

文章编号 1006-8147(2023)05-0547-07

论 著

## 益母草碱可溶性微针的制备与初步研究

陈健敏<sup>1,2,3</sup>, 蔡小真<sup>1,2</sup>, 朱丹虹<sup>1,2</sup>, 李金兰<sup>1,2</sup>, 陈科元<sup>3</sup>

(1.莆田学院药学与医学技术学院,莆田 351100;2.药物分析与检验医学福建省高校重点实验室,莆田 351100;  
3.中药质量研究国家重点实验室,澳门科技大学,澳门 999078)

**摘要** 目的:采用经皮给药方式而避免首过效应,研制益母草碱可溶性微针。方法:制备含益母草碱的普通可溶性微针(CDMNs)和针体载药微针(TDMNs),测试力学强度并评价穿刺性能,研究微针的体外溶出和在模拟皮肤中的药物释放行为,进而考察微针在体内的溶解行为和经皮给药释放规律,最后对微针的皮肤安全性进行评价。结果:TDMNs和CDMNs的针形均完整饱满,并实现药物剂量和药物分布可控;每根针体承受0.14 N的压力,有足够强度刺入皮肤;CDMNs中药物的体外溶出高于TDMNs,然而在模拟皮肤中的药物释放率却低于TDMNs;微针能提高益母草碱的皮肤吸收,其中TDMNs的吸收率达到约63%,是CDMNs的2倍左右;微针作用后的皮肤在5~6 h后完全愈合,而且未发现明显的红肿现象。结论:建立了益母草碱可溶性微针给药体系,为其经皮给药剂型的研发提供理论基础和数据支撑。

**关键词** 益母草碱;可溶性微针;经皮给药;皮肤吸收率

中图分类号 R9

文献标志码 A

### Preparation and preliminary study of leonurine dissolving microneedles

CHEN Jian-min<sup>1,2,3</sup>, CAI Xiao-zhen<sup>1,2</sup>, ZHU Dan-hong<sup>1,2</sup>, LI Jin-lan<sup>1,2</sup>, CHEN Ke-yuan<sup>3</sup>

(1.School of Pharmacy and Medical Technology, Putian University, Putian 351100, China;2.Key Laboratory of Pharmaceutical Analysis and Laboratory Medicine, Fujian Province University, Putian 351100,China;3.State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicines,Macao University of Science and Technology, Macao 999078, China)

**Abstract Objective:** To develop the leonurine dissolving microneedles by transdermal administration to avoid the first pass effect. **Methods:** Common dissolving microneedles (CDMNs) and tip loaded dissolving microneedles (TDMNs) were prepared, the mechanical strength and puncture performance were tested. And then the *in vitro* dissolution of microneedles and the drug release behavior in simulated skin were studied. After that, the dissolution behavior *in vivo* and the rule of drug release by transdermal administration of microneedles were investigated. Finally, the skin safety of microneedles was evaluated. **Results:** The needle shapes of TDMNs and CDMNs were complete and plump, and the drug dosage and drug distribution were controllable. Each needle body bears a pressure of 0.14 N and has enough strength to penetrate the skin. The drug dissolution rate *in vitro* of CDMNs was higher than that of TDMNs, but the drug release rate in simulated skin was lower than that of TDMNs. Microneedles can improve the skin absorption of leonurine, among which the absorption rate of TDMNs is about 63%, about twice that of CDMNs. The skin treated with microneedles healed completely 5~6 hours later, and no obvious redness or swelling were found. **Conclusion:** The dissolving microneedles drug delivery system of leonurine has been established, which provides theoretical basis and data support for the research and development of its transdermal drug delivery preparation.

**Key words** leonurine; dissolving microneedles; transdermal drug delivery; skin absorption rate

益母草碱(leonurine)是从益母草中提取出来的一种有机胺类生物碱,具有广泛的药理活性,包括抗血小板聚集、抗纤维化、抗氧化、抗炎镇痛、降血脂、保护神经和心肌等<sup>[1-2]</sup>。然而,目前益母草碱的相关制剂研究仍然处于临床前或临床研究阶段,尚未有上市产品。临床和临床前研究主要聚焦于益母草碱的口服制剂,但因其半衰期较短,肠道首过效应

(intestinal first pass effect,消除90%的益母草碱)等导致益母草碱绝对口服生物利用度非常低(大鼠为4.2%,狗为7.0%),严重限制了口服制剂在临床上的应用<sup>[3]</sup>。注射剂可不经胃肠道代谢直接进入体循环,生物利用度较高,但注射时会引起疼痛和创伤,而且益母草碱水溶性差难以制成针剂,广泛应用也受到一定限制。因此,开发满足临床需要的益母草碱的新剂型,对其临床应用具有深远的意义。

经皮给药系统(transdermal drug delivery systems, TDDS)是指药物通过皮肤吸收,在局部或全身达到有效血药浓度,实现预防或治疗疾病的一种给药方式<sup>[4]</sup>。与传统给药方式(口服和注射)相比,经皮给药

基金项目 国家自然科学基金资助项目(82001926);莆田市科技局科研创新专项(2021ZP01);大学生创新创业训练计划(S202211498003, S202211498004, S202111498016, S202111498016)

作者简介 陈健敏(1985-),男,教授,博士,研究方向:微针经皮给药研究;E-mail:chenjianmin1985@sina.com。

系统具有很多优势,例如能避免肠道和肝脏的首过效应,使用安全方便,无痛无创口等,在临床上越来越受到患者的青睐<sup>[5]</sup>。然而,目前临床上可用于经皮给药的药物并不多,主要因为传统乳膏剂以及现代骨架型、膜控型贴剂等受皮肤角质层的屏障作用,大部分药物经皮渗透的速率和效率较低<sup>[6-7]</sup>。益母草碱的水溶性差,较难通过皮肤屏障而导致治疗效果不理想<sup>[8]</sup>。可溶性微针(dissolving microneedles)是结合了皮下注射和经皮给药二者优势的一种新型经皮给药载体,是由针状突起物排列而成的阵列,每根突起物长约为 25~1 000  $\mu\text{m}$ <sup>[9]</sup>。它将药物包埋在针状突起物内,通过穿透角质层,形成小孔道<sup>[10]</sup>,打破角质层的屏障作用,药物直接进入皮内,大大提高药物的经皮吸收率<sup>[11]</sup>。可溶性微针的尺寸微小,不易触及皮下神经,因此不会引起明显的疼痛感;穿刺形成的细微通道可以在数小时内自动愈合,不会造成出血和创伤;使用简单方便,患者可以在家自行给药<sup>[12]</sup>。正因为这些优势,可溶性微针已成为解决难溶性药物经皮递送难题的有效载体。本文制备益母草碱可溶性微针来促进药物的经皮吸收,通过考察微针的形态特征、力学强度、体外溶出、皮肤吸收率和皮肤安全性等指标,初步建立益母草碱可溶性微针给药体系,为其经皮给药制剂的研发提供理论基础和数据支撑。

## 1 材料与方法

1.1 试剂 益母草碱(>98%)获赠于中药质量研究国家重点实验室(澳门科技大学);聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、罗丹明 B、亚甲基蓝、三氯乙醛、无水乙醇、甲醇、磷酸二氢钠·二水和磷酸氢二钠·十二水均为分析纯,购于上海晶纯生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 微针力学强度测试仪(艾得堡仪器, Handpi-NK-50)、电子天平(上海卓精科技有限公司, BSM)、电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司, DHG-9240B)、智能透皮仪(北京新诺华仪器有限公司, YB-P6)、单反数码相机(佳能, 700D)、高效液相色谱仪(美国 Agilent Technologies 公司, 1200 series)、体视显微镜(深圳赛克数码科技开发有限公司, SK2500TSH)。

1.3 实验动物与皮肤模型 动物相关的方法与试验步骤均严格按照莆田学院动物伦理委员会的批件[2020(30)]执行。雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(200 $\pm$ 10)g 购于福建省闽侯县吴氏实验动物贸易有限公司,饲养在 12 h 明暗循环,温度为(22 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为 40%~60%的动物房中。大鼠离体皮肤模

型制备流程如下:大鼠用 5%水合氯醛溶液(剂量为 0.7 mL/100 g)麻醉处死,再进行脱毛处理,取腹部皮肤,去除皮下脂肪后,用 pH 7.4 的磷酸缓冲溶液(PBS)洗净,分装于自封袋中,放入冰箱冷冻室(-20 $^{\circ}\text{C}$ )储藏备用。

1.4 分析方法的建立 参考文献中的方法<sup>[13]</sup>,采用高效液相色谱法检测样品中的益母草碱含量,具体检测条件如下。色谱柱:Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:甲醇:水=70:30;流速:1.0 mL/min;检测波长:277 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:20  $\mu\text{L}$ 。标准溶液的配制:精密称取益母草碱 30 mg,用甲醇定容至 250 mL 容量瓶中,配成 120  $\mu\text{g/mL}$  的益母草碱储备液。用甲醇将储备液分别稀释成浓度为 3.75、7.50、15.00、30.00、60.00 和 120.00  $\mu\text{g/mL}$  的系列标准溶液。按以上色谱条件进样测定,记录峰面积。以益母草碱标准溶液的浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制线性回归曲线,获得标准曲线方程: $Y=35\ 769X-90\ 856$ ,  $R^2=0.999\ 4$ ,结果表明益母草碱在浓度范围 3.75~120.00  $\mu\text{g/mL}$  内有良好的线性关系。

1.5 微针的制备及含量测定 益母草碱可溶性微针的制备参考本课题组之前的方法<sup>[14]</sup>,分为普通可溶性微针(common dissolving microneedles, CDMNs)和针体载药微针(tip loaded dissolving microneedles, TDMNs)2 种制备方法,如图 1 所示。分别配制含 0.1% 和 0.2% 益母草碱的高分子溶液(5%PVP+5%PVA),按以下流程制备 CDMNs:将含药的高分子溶液按一定量加入 PDMS 微针模具中,然后离心让溶液进入模具微孔,再加入适量的溶液(总体积为 500  $\mu\text{L}$ ),干燥脱模后得到针体和背衬均含药的 CDMNs。分别配制含 1% 和 2% 益母草碱的高分子溶液(5%PVP+5%PVA),按以下流程制备 TDMNs:将含药的高分子溶液 50  $\mu\text{L}$  加入 PDMS 微针模具中,然后离心让溶液进入模具微孔,溶剂挥发后,再加入适量的不含药的高分子溶液(15%PVP+15%PVA),干燥脱模后得到针体含药的 TDMNs。为了考察药物在 CDMNs 和 TDMNs 两种类型微针针体的分布情况,用刀片小心地将微针针体切下,分别将切下的针体和残留的背衬溶解于适量 PBS 中,采用高效液相色谱法检测其中的益母草碱的含量。

1.6 微针的力学强度及穿刺能力表征 采用 PVP 和 PVA 混合物作为基质材料制备的 CDMNs 已被本课题组证实具有足够的力学强度和穿刺能力<sup>[15]</sup>。因此,本部分采用本课题组之前报道的方法<sup>[16]</sup>,只对 TDMNs 进行力学强度测试。简单来说,将 TDMNs 针体朝上置于微针力学强度测试仪的测试台上,用铝

制平底探头(直径 10 mm)以 0.5 mm/min 的恒定速度垂直向下移动至微针的尖端,记录位移和力值,直至达到预设的最大位移(0.5 mm)。当作用力达到 5、10、15、20、25、30、35 和 40 N 时,用相机观察并拍摄 TDMNs 的形貌变化。为了测试 TDMNs 体外穿刺能力,开展了铝箔纸穿刺试验和鼠皮穿刺试验。将铝箔纸(厚度:10  $\mu\text{m}$ )放置在 PDMS 微针模具上,再将 TDMNs 置于铝箔纸上,然后在其背部施加适当的压力保持 1 min,取出铝箔纸放置于白纸上,用 2% 亚甲基蓝溶液涂抹铝箔上的微孔,观察染色液是否通过微孔而使白纸染色,最后用相机拍照记录。取出冷冻保存的离体大鼠皮肤,用 PBS 浸泡 1 h 使其恢复活性,将皮肤垫在柔软的橡胶片上,将 TDMNs 置于鼠皮上,用拇指按压 1 min 后取出 TDMNs,鼠皮用 2% 亚甲基蓝溶液染色 1 min,观察并拍照。按以下公式计算 TDMNs 的穿刺效率(penetration efficiency, PE), $PE\%=(\text{染色孔数}/\text{微针数})\times 100\%$ 。

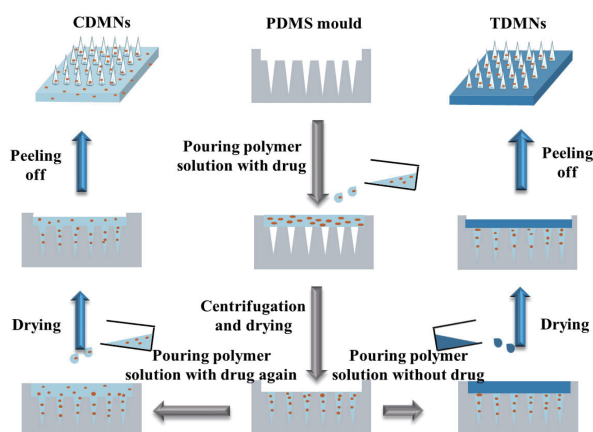


图1 益母草碱可溶性微针制备流程示意图

Fig 1 Schematic diagram of leonurine soluble microneedle preparation process

1.7 微针的体外溶出和模拟皮肤释放 采用本课题组之前报道的方法研究益母草碱的体外溶出<sup>[7]</sup>,步骤如下:用双面胶将 CDMNs 或 TDMNs 固定在塑料片上,然后针体朝下扣在 Franz 透皮杯的接收池上,再将给药池扣在塑料片上,夹上马蹄铁,然后往接收池中加入 PBS 溶液。将 Franz 透皮杯置于水浴中(37℃),磁子以 350 r/min 的速度搅拌,开始实验。在试验开始后的 0.5、1、2、4、8 和 16 min,分别从接收池中取出全部溶液,并立即加入等量的 PBS。为了模拟药物在皮肤中释放,采用目前评价可溶性微针体外释放的较为合理的方法<sup>[8]</sup>,以 Parafilm 作为皮肤模型,将微针刺穿 Parafilm 后形成一个半封闭体系,再按体外溶出试验步骤进行实验。在实验开始后的 1、2、3、4 和 5 h,从接收池中取出全部溶液,并立

即加入等量的 PBS。所有实验至少重复 3 次( $n=3$ ),所得样品均采用高效液相色谱法进行检测。计算每个时间点的药物累积释放量,再将其对时间作图。

1.8 微针的皮肤溶解及经皮释放 将活化的鼠皮平铺在柔软的橡胶板上,用拇指按压微针使其刺入皮肤,然后将微针和鼠皮一起放置于 1% 的琼脂上,以防止鼠皮水分过度流失而干燥变硬,更好的模拟体内环境;分别在 15、30、60 min 后取出微针,在显微镜下观察并拍照记录。采用智能透皮仪研究 CDMNs(或 TDMNs)的经皮释放规律,具体步骤如下:将 CDMNs 刺入皮肤后,将其和皮肤作为一个整体放置在接收池上,用透明胶带固定,再扣上给药池,夹上马蹄铁,然后往接收池中加入 PBS 作为接收液。将 Franz 透皮杯置于水浴中(37℃),磁子以 350 r/min 的速度搅拌,开始试验。在实验开始后的 1、3、6、12 和 24 h,从接收池中取出全部溶液,并立即加入等量的接收液。试验结束后,先用刮刀将鼠皮表面残留的 CDMNs 刮取,鼠皮表面再用接收液清洗,二者合并后,用适量接收液稀释后待测。皮肤对药物的吸收率 $= (A-B)/A \times 100\%$ ,其中 A 为微针中总药量;B 为未进入皮肤的药量。200  $\mu\text{L}$  含益母草碱 500  $\mu\text{g}$  或 1 000  $\mu\text{g}$  的悬浊液(含 0.1% 羧甲基纤维素钠)作为对照组,按上述步骤操作。

1.9 体内皮肤水分流失(TEWL)实验 一般来说,皮肤若受损严重则表现出较高的 TEWL 值,如果受损程度较小或皮肤完整则表现出较低的 TEWL 值,因此可以利用 TEWL 值的大小评价皮肤的受损程度和愈合情况<sup>[9]</sup>。在实验前 1 d,利用剃毛刀将雄性大鼠腹部皮肤的毛发剃除,残留毛发再使用脱毛膏处理。采用水合氯醛麻醉大鼠后,将 TDMNs 作用于腹部皮肤,5 min 后移除,采用经皮水分流失测试仪记录每个固定时间点(0、10、30 min、1、2、3、4、5 和 6 h)的经皮水分流失(transdermal water loss, TEWL)情况,并用单反数码相机记录大鼠腹部皮肤的恢复情况。将靠近 TDMNs 作用位点的临近部位皮肤作为空白对照。实验重复 3 次( $n=3$ ),TEWL 值以  $\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$  表示。

1.10 统计学处理 每个试验至少重复 3 次( $n=3$ ),结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析(ANOVA)和学生  $t$  检验对有关数据进行统计学分析, $P < 0.05$  被认为具有显著性差异。

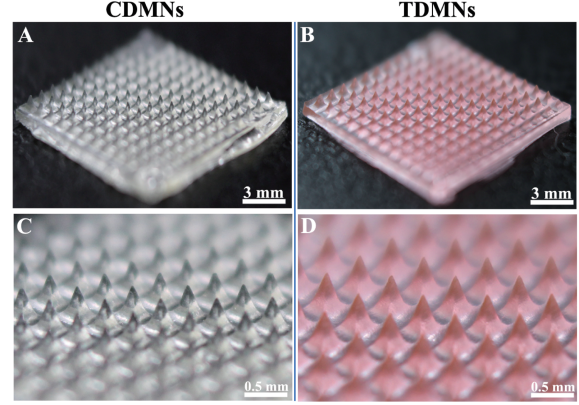
## 2 结果

2.1 微针形貌表征及剂量控制 干燥脱模后,得到背衬平整、针型完整、针体形态饱满的 12×12 阵列(长宽为 10 mm×10 mm)的 CDMNs,每片微针阵列上有 144 根针体,如图 2A 和 2C 所示。每根针体为

四棱锥形,棱锥高为 680  $\mu\text{m}$ ,各针体之间的间距为 600  $\mu\text{m}$ 。针体顶部的横切面为四边形,两边长约 20  $\mu\text{m}$  和 10  $\mu\text{m}$ ,针体顶部面积约为 200  $\mu\text{m}^2$ 。为了更清楚的展示 TDMNs 中药物的分布,在含药的高分子溶液中加入 0.01% 的罗丹明 B,所制备的 TDMNs 如图 2B 和 2D 所示。TDMNs 的各个形貌特征均与 CDMNs 相同,但药物主要集中在微针的针体上,证明通过不同的工艺能够将药物富集在针体上。

为掌握微针的制备工艺对药物分布的影响,对 CDMNs 和 TDMNs 的针体和背衬的载药量情况进行了分析,结果如表 1 所示。0.1%CDMNs 的针体载药量(tip drug loaded)和背衬载药量(backing drug loaded)分别为  $(9.88\pm2.36)$  和  $(475.04\pm18.14)\mu\text{g}$ ,二者之和为实际载药量(actual drug loaded)  $(484.92\pm16.68)\mu\text{g}$ ;理论载药量(theoretical drug loaded)为 500  $\mu\text{g}$ ,由此计算载药效率(drug loading efficiency)为  $(96.98\pm3.33)\%$ 。1%TDMNs 的针体载药量和背衬载药量分别为  $(456.85\pm14.82)$  和  $(31.49\pm3.12)\mu\text{g}$ ,载药效率为  $(97.67\pm3.68)\%$ 。因 0.1%CDMNs 和 1%TDMNs 的投

入总药量相同,载药效率方面没有显著差异,但是药物在针体和背衬中的分布大大不同。1%TDMNs 的针体载药量是 0.1%CDMNs 的 46 倍,表明 TDMNs 能够有效地将药物富集在针体上,但因扩散作用,也有少量药物分布在背衬中。当投药量翻倍后,TDMNs 和 CDMNs 针体和背衬载药量均按比例增加,表明可以通过控制投药量来准确控制微针中的药物剂量。



注:A、C:CDMNs;B、D:TDMNs  
图 2 CDMNs 和 TDMNs 的形貌特征  
Fig 2 Morphological characteristics of CDMNs and TDMNs

表 1 不同类型微针中的药物分布和载药效率( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 1 Drug distribution and drug loading efficiency in different types of microneedles( $\bar{x}\pm s$ )

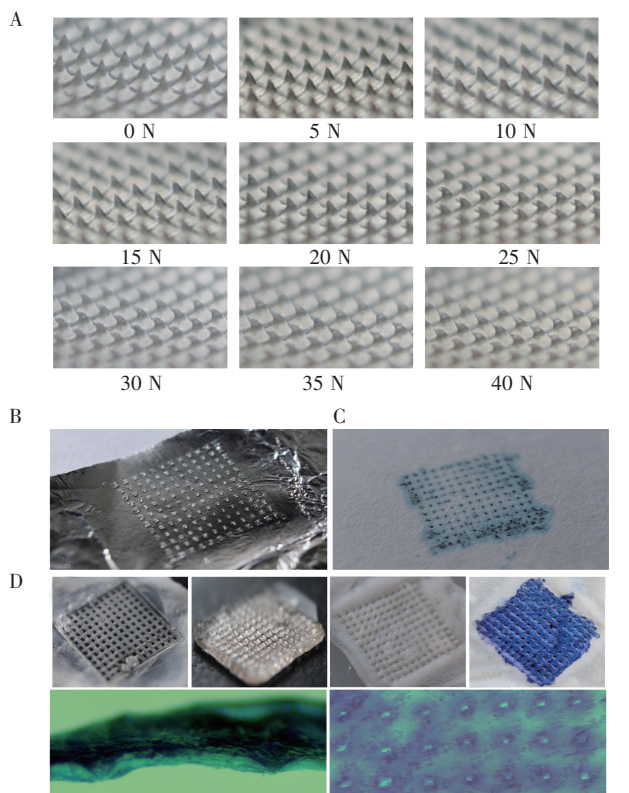
组别	针体载药量( $\mu\text{g}$ )	背衬载药量( $\mu\text{g}$ )	实际载药量( $\mu\text{g}$ )	理论载药量( $\mu\text{g}$ )	载药效率(%)
0.1%CDMNs	$9.88\pm2.36$	$475.04\pm18.14$	$484.92\pm16.68$	500	$96.98\pm3.33$
0.2%CDMNs	$24.35\pm4.28$	$958.03\pm27.25$	$992.26\pm24.33$	1 000	$99.23\pm2.43$
1%TDMNs	$456.85\pm14.82$	$31.49\pm3.12$	$488.34\pm18.43$	500	$97.67\pm3.68$
2%TDMNs	$913.71\pm26.38$	$72.54\pm5.66$	$986.25\pm22.64$	1 000	$98.62\pm2.26$

2.2 微针的力学强度和穿刺能力 用微针力学强度测试仪对 2%TDMNs 的力学强度进行测试,结果如图 3A 所示。TDMNs 在 20 N 及以内的作用力下,没有发现明显的变形,表明 TDMNs 能够承受至少 20 N 的作用力;每片微针共有 144 根针体,即每根针体能承受至少 0.14 N 的压力。随着作用力的增大,TDMNs 的针体逐渐发生弯曲,但未发现微针折断的情况,表明它有足够的韧性。以铝箔模拟皮肤进行穿刺实验,结果如图 3B 所示,在铝箔上形成了微孔阵列。通过这些微孔,可以将亚甲基蓝溶液染色到白纸上,如图 3C 所示,表明 TDMNs 有效穿刺铝箔,确实形成了 144 个孔道,穿刺效率 PE 为 100%。TDMNs 作用于鼠皮的结果如图 3D 所示,微针针体有部分溶解,同时在鼠皮上留下了 144 个微孔,亚甲基蓝染色后每个孔都有着色,同时,在显微镜下可看到明显的鼠皮被穿透后留下的孔洞,PE 为 100%,表明微针有足够的硬度可以穿刺皮肤、突破角质层。

2.3 微针的体外溶出和在模拟皮肤中释放 CDMNs 和 TDMNs 的体外溶出实验结果如图 4A 和 4B 所

示。随着时间的延长,1%TDMNs 中释放的药物逐渐增加,到 8 min 时已基本完全释放;0.1%CDMNs 中的药物释放更快,在 4 min 时已基本完全释放。在 2%TDMNs 和 0.2%CDMNs 中的药物释放也发现同样的规律,主要原因可能是 CDMNs 的针体和背衬都含药物,药物与释放介质接触的面积较大,药物溶出速率较快。从图 4B 可以看出,在 3 min 内 CDMNs 和 TDMNs 均有 50% 的药物释放,在 8 min 药物释放率达到峰值,在 95% 左右。研究结果如图 4C 和 4D 所示。对比同剂量的 CDMNs 和 TDMNs,发现 TDMNs 的释放量在每个时间节点都比 CDMNs 高,具有显著性差异( $P<0.05$ ),这结果与体外溶出刚好相反。例如,如图 4C 所示,1%TDMNs 在 2 h 时已经释放约 400  $\mu\text{g}$ ,而 0.1%CDMNs 才释放约 256  $\mu\text{g}$ ,高剂量组也发现同样的规律。导致这一现象的主要原因在于:当微针针体穿刺模拟皮肤后,只有微针的针体直接暴露在接收液中,而 TDMNs 针体上的药物含量远高于 CDMNs 针体上的药物,所以导致药物较快释放。从图 4D 可以看出,TDMNs 在 1.5 h 时释放

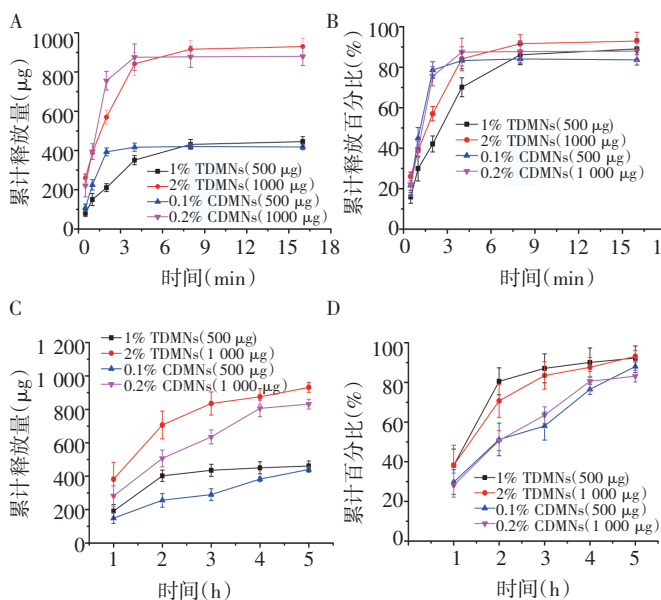
率达到 50%,而 CDMNs 在 2 h 时才达到 50%,不同剂量的 TDMNs(或 CDMNs)的药物释放率基本一致,没有显著性差异( $P>0.05$ );然而对比 TDMNs 和 CDMNs,发现 TDMNs 的释放率均显著( $P<0.05$ )高于 CDMNs,表明针体载药微针的药物释放率更高,更有利于药物的递送和释放。



注:A:TDMNs 的力学强度测试,B,C:TDMNs 穿刺铝箔;D:TDMNs 穿刺鼠皮

图3 TDMNs 的力学强度测试及穿刺实验

Fig 3 Mechanical strength test and puncture test of TDMNs

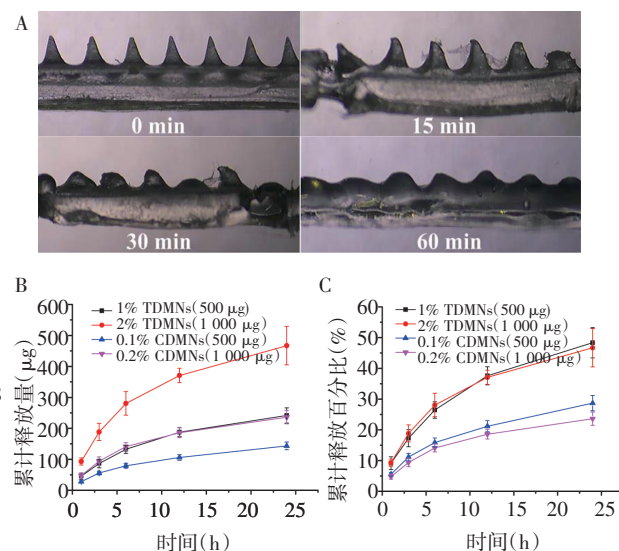


注:A、B:微针体外溶出;C、D:模拟皮肤中释放

图4 微针体外溶出和在模拟皮肤中释放

Fig 4 Microneedle dissolution in vitro and release in simulated skin

2.4 微针的皮肤溶解及皮肤吸收率 TDMNs 刺入皮肤后的溶解情况如图 5A 所示,发现微针刺入皮肤后随着时间的延长而逐渐溶解,在 30 min 时溶解接近一半,而到 60 min 针体基本溶解完全。这表明 TDMNs 作用于皮肤至少需要停留 60 min,才能保证药物的有效释放。TDMNs 和 CDMNs 的经皮释放规律如图 5B 和 5C 所示,TDMNs 药物的释放速率和释放量均高于同等剂量的 CDMNs,而同等剂量的悬浊液各个时间点的药物浓度均低于检测限,故无数数据展示。如图 5B 所示,0.1%CDMNs 在 1、3、6、12 和 24 h 的释放量均显著低于 1%的 TDMNs ( $P<0.05$ ),24 h 的累积渗透量为 143.40  $\mu\text{g}$ ,只有 TDMNs 的 60% (241.64  $\mu\text{g}$ );0.2%CDMNs 在 1、3、6、12 和 24 h 的释放量均显著低于 2%的 TDMNs ( $P<0.05$ ),24 h 的累积渗透量为 236.08  $\mu\text{g}$ ,只有 TDMNs 的 50% (467.06  $\mu\text{g}$ )。从图 5C 可以看出,TDMNs 的药物递送效率均显著高于 CDMNs ( $P<0.05$ ),而同类型的微针之间没有显著性差异( $P>0.05$ )。通过测试未进入皮肤的残留药量,进一步获得 1%TDMNs、2%TDMNs、0.1%CDMNs 和 0.2%CDMNs 的药物皮肤吸收率分别为  $(64.73\pm 6.37)\%$ 、 $(63.83\pm 5.92)\%$ 、 $(33.54\pm 3.67)\%$  和  $(27.26\pm 2.42)\%$ 。一般透皮贴片的皮肤吸收率为 3%~5%<sup>[20]</sup>,CDMNs 的吸收率是传统的 10 倍左右,而 TDMNs 则高出了将近 20 倍。



注:A:微针的皮肤溶解;B、C:微针的经皮释放规律

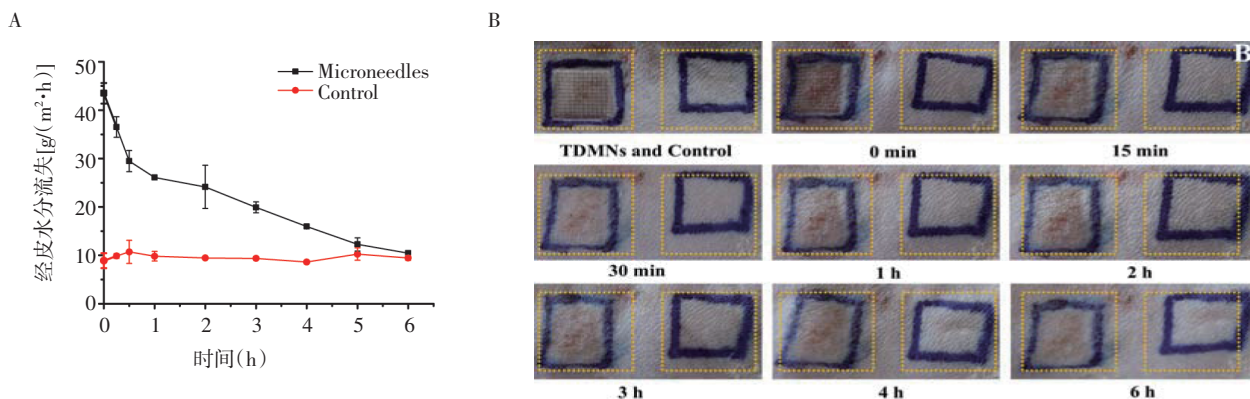
图5 微针的皮肤溶解及经皮释放规律

Fig 5 Skin dissolution and transdermal release rule

2.5 经皮水分流失及皮肤愈合情况 TDMNs 作用于大鼠腹部皮肤后,测试 TEWL 值并记录皮肤的恢复情况,结果如图 6 所示。图 6A 表明,当 TDMNs 作用于大鼠皮肤后,皮肤的 TEWL 值升高到  $(43.5\pm 2.12)\text{g/}$

( $\text{m}^2 \cdot \text{h}$ ), 是空白对照组[( $8.9 \pm 1.56$ ) $\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ ]的4.9倍; 从图6B可以明显看出, 微针作用后在皮肤表面形成了数百个微孔。随着时间的延长, TEWL值逐渐下降, 但在4h之前, TDMNs的TEWL值仍然显著高于空白对照组( $P < 0.05$ ), 表明皮肤在逐渐的愈合; 从图6B也可以看出微针作用形成的微孔逐渐愈合。

当时间延长至5h后, TDMNs的TEWL值[( $11.25 \pm 1.36$ ) $\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ ]与空白对照组[( $10.25 \pm 1.27$ ) $\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ ]已经没有任何显著性差异( $P > 0.05$ ), 表明皮肤的角质层已基本恢复了屏障作用; 6h时TDMNs的TEWL值已恢复正常水平。另外, 在6h后, 皮肤上的微孔也已肉眼不可见, 而且没有明显的红肿现象。



注:A:经皮水分流失变化;B:皮肤愈合情况

图6 经皮水分流失及皮肤愈合情况

Fig 6 TEWL and skin healing

### 3 讨论

本文成功制备了2种类型的益母草碱可溶性微针, 并对其基本理化性质和经皮给药特性进行了表征和研究。制备可溶性微针的材料可分为韧性材料和脆性材料2类, 研究表明韧性材料制得的微针平整度不理想, 且产生皱缩现象, 而脆性材料制备出来的微针有较大的硬度但容易断裂, 使用单一材料制备的微针都存在一定缺陷<sup>[21]</sup>, 同时有研究证明皮肤穿透所需的力小于0.1 N/针<sup>[22]</sup>, 而本文制得的两种可溶性都采用了PVA(韧性材料)和PVP(脆性材料)混合材料作为基质, 使其具有足够的韧性和强度, 并且TDMNs每根针体能承受至少0.14 N的压力, 表明了本文所制备的微针有足够的力学强度且能有效地刺入模拟皮肤和大鼠皮肤。微针中的益母草碱能有效地在不同媒介中释放, 而TDMNs在大鼠皮肤中的吸收率高达63%左右, 表明了TDMNs科研大大促进了益母草碱的经皮吸收, 而益母草碱在高血脂小鼠模型改善实验中的高剂量为20 mg/(kg·d)<sup>[23]</sup>, 小鼠按20 g计算, 每次给药只需要益母草碱400  $\mu\text{g}$ , 因此一片TDMNs即可满足动物实验的剂量要求, 该研究的结果为接下去的动物实验提供了基础数据支撑。当TDMNs作用于大鼠皮肤后, 皮肤的TEWL值升高, 表明微针打破了皮肤的角质层的屏障作用, 在5~6h后皮肤的TEWL值即恢复到正常水平, 且未发现明显的红肿现象, 表明皮肤已恢复完整性, 这些结果都与文献报道的结果

一致<sup>[24-25]</sup>, 同时表明了TDMNs对于皮肤是相对安全的。以上结果表明, 本文制备的益母草碱可溶性微针是一种有潜力的新型经皮给药制剂, 为益母草碱的临床应用提供了新的思路和途径。接下来本课题组将研究益母草碱可溶性微针的药动力学, 并构建高血脂动物模型开展药效学研究。

#### 参考文献:

- [1] MIYAKE S, OGO A, KUBOTA H, et al.  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate suppresses NF- $\kappa$ B activation and IL-6 production in TE-1 cancer cells[J]. *In Vivo*, 2019, 33(2):353-358.
- [2] LIU X, PAN L, GONG Q, et al. Leonurine(SCM-198) improves cardiac recovery in rat during chronic infarction[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649(1/3):236-241.
- [3] GUSTAFSON D L, DUVAL D L, REGAN D P, et al. Canine sarcomas as a surrogate for the human disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 188:80-96.
- [4] LEE H, SONG C, BAIK S, et al. Device-assisted transdermal drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 127:35-45.
- [5] JEONG W Y, KWON M, CHOI H E, et al. Recent advances in transdermal drug delivery systems: a review[J]. *Biomater Res*, 2021, 25(1):24.
- [6] ZHOU X, HAO Y, YUAN L, et al. Nano-formulations for transdermal drug delivery: a review[J]. *Chinese Chem Lett*, 2018, 29(12):1713-1724.
- [7] 包玉胜. 透皮给药系统的研究进展[J]. *山东化工*, 2014, 43(6):4-7.
- [8] 伍兰萼, 章青青, 郭倩, 等. 益母草碱抑制人脑血管外膜成纤维细胞增殖并促进细胞凋亡的机制研究[J]. *河北医药*, 2022, 44(6):4-9.
- [9] WAGHULE T, SINGHVI G, DUBEY S K, et al. Microneedles: a smart approach and increasing potential for transdermal drug deliv-

ery system[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1249–1258.

[10] 陈欢欢, 宋信莉, 汪云霞, 等. 可溶性微针在经皮给药系统中的研究进展[J]. 广东化工, 2021, 48(16): 2–5.

[11] KIM H S, SUN X, LEE JH, et al. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2019, 146: 209–239.

[12] MOORE L E, VUCEN S, MOORE A C. Trends in drug- and vaccine-based dissolvable microneedle materials and methods of fabrication[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2022, 173: 54–72.

[13] KUCHTA K, ORTWEIN J, BRIEL D, et al. Leonurine in leonurus and leonotis drugs? Detection and quantitative determination by a newly developed HPLC method[J]. Planta Med, 2010, 76(12): 541.

[14] CHEN J, HUANG W, HUANG Z, et al. Fabrication of tip-dissolving microneedles for transdermal drug delivery of meloxicam[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2018, 19(3): 1141–1151.

[15] CHEN J, LIU X, LIU S, et al. Fabrication and characterization of dissolving microneedles for transdermal drug delivery of allopurinol[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2021, 47(10): 1578–1586.

[16] CHEN J, WANG M, RAN M, et al. Fabrication and Evaluation of Glabridin Tip-loaded Dissolving Microneedles[J]. Curr Drug Deliv, 2021, 18(10): 1585–1594.

[17] 陈健敏, 刘欣莹, 刘思弯, 等. 包覆涂层的可溶性微针的制备及性能测试[J]. 安徽大学学报: 自然科学版, 2021, 45(6): 90–98.

[18] LARRAÑETA E, STEWART S, FALLOWS S J, et al. A facile system to evaluate in vitro drug release from dissolving microneedle arrays[J]. Int J Pharm, 2016, 497(1/2): 62–69.

[19] ZHU D D, CHEN B Z, HE M C, et al. Structural optimization of rapidly separating microneedles for efficient drug delivery[J]. J Ind Eng Chem, 2017, 51: 178–184.

[20] CHA K J, KIM T, PARK S J, et al. Simple and cost-effective fabrication of solid biodegradable polymer microneedle arrays with adjustable aspect ratio for transdermal drug delivery using acupuncture microneedles[J]. J Micromech Microeng, 2014, 24(11): 115015.

[21] 张远杏, 武凤兰, 李玉珍. 莫索尼定贴片的制备及体外释放、透皮吸收研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(4): 3.

[22] SUGURO R, CHEN S, YANG D, et al. Anti-hypercholesterolemic effects and a good safety profile of SCM-198 in animals: from ApoE knockout mice to rhesus monkeys[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1468.

[23] ONO A, AZUKIZAWA H, ITO S, et al. Development of novel double-decker microneedle patches for transcutaneous vaccine delivery[J]. Int J Pharm, 2017, 532(1): 374–383.

[24] ZHU D D, ZHANG X P, ZHANG B L, et al. Safety assessment of microneedle technology for transdermal drug delivery: a review[J]. Adv Ther, 2020, 3(8): 2000033.

[25] LING M H, CHEN M C. Dissolving polymer microneedle patches for rapid and efficient transdermal delivery of insulin to diabetic rats[J]. Acta Biomater, 2013, 9(11): 8952–8961.

(2023-02-01 收稿)

.....

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》对缩略语的使用说明

文题原则上不能使用缩略语, 文中应尽量减少缩略语。公认的缩略语在文中可以直接使用。未公布的名词术语, 请按照如下规则进行缩写: 原词过长且在文中出现 3 次以上者, 可在第一次出现时写出全称, 并在括号内写出缩略语。不超过 5 个汉字的名称不宜使用缩略语, 以免影响文章的可读性。

缩略语	中文名称	缩略语	中文名称
ADA	美国糖尿病协会	MRI	磁共振成像
CT	电子计算机体层扫描	MtDNA	线粒体 DNA
ELISA	酶联免疫吸附试验	OR	优势比
HE	苏木素-伊红	PCR	聚合酶链反应
HIV	人类免疫缺陷病毒	PET	正电子发射断层摄影术
HbA1c	糖化血红蛋白	Real-time PCR	实时定量聚合酶链反应
HR	风险比	RT-PCR	反转录聚合酶链反应
ICU	重症监护治疗病房	WHO	世界卫生组织

本刊编辑部