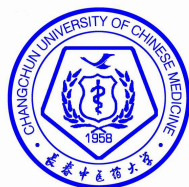


学校代码 10199

学 号 17430815065



长春中医药大学

CHANGCHUN UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE

硕士学位论文

人参总皂苷脂质体的制备及其对皮肤光老化 治疗作用的研究

Preparation of total saponins of Panaxginseng liposomes
and the study of its therapeutic effect on skin photoaging

学位申请人	鹿禛
指导教师	邱智东 教授 金叶 副教授
专业名称	中药药剂学
研究方向	中药新型给药系统研究
培养方式	全日制
学位类型	学术学位

二〇二〇年三月

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

硕士学位论文

人参总皂苷脂质体的制备及其对皮肤光老化

治疗作用的研究

**Preparation of total saponins of Panaxginseng liposomes
and the study of its therapeutic effect on skin photoaging**

学位申请人：鹿禛

指导教师：邱智东 教授 金叶 副教授

培养单位：药学院

专业名称：中药药剂学

研究方向：中药新型给药系统研究

学位类型：学术学位

学位级别：硕士

论文提交日期：2020 年 3 月

学位授予单位：长春中医药大学

提交确认：作者签名

鹿禛

导师签名

邱智东

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
英文缩略语.....	VI
引言.....	1
文献综述.....	2
1 人参总皂苷的研究概况.....	2
1.1 人参总皂苷化学成分.....	2
1.2 人参总皂苷物理化学性质.....	2
1.3 人参总皂苷药理作用.....	2
1.3.1 神经系统作用.....	3
1.3.2 心血管系统作用.....	3
1.3.3 抗肿瘤作用.....	3
1.3.4 抗氧化作用.....	3
1.3.5 抗衰老作用.....	3
2 皮肤光老化研究进展.....	4
2.1 皮肤光老化特征.....	4
2.2 皮肤光老化机制.....	4
2.2.1 氧化应激.....	4
2.2.2 MMPs 作用.....	5
2.2.3 DNA 损伤.....	5
2.2.4 炎症反应.....	5
2.2.5 免疫抑制.....	6
2.2.6 AGEs 作用.....	6
2.2.7 细胞凋亡.....	6
3 脂质体及其经皮给药的研究进展.....	6
3.1 皮肤屏障的结构特点.....	7

3.2.1 皮肤的“砖”结构.....	7
3.2.2 皮肤的“灰浆”结构.....	7
3.2.3 皮肤屏障的水脂膜.....	7
3.2 脂质体经皮吸收研究进展.....	8
3.2.1 脂质体结构特点.....	8
3.2.2 脂质体的制备方法.....	8
3.2.3 脂质体作为经皮给药的特点.....	8
3.2.4 脂质体作为经皮给药的分类.....	10
3.2.5 脂质体经皮给药的作用机制.....	10
3.2.6 新型经皮给药脂质体的进展.....	10
3.2.7 脂质体经皮给药体系在化妆品领域的应用.....	11
3.2.8 脂质体经皮给药的展望.....	11
4 结语.....	11
第一章 人参总皂苷体外分析方法的建立.....	13
1 试验材料.....	13
1.1 试剂.....	13
1.2 仪器.....	14
2 试验方法.....	14
2.1 色谱条件的建立.....	14
2.2 溶液的配制.....	14
2.3 标准曲线的绘制.....	14
2.4 精密度试验.....	14
2.5 稳定性试验.....	15
2.6 加样回收率试验.....	15
3 试验结果.....	15
3.1 线性关系的考察.....	15
3.2 精密度试验结果.....	16
3.3 稳定性试验结果.....	17

3.4 加样回收率试验结果.....	17
4 讨论.....	18
5 小结.....	19
第二章 人参总皂苷脂质体制备工艺研究.....	20
1 试验材料.....	20
1.1 试剂.....	20
1.2 仪器.....	21
2 试验方法.....	21
2.1 人参总皂苷脂质体包封率测定方法的建立.....	21
2.2 人参总皂苷脂质体的处方优化.....	22
2.2.1 磷脂种类的筛选.....	22
2.2.2 磷脂与药物摩尔比考察.....	22
2.2.3 胆固醇与磷脂比考察.....	23
2.2.4 有机相与水相比比例考察.....	23
2.3 验证性试验.....	24
2.4 冷冻干燥法制备人参总皂苷脂质体冻干粉.....	24
3 试验结果.....	25
3.1 磷脂种类筛选.....	25
3.2 磷脂与药物摩尔比考察.....	25
3.3 胆固醇与磷脂比考察.....	26
3.4 有机相与水相比比例考察.....	26
3.5 验证性试验结果.....	27
3.6 冷冻干燥法制备人参总皂苷脂质体冻干粉.....	27
4 讨论.....	27
5 结论.....	28
第三章 人参总皂苷脂质体质量评价.....	29
1 试验材料.....	29
1.1 试剂.....	29

1.2 仪器.....	30
2 试验方法.....	30
2.1 外观观察.....	30
2.2 粒径分布.....	30
2.3 Zeta 电位测定.....	30
2.4 DSC 分析.....	30
2.5 体外透皮性能研究.....	31
2.5.1 试验动物.....	31
2.5.2 试验装置.....	31
2.5.3 离体鼠皮的制备.....	32
2.5.4 人参总皂苷脂质体体外皮肤透过性试验.....	32
3 试验结果.....	32
3.1 外观观察.....	32
3.2 粒径分布.....	33
3.3 Zeta 电位.....	33
3.4 DSC 分析结果.....	34
3.5 体外透皮试验结果.....	34
4 讨论.....	35
5 小结.....	36
第四章 人参总皂苷脂质体对紫外皮肤光老化治疗作用的研究.....	37
1 试验材料.....	37
1.1 试剂.....	38
1.2 仪器.....	39
1.3 试验动物.....	39
1.4 试验环境.....	39
1.5 溶液配制.....	39
2 试验方法.....	39
2.1 大鼠皮肤光老化模型建立.....	39

2.2 大鼠皮肤外观形态观察.....	40
2.3 大鼠皮肤厚度测定.....	40
2.4 大鼠皮肤组织形态学观察.....	40
2.4.1 皮肤标本制备.....	41
2.4.2 HE 染色.....	41
2.4.3 醛品红染色.....	41
2.5 大鼠皮肤组织中 MDA 含量以及 SOD、GSH-Px 活性测定.....	41
2.5.1 皮肤组织匀浆液的制备.....	41
2.5.2 皮肤组织匀浆蛋白浓度测定.....	42
2.5.3 大鼠皮肤组织中 MDA 含量测定.....	42
2.5.4 大鼠皮肤组织中 SOD 活力测定.....	43
2.5.5 大鼠皮肤组织中 GSH-Px 活性测定.....	44
2.6 大鼠皮肤组织中 MMP-1/MMP-3 含量测定.....	45
2.6.1 皮肤组织匀浆液制备.....	45
2.6.2 Elisa 法测定大鼠皮肤组织中 MMP-1/MMP-3 含量.....	45
2.7 大鼠皮肤组织中 IL-6、IL-1 β 以及 TNF- α 含量测定.....	45
2.8 统计分析.....	45
3 试验结果.....	45
3.1 大鼠皮肤形态观察.....	45
3.2 人参总皂苷脂质体对大鼠光老化皮肤厚度影响.....	46
3.3 HE 染色观察人参总皂苷脂质体对大鼠皮肤组织结构的影响.....	47
3.4 醛品红染色观察人参总皂苷脂质体对大鼠皮肤弹性纤维的影响.....	48
3.5 人参总皂苷脂质体对大鼠光老化皮肤组织中 MDA 含量的影响.....	48
3.6 人参总皂苷脂质体对大鼠皮肤组织中 SOD、GSH-Px 活力的影响.....	49
3.7 人参总皂苷脂质体对大鼠皮肤组织中 MMP-1、MMP-3 含量的影响.....	51
3.8 人参总皂苷对大鼠皮肤组织中 IL-6、IL-1 β 以及 TNF- α 含量的影响.....	52
4 讨论.....	54
5 小结.....	54

结论.....	56
本文创新点.....	57
参考文献.....	58
致谢.....	66
在学期间主要研究成果.....	67
个人简历.....	68

摘要

目的：皮肤光老化的发生和紫外线（UV）诱导过度生成活性氧自由基（ROS）以及炎症反应等有关，因而抗炎和抗氧化可以作为治疗皮肤老化的方法。人参总皂苷是人参中主要的活性物质，有抗氧化，抗衰老等多种药理作用，但人参总皂苷皮肤透过性差限制了它的开发利用。采用脂质体这一新型载药系统包埋人参总皂苷，以期提高其皮肤透过性，更好的发挥作用，并通过观察人参总皂苷对大鼠光老化皮肤的治疗作用，从组织病理学、氧化应激损伤、炎症反应等角度初步探讨可能存在的治疗机制。

方法：首先建立人参总皂苷体外分析方法：采用高效液相色谱法进行人参总皂苷含量测定；采用乙醇注入法制备人参总皂苷脂质体，采用超滤离心法分离游离药物与载药脂质体，建立了人参总皂苷脂质体的包封率测定方法；采用单因素考察法优化人参总皂苷脂质体的处方及制备工艺；对人参总皂苷脂质体进行质量评价和体外皮肤透过性研究；通过建立大鼠光老化模型，从外观形态及皮肤厚度初步评价人参总皂苷对大鼠光老化皮肤的治疗作用，对大鼠光老化皮肤组织进行 HE 和醛品红染色观察皮肤组织形态学变化，测定大鼠皮肤组织中 MDA 含量、GSH-Px、SOD 酶活力，基质金属蛋白酶 MMP-1 和 MMP-3 含量，炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子 TNF- α 含量，初步探讨人参总皂苷对大鼠皮肤光老化模型治疗作用可能的机制。

结果：人参总皂苷脂质体的最佳处方为：氢化大豆磷脂与人参总皂苷摩尔比为 1:0.4；胆固醇与氢化大豆磷脂的摩尔比为 1:3.5；有机相与水相的体积比为 1:9；搅拌时间为 4 h；验证性试验测得人参总皂苷脂质体的平均包封率为 63.38%，平均粒径为 111.0 nm；PDI 为 0.059，Zeta 电位为 -5.72 mv；人参总皂苷脂质体冻干粉的包封率为 61.21%；体外透皮试验结果显示，人参总皂苷溶液 24 h 内未检测到透过量，人参总皂苷脂质体的皮肤 24 h 内总透过率为 85.46%。人参总皂苷对大鼠光老化皮肤治疗作用的研究中，与模型组相比，人参总皂苷脂质体组及溶液组皮肤均有不同程度的好转，HE 及醛品红染色结果表明人参总皂苷能够有效的改善 UV 照射引起的皮肤角质层增厚、弹性纤维断裂，聚集成团等现象；与模型组相比，人参总皂苷脂质体组皮肤组织中 MDA 含量明显下降，GSH-Px、SOD 酶活力明显提高，炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子 TNF- α 含量，基质金属蛋白酶 MMP-1 和 MMP-3 含量明显升高。

结论：采用单因素考察法优化人参总皂苷脂质体的制备工艺，并对其进行质量评价；体外透皮试验结果表明，人参总皂苷原药皮肤透过性差，而脂质体能够明显提高人参总皂苷的皮肤透过性；局部使用人参总皂苷脂质体对大鼠光老化皮肤有一定的治疗作用，这种保护作用可能与抑制 UV 诱导皮肤脂质过氧化，提高抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活力，减少炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达，降低 MMPs 含量有关。

关键词：皮肤光老化；人参总皂苷；脂质体；制备工艺；质量评价

Abstract

Objective:The occurrence of skin photoaging is related to the over-generation of reactive oxygen species (ROS) induced by ultraviolet (UV) and the inflammatory response, therefore, anti- inflammatory and anti-oxidation can be used as a treatment for skin aging methods. As the main active ingredient in ginseng, total saponins of Panaxginseng have a variety of pharmacological effects such as anti-oxidation and anti-aging. However, the poor skin transmissibility of total saponins of Panaxginseng limited its development and utilization.Liposome, a new drug delivery technology, was used to encapsulate total saponins of Panaxginseng in order to improve skin transmissibility and make it work better. By observing the therapeutic effect of total saponins of Panaxginseng on photoaging skin of rats, the possible therapeutic mechanisms were preliminarily discussed from the perspectives of histopathology, oxidative stress and inflammatory response.

Methods:Firstly, an in vitro analysis method of total saponins of Panaxginseng was established.The content of total saponins of Panaxginseng was determined by HPLC.A method for the determination of encapsulation was established. Total saponins of Panaxginseng liposomes were prepared by ethanol injection method, and the free drug and carrier liposome of drug were separated by ultrafiltration centrifugation method.The method of single factor investigation was used to optimize the formulation and preparation of total saponins of Panaxginseng liposomes. Quality evaluation and Study on skin permeability in vitro were carried out.Through the establishment of light aging rats model, effect of total saponins of Panaxginseng on photoaging skin of rats preliminarily evaluated from the appearance shape and thickness of skin.Photoaging skin of rats was observed the skin morphology changes after HE and aldehyde fuchsin staining. The content of MDA , gsh-px, SOD enzyme activity, matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-3, inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor TNF- α in the skin tissue of rats were determined. The possible mechanism of total saponins of Panaxginseng treating rats photoaging skin model was preliminarily discussed.

Results: The best prescription for total saponins of Panaxginseng liposomes is: the molar ratio of Lecithin Hydrogenated to total saponins of Panaxginseng is 1: 0.4; the molar ratio of cholesterol to Lecithin Hydrogenated is 1: 3.5; the volume ratio of organic phase to water phase is 1: 9; Stirring time: 4h; The average encapsulation rate of total saponins of Panaxginseng liposomes measured by confirmatory experiments: 63.38 %, average particle size is 111.0 nm; PDI: 0.059, Zeta potential -5.72 mv; The encapsulation efficiency of total saponins of Panaxginseng liposomes lyophilized powder was 61.21 %. The results of in vitro transdermal test showed that, total saponins of Panaxginseng solution was no transmission within 24 hours. The total transmission rate of total saponins of Panaxginseng liposomes in skin was 85.46 % within 24 hours. The effect of total saponins of Panaxginseng on photoaging skin in rats was compared with the model group. The skin of the plastid group and the solution group improved in different degrees. The HE and aldehyde fuchsin staining results showed that the total saponins of Panaxginseng could effectively improve the skin cuticle thickness, elastic fiber breakage, and agglomeration caused by UV. Compared with the control group, the content of MDA in the skin tissue of the total saponins of Panaxginseng liposome group decreased significantly, the activities of GSH-Px and SOD enzymes increased significantly, The levels of inflammatory factors IL-6 and IL-1 β And tumor necrosis factor TNF- α , and the contents of matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-3 were significantly increased .

Conclusion: The preparation technology of saponins of Panaxginseng liposome was optimized by single factor method and its quality was evaluated. The results of in vitro transdermal experiments showed the poor skin penetration of total saponins of Panaxginseng and liposomes can improve it significantly; topically using total saponins of Panaxginseng liposomes has a certain therapeutic effect on photoaged skin in rats. This protective effect may be related to inhibiting UV-induced skin lipid peroxidation, increasing the activity of antioxidant enzymes SOD and GSH-Px, and reducing the inflammatory factors TNF- α , IL-1 β and IL-6 expression, reducing the content of MMPs.

Key words: Skin photoaging; Total saponins of Panaxginseng; Lliposome; Preparatio
process; Quality evaluation

英文缩略语

英文缩写	英文全称	中文名称
AGEs	advanced glycationend products	晚期糖基化终末产物
DPPC	1,2-Dihexadecanoyl-rca-glycero-3-phosphoch olin	二棕榈酰磷脂酰胆碱
DSC	differential Scaaning calorimetry	差示扫描里量热法
EE	encapsulation efficiency	包封率
Egg-PC	Egg Yolk Lecithin	蛋黄磷脂
Elisa	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
GSH-Px	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽还原酶
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相
HSPC	Lecithin Hydrogenated	氢化大豆磷脂
HE	Hematoxylin Eosin	苏木素-伊红
IL-6	Interleukin-6	白介素-6
IL-1 β	Interleukin-1 β	白介素-1 β
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
MMPs	Matrix metalloproteinase s	基质金属蛋白酶
MMP-1	Matrix metalloproteinases-1	基质金属蛋白酶-1
MMP-3	Matrix metalloproteinases-3	基质金属蛋白酶-3
PDI	polymer dispersity index	多分散系数
ROS	Reactive oxygen species	活性氧簇
SPC	Soybean phospholipid	大豆磷脂
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
TNF- α	Tumor necrosis factor - α	肿瘤坏死因子- α
UV	Ultraviolet ray	紫外线
UVA	Ultraviolet A ray	长波紫外线
UVB	Ultraviolet B ray	中波紫外新

引言

皮肤光老化是由于紫外线过度照射皮肤引起的皮肤粗糙、起皮、皱纹出现以及色素沉着，色斑出现等皮肤损伤现象的总称。现如今，随着社会的不断发展，人口老龄化的不断加深，人们对于皮肤老化问题的关注日渐密切^[1]。中草药作为我国传统医药的瑰宝，是我国宝贵的物质资源，具有纯天然、副作用小、毒性小的特点，因此受到越来越多人的关注。《神农本草经》中就曾有关中草药抗衰老佳品记载^[2]，说明从古代开始，人们关于中草药抗衰老的探究就从未停止，如今中草药预防和治疗皮肤光老化已经成为学术界关注的重点。

人参是五加科植物人参 (*Panax ginseng* C.A.Mey.) 的干燥根及根茎，人参总皂苷作为其主要的活性物质，具有很好的抗氧化，抗衰老的功效。当前，人参也作为美白抗皱的佳品活跃在化妆品领域。但是，由于人参总皂苷皮肤透过性较差，生物利用度低，导致目前市面上含人参类化妆品大都无法跨越皮肤屏障，发挥更好的作用，因此限制了人参总皂苷的开发利用。这是由于人参总皂苷中含有的多种人参单体皂苷，例如人参皂苷 Rg1，相对分子质量较大，油水分配系数较小，易溶于水^[3]，现代药剂学研究表明这种结构的分子不易跨过皮肤屏障，属于不易透皮吸收的类型^[4]。因此，这在很大程度上限制了人参总皂苷的开发和利用。基于此，本课题希望可以借助现有的新型载药系统，帮助人参总皂苷跨越皮肤屏障，增加其透皮吸收，更好的发挥其抗氧化、抗衰老功效。

脂质体，作为近年来新兴的纳米载药系统，其具有的双层囊泡结构既能装载水溶性药物又能装载脂溶性药物，展现出了巨大的开发潜力。除此以外，脂质体良好的生物相容性也为其增加药物的透皮性提供了巨大的可能，双层囊泡结构也能够一定程度延长药物的释放时间，起到缓释或者长效作用，提高用药的安全性。

基于以上原因，本课题将人参总皂苷与脂质体这一新型载药体系相结合，利用脂质体的囊泡结构携带人参总皂苷，利用相似相容原理，克服皮肤屏障，使其更好的发挥抗氧化、抗衰老的作用；通过建立大鼠光老化模型，初步探究人参总皂苷治疗皮肤光老化可能存在的作用机制。

文献综述

1 人参总皂苷的研究概况

人参是五加科人参属植物人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 的干燥根和根茎, 味甘、微苦, 性温、平^[5], 是我国传统的名贵药材之一, 距今已有两千多年的使用历史; 具有抗肿瘤、抗衰老、减少心肌缺血损伤、提高机体免疫力以及降低血糖等多种生物活性和药理作用。目前, 人参作为传统中药已广泛应用于中医临床, 由于其具有多种药理活性, 使得越来越多的国内外学者对其展现出巨大的研究热情^[6]。

汉代的《神农本草经》中记载人参“主补五脏, 安精神、定魂魄、止惊悸、除邪气、明目、开心、益智, 久服轻身延年”^[2], 自此以后, 人参一直被称做抗衰老的佳品。人参也一直作为抗衰老和美白的主要活性物质应用于化妆品领域。目前, 市面上有许多上市的化妆品以人参作为其美白抗衰的主要活性物质。但是, 这一类化妆品大多只能让人参总皂苷这一抗衰老的主要活性物质停留在皮肤的表面, 而不能使其跨越皮肤屏障从而更好的发挥作用。基于此, 本课题希望能够利用新型的药物载体使人参总皂苷能够克服皮肤屏障, 更好的发挥抗衰老作用。

1.1 人参总皂苷化学成分

人参总皂苷作为人参最主要的活性物质, 属于糖苷类化合物, 是由糖和苷元连接而成的^[7], 属于三萜类皂苷, 其中包括齐墩果烷型五环三萜类、达玛烷型四环三萜类, 人参总皂苷中大多数的皂苷类成分属于达玛烷型四环三萜类皂苷^[8]。根据皂苷中连接的苷元不同, 达玛烷型四环三萜类皂苷又可以分为两种: 原人参二醇型: Rs2、Rg3、Rd、Rh2、Rc、Ra1、Ra2、Ra3、Rb1、Rb2、Rb3、Rs1 等; 原人参三醇型: Rf、Re、Rg1、Rh1、Rg2、三七皂苷 R1、三七皂苷 R4 等^[9]。当前, 我国在对人参单体皂苷的分离^[10]、生物合成^[11]和生物转化^[12]方面的研究技术十分成熟, 已经达到世界领先水平。

1.2 人参总皂苷物理化学性质

人参总皂苷(Total saponins of *Panaxginseng*, TSPG)作为人参等五加科植物的重要活性物质, 其中 Rb1、Rb2、Rb3、Rg1、Re 和 Rf 的含量较多, 大约占人参总皂苷成分的 70 %^[13]。人参总皂苷是黄色无定型粉末或结晶, 味微苦, 具有吸湿性, 能溶于水、甲醇和乙醇, 几乎不会溶解在乙醚或者石油醚当中^[14]。

1.3 人参总皂苷药理作用

1.3.1 神经系统作用

现有的临床研究表明人参皂苷在保护和促进神经系统中表现出巨大的潜力。人参皂苷 Rb1 和 Rg1 作为其中代表性的成分, 不仅含量较高, 而且现代药理学研究也表明二者对中枢神经系统具有双向的调节作用。有研究表明人参皂苷 Rb1 可以通过调节 AKT/GSK-3 β /NFAT 信号通路, 从而抑制硫化砷诱导的 PC12 细胞凋亡, 保护神经细胞^[15]。Sun 等^[16]研究表明, 人参皂苷 Rg1 通过对星形神经胶质细胞凋亡的保护从而实现其对神经系统的保护作用。

1.3.2 心血管系统作用

人参对心血管系统有非常好的保护作用, 现代研究表明, 人参皂苷在缺血性心脏病、心律失常、心力衰竭等众多心血管系统的疾病治疗上有很大的潜力。人参皂苷 Rg1、Re、Rd、Rg3、Rb3 和 Rf 等都具有该药理活性。血管的衰老是导致心血管疾病发生的重要原因之一, 衰老的内皮细胞与年龄相关性血管疾病之间存在密切的关系, 周彬^[17]等的研究发现人参皂苷 Rb1 能通过上调 SIRT1 表达, 促进 eNOS 的合成, 使 NO 的含量增加, 延缓内皮细胞复制性衰老, 从而减少因内皮细胞衰老引起的血管性疾病的发生。

1.3.3 抗肿瘤作用

人参总皂苷作为人参中主要的活性物质, 在抗肿瘤方面 also 具有很好的效果, 其中, 人参总皂苷中含有的稀有人参皂苷 Rg3 与 Rh2 抗肿瘤效果最为显著^[18]。人参皂苷 Rh2 能够通过上调促凋亡蛋白 Bax 和下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 以及基质金属蛋白酶 MMP-2 来抑制神经母细胞瘤的转移和侵袭过程^[19]; 人参皂苷 Rg3 可以通过下调 β -catenin 磷酸化水平有效抑制 HCT116 和 SW480 细胞生长, 发挥其抗肿瘤活性^[20]。

1.3.4 抗氧化作用

活性氧簇 (SOD) 和谷胱甘肽还原酶 (GSH-Px) 是机体非常重要的用来清除氧自由基的抗氧化酶, 二者的活性可以直接反映出机体自身的抗氧化能力; 丙二醛 (MDA) 作为脂质过氧化的产物, 会对细胞膜产生不同程度的伤害, 它也可以间接反映氧自由基对机体的损伤程度。研究发现人参皂苷 Rg1 可以明显提高大鼠血清中活性氧簇以及谷胱甘肽还原酶的活力, 降低丙二醛的含量, 以此减少自由基对缺血心肌的损伤, 起到抗氧化的功效, 从而对缺血心肌起到保护作用^[21]。

1.3.5 抗衰老作用

人参作为我国传统名贵中药材，其在化妆品领域的应用历史由来已久，这得益于人参具有美白、抗皱、延缓衰老的功效。人参总皂苷作为人参主要的活性物质，也是其美白抗衰老的主要成分。Hong 等^[22]研究发现，人参茎叶皂苷具有很好的抗氧化活性，可以清除 DPPH 自由基和 ABTS 自由基，小鼠试验表明人参茎叶皂苷能够减轻 UVB 诱导的表皮增厚和皮肤屏障功能损伤，抑制 UVB 诱导的基质金属蛋白酶的表达；Shin 等^[23]利用人体试验也证明了人参茎叶皂苷在体内具有很好地抗皮肤衰老的特性。

2 皮肤光老化研究进展

皮肤作为人体的最表层，是人体的第一道屏障。皮肤的老化过程是一个复杂的生物现象，根据影响因素的不同可以分为内源性老化和外源性老化两种。内源性老化是指遗传因素控制的程序化的老化，是随时间的消逝而发生，不能逆转的，也称为自然老化；外源性老化主要是由于外界环境因素比如紫外线、红外线、化学烟雾以及粉尘雾霾等引起的老化，其中最主要的因素之一就是紫外线照射，因此皮肤外源性老化也被称为皮肤光老化^[24,25]。

2.1 皮肤光老化特征

当暴露在外的皮肤受到紫外线照射，会引起皮肤光老化，其表现特征为：皮肤表面粗糙起皮，失去光泽；皮肤弹性下降使其变得松弛，此时通常伴随着皱纹的出现，并有加深加粗的趋势；色素脱失或者沉着，导致皮肤表面出现色斑。

2.2 皮肤光老化机制

紫外线（UV）照射产生的光子能量被细胞原子或分子吸收，产生大量的二次电子和自由基，从而导致细胞损伤^[26]。紫外线，根据波长将其分为 3 个波段：UVA（320-400 nm）、UVB（275-320 nm）、UVC（230-275 nm）。在紫外线的范围内，260 nm 和 278 nm 的波长会被细胞中的核酸以及蛋白质吸收^[26]，UVC 由于大气层的阻挡作用几乎全被臭氧吸收，因此 UVA 和 UVB 是造成皮肤光老化的主要原因。紫外线辐射引起的皮肤光老化的机制十分复杂，根据国内外研究概括主要有以下机制：

2.2.1 氧化应激

氧化应激是指机体内清除氧自由基的平衡状态发生改变，从而导致产生了大量的活性氧簇（ROS），进而引起组织损伤。活性氧簇（ROS）指的是一组一个或者多个未配对电子的原子或分子，主要有超氧阴离子、单线态氧、过氧化氢及羟基自由基等^[27]。UV

照射引起细胞内 ROS 的异常增多破坏了线粒体正常的调节功能，导致线粒体参与的多种信号传导被破坏造成细胞损伤。UV 照射产生许多 ROS 破坏了细胞间氧化和抗氧化的平衡状态，使细胞发生氧化应激反应。氧化应激严重时会引发细胞的凋亡和死亡^[28]。除此之外，ROS 还能够激活细胞表面的表皮生长因子等细胞因子引发一系列活化反应^[29,30]，UV 照射激活表皮生长因子（EGFR）活化表达，刺激前炎症因子 1L-1、1L-6、TNF- α 等基因转录，这些细胞因子通过细胞表面活化 NF- κ B 和 AP-1 通路，致使二者被激活，上调靶基因炎症细胞因子，增加 MMPs 表达，引发炎症反应和胶原蛋白降解^[31]。

2.2.2 MMPs 作用

基质金属蛋白酶（MMPs）是一组广泛存在于脊椎动物、无脊椎动物和植物中的一组锌依赖性蛋白酶。在细胞外基质中它能够降解几乎所有的细胞外基质，主要有胶原酶、明胶酶、基质溶解素、膜型 MMP 以及其他类型 MMP 五种。I 型和 III 型胶原纤维是保持皮肤强度和弹性的关键，皮肤老化的程度可以由皮肤胶原纤维和胶原蛋白含量的变化来体现^[32]。AP-1 是一类重要的调节蛋白，由 Fus 和 Jun 家族组成，UV 辐射会激活 AP-1 调节 MMP-1、MMP-3、MMP-9，使它们的表达增多^[33,34]。I 型和 III 型胶原纤维会被 MMP-1 降解；而基膜中的蛋白聚糖、板层素胶原纤维、纤维粘连蛋白和 W 型胶原纤维等会被 MMP-3 降解；MMP-1 降解后的下游物质还会被 MMP-9 进一步的降解，这些都会造成皮肤胶原修复能力下降，除此以外，还伴随着弹性纤维和胶原纤维的减少、异常弹性纤维的沉积、胶原合成减少、细胞外基质消失，最终造成皮肤粗糙、松弛、下垂、皱纹以及色斑增多等诸多老化症状的出现^[35]。

2.2.3 DNA 损伤

紫外线照射会直接或者间接的引起 DNA 损伤。长波紫外线可以诱导皮肤生成大量的 ROS 从而导致 DNA 的氧化损伤，诱发 DNA 形成环丁烷嘧啶二聚体，尤其是胸腺嘧啶二聚体，氧化 DNA 鸟嘌呤形成 8-羟基脱氧鸟苷，导致单链 DNA 片段出现断裂、DNA 发生蛋白交联^[36]，此时，DNA 的空间结构改变，DNA 的复制、转录受到影响，从而导致蛋白质的生物功能受到影响，进一步增强了短波紫外线的致癌作用^[37]。

2.2.4 炎症反应

紫外线照射能够激活神经内分泌系统，刺激该系统会导致其释放神经内分泌介质，合成和释放出组胺、5-HT、激肽等炎性介质，上述物质的释放增加了真皮层炎性细胞，

导致细胞出现炎症损伤,进而形成皮肤老化^[38]。紫外线照射使 ROS 大量增加引起氧化应激反应,刺激 EGFR/ERK 通路产生促炎因子如白介素 1L-1、1L-6 等,使炎症细胞浸润导致皮肤出现老化^[39]。除此之外,紫外线照射还能刺激角质形成细胞分泌释放 TNF- α 。如果 TNF- α 进入血液,就会激活表皮生长因子,从而介导炎症反应发生。

2.2.5 免疫抑制

UVA 和 UVB 都能影响皮肤免疫系统从而引发各种生物学效应。其中,UVB 更能引发皮肤免疫抑制作用。有研究表明,UVB 能够诱导角质形成细胞产生并释放细胞白介素和 TNF- α ,同时还会使朗格汉斯细胞(LC)数量减少。LC 细胞的减少又会使其作为抗原传递细胞的功能受到影响,从而导致 T 淋巴细胞产生耐受性,抑制了机体皮肤的免疫系统,从而降低了机体对迟发性超敏反应的对抗能力^[40]。

2.2.6 AGEs 作用

晚期糖基化终末产物(AGEs)是指核酸、脂质和蛋白质等大分子自发地在无酶参与的情况下,由葡萄糖或者其他还原单糖参与反应生成的稳定共价加成产物。这个过程被称为非酶糖基化反应。表皮和真皮中都有 AGE 受体(receptor for advanced glycation end product)的表达,有研究表明光老化皮肤的成纤维细胞对吞入胞内的晚期糖基化终末产物的降解能力下降,导致 AGEs 在光老化皮肤堆积^[41],而 AGEs 的大量存在会诱导细胞产生大量的活性氧,从而引发一系列的细胞损伤。

2.2.7 细胞凋亡

Bcl-2 家族包括抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白,分别能够促进细胞存活和诱导细胞死亡。Bcl-2 是 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白之一,它是通过阻止线粒体膜去极化和细胞色素 c 的释放来抑制细胞死亡;与此相反的是,促凋亡蛋白 Bax 可诱导线粒体膜去极化和细胞色素 c 释放,细胞色素 c 释放到胞质中后,介导 Caspase 蛋白家族被激活,进而导致细胞凋亡。紫外线照射会诱导线粒体降低 Bcl-2 表达以及释放细胞色素 C 等细胞凋亡因子,促使 Caspase-9 与细胞色素 C 结合形成凋亡小体,Caspase-9 被激活后,促使 Caspase-3 被激活,从而诱导了细胞的凋亡^[42,43]。

3 脂质体及其经皮给药的研究进展

1965 年,英国 Bangham 和 Standish^[44]在将磷脂分散于水中并进行电镜观察时发现了脂质体;1971 年,英国 Sessa 等^[45]首次将脂质体作为载体系统应用于药物领域;1980

年,研究者把脂质体用于经皮给药,使其发挥局部作用,研究表明,脂质体能够使曲安奈德在作用部位的浓度有所提高^[46]。除了口服给药之外,经皮给药也是经常使用的给药方式之一。相对分子量大、油水分配系数小和易溶于水是大部分药物的活性成分难以跨越皮肤角质层屏障被皮肤吸收的主要原因,而脂质体包埋此类药物之后可以促进药物活性成分在皮内滞留或者透皮吸收,从而增强此类药物经皮给药的治疗作用。

3.1 皮肤屏障的结构特点

皮肤是保护机体防止其受到外界物理、化学以及生物因素侵害的第一道防线。一个成年人皮肤总重量占身体总比重的 5~15 %左右,总面积大约是 1.5~2 m² 左右。

表皮、真皮和皮下组织共同构成了皮肤这一屏障保护器官。皮肤屏障狭义上指物理性屏障,主要是指以角质层结构为主的屏障,还与表皮的各种蛋白质、脂质、水、无机盐及各种代谢产物密切相关^[47]。

3.2.1 皮肤的“砖”结构

皮肤的“砖”结构主要是由皮肤的角质形成细胞构成,它是表皮分化的最后阶段,细胞内的细胞核和细胞质的内部结构已经分化消失,此时的细胞是死亡的无生命细胞。但是细胞内还存在许多不溶性的角蛋白纤维束。细胞角蛋白及角蛋白中间丝蛋白等物质是角质屏障的基础^[48],角蛋白的正确表达是皮肤屏障稳固的关键,而角蛋白中间丝蛋白及其相关蛋白由许多蛋白和酶组成,这些蛋白和酶由颗粒层、表皮层和小皮层分泌,所有这些成分都对角质层屏障非常重要,角质层因此被认为是经皮给药吸收最大的挑战^[49]。

3.2.2 皮肤的“灰浆”结构

角质细胞间脂质构成了皮肤的“灰土结构”^[50]。角质细胞在分化过程中形成具有分泌功能和独特结构的细胞器:板层小体。板层小体分泌的脂质主要成分包括胆固醇、磷脂、糖化神经酰胺以及鞘磷脂。当板层小体跟随角质细胞运动到颗粒层与角质层交界部位时,会随着角质释放到角质细胞相互的间隙中,与角质细胞间的相应代谢酶代谢后形成表皮脂质,发挥屏障保护作用。15 %自由脂肪酸、25 %胆固醇、50 %神经酰胺以及极少量磷脂共同构成表皮脂质^[51]。

3.2.3 皮肤屏障的水脂膜

皮肤的水脂膜是皮肤的表皮和外界环境的交界处,是皮肤屏障结构的最外层防线,

对皮肤发挥其屏障作用具有至关重要的作用。透皮水蒸发和汗腺分泌是水脂膜中水分的主要来源；表皮的分化代谢和汗腺、皮脂腺的分泌则是脂质的主要来源^[52,53]。

3.2 脂质体经皮吸收研究进展

脂质体是指由磷脂和其他两亲物质分散于水中，磷脂双分子层包封药物，形成单层或者多层同心的圆球体，也就是由脂质双分子层组成的内部为水相的封闭囊泡。

3.2.1 脂质体结构特点

当磷脂分散在水中，由于磷脂具有疏水的特殊性质，可以自发的形成封闭的脂质体囊泡。此时，该囊泡的内核是水相，能够包封亲水性药物，而双分子膜区域为油相，可以包封亲脂性药物。脂质体根据结构以及包含的双层磷脂膜层数的不同，分为单室脂质体和多室脂质体。其中单室脂质体又可以分为大单室脂质体（粒径范围： $0.1\sim 1\ \mu\text{m}$ ）和小单室脂质体（粒径范围： $0.02\sim 0.8\ \mu\text{m}$ ），多室脂质体则是由多层类脂质双分子层组成（粒径范围： $1\sim 5\ \mu\text{m}$ ）。

3.2.2 脂质体的制备方法

脂质体制备过程中可选用的制备方法有很多，制备方法不同，脂质体的粒径可从几十纳米到几微米不等，结构也不完全相同。目前，脂质体制备常用的方法主要有以下几种：薄膜分散法、乙醇注入法、乙醚注入法、逆向蒸发法、pH 梯度法^[54-58]，近年来，随着对脂质体这一载药体系的研究不断深入，脂质体的制备方法也不在局限于上述所述的单一制备方法，而是可以选择两种或者多种制备方法相结合，取长补短，往往能得到包封率较高，稳定性更好的载药脂质体。

脂质体选择的制备方法不同，得到的脂质体的形态不同，可能是单室，也可能是多室脂质体，脂质体的大小，包封率以及皮肤渗透性均不同，因此可以根据用药的目的，选择合适的制备方法控制脂质体的透皮特性^[59]。

3.2.3 脂质体作为经皮给药的特点

3.2.3.1 靶向性

脂质体作为纳米制剂的一种，因其结构的特殊性，能够将药物有目的的运送到特定的组织或者器官，这也是脂质体作为药物载体一个突出的优点—靶向性。研究表明，雷公藤脂质体透皮制剂与其片剂相比，对Ⅱ型胶原诱导的关节炎的治疗作用相当，但是前者对心、肝、肺以及肾的不良反应明显降低，体现了良好的靶向性，降低了药物的毒副

作用^[60]。

3.2.3.2 缓释性

脂质体装载药物的原理是将药物包封在脂质体的双层膜间或者双层膜内部，由于脂质体的包封作用和药物与磷脂之间的相互作用，会使药物缓慢的释放，因此延长了药物的释放时间，由此起到了缓释或者长效的作用。肖卫红等^[61]采用薄膜分散法制备的高乌甲素（LA）脂质体凝胶，LA 凝胶 24 h 内皮肤滞留量为 $8.39 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ，LA-Lip 凝胶皮肤滞留量为 $15.17 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ，明显高于 LA 凝胶，具有良好的缓释效果。为防治增生性瘢痕制备的丹皮酚血管内皮生长因子（VEGF）抗体修饰脂质体，体外透皮性能良好，药物真皮滞留量显著高于丹皮酚原料药和丹皮酚脂质体，具有很好的缓释效果^[62]。

3.2.3.3 安全性

磷脂，作为脂质体的主要成分，也是生物膜的固有成分之一，能够被机体降解，对皮肤没有刺激性，安全性良好。管圆圆^[63]制备的盐酸普萘洛尔脂质体凝胶与普通的盐酸普萘洛尔凝胶相比，24 h 时皮肤滞留药量，前者为后者的 2 倍，前者具有很好的粘附性和稳定性，对皮肤无刺激性，此外，前者的使用延长了给药间隔，减少了药物对其他组织及器官的毒副作用，提高了用药的安全性。丙酸氯倍他索（CP）脂质体，通过建立豚鼠湿疹皮炎模型进行药效学评价，试验结果表明 CP 脂质体与 CP 软膏相比，在长期使用中的安全性更高^[64]。

3.2.3.4 增强皮肤透过性

透皮制剂是指药物经由皮肤给药途径转运到局部组织或全身血液循环而发生局部或全身作用的制剂。由于皮肤屏障的存在，许多药物由于其透过皮肤的能力较差，生物利用度低，限制了其在临床的应用。脂质体作为新型载药系统，由于其结构中存在磷脂双分子层结构，与生物膜结构相似，可以很好的解决这一问题。现代研究表明积雪草苷能够加快伤口的愈和，修复损坏的皮肤，但是因为积雪草苷是大分子物质，导致其很难透过皮肤屏障发挥作用。利用脂质体这一新型载药系统包封积雪草苷，皮肤滞留量试验结果表明将积雪草苷包封于脂质体中，与其水溶液组相比，皮肤滞留量提高了 1.17 倍，在很大程度上提高了积雪草苷的皮肤透过性^[65]。刘基的湖北海棠总黄酮脂质体体外透皮试验结果表明，24 h 后脂质体皮肤累积药物透过量明显高于溶液皮肤累积透过量，激光共聚焦显微镜（CLSM）观察结果也证实载药脂质体更容易滞留在皮肤层^[66]。

3.2.4 脂质体作为经皮给药的分类

脂质体经皮给药属于经皮给药系统（TDDS），胰岛素、疫苗和肿瘤药物^[67-69]等是通过经皮吸收进入全身循环发挥疗效；而固醇类、局麻药和皮质类则是在皮肤局部发挥疗效。

3.2.5 脂质体经皮给药的作用机制

目前，脂质体作为经皮给药载体促进皮肤吸收的机制还不是很明确，但总体可以归纳为以下几点：（1）融合机制：由于皮肤屏障的存在，所以脂质体不能以完整的结构进入皮肤，而是与皮肤表层脂质发生融合使脂质体解体，药物通过脂质颗粒间的空隙进入皮肤深层发挥作用^[70,71]；（2）水合机制：有研究认为，增加角质层的湿化和水合作用，从而改变角质细胞间的结构，使药物能够通过扩散作用进入细胞间质^[72]是脂质体包埋药物后透皮吸收率高的原因。（3）穿透机制：一些特殊结构的脂质体能够穿透皮肤屏障，使药物透过完整的皮肤发挥作用。例如传递体，也叫可变形脂质体，通过对传递体皮肤透过性的研究，有研究者认为，脂类载体穿透皮肤的动力是由皮肤表面和内部存在的水浓度差产生的渗透压梯度和脂类较高的水化能提供的，这个动力能够保障脂类载体穿过皮肤屏障，因此认为传递体可以借助这一力量穿过完整的皮肤^[73]。

3.2.6 新型经皮给药脂质体的进展

近年来，随着对脂质体研究的不断深入，发现通过使用不同种类的脂质膜材或者改变脂质膜材之间的比例，可以得到不同经皮治疗作用的脂质体。许多和脂质体相关或者类似的载药技术已经在经皮给药领域被开发应用。比如（1）醇脂体是指将传统脂质体中的胆固醇用浓度大于 30 %乙醇代替制备得到的脂质囊泡^[74]，与传统脂质体相比，它的包封率和渗透性都更好。透皮效果好、皮肤刺激性小和包封率高等优点使该剂型在透皮制剂中展现出巨大的发展前景。与普通川穹嗪制剂相比，川穹嗪醇脂体贴剂能更有效地促进川穹嗪吸收入血，其相对生物利用度高达 209.45 %，组织与毒理学试验也表明醇脂体的具有良好的安全性，因此，醇脂体在未来具有很好的开发利用前景^[75]。（2）传递体，也是在脂质体基础上发展出的一种新的透皮吸收有效载体，它是在脂质体膜材中加入边缘活性剂(edge activator,EA)，使得双分子层的变形性增加从而增强其穿透角质层的能力，更好的发挥作用^[76]。吴玉等制备的马钱子脂质体与传递体，体外透皮试验结果表明，传递体可以在很大程度上提高马钱子碱的透皮速率^[77]。

除此以外还有包括类脂囊泡, 前体脂质体, 柔性脂质体等都在经皮给药领域展现出良好的应用前景。

3.2.7 脂质体经皮给药体系在化妆品领域的应用

随着科学技术的不断发展, 学科交叉融合的趋势越来越明显, 为了解决化妆品领域有效活性成分水溶性差等缺点, 引入了脂质体等新兴载药体系。脂质体结构的特殊性能能够很好地解决这一问题。王丽^[78]等制备的神经酰胺 II 脂质体, 稳定性和水溶性均有很大程度的提高, 通过简单的搅拌就可以均匀的分散在化妆品中, 不会出现结晶析出的现象, 人体试验结果也表明, 乳霜中添加了 1 %神经酰胺 II 脂质体 (含 10 %神经酰胺 II) 会使使用者的经表皮水分流失值在 2 h 内恢复 85 %, 在 1 h 内皮肤含水量能够增加 39.58 %。

脂质体在化妆品中除了可以作为载体促进有效成分进入肌肤以外, 还可以起到保湿、软化皮肤、抗氧化等功效。从 1986 年 Dior 首先开发了第一个脂质体化妆品 “CAPTURE” 开始, 已经有超过 100 种含有脂质体的化妆品上市^[79]。

3.2.8 脂质体经皮给药的展望

脂质体作为经皮载药系统中新兴的药物载体, 已经引起了国内外学者的广泛关注。越来越多的学者对脂质体在治疗皮肤疾病、局部伤口、美容护肤和皮肤损伤的保护等方面的优势给予了高度的评价。目前, 在化妆品领域, 脂质体经皮给药系统的应用也有了巨大进展。未来, 随着对脂质体系统研究的不断加深以及科学技术的不断发展, 新兴技术的不断引入, 脂质体在经皮给药领域一定会得到更广泛应用。

4 结语

现如今, 随着社会人口老龄化的不断加深, 越来越多的人开始关注机体老化的问题, 首当其冲的就是皮肤老化的问题, 在现代社会, 越来越多学者开始关注中药在预防和治疗皮肤光老化方面的应用。中草药是我国珍贵的物质资源, 有着悠久的历史, 而且具有纯天然、毒性小、副作用小的优点。人参作为我国传统的名贵中药材, 具有巨大的开发和利用的意义, 人参总皂苷作为人参中主要的活性物质, 除了对多种疾病具有良好的治疗效果, 它在美白护肤抗衰老方面也展现出巨大的潜能。由于人参总皂苷相对分子量较大, 油水分配系数小, 亲脂性差, 导致其皮肤透过性差, 无法跨越皮肤屏障, 限制了人参总皂苷的开发利用。脂质体作为近年来逐渐发展起来的新型纳米载药系统, 在药物的传递上具有其独特的优越性: 水溶性药物和脂溶性药物都可以装载在脂质体的双层

结构中，而磷脂双层膜结构与生物膜结构的高度相似性，能够增加药物的经皮吸收。人参总皂苷包埋在脂质体的双层结构中，能够掩盖人参总皂苷作为水溶性药物难以跨越皮肤屏障的缺点，提高人参总皂苷的透皮效率，这样也会在一定程度上增强人参总皂苷抗衰老、抗氧化的作用；除此以外，人参总皂苷包埋进脂质体的磷脂双分子结构中，由于药物与磷脂间的相互作用，也可以延缓药物的释放时间；因此，本课题将人参中的主要活性物质人参总皂苷与脂质体这一新型载药系统相结合，以期能够改善人参总皂苷透皮性能，延长人参总皂苷的作用时间，提高其生物利用度，从而提高人参总皂苷对于紫外线过度照射引起的皮肤老化的治疗作用。

实验研究

第一章 人参总皂苷体外分析方法的建立

人参总皂苷是人参主要的活性物质，其中含有多种人参皂苷单体，本课题为测定试验过程中人参总皂苷的含量，需要建立一个稳定、可实行的含量测定方法，为整个试验过程中的研究提供科学依据。《中国药典》（2015 版）用人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 及人参皂苷 Rd 为代表性成分，对人参总皂苷进行含量测定。本课题参照《中国药典》（2015 版）选用高效液相色谱法对人参总皂苷进行含量测量，通过对人参总皂苷含量测定方法的建立和方法学的考察，确定了该方法是非常稳定并且可行的，为下一步的试验研究做好了铺垫。

1 试验材料

1.1 试剂

表1 主要试剂

名称	来源
人参皂苷 Rg1 批号：110703-291128	中国食品药品检定研究所
人参皂苷 Re 批号：111818-201803	中国食品药品检定研究所
人参皂苷 Rd 批号：110754-208126	中国食品药品检定研究所
纯净水	实验室自制
甲醇、磷酸（分析）	北京化工厂
甲醇、乙腈（色谱）	Fisher Scientific

1. 2仪器

表2 主要仪器

名称	来源
KQ-250B 型超声波清洗机	昆山市超声仪器有限公司
WP-UP-40 超纯水机	四川沃特尔公司
EL204 型电子天平	上海梅特勒-托利多公司
NewClassic MS 电子天平	上海梅特勒-托利多公司
LC-1260 系列高效液相色谱仪	美国安捷伦公司

2 试验方法

2.1 色谱条件的建立

色谱条件: Inertsil ODS 色谱柱(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm); 流动相: 乙腈(A):0.1 %磷酸水(B), 梯度洗脱 0 min(21 %A) \rightarrow 35 min(21 %A) \rightarrow 40 min(37 %A) \rightarrow 60 min(45 %A) \rightarrow 80 min(21 %A), 流速:1.3 ml/min, 进样量:20 μl ; 检测波长:203 nm; 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 溶液的配制

对照品溶液:分别精密称取人参皂苷对照品 Rg1 0.016 g、人参皂苷对照品 Re 0.016 g 和人参皂苷对照品 Rd 0.016 g 置于 10 ml 容量瓶中, 加甲醇定容直至刻度线, 超声让其全部溶解, 即得。

2.3 标准曲线的绘制

分别精密称取人参皂苷对照品 Rg1、Re 及 Rd 置于容量瓶中, 加甲醇配制成浓度为每 1 ml 含有 0.016 g 人参皂苷 Rg1、0.016 g 人参皂苷 Re 及 0.016 g 人参皂苷 Rd 的混合标准品溶液作为储备溶液。用甲醇将储备溶液稀释, 分别稀释成浓度为 0.05 mg/ml、0.01 mg/ml、0.20 mg/ml、0.40 mg/ml、0.80 mg/ml、1.60 mg/ml 的标准品溶液; 过 0.22 μm 滤膜, 根据“2.1 项下”的色谱条件进行测定, 以人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rd 的峰面积为 X 轴, 浓度为 Y 轴, 分别绘制其标准曲线。

2.4 精密度试验

分别精密称取人参皂苷对照品 Rg1、Re 和 Rd 置于容量瓶中, 加入甲醇溶液, 制成浓度为每 1 ml 溶液中含有人参皂苷 Rg1800 μg 、人参皂苷 Re800 μg 及人参皂苷 Rd800 μg 的混合标准品溶液, 每 1 ml 溶液中含有人参皂苷 Rg1400 μg 、人参皂苷 Re400 μg 及人

参皂苷 Rd400 μg 的混合标准品溶液以及每 1 ml 溶液中含有人参皂苷 Rg1200 μg 、人参皂苷 Re200 μg 、人参皂苷 Rd200 μg 的混合标准品溶液。按照“2.1 项下”色谱条件，24 h 内连续的进样六次，计算混标的日内精密度；连续 6 天，每天进样一次，计算混标的日间精密度。

2.5 稳定性试验

精密量取“2.2 项下”的对照品溶液，按“2.1 项下”色谱条件，分别在 0、2、4、6、12、24 h 进样对其进行含量测定，根据测定得到的峰面积，计算其 RSD 值。

2.6 加样回收率试验

分别精密称取人参皂苷对照品 Rg1、Re 和 Rd 置于容量瓶中，配成每 1 ml 溶液中含有人参皂苷 Rg1400 μg 、人参皂苷 Re400 μg 及人参皂苷 Rd400 μg 的混合标准品溶液。再分别精密移取 0.25 ml、0.5 ml、0.75 ml 置于 10 ml 容量瓶中，分别加入空白的脂质体，在定容至刻度，得浓度为 10、20、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的低、中、高三种浓度的样品溶液。按照“2.1”项下色谱条件测定，计算加样回收率，并计算其 RSD 值。

3 试验结果

3.1 线性关系的考察

经绘制人参皂苷 Rg1 的线性回归方程 $Y=3126X+6.0423$ $R^2=0.9996$ ；人参皂苷 Re 的线性回归方程 $Y=2582.9X+6.7368$ $R^2=0.9996$ ；人参皂苷 Rd 的线性回归方程为： $Y=3766X+43.93$ $R^2=0.9995$ ，在 0.050 mg/ml ~1.604 mg/ml 范围内线性关系良好。其中的 X 代表人参皂苷 Rg1、Re 及 Rd 的浓度，Y 则代表峰面积，结果见下图 1-图 3。

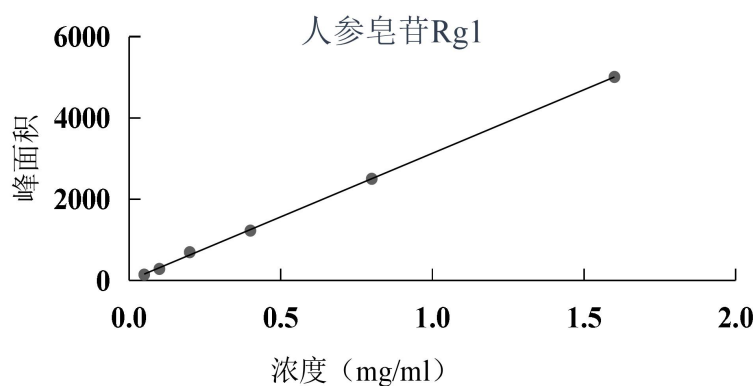


图 1 人参皂苷 Rg1 标准曲线

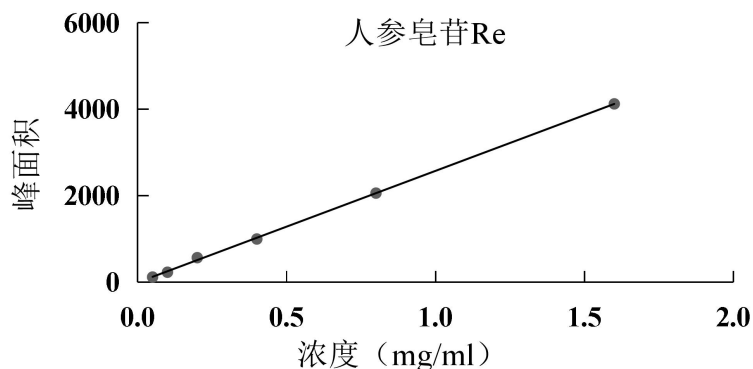


图 2 人参皂苷 Re 标准曲线

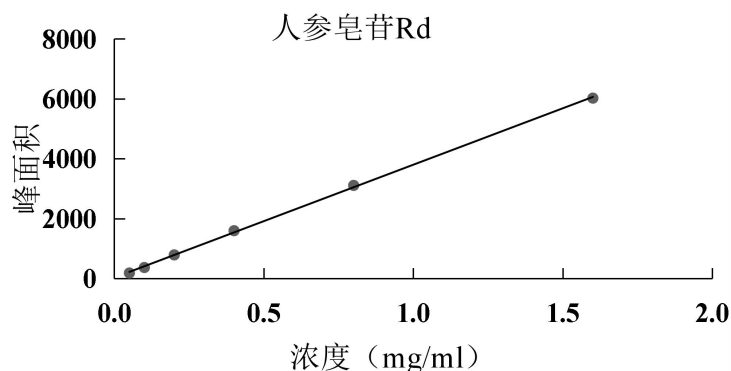


图 3 人参皂苷 Rd 标准曲线

3.2 精密度试验结果

表 3 人参皂苷 Rg1 日内和日间精密度 (n=6)

C (mg/ml)	日内精密度		日间精密度	
	峰面积 (x±s)	RSD (%)	峰面积 (x±s)	RSD (%)
0.20	680.5±7.80	1.15	681.5±4.27	0.63
0.40	1176.6±14.54	1.23	1173.1±5.63	0.48
0.80	2469.5±6.52	0.26	2432.7±20.47	0.84

表 4 人参皂苷 Re 日内和日间精密度 (n=6)

C (mg/ml)	日内精密度		日间精密度	
	峰面积 (x±s)	RSD (%)	峰面积 (x±s)	RSD (%)
0.20	552.0±7.52	1.36	551.0±8.20	1.49
0.40	955.2±14.78	1.54	962.6±5.91	0.62
0.80	2022.4±4.43	0.22	2019.9±6.45	0.32

表 5 人参皂苷 Rd 日内和日间精密度 (n=6)

C (mg/ml)	日内精密度		日间精密度	
	峰面积 (x±s)	RSD (%)	峰面积 (x±s)	RSD (%)
0.20	786.5±11.74	1.49	779.3±11.87	1.52
0.40	1571.0±13.84	0.88	1572.2±12.84	0.82
0.80	3095.2±2.48	0.08	3082.8±16.36	0.53

由表 3-表 5 可知, 人参皂苷 Rg1 日内精密度 RSD 值分别为 1.15 %, 1.23 %, 0.26 %, 日间精密度 RSD 值分别为 0.63 %, 0.48 %, 0.84 %; 人参皂苷 Re 日内精密度 RSD 值分别为 1.36 %, 1.54 %, 0.22 %, 日间精密度 RSD 值分别为 1.49 %, 0.62 %, 0.32 %; 人参皂苷 Rd 日内精密度分别为 1.49 %, 0.88 %, 0.08 %, 日间精密度 RSD 值分别为 1.52 %, 0.82 %, 0.53 %, RSD 值均符合规定, 说明该方法精密度良好。

3.3 稳定性试验结果

表 6 人参皂苷 Rg1 的稳定性试验结果

时间 (h)	峰面积	RSD (%)
0	3121	1.24
2	3144	
4	3144	
6	3180	
12	3052	
24	3126	

表 7 人参皂苷 Re 的稳定性试验结果

时间 (h)	峰面积	RSD (%)
0	2991	1.48
2	2992	
4	3099	
6	3046	
12	2993	
24	2967	

表 8 人参皂苷 Rd 的稳定性试验结果

时间 (h)	峰面积	RSD (%)
0	3851	0.96
2	3866	
4	3954	
6	3905	
12	3844	
24	3885	

从表 6-表 8 中可以看出, 将人参皂苷 Rg1、Re 和人参皂苷 Rd 溶解在甲醇中, 在 24 h 内的稳定性都比较好, RSD 值分别为 1.24 %, 1.48 %和 0.96 %, 均符合规定。

3.4 加样回收率试验结果

表 9 人参皂苷 Rg1 的加样回收率试验结果

浓度 (mg/ml)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD 值
10	99.78	101.44	1.12
10	100.43		
10	101.23		
20	102.42		
20	99.98		
20	103.24		
30	101.52		
30	101.76		
30	102.56		

表 10 人参皂苷 Re 的加样回收率试验结果

浓度 (mg/ml)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD 值
10	100.78	101.84	1.18
10	101.43		
10	101.76		
20	101.42		
20	104.21		
20	101.34		
30	101.29		
30	103.76		
30	100.56		

表 11 人参皂苷 Rd 样回收率试验结果

浓度 (mg/ml)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD 值
10	101.9	102.12	0.77
10	100.64		
10	102.65		
20	101.42		
20	103.26		
20	102.54		
30	101.79		
30	103.05		
30	101.87		

对加样回收率试验的考察, 结果见表 9-11, 由表 9-11 显示, 三个浓度下的加样回收率 RSD 值均小于 2%, 符合加样回收率要求。

4 讨论

人参总皂苷常用的含量测定方法主要有紫外分光光度法以及高效液相色谱法。紫外

分光光度法作为人参总皂苷传统的测定方法，具有操作简单等优点，但由于人参总皂苷中含有很多种单体皂苷成分，在具体的试验操作中，试验重复性较差，导致试验结果不稳定。因此本课题根据《中国药典》（2015 版），选用高效液相色谱法，以人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rd 作为人参总皂苷的主要检测成分，进行人参总皂苷的含量测定。

5 小结

本章利用 HPLC 法，通过对人参总皂苷中的人参皂苷 Rg1、人参皂 Re 和人参皂 Rd 的含量进行了测定，建立了人参总皂苷含量的体外分析测定方法，并对其进行方法学验证，结果表明，人参皂苷 Rg1、Re 及 Rd 在 0.05~1.60 mg/ml 浓度范围内线性关系良好，方法学考察结果表明该方法精密度很好，人参皂苷 Rg1、Re 及 Rd 在 24 h 内稳定性良好。

第二章 人参总皂苷脂质体制备工艺研究

脂质体，最早是由英国学者 Bangham 提出并将其作为药物载体开始应用^[80]。脂质体的成膜材料主要是磷脂和胆固醇；其中，磷脂具有和生物膜相似的双层结构，它结构中亲水的部位可以用来包埋水溶性药物，结构中亲脂的部位可以包埋脂溶性药物。胆固醇则可以用来调节磷脂双层膜的流动性。经常使用的脂质体制备方法主要有注入法（乙醇/乙醚）、逆向蒸发法、薄膜分散法等等。由于人参总皂苷易溶于水和乙醇，在乙醚中几乎不溶，也为了在试验中减少有毒性的试剂的引入，因此选择乙醇注入法制备人参总皂苷脂质体，该制备方法操作简单易行，试验过程中没有毒性试剂的引入，并且该试验方法能够满足工业化大生产。本章以人参总皂苷脂质体的制备作为主要研究内容，以包封率作为评价指标对人参总皂苷脂质体的处方以及其制备工艺进行摸索及优化。

1 试验材料

1.1 试剂

表 12 主要试剂

名称	来源
人参总皂苷	上海源叶生物有限公司
甲醇、乙腈（色谱纯）	Fisher Scientific
甲醇	北京化工厂
去离子水	实验室自制
胆固醇	上海源叶生物有限公司
大豆磷脂	上海艾伟特医药科技有限公司
蛋黄磷脂	上海艾伟特医药科技有限公司
氢化大豆磷脂	上海艾伟特医药科技有限公司
二棕榈酰磷脂酰胆碱	上海艾伟特医药科技有限公司
甘露醇	广西南宁化学制药有限公司

1.2 仪器

表 13 主要仪器

仪器设备	厂家
LC-1260 系列高效液相色谱仪	美国安捷伦公司
Sigma4K15 台式高速冷冻离心机	德国 Sigma 公司
NewClassic MS 电子天平	上海梅特勒-托利多公司
恒温水浴振荡器	上海智城责任有限公司
超声波清洗机器	昆山市超声仪器厂
恒温水浴锅	北京市永光仪器有限公司
78-1 型磁力加热搅拌器	金坛市江南仪器厂

2 试验方法

2.1 人参总皂苷脂质体包封率测定方法的建立

包封率是控制脂质体质量、进行处方筛选以及工艺优化的重要评价指标之一。包封率的测定原理是将包埋了药物的脂质体与未包埋进脂质体双层结构的游离药物分离，通过测定包埋进双层结构的药物含量或者游离药物的含量计算脂质体样品的包封率；包封率的测定方法，常用的主要有离心法、透析法、葡聚糖凝胶法等，其中离心法又包括超速离心法和超滤离心法，每个方法都有它的优缺点，因此，选用一种合适的方法进行包封率的测定是至关重要的。本课题试验之初，分别对不同的分离方法的分离效果进行比较，根据预试验结果，超滤离心法能够很好地分离载药脂质体与游离药物。因此，选用超滤离心法作为载药脂质体与游离药物的分离方法。其原理是根据载药脂质体与游离药物的分子量的差异，在离心力的作用下，游离药物能够通过超滤膜到达离心管的底部，而载药脂质体会被截留在超滤膜上部，以此达到载药脂质体与游离药物分离的目的^[81,82]。接下来，利用 HPLC 法测定游离药物含量，计算该样品的包封率。

计算公式如下：包封率 $EE(\%) = 1 - W_{\text{游离药物}} / W_{\text{总药物}} \times 100\%$ ①。

试验具体操作：取制备得到的人参总皂苷脂质体溶液适量，将其放在超滤离心管中，进行离心，4000 r/min，30 min，离心结束后，取超滤离心管下部游离药物，过 0.22 μm 滤膜，置于液相小瓶中，按照第一章“2.1 项下”的高效液相色谱条件进行人参总皂苷的含量测定，得到该样品中游离药物含量。另取制备得到的人参总皂苷脂质体溶液 1 ml，

将其放在 2 ml 的容量瓶中,加入甲醇溶液进行破乳定容后,过 0.22 μm 滤膜后放于液相小瓶中,按照第一章“2.1 项下”的高效液相色谱条件进行人参总皂苷的含量测定,得到该样品中人参总皂苷总含量,按照上述公式计算人参总皂苷脂质体的包封率。

2.2 人参总皂苷脂质体的处方优化

本课题选用乙醇注入法制备人参总皂苷脂质体。制备方法如下:分别称取处方量的磷脂、胆固醇以及人参总皂苷,将全部膜材与药物,置于 10 ml 烧杯中,加入 1 ml 无水乙醇,超声使其全部溶解,另取烧杯加入 9 ml 去离子水,将溶解好的有机相用注射器一次性全部注入水相中,搅拌一定时间使有机试剂挥发完全即得人参总皂苷脂质体溶液。结合预试验结果,本课题选取以下四个因素进行单因素优化人参总皂苷脂质体处方及制备工艺。

2.2.1 磷脂种类的筛选

磷脂是脂质体制备中的主要膜材,在水中能够组成双分子层或者混合后可以形成双分子层结构的磷脂都能够作为制备脂质体的膜材,这些磷脂主要是天然磷脂和合成磷脂^[83]。不同种类的磷脂对药物的包封程度不同,适合包封的药物性质也不同,有些磷脂适合包封亲脂性药物,有些磷脂对亲水性药物的包封效果较好。因此,本课题选择了大豆磷脂(SPC)、蛋黄磷脂(Egg-PC)、氢化大豆磷脂(HSPC)脂以及合成磷脂二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)四种磷脂分别制备人参总皂苷脂质体溶液,以包封率为评价指标筛选最合适制备人参总皂苷脂质体的磷脂,试验处方见表 14。

表 14 磷脂种类考察处方组成

处 方	磷脂种类	脂药比 (n/n)	胆固醇和磷脂比 (n/n)	有机相和水相比 (v/v)
1	HSPC	1:0.2	1:2.5	1:9
2	Egg-PC	1:0.2	1:2.5	1:9
3	SPC	1:0.2	1:2.5	1:9
4	DPPC	1:0.2	1:2.5	1:9

2.2.2 磷脂与药物摩尔比考察

脂质体的制备中,磷脂与药物之间的比例是影响脂质体对药物包封程度的关键因素,这是由于固定量的磷脂对药物的包封是有限的,药物加入过少,脂质体的包封率过低;药物加入过多,会造成制备过程中药物泄露,也会导致脂质体包封率过低。这两种结果都会使脂质体失去其药物传递的优势。因此,本试验对磷脂与药物的摩尔比进行考

察，以包封率为评价指标，筛选磷脂与药物最合适的摩尔比例。使磷脂与药物摩尔比为：1:0.20，1:0.40，1:0.50，1:0.75，1:0.90，测定其包封率的大小，处方见表 15。

表 15 磷脂与药物比例考察处方组成

处 方	磷脂种类	脂药比 (n/n)	胆固醇和磷脂比 (n/n)	有机相和水相比 (v/v)
1	HSPC	1:0.20	1:2.5	1:9
2	HSPC	1:0.40	1:2.5	1:9
3	HSPC	1:0.50	1:2.5	1:9
4	HSPC	1:0.75	1:2.5	1:9
5	HSPC	1:0.90	1:2.5	1:9

2.2.3 胆固醇与磷脂比考察

众所周知，胆固醇本身是没有双层结构的，但是它可以镶嵌在磷脂的双分子层结构上，用来调节磷脂双分子层膜的流动性，而且它是具有双向调节磷脂膜流动性的能力的，因此，胆固醇也被称作是脂质体的“流动性调节剂”。在处方中加入胆固醇，不仅可以使脂质体膜的稳定性有所提高，而且也可以在一定程度上提高脂质体的包封率。一定量的胆固醇，对脂质体双分子膜流动性的调节是有限制的，当超出其调节能力时，脂质体的稳定性以及包封率会受到影响。因此对胆固醇与磷脂的摩尔比进行考察，筛选出最佳的胆固醇加入量。试验中固定磷脂种类、脂药摩尔比、注入体积比不变，分别考察胆固醇与磷脂的摩尔比分别为 1:2.5，1:3.0，1:3.5，1:4.0，1:4.5 时，脂质体包封率的变化，具体处方见表 16。

表 16 胆固醇与磷脂比例考察处方组成

处 方	磷脂种类	脂药比 (n/n)	胆固醇和磷脂比 (n/n)	有机相和水相比 (v/v)
1	HSPC	1:0.40	1:2.5	1:9
2	HSPC	1:0.40	1:3.0	1:9
3	HSPC	1:0.40	1:3.5	1:9
4	HSPC	1:0.40	1:4.0	1:9
5	HSPC	1:0.40	1:4.5	1:9

2.2.4 有机相与水相比例考察

本课题选用乙醇注入法制备人参总皂苷脂质体，试验中固定磷脂种类、脂药摩尔比、胆固醇磷脂摩尔比不变，考察有机相和水相的体积比对脂质体包封率的影响。分别考察有机相与水相的体积比为 1:6，1:7，1:8，1:9，1:10 时，脂质体的包封率变化，具体处方见表 17。

表 17 有机相与水相比比例考察处方组成

处 方	磷脂种类	脂药比 (n/n)	胆固醇和磷脂比 (n/n)	有机相和水相比 (v/v)
1	HSPC	1:0.40	1:2.5	1:6
2	HSPC	1:0.40	1:3.0	1:7
3	HSPC	1:0.40	1:3.5	1:8
4	HSPC	1:0.40	1:4.0	1:9
5	HSPC	1:0.40	1:4.5	1:10

2.3 验证性试验

根据单因素考察的试验结果，优选出最佳制备工艺：磷脂为氢化大豆磷脂，磷脂与人参总皂苷的摩尔比为 1:0.4，胆固醇与磷脂的摩尔比为 1:3.5，有机相与水相的体积比为 1:9，搅拌时间为 4 h，根据得到的最佳制备工艺，平行制备三批样品，分别测定其包封率并计算 RSD 值。

2.4 冷冻干燥法制备人参总皂苷脂质体冻干粉

由于人参总皂苷脂质体样品为溶液，为了方便贮存和后续试验的开展，将利用冷冻干燥法制备人参皂苷脂质体冻干粉。

具体操作如下：制备得到的人参总皂苷脂质体溶液，精密测定其体积，为了避免样品在形成冻干粉的过程中，脂质体的结构被破坏，需要加入冻干保护剂。本试验选择甘露醇作为冻干保护剂，根据预试验，确定甘露醇加入量为每 10 ml 加入 0.1 g 甘露醇。加入冻干保护剂混合均匀后，将其转移至 -80 °C 冰箱进行预冻，接下来冷冻干燥 48 h 即得人参总皂苷脂质体冻干粉，并对其进行包封率的测定。

3 试验结果

3.1 磷脂种类筛选

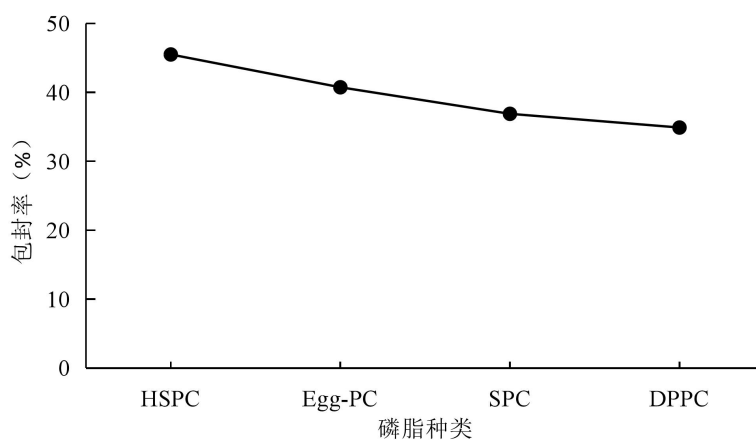


图 4 磷脂种类筛选

如图 4 所示，选择氢化大豆磷脂制备得到的人参总皂苷脂质体的包封率最高，为 45.50%。因此选择氢化大豆磷脂作为制备人参总皂苷脂质体的双层骨架材料。

3.2 磷脂与药物摩尔比考察

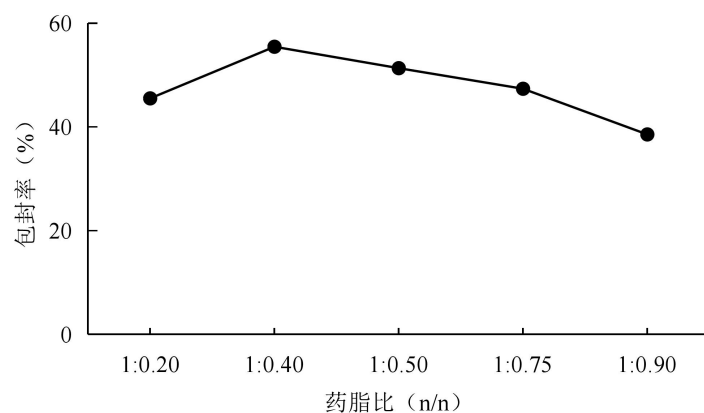


图 5 磷脂与药物比例考察

如图 5 所示，试验中固定其他因素不变，制备得到的脂质体的包封率随着处方中药物量的增加呈现先上升后下降的趋势，这也说明一定量的磷脂对药物的包封程度是有限的。当磷脂与人参总皂苷的摩尔比为 1:0.4 时，得到的脂质体的包封率最高，为 55.45 %。

3.3 胆固醇与磷脂比考察

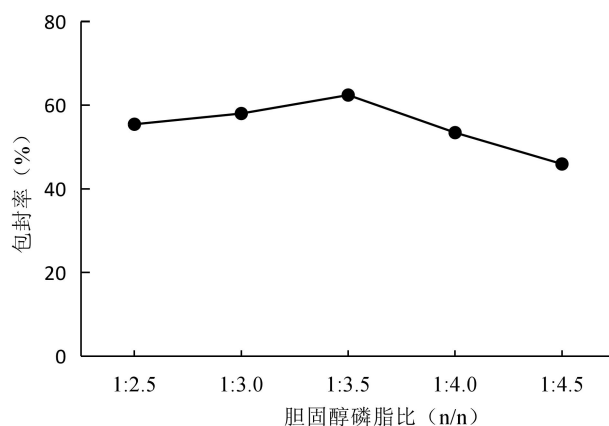


图 6 胆固醇与磷脂比例考察

胆固醇对磷脂双层膜的流动性有调节作用，胆固醇加入量过多，膜流动性增加会造成药物的泄露，胆固醇加入量过少，对磷脂双层膜调节性会减弱，失去其调节作用。如图 6，试验中固定其他条件不改变，考察了胆固醇与磷脂的摩尔比，当胆固醇与磷脂的摩尔比为 1:3.5 时，脂质体有最高的包封率，是 62.43 %。

3.4 有机相与水相比比例考察

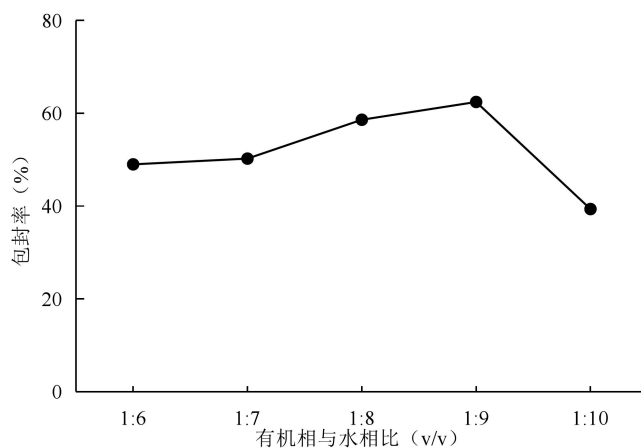


图 7 有机相与水相比比例考察

本试验采用乙醇注入法制备人参总皂苷脂质体，对有机相与水相的体积比进行考察。如图 7 所示，随着水相体积的增加，脂质体的包封率呈现先增加后下降的趋势，当两相的体积比在 1:9 时，得到的脂质体的包封率最高。

3.5 验证性试验结果

表 18 验证试验

序号	包封率 (%)	平均包封率 (%)	RSD (%)
1	63.25	63.38	1.207
2	64.38		
3	62.52		

根据单因素试验考察结果,得到人参总皂苷脂质体最佳处方:氢化大豆磷脂与人参总皂苷摩尔比为 1:0.4;胆固醇与氢化大豆磷脂摩尔比为 1:3.5;有机相与水相的注入体积比 1:9,按照上述处方,搅拌 4 h 既得到人参总皂苷脂质体溶液。根据最佳处方及制备条件,平行制备三批样品,并对三批样品进行包封率测定,计算其 RSD 值,如表 18 显示, RSD 值均符合规定,说明该工艺合理、稳定、可行。

3.6 冷冻干燥法制备人参总皂苷脂质体冻干粉

人参总皂苷脂质体冻干粉为乳白色蓬松的粉末,通过对该冻干粉的包封率的测定,结果为 61.21%,与人参总皂苷脂质体溶液的包封率相差不大。

4 讨论

本试验采用乙醇注入法制备人参总皂苷脂质体的制备。该制备方法的关键在于试验中乙醇是否挥发完全。乙醇的残留会导致药物溶解在乙醇中,从而导致脂质体的包封率下降;除此以外,乙醇的残留也会导致脂质体多分散指数(PDI)过大,粒径分布不均匀。因此,在预试验阶段,对制备过程中的搅拌时间进行了考察,分别考察了搅拌 2 h 和 4 h 对脂质体包封率的影响,试验结果表明搅拌 4 h 得到的脂质体包封率较高,因此最终确定试验搅拌时间为 4 h。

采用单因素考察优化了人参总皂苷脂质体制备处方,分别选择了磷脂种类;磷脂与人参总皂苷摩尔比;胆固醇与磷脂摩尔比以及有机相与水相注入体积比四个条件作为考察因素,以包封率作为评价指标,最终得到人参总皂苷脂质体的最佳制备处方:选择氢化大豆磷脂作为制备人参总皂苷的主要膜材,氢化大豆磷脂与人参总皂苷摩尔比为 1:0.4;胆固醇与氢化大豆磷脂的摩尔比为 1:3.5;有机相与水相的体积比为 1:9;搅拌时间 4 h。为了延长人参总皂苷脂质体的贮存时间,所以将其制备成冻干粉,在进行冻干

之前，对冻干保护剂的加入量进行了考察，以外观状态以及包封率作为评价指标，最终确定甘露醇的加入量为每 10 ml 样品加入 0.1 g 甘露醇。

5 结论

本章建立了人参总皂苷脂质体包封率的测定方法，选用超滤离心法分离载药脂质体和游离药物，采用高效液相色谱法测定游离药物含量，并计算其包封率；单因素考察法优化了人参总皂苷脂质体的处方及制备工艺，最终得到人参总皂苷脂质体最佳制备处方及工艺并进行了三批验证性试验。为延长脂质体的贮藏时间，采用冷冻干燥法，以甘露醇作为冻干保护剂，加入量为每 10 ml 样品中加 0.1 g。制备得到状态良好的人参总皂苷脂质体冻干粉，且包封率与冻干前相差不大。

第三章 人参总皂苷脂质体质量评价

随着越来越多的脂质体药物应用于临床，对脂质体进行质量评价显得尤为重要。本课题对制备得到的人参总皂苷脂质体从外观、粒径分布、Zeta 电位等进行质量评价；利用差示扫描量热法观察脂质体中药物与膜材及辅料间的相互作用；利用 Franz 扩散池法对制备得到的脂质体进行体外透皮性能评价

1 试验材料

1.1 试剂

表 19 主要试剂

名称	来源
人参总皂苷	上海源叶生物有限公司
去离子水	实验室自制
胆固醇	上海源叶生物有限公司
氢化大豆磷脂	上海艾伟特医药科技有限公司
甲醇、乙腈（色谱纯）	Fisher Scientific
甲醇	北京化工厂
甘露醇	广西南宁化学制药有限公司

1.2 仪器

表 20 主要仪器

仪器设备	厂家
EL204 型电子天平	上海梅特勒-托利多公司
NewClassic MS 电子天平	上海梅特勒-托利多公司
Zeta Potential/Particle Sizer NICOMP™ 380 ZLS	美国 PSS 公司
差示扫描量热仪	上海梅特勒-托利多公司
WP-UP-III-40 实验室专用超纯水机	四川沃特尔有限公司
DW-86L938 超低温冰箱	杭州大卫科教仪器有限公司
KQ-250B 型超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司
78-1 型磁力加热搅拌器	金坛市江南仪器厂
RYJ-12B 型药物透皮扩散试验仪	上海黄海药检仪器有限公司
LC-1260 系列高效液相色谱仪	美国安捷伦公司
FDU-1200 冷冻干燥机	日本 EYELA 公司

2 试验方法

2.1 外观观察

首先对制备得到的人参总皂苷脂质体溶液进行外观及气味观察。

2.2 粒径分布

脂质体的形态是封闭的多室囊状或者是多室圆球状。利用激光粒度分析仪可以对脂质体的粒径大小及分布范围进行测定。

试验具体操作如下：取制备好的人参总皂苷脂质体溶液适量，将其放在粒径测定杯中，之后将粒径测定杯放入马尔文粒度分析仪中，于 25 ℃ 的条件下，平衡 120 秒后测定样品的粒径和 PDI，平行测定三次。

2.3 Zeta 电位测定

理论上脂质体是热力学不稳定体系，因此对其表面荷电性进行测定。具体操作是：精密移取制备得到的人参总皂苷脂质体溶液 1 ml 放在电位杯中，将电位杯放在马尔文粒度分析仪中进行电位测定，平行测定三次。

2.4 DSC 分析

差示扫描量热法 (differential Scanning calorimetry,DSC)是在程序升温的条件下,在程序控温和一定气氛下,测定供试品和参比物的热流速率或者是供试品和参比物加热功率,与温度或者时间之间关系的一种热分析方法^[84],它是在差示热分析基础上发展起来的一种热分析方法。文献报道,利用 DSC 分析,即通过观察药物、膜材及载药脂质体的 DSC 曲线的差异,可以观察药物与脂质体间的相互作用^[85]。本课题利用 DSC 分析,观察人参总皂苷、氢化大豆磷脂、胆固醇以及人参总皂苷脂质体 DSC 曲线的差异,评价各物质之间相互作用。

测定条件:分别取适量待测样品,装入铝制的坩埚内,按压紧实。另取作为参比空白坩埚重复上述操作。试验条件:在流速为 50 ml/min 的氮气流保护下进行测量;升温范围是-30~300 °C,升温速率是 10 °C/min。

2.5 体外透皮性能研究

体外透皮吸收试验是通过模拟人体经皮肤给药的渗透过程,计算药物的累积透过率,皮肤滞留量等,为药物的透皮性能提供理论依据^[86-90]。

在药物体外透皮试验中,不同皮肤的性质、以及状态的差异对药物透皮扩散的影响都很大。由于皮肤角质层的厚度和毛孔的密度等因素都会对试验造成影响,本试验使用与人体皮肤相接近的大鼠皮肤作为试验研究对象,但是皮肤的渗透性受皮肤位置的影响,因此,为了减少试验误差,本试验选择雄性大鼠腹部皮肤作为渗透膜进行体外皮肤透过试验研究。

通过查阅相关文献,本试验选择 Franz 扩散池法^[91]进行人参总皂苷脂质体体外透皮吸收试验。Franz 扩散池由接受池和释放池共同模拟药物透过皮肤的过程。本试验通过测定人参总皂苷脂质体冻干粉以及人参总皂苷原料药的皮肤累积透过率、皮肤滞留率以及皮肤总透过量评价人参总皂苷原料药和人参总皂苷脂质体的体外透皮性能。

2.5.1 试验动物

Wistar 雄性大鼠(200±20 g, SPF 级),由长春市亿斯试验动物技术有限责任公司提供,质量检测单位为吉林省试验动物质量检测中心,合格证号:SCXK(吉)-2019-0003。

2.5.2 试验装置

试验装置是 Franz 扩散池,接受池体积为 7 ml,释放池的释药面积为 2.23 cm²,将皮肤放在释放池与接受池中间,用特定的夹子固定好,装置安装完毕后,整个装置与大

气相通的地方用封口膜封住，试验过程中采用封闭给药形式。

2.5.3 离体鼠皮的制备

取体重 200 ± 20 g 的健康雄性大鼠，用乙醚进行麻醉后脱颈处死，用手术剪将大鼠背部皮肤剪开，将整张鼠皮剖下后，选取完整的腹部皮肤，刮去皮肤角质层部位多余的脂肪和黏连物，然后平铺在玻璃板上，将表皮毛发清除干净，再用大量的生理盐水进行反复冲洗，浸泡于生理盐水中， 4°C 保存备用。试验开始前，根据所要求，将其裁剪成合适尺寸进行试验。

2.5.4 人参总皂苷脂质体体外皮肤透过性试验

Franz 扩散池由接受池和供给池组成，皮肤处于中间，试验选用 PBS ($\text{pH}=7.2$) 溶液作为接收介质，取适量的接收介质置于接收池中，并在其中放入搅拌子；采用封闭式给药方式，因此需要用封口膜密封该装置。随后取“2.5.3 项下”制备的大鼠腹部皮肤，一共五块，分别按前文所述放置，夹子固定住后剪去多余皮肤，供给池分别铺满 200 mg 人参总皂苷原药和含有相同药量的人参总皂苷脂质体冻干粉，试验中，温度控制在 37°C ，转速为 300 r/min，记录时间，分别于 6 h、8 h、12 h、24 h 从不同的接受池中取出 1 ml 溶液，加甲醇定容至 2 ml 的容量瓶中，超声使其溶解，过膜，按照第一章“2.1 项下”色谱条件测定其中人参总皂苷含量，计算药物透过率。

分别于各时间点，回收供给池上剩余的样品，加甲醇定容在 5 ml 容量瓶中，超声使其溶解，过膜，按照第一章“2.1 项下”色谱条件测其人参总皂苷含量，计算人参总皂苷剩余量。

分别在不同的取样时间，将皮肤取出，收集回收供给池上剩余样品后将皮肤清洗干净，剪去多余部分的皮肤，剪碎处理后加入生理盐水 1 ml，组织匀浆，匀浆液 9800 r/min 离心 30 分钟，取上清液置于 5 ml 容量瓶中，甲醇定容至刻度线，超声使其全部溶解，过膜，按照第一章“2.1 项下”色谱条件测其人参总皂苷含量计算药物的皮肤滞留率。

3 试验结果

3.1 外观观察

如图 8 所示，人参总皂苷脂质体溶液为透明状液体，能看见明显的白色乳光，状态均一稳定没有聚集沉淀现象；没有特殊或难闻的气味。

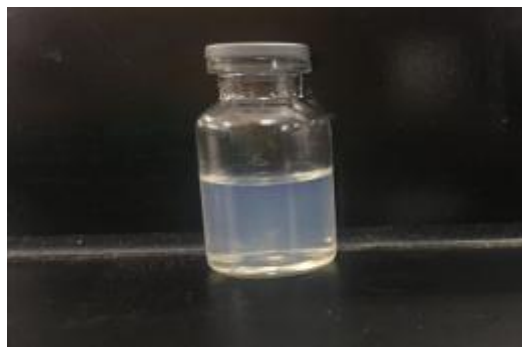


图 8 人参总皂苷脂质体溶液

3.2 粒径分布

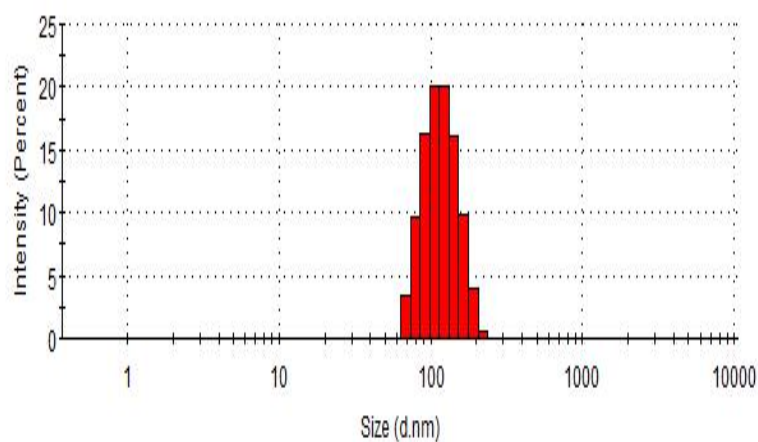


图 9 人参总皂苷脂质体粒径分布图

人参总皂苷脂质体的粒径分布图见图 9，人参总皂苷脂质体的平均粒径为 111.0 nm；PDI: 0.059，小于 0.3，说明该脂质体的粒径分布均匀。

3.3 Zeta 电位

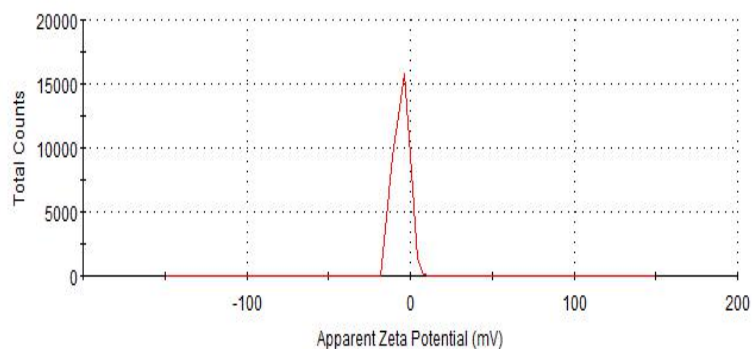


图 10 人参总皂苷脂质体 Zeta 电位图

人参总皂苷脂质体 Zeta 电位测定结果见图 10，人参总皂苷脂质体的 Zeta 电位为 -5.72 mv，该脂质体表面荷负电性，体系较稳定。

3.4 DSC 分析结果

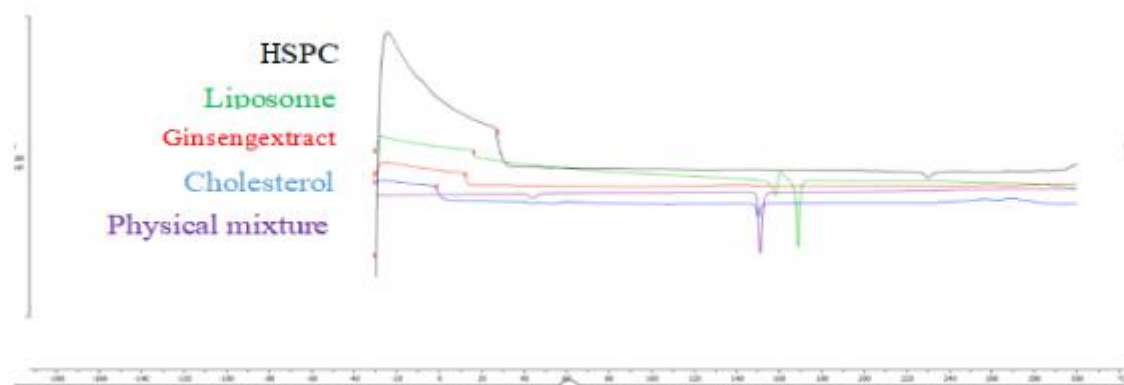


图 11 人参总皂苷脂质体 DSC 分析图

利用差示扫描量热法对人参总皂苷与氢化大豆磷脂、胆固醇之间的相互作用进行观察。如图 11 所示，是人参总皂苷、氢化大豆磷脂、胆固醇、人参总皂苷脂质体以及药物与膜材物理混合物的吸热峰曲线，通过对上述曲线的观察，可以看出胆固醇在 150 °C 有一个明显的吸热峰，这个吸热峰在物理混合物曲线中依然存在，与胆固醇曲线基本重合，而在人参总皂苷脂质体曲线中，这个吸热峰有明显的位移现象；从图中可以看见氢化大豆磷脂在 240 °C 左右有一个吸热峰，而这个吸热峰在人参总皂苷脂质体的曲线中消失；其次，从图中还可以观察到在人参总皂苷脂质体的曲线中有新的吸热峰的出现。综上，说明人参总皂苷与氢化大豆磷脂、胆固醇之间并不是简单的物理混合，而是以上物质之间发生了相互作用，人参总皂苷被包埋在氢化大豆磷脂的双层结构中形成载药脂质体。

3.5 体外透皮试验结果

本课题采用 Franz 扩散池法对人参总皂苷原料药和人参总皂苷脂质体的体外透皮性能进行了比较研究。人参总皂苷原料药在 24 h 内未检测到透过药物含量；如图 12 是人参总皂苷脂质体体外皮肤透过率曲线，人参总皂苷脂质体在 6 h, 8 h, 12 h, 24 h 内的累积透过率、皮肤滞留率以及皮肤总透过率见表 18。

如表 21 所示，人参总皂苷脂质体在 24 h 内的累积透过率为 33.30 %、在 24 h 内的滞留率为 52.16 %、在 24 h 内的总透过率为 85.46 %。试验结果表明，人参总皂苷原药皮肤透过性差，含量无法准确测定；将人参总皂苷制备成人参总皂苷脂质体能够有效的

提高人参总皂苷的皮肤透过性。

表 21 人参总皂苷脂质体体外透过试验结果 (n=3)

时间 (h)	累积透过率 (%)	皮肤滞留率 (%)	总透过率 (%)
6 h	21.43±0.908	26.74±2.677	48.17±2.076
8 h	23.52±2.326	30.92±1.040	54.44±1.340
12 h	29.40±1.685	44.49±0.947	73.89±2.355
24 h	33.3±0.290	52.16±1.350	85.46±3.640

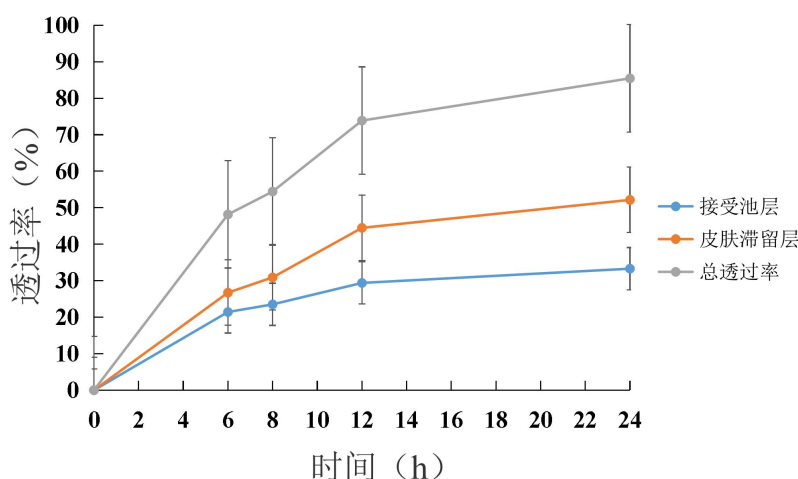


图 12 人参总皂苷脂质体体外皮肤透过率曲线

4 讨论

本章根据本课题对制备得到的人参总皂苷脂质体的需求, 对其进行了质量评价。

首先对人参总皂苷脂质体的外观及气味进行观察, 其外观状态良好, 无不良气味; 其次对人参总皂苷脂质体的粒径及 Zeta 电位进行测定, 对其粒径的分布及稳定性进行初步的评价; 利用 DSC 分析对制剂、原料药以及膜材的吸热峰曲线进行测定, 该试验在加样的过程中, 应注意由于铝制坩埚的容量有限, 所以加样量应控制在合理的范围, 加样过少, 样品不能铺满坩埚底部, 导致试验结果不准确; 加样过多会造成样品泄露, 对机器造成污染, 也会影响试验结果。通过对其吸热曲线的测定, 观察人参总皂苷与氢化大豆磷脂、胆固醇之间的相互作用。利用 Franz 扩散池法对人参总皂苷原药和人参总皂苷脂质体的体外透皮性能进行评价, 试验中选择封闭给药的方式, 试验温度控制在

37 ℃，通过查阅文献，选择 PBS 缓冲液（pH=7.2）作为接收池中的接受介质，分别在各时间点取样测定药物的累积透过率，通过对各时间点试验皮肤的处理，测定药物在皮肤内的滞留率；通过对皮肤表面药物的含量测定，计算药物在各时间点的总透过率。

5 小结

本章对得到的人参总皂苷脂质体进行了初步的质量评价。人参总皂苷脂质体的外观状态良好，无聚集沉淀现象，并且没有难闻气味；人参总皂苷脂质体的粒径为 111.0 nm，PDI 为 0.059；Zeta 电位为-5.72 mv，为带负电脂质体，可能是因为本文所用的磷脂含有较少负电荷；通过对人参总皂苷、氢化大豆磷脂、胆固醇以及人参总皂苷脂质体的吸热曲线的测定，说明人参总皂苷与处方中其他膜材之间不是简单的物理混合而是发生相互作用，药物被包埋在磷脂双分子层的亲水中心；Franz 扩散池法对人参总皂苷原药在 24 h 内未检测到透过药物含量，可能是由于透过皮肤的药物含量较少，无法进行含量测定，说明人参总皂苷的皮肤透过性很差；人参总皂苷脂质体在 24 h 内的累积透过率为 33.30 %；人参总皂苷脂质体在 24 h 内的滞留率为 52.16 %；人参总皂苷脂质体在 24 h 内的总透过率为 85.46 %。

综上，本课题制备得到的人参总皂苷脂质体各项均符合规定，经过体外透皮试验初步证明利用脂质体这一新型药物载体装载人参总皂苷能够提高人参总皂苷的皮肤透过率，提高其生物利用度，使其更好的经皮发挥疗效。

第四章 人参总皂苷脂质体对紫外皮肤光老化治疗作用的研究

皮肤是人体的最表层,如果外邪侵害人体,作为人体的屏障保护器官的皮肤,会最先受到伤害,出现干燥、松弛、变薄、皱纹出现以及色素沉着等现象。风、湿、热、毒和虫均可以称为外邪。其中,“光毒”是在日常生活中,人类皮肤最容易遭受到的侵害^[92]。本章利用 UVA/UVB 模拟日光建立大鼠皮肤光老化模型。采用背部皮肤外部涂抹擦拭的给药方式对患处皮肤进行治疗。通过肉眼观察、拍照记录以及皮肤厚度测定的方式观察大鼠患处皮肤变化情况;通过对大鼠患处皮肤组织病理学切片观察皮肤组织形态学变化,评价人参总皂苷对大鼠光老化皮肤的治疗作用。通过分别测定大鼠皮肤内 MDA 含量、SOD、GSH-Px 活性,从氧化应激的角度初步探讨人参总皂苷对大鼠皮肤光老化治疗可能的作用机制;另外,分别测定 MMP-1、MMP-3、IL-6、IL-1 β 以及 TNF- α 在大鼠皮肤组织中的含量,初步探讨人参总皂苷是否是通过干预炎症反应从而对大鼠光老化皮肤起到治疗作用,以此发挥其抗衰老功效。

1 试验材料

1.1 试剂

表 22 主要试剂

名称	来源
人参总皂苷	上海源叶生物有限公司
去离子水	实验室自制
胆固醇	上海源叶生物有限公司
氢化大豆磷脂	上海艾伟特医药科技有限公司
4 %多聚甲醛	北京酷来博科技有限公司
丙二醛 (MDA) 试剂盒	南京建成生物工程研究所
总超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒	南京建成生物工程研究所
谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒	南京建成生物工程研究所
BCA 法蛋白定量试剂盒	南京建成生物工程研究所
肿瘤坏死因子 (TNF- α) ELisa 试剂盒	江苏酶免实业有限公司
白介素-1 β (1L-1 β) ELisa 试剂盒	江苏酶免实业有限公司
白介素-6 (1L-6) ELisa 试剂盒	江苏酶免实业有限公司
基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) ELisa 试剂盒	江苏酶免实业有限公司
基质金属蛋白酶-3 (MMP-3) ELisa 试剂盒	江苏酶免实业有限公司

1.2 仪器

表 23 主要仪器

仪器设备	厂家
NewClassic MS 电子天平	上海梅特勒-托利多公司
78-1 型磁力加热搅拌器	金坛市江南仪器厂
UVA/UVB 灯管	飞利浦电器科技集团(中国)有限公司
紫外辐射测定仪	北京师范大学光电仪器厂
手动组织匀浆器	睿星实验器材厂
多功能酶标仪	美谷分子仪器有限公司
恒温水浴锅	北京市永光仪器有限公司
电动剃须刀	飞科公司
超声波清洗机器	昆山市超声仪器厂
Sigma4K15 台式高速冷冻离心机	德国 Sigma 公司

1.3 试验动物

SPF 级 SD 大鼠 32 只, 雌雄各半, 体重 200 ± 20 g, 由长春市亿斯试验动物技术有限责任公司提供, 质量检测单位为吉林省试验动物质量检测中心, 合格证号: SCXK(吉)-2019-0003。

1.4 试验环境

环境设施符合试验动物清洁级别, 温度为 $20-25^{\circ}\text{C}$, 湿度为 40-70 %。

1.5 溶液配制

表 24 主要溶液配制

溶液	配制方法
PBS 缓冲液	0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液 50 ml 与 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 35 ml, 加蒸馏水定容稀释至 200 ml, 混匀后调节 pH 至 6.8。
戊二醛固定液 (2.5 %)	25 % 戊二醛溶液 1 ml, 加 4 ml 蒸馏水, 5 ml, 0.2 M 磷酸盐缓冲液, 混合均匀。

2 试验方法

2.1 大鼠皮肤光老化模型建立

32 只 SD 大鼠按照性别随机分为四组, 每组 8 只, 雌雄各半。具体分组如下: 正常

对照组（Normal control group）、模型对照组（Model control group）、人参总皂苷溶液组（Ginseng total saponin solution group）、人参总皂苷脂质体组（Ginseng total saponin liposome group）。试验动物分组后单笼饲养在特制鼠笼中，光照符合昼夜交替。遵守动物试验伦理要求，试验动物均经过一周适应性饲养后开始试验。

首先参照文献^[93,94]对大鼠背部皮肤进行剃毛处理：先用剪刀剪短背部毛发，再用电动剃须刀剃去毛发露出背部皮肤，面积大约为 3 cm×3 cm。接下来进行紫外照射，照射前对 UVA 及 UVB 灯管辐射强度进行测量，利用紫外辐照测定仪测定最小红斑量（minimum erythema quantity）为 37.34 J/cm²。根据最小红斑量，设定照射时间。将剃毛后的大鼠放入自制的紫外灯箱中，固定照射距离为 10 cm，进行紫外（UVA+UVB）照射。结合试验情况以及文献^[95-97]中的照射方案，第一周 20 min/每天，第二周 40 min/每天，第三周 60 min/每天，此后维持 60 min/每天直至大鼠背部皮肤出现干燥，起皮，甚至局部有溃烂现象即为造模结束。试验中动物分组及具体处理情况见表 25。

表 25 试验动物分组及处理情况

分组	处理情况
正常对照组（A）	正常饲养，剃毛，不进行紫外照射，不给药
模型对照组（B）	正常饲养，剃毛，和其他组一起进行紫外照射，不给药
人参总皂苷溶液组（C）	正常饲养，剃毛，进行紫外照射，给药时背部均匀涂抹固定量的人参总皂苷溶液
人参总皂苷脂质体组（D）	正常饲养，剃毛，进行紫外照射，给药时背部均匀涂抹与溶液组等浓度等量的人参总皂苷脂质体溶液

2.2 大鼠皮肤外观形态观察

造模结束后，给药期间，每天分别对试验动物进行拍照观察其背部皮肤变化。

2.3 大鼠皮肤厚度测定

造模试验结束后，给药期间，利用游标卡尺每天分别对试验动物背部皮肤厚度进行测量。具体操作如下，提起试验动物背部患处皮肤，用游标卡尺测定同一部位皮肤厚度，此时测定的为试验动物背部双层皮肤厚度。

2.4 大鼠皮肤组织形态学观察

2.4.1 皮肤标本制备

- ①固定:用锋利的手术剪快速剪下 1 cm×1 cm 大鼠皮肤组织, 放在 4 %多聚甲醛固定液中固定超过 48 h;
- ②脱水:50 %乙醇 0.5 h→70 %乙醇 1 h→80 %乙醇 2 h→90 %乙醇 2 h→95 %乙醇 2 h→95 %乙醇 2 h→100 %乙醇 1 h→100 %乙醇 1 h;
- ③透明:二甲苯(I)1 h→二甲苯(II)1 h;
- ④浸蜡:石蜡(I)0.5 h→石蜡(II)1.5 h;
- ⑤包埋后切片: 包埋好的皮肤组织蜡块切成厚度 5 μm 的薄片, 晾干过夜, 密封后冰箱 4 °C 保存。

2.4.2 HE 染色

- ①脱蜡:二甲苯(I)10 min→二甲苯(II)5 min→二甲苯(III)5 min→无水乙醇(I)3 min→无水乙醇(II)3 min→95 %乙醇(I)3 min→95 %乙醇(II)3 min→85 %乙醇 3 min→80 %乙醇 2 min→70 %乙醇 2 min→50 %乙醇 2 min→蒸馏水 2 min;
- ②染色:苏木精染色 5 min 左右→自来水洗 2 min→蒸馏水 2 min→1 %盐酸酒精 3-5 s→自来水蓝化 15 min→蒸馏水 2 min→1 %伊红 2 min→蒸馏水 2 s;
- ③脱水、透明:80 %乙醇 2 min→95 %乙醇(I)2 min→95 %乙醇(II)2 min→无水乙醇(I)5 min→无水乙醇(II)5 min→二甲苯(I)5 min→二甲苯(II)5 min;
- ④脱水和透明完成后, 用中性树胶进行封片。

2.4.3 醛品红染色

- ①脱蜡:与 HE 染色步骤一致;
- ②染色:0.5 %高锰酸钾溶液氧化 5 min, 水洗:2 %草酸漂白 1-2 min, 水洗:70 %乙醇浸泡 1 min; 醛品红浸染 10 min; 70 %乙醇分化, 至切片不再脱色;0.5 %橙黄 G 染色 1 min(做对比);
- ③脱水、透明和封片:无水乙醇脱水 20 s, 二甲苯透明 20 s, 中性树脂进行封片。

2.5 大鼠皮肤组织中 MDA 含量以及 SOD、GSH-Px 活性测定

2.5.1 皮肤组织匀浆液的制备

试验动物脱颈处死后, 立即用手术剪取试验部位皮肤适量, 除去皮下多余的结缔组织, 4 °C 保存的生理盐水清洗后, 滤纸吸干多余的水分, 称重, 再加入 4 °C 保存的生理

盐水，加入比例为 W:V=1:9，放在离心管中暂时保存。冰水浴中进行组织匀浆，利用玻璃手动组织匀浆器进行充分匀浆后，将匀浆液进行离心处理，条件为：4 ℃；4000 r/min；20 min。离心结束后，收集上部清液，分别装在合适的离心管中保存于-80 ℃冰箱中待测。

2.5.2 皮肤组织匀浆蛋白浓度测定

依照 BCA 法蛋白定量试剂盒的说明书配制试验中需要的工作液，根据表 26 依次加入各试剂，混合均匀，37 ℃孵育 30 min，利用酶标仪在 562 nm 的波长下测定各孔的吸光度。根据下列公式计算组织中蛋白浓度。

计算公式：总蛋白浓度=（测定 OD 值-空白 OD 值）/（标准 OD 值-空白 OD 值）×标准品浓度×样品稀释倍数②。

表 26 蛋白浓度测定操作表

试剂	空白孔	标准孔	测定孔
双蒸水（μl）	10	—	—
标准品（μl）	—	10	—
待测样品（μl）	—	—	10
工作液（μl）	250	250	250

2.5.3 大鼠皮肤组织中 MDA 含量测定

依照丙二醛（MDA）试剂盒的说明书配制试验中需要的应用液，根据表 27 依次加入各试剂，混合均匀后盖紧离心管，在离心管的盖子上用注射器扎上小孔，95 ℃水浴反应 80 分钟，取出后流水冷却，接下来进行离心处理，条件为：4 ℃；4000 r/min；10 min，离心结束后，收集上部清液，利用酶标仪在 532 nm 的波长下测定各孔的吸光度。根据下列公式计算 MDA 含量。

计算公式：组织中 MDA 含量（nmol/ml）=（样品 OD 值-对照 OD 值）/（标准品 OD 值-空白 OD 值）×标准品浓度×待测样品蛋白浓度（mgprot/ml）③。

表 27 MDA 含量测定操作表

试剂	空白		样品	对照
10 nmol 标准品 (ml)	—	标准	—	—
无水乙醇 (ml)	0.1	—	—	—
待测样品 (ml)	—	—	0.1	0.1
试剂 1 (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
混合均匀				
试剂 2 应用液 (ml)	3.0	3.0	3.0	3.0
试剂 3 应用液 (ml)	1.0	1.0	1.0	—
50 %冰醋酸 (ml)	—	—	—	1.0

2.5.4 大鼠皮肤组织中 SOD 活力测定

依照超氧化物歧化酶 (T-SOD) 试剂盒的说明书配制试验中需要的应用液, 按照表 28 依次加入各试剂, 混合均匀室温反应 10 min, 利用酶标仪在 550 nm 的波长下测定各孔的吸光度。根据下列公式计算皮肤组织中总 SOD 活力。

计算公式: 总 SOD 活力 (U/mgprot) = (对照 OD 值-测定 OD 值) / 对照 OD 值 ÷ 50% × {反应总体积 (ml) / 取样量 (ml)} ÷ 待测样品蛋白浓度 (mgprot/ml) ④。

表 28 SOD 活力测定操作表

试剂	测定	对照
试剂 1 应用液 (ml)	1.00	1.00
待测样品 (ml)	0.05	—
蒸馏水 (ml)	—	0.05
试剂 2 (ml)	0.10	0.10
试剂 3 (ml)	0.10	0.10
试剂 4 应用液 (ml)	0.10	0.10
混合均匀, 37 °C 水浴恒温 40 min		
显色剂 (ml)	2.00	2.00

2.5.5 大鼠皮肤组织中 GSH-Px 活性测定

依照谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒的说明书配制试验中需要的应用液，试验中应注意试剂 1 应用液应在 37 ℃ 水浴中提前预热，按照表 29 进行酶促反应试验，混合均匀后进行离心处理，条件为：4000 r/min；10 min，离心结束后取上清液按照表 30 进行显色反应，在 421 nm 的波长处，测定各管的吸光度。根据下列公式计算 GSH-Px 酶活力。

计算公式：GSH-Px 酶活力=（非酶管 OD 值-酶管 OD 值）/（标准管 OD 值-空白管 OD 值）×标准管浓度（20 mmol）×稀释倍数（5）÷反应时间÷（取样量×样本蛋白含量）⑤。

表 29 GSH-Px 活性测定操作表 1

试剂	测定	对照
1 mmolGSH（ml）	0.2	0.2
待测样品（ml）	—	0.2
37 ℃ 水浴预热 5 分钟		
试剂 1 应用液（ml）	0.1	0.1
37 ℃ 水浴准确反应 5 分钟		
试剂 2 应用液（ml）	2.0	2.0
待测样品（ml）	0.2	—
混合均匀，4000 r/min，10 min，取上清做显色反应		

表 30 GSH-Px 活性测定操作表 2

试剂	空白管	标准管	非酶管	酶管
GSH 标准品溶剂应用液（ml）	1.00	—	—	—
20 mmolGSH 标准液（ml）	—	1.00	—	—
上清液（ml）	—	—	1.00	1.00
试剂 3 应用液（ml）	1.00	1.00	1.00	1.00
试剂 4 应用液（ml）	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂 5 应用液（ml）	0.05	0.05	0.05	0.05

2.6 大鼠皮肤组织中 MMP-1/MMP-3 含量测定

2.6.1 皮肤组织匀浆液制备

试验步骤同 2.5.1。

需要注意的是测试前，样品需要再次离心除去沉淀。

2.6.2 Elisa 法测定大鼠皮肤组织中 MMP-1/MMP-3 含量

①试验开始前将试剂放在室温平衡 30 分钟，按照试剂盒提供的说明书配制试验所需各工作液备用。

②加样：试验中设置标准孔、空白孔以及待测样品孔，在酶标包被板上标准品准确加样 50 μl ，待测样品孔中先加样品稀释液 40 μl ，然后再加待测样品 10 μl （样品最终稀释度为 5 倍）。

③温育：用封板膜封板后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 分钟。

④洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液（预先配置好），静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。

⑤加酶：每孔加入酶标试剂 50 μl ，空白孔除外。

⑥温育：操作同 3。

⑦洗涤：操作同 4。

⑧显色：每孔先加入显色剂 A 50 μl ，再加入显色剂 B 50 μl ，轻轻震荡混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 分钟。

⑨终止：每孔加终止液 50 μl ，终止反应（此时蓝色立转黄色）。

⑩测定：以空白孔调零，450 nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

2.7 大鼠皮肤组织中 1L-6、1L-1 β 以及 TNF- α 含量测定

试验步骤同 2.6.2。

2.8 统计分析

采用 t 检验进行数据分析，数据以均数 \pm 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示， $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 试验结果

3.1 大鼠皮肤形态观察

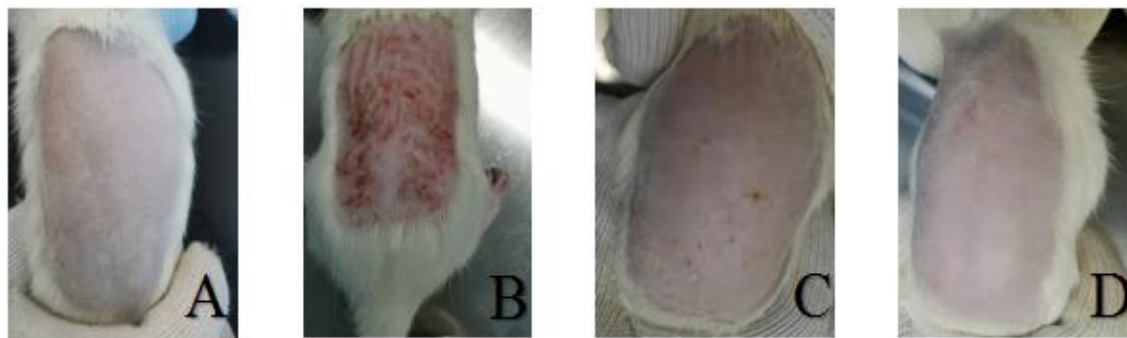


图 13 人参总皂苷脂质体对大鼠光老化皮肤外观形态的影响

(注：A：正常对照组；B：模型对照组；C：人参总皂苷溶液组；D：人参总皂苷脂质体组)

试验给药期间，对各组试验大鼠代表性皮肤变化进行拍照记录。如图 13 是给药 10 天后各组大鼠背部皮肤状态。正常对照组试验大鼠的背部皮肤状态良好，表面没有肉眼可见的伤痕，皮肤较为光滑，无粗糙起皮的现象，偶尔可见细小皱纹，但会随着大鼠的运动而消失；模型对照组大鼠的背部皮肤可以看见明显的红肿或者稍有溃烂，情况未见明显的好转，可以看见横向粗糙的皱纹持续存在，不会随着大鼠的运动而消失；人参总皂苷溶液组大鼠背部皮肤有所好转，但是仍然可以看见细小的皱纹持续存在，局部仍然有粗糙起皮的现象，局部溃烂的地方可以看见明显的疤痕；人参总皂苷脂质体组大鼠背部皮肤可以观察到明显的好转，局部有微微发红现象，但是干燥起皮的现象消失，局部皮肤表面有细微的毛发生长现象。

3.2 人参总皂苷脂质体对大鼠光老化皮肤厚度影响

给药期间，每天对各组试验大鼠背部皮肤厚度进行测量，结果见图 14。和正常对照组相比，模型对照组大鼠皮肤厚度明显增加，差异具有统计学意义 ($P<0.001$)；和模型对照组比较，人参总皂苷溶液大鼠皮肤厚度有所减小，但是没有明显的差异；人参总皂苷脂质体组与模型对照组相比，皮肤厚度明显减小，差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。

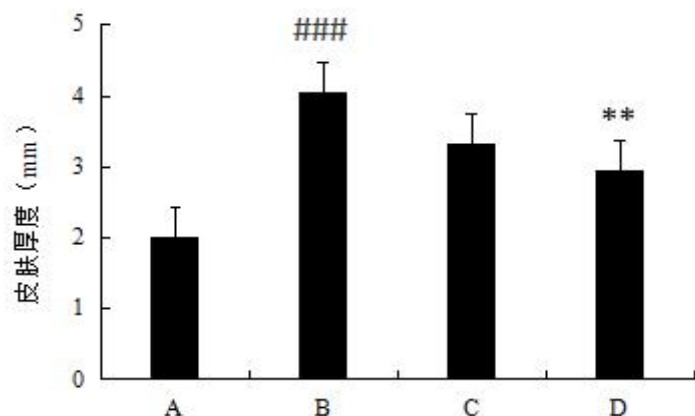


图 14 人参总皂苷脂质体对大鼠光老化皮肤厚度的影响

(注: A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 人参总皂苷溶液组; D: 人参总皂苷脂质体组)

(注: 与正常组相比, ### $P<0.001$ 、## $P<0.01$; 与模型组相比, *** $P<0.001$ 、** $P<0.01$ 、* $P<0.05$)

3.3 HE 染色观察人参总皂苷脂质体对大鼠皮肤组织结构的影响

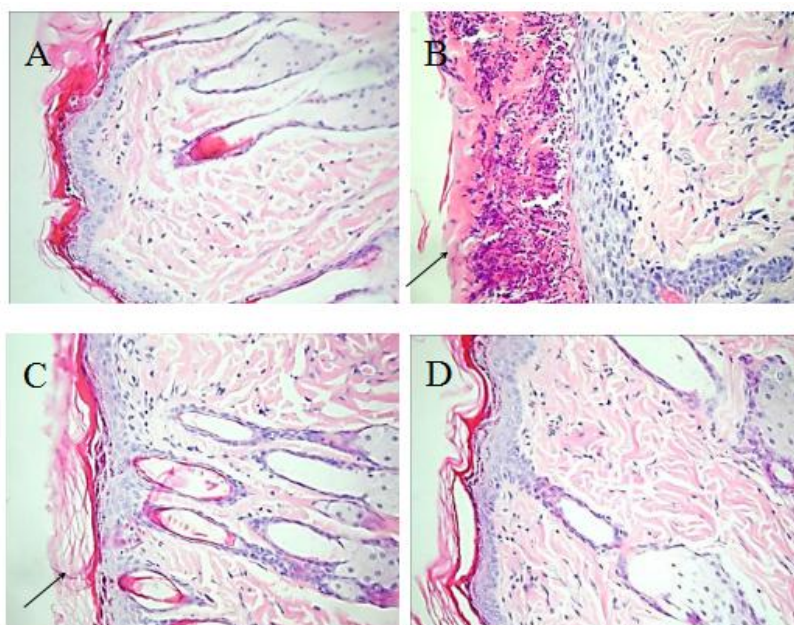


图 15 SD 大鼠光老化皮肤病理切片 HE 染色 (200×)

(注: A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 人参总皂苷溶液组; D: 人参总皂苷脂质体组)

对大鼠光老化皮肤病理切片进行 HE 染色观察, 图 15 为给药 10 天后进行 HE 染色后观察的结果。正常对照组大鼠皮肤没有过度角质化的现象, 表皮层的厚度正常, 表皮层和真皮层的连接处, 呈现波浪状, 观察中可看见表皮突和真皮乳头; 丰富的胶原纤维束以细长的波浪状规则的排列在真皮层。模型对照组大鼠皮肤的角质层明显加厚, 这是角质细胞过度增殖, 并且排列失去规则导致的结果; 表皮层与真皮层的连接失去波浪状,

受损区域的部分表皮出现缺失的现象，并且伴随着真皮乳头的减少或者消失，人参总皂苷溶液组大鼠皮肤角质层与正常对照组相比较厚，可见结痂、表皮下及真皮层的炎细胞浸润，真皮乳头可见但较少。人参总皂苷脂质体组与模型对照组相比有明显的好转，皮肤表皮层厚度基本正常，较薄，表皮与真皮连接处可以看到少量炎细胞浸润。

3.4 醛品红染色观察人参总皂苷脂质体对大鼠皮肤弹性纤维的影响

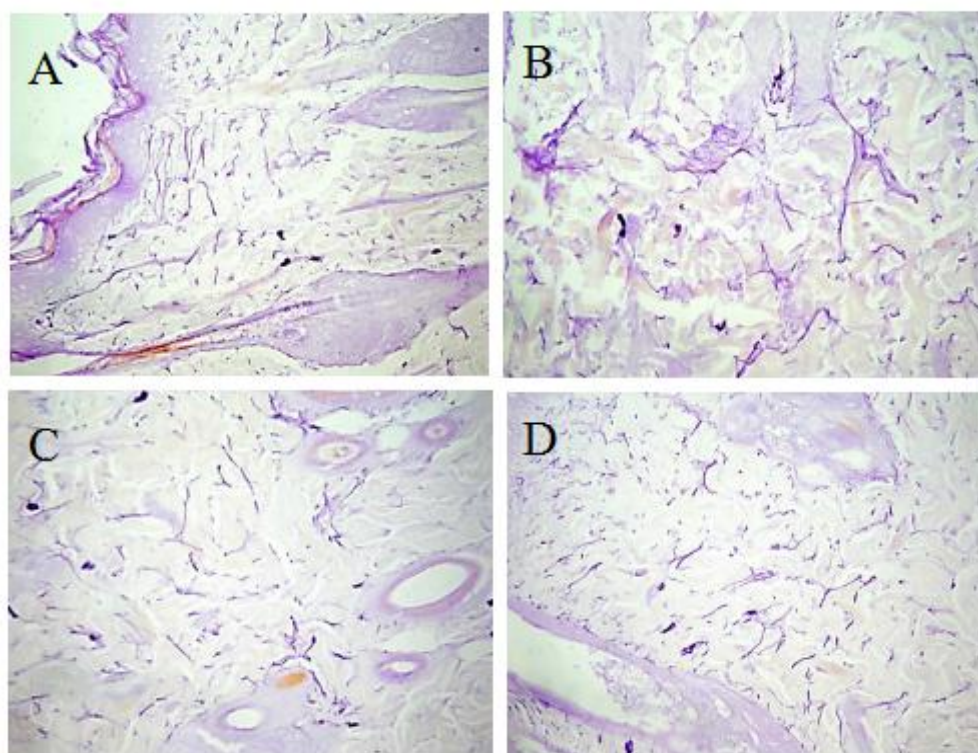


图 16 SD 大鼠光老化皮肤病理切片醛品红染色（200×）

（注：A：正常对照组；B：模型对照组；C：人参总皂苷溶液组；D：人参总皂苷脂质体组）

对大鼠光老化皮肤进行醛品红染色观察其弹性纤维变化，图 16 为给药 10 天后进行醛品红染色的结果，正常对照组大鼠皮肤弹性纤维的网状结构比较清晰，纤维形状细长，有序排列。模型对照组和人参总皂苷溶液组的大鼠皮肤弹性纤维的排列规则消失，这是弹性纤维大量断裂，堆积成团的结果。人参总皂苷脂质体组与模型对照组相比，该现象有明显的改善，弹性纤维没有明显的断裂及堆积成团的现象，网状结构比较清晰，排列有序，楚楚有致。醛品红染色的结果提示人参总皂苷能够修复由紫外诱导的大鼠皮肤弹性纤维的损伤。

3.5 人参总皂苷脂质体对大鼠光老化皮肤组织中 MDA 含量的影响

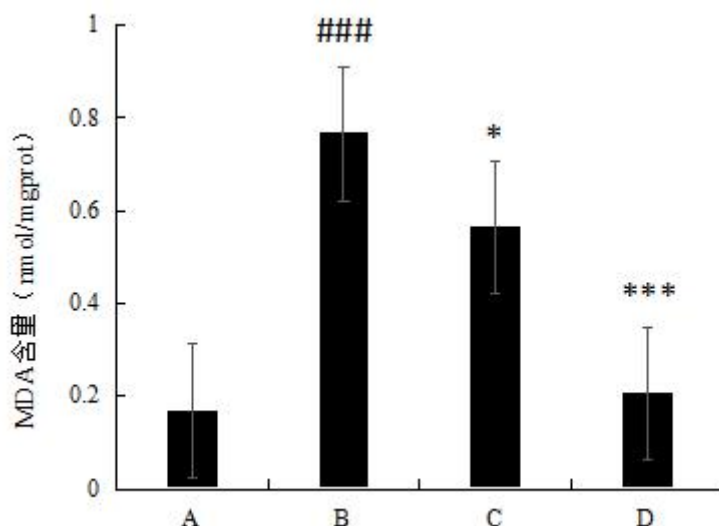


图 17 人参总皂苷脂质体对大鼠光老化皮肤组织中 MDA 含量的影响

（注：A：正常对照组；B：模型对照组；C：人参总皂苷溶液组；D：人参总皂苷脂质体组，均为给药 10 天后测定结果）

丙二醛（MDA）作为生物膜脂质氧化的最终产物，能与蛋白质，核酸等物质交联生成难溶性的物质，从而导致细胞膜损伤，进而影响细胞间的物质交换^[98]。如图 17 所示，与正常对照组相比，模型对照组 MDA 含量明显增加（ $P<0.001$ ），这个结果表明紫外线照射可以使皮肤组织中的 MDA 含量的增多，从而引起皮肤损伤。人参总皂苷溶液组与模型对照组相比，MDA 含量有降低的趋势，有显著性差异（ $P<0.05$ ）；人参总皂苷脂质体组与模型对照组相比，MDA 含量明显降低，有极显著差异（ $P<0.001$ ）。该试验结果提示，人参总皂苷脂质体能够在一定的程度上抑制由紫外线照射引起的大鼠皮肤脂质过氧化。

3.6 人参总皂苷脂质体对大鼠皮肤组织中 SOD、GSH-Px 活力的影响

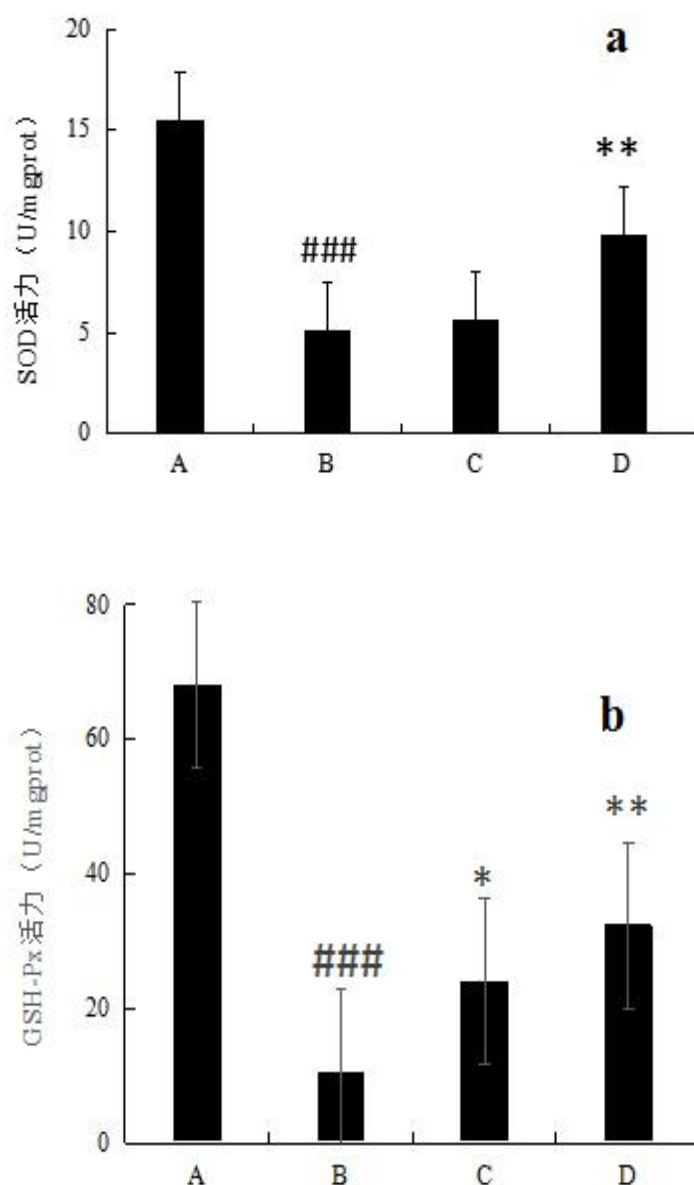


图 18 人参总皂苷脂质体对大鼠光老化皮肤组织中 SOD、GSH-Px 活力的影响

(注: A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 人参总皂苷溶液组; D: 人参总皂苷脂质体组, 均为给药 10 天后测定结果)

抗氧化酶系统作为生物体对抗氧化应激的重要组成部分, 是评价人体抗氧化能力的重要指标之一。从图 18a 可以看出, 与正常对照组相比, 模型对照组大鼠皮肤组织中 SOD 活力明显下降 ($P<0.001$)。与模型对照组相比, 人参总皂苷溶液组皮肤组织中的 SOD 酶活力稍有提高, 但是差异不具有统计学意义; 人参总皂苷脂质体组的大鼠皮肤组织中 SOD 活力提高明显, 有统计学意义 ($P<0.01$)。

如图 18b 所示, 模型对照组大鼠皮肤组织中 GSH-Px 活力与正常对照组相比, 明显

下降 ($P<0.001$)。与模型对照组相比, 人参总皂苷溶液组与脂质体组的大鼠皮肤组织中的 GSH-Px 酶活力都有提高, 其中人参总皂苷脂质体组 GSH-Px 活力提高更为明显 ($P<0.01$)。

3.7 人参总皂苷脂质体对大鼠皮肤组织中 MMP-1、MMP-3 含量的影响

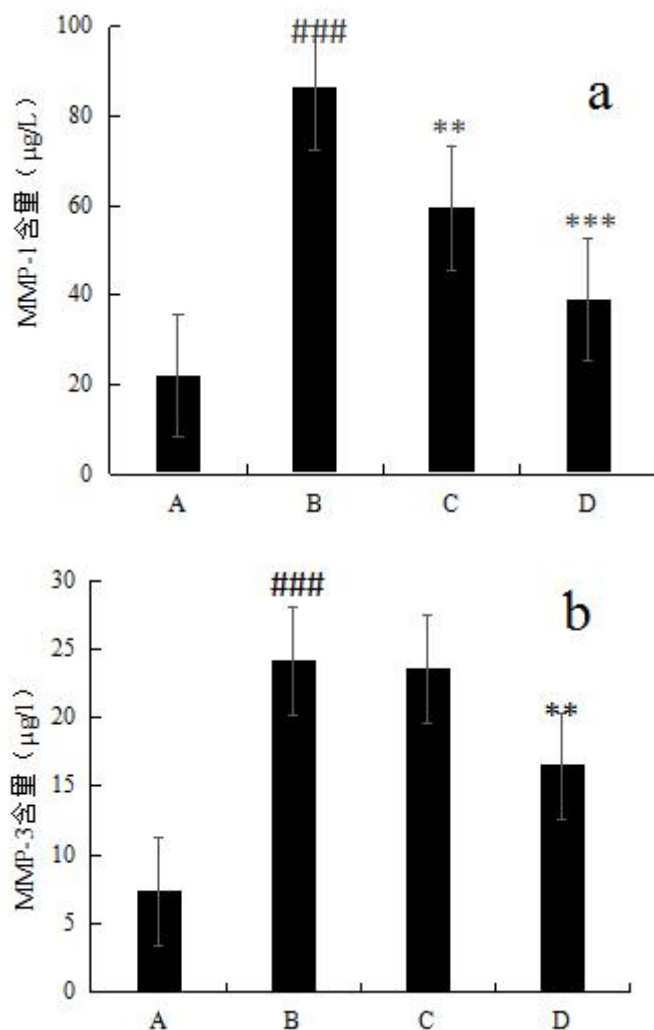


图 19 人参总皂苷脂质体对大鼠皮肤组织中 MMP-1、MMP-3 含量的影响

(注: A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 人参总皂苷溶液组; D: 人参总皂苷脂质体组, 均为给药 10 天后测定结果)

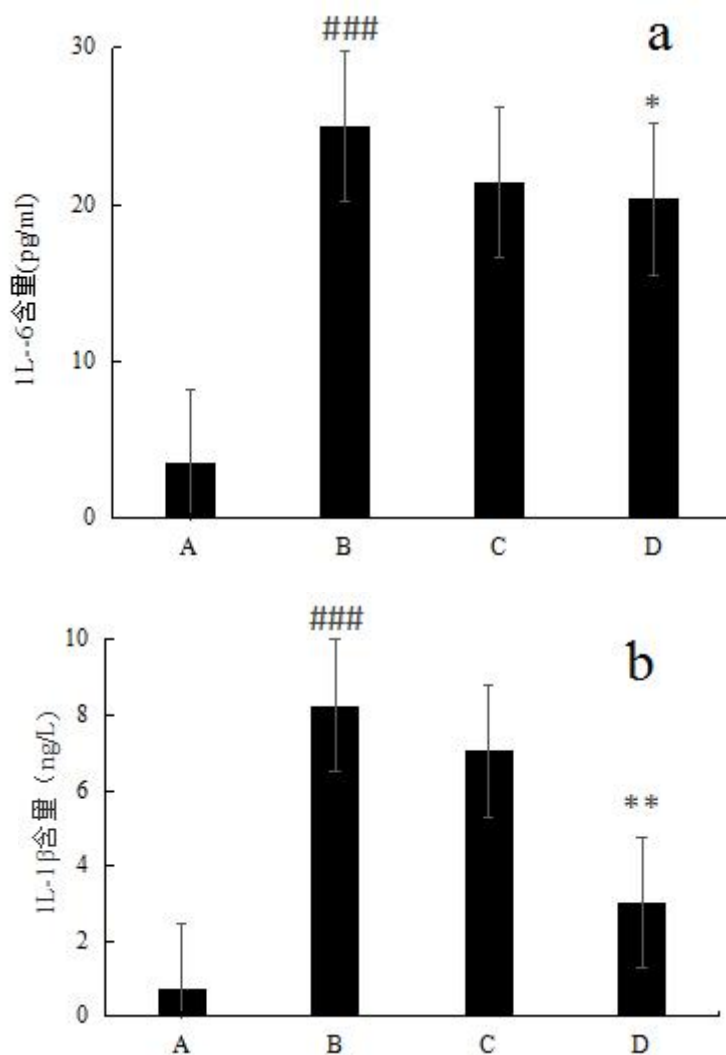
在皮肤老化的过程中, 一个非常明显的特征就是胶原纤维的降解和弹性纤维的断裂, 有研究表明这是基质金属蛋白酶作用的结果。本课题对大鼠光老化皮肤中的 MMP-1 和 MMP-3 的含量进行测定。

如图 19a 所示, 与正常对照组相比, 模型对照组大鼠皮肤组织中 MMP-1 含量明显升高 ($P<0.001$), 说明紫外线照射能够刺激细胞中 MMPs 的表达。与模型组比, 人参

总皂苷溶液组以及脂质体组的大鼠皮肤组织中 MMP-1 的含量均降低,但是,人参总皂苷脂质体组 MMP-1 含量下降更为明显 ($P<0.001$)。

如图 19b 所示,与正常对照组相比,模型对照组大鼠皮肤组织中 MMP-3 含量明显升高($P<0.001$);与模型组比,人参总皂苷溶液组以及脂质体组的大鼠皮肤组织中 MMP-3 含量均有所下降,人参总皂苷脂质体中 MMP-3 含量降低更多 ($P<0.01$)。综上说明人参总皂苷对紫外线诱导的 MMP-1 和 MMP-3 含量的升高有一定抑制作用。

3.8 人参总皂苷对大鼠皮肤组织中 IL-6、IL-1 β 以及 TNF- α 含量的影响



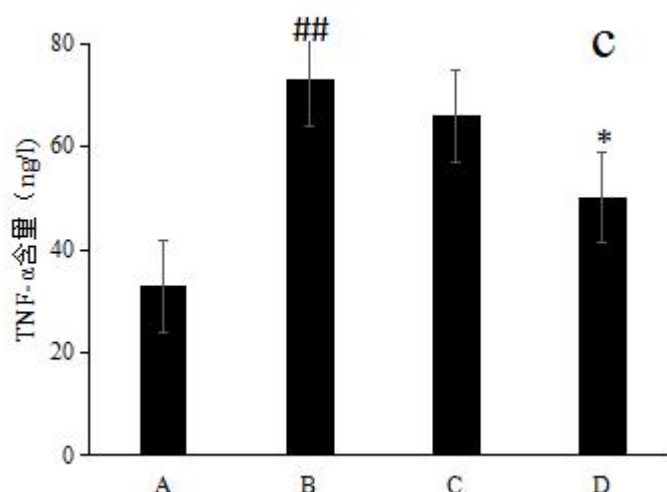


图 20 人参总皂苷对大鼠皮肤组织中 1L-6、1L-1 β 以及 TNF- α 含量的影响

(注: A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 人参总皂苷溶液组; D: 人参总皂苷脂质体组)

当皮肤受到紫外线的刺激会促进皮肤表皮以及真皮细胞大量分泌促炎症因子 1L-6、1L-1 β 以及肿瘤坏死因子 TNF- α 等^[99]。这些促炎症因子的产生会损伤线粒体,使 ROS 的产生增加;而 ROS 的增多会进一步促进促炎症因子的产生,因此形成了一个正反馈机制。

如图 20a 所示,与正常对照组相比,模型对照组大鼠皮肤组织中 1L-6 含量明显增多 ($P<0.001$),这表明紫外线照射能够使皮肤组织中 1L-6 的含量显著增多。与模型对照组相比,人参总皂苷溶液组大鼠皮肤中 1L-6 的含量降低较少;人参总皂苷脂质体组大鼠皮肤组织中 1L-6 的含量有所降低 ($P<0.05$)。

如图 20b 所示,与正常对照组相比,模型对照组大鼠皮肤组织中 1L-1 β 的含量明显升高 ($P<0.001$),这也表明紫外线照射能够使皮肤组织中 1L-1 β 的含量显著增多。与模型对照组相比,人参总皂苷溶液组大鼠皮肤中 1L-1 β 的含量降低较少;人参总皂苷脂质体组大鼠皮肤组织中 1L-1 β 的含量明显下降 ($P<0.01$)。

如图 20c 所示,与正常对照组相比,模型对照组大鼠皮肤组织中 TNF- α 的含量明显升高 ($P<0.01$),提示紫外线照射会造成皮肤组织中 TNF- α 含量的升高。与模型对照组相比,人参总皂苷溶液组及脂质体组大鼠皮肤中 TNF- α 含量均有所下降,其中人参总皂苷脂质体组 TNF- α 含量下降更为明显 ($P<0.05$)。

4 讨论

皮肤老化是机体内源性老化以及环境造成的外源性老化共同作用的结果,具体的表现形式主要是皮肤松弛,皱纹形成以及色素沉着导致色斑出现等。其中,环境引起的皮肤老化主要指的是皮肤经受紫外线照射后出现的老化现象。本章通过建立大鼠皮肤光老化模型,观察人参总皂苷脂质体对大鼠光老化皮肤的修复作用。与正常对照组相比,模型对照组大鼠皮肤在紫外线的照射下出现大量红斑,皮肤表面变得粗糙起皮,严重的甚至会出现红肿溃烂的现象,在给药组给药期间没有明显的好转;而人参总皂苷溶液组以及人参总皂苷脂质体组大鼠皮肤均有不同程度的好转。通过对大鼠皮肤组织病理切片进行 HE 染色,观察其组织结构变化,模型对照组大鼠皮肤的角质层明显加厚,表皮层与真皮层的连接失去波浪状,受损区域的部分表皮缺失,并且伴随着真皮乳头的减少或者消失,醛品红染色结果显示,与正常对照组相比,模型对照组大鼠皮肤组织中的弹性纤维大量的出现断裂、堆积、成团的现象,这些现象在人参总皂苷组中均有不同程度的减轻。

在皮肤光老化的发生过程中,氧化应激也起到了重要作用。紫外照射会损伤 DNA 使 SOD、GSH-Px 的活性下降,从而引发活性氧自由基的增多导致细胞膜脂质过氧化,产生的过量 MDA 损害细胞。本试验对大鼠皮肤组织中 MDA 含量, SOD、GSH-Px 活性进行测定;基质金属蛋白酶作为锌依赖性蛋白家族,主要包括 MMP-1、MMP-2、MMP-3 成纤维等,是现如今发现的,唯一能够分解纤维胶原的酶,除此以外,它还可以降解细胞外基质的其他蛋白和基底膜,包括弹性蛋白、明胶、纤连蛋白等^[1],本试验利用 Elisa 法对大鼠皮肤组织中 MMP-1、MMP-3 含量进行测定;当细胞受到外界环境的刺激,会产生一些能够参与调节免疫作用以及炎症反应的多肽和糖蛋白,这些物质被称为细胞因子,这些细胞因子根据对炎症因子的影响不同分为促炎症因子和抑炎症因子^[98],而这些促炎症因子的产生会导致 MMP-1 的产生。本试验利用 Elisa 法对大鼠皮肤组织中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 这些促炎症因子的含量进行测定。在进行上述含量测定前,需要制备试验所需的皮肤组织匀浆液,应注意在组织匀浆液的制备过程中,应保证整个过程在冰水浴中进行,以防止蛋白降解影响试验结果。

5 小结

本章利用 UVA/UVB 光源模拟日光照射建立了大鼠皮肤光老化模型。从外观形态、

皮肤组织形态以及氧化应激损伤机制和炎症因子的角度，初步探讨人参总皂苷脂质体对紫外造成的皮肤光老化的修复作用机制。

本课题通过对 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活性的检测，结果显示，模型组对照组 MDA 含量升高，SOD、GSH-Px 活性下降，人参总皂苷脂质体组 MDA 的含量明显降低，SOD、GSH-Px 活性明显升高，提示人参总皂苷能够有效的减弱紫外线照射引起的皮肤脂质过氧化。

本课题利用 Elisa 法对大鼠皮肤组织中 MMP-1、MMP-3 含量进行测定，结果显示，模型组对照组 MMP-1、MMP-3 含量明显升高，人参总皂苷脂质体组 MMP-1、MMP-3 含量明显下降，结果表明人参总皂苷脂质体能够修复由紫外线照射引起的皮肤组织中胶原纤维降解以及弹性纤维的断裂，这也与醛品红染色的结果一致。提示人参总皂苷脂质体对紫外照射引起的胶原纤维和弹性纤维的损伤有修复作用。

本课题利用 Elisa 法对大鼠皮肤组织中的促炎症因子 1L-6、1L-1 β 和肿瘤坏死 TNF- α 的含量进行测定，结果显示，模型组对照组 1L-6、1L-1 β 和 TNF- α 含量明显升高，人参总皂苷脂质体组 1L-6、1L-1 β 和 TNF- α 含量明显下降，结果表明总皂苷脂质体能够有效地降低紫外线照射引起的炎症因子含量的增多，从而降低基质金属蛋白酶的含量。

本课题为克服人参总皂苷皮肤透过性差这一缺点，使其能够更好地发挥抗氧化，抗衰老的作用，将人参总皂苷与脂质体这一新型药物传递系统结合，通过实验研究，最终达到这一目的，制备得到的人参总皂苷脂质体在很大程度上提高了人参总皂苷的皮肤透过性，并且对人参总皂苷治疗皮肤光老化的作用机制进行了初步的研究，为人参总皂苷未来在经皮给药领域的开发利用提供了可能，也为人参总皂苷在抗衰老方面的开发利用提供了理论依据。

结论

本课题根据人参总皂苷透皮性能较差,生物利用度低这一缺点,设计将人参总皂苷与新型药物载体脂质体相结合来改善其透皮性能,提高其生物利用度。对人参总皂苷脂质体制备工艺、质量标准、透皮性能以及人参总皂苷对光老化皮肤治疗的作用机制进行了初步研究。

1、利用高效液相色谱法建立了人参总皂苷含量测定的方法,并对该方法进行方法学考察;建立了人参总皂苷脂质体包封率测定方法,采用超滤离心法分离游离药物与载药脂质体,利用高效液相色谱法进行含量测定并计算人参总皂苷脂质体包封率。

2、本课题利用乙醇注入法制备人参总皂苷脂质体。采用单因素考察法,以包封率为评价指标优化人参总皂苷脂质体最佳处方及制备工艺。

3、对得到的人参总皂苷脂质体进行质量评价,主要包括外观、粒径分布、Zeta 电位和 DSC 分析研究;采用 Franz 扩散池法对人参总皂苷原药和人参总皂苷脂质体冻干粉的体外透皮性能进行研究,结果表明质量评价均符合要求,人参总皂苷脂质体与原药相比,在制成制剂后,很大程度上提高了人参总皂苷的透皮性能。

4、建立 SD 大鼠皮肤光老化模型,从外观形态、组织形态学变化、氧化应激损伤机制以及炎症反应的角度,初步探讨人参总皂苷脂质体对光老化皮肤治疗可能存在的作用机制。结果表明,人参总皂苷脂质体对大鼠光老化皮肤出现的红肿,粗糙起皮,皱纹加深甚至溃烂现象均有明显的治疗作用;皮肤病理切片组织形态学观察结果表明人参总皂苷脂质体对光老化引起的皮肤角质层的增厚,胶原纤维的降解和弹性纤维的断裂等的损伤具有一定的修复作用。人参总皂苷通过减轻紫外照射引起的皮肤脂质过氧化程度,降低炎症因子含量以及修复 MMPs 对皮肤胶原蛋白和弹性蛋白的损伤等途径发挥其抗衰老功效。

本文创新点

人参，作为中国传统的名贵药材之一，具有很多的药理活性，在许多疾病的治疗上都展现出巨大的潜力，一直以来都是中外研究者研究的热点药物。自古以来，人参就作为美白护肤抗衰老的佳品被人们应用，人参总皂苷作为人参主要的活性物质，也具有很好地抗氧化抗衰老的功效，现代研究者也在尝试将其引入护肤领域，开发出更好的抗氧化抗衰老的护肤佳品，但是由于人参总皂苷易溶于水，难以跨过皮肤屏障到达肌肤深层更好的发挥疗效，限制了人参总皂苷的开发利用。

市面上现有的人参类护肤产品大多是直接将人参或其主要活性物质作为有效成分直接加入护肤基质中形成相关产品，这样的传统做法大都只能让人参中的活性成分停留在皮肤表面发挥作用，并不能到达肌肤底部更好的发挥疗效。基于此，本课题希望可以解决人参总皂苷难以跨越皮肤屏障这一缺点，提高其经皮吸收的效率。脂质体，作为一种新型的载药系统，在跨越皮肤屏障，经皮吸收的领域展现出巨大的优势，这主要得益于脂质体结构的特殊性，磷脂不仅是构成脂质体双层结构的主要膜材，也是生物体细胞膜的固有成分，相似相溶的原理让脂质体能够很好地带领药物跨过皮肤屏障，更好的发挥效果，其次磷脂的双层结构能够很好地装载亲水性或者亲脂性药物，提高药物的稳定性。因此，将人参总皂苷装载于脂质体双层结构中制成人参总皂苷脂质体，在很大程度上提高人参总皂苷的皮肤透过性，进而提高其生物利用度。

通过建立大鼠皮肤光老化模型，从外观形态，病理切片组织形态学的变化，直观的观察人参总皂苷对紫外照射引起的皮肤老化的治疗作用；利用 Elisa 法从氧化应激损伤以及炎症反应的角度初步探究人参总皂苷对光老化皮肤治疗可能存在的作用机制。综上所述为人参总皂苷接下来在抗氧化、抗衰老方面的开发利用提供了理论基础。

参考文献

- [1] 刘晶,唐昌敏,陈刚.地芝丸治疗面部皮肤老化的疗效观察[J].时珍国医国药,2019, 30(1): 114-115.
- [2] 项敏泓,文杭,赵艳青,等.衰老在祖国医学的认识及其中药研究进展[J].中国医药导报,2019, 16(9):47-51.
- [3] 白志华,方晓玲.三七总皂苷中人参皂苷 Rg1 体外透皮吸收的实验研究[J].中成药,2006, 28(5) :639-641.
- [4] 崔福德.药剂学[M].第 7 版.北京:人民卫生出版社,2011.
- [5] 张浩.人参活性成分蛋白质、氨基酸、有机酸及核苷类成分研究[D].吉林大学,2016.
- [6] 姚梦杰,吕金朋,张乔,等.人参化学成分及药理作用研究[J].吉林中医药,2017, 37(12):1 261-1263
- [7] 杨慧萍,永雪薇.人参中有效成分人参皂苷及其药理活性研究概述[J].世界最新医学信息文摘(电子版),2016(52):68-69.
- [8] 王敏,赵振霞,雷蓉等.UPLC 法同时测定人参叶和人参花中 6 种皂苷类成分的含量[J/OL]中药材,2018(11):2372-2375[2019-03-01].2018. 11. 029.
- [9] 宋齐.人参主要化学成分及皂苷提取方法研究进展[J].人参研究,2019, 31(04):43-46.
- [10] 李沙沙.人参花蕾中化学成分及其稀有皂苷分离工艺的研究[D].大连大学,2017.
- [11] 梁会超,王庆华,巩婷,等.人参皂苷生物合成相关糖基转移酶研究基本策略及进展[J].药学学报,2015, 50(2):148-153.
- [12] 李伟娜,蒋云云,刘彦楠,等.人参皂苷单体定向转化的生物催化及应用进展[J].生物工程学报,2019(9):1590-1606.
- [13] Li Qing, Kobayashi Maiko, Kawada Tomoyuki.Effect of ziram on natural killer, lymphokine-activated killer, and cytotoxic T lymphocyte activity. [J]. Arch. Toxicol. 2012, 86: 475-81.
- [14] 林美好,刘海宇,刘金平,等.人参皂苷的化学研究进展[J].人参研究,2011,23(04):43-46.
- [15] 邓立军,吕育玲,吴丹.人参皂苷 Rb1 通过 AKT/GSK-3 β /NFAT 途径抑制硫化砷诱导的神经细胞 PC12 毒性[J].中国动脉硬化杂志,2019, 27(8):667-673.
- [16] Sun C, Lai X, Huang X, et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 on astrocytes and cerebral ischemic-reperfusion mice[J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(12): 1891-1898.
- [17] 胡安玲.人参皂苷 Rg1 促进内皮修复抑制血管再狭窄的作用及机制研究[D].遵义医科大

学, 2019.

[18] 周彬, 余舒杰, 刘定辉, 等. SIRT1/eNOS/NO 通路在人参皂苷 Rb1 抗内皮细胞复制性衰老中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(10): 1762-1768.

[19] 高培新, 刘勇, 侯德志. 浅谈人参皂苷 Rg3 和 Rh2 抗癌研究成果[J]. 当代医学, 2019, 25(26): 193-194.

[20] Li B, Zhao J, Wang CZ, et al. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis and paraptosis-like cell death in colorectal cancer cells through activation of p53[J]. Cancer Lett, 2011, 301(2): 185-192.

[21] 张庆勇, 陈燕萍, 刘芬, 等. 人参皂苷 Rg1 对大鼠急性心肌缺血抗氧化损伤指标及超微结构的影响[J]. 中国循环杂志, 2015, 30(02): 164-167.

[22] Hong Y H, Lee H S, Jung E Y, et al. Photoprotective effects of topical ginseng leaf extract using Ultraflo L against UVB-induced skin damage in hairless mice[J]. Journal of Ginseng Research, 2016, 41(4): 456-462.

[23] Shin S, Lee J, Son D, et al. Anti-skin-aging activity of a standardized extract from Panax ginseng leaves in vitro and in human volunteer[J]. Cosmetics, 2017, 4(2): 18-30

[24] Han A, Chien A L, Kang S. Photoaging[J]. Dermatologic Clinics, 2014, 32(3): 291-299.

[25] Cavinato M, Jansen-Dürr, Pidder. Molecular mechanisms of UVB induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin[J]. Experimental Gerontology, 2017, 94: 78-82.

[26] 刘少英, 孟祥瑞, 张祥奎, 等. 皮肤光老化机制及抗光老化药物[J]. 生理科学进展, 2018, 49(4): 265-269.

[27] 杨斌, 郝飞. 皮肤光老化、活性氧簇与抗氧化剂[J]. 中国美容医学, 2005, 14(5): 637-639.

[28] Van Laethem A, Nys K, Van Kelst, et al. Apoptosis signal-regulating kinase-1 connects reactive oxygen species to p38 MAPK-induced mitochondrial apoptosis in UVB-irradiated human keratinocytes[J]. Free Radic Biol Med. 2006, 41(9): 1361—1371.

[29] Kovacs D, Raffa S, Flori E, et al. Keratinocyte growth factor down regulates intracellular ROS production induced by UVB[J]. J Dermatol Sci, 2009, 54(2): 106—113

[30] Yao J, Liu Y, Wang X, et al. UVB radiation induces human lens epithelial cell migration via NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species and up-regulation of matrix

Metalloproteinases[J]. IntJMolMed, 2009, 24(2):153—159.

[31] Kwon Kyoo-Ri, Alam Md Badrul, Park Ji-Hyun et al. Attenuation of UVB-Induced Photo-Aging by Polyphenolic-Rich Spatholobus Suberectus Stem Extract Via Modulation of MAPK/AP-1/MMPs Signaling in Human Keratinocytes.[J]. Nutrients, 2019, 11: undefined.

[32] Zhang S, Dong Z, Peng Z, et al. Anti-aging effect of adipose derived stem cells in a mouse model of skin aging induced by D -galactose[J]. PLoS One , 2014, (5):e97573.

[33] Han Hee-Soo, Shin Ji-Sun, Myung Da-Bin, et al. Hydrangea serrata (Thunb.) Ser. Extract Attenuate UVB-Induced Photoaging through MAPK/AP-1 Inactivation in Human Skin Fibroblasts and Hairless Mice.[J] . Nutrients, 2019, 11: undefined.

[34] Kwon Kyoo-Ri, Alam Md Badrul, Park Ji-Hyun, et al. Attenuation of UVB-Induced Photo-Aging by Polyphenolic-Rich Spatholobus Suberectus Stem Extract Via Modulation of MAPK/AP-1/MMPs Signaling in Human Keratinocytes.[J]. Nutrients, 2019, 11: undefined.

[35] Yu S L, Lee SK. Ultraviolet radiation:DNA damage, repair, and human disorders[J]. Mol Cell T oxicol, 2017, 13 (1):21-28.

[36] Beani JC. Ultraviolet A-induced DNA damage:Role in skin cancer [J]. Bull Acad Natl Med, 2014, 198 (2):273-295.

[37] 刘陶, 刘洋, 夏庆梅, 等. 中药及其复方抗皮肤光老化的机制及应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13):224-230.

[38] Liebel, F., Kaur, S., Ruvolo, E., Kollias, N., & Southall, M. D. (2012). Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes[J]. Journal of Investigative Dermatology, 132(7), 1901 – 1907.

[39] Patriota Régia Celli Ribeiro,Rodrigues Consuelo Junqueira,Cucé Luiz Carlos, Intense pulsed light in photoaging: a clinical, histopathological and immunohistochemical evaluation.[J]. An Bras Dermatol, 2011, 86: 1129-33.

[40] 许新雅, 郑跃, 许庆芳, 等. 光老化对皮肤成纤维细胞降解晚期糖基化终末产物的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2018, 51(4):260-264.

[41] 王继慧, 张小卿, 马月丹, 等. 绞股蓝总皂苷对光老化人皮肤成纤维细胞 Caspase-3 信号通路的影响[J]. 中国全科医学, 2014, 17(18):2109-2114.

- [42] Wang Yaning, Li Weixuan, Xu Sika, et al. Protective skin aging effects of cherry blossom extract (*Prunus Yedoensis*) on oxidative stress and apoptosis in UVB-irradiated HaCaT cells. [J], Cytotechnology, 2019, 71: 475-487.
- [43] 斯敏, 杨慧龄. 紫外线引起皮肤光老化机制及防治的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(2):341-346.
- [44] Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids [J]. J Mol Biol, 1965, 13:238—252.
- [45] Sessa G, Weissmann G. Incorporation of lysozyme into liposomes. A model for structure — linked latency[J] J Biol Chem, 1970, 245:3 295—3 301.
- [46] MEZEI M, GULASEKHARAM V. Liposomes: A selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form[J]. Life Sci, 1980, 26(18):1473-1477.
- [47] EGAWA G, KABASHIMA K. Barrier dysfunction in the skin allergy[J]. Allergol Int, 2018, 67(1):3-11.
- [48] 刘玮. 皮肤屏障功能解析[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2008, 22(12):758-761.
- [49] Menon, G. K., Cleary, G. W., & Lane, M. E. The structure and function of the stratum corneum. International Journal of Pharmaceutics[J], 2012, 435(1), 3 – 9.
- [50] Coderch L, De Pera M, Fonollosa J, et al. Efficacy of stratum corneum lipid supplementation on human skin[J]. Contact Dermatitis, 2002, 47 (7):139-146.
- [51] Feingold KR, Elias PM. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1841(3):280-294.
- [52] Luca DC, Valacchi G. Surface lipids as multifunctional mediators of skin responses to environmental stimuli[J]. Mediators of Inflammation, 2010, 2010:321494.
- [53] De Jong A, Cheng TY, Huang S, et al. CD1a autoreactive T cells recognize natural skin oils that function as headless antigens[J]. Nature Immunology, 2014, 15(2):177-185.
- [54] 王明明, 孙赞, 王晓曼, 等. 响应曲面法优化米托蒽醌长循环脂质体的制备工艺[J]. 食品工业, 2019, 40(9):102-107.
- [55] 张萌萌, 李淼, 葛媛媛, 等. 治疗原发性肺癌的美乐托宁脂质体粉雾剂研究[J]. 药学学报, 2019, 54(3):555-564.
- [56] Deamer D, Bangham A D. Large volume liposomes by an ether vaporization method[J]. Biochim

BiophysActa, 1976, 443:629.

[57] 苏瑾, 王丹, 胡孟洋, 等. 山药总多糖脂质体的制备及表征[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16):18-21.

[58] 张雪冰, 李文静, 王杏林, 等. 硫酸长春新碱脂质体的质量评价研究[J]. 现代药物与临床, 2015(6):658-662.

[59] Pathak Y, Thassu D. Drug delivery nanoparyicles formulation and characterization[J]. Drug and the Pharmaceutical[J]. Sciences, 2009, 191 (1) :130-132.

[60] 李瀚旻, 兰少波, 常明向. 雷公藤甲素脂质体透皮制剂对 II 型胶原诱发的关节炎的影响[J]. 中草药, 2013, 44(2):199-202.

[61] 肖卫红, 徐宏峰, 张耕, 等. 高乌甲素脂质体凝胶制备工艺及体外释药性能研究[J]. 中国医院药学杂志, 2019(5):466-470.

[62] 张慧迪, 时军, 陈桂添, 等. 丹皮酚 VEGF 抗体修饰脂质体的制备及其真皮滞留效应考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3):19-24.

[63] 管圆圆. 盐酸普萘洛尔脂质体凝胶的制备与组织分布研究[D]. 济南:山东大学, 2015.

[64] 谭敏, 胡敢, 王昆. 丙酸氯倍他索脂质体的药效和安全性评价[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(4):463-465.

[65] 闫丹, 江敏瑜, 王云红, 等. 积雪草总苷脂质体的制备及体外透皮研究[J]. 中草药, 2018, 49(09):2041-2048.

[66] 刘基. 湖北海棠总黄酮体外抗氧化活性评价及脂质体乳液研究[D]. 陕西中医药大学, 2019.

[67] Layek B, Mukherjee B. Tamoxifen citrate encapsulated sustained release liposomes:preparation and evaluation of physicochemical properties[J]. Sci Pharma, 2010, 78 (3) :507-515.

[68] Eder Lilia Romero, Maria Jose Morilla. Topical and mucosal liposomes for vaccine delivery[J]. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2011, 3:356-375.

[69] Andrews S, Lee JW, Choi SO, et al. Transdermal insulin delivery using microdermabrasion[J]. Pharm Res, 2011, 28:2110-2118.

[70] Shim J, Kim MJ, Kim HK, et al. Morphological effect of lipid carriers on permeation of lidocaine hydrochloride through lipid membranes[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2010, 388 (1-2) :251-256.

- [71] DREIER J, SORENSEN JA, BREWER JR. Superresolution and fluorescence dynamics evidence reveal that intact liposomes do not cross the human skin barrier[J]. PLoS ONE, 2016, 11(1):e0146514.
- [72] Benson HAE. Liposomes for topical and transdermal drug delivery[J]. Current Drug Delivery, 2009, 6(3):217-226.
- [73] Rattanapak T, Young K, Rades T, et al. Comparative study of liposomes, transfersomes, ethosomes and cubosomes for transcutaneous immunisation: characterisation and in vitro skin penetration[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2012, 64:1560-1569.
- [74] Ainbinder D, Paolino D, Fresta M. Drug delivery applications with ethosomes[J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2010, 6:558-568.
- [75] Liu X, Liu H, Liu J, et al. Preparation of a ligustrazineethosome patch and its evaluation in vitro and in vivo[J]. International Journal of Nanomedicine, 2011, 6:241-247.
- [76] Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force[J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1104(1):226.
- [77] 吴玉, 陈军, 方芸, 等. 马钱子碱传递体的体外透皮与促渗性质研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(16):3009-3015.
- [78] 王丽, 刘瑞学, 冷群英, 等. 神经酰胺Ⅱ脂质体的制备及在化妆品中的应用[J]. 日用化学工业, 2019, 49(11):742-747.
- [79] Müller-Goymann C C, Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2004, 58:343-56.
- [80] Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices [J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10(1):975-999.
- [81] 李红茹, 李淑芬. 脂质体中药物包封率的测定方法[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11):1844-1848.
- [82] 邵红霞, 奉建芳, 龙晓英. 脂质体包封率的测定方法[J]. 中南药学, 2009, 7(3):212-215.
- [83] 盛竹君, 徐维平, 徐婷娟, 金勤玉, 吴亚东, 杨东梅. 脂质体药物传输系统的研究新进展[J]. 中国药业, 2015, 24(23):6-9.
- [84] 朱炯, 吴建敏, 黄海伟, 刘毅. 差示扫描量热法在药品检验中的研究进展. 中国药事, 2018, 32(2):210-215.

- [85] 宁美英, 郭颖志, 顾忠伟. 差示扫描量热法在脂质体研究中的应用. 国外医学: 药学分册, 2005, 32(1):56-61.
- [86] 姜素芳, 周学军, 邓卓, 刘英姿. 丹皮酚脂质体体外透皮试验[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(6):44-46.
- [87] 祖强, 赵晓莉, 狄留庆, 等. 不同种类离体皮肤及人工合成膜对川芎贴膏体外透皮试验的影响[J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14(6):358-360.
- [88] 周密, 徐晓勇, 马凤森, 等. 雷公藤涂膜剂的制备及其体外透皮试验[J]. 中成药, 2015, 37(3):526-529.
- [89] 孟凡敏, 王延科, 贺吉香. 对近年国内中药巴布剂体外透皮吸收研究进展综述[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(2):212-215.
- [90] 田洁. 皮肤外用半固体制剂体外透皮吸收对比实验常见问题分析[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(18):2113-2115.
- [91] 陈积, 赵小倩, 马彦巧, 等. 复方莪术油脂质体凝胶的制备及体外透皮作用[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(7):830-838.
- [92] 吴景东. 绞股蓝抗皮肤光老化的实验研究[D]. 辽宁中医药大学, 2006.
- [93] 曹迪, 陈瑾, 黄琨, 等. 皮肤光老化 SD 大鼠模型的构建及评价标准的探讨[J]. 重庆医科大学学报, 2016, 41(04):379-38.
- [94] 杨汝斌, 万屏, 刘玲, 等. SD 大鼠皮肤光老化动物模型建立方法的探索[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2011, 25(03):199-202.
- [95] 李翊雯. 透明质酸对 SD 大鼠光老化皮肤屏障和皮肤弹性的影响[J]. 河南医学研究, 2018, 27(12):2122-2124.
- [96] Jeong Mok Cho, Yoon Ho Lee, Rong-Min Baek, Sang Woo Lee. Effect of platelet-rich plasma on ultraviolet b-induced skin wrinkles in nude mice[J]. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2010, 64(2).
- [97] Hyeon Ho Kim, Min Jung Lee, Se Rah Lee, et, al. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2005, 126(11).
- [98] 宣敏, 程飏. 皮肤衰老的分子机制[J]. 中国老年学杂志, 2015(15):4375-4380.
- [99] Cho JL, Allanson M, Reeye VE. Hypoxia inducible factor 1 contributes to UV radiation-induced

inflammation, lhyperplasia and immunosuppression in mice[J]. Photoch Photobiosci, 2012, 11 309-317.

致谢

“素年锦时指间落，蓦然回首韶华过”，三年的研究生生活转眼就已接近尾声，这三年的科研与校园生活是我学生生涯中至关重要的三年，是我人生中最宝贵的经历。

首先，要感谢邱智东教授和金叶教授对我的教导。我的毕业课题《人参总皂苷脂质体的制备及其对光老化皮肤治疗作用的研究》是在二位老师的悉心指导下完成的。二位老师在科学研究中展现出的专业能力以及对于科学研究严谨认真的态度，一直影响着我整个研究生生涯。两位老师专业及认真耐心的指导，使我能够按期顺利的完成我的毕业课题。在生活中，二位老师也会在我感到迷茫无助是为我排忧解难，指点迷津。在今后的学习，工作和生活中，我也会谨记两位老师的教导，继续严格的要求自己。在此，再次对敬爱的两位老师表达我最诚挚的感谢！

感谢课题组毕野老师，刘达老师，以及课题组其他老师在课题进行过程中给与的关心和帮助，感谢您们无私的伸出援助之手，在我实验遇到困难时给予帮助及指导，你们的帮助我会永远铭记在心。

除此之外，我要感谢同组的金媛媛师姐、杨璐冰师姐以及陈江丽师妹在实验过程中为我提供的无私的帮助。谢谢金媛媛师姐的帮助，三年时光，我们一起学习，一起成长，这些都是属于我们的独一无二的回忆；谢谢陈江丽师妹在实验过程中对我提供的帮助，实验过程中我们一起面对所有的困难和难题，一起思考一起探讨。也要感谢实验室其他的师兄师姐以及同学们给予我的关心和帮助，借此机会也对你们表达我最诚挚的感谢。

最后，要感谢我的爸爸妈妈以及妹妹，感谢爸爸妈妈在我决定继续求学时给予我最大的支持和鼓励，无论是精神上还是物质上，感谢你们为我做出的一切，你们永远是我继续前进的道路上最大的后盾；三年远离家乡的求学过程，感谢妹妹的关心和陪伴，我们永远是对方最忠实的支持者，你永远是我的二分之一。在此，再次对我的家人们表达我最深的感谢！

岁月虽轻浅，时光亦潋潋，无论将来行至何地，我永远会记得长春中医药大学，我的母校。

在学期间主要研究成果

发表论文:

[1] 鹿禛,邱智东,王蕾,陈江丽,金叶.人参总皂苷对皮肤细胞的修复作用机制研究[J].吉林中医药,2020,40(04):518-521.

科研获奖:

2017-2018 年度 互联网+科技竞赛校级金奖, 互联网+科技竞赛省级铜奖

2018-2019 年度 互联网+科技竞赛校级金奖, 互联网+科技竞赛省级银奖

第四届“青春创客”系列活动吉林省赛区二等奖

其他:

无

