负载芍药苷的芍药细胞外囊泡水凝胶的构建及其抗皮肤衰老作用研究

杨嘉怡, 李珮欣, 艾鑫仪, 张永太, 郭　腾*, 冯年平*

(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘要: 本研究以中药芍药来源的细胞外囊泡 (*Paeonia lactiflora* derived extracellular vesicles-like particles, PL-EVLP) 包载有效成分芍药苷 (paeoniflorin, PF), 以增强抗皮肤衰老效果, 进而以水凝胶体系 (PF@PL-EVLP Gel) 进一步提升制剂的稳定性和经皮递送效率。以差速离心法提取PL-EVLP, 采用超声结合冻融法制备负载芍药苷的芍药细胞外囊泡 (PF@PL-EVLP), PF@PL-EVLP为具有双层膜的茶托状纳米颗粒, 平均粒径约为148.07 nm, 具有较高的载药量及较好的稳定性。以卡波姆934作为凝胶基质制备PF@PL-EVLP Gel, 水凝胶体系中细胞外囊泡的结构完整且分散均匀, 稳定性良好。体外释放实验结果表明: PF@PL-EVLP和PF@PL-EVLP Gel具有一定缓释效果; 体外药效学研究表明, PF@PL-EVLP具有良好的氧化损伤保护作用, 可使细胞内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 含量显著提升, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量明显下降; 相较于溶液组, PF@PL-EVLP Gel可使药物的累积透皮量提高约10.82倍, 局部皮肤滞留量提高约7.38倍, 累积透皮率提高约9.36倍。体内药效学实验表明: PF@PL-EVLP Gel可发挥抗皮肤衰老作用, 提高皮肤含水量, 增加小鼠皮肤中的胶原纤维比例, 防止*D*-半乳糖诱导衰老小鼠的皮肤变薄; ELISA结果表明PF@PL-EVLP Gel有效提高小鼠皮肤组织总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、SOD、HYP、基质金属蛋白酶抑制剂-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 含量及血清中SOD含量, 减少皮肤组织MDA、MMP-1含量及小鼠血清中MDA含量, 减轻皮肤氧化损伤程度; Western blot实验表明水凝胶体系通过下调BAX的表达, 抑制皮肤细胞凋亡, 发挥抗皮肤衰老作用。本研究为芍药细胞外囊泡水凝胶体系在经皮递送中药有效成分延缓皮肤衰老方面的应用提供了实验依据。动物实验经上海中医药大学动物伦理委员会批准 (批准编号: PZSHUTCM2503120002、PZSHUTCM230907004)。

关键词: 芍药苷; 细胞外囊泡; 水凝胶; 抗氧化; 皮肤衰老

中图分类号: R943　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870(2026)06-2306-14

Construction and mechanism study of paeoniflorin-loaded *Paeonia lactiflora* extracellular vesicles like particles hydrogel for anti-skin aging

YANG Jia-yi, LI Pei-xin, AI Xin-yi, ZHANG Yong-tai, GUO Teng*, FENG Nian-ping*

(*School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China*)

Abstract: In this study, paeoniflorin (PF), the active constituent of *Paeonia lactiflora*, was encapsulated within *Paeonia lactiflora* derived extracellular vesicle-like particles (PL-EVLP) to augment anti-skin-aging efficacy. A hydrogel system (PF@PL-EVLP Gel) was subsequently engineered to further enhance the formulation's stability and transdermal delivery efficiency. PL-EVLP were isolated by differential centrifugation, and paeoniflorin-loaded PL-EVLP (PF@PL-EVLP) were prepared *via* ultrasound-assisted freeze-thaw cycling. The resulting PF@PL-EVLP exhibited cup-shaped, bilayer-membrane nanostructures with a mean diameter of approximately 148.07 nm, a high

收稿日期: 2025-08-20;　修回日期: 2025-12-18.
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82574706).
*通讯作者 Tel: 86-21-51323146, E-mail: guoteng7373@163.com;
Tel: 86-21-51322198, E-mail: npfeng@shutcm.edu.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0972

drug-loading capacity, and favorable stability. PF@PL-EVLP Gel was fabricated using Carbomer 934 as the gel matrix. Within the hydrogel system, extracellular vesicles maintained structural integrity and uniform dispersion, exhibiting excellent stability. *In vitro* release studies demonstrated that both PF@PL-EVLP and PF@PL-EVLP Gel exhibited sustained-release characteristics. *In vitro* pharmacodynamic studies revealed that PF@PL-EVLP exerts robust protection against oxidative damage, significantly elevating intracellular superoxide dismutase (SOD) and hydroxyproline (HYP) levels while markedly reducing malondialdehyde (MDA), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), and reactive oxygen species (ROS) contents. Compared with the solution group, PF@PL-EVLP Gel increased the cumulative transdermal permeation by approximately 10.82-fold, the local skin retention by 7.38-fold, and the cumulative permeation rate by 9.36-fold. *In vivo* pharmacodynamic evaluations demonstrated that PF@PL-EVLP Gel exerts pronounced anti-skin-aging effects, as evidenced by increased skin hydration, elevated dermal collagen-fiber density, and prevention of *D*-galactose-induced epidermal and dermal thinning. ELISA analyses revealed that the hydrogel significantly augmented cutaneous total antioxidant capacity (T-AOC), catalase (CAT), SOD, HYP, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) levels, concomitantly attenuating dermal MDA and MMP-1 contents; serum SOD was also upregulated and MDA downregulated. Western blot confirmed that the formulation mitigates keratinocyte apoptosis *via* BAX down-regulation. These findings provide a robust foundation for the topical application of *Paeonia lactiflora* extracellular vesicle-based hydrogel systems in transdermal delivery of active phytoconstituents for skin-aging retardation. The animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (approval numbers: PZSHUTCM2503120002, PZSHUTCM230907004).

Key words: paeoniflorin; extracellular vesicle; hydrogel; antioxidant; skin aging

衰老是机体器官与组织随年龄增长而出现的不可逆转的功能性衰退过程[1], 皮肤作为最直观的器官, 其变化成为机体衰老显著的表现形式之一, 体现为皮肤结构、功能及外观的累积性变化, 如皱纹增多、皮肤松弛及弹性减退等[2]。现代研究表明, 自由基积累和氧化应激是导致皮肤衰老的核心因素[3,4], 二者相互作用, 会对细胞和组织造成持续且反复的损伤, 从而加速皮肤衰老的进程。

基于中药有效成分的多靶点作用及绿色天然特性, 使其为抗皮肤衰老领域提供了独特的视角和丰富的资源。研究表明, 来源于毛茛科植物芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 的补虚药白芍和活血化瘀药赤芍在抗皮肤衰老方面具有很好的应用潜力[5]。芍药苷 (paeoniflorin, PF)[6] 是白芍与赤芍的主要活性成分, 可通过抗氧化[7]、调节活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平[8]、抗炎、改善微循环等多途径作用于皮肤衰老的多个关键环节。然而, PF 的物理化学稳定性[9]和生物利用度[10]较低, 限制了其临床应用。目前, 脂质体、醇质体等纳米制剂已广泛应用于药物的经皮递送[11], 但人工载体存在引发炎症、免疫反应的风险[12]。相比之下, 植物细胞外囊泡 (plant-derived extracellular vesicles, P-EVs) 是植物细胞释放的纳米级磷脂双层囊泡, 能够跨越生物屏障实现高效递药。中药来源的EVs具备独特的治疗潜力及在安全性、成本效益、环保可持续方面的额外优势, 可作为天然递送载体[13-15]。

本研究以芍药根源细胞外囊泡为载体负载PF, 构建新型递送系统, 通过天然纳米载体显著提升PF的稳定性和皮肤渗透性, 同时发挥囊泡自身活性成分与PF的协同抗衰效应。在此基础上构建透明质酸钠水凝胶体系, 进一步提高制剂的稳定性和药物的经皮递送效率, 从而更好地发挥抗皮肤衰老作用。

材料与方法

药品与试剂 芍药根 (经上海中医药大学中药研究所俞桂新教授鉴定为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的新鲜根, 菏泽志恒牡丹芍药种植基地); 芍药苷标准品 (质量分数 ≥ 98%, M22HS179898, 成都德思特生物技术有限公司); *D*-半乳糖 (S11050, 上海源叶生物科技有限公司); 酶切寡聚透明质酸钠 (< 10 kDa, J201240424, 华熙生物科技股份有限公司); 维生素C (*L*-ascorbic acid, VC, WXBD5783V, 美国Sigma-Aldrich有限公司); BCA蛋白定量试剂盒 (MA0082-2, 大连美仑生物技术有限公司); 考马斯亮蓝超快染色液、ROS检测试剂盒 (P0017F、S0033S, 上海碧云天生物技术有限公司); DiO (KGE2604-10, 江苏凯基生物技术股份有限公司); Hoechst 33342染液 (40732ES03, 上海翌圣生物科技股份有限公司); 人超氧化物歧化酶ELISA Kit (BPE11086, 上海朗顿生物技术有限公司); 人基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1) ELISA Kit (EK1M01-96, 杭州联科生物技术股份有限公司);

丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 体外测定试剂盒 (A003-2-2)、MDA 体内测定试剂盒 (A003-1)、羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 体外测定试剂盒 (A030-1-1)、HYP 体内测定试剂盒 (A030-2-1)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 测定试剂盒 (A015-2-1)、总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒 (A001-1)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 测定试剂盒 (A007-1-1) 购自南京建成生物工程研究所; 维生素 E 胶囊购自浙江医药股份有限公司; 鼠基质金属蛋白酶抑制剂-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) ELISA KIT、鼠 MMP-1 ELISA KIT、鼠 anti-Bcl-2、羊抗鼠 lgG (H+L) HRP (SYP-M0164、SYP-M0204、YP-mAb-00322、YP848526-H, 杭州臻优品生物科技有限公司); 羊抗兔 lgG (H+L) HRP (AA012218, 美国 Origene 公司); 兔 anti-BAX (A12009, 武汉爱博泰克生物科技有限公司)。

仪器 超声波细胞破碎仪、高通量组织研磨器 (JY92-IIN、SCIENTZ-48, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 飞利浦搅拌机 (HR2024, 飞利浦电子公司); 超高速离心机、流式细胞仪 (XPN-100、CytoFLEX S, 美国贝克曼库尔特有限公司); 高效液相色谱仪 (1260 Infinity II, 美国 Agilent 公司); 激光粒度仪、纳米颗粒追踪分析仪 (Nano-ZS90、NanoSight NS300, 英国 Malvern 公司); 冷冻干燥机 (7740070, 美国 Labconco 公司); 透射电子显微镜 (JEM-1400 Plus, 日本 JEOL 公司); 细胞成像微孔板检测系统 (Cytation 5, 美国 Biotek 公司); 多功能微孔板酶标仪 (Spectramax iD5, 美国 Molecular Devices 公司); 药物透皮扩散试验仪 (RYJ-12B, 上海黄海药检仪器有限公司); 化学发光蛋白印迹成像仪 (Touch Image, 上海易孛特光电技术有限公司)。

细胞 HaCaT 细胞: 人正常永生化角质形成细胞, 购于中国科学院典型培养物委员会细胞资源库; CCC-ESF-1 细胞: 人胚胎皮肤成纤维细胞, 购于中国科学院典型培养物委员会细胞资源库。

动物 昆明 (Kunming, KM) 小鼠, 雄性, SPF, 18～20 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 由上海中医药大学实验动物中心提供 [许可证号: SYXK (沪) 2020-0009], 所有动物实验均符合伦理学规范 (批准号: PZSHUTCM2503120002)。

BALB/c-nu 无胸腺裸鼠, 雄性, SPF, 16～20 g, 购于上海吉辉实验动物饲养有限公司, 由上海中医药大学实验动物中心提供, 所有动物实验均符合伦理学规范 (批准号: PZSHUTCM230907004)。

芍药苷 HPLC 体外分析方法

色谱条件 采用 Diamonsil Plus C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 在乙腈−0.1% 磷酸水为 15∶85 的条件下等度洗脱, 检测波长为 230 nm, 进样体积为 10 μL, 流速为 1.0 mL·min^{-1}; 柱温: 30 ℃; 检测时间: 15 min。

标准曲线的建立 精密称取 1.06 mg PF 标准品置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 得到质量浓度为 106.00 μg·mL^{-1} 的储备液。以甲醇稀释配制成 0.34、0.68、1.36、2.71、5.43、10.85、21.71、43.42、54.27、67.84、84.80、106.00 μg·mL^{-1} 的 PF 标准品溶液进样检测。

专属性考察 分别取 PF 标准品溶液、芍药细胞外囊泡 (*Paeonia lactiflora* derived extracellular vesicles-like particles, PL-EVLP) 溶液及负载芍药苷的芍药细胞外囊泡溶液 (PF@PL-EVLP), 进样测定, 考察专属性。

精密度考察 分别配制低、中、高浓度 (10.00、50.00、100.00 μg·mL^{-1}) 的 PF 标准品溶液, 在同一天内连续进样测定 5 次, 考察精密度。

准确度考察 分别配制低、中、高浓度 (10.00、50.00、100.00 μg·mL^{-1}) 的 PF 标准品溶液, 连续进样测定 5 次。记录峰面积并计算相应的测定浓度, 通过计算测定浓度与实际浓度的比值评估准确度。

重复性考察 平行配制 5 份 50.00 μg·mL^{-1} 的 PF 标准品溶液, 连续进样, 记录峰面积并计算相应的测定浓度, 考察方法的重复性。

稳定性考察 配制 1 份 50.00 μg·mL^{-1} 的 PF 标准品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、18、24 h 进样, 记录峰面积并计算相应的测定浓度, 考察方法的稳定性。

PL-EVLP 的提取与初步表征

差速离心法提取 PL-EVLP 取新鲜芍药根, 洗净、干燥后称重 ($M_{原药材}$)。将其切块, 加入 2 倍量超纯水破碎, 用 100 目筛网过滤, 滤液 4 ℃静置过夜。依次以 1 500 ×*g* 离心 10 min、3 000 ×*g* 离心 20 min, 取上清液。再以 5 000 ×*g* 离心 30 min、10 000 ×*g* 离心 1 h, 取上清液过 0.8 μm 滤膜。150 000 ×*g* 离心 2 h, 沉淀重悬后冷冻干燥, 即得 PL-EVLP 冻干粉末, 称重 ($M_{PL\text{-}EVLP}$)。根据公式 (1) 计算 PL-EVLP 的提取收率。取 5 000 ×*g* 和 10 000 ×*g* 离心所得上清及 150 000 ×*g* 离心所得沉淀重悬液, 进行粒径分布考察, 分析提取过程各步骤中颗粒的纯净度。

$$提取收率\ (mg\cdot kg^{-1}) = M_{PL\text{-}EVLP} / M_{原药材} \quad (1)$$

粒径、多分散系数、zeta 电位及透射电镜观察 PL-EVLP 冻干粉末经超纯水复溶后, 通过马尔文激光粒度仪测定电位、粒径分布和多分散系数 (polydispersity index, PDI), 并使用纳米颗粒追踪分析仪测量其颗粒数。取 7 μL 样品滴于铜网, 直至液滴在室温下自然挥干, 于铜网表面滴加 7 μL 2% 磷钨酸染色 3 min, 立即取滤纸吸除多余液滴, 于透射电镜下观察 PL-EVLP 的

形态特征。

PL-EVLP的组成分析　采用Bligh-Dyer法[16]提取脂质, 无水乙醇[17]超声提取糖, 通过BCA试剂盒定量蛋白, 计算PL-EVLP中的脂质、糖、蛋白含量。

PF@PL-EVLP的制备与表征

PF@PL-EVLP的制备　将PL-EVLP冻干粉末用超纯水溶解至每毫升蛋白含量150 μg, 称取适量PF粉末加入上述溶液, 使PF质量浓度为150 μg·mL^{-1}。混合溶液经探头超声后 (探头超声条件: 15%振幅, 10 s开/50 s关, 持续9 min), 置于37 ℃气浴摇床孵育1 h。再将混合溶液置于−20 ℃冷冻30 min, 室温下化冻10 min为一次冻融循环, 反复冻融3次, 即得PF@PL-EVLP。

载药量和包封率考察　采用超滤离心法测定PF@PL-EVLP中PF的包封率和载药量。取100 μL PF@PL-EVLP溶液置于超滤离心管 (3 kDa) 中, 12 000 r·min^{-1}离心10 min, 取续滤液过0.45 μm滤膜, HPLC测定并计算PF质量, 即为制剂中的游离药物质量 (M_{free})。另取100 μL PF@PL-EVLP, 加入甲醇超声破乳后过0.45 μm滤膜, HPLC测定并计算PF质量, 即为制剂中的药物总质量 (M_{total})。以同法测定PL-EVLP中的PF质量 ($M_{EV\text{-}free}$、$M_{EV\text{-}total}$)。根据公式 (2)、(3) 计算PF@PL-EVLP的包封率和载药量。

$$包封率\ (\%) = [(M_{total} - M_{EV\text{-}total}) - (M_{free} - M_{EV\text{-}free})]/(M_{total} - M_{EV\text{-}total}) \times 100\% \quad (2)$$

$$载药量\ (\%) = M_{total}/M_1 \times 100 \quad (3)$$

其中, M_{total}为PF@PL-EVLP的总药物质量; M_{free}为PF@PL-EVLP的游离药物质量; $M_{EV\text{-}total}$为PF@PL-EVLP药物总质量中, 来源于PL-EVLP的PF质量; $M_{EV\text{-}free}$为PF@PL-EVLP游离药物质量中, 来源于PL-EVLP的PF质量; M_1为制剂中PF与PL-EVLP的质量之和。

PF@PL-EVLP初步表征及稳定性考察　对PF@PL-EVLP进行粒径分布、zeta电位测定、透射电镜观察及特征蛋白表征, 并考察其4 ℃储存稳定性。

PF@PL-EVLP水凝胶 (PF@PL-EVLP Gel) 的制备与表征　卡波姆934溶胀后依次加入PF@PL-EVLP、甘油 (5%)、透明质酸钠 (0.5%), 三乙醇胺调节pH ≈ 6.5, 即得PF@PL-EVLP Gel。取1 mL PF@PL-EVLP Gel放入已活化的透析袋中, 排空气泡后扎紧透析袋两端, 浸没于10 mL超纯水中。于32 ℃、100 r·min^{-1}条件下恒温振荡24 h, 取释放液通过TEM观察, 考察PF@PL-EVLP Gel中PF@PL-EVLP结构的完整性。同时, 对PF@PL-EVLP Gel的离心、温度稳定性进行考察。

PF@PL-EVLP和PF@PL-EVLP Gel的体外释放行为考察　以生理盐水作为释放介质, 通过透析法 (32 ℃、100 r·min^{-1}) 对PF@PL-EVLP、PF@PL-EVLP Gel的体外释药行为进行考察。取1 mL样品加至已活化的透析袋中, 排空气泡后扎紧透析袋两端, 浸没于40 mL生理盐水 (满足漏槽条件) 中, 分别于0.5～24 h定时取样并补液。HPLC测定PF含量, 计算PF的累积释放率并绘制释放曲线。

载荧光标记样品的制备　DiO (10 μg·mL^{-1}) 与PL-EVLP于37 ℃避光孵育30 min (每10 min涡旋), 150 000 ×*g* 离心2 h, 复溶即得DiO标记PL-EVLP溶液 (DiO/PL-EVLP)。罗丹明B (rhodamine B, Rh B) (10 μg·mL^{-1}) 与DiO/PL-EVLP或PL-EVLP混合后, 即得Rh B与DiO标记PL-EVLP共混溶液 (Rh B + DiO/PL-EVLP) 或Rh B与PL-EVLP共混溶液 (Rh B + PL-EVLP), 该溶液经超声结合冻融处理, 即得负载Rh B的DiO标记PL-EVLP溶液 (Rh B@DiO/PL-EVLP) 及负载Rh B的PL-EVLP溶液 (Rh B@PL-EVLP)。Rh B@DiO/PL-EVLP加入溶胀后的卡波姆934, 配甘油、透明质酸钠, 三乙醇胺调节pH, 即得负载Rh B的DiO标记PL-EVLP水凝胶 (Rh B@DiO/PL-EVLP Gel)。

体外细胞毒性评价　以CCK-8法评估制剂的毒性: HaCaT与CCC-ESF-1细胞按每孔1×10^{4}个接种培养12 h后, 分别加入梯度浓度的PF或PL-EVLP, 设空白及对照组 (以不含制剂的空白培养基作为对照组, 不含细胞的空白培养基作为空白组); 24 h后换10% CCK-8培养基, 避光孵育30 min, 于450 nm测吸光度值, 并根据公式 (4) 计算存活率。

$$细胞存活率\ (\%) = (A_{给药} - A_{空白})/(A_{对照} - A_{空白}) \times 100\% \quad (4)$$

其中, $A_{给药}$为给药组吸光度值, $A_{对照}$为对照组吸光度值, $A_{空白}$为空白组吸光度值。

CCC-ESF-1和HaCaT细胞摄取行为考察

细胞共定位　CCC-ESF-1、HaCaT细胞 (每孔3×10^{5}个) 于6孔板中孵育12 h, 分别加入空白/含药培养基处理8 h; PBS洗涤2次后, 以4%多聚甲醛固定15 min。Hoechst 33342 (10 μg·mL^{-1}) 染色15 min, 通过Cytation 5进行观察 (Hoechst 33342: 377/447 nm; DiO: 469/525 nm; Rh B: 586/647 nm)。

CCC-ESF-1和HaCaT细胞对Rh B@PL-EVLP的摄取行为　CCC-ESF-1与HaCaT细胞以每孔3×10^{5}个的密度接种于6孔板, 贴壁后分别用空白/含药培养基孵育1～8 h; PBS洗涤, 0.25%胰酶消化细胞, 4 ℃、1 000 r·min^{-1}离心3 min, 1% FBS-PBS重悬细胞并洗涤2次, 通过流式细胞仪检测荧光摄取量。

CCC-ESF-1细胞氧化损伤保护能力考察

PF@PL-EVLP的抗氧化活性评价　CCC-ESF-1 (每孔1×10^{4}个) 接种于96孔板, 贴壁培养12 h, 依次加

入梯度浓度PF、PL-EVLP或PF@PL-EVLP培养24 h, 再以2 500 μmol·L^{-1}过氧化氢(H_2O_2)刺激1 h; 加入10% CCK-8避光孵育30 min, 记录450 nm吸光度值并计算存活率。

影响抗氧化能力及胶原蛋白的相关指标检测 CCC-ESF-1 (每孔3×10^{5}个)接种于6孔板, 贴壁培养12 h, 依次加入梯度浓度PF、PL-EVLP或PF@PL-EVLP培养24 h, 再以2 500 μmol·L^{-1} H_2O_2刺激1 h; 加入10% CCK-8避光孵育30 min, 记录450 nm吸光度并计算存活率。对照、模型及给药组分别加空白/含药培养基孵育24 h。模型与给药组加2 500 μmol·L^{-1} H_2O_2刺激1 h后, 收集细胞培养上清(3 000 r·min^{-1}, 10 min)用于SOD、MMP-1含量检测。细胞经PBS重悬、反复冻融裂解后, 12 000 r·min^{-1}离心15 min, 取上清, BCA定量蛋白并检测HYP、MDA含量。

细胞内ROS表达量考察 将CCC-ESF-1细胞按“影响抗氧化能力及胶原蛋白的相关指标检测”中相同条件进行给药、造模处理, 装载DCFH-DA荧光探针(20 min)。PBS洗涤3次后, 4%多聚甲醛固定15 min。Hoechst 33342 (10 μg·mL^{-1})染色15 min, 通过Cytation 5观察(Hoechst 33342: 377/447 nm; DCFH-DA: 469/525 nm)。

体外透皮行为考察 将剃毛KM小鼠背部皮肤剥离筋膜后, 固定于改良立式Franz透皮扩散池(有效给药面积约为2.8 cm^2, 接收液约6.5 mL, 32 ± 0.5 ℃, 500 r·min^{-1})。以生理盐水作为接收介质, 各组给药(PF含量均为2 mg, 2 mL溶液/凝胶)后, 在预设时间点(0.5～12 h)分别采集1 mL接收液并补液, HPLC对其浓度进行定量分析。根据公式(5)计算单位面积的累积渗透量(Q)和经皮渗透速率。实验结束后, 将有效透皮区域皮肤洗净, 加入10% DMSO的PBS溶液中匀浆, 4 000 r·min^{-1}离心20 min。取上清, HPLC测量并计算皮肤中的药物滞留量。

$$Q = (CnV + \sum_{i=1}^{n-1} CiVi)/A \quad (5)$$

其中, C_n和C_i分别为第n个和第i个取样点测得的药物浓度, V和V_i分别为接收池体积(6.5 mL)和取样体积(1 mL), A为有效渗透面积(2.8 cm^2)。

经皮递送可视化研究 过量异氟烷麻醉处死BALB/c-nu裸鼠, 取背部皮肤经生理盐水漂洗后固定于Franz扩散池, 角质层朝上。供给池分别加入1 mL Rh B溶液、Rh B + DiO/PL-EVLP溶液、Rh B@DiO/PL-EVLP溶液、Rh B@DiO/PL-EVLP Gel (Rh B质量浓度均为10 μg·mL^{-1})。12 h后取下皮肤, 生理盐水漂洗, 4%多聚甲醛固定, 冷冻包埋剂包埋, 液氮速冻, 纵向冷冻切片。使用Cytation 5观察。

***D*-半乳糖小鼠皮肤衰老模型的构建** 雄性KM小鼠, 背部皮肤脱毛5 cm^2, 每日给药前, 空白组小鼠颈背部皮下注射0.5 mL生理盐水溶液, 其余组别小鼠颈背部皮下注射同等剂量(1 000 mg·kg^{-1}) *D*-半乳糖生理盐水溶液, 持续42天建立皮肤衰老模型。第7天起, 正常组和模型组小鼠涂抹超纯水, 其余组别经皮涂抹药物: 维生素E (vitamin E, VE)组(每只100 mg)、PF、PL-EVLP、PF@PL-EVLP和PF@PL-EVLP Gel组(每只0.15 mg), 持续36天。第43天, 麻醉后眼内眦取血, 静置凝血, 离心取血清分装保存。取1 cm^{2}皮肤3块, 2块置于4%多聚甲醛溶液固定[苏木素−伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, H&E)、Masson染色], 1块测定皮肤含水量; 剩余皮肤液氮速冻, −80 ℃保存; 取心、肝、脾、肺、肾, 置于4%多聚甲醛溶液固定。

小鼠皮肤外观、体重及皮肤含水量的变化 于造模第0、7、42天拍照记录小鼠皮肤外观, 并记录造模第0、42天体重。称量并记录1 cm^{2}皮肤组织的湿重($M_{湿重}$), 80 ℃烘烤24 h后, 称量皮肤干重($M_{干重}$), 根据公式(6)计算皮肤含水量。

$$皮肤含水量(\%) = (M_{湿重} - M_{干重})/M_{湿重} \times 100\% \quad (6)$$

小鼠皮肤组织的形态学观察

小鼠皮肤H&E染色结构观察与皮肤厚度分析 取置于4%多聚甲醛溶液中固定的皮肤组织, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋切片; H&E染色后, 中性树胶封片。光学显微镜下观察并通过Image J软件定量皮肤厚度。

小鼠皮肤Masson染色结构观察与胶原纤维面积分析 取置于4%多聚甲醛溶液中固定的皮肤组织, 脱水透明后石蜡包埋切片。重铬酸钾过夜浸染, 铁苏木素−丽春红−苯胺蓝三色染色, 冰醋酸分化, 脱水透明封片。光学显微镜下观察并通过Image J软件定量胶原纤维面积。

小鼠皮肤中抗氧化及胶原蛋白相关生化指标检测

小鼠皮肤匀浆的制备及蛋白定量 精确称取0.1 g皮肤组织, 加入0.9 mL预冷的生理盐水, 于冰上剪碎, 加入小钢珠, 使用高通量组织研磨器进行破碎匀浆, 16 000 ×g离心20 min, 取上清液置于−20 ℃保存备用。通过BCA试剂盒测定所得匀浆上清的蛋白含量。

小鼠皮肤抗氧化能力相关指标检测 严格按照试剂盒说明书, 完成小鼠皮肤匀浆上清的各生化指标含量的测定, 包括: T-AOC、CAT、SOD活力、MDA含量。

小鼠皮肤胶原蛋白相关指标检测 严格按照试剂盒说明书, 完成小鼠皮肤匀浆上清的各生化指标含量的测定, 包括: MMP-1和TIMP-1含量; 另精密称取

50 mg皮肤组织, 按说明书进行HYP含量测定。

小鼠血清抗氧化能力生化指标检测 严格按照试剂盒说明书, 完成小鼠血清的生化指标含量的测定, 包括SOD活力和MDA含量。

皮肤组织中BAX、Bcl-2的含量测定

蛋白提取及定量 按前述方法制备小鼠皮肤匀浆, 采用RIPA裂解液作为溶剂, 通过BCA试剂盒测定所得匀浆上清的蛋白含量, 取适量匀浆上清加入上样缓冲液, 加热变性后, 即得蛋白样品, 置于−20 ℃保存备用。

免疫印迹 根据说明书制胶, 验漏后加样, 恒压80 V电泳至最佳分离区, 300 mA转膜。PVDF膜经TBS-T漂洗3次, 快速封闭20 min, TBS-T漂洗膜3次。一抗4 ℃孵育过夜, TBS-T漂洗膜3次。二抗室温孵育2 h, TBS-T漂洗膜3次。滴加适量ECL工作液, 使用化学发光蛋白印迹成像仪进行成像。通过Image J软件, 以GAPDH蛋白的灰度值作为对照, 半定量目的蛋白。

统计学方法 采用GraphPad Prism 9.5.1软件对数据进行统计学分析, 实验数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。

结果

1 芍药苷HPLC体外分析方法的建立与方法学考察

以色谱峰面积 (A) 对PF标准品溶液质量浓度 C (μg·mL^{-1}) 进行线性回归, 得PF线性方程: $C = 0.084\ 1A - 0.165\ 8$, $r = 0.999\ 9$。PF标准品、PL-EVLP及PF@PL-EVLP溶液中的PF保留时间均为10.2 min (图1), 表明PL-EVLP中含有一定量的PF。通过对PL-EVLP中PF含量进行定量分析, 可在后续计算时排除PL-EVLP中药物的干扰。精密度平均含量分别为9.99 ± 0.061、51.59 ± 0.46和100.36 ± 0.79 μg·mL^{-1}, RSD分别为0.61%、0.90%和0.79%, 表明该方法的精密度良好。各浓度的准确度平均值为99.01%～104.66%, 且RSD均小于2%, 说明该方法的准确度良好。样品中PF平均含量为51.72 ± 0.21 μg·mL^{-1}, RSD为0.41%, 说明该方法的重复性良好。24 h内样品中PF平均含量为50.59 ± 0.34 μg·mL^{-1}, RSD为0.67%, 表明在室温状态, PF样品24 h内具有良好稳定性。

2 PL-EVLP的初步表征、组成分析及稳定性

PL-EVLP重悬溶液呈透明淡粉色, 丁达尔效应明显; 冻干粉末呈淡粉色疏松海绵状, 二者均具有芍药根特有的芳香气味。PL-EVLP提取收率约为742 ± 34 mg·kg^{-1} (表1)。150 000 ×g离心沉淀重悬液的粒径分布曲线对称且均匀, 表明差速离心可有效去除细胞碎片等杂质, 获得较纯净的PL-EVLP, 是较为可靠的提取方法。

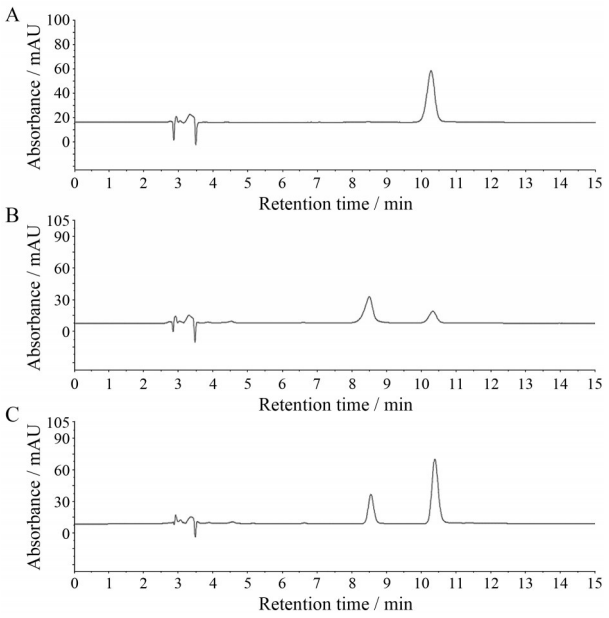


Figure 1 HPLC chromatograms. A: PF standard stock solution; B: PL-EVLP; C: PF@PL-EVLP. PF: Paeoniflorin; PL-EVLP: *Paeonia lactiflora* derived extracellular vesicle-like particles; PF@PL-EVLP: Paeoniflorin-loaded PL-EVLP

Table 1 The extraction yield of PL-EVLP. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. SD: Standard deviation

Sample	Extraction yield / mg·kg^{-1}	Mean	SD
PL-EVLP	781.04		
PL-EVLP	723.40	741.99	33.83
PL-EVLP	721.53		

PL-EVLP的粒径集中在110～180 nm之间, 颗粒浓度为每毫升 (5.82 ± 0.02)×10^{11}个颗粒, 颗粒蛋白比为每毫克蛋白 (4.09 ± 0.02)×10^{11}个颗粒; 其平均粒径为173.90 ± 3.14 nm, PDI为0.24 ± 0.03, 说明体系分散较均匀, 稳定性良好; zeta电位为−19.17 ± 0.31 mV, 表明PL-EVLP是带有阴离子的纳米囊泡结构。TEM显示, 冻干复溶溶液中的PL-EVLP为具有完整的双层膜结构的茶托状纳米颗粒, 轻微聚集, 符合植物细胞外囊泡特征, 说明冻干未破坏PL-EVLP的结构 (图2D)。PL-EVLP中的脂质含量为 (11.12 ± 0.97)%, 糖含量为 (31.74 ± 2.56)%, 蛋白含量为 (26.98 ± 0.57)%, PF含量为 (1.62 ± 0.14)%。与人工合成载体相比, PL-EVLP的内源性组分赋予其额外的生物活性[18]。

通过比较溶液14天内的粒径变化可以发现, PL-EVLP冻干粉末的粒径变化幅度较小, 为优选的储存形式; PL-EVLP重悬溶液和冻干粉末在4和−80 ℃储存时, 均保持稳定 (图2E～H)。冻干前后PL-EVLP的粒径 (164.53 ± 2.29 nm→167.13 ± 2.89 nm) 及电位 (−16.23 ± 0.42 mV→−18.33 ± 0.78 mV) 均无显著差

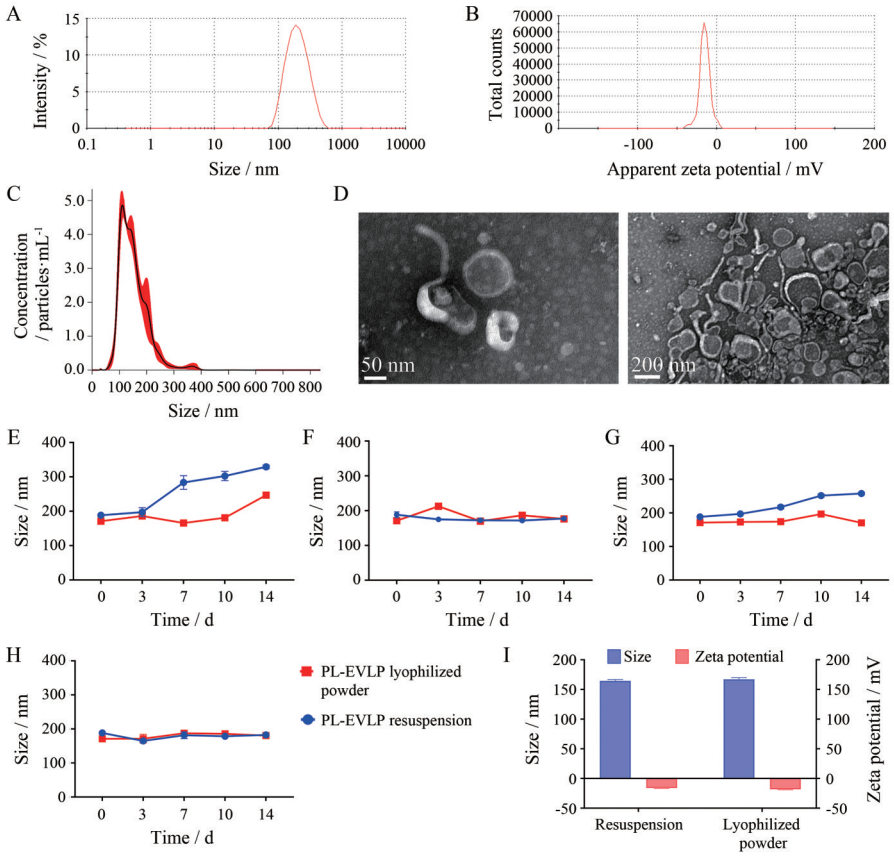


Figure 2 Characterization and storage stability of PL-EVLP. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. A: Particle size distribution profile; B: Zeta-potential distribution diagram; C: Nanoparticle tracking analysis of particle size; D: Transmission electron micrographs; E: Storage stability of PL-EVLP resuspension and lyophilized powder at 25 ℃; F: Storage stability of PL-EVLP resuspension and lyophilized powder at 4 ℃; G: Storage stability of PL-EVLP resuspension and lyophilized powder at −20 ℃; H: Storage stability of PL-EVLP resuspension and lyophilized powder at −80 ℃; I: Lyophilization stability

异, 结构保持完整, 稳定性良好 (图2I)。

3 PF@PL-EVLP的初步表征、蛋白组成及稳定性

负载PF后, PF@PL-EVLP的平均粒径减小至148.07 ± 7.34 nm, PDI为0.21 ± 0.04, zeta电位为−17.13 ± 0.93 mV, 说明体系较稳定。PF@PL-EVLP的包封率为 (52.78 ± 1.45)%, 载药量为 (12.48 ± 0.19)% (表2)。PF@PL-EVLP仍为具有膜结构的纳米粒, 轻微聚集情况消失, 颗粒分散较均匀 (图3A), 这证明超声结合冻融处理既可实现高效包封, 更能改善粒径的均一性。

BCA定量后, 经SDS-PAGE (10%凝胶, 80 V) 及

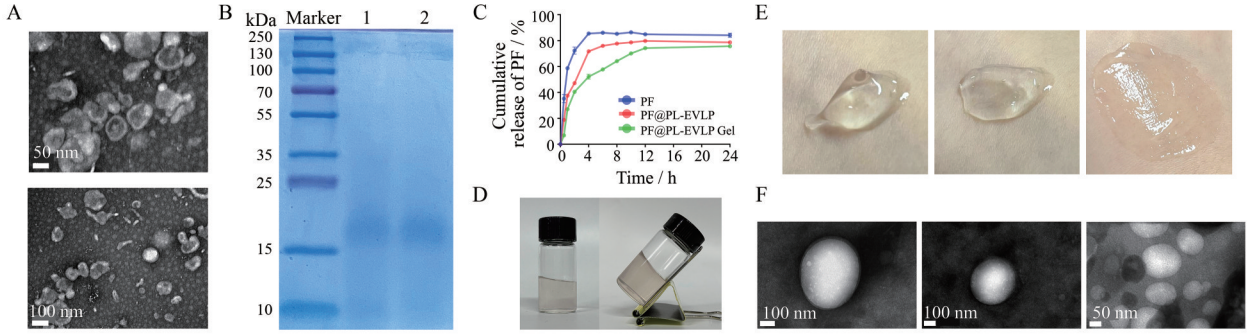


Figure 3 Characterization of PF@PL-EVLP and PF@PL-EVLP Gel. A: Transmission electron micrographs of PF@PL-EVLP; B: Protein distribution profiles of PL-EVLP (1) and PF@PL-EVLP (2); C: *In vitro* drug release profiles of PF solution, PF@PL-EVLP and PF@PL-EVLP Gel; D: Macroscopic appearance of PF@PL-EVLP Gel; E: Spreadability and texture profile of PF@PL-EVLP Gel; F: Transmission electron micrograph of the release medium from PF@PL-EVLP Gel. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Table 2 The entrapment efficiency and drug loading of PF@PL-EVLP. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. EE: Entrapment efficiency; DL: Drug loading

Sample	EE/%	Mean	SD	DL/%	Mean	SD
PF@PL-EVLP	51.41			12.28		
	54.30	52.78	1.45	12.65	12.48	0.19
	52.65			12.52		

考马斯亮蓝染色, PL-EVLP、PF@PL-EVLP均于16 kDa和10 kDa处存在相同蛋白条带 (图3B), 提示载药过程未改变PL-EVLP的蛋白组成和结构完整性, 与TEM结果相一致。

取制备好的PF@PL-EVLP置于4 ℃存放, 15天内, 其粒径随时间略上升, 但增长幅度不超过10 nm, 包封率和载药量的变化均小于2%, 说明PF@PL-EVLP的稳定性良好。

4 PF@PL-EVLP Gel的初步表征、结构完整性及稳定性

凝胶为淡粉色透明半固体, 倾斜或倒置均不流动, 体系分散均匀, 涂抹质地轻薄且水润感强, 吸收快, 不油腻 (图3D、E)。凝胶中的细胞外囊泡可释放至扩散介质中, 形成均匀的胶体分散溶液。纳米囊泡具有明显膜结构, 均匀分散, 未蓄积结团 (图3F), 提示该凝胶可延长药物在皮肤表面的滞留时间并保持纳米结构, 利于经皮递送。

8 000 r·min^{-1}离心10 min后, PF@PL-EVLP沉降明显, 而PF@PL-EVLP Gel无分层、保持均一透明, 表明后者物理稳定性更优。于−20 ℃/室温冻融3次及50 ℃放置12 h后, PF@PL-EVLP Gel未出现脆化、分层或沉淀现象, 颜色略深, 仍保持透明的半固体状态, 外观与涂展质地均未明显改变, 温度稳定性良好。4 ℃存放30天后, PF@PL-EVLP溶液颜色加深并出现絮状沉淀, 稳定性较差; PF@PL-EVLP Gel轻微变色, 无沉淀、分层, 表明其结构稳定性良好, 适于长期储存。上述结果说明, PF@PL-EVLP Gel在低温、长期存储时, 具有更好稳定性, 能够减少药物泄漏/沉降, 具有作为药物递送载体的潜力。

5 体外释放行为

如图3C所示, 游离PF溶液PF@PL-EVLP中的药物分别于4和12 h基本释放完全, 表明PL-EVLP的包覆, 可减缓药物的释放。PF@PL-EVLP Gel的完全释药时间延长至24 h, 证明凝胶结构可进一步减缓药物的释放。各组累积释放量为77%～86%, 表明细胞外囊泡包覆与凝胶体系协同缓释而不阻碍药物释放。

6 体外细胞毒性

PF质量浓度在0～1 000 μg·mL^{-1}, 对CCC-ESF-1细胞无明显毒性, 质量浓度在0～2 000 μg·mL^{-1}, 对HaCaT细胞无明显毒性; PL-EVLP蛋白浓度在0～250 μgprot·mL^{-1}, 对两种细胞均安全, 生物相容性良好 (图4A～D)。

7 CCC-ESF-1和HaCaT细胞摄取行为

在细胞共定位实验中, DiO标记PL-EVLP (绿), Rh B示踪药物 (红), Hoechst标记细胞核 (蓝)。绿、红信号均环绕蓝核, 提示PL-EVLP携带Rh B定位于胞质; 绿荧光富集于膜, 归因于PL-EVLP的天然脂质膜易与细胞膜相互作用。与游离Rh B相比, Rh B+DiO/PL-EVLP及Rh B@DiO/PL-EVLP组红色荧光显著增强, 表明PL-EVLP能有效促进并放大细胞对Rh B的摄取, 且PL-EVLP的负载能够更大程度提升Rh B的细胞摄取量, 从而使制剂更好地发挥药效 (图4E、F)。

通过流式细胞仪检测, 两细胞系中, Rh B@PL-EVLP各时间点的摄取量均最高 (图4G、H), 与细胞内共定位结果一致。推测可能原因是, PL-EVLP的脂质膜易与细胞膜融合, 提示PL-EVLP可显著增强药物摄取, 从而放大PF的抗皮肤衰老效应。

8 CCC-ESF-1细胞氧化损伤保护能力

在H_2O_2诱导的CCC-ESF-1细胞氧化损伤模型中, PF (500～2 000 μg·mL^{-1}) 和PL-EVLP (50～250 μgprot·mL^{-1}) 均显著提高细胞存活率 (图5A), 提示两者对H_2O_2诱导的细胞损伤具有保护作用, PL-EVLP兼具活性成分与递送载体的双重功能。以1 000 μg·mL^{-1} VC作为阳性对照, 150 μg·mL^{-1} PF单用无显著保护作用; PF + PL-EVLP组细胞的存活率为 (98.80 ± 4.04)%, 优于单用组分, 提示PL-EVLP可能发挥协同抗氧化的作用。PF@PL-EVLP组细胞存活率较PF + PL-EVLP组提升18.24%, 归因于细胞外囊泡的促摄取与协同增效作用, 结果与细胞摄取实验相互验证 (图5B)。

经H_2O_2刺激后, 细胞内SOD、HYP含量下降, MDA、MMP-1含量上升。PF@PL-EVLP处理后, 与模型组相比, 细胞内SOD的含量提高约2.04倍, HYP含量提高约1.47倍, MDA含量降低约87.02%, MMP-1含量降低约47.14%, 均接近正常水平 (图5D), 说明PF@PL-EVLP可发挥氧化损伤预保护的作用, 大幅降低氧化损伤程度, 并可能减少胶原蛋白的降解, 维持胶原蛋白总含量, 具有抗皮肤衰老潜力。

此外, H_2O_2刺激使模型组细胞内绿色荧光强度显著升高, 即ROS含量提升, 而各组制剂均可下调ROS (图5C)。其中, 经PF@PL-EVLP处理后, 细胞内ROS含量降幅最大, 提示PF@PL-EVLP预处理可显著增强细胞的抗氧化能力, 减轻氧化损伤。

9 体外透皮行为及经皮递送可视化研究

在给药12 h后, PF、PF + PL-EVLP、PF@PL-EVLP和PF@PL-EVLP Gel的累积透皮量分别为6.26 ± 1.74、

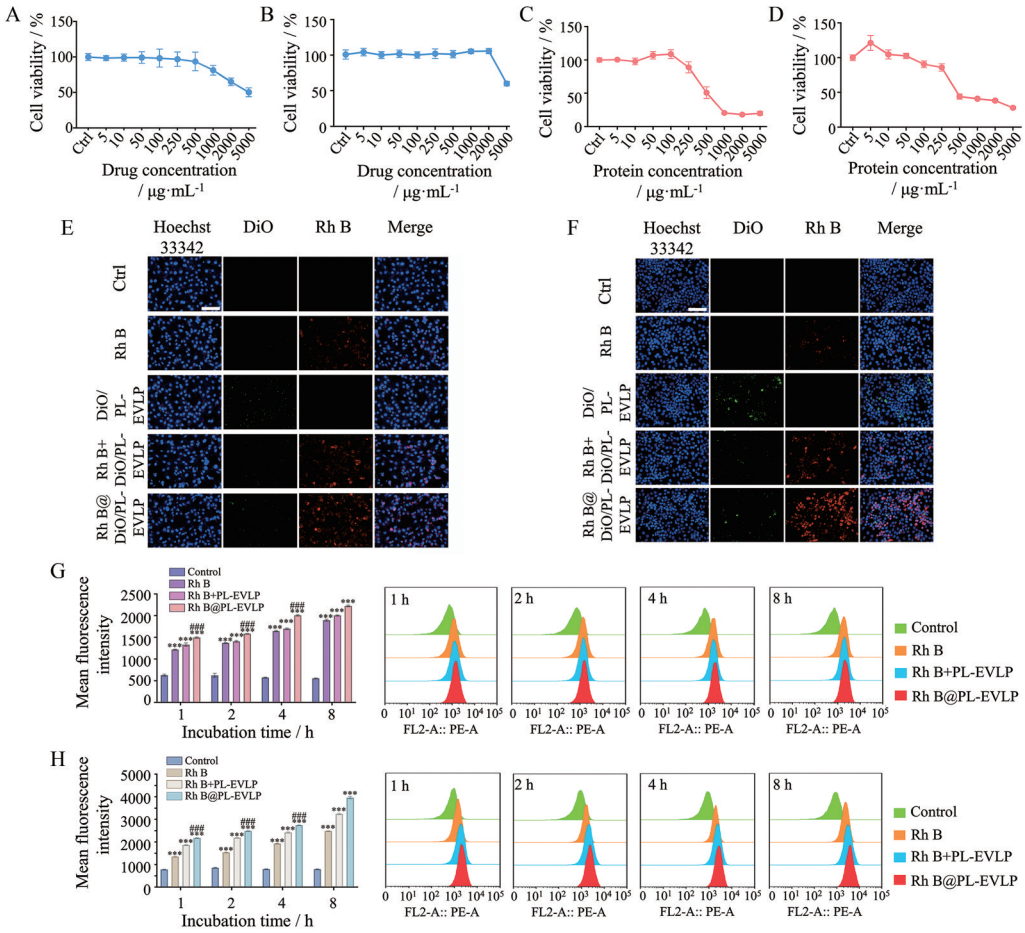


Figure 4 Safety evaluation of PF and PL-EVLP and results on the uptake behavior of CCC-ESF-1 cells and HaCaT cells. A: Cytotoxicity of PF against CCC-ESF-1 cells; B: Cytotoxicity of PF against HaCaT cells; C: Cytotoxicity of PL-EVLP against CCC-ESF-1 cells; D: Cytotoxicity of PL-EVLP against HaCaT cells; E: Uptake of various formulations by CCC-ESF-1 cells (Scale bar = 100 μm); F: Uptake of various formulations by HaCaT cells (Scale bar = 100 μm); G, H: Quantitative analysis of fluorescence intensity and representative flow-cytometric histograms for CCC-ESF-1 (G) and HaCaT (H) cells uptake under identical incubation conditions. n = 5 (A−D), 3 (F−H), $\bar{x} \pm s$. $^{***}P < 0.001$ *vs* control; $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* Rh B@PL-EVLP at 8 h

10.06 ± 4.05、36.60 ± 9.58 和 67.72 ± 16.15 μg·cm^{-2}, 累积透皮率分别为0.66%、0.92%、3.42%和6.17% (图6A)。可以发现, 单纯物理混合无法提高PF的经皮渗透能力; 而PL-EVLP的包封能够显著提升药物累积透皮量, 提高PF的皮肤渗透性能; 凝胶体系可进一步提高PF的透皮能力, 这可能是由于卡波姆的促水合作用与透明质酸钠的保湿作用, 可协同降低药物经皮渗透的屏障阻力, 促进药物的渗透。PF@PL-EVLP Gel兼具高经皮渗透效率和皮肤滞留量, 是适合水溶性药物经皮给药的递送系统。

如图6B所示, 给药12 h后, Rh B组红色荧光最弱, Rh B + DiO/PL-EVLP组红色荧光略有加强。经PL-EVLP负载后, Rh B@DiO/ PL-EVLP的渗透显著加深且局部Rh B含量提高, Rh B@DiO/PL-EVLP Gel组红色荧光与之相近, 绿色荧光分布更广, 提示凝胶既能增强药物的经皮渗透, 又能提升药物在皮肤中的保留能力, 与体外透皮实验结果相一致。

10 小鼠皮肤外观、体重及皮肤含水量的变化

局部或口服VE均可发挥抗氧化特性[19,20], 故选择VE作为阳性对照。初始阶段, 小鼠皮肤光滑且富有弹性, 经7天*D*-半乳糖皮下注射造模后, 皮肤出现轻微皱纹。造模42天后, 衰老模型组小鼠的皮肤局部出现皱纹, 缺乏弹性和光泽, 皮肤含水量降至65.66%; VE组和PF@PL-EVLP Gel组小鼠的状态较好, 皮肤色泽与弹性均明显改善, 皮肤含水量分别为69.73%和69.01%, 与空白对照组无差异。上述结果表明, 经皮涂抹PF@PL-EVLP Gel可改善皮肤外观, 有效提高皮肤的保水能力, 减少水分散失。与衰老模型组相比, PF@PL-EVLP Gel组小鼠的体重增加量明显提升, 小鼠体重增长速度与正常对照组基本一致, 提示凝胶制剂的涂抹干预,

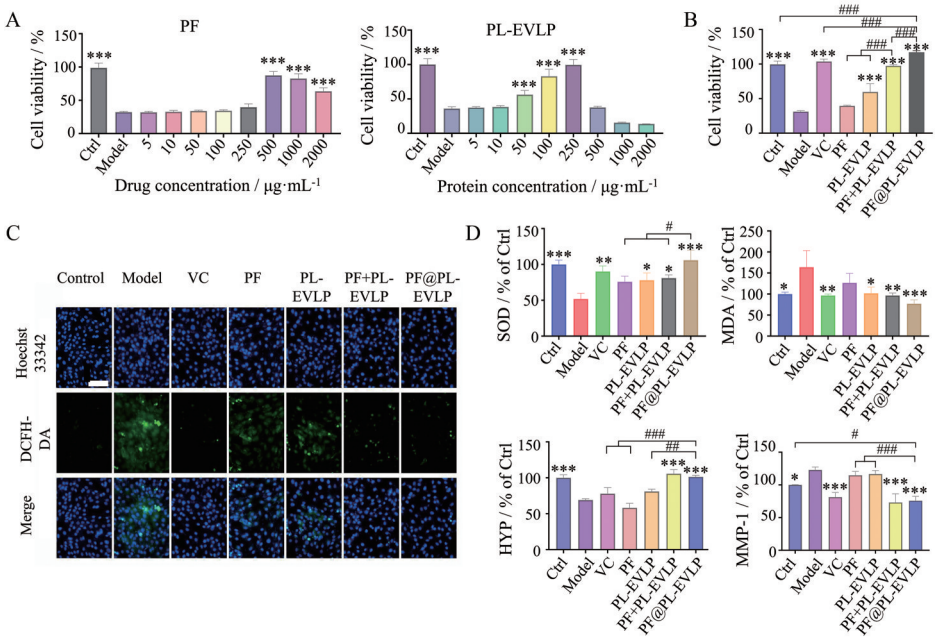


Figure 5 Results on the protective effect of CCC-ESF-1 cells against oxidative damage. A: Effect of PF and PL-EVLP on cell viability; B: Effect of each formulation on cell viability; C: Intracellular ROS levels after treatment with different formulations (Scale bar = 100 μm); D: Changes in SOD, MDA, HYP and MMP-1 contents in the CCC-ESF-1 oxidative-stress model. n = 5 (A, B), 3 (D), $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* model; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.0001$. ROS: Reactive oxygen species; SOD: Superoxide dismutase; MDA: Malondialdehyde; HYP: Hydroxyproline; MMP-1: Matrix metalloproteinase-1

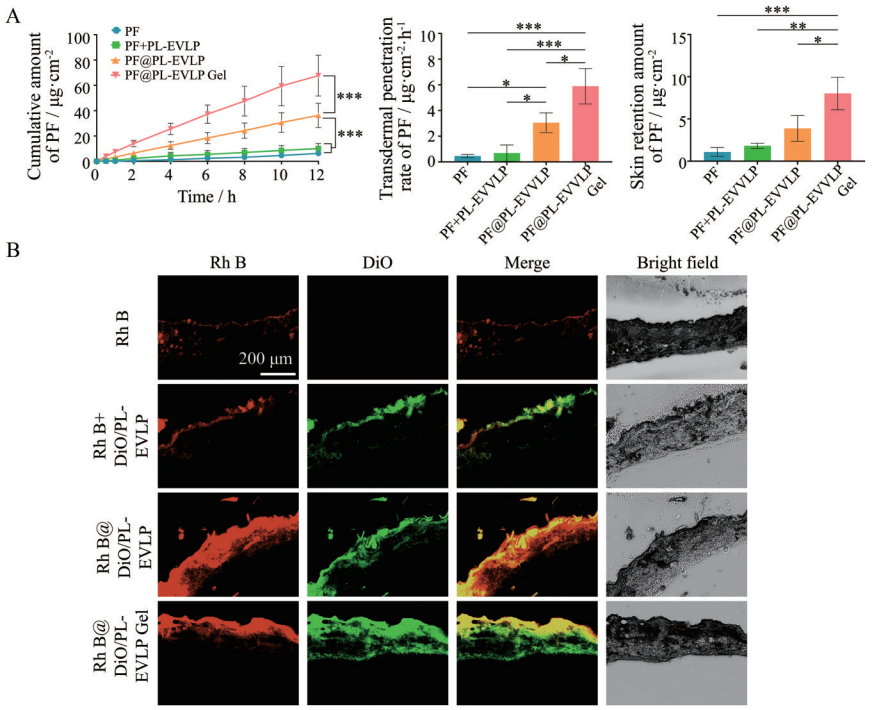


Figure 6 The transdermal results of PF@PL-EVLP and PF@PL-EVLP Gel *in vitro*. A: *In vitro* cumulative transdermal penetration profiles, transdermal flux, and skin retention. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; B: Fluorescence micrographs of transdermal delivery (Vertical section, ×10)

可改善衰老小鼠体重下降的现象 (表3)。

11 小鼠皮肤组织形态学变化

与空白对照组相比, 衰老模型组皮肤的表皮粗糙且厚度明显降低, 表皮、真皮厚度分别下降约34%、33%。在皮肤衰老环境中, 氧化应激可能加速胶原蛋白降解, 导致皮肤变薄。各干预组均抑制皮肤变薄, 其

Table 3 Average body weight change in mice. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$ *vs* model; $^{\triangle}P > 0.05$ *vs* blank. VE: Vitamin E

Group	Pre-experiment body weight/g	Post-experiment body weight/g	Body mass increment/g
Blank	36.65 ± 2.79	52.92 ± 4.74	16.27 ± 3.11*
Model	33.50 ± 1.81	45.77 ± 2.45	12.27 ± 1.39
VE	34.02 ± 1.72	48.30 ± 3.19	14.28 ± 2.08
PF	34.38 ± 1.40	47.62 ± 3.18	13.23 ± 2.16
PL-EVLP	35.08 ± 1.50	48.78 ± 3.58	13.70 ± 2.27
PF@PL-EVLP	34.02 ± 0.77	47.85 ± 2.37	13.83 ± 2.12
PF@PL-EVLP Gel	35.23 ± 1.22	51.47 ± 1.96	16.23 ± 1.65$^{*\triangle}$

中 PF@PL-EVLP Gel 可使表皮、真皮厚度恢复至与空白对照组基本无差异, 效果优于 PF、PL-EVLP 及 PF@PL-EVLP (图 7B、表 4)。提示凝胶能够有效提高药物局部浓度, 延长药物在表皮层和真皮层的滞留时间, 有助于药物发挥抗皮肤衰老作用, 与经皮渗透特性研究结果相一致。

如图 7C 所示, Masson 染色后, 胶原纤维呈蓝色, 肌纤维、纤维素和红细胞呈红色。正常小鼠的真皮层胶原纤维粗细适中, 排列紧密有序, 胶原纤维比例为 (69.20 ± 2.23)%; 衰老小鼠真皮层的胶原纤维, 排列杂乱疏松且存在缺失, 胶原纤维比例由 (69.20 ± 2.23)% 降至 (47.45 ± 3.45)%, 说明 *D*-半乳糖会破坏皮肤中胶原纤维的结构, 导致其含量下降, 从而引起皮肤衰老。PF、PL-EVLP、PF@PL-EVLP、VE 和 PF@PL-EVLP Gel 组小鼠皮肤中的胶原纤维比例均有不同程度的回升; 后两者可使皮肤中胶原纤维含量基本恢复正常, 且

Table 4 Measurement of epidermal and dermal thickness and skin collagen fiber proportion in mice. $n = 6$, $\bar{x} \pm$ s. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* model

Group	Epidermal thickness/μm	Dermal thickness/μm	Relative collagen fiber area fraction/%
Blank	38.68 ± 9.75**	702.00 ± 52.10***	69.20 ± 2.23***
Model	25.73 ± 3.34	467.03 ± 29.72	47.45 ± 3.45
VE	50.08 ± 7.68***	785.75 ± 52.55***	64.08 ± 5.01***
PF	26.55 ± 2.44	504.05 ± 21.66	50.38 ± 4.15
PL-EVLP	29.68 ± 3.70	576.58 ± 50.95**	59.99 ± 2.42***
PF@PL-EVLP	32.45 ± 3.59	630.38 ± 49.55***	65.08 ± 3.50***
PF@PL-EVLP Gel	38.37 ± 3.42**	714.65 ± 54.75***	75.98 ± 3.72***

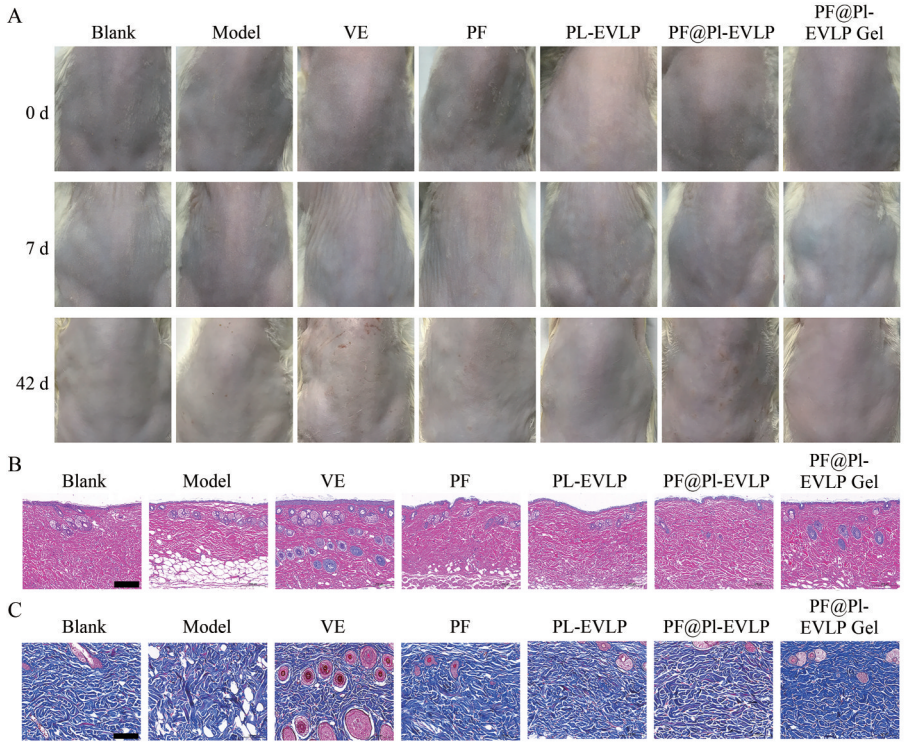


Figure 7 Cutaneous alterations in mice. A: Macroscopic morphological changes in mouse skin; B: Microarchitecture of H&E-stained dorsal skin (× 100, Scale bar = 200 μm); C: Microarchitecture of Masson-trichrome-stained dorsal skin (× 200; Scale bar = 100 μm). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

PF@PL-EVLP Gel组的皮肤排列更紧密整齐, 具有更优的胶原纤维保护效果。

12 小鼠抗氧化 (皮肤、血清) 及胶原蛋白 (皮肤) 相关生化指标变化

如图8A、B所示, 与正常小鼠相比, 衰老小鼠皮肤中T-AOC、CAT、SOD、HYP、TIMP-1含量均显著降低, MDA、MMP-1含量升高, 血清中SOD降低、MDA升高, 说明*D*-半乳糖会使小鼠皮肤中的抗氧化酶活性降低, 脂质过氧化产物增加, 加速胶原蛋白的降解, 导致体内自由基过剩, 引起氧化应激, 并可能对机体的整体氧化应激水平造成影响, 共同加速皮肤衰老。

PF@PL-EVLP Gel对小鼠各指标的改善效果最为显著: 一方面, 通过提高抗氧化酶含量, 清除体内多余自由基, 降低皮肤的氧化损伤; 另一方面, 通过提高皮肤中TIMP-1的含量, 使皮肤中MMP-1的含量维持在较低水平, 减少胶原蛋白的分解, 共同作用延缓皮肤衰老。此外, PF@PL-EVLP Gel亦可显著提升小鼠血清SOD含量, 降低MDA含量, 说明凝胶能够有效增强机体抗氧化能力, 减轻氧化损伤程度。

13 皮肤组织中BAX、Bcl-2的含量变化

BAX和Bcl-2是调控细胞凋亡的关键蛋白, BAX属于促凋亡蛋白, Bcl-2属于抗凋亡蛋白, 通常用BAX/Bcl-2比值来衡量细胞凋亡的倾向性[21]。衰老过程中, 氧化应激水平的提高会直接上调BAX/Bcl-2[22], 促进皮肤细胞的凋亡, 导致皮肤变薄、屏障功能下降和修复能力减弱, 加速皮肤衰老。衰老皮肤BAX/Bcl-2比值升高, 凋亡增强。PF、PL-EVLP和VE干预对凋亡蛋白的表达均无显著影响; PF@ PL-EVLP和PF@PL-EVLP Gel显著下调BAX, 使BAX/Bcl-2比值恢复至正常水平 (图8C～E)。推测PF@PL-EVLP Gel可能通过抑制BAX表达, 导致BAX/Bcl-2比值下降, 发挥抗凋亡能力, 延缓皮肤衰老。

讨论

皮肤衰老会显著降低生活舒适度和质量, 因此, 延缓皮肤衰老、维持皮肤的年轻化状态有重要意义。在

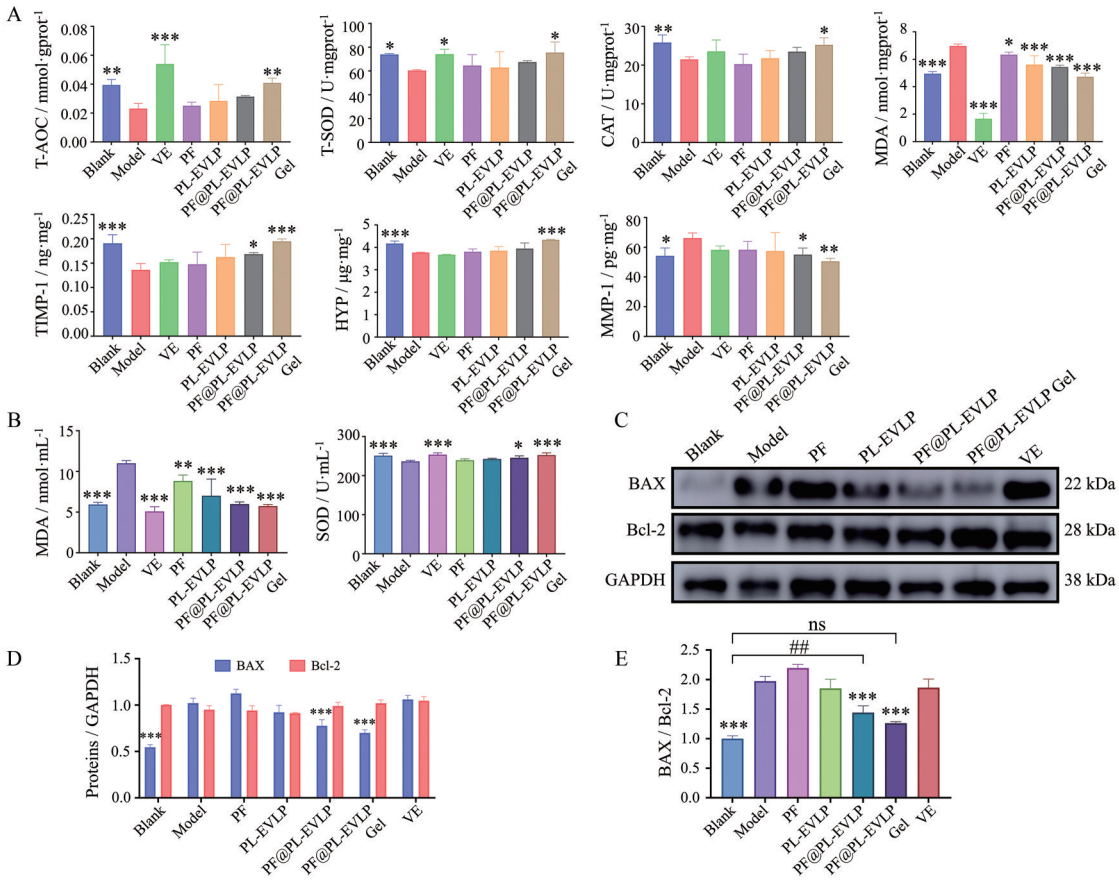


Figure 8 Biochemical analysis of mouse skin and serum and expression of related proteins in skin of KM mice. A: Determination of T-AOC, CAT, SOD, MDA, TIMP-1, HYP and MMP-1 levels in murine dorsal skin homogenates; B: Determination of MDA and SOD levels in murine serum; C: Representative Western blot images; D: Densitometric quantification of BAX and Bcl-2 expression in dorsal skin; E: Ratio of BAX to Bcl-2 abundance. n = 6 (A, B), 3 (D, E), $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* model; $^{\#\#}P < 0.01$. T-AOC: Total antioxidant capacity; CAT: Catalase; TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase

抗皮肤衰老方面, 经皮给药是最优的药物递送途径。芍药苷具有多种药理活性, 可改善多种衰老相关疾病。但其经皮渗透性能不佳等问题, 制约了在抗皮肤衰老方面的应用。

P-EVs的脂质双分子层可通过疏水作用嵌合脂溶性药物, 而亲水性药物则主要滞留于内腔; 后者与膜相互作用弱, 易在制备及贮存阶段泄漏, 故其封装效率通常低于亲脂性药物[23]。与人工合成载体相比[11], 本研究构建的PF@PL-EVLP虽包封率略低, 却呈现较高载药量。效率下降可归因于天然膜结构的渗透屏障, 然而同源特性赋予PL-EVLP“药载一体”协同优势, 既增强膜亲和性, 又提升递药潜能。近期研究亦证实, 甘草来源外囊泡样颗粒负载甘草查尔酮可显著改善生物利用度与药效[24], 进一步佐证同源P-EVs在构建中药纳米递药系统中的可行性与前景。

本文所构建的PF@PL-EVLP Gel可显著提高PF的局部皮肤滞留量和经皮渗透效率。同时防止衰老小鼠的皮肤变薄, 增加小鼠皮肤中的胶原纤维比例; 并可不同程度地提高小鼠皮肤组织T-AOC、CAT、SOD、HYP、TIMP-1含量及血清中SOD含量, 减少皮肤组织MDA、MMP-1含量及小鼠血清中MDA含量, 减轻皮肤氧化损伤程度; 可通过下调BAX的表达, 抑制皮肤细胞凋亡, 发挥抗皮肤衰老作用。综上, 本研究以中药来源的芍药细胞外囊泡包载芍药苷并制成水凝胶体系, 既提高了中药活性成分的抗皮肤衰老效果, 又提高了制剂的稳定性, 为基于中药细胞外囊泡的新型经皮给药系统的进一步开发利用提供了新的思路和实验基础。

P-EVs作为新兴纳米载体, 凭借低免疫原性、高稳定性、低成本及可扩展生产优势, 已展现出优于哺乳动物细胞外囊泡的递送潜能; 其固有生物学特性或表面功能化修饰均可实现药物的安全高效包载[25]。然而, 统一分离标准的缺位导致批次间差异显著, 亟需从分子组成、结构及作用机制等多维度建立表征规范。迈向临床应用的关键在于开发可重复、可放大且工艺友好的药物装载平台。现有共孵育、超声、挤出、脂质体膜融合、冻融循环、渗透休克与电穿孔等策略封装效率差异显著, 需依据药物理化性质与递送目标综合优选。因此, 构建高效、标准化的新型载药技术体系是推动P-EVs递送系统发展的重要环节。

总之, 目前对P-EVs的生理特性、递送活性分子和靶向功能的认识还相对有限, 且其生物学性质和转运机制仍需更全面和深入的研究。但P-EVs作为一种天然新型纳米载体, 在药物递送领域有不容忽视的开发潜力。

作者贡献: 杨嘉怡负责实验设计、实施、论文撰写; 李珮欣参与药物制剂、动物实验; 艾鑫仪参与实验数据分析、实验设计; 张永太参与实验指导; 郭腾、冯年平负责指导实验设计和组织实施。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Tobin DJ. Introduction to skin aging [J]. J Tissue Viability, 2017, 26: 37-46.

[2] Baker P, Huang C, Radi R, et al. Skin barrier function: The interplay of physical, chemical, and immunologic properties [J]. Cells, 2023, 12: 2745.

[3] Victorelli S, Lagnado A, Halim J, et al. Senescent human melanocytes drive skin ageing *via* paracrine telomere dysfunction [J]. EMBO J, 2019, 38: e101982.

[4] Csekes E, Račková L. Skin aging, cellular senescence and natural polyphenols [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 12641.

[5] Li NN, Zhang K. Research progress on the metabolomics-based study of deficiency-nourishing herbs and interior-warming herbs [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2021, 36: 5409-5415.

[6] Wang Q, Li LT, Ma YB, et al. Comparative study on chemical composition and pharmacological action of Radix Paeoniae alba and Radix Paeoniae rubra and predictive analysis of quality markers [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2021, 30: 1093-1098.

[7] Lu YS, Yin L, Yang W, et al. Antioxidant effects of paeoniflorin and relevant molecular mechanisms as related to a variety of diseases: A review [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 176: 116772.

[8] Mao LL, Chen J, Cheng K, et al. Nrf2-dependent protective effect of paeoniflorin on α-naphthalene isothiocyanate-induced hepatic injury [J]. Am J Chin Med, 2022, 50: 1331-1348.

[9] Xiao Y, Wei Q, Du L, et al. *In vitro* evaluation and *in situ* intestinal absorption characterisation of paeoniflorin nanoparticles in a rat model [J]. RSC Adv, 2024, 14: 22113-22122.

[10] Wang D, Yang F, Shang W, et al. Paeoniflorin-loaded pH-sensitive liposomes alleviate synovial inflammation by altering macrophage polarity *via* STAT signaling [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101: 108310.

[11] Liu LL, Shi TN, Fang L, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of total alkaloids of Strychni Semen-total glucosides of paeony lipid-based cubic liquid crystalline nanoparticles [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 4076-4083.

[12] Chattopadhyay S, Goswami A, Sil M. Nanobiotechnology: Traditional re-interpreting personalized medicine through targeted therapies and regenerative solutions [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2025, 398: 10025-10048.

[13] Xiao J, Feng SY, Wang X, et al. Identification of exosome-like

nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables [J]. PeerJ, 2018, 6: e5186.

[14] Baldini N, Torreggiani E, Roncuzzi L, et al. Exosome-like nanovesicles isolated from *Citrus limon* L. exert antioxidative effect [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2018, 19: 877-885.

[15] Zhuang X, Deng ZB, Mu J, et al. Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage [J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4: 28713.

[16] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37: 911-917.

[17] Morales H, Di Sciascio F, Aguirre-Zapata E, et al. Crystallization process in the sugar industry: A discussion on fundamentals, industrial practices, modeling, estimation and control [J]. Food Eng Rev, 2024, 16: 441-469.

[18] Li SM, He FJ, Qin LX, et al. Preparation and properties of extracellular vesicle-like nanoparticles from medicinal and edible plants [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2021, 56: 2086-2092.

[19] Pincemail J, Meziane S. On the potential role of the antioxidant couple vitamin E/selenium taken by the oral route in skin and hair health [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11: 2270.

[20] Draelos Z, Bogdanowicz P, Saurat JH. Top weapons in skin aging and actives to target the consequences of skin cell senescence [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2024, 38: 15-22.

[21] Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2 [J]. Science, 1997, 277: 370-372.

[22] Park C, Lee H, Jin S, et al. The preventive effect of loganin on oxidative stress-induced cellular damage in human keratinocyte HaCaT cells [J]. Biosci Trends, 2022, 16: 291-300.

[23] Ye YH, Chen KX, Xiong Y. Research progress of plant-derived extracellular vesicles and their application in drug delivery systems [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2026, 61: 147-156.

[24] Ning JT, Deng X, Chen L, et al. Construction and *in vitro* anti-inflammatory evaluation of a drug-loaded one-piece licorice exocyst-like particle-loaded licorice chalcone A nano-delivery system [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2025, 60: 1147-1155.

[25] Liu YJ, Wang HJ, Zhang JB, et al. Research progress of plant-derived extracellular vesicles as drug carriers [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2025, 60: 721-730.