

微针长度与马钱子碱可溶性微针刺入性能及治疗效果的关联性研究

汪云霞^{1,4}, 宋信莉^{1,4*}, 王永林², 刘文^{1,3}, 张永萍¹, 王群¹, 陈欢欢¹, 石佳楠¹, 杨小双¹, 杨胜磊¹

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州医科大学省级制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004

3. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025

4. 国家苗药工程技术研究中心, 贵州中药炮制与制剂工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 制备不同微针长度(针长)马钱子碱(brucine, Bru)可溶性微针(Bru-DMNs), 探讨针长对微针刺入性能及治疗效果的影响。方法 采用两步离心法制备不同针长(350、450、550、650、750、850 μm) Bru-DMNs。通过铝箔及鼠皮穿刺实验考察各针长微针穿刺性能; 在体溶解实验考察各针长微针溶解性能; 皮肤 HE 染色观察各针长微针刺入皮肤的深度; 皮肤屏障恢复实验评估各针长微针对于皮肤角质层的影响; 采用 Franz 扩散池考察各针长微针体外透皮性能; 体内药效学评估各针长微针对类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的治疗作用。结果 350、850 μm 针长微针穿刺效果较差, 450、550、650、750 μm 针长微针穿刺性能较好, 能成功刺入皮肤形成微孔通道成功递送药物, 刺入皮肤后可快速溶解, 微针越长, 溶解越快; 针长越长, 刺入皮肤越深, 皮肤角质层孔道闭合越慢(4~6 h); 450 μm 针长微针促渗效果较差, 长度达到 550 μm 时即有较好促渗效果; 各针长微针均可不同程度缓解和治疗 RA, 长度达到 550 μm 时即可达到理想疗效。

结论 当微针长度达到 550 μm 时, 各项性能良好, 具有显著的促渗效果和治疗效果。

关键词: 马钱子碱; 可溶性微针; 微针长度; 经皮给药; 类风湿性关节炎; 两步离心法; 药效学; 促渗

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **章编号:** 0253-2670(2022)11-3338-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.11.009

Correlation study between microneedle length and brucine dissolving microneedles penetration performance and therapeutic effect

WANG Yun-xia^{1,4}, SONG Xin-li^{1,4}, WANG Yong-lin², LIU Wen^{1,3}, ZHANG Yong-ping¹, WANG Qun¹, CHEN Huan-huan¹, SHI Jia-nan¹, YANG Xiao-shuang¹, YANG Sheng-lei¹

1. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

3. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

4. National Engineering Technology Research Center for Miao Medicine, Guizhou Engineering Technology Research Center for Processing and Preparation of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To investigate the effect of needle length on microneedle penetration performance and therapeutic effect, brucine dissolving microneedles (Bru-DMNs) with different lengths were fabricated. **Methods** Bru-DMNs with different needle lengths (350, 450, 550, 650, 750, 850 μm) were prepared by two-step centrifugation. The puncture performance of each needle-length microneedle was evaluated by aluminum foil and rat skin puncture experiments. The solubility of each needle-length microneedles was investigated by *in vivo* dissolution test; Skin HE staining was used to observe the penetration depth of each Bru-DMNs into the skin. Skin barrier restoration experiment was conducted to evaluate the effect of needle length on cuticle. The

收稿日期: 2021-12-17

基金项目: 贵州省国内一流学科建设项目(GNYL[2017]008); 贵州省药物新剂型新工艺科技创新人才团队项目(黔科合平台人才[2017]5655); 贵州省特色功能食品与中药制剂开发攻关大平台(黔教合 KY 字[2020]006); 贵州中医药大学药用高分子材料研究中心(贵中医党办发[2019]70 号); 贵州中医药大学博士启动基金(贵中医博士启动[2021]14 号)

作者简介: 汪云霞(1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药新技术与新制剂研究。Tel: 18886063448 E-mail: Yunxia_18886063448@163.com

***通信作者:** 宋信莉(1982—), 女, 教授, 主要从事中药新技术与新制剂研究。Tel: 13765158121 E-mail: 392347047@qq.com

transdermal properties of the microneedles with different needle lengths were investigated in vitro by Franz diffusion cell. The therapeutic effect of each needle-length microneedles on rheumatoid arthritis (RA) was evaluated by *in vivo* pharmacodynamics. **Results** Microneedle lengths of 350 and 850 μm had poor puncture effect, while microneedle lengths of 450, 550, 650 and 750 μm had better puncture performance, which could successfully penetrate into the skin to form microporous channels for successful delivery of drugs. After penetrating into the skin, the drug could be dissolved quickly. The longer the microneedles, the faster the dissolution. The longer the microneedles, the deeper the penetration of skin, the slower the closure of cuticle pores (4—6 h). Microneedles with a length of 450 μm was less effective in promoting osmosis, while a length of 550 μm was more effective in promoting osmosis. All needle lengths of microneedles could relieve and treat RA to varying degrees, and the ideal effect could be achieved when the length reached 550 μm . **Conclusion** When the length of microneedles reaches 550 μm , all the properties are good, and it has a significant pro-permeation effect and therapeutic effect.

Key words: brucine; dissolving microneedles; length of Bru-DMNs; transdermal delivery; rheumatoid arthritis; two-step centrifugation; pharmacodynamics; pro-permeation

微针 (microneedle) 作为透皮给药系统 (transdermal drug delivery system, TDDS) 的一种新方法, 为透皮给药提供了一种新型的、无痛的、可自行操作的方法, 它可以穿透角质层, 形成可恢复的微通道有效递药^[1-3]。根据微针的尺寸大小、形状和制备材料可将其分为固体微针、涂层微针、空心微针、可溶性微针 (dissolving microneedles, DMNs) 和水凝胶微针^[4-6]。其中 DMNs 由于制备简单、成本低、性能好, 已成为目前透皮递送药物使用最广泛的微针。DMNs 由生物相容性好的可降解材料与药物混合制备而成, 针体插入皮肤后会逐渐溶解或降解在间质液中, 不会引起人体危害^[7-9]。

在皮肤表面形成孔道是 DMNs 递送药物发挥药效的决定性因素, 也是限制其发展与推广的一个关键。在穿刺过程中, 由于皮肤的不均匀性、刺入过程中不可避免的移动等原因, DMNs 会受到各种各样的力导致发生断裂、弯曲等形变, 影响穿刺性能。因此, 在选择或设计 DMNs 产品时不仅要考虑制备微针的基质材料, 还要考虑所加载的药物, 微针的物理参数如几何形状、微针长度、微针阵列的密度、针间距等对微针穿刺性能的影响。研究表明, 微针的强度会随着所载药物量的增加而降低^[10]; 微针阵列密度过高, 会导致“钉子床”效应, 无法有效突破角质层屏障^[11-13]; 同时, 过高的微针密度会降低微针间距, 当微针间距低于 150 μm 时会显著降低刺入率^[14-15]; 当微针阵列密度小于 2000 针/ cm^2 时, “钉子床”效应较小, 透皮性能较好^[16]。课题组前期以马钱子碱 (brucine, Bru) 为模型药物, 以复合材料聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP) K30、硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 为针尖材料, 单一材料聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA)

为背衬材料制备了背衬柔软-针尖坚硬的马钱子碱可溶性微针 (Bru-DMNs), 并对其性能、载药量等进行了考察^[17-18]。所制备的微针针体部分具有足够的硬度足以刺穿皮肤并迅速将药物释放在皮内, 背衬部分与皮肤有较好的贴合性, 有足够的韧性能承受使用时施加的力并将力传递到顶端刺入皮肤而不发生断裂, 在不影响微针穿刺能力的情况下每片微针最大载药量约为 256 μg 。基于此, 本研究在载药量相同、微针针体形状相同 (圆锥形)、针间距相同且大于 150 μm (700 μm)、阵列相同 (20 $\times$ 20) 的前提下制备了长度分别为 350、450、550、650、750、850 μm 的 Bru-DMNs, 通过穿刺实验、在体溶解实验、体外透皮实验、体内药效学实验等考察微针长度对其相关性能及药效的影响。

1 仪器与材料

1.1 仪器

微针模具, 台州薇凯生物科技有限公司, 阵列: 20 $\times$ 20, 针长 350、450、550、650、750、850 μm ; TD5A-120 台式低速离心机, 常州金坛良友仪器有限公司; KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 101-3AB 型电热鼓风干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; SIPTOP 型光学显微镜 (OM), 宁波舜宇仪器有限公司; SU8100 型扫描电子显微镜 (SEM), 日本日立高新技术有限公司; RYJ-12B 型药物透皮扩散实验仪, 上海黄海药检仪器有限公司。

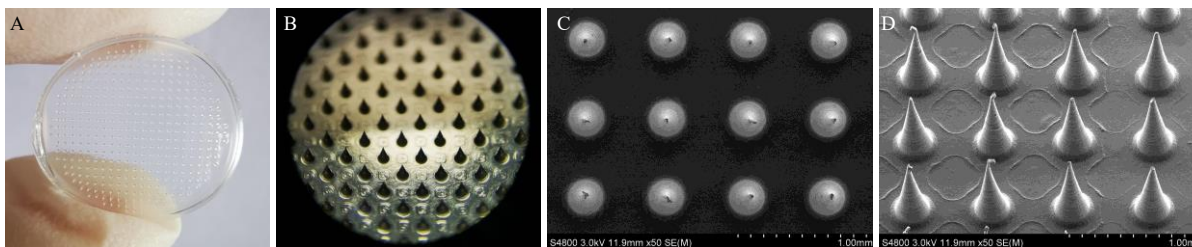
1.2 药品与试剂

马钱子碱对照品, 质量分数 99.43%, 北京中科质检生物技术有限公司, 批号 19031510; PVP K30, 合肥巴斯夫生物科技有限公司, 批号 BSF190822; CS, 江苏鑫瑞生物科技有限公司, 批号 20191028;

乌来糖,上海源叶生物科技有限公司,批号 Z28A11; 弗氏完全佐剂 (CFA), 美国 Sigma-Aldrich 公司, 规格 20 mL; PVA, 山东优索化工科技有限公司, 批号 P21501215; 台盼蓝、乙二胺四乙酸 (EDTA), 北京索莱宝科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)、IL-6、IL-17 试剂盒, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 类风湿因子 (rheumatoid factor, RF) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所。双氯芬酸二乙胺乳胶剂 (扶他林), 北京诺华制药有限公司。

1.3 实验动物

健康雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, SPF 级, 体质量 210~250 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (辽) 2020-0001。饲养条件: 购入后在本实验室常规饲养, 饮用自来水, 饲以标准大鼠饲料。动物房光照充足, 通风良好, 实验前饲养 1 周适应环境。所有的动物实验都符合贵州医科大学伦理委员会对实验动物的关怀和使用的要求。



A-目视观察 B-OM (×40) C-SEM (×50) D-SEM (×150)
A-visual observation B-OM (×40) C-SEM (×50) D-SEM (×150)

图 1 马钱子碱可溶性微针 (550 μm) 的外观形态

Fig. 1 Characteristics of Bru-DMNs (550 μm)

2.3 Bru-DMNs 穿刺性能考察

2.3.1 铝箔穿刺实验 分别以一定的力度将针长 350、450、550、650、750、850 μm 的微针垂直作用于铝箔上, 取下微针, 观察铝箔穿刺情况及穿刺后的微针是否发生弯曲、断裂等情况。

2.3.2 离体大鼠皮肤穿刺实验 取健康 SD 大鼠, 麻醉处死, 小心剔除干净腹部毛发, 避免出现破损, 然后剥离此处皮肤, 剔除皮下脂肪组织, 用生理盐水冲洗干净, 滤纸拭干后备用。分别将上述针长微针垂直作用于已处理好的离体皮肤上, 作用 2 min 后取出, 皮肤立即用 0.4% 台盼蓝溶液染色, 15 min 后用异丙醇除去皮肤表面多余的染色剂, 并用生理盐水清洗干净, 观察皮肤表面染色小孔的情况及微

2 方法与结果

2.1 不同针长 Bru-DMNs 的制备

根据前期研究确定的工艺参数及制备方法^[17-18] 分别制备针长为 350、450、550、650、750、850 μm 的 Bru-DMNs。第 1 步, 微针针体的制备: 分别以 1:1 的比例称取 PVP K30、CS 溶解在马钱子碱水溶液中, 快速搅拌, 制备成均匀的溶液, 倒入微针模具中, 以 4000 r/min 离心 (离心半径 13.5 cm) 10 min, 收集微针模具表面多余的含药基质, 微针室温干燥 30 min 备用。第 2 步, 微针背衬层的制备: 将已充分溶胀的 15% PVA 水溶液注入含有针体的微针模具中, 相同条件下离心 10 min, 在室温下干燥 24 h, 脱模后即得 Bru-DMNs。

2.2 Bru-DMNs 外观形态

肉眼观察微针阵列 (以 550 μm 针长微针为例) 是否完好、背衬是否平整, 并在 OM 及 SEM 下观察其针体外观形态及分布情况。如图 1 所示, 所制备的 Bru-DMNs 阵列完好, OM 及 SEM 下可看到微针阵列排列整齐、针体呈圆锥形, 表面光滑、分布均匀, 针尖锐利。

针穿刺后的形态以判断不同针长微针的穿刺性能。

穿刺结果如图 2 所示, 各针长微针均能穿刺铝箔, 在铝箔上留下整齐、完整的孔洞, 由于针长过长, 穿刺后 850 μm 微针严重弯曲。根据皮肤上的孔道染色情况可以看出, 350、850 μm 针长微针穿刺性能最差, 且穿刺后微针针体大量弯曲、断裂, 其他针长微针穿刺后针体基本完好。这可能是因为微针针长较短或过长时穿刺性能较差, 受到施加的外力时容易弯曲或折断, 故微针过短或过长均不宜用于给药。

2.4 Bru-DMNs 在体溶解实验

基于穿刺实验结果, 继续对针长为 450、550、650、750 μm 的微针溶解性能进行考察。为了观察

各针长微针的溶解性能, 将健康 SD 大鼠麻醉后分别以一定力度将各针长微针作用于大鼠腹部皮肤(实验前 24 h 进行脱毛处理), 分别停留 5、10、15、20 min 之后取下微针, 立即在显微镜下观察微针外观形态。结果如图 3 所示, 作用 5 min 后, 各针长微针针体部分开始溶解; 10 min 后, 各针长微针约 1/2 针体溶解; 15 min 后, 各针长微针 2/3 针体溶解;

20 min 后, 除 450 μm 针长微针外, 其余针长微针针体几乎完全溶解。

2.5 Bru-DMNs 刺入深度

为了直观观察 450、550、650、750 μm 针长微针刺入皮肤的深度, 将各针长微针分别刺入已处理好的离体大鼠皮肤并作用 2 min, 随后皮肤用 10% 中性福尔马林溶液固定, 石蜡包埋, 切片 5 μm 。切

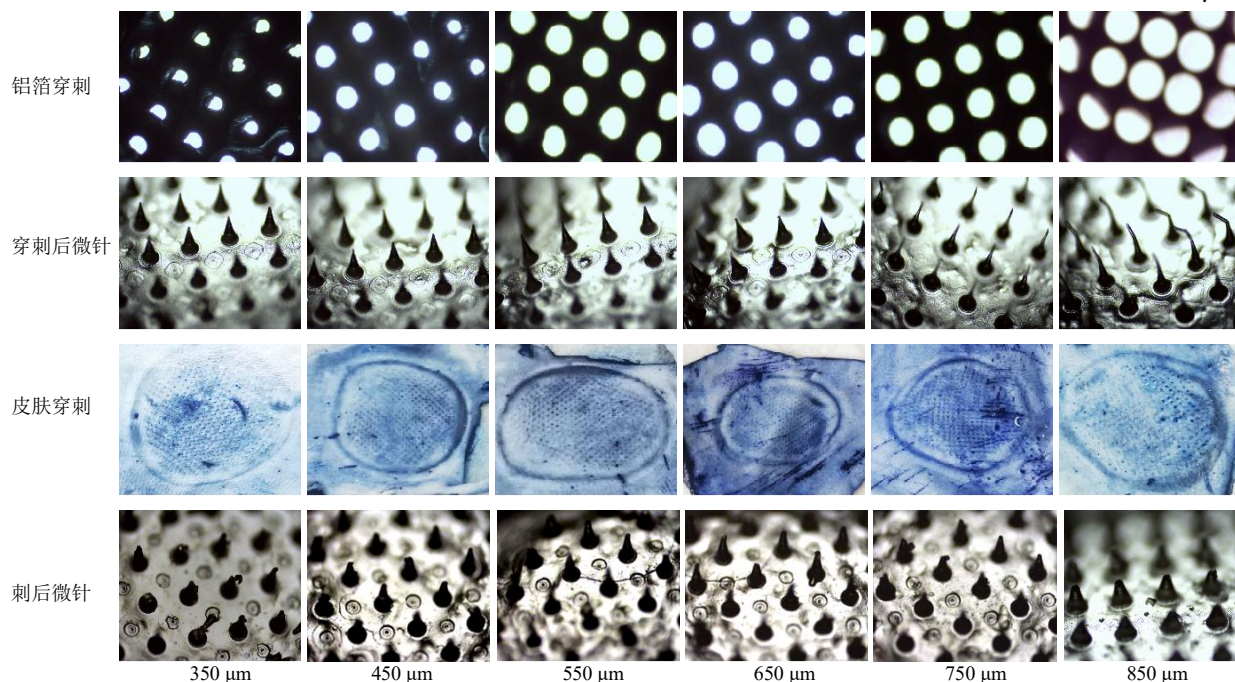


图 2 不同针长微针穿刺性能考察结果 (OM, $\times 40$)

Fig. 2 Penetration ability with different lengths of DMNs (OM, $\times 40$)

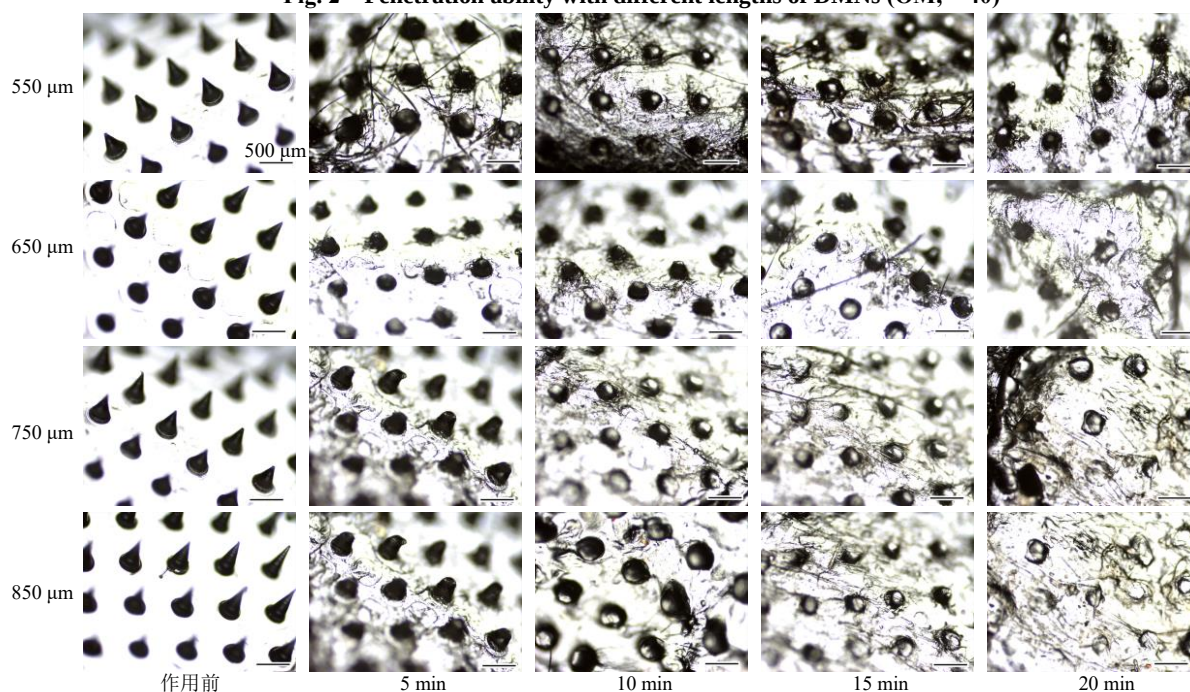


图 3 不同针长微针溶解性能考察结果 (OM, $\times 40$)

Fig. 3 Dissolution of Bru-DMNs after their application onto rat skin *in vivo* at indicated time points (OM, $\times 40$)

片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇洗涤,HE 染色,OM 下观察各针长微针对皮肤的穿刺深度及微孔大小。各针长微针皮肤穿刺深度如图 4 所示,由于皮肤弹性和变形及微针的机械强度等原因,微针不能完全刺入皮肤,皮肤表面的孔隙深度明显短于微针的总长度,但均能达到各针长微针总长的 3/4。450 μm 微针刺入深度约为 337.3 μm ,微孔大小约为 96.7 μm ; 550 μm 针长微针刺入深度约为 369.5 μm ,微孔大小约为 89.8 μm ; 650 μm 针长微针刺入深度约为 423.8 μm ,微孔大小约为 91.7 μm ; 750 μm 针长微针刺入深度约为 462.1 μm ,微孔大小约为 94.7 μm 。各针

长穿刺后留下的孔洞大小无明显差异,穿刺深度随针长的增加而增大。

2.6 皮肤屏障恢复实验

皮肤角质层孔道的闭合情况被认为是评估皮肤角质层恢复快慢的指标,可用于评估微针对角质层的作用程度。按“2.1”项下方法分别制备针长为 450、550、650、750 μm 的载台盼蓝的微针,分别作用于大鼠去毛腹部皮肤,2 min 后取下,于取下微针后 0、5、30 min 及 2、4、6 h 观察台盼蓝在皮肤中的扩散情况,根据皮肤染色情况判断微针对角质层的影响。结果如图 5 所示,取下微针后可看见明显的蓝色斑

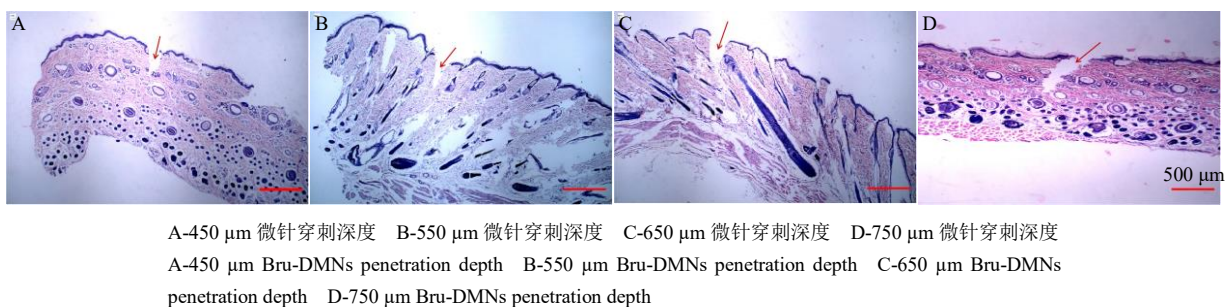


图 4 不同针长微针皮肤穿刺情况 ($\times 40$)

Fig. 4 Depth into the skin (B-b, 40X) of Bru-DMNs with different lengths ($\times 40$)

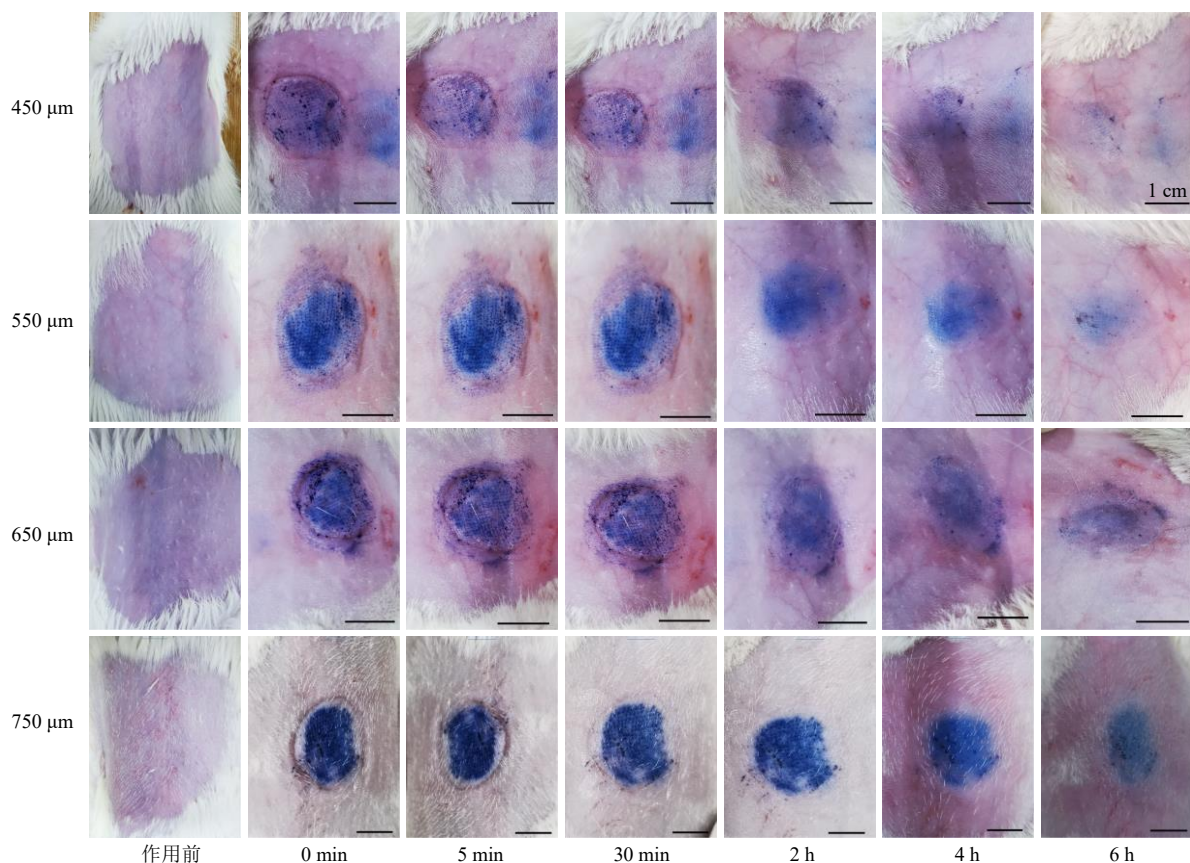


图 5 不同针长微针作用后皮肤角质层恢复情况

Fig. 5 Skin stratum corneum recovery after the action of Bru-DMNs of different lengths

点(微针作用后形成的孔道),表明台盼蓝已经进入皮肤;取下微针 5 min 后蓝色斑点无任何变化;30 min 后蓝色开始变淡。

450、550 μm 针长微针处理的大鼠皮肤表面蓝色斑点 2 h 后大部分消失,4 h 后蓝色斑点完全消失,但皮肤表面仍有蓝色残留,6 h 后蓝色基本消失;650、750 μm 针长微针处理的大鼠皮肤表面蓝色斑点 2 h 时仍明显,4 h 后大部分消失,6 h 后斑点完全消失,但皮肤表面仍有明显蓝色残留。孔道的闭合时间取决于皮肤屏障被破坏的程度,微针越长,孔道闭合需要时间越久。根据蓝色斑点可判断,以上 4 种针长微针给药后对皮肤的影响是可逆的,皮肤屏障功能很快(4~6 h)可以恢复。

2.7 体外皮肤渗透性实验

采用 Franz 扩散池考察各针长微针体外透皮性能^[19-20]。向立式透皮扩散实验仪(有效扩散面积为 2.3 cm^2 ,接收室容积为 7 mL)内注入 20%乙醇的生理盐水作为接收液,同时超声排出接收室内多余的空气。将各针长马钱子碱可溶性微针(含药约 176.23 $\mu\text{g}/\text{片}$)置于处理好的离体大鼠皮上并施加一定力度的力,用透气医用胶布将其固定,将鼠皮置于供给池与接收池之间(角质层朝向供给池),并保证皮肤的有效扩散面积均与接收液的液面相接触。用夹子固定好供给池和接收室后将扩散池置于透皮扩散实验仪上,磁力搅拌速度为 300 r/min ,接收室水浴温度保持在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温。分别于透皮 0、10、20、30 min 和 1、2、4、6、8 h 取样 1 mL,每次取样后立即补足同体积同温度的新鲜接收液。通过 HPLC 测定不同针长微针透皮接收液中马钱子碱的质量浓度,根据公式计算单位面积累积渗透量(Q_n),并以 Q_n 为纵坐标,时间(t)为横坐标绘制药物的累积渗透曲线图。

$$Q_n = (C_n V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V) / S$$

Q_n 为第 n 个取样点药物的单位面积累积渗透量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_n 为第 n 个取样点接收液中药物的质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$), V 为接收池体积(mL), V_0 为取样体积(mL), S 为药物透过时有效透过面积(cm^2), C_i 为第 i ($i \leq n-1$) 个取样点测得的接收液中药物质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)

各针长微针体外透皮实验结果如图 6 所示,前 4 h,各针长微针持续释放药物,微针长度越长,促渗作用越强;6 h 时,450、550、650、750 μm 微针中马钱子碱透过皮肤的 Q_6 分别为 126.75、149.44、

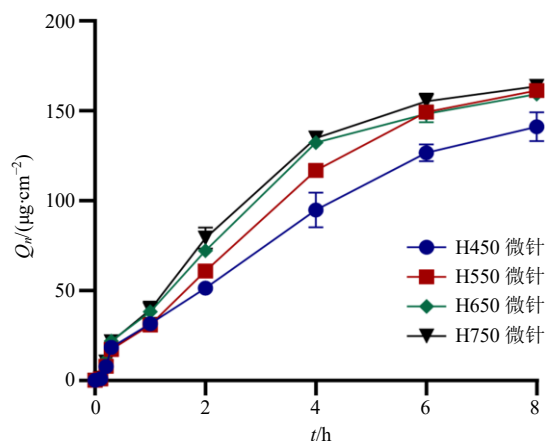


图 6 不同针长微针累积释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 In vitro transdermal delivery profile of Bru-DMNs with different lengths in rats skin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

148.49、155.42 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。8 h 时, Q_8 分别为 141.21、161.49、159.41、163.81 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。可见,不同长度微针有不同促渗作用,但促渗效果不随着针长的增加而增加,450 μm 针长微针促渗效果较 550、650、750 μm 针长微针差。微针长度在 550 μm 左右即可达到较好的促渗效果。

2.8 体内药效学考察

2.8.1 RA 大鼠模型的建立 佐剂性关节炎(adjutant-induced arthritis, AA)模型是用于筛选和研究抗 RA 药物的最为经典且最为常用的动物模型。因此本研究选择 AA 大鼠模型为研究 Bru-DMNs 抗 RA 的动物模型。参照文献方法^[21],于每只大鼠右后足足垫皮内注射 CFA 0.1 mL 致炎,对照组大鼠相同部位注射同等体积生理盐水,第 7 天再次加强免疫。

2.8.2 分组及给药 将造模成功的大鼠分为模型组、阳性药物组(给予扶他林乳胶)、不同针长微针给药组(依次记为 H450、H550、H650、H750 微针给药组)、空白微针组,另设一组对照组,共 8 组,每组 8 只。造模后第 8 天开始给药,各微针组于大鼠右后足关节肌肉处给予 1 块相应微针(每块微针含马钱子碱 256 μg),阳性药物组于相同部位涂抹扶他林乳胶 0.6 g(含药 300 μg),连续给药 22 d。

2.8.3 一般情况观察及体质量测量 观察各组大鼠致炎前和致炎后第 5、10、15、20、25、30 天局部的炎症反应、行为及饮食情况,并记录体质量。各组大鼠造模前健康状态良好,毛发顺滑有光泽。造模后各组大鼠较空白组可见活动及饮食减少,毛发略微发黄,足趾肿胀,部分大鼠关节呈急性炎症

表现, 表面皮肤发红发亮充血, 活动受限, 无死亡。各组大鼠体质量变化如图 7 所示, 对照组大鼠摄食饮水正常, 体质量增长最快; 其余各组大鼠造模后体质量增长缓慢, 经药物治疗后体质量增长逐渐加快, 模型组、空白微针组大鼠体质量增长最为缓慢。

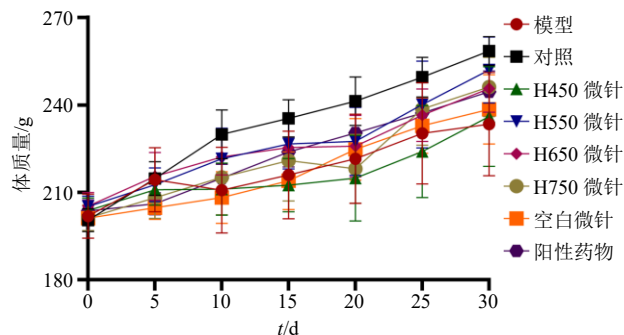


图 7 大鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 7 Body mass changes in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

表 1 大鼠足趾肿胀度变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Bru-DMNs on paw swelling in AA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ μg	足趾肿胀度/mm					
		第 5 天	第 10 天	第 15 天	第 20 天	第 25 天	第 30 天
对照		0.14±0.05	0.35±0.08	0.39±0.08	0.64±0.09	0.65±0.07	0.70±0.08
模型		4.11±0.36**	4.79±0.38**	4.70±0.41**	4.52±0.40**	4.28±0.35**	3.87±0.23**
H450 微针	256	3.64±0.23	4.39±0.17	4.57±0.88	3.67±0.67	3.16±0.41 ^{###}	2.65±0.41 ^{###}
H550 微针	256	3.84±0.21	4.53±0.60	4.16±0.56	3.16±0.18 ^{###}	2.77±0.24 ^{###}	2.53±0.37 ^{###}
H650 微针	256	3.97±0.34	4.92±0.54	4.37±0.62	3.02±0.47 ^{###}	2.70±0.49 ^{###}	2.29±0.40 ^{###}
H750 微针	256	4.00±0.31	4.86±0.57	3.97±0.65	2.79±0.27 ^{###}	2.33±0.46 ^{###}	1.97±0.46 ^{###}
空白微针		4.63±0.31**	5.97±0.72**	5.06±0.50**	4.41±0.28**	4.20±0.29**	3.79±0.38**
阳性药物	300	4.09±0.27	5.11±0.24	4.55±0.30	3.89±0.28	3.05±0.18 ^{###}	2.29±0.30 ^{###}

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{###} $P<0.01$, 表 2、3 同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs normal group; [#] $P<0.05$ ^{###} $P<0.01$ vs AA group, same as Table 2 and 3

后第 30 天, 腹主动脉取血, 分离各组大鼠右足踝关节, 用 4% 多聚甲醛溶液固定, EDTA 脱钙, 乙醇脱水, 石蜡包埋切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色, 观察大鼠踝关节组织病理变化。

结果如图 8 所示, 由关节病理切片观察到, 空白对照组大鼠关节结构正常, 关节滑膜上皮排列整齐, 未见血管翳生成与炎性细胞浸润, 界限清楚; 模型组可见滑膜细胞增生、炎性细胞浸润并伴有血管翳生成, 软骨被侵蚀; 与模型组比较, 空白微针组、模型组和对照组大鼠关节间隙已不可见, 各微针给药组与阳性给药组大鼠软骨侵蚀、炎性细胞浸润、血管翳生成等情况不同程度得到改善, 仍可见变窄的关节间隙。

2.8.6 脏器指数测定 各组大鼠造模后第 30 天测

2.8.4 AA 大鼠足趾肿胀度的变化 于造模前测定各组大鼠右后足足趾厚度, 作为正常指标。于造模后第 5、10、15、20、25、30 天分别测量各组大鼠右后足足趾厚度, 根据公式计算大鼠足趾肿胀度, 每次测量部位保持一致。

足趾肿胀度=致炎后右足趾厚度 (mm) - 致炎前右足趾厚度 (mm)

对照组大鼠在整个实验过程中, 足趾厚度几乎无变化, 其余组大鼠造模后足趾肿胀, 第 7 天再次加强免疫后各组大鼠造模侧不能负重, 甚至溃烂。经药物治疗后, 与模型组比较, 从给药第 20 天起, 各微针给药组和阳性药物组均有明显改善 ($P<0.01$), 但各针长微针给药组间无明显差异, 结果如表 1 所示。

2.8.5 AA 大鼠踝关节病理学检查 各组大鼠造模

定体质量, 腹主动脉取血后处死, 取出心、肝、脾、肺、肾、胸腺并称定质量, 根据公式计算相应的脏器指数。

脏器指数=脏器质量/体质量

结果表明 (表 2), 与模型组相比, 不同针长微针给药组对 AA 大鼠心脏、肝脏、肺脏、肾脏等脏器无明显影响, 而对免疫器官脾脏和胸腺有明显影响 ($P<0.01$), 能不同程度地减轻 AA 大鼠免疫器官的炎症程度。

2.8.7 AA 大鼠血清中细胞相关因子水平的测定 各组大鼠于造模后第 30 天腹主动脉取血, 血样静置 1 h, 3000 r/min 离心 (离心半径 13.0 cm) 15 min, 取上清液, 分装并于 -80 °C 保存至检测。采用 ELISA 法检测大鼠血清中 RF, 促炎细胞因子 TNF- α 、IL-17、

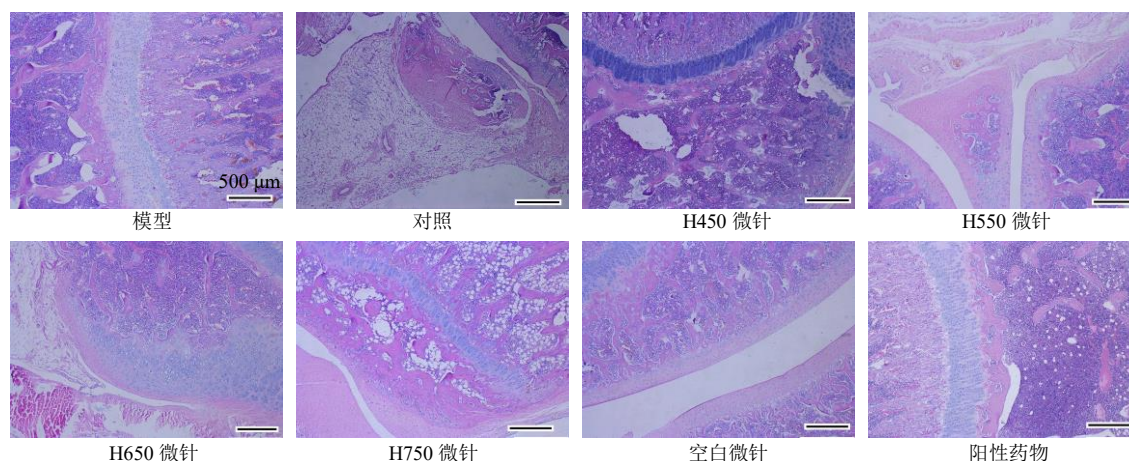


图 8 各组大鼠踝关节病理切片 ($\times 40$)

Fig. 8 Macroscopically changes and HE staining of pathological sections of ankle joint in AA rats ($\times 40$)

表 2 各组大鼠脏器指数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Bru-DMNs on organ index in AA rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ μg	脾脏指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	胸腺指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	心脏指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	肝脏指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	肺脏指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	肾脏指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照		1.55 ± 0.17	1.12 ± 0.20	2.99 ± 0.18	24.80 ± 1.45	4.50 ± 0.22	5.46 ± 0.50
模型		$3.09 \pm 0.31^{**}$	$2.04 \pm 0.20^{**}$	3.08 ± 0.10	$26.82 \pm 2.05^{*}$	$6.08 \pm 0.71^{**}$	5.86 ± 0.44
H450 微针	256	$3.36 \pm 0.39^{##}$	$1.42 \pm 0.37^{##}$	3.09 ± 0.47	26.20 ± 2.24	5.94 ± 0.69	5.79 ± 0.42
H550 微针	256	$2.09 \pm 0.19^{##}$	$1.37 \pm 0.19^{##}$	3.02 ± 0.20	25.58 ± 1.94	5.48 ± 0.21	5.48 ± 0.21
H650 微针	256	$2.09 \pm 0.20^{##}$	$1.33 \pm 0.20^{##}$	3.21 ± 0.28	25.19 ± 2.39	5.32 ± 0.44	5.65 ± 0.25
H750 微针	256	$1.72 \pm 0.22^{##}$	$1.22 \pm 0.25^{##}$	3.08 ± 0.19	25.78 ± 1.45	$4.93 \pm 0.37^{#}$	5.66 ± 0.65
空白微针		2.96 ± 0.18	1.75 ± 0.21	3.14 ± 0.42	27.02 ± 2.10	5.86 ± 0.52	6.02 ± 0.45
阳性药物	300	$2.04 \pm 0.35^{##}$	$1.29 \pm 0.20^{##}$	3.20 ± 0.26	26.32 ± 1.61	5.75 ± 0.43	5.66 ± 0.26

IL-6, 抗炎细胞因子 IL-10 的表达水平, 方法按试剂盒说明程序进行。ELISA 检测结果如表 3, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 RF、TNF- α 、IL-6、IL-17 的水平明显增加 ($P < 0.01$), IL-10 的水平明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各微针给药组、阳性药物组均能在一定程度上降低大鼠血清中 RF、

TNF- α 、IL-6、IL-17 的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 上调 IL-10 的水平 ($P < 0.01$), 空白微针组无任何调控作用, 各针长微针给药组间无显著性差异。

以上结果表明, AA 大鼠炎症发生后, 类风湿因子 RF、炎性细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-17 水平增加, 抗炎细胞因子 IL-10 水平降低, Bru-DMNs、

表 3 大鼠血清中 RF、TNF- α 、IL-17、IL-10、IL-6 的水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of Bru-DMNs on serum cytokines in AA rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	RF	TNF- α /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-17/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-10/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照		112.18 ± 69.91	47.48 ± 8.37	33.07 ± 4.55	21.80 ± 3.44	112.14 ± 9.68
模型		$266.53 \pm 40.87^{**}$	$108.48 \pm 17.82^{**}$	$98.41 \pm 15.54^{**}$	$47.92 \pm 9.86^{**}$	$65.24 \pm 12.97^{**}$
H450 微针	256	218.65 ± 25.34	$86.56 \pm 14.67^{##}$	$75.33 \pm 10.83^{##}$	$36.32 \pm 4.70^{##}$	76.32 ± 8.47
H550 微针	256	$175.36 \pm 29.88^{##}$	$72.35 \pm 10.43^{##}$	$69.20 \pm 16.13^{##}$	$31.11 \pm 6.09^{##}$	$89.82 \pm 17.22^{##}$
H650 微针	256	187.94 ± 100.03	$84.52 \pm 9.83^{##}$	$69.69 \pm 15.60^{##}$	$36.29 \pm 6.43^{##}$	$85.41 \pm 191^{##}$
H750 微针	256	$156.92 \pm 32.30^{##}$	$74.63 \pm 12.91^{##}$	$56.69 \pm 10.55^{##}$	$38.98 \pm 5.95^{##}$	$93.94 \pm 8.99^{##}$
空白微针		237.53 ± 24.04	108.51 ± 11.69	98.37 ± 4.06	47.29 ± 6.69	65.44 ± 11.07
阳性药物	300	$193.38 \pm 26.17^{#}$	$89.67 \pm 7.95^{##}$	$71.41 \pm 14.34^{##}$	$32.93 \pm 6.23^{##}$	$96.07 \pm 12.50^{##}$

阳性药物能够不同程度地降低 AA 大鼠血清中 RF、TNF- α 、IL-6、IL-17 水平，升高 IL-10 水平，从而有效减缓 AA 大鼠的病程发展，对 AA 大鼠有良好的治疗效果。

3 讨论

文献报道，微针的几何参数，如形状、尺寸、阵列密度和类型等对促进药物的透皮吸收起着重要作用^[22]。这些变量的影响也是相互作用的，因此，它们对药物分子渗透的影响通常是非直观的，最好针对具体情况来研究它们的影响。故本研究通过系列实验探讨了针长因素与 Bru-DMNs 刺入性能及治疗效果的关联性研究。实验结果显示针长对微针穿刺性能影响较大，微针过短（350 μm ）或过长（850 μm ）刺入性能均较差，长度为 450、550、650、750 μm 时刺入效果较佳，刺入后能很快溶解在皮内，针长越长，溶解越快，可能是微针越长，刺入皮肤越深，针体更多部分同时接触到皮肤间质液而溶解。

根据皮肤结构，表皮的厚度为 75~150 μm ，最外层是角质层，表皮下是 1~4 mm 的真皮层，可判断 4 种长度的微针均可以刺破皮肤角质层延伸至真皮层。由于皮肤的弹性削弱了微针的刺入效果，微针无法完全刺入皮肤内，刺入皮肤深度小于微针长度，但形成孔道的深度随长度增加而增加。微针刺入皮肤后形成的微孔通道可通过染料在皮肤上的染色情况来观察，4 种长度的微针刺入皮肤后不会对皮肤造成永久破坏，产生的作用是可逆的、轻微的，随着皮肤屏障功能的恢复，孔道会逐渐闭合（4~6 h），微针越长，孔道闭合越慢。同时，微针长度越长，促渗效果越好，微针长度达到 550 μm 左右即有良好的促渗效果。

初步药效学研究结果表明，各长度 Bru-DMNs 均具有抗炎消肿、缓解 RA 病情发展的作用，能不同程度地改善 AA 大鼠的关节炎外观症状；不同程度地增加 AA 大鼠的体质量；不同程度地减轻 AA 大鼠足趾肿胀程度，改善踝关节组织病理状态；能不同程度地减轻 AA 大鼠免疫器官的炎症程度，具有一定免疫调节作用；同时，可下调类风湿因子 RF 及促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-17 的表达水平，上调抑炎细胞因子 IL-10 的表达水平而达到治疗 RA 的炎症反应。但治疗效果与针长不成正比，微针长度在 550 μm 左右即可达到理想的治疗效果。

综上，当微针长度达到 550 μm 左右时即有良好的穿刺效果、促渗效果及治疗效果，且能较好地体

现微针应用无痛（微痛）、微创、有效递药的特点。尽管本实验探讨了针长因素与 Bru-DMNs 刺入性能及治疗效果的关系，考虑到研究者们彼此之间使用的基质材料、微针参数和工艺条件等各不相同，可能会导致结果差异，仍有待于进一步系统性探索研究针长与微针穿刺性能、治疗效果的关键因素及规律，为微针的质量可控性、有效性和安全性等提供足够的保障。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lim D J, Vines J B, Park H, *et al.* Microneedles: A versatile strategy for transdermal delivery of biological molecules [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 110: 30-38.
- [2] Larrañeta E, Lutton R E M, Woolfson A D, *et al.* Microneedle arrays as transdermal and intradermal drug delivery systems: Materials science, manufacture and commercial development [J]. *Mater Sci Eng R Rep*, 2016, 104: 1-32.
- [3] Yu W J, Jiang G H, Zhang Y, *et al.* Near-infrared light triggered and separable microneedles for transdermal delivery of metformin in diabetic rats [J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5(48): 9507-9513.
- [4] Bariya S H, Gohel M C, Mehta T A, *et al.* Microneedles: an emerging transdermal drug delivery system [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(1): 11-29.
- [5] Jin X, Zhu D D, Chen B Z, *et al.* Insulin delivery systems combined with microneedle technology [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 127: 119-137.
- [6] Shende P, Sardesai M, Gaud R S. Micro to nanoneedles: A trend of modernized transepidermal drug delivery system [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(1): 19-25.
- [7] Maurya A, Nanjappa S H, Honnavar S, *et al.* Rapidly dissolving microneedle patches for transdermal iron replenishment therapy [J]. *J Pharm Sci*, 2018, 107(6): 1642-1647.
- [8] Pei P, Yang F, Liu J X, *et al.* Composite-dissolving microneedle patches for chemotherapy and photothermal therapy in superficial tumor treatment [J]. *Biomater Sci*, 2018, 6(6): 1414-1423.
- [9] Lee B M, Lee C S, Lahiji S F, *et al.* Dissolving microneedles for rapid and painless local anesthesia [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(4): 1-13.
- [10] Yao W D, Tao C H, Zou J F, *et al.* Flexible two-layer dissolving and safing microneedle transdermal of neurotoxin: A biocomfortable attempt to treat Rheumatoid

- Arthritis [J]. *Int J Pharm*, 2019, 563: 91-100.
- [11] Andersen T E, Andersen A J, Petersen R S, *et al.* Drug loaded biodegradable polymer microneedles fabricated by hot embossing [J]. *Microelectron Eng*, 2018, 195: 57-61.
- [12] Chen Y, Chen B Z, Wang Q L, *et al.* Fabrication of coated polymer microneedles for transdermal drug delivery [J]. *J Control Release*, 2017, 265: 14-21.
- [13] Yung K L, Xu Y, Kang C L, *et al.* Sharp tipped plastic hollow microneedle array by microinjection moulding [J]. *J Micromech Microeng*, 2011, 22(1): 015016.
- [14] Xenikakis I, Tzimtzimis M, Tsongas K, *et al.* Fabrication and finite element analysis of stereolithographic 3D printed microneedles for transdermal delivery of model dyes across human skin *in vitro* [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 137: 104976.
- [15] Hsueh K J, Chen M C, Cheng L T, *et al.* Transcutaneous immunization of *Streptococcus suis* bacterin using dissolving microneedles [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2017, 50: 78-87.
- [16] Yan G, Warner K S, Zhang J, *et al.* Evaluation needle length and density of microneedle arrays in the pretreatment of skin for transdermal drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2010, 391: 7-12.
- [17] 汪云霞, 宋信莉, 陈欢欢, 等. 马钱子碱双层聚合物可溶性微针的制备及其在不同载药方式下的体外经皮渗透性研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2112-2118.
- [18] Song X L, Wang Y X, Chen H H, *et al.* Dosage-efficacy relationship and pharmacodynamics validation of brucine dissolving microneedles against rheumatoid arthritis [J]. *J Drug Deliv Sci Tech*, 2021, 63: 102537.
- [19] Xie Y, Wang H, Mao J Z, *et al.* Enhanced *in vitro* efficacy for inhibiting hypertrophic scar by bleomycin-loaded dissolving hyaluronic acid microneedles [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(42): 6604-6611.
- [20] Shu Z X, Cao Y J, Tao Y T, *et al.* Polyvinylpyrrolidone microneedles for localized delivery of sinomenine hydrochloride: Preparation, release behavior of *in vitro* & *in vivo*, and penetration mechanism [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 642-651.
- [21] Bao Y, Sun Y W, Ji J, *et al.* Genkwanin ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats through inhibiting JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153036.
- [22] Goma Y A, Morrow D I, Garland M J, *et al.* Effects of microneedle length, density, insertion time and multiple applications on human skin barrier function: Assessments by transepidermal water loss [J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24(7): 1971-1978.

[责任编辑 郑礼胜]