说　明　书

一种难治型溃疡性结肠炎灌肠剂及其制备方法

技术领域

本发明属于药物研发技术领域，具体地说，涉及一种难治型溃疡性结肠炎灌肠剂及其制备方法。

背景技术

难治型溃疡性结肠炎（RUC）定义为对激素治疗无效或对激素依赖、不能耐受激素的溃疡性结肠炎患者（UC 患者），具有经规范化具有经规范化、系统化的内科治疗后仍无效、病情长期不能缓解、易反复发作等特点，发生率约占重症 UC 患者的 30%。长时间难控制的慢性炎症为肿瘤发生提供了适宜的微环境，癌变是 UC 患者死亡的重要原因。流行病学研究表明，UC 是结直肠癌发病的高危因素，病程越长，发生癌变的风险越大，病程 8-15 年，癌变率约 22％。

UC 患者因耐药、体质因素等影响对常规氨基水杨酸类药物和糖皮质激素治疗无反应。主要的机制有：①合并巨细胞病毒(CMV)感染导致 GR 有效数目减少。CMV 可引起 T 细胞功能障碍，使得 CD4+T 细胞可产生大量的 Th1 型细胞因子，如 IFN - γ 和 TNF - α，从而加剧了炎症反应。此外，CMV 还可激活 NF - κ B 信号通路，增加促炎细胞因子表达，导致炎症反应恶化。炎性因子 IL - 2、IL - 4 等可激活诱导 AP - 1、NF - κB 表达增加，使其与 GR 形成复合物，从而使 GR 有效数目减少、效应降低，产生激素抵抗；②糖皮质激素受体(GR)功能紊乱致糖皮质激素信号途径受损。糖皮质激素的药理作用依赖于 GR，而 GR 有 GRα 、GRβ 两种类型，其中 GRα 能够结合糖皮质激素，具有生理药理活性，而 GRβ 无此生物学功能，但具有拮抗 GRα 的作用。张虎等对溃疡性结肠炎患者肠粘膜细胞中 GRα 与 GRβ 表达与糖皮质激素治疗反应以及严重程度之间关系进行分析，发现存在激素抵抗的患者 GRα /GRβ 明显下降。表明除了体内总体 GR 表达水平影响患者的激素反应

外，亚型的比例失调也是导致糖皮质激素抵抗的重要原因。

另外，作为炎症性疾病，肠道粘膜在异常炎症反应下也存在严重受损，病情无法缓解。并且，目前多数研究认为溃疡性结肠炎相关癌变(UCAC) 的发生经历了“炎症-不典型增生-癌症”模式发病，癌变的风险与炎症反应持续的时间和严重程度呈正比。

因此，难治型溃疡性结肠炎的具有以下问题：第一，各种机制导致 GR 有效数目减少与亚型比例失调，最终造成无常规药可用；第二，炎症反应剧烈，肠道粘膜的完整性严重受损，延缓了病情缓解的速度，导致病程延长，致癌风险增高。

现有治疗主要分为手术治疗和口服药物治疗，但都存在不足。预防性结肠切除手术虽可预防癌变的发生，但对患者的生存质量影响很大；药物治疗分为西药与中药两大类型，免疫抑制剂的不良反应多，如骨髓抑制和肾毒性，尤其是与氨基水杨酸联合应用时，会增加不良反应的发生；新型药物治疗如生物制剂：抗 TNF-α 单抗：英夫利昔单抗(IFX)、阿达木单抗(ADA)等；$\alpha_4\beta_7$ 整合素单抗：维多珠(vedolizumab)；非选择性 JAK 抑制剂：托法替尼(Tofacitinib)，对患者治疗代价高、也存在不良反应如 IFX 会造成机会性感染、迟发性变态反应、药源性狼疮、托法替尼还会出现胆固醇水平增高。而中药治疗方案大多需要先针对本病进行中医临床分型，再进行治疗。但迄今为止，尚未形成统一的分型标准，且药方多为自拟方或传统方剂的加减运用，主要为经验方，目前尚未形成公认的规范和标准，目前临床上缺乏最佳药物配比的复方药物，尚不能推广运用。

目前，临床也有中药或西药局部灌肠疗法，并取得不错的效果。作为灌肠剂，灌肠治疗方式自身具有优势。溃疡性结肠炎的病变部位大部分位于直肠及结肠下段，灌肠治疗作用直接、疗效显著，具有明显优势，其优点在于：一方面灌肠给药可使药物直达病所，并使之充分接触病灶，从而快速提高病变部位的血药浓度，使药物迅速被吸收，充分发挥药物的局部治疗作用；另一方面，药物经结直肠吸收后，大部分可不经过肝脏而直接进入体循环，对全身发挥治疗作用，减少了肝脏解毒过程对药效的影响。直肠给药还可以防止胃肠道酸碱和消化酶对药物的破坏，能够实现药物减量，避免大剂量药物

治疗造成的严重全身不良反应，特别对年老体弱，或同时患有消化系统疾病、不宜口服药物的患者更具有重要意义。但灌肠液的肠道黏附性不足，就需要增加灌肠次数或要求患者配合延长灌肠液的肠道停留时间来达到药效，常配合口服药物作为难治型溃结的辅助疗法。而灌肠存在肠道停留时间短、操作复杂、使用次数频繁等不足，影响患者的就医体验和治疗依从性，从而进一步影响本身的治疗效果，难以充分发挥出灌肠这一治疗本身的优势。更重要的是，目前的灌肠剂成分也无法针对难治型溃疡性结肠炎起到有效的治疗效果。

因此，有必要提供一种新的难治型溃疡性结肠炎灌肠剂。

发明内容

有鉴于此，本发明针对上述的问题，提供了一种难治型溃疡性结肠炎灌肠剂及其制备方法。

为了解决上述技术问题，本发明公开了一种难治型溃疡性结肠炎灌肠剂，按照质量百分比由以下组分构成：黑麦酮酸 D 0.03%-0.16%；苦石莲提取物 M2 0.03%-0.09%；生地黄提取物 2.5%-3.8%；丁酸甘油酯 0.13%-0.5%；尼古丁 0.008%-0.032‰；鱼腥草多糖 0.48%-1.29%；粉防己碱 0.62%-1.8%；氢化可的松 0.03%-0.3‰；巯基化壳聚糖 10%-14%；N-异丙基丙烯酰胺 8%-12% ；甘油 16%-20% ；焦亚硫酸钾 0.8%-1%，余量为蒸馏水，以上质量总量为 100%，pH 为 6-7。

可选地，按照质量百分比由以下组分构成：黑麦酮酸 D 0.09%-0.1%；苦石莲提取物 M2 0.06%-0.07%；生地黄提取物 3%-3.2%；丁酸甘油酯 0.2%-0.4%；尼古丁 0.01%-0.03‰；鱼腥草多糖 0.7%-1.1%；粉防己碱 0.62%-1.8%；氢化可的松 0.2‰；巯基化壳聚糖 12%；N-异丙基丙烯酰胺 11%；甘油 18%；焦亚硫酸钾 0.9%，余量为水，以上质量总量为 100%，pH 为 6-7。

本发明还公开了一种难治型溃疡性结肠炎灌肠剂的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1、制备生地黄提取液：

步骤 2、制备鱼腥草多糖：

步骤 3、按照质量百分比称量以下组分：黑麦酮酸 D 0.03%-0.16%；苦石莲提取物 M2 0.03%-0.09%；生地黄提取物 2.5%-3.8%；丁酸甘油酯 0.13%-0.5%；尼古丁 0.008%-0.032‰；鱼腥草多糖 0.48%-1.29%；粉防己碱 0.62%-1.8%；氢化可的松 0.03%-0.3‰；巯基化壳聚糖 2%-4%；N-异丙基丙烯酰胺 8%-12% ；甘油 16%-20% ；焦亚硫酸钾 0.8-1%，余量为蒸馏水；

步骤 4、制备酶温双敏型水凝胶成分：将称量好的 N-异丙基丙烯酰胺、甘油与巯基化壳聚糖加入 35%的蒸馏水中磁力搅拌至溶胀均匀，使其充分溶胀并反应；再加入称量好的焦亚硫酸钾、黑麦酮酸 D、苦石莲提取物 M2、生地黄提取物、丁酸甘油酯、尼古丁、鱼腥草多糖、粉防己碱和氢化可的松，室温搅拌均匀后加水至全量，并加入 pH 值调节剂，调节 pH 值至 6-7 内，搅拌均匀，制备得到酶温双敏型水凝胶成分；

步骤 5、均质：采用管线式均质机均质，搅拌均匀；

步骤 6、灌装：无菌室温灌装于给药器中，外包装。

可选地，所述步骤 1 中的制备生地黄提取液具体为：将地黄在 40-50℃温度条件下烘焙至八成干，粉碎过 40 目筛，按液料比 15:1-25: 1（ mL/g）加入 70%乙醇，在 25-35℃温度条件下超声处理 35-45 min，提取 2 次，再过滤，分离，浓缩出提取液，真空干燥至恒重，制备得到生地黄提取物。

可选地，所述步骤 2 中的制备鱼腥草多糖具体为：将鱼腥草晒干，粉碎，过 100 目筛，制备得到鱼腥草干粉，将鱼腥草干粉置于锥形瓶中，按液料比 35:1-45: 1（mL/g）加入 70%乙醇、超声功率 72 W、超声温度 60-70℃、超声时间 20-30min，过滤分离出提取液；将提取液装入离心管中以 2500-3500 r/min 离心 15-25 min，收集上清液，倾入圆底烧瓶中冷凝回流浓缩至 2 mL，转移到试管中冷却；于浓缩液中加入无水乙醇 8 mL，在 4℃静置 12h 醇沉，然后以 2500-3500 r/min 离心 15-25 min，弃去上清液，留取沉淀，制备得到鱼腥草多糖。

可选地，所述鱼腥草干粉通过索氏提取器进行石油醚浸泡，70-80V 电压下电加热套加热回流 4 次完成脱脂、风干 12h 后再用甲醇加热回流 5 次进行脱色，最后自然风干制备得到。

可选地，所述步骤 4 中的磁力搅拌时间为 50-60℃，转速为 350-450r/min。

可选地，所述步骤 4 中的溶胀反应时间为 10-15h。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

本发明针对难治性溃疡性结肠炎的病因机制，运用有效药物成分通过上调结肠粘膜细胞 GRα 的表达与激活其下游反应和减轻炎症对 GRα 有效数目的影响，解除糖皮质激素抵抗的问题。同时制备了酶温双敏型水凝胶作为灌肠剂，达到与肠粘膜黏附并缓慢持久地释放药物，克服了灌肠液停留时间短，操作麻烦，使用次数多而对病人的造成的肠道刺激与治疗不适感，能够实现灌肠剂在溃结治疗中作为主治疗手段，并发挥出传统中药与西药结合的治疗优势，弥补目前难治型溃疡性结肠炎尚无便捷有效的灌肠治疗的空缺。

当然，实施本发明的任一产品并不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 是本发明粉防己碱累计释放度；

图 2 是本发明各组小鼠体重变化。

具体实施方式

以下将配合实施例来详细说明本发明的实施方式，藉此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。

本发明公开了一种难治型溃疡性结肠炎灌肠剂，按照质量百分比由以下组分构成：黑麦酮酸 D 0.03%-0.16%；苦石莲提取物 M_2 0.03%-0.09%；生地黄提取物 2.5%-3.8%；丁酸甘油酯 0.13%-0.5%；尼古丁 0.008%-0.032‰；鱼腥草多糖 0.48%-1.29%；粉防己碱 0.62%-1.8%；氢化可的松 0.03%-0.3‰；巯基化壳聚糖 12%-14%；N-异丙基丙烯酰胺 8%-12% ；甘油 16%-20%；焦亚硫酸钾 0.8%-1%，余量为水，以上质量总量为 100%；苦石莲提取物 M_2

根据文章天然产物M2与V11治疗溃疡性结肠炎的作用及机制研究(向钢. 天然产物 M2 与 V11 治疗溃疡性结肠炎的作用及机制研究[D]. 江苏:南京大学,2016.)制备得到。

其中，1)运用黑麦酮酸D，苦石莲提取物M2，生地黄，增强结肠细胞GRα的表达与作用。黑麦酮酸 D 是一个微生物来源的天然产物，具有抗真菌和抗肿瘤的活性，其对 GRα 的转录调控作用具有激动活性，可明显上调其 mRNA 表达量；苦石莲提取物 M2 能够靶向 GR，促进 GR 入核，增强 GRα 作用。

熟地黄可以上调 GRα 的结合力，实现低浓度的糖皮质激素使用来发挥治疗作用，大大减轻其造成的机体不良反应，此中药多在溃结以外的其他自身免疫性疾病中的治疗中运用。但是，同时，各种方法炮制而成的熟地黄最终因为高温与炮制时间的影响使得其中的有效成分含量有所减少，并产生了大量的 5-羟甲基-2-糠醛(5-HMF)，其药理效果根据剂量增长会从有利转为有害，特别是对于结肠具有剂量依赖性的毒理效果，如刺激结肠小囊异常生长，增加致癌风险。本发明采用生地黄温热提取法，与传统炮制而成的熟地黄相比，避免了前期炮制过程对有效成分的损伤，并大大减少 5-HMF 的含量，避免其发挥毒理作用，适当保留了其对于血液流变学的改善能力。

2)使用丁酸、尼古丁和鱼腥草多糖、粉防己碱等中药单体成分，修复肠粘膜、抑制炎症，减少癌变风险，也可以减轻炎症激活对 GRα 有效数目的影响。

丁酸盐是结肠黏膜的代谢底物，并且为肠黏膜上皮细胞合成紧密连接蛋白的必要条件，最终促进肠上皮细胞增殖分化提高肠黏膜的完整性；能刺激结肠黏膜细胞吸收钠水。溃疡性结肠炎的结肠上皮可能处于某种能量缺乏状态，丁酸盐可能通过纠正这种结肠上皮能量缺乏，促进细胞修复及炎症缓解，助于 RUC 治疗。丁酸也有抗炎作用，内在机制为：UC 患者发病时肠壁组织内的 T 淋巴细胞的持续异常活化，造成肠壁的损伤，丁酸可以通过增强组蛋白 H3 在 Foxp3 启动子中的乙酰化作用和结合肠上皮细胞的 GPR43 激活转录因子 STAT3 和 mTOR 途径,促进产生 IL-10 的 CD4+T 细胞以及 Th1 和 Th17 细胞的分化,抑制肠粘膜免疫反应发挥抗炎作用;丁酸还可以通过抑制 NF-κB

通路下调促炎因子 TNF-α、IL-1β 表达，也有助于缓解糖皮质激素抵抗。

尼古丁可以刺激迷走神经释放乙酰胆碱，进而作用于烟碱型乙酰胆碱受体，达到降低肠道感觉神经元的兴奋性的作用。此外，尼古丁还可改善微循环，抑制花生四烯酸代谢产物的生成，调节肠道运动能力，促进肠道黏蛋白的合成。CO 同样具有抗炎作用，其机制可能为抑制中性粒细胞聚集，减少结肠 TNF、IL-4 的表达，通过血红素加氧酶-1(HO-1)途径促进抗炎细胞因子 IL-10 的产生。

鱼腥草多糖（HCP）含有葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、半乳糖醛酸等丰富的单糖组成成分，并证实其具有消炎抑菌、抗病毒、免疫调节、肠道保护及抗氧化等多种活性功能。并且可松弛肠道平滑肌作用可减轻肠痉挛，缓解临床症状。

粉防己碱可升高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 活性, 降低丙二醛(malondialdehyde, MDA) 含量和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO) 活性，提升机体抗氧化能力，减轻肠道黏膜的损伤，从而治疗 UC。

本发明还公开了一种难治型溃疡性结肠炎灌肠剂的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1、制备生地黄提取液：将地黄在 40-50℃温度条件下烘焙至八成干，粉碎过 40 目筛，按液料比 15:1-25：1（mL/g）加入 70%乙醇，在 25-35℃温度条件下超声处理 35-45 min，提取 2 次，再过滤，分离，浓缩出提取液，真空干燥至恒重，制备得到生地黄提取物；

步骤 2、制备鱼腥草多糖：晒干，粉碎，过 100 目筛，称取鱼腥草干粉，置于锥形瓶中，按液料比 35:1-45：1(mL/g)加入 70%乙醇、超声功率 72 W、超声温度 60-70℃、超声时间 20-30min，过滤分离出提取液；将提取液装入离心管中以 2500-3500 r/min 离心 15-25 min，收集上清液，倾入圆底烧瓶中冷凝回流浓缩至 2 mL，转移到试管中冷却；于浓缩液中加入无水乙醇 8 mL，在 4℃静置 12h 醇沉，然后以 2500-3500 r/min 离心 15-25 min，弃去上清液，留取沉淀，制备得到鱼腥草多糖；

其中，鱼腥草干粉通过索氏提取器进行石油醚浸泡，电加热套（70-80V）加热回流 4 次完成脱脂、风干 12h 后再用甲醇加热回流 5 次进行脱色，最后

自然风干制备得到。

步骤 3、按照质量百分比称量以下组分：黑麦酮酸 D 0.03%-0.16%；苦石莲提取物 M2 0.03%-0.09%；生地黄提取物 2.5%-3.8%；丁酸甘油酯 0.13%-0.5%；尼古丁 0.008%-0.032‰；鱼腥草多糖 0.48%-1.29%；粉防己碱 0.62%-1.8%；氢化可的松 0.03%-0.3‰；巯基化壳聚糖 12%-14%；N-异丙基丙烯酰胺 8%-12% ；甘油 16%-20% ；焦亚硫酸钾 0.8%-1%；余量为水，以上质量总量为 100%；

步骤 4、制备酶温双敏型水凝胶成分：将称量好的 N-异丙基丙烯酰胺、甘油与巯基化壳聚糖加入 35%的蒸馏水中 50-60℃下 350-450r/min 磁力搅拌至溶胀均匀，使其充分溶胀并反应 10-15h；再加入称量好的焦亚硫酸钾、黑麦酮酸 D、苦石莲提取物 M2、生地黄提取物、丁酸甘油酯、尼古丁、鱼腥草多糖、粉防己碱和氢化可的松，室温搅拌均匀后再加入余量的蒸馏水至全量，并加入 pH 值调节剂，调节 pH 值至 6-7 内，搅拌均匀，制备得到酶温双敏型水凝胶成分；

步骤 5、均质：采用管线式均质机均质，搅拌均匀；

步骤 6、灌装：无菌室温灌装于给药器中，外包装。

在剂型制备上，本发明特别制备了酶温双敏型水凝胶作为灌肠剂，其好处是：本发明所述的酶温双敏型灌肠凝胶剂的胶凝温度在 37℃左右，接近于体温，能保证其在体温下迅速胶凝附着与肠道表面，与传统灌肠液相比停留在肠道粘膜时间更长，从而延长了药物作用时间；此外，壳聚糖可被结肠处所特有的糖苷酶降解，靶向性强，并且作为天然多糖，生物相容性较高、稳定、无毒，通过调节降解速率控制药物释放；在其侧链上进行巯基化后所得的产物能够与粘膜中富含的半胱氨酸发生类似“受体一配体”的特异性结合，形成作用力强，能显著改善生物粘附性，有效的减缓了纤毛的清除作用，并能提高药物对细胞膜的透过性。这种新型的巯基化壳聚糖- N-异丙基丙烯酰胺凝胶同时具备了生物相容性高、酶降解特异性的生物可降解性和较好的粘膜黏附性，从而达到缓慢持久地释放药物，克服了灌肠液停留时间短，操作麻烦，使用次数多而对病人的造成的肠道刺激与治疗不适感。

实施例 1-10 与对比例 1-6 的配方表见表 1。

表 1 实施例 1-10 与对比例 1-6 的配方表

	重量百分比（%）	实施例							
		1	2	3	4	5	6	7	8
黑麦酮酸 D（%）	0.03-0.16	0.1	0.03	0.03	0.09	0.09	0.014	0.16	0.01
苦石莲提取物 M2（%）	0.03-0.09	0.07	0.03	0.03	0.06	0.06	0.08	0.09	0.07
生地黄（%）	2.5-3.8	3.2	2.5	2.5	3	3	3.5	3.8	3.2
熟地黄（%）	-	-	-	-	-	-	-	-	-
丁酸甘油酯（%）	0.13-0.5	0.4	0.5	0.35	0.35	0.2	0.2	0.13	0.4
尼古丁（‰）	0.008-0.032	0.02	0.032	0.025	0.025	0.01	0.01	0.008	0.02
鱼腥草多糖（%）	0.48-1.29	0.9	1.29	1.1	1.1	0.7	0.7	0.48	0.9
粉防己碱（%）	0.62-1.8	1.2	1.8	1.4	1.4	0.8	0.8	0.62	1.2
雷公藤甲素（%）	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氢化可的松（‰）	0.03-0.3	0.2	0.3	0.25	0. 2	0.2	0.1	0. 03	0.2
巯基化壳聚糖（%）	12-14	12	12	12	12	12	12	12	10
羟丙甲基纤维素（%）	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-异丙基丙烯酰胺（%）	8-12	11	11	11	11	11	11	11	15
甘油（%）	16-20	18	18	18	18	18	18	18	20
焦亚硫酸钾（%）	0.8-1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8
	重量百分比	实施例		对比例					
		9	10	1	2	3	4	5	6
黑麦酮酸 D（%）	0.03-0.16	0.01	0.01	-	0.01	0.1	-	0.01	0.01
苦石莲提取物 M2（%）	0.03-0.09	0.07	0.07	-	0.07	0.07	-	0.07	0.07
生地黄（%）	2.5-3.8	3.2	3.2	-	-	3.2	-	3.2	3.2
熟地黄（%）	-	-	-	-	3.2	-	3.2	-	-
丁酸甘油酯（%）	0.13-0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	-	-	0.4	0.4
尼古丁（‰）	0.008-0.032	0.02	0.02	0.02	0.02	-	-	0.02	0.02
鱼腥草多糖（%）	0.48-1.29	0.9	0.9	0.9	0.9	-	-	0.9	0.9
粉防己碱（%）	0.62-1.8	1.2	1.2	1.2	1.2	-	-	1.2	1.2
雷公藤甲素（%）	-	-	-	-	-	3	3	-	-
氢化可的松（‰）	0.03-0.3	0.2	0.2	1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
巯基化壳聚糖（%）	12-14	13	14	12	12	12	12	-	-
羟丙甲基纤维素（%）	-	-	-	-	-	-	-	-	12
N-异丙基丙烯酰胺（%）	8-12	10	5	11	11	11	11	16	11
甘油（%）	16-20	17	14	18	18	18	18	23	18
焦亚硫酸钾（%）	0.8-1	0.9	1	0.9	0.9	0.9	0.9	1	0.9

实施例 1

实施例 1 中的组分见表 1 中的实施例 1 中的数据，实施例 1 中的难治型溃疡性结肠炎灌肠剂的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1、制备生地黄提取液：地黄 45℃烘焙至约八成干，粉碎过 40 目筛，超声波辅助提取生地黄成分：用按液料比 20：1（ mL/g） 70％乙醇，在温度 30℃时超声处理 40 min，提取 2 次，再过滤，分离，浓缩出提取液，真空干燥至恒重，制备得到生地黄提取物；

步骤 2、制备鱼腥草多糖：晒干，粉碎，过 100 目筛，将鱼腥草干粉，置于锥形瓶中，按液料比 40：1（ mL/g）加入 70％乙醇、超声功率 72 W、超声温度 65℃、超声时间 25 min，过滤分离出提取液；将提取液装入离心管中以 3 000 r/min 离心 20min，收集上清液，倾入圆底烧瓶中冷凝回流浓缩至 2 mL，转移到试管中冷却；于浓缩液中加入无水乙醇 8mL，在 4℃静置 12 h 醇沉，然后以 3000 r/min 离心 20 min，弃去上清液，留取沉淀，制备得到鱼腥草多糖；

其中，鱼腥草干粉通过索氏提取器进行石油醚浸泡，70-80V 电压下电加热套加热回流 4 次完成脱脂、风干 12h 后再用甲醇加热回流 5 次进行脱色，最后自然风干制备得到。

步骤 3、按照表 1 中实施例 1 中的各组分含量称量各组分；

步骤 4、制备酶温双敏型水凝胶成分：将称量好的 N-异丙基丙烯酰胺、甘油与巯基化壳聚糖加入 35%的蒸馏水中 55℃下 400r/min 磁力搅拌至溶胀均匀，使其充分溶胀并反应 12h。再加入称量好的焦亚硫酸钾、黑麦酮酸 D、苦石莲提取物 M2、生地黄提取物、丁酸甘油酯、尼古丁、鱼腥草多糖、粉防己碱和氢化可的松，室温搅拌均匀后加水至全量，并加入 pH 值调节剂，调节 pH 值至 6-7 内，搅拌均匀；

步骤 5、均质：采用管线式均质机均质，搅拌均匀；

步骤 6、灌装：无菌室温灌装于给药器中，外包装。

实施例 2

实施例 2 中的组分见表 1 中的实施例 2 中的数据，实施例 2 中的难治型

溃疡性结肠炎灌肠剂的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1、制备生地黄提取液：将地黄在 40℃温度条件下烘焙至八成干，粉碎过 40 目筛，按液料比 25: 1（mL/g）加入 70％乙醇，在 25℃温度条件下超声处理 45 min，提取 2 次，再过滤，分离，浓缩出提取液，真空干燥至恒重，制备得到生地黄提取物；

步骤 2、制备鱼腥草多糖：晒干，粉碎，过 100 目筛，将鱼腥草干粉，置于锥形瓶中，按液料比 35:1（mL/g）70％乙醇、超声功率 72 W、超声温度 70℃、超声时间 20min，过滤分离出提取液；将提取液装入离心管中以 3500 r/min 离心 15min，收集上清液，倾入圆底烧瓶中冷凝回流浓缩至 2 mL，转移到试管中冷却；于浓缩液中加入无水乙醇 8 mL，在 4℃静置 12h 醇沉，然后以 2500r/min 离心 25 min，弃去上清液，留取沉淀，制备得到鱼腥草多糖；

其中，鱼腥草干粉通过索氏提取器进行石油醚浸泡，70-80V 电压下电加热套加热回流 4 次完成脱脂、风干 12h 后再用甲醇加热回流 5 次进行脱色，最后自然风干制备得到。

步骤 3、按照表 1 中实施例 2 中的各组分含量称量各组分；

步骤 4、制备酶温双敏型水凝胶成分：将称量好的 N-异丙基丙烯酰胺、甘油与巯基化壳聚糖加入 35%的蒸馏水中 50℃下 450r/min 磁力搅拌至溶胀均匀，使其充分溶胀并反应 10h；再加入称量好的焦亚硫酸钾、黑麦酮酸 D、苦石莲提取物 M2、生地黄提取物、丁酸甘油酯、尼古丁、鱼腥草多糖、粉防己碱和氢化可的松，室温搅拌均匀后加水至全量，并加入 pH 值调节剂，调节 pH 值至 6-7 内，搅拌均匀；

步骤 5、均质：采用管线式均质机均质，搅拌均匀；

步骤 6、灌装：无菌室温灌装于给药器中，外包装。

实施例 3

实施例 3 中的组分见表 3 中的实施例 1 中的数据，实施例 3 中的难治型溃疡性结肠炎灌肠剂的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1、制备生地黄提取液：将地黄在 50℃温度条件下烘焙至八成干，粉碎过 40 目筛，按液料比 15:1（mL/g）加入 70％乙醇，在 35℃温度条件

下超声处理 35min，提取 2 次，再过滤，分离，浓缩出提取液，真空干燥至恒重，制备得到生地黄提取物；

步骤 2、制备鱼腥草多糖：将鱼腥草晒干，粉碎，过 100 目筛，制备得到鱼腥草干粉，将鱼腥草干粉置于锥形瓶中，按液料比 45：1（mL/g）70%乙醇、超声功率 72 W、超声温度 60℃、超声时间 30min，过滤分离出提取液；将提取液装入离心管中以 2500 r/min 离心 25 min，收集上清液，倾入圆底烧瓶中冷凝回流浓缩至 2 mL，转移到试管中冷却；于浓缩液中加入无水乙醇 8 mL，在 4℃静置 12h 醇沉，然后以 3500 r/min 离心 15 min，弃去上清液，留取沉淀，制备得到鱼腥草多糖；

步骤 3、按照表 1 中实施例 3 中的各组分含量称量各组分；

步骤 4、制备酶温双敏型水凝胶成分：将称量好的 N-异丙基丙烯酰胺、甘油与巯基化壳聚糖加入 35%的蒸馏水中 60℃下 350r/min 磁力搅拌至溶胀均匀，使其充分溶胀并反应 15h；再加入称量好的焦亚硫酸钾、黑麦酮酸 D、苦石莲提取物 M2、生地黄提取物、丁酸甘油酯、尼古丁、鱼腥草多糖、粉防己碱和氢化可的松，室温搅拌均匀后加水至全量，并加入 pH 值调节剂，调节 pH 值至 6-7 内，搅拌均匀；

步骤 5、均质：采用管线式均质机均质，搅拌均匀；

步骤 6、灌装：无菌室温灌装于给药器中，外包装。

实施例 4-10 及对比例 1-6 中的制备方法同实施例 1。

下面结合具体的实验数据来说明本发明的技术效果：

（一）检验水凝胶的性能：实施例 1、 8、9、10 和对比例 5、6

1.凝胶温度和粘附力的测定：

采用倒置试管法测定凝胶温度：取制备好的凝胶溶液 2mL 于试管中，置于恒温水浴中缓慢升温，升温速率约为 0.2℃/min，每升高 0.2℃，迅速倒置试管，观察溶液的流动情况，定义试管内溶液不再流动时的温度为胶凝温度，每个样品测定 3 次，取平均值，结果见下表 2：

表 2 各组的凝胶温度测定结果（n=3）

实验号	胶凝温度（℃）

实施例 1	37.2±0.2
实施例 8	42.2±0.4
实施例 9	34.6±0.2
实施例 10	30.6±0.4
对比例 5	40. 2±0.2
对比例 6	35.2±0.4

从上表 2 中可知：胶凝温度从低到高依次为：实施例 10 < 实施例 9 < 对比例 6 < 实施例 1 < 对比例 5 < 实施例 8，实施例 1 是最接近肠道温度的。

从对比实施例 1 和实施例 8-10 的胶凝温度结果可看出，巯基化壳聚糖在本发明灌肠剂中所占的质量百分比最佳为 12%，N-异丙基丙烯酰胺在本发明灌肠剂中所占的质量百分比最佳为 11%，此时的胶凝温度更接近肠道内核温度即 37℃，可以成功在肠道内完成形态转换。而随着 N-异丙基丙烯酰胺本身含量大幅度增加，其胶凝温度也不断升高，这与巯基化壳聚糖与其的反应也有一定的关系，巯基化壳聚糖的比例一定程度上使得凝胶温度升高幅度有所改变。对比例 6 与实施例 1 相比，仅对酶敏感材料进行了替换，具体是将巯基化壳聚糖替换成羟丙甲基纤维素，两组凝胶温度相差最小（2℃左右），但是仍低于肠道温度，不能满足在灌肠时成功改性进行黏附；而直接使用普通的温敏材料制作的水凝胶灌肠剂，温度差距更大。

2.药物体外模拟释放时间：以粉防己碱的释放量为指标，采用 HPLC 法检测粉防己碱：各组分别取 3g 凝胶置于 pH7.4 缓冲溶液中，在糖苷酶存在的条件下，37℃恒温进行体外降解试验，分别于 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0h 取样 5mL，并立即补加等量 37℃pH7.4 缓冲溶液，HPLC 法检测粉防己碱含量，计算其累计释放度，每个样品测定 3 次，取平均值；结果见下图 1 和表 3。

表 3 粉防己碱累计释放度（%）（n=3）

实验号	实施例 1	实施例 8	实施例 9	实施例 10	对比例 5	对比例 6

0.25	8	5	6	10	2	4
0.5	13	9	10	20	4	8
1	25	18	20	40	10	15
1.5	42	25	30	50	15	20
2	50	33	40	60	20	27
3	65	43	50	80	25	33
4	75	53	65	93	36	47
6	90	76	80	95	53	58
8	93	87	89	96	60	69
10	95	88	90	96	62	73
12	96	90	92	96	68	80

由图 1 与表 3 结果可知：各组的释放速率从快到慢依次为：实施例 10 > 实施例 1 > 实施例 9 > 实施例 8 > 对比例 6（与发明的酶敏感材料不同但含量相同）> 对比例 5（普通温敏水凝胶）。

从对比实施例 1 和实施例 8-10 的体外模拟释放情况可看出，实施例 1 的释放速度更适合药物在肠道粘膜进行一个长时的作用，能在 6h 后达到一个较高的释放率，并且更利于药物维持治疗的血药浓度；而实施例 10 在 4h 就已经达到了一个很高的释放率，这样会使得药物的作用时间大大缩短，不利于维持治疗的血药浓度。实施例 8、9 的累计释放度比较起来看，有效时间则过长。对比例 6 与实施例 1 相比，仅对酶敏感材料进行了替换，但是药物释放率大打折扣，直到 12h 才只能达到 80%，这样药物有效浓度不能很好到达，而且这么长的时间内不免会发生肠道排泄，使得灌肠液被大量排出，不能配合患者本身的疾病情况。而直接使用普通的温敏材料制作的水凝胶灌肠剂，与对比例 6 存在同样的问题，甚至效果更差。

（二）慢性实验性结肠炎小鼠模型来考察本发明的药物效果：

小鼠模型的制备与给药方法

选取健康雄性 BALB/c 小鼠 48 只， 6-8 周龄， 体重（21±2）g，所有小鼠实验前适应环境 1 周。

依照现有文献中的造模方法进行造模，具体为：采用 25mg / kg TNBS 一 50%乙醇单次灌肠 + 3%DSS 自饮水 6d 建立难治型 UC 模型；模型建立成功的标志为小鼠出现半稀便、腹泻、粪便隐血阳性和肉眼血便中至少两种症状。接着，随机分为 12 组，分别为对照组、实施例 1-7 与对比例 1-4。对照组剂量为与含药凝胶等量的生理盐水，连续 7 天；给予各组灌肠相应药物，给药剂量为人每日灌肠剂量折算成小鼠等效剂量，连续 7 天。

（1）小鼠体重的降低情况：自试验开始至处死前，每 2 天观察小鼠体重变化，结果如图 2 和表 4 所示。

表 4 各组小鼠体重变化（n=4）

组别	天数（day）								治疗期体重变化（g）	变化率（%）
	0	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**	**12**	**14**		
对照组	21.3	19.2	18.1	16.2	15.3	14.2	14.4	14.7	-1.5	-0.093
实施例 1	20.2	18.1	16.2	15.3	14.8	17	19.2	20.4	5.1	0.333
实施例 2	19.4	19	16.8	15.4	14.1	15.2	15.4	16	0.6	0.039
实施例 3	21.1	19.9	17.8	16.2	15	16.1	16.6	18.1	1.9	0.117
实施例 4	20.2	19.2	18	15.9	14.9	16.3	17.5	18.3	2.4	0.151
实施例 5	20.2	19.3	18.2	15.5	14.7	15.8	16.4	17.6	2.1	0.135
实施例 6	21.1	18	17.2	15.6	13.9	15.2	16.4	17.2	1.6	0.103
实施例 7	20.2	17.9	15.3	15.5	14	14.2	15.3	15.8	0.3	0.019
对比例 1	20.5	18.1	17.1	15.4	15	14.1	14	15	-0.4	-0.026
对比例 2	21.1	19	18.2	16.3	16.2	15	15.2	16.7	0.4	0.025
对比例 3	21	19.9	17.3	15.8	14.3	14.2	15	16.3	0.5	0.032
对比例 4	21.1	20.2	18.2	16.1	15.2	16.1	16.3	16.3	0.2	0.012

由图 2 与表 4 的数据可以看来，各组小鼠的初始体重之间没有统计学差异，并且在造模时间内（前 6 天）体重有一个明显的下降，但造模结束后各组间的体重差异并不大。在后续的治疗进行过程中，发明人明显发现：作为对照组的小鼠，因为没有使用药物治疗，它的体重仍然呈现一种下降趋势，随着天数延长，最后出现了微弱的波动，但是与初始体重仍存在明显的巨大差距。在含有本发明药物种类，但各类药物剂量配伍不同的治疗组（实施例 1-7)中 ,老鼠的体重波动最终都呈现出比造模结束最后一天有了一定的回升，但是各组的回升率存在差异。其中，作为最佳配方的实施例 1 的体重回升最为明显，并且有了超过初始体重呈现小鼠体重增长的趋势，说明该组小鼠的疾病恢复程度非常好，肠粘膜的恢复甚至促进了小鼠对营养的良好吸收，并且抵消了炎症状态对能力的过分消耗，使得补充的饮食可以实现小鼠的正氮平衡。而当药物剂量发生改变，则小鼠的体重恢复情况就明显弱于实施例 1。进一步分析：实施例 4、5、6 是效果仅次于实施例 1 的三组，并且他们的药物剂量也是较为接近实施例 1。实施例 1 与 4 相比，药物的剂量都有了一定的减弱，所以整体治疗效果在体重恢复方面出现了比较大的下降；实施例 4 与 5 相比，两者在发挥抗炎方面的药物成分有所差距，即实施例 4 剂量大于实施例 5，这一调整，也使得最终效果有所折扣；实施例 5-7 相比，虽然药物对于糖皮质激素受体的激活有了剂量依赖性增强，但是由于本身发挥抗炎的药物成分剂量在不断减少，二者在药物配合方面实去了内在平衡，导致效果也在不断减弱；其他组别的改变也产生同样的效果。对比例 1 保留了抗炎药物成分和常规糖皮质激素治疗量，发现治疗初期小鼠体重并没有回升，仍然有下降，表示其对治疗反应很慢，虽然体重在最后两天也是有逐渐回升的迹象，但也充分说明其不能在药物的预计治疗周期内达到恢复效果，证明疾病的治疗效果并不好。这可能也反应出若仅仅依靠减轻炎症来使得小鼠自身的糖皮质激素受体恢复上调从而减轻糖皮质激素抵抗的现象是非常缓慢的，不能达到良好的效果；对比例 2 中将本发明对于生地黄的萃取方法替换，换成常规的熟地黄之后，同样效果大打折扣，对比例 3 中将抗炎类药物换成文献中已经提及的治疗用药后，其效果仍然不及实施例 1 的配伍，对比例 4 将两大类药物全部替换之后，效果更差；且对比例之间的差别也能看出，无论是药物提取方式改变还是成分替换，都会对其最终效果产生影响。综上所述，

两大类药物对疾病在体重恢复方面，存在一定的药物剂量依赖性，这与前期的背景调查相符，而本发明的实验更说明了，这两大类药物的效果必须要同时存在并且剂量相互配合，才能发挥出最佳的治疗效果。

（2）结肠标本的情况：

小鼠末次给药后，禁食 1d，麻醉处死，解剖，取出肛门端至盲肠末端的整个肠段，溃疡处取组织标本经 4%多聚甲醛固定后，常规脱水及石蜡包埋，5um 切片后，进行常规 HE 染色，

光学显微镜下进行结肠组织病理学检查，参照表 5 标准进行评分:

表 5 肠组织学损伤评分

计分	炎症程度	病变深度	隐窝破坏	病变范围(%)
0	无	无	无	无
1	轻度	粘膜下层	基底 1/3 隐窝被破坏	1-25
2	中度	肌层	基底 2/3 隐窝被破坏	26-50
3	重度	浆膜层	仅有完整表面上皮	51-75
4	/	/	全部隐窝和上皮被破坏	76-100

采用 SPSS 26.0 软件对结果进行统计学分析，计量资料均用 mean 土 SD 表示，方差齐性检验后，各组间差异的比较采用单因素方差分析(One-way AN0VA)，以 P<0.05 为差异具有统计学意义，结果见表 6。

表 6 各组小鼠结肠组织学损伤评分（n=4）

组别	结肠组织学损伤评分（分）
对照组	10.50±1.97#
实施例 1	4.30± 1.05 *
实施例 2	6.90± 1.37*#
实施例 3	6.20± 1.62#*
实施例 4	4.80± 1.45 *

实施例 5	5.10± 0.98 *
实施例 6	4.90± 1.12 *
实施例 7	7.30± 1.03*#
对比例 1	9.30± 1.23#
对比例 2	7.90± 0.82*#
对比例 3	7.80±0.81*#
对比例 4	8.20± 0.84*#

注：与对照组相比，*P < 0.05，与治疗组 1 相比，#P < 0.05。

本发明进一步分析药物治疗对各组小鼠的结肠粘膜组织的修复情况。在取出肛门端至盲肠末端的整个肠段时肉眼观察了各组小鼠的结肠大体观，可以明显看出肠粘膜的外观形态的不同：对照组小鼠结肠表面粗糙呈颗粒状，肠壁增厚，扭曲变形，肠黏膜充血、水肿，可见轻至重度糜烂及溃疡；实施例 1、4、5 组小鼠结肠肠壁增厚，肠粘膜轻度充血、水肿，有 2 只小鼠可见轻度糜烂，但未见溃疡灶；其他实施例与对比例组的小鼠结肠肠壁增厚，肠粘膜充血、水肿，轻度糜烂，可见不同程度与数量的小溃疡灶，但整体情况介于对照组和实施例 1、4、5 之间。从表 5 的评分可以看出结肠粘膜恢复情况由好到差依次为：实施例 1 > 实施例 4 > 实施例 6 > 实施例 5 > 实施例 3 > 实施例 2 > 实施例 7 > 对比例 2=对比例 3 > 对比例 4 > 对比例 1。并且各组的结肠粘膜恢复都明显强于对照组，药物治疗都在粘膜损伤恢复上有一定的帮助。具体分析可知：实施例 1、4、5、6 属于结肠组织学损伤评分偏低水平，即疾病恢复效果好的一类实验组，其中实施例 1 作为最优选，其结果最好，其他组的效果都有所减弱，但其差异在本次结果中无统计学意义。说明这个范围的药物剂量是较为合适的，在病理方面会取得比较好的效果；当药物之间的差距比例增加后，其发挥配伍的效果就会大大折扣，粘膜的恢复速度与恢复情况也会受到阻碍。而在对比例中，对药物进行成分改变或者萃取方法改变，同样效果大打折扣，这与之前体重的改变也是相同的趋势。

（3）小鼠治疗结束后血清 TNF-α 和 IL-6 的浓度：治疗结束后，禁食 1

d 后处死各组大鼠，处死前行心包穿刺，采血 3 ml，4℃冰箱中静置 3 h，然后 3000r·min^{-1} 离心 15min，吸出血清，TNF-α 含量的检测：采用 ELISA 方法按试剂盒说明书用∑960E 型全自动酶标仪在 410 nm 处测吸光值，对照标准曲线得 TNF-α 含量；IL-6 含量的检测：采用双抗夹心 ELISA 方法，按试剂盒说明书用∑960E 型全自动酶标仪在 450 nm 处测吸光值，对照标准曲线得 IL-6 含量。

采用 SPSS 26.0 软件对结果进行统计学分析，计量资料均用 mean 土 SD 表示，方差齐性检验后，各组间差异的比较采用单因素方差分析(One-way AN0VA)，以 P<0.05 为差异具有统计学意义，结果如表 7 所示。

表 7 小鼠血清 TNF-α 和 IL-6 的浓度的变化（n=4）

组别	TNF-α （g/mL）	IL-6(pg/mL)
对照组	740.6±3.8	190.1±4.2
实施例 1	360.3±2.5*	91.2±2.1*
实施例 2	420.3±2.4*#	124.5±2.1*#
实施例 3	413.7±2.9*#	120.8±3.7*#
实施例 4	380.0±2.2*	106.1±5.2*
实施例 5	391.9±5.0*	114.1±3.6*
实施例 6	397.2±4.1*	118.9±4.0*
实施例 7	430.5±3.1*#	130.7±2.6*#
对比例 1	580.1±5.1*#	164.6±4.3*#
对比例 2	489.6±3.1*#	147.6±3.0*#
对比例 3	490.4±2.9*#	149.3±3.4*#
对比例 4	510.7±4.8*#	157.6±4.2*#

注：与对照组相比，*P < 0.05，与治疗组 1 相比，#P < 0.05。

接下来本发明分析药物治疗对各组小鼠血清 TNF-α 和 IL-6 的浓度的变

化情况。从表 6 的评分可以看出小鼠的整体炎症水平由低到高依次为：实施例 1 < 实施例 4 < 实施例 5 < 实施例 6 < 实施例 3 < 实施例 2 < 实施例 7 < 对比例 2≈ 对比例 3 < 对比例 4 < 对比例 1。并且各组的炎症水平都明显高于对照组，药物治疗在炎症恢复上有较为明显的帮助。进一步分析比较可知：实施例 1、4、5、6 仍属于炎症反应水平偏低，表征小鼠整体疾病炎症反应有明显减少的一类实验组，其中实施例 1 作为最优选，其结果最好，其他组的效果都有所减弱，但其差异在本次结果中无统计学意义。同样说明这个范围的药物剂量是较为合适的，在减轻炎症方面也取得比较好的效果；当药物之间的差距比例增加后，其发挥配伍，减轻炎症的效果就会大大折扣。而在对比例中，对药物进行成分改变或者萃取方法改变，同样效果大打折扣，这与前面的改变是相符的。

上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例，但如前所述，应当理解发明并非局限于本文所披露的形式，不应看作是对其他实施例的排除，而可用于各种其他组合、修改和环境，并能够在本文所述发明构想范围内，通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围，则都应在发明所附权利要求的保护范围内。