

紫草素/藁本内酯共载脂质体的制备、表征和透皮性能研究

禹佳惠¹, 张俏菊², 程璐璐¹, 孟文君¹, 徐悦¹, 时军^{1,3*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广州白云山花城药业有限公司, 广东 广州 510555

3. 广东省药物制剂研究与评价重点实验室, 广东 广州 510006

摘要: 目的 制备共载紫草素和藁本内酯的脂质体 (liposomes co-loaded with shikonin and ligustilide, Lip@Shi/Lig) 并优化其制备工艺, 对其进行相关表征及体外透皮性能研究。方法 应用 CCK-8 法和 Synergy Finder 分析工具, 以细胞活力为评价指标, 确定紫草素与藁本内酯的最佳联用比例; 采用薄膜分散法制备 Lip@Shi/Lig, 以包封率为评价指标, 通过单因素实验筛选 Lip@Shi/Lig 的最佳处方; 通过外观与形貌观察, 粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位测定, X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 分析和傅里叶变换红外光谱法 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 分析等表征手段, 对 Lip@Shi/Lig 进行质量评价; 最后, 采用 Franz 扩散池法考察 Lip@Shi/Lig 的经皮渗透能力及真皮滞留性能。结果 紫草素与藁本内酯的最佳联用比例为 1:1。Lip@Shi/Lig 的最佳制备工艺为蛋黄卵磷脂质量浓度 10 mg/mL, 蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比 4:1, 蛋黄卵磷脂与总药物质量比 1:15, 超声时间 5 min; 该方法制备的 Lip@Shi/Lig 形态规整, 为类圆形囊泡结构, 紫草素与藁本内酯的包封率分别为 (98.16 \pm 0.67)%、(97.20 \pm 0.76)%, Lip@Shi/Lig 粒径为 (88.62 \pm 0.26) nm, PDI 为 0.246 \pm 0.013, ζ 电位为 (-36.57 \pm 1.65) mV。XRD 与 FT-IR 结果表明, 紫草素和藁本内酯被成功包裹于脂质体中; Lip@Shi/Lig 中紫草素与藁本内酯在 30 h 内的累积透皮量分别为 (82.97 \pm 0.72)、(81.57 \pm 3.59) μ g/cm², 真皮滞留量 (Q_s) 分别为 (6.12 \pm 0.18)、(8.08 \pm 0.04) μ g/cm², 相比单体药物和单载药脂质体均有所提高。结论 成功制备了具有良好透皮性能和稳定性的 Lip@Shi/Lig, 并显著改善了紫草素与藁本内酯的透皮性能和 Q_s , 为其进一步体内研究和未来临床应用提供了实验依据。

关键词: 紫草素; 藁本内酯; 共载脂质体; 联合用药; 透皮吸收; 细胞活力; 薄膜分散法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)01-0109-17

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.01.012

Preparation, characterization, and transdermal properties of shikonin/ligustilide co-loaded liposomes

YU Jiahui¹, ZHANG Qiaojun², CHENG Lulu¹, MENG Wenjun¹, XU Yue¹, SHI Jun^{1,3}

1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangzhou Baiyunshan Huacheng Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510555, China

3. Guangdong Provincial Key Laboratory for Research and Evaluation of Pharmaceutical Preparations, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To prepare liposomes co-loaded with shikonin and ligustilide (Lip@Shi/Lig), optimize its preparation process, and to investigate its characterization and transdermal performance *in vitro*. **Methods** The CCK-8 assay and Synergy Finder analysis tool were used to determine the optimal combination ratio of shikonin and ligustilide based on cell viability. Lip@Shi/Lig was prepared using the thin-film dispersion method, and the optimal formulation of Lip@Shi/Lig was screened through single-factor investigation using encapsulation efficiency as the evaluation criterion. The quality evaluation of Lip@Shi/Lig was conducted using characterization methods, including appearance and morphology observation, particle size, polydispersity index (PDI), ζ potential determination, X-ray diffraction (XRD) analysis, and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis. Finally, the transdermal permeability and dermal retention performance of Lip@Shi/Lig were investigated using the Franz diffusion cell method. **Results** The optimal combined

收稿日期: 2025-08-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173982); 广东省自然科学基金资助项目 (2022A1515011382)

作者简介: 禹佳惠 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂研究与开发。E-mail: yujiahui0128@163.com

*通信作者: 时军 (1980—), 男, 博士, 教授, 研究方向为纳米经皮给药系统及癰疽的中医药防治。E-mail: shijun8008@163.com

ratio of shikonin and ligustilide was 1 : 1. The optimal conditions were determined as follows: egg yolk lecithin concentration of 10 mg/mL, phospholipid-cholesterol ratio of 4 : 1, total drug-phospholipid ratio of 1 : 15, and ultrasonication time of 5 min. The resulting Lip@Shi/Lig exhibited regular, spherical vesicle morphology, with encapsulation efficiencies of shikonin and ligustilide at $(98.16 \pm 0.67)\%$ and $(97.20 \pm 0.76)\%$, respectively, particle size of (88.62 ± 0.26) nm, PDI of 0.246 ± 0.013 , and ζ potential of (-36.57 ± 1.65) mV. XRD and FT-IR results indicated that shikonin and ligustilide were successfully encapsulated in the liposomes. The cumulative penetration of shikonin and ligustilide in Lip@Shi/Lig within 30 h were (82.97 ± 0.72) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and (81.57 ± 3.59) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively, with dermal retention rates of (6.12 ± 0.18) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and (8.08 ± 0.04) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively, both of which were significantly higher than those of the single drug and the single-drug-loaded liposomes. **Conclusion** Lip@Shi/Lig was successfully prepared with favorable transdermal properties and stability. It significantly enhanced the transdermal penetration and dermal retention of both shikonin and ligustilide, providing a solid experimental foundation for further *in vivo* studies and potential clinical applications.

Key words: shikonin; ligustilide; co-loaded liposomes; drug combination; transdermal absorption; cell viability; film dispersion method

烧烫伤是由极端温度或化学物质接触导致的一种急性创伤，可造成局部或全身组织损伤^[1]。中医认为烫伤由热力损伤肌肤，导致气血失衡，治疗需内外兼治，以清热解毒、活血化瘀为原则，并以外治法为核心^[2-5]。明代医学典籍《幼科金针》记载的紫草润肌膏对水火烫伤疗效显著，方中紫草发挥清热解毒之效，化解肌肤热毒；配伍当归则兼具活血养血之功，既能祛除瘀血阻滞，又可促进新血生成，使气血畅通，从而有效缓解烫伤症状^[6]。基于这一经典配伍，紫草与当归逐渐成为治疗烧烫伤等外科疾病的常用药对。现代药理学研究为这一经典药对的疗效提供了科学佐证，并揭示了其“清热解毒”与“活血化瘀”配伍的现代科学内涵——即抗炎、抗氧化与促进组织再生等多重机制的协同。研究表明，紫草的主要活性成分紫草素（shikonin）是发挥“清热解毒”功效的物质基础，可通过刺激成纤维细胞、内皮细胞增殖和血管生成，发挥促进大鼠皮肤伤口愈合的作用^[7]。Luo 等^[8]发现紫草素通过调控丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路抑制巨噬细胞的炎症反应，从而促进糖尿病创面愈合。另外，紫草素能通过控制感染，缓解炎症从而直接促进烧烫伤创面修复，被视为具有潜力的天然促愈活性成分^[9]。

而当归挥发油中的关键成分藁本内酯（ligustilide）则承载了“活血化瘀”之功，具有抗氧化、抗炎、镇痛及促进血管新生等多种药理效应，其主要通过激活核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2）/抗氧化反应元件（antioxidant response element, ARE）信号通路增强抗氧化基因表达，减少活性氧（reactive oxygen species, ROS）产生，缓解氧化应激^[10]。Zhu 等^[11]证实其对血管内皮细胞具有抗氧化保护作用；

Zhang 等^[12]发现其在大鼠模型中能同时抑制炎症反应和氧化应激。紫草素显著的抗炎活性与藁本内酯突出的抗氧化能力，分别针对烧烫伤创面愈合过程中并存的炎症过度激活与氧化应激损伤这 2 个关键病理环节。此外，藁本内酯具有良好的透皮性能，既能促进药物吸收又对皮肤刺激小。朱红梅等^[13]利用当归挥发油的“药辅合一”特性，证实其可显著提高白藜芦醇的透皮吸收率。这提示，藁本内酯不仅本身是活性成分，还可能作为“药引”促进紫草素的经皮输送，从而实现药效协同与递送协同的双重目标。

然而，尽管这些活性成分的药理作用明确，但将其从传统汤膏剂型转化为现代高效制剂却面临巨大挑战。一方面，紫草素作为萘醌类化合物，其疏水性强、水中溶解度极低且透皮性能差，严重制约了其在皮肤局部的生物利用度^[14-15]。另一方面，藁本内酯虽具有良好的透皮潜力，但其作为挥发油成分，化学性质不稳定、易氧化降解且水溶性差，导致其在常规剂型中难以有效保存和递送^[16]。因此，如何将这 2 种不同性质但功能互补的活性成分整合于同一递送系统，以期最大化其协同效应，同时克服各自的成药性缺陷，是发挥该经典药对疗效的关键科学问题。

脂质体作为一种由磷脂双分子层构成的纳米囊泡，具有优良的生物相容性、载药灵活性和促进皮肤渗透的能力，是理想的皮肤局部给药载体^[17]。因此，本研究立足于中医药理论，基于紫草素与藁本内酯多机制协同的视角，旨在设计并制备一种共载紫草素与藁本内酯的新型脂质体纳米递送系统（Lip@Shi/Lig），以提升两药的稳定性和递送效率，并验证其协同治疗优势，从而突破传统剂型的局限，探索一种高效、安全的烧烫伤局部治疗策略。

1 仪器与材料

1.1 仪器

8 000 WJ 型 CO₂ 培养箱、Varioskan Lux 型多功能微孔板读数仪、Attune NxT 型超高速流式细胞仪、Evos M5000 型智能细胞成像系统、Ultimate3000 型高效液相色谱仪系统, 美国赛默飞世尔科技有限公司; SW-CJ-1F 型洁净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; DW-HL858G 型超低温冷冻储存箱, 中科美菱低温科技有限责任公司; ICX41 型倒置显微镜, 舜宇光学科技有限公司; HWS-12 型电热恒温水浴锅, 上海一恒科学仪器有限公司; RE-2000A 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; JY-96IIN 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; TGL-16 型高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; FD-1A50 型冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; NK200-1B 型可视化氮吹仪, 杭州米欧仪器有限公司; HT-7800 型透射电子显微镜(TEM), 日本株式会社日立高新技术公司; Nano Brook Omni 型粒度仪及 Zeta 电位仪, 美国贝克曼库尔特有限公司; D8 Advance X 射线衍射仪、Alpha II 型傅里叶变换红外光谱仪, 德国布鲁克公司; TP-6 型透皮扩散仪, 天津市精拓仪器科技有限公司; Tiss-24 型高速组织研磨机, 上海净信实业有限公司。

1.2 材料

紫草素对照品, 批号 PS013058, 质量分数 > 98.0%, 成都普思生物科技股份有限公司; 紫草素原料药, 质量分数 > 98.0%, 批号 YRZ017-220701, 成都仪睿生物科技股份有限公司; 藁本内酯对照品, 批号 23100705, 质量分数 > 98.0%, 成都格利普生物科技股份有限公司; 人永生角质细胞(HaCaT)、人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC), 广州欣源生物技术有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 批号 3023A-100, 安徽歌者生物科技股份有限公司; DMEM-高糖培养基(批号 8122010)、0.25% Trypsin-EDTA 酶(批号 2276754)、磷酸盐缓冲液(PBS, 批号 8122009), 美国 Gibco 公司; 链霉素/青霉素(P/B)双抗(批号 2145167)、无血清细胞冻存液(批号 042022220622)、ROS 检测试剂盒(批号 S0033S)、CCK-8 试剂盒(批号 052822220718)、增强型线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)检测试剂盒(批号 C2003S), 上海碧云天技术有限公司; Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit, 批号 E-ck-

A211B, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 蛋黄卵磷脂, 批号 M16IS212223, 上海源叶生物科技有限公司; 胆固醇, 批号 O1031C, 大连美仑生物技术有限公司; 三氯甲烷(批号 GSGD10)、甲醇(批号 GSjc001)、乙酸(批号 20181003), 广东化学试剂厂; 色谱乙腈, 批号 1024QH288, 瑞典 Oceanpak 公司。

1.3 动物

健康 Sprague Dawley (SD) 大鼠 6 只, 清洁级, 雌性, 体质量 (200±10) g, 由南方医科大学提供, 生产许可证号 SYXK(粤)2022-0125, 动物实验经广东药科大学动物研究伦理委员会批准, 批准号 SPF2022382。

2 方法与结果

2.1 紫草素与藁本内酯联用比例的筛选

2.1.1 药物安全浓度范围的测定 采用 CCK-8 法评估紫草素、藁本内酯对人角质形成细胞(HaCaT)和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的增殖毒性, 以确定药物的安全浓度范围。分别取对数生长期的 HaCaT 细胞与 HUVEC 细胞接种于 96 孔板中, 待细胞密度为 70%~80%时, 给予不同浓度(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μmol/L)紫草素溶液或(0、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0 μmol/L)藁本内酯溶液孵育 24 h。另设置空白组(不接种细胞不给药), 孵育结束后, 每孔更换为 100 μL 含 10% CCK-8 的无血清培养基, 避光孵育 2 h 后, 使用酶标仪测定 450 nm 和 630 nm 处的吸光度(A)值, 并计算细胞存活率。紫草素与藁本内酯对 HaCaT 及 HUVEC 细胞的体外细胞毒性结果如表 1 所示。0.5~1.0 μmol/L 紫草素对 HaCaT 细胞存活率无明显影响; 然而当其浓度高于 1.5 μmol/L 时, 则表现出显著的剂量相关性抑制作用。相比之下, HUVEC 细胞对紫草素更为敏感, 在 1.0 μmol/L 时, 其存活率已显著下降至 70.70%。与紫草素不同, 藁本内酯在较宽的浓度范围内, 均表现出良好的安全性, 在浓度低于 60.0 μmol/L 时, 2 种细胞的存活率均维持在 99.00%以上。以上结果明确了 2 种药物对正常细胞的毒性反应曲线, 这为后续筛选热损伤细胞的有效治疗浓度提供了重要参考依据。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.1.2 药物有效浓度范围的确定 为评价 2 种药物对热损伤细胞的修复作用, 首先, 建立了细胞热损

表 1 紫草素与藁本内酯对正常 HaCaT 和 HUVEC 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 1 Effects of shikonin and ligustilide on cell viability of normal HaCaT and HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

紫草素/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞活力/%		藁本内酯/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞活力/%		藁本内酯/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞活力/%	
	HaCaT	HUVEC		HaCaT	HUVEC		HaCaT	HUVEC
0	99.98 \pm 0.49	99.60 \pm 1.09	0	100.47 \pm 1.62	100.00 \pm 0.75	60.0	81.42 \pm 2.50 ^{###}	71.34 \pm 1.65 ^{###}
0.5	104.93 \pm 0.90	102.78 \pm 5.46	5.0	101.74 \pm 1.81	100.89 \pm 1.53	100.0	79.95 \pm 3.86 ^{###}	51.05 \pm 1.61 ^{###}
1.0	97.29 \pm 3.35	70.70 \pm 4.62 ^{***}	10.0	99.92 \pm 0.94	101.23 \pm 1.68	150.0	63.77 \pm 2.72 ^{###}	49.64 \pm 4.01 ^{###}
1.5	79.35 \pm 4.52 ^{***}	51.09 \pm 5.60 ^{***}	20.0	99.83 \pm 1.31	99.87 \pm 1.50	200.0	59.40 \pm 7.00 ^{###}	37.45 \pm 3.18 ^{###}
2.0	54.35 \pm 1.26 ^{***}	33.08 \pm 8.20 ^{***}	30.0	100.39 \pm 1.29	98.94 \pm 3.73	250.0	41.18 \pm 3.45 ^{###}	29.27 \pm 3.39 ^{###}
2.5	44.68 \pm 3.46 ^{***}	21.56 \pm 2.69 ^{***}	40.0	97.43 \pm 1.76	100.65 \pm 1.75	300.0	30.04 \pm 2.13 ^{###}	26.72 \pm 2.84 ^{###}
3.0	36.53 \pm 2.70 ^{***}	17.31 \pm 1.89 ^{***}	50.0	99.08 \pm 0.99	99.26 \pm 1.30			

与紫草素 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组同种细胞比较: ^{***} $P < 0.001$; 与藁本内酯 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组同种细胞比较: ^{###} $P < 0.001$ 。^{***} $P < 0.001$ vs homologous cells of shikonin 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; ^{###} $P < 0.001$ vs homologous cells of ligustilide 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

伤模型。取生长状态良好的 HaCaT 细胞和 HUVEC 细胞培养至细胞密度为 90%，将细胞悬液于 52 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中，处理 2 min 以构建热损伤模型，随后铺至 96 孔板中培养 24 h。使用不同浓度紫草素或藁本内酯处理 24 h。通过 CCK-8 法检测细胞存活率，具体步骤同“2.1.1”项。药物对热损伤细胞的修复结果如表 2 所示。与对照组相比，模型组的 HaCaT 与 HUVEC 细胞存活率分别显著下降至 53.63% 和 49.26% ($P < 0.001$)，证明热损伤模型构建成功。经给药干预后，紫草素对 2 种细胞的修复作用呈现先升高后降低的趋势，HaCaT 细胞在 0.50

$\mu\text{mol/L}$ 时修复效果最佳，细胞存活率回升至 61.88% ($P < 0.01$)；HUVEC 细胞则在 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 时达到峰值，细胞存活率为 60.67% ($P < 0.001$)。相比之下，藁本内酯则在更宽的浓度范围内表现出稳定的修复作用，其对 HaCaT 细胞的保护作用在 1.75 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大值 65.22% ($P < 0.001$)；对 HUVEC 细胞则在 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大修复效果，细胞存活率为 70.67% ($P < 0.001$)。综合考量 2 种药物对 2 种细胞的修复效果，并为后续联合用药探索协同增效作用，最终确定了 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 的紫草素与 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 的藁本内酯作为最佳组合浓度。

表 2 紫草素与藁本内酯对热损伤 HaCaT 和 HUVEC 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Effects of shikonin and ligustilide on viability of thermally injured HaCaT and HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞活力/%		组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞活力/%	
		HaCaT	HUVEC			HaCaT	HUVEC
对照	—	100.00 \pm 0.55	100.92 \pm 1.39	模型	—	53.63 \pm 0.64 ^{###}	49.26 \pm 0.65 ^{###}
紫草素	0.25	56.41 \pm 2.59	52.23 \pm 2.96	藁本内酯	0.25	56.46 \pm 2.01	60.67 \pm 0.89
	0.50	61.88 \pm 3.62 ^{**}	59.44 \pm 1.29 ^{***}		0.50	56.25 \pm 3.11	66.70 \pm 0.87 ^{***}
	0.75	60.86 \pm 0.51 ^{***}	60.67 \pm 0.89 ^{***}		0.75	59.25 \pm 3.11 [*]	69.75 \pm 2.45 ^{***}
	1.00	56.76 \pm 0.57	50.12 \pm 2.30		1.00	61.56 \pm 4.83 ^{**}	70.67 \pm 3.08 ^{***}
	1.25	52.75 \pm 2.56 ^{***}	49.27 \pm 1.77		1.25	62.02 \pm 0.50 ^{***}	68.42 \pm 2.46 ^{***}
	1.50	45.22 \pm 1.77 ^{***}	38.84 \pm 4.71 [*]		1.50	62.97 \pm 3.43 ^{***}	67.72 \pm 3.10 ^{***}
	1.75	42.83 \pm 0.88 ^{***}	35.66 \pm 1.75 ^{**}		1.75	65.22 \pm 2.67 ^{***}	70.39 \pm 2.12 ^{***}
	2.00	42.65 \pm 0.43 ^{***}	20.44 \pm 2.55 ^{***}		2.00	62.34 \pm 0.69 ^{***}	70.39 \pm 1.80 ^{***}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

2.1.3 两药联用比例的筛选 Synergy Finder 是近年开发的一种基于数据驱动的用于交互式 and 可视化分析多种药物组合效应的工具，适用于探究多种药物的组合效应^[18]。Synergy Finder 整合零相互作用效力模型 (zero interaction potency, ZIP)、最高单药效模型 (highest single-agent, HAS) 等多种模

型，用于多个剂量和样本的协同性分析，可以降低由于模型差异、实验误差等导致的可信度协同效应风险。因此，为探究紫草素与藁本内酯联合应用对热损伤细胞的修复效应，本研究构建了包含不同浓度配比的药物矩阵，在对热损伤 HaCaT 与 HUVEC 细胞进行给药干预 24 h 后，通过 CCK-8 法检测细

胞存活率。随后,采用 Synergy Finder 工具对数据进行分析,通过计算协同分数(synergy score, SS)来量化 2 种药物间的相互作用,协同分数越高,代表协同增效作用越强^[19]。

首先,细胞活力数据显示,在多数情况下,2 种药物联用比模型组能更有效地促进热损伤细胞的存活(表 3)。为了进一步从复杂的浓度组合中筛选出最佳配比,进行了协同作用分析。Synergy Finder

的分析结果(图 1 和表 4)清晰地展示了 2 种药物在不同细胞系中的协同作用模式。在 HaCaT 细胞中,协同作用的“热点区域”较为集中,在紫草素与藁本内酯浓度均为 0.50 $\mu\text{mol/L}$ 时,获得了最高的协同分数 4.23。而在 HUVEC 细胞中,协同作用不仅强度更高,且范围更广,在紫草素与藁本内酯浓度均为 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 时,协同分数达到了最大值,为 36.69。

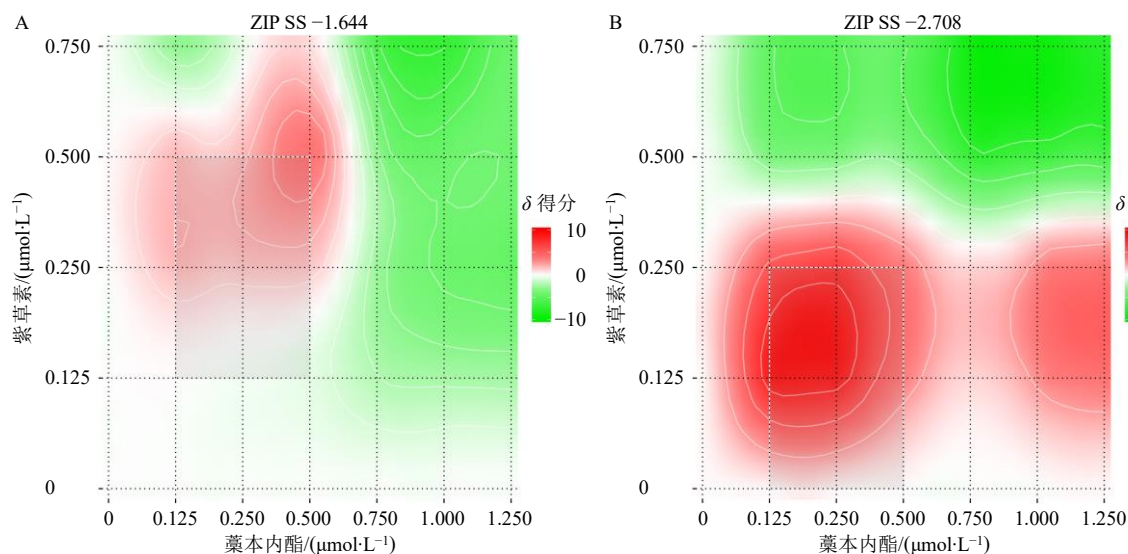
表 3 紫草素与藁本内酯联合给药对热损伤 HaCaT 和 HUVEC 细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of co-administration of shikonin and ligustilide on cell viability of thermally injured HaCaT and HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞活力/%		组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞活力/%	
		HaCaT	HUVEC			HaCaT	HUVEC
对照	—	100.00 \pm 0.52	100.92 \pm 1.32	藁本内酯+	0.500 \pm 0.750	61.74 \pm 10.35	56.99 \pm 2.45*
模型	—	52.90 \pm 0.55###	49.26 \pm 0.62###	紫草素	0.750 \pm 0.125	63.16 \pm 3.59**	62.18 \pm 3.00**
藁本内酯+	0.125+0.125	60.48 \pm 2.78**	62.26 \pm 4.53**		0.750+0.250	67.68 \pm 9.12*	65.84 \pm 4.70***
	0.125+0.250	63.38 \pm 9.94	57.13 \pm 3.43		0.750+0.500	69.10 \pm 8.36**	60.90 \pm 2.87**
	0.125+0.500	61.78 \pm 9.41	58.52 \pm 4.39		0.750+0.750	63.52 \pm 10.51	60.40 \pm 1.46***
	0.125+0.750	59.63 \pm 9.15	55.30 \pm 5.62		1.000+0.125	62.75 \pm 2.79*	66.47 \pm 2.42***
	0.250+0.125	58.67 \pm 2.51*	60.31 \pm 8.21*		1.000+0.250	67.10 \pm 5.92*	64.29 \pm 3.98***
	0.250+0.250	63.77 \pm 9.29	59.65 \pm 8.22*		1.000+0.500	67.48 \pm 7.08*	65.58 \pm 5.44***
	0.250+0.500	65.32 \pm 8.44*	59.40 \pm 7.33*		1.000+0.750	62.93 \pm 8.09*	57.85 \pm 6.23
	0.250+0.750	58.74 \pm 10.35	54.61 \pm 6.39		1.250+0.125	66.93 \pm 5.02**	67.53 \pm 2.57***
	0.500+0.125	61.67 \pm 2.51**	59.97 \pm 2.57**		1.250+0.250	67.03 \pm 7.02*	69.44 \pm 4.98***
	0.500+0.250	66.77 \pm 9.29*	62.58 \pm 3.19***		1.250+0.500	66.85 \pm 5.75*	66.66 \pm 4.64***
	0.500+0.500	68.32 \pm 8.44**	61.13 \pm 3.27**		1.250+0.750	63.16 \pm 4.86	66.52 \pm 7.38*

与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.



A 为 HaCaT 细胞, B 为 HUVEC 细胞; 红色越深, 药物联合评分越高。

A is HaCaT cells, B is HUVEC cells; Darker red, higher drug combination score.

图 1 紫草素与藁本内酯联合给药模型拟合效果

Fig. 1 Effect of model fit for co-administration of shikonin and ligustilide

表 4 紫草素与藁本内酯联合给药模型评分结果

Table 4 Results of shikonin and ligustilide co-administration model scores

细胞系	紫草素/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	藁本内酯/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	SS	细胞系	紫草素/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	藁本内酯/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	SS
HaCaT	0.500	0.500	4.23	HUVEC	0.125	0.125	36.69
	0.250	0.125	2.01		0.125	0.250	34.81
	0.500	0.125	1.83		0.250	0.250	25.61
	0.500	0.250	1.77		0.250	0.125	21.18
	0.250	0.250	1.72		0.125	1.250	16.38
	0.250	0.500	1.54		0.250	1.250	15.79
	0.750	0.500	0.32		0.125	1.000	14.29
	0.125	0.125	0.04		0.250	1.000	13.72

尽管 2 种细胞的最佳协同浓度点不同,但它们均出现在紫草素与藁本内酯的浓度比为 1:1 时,这提示 1:1 是该药对发挥协同作用的基础比例。同时

考虑到在 HUVEC 细胞中观察到的协同作用远远强于 HaCaT 细胞,且血管内皮细胞的增殖与迁移所代表的血管新生是创面深度修复的关键步骤,优先选择了对 HUVEC 细胞效应最强的浓度组合。因此,最终确定 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 紫草素与 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 藁本内酯作为后续制备共载脂质体的最佳药物配比。

2.1.4 两药联用对细胞凋亡的抑制作用 为评估药物对热损伤诱导细胞凋亡的抑制作用,采用 Annexin V-FITC/PI 双染法,并通过流式细胞术定量分析各组细胞的凋亡率。实验分组及给药:对照组、模型组(热损伤处理)、紫草素组(给予 0.5 $\mu\text{mol/L}$)、藁本内酯组(给予 0.5 $\mu\text{mol/L}$)、联合给药组(给予紫草素 0.5 $\mu\text{mol/L}$ +藁本内酯 0.5 $\mu\text{mol/L}$)。结果如图 2 和表 5 所示,与对照组相比,经热损伤处理的模型组细胞凋亡率显著升高 ($P<0.001$),表明细胞热损

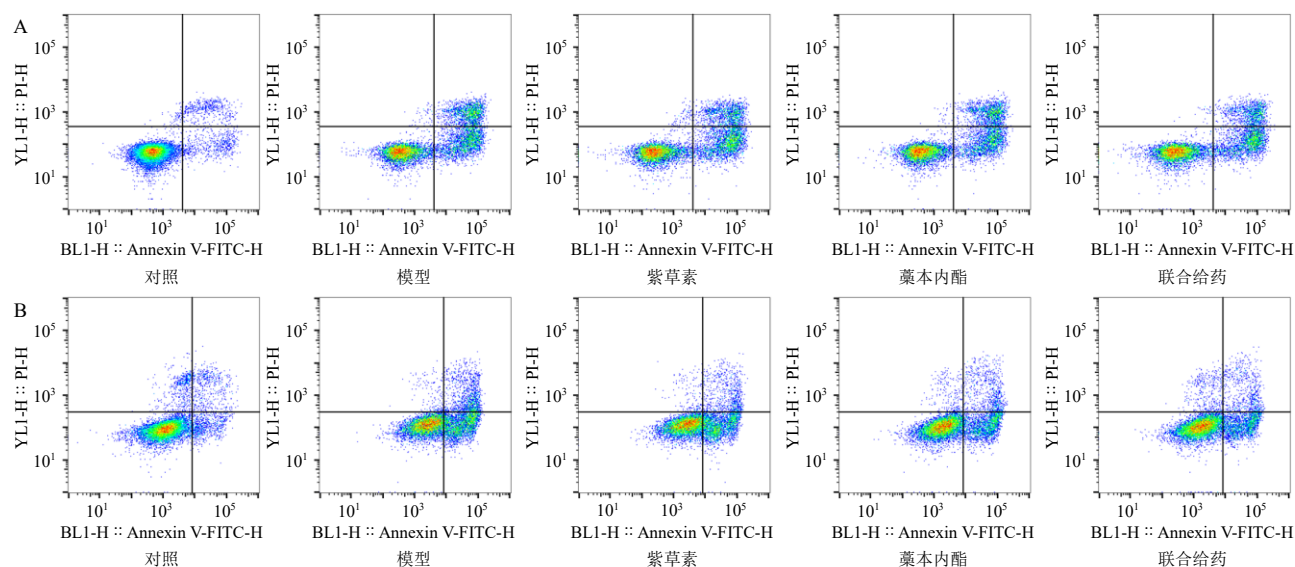


图 2 紫草素与藁本内酯联合给药对热损伤 HaCaT (A) 和 HUVEC (B) 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of co-administration of shikonin and ligustilide on apoptosis of thermal injured HaCaT (A) and HUVEC (B) cells

表 5 联合给药对热损伤 HaCaT 和 HUVEC 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Effects of co-administration on apoptosis of thermal injured HaCaT and HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	总凋亡率/%	
		HaCaT	HUVEC
对照	—	3.50±2.09	13.91±3.27
模型	—	45.83±2.47###	45.32±2.43###
紫草素	0.5	44.60±2.51	40.59±2.76
藁本内酯	0.5	43.80±4.62	28.08±3.48**
联合给药	0.5+0.5	39.83±2.10	22.11±0.25***

与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。

$P<0.001$ vs control group; ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group.

伤模型构建成功。给药干预后,各药物组均表现出不同程度的抗细胞凋亡作用。在 HUVEC 细胞中,此效应尤为显著:与模型组相比,藁本内酯单药组细胞凋亡率降至 28.08% ($P<0.01$),而联合给药组细胞凋亡率进一步显著降低至 22.11% ($P<0.001$)。虽然在 HaCaT 细胞中,紫草素组、藁本内酯组及联合给药组的细胞凋亡率与模型组相比,未呈现统计学差异,但其数值上的下降趋势仍表明了一定的保护倾向。

综上所述,紫草素与藁本内酯联合给药在 HUVEC 细胞中展现出协同增强的抗凋亡效应,这为二者在促进血管内皮修复方面具有协同作用提供

了直接的细胞学证据。

2.1.5 两药联用对细胞迁移能力的促进作用

组与给药同“2.1.4”项，采用细胞划痕实验探究药物对细胞迁移能力的影响。如图 3 和表 6 所示，对

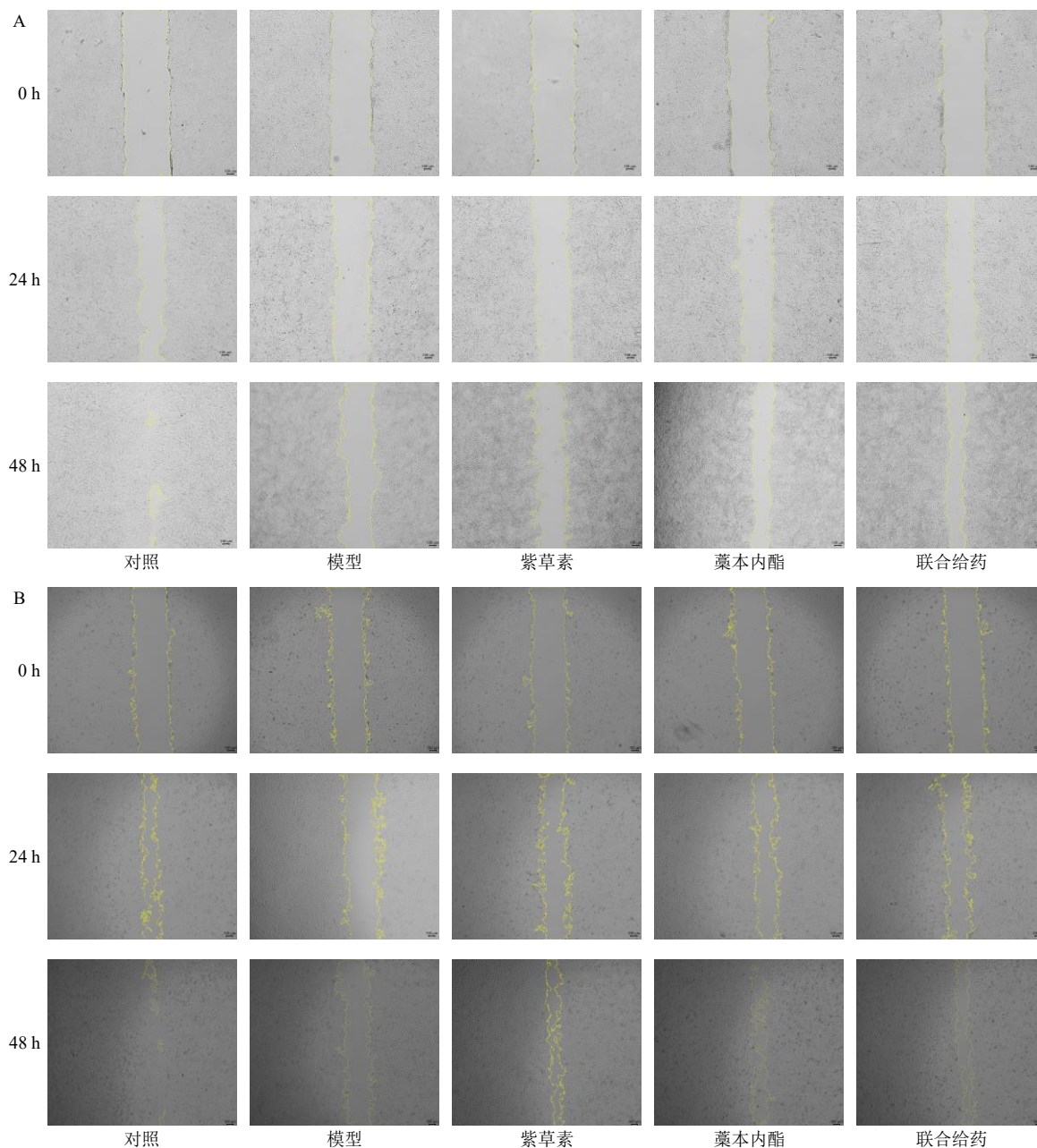


图 3 联合给药对热损伤 HaCaT (A) 和 HUVEC (B) 细胞迁移的影响

Fig. 3 Effects of co-administration on migration of thermal injured HaCaT (A) and HUVEC (B) cells

表 6 联合给药对热损伤 HaCaT 和 HUVEC 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effects of co-administration on migration of thermal injured HaCaT and HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	HaCaT 细胞迁移率/%		HUVEC 细胞迁移率/%		组别	HaCaT 细胞迁移率/%		HUVEC 细胞迁移率/%	
	24 h	48 h	24 h	48 h		24 h	48 h	24 h	48 h
对照	46.06±1.00	87.27±8.04	55.06±6.04	95.25±3.61	藁本内酯	29.79±2.85***	61.43±0.60***	46.11±3.20***	68.09±1.30***
模型	15.92±4.32###	43.08±4.98###	8.99±2.20###	17.86±6.29###	联合给药	35.17±3.15***	63.39±1.88***	34.79±2.03***	77.60±11.81***
紫草素	18.60±5.66	43.21±8.08	33.09±3.72***	65.99±5.99***					

与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group.

照组细胞在 48 h 内划痕基本愈合,表明细胞增殖与迁移活力良好。经热损伤后,模型组细胞迁移能力显著受损,HaCaT 和 HUVEC 细胞 48 h 划痕愈合率分别降低至 43.08% 和 17.86% ($P < 0.001$)。药物干预显著促进了损伤细胞的迁移修复。在 HaCaT 细胞中,藁本内酯单药组与联合给药组表现出强劲的促迁移效果,48 h 划痕愈合率分别提升至 61.43% 和 63.39% ($P < 0.001$),而紫草素单药组效果不显著。在 HUVEC 细胞中,所有给药组均表现出显著的促迁移作用 ($P < 0.001$),其中联合给药的效应最为突出,划痕愈合率为 77.60%,高于紫草素单药组 (65.99%) 和藁本内酯单药组 (68.09%)。以上结果表明,藁本内酯是促进细胞迁移的关键活性成分,而紫草素与藁本内酯联合使用时,在 HUVEC 细胞中展现出协同增强的促迁移作用,这为二者协同促进创面愈合提供了有力的功能学证据。

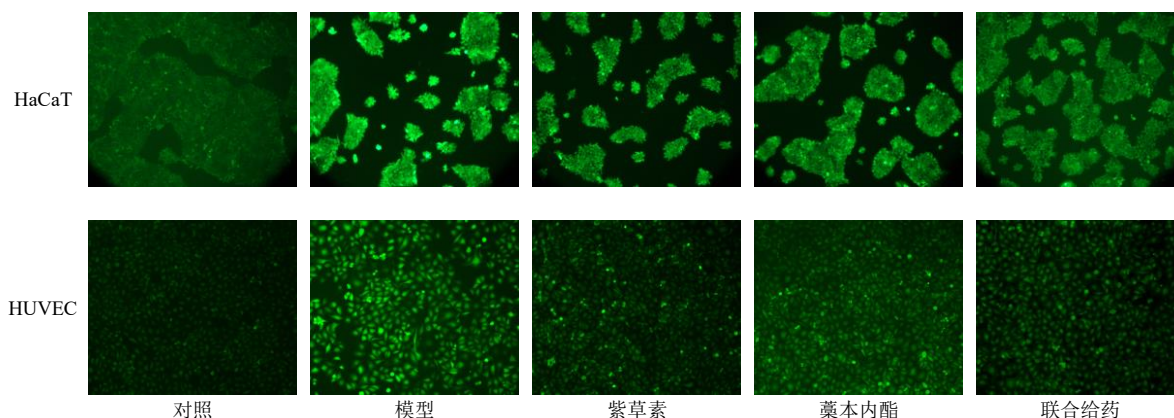


图 4 联合给药对热损伤 HaCaT 和 HUVEC 细胞 ROS 水平的影响 (4×)

Fig. 4 Effects of co-administration on ROS levels of HaCaT and HUVEC cells (4 ×)

表 7 联合给药对热损伤 HaCaT 和 HUVEC 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 7 Effects of co-administration on ROS levels of HaCaT and HUVEC cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	ROS 平均荧光密度	
		HaCaT	HUVEC
对照	—	26.50 ± 2.13	13.56 ± 0.90
模型	—	$51.15 \pm 3.12^{###}$	$44.24 \pm 1.85^{###}$
紫草素	0.5	$37.15 \pm 3.71^{***}$	$20.08 \pm 2.73^{***}$
藁本内酯	0.5	$35.52 \pm 4.77^{***}$	$25.81 \pm 2.71^{***}$
联合给药	0.5+0.5	$29.23 \pm 3.21^{***}$	$17.06 \pm 2.87^{***}$

与对照组比较: $^{###}P < 0.001$; 与模型组比较: $^{***}P < 0.001$ 。

$^{###}P < 0.001$ vs control group; $^{***}P < 0.001$ vs model group.

2.1.7 两药联用对细胞 MMP 的影响 MMP 的崩潰是细胞凋亡的早期关键环节。为评估药物对线粒

2.1.6 两药联用对细胞内 ROS 水平的调控作用 为评估药物对热损伤诱导的氧化应激的调控作用,采用 DCFH-DA 荧光探针法检测了 ROS 水平。分组与给药同“2.1.4”项,结果如图 4 所示,对照组细胞仅呈现微弱的绿色荧光,表明其细胞内 ROS 处于基础生理水平。经热损伤后,模型组细胞荧光信号急剧增强,与对照组相比,其平均荧光强度在 HaCaT 和 HUVEC 细胞中分别显著升高了 1.93 倍和 3.26 倍 ($P < 0.001$, 表 7)。药物干预后,各给药组均能有效清除细胞内过量 ROS,荧光强度呈现不同程度的降低。其中,联合给药组的荧光强度降至最低,其抑制作用强于各单药组。该结果表明,紫草素与藁本内酯均具备抗氧化活性,能够有效缓解热损伤引发的氧化应激。二者联合使用时,在清除过量 ROS 方面展现出显著的协同效应,这可能是其协同促进创面愈合的重要分子机制之一。

体功能的保护作用,采用 JC-1 荧光探针法检测了 MMP 的变化,以红/绿荧光强度比值表示。分组与给药同“2.1.4”项,结果如图 5 和表 8 所示,对照组细胞显示出强烈的红色荧光和微弱的绿色荧光,其红/绿荧光比值较高,分别为 HaCaT 细胞 5.96 ± 0.35 、HUVEC 细胞 10.60 ± 1.60 ,表明 MMP 稳定,功能完好。热损伤后,模型组细胞红色荧光显著减弱,绿色荧光急剧增强,其比值大幅下降 ($P < 0.001$),说明线粒体发生了严重去极化,功能受损。药物干预能显著逆转这一趋势。与模型组相比,各给药组的红/绿荧光比值均出现不同程度的上调 ($P < 0.001$)。联合给药组的比值恢复程度最为显著,其效果优于任一单药组,表明联合治疗在稳定 MMP 方面发挥了协同保护效应。

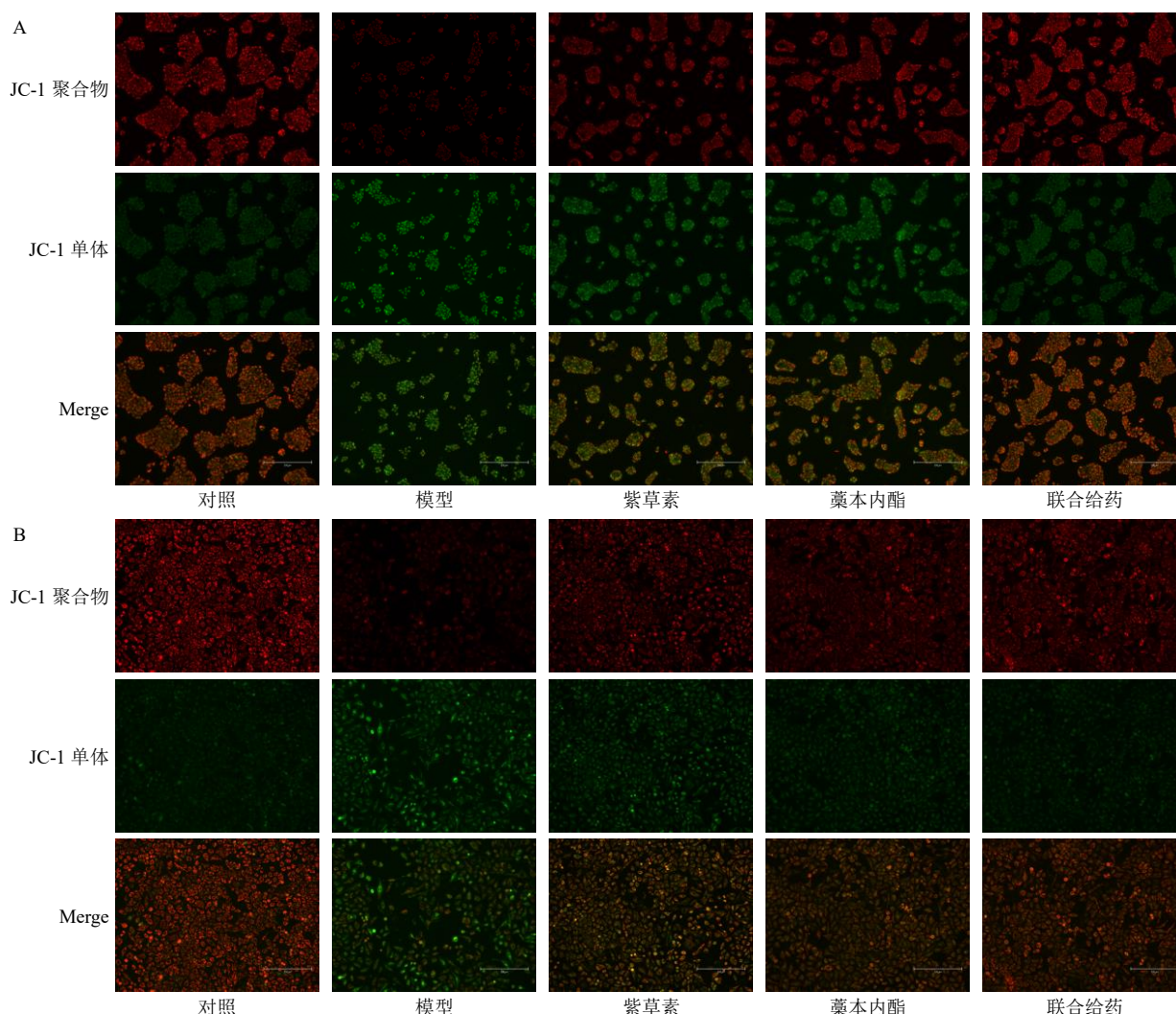


图 5 联合给药对热损伤 HaCaT (A) 和 HUVEC (B) 细胞 MMP 的影响

Fig. 5 Effects of co-administration on MMP levels of thermal injured HaCaT (A) and HUVEC (B) cells

表 8 联合给药对热损伤 HaCaT 和 HUVEC 细胞 MMP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effects of co-administration on MMP levels of thermal injured HaCaT and HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	红/绿荧光强度比值	
		HaCaT	HUVEC
对照	—	5.96 ± 0.35	10.60 ± 1.60
模型	—	$0.54 \pm 0.09^{###}$	$0.61 \pm 0.05^{###}$
紫草素	0.5	$1.87 \pm 0.24^{***}$	$3.33 \pm 1.28^{***}$
藁本内酯	0.5	$2.45 \pm 0.03^{***}$	$3.12 \pm 0.39^{***}$
联合给药	0.5+0.5	$4.49 \pm 1.10^{***}$	$4.76 \pm 0.41^{***}$

与对照组比较: $^{###}P < 0.001$; 与模型组比较: $^{***}P < 0.001$ 。

$^{###}P < 0.001$ vs control group; $^{***}P < 0.001$ vs model group.

2.2 Lip@Shi/Lig 的制备

本实验采用薄膜分散法制备共载紫草素和藁本内酯的脂质体 (Lip@Shi/Lig)。将适量蛋黄卵磷脂、胆固醇、紫草素与藁本内酯共溶于氯仿中, 充

分混匀后, 于 37°C 减压旋转蒸发 15 min。随后, 将茄型烧瓶置于氮吹仪中以去除残留溶剂。向茄形瓶中滴加 37°C 的蒸馏水, 在 37°C 水浴中于常压条件下水化 30 min。水化结束后, 在冰浴中利用超声探头调整粒径, 并使用 $0.8 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 得到共载脂质体 Lip@Shi/Lig。同法制备不含紫草素与藁本内酯的双空白脂质体和单载药脂质体 (Lip@Shi 或 Lip@Lig)。Lip@Shi/Lig 的制备流程见图 6。

2.3 紫草素、藁本内酯含量测定

2.3.1 紫草素、藁本内酯对照品溶液的配制 称取紫草素对照品 10.00 mg, 藁本内酯对照品 10.00 mg, 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 加入适量甲醇, 振荡溶解, 用甲醇定容至刻度, 混匀, 即得 1.00 mg/mL 紫草素/藁本内酯对照品储备液, 按比例稀释至所需质量浓度的工作溶液。

2.3.2 供试品溶液的配制 量取 1 mL Lip@Shi/Lig

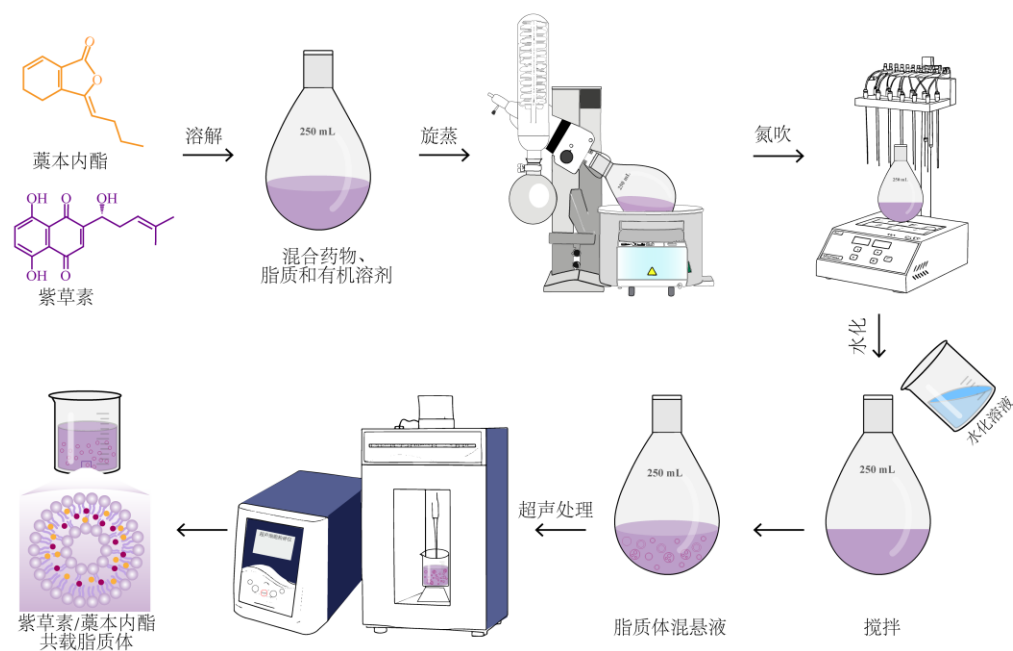


图 6 Lip@Shi/Lig 制备流程图

Fig. 6 Flowchart of Lip@Shi/Lig preparation

于 10 mL 棕色量瓶中, 加入适量甲醇, 混匀后超声破乳 10 min, 放冷至室温, 用甲醇定容至刻度。0.22 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。同法配制空白脂质体供试品溶液 (除不加药物成分外, 其余操作一致)。

2.3.3 色谱条件 采用 Ultimate3000 型高效液相色谱系统; 色谱柱为 Ecosil C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.2% 甲酸水溶液-乙腈 (30 : 70), 等度洗脱; 体积流量设定为 1.0 mL/min; 检测波长为 273 nm; 柱温维持在 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 10 μL 。

2.3.4 专属性考察 分别取紫草素、藜本内酯对照品溶液、载药脂质体供试品溶液及空白脂质体供试品溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜后, 按照“2.3.3”项下色谱条件进样测定, 考察系统的专属性。结果如图 7 所示, 紫草素、藜本内酯的保留时间分别为 (18.18 \pm 0.06)、(12.60 \pm 0.01) min, 2 种成分的峰形稳定, 分离度良好, 药物检测不受空白脂质体成分、溶剂的检测, 满足检测要求。

2.3.5 线性关系考察 精密吸取适量紫草素或藜本内酯对照品储备液, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇, 依次稀释为 400.00、200.00、100.00、50.00、25.00、10.00、5.00、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。取上述溶液过 0.22 μm 微孔滤膜, 按照“2.3.3”项下色谱条件进样测定。以峰面积 (A) 为纵坐标, 溶液质量浓度 (C) 为横坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回

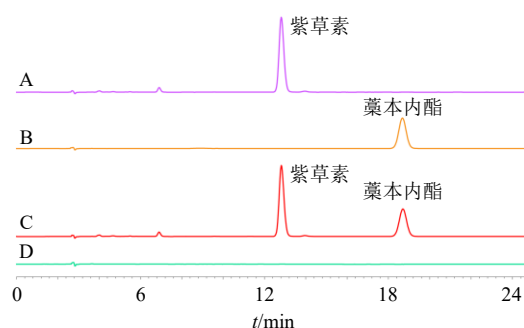


图 7 紫草素 (A)、藜本内酯 (B) 对照品和共载药 (C)、空白 (D) 脂质体的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC chromatograms of shikonin (A), ligustilide (B) reference substances and co-loaded (C) and blank (D) liposomes

归得线性回归方程: 紫草素 $A=0.2284C-0.2457$, $r=0.9998$; 藜本内酯 $A=0.3748C+0.0798$, $r=0.9999$, 结果表明 2 药在 5.00~400.00 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度与峰面积间的线性关系良好。

2.3.6 精密度考察 将紫草素、藜本内酯对照品储备液, 分别稀释为高 (200.00 $\mu\text{g/mL}$)、中 (25.00 $\mu\text{g/mL}$)、低 (2.50 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度溶液, 连续进样测定 6 次, 计算其 RSD 考察精密度。计算紫草素质量浓度的 RSD 值分别为 0.78%、0.95%、0.87%, 藜本内酯质量浓度的 RSD 值分别为 0.68%、0.88%、1.60%, 均小于 2%, 结果表明该仪器具有良好的精密度。

2.3.7 稳定性考察 取载药脂质体供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、16、24 h 进样测定, 记录峰面积, 计算其峰面积的 RSD 值。计算得到紫草素、藁本内酯质量浓度的 RSD 值分别为 1.29% 和 1.37%, 均小于 2%, 表明供试品溶液在 24 h 内检测稳定性良好。

2.3.8 重复性考察 分别制备 6 份载药脂质体供试品溶液, 按照“2.3.3”项下色谱条件, 进样测定并记录两药的峰面积, 计算得到紫草素、藁本内酯两药质量浓度的 RSD 值分别为 0.55% 和 0.18%, 均小于 1%, 表明该方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率考察 精密吸取空白脂质体 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 分为 200.00、25.00、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度 3 组, 每组 3 份, 各加入 1.0 mL 上述质量浓度的紫草素或藁本内酯对照品溶液, 其余步骤按照“2.3.2”项下方法制备加标或不加标供试品溶液, HPLC 法进样测定, 计算加样回收率。计算得出紫草素不同质量浓度的平均加样回收率分别为 101.4%、99.63%、100.66%, RSD 值分别为 0.24%、1.24%、1.94%; 藁本内酯不同质量浓度的平均加样回收率分别为 99.17%、99.15%、100.30%, RSD 值分别为 0.20%、1.01%、1.93%; 均符合检测要求。

2.4 Lip@Shi/Lig 制备工艺的优化与确定

包封率是脂质体制备中的核心参数, 同时也是评判脂质体制备成功与否的重要依据。本研究对薄膜分散法制备的共载脂质体进行了单因素考察, 分别考察了蛋黄卵磷脂质量浓度、蛋黄卵磷脂与胆固醇的质量比、蛋黄卵磷脂与药物的质量比以及超声时间对包封率的影响。由于紫草素和藁本内酯均为脂溶性物质, 在水中的溶解度极低, 因此, 在制备过程中, 通过微孔滤膜滤过和低速离心处理去除游离药物。取 1 mL 共载脂质体, 加入至 2 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 超声破乳过滤膜后, 用 HPLC 法检测药物总质量浓度 (C_1); 同时, 取制备好的脂质体适量, 过微孔滤膜后, 离心 10 min, 吸取上清液 1 mL, 加入甲醇定容至 2 mL, 超声破乳过滤膜后, 用 HPLC 法检测药物质量浓度 (C_2)。按公式计算包封率 (encapsulation efficiency, EE)。

$$\text{包封率} = C_2/C_1$$

C_1 为脂质体经甲醇超声破乳后测得的总药物质量浓度, C_2 为包封于脂质体内的药物质量浓度

2.4.1 蛋黄卵磷脂质量浓度考察 按照“2.2”项下制备方法, 固定蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比为 4 :

1, 分别考察不同蛋黄卵磷脂质量浓度 (5、10、15、20、30 mg/mL) 对共载药脂质体包封率的影响。结果 (表 9) 显示, 蛋黄卵磷脂质量浓度为 10 mg/mL 时, 紫草素的药物包封率最高, 为 94.07%, 随后蛋黄卵磷脂质量浓度越高, 包封率下降; 而藁本内酯的药物包封率整体上高于紫草素, 且变化不显著。

表 9 蛋黄卵磷脂质量浓度对包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effect of egg yolk lecithin concentration on encapsulation rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

蛋黄卵磷脂质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	包封率/%	
	紫草素	藁本内酯
5	91.91 \pm 1.44	94.43 \pm 3.87
10	94.07 \pm 3.42	95.15 \pm 0.94
15	81.90 \pm 5.14	93.96 \pm 1.83
20	75.35 \pm 6.54	93.80 \pm 2.91
30	63.20 \pm 0.25	95.77 \pm 0.93

因此, 选择 10 mg/mL 作为最佳蛋黄卵磷脂质量浓度用于后续研究。

2.4.2 蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比考察 按照“2.2”项下制备方法, 固定蛋黄卵磷脂质量浓度为 10 mg/mL , 分别考察蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比 (2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1) 对共载药脂质体包封率的影响。结果 (表 10) 显示, 紫草素的包封率随着比例 2 : 1 到 4 : 1 而上升, 在 4 : 1 时达到最大值 98.75%, 此后比例继续增大则包封率逐渐下降; 藁本内酯的包封率在各比例下均保持较高水平。因此, 确定蛋黄卵磷脂与胆固醇的最佳质量比为 4 : 1。

2.4.3 蛋黄卵磷脂与总药物质量比考察 按照“2.2”项下制备方法, 固定蛋黄卵磷脂质量浓度为 10 mg/mL , 蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比为 4 : 1, 分别考察蛋黄卵磷脂与总药物的质量比 (7.5 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、30 : 1) 对共载药脂质体包封率

表 10 蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比对包封率的影响

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Effect of mass ratio of egg yolk lecithin to cholesterol on encapsulation rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

蛋黄卵磷脂与 胆固醇质量比	包封率/%	
	紫草素	藁本内酯
2 : 1	94.82 \pm 4.23	97.66 \pm 0.54
3 : 1	97.79 \pm 1.00	97.21 \pm 0.90
4 : 1	98.75 \pm 0.56	97.76 \pm 0.79
5 : 1	94.74 \pm 5.04	96.43 \pm 3.26
6 : 1	93.04 \pm 1.67	96.78 \pm 0.76

的影响。结果(表 11)显示,蛋黄卵磷脂与总药物比例从 7.5:1 上升至 15:1 时,紫草素的包封率从 92.79%提升至 98.26%;藁本内酯的包封率,除 30:1 组外,在各比例下无显著变化。故选择 15:1 为蛋黄卵磷脂与总药物的最佳质量比。

2.4.4 超声时间考察 按照“2.2”项下制备方法,固定蛋黄卵磷脂质量浓度为 10 mg/mL,蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比为 4:1,与总药物的质量比为 15:1,分别考察不同超声时间(2、3、4、5、6 min)对共载药脂质体包封率的影响。结果(表 12)显示,随着超声时间的增加,紫草素包封率呈现缓慢上升的趋势,从 96.59%上升至 97.83%;藁本内酯的包封率在 5 min 时出现最高值 96.73%。因此,选择 5 min 为最佳超声时间。

表 11 总药物与蛋黄卵磷脂质量比对包封率的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Effect of mass ratio of total drugs to egg yolk lecithin on encapsulation rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

蛋黄卵磷脂与 总药物质量比	包封率/%	
	紫草素	藁本内酯
7.5:1	92.79±4.89	96.53±2.18
10:1	97.64±1.33	95.41±1.59
15:1	98.26±0.92	96.40±0.79
20:1	97.65±1.58	97.82±0.59
30:1	95.53±3.28	87.40±6.56

表 12 超声时间对包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 12 Effect of ultrasound time on encapsulation rate
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/ min	包封率/%	
	紫草素	藁本内酯
2	96.59±2.50	93.94±2.45
3	96.10±1.37	94.99±1.99
4	96.46±1.17	94.93±3.12
5	97.20±0.54	96.73±1.97
6	97.83±1.47	94.99±0.41

综上,由单因素考察结果,得到 Lip@Shi/Lig 的最佳处方工艺为蛋黄卵磷脂质量浓度 10 mg/mL,与胆固醇质量比 4:1,蛋黄卵磷脂与总药物质量比 15:1,超声时间 5 min。

为验证该工艺的稳定性与重现性,平行制备了 3 批样本并测定包封率。结果显示,紫草素的包封率分别为 98.15%、98.83%、97.49%,藁本内酯分别为 97.79%、97.45%、96.34%,计算得 Lip@Shi/Lig 中紫草素与藁本内酯的平均包封率分别为(98.16±

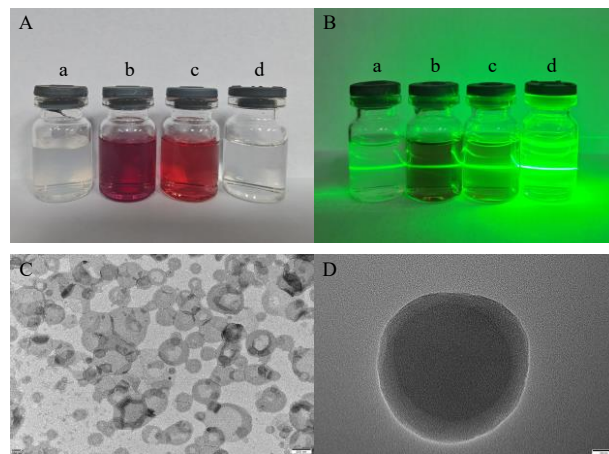
0.67)%和(97.20±0.76)%。

2.5 Lip@Shi/Lig 的表征与稳定性

2.5.1 外观与形貌观察 取制备好的脂质体溶液置于自然光照条件下,进行外观观察并拍摄记录。将溶液稀释至一定浓度后,使用激光笔进行照射,观察溶液是否出现丁达尔效应。

另取适量脂质体溶液,固定于 2%戊二醛中用蒸馏水稀释至适宜浓度。取稀释后的样品滴于铜网上,待其自然晾干后,使用 2%磷钨酸溶液负染 3 min,风干后置于透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)下观察其形态并拍照。

结果显示,空白脂质体、单载药脂质体以及共载药脂质体,自然光下为均一澄清液体(图 8-A)。使用激光笔照射,出现一条明亮的光路,表明溶液的粒径在 1~100 nm(图 8-B)。TEM 结果显示,共载药脂质体呈现均匀球形,轮廓形状清晰,其中可见明显双层膜结构,证明该纳米粒是一种具有类脂质双分子层的囊泡(图 8-C、D)。



a~d 分别为空白脂质体、Lip@Shi/Lig、紫草素脂质体和藁本内酯脂质体。

a~d are blank-Lip, Lip@Shi/Lig, Lip@Shi and Lip@Lig, respectively.

图 8 不同脂质体的整体外观 (A)、脂质体的丁达尔效应 (B) 和 Lip@Shi/Lig 的 TEM 图 (C、D)

Fig. 8 General appearance of different liposomes (A), tyndall effect of liposomes (B) and TEM image of Lip@Shi/Lig (C, D)

2.5.2 粒径与 ζ 电位测定 平行制备 3 批共载药脂质体,取样品混悬液稀释至适宜浓度,使用粒度电位仪测定样品的粒径、多分散系数(polydispersity index, PDI)和 ζ 电位,取平均值。结果如图 9 所示,制得的 3 批脂质体的平均粒径为(88.62±0.26) nm, PDI 为 0.246±0.013, ζ 电位为(-36.57±1.65) mV。

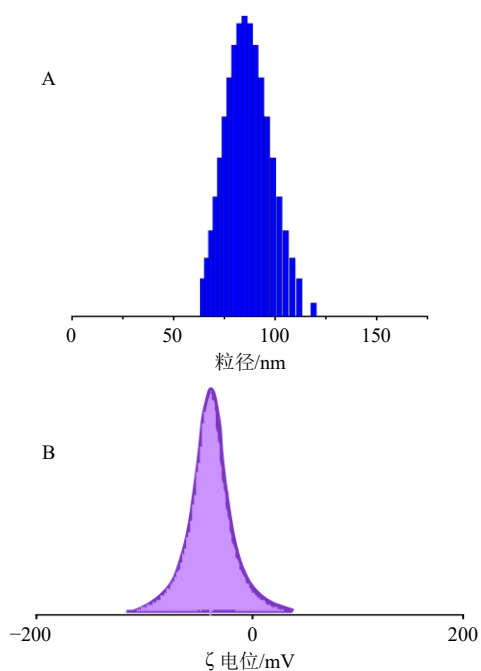


图 9 Lip@Shi/Lig 的粒径 (A) 和 ζ 电位 (B) 分布
Fig. 9 Particle size (A) and ζ potential (B) distribution of Lip@Shi/Lig

2.5.3 药物包封状态分析 为确认药物的包封状态及其在脂质体中的物理形态, 采用傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 与 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 技术, 对紫草素、藁本内酯、空白脂质体及载药脂质体等冻干样品进行了分析。FT-IR 光谱结果 (图 10-A) 显示, 在共载脂质体的谱图中, 属于紫草素和藁本内酯的特征吸收峰均消失, 其整体峰形与空白脂质体高度相似。同样地, XRD 分析结果 (图 10-B) 也表明, 原属于 2 种药物的尖锐晶体衍射峰, 在共载脂质体的图谱中完全消失, 呈现为 1 个与空白脂质体类似的、代表无定形结构的宽泛弥散峰。综上, FT-IR 与 XRD 结果共同表明, 紫草素和藁本内酯已成功被包封于脂质体载体中, 并以无定形状高度分散在脂质双分子层内。

为考察 Lip@Shi/Lig 中的药物稳定性, 将紫草素与藁本内酯的甲醇溶液与共载脂质体放置在 25 °C、自然光照、敞口的条件下保存, 分别在 0、2、4、8、24、48、72 h 测定药物含量, 以 0 h 测定量为 100%, 计算不同时间点下药物质量分数的经时变化。结果显示, 2 种药物在溶液状态下极不稳定。放置 48 h 后紫草素与藁本内酯的质量分数分别下降至 $(50.57 \pm 0.38)\%$ 和 $(26.88 \pm 0.11)\%$ (图 11)。此外, HPLC 图谱显示, 藁本内酯附近出现多个未

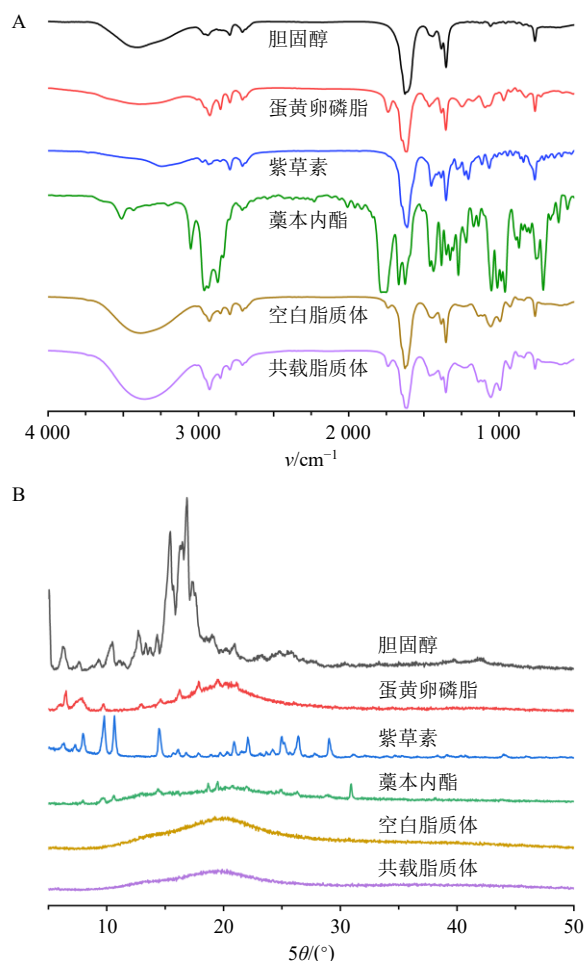


图 10 FT-IR (A) 和 XRD (B) 分析结果
Fig. 10 Analysis results of FT-IR (A) and XRD (B)

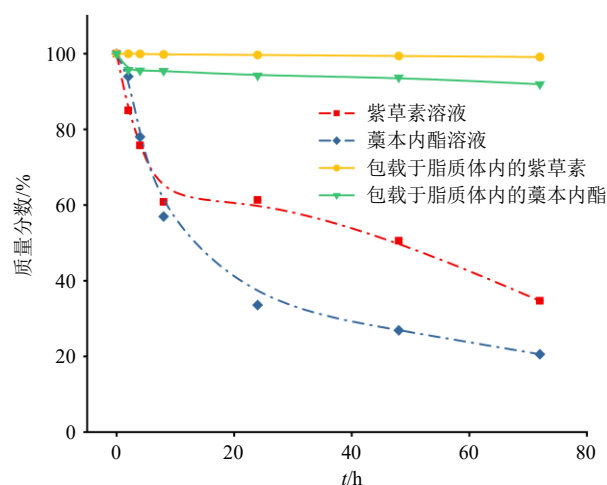


图 11 药物含量经时变化曲线
Fig. 11 Time-dependent change curve of drug content

知杂峰, 且其峰面积不断增加, 表明药物发生了降解。而药物包封进脂质体后, 含量变化较小, 72 h 时共载脂质体中紫草素与藁本内酯的质量分数仍分别保持在 $(99.13 \pm 0.06)\%$ 和 $(91.93 \pm 0.16)\%$, 这表

明脂质体能够有效保护所包封的药物。

2.5.4 稳定性考察 为考察共载脂质体在冷藏条件下的稳定性, 将其置于 4 °C 下保存, 并于 0、4、8、12、15 d 取样, 测量其粒径、PDI、包封率和渗漏率的变化, 按照如下公式计算渗漏率。保存 15 d 后, Lip@Shi/Lig 溶液未出现明显变化, 无沉淀产生。由图 12 和表 13 可知共载脂质体粒径在冷藏 15 d 内变化较小, 脂质体包封率及渗漏率未有显著变化, 这表明其在低温环境下具有较好的稳定性。

$$\text{渗漏率} = (\text{EE}_0 - \text{EE}_t) / \text{EE}_0$$

EE₀ 为 0 d 时脂质体的包封率, EE_t 为 t d 时脂质体的包封率

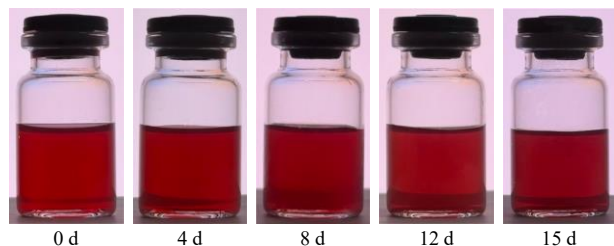


图 12 Lip@Shi/Lig 溶液外观

Fig. 12 Appearance of Lip@Shi/Lig solution

表 13 储藏稳定性试验 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 13 Storage stability test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	粒径/nm	PDI	包封率/%		渗漏率/%	
			紫草素	藁本内酯	紫草素	藁本内酯
0	89.59±0.67	0.158±0.014	98.09±0.06	96.88±0.22	0	0
4	90.48±0.58	0.175±0.007	97.72±0.18	96.75±0.07	0.38±0.18	0.14±0.07
8	89.53±0.81	0.142±0.010	94.49±0.07	96.37±0.03	3.67±0.07	0.53±0.03
12	90.33±0.42	0.187±0.019	89.87±0.44	93.63±0.07	8.38±0.45	3.36±0.07
15	90.62±0.46	0.156±0.013	86.82±0.13	91.79±0.17	11.49±0.13	5.26±0.17

2.6 脂质体透皮性能考察

2.6.1 体外透皮实验 使用异氟烷吸入方式麻醉 SD 大鼠, 腹部脱毛处理后处死动物。取腹部皮肤, 清除脂肪层及皮下结缔组织, 将皮肤修剪成合适大小。用生理盐水反复冲洗后, 用滤纸吸除表面水分。将处理好的皮肤固定于 Franz 扩散池中, 将角质层面向供给池, 接收池中注入 30% 乙醇生理盐水作为接收介质, 确保皮肤与接收池溶液之间无气泡残留。向各组供给池中加入样品液, 在 (37.0±0.5) °C、350 r/min 条件下恒速搅拌。分别于加样后 1、2、4、6、8、10、12、24、30 h 吸取 1 mL 接收池溶液, 同时补充等量接收介质。将各时间点所取的样品液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 测定药物质量浓度, 按照公式计算单位面积累积渗透量 (cumulative permeation quantity, Q_n), 绘制 Q_n-t 曲线。

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

C_n 为第 n 个取样时间点接收液的药物质量浓度 (μg/mL), C_i 为第 i 个时间点所取接收液的药物质量浓度 (μg/mL), V 为接收池液体总体积 (15 mL), V_i 为第 i 次所取样品的体积 (1 mL), A 为渗透屏障面积 (1.766 cm²)

2.6.2 真皮滞留量 (Q_s) 透皮实验结束后, 收集皮肤, 用生理盐水冲洗残留药物, 用滤纸吸干多余水分, 将皮肤剪碎后加适量生理盐水研磨成浆, 所得匀浆液加入 1 mL 甲醇, 超声 20 min, 以 3 500 r/min 转速离心 10 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, HPLC 法测定紫草素在各组皮肤真皮中的滞留量, 按公式计算药物 Q_s 。

$$Q_s = C_s V_s / A$$

C_s 为真皮样品中药物含量, V_s 为真皮样品液体积, A 为渗透屏障面积 (1.766 cm²)

2.6.3 体外透皮研究及 Q_s 测定结果 体外透皮吸收曲线见图 13, 紫草素与藁本内酯的单体药物透皮性能较差, 30 h 的累积透皮量分别为 (9.05±0.37)、(23.73±0.56) μg/cm²。将其制备为 Lip@Shi 和 Lip@

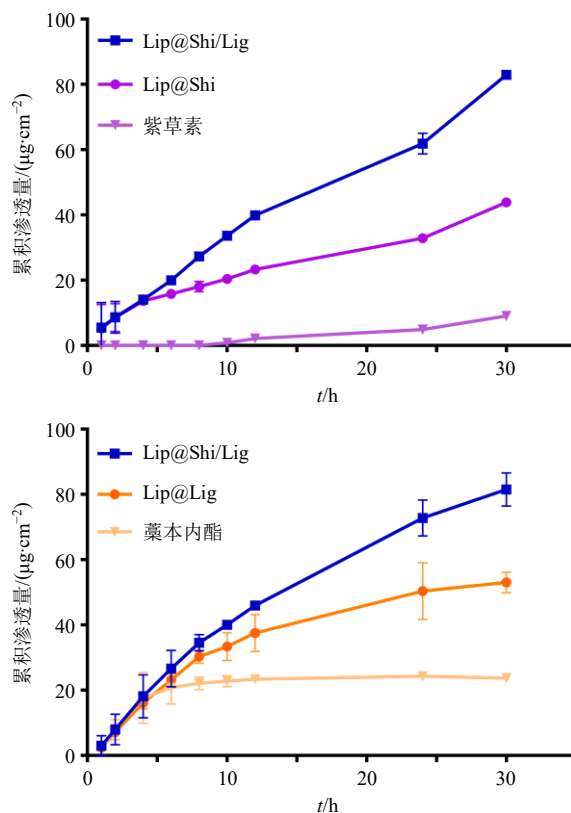


图 13 Lip@Shi/Lig、Lip@Shi、Lip@Lig、紫草素和藁本内酯的经皮累积渗透量曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Transdermal cumulative permeation curves of Lip@Shi/Lig, Lip@Shi, Lip@Lig, shikonin and ligustilide ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Lig 后, 透皮效率均得到显著提升, 累积透皮量分别达到 (43.90 ± 0.17) 、 (53.01 ± 2.26) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。共载脂质体 Lip@Shi/Lig 对 2 种药物的递送效率实现了最大化, 其中紫草素和藁本内酯的累积透皮量分别增加至 (82.97 ± 0.72) 、 (81.57 ± 3.59) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。这表明 Lip@Shi/Lig 不仅是一种有效的递送载体, 更可能在 2 种药物之间产生了协同促渗效应。

为深入探究其机制, 对 Q_n - t 曲线进行了模型拟合, 结果见表 14。由表可知, 紫草素在 Lip@Shi/Lig 中的释放行为从单载药脂质体 Lip@Shi 的零级动力学转变为更偏向于一级动力学。这种释放动力学的改变提示, 藁本内酯的存在影响了紫草素从脂质体

中的释放模式, 可能导致其初期释放速率加快, 从而在皮肤表面建立更高的浓度梯度。与此同时, 藁本内酯在单载和共载脂质体中的释放均符合 Higuchi 方程, 表明其释放主要受扩散控制, 且紫草素未对其释放机制产生明显影响。

各组药物的皮肤 Q_s 见表 15。紫草素单体药物的皮肤滞留量为 (1.75 ± 0.20) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, Lip@Shi 和 Lip@Shi/Lig 分别增加至 (4.74 ± 0.68) 、 (6.12 ± 0.18) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 相比与单体药物组均有所提高。藁本内酯药物的 Q_s 变化更为明显, Lip@Lig 和 Lip@Shi/Lig 分别为 (6.98 ± 0.80) 、 (8.08 ± 0.04) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 显著高于单体药物的皮肤滞留量 (1.04 ± 0.16) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

表 14 紫草素和藁本内酯经皮累积渗透量曲线模型拟合 ($n = 3$)

Table 14 Model fitting of transdermal cumulative permeation curves of shikonin and ligustilide ($n = 3$)

模型	紫草素拟合方程		
	紫草素乙醇溶液	Lip@Shi	Lip@Shi/Lig
零级释放	$Q = -0.15t - 0.59, R^2 = 0.5682$	$Q = 1.14t + 9.52, R^2 = 0.9944$	$Q = 2.58t + 6.22, R^2 = 0.9938$
一级释放	—	$Q = 64.59(1 - e^{-0.04t}), R^2 = 0.9880$	$Q = 182.87(1 - e^{-0.02t}), R^2 = 0.9986$
Higuchi	$Q = 2.02t^{1/2} - 4.99, R^2 = 0.9598$	$Q = 9.93t^{1/2} - 11.11, R^2 = 0.9893$	$Q = 20.38t^{1/2} - 29.80, R^2 = 0.9944$
Ritger Peppas	$Q = 0.12t^{1.16}, R^2 = 0.9916$	$Q = 4.24t^{0.68}, R^2 = 0.9928$	$Q = 4.70t^{0.84}, R^2 = 0.9976$

模型	藁本内酯拟合方程		
	藁本内酯乙醇溶液	Lip@Lig	Lip@Shi/Lig
零级释放	$Q = 0.41t + 14.32, R^2 = 0.3329$	$Q = 2.26t + 1.52, R^2 = 0.8154$	$Q = 2.88t + 10.06, R^2 = 0.9117$
一级释放	$Q = 24.39(1 - e^{-0.24t}), R^2 = 0.9724$	$Q = 69.25(1 - e^{-0.06t}), R^2 = 0.9506$	$Q = 109.35(1 - e^{-0.05t}), R^2 = 0.9977$
Higuchi	$Q = 3.59t^{1/2} + 7.19, R^2 = 0.5633$	$Q = 12.80t^{1/2} - 10.53, R^2 = 0.9770$	$Q = 17.85t^{1/2} - 16.12, R^2 = 0.9984$
Ritger Peppas	$Q = 10.25t^{0.28}, R^2 = 0.6728$	$Q = 3.96t^{0.81}, R^2 = 0.8848$	$Q = 7.93t^{0.70}, R^2 = 0.9829$

表 15 药物体外透皮实验相关参数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 15 Parameters related to *in vitro* drug transdermal assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

成分	组别	$Q_s(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$	拟合方程	R^2
紫草素	紫草素乙醇溶液	1.75 ± 0.20	$Q = 0.12t^{1.16}$	0.9916
	Lip@Shi	4.74 ± 0.68	$Q = 1.14t + 9.52$	0.9944
	Lip@Shi/Lig	6.12 ± 0.18	$Q = 182.87(1 - e^{-0.02t})$	0.9986
藁本内酯	藁本内酯乙醇溶液	1.04 ± 0.16	$Q = 24.39(1 - e^{-0.24t})$	0.9724
	Lip@Lig	6.98 ± 0.80	$Q = 12.80t^{1/2} - 10.53$	0.9770
	Lip@Shi/Lig	8.08 ± 0.04	$Q = 17.85t^{1/2} - 16.12$	0.9984

以上结果表明, 脂质体能增加药物的角质渗透性, 增大药物的 Q_s ; 同时, 将紫草素与藁本内酯制成共载脂质体, 可能通过协同作用, 进一步提高药物的经皮效率。

3 讨论

皮肤烧烫伤修复是一个复杂的动态过程, 其过程主要涉及局部角质形成细胞、成纤维细胞增殖并

迁移至创面重建表皮和真皮层, 以及血管内皮细胞增殖迁移并形成新血管为修复提供营养^[20], 因此本实验选取了人角质形成细胞和人脐静脉血管内皮细胞作为主要研究细胞类型用于研究药物的修复作用^[21]。实验采用 CCK-8 法评估了紫草素和藁本内酯对正常 HaCaT 细胞和 HUVEC 细胞的安全性以及热损伤细胞的有效性, 初步筛选了紫草素单体药和藁本内酯单体药物的安全浓度和有效浓度范围, 确定紫草素和藁本内酯的最佳作用浓度为 0.125 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 两药联合的最佳比例为 1 : 1。随后, 考察了联合用药对热损伤细胞的协同治疗作用, 发现两药联用时能显著促进细胞增殖和迁移、抑制细胞凋亡, 并有效调控细胞 ROS 水平和 MMP 水平, 发挥促进热损伤细胞修复作用, 这些研究发现为后续制剂的开发奠定了基础。

在烧烫伤愈合过程中, 愈合时间延长是主要障碍之一。尤其是当烧烫伤累及深 II 度甚至 III 度损

伤时,愈合时间的延长容易增加患处微生物感染风险,导致损伤向皮肤深部发展,延长加重病情^[1]。这就需要开发能够更深入皮肤组织并持续给药的递送体系,加速伤口愈合,严防并发症的发生。脂质体系统可以帮助药物有效渗透从而实现药物向特定的更深损伤皮肤组织层的靶向递送以及降低药物的全身毒性,同时在烧伤部位形成理想的微环境,显著促进伤口愈合和组织再生^[22]。鉴于脂质体的这些特性,将其应用于共载紫草素和藁本内酯,以期同时解决紫草素的难溶性及高毒性问题、增加藁本内酯的稳定性,并利用其递送优势提升药物在烧烫伤部位的蓄积和疗效,充分发挥两药在治疗皮肤疾病上的优势。本实验采用薄膜分散法制备共载药脂质体 Lip@Shi/Lig,通过工艺优化和质量考察,确定了共载脂质体最佳处方工艺为蛋黄卵磷脂质量浓度为 10 mg/mL,蛋黄卵磷脂与胆固醇质量比 4:1,蛋黄卵磷脂与总药物质量比 15:1,超声时间 5 min。所制备的 Lip@Shi/Lig 具有双层膜结构,为类圆形囊泡结构,具有典型的脂质体特征,紫草素与藁本内酯的包封率均在 97%以上,具有均匀的粒径分布和适宜的稳定性。

透皮实验结果表明,与单载药脂质体相比,Lip@Shi/Lig 共载脂质体在药物递送效率和 Q_s 方面均表现出显著的提升。这种良好性能并非由单一因素驱动,而是制剂内部优化、载体性质改变以及药物分子对皮肤屏障的直接作用在多层面协同作用的结果。首先,在制剂微观层面,推测藁本内酯的引入改善了紫草素在脂质双分子层内的物理分散状态。油状的藁本内酯作为“分子间隔物”共载于膜中,可抑制紫草素的聚集或结晶,使其以更高能量、更均匀的非晶态或单分子状态存在。有研究表明,共包封油性成分可显著改变药物在脂质载体中的结晶行为^[23]。这种高度分散状态提高了紫草素的表观溶解度和热力学活性,使其在脂质体与皮肤接触时能够以更高的分配系数和更快的速率穿透角质层。这一推测得到了释放动力学结果的进一步支持,紫草素在共载脂质体中的释放机制由单载时的零级动力学转变为一级动力学。这一关键变化表明,藁本内酯的存在确实改变了紫草素的微环境,优化了其释放模式,使其能更快地建立透皮所需的浓度梯度。其次,在载体宏观性质方面,藁本内酯可能充当了“膜流动性调节剂”。作为亲脂性小分子,其嵌入磷脂双分子层后可扰乱磷脂酰胆碱链的有

序排列,从而增加囊泡膜的流动性与柔韧性^[24-25]。已有研究证实,囊泡载体的变形能力是其高效穿透角质层屏障的关键因素之一,柔性更高的共载脂质体能够更有效地通过角质层细胞间狭窄的脂质通道^[26]。因此,共载脂质体可能因其更佳的变形能力而展现出更强的皮肤渗透性。最后,当脂质体将药物递送至皮肤表面后,释放出的藁本内酯分子则继续发挥其作为传统化学促渗剂对皮肤屏障的直接作用,通过扰乱角质层脂质的有序排列,为紫草素的渗透进一步开辟通道^[27]。

综上所述,Lip@Shi/Lig 共载脂质体的透皮优势,是药物在载体内的优良分散状态、载体膜柔性提升以及藁本内酯对皮肤屏障的直接促渗作用三者协同效应的体现,充分彰显了药物共载策略在设计高效透皮递送系统中的巨大潜力。本研究针对烧烫伤深部组织修复的临床挑战,成功开发了一种具有良好透皮性能和稳定性的脂质体纳米系统(Lip@Shi/Lig)。该系统有效克服了单体药物的局限性,并展现出显著优于游离药物和单载药脂质体的 Q_s ,显示出加快烧烫伤修复愈合、降低感染风险的潜力。这不仅为烧烫伤修复药物的开发提供了重要的实验依据,还为其他局部给药系统的设计提供了参考,为后续在体内外深入研究其促愈合机制奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Maitz J, Merlino J, Rizzo S, *et al.* Burn wound infections microbiome and novel approaches using therapeutic microorganisms in burn wound infection control [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, 196: 114769.
- [2] 陈红风. 中医外科学 [M]. 第 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 151-329.
- [3] 袁海宁, 冯佳英, 杨志玲, 等. 烧烫伤中医治疗及剂型的研究进展 [J]. *光明中医*, 2023, 38(19): 3885-3888.
- [4] Zhou T, Zhang C Y, Wang X, *et al.* Research on traditional Chinese medicine as an effective drug for promoting wound healing [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 332: 118358.
- [5] Nascimento J A C Jr, Santos Oliveira A M, Porras K D L, *et al.* Exploring trends in natural product-based treatments to skin burn: A comprehensive review [J]. *Phytomedicine*, 2025, 139: 156481.
- [6] 明·秦景明编著, 吴果超校. 幼科金针 [M]. 上海: 中医书局, 1936: 1-128.
- [7] Xue C H, Dou J F, Zhang S Z, *et al.* Shikonin potentiates skin wound healing in Sprague-Dawley rats by stimulating

- fibroblast and endothelial cell proliferation and angiogenesis [J]. *J Gene Med*, 2024, 26(1): e3633.
- [8] Luo B X, Ding X F, Hu Y, *et al.* Shikonin hastens diabetic wound healing by inhibiting M1 macrophage polarisation through the MAPK signaling pathway [J]. *Mol Immunol*, 2025, 177: 73-84.
- [9] Shu G, Xu D, Zhang W, *et al.* Preparation of shikonin liposome and evaluation of its *in vitro* antibacterial and *in vivo* infected wound healing activity [J]. *Phytomedicine*, 2022, 99: 154035.
- [10] Li J, Yu J, Ma H, *et al.* Intranasal pretreatment with Z-ligustilide, the main volatile component of *Rhizoma Chuanxiong*, confers prophylaxis against cerebral ischemia via Nrf2 and HSP70 signaling pathways [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(8): 1533-1542.
- [11] Zhu Y, Zhang Y J, Huang X, *et al.* Z-Ligustilide protects vascular endothelial cells from oxidative stress and rescues high fat diet-induced atherosclerosis by activating multiple *NRF2* downstream genes [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 284: 110-120.
- [12] Zhang K X, Liu W J, Shen F K, *et al.* Ligustilide covalently binds to Cys703 in the pre-S1 helix of TRPA1, blocking the opening of channel and relieving pain in rats with acute soft tissue injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 330: 118217.
- [13] 朱红梅, 张爱军, 李帅. 基于药辅合一理念的川芎与当归挥发油透皮作用研究 [J]. 中国药学杂志, 2024, 59(23): 2249-2257.
- [14] 杨小瑜, 姜一平, 冯浩维, 等. 紫草外用传统制剂与新型纳米制剂的研究进展 [J]. 中国药房, 2023, 34(15): 1909-1914.
- [15] Guo C J, He J L, Song X, *et al.* Pharmacological properties and derivatives of shikonin-A review in recent years [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 149: 104463.
- [16] 侯效英, 高帆, 杜丽东, 等. 藜本内酯稳定性研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2024, 59(24): 2299-2305.
- [17] Barroso A, Mestre H, Ascenso A, *et al.* Nanomaterials in wound healing: From material sciences to wound healing applications [J]. *Nano Sel*, 2020, 1(5): 443-460.
- [18] Zheng S Y, Wang W Y, Aldahdooh J, *et al.* Synergy Finder plus: Toward better interpretation and annotation of drug combination screening datasets [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2022, 20(3): 587-596.
- [19] Ianevski A, Giri A K, Aittokallio T. SynergyFinder 3.0: An interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W739-W743.
- [20] Hussain Z, Thu H E, Rawas-Qalaji M, *et al.* Recent developments and advanced strategies for promoting burn wound healing [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 68: 103092.
- [21] Veith A P, Henderson K, Spencer A, *et al.* Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 146: 97-125.
- [22] Zhang D L, Zhang J X. Surface engineering of nanomaterials with phospholipid-polyethylene glycol-derived functional conjugates for molecular imaging and targeted therapy [J]. *Biomaterials*, 2020, 230: 119646.
- [23] Karande P, Mitragotri S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(11): 2362-2373.
- [24] Campani V, Scotti L, Silvestri T, *et al.* Skin permeation and thermodynamic features of curcumin-loaded liposomes [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2020, 31(2): 18.
- [25] Souto E B, Macedo A S, Dias-Ferreira J, *et al.* Elastic and ultradeformable liposomes for transdermal delivery of active pharmaceutical ingredients (APIs) [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9743.
- [26] Elsayed M M A, Abdallah O Y, Naggar V F, *et al.* Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery [J]. *Int J Pharm*, 2006, 322(1/2): 60-66.
- [27] Schafer N, Balwierz R, Biernat P, *et al.* Natural ingredients of transdermal drug delivery systems as permeation enhancers of active substances through the *Stratum corneum* [J]. *Mol Pharm*, 2023, 20(7): 3278-3297.

[责任编辑 郑礼胜]