

中华眼镜蛇神经毒素可溶性微针的制备及体外经皮渗透性研究

夏爱晓¹, 姚文栋², 陈晓劼³, 蒋正立¹, 李范珠^{3*}

1. 台州恩泽医疗中心(集团)浙江省台州医院 药剂科临床药学实验室, 浙江 台州 317000

2. 浙江省中医院 药剂科, 浙江 杭州 310000

3. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311400

摘要: **目的** 制备中华眼镜蛇神经毒素(NT)可溶性微针(DMNs-NT), 并考察其理化性质及体外透皮性能。**方法** 采用两步离心法制备 DMNs-NT, 并以微针针体的成形性、机械强度及背衬层的柔韧性为指标, 考察硫酸软骨素(CS)与聚乙烯吡咯烷酮(PVP k30)的比例、基质液含水量、背衬层材料; HPLC 法测定其载药量, 正置光学显微镜表征, 并考察稳定性; 采用 Franz 扩散池考察其体外透皮性能。**结果** 通过单因素考察确定 DMNs-NT 制备的最佳处方工艺为 CS 与 PVP K30 比例 1:1、基质材料与加水量比例 5:4、以羧甲基纤维素(CMC)为背衬层材料。DMNs-NT 针体呈四棱锥形, 表面平整, 长度约为 500 μm , 每片含药量为 $(15.4 \pm 0.5) \mu\text{g}$, 药物位于针体上部, 3 个月内稳定性良好。离体皮肤渗透结果显示, 4 h 后 DMNs-NT 中 NT 的累积渗透量可达 95.8%, 而 NT 溶液几乎没有透过皮肤, 证明可溶性微针对 NT 透皮递送具有良好的促进作用, 能有效穿透大鼠离体皮肤。**结论** 制备 DMNs-NT 机械强度及柔韧性好, 实现了大分子药物 NT 的透皮递送。

关键词: 中华眼镜蛇; 神经毒素; 可溶性微针; 经皮给药系统; 两步离心法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0625-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.011

Preparation of neurotoxin loaded dissolving microneedles and its transdermal penetration

XIA Ai-xiao¹, YAO Wen-dong², CHEN Xiao-jie³, JIANG Zheng-li¹, LI Fan-zhu³

1. Laboratory of Clinical Pharmacy, Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Taizhou Enze Medical Center (Group) Pharmacy, Taizhou 317000, China

2. Pharmacy of Zhejiang Provincial Hospital of TCM, Hangzhou 310000, China

3. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China

Abstract: Objective To prepare *Naja atra* neurotoxin (NT) loaded dissolving microneedles (DMNs-NT), and investigate the physicochemical properties and *in vitro* transdermal properties. **Methods** DMNs-NT was prepared by a two-step centrifugation method. The ratio of CS and PVP K30, the water content of the matrix solution, and the backing layer material were optimized by the indexes of formability and mechanical strength of the microneedles and flexibility of the backing layer. The drug loading content was determined by HPLC, and the morphological characteristics were observed under an optical microscope, and the stability was also examined. Franz diffusion cell was used to investigate its *in vitro* skin permeation characteristics. **Results** Through the single-factor exploration, we confirmed that the optimal prescription technique for DMNs-NT preparation was a 1:1 ratio of CS and PVP k30, a 5:4 ratio of matrix material and water, with CMC as the backing layer material. The DMNs-NT had a pyramidal shape with a smooth surface and a length of approximately 500 μm . The drug loading content of per tablet was $(15.4 \pm 0.5) \mu\text{g}$. The drug was located in the upper part of the needle. DMNs-NT had good stability within 3 months. The results of *in vitro* skin permeation assay showed that

收稿日期: 2019-09-23

基金项目: 浙江省自然科学基金项目资助(LQ19H280004); 浙江省中医药优秀青年人才基金项目(2018ZQ013); 浙江省台州市科技计划项目(1701KY18); 浙江省药学会科研资助项目(2016ZY27); 浙江省新苗人才计划项目资助(2019R410057); 浙江中医药大学2018年度校级科研基金(2018ZJ09)

作者简介: 夏爱晓(1982—), 女, 浙江天台人, 主管药师, 硕士, 主要从事药物新剂型和新技术研究。

Tel./Fax: (0576)85199810 E-mail: 52123748@qq.com

*通信作者 李范珠(1964—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物新剂型与新技术研究。

Tel: (0571)61768181 E-mail: lifanzhu@zcmu.edu.cn

the cumulative penetration of NT in DMNs-NT could reach 95.8% in 4 h, while NT solution barely penetrated the skin, which proved that it had a good promoting effect on NT transdermal delivery. **Conclusion** In this study, DMNs-NT had good mechanical properties and good skin penetration, which realized the transdermal drug delivery of macromolecular drugs.

Key words: *Naja atra*; neurotoxin; dissolving microneedles; transdermal drug delivery system; two-step centrifugation method

中华眼镜蛇 *Naja atra* 毒液中的一种多肽成分神经毒素 (neurotoxin, NT), 具有镇痛、抗炎、抗衰老及免疫抑制作用^[1-2]。目前, 已有肌内注射剂科博肽注射液上市, 用于治疗三叉神经痛、晚期癌痛、关节痛等。但注射给药引起患者疼痛与反感, 由于注射所致体内分布过快, 有呼吸抑制的副作用。

经皮给药系统 (transdermal drug delivery system, TDDS) 已经被广泛应用于药物递送, 使用便捷, 血浆药物浓度稳定, 能减少不良反应, 提高依从性^[3-6]。皮肤角质层 (stratum corneum, SC) 阻止了水溶性药物和高分子亲脂性药物的透皮效果。目前, 渗透促进剂、离子导入、电穿孔和超声来增加药物经皮吸收量^[7-8], 对于神经毒素等多肽类及大分子药物的透皮依然是个难点。近年来, 越来越多的研究表明微针技术可用于多肽类及大分子药物经皮给药, 其作用机制为在皮肤 SC 上形成微米级的通道使药物顺利通过, 且刺入深度达不到真皮层, 是一种无痛的给药方式^[9-13]。微针一般分为固体微针、涂层微针、中空微针和可溶性微针 (dissolving microneedles, DMNs) 这 4 种, 可由多种材料制成, 包括金属、无机硅、玻璃、聚合物等^[14-15]。其中, 由可降解的水溶性聚合物制成的可溶性微针用于经皮递送蛋白类药物, 引起极大关注。通常, DMNs 作用于皮肤后, 构成针体部分的生物相容性聚合物可溶解于少量组织液中, 包封的蛋白类药物即可释放^[16-18]。因此, DMNs 是大分子药物理想的经皮递送方式, 其不仅有其他微针的优点, 而且针体部分的完全溶解不会引起人体危害^[19]。聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP)、羧甲基纤维素 (carboxymethyl cellulose, CMC) 均具有高度生物相容性与可降解性, 是制备 DMNs 的绝佳材料, 有研究表明以其为基质材料制备的微针负载蛋白类药物不会影响其药效^[20]。硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 是关节炎治疗中常用的营养补充剂, 患者耐受性好, 副作用小, 药物相互作用少; 还可减少刺激加速皮肤愈合, 增加微针生物相容性^[21-22]。

本实验以 PVP、CMC 和 CS 制备载 NT 的 DMNs (DMNs-NT), 正置光学显微镜表征、HPLC 考察载药量及皮肤的透皮性能, 为多肽及大分子药物经皮

递送研发提供理论依据。

1 仪器材料

1.1 仪器

微针模具, 台州薇凯生物科技有限公司; HF-50 数显推拉力计、HLX-S 推拉力计测试机架, 美国 PACK 公司; B008 便携式显微镜, 深圳超眼科技有限公司; TL6R 立式低速冷冻离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; TGL-16G 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; DZF-6050 真空干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; Labconco 冷冻干燥机 (4.5 L 台式), 美国 Labconco 公司; Nikon Eclipse Ci-L 正置显微镜, 日本尼康株式会社; Waters Alliance e2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; CP225D 型电子分析天平, 德国 Sartorius 公司。

1.2 药品与试剂

NT, 质量分数 >97%, 云南龙凤谷生物药业有限公司, 批号 H45021228; CS, 郑州欧泰化工产品有限公司, 批号 170801; PVP K30, 美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号 BCBP9635V; CMC, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 C10085620; 实验用水为去离子水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

Wistar 大鼠, 体质量 (180±20) g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 合格证号 SCXK (沪) 2017-0005。

2 方法与结果

2.1 微针的制备

经过前期预试验, 采用两步离心法^[23]制备 DMNs-NT。第 1 步, 微针头的制备: 按一定比例分别称取 CS 与 PVP K30 于烧杯中, 加入一定量 NT 的水溶液, 充分溶解并搅拌均匀。将含药的基质液注入微针模具中, 在 4 °C 条件下, 4 000 r/min (3 580×g) 离心 10 min, 除去并收集微针模具表面的含药基质液, 放入干燥器中干燥 1 h 后取出备用; 第 2 步, 微针背衬层的制备: 称取适量 CMC, 溶于去离子水, 搅拌均匀后注入微针模具, 相同条件下离心 10 min, 取出具有含药基质液微针模具干燥成形, 用弯镊小心脱模, 即得 DMNs-NT。微针模具放入热水中超声清洗后, 放入真空干燥箱干燥,

重复利用。

2.2 NT 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 CNW Athena C₁₈-BIO (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 0.1% 三氟乙酸水溶液, 流动相 B: 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液; 梯度洗脱: 0~10 min, 10%~27% B; 10~12 min, 27% B; 12~15 min, 27%~10% B; 15 min, 10% B; 体积流量 0.9 mL/min; 检测波长 200 nm; 进样量 20 μL; 柱温 30 °C。理论塔板数≥5 000, 分离度>1.5。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取 NT 对照品 2.02 mg, 用 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶解, 转移至 10.0 mL 量瓶中, 用 PBS 润洗 3 次至量瓶, 加至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液 (质量浓度为 202.00 μg/mL)。

2.2.3 专属性试验 取 DMNs-NT 溶解配制成溶液, 与 NT 对照品储备液过 0.45 μm 微孔滤膜, 按“2.2.1”项下条件进样测定。结果 (图 1) 表明, NT 峰形良好, 基质材料对药物测定无干扰, 方法具有良好的专属性。

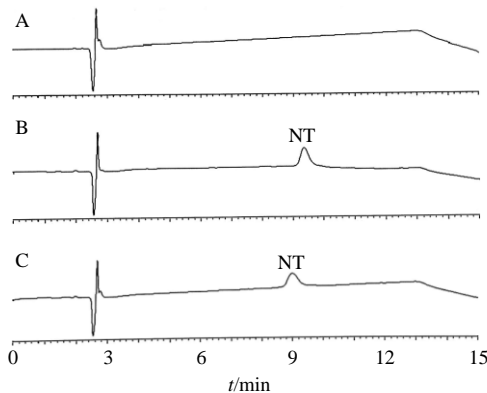


图 1 空白微针 (A)、NT 对照品 (B) 和 DMNs-NT (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank microneedle (A), NT reference substance (B), and DMNs-NT sample (C)

2.2.4 线性关系考察 精密取对照品储备液, 加 pH 值为 7.4 的 PBS 分别稀释成 151.50、101.00、75.75、50.50、20.20、10.10 μg/mL 的溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件分别进样。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 得回归方程为 $Y=35\ 624 X-69\ 232$, $r=0.999\ 8$ 。表明 NT 在 10.10~202.00 μg/mL 线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 分别取 NT 对照品溶液 151.50、50.50、20.20 μg/mL, 按“2.2.1”项下色谱条件 1 d 内分别测定 5 次, 连续测定 3 d。结果表明, NT 低、

中、高质量浓度溶液的日内精密度 RSD 分别为 0.95%、1.10%、1.32%; 日间精密度 RSD 分别为 1.76%、1.14%、1.08%, 日内和日间精密度 RSD 均符合要求, 该方法精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取 DMNs-NT 6 份, 分别溶解配制成质量浓度约为 50.00 μg/mL 的供试品溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 按“2.2.1”项下色谱条件测定质量浓度。结果表明, NT 实际质量浓度平均值为 (50.60±0.66) μg/mL, RSD 为 1.30%, 该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取 DMNs-NT 溶解配制成药物质量浓度为 50.00 μg/mL 的供试品溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 按“2.2.1”项下色谱条件测定质量浓度。结果表明, NT 实际质量浓度平均值为 (49.91±0.79) μg/mL, RSD 为 1.59%, 表明 DMNs-NT 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取 DMNs-NT 9 份分别溶解配制成药物质量浓度为 50.00 μg/mL 的供试品溶液, 分别加入同体积质量浓度为 40.40、50.50、60.60 μg/mL 的对照品溶液, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 按“2.2.1”项下色谱条件测定质量浓度。以计算的质量浓度值和真实质量浓度值之比计算加样回收率。结果显示低、中、高质量浓度的加样回收率分别为 (99.84±1.07)%、(100.40±1.42)%、(96.77±0.76)%, RSD 分别为 1.07%、1.41%、0.79%, 结果表明加样回收率符合方法学要求。

2.3 微针制备条件的优化

以微针的成形性、机械强度及背衬层的柔韧性为指标, 单因素考察 CS 与 PVP k30 的比例、基质液的含水量、背衬层的材料。

2.3.1 CS 与 PVP K30 的比例 前期研究表明在基质液 CS 中加入 PVP K30 可以提高所制备 DMNs-NT 的机械强度, 优选 CS 与 PVP K30 最优配比。分别以 CS 与 PVP K30 配比 1:0、5:1、3:1、2:1、3:2、1:1、2:3、1:2, 按照“2.1”方法, 基质材料与加水量的比例 5:4, 制备 DMNs-NT, 显微镜下观察其成形性, 并采用 HF-50 数显推拉力计测定其机械强度 (纵向与横向的断裂力)。结果如表 1 所示, 以 CS 与 PVP K30 配比为 1:1 制备的 DMNs-NT 成形性和机械强度最优。

2.3.2 加水量的确定 在 DMNs-NT 制备的过程中, 需要向 CS 与 PVP K30 的基质液中加入适量水,

而加水量会直接影响所得 DMNs-NT 的机械强度,考察基质材料与加水量最优配比。基质材料与加水量的比例(质量比)分别为 3:5、4:5、1:1、5:4,按照“2.1”项方法,CS 与 PVP K30 配比为 1:1,制备 DMNs-NT,显微镜下观察其成形性,并采用 HF-50 数显推拉力计测定其机械强度。结果如表 2

表 1 不同比例 CS 与 PVP k30 对机械强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

CS 与 PVP K30 的比例	纵向断裂力/N	横向断裂力/N
1:0	0.025±0.003	0.320±0.011
5:1	0.051±0.002	0.350±0.012
3:1	0.071±0.002	0.453±0.014
2:1	0.082±0.002	0.572±0.021
3:2	0.108±0.001	0.684±0.032
1:1	0.152±0.001	0.935±0.042
2:3	0.182±0.001	0.731±0.035
1:2	0.218±0.001	0.612±0.041

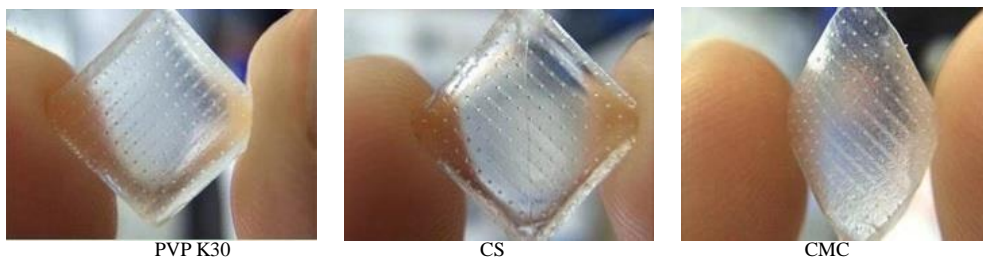


图 2 不同背衬层材料对柔韧性的影响

Fig. 2 Effect of different backing layer of material on pliability

2.3.4 微针制备最终方案 按 1:1 的比例分别称取 CS 与 PVP K30 各 500 mg 于烧杯中,加入 5 mg/mL 的 NT 水溶液 0.8 mL,充分溶解并搅拌均匀。将含药的基质液注入微针模具中,在 4 °C 条件下,4 000 r/min 离心 10 min,除去并收集微针模具表面的含药基质液,放入干燥器中干燥 1 h 后取出备用。称取 150 mg CMC,溶于 5 mL 去离子水,搅拌均匀后注入微针模具,相同条件下离心 10 min,取出具有含药基质液微针模具后放入干燥器中,干燥 24 h 后取出,用弯镊小心脱模,即得 DMNs-NT。

2.4 微针的表征

2.4.1 微针机械强度 以最终优化的制备方案参照“2.3.4”方法制备 DMNs 及 DMNs-NT,用 HF-50 数显推拉力计测定其纵向与横向的断裂力以确定机械强度。所得 DMNs 纵向与横向的断裂力分别为 (0.20±0.01)、(1.47±0.09) N,而 DMNs-NT 则为

所示,基质材料与加水量的比例 5:4 时,基质溶液的流动性适宜,所得 DMNs-NT 的机械强度最好。

2.3.3 微针背衬层材料的选择 在 DMNs-NT 制备的过程中,选择不同材料制作 DMNs-NT 的背衬层会影响最终制剂的柔韧性,因此本实验考察不同材料对最终制剂柔韧性的影响。分别以 PVP K30 500 mg、CS 800 mg、CMC 30 mg 为背衬层材料与 1 mL 水混合均匀,其他条件相同制备 DMNs-NT,分别记录其柔韧性。结果如图 2 所示,以 CMC 为材料制作的背衬层柔韧性最佳。

表 2 不同比例基质材料与加水量对机械强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of different proportions of matrix material and water on mechanical strength ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

基质材料与加水量的比例	纵向断裂力/N	横向断裂力/N
3:5	0.112±0.002	0.940±0.041
4:5	0.132±0.001	1.171±0.032
1:1	0.141±0.001	1.320±0.021
5:4	0.221±0.001	1.480±0.011

(0.20±0.01)、(1.51±0.11) N,两者差异无显著性 ($P>0.05$)。

2.4.2 微针含药量测定 将 DMNs-NT 溶于 1 mL 去离子水中,提取 10 min 后,以 8 000 r/min 离心,5 min 后取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,按“2.2.1”项下色谱条件测定其含药量,所得每片 DMNs-NT 含药 (15.4±0.5) μg。

2.4.3 微针形态特征 将所制备的 DMNs-NT 置于正置光学显微镜下观察其不同角度的外观形态。结果如图 3 所示,DMNs-NT 针体呈四棱锥形,表面平整,长度约为 500 μm,底部宽度约为 300 μm,中心间距约为 900 μm。

2.4.4 微针的稳定性 将制备的 DMNs-NT 分别在 -20、4 °C 及常温条件下分别存放 1、2、3 个月,用 HPLC 测定其剩余含药量。结果如表 3 所示,在同种条件下,保存时间越长 DMNs-NT 中含药量越

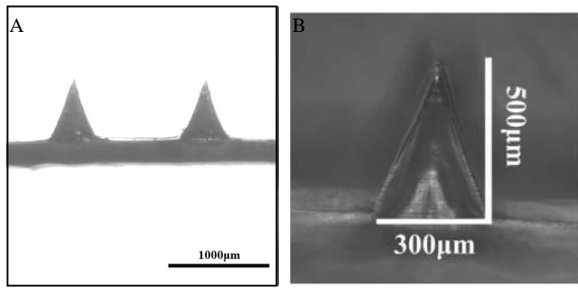


图 3 正置光学显微镜观察 DMNs-NT 表观形态 (40×, A; 100×, B)

Fig. 3 DMNs-NT images in positive optical microscope (40×, A; 100×, B)

表 3 DMNs-NT 在不同条件下的稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Stability of DMNs-NT under different conditions ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

存储条件	NT 剩余含药量/%		
	1 个月	2 个月	3 个月
-20 °C	100.4 ± 1.6	99.4 ± 1.2	99.1 ± 1.4
4 °C	100.2 ± 1.2	99.4 ± 1.8	97.2 ± 1.7
常温	99.9 ± 2.0	98.9 ± 1.5	94.8 ± 1.9

低。而在不同条件下保存相同时间, 在-20 °C 条件下 DMNs-NT 中含药量最高, NT 含量变化程度最小。可见, DMNs-NT 的稳定性良好且更适合储存在低温环境中。

2.5 微针体外皮肤渗透实验

取雌性 Wistar 大鼠, ip 戊巴比妥 (50 mg/kg), 待大鼠麻醉后, 先用小动物剃毛器剃去大部分鼠毛, 再用电动剃须刀剃去剩余鼠毛, 取下皮肤, 剥离脂肪组织和筋膜, 用生理盐水反复清洗后, 用滤纸吸干, 再用锡箔纸包裹后, 放入-80 °C 冰箱。使用时, 从-80 °C 冰箱取出锡箔纸包裹的皮肤, 小心打开, 取出皮肤, 放入生理盐水浸泡 30 min 后使用。

向 Franz 扩散池的接收室内注入 pH 值为 7.4 的 PBS 作为接收液, 同时超声排出接收室内多余的空气。将制得的 DMNs-NT 置于处理好的离体大鼠皮上并施加一定力度的力, 1 min 后用医用胶带固定, 处理过程中须保证皮肤的完整性。处理完成后将皮肤置于 8 mL 接收室上, 皮肤角质层朝上, 皮肤组织朝向接收室, 保证皮肤的有效扩散面积均与接收液的液面相接触, 同时另设一组给予 NT 溶液。固定好供给池和接收室后将扩散池置于恒温磁力搅拌器上, 以 600 r/min 的转速模拟人体皮肤下的血液和组织液内循环, 保持温度在 32 °C 恒温。分别于透皮 0、10、20、30 min 及 1、2、3、4、6、8 h 后收

集 0.5 mL 接收液作为样品进行含量测定, 取样后及时补充等量的新鲜接收液。

将取出的接收液样品以 0.45 µm 微孔滤膜进行滤过, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, SPSS 17 数据处理, 绘制药物的累积渗透曲线。结果如图 4 所示, 前 20 min DMNs-NT 中的 NT 较少透过皮肤, 累积渗透率为 12.1%, 而 1 h 后透过皮肤的 NT 的累积渗透率已大于 50%, 4 h 后达到 90% 以上。本实验中的 NT 溶液组由于未在实验过程中测到, 故认为 NT 几乎没有透过皮肤。

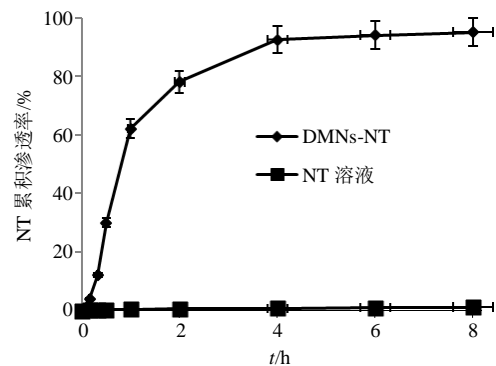


图 4 DMNs-NT 累积渗透曲线 (n = 6)

Fig. 4 *In vitro* penetration curve of DMNs-NT (n = 6)

3 讨论

本实验旨在通过 DMNs 荷载, 将 NT 蛋白多肽类经皮给药达到无痛给药并缓释的目的。采用两步离心法制备了 DMNs-NT, 其由微针针头与背衬层 2 部分构成。微针头的主要组成材料为 CS 与 PVP K30, 其中含有药物 NT, 背衬则由 CMC 构成。采用两步离心法成功制备了 DMNs-NT, 并进行了制备条件的优化。微针头呈四棱锥形, 针与针之间差异小, 机械强度良好。有研究表明相比于其他形状的微针, 四棱锥形的微针能够更好地穿透 SC, 使药物透过皮肤^[19], 有助于 NT 的溶解及在体释放。

DMNs 主要依靠在 SC 上形成通道并最终使针头部分在皮肤中溶解, 从而释放出药物 NT 发挥作用。因此, 微针头必须具有良好的成形性与机械强度以保证其能顺利刺入皮肤而不变形。微针头在刺入皮肤过程中不仅仅受到轴向的作用力, 而且会有一个垂直于针体的弯曲力。因此, 确定 CS 与 PVP K30 的比例、基质材料与加水量比例这 2 个条件时综合考虑, 兼顾轴向的作用力与垂直于针体的弯曲力, 最终确定 CS 与 PVP K30 的比例为 1 : 1、基质材料与加水量的比例为 5 : 4。而背衬层的柔韧性关乎 DMNs-NT 给药时能否很好地贴合皮肤, 对

DMNs-NT 能否更好发挥疗效产生影响。与 CS、PVP K30 相比,以 CMC 为材料的背衬层可以很轻松地弯曲,更适合本研究的要求。

DMNs-NT 在体外透皮实验过程中,前 20 min 透过皮肤的 NT 不到 20%,之后其透皮速率加快,1 h 后 NT 的累积渗透率已大于 50%,4 h 后达到 90% 以上,表现出对 NT 的缓释作用。NT 溶液组在释放介质中未检测到。NT 这种大分子多肽很难穿透皮肤,DMNs 可以显著提高 NT 的透皮递送量。DMNs 可有效荷载 NT 类多肽药物,显示出良好的机械强度,可通过透皮方式给药,实现无痛给药及缓释作用;且 DMNs 将 NT 固化在可降解材料中,使 DMNs 中的 NT 具备优越的稳定性。

参考文献

- [1] Xu Y L, Kou J Q, Wang S Z, *et al.* Neurotoxin from *Naja atra* venom inhibits skin allograft rejection in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(1): 188-98.
- [2] Yang Q, Zhao C, Zhao J, *et al.* Photoresponsive nanocapsulation of cobra neurotoxin and enhancement of its central analgesic effects under red light [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 3463-3470.
- [3] Lee H, Song C, Baik S, *et al.* Device-assisted transdermal drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 127: 35-45.
- [4] Song H, Wen J, Li H, *et al.* Enhanced transdermal permeability and drug deposition of rheumatoid arthritis via sinomenine hydrochloride-loaded antioxidant surface transethosome [J]. *Int J Nanomed*, 2019, 14: 3177-3188.
- [5] 申宝德, 沈成英, 徐玲霞, 等. 纳米混悬凝胶剂在中药经皮给药中的应用进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(23): 5012-5018.
- [6] 华晓东, 任变文. 经皮给药系统的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(5): 282-285.
- [7] Delgado-Charro M B, Guy R H. Effective use of transdermal drug delivery in children [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 73: 63-82.
- [8] Pandey P C, Shukla S, Skoog S A, *et al.* Current advancements in transdermal biosensing and targeted drug delivery [J]. *Sensors*, 2019, doi:10.3390/s19051028.
- [9] Kim Y C, Park J H, Prausnitz M R. Microneedles for drug and vaccine delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(14): 1547-1568.
- [10] Thakkar H, Pandya K, Patel B. Microneedle-mediated transdermal delivery of tizanidine hydrochloride [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2059: 239-258.
- [11] Chen W, Tian R, Xu C, *et al.* Microneedle-array patches loaded with dual mineralized protein/peptide particles for type 2 diabetes therapy [J]. *Nat Commun*, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01764-1.
- [12] Hao Y, Li W, Zhou X, *et al.* Microneedles-based transdermal drug delivery systems: A review [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2017, 13(12): 1581-1597.
- [13] Rzhavskiy A S, Singh T R R, Donnelly R F, *et al.* Microneedles as the technique of drug delivery enhancement in diverse organs and tissues [J]. *Ther Deliv*, 2017, 8(9): 725-728.
- [14] Chandrasekhar S, Iyer L K, Panchal J P, *et al.* Microarrays and microneedle arrays for delivery of peptides, proteins, vaccines and other applications [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10(8): 1155-1170.
- [15] Chen H, Wu B, Zhang M, *et al.* A novel scalable fabrication process for the production of dissolving microneedle arrays [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2019, 9(1): 240-248.
- [16] Duarah S, Sharma M, Wen J. Recent advances in microneedle-based drug delivery: Special emphasis on its use in paediatric population [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 136: 48-69.
- [17] Waghule T, Singhvi G, Dubey S K, *et al.* Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1249-1258.
- [18] Leone M, Mönkäre J, Bouwstra J A, *et al.* Dissolving microneedle patches for dermal vaccination [J]. *Pharm Res*, 2017, 34(11): 2223-2240.
- [19] Jeong H R, Lee H S, Choi I J, *et al.* Considerations in the use of microneedles: Pain, convenience, anxiety and safety [J]. *J Drug Target*, 2017, 25(1): 29-40.
- [20] Fakhraei Lahiji S, Jang Y, Ma Y, *et al.* Effects of dissolving microneedle fabrication parameters on the activity of encapsulated lysozyme [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 117: 290-296.
- [21] Franssen M, Agalotiis M, Nairn L, *et al.* Glucosamine and chondroitin for knee osteoarthritis: A double-blind randomised placebo-controlled clinical trial evaluating single and combination regimens [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(5): 851-858.
- [22] Kashiuchi S, Miyazawa R, Nagata H, *et al.* Effects of administration of glucosamine and chicken cartilage hydrolysate on rheumatoid arthritis in SKG mice [J]. *Food Funct*, 2019, doi: 10.1039/c9fo00981g.
- [23] Dharadhar S, Majumdar A, Dhoble S, *et al.* Microneedles for transdermal drug delivery: A systematic review [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2019, 45(2): 188-201.