

野黄芩素纳米晶体的制备及治疗慢性瘙痒模型药效评价

刘新颖^{1,2}, 王富江^{2*}, 葛海涛^{1,2*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 江苏苏中药业研究院有限公司, 江苏 南京 210031

摘要: **目的** 制备野黄芩素纳米晶体 (scutellarein nanocrystals, Scu-NCs), 进行药剂学性质研究, 并考察其对小鼠皮肤干燥瘙痒模型的治疗效果。**方法** 采用反溶剂沉淀技术制备 Scu-NCs, 并通过冷冻干燥技术将其固化成固体粉末; 测定 Scu-NCs 的平均粒径、分散系数、 ζ 电位并观察其微观结构; 差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 及傅里叶变换红外光谱法 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析其晶型及化学结构的变化; 测试其体外药物溶出速率和其凝胶剂的体外释放度; 评价野黄芩素及 Scu-NCs 凝胶剂经皮给药对丙酮/乙醚和水 (acetone-ether-water, AEW) 诱导的小鼠干皮瘙痒模型的止痒作用。**结果** 制备得到的 Scu-NCs 平均粒径为 (379.1 ± 1.7) nm, 多分散系数 (polydispersity index, PDI) 值为 0.238 ± 0.081 , ζ 电位为 (25.50 ± 0.25) mV; 野黄芩素纳米化后野黄芩素的晶型和化学结构未发生明显变化; Scu-NCs 冷冻干燥后粒径无明显变化; 野黄芩素纳米化后提高了药物 2 h 内的溶出速率、溶出度及 Scu-NCs 凝胶剂 6 h 内的体外释放度; 与 AEW 模型组相比, 野黄芩素、Scu-NCs 凝胶剂给药组可明显降低小鼠 1 h 内抓挠次数, 抑制颈背部表皮增厚及皮肤中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达, 且 Scu-NCs 对 AEW 模型抑制效果更明显。**结论** Scu-NCs 粒径较小且均匀, 其纳米化后晶型和化学结构没有发生明显改变; 将野黄芩素制备成纳米晶体后, 可明显改善药物的溶出度与体外释放度, 对皮肤局部慢性瘙痒具有更好的治疗效果。

关键词: 野黄芩素; 纳米晶体; 凝胶; 慢性瘙痒; 外用制剂; 反溶剂沉淀技术; 冷冻干燥技术; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子- α
中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)09-2946-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.09.009

Preparation of scutellarein nanocrystals and evaluation of its efficacy in treatment of chronic pruritus model

LIU Xinying^{1,2}, WANG Fujiang², GE Haitao^{1,2}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Suzhong Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Nanjing 210031, China

Abstract: Objective To prepare scutellarein nanocrystals (Scu-NCs), investigate their pharmaceutical characteristics and their therapeutic effects on a mouse model of dry and itchy skin. **Methods** The Scu-NCs were prepared by anti-solvent precipitation technique and solidified into solid powder by freeze-drying technique; The average particle size, dispersion coefficient, ζ potential, and microstructure of Scu-NCs were determined; Differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were used to analyze the changes in crystalline shape and chemical structure of Scu-NCs; The dissolution rate of the drug and the release degree of the gel *in vitro* were tested; and the itch-relieving effects of the transdermal administration of scutellarein and Scu-NCs gel on the mouse model of dry and itchy skin induced by acetone/ethyl ether and water (AEW) were evaluated. **Results** The average particle size of the prepared Scu-NCs was (379.1 ± 1.7) nm, the polydispersity index (PDI) value was 0.238 ± 0.081 , and the ζ potential was (25.50 ± 0.25) mV; The crystalline shape and chemical structure of scutellarein after nano conversion did not change

收稿日期: 2023-10-19

基金项目: 泰州市“凤城英才计划”青年科技人才托举工程; 南京中医药大学自然科学基金项目 (XZR2020099)

作者简介: 刘新颖 (1999—), 女, 硕士, 从事中药制药技术与产品开发研究。Tel: 13770824736 E-mail: liuxinying016@163.com

*通信作者: 葛海涛 (1974—), 男, 博士, 高级工程师, 从事中药新药研究及中药大品种二次开发研究。

Tel: 13851872795 E-mail: geht@suzhongyy.com

王富江, (1987—), 男, 博士, 高级工程师, 从事新药创新药研发研究。Tel: 18351834272 E-mail: wangfj@suzhongyy.com

significantly; There was no significant change in the particle size of Scu-NCs after freeze-drying; The nano conversion of scutellarein improved the drug dissolution rate within 2 h, dissolution degree and the release degree of the Scu-NCs gel *in vitro* within 6 h; Compared with the AEW model group, the scutellarein and Scu-NCs gel administration group could significantly reduce the number of scratching within 1 h, inhibit epidermal thickening of the nape of the neck and expression of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the skin, and the inhibitory effect of Scu-NCs was more obvious on the AEW model.

Conclusion The particle size of Scu-NCs was small and uniform, and there was no significant change in the crystal shape and chemical structure after its nano conversion; The preparation of scutellarein into nanocrystals significantly improved the dissolution and *in vitro* release degree of the drug, and provided a better therapeutic effect on local chronic itching of the skin.

Key words: scutellarein; nanocrystals; gel; chronic itching; external preparations; anti-solvent precipitation technique; freeze-drying technique; interleukin; tumor necrosis factor- α

黄芩 *Scutellariae Radix* 是一种被广泛应用于呼吸道感染、肝脏炎症、皮肤特别是上皮组织炎症性疾病的传统中药^[1]。野黄芩素是黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 中的主要黄酮类化合物之一,此外,野黄芩素也富含于治疗皮肤炎症性疾病的传统中药灯盏细辛 *Erigeron breviscapus* (Vant.) -Mazz. 和木蝴蝶 *Oroxylum indicum* (L.) Vent 中^[2-3],因此推测野黄芩素对皮肤炎症及瘙痒具有一定的治疗效果。但是,野黄芩素水溶性差、吸收率低、生物利用度极低^[4-5],因此限制了其在经皮给药领域的应用。剂型研究发现,纳米混悬液(又称纳米晶体、纳米结晶)载药量高、生物相容性好,可改善难溶性药物的溶解度和生物利用度^[6-7]。

慢性瘙痒是皮肤科疾病最常见的临床症状,常与特应性皮炎等病理性干燥皮肤病和肾病等系统性疾病有关,目前对其发病机制尚不十分清楚,且缺乏便捷有效的治疗方法^[8-10]。通过对小鼠采用丙酮/乙醚和水(acetone/ethyl ether and water, AEW)贯序涂抹的实验方法,可破坏皮肤屏障、增加经皮水分损失,引起皮肤干燥、瘙痒,这也是目前研究慢性瘙痒疾病比较经典的模型之一^[11-12]。

本研究采用反溶剂沉淀技术制备野黄芩素纳米晶体(scutellarein nanocrystals, Scu-NCs)混悬液^[13],将其冷冻干燥形成固体粉末后作为制剂中间体,并进行凝胶化,并考察 Scu-NCs 对小鼠 AEW 模型的治疗效果。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

Scientz-10N/D-80 ℃型冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司; Talos F200X G2 型透射电子显微镜(TEM)、Vanquish Core 型高效液相色谱仪,赛默飞世尔科技公司; RYJ-12B 型智能透皮仪,上海黄海药检仪器有限公司; Nano-ZS 型纳米激光

粒度仪,英国马尔文仪器有限公司; TGL-16c 型台式离心机,上海安亭科学仪器厂; KH7200DB 型数控超声波清洗机,昆山禾创超声仪器有限公司; ZKT-18F 型智能溶出仪,上海富科思分析仪器有限公司; RT-6100 型酶标分析仪,深圳雷杜生命科技股份有限公司; Q2000 型差示扫描量热仪,美国 TA 仪器公司; Alpha II 型傅里叶红外光谱仪,北京布鲁克科技有限公司。

1.2 实验药品

野黄芩素原料药,批号 047-09-20,质量分数 96.7%,江苏苏中药业研究院有限公司;卡泊三醇倍他米松软膏(calcipotriol betamethasone, Cal B),批号 C81922,爱尔兰利奥制药有限公司;泊洛沙姆(Poloxamer 188, P188, 批号 N20220205)、聚山梨酯 80(Tween-80, T80, 批号 20210904-01),南京威尔药业集团股份有限公司;十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),批号 C2131028,阿拉丁试剂(上海)有限公司;大豆卵磷脂,批号 202206041,上海太伟药业股份有限公司;聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone K30, PVP K30),批号 210601,安徽山河药用辅料有限公司;N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF, 批号 K95760602)、甲醇(批号 L121907224),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;无水乙醚(批号 20220630)、丙酮(批号 20180606),国药集团化学试剂有限公司;羟丙甲基纤维素(hydroxypropyl methyl cellulose, HPMC),批号 PDR504180,卡乐康包衣技术(上海)有限公司。

1.3 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 50 只,6 周龄,体重(20 $\pm$ 2) g,购自北京斯贝福生物技术有限公司;生产许可证号 SCXK(京)2019-0010。实验动物饲养于江苏苏中药业集团生物制药有限公司动物房,

饲养环境温度 (22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%~80%, 所有动物均正常饲养, 自由饮水、进食。本研究经过江苏苏中生物制药有限公司实验动物伦理委员会批准, 伦理审查批号为 SZSW-2023050901。

2 方法与结果

2.1 Scu-NCs 冻干粉的制备

采用反溶剂沉淀技术制备 Scu-NCs。精密称取处方量的野黄芩素原料药于烧杯中, 加入一定质量的 DMF 充分溶解, 另外称取处方量的卵磷脂加入到同一烧杯中, 加入一定质量的甲醇充分溶解卵磷脂, 取完全溶解的 SCU 和卵磷脂混合溶液过 0.22 μm 滤膜, 作为有机相; 取处方量的稳定剂溶解于纯水中, 充分溶胀后过 0.22 μm 滤膜, 作为水相。将 18 mL 水相置于冰水浴中, 在超声的条件下, 将 2 mL 有机相匀速滴入水相中, 加入过程中持续搅拌, 超声频率为 40 kHz, 超声时间为 2 min, 即得到 Scu-NCs 混悬液。

取上述 Scu-NCs 混悬液, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥机中预冻 12 h 后, 继续减压干燥 48 h, 即得到 Scu-NCs 冻干粉。

2.2 Scu-NCs 制备条件优化

2.2.1 稳定剂种类筛选 在“2.1”项工艺条件下, 将质量分数 0.2% 的稳定剂 (Poloxamer 188、HPMC、SDS、Tween-80、PVP K30) 引入水相, 单因素考察不同稳定剂对纳米晶体粒径及多分散系数 (polydispersity index, PDI) 的影响, 筛选纳米晶体制备时所用稳定剂种类。稳定剂种类筛选结果见表 1, 当选用稳定剂为 Poloxamer 188 时, 所制得 Scu-NCs 平均粒径较小 [(501.3 ± 1.4) nm] 的同时 PDI 值较低 (0.265 ± 0.016)。

2.2.2 正交试验优化处方 结合稳定剂种类筛选结果与预实验中纳米晶体制备过程中对粒径影响较大因素, 以水相中稳定剂的质量分数 (B), 有机相中

表 1 稳定剂种类对 Scu-NCs 的粒径、PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

稳定剂	平均粒径/nm	PDI
T80	$1\,179.8 \pm 9.4$	0.279 ± 0.036
SDS	619.2 ± 2.1	0.287 ± 0.036
HPMC	684.8 ± 4.2	0.230 ± 0.032
P188	501.3 ± 1.4	0.265 ± 0.016
PVP K30	873.4 ± 4.4	0.406 ± 0.014

野黄芩素质量分数 (A)、卵磷脂的质量分数 (C), 有机相中 DMF 与甲醇 ($V_{\text{DMF}}/V_{\text{甲醇}}$) 的体积比 (D) 为 4 个因素, 每个因素设置 3 个水平, 以平均粒径为筛选指标, 按 $L_9(3^4)$ 正交表设计实验方案, 进行 Scu-NCs 制备处方筛选。正交试验因素与水平及试验结果见表 2, 方差分析结果见表 3。

表 2 正交试验设计与结果

试验号	A/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	B/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	C/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	D	平均粒径/ nm
1	10 (1)	1 (1)	10 (1)	1 : 5 (1)	424.80
2	10 (1)	2 (2)	30 (2)	1 : 3 (2)	467.27
3	10 (1)	3 (3)	50 (3)	1 : 1 (3)	578.26
4	20 (2)	1 (1)	30 (2)	1 : 1 (3)	519.53
5	20 (2)	2 (2)	50 (3)	1 : 5 (1)	546.77
6	20 (2)	3 (3)	10 (1)	1 : 3 (2)	598.30
7	30 (3)	1 (1)	50 (3)	1 : 3 (2)	626.47
8	30 (3)	2 (2)	10 (1)	1 : 1 (3)	550.57
9	30 (3)	3 (3)	30 (2)	1 : 5 (1)	652.60
K_1	1 470.33	1 570.80	1 573.67	1 624.17	
K_2	1 664.60	1 564.61	1 639.40	1 692.04	
K_3	1 829.64	1 829.16	1 751.50	1 648.36	
R	359.31	264.55	177.83	67.87	

表 3 方差分析

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	21 564.745 6	2	27.337 8	$P < 0.05$
B	15 197.212 0	2	19.265 6	$P < 0.05$
C	5 390.039 1	2	6.833 0	
D	788.826 2	2	1.000 0	

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$ 。

根据表 2 中极差值可知, 各因素对 Scu-NCs 平均粒径影响的顺序为 $A > B > C > D$, 说明有机相中野黄芩素质量分数对 Scu-NCs 粒径影响最大。根据考察指标平均粒径, 选择平均粒径小的处方, 即 $A_1B_2C_1D_1$, 正交试验所得最佳工艺参数为水相中 P188 质量分数为 2 mg/g, 有机相中野黄芩素、卵磷脂质量分数为 10 mg/g, 有机相中 $V_{\text{DMF}}/V_{\text{甲醇}}$ 比例为 1 : 5。

2.2.3 处方工艺验证 采用“2.2.2”项下确定的处方制备 Scu-NCs 混悬液及冻干粉各 3 批, 分别将新制备的 Scu-NCs 混悬液及复溶后的 Scu-NCs 冻干粉稀释 10 倍, 使用激光粒度仪测定平均粒径, 分散系

数及 ζ 电位。测定参数：室温；水折光率 1.33；野黄芩素折光率 1.59。由检测结果可知，Scu-NCs 混悬液冻干前后平均粒径及分散系数变化不大，多分散系数均 <0.30 ，表明 Scu-NCs 粒度分布较窄，分散性良好，黏附和聚集情况较少^[14]；Scu-NCs 混悬液冻干后 ζ 电位变小，但均 >20 mV，表明 Scu-NCs 稳定性较好^[15]。粒径、PDI、 ζ 电位检测结果显示，3 批 Scu-NCs 混悬液及冻干粉制备处方工艺稳定，重复性良好，实验结果见表 4。

表 4 Scu-NCs 混悬液及冻干粉粒径、分散系数及 ζ 电位
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Particle size, PDI, and ζ potential of Scu-NCs suspension and lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)			
制剂	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
Scu-NCs 混悬液	379.1 $\pm$ 1.7	0.238 $\pm$ 0.081	25.50 $\pm$ 0.25
Scu-NCs 冻干粉	385.9 $\pm$ 1.0	0.237 $\pm$ 0.030	21.30 $\pm$ 0.08

2.3 外观形态观察

将 1 滴 Scu-NCs 悬浮液滴加在铜网上，用 2% 磷钨酸染色 2 min，在 TEM 下观察 Scu-NCs 的大小和形态。由图 1 可知，Scu-NCs 呈棒状规则晶体形态，分散性良好，其粒径相比于野黄芩素原料药显著减小，在 300~500 nm。

2.4 晶形及结构

2.4.1 差示扫描量热分析 (differential scanning calorimetry, DSC) 将野黄芩素、Scu-NCs、空白辅料及处方量比例的野黄芩素、泊洛沙姆、卵磷脂物理混合物用差示扫描量热仪分别测定其吸热峰。测定条件：参比物 Al_2O_3 ；气氛： N_2 ；升温程序：初温 25 $^{\circ}C$ ，终温 280 $^{\circ}C$ ，升温速率 10 $^{\circ}C/min$ 。DSC 图谱见图 2，由图可知，野黄芩素原料药无明显峰，空白辅料在 50 $^{\circ}C$ 左右有 1 个吸热峰，野黄芩素物理混合物及 Scu-NCs 除 50 $^{\circ}C$ 左右空白辅料吸热峰

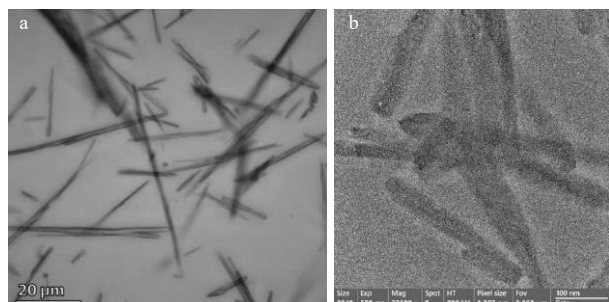


图 1 野黄芩素原料药 (a) 和 Scu-NCs (b) 的微观形貌
Fig. 1 Microstructure of scutellarein active pharmaceutical ingredients (a) and Scu-NCs (b)

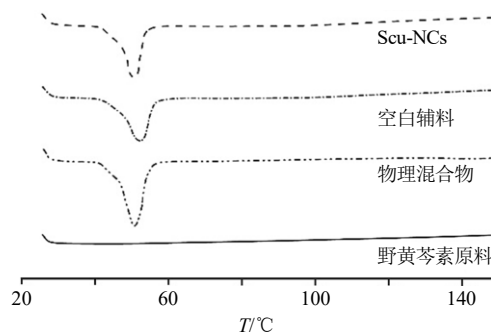


图 2 野黄芩素、Scu-NCs、野黄芩素物理混合物及空白辅料 DSC 图谱
Fig. 2 DSC mapping of scutellarein, Scu-NCs, scutellarein physical mixtures, excipients

外无特别明显的峰。结果表明，野黄芩素纳米晶化后晶型没有发生明显变化，仍以晶体形式存在。

2.4.2 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析 将野黄芩素和 Scu-NCs 压片后分别用红外光谱仪进行测定。取少量待测样品，碾碎后加入溴化钾 (KBr) 混合均匀、研磨后压片。红外光谱测定扫描范围 4 000~500 cm^{-1} 。分别对野黄芩素、Scu-NCs 进行红外光谱分析，检测结果如图 3 所示，Scu-NCs 的酚羟基 (OH 伸缩振动峰，3 294.10、2 888.74、2 360.13 cm^{-1}) 发生了一定程度的蓝移，推测是由于 Scu-NCs 形成过程中，野黄芩素与辅料分子之间形成氢键作用。此外，Scu-NCs 相较野黄芩素其他特征峰的峰形和位置基本相似，说明野黄芩素纳米化后化学结构没有发生明显改变。

2.5 溶出度考察

2.5.1 野黄芩素含量测定方法

(1) 色谱条件：Agilent C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm，5 μm)；流动相为乙腈-磷酸盐溶液 (pH 3.0 的 0.02 mol/L 磷酸二氢钠溶液) (25 : 75)；柱温

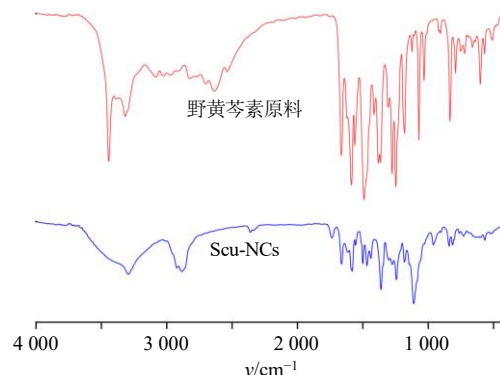


图 3 野黄芩素、Scu-NCs 的 FTIR 图
Fig. 3 FTIR spectra of scutellarein and Scu-NCs

35 ℃；检测波长 336 nm；体积流量 1.0 mL/min；进样体积 20 μ L。

(2) 线性关系考察：精密称取野黄芩素对照品 20 mg 于量瓶中，加入甲醇超声溶解后定容摇匀，用甲醇将对照品溶液稀释成质量浓度分别为 12、16、20、24、28 μ g/mL 的系列梯度溶液。精密称取上述不同质量浓度梯度溶液，HPLC 测定含量，以峰面积 (A) 为纵坐标，质量浓度 (C) 为横坐标，得标准曲线方程 $A=0.9608C-0.3381$ ， $r=0.9997$ ，线性范围为 12~28 μ g/mL。

2.5.2 溶出度检测方法 分别称取 Scu-NCs 冻干粉与相同处方物理混合物，选择桨法评价其体外溶出行为^[16]，转速为 100 r/min，溶出介质为含 SDS 浓度为 10 mg/mL 的 pH 6.8 磷酸盐水溶液，溶出体积为 900 mL，温度为 (37.0 ± 0.5) ℃。分别于第 5、15、30、45、60、90、120 分钟取 10 mL 溶出介质，同时补充等体积等温度空白介质。取样后用 0.22 μ m 滤膜滤过，用 HPLC 法计算药物溶出度，绘制溶出度-时间曲线。结果如图 4 所示，与野黄芩素相比，Scu-NCs 溶出速率显著增加，2 h 内溶出度显著增加。Scu-NCs 在 5 min 时累积溶出度达到 72.50%，15 min 时累积溶出度达到 83.89%，而野黄芩素原料药 5、15 min 累积溶出度分别为 10.39%、21.84%。120 min 时野黄芩素原料药累积溶出度只有 30.50%，而 Scu-NCs 可达到 85.64%，是野黄芩素原料的 2.8 倍。结果表明，野黄芩素制备成纳米晶体可明显改善药物的溶出度，提高药物溶出速率。

2.6 野黄芩素凝胶的制备

2.6.1 Scu-NCs 凝胶及野黄芩素凝胶制备 称取 0.3%

的卡波姆于适量纯化水溶胀 24 h，称取不同浓度的 Scu-NCs 及野黄芩素于适量纯化水中分散均匀后加入到溶胀后的卡波姆中，加入 8% 丙二醇、0.3% 三乙醇胺、10% 甘油、0.1% 羟苯甲酯及处方量纯化水后搅拌均匀，即得到野黄芩素质量分数为 10、20、40 mg/g 的 Scu-NCs 凝胶和野黄芩素凝胶。

2.6.2 体外释放度考察 使用 Franz 扩散池在 35 ℃ 条件下考察野黄芩素、Scu-NCs 凝胶剂及 Scu-NCs 纯水混悬液通过尼龙膜 (0.22 μ m) 的体外释放度^[16]。扩散面积为 2.2 cm²，接收池体积为 8.0 mL，使用 pH 6.8 磷酸盐水溶液/PEG400 (体积比 1:1) 的混合物作为渗透介质，磁力搅拌器的转速为 500 r/min。精密称取野黄芩素及 Scu-NCs 制备的凝胶剂 200 mg 涂敷于尼龙膜上，于实验开始后 1、2、3、4、5、6 h 于接收池中取样 150 μ L，并同时补充等体积等温度空白介质。用 HPLC 法计算药物释放度，绘制累积释放度曲线。图 5 显示了 3 种制剂 6 h 内体外释放曲线，Scu-NCs 混悬液组体外释放速度于实验开始 2 h 内较快，3 h 左右变得缓慢；Scu-NCs 凝胶组体外释放速度 1~6 h 内较均匀；Scu-NCs 混悬液及 Scu-NCs 凝胶剂实验 6 h 内累积释放度分别为 162.38、152.46 μ g/cm²，而野黄芩素凝胶剂渗透非常缓慢，6 h 内累积释放度为 0.94 μ g/cm²。结果表明，未经处理过的野黄芩素粗粉体外释放效率低，药物纳米结晶化可增加药物体外释放度，Scu-NCs 凝胶化有助于延缓药物的释放，起到缓释作用。

2.7 药效考察

2.7.1 动物分组、建立模型与给药 50 只 BALB/c 小鼠随机分为空白组，模型组，空白凝胶组，阳性

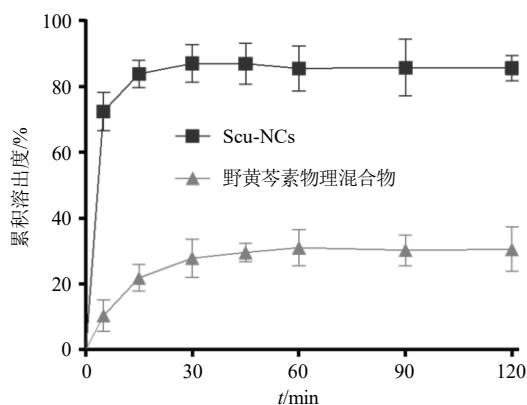


图 4 野黄芩素物理混合物和 Scu-NCs 溶出曲线 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Dissolution curves of scutellarein physical mixture and Scu-NCs ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

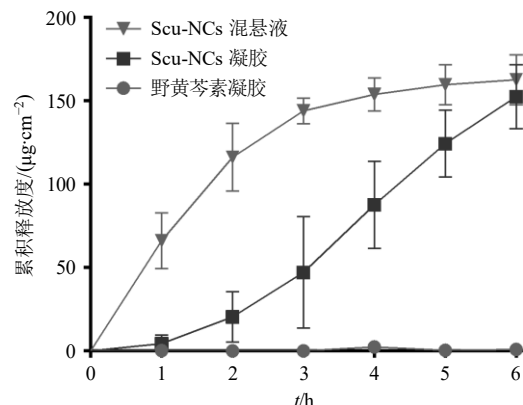


图 5 野黄芩素、Scu-NCs 凝胶剂及 Scu-NCs 混悬液体外渗透曲线 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 5 In vitro permeation curves of scutellarein, Scu-NCs gel and Scu-NCs suspension liquid ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

药组,野黄芩素凝胶 1%、2%、4%剂量组,Scu-NCs 凝胶 1%、2%、4%剂量组,每组 5 只。实验前 2 d 剃除小鼠颈背部约 2 cm×3 cm 面积区域毛发。空白组除外,其余各组于每天 8:00 时和 16:00 时用浸泡过丙酮乙醚混合液(acetone and ethyl ether, AE, $V_{\text{丙酮}}:V_{\text{乙醚}}=1:1$)的棉片于小鼠剃毛区域涂敷 15 s,再使用浸泡过超纯水的面片于同一部位涂敷 30 s,空白组小鼠使用纯水进行处理,每天 2 次,连续 7 d^[17];下午造膜处理 90 min 后,各剂量给药组分别给予含量 1%、2%、4%野黄芩素凝胶及野黄芩素纳米结晶

凝胶 60 mg,阳性药组给予卡泊三醇倍他米松软膏 60 mg,空白凝胶组给予空白凝胶 60 mg,空白组使用纯水涂抹小鼠皮肤,连续处理 7 d。

2.7.2 各组小鼠背部皮肤观察 各组小鼠实验第 7 天造模及给药区域皮肤皮损情况见图 6,对比发现,空白对照组小鼠背部皮肤较光滑,AEW 组及空白凝胶组相较于空白对照组出现严重的皮肤干燥、结痂、鳞屑,阳性药及各给药组较模型组皮损情况有所减轻,相较于各浓度野黄芩素凝胶组,阳性药组及 1%、2%、4% Scu-NCs 凝胶组皮肤结痂及鳞屑较少。

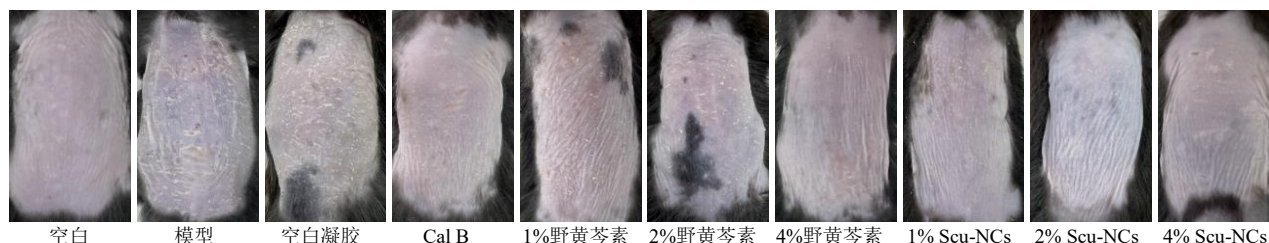


图 6 实验第 7 天各组小鼠背部皮肤情况

Fig. 6 Skin condition on back of mice in each group on day 7 of experiment

2.7.3 小鼠瘙痒行为学观察 通过小鼠 1 h 内抓挠行为次数的对比来评价瘙痒的严重程度。实验第 7 天上午 10:00 时,将各只小鼠单独放置于透明观察笼内,等待 20 min 让小鼠适应陌生环境。通过摄像记录小鼠 1 h 内的抓挠行为,由不知情人员统计小鼠的抓挠次数。一次抓挠行为指的是小鼠抬起后爪抓挠颈背部造膜及给药部位的一次或多次动作,前爪及后爪对其他部位的抓挠动作不计。小鼠 1 h 内抓挠次数,如表 5 所示,与空白对照组相比,AEW 模型组及空白凝胶组由瘙痒引起的抓挠行为显著增加($P<0.001$)。相较于 AEW 模型组,阳性药组及低、中、高剂量野黄芩素、Scu-NCs 凝胶组由瘙痒引起的抓挠行为显著减少($P<0.001$)。进一步比较

相同浓度 Scu-NCs 凝胶组与野黄芩素凝胶组小鼠,1 h 内 Scu-NCs 凝胶组抓挠次数明显减少。

2.7.4 皮肤组织病理检测 实验第 8 天,颈椎脱臼法处死各组小鼠,取小鼠颈背部造膜区域皮肤,10%福尔马林溶液固定 48 h 以上,常规脱水处理、石蜡包埋并进行 3 μm 切片,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H&E)染色,光学显微镜下观察皮肤组织病理变化,拍照后应用 Image J 软件分析表皮厚度。由图 7 可知,空白组小鼠背部皮肤结构较完整,角质层、表皮层无增厚,表皮平坦,真皮层炎症细胞浸润较少;模型组出现了明显的表皮层增厚,角质层广泛角化过度及角化不全,表皮不平坦,呈波浪状起伏,炎症细胞浸润增多现象;各给药组表皮层增厚现象减轻,表皮较平坦,除低剂量给药组,其余给药组炎症细胞浸润减少。

表皮厚度的增加是 AEW 模型成功的标志。由表 6 可知,AEW、blank gel、1%野黄芩素、2%野黄芩素组与空白对照组表皮厚度相比具有统计学差异($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),其余各组与空白对照组相比无统计学差异;与野黄芩素组相比,相同浓度下 Scu-NCs 组表皮厚度较小但无统计学差异;浓度为 1% Scu-NCs 组与浓度为 4%野黄芩素组表皮厚度相当;在浓度为 4%时,Scu-NCs 组表皮厚度小于阳性对照组。这表明,野黄芩素原料药制成纳米晶体后药效更好,与阳性对照药相当。

表 5 小鼠抓挠行为学观察 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 Observations on scratching behavior of mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	1 h 内抓挠次数	组别	1 h 内抓挠次数
空白	11.3±3.1	2%野黄芩素	71.7±3.0***
模型	152.7±14.4###	4%野黄芩素	56.3±2.1***
空白凝胶	140.3±12.9###	1% Scu-NCs	68.3±5.5*** ^Δ
Cal B	66.7±4.7***	2% Scu-NCs	61.0±7***
1%野黄芩素	89.7±5.0***	4% Scu-NCs	35.0±3.6*** ^Δ

与空白组比较:### $P<0.001$;与模型组比较:*** $P<0.001$;Scu-NCs 组与相同浓度野黄芩素组比较:^Δ $P<0.05$ 。

$P<0.001$ vs blank group;*** $P<0.001$ vs model group;^Δ $P<0.05$ vs the same concentration of scutellarein in the Scu-NCs group.

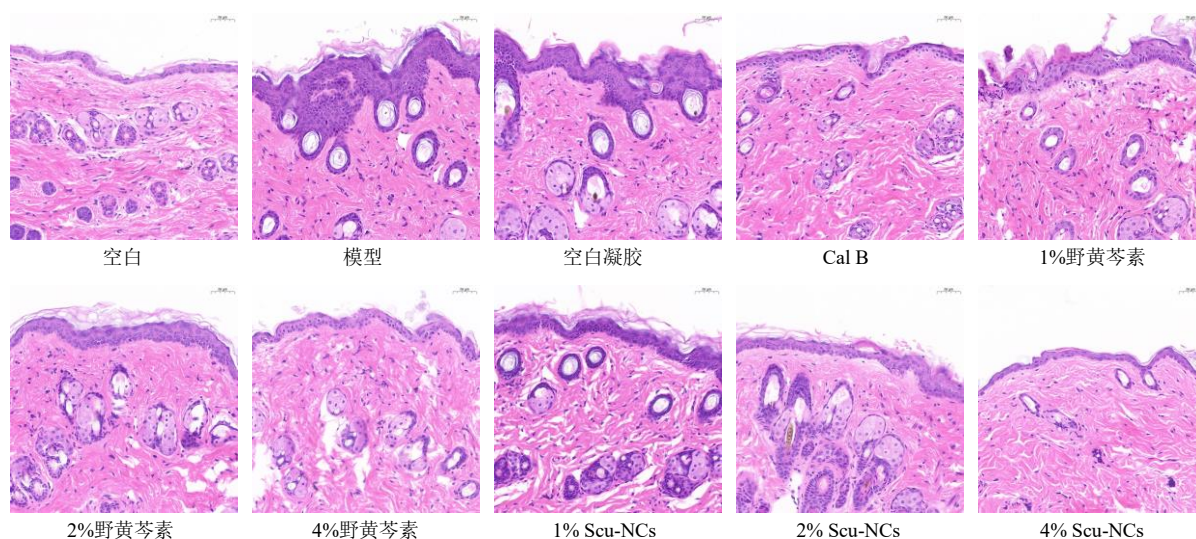


图 7 小鼠颈背部皮肤病理学切片 (HE, ×200)

Fig. 7 Dermatopathology sections of nape of neck skin of mice (HE, × 200)

表 6 小鼠颈背部皮肤表皮厚度统计 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Table 6 Epidermal thickness statistics of nape of neck skin of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	表皮厚度/ μm	组别	表皮厚度/ μm
空白	18.03 ± 3.64	2%野黄芩素	$37.24 \pm 3.68^{***\#}$
模型	$68.74 \pm 13.66^{###}$	4%野黄芩素	$30.58 \pm 3.17^{***}$
空白凝胶	$66.98 \pm 10.52^{###}$	1% Scu-NCs	$32.13 \pm 5.75^{***}$
Cal B	$27.65 \pm 2.76^{***}$	2% Scu-NCs	$30.05 \pm 2.42^{***}$
1%野黄芩素	$42.14 \pm 8.35^{***\#}$	4% Scu-NCs	$24.58 \pm 2.89^{***}$

与空白组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{###}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$; 与模型组比较: $^{***}P < 0.001$ 。

$^{\#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ $^{###}P < 0.001$ vs blank group; $^{***}P < 0.001$ vs model group.

2.7.5 炎症因子水平检测 取适量小鼠颈背部造膜区域皮肤制成匀浆, 2 000~3 000 r/min 离心取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测各组小鼠背皮中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 炎症因子水平。与空白对照都相比, AEW 模型组炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 阳性药组、1%、2%、4%浓度野黄芩素组及 Scu-NCs 组炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 表达水平降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。相同浓度 Scu-NCs 凝胶组较野黄芩素凝胶组炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 表达较低 ($P < 0.05$ 、0.01), 结果见表 7。相同药物浓度下, 背部皮肤中 IL-6 表达水平在 Scu-NCs 组表达均低于野黄芩素组, 1%低剂量 Scu-NCs 组 IL-6 水平甚至低于 4%高剂量野黄芩素组。背部皮肤中 IL-1 β 表达水平在 Scu-NCs 组表达均低于野黄芩素组,

表 7 各组小鼠颈背部皮肤炎症因子表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Table 7 Expression levels of inflammatory factors of nape of neck skin of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
空白	24.75 ± 4.13	49.41 ± 9.59	277.12 ± 46.44
模型	$64.63 \pm 3.70^{###}$	$95.88 \pm 7.07^{###}$	$516.74 \pm 11.17^{###}$
空白凝胶	$62.09 \pm 6.26^{###}$	$90.49 \pm 6.70^{###}$	$512.72 \pm 52.36^{###}$
Cal B	$32.00 \pm 4.50^{***}$	$58.91 \pm 3.90^{***}$	$268.30 \pm 44.60^{***}$
1%野黄芩素	$49.04 \pm 8.35^{**}$	$80.12 \pm 2.94^{**}$	$414.11 \pm 40.64^{*}$
2%野黄芩素	$43.34 \pm 2.83^{***}$	$76.13 \pm 4.17^{***}$	$376.14 \pm 64.53^{***}$
4%野黄芩素	$39.56 \pm 4.71^{***}$	$60.82 \pm 4.78^{***}$	$361.30 \pm 57.02^{***}$
1% Scu-NCs	$36.61 \pm 7.35^{***\Delta}$	$64.28 \pm 3.87^{***\Delta\Delta}$	$321.49 \pm 6.48^{***\Delta}$
2% Scu-NCs	$34.25 \pm 9.48^{***}$	$62.84 \pm 2.70^{***\Delta}$	$305.18 \pm 35.76^{***}$
4% Scu-NCs	$34.76 \pm 5.11^{***}$	$56.81 \pm 3.09^{***}$	$254.64 \pm 39.60^{***\Delta}$

与空白组比较: $^{###}P < 0.001$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^{***}P < 0.001$; Scu-NCs 组与相同浓度野黄芩素组比较: $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

$^{###}P < 0.001$ vs blank group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model group; $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs the same concentration of scutellarein in the Scu-NCs group.

4% Scu-NCs 组甚至低于阳性对照组。背部皮肤中 TNF- α 表达水平在 Scu-NCs 组表达均低于野黄芩素组, 1%低剂量 Scu-NCs 组 TNF- α 表达水平甚至低于 4%高剂量野黄芩素组, 4% Scu-NCs 组低于阳性药组与空白对照组。这表明, 野黄芩素纳米晶体对炎症因子的降低具有更好的效果。

3 讨论

为防止药物聚集、晶体长大, 通常使用适量的稳定剂来抑制纳米晶体粒子的成长速率。良好的稳

定剂能够有效的与药物纳米晶体的疏水性表面吸附, 提供给纳米晶体粒子足够的空间位阻或静电排斥力, 以防止粒子聚集^[18]。实验结果表明, 稳定剂种类、浓度对 Scu-NCs 粒径有一定的影响。

通过正交试验筛选得到最佳工艺参数后, 制得的 Scu-NCs 粒径远小于原料药, 且分布均匀, 晶型及结构并未发生明显变化。纳米晶体其具有较大的比表面积和较高的表观溶解度, 因此, 具有较大的溶出度^[19]。本研究通过浆法证明 Scu-NCs 体外溶出度远高于原料药, 通过扩散池法证明 Scu-NCs 凝胶体外扩散度远高于野黄芩素普通凝胶。

野黄芩素可抑制银屑病、特异性皮炎等皮肤病引起的瘙痒^[20], Wang 等^[21]和 Um 等^[22]的研究已证实野黄芩素可以通过选择性抑制瞬时受体电位离子通道香草素 3 (transient receptor potential vanilloid-3, Trpv3) 来减轻特异性皮炎症状, sc 野黄芩素可以抑制香芹酚诱导的小鼠皮肤瘙痒、增生和炎症。而 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 是参与慢性瘙痒发生的重要炎症因子^[23-24], 本研究将 Scu-NCs、野黄芩素制备成皮肤外用凝胶剂应用于 AWE 小鼠模型, 药效实验表明, Scu-NCs 及野黄芩素均可明显降低小鼠抓挠次数、颈背部表皮增厚及炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平, 说明二者对 AEW 模型均有一定的治疗效果。

纳米晶体在经皮给药后可以在皮肤表面形成较高的浓度梯度; 此外, 纳米晶体较小的粒径可以蓄积在毛囊中, 且具有好的生物黏附性, 可延长其在皮肤表面的滞留时间^[25], 因此, 药物纳米晶体化是促进难溶药物经皮转运的重要途径。对原料药和纳米晶体药效比较, Scu-NCs 体现出更好的止痒药效, 与阳性对照药卡泊三醇倍他米松相比无统计学差异, 说明野黄芩素纳米结晶化可改善其经皮给药作用效果。

纳米晶体技术用于难溶性药物经皮给药, 具有良好的临床应用前景, 由于载药量大, 其经皮递药能力比传统纳米载体更具优势。本研究为 Scu-NCs 应用于外用制剂领域提供了重要参考, 但本研究仍具有一定的局限性, 如 Scu-NCs 治疗干皮性慢性瘙痒模型的具体机制及 Scu-NCs 的促渗机制需进一步考察。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Liao H F, Ye J, Gao L L, *et al.* The main bioactive

compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines: A comprehensive review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110917.

[2] Shi X J, Chen G F, Liu X Q, *et al.* Scutellarein inhibits cancer cell metastasis *in vitro* and attenuates the development of fibrosarcoma *in vivo* [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(1): 31-38.

[3] 张人伟, 赵尔跃, 樊献俄. 高纯度灯盏花乙素原料药的制备工艺: 中国, CN101735291B [P]. 2011-11-30.

[4] Sun Z H, Xu W Q, Yuan Y, *et al.* Scutellarein stimulates human sperm function by increasing the levels of intracellular calcium and tyrosine phosphorylation [J]. *Andrologia*, 2022, 54(11): e14625.

[5] Shi Z H, Li N G, Shi Q P, *et al.* Synthesis of scutellarein derivatives to increase biological activity and water solubility [J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(21): 6875-6884.

[6] Quinn H L, Kearney M C, Courtenay A J, *et al.* The role of microneedles for drug and vaccine delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, 11(11): 1769-1780.

[7] Ita K. Dissolving microneedles for transdermal drug delivery: Advances and challenges [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1116-1127.

[8] Roh Y S, Choi J, Sutaria N, *et al.* Itch: Epidemiology, clinical presentation, and diagnostic workup [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2022, 86(1): 1-14.

[9] Tominaga M, Takamori K. Peripheral itch sensitization in atopic dermatitis [J]. *Allergol Int*, 2022, 71(3): 265-277.

[10] 朱佳. 含 β -葡聚糖和泛醇的喷雾剂对小鼠 AEW 模型修复皮肤屏障、缓解炎症及瘙痒的作用 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2022.

[11] Moniaga C S, Tominaga M, Takamori K. Mechanisms and management of itch in dry skin [J]. *Acta Derm Venereol*, 2020, 100(2): adv00024.

[12] 金锦花, 李科岩, 王玉慧, 等. 皮肤干燥症瘙痒小鼠模型的建立 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2020, 34(3): 246-249.

[13] Yang X, Miao X Q, Cao F R, *et al.* Nanosuspension development of scutellarein as an active and rapid orally absorbed precursor of its BCS class IV glycoside scutellarin [J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(11): 3576-3584.

[14] Luo Z M, Sun W J, Fang J, *et al.* Biodegradable gelatin methacryloyl microneedles for transdermal drug delivery [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(3): e1801054.

[15] Scholz P, Keck C M. Nanoemulsions produced by rotor-stator high speed stirring [J]. *Int J Pharm*, 2015, 482(1/2): 110-117.

[16] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 132-137.

[17] 刘丽娟, 吴亚运, 赵亚, 等. 和肤止痒方对 AEW 诱导

- 的慢性瘙痒小鼠皮肤屏障功能及 AQP3、Caspase-14 蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(1): 347-351.
- [18] 刘阳, 谢锦, 许俊男, 等. 药物固体纳米晶体稳定性关键影响因素的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(8): 1073-1082.
- [19] Pireddu R, Caddeo C, Valenti D, *et al.* Diclofenac acid nanocrystals as an effective strategy to reduce *in vivo* skin inflammation by improving dermal drug bioavailability [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 143: 64-70.
- [20] 栾冰. 从中药组分对 HUVECs 模型的影响探索化瘀通络中药抑制银屑病血管新生机制 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2021.
- [21] Wang Y J, Tan L X, Jiao K J, *et al.* Scutellarein attenuates atopic dermatitis by selectively inhibiting transient receptor potential vanilloid 3 channels [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(20): 4792-4808.
- [22] Um J Y, Kim H B, Kim J C, *et al.* TRPV3 and itch: The role of TRPV3 in chronic pruritus according to clinical and experimental evidence [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 14962.
- [23] 刘雪婷, 曾丽萍, 邹泽红, 等. 促炎和抗炎细胞因子及 VEGF 在 AEW 诱发的干皮症痒模型小鼠脊髓水平的表达 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2018, 32(4): 401-405.
- [24] Du B, Bian Z X, Xu B J. Skin health promotion effects of natural beta-glucan derived from cereals and microorganisms: A review [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(2): 159-166.
- [25] Shen C, Shen B, Shen G, *et al.* Therapeutic effects of nanogel containing triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum* (GLT) using therapeutic ultrasound (TUS) for frostbite in rats [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(8): 2643-2650.

[责任编辑 郑礼胜]