

载 MD-CPT 透明质酸纳米微乳经皮给药 作用于瘢痕修复的研究*

高媛媛¹⁾ 孔明¹⁾ 程晓杰¹⁾ 王志国²⁾ 陈西广^{1)**}

¹⁾中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003; ²⁾青岛大学医学院附属医院, 青岛 266013

摘要 喜树碱衍生物对瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖有明显的抑制作用, 为提高药物利用度, 提供透皮给药的治疗途径, 本文采用微乳法制备了一种新的 O/W 型透明质酸纳米载体(HA-GMS), 包载药物 10, 11- 亚甲二氧基喜树碱(MD-CPT), 制备过程中无酒精, 且没有使用化学增强剂, 经透射电镜和激光粒度仪分别测得 HA-GMS 纳米乳粒径为(177.33±27.11) nm, zeta 电位为-15.6±1.7, 多分散系数为 0.55±0.01, 纳米微乳对 MD-CPT 药物的包封率为(77.85±1.29)%, 且稳定性良好. 用 MTT 法检测 HA-GMS 对人正常细胞 HSF、HUVECs 的作用, 细胞相对存活率为 75%~95%, 生物相容性良好, 用 HA-GMS 对瘢痕疙瘩成纤维细胞培养 48 h, 其生长抑制率为 28.2%. HA-GMS 纳米乳运载的 MD-CPT 皮肤渗透量明显高于对照组 MD-CPT 乙醇溶液对皮肤的渗透量, 作用 4 h 的累积渗透量分别为(660.72±20.54) μg/cm² 和(102.73±13.81) μg/cm², HA-GMS 纳米乳明显增加了 MD-CPT 的透皮效率, 本研究结果为透皮给药治疗瘢痕疾病提供了基础.

关键词 透明质酸, 纳米微乳, 喜树碱衍生物, 透皮给药, 瘢痕疙瘩

学科分类号 R944.1, Q819

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00280

创伤修复失控可导致伤口愈合后形成瘢痕疙瘩, 且治疗后易复发^[1-2], 但目前该病的发病机制仍不明确^[3]. 瘢痕疙瘩通过手术和局部注射治疗容易造成皮肤的二次创伤, 极易复发^[4]. 通过口服药物治疗, 针对性不强, 药物有效利用率较低, 且可能对机体代谢造成损害. 因此, 为降低瘢痕疙瘩的复发几率, 避免肝脏首过效应, 提高药物利用率, 降低药物对机体其他组织和器官的不良影响, 局部透皮给药体外治疗瘢痕疙瘩是一个值得研究探索的新策略. 在病理性瘢痕成纤维细胞中, 拓扑异构酶 I 存在高表达, 而病理性瘢痕的形成与成纤维细胞异常增殖密切相关^[5]. 喜树碱类药物作为 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂, 抑制 DNA 的复制和细胞的有丝分裂, 不仅对部分癌细胞有较好的杀伤力, 对增生性成纤维细胞也有较为明显的抑制效果^[6], 用其治疗瘢痕疙瘩的研究已经成为关注的焦点. 但是药物对肝脏等具有一定的毒副作用, 口服或者注射难免对机体造成损害, 同时药物本身的难溶性也限制了其药效的发挥. 纳米微乳的粒径小, 表面张力

低, 易于透过皮肤, 同时可增加药物的溶解度, 提高载药量, 增大药物浓度梯度. 纳米微乳有望成为其经皮给药的良好载体^[7], 并改善其治疗功效. 本文通过制备一种 O/W 型透明质酸纳米载体(HA-GMS)包载 10, 11- 亚甲二氧基喜树碱(MD-CPT), 研究纳米微乳药剂的理化特征和其体外对瘢痕成纤维细胞及人皮肤正常成纤维作用的效果.

1 材料与方法

1.1 材料

分子质量在 110~10 K Fsa 的透明质酸(HA), α- 甘油单硬脂酸酯(GMS), N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS, 97%), 二氯乙烷(EDC), 二氯甲烷, PBS 缓冲液(pH 7.4)购自 Sigma-Aldrich 公司; 各种表面活性

* 国家科技部国际合作重点项目(2013DFG32880), 国家自然科学基金(31000423)和教育部博士点基金(20120132110012)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0532-82032586, E-mail: xgchen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2013-06-19, 接受日期: 2013-08-21

性剂聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯(吐温)和山梨醇酐脂肪酸酯(司盘), 无水氯化钙, 溴化钠均为分析纯, Triton X-100 购自 Sigma-Aldrich 公司; 磷酸缓冲液(pH 7.4), 10, 11- 亚甲二氧基喜树碱(MD-CPT) 由中国海洋大学医药学院江涛课题组提供。

胰蛋白酶(Trypsin)购自 Amresco 公司; 胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司; D-Hank's 缓冲液、DMEM(高糖)液体培养基购自 Hyclone 公司; 盐酸、乙醇等均为分析纯。噻唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司; 二甲基亚砜(DMSO)购自 Merck 公司; 瘢痕疙瘩成纤维细胞(KFs)和人皮肤成纤维细胞(HSF)由青岛大学医学院附属医院整形美容中心提供的瘢痕疙瘩组织, 经原代培养获得; 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)由滨州医学院提供。

1.2 方法

1.2.1 合成双亲性 HA-GMS.

HA-GMS 的制备参照文献[8], GMS 由 EDC 催化通过酯键连接到 HA 的羧基基团上。将 HA 和 EDC/NHS 按摩尔比 1:1:1 分别溶于 PBS(pH 7.4) 中, 两溶液混合搅拌 2 h。将混合溶液逐滴加入到 GMS 的丙酮溶液中, HA 与 GMS 的摩尔比为 1:1, 边加边搅拌, 室温反应 48 h。终产物在 15 000 r/min、4℃ 下离心 20 min/ 周期, 直到获得不再浑浊的溶液, 将其用 Spectra/Por 透析膜(拦截分子质量 6000~8000)充分透析 72 h 后, 冻干 72 h。

利用超声自组装法制备载 MD-CPT 的 HA-GMS 纳米乳^[9]。称取 20 mg HA-GMS 溶于 19 ml 蒸馏水中; 称取 MD-CPT 50 mg 于 5 ml 离心管中, 加入二氯甲烷 0.6 g, 涡旋至均匀分散。加入表面活性剂吐温 80- 司盘 20(HLB = 12.5) 0.9 g, 涡旋至均匀分散, 取 1 g 上述混合液, 逐滴加入 HA-GMS 溶液中, 磁力搅拌 30 min。冰浴条件下, 超声处理 2 个周期(功率为 150W, 超声 10 s, 停 2 s, 3 min/ 周期)得纳米乳。不加 MD-CPT, 做空白对照。

1.2.2 包封率的计算。

利用 G25 柱层析分离新鲜制备的 MD-CPT - HA-GMS 纳米乳和游离的 MD-CPT。用荧光酶标仪检测(激发波长: 367 nm, 发射波长: 405 nm), 绘制 MD-CPT 标准曲线, 计算 HA-GMS 纳米乳中包载的 MD-CPT 浓度。通过公式(1)计算 HA-GMS 纳米乳的包封率(encapsulation efficiency, EE)。

$$EE = W_1 \times 100\% / W_0 \quad (1)$$

其中, W_0 为 MD-CPT 总量, W_1 为包载入纳米乳的 MD-CPT 的质量。

1.2.3 平均粒径与 zeta 电位的测定。 利用激光粒度仪(Malvern Zetasizer nano ZS90, UK), 通过动态光散射的方法对 HA-GMS 纳米乳的平均粒径大小和 zeta 电位进行测定, 检测温度为 25℃, 每个样品测试重复 3 次, 检测波长为 633 nm。

1.2.4 透射电镜(TEM)观察。 将 HA-GMS 纳米乳悬液稀释后滴到铜网上, 1%的醋酸双氧铀(pH 6)染色 5 min, 过夜干燥, 通过透射电镜观察 HA-GMS 纳米乳的表面形态和颗粒的分布情况^[10]。

1.2.5 体外皮肤渗透研究。

皮肤处理: 割取小白鼠毛皮, 剃去毛发。在生理盐水中浸润 30 min, 待毛皮软化后放入 2 mol/L NaBr 溶液中浸泡 90 min, 然后取出切成 3 块进行剥皮, 留取角质层进行实验, 4℃ 冻存 24 h。

利用体外透皮扩散池研究纳米乳液的透皮性能。取透皮杯, 内置转子, 在杯中注满 PBS 缓冲液, 将角质层膜覆盖于透皮杯上, 移取 1.0 ml 制备的载有药物的纳米微胶囊以及空载微胶囊, 从上端分别注入两只透皮杯中。分别在 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4、6、8、10、12、24 h 取样 100 μl 加到 96 孔黑色微孔板, 设 3 个平行孔, 并及时补充等体积 PBS 溶液。每个样孔分别加入 50 μl 的甲醇裂解纳米乳, 实验过程中避光。用荧光酶标仪分别在激发波长与发射波长为 367、405 nm 处测定载有药物的纳米微胶囊以及空载微胶囊的吸光度值。以 MD-CPT 乙醇溶液为对照组。做标准曲线, 通过公式(2)计算活性成分累计透过量(Q_t , μg/cm²)

$$Q_t = V_r C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_s C_i \quad (2)$$

其中, C_t 为每个检测时间扩散到透皮杯中的药物浓度, C_i 为第 i 次取样中样品浓度, V_r 为透皮杯的体积, V_s 为取样体积, Q_t 为单位皮肤面积药物透过量^[11]。

1.2.6 对瘢痕疙瘩成纤维细胞、人皮肤成纤维细胞和人脐静脉内皮细胞增殖的影响。

分别取指数生长期的瘢痕疙瘩成纤维细胞(KFs)、人皮肤成纤维细胞(HSF)和人脐静脉内皮细胞(HUVECs), 用胰酶消化后接种于 96 孔细胞培养板上(200 μl/ 孔, 接种密度为 3×10^4 个/ml), 在 37℃、5% CO₂、95%湿度的二氧化碳培养箱中培养 12 h 至细胞贴壁^[11]。待细胞生长成单层, 吸出原培

养液, 每孔加入不同浓度的无菌 HA-GMS 纳米乳悬液(200 μl /孔, 每个浓度设 6 个平行样), 用含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液作为阴性对照, 继续培养 72 h 后. 每孔加入 20 μl MTT(2.5 g/L) 溶液反应, 继续培养 4 h 后弃去上清液, 每孔加入 100 μl DMSO 终止反应, 恒温振荡 10 min, 在酶标仪(Bio-tekELX800UV, USA) 492 nm 处测定培养板各组样品的吸光度值(A), 按照公式(3)计算细胞的相对存活率(relative cell proliferation rate, RPR):

$$RPR = \frac{A_t}{A_{nc}} \times 100\% \quad (3)$$

其中, A_t 和 A_{nc} 分别为样品组和阴性对照组在 490 nm 波长处的吸光度值^[12].

按照公式(4)计算细胞的相对生长抑制率(growth inhibitory rate, GIR):

$$GIR = 1 - RPR \quad (4)$$

1.2.7 统计方法. 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理, 配对组间比较采用 t 检验, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为显著性差异.

2 结 果

2.1 纳米材料的制备与表征

GMS 由 EDC 催化通过酯键连接到 HA 上, 以保持亲水 - 疏水性平衡. 在超声波的协助作用下, 更有利于分子内与分子间的氢键作用和疏水基团的疏水作用, 柔性分子链间的接触缠绕利于形成稳定的疏水微区, 最终形成稳定的具有亲水外壳和疏水内核的 HA-GMS 纳米乳^[9].

2.1.1 纳米乳的 zeta 电位, 平均粒径及粒径分布.

载药 HA-GMS 纳米乳的 zeta 电位, 平均粒径及粒径分布见表 1. 载药后, 纳米乳的平均粒径随药物浓度略有增大, zeta 电位绝对值因为药物的包载而略有减小. 多分散系数(PdI)分别为 0.33 ± 0.07 , 0.55 ± 0.01 , 0.49 ± 0.03 , 说明载药和未载药的 HA-GMS 纳米乳的均一性较好. 但纳米粒子的形态和稳定性并未出现明显变化, 表现出较高的包封率, 均大于 50%.

Table 1 Zeta potential, particle size and polydispersity index (PdI) of HA-GMS NPs

Nanoemulsion	Particle size/nm	Zeta potential/mV	PdI	EE/%
No MD-CPT	112.41 \pm 18.62	-19.3 \pm 2.2	0.33 \pm 0.07	-
80MD-CPT	177.33 \pm 27.11	-15.6 \pm 1.7	0.55 \pm 0.01	77.85 \pm 1.29
160MD-CPT	242.33 \pm 13.83	-14.3 \pm 3.8	0.49 \pm 0.03	55.23 \pm 6.71

80MD-CPT means the concentration of MD-CPT was 80 mg/L during nanoemulsion preparation, 160MD-CPT means the concentration was 160 mg/L. Data represented the $\bar{x} \pm s$, $n=3$. EE: encapsulation efficiency.

2.1.2 纳米乳的形态学观察.

通过透射电镜对载药 MD-CPT-HA-GMS 纳米乳进行形态学观察, 由图 1 测量出纳米乳的平均粒

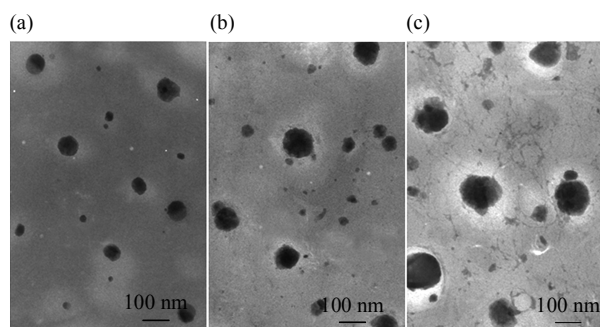


Fig. 1 Physical characterization of no-load and MD-CPT-HA-GMS NPs by TEM

(a) No MD-CPT. (b) 80 MD-CPT. (c) 160MD-CPT.

径约为 55、101、132 nm, 这与通过激光粒度分布仪测得的平均粒径不一致, 原因可能是电镜检测的是在铜网上干燥状态下的纳米颗粒大小, 而激光粒度仪检测的是在溶液中纳米颗粒的水和粒径, 因此电镜照片中测量出的粒径偏小. 由图 1 微乳装法制备的 HA-GMS 纳米乳呈球形, 形态完整, 分布均匀, 几乎没有聚集的现象, 与 2.1.1 的结果相吻合.

2.1.3 纳米乳的稳定性检测.

通过对制备了 1、7、14 天的载药纳米乳 80MD-CPT-HA-GMS 的平均粒径、zeta 电位和多分散系数(PdI)的测定和透射电镜(TEM)观察, 由表 2 和图 2 可见, 粒径大小差异不大、分布均匀、几乎没有聚集的现象, HA-GMS 纳米乳的稳定性良好.

Table 2 Zeta potential, particle size and polydispersity index (PdI) of HA-GMS NPs

Preparation time/d	Particle size/nm	Zeta potential/mV	PdI	EE/%
1	177.33 ± 27.11	-15.6 ± 1.7	0.55 ± 0.01	77.85 ± 1.29
7	190.98 ± 23.15	-11.2 ± 3.2	0.59 ± 0.02	71.22 ± 3.37
14	214.23 ± 13.83	-10.3 ± 2.8	0.60 ± 0.03	65.23 ± 6.71

Data represented the $\bar{x} \pm s$, $n=3$.

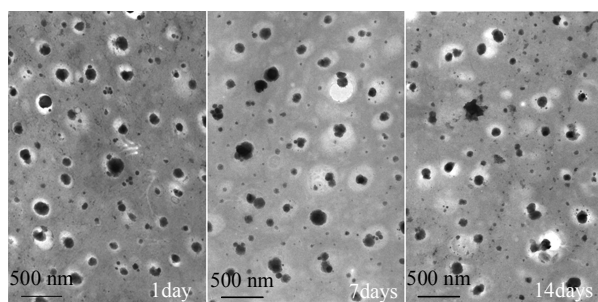


Fig. 2 TEM of MD-CPT-HA-GMS NPs at 1 day, 7 days, 14 days

2.2 体外皮肤渗透研究

外用药物的透皮效率直接影响药效. 10, 11- 亚甲二氧基喜树碱(MD-CPT)水溶性差, 并难溶于常见药用有机溶剂, 限制了其药效的发挥. 通过 HA-GMS 纳米乳的亲水外壳和疏水内核结构, 解决了药物的难溶问题, 同时 HA-GMS 纳米乳的皮肤促渗透性能, 使药物能够通过皮肤屏障, 实现经皮给药. 由图 3 所示, MD-CPT HA-GMS 纳米乳

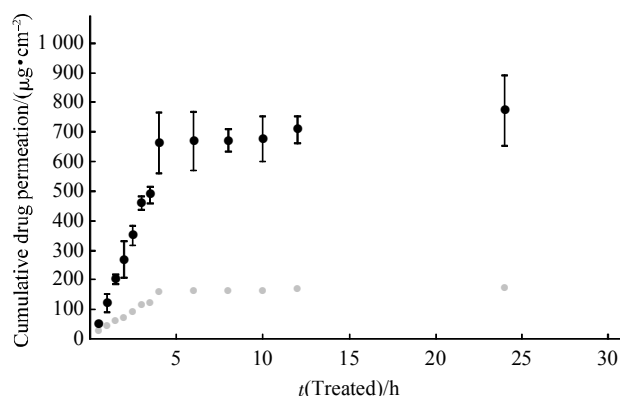


Fig. 3 Permeation profiles of MD-CPT through the excised rat skin from HA-GMS nanoemulsion formulation. The control sample was ethanol solution of MD-CPT (1.0 g/L). Data represented the $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ●: MD-CPT-HA-GMS; ○: Ethanol solution.

的皮肤渗透量高于 MD-CPT 乙醇溶液. 作用 4 h 后, 累积渗透量 Q_t 分别为 $(660.72 \pm 20.54) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 $(102.73 \pm 13.81) \mu\text{g}/\text{cm}^2$. 可见, HA-GMS 纳米乳明显增加了 MD-CPT 的透皮效率.

2.3 材料 HA-GMS 和药物 MD-CPT 对瘢痕疙瘩成纤维细胞、人皮肤成纤维细胞和人脐静脉内皮细胞增殖的影响

利用 MTT 法检测所制备的 HA-GMS 纳米乳和喜树碱衍生物对瘢痕成纤维细胞(KFs)和正常的人皮肤成纤维细胞(HSF)以及人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的细胞增殖的影响.

空载的 HA-GMS 纳米乳对以上三种细胞作用 48 h 的细胞增殖情况如图 4 所示. 随着纳米乳浓度的增加, 两种人正常细胞 HSF 和 HUVECs 相对成活率均在 75%~95%. 根据 ISO 10993-5 手册中关于 MTT 细胞毒性检验中的规定, 当材料与细胞共培养 24 h 后, 若细胞的相对存活率大于 70%, 则被认为该材料不具有潜在的细胞毒性^[13]. 由此可见, HA-GMS 纳米乳在 63~1000 mg/L 浓度范围内时, 对 HSF 细胞和 HUVECs 细胞^[14]均无细胞毒性. 同时, 对瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖也无太大影响, 在 1 g/L 浓度下有小于 30%的抑制率, 可以用于瘢痕疙瘩.

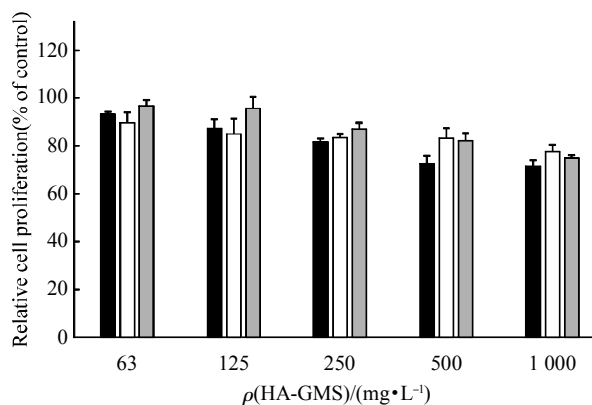


Fig. 4 Relative cell proliferation of HA-GMS in KFs cells, HSF cell and HUVECs cells. ■: HSF; □: HUVECs; ▒: KFs.

药物 MD-CPT 对三种细胞作用 48 h 的细胞增殖情况如图 5 所示. 随着药物浓度的增加, 对两种人正常细胞 HSF 和 HUVECs 的细胞增殖略有抑制, 药物浓度 100 mg/L 时, 细胞相对存活率降至 (75.43±3.55)% 和 (83.21±3.13)%, 但仍大于 70%, 而对瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖有明显抑制, 细胞相对成活率为 52.5%~56.7%^[15]. 由此可见, 10, 11-亚甲二氧基喜树碱(MD-CPT)对细胞增殖的影响是带有选择性的, 在 100 mg/L 浓度以下时, 对 HSF 细胞和 HUVECs 细胞^[16]的杀伤率较低, 而对瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖有明显抑制作用. 瘢痕疙瘩主要以成纤维细胞过度增殖为特征, 相较而言, 正常的人皮肤成纤维细胞的增殖能力较弱, DNA 的合成与表达不如前者. 而将 MD-CPT 和 HA-GMS 同时加入, 评价药物和材料对三种细胞共同作用 48 h 的细胞增殖情况如图 6 所示. 与药物 MD-CPT 直接对三种细胞作用 48 h 的细胞增殖趋势(图 5)无

明显差异, 较高浓度(80 mg/L)细胞相对存活率略有上升, 达到(53.81±5.56)%, 即对瘢痕疙瘩的抑制略有减弱, 可能是 HA-GMS 的双亲性使 MD-CPT 易于结合在疏水区, 减弱了与细胞表面的结合, 从而降低了细胞对药物的吞噬率.

3 讨 论

皮肤具有保护和防渗透的特性用来防止机体失去水、矿物质和溶解蛋白, 透皮输送体系仍作为局部给药方式在医药和化妆品产业中占据优势. 相较于传统的药物摄取方式, 无创性是透皮给药的特色, 可以尽量消除不良副反应, 有助于病人配合和增加连续性、可控地摄取药物的可能性^[17].

体外局部透皮给药治疗瘢痕疙瘩可以避免造成皮肤的二次创伤, 降低复发机率, 加强药物针对性, 提高其有效利用率, 降低对机体代谢造成的损害, 温和可行. 喜树碱类药物对瘢痕疙瘩成纤维细胞有较为明显的抑制^[15], 成为治疗瘢痕疙瘩的研究热点, 但药物本身的难溶性限制了药效的发挥. 本实验通过超声自组装的方法, 成功制备了一种不含酒精的 O/W 型透明质酸纳米乳 HA-GMS 包载 MD-CPT, 为其提供了透皮给药的治疗途径.

从空载开始随着制备过程中 MD-CPT 加药量的增加, 纳米乳的粒径大小依次为(112.41±18.62) nm、(177.33±27.11) nm 和(242.33±13.83) nm. 多分散系数(PdI)分别为(0.33±0.07), (0.55±0.01), (0.49±0.03), 说明载药和未载药的 HA-GMS 纳米乳的均一性较好. 虽然 zeta 电位绝对值减少, 但纳米粒子的形态和稳定性并未出现明显变化. 通过透射电镜观察, 纳米粒均为完整的球形、形态完整、粒径大小差异不大、分布均匀、几乎没有聚集的现象、且稳定性良好.

HA-GMS 纳米乳运载的 MD-CPT 皮肤渗透量明显高于 MD-CPT 乙醇溶液对皮肤的渗透量. 作用 4 h, 累积渗透量分别为(660.72±20.54) μg/cm² 和(102.73±13.81) μg/cm². 可见, HA-GMS 纳米乳明显增加了 MD-CPT 的透皮效率.

利用 MTT 法检测材料 HA-GMS 对瘢痕疙瘩成纤维细胞(KFs)和正常的人皮肤成纤维细胞(HSF)以及人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的细胞增殖的影响. HA-GMS 在 63~1000 mg/L 浓度范围内时, 对 HSF 细胞和 HUVECs 细胞均无细胞毒性. 同时, 对瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖也无明显影响, 在 1 g/L 浓度下抑制率小于 30%. MD-CPT 作为 DNA

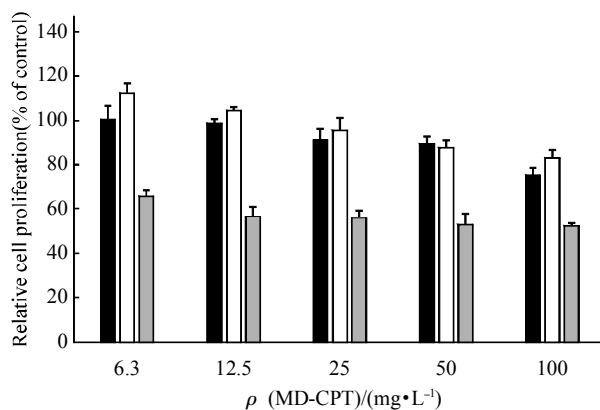


Fig. 5 Relative cell proliferation of MD-CPT in KFs cells, HSF cell and HUVECs cells
 ■: HSF; □: HUVECs; ▒: KFs.

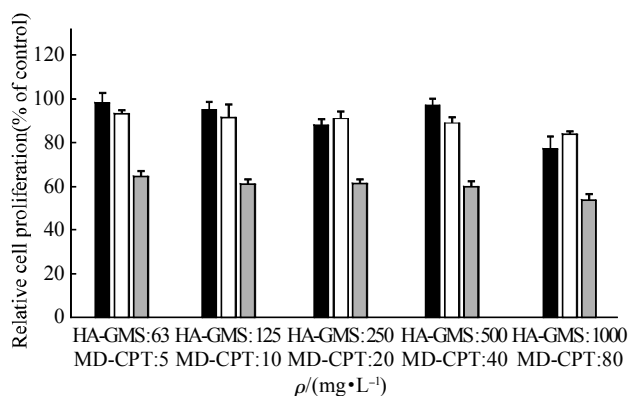


Fig. 6 Relative cell proliferation of HA-GMS with MD-CPT in KFs cells, HSF cell and HUVECs cells
 ■: HSF; □: HUVECs; ▒: KFs.

拓扑异构酶 I 抑制剂, 抑制 DNA 复制和有丝分裂, 对瘢痕疙瘩和正常人细胞的抑制作用有选择性, 而加入 HA-GMS, 对 MD-CPT 作用以上三种细胞的效果无显著影响, 说明作为治疗瘢痕疙瘩的药物载体有优势, 为进一步研究体外透皮给药的方式进行瘢痕修复提供了思路。

参 考 文 献

- [1] Brown B C, McKenna S P, Solomon M, *et al.* The Patient-reported impact of scars measure: development and validation. *Plastic Reconstruct Surgery*, 2010, **125**(5): 1439-1449
- [2] Seifert O, Mrowietz U. Keloid scarring: bench and bedside. *Arch Dermatol Res*, 2009, **301**(4): 259-272
- [3] Barbara Shih. Genetics of keloid scarring. *Arch Dermatol Res*, 2010, **302**(5): 319-339
- [4] Park T H, Chang C H. Early postoperative magnet application combined with hydrocolloid dressing for the treatment of earlobe keloids. *Aesthetic Plastic Surgery*, 2013, **37**(2): 439-444
- [5] 廖立新, 潘登, 陈刚泉, 等. 羟基喜树碱与人病理性瘢痕成纤维细胞的增殖. *国际组织工程研究与临床康复*, 2010, **14**(33): 6159-6162
Liao L X, Pan D, Chen G Q, *et al.* *J Clin Rehab Tiss Engin Res*, 2010, **14**(33): 6159-6162
- [6] Sun Y, Wang L, Sun S X, *et al.* The effect of 10-hydroxycamptothecine in preventing fibroblast proliferation and epidural scar adhesion after laminectomy in rats. *Euro J Pharmacol*, 2008, **593**(1-3): 44-48
- [7] Subedi R K, Oh S Y, Chun M K, *et al.* Recent advances in transdermal drug delivery. *Arch Pharm Res*, 2010, **33**(3): 339-351
- [8] Kong M, Chen X G, Hyunjin Park. Design and investigation of nanoemulsified carrier based on amphiphile-modified hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers*, 2011, **83**(2): 462-469
- [9] Kong M, Chen X G, Hyunjin Park, *et al.* Investigations on skin permeation of hyaluronic acid based nanoemulsion as transdermal carrier. *Carbohydrate Polymers*, 2011, **86**(2): 837-843
- [10] 李敬. 基于壳聚糖的纳米载体系统的构建及其肿瘤靶向性研究. 山东: 中国海洋大学, 2012
Li J. Chitosan based nanocarrier systems for tumor targeting. Shandong: Ocean University of China, 2012
- [11] Amnon C Sintov, Lilia Shapiro. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. *J Con Rel*, 2004, **95**(2): 173-183
- [12] Liu Y, Kong M, Chao Feng, *et al.* Biocompatibility, cellular uptake and biodistribution of the polymeric amphiphilic nanospheres as oral carrier. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, **103**: 345-353
- [13] Bonferoni M C, Rossi S, Ferrari F, *et al.* A modified Franz diffusion cell for simultaneous assessment of drug release and washability of mucoadhesive gels. *Pharm Develop Technol*, 1999, **4**(1): 45-53
- [14] Hodgkinson T, Bayat A. Dermal substitute-assisted healing: enhancing stem cell therapy with novel biomaterial design. *Arch Dermatol Res*, 2011, **303**(5): 301-315
- [15] Syed F, Sherris D, Pausetal R. Keloid disease can be inhibited by antagonizing excessive mTOR signaling with a novel dual TORC1/2 inhibitor. *Amer J Pathol*, 2012, **181**(5): 1642-1658
- [16] Wiegand N, Naumov I, Nöt L G, *et al.* Differential scanning calorimetric examination of pathologic scar tissues of human skin. *J Therm Anal Calorim*, 2013, **111**(3): 1897-1902
- [17] Lee J, Lee Y, Kim J, *et al.* Formulation of microemulsion systems for transdermal delivery of aceclofenac. *Arch Pharm Res*, 2005, **28**(9): 1097-1102

The Study of HA Nanoemulsionloading MD-CPT by Transdermal Delivery Effect on Keloid Repair*

GAO Yuan-Yuan¹⁾, KONG Ming¹⁾, CHENG Xiao-Jie¹⁾, WANG Zhi-Guo²⁾, CHEN Xi-Guang^{1)**}

¹⁾ College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

²⁾ Department of Plastic Surgery, The Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266013, China)

Abstract Camptothecin derivatives have an obvious inhibitory effect on keloid fibroblasts proliferation. In order to improve the utilization rate of drug and provide a transdermal drug treat method, a non-alcoholic hyaluronic acid O/W type nanoemulsion without any chemical enhancers was made to encapsulate 10,11-methylenedioxycamptothecin (MD-CPT). We used transmission electron microscopy (TEM) and laser particle size instrument to survey the HA-GMS nanoemulsion morphology observation, and measured the particle size of (177.32 ± 27.11) nm, the zetaelectric potential of -15.6 ± 1.7 , the PDI of 0.55 ± 0.01 and the encapsulation efficiency of $(77.85 \pm 1.29)\%$. Determination by MTT method was used to research the effect of biomaterial HA-GMS on HSF cells and HUVECs cells, and the relative cell viability range from 75%~95%, having good biocompatibility, and for keloid fibroblasts culture, growth inhibition rate was 28.2%.The transdermal effect of HA-GMS nanoemulsion carrying MD-CPT was obviously better than that of the control group (CPT MD-CPT ethanol solution), treating for 4 h, the cumulative drug permeation was (660.72 ± 20.54) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and (102.73 ± 13.81) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectively, the HA-GMS nanoemulsion significantly increased the efficiency of MD-CPT through skin, which may provide a good drug delivery approach.

Key words shyaluronic acid, nanoemulsion, Camptothecin derivatives, transdermal drug treatment, keloid

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00280

*This work was supported by grants from International S&T Cooperation Program of China (2013DFG32880), The National Natural Science Foundation of China (31000423) and Doctoral Fund of Ministry of Education of China (20120132110012).

**Corresponding author.

Tel: 86-532-82032586, E-mail: xgchen@ouc.edu.cn

Received: June 19, 2013 Accepted: August 21, 2013