DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250220.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250220.1541.002

RVG29肽修饰雷公藤红素传递体鼻用原位凝胶的制备及体外释药性能评价

郑维莉,钟 靓,程光琴,闫汉语,张永萍,徐 剑,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,贵州 贵阳 550025)

[摘要] **目的**:制备RVG29肽修饰雷公藤红素传递体鼻用原位凝胶(RVG29-CLT-TFs/DGG)并对其体外释药行为进行考察。**方法**:采用薄膜水化-超声法制备RVG29肽修饰雷公藤红素传递体(RVG29-CLT-TFs);选用脱乙酰结冷胶(deacetyl gellan gum,DGG)作为凝胶基质,以黏度、临界离子浓度、凝胶强度、持水能力、体积膨胀系数以及pH值为考察指标,筛选DGG的用量;将DGG与RVG29-CLT-TFs按1∶1(*v*/*v*)混合,得RVG29-CLT-TFs/DGG,以PBS缓冲液(pH=7.4,含1% Tween 80)为释放介质对其释药特性进行研究。**结果**:RVG29-CLT-TFs平均粒径为(112.33±0.26) nm,多分散指数为0.203±0.018,Zeta电位为(-41.13±1.7) mV,包封率和载药量分别为(94.22±0.21)%和(2.31±0.25)%。确定1.0% DGG作为凝胶基质,将其与RVG29-CLT-TFs按1∶1(*v*/*v*)混合后得RVG29-CLT-TFs/DGG。测得RVG29-CLT-TFs/DGG相变前黏度为(10.33±0.47) mPa·s,相变后黏度为(337.00±0.82) mPa·s;凝胶强度为(30.0±0.8) s;水分保持能力高于85%;S%为(1.33±0.02)%;pH值为6.18±0.02;1 mL RVG29-CLT-TFs/DGG临界离子浓度需要250 μL人工拟鼻液。体外释放结果表明72 h内RVG29-CLT-TFs/DGG累积释放率低于CLT和RVG29-CLT-TFs。**结论**:RVG29-CLT-TFs/DGG原位凝胶的制备工艺简单、稳定,其可明显改善CLT的释药速度,具有良好的缓释性能。

[关键词] 雷公藤红素;传递体凝胶剂;体外释放;帕金森
[中图分类号] R283.6 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)02-0120-08

Study on preparation and *in vitro* drug release performance of RVG29 peptide modified celastrol transfersomes *in situ* nasal gel

ZHENG Weili, ZHONG Liang, CHENG Guangqin, YAN Hanyu, ZHANG Yongping, XU Jian, GUO Ling✉
(*School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, National Engineering Technology Research Center for Miao Medicine, Guizhou Engineering Technology Research Center for Processing and Preparation of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine, Guiyang* 550025, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project* [*Qiankehe Basic Engineering-ZK*(2021) *General* 555]; *Capacity Enhancement of the National Engineering Research Center for Miao Medicine* [*Qian Ke He Zhong Yin Di* (2023)006]; *Engineering Research Center for New Dosage Forms and Preparations of Traditional Chinese Medicine, Ethnic Medicine* (*Miao Medicine*) *in Higher Education Institutions of Guizhou Province* [*Qian Jiao Ji* (2022)022]
[*Author*]: *ZHENG Weili, E-mail*:2664790361@*qq.com.*
[*Correspondence to*]: *GUO Ling, Ph.D., Associate Professor, E-mail*:*guoling*032@*gzy.edu.cn.*
Received: 2024-11-26 *Revised*: 2025-02-03 *JHMU*, 2026;32(2):120-127

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To prepare RVG29 peptide modified celastrol transfersomes *in situ* nasal gel (RVG29-CLT-TFs/DGG) and investigate its *in vitro* drug release behavior. **Methods**: RVG29 peptide modified celastrol transfersomes (RVG29-CLT-TFs)were prepared by film hydration-sonication method. Deacetyl gellan gum (DGG) was selected as the gel ma-

[基金项目] 贵州省科技计划项目[黔科合基础-ZK(2021)一般555];国家苗药工程技术研究中心能力提升[黔科合中引地(2023)006];贵州省高等学校中药民族药(苗药)新剂型新制剂工程研究中心[黔教技(2022)022]
[作者简介] 郑维莉,E-mail:2664790361@qq.com。
[通讯作者] 郭玲,博士,副教授,E-mail:guoling032@gzy.edu.cn。
[收稿日期] 2024-11-26 [修回日期] 2025-02-03 网络出版时间:2025-02-20 17:20:33

trix, with its amount determined based on viscosity, critical ion concentration, gel strength, water retention capacity, volume expansion and pH value as the inspection indices. The optimal concentration of DGG and RVG29-CLT-TFs were mixed evenly in a volume ratio of 1∶1 to obtain RVG29-CLT-TFs/DGG. The drug release characteristics of RVG29-CLT-TFs were studied using PBS buffer (pH=7.4, containing 1.0% Tween 80). **Results**: The average particle size of RVG29-CLT-TFs was (112.33±0.26) nm, with a polydispersity index of 0.203±0.018 and a Zeta potential of (−41.13±1.7) mV. The entrapment efficiency and drug loading were (94.22±0.21)% and (2.31±0.25)%, respectively. A concentration of 1.0% DGG was determined as the optimal gel matrix and mixed it with RVG29-CLT-TFs at a ratio of 1∶1(*v*/*v*) to obtain RVG29-CLT-TFs/DGG. The viscosity of RVG29-CLT-TFs/DGG before phase transition was (10.33±0.47) mPa·s, wihch increased to (337.00±0.82) mPa·s after phase transition. The gel strength was (30.0±0.8) s, and the water retention capacity exceeded 85%. The *S*% was (1.33±0.02)%, the pH value was 6.18±0.02, and the critical ion concentration required for 1 mL of RVG29-CLT-TFs/DGG was 250 μL of artificial nasal liquid. The *in vitro* release results showed that the cumulative release rate of RVG29-CLT-TFs/DGG over 72 h was lower than that of both CLT and RVG29-CLT-TFs. **Conclusion**: The combination of RVG29-CLT-TFs and DGG can obviously improve the drug CLT release rate and realize sustained release, and the preparation process is simple and feasible.

[**Key words**] Celastrol; Transfersomal gel; I*n vitro* drug release; Parkinson′s disease

帕金森病(Parkinson′s disease,PD)是一种以黑质致密部多巴胺能神经元进行性丢失为特征的神经退行性疾病[1],目前临床仍以药物治疗为主。雷公藤红素(celastrol,CLT)是从雷公藤属植物中分离得到的五环三萜类单体化合物,除具有抗炎和抗氧化活性外,还具有神经保护功能[2,3],其可通过多条通路抑制PD动物黑质致密部中神经元的减少[4],展现出治疗PD的巨大潜力。但CLT口服给药生物利用度低,静脉给药又会因脱靶效应产生严重的毒副作用[5]。药物鼻腔给药后可沿嗅通路和三叉神经通路直接转运入脑[6],为CLT治疗PD提供了新的给药途径。但药物经鼻入脑传递过程还需克服鼻纤毛的快速清除、鼻黏膜的低通透性以及入脑后非特异性分布等问题。

传递体(transfersomes, TFs),又称变形脂质体,其能穿过比自身粒径小1/10～1/5的孔穴,且结构不破裂[7,8],是经鼻入脑给药制剂的理想载体之一。TFs可借助自身的膜融合作用和形变穿透作用穿过鼻黏膜上皮细胞进入脑区,但到达脑区后分布无选择性,不能在病灶部位有效蓄积。已有研究表明,多巴胺能神经元高表达乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor,AchR),而由狂犬病毒糖蛋白衍生得到的多肽RVG29可与AchR特异性识别结合[9]。因此,将RVG29肽修饰于TFs表面(RVG29-TFs),利用配体和受体的相互作用,可实现高效的多巴胺能神经元主动靶向入胞作用。但RVG29-TFs为水性制剂,在鼻腔易流失。本研究进一步将RVG29-TFs载入可响应鼻腔环境中Na^+、Ka^+、Ca^{2+}发生相变的脱乙酰结冷胶(deacetylated gellan gum,DGG)[10]凝胶基质中,延长载体的鼻腔滞留时间,提高鼻脑转运效率。

综上,本研究基于“鼻-脑”相通的生理特点,以CLT为模型药物,以靶向肽修饰的传递体RVG29-TFs为载体,并将其载入DGG凝胶溶液中制备离子响应型原位凝胶制剂RVG29-CLT-TFs/DGG,对其质量进行初步评价,测定其黏度、临界离子浓度、凝胶强度、持水能力、体积膨胀系数以及pH值并考察其体外释放性能,为开发治疗PD的新型中药制剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

本研究所用的主要仪器有DelsaMax PRO贝克曼激光粒度分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司)、H-600型透射电子显微镜(日本Hitachi公司)、LC 2030 3D高效液相色谱仪(日本株式会社岛津制作所)、SB-4200D型超声波细胞粉碎仪(宁波新芝超声设备有限公司)、RE-52AA旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、LQ-C2002型电子天平(上海瑶新电子科技有限公司)、H2050R高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司)、XMTD-8222恒温振荡仪(上海精宏实验设备有限公司)、HJ-6A数显恒温磁力搅拌器(常州国华电器有限公司)、NDJ-5S数字式黏度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)、PHS-3C pH仪(上海虹益仪器仪表有限公司)。

1.2 试药

CLT(成都普菲德生物技术有限公司,纯度＞99%,批号:19041101);$mPEG_{2000}$-DSPE(西安瑞禧生物科技有限公司,批号:LP-R4-039);$mPEG_{2000}$-DSPE-RVG29(西安瑞禧生物科技有限公司,批号:R-9985);色谱级冰醋酸(上海麦克林生化科技有限公司,批号:C14357167);色谱级甲醇(上海麦克林生化科技有限公司,批号:M813904);胆固醇(索莱宝生物科技有限公司,批号:C8280);脱氧胆酸钠(索莱宝生物科技有限公司,批号:D8331);

大豆磷脂(上海麦克林生化科技有限公司,批号:L6300);DGG(浙江天伟生物科技有限公司,批号:TW-J500);Tween 80(索莱宝生物科技有限公司,批号:420G011);其他试剂均为分析纯,水为纯水或屈臣氏蒸馏水。

1.3　CLT含量测定方法的建立

1.3.1　色谱条件　采用HPLC测定RVG29-CLT-TFs中CLT的含量。HPLC方法的检测条件:色谱柱:Eclipse XDB-C18柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇:10%醋酸水=95:5;流速:1.0 mL/min;检测波长:425 nm;柱温:35 ℃;进样量:10 μL。

1.3.2　专属性考察　吸取10 μL 60.0 μg/mL的free CLT甲醇溶液和相同浓度RVG29-CLT-TFs溶液,以及空白RVG29-TFs溶液注入高效液相色谱仪,按照"1.3.1"项下色谱条件下进行分析,记录色谱图。

1.3.3　标准曲线的绘制　精密称取CLT标准品10.00 mg,用甲醇溶解并定容至10 mL,配制成母液1.00 mg/mL。精密移取不同体积的母液置于5 mL容量瓶,用甲醇稀释定容至5 mL,得到10.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0、120.0 μg/mL不同浓度的CLT系列溶液,按照"1.3.1"项下色谱条件下进行分析。

1.3.4　精密度考察　日内精密度:3种浓度的CLT甲醇溶液:低(10.00 μg/mL)、中(60.00 μg/mL)、高(120.00 μg/mL),按照既定的HPLC分析,同一天内每个浓度重复测定3次,每隔2 h测定1次,连续进行6 h,考察方法的日内精密度。每个浓度每天测定1次,连续5 d同一时间进样测定,考察方法的日间精密度。

1.3.5　回收率测定　分别配制低(10.00 μg/mL)、中(60.00 μg/mL)、高(120.00 μg/mL)3种浓度的CLT甲醇溶液,取适量加入到RVG29-TFs中,加入3倍量甲醇混合,涡旋振摇5 min使其破乳完全,用甲醇稀释至5 mL,再于10 000 r/min离心20 min,取上清液用0.22 μm滤膜过滤。注入高效液相色谱仪,按照"1.3.1"项下色谱条件下进行分析,计算其RSD值。

1.4　RVG29-CLT-TFs的制备

结合课题组前期工作,采用薄膜水化-超声法制备RVG29-CLT-TFs。具体操作如下:准确称取3.00 mg CLT、50.00 mg大豆磷脂、13.00 mg胆固醇、10.00 mg $mPEG_{2000}$-DSPE、18.00 mg $mPEG_{2000}$-DSPE-RVG29和8.00 mg脱氧胆酸钠溶于5 mL二氯甲烷。在37 ℃水浴下,30 r/min旋转蒸发除去二氯甲烷后,得到均匀的脂质薄膜。加入10 mL蒸馏水,于60 ℃恒温振荡器100 r/min条件下水化30 min,冰浴超声3 min,功率为300 W,即得。

1.4.1　粒径、Zeta电位、多分散指数、形貌及稳定性的测定　DelsaMax PRO贝克曼激光粒度分析仪测定RVG29-CLT-TFs的粒径、多分散指数和Zeta电位。透射电镜下观察RVG29-CLT-TFs形貌。室温条件下连续3 d同一时间测粒径、PDI用于表征其稳定性。

1.4.2　包封率及载药量测定　精密移取1 mL RVG29-CLT-TFs溶液,置于活化完毕的超滤管(MWCO=10 kDa, Millipore)中,6 000 r/min离心40 min。将超滤管中的液体稀释至1 mL,取200 μL制剂加入3倍量甲醇溶液涡旋破乳,按照"1.3.1"项下的色谱方法测定被包载CLT的含量(W_e);另取相同体积的RVG29-CLT-TFs溶液,直接破乳同法测定总CLT量(W_t),并按照下述公式测定包封率:

$$包封率(\%)=W_e/W_t\times100\%$$

另取1 mL RVG29-CLT-TFs,冻干后称量其干粉总质量(W_d),载药量计算公式如下:

$$载药量(\%)=W_e/W_d\times100\%$$

1.5　RVG29-CLT-TFs/DGG处方筛选

1.5.1　不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG的制备　称取不同量DGG粉末置于烧杯中,加入适量的蒸馏水,90 ℃恒温磁力搅拌2 h使其完全溶解,冷却至室温,补水至需要量后,密封,置于4 ℃充分溶胀24 h,得0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4% DGG溶液。将RVG29-CLT-TFs与DGG溶液等体积混合,100 r/min搅拌均匀,即得DGG浓度为0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7% RVG29-CLT-TFs/DGG。

1.5.2　不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG黏度的测定　利用旋转黏度计测量各DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG相变前后的黏度,32～34 ℃条件下进行测定。

1.5.3　不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG临界离子浓度的测定　将50、100、150、200、250、300、350 μL的人工拟鼻溶液分别与1 mL各DGG浓度的RVG29-CLT-TFs/DGG溶液混在离心管,置于32～34 ℃水浴中,30 s后将离心管倒置用于评估凝胶相变情况。若凝胶黏附在底部,未沿着侧面流动或滑动,则认为已完成相变,用"+"表示;易流动或滑动的凝胶用"−"表示,表明未发生相变;而具有中间行为的制剂,即沿着侧面缓慢流动或滑动,用"±"表示。每个样品平行测定3次。

1.5.4　不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG凝

胶强度的测定　根据Galgatte等[11]描述的方法，采用自制装置测定凝胶强度。取适量RVG29-CLT-TFs/DGG溶液与适量的人工鼻液反应形成凝胶后，精密移取50 g相变后RVG29-CLT-TFs/DGG于100 mL量筒中，将35 g砝码置于凝胶顶部，记录砝码下沉5 cm的时间[12]。所有测量在32～34 ℃进行，平行测定3份。

1.5.5　不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG持水能力的测定　精密移取RVG29-CLT-TFs/DGG溶液1 mL，置于已经精密称重的离心管中，分别加入400 μL的人工鼻液与其混合。用滤纸吸干水分，精密称重凝胶质量，记为W_0。8 000 r/min离心10 min，滤纸吸干水分。精密称重凝胶质量，记为W_1。根据水分保持能力的计算公式：水分保持能力(%)=$W_1/W_0\times100\%$[12]。所有测量在32～34 ℃进行，每个样品平行测定3份。

1.5.6　不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG体积膨胀系数的测定　取1 mL RVG29-CLT-TFs/DGG溶液与0.4 mL人工鼻液在10 mL量筒中混合，置于32～34 ℃水浴中，此时液体总体积(V_M)为1.4 mL。继续加人工鼻液2.0 mL，记录液体总体积为V_1。发生相转变后的凝胶体积(V_G)=(V_1－2.0) mL。计算RVG29-CLT-TFs/DGG的膨胀系数$S\%=(V_G-V_M)/V_M\times100\%$，所有测量在32～34 ℃进行，平行测定3份。

1.5.7　不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG pH的测定　用pH计测定RVG29-CLT-TFs/DGG溶液的pH，所有测量在32～34 ℃进行，平行测定3次。

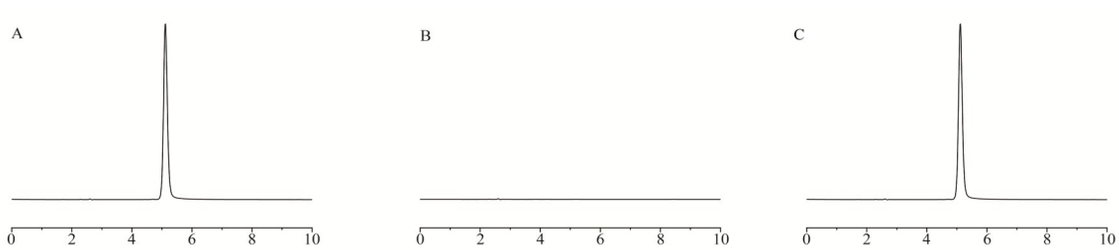
1.6　体外药物释放

采用透析袋法对载药传递体凝胶的体外药物释放行为进行了评价。释放介质选用0.01 moL/L PBS缓冲液(pH=7.4，含1% Tween 80)。按“1.5”项下方法制备RVG29-CLT-TFs/DGG，并与适量人工拟鼻液混合后精密吸取2 mL(1.18 mg CLT)置于分子截留量8 000～14 000 Da的透析袋中，再将扎紧的透析袋置于40 mL释放介质中，于37 ℃条件下的恒温摇床中缓慢振摇孵育。RVG29-CLT-TFs体外药物释放行为研究同上。另取2 mL与RVG29-CLT-TFs/DGG相同浓度的free CLT溶液，同上述方法操作作为对照。于预定时间点(0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72 h)从释放介质中取样1 mL，并同时补充等体积的空白释放介质。涡旋振摇5 min，用已建立的HPLC法检测CLT含量，绘制释放曲线并计算累积释放率。

2　结果

2.1　CLT含量测定方法

专属性实验考察结果见图1，RVG29-TFs溶液在CLT的出峰位置没有峰，表明材料不干扰CLT的测定，该方法的专属性符合要求。



A：free CLT溶液；B：RVG29-TFs溶液；C：CLT-RVG29-TFs溶液

图1　RVG29-CLT-TFs高效液相(HPLC)专属性色谱图

Fig 1　HPLC specificity spectrum of RVG29-CLT-TFs

回归方程为：$As=18\ 866\ C+80\ 348$，$R^2=0.999$，表明CLT在10～120 μg/mL范围内，线性关系良好。精密度考察中测得CLT溶液低、中、高浓度的日内RSD分别为0.44%、0.19%、0.60%，日间RSD分别为1.21%、1.48%、1.75%，日内以及日间精密度均符合要求。同时，低、中、高浓度的平均回收率分别为102.24%、95.85%、103.05%，RSD分别为0.18%、0.13%、0.11%，表明方法的回收率符合要求。

2.2　粒径、Zeta电位、多分散指数、形貌及稳定性的测定

测得RVG29-CLT-TFs平均粒径为(112.33±0.26)nm，多分散指数为0.203±0.018，Zeta电位为(－41.13±1.7) mV，粒径和多分散指数都较小，粒径分布均一。粒径分布见图2。透射电镜观察结果见图3，RVG29-CLT-TFs呈类球形，比较规则圆整。稳定性结果见图4，3 d内RVG29-CLT-TFs粒径、PDI无明显变化，说明其稳定性良好。

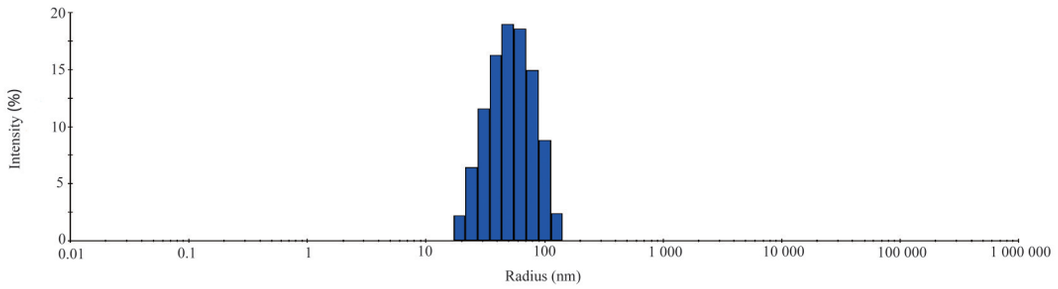


图 2　RVG29-CLT-TFs粒径分布图

Fig 2　Particle size distribution of RVG29-CLT-TFs

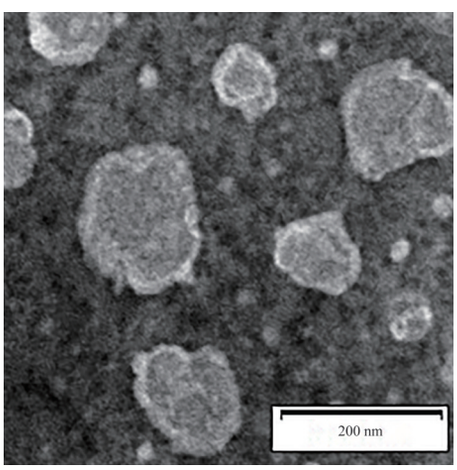


图 3　RVG29-CLT-TFs的TEM图(比例尺=200 nm)

Fig 3　TEM of RVG29-CLT-TFs (scale=200 nm)

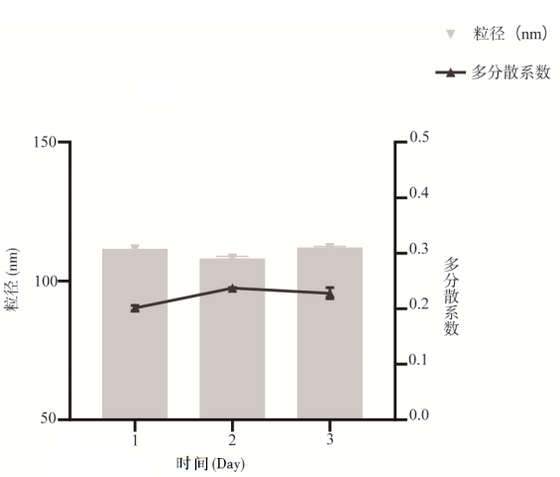


图 4　RVG29-CLT-TFs稳定性结果

Fig 4　Stability result of RVG29-CLT-TFs

2.3　包封率及载药量测定

测得RVG29-CLT-TFs的包封率为(94.22±0.21)%,载药量为(2.31±0.25)%。

2.4　RVG29-CLT-TFs/DGG处方筛选

2.4.1　不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG黏度的测定　利用旋转黏度计测量各DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG相变前后的黏度结果见图5,可以看出随着DGG浓度的升高,RVG29-CLT-TFs/DGG溶液相变前后的黏度也随之增加,而相变前RVG29-CLT-TFs/DGG溶液的黏度远远小于相变后,满足了原位凝胶溶液低黏度而凝胶化后形成的凝胶应具有适宜黏度的要求。

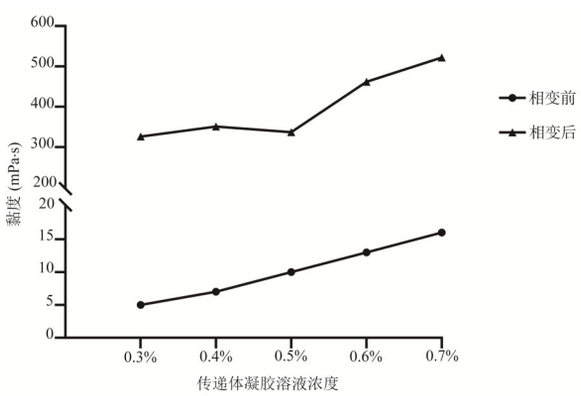


图 5　黏度的测定结果

Fig 5　Measurement results of viscosity

2.4.2　不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG临界离子浓度的测定　当基质用量为0.4%及以下时,需要较大量的人工拟鼻液才能促发RVG29-CLT-TFs/DGG相变;当基质用量为0.7%及以上时,在加入极少或不加人工拟鼻液就能形成凝胶状;而当基质用量为0.5%或0.6%时,需要适量人工拟鼻液即可相变。见表1。

2.4.3　不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG凝胶强度的测定　当基质用量为0.4%及以下时,凝胶强度不够(<20 s);当基质用量为0.7%及以上时,凝胶强度过大(>50 s);而当基质用量为0.4%~0.6%时,凝胶强度符合要求,居于25~50 s。见图6。

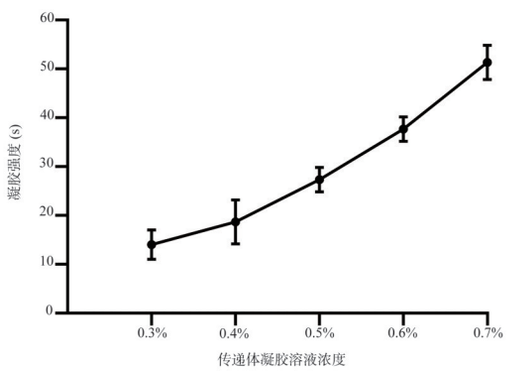
2.4.4　不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG持水能力的测定　各DGG浓度的RVG29-CLT-TFs/

表 1 临界离子浓度的测定结果(n=3)

Tab 1 Determination results of critical ion concentration(n=3)

人工拟鼻液体	传递体凝胶溶液浓度				
积(μL)	0.3%	0.4%	0.5%	0.6%	0.7%
50	−	−	−	−	±
100	−	−	−	±	+
150	−	−	−	+	+
200	−	−	±	+	+
250	−	±	+	+	+
300	±	+	+	+	+
350	+	+	+	+	+

注:+:凝胶未沿着侧面流动或滑动,已完成相变;−:凝胶易流动或滑动,未发生相变;±:凝胶沿着侧面缓慢流动或滑动,具有中间行为。



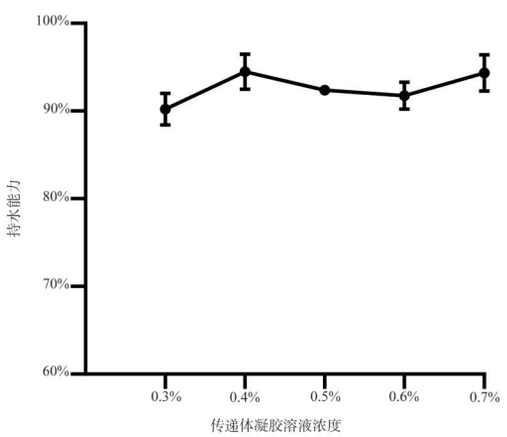
n=3

图 6 凝胶强度的测定结果

Fig 6 Determination results of gel strength

DGG的水分保持能力都高于85%,满足要求。见图7。

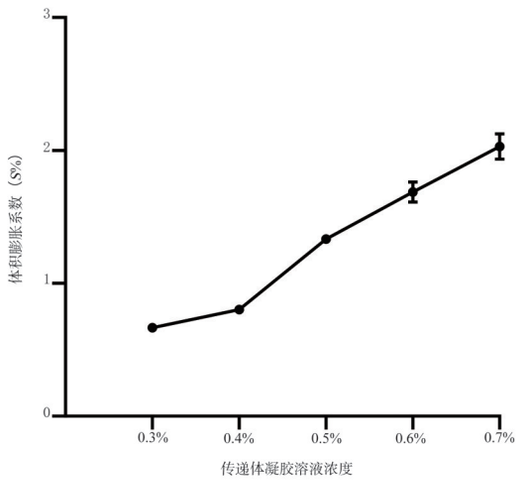
2.4.5 不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG体积膨胀系数的测定 各个DGG浓度的RVG29-CLT-TFs/DGG的S%都低于5%,符合要求。见图8。



n=3

图 7 持水能力的测定结果

Fig 7 Measurement results of water holding capacity

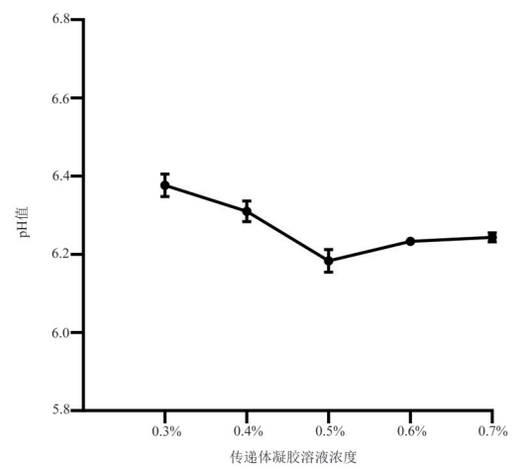


n=3

图 8 体积膨胀系数的测定结果

Fig 8 Measurement results of volume expansion coefficient

2.4.6 不同DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG pH的测定 用pH计测得各个DGG浓度的传递体原位凝胶溶液的pH值都介于5.5~7.0,符合要求。见图9。综合考察结果,最终选择浓度为1.0% DGG作为凝胶基质用于后续研究。



n=3

图 9 pH值的测定结果

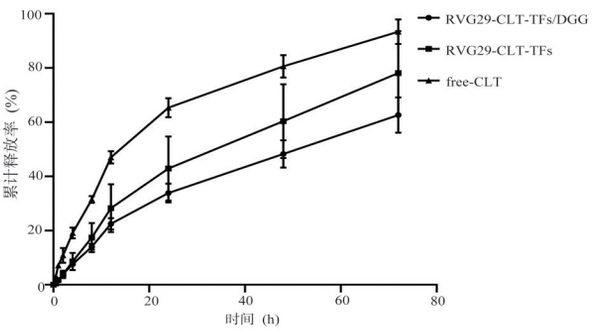
Fig 9 Measurement results of pH value

2.5 最佳处方工艺的确定

采用薄膜水化-超声法制备RVG29-CLT-TFs,将RVG29-CLT-TFs与1.0% DGG溶液按1∶1(v/v)混合,100 r/min搅拌均匀,即得橙黄色的RVG29-CLT-TFs/DGG凝胶溶液。

2.6　体外药物释放

相较于Free CLT和RVG29-CLT-TFs组，RVG29-CLT-TFs/DGG的释放时间明显延长，72 h内累积释放量为(59.44±1.22)%，而RVG29-CLT-TFs和free CLT则分别达到(74.79±2.17)%和(94.55±2.64)%。见图10。



n=3

图10　CLT的释放曲线

Fig 10　Release curve of CLT

3　讨论

结合本课题组前期工作和参考文献[13]，确定RVG29-PEG_{2000}-DSPE与mPEG_{2000}-DSPE投药量比为2∶1(m/m)。比例过高时，制备的RVG29-CLT-TFs出现沉淀，可能是TFs表面连接的RVG29肽的数目过多导致RVG29-CLT-TFs的稳定性下降并出现了聚集。比例过低时，TFs表面连接的RVG29数量较少，不利于介导RVG29-CLT-TFs的主动靶向。所以综合考虑TFs的稳定性和RVG29偶联密度，最终确定了制备方法。制得RVG29-CLT-TFs粒径分布在110 nm左右，分布均一，包封率、载药量较高，且稳定性较好。该比例TFs表面连接的RVG29数利于介导主动靶向。

本研究将RVG29-CLT-TFs与不同浓度DGG溶液等体积混匀制得不同DGG浓度的RVG29-CLT-TFs/DGG，并对其理化性质进行考察。最终确定1.0% DGG为最佳浓度，0.5% RVG29-CLT-TFs/DGG为最佳处方。测得0.5% RVG29-CLT-TFs/DGG在溶液状态下的黏度为(10.33±0.47) mPa·s，与人工拟鼻液反应发生相变后，黏度变为(337.00±0.82) mPa·s，相变后的黏度远大于相变前的黏度，即以低黏度的溶液态给药时，能更好地流入鼻腔，进入鼻腔后，与鼻腔内阳离子络合相变形成的凝胶，有效吸附于鼻黏膜上，可延长药物的经鼻入脑时间，满足鼻腔给药制剂的要求。凝胶强度[14]被定义为高分子聚合物形成和维持凝胶形态的能力的量度。在正常生理条件下，鼻纤毛以每分钟1 000次的速率振荡。凝胶强度要求一般在25～50 s范围内，经测0.5% RVG29-CLT-TFs/DGG的凝胶强度为(30.0±0.8)s，介于25～50 s，既可抵抗鼻纤毛的清除，保护凝胶完整性的同时，又能实现药物在鼻腔中特定吸收部位的持续释放，满足要求。水分保持能力对保持凝胶在储存或受到外力作用时发挥稳定作用有重要意义，测得各DGG浓度RVG29-CLT-TFs/DGG的水分保持能力高于85%，具有优良的水分保持能力。由于人体鼻腔容积有限，过大的凝胶体积膨胀系数S%导致鼻腔不适，要求S%低于5%，0.5% RVG29-CLT-TFs/DGG的S%为(1.33±0.02)%，低于5%。鼻用凝胶剂对鼻腔黏膜的刺激性与pH值密切相关，要求原位凝胶的pH应与鼻腔黏液的pH值相近，鼻腔黏液的pH值通常在5.5～7.0，测得0.5% RVG29-CLT-TFs/DGG的pH值为6.18±0.02，介于5.5～7.0，满足要求。临界离子浓度是促使离子型原位凝胶发生相变的最小离子浓度[12]，1 mL RVG29-CLT-TFs/DGG只需要250 μL人工拟鼻液就能发生相变，有效黏附于鼻腔黏膜表面，减缓鼻腔的清除。

由于CLT水溶性差，本研究选用含1% Tween 80的0.01 moL/L PBS缓冲液(pH=7.4)作为释放介质，采用透析袋法初步考察了RVG29-CLT-TFs/DGG的释药行为。实验结果显示，相较于free CLT和RVG29-CLT-TFs，RVG29-CLT-TFs/DGG的释放时间明显延长，说明其达到缓释作用。

本实验针对CLT治疗PD的优势和不足，借助“鼻-脑”通路，采用构建的多功能传递体原位凝胶递药系统将CLT递送至多巴胺能神经元处，通过抑制神经炎症、抗氧化应激修复损伤的多巴胺能神经元，以实现神经保护作用的目的。后期笔者将对该递药系统的鼻脑转运效率、PD的治疗效果及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。

作者贡献度说明：

郑维莉、钟靓、程光琴、闫汉语：课题设计，实验执行，数据处理与分析，论文撰写；郭玲：实验指导，论文修改，课题指导，经费支持；张永萍、徐剑：论文审阅，论文修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Kalia LV, Lang AE. Parkinson′s disease[J]. Lancet, 2015, 386(9996): 896-912.

2 Zhang C, Zhao M, Wang B, et al. The Nrf2-NLRP3-caspase-1 axis mediates the neuroprotective effects of Celastrol in Parkinson′s disease[J]. Redox Biol, 2021, 47: 102134.

3 Li X, Liu W, Jiang G, et al. Celastrol ameliorates neuronal mitochondrial dysfunction induced by intracerebral hemorrhage *via* targeting cAMP-activated exchange protein-1[J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11(19): e2307556.

4 Guo L, Qu B, Song C, et al. Celastrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity by regulating the miR-146a/PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in differentiated rat pheochromocytoma cells[J]. J Affect Disord, 2022, 316: 233-242.

5 Fan N, Zhao J, Zhao W, et al. Celastrol-loaded lactosylated albumin nanoparticles attenuate hepatic steatosis in non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Control Release, 2022, 347: 44-54.

6 Jeong SH, Jang JH, Lee YB. Drug delivery to the brain *via* the nasal route of administration: Exploration of key targets and major consideration factors[J]. J Pharm Invest, 2023, 53(1): 119-152.

7 Luiz MT, Viegas JSR, Abriata JP, et al. Docetaxel-loaded folate-modified TPGS-transfersomes for glioblastoma multiforme treatment[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021, 124: 112033.

8 Matharoo N, Mohd H, Mickniak-kohn B. Transferosomes as a transdermal drug delivery system: Dermal kinetics and recent developments[J]. WIREs Nanomed Nanobiotechnol, 2024, 16(1): e1918.

9 Hao R, Sun B, Yang L, et al. RVG29-modified microRNA-loaded nanoparticles improve ischemic brain injury by nasal delivery[J]. Drug Delivery, 2020, 27(1): 772-781.

10 Huang G, Xie J, Shuai S, et al. Nose-to-brain delivery of drug nanocrystals by using Ca^{2+} responsive deacetylated gellan gum based in situ-nanogel[J]. Int J Pharmaceut, 2021, 594: 120182.

11 Galgatte UC, Kumbhar AB, Chaudhari PD. Development of *in situ* gel for nasal delivery: Design, optimization, *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. Drug Delivery, 2014, 21(1): 62-73.

12 谢慧超. 基于“鼻-脑”转运的PAMAM纳米复合物-原位凝胶递药系统的构建与评价研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2020.
Xie HC. Construction and evaluation of PAMAM nanocomposite-in-situ gel drug delivery system based on "nose-brain" transport[D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2020.

13 Qu M, Lin Q, He S, et al. A brain targeting functionalized liposomes of the dopamine derivative N-3,4-bis(pivaloyloxy)-dopamine for treatment of Parkinson′s disease[J]. J Control Release, 2018, 277: 173-182.

14 荆紫琪, 王雪, 闫天月, 等. 靶向叶酸受体和线粒体的载雷公藤红素PAMAM纳米递药系统构建及体外抗炎作用[J]. 药学学报, 2023, 58(3): 550-559.
Jing ZQ, Wang X, Yan TY, et al. Construction of celastrol-loaded PAMAM nano-drug delivery system targeting folate receptor and mitochondria and its anti-inflammatory effect *in vitro*[J]. Acta Pharmaceut Sin, 2023, 58(3): 550-559.

[本文编辑] 朱金月