

经皮给药载体载 MD-CPT 透明质酸纳米乳
的细胞吞噬与体内药代动力学研究*高媛媛¹⁾ 王志国²⁾ 姜长青¹⁾ 孔 明¹⁾ 程晓杰¹⁾ 王 娟¹⁾ 包子嫻¹⁾
孙国辉¹⁾ 黄聿华³⁾ 林成兵³⁾ 依宏君³⁾ 陈西广^{1)**}⁽¹⁾ 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003; ⁽²⁾ 青岛大学附属医院美容科, 青岛 266013; ⁽³⁾ 青岛继发集团技术中心, 青岛 266221)

摘要 本文在研究制备了包载 10, 11- 亚甲二氧基喜树碱(MD-CPT)的透明质酸纳米乳(HANs)经皮给药系统的基础上, 进一步研究了载 MD-CPT 透明质酸纳米乳的细胞吞噬, 并进行了体内药代动力学分析. 通过优化制备条件, 得到了皮肤渗透性良好的缓释剂型. 从 CLSM 观察到药物被细胞摄入并传递入细胞核, 同时, 载药纳米乳的细胞吞噬效率呈时间依赖性, 不同细胞株 HSF、HUVES、MCF-7、KF 的细胞吞噬率略有不同. 用 Rhodamine B 标记 HANs, 通过荧光显微镜观察到载药纳米乳透过角质层到达真皮层的拟动态过程. 利用 HPLC 检测 MD-CPT 血药浓度, 测得经皮给药半衰期 $T_{1/2}$ 是静脉注射的 3.6 倍, 肌肉注射的 1.6 倍, 体内药物滞留时间显著增加; 血药浓度峰谷值差异小, 曲线平缓, 说明经皮给药能保证血药浓度呈现可控的持续性. 最终通过活体成像系统和组织切片荧光显微镜, 直观地反映出经皮给药后药物在大鼠体内的分布情况和各组织器官药物含量, 确定载药纳米乳主要采取胞间渗透的扩散方式, 在局部给药的区域滞留时间较长, 有利于对浅表性的病灶区持续给药, 延长药效, 而剩余的 MD-CPT 和解离的 HANs 都进入了血液循环, 最终通过新陈代谢被排出体外. 为无创型 HANs 经皮给药系统应用于浅表性肿瘤治疗提供了理论基础.

关键词 透明质酸, 纳米微乳, 喜树碱衍生物, 经皮给药, 体内分布

学科分类号 R944.1, Q819

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00111

研究报道, 药物开发得到的具有生物活性的新化合物(new chemical entities, NCEs)约 40%是疏水性的^[1], 普遍存在生物利用度低、吸收不稳定、个体差异性大、剂量均衡性缺乏等问题. 因此, 非晶型固体、纳米粒、固体分散剂、熔融挤出、成盐、脂质体、微乳或纳米乳、自乳化剂型等普遍成为克服疏水性化合物缺点的方法. 其中, 纳米乳是由水相、油相、表面活性剂和助表面活性剂按适当比例形成的低黏度、各向同性的透明或半透明纳米体系. 纳米乳具有良好的热力学稳定性和纳米级粒径, 比微乳更具优势, 比表面积大、表面张力低, 使其与皮肤能够紧密接触, 通过透皮扩散进入血液循环和淋巴循环, 同时其细胞吞噬作用可促进药物摄取、实现药效, 是疏水性药物的理想载体^[2].

10, 11- 亚甲二氧基喜树碱(MD-CPT)作为喜树碱的重要衍生物之一, 具有良好的生物活性, 可以通过亲核取代与 DNA 形成共价配合物, 使 CPT-Topo I-DNA 可裂解复合物维持的时间更长、

更稳定、更加有效地阻止 DNA 复制. 但是, MD-CPT 不溶于水, 毒副作用较大, 特别针对快速分裂的细胞如胃肠道细胞、骨髓细胞和毛囊等. 而通过化学修饰, 形成开环钠盐用于临床, 却发现毒副作用增大^[3]. 因此, 借助载体克服 MD-CPT 不溶于水的特性、降低毒副作用、延长内酯环在体内的保留时间、增加生物活性成为研究热点^[3]. 经皮给药纳米乳作为 MD-CPT 的载体, 可克服 MD-CPT 难溶于水的特性, 提高载药量, 增大药物浓度梯度, 促进药物透皮吸收、增加药物靶向性、减少毒副作用、维持血药浓度、延长半衰期和提高药效. 此外, 这种经皮给药方式在改善对浅表层癌细胞的

* 国家科技部国际合作重点项目(2013DFG32880, 2010DFB50140), 国家自然科学基金(31300786)和教育博士点基金(20120132110012)资助项目.

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2014-04-19, 接受日期: 2014-05-28

控制与治疗效果、通过抗原呈递细胞诱发机体免疫反应、增强淋巴系统给药效率等方面,表现出特有的优势^[4].

前期工作报道了通过微乳法制得这种 O/W 型透明质酸纳米乳载体(HANs)用于包载 MD-CPT,建立经皮给药体系.制备过程中不含酒精,且没有使用化学增强剂,生物相容性良好,纳米颗粒粒径相对均一,带负电荷,分散性和稳定性良好,包载量可达 77.85%,具有较高的皮肤角质层渗透性能^[5].由于纳米微乳成分中的表面活性剂和助表面活性剂可以破坏角质层脂质双分子层的有序排列,移除角质细胞间的脂质^[6].此外,纳米微乳与皮肤作用后,对角质层有明显的脱水作用,使得角质层的渗透性大大增强,而透明质酸(HA)的强保湿性,可与皮肤内部形成水合梯度,为载药纳米乳的透皮扩散提供动力.另外,HA 可以特异性结合部分 CD44、RHAMM、ICAM-1 过表达的细胞,促进细胞吞噬,帮助抗癌药物靶向运输到肿瘤组织^[7].

本文在前期研究的基础上,通过比较不同配比制得的 HANs 的粒径、包封率、体外释药性和表面渗透性,得到最佳配比,优化了制备条件.为了综合评价 HANs 的药物载体性能,合成了 Rhodamine B 标记的 HANs,进行了经皮给药纳米体系的体外细胞吞噬、体内药代动力学研究.以 HSF、HUVES 为正常皮肤和血管的细胞模型,而 MCF-7、KF 为 MD-CPT 作用的靶细胞模型定量分析了细胞吞噬率随时间的变化趋势,并通过激光共聚焦显微镜观察到细胞吞噬和胞内转移的过程.利用荧光显微镜观察到载药纳米乳透皮扩散的拟动态过程.HPLC 法进行血药浓度药代动力学分析,与静脉注射和局部肌肉注射方式给药进行比较,经皮给药的血药浓度呈现可控的持续性.利用活体成像观察大鼠体内的药物分布情况,进一步证实了载 MD-CPT 的 HANs 透过皮肤扩散到体内,在各个器官分布情况不同,MD-CPT 在给药部位滞留时间较长,形成临时的药物贮库,有利于在浅表性的病灶区持续给药,延长药效,而剩余的 MD-CTP 和解离的 HANs 都通过新陈代谢被排出体外,未形成肌体负担.HA 纳米乳经皮给药体系为浅表性疾病提供了一种温和和无创的长期给药治疗途径.

1 材料与方法

1.1 材料

分子质量 10 ku 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%)、碳二亚胺(EDC)、Rhodamine B(Rhodamine B)购于 Sigma-Aldrich 公司;吐温 80 和司盘 20 购自 Solarbio 公司;二氯甲烷、无水氯化钙和溴化钠等均均为分析纯;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,乙醇等均均为分析纯.噻唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司;细胞周期与凋亡试剂盒购于 BD 公司.

细胞培养:瘢痕疙瘩成纤维细胞(KF)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原代培养;人脐静脉内皮细胞(HUVES)和乳腺癌细胞(MCF-7)由中国科学院上海细胞库购得.

经皮给药动物模型的建立:Wistar 大鼠(雄性,4 周龄,平均体重 200 g)空腹 2 天,剃去背部毛发,用万能胶将组装型滤器(Swinnex $\times$ 13, Millipore USA)的进口部分粘在裸露皮肤上,滤器与皮肤的接触面积为有效给药面积(1.33 cm²,直径 13 mm,厚度 10 mm),最大给药体积为 1.33 ml.大鼠的头部带有通气的面罩,以避免其咬掉滤器,舔舐皮肤.载药纳米乳的给药剂量为 1 天 2 次,1 次 0.5 ml.

1.2 合成 Rhodamine B 标记的 HANs 和制备载 MD-CPT 纳米乳

Rhodamine B 标记 HA-GMS 的制备参照文献方法^[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,得到 HA-GMS.

HA-GMS 溶于 PBS(pH 7.4),加入 EDC/NHS,混匀放置 2 h,加入溶于 PBS(pH 7.4)的 Rhodamine B,20℃反应 2 h,再重复以上透析冻干过程,得到 Rhodamine B 标记的 HA-GMS(λ_{ex} =540 nm, λ_{em} =625 nm).

利用超声自组装法制备了载 MD-CPT 的 HANs^[5]. HA-GMS 与 MD-CPT 的质量比分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0, 剂型标记 H1(1:1), H2(2:1), H3(3:1), 以此类推.

1.3 MD-CPT/HANs 的理化性质检测

利用激光粒度仪(Malvern Zetasizer nano ZS90, UK)测定 HANs 的平均粒径大小和 zeta 电位.

通过透射电镜(TEM, JEM-2010, Japan)观察 HANs 的表面形态和颗粒的分布情况^[5].

MD-CPT($\lambda_{ex}=367\text{ nm}$, $\lambda_{em}=405\text{ nm}$), 用荧光酶标仪(Biotek, Winooski, USA)检测纳米乳包封率(encapsulation efficiency, EE%).

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

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

1.4 体外释药研究

通过透析法研究体外药物释放. 透析袋(阻截分子质量 12~14 ku)放于沸水中煮 10 min, 冲洗干净, 不同配比制得的 MD-CPT/HANs(H1~H6)和对照组 MD-CPT 的羧甲基纤维素(CMC)悬浮液(MD-CPT 相对含量均为 2 mg)被放置于活化好的透析袋中透析 8 h, 透析液为 PBS (pH 7.4), 温度 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 转速 50 r/min, 每隔 1 h 取样, 通过荧光酶标仪测量 MD-CPT 浓度.

1.5 体外细胞吞噬研究

将 KF 细胞接种在玻璃底细胞培养皿(专用于激光共聚焦显微镜, 内径 35 mm)培养 24 h. 用 D-Hank's 缓冲液洗涤细胞, 37°C 平衡 30 min. 加入配好的 MD-CPT/HANs($50 \sim 800\text{ mg/L}$ 的 PBS), 37°C 孵育 30 min. 最后, 用 PBS(pH 7.4)冲洗细胞单层 3 遍, 放在激光共聚焦显微镜(Olympus, Japan)下观察.

取指数生长期的 KF 细胞, 接种于 96 孔黑色细胞培养板上(细胞密度为 3×10^4 个/ml), 在 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养 12 h 至细胞贴壁. 72 h 后, 吸出原培养液, 每孔加入不同浓度的无菌 MD-CPT/HANs 悬液(每个浓度设 6 个平行样), PBS(pH 7.4)作为阴性对照. 用荧光酶标仪检测 MD-CPT 的浓度($\lambda_{ex}=367\text{ nm}$, $\lambda_{em}=405\text{ nm}$). 按公式(2)计算细胞吞噬率(UR%)^[9]

$$UR\% = 100 \times C_u / C_i \quad (2)$$

其中, C_u 为细胞吞噬药物浓度, C_i 为初始药物浓度.

1.6 载药纳米乳的体外皮肤渗透研究

1.6.1 皮肤处理

大鼠背部剃去毛发, 割取全层皮肤, 去除皮下组织, 真皮侧用异丙醇擦拭, 去除附着的皮下脂肪. 得到的全层皮肤在 PBS(pH 7.4)中反复冲洗, 包在锡箔纸中放于 -20°C 保存待用.

1.6.2 皮肤渗透定量检测

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, 将小鼠全皮覆盖于透皮杯上, 移取 1.0 ml 制备的不同质量配比的 MD-CPT/HANs, 从上端分别注入两只透皮杯中. 分别每 2 h 取样 100 μl 加到 96 孔黑色微孔板, 设 3 个平行孔. 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. 用荧光酶标仪测定载有药物的纳米微胶囊以及空载微胶囊的吸光度值($\lambda_{ex}=367\text{ nm}$, $\lambda_{em}=405\text{ nm}$). 做标准曲线, 通过公式(3)计算活性成分累计透过量(Q_t , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

$$Q_t = V_r C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_s C_i \quad (3)$$

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/S 为单位皮肤面积药物透过量.

稳态流量(J_{ss} , $\text{mg}/\text{cm}^2\text{h}$)是基于一个稳量的线性回归方程(4)计算得到:

$$J_{ss} = \frac{\Delta Q_t}{\Delta t \times S} \quad (4)$$

表观渗透系数(K_p , $\times 10^{-3}\text{cm}/\text{h}$)是通过方程式(5)计算得到:

$$K_p = \frac{J_{ss}}{C_d} \quad (5)$$

其中, C_d 是加样浓度, 假定与加样浓度相比, 接收器中的活性物质浓度是极微小的^[10].

1.6.3 皮肤渗透定性观察

利用荧光显微镜观察经载药纳米乳处理的皮肤组织切片. Rhodamine B($\lambda_{ex}=540\text{ nm}$, $\lambda_{em}=625\text{ nm}$)标记的纳米乳绿光激发显红色, MD-CPT($\lambda_{ex}=367\text{ nm}$, $\lambda_{em}=405\text{ nm}$)紫外激发光显蓝色.

1.7 载药纳米乳的体内分布研究

1.7.1 MD-CPT 血药浓度检测和尿样检测

取 MD-CPT 标准品适量, 精密称定, 溶于 0.01 mol/L 枸橼酸 - 乙腈(1/1, v/v)中, 制得标准溶液. 利用高效液相荧光分析系统(Agilent 1200,

USA)检测血液中 MD-CPT 的含量, $\lambda_{\text{ex}}=367 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=405 \text{ nm}$, Liehrospher C18 色谱柱, 流动相为乙腈 -0.075 mol/L 醋酸铵缓冲液(pH 6.4)(32: 68, 含 0.2%三乙胺), 流速 1.0 ml/min, 采用内标法测定浓度. 设定载 MD-CPT 纳米乳经皮给药为实验组, MD-CPT 溶液(1% DMSO)静脉注射和局部肌肉注射为对照组, MD-CPT 相对剂量均根据体重 10 mg/kg, 每隔 2 h 收集血样 250 μL , 5 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 血样被转入聚丙烯管中, 放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 待测^[11].

收集尿样分别用于检测 HANs($\lambda_{\text{ex}}=540 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=625 \text{ nm}$)和 MD-CPT 含量.

1.7.2 MD-CPT 的体内分布检测

用脱毛剂去除毛发, 通过小动物活体成像系统 (*in vivo* small animal imaging system, Fusion FX7 Spectra, Vilber Lourmat, FRA)检测药物的体内分布^[12]. 将大鼠解剖检测在大鼠体内各组织器官中药物的分布情况, 并将一部分组织器官做冰冻切片, 用荧光显微镜观察, 再将剩下的组织器官称重、破碎匀浆、离心过滤, 得到的组织匀浆液点在 96 孔黑板上, 每孔 200 μL , 用荧光酶标仪定量检测药物浓度.

1.8 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 纳米载体的特性

前期研究完成了 HANs 的制备与表征^[6], 包括纳米乳的 zeta 电位、粒径、包封率和分散度等相关参数, 并通过透射电镜 TEM 观察到纳米乳的形态, 呈规则的球型、大小均一、分散良好、并进一步评价了载药纳米乳的稳定性, 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 14 天, 未发生聚积. 在此基础上, 按照 HA-GMS 与 MD-CPT 的不同质量比制得大小性能各异的 MD-CPT/HANs, 最大包封率可达到(86.73 $\pm$ 5.82)%.随 HA-GMS 所占比率的增加平均粒径显著减少, 而包封率显著增加 ($P < 0.001$), 为了同时兼顾粒径大小, 包封率 - 质量配比变化曲线与平均粒径 - 质量配比变化曲线相交的位置对应着 HA-GMS: MD-CPT 的最优配比 (4: 1, 质量比), 平均粒径(178.35 $\pm$ 5.23) nm, 包封率(65.31 $\pm$ 6.78)%, 在后续实验中被采用, MD-CPT 相对浓度为 0.2 mg/L(图 1a).

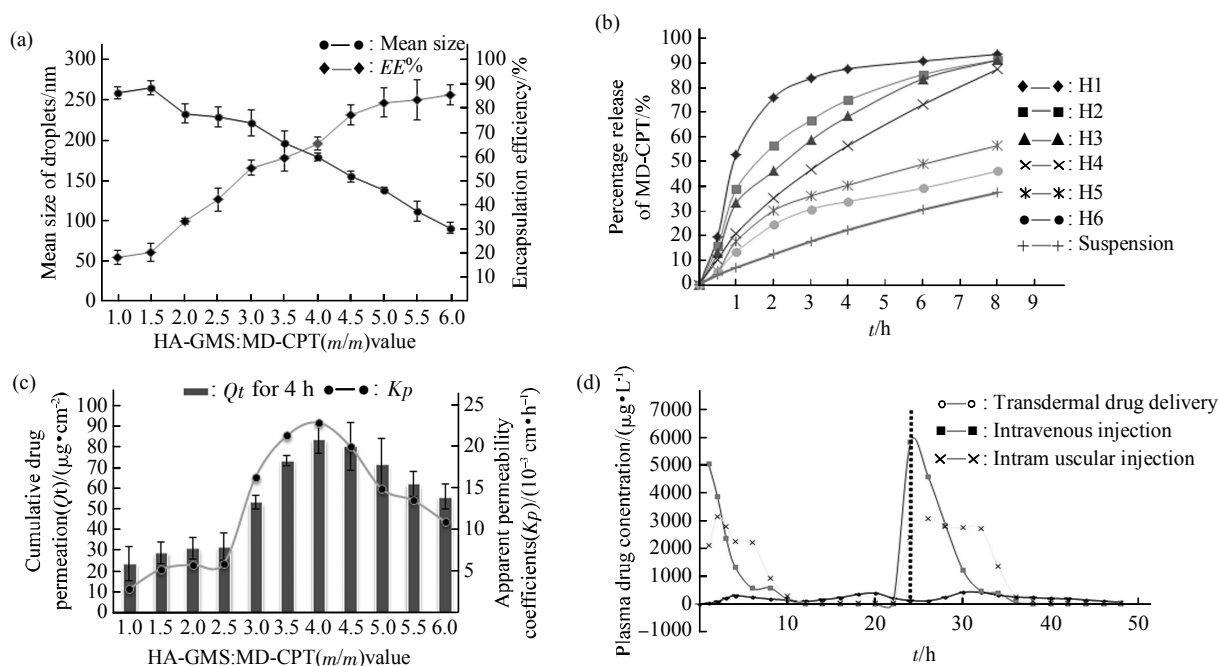


Fig. 1 Nanoparticle functionalization, characterization, and drug controlled release *in vitro* and *in vivo*

(a) The variation tendency of mean size and encapsulation efficiency with the different HA-GMS: MD-CPT(m/m) ratio. The corresponding ratio of the blue point was nearly the optimum ratio, 4: 1. (b) *In vitro* release profiles of MD-CPT/HANs and MD-CPT suspension in PBS (pH 7.4) for 8 h ($n=3$). (c) The variation tendency of the cumulative drug permeation with the different HANS: MD-CPT (m/m) ratio. The peak marked by the blue point was 4: 1 correspondingly. (d) Drug plasma concentration curve within 48 h, mice was treated with H1 (MD-CPT, 10 mg/kg) every 12 h, intravenous injection and intramuscular injection of MD-CPT aqueous solution (1% DMSO, MD-CPT, 10 mg/kg). After 24 h treated, all treatments stopped. Data represented the $\bar{x} \pm s$, $n=3$, $P < 0.05$.

通过透析法测定了在 PBS (pH 7.4) 体系中 HANs 对 MD-CPT 的体外释药性. 不同剂型的 HANs 均表现出良好的释药性, 特别是 H1~H4, 均在 1 h, 释药率超过 20%, 达到有效药物浓度, 经过 8 h, 释药率超过 85%, 明显高于对照组 MD-CPT 悬浮液(37.18%). 其中, H1、H2 在前 2 h 就出现药物突释, 不利于体内药物输送, 而 H4 最接近线性释放规律, 可以达到药物的稳定缓释效果(图 1b).

2.2 纳米乳的体外细胞吞噬观察

选择人皮肤成纤维细胞(HSF)和人脐静脉内皮细胞(HUVECs)作为正常皮肤和毛细血管的细胞吞噬模型, 是为了体外模拟药物渗透的过程. 而人瘢痕成纤维细胞(KF)与人乳腺癌细胞(MCF-7)作为喜树碱药物的靶细胞模型, 其细胞吞噬的效果将直接影响药效. 定量检测的结果(图 2)反映了载 MD-CPT 纳米乳实现了细胞吞噬作用, 且不同处理时间细胞吞噬率呈规律变化. 不同种类的细胞株表现出了几乎相同的变化趋势, 0.5 h 后细胞吞噬率上升, 1 h 达到顶峰, 之后下降. 在细胞状态良好时, 细胞吞噬是一个动态平衡的过程, 呈时间依赖性. 吞噬率下降是由于纳米乳中含有少量的非离子型表面活性剂, 它会影响细胞膜的双分子磷脂层的有序排列和跨膜蛋白的稳定性, 造成细胞膜不完整、保护能力下降. 吐温 80 和司盘 20 是被广泛应用于药物制剂的表面活性剂, 毒性最低, 在纳米乳中含量(3%)高于其他报道的用量(0.5~1%), 使细胞毒性有所增加, 导致吞噬率下降. 但作为经皮给药系统, 表面活性剂可以增加皮肤角质层通透性, 并出现脱水现象, 而透明质酸纳米乳的保湿性就可以与皮肤表面形成水合梯度, 帮助药物透过皮肤屏障进入体内.

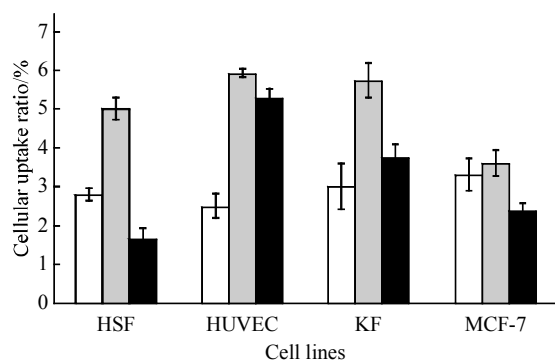


Fig. 2 Cellular uptake ratio of different cell lines include HSF, HUVECs, KF and MCF-7

$\bar{x} \pm s$, $n = 6$, $P < 0.05$. The cell lines were incubated at 37°C for 0.5, 1 and 1.5 h. □: 0.5 h; ▨: 1 h; ■: 1.5 h.

而且经皮给药是一个连续缓慢的渗透过程, 体内细胞实际接触到的表面活性剂含量大大降低, 细胞毒性也将低于体外实验. 不同细胞株中, HUVEC 对载药纳米乳的细胞吞噬率变化趋势上升最快下降最缓慢, 因为血管内皮细胞是物质交换中最活跃的细胞之一, 细胞膜的结构相较于其他较为特殊, 通透性较高, 药物耐受性较强.

以靶细胞 KF 为例(图 3), 通过激光共聚焦显微镜观察到细胞吞噬的拟动态过程, MD-CPT 在紫外光激发下发出蓝色荧光, 显示了 KF 细胞对 MD-CPT/HANs 的摄入量随时间而增多, MD-CPT 首先进入细胞质, 逐步集中在细胞核附近, 最终到达核内, 整个过程在 1 h 完成. 进入核内的 MD-CPT 就可以与 Topo I 和 DNA 作用, 形成复合物, 进而阻碍 DNA 复制, 抑制靶细胞的增殖.

2.3 体外皮肤渗透研究

前期研究中, 已经证明载药纳米乳可以透过皮肤角质层, 且得到了药物累积量(Q_t)随时间变化趋势, 4 h 时, 已经基本达到饱和. 目前, 在此研究基础上, 以大鼠的全皮为研究对象, 在相同的条件 4 h 时, 研究 HA-GMS 与 MD-CPT 不同质量配比制备得到的载药纳米乳对其皮肤渗透性能的影响. 如图 1c 所示, 随着 HA-GMS 组分的增加, Q_t 首先呈显著上升趋势, 质量比为 4:1 时, 出现峰值 (83.73 ± 5.22) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 稳态流量 $J_s = (29.93 \pm 0.09) \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 表观渗透系数 $K_p = (22.93 \pm 0.09) \times 10^{-3} \text{ cm}/\text{h}$, 随后均显著下降 ($P < 0.05$)(图 1c). 经皮给药载体的皮肤渗透性能主要受到载体粒径、结构、亲水性、柔韧性、药物包载量等特性影响. 显然, 载体颗粒越小、载药量越高、药物的渗透效率越高. 结合之前质量配比对于载体颗粒大小和药物包封率的影响, 得到的最优配比 4:1(质量比), 这与体外释药、皮肤渗透性实验结果一致.

荧光显微镜照片(图 4)分别展示了载药纳米乳在 2 h 和 4 h 的皮肤渗透状态, MD-CPT 由紫外光激发出蓝色荧光, 而 Rhodamine B 由绿光激发出红色荧光, 当荧光亮度过高时, 分别显青色和黄色. 经皮给药是一个动态连续的渗透过程, 载药纳米乳逐渐由角质层扩散到真皮层. 4 h 时, 虽然药物在角质层的含量仍然很高(呈黄色), 但部分载药纳米乳已经到达真皮层, 实现透皮. 红色和蓝色荧光的分布基本一致, 说明载体和药物还没有分离, 推测仍然以载药纳米乳的形态存在.

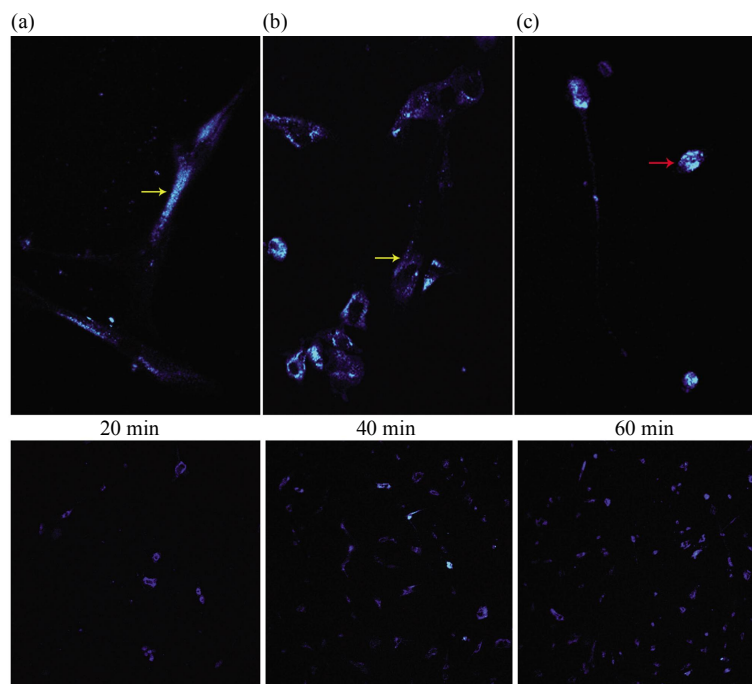


Fig. 3 CLSM images of Keloid fibroblasts with HANs loaded MD-CPT incubated at 37°C for 20 min (a), 40 min (b), 60 min (c) under different magnification (400×)

The blue fluorescence was from MD-CPT ($\lambda_{ex}=367$ nm, $\lambda_{em}=405$ nm). The yellow arrow points to cell nucleus, and the red arrow points to the cytoplasm. Keloid fibroblasts were observed with time (100×).

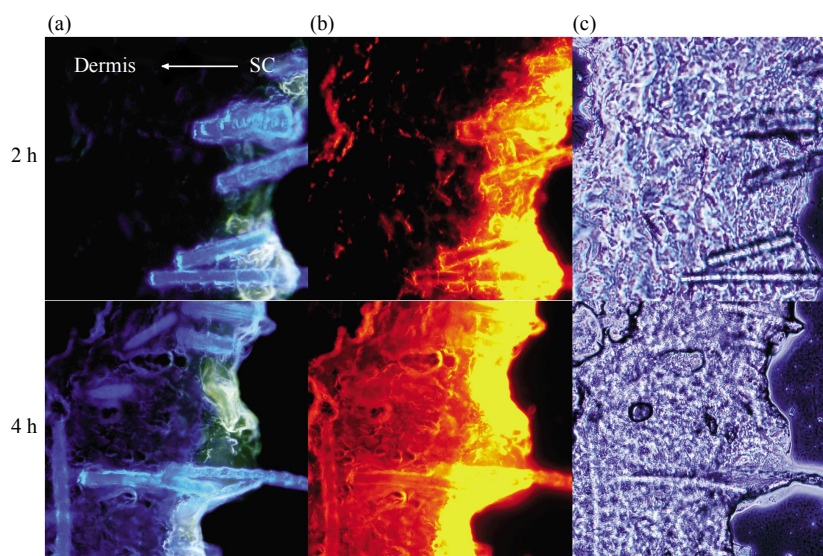


Fig. 4 Penetration of rhodamine labeled MD-CPT/HANs into the mice dorsal skin

(a) The blue fluorescence was from MD-CPT. (b) The red was from rhodamine labeled HA-GMS and (c) The skin images was under the white light of the fluorescence microscope (200×).

2.4 药代动力学研究

载药纳米乳透过皮肤后, 需通过毛细血管进入血液循环进入体内。因此 MD-CPT 的血药浓度直

接反映了载体纳米乳在体内的分布情况, 通常药物作用的强度与药物在血浆中的浓度成正比, 药物在体内的浓度随着时间而变化。

通过高效液相色谱法(HPLC)求得回归方程: $y=0.006683+0.005725C$, 相关系数 $r=0.9428$. 在本实验条件下, 信噪比大于3时血浆中 MD-CPT

的最低检测浓度为 $1.0\text{ }\mu\text{g/L}$. 回收率接近100%, 日内精密度与日间精密度均 $<15\%$ (表1). 保证了 HPLC 检测 MD-CPT 的血药浓度的准确性.

Table 1 Tests of recovery rate of plasma sample and precision test of HPLC

Sample concentration/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	Recovery rate/%	RSD/%	Within-day precision/%	$n=6$	
				Day to day precision/%	
2.65	102.32 $\pm$ 0.17	4.77 $\pm$ 0.87	7.41 $\pm$ 0.25	11.89 $\pm$ 0.13	
103.78	109.84 $\pm$ 0.33	6.42 $\pm$ 0.92	4.28 $\pm$ 0.23	10.73 $\pm$ 0.44	
1529.13	107.81 $\pm$ 0.45	9.25 $\pm$ 0.51	6.55 $\pm$ 0.67	9.01 $\pm$ 0.33	

Data represented the $\bar{x} \pm s$, $n=3$, $P<0.05$.

Wistar 大鼠经过2天的连续给药, 对其血药浓度进行检测, 得到平均血药浓度-时间曲线(图1d). 利用非房室药代动力学拟合模型, 定量分析 HANs 经皮给药和经静脉注射、肌肉注射后 MD-CPT 的吸收、分布、消除规律. 血药分析结果见表2. 经过 HANs 透皮给药后, 约6 h, 达到血药峰, 与肌肉注射的达峰时间 $T_{\max}$ (2.718 $\pm$ 0.151) h 滞后许多, 但是半衰期 $T_{1/2}$ (17.195 $\pm$ 1.719) h 与静脉注射(4.772 $\pm$ 0.263) h 和肌肉注射(10.825 $\pm$ 1.35) h 相比, 显著增加($P<$

0.05), 出现此现象的可能原因是通过纳米乳的形式经皮给药进入体内, MD-CTP 的体内分布容积增大; 同时, 纳米乳对药物具有缓释功能, 体内持续性释放也会延长药物在体内的滞留时间. 虽然, 最大血药浓度 $C_{\max}$ (0.417 $\pm$ 0.1717) mg/L 低于静脉注射(5.812 $\pm$ 0.511) mg/L 和肌肉注射(3.077 $\pm$ 0.278) mg/L, 但是经皮给药血药浓度峰谷值差异小, 曲线平缓, 说明经皮给药能保证血药浓度呈现可控的持续性.

Table 2 Pharmacokinetic parameters of MD-CPT after transdermal administration of H4, intravenous injection and intramuscular injection

Parameters	Intravenous injection	Intramuscular injection	H4
$AUC_{24\text{h}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	24.853 $\pm$ 3.417	28.624 $\pm$ 4.662	5.380 $\pm$ 0.992
$AUC_{24\text{h}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	25.557 $\pm$ 2.833	29.135 $\pm$ 4.516	9.774 $\pm$ 0.944
$C_{\max}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	5.812 $\pm$ 0.511	3.077 $\pm$ 0.278	0.417 $\pm$ 0.171
$T_{\max}/\text{h}$	—	2.718 $\pm$ 0.151	6.312 $\pm$ 0.519
$T_{1/2}/\text{h}$	4.772 $\pm$ 0.263	10.825 $\pm$ 1.350	17.195 $\pm$ 1.719
K_{el}/h^{-1}	0.145 $\pm$ 0.039	0.092 $\pm$ 0.038	0.058 $\pm$ 0.012
Relative bioavailability/%	100.0	115.2	21.6

The data presented in this table as $\bar{x} \pm s$, $n=4$.

2.5 体内药物分布研究

2.5.1 活体成像系统观察药物体内分布

非入侵性的实时荧光活体成像系统被广泛应用, 药物载体在体内的传递过程可以直观地表现出来, 同时可以定量分析药物在体内各器官组织的富集情况. 为了跟踪 HANs 纳米载体在大鼠体内输送, 用活体成像专用荧光素 Rhodamine B 标记

HANs, 因为其发射的近红外荧光, 被水和血红蛋白吸收最少, 干扰性最低. 图5显示了背部局部经皮给药, 经过24 h, 载药纳米乳逐渐向周围组织器官扩散, 不完全依赖血液循环的物质输送, 扩散速度较为缓慢, 浅表层滞留时间较长, 给药区域浓度较高, 适合浅表层疾病局部给药.

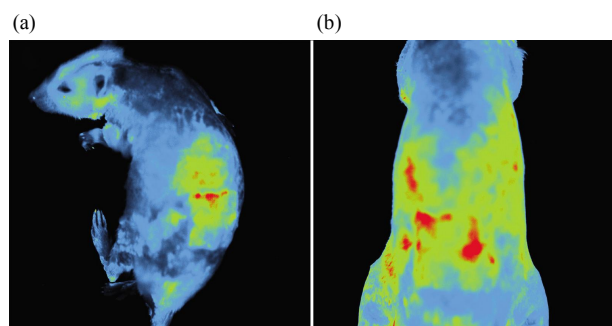


Fig. 5 The biodistribution of MD-CPT/HANs with whole body imaging was seen using the non-invasive imaging technique at the 24 h

(a) At the beginning (< 5 min), the dorsal local area of the rat was treated with MD-CPT/HANs, and yellow to red demonstrated the fluorescence intensity from weak to strong. (b) For the same rat, MD-CPT/HANs had spread to the whole back after 24 h.

大鼠解剖，主要器官分别放置在黑色检测台

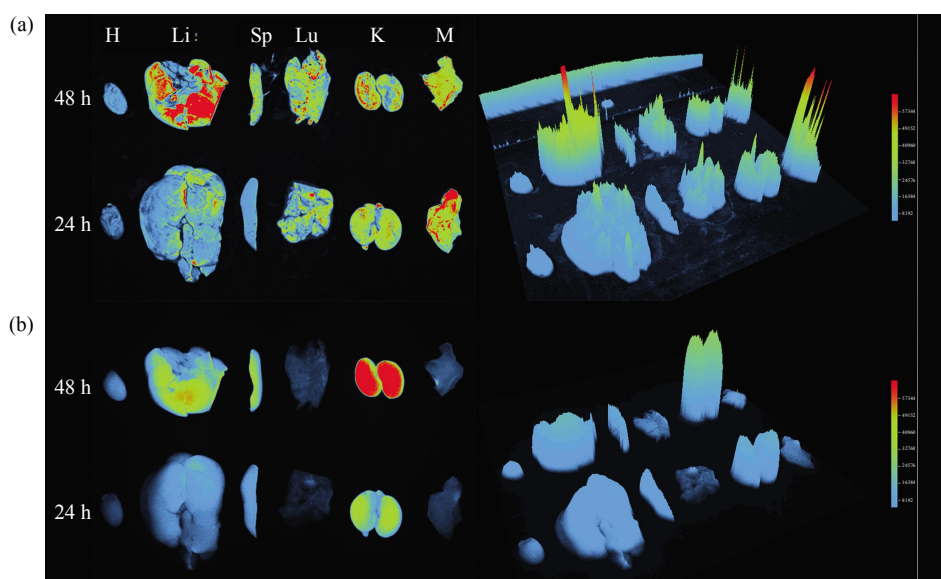


Fig. 6 GF (a) and NIRF (b) imaging of isolated tissues at 24, 48 h after administration of rhodamine labeled HANs

H: Heart; Li: Liver; Sp: Spleen; Lu: Lung; K: Kidney; M: Muscle.

利用活体成像(图 7)可以直观地看到药物信号的强弱，肾、肝、皮下肌肉组织信号最强，肺、脾、腋下淋巴结中等，心、脑、肠、胃信号最弱。同时用荧光酶标仪定量检测组织匀浆液中 MD-CPT 的浓度(表 3)，结果扣除了阴性对照(未给药大鼠的组织器官)值，并通过重复实验去除了个体差异性，

上，依次是心、肝、脾、肺、肾和给药区域的皮下肌肉，用来评价 MD-CPT 和载体 HANs 在器官中的分布。通过绿色荧光(GF)检测系统检测 MD-CPT 含量(图 6a)，近红外检(NIRF)测 Rhodamine B 标记的 HANs(图 6b)。24 h 时，药物主要分布在给药区域的皮下肌肉，其次是肾脏，再次反映了药物已经进入血液循环，参与体内的新陈代谢。48 h 后，肝、脾、肺也出现了药物富集，其中以肝脏为主，心脏始终没有药物分布。同时，HANs 的走向与 MD-CPT 略有不同，肾脏的近红外荧光信号一直最强，说明 HANs 在肾脏中含量始终最高，在 48 h 时，肝脏和脾脏才出现少量分布，基本没有滞留在皮下肌肉中。同时，取得 24 h 和 48 h 内的尿样，用荧光酶标仪检测 HANs 浓度为 $(211.22 \pm 92.74) \mu\text{g/L}$ 和 $(599.62 \pm 23.61) \mu\text{g/L}$ 。说明纳米载体经皮给药后，在体内释放药物，完成了局部给药的任务后，快速进入了血液循环，参与体内的新陈代谢，最终被排出体外，不会滞留在体内成为肌体负担。

每个样品测量时设 4 个复孔，结果与图 7 显示的基本一致，皮下肌肉组织的 MD-CPT 含量已经达到药物的有效浓度($Cd > 1000 \mu\text{g/L}$)，另外，腋下淋巴结中药物浓度仅次于脾，说明药物不仅进入了血液循环，也参与到淋巴循环。淋巴液的成分虽与血浆类似，但是脂类和小分子蛋白质含量较高，这对于

MD-CPT 这类疏水性药物是有利的. 另外, 淋巴节含有较多巨噬细胞, CD44 介导的 HA 可以促进巨噬细胞的细胞吞噬, 实现了 MD-CPT/HANs 的靶向传递和细胞吞噬. 另外, 在尿样检测中检测到 MD-CPT(表 3), 最终也排出体外, 不会滞留在体内.

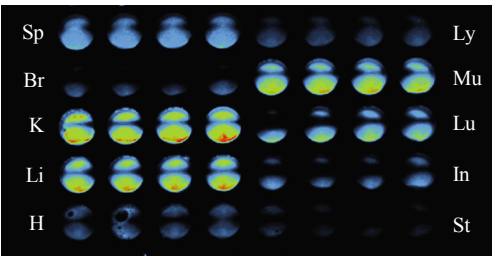


Fig. 7 GF imaging of MD-CPT concentration of tissue homogenate include lung, stomach, spleen, liver, muscle, kidney, brain, heart and intestine after 48 h
Sp: Spleen; Br: Brain; K: Kidney; Li: Liver; H: Heart; Ly: Lymph; Mu: Muscle; Lu: Lung; In: Intestine; St: Stomach. *n*=4.

为了检测 HANs 纳米微乳的体内渗透效果, 大鼠经皮给药 48h 后, 制备冰冻组织切片, 通过荧光显微镜观察组织切片(图 8), 可以观察到 MD-CPT (蓝色荧光)和 HANs(红色荧光). 在大鼠的肝脏、肾脏、脾脏和给药部位皮下肌肉组织中, 都存在较强的荧光信号, 这与定量试验的结果相吻合,

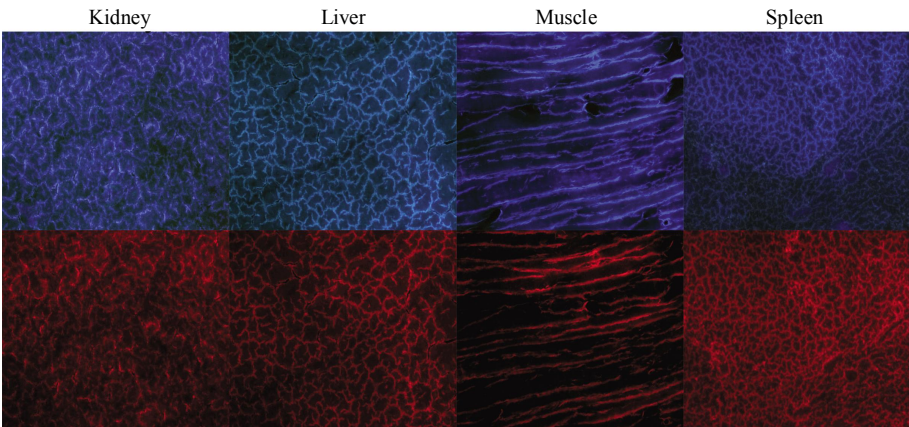


Fig. 8 Tissue accumulation of MD-CPT and HANs after 48 h through transdermal delivered to rats measured by fluorescence microscopy (100×)
Kidney, liver, muscle and spleen. The blue fluorescence was from MD-CPT; the red was from rhodamine B labeled HAN-GMS.

3 讨 论

载药纳米乳实现经皮给药通常要经历表皮渗

Table 3 Tissue distribution of MD-CPT was measured with the fluorescence intensity (emitted by MD-CPT) after 1, 2 days treatment

Organ	Drug concentration in different organs/tissues/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	
	24 h	48 h
Lung	74.68 $\pm$ 3.12	226.87 $\pm$ 0.95
Stomach	16.74 $\pm$ 1.09	196.51 $\pm$ 5.11
Spleen	17.08 $\pm$ 3.33	288.91 $\pm$ 2.25
Liver	15.67 $\pm$ 2.59	513.33 $\pm$ 0.88
Muscle	1906.39 $\pm$ 78.57	2206.48 $\pm$ 36.30
Kidney	1013.59 $\pm$ 35.34	833.55 $\pm$ 62.43
Brain	133.01 $\pm$ 12.16	124.89 $\pm$ 14.25
Heart	172.36 $\pm$ 14.58	115.19 $\pm$ 9.12
Intestine	33.17 $\pm$ 8.87	17.02 $\pm$ 7.31
Lymph	366.21 $\pm$ 5.33	351.97 $\pm$ 2.65
Lung	74.68 $\pm$ 4.67	226.87 $\pm$ 11.18
Urine	173.56 $\pm$ 49.11	393.86 $\pm$ 97.01

Data are represented as $\bar{x} \pm s$, *n*=4.

MD-CPT 主要存在于细胞间隙间, 属于胞间渗透. 两色荧光形成的纹理相同, 推测还有部分未解离的载药纳米微乳贮存在细胞间隙组织液中. 进一步证明了 HANs 载药纳米微乳对 MD-CPT 具有局部定点缓释作用, 反映了 HANs 作为经皮给药, 药物载体成功地将疏水性药物 MD-CPT 递送到体内.

透、细胞传递、细胞间组织液扩散、毛细血管吸收、进入血液或淋巴循环、靶位点药物富集.
皮肤是肌体保护的天然屏障, 透过皮肤传递药

物, 经皮给药载体的颗粒大小、结构柔韧性、表面亲水性和药物包载率对皮肤的有效渗透性至关重要^[13]. 在前期研究的基础上, 改变组分配比, 制得不同粒径和包封率的 HANs 剂型, 通过分析 MD-CPT/HANs 的体外释药, 筛选出最接近线性释放规律, 可以实现药物稳定释放的缓释剂型 H4 (图 1b).

通过透皮扩散定量分析筛选出 HA-GMS: MD-CPT 最佳组分配比, 优化了制备条件. 用 Rhodamine B 标记 HANs, 通过荧光显微镜观察到载药纳米乳透过角质层到达真皮层的拟动态过程, 4 h 时, 部分载药纳米乳已经到达真皮层, 实现透皮. 药物荧光和载体标记荧光的分布基本一致, 说明药物和载体还没有分离, 推测此时仍然以载药纳米乳的形态存在.

细胞吞噬反应了细胞对药物的摄入, 与细胞传递、靶细胞作用直接相关. 本研究中, 选择人皮肤成纤维细胞(HSF)和人脐静脉内皮细胞(HUVES)作为正常细胞吞噬模型, 是为了反映 HANs 体外细胞传递特性. 而人瘢痕成纤维细胞(KF)与人乳腺癌细胞(MCF-7)作为喜树碱药物的靶细胞模型, 其细胞吞噬的效果将直接影响药效. 不同细胞株对载药 HA-GMD 纳米乳的细胞吞噬效率随时间的变化趋势基本相同. 前期研究已经验证 MD-CPT/HA-GMS 对 KF 的增殖有抑制作用, 且呈浓度依赖性, 通过激光共聚焦显微镜可以观察到, 在 1 h 内 KF 基本完成了细胞吞噬, 且将 MD-CPT 胞内转移至细胞核内, 便于其与 Topo I、DNA 形成复合物^[14], 发挥阻碍 DNA 复制的功能, 同时, MD-CPT 的摄入量随时间增多, 实现了纳米载体的胞内物质传递作用. 对表面受体 CD44、RHAMM、ICAM-1 过度表达的细胞, 如癌细胞、炎性细胞, HANs 可以特异性结合, 促进细胞吞噬, 使载体具有靶向传递的功能, 对于部分炎症和肿瘤治疗具有优势^[17].

血药浓度药代动力学分析表明, 经过 HANs 透皮给药与肌肉注射的达峰时间 T_{max} 滞后, 但是半衰期 $T_{1/2}$ 是静脉注射的 3.6 倍, 肌肉注射的 1.6 倍, 体内药物滞留时间显著增加($P < 0.05$), 原因是通过纳米乳的形式经皮给药进入体内, MD-CTP 的体内分布容积增大, 同时, 纳米乳对药物具有缓释功能, 体内持续性释放也会延长药物在体内的滞留时间. 虽然, 经皮给药最大血药浓度 C_{max} (0.417 ± 0.1717) mg/L 低于静脉注射 (5.812 ± 0.511) mg/L 和肌

肉注射 (3.077 ± 0.278) mg/L, 但是经皮给药血药浓度峰谷值差异小, 曲线平缓, 说明经皮给药能保证血药浓度呈现可控的持续性, 提供了一种无创的长期给药的稳定状态, 可降低与峰值相关的各种副作用, 确保了药物浓度高于最低治疗浓度. 研究报道, 适量浓度的药物对患病组织长期可控和缓慢的释放已被证明比高于治疗浓度的药物瞬时释放对疾病治疗更加有利^[15].

药物在体内器官组织的主要扩散方式有: a. 细胞间渗透, 通过细胞外侧连续的脂质区, 通过细胞间连续分布的脂质区域透入体内, 是药物透皮吸收的主要方式^[16]. 细胞间脂质的疏水性, 使脂溶性药物相比水溶性药物更利于透过, 对于疏水性药物是有利的. b. 细胞内渗透, 渗入细胞间脂质中并穿透转运, 这一需要穿越亲水与疏水区域的扩散方式, 扩散速度缓慢, 二者的穿透效率相差约 10 000 倍^[16]. 经皮给药 MD-CPT 的血药达峰时间 T_{max} , 反映 MD-CPT 的体内扩散速度, 荧光显微镜观察 MD-CPT 主要存在于细胞间隙间, 由此可见, MD-CPT/HANs 属于胞间渗透方式.

通过活体成像研究药物体内分布, 进一步验证药物在给药区域皮下组织的滞留时间较长, 药物浓度较高, MD-CPT 含量已经达到药物的有效浓度, 可以不断渗透到病灶区, 实现药物缓释作用, 达到持续给药, 延长药效的目的.

另外, 目前对药物载体的研究, 不仅关注其对药物输送功能, 同时载体代谢成为新的研究热点. 合成载体的材料, 作为可能不被肌体利用的外来物质, 在体内过度积累也会给肌体带来额外的负担, 甚至浓度过高而产生毒性. 因此, 良好的药物载体在完成药物输送和释药后, 通过血液循环和新陈代谢排出体外^[17]. 本实验室前期研究报道了, HA-GMS 双亲性生物材料, 具有良好的生物相容性和水溶性^[9], 通过活体成像分析, 纳米载体释药后, 解离的 HANs 没有滞留在皮下肉中, 而是在完成了局部给药的任务后, 快速进入了血液循环, 参与体内的新陈代谢, 最终被排出体外, 不会滞留在体内, 成为肌体负担. 另外, HANs 纳米载体携带 MD-CPT 避开了对喜树碱类药物十分敏感的消化道等组织器官, 起到了保护作用.

经皮给药体系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. 透明质酸纳米乳作为经皮给药载体具有明显优势, 有利于浅表层疾病的治疗, 如乳腺癌、皮肤癌、淋巴瘤、黑色素瘤、瘢痕疙瘩等. 为进一步研究体外透皮给药的方式治疗浅表层疾病提供了思路.

参 考 文 献

- [1] Porter C J H, Pouton C W, Cuine J F, *et al.* Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid based delivery systems *Adv. Drug Deliv Rev*, 2008, (60): 673–691
- [2] Khan A W, Kotta S, Ansari S H, *et al.* Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of the poorly water-soluble grapefruit flavonoid Naringenin: design, characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Drug Delivery*, 2014 (0): 1–10
- [3] Min K H, Park K, Kim Y S, *et al.* Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 2008, **127**(3): 208–218
- [4] 孔 明, 程晓杰, 陈西广. 经皮给药中纳米制剂与皮肤的质构效关系. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **40**(10): 1023–1030
Kong M, Cheng X J, Chen X G. *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(10): 1023–1030
- [5] 高媛媛, 孔明, 陈西广, 等. 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. *生物化学与生物物理进展*, 2014, **41**(2): 202–208
Gao Y Y, Kong M, Chen X G, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2014, **41**(2): 202–208
- [6] Chaudhary H, Kohli K, Kumar V K. Nano-transfersomes as a novel carrier for transdermal delivery. *Int J Pharm*, 2013, **454**(1): 367–380
- [7] Ganesh S, Iyer A K, Morrissey D V, *et al.* Hyaluronic acid based self-assembling nanosystems for CD44 target mediated siRNA delivery to solid tumors. *Biomaterials*, 2013, **34**(13): 3489–3502
- [8] Kong M, Chen X G, Park H. Design and investigation of nanoemulsified carrier based on amphiphile-modified hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers*, 2011, **83**(2): 462–469
- [9] Kong M, Park H, Feng C, *et al.* Construction of hyaluronic acid nanosome as functional transdermal nanocarrier for tumor therapy. *Carbohydrate Polymers*, 2013, **94**(1): 634–641
- [10] Kong M, Chen X G, Park H, *et al.* Investigations on skin permeation of hyaluronic acid based nanoemulsion as transdermal carrier. *Carbohydrate Polymers*, 2011, **86**(2): 837–843
- [11] Wadkins R M, Potter P M, Vladu B, *et al.* Water soluble 20 (S)-glycinate esters of 10, 11-methylenedioxycamptothecins are highly active against human breast cancer xenografts. *Cancer Research*, 1999, **59**(14): 3424–3428
- [12] Kim J H, Kim Y S, Park K, *et al.* Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. *J Control Release*, 2008, **127**(1): 41–49
- [13] Kong M, Park H. Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier. *Carbohydrate Polymers*, 2011, **83**(3): 1303–1310
- [14] Tanizawa A, Kohn K W, Kohlhaagen G, *et al.* Differential stabilization of eukaryotic DNA topoisomerase I cleavable complexes by camptothecin derivatives. *Biochemistry*, 1995, **34**(21): 7200–7206
- [15] Alexander A, Dwivedi S, Giri T K, *et al.* Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Release*, 2012, **164**(1): 26–40
- [16] Pegoraro C, MacNeil S, Battaglia G. Transdermal drug delivery: from micro to nano. *Nanoscale*, 2012, **4**(6): 1881–1894
- [17] Li K, Pan J, Feng S S, *et al.* Generic strategy of preparing fluorescent conjugated-polymer-loaded poly (DL-lactide-co-Glycolide) nanoparticles for targeted cell imaging. *Adv Funct Mater*, 2009, **19**(22): 3535–3542

Cellular Uptake and Pharmacokinetics of MD-CPT-loaded HA Nanoemulsion as Transdermal Delivery Carriers*

GAO Yuan-Yuan¹⁾, WANG Zhi-Guo²⁾, JIANG Chang-Qing¹⁾, KONG Ming¹⁾, CHENG Xiao-Jie¹⁾,
WANG Juan¹⁾, BAO Zi-Xian¹⁾, SUN Guo-Hui¹⁾, HUANG Yu-Hua³⁾, LIN Cheng-Bing³⁾,
YI Hong-Jun³⁾, 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;

³⁾ Technology Center, Jifa Group Company Limited, Qingdao 266221, China)

Abstract Our previous study prepared loading 10,11-methylenedioxy camptothecin (MD-CPT) hyaluronic acid nanocarriers (HANs) as a transdermal delivery system. The further study targets to value the cellular uptake and pharmacokinetic analysis of MD-CPT-loaded HA nanoemulsion as transdermal delivery carriers. A sustained-release dosage formulation was obtained with good skin permeability by optimizing the preparation conditions. The cellular-uptake of keloid fibroblast for nanoemulsion was observed with CLSM, drug eventually into the nucleus. Phagocytosis was time dependence, and different cell lines include HSF, HUVES, MCF-7 and KF were slightly different. Rhodamine B labeled HANs performed desirable skin permeable capacity across stratum corneum, and the drug was transferred to the dermis by fluorescence microscopy. The optimized HANs formulation was verified with the highest effective drug permeability. The plasma concentration of MD-CPT was analyzed by HPLC, showed an almost 3.6 and 1.6 times increase $T_{1/2}$ respectively compared with intravenous and intramuscular injection; moreover, the curve of transdermal delivery was smooth continuous. *In vivo* imaging system intuitively reflected the distribution of transdermal drug in mice and the drug content of various organs/tissues. The rest of MD-CPT and HANs entered into the blood circulation, eventually excreted through metabolism without body burden. The longer drug residence at topical area with treatment could provide a continuous and controllable, extended efficacy, which was beneficial to superficial lesions therapy.

Key words hyaluronic acid, nanoemulsion, 10, 11-methylenedioxycamptothecin, transdermal delivery, cellular uptake, biodistribution

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00111

*This work was supported by grants from International S&T Cooperation Program of China (2013DFG32880, 2010DFB50140), The National Natural Science Foundation of China (31300786) and Doctoral Fund of Ministry of Education of China (20120132110012).

**Corresponding author.

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

Received: April 19, 2014 Accepted: May 28, 2014