

雪松醇纳米混悬剂的制备及其治疗雄激素性脱发的药效学研究

官 鹭^{1,2}, 戴逸潇^{1,2}, 王 线³, 雷万锋³, 李 平³, 卢 山^{1,2}, 郭瑜婕^{1,2}, 洪 怡^{1,2*}

1. 湖北中医药大学药学院 药物制剂中心, 湖北 武汉 430065

2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065

3. 武汉润禾生物医药有限公司, 湖北 武汉 430040

摘要: 目的 为提高雪松醇的毛囊靶向递送效率, 制备雪松醇纳米混悬剂 (cedrol-nanosuspension, Ce-NS), 进行处方工艺优化、理化性质表征, 并评价其治疗雄激素性脱发 (androgenetic alopecia, AGA) 的药效。方法 采用溶剂-反溶剂沉淀法制备 Ce-NS, 在单因素实验的基础上, 以粒径大小和多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为考察指标, 应用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 对处方工艺参数进行系统优化。利用动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 对制剂的理化性质及贮藏稳定性进行表征。通过 Franz 扩散池评价体外透皮能力, 采用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 进行形态学研究并评估毛囊中纳米晶体的积累, 建立 C57BL/6 小鼠 AGA 模型, 对其背部皮肤组织进行苏木精-伊红 (HE) 染色、免疫组织化学染色评价其促进体内生发药效。结果 确定最优处方工艺为雪松醇的质量浓度为 7.5 mg/mL, 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 用量为 170 mg, 羟丙基甲基纤维素 (hydroxypropyl methylcellulose, HPMC) 用量为 130 mg, 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 400 与水相的比例为 1:12; 滴加速度为 20 mL/min, 搅拌速度为 10 000 r/min, 剪切时间为 5 min。所得 Ce-NS 粒径为 (434.47±9.90) nm, PDI 为 0.232±0.005, ζ 电位为 (-15.20±1.15) mV, 实测值与模型预测值拟合良好。Ce-NS 在室温下放置 90 d, 稳定性良好。体外透皮结果显示, 24 h 内 Ce-NS 的皮肤滞留量为 (74.38±3.90) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 较原料药组显著提高 4.1 倍, 且在接收液中未检出。SEM 扫描皮肤切片证实了雪松醇纳米晶体在毛囊内的积累。药效学实验表明, 与模型组相比, Ce-NS 能有效促进 AGA 模型小鼠毛发再生, 并显著增加毛囊数量与毛发长度, 且小鼠背部皮肤组织中的雄激素受体 (androgen receptor, AR) 表达水平下降, 而 Ki-67 抗原 (Ki-67 antigen, Ki67)、 β -连环蛋白 (Beta-catenin, β -catenin) 表达水平升高。结论 采用绿色工艺成功制备了 Ce-NS, 且理化性质稳定, 并能显著提高雪松醇在皮肤中的滞留量以及成功靶向到毛囊, 对 AGA 表现出良好的治疗潜力, 其作用机制可能与降低雄激素水平和促进 Wnt/ β -连环蛋白信号通路 (Wnt/ β -catenin) 传导有关。

关键词: 雪松醇; 聚乙二醇 400; 纳米混悬剂; 雄激素性脱发; 毛发再生

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)17-6779-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.17.011

Preparation of cedrol nanosuspension and its pharmacodynamic study on treatment of androgenetic alopecia

GUAN Lu^{1,2}, JI Yixiao^{1,2}, WANG Xian³, LEI Wanfeng³, LI Ping³, LU Shan^{1,2}, GUO Yujie^{1,2}, HONG Yi^{1,2}

1. Research Center for Pharmaceutical Preparation, School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China

3. Wuhan Runhe Bio-pharmaceutical Co., Ltd., Wuhan 430040, China

Abstract: Objective To enhance the hair follicle-targeted delivery efficiency of cedrol, a cedrol nanosuspension (Ce-NS) was prepared. The formulation and process parameters were optimized, the physicochemical properties were characterized, and its therapeutic efficacy in the treatment of androgenetic alopecia (AGA) was evaluated. **Methods** Ce-NS was prepared using a solvent-antisolvent precipitation method. Based on single-factor experiments, particle size and polydispersity index (PDI) were selected as

收稿日期: 2026-03-12

基金项目: 湖北省经济和信息化厅第五批中小微企业“科技副总”对接项目 (61)

作者简介: 官 鹭 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物制剂新技术研究。E-mail: 862756829@qq.com

*通信作者: 洪 怡, 博士, 副教授, 主要从事药物制剂新技术与新药研发。E-mail: 46447564@qq.com

evaluation parameters to optimize the formulation and process variables using the Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM). The physicochemical characteristics and storage stability of the formulation were determined by dynamic light scattering (DLS). *In vitro* transdermal performance was evaluated using a Franz diffusion cell system. Morphological characteristics were examined by scanning electron microscopy (SEM) to assess the accumulation of nanocrystals within hair follicles. An AGA model was established in C57BL/6 mice. Hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemical analysis of dorsal skin tissues were performed to evaluate the *in vivo* hair growth-promoting efficacy. **Results** The optimal formulation parameters were as follows: cedrol mass concentration 7.5 mg/mL, sodium dodecyl sulfate (SDS) 170 mg, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) 130 mg, and a polyethylene glycol (PEG) 400-to-water phase ratio of 1 : 12. The process parameters included a dropping rate of 20 mL/min, stirring speed of 10 000 r/min, and shearing time of 5 min. The prepared Ce-NS exhibited a mean particle size of (434.47 ± 9.90) nm, a PDI of 0.232 ± 0.005 , and a ζ potential of (-15.20 ± 1.15) mV. The experimental values were in good agreement with the predicted values of the model. Ce-NS remained stable for 90 days at room temperature. *In vitro* transdermal studies showed that the skin retention of Ce-NS within 24 h reached (74.38 ± 3.90) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, which was 4.1-fold higher than that of the raw drug group, while no cedrol was detected in the receptor medium. SEM observation of skin sections confirmed the accumulation of cedrol nanocrystals within hair follicles. Pharmacodynamic evaluation demonstrated that, compared with the model group, Ce-NS significantly promoted hair regeneration in AGA model mice, increased hair follicle density and hair length, decreased androgen receptor (AR) expression in dorsal skin tissue, and upregulated the expression of Ki67 and β -catenin. **Conclusion** Ce-NS was successfully prepared using a green preparation process and exhibited stable physicochemical properties. The formulation significantly enhanced the skin retention and follicular targeting of cedrol, demonstrating promising therapeutic potential for androgenetic alopecia. The underlying mechanism may be associated with the downregulation of androgen signaling and activation of the Wnt/ β -catenin pathway.

Key words: cedrol; polyethylene glycol 400; nanosuspensions; androgenetic alopecia; hair regeneration

雄激素性脱发 (androgenetic alopecia, AGA) 又称脂溢性脱发, 是临床最常见的脱发类型, 其特征表现为毛发生长周期紊乱, 毛囊逐渐微小化、生长周期缩短而休止期延长^[1]。在 AGA 的发病机制中, 雄激素被认为是疾病发展的核心因素^[2], 体内的主要雄激素睾酮在毛囊中被 5 α -还原酶催化生成活性更高的 5 α -二氢睾酮 (5 α -dihydrotestosterone, DHT), DHT 与毛囊内雄激素受体 (androgen receptor, AR) 结合后, 诱导毛囊逐渐萎缩, 毛发生长周期缩短, 最终导致脱发^[3]。

目前, FDA 批准用于 AGA 治疗的药物包括口服非那雄胺和外用米诺地尔 (Minoxidil)^[4], 米诺地尔可能会导致多毛症以及用药部位的瘙痒和发红等刺激性反应, 非那雄胺则可能导致性功能障碍且不适用于女性患者^[5]。

雪松醇又称柏木脑、柏木醇, 是一种天然的倍半萜醇类化合物。可从柏科、杉科和松科等多种植物提取得到, 具有抗焦虑、抗炎镇痛、抗肿瘤、抗菌、促进头发生长等药理作用^[6-8]。此外, 雪松醇能通过拮抗血小板活化因子, 改善毛囊周围的微循环、增加血流量、增强氧气和营养物质向毛囊细胞的输送, 从而促进毛发生长^[9]。雪松醇已获得 FDA 批准用于化妆品和香水中^[10], 提取工艺成熟、价格低廉、皮肤相容性好。但其低溶解性和低渗透性导

致其在皮肤中的分布及滞留能力有限。在外用给药时, 难以在毛囊部位维持有效浓度, 从而影响药效的最大化发挥。

纳米混悬剂 (nanosuspension, NS) 也可称为纳米晶体, 是将难溶性药物在稳定剂作用下形成的纳米级“纯药物”分散体系, 具有提高药物溶解度、溶出度等优势^[11], 并且能够通过控制粒径和表面性质来实现靶向药物的递送^[12]。经皮递送系统可避免胃肠道降解及首过效应, 结合纳米晶良好的皮肤附着性, 有助于提高药物在皮肤中的滞留与分布^[13]。

本研究采用溶剂-反溶剂沉淀法制备 Ce-NS, 运用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化 Ce-NS 的处方工艺, 并对其进行表征、透皮机制以及毛囊靶向的研究, 建立小鼠 AGA 模型, 通过苏木精-伊红 (HE) 染色和免疫组织化学染色 (immunohistochemistry, IHC) 评价 Ce-NS 对 AGA 的治疗作用。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ME104E 型万分之一电子天秤, 梅特勒-托利多仪器有限公司; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器, 郑州长城科工贸有限公司; YZ1515X 型蠕动泵, 保定创锐泵业有限公司; ST2100 型 pH 计, 奥

豪斯仪器有限公司; FA25D 型数显高剪切分散乳化机, 上海弗鲁克科技发展有限公司; ZS90 型纳米粒度电位仪, 马尔文帕纳科; LC-20A 型高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司; PK4-WS 离心机, 湖南平科科学仪器有限公司。

1.2 试剂

雪松醇对照品, 批号 D2407033, 质量分数 $\geq 98\%$, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 雪松醇原料药, 批号 20240315, 质量分数 97.05%, 江西宝林天然香料有限公司; 聚乙二醇 400 (polyethylene glycol 400, PEG400, 批号 20220928)、羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na, 批号 30036328), 国药集团化学试剂有限公司; 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS), 批号 F310C231002, 湖北葛店人福药用辅料有限责任公司; 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP) K30, 批号 C15050213, 上海麦克林生化科技有限公司; 泊洛沙姆 407 (P407), 批号 H11J9C52602, 上海源叶生物科技有限公司; 羟丙基甲基纤维素 (hydroxypropyl methylcellulose, HPMC), 批号 2405018, 山东一滕材料股份有限公司; 聚山梨酯-80, 批号 D0277HB35, 广东润化工有限公司; 丙酸睾酮注射液, 批号 20250607, 合肥新科信动物药业有限公司; 注射用大豆油, 批号 20250501D3, 浙江田雨山药用油有限公司。

1.3 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 60 只, 7~8 周龄, 体质量 20~22 g, 由湖北贝恩特生物科技有限公司提供, 许可证号 SCXK (鄂) 2021-0027, 实验动物统一饲养于湖北中医药大学实验动物中心, 实验开展前先进行 1 周适应性喂养, 期间可自由饮水, 本研究经湖北中医药大学动物伦理委员会批准, 批准号 HUCMS69900053。

2 方法与结果

2.1 Ce-NS 和 Blank-NS 的制备

采用溶剂-反溶剂沉淀法制备 Ce-NS, 取处方量的雪松醇溶于 PEG400 溶液中, 沸水浴超声使其溶解后作为药物溶剂相; 将 SDS 和 HPMC 加入纯水中充分溶胀作为反溶剂相; 在持续搅拌条件下, 通过蠕动泵将雪松醇溶液相, 以一定速度滴加至反溶剂相中, 滴加结束后继续搅拌得 Ce-NS。空白药物纳米混剂 (Blank-NS) 除去主药外, 其余制备方法同 Ce-NS。

2.2 Ce-NS 粒径分布、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 及 ζ 电位的测定

取 Ce-NS 样品 1 mL 置于比色皿中, 采用马尔文纳米激光粒度仪测定其粒径、PDI 及 ζ 电位, 平行测定 3 次, 结果取平均值。

2.3 雪松醇含量的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Fortis XI C₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (85:15); 检测波长 190 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L。

2.3.2 对照品溶液的配制 精密称取雪松醇对照品 10 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加入适量乙腈溶解后定容至刻度, 制得质量浓度为 200 μ g/mL 雪松醇对照品溶液, 密封后于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3.3 供试品溶液的配制 精密吸取 Ce-NS 混悬液 1 mL 置于 50 mL 量瓶中, 加入乙腈溶解并定容至刻度线, 即得质量浓度为 150 μ g/mL 的 Ce-NS 供试品溶液。

2.3.4 专属性考察 取 SDS、HPMC 等辅料, 按处方组成配制阴性样品, 按照“2.3.3”项下方法配制阴性样品溶液。按照“2.3.1”项下色谱条件, 对雪松醇对照品溶液、Ce-NS 供试品溶液及阴性样品溶液分别进行 HPLC 分析, 色谱图见图 1。结果表明, 在雪松醇保留时间处未观察到辅料干扰峰, 说明该方法具有良好的专属性。

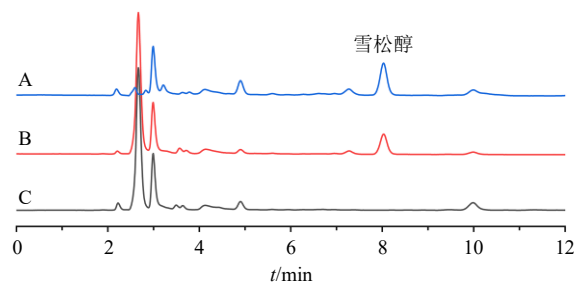


图 1 雪松醇对照品 (A)、Ce-NS 样品 (B)、阴性样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of cedrol reference substance (A), Ce-NS sample (B), and negative sample (C)

2.3.5 线性关系考察 精密吸取雪松醇对照品溶液适量, 以乙腈作为稀释剂, 配制质量浓度分别为 5、10、25、50、100、200 μ g/mL 的系列对照品溶液。按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定, 记录各质量浓度的峰面积。以质量浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归分析, 得到回归方程为 $Y=551.71 X+598.12$, $R^2=0.999 8$, 结果表明雪松

醇在 5~200 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系。

2.3.6 精密度考察 按照“2.3.1”项下色谱条件,对质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的雪松醇对照品溶液连续进样测定 6 次。结果显示,雪松醇峰面积的 RSD 为 0.62%,结果表明该仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性考察 按照“2.3.1”项下色谱条件,对制备后的 Ce-NS 供试品溶液分别在 0、2、4、8、12、24 h 取样测定,计算雪松醇峰面积的 RSD 为 1.61%,结果表明 Ce-NS 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.8 重复性考察 按照“2.3.3”项下方法,将 Ce-NS 平行制备 6 份供试品溶液,在“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算得雪松醇质量分数的 RSD 为 1.24%,结果表明该方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率考察 取 9 份体积均为 0.5 mL 的 Ce-NS 置于 25 mL 量瓶中,分为低、中、高 3 组,分别加入 80%、100%、120% 的雪松醇对照品,按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定雪松醇含量,并计算加样回收率。结果显示,雪松醇的平均加样回收率为 100.41%,RSD 为 0.86%,结果表明该方法准确度较高。

2.4 处方单因素考察

2.4.1 稳定剂的筛选 在雪松醇用量为 500 mg,稳定剂用量为 100 mg,溶剂与反溶剂比例为 1:15,药物质量浓度为 5 mg/mL,溶剂滴加速度为 10 mL/min,搅拌速度为 10 000 r/min,剪切时间为 5 min 的条件下,考察不同稳定剂对 Ce-NS 的粒径及 PDI 的影响,结果见表 1。SDS 与 HPMC 联用时制备的 Ce-NS 平均粒径最小且 PDI 较低,因此选择 SDS 与 HPMC 组合作为 Ce-NS 稳定剂。

2.4.2 复合稳定剂 SDS 与 HPMC 比例的筛选 在

表 1 稳定剂种类对粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of stabilizer type on particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂种类	粒径/nm	PDI
SDS	665.1 $\pm$ 29.3	0.217 $\pm$ 0.029
PVP K30	—	—
P407	1 104.0 $\pm$ 52.6	0.177 $\pm$ 0.036
HPMC	1 914.3 $\pm$ 175.7	0.955 $\pm$ 0.078
聚山梨酯-80	1 121.7 $\pm$ 17.2	0.182 $\pm$ 0.043
CMC-Na	—	—
P407+SDS	1 134.8 $\pm$ 177.6	1.000 $\pm$ 0.000
HPMC+SDS	644.3 $\pm$ 21.9	0.235 $\pm$ 0.051
聚山梨酯-80+SDS	933.6 $\pm$ 49.3	0.325 $\pm$ 0.159

雪松醇用量为 500 mg,溶剂与反溶剂比例为 1:15,药物质量浓度为 5 mg/mL,溶剂滴加速度为 10 mL/min,搅拌速度为 10 000 r/min,剪切时间为 5 min 的条件下,考察不同比例的 SDS 和 HPMC 对 Ce-NS 的粒径及 PDI 的影响,结果见表 2。Ce-NS 的平均粒径和 PDI 随着 SDS 用量的增加而增大,当 SDS 与 HPMC 比例 1:1 时,制备的 Ce-NS 平均粒径及 PDI 最小,因此选择 SDS 与 HPMC 比例为 1:1 作为 Ce-NS 的稳定剂。

表 2 复合稳定剂 SDS 与 HPMC 比例对粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of SDS/HPMC ratio on particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

SDS与HPMC比例	粒径/nm	PDI
1:3	1 107.7 $\pm$ 31.4	0.242 $\pm$ 0.021
1:2	743.4 $\pm$ 17.2	0.240 $\pm$ 0.016
1:1	637.2 $\pm$ 16.7	0.227 $\pm$ 0.054
2:1	702.0 $\pm$ 8.0	0.251 $\pm$ 0.001
3:1	1 102.0 $\pm$ 94.9	1.000 $\pm$ 0.000

2.4.3 复合稳定剂用量的考察 在雪松醇用量为 500 mg,复合稳定剂比例为 1:1,溶剂与反溶剂比例为 1:15,药物质量浓度为 5 mg/mL,溶剂滴加速度为 10 mL/min,搅拌速度为 10 000 r/min,剪切时间为 5 min 的条件下,考察复合稳定剂不同用量对 Ce-NS 粒径及 PDI 的影响,结果见表 3。当稳定剂用量为 300 mg 时,制备的 Ce-NS 平均粒径及 PDI 最小,因此复合稳定剂的用量确定为 300 mg。

2.4.4 雪松醇质量浓度的筛选 在稳定剂用量为 300 mg,稳定剂比例为 1:1,溶剂与反溶剂比例为 1:15,溶剂滴加速度为 10 mL/min,搅拌速度为 10 000 r/min,剪切时间为 5 min 的条件下,考察雪松醇质量浓度对 Ce-NS 的粒径及 PDI 的影响,结果见表 4。随着雪松醇质量浓度升高,Ce-NS 的平均粒径及 PDI 呈现先下降后上升的变化趋势,其中,在雪松醇的质量浓度为 7.5 mg/mL 下制备的 Ce-NS 平均粒径及 PDI 较小,因此,选择雪松醇质量浓度

表 3 复合稳定剂用量对粒径和 PDI 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of composite stabilizer dosage on particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂/mg	粒径/nm	PDI
100	901.2 $\pm$ 23.6	0.283 $\pm$ 0.034
300	590.2 $\pm$ 8.6	0.185 $\pm$ 0.034
500	735.1 $\pm$ 9.9	0.255 $\pm$ 0.001

表 4 雪松醇质量浓度对粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Effects of mass concentration of cedrol on particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n=3$)

雪松醇/(mg·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI
5.0	606.6±4.9	0.235±0.060
7.5	558.7±10.4	0.201±0.026
10.0	685.2±0.4	0.275±0.027

为 7.5 mg/mL。

2.4.5 溶剂 PEG400 与反溶剂纯水比例考察 在雪松醇质量浓度为 7.5 mg/mL, 稳定剂用量为 300 mg, 复合稳定剂比例为 1:1, 溶剂滴加速度为 10 mL/min, 搅拌速度为 10 000 r/min, 剪切时间为 5 min 的条件下, 考察溶剂与反溶剂的比例对 Ce-NS 的粒径、PDI 的影响, 结果见表 5。当 PEG400 与纯水的比例为 1:12.5 时制备的 Ce-NS 粒径和 PDI 相对较小, 因此选择溶剂与反溶剂比例为 1:12.5。

表 5 溶剂 PEG400 与反溶剂纯水比例对粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Effects of solvent PEG400-antisolvent pure water ratio on particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n=3$)

PEG400与纯水比例	粒径/nm	PDI
1:5	612.6±18.6	0.235±0.026
1:10	575.3±1.4	0.251±0.014
1:12.5	528.8±0.7	0.185±0.008
1:15	695.3±14.8	0.209±0.024
1:20	859.7±15.7	0.258±0.021

2.5 工艺单因素考察

2.5.1 滴加速度 固定雪松醇质量浓度为 7.5 mg/mL, 稳定剂用量为 300 mg, 稳定剂比例为 1:1, 溶剂与反溶剂比例为 1:12.5, 搅拌速度为 10 000 r/min, 剪切时间为 5 min, 对滴加速度进行考察, 结果见表 6。由结果可知, Ce-NS 在溶剂滴加速度为 20 mL/min 条件下, 平均粒径和 PDI 较小, 故选择滴加速度为 20 mL/min。

2.5.2 搅拌速度 固定雪松醇药物的质量浓度为

表 6 滴加速度对粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 Effects of droplet acceleration on particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n=3$)

滴加速度/(mL·min ⁻¹)	粒径/nm	PDI
10	534.4±6.0	0.215±0.012
20	461.5±9.5	0.241±0.030
30	556.4±15.7	0.264±0.026
40	620.8±11.8	0.254±0.007

7.5 mg/mL, 稳定剂用量为 300 mg, 稳定剂比例为 1:1, 溶剂与反溶剂的比例为 1:12.5, 滴加速度为 20 mL/min, 剪切时间为 5 min, 对搅拌速度进行考察, 结果见表 7。由结果可知, 搅拌速度为 10 000 r/min 时, 制备的 Ce-NS 粒径和 PDI 较小, 故选择搅拌速度为 10 000 r/min。

2.5.3 剪切时间 固定雪松醇质量浓度为 7.5 mg/mL, 稳定剂用量为 300 mg, 稳定剂比例为 1:1, 溶剂与反溶剂比例为 1:12.5, 滴加速度为 20 mL/min, 搅拌速度为 10 000 r/min, 对剪切时间进行考察, 结果见表 8。由结果可知, 当剪切时间为 5 min 时制备的 Ce-NS 粒径和 PDI 较小, 故选择剪切时间为 5 min。

表 7 搅拌速度对粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 7 Effects of stirring speed on particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n=3$)

搅拌速度/(r·min ⁻¹)	粒径/nm	PDI
9 600	713.4±10.0	0.269±0.041
9 800	624.3±7.0	0.233±0.027
10 000	457.8±8.4	0.235±0.004
10 200	708.1±13.4	0.226±0.027
10 400	814.7±8.3	0.290±0.024

表 8 剪切时间对粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 8 Effects of shear time on particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n=3$)

剪切时间/min	粒径/nm	PDI
1	712.2±5.8	0.238±0.007
3	553.6±11.7	0.257±0.018
5	453.7±10.8	0.227±0.038
7	647.8±12.7	0.219±0.007
9	650.5±1.5	0.255±0.042

2.6 BBD-RSM 优化 Ce-NS 处方

2.6.1 BBD-RSM 处方因素试验设计及结果 处方以 SDS 的用量 (X_1)、HPMC 的用量 (X_2)、雪松醇的质量浓度 (X_3)、溶剂与反溶剂的比例 (X_4) 为自变量, 以平均粒径 (Y_1) 和 PDI (Y_2) 为评价指标, 并将评价指标进行归一化处理, 采用总评归一值 (overall desirability, OD) 作为响应值, 各因素水平及试验设计与结果见表 9。

$$d = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$$

$$OD = (d_{\text{粒径}} d_{\text{PDI}})^{1/2}$$

M_i 、 $M_{\max}$ 和 $M_{\min}$ 分别为实测值、最大值和最小值

2.6.2 2 次多元回归模型的建立及显著性分析 采

表9 BBD-RSM 优化 Ce-NS 处方的试验设计与结果 ($n=3$)Table 9 Experimental design and results for optimization of Ce-NS formulation using BBD-RSM ($n=3$)

序号	X_1 / mg	X_2 / mg	X_3 / (mg·mL ⁻¹)	X_4	Y_1 /nm	Y_2	OD	序号	X_1 / mg	X_2 / mg	X_3 / (mg·mL ⁻¹)	X_4	Y_1 /nm	Y_2	OD
1	250 (+1)	50 (-1)	7.5 (0)	1 : 12.5 (0)	772.8	0.264	0.689	15	150	50	7.5	1 : 5.0	913.6	0.253	0.610
2	150 (0)	150 (0)	10.0 (+1)	1 : 20.0 (+1)	1 286.7	0.317	0.000	16	150	250	10.0	1 : 12.5	1 098.2	0.237	0.455
3	250	150	7.5	1 : 20.0	1 004.4	0.256	0.525	17	150	150	10.0	1 : 5.0	774.0	0.241	0.742
4	150	150	7.5	1 : 12.5	456.6	0.238	0.953	18	150	250	7.5	1 : 20.0	1 148.3	0.272	0.348
5	150	50	7.5	1 : 20.0	775.9	0.253	0.713	19	150	50	10.0	1 : 12.5	797.3	0.285	0.621
6	150	150	7.5	1 : 12.5	440.5	0.237	0.965	20	250	150	5.0	1 : 12.5	891.0	0.285	0.558
7	50 (-1)	50	7.5	1 : 12.5	907.9	0.338	0.410	21	150	250	5.0	1 : 12.5	1 084.3	0.243	0.464
8	150	150	5.0 (-1)	1 : 5.0 (-1)	1 098.3	0.290	0.377	22	150	50	5.0	1 : 12.5	703.6	0.247	0.777
9	250	250 (+1)	7.5	1 : 12.5	765.9	0.260	0.704	23	250	150	10.0	1 : 12.5	884.3	0.261	0.616
10	50	150	1.0	1 : 12.5	1 105.0	0.351	0.255	24	50	250	7.5	1 : 12.5	1 134.7	0.282	0.350
11	50	150	7.5	1 : 20.0	1 257.3	0.406	0.000	25	150	150	5.0	1 : 20.0	825.9	0.296	0.575
12	250	150	7.5	1 : 5.0	959.3	0.323	0.421	26	50	150	5.0	1 : 12.5	1 015.7	0.336	0.351
13	150	250	7.5	1 : 5.0	768.5	0.239	0.751	27	150	150	7.5	1 : 12.5	419.2	0.229	1.000
14	50	150	7.5	1 : 5.0	1 131.7	0.345	0.248								

用 Design-Expert 13 软件对试验数据进行统计分析, 并对响应面试验中的处方参数进行优化。以 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 为自变量, 以 OD 为响应值, 建立 2 次多项式模型, 其回归方程分别为 $OD=0.973+0.1576X_1-0.062X_2-0.041X_3-0.089X_4+0.019X_1X_2+0.039X_1X_3+0.088X_1X_4+0.038X_2X_3-0.127X_2X_4-0.214X_3X_4-0.331X_1^2-0.111X_2^2-0.238X_3^2-0.298X_4^2$ 。方差分析结果显示, 回归模型极显著 ($P<0.0001$),

且失拟项 $P=0.0614$ (>0.05), 模型 R^2 和 R_{adj}^2 分别为 0.944 6 和 0.880 0, 说明模型拟合效果较好, 可用于 Ce-NS 制备处方参数的优化。

2.6.3 响应面分析与优化结果 以 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 为自变量, OD 为响应值, 在固定单一因素条件下, 通过 Design-Expert 13 软件绘制响应面图, 结果见图 2。根据模型分析得到 Ce-NS 的最优制备处方为 SDS 用量为 172.832 mg, HPMC 用量为 131.880 mg,

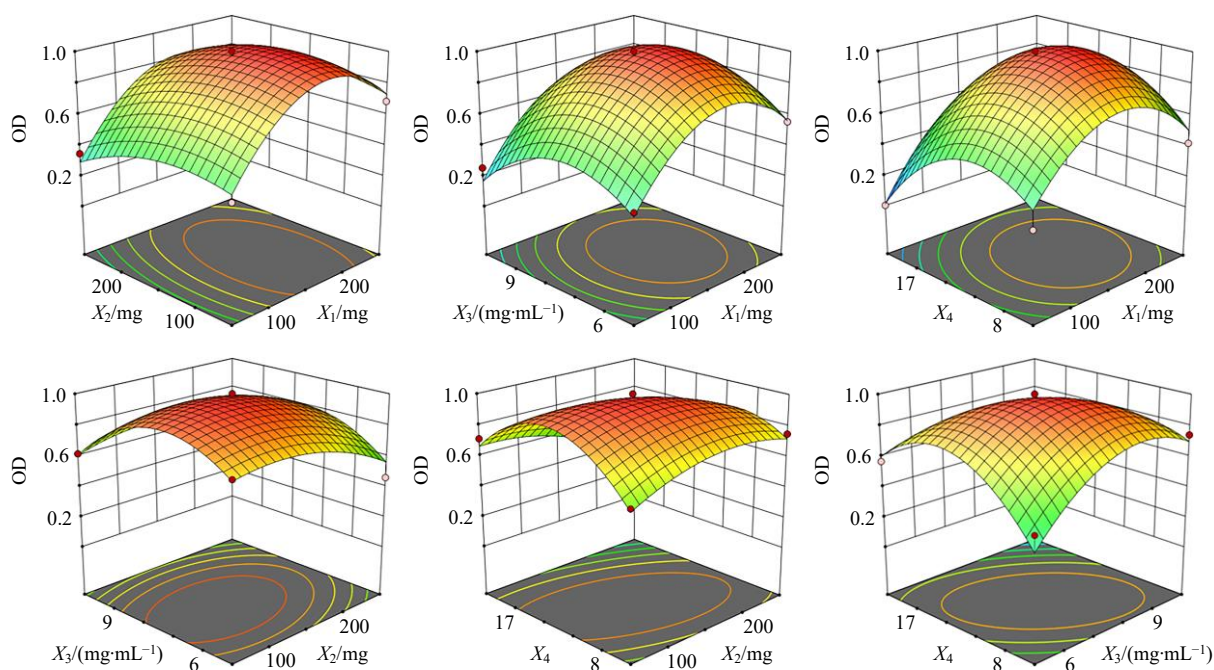


图2 处方自变量与响应值的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plot of prescription independent variables and response values

雪松醇质量浓度为 7.438 mg/mL, 溶剂与反溶剂的比例为 1:12.304。

2.7 BBD-RSM 优化 Ce-NS 工艺

2.7.1 BBD-RSM 工艺因素试验设计及结果 对 Ce-NS 来说, 粒径大小对药物的生物利用度、药效等影响较大, 因此采用 BBD-RSM 分别对 Ce-NS 的

制备工艺和处方进行优化, 基于单因素试验结果, 选取滴加速度(X_1)、搅拌速度(X_2)和剪切时间(X_3)为自变量, 平均粒径(Y_1)和 PDI(Y_2)为评价指标进行工艺设计, 并将评价指标进行归一化处理, 采用 OD 作为响应值, 各因素水平及实验设计与结果见表 10。

表 10 BBD-RSM 优化 Ce-NS 工艺的试验设计与结果 ($n=3$)

Table 10 Experimental design and results for optimizing Ce-NS process using BBD-RSM ($n=3$)

序号	$X_1/(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$	$X_2/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$	X_3/min	Y_1/nm	Y_2	OD	序号	$X_1/(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$	$X_2/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$	X_3/min	Y_1/nm	Y_2	OD
1	30 (+1)	10 000 (0)	3 (-1)	885.7	0.290	0.000	10	10	10 200	5	703.3	0.268	0.374
2	20 (0)	10 000	5 (0)	476.9	0.227	0.948	11	30	10 200	5	671.4	0.255	0.512
3	10 (-1)	10 000	3	807.1	0.266	0.257	12	20	9 800 (-1)	7	636.6	0.272	0.396
4	10	10 000	7 (+1)	877.7	0.270	0.075	13	10	9 800	5	668.2	0.258	0.493
5	30	10 000	7	704.8	0.264	0.405	14	30	9 800	5	640.5	0.264	0.472
6	20	10 000	5	454.5	0.238	0.884	15	20	10 200	3	873.5	0.263	0.107
7	20	10 200 (+1)	7	813.4	0.269	0.230	16	20	10 000	5	430.7	0.236	0.926
8	20	10 000	5	484.8	0.231	0.980	17	20	9 800	3	788.1	0.282	0.165
9	20	10 000	5	443.5	0.239	0.887							

2.7.2 2 次多元回归模型的建立及显著性分析 采用 Design-Expert 13 软件对实验结果进行回归分析, 并通过响应面法优化 Ce-NS 的制备工艺。以 X_1 、 X_2 、 X_3 为自变量, 以 OD 为响应值建立 2 次多项式模型, 其回归方程分别为 $\text{OD}=0.911+0.024 X_1-0.038 X_2+0.072 X_3+0.040 X_1 X_2+0.147 X_1 X_3-0.027 X_2 X_3-0.244 X_1^2-0.204 X_2^2-0.482 X_3^2$ 。方差分析结果显示, 模型极显著 ($P<0.0001$), 且失拟项 $P=0.2191 (>0.05)$, 模型 R^2 和 R_{adj}^2 分别为 0.9953 和 0.9893, 表明模型拟合度良好, 可用于工艺条件优化。

2.7.3 响应面分析与优化结果 以 X_1 、 X_2 、 X_3 为自变量, OD 为响应值, 在保持其中 1 个变量不变的情况下, 通过 Design-Expert 13 软件绘制响应面图, 结果见图 3。平均粒径 (Y_1) 是评价纳米粒体系的主要指标, 理想的纳米粒应具有较小的粒径以充分发

挥纳米尺寸效应, 同时具备粒径分布均匀、载药量较高及制备工艺简便等特点, 因此, Ce-NS 的最佳制备工艺为滴加速度为 20.452 mL/min, 搅拌速度为 9 985.2 r/min, 剪切时间为 5.174 min。

2.8 最佳处方工艺确定及验证

考虑到实际操作性, 将优化后的最佳处方工艺验证略作调整: 雪松醇的质量浓度为 7.5 mg/mL, SDS 用量为 170 mg, HPMC 用量为 130 mg, PEG400 与水相的比例为 1:12; 滴加速度为 20 mL/min, 搅拌速度为 10 000 r/min, 剪切时间为 5 min。在该条件下制备 3 批 Ce-NS, 测定其粒径及 PDI, 并与模型预测值进行比较, 按公式计算偏差。结果见表 11, Ce-NS 平均粒径值为 (434.47 ± 9.90) nm, PDI 为 0.232 ± 0.005 。粒径预测值为 420.52 nm, 实际值的偏差为 3.32%, 表明该模型可信度良好, 预测性较

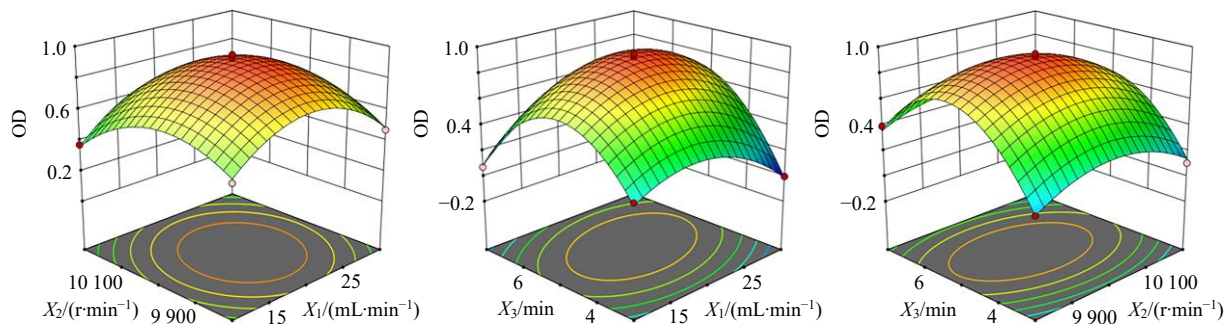


图 3 工艺自变量与响应值的三维图

Fig. 3 Three-dimensional diagram of process independent variables and response values

表 11 3 批雪松醇纳米混悬剂验证结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Three batches of cedrol nanosuspension validation results ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

试验号	平均粒径/nm	PDI
1	429.00±3.55	0.236±0.011
2	445.90±4.34	0.227±0.008
3	428.50±2.05	0.234±0.001
平均值	434.47±9.90	0.232±0.005

优, 可用于处方工艺优化。

偏差=(实际值-预测值)/预测值

2.9 Ce-NS 表征

2.9.1 粒径分布及 ζ 电位的测定 取 3 批 Ce-NS, 按照“2.2”项下方法操作进行测定, 粒径和 ζ 电位分布图见图 4, 分布区间在 (434.47±9.90) nm, PDI 值为 0.232±0.005, ζ 电位值为 (-15.2±1.15) mV。

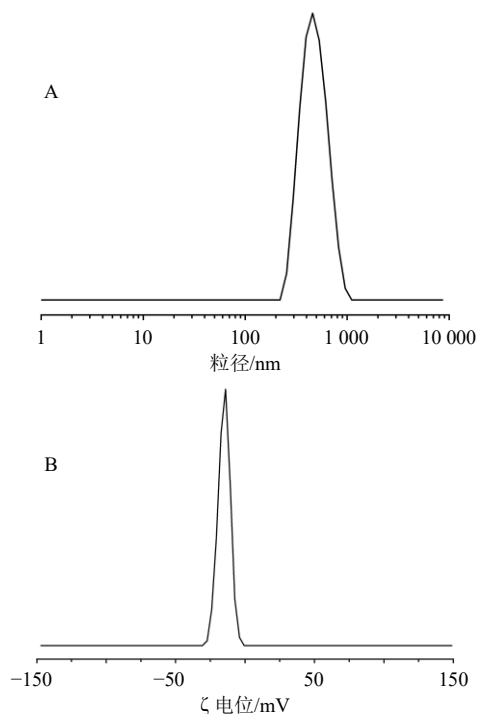


图 4 Ce-NS 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 4 particle size distribution (A) and ζ potential (B) of Ce-NS

2.9.2 Ce-NS 的稳定性考察 将制备好的 Ce-NS 分别在 40 °C 高温、光照强度 (4 500±500) lx、室温以及 4 °C 条件下, 在预定的时间点取样, 通过高效液相色谱测定雪松醇的标示量的百分含量, 并测定其粒径、PDI 和 ζ 电位以及 pH 值的变化, 结果分别见表 12~15。考察 Ce-NS 的初步稳定性, 以预测 Ce-NS 的贮存条件。由此可知, 在高温、强光、室温和 4 °C 条件下, Ce-NS 放置 90 d 后再分散性影响

表 12 40 °C 高温稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 12 40 °C high-temperature stability test results ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	pH 值	含量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	5.46±0.10	99.20±2.45	424.70±11.65	0.195±0.057	-13.00±1.55
5	5.28±0.07	97.90±4.50	517.60±15.66	0.165±0.022	-14.80±0.70
10	5.12±0.12	97.20±2.15	559.70±2.50	0.175±0.008	-9.90±0.95
15	5.23±0.07	95.00±3.96	546.20±10.27	0.186±0.017	-10.00±0.40
30	4.84±0.10	94.00±2.51	579.80±8.11	0.212±0.045	-14.80±0.47
60	4.96±0.09	94.90±3.45	636.10±3.83	0.260±0.006	-10.70±0.87
90	4.00±0.12	82.00±4.50	805.70±30.89	0.267±0.014	-12.00±2.40

表 13 强光稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 13 Results of high-intensity light stability test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	pH 值	含量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	5.46±0.10	99.20±2.45	424.70±11.65	0.195±0.057	-13.00±1.55
5	5.26±0.12	98.10±4.10	433.20±4.97	0.225±0.025	-12.30±0.62
10	5.47±0.07	97.00±3.50	453.90±8.06	0.163±0.047	-11.20±0.71
15	5.23±0.11	92.00±5.00	448.40±3.52	0.198±0.025	-11.20±0.89
30	5.35±0.09	95.70±2.85	441.90±4.81	0.221±0.030	-12.70±1.19
60	4.90±0.12	92.00±4.50	443.90±4.09	0.190±0.010	-10.20±0.48
90	3.98±0.12	94.90±2.85	465.70±5.51	0.207±0.007	-13.60±1.54

表 14 室温稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 14 Room temperature stability test results ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	pH 值	含量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	5.46±0.10	99.20±2.45	424.70±11.65	0.195±0.057	-13.00±1.55
5	5.51±0.07	96.70±4.80	422.60±10.76	0.233±0.023	-14.30±1.10
10	5.45±0.11	98.00±2.65	451.50±10.34	0.126±0.011	-15.80±0.71
15	5.50±0.09	97.90±3.55	446.90±3.80	0.150±0.021	-15.70±1.29
30	5.14±0.12	94.60±4.05	456.60±4.45	0.156±0.390	-13.00±1.01
60	5.37±0.08	95.10±1.95	467.10±13.56	0.172±0.048	-11.30±0.23
90	4.93±0.11	95.70±3.45	445.70±4.52	0.223±0.028	-10.60±1.48

表 15 4 °C 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 15 Stability test results at 4 °C ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	pH 值	含量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	5.46±0.10	99.20±2.45	424.70±11.65	0.195±0.057	-13.00±1.55
5	5.46±0.12	95.90±2.75	427.90±2.26	0.197±0.011	-15.20±1.15
10	5.52±0.07	99.90±2.35	425.10±12.86	0.151±0.039	-13.70±0.57
15	5.50±0.10	94.50±5.05	409.20±3.05	0.156±0.015	-15.80±0.83
30	5.21±0.10	97.50±3.45	417.80±2.69	0.208±0.006	-17.00±1.47
60	5.51±0.12	94.70±3.75	437.80±2.56	0.147±0.020	-14.90±2.06
90	5.57±0.09	97.50±2.55	428.40±6.36	0.209±0.005	-15.00±1.93

较小，颜色也无明显变化，然而在高温条件下，随着放置时间的延长，Ce-NS 的粒径与 PDI 均表现出增大的趋势，结果表明 Ce-NS 在室温保存时稳定性良好。

2.10 体外透皮实验

2.10.1 透皮行为考察 采用 Franz 扩散池法对 Ce-NS 的透皮行为和皮内滞留量进行评价，以同质量浓度游离雪松醇溶液 (Free-Ce) 作为对照。将猪皮角质层朝上固定于供给池和接收池之间，有效扩散面积为 1.77 cm^2 ，接收池体积为 12 mL ，以 PBS 溶液作为接收液，接收池恒温水浴 $(32\pm 2)^\circ\text{C}$ ，转速为 600 r/min ，分别取 0.5 mL Ce-NS 和 Free-Ce 溶液均匀涂布于皮肤表皮层，分别于 1、2、4、6、8、10、12、24 h 时取 2 mL 接收液，同时补加等体积的新鲜接受介质，所取接收液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过后，通过 HPLC 法测定雪松醇含量。按照公式计算单位面积的累积渗透量 (Q_n)。

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

C_n 为第 n 次取样时接收液中药物的质量浓度， V 为接收液总体积， C_i 为第 i 次取样所得接收液中药物浓度， V_i 为单次取样体积， A 为有效渗透面积

结果发现，24 h 后 Ce-NS 和 Free-Ce 均没有在接收液中检测到雪松醇，说明药物在皮肤中有较好的累积效果。

2.10.2 皮肤滞留量 (Q_m) 测定 透皮实验结束后，取下皮肤，用生理盐水将表面残存药物冲洗干净，用滤纸吸干表面水分后将皮肤剪碎后加入 3 mL 无水乙醇剪切 30 min，涡旋 5 min，超声 10 min，充分提取药物，将所得样品以 4000 r/min 在离心半径约为 150 mm 条件下离心 10 min，取上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜滤过后进 HPLC 测定雪松醇含量，计算皮肤 Q_m ，结果见表 16。可见，Ce-NS 在皮肤中的 Q_m 约为 Free-Ce 的 4.1 倍，差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

$$Q_m = C_m V / A$$

C_m 为提取液质量浓度， V 为提取液体积， A 为经皮渗透面积

表 16 皮肤 Q_m 测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 16 Skin retention results ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$Q_m/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
Free-Ce	18.09 ± 0.88
Ce-NS	$74.38 \pm 3.90^{***}$

与 Free-Ce 组比较: $***P < 0.001$ 。

$***P < 0.001$ vs Free-Ce group.

2.11 毛囊扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察

利用 SEM 对 Ce-NS 处理后的毛囊微观结构进行可视化观察，研究纳米晶体的毛囊靶向性。体外透皮实验按照上述“2.10”项下进行，实验分为 2 组，分别为 PBS 空白组和 Ce-NS 组，采用 Franz 扩散仪装置，给药 24 h 后取下皮肤，先用生理盐水去除残留制剂后用滤纸吸干，然后用手术刀片将皮肤样本沿近垂直于表面的方向切割，将皮肤置于干燥器上干燥 72 h，使用 SEM 观察 Ce-NS 处理后毛囊的微观结构，以观察毛囊中的纳米晶。结果见图 5，可以清楚的观察到毛囊周围存在许多纳米晶体，而应用 PBS 溶液处理的对照组在毛囊周围并未发现雪松醇纳米晶体的结构，表明了局部应用 Ce-NS 可以增加药物渗透到毛囊周围区域，为 Ce-NS 靶向毛囊的机制提供了有力证据。

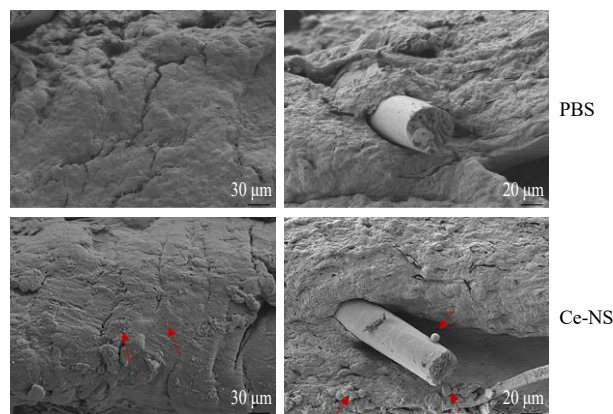


图 5 不同制剂处理猪皮的 SEM 图

Fig. 5 SEM scans of pig skin treated with different formulations

2.12 药效学研究

2.12.1 AGA 小鼠模型的分组、建立及给药 将 60 只体质量 $20\sim 22\text{ g}$ 健康的 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠适应性喂养 1 周，随机分为 6 组，分别为阴性对照组、模型组、阳性对照 (米诺地尔) 组、Blank-NS、Free-Ce、Ce-NS，每组 10 只。在小鼠背部 ($2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$) 的区域先剃除毛发，然后使用脱毛膏涂抹 $1\sim 2\text{ min}$ 去除残余毛发，再用温水清洗干净，避免损伤皮肤。取 24 份注射级大豆油与 1 份丙酸睾酮注射液混合，充分摇匀 $2\sim 3\text{ min}$ ，配制成 1 mg/mL 丙酸睾酮稀释液，除阴性对照组外，其余各组均以 5 mg/kg sc 丙酸睾酮稀释液，连续注射 21 d。造模 30 min 后开始给药，阴性对照组和模型组涂抹生理盐水 1 mL ，阳性对照组涂抹 5% 米诺地尔酊 0.15 mL ，

Blank-NS 组、Free-Ce 组和 Ce-NS 组分别涂抹对应药物溶液 1 mL，其中 Free-Ce 和 Ce-NS 的药物质量浓度均为 7.5 mg/mL（以雪松醇计），连续 21 d，每日 1 次。

在实验期间每 2 天记录体质量变化。结果见表 17。各组小鼠体质量均随时间呈上升趋势。与阴性对照组相比，造模各组于第 21 天体质量显著增加，提示造模成功^[14]。米诺地尔溶液中含有丙二醇和乙

表 17 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 17 Changes in body weight among different groups of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ mg	体质量/g										
		1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d	17 d	19 d	21 d
阴性对照	0	20.04±0.77	21.64±0.44	21.99±0.77	21.90±0.77	21.66±1.00	22.08±1.15	22.39±0.99	22.45±1.22	22.12±1.06	22.50±0.87	23.00±1.12
模型	0	19.93±0.72	21.37±0.86	22.02±0.71	22.28±0.80	22.40±0.88 [#]	22.89±0.85 ^{##}	23.56±0.96 ^{###}	23.96±0.80 ^{###}	24.17±0.92 ^{###}	25.68±1.07 ^{###}	25.58±0.80 ^{###}
阳性对照	7.5	20.19±0.61	22.63±0.67 ^{**}	23.37±0.86 ^{**}	14.10±0.72 ^{***}	24.35±0.80 ^{***}	24.96±0.65 ^{***}	25.58±0.72 ^{***}	26.06±0.67 ^{***}	26.07±0.56 ^{***}	26.03±0.58	26.70±0.58 [*]
Blank-NS	0	19.81±0.39	21.88±0.36	22.55±0.50	23.24±0.10	23.33±0.21	23.65±0.23	24.38±0.24 [*]	24.68±0.52	25.33±0.62 [*]	25.68±0.74	26.10±0.63
Free-Ce	7.5	19.76±0.72	22.02±0.73	23.15±0.64 [*]	23.18±0.72	23.05±0.62	23.65±0.54	24.28±0.55	24.74±0.70	24.91±0.55	25.70±0.36	25.71±0.62
Ce-NS	7.5	19.26±0.30	22.00±0.79	22.87±0.60	23.37±0.49 [*]	23.57±0.49 ^{**}	23.72±0.79	24.44±0.36	24.89±0.41	25.11±0.38	26.12±0.53	26.09±0.73

与阴性对照组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ ；表 18 同。
[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs negative control group；^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group；Same as table 18.

醇，长期使用会引发刺激性，导致局部皮肤出现红斑、干燥脱屑、瘙痒及灼痛感等不良反应^[15]。在动物实验中，小鼠使用米诺地尔时也可观察到背部皮肤屏障功能受损，出现轻度红肿、毛囊发炎、干燥起皮等现象，相比之下，本研究所制备的 Ce-NS 选用 PEG400/水为溶剂，PEG400 具有良好的皮肤相容性，能有效减少对皮肤的刺激性，且在实验过程中小鼠皮肤状态保持正常。与阴性对照组相比，阳性对照组、Blank-NS、Free-Ce 和 Ce-NS 小鼠体质量无显著性差异，由此说明，Ce-NS 在安全性方面具有一定优势，能有效降低皮肤刺激风险，提高用药安全性和依从性，为外用治疗 AGA 提供了更加安全、温和的选择。

2.12.2 小鼠毛发生长情况 每日观察各组小鼠背部毛发生长情况，于实验第 1、7、14、21 天拍照，记录皮肤变黑和毛发再生的时间，脱毛区域的毛发生长结果见图 6，并用 Image J 软件量化第 21 天新生毛发覆盖率，结果见表 18。整个过程需每日观察并记录小鼠背部脱毛区外用药物后有无红肿、渗液、溃烂、干燥起皮。由结果显示，第 1 天，各组小鼠背部皮肤均呈粉红色，表明毛囊处于休止期。第 7 天，阴性对照组小鼠背部皮肤呈灰黑色，无生长毛发，表明其启动了毛囊生长周期转变；阳性对照组和 Ce-NS 组小鼠皮肤背部颜色与阴性对照组相近，模型组仍保持粉色，揭示毛囊仍处于休止期。给药第 14 天，阴性对照组毛发已明显生长，短小且密集；Blank-NS 和 Free-Ce 小鼠背部皮肤呈灰黑色，

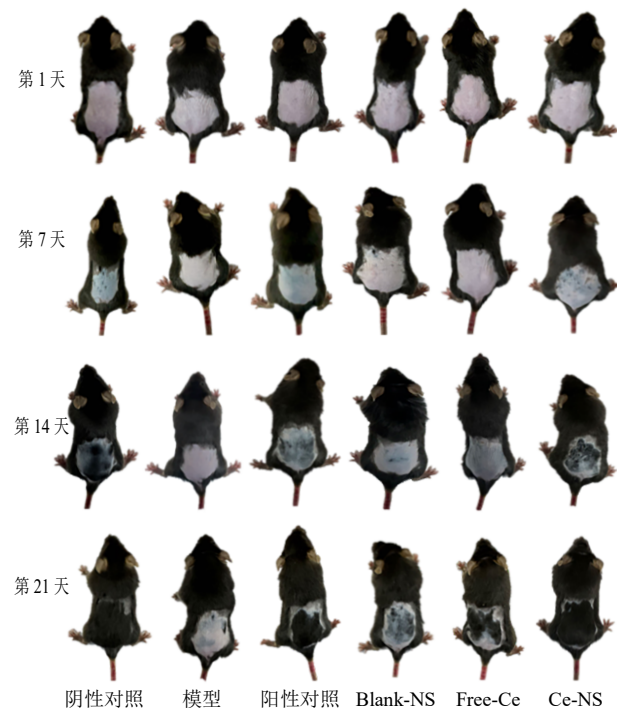


图 6 各组小鼠在不同时期的毛发生长及皮肤颜色的情况
Fig. 6 Hair growth and skin color of mice in each group at different periods were observed

但无毛发生长；阳性对照组和 Ce-NS 组背部出现“点片状”新生毛发，且 Ce-NS 组覆盖面积较阳性对照组多，表明雪松醇可以加速毛囊进入生长期。第 21 天，阴性对照组脱毛区域毛发几乎完全覆盖；模型组、Blank-NS 组整体毛发稀疏，部分区域无毛发生长；Free-Ce 组仍有小部分区域毛发生长较稀疏；阳性对照组、Ce-NS 组毛发生长明显，基本完

表 18 各组小鼠的毛发覆盖率、新生毛发长度和质量
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 18 Hair coverage, length and weight of newly grown hair in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ mg	毛发覆盖率/ %	毛发长度/ mm	毛发质量/ mg
阴性对照	0	95.07±1.49	6.20±0.24	34.99±2.63
模型	0	21.49±4.51 ^{###}	2.57±0.13 ^{###}	0.66±0.56 ^{###}
阳性对照	7.5	77.15±7.36 ^{***}	4.00±0.28 ^{***}	16.66±1.67 ^{***}
Blank-NS	0	29.35±9.20	3.23±0.28 ^{***}	5.01±1.58 ^{***}
Free-Ce	7.5	59.80±6.10 ^{***}	3.77±0.15 ^{***}	9.58±1.28 ^{***}
Ce-NS	7.5	90.19±4.13 ^{***}	4.94±0.16 ^{***}	25.03±1.08 ^{***}

全覆盖,且 Ce-NS 组促进毛发生长效果优于阳性对照组和 Free-Ce 组。

结果如表 18 所示,第 21 天的毛发覆盖率显示,与阴性对照组相比,模型组显著下降至 21.49%;阳性对照组、Free-Ce 组和 Ce-NS 组均明显高于模型组,分别为 77.15%、59.80%和 90.19%。皮肤状态方面,整个实验期间仅阳性对照组个别小鼠出现轻度红肿、毛囊发炎、干燥起皮,其余各组小鼠背部皮肤未见明显异常。由此可见,采用 sc 丙酸睾酮成功构建 AGA 模型,雪松醇对 AGA 具有一定缓解作用,可促进毛发生长,且 NS 递送系统可以显著增加雪松醇的经皮渗透及治疗效果,且局部应用时皮肤耐受性良好。

2.12.3 新生毛发质量和长度的测量 第 21 天处死小鼠,从每只小鼠背部随机拔取 6 根新生毛发,使用游标卡尺测量毛发长度,并计算其平均值。接着剃除各组小鼠背部试验区域的毛发,收集每只小鼠的新生毛发,用分析天平进行称量,记录新生毛发质量取平均值,比较各组小鼠的毛发生长情况,结果见表 18。与阴性对照组比较,模型组小鼠新生毛发的长度和质量均显著下降。就毛发长度而言,各给药组小鼠均显著高于模型组;在毛发质量方面,Ce-NS 组小鼠的新生毛发质量[(25.03±1.08)mg]显著高于其他组($P < 0.01$)。

2.12.4 HE 染色观察皮肤组织病理变化 小鼠处死后剪下实验区域皮肤,浸入 4%多聚甲醛固定液中固定至少 24 h,经脱水、透明处理后进行石蜡包埋与切片,再依次脱水、水化、苏木精染色、分化复染伊红,最后脱水透明并封片。切片经光学显微镜观察并记录,HE 染色结果见图 7,在实验第 21 天时,通过小鼠皮肤组织切片中毛囊的形态发现,

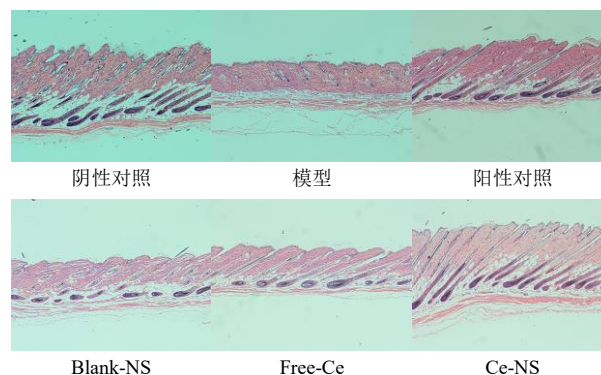


图 7 各组小鼠皮肤组织 HE 染色 (×50)

Fig. 7 HE staining of skin tissue of mice in each group (× 50)

与阴性对照组相比,模型组小鼠的皮肤更薄,毛囊数量更少,且毛囊多数萎缩,尚未进入增殖期,说明毛发的生长受到了丙酸睾酮的抑制,仍处于毛囊休止期;经过 Free-Ce、Ce-NS 和阳性对照组治疗的小鼠再生毛囊数量明显增多,处于生长期,但与 Free-Ce 和阳性对照组相比,Ce-NS 小鼠皮肤组织中具有更多的毛囊,毛囊结构完整,毛球增大,毛干成熟,皮肤厚度明显增加,说明 Ce-NS 小鼠的毛囊已进入生长期,表明该 NS 递送系统在促进毛发再生方面的优越性。

2.12.5 免疫组织化学染色 为研究雪松醇对毛囊的增殖和凋亡的影响,皮肤组织蜡块切片,将切片的皮肤组织样本分别与 AR 抗体、Ki67 抗体、 β -catenin 抗体和进行免疫组织化学染色,然后通过光学显微镜对切片进行观察拍照,以评估毛囊的微环境重塑效果。

结果见图 8,与阴性对照组相比,模型组小鼠皮肤中的 AR 蛋白表达明显增加,表明正常毛囊周围仅有少数或没有 AR 的表达,说明在小鼠皮下注射丙酸睾酮,雄激素可能竞争性结合 AR,诱导毛囊周围的 AR 表达增加。经过 Ce-NS 治疗后,AR 蛋白水平较模型组有所下调,说明雪松醇可以调控 AR 的表达水平;模型组的 Ki67 表达量很低,表明此时毛囊进入休止期或抑制了增殖活性,与模型组相比,阳性对照组、Free-Ce 组和 Ce-NS 组中 Ki67 表达量均有不同程度的提高,表明了米诺地尔和雪松醇促进了毛囊生长周期的转变和毛发再生相关的细胞增殖并减轻 AGA 症状;模型组和 Blank-NS 组中的 β -catenin 的阳性表达较阴性对照组明显减少,阳性染色面积显著减小,与其他治疗组相比,经过 Ce-NS 治疗的 β -catenin 的阳性表达明显,说明了其

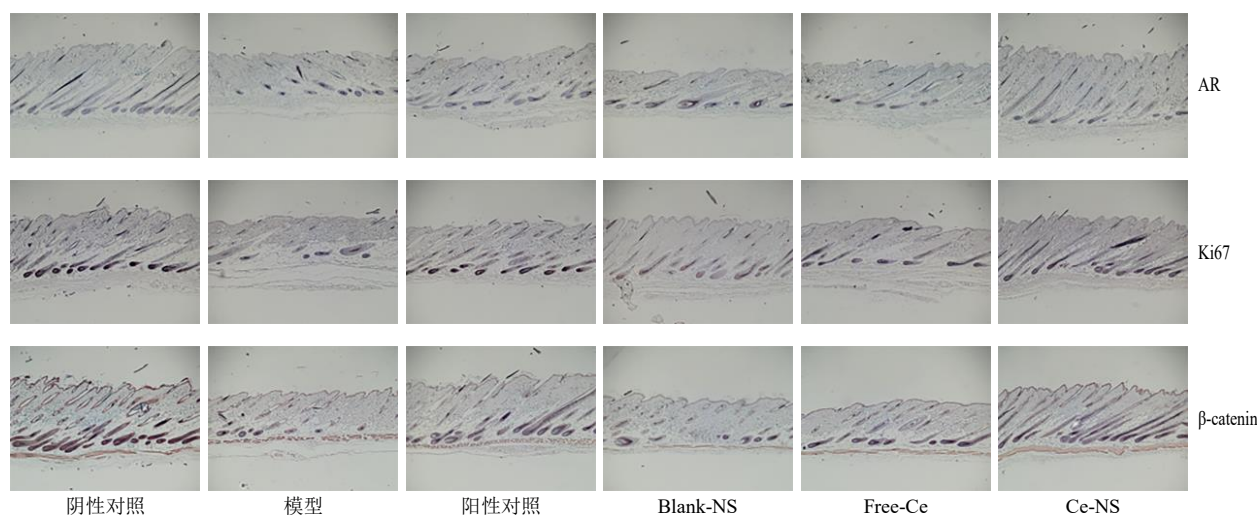


图 8 皮肤组织中的 AR、Ki67、 β -catenin 的免疫组化化学染色结果 ($\times 50$)

Fig. 8 Immunohistochemical staining results for AR, Ki67 and β -catenin in skin tissue ($\times 50$)

可能通过激活 Wnt/ β -catenin 通路,从而促进毛发再生。综上所述,免疫组织化学结果显示 Ce-NS 通过下调 AR 表达水平,上调 Ki67 和 β -catenin 的表达水平,调控毛囊生长周期,促进毛干细胞的增殖和毛发再生。

3 讨论

采用溶剂-反溶剂沉淀法制备 Ce-NS,并对传统沉淀法进行改进。传统有机溶剂沉淀法存在溶剂残留及物理稳定性差等问题^[16]。为此,本研究引入 PEG400/水体系作为绿色溶剂,既避了有机溶剂的毒性风险,又利用 PEG 的亲脂特性改善了药物的皮肤亲和性^[17],可以减少对皮肤的刺激作用。在 NS 的制备中,稳定剂的种类和用量是影响 NS 的物理稳定性的关键因素,其机制主要包括空间位阻效应和静电稳定作用^[18]。

单因素实验结果显示,单独使用 SDS 或 HPMC 所得 NS 粒径和 PDI 较大,且单独使用 SDS 时稳定性和再分散性较差,因此,本研究选用 SDS 和 HPMC 为复合稳定剂,SDS 作为离子型表面活性剂,通过电荷排斥^[19],抑制颗粒初期聚集;HPMC 作为非离子型聚合物,通过高分子包裹层与增稠剂提供空间位阻,抑制 Ostwald 熟化与团聚^[20-21],二者在 NS 中发挥互补的稳定机制,进一步增加体系的稳定性^[22]。此外,在制备工艺上采用响应面法进行系统优化^[23-24],确保处方工艺的科学性和可重复性。稳定性试验考察结果表明,Ce-NS 在室温和 4 °C 条件下可稳定保存 90 d,满足外用制剂的基本储存要求,但在高温条件下,粒径和 PDI 随着时间的延长

而显著增大,表明了高温可能会加速颗粒的聚集,导致稳定性下降,说明 Ce-NS 对温度敏感,在贮存时应严格控制环境温度。

纳米粒可以增强靶向药物蓄积和滞留时间^[25]。粒径是影响药物颗粒在毛囊中渗透和蓄积的关键因素^[26],研究发现粒径在 400~700 nm 的纳米颗粒最有利于通过毛囊开口进入毛囊窦并形成药物储库,较小的颗粒主要到达较深的皮肤层,而较大的颗粒主要停留在皮肤表面^[27]。

体外透皮实验结果显示,24 h 内 Free-Ce 和 Ce-NS 在接收液中均未检测到活性药物,但 Ce-NS 的皮肤滞留量显著高于 Free-Ce,为后者的 4.1 倍,验证了 NS 能有效限制药物进入体循环,降低系统性不良反应。本研究制备的 Ce-NS 粒径位于 400~700 nm 这一理想区间,SEM 观察进一步证实了雪松醇纳米晶能够进入毛囊并作为储库,因此在皮肤中更高的滞留量很可能是通过毛囊通道实现的靶向递送,为后续的药效学研究提供了有力的理论支撑。

C57BL/6 小鼠是筛选促毛发生长药物的常用模型,其躯干色素沉着主要源于生长期毛囊黑色素细胞产生的色素故可根据毛囊中黑色素含量判断毛囊是否进入生长期^[28]。毛囊周期分为生长期(毛囊增长、毛干增厚)、退行期和休止期(毛囊缩短、毛干变细脱落),生长期的毛囊越多,头发生长越好^[29]。AGA 的关键病理特征为毛囊微小化、生长周期缩短及休止期延长。

在丙酸睾酮诱导的 AGA 小鼠模型中,Ce-NS 促毛发再生能力优于米诺地尔和 Free-Ce,Ce-NS 组

的毛发覆盖率达 90.19%，新生毛发的长度 $[(4.94 \pm 0.16) \text{ mm}]$ 和质量 $[(25.03 \pm 1.08) \text{ mg}]$ 均显著高于其他组 ($P < 0.05$)。HE 染色证实，Ce-NS 毛囊数量显著增多，结构完整，毛球饱满，多数毛囊进入生长期，表明其能有效逆转 AGA 模型中毛囊的休止期停滞。免疫组化结果显示，Ce-NS 能显著上调毛囊基质细胞增殖标志物 Ki67 和 Wnt/ β -catenin 通路核心蛋白 β -catenin 的表达。提示雪松醇可能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进毛囊干细胞增殖，同时下调 AR 表达以抑制雄激素介导的毛囊微小化，从而实现对 AGA 病理过程的双重干预。

本研究成功构建了具有优异物理稳定性和毛囊靶向递送能力的 Ce-NS。该制剂显著提高了雪松醇在皮肤中的滞留量，并通过毛囊靶向递送机制，显著促进了 AGA 小鼠模型中毛囊的生长周期和毛发再生。该成果为利用纳米技术改进中药外用制剂的治疗效果提供了新的思路和范例。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Premanand A, Reena Rajkumari B. Androgen modulation of Wnt/ β -catenin signaling in androgenetic alopecia [J]. *Arch Dermatol Res*, 2018, 310(5): 391-399.
- [2] Krysiak R, Kowalcze K, Marek B, et al. The impact of levothyroxine on thyroid autoimmunity and hypothalamic-pituitary-thyroid axis activity in men with autoimmune hypothyroidism and early-onset androgenetic alopecia [J]. *Endokrynol Pol*, 2021, 72(5): 498-504.
- [3] Gao H, Zhang J Y, Zhao L J, et al. Synthesis and application of clinically approved small-molecule drugs targeting androgen receptor [J]. *Bioorg Chem*, 2024, 143: 106998.
- [4] Devjani S, Ezenma O, Kelley K J, et al. Androgenetic alopecia: Therapy update [J]. *Drugs*, 2023, 83(8): 701-715.
- [5] Randolph M, Tosti A. Oral minoxidil treatment for hair loss: A review of efficacy and safety [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2021, 84(3): 737-746.
- [6] 汤陆扬, 卢小鸾, 杨敏, 等. 雪松醇的合成应用及其药理作用研究进展 [J]. *化学试剂*, 2021, 43(1): 48-54.
- [7] Özek G, Schepetkin I A, Yermagambetova M, et al. Innate immunomodulatory activity of cedrol, a component of essential oils isolated from *Juniperus* species [J]. *Molecules*, 2021, 26(24): 7644.
- [8] Sakhaee M H, Sayyadi S A H, Sakhaee N, et al. Cedrol protects against chronic constriction injury-induced neuropathic pain through inhibiting oxidative stress and inflammation [J]. *Metab Brain Dis*, 2020, 35(7): 1119-1126.
- [9] Adamantidi T, Grabrucker A M, Tsoupras A. Targeting platelet activating factor signaling for therapeutic benefits in neurodegenerative disorders [J]. *Front Biosci*, 2025, 30(4): 38300.
- [10] Luo F, Ling Y, Li D S, et al. Characterization of a sesquiterpene cyclase from the glandular trichomes of *Leucosceptum canum* for sole production of cedrol in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana* [J]. *Phytochemistry*, 2019, 162: 121-128.
- [11] Prajapat P, Sharma P K, Dwivedi S, et al. A systematic review on nanosuspension and its advancements [J]. *Int J Pharm* 2023, 14(4): 17-24.
- [12] Chavda V P, Vaghela D A, Solanki H K, et al. Nanosuspensions: A new era of targeted therapeutics [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2025, 105: 106613.
- [13] Karakucuk A, Tort S, Han S, et al. Etodolac nanosuspension based gel for enhanced dermal delivery: *In vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *J Microencapsul*, 2021, 38(4): 218-232.
- [14] Lai Y X, Wu J C, Tan T H, et al. Engineered exosomes co-delivering EGF and FGF ameliorate androgenetic alopecia in a mouse model [J]. *Int J Nanomed*, 2026, 21: 572518.
- [15] Junge A, Radonjic-Hoesli S, Bossart S, et al. Contact dermatitis caused by topical minoxidil: Allergy or just irritation [J]. *Acta Derm Venereol*, 2025, 105: 42401.
- [16] 田凯, 许丹, 卢迪, 等. 阿苯达唑纳米混悬剂的研制及其评价 [J]. *中国兽药杂志*, 2022, 56(7): 60-67.
- [17] Petrovic S, Bitá B, Barbinta-Patrasu M E. Nanoformulations in pharmaceutical and biomedical applications: Green perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 5842.
- [18] Jacob S, Kather F S, Boddu S H S, et al. Nanosuspension innovations: Expanding horizons in drug delivery techniques [J]. *Pharmaceutics*, 2025, 17(1): 136.
- [19] Soisuwan S, Teeranachaideekul V, Wongrakpanich A, et al. Impact of uncharged and charged stabilizers on *in vitro* drug performances of clarithromycin nanocrystals [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 137: 68-76.
- [20] Rachmawati H, Al Shaal L, Müller R H, et al. Development of curcumin nanocrystal: Physical aspects [J]. *J Pharm Sci*, 2013, 102(1): 204-214.
- [21] 曹秋芳, 蒋青香, 郑玲玲, 等. 基于质量源于设计理念结合模糊层次分析法-熵权法优化羟丙甲基纤维素改善栀子水提物可压性研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(16): 5448-5458.
- [22] Shobha U, Aditi B, Vaishali K. Effect of various stabilizers

- on the stability of lansoprazole nanosuspension prepared using high shear homogenization: Preliminary investigation [J]. *J Appl Pharm Sci*, 2021(9): 85-92.
- [23] Wang Y H, Qin W H, Yang Y J, *et al.* A study on the processing technology for *Rhizoma Coptidis* [J]. *BMC Biotechnol*, 2022, 22(1): 3.
- [24] Du L X, Lu H L, Xiao Y F, *et al.* Preparation, characterization and *in vivo* pharmacokinetic study of ginsenoside Rb₁-PLGA nanoparticles [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 18472.
- [25] Kumar P, Kumar V, Sahoo S, *et al.* Enhancing alopecia areata management: Nanocrystal-driven strategy for targeting hair follicles [J]. *Int J Pharm*, 2025, 675: 125557.
- [26] Heydari S, Barzegar-Jalali M, Heydari M, *et al.* The impact of particle size of nanostructured lipid carriers on follicular drug delivery: A comprehensive analysis of mouse and human hair follicle penetration [J]. *Bioimpacts*, 2024, 14(6): 30243.
- [27] Gu Y T, Bian Q, Zhou Y J, *et al.* Hair follicle-targeting drug delivery strategies for the management of hair follicle-associated disorders [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2022, 17(3): 333-352.
- [28] Madaan A, Verma R, Singh A T, *et al.* Review of hair follicle dermal papilla cells as *in vitro* screening model for hair growth [J]. *Int J Cosmet Sci*, 2018, 40(5): 429-450.
- [29] Lin X Y, Zhu L, He J. Morphogenesis, growth cycle and molecular regulation of hair follicles [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 899095.

[责任编辑 郑礼胜]