

柴达木枸杞籽油纳米乳的制备及其对日光性皮炎小鼠的药效评价

姬一鸣¹, 韩乐¹, 王雨婷¹, 杜莎莎¹, 胡春晖², 邹永强³, 杨永晶^{2*}

1. 青海大学 生态环境工程学院, 青海 西宁 810016

2. 青海大学 药学院, 青海 西宁 810016

3. 青海省地方病预防控制所, 青海 西宁 810016

摘要: **目的** 制备柴达木枸杞籽油纳米乳 (LN), 并评价其对日光性皮炎小鼠的治疗效果。 **方法** 以离心乳层保留率 (CR) 为评价指标, 采用单因素实验结合 Box-Behnken 设计-效应面法 (BBD-RSM) 优化 LN 的处方及制备工艺; 通过透射电子显微镜 (TEM) 观察纳米乳微观形态; 测定其 pH 值、粒径、多分散系数 (PDI)、Zeta 电位、黏度、包封率 (EE) 及载药量 (DL), 并通过室温储存实验、离心实验初步评价其稳定性; 采用人永生角质形成细胞 (HaCaT 细胞) 初步评估其生物安全性; 建立紫外线 (UV) 诱导的 BALB/c 小鼠急性日光性皮炎模型, 评价 LN 的治疗效果。 **结果** LN 的最佳制备工艺条件为: 乳化时间 10 min、乳化温度 75 °C、乳化剂添加量 16%、增稠剂添加量 0.6% (增稠剂比例 8:2)、柴达木枸杞籽油添加量 6%, 此条件下制备 LN 的 CR 为 94.92%。TEM 观察显示, LN 为乳白色近球形液滴, 分散均匀; 其理化指标检测结果为: pH 值 5.78 ± 0.02 , 粒径 (93.33 ± 9.53) nm, PDI 为 0.22 ± 0.02 , Zeta 电位 (-31.43 ± 0.36) mV, 黏度 0.37 Pa·s, EE 为 84.01%, DL 为 4.29%。稳定性实验表明, LN 在室温放置 30 d 及不同离心条件下, 外观性状无明显异常, 粒径及 PDI 无显著变化, 稳定性良好; 细胞实验显示, LN 对 HaCaT 细胞活力无明显影响, 生物安全性良好。动物实验结果显示, 与模型组相比, LN 各剂量组均能有效缓解 UV 诱导的小鼠皮肤红斑、结痂及脱屑症状, 显著提升小鼠皮肤组织中过氧化氢酶 (CAT) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活力, 降低基质金属蛋白酶 (MMP)-3 和 MMP-9 含量 ($P < 0.01$); 其中 LN 高、中剂量组可显著降低炎症因子白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 水平 ($P < 0.01$)。 **结论** 制备的 LN 在理化性能、稳定性及生物安全性方面表现优异, 且对 UV 诱导的小鼠急性日光性皮炎具有显著治疗效果, 是一种极具应用前景的外用纳米乳制剂。

关键词: 柴达木枸杞籽油; 纳米乳; 日光性皮炎; Box-Behnken 设计-效应面法; 炎症因子

中图分类号: R283.6; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)03-0910-16

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2026.03.016

Preparation of nanoemulsion of seed oil of *Lycium barbarum* from Qaidam Basin and its pharmacological evaluation on mice with solar dermatitis

Ji Yiming¹, Han Le¹, Wang Yuting¹, Du Shasha¹, Hu Chunhui², Zou Yongqiang³, Yang Yongjing²

1. School of Ecological and Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China

2. School of Pharmacy, Qinghai University, Xining 810016, China

3. Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Xining 810016, China

Abstract: Objective To prepare nanoemulsion of seeds oil of *Lycium barbarum* from Qaidam Basin (LN) and evaluate its therapeutic effect on mice with solar dermatitis. **Methods** The centrifugal retention rate (CR) was used as the evaluation index. The single factor experiment combined with Box-Behnken response surface design method (BBD-RSM) was adopted to optimize the prescription and preparation process of LN. The microscopic morphology of LN was observed by transmission electron microscopy (TEM). The pH value, particle size, polydispersity index (PDI), Zeta potential, viscosity, encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) of LN were determined. The stability of LN was preliminarily evaluated by room temperature storage experiment and centrifugation experiment. The biological safety of LN was preliminarily evaluated by human immortalized keratinocyte (HaCaT cells). The acute solar dermatitis model of BALB/c mice was established by ultraviolet (UV) irradiation to evaluate the therapeutic effect of LN. **Results**

收稿日期: 2025-10-22

基金项目: 青海省中央引导地方科技发展资金计划项目 (2025ZY011)

作者简介: 姬一鸣 (2002—), 女, 硕士研究生, 主要从事天然产物研究与开发。E-mail: 19839624607@163.com

*通信作者: 杨永晶, 博士, 副教授, 主要从事特色植物资源开发与利用研究。E-mail: yongjing223@163.com

The optimal preparation process of LN was as follows: emulsification time 10 min, emulsification temperature 75 °C, emulsifier addition 16%, thickener addition 0.6% (thickener ratio 8 : 2), and seeds oil of *L. barbarum* from Qaidam Basin addition 6%. Under these conditions, the CR of LN was 94.92%. TEM observation showed that LN was a milky white nearly spherical droplet with uniform dispersion. The physical and chemical index detection results were as follows: pH value 5.78 ± 0.02 , particle size (93.33 ± 9.53) nm, PDI 0.22 ± 0.02 , Zeta potential (-31.43 ± 0.36) mV, viscosity 0.37 Pa·s, EE 84.01%, and DL 4.29%. The stability experiment showed that LN had no obvious abnormal appearance after being placed at room temperature for 30 days and under different centrifugation conditions. There was no significant change in particle size and PDI, and the stability was good. The cell experiment showed that LN had no significant effect on the viability of HaCaT cells, and the biological safety was good. The animal experiment results showed that compared with the model group, all dose groups of LN could effectively alleviate the symptoms of skin erythema, scabbing and desquamation induced by UV in mice, significantly increase the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in mouse skin tissue, and reduce the contents of matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 ($P < 0.01$). Among them, the high and medium dose groups of LN could significantly reduce the levels of inflammatory factors interleukin (IL)-6 and IL-1 β ($P < 0.01$). **Conclusion** The prepared LN has excellent physical and chemical properties, stability and biological safety, and has a significant therapeutic effect on acute solar dermatitis induced by UV in mice. It is a nanoemulsion formulation with great application prospects for external use.

Key words: seed oil of *Lycium barbarum* from Qaidam Basin; nanoemulsion; solar dermatitis; Box-Behnken response surface design method; inflammatory factor

皮肤作为机体最大的器官，是抵御外界伤害的第一道天然屏障，由表皮、真皮及皮下组织构成^[1]。除遗传因素外，太阳紫外线（UV）是导致皮肤损伤的首要环境因子，其损伤效应与辐射强度及暴露时长直接相关。其中，长波紫外线（UVA，320~400 nm）穿透能力强，可累及真皮与皮下组织，通过提升皮肤组织中基质金属蛋白酶（MMPs）活性，加速胶原蛋白与弹性蛋白纤维降解，破坏皮肤支撑结构；中波紫外线（UVB，280~320 nm）主要作用于表皮，诱导角质层增厚、黑色素细胞增生，同时引发氧化应激、DNA 损伤及细胞凋亡，最终导致皮肤损伤^[2]。日光性皮炎是皮肤过度暴露于 UV 后引发的光毒性反应，不仅表现为晒斑、色素沉着、红斑、水肿、水疱等急性光损伤症状，还可能进展为光化性肉芽肿、日光角化病等慢性病变，显著增加皮肤癌的发病风险^[3-4]。因此，早期有效干预日光性皮炎是阻断其向皮肤癌进展的关键途径。

氧化应激与炎症反应是 UV 诱导皮肤光损伤的核心驱动机制。UV 可诱导皮肤产生过量活性氧（ROS），进而引发皮肤细胞内蛋白质、膜脂质及 DNA 等生物大分子的过氧化反应；这一过程不仅会破坏皮肤自身防御系统，过量蓄积的 ROS 及脂质过氧化物还会触发下游细胞内信号通路，最终诱导细胞凋亡^[5]。氧化损伤相关因子的上调会进一步诱导炎症因子释放，如白细胞介素（IL）-6、血管内皮生长因子（VEGF）、肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）等，从而诱发皮肤炎症^[6]。而炎症细胞因子又可通

过激活 MMPs，促进 I 型胶原蛋白、弹性蛋白及透明质酸等细胞外基质成分降解，导致皮肤机械强度下降^[7]。

相较于单一物理防护或化学干预手段，中药凭借多成分协同作用、多靶点调控、多途径干预的独特优势，以及纯天然、安全性高的特性，在皮肤损伤修复领域具有显著潜力^[8]。柴达木枸杞作为传统中药及少数民族常用药材，是青海地区重要的经济型药用植物资源。柴达木枸杞籽油是从其籽中提取的天然功能性油脂，富含不饱和脂肪酸、植物甾醇、磷脂、维生素 E、多酚、黄酮、类胡萝卜素、叶黄素及超氧化物歧化酶（SOD）等多种生物活性成分，这些成分是其发挥抗氧化、抗炎、免疫调节、调血脂及降血糖等药理活性的核心物质基础^[9]。其中诸多成分在皮肤损伤修复中发挥关键作用：例如，多酚、类黄酮及类胡萝卜素可清除过量 ROS，减轻皮肤氧化应激与炎症反应^[10-11]；维生素 E 与 SOD 可通过清除自由基增强皮肤抗氧化系统功能^[12]；此外，柴达木枸杞籽油中丰富的不饱和脂肪酸还具有抑菌抗炎、促进伤口愈合及修复皮肤屏障的功效^[13]。前期研究已证实，柴达木枸杞籽油可通过调控细胞凋亡、减轻炎症反应，缓解 UVB 诱导的人永生角质形成细胞（HaCaT 细胞）光损伤^[14]，提示其在日光性皮炎治疗中的应用潜力。

天然植物油脂因富含不饱和脂肪酸，在氧气、光照、水分及微生物作用下易发生氧化与水解酸败，进而影响其功能发挥^[15]。纳米乳是由油相和水

相经乳化形成的均一液体分散体系,作为新型药物递送系统,可有效延缓油脂氧化酸败并提升其生物利用度^[16]。已有研究表明,枸杞籽油纳米乳的抗氧化能力显著优于枸杞籽油本身^[17]。但纳米乳作为由 2 种互不相溶液体组成的热力学不稳定体系,制备工艺对其稳定性具有决定性影响。

因此,本研究以离心乳层保留率(CR)为稳定性评价指标,通过单因素实验系统考察乳化时间、乳化温度、乳化剂添加量、增稠剂添加量及比例、柴达木枸杞籽油添加量对纳米乳稳定性的影响;在此基础上,进一步采用 Box-Behnken 设计-响应面法(BBD-RSM)优化制备工艺,以获得稳定的柴达木枸杞籽油纳米乳(LN)。表征纳米乳的微观形态,测定其 pH 值、粒径、多分散系数(PDI)、Zeta 电位、黏度、包封率(EE)及载药量(DL),并通过室温储存实验与离心实验初步评价其稳定性;同时考察其对 HaCaT 细胞活力的影响以初步评估生物安全性,利用 UV 诱导的 BALB/c 小鼠急性日光性皮炎模型评价 LN 的治疗效果。本研究旨在拓展柴达木枸杞籽油的应用形式与领域,为青海柴达木枸杞资源的高值化利用及精深开发提供科学依据。

1 材料

1.1 材料与试剂

柴达木枸杞籽油(批号 KPGQZY-23-05),青海康普生物科技有限公司;维生素 E 油(货号 S13017)、甲醇(货号 W13007)、亚油酸(货号 B21421,质量分数 98%),上海源叶生物科技有限公司;甲酸(货号 F112034),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙腈(货号 W50101),迪马科技有限公司;黄原胶(货号 S30551)、明胶(货号 S25197)、赤藓醇(货号 S11140)、泛醇(货号 P107368)、抗坏血酸磷酸酯钠(货号 S67343)、羟苯甲酯(货号 M111496)、羟苯丙酯(货号 S30313)、肌肽(货号 KL20190)、山梨糖醇酐单油酸酯 80(货号 ZR70299),上海阿达玛斯试剂有限公司;聚山梨酯 80(货号 S15020),泰坦科技探索平台;甘油(货号 G116214),国药集团化学试剂有限公司;HaCaT 专用培养基(货号 CM0090,含体积分数为 15%的胎牛血清)、胰蛋白酶(货号 PB180225)、MEM 培养基(货号 PM150410P),武汉普诺赛生命科技有限公司;CCK-8 增强型细胞活力检测试剂盒(货号 E-CK-A362),MMP-3(货号 E-EL-MO626)、MMP-

9(货号 K-E-10037),武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;异氟烷(货号 R510-22-10),深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司;磷酸缓冲盐溶液(PBS,货号 P301984),青海莱茵尔生物科技有限责任公司;SOD(WST-1 法,货号 A001-3-2)和过氧化氢酶(CAT)(可见光法,货号 A007-1-1)检测试剂盒,南京建成生物技术研究所;IL-1 β (货号 KE10002)、IL-6(货号 KE10007),武汉三鹰生物技术有限公司;快速蛋白质定量试剂盒(BCA 法,货号 PK10026),生物工程生物技术有限公司。

1.2 仪器

A60-075 高剪切分散乳化均质机,上海欧河机械设备有限公司;Eppendorf 5810 R 高速冷冻离心机,艾本德中国有限公司;SQP 电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;DHG-9015A 电热鼓风干燥箱,上海恒科学仪器有限公司;Seven Excellence pH 计,梅特勒托利多科技(中国)有限公司;Malvern Panalytical Zetasizer Lab 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪,马尔文帕纳科公司;brookfield DV-2 pro 旋转黏度计,博勒飞工程实验室有限公司;Talos F200X 场发射透射电子显微镜(TEM)、A51119500C 酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;KQ-500E 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;AP135W 电子天平、DGU-20A3R 岛津高效液相色谱,日本岛津公司;HF 100 三气培养箱,上海力申科学仪器有限公司;TGyrate mini 涡旋仪,天根生化科技(北京)有限公司;OSB-2200 油浴锅,上海爱朗仪器有限公司;CBCL-24 冷冻研磨仪,上海测博生物技术发展中心;A-PKJ 紫外线耐候老化试验箱,广东爱佩实验设计有限公司。

1.3 动物

8 周龄 BALB/c 雌性小鼠,体质量(20 \pm 2)g,生产许可证号 SCXK(京)2024-0001,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物实验均严格遵循国际标准,并在 SPF 级实验动物房中进行,饲养温度为 23~24 $^{\circ}$ C,相对湿度为(50 \pm 15)%,光照/黑暗周期 12h。研究方案经青海大学科技伦理委员会审查并批准(批件号 SL202501-70)。

1.4 细胞

HaCaT 细胞(批号 0RSTVZ4R2D)采用含 15% FBS 的 HaCaT 细胞专用培养基于 37 $^{\circ}$ C、5%(体积分数)CO₂ 的三气培养箱中培养,待细胞融合度至 80%进行传代,取对数生长期的细胞进行后

续实验。

2 方法与结果

2.1 LN 的组分构成及制备

LN 由 4 个组分构成, 其中 A 组分为油相, 采用柴达木枸杞籽油; B 组分为水相, 包含增稠剂(黄原胶与明胶), 保湿剂(赤藓醇、泛醇、甘油), 防腐剂(羟苯甲酯、羟苯丙酯)及去离子水; C 组分由抗坏血酸磷酸酯钠和肌肽组成; D 组分为乳化剂, 含聚山梨酯 80 和山梨糖醇酐单油酸酯 80 (质量比 4:1), 各物质添加量均按质量分数计。其中, 赤藓醇(1.00%)、泛醇(0.40%)、甘油(3.00%)、抗坏血酸磷酸酯钠(1.50%)、羟苯甲酯(0.30%)、羟苯丙酯(0.10%)及肌肽(0.10%)的添加量均依据国家药品监督管理局相关规定确定, 柴达木枸杞籽油、乳化剂及增稠剂的添加量则通过单因素实验与响应面实验优化确定。

LN 的具体制备步骤如下: 先将 B 组分中的黄原胶、明胶、赤藓醇、泛醇、甘油、羟苯甲酯及羟苯丙酯加入去离子水(补至总质量 100 g)中, 于 75 °C 条件下充分溶解并均匀分散, 保温搅拌至体系均一, 冷却至 45 °C 后缓慢加入 C 组分, 持续搅拌至混合均匀, 制得水相混合液(B+C 组分)。另取 A 组分, 向其中缓慢加入 D 组分, 充分溶解并搅拌均匀, 得到油相混合物(A+D 组分)。随后在适宜乳化温度、1 400 r·min⁻¹ 的均质条件下, 将油相混合物缓慢滴加至水相混合液中, 持续乳化适宜时间, 即可制得均匀分散的纳米乳。

空白纳米乳的制备方法与上述纳米乳一致, 仅去除柴达木枸杞籽油, 其余操作步骤保持不变。

2.2 纳米乳 CR 测定

取适量 LN 于 4 500 r·min⁻¹ 离心 30 min, 计算 CR^[18]。

$$CR = (W_1 - W_2) / W_1$$

W_1 为纳米乳总质量(g); W_2 为纳米乳离心后析出相质量(g)

2.3 数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并使用 GraphPad Prism 8.3.0 软件对实验测定数据进行预处理并作图, 借助 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2.4 单因素实验优化 LN 处方及制备工艺

根据预试验结果, 固定柴达木枸杞籽油添加量为 8%、乳化温度为 70 °C、乳化剂添加量为油相 14%、增稠剂添加量 0.3%、增稠剂比例为 7:3、乳

化时间 15 min 条件下制备纳米乳, 进行单因素实验。

2.4.1 乳化时间对纳米乳稳定性的影响 固定柴达木枸杞籽油添加量为 8%、乳化温度为 70 °C、乳化剂添加量为油相 14%、增稠剂添加量 0.3%、增稠剂比例为 7:3 条件下制备纳米乳, 考察不同乳化时间对 CR 的影响。结果如图 1 所示, 纳米乳的 CR 随着乳化时间的延长总体呈现先上升后下降的趋势。当乳化时间达到 10 min 时, CR 达到最高值 83.93%。基于此, 在后续实验中, 乳化时间选取 5、10、15 min 进行优化。

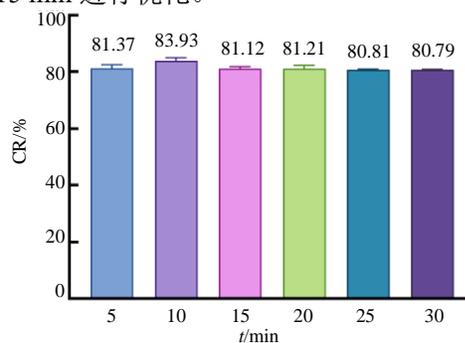


图 1 乳化时间对纳米乳 CR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 1 Influence of emulsification time on CR of nanoemulsion ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.4.2 乳化温度对纳米乳稳定性的影响 固定柴达木枸杞籽油添加量为 8%、乳化时间为 15 min、乳化剂添加量为油相 14%、增稠剂添加量 0.3%、增稠剂比例为 7:3, 考察不同乳化温度对 CR 的影响。结果见图 2, 随着乳化温度升高, 纳米乳的 CR 呈现先升高后降低的趋势, 当乳化温度为 75 °C 时, CR 最高, 为 82.08%。故后续乳化温度选择 70、75、80 °C 进行优化。

2.4.3 乳化剂添加量对纳米乳稳定性的影响 固定柴达木枸杞籽油添加量为 8%、乳化温度 70 °C、

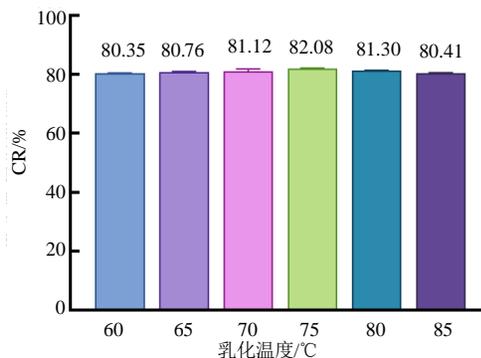


图 2 乳化温度对纳米乳 CR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 Influence of emulsification temperature on CR of nanoemulsion ($\bar{x} \pm s, n=3$)

乳化时间为 15 min、增稠剂添加量 0.3%、增稠剂比例为 7 : 3, 考察乳化剂添加量对 CR 的影响, 结果见图 3。随着乳化剂添加量的递增, 纳米乳 CR 呈现出先升高后降低的变化趋势。当乳化剂添加量为油相添加量的 16% 时达到最大值 83.11%。鉴于此, 在响应面实验设计中, 乳化剂添加量选取 14%、16%、18% 展开研究。

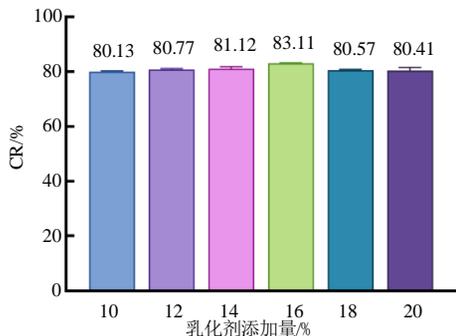


图 3 乳化剂添加量对纳米乳 CR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 Influence of emulsifier dosage on CR of nanoemulsion ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.4.4 增稠剂添加量对纳米乳稳定性的影响 固定柴达木枸杞籽油添加量为 8%、乳化温度 70 °C、乳化时间为 15 min、乳化剂添加量为油相 14%、增稠剂比例为 7 : 3, 考察不同增稠剂添加量对 CR 的影响, 结果如图 4 所示, 随着增稠剂添加量的增多纳米乳的 CR 呈现上升趋势。当增稠剂添加量为 0.6% 和 0.7% 时, 纳米乳的 CR 均为最高值 94.76%。考虑到增稠剂添加量过高会导致纳米乳黏度过高, 会发生结块, 因此后续纳米乳制备过程中将增稠剂添加量确定为 0.6%。

2.4.5 增稠剂比例对纳米乳稳定性的影响 固定柴达木枸杞籽油添加量为 8%、乳化温度 70 °C、乳化时间为 15 min、乳化剂添加量为油相 14%、增稠剂添加量 0.3%, 考察不同增稠剂比例 (黄原胶 : 明胶)

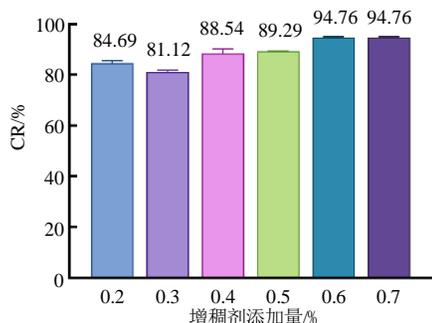


图 4 增稠剂添加量对纳米乳 CR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 4 Influence of thickener dosage on CR of nanoemulsion ($\bar{x} \pm s, n=3$)

胶) 对 CR 的影响。结果如图 5 所示, 纳米乳的 CR 随着增稠剂比例的升高呈现出先升高后降低的趋势, 并且在增稠剂比例为 8 : 2 时, 纳米乳的 CR 达到最高, 为 90.66%。因此后续选择增稠剂比例为 7 : 3、8 : 2、9 : 1 进行优化。

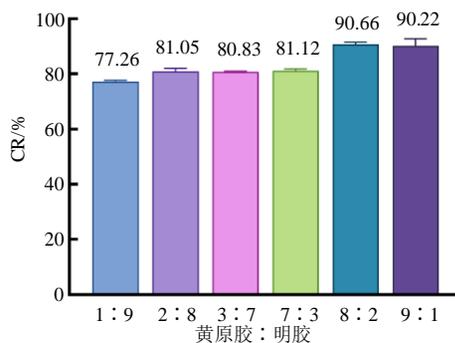


图 5 增稠剂比例对纳米乳 CR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 5 Influence of thickener ratio on CR of nanoemulsion ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.4.6 柴达木枸杞籽油添加量对纳米乳稳定性的影响 固定乳化温度 70 °C、乳化时间为 15 min、乳化剂添加量为油相 14%、增稠剂添加量 0.3%、增稠剂比例为 7 : 3, 考察不同柴达木枸杞籽油添加量对 CR 的影响。结果如图 6 所示, 柴达木枸杞籽油添加量在 3%~7% 时, CR 值波动不明显, 纳米乳稳定性未明显提升。而当添加量提高至 8% 时, CR 明显下降至 85.29%。因此, 综合考虑纳米乳稳定性, 确定制备过程中柴达木枸杞籽油最佳添加量为 6%, 此时纳米乳 CR 最高 (87.06%)。

2.5 BBD-RSM 优化 LN 制备处方工艺

2.5.1 实验设计及结果 BBD-RSM 的中心组合实验设计原理, 选取单因素试验中对纳米乳 CR 影响比较明显的乳化时间 (A)、乳化温度 (B)、乳化

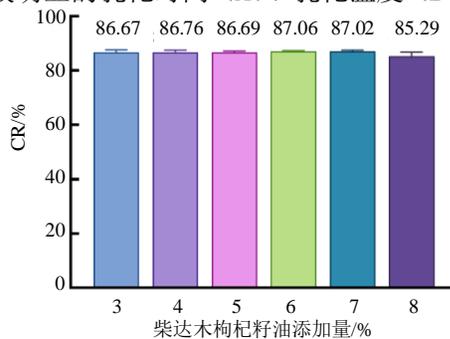


图 6 柴达木枸杞籽油添加量对纳米乳 CR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Influence of seed oil of *L. barbarum* from Qaidam Basin dosage on CR of nanoemulsion ($\bar{x} \pm s, n=3$)

剂添加量 (C)、增稠剂比例 (D) 为自变量, CR 为响应值 (Y) 因素, 进行 4 因素 3 水平共计 29 次实验, 对 LN 的制备工艺进行优化。因素水平、实验设计及结果见表 1。

2.5.2 模型拟合与方差分析 根据表 1 测得的 Y 值, 利用 Design-Expert 13 统计软件对表 1 数据进行回归拟合得到二次多项回归模型: $Y=94.44+0.0217A+0.5342B+1.86C+2.11D+1.62AB-0.31AC+0.7325AD+0.4825BC+0.0075BD+1.19CD-1.87A^2-3.08B^2-2.13C^2-5.05D^2$ 。

由表 2 可知, 模型的 F 值为 29.15、 $P<0.0001$ 说明回归模型差异极显著, 失拟项 P 值为 0.098 4 表明失拟项不显著, 模型的拟合性较好。相关系数

$R^2=0.9668$, 校正决定系数 $R_{adj}^2=0.9337$, 说明该回归方程拟合度和可信度均很高, 实验误差较小, 实验可靠性高, 可用此模型对工艺进行预测分析。多元回归方程 CD 项具显著差异 ($P<0.05$), C、D、AB、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 均具极显著性差异 ($P<0.01$); 比较各因素的 F 值, 可得出各因素对 Y 值的影响程度依序为 $D>C>B>A$ 。

2.5.3 响应面分析及 CS-Rhe-Lips 最佳处方 分别绘制 A、B、C、D 对 CR 值的三维曲面图, 结果见图 7。随着自变量增加 CR 值均呈先增加后下降的趋势, 以 CR 值最大为优化目标, 由 Design-Expert 8.0.6 软件得到的最佳制备条件为乳化时间 10.02 min, 乳化温度 74.74 °C, 乳化剂添加量 16.50%, 增稠剂 (黄

表 1 BBD-RSM 实验因素水平、设计及结果

Table 1 BBD-RSM factor level, test design and results

序号	A/min	B/°C	C/%	D	Y/%	序号	A/min	B/°C	C/%	D	Y/%
1	5 (-1)	70 (-1)	16 (0)	8 : 2 (0)	90.25	16	10	80	18	8 : 2	93.26
2	15 (1)	70	16	8 : 2	87.02	17	5	75	14	8 : 2	88.42
3	5	80 (1)	16	8 : 2	87.79	18	15	75	14	8 : 2	89.26
4	15	80	16	8 : 2	91.03	19	5	75	18	8 : 2	92.96
5	10 (0)	75 (0)	14 (-1)	7 : 3 (-1)	84.65	20	15	75	18	8 : 2	92.56
6	10	75	18 (1)	7 : 3	85.24	21	10	70	16	7 : 3	84.98
7	10	75	14	9 : 1 (1)	85.96	22	10	80	16	7 : 3	84.78
8	10	75	18	9 : 1	91.31	23	10	70	16	9 : 1	88.54
9	5	75	16	7 : 3	85.70	24	10	80	16	9 : 1	88.37
10	15	75	16	7 : 3	84.14	25	10	75	16	8 : 2	93.86
11	5	75	16	9 : 1	89.64	26	10	75	16	8 : 2	94.79
12	15	75	16	9 : 1	91.01	27	10	75	16	8 : 2	93.93
13	10	70	14	8 : 2	86.39	28	10	75	16	8 : 2	94.92
14	10	80	14	8 : 2	88.04	29	10	75	16	8 : 2	94.68
15	10	70	18	8 : 2	89.68						

表 2 回归模型方差分析结果

Table 2 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	320.030 0	14	22.860 0	29.150 0	<0.000 1	CD	5.660 0	1	5.660 0	7.22	0.017 7
A	0.005 6	1	0.005 6	0.007 2	0.933 7	A ²	22.670 0	1	22.670 0	28.92	<0.000 1
B	3.420 0	1	3.420 0	4.370 0	0.055 4	B ²	61.370 0	1	61.370 0	78.27	<0.000 1
C	41.400 0	1	41.400 0	52.800 0	<0.000 1	C ²	29.320 0	1	29.320 0	37.39	<0.000 1
D	53.510 0	1	53.510 0	68.240 0	<0.000 1	D ²	165.560 0	1	165.560 0	211.15	<0.000 1
AB	10.470 0	1	10.470 0	13.350 0	0.002 6	残差	10.980 0	14	0.784 1		
AC	0.384 4	1	0.384 4	0.490 2	0.495 3	失拟项	9.970 0	10	0.997 1	3.96	0.098 4
AD	2.150 0	1	2.150 0	2.740 0	0.120 3	净误差	1.010 0	4	0.251 7		
BC	0.931 2	1	0.931 2	1.190 0	0.294 2	总值	331.000 0	28			
BD	0.000 2	1	0.000 2	0.000 3	0.986 7						

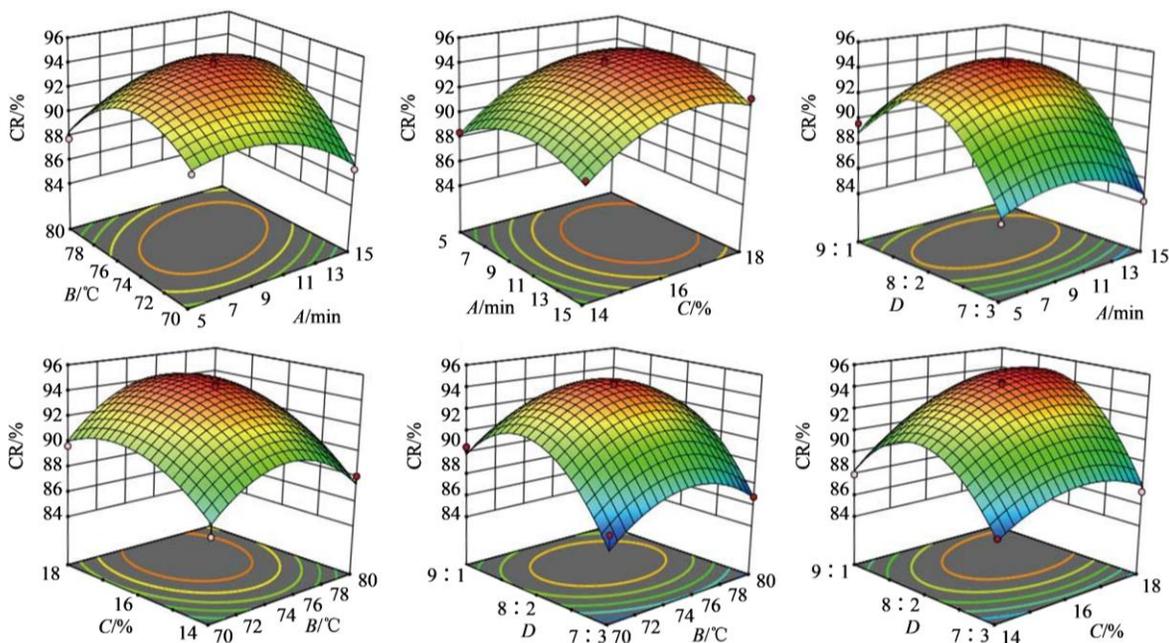


图 7 各因素对 CR 值影响的响应面图

Fig. 7 Response surface plot of each factor on CR value

原胶：明胶）比例 8.34：2，预测 Y 值为 94.96%。为了验证响应面制备柴达木枸杞籽油的最佳工艺条件，根据实际情况，调整乳化时间 10 min，乳化温度 75 °C，乳化剂添加量 16%，增稠剂黄原胶：明胶=8：2，进行 3 组平行实验进行验证，得到的纳米乳 CR 均值为 94.92%。实验得到的数值与预测值相对误差较小，说明构建的数学模型具有较高的指导意义。

2.6 LN 的 pH 值、粒径、PDI、Zeta 电位、黏度检测

2.6.1 pH 值测定 精密称取 2.0 g LN 样品，加 18.0 g 去离子水，40 °C 持续搅拌至均匀，冷却至室温。采用 pH 计平行测定 3 次。测得 LN 的 pH 值为 5.78 ± 0.02 。

2.6.2 粒径、PDI、Zeta 电位检测 称取 1.0 g LN 样品于烧杯中，加入 100 mL 去离子水，超声（1300 W、40 kHz）5 min，使其均匀分散，制备质量浓度为 $0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LN 溶液，将其置于纳米粒度及 Zeta 电位分析仪，测定纳米乳的粒径为 $(93.33 \pm 9.53) \text{ nm}$ 、PDI 为 0.22 ± 0.02 ，Zeta 电位为 $(-31.43 \pm 0.36) \text{ mV}$ （图 8）。

2.6.3 黏度检测 将旋转黏度计设置为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、25 °C，稳定 10 min 后测定 LN 黏度为 $0.37 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 。

2.7 TEM 观察 LN 外貌

取 10 μL LN 滴于 200 目铜网内，室温自然干

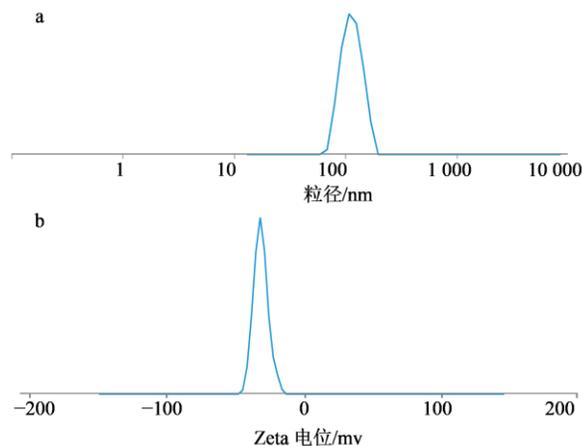


图 8 LN 粒径 (a) 和 Zeta 电位 (b)

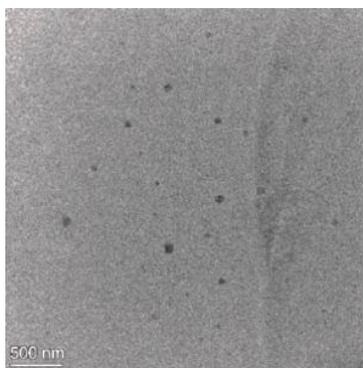
Fig. 8 Particle size (a) and Zeta potential (b) of LN

燥后置于电压 200 kV 的 TEM 下，放大至 17 500 倍后观察 LN 形态。结果见图 9，LN 为近球形液滴，粒径小于 100 nm，且未聚集。

2.8 亚油酸含量测定方法的建立

2.8.1 色谱条件 采用 Agilent C₁₈（250 mm × 4.6 mm，5 μm ）色谱柱，流动相为 0.01% 甲酸水溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱 0~30 min，5%→55%B，体积流量 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，柱温 35 °C，进样量 5 μL ，检测波长 203 nm。

2.8.2 对照品溶液的制备 称取亚油酸对照品 37.22 mg 于 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，配制成质量浓度为 $3.722 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

图 9 LN 的 TEM 图 ($\times 17\,500$)Fig. 9 TEM image of LN ($\times 17\,500$)

2.8.3 LN 游离亚油酸供试品溶液的配制 称取 LN 300 mg 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 吸取 LN 溶液于 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液即得 LN 游离亚油酸供试液。

2.8.4 LN 总亚油酸供试品溶液的配制 称取 LN 300 mg 置 10 mL 量瓶中, 加 5 mL 甲醇, 1 300 W、40 kHz 超声 1 h 后使其破乳溶解, 加甲醇定容至刻度, 吸取 LN 溶液于 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液即得供试品溶液。同法制备空白纳米乳供试品溶液。

2.8.5 专属性考察 取亚油酸对照品储备液、LN 游离亚油酸、LN 总亚油酸供试品溶液以及空白纳米乳供试品溶液, 分别按“2.8.1”项下色谱条件测定, 结果见图 10, 证明该法专属性良好。

2.8.6 线性关系考察 精密吸取适量对照品储备液, 用甲醇稀释至质量浓度分别为 3.722、1.861、0.931、0.465、0.233、0.116 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 按“2.8.1”

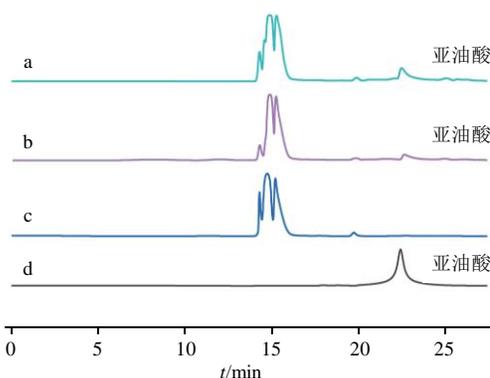


图 10 LN 总亚油酸溶液 (a)、LN 游离亚油酸溶液 (b)、空白纳米乳供试品溶液 (c)、亚油酸对照品溶液 (d) 的 HPLC 色谱图

Fig. 10 HPLC chromatograms of total linoleic acid of LN (a), free linoleic acid of LN (b), test solution of blank nanoemulsion (c), and control solution of linoleic acid (d)

项下方法分析, 记录色谱图及峰面积。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 拟合得亚油酸线性方程 $Y=2\times 10^7 X+872\,446$, $r=0.999\,7$, 线性范围 $0.116\sim 3.722\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.8.7 精密度考察 分别精密移取“2.8.2”项下的亚油酸对照品储备液 0.1、0.2、0.4 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 得质量浓度分别为 37.22、74.44、148.88 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的亚油酸对照品溶液, 按“2.8.1”项下色谱条件分析, 每个质量浓度分别重复进样 6 次。结果表明 3 个质量浓度下亚油酸峰面积的 RSD 值分别为 3.39%、3.56%、4.78%, 表明该方法精密度良好。

2.8.8 重复性考察 分别按“2.8.3”和“2.8.4”项方法制备 LN 游离亚油酸供试液和 LN 总亚油酸供试液各 6 份, 按“2.8.1”项下色谱条件进样测定峰面积并计算含量。结果表明 2 种样品中亚油酸的 RSD 值分别为 3.47%、4.03%, 表明该法重复性良好。

2.8.9 稳定性考察 分别按“2.8.3”和“2.8.4”项方法制备 LN 游离亚油酸供试品溶液和 LN 总亚油酸供试品溶液, 在室温下放置 0、2、6、8、12、24 h 后, 按“2.8.1”项下色谱条件进样, 测定亚油酸峰面积。结果表明 2 种供试品溶液不同时间下测定的亚油酸峰面积 RSD 分别为 4.48%、3.60%, 表明 2 种供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.8.10 加样回收率考察 精密吸取“2.8.4”项下方法配制已测定亚油酸的 LN 总亚油酸供试品溶液 9 份, 每份 1 mL, 分别精密加入一定量的亚油酸对照品溶液 (相当于亚油酸 0.025、0.050、0.100 mg) 混匀, 分为低、中、高 3 组, 每组 3 份, 按“2.8.1”的色谱条件重复进样 3 次, 取峰面积平均值, 计算质量浓度、回收率和 RSD 值。测得亚油酸加样回收率平均值为 99.38%, RSD 为 3.01%。表明该方法准确度良好。

2.8.11 EE 及 DL 的测定 取“2.8.3”和“2.8.4”项下条件制备的 LN 游离亚油酸供试品溶液以及 LN 总亚油酸供试品溶液。按“2.8.1”项色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算 LN 的 EE 为 84.01%, DL 为 4.29%^[19]。

$$EE=(m_{\text{总}}-m_{\text{游离}})/m_{\text{总}}$$

$$DL=(m_{\text{总}}-m_{\text{游离}})/m$$

$m_{\text{游离}}$ 为未被包裹在 LN 里的亚油酸质量 (mg); $m_{\text{总}}$ 为 LN 中所有形式的亚油酸总质量 (mg); m 为 LN 的质量 (mg)

2.9 LN 稳定性考察

2.9.1 储存稳定性 为评估 LN 在实际应用场景中

的储存稳定性能。取 5 mL LN 装入易于观察的密封玻璃瓶中，置于室温（25 °C）下，分别于第 15 天和第 30 天观察纳米乳有无分层、絮凝和沉淀现象，并检测粒径及 PDI 变化。由图 11-a 显示，LN 呈乳

白色、质地细腻无颗粒感。在 25 °C 条件下静置 30 d 的过程中未出现相分离、沉淀及破乳等现象，且粒径和 PDI 未发生显著性差异 ($P>0.05$) (图 11-b、c)，表明 LN 在室温储存 30 d 稳定性良好。

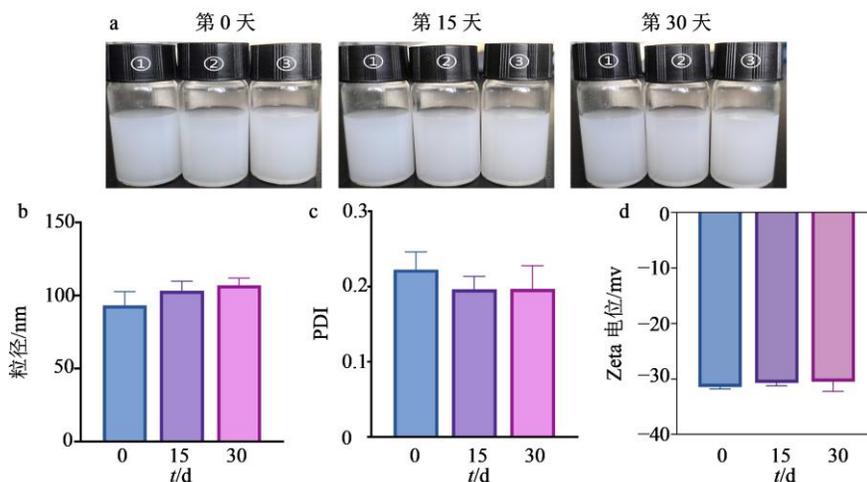


图 11 不同储存时间下 LN 的外观 (a)、粒径 (b)、PDI (c)、Zeta 电位 (d) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 11 Appearance (a), particle size (b), PDI (c), and Zeta potential (d) of LN at different storage times ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.9.2 离心稳定性 乳液为热力学不稳定体系，多转速离心可模拟不同强度外界力学作用，是评估 LN 物理稳定性的方法之一^[20]。具体测试方法为：分别取 2 mL LN 置于不同离心管中，分别在 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 r·min⁻¹ 下离心 10 min，观察纳米乳离心后有无分层、絮凝和沉淀现象，并检测粒径及 PDI 变化。LN 在 6 种离心条件下均未观察到分层、絮凝及沉淀现象 (图 12-a)，且粒径 (图 12-b) 与 PDI (图 12-c) 均无显著性差异 ($P>0.05$)，表明 LN 在上述离心条件下

未发生显著性变化。

2.10 LN 对 HaCaT 细胞活力的影响

HaCaT 细胞以每孔 1.5×10^4 个接种于 96 孔板中，在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。弃去 HaCaT 细胞专用培养基，分别加入含有不同质量浓度空白纳米乳 (1.000 、 2.000 mg·mL⁻¹) 或 LN (2.000 、 1.000 、 0.500 、 0.250 、 0.125 mg·mL⁻¹) 的无血清 MEM 培养基，设置空白组 (不含细胞)，以无血清 MEM 培养基为对照，每个浓度设置 6 个复孔。继续培养 24 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8，

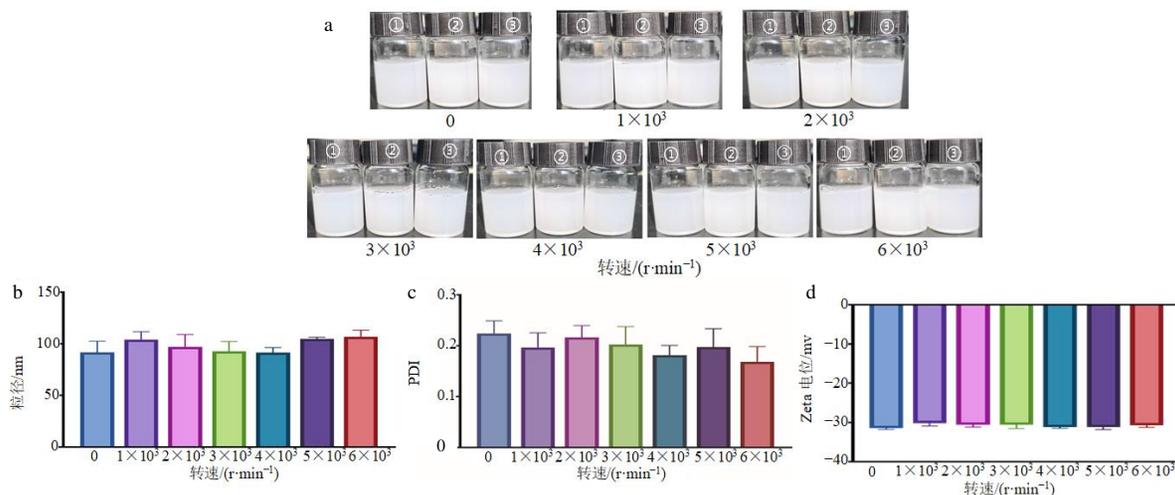


图 12 不同转速下 LN 的外观 (a)、粒径 (b)、PDI (c)、Zeta 电位 (d) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 12 Appearance (a), particle size (b), PDI (c), and Zeta potential (d) of LN at different rotation speeds ($\bar{x} \pm s, n=3$)

37 °C 孵育 2 h, 于 450 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算 HaCaT 细胞存活率。由图 13 结果可知, LN 各剂量组及空白纳米乳组 HaCaT 细胞存活率与对照组相比均无显著差异 ($P>0.05$), 表明 LN 和空白纳米乳对 HaCaT 细胞无毒性。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

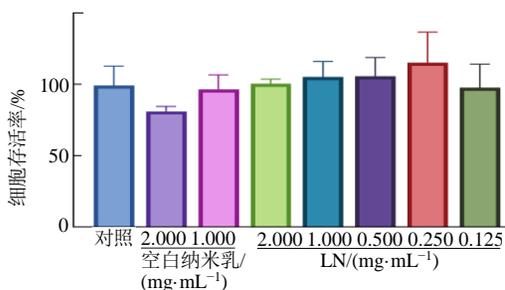


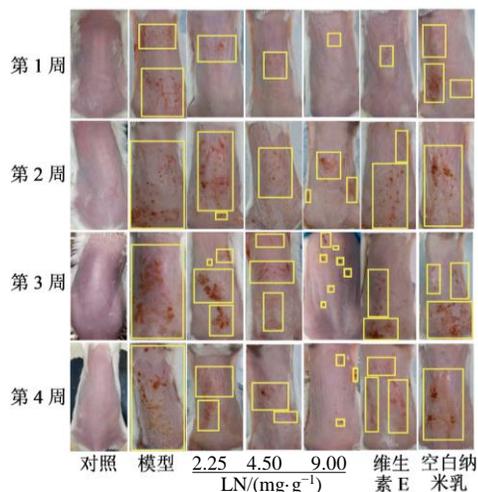
图 13 LN 对 HaCaT 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 13 Effect of LN on survival rate of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.11 LN 对 BALB/c 小鼠日光性皮炎的治疗效果评价

2.11.1 分组、造模及给药 70 只健康 BALB/c 小鼠, 适应性饲养 1 周后随机分为对照组 (蒸馏水), 模型组, LN 高剂、中、低剂量 (9.00、4.50、2.25 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 组, 空白纳米乳 (除不加药外, 其余与 LN 中剂量组相同) 组及维生素 E (阳性药, 4.50 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 组, 每组 10 只。采用 UV 照射法构建小鼠日光性皮炎模型^[21], 具体操作如下: UV 照射前 24 h, 用剃毛器在小鼠背部中间轻推去除毛发, 形成 2 cm × 3 cm 大小的裸露区域, 实验过程中定期脱毛以维持该裸露状态。根据预试验最终确定 UVA 单次辐照剂量为 1.6 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$, UVB 单次辐照剂量为 0.2 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。造模照射方案: 隔天照射 1 次, 持续 4 周, 累计照射 14 次。各组处理方式如下: 对照组小鼠背部仅涂抹蒸馏水且进行 UV 照射; 模型组经 UV 照射后不予给药; 其余各组均于每次 UV 照射后立即在小鼠背部分别涂抹上述剂量的 LN、空白纳米乳和维生素 E, 各组给药剂量均以实际给药质量计算。

2.11.2 LN 对 BALB/c 小鼠皮肤状态的影响 日光性皮炎急性皮肤光损伤的显著特征是出现红斑、表皮增厚、干燥脱屑^[22]。因此, 每 7 天拍照记录小鼠背部皮肤状态, 并使用 Image J 软件定量分析皮肤表面红斑面积, 计算红斑量。各组小鼠 4 周实验期内的皮肤外观如图 14 所示。结果显示, 对照组小鼠



黄色方框为小鼠背部皮肤红斑。

Yellow box indicates erythema on back skin of mouse.

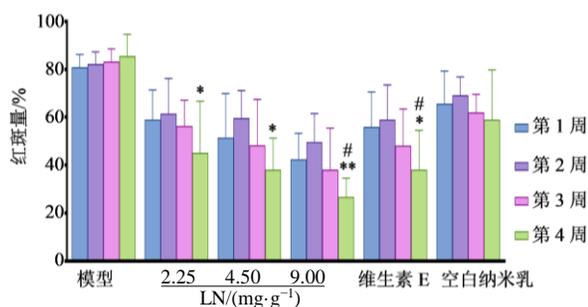
图 14 LN 对 BALB/c 小鼠皮肤状态的影响

Fig. 14 Effect of LN on skin condition of BALB/c mice

皮肤健康光滑。模型组小鼠经 UV 照射后皮肤出现明显的红斑且表皮粗糙, 随着实验的进行, 红斑范围持续扩大, 并伴有结痂和脱屑。LN 高、中剂量组及维生素 E 组小鼠的背部皮肤状态, 相较于模型组有明显改善, 其中 LN 高剂量处理后, 小鼠皮肤状态的改善效果最为明显。空白纳米乳对小鼠背部皮肤状态也有一定改善作用。

$$\text{红斑量} = \text{红斑面积} / \text{裸露区域面积}$$

图 15 为不同时间点各组小鼠背部皮肤红斑量的统计分析结果。模型组小鼠背部红斑量在实验第 1~4 周间无显著差异 ($P>0.05$)。各给药组小鼠皮肤红斑量随实验进程均呈现先升高后降低的趋势, 其中 LN 高剂量组小鼠第 4 周的皮肤红斑量相较于



与同组第 1 周比较: # $P<0.05$; 与同组第 2 周比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

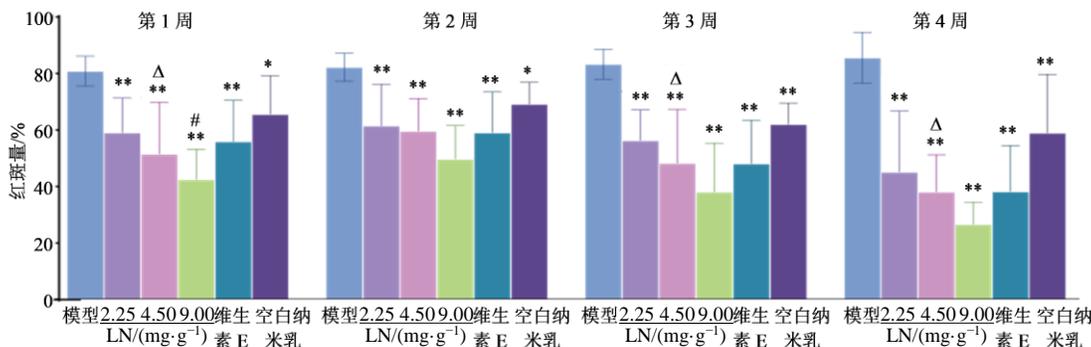
$P<0.05$ vs first week of same group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs second week of same group.

图 15 不同照射周期下各组小鼠红斑量 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 15 Amount of erythema in each group of mice at different irradiation cycles ($\bar{x} \pm s, n=10$)

第 1 周显著降低 ($P < 0.05$)、相较于第 2 周极显著降低 ($P < 0.01$)，且该组第 4 周的红斑量明显低于其余各组；LN 中、低剂量组小鼠第 4 周的皮肤红斑量相较于第 2 周均显著降低 ($P < 0.05$)；维生素 E 组小鼠第 4 周的皮肤红斑量与第 1、2 周相比均显著降低 ($P < 0.05$)。空白纳米乳组小鼠各周的皮肤红斑量间无显著差异 ($P > 0.05$)。

图 16 是不同组别小鼠在相同时期内的红斑量



与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与空白纳米乳比较: $\Delta P < 0.05$; 与维生素 E 比较: # $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs blank nanoemulsion; # $P < 0.05$ vs vitamin E.

图 16 各组小鼠在相同照射周期下的红斑量 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 16 Amount of erythema in each group of mice under same irradiation period ($\bar{x} \pm s, n=10$)

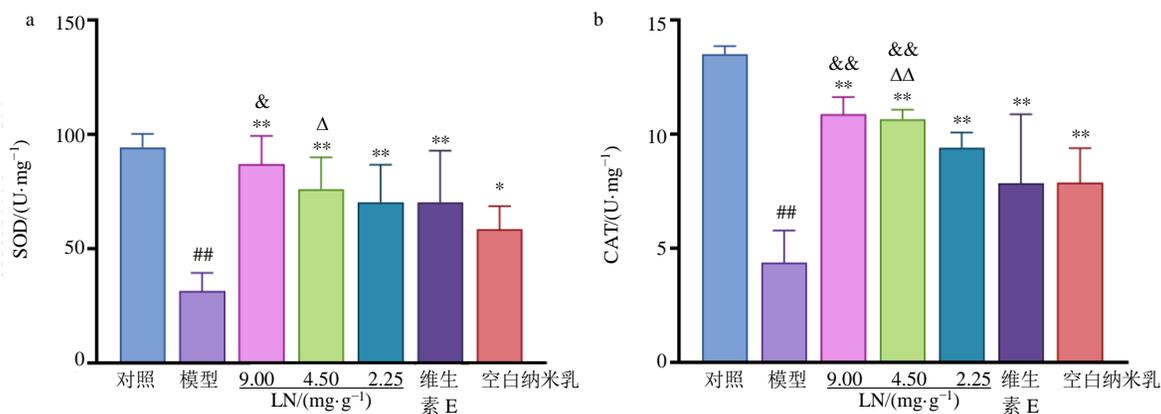
背部皮肤红斑的缓解作用。

2.11.3 小鼠皮肤组织中生化指标的测定 末次 UV 照射并干预后将小鼠禁食 12 h (保持自由饮水)，使用异氟烷麻醉小鼠后立即通过颈椎脱位法处死，快速采集小鼠背部皮肤组织样本，剔除附着的脂肪组织，并使用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 充分漂洗以去除残留血液。取小鼠皮肤组织样本加入 PBS，使

情况。与模型组相比，LN 各剂量组及维生素 E 组小鼠皮肤红斑量在 4 周内均极显著下降 ($P < 0.01$)，且 LN 各剂量组小鼠皮肤红斑量改善效果均呈现明显的剂量相关性。与维生素 E 组相比，LN 高剂量组小鼠背部红斑量在第 1 周显著降低 ($P < 0.05$)。与空白纳米乳组相比，LN 中剂量组在第 1、3、4 周显著减少小鼠背部皮肤红斑量 ($P < 0.05$)。可见，柴达木枸杞籽油的加入有利于增加纳米乳对小鼠

用冷冻研磨仪将混合物制备成 10% 的皮肤组织匀浆，收集上清液。采用微板法测定小鼠皮肤组织中 SOD 和 CAT 活力，使用 ELISA 试剂盒测定小鼠皮肤组织中 IL-1 β 、IL-6、MMP-3 和 MMP-9 含量。

小鼠皮肤组织中抗氧化酶 SOD 和 CAT 的活力如图 17-a、b 所示。与对照组相比，模型组小鼠皮肤组织中 SOD 和 CAT 的含量极显著性降低 ($P <$



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与空白纳米乳比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$; 与维生素 E 组比较: & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs blank nanoemulsion; & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ vs vitamin E group.

图 17 各组小鼠皮肤组织中 SOD (a) 和 CAT (b) 含量 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

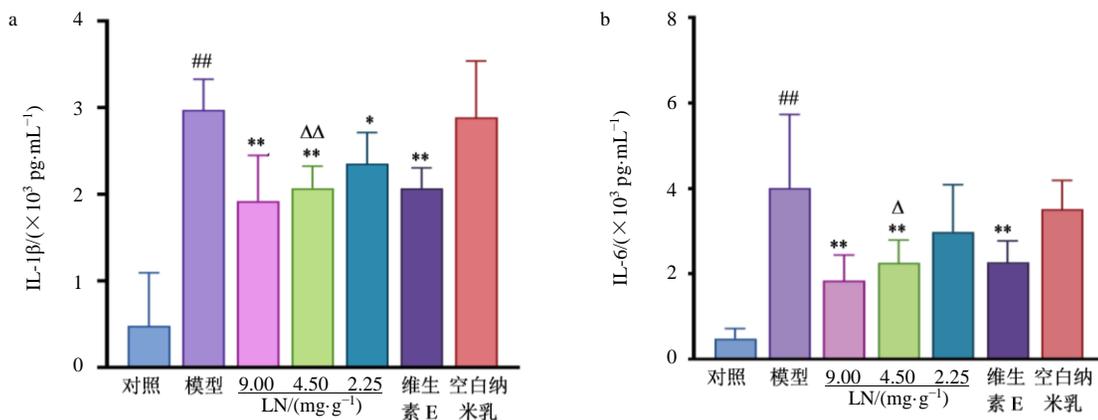
Fig. 17 Contents of SOD (a) and CAT (b) in skin tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

0.01)。相较于模型组, LN 各剂量组和维生素 E 干预后, 小鼠皮肤中 SOD 和 CAT 含量均极显著增加 ($P < 0.01$), 且 LN 对 SOD 和 CAT 含量的增加呈现明显的剂量相关性。与模型组相比, 空白纳米乳能显著提升小鼠皮肤组织中 SOD 及 CAT 含量 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与维生素 E 组相比, LN 高剂量组可显著提升小鼠皮肤组织中 SOD 含量 ($P < 0.05$), LN 高、中剂量组均能极显著提升小鼠皮肤组织中 CAT 含量 ($P < 0.01$)。与空白纳米乳组相比, LN 中剂量组小鼠皮肤中 SOD 及 CAT 含量均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

图 18-a、b 为 LN 对小鼠皮肤组织中 IL-1 β 和 IL-6 含量的影响。UV 辐射后, 模型组小鼠皮肤组织中炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 的水平较对照组极显著

升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 小鼠皮肤组织中 IL-1 β 和 IL-6 的含量经 LN 高、中剂量及维生素 E 干预均极显著下降 ($P < 0.01$), 经 LN 低剂量处理后 IL-1 β 的含量显著下降 ($P < 0.05$), 且 IL-1 β 和 IL-6 的含量随 LN 剂量的增加而降低。与空白纳米乳组相比, LN 中剂量组小鼠皮肤中 IL-6、IL-1 β 含量均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.05)。

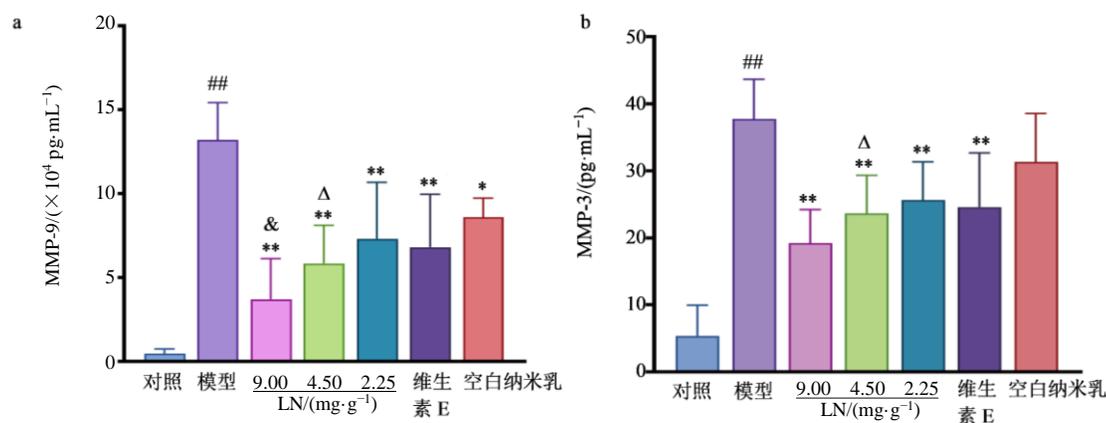
如图 19-a、b 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠皮肤组织中 MMP-9 和 MMP-3 的含量极显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, LN 各剂量组小鼠皮肤中 MMP-9 和 MMP-3 的含量均极显著下降 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性; 维生素 E 组小鼠皮肤组织中 MMP-9 和 MMP-3 的含量极显著降低 ($P < 0.01$); 空白纳米乳组小鼠皮肤组织中 MMP-9 含量显著降



与对照组比较: $##P < 0.01$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$; 与空白纳米乳组比较: $\Delta P < 0.05$ 。
 $##P < 0.01$ vs control group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs blank nanoemulsion group.

图 18 各组小鼠皮肤组织中 IL-1 β (a) 和 IL-6 (b) 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 18 Contents of IL-1 β (a) and IL-6 (b) in skin tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)



与对照组比较: $##P < 0.01$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$; 与空白纳米乳比较: $\Delta P < 0.05$; 与维生素 E 组比较: $\&P < 0.05$ 。
 $##P < 0.01$ vs control group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs blank nanoemulsion; $\&P < 0.05$ vs vitamin E group.

图 19 各组小鼠皮肤组织中 MMP-9 (a) 和 MMP-3 (b) 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 19 Contents of MMP-9 (a) and MMP-3 (b) in skin tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

低 ($P < 0.05$)。与维生素 E 组相比, LN 高剂量组显著降低小鼠皮肤组织中 MMP-9 含量 ($P < 0.05$)。与空白纳米乳组相比, LN 中剂量组显著降低小鼠皮肤中 MMP-9 与 MMP-3 的含量 ($P < 0.05$)。以上结果说明, LN 能有效改善 UV 诱导的急性光损伤小鼠皮肤的氧化应激和炎症反应, 并降低小鼠皮肤中 MMPs 含量, 且柴达木枸杞籽油的加入促进了 LN 对急性日光性皮炎的治疗效果。

3 讨论

功能性辅料的添加是维持纳米乳物理和化学稳定性的关键。乳化剂通过降低油-水界面张力形成致密界面膜, 从而有效抑制液滴聚集, 为纳米乳物理稳定性奠定基础。增稠剂通过提升连续相黏度、构建空间位阻进一步增强体系稳定性^[23]。吸附于油-水界面的抗氧化剂不仅能清除自由基, 还能通过改变界面电荷、形成致密的物理屏障, 从而协同限制氧气扩散, 提升纳米乳的化学与物理稳定性^[24]。具有强吸湿性的保湿剂不但可提高连续相黏度, 进一步稳固液滴结构, 还能有效增强皮肤水合作用^[25]。本研究构建了以聚山梨酯 80-山梨糖醇酐单油酸酯 80 为复配乳化剂, 黄原胶和明胶为增稠剂, 具备广谱抑菌作用的羟苯甲酯和羟苯丙酯为防腐剂^[26], 肌肽和抗坏血酸磷酸酯钠 (SAP) 为抗氧化剂, 甘油、泛醇及赤藓醇为保湿剂的复合纳米乳体系。这些成分不仅有助于维持 LN 的物理、化学稳定性, 其中的抗氧化剂和保湿剂还能与柴达木枸杞籽油协同, 在 BALB/c 小鼠皮肤光损伤模型中增强 LN 对急性 UV 日光性皮炎的治疗效果。

诸多研究发现, 原材料配比 (如乳化剂与增稠剂用量、油水比例等) 及乳化工艺 (如乳化时间、温度等) 对纳米乳稳定性存在显著影响。例如, 负载姜黄素的 Pickering 纳米乳稳定性随乳化剂 (CS-OSA) 添加量的增加呈现先升后降的趋势^[27]。八月瓜籽油纳米乳研究显示, 油相添加量达 10% 时纳米乳稳定性最强, 过量稳定性下降^[28]。在香榧油微乳的制备中, 乳化温度会明显影响表面活性剂的溶解效率, 且乳化时间过长易导致纳米乳转相和稳定性降低^[29]。由此可见, 无论是组分比例还是乳化工艺参数对纳米乳稳定性的影响均非简单线性关系。CR 是纳米乳稳定性的核心评价标准之一, 数值越高纳米乳稳定性越强^[30]。本研究以 CR 为稳定性评价指标, 最终确定乳化剂添加量、增稠剂比例、乳化时间与温度是影响 LN 稳定性的关键因素 (图 7), 并在

此基础上获得 LN 的最佳制备工艺。采用此工艺制备的 LN 的 CR 为 94.92% (4 500 r·min⁻¹ 离心 30 min 不分层), 符合《中国药典》2025 年版四部通则中“乳剂在 4 000 r·min⁻¹ 下离心 15 min 不分层”的要求^[31]。初步说明, 该制备工艺获得的 LN 较为稳定。

粒径是乳剂的核心质量参数, 较小的粒径往往具有比表面积大、油-水界面张力低的特点, 更有利于活性物质经皮递送粒径^[32]。本研究制备的 LN 在 TEM 下呈近球形液滴, 粒径为 (93.33 ± 9.53) nm, 属于纳米乳^[33]。LN 的 PDI 为 0.22 ± 0.02 (< 0.3), 表明其粒径分布窄、颗粒均一, 体系分散性良好^[34]。此外, 其 Zeta 电位为 (-31.43 ± 0.36) mV (绝对值 > 30 mV), 说明液滴间静电排斥力强, 可有效防止颗粒絮凝^[35]。研究显示, 当乳剂黏度处于 0.015 ~ 10.000 Pa·s 时, 可显著降低液滴运动速率, 从而减少液滴的碰撞聚集, 有利于提升乳剂稳定性^[36]。LN 的黏度为 0.37 Pa·s, 可进一步保障其稳定性。此外, 纳米乳的 pH 值为 5.78 ± 0.02, 处于弱酸性区间 (4 ~ 6), 满足外用制剂不破坏皮肤微环境的 pH 值要求^[37]。此外, EE 与 DL 是决定纳米制剂药物递送效能的关键参数。其中, EE 直接反映载体对活性成分的捕获能力, DL 则直接决定单位质量载体所能递送的活性物质剂量^[38]。本研究中, 柴达木枸杞籽油添加量为 6%, 以柴达木枸杞籽油的主要活性成分亚油酸为检测指标, 测得 LN 的 EE 值为 84.01%, DL 为 4.29%, 为其发挥急性日光性皮炎治疗作用提供了重要基础。本研究中, LN 显示出良好的储存与离心稳定性 (图 11、12)。然而, 本研究仅考察了 LN 的短期室温储存和离心稳定性, 未关注不同温度、放置时间、pH 条件等其他因素对其稳定性的影响, 后续将进行更全面深入的稳定性研究, 为其进一步开发和应用提供更加充足的依据。

HaCaT 细胞是一种永生生化人源角质形成细胞系, 不仅保留了原代表皮细胞的主要标志物与功能, 还具有成本低、易培养、重现性好等特点, 常用于体外皮肤毒性评价^[39]。本研究显示, LN 在 0.125 ~ 2.000 mg·mL⁻¹ 对 HaCaT 细胞活力无显著影响, 初步表明 LN 对表皮细胞无毒性。然而, 皮肤是由表皮、真皮和皮下组织构成的复杂器官。其中, 表皮主要由角质形成细胞构成, 承担物理屏障功能。真皮由致密的细胞外基质和成纤维细胞等基质细胞组成, 为皮肤提供弹性和机械强度^[40]。因此, 仅通过单一类型皮肤细胞或单层细胞培养无法全

面反映药物与皮肤的生物相容性。本研究后续将进一步采用其他种类的皮肤细胞、三维重建皮肤模型等对 LN 的安全性进行更加全面的研究。

过度的紫外线暴露可诱导皮肤产生大量 ROS, 如过氧化氢 (H_2O_2)、超氧阴离子 (O_2^-)、羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 等, 打破皮肤氧化还原平衡, 造成皮肤氧化应激^[41]。SOD 和 CAT 是机体重要的抗氧化酶, 当它们活性降低时, 自由基清除不足或过量产生, 氧化损伤加剧^[42]。过量的 ROS 还能激活炎症信号通路, 促进 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症细胞因子的释放, 这些因子又进一步诱导产生氧自由基, 形成“氧化应激-炎症”恶性循环, 加剧皮肤损伤^[43-44]。此外, 炎症因子(如 IL-6)还能上调 MMPs 的表达, 后者通过降解胶原纤维、抑制弹性蛋白活性加速细胞外基质 (ECM) 的降解, 导致皮肤机械力下降^[45]。ECM 降解片段又可被相关受体识别后激活核因子 (NF)- κB 信号通路, 进一步驱动促炎因子释放并放大炎症反应^[46]。本研究发现, 局部涂抹 LN 可显著提升紫外线照射后小鼠皮肤组织中 SOD 和 CAT 活力, 降低 MMP-9 和 MMP-3 水平, 并减少炎症细胞因子 IL-6 和 IL-1 β 含量 (图 17~19)。说明 LN 可通过提升皮肤内源性抗氧化酶活力、减轻皮肤炎症和降低 MMPs 水平有效缓解 UV 诱导的 BALB/c 小鼠日光性皮炎。

综上, 本实验制备的 LN 粒径均匀、分散性佳、黏度适宜, 具有良好的载药能力和稳定性, 且对表皮细胞无毒性。LN 在 UV 诱导的 BALB/c 小鼠急性日光性皮炎模型中显示出明显的治疗效果, 是一种极具应用前景的外用纳米乳制剂。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Pistone D, Meroni G, Panelli S, et al. A journey on the skin microbiome: Pitfalls and opportunities [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9846.
- [2] Yu Z W, Zheng M, Fan H Y, et al. Ultraviolet (UV) radiation: A double-edged sword in cancer development and therapy [J]. *Mol Biomed*, 2024, 5(1): 49.
- [3] 吴小涵, 王洪瑾. 在青海省锁阳对日光性皮炎发病机制的应用 [J]. *临床医学进展*, 2023(12): 19847-19850.
Wu X H, Wang H J. Application of *Cynomorium songaricum* on the pathogenesis of solar dermatitis in Qinghai province [J]. *Adv Clin Med*, 2023(12): 19847-19850.
- [4] Mülayım K, Yücel A. Dermoscopic and histopathological correlation in macular hyperpigmented facial lesions [J]. *J Surg Med*, 2022, 6(2): 125-130.
- [5] Vats K, Kruglov O, Mizes A, et al. Keratinocyte death by ferroptosis initiates skin inflammation after UVB exposure [J]. *Redox Biol*, 2021, 47: 102143.
- [6] Feng Y Q, Zhang H, Han J X, et al. HSF4/COIL complex-dependent R-loop mediates ultraviolet-induced inflammatory skin injury [J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(7): e1336.
- [7] Cui B N, Wang Y, Jin J H, et al. Resveratrol treats UVB-induced photoaging by anti-MMP expression, through anti-inflammatory, antioxidant, and antiapoptotic properties, and treats photoaging by upregulating VEGF-B expression [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6037303.
- [8] Yang J Y, Guo J G, Tang P L, et al. Insights from traditional Chinese medicine for restoring skin barrier functions [J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(9): 1176.
- [9] Zhang Y, Li X L, Xu Y Y, et al. Comparison of chemical characterization and oxidative stability of *Lycium barbarum* seed oils: A comprehensive study based on processing methods [J]. *J Food Sci*, 2022, 87(9): 3888-3899.
- [10] Flieger J, Raszewska-Famielec M, Radzikowska-Büchner E, et al. Skin protection by carotenoid pigments [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(3): 1431.
- [11] Ruel Y, Moawad F, Alsarraf J, et al. Antiproliferative and anti-inflammatory effects of the polyphenols phloretin and balsacone C in a coculture of T cells and psoriatic keratinocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 5639.
- [12] Tomas M, Günal-Köroğlu D, Kamiloğlu S, et al. The state of the art in anti-aging: Plant-based phytochemicals for skin care [J]. *Immun Ageing*, 2025, 22(1): 5.
- [13] Wang X, Jia Y, He H M. The role of linoleic acid in skin and hair health: A review [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 26(1): 246.
- [14] 王学红, 尹星星, 陆杰, 等. 枸杞籽油对中波紫外线诱导人永生化角质形成细胞光损伤的防护作用 [J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(6): 47-55.
Wang X H, Yin X X, Lu J, et al. Protective effect of *Lycium barbarum* seed oil on ultraviolet B-induced photodamage in human immortalized keratinocytes [J]. *Food Ferment Ind*, 2024, 50(6): 47-55.
- [15] Blasi F, Cossignani L. An overview of natural extracts with antioxidant activity for the improvement of the oxidative stability and shelf life of edible oils [J]. *Processes*, 2020, 8(8): 956.

- [16] Ashaolu T J. Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review [J]. *Environ Chem Lett*, 2021, 19(4): 3381-3395.
- [17] Liu M, Liang J, Jing C, et al. Preparation and characterization of *Lycium barbarum* seed oil pickering emulsions and evaluation of antioxidant activity [J]. *Food Chem*, 2023, 405: 134906.
- [18] Sun A D, Dong W M, Li S Y, et al. Preparation and characterization of pickering emulsion gel stabilized by WPI/SPI composite particles and encapsulation of milk-derived peptide FDRPFL [J]. *LWT*, 2024, 199: 116093.
- [19] 陈琳, 吴欢欢, 黄小丽, 等. 鸦胆子油交联环糊精包合物的制备及其急性毒性研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(16): 2843-2849.
Chen L, Wu H H, Huang X L, et al. Preparation and acute toxicity test of *Bruceae Fructus* oil and β -cyclodextrin polymer inclusion complexes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2016, 47(16): 2843-2849.
- [20] 于鑫, 翁文, 刘楚怡, 等. 紫贻贝油纳米乳液制备及其稳定性和抗紫外辐射作用研究 [J]. *安徽农业科学*, 2025, 53(22): 171-178, 183.
Yu X, Weng W, Liu C Y, et al. Study on the preparation, stability, and anti-ultraviolet radiation of *Mytilus edulis* oil nanoemulsion [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2025, 53(22): 171-178, 183.
- [21] Hong J, Mu T, Sun H, et al. Photoprotective effects of sweet potato leaf polyphenols and caffeic acid against UV-induced skin-718damage in BALB/C nude mice [J]. *Food Funct*, 2022, 13(13): 7075-7087.
- [22] Li Y C, Gao J F, Liu S H, et al. Ergothioneine protects against UV-induced oxidative stress through the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway [J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2024, 17: 1309-1319.
- [23] Kupikowska-Stobba B, Domagała J, Kasprzak M M. Critical review of techniques for food emulsion characterization [J]. *Appl Sci*, 2024, 14(3): 1069.
- [24] Bao Y F, Pignitter M. Mechanisms of lipid oxidation in water-in-oil emulsions and oxidomics-guided discovery of targeted protective approaches [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2023, 22(4): 2678-2705.
- [25] Zhang X H, Kerob D, Zhang Z X, et al. Efficacy and safety of a cream containing panthenol, prebiotics, and probiotic lysate for improving sensitive skin symptoms [J]. *Skin Res Technol*, 2024, 30(1): e13540.
- [26] Lewińska A, Domżał-Kędzia M, Kierul K, et al. Targeted hybrid nanocarriers as a system enhancing the skin structure [J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 1063.
- [27] Wang L M, Jia Q F, Li Y, et al. Chitosan/OSA starch composite-stabilized pickering emulsions: Characterization and its application in curcumin [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2025, 222: 117661.
- [28] 朱仁威, 武奕彤, 胡深德, 等. 八月瓜籽油纳米乳液制备及其稳定性评价 [J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(4): 130-137.
Zhu R W, Wu Y T, Hu S D, et al. Preparation and stability evaluation of *Akebia trifoliata* seed oil nanoemulsion [J]. *Food Ferment Ind*, 2023, 49(4): 130-137.
- [29] 王婧怡, 徐艺家, 张雨鑫, 等. 响应面法优化香榧油微乳的制备工艺 [J]. *食品科技*, 2024, 49(1): 251-259.
Wang J Y, Xu Y J, Zhang Y X, et al. Optimization of preparation technology of *Torreya grandis* oil microemulsion by response surface methodology [J]. *Food Sci Technol*, 2024, 49(1): 251-259.
- [30] 李梦雪, 李玉珊, 霍金海, 等. 响应面法优化中药复合防晒乳液的制备工艺 [J]. *中国中医药科技*, 2023, 30(5): 870-876.
Li M X, Li Y S, Huo J H, et al. Optimisation of the preparation process of traditional Chinese medicine composite sunscreen production by response surface methodology [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol*, 2023, 30(5): 870-876.
- [31] 中国药典 [S]. 四部. 2025.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2025.
- [32] 李梦雅, 丁玉, 辛娟, 等. 马来酰亚胺修饰延胡索乙素纳米粒的制备、药动学及其对急性肝损伤的保护作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(9): 2565-2578.
Li M Y, Ding Y, Xin J, et al. Maleimide-modified tetrahydropalmatine nanoparticles: Preparation, pharmacokinetics and evaluation of protective effects on acute liver injury [J]. *Drug Eval Res*, 2025, 48(9): 2565-2578.
- [33] Liew S N, Utra U, Alias A K, et al. Physical, morphological and antibacterial properties of lime essential oil nanoemulsions prepared via spontaneous emulsification method [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 128: 109388.
- [34] 李姚昌, 余静怡, 林秋瑀, 等. 超声波均质法制备糖基化蛋白-茶油纳米乳液及其稳定性的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(23): 165-172.
Li Y C, Yu J Y, Lin Q Y, et al. Preparation of glycosylated protein-camellia oil nanoemulsion by ultrasonic homogenization and study on stability [J]. *Food Ferment Ind*, 2023, 49(23): 165-172.
- [35] Qi J R, Zhang D Y, Zhao R X, et al. Micro- and nano-emulsions based on soluble soy polysaccharide and octenyl succinic anhydride modified soluble soy

- polysaccharide [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2021, 56(6): 3034-3043.
- [36] Odofo K, Peletiri S, Gbonhinbor J, et al. Contemporary advancement in green demulsification technique: A review [J]. *J Chem Eng Ind Biotechnol*, 2025, 11(1): 17-32.
- [37] Lukić M, Pantelić I, Savić S D. Towards optimal pH of the skin and topical formulations: From the current state of the art to tailored products [J]. *Cosmetics*, 2021, 8(3): 69.
- [38] Hudiyaniti D, Al Khafiz M F, Anam K, et al. *In vitro* evaluation of curcumin encapsulation in gum arabic dispersions under different environments [J]. *Molecules*, 2022, 27(12): 3855.
- [39] Zaiter T, Cornu R, El B W, et al. Toxicity assessment of nanoparticles in contact with the skin [J]. *J Nanopart Res*, 2022, 24(7): 149.
- [40] Abdo J M, Sopko N A, Milner S M. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration [J]. *Wound Med*, 2020, 28: 100179.
- [41] Wang F, Shin J Y, Kang E S, et al. Kushenol C from *Sophora flavescens* protects against UVB-induced skin damage in mice through suppression of inflammation and oxidative stress [J]. *Heliyon*, 2023, 9(12): e22804.
- [42] Wang Z F, Li C N, Shao Y Y, et al. Antioxidant defense system responses, lysosomal membrane stability and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to perfluorooctanoic acid: an integrated biomarker approach to evaluating toxicity [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(43): 26481-26492.
- [43] Zhao C H, Wu S Y, Wang H. Medicinal plant extracts targeting UV-induced skin damage: Molecular mechanisms and therapeutic potential [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(5): 2278.
- [44] 金文静, 李子豪, 陈永方, 等. 甘草酸及其制剂治疗皮肤疾病的研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(18): 6833-6841.
- Jin W J, Li Z H, Chen Y F, et al. Research progress on glycyrrhizic acid and its preparations for treating skin diseases [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(18): 6833-6841.
- [45] Sim W J, Kim J, Baek K S, et al. Porcine placenta peptide inhibits UVB-induced skin wrinkle formation and dehydration: insights into MAPK signaling pathways from *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 25(1): 83.
- [46] Blokland K E C, Pouwels S D, Schuliga M, et al. Regulation of cellular senescence by extracellular matrix during chronic fibrotic diseases [J]. *Clin Sci*, 2020, 134(20): 2681-2706.

[责任编辑 孙英杰]