

苦参总碱纳米乳和苦参总碱纳米乳凝胶的透皮机制研究

李文华, 王英姿*, 骆声秀, 张 瑜, 聂瑞杰, 孙振阳, 李凤英, 张春泥

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘 要: 目的 以苦参总碱(*Sophora flavescens* alkaloids, SFA)为模型药物,通过制备的 SFA 纳米乳(SFA nanoemulsions, SFA-NEs)和 SFA 纳米乳凝胶(SFA nanoemulsion-based gels, SFA-NBGs)初步阐明其透皮作用机制。**方法** 采用扫描电子显微镜(SEM)法、HE 染色法和激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)法分别考察 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 对小鼠皮肤角质层和皮肤超微结构的影响。**结果** SEM 法观察发现,正常小鼠皮肤角质层平滑光整,生理盐水处理 6 h 后角质层出现轻微褶皱,而经 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 分别处理 2 h 和 6 h 后的皮肤角质层均发生不同程度的损伤;HE 染色法发现,生理盐水组皮肤结构完整,SFA-NBGs 组的皮肤分层结构不明显,基底层排列不清,角质层明显疏松,而 SFA-NEs 组皮肤分层结构紊乱,间隙增大,角质层疏松变薄;CLSM 实验结果显示,对照组、SFA-NEs 组和 SFA-NBGs 组处理后的皮肤表面的荧光较强,深处荧光较弱,且在毛囊及其附属器附近的荧光较强。**结论** SFA-NEs 和 SFA-NBGs 主要通过破坏皮肤角质层及皮肤超微结构进而透过皮肤发挥治疗作用,同时皮肤中的毛囊及其附属器对药物的透皮也发挥了一定的作用。

关键词: 湿疹;苦参总碱;纳米乳;纳米乳凝胶;透皮机制;超微结构

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)03-0484-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.03.011

Study on transdermal mechanism of *Sophora flavescens* alkaloids nanoemulsions and nanoemulsion-based gels

LI Wen-hua, WANG Ying-zi, LUO Sheng-xiu, ZHANG Yu, NIE Rui-jie, SUN Zhen-yang, LI Feng-ying, ZHANG Chun-ni

College of Traditional Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To prepare nanoemulsions (NE) and nanoemulsion-based gels (NBGs) with *Sophora flavescens* alkaloids (SFA) as model drug to illuminate its mechanism of transdermal delivery basically. **Methods** Using scanning electron microscopy (SEM) method, HE staining method, and confocal laser scanning microscope (CLSM) method to investigate the effect of SFA-NEs and SFA-NBGs on stratum corneum (SC) and ultrastructure. **Results** The results of SEM showed that the SC of normal mouse was smooth and finishing. And slightly crimp the saline group after 6 h of treatment appeared, while it was damaged in varying degrees hurt after 2 h and 6 h of action by SFA-NEs and SFA-NBGs, respectively. HE staining results indicated that the skin structure of saline group was basically intact. But the hierarchy structure of SFA-NBGs group was not obvious, basal layer arranged unclearly and SC loosed apparently, as well as that the hierarchy structure of SFA-NEs group disordered, the gap increased, SC loosed and thinned. The result of confocal laser scanning microscope indicated that fluorescence in surface was stronger while weaker in depth among control group, SFA-NEs group, and SFA-NBGs group, and fluorescence in hair follicles and around its appendages was also stronger. **Conclusion** SFA-NEs and SFA-NBGs could permeate skin mainly through breaking SC and ultrastructure so as to perform therapeutic action. At the same time, hair follicles and its appendages play a role on drug transdermal course.

Key words: eczema; *Sophora flavescens* alkaloids; nanoemulsions; nanoemulsion-based gels; transdermal mechanism; ultrastructure

苦参总碱(*Sophora flavescens* alkaloids, SFA)成分,因苦参具有清热燥湿、祛风止痒的功效而历来系从苦参根中提取的生物碱^[1],是苦参的主要活性

成分,因苦参具有清热燥湿、祛风止痒的功效而历来为中医治疗皮肤病所推崇^[2]。现代药理学研究表明,

收稿日期: 2016-09-17

基金项目: 2015 年公益性科研专项项目(项目编号 201507002)

作者简介: 李文华(1988—),女,在读硕士研究生,研究方向为中药制剂新技术研究。E-mail: liwenhua2011@163.com

*通信作者 王英姿(1975—),女,博士,教授,博士生导师,研究方向为中药制剂新技术研究。Tel: (010)84738615 E-mail: wangyzi@sina.com

SFA 可以安全地用于急性、亚急性湿疹的治疗^[3]。但是,目前,SFA 在治疗湿疹方面的剂型主要为汤剂、注射剂、乳膏、软膏、洗剂,存在使用不方便,药物发挥作用时间短,易污染衣物等缺点。而纳米乳凝胶(nanoemulsion-based gels, NBGs)可以改善以上缺点,其具有提高药物稳定性,增加难溶性药物的溶解度,无油腻感、易清除,对皮肤与黏膜无刺激性,延长药物作用时间,增加药物的透皮吸收等优点^[4-6]。

明确药物在皮肤中的透皮作用机制对设计经皮给药系统十分重要。目前药物透过皮肤发挥治疗作用主要有以下几种方式:以融合扩散的方式通过角质层、改变表皮各层的超微结构、降低皮肤屏障作用、通过毛囊途径作用于机体^[7-11]。因此本实验使用了扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)法、HE 染色法、激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)技术,从皮肤整体水平方法和微观结构研究了 SFA 纳米乳(SFA nanoemulsion, SFA-NEs)和 SFA-NEs 凝胶(SFA-nanoemulsion-based gels, SFA-NBGs)的透皮作用机制,这将对制剂疗效发挥的正确评价,剂型选择的合理性,经皮给药的可行性以及经皮制剂的进一步开发应用具有重要的指导作用和实际意义。

1 仪器与试药

1.1 仪器与设备

BS110S 型万分之一电子分析天平,赛多利斯仪器系统有限公司;HJ-6A 型多头磁力搅拌器,常州国华电器有限公司;KH7200DB 型数控超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司。JEM-1230 透射电子显微镜(TEM),日本电子株式会社;马尔文动态激光散射仪,英国马尔文公司;TK-12D 型透皮扩散试验仪,上海锴凯科技贸易有限公司;Anton Paar Physica MCR302 系列高级旋转流变仪,奥地利安东帕(中国)有限公司;Quanta 250 环境扫描电子显微镜,捷克 FEI 公司;显微镜 BA400,麦克迪奥实业集团公司;FV1000 激光共聚焦扫描显微镜,日本 Olympus 公司。

1.2 试药与材料

SFA 提取物(1 g 相当于原生药材 125 g, SFA 提取物中含苦参总碱以氧化苦参碱计为 40.092 mg/g,以苦参碱计为 180.997 8 mg/g),购自宁夏紫荆花制药有限公司;SFA-NEs、SFA-NBGs 均为实

验室自制;氯化钠,天津光复科技发展有限公司;香豆素 6 对照品,北京百灵威科技有限公司;中性福尔马林试剂(10%, NBF),北京高华伟业食品添加剂有限公司;肉豆蔻酸异丙酯(IPM),国药集团化学试剂有限公司;聚氧乙烯 35 蓖麻油(EL35),北京凤礼精求商贸有限责任公司;无水乙醇,北京化工厂;聚丙烯酸钠 700(NP700),美国国际特品公司;卡波姆(CP-934),廊坊聚通化工有限公司。

1.3 实验动物

SD 大鼠,雄性,体质量 180~220 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证编号 SCXK(京)2012-0001。

昆明种小鼠,雄性,体质量 18~22 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证编号 SCXK(京)2012-0001。

2 方法与结果

2.1 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 的制备及质量评价

将 SFA 100.0 mg 溶入 90.6 mg IPM,再加入 1.730 7 g EL35 和 1.352 0 g 无水乙醇,在室温 25 ℃ 以 200 r/min 的转速磁力搅拌 0.5 h 搅拌至均匀,作为含 SFA 的内相。然后缓慢滴入 32.645 6 g 去离子水,并以 200 r/min 的转速搅拌至澄清透明,即得 SFA-NEs^[12]。精密称取 20.1 mg(0.4%) NP700 与 12.5 mg(0.25%) CP-934 凝胶基质,再加入甘油 1 mL 研磨润湿,然后逐渐加入上述制备的 3.074 3 g SFA-NEs 研磨均匀,放置,即得 SFA-NBGs。

用 TEM 对 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 进行形态考察,发现 SFA-NEs 为外观圆整、均匀的球体, SFA-NBGs 基本呈圆整均一的球体。马尔文动态光散射粒径仪测定结果显示 SFA-NEs 的粒径为 15.60 nm,粒径分布值为 0.185, SFA-NBGs 的粒径为 20.32 nm,呈正态分布,多分散系数为 0.365。采用 Franz 扩散池对 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 进行体外透皮行为的考察,其稳态渗透系数(J_s)分别为 24.353、15.157 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$,而水溶液仅为 5.418 9 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ 。Anton Paar Physica MCR302 系列高级旋转流变仪对其进行黏度考察,结果表明所制备 SFA-NEs 的黏度不随剪切速率变化而变化,属于牛顿流体,黏度为 8.69 mPa·s(剪切速率为 100 s^{-1}),而 SFA-NBGs 的黏度随剪切速率的增大而减小,为非牛顿流体。因此,本实验所建立的 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 制备工艺简单,体外透皮性能较好,可以显著提高 SFA 的经皮渗透量及透过速率,黏度适中,有利于在皮肤的黏

附和涂展, 可为 SFA 经皮给药制剂选择提供参考。

2.2 SEM 法观察 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 对皮肤角质层的影响

2.2.1 实验动物的分组与处理

取昆明种小鼠 36 只, 随机分为 6 组, 每组 6 只, 用 25% 的乌拉坦进行 ip 麻醉小鼠, 用脱毛膏去掉腹部体毛, 分别给予 SFA-NEs、SFA-NBGs、生理盐水, 另取对照组中小鼠未作任何处理的相同部位皮肤作为对照。根据预试验又将 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 分为作用 2 h 组和作用 6 h 组。给药 2 h 后, 剥取 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 组小鼠皮肤; 给药 6 h 后, 剥取 SFA-NEs、SFA-NBGs 和生理盐水组小鼠皮肤, 同时剥取对照组中未涂药的空白皮肤作对照, 用生理盐水洗净皮肤后, 滤纸吸干, 备用。

2.2.2 SEM 样品的制备及观察

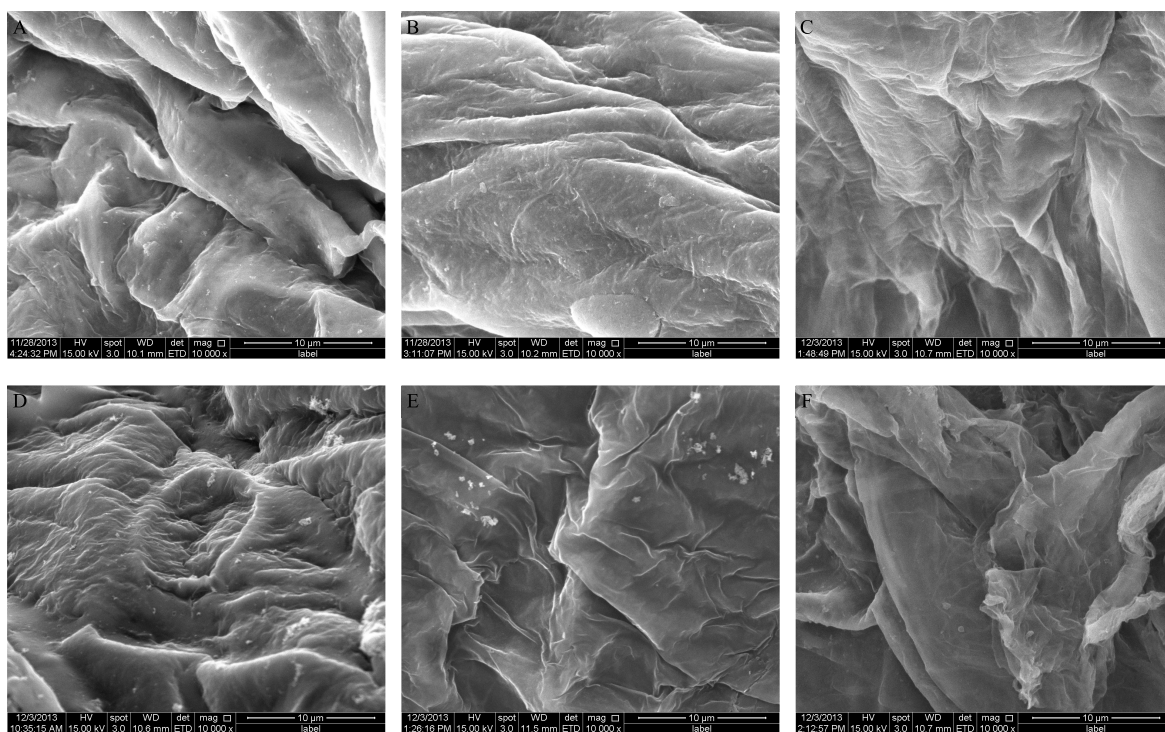
将处理好的皮肤分别用 2.5% 的戊二醛溶液固定 1.5 h 后, 依次经 70%、90%、100% 乙醇梯度脱水。然后将脱水后的皮肤经二氧化碳干燥后表面喷胶体金颗粒制备成扫描电镜所需的皮肤样品, 置于 SEM 下观察并拍照。

结果如图 1 所示。由图 1 可知, 正常小鼠皮肤的角质层平滑光整 (图 1-A), 经生理盐水处理 6 h 后, 角质层出现轻微褶皱 (图 1-B); SFA-NBGs 作用 2 h 后, 皮肤角质层出现明显褶皱, 一些部位比较明显 (图 1-C); SFA-NEs 处理皮肤 2 h 后, 角质层表面变得粗糙不平, 褶皱较多且明显 (图 1-D); SFA-NBGs 作用 6 h 后, 皮肤角质层出现严重皱缩, 皱痕深且多, 角质层结构已发生变化 (图 1-E); 而 SFA-NEs 作用皮肤 6 h 后, 角质层不仅皱缩严重, 而且明显可见碎裂的角质层 (图 1-F)。由此说明, SFA-NEs 和 SFA-NBGs 可以破坏皮肤角质层结构, 使其失去原有的屏障功能, 从而达到药物的透皮作用, 而且 SFA-NEs 的作用强于 SFA-NBGs。

2.3 HE 染色法研究 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 对皮肤超微结构的影响

2.3.1 实验动物的处理

取雄性 SD 大鼠 12 只, 随机分成 2 组, 每组 6 只, 经 10% 水合氯醛 ip 麻醉后, 剪去腹部皮肤体毛后作为涂药区, 一部分皮肤分别给予 SFA-NEs、SFA-NBGs, 另取附近未涂药皮肤



A-正常皮肤角质层 B-SFA 生理盐水处理 6 h 后的皮肤角质层 C-SFA-NBGs 处理 2 h 后的皮肤角质层 D-SFA-NEs 处理 2 h 后的皮肤角质层 E-SFA-NBGs 处理 6 h 后的皮肤角质层 F-SFA-NEs 处理 6 h 后的皮肤角质层

A-normal skin cutin layer B-skin cutin layer after 6 h of treatment with SFA saline C-skin cutin layer after 2 h of treatment with SFA-NBGs D-skin cutin layer after 2 h of treatment with SFA-NEs E-skin cutin layer after 6 h of treatment with SFA-NBGs F- skin cutin layer after 6 h of treatment with SFA-NEs

图 1 小鼠皮肤角质层 SEM 扫描图

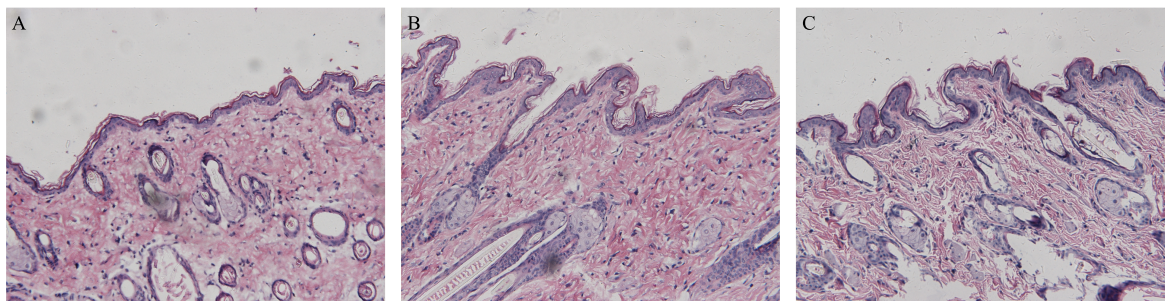
Fig. 1 SEM scintigram of mouse skin stratum corneum

作为空白对照,涂布生理盐水。给药 8 h 后,脱颈处死大鼠,剥取给药部位的皮肤,除去脂肪,生理盐水洗净,滤纸吸干,备用。

2.3.2 皮肤切片的制备及观察 将已处理好的皮肤浸泡在中性福尔马林固定液中固化 48 h,常规取材,用不同体积分数乙醇脱水,进行石蜡包埋切片,制片,HE 染色后,置于显微镜下观察并拍照,结果见图 2。

从图 2 可看出,生理盐水组的皮肤结构完整,

各层排列紧密且清晰,角质层无增厚(图 2-A),SFA-NBGs 处理后,皮肤结构发生变化,分层结构不明显,基底层排列不清,角质层明显疏松(图 2-B),而 SFA-NEs 作用后的皮肤分层结构紊乱,间隙增大,同时角质层结构疏松变薄,并出现脱落现象(图 2-C)。因此,通过皮肤超微结构的变化,可进一步表明,SFA-NEs 和 SFA-NBGs 经皮渗透的作用还与其改变皮肤结构有关,且与 SEM 结果一致,SFA-NEs 的作用强于 SFA-NBGs。



A-生理盐水组 B-SFA-NBGs 组 C-SFA-NEs 组
A-saline group B-SFA-NBGs group C-SFA-NEs group

图 2 不同处理条件下的皮肤超微结构图(×200)

Fig. 2 Skin ultrastructure under different treatment conditions (× 200)

2.4 CLSM 技术研究 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 对大鼠皮肤的影响

2.4.1 CLSM 技术的检测原理 CLSM 技术作为一种新型的透皮分析技术现已广泛用于药物的经皮给药研究^[13],用于透皮作用机制研究的原理是通过检测有荧光的药物或经皮给药制剂在皮肤各部位中的荧光分布情况,来分析不同部位对其透皮过程所起的作用^[14]。其技术的关键点是研究对象必须有荧光现象^[15],针对这一特点,本实验采用预试验采用过的香豆素 6 包埋法制备荧光标记的 SFA-NEs 和 SFA-NBGs,然后采用 CLSM 技术法观察两者在皮肤中的分布情况。

2.4.2 荧光标记样品的制备

(1) 对照组溶液的制备:精密称取香豆素 6 对照品适量,加入 IPM 超声溶解,配制成 0.5%的香豆素 6 溶液,作为对照组。

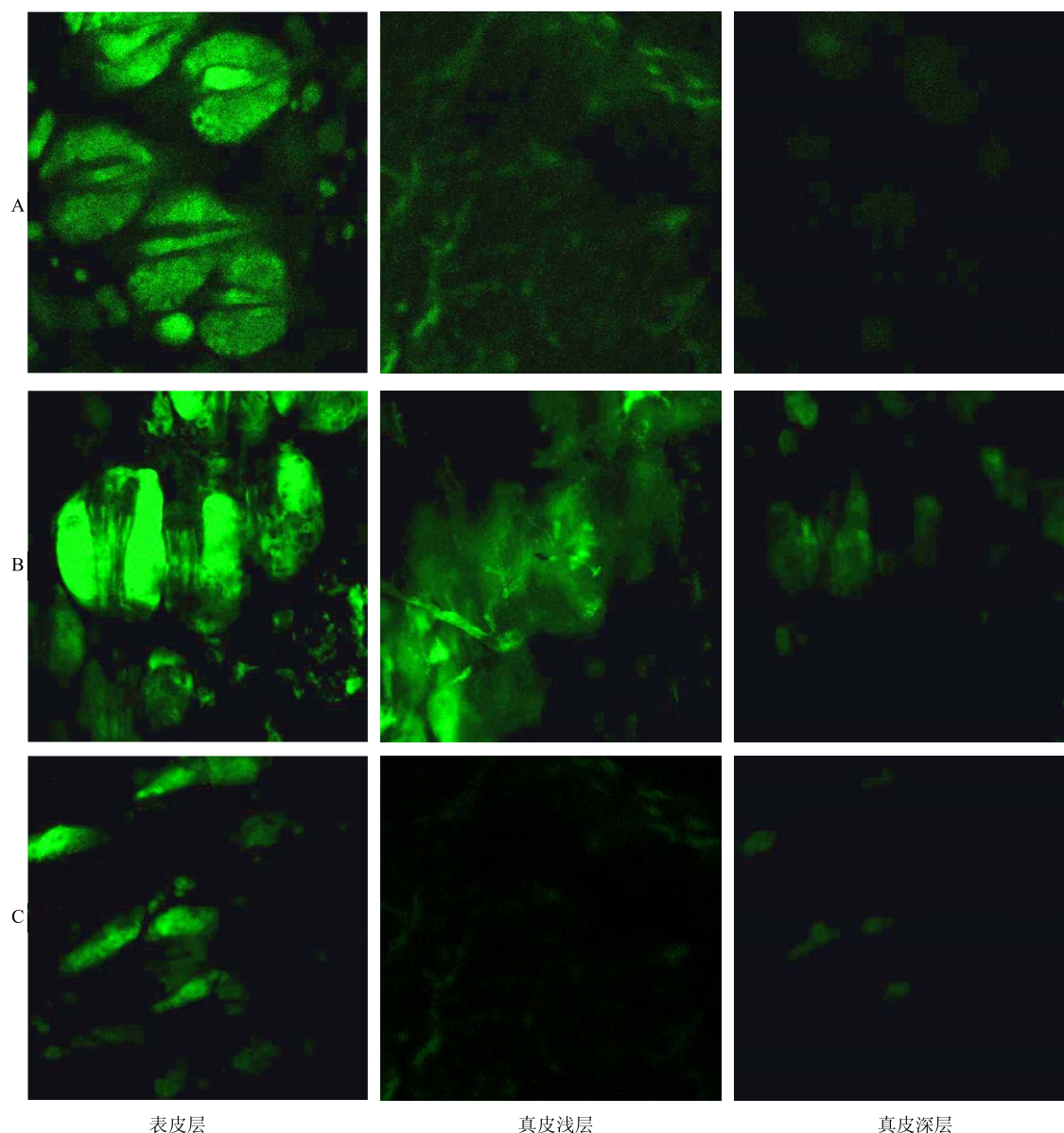
(2) 荧光标记 SFA-NEs 的制备:按前期 SFA-NEs 的制备方法制备 SFA-NEs,在加入水相前,滴加 0.5%香豆素 6 溶液 10 滴,然后继续搅拌,再加入水相,即制得荧光标记的 SFA-NEs。

(3) 荧光标记 SFA-NBGs 的制备:在已制得荧光标记的 SFA-NEs 的基础上,按 SFA-NBGs 的制备

方法加入凝胶基质,研磨均匀,即可制成荧光标记的 SFA-NBGs。

2.4.3 CLSM 技术样品的制备及观察 取昆明种小鼠 18 只,随机分为 3 组,每组 6 只,用 0.25%的乌拉坦麻醉小鼠,用脱毛膏去掉其腹部体毛,将荧光标记的 SFA-NEs、SFA-NBGs 和香豆素 6 对照溶液分别给药于小鼠腹部皮肤,处理 6 h 后,处死小鼠,剥离给药部位的皮肤,生理盐水洗净,滤纸吸干多余水分,最后将皮肤平铺于载玻片上,用甘油封片。将载玻片置于 CLSM 下,光源 Ar/He/Ne,激发波长 488 nm,针孔大小 100 μm 固定不变,然后进行观察并采集图像。结果如图 3 所示。

实验结果发现,小鼠皮肤经不同制剂处理后,表皮层的荧光较强,其次是真皮浅层的荧光,真皮深层的荧光明显减弱,而且毛囊及其附属器周围的荧光强度明显比其他区域强。SFA-NEs 组的皮肤各层荧光显著强于 SFA-NBGs 组和香豆素 6 溶液对照组,表明 SFA-NEs 能增加香豆素 6 在皮肤各层中的渗透。以上结果说明,SFA-NEs 和 SFA-NBGs 透皮给药后,主要分布于皮肤表层和毛囊及其附属器等部位,这也提示,皮肤中的毛囊及其附属器对药物的透皮吸收也发挥了一定的作用。



A-SFA-NEs B-SFA-NBGs C-0.5%香豆素 6 对照品溶液
A-SFA-NEs B-SFA-NBGs C-0.5% coumarin 6 reference solution

图 3 不同制剂在皮肤各层及附属器中的荧光分布图

Fig. 3 Different preparations of fluorescence in each layer of skin and appendages in distribution

3 讨论

SEM 法的放大倍数最高可达到 50 万倍，其分辨率在 2~10 nm，可以清晰地观察到皮肤表层的微观立体结构。本实验通过 SEM 观察发现，正常小鼠皮肤角质层平滑光整，生理盐水处理 6 h 后角质层出现轻微褶皱，而经 SFA-NEs 和 SFA-NBGs 分别处理 2 h 和 6 h 后的皮肤角质层均发生不同程度的损伤，且 SFA-NEs 的作用强于 SFA-NBGs。但值得注意的是，如果动物皮肤表面去体毛较多，则会严重影响观测，在 SEM 下很难找到皮肤的位置，但是

若过分脱毛，又可能会影响皮肤角质层的性能或结构，因此对动物皮肤的脱毛程度要适宜，本实验采用了国外进口专用小鼠皮肤脱毛膏轻微、适度地脱掉部分毛发，结果良好。

HE 染色法是皮肤病理组织染色最常用也是最重要的一种病理学染色技术。该法分别采用苏木精染液对细胞内的染色质与胞质内的核糖体进行染色，而用伊红染液对细胞质和细胞外基质中的成分染色，分别呈现出紫蓝色和红色，通过观察皮肤各结构的变化可揭示皮肤超微结构的改变。本实验通

过 HE 染色法发现,生理盐水组皮肤结构基本完整,层次结构较清晰,SFA-NBGs 组的皮肤分层结构不明显,基底层排列不清,角质层明显疏松;而 SFA-NEs 组皮肤分层结构紊乱,间隙增大,角质层疏松变薄,但在实验中要注意皮肤结构的完整性。

CLSM 技术在透皮研究方面具有独特的优势,一方面 CLSM 技术能应用于药物对活体组织的透皮研究,从而更能真实地反映出药物对活体组织的作用效果和影响;另一方面,CLSM 技术能使药物透皮过程可视化,能清楚地显示药物的透皮路径及药物在皮肤不同部位的具体分布。本实验通过 CLSM 实验结果发现,对照组、SFA-NEs 组和 SFA-NBGs 组处理后的皮肤表面的荧光较强,深处荧光较弱,且在毛囊及其附属器附近的荧光较强,对照组的荧光均弱于 SFA-NEs 组和 SFA-NBGs 组。

4 结论

以上 3 种方法的研究结果表明,SFA-NEs 和 SFA-NBGs 的透皮作用机制主要是通过破坏皮肤角质层及皮肤超微结构,进而透过皮肤发挥治疗作用,同时皮肤中的毛囊及其附属器对药物的透皮吸收也发挥了一定的作用。SFA-NEs 和 SFA-NBGs 经皮给药后的皮肤药动学和血液药动学研究,以及细胞水平和分子水平的透皮作用机制研究尚有待于探索。

参考文献

- [1] 李存玉,马 赟,龚柔佳,等. 响应面分析法耦合调节 Donnan 效应优化苦参提取液的纳滤浓缩工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3395-3400.
- [2] 何 雄,韦星船,田裕昌,等. 苦参碱及其衍生物合成及生物活性研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(9): 816-823.
- [3] 徐国红. 苦参治疗湿疹的药理作用研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2010, 26(5): 781.
- [4] 王利胜,张 升,刘丽萍,等. 青藤碱微乳凝胶的制备及体外透皮特性研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(1): 21-24.
- [5] Xiao Y Y, Liu F, Cheng Z P, *et al.* Microemulsion based gel of fluorouracil for transdermal delivery [J]. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45(1): 440-446.
- [6] 刘继勇,韩 盈,杨 明,等. 丹皮酚微乳凝胶剂的制备及体外透皮特性研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2730-2733.
- [7] 郭健新,高凤艳,平其能. 柔性纳米脂质体对皮肤角质层结构的改变 [J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(5): 406-408.
- [8] 颌玉胜,曾 抗,徐彦春,等. 脂质体制剂影响大鼠皮肤超微结构的初步研究 [J]. 西北国防医学杂志, 2004, 25(2): 100-102.
- [9] 熊小英,李 娟. 酮洛芬微乳凝胶的制备及透皮机制 [J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(6): 514-518.
- [10] 薛漫清,梁 庆,黄 钊,等. 利用 ATR-FTIR 变化探讨薄荷醇对皮肤角质层结构的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2474-2477.
- [11] 朱晓亮. 纳米乳透皮作用机制及利多卡因纳米乳透皮局麻制剂的研究 [D]. 广州: 第一军医大学, 2007.
- [12] 贺葵邦,王英姿,冯艾灵,等. 苦参地龙纳米乳凝胶的制备及其离体透皮吸收研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2623-2627.
- [13] 石德顺. 醇质体促水溶性药物经皮渗透的机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [14] 张鹏威. 辣椒碱透皮微乳的研究 [D]. 天津: 天津大学, 2009.
- [15] 魏通达. 共聚焦激光扫描光学显微成像关键技术研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2014.