

金属和可溶性微针及其使用参数对皮肤孔道形成与闭合的影响

李蓉蓉, 王缘, 刘勇, 王延妮, 刘哲, 马凤森*

(浙江工业大学药学院, 生物制剂与材料实验室, 浙江杭州 310014)

摘要: 本文主要研究金属和可溶性微针对皮肤微孔道形成与闭合的影响因素及效果。采用不同长度、针尖间距和基座面积的金属(不锈钢)微针, 形状分别为铅笔形和圆锥形, 以及不同针尖间距的铅笔形可溶性微针。将微针刺入在除毛小鼠和大鼠的皮肤上, 通过经皮水分丢失 (transepidermal water loss, TEWL) 法和亚甲蓝染色法研究微针施用参数、自身参数和动物对孔道产生的影响; 通过视觉观察微针引起的皮肤局部刺激性现象。动物实验已获得浙江工业大学实验动物福利与伦理委员会批准。不锈钢金属微针刺入皮肤后保持 30 s 以上, 刺入力分别为 2、4 和 8 N, 形成孔道的 TEWL 初始值分别为 12.9、33.0 和 40.4 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; 当长度分别为 400、600 和 800 μm , 形成孔道的 TEWL 初始值分别为 37.1、40.4 和 49.5 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; 当针尖间距分别为 400、600 和 800 μm , 形成孔道的 TEWL 初始值分别为 33.2、40.4 和 55.8 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; 当基座面积分别为 0.16、0.35 和 0.62 cm^2 , 形成孔道的 TEWL 初始值分别为 35.1、40.4 和 67.1 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, 而圆锥形和铅笔形的微针产生的影响是近似的。铅笔形的可溶微针刺入皮肤, 针尖间距分别为 400、600 和 800 μm , 形成孔道的 TEWL 初始值分别为 49.8、60.5 和 70.5 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ 。不同性别和品系动物皮肤的 TEWL 基线值有所不同, 但是孔道形成与闭合的趋势近似。微针引起的轻微红斑在 24 h 内消退。不同参数微针对皮肤孔道产生的影响有一定差异, 但孔道都可在 24 或 48 h 内闭合, 皮肤局部刺激性轻微。

关键词: 微针; 经皮水分丢失法; 染色法; 微孔道; 因素

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)04-1163-07

Effects of metal or dissolving microneedles and its parameters of operation on the formation and closure of skin microchannels

LI Rong-rong, WANG Yuan, LIU Yong, WANG Yan-ni, LIU Zhe, MA Feng-sen*

(Biologics and Biomaterials Laboratory, College of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: To investigate the influence factors and effects of metal or dissolving microneedles on the formation and healing of skin microchannels, the pencil-shaped or conical stainless steel microneedles with different lengths, tip to tip space and base area, and the pencil-shaped dissolving microneedles with different tip to tip space were used. The microneedles were applied to the skin of epilatory mice and rats, and the effects of various microneedle parameters, application parameters, and animals on the microchannels were explored by the transepidermal water loss (TEWL) and methylene blue staining. Visually observe the skin local irritation caused by the microneedles. The animal experiments were approved by the Animal Experiments Welfare and Ethical Committee of Zhejiang University of Technology. The application time of the microneedle should be maintained at 30 s or more. When the insertion forces were 2, 4, 8 N, and the TEWL initial values of the formed microchannels were 12.9, 33.0, 40.4 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively. When the length of metal microneedle were 400, 600, 800 μm , and the TEWL initial values of the formed microchannels were 37.1, 40.4, 49.5 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively. When the tip to tip space of metal microneedle were 400, 600, 800 μm , and the TEWL initial values of the formed microchannels were 33.2, 40.4,

收稿日期: 2020-11-02; 修回日期: 2020-12-13.

基金项目: 浙江省重点科技创新团队计划资助项目 (2013TD15).

*通讯作者 Tel: 86-571-88320218, E-mail: merrigen@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1713

55.8 g·m⁻²·h⁻¹, respectively. When the base area of metal microneedle were 0.16, 0.35, 0.62 cm², and the TEWL initial values of the formed microchannels were 35.1, 40.4, 67.1 g·m⁻²·h⁻¹, respectively. The effects of conical and pencil-shaped microneedles are similar. When the tip to tip space of pencil shaped dissolving microneedle were 400, 600, 800 μm, and the TEWL initial values of the formed microchannels were 49.8, 60.5, 70.5 g·m⁻²·h⁻¹, respectively. The TEWL baseline values of animal skins of different genders and series are different, but the tendency of microchannels formation and closure is similar. Visual inspection revealed that the slight erythema caused by the microneedles subsided within 24 h. Microneedles of different parameters have different effects on microchannels. The microchannels closed within 24 or 48 h, and the skin local irritation caused by microneedle was mild.

Key words: microneedles; transepidermal water loss; methylene blue staining; microchannels; factor

微针是一种微侵入经皮递药技术^[1],通过多个微米级针头穿透皮肤角质层产生微孔道促进药物透皮^[2]。微针刺入不会损伤表皮和真皮内层皮肤中的神经末梢和血管,不会导致出血和疼痛^[3,4],促进药物以无痛方式有效渗透到皮肤中,可提高患者依从性^[5-7]。微针已广泛用于美容^[8]、检测^[9]、辅助药物递送^[10]和疫苗接种^[11]等。微针在皮肤上形成孔道(即微孔道, microchannels)的大小和保持时间决定药物递送的速率和剂量。当微针刺破皮肤后,皮肤组织的高弹性回缩力特性和伤口愈合过程使微孔逐渐变小,直至闭合。微生物和细菌可能通过微孔进入到身体中,并引发感染,造成安全隐患。因此,微针刺入皮肤后形成的孔道及其闭合的过程和规律对微针研究至关重要。

皮肤孔道形成与闭合的研究方法有染色法、经皮水分丢失(transsepidermal water loss, TEWL)法、电阻法和光学相干断层扫描等^[12]。其中,TEWL法和亚甲蓝染色法更为常用。TEWL是一种快速、成熟的方法^[13-16],可实现非侵入性的监测,虽然无法测量出微针所形成孔道的大小,但可定量通过数据表明皮肤受损的程度。TEWL中传感器测量相对湿度百分比并将其转换为TEWL值。当微针刺破皮肤时,会形成微孔道^[17,18],加快皮肤表面水分的流失,造成TEWL值迅速增加,随着皮肤屏障功能的缓慢恢复,TEWL值会逐渐减小,直至正常皮肤的基线水平;亚甲蓝染色法经济、简单^[19,20]。通过染料在皮肤上的扩散来观察孔道的直径大小,研究孔道的闭合情况。

微针的应用会对皮肤造成局部刺激性,形成红斑和水肿等炎症反应^[21],视觉检查可反映微针应用的安全性。

微针对皮肤孔道的产生与众多因素有关,现有研究^[14,22,23]仅对部分因素进行了考察,若将相似研究的实验结果进行比较,可能由于微针参数、刺入参数、实验条件和检测方法等不统一,导致实验结果无法得出关键变量及其影响的明确规律。因而,亟需深入系统地研究单一变量对孔道的影响,以便确认其相关机制。

微针在经皮药物递送技术中占有重要地位,系统研究各种参数对微针刺入皮肤的影响具有重要意义。本文采用控制变量法首次系统性研究微针的刺入参数(刺入力、时间)、自身参数(长度、密度、形状、阵列面积、材料)和动物(性别、品系)对孔道形成和闭合的影响。通过TEWL法和亚甲蓝染色法两种方法比较上述因素对皮肤孔道产生的影响。通过视觉检查研究微针在皮肤上应用的安全性,为其他研究者选择微针作为经皮给药技术时,提供借鉴。

材料与amp;方法

仪器 Dermalab(皮肤检测仪,丹麦Cortex公司);宠物毛推剪(桂林市莱西贸易有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);低速台式冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)。

试剂与材料 薇婷脱毛膏(利洁时家化有限公司);亚甲蓝(上海三爱思试剂有限公司);聚维酮(PVP K30,广东粤美化工有限公司);聚乙烯醇(PVA 217,上海易恩化学技术有限公司);聚二甲氧基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS,美国道康宁公司);不锈钢微针和微针专用给药器[微缔医药科技(杭州)有限公司]。

动物 SD大鼠,雄性,体重40~50 g;ICR小鼠,体重30 g,以上动物均购自浙江省实验动物中心,合格证编号:20201013Abba0100018633,生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002。动物饲养环境:温度20~25℃、相对湿度50%~60%,12 h昼夜明暗交替。动物实验已获得浙江工业大学实验动物福利与伦理委员会批准。

微针与微针专用给药器参数 将铅笔形和圆锥形的微针(图1)进行排列组合,制备成不同参数的金属微针(表1)。微针专用给药器设有多档,1、2、3档分别相当于2、4和8 N刺入力。

可溶性微针的制备 以上述具有不同间距(400、600、800 μm)的金属微针为阳模,使用PDMS制备微针阴模,采用倒模浇注法制备可溶性微针^[24]。将处方质量占比分别为30% PVP K30、6% PVA 217、4%蔗糖

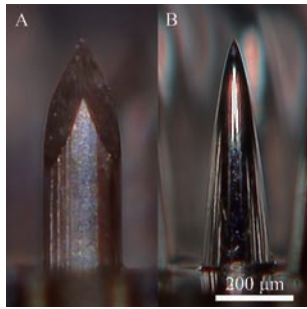


Figure 1 Metal microneedles. A: Pencil; B: Cone

Table 1 Microneedles with different parameters

Type	Length / μm	Tip to tip space/ μm	Base area / cm^2	Shape
1	600	400	0.35	Pencil
2	600	600	0.35	Pencil
3	600	800	0.35	Pencil
4	400	600	0.35	Pencil
5	800	600	0.35	Pencil
6	600	600	0.16	Pencil
7	600	600	0.62	Pencil
8	600	600	0.35	Cone

和 60% 水配制成均一的基质溶液, 取上述基质溶液置于阴模中, 通过离心法入模。随后 40 °C 通风干燥, 干燥后脱模, 保存于干燥器中备用。

实验前处理 将 ICR 雄鼠、ICR 雌鼠和 SD 大鼠分成 30 组, 每组 6 只, 作为实验组。在正式进行实验前一晚, 使用宠物毛推剪和脱毛膏将实验动物背部毛发除去, 脱毛面积不小于 3 cm \times 3 cm。过夜, 挑选无皮肤损伤的动物进行实验。其中一半数量的动物进行 TEWL 实验; 另一半数量的动物进行亚甲蓝染色实验。

TEWL 法的测定 在微针刺入皮肤前 15 min, 使用 Dermalab 中的水分流失测试探头测定实验动物完整皮肤表面的 TEWL 值, 将其作为对照值 (基线值)。使用微针专用给药器的 3 档将金属微针 (长度为 600 μm , 针尖间距为 600 μm , 基座面积为 0.35 cm^2 , 形状为铅笔形) 刺入雄小鼠的皮肤上, 30 s 后移除微针 (单一变量)。在刺入微针并移除微针后 0、1、2、4、6、24 h 测定微针作用处皮肤的 TEWL 值并记录, 直至孔道闭合, 并将 0 h 测得的 TEWL 值为初始值。

亚甲蓝染色法的测定 使用微针专用给药器的 3 档, 将金属微针 (长度为 600 μm , 针尖间距为 600 μm , 基座面积为 0.35 cm^2 , 形状为铅笔形) 刺入雄小鼠的皮肤上, 30 s 后移除微针 (单一变量)。在刺入微针并且移除微针后 0、6 和 24 h, 使用亚甲蓝溶液进行染色, 用异丙醇除去多余的亚甲蓝染料, 并对染色后的皮肤进行拍照记录 (微针贴片面积相同但图片显示形状、大小有差异, 因刺入是在体, 拍照时为了清晰显示整个微针贴片

的刺入情况, 稍作拉伸而致)。

皮肤刺激性现象 每次施用微针后进行, 目视检查微针处理部位的刺激性现象 (红斑、水肿)^[25]。

统计学方法 实验数据用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间检验采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1 微针刺入参数的影响

1.1 刺入时间 在施用微针前, 皮肤没有受到损伤, TEWL 值较低。当微针刺破皮肤的 TEWL 值 (初始值) 立即显著增大, 表明孔道的形成。随着时间的延长, TEWL 值呈下降趋势, 反映孔道正在闭合, 前期孔道的闭合速度较快, 后期孔道闭合的速度较为缓慢。当刺入时间为 30 和 60 s 时, TEWL 值没有差异 ($P > 0.05$), 两者的趋势线也几乎重合, 但要显著大于刺入时间为 10 s 形成孔道的 TEWL 值 ($P < 0.001$) (图 2)。但 3 个时间段对孔道的闭合时间并没有影响, 所形成的孔道都在 24 h 内闭合了。染色结果和 TEWL 结果保持一致, 微针刺入时, 孔道的颜色较深, 随后变浅, 直至 24 h 没有蓝色。因此, 确定刺入时间为 30 s, 进行后续实验。

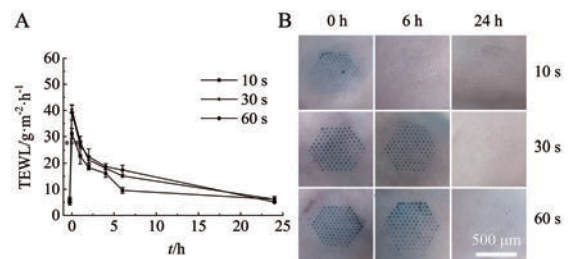


Figure 2 Effect of application time on the formation and closure of microchannels. A: TEWL; B: Methylene blue staining. TEWL: Transepidermal water loss. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs 30 s (0 h)

1.2 刺入力 由 TEWL 法和染色法的结果可知, 随着刺入力的增大, 微针形成孔道的 TEWL 值逐渐增大。文献^[23]报道中手动给药的刺入力可达 20 N, 但所形成孔道的 TEWL 值和染色程度却低于微针专用给药器形成孔道的 TEWL 值和染色程度。皮肤染色结果表明手动给药不易把控刺入力量, 皮肤孔道形成不均一 (图 3)。因此, 采用辅助给药的微针专用给药器可减少人为误差。使用微针专用给药器的过程中, 除了力的因素外, 还有一个重要的因素是速度。微针专用给药器的 1 档刺入力为 2 N, TEWL 和染色法结果都表明其形成的孔道在 4 h 内闭合, 而微针专用给药器 2 档和 3 档刺入力 (4 和 8 N) 形成的孔道, 在 24 h 内闭合, 但孔道的 TEWL 值有显著性差异 ($P < 0.001$)。因此, 确定刺

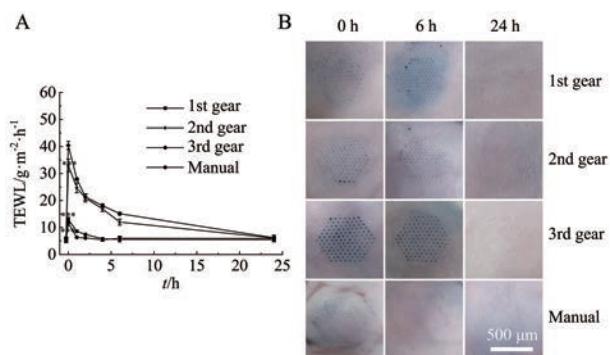


Figure 3 Effect of application force on the formation and closure of microchannels. A: TEWL; B: Methylene blue staining. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs 3rd gear (0 h)

入力为3档的微针专用给药器进行后续实验。

2 微针参数的影响

2.1 微针长度 长度分别为400和800 μm的微针造成孔道的TEWL值分别为37.1和49.5 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ，与长度为600 μm的微针造成孔道的TEWL值40.4 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ 比较，均有显著性差异 ($P < 0.01$)，表明较长的微针造成的皮肤损伤更大，并且这种趋势在愈合过程中一直存在(图4)。同等间隔的情况下，长度越长，造成的差异越大。但3种长度对孔道的闭合时间没有影响，都是在24 h内闭合。

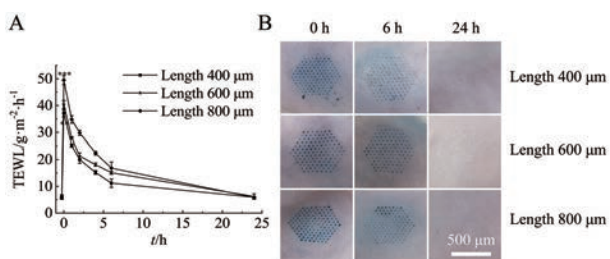


Figure 4 Effect of length of microneedles on the formation and closure of microchannels. A: TEWL; B: Methylene blue staining. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs length 600 μm (0 h)

2.2 微针的间距 间距对孔道的形成和闭合造成显著影响，间距分别为400和800 μm的微针造成孔道的TEWL值分别为33.2和55.8 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ，与间距为600 μm的微针造成孔道的TEWL值40.4 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ 比较，均有显著性差异 ($P < 0.001$)，图5)。当24 h时，间距为800 μm的微针形成的孔道没有闭合，因而延长测量时间至48 h，才完全闭合。这也在一定程度上说明了“钉子床”效应^[26,27]，表明在一定程度上，微针的间距越大，越有利于刺入，较少对皮肤的挤压效应。

2.3 微针的形状 从TEWL法和染色法的结果来看，形状对孔道形成和闭合几乎没有影响，TEWL初始值没有差异 ($P > 0.05$)，且孔道都在24 h内闭合(图6)。

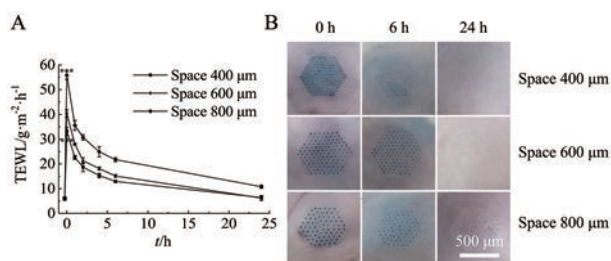


Figure 5 Effect of space of microneedles on the formation and closure of microchannels. A: TEWL; B: Methylene blue staining. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs space 600 μm (0 h)

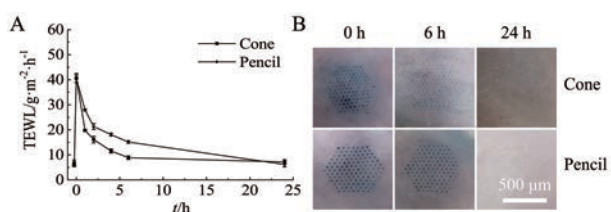


Figure 6 Effect of shape of microneedles on the formation and closure of microchannels. A: TEWL; B: Methylene blue staining. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.4 微针的面积 随着面积的增大，微针在皮肤上形成孔道的数量逐渐增多，染色法更加直观地看出微针的孔道数随着面积的变化(图7)。TEWL法显示小面积、大面积微针的初始值分别为35.1和67.1 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ，与中间面积微针造成孔道的TEWL值40.4 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ 比较，有显著性差异 ($P < 0.001$)，但闭合时间都是保持一致的，为24 h内。

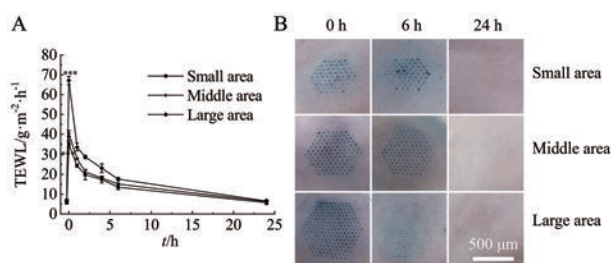


Figure 7 Effect of area of microneedles on the formation and closure of microchannels. A: TEWL; B: Methylene blue staining. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs middle area (0 h)

3 实验动物的影响

3.1 动物的性别 雌小鼠皮肤的基线值要显著低于雄小鼠皮肤的基线值(图8)，同时，微针刺入后雌小鼠皮肤孔道的TEWL值也显著低于同时段雄小鼠皮肤孔道的TEWL值 ($P < 0.01$)。TEWL法和染色法的结果显示，在两种性别的小鼠皮肤上产生孔道的闭合时间是一致的。

3.2 动物的品系 动物品种对微针孔道产生的影响

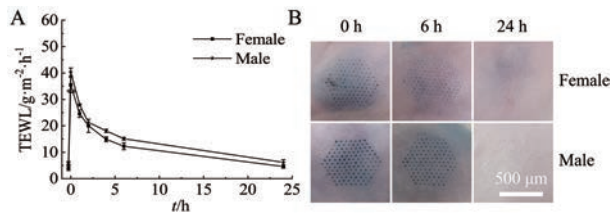


Figure 8 Effect of sex of animal on the formation and closure of microchannels. A: TEWL; B: Methylene blue staining. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs female (0 h)

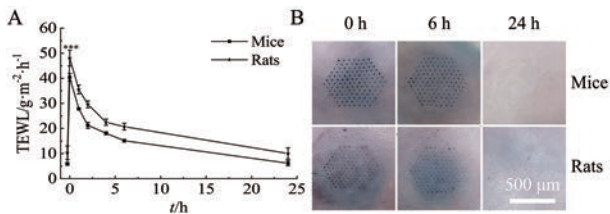


Figure 9 Effect of animal species on the formation and closure of microchannels. A: TEWL; B: Methylene blue staining. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs rats (0 h)

与动物性别产生的影响非常相似(图9),大鼠皮肤的基线值和微针刺破皮肤时的TEWL值要显著高于小鼠皮肤对应的数值($P < 0.001$),但闭合时间都是24 h。

4 可溶性微针的验证

为了验证不同间距的可溶性微针对皮肤孔道产生的影响是否与金属微针一致,制备具有不同针尖密度的铅笔形可溶性微针进行实验。

TEWL法和染色法的结果显示可溶性微针间距产生的影响与金属微针产生的影响保持一致(图10),但可溶性微针在皮肤上形成孔道的TEWL初始值显著大于对应参数的金属微针在皮肤上形成孔道的TEWL初始值(图5)。这可能是可溶性微针在刺入皮肤拔出时,针尖部分断裂在皮肤中,导致孔道无法快速的收缩,造成的TEWL值较大,后期因断裂在体内的针尖溶解、被吸收,孔道的TEWL值呈快速下降趋势。

5 皮肤的局部刺激性

刺入微针后,所有动物的皮肤都会形成明显的红

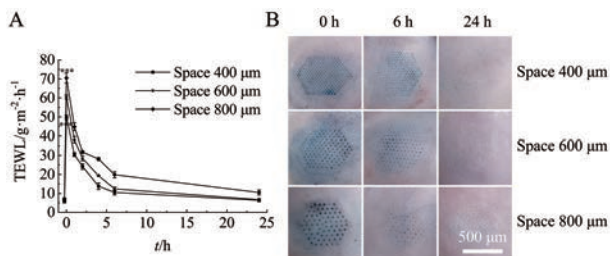


Figure 10 Effect of spaces of soluble microneedles on the formation and closure of microchannels. A: TEWL; B: Methylene blue staining. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs space 600 μm (0 h)

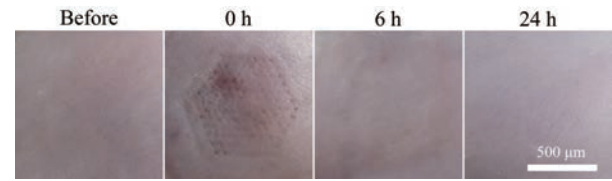


Figure 11 The irritation of skin which is penetrated by the type 2 microneedles

斑和轻微水肿,并于24 h内消退(图11)。同时,视觉检查发现皮肤上没有其他任何不良反应。

讨论

本实验使用TEWL法和亚甲蓝染色法探究微针刺入参数(刺入力和时间),自身参数(长度、密度、形状、阵列面积、材料)和动物(性别、品系)对形成孔道的影响。微针所形成的孔道是可逆、轻微的,不同于胶带剥离法造成的损伤是不可逆的^[28]。

每个因素产生的效果也各有差异。本实验建议微针的刺入时间保持在30 s以上,与文献报道一致^[25]。但另有文献^[14]表明微针的刺入时间保持在2 s左右,时间过长会加速皮肤的弹性收缩,导致孔道的TEWL值偏低。可能的原因是本文采用活体实验,而Gomaa等^[14]采用的是扩散池离体装置,从而造成结果的差异。微针刺入力产生的影响如预期结果一致,刺入力越大,形成的孔道越大,闭合的时间越久。但刺入力增大到一定程度时,对孔道大小产生的影响较小,如Vicente-Perez等^[29]采用手动、20、30和50 N的刺入力施用微针,发现力度对微针造成孔道的大小没有差异。在实际应用中要结合具体的微针选择合适的刺入力。同时,刺入力和刺入速度是不可分割的两部分,两者结合才能更好地刺入皮肤。

微针自身参数中对皮肤孔道产生影响最大的是针尖间距,间距与“钉子床”效应密切相关,即微针贴片上的微针数量多、密度高,在给定的作用力下无法有效突破角质层屏障,导致刺入失败。高密度微针更易在皮肤上产生挤压效应,不能有效地刺穿皮肤。这也说明大面积微针产生的孔道较浅,愈合更快,6 h后染色结果显示,颜色要浅于中等面积和小面积的颜色(图7B)。而微针长度对孔道形成的影响也是不同的,长度越长,形成的孔道越大,但孔道大小增加的比例大于微针长度增加的比例。而长度对孔道闭合时间的影响并不大,这与Gomaa等^[14]和Gupta等^[30]研究结果类似。本实验中,采用圆锥形和铅笔形两种形状的微针对孔道的影响几乎是相同的。虽然圆锥形微针较铅笔形微针更尖锐、刺入深度更深,但铅笔状微针形成的孔道更

宽,两者综合的效果可能是近似的。本实验采用可溶性微针验证间距对孔道形成的影响发现,虽然金属和普通的可溶性微针形成孔道的TEWL值有所不同,但孔道闭合的趋势是类似的,这与预期金属微针形成孔道的闭合时间更久有所不同。

由于动物皮肤种类^[31, 32]不同,皮肤的TEWL基线值及微针在相应皮肤上形成孔道的TEWL初始值可能略有差异,但形成孔道和闭合的趋势是近似的。

本实验采用TEWL法和染色法研究微针对孔道的影响结果是一致的。而TEWL值易受情绪、感觉、温度波动和汗腺活动等影响^[17, 33],引起一定的结果误差。TEWL法仅能通过数据定量表现出孔道的大小,无法准确测定孔道的深度、宽度和体积等详细信息。染色法也仅能显示微针孔道的数量及孔道的宽度。在后续实验中,本团队还将建立其他评价方法进一步探究上述因素对孔道深度和宽度的影响。

本研究成功揭示了微针对皮肤孔道形成与闭合的影响因素及其规律,形成的有效孔道都可在24或48 h内闭合。研究结果为微针进一步开发应用提供了依据,也为微针产品的设计研究提供借鉴参考。

作者贡献:李蓉蓉是本实验研究的执行人;李蓉蓉和王缘完成数据分析和论文初稿的写作;李蓉蓉、王缘、刘勇、王延妮和刘哲参与具体实验过程和实验结果分析;马凤森是项目的构思者及负责人,负责实验设计、指导实验、数据分析和论文写作与修改。

利益冲突:本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Duarah S, Sharma M, Wen JY. Recent advances in microneedle-based drug delivery: special emphasis on its use in paediatric population [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 136: 48-69.
- [2] Dou JJ, Yan JH, Xu K, et al. Transdermal delivery of *Gentiana macrophylla* complex components system under micro-needle conditions [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 1137.
- [3] Donnelly RF, Singh TRR, Woolfson AD. Microneedle-based drug delivery systems: microfabrication, drug delivery, and safety [J]. *Drug Deliv*, 2010, 17: 187-207.
- [4] Henry S, Mcallister DV, Allen MG, et al. Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery [J]. *Daru*, 1998, 87: 922-925.
- [5] Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3: 115-124.
- [6] Brogden NK, Milewski M, Ghosh P, et al. Diclofenac delays micropore closure following microneedle treatment in human subjects [J]. *J Control Release*, 2012, 163: 220-229.
- [7] Xie Y, Xu B, Gao Y. Controlled transdermal delivery of model drug compounds by MEMS microneedle array [J]. *Nanomedicine*, 2005, 1: 184-190.
- [8] Chen YJ, Yang S, Ai Q, et al. Microneedle-mediated intradermal injection with hyaluronic acid for the treatment of sensitive skin: a split-face study [J]. *Chin J Dermatol (中华皮肤科杂志)*, 2019, 52: 899-906.
- [9] Sharma S, El-laboudi A, Remmy M, et al. A pilot study in humans of microneedle sensor arrays for continuous glucose monitoring [J]. *Anal Methods*, 2018, 10: 2088-2095.
- [10] Shen C, Xia X, Gao WY, et al. Research progress in the microneedle assisted transdermal drug delivery system [J]. *Chin J Pharms (中国医药工业杂志)*, 2017, 48: 965-973.
- [11] Edens C, Collins ML, Goodson NJL, et al. A microneedle patch containing measles vaccine is immunogenic in non-human primates [J]. *Vaccine*, 2015, 33: 4712-4718.
- [12] Zhan HH, Huang YC, Ma FS. Research progress in the evaluation methods of microneedles puncture performance [J]. *Chin Pharmacol J (中国药理学杂志)*, 2018, 53: 1890-1895.
- [13] Park JH, Kim CB, Lee HJ, et al. Development and clinical study of the use of infrared radiation to accelerate the dissolution rate of a microneedle array patch (MAP) [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2020, 10: 791-800.
- [14] Goma YA, Morrow DIJ, Garland MJ, et al. Effects of microneedle length, density, insertion time and multiple applications on human skin barrier function: assessments by transepidermal water loss [J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24: 1971-1978.
- [15] Haq MI, Smith E, John DN, et al. Clinical administration of microneedles: skin puncture, pain and sensation [J]. *Biomed Microdevices*, 2009, 11: 35-47.
- [16] Chilcott RP, Dalton CH, Emmanuel AJ, et al. Transepidermal water loss does not correlate with skin barrier function *in vitro* [J]. *J Invest Dermatol*, 2002, 118: 871-875.
- [17] Verbaan FJ, Bal SM, DJVD Berg, et al. Assembled microneedle arrays enhance the transport of compounds varying over a large range of molecular weight across human dermatomed skin [J]. *J Control Release*, 2007, 117: 238-245.
- [18] Yan G, Warner KS, Zhang J, et al. Evaluation needle length and density of microneedle arrays in the pretreatment of skin for transdermal drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2010, 391: 7-12.
- [19] Arya JM, Dewitt K, Scott-Garrard M, et al. Rabies vaccination in dogs using a dissolving microneedle patch [J]. *J Control Release*, 2016, 239: 19-26.
- [20] Aung NN, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, et al. Fabrication, characterization and comparison of α -arbutin loaded dissolving and hydrogel forming microneedles [J]. *Int J Pharm*, 2020, 586: 119508.
- [21] Liu S, Quan YS, Shen WN, et al. Preparation and characterization of novel hyaluronic acid microneedles for insulin transdermal delivery [J]. *J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报)*,

- 2010, 21: 6-10.
- [22] Donnelly RF, Garland MJ, Morrow DI, et al. Optical coherence tomography is a valuable tool in the study of the effects of microneedle geometry on skin penetration characteristics and in-skin dissolution [J]. *J Control Release*, 2010, 147: 333-341.
- [23] Kelchen MN, Siefers KJ, Converse CC, et al. Micropore closure kinetics are delayed following microneedle insertion in elderly subjects [J]. *J Control Release*, 2016, 225: 294-300.
- [24] Zhan HH, Huang YC, Ma FS, et al. Quality evaluation of lidocaine hydrochloride rapid onset local anesthesia preparation based on microneedles technology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1371-1376.
- [25] Larrañeta E, Moore J, Vicente-Pérez, et al. A proposed model membrane and test method for microneedle insertion studies [J]. *Int J Pharm*, 2014, 472: 65-73.
- [26] Andersen TE, Andersen AJ, Petersen RS, et al. Drug loaded biodegradable polymer microneedles fabricated by hot embossing [J]. *Microelectron Eng*, 2018, 195: 57-61.
- [27] Chen Y, Chen BZ, Wang QL, et al. Fabrication of coated polymer microneedles for transdermal drug delivery [J]. *J Control Release*, 2017, 265: 14-21.
- [28] Liu S, Jin MN, Quan YS, et al. Transdermal delivery of relatively high molecular weight drugs using novel self-dissolving microneedle arrays fabricated from hyaluronic acid and their characteristics and safety after application to the skin [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 86: 267-276.
- [29] Vicente-Perez EM, Quinn HL, McAlister E, et al. The use of a pressure-indicating sensor film to provide feedback upon hydrogel-forming microneedle array self-application *in vivo* [J]. *Pharm Res*, 2016, 33: 3072-3080.
- [30] Gupta J, Gill HS, Andrews SN, et al. Kinetics of skin resealing after insertion of microneedles in human subjects [J]. *J Control Release*, 2011, 154: 148-155.
- [31] Shi LJ, Wu T, Wu ZH. Morphology and biochemical parameters in rats with *D*-galactose-induced skin ageing [J]. *Chin J Dermatol (中华皮肤科杂志)*, 2005, 38: 165-167.
- [32] Ma LW, Zhao HW, Zhou BR, et al. Protective effects of soybean oligopeptide on UVB-induced skin photoaging in mice [J]. *Chin J Dermatovenereol (中国皮肤性病学杂志)*, 2014, 28: 18-21.
- [33] Elkeeb R, Hui X, Chan H, et al. Correlation of transepidermal water loss with skin barrier properties *in vitro*: comparison of three evaporimeters [J]. *Skin Res Technol*, 2010, 16: 9-15.