

壳聚糖修饰大黄酸脂质体凝胶的制备及透皮抗光老化活性评价

王 丽¹, 高小玲^{2*}, 贾文汇¹, 刘广辉¹, 黄一聆¹

1. 商丘医学高等专科学校 药学院, 河南 商丘 476000

2. 河南中医药大学 药学院, 河南 郑州 450046

摘 要: 目的 制备壳聚糖修饰的大黄酸脂质体 (CS-Rhe-Lips) 凝胶, 评价其制剂学特性、透皮递送效率及抗皮肤光老化活性。方法 以包封率、载药量及粒径为关键评价指标, 采用单因素结合 Box-Behnken 响应面法优化 CS-Rhe-Lips 的制备处方; 通过透射电子显微镜 (TEM) 观察其微观形态。以卡波姆 940 为凝胶基质, 将优化后的 CS-Rhe-Lips 混悬液制备为 CS-Rhe-Lips 凝胶, 考察其体外释药行为及流变学特征; 采用 Franz 扩散池法评价该凝胶的经皮渗透性能及皮肤滞留量。建立紫外线照射诱导的昆明小鼠皮肤光老化模型, 将小鼠按体重随机分为对照组、模型组、维生素 C (阳性药, 10 mg·kg⁻¹) 组、大黄酸凝胶 (20 mg·kg⁻¹) 组、大黄酸脂质体 (Rhe-Lips, 20 mg·kg⁻¹) 凝胶组及 CS-Rhe-Lips 凝胶低、高剂量组 (10、20 mg·kg⁻¹) 组。通过皮损面积和严重程度 (PASI) 评分评价皮损面积及严重程度, 检测皮肤组织炎症因子水平与皮肤含水量, 结合苏木素-伊红 (HE) 染色、Masson 染色观察皮肤病理形态及胶原纤维变化。**结果** 确定 CS-Rhe-Lips 的最佳制备处方为: 药物与磷脂用量比 9.88:1.00、磷脂与胆固醇用量比 5.18:1.00、壳聚糖质量分数 0.19%。优化后 CS-Rhe-Lips 的平均包封率为 (85.65±0.85)%, 载药量为 (3.93±0.09)%, 粒径为 (185.83±7.55) nm, Zeta 电位为 (25.15±1.09) mV。TEM 观察显示其形态圆整, 呈类圆形或圆形。CS-Rhe-Lips 凝胶体外 24 h 累积释放度达 76.73%, 具有良好的固体弹性特征, 倒置后无流淌现象。与大黄酸凝胶相比, CS-Rhe-Lips 凝胶的大黄酸透皮速率、累积渗透量及皮肤滞留量分别提高 2.90 倍、2.87 倍和 3.28 倍。动物实验结果显示, CS-Rhe-Lips 凝胶能显著降低光老化小鼠皮肤 PASI 评分, 抑制炎症因子的异常升高, 提高皮肤含水量, 改善光老化皮肤的外观形态及组织结构, 增加胶原纤维含量; 其抗光老化作用显著优于大黄酸凝胶及 Rhe-Lips 凝胶, 且高剂量组效果更优。**结论** CS-Rhe-Lips 凝胶具有理想的缓释特性与流变学性能, 可显著改善大黄酸的透皮递送效率, 增强其抗皮肤光老化活性。

关键词: 大黄酸; 脂质体凝胶; 壳聚糖; 透皮性能; 抗皮肤光老化; 经皮给药

中图分类号: R283; R944.9; R758.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)01-0202-13

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2026.01.018

Preparation and transdermal anti-photoaging activity evaluation of chitosan-modified rhein liposome gel

WANG Li¹, GAO Xiaoling², JIA Wenhui¹, LIU Guanghui¹, HUANG Yiling¹

1. Department of Pharmacy, Shangqiu Medical College, Shangqiu 476000, China

2. Department of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To prepare chitosan-coated rhein (CS-Rhe-Lips) liposomes, its pharmaceutical characteristics, transdermal delivery efficiency and anti-skin photoaging effect was investigated. **Methods** Envelopment efficiency, drug loading and particle size were used as key evaluation indicators, single factor study and Box-Behnken design-response surface method (BBD-RSM) were employed to optimize the prescriptions of CS-Rhe-Lips. Transmission electron microscope (TEM) was employed to observe the microscopic morphology of CS-Rhe-Lips. CS-Rhe-Lips gel was formulated using carbopol 940 as gel matrix after optimized the prescriptions of CS-Rhe-Lips suspension, its drug release behavior *in vitro* and rheological characteristics were also investigated. Franz diffusion cell method was used to investigate the transdermal properties and skin retention of CS-Rhe-Lips gel. Ultraviolet irradiation-induced skin photoaging model of KM mice was established, and then randomly divided into control group, model

收稿日期: 2025-08-18

基金项目: 2024 年度河南省科技攻关项目 (242102110111)

作者简介: 王 丽 (1979—), 女, 硕士, 副教授, 主要从事临床药学研究。E-mail: maomao0492@163.com

*通信作者: 高小玲 (1981—), 女, 博士, 教授, 主要从事中医药研究。E-mail: gxling2005@163.com

group, vitamin C group (positive drug, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), rhein gel group (Rhe-Lips, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), CS-Rhe-Lips gel low-dose and high-dose group ($10, 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The area and severity of skin lesions were evaluated by the PASI score. The levels of inflammatory factors in skin tissue and the skin water content were detected. The pathological morphology and changes of collagen fibers in the skin were observed through hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining. **Results** The optimal formulation of CS-Rhe-Lips: carriers to drug ratio was $9.88 : 1.00$, phospholipids to cholesterol ratio was $5.18 : 1.00$, and chitosan concentration was 0.19% . Envelopment efficiency, drug loading, particle size and Zeta potential of CS-Rhe-Lips were $(85.65 \pm 0.85) \%$, $(3.93 \pm 0.09) \%$, $(185.83 \pm 7.55) \text{ nm}$, $(25.15 \pm 1.09) \text{ mV}$, respectively. TEM results showed that the microscopic morphology of CS-Rhe-Lips were regular, presenting as an oval or circular shape. The cumulative release rate of CS-Rhe-Lips gel was increased to 76.73% in 24 h, which had solid properties and did not flow after inversion. Compared with Rhe gel, CS-Rhe-Lips gel enhanced the transdermal rate, cumulative permeation amount, and skin retention of rhein by 2.90, 2.87, and 3.28-fold, respectively. The results of animal experiments showed that CS-Rhe-Lips gel significantly reduced the PASI, suppressed the increase of inflammatory factors in photoaging skin tissue, increased skin moisture, improved the appearance and tissue structure of photoaging skin, and increased collagen fibers. The anti-skin photoaging effect of CS-Rhe-Lips gel was superior than that of rhein gel and Rhe-Lips gel, and the effect of high-dose group of CS-Rhe-Lips gel was better. **Conclusion** CS-Rhe-Lips gel exhibited ideal sustained release characteristics and rheological properties, significantly improving the transdermal delivery efficiency of rhein, and enhancing anti-skin photoaging activity.

Key words: rhein; liposome gel; chitosan; transdermal properties; skin photoaging; transdermal drug delivery

皮肤光老化主要由紫外线辐射引发, 表现为皮肤外观改变、弹性下降、干燥失水及皱纹增多等, 严重时可诱发鳞状细胞癌等恶性皮肤疾病^[1]。临床常用化学药物治疗该病症, 但易引发皮肤刺激、红斑等不良反应, 因耐受性较差限制了其临床应用。中药活性成分凭借刺激性小、多靶点协同调控等优势, 已获得国内外医药研究者的广泛关注^[1]。

中药大黄及其复方制剂 (如大黄甘草汤、大黄廑虫丸、颠倒散、桃花散等) 在皮肤光老化等皮肤病的治疗中应用广泛。大黄酸 (Rhe) 是从大黄中分离得到的蒽醌类化合物, 具有抗氧化、抗炎、抗纤维化及促进伤口愈合等多种生物活性^[2-4]。研究已证实, Rhe 可减轻紫外线 B (UVB) 诱导的皮肤光老化损伤^[3], 且其刺激性与不良反应小, 是潜在的光老化治疗候选药物。

Rhe 的油水分分配系数为 $2.79^{[5]}$, 脂溶性良好, 但溶解度仅为 $3.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1[5]}$, 疏水性强导致药物溶出度极差; 同时因其首关效应明显, 口服生物利用度低, 故需通过改变给药途径以充分发挥药效。局部外用是皮肤疾病治疗的重要手段, 但 Rhe 传统外用制剂受皮肤角质层屏障阻碍, 治疗效果欠佳^[6]。化学促渗剂虽可提高药物渗透量, 却易引发不良反应^[7], 因此构建无化学促渗剂、高渗透能力的 Rhe 新型外用制剂成为临床需求^[8]。

脂质体是以磷脂为载体、胆固醇为稳定剂制备的囊泡结构^[9-10], 在口服及注射给药中应用成熟。作为经皮给药载体时, 脂质体可在表皮与真皮间形成

药物储库, 实现药物持续释放。但受角质层阻滞作用, 其难以有效渗透至皮肤深层, 药效发挥受限。壳聚糖 (CS) 是一种天然阳离子多糖^[11], 可通过与皮肤表面负电荷相互作用促进药物经皮渗透, 同时能打开角质层紧密连接^[12], 显著降低药物渗透阻力, 提升皮肤内药物渗透量与滞留量。

基于此, 本研究以 CS 为修饰剂制备壳聚糖包覆大黄酸脂质体 (CS-Rhe-Lips), 采用单因素法结合 Box-Behnken 响应面法 (BBD-RSM) 优化其处方工艺。考虑到 CS-Rhe-Lips 混悬液与皮肤黏合性差、易发生体外损失, 而凝胶剂可增强生物黏附力、利于局部用药并提高利用效率^[7], 故本研究以卡波姆 940 为凝胶基质进一步将其制备为 CS-Rhe-Lips 凝胶。Rhe 原料药及大黄酸脂质体 (Rhe-Lips) 作为对照, 比较 CS-Rhe-Lips 的体外释药特性、离体皮肤渗透能力及对皮肤光老化的治疗作用, 旨在为 Rhe 局部用药提供新型制剂方案, 同时为后续研究奠定基础。

1 仪器、材料与动物

1200 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; WH220-HT 型磁力搅拌器, 上海沪粤明科学仪器有限公司; MSE125P-CE 型电子天平, 德国 Sartorius 公司; PS-60AL 型超声仪, 深圳市雷德邦电子有限公司; Sorvall ST8R 型高速离心机, 美国 ThermoFisher Scientific 公司; RC806D 型溶出仪, 天大天发科技有限公司; BeNano 90 型粒度分析仪, 丹东百特仪器有限公司; MCR302e 型动态剪切流变

仪, 奥地利 Anton Paar 公司; JEM 2100F 型透射电镜 (TEM), 日本电子株式会社; TP-3A 型 Franz 扩散池, 河南佰泽仪器有限公司; T10 型高速组织匀浆机, 德国 IKA 公司; ASA-M3/R 型皮肤角质层含水量测试仪, 上海桂宁实验器材有限公司; BH-2 型光学显微镜, 日本 Olympus 公司。

Rhe 原料药(批号 20210105, 质量分数 97.2%), 武汉大华伟业医药化工有限公司; Rhe 对照品(批号 110757-201607, 质量分数 98.5%), 中国食品药品检定研究院; CS(批号 S11064), 上海源叶生物有限公司; 磷脂(批号 L6300)、胆固醇(批号 C804517), 上海麦克林生化科技有限公司; 卡波姆 940(批号 I2426167), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 三乙醇胺(批号 20230915), 国药集团化学试剂有限公司; 脱毛膏(批号 2024011610H), 中国利洁时家化有限公司; 白细胞介素-1 α (IL-1 α , 批号 F2168-B)、白细胞介素-1 β (IL-1 β , 批号 F2042-B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 批号 F2132-B)、白细胞介素-6 (IL-6, 批号 F2163-B) ELISA 试剂盒, 上海科兴商贸有限公司; 改良马松 (Masson) 染色试剂盒(批号 G1346)、苏木素-伊红染色试剂盒(批号 G1120), 北京索莱宝科技有限公司。

健康 KM 小鼠购自河南省动物实验中心, 生产许可证号 SCXK(豫)2020-0001, 雌雄兼具, 体质量 18~22 g。动物实验遵循商丘医学高等专科学校有关实验动物管理和使用的规定, 动物伦理批准号 LL-2024-006。

2 方法与结果

2.1 CS-Rhe-Lips 混悬液的制备

取 30 mg Rhe 置于茄形瓶中, 加入 30 mL 混合溶剂(三氯甲烷:乙醇=2:1)震荡使之溶解, 加入处方量胆固醇和磷脂, 置于 45 °C 水浴中磁力搅拌 20 min 至完全溶解。减压条件下旋蒸除去有机溶剂, 在茄形瓶内壁上形成均匀脂质薄膜。配制 30 mL pH 6.8 磷酸盐缓冲液(含 0.5% 聚山梨酯 80)作为水相, 加至含脂质薄膜的茄形瓶中, 45 °C 水浴中磁力搅拌 40 min, 超声(200 W, 37 kHz) 10 min。置于 8 °C 冰箱中快速降温, 经 0.45 μ m 滤膜滤过, 即得 Rhe-Lips 混悬液。采用 1% 醋酸配制一定质量浓度的 CS 溶液 30 mL, 与 Rhe-Lips 混悬液混合, 磁力搅拌 3 h。10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min, 弃去上清液, 加入 30 mL 纯化水重悬, 即得 CS-Rhe-Lips 混悬液。采用相同方法制备不含 Rhe 的空白混悬液。

2.2 Rhe 含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用 Agilent SB-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱; 检测波长 254 nm; 柱温 35 °C; 进样体积 20 μ L; 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (60:40); 体积流量 1 mL \cdot min⁻¹。

2.2.2 供试品溶液的配制 精密取 CS-Rhe-Lips 混悬液 1 mL 至 50 mL 量瓶中, 加 30 mL 乙醇超声破坏 CS-Rhe-Lips, 使 Rhe 充分游离, 加乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (60:40) 稀释定容。经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 精密吸取 1 mL 续滤液至 10 mL 量瓶中, 加乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (60:40) 稀释定容, 即得 CS-Rhe-Lips 供试品溶液。同法制备空白脂质体供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 取 Rhe 对照品适量, 采用乙腈配制成质量浓度为 50.00 μ g \cdot mL⁻¹ 的 Rhe 储备液。采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (60:40) 稀释, 配制成质量浓度为 5.00、2.50、1.00、0.50、0.25、0.05 μ g \cdot mL⁻¹ 对照品溶液, 按“2.2.1”项下方法进样测定。以 Rhe 质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 拟合得方程为 $Y=36.1554X-1.8256$, $r=0.9999$, 线性范围 0.05~5.00 μ g \cdot mL⁻¹。

2.2.4 专属性考察 按“2.2.2”项下制备阴性样品溶液。取 CS-Rhe-Lips 供试品溶液、空白脂质体的供试品溶液和质量浓度为 1.00 μ g \cdot mL⁻¹ 的 Rhe 对照品溶液, 按“2.2.1”项下方法进样分析, 结果见图 1。Rhe 色谱峰附近无辅料或其他杂质干扰, 专属性高。

2.2.5 精密度考察 取 0.05、1.00、5.00 μ g \cdot mL⁻¹ 的 Rhe 对照品溶液连续检测 6 次, Rhe 峰面积 RSD 分别为 0.80%、0.47%、0.64% ($n=6$), 表明精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 CS-Rhe-Lips 供试品溶液, 分别于 0、4、8、12、16、24 h 检测, Rhe 质量浓度

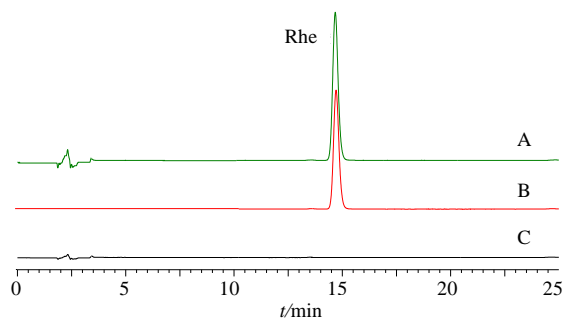


图 1 Rhe 对照品 (A)、CS-Rhe-Lips (B) 和空白样品 (C) 溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of Rhe reference substance (A), CS-Rhe-Lips (B) and negative sample (C) solutions

RSD 为 1.23% ($n=6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取同一份 CS-Rhe-Lips 混悬液, 按“2.2.2”项制备 6 份供试品溶液后进行检测, Rhe 质量浓度 RSD 为 1.49% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密吸取 CS-Rhe-Lips 混悬液 0.5 mL 至 50 mL 量瓶中, 共 9 份, 分成低、中、高 3 组, 每组 3 份。按 Rhe 含量 50% (低)、100% (中) 和 150% (高) 分别加入 Rhe 对照品, 震荡摇匀后制备供试品溶液, 按“2.2.1”项测定 Rhe 总含量, 计算得低、中、高 3 组平均加样回收率分别为 101.16%、99.24%、98.93%, RSD 分别为 1.12%、0.63%、0.78% ($n=3$), 表明该方法准确度高。

2.3 CS-Rhe-Lips 包封率、载药量、粒径多分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位的测定

取葡聚糖凝胶 G-50 置纯化水中, 使之充分溶胀, 制备微柱。精密取 0.2 mL CS-Rhe-Lips 混悬液加入微柱, 于 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 以缩短分离时间。继续加 0.2 mL 纯化水重复洗脱 3 次, 合并洗脱液至 10 mL 量瓶中, 加入 5 mL 乙醇探头超声 10 min (200 W, 37 kHz), 使 Rhe 充分游离, 加乙腈-0.1%磷酸水溶液 (60:40) 稀释至 10 mL, 测定被包封 Rhe 的量 (M_1)。根据 Rhe 投药总量 (M) 计算包封率。根据 CS-Rhe-Lips 处方中药物和辅料总用量 (W) 计算载药量。取 CS-Rhe-Lips 混悬液采用纯化水稀释 50 倍, 混匀后测定粒径、PDI 和 Zeta 电位。

$$\text{包封率} = M_1/M$$

$$\text{载药量} = M_1/W$$

2.4 单因素优化 CS-Rhe-Lips 处方

2.4.1 载药比考察 选用磷脂、胆固醇和 CS 作为 CS-Rhe-Lips 载体。固定磷脂与胆固醇用量比为 6:1, CS 质量分数为 0.2%, 考察载药比对包封率、载药量及粒径的影响, 结果见表 1。随着载药比的增加, CS-Rhe-Lips 包封率逐渐增加后趋稳, 可能是增加载体用量利于增加包封率; 但载体对药物的包载是有限的^[5], 载体用量增加到一定程度后包封率不再明显增加。载药量先增加后逐渐下降, 说明过量使用载体会影响 CS-Rhe-Lips 载药量。CS-Rhe-Lips 粒径随着载药比的增加呈先变小后增加趋势, 可能是载体用量较少时部分药物附着在 CS-Rhe-Lips 表面^[7], 导致粒径较大; 载体用量过大时形成的 CS-Rhe-Lips 数量增加, 从而易发生黏连^[5], 使粒径变大。载药比

表 1 载药比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of carrier to drug ratio ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

载药比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
8:1	62.56±1.53	3.31±0.06	258.90±6.18
9:1	73.94±1.12	3.70±0.07	229.84±10.74
10:1	83.13±0.83	3.84±0.06	195.67±10.27
11:1	83.05±1.09	3.39±0.02	214.00±6.08
12:1	83.61±0.61	3.20±0.06	229.60±5.30

用量比为 10:1 时包封率和载药量均相对较高, 且粒径较小, 故后续对载药比 9:1~11:1 进行优化。

2.4.2 磷脂与胆固醇用量比考察 固定载药比为 10:1, CS 质量分数为 0.2%, 考察磷脂与胆固醇用量比对 CS-Rhe-Lips 包封率、载药量及粒径的影响, 结果见表 2。包封率与载药量随磷脂与胆固醇用量比增加呈先升后降趋势: 磷脂主要为药物负载提供空间^[9], 比例过低会限制包封率与载药量; 胆固醇可增强制剂的韧性及结构稳定性^[5], 若两者用量比过大, 胆固醇占比不足会破坏结构稳定性, 导致药物泄露。粒径随磷脂与胆固醇用量比增大呈先减小后增大趋势, 当用量比为 5:1 时, 制剂的包封率、载药量相对较高且粒径较小, 因此后续对磷脂与胆固醇用量比 4:1~6:1 进行优化。

表 2 磷脂与胆固醇用量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effects of phospholipids to cholesterol amount ratio ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

磷脂与胆固醇用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
3:1	64.21±0.99	3.01±0.07	245.47±5.20
4:1	72.24±1.15	3.73±0.06	211.45±6.08
5:1	84.16±0.95	3.79±0.08	195.63±5.72
6:1	78.96±1.11	3.66±0.06	205.07±5.56
7:1	74.72±0.75	3.46±0.05	212.38±9.60

2.4.3 CS 质量分数的考察 固定载药比为 10:1, 磷脂与胆固醇用量比为 5:1, 考察 CS 质量分数对 CS-Rhe-Lips 包封率、载药量及粒径的影响, 结果见表 3。包封率与载药量随 CS 质量分数增加呈先升后降趋势: CS 包覆于制剂表面时, 有助于减少浅表层药物的泄漏^[12], 因此适当提高 CS 质量分数可提升包封率与载药量; 但 CS 质量分数过高时, 易在缓冲液发生絮凝, 导致 CS 保护层局部解离^[13], 进而造成药物泄漏。粒径随 CS 质量分数增加呈逐渐增大趋势, 当 CS 质量分数为 0.20% 时, 制剂的包封率、载药量相对较高, 且粒径低于 200 nm, 故后续对 CS 质量分数 0.15%~0.25% 进行优化。

表 3 CS 质量分数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effects of CS concentration ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

CS 质量分数/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
0.10	76.21±0.94	3.53±0.10	190.68±4.91
0.15	80.05±0.15	3.63±0.11	191.11±7.48
0.20	85.02±0.34	3.86±0.06	196.42±10.13
0.25	79.66±0.80	3.66±0.08	208.18±7.53
0.30	75.87±1.12	3.54±0.07	228.30±7.09

2.5 BBD-RSM 优化 CS-Rhe-Lips 处方

2.5.1 实验设计及结果 载药用量比 (X_1)、磷脂与胆固醇用量比 (X_2) 和 CS 质量分数 (X_3) 分别作为主要影响因素, 包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2) 和粒径

(Y_3) 是纳米制剂的主要质量指标, 故作为 CS-Rhe-Lips 优化指标。为从整体上控制 CS-Rhe-Lips 质量, 采用总评归一值 (OD) 作为综合质量指标。根据 BBD-RSM 进行 3 因素、3 水平共计 17 次实验, 对 CS-Rhe-Lips 处方进行优化。实验设计及结果见表 4。

$$d_{\text{包封率}} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$$

$$d_{\text{载药量}} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$$

$$d_{\text{粒径}} = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$$

M_i 、 M_{\max} 和 M_{\min} 分别为包封率、载药量和粒径实测值、最大值和最小值

$$OD = (d_{\text{包封率}} \times d_{\text{载药量}} \times d_{\text{粒径}})^{1/3}$$

表 4 BBD-RSM 实验因素水平、设计及结果

Table 4 BBD-RSM factor level, test design and results

序号	X_1	X_2	$X_3/\%$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD	序号	X_1	X_2	$X_3/\%$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD
1	11:1(1)	4:1(-1)	0.20(0)	78.94	3.22	223.88	0	10	9:1	5:1	0.15	76.15	3.72	188.64	0.548
2	9:1(-1)	6:1(1)	0.20	75.61	3.56	189.14	0.453	11	9:1	4:1	0.20	75.43	3.68	193.58	0.477
3	9:1	5:1(0)	0.25(1)	72.75	3.51	230.56	0	12	10:1	5:1	0.20	85.31	3.90	194.26	0.905
4	10:1(0)	5:1	0.20	84.17	3.95	183.34	0.960	13	10:1	5:1	0.20	83.24	3.84	196.62	0.813
5	10:1	6:1	0.25	79.20	3.46	224.71	0.370	14	10:1	5:1	0.20	85.65	3.93	185.74	0.977
6	10:1	5:1	0.20	83.54	3.85	184.15	0.893	15	10:1	4:1	0.25	73.38	3.24	230.95	0.065
7	10:1	6:1	0.15(-1)	78.44	3.44	194.52	0.476	16	11:1	6:1	0.20	81.54	3.41	196.38	0.518
8	10:1	4:1	0.15	77.92	3.41	188.92	0.456	17	11:1	5:1	0.25	80.61	3.36	243.04	0.000
9	11:1	5:1	0.15	80.47	3.26	215.81	0.248								

2.5.2 模型拟合与方差分析 根据表 4 测得的 OD 值, 使用 Design Expert V13.0 软件建立数学模型, 得 OD 多元二次项方程为 $OD = 0.91 - 0.09 X_1 + 0.10 X_2 - 0.16 X_3 + 0.14 X_1 X_2 + 0.08 X_1 X_3 + 0.07 X_2 X_3 - 0.35 X_1^2 - 0.20 X_2^2 - 0.37 X_3^2$, 数学模型系数 R^2 为 0.982 5; 修正系数 R_{Adj}^2 为 0.959 9, 说明该数学模型可以反映 95.99% 响应值的变化规律, 测定值和拟合值相关性良好。方差结果见表 5, 数学模型 $P < 0.000 1$, 说明因变量与自变量之间的关联性极强;

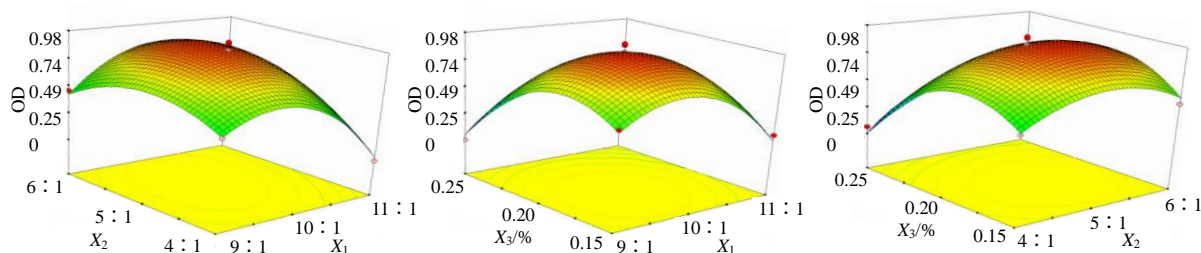
失拟项 $P = 0.395 6$ ($P > 0.05$), 说明由误差引起的拟合偏差未对结果造成显著影响。OD 多元二次项方程中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 $X_1 X_2$ 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 项均具有极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.5.3 响应面分析及 CS-Rhe-Lips 最佳处方 分别绘制 X_1 、 X_2 、 X_3 对 OD 值的三维曲面图, 结果见图 2。随着各个自变量增加 OD 值均呈先增加后下降情况, 即典型的抛物线变化趋势。OD 值最大值作为优化目标, 得 CS-Rhe-Lips 最佳处方: X_1 为 9.88:1.00,

表 5 回归模型方差分析结果

Table 5 Results of variance analysis of regression model

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.84	9	0.20	43.59	<0.000 1	X_1^2	0.50	1	0.50	106.78	<0.000 1
X_1	0.06	1	0.06	13.57	0.007 8	X_2^2	0.17	1	0.17	36.67	0.000 5
X_2	0.08	1	0.08	17.86	0.003 9	X_3^2	0.56	1	0.56	119.79	<0.000 1
X_3	0.21	1	0.21	44.37	0.000 3	残差	0.03	7	4.70×10^{-3}		
$X_1 X_2$	0.07	1	0.07	15.56	0.005 6	失拟项	0.02	3	5.37×10^{-3}	1.28	0.395 6
$X_1 X_3$	0.02	1	0.02	4.83	0.063 8	绝对误差	0.02	4	4.20×10^{-3}		
$X_2 X_3$	0.02	1	0.02	4.29	0.077 0	总和	1.88	16			

图 2 X_1 、 X_2 、 X_3 对 OD 值影响的响应面图Fig. 2 Response surface plot of X_1 , X_2 and X_3 on OD value

X_2 为 5.18 : 1.00, X_3 为 0.19%, 预测 OD 值为 0.982。

2.5.4 CS-Rhe-Lips 工艺验证 制备 3 批 CS-Rhe-Lips, 指标测定结果见表 6。CS-Rhe-Lips 平均包封率、载药量和粒径分别为 $(85.65 \pm 0.85) \%$ 、 $(3.93 \pm 0.09) \%$ 和 $(185.83 \pm 7.55) \text{ nm}$ 。3 批 CS-Rhe-Lips 的实际 OD 值为 0.976, 根据数学模型预测 OD 值 (0.982) 实际 OD 值相对偏差为 -0.61%, 说明构建的数学模型具有较高的指导意义。另测得 CS-Rhe-Lips 平均 PDI 值为 0.117 ± 0.006 , Zeta 电位为 $(25.15 \pm 1.09) \text{ mV}$, 见图 3。

表 6 处方验证结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 6 Prescription verification results ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

批次	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
1	85.45 ± 1.04	3.93 ± 0.12	181.09 ± 7.10
2	85.69 ± 1.05	3.91 ± 0.11	186.81 ± 8.16
3	85.80 ± 0.77	3.95 ± 0.06	189.58 ± 7.41

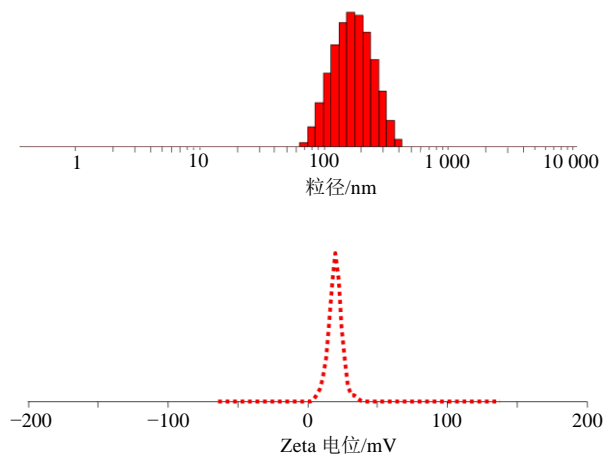


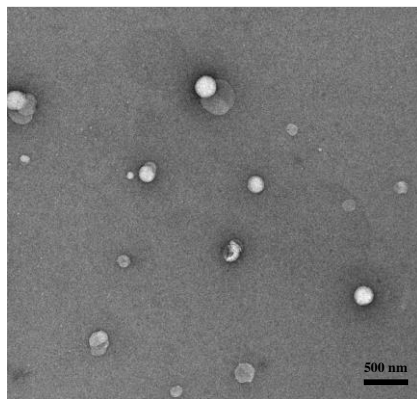
图 3 CS-Rhe-Lips 粒径和 Zeta 电位

Fig. 3 Particle size and Zeta potential of CS-Rhe-Lips

2.6 TEM 观察 CS-Rhe-Lips 外貌

取 CS-Rhe-Lips 混悬液用蒸馏水稀释 40 倍, 滴入 5 滴浓度为 2% 戊二醛固定液, 以降低制备样本

时对 CS-Rhe-Lips 形貌的影响, 摇匀后静置 2 h。取适量混悬液滴至铜网上, 晃动使之铺展均匀, 加 1.5% 磷钨酸钠染色, 晾干, 置 TEM 下观察 CS-Rhe-Lips 形貌。结果见图 4, CS-Rhe-Lips 呈圆形或类圆形。

图 4 CS-Rhe-Lips 的 TEM 图 ($\times 20\ 000$)Fig. 4 TEM of CS-Rhe-Lips ($\times 20\ 000$)

2.7 Rhe、Rhe-Lips 和 CS-Rhe-Lips 凝胶的制备

除不加 CS 外, 按照 CS-Rhe-Lips 最优处方及工艺制备 Rhe-Lips 混悬液, 测得平均包封率为 $(82.72 \pm 1.07) \%$, 载药量为 $(7.79 \pm 0.13) \%$, 粒径为 $(172.50 \pm 4.39) \text{ nm}$, PDI 值为 0.101 ± 0.007 , Zeta 电位为 $(-23.81 \pm 0.94) \text{ mV}$ 。参考文献方法^[7], 称取卡波姆 940 适量分散至 30 mL 蒸馏水中, 使卡波姆 940 质量分数为 2.0%, 磁力搅拌 1 h 后静置过夜, 即得空白凝胶基质。取 Rhe 混悬液 (仅将 Rhe 分散于水中)、Rhe-Lips 混悬液和 CS-Rhe-Lips 混悬液 30 mL 加至凝胶基质, 搅拌均匀, 使用三乙醇胺调节 pH 值至 6.5, 静置过夜即得各凝胶。室温环境中各样品外观见图 5, 由于 Rhe 难溶于水, 在混悬液中易沉降聚集于体系底部, 致使所制备的 Rhe 凝胶均一性欠佳; 而 Rhe-Lips 混悬液、CS-Rhe-Lips 混悬液及其对应制备的凝胶均呈现良好均一性, 且凝胶倒置后无流淌现象, 表明其成型性良好。

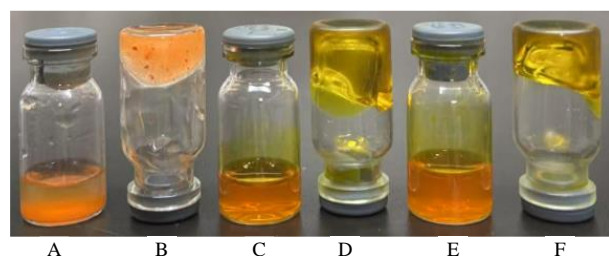


图 5 Rhe 混悬液 (A) 及其凝胶 (B)、Rhe-Lips 混悬液 (C) 及其凝胶 (D)、CS-Rhe-Lips 混悬液 (E) 及其凝胶 (F) 的外观

Fig. 5 Appearance of Rhe suspension (A) and its gel (B), Rhe-Lips suspension (C) and its gel (D), CS-Rhe-Lips suspension (E) and its gel (F)

2.8 体外释药行为及流变学研究

2.8.1 体外释药行为比较 取 Rhe 凝胶、Rhe-Lips 凝胶和 CS-Rhe-Lips 凝胶适量 (Rhe 含量均为 15.0 mg), 加入 5 mL pH 6.5 磷酸盐缓冲液 [含 1.0% 的十二烷基硫酸钠 (SDS)], 震荡分散成混悬液后密封至透析袋中 (截留相对分子质量 1×10^4)。采用 900 mL pH 6.5 磷酸盐缓冲液 (含 1.0% 的 SDS) 作为介质, 并恒温至 37 °C, 在 75 r·min⁻¹ 条件下分别于 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、18.0、24.0 h 取 5 mL 介质, 并补充 5 mL pH 6.5 磷酸盐缓冲液 (含 1.0% 的 SDS), 测定 Rhe 质量浓度, 考察 “2.7” 项下制备的 3 种凝胶剂的释药行为。结果见图 6。Rhe 凝胶 24 h 累积释放度仅为 23.13%, 主要与 Rhe 疏水性强、粒度大等因素有关^[4], 而 Rhe-Lips 凝胶和 CS-Rhe-Lips 凝胶累积释放度分别提高至 85.90% 和 76.73%。

2.8.2 线性应变扫描分析 取 Rhe 凝胶、Rhe-Lips 凝胶和 CS-Rhe-Lips 凝胶分别作单次应变扫描, 模式为震荡模式, 角频率 10 rad·s⁻¹, 测试温度为 37 °C,

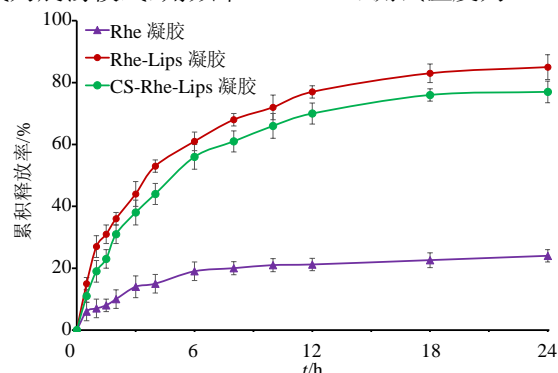


图 6 体外释药曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 6 In vitro drug release curve ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

频率为 5 Hz, 应变范围为 1.16%~211.56%^[7]。结果见图 7, Rhe 凝胶、Rhe-Lips 凝胶和 CS-Rhe-Lips 凝胶在各个应变点的储能模量 (G') 均大于各自的损耗模量 (G''), 证明各个凝胶在一定的应变范围内具有固体弹性性质。

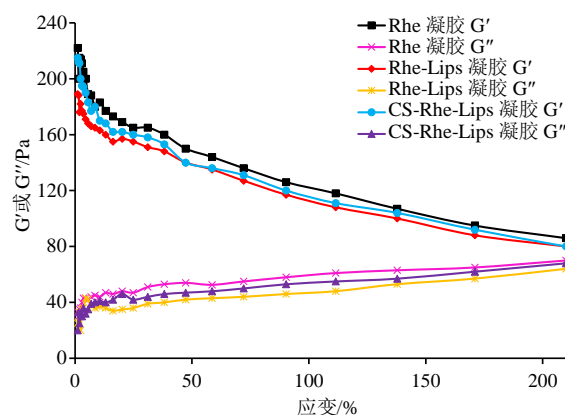


图 7 各个凝胶模量-应变关系曲线

Fig. 7 Modulus-strain curve of each gel

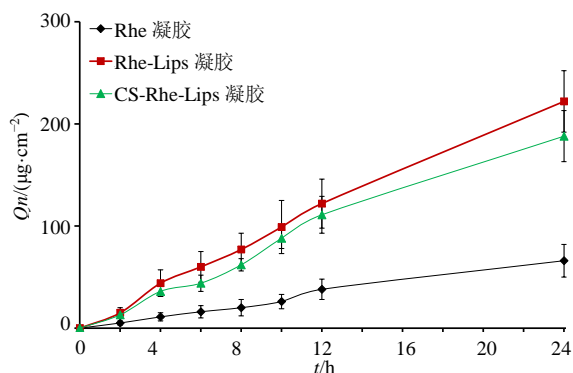
2.9 体外透皮研究

2.9.1 实验方案 取 KM 小鼠, 剪去背部毛发, 涂抹脱毛膏, 6 min 后使用纱布擦拭干净, 脱毛面积为 4 cm×2 cm。按 0.01 mL·g⁻¹ 剂量 ip 异氟烷进行麻醉, 颈部脱臼处死, 使用手术刀剥离皮肤 (勿伤及脱毛区域皮肤), 除去皮下脂肪、肌肉等组织, 0.9% 氯化钠溶液洗涤干净, 12 h 内使用。将皮肤固定于 Franz 扩散池 (有效渗透面积为 1.13 cm²), 并使角质面向给药池。取 Rhe 凝胶、Rhe-Lips 凝胶和 CS-Rhe-Lips 凝胶适量 (Rhe 含量均为 1.0 mg), 分别均匀涂抹于角质层。pH 6.5 磷酸盐缓冲液 [含 20% 聚乙二醇 (PEG) 400] 作为接收液, 设置转速为 150 r·min⁻¹, 待接收液恒温至 37 °C 后进行实验, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 取样 0.5 mL, 每次取样后同时补进 pH 6.5 磷酸盐缓冲液 (含 20% PEG 400) 0.5 mL。样品经 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 按 “2.2.1” 项下条件测定 Rhe 含量, 计算单位面积累积渗透量 (Q_n)。

$$Q_n = (V C_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / A$$

C_n 为第 n 次取样测定浓度, V 为扩散池体积, V_i 为每次取样体积 (mL); C_i 分别为第 i 次取样时接收液的浓度; A 为有效皮肤渗透面积 (cm²)

2.9.2 体外渗透曲线及透皮参数 以 t 为横坐标, Q_n 为纵坐标, 绘制体外渗透曲线 (图 8)。采用零级

图 8 Q_n-t 曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Fig. 8 Q_n-t curves ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

函数方程对 Rhe 凝胶、Rhe-Lips 凝胶和 CS-Rhe-Lips 的数据进行模型拟合, 得到 Rhe 透皮速率 (J) 和皮肤滞留量 (Q_0), 结果见表 7。与 Rhe 凝胶相比, Rhe-Lips 凝胶和 CS-Rhe-Lips 凝胶 Q_{24} 分别提高至 2.90 倍和 3.41 倍, Q_{24} 值均具有极显著性提高 ($P < 0.01$); J 分别提高至 2.87 倍和 3.33 倍, 证明 Rhe-Lips 凝胶和 CS-Rhe-Lips 凝胶均有效促进了 Rhe 经皮渗透, CS-Rhe-Lips 凝胶经皮渗透能力低于 Rhe-

Lips 凝胶, 有助于更多药物滞留于皮肤内部, 进而发挥局部皮肤病的治疗作用。

2.9.3 Q_0 从 Franz 扩散池上取下皮肤, 采用 0.9% 氯化钠溶液洗涤 3 次, 用手术刀剪至 $0.2 \text{ cm} \times 0.2 \text{ cm}$, 加入 5 mL 0.9% 氯化钠溶液进行匀浆, 于混悬液中加入 5 mL 无水乙醇, 涡旋 3 min, 超声 (200 W、37 kHz) 10 min, 充分提取 Rhe。8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min, 取出上清液。残渣中再加入 5 mL 无水乙醇, 同法涡旋、超声提取, 将提取液转移至 25 mL 量瓶中, 用无水乙醇稀释定容, 按“2.2.1”项下条件测定 Rhe 质量浓度 (C), 根据溶剂体积 (V , 25 mL), 计算 Q_0 , 结果见表 7。与 Rhe 凝胶相比, Rhe-Lips 凝胶和 CS-Rhe-Lips 凝胶皮肤滞留量均具有极显著性提高 ($P < 0.01$), 分别提高至 3.28 倍和 2.34 倍。与 Rhe-Lips 凝胶皮肤滞留量相比, CS-Rhe-Lips 凝胶皮肤滞留量也具有极显著性差异 ($P < 0.01$), 利于提高 Rhe 药效。

$$Q_0 = CV/A$$

V 为体积, A 为渗透面积

表 7 拟合方程及渗透参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 7 Fitted equation and permeation parameters ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

样品	拟合方程	R^2	$Q_{24}/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$	$J/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$	$Q_0/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$
Rhe 凝胶	$Q_n = 2.8028t - 0.3729$	0.9902	65.52 ± 13.17	2.8028	122.70 ± 163.04
CS-Rhe-Lips 凝胶	$Q_n = 8.0468t + 1.3641$	0.9875	$189.79 \pm 24.05^{***}$	8.0468	$402.13 \pm 58.69^{***}$
Rhe-Lips 凝胶	$Q_n = 9.3357t + 2.8559$	0.9857	$224.11 \pm 31.23^{**}$	9.3357	$286.84 \pm 41.17^{**}$

与 Rhe 凝胶比较: $^{**}P < 0.01$; 与 Rhe-Lips 凝胶比较: $^{*}P < 0.05$ $^{***}P < 0.01$ 。

$^{**}P < 0.01$ vs Rhe gel; $^{*}P < 0.05$ $^{***}P < 0.01$ vs Rhe-Lips gel.

2.10 药效学评价

2.10.1 动物光老化模型的建立^[15] 取 KM 小鼠, 剪去背部毛发, 于背部涂抹脱毛膏, 6 min 后使用纱布擦拭干净, 脱毛面积为 $4 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$, 采用 0.9% 氯化钠溶液冲洗, 晾干。随机分为 7 组, 即对照组、模型组、维生素 C (阳性药, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[15]) 组、Rhe 凝胶 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[16]) 组、Rhe-Lips 凝胶 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组、CS-Rhe-Lips 凝胶低、高剂量 (10 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 每组 6 只。除对照组外, 其余各组均使用两根 UVB 灯管 (313 nm) 照射小鼠背部暴露皮肤, 强度为 ($12.8 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$), 照射源距小鼠背部区正上方 (25 ± 1) cm, 每次照射 20 min, 每周 4 次, 持续 8 周。KM 小鼠照射前 1 h 背部涂抹药物, 每 2 周脱毛 1 次。

2.10.2 皮损评分标准及结果 根据各组小鼠红斑、溃烂/渗血、皱纹和结痂情况, 按照皮损面积和

严重程度 (PASI) 评分标准进行评分^[17]: 无明显症状评分为 0; 轻度评分为 1; 中度评分为 2; 重度评分为 3。将小鼠红斑、溃烂/渗血、皱纹和结痂评分总和作为 PASI 评分, 得分越高表示皮损越重, 第 2、4、8 周 PASI 评分结果见表 8。实验结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠各时间点的 PASI 评分均呈极显著性升高 ($P < 0.01$), 证实经 UVB 照射后模型组小鼠皮肤损伤严重, 光老化模型构建成功。与模型组相比, 维生素 C 组及各给药组的 PASI 评分均呈显著性或极显著性降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明上述干预措施可有效缓解小鼠皮肤光老化程度。与 Rhe 凝胶组相比, CS-Rhe-Lips 凝胶低剂量组在第 8 周的 PASI 评分呈显著性降低 ($P < 0.05$), 而 Rhe-Lips 凝胶组及 CS-Rhe-Lips 凝胶高剂量组在第 8 周的 PASI 评分均呈极显著性降低 ($P < 0.01$), 提示该干预方案可显著增强皮肤光老化的治疗效果。

表 8 各组小鼠皮损 PASI 评分结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 8 PASI results of skin lesions in each group of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PASI 评分		
		第 2 周	第 4 周	第 8 周
对照	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	—	7.27±0.71**	9.28±0.56**	13.50±1.36**
维生素 C	10	2.65±0.71##	4.73±0.63##	6.40±0.98##
Rhe 凝胶	20	6.20±0.73#	8.57±0.56#	11.15±0.88#
Rhe-Lips 凝胶	20	5.45±0.90###Δ	6.90±0.38###Δ	8.67±0.69###ΔΔ
CS-Rhe-Lips 凝胶	10	6.42±0.73#	8.65±0.77#	9.47±0.56###Δ
	20	2.72±0.50###ΔΔ&&	5.32±0.76###ΔΔ&	6.80±0.73###ΔΔ&&

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与 Rhe 凝胶组比较: Δ $P<0.05$ ΔΔ $P<0.01$; 与 Rhe-Lips 凝胶组比较: & $P<0.05$ && $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group; Δ $P<0.05$ ΔΔ $P<0.01$ vs Rhe gel group; & $P<0.05$ && $P<0.01$ vs Rhe-Lips group.

进一步对比发现,与 Rhe-Lips 凝胶组相比,CS-Rhe-Lips 凝胶高剂量组在第 2、4、8 周的 PASI 评分均存在显著性或极显著性差异($P<0.05$ 、 0.01),表明 CS-Rhe-Lips 凝胶对皮肤光老化的治疗效能优于 Rhe-Lips 凝胶。

2.10.3 ELISA 法测定小鼠皮肤组织炎症因子含量
实验结束后取各组小鼠皮肤组织,剪碎后进行匀浆,按照 ELISA 试剂盒的方法操作检测 IL-6、IL-1α、IL-1β 和 TNF-α 含量^[17],结果见表 9。与对照组相比,模型组 IL-6、IL-1α、IL-1β 和 TNF-α 均极显

著性升高($P<0.01$),表明建模成功。与模型组相比,给药组各炎症因子均具有极显著性下降($P<0.01$),说明各给药组抑制了各个炎症因子的升高。与 Rhe 凝胶组相比,Rhe-Lips 和 CS-Rhe-Lips 凝胶低、高剂量组各炎症因子有显著性或极显著性下降($P<0.05$ 、 0.01),说明 Rhe-Lips 和 CS-Rhe-Lips 凝胶对炎症因子升高的抑制效果优于 Rhe 凝胶。与 Rhe-Lips 凝胶组相比,CS-Rhe-Lips 凝胶高剂量组各个炎症因子均具有极显著性下降($P<0.01$),说明 CS-Rhe-Lips 凝胶药效高于 Rhe-Lips 凝胶。

表 9 各组小鼠皮肤组织炎症因子含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 9 Content of inflammatory factors in skin tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

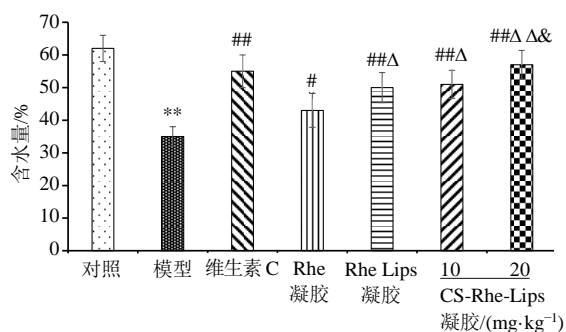
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-6/(pg·g ⁻¹)	IL-1α/(pg·g ⁻¹)	IL-1β/(pg·g ⁻¹)	TNF-α/(pg·g ⁻¹)
对照	—	3 043.80±248.84	511.90±42.99	70.15±13.63	480.60±36.14
模型	—	8 837.45±212.31**	1 208.63±121.04**	559.90±46.08**	1 208.58±117.45**
维生素 C	10	4 659.02±232.58##	689.57±83.91##	199.07±46.86##	626.40±45.28##
Rhe 凝胶	20	6 233.17±240.98##	902.73±26.41##	434.55±29.67##	938.73±63.80##
Rhe-Lips 凝胶	20	5 526.42±141.67###Δ	807.68±21.47###ΔΔ	377.12±39.98###Δ	830.62±59.37###Δ
CS-Rhe-Lips 凝胶	10	5 693.40±358.22###Δ	872.65±38.98###Δ	370.35±41.92###Δ	810.53±48.89###Δ
	20	4 624.77±282.11###ΔΔ&&	672.22±69.44###ΔΔ&&	227.10±24.46###ΔΔ&&	613.23±45.49###ΔΔ&&

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ## $P<0.01$; 与 Rhe 凝胶组比较: Δ $P<0.05$ ΔΔ $P<0.01$; 与 Rhe-Lips 凝胶组比较: & $P<0.05$ && $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs model group; Δ $P<0.05$ ΔΔ $P<0.01$ vs Rhe gel group; & $P<0.05$ && $P<0.01$ vs Rhe-Lips gel group.

2.10.4 皮肤含水量结果 UVB 照射引发的高温可导致小鼠皮肤水分流失,因此皮肤含水量是评价皮肤老化程度的重要指标^[18]。实验结束后,采用皮肤角质层含水量测试仪测定各组小鼠的皮肤含水量,结果如图 9 所示。与对照组相比,模型组小鼠皮肤含水量显著降低($P<0.01$);与模型组相比,各给药组小鼠皮肤含水量均显著性升高($P<0.05$ 、 0.01)。与 Rhe 凝胶组相比,Rhe-Lips 凝胶

组及 CS-Rhe-Lips 凝胶低剂量组小鼠皮肤含水量显著增加($P<0.05$),而 CS-Rhe-Lips 凝胶高剂量组小鼠皮肤含水量极显著增加($P<0.01$);与 Rhe-Lips 凝胶组相比,CS-Rhe-Lips 凝胶高剂量组小鼠皮肤含水量同样显著增加($P<0.05$)。上述结果表明,CS-Rhe-Lips 凝胶对 UVB 诱导的皮肤老化具有更优的水分保护改善效果,其作用优于 Rhe-Lips 凝胶。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$;
与 Rhe 凝胶组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 Rhe-Lips 凝胶组比
较: $\&P < 0.05$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Rhe gel group; $\&P < 0.05$ vs Rhe-Lips gel group.

图 9 各组小鼠皮肤含水量 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 9 Water content of skin in each group of mice

($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.10.5 Rhe 及各脂质体凝胶对小鼠光老化皮肤组织结构的影响 将各组小鼠皮肤组织经 4%多聚甲醛固定 2 d, 依次经 70%、80%、90%乙醇及无水乙醇梯度脱水后, 用二甲苯透明处理 20 min, 随后进行石蜡包埋并制作 4 μm 切片。采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察皮肤组织形态学变化, 通过 Masson 三色染色评估皮肤胶原纤维沉积情况^[18], 染色结果见图 10。

HE 染色结果显示: 对照组小鼠皮肤细胞排列

规则有序, 真皮层结构完整, 未见明显炎症细胞浸润; 模型组皮肤组织中可见大量炎症细胞浸润, 真皮层胶原纤维含量显著减少, 光老化损伤特征明显。维生素 C 组炎症细胞浸润程度明显减轻, 胶原纤维数量显著增加, 提示皮肤光老化损伤得到有效修复。Rhe 凝胶组皮肤组织中仍存在较多炎症细胞浸润, 但胶原纤维含量较模型组有一定程度提升, 表明游离 Rhe 具有改善皮肤光老化的潜在活性。Rhe-Lips 凝胶组的炎症细胞浸润进一步减少, 胶原纤维增生更为显著, 其光老化修复效果明显优于游离 Rhe 凝胶组。对于 CS-Rhe-Lips 凝胶组, 随着给药剂量的增加, 皮肤组织炎症浸润减轻、胶原纤维增多的改善趋势愈加明显, 呈现出良好的剂量相关性。

Masson 三色染色结果与 HE 染色趋势一致: 对照组小鼠皮肤胶原纤维排列致密、走向规则, 形态及分布均正常; 模型组胶原纤维呈现稀疏紊乱状态, 纤维密度显著降低; 维生素 C 组胶原纤维密度明显回升, 排列紧致度显著提高。Rhe 凝胶组胶原纤维虽仍较稀疏, 但密度及排列状态已明显优于模型组; Rhe-Lips 凝胶组的胶原纤维密度进一步高于 Rhe 凝胶组, 证实脂质体凝胶剂可增强 Rhe 的光老化治疗效果。CS-Rhe-Lips 凝胶组同样表现出剂量相关性改善特征, 随着给药剂量增加, 胶原纤维密度逐步升高, 排列有序性显著提升。

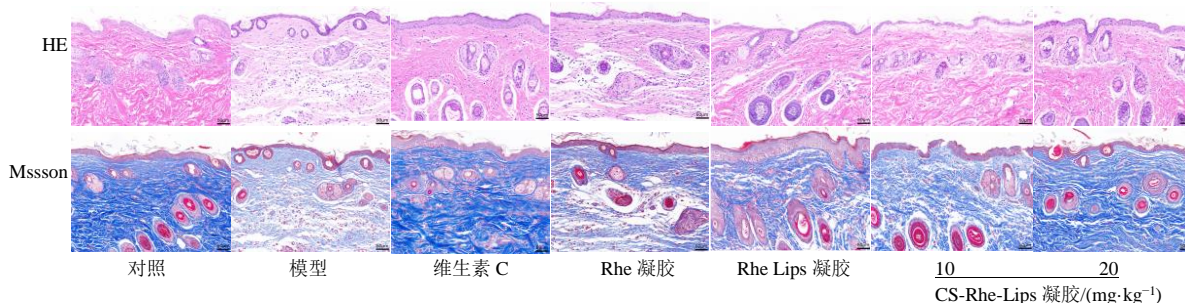


图 10 各组小鼠皮肤组织 HE 和 Masson 染色图 ($\times 200$)

Fig. 10 HE and Masson staining images of skin tissue of mice in each group ($\times 200$)

3 讨论

超声工艺、水化时间等关键制备参数对 CS-Rhe-Lips 的包封率、载药量及粒径具有显著影响。超声功率过高或超声时间过长, 均会破坏 CS-Rhe-Lips 的结构稳定性^[5], 进而引发药物泄漏。实验考察表明, 当超声功率设定为 250 W、超声时间控制在 10 min 时, 所制备的 CS-Rhe-Lips 可同时实现较高的包封率与载药量, 且粒径维持在相对较小的范

围。水化过程中, 适宜的水化时间可促进磷脂在水相中充分舒展并规则排列, 形成稳定的载药空间; 但水化时间过长易导致磷脂发生氧化变性^[19], 同样引发药物泄漏, 因此本研究最终确定 40 min 为最佳水化时间, 用于制备 CS-Rhe-Lips 混悬液。在包封率测定方法的选择上, 高速离心法与超滤离心法均可能破坏脂质体结构^[7], 从而引入测定误差。本研究采用葡聚糖凝胶柱法分离 CS-Rhe-Lips 混悬液中

的游离药物,可有效避免脂质体结构损伤,确保实验结果的准确性,为后续 CS-Rhe-Lips 的处方优化研究奠定基础。

CS-Rhe-Lips 的包封率高于 Rhe-Lips,其原因可能在于 CS-Rhe-Lips 表面包覆的 CS 修饰层可有效阻滞浅表层药物泄漏^[7]。与之相对,CS-Rhe-Lips 的载药量低于 Rhe-Lips,这主要因处方中引入 CS 后载体总用量增加,从而稀释了单位载体的载药能力。CS-Rhe-Lips 的粒径大于 Rhe-Lips,这与 CS 在其表面的包覆作用直接相关,该修饰同时导致 CS-Rhe-Lips 的 PDI 高于 Rhe-Lips。Zeta 电位检测结果显示,Rhe-Lips 呈负电性,而 CS-Rhe-Lips 表面转为正电荷,这是由于 CS 作为阳离子多糖,其包覆作用使脂质体表面电荷发生显著反转^[12,20]。考虑到 CS-Rhe-Lips 混悬液与皮肤的黏合性极差,为充分发挥其促渗透作用,本研究以卡波姆为凝胶基质制备 CS-Rhe-Lips 凝胶。结合卡波姆形成凝胶的最佳 pH 值及皮肤生理耐受范围^[7],最终将 CS-Rhe-Lips 凝胶的 pH 值确定为 6.5。

体外释药实验表明,与 Rhe 凝胶相比,Rhe-Lips 及 CS-Rhe-Lips 凝胶的药物累积释放度均极显著性提升,有效改善了 Rhe 经皮渗透水平,为药效增强提供了基础。Rhe-Lips 与 CS-Rhe-Lips 凝胶均呈现明显的缓释特征,这一方面是由于药物需克服脂质体磷脂双分子层的阻滞作用,另一方面凝胶的三维网状结构对药物分子具有物理控释效果^[21-22],使其可作为药物储库实现长效释药。其中 CS-Rhe-Lips 凝胶的缓释效果优于 Rhe-Lips 凝胶,推测与 CS 修饰层增加药物释放阻力相关。在离体透皮实验的接收液选择上,多数研究通过添加聚山梨酯 80、乙醇、甲醇等试剂构建漏槽条件^[6,12],但聚山梨酯 80 的促渗作用及乙醇、甲醇对皮肤通透性的改变,均可能导致实验结果偏离实际应用场景。本研究经测定发现,Rhe 在含 20% PEG 400 的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中溶解度可达 $(759.74 \pm 11.16) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,完全满足漏槽条件;同时 PEG 400 不会破坏离体皮肤结构,且该缓冲液 pH 值(6.8)处于人体皮肤生理 pH(5.0~7.0),可避免皮肤刺激,确保了实验结果的可靠性。

离体皮肤渗透实验结果显示,Rhe-Lips 与 CS-Rhe-Lips 凝胶均显著提高了药物的透皮总量,这与其促经皮渗透作用直接相关,而透皮进入血液循环的药物同样可发挥全身药效^[3]。但作为局部用药,更理想的效果是使药物滞留于皮肤组织内形成局

部药物储库^[23]。CS-Rhe-Lips 通过降低药物透皮量,促进更多药物滞留于皮肤内部,为局部长效作用的发挥奠定基础;而 Rhe-Lips 虽能提高药物透皮量,但显著降低皮肤滞留量,不利于局部治疗效果的实现。值得注意的是,Rhe-Lips 仍在一定程度上提高了药物在皮肤组织中的累积量,其机制包括三方面:一是 Rhe-Lips 提升了 Rhe 的释放度;二是处方中磷脂与聚山梨酯 80 本身具有促进药物在皮肤组织中扩散的作用;三是 Rhe-Lips 粒径较小,易于携带药物穿透皮肤脂质间隙^[18],使部分药物得以滞留。但由于 Rhe-Lips 表面呈负电性,而皮肤组织同样带负电荷^[12],电荷排斥作用显著降低了其皮肤滞留量。

CS-Rhe-Lips 凝胶的皮肤滞留量显著高于 Rhe-Lips 凝胶,推测其核心机制包括两方面:一方面 CS 可有效削弱角质层的物理阻滞作用,促进药物向皮肤组织渗透扩散;另一方面 CS-Rhe-Lips 表面的正电荷与皮肤组织的负电荷形成静电引力^[12],显著增强了制剂与皮肤组织的亲和力,有利于药物滞留并形成稳定药物储库,进而对皮肤光老化发挥长效治疗作用。药效学评价结果显示,在相同给药剂量下,CS-Rhe-Lips 凝胶的 PASI 评分改善效果、炎症因子抑制能力、皮肤含水量提升作用及病理形态修复效果均优于 Rhe 凝胶与 Rhe-Lips 凝胶,表明其具有更优异的药效价值,值得深入研究。

综上所述,本研究成功完成 CS-Rhe-Lips 凝胶制剂的处方工艺优化,最终产品包封率超过 80%,粒径控制在 200 nm 以下。通过系统考察 CS-Rhe-Lips 凝胶的体外释药特性、离体皮肤渗透行为及对皮肤光老化的治疗效果,证实该制剂具有良好的开发潜力,为其成药性评价提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王克婧,孙梦迪,张振东,等.中医药防治皮肤光老化机制及应用[J].生命的化学,2025,45(5):799-811.
Wang K J, Sun M D, Zhang Z D, et al. The mechanisms and applications of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of skin photoaging [J]. Chem Life, 2025, 45(5): 799-811.
- [2] 吴云飞,袁胜超,谭志超,等.基于网络药理学和分子对接研究大黄治疗膝关节炎的分子机制[J].现代药物与临床,2024,39(8):1988-1994.
Wu Y F, Yuan S C, Tan Z C, et al. Molecular mechanism of

- Rhei Radix et Rhizoma* in treatment of knee osteoarthritis based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Drugs Clin*, 2024, 39(8): 1988-1994.
- [3] 邵冠儒, 张坤阳. 大黄酸通过抑制 p38 MAPK 磷酸化减轻 UVB 诱导的皮肤光老化损伤 [J]. *日用化学工业 (中英文)*, 2024, 54(7): 836-843.
Shao G R, Zhang K Y. Rhein attenuates UVB-induced skin photoaging injury by inhibiting p38 MAPK phosphorylation [J]. *China Surfactant Deterg Cosmet*, 2024, 54(7): 836-843.
- [4] 朱学进, 王英豪, 刘敏, 等. 基于网络药理学大黄治疗酒精性肝炎作用机制探讨及实验验证 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(7): 1817-1827.
Zhu X J, Wang Y H, Liu M, et al. Mechanism of *Rhei Radix et Rhizoma* in treating alcoholic hepatitis based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Drug Eval Res*, 2025, 48(7): 1817-1827.
- [5] 刘艳菊, 闫晓宇, 王永飞, 等. 聚乙二醇修饰大黄素/大黄酸脂质体温敏凝胶的制备、表征及对溃疡性结肠炎的治疗作用 [J]. *中草药*, 2025, 56(14): 5006-5018.
Liu Y J, Yan X Y, Wang Y F, et al. Preparation, characterisation and therapeutic effects on ulcerative colitis of PEGylated emodin/Rhein-liposomes thermosensitive gel [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(14): 5006-5018.
- [6] 汪亚飞, 冯洁颖, 吴惠妃, 等. 蛇黄凝胶与蛇黄散体外释放与透皮特性比较研究 [J]. *今日药学*, 2024, 34(2): 106-111.
Wang Y F, Feng J Y, Wu H F, et al. Comparative study on release and transdermal behavior in vitro between shehuang gels and shehuang powder [J]. *Pharm Today*, 2024, 34(2): 106-111.
- [7] 柳超, 董亚楠, 李伟宏, 等. 冰片修饰根皮素醇质体凝胶的制备、表征及其离体皮肤渗透特性研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(21): 7288-7299.
Liu C, Dong Y N, Li W H, et al. Preparation, characterisation and their *ex vivo* transdermal permeation properties of borneol-modified phloretin ethosomes gel [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(21): 7288-7299.
- [8] 苏哲, 张铮, 张筱雨, 等. 5 种纳米原料的透皮吸收及安全评估研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(11): 2371-2378.
Su Z, Zhang Z, Zhang X Y, et al. Research progress on percutaneous absorption and safety evaluation of five nanomaterials [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(11): 2371-2378.
- [9] 张体鹏, 决利利. 白屈菜红碱 2 种脂质体的制备和口服生物利用度比较 [J]. *中草药*, 2023, 54(17): 5568-5579.
Zhang T P, Jue L L. Preparation of two kinds of chelerythrine liposomes and oral bioavailability comparison [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(17): 5568-5579.
- [10] 唐永瑜, 邵诗蝶, 吴兴杰, 等. MiRNA-126 硬脂胺阳离子脂质体递送系统的构建及细胞摄取考察 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(9): 2006-2016.
Tang Y Y, Tai S D, Wu X J, et al. Construction of miRNA-126 stearylamine cationic liposome delivery system and cellular uptake investigation [J]. *Drug Eval Res*, 2024, 47(9): 2006-2016.
- [11] 杨连利, 马晓燕, 刘思雨, 等. 壳聚糖/载 Ag 基等离子体有机累托石复合凝胶膜的制备及性能研究 [J]. *化学研究与应用*, 2023, 35(2): 335-340.
Yang L L, Ma X Y, Liu S Y, et al. Preparation and properties of chitosan/Ag based plasma-carrying organic rectorite composite hydrogel membrane [J]. *Chem Res Appl*, 2023, 35(2): 335-340.
- [12] 万子腾, 张跃, 姜建鑫, 等. 壳聚糖修饰绿原酸脂质体的制备及其体外透皮性能考察 [J]. *中国医药工业杂志*, 2023, 54(5): 760-765.
Wan Z T, Zhang Y, Jiang J X, et al. Preparation of chitosan-modified chlorogenic acid liposomes and investigation on their transdermal properties *in vitro* [J]. *Chin J Pharm*, 2023, 54(5): 760-765.
- [13] 孟豪杰. 虾青素-植物甾醇酯复合脂质体制备及特性的研究 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2024.
Meng H J. Preparation and characterization of liposomes co-encapsulating astaxanthin and phytosterol esters [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2024.
- [14] 曹伶俐, 刘素梅. 甜菊糖苷-高良姜素纳米复合物的制备及其理化性质评价 [J]. *化学研究与应用*, 2025, 37(6): 1506-1514.
Cao L L, Liu S M. Preparation and physicochemical property evaluation of stevioside-galangin nanocomposites [J]. *Chem Res Appl*, 2025, 37(6): 1506-1514.
- [15] 叶佳丰, 曹家敏, 李薇, 等. 中药郁金总黄酮的抗皮肤光老化活性评价及机制分析 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2025, 27(7): 2000-2012.
Ye J F, Cao J M, Li W, et al. Anti-skin photoaging activity and mechanism analysis of total flavonoids from the Chinese herb tulip [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2025, 27(7): 2000-2012.
- [16] 封玲. 神阙穴给药制剂参黄凝胶膏的制备及其体外渗透特性评价 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2016.
Feng L. Preparation of Shenque hydrogel patch used at Shenque acupoint and study on its transdermal permeability *in vitro* [D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University, 2016.

- [17] 钟沁月. 花椒精油抑制紫外线辐射致小鼠皮肤光老化的研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2017.
Zhong Q Y. Essential oil of *Zanthoxylum bungeanum* maxim prevents ultraviolet irradiation-induced cutaneous photoaging in mice [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2017.
- [18] 王丽峰, 丁苗苗, 何新, 等. 光甘草定醇质体与立方液晶纳米粒皮肤滞留量比较及抗豚鼠皮肤光老化作用观察 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(10): 1944-1950.
Wang L F, Ding M M, He X, et al. Comparison of skin retention amount of ethosomes and cubic liquid crystalline nanoparticles of glabridin and observation of its anti-photoaging effect on guinea pig skin [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(10): 1944-1950.
- [19] 王丽, 高小玲, 李思翰, 等. 五味子乙素-磷脂酰胆碱复合物制备工艺优化及理化性质研究 [J]. 化学研究与应用, 2025, 37(7): 2115-2123.
Wang L, Gao X L, Li S H, et al. Preparation optimization and physicochemical properties study of schisandrin B-phosphatidylcholine complex [J]. Chem Res Appl, 2025, 37(7): 2115-2123.
- [20] 刘艳菊, 武月丹, 位小杰, 等. 包载金丝桃苷的磷脂酰胆碱/壳聚糖自组装纳米粒的制备、表征及其口服药动学研究 [J]. 中草药, 2025, 56(3): 819-830.
Liu Y J, Wu Y D, Wei X J, et al. Self-assembled phosphatidylcholine/chitosan nanoparticles loaded with hyperoside: Preparation, characterization and oral pharmacokinetics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(3): 819-830.
- [21] Qing M, Hou Y, Xie Z, et al. Thermal-triggered polymerizable hydrogels with localized hyperthermia for shrinkage-driven starvation therapy [J]. Adv Funct Mater, 2025: e12839.
- [22] 冯顺丽, 王会, 李振东, 等. 托法替尼醇质体温敏凝胶的制备及其对溃疡性结肠炎模型小鼠的治疗作用 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(7): 1880-1892.
Feng S L, Wang H, Li Z D, et al. Preparation of tofacitinib alcohol-based thermosensitive gel and its therapeutic effect on ulcerative colitis model mice [J]. Drug Eval Res, 2025, 48(7): 1880-1892.

[责任编辑 孙英杰]