一种基于 5- 氨基酮戊酸己酯立方液晶的光动力治疗纳米凝胶的制备

曾令军，卿洪都，柯月娇，周　欣*

（联勤保障部队第九〇〇医院药剂科，福建福州 350025）

摘要：该研究以 5- 氨基酮戊酸己酯（**1**）为模型药物，采用超声法制备用于光动力治疗的立方液晶（**1**-Cubs）纳米制剂。以粒径、PDI 为评价指标，优化了超声功率、超声时间、单油酸甘油酯（GMO）与泊洛沙姆 407（F127）的质量比、载体（GMO 与 F127 总和）与药物的质量比、药物浓度。考察了优化所得的 **1**-Cubs 在 635 nm 激光辐照下对人表皮癌细胞（A431 细胞）存活率和 ROS 含量的影响。然后，以 SD 大鼠为模型，累积渗透量和皮肤滞留量为评价指标，考察制品的皮肤渗透行为。结果表明，在超声功率 400 W、超声时间 15 min、GMO 与 F127 质量比 4 ∶ 1、载体与药物质量比 5 ∶ 1、药物浓度 1%时，所得的 **1**-Cubs 能在细胞水平上显著提高 **1** 的 PDT 疗效和 ROS 产量。基于 HPMC 制得的 **1**-Cubs（粒径小于 200 nm）纳米凝胶对 SD 大鼠也具有较优的皮肤渗透性，有望成为一种优良的光动力治疗外用制剂。

关键词：5- 氨基酮戊酸己酯；立方液晶；光动力治疗；经皮渗透；纳米凝胶

中图分类号：R730.57；R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)06-0820-09

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.06.012

Preparation of a Photodynamic Therapy Nanogel Based on Hexaminolevulinate Cubosomes

ZENG Lingjun, QING Hongdu, KE Yuejiao, ZHOU Xin*

(*900 Hospital of the Joint Logistics Team, Fuzhou 350025*)

ABSTRACT: With hexaminolevulinate (**1**) as a model drug, the nano cubosomes of **1** (**1**-Cubs) for photodynamic therapy (PDT) were prepared by ultrasonication in this study. With particle size and PDI as evaluation indexes, ultrasonic power, ultrasonic time, mass ratio of glycerol monooleate (GMO) to poloxamer 407 (F127), mass ratio of carrier (the total amount of GMO and F127) to drug, and drug concentration were optimized. The effect of the optimal **1**-Cubs on the survival rate and ROS content of human epidermal cancer cells (A431 cells) under 635 nm laser irradiation was investigated. Then, the skin permeation behaviors of the products were investigated with SD rats as models, and the cumulative transdermal penetration amount and skin retention amount as evaluation indicators. The results showed that the **1**-Cubs prepared at ultrasonic power of 400 W, for 15 min, in a 4 ∶ 1 mass ratio of GMO to F127 , in a 5 ∶ 1 mass ratio of carrier to drug, and drug concentration of 1% had a significant PDT efficacy and ROS production at the cellular level. The **1**-Cubs (with the particle size of less than 200 nm) based nanogel with HPMC as the gel matrix also had better skin permeability to SD rats, which was expected to become an excellent topical preparation for PDT.

Key Words: hexaminolevulinate; cubosome; photodynamic therapy; transdermal penetration; nanogel

光敏剂是影响光动力治疗（photodynamic therapy，PDT）临床疗效的关键因素[1]。5- 氨基酮戊酸（aminolevulinic acid，ALA）为国内唯一上市的外用光敏剂，在体内通过转化为具有强光敏活性的原卟啉Ⅸ（protoporphyrin Ⅸ，Pp Ⅸ）而发挥作用。但 ALA 亲水性极强、脂溶性低（log*P* 为 －1.5）、透

收稿日期：2023-11-29

基金项目：福建省自然科学基金项目（2022J011092、2021J011268）

作者简介：曾令军（1989—），男，硕士，副主任药师，从事药物制剂与质量分析研究。

通信作者：周　欣（1977—），女，硕士，副主任药师，硕士生导师，从事药物新剂型与制剂新技术的研究。

E-mail：fzzyyg@163.com

皮吸收差，临床使用浓度为20%水溶液；且ALA不稳定，需现配现用。

5-氨基酮戊酸己酯（hexaminolevulinate，HAL，**1**）为ALA的酯类衍生物，在细胞内通过内酯酶代谢而转换成ALA，再经历与ALA相同的途径发挥光毒性作用。研究[2]表明，相比于ALA，**1**具有更高的PpⅨ产率；细胞试验中，在达到相同的PpⅨ产率时，**1**的浓度约为ALA的1/10。此外，相较于ALA，**1**亲水性较弱，脂溶性（log*P* 1.55）较大，具有更高的透皮属性[3]。因此，选择**1**作为光敏剂有望获得更优的PDT疗效。

本课题组前期基于立方液晶（cubosomes）载体进行了大量研究；国内外诸多研究[4—6]亦表明，立方液晶可显著改善药物的经皮渗透性。因此，本研究将**1**制成基于立方液晶（**1**-Cubs）的纳米凝胶，有望能进一步提高**1**的皮肤渗透性，增强PDT疗效。

1 仪器与试药

AL204型电子天平［梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司］；JY92-IIN型超声波细胞破碎仪（宁波新芝生物科技股份有限公司）；Zetasizer Lab型纳米粒度及电位分析仪（英国马尔文仪器有限公司）；1200型高效液相色谱仪（美国Agilent公司，配备G1321A型荧光检测器）；JEM2100F型透射电镜（日本JEOL公司）；EasyCell型流式细胞仪（深圳唯公科技有限公司）；IX73型荧光显微镜（日本奥林巴斯公司）；TK-20B型透皮扩散试验仪（上海锴凯科技贸易有限公司）；PSU-III-LED型激光器（长春新产业光电技术有限公司）。

1（上海源叶生物科技有限公司，纯度>98%，批号X08J11H107813）；单油酸甘油酯（glyceryl monooleate，GMO）和泊洛沙姆407（F127）均购自德国巴斯夫公司；黄原胶（xanthan gum，XG，购自淄博中轩生化有限公司）；壳聚糖（chitosan，CS，脱乙酰度≥85%，济南海得贝海洋生物工程有限公司）；HPMC（规格K100LV）和羧甲纤维素钠（sodium carboxymethylcellulose，CMC-Na）（安徽山河药用辅料股份有限公司）；甲醇、乙腈均为色谱纯，水为超纯水，其余试剂为分析纯。

人表皮细胞癌（A431细胞，上海中乔新舟生物科技有限公司）。

SD大鼠，（250±10）g，雄性，购自上海吉辉实验动物饲养有限公司，动物生产许可证号SCXK（沪）2017-0012，动物使用许可证号SYXK（闽）2018-0006。动物试验已获联勤保障部队第九〇〇医院伦理委员会批准，伦理审批号2020-004。

2 方法与结果

2.1 **1**含量的HPLC-荧光测定法

2.1.1 溶液的制备

对照品贮备液：精密称取**1**约15 mg，用甲醇适量溶解并稀释至质量浓度为300 μg/mL，即得。

含药透皮接受液：取含药透皮接受液，离心（1 000×*g*）5 min，取上清液，即得。

空白透皮接受液：取空白立方液晶的经透皮试验样品，照上述“含药透皮接受液”同法处理，即得。

2.1.2 柱前荧光衍生化方法

采用本课题组前期优化方法[7]配制荧光胺丙酮溶液和硼酸缓冲液，在定量测定前对样品进行衍生化处理，以提高**1**的检测灵敏度。具体如下。

荧光胺丙酮溶液：取荧光胺适量，用丙酮溶解并制成0.1%的浓度，即得。

硼酸缓冲液：精密称取硼酸1.02 g和十水四硼酸钠0.92 g，加水200 mL使其溶解，摇匀，即得。

衍生化方法：取待衍生化样品溶液100 μL、0.1%荧光胺丙酮溶液100 μL、硼酸缓冲液300 μL，置同一离心管中，涡旋混合，室温反应5 min，然后离心（10 000×*g*）5 min，取上层液体测定。

2.1.3 色谱条件

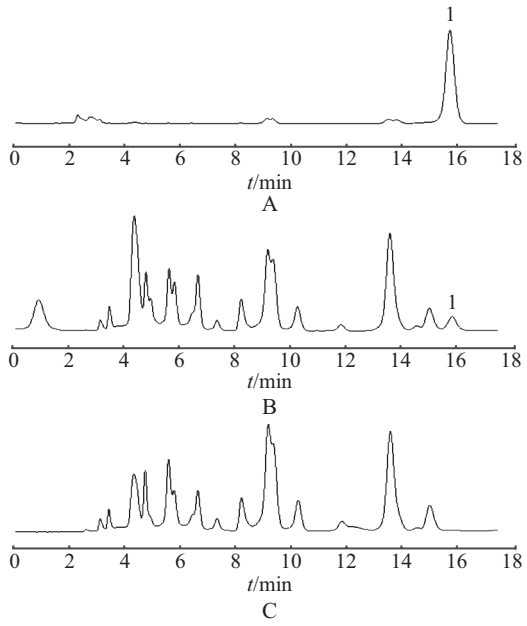
色谱柱 Agilent 5 HC-C_{18}（2）柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；*流动相* 乙腈和0.1%三氟乙酸溶液（体积比33∶67）；*激发波长* 398 nm；*发射波长* 480 nm；*流速* 1.0 mL/min；*柱温* 40 ℃；*进样量* 5 μL。

2.1.4 系统适用性与专属性试验

取**1**对照品溶液、含药透皮接受液、空白透皮接受液，照“**2.1.2**”项下方法衍生化，再照“**2.1.3**”项下色谱条件测定，结果如图1所示。结果表明，空白透皮接受液色谱图中在**1**出峰位置未见相应色谱峰，表明本法专属性良好。

2.1.5 线性关系、精密度及回收率试验

取**1**对照品贮备液，用接受液（生理盐水）逐



A—**1** 对照品溶液（75.0 μg/mL）；B—含药透皮接受液；C—空白透皮接受液。

1—**1**。

图 1　典型 HPLC 色谱图

Fig.1　Typical HPLC Chromatograms

步稀释，制得质量浓度分别为 4.69、18.75、37.5、75.0、150.0 μg/mL 的对照品溶液，照“**2.1.2**”和“**2.1.3**”项下方法处理及测定。以 **1** 质量浓度 *c* 为横坐标、峰面积 *A* 为纵坐标，进行线性回归，得标准曲线方程为 *A*=1.578 8*c*+1.327 5（*r*=0.999 7），表明 **1** 质量浓度在 4.69 ～ 300.0 μg/mL 与峰面积线性关系良好。取 **1** 对照品溶液（75.0 μg/mL），连续进样 6 次，结果峰面积的 RSD 为 0.65%，表明本方法精密度良好。取 **1** 对照品适量，置 25 mL 量瓶中，用接受液溶解并定容，测得平均回收率为 97.88%（*n*=6），RSD 为 1.77%，表明本方法回收率良好。

2.2　1-Cubs 制备工艺及处方的优化

2.2.1　超声功率

采用超声法制备 **1**-Cubs。取加热融化的 GMO 208.33 mg，作为油相；取 F127 41.67 mg 和 **1** 25 mg，加水适量（使油相和水相的总质量为 2.5 g），搅拌溶解，作为水相；于磁力搅拌（1 000 r/min，25 ℃）下将油相逐滴加入水相中，持续搅拌 30 min；然后置超声波细胞破碎仪中进行超声处理（超声 2 s，停 2 s，共 15 min），考察超声功率（100、200、300、400、500 W）对制得 **1**-Cubs 粒径的影响，结果如表 1 所示。可见，随超声功率的增大，**1**-Cubs 粒径逐渐减小，功率大于 400 W 后粒径变化不明显。本试验设计的 **1**-Cubs 粒径应小于 200 nm，以利于经皮渗透。因此，超声功率选择为 400 W。

表 1　超声功率对 1-Cubs 粒径的影响（$\bar{x}\pm s$，*n*=3）

Tab.1　Effect of Ultrasonic Power on Particle Size of **1**-Cubs（$\bar{x}\pm s$, *n*=3）

功率 /W	粒径 /nm	PDI
100	776.67±17.96	0.10±0.08
200	258.27±3.81	0.26±0.09
300	159.57±4.93	0.10±0.04
400	118.87±2.70	0.08±0.01
500	112.67±3.02	0.06±0.01

2.2.2　超声时间

在超声功率 400 W、其他条件同“**2.2.1**”项的条件下制备纳米粒，考察超声时间（5、10、15、20 min）对粒径的影响，结果如表 2 所示。可见，随超声时间的增加，制得的 **1**-Cubs 粒径逐渐变小，在超声时间为 15 min 时粒径最小；继续增加超声时间，粒径反而变大，提示过长时间的超声反而会破坏已形成的纳米粒结构。因此，超声时间确定为 15 min。

表 2　超声时间对 1-Cubs 粒径的影响（$\bar{x}\pm s$，*n*=3）

Tab.2　Effect of Ultrasonic Time on Particle Size of **1**-Cubs（$\bar{x}\pm s$, *n*=3）

超声时间 /min	粒径 /nm	PDI
5	535.10±66.93	0.75±0.09
10	182.20±6.88	0.22±0.02
15	118.87±2.70	0.08±0.01
20	283.37±1.95	0.13±0.11

2.2.3　GMO/F127 质量比

在上述优化的基础上，固定 GMO 与 F127 质量之和为 250 mg，考察 GMO 与 F127 质量比（10 ∶ 1、8 ∶ 1、6 ∶ 1、5 ∶ 1、4 ∶ 1、2 ∶ 1、1 ∶ 1）对 **1**-Cubs 粒径的影响，结果如表 3 所示。可见，随 GMO 与 F127 质量比的增加，粒径呈先减小后增加的趋势，当 GMO 与 F127 质量比为 4 ∶ 1 时粒径最小。F127 为制备立方液晶纳米制剂时常用的稳定剂；在一定范围内，随 F127 用量的增加，制得纳米粒的粒径逐

渐减小，但并不是 F127 比例越大，制品的粒径就越小。本试验中，GMO 与 F127 质量比确定为 4 ∶ 1。

表 3 GMO 与 F127 质量比对 1-Cubs 粒径的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Effect of Mass Ratio of GMO to F127 on Particle Size of **1**-Cubs ($\bar{x}\pm s$, n=3)

GMO 与 F127 质量比	粒径 /nm	PDI
10 ∶ 1	256.43±2.33	0.22±0.01
8 ∶ 1	141.17±3.57	0.01±0.01
6 ∶ 1	127.53±4.46	0.14±0.01
5 ∶ 1	118.87±2.70	0.08±0.01
4 ∶ 1	100.15±5.11	0.05±0.04
2 ∶ 1	134.03±6.71	0.26±0.01
1 ∶ 1	249.43±13.06	0.13±0.02

2.2.4 载体与药物的质量比

在上述优化的基础上，考察载体（即 GMO 与 F127 的总和）与药物质量比（30 ∶ 1、20 ∶ 1、10 ∶ 1、5 ∶ 1）对 **1**-Cubs 粒径的影响，结果如表 4 所示。可见，载体与药物质量比对 **1**-Cubs 粒径的影响无明显规律，选择 5 ∶ 1 具有较低的使用成本。

表 4 载体与药物质量比对 1-Cubs 粒径的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4 Effect of Mass Ratio of Carrier to Drug on Particle Size of **1**-Cubs ($\bar{x}\pm s$, n=3)

载体与药物质量比	粒径 /nm	PDI
30 ∶ 1	119.67±3.16	0.09±0.02
20 ∶ 1	91.11±2.27	0.07±0.01
10 ∶ 1	100.15±5.11	0.05±0.04
5 ∶ 1	95.43±1.56	0.17±0.02

2.2.5 药物浓度

在上述优化的基础上，考察药物浓度分别为 1%、2%、3% 时所得 **1**-Cubs 的粒径，结果如表 5 所示。可见，在受试范围内所得 **1**-Cubs 的粒径均小于 100 nm；药物浓度越大，制得的 **1**-Cubs 粒径越小。推测是 **1** 结构中同时具有亲水和亲油基团，可能会起到一定的表面活性作用，降低了油相 GMO 的表面张力，从而在高浓度下得到粒径更小的纳米粒。

2.2.6 工艺验证

综上所述，**1**-Cubs 的优化处方和工艺参数如下：药物浓度 1%，载体与药物质量比 5 ∶ 1，GMO 与 F127 质量比 4 ∶ 1，超声功率 400 W，超声时间 15 min。在此条件下制备 **1**-Cubs，各批次的制备量分别为 2.5、5.0、10.0、20.0 g，考察试验规模对 **1**-Cubs 粒径的影响，结果如表 6 所示。可见，当制备量为 2.5 g 时，制得纳米粒的粒径、PDI 与单因素考察时差异不大，具有较好的重复性；随制备量的增大，制得纳米粒的粒径有增大趋势，均一性也逐渐降低（PDI>0.2）。原因可能是某一超声功率可能只适用于一定范围的制备量，当制备量增大时超声功率可能也需要有所调整。

表 5 药物浓度对 1-Cubs 粒径的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.5 Effect of Drug Concentration on Particle Size of **1**-Cubs ($\bar{x}\pm s$, n=3)

药物浓度 /%	粒径 /nm	PDI
1	95.43±1.56	0.17±0.02
2	87.64±1.38	0.11±0.05
3	79.82±1.16	0.15±0.04

表 6 试验规模对 1-Cubs 粒径的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.6 Effect of Preparative Throughput on Particle Size of **1**-Cubs ($\bar{x}\pm s$, n=3)

制备量 /g	粒径 /nm	PDI
2.5	93.82±1.79	0.15±0.03
5.0	95.21±1.36	0.11±0.06
10.0	105.62±2.31	0.16±0.05
20.0	121.85±3.62	0.21±0.05

2.3 纳米粒形貌

取照优化工艺及处方制得的 **1**-Cubs 适量，用纯化水稀释后，吸附于碳膜镀层铜网上，用 1% 磷钨酸负染，置透射电镜下观察纳米粒形态，结果如图 2 所示。可见，制得的纳米粒呈球状，不粘连。

2.4 细胞水平的 PDT 疗效考察

将对数生长期的 A431 细胞接种于 96 孔板（每孔 1×10^4 个），置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中；培养 24 h 后，给予不同浓度（0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.1 mmol/L）的 **1** 水溶液或 **1**-Cubs；继续孵育 3.5 h，然后用 635 nm 激光器（3 mW/cm^2）照射 30 min。照射结束后，更换新鲜培养基，继续培养 24 h；然后采用 MTT 法测定并计算细胞存活率。结果（图 3）表明，**1**-Cubs 处理组的细胞存活率在 0.2 mmol/L 以

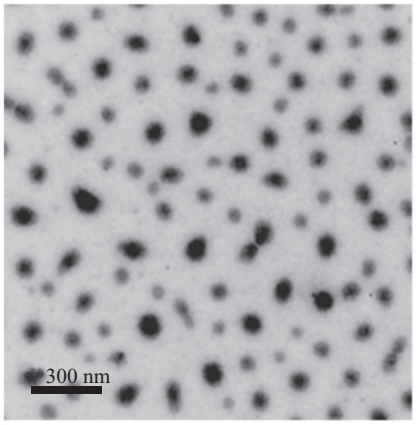
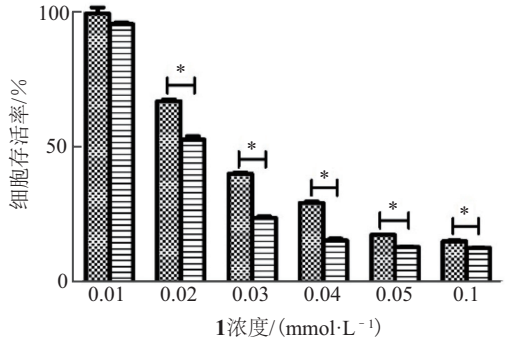


图 2　透射电镜照片（×5 000）
Fig.2　TEM Image（×5 000）

上的各个浓度下均小于 **1** 水溶液处理组，提示立方液晶载体可能促进了细胞对 **1** 的摄取，提高了 **1** 的细胞内浓度，从而提高了 **1** 的 PDT 疗效。

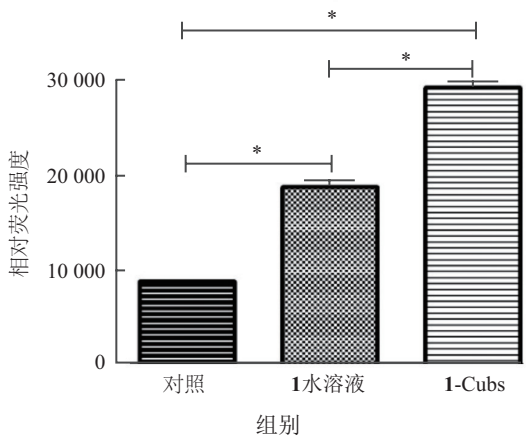


注：* 表示两组间结果有统计学差异（P<0.05）。

图 3　635 nm 激光辐照下 1-Cubs 对 A431 细胞存活率的影响（n=6）
Fig.3　Effect of **1**-Cubs on the Survival Rate of A431 Cells under 635 nm Laser Irradiation（n=6）

2.5　ROS 含量的测定

将 A431 细胞接种于 6 孔板（每孔 1×10^5 个），置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中；培养 24 h 后，加入样品溶液（**1** 水溶液或 **1**-Cubs），使 **1** 的终浓度均为 0.1 mmol/L。另设对照组（以培养基替代样品溶液）进行平行试验。各组孵育 4.0 h 后，洗去含药培养基，加入 2',7'- 二氯二氢荧光素二乙酸酯溶液（1 μmol/L，用无血清培养基配制）1 mL，置培养箱内孵育 30 min；然后用无血清培养基洗涤细胞 3 次，再用 635 nm 激光器（3 mW/cm^2）照射 30 min；用胰酶消化后收集细胞，用流式细胞仪测定。结果（图 4）表明，将 **1** 制成 **1**-Cubs 后，显著提高了 **1** 的 ROS 产量，这也可能是 **1**-Cubs 比 **1** 水溶液具有更高 PDT 疗效的原因之一。



注：* 表示两组间结果有统计学差异（P<0.05）。

图 4　ROS 产量测定结果（n=6）
Fig.4　Determination Results of ROS Production（n=6）

2.6　皮肤渗透性考察

基于本课题组前期建立的 ALA 皮肤渗透性考察方法 [7] 开展 **1** 相关皮肤渗透性研究。

累积渗透量：取处理好的大鼠腹部皮肤，固定在接受池上，角质层朝上，渗透面积 3.14 cm^2，加入接受液（生理盐水）7.8 mL（接受液总体积），排出气泡，置（32±1）℃、转速 400 r/min 的透皮扩散仪中，预平衡 30 min。于给药池中加入药物 1 g，分别于给药后 2、4 h 取出接受液 1 mL（及时补加同温新鲜接受液 1 mL），离心（5 000×g）5 min，上清液照“**2.1.2**”和“**2.1.3**”项下方法衍生化和测定，计算累积渗透量。

皮肤滞留量：透皮试验结束后剪去多余的外围皮肤，洗净皮肤上残留药物，剪碎，加入甲醇 20 mL，冰浴超声（500 W，超声 2 s，停 1 s，共 20 min），最后定容至 25 mL，摇匀，离心（5 000×g）5 min，取上清液照“**2.1.2**”和“**2.1.3**”项下方法衍生化和测定。

2.6.1　粒径对皮肤渗透性的影响

在优化处方及工艺的基础上，通过调整超声功率制得不同粒径的 **1**-Cubs[a 组：（261.10±

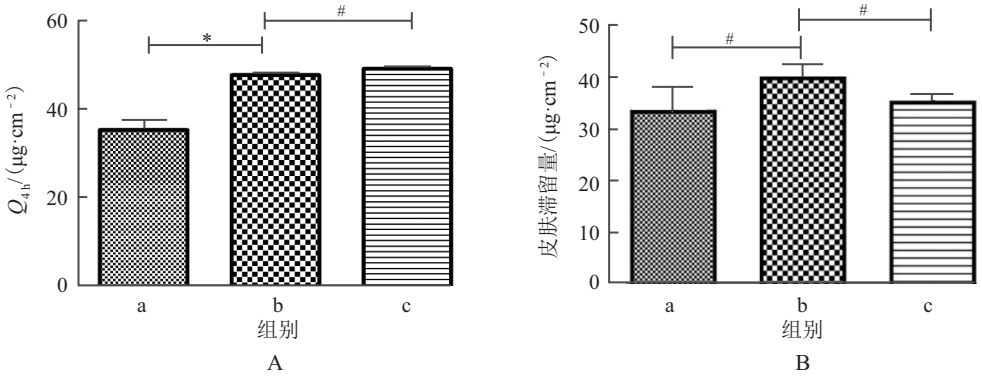
16.64)nm，b 组：(174.30±2.13)nm，c 组：(110.63±1.27)nm]，考察 **1**-Cubs 粒径对皮肤渗透性的影响，结果如图 5 所示。结果表明，b 组和 c 组的 4 h 累积渗透量（$Q_{4\,h}$）无明显差异，但均显著大于 a 组；而各组的皮肤滞留量差异不显著。综合累积渗透量及皮肤滞留量的结果可见，**1**-Cubs 粒径大于 200 nm 可能不利于药物的渗透，而粒径低于 200 nm 时对药物渗透性的影响可能不明显。

2.6.2 GMO 与 F127 质量比对皮肤渗透性的影响

在优化处方及工艺的基础上，制备 GMO 与 F127 质量比不同（8 ∶ 1、6 ∶ 1、4 ∶ 1、2 ∶ 1）的 **1**-Cubs，考察其皮肤渗透性，结果如图 6 所示。结果表明，GMO 与 F127 质量比越大，制品中 **1** 的累积渗透量越大；GMO 与 F127 的质量比对皮肤滞留量的影响则无明显规律，在 2 ∶ 1 时最小，其他各组间无统计学差异。综合累积渗透量和皮肤滞留量考虑，拟选择 GMO 与 F127 质量比为 8 ∶ 1。

2.6.3 载体与药物质量比对皮肤渗透性的影响

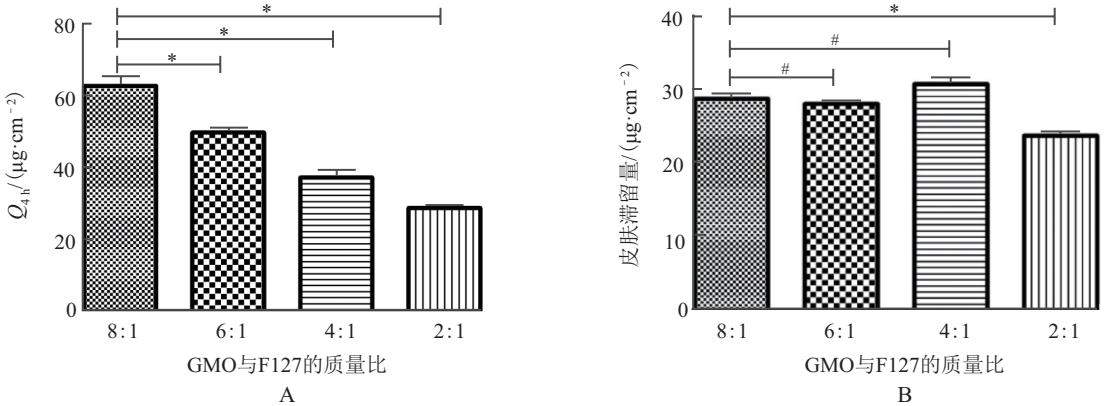
在优化处方及工艺的基础上，制备载体与药物质量比不同（30 ∶ 1、20 ∶ 1、10 ∶ 1、5 ∶ 1）的 **1**-Cubs，考察其皮肤渗透性，结果如图 7 所示。结果表明，载体与药物质量比为 20 ∶ 1、10 ∶ 1、5 ∶ 1



注：* 表示两组间结果有统计学差异（P<0.05）；# 表示两组间结果无统计学差异（P>0.05）。

图 5 1-Cubs 粒径对累积渗透量（A）和皮肤滞留量（B）的影响（n=3）

Fig.5 Effect of Particle Size of **1**-Cubs on the Cumulative Transdermal Penetration Amount (A) and Skin Retention Amount (B) (n=3)



注：* 表示两组间结果有统计学差异（P<0.05）；# 表示两组间结果无统计学差异（P>0.05）。

图 6 GMO 与 F127 质量比对累积渗透量（A）和皮肤滞留量（B）的影响（n=3）

Fig.6 Effect of Mass Ratio of GMO to F127 on the Cumulative Transdermal Penetration Amount (A) and Skin Retention Amount (B) (n=3)

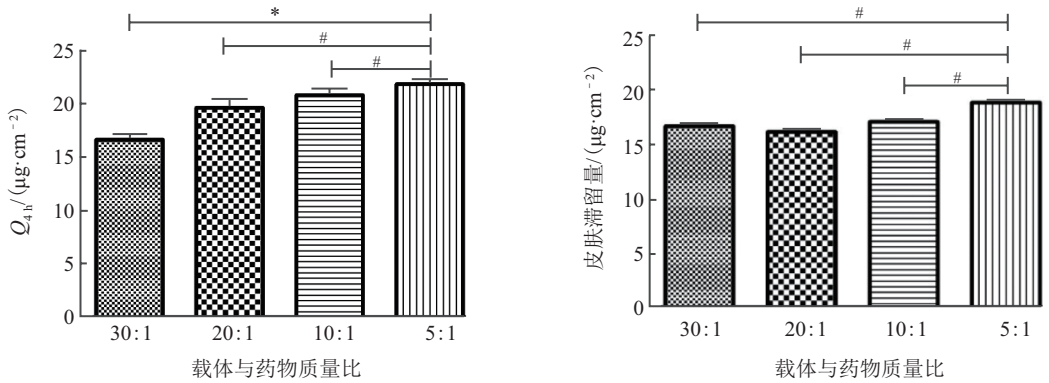
时累积渗透量较大，但相互间并无统计学差异；各组制品的皮肤滞留量无统计学差异。总体来看，载体与药物质量比为 5 ∶ 1 时的累积渗透量和皮肤滞留量均最高。

2.6.4 药物浓度对皮肤渗透性的影响

在优化处方及工艺的基础上，制备药物浓度分别为 1%、2%、3%的 **1**-Cubs，考察其皮肤渗透性，结果如图 8 所示。结果表明，药物浓度为 2%和 3%时所得制品的累积渗透量显著大于浓度为 1%的制品，但两组间无统计学差异；不同浓度制品组之间的皮肤滞留量差异不显著。

2.6.5 凝胶基质对皮肤渗透性的影响

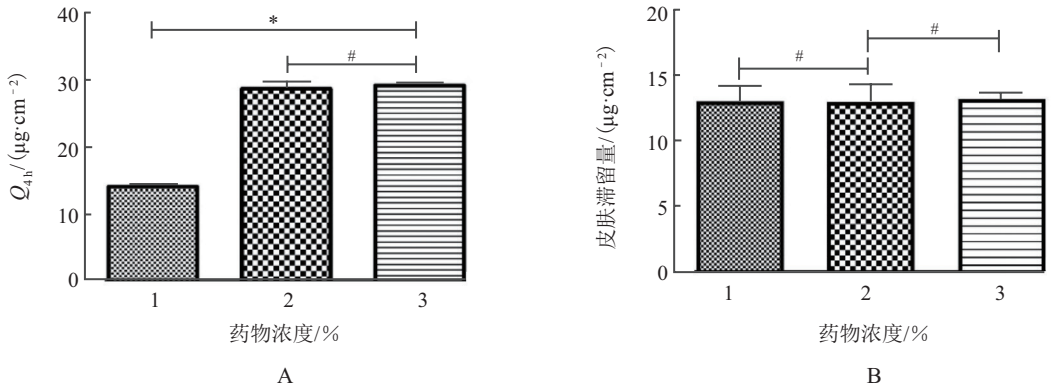
在超声功率 400 W、超声时间 15 min、GMO 与 F127 质量比 8 ∶ 1、载体与药物质量比 5 ∶ 1、药物浓度 1%的条件下，照“**2.2.1**”项下方法制备 **1**-Cubs，再分别加入不同的凝胶基质（黄原胶 2.5%、壳聚糖 4.5%、HPMC K100LV 6%、CMC-Na 4%）制成凝胶以方便临床使用。控制上述 4 种凝胶基质的黏度相近（约 1 000 mPa·s），以考察凝胶基质种类对皮肤渗透性的影响，结果如图 9 所示。可



注：* 表示两组间结果有统计学差异（P<0.05）；# 表示两组间结果无统计学差异（P>0.05）。

图 7　载体与药物质量比对累积渗透量（A）和皮肤滞留量（B）的影响（n=3）

Fig.7　Effect of Mass Ratio of Carrier to Drug on the Cumulative Transdermal Penetration Amount (A) and Skin Retention Amount (B) (n=3)



注：* 表示两组间结果有统计学差异（P<0.05）；# 表示两组间结果无统计学差异（P>0.05）。

图 8　药物浓度对累积渗透量（A）和皮肤滞留量（B）的影响（n=3）

Fig.8　Effect of Drug Concentration on the Cumulative Transdermal Penetration Amount (A) and Skin Retention Amount (B) (n=3)

见，不同凝胶基质制得的 **1**-Cubs 凝胶的累积渗透量差异显著，以 HPMC 为基质的凝胶组的累积渗透量最大；皮肤滞留量以 HPMC 凝胶和 CMC-Na 凝胶组较大。综合考虑，HPMC 凝胶制品（以下简称“**1**-Cubs-Gel”）同时具有较大的累积渗透量和皮肤滞留量，故选用。

此外，分别检测了 1% **1** 水溶液和 **1**-Cubs-Gel 的累积渗透量和皮肤滞留量。结果显示，**1**-Cubs-Gel 的累积渗透量［(52.4±1.4) vs. (39.0±0.9) μg/cm^2，n=3］和皮肤滞留量［(22.4±1.1) vs. (17.1±0.8) μg/cm^2，n=3］均显著高于 1% **1** 水溶液组（P<0.05），说明立方液晶纳米粒载体促进了 **1** 的经皮渗透。

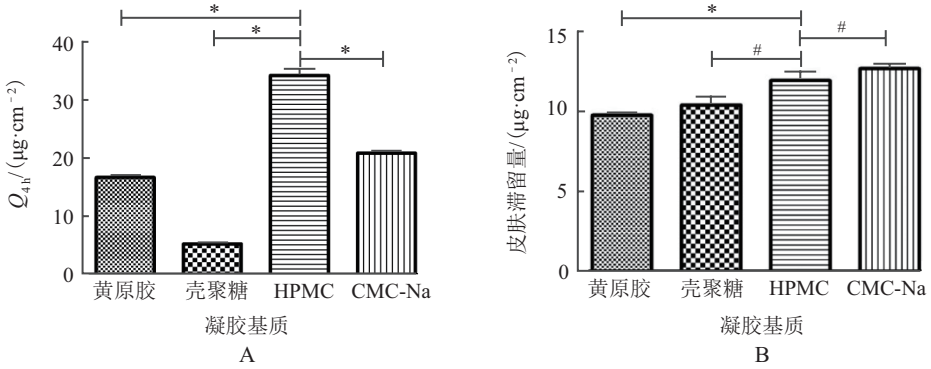
2.7 皮肤渗透的可视化分析

取 SD 大鼠 4 只，腹部脱毛，观察无明显皮肤损伤后随机分为 2 组，分别给予“**2.6.5**”项下的 1% **1** 水溶液和 **1**-Cubs-Gel。于给药后 2 和 4 h 将大鼠处死，取用药部位皮肤，用生理盐水洗除残留药物，滤纸吸干后制备成冷冻切片，置荧光显微镜下观察，结果如图 10 所示。可见，各组给药 2 h 后，红色荧光信号均较弱，给药 4 h 后荧光信号明显增强；**1**-Cubs-Gel 组在给药 2 和 4 h 后的荧光信号均强于 **1** 水溶液组，表明基于立方液晶纳米凝胶可促进 **1** 的渗透。

3 讨论

PDT 是通过特定波长光源辐照光敏剂，引起光化学反应以破坏病变组织，从而达到治疗目的。光敏剂是影响 PDT 临床疗效的关键因素。ALA 为一种内源性的光动力治疗药物，本身无光毒性，但在体内可经血红素循环转化为具有强光敏作用的 Pp Ⅸ，继而发挥光动力治疗作用 [8]。为提高细胞内 Pp Ⅸ浓度，采用 ALA 酯类衍生物作为 Pp Ⅸ合成前体的方法被证实是切实可行的 [3]。目前已成功在国外上市的 ALA 酯类衍生物制剂有 5- 氨基酮戊酸甲酯霜剂和 **1** 散剂。前者脂溶性（log$P$ 为 －1.3）与 ALA（log$P$ 为 －1.5）差异不大，临床使用浓度亦较大，为 16%。后者用于荧光膀胱镜，辅助筛查膀胱癌，使用溶度仅为 0.2%，并且给药后 1 h 就可进行镜检，证明了 **1** 具有较高的渗透性和 Pp Ⅸ转化率。由此推测，合成相同量 Pp Ⅸ时所需的 **1** 浓度远低于 ALA，可减少 ALA 的用量，亦可避免高浓度 ALA 带来的高不良反应发生率。

相比于使用透皮促渗剂，采用药剂学的方法，如制成纳米制剂，具有更高的安全性，且通常能提高药物的稳定性。作为外用制剂载体，通常认为粒径较小的纳米粒透皮性能更好。本研究表明，粒径低于 200 nm 的载药纳米粒的累积渗透量较高，但 200 nm 以下的 2 个试验组无统计学差异。这一结果提示除了纳米粒粒径，纳米粒中各组分的比例、载体与药物的质量比等因素均会影响药物的透皮性能 [9]。此外，凝胶基质不仅通过赋形



注：* 表示两组间结果有统计学差异（P<0.05）；# 表示两组间结果无统计学差异（P>0.05）。

图 9 凝胶基质种类对累积渗透量（A）和皮肤滞留量（B）的影响（n=3）

Fig.9 Effect of Gel Matrix Type on the Cumulative Transdermal Penetration Amount (A) and Skin Retention Amount (B) (n=3)

作用使液体制剂的使用更为方便，同时亦会影响到药物的透皮性能。

致谢：联勤保障部队第九〇〇医院院内课题（2021MS06）给予资助。

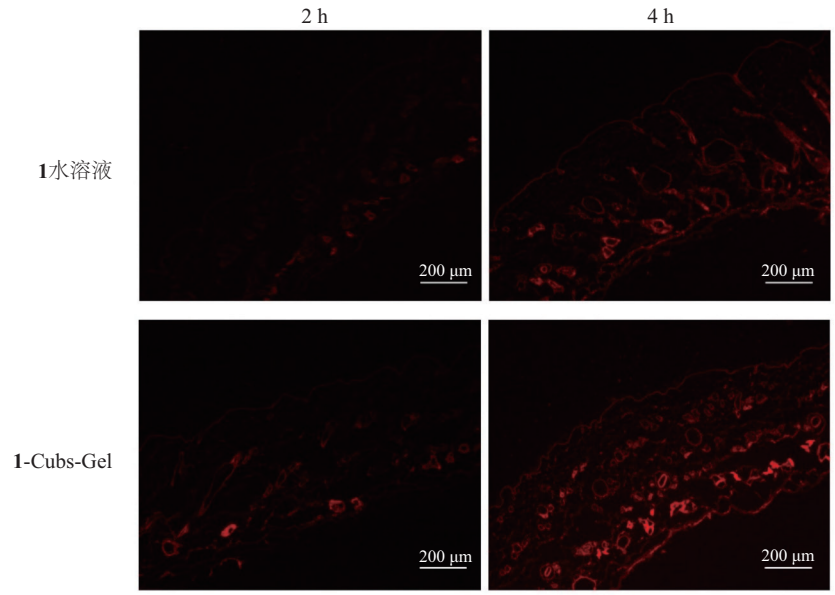


图 10　荧光显微镜可视化分析药物的经皮渗透

Fig.10　Fluorescence Microscopic Visualization of Drug Transdermal Penetration

参考文献：

[1] BATTAGLIA PARODI M, LA SPINA C, BERCHICCI L, *et al*. Photosensitizers and photodynamic therapy: verteporfin [J]. *Dev Ophthalmol*, 2016, **55**: 330-336.

[2] CASAS A, FUKUDA H, DI VENOSA G, *et al*. Photosensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy [J]. *Br J Cancer*, 2001, **85**(2): 279-284.

[3] LANGE N, JICHLINSKI P, ZELLWEGER M, *et al*. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin Ⅸ : a pilot study [J]. *Br J Cancer*, 1999, **80**(1/2): 185-193.

[4] ZENG L, TAO C, LIU Z, *et al*. Preparation and evaluation of cubic nanoparticles for improved transdermal delivery of propranolol hydrochloride [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2020, **21**(7): 266.

[5] AZMI I D, MOGHIMI S M, YAGHMUR A. Cubosomes and hexosomes as versatile platforms for drug delivery [J]. *Ther Deliv*, 2015, **6**(12): 1347-1364.

[6] LI JC, ZHU N, ZHU J X, *et al*. Self-assembled cubic liquid crystalline nanoparticles for transdermal delivery of paeonol [J]. *Med Sci Monit*, 2015, **21**: 3298-3310.

[7] 曾令军，胡晓木，刘志宏，等. 基于立方液晶载体的 5- 氨基酮戊酸纳米经皮给药制剂的研究 [J]. 中国医院药学杂志，2023, **43**(8): 877-881.

[8] PENG Q, WARLOE T, BERG K, *et al*. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges [J]. *Cancer*, 1997, **79**(12): 2282-2308.

[9] 徐玲霞，申宝德，金　晨，等. 立方液晶作为天然药物载体的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志，2018, **49**(11): 1500-1507.