

·实验研究·

本文引用: 王文鹏, 施丹, 李明锐. pH 响应型芹菜素纳米颗粒靶向溃疡性结肠炎的增效研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(8): 1535–1547.

pH 响应型芹菜素纳米颗粒靶向溃疡性结肠炎的增效研究

王文鹏^{1,2}, 施丹^{3*}, 李明锐^{2,4*}

1. 天津医科大学肿瘤医院, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060; 2. 德国埃尔朗根-纽伦堡大学库斯毛尔医学研究园区, 巴伐利亚州 埃尔朗根 91052; 3. 天津医科大学南开临床学院, 天津市急腹症器官损伤与中西医修复重点实验室, 天津市中西医结合急腹症研究所, 天津 300100; 4. 达州市中心医院, 四川 达州 635000

〔摘要〕 目的 通过纳米技术改良芹菜素的递送系统, 并评估其在溃疡性结肠炎(UC)治疗中的潜在疗效。方法 采用纳米沉淀法制备载芹菜素的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米颗粒(PANPs)和 PLGA 联合 pH 敏感聚合物(ES100)复合纳米颗粒(PEANPs), 并通过粒径、多分散性指数(PDI)、Zeta 电位、包封率、扫描电子显微镜及体外释放实验对其理化性质进行表征。采用 MTT、Transwell 及共聚焦显微镜评价其细胞毒性、跨上皮渗透和细胞内化能力。建立噁唑酮和硫酸葡聚糖钠盐(DSS)诱导的急性 UC 小鼠模型, 通过内镜、活性成像系统(IVIS)-过氧化物酶(MPO)活性成像、组织病理学、MPO 免疫荧光、RT-qPCR 和 ELISA 评价其抗炎作用, 并采用 IVIS 和共聚焦显微镜观察纳米制剂在结肠组织中的分布与定位。结果 成功制备了 PANPs 和 PEANPs。与游离芹菜素相比, 两种纳米颗粒的粒径均减小($P<0.001$), PDI 降低($P<0.001$), PEANPs 的 Zeta 电位负值最大($P<0.01$); PANPs 和 PEANPs 的包封率分别为 $93.0\% \pm 3.0\%$ 和 $89.0\% \pm 3.5\%$ 。体外实验表明, 与游离芹菜素相比, 两种纳米颗粒均可跨越 Caco-2 细胞形成的致密肠上皮屏障, 并能有效穿透 SW480 细胞质膜。体内实验进一步证实, 与安慰剂组相比, PANPs 和 PEANPs 均可显著改善噁唑酮和 DSS 诱导的急性 UC 小鼠的疾病表型及炎症相关指标($P<0.05$), 并可在炎症结肠组织中形成较明显的荧光信号富集($P<0.05$)。结论 本研究构建的 PANPs 和 PEANPs 能有效增强药物对肠屏障的穿透能力和病灶靶向性, 显著提升其在 UC 模型中的抗炎疗效, 展现出良好的治疗潜力。

〔关键词〕 溃疡性结肠炎; 芹菜素; 纳米颗粒; pH 敏感聚合物; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.08.001

Synergistic effects of pH-responsive apigenin nanoparticles for targeted therapy of ulcerative colitis

WANG Wenpeng^{1,2}, SHI Dan^{3*}, LI Mingrui^{2,4*}

1. Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment, Tianjin 300060, China; 2. Kussmaul Campus for Medical Research, University of Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Bavaria 91052, Germany; 3. Nankai Clinical Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory of Acute Abdomen Disease-Associated Organ Injury and ITCWM Repair, Tianjin Institute of Integrated Chinese and Western Medicine for Acute Abdominal Diseases, Tianjin 300100, China; 4. Dazhou Central Hospital, Dazhou, Sichuan 635000, China

〔Abstract〕 **Objective** To develop the delivery system of apigenin using nanotechnology and evaluate its potential therapeutic

〔收稿日期〕 2026-01-25

〔基金项目〕 国家卫生健康委员会慢病管理基金项目(GWJJMB202510024049); 天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDXK-009A); 河北省中医药管理局科研计划项目(T2026068)。

〔通信作者〕 *李明锐, 男, 博士, 副主任医师, E-mail: wclimingrui@hotmail.com; 施丹, 女, 硕士, 医师, E-mail: shidanyx@126.com。

efficacy in ulcerative colitis (UC). **Methods** Apigenin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (PANPs) and PLGA/pH-sensitive polymer (ES100) composite nanoparticles (PEANPs) were prepared by nanoprecipitation. Their physicochemical properties were characterized in terms of particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, encapsulation efficiency, scanning electron microscopy, and *in vitro* release assays. MTT assay, Transwell assay, and confocal microscopy were employed to evaluate cytotoxicity, transepithelial permeability, and cellular internalization. Mouse models with acute UC induced by oxazolone and dextran sulfate sodium (DSS) were established. The anti-inflammatory effects of the nanoformulations were evaluated by endoscopy, *in vivo* imaging system (IVIS)-based myeloperoxidase (MPO) activity imaging, histopathological examination, MPO immunofluorescence staining, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and ELISA. IVIS and confocal microscopy were used to observe the distribution and localization of the nanoformulations in colonic tissues. **Results** PANPs and PEANPs were successfully prepared. Compared with free apigenin, both nanoparticles exhibited significantly reduced particle size ($P<0.001$) and lower PDI ($P<0.001$), while PEANPs showed the most negative zeta potential ($P<0.01$). Encapsulation efficiencies of PANPs and PEANPs were $93.0\%\pm 3.0\%$ and $89.0\%\pm 3.5\%$, respectively. *In vitro* assays showed that, compared with free apigenin, both nanoparticles could traverse the tight intestinal epithelial barrier formed by Caco-2 cells and effectively penetrate the plasma membrane of SW480 cells. *In vivo* experiments further confirmed that, compared with the placebo group, both PANPs and PEANPs significantly ameliorated disease phenotypes and inflammation-related indicators in mice with oxazolone- and DSS-induced acute UC ($P<0.05$), and exhibited more pronounced accumulation of fluorescent signals in inflamed colonic tissues ($P<0.05$). **Conclusion** PANPs and PEANPs developed in this study can effectively enhance intestinal-barrier penetration and lesion-targeting ability of apigenin, and significantly improve anti-inflammatory efficacy in UC models, thereby exhibiting promising therapeutic potential.

[**Keywords**] ulcerative colitis; apigenin; nanoparticles; pH-sensitive polymer; poly(lactic-co-glycolic acid)

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种主要累及结肠和直肠的慢性炎症性肠病, 临床表现为腹痛、腹泻、血便及体质量减轻, 其全球发病率总体呈上升趋势^[1-3]。目前, UC 的治疗仍面临挑战, 传统药物 (如抗生素、免疫抑制剂和生物制剂) 长期使用易产生毒副作用, 而手术干预效果有限^[4-5]。近年来, 黄酮类化合物因其良好的耐受性和多靶点作用成为 UC 治疗的研究热点^[6]。其中, 芹菜素广泛存在于欧芹、洋甘菊等植物中, 具有抗氧化、维护肠屏障、调节菌群和免疫调控等多种保护作用^[7-13]。Zhou 等^[14]发现, 芹菜素可通过调控腺苷酸活化蛋白激酶/核因子 κ B/NOD 样受体家族含 pyrin 结构域蛋白 3 信号轴缓解 UC, 能显著改善小鼠体质量下降、结肠缩短及组织损伤, 通过上调肠道紧密连接蛋白表达修复肠黏膜屏障, 同时降低炎症因子水平。但其临床应用受限于水溶性差、口服生物利用度低等问题。

纳米递药系统为改善药物递送提供了新思路。研究表明, 采用 pH 敏感聚合物 (ES100) 或缓释材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA] 构建的纳米颗粒可实现结直肠靶向释放, 显著提高药物生物利用度^[15-18]。目前, 已有多种负载芹菜素的纳米制剂被研究用于 UC 治疗。例如, Lv 等^[19]制

备了负载芹菜素-Mn(II) 的透明质酸纳米颗粒, 在硫酸葡聚糖钠盐 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 诱导的 UC 小鼠模型中表现出良好的肠屏障修复作用。Wang 等^[20]发现, 芹菜素被虾粉/ κ -卡拉胶水凝胶包裹后, 可通过改善释放特性和微环境作用, 显著增强其抗炎作用和益生菌调节能力, 在 UC 小鼠模型中效果优于游离芹菜素。然而, 目前关于 PLGA 联合 ES100 双载体纳米颗粒负载芹菜素治疗 UC 的研究尚未见报道。

基于此, 本研究拟采用纳米沉淀法制备两种芹菜素纳米制剂: PLGA 负载的芹菜素纳米颗粒 (apigenin encapsulated by PLGA, PANPs) 及 PLGA 联合 ES100 复合纳米颗粒 (apigenin encapsulated by PLGA and ES100, PEANPs)。通过噻唑酮和 DSS 诱导的急性 UC 模型评估其疗效, 并通过体内实验探究其作用机制, 旨在为 UC 的治疗提供新策略。

1 材料

1.1 实验细胞与动物

Caco-2 与 SW480 细胞购自欧洲细胞培养物保藏中心, 培养于含 10% 胎牛血清、1% L-丙氨酸-L-谷氨酰胺溶液 (100 $\times$)、1% 丙酮酸钠 (100 $\times$)、青霉素

(100 U/mL)和链霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)的RPMI-1640培养基中。实验使用传代次数为20~50的Caco-2细胞及SW480细胞。

选用62只8~10周龄雌性C57BL/6小鼠(体重18~20 g,购自Jackson实验室),饲养于无特定病原体环境[(23 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$,12 h/12 h光暗周期,湿度50% $\pm$ 5%],自由摄食和饮水,实验前适应性饲养5 d。所有动物实验程序均经德国中弗兰肯行政当局批准,并遵循相关机构伦理与实验规范(批准编号:55.2.2-2532-2-1152-18)。

1.2 主要药物、试剂和仪器

芹菜素(德国Sigma-Aldrich公司,批号:445301/1);PLGA、RPMI-1640培养基、罗丹明标记鬼笔环肽(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:A0444913、2436534、2266606);ES100(德国Evonik公司,批号:B201205210);聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)(德国Carl-Roth公司,批号:EG-Nr. 618-340-9);噻唑酮、香豆素-6、MTT试剂、胎牛血清(德国Sigma-Aldrich公司,批号:MKCS1471、SHBR8837、MKCS4540、24E201)。

扫描电子显微镜(德国Zeiss公司,型号:Merlin);纳米粒度及电位分析仪(英国Malvern Panalytical公司,型号:Zetasizer Nano ZS);微型内窥镜(德国Karl Storz公司,型号:Tele Pack+HD系列);高速冷冻微量离心机(德国Eppendorf公司,型号:Centrifuge 5424R);冷冻切片机(德国Leica公司,型号:CM3050 S);数字切片扫描仪(日本Hamamatsu公司,型号:NanoZoomer S60);多功能酶标仪(瑞士Tecan公司,型号:Infinite M200 PRO);小动物活体成像系统(美国PerkinElmer公司,型号:IVIS Spectrum)。

2 方法

2.1 纳米颗粒的制备与表征

2.1.1 纳米颗粒PANPs与PEANPs的制备 采用纳米沉淀法制备PANPs,考察药载比(芹菜素/PLGA=1:2、1:6、1:10)、油水相体积比(1:10、2:10、3:10)及PVA浓度(0.5%、1%、2%)对纳米颗粒的影响。将2.5 mg芹菜素与不同量PLGA(5~25 mg)溶于丙酮(1~3 mL),滴入含PVA的10 mL水相中,超声(90%,3 min)、搅拌(1 500 r/min)后挥干溶剂,离心洗涤后得到PANPs悬液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PEANPs制备流程相同,

丙酮中同时加入PLGA和ES100。

2.1.2 纳米颗粒的粒径与Zeta电位 采用动态光散射技术测定纳米颗粒包裹药物及游离芹菜素的粒径与Zeta电位。粒径测量在室温下重复3次,Zeta电位测定采用相同仪器与流程。

2.1.3 包封率测定 采用紫外分光光度法测定芹菜素包封率。芹菜素在337 nm处有最大吸收,以甲醇配制标准溶液(0~10 $\mu\text{g/mL}$)建立标准曲线($R^2>0.999$)。方法学验证结果显示,日内及日间精密度 $RSD<3\%$,加样回收率为98.2%~101.5%。包封率测定:取100 μL 纳米颗粒混悬液,加900 μL 丙酮破乳后离心(15 000 r/min,5 min,离心半径为8.4 cm),取上清液稀释后于337 nm处测吸光度,根据标准曲线计算药物含量。包封率(%)=(包封药量/总药量) $\times 100\%$ 。实验重复3次。

2.1.4 体外药物释放实验 为模拟细胞培养条件下的纳米颗粒降解,将纳米颗粒悬液(1 mL)加入9 mL PBS(pH 7.3)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育24 h。按预定时间取样,离心10 min(15 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$,离心半径为8.4 cm),用甲醇溶解沉淀,测定337 nm处的吸光度并计算释放率。释放率(%)=($M_t/M_{\text{总}}$) $\times 100\%$,其中 M_t 为不同时间点释放的药物量, $M_{\text{总}}$ 为纳米颗粒中加载药物总量。模拟胃肠道条件实验使用模拟胃液(pH 1.2)或模拟肠液(pH 7.4)替代PBS,其余操作相同。

2.1.5 荧光标记纳米颗粒与游离芹菜素 香豆素-6用于标记PANPs、PEANPs及游离芹菜素。标记PANPs:2.5 mg芹菜素+0.25 mg香豆素-6溶于含15 mg PLGA的丙酮中;标记PEANPs:2.5 mg芹菜素+0.5 mg香豆素-6溶于含15 mg PLGA与15 mg ES100的丙酮中。标记游离芹菜素:5 mg芹菜素溶于水中,加入香豆素-6乙醇溶液,搅拌4 h后离心、洗涤并重悬。香豆素-6与芹菜素质量比为1:10,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

2.2 细胞实验

2.2.1 MTT法检测细胞毒性 采用MTT法评估纳米颗粒及游离芹菜素对人结肠癌Caco-2和SW480细胞的毒性。将对数生长期细胞以 1×10^5 个/mL密度接种于96孔板(100 μL /孔),培养24 h后分别加入含芹菜素(5~80 $\mu\text{mol/L}$)的无血清培养基处理24 h。随后加入新鲜配制的0.5 mg/mL MTT溶液(无血清

培养基配制)100 μL ,避光孵育 4 h 后吸弃上清,加入 100 μL DMSO 溶解甲臍结晶,于 550 nm 处测定光密度(optical density, OD)值。细胞存活率按(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(阴性对照组 OD 值-空白组 OD 值) $\times 100\%$ 计算。SW480 细胞实验步骤同上。每组设 3 个复孔,实验独立重复 3 次。

2.2.2 纳米颗粒渗透性研究 Caco-2 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 24 孔 Transwell 板,完全 RPMI-1640 培养 21 d(每周换液 2 次)。用跨上皮电阻(trans-epithelial electrical resistance, TEER)测定单层完整性,TEER $>400\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ 的细胞用于后续实验。细胞与香豆素-6 荧光标记的芹菜素及纳米颗粒(10 $\mu\text{mol/L}$) 在无血清培养基中共孵育 4 h。培养结束后,用 4.5% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤, 罗丹明标记鬼笔环肽(1:50, 0.2% Triton X-100)染膜 15 min, DAPI(1:5 000)染核 5 min, 裁切插片封片, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待成像。

2.2.3 纳米颗粒细胞内化研究 将 SW480 细胞以 50 000 个/mL 密度接种于 24 孔板,培养 7 d。细胞与荧光标记纳米颗粒及游离芹菜素(浓度同前)共孵育 4 h 后,弃培养基并用 PBS 清洗 3 次。经 4.5% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 清洗后,依次用罗丹明标记鬼笔环肽(1:50)和 DAPI(1:5 000)进行细胞膜与细胞核染色。最后每孔加入 500 μL PBS,通过共聚焦显微镜成像,所有操作均避光进行。

2.3 动物实验

2.3.1 噻唑酮或 DSS 诱导急性 UC 模型 噻唑酮模型致敏阶段:小鼠腹部脱毛后涂抹 3% 噻唑酮(丙酮:橄榄油=4:1, 100 μL)。5 d 后麻醉,直肠灌注 1% 噻唑酮(50%乙醇, 100 μL)。24 h 后行微型内镜检查,内镜检查 24 h 后处死取材。DSS 模型:第 0 天称重后,予 3% DSS 饮水至第 7 天,每日监测体质量。第 8 天内镜检查后处死。

2.3.2 芹菜素给药方案 文献报道慢性 UC 小鼠口服芹菜素有效剂量为 3~5 mg/d^[9]。本研究采用噻唑酮模型明确游离芹菜素的有效剂量,将小鼠分为 3 组:安慰剂组(Millipore 水)、低剂量组(0.2 mg 芹菜素)和高剂量组(2 mg 芹菜素),每日灌胃 200 μL 。各组于噻唑酮致敏第 0 天开始给药。

2.3.3 纳米颗粒给药方案 噻唑酮模型:将小鼠分为安慰剂组、PANPs 组和 PEANPs 组,各组给药剂量

为 1 mg 芹菜素(以芹菜素含量计)/200 μL 。DSS 模型:将小鼠分为安慰剂组、游离芹菜素组(1 mg/200 μL)、PANPs 组和 PEANPs 组(1 mg 芹菜素/200 μL)。

2.3.4 内镜评分 进行微型内镜分析以评估结肠炎症的严重程度。将小鼠置于含 2% 异氟烷的麻醉舱中实施麻醉,经直肠插入微型内镜并录制视频。评估黏膜透明度、颗粒样改变、血管形态、粪便性状及纤维蛋白渗出 5 个参数,每个参数按 0~3 分计分(0 分正常,3 分最重),累计总分后根据小鼠结肠炎严重程度内镜指数(murine endoscopic index of colitis severity, MEICS)进行分级。该指数总分为 0~15 分,0 分代表无炎症,15 分代表重度炎症^[21]。

2.3.5 活体成像系统(in vivo imaging system, IVIS) 检测髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性 内镜检查结束后立即进行活体即时染色以检测 MPO 活性。MPO 作为炎症过程的关键标志物,主要在中性粒细胞和巨噬细胞中表达,其可催化过氧化氢与氯离子转化为次氯酸。鲁米诺与次氯酸反应后释放可检测的冷光,该冷光强度可反映 MPO 活性水平。为评估 MPO 活性,小鼠经腹腔注射 100 μL L-012 (20 mmol/L,一种鲁米诺衍生物),并于密闭舱内通过 2% 异氟烷实施麻醉。将剃除腹毛的小鼠以仰卧位固定于 IVIS 观测舱内,持续检测冷光信号 1 min。

2.3.6 组织病理学评估 将小鼠结肠组织包埋于 Tissue-Tek 包埋剂中,经液氮速冻后制成冷冻块,并于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用冷冻切片机制备冷冻切片,将切片转移至载玻片后置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 储存。随后对切片进行 HE 染色,最终根据组织损伤和炎症细胞浸润程度,分别采用 0~4 分(噻唑酮诱导急性 UC)和 0~6 分(DSS 诱导急性 UC)评分标准对染色样本进行观察评估^[22]。

2.3.7 MPO 免疫荧光染色 冰冻切片先用 4.5% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤后用 1 $\times$ 通透缓冲液处理 10 min,再用封闭液孵育 30 min。随后进行 MPO 免疫染色:山羊一抗(1:50)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,次日用兔抗山羊二抗(1:200)室温孵育 2 h, PBS 洗涤后 DAPI(1:5 000)染核 5 min, 聚乙烯醇封片剂封片。共聚焦显微镜采集图像。设阴性对照(PBS 替代一抗)与阳性对照(正常孵育流程)以验证染色可靠性。

2.3.8 RT-qPCR 检测炎症因子 使用 NucleoSpin RNA 试剂盒对小鼠结肠组织进行总 RNA 提取,随

后通过 NanoDrop 测定 RNA 浓度。取 500 ng RNA 采用 SCRIPT cDNA 合成试剂盒进行逆转录反应, 所得 cDNA 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。将 cDNA 用无核酸酶水按 1:10 比例稀释后, 进行实时荧光定量 PCR 分析。以在炎症结肠组织中稳定表达的 18S rRNA 作为内参基因, 检测白细胞介素(interleukin, IL)- 1β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和 IL-10 靶基因的表达水平。靶基因引物均购自 Qiagen 公司, 为该公司设计的商品化引物。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各靶基因 mRNA 相对表达量, 所有实验均设置 3 次独立重复以确保结果的可靠性。

2.3.9 ELISA 检测血浆细胞因子 处死小鼠后采血, 离心($12\ 500\ \text{r/min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $15\ \text{min}$, 离心半径 $8.4\ \text{cm}$)分离血浆, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 ELISA 法测定血浆 IL- 1β 、IL-6、IL-10、TNF- α 水平。96 孔板经捕获抗体包被后, 依次加入样本或标准品、检测抗体及亲和素-辣根过氧化物酶(streptavidin-horseradish peroxidase, SA-HRP)孵育, 洗涤后加入底物显色, 终止反应。于 $450\ \text{nm}$ 处测定吸光度, 并以 $570\ \text{nm}$ 进行校正。

2.3.10 结肠组织中的药物定位 在咪唑酮或 DSS 诱导的急性 UC 模型中, 小鼠分为 4 组: 对照组、游离芹菜素组、PANPs 组与 PEANPs 组。4 组小鼠每日摄入含有叶绿素的食物, 叶绿素在远红外和近红外光谱内可产生强烈的黄色背景荧光, 从而显示肠道轮廓。对照组不给予药物干预; 游离芹菜素组灌胃 $200\ \mu\text{L}$ 含 $3\ \text{mg}$ 芹菜素的溶液; PANPs 组与 PEANPs 组灌胃等体积荧光标记纳米颗粒(以 $1\ \text{mg}$ 芹菜素含量计)。给药 $18\ \text{h}$ 后处死小鼠, 留取结肠组织, 采用 IVIS 观察荧光标记纳米颗粒在小鼠体内的分布情况, 并制备冷冻切片, 经 DAPI 染色后通过共聚焦显微镜验证纳米颗粒及芹菜素在结肠中的定位。实验重复 2 次, 绿色荧光信号用 ImageJ 定量分析。

2.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 分析数据。多组比较采用 ANOVA 检验, 两组间数据采用独立样本 t 检验进行比较。数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 纳米颗粒最佳制备条件的确定

随 PVA 浓度增加, PANPs 粒径从 $260\ \text{nm}$ 降至 $110\ \text{nm}$ ($P<0.001$), 但浓度达 2% 时包封率显著降至 71% ($P<0.01$), 0.5%~1% 间无显著差异, 因此选定 1%; 药载比 1:2 时包封率最低 (72%, $P<0.01$), 1:6 与 1:10 无显著差异且对粒径影响不显著, 综合考虑 PLGA 利用与成本, 选用 1:6; 油水比增大对包封率无显著影响, 但粒径从 $150\ \text{nm}$ 增至 $240\ \text{nm}$ ($P<0.001$), 最终选择 1:10。详见图 1A—F。对于 PEANPs, 1% PVA 与 1:6 药载比同样适用; 油水比对包封率影响不明显, 当油水比为 1.5:10 时粒径最小 ($145\ \text{nm}$, $P<0.05$), 故选用该比例。详见图 1G—L。

3.2 纳米颗粒表征

两种纳米颗粒的粒径均显著小于游离芹菜素 ($P<0.001$), 游离芹菜素的多分散性指数(polydispersity index, PDI)明显高于纳米制剂 ($P<0.001$), 而 PEANPs 的 Zeta 电位负值最大 ($P<0.01$)。详见图 2A。最终制备的 PANPs 和 PEANPs 包封率分别为 $93.0\%\pm 3.0\%$ 和 $89.0\%\pm 3.5\%$ 。扫描电镜显示, 两种纳米颗粒均为表面光滑的球形结构。体外释药实验表明, 在 pH 7.3 介质中, 两种纳米颗粒均呈突释-缓释特征, PANPs 1 h 释放约 41%, 24 h 累计 57%; PEANPs 分别为 37% 和 63%。在 pH 梯度介质(前 2 h pH 1.2, 后调至 pH 7.4) 中, PEANPs 在酸性条件下释放缓慢 ($<23\%$), 转入中性环境后迅速释放(累计 83%); 而 PANPs 在酸性阶段即出现突释(2 h 释放 58%), 后续释放减缓(24 h 累计 80%)。详见图 2B—D。

3.3 体外实验研究结果

MTT 细胞毒性实验结果表明, 空白纳米颗粒及 0.1% DMSO 对 Caco-2 和 SW480 细胞均无显著毒性(细胞存活率接近 100%)。两种载药纳米制剂对两类细胞的抑制效果均弱于游离芹菜素。Caco-2 单层渗透性实验显示, 游离芹菜素因粒径大而聚集在细胞表面, 难以穿透; 而 PANPs 和 PEANPs 因粒径小, 穿透效率高, 荧光信号低于检测阈值, 且细胞单层完整, 提示纳米包载可提高肠道渗透性。SW480 细胞内化实验进一步证实, 纳米颗粒可被细胞摄取并

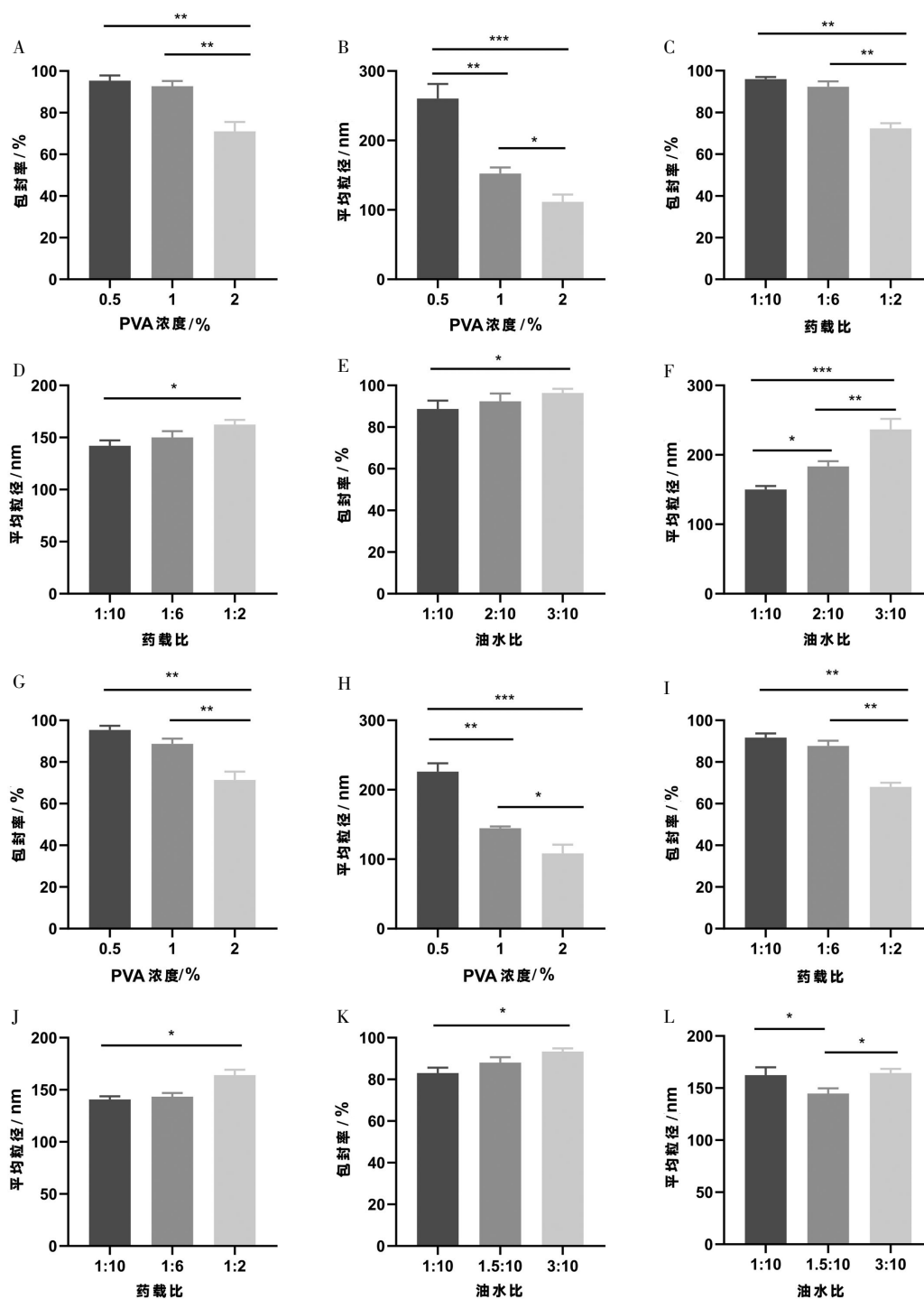


图1 PANPs 和 PEANPs 的制备参数优化

Fig.1 Optimization of preparation parameters for PANPs and PEANPs

注:制备参数对 PANPs(A—F)与 PEANPs(G—L)的包封率及粒径的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

富集于核周区域,而游离芹菜素无法进入细胞,表明纳米包载有效促进了药物内化。详见图3。

3.4 体内实验研究结果

3.4.1 芹菜素口服剂量的确定 与安慰剂组相比,低剂量组和高剂量组在体质量变化、MEICS 评分、组织学评分和 MPO 阳性细胞数量指标差异均无统计学意义($P>0.05$),3 组间 IVIS 活体荧光信号强度

无显著的差别趋势,表明 2 mg/d 游离芹菜素仍无显著疗效。因此,后续选择载药量相当于 1 mg/d 芹菜素的纳米制剂进行评价,该剂量低于文献有效剂量且在急性模型中验证无效,可更严谨地验证纳米载体的增效作用。详见图4。

3.4.2 纳米制剂对哌唑酮诱导的急性 UC 模型的保护作用 鉴于 0.2、2 mg/d 游离芹菜素对急性 UC 模

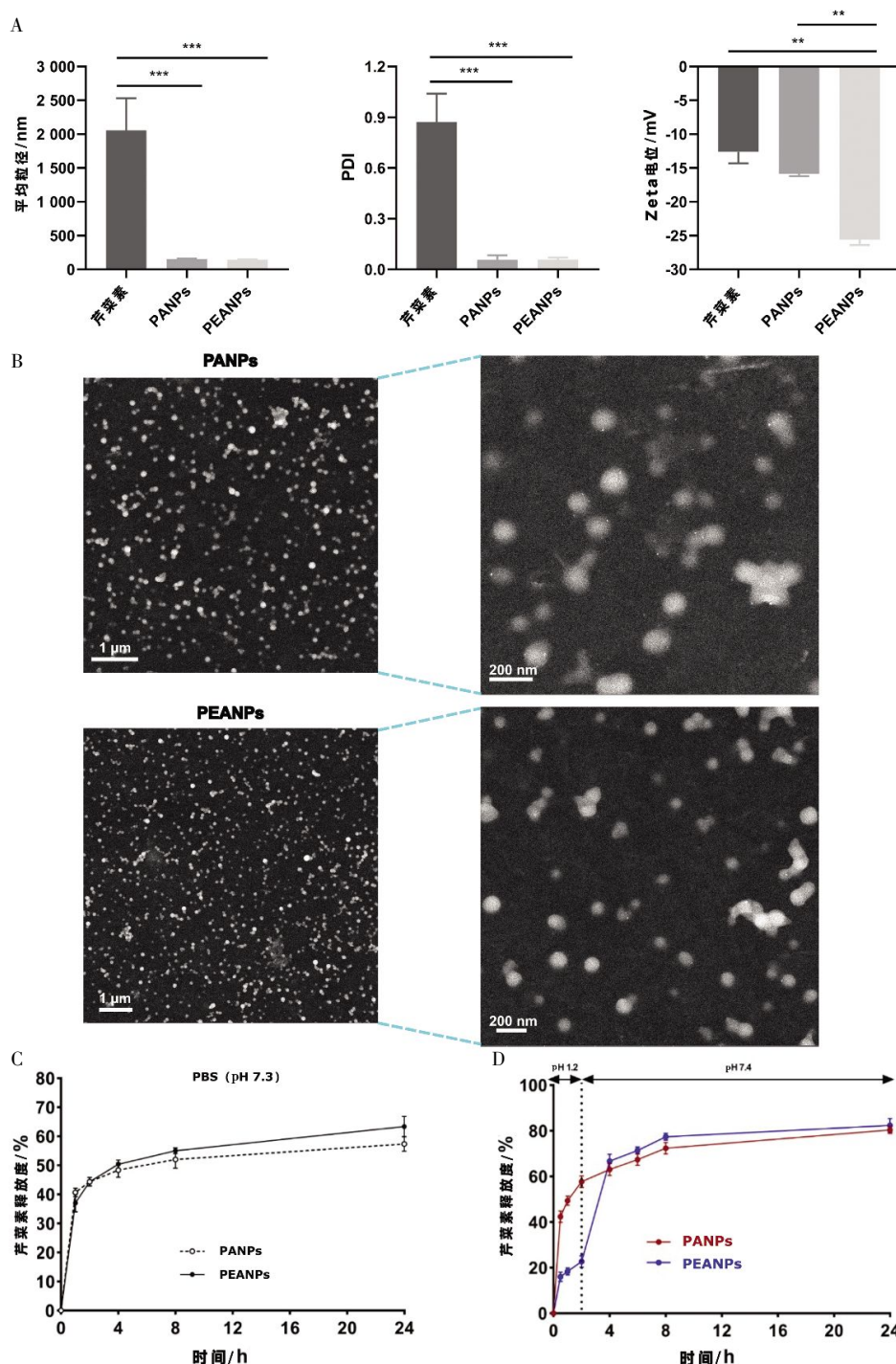


图2 PANPs 和 PEANPs 的表征结果

Fig.2 Characterization results of PANPs and PEANPs

注:A.粒径、PDI 与 Zeta 电位;B.扫描电子显微镜图;C. pH 7.3 释药曲线;D.模拟胃肠液释药行为(pH 1.2/7.4)。

** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

型均无效,推断 1 mg/d 亦难起效,故未设游离芹菜素对照组,仅设安慰剂组、PANPs 组和 PEANPs 组。结果显示:与安慰剂组相比,两种纳米制剂组 ME-ICS 评分显著降低($P<0.01$),IVIS 活体荧光信号强度降低、MPO 阳性细胞数量减少($P<0.01$),促炎性细胞因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)mRNA 表达下调、抗

炎性细胞因子 IL-10 mRNA 表达上调($P<0.05$),血浆 IL-1 β 和 IL-6 水平降低($P<0.05$),且噻唑酮所致体质量下降明显缓解。详见图 5。

3.4.3 纳米制剂对 DSS 诱导的急性 UC 模型的保护作用 DSS 诱导后,小鼠体质量显著下降;安慰剂组体质量较游离芹菜素组及其纳米制剂组明显下降($P<$

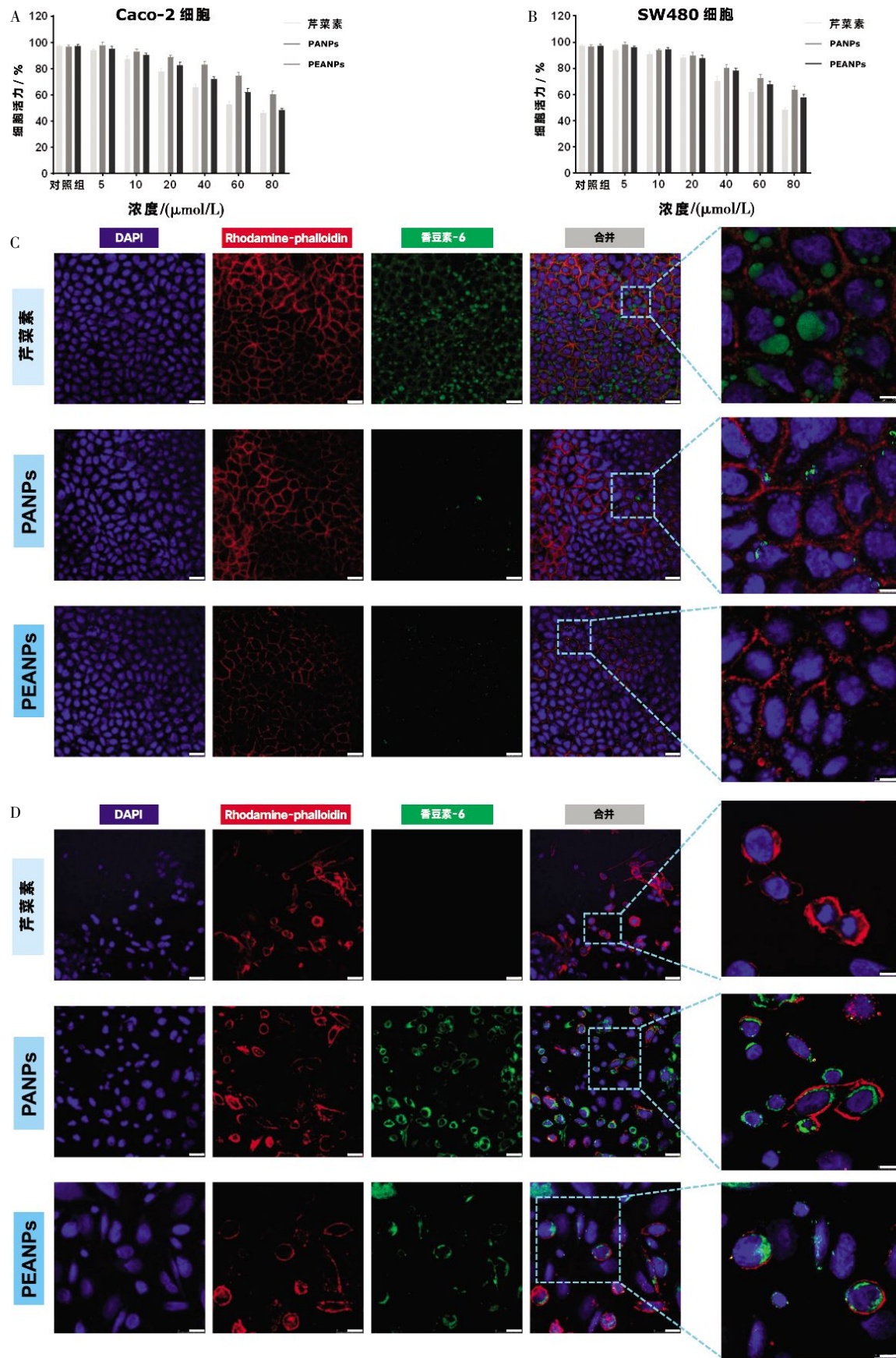


图 3 纳米颗粒 PANPs 和 PEANPs 的体外实验结果

Fig.3 *In vitro* experimental results of PANPs and PEANPs

注: A、B. MTT 法检测芹菜素、PANPs 及 PEANPs 对 Caco-2(A) 和 SW480(B) 细胞的毒性; C、D. Caco-2 细胞及 SW480 细胞单层共孵育 4 h 后的共聚焦图。红色: 细胞边界, 蓝色: 细胞核, 绿色: 药物/纳米颗粒。图 C—D 左图标尺为 25 μm ($\times 400$), 右图 7.5 μm ($\times 1000$)。

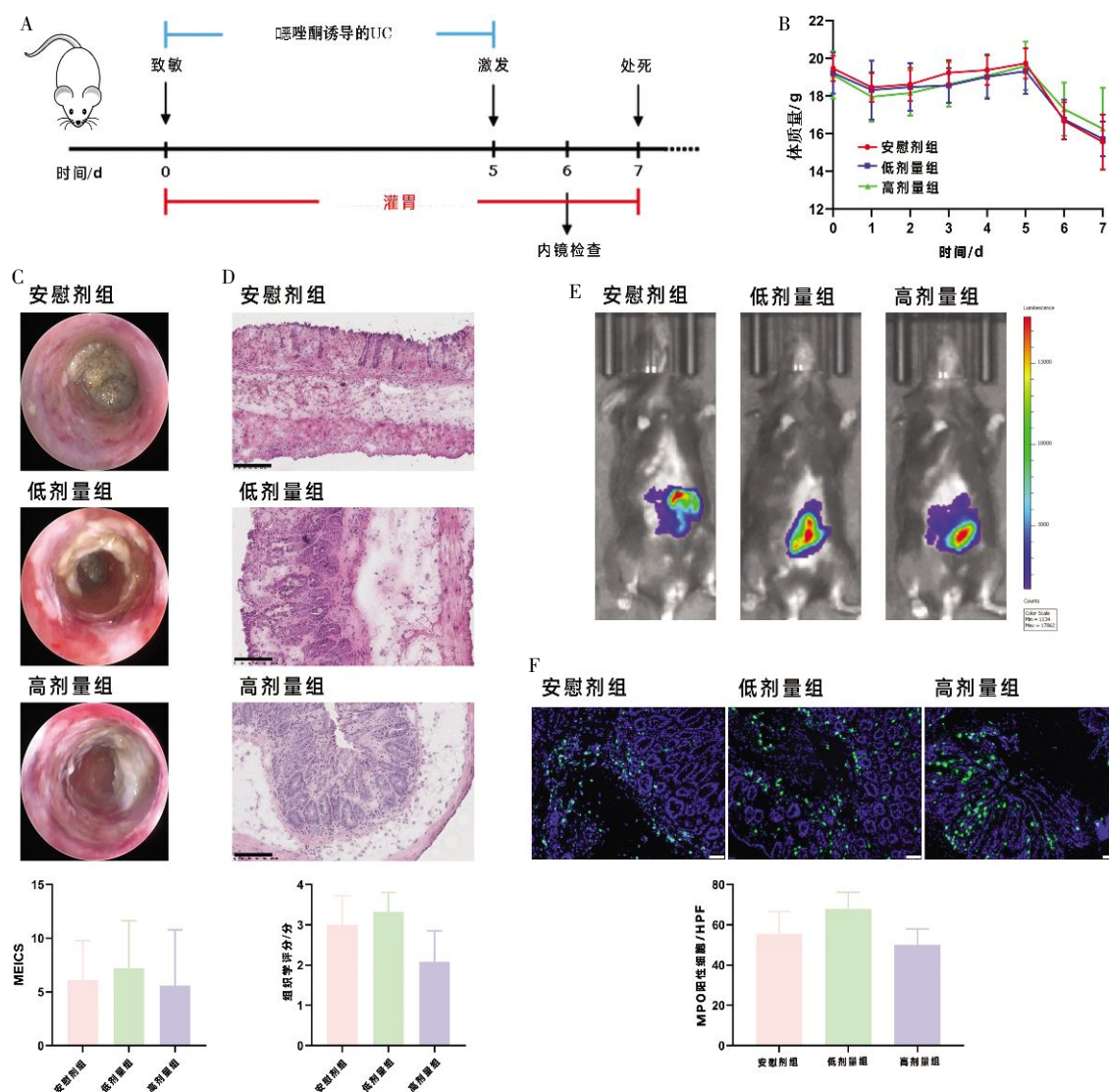


图4 噁唑酮诱导的急性UC模型中不同剂量芹菜素治疗效果的评价

Fig.4 Therapeutic efficacy of different doses of apigenin in oxazolone-induced acute UC models

注:A.急性UC模型实验流程(第0~7天灌胃给药);B.体质量变化;C.内镜及MEICS评分;D.HE染色($\times 100$, $100\ \mu\text{m}$)及病理组织学评分;E.小鼠IVIS活体化学发光成像图;F.MPO染色($\times 200$, $50\ \mu\text{m}$)及计数。

0.05)。宏观与微观病理学分析显示,PEANPs组和PANPs组炎症程度最轻,结肠长度均长于安慰剂组($P<0.05$)。与安慰剂组相比,PEANPs组和PANPs组IVIS活体荧光信号强度降低,MPO阳性细胞数量减少($P<0.05$),RT-qPCR和ELISA检测的炎症相关指标均得到显著改善($P<0.05$)。详见图6。

3.4.4 芹菜素及其纳米制剂在小鼠结肠中的定位分布 两种UC模型中,纳米制剂结肠蓄积均显著高于游离芹菜素($P<0.05$)。游离芹菜素仅少量分布于肠腔,纳米制剂则大量富集于肠壁。噁唑酮模型中PANPs分布高于PEANPs($P<0.05$),DSS模型中则PEANPs分布高于PANPs($P<0.05$)。详见图7。

4 讨论

芹菜素因水溶性和脂溶性较差而生物利用度有限,限制了其在炎症性肠病治疗中的应用^[23]。研究表明,纳米递药系统能改善难溶性药物的溶解性、延长其在肠道内的滞留时间;其中,小尺寸、带负电的纳米颗粒更易穿透黏液层、靶向结肠上皮,已成为UC治疗的重要策略^[24-27]。本研究中PANPs和PEANPs具有较小粒径及负电性,有利于其跨上皮转运。Caco-2模型结果进一步证实,纳米颗粒显著增强了芹菜素的跨屏障能力。然而,药物仅有跨屏障能力并不足以保证疗效,其关键在于能否被靶细胞(如炎症部位的免疫细胞或上皮细胞)有效摄取。相关研究发

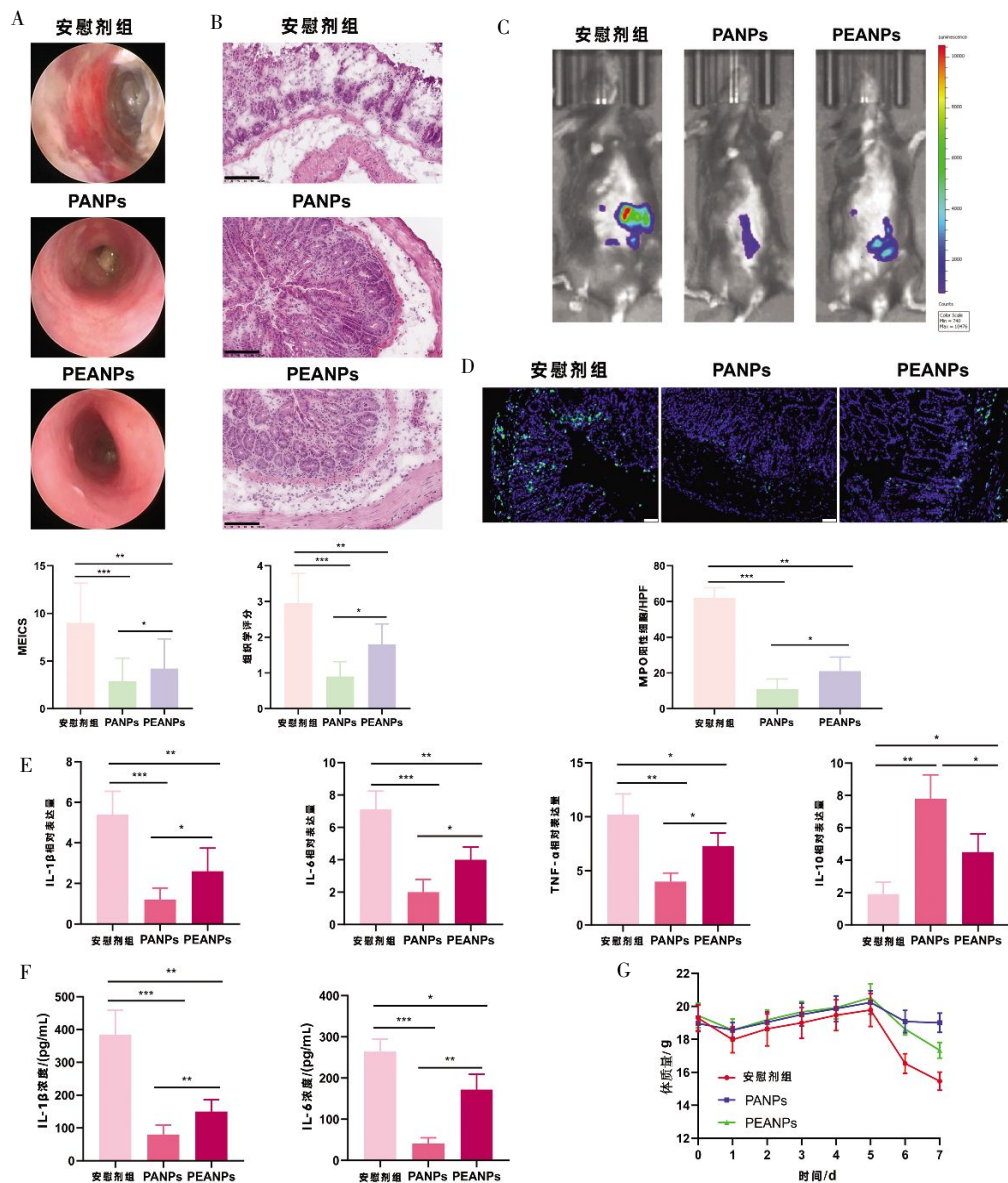


图 5 PANPs 和 PEANPs 治疗显著改善噻唑酮诱导的急性 UC 模型炎症表征

Fig.5 Treatment with PANPs and PEANPs significantly ameliorated the inflammatory manifestations in the oxazolone-induced acute UC model

注: A. 内镜及 MEICS 评分; B. HE 染色($\times 100$, $100\ \mu\text{m}$)及评分; C. 活体成像信号; D. MPO 染色($\times 200$, $50\ \mu\text{m}$)及定量; E. RT-qPCR 检测促炎因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)和抗炎因子(IL-10)水平变化; F. ELISA 检测促炎因子(IL-1 β 和 IL-6)水平变化; G. 体质量变化。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

现, 纳米颗粒的细胞摄取主要依赖于网格蛋白介导、小窝蛋白介导及巨胞饮等多种内吞途径, 且该过程与粒径和表面性质密切相关^[28]。本研究中 PANPs 和 PEANPs 可被 SW480 细胞有效内吞, 考虑到两种纳米颗粒粒径为 100~200 nm, 其摄取可能主要通过能量依赖性内吞途径实现, 从而提高细胞内递送效率。

本研究在细胞水平验证了纳米颗粒的跨屏障能力及内吞优势后, 进一步在动物水平评估其体内治疗效果。为此, 在两种不同 UC 模型——噻唑酮模型和 DSS 模型中应用芹菜素及其纳米颗粒。噻唑酮

模型以 Th2 型免疫反应为主, IL-4 水平显著升高, 通过致敏和直肠激发诱导免疫介导的炎症反应, 其病理机制更接近人类 UC^[29]。而 DSS 模型则主要通过直接破坏结肠上皮屏障完整性, 引起肠道菌群移位和继发性炎症反应, 其细胞因子谱表现为 Th1/Th2 混合反应^[30]。两种模型的联合应用, 可从免疫调节和屏障修复两个维度评估纳米制剂的治疗效果。基于两种模型的实验结果, 进一步探讨纳米颗粒疗效差异的可能机制。纳米颗粒的疗效差异可能与其在不同炎症微环境中的行为有关。本研究中,

图6 芹菜素及其纳米制剂治疗显著缓解DSS诱导的急性UC模型炎症表征

Fig.6 Treatment with apigenin and its nanoformulations significantly alleviated the inflammatory manifestations in the DSS-induced acute UC model

注:A.实验流程(第0~8天灌胃给药);B.体质量变化;C.内镜及MEICS评分;D.HE染色($\times 100$, 100 μm)及评分;E.结肠长度;F.活体成像信号;G.MPO染色($\times 200$, 50 μm)及对应的MPO阳性细胞定量分析;H.RT-qPCR检测促炎性(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)和抗炎性细胞因子(IL-10)水平变化;I.ELISA检测促炎性(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)和抗炎性细胞因子(IL-10)水平变化。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

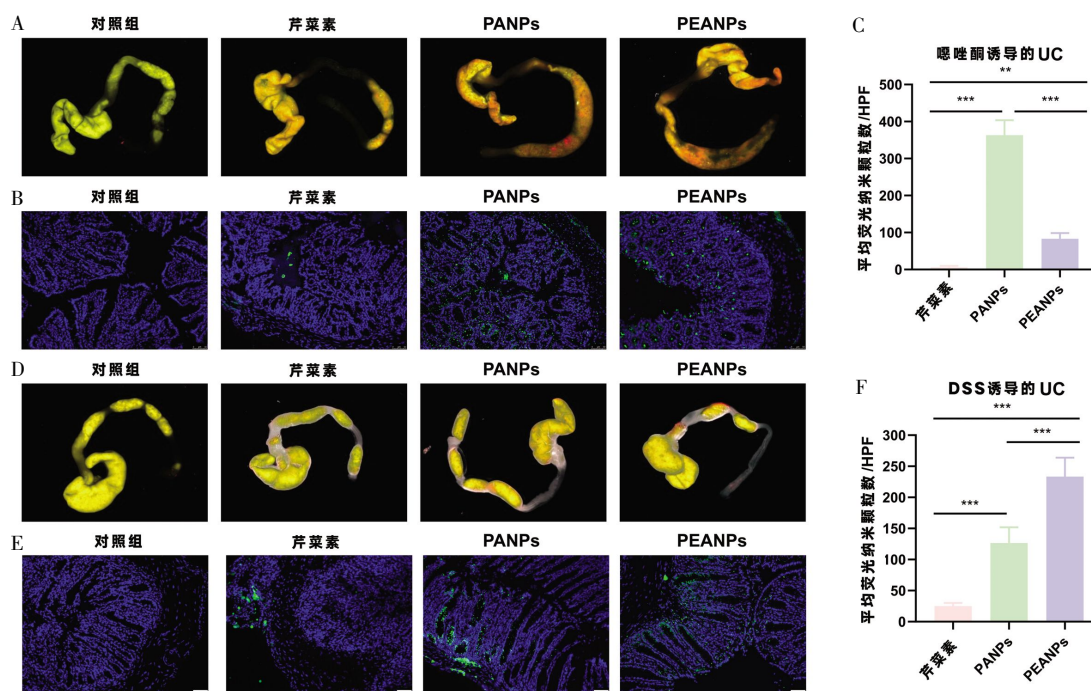


图 7 芹菜素及其纳米制剂在小鼠结肠中的定位分布

Fig.7 Localization and distribution of apigenin and its nanoformulations in the mouse colon

注:A、D.噻唑酮(A)和 DSS(D)活体分布(红色:药物/纳米颗粒,黄色:肠道轮廓);B、E.噻唑酮(B)和 DSS(E)模型结肠切片($\times 200$, 50 μm , 绿:药物/纳米颗粒,蓝:DAPI);C、F.噻唑酮(C)和 DSS(F)模型定量结果。*** $P<0.001$ 。

PANPs 和 PEANPs 在两种 UC 模型中均优于游离芹菜素,支持了“小尺寸、负电荷纳米颗粒可增强炎症组织富集”的观点^[24-27]。从疗效趋势上看,PEANPs 在 DSS 模型中的疗效似乎优于 PANPs,而在噻唑酮模型中则未见此趋势。这一模型依赖性差异在纳米颗粒的分布实验中也有所体现:DSS 模型中 PEANPs 富集高于 PANPs,而噻唑酮模型中则呈相反趋势。DSS 模型以上皮屏障广泛破坏和通透性增加为特征,有利于纳米颗粒在炎症部位渗透与滞留;同时,PEANPs 中 pH 敏感材料 ES100 可在结肠高 pH 环境下溶解,实现结肠靶向释放,从而可能有利于其局部富集并发挥作用。相比之下,噻唑酮模型炎症相对局限,主要表现为免疫细胞浸润,PANPs 易被活化的巨噬细胞和中性粒细胞摄取^[31]。因此,PANPs 在该模型中可能更易通过炎症细胞内吞实现局部富集。综上,PEANPs 的作用优越性可能源于其“pH 响应释放+炎症靶向”的双重机制,该机制在炎症范围更广的病理环境中可能发挥协同作用。

上述纳米递药系统的“炎症靶向”理念与中医治疗 UC 的“靶向病所”思想契合。UC 属中医学“泄泻”“痢疾”范畴,其病机多与脾虚湿盛、湿热内蕴及气滞血瘀相关^[32]。芹菜素具有清热解毒、抗炎作用,纳米递药系统则为其发挥药效提供了新的递送方式,二

者在治疗理念上与中医学“直达病所”思想具有一定契合性。

综上所述,本研究构建的 PLGA/ES100 纳米递送系统显著提高了芹菜素的生物利用度和抗 UC 效果,并在不同 UC 模型中表现出差异化优势,为炎性肠病的精准治疗提供了新的策略。

参考文献

- [1] Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(7): 521-533.
- [2] Nakase H, Uchino M, Shinzaki S, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease 2020[J]. *Journal of Gastroenterology*, 2021, 56(6): 489-526.
- [3] Kaplan G G, Windsor J W. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(1): 56-66.
- [4] Guan Q D. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Journal of Immunology Research*, 2019, 2019: 7247238.
- [5] Rogler G, Singh A, Kavanaugh A, et al. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: Current concepts, treatment, and implications for disease management[J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(4): 1118-1132.
- [6] Ribeiro D, Proenca C, Rocha S, et al. Immunomodulatory effects

- of flavonoids in the prophylaxis and treatment of inflammatory bowel diseases: A comprehensive review[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2018, 25(28): 3374–3412.
- [7] Tang D, Chen K L, Huang L Q, et al. Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone[J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2017, 13(3): 323–330.
- [8] Vogiatzoglou A, Mulligan A A, Lentjes M A, et al. Flavonoid intake in European adults (18 to 64 years)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0128132.
- [9] Fu R R, Wang L C, Meng Y, et al. Apigenin remodels the gut microbiota to ameliorate ulcerative colitis[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1062961.
- [10] Márquez-Flores Y K, Villegas I, Cárdeno A, et al. Apigenin supplementation protects the development of dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis by inhibiting canonical and non-canonical inflammasome signaling pathways[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2016, 30: 143–152.
- [11] Mascaraque C, González R, Suárez M D, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of apigenin K in two rat colitis models induced by trinitrobenzenesulfonic acid and dextran sulphate sodium[J]. *The British Journal of Nutrition*, 2015, 113(4): 618–626.
- [12] Shibrya E E, Rashed R R, Abd El Fattah M A, et al. Apigenin and exposure to low dose gamma radiation ameliorate acetic acid-induced ulcerative colitis in rats[J]. *Dose-response*, 2023, 21(1): 1–13.
- [13] Li M R, Weigmann B. A novel pathway of flavonoids protecting against inflammatory bowel disease: Modulating enteroendocrine system[J]. *Metabolites*, 2022, 12(1): 31–48.
- [14] Zhou M S, Mao X S, Zou L E, et al. Natural dietary flavonoid apigenin mitigates ulcerative colitis via modulating the AMPK/NF- κ B/NLRP3 signaling axis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2026, 74(1): 983–997.
- [15] Chen F Q, Liu Q, Xiong Y, et al. Current strategies and potential prospects of nanomedicine-mediated therapy in inflammatory bowel disease[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2021, 16: 4225–4237.
- [16] Jacob E M, Borah A, Pillai S C, et al. Garcinol encapsulated pH-sensitive biodegradable nanoparticles A novel therapeutic strategy for the treatment of inflammatory bowel disease[J]. *Polymers*, 2021, 13(6): 862.
- [17] Xu Y, Zhu B W, Li X, et al. Glycogen-based pH and redox sensitive nanoparticles with ginsenoside Rh2 for effective treatment of ulcerative colitis[J]. *Biomaterials*, 2022, 280: 121077.
- [18] Zeeshan M, Ali H, Khan S, et al. Glycyrrhizic acid-loaded pH-sensitive poly-(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for the amelioration of inflammatory bowel disease[J]. *Nanomedicine*, 2019, 14(15): 1945–1969.
- [19] Lv F, Zhang Y C, Peng Q, et al. Apigenin-Mn (II) loaded hyaluronic acid nanoparticles for ulcerative colitis therapy in mice[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2022, 10: 969962.
- [20] Wang Y R, Zhang Q, Liu J N, et al. Improvement of anti-inflammatory efficacy of apigenin by shrimp (*Penaeus vannamei*) powder/ κ -carrageenan hydrogel in dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. *Food Chemistry*, 2025, 488: 144897.
- [21] Becker C, Fantini M C, Wirtz S, et al. In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy[J]. *Gut*, 2005, 54(7): 950–954.
- [22] Wirtz S, Popp V, Kindermann M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(7): 1295–1309.
- [23] Hu D, Chen D, Zhang A, et al. Oral multifunctional gel beads for the targeted treatment of inflammatory bowel disease[J]. *The Journal of Controlled Release*, 2025, 387: 114240.
- [24] Lechner K, Zeeshan M, Noack M, et al. Small but powerful: Will nanoparticles be the future state-of-the-art therapy for IBD[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2022, 19(3): 235–245.
- [25] Chen M C, Mi F L, Liao Z X, et al. Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(6): 865–879.
- [26] Maisel K, Ensign L, Reddy M, et al. Effect of surface chemistry on nanoparticle interaction with gastrointestinal mucus and distribution in the gastrointestinal tract following oral and rectal administration in the mouse[J]. *The Journal of Controlled Release*, 2015, 197: 48–57.
- [27] Stalder T, Zaiter T, El-Basset W, et al. Interaction and toxicity of ingested nanoparticles on the intestinal barrier[J]. *Toxicology*, 2022, 481: 153353.
- [28] Means N, Elechalawar C K, Chen W R, et al. Revealing macropinocytosis using nanoparticles[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2022, 83: 100993.
- [29] Hoving J C, Kirstein F, Nieuwenhuizen N E, et al. B cells that produce immunoglobulin E mediate colitis in BALB/c mice[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(1): 96–108.
- [30] Randhawa P K, Singh K, Singh N, et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents[J]. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2014, 18(4): 279–288.
- [31] Bourguignon T, Torrano A A, Houel-Renault L, et al. An original methodology to study polymeric nanoparticle-macrophage interactions: Nanoparticle tracking analysis in cell culture media and quantification of the internalized objects[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, 610: 121202.
- [32] 胡鑫海, 索卓群, 王素盈, 等. 李慧臻教授运用运脾法治疗溃疡性结肠炎经验[J]. *湖南中医药大学学报*, 2025, 45(9): 1776–1779.