

## • 药剂与工艺 •

## 水飞蓟素脂质体的制备、质量评价及其对 HaCaT 细胞增殖和摄取的影响

陈江丽, 邱智东, 金媛媛, 周栩妍, 李弘鹏, 刘 达, 金 叶\*

长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117

**摘要:** 目的 制备水飞蓟素脂质体 (silymarin liposomes, SM-L) 并进行质量评价, 考察 SM-L 对人永生角质形成细胞 (human immortal keratinocyte line, HaCaT) 增殖和摄取的影响。方法 采用乙醇注入法制备 SM-L, 以包封率和  $\zeta$  电位为考察指标, Box-Behnken 响应曲面设计实验优化 SM-L 处方和制备工艺, 并对 SM-L 进行质量评价; 采用噻唑蓝 (MTT) 法考察 SM-L 对 HaCaT 细胞增殖的影响, 细胞划痕实验考察 SM-L 对 HaCaT 细胞水平迁移能力的影响, 共聚焦显微镜观察并以流式细胞术考察 HaCaT 细胞对 SM-L 的摄取情况。**结果** 优化的 SM-L 制备工艺为大豆磷脂、水飞蓟素和胆固醇的质量比为 20:7.94:6.21, 无水乙醇和水的最佳比例为 1:10。SM-L 包封率为  $(85.44 \pm 0.87)\%$ , 平均粒径为  $(133.80 \pm 2.13)$  nm, 多分散指数为  $0.134 \pm 0.020$ ,  $\zeta$  电位为  $(-14.1 \pm 0.3)$  mV, 稳定性良好, 36 h 皮肤透过率为  $(14.58 \pm 6.37)\%$ , 皮肤滞留率为  $(65.80 \pm 4.04)\%$ 。细胞实验证明一定质量浓度范围的 SM-L 能促进 HaCaT 细胞增殖, SM-L 相比水飞蓟素对 HaCaT 细胞的水平迁移促进作用有明显提高, 并且 SM-L 能够有效提高 HaCaT 细胞对水飞蓟素的摄取。**结论** 制备所得的 SM-L 粒径均一, 性质稳定, 透皮性能好, 并且可以促进 HaCaT 细胞增殖和对水飞蓟素的摄取, 有很好的角质修复作用。

**关键词:** 水飞蓟素; 脂质体; 质量评价; 细胞增殖; 细胞摄取; 乙醇注入法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)12-3614-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.006

## Preparation and quality evaluation of silymarin liposomes and their effects on proliferation and uptake of HaCaT cells

CHEN Jiang-li, QIU Zhi-dong, JIN Yuan-yuan, ZHOU Xu-yan, LI Hong-peng, LIU Da, JIN Ye

School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

**Abstract: Objective** Silymarin liposomes (SM-L) were prepared and evaluated to investigate its effect on the uptake and migration of HaCaT cells. **Methods** SM-L was prepared by ethanol injection method. Taking the entrapment efficiency and  $\zeta$  potential as the indexes, the Box-Behnken response surface design was used to optimize the best formulation and process of SM-L, and the quality of SM-L was evaluated; MTT method was used to investigate the effect of SM-L on the proliferation of HaCaT cells, cell scratch test was used to investigate the effect of SM-L on the horizontal migration ability of HaCaT cells, confocal microscope and flow cytometry were used to investigate the uptake of SM-L by HaCaT cells. **Results** The best preparation process of SM-L was as follows: the mass ratio of soybean phospholipid, silymarin (SM-L) and cholesterol was 20:7.94:6.21, and the optimum ratio of organic phase and aqueous phase was 1:10. The entrapment efficiency of SM-L was  $(85.44 \pm 0.87)\%$ , the particle size was  $(133.80 \pm 2.13)$  nm, the polydispersity index was  $0.134 \pm 0.020$ , the  $\zeta$  potential was  $(-14.1 \pm 0.3)$  mV, the skin transdermal rate was  $(14.58 \pm 6.37)\%$ , and skin retention rate was  $(65.80 \pm 4.04)\%$  within 36 h, and SM-L had good stability. Cell experiments showed that SM-L in a certain concentration range could promote the proliferation of HaCaT cells. Compared with silymarin, SM-L could significantly improve the horizontal migration of HaCaT cells, and SM-L could effectively improve the uptake of silymarin by HaCaT cells. **Conclusion** The prepared SM-L has uniform particle size, good stability and transdermal performance, can promote HaCaT cell proliferation and silymarin uptake, and has

收稿日期: 2022-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82003985); 吉林省教育厅科学技术研究项目 (JKH20210995KJ); 吉林省科技发展计划项目 (20210204013YY)

作者简介: 陈江丽 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: 932153713@qq.com

\*通信作者: 金 叶, 副教授, 硕士生导师, 主要从事新剂型与新型给药系统研究。E-mail: jyccucm@foxmail.com

a good role in cuticle repair.

**Key words:** silymarin; liposomes; quality evaluation; cell proliferation; cellular uptake; ethanol injection method

水飞蓟素(silymarin)是提取自菊科水飞蓟属植物水飞蓟 *Silybum marianum* (L.) Gaertn.干燥种子的天然黄酮木脂素类化合物,水飞蓟宾是水飞蓟素的主要活性成分,占60%~70%<sup>[1-2]</sup>。水飞蓟素抗氧化性显著,具有保肝<sup>[3-4]</sup>、抗癌、神经保护、调血脂、抗衰老等广泛的药理作用<sup>[5]</sup>,而水飞蓟素在皮肤修复方面的作用尚未引起广泛关注。但是水飞蓟素水溶性和脂溶性均差,且药物递送效率不高,严重限制了水飞蓟素的应用。脂质体有良好的生物相容性和药物包载能力<sup>[6]</sup>,且能够降低用药剂量和药物毒性<sup>[7-8]</sup>,常用于解决难溶药物溶解度问题<sup>[9-10]</sup>。将水飞蓟素制备为脂质体(silymarin liposomes, SM-L)可以同时提高水飞蓟素溶解度和生物利用度<sup>[11-12]</sup>,且脂质体的缓释特性可以使水飞蓟素持续发挥作用。

人永生角质形成细胞(human immortal keratinocyte line, HaCaT)具有与角质形成细胞分化特性相似、遗传性质稳定等特点,可作为研究各类皮肤损伤修复的模型细胞<sup>[13]</sup>,以HaCaT细胞为实验对象,对于研究SM-L的角质修复作用有重要意义。本实验采用注入法制备SM-L,以包封率和 $\zeta$ 电位为指标,Box-Behnken响应面设计法优化SM-L的处方和制备工艺;对SM-L平均粒径、 $\zeta$ 电位、DSC鉴别和体外透皮性能进行评价;通过细胞增殖、细胞划痕、细胞摄取实验考察SM-L对HaCaT细胞的影响,证明SM-L能促进HaCaT细胞增殖和摄取,并具有良好的皮肤修复作用,为后期SM-L在治疗皮肤相关疾病及护肤领域的应用提供理论和实验依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

WP-UP-40超纯水机,四川沃特尔公司;EL204型电子天平,NewC classic MS电子天平,上海梅特勒-托利多公司;LC-15C岛津液相色谱仪,岛津仪器(苏州)有限公司;SER33270-1236型多功能读板机,美谷分子仪器(上海)有限公司;RYJ-12B型药物透皮扩散试验仪,上海黄海药检仪器有限公司;DF-101Z集热式恒温加热磁力搅拌器,上海科升仪器有限公司;380ZLS型粒度及 $\zeta$ 电位检测分析仪,美国PSS公司;DSC 3型差示扫描量热仪,上海梅特勒-托利多公司;Heraeus™ Megafuge™ 8离心机、

Countess II FL型细胞计数仪、EVOS XL Core细胞成像系统、Thermo371型热电CO<sub>2</sub>培养箱, Thermo Fisher Scientific公司;A00-1-1102型流式细胞仪, Beckman Cytoflex公司;Hitachi H-7650型透射电子显微镜(TEM),日立(中国)有限公司。

### 1.2 材料

水飞蓟素(批号C16D10H05984)、胆固醇(批号L29N8F49258)、水飞蓟宾(批号Y24F11Y17078,质量分数 $\geq 98\%$ )、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC,批号J15N11H131088)、硬脂胺(octadecanamine, ODA,批号Y15M11S109696),上海源叶生物科技有限公司;大豆磷脂,批号SY-SI-180501,上海艾伟特医药科技有限公司;无水乙醇,批号20210203,广东光华科技股份有限公司;甲醇,批号201208,费舍尔化学公司;冰醋酸,批号190316,陇西科学股份有限公司;生理盐水,批号11B20121609,山东齐都药业有限公司;噻唑蓝(MTT),批号NO.1223G0524,索莱宝生物科技有限公司;DMEM培养基,批号8121341,赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司。

### 1.3 细胞株及实验动物

HaCaT细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。SPF级雄性SD大鼠,体质量(200 $\pm$ 20)g,由长春市亿斯试验动物技术有限责任公司提供,质量检测单位为吉林省试验动物质量检测中心,合格证号:SCXK(吉)-2020-0002,本实验已通过长春中医药大学动物实验伦理审查,批准编号2021001。

## 2 方法与结果

### 2.1 SM-L的制备

本实验选用乙醇注入法制备SM-L<sup>[14]</sup>,经预实验考察得到制备方法如下:称取大豆磷脂20mg、胆固醇5mg以及水飞蓟素5mg,使三者质量比为20:5:5,1mL无水乙醇超声溶解,一次快速注入10mL去离子水中,磁力搅拌器转速300r/min搅拌4h,即得。除不加药物外,同法制备空白脂质体。

### 2.2 水飞蓟宾含量测定

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为Wondasil C<sub>18</sub>柱(250mm $\times$ 4.6mm, 5 $\mu$ m);流动相为甲醇-水-冰醋酸(48:52:1);检测波长287nm;柱温38 $^{\circ}$ C;体积流量1.0mL/min,进样量5 $\mu$ L<sup>[15]</sup>。

**2.2.2 对照品溶液的配制** 称取水飞蓟宾对照品 12 mg 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 作为母液。取 1 mL 母液置 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 即得 0.12 mg/mL 的水飞蓟宾对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的配制** 取 1 mL SM-L 溶液置 5 mL 量瓶中, 甲醇破乳超声后稀释至刻度, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 即得 SM-L 破乳溶液。同法制备空白脂质体破乳溶液。

**2.2.4 专属性考察** 取空白脂质体破乳溶液、水飞蓟宾对照品溶液、SM-L 破乳溶液, 各进样 5  $\mu\text{L}$ , 记录色谱图 (图 1), 实验结果证明此色谱条件下, 水飞蓟宾 A、B 峰形良好, 载体辅料对水飞蓟宾测定无干扰。

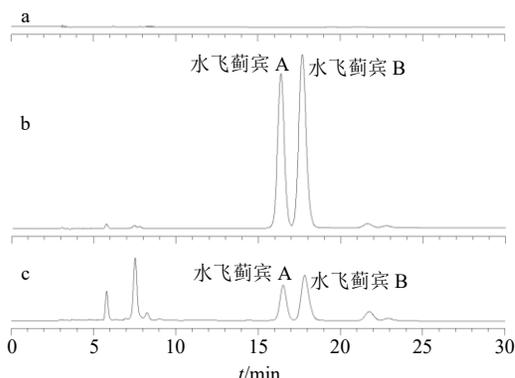


图 1 空白脂质体破乳液 (a)、水飞蓟宾对照品 (b) 和 SM-L 破乳液 (c) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of blank liposome (a), silybinin reference substance (b) and SM-L (c)

**2.2.5 线性关系考察** 取水飞蓟宾对照品溶液适量, 稀释成质量浓度分别为 0.50、1.01、5.03、10.07、30.20、60.40、90.60、120.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的系列对照品溶液, 进样测定并记录峰面积。以水飞蓟宾质量浓度为横坐标 ( $X$ )、水飞蓟宾 A、B 峰面积之和为纵坐标 ( $Y$ ) 进行线性回归, 得线性回归方程  $Y=10\ 803 X+2\ 321.7$ ,  $r=0.999\ 9$ , 结果表明水飞蓟宾在 0.50~120.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  与峰面积线性关系良好。

**2.2.6 精密度试验** 取水飞蓟宾对照品溶液进样测定 6 次, 记录峰面积, 计算其 RSD 为 0.31%, 表明仪器精密度良好。

**2.2.7 重复性试验** 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液并进行测定, 记录峰面积, 计算 RSD 值为 1.53%, 表明该方法重复性较好。

**2.2.8 稳定性试验** 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液并进行测定, 分别于 0、2、4、8、16、24、

48 h 进样测定, 记录峰面积, 计算其 RSD 为 0.58%, 表明 SM-L 破乳溶液 48 h 内稳定性良好。

**2.2.9 加样回收率试验** 精密吸取按“2.1”项下方法制备的 SM-L 溶液 0.5 mL, 加入水飞蓟宾对照品溶液 (120.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 0.5 mL, 涡旋混匀, 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液进行测定, 计算得平均加样回收率为 99.23%, RSD 为 1.21%, 表明该实验方法准确可靠。

### 2.3 SM-L 包封率的测定方法

超滤离心管中加入 1 mL SM-L 溶液, 4000 r/min 离心 30 min (离心半径 12 cm), 取滤液置 5 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 测定游离水飞蓟宾含量 ( $W_{\text{游离}}$ )。另取制得的 SM-L 溶液 1 mL 置 5 mL 量瓶中, 甲醇破乳后稀释至刻度, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 测定水飞蓟宾总含量 ( $W_{\text{总}}$ ), 包封率计算公式如下。

$$\text{包封率} = 1 - W_{\text{游离}}/W_{\text{总}}$$

### 2.4 SM-L 处方工艺的单因素试验

**2.4.1 大豆磷脂与水飞蓟素质量比的考察** 设定大豆磷脂与水飞蓟素质量比分别为 20:5、20:6、20:7、20:8、20:9, 大豆磷脂与胆固醇质量比为 20:5, 无水乙醇与水体积比为 1:10, 一次快速注入水中, 搅拌 4 h 制得 SM-L 并测定其包封率, 测得包封率分别为 (71.64 $\pm$ 1.09)%、(76.33 $\pm$ 0.57)%、(79.23 $\pm$ 1.97)%、(80.77 $\pm$ 0.66)%、(75.45 $\pm$ 0.66)% ( $n=3$ )。随着处方中水飞蓟素质量的增加, SM-L 的包封率呈现先上升后下降的趋势, 说明一定量的大豆磷脂对药物的包封程度是有限的, 因此, 选择大豆磷脂与水飞蓟素的质量比为 20:8。

**2.4.2 大豆磷脂与胆固醇质量比的考察** 设定大豆磷脂与胆固醇质量比分别为 20:3、20:4、20:5、20:6、20:7, 大豆磷脂与水飞蓟素质量比为 20:8, 无水乙醇与水体积比为 1:10, 一次快速注入水中, 搅拌 4 h 制得 SM-L 并测定其包封率, 测得包封率分别为 (70.44 $\pm$ 0.17)%、(75.46 $\pm$ 0.42)%、(80.42 $\pm$ 0.29)%、(85.04 $\pm$ 0.63)%、(84.29 $\pm$ 0.53)% ( $n=3$ )。随着处方中胆固醇质量的增加, SM-L 的包封率呈现先上升后下降的趋势, 可能是由于胆固醇含量过高使膜超负荷导致药物渗漏, SM-L 包封率下降, 因此, 大豆磷脂与胆固醇的质量比定为 20:6。

**2.4.3 无水乙醇与水体积比的考察** 设定无水乙醇

和水体积比分别为 1:8、1:9、1:10、1:11、1:12,大豆磷脂、水飞蓟素和胆固醇质量比为 20:8:6,一次快速注入水中,搅拌 4h 制得 SM-L 并测定包封率,测得包封率分别为 (80.95±0.61)%、(85.67±0.19)%、(84.74±0.73)%、(79.21±0.26)%、(71.87±0.44)% (n=3)。SM-L 的包封率随着处方中水使用体积的增加呈现先上升后下降的趋势,可能是因为水的体积过大,无水乙醇无法及时分布均匀而导致包封率下降,因此,选择无水乙醇和水的体积比定为 1:9。

**2.4.4 注入方法的考察** 注入方法分别设为一次快速注入法和缓慢自由滴入法,大豆磷脂、水飞蓟素和胆固醇质量比为 20:8:6,无水乙醇与水体积比为 1:9,搅拌 4h 制得 SM-L 并测得包封率分别为 (85.90±0.84)%、(85.43±0.76)% (n=3),结果无明显差异,但考虑到工艺简便性和节约时间成本,选择一次快速注入法作为注入方法。

**2.4.5 搅拌时间的考察** 设定搅拌时间分别为 1、2、3、4、5h,大豆磷脂、水飞蓟素和胆固醇质量比

为 20:8:6,无水乙醇与水体积比为 1:9,一次快速注入水中,制得 SM-L 并测定其包封率,测得包封率分别为 (72.45±0.43)%、(79.73±1.06)%、(84.56±1.12)%、(85.26±0.77)%、(85.40±0.61)% (n=3)。SM-L 的包封率随着搅拌时间的增加不断上升,但增长速度在 4h 后减缓,可能是由于无水乙醇已经挥发殆尽,继续搅拌包封率也不会有太大增长,结合时间成本,将搅拌时间定为 4h。

**2.5 Box-Behnken 响应面设计实验优化 SM-L 制备工艺及处方**

**2.5.1 Box-Behnken 响应面实验设计及结果** 应用 Design Expert 13.0 软件进行响应面设计,在前期单因素试验的基础上,以 SM-L 包封率 (Y<sub>1</sub>) 和 ζ 电位 (Y<sub>2</sub>) 为响应值,影响较为显著的大豆磷脂与水飞蓟素质量比 (20:X<sub>1</sub>)、大豆磷脂与胆固醇质量比为 (20:X<sub>2</sub>)、无水乙醇与水体积比 (1:X<sub>3</sub>) 3 个因素为考察对象,采取 3 因素 3 水平 Box-Behnken 响应面优化法,确定最佳制备工艺。考察因素水平、试验设计及结果见表 1。

表 1 Box-Behnken 响应面设计试验设计及结果

Table 1 Experimental design and results of Box-Behnken response surface

试验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub> /%	Y <sub>2</sub> /mV	试验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub> /%	Y <sub>2</sub> /mV	试验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub> /%	Y <sub>2</sub> /mV
1	9	6	8	88.66	-6.5	7	9	7	9	82.27	-6.3	13	8	6	9	86.49	-8.7
2	7	5	9	70.89	-6.1	8	8	5	8	79.54	-8.0	14	7	7	9	79.39	-5.7
3	8	7	10	84.29	-13.8	9	8	6	9	85.89	-10.2	15	7	6	8	83.84	-6.3
4	7	6	10	84.02	-12.2	10	8	6	9	84.24	-8.9	16	9	6	10	79.89	-12.8
5	9	5	9	74.74	-6.3	11	8	6	9	83.77	-8.9	17	8	5	10	79.45	-14.7
6	8	7	8	83.08	-6.8	12	8	6	9	86.91	-8.9						

**2.5.2 模型的建立及其显著性检验** 通过 Design-Expert 13.0 软件对表 1 数据进行拟合,得到方程为 Y<sub>1</sub>=85.46+0.93 X<sub>1</sub>+3.05 X<sub>2</sub>-0.93 X<sub>3</sub>-0.24 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>-2.24 X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>+0.32 X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-3.06 X<sub>1</sub><sup>2</sup>-5.58 X<sub>2</sub><sup>2</sup>+1.70 X<sub>3</sub><sup>2</sup>, Y<sub>2</sub>=-9.11-0.20 X<sub>1</sub>+0.31 X<sub>2</sub>-3.26 X<sub>3</sub>-0.09 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>-0.11 X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>-0.09 X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>+2.2 X<sub>1</sub><sup>2</sup>+0.82 X<sub>2</sub><sup>2</sup>-2.55 X<sub>3</sub><sup>2</sup>。方差分析见表 2。模型 P<0.05,具有显著性影响,而失拟项 P>0.05,表明失拟不显著。模型的相关系数(R<sup>2</sup>)分别为 0.903 5、0.983 0,调整确定系数(R<sub>adj</sub><sup>2</sup>)分别为 0.779 5、0.961 0,该模型与实际试验拟合程度良好,适用于分析和预测 SM-L 的制备。

**2.5.3 响应面分析** 通过 Design-Expert 13.0 软件对各因素之间的交互作用进行响应面分析,绘制响应面曲线图。结果如图 2、3 所示,响应曲面越陡

峭,对包封率和 ζ 电位的影响也越大。从图 2 中可以看出大豆磷脂与胆固醇质量比对包封率有显著影响,大豆磷脂与水飞蓟素质量比和无水乙醇与水体积比对包封率没有显著影响;从图 3 中可以看出无水乙醇与水体积比对 ζ 电位影响显著,大豆磷脂与胆固醇质量比和大豆磷脂与水飞蓟素质量比对 ζ 电位影响不显著,但是从图中可以看出有较为明显的交互作用。

**2.5.4 最佳工艺的确定和验证** 期望以 SM-L 包封率处于最大值,ζ 电位处于最小值为优化指标,通过 Design-Expert 13.0 软件分析,最终确定 SM-L 制备的最佳工艺条件为大豆磷脂、水飞蓟素和胆固醇的质量比为 20:7.94:6.21,无水乙醇和水的最佳比例为 1:10。在该条件下 SM-L 的理论包封率为

表 2 包封率和  $\zeta$  电位方差分析

Table 2 Variance analysis of encapsulation efficiency and  $\zeta$  potential

来源	自由度	$Y_1$				$Y_2$			
		离均差平方和	均方	F 值	P 值	离均差平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	293.713 1	32.634 8	7.283 7	0.007 9	134.225 5	14.913 9	45.037 7	<0.000 1
$X_1$	1	6.867 7	6.867 7	1.532 8	0.255 6	0.308 1	0.308 1	0.930 4	0.366 9
$X_2$	1	74.462 4	74.462 4	16.619 2	0.004 7	0.768 8	0.768 8	2.3216	0.171 4
$X_3$	1	6.990 3	6.990 3	1.560 2	0.251 8	84.955 6	84.955 6	256.552 2	<0.000 1
$X_1X_2$	1	0.235 1	0.235 1	0.052 5	0.825 4	0.032 4	0.032 4	0.097 8	0.763 5
$X_1X_3$	1	19.989 1	19.989 1	4.461 4	0.072 6	0.046 2	0.046 2	0.139 6	0.719 7
$X_2X_3$	1	0.422 0	0.422 0	0.094 2	0.767 9	0.032 4	0.032 4	0.097 8	0.763 5
$X_1^2$	1	39.459 9	39.459 9	8.807 0	0.020 9	20.467 0	20.467 0	61.807 2	0.000 1
$X_2^2$	1	130.881 0	130.881 0	29.211 3	0.001 0	2.812 2	2.812 2	8.492 4	0.022 5
$X_3^2$	1	12.224 9	12.224 9	2.728 4	0.142 6	27.277 0	27.277 0	82.372 2	<0.000 1
残差	7	31.363 5	4.480 5			2.318 0	0.331 1		
失拟项	3	23.640 3	7.880 1	4.081 3	0.103 9	0.720 3	0.240 1	0.601 1	0.647 7
纯误差	4	7.723 2	1.930 8			1.597 7	0.399 4		
总差	16	325.076 5				136.543 5			

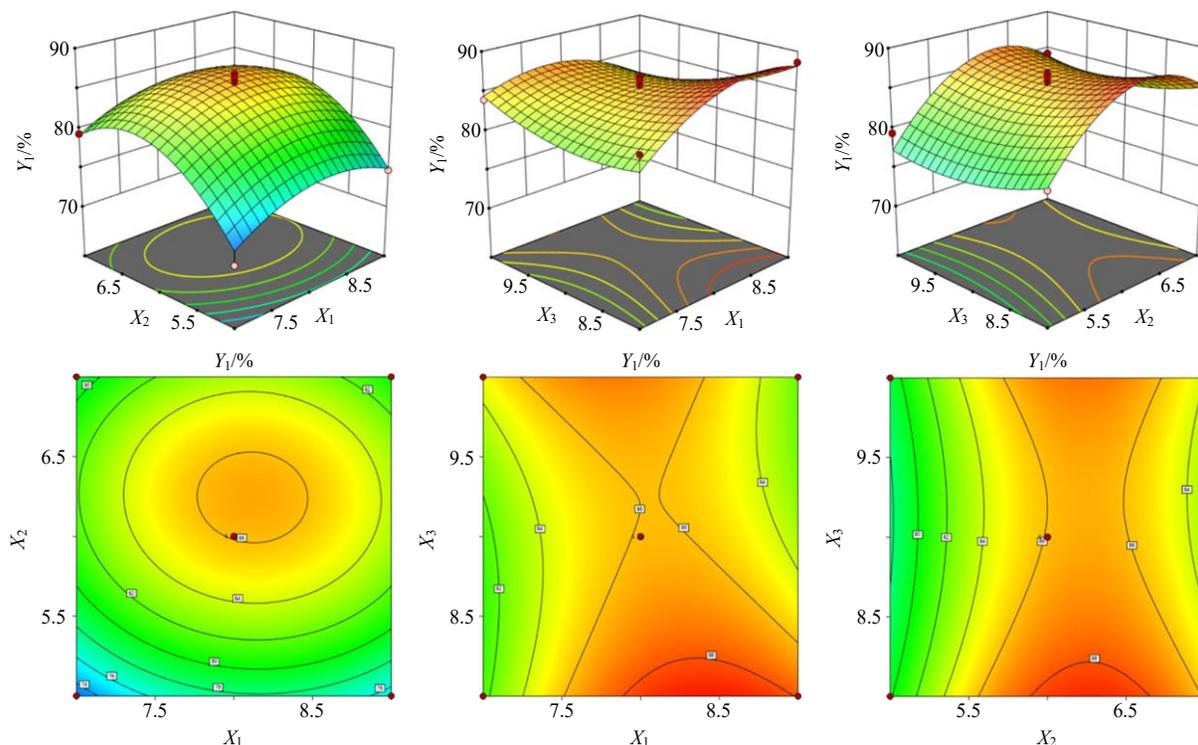


图 2 基于响应曲面法不同因素对包封率的影响

Fig. 2 Effects of different factors on encapsulation efficiency based on response surface method

86.77%，理论  $\zeta$  电位为-14.8 mV，说明利用 Box-Behnken 建立的模型是合理的。

对结果进行验证，重复 3 次，SM-L 的包封率为  $(85.44 \pm 0.87)\%$  ( $n=3$ )， $\zeta$  电位为  $(-14.1 \pm 0.3)$  mV ( $n=3$ )，说明该模型所得结果可靠。

## 2.6 SM-L 的质量评价

**2.6.1 外观形态** SM-L 外观澄清透明，有淡蓝色乳光，如图 4-a 所示。将 SM-L 溶液滴入铜网，然后用 2%磷钨酸染色，干燥后置于透射电镜下观察。结果如图 4-b 所示，SM-L 为类球形或类椭圆形球

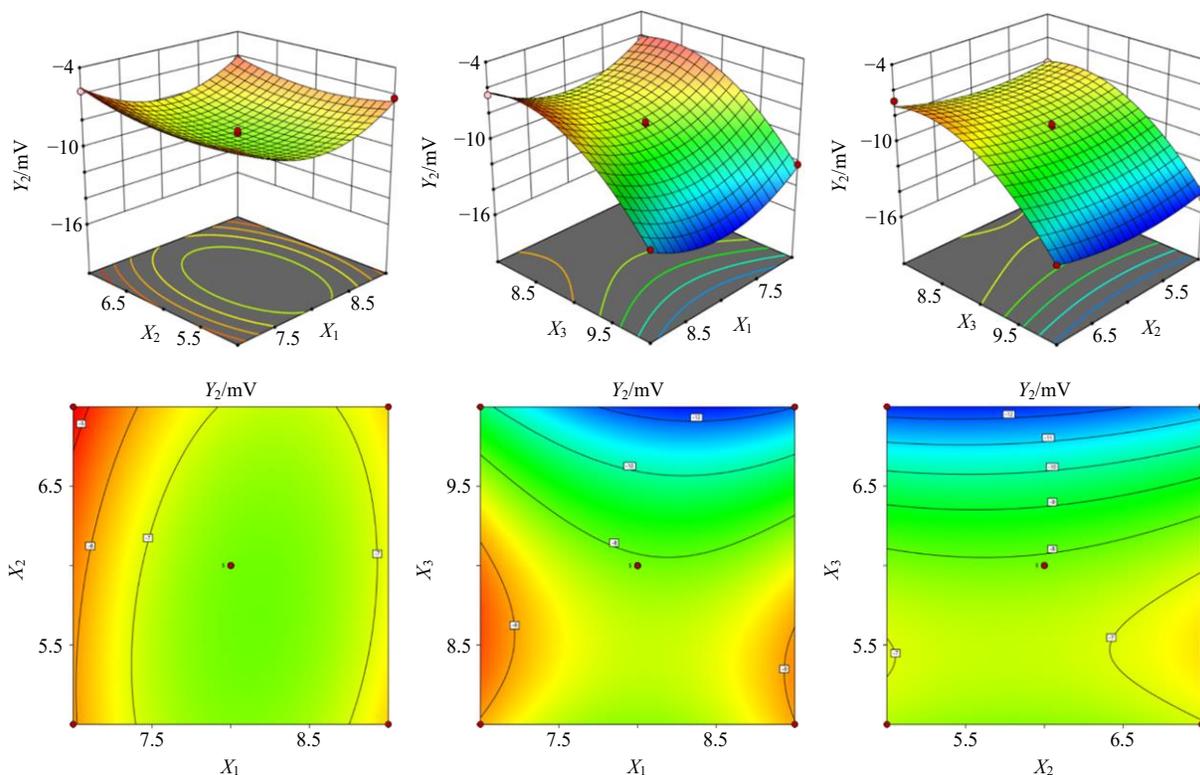


图3 基于响应曲面法不同因素对 $\zeta$ 电位的影响

Fig. 3 Effects of different factors on  $\zeta$  potential based on response surface method

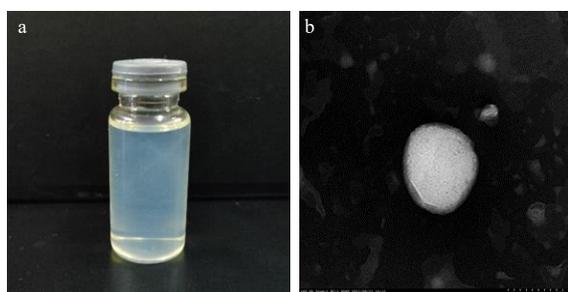


图4 SM-L的外观 (a) 和 TEM 图 (b)

Fig. 4 Appearance (a) and TEM (b) of SM-L

体, 有明显层膜结构。

**2.6.2 粒径与 $\zeta$ 电位** 制备3批SM-L, 激光粒度分析仪测定粒径、 $\zeta$ 电位及多分散系数(PDI), 结果见图5。SM-L平均粒径为 $(133.80 \pm 2.13)$  nm ( $n=3$ ), PDI为 $0.134 \pm 0.020$  ( $n=3$ ), 平均 $\zeta$ 电位为 $(-14.1 \pm 0.3)$  mV ( $n=3$ ), 说明SM-L分布均一, 质量较稳定。

**2.6.3 DSC分析** 为了增加SM-L的稳定性, 将SM-L制备为SM-L冻干粉, 添加1%甘露醇作为冻干保护剂, 冻干条件是降温速度为20 K/min, 降至 $-50$  °C, 预冻6 h, 压力9 Pa, 搁板温度 $-15$  °C, 冷冻干燥48 h。另按处方混合大豆磷脂、水飞蓟素、胆固醇和甘露醇作为物理混合物(比例约为20:

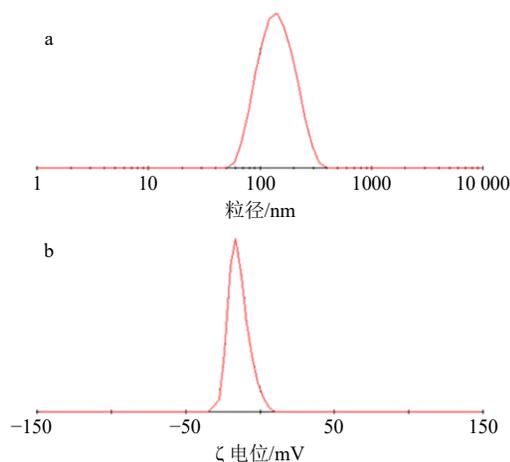


图5 SM-L的粒径分布 (a) 和 $\zeta$ 电位 (b)

Fig. 5 Particle size distribution (a) and  $\zeta$  potential diagram (b) of SM-L

7.94 : 6.21 : 100)。以空白坩埚为参比, 氮气为保护气体, 气体体积流量为50 mL/min, 升温范围为 $-20 \sim 300$  °C, 升温速率为10 °C/min。对水飞蓟素、大豆磷脂、胆固醇、甘露醇、SM-L冻干粉和物理混合物进行DSC分析。

结果如图6所示, 物理混合物的DSC曲线中甘露醇、胆固醇和水飞蓟素在168、149、153 °C处分别有明显吸热峰, 大豆磷脂在233、266 °C等多处

有吸热峰。在 SM-L 的曲线中甘露醇的吸热峰仍存在，而水飞蓟素、胆固醇和大豆磷脂的吸热峰消失，并且在 155 °C 处有新的吸热峰出现，说明水飞蓟素

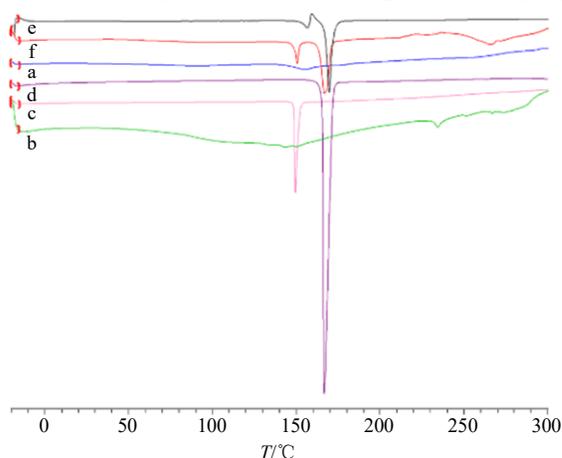


图 6 水飞蓟素 (a)、大豆磷脂 (b)、胆固醇 (c)、甘露醇 (d)、SM-L 冻干粉 (e) 和物理混合物 (f) 的 DSC 扫描分析图  
Fig. 6 DSC scanning analysis diagram of silymarin (a), soybean lecithin (b), cholesterol (c), mannitol (d), SM-L lyophilized powder (e) and physical mixture (f)

与大豆磷脂、胆固醇之间并不是简单的物理混合，而是发生了相互作用，水飞蓟素被包埋在大豆磷脂的双层结构中形成载药脂质体<sup>[16]</sup>。

**2.6.4 初步稳定性考察** 将新制备的 SM-L 溶液置于常温常压环境中密封保存，分别于第 0、30、90、180 天取出，拍照记录外观变化，并分别测定粒径、载药率和包封率，通过外观、粒径和包封率的变化初步考察 SM-L 的常温放置稳定性。结果如图 7 和表 3 所示，实验表明，30 d 内 SM-L 常温常压下稳定性良好。

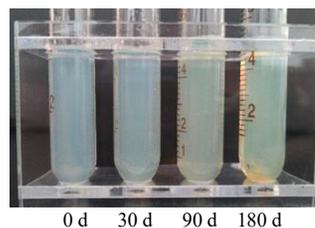


图 7 SM-L 初步稳定性考察外观变化  
Fig. 7 Appearance change diagram of SM-L preliminary stability inspection

表 3 常温常压下 SM-L 初步稳定性考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Preliminary stability inspection of SM-L in normal temperature and pressure ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

储藏时间/d	外观	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药率/%
0	澄清透明，明显蓝色乳光现象	133.8±2.1	0.134±0.024	85.28±0.73	19.83±0.17
30	澄清透明，明显蓝色乳光现象	141.2±1.4	0.107±0.131	83.43±0.23	19.40±0.05
90	澄清透明，有蓝色乳光现象，溶液颜色微黄	145.3±1.3	0.112±0.080	77.41±1.04	18.00±0.24
180	上部澄清透明，有蓝色乳光现象，颜色微黄，底部出现黄色沉淀	172.7±2.8	0.109±0.146	47.60±0.81	11.07±0.19

## 2.7 SM-L 体外经皮渗透实验

**2.7.1 离体大鼠皮肤的制备** 取体质量 (200±20) g 的健康雄性 SD 大鼠，脱颈处死，剥离腹部皮肤，刮去皮下组织及脂肪，清除表皮毛发，生理盐水反复冲洗，4 °C 保存备用。

**2.7.2 体外经皮渗透实验** 体外经皮渗透试验采用 Franz 扩散池法，将离体皮肤角质层朝上，真皮层朝下，固定在供药池与接收池之间，封口膜密封。接收池内加入 15%乙醇生理盐水溶液，供药池分别加入水飞蓟素混悬液 (加入适量聚山梨酯 80 和无水乙醇增溶)、SM-L 溶液和处方比例物理混合物 (大豆磷脂、水飞蓟素和胆固醇比例约为 20 : 7.94 : 6.21) 混悬液各 1 mL (各溶液中含有水飞蓟素约 794 μg)，维持 37 °C 水浴，转速 300 r/min。分别于 4、8、12、18、24、36 h 取样 0.5 mL 至 1 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，过 0.22 μm 微孔滤膜，测定水飞蓟素含量，计算皮肤透过率。

在不同的取样时间将皮肤取出，回收供给池上剩余样品后将皮肤清洗干净，剪去多余部分的皮肤，剪碎后加入 15%乙醇生理盐水 0.5 mL 进行匀浆，匀浆液 9800 r/min 离心 30 min (离心半径 12 cm)，取上清液至 1 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，过 0.22 μm 微孔滤膜，测定水飞蓟素含量，计算药物的皮肤滞留率。

如图 8 所示，SM-L 和物理混合物在 36 h 内的皮肤透过率为 (14.58±6.37)%、(0.08±0.03)%，皮肤滞留率为 (65.80±4.04)%、(6.28±0.66)%，而水飞蓟素组在相同实验条件下，各部分水飞蓟素含量低于检测限，未能检测到其透皮量。实验结果表明，水飞蓟素经皮渗透性差，含量无法准确测定；由于物理混合物中的大豆磷脂和胆固醇起到了表面活性剂的作用，增强了皮肤细胞的膜通透性，使水飞蓟素透皮率稍有提高，但是效果不明显；而 SM-L 皮肤透过性良好，相较于物理混合物有显著的提高。

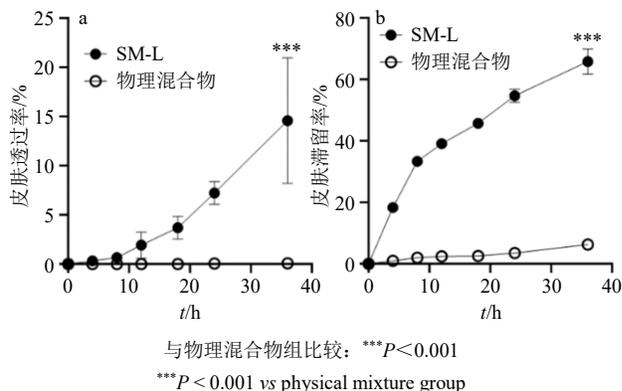


图 8 SM-L 与物理混合物皮肤透过率 (a) 和皮肤滞留率 (b) 比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Comparison of skin transmittance (a) and retention rate (b) of SM-L and physical mixture ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 2.8 HaCaT 细胞增殖实验

将 HaCaT 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板中, 空白组加无细胞空白培养基 100  $\mu\text{L}$ 。24 h 后弃去培养基, 分别加含有水飞蓟素、SM-L、空白脂质体的培养基 200  $\mu\text{L}$ , 平行 6 孔, 阴性对照组加入等量培养基。48 h 后每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ , 孵育 4 h, 弃去培养基, 加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 在 490 nm 波长处测定各孔吸光度 ( $A$ ) 值。细胞增殖率计算公式如下。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白}}) - 1$$

如图 9 所示, 不同质量浓度的水飞蓟素溶液和 SM-L 对 HaCaT 细胞均有增殖作用, 随着水飞蓟素质量浓度的升高呈现先上升后下降的趋势。水飞蓟素质量浓度为 5、10、25  $\mu\text{g/mL}$  时, SM-L 组对 HaCaT

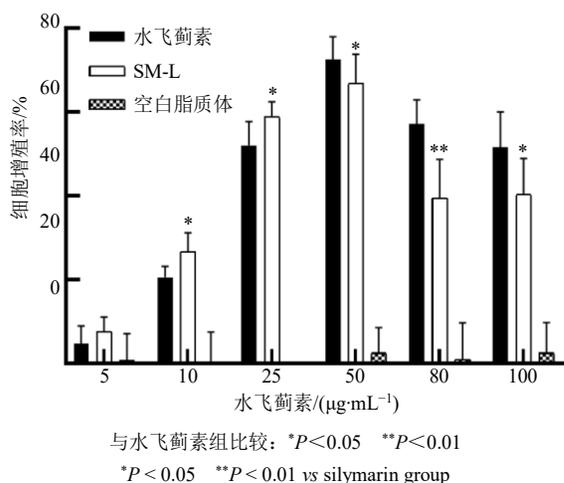


图 9 水飞蓟素和 SM-L 对 HaCaT 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 9 Effects of silymarin and SM-L on proliferation of HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

细胞增殖作用强于水飞蓟素组; 水飞蓟素质量浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  时, 水飞蓟素和 SM-L 对细胞增殖作用达到最大值, 而 SM-L 组的细胞增殖作用开始低于水飞蓟素组; 水飞蓟素质量浓度为 80、100  $\mu\text{g/mL}$  时, 水飞蓟素组和 SM-L 组对 HaCaT 细胞增殖作用都呈下降趋势, 且 SM-L 组持续低于水飞蓟素组。

同时, 不同质量浓度的空白脂质体 (脂质含量与 SM-L 组相同) 对 HaCaT 细胞的增殖率影响极小, 基本可排除载体的影响。分析结果可知, SM-L 组对 HaCaT 细胞的增殖作用相较于水飞蓟素组更早达到峰值并开始减弱, 可能是由于脂质体结构增强了水飞蓟素的溶解性, 使水飞蓟素的生物利用度得到了提高, 更好地发挥了药效。

### 2.9 细胞划痕实验

将 HaCaT 细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 细胞长满后用 10  $\mu\text{L}$  枪头垂直于皿底划线, 每孔 3 道划痕, PBS 清洗 3 次, 实验组分别加入含水飞蓟素和 SM-L 的培养基 (水飞蓟素质量浓度分别为 5、10、25  $\mu\text{g/mL}$ ), 空白组加入空白培养基, 培养 24 h。观察 0、24 h HaCaT 细胞的愈合情况, 倒置显微镜下拍摄并用 Image J 软件分析划痕面积。按以下公式计算划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = (0 \text{ h 划痕面积} - 24 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积}$$

由图 10 可知, 空白组、水飞蓟素组和 SM-L 组的划痕在 24 h 内均呈现愈合趋势, 高质量浓度组的愈合程度较低浓度组更明显; 由图 11 可知, 随着水飞蓟素质量浓度的增加, 愈合率呈上升趋势, 与水飞蓟素质量浓度呈正相关, 水飞蓟素质量浓度为 25  $\mu\text{g/mL}$  时, SM-L 对 HaCaT 细胞的愈合率有极显著

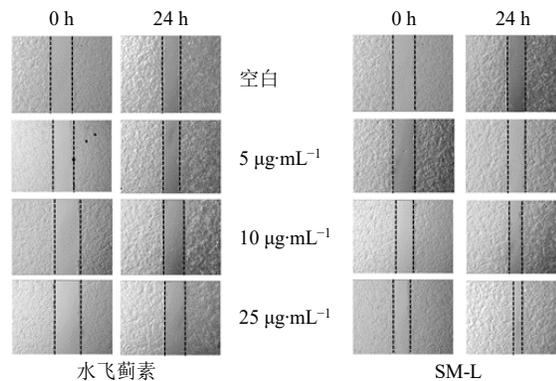
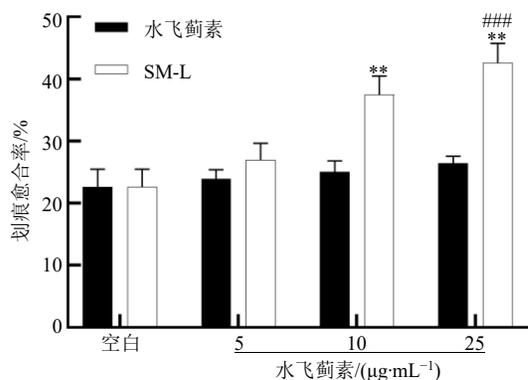


图 10 水飞蓟素和 SM-L 培养基中水飞蓟素质量浓度对 HaCaT 细胞划痕愈合的影响 ( $\times 10$ )

Fig. 10 Effects of different concentrations of SM and SM-L on scratch healing of HaCaT cells ( $\times 10$ )



与水飞蓟素组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与空白组比较: ### $P < 0.001$   
\*\* $P < 0.01$  vs silymarin group; ### $P < 0.001$  vs blank group

图 11 水飞蓟素和 SM-L 培养基中水飞蓟素质量浓度和 HaCaT 细胞划痕愈合率的关系 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 11 Relationship between silymarin concentration and scratch healing rate of HaCaT cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

影响 ( $P < 0.001$ ); 相同质量浓度下 SM-L 组划痕愈合率高于水飞蓟素组, 其中水飞蓟素质量浓度为 10、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, SM-L 组愈合率明显高于水飞蓟素组 ( $P < 0.01$ )。实验结果表明, 脂质体将水飞蓟素包埋后, 有效提高了水飞蓟素的生物利用度, 更好地促进了 HaCaT 细胞水平迁移, 有突出的角质修复作用。

### 2.10 细胞摄取实验

**2.10.1 ODA-FITC 的制备<sup>[17]</sup>** 考虑到水飞蓟素本身无荧光, 本实验以 ODA-FITC 为荧光探针考察 HaCaT 细胞对 SM-L 的摄取情况, ODA-FITC 为绿色荧光, 实验中选择 FITC 通道。精密称取 ODA 20 mg, FITC 28 mg, 溶于 6 mL 无水乙醇中, 磁力搅拌避光反应 24 h, 加足量水使产物析出, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 洗涤 2 次, 避光常温干燥, 即得。

**2.10.2 ODA-FITC-SM-L 和 ODA-FITC 脂质体的制备** 按处方称取大豆磷脂、水飞蓟素、胆固醇、ODA-FITC 10 mg, 1 mL 无水乙醇超声溶解, 快速注入 10 mL 蒸馏水中, 避光搅拌 4 h, 超滤法去除游离 ODA-FITC, 即得 ODA-FITC-SM-L。同法制备不含水飞蓟素的 ODA-FITC 脂质体。

### 2.10.3 HaCaT 细胞摄取实验

(1) 定性实验: 将 HaCaT 细胞  $5 \times 10^4$  个/皿接种于共聚焦培养皿中, 培养 24 h。分别加入含有 SM-L、ODA-FITC、ODA-FITC+水飞蓟素的混合物、ODA-FITC 脂质体、ODA-FITC-SM-L 培养基 (各组 ODA-FITC 质量浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 后继续孵育 1 h, PBS 清洗 3 次, 加入 400  $\mu\text{L}$  DAPI 染色液, 37  $^\circ\text{C}$  孵

育 10 min, 弃去染色液, PBS 清洗 3 次, 共聚焦显微镜下观察并拍照。

(2) 定量实验: 将 HaCaT 细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h。分别加入含有 SM-L、ODA-FITC、ODA-FITC+SM 的混合物、ODA-FITC 脂质体、ODA-FITC-SM-L 培养基 (各组 ODA-FITC 质量浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 后继续孵育 1 h, PBS 清洗 3 次, 胰酶消化后 PBS 重悬, 流式细胞术检测各组 FITC 荧光强度, 细胞计数 10 000 个, FlowJo 10.6.2 计算各组平均荧光强度。平行实验 3 次。

HaCaT 细胞对各组培养基中 ODA-FITC 的摄取情况见图 12、13。由图 12 可知, SM-L 本身无荧光, ODA-FITC 脂质体和 ODA-FITC-SM-L 处理的 HaCaT 细胞荧光强度较强; 图 13 表明, 流式细胞仪检测结果与荧光显微镜下观察到的结果一致, ODA-FITC 脂质体和 ODA-FITC-SM-L 处理的 HaCaT 细胞荧光强度有显著的提高 ( $P < 0.001$ ), 说明脂质体这一结构能够有效提高 HaCaT 细胞对水飞蓟素摄取量, 而 ODA-FITC-SM-L 组荧光强度略高于 ODA-FITC 脂质体组, 这可能与水飞蓟素能够提高 HaCaT 细胞的细胞活力<sup>[18]</sup>有关。

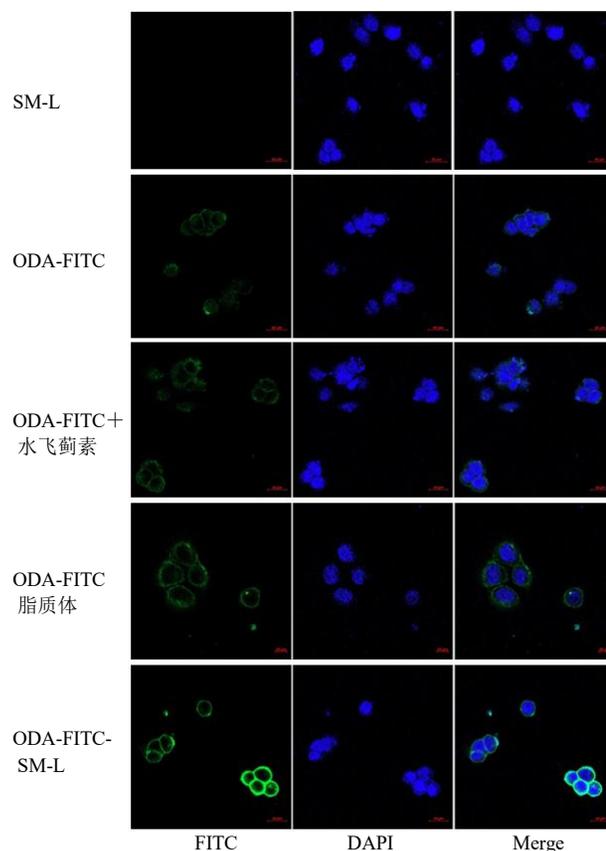
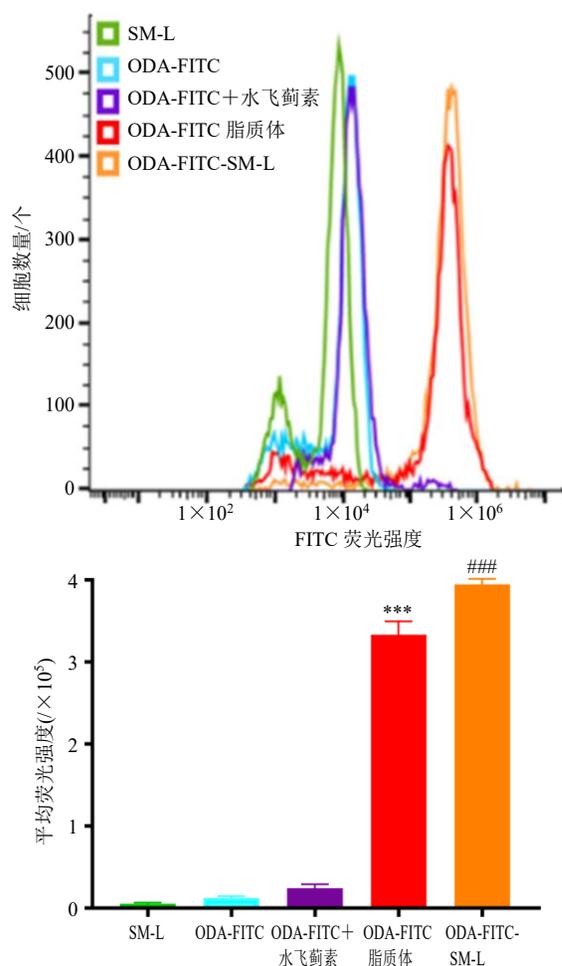


图 12 HaCaT 细胞摄取共聚焦图

Fig. 12 Confocal diagram of HaCaT cell uptake



与 ODA-FITC 组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 ODA-FITC+水飞蓟素组比较: ### $P < 0.001$   
\*\*\* $P < 0.01$  vs ODA-FITC group; ### $P < 0.001$  vs ODA-FITC + silymarin group

图 13 流式细胞术检测不同给药组 FITC 荧光强度 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Fig. 13 Detection of FITC fluorescence intensity in different administration groups by flow cytometry ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

### 3 讨论

脂质体的常规制备方法有薄膜分散法<sup>[19]</sup>、乙醇注入法<sup>[20]</sup>和反向蒸发法<sup>[21]</sup>等, 考虑到薄膜分散法、反向蒸发法等方法在制备过程中可能会残留毒性有机溶剂, 不利于后期护肤产品开发, 故本实验选择了安全而快捷的乙醇注入法作为制备方法。

在选择经皮渗透实验接收液时, 考察了水飞蓟素在含不同体积分数乙醇的生理盐水溶液<sup>[22]</sup>和 PBS 溶液中的溶解度, 结合不同体积分数无水乙醇对皮肤活力和组织结构的影响<sup>[23]</sup>, 最终选择了 15% 乙醇生理盐水; 水飞蓟素混悬液的透过层和皮肤滞留层中未检测到水飞蓟素的含量, 这可能是由于水飞蓟素皮肤透过性差, 且供药池样品中水飞蓟素总

量较少, 导致其含量低于检测限。在文献中也有类似情况出现, 如 Park 等<sup>[24]</sup>在对槲皮素和芦丁负载神经酰胺脂质体透皮性能的考察中, 槲皮素和芦丁的给药量高达 30 mg 和 60 mg, 但 24 h 后的总透过率仅为 2.48% 和 1.89%。SM-L 可以在皮肤中停留超过 24 h, 36 h 内水飞蓟素皮内滞留率达到了 65% 以上, 使水飞蓟素可以在皮肤中持续、稳定地发挥作用。

细胞摄取预实验中, 对 HaCaT 细胞摄取时间进行了考察, 发现摄取时间为 2 h 时, ODA-FITC 脂质体、ODA-FITC-SM-L 组 DAPI 染色区域向细胞膜弥散, 而 ODA-FITC、ODA-FITC+水飞蓟素组细胞核染色正常, 可能是因为 ODA-FITC 有一定细胞毒性, 相同摄取时间内脂质体提高了 HaCaT 细胞对 ODA-FITC 的摄取量, 影响了 HaCaT 细胞核的正常状态, 所以在正式实验中将摄取的时间定为 1 h, 避免 ODA-FITC 对实验结果的影响。

已有文献报道水飞蓟素或水飞蓟宾可减少长波紫外线刺激所导致的活性氧簇和核酸单链断裂的产生, 防止谷胱甘肽耗竭, 减少 Caspase-3 及其作用, 降低基质金属蛋白酶-1 和热激蛋白表达水平, 同时一定程度上促进了半胱氨酶的表达水平, 表明水飞蓟素和水飞蓟宾是非光毒性的, 并且具有长波紫外线光防护潜力<sup>[25]</sup>; Pientaweeratch 等<sup>[26]</sup>在考察余甘子、人心果和水飞蓟素的抗衰老作用时, 证明了水飞蓟素有较强的抗氧化和抗弹性蛋白酶的作用; Shin 等<sup>[27]</sup>证明了水飞蓟宾是水飞蓟花提取物抗糖基化的主要活性成分, 并且可以抑制皮肤中蛋白质的氧化, 起到抗衰老的作用。

综上所述, 本研究通过 Box-Behnken 响应曲面优化设计实验制备的 SM-L 粒径均一、稳定性较好、经皮渗透性好, 证明了 SM-L 对 HaCaT 细胞增殖和摄取具有促进作用, 并且具有提高水飞蓟素生物利用度的潜力, 后期将以此为基础针对 SM-L 的皮肤修复、抗光老化作用进行研究, 探究 SM-L 经皮给药的释药特性, 充分开发 SM-L 透皮制剂、护肤产品方面的应用价值<sup>[28-29]</sup>。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 刘立伟. 水飞蓟素的提取方法及药理活性研究进展 [J]. 河北北方学院学报: 自然科学版, 2019, 35(10): 51-56.
- [2] 邓茂, 李小芳, 陈慧娟, 等. 以茶皂素为天然乳化剂制备水飞蓟素纳米乳及其理化性质考察 [J]. 中草药,

- 2021, 52(21): 6528-6536.
- [3] Stephen R J M, Peddha M S, Srivastava A K. Effect of silymarin and quercetin in a miniaturized scaffold in wistar rats against non-alcoholic fatty liver disease [J]. *ACS omega*, 2021, 6(32): 20735-20745.
- [4] 陈菲, 艾国, 盛柳青, 等. 九味肝泰胶囊对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪肝的治疗作用 [J]. *中草药*, 2015, 46(09): 1338-1342.
- [5] 王伊宁, 张甜甜, 李玮萱, 等. 水飞蓟素的药理学研究进展 [J]. *药学研究*, 2021, 40(6): 397-399.
- [6] 王佳辉, 陈麟, 孙平, 等. 黄芩苷脂质体凝胶制备、质量评价及其对痤疮的药效学评价 [J]. *中草药*, 2021, 52(16): 4860-4872.
- [7] 朱顺耀, 来银芳, 李晓稳, 等. 唾液酸修饰绿原酸脂质体制备及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(24): 6178-6187.
- [8] 陈云云, 姚文栋, 谢先泽, 等. 载 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pH 敏感钙钾复合脂质体的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2020, 51(21): 5447-5453.
- [9] 刘爽, 陆海天, 康宁, 等. 水飞蓟素缓释制剂的研究进展 [J]. *广州化工*, 2021, 49(12): 4-6.
- [10] Tvrđý V, Pourová J, Jirkovský E, *et al.* Systematic review of pharmacokinetics and potential pharmacokinetic interactions of flavonolignans from silymarin [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(4): 2195-2246.
- [11] 刘剑桥, 孟莹, 朱艳华. 水飞蓟素缓释制剂的研究进展 [J]. *中国药房*, 2017, 28(28): 4011-4014.
- [12] Piazzini V, Micheli L, Luceri C, *et al.* Nanostructured lipid carriers for oral delivery of silymarin: Improving its absorption and *in vivo* efficacy in type 2 diabetes and metabolic syndrome model [J]. *Int J Pharm*, 2019, 572: 118838.
- [13] Chandika P, Oh G W, Heo S Y, *et al.* Electrospun porous bilayer nano-fibrous fish collagen/PCL bio-composite scaffolds with covalently cross-linked chitooligosaccharides for full-thickness wound-healing applications [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 121: 111871.
- [14] Gouda A, Sakr O S, Nasr M, *et al.* Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2021, 61: 102174.
- [15] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 85.
- [16] 张小雯, 孙敬蒙, 汪卓明, 等. Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 响应面法优化马来酸桂哌齐特脂质体的制备及表征 [J]. *医药导报*, 2021, 40(2): 240-247.
- [17] 王韵馨. 影响固体脂质纳米粒跨膜转运的制剂因素研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [18] 石玉生, 张艳, 马金龙, 等. 水飞蓟素对 UVB 致人角质形成细胞光老化保护作用的研究 [J]. *中医药信息*, 2013, 30(6): 36-39.
- [19] Gheybi F, Alavizadeh S H, Rezayat S M, *et al.* pH-sensitive PEGylated liposomal silybin: Synthesis, *in vitro* and *in vivo* anti-tumor evaluation [J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110: 3919-3928.
- [20] 吴倩倩. 脱氢水飞蓟宾磷脂复合物脂质体的制备及性能 [D]. 大连: 大连理工大学, 2015.
- [21] Ripoli M, Angelico R, Sacco P, *et al.* Phytoliposome-based silibinin delivery system as a promising strategy to prevent hepatitis C virus infection [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, 12: 770-780.
- [22] 李春雪, 曾锐, 高元平, 等. 粗茎秦艽醇提物内外经皮渗透性研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(11): 2914-2921.
- [23] 兰颐, 王琼, 安静, 等. 接受液中的乙醇浓度对药物体外透皮试验的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(16): 2597-2600.
- [24] Park S N, Lee M H, Kim S J, *et al.* Preparation of quercetin and rutin-loaded ceramide liposomes and drug-releasing effect in liposome-in-hydrogel complex system [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(3): 361-366.
- [25] Rajnochová Svobodová A, Gabrielová E, Michaelides L, *et al.* UVA-photoprotective potential of silymarin and silybin [J]. *Arch Dermatol Res*, 2018, 310(5): 413-424.
- [26] Pientaweeratch S, Panapisal V, Tansirikongkol A. Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and silymarin: An *in vitro* comparative study for anti-aging applications [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(9): 1865-1872.
- [27] Shin S, Lee J G, Kim M, *et al.* Anti-glycation activities of phenolic constituents from *Silybum marianum* (Milk Thistle) flower *in vitro* and on human explants [J]. *Molecules*, 2015, 20(3): 3549-3564.
- [28] 杨延音, 杨治国, 胡世国, 等. 水飞蓟素在皮肤科的功效及其在化妆品中的应用进展 [J]. *日用化学工业*, 2019, 49(4): 259-263.
- [29] Rajnochová Svobodová A, Zálešák B, Biedermann D, *et al.* Phototoxic potential of silymarin and its bioactive components [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2016, 156: 61-68.