大麻二酚-胆甾醇琥珀酸单酯-g-羧甲基壳聚糖纳米胶束体内药动学及体外抗炎作用研究Δ

李　睿[1*]，路丽艳[1]，许　楚[1]，郝　瑞[1]，田湘涵[1]，阮文辉[2#]，王颖莉[3]（[1]山西中医药大学中药与食品工程学院，山西 晋中　030619；[2]山西省药品审评中心（山西省医药与生命科学研究院），太原　030006；[3]山西中医药大学实验管理中心，山西 晋中　030619）

中图分类号　R969.1；285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）23-2889-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.23.09

摘　要　目的　研究大麻二酚（CBD）-胆甾醇琥珀酸单酯-g-羧甲基壳聚糖（CCMC）纳米胶束在大鼠体内的药动学及组织分布特性，并初步评价其体外抗炎作用。**方法**　采用透析法制备CBD-CCMC纳米胶束，并对其性能进行表征。将SD大鼠分为CBD组和CBD-CCMC纳米胶束组，每组6只，分别灌胃100 mg/kg CBD和CBD-CCMC纳米胶束（以负载的CBD计）；于给药后0.5、1、1.33、1.5、1.75、2、4、8、24、48 h眼眶采血，计算药动学参数。另取大鼠同法分组、给药，每组24只；分别于给药后0.25、1.5、10、24 h，每组取6只大鼠分离其心、肝、脾、肺、肾、肌肉组织，分析药物的组织分布情况。采用脂多糖诱导来建立Caco-2细胞炎症模型，分别以终质量浓度为5、10、15 μg/mL的CBD和CBD-CCMC纳米胶束（以负载的CBD计）作用24 h后，检测细胞活力、跨膜电阻（TEER）和炎症刺激下细胞产生的炎症因子[白细胞介素1β（IL-1β）、IL-8、肿瘤坏死因子α（TNF-α）]水平。**结果**　所制CBD-CCMC纳米胶束的平均粒径为（230.6±1.8）nm，多分散性指数为0.170±0.053，Zeta电位为（−13.5±1.2）mV，包封率及载药量分别为（86.35±0.56）%、（9.18±0.32）%；溶解度为68.240 μg/mL。药动学结果显示，与CBD组比较，CBD-CCMC纳米胶束组大鼠的药时曲线下面积（AUC）$_{0\text{-}48\,h}$、AUC$_{0\text{-}\infty}$、半衰期、峰浓度均显著增加/延长（$P<0.05$或$P<0.01$）。组织分布研究结果表明，在同一时间点，CBD-CCMC纳米胶束组大鼠组织中药物的分布浓度均高于CBD组。抗炎作用研究结果显示，与同质量浓度的CBD相比，CBD-CCMC纳米胶束可显著提高细胞活力（$P<0.05$或$P<0.01$），升高TEER，降低细胞中IL-8、IL-1β、TNF-α水平（$P<0.01$）。**结论**　CBD-CCMC纳米胶束能够增加CBD血药浓度和组织分布浓度，提高CBD的抗炎活性。

关键词　大麻二酚；纳米胶束；胆甾醇琥珀酸单酯；羧甲基壳聚糖；药动学

Study on *in vivo* pharmacokinetics and *in vitro* anti-inflammatory effects of cannabidiol-cholesterol succinate monoester-g-carboxymethyl chitosan nano-micelles

LI Rui[1], LU Liyan[1], XU Chu[1], HAO Rui[1], TIAN Xianghan[1], RUAN Wenhui[2], WANG Yingli[3]（[1]. College of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi Jinzhong 030619, China; [2]. Shanxi Center of Drug Evaluation (Shanxi Institute of Medicine and Life Science), Taiyuan 030006, China; [3]. Experimental Management Center, Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi Jinzhong 030619, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the pharmacokinetics and tissue distribution of cannabidiol (CBD)-cholesterol succinate monoester-g-carboxymethyl chitosan (CCMC) nano-micelles in rats, and to evaluate its anti-inflammatory effect. **METHODS** CBD-CCMC nano-micelles were prepared by dialysis method and the properties were characterized. SD rats were divided into CBD group and CBD-CCMC nano-micelles group with 6 rats in each group. The rats were given 100 mg/kg CBD and CBD-CCMC nano-micelle by intragastric administration, respectively (based on the CBD load). Blood was collected from the posterior ophthalmic venous plexus at 0.5, 1, 1.33, 1.5, 1.75, 2, 4, 8, 24, 48 h after administration. The heart, liver, spleen, lung, kidney and muscle tissues of rats were separated at 0.25, 1.5, 10 and 24 h after administration of CBD and CBD-CCMC nano-micelle with the same dose. The drug content in plasma and tissues was determined, the pharmacokinetic parameters were calculated, and the tissue distribution was analyzed. The inflammatory model of Caco-2 cells was induced by lipopolysaccharide, after 24 h of treatment with 5, 10, and 15 μg/mL CBD and

Δ **基金项目**　山西省科技创新人才团队专项计划（No. 202204051002028）；山西中医药大学-企业技术合作研发项目（No. 2022-05）；吕梁市引进高层次科技人才重点研发（社会发展）项目（No. 2022RC06）

＊**第一作者**　副教授，硕士生导师。研究方向：天然成分新型载药体系。E-mail：46116288@qq.com

＃**通信作者**　高级工程师，博士。研究方向：天然成分新型载药体系。E-mail：24730890@qq.com

CBD-CCMC nanomicelles (based on loaded CBD), its anti-inflammatory activity was investigated by measuring cell viability, transepithelial electrical resistance (TEER) and inflammatory cytokines IL-1β, IL-8 and TNF-α. **RESULTS** The prepared CBD-CCMC nano-micelles had a particle size of (230.6±1.8) nm, a polydispersity index of 0.170±0.053, a Zeta potential of (−13.5±1.2) mV, an encapsulation rate of (86.35±0.56)% and a drug loading of (9.18±0.32)%, respectively; the solubility was 68.240 μg/mL. The pharmacokinetic results showed that the $AUC_{0\text{-}48\ h}$, $AUC_{0\text{-}\infty}$, half-life time and peak concentration of CBD-CCMC nano-micelle group were significantly increased/extended compared with CBD group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The results of the tissue distribution study showed that at the same time point, the drug distribution concentration of CBD-CCMC nanomicelles in the rat tissue was higher than that in the CBD group. Research on anti-inflammatory effects shows that compared with CBD of the same mass concentration, CBD-CCMC nano-micelles can significantly increase cell viability ($P<0.05$ or $P<0.01$), enhance TEER, and reduce the levels of IL-8, IL-1β and TNF-α in cells ($P<0.01$), and the secretion levels of inflammatory cytokines IL-8, IL-1β and TNF-α were significantly decreased ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** CBD-CCMC nano-micelles can increase the plasma concentration and tissue distribution concentration of CBD, and improve anti-inflammatory activity of CBD.

KEYWORDS cannabinol; nano-micelles; cholesterol succinate monoester; carboxymethyl chitosan; pharmacokinetics

大麻二酚(cannabidiol,CBD)是从天然植物大麻中提取的有效成分,无成瘾性、精神活性及药物依赖性,是目前研究最广泛、最热门的植物源性大麻素之一[1]。研究表明,CBD作为多靶点药物,具有抗炎、抗癫痫、抗肿瘤、抗抑郁、抗焦虑、保护心血管系统等多种药理活性[2]。但CBD疏水性极强,见光易分解,口服生物利用度仅为6%,限制了其药效发挥[3]。

聚合物胶束是一种由两亲性聚合物在水溶液中自组装而成的具有核壳结构和热力学稳定性的纳米材料。聚合物胶束的核心由聚合物的疏水部分构成,可包载难溶性药物,从而提高其溶解度;外壳由亲水部分构成,可保护药物免受免疫系统的非特异性摄取,并且纳米级尺寸的粒径可增强胶束的渗透效应[4]。近年来,动物模型实验证实,聚合物胶束可改善药物的药动学特征、增强治疗效果,且安全性高,是一种非常有前途的药物传递系统,现已被广泛应用于各个研究领域[5]。本课题组前期以胆甾醇琥珀酸单酯(亲脂性内核)和羧甲基壳聚糖(亲水性外壳)为载体制备了一种CBD-胆甾醇琥珀酸单酯-g-羧甲基壳聚糖(CBD-cholesterol succinate monoester-g-carboxymethyl chitosan,CBD-CCMC)纳米胶束。本研究在前期工作的基础上,通过动物实验初步探究CBD-CCMC纳米胶束是否能够改善CBD的体内药动学特征,并进一步利用脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导来建立细胞炎症模型,通过检测细胞活力、跨膜电阻(transepithelial electrical resistance,TEER)和细胞炎症因子水平初步评价CBD和CBD-CCMC纳米胶束的抗炎活性差异,以期为改善CBD的口服吸收效果、提升其临床疗效提供理论基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括AX124ZH型电子分析天平[奥毫斯仪器(常州)有限公司]、B13-3型智能恒温定时磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司)、ALPHA 1-4 LD plus型冷冻干燥机(德国Marin Christ公司)、Zetasizer Nano ZS 90型粒度电位仪(英国Malvern公司)、Q-Exactive型四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、SD-12型水浴氮吹仪(上海叶拓科技有限公司)、JEM-2100F型透射电镜(日本JEOL公司)、HC-3018R型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)、Varioskan LUX型多功能酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]、Millicell ERS-2型跨膜电阻仪(美国Millipore公司)。

1.2 主要药品与试剂

CBD对照品(批号20200601,纯度≥99.5%)购自云南汉素生物科技有限公司;CBD原料药(批号Yz090825,纯度98%)购自南京源植生物科技有限公司;CCMC空白纳米胶束(批号20221125)由本团队实验室自制;四氢呋喃(批号20220702)购自天津市北辰区方正化学试剂厂;苯海拉明对照品(批号H2110175,纯度≥98%)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;甲基叔丁醚(批号C14854786)购自上海麦克林生化科技有限公司;MEM培养基(含非必需氨基酸)(批号WH0022K01)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)试剂盒(批号110922230202)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;透析袋(批号409C021,截留分子量8 000～14 000 Da)购自金克隆(北京)生物技术有限公司;Transwell细胞小室(批号35721088A)购自北京兰杰柯科技有限公司;白细胞介素1β(interleukin-1β,IL-1β)、IL-8、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号均为202301)均购自上海泛柯实业有限公司;质谱级甲酸、乙腈、甲醇均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

1.3 细胞株及动物

Caco-2细胞株（批号CL-0050）购自武汉普诺赛生命科技有限公司。本研究所用动物为健康雄性SD大鼠，共60只，6～7周龄，体重（220±20）g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2019-0010。实验开始前大鼠先适应性饲养7 d。本研究中动物实验经山西中医药大学实验动物伦理委员会审核通过后实施，伦理号为AWE202209101。

2 方法与结果

2.1 CBD-CCMC纳米胶束的制备与表征

2.1.1 CBD-CCMC纳米胶束的制备

采用透析法制备CBD-CCMC纳米胶束，具体操作如下：精密称取CBD原料药2 mg溶解于2 mL四氢呋喃中，作为有机相；称取CCMC空白纳米胶束粉末48 mg溶解于12 mL水中，于25 ℃下搅拌30 min得到空白纳米胶束溶液，作为水相。将有机相逐滴加入水相，持续搅拌10 h后将反应液转移至透析袋中透析24 h，以0.45 μm有机滤膜过滤，收集滤液，冻干后即得CBD-CCMC纳米胶束。

2.1.2 纳米胶束的表征

（1）Zeta电位、粒径、多分散性指数（polydispersity index，PDI）、载药量及包封率测定：制备3批CBD-CCMC纳米胶束，测定其表面Zeta电位、粒径大小、PDI，并计算载药量和包封率。结果显示，所制纳米胶束的Zeta电位为（－13.5±1.2）mV，平均粒径为（230.6±1.8）nm，PDI为0.170±0.053，载药量为（9.18±0.32）%，包封率为（86.35±0.56）%。

（2）溶解度：分别称取等量（以CBD量计）的CBD原料药及CBD-CCMC纳米胶束，加水搅拌48 h。离心，取上清液1 mL加9 mL乙腈，过滤，采用高效液相色谱法检测CBD含量并计算其溶解度[6]。结果显示，CBD的溶解度为0.124 μg/mL，CBD-CCMC纳米胶束中CBD的溶解度为68.240 μg/mL，水溶性增加了约550倍。

（3）稳定性：取3份CBD-CCMC纳米胶束放入西林瓶中，分别于室温及37 ℃下放置7 d，测定7 d内载药胶束的粒径变化，观察载药纳米胶束稳定性。结果显示，在室温或37 ℃下放置7 d，CBD-CCMC纳米胶束的粒径无明显变化，具有良好的储存稳定性。

（4）体外释放性能：取CBD-CCMC纳米胶束，加水溶解后置于透析袋中，分别放置于20 mL pH5.5及pH7.4的磷酸盐缓冲液[含0.5%吐温80（*m*/*V*）]中。分别于放置0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、48、72、96、120、144 h时取样，采用高效液相色谱法检测CBD含量[6]，计算CBD累计释放率。结果显示，CBD-CCMC纳米胶束在pH5.5和pH7.4磷酸盐缓冲液中的144 h累计释放率分别为37.71%、21.83%。该结果提示，CBD-CCMC纳米胶束中药物的释放具有pH依赖性，且表现出良好的缓释性能。

2.1.3 形态学考察

取CBD-CCMC纳米胶束样品以水溶解，配制成质量浓度为1 mg/mL的胶束溶液，于冰水浴中超声10 min，铜网打捞，以滤纸吸去多余液体，置于空气中自然干燥，即得待测样品，采用透射电镜观察其形态。结果显示，CBD-CCMC纳米胶束能在水中自组装形成粒径均匀、分散良好的类球形胶束。结果见图1。

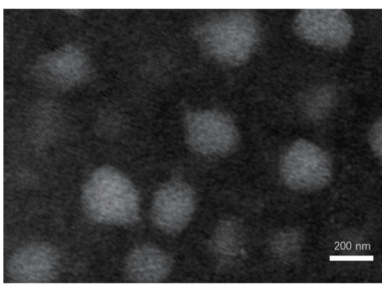


图1 CBD-CCMC纳米胶束的透射电镜图

2.2 血浆和组织样品中CBD含量测定方法的建立

2.2.1 溶液配制

内标工作液配制：精密称取苯海拉明对照品5 mg，置于10 mL容量瓶中，以甲醇溶解、定容，混匀，得内标储备液；取上述储备液，以甲醇稀释，得质量浓度为10 ng/mL的内标工作液。CBD工作液配制：精密称取CBD对照品10 mg，以甲醇溶解于10 mL容量瓶中并定容，得质量浓度为1 mg/mL的CBD工作液，4 ℃保存。

2.2.2 样品处理

（1）血浆样品：取大鼠血浆100 μL，加无水甲醇200 μL、内标工作溶液10 μL，涡旋混匀1 min，静置20 min后，以12 000 r/min离心10 min，重复3次，取上层溶液进样测定。

（2）组织样品：分别称取大鼠心、肝、脾、肺、肾、肌肉组织各100 mg，置于研磨管中，加水至1 mL，加入甲醇50 μL进行组织研磨。取匀浆液100 μL，加入内标工作液10 μL、乙腈100 μL、甲基叔丁醚400 μL，涡旋混匀1 min，以9 000 r/min离心5 min，取上层溶液400 μL，以氮气流吹干。残渣用甲醇200 μL复溶，以12 000 r/min离心5 min，重复3次，取上层溶液进样测定。

2.2.3 检测条件

利用超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）法进行检测，检测条件如下[6]：色谱条件——采用CORTECS C_{18}（150 mm×4.6 mm，2.7 μm）色谱柱，以0.1%甲酸水（A）-乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱（0～2 min，30%A；2～9 min，30%A→10%A；9～14 min，10%A→30%A）；柱温为30 ℃；流速为0.3 mL/min；进样量为5 μL。质谱条件——采用电喷雾离子源以多反应监测模

式进行正离子扫描，扫描时间为200 ms；喷雾电压为4 kV；雾化温度为500 ℃；雾化气流速为40 L/min；气帘气流速为20 L/min；碰撞气压力为medium；辅助气流速为50 L/min。用于定量分析的离子对质荷比（m/z）为315.2→193.2（CBD）、256.1→167.1（内标）。

2.2.4　标准曲线

以CBD对照品质量浓度为横坐标（X）、CBD和苯海拉明的峰面积比值为纵坐标（Y）进行线性回归，得到血浆的线性回归方程为Y=0.018 12X+0.445 21（r=0.993）、心脏为Y=0.003 25X+3.242 49（r=0.996）、肝脏为Y=0.012 43X+10.387 32（r=0.996）、脾脏为Y=0.013 47X+7.227 17（r=0.995）、肺为Y=0.007 51X+7.669 32（r=0.996）、肾脏为Y=0.007 69X+9.772 49（r=0.998）、肌肉为Y=0.004 72X+21.350 38（r=0.998），血浆、不同组织样品中CBD的检测线性范围均为10～2000 ng/mL。

2.3　药动学研究

取雄性SD大鼠12只，禁食不禁水12 h后，将其分为CBD组和CBD-CCMC纳米胶束组，每组6只。CBD组大鼠按100 mg/kg灌胃CBD混悬液：精密称取CBD原料药适量，溶于0.5%羧甲基纤维素钠溶液中制成混悬液[含3%吐温80（m/V）]；CBD-CCMC组大鼠按100 mg/kg（以负载的CBD计，下同）灌胃纳米胶束混悬液：CBD-CCMC纳米胶束用生理盐水溶解[7]。分别于给药后0.5、1、1.33、1.5、1.75、2、4、8、24、48 h眼眶采血300 μL，置于抗凝管中，以6 000 r/min离心5 min，取上清液（血浆）置于－80 ℃环境中保存。取血浆按“2.2.2（1）”项下方法处理后，按“2.2.3”项下检测条件进样测定，记录峰面积并代入“2.2.4”项下回归方程计算各时间点的血药浓度。采用OriginPro 2018软件绘制药-时曲线图，采用DAS 2.0软件按非房室模型分析2组大鼠的药动学参数[药时曲线下面积（area under the drug concentration time curve，AUC）、平均滞留时间（mean residence time，MRT）、半衰期（half-life time，$t_{1/2}$）、达峰时间（peak time，t_{max}）、清除率（clearance，CL）、峰浓度（peak concentration，c_{max}）]。采用SPSS 20.0软件进行统计分析，数据均以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用独立样本t检验，检验水准α=0.05。2组大鼠的药-时曲线见图2，主要药动学参数见表1。

结果显示，与CBD组比较，CBD-CCMC纳米胶束组大鼠的$AUC_{0\text{-}48\,h}$、$AUC_{0\text{-}\infty}$、$t_{1/2}$、c_{max}均显著增加（P<0.05或P<0.01），且$MRT_{0\text{-}48\,h}$、t_{max}、CL也有不同程度升高/延长，提示CBD-CCMC纳米胶束具有延长药物在大鼠血液中的循环时间以及促CBD吸收的作用。

2.4　组织分布研究

取雄性SD大鼠48只，分成CBD组和CBD-CCMC纳米胶束组，每组24只。CBD组大鼠灌胃100 mg/kg

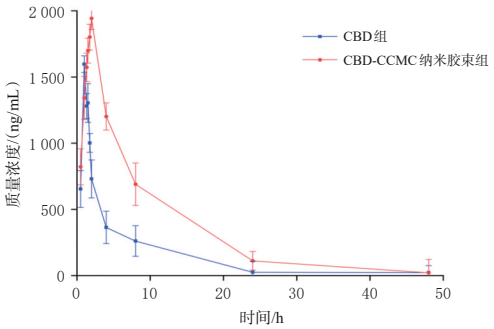


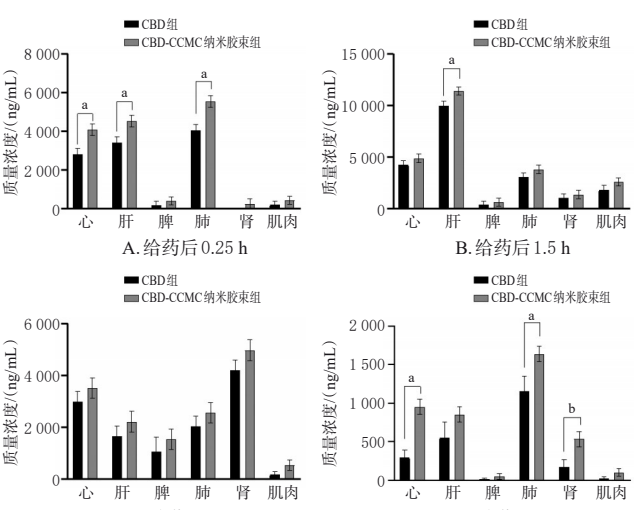
图2　CBD-CCMC纳米胶束在大鼠体内的药-时曲线图（$\bar{x}\pm s$，n=6）

表1　2组大鼠的药动学参数比较（$\bar{x}\pm s$，n=6）

参数	CBD组	CBD-CCMC纳米胶束组
$AUC_{0\text{-}48\,h}$/(μg·h/L)	7 086.35±343.12	17 296.92±562.79[a]
$AUC_{0\text{-}\infty}$/(μg·h/L)	7 440.44±493.19	17 351.87±649.62[a]
$MRT_{0\text{-}48\,h}$/h	7.52±0.23	8.16±0.19
t_{max}/h	1.00±0.11	2.00±0.22
$t_{1/2}$/h	5.88±0.79	11.07±1.17[b]
CL/[L/(h·kg)]	13.44±0.76	5.76±0.12
c_{max}/(μg/L)	1 596.34±139.87	1 942.40±131.64[b]

a：与CBD组比较，P<0.05；b：与CBD组比较，P<0.01。

CBD原料药混悬液，CBD-CCMC纳米胶束组大鼠灌胃100 mg/kg（以负载的CBD计）CBD-CCMC纳米胶束混悬液。分别于给药后0.25、1.5、10、24 h，每组选取6只大鼠，取其心、肝、脾、肺、肾和肌肉组织，按“2.2.2（2）”项下方法处理后，按“2.2.3”项下检测条件进样测定，记录峰面积并代入“2.2.4”项下回归方程计算各时间点不同组织样品中CBD的质量浓度。统计学处理同“2.3”项下。使用DAS 2.0软件对大鼠各组织样品中CBD的质量浓度进行非房室模型拟合，进行药物的组织分布研究，结果见图3。



a：与CBD组同组织样品比较，P<0.01；b：与CBD组同组织样品比较，P<0.05。

图3　给药不同时间后2组大鼠各组织样品中CBD质量浓度比较（$\bar{x}\pm s$，n=6）

结果显示，给药0.25 h后，CBD组、CBD-CCMC纳米胶束组大鼠心、肝、肺组织中CBD质量浓度均较高，表明CBD、CBD-CCMC纳米胶束经口服给药后，优先进入大鼠心、肝和肺组织；相比于CBD组，CBD-CCMC纳米胶束组大鼠心、肝、肺组织中CBD质量浓度均显著升高（$P<0.01$）。随着时间的推移，药物逐渐向肝组织积累，在给药1.5 h后，大鼠肝组织中CBD质量浓度达到最高，且CBD-CCMC纳米胶束组大鼠肝组织中CBD的质量浓度显著高于CBD组（$P<0.01$），说明纳米胶束可延长CBD的消除时间。给药10 h后，CBD在肝组织中的质量浓度降低，表明其不易在体内蓄积。给药24 h后，各组织样品中CBD质量浓度均很低，已基本无治疗效果。值得注意的是，在给药后同一时间点，与CBD组比较，CBD-CCMC纳米胶束组大鼠各组织样品中CBD的质量浓度均有所提升，表明CBD经CCMC纳米胶束负载后能促进其向各组织分布。

2.5 体外抗炎作用考察

2.5.1 细胞培养及单层模型建立

将Caco-2细胞株接种于MEM培养基（含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗）中，于37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中培养，待细胞生长密度达90%以上时，将细胞以1×10^5个/mL的密度接种于Transwell小室上室，共0.5 mL；下室加入1.5 mL培养基。前1周后隔天换液，7 d后每天换液，培养至21 d。当细胞的TEER达800 Ω·cm^2且趋于稳定时，表明已形成完整、紧密的细胞单层模型[8-9]。

2.5.2 炎症细胞模型建立及实验分组

将Caco-2细胞分为空白对照组、LPS组、LPS+CBD组、LPS+CBD-CCMC纳米胶束组，每组设置6个复孔。基于建立的Caco-2细胞单层模型，空白对照组细胞用普通MEM培养基培养，其余各组细胞均以含10 μg/mL LPS的MEM培养基处理24 h，以建立细胞炎症模型[10]。细胞炎症模型建立成功后（细胞活力显著下降），LPS+CBD组、LPS+CBD-CCMC纳米胶束组细胞分别加入CBD终质量浓度为5、10、15 μg/mL的CBD混悬液（加0.1%二甲基亚砜助溶）或CBD-CCMC纳米胶束混悬液（以磷酸盐缓冲溶液为溶剂），LPS组和空白对照组细胞加入等量磷酸盐缓冲溶液。

2.5.3 细胞活力检测

取“2.5.2”项下各组细胞，采用CCK-8法和LDH释放法检测细胞活力。培养24 h后，利用酶标仪检测450、570 nm波长处的光密度（optical density，OD）值，按下式计算细胞存活率：细胞存活率（%）=$OD_{处理孔}/OD_{对照孔}\times100\%$（式中，$OD_{处理孔}$表示加入药物后的细胞OD值，$OD_{对照孔}$表示空白对照的细胞OD值）；通过测定LDH释放量来表征细胞膜完整性，结果以LDH释放相对百分比的形式呈现：LDH释放相对百分比（%）=$OD_{处理孔}/OD_{对照孔}\times100\%$（其中$OD_{处理孔}$表示药物处理后细胞上清液的OD值，$OD_{对照孔}$表示空白对照细胞上清液的OD值）。采用SPSS 20.0软件进行统计分析，所有数据均以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验，检验水准$\alpha=0.05$。实验重复3次，结果见表2。

表2 不同检测方法下细胞活力测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	质量浓度/(μg/mL)	细胞存活率(CCK-8法)/%	LDH释放相对百分比(LDH释放法)/%
空白对照组	–	100.00±3.00	100.00±5.00
LPS组	–	68.01±2.60[a]	158.01±7.45[a]
LPS+CBD组	5	74.30±2.18[b]	143.75±7.39
	10	85.01±1.62[c]	130.28±5.71[c]
	15	88.40±3.56[c]	128.42±7.60[c]
LPS+CBD-CCMC组	5	84.23±2.46[cd]	136.38±5.67[b]
	10	94.59±3.40[cd]	119.54±4.76[c]
	15	94.24±2.75[ce]	105.33±5.45[cd]

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与LPS组比较，$P<0.05$；c：与LPS组比较，$P<0.01$；d：与相同质量浓度LPS+CBD组比较，$P<0.01$；e：与相同质量浓度LPS+CBD组比较，$P<0.05$。

结果显示，与空白对照组比较，LPS组细胞存活率显著降低（$P<0.01$），LDH释放相对百分比显著升高（$P<0.01$）。与LPS组比较，不同质量浓度LPS+CBD组及LPS+CBD-CCMC纳米胶束组细胞存活率均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），LDH释放相对百分比（除5 μg/mL LPS+CBD组外）显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。与LPS+CBD组比较，相同质量浓度LPS+CBD-CCMC纳米胶束组细胞存活率均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。当质量浓度为15 μg/mL时，与LPS+CBD组比较，LPS+CBD-CCMC纳米胶束组细胞LDH释放相对百分比显著降低（$P<0.01$）。

2.5.4 TEER检测

将Caco-2细胞按照“2.5.2”项下方法分组处理，采用ERS-2型跨膜电阻仪分别检测给药后2、5、8、10 h Caco-2细胞的TEER：TEER（Ω·cm^2）=$(R_t-R_0)\times A$（式中，R_t为接种有Caco-2细胞的实验孔测量值，R_0为没有接种Caco-2细胞的空白孔测量值，A为Transwell膜面积）。TEER测定结果（图4）显示，与空白对照组比较，LPS组细胞的TEER在0～5 h内迅速下降，并在8 h后趋向于稳定；与LPS组比较，LPS+CBD组及LPS+CBD-CCMC纳米胶束组细胞在给药处理5 h后，TEER明显升高，其中以LPS+CBD-CCMC纳米胶束组升高更为明显。

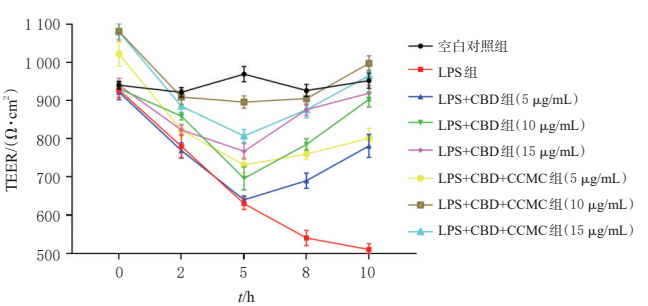


图4 各组细胞的TEER测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

2.5.5　细胞炎症因子水平测定

将Caco-2细胞按“2.5.2”项下方法处理后，4 ℃下收集细胞培养上清液。取适量上清液，按ELISA试剂盒说明书步骤检测其中炎症因子IL-1β、IL-8、TNF-α水平。实验重复3次。统计学处理同“2.5.3”项下。结果（表3）显示，与空白对照组比较，LPS组细胞培养上清液中IL-8、IL-1β、TNF-α水平均显著升高（$P<0.01$）；与LPS组相比，不同质量浓度LPS+CBD组及LPS+CBD-CCMC纳米胶束组细胞培养上清液中IL-8、IL-1β、TNF-α水平均显著降低（$P<0.01$）；且在相同给药质量浓度下，LPS+CBD-CCMC纳米胶束组的作用较LPS+CBD组更明显（$P<0.01$）。

表3　各组细胞炎症因子分泌水平测定结果比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，pg/mL）

组别	质量浓度（μg/mL）	TNF-α	IL-1β	IL-8
空白对照组	−	37.38±10.11	20.76±4.64	21.17±9.53
LPS组	−	423.63±12.74^{a}	274.96±13.22^{a}	398.27±23.12^{a}
LPS+CBD组	5	414.23±14.42^{b}	221.04±8.62^{b}	366.75±19.38^{b}
	10	403.29±15.86^{b}	205.06±9.98^{b}	329.20±24.46^{b}
	15	361.03±19.71^{b}	194.19±13.46^{b}	308.84±19.62^{b}
LPS+CBD-CCMC组	5	350.33±13.93^{bc}	152.70±12.50^{bc}	293.94±12.58^{bc}
	10	290.22±14.95^{bc}	103.03±10.06^{bc}	107.21±15.21^{bc}
	15	265.04±12.76^{bc}	105.34±9.22^{bc}	114.27±11.44^{bc}

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b.与LPS组比较，$P<0.01$；c：与相同质量浓度的LPS+CBD组比较，$P<0.01$。

3　讨论

纳米胶束具有独特的疏水核-亲水壳结构，其将CBD包裹在疏水内核后，可通过“隐形功能”避免胶束被体内网状内皮系统识别和摄取，减少免疫系统和肝细胞对药物的清除，从而提升包载药物的口服吸收[11—12]。本研究结果显示，CBD-CCMC纳米胶束显著增加了CBD的吸收，提高了CBD的相对生物利用度。这可能是由于胃肠道对纳米胶束具有黏附性，使得药物在胃肠道中停留时间延长，且纳米胶束表现出良好的缓释性能，更有利于CBD吸收[13—14]。

药物进入机体后，考察药物有效成分在体内的组织分布至关重要。深入了解药物在特定组织中的积聚和代谢是指导药物临床应用的重要环节，也是阐明药物体内作用的必要途径[15]。有研究表明，与其他大麻素一样，CBD在肝脏的代谢过程中，经细胞色素P_{450}酶系催化转化为活性代谢产物7-OH-CBD，这些代谢产物主要通过粪便排出体外，少量通过尿液排泄[16]。本研究结果显示，CBD在肝脏大量积累，在给药1.5 h时肝脏药物质量浓度达到最高，这与文献研究结果一致[17]。另外，本研究发现，在同一时间、同一组织中，CBD-CCMC纳米胶束组大鼠各组织中CBD含量均要高于CBD组，这可能是由于纳米胶束增强了组织对药物的亲和力，使得药物在组织中分布增加、$t_{1/2}$延长。

LPS是革兰氏阴性菌细胞壁的一种成分，是细菌的主要致病因素。LPS直接接触肠黏膜上皮细胞便可激活细胞内信号通路，产生IL-1β、TNF-α等炎症因子，这些促炎因子可破坏细胞间紧密连接蛋白进而破坏紧密连接结构，导致肠道通透性增加、TEER降低[18—19]。研究表明，Caco-2细胞适用于肠道炎症相关研究，通过相关细胞因子或LPS诱导的Caco-2细胞炎症模型是最常用的体外肠道炎症模型[20]。本研究通过LPS诱导来建立Caco-2细胞炎症模型，从而探讨CBD和CBD-CCMC纳米胶束的抗炎作用差异。Gigli等[20]研究发现，CBD可以改善因乙二胺四乙酸或促炎因子刺激而增加的体外肠道通透性，具有恢复上皮黏膜损伤、治疗结肠炎的潜力。但由于CBD亲脂性极强，限制了其抗炎药效的发挥。本研究结果表明，CBD-CCMC纳米胶束能提升CBD的水溶性，增强CBD的抗炎活性，改善LPS引起的Caco-2细胞通透性增强的现象；同时其还可抑制细胞中炎症因子IL-8、IL-1β、TNF-α的分泌，缓解炎症反应，且这种能力呈浓度依赖性趋势，与文献研究结果一致[21]。

综上所述，CBD-CCMC纳米胶束粒径优良，显著改善了CBD的水溶性，能够增加CBD血药浓度和组织分布浓度，提高了CBD的抗炎活性。但鉴于本研究仅限于利用Caco-2细胞构建炎症模型，尚未进行体内抗炎药效学评价，后续将考虑进行体内实验并采用其他炎症模型进行深入研究，进一步完善CBD-CCMC纳米胶束改善CBD抗炎药效的作用机制。

参考文献

[1] 安娜，聂颖兰，朱法科，等. 大麻二酚抗阿尔茨海默病活性研究进展[J]. 药学进展，2021，45(7)：539-548.
AN N，NIE Y L，ZHU F K，et al. Progress of research on anti-Alzheimer’s disease activity of cannabidiol[J]. Prog Pharm Sci，2021，45(7)：539-548.

[2] 谢冉，郝单丽，杨佳颖，等. 大麻二酚抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国中药杂志，2022，47(24)：6541-6550.
XIE R，HAO D L，YANG J Y，et al. A mini-review on anti-tumor effect of cannabidiol[J]. China J Chin Mater Med，2022，47(24)：6541-6550.

[3] DI BELLO M P，BLOISE E，MAZZETTO S E，et al. Formulation and chemical stability in aqueous media of cannabidiol embedded in cardanol-based nanovesicles[J]. ACS Sustainable Chem Eng，2017，5(10)：8870-8875.

[4] KUPERKAR K，PATEL D，ATANASE L I，et al. Amphiphilic block copolymers：their structures，and self-assembly to polymeric micelles and polymersomes as drug delivery vehicles[J]. Polymers，2022，14(21)：4702.

[5] ROCHA B，DE MORAIS L A，VIANA M C，et al. Promising strategies for improving oral bioavailability of poor water-soluble drugs[J]. Expert Opin Drug Discov，2023，

18(6):615-627.

[6] 李睿,郝瑞,陈珏,等. 大麻二酚跨膜转运体内外吸收机制及抗炎活性研究[J]. 中国中药杂志,2024,49(17):4777-4785.
LI R, HAO R, CHEN J, et al. Transepithelial transport *in vivo* and *in vitro* and anti-inflammatory activity of cannabidiol[J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(17): 4777-4785.

[7] 安娜,聂颖兰,范斌. 基于LC-MS/MS测定大鼠血清中大麻二酚及其药动学研究[J]. 药物分析杂志,2022,42(4):630-636.
AN N, NIE Y L, FAN B. Determination of cannabidiol in rat serum and its pharmacokinetic effects based on LC-MS/MS[J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42(4): 630-636.

[8] 何静,邱妍川,杨延音,等. 水飞蓟素肠溶聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒在大鼠在体肠灌流模型及Caco-2细胞模型中的吸收研究[J]. 中国药房,2017,28(1):46-49.
HE J, QIU Y C, YANG Y Y, et al. Study on the absorption of silymarin enteric coated-PLGA nanoparticles in rat in situ intestine perfusion model and Caco-2 cell model[J]. China Pharm, 2017, 28(1): 46-49.

[9] 来丽华,葛建. 葡萄籽原花青素对胆汁酸盐在结肠腺细胞Caco-2中转运的影响[J]. 中国药房,2017,28(10):1323-1325.
LAI L H, GE J. Effects of grape seed proanthocyanidin on the transport of bile salts in colon glandular cell Caco-2 [J]. China Pharm, 2017, 28(10): 1323-1325.

[10] 陈禺,王小吉,李合. 基于自噬角度探究A2AR对内毒素诱导的Caco-2肠上皮细胞炎性损伤的影响[J]. 安徽医科大学学报,2024,59(9):1636-1642.
CHEN Y, WANG X J, LI H. To explore the effect of A2AR on endotoxin-induced inflammatory injury of Caco-2 intestinal epithelial cells from the perspective of autophagy[J]. Acta U Med Anhui, 2024, 59(9): 1636-1642.

[11] 张宇航,邱智东,邱野,等. 金丝桃苷混合纳米胶束的制备及其肠吸收研究[J]. 中国药房,2022,33(10):1189-1197.
ZHANG Y H, QIU Z D, QIU Y, et al. Study on the preparation of hyperoside mixed nanomicelles and its intestinal absorption[J]. China Pharm, 2022, 33(10): 1189-1197.

[12] 米翔. 人参皂苷Rg_3的增溶及其纳米晶颗粒剂药动学研究[D]. 长春:吉林大学,2023.
MI X. Solubilization of ginsenoside Rg_3 and pharmacokinetics of nanocrystalline granules[D]. Changchun: Jilin University, 2023.

[13] 宁国庆,吴洁,葛晨亮,等. 黄芩苷PEG-PE纳米胶束的制备、表征与细胞毒性研究[J]. 中国药房,2019,30(11):1487-1491.
NING G Q, WU J, GE C L, et al. Study on preparation, characterization and cytotoxicity of baicalin PEG-PE nanomicelles[J]. China Pharm, 2019, 30(11): 1487-1491.

[14] 谢冉. 负载大麻二酚纳米胶束的制备及抗乳腺癌作用研究[D]. 北京:中国中医科学院,2021.
XIE R. Preparation and anti-breast cancer effect of nanomicelle loaded with cannabidiol[D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2021.

[15] 张青,李梦婷,李梅,等. 杜仲提取物多次给药后在正常大鼠和SHR模型体内的药动学比较研究[J]. 中国比较医学杂志,2022,32(1):41-47.
ZHANG Q, LI M T, LI M, et al. Pharmacokinetic comparison of active components in an *Eucommia ulmoides* extract by multiple administrations between normal and spontaneously hypertensive rats[J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 41-47.

[16] MOLNAR A, FU S. Techniques and technologies for the bioanalysis of Sativex®, metabolites and related compounds[J]. Bioanalysis, 2016, 8(8): 829-845.

[17] NASRIN S, WATSON C J W, PEREZ-PARAMO Y X, et al. Cannabinoid metabolites as inhibitors of major hepatic CYP450 enzymes, with implications for cannabis-drug interactions[J]. Drug Metab Dispos, 2021, 49(12): 1070-1080.

[18] 左灵妮,刘康,马晓勤,等. 茶黄素通过调控miR-190表达对LPS诱导的结肠上皮细胞炎症损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(17):2087-2092.
ZUO L N, LIU K, MA X Q, et al. Effect of theaflavins on LPS-induced inflammation of colon epithelial cells by regulating miR-190 expression[J]. Chin J Immunol, 2021, 37(17): 2087-2092.

[19] 石庚生. 外源性一氧化碳释放分子(CORM-2)对脓毒症早期肝脏炎症反应和JAK分子磷酸化的抑制作用及分子机制[D]. 镇江:江苏大学,2010.
SHI G S. Inhibitory effect and molecular mechanism of exogenous carbon monoxide releasing molecule (CORM-2) on liver inflammation and JAK phosphorylation in early sepsis[D].Zhenjiang: Jiangsu University, 2010.

[20] GIGLI S, SEGUELLA L, PESCE M, et al. Cannabidiol restores intestinal barrier dysfunction and inhibits the apoptotic process induced by *Clostridium difficile* toxin A in Caco-2 cells[J]. United European Gastroenterol J, 2017, 5(8): 1108-1115.

[21] ALHAMORUNI A, LEE A C, WRIGHT K L, et al. Pharmacological effects of cannabinoids on the Caco-2 cell culture model of intestinal permeability[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 335(1): 92-102.

(收稿日期:2024-07-22 修回日期:2024-10-22)
(编辑:舒安琴)