

双氢青蒿素脂质体的制备及其缓解小鼠银屑病样皮损的作用

杨佳琦^{1,2}, 王蓉蓉¹, 王锐利¹, 张淑秋^{1*}

1. 山西医科大学 药学院, 山西 太原 030001

2. 山西医科大学 医学科学院, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 制备双氢青蒿素脂质体 (DHA-LPs), 并评价其外用治疗银屑病的作用。**方法** 采用薄膜分散法制备 DHA-LPs, 利用单因素试验结合 Box-Behnken 设计-响应面法 (BBD-RSM) 优化工艺参数, 采用透射电子显微镜 (TEM)、动态透析法及稳定性考察评价其理化性质。采用咪喹莫特 (IMQ) 诱导的小鼠银屑病样皮损模型, 结合 HE 染色、血常规分析、ELISA 分析评价 DHA-LPs 的抗银屑病作用。**结果** DHA-LPs 确定的最佳制备工艺为: 二氯甲烷为溶剂、药脂比 1 : 4.329、胆固醇与磷脂比 1 : 1.833、水化温度 46 °C。测得 DHA-LPs 粒径 (97.39 ± 0.50) nm、多分散系数 (0.275 ± 0.002)、ζ 电位 (-14.52 ± 0.08) mV、包封率 (76.03 ± 0.47) %, 载药量 (31.21 ± 1.53) %。TEM 显示 DHA-LPs 呈椭圆形, 体外释放呈双相模式, 4 °C 储存 28 d 稳定性良好。动物药效学结果显示, 与 DHA 溶液相比, DHA-LPs 显著缓解 IMQ 诱导的小鼠银屑病样皮损, 逆转 IMQ 诱导的小鼠脾脏系数升高, 改善 IMQ 诱导的表皮结构、脾脏结构及中性粒细胞和单核细胞的异常, 降低血清中促炎因子 [白细胞介素 (IL)-6、IL-17、IL-23、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)] 水平, 升高小鼠血清中抑炎因子 [转化生长因子-β (TGF-β)] 水平。**结论** 双氢青蒿素外用缓解小鼠银屑病样皮损, 将其制备成脂质体制剂能够增强其抗银屑病作用, 拓展了青蒿素类药物的应用范畴, 为银屑病的治疗提供了一种新的策略。

关键词: 双氢青蒿素; 脂质体; 银屑病; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子-α; 转化生长因子-β

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376(2025)07 - 1853 - 16

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.07.015

Preparation of dihydroartemisinin-loaded liposomes and their topical efficacy in alleviating psoriasis-like lesions in mice

YANG Jiaqi^{1,2}, WANG Rongrong¹, WANG Ruili¹, ZHANG Shuqiu¹

1.School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

2.College of Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To prepare dihydroartemisinin liposomes (DHA-LPs) and evaluate their efficacy in the treatment of psoriasis when applied topically. **Methods** DHA-LPs were prepared using the thin film dispersion method. The process parameters were optimized by single-factor experiments combined with Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM). The physicochemical properties of DHA-LPs were evaluated by transmission electron microscopy (TEM), dynamic dialysis, and stability studies. The anti-psoriasis effect of DHA-LPs was evaluated using an imiquimod (IMQ)-induced psoriasis-like skin lesion model in mice, combined with HE staining, blood routine analysis, and ELISA analysis. **Results** The optimal preparation process of DHA-LPs was determined as follows: dichloromethane as the solvent, drug-to-lipid ratio of 1 : 4.329, cholesterol-to-phospholipid ratio of 1 : 1.833, and hydration temperature of 46 °C. The particle size of DHA-LPs was (97.39 ± 0.50) nm, the polydispersity index was (0.275 ± 0.002), the ζ potential was (-14.52 ± 0.08) mV, the entrapment efficiency was (76.03 ± 0.47)%, and the drug loading was (31.21 ± 1.53)%. TEM showed that DHA-LPs were ellipsoidal in shape, and the *in vitro* release followed a biphasic pattern. The stability of DHA-LPs was good after 28 days of storage at 4 °C. The animal pharmacodynamics results showed that compared with DHA solution, DHA-LPs significantly alleviated IMQ-induced psoriasis-like skin lesions in mice, reversed the increase in spleen coefficient induced by IMQ, improved the

收稿日期: 2025-04-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173767); 山西省基础研究计划 (自由探索类) 青年科学基金项目 (202403021212250); 山西省博士启动基金资助项目 (SD2420); 山西医科大学校级博士启动基金资助项目 (XD2313)

作者简介: 杨佳琦 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为靶向纳米给药系统及药动学。E-mail: yangjiaqi87@sxmu.edu.cn

*通信作者: 张淑秋, 教授, 主要从事靶向纳米给药系统及药动学研究。E-mail: shuqiu.zhang@sxmu.edu.cn

abnormal epidermal and splenic structures and neutrophil granulocytes and monocytes induced by IMQ, and reduced the levels of pro-inflammatory factors [(Interleukin (IL)-6, IL-17, IL-23, Tumor necrosis factor- α (TNF- α)] in serum while increasing the level of anti-inflammatory factor [Transforming growth factor- β (TGF- β)] in mouse serum. **Conclusion** Topical application of dihydroartemisinin can alleviate psoriasis-like skin lesions in mice. Preparing it into liposomal formulation can enhance its anti-psoriasis effect, expanding the application scope of artemisinin derivatives and providing a new strategy for the treatment of psoriasis.

Key words: dihydroartemisinin; liposomes; psoriasis; IL-6; TNF- α ; TGF- β

银屑病是一种临床常见的慢性免疫性皮肤病，具有反复发作、难以根治的特点，其核心病理特征表现为角质形成细胞异常增生与慢性炎症细胞浸润。该病发病机制复杂，是遗传、免疫、环境等多因素交互作用的结果^[1-2]。目前研究表明，角质形成细胞异常增殖与皮肤炎症微环境之间形成的正反馈调控环路，是驱动疾病进展的关键机制，其中白细胞介素 (IL) -17、IL-23、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症因子发挥核心调控作用^[3]。在治疗领域，糖皮质激素、免疫抑制剂作为传统一线药物已应用逾 40 年，但其临床应用因患者耐受性较差、治愈后复发率高而受到显著限制^[4]。近年来，以 IL-17、IL-23、TNF- α 为靶点的生物制剂研究取得突破性进展，临床有效率超 90%，极大改善了银屑病治疗格局^[5]。然而，此类药物需长期使用，可能导致机体免疫功能抑制，进而增加感染等不良反应风险。值得关注的是，部分患者在长期用药过程中会出现矛盾性银屑病，其临床表现虽与经典型相似，但病情更趋严重，且二者免疫学发病机制存在显著差异^[6]。因此，开发新型、高效、安全的抗银屑病药物成为迫切的临床需求。

青蒿素类药物在疟疾治疗中的应用是中医药对现代医学的重大贡献。随着基础与临床研究的不断深入，这类药物在肿瘤及自身免疫性疾病治疗领域逐渐展现出巨大潜力^[7-8]。双氢青蒿素 (DHA) 作为青蒿素类药物的典型代表，其在银屑病领域的研究已广泛开展，并显示出良好的应用前景。研究表明^[9-10]，在银屑病模型小鼠中，尾 iv DHA 可通过调节 Th17/Treg 细胞平衡，显著降低体内 IL-17、TNF- α 等关键炎症因子水平，同时抑制角质形成细胞异常增殖，进而缓解银屑病样皮损并延缓疾病复发。此外，脂肪酸修饰的青蒿素衍生物可通过靶向视黄酸相关孤儿受体 γ t (ROR γ t) 蛋白发挥抗银屑病作用^[11]，青蒿琥酯则能通过减少 γ δ T 细胞数量改善小鼠银屑病样皮损^[12]。上述研究均提示，青蒿素类药物在银屑病治疗中具有独特优势及潜

在临床转化价值。

尽管青蒿素类药物应用于疟疾治疗已逾 20 年，但其临床广泛应用仍受诸多问题制约。首先，该类物质因分子结构中内过氧桥的存在，对热、酸、碱及还原剂敏感，化学稳定性较差；其次，其生物半衰期短、体内代谢速率快^[13]；此外，青蒿素类药物普遍存在溶解度低的问题，且课题组前期研究发现，该类物质多次口服给药时存在“自身诱导代谢”现象^[14]，导致口服生物利用度显著降低。在疟疾治疗中，临床常通过增加给药次数或提高用药剂量缓解上述问题，但此类给药方式难以满足银屑病长期服药的治疗需求。因此，通过创新性手段提升青蒿素类药物的化学稳定性与药物代谢稳定性，对其拓展至抗银屑病领域具有关键科学意义。

当前，青蒿素类药物在银屑病治疗中的研究主要聚焦于系统用药，而外用给药途径的研究尚属空白。外用药物作为银屑病的一线治疗选择，近 30 年仅本维莫德一款新药上市，研发新型抗银屑病外用制剂的临床需求极为迫切^[15]。基于此，本研究制备外用双氢青蒿素脂质体 (DHA-LPs)，借助脂质体的缓控释特性^[16]，优化药物在皮损局部的递送效率，实现更理想的银屑病治疗效果，同时为青蒿素类药物的应用拓展及银屑病药物研发提供新范式。

1 材料

1.1 仪器

CCA-420 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司)；SB-5200DT 型超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)；RE-52CS-1 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)；LA84/A 型分析天平 [梅特勒托利多科技 (中国) 有限公司]；HH-6 型可升温水浴锅 (常州荣华仪器制造有限公司)；SCIENTZ-IIID 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)；WFH-203 型三用紫外分析仪 (上海精科实业有限公司)；

Master 粒径 r 3000+Ultra 型马尔文激光粒度仪[英国马尔文仪器(中国)有限公司]; TH-F120 型透射电子显微镜[日立(中国)有限公司]; BX43 型生物显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司]; Essentia LC-15C 型高效液相色谱仪[岛津企业管理(中国)有限公司]; HT-110X30 型气浴恒温振荡器(上海赫田科学仪器有限公司); BC-760CS 型全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); Multiskan FC 型全波长酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 药品与试剂

DHA(批号 100184-202204, 质量分数 99.9%, 昆药集团重庆武陵山制药有限公司); 大豆磷脂(批号 L6300, 质量分数 95%)、胆固醇(批号 C804517, 质量分数 95%)、分析纯二氯甲烷(批号 D807825)、分析纯无水乙醇(批号 E809056), 均购自上海麦克林生物科技有限公司; 无菌磷酸盐缓冲生理盐水(批号 P787575, 北京索莱宝科技有限公司); 咪喹莫特乳膏(IMQ, 批号 H20030128, 四川明欣药业有限责任公司); 本维莫得乳膏(Tap, 批号 H20240040, 上海新亚药业闵行有限公司); Mouse ELISA Kit 检测试剂盒(货号 EK206, 杭州联科生物技术股份有限公司)。

1.3 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体质量 20~22 g, 均由山西医科大学实验动物中心提供。动物实验经山西医科大学福利伦理委员会审核, 伦理批准文件编号 2021-240。

2 方法与结果

2.1 DHA-LPs 的制备

精确称取适量的 DHA、大豆磷脂和胆固醇至 100 mL 茄形瓶中。加入适量有机溶剂充分溶解, 应用减压旋转蒸发器, 使脂质成分在瓶内壁形成均匀且光滑的脂质膜。随后加入适量已预热至适宜温度的超纯水进行脂质膜的水化。使用细胞破碎仪配备超声探头对水化溶液进行超声, 设定超声 1 s, 停顿 1 s 的循环模式, 持续 10 min。即得 DHA-LPs。

2.2 粒径、多分散指数(PDI)、 ζ 电位、包封率(EE)、载药量(DL)的测定

本研究遵循“结构稳定-响应面优化-处方验证”的 3 阶段递进策略, 首先单因素处方优化探究影响脂质体物理稳定性的基本处方因素: 粒径、

PDI 和 ζ 电位; 而后脂质体评价指标权重建立及响应面处方优化集中解决对临床疗效最关键的 EE; 最终通过最优处方验证 DL。

取“2.1”项下 DHA-LPs 用超纯水稀释适当倍数, 使用马尔文激光粒度仪测定其粒径、PDI 和 ζ 电位。鉴于 DHA 在水中几乎不溶, 采用低速离心法去除 DHA-LPs 中不溶的 DHA, EE 和 DL 的测定方法基于课题组前期建立的高效液相色谱-柱后衍生化法^[17], 并已完成方法学考察, 包括专属性、线性、精密度、加样回收率及稳定性验证, 确保其在脂质体体系中应用的适用性和准确性。

$$EE = W_2/W_1$$

$$DL = W_2/W_3$$

W_1 为 DHA-LPs 原液中测得 DHA 的质量, W_2 为离心后测得 DHA-LPs 中 DHA 的质量, W_3 为包载 DHA 及辅料的总质量。

2.3 单因素优化 DHA-LPs 处方

2.3.1 有机溶剂考察 固定处方中药脂比(1:5)、胆固醇与磷脂比(1:5)、水化温度 45 °C 不变, 按“2.1”项下方法制备 DHA-LPs, 考察有机溶剂甲醇、乙醇、二氯甲烷对 DHA-LPs 粒径、PDI 和 ζ 电位的影响。结果如表 1 所示, 使用二氯甲烷作为溶剂时, DHA-LPs 具有最小的粒径和最大的 ζ 电位绝对值, 表明其稳定性较好。因此选择二氯甲烷为制备脂质体的优选溶剂。

表 1 不同有机溶剂对 DHA-LPs 粒径、PDI 及 ζ 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of different organic solvents on particle size, PDI, ζ potential of DHA-LPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

有机溶剂	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
甲醇	104.8 \pm 0.3	-16.79 \pm 0.56	0.246 \pm 0.003
乙醇	102.3 \pm 0.8	-16.13 \pm 0.47	0.253 \pm 0.004
二氯甲烷	101.9 \pm 0.6	-18.67 \pm 0.93	0.185 \pm 0.005

2.3.2 药脂比考察 固定处方中有机溶剂二氯甲烷、胆固醇与磷脂比(1:5)、水化温度 45 °C 不变, 按“2.1”项下方法制备 DHA-LPs, 考察药脂比(1:1、1:3、1:5、1:8、1:20)对 DHA-LPs 的粒径、PDI 和 ζ 电位的影响。结果如表 2 所示, 在药脂比为 1:1 和 1:3 时, 未能形成稳定的脂质体结构。DHA-LPs 的粒径分别为(185.5 \pm 5.0)、(155.0 \pm 3.8) nm, ζ 电位绝对值均处于较低水平, 且 PDI 均超过 0.3。这

一现象可能是由于药物与脂质的比例过高，导致脂质材料无法充分包封药物，进而影响了脂质体结构的稳定性。相较于药脂比 1:5、1:20，药脂比为 1:8 时，DHA-LPs 的粒径最小，PDI<0.3，且 ζ 电位的绝对值最高。因此，选择药脂比为 1:8 进行后续实验。

表 2 不同药脂比对 DHA-LPs 粒径、PDI 及 ζ 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of different drug-to-lipid ratios on partical size, PDI and ζ potential of DHA-LPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药脂比	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
1:1	185.5±5.0	-7.58±1.03	0.550±0.050
1:3	155.0±3.8	-9.05±0.85	0.420±0.030
1:5	104.5±0.3	-13.16±0.27	0.205±0.010
1:8	101.6±2.1	-18.25±0.93	0.167±0.006
1:20	106.8±0.5	-16.20±0.24	0.185±0.005

2.3.3 胆固醇与磷脂比考察 固定处方中有机溶剂二氯甲烷、药脂比(1:8)、水化温度 45 °C 不变，按“2.1”项下方法制备 DHA-LPs，考察不同胆固醇与磷脂比(1:1、1:3、1:5、1:8、1:20)对 DHA-LPs 的粒径，PDI 和 ζ 电位的影响。

结果如表 3 所示，在胆固醇与磷脂比为 1:1 和 1:3 时均未能形成稳定的脂质体结构。其中，DHA-LPs 的粒径分别为(115.3±3.7)、(110.0±1.9) nm， ζ 电位绝对值均较小，且 PDI 均高于 0.3。这一现象可能归因于胆固醇相对于磷脂的比例过高，过量的胆固醇干扰了脂质双层的正常组装过程，进而导致脂质体结构稳定性不足。在胆固醇与磷脂比为 1:5 时，相较于胆固醇与磷脂比 1:8 及 1:20，DHA-LPs 的粒径最小，PDI<0.3，且 ζ 电位的绝对值最高。因此，选择胆固醇与磷脂比为 1:5 进行后续实验。

2.3.4 水化温度考察 固定处方中有机溶剂二氯甲烷、药脂比(1:8)、胆固醇与磷脂比(1:5)不变，按“2.1”项下方法制备 DHA-LPs，考察不同水化温度(30、45、60 °C)对 DHA-LPs 的粒径、PDI 和 ζ 电位的影响。结果如表 4 所示，水化温度为 45 °C 时，DHA-LPs 的粒径最小，PDI 值<0.3，同时 ζ 电位绝对值最高，表明 45 °C 条件下 DHA-LPs 的物理稳定性最佳。因此，选择水化温度为 45 °C 进行后续实验。

表 3 不同胆固醇与磷脂比对 DHA-LPs 粒径，PDI 及 ζ 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of different cholesterol-to-phospholipid ratios on partical size, PDI and ζ potential of DHA-LPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

胆固醇与磷脂比	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
1:1	115.3±3.7	-7.96±0.23	0.300±0.020
1:3	110.0±1.9	-6.32±0.20	0.259±0.040
1:5	104.9±2.7	-17.80±0.98	0.158±0.004
1:8	106.2±0.9	-17.02±0.71	0.165±0.002
1:20	110.6±1.9	-15.23±0.50	0.220±0.010

表 4 不同水化温度对 DHA-LPs 粒径，PDI 及 ζ 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of different hydration temperatures on partical size, PDI and ζ potential of DHA-LPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水化温度/°C	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
30	105.3±1.7	-13.83±1.50	0.176±0.002
45	103.8±2.1	-16.93±0.81	0.132±0.005
60	115.9±3.1	-14.42±1.93	0.189±0.010

2.4 Box-Behnken 设计-响应面法 (BBD-RSM) 优化 DHA-LPs 处方及制备工艺

2.4.1 综合评价指标的建立 权重确定方法在多准则决策中至关重要，其中层次分析法(AHP)和准则重要性关联法(CRITIC)是 2 种常用的技术手段^[18]。在 DHA-LPs 处方优化的过程中，为建立综合评价指标，需综合考虑粒径、 ζ 电位、EE 和 PDI 等多项标准，并确定各标准的权重。采用 AHP 法^[19]，根据各指标权重系数(ω_{AHPi})确定 4 个指标的优先顺序为: EE> ζ 电位>粒径>PDI，其 ω_{AHPi} 分别为 0.482 8、0.272 0、0.157 5、0.083 3，并构建判断矩阵并完成一致性检验。一致性比率(CR)为 0.004 4 (<0.1)，表明指标优先判断矩阵具有一致性，该权重分配合理可信(表 5)。

表 5 DHA-LPs 评价指标判断矩阵

Table 5 Judgment matrix of evaluation index of DHA-LPs

指标	判断矩阵				ω_{AHPi}	CR
	粒径	ζ 电位	EE	PDI		
粒径	0.154	0.13	0.164	0.182	0.157 5	0.004
ζ 电位	0.308	0.261	0.246	0.273	0.272 0	
EE	0.462	0.522	0.492	0.455	0.482 8	
PDI	0.077	0.087	0.098	0.091	0.083 3	

CRITIC 法^[20]通过综合考虑指标的变异性和指标间的冲突性来确定客观权重系数 (ω_{CRITIC_i})。其中, 权重指标的标准差越大, 变异性越高, 相应的权重也越大; 而指标间的相关性越强, 冲突性越低, 权重则会减小。将原始实验数据导入 SPSS 27.0 软件并进行归一化处理, 对数据进行 CRITIC 分析, 计算得出粒径、 ζ 电位、EE 和 PDI 的 ω_{CRITIC_i} 分别为 0.231 9、0.280 5、0.324 1、0.063 5。

AHP-CRITIC 复合加权法整合了 AHP 和 CRITIC 2 种方法的优点以确定复合权重系数 ($\omega_{\text{AHP-CRITIC}_i}$)。AHP 法依赖主观评估设定权重, 因而主观性较强, 而 CRITIC 法利用数据的客观变异程度和指标间的相关性确定权重, 具有更高的客观性。将这 2 种方法相结合, 能够更科学且公正地评价各指标的综合权重。经计算粒径、 ζ 电位、EE 和 PDI 的 $\omega_{\text{AHP-CRITIC}_i}$ 分别 0.073 2、0.218 3、0.687 9、0.020 5。最终对各指标进行综合评分 (OD) ^[21] 计算。

$$\omega_{\text{AHP-CRITIC}_{ij}} = \omega_{\text{AHP}_{ij}} \times \omega_{\text{CRITIC}_{ij}} / \sum (\omega_{\text{AHP}_{ij}} \times \omega_{\text{CRITIC}_{ij}})$$

$$\text{OD} = \omega_1 \times Y_1/Y_{1\text{max}} + \omega_2 \times Y_2/Y_{2\text{max}} + \omega_3 \times Y_3/Y_{3\text{max}} + \omega_4 \times Y_4/Y_{4\text{max}}$$

ω_i 表示第 i 个指标的 $\omega_{\text{AHP-CRITIC}_i}$, Y_i 表示第 i 个指标的, $Y_{i\text{max}}$ 表示第 i 个指标的最大值

2.4.2 实验方案设计及结果 在单因素实验处方

优化及工艺评价指标权重建立的基础上, 选取药脂比 (X_1)、胆固醇与磷脂比 (X_2) 及水化温度 (X_3) 为主要考察因素, 粒径 (Y_1)、 ζ 电位 (Y_2)、EE (Y_3) 和 PDI (Y_4) 的 OD 值作为评价指标, 根据 BBD-RSM 进行 3 因素 3 水平, 共计 17 次实验, 设计方案及结果见表 6。

使用 Design Expert 13.0 软件对表 6 中 X_1 、 X_2 和 X_3 与各评价指标的 OD 进行二项式拟合, 得到拟合方程为: $\text{OD} = 95.1 + 0.306 3 X_1 - 7.80 X_2 - 2.12 X_3 + 0.177 5 X_1 X_2 - 0.795 X_1 X_3 + 0.737 5 X_2 X_3 - 7.65 X_1^2 - 10.13 X_2^2 - 10.01 X_3^2$, $R^2 = 0.973 7$, 方差分析结果见表 7。

拟合模型的 $P < 0.001$, 说明该模型的拟合效果良好; 拟合方程的失拟项检验表明差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明未确定的因素对实验结果的影响较小, 对模型的建立未造成明显干扰。根据方差分析结果, X_2 的主效应最强 ($F = 71.86$, $P < 0.000 1$), 其次为 X_1 ($F = 13.51$, $P = 0.007 5$), X_3 的效应不显著 ($F = 5.33$, $P = 0.054 3$)。在交互作用方面, 所有交互项 ($X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$) 的影响均未达到统计学上的显著水平 ($P > 0.05$) 此外, X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 的平方项均具有较高的统计学意义。其中, X_2^2 ($F = 63.83$, $P < 0.000 1$) 和 X_3^2 ($F = 62.35$, $P < 0.000 1$) 表现出

表 6 BBD-RSM 因素水平、实验方案设计与结果

Table 6 Factor levels, design and results of BBD-RSM

序号	X_1	X_2	$X_3/^\circ\text{C}$	粒径/nm	ζ 电位/mV	EE/%	PDI	OD
1	1 : 8(0)	1 : 5(0)	45(0)	90.31	-15.2	65.23	0.226	77.76
2	1 : 8	1 : 5	45	93.74	-15.2	57.75	0.282	71.23
3	1 : 5(1)	1 : 5	30(-1)	90.66	-13.0	40.08	0.258	60.18
4	1 : 5	1 : 5	60(1)	88.30	-13.4	53.67	0.319	65.42
5	1 : 20(-1)	1 : 8(-1)	45	90.07	-12.8	74.37	0.242	83.17
6	1 : 20	1 : 5	60	92.76	-15.0	56.48	0.219	70.03
7	1 : 20	1 : 3(1)	45	83.80	-17.6	68.29	0.249	81.21
8	1 : 8	1 : 8	30	88.36	-11.5	65.84	0.243	77.11
9	1 : 8	1 : 5	45	90.80	-14.4	89.37	0.244	92.46
10	1 : 5	1 : 3	45	88.23	-17.4	60.73	0.245	73.07
11	1 : 8	1 : 5	45	103.40	-15.0	39.34	0.287	54.77
12	1 : 8	1 : 8	60	95.20	-14.5	71.17	0.227	80.33
13	1 : 5	1 : 8	45	101.70	-15.4	62.78	0.236	69.80
14	1 : 8	1 : 3	30	86.34	-15.8	79.08	0.247	85.60
15	1 : 20	1 : 5	30	87.56	-17.7	72.87	0.235	83.35
16	1 : 8	1 : 5	45	94.06	-14.4	72.81	0.247	80.74
17	1 : 8	1 : 3	60	86.34	-15.8	79.08	0.247	85.60

表 7 回归模型方差分析结果

Table 7 Results of variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 846.49	9	205.17	30.31	<0.0001	X_1^2	246.09	1	246.09	36.33	0.000 5
X_1	91.46	1	91.46	13.51	0.007 5	X_2^2	432.28	1	432.28	63.83	<0.000 1
X_2	486.72	1	486.72	71.86	<0.000 1	X_3^2	422.32	1	422.32	62.35	<0.000 1
X_3	36.08	1	36.08	5.33	0.054 3	残差	47.41	7	6.77		
X_1X_2	0.13	1	0.126	0.02	0.895 3	失拟项	11.44	3	3.81	0.42	0.746 6
X_1X_3	2.53	1	2.53	0.37	0.560 5	误差	35.97	4	8.99		
X_2X_3	2.18	1	2.18	0.32	0.588 6	总离差	1 803.19	16			

最强的、且影响程度几乎相当的曲面效应。与此同时， X_1^2 ($F=36.33$, $P=0.000 5$) 的非线性影响也非常显著，表明三因素的非线性效应亦不可忽略。综合主效应与交互作用，三因素对综合评分的影响顺序为： $X_2>X_1>X_3$ 。

应用 Design Expert 13.0 软件绘制自变量对

因变量的三维响应面图。结果如图 1 所示，通过等高线的形状反映交互效应的强弱，椭圆表示交互作用强，圆形表示交互作用弱。模型拟合结果得到最优工艺参数：药脂比为 1 : 4.329，胆固醇：磷脂比为 1 : 8.333，水化温度为 46 °C，综合评分为 87.213。

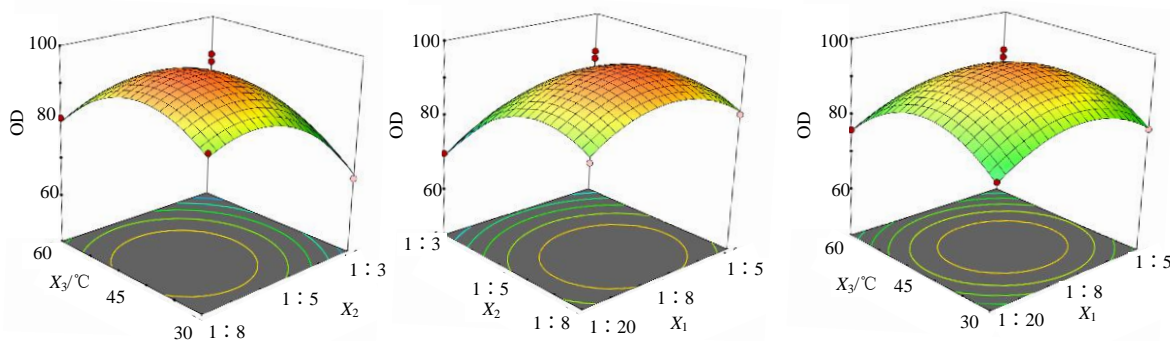


图 1 各因素对 OD 的影响

Fig. 1 Effect of various factors on OD

2.4.3 处方验证 按照响应面优化得到的最佳条件，确定 DHA-LPs 最佳处方及制备工艺为药脂比为 1 : 4.329，胆固醇：磷脂比为 1 : 8.333，水化温度 46 °C，并进行 3 次验证实验，以验证响应面优化处方的可靠性。

粒径、 ζ 电位、EE、PDI、DL 及 OD 的预测结果和实测结果如表 8 所示。3 次平行样品 OD 平均值为 80.03，RSD 为 0.97%，展现出了极高的稳定性和一致性。所有评价指标 RSD 值均 <1%，验证了结果的良好重复性，但实测值与预测值存在细微差异。例如，粒径实测均值 97.39 nm，略高于预测值 95.24 nm，可能由工艺波动、测量误差或实验条件差异所致。总体来看，该偏差在可接受范围内，不影响模型的可靠性与适用性。

表 8 BBD-RSM 优化处方的指标预测值和实测值 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 8 Predicted and measured values of prescriptions optimized by BBD-RSM ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

指标	理论值	验证值
粒径/nm	95.24	97.39 ± 0.50
ζ 电位/mV	-14.44	-14.52 ± 0.08
EE/%	74.50	76.03 ± 0.47
PDI	0.298	0.275 ± 0.002
DL/%	32.81	31.21 ± 1.53
OD	80.02	80.03 ± 0.78

2.5 透射电子显微镜 (TEM) 观察 DHA-LPs 形态

取适量 DHA-LPs 滴加至铜网上，待样品中的溶剂自然挥发后，使用 10% 磷钨酸溶液对样品进行染色，10 min 后，将铜网置于 TEM 下观察

DHA-LPs 的形态结构。结果如图 2 所示, DHA-LPs 大多呈椭圆形, 颗粒分布均匀, 边界清晰, 双分子层结构完整, 未见明显膜缺陷或破裂, 平均粒径约为 100 nm, 符合脂质体药物递送系统要求^[22]。部分图像中脂质体内部存在低对比度区域, 表明疏水药物 DHA 已成功封装在脂质双分子层的疏水区。

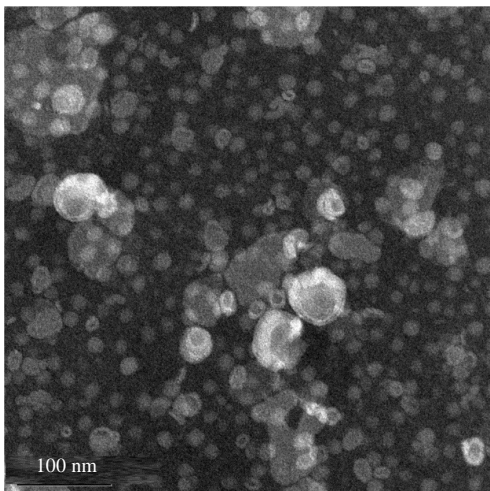


图 2 DHA-LPs 的 TEM 图

Fig. 2 TEM images of DHA-LPs

2.6 DHA-LPs 的体外释放模型拟合结果及分析

采用动态透析法^[23]对 DHA-LPs 及 DHA 水溶液 (DHA Sol) 在超纯水中的药物释放行为进行探究。具体方法如下: 精确量取 2 mL 的 DHA-LPs 和 DHA Sol, 分别置于透析袋 (截留相对分子质量 3.5×10^3) 中, 将透析袋两端用线绳扎紧后浸没于 20 mL 预先加热至 37 °C 的释放介质中, 并将透析装置放置于 37 °C 恒温气浴振荡箱内, 以 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 持续振荡, 于 0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00、24.00、48.00 h, 取出透析装置中 200 μL 的释放介质用于检测, 并立即补充等体积的 37 °C 新鲜释放介质以维持体积恒定。采用“2.2”项下方法, 测定 DHA 在释放介质中的质量浓度。并计算 DHA 的累积释放率, 绘制累积释放曲线, 以评价 DHA-LPs 的体外释放行为。结果如图 3 所示。

DHA-LPs 的药物释放呈双相模式: 在前 2 h 表现为快速释放, 累计释放率为 36.39%; 在 2 h 后表现为缓慢释放, 48 h 的累计释放率仅为 47.17%。与之相比, DHA Sol 在 2 h 累积释放率已高达 80.82%, 至 6 h 释放完全。结果表明, DHA-LPs 的药物释放受到跨膜扩散及脂质双分

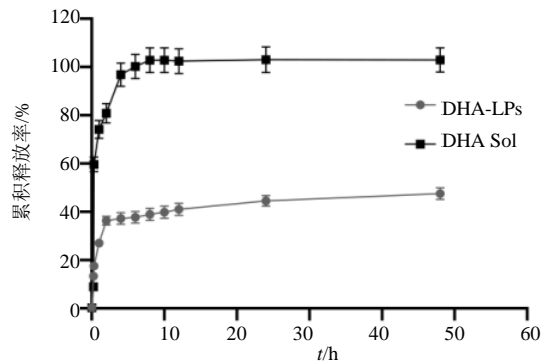


图 3 DHA Sol、DHA-LPs 的体外释放曲线

Fig. 3 *In vitro* release curves of DHA solution and DHA-LPs

子层缓慢降解的双重调控, 相较于 DHA Sol 表现出优良缓释特性。已有研究显示, 脂质体的双分子层结构使其缓释性能优于游离药物, 尽管 DHA-LPs 48 h 内释放未超 50%, 但是这一特点与持续释药体系的设计目标高度契合。例如, 临床上已批准的 DepoDur™ (吗啡脂质体) 同样在 48 h 内实现持续释放, 用于术后疼痛管理^[24]。有研究指出, 脂质体的双相释放模式, 初期快速释放后转为缓慢释放, 在慢性疾病治疗中具有显著优势^[25]。缓慢释放有其优势, 但仍存在一些风险, 一是不完全释放, 若剩余超过 50% DHA 未在预期时间内释放, 可能降低疗效; 二是安全性问题, 长期积聚未释放的脂质体可能引发免疫反应或组织蓄积, 但上述研究表明, 脂质体通常生物相容性良好, 风险较低。

2.7 DHA-LPs 的储存稳定性考察

根据 BBD-RSM 优化得到的最优处方, 平行制备了 3 批 DHA-LPs 样品, 并在 4 °C 条件下储存。通过测定 DHA-LPs 的粒径和 PDI 值, 评估其储存稳定性, 结果如图 4 所示。

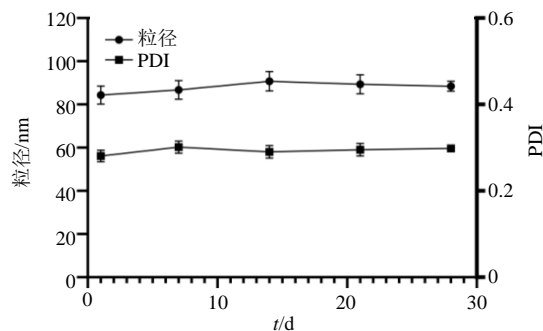


图 4 DHA-LPs 的储存稳定性

Fig. 4 Storage stability of DHA-LPs

在 4 °C 储存 28 天, 粒径基本稳定, 波动小(±5%内), 未见颗粒聚集或尺寸增大。PDI 始终小于 0.3, 表明其均匀性良好, 无聚集或宽分布趋势。

2.8 DHA-LPs 对银屑病模型小鼠治疗作用及机制研究

2.8.1 DHA-LPs 在 IMQ 诱导的小鼠模型中的急性皮肤刺激性评估

将 12 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为对照组(白凡士林)^[26]和 DHA-LPs(以 DHA 计 5 mg·mL⁻¹)组^[27], 每组 6 只。实验开始前, 剃除小鼠背部沿脊柱两侧的毛发, 剃毛区域大小约为左右各 3 cm×2 cm。小鼠在常规饲养环境中适应性饲养 3 d, 以确保其正常状态。

将小鼠背部脊柱左侧的实验区均匀涂抹 DHA-LPs 溶液, 并用双层消毒纱布覆盖, 固定时使用无刺激性胶布。另一侧皮肤涂抹白凡士林作为自身对照。实验采用封闭敷药法, 每次敷药时间为 4 h。给药 4 h 后, 用温水清洗残留物, 并在清洗后 1、24、48、72 h 进行观察, 记录皮肤给药部位是否出现红斑、水肿等刺激性反应。根据表 9 对皮肤刺激反应进行评分, 并计算每个观察时间点的小鼠皮肤刺激反应总积分。根据公式计算小鼠皮肤刺激反应的平均积分。通过 24、48、72 h 的最高平均积分, 参照表 10 评估 DHA-LPs 组对小鼠皮肤的刺激强度。

$$\text{平均积分} = (\text{红斑总分} + \text{水肿总分}) / \text{受试动物数量}$$

表 11 DHA-LPs 对小鼠皮肤刺激性实验评分结果 (n=6)

Table 11 Grading results of DHA-LPs for acute skin irritation in mice (n=6)

组别	刺激反应总积分				刺激反应平均积分				刺激强度
	1 h	24 h	48 h	72 h	1 h	24 h	48 h	72 h	
对照	0	0	0	0	0	0	0	0	无刺激性
DHA-LPs	0	0	1	0	0	0	0.167	0	无刺激性

素沉着等皮肤刺激反应, 说明 DHA-LPs 对小鼠皮肤未表现出急性刺激性。

2.8.2 动物分组、造模与给药

25 只雄性 BALB/c 小鼠背部脱毛, 面积约为 3 cm×2 cm, 在常规饲养环境中平衡饲养 3 d, 随机分为 5 组, 每组 5 只。具体分组如下: 对照组、模型组、Tap(阳性药, 62.5 mg)组、DHA Sol 组(5 mg·mL⁻¹)和 DHA-LPs 组(以 DHA 计 5 mg·mL⁻¹)。除对照组外, 其余各组小鼠脱毛部位在实验的 1~6 d 每日涂抹 62.5 mg 的 IMQ 以诱导银屑病样皮损^[28]; 对照组

表 9 皮肤刺激反应标准

Table 9 Grading standard of skin irritation reaction

皮肤反应	分级	积分
红斑形成	无红斑	0
	轻微红斑(勉强可见)	1
	明显红斑	2
	中度-重度红斑	3
	严重红斑(紫红色)	4
水肿形成	无水肿	0
	轻微水肿(勉强可见)	1
	轻度水肿(皮肤隆起轮廓清楚)	2
	中度水肿(皮肤隆起约 1 mm)	3
	重度水肿(皮肤隆起超过 1 mm, 范围扩大)	4

表 10 皮肤刺激强度分级

Table 10 Intensity classification of skin irritation

平均积分	强度
[0.0, 0.5)	无刺激性
[0.5, 2.0)	轻刺激性
[2.0, 6.0)	中刺激性
[6.0, 8.0)	强刺激性

结果如表 11 所示, 对照组在 72 h 内未观察到红斑或水肿现象, 刺激反应的平均积分为 0。DHA-LPs 组小鼠皮肤的刺激反应平均积分最高为 0.167。两组的皮肤刺激积分均低于 0.5, 且未见明显的红斑、亦未出现水肿、充血、渗液、溃烂或色

则在相同部位每日涂抹等量白凡士林。IMQ 诱导 8 h 后, 各组小鼠同步开始给药。对照组和模型组小鼠背部给予 80 μL 超纯水涂抹处理; DHA-LPs 组和 DHA Sol 组在小鼠背部涂抹 80 μL 的药物溶液, 所有给药方案均持续至实验第 6 天, 每天给药 1 次。

2.8.3 银屑病面积和严重程度指数(PSAI)评分

在实验终点前, 拍照直观记录各组小鼠银屑病样皮损情况, 结果如图 5 所示, 对照组小鼠皮肤正常; 模型组小鼠皮肤有明显鳞屑, 且干燥粗糙, 伴

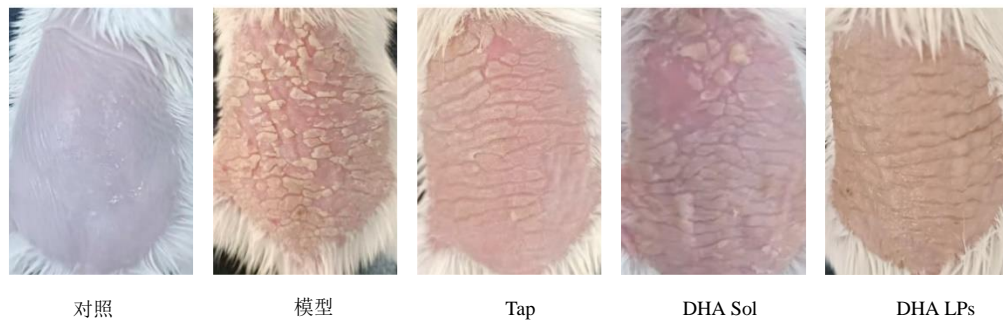


图 5 治疗 6 d 后银屑病小鼠背部鳞屑状况比较

Fig. 5 Comparison of the scale condition on back of psoriasis mice after six days of treatment

有显著银屑病样皮损特征；Tap 组皮肤有明显鳞屑、干燥粗糙，银屑病样皮损较模型组略有改善；DHA Sol 组相较模型组小鼠鳞屑减少，银屑病样皮损减轻，但治疗效果不如 DHA-LPs 组明显。DHA-LPs 组小鼠皮肤鳞屑明显减少，状态接近对照组，银屑病样皮损改善情况最好。结果表明，DHA 对小鼠的银屑病样皮损具有改善作用，外用 DHA-LPs 的疗效优于阳性药物 Tap 和 DHA

Sol，显示出外用脂质体载药系统在提高 DHA 疗效、缓解小鼠银屑病样皮损方面的独特优势。

参照 PASI 标准^[29]，从红斑、表皮脱屑及浸润程度 3 个维度对小鼠背部皮损进行量化评估：按 0 分（无症状）、1 分（轻微）、2 分（显著）、3 分（严重）、4 分（非常严重）的标准分别评分，3 项得分累加即为 PASI 总分，具体评估结果如表 12 所示。

表 12 PASI 评分结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 12 Results of PASI scores ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	PASI 评分						
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
对照	0±0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	0±0	1.57±0.35 ^{###}	2.50±0.40 ^{###}	3.57±0.35 ^{###}	5.57±0.45 ^{###}	7.83±0.40 ^{###}	8.97±0.35 ^{###}
Tap	0±0	1.73±0.25	2.67±0.31	3.43±0.45	4.80±0.20 [*]	6.07±0.21 ^{***}	7.80±0.20 ^{**}
DHA Sol	0±0	0.50±0.20 ^{***}	1.07±0.12 ^{***ΔΔ}	2.03±0.15 ^{***ΔΔ}	2.80±0.26 ^{***ΔΔΔ}	4.73±0.25 ^{***ΔΔΔ}	5.93±0.21 ^{***ΔΔΔ}
DHA-LPs	0±0	0.27±0.21 ^{***}	0.87±0.15 ^{***ΔΔ}	1.73±0.15 ^{***ΔΔ}	2.40±0.26 ^{***ΔΔΔSSS}	3.47±0.25 ^{***ΔΔΔSSS}	4.37±0.21 ^{***ΔΔΔSSS}

对照组比较：^{###} $P<0.001$ ；与模型组比较：^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ ；与 Tap 组比较：^{ΔΔ} $P<0.01$ ^{ΔΔΔ} $P<0.001$ ；与 DHA Sol 组比较：^{SSS} $P<0.001$ 。

^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs model group; ^{ΔΔ} $P<0.01$ ^{ΔΔΔ} $P<0.001$ vs Tap group; ^{SSS} $P<0.001$ vs DHA Sol group.

给药第 2 天，模型组 PASI 评分较对照组显著升高 ($P<0.001$)，而 DHA Sol 组和 DHA-LPs 组的 PASI 评分较模型组均显著降低 ($P<0.001$)，阳性药 Tap 组与模型组相比无统计学差异。

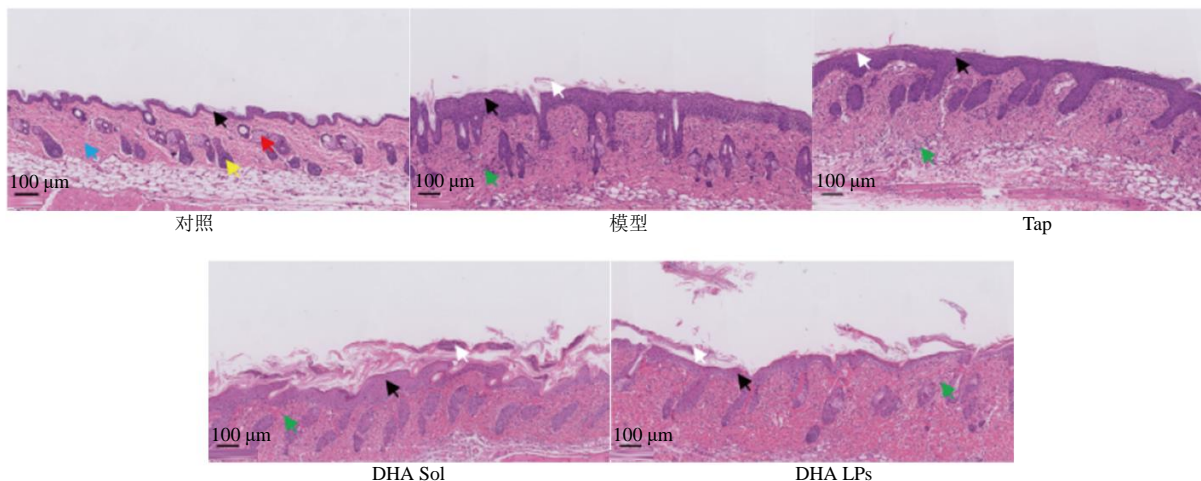
给药第 5 天，各给药组 PASI 评分均显著低于模型组 ($P<0.05$ 、 0.001)。其中，DHA Sol 组和 DHA-LPs 组的疗效显著优于 Tap 组 ($P<0.05$)，且 DHA-LPs 组的 PASI 评分较 DHA Sol 组进一步降低 ($P<0.05$)，体现出更优的皮损改善效果。

给药第 7 天实验终点，各组 PASI 评分与模型组相比均存在显著差异 ($P<0.01$ 、 0.001)。动态分析显示，从给药第 3 天起，DHA Sol 组和 DHA-LPs 组的 PASI 评分降低幅度即显著优于 Tap 组

($P<0.05$)；在给药第 5~7 天，DHA-LPs 组的 PASI 评分较 DHA Sol 组持续显著降低 ($P<0.05$)，凸显出其在长疗程中更强的治疗潜力。

2.8.4 皮肤苏木精-伊红 (HE) 检测 为进一步评价外用 DHA-LPs 对小鼠皮肤结构异常的重塑能力，采用 HE 染色分析小鼠皮肤组织形态学变化。切取实验结束时小鼠的背部皮肤组织并固定于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h。随后进行脱水处理，并采用常规石蜡包埋方法，制备皮肤组织切片。切片厚度为 4~5 μm ，经过 HE 染色后，在显微镜下观察和分析皮肤结构的变化^[30]。

结果如图 6 所示，对照组皮肤完整，各附属器官完整清晰；模型组皮肤结构异常，表皮棘层



黑色箭头-棘层细胞；蓝色箭头-胶原纤维；红色箭头-皮脂腺；黄色箭头-毛囊；白色箭头-表皮角化；绿色箭头-炎症细胞。
Black arrow-spinous cells; blue arrow-collagen fibers; red arrow-sebaceous glands; yellow arrow-hair follicles; white arrow-epidermal keratinization; green arrow-inflammatory cells.

图 6 银屑病小鼠背部皮肤切片 HE 染色结果

Fig. 6 HE staining results of skin sections from the back of psoriasis mice

增厚，棘层细胞空泡变性，伴轻度角化，真皮层胶原纤维紊乱，少量炎症细胞浸润；Tap 组表皮轻度角化，棘层细胞较正常，真皮层少量炎症细胞浸润；DHA Sol 组表皮部分增厚，棘层细胞较正常，角质层过度角化并见银屑，真皮层胶原纤维紊乱，炎症细胞浸润较模型组减轻；DHA-LPs 组皮肤损伤最轻，表皮棘层变薄，轻度角化，真皮层炎症细胞少，治疗效果明显。HE 结果表明，DHA-LPs 通过脂质体递送系统重塑了 IMQ 诱导的银屑病小鼠的皮肤结构异常。

2.8.5 脾脏指数及脾脏 HE 染色 上述实验结果已证实外用 DHA-LPs 可有效改善小鼠银屑病皮肤病变。为进一步探究 DHA-LPs 对全身性治疗效果，实验终点时，解剖取小鼠脾脏，用预冷的 PBS 清洗，去除脂肪和结缔组织后，测量脾脏长度并拍照记录，称量脾脏湿质量，计算脾脏系数，同时，取各组新鲜脾脏组织，用 4% 多聚甲醛固定后，进行石蜡包埋，切片厚度为 4~5 μm，经二甲苯脱蜡、水化后，进行 HE 染色，借助光学显微镜进行多视野形态学观察，系统性评价 DHA-LPs 对银屑病小鼠脾脏异常的缓解程度。结果见图 7 和表 13。

脾脏系数 = 脾脏质量 / 体质量

以对照组正常脾脏大小为基准，模型组较对照组脾脏增大约 1.4 倍 ($P < 0.05$)，提示银屑病模型诱导后伴随明显的脾脏炎性肿大。与模型组相比，Tap 组和 DHA Sol 组小鼠的脾脏长度均显

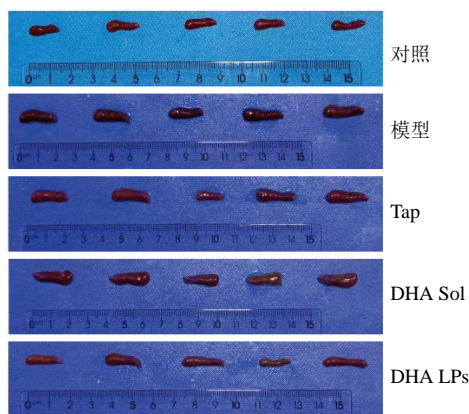


图 7 各给药组银屑病小鼠脾脏外观

Fig. 7 Appearance of the spleens of the psoriasis mice in each treatment group

表 13 各给药组小鼠脾脏长度比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 13 Comparison of spleen lengths in psoriasis mice among different treatment groups ($\bar{x} \pm s, n=5$)

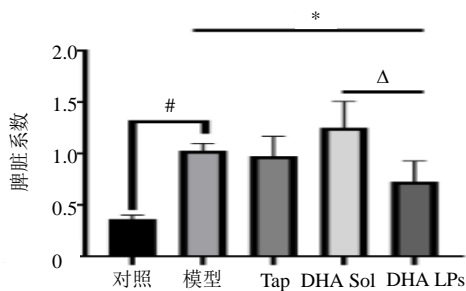
组别	脾脏长度/cm
对照	1.40 ± 0.08
模型	2.02 ± 0.17 ^{###AS}
Tap	1.84 ± 0.24 [*]
DHA Sol	1.84 ± 0.21 ^{*Δ}
DHA-LPs	1.60 ± 0.14 ^{**ΔSS}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与 Tap 组比较: ^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$; 与 DHA Sol 组比较: [§] $P < 0.05$ ^{§§} $P < 0.01$ 。

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.001$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs Tap group; [§] $P < 0.05$ ^{§§} $P < 0.01$ vs DHA Sol group.

著降低 ($P < 0.05$), 而 DHA-LPs 组的脾脏长度降低更加明显, 差异具有更高显著性 ($P < 0.01$)。与 Tap 组相比, DHA Sol 组和 DHA-LPs 组的脾脏长度均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。此外, 与 DHA Sol 组相比, DHA-LPs 组脾脏长度进一步降低 ($P < 0.01$), 表明 DHA-LPs 在缓解银屑病小鼠脾脏肿大方面具有更优越的治疗效果。

通过统计分析各实验组小鼠的脾脏系数^[31], 可精确评估 DHA-LPs 对银屑病小鼠脾脏大小的改善程度, 结果如图 8 所示。



与对照组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$; 与 DHA Sol 组比较: $\Delta P < 0.05$ 。

$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs DHA Sol group.

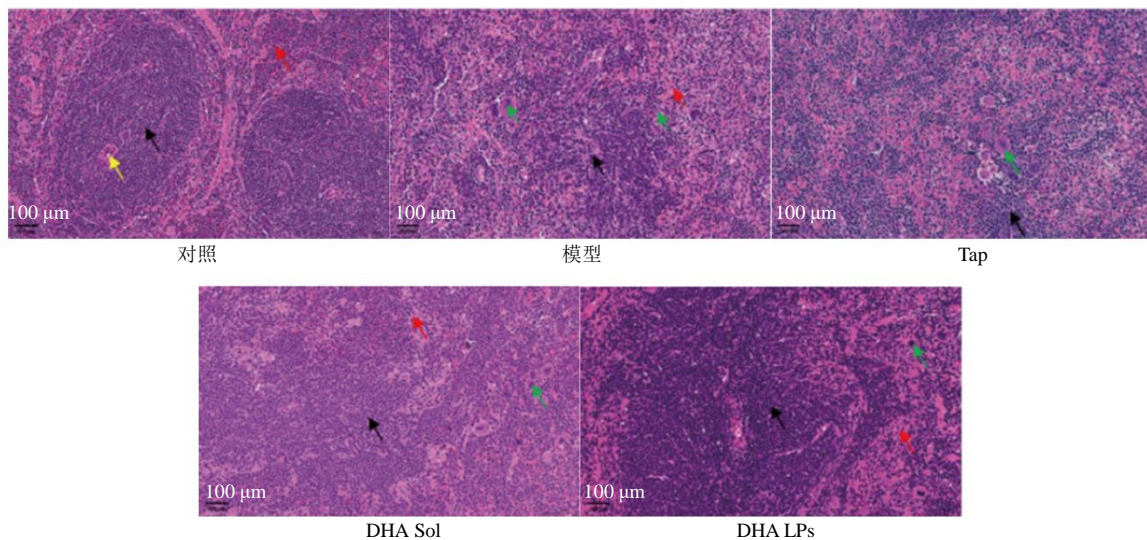
图 8 DHA-LPs 对银屑病小鼠脾脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 8 Effect of DHA-LPs on the spleen index in psoriatic mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

对照组脾脏系数正常; 模型组脾脏系数显著高于对照组 ($P < 0.05$), 表明模型组小鼠脾脏异常增大; 与模型组相比, Tap 组及 DHA Sol 组无显著差异, 表明两组对脾脏肿大的缓解程度不明显, DHA-LPs 组脾脏系数显著降低 ($P < 0.05$), 接近对照组水平, 显示出显著疗效; DHA-LPs 组与 DHA Sol 组有显著差异 ($P < 0.05$), 表明 DHA-LPs 治疗效果更优。上述脾脏系数结果与脾脏大小趋势一致, 提示 DHA-LPs 可有效改善 IMQ 诱导的小鼠脾脏病理异常, 可能与脂质体递送系统提升 DHA 递送效率, 增强 DHA 治疗效果有关。

DHA-LPs 对银屑病小鼠脾脏组织形态的改善作用结果如图 9 所示, 对照组脾组织正常, 脾小结数量多, 淋巴细胞排列紧密、结构清晰; 模型组脾脏结构异常, 淋巴细胞减少, 脾小结紊乱, 红髓与脾小结界限不清, 多核巨噬细胞增生明显; Tap 组脾小结结构紊乱, 红髓与脾小结界限不清, 多核巨噬细胞增生; DHA Sol 组脾脏损伤有所改善, 淋巴细胞增多, 脾小结结构略清晰, 多核巨噬细胞减少; DHA-LPs 组脾脏损伤最轻, 淋巴细胞增多, 脾小结结构清晰, 偶见多核巨噬细胞。综上, DHA-LPs 可最大程度改善 IMQ 诱导的小鼠脾脏异常。

2.8.6 DHA-LPs 对免疫细胞的影响 眼眶采血采集各组小鼠的全血样本, 利用全自动血液分析仪



黑色箭头-脾小结; 红色箭头-红髓; 黄色箭头-脾动脉; 绿色箭头-多核巨噬细胞。

Black arrow-splenic nodules; red arrow-red pulp; yellow arrow-splenic artery; green arrow-multinucleated macrophages.

图 9 银屑病模型小鼠脾脏切片 HE 染色结果

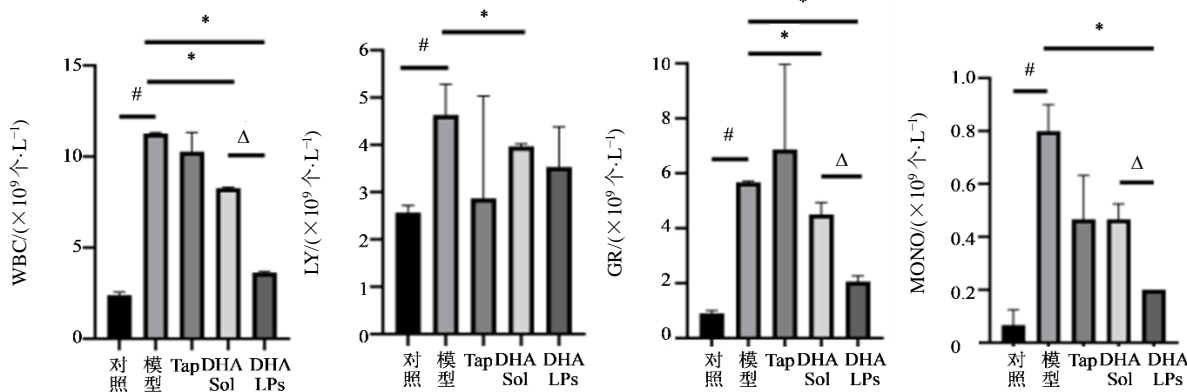
Fig. 9 HE staining results of spleen sections from psoriasis model mice

对样本进行白细胞 (WBC)、淋巴细胞 (LY)、中性粒细胞 (GR) 及单核细胞 (MONO) 计数。通过比较各组的血常规数据, 进一步评估银屑病模型的全身炎症状况及药物干预对炎症和免疫状态的调节作用。

结果如图 10 所示, WBC 在银屑病炎症发生时起重要防御作用, WBC 水平可直观评估银屑病小鼠的炎症强度。其中对照组的 WBC 处于最低水平; 模型组的 WBC 水平是对照组的 4.9 倍 ($P < 0.05$), 表明存在明显炎症反应; Tap 组与模型组无显著差异, 表明 Tap 对于银屑病炎症的治疗效果不理想; DHA Sol 组与模型组虽有显著性差异 ($P < 0.05$), 但 WBC 水平仍是对照组的 3.1 倍 ($P < 0.05$); 相较于 Tap 组和 DHA Sol 组, DHA-LPs 显示出最佳的降低 WBC 的效果, 且 DHA-LPs 的 WBC 水平接近于对照组, 仅为对照组的 1.4 倍, 表明 DHA-

LPs 可明显缓解银屑病炎症反应。

为揭示 DHA-LPs 对银屑病小鼠白细胞亚群的调控作用, 进一步检测并比较了各组小鼠外周血中 LY、GR 及 MONO 的水平差异。模型组的 LY、GR 和 MONO 水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 表明模型组小鼠有严重的炎症反应; Tap 组的 LY、GR、MONO 水平与模型组均无显著性差异, 其中 GR 水平甚至略高于模型组, 表明 Tap 对于银屑病小鼠炎症的治疗作用不理想; DHA Sol 组的 LY、GR 水平相比于模型组有显著性差异 ($P < 0.05$), 但仍显著高于对照组 ($P < 0.05$), 表明 DHA Sol 虽对银屑病炎症有一定治疗效果, 但未达最佳; DHA-LPs 组相较于模型组、DHA Sol 组, 其降低 GR, MONO 作用更明显 ($P < 0.05$), 且 LY、GR 及 MONO 水平接近于对照组, 表现出最佳的炎症治疗效果。



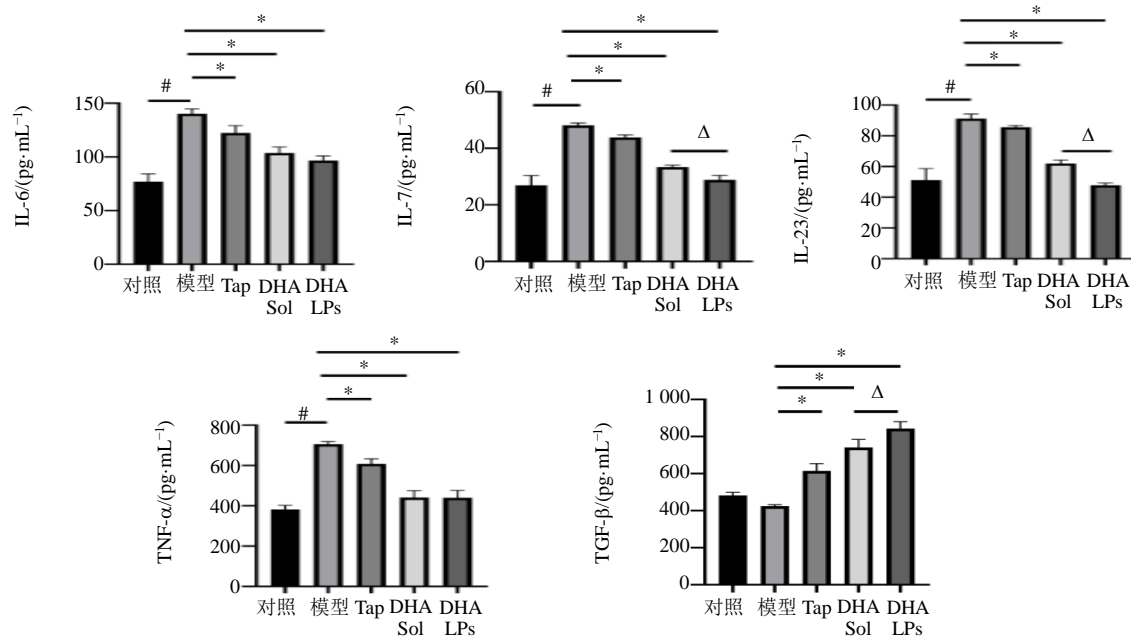
与对照组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$; 与 DHA Sol 组比较: $\Delta P < 0.05$ 。
$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs DHA Sol group.

图 10 DHA-LPs 对银屑病小鼠外周血炎症细胞的调节作用 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 10 Modulatory effect of DHA-LPs on inflammatory cells in the peripheral blood of psoriatic mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

2.8.7 DHA-LPs 对小鼠血清细胞因子的影响 为进一步探究 DHA-LPs 对银屑病小鼠免疫细胞分泌细胞因子的调控作用, 实验终点时, 采集各组小鼠血液, 以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 分离血清, 并置于 -80°C 保存备用。采用 ELISA 法检测血清中促炎因子 IL-6、IL-17、IL-23、TNF- α 及抑炎因子 TGF- β 的含量, 以评估 DHA-LPs 的免疫调节作用。结果如图 11 所示, 对照组的炎症因子和抑炎因子的水平均保持最低水平; 模型组的炎症因子水平是对照组的 1.6~2.0 倍 ($P < 0.05$), 抑炎因子与对照组无显著差异, 整体表现为免疫失衡; Tap 组炎症因子水平虽比模型组有显著降低 ($P <$

0.05), 但炎症因子水平仍是对照组的 1.5~2.0 倍, 表明 Tap 组对银屑病炎症的治疗效果不佳; DHA Sol 组炎症因子水平相较于模型组显著降低 ($P < 0.05$), 且 TGF- β 含量是模型组的 1.5 倍 ($P < 0.05$), 但炎症因子整体水平仍略高于对照组, 表明经 DHA Sol 治疗后, 银屑病小鼠的炎症有一定缓解, 但免疫失衡尚未完全纠正; DHA-LPs 组的炎症因子水平相较于模型组显著降低 ($P < 0.05$), 基本降至接近对照组, 同时 TGF- β 含量显著升高 ($P < 0.05$), 是模型组的 1.7 倍, 处于最高水平。且与 DHA Sol 相比, 炎症因子 IL-17、IL-23 含量显著降低 ($P < 0.05$), 且 TGF- β 含量



与对照组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$; 与 DHA Sol 组比较: $\Delta P < 0.05$ 。
$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs DHA Sol group.

图 11 各组 IL-6、IL-17、IL-23、TNF- α 、TGF- β 质量浓度变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 11 Changes in concentrations of IL-6, IL-17, IL-23, TNF- α , and TGF- β in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

显著升高 ($P < 0.05$), 表明 DHA-LPs 很大程度纠正了银屑病小鼠的免疫失衡, 调节炎症反应至接近正常水平。

2.9 统计学分析

数据分析和图表制作采用 Design-Expert 13.0 和 GraphPad Prism 8.0 进行, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用 Two-way ANOVA 检验法分析或 One-way ANOVA 检验法分析, $P < 0.05$ 时判定组间存在显著性差异。

3 讨论

银屑病引发的皮损及炎症是其治疗的难点, DHA-LPs 对于银屑病小鼠皮损及炎症反应的治疗作用优于 Tap, 具有较好的应用前景。

尽管 DHA 已被证实具有显著的抗炎与免疫调节活性^[32], 但其临床应用受限于首关效应导致的生物利用度低下、化学稳定性差和生物半衰期短^[33]。本课题组前期研究显示, DHA 经口服给药后血药浓度半衰期不足 3 h^[34], 而本课题组通过脂质体纳米包封技术成功将 DHA 体外释放周期延长至 72 h^[35]。这种基于纳米载体的缓释策略不仅与 Wang 等^[36]报道的脂质体延长药物作用时间机制相契合, 更为解决青蒿素类药物“代谢逃逸”等难题提供了创新性解决方案。

在课题组前期关于 DHA-LPs 体内给药研究的基础上^[35], 本研究创新性地将 DHA-LPs 应用于皮肤局部给药, 证实了其治疗银屑病的安全性和独特疗效。相较于传统外用制剂 (如乳膏、酊剂), 脂质体在皮肤外用药中展现出三重独特优势: 首先, 磷脂双分子层结构与角质层脂质具有相似相容性, 可显著提升药物经皮渗透效率; 其次, 脂质体因其较小的粒径可在皮肤毛囊处形成药物储库, 实现缓释效应; 最后, 局部应用脂质体可限制药物的系统吸收, 将血药浓度控制较低浓度, 从而规避口服制剂可能引发的肝首关效应及肝毒性风险^[37]。本研究首次将 DHA-LPs 作为皮肤外用制剂治疗小鼠银屑病, 结合脂质体皮肤外用制剂的优良特性, 使 DHA-LPs 成为银屑病局部-系统双重调控的理想载体, 即 DHA-LPs 不仅展现出重塑银屑病小鼠皮肤结构异常的局部治疗作用, 还表现出对银屑病小鼠脾脏异常、血液免疫细胞及细胞因子的促炎-抑炎系统平衡作用。

有研究表明, 银屑病的发病与 T 淋巴细胞的局部浸润、活化及其诱导的角质形成细胞异常增生密切相关^[38]。Aggarwal 等^[39]最早发现并提出银屑病发病的 IL-23/Th17 通路理论, 这一通路至今仍是银屑病发病机制的研究热点。本研究在银屑

病局部-系统双重调控中,创新性阐释了 DHA-LPs 对银屑病外周血白细胞亚群 GR 及 MONO 的特异性调节用:与阳性药物 Tap 相比, DHA-LPs 使 GR 和 MONO 比例分别降低 80.1%和 54.1% ($P < 0.05$); 与 DHA Sol 相比, GR 和 MONO 比例分别降低 55.6%和 55.0% ($P < 0.05$)。这一发现突破了当前银屑病治疗过度依赖 IL-23/Th17 轴调控的思维定式。同时, GR、MONO 异常与银屑病皮损严重程度呈强相关性,提示 DHA-LPs 可能通过抑制 GR 及 MONO 的过度浸润,阻断“炎症-皮损”恶性循环,这为未来银屑病机制研究开辟了新维度。

以 IL-23/Th17 通路理论为代表,多种炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-17、IL-23 被认为与银屑病发病的关联最为直接^[40]。Etanercept、Secukinumab、Ustekinumab 单抗分别是第一款靶向 TNF- α 、IL-17、IL-23 的上市药物。本研究基于以上 3 种炎症因子,探究了 DHA-LPs 对其调节作用,并进一步拓展至 DHA-LPs 对促炎因子 IL-6 及抑炎因子 TGF- β 的动态平衡研究,进一步完善了免疫细胞因子的研究广度。DHA-LPs 对促炎因子 TNF- α 、IL-17 及 IL-23 的抑制效果显著优于阳性药物 Tap ($P < 0.05$),同时 TGF- β 相较于 Tap 有显著升高,表明 DHA-LPs 相较于 Tap 具有更优越的治疗效果; DHA-LPs 相较于 DHA Sol,不仅对促炎因子 IL-17 及 IL-23 表现出更强的抑制作用,同时显著上调抑炎因子 TGF- β 水平。这种双向调控优势表明脂质体递送系统通过增强 DHA 的递送效率,实现了抗炎与免疫调节效应的协同增效,脂质体剂型同时也规避了乙醇溶液剂使皮肤干燥的劣势。

综上所述, DHA-LPs 可有效改善小鼠银屑病样皮损,大幅缓解银屑病小鼠脾脏肿大和系统炎症,药效强于 DHA Sol 及阳性药物 Tap。DHA-LPs 通过双重机制干预银屑病病理进程:一方面靶向调控 IL-23/Th17 这一经典通路及 TNF- α 、IL-17、IL-23 等经典炎症因子,另一方面通过重塑 GR、MONO 的免疫平衡,这种对先天免疫细胞的特异性调控,突破了当前以 IL-23/Th17 通路为核心的单一治疗模式。本研究提供了一种减轻银屑病样皮损及炎症的潜在外用治疗药物 DHA-LPs,并创新性探索了其对于 GR 及 MONO 的免疫调节作用,为银屑病治疗向多靶点调控的范式转变提供了实证依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kamiya K, Kishimoto M, Sugai J, et al. Risk factors for the development of psoriasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4347.
- [2] Purewal J S, Doshi G M. Deciphering the function of new therapeutic targets and prospective biomarkers in the management of psoriasis [J]. *Curr Drug Targets*, 2023, 24(16): 1224-1238.
- [3] Salgaonkar S P, Purewal J S, Doshi G M, et al. New insights in psoriasis management using herbal drug nanocarriers [J]. *Curr Pharm Des*, 2024, 30(32): 2550-2561.
- [4] 中华医学会皮肤性病学分会银屑病专业委员会, 张学军. 中国银屑病诊疗指南 (2023 版) [J]. *中华皮肤科杂志*, 2023, 56(7): 573-625.
Committee on Psoriasis, Chinese Society of Dermatology; Zhang X J, Zhang X J. Guideline for the diagnosis and treatment of psoriasis in China (2023 edition) [J]. *Chin J Dermatol*, 2023, 56(7): 573-625.
- [5] 中华医学会皮肤性病学分会, 中国医师协会皮肤科医师分会, 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会, 等. 中国银屑病生物制剂治疗指南 (2021) [J]. *中华皮肤科杂志*, 2021, 54(12): 1033-1047.
Chinese Society of Dermatology, Chinese Dermatologist Association, Chinese Dermatovenerology Society of Integrative Medicine, et al. Guidelines for the treatment of psoriasis with biologic agents in China (2021) [J]. *Chin J Dermatol*, 2021, 54(12): 1033-1047.
- [6] 史琳丽, 晏少琛, 毕新岭. 银屑病常用生物制剂诱导的矛盾性反应研究进展 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2023, 39(3): 201-205.
Shi L L, Yan S C, Bi X L. Update of paradoxical reactions induced by commonly used biological agents in psoriasis [J]. *China J Lepr Skin Dis*, 2023, 39(3): 201-205.
- [7] Gao Y T, Cui M M, Zhong S J, et al. Dihydroartemisinin ameliorates LPS-induced neuroinflammation by inhibiting the PI3K/AKT pathway [J]. *Metab Brain Dis*, 2020, 35(4): 661-672.
- [8] Li Y N, Fan M L, Liu H Q, et al. Dihydroartemisinin derivative DC32 inhibits inflammatory response in osteoarthritic synovium through regulating Nrf2/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74: 105701.
- [9] Patel P S, Srivastava R, Panchawat S. Role of apoptotic-targeted phytoconstituent-loaded antipsoriatic nanobiocomposites [J]. *Recent Pat Nanotechnol*, 2024, 18(2): 220-236.

- [10] Armstrong A W, Read C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: A review [J]. JAMA, 2020, 323(19): 1945-1960.
- [11] Tian X Y, Peng F R, Xiong X X, et al. Artemisinin analogues are effective in the treatment of psoriasis by targeting ROR γ t [J]. Mol Immunol, 2025, 180: 11-22.
- [12] Huang Z Z, Xu Y, Xu M, et al. Artesunate alleviates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in BALB/c mice [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 75: 105817.
- [13] Bai G C, Gao Y B, Liu S J, et al. pH-dependent rearrangement determines the iron-activation and antitumor activity of artemisinins [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 163: 234-242.
- [14] Chai L Q, Wang R R, Wang Y, et al. Auto-induction of intestinal first-pass effect related time-dependent pharmacokinetics of artemisinin rather than dihydroartemisinin [J]. J Pharm Sci, 2021, 110(1): 458-466.
- [15] Nestle F O, Kaplan D H, Barker J. Psoriasis [J]. N Engl J Med, 2009, 361(5): 496-509.
- [16] Efferth T, Oesch F. The immunosuppressive activity of artemisinin-type drugs towards inflammatory and autoimmune diseases [J]. Med Res Rev, 2021, 41(6): 3023-3061.
- [17] 王蓉蓉. 四种双氢青蒿素前药自组装纳米粒的制备、药动学及药效学评价 [D]. 太原: 山西医科大学, 2019.
- Wang R R. Preparation, Pharmacokinetics and pharmacodynamic evaluation of four dihydroartemisinin prodrug self-assembled nanoparticles [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2019.
- [18] 张娇, 蒋倩倩, 张伯言, 等. 基于 AHP-CRITIC 法正交优选乌甘袋泡茶提取工艺及抗炎作用研究 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2177-2184.
- Zhang J, Jiang Q Q, Zhang B Y, et al. Study on extraction process and anti-inflammatory effect of Wugan Tea based on AHP-CRITIC analysis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(8): 2177-2184.
- [19] Zhou R G, Chan A H S. Using a fuzzy comprehensive evaluation method to determine product usability: A test case [J]. Work, 2017, 56(1): 21-29.
- [20] 刘绍姜, 钟凌云, 张弘毅, 等. 基于 AHP-CRITIC 法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选盐麸泽泻炮制工艺及药效研究 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2773-2785.
- Liu S J, Zhong L Y, Zhang H T, et al. Study on optimization of processing technique and pharmacological effects of *Alismatis Rhizoma* with salt bran, bran using AHP-CRITIC method combined with response surface methodology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(8): 2773-2785.
- [21] 祁玉芳, 范星晨, 汪思晨, 等. 基于 AHP-CRITIC 复合加权法优选厚朴姜炙工艺及姜炙前后化学成分变化研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(14): 3806-3814.
- Qi Y F, Fan X C, Wang S C, et al. Processing magnoliae officinalis cortex with ginger juice: Process optimization based on AHP-CRITIC weighting method and composition changes after processing [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(14): 3806-3814.
- [22] Fan Y, Marioli M, Zhang K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 192: 113642.
- [23] Li X X, Chen J, Shen J M, et al. pH-Sensitive nanoparticles as smart carriers for selective intracellular drug delivery to tumor [J]. Int J Pharm, 2018, 545(1/2): 274-285.
- [24] Hartrick C T, Hartrick K A. Extended-release epidural morphine (DepoDur): Review and safety analysis [J]. Expert Rev Neurother, 2008, 8(11): 1641-1648.
- [25] Jafari M R, Jones A B, Hikal A H, et al. Characterization of drug release from liposomal formulations in ocular fluid [J]. Drug Deliv, 1998, 5(4): 227-238.
- [26] 魏明, 甘露, 侯进, 等. 白藜芦醇抑制角蛋白 17 改善银屑病样皮肤损伤 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 37-41.
- Wei M, Gan L, Hou J, et al. Promotion of resveratrol on psoriasis like skin damage by down-regulating expression of Keratin 17 [J]. Drug Eval Res, 2017, 40(1): 37-41.
- [27] Chen Y C, Yan Y H, Liu H Z, et al. Dihydroartemisinin ameliorates psoriatic skin inflammation and its relapse by diminishing CD8⁺ T-cell memory in wild-type and humanized mice [J]. Theranostics, 2020, 10(23): 10466-10482.
- [28] 钟淇滨, 祝曙光, 陆少君, 等. 和厚朴酚对咪喹莫特诱导小鼠银屑病的干预作用 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(5): 626-631.
- Zhong Q B, Zhu S G, Lu S J, et al. Anti-psoriatic effects of honokiol in imiquimod induced mouse model [J]. Chin Pharmacol Bull, 2018, 34(5): 626-631.
- [29] 杨凡, 管连城, 赵泽鑫, 等. 黄芪对银屑病小鼠模型皮损维生素 D 受体表达及 IL-23、IL-17 水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(7): 31-34, 263-265.
- Yang F, Guan L C, Zhao Z X, et al. Effects of Huangqi(*astragali Radix*) on expression of VDR and level of IL-23 and IL-17 in skin lesions of psoriatic mice models [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2024, 42(7): 31-

- 34, 263-265.
- [30] 刘丹, 宫灿仪, 许静, 等. 青黄软膏对咪喹莫特诱导银屑病小鼠模型的治疗效果及作用机制 [J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2025, 32(5): 322-328.
- Liu D, Gong C Y, Xu J, et al. Study on the therapeutic effects of Qinghuang ointment in a mouse model of imiquimod-induced psoriasis and its underlying mechanisms [J]. *J Diagn Ther Derm Venereol*, 2025, 32(5): 322-328.
- [31] 杨建鸿, 刘伯言, 陈军, 等. 纳米气泡氩水处理对咪喹莫特诱导银屑病小鼠模型的影响 [J]. 生物技术进展, 2024, 14(4): 676-684.
- Yang J H, Liu B Y, Chen J, et al. Effects of pre-treatment of nanobubble hydrogen water on the mouse psoriasis induction by imiquimod [J]. *Curr Biotechnol*, 2024, 14(4): 676-684.
- [32] Liu J M, Jin Q X, Fujimoto M, et al. Dihydroartemisinin alleviates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion in mice involving modulation of IL-23/Th17 axis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 704481.
- [33] 蒋沅岐, 田成旺, 周钰通, 等. 双氢青蒿素固体分散体的制备及其生物利用度研究 [J]. 中草药, 2022, 53(4): 1013-1020.
- Jiang Y Q, Tian C W, Zhou Y T, et al. Preparation and bioavailability of dihydroartemisinin solid dispersions [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(4): 1013-1020.
- [34] 左恒通. 红细胞膜包覆双氢青蒿素聚乳酸-羟基乙酸仿生纳米粒的制备及抗疟作用评价 [D]. 太原: 山西医科大学, 2022.
- Zuo H T. Preparation and antimalarial evaluation of erythrocyte membrane-coated dihydroartemisinin PLGA biomimetic nanoparticles [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2022.
- [35] 段丹昱. 两种阿霉素-双氢青蒿素偶联前药自组装纳米粒的制备及抗肿瘤药效学评价 [D]. 太原: 山西医科大学, 2022.
- Duan D Y. Preparation and antitumor pharmacodynamic evaluation of two doxorubicin-dihydroartemisinin conjugated prodrug self-assembled nanoparticles [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2022.
- [36] Wang S Y, Liu R H, Fu Y, et al. Release mechanisms and applications of drug delivery systems for extended-release [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2020, 17(9): 1289-1304.
- [37] Koynova R, Tenchov B. Recent progress in liposome production, relevance to drug delivery and nanomedicine [J]. *Recent Pat Nanotechnol*, 2015, 9(2): 86-93.
- [38] 李鑫, 范洁琳. Th17/Treg 细胞在银屑病的发病机制研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(24): 4769-4772.
- Li X, Fan J L. Advancements in Th17/treg cells in the pathogenesis of psoriasis [J]. *Prog Mod Biomed*, 2012, 12(24): 4769-4772.
- [39] Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M H, et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(3): 1910-1914.
- [40] Cua D J, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain [J]. *Nature*, 2003, 421(6924): 744

[责任编辑 孙英杰]