

甘草查耳酮 A 柔性脂质体的制备及其抗炎活性研究

欧阳泽垚¹, 苗开元¹, 赵新颖¹, 陈欣妍^{1,2*}, 石召华^{2,3*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065

3. 湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 湖北 武汉 430065

摘要: 目的 制备负载甘草查耳酮 A (licochalcone A, LA) 柔性脂质体 (elastic liposomes, LA-EL), 并评价其体外透皮效果、变形性和抗炎活性。方法 采用薄膜分散法制备 LA-EL, 首先通过粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、包封率及透皮性能优化膜软化剂配方, 然后采用透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 和微孔挤压法表征 LA-EL 的形貌与变形能力, 并考察 LA-EL 的低温贮存稳定性和体外释放特性, 通过制备香豆素 6 (coumarin 6, C6) 标记的柔性脂质体 C6-EL, 观察其在皮肤内的分布。最后通过 RAW264.7 巨噬细胞实验, 分析 LA-EL 的细胞摄取、毒性及对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 NO、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症因子的抑制作用, 评价其抗炎活性。结果 采用 10 mg 肉豆蔻酸异丙酯 (isopropyl myristate, IPM) 和 5 mg 聚氧乙烯蓖麻油 (polyoxyethylene castor oil, PCO) 共修饰制备的 LA-EL, 具有最优的 LA 透皮效果和脂质体理化特性, 且能显著提高 LA 的水溶性。LA-EL 的粒径呈现单峰分布特征, 在 TEM 下显示类球形的微观形态。在 4 °C 贮存 14 d 内, LA-EL 稳定性良好, 而无 IPM/PCO 共修饰普通脂质体 (LA-L) 的粒径、PDI 和包封率均发生显著变化。LA-EL 的变形指数高达 0.874 ± 0.125 , 是 LA-L 的 6.83 倍。与 LA 相比, LA-EL 缓释特性显著, 且释药行为与 LA-L 基本一致。IPM/PCO 共修饰脂质体不仅能够将 C6 有效递送至皮肤深层, 还显著提高了细胞摄取效率, 并且增强了 LA 对 LPS 诱导的 NO 和 TNF- α 分泌的抑制作用。结论 LA-EL 具有良好的低温贮存稳定性、变形性以及优异的透皮性能, 能够显著促进细胞对药物的摄取, 从而有效增强 LA 在细胞水平上的抗炎活性。

关键词: 甘草查耳酮 A; 柔性脂质体; 共修饰; 体外透皮; 变形性; 细胞摄取; 抗炎活性; 薄膜分散法; NO; 白细胞介素-1 β ; 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(2025)20-7355-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.20.009

Preparation of licochalcone A-loaded elastic liposomes and evaluation of their anti-inflammatory activity

OUYANG Zeyao¹, MIAO Kaiyuan¹, ZHAO Xinying¹, CHEN Xinyan^{1,2}, SHI Zhaohua^{2,3}

1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China

3. Key Laboratory of Chinese Medicine-Resource and Compound Prescription, Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Abstract: Objective To prepare licochalcone A (LA)-loaded elastic liposomes (LA-EL) and evaluate their transdermal efficacy, deformability, and anti-inflammatory activity. **Methods** LA-EL were prepared using the thin-film hydration method. The formulation of membrane softeners was optimized based on particle size, polydispersity index (PDI), encapsulation efficiency, and transdermal parameters. The morphology and deformability of LA-EL were characterized by transmission electron microscopy (TEM) and

收稿日期: 2025-05-08

基金项目: 湖北省技术创新计划项目 (2024BCA002); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目 (T2023014); 湖北中医药大学校级科技创新项目 (2024KJCX003)

作者简介: 欧阳泽垚, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型的研究。E-mail: 891865007@qq.com

*通信作者: 陈欣妍, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新剂型、新材料及肝癌靶向治疗研究。E-mail: 514565528@qq.com

石召华, 教授, 博士生导师, 从事中药资源开发与高值转化研究。E-mail: zhshi78@hbucm.edu.cn

extrusion through microporous membranes, respectively. Additionally, the storage stability (at 4 °C for 14 d) and *in vitro* release profile were evaluated. Coumarin 6 (C6)-labeled elastic liposomes (C6-EL) were prepared to observe their skin distribution. Finally, RAW264.7 macrophages were used to assess cellular uptake, cytotoxicity, and the inhibitory effects of LA-EL on lipopolysaccharide (LPS)-induced secretion of inflammatory mediators (NO, IL-1 β , and TNF- α). **Results** LA-EL co-modified with 10 mg isopropyl myristate (IPM) and 5 mg polyoxyl castor oil (PCO) exhibited optimal transdermal delivery of LA and optimal physicochemical properties of liposomes, while significantly improving the water solubility of LA. The particle size distribution of LA-EL was monodisperse, and TEM revealed uniform spherical morphology. After 14 d of storage at 4 °C, LA-EL maintained excellent stability, whereas conventional liposomes (LA-L) without IPM/PCO modification showed significant changes in particle size, PDI, and EE. The deformability index of LA-EL reached 0.874 ± 0.125 , which was 6.83-fold higher than that of LA-L. Compared with free LA, LA-EL demonstrated sustained release behavior, with a drug release profile similar to that of LA-L. Importantly, IPM/PCO co-modified liposomes not only effectively delivered C6 into deeper skin layers but also significantly enhanced cellular uptake and suppressed LPS-induced NO and TNF- α production. **Conclusion** LA-EL exhibits good stability, deformability, and excellent transdermal performance, which can significantly promote cellular uptake of the drug, thereby effectively enhancing the anti-inflammatory activity of LA at the cellular level.

Key words: licochalcone A; elastic liposome; co-modification; *in vitro* transdermal; deformability; cellular uptake; anti-inflammatory activity; thin-film hydration method; NO; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α

皮肤炎症作为临床常见病理状态,其发生发展与炎症细胞过度浸润及促炎因子异常释放密切相关^[1]。近年来,中药天然产物因其独特的药理活性在抗炎领域备受关注,其中甘草活性成分凭借显著疗效已成为研究热点^[2-3]。如甘草酸、甘草次酸等成分已成功应用于炎症性皮肤病治疗。甘草查耳酮 A (licochalcone A, LA) 是从胀果甘草根中提取的一种新型黄酮类活性成分^[4],具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗肿瘤等多重药理活性^[5],且安全性良好^[6],在抗炎药物研发中极具潜力。然而,LA 存在水溶性差、分配系数高等缺陷^[7],严重影响其透皮吸收及生物利用度,限制其药效发挥。

柔性脂质体 (elastic liposomes, EL) 是在传统脂质体磷脂成分的基础上,引入适量膜软化剂而构建出的一种具有高度变形性的新型脂质体结构^[8]。与传统脂质体相比,柔性脂质体不仅可通过变形作用跨越皮肤屏障,提高药物的透皮吸收效率^[9-10],还可将各类药物紧密包裹于其内部,显著提升药物的稳定性^[11],因而可广泛应用于抗炎药、抗肿瘤药及疫苗等的经皮递送^[12]。鉴于 LA 虽具有显著的抗炎活性,但其皮肤渗透能力受限于皮肤天然屏障以及自身的疏水特性,本研究采用柔性脂质体技术构建一种新型的 LA 经皮递药系统。基于前期对多种膜软化剂的初步筛选结果,最终选定聚山梨酯 80 (Tween 80, T80)、聚氧乙烯蓖麻油 (polyoxyethylene castor oil, PCO)、肉豆蔻酸异丙酯 (isopropyl myristate, IPM)、1,2-丙二醇 (1,2-propanediol, PG) 和氮酮 (azone) 5 种膜软化剂进行系统研究。通过

综合评估脂质体关键理化参数 [粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和包封率] 及体外透皮性能,筛选最优处方制备 LA 柔性脂质体 (LA-loaded elastic liposomes, LA-EL), 并进一步考察 LA-EL 的变形能力、贮存稳定性、体外药物释放行为及其在皮肤内的分布情况和体外抗炎活性,为开发具有临床转化价值的 LA 经皮给药制剂奠定理论基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司; AL204 型电子天平,瑞士梅特勒托利多有限公司; LC-MSB-S 型磁力搅拌器,上海力辰仪器科技有限公司; RE-52A 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂; ZNHW-II 型智能恒温控温仪,巩义市予华仪器有限责任公司; VCX750 型细胞破碎仪,美国 Sonics 公司; UV-1800PC 型紫外分光光度计,翱艺仪器 (上海) 有限公司; PK-165 型离心机,湖南平科科学仪器有限公司; NanoZS90 型激光粒度分析仪,英国马尔文仪器有限公司; 日本 JEOLJEM-2100F 型透射电子显微镜 (TEM),日本电子株式会社; TP-12 型智能透皮扩散仪,天津市精拓仪器科技有限公司; Herocell 80 型细胞培养箱,上海润度生物科技有限公司; X Mark™ 型全波长酶标仪,美国 Bio-Rad 公司; DP73 型倒置荧光显微镜,日本奥林巴斯株式会社。

1.2 药品与试剂

胆固醇,批号 1012E104,北京索莱宝科技有限公司; LA,批号 GCCETA20221129,南京春秋生物

工程有限公司；大豆磷脂，批号 SY-SO-231205，质量分数 95.0%，艾伟拓（上海）医药科技有限公司；PCO（批号 A2404306）、IPM（批号 K2103756），上海阿拉丁生化科技股份有限公司；T80（批号 T6336）、1,2-丙二醇（PG，批号 20220720）、氮酮（批号 S1-17）、香豆素-6（coumarin 6, C6，批号 C16628698），上海麦克林生化科技股份有限公司；脂多糖（lipopolysaccharide, LPS），批号 L2880，默克西格玛奥德里奇贸易有限公司；NO 试剂盒（批号 Z938241028），上海碧云天生物技术股份有限公司；白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）试剂盒（批号 WZ03XZ8H2220）、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）试剂盒（批号 WU03T4847069），伊莱瑞特（武汉）生物技术有限公司；4',6-二脒基-2-苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI），批号 J21HS174906，上海源叶生物科技有限公司；色谱纯甲醇，批号 F2409J204，武汉弗顿控股有限公司；其余试剂均为市售分析纯。

1.3 动物与细胞株

巨噬细胞 RAW264.7，购自武汉普诺赛生命科技有限公司；SD 大鼠，SPF 级，雄性，体质量约为 160 g，饲养环境保持在温度 20~25 $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度控制在 (55 $\pm$ 5) %，购自武汉子科恒生物科技有限公司，合格证书编号为 42000600058254，动物实验伦理审查批号为 HUCMS00312274。

2 方法与结果

2.1 LA 含量测定方法学

2.1.1 对照品溶液的配制 取 LA 对照品适量，精密称定，置于 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇，超声定容至刻度，摇匀，即得质量浓度为 200.00 mg/mL 的对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液的配制 取 LA 提取物适量，精密称定，置于 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇，超声定容至刻度，摇匀，即得质量浓度为 200.00 mg/mL 的供试品储备液。

2.1.3 最大吸收波长的测定 将 LA 对照品溶液稀释后，利用紫外分光光度计进行全波长扫描，确定其最大吸收波长。结果如图 1 所示，在 350~500 nm 的波长范围内，LA 的最大吸收波长为 379 nm。

2.1.4 色谱条件 色谱柱为 Ultimate[®] LP-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-水 (70 : 30)；体积流量为 1.0 mL/min；柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ ；检测

波长为 379 nm；进样体积为 10 μL 。

2.1.5 专属性试验 取适量 LA 供试品溶液、空白柔性脂质体（elastic liposomes, EL）以及 LA-EL，用甲醇破乳并定容后，按照“2.1.4”项下色谱条件进样测定。结果如图 2 所示，LA 供试品溶液和 LA-EL 的色谱峰保留时间分别为 16.666 min 和 16.635 min，峰形较好，而 EL 在该保留时间无吸收峰，表明溶剂以及膜材对 LA 的含量测定无干扰，该方法专属性良好。

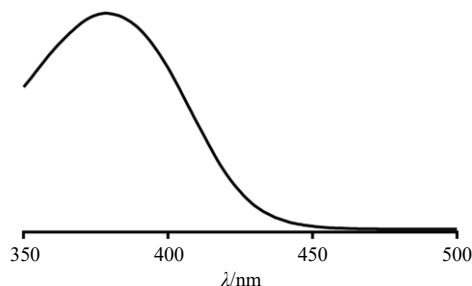


图 1 LA 的紫外吸收光谱

Fig. 1 UV absorption spectrum of LA

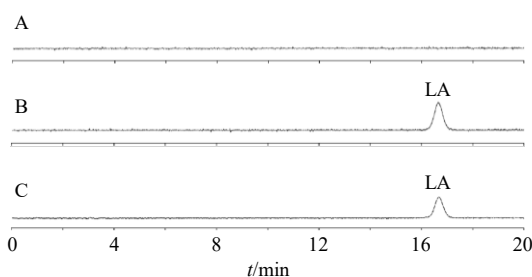


图 2 EL (A)、LA 对照品 (B) 和 LA-EL 样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of EL (A), LA reference substance (B) and LA-EL sample (C)

2.1.6 线性关系考察 精密移取 LA 对照品储备液，配制成质量浓度分别为 3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液，按照“2.1.4”项下色谱条件进样测定。以峰面积积分值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归，经 Prism 8.0 软件计算得到回归方程 $Y=44\,827X+25\,769$, $R^2=0.999\,9$ ，表明 LA 在 3.125~200.000 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.1.7 精密度试验 取适量 LA 对照品溶液，按照“2.1.4”项下色谱条件重复进样测定 6 次，记录峰面积，计算其 RSD，考察仪器的精密度。经计算得 LA 峰面积的 RSD 为 1.38%，表明该仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取质量浓度为 200.000 $\mu\text{g/mL}$ 的 LA 供试品溶液，分别在 0、2、4、6、8、12、

24、48 h, 按照“2.1.4”项下色谱条件进样分析, 考察供试品溶液的稳定性。经计算得 LA 峰面积的 RSD 为 0.70%, 表明 LA 供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.1.9 重复性试验 分别取质量浓度为 6.250、25.000、100.000 $\mu\text{g/mL}$ 3 个不同质量浓度的 LA 对照品溶液, 按照“2.1.4”项下色谱条件重复进样测定 5 次, 计算其质量分数的 RSD, 考察该方法的重复性。经计算得 3 个质量浓度下, LA 质量分数的 RSD 分别为 0.82%、1.53%、1.37%, 表明该方法能有效避免偶然误差。

2.1.10 加样回收率试验 用回收率表示准确度。精密量取 LA 供试品溶液, 加入空白柔性脂质体进行稀释, 使 LA 的质量浓度分别为 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 。经微孔滤膜滤过后, 按照“2.1.4”项下色谱条件重复进样 3 次, 测定 LA 含量, 并按照下式计算回收率。经计算, LA 在低、中、高质量浓度供试品溶液中 LA 的平均加样回收率分别为 98.95%、98.26%、99.46%, RSD 分别为 0.67%、0.98%、1.65%, 表明该方法准确度良好。

回收率 = LA 实际质量浓度 / 加入 LA 质量浓度

2.2 LA-EL 的制备

2.2.1 荷载 LA 普通脂质体 (LA-loaded liposomes, LA-L) 的制备和表征 采用薄膜分散法制备 LA-L。依据预实验所确定的 LA-L 最佳制备工艺, 精密称取 4 mg LA、160 mg 大豆磷脂和 26.67 mg 胆固醇, 加入无水乙醇后进行超声溶解。在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下快速旋转蒸发, 直至形成均匀薄膜。随后加入 10 mL 超纯水, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 温度下水化 60 min。采用细胞超声破碎仪 (功率 225 W) 对水化液超声破碎 20 min。0.45 μm 微孔滤膜滤过后, 即可得到 LA-L。将适量脂质体溶液置于样品池中, 采用激光粒度分析仪测定其粒径、PDI 和 ζ 电位。

2.2.2 LA 包封率的测定

(1) 过膜法测定包封率: 按照文献报道方法^[13], 将脂质体溶液用超纯水稀释至 10 mL, 过 0.45 μm 水系滤膜, 甲醇破乳后按照“2.1.4”项下色谱条件进样分析, 测得被包封的 LA 含量, 未过膜的脂质体经甲醇破乳后测得总 LA 投药量, 按下式计算 LA 包封率。

包封率 = 包封的 LA 质量 / 总 LA 投药量

(2) 过膜法验证: 将处方量 LA 加入到空白脂质体中, 冰浴中超声分散后, 按照“2.2.2”项下方

法测定包封率。结果显示 LA 的包封率仅为 (8.19 $\pm$ 0.07) %, 远低于 LA-L 的包封率 (94.27 $\pm$ 1.66) %, 表明未被脂质体包封的 LA 可被 0.45 μm 滤膜有效截留, 该方法可用于测定脂质体的药物包封率。

2.2.3 体外透皮实验

(1) 皮肤累积渗透量 (Q_n): 采用 Franz 扩散池法^[14-15], 将鼠皮角质层向上固定于供给室和接收室之间, 体积比为 1:1 的乙醇/生理盐水混合液作为接收液。将 2 mL 质量浓度相同的 LA 不同脂质体样品溶液加入到供给室, 控制皮肤表面温度保持在 32 $^{\circ}\text{C}$, 搅拌速度设置为 400 r/min。分别于 1、2、3、4、6、8、10、12、24、36、48 h 取出接收液, 并补充等量新鲜接收液。取出的接收液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 按照“2.1.4”项下色谱条件进样测定, 测定接收液中 LA 的含量, 并计算 Q_n 。

(2) 皮肤滞留量 (Q_s): 透皮实验结束后, 取下大鼠皮肤, 将其表面残留药物洗净。取透皮处皮肤, 捣碎后加入 1 mL 甲醇, 依次进行超声处理和涡旋混合, 以充分提取药物成分。在 12 000 r/min 的转速下离心 10 min, 分离出上清液。用 0.5 mL 甲醇对离心后的残渣进行重提, 合并 2 次提取的上清液, 并定容至 2 mL。最后, 按照“2.1.4”项下色谱条件进样测定, 通过测定结果计算 Q_s 。

2.2.4 膜软化剂的筛选 按照 LA-L 的制备方法, 在无水乙醇中额外加入 10 mg 不同类型的膜软化剂 (T80、PCO、IPM、PG 和 azone), 制备荷载 LA 的柔性脂质体 (LA-T80-Lip、LA-PCO-Lip、LA-IPM-Lip、LA-PG-Lip、LA-azone-Lip)。测定这些柔性脂质体的粒径、PDI、 ζ 电位和药物包封率, 并按照“2.2.3”项下方法测定 LA 的 Q_n 和 Q_s 。

钟玮等^[16]研究发现, 膜软化剂的种类会对脂质体的透皮吸收特性产生显著影响, 同时也会改变其粒径分布和药物包封率。因此, 以脂质体的理化性质和 LA 透皮效果为评价指标, 筛选最优膜软化剂。结果如表 1 所示, 与未修饰的 LA-L 相比, 经 PCO 或 IPM 修饰后, 脂质体粒径均减小至 100 nm 以下, 其中 IPM 修饰组的粒径降低幅度更为显著 ($P < 0.01$), 并且 LA 包封率也提高至 95% 以上。值得注意的是, IPM 修饰脂质体的 PDI 与未修饰的 LA-L 相比无显著差异, 但 PCO 修饰组的 PDI 极显著降低至 0.298 ± 0.023 ($P < 0.000 1$), 表明该膜软化剂可显著改善脂质体粒径分布的均一性。T80 修饰同样能够使脂质体的粒径和 PDI 降低, 但也导致 LA

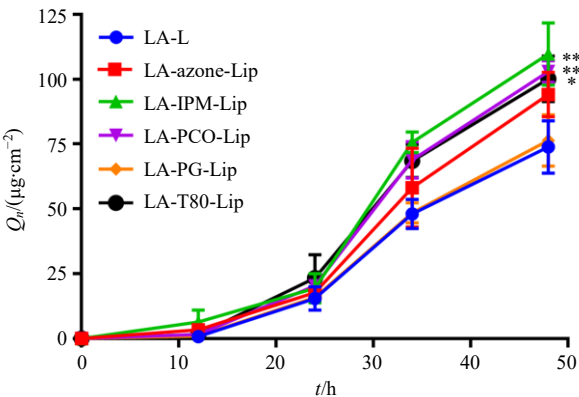
表 1 不同膜软化剂修饰时脂质体的理化性质 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Physicochemical properties of liposomes modified by different membrane softeners ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂质体	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	包封率/%
LA-L	126.20±19.50	0.545±0.047	-2.95±0.45	94.27±1.66
LA-PCO-Lip	97.60±1.97	0.298±0.023****	-4.93±0.53	96.12±0.54
LA-azone-Lip	147.10±19.20	0.548±0.053	-4.59±1.12	95.36±3.41
LA-T80-Lip	102.20±1.75	0.307±0.029****	-3.40±0.15	89.39±4.45
LA-IPM-Lip	68.32±5.42**	0.518±0.035	-3.87±0.54	97.43±0.94
LA-PG-Lip	151.80±19.60	0.593±0.023	-5.61±1.13**	97.49±1.34

与 LA-L 比较: ** $P < 0.01$ **** $P < 0.0001$ 。
** $P < 0.01$ **** $P < 0.0001$ vs LA-L.

包封率降低至 90% 以下, 这可能与膜软化剂分子对药物-脂质相互作用的影响有关^[17]。LA-L 的 ζ 电位为 (-2.95±0.45) mV。经膜软化剂修饰后, ζ 电位变化不显著, 仅 PG 修饰使其显著增至 (-5.61±1.13) mV ($P < 0.01$)。这可能是因为 T80 和 PCO 是非离子型表面活性剂, 其分子结构中缺乏可解离的基团; IPM 和 azone 属于非极性化合物, 同样不具备解离能力; 而 PG 分子中的羟基 (-OH) 在水相中可能发生部分解离, 从而增加了脂质体表面的负电荷密度。

皮肤渗透实验结果显示, 在 5 种测试的膜软化剂中, IPM 修饰的脂质体 (LA-IPM-Lip) 表现出最优异的促渗透效果 (图 3 和表 2), 其 LA 48 h Q_n 达 (109.76±12.05) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 较 LA-L (73.92±10.09) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 提高了约 48.5% ($P < 0.01$)。同时, IPM 修饰组在皮肤组织中的 Q_s 亦显著高于 LA-L ($P < 0.05$), 表明该膜软化剂不仅能增强药物透皮输送能力, 还可提高药物在皮肤层中的蓄积。虽然 PCO 与



与 LA-L 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs LA-L.

图 3 不同膜软化剂修饰时 LA 的 Q_n ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 LA Q_n modified with various membrane softeners ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 2 不同膜软化剂修饰时 LA 的 Q_s ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 LA Q_s modified with various membrane softeners ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂质体	$Q_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	脂质体	$Q_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
LA-L	2.348±0.159	LA-T80-Lip	2.543±0.056
LA-PCO-Lip	2.806±0.074*	LA-IPM-Lip	2.737±0.141*
LA-azone-Lip	1.996±0.097	LA-PG-Lip	2.606±0.319

与 LA-L 比较: * $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs LA-L.

T80 修饰组 (LA-PCO-Lip、LA-T80-Lip) 的 48 h Q_n 略低于 IPM 组, 但也显著高于 LA-L 组 ($P < 0.05$)。然而, 仅 PCO 组的 Q_s 与 LA-L 组存在统计学差异 ($P < 0.05$)。基于膜软化剂对脂质体理化性质和 LA 透皮行为的差异化调控作用, 本研究采用 IPM 与 PCO 共修饰策略: IPM 主要维持其优异的透皮促进作用, 而 PCO 则降低脂质体的 PDI, 以改善脂质体的稳定性。

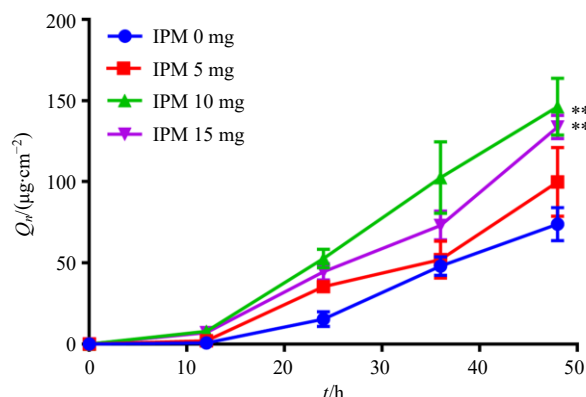
2.2.5 膜软化剂用量的筛选 采用 LA-L 的制备方法, 分别在无水乙醇中加入 5、10、15 mg IPM 制备 LA-IPM-Lip, 并通过测定粒径、PDI、包封率及 Q_n 和 Q_s 筛选 IPM 最佳用量。随后固定 IPM 为 10 mg, 分别加入 5、10、15 mg PCO 制备 IPM/PCO 共修饰的柔性脂质体 LA-EL, 并采用相同指标筛选 PCO 最优用量。

结果如表 3 所示, 随着 IPM 用量从 5 mg 增加至 15 mg, 脂质体的平均粒径减小至 100 nm 以下, 但 PDI 和 LA 包封率均未发生明显改变 ($P > 0.05$)。结合透皮实验结果可知, 当 IPM 用量为 10 mg 时, LA 48 h Q_n 达到最大值, 且显著性高于 LA-L (图 4, $P < 0.01$)。虽然 IPM 用量为 15 mg 时, LA 48 h Q_n 也与 LA-L 存在显著性差异 ($P < 0.01$), 但只有 IPM 用量为 10 mg 时, 其 48 h Q_s 显著性高于 LA-L (表 4, $P < 0.05$)。因此, 确定 IPM 的最佳用量为 10 mg。

在 10 mg IPM 修饰的 LA 脂质体中加入 5 mg PCO 后, 脂质体的 PDI 从 0.510±0.016 显著降低至 0.254±0.018 (表 5, $P < 0.0001$), 表明其分散均一

表 3 不同 IPM 用量下脂质体的理化性质 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Physicochemical properties of liposomes modified with different dosages of IPM ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

IPM/mg	粒径/nm	PDI	包封率/%
0	126.20±19.50	0.545±0.047	94.27±1.66
5	131.10±30.20	0.543±0.044	95.23±1.33
10	79.91±14.20	0.510±0.016	97.52±4.12
15	77.77±15.70	0.560±0.078	95.96±0.75



与 IPM 0 mg 比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs IPM 0 mg.

图 4 不同 IPM 用量下 LA 的 Q_n ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 LA Q_n modified with various IPM dosages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 4 不同 IPM 用量下 LA 的 Q_s ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table LA Q_s modified with various IPM dosages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

IPM/mg	$Q_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	IPM/mg	$Q_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
0	2.348 ± 0.159	10	$3.370 \pm 0.671^*$
5	2.556 ± 0.176	15	2.442 ± 0.214

与 IPM 0 mg 比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs IPM 0 mg.

表 5 不同 PCO 用量下脂质体的理化性质 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table Physicochemical properties of liposomes modified with different dosages of PCO ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

PCO/mg	粒径/nm	PDI	包封率/%
0	79.91 ± 14.20	0.510 ± 0.016	97.52 ± 4.12
5	$107.50 \pm 4.44^*$	$0.254 \pm 0.018^{****}$	92.76 ± 2.05
10	98.66 ± 1.01	$0.244 \pm 0.008^{****}$	94.83 ± 2.30
15	92.74 ± 1.59	$0.256 \pm 0.008^{****}$	96.59 ± 3.53

与 PCO 0 mg 比较: * $P < 0.05$ **** $P < 0.0001$ 。

* $P < 0.05$ **** $P < 0.0001$ vs IPM 0 mg.

性得到明显改善。同时,脂质体的粒径从 (79.91 ± 14.20)nm 显著增大至 (107.50 ± 4.44)nm ($P < 0.05$), LA 包封率则降至 95% 以下,但差异并无统计学意义 ($P > 0.05$)。随着 PCO 用量增加到 15 mg,脂质体的粒径减小到 (92.74 ± 1.59) nm,同时 LA 包封率也提升到 95% 以上,表明更高剂量的 PCO 可优化脂质体的纳米结构并增强药物负载能力。然而,PCO 剂量的增加并没有进一步减小脂质体的 PDI,表明 5 mg 的 PCO 已能有效改善脂质体的分散性,继续增加用量对 PDI 的优化作用有限。

表 6 结果显示,与仅用 IPM 修饰的脂质体组相比,添加不同质量的 PCO,均可显著性提高 LA 48 h

的 Q_s ($P < 0.05$)。但只有 PCO 的添加量为 5 mg 时,LA 48 h 的 Q_n 与未添加 PCO 组相比具有统计学差异 ($P < 0.01$),因此,确定 PCO 的最佳用量为 5 mg (图 5)。

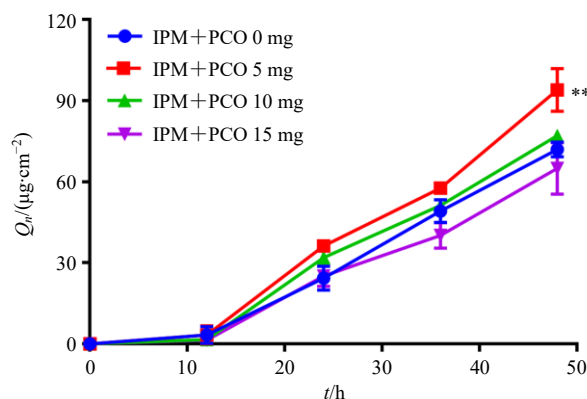
表 6 不同 PCO 用量下 LA 的 Q_s ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 6 LA Q_s modified with various PCO dosages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

PCO/mg	$Q_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	PCO/mg	$Q_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
0	2.145 ± 0.753	10	$3.710 \pm 0.541^*$
5	$3.875 \pm 0.100^*$	15	$3.634 \pm 0.556^*$

与 PCO 0 mg 比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs PCO 0 mg.



与 IPM+PCO 0 mg 比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs IPM + PCO 0 mg.

图 5 不同 PCO 用量下 LA 的 Q_n ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 LA Q_n modified with various PCO dosages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.2.6 LA 溶解度比较 由于 LA 在纯水中的溶解度低于 HPLC 检测限,故参照李钰等^[18]方法,测定其在含处方量 IPM 和 PCO 水溶液中的溶解度,并采用“2.1.4”项下色谱条件进行分析。结果表明,LA 在该水溶液中溶解度仅为 (43.260 ± 4.118) $\mu\text{g/mL}$,而经 IPM/PCO 共修饰脂质体包载后,溶解度显著提高至 (397.700 ± 14.250) $\mu\text{g/mL}$,提升幅度达 9.19 倍 (表 7, $P < 0.0001$)。

2.3 LA-EL 的微观形态

取 10 μL 的 LA-L 或 LA-EL 溶液,滴于铜网上,

表 7 LA 和 LA-EL 的溶解度比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 7 Solubility comparison of LA and LA-EL ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	溶解度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
LA	43.260 ± 4.118
LA-EL	$397.700 \pm 14.250^{****}$

与 LA 比较: **** $P < 0.0001$ 。

**** $P < 0.0001$ vs LA.

静置 1 min 后用滤纸吸干。随后滴加 10 μ L 磷钨酸染色液重复上述操作。室温下晾干后,采用 TEM 在 80 kV 加速电压下观察样品的微观形貌。结果如图 6-A 所示,LA-L 的粒径分布呈现双峰特征,表明体系中存在明显的粒径不均一现象,这与 TEM 下观察到的大小不一的形态相一致(图 6-C)。相比之下,IPM (10 mg) 与 PCO (5 mg) 共修饰的 LA 脂质体 (LA-EL) 表现出显著改善的单峰分布(图 6-B),该结果与 TEM 观察到的均一类球形形貌高度一致(图 6-D),表明 IPM 与 PCO 的协同修饰作用可有效改善脂质体的物理特性。

2.4 LA-EL 的变形性考察

参照 Ni 等^[19]的方法,考察 LA-EL 的变形性。

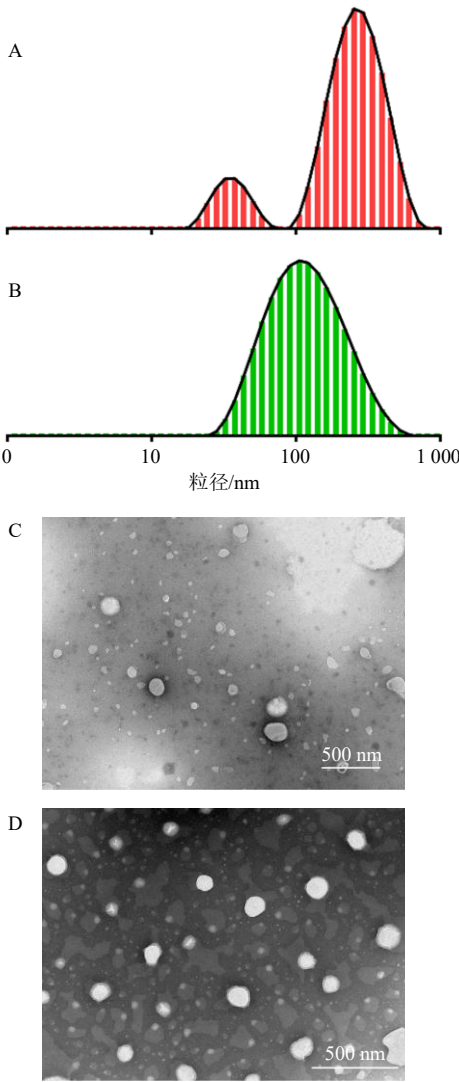


图 6 LA-L 和 LA-EL 的粒径分布图 (A、B) 及 TEM 图 (C、D)

Fig. 6 Particle size distribution profiles (A, B) and TEM images (C, D) of LA-L and LA-EL

分别取 LA-L 和 LA-EL 溶液,在 1 MPa 的压力下使其通过 50 nm 的聚碳酸酯膜,记录 5 min 内的挤出体积,并测定挤出前后的粒径,最后按下式计算变形指数。研究表明,柔性脂质体的变形性是其能够显著增强透皮给药效率的关键因素^[20]。因此,采用微孔挤压法定量评价了 LA-EL 的变形能力。结果如表 8 所示,LA-EL 在 5 min 内的相对挤出体积为 (15.220 $\pm$ 2.180) %,显著高于 LA-L 的 (3.750 $\pm$ 1.250) % ($P<0.001$)。经计算 LA-EL 的变形指数为 0.87,是 LA-L 的 6.82 倍 ($P<0.0001$),这一结果从动力学角度证实了共修饰策略对脂质体柔性的显著增强作用。

变形指数=挤出体积数 $\times$ (挤出后粒径/膜孔径)²

表 8 LA-L 和 LA-EL 的相对挤出体积 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 8 Relative extruded volume of LA-L and LA-EL ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对挤出体积/%	变形指数
蒸馏水	98.550 $\pm$ 1.253	—
LA-L	3.750 $\pm$ 1.250	0.128 $\pm$ 0.043
LA-EL	15.220 $\pm$ 2.175***	0.874 $\pm$ 0.125****

与 LA-L 比较: *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$ 。
*** $P<0.001$ **** $P<0.0001$ vs LA-L.

2.5 LA-EL 的贮存稳定性

将 LA-L 和 LA-EL 溶液分别置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中贮存,分别在第 0、1、3、5、7、14 天取样,测定样品溶液的粒径和 PDI,并按照“2.2.2”项下方法测定药物包封率。结果如表 9 所示,在 4 $^{\circ}$ C 贮存 14 d 后,LA-L 的粒径 ($P<0.0001$) 和 PDI ($P<0.001$) 与第 0 天相比均显著增大,LA 的包封率也显著降低 ($P<0.05$)。然而,在贮存相同天数后,LA-EL 的粒径和包封率均未发生明显变化(表 10),但第 14 天的 PDI 与第 0 天时相比显著降低 ($P<0.01$)。这

表 9 LA-L 在 4 $^{\circ}$ C 避光贮存 14 d 内理化性质的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Physicochemical properties of LA-L during 14 d of light-avoidance storage at 4 $^{\circ}$ C ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	粒径/nm	PDI	包封率/%
0	112.10 $\pm$ 12.10	0.552 $\pm$ 0.021	96.30 $\pm$ 3.51
1	118.30 $\pm$ 2.31	0.581 $\pm$ 0.031	96.93 $\pm$ 0.73
3	142.50 $\pm$ 5.69	0.587 $\pm$ 0.025	97.87 $\pm$ 0.99
5	161.50 $\pm$ 2.45	0.622 $\pm$ 0.007	95.47 $\pm$ 1.63
7	171.70 $\pm$ 2.46	0.607 $\pm$ 0.011	94.47 $\pm$ 1.15
14	191.10 $\pm$ 4.18****	0.670 $\pm$ 0.029***	92.09 $\pm$ 0.64*

与第 0 天比较: * $P<0.05$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$ 。
* $P<0.05$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$ vs 0 d.

表 10 LA-EL 在 4 ℃ 避光贮存 14 d 内理化性质的变化
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Physicochemical properties of LA-EL during 14 d of light-avoidance storage at 4 ℃ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	粒径/nm	PDI	包封率/%
0	113.20±11.10	0.257±0.004	98.03±0.45
1	115.00±2.92	0.239±0.004	97.72±0.31
3	109.30±2.33	0.226±0.012	98.42±1.34
5	104.20±4.89	0.229±0.011	98.37±0.71
7	122.10±9.15	0.215±0.007	98.52±0.67
14	119.90±42.32	0.195±0.011**	98.12±0.78

与第 0 天比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs 0 d.

可能是由于 PCO 分子通过稳定脂质体表面结构,有效抑制了贮存过程中颗粒的聚集行为,从而使 PDI 下降^[21]。以上结果表明,PCO 修饰不仅能够优化脂质体的粒径分布均一性,更能通过增强膜结构稳定性显著提升 LA-EL 的贮存稳定性。

2.6 LA-EL 的体外药物释放行为

采用吴斯宇等^[22]建立的透析法考察 LA 乙醇溶液、LA-L 及 LA-EL 溶液的体外药物释放行为。将 1 mL 相同 LA 质量浓度的样品溶液,分别置于透析袋(截留相对分子质量 8 000~14 000)中,扎紧透析袋的两端后,将其浸入 40 mL 释放介质(pH 7.4 的 PBS,含 30%乙醇)中。释放介质的温度维持在 37 ℃,并以 150 r/min 的转速进行动态透析。分别在 0、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h 取出 1 mL 透析液,并补充相同体积的新鲜释放介质。按照“2.1.4”项下色谱条件进样测定,按照下式计算各取样点的累积释放率,绘制释放曲线。结果如图 7 所示,LA 乙醇对照组呈现典型的快速药物释放模式,在 4 h 时 LA 的累积释放量已高达 80%左右,6 h 时基本完全释放。与对照组相比,LA-EL 呈缓释特性,

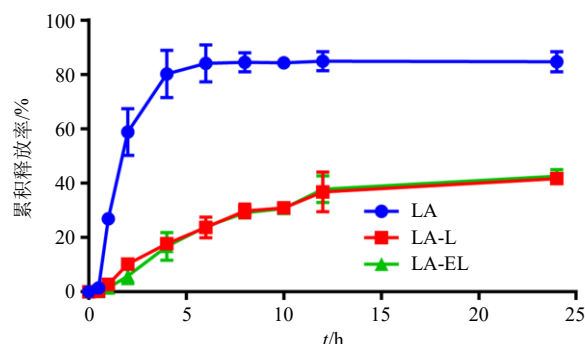


图 7 LA、LA-L 和 LA-EL 的体外释放行为 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 In vitro release profiles of LA, LA-L and LA-EL
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

在 24 h 时累积释放量为 (42.690 ± 2.390)%, 且其释药行为与 LA-L 相似,表明脂质体的包裹可显著延缓 LA 的释放。

$$\text{累积释放率} = (C_n V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / W$$

C_n 为第 n 个取样点质量浓度, C_i 为第 i 个取样点质量浓度, V_0 为释放介质体积, V_i 为每次的取样体积, W 为标示量

2.7 LA-EL 的皮肤内分布

2.7.1 C6-EL 的制备 将脂溶性荧光染料香豆素 6 (C6) 替代 LA, 按照“2.2.5”项下方法制备荷载 C6 的 IPM/PCO 共修饰柔性脂质体 (C6-EL), 同时制备荷载 C6 的无 IPM/PCO 共修饰的普通脂质体 (C6-Lip) 作为对照。结果如表 11 所示, C6-EL 的粒径为 (92.19 ± 1.68) nm, PDI 为 0.278 ± 0.017 , 与 LA-EL 的相近, 表明 C6-EL 可作为 LA-EL 的示踪替代物直观比较不同脂质体的透皮行为。

表 11 C6-Lip 及 C6-EL 的理化性质 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Physicochemical properties of C6-Lip and C6-EL
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂质体	粒径/nm	PDI	包封率/%
C6-Lip	108.30±2.01	0.530±0.056	63.71±4.77
C6-EL	92.19±1.68	0.278±0.017	61.98±3.58

2.7.2 C6-EL 的皮肤内定位 采用“2.2.3”项下 Franz 扩散池法, 在 2 mL 的脂质体样品溶液与大鼠腹部皮肤孵育 12、24 h 后, 取出皮肤样品并切成 1 cm² 大小的薄片, 使用荧光倒置显微镜观察 C6 在大鼠皮肤中的分布, 评估 C6-EL 的皮肤渗透性能。结果如图 8 所示, 在与大鼠皮肤孵育 12 h 后, C6-EL 组皮肤中清晰可见代表 C6 的绿色荧光, 其呈现细长条状和散点分布, 表明 C6 可能一部分聚集在角质层, 另一部分已穿透角质层, 深入到真皮层。相比之下, C6-Lip 组皮肤中的绿色荧光则十分微弱, 仅能隐约辨认出一条细长的荧光带, 表明此时仅有少量 C6 聚集在角质层。经过 24 h 的孵育, C6-Lip 组的荧光带才变得清晰可见, 而 C6-EL 组的荧光带不仅变宽, 且在皮下组织的毛囊处出现了明亮的绿色荧光。这些结果进一步证实, IPM/PCO 共修饰脂质体具有更优异的透皮性能, 能够使更多的药物穿透皮肤, 进入到皮下组织, 这一效果也与前面体外透皮实验的定量分析结果相一致。

2.8 LA-EL 的体外抗炎活性

2.8.1 细胞摄取 将 RAW264.7 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔板中, 培养 24 h 后弃去培养基, 分别替换为含有 C6、C6-Lip 和 C6-EL 的完全培养

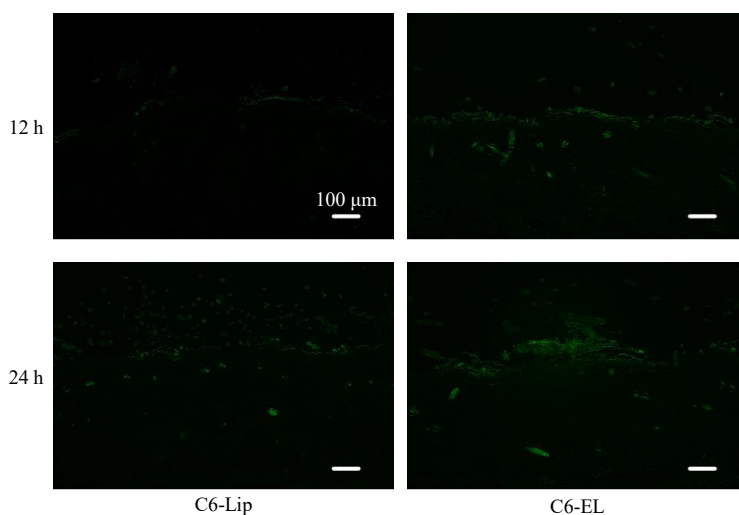


图 8 C6-Lip 和 C6-EL 的皮下荧光分布

Fig. 8 Subcutaneous fluorescence distribution of C6-Lip and C6-EL

基 (C6 质量浓度为 0.4 mg/mL)。孵育 4 h 后, 弃去培养基, 用适量 PBS 清洗 3 次。加入 2 μg/mL DAPI 溶液, 室温孵育 20 min 进行细胞核染色, 再用冰 PBS 漂洗 3 次。加入 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, 弃去多聚甲醛后, 用冰 PBS 保存细胞。采用倒置荧光显微镜观察细胞的摄取情况, 并使用 Image J 软件对荧光图像进行分析, 以相对灰度值表示相对荧光强度, 评估细胞对不同制剂的摄取效率。如图 9 所示, 在 C6-Lip 和 C6-EL 组中, 可观察到大量的绿

色荧光亮点, 且绿色荧光分布在蓝色细胞核周围, 表明脂质体有效增强了 C6 的内化。荧光强度分析显示, C6-Lip 和 C6-EL 组的平均荧光强度均显著高于游离 C6 组 ($P < 0.001$)。不仅如此, C6-EL 组的平均荧光亮度, 相比 C6-Lip 组有显著提升 ($P < 0.01$, 表 12), 表明 IPM 与 PCO 的共修饰进一步增强了细胞摄取效率, 这可能是由于 IPM 和 PCO 优化了脂质体的亲脂性或扰乱了细胞膜结构^[23], 从而促进药物的细胞摄取。

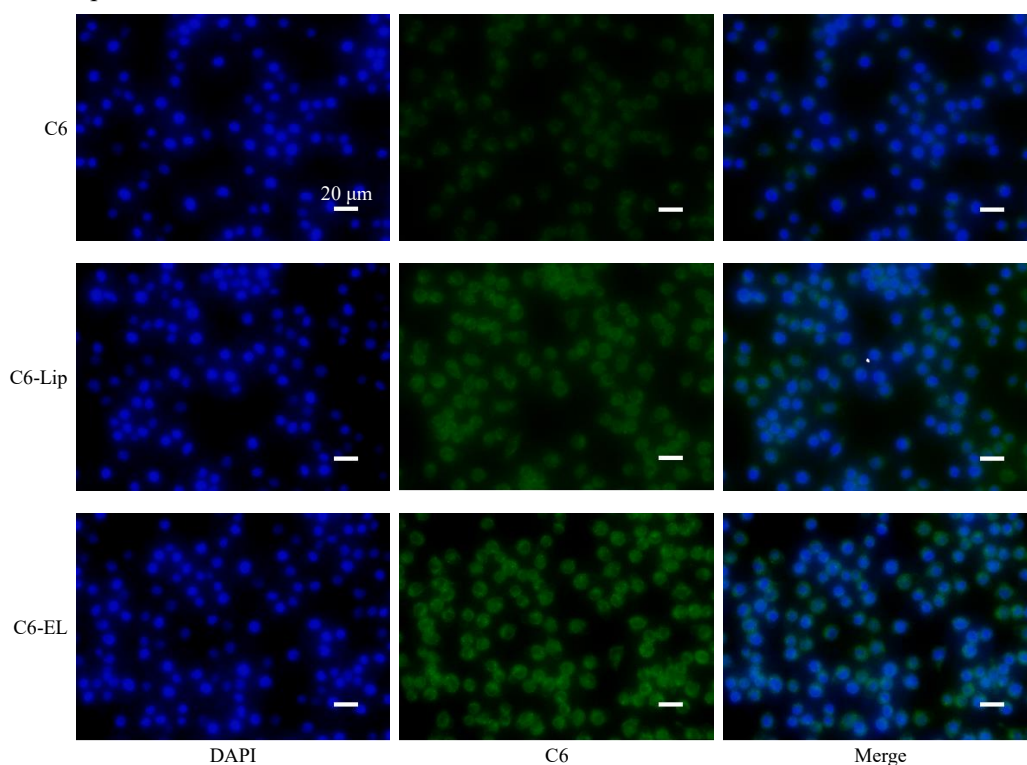


图 9 C6、C6-Lip 和 C6-EL 与 RAW264.7 细胞孵育 4 h 后的细胞摄取差异

Fig. 9 Differences in cellular uptake of C6, C6-Lip and C6-EL after 4 h of incubation with RAW264.7 cells

表 12 C6、C6-Lip 和 C6-EL 与 RAW264.7 细胞孵育 4 h 后的细胞摄取荧光强度分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 12 Gray scale analysis of cellular uptake fluorescence of C6, C6-Lip and C6-EL after 4 h of incubation with RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	平均荧光强度
C6	0.4	44.09 ± 1.34
C6-Lip	0.4	60.79 ± 0.86***
C6-EL	0.4	68.17 ± 0.25***##

与 C6 组比较: *** $P < 0.001$; 与 C6-Lip 组比较: ## $P < 0.01$ 。

*** $P < 0.001$ vs C6 group; ## $P < 0.01$ vs C6-Lip group.

2.8.2 细胞存活率 取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞,按照 1×10^4 个/孔的细胞密度铺入 96 孔板中,在培养箱中孵育 24 h。弃去培养基,分别加入含有不同质量浓度 (1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00 $\mu\text{g/mL}$) 的游离 LA、LA-L 和 LA-EL 的完全培养基。继续培养 24 h 后,弃去培养基,每孔加入 CCK-8 溶液,孵育 1 h 后,使用酶标仪检测每孔在 450 nm 处的吸光度 (A) 值,按照下式计算细胞存活率。设置含 10% FBS 的完全培养基为空白对照组,未经药物处理过的细胞悬液为阴性对照组。

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

结果如表 13 所示,随着 LA 质量浓度的递增,各组 RAW264.7 细胞的存活率呈现出逐步下降的趋势。当 LA 质量浓度超过 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,LA-EL 组的细胞存活率均低于 LA-L 组,这可能是因为膜软化剂的存在导致细胞毒性有所上升。鉴于在 LA 质量浓度低于及等于 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,各组的细胞存活率均高于 80%,故将该浓度设定为后续细胞内炎症因子含量测定的给药浓度上限。

2.8.3 LA-EL 对细胞炎症因子分泌的影响 采用 Griess 法^[24]测定 LPS 诱导的炎性细胞与 LA-EL 孵

育后的 NO、IL-1 β 和 TNF- α 水平,以评估 LA-EL 的抗炎活性。取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞,按照 1×10^5 个/孔的细胞密度铺入 48 孔板中,培养 12 h 后弃去培养基,用 PBS 清洗 2 次。随后,各组分别加入 200 μL 培养基:空白组加入普通培养基;模型组加入含 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的培养基;样品组加入含 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和 LA 样品溶液 (LA、LA-L、LA-EL, LA 的质量浓度均为 5 $\mu\text{g/mL}$) 的培养基。继续孵育 24 h 后,收集细胞培养上清液,按照试剂盒说明书分别检测每孔细胞中 NO、IL-1 β 和 TNF- α 的含量。

巨噬细胞 RAW264.7 是研究炎症反应的常用细胞模型^[25],在受到炎症刺激 [比如 LPS、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 等] 时可通过激活核因子- κB (nuclear factor kappa-B, NF- κB)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等信号通路,上调诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和促炎细胞因子的表达,从而释放 NO、IL-1 β 、TNF- α 等关键炎症因子^[26]。因此,考察了不同制剂在与 RAW264.7 细胞孵育后对 LPS 诱导的炎症反应的抑制效果。结果如表 14 所示,LPS 诱导后,细胞中 NO、IL-1 β 和 TNF- α ($P < 0.001$) 水平相较于空白组均显著上调,表明炎症细胞模型构建成功。在与 LA 孵育后,NO 的分泌量显著性低于模型组 ($P < 0.001$),表明 LA 本身具有一定的抑制 iNOS 活性。而与 LA-L 孵育后,NO 的分泌量均显著低于 LA 组 ($P < 0.001$),表明脂质体通过提升 LA 的细胞摄取效率,显著增强了其抑制 iNOS 活性的能力。特别是,LA-EL 组 NO 的含量显著低于 LA-L 组 ($P < 0.001$),表明 IPM 和 PCO 的表面修饰策略进一步抑制了 NO 的分泌。不仅如此,LA-EL 组 TNF- α 的含量也显著低于 LA-L 组 ($P < 0.05$),表明 IPM 和 PCO 共修饰的柔性脂质体更高效地将 LA 递送至 TNF- α 调控靶点。LA-EL 组 IL-1 β 水平与 LA 及 LA-L 组相比无统计学差异 ($P > 0.05$),但 LA 组较模型组显著降低 ($P < 0.01$)。上述结果证实,IPM 和 PCO 共修饰策略显著增强了 LA 在细胞水平上的抗炎活性。

3 讨论

皮肤是人体重要的保护屏障,其角质层结构虽能阻挡有害物质,但也限制了药物吸收。研究表明,药物经皮吸收效率与 lg P 值密切相关^[27]。通常,当相对分子质量 < 500 且 lg P 为 1~3 时,药物更易穿

表 13 LA、LA-L 和 LA-EL 对 RAW264.7 的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 13 Cytotoxicity of LA, LA-L and LA-EL on RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞毒性/%		
	LA	LA-L	LA-EL
1.25	94.620 ± 2.305	100.800 ± 2.037	97.690 ± 2.776
2.50	91.800 ± 2.915	95.900 ± 6.218	93.850 ± 2.662
5.00	88.460 ± 1.334	92.310 ± 3.524	80.510 ± 1.938
10.00	75.130 ± 3.107	89.490 ± 0.445	55.130 ± 3.870
20.00	33.080 ± 2.037	55.900 ± 4.884	36.150 ± 2.662
40.00	0.257 ± 0.445	31.280 ± 0.889	14.110 ± 0.889

表 14 LA、LA-L 和 LA-EL 对 LPS 诱导的 NO、IL-1 β 和 TNF- α 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 14 Effects of LA, LA-L, and LA-EL on LPS-induced NO, IL-1 β and TNF- α secretion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-1 β /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α /($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白	—	0.720 $\pm$ 0.008	2.755 $\pm$ 0.915	109.200 $\pm$ 3.842
模型	—	2.486 $\pm$ 0.016 ^{***}	10.900 $\pm$ 0.120 ^{***}	501.100 $\pm$ 24.760 ^{***}
LA	5	2.401 $\pm$ 0.004 ^{###}	5.830 $\pm$ 0.642 ^{##}	406.300 $\pm$ 12.530 ^{###}
LA-L	5	1.951 $\pm$ 0.016 ^{&&&}	5.283 $\pm$ 0.390	396.200 $\pm$ 15.890
LA-EL	5	1.855 $\pm$ 0.028 ^{$\Delta\Delta\Delta$}	5.048 $\pm$ 0.714	344.800 $\pm$ 21.090 ^{Δ}

与空白组比较: ^{***} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与 LA 组比较: ^{&&&} $P < 0.001$; 与 LA-L 组比较: ^{Δ} $P < 0.05$ ^{$\Delta\Delta\Delta$} $P < 0.001$ 。

^{***} $P < 0.001$ vs blank group; ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group; ^{&&&} $P < 0.001$ vs LA group; ^{Δ} $P < 0.05$ ^{$\Delta\Delta\Delta$} $P < 0.001$ vs LA-L group.

透角质层^[28]。本研究前期测定了 LA 的油水分配系数, 结果显示 LA 在正辛醇-水体系及 pH 5.5 (模拟皮肤酸性表面)、pH 7.4 缓冲液中的 lg P 值分别为 4.02 $\pm$ 0.17、4.64 $\pm$ 0.40 和 4.53 $\pm$ 0.40, 与文献报道的 4.53 (ChemDraw 计算值) 一致^[29], 表明 LA 属于高亲脂性化合物, 其经皮渗透能力较弱。因此, 本研究基于 Cevc 和 Blume^[30]建立的柔性脂质体技术, 改善 LA 的皮肤渗透性, 提升其皮肤抗炎活性。研究结果表明, IPM 的加入显著提高了 LA 累积皮肤渗透量 ($P < 0.01$), 这一结果与 Zidan 等^[31]证实的 IPM 能够促进鞣酐从卡波姆凝胶中渗透进入皮肤的发现相似, 表明 IPM 是一种有效的化学渗透增强剂。

而 PCO 的加入不仅可以提高 LA 的透皮性能, 还可显著降低脂质体的 PDI ($P < 0.000 1$)。PDI 是评价脂质体质量的关键指标, PDI <0.3 时不仅可以避免大颗粒导致的毛细血管栓塞风险, 还可延长脂质体的储存期, 提高包封药物的靶向递送精度, 在经皮给药时还可提升药物的渗透效率^[32]。基于上述发现, 本研究采用 IPM 与 PCO 共修饰策略, 将 2 种功能互补的膜软化剂整合于脂质体递药系统中。

经优化 IPM 和 PCO 用量后, 最终制得的共修饰脂质体 LA-EL 不仅粒径小 (107.50 $\pm$ 4.44) nm, 而且药物包封率在 90% 以上。相比之下, Chen 等^[33]利用聚山梨酯-80 构建的姜黄素柔性脂质体, 其包封率仅为 (47.30 $\pm$ 3.40) %; 张雅筠等^[34]利用 1,2-丙二醇制备的红花黄色素纳米柔性脂质体, 其药物包封率为 (81.40 $\pm$ 4.25) %, 但粒径较大, 为 (534.50 $\pm$ 1.96) nm。大量研究表明, 纳米颗粒的粒径是影响其穿透皮肤屏障能力的关键因素, 通常粒径越小, 皮肤渗透性越好^[35]。此外, 本研究制备的 10 mL LA-EL 溶液中, LA 质量浓度高达 (397.70 $\pm$ 14.25) $\mu\text{g/mL}$, 而 Wu 等^[36]利用皮肤角蛋白构建的 LA 脂

质体, 其 10 mL 脂质体溶液中仅含有 0.3 mg LA, 且药物包封率只有 (54.07 $\pm$ 6.99) %。由此可见, 本研究开发的 IPM/PCO 共修饰脂质体不仅显著提升了 LA 的载药效率, 还使其水溶性得到明显改善。特别是, IPM/PCO 的加入还显著增强了脂质体的低温贮存稳定性。

由于 LA 的水溶性极差, 在开展皮肤渗透和体外药物释放行为研究时, 参考了相关文献方法^[37], 经预实验摸索后, 最终确定在接收液和释放介质中添加适量乙醇, 以确保浓度梯度, 从而持续驱动药物渗透和扩散。结果显示, LA-EL 具有缓释特性, 这将有助于延长药物在炎症部位的作用时间, 进而减少药物的全身分布。

然而, 这种基于水溶液的脂质体制剂, 由于流动性较强, 可能难以在皮肤表面实现长效驻留, 进而影响抗炎效果的持续性。为此, 在后续皮肤抗炎功效评价中, 可将 LA-EL 水溶液剂型优化为凝胶制剂, 通过提高制剂黏附性来延长药物在皮肤作用部位的滞留时间, 进而增强其治疗效果。如 Wu 等^[38]将负载抗坏血酸葡萄糖苷的脂质体包封于羧甲基化壳聚糖/透明质酸为基质的水凝胶中, 成功实现了药物的长效透皮递送。在离体透皮实验中还发现, LA 的透皮行为呈现明显的时滞效应, 药物在 12 h 后方可被准确定量检测。这一现象可能是因为药物在透皮初期主要集中于突破角质层屏障, 只有在充分克服了该屏障的阻力之后, 药物的渗透效率才会显著提升。

这一推测也得到了皮肤定位实验中 C6 在角质层中聚集现象的有力支持。通过 LPS 诱导的炎症细胞模型发现, LA-EL 可显著抑制 LPS 诱导的 NO 和 TNF- α 的分泌, 但对 IL-1 β 的分泌无显著影响, 这可能是因为炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的产生机制不同^[39], IPM/PCO 共修饰可能更有利于调控 TNF- α 信

号通路。Cai 等^[40]的研究揭示, LA 的抗炎活性可能源于其直接与 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) -MD2 复合物结合, 进而抑制 TLR4 及其下游的 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的激活。NF- κ B 作为一种关键的转录因子, 能够调控多种炎症因子的表达, 包括 TNF- α 等。因此, LA 通过抑制这些信号通路, 减少了促炎因子的表达。

综上所述, 相较于传统脂质体, IPM/PCO 共修饰柔性脂质体 (LA-EL) 展现出更显著的临床转化潜力。基于现有研究数据, 后续拟建立 UVB 诱导的小鼠皮肤炎症模型, 系统评价 LA-EL 的抗炎效果并深入解析其分子机制, 为开发基于 LA 的新型抗炎制剂提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘雅清, 刘滨, 马旭冉, 等. 黄芩汤对 LPS 诱导的 RAW264.7 炎症细胞的抗炎作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(7): 20-28.
- [2] Ji X Y, Liu N, Huang S C, *et al.* A comprehensive review of licorice: The preparation, chemical composition, bioactivities and its applications [J]. *Am J Chin Med*, 2024, 52(3): 667-716.
- [3] 宁建涛, 邓翔, 陈莉, 等. 基于药载一体的甘草外囊泡样颗粒负载甘草查尔酮 A 纳米给药系统的构建及体外抗炎评价 [J]. 药学报, 2025, 60(4): 1147-1155.
- [4] 崔玉梅, 刘厚如, 刘伟, 等. 甘草中甘草查尔酮 A 含量测定方法的建立 [J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(1): 64-66.
- [5] Li M T, Xie L, Jiang H M, *et al.* Role of licochalcone A in potential pharmacological therapy: A review [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 878776.
- [6] Sarkar C, Chaudhary P, Jamaddar S, *et al.* Redox activity of flavonoids: Impact on human health, therapeutics, and chemical safety [J]. *Chem Res Toxicol*, 2022, 35(2): 140-162.
- [7] Wang Z X, Xue Y Q, Chen T T, *et al.* Glycyrrhiza acid micelles loaded with licochalcone A for topical delivery: Co-penetration and anti-melanogenic effect [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2021, 167: 106029.
- [8] 王维, 黄巧玲. 柔性脂质体在经皮给药系统中的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(4): 495-502.
- [9] Nayak D, Tippavajhala V K. A comprehensive review on preparation, evaluation and applications of deformable liposomes [J]. *Iran J Pharm Res*, 2021, 20(1): 186-205.
- [10] Phatale V, Vaiphei K K, Jha S, *et al.* Overcoming skin barriers through advanced transdermal drug delivery approaches [J]. *J Control Release*, 2022, 351: 361-380.
- [11] Park S, Kim H K. Development of skin-permeable flexible liposome using ergosterol esters containing unsaturated fatty acids [J]. *Chem Phys Lipids*, 2023, 250: 105270.
- [12] Dorrani M, Garbuzenko O B, Minko T, *et al.* Development of edge-activated liposomes for siRNA delivery to human basal epidermis for melanoma therapy [J]. *J Control Release*, 2016, 228: 150-158.
- [13] 代思雨, 汤颖, 刘念, 等. 芹菜素脂质体的制备、修饰、表征及抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(1): 190-200.
- [14] 杨晓婧, 陈赤清, 苗开元, 等. 寡聚透明质酸修饰的鞣花酸脂质体的制备及体外透皮效果和美白活性的研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2023, 25(12): 3856-3865.
- [15] Zainuddin N, Ahmad I, Zulfakar M H, *et al.* Cetyltrimethylammonium bromide-nanocrystalline cellulose (CTAB-NCC) based microemulsions for enhancement of topical delivery of curcumin [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 254: 117401.
- [16] 钟玮, 王俊, 张玉洁, 等. 白藜芦醇柔性脂质体的制备及其体外评价 [J]. 中国新药杂志, 2024, 33(2): 187-193.
- [17] Chen Y, Liao M R, Ma K, *et al.* Implications of surfactant hydrophobic chain architecture on the surfactant-skin lipid model interaction [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2022, 608(Pt 1): 405-415.
- [18] 李珏, 姜飞, 李慧丽, 等. 白藜芦醇-牛磺脱氧胆酸钠共无定形体系改善溶解度和物理稳定性 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7248-7256.
- [19] Ni Y F, Zhao W Z, Cheng W J, *et al.* Lipopeptide liposomes-loaded hydrogel for multistage transdermal chemotherapy of melanoma [J]. *J Control Release*, 2022, 351: 245-254.
- [20] 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.
- [21] 马德雪, 闫晓佳, 刘夫国, 等. 共递送姜黄素和 EGCG 脂质体的构建及其对神经炎症的作用 [J]. 食品科学技术学报, 2024, 42(2): 32-45.
- [22] 吴斯宇, 曾盈蓉, 唐聘, 等. RGD 环肽修饰的姜黄素/黄芩苷靶向共递送纳米脂质体的制备工艺优化及表征 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6834-6844.
- [23] Zahednezhad F, Shahbazi Mojarad J, Zakeri-Milani P, *et al.* Surface modification with cholesteryl acetyl carnitine, a novel cationic agent, elevates cancer cell uptake of the PEGylated liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2021, 609: 121148.

- [24] 陈乔, 张鹏, 韩诗祺, 等. 基于液质联用技术结合网络药理学探讨金莲花乙酸乙酯部位抗炎作用机制 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2025, 27(2): 404-419.
- [25] Yu Y, Jiang X F, Li R R, *et al.* Study on the anti-inflammatory effect of *Gentiana scabra* bunge extract and its mechanism using zebrafish and RAW264.7 cell models [J]. *Biomed Chromatogr*, 2025, 39(5): e70050.
- [26] Zhai Y, Chen K, Xu Z, *et al.* Harmine alleviates LPS-induced acute lung injury by inhibiting CSF3-mediated MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. *Resp Res*, 2025, 26(1): 119.
- [27] Kang L, Yap C W, Lim P F C, *et al.* Formulation development of transdermal dosage forms: Quantitative structure-activity relationship model for predicting activities of terpenes that enhance drug penetration through human skin [J]. *J Control Release*, 2007, 120(3): 211-219.
- [28] Kahraman E, Güngör S, Özsoy Y. Potential enhancement and targeting strategies of polymeric and lipid-based nanocarriers in dermal drug delivery [J]. *Ther Deliv*, 2017, 8(11): 967-985.
- [29] 龙思如. 甘草查尔酮镇痛效应的机制研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2021.
- [30] Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1104(1): 226-232.
- [31] Zidan A S, Kamal N, Alayoubi A, *et al.* Effect of isopropyl myristate on transdermal permeation of testosterone from carbopol gel [J]. *J Pharm Sci*, 2017, 106(7): 1805-1813.
- [32] Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(2): 57.
- [33] Chen H W, Cheng C H, Yu Y H, *et al.* Characterization, antibacterial property, biocompatibility, and optimization of novel composite nanofibers incorporating curcumin-loaded flexible nano-liposomes [J]. *Biophys Chem*, 2025, 323: 107453.
- [34] 张雅筠, 程玉钊, 李伟泽, 等. 红花黄色素纳米柔性脂质体的制备研究 [J]. 中草药, 2024, 55(20): 6909-6917.
- [35] Yao S C, Chen N Y, Sun X X, *et al.* Size-dependence of the skin penetration of andrographolide nanosuspensions: *In vitro* release-*ex vivo* permeation correlation and visualization of the delivery pathway [J]. *Int J Pharm*, 2023, 641: 123065.
- [36] Wu W F, Wang Z X, Wu Y F, *et al.* Mechanisms of penetration enhancement and transport utilizing skin keratine liposomes for the topical delivery of licochalcone A [J]. *Molecules*, 2022, 27(8): 2504.
- [37] Sinico C, Manconi M, Peppi M, *et al.* Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: *in vitro* evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction [J]. *J Control Release*, 2005, 103(1): 123-136.
- [38] Wu S J, Liu G D, Shao P, *et al.* Transdermal sustained release properties and anti-photoaging efficacy of liposome-thermosensitive hydrogel system [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(2): e2301933.
- [39] Sahu D, Gupta C, Yennamalli R M, *et al.* Novel peptide inhibitor of human tumor necrosis factor- α has antiarthritic activity [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 12935.
- [40] Cai M, Xu Y C, Deng B, *et al.* *Radix Glycyrrhizae* extract and licochalcone a exert an anti-inflammatory action by direct suppression of toll like receptor 4 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302: 115869.

[责任编辑 郑礼胜]