

异补骨脂素纳米结构脂质载体的体外溶出及其抗白癜风活性研究

庞建云^{1,2}, 沈成英¹, 周敏¹, 申宝德^{1,3}, 刘肖^{1,2}, 刘娟^{1,2}, 许润春^{2*}, 袁海龙^{1*}

1. 中国人民解放军空军总医院 药学部, 北京 100142

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

3. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 评价异补骨脂素纳米结构脂质载体 (IPRN-NLC) 的体外溶出行为, 并考察其对小鼠黑色素瘤 B₁₆F₁₀ 细胞增殖、黑色素合成及酪氨酸酶活性的影响。方法 采用透析袋法测定 IPRN-NLC 在 72 h 内的累积溶出量并绘制溶出曲线, MTT 法测定 B₁₆F₁₀ 细胞增殖情况, 多巴氧化法测定酪氨酸酶活性, GENMED 细胞黑色素含量比色法测定黑色素合成。结果 在 72 h 时体外累积溶出量 IPRN-NLC 为 67.31%, IPRN-物理混合物为 90.30%, IPRN-DMSO 为 98.67%, IPRN-混悬液为 53.34%。IPRN 在一定质量浓度范围内可以促进 B₁₆F₁₀ 细胞增殖, 提高酪氨酸酶活性, 增加黑色素的合成, 且同质量浓度的 IPRN-NLC 对 B₁₆F₁₀ 的作用显著高于 IPRN 溶液 ($P < 0.05$)。结论 IPRN-NLC 不仅具有缓释作用, 还可以增加药物的溶解度; 在一定质量浓度范围内与细胞具有较好的生物相容性, 能显著提高细胞酪氨酸酶活性, 促进黑色素合成。

关键词: 异补骨脂素; 纳米结构脂质载体; 体外释放; 黑色素瘤 B₁₆F₁₀ 细胞; 白癜风; 酪氨酸酶; 细胞增殖; 黑色素; MTT 法; 多巴氧化法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)08-1796-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.08.009

In vitro dissolution and anti-vitiligo activity of isopsoralen nanostructured lipid carriers

PANG Jian-yun^{1,2}, SHEN Cheng-ying¹, ZHOU Min¹, SHEN Bao-de^{1,3}, LIU Xiao^{1,2}, LIU Juan^{1,2}, XU Run-chun², YUAN Hai-long¹

1. Department of Pharmacy, Air Force General Hospital, PLA, Beijing 100142, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To evaluate the *in vitro* dissolution characteristic of IPRN-NLC and to study its effects on B₁₆F₁₀ cells proliferation, melanin synthesis, and tyrosinase activity. **Methods** The dynamic dialysis was employed to compare the *in vitro* dissolution of IPRN and IPRN-NLC; MTT assay was used to detect the proliferation of B₁₆F₁₀; The tyrosinase activity was determined by L-DOPA-oxidation; The melain content was determined by GENMED Cell Melanin Quantitative Assay Kit. **Results** The accumulation dissolution of IPRN-NLC was 67.31% within 72 h, which showed sustained release; While the dissolution of IPRN-suspension, IPRN-physical mixture, and IPRN-DMSO were 53.34%, 90.30%, and 98.67%, respectively. The IPRN-NLC could significantly promote the proliferation, tyrosinase activity and melanin content compared with IPRN DMSO groups ($P < 0.05$) at the same concentration. **Conclusion** IPRN-NLC could increase the solubility of the drug with sustained release, and showed good cell biology intermiscibility, which could significantly increase the effects on B₁₆F₁₀ cells.

Key words: isopsoralen; nanostructured lipid carrier; *in vitro* dissolution; B₁₆F₁₀ cells; vitiligo; tyrosinase; cell proliferation; melanin; MTT assay; L-DOPA-oxidation

收稿日期: 2017-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573696); 全军重大科研计划 (BKJ16J025, BKJ16J011)

作者简介: 庞建云 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。Tel: 18311334067 E-mail: 1063804092@qq.com

*通信作者 许润春, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药炮制新工艺及炮制原理研究。Tel: 13308064016 E-mail: 309786953@qq.com

袁海龙, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型给药系统。Tel: (010)66928505 E-mail: yhlpharm@126.com

补骨脂是豆科补骨脂属植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* Linn. 的干燥成熟果实, 是治疗白癜风的常用光敏剂之一^[1-5]。补骨脂用于治疗白癜风已有悠久的历史^[6], 其中香豆素类异补骨脂素 (isopsoralen, IPRN) 具有光敏性, 在阳光的照射下, 可通过提高细胞酪氨酸酶活性, 促进黑色素的合成, 达到去白斑的效果^[7]。然而, IPRN 为难溶性成分、透皮吸收差、生物利用度低, 限制了其药效的发挥。本课题组前期研究表明 IPRN 纳米结构脂质载体 (IPRN-NLC) 可以促进 IPRN 的透皮吸收, 增加皮肤滞留量, 提高药物的生物利用度^[8-11]。本实验在前期的研究基础上进一步考察 IPRN-NLC 与 IPRN 溶液对体外培养的小鼠黑色素瘤 B₁₆F₁₀ 细胞增殖、黑色素合成及酪氨酸酶活性的影响。

1 仪器与材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; TB-215D 电子天平, 北京丹佛仪器有限公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 北京恒丰长伟科技有限公司; Winner 802 纳米激光粒度仪, 济南微纳有限公司; 透析袋, 截留相对分子质量 8 000~14 000, 美国 Viskase 公司; RT-6000 酶标仪, 深圳雷杜生命科学股份有限公司; 细胞培养箱, 三洋有限公司。

IPRN 原料药, 质量分数 98%, 陕西金泰生物工程公司, 批号 xh20160415; IPRN 对照品, 质量分数 99.9%, 中国食品药品检定研究院, 批号 110738-201614; 左旋多巴对照品 (*L*-DOPA), 中国食品药品检定研究院, 批号 100170-200303; 山嵛酸甘油酯 (ATO888), 嘉法狮 (上海) 贸易有限公司, 批号 158355; 大豆磷脂, 上海太伟药业有限公司, 批号 20150201; 中碳链三甘酯 (MCT), 北京凤礼精求商贸有限责任公司, 批号 24561; DMEM 培养液, 美国 HyClone 公司, 批号 AB10113944; 胎牛血清 (四季青), 浙江天航生物科技股份有限公司, 批号 20170123; 胰酶, 北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1608200; 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 北京索莱宝科技有限公司, 批号 20170517; 磷酸缓冲溶液 (PBS), 北京 Solarbio 科技, 批号 20170620; 小鼠黑色素瘤细胞 B₁₆F₁₀, 上海弘顺生物科技有限公司; 黑色素试剂盒 (GENMED), 上海杰美基因医药科技有限公司, 批号 8-251531-10; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), 北京 Solarbio 科技有限公司, 批号 20170928; Triton

X-100, 北京中科迈晨科技有限公司, 批号 20170362; 青霉素钠, 华北制药股份有限公司, 批号 F6092316; 硫酸链霉素, 山东鲁抗医药股份有限公司, 批号 160501; 聚山梨酯 80 (T80), 浙江遂昌惠康药业有限公司, 批号 20150528; 色谱乙腈, Fisher 公司, 批号 173535; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 IPRN-NLC 的制备

采用高压均质法制备 IPRN-NLC^[8]。精密称取处方量 1.05 g ATO888 和 0.45 g MCT 于 77 °C 水浴加热到熔融状态, 再加入 IPRN 原料药 50 mg, 搅拌混匀溶解后作为油相。另称取 0.67 g 聚氧乙烯氢化蓖麻油 RH40 和 0.33 g 大豆卵磷脂于 100 mL 烧杯中, 加入 100 mL 蒸馏水, 水浴加热至与油相相同的温度, 作为水相。在 77 °C 条件下, 用 1 mL 注射器将水相缓慢匀速注入到搅拌速度为 1 200 r/min 的油相中, 继续搅拌 0.5 h, 将得到的初乳在 10 000 r/min 下高速剪切 3 次, 每次 1 min, 然后在 88.0 MPa (880 bar) 条件下, 高压均质循环 6 次, 在室温下冷却, 即得包封率为 (90.25±0.73) %、载药量为 (1.56±0.27) % 的 IPRN-NLC。同法制得不含 IPRN 的空白 NLC 及未经高压均质的 IPRN-物理混合物。

2.2 IPRN-NLC 体外溶出考察

2.2.1 色谱条件 Kromasil 100-5C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, E82592) 色谱柱; 柱温 25 °C; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (38:62); 检测波长 246 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。理论塔板数以 IPRN 计为 16 327。

2.2.2 对照品储备液的制备 精密称取 10.11 mg IPRN 对照品适量, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度线, 即得 0.404 mg/mL 的 IPRN 对照品储备液, 置 4 °C 冰箱中保存备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 在满足漏槽条件的基础上, 取含 1.5 mg IPRN 的 IPRN-NLC 分散液于已处理好的透析袋中, 将两端扎紧, 然后固定在溶出仪搅拌桨的下端^[10], 悬置于盛有 500 mL 0.5% T80 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 6.8) 溶出杯中, 转速为 100 r/min, 温度为 (32.0±0.5) °C, 按规定时间取样 1 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 取 IPRN 对照品溶液、IPRN-NLC 供试品溶液、空白 NLC 溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件分别进样 10 μL, 记录色谱图, 结果见图 1。由图 1 可知, 阴性溶液在与对照品相同保

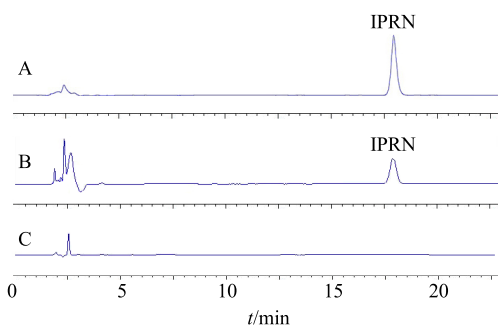


图 1 IPRN 对照品 (A)、IPRN-NLC 样品 (B) 和阴性溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of IPRN reference standards (A), sample of IPRN-NLC (B), and negative reference solution (C)

留时间处未见色谱峰, 说明其他成分对 IPRN 的含量测定无干扰。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取 IPRN 对照品储备液适量, 用甲醇分别配制成质量浓度为 0.161 7、0.808 5、1.617 0、2.425 5、3.234 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IPRN 溶液。按上述色谱条件进行测定, 记录峰面积。以 IPRN 的质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得线性回归方程为 $Y=118.36 X-0.097 6$, $R^2=0.999 9$, 结果表明 IPRN 在 0.161 7~3.234 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

2.2.6 精密度考察 精密吸取质量浓度为 1.617 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 IPRN 对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 平行测定 6 次, 计算精密度。结果显示 IPRN 的峰面积 RSD 为 0.37%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批次的 IPRN-NLC 溶液 6 份, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算 IPRN 含量。结果显示 IPRN 质量浓度的 RSD 为 0.12%, 表明该实验方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取“2.2.3”项下的 IPRN-NLC 供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24、36、48 h 进样测定, 记录峰面积。结果 RSD 为 0.33%, 表明 IPRN-NLC 供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.9 回收率试验 精密量取 9 份 0.5 mL 空白 NLC 溶液于 10 mL 量瓶中, 分别加入 0.5、1.0、1.5 mL IPRN 对照品溶液, 每一水平重复 3 次, 然后加适量含 0.5% T80 的 PBS (pH 6.8) 超声 0.5 h 定容至刻度线, 滤过后按“2.2.1”项下色谱条件分析, 计算加样回收率。结果 3 个水平的回收率为 95.75%、95.91%、96.82%, RSD 为 0.36%、0.63%、0.73%, 表明该方法准确度良好。

2.2.10 体外溶出度测定 采用透析袋法考察 IPRN-NLC、IPRN 混悬液、IPRN-DMSO、IPRN-物理混合物的体外溶出^[10]。分别量取含等量药物的 5 mL IPRN-NLC、IPRN-混悬液、IPRN-物理混合物、IPRN-DMSO 于处理好的透析袋中, 将两端扎紧, 然后固定在溶出仪搅拌桨的下端, 悬置于盛有 500 mL 0.5% T80 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 6.8) 溶出杯中^[12], 转速为 100 r/min, 温度为 $(32.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 分别于 0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0、10.0、12.0、24.0、36.0、48.0、72.0 h 取样 1 mL, 同时补加同温同等体积的溶出介质, 过 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 按“2.2.1”项下方法测定 IPRN 含量, 并计算 IPRN 累积溶出量, 结果见图 2。由图 2 可知, IPRN-NLC 在溶出初期有突释现象, 在 3~12 h 具有缓释现象, 在 72 h 时, IPRN-混悬液累积溶出量达 53.34%, IPRN-NLC 的累积溶出量达 67.31%, IPRN-物理混合物累积溶出量达 90.30%, IPRN-DMSO 累积溶出量达 98.67%, 说明 NLC 不仅具有缓释作用, 还可以提高药物的溶解度^[13]。

2.3 IPRN-NLC 抗白癜风活性研究

2.3.1 细胞培养 将复苏后的 $B_{16}F_{10}$ 细胞接种于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 在 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。待细胞长至融合状态, 胰酶消化, 1:4 传代培养。

2.3.2 细胞增殖测定 采用 MTT 法测定^[5]。选择对

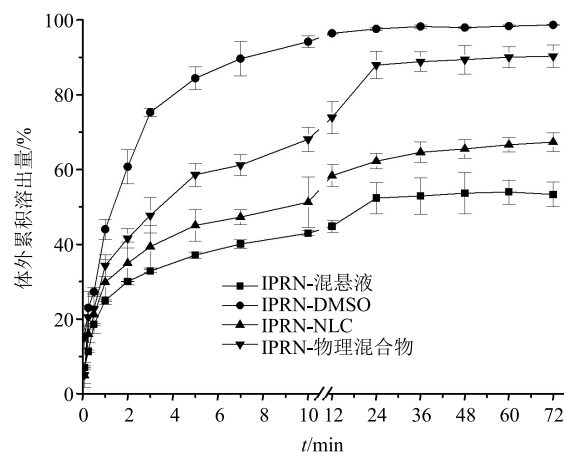


图 2 IPRN-混悬液、IPRN-NLC、IPRN-DMSO 及 IPRN-物理混合物在 PBS (pH 6.8, 含 0.5% T80) 中溶出曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 *In vitro* dissolution of IPRN-suspension, IPRN-NLC, IPRN-DMSO, and IPRN-physical mixture in pH 6.8 PBS buffer solution with 0.5% T80 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

数生长期的 B₁₆F₁₀ 细胞, 用胰蛋白酶消化制备细胞混悬液后计数, 将细胞浓度调整为 4×10⁴ 个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 将培养板放在培养箱内培养使细胞贴壁(在 37 °C、5% CO₂ 的条件下)。细胞贴壁后小心吸去上清液, 加入质量浓度为 0.26、0.52、1.04、7.80、19.50、39.00 μg/mL 的 IPRN-NLC 和 IPRN 溶液(DMSO 溶解, 用 DMEM 培养液稀释使 DMSO 体积分数均不超过 0.1%), 每一质量浓度设 5 个复孔, 同时设定对照组(培养液)和 NLC 组(培养液+NLC)。细胞分别培养 24、48 h 弃去培养液, 加入 100 μL 含 10% MTT 的培养液, 将培养板在培养箱内孵育 4 h 后弃去上清液, 加入 100 μL DMSO 溶解液, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶充分溶解, 用酶标仪测定在 490 nm 处的吸光度(A)值并计算细胞存活率, 结果见表 1。由表 1 可知, 在低质量浓度时, 与等质量浓度 IPRN 溶液相比, IPRN-NLC 对细胞生长有明显的促进作用(P<0.05), 但在 19.50 μg/mL 时, IPRN-NLC 与 IPRN 对细胞生长的影响没有显著性差别, 且由 NLC 组细胞存活率可知, IPRN-NLC 在 19.50~39.00 μg/mL 时可能对细胞有毒性而抑制了细胞的生长。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{NLC}} - A_{\text{对照}})$$

2.3.3 酪氨酸酶活性测定 采用多巴氧化法测酪氨酸酶的活性^[14-15]。按“2.3.1”及“2.3.2”项培养细胞并分组, 细胞给药 24、48 h 后弃去培养基, 用 pH 7.4 的 PBS 洗涤细胞 2 遍, 每孔加入 50 μL 的 1% TritonX-100 溶液, 立即将其放置于-80 °C 冰箱内处理 30 min, 随后室温融化使细胞完全破裂, 将其放置于显微镜下观察至无完整细胞, 37 °C 预温后每孔加入 50 μL 0.2% 的 L-DOPA 溶液, 于 37 °C 温箱中反应 2 h, 将酶标仪调至 492 nm 测定 A 值, 计算酪氨酸酶活性, 结果见表 2。由表 2 可知, IPRN 溶液和 IPRN-NLC 可以显著提高酪氨酸酶的活性(P<0.05), 在一定质量浓度范围内呈剂量依赖性, 且 IPRN-NLC 与 IPRN 溶液间有显著性差异(P<0.05)。

$$\text{酪氨酸酶活性} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{NLC}} - A_{\text{对照}})$$

2.3.4 黑色素含量测定 采用 GENMED 细胞黑色素含量比色法测定黑色素合成。选择对数生长期的 B₁₆F₁₀ 细胞, 用胰蛋白酶消化制备细胞混悬液后计数, 接种于 6 孔板中, 1×10⁶ 个/孔, 将培养板放在培养箱内(在 37 °C、5% CO₂ 的条件下)。细胞贴壁后, 小心吸去上清液, 加入不同质量浓度的 IPRN-

表 1 不同质量浓度 IPRN 溶液和 IPRN-NLC 对 B₁₆F₁₀ 细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of different concentrations of IPRN and IPRN-NLC on proliferation of B₁₆F₁₀ cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	存活率/%	
		24 h	48 h
对照		99.73±0.24	99.22±0.38
NLC		92.51±0.32	90.06±0.18
IPRN 溶液	0.26	110.84±0.28 [#]	116.45±0.45 [#]
	0.52	115.14±0.44 [#]	122.13±0.41 [#]
	1.04	119.90±0.59 [#]	124.61±1.12 [#]
	7.80	108.41±0.55 [#]	109.98±0.67 [#]
	19.50	103.18±0.61	98.29±0.55
	39.00	101.63±0.25	98.50±0.17
IPRN-NLC	0.26	130.08±0.24 ^{*#}	144.51±0.44 ^{*#}
	0.52	145.22±0.32 ^{*#}	151.58±0.68 ^{*#}
	1.04	135.49±0.37 ^{*#}	139.02±0.81 ^{*#}
	7.80	120.42±0.36 ^{*#}	115.58±0.35 ^{*#}
	19.50	103.35±0.31	103.85±0.60 [*]
	39.00	89.81±0.45 [*]	75.29±0.39 [*]

与同质量浓度 IPRN 溶液组比较: *P<0.05; 与 NLC 组比较:

[#]P<0.05, 下表同

*P < 0.05 vs the same concentration of IPRN solution group; [#]P < 0.05 vs NLC group, same as below

表 2 不同质量浓度 IPRN 和 IPRN-NLC 对 B₁₆F₁₀ 细胞酪氨酸酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effects of different concentrations of IPRN and IPRN-NLC on tyrosinase activity of B₁₆F₁₀ cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	酪氨酸酶活性/%	
		24 h	48 h
对照		99.83±0.70	98.76±0.68
NLC		97.32±0.27	96.67±0.61
IPRN 溶液	0.08	101.69±0.57	103.48±0.36
	0.31	103.91±1.42	105.84±0.37
	5.00	118.65±1.00 [#]	122.77±0.59 [#]
	15.00	123.62±2.00 [#]	129.99±0.65 [#]
	30.00	123.27±3.00 [#]	132.20±0.52 [#]
	IPRN-NLC	0.08	115.67±1.28 ^{*#}
0.31		123.07±0.91 ^{*#}	128.77±0.66 ^{*#}
5.00		135.69±0.67 ^{*#}	141.00±0.70 ^{*#}
15.00		153.16±0.40 ^{*#}	160.61±0.43 ^{*#}
30.00		160.23±1.06 ^{*#}	158.53±0.46 ^{*#}

NLC 和 IPRN 溶液, 每一质量浓度设 3 个复孔, 同时设定对照组和 NLC 组。细胞分别培养 24、48 h

后, 弃去培养液, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 3 min, 将细胞收集入离心管, 离心后 PBS 洗涤 2 次, 再次离心, 然后按试剂盒说明进行操作测定, 结果见表 3。由表 3 可知, 与 NLC 组相比, IPRN 与 IPRN-NLC 可以显著提高黑色素合成含量 ($P < 0.05$), IPRN-NLC 作用最显著, 与 IPRN 溶液相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。在一定药物质量浓度范围内, 黑色素合成随着药物质量浓度的增加而增加, 且随着时间的延长, 黑色素细胞分泌黑色素的含量也在增加。

表 3 不同质量浓度 IPRN 和 IPRN-NLC 对 B₁₆F₁₀ 细胞黑色素合成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of IPRN solution and IPRN-NLC at different concentrations on melanogenesis in B₁₆F₁₀ cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	黑色素/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
		24 h	48 h
对照		13.31 ± 0.31	12.88 ± 0.55
NLC		13.03 ± 0.36	13.16 ± 0.51
IPRN 溶液	0.31	13.39 ± 0.42	14.95 ± 0.08 [#]
	1.25	15.06 ± 0.14 [#]	16.90 ± 0.19 [#]
	5.00	18.39 ± 0.42 [#]	20.85 ± 0.29 [#]
	15.00	20.29 ± 0.55 [#]	21.83 ± 0.47 [#]
	30.00	20.37 ± 0.26 [#]	22.88 ± 0.19 [#]
IPRN-NLC	0.31	15.09 ± 0.24 ^{*#}	16.69 ± 0.35 ^{*#}
	1.25	17.07 ± 0.11 ^{*#}	18.44 ± 0.30 ^{*#}
	5.00	20.37 ± 0.49 ^{*#}	22.21 ± 0.14 ^{*#}
	15.00	23.14 ± 0.22 ^{*#}	24.15 ± 0.33 ^{*#}
	30.00	24.06 ± 0.08 ^{*#}	24.67 ± 0.18 ^{*#}

3 讨论

由于 IPRN 为水难溶性药物, 表面活性剂 T80 可以增加药物的溶解度, 为满足漏漕条件, 故选用 0.5% T80 pH 6.8 的 PBS 为溶出介质。由体外溶出研究可知 IPRN-NLC 在溶出初期具有突释现象, 可能是部分药物吸附于 NLC 表面^[16], 或由于 ATO888 熔点较高, 在低温固化时先冷却形成内核而 MCT 包裹在外面, 导致了药物溶出的速度加快^[17]。在 3~12 h 时 IPRN-NLC 具有缓释作用, 可能是液体脂质扰乱了固体脂质的晶格结构, 使更多的药物包裹在固体脂质中, 出现了缓释的现象。72 h 时 IPRN-NLC 的体外溶出量高于 IPRN 混悬液是因为 IPRN 以晶体的状态存在, 粒径较大, 而 IPRN 在 NLC 中以无定形形式存在, 且具有较小的粒径^[7,18]。

本实验研究发现用 1640 细胞培养液培养细胞

时, 黑色素细胞呈白色, 几乎不合成黑色素, 而将培养液换为 DMEM 时, 黑色素细胞呈黑色, 可能是 DMEM 含有较丰富的营养成分, 有利于细胞黑色素的合成, 具体原因有待进一步研究。将 IPRN 制成 NLC, 使其与细胞膜脂质有高度相似性, 能促进 IPRN 进入细胞内^[14], 故在一定质量浓度范围内 IPRN-NLC 可以促进黑色素细胞的增殖, 但随着药物质量浓度的增加, 其对黑色素细胞产生抑制作用, 可能是 NLC 中的表面活性剂对细胞膜有毒副作用, 导致细胞凋亡, 具体原因需进一步探索^[19]。随着时间的延长, IPRN-NLC 对黑色素细胞仍有显著的影响, 可能与其具有缓释作用有关, NLC 将 IPRN 持续缓慢的溶出到培养液中, 也可能是 NLC 与细胞膜具有相似性, 细胞可以通过内吞作用使药物进入细胞内, 使其持续发挥药效。IPRN-NLC 在一定质量浓度范围内可通过提高酪氨酸酶的活性而促进黑色素的合成, 表明其在抗白癜风方面具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Zhou J, Shi W, Li L, *et al.* Detection of misdistribution of tyrosinase from melanosomes to lysosomes and its upregulation under psoralen/ultraviolet A with a melanosome-targeting tyrosinase fluorescent probe [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(8): 4557-4564.
- [2] Bansal S, Sahoo B, Garg V. Psoralen-narrowband UVB phototherapy for the treatment of vitiligo in comparison to narrowband UVB alone [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2013, 29(6): 311-317.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 吴疆, 魏巍, 袁永兵. 补骨脂的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(3): 217-219.
- [5] 唐晓琴, 闰明, 高莉, 等. 补骨脂对 A375 人黑色素瘤细胞增殖及黑色素合成的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2010, 17(3): 41-42.
- [6] Pathak M A, Fitzpatrick T B. Part IV: Basic considerations of the psoralens: Relationship of molecular configuration to the activity of furocoumarins. Which increase the cutaneous responses following long wave ultraviolet radiation [J]. *J Inves Dermatol*, 1959, 32(2): 255-262.
- [7] Conforti F, Marrelli M, Menichini F, *et al.* Natural and synthetic furanocoumarins as treatment for vitiligo and psoriasis [J]. *Curr Drug Ther*, 2009, 4(1): 38-58.
- [8] 庞建云, 刘肖, 申宝德, 等. 异补骨脂素纳米结构脂质载体的制备及其体外透皮研究 [J]. *中国中药杂志*,

- 2017, 42(13): 2473-2478.
- [9] 刘碧林, 石明芯, 朱照静, 等. 星点设计-效应面法优化姜黄素正负离子纳米结构脂质载体处方 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3401-3406.
- [10] 郑娟, 沈成英, 庞建云, 等. 丹参酮 II_A 纳米结构脂质载体的体外评价及其对 HaCaT 细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4340-4344.
- [11] 李静静, 贾运涛, 田睿, 等. 柚皮素纳米结构脂质载体的处方优化和初步评价 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 211-215.
- [12] 杨付英, 陈和莉, 张文萍, 等. 盐酸伊立替康纳米粒的制备及体外评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(21): 1732-1726.
- [13] Kelidari H R, Saeedi M, Akbari J, *et al.* Formulation optimization and *in vitro*, skin penetration of spironolactone loaded solid lipid nanoparticles [J]. *Collo Surf B Biointer*, 2015, 128: 473-479.
- [14] 王军, 韩瑞玲, 罗顺德, 等. 8-甲氧补骨脂素脂质体对小鼠黑色素瘤细胞黑色素生成影响的研究 [J]. 广东学院学报, 2004, 20(5): 509-511.
- [15] 霍仕霞, 彭晓明, 高莉, 等. 不同质量分数高良姜素对人黑色素瘤 A375 细胞黑色素合成及相关基因表达的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 244-249.
- [16] Nagaich U, Gulati N. Nanostructured lipid carriers (NLC) based controlled release topical gel of clobetasol propionate: Design and *in vivo* characterization [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2016, 6(3): 289-298.
- [17] 李静静, 贾运涛, 田睿, 等. 柚皮素纳米结构脂质载体的处方优化和初步评价 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 211-215.
- [18] Garg N K, Tyagi R K, Singh B, *et al.* Nanostructured lipid carrier mediates effective delivery of methotrexate to induce apoptosis of rheumatoid arthritis via NF- κ b and FOXO1 [J]. *Int J Pharm*, 2016, 499(1/2): 301-320.
- [19] Wang J, Xia Q. Alpha-lipoic acid-loaded nanostructured lipid carrier: Sustained release and biocompatibility to HaCaT cells *in vitro* [J]. *Drug Deliv*, 2014, 21(5): 328-341.