

松萝酸纳米胶束的构建及其抗菌活性与药代动力学特征

牛生吏 韩晓卓 佟芷帆 王艳平 郝嘉辉 王盈予 张路遥 崔璨璨 莫菲

Development, antibacterial activity and pharmacokinetic characteristics of usnic acid nano-micelles

NIU Shengli, HAN Xiaozhuo, TONG Zhifan, WANG Yanping, HAO Jiahui, WANG Yingyu, ZHANG Luyao, CUI Cancan, MO Fei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20241010.001>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

季铵盐接枝聚膦腈微球的制备及抗菌活性

Antibacterial activity and preparation of quaternary ammonium grafted polyphosphazene microspheres

复合材料学报. 2021, 38(10): 3226–3235 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20210203.002>

单宁酸包裹的阿维菌素/介孔SiO₂纳米载药系统的构建与性能

Preparation and properties of tannic acid coated abamectin/mesoporous silica nano-pesticide delivery system

复合材料学报. 2024, 41(3): 1470–1479 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20230828.002>

左旋聚乳酸-聚己内酯-醋酸纤维素三维微-纳米复合纤维多孔支架材料的制备与生物矿化活性

Fabrication of polycaprolactone–cellulose acetate–poly(L–lactic acid) three–dimensional micro–nanofibrous porous scaffold composites and its bio–mineralization activity

复合材料学报. 2022, 39(6): 2918–2929 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20210906.007>

纳米SiO₂/聚乙二醇复合体系剪切增稠特性与机制

Shear thickening characteristics and mechanism of nano–SiO₂/polyethylene glycol composite system

复合材料学报. 2022, 39(4): 1725–1738 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20210702.004>

石墨烯-碳纳米管-聚乳酸/聚乙二醇相变储能复合材料的制备与温敏响应行为

Preparation and temperature–sensitive response behavior of graphene–carbon nanotubes–polylactic acid/polyethylene glycol phase change energy storage composites

复合材料学报. 2024, 41(1): 250–260 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20230504.003>

3D打印聚乙二醇修饰木质素/聚乳酸生物复合材料的热性能与力学性能

Thermal and mechanical properties of polyethylene glycol modified lignin/polylactic acid biocomposites for 3D printing

复合材料学报. 2024, 41(12): 6544–6554 <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20241010.001>



扫码关注微信公众号，获得更多资讯信息

松萝酸纳米胶束的构建及其抗菌活性与药代动力学特征



分享本文

牛生吏, 韩晓卓, 佟芷帆, 王艳平, 郝嘉辉, 王盈予, 张路遥,
崔璨璨, 莫菲*

(沈阳农业大学 动物科学与医学学院, 沈阳 110866)

摘要: 松萝酸(UA)具有优良的抗菌活性, 但水溶性差、生物利用度低极大地限制了其临床应用。本研究采用薄膜水合法利用聚己内酯-聚乙二醇(PCL-PEG)高分子材料构建UA胶束, 利用单因素试验及Box-Behnken响应面法优化制备条件, 从而提高UA的水溶性及生物利用度。表征及评价UA胶束的粒径、Zeta电位、微观形貌、包埋效果、水溶性、体外释药、稳定性及安全性。并明确UA胶束对4种常见细菌的体外抗菌活性及其对金黄色葡萄球菌感染小鼠的体内治疗效果。考察UA胶束在大鼠体内的药代动力学特征。结果显示制得的UA胶束呈现为大小均匀、表面光滑的球体, 粒径为120.4 nm, Zeta电位为-7.8 mV, 包封率与载药量分别为80.66%和9.47%, 且UA被成功包埋在胶束的疏水性内核中, 水溶性提高19.11倍。UA胶束具备一定的缓释性能, 48 h药物累计释放度为76.26%, 在4℃贮存60 d后, 稳定性良好, 用药安全性良好, 对多种常见细菌均具有一定抗菌活性, 且UA胶束对金黄色葡萄球菌感染小鼠的治疗效果比UA原药更好。与UA原药相比, UA胶束在大鼠体内的相对生物利用度提高156%, $C_{\max}$ 提高1.34倍, 半衰期延长21.38%, 清除率降低32.39%。本研究可为UA胶束的临床应用提供一定理论依据。

关键词: 松萝酸; 纳米胶束; 聚己内酯-聚乙二醇; 抗菌活性; 药代动力学

中图分类号: TB332; S859.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-3851(2025)07-4001-12

Development, antibacterial activity and pharmacokinetic characteristics of usnic acid nano-micelles

NIU Shengli, HAN Xiaozhuo, TONG Zhifan, WANG Yanping, HAO Jiahui, WANG Yingyu,
ZHANG Luyao, CUI Cancan, MO Fei*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Usnic acid (UA) has excellent antibacterial activity, but its poor water solubility and low bioavailability greatly limit its clinical application. In this study, polycaprolactone-polyethylene glycol (PCL-PEG) polymer material was used to construct UA micelles by film dispersion method. Single-factor test and Box-Behnken response surface method were used to optimize the preparation conditions, so as to improve the water solubility and bioavailability of UA. The particle size, Zeta potential, microstructure, embedding effect, water solubility, drug release in vitro, stability and safety of UA micelles were characterized. The antibacterial activity of UA micelles against four common bacteria in vitro and the therapeutic effect on *Staphylococcus aureus* infected mice in vivo were investigated. The pharmacokinetic characteristics of UA micelles in rats were clarified. The results show that UA micelles are uniform size and smooth surface spheres with a particle size of 120.4 nm, Zeta potential of -7.8 mV, encapsulation rate and drug loading of 80.66% and 9.47%, respectively. UA is successfully embedded in the hydro-

收稿日期: 2024-07-30; 修回日期: 2024-09-08; 录用日期: 2024-09-21; 网络首发时间: 2024-10-11 16:11:04

网络首发地址: <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20241010.001>

基金项目: 辽宁省教育厅项目 (JYTYB2024042)

Science and Technology Research Project of Liaoning Provincial Department of Education (JYTYB2024042)

通信作者: 莫菲, 博士, 讲师, 研究方向为抗菌药物递释系统研发 E-mail: mf07@syau.edu.cn

引用格式: 牛生吏, 韩晓卓, 佟芷帆, 等. 松萝酸纳米胶束的构建及其抗菌活性与药代动力学特征 [J]. 复合材料学报, 2025, 42(7): 4001-4012.

NIU Shengli, HAN Xiaozhuo, TONG Zhifan, et al. Development, antibacterial activity and pharmacokinetic characteristics of usnic acid nano-micelles[J]. Acta Materiae Compositae Sinica, 2025, 42(7): 4001-4012(in Chinese).

phobic core of the micelles, and the water solubility is increased by 19.11 times. UA micelles have a certain slow-release performance, and the cumulative drug release rate is 76.26% after 48 h. After 60 d of storage at 4 °C, it shows good stability and good drug safety, and has certain antibacterial activity against many common bacteria. In addition, the therapeutic effect of UA micelles on *Staphylococcus aureus* infected mice is better than that of the original UA drug. Compared with the original UA drug, the relative bioavailability of UA micelles in rats is improved by 156%, $C_{\max}$ of UA micelles is increased by 1.34 times, the half-life of UA micelles is extended by 21.38%, and clearance rate of UA micelles is decreased by 32.39%. This study can provide a theoretical basis for the clinical application of UA micelles.

Keywords: usnic acid; nano-micelles; PCL-PEG; antibacterial activity; pharmacokinetics

松萝酸 (Usnic acid, UA) 是松萝属植物地衣 (*Usnea lichen*) 的次级代谢产物, 具有独特的二苯并呋喃结构^[1], 研究表明 UA 及其衍生物具有抗菌^[2-3]、抗寄生虫^[4-5]、抗肿瘤^[6-7]、抗炎^[8]及促进伤口愈合^[9-10]等多种药理活性, 且 UA 价廉易得, 不易产生耐药性, 具有较大临床应用潜力^[1-3]。目前关于 UA 制剂的研发主要包括脂质体、微球、乳剂、微囊等, 这些剂型可以帮助 UA 提高其抗微生物活性、用药安全性等^[11-14]。但值得注意的是 UA 的水溶性差, 为典型的生物药剂学分类系统 (Biopharmaceutics classification system, BCS) II 类药物, 用于体内时生物利用度低, 这极大地限制了它的临床应用^[15]。而关于 UA 生物利用度的研究较少, 宋婷等^[15]构建了 UA 磷脂复合物, 按 17.5 mg/kg 剂量灌胃大鼠时发现其生物利用度可提高为 150.27%。本研究利用聚合物胶束 (Polymeric micelle, PM) 提高 UA 的水溶性及生物利用度。

PM 是一种具有亲水链和疏水链两亲结构的纳米组装体。聚合物在溶液中可形成核-壳结构的球形胶束, 亲水链暴露于周围溶剂中作为胶束外层, 与内层疏水链螯合, 采用物理组装的方式最终形成 PM^[16]。PM 递药系统具有增强组织渗透性、增强药物水溶性、延长药物驻留时间等多种优势, 还可通过通透性增强与滞留效应等多种途径将药物输送到靶向部位。与其他纳米制剂相比, PM 的稳定性、缓释性能及靶向性均更好, 且合成方式更简单^[17-19]。在各类制备 PM 的聚合物材料中, 聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 是一种具备高亲水性、柔性、电中性及生物相容性的聚合物^[20], 使用 PEG 作为胶束中的亲水嵌段可形成紧密的刷状壳, 避免胶束内核的过度延伸, 从而保证胶束的稳定性^[21]。同时, PEG 可以避免被机体内网状内皮系统识别, 降低血浆调理素的含量及黏附作用, 延长药物在血液中的驻留时间, 增强

药效^[22-23]。与其他亲水聚合物相比, 以 PEG 作为大分子引发剂, 与聚乳酸、聚己内酯 (Polycaprolactone, PCL) 等内酯聚合的效果更完善, 临床应用也更广泛^[24-26]。

目前载药 PM 的制备方法主要有直接溶解法、薄膜水合法、透析法及冷冻干燥法等^[27]。其中, 直接溶解法制备的 PM 载药量低, 且对药物本身的溶解性有一定要求; 透析法需使用氯化溶剂, 安全性低, 且制备效率低; 冷冻干燥法限制因素较多, 目前尚未得到广泛应用。而薄膜水合法是采用挥发性有机溶剂溶解药物载体和药物, 蒸发除去有机溶剂后得到载体和药物的混合薄膜, 后用水重构薄膜而获得的载药 PM。此法制备工艺简单、重现性好、载药量大, 可用于难溶性药物胶束的制备^[28]。故本文采用薄膜水合法制备 UA PM。

基于以上背景, 本研究为解决 UA 水溶性差、生物利用度低的难题, 利用高分子材料 PCL₅₀₀₀-PEG₅₀₀₀ 共聚物构建 UA 胶束, 提高 UA 的水溶性及生物利用度, 并明确其抗菌活性, 为 UA 胶束的临床应用提供一定理论依据。

1 实验材料及方法

1.1 原材料

UA (含量>98%), 药用级, 上海毕得药物科技有限公司; PCL-PEG (5 K : 5 K), 西安瑞禧生物科技有限公司; 三氯甲烷, 优级纯, 成都市科隆化学制品有限公司; 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution, PBS) 粉末, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 甲醇, 分析纯, 天津中天精细化工有限公司; 乙腈, 分析纯, 天津市大茂化学试剂厂; MHB 培养基、MHA 培养基、甘露醇氯化钠鉴别培养基, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 注射用生理盐水, 辽宁民康制药有限公司; 二乙二醇单乙基醚, 法国嘉法狮公司; 磷酸二氢钾、三乙胺, 天津市大茂化学试剂厂; 磷酸, 国药集团

化学试剂有限公司; 大黄素(含量 $\geq 98\%$), 成都普思生物科技有限公司; 细菌标准株 ATCC 29213、ATCC 19411、ATCC 25922、ATCC 49619, 美国菌种保藏中心; 细菌分离株, 本实验室分离、鉴定并保存。

1.2 UA 胶束的制备

采用薄膜水合法制备 UA 胶束: 精确称取 4.08 mg UA 和 30.00 mg PCL-PEG 于蒸馏烧瓶中, 加入适量三氯甲烷和甲醇, 超声助溶, 旋转蒸发制得载药干燥薄膜。加入 30 mL PBS (pH=7.4), 磁力搅拌水化 1 h 后用 0.22 μm 滤膜过滤, 即得 UA 胶束。同法制备不含 UA 的空白胶束用于后续试验。

1.3 UA 胶束包封率和载药量的测定

取空白胶束用乙腈破乳, 另取 UA 对照品溶液用乙腈适度稀释后, 于紫外-可见分光光度计(U-T6 APC, 屹谱仪器制造(上海)有限公司)进行全波长扫描。后用 UA 对照品溶液建立标准曲线, 并分别对低(1 $\mu\text{g/mL}$)、中(5 $\mu\text{g/mL}$)、高(15 $\mu\text{g/mL}$)浓度的 UA 溶液进行日内、日间精密度及回收率检测。

取 UA 胶束 2 mL, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 1 mL, 加入适量乙腈, 测定吸光度值。根据建立的标准曲线, 计算 UA 含量, 并计算包封率及载药量。

1.4 UA 胶束制备条件的优化

在单因素考察的基础上, 进一步采用 Box-Behnken 响应面法进行四因素(三氯甲烷: 甲醇、UA 投药量、PBS 体积、PBS pH 值)三水平(-1、0、1)试验, 以包封率和载药量作为考察指标, 最终确定 UA 胶束的最佳制备条件。

1.5 UA 胶束的表征与评价

1.5.1 粒径及电位

经 0.22 μm 滤膜过滤的 UA 胶束溶液, 在 25 $^{\circ}\text{C}$, 633 nm 的 He-Ne 光条件下, 用纳米粒度仪(Zeta sizer 3000 HAS, 英国马尔文帕纳科有限公司)测定粒径大小及 Zeta 电位。

1.5.2 微观形貌

经 0.22 μm 滤膜过滤的 UA 胶束溶液滴加于铜网上, 干燥后用 TEM (HT 77002400306, 日本日立有限公司)观察微观形貌。

1.5.3 包埋效果

将 UA 原药溶于 CDCl_3 , PCL-PEG 溶于 D_2O ,

UA 胶束分别溶于 CDCl_3 和 D_2O , 使用核磁共振仪(Bruker-AV-600, 德国布鲁克科技有限公司)进行 ^1H NMR 测定。此外, 将 UA 原药、UA 与 PCL-PEG 的物理混合物、UA 胶束分别经 KBr 压片, 使用 FTIR (BrukerTensor-27 spectrometer, 德国布鲁克科技有限公司)进行红外吸收光谱测定。

1.5.4 水溶性

分别于 500 μL 蒸馏水中加入过量 UA 胶束冻干粉及过量 UA 原药粉末, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡溶解 9 h。离心取上清液, 利用紫外-可见分光光度计测定 UA 的最大吸收波长 290 nm 处的吸光度值, 根据构建的标准曲线计算 UA 浓度, 即可反映 UA 胶束和 UA 原药的水溶性变化。

1.5.5 体外释药性能

采用透析法测定 UA 胶束的体外释药性能: 将 UA 胶束溶液加入经活化的透析袋中, 放入含 1% 吐温-80 的 PBS (pH=7.4) 释放介质中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温搅拌。分别于不同时间点移取定量接收液, 计算药物释放量。并同时补加等量新的含 1% 吐温-80 的 PBS (pH=7.4) 继续试验。

1.5.6 贮存稳定性

将 UA 胶束溶液分别置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下贮存, 分别测定 0 d、15 d、30 d、45 d、60 d 的包封率及载药量, 以此反映 UA 胶束的贮存稳定性。

1.5.7 用药安全性

取新鲜兔血制备 2% 红细胞悬液, 将 UA 胶束稀释至不同浓度, 加入等体积的 2% 红细胞悬液, 混合均匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 2 h 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定 540 nm 处的吸光度值, 按下式计算溶血率。2% Triton X-100 和生理盐水分别作为阳性对照和阴性对照。

$$\text{溶血率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{生理盐水}}}{\text{OD}_{\text{Triton X-100}} - \text{OD}_{\text{生理盐水}}} \times 100 \quad (1)$$

1.6 UA 胶束的抗菌活性

1.6.1 最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌浓度 (Minimal bactericidal concentration, MBC) 的测定

根据美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 关于药敏试验的指导, 采用微量肉汤稀释法进行测定^[29]。将对数生长期的金黄色葡萄球菌标准株、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌标准株、化脓隐梭杆菌标准株及分离株、大肠杆菌标准株以及肺炎链球菌标准

株 (浓度为 10^8 CFU/mL) 分别接种至 96 孔板内 (100 μ L/孔), 按二倍稀释法将不同浓度的游离 UA、UA 胶束加入各孔内 (100 μ L/孔), 37℃ 静置培养 24 h 后, 肉眼观察各孔内浑浊情况。澄清孔的最低药物浓度为 MIC 值。将所有澄清孔中的菌悬液取 10 μ L 涂布于琼脂平板培养基上, 37℃ 静置培养后无菌落生长的最低药物浓度为 MBC 值。

1.6.2 UA 胶束对金黄色葡萄球菌感染小鼠的治疗效果

将雄性昆明小鼠 (体质量 18~22 g) 随机分为 6 组 ($n=10$)。各组小鼠按 0.5 mL/只的剂量腹腔注射 5×10^8 CFU/mL 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 菌悬液进行感染。2 h 后按 20 mg/kg 的剂量分别腹腔注射 0.5 mL UA 原药混悬液、UA 胶束溶液及生理盐水。于 12 h、24 h 制备小鼠肺脏、脾脏组织匀浆以及腹腔洗液, 并制备组织切片。将肺脏、脾脏组织匀浆及腹腔洗液适度稀释后涂布于甘露醇氯化钠鉴别培养基平板上, 37℃ 恒温培养箱 (DNP-9082, 上海精宏实验设备有限公司) 过夜培养, 计数菌落数。

1.7 UA 胶束的药代动力学研究

1.7.1 动物分组及处理

将雄性 SD 大鼠 (体质量约 200 g) 随机分为 2 组 ($n=8$), 分别尾静脉注射 UA 原药混悬液 (4 mg/mL) 和 UA 胶束溶液, 给药剂量为 20 mg/kg。单次给药后, 分别于 0.08、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、8、12 h 眼眶静脉丛采血 0.5 mL 于抗凝管中, 4 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液, 于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.7.2 血浆样品前处理

精确吸取血浆样品 200 μ L 于 2 mL 离心管中, 加入 50 μ L 内标大黄素溶液 (0.6 mg/mL), 涡旋混合 3 min; 加入 200 μ L 甲醇溶液, 涡旋混合 3 min; 加入 200 μ L 乙腈溶液, 涡旋混合 3 min。4℃ 下 14 000 r/min 离心 10 min, 精确吸取上清液, 置于 2 mL 离心管中, 重复两次。50℃ 氮气吹干, 残渣用 200 μ L 流动相复溶, 涡旋混合 5 min。4℃ 下 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。用 0.22 μ m 滤膜过滤, 取滤液于样品瓶中待测。

1.7.3 UA 的 HPLC 检测方法的建立

HPLC (1260, 美国安捷伦科技有限公司) 色谱柱为伊力特 ODS-C18 (4.6 mm $\times$ 200 nm, 5 μ m), 表 1 为梯度洗脱程序。检测波长为 290 nm, 进样量 20 μ L, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30℃。

表 1 松萝酸 (UA) 的 HPLC 检测梯度洗脱程序

Table 1 HPLC gradient elution procedure for detection of usnic acid (UA)

Time/min	Methanol	15 mmol/L KH ₂ PO ₄ : Triethylamine=500 : 1
0	60%	40%
3	70%	30%
7	75%	25%
15	60%	40%

于空白大鼠血浆中加入一定量 UA 对照品储备液 (1.0 mg/mL) 制备血浆样本, 另取大鼠空白血浆及尾静脉注射 UA 原药的大鼠血浆, 进行专属性考察。取适量大鼠空白血浆, 加入不同稀释倍数的 UA 对照品储备液 (1.0 mg/mL), 制得不同浓度的血浆样品溶液进行处理及检测。以药物浓度为横坐标, 以 UA 峰面积与大黄素峰面积的比值为纵坐标, 绘制标准曲线。根据 3 倍信噪比 ($S/N=3$) 计算 UA 的检出限, 根据 10 倍信噪比 ($S/N=10$) 计算 UA 的定量限。同法取大鼠血浆制得低 (1 μ g/mL)、中 (4 μ g/mL)、高 (16 μ g/mL) 浓度 UA 的血浆样品溶液, 检测回收率及日内、日间精密度。

1.7.4 UA 在空白血浆中的稳定性

测定低 (1 μ g/mL)、中 (4 μ g/mL)、高 (16 μ g/mL) 浓度 UA 的血浆样品溶液中的 UA 含量。并将供试品放入 -20℃ 贮存 30 d, 同法测定 UA 浓度。计算相对标准偏差 (RSD%)。

2 结果与讨论

2.1 紫外-可见分光光度法检测 UA 的结果

图 1(a) 为 190~600 nm 波长范围内紫外-可见分光光度计的全波长扫描结果, 从图中可见 UA 在 290 nm 处有最大吸收峰, 而空白胶束在 290 nm 处无吸收。图 1(b) 为建立的 UA 标准曲线, 线性回归方程为 $y=0.0563x-0.01$, 线性范围为 1~15 μ g/mL, 决定系数 $R^2=0.9999$ 。

此外, 低 (1 μ g/mL)、中 (5 μ g/mL)、高 (15 μ g/mL) 浓度 UA 溶液的日内精密度 RSD% 分别为 0.95%、1.12%、1.28%, 日间精密度 RSD% 分别为 1.24%、0.52%、1.53%, 均小于 2%。回收率分别为 99%、97.5%、99%, RSD% 分别为 0.77%、1.05%、0.35%, 均小于 2%。

2.2 UA 胶束的最佳制备条件

表 2 为基于单因素试验结果的 Box-Behnken 响应面法的试验设计及结果。图 2、图 3 分别为

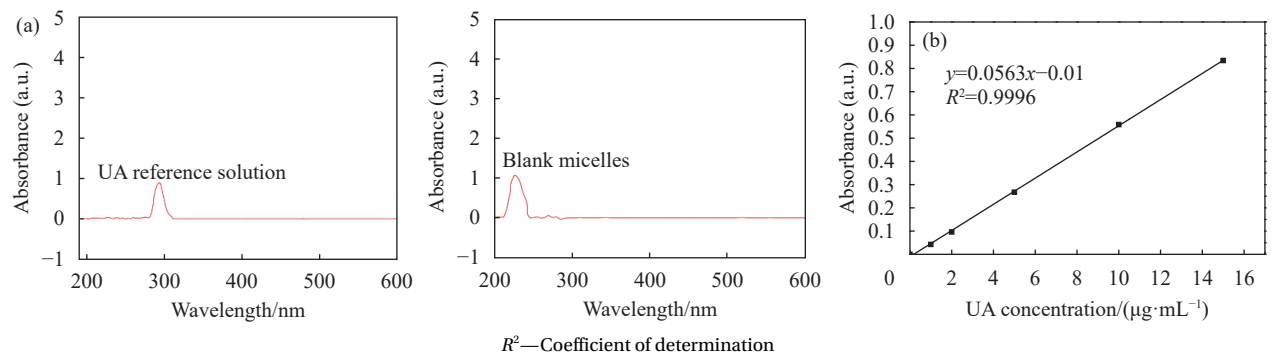


图 1 190-600 nm 全波长扫描结果 (a) 及 UA 标准曲线 (b)

Fig. 1 Full wavelength scanning results from 190 to 600 nm (a) and standard curve of UA (b)

各因素对 UA 胶束包封率和载药量影响的 3D 响应面。根据 Box-Behnken 响应面法试验结果，UA 胶束的最佳制备条件为：三氯甲烷：甲醇体积比为 1：1，UA 投药量为 4.15 mg，PBS 体积为 24.38 mL，PBS pH 值为 7.4。Box-Behnken 响应面法预测的包封率为 80.66%，载药量为 9.47%。

表 2 Box-Behnken 响应面法的试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of Box-Behnken response surface methodology

Formula	PBS volume/mL	UA dosage/mg	Trichloromethane : Methanol	PBS pH value	Encapsulation efficiency/%	Drug loading/%
1	25	3	1 : 1	8.0	72.25	8.39
2	25	3	1 : 2	7.4	68.71	8.03
3	25	5	1 : 2	7.4	72.35	8.90
4	25	3	1 : 1	6.5	42.55	6.21
5	25	4	2 : 1	6.5	47.36	6.33
6	20	4	1 : 2	7.4	74.54	8.76
7	30	3	1 : 1	7.4	67.40	7.98
8	25	3	2 : 1	7.4	72.72	8.43
9	25	5	2 : 1	7.4	75.48	9.02
10	20	3	1 : 1	7.4	68.70	8.02
11	25	4	1 : 2	6.5	48.62	6.66
12	20	4	1 : 1	8.0	72.01	8.71
13	25	4	1 : 1	7.4	79.59	9.36
14	30	4	1 : 1	8.0	66.18	8.44
15	20	5	1 : 1	7.4	70.37	8.62
16	30	4	1 : 1	6.5	49.45	6.70
17	30	4	2 : 1	7.4	70.35	8.56
18	20	4	2 : 1	7.4	72.16	8.68
19	20	4	1 : 1	6.5	43.55	6.28
20	25	4	1 : 1	7.4	78.40	9.25
21	25	5	1 : 1	6.5	49.92	6.98
22	25	4	1 : 1	7.4	78.62	9.27
23	25	4	2 : 1	8.0	73.33	8.69
24	25	5	1 : 1	8.0	67.67	8.59
25	25	4	1 : 2	8.0	71.04	8.62
26	30	4	1 : 2	7.4	72.97	8.72
27	30	5	1 : 1	7.4	70.26	8.60
28	25	4	1 : 1	7.4	77.48	9.11
29	25	4	1 : 1	7.4	78.31	9.24

Note: PBS—Phosphate buffer solution.

2.3 UA 胶束的表征与评价

2.3.1 粒径、Zeta 电位、微观形貌及包埋效果

图 4(a) 为 UA 胶束粒径分布图，可见 UA 胶束的粒径约为 120.4 nm，Zeta 电位为-7.8 mV，表面

带负电荷，稳定性良好。图 4(b) 为 UA 胶束的微观形貌，可见 UA 胶束为大小均匀、表面光滑的球体，胶束粒子之间无粘连。图 4(c) 为 ¹H NMR 表征结果，可见 UA 胶束与 UA 原药的图谱特征峰

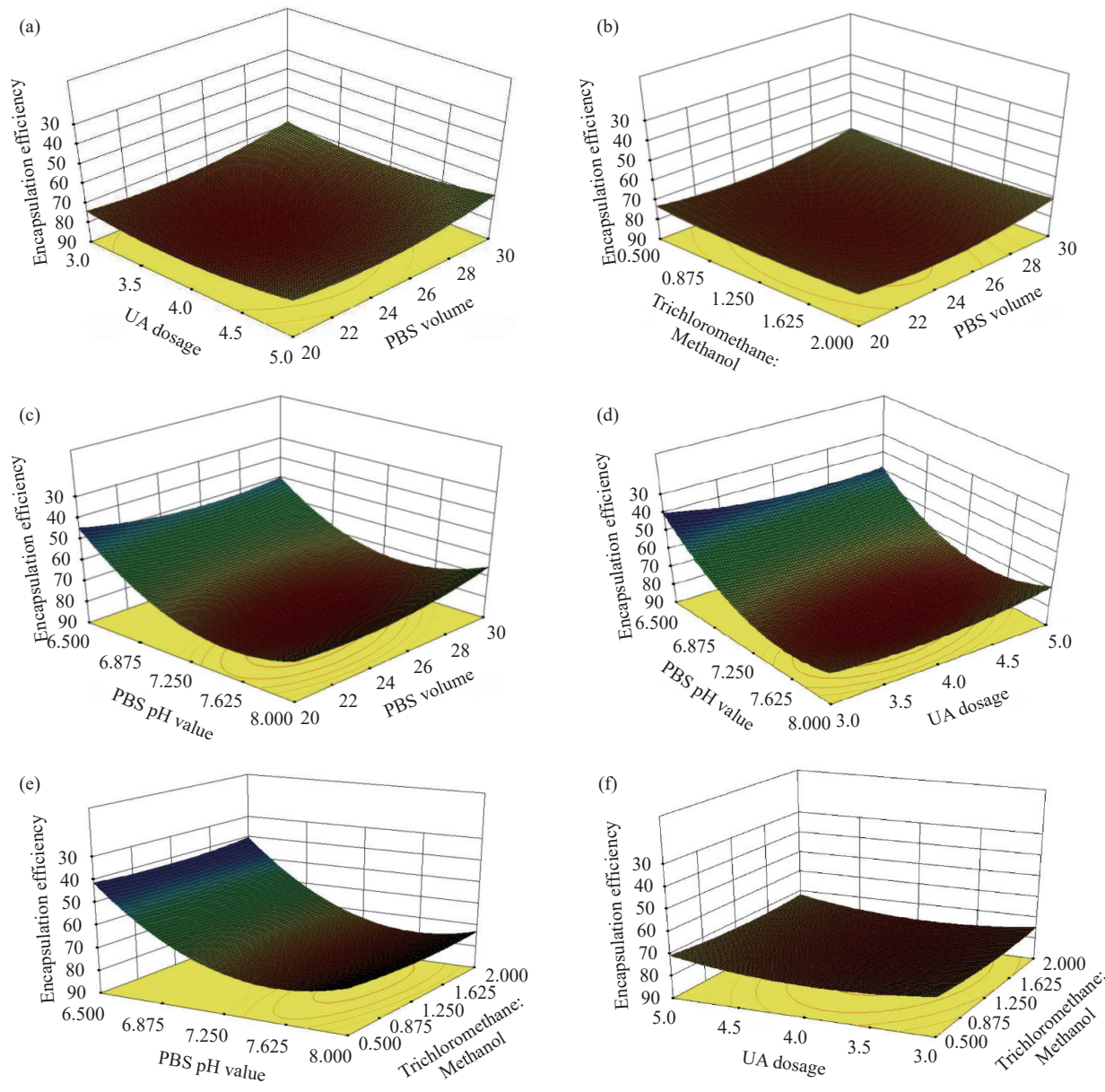


图2 四种因素对 UA 胶束包封率影响的交互作用
Fig. 2 Interaction of the influence of four factors on the encapsulation efficiency of UA micelles

发生了改变，表明 UA 已被成功包埋 在胶束内部。图 4(d) 为红外光谱检测结果，可见 UA 原药的羧基在 3 500 cm⁻¹ 处有明显峰，在 2 800 cm⁻¹ 有烷基峰；UA 胶束与 UA 原药及 UA 与 PCL-PEG 的物理混合物相比，红外吸收光谱的官能团区发生变化，观察不到明显峰形，表明 UA 被成功包埋于胶束中。

2.3.2 水溶性

UA 原药的饱和溶解度为 17.19 μg/mL，UA 胶束冻干粉的饱和溶解度为 328.54 μg/mL，水溶性提高了 19.11 倍。

2.3.3 体外释药性能

图 4(e) 为 UA 胶束体外释药表征结果，可见 UA 胶束在 0-2 h 释放速度较快，5 h 时释放度约为 50%，15 h 后趋于平缓，48 h 时释放度为 76.26%。与游离 UA 相比，UA 胶束具有一定缓释性。

2.3.4 贮存稳定性

表 3 为 UA 胶束稳定性的考察结果，从表 3 中可见 UA 胶束于 4℃、25℃ 避光贮存不同时间后，包封率和载药量均有少量下降，其中 4℃ 下降更缓慢，说明 UA 胶束在 4℃ 条件下贮存更稳定。此外，UA 胶束于 4℃、25℃ 避光贮存 60 d 后，均

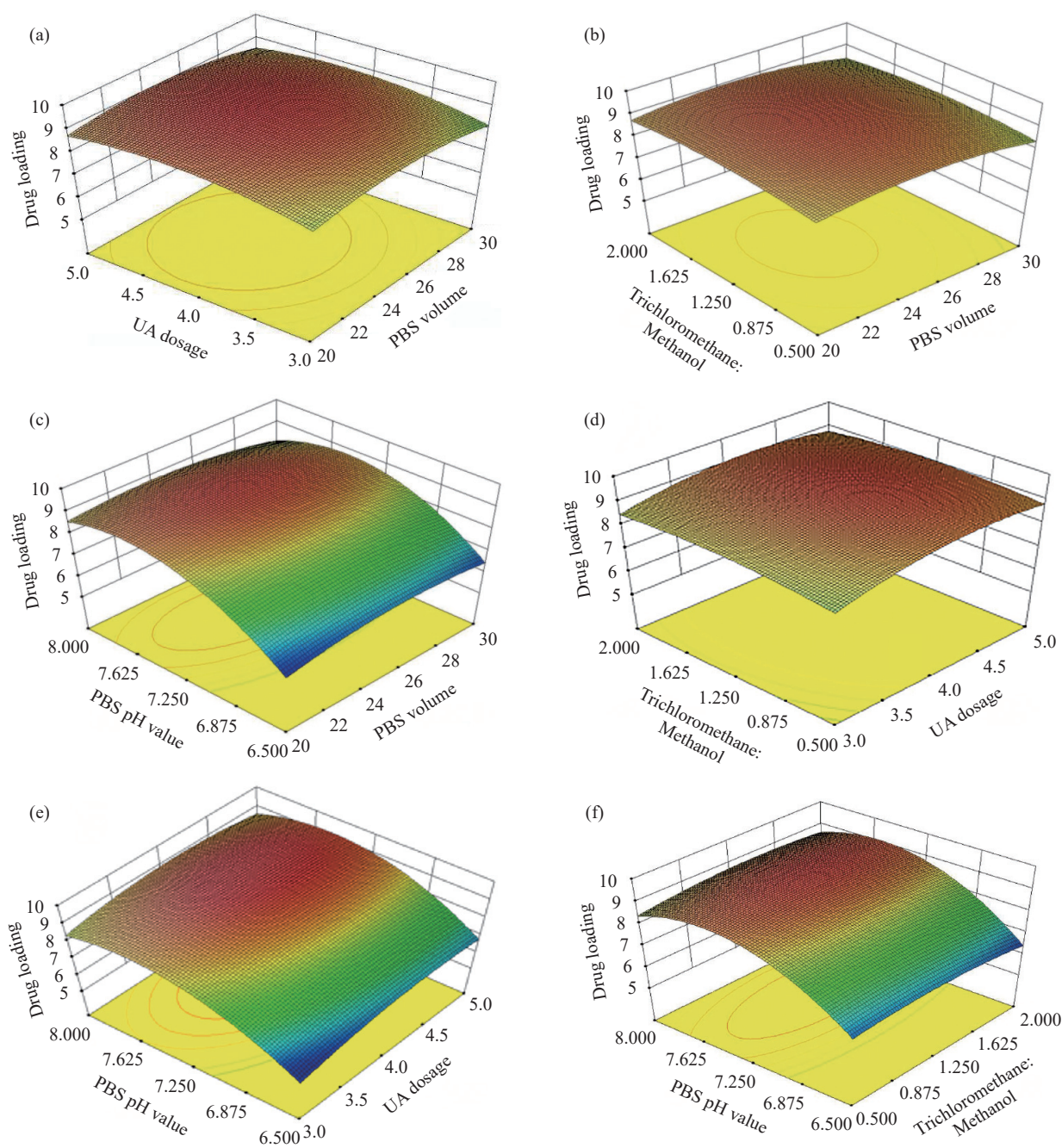


图3 四种因素对 UA 胶束载药量影响的交互作用

Fig. 3 Interaction of the influence of four factors on the drug loading of UA micelles

观察到少量淡黄色沉淀生成，振荡后沉淀消失。

2.3.5 用药安全性

图 4(f) 为 UA 胶束溶血试验结果，随着 UA 胶束浓度的增加，溶血率逐渐升高，在 8 mg/mL 浓度时，溶血率小于 2%，表明该浓度条件下不会引起体内溶血现象，作用安全可靠。

2.4 UA 胶束的抗菌活性

2.4.1 MIC 和 MBC 测定结果

表 4 为 UA 胶束和游离 UA 对 4 种细菌的 MIC

和 MBC，可见游离 UA 和 UA 胶束对金黄色葡萄球菌和化脓隐秘杆菌均有较强的抑菌活性，而对大肠杆菌和肺炎链球菌的抑菌活性相对较差。UA 胶束对 4 种细菌的 MIC 和 MBC 基本与游离 UA 相同。

2.4.2 UA 胶束对金黄色葡萄球菌感染小鼠的治疗效果

图 5 为小鼠不同脏器菌落数计数结果。对于肺脏，与生理盐水组相比，12 h、24 h 时 UA 原药和

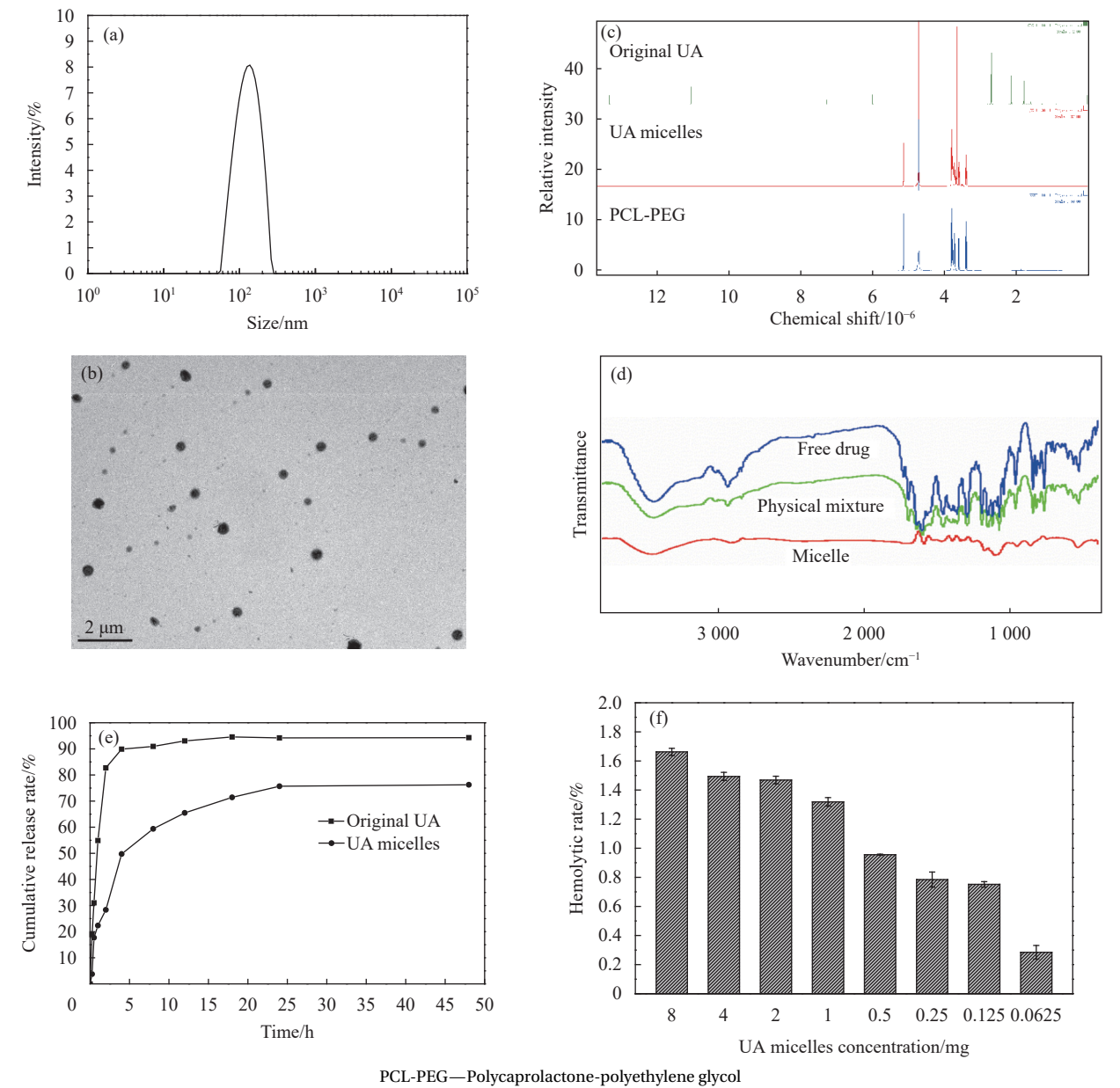


图 4 UA 胶束的部分表征结果: (a) UA 胶束粒径分布图; (b) TEM 观察 UA 胶束的微观形貌; (c) ¹H NMR 结果; (d) 红外光谱测定结果; (e) UA 胶束体外释放行为; (f) UA 胶束溶血试验结果

Fig. 4 Partial characterization of UA micelles: (a) Particle size distribution of UA micelles; (b) The morphology of UA micelles observed by TEM; (c) ¹H NMR results; (d) Infrared spectroscopic results; (e) In vitro release behavior of UA micelles; (f) Hemolysis test results of UA micelles

表 3 UA 胶束在不同温度下避光贮存不同时间的封装率和载药量						
Table 3 Encapsulation efficiency and drug loading of UA micelles stored at different temperatures for different time and away from light						
Storage temperature/℃		0 d	15 d	30 d	45 d	60 d
Encapsulation efficiency/%	4	80.60±0.31	72.88±0.78	68.13±1.76	64.72±2.06	61.11±3.36
	25	80.60±0.31	65.81±1.13	60.06±1.77	58.64±2.31	55.90±2.89
Drug loading/%	4	9.10±0.35	8.43±0.92	7.96±1.12	7.46±1.43	7.17±1.19
	25	9.10±0.35	7.53±0.66	7.01±2.02	6.77±0.62	6.60±1.15

UA 胶束均极显著降低菌落数, 24 h 的 UA 原药和
UA 胶束相比也有极显著差异; 对于脾脏, 与生理
盐水组相比, UA 原药差异不显著, 而 UA 胶束在
12 h 时差异显著, 24 h 时差异极显著, 24 h 的 UA

表 4 UA 胶束和 UA 原药对 4 种细菌的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) ^[29]								
Table 4 Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of UA micelles and original UA against four bacteria								
<i>Staphylococcus aureus</i>								
	ATCC 29213	MRSA-5	MRSA-66	MRSA-70	ATCC 29213	MRSA-5	MRSA-66	MRSA-70
	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				MBC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
Free UA	8	4	8	16	64	32	32	64
UA micelles	16	8	8	16	64	32	32	64
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>								
	ATCC 19411	HC-H12	HC-H02-2	BMH06-3	ATCC 19411	HC-H12	HC-H02-2	BMH06-3
	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				MBC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
Free UA	16	32	32	16	64	128	128	64
UA micelles	16	32	64	32	64	128	256	128
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922					<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619			
	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		MBC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		MBC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
Free UA	256		>512		128		>512	
UA micelles	256		>512		128		>512	

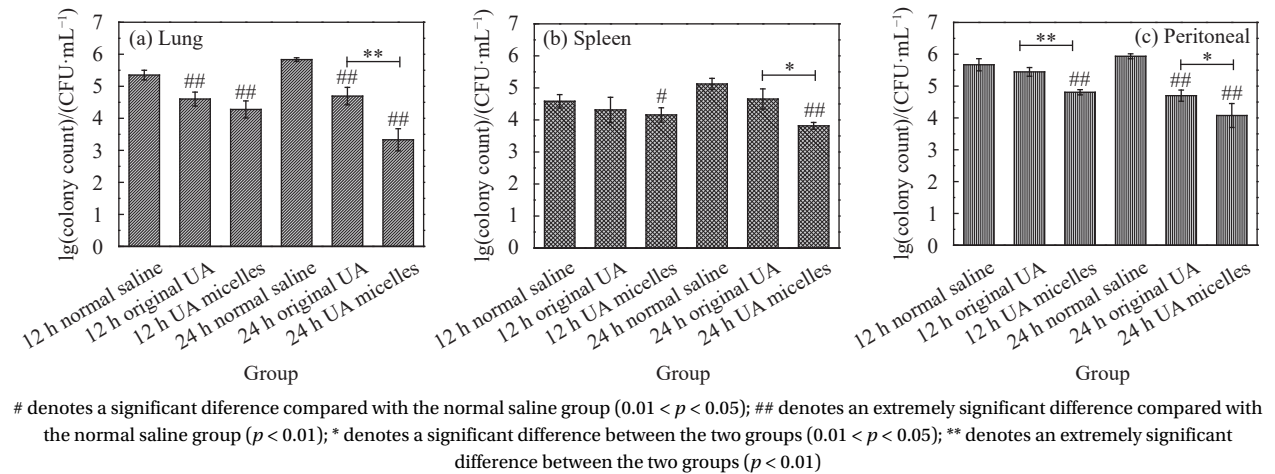


图 5 金黄色葡萄球菌感染小鼠不同脏器的菌落数

Fig. 5 Number of colonies in different organs of mice infected by *Staphylococcus aureus*

原药和 UA 胶束相比也有显著差异；对于腹腔洗液，与生理盐水组相比，12 h 的 UA 胶束极显著降低菌落数，24 h 的 UA 原药和 UA 胶束均极显著降低菌落数，12 h、24 h 的 UA 原药和 UA 胶束相比也有显著差异。综上，UA 胶束可明显抑制小鼠体内金黄色葡萄球菌感染，且效果优于 UA 原药。

图 6 为小鼠肺脏及脾脏组织病理学改变情况。肺脏组织中，与正常对照组相比，生理盐水组小鼠肺间质明显增宽，肺泡腔面积减少，出现大面积炎性细胞浸润并伴随出血，提示造模成功；与生理盐水组相比，UA 原药组和 UA 胶束组小鼠肺组织间质变窄，炎性细胞浸润减少，表明 UA 可发挥一定治疗作用；此外，与 UA 原药组相比，UA 胶束组小鼠肺组织炎性细胞浸润更少，间质宽度更加正常，肺组织结构逐渐恢复至正常水平。

脾脏组织中，正常对照组小鼠脾脏组织形态完整，淋巴小结结构清晰，胞核胞浆界限分明；生理盐水组小鼠脾脏组织红髓、白髓结构不清晰，脾小梁结构不完整，淋巴小结结构不完整，有明显中

Lung Spleen

图 6 金黄色葡萄球菌感染小鼠的肺脏、脾脏组织病理学改变情况

Fig. 6 Histopathological changes of lung and spleen in mice infected by *Staphylococcus aureus*

性粒细胞浸润，提示造模成功；UA 原药组小鼠脾脏细胞核结构逐渐恢复完整，有中性粒细胞浸润，脾小梁结构不清晰；而 UA 胶束组小鼠脾脏组织结构较为完整，仅有少量中性粒细胞浸润，脾小梁结构完整。以上结果表明，UA 胶束的治疗效果优于 UA 原药。

2.5 UA 胶束的药代动力学研究

2.5.1 HPLC 法检测血浆中 UA 的结果

图 7(a) 为大鼠空白血浆、空白血浆加入 UA 及大鼠尾静脉注射 UA 的血浆样品色谱图，可见

UA 的保留时间为 6.277 min，大黄素的保留时间为 9.043 min，UA 和大黄素不受血浆内源物质干扰，此方法的专属性良好。图 7(b) 为建立的标准曲线，线性回归方程为： $y=0.0859x-0.0214$ ，线性范围为 1~16 $\mu\text{g/mL}$ ， R^2 为 0.9991，检出限为 0.283 $\mu\text{g/mL}$ ，定量限为 0.942 $\mu\text{g/mL}$ 。低 (1 $\mu\text{g/mL}$)、中 (4 $\mu\text{g/mL}$)、高 (16 $\mu\text{g/mL}$) 浓度 UA 的回收率分别为 93.6%、92.8%、88.3%，日内变异系数分别为 1.7%、1.4%、2.5%，日间变异系数分别为 3.4%、1.7%、4.9%，均满足检测要求。

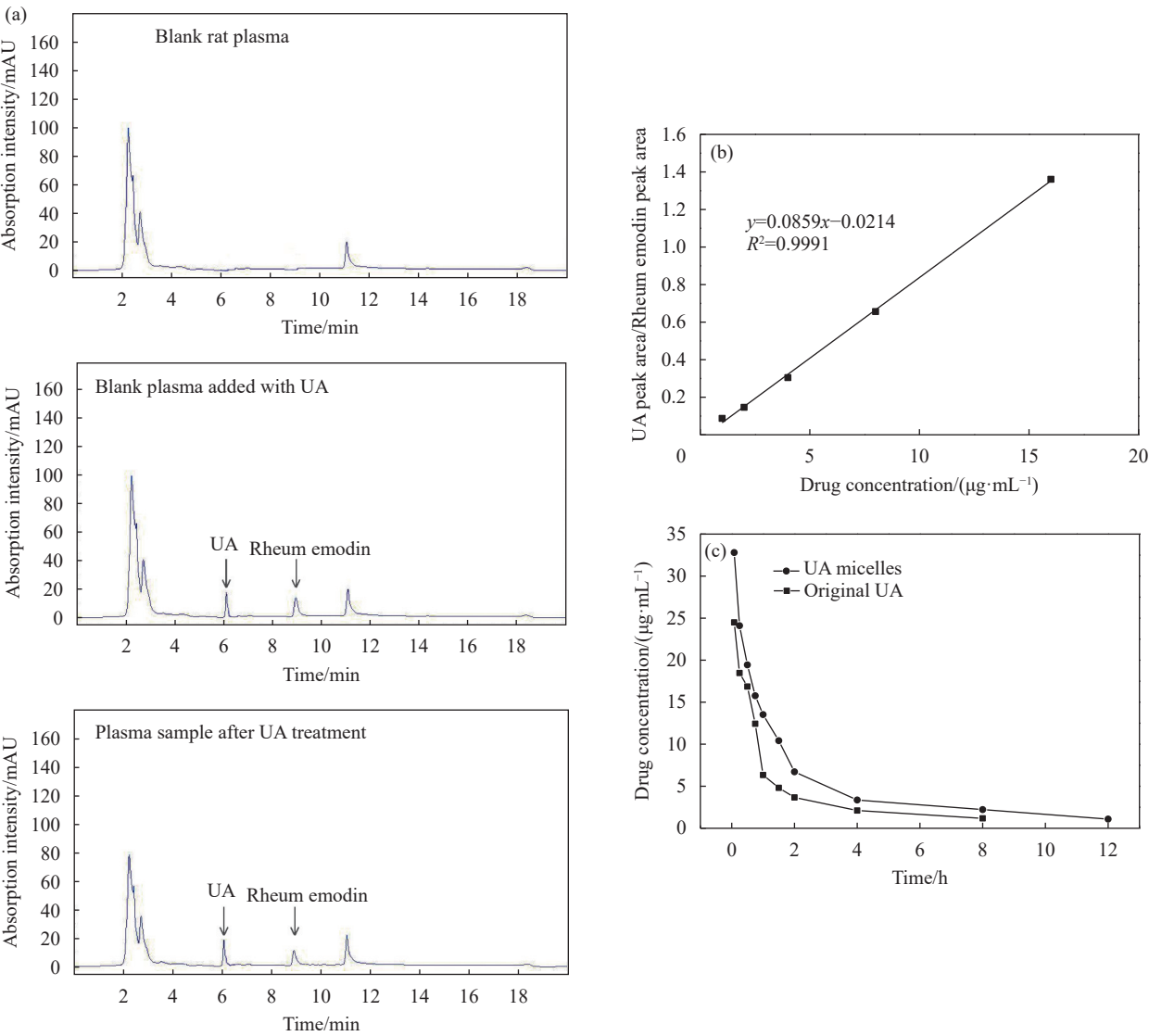


图 7 HPLC 法检测血浆中 UA 的结果及血浆药物浓度-时间曲线：(a) 不同血浆样品的 HPLC 色谱图；(b) 标准曲线；(c) 血浆药物浓度-时间曲线

Fig. 7 Determination of UA in plasma by HPLC and plasma drug concentration-time curves: (a) HPLC chromatograms of different plasma samples; (b) Standard curve; (c) Plasma drug concentration-time curves

2.5.2 UA 在空白血浆中的稳定性

低 (1 $\mu\text{g/mL}$)、中 (4 $\mu\text{g/mL}$)、高 (16 $\mu\text{g/mL}$) 浓

度 UA 的血浆样品在 -20°C 贮存 30 d 后，检测 UA 含量所得 RSD% 分别为 13.1%、11.6%、11.3%，均

小于 15%，表明 UA 在大鼠血浆中较稳定。

2.5.3 UA 的药代动力学特征

图 7(c) 为血浆药物浓度-时间曲线，可见尾静脉注射给药后，血药浓度均迅速达到峰值。UA 原药的血药浓度降低至 30% 需约 1 h，而 UA 胶束的血药浓度降低至 30% 则需约 2 h。与 UA 原药相比，UA 胶束药物的吸收量明显增加，且药物在大鼠体内的保留时间更长。

根据 UA 原药和 UA 胶束血药浓度的测定结果，采用药动学程序软件 DAS 2.1 计算药动力学参

数，其在大鼠体内符合有吸收的二室模型，权重为 1/C。表 5 为采用非房室模型进行处理后得到的药代动力学主要参数，结果表明，尾静脉注射给药后，大鼠血浆中 UA 胶束的血药浓度-时间曲线下总面积_(0-∞) (AUC_(0-∞)) 为 58.423 mg/(L·h)，比 UA 原药的 AUC_(0-∞) (37.481 mg/(L·h)) 提高了 1.56 倍，相对生物利用度提高了 156%，最大血药浓度 (C_{max}) 提高了 1.34 倍，半衰期延长了 21.38%，清除率降低了 32.39%，平均驻留时间 MRT_(0-t) 也明显延长。

表 5 尾静脉注射给药后血浆中的药动力学参数

Table 5 Pharmacokinetic parameters in plasma after administration by tail vein injection

Sample	AUC _(0-t) /(mg·(L·h) ⁻¹)	AUC _(0-∞) /(mg·(L·h) ⁻¹)	C _{max} /(mg·L ⁻¹)	t _{1/2} /h	CL/(L·(h·kg) ⁻¹)	V _z /(L·kg ⁻¹)	MRT _(0-t) /h
Original UA	37.481±4.847	43.511±6.764	24.493±2.848	3.807±0.132	0.46±0.013	3.065±0.067	2.817±0.176
UA micelles	58.423±4.946	64.375±4.877	32.799±2.620	4.621±1.194	0.311±0.028	1.707±0.053	2.969±0.295

Notes: AUC_(0-t) is area under the blood concentration time curve from 0 to t; AUC_(0-∞) is area under the blood concentration time curve from 0 to ∞; C_{max} is maximum blood concentration; t_{1/2} is plasma half-life of the drug; CL is the volume of drug-containing plasma eliminated from the body per unit time; V_z is apparent volume of distribution; MRT_(0-t) is mean residence time from 0 to t.

3 结论

(1) 采用薄膜水合法可成功将松萝酸 (UA) 包埋在聚己内酯₅₀₀₀-聚乙二醇₅₀₀₀ (PCL₅₀₀₀-PEG₅₀₀₀) 胶束的疏水性内核中，显著提高 UA 的水溶性，并具备一定的药物缓释能力，贮存稳定性及用药安全性良好。

(2) UA 胶束对多种细菌具有一定的体外抗菌活性，对金黄色葡萄球菌感染小鼠的治疗效果比 UA 原药更好。

(3) 与 UA 原药相比，UA 胶束在大鼠体内的相对生物利用度提高 156%，C_{max} 提高 1.34 倍，半衰期延长 21.38%，清除率降低 32.39%。UA 胶束在大鼠体内具有较强的缓释作用。

参考文献：

[1] ARAUJO A A, DE MELO M G D, RABELO T K, et al. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid[J]. *Natural Product Research*, 2015, 29(23): 2167-2180.

[2] SIENIAWSKA E, SAWICKI R, TRUSZKIEWICZ W, et al. Usnic acid treatment changes the composition of mycobacterium tuberculosis cell envelope and alters bacterial redox status[J]. *mSystems*, 2021, 6(3): e00097-21.

[3] POMPILIO A, RIVIELLO A, CROCETTA V, et al. Evaluation of antibacterial and antibiofilm mechanisms by usnic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Future Microbiology*, 2016, 11(10): 1315-1338.

[4] 郭红艳. 松萝酸衍生物的抗弓形虫活性研究及人参三醇衍生物的抗肿瘤活性研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2021.

GUO Hongyan. Study on *Toxoplasma gondii* activity of usnea acid derivatives and the anti-tumor activity of panaxotriol derivatives [D]. Yanji: Yanbian University, 2021(in Chinese).

[5] DERICI M K, CANSARAN-DUMAN D, TAYLAN-ÖZKAN A. Usnic acid causes apoptotic-like death in *Leishmania major*, *L. infantum* and *L. tropica* [J]. *3 Biotech*, 2018, 8(9): 384-390.

[6] GALANTY A, ZAGRODZKI P, GDULA-ARGASIŃSKA J, et al. A comparative survey of anti-melanoma and anti-inflammatory potential of usnic acid enantiomers—A comprehensive in vitro approach [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(9): 945.

[7] KUMAR K, MISHRA J P N, SINGH R P. Usnic acid induces apoptosis in human gastric cancer cells through ROS generation and DNA damage and causes up-regulation of DNA-PKcs and γ-H2A.X phosphorylation [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2020, 315: 108898.

[8] 苏祖清. 松萝酸对小鼠急性肺损伤以及肺纤维化的保护作用 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.

SU Zuqing. The protective effects of usnic acid on lipopolysaccharide-induced acute lung injury and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015(in Chinese).

[9] 李德. 松萝酸钠在大鼠皮肤伤口愈合过程中对成纤维细胞的影响 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.

- LI De. Effect of sodium usnic acid for the fibroblasts on rat skin wound healing[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016(in Chinese).
- [10] 郑宇. 松萝酸钠对皮肤创伤愈合的影响及临床应用实验 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- ZHENG Yu. The effects of sodium usnic acid on skin wound healing and clinical experiments[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016(in Chinese).
- [11] 杨帆. 松萝酸纳米给药系统的制备及减毒作用的初步研究 [D]. 重庆: 重庆理工大学, 2020.
- YANG Fan. Preliminary study on preparation and attenuation of usnic acid nano-drug delivery system[D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2020(in Chinese).
- [12] BATTISTA S, BELLIO P, CELENZA G, et al. Correlation of physicochemical and antimicrobial properties of liposomes loaded with (+)-usnic acid[J]. *ChemPlusChem*, 2020, 85(5): 1014-1021.
- [13] FRANCOLINI I, GIANSAANTI L, PIOZZI A, et al. Glucosylated liposomes as drug delivery systems of usnic acid to address bacterial infections[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 181: 632-638.
- [14] ZUGIC A, TADIC V, SAVIC S. Nano- and microcarriers as drug delivery systems for usnic acid: Review of literature[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(2): 156.
- [15] 宋婷, 宋丹, 管海燕, 等. 松萝酸磷脂复合物在大鼠体内的药动学及组织分布研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(6): 1358-1364.
- SONG Ting, SONG Dan, GUAN Haiyan, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of usnic acid phospholipid complex in rats[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(6): 1358-1364(in Chinese).
- [16] 王永中, 方晓玲. 聚合物胶束作为肿瘤靶向给药载体的研究 [J]. *中国新药杂志*, 2005, 14(10): 1127-1131.
- WANG Yongzhong, FANG Xiaoling. Polymeric micelles and targeting drug delivery systems for cancer therapy[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2005, 14(10): 1127-1131(in Chinese).
- [17] CHO H K, CHO J H, JEONG S H, et al. Polymeric vehicles for topical delivery and related analytical methods[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2014, 37(4): 423-434.
- [18] MATSUMURA Y. The drug discovery by nanomedicine and its clinical experience[J]. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2014, 44(6): 515-525.
- [19] YOKOYAMA M. Polymeric micelles as drug carriers: Their lights and shadows[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2014, 22(7): 576-583.
- [20] GOU M, WEI X, MEN K, et al. PCL/PEG copolymeric nanoparticles: Potential nanoplateforms for anticancer agent delivery[J]. *Current Drug Targets*, 2011, 12(8): 1131-1150.
- [21] 苑莹芝. pH响应型抗肿瘤纳米药物载体的合成及药物控释 [D]. 兰州: 西北师范大学, 2017.
- YUAN Yingzhi. Synthesis and drug controlled release of pH-responsive antitumor nano-drug delivery systems[D]. Lanzhou: Northwest Normal University, 2017(in Chinese).
- [22] GHEZZI M, PESCHINA S, PADULA C, et al. Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions[J]. *Journal of Controlled Release*, 2021, 332: 312-336.
- [23] MAJUMDER N, DAS N G, DAS S K. Polymeric micelles for anticancer drug delivery[J]. *Therapeutic Delivery*, 2020, 11(10): 613-635.
- [24] 蔡杰慧, 杨英全, 郑燕菲. 载姜黄素类化合物 PCL-PEG-PCL 微球的制备及释药性、抗氧化性研究 [J]. *现代化工*, 2022, 42(7): 201-206.
- CAI Jiehui, YANG Yingquan, ZHENG Yanfei. Preparation of curcuminoids-loaded PCL-PEG-PCL microspheres, and study on their drug delivery and antioxidant activity[J]. *Modern Chemical Industry*, 2022, 42(7): 201-206(in Chinese).
- [25] 苏晓梅, 张丹参, 赵凯燕, 等. 以 PCL-PEG 为载体的人参皂苷 Rg3 纳米粒的制备及表征 [J]. *应用化工*, 2018, 47(3): 525-529.
- SU Xiaomei, ZHANG Danshen, ZHAO Kaiyan, et al. Preparation and characterization of ginsenoside Rg3 nanoparticles based on PCL-PEG[J]. *Applied Chemical Industry*, 2018, 47(3): 525-529(in Chinese).
- [26] LI J, DU Y T, SU H T, et al. Interfacial properties and micellization of triblock poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone)-polyethyleneimine copolymers[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2020, 10(6): 1122-1133.
- [27] REDDY B P, YADAV H K, NAGESHA D K, et al. Polymeric micelles as novel carriers for poorly soluble drugs—A review[J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2015, 15(6): 4009-4018.
- [28] LI Q, LAI K L, CHAN P S, et al. Micellar delivery of dasatinib for the inhibition of pathologic cellular processes of the retinal pigment epithelium[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 140: 278-286.
- [29] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100S[S]. New York: Infobase Publishing, 2017.