 000 r/min离心10 min，取上清液经0.22 μm滤膜过滤，同法测定体系中药物总含量（W_t）。通过下式计算包封率：包封率（%）=W_e/W_t×100%[15]。另取0.2 mL按最佳处方工艺制备的新鲜CLT-AN，冻干后称定CLT-AN干粉的总质量（W_d），通过下式计算载药量：载药量（%）=W_e/W_d×100%[16]。各实验平行制备3份样品，每份样品测定3次。结果显示，CLT-AN的包封率和载药量分别为（94.61±0.46）%和（2.42±0.21）%。

2.6 体外稳定性考察

将按最优工艺制备的CLT-AN保存于室温条件下，分别在0、1、3、5 d定时取样测定其粒径、PDI、Zeta电位和包封率，考察其稳定性。每个时间点平行测定3次。结果，随着放置时间的延长，CLT-AN的粒径、PDI、Zeta电位和包封率均无明显变化，且未见沉淀或浑浊现象，说明CLT-AN在室温条件下贮存5 d比较稳定。结果见表4。

表4 室温下CLT-AN的稳定性考察结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

时间/d	粒径/nm	PDI	Zeta电位/mV	包封率/%
0	95.8±1.3	0.180±0.010	−19.6±2.1	94.59±0.39
1	94.7±1.0	0.187±0.020	−20.1±1.0	95.61±0.46
3	96.1±1.1	0.178±0.030	−21.3±2.0	93.77±0.63
5	96.8±1.5	0.184±0.010	−20.6±1.7	93.61±1.16

2.7 体外释放行为考察

精密量取2.0 mL CLT溶液（取CLT对照品，以二甲基亚砜为溶剂制得）和按最优工艺制备的CLT-AN溶液（CLT含量均为1.18 mg），装入透析袋（截留分子量为8 000～10 000 Da）内，两端扎紧，以40 mL含1%聚山梨酯80的磷酸盐缓冲液（PBS）（pH=7.4）为释放外液，在37 ℃水浴恒温振荡器（100 r/min）内释放，每份样品重复3次实验。在0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72 h时分别取样1 mL，同时补充同温、同体积的释放外液。按“2.4”项下方法测定释放样品中CLT的药物浓度，计算累积释放量，并绘制释放曲线，结果见图3。由图3可知：游离CLT在24 h内基本释放完全；CLT-AN在12 h前属于快速释放期，12 h后属于缓慢释放期，72 h内的累积释放量达73.56%，具有明显的缓释特征。

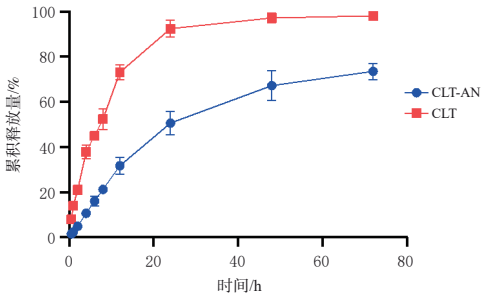


图3 CLT和CLT-AN的体外释药曲线（$\bar{x}\pm s$，n=3）

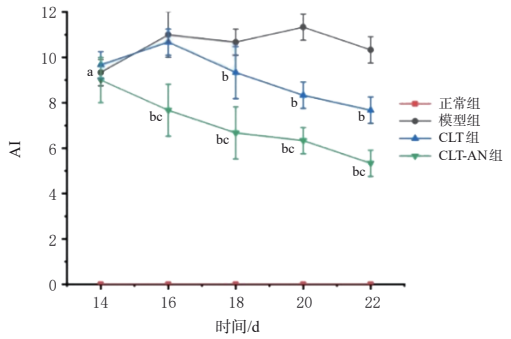
2.8 抗RA的药效评价

2.8.1 模型建立及分组、给药 于SD大鼠尾根部皮下注射100 μL完全弗氏佐剂（含结核分枝杆菌10 mg/mL）建立佐剂诱导关节炎（adjuvant induced arthritis，AIA）大鼠模型[11]，造模当天记为第0天。造模后第14天，大鼠四肢出现明显肿胀，提示造模成功。将AIA模型大鼠按随机数字表法分为模型组、CLT组和CLT-AN组，每组6只。按“2.4”项下方法测定游离CLT溶液浓度以及CLT-AN溶液中CLT浓度后，CLT组和CLT-AN组大鼠分别尾静脉注射给药，给药剂量按CLT计均为1 mg/kg[10]；模型组大鼠同法注射等体积PBS。隔天注射1次，连续给药4次。另外选取6只健康大鼠作为正常组，同法注射等体积PBS。

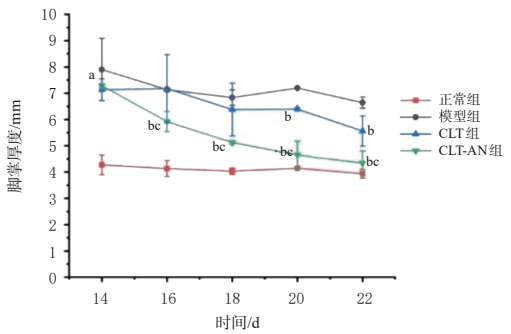
2.8.2 CLT-AN对AIA模型大鼠关节肿胀的影响 造模后第14天，参照文献[11]，采用0～4级关节评分法对各组大鼠关节肿胀程度进行评分：0分，无红斑和关节肿胀迹象；1分，踝关节或脚掌中部有红斑或轻度肿胀；2分，踝关节至脚掌中部有红斑和肿胀；3分，踝关节和足跖关节有红斑和中度肿胀；4分，踝关节至脚掌有红斑和严重肿胀。关节肿胀度评分为四肢评分总和，用关节炎指数（arthritis index，AI）表示。另外使用测厚仪测定各组大鼠后肢的脚掌厚度。AI和脚掌厚度的测量从造模后第14天开始，每隔1天测定1次，直至造模后第22天。采用SPSS 22.0软件进行统计学分析；数据以$\bar{x}\pm s$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检验；检验水准α=0.05。结果见图4、图5。

由图4可知，随着给药次数的增加，CLT-AN组大鼠的AI和脚掌厚度均出现大幅度下降。到造模后第22天，其AI和脚掌厚度均显著低于CLT组和模型组（P<0.05）。由图5可知，模型组大鼠显示出严重而全面的关节肿胀与关节变形；CLT组大鼠关节肿胀程度较模型组稍微减轻，但效果并不明显；CLT-AN组大鼠关节与脚掌肿胀程度均较模型组显著改善（P<0.05），其关节与脚掌形貌趋近于正常组大鼠。

2.8.3 CLT-AN对AIA大鼠血清中炎症因子水平的影响 造模后第22天，取各组大鼠血液，放置30 min后以7 000 r/min离心10 min，收集血清样品，按照ELISA试剂盒说明书操作，检测血清中炎症因子TNF-α和IL-1β含



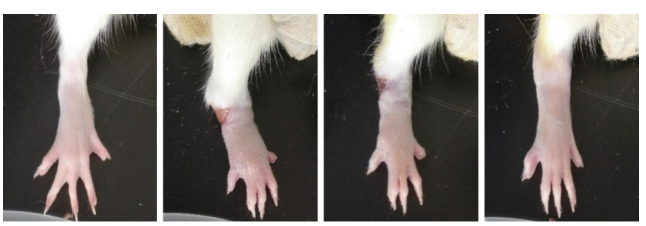
A.关节肿胀度评分



B.大鼠脚掌厚度

a:与正常组比较，$P<0.05$；b:与模型组比较，$P<0.05$；c:与CLT组比较，$P<0.05$

图4　各组大鼠关节肿胀度评分和脚掌厚度测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）



A.正常组　B.模型组　C.CLT组　D.CLT-AN组

图5　各组大鼠关节肿胀程度图

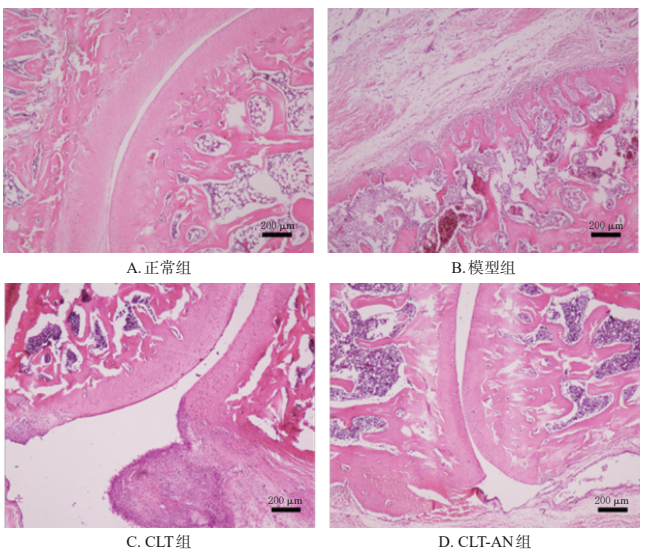
量，结果见表5。结果显示，相较于模型组和CLT组，CLT-AN组大鼠血清中TNF-α、IL-1β含量均显著降低（$P<0.05$）。

表5　各组大鼠血清中TNF-α、IL-1β含量测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，pg/mL）

组别	TNF-α	IL-1β
正常组	310.50±45.96	247.06±23.24
模型组	849.33±33.00[a]	515.64±38.18[a]
CLT组	651.17±31.82[b]	409.27±39.86[b]
CLT-AN组	393.00±44.31[bc]	268.32±6.11[bc]

a:与正常组比较，$P<0.05$；b:与模型组比较，$P<0.05$；c:与CLT组比较，$P<0.05$

2.8.4　CLT-AN对AIA模型大鼠关节组织病理状态的影响　取血后处死大鼠，取其踝关节，常规固定、脱钙后制备石蜡包埋切片（厚度为4 μm），脱蜡至水，行HE染色、中性树脂封片，光学显微镜下观察病理组织学变化，结果见图6。图6结果显示：模型组大鼠关节面呈中重度缺损伴软骨消失，大部分骨组织坏死，关节组织中有大量炎症细胞浸润；CLT组大鼠的病理情况较模型组略有改善，但炎症细胞浸润以及组织坏死仍十分明显；CLT-AN组大鼠虽仍有少量炎症细胞浸润，但可观察到清晰、完整的关节腔，并且骨组织正常，未见骨萎缩及坏死。



A.正常组　B.模型组

C.CLT组　D.CLT-AN组

图6　各组大鼠踝关节组织病理状态（HE染色）

3　讨论

RA是一种不可逆转的自身免疫性疾病，目前临床主要采用非甾体抗炎药、糖皮质激素、改善病情的抗风湿药以及生物制剂对其进行治疗[17]。但这些药物疗效不一，有的缓解RA症状后易复发，有的长期或者大量使用极易引起一系列毒副作用，如非甾体抗炎药容易引起胃肠道出血，糖皮质激素类药物会造成股骨头坏死[18]。因此，研究开发高效低毒的RA治疗方法具有重要的临床意义。CLT已被证实对RA具有良好的治疗效果，但其溶解度较差（在pH 7.4缓冲液中的溶解度为11 μg/mL）[19]、生物利用度低（口服生物利用度为17.06%）[20]，且给药后体内非选择性地广泛分布可导致心脏、肝脏及神经毒性[10]，严重限制了其开发利用。本研究将CLT包载于纳米粒中，一方面是尝试通过纳米技术改善CLT理化性质的缺陷，另一方面是想利用白蛋白的炎性靶向能力和纳米制剂的ELVIS效应，提高药物在病灶部位的蓄积量，达到增强药物疗效和降低毒性的目的。

在本研究中，笔者通过超声法制备了CLT-AN，该方法属于新型白蛋白纳米制备技术（nanoparticle-albumin bound technology，Nab™），是一种适合包载难溶性药物的纳米技术[21]。该技术以白蛋白作为载体材料和稳定剂，通过高剪切力（超声、高压均质等方法）产生局部高热以及气穴空化效应，使白蛋白分子中原有的巯基在水不溶性药物液滴周围交联形成新的二硫键，进而将白蛋白交联在一起形成纳米粒。美国FDA批准上市的白蛋白结合紫杉醇纳米粒注射液（Abraxane）正是基于这种技术制备的[22]。基于Nab™包载难溶性药物的基本要求有两点：第一，药物在与水不相溶的溶剂中有较高溶解

度；第二，药物具有较高的血浆蛋白结合率[22]。CLT难溶于水，能溶于乙酸乙酯、二氯甲烷和氯仿等有机溶剂，且与白蛋白结合率高（血浆蛋白结合率大于80%）[23-24]，提示其适合采用Nab™制备成载药白蛋白纳米粒，并能获得较高的包封率。此外，白蛋白具有独特的疏水袋状结构[22]，可通过疏水作用与CLT结合，这也为制备高包封率的载药纳米粒创造了有利条件。CLT的水难溶性和较强的血浆蛋白结合率、白蛋白独特的空间结构以及超声法制备技术的优势，是本研究制备得到较高包封率CLT-AN的主要原因。

粒径是影响纳米粒在关节部位蓄积的最重要因素之一：粒径过大的纳米粒无法穿过血管内皮细胞间隙进入关节腔；粒径过小的纳米载体虽能穿过内皮层，但是也很容易重新回到血液中而无法实现大量蓄积；而粒径100 nm左右的纳米粒既能穿过血管内皮细胞间隙，又能在关节腔内大量蓄积滞留[25]。因此，本研究首先通过单因素实验筛选最优处方工艺，希望得到粒径在100 nm左右且稳定性好的CLT-AN。前期实验结果显示，投药量、大豆油用量和超声功率对纳米粒的粒径和稳定性有很大影响：（1）投药量过多，药物在有机相中难以溶解完全，容易造成CLT-AN粒径增大、稳定性差以及药物泄露等问题。（2）大豆油在水相中分散较慢，不具有挥发性，白蛋白可以逐渐在油滴周围交联形成包衣，使溶解在油相中的CLT不易向水相扩散，有助于形成CLT-AN。当大豆油用量较少时，所形成的油滴不足以承载处方中所有CLT，易导致纳米体系粒径较大、稳定性差。（3）超声法制备纳米粒是通过超声波产生的外加能量使体系中的粒子分散成型，若超声功率太低则不能使纳米粒分散成小粒径粒子，随着超声功率的增大，纳米粒粒径随之减小、稳定性随之增加。最终，本研究通过筛选出的最佳处方工艺制得了粒径约100 nm、表面电荷约－18 mV的均一、稳定且包封率高的CLT-AN。此外，本研究通过建立AIA大鼠模型对CLT-AN的药效进行了评价，结果显示，与PBS和游离CLT相比，CLT-AN可以显著遏制AIA模型大鼠的关节肿胀，降低其血清中炎症因子（TNF-α、IL-1β）的水平，同时显著改善其关节组织的病理状况。

综上所述，本研究通过单因素实验优选出了CLT-AN的最佳处方工艺，按最佳工艺制备的CLT-AN的粒径、PDI适宜，稳定性良好，具有显著的缓释特征，且具有较好的抗RA作用。后续，笔者将对CLT-AN的体内分布、体内安全性等进行全面研究，为其进一步的开发应用提供更完整的实验数据。

参考文献

[1] MCINNES I B, SCHETT G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2017, 389(10086): 2328-2337.

[2] SALMINEN A, LEHTONEN M, PAIMELA T, et al. Celastrol: molecular targets of thunder god vine[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(3): 439-442.

[3] KANNAIYAN R, SHANMUGAM M K, SETHI G. Molecular targets of celastrol derived from Thunder of God Vine: potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer[J]. Cancer Lett, 2011, 303(1): 9-20.

[4] AN L M, LI Z R, SHI L Q, et al. Inflammation-targeted celastrol nanodrug attenuates collagen-induced arthritis through NF-κB and Notch1 pathways[J]. Nano Lett, 2020, 20(10): 7728-7736.

[5] VENKATESHA S H, YU H, RAJAIAH R, et al. *Celastrus*-derived celastrol suppresses autoimmune arthritis by modulating antigen-induced cellular and humoral effector responses[J]. J Biol Chem, 2011, 286(17): 15138-15146.

[6] YU Y, KOEHN C D, YUE Y, et al. Celastrol inhibits inflammatory stimuli-induced neutrophil extracellular trap formation[J]. Curr Mol Med, 2015, 15(4): 401-410.

[7] ASTRY B, VENKATESHA S H, LAURENCE A, et al. Celastrol, a Chinese herbal compound, controls autoimmune inflammation by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells in the target organ[J]. Clin Immunol, 2015, 157(2): 228-238.

[8] GAN K, XU L X, FENG X K, et al. Celastrol attenuates bone erosion in collagen-induced arthritis mice and inhibits osteoclast differentiation and function in RANKL-induced RAW264.7[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 24(2): 239-246.

[9] XU Z T, WU G S, WEI X, et al. Celastrol induced DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis in human rheumatoid fibroblast-like synovial cells[J]. Am J Chin Med, 2013, 41(3): 615-628.

[10] GUO L, LUO S, DU Z, et al. Targeted delivery of celastrol to mesangial cells is effective against mesangioproliferative glomerulonephritis[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 878.

[11] WANG Q, JIANG J Y, CHEN W F, et al. Targeted delivery of low-dose dexamethasone using PCL-PEG micelles for effective treatment of rheumatoid arthritis[J]. J Control Release, 2016, 230: 64-72.

[12] ISHIMA Y, MARUYAMA T. Human serum albumin as carrier in drug delivery systems[J]. Yakugaku Zasshi, 2016, 136(1): 39-47.

[13] LEVICK J R. Permeability of rheumatoid and normal human synovium to specific plasma proteins[J]. Arthritis Rheum, 1981, 24(12): 1550-1560.

[14] WUNDER A, MÜLLER-LADNER U, STELZER E H, et al. Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis[J]. J Immunol, 2003, 170(9): 4793-4801.

（下转第2608页）