

基于富勒醇-氧化铈复合体系的长效光防护纳米凝胶的制备与评价[△]

张天龙^{1*}, 刘佳¹, 赵庆¹, 周玥², 杨明^{2#}, 罗倩钰³ (1. 川北医学院药学院, 四川南充 637000; 2. 川北医学院附属医院药学部, 四川南充 637000; 3. 金堂县第一人民医院药学部, 成都 610000)

中图分类号 R944.9; R751

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2025)17-2106-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.17.05



摘要 **目的** 开发一种兼具物理屏障和化学清除功能的长效光防护纳米凝胶, 并评价其性能。**方法** 基于富勒醇-氧化铈纳米复合体系构建由贻贝黏蛋白和透明质酸钠组成的富勒醇-氧化铈纳米凝胶(FCN), 并进行表征。采用体外自由基清除实验评价FCN的抗氧化能力; 采用防晒指数(SPF)检测仪评价其紫外线屏蔽能力; 根据《药品安全性评价指南》要求评价其生物安全性; 采用小动物三维活体成像技术评价其皮肤黏附性; 采用皮肤防晒伤观察和组织病理学观察评价其防晒伤能力。**结果** FCN中的氧化铈纳米颗粒和富勒醇纳米颗粒的平均粒径分别约20、10 nm, FCN表现出良好的紫外线吸收能力和自由基清除能力。FCN在临界波长370 nm处的SPF值为 58.95 ± 0.82 , 紫外线防护等级为 6.21 ± 0.15 。纳米凝胶中未检出金黄色葡萄球菌等致病菌, 铅、砷、汞、镉含量均符合药用辅料标准; FCN组小鼠未出现红斑、水肿、脱屑等刺激性反应, 血生化指标均在正常参考范围内。人工汗液冲刷组小鼠的材料清除率不到30%, 干态清洁组小鼠的材料清除率约为92%。防护组小鼠在整个实验过程中均未出现明显红斑或形成溃疡; 组织病理学观察可见皮肤组织纤维排列有序, 胶原纤维数量接近对照组。**结论** 本研究制备的FCN符合《中国药典》相关要求, 其安全性和皮肤相容性良好, 且实现了紫外线屏蔽、自由基清除双重协同防护。

关键词 纳米凝胶; 富勒醇; 氧化铈; 高原紫外线损伤; 抗氧化; 光防护

Preparation and evaluation of long-acting light-protective nanogel based on fullereneol-cerium oxide composite system

ZHANG Tianlong¹, LIU Jia¹, ZHAO Qing¹, ZHOU Yue², YANG Ming², LUO Qianyu³ (1. College of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China; 3. Dept. of Pharmacy, Jintang First People's Hospital, Chengdu 610000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To develop a long-acting light-protective nanogel with both physical barrier and chemical clearance functions, and evaluate its performance. **METHODS** The photoprotective nanogel composed of mussel mucin and sodium hyaluronate was constructed based on a fullereneol-cerium oxide composite nano system, namely fullereneol-cerium oxide nanogel (FCN), and was characterized. The antioxidant capacity of FCN was evaluated using *in vitro* free radical scavenging experiments; its UV shielding ability was assessed by using an SPF value detector; its biosafety was assessed according to the requirements of the *Guidelines for Drug Safety Evaluation*; skin adhesion was assessed using small animal 3D live imaging technology; its sun protection ability was assessed through skin sunscreen detection and histopathological observation. **RESULTS** The average particle sizes of cerium oxide and fullereneol nanoparticles in FCN were about 20 and 10 nm, respectively, and FCN exhibited good UV absorption and free radical scavenging abilities. SPF value of FCN was 58.95 ± 0.82 , and the ultraviolet A protection level value was 6.21 ± 0.15 . No pathogenic colonies such as *Staphylococcus aureus*, were detected in the nanogel, and the contents of lead, arsenic, mercury and cadmium all met the standards for pharmaceutical excipients; FCN group did not show any irritating reactions such as erythema, edema, or desquamation; blood biochemical indicators of the FCN group were within the normal reference range. The material clearance rate of mice in the artificial sweat flushing group was less than 30%, while the material clearance rate of mice in the dry cleaning group reached about 92%. The mice in the protective group did not show obvious erythema or ulcer

formation throughout the experiment. Histopathology showed that the fibers were arranged in an orderly manner, and the number of collagen fibers was close to that of the control group. **CONCLUSIONS** The FCN formulation constructed in this study meets the relevant requirements of the *Chinese Pharmacopoeia*, has good safety and skin compatibility, and

[△] 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82102448); 四川省医学科技创新研究会项目(No.YCK-KY-YCZD2024-104)

* 第一作者 药师, 硕士。研究方向: 紫外线防护纳米药物研发。
E-mail: 14780656972@163.com

通信作者 主任药师, 硕士生导师, 博士。研究方向: 抗感染药物的药理学与治疗学。E-mail: yangming1211@nsmc.edu.cn

achieves dual synergistic protection of UV shielding and free radical scavenging.

KEYWORDS nanogel; fulleranol; cerium oxide; high altitude ultraviolet damage; antioxidant; light protection

高原地区因高海拔、大气稀薄等因素,紫外线辐射强烈,显著威胁高原人群的皮肤健康^[1]。紫外线辐射直接损伤生物大分子并诱导大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生,导致DNA损伤、蛋白质变性和细胞膜破坏^[2]。长期暴露于强烈的紫外线辐射下可导致皮肤晒伤、皮炎甚至皮肤癌^[3]。然而,现有的光防护制剂主要针对紫外线B(ultraviolet B, UVB)进行防护,缺乏有效的紫外线A(ultraviolet A, UVA)屏蔽功能,且自由基清除能力不足,难以满足高原环境的特殊需求。目前,抗氧化剂存在较多局限:超氧化物歧化酶仅能清除超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$),对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)无效;小分子抗氧化剂稳定性差、半衰期短;常规的抗氧化剂需要频繁给药,依从性差。

纳米技术的发展为皮肤紫外线辐射防护提供了新思路^[4-6]。纳米材料不仅具有优异的紫外线屏蔽能力,还能高效清除多种ROS,具有化学稳定性高、作用时间长等优点。氧化铈纳米颗粒基于其宽带隙特性可物理屏蔽全波段紫外线(UVA和UVB),同时通过 $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ 价态转换模拟过氧化物酶和过氧化氢(H_2O_2)酶活性,广谱清除 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 等ROS;富勒醇纳米颗粒作为水溶性富勒烯衍生物,其笼状共轭结构能高效捕获电子,清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 、单线态氧(singlet oxygen, $^1\text{O}_2$)及脂质自由基,并阻断自由基链式反应^[7-8]。水凝胶材料作为递送载体,可增强皮肤黏附性,从而使材料在皮肤上长时间滞留,延长防护时间。研究显示,贻贝黏蛋白因富含多巴结构域,可基于共价/非共价作用在湿润皮肤表面形成强黏附界面,其多巴基团还能通过与金属离子的配位作用稳定负载氧化铈纳米颗粒,显著延长皮肤驻留时间^[9]。另外,透明质酸钠作为一种天然多糖,兼具优异的生物相容性和深层次的保湿能力,可为皮肤组织提供水合微环境^[10]。因此,本研究拟基于富勒醇-氧化铈纳米复合体系构建由贻贝黏蛋白和透明质酸钠组成的光防护纳米凝胶,即富勒醇-氧化铈纳米凝胶(fullerenol-cerium oxide nanogel, FCN),并对其性能进行评价,旨在为一种新型抗氧化制剂的开发奠定基础,以满足高原人群对高效、持久且安全的紫外线辐射防护需求。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ME204型分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司),5425R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司),UH4150型紫外-可见-近红外分光光度计、HT7700型高分辨透射电镜、SU8010型高分辨场发射扫描电镜(日本Hitachi公司),FTIR-650型红外光谱仪(天津港东科技发展股份有限公司),Spectra-

MaxiD5型全功能酶标仪(美国MD Electronics公司),IVIS Spectrum型小动物三维活体成像仪(美国PerkinElmer公司),TEKSQRAY SQS-600P型高通量切片扫描仪(深圳市生强科技有限公司),Bruker D8 Advance型X射线衍射分析仪(德国Bruker公司),UV-2000S型防晒指数(sun protection factor, SPF)检测仪(上海蓝菲光学仪器有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

氯化铈七水合物、透明质酸钠、贻贝黏蛋白(分子量100 kDa)、吩嗪硫酸甲酯、过硫酸钾、还原型辅酶I二钠、氯化硝基四氮唑蓝、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)、硫酸亚铁(批号分别为C432245、H293507、rp212901、299-11-6、7727-21-1、606-68-8、298-83-9、30931-67-0、D273092、T100416、F684697)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;富勒烯粉末(纯度99.5%,批号99685-96-8)购自中国科学院成都有机化学有限公司;30% H_2O_2 (批号7722-84-1)购自成都市科隆化学品有限公司;ROS检测试剂盒(批号080923231114)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;CCK-8试剂盒(批号BG0025)购自重庆葆光生物技术有限公司;Masson三色染色试剂盒、乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管、磷酸盐缓冲液(批号分别为G1340、YA1461、P1020)均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 实验动物

无特定病原体的雌性BALB/c小鼠51只,6~7周,体重18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2021-0006。实验动物于室温25℃、空气湿度50%、12 h明/12 h暗循环条件下饲养。动物实验设计及实施过程严格遵循“3R”原则。

2 方法

2.1 材料制备

(1)氧化铈纳米颗粒的制备:称取37.3 mg氯化铈七水合物粉末溶于10 mL去离子水中,室温搅拌15 min,在避光环境下边搅拌边滴加1.3 mL H_2O_2 ,搅拌反应2 h;以12 000 r/min离心10 min,收集产物,经冷冻干燥后得到棕褐色粉末,即为氧化铈纳米颗粒。(2)富勒醇纳米颗粒的制备:将质量比为10:1的富勒烯粉末与NaOH投入到玛瑙球磨罐中预处理1 h,然后在球磨罐中加入30% H_2O_2 (富勒烯与 H_2O_2 物质的量之比为0.139:1)研磨1 h(转速450 r/min);再加水水解,将所得溶液进行离心除去水不溶物,并在透析袋(截留分子量为3 500 Da)中用

水透析3 d,最后经冷冻干燥获得棕褐色粉末,即为富勒醇纳米颗粒。(3)FCN的制备:将10 mg贻贝黏蛋白和1 000 mg透明质酸钠溶于20 mL水中,加热(50℃),搅拌溶解得到水凝胶,然后将5 000 mg氧化铈纳米颗粒和100 mg富勒醇纳米颗粒加入到50 mL凝胶体系中,加热到50℃后进行均质处理(3~5 min),均质降温后得到的产物即为FCN。

2.2 材料表征

2.2.1 氧化铈纳米颗粒的表征

(1)形貌表征:将合成的氧化铈纳米颗粒分散到去离子水中(20 μg/mL),取10 μL氧化铈纳米颗粒水溶液均匀滴加于铜网上,待其干燥后置于高分辨透射电镜下观察形貌。(2)晶体结构表征:将氧化铈纳米颗粒均匀铺在载样台上,使用X射线衍射分析仪测定其晶体结构,采用广角衍射测试,扫描角度为4°~120°,扫描速度为每分钟8°。(3)紫外-可见吸收光谱表征:将氧化铈纳米颗粒置于载样台上铺平,使用紫外-可见-近红外分光光度计测定其在200~500 nm波长范围内的吸光度(*A*)值,得到其紫外-可见吸收光谱图。

2.2.2 富勒醇纳米颗粒的表征

(1)形貌表征:将合成的富勒醇纳米颗粒分散到水中(10 μg/mL),取10 μL富勒醇纳米颗粒水溶液均匀滴加于铜网上,待其干燥后置于高分辨透射电镜下观察形貌。(2)红外吸收光谱表征:将冷冻干燥的富勒醇纳米颗粒与溴化钾以质量比1:100压制成透明薄片后,用红外光谱仪进行检测,得到其红外吸收光谱图。(3)紫外-可见吸收光谱表征:配制质量浓度为20 μg/mL的富勒醇纳米颗粒水溶液,在使用水扫平基线后,用紫外-可见-近红外分光光度计测定其在200~500 nm波长范围内的*A*值,得到其紫外-可见吸收光谱图。

2.2.3 FCN的表征

(1)形貌表征:将均质后的FCN冻干,经研钵研磨分散后,取适量粉末均匀撒布于导电胶表面,随后进行溅射和镀金处理,并采用高分辨场发射扫描电镜观察其形貌。(2)紫外-可见吸收光谱表征:将FCN置于600 μL比色皿中,在使用水扫平基线后,用紫外-可见-近红外分光光度计测定其在200~500 nm波长范围内的*A*值,得到其紫外-可见吸收光谱图。

2.3 FCN的自由基清除能力评价

本研究采用体外自由基清除实验对FCN抗氧化活性进行定量分析。

2.3.1 ABTS自由基清除能力

将3.84 mg/mL的ABTS溶液与0.66 mg/mL的过硫酸钾溶液于室温下避光反应16 h得到ABTS自由基溶液。将等体积的ABTS自由基溶液与不同质量浓度(25、50、100、200 μg/mL,浓度依据前期预实验结果得出)的FCN溶液避光反应10 min,用紫外-可见-近红外分

光光度计测定其在700~800 nm波长范围内的*A*值,选取734 nm波长处的特征吸收值,并计算自由基清除率。自由基清除率(%)=[*A*_{对照}-(*A*_{样品}-*A*_{空白})]/*A*_{对照}×100%。其中*A*_{对照}指未加待测物质的自由基溶液的*A*值,*A*_{样品}指加了待测物质的自由基溶液的*A*值,*A*_{空白}指不含自由基的溶液的*A*值。实验重复3次。

2.3.2 DPPH自由基清除能力

将等体积的DPPH溶液(0.04 mg/mL)与不同质量浓度(25、50、100、200 μg/mL,浓度依据前期预实验结果得出)的FCN溶液避光反应30 min,用紫外-可见-近红外分光光度计测定其在500~600 nm波长范围内的*A*值,选取517 nm波长处的特征吸收值,并计算自由基清除率(同“2.3.1”项下)。实验重复3次。

2.3.3 •O₂清除能力

将200 μL磷酸盐缓冲液、100 μL还原型辅酶Ⅱ二钠溶液(8 mg/mL)、100 μL氯化硝基四氮唑蓝溶液(0.216 mg/mL)、100 μL吩嗪硫酸甲酯溶液(2.7 μg/mL)和100 μL不同质量浓度(25、50、100、200 μg/mL,浓度依据前期预实验结果得出)的FCN溶液避光反应10 min,在全功能酶标仪上测定其在517 nm波长处的*A*值,并计算自由基清除率(同“2.3.1”项下)。实验重复3次。

2.3.4 •OH清除能力

将200 μL磷酸盐缓冲液、100 μL TMB溶液(4 mmol/L)、100 μL硫酸亚铁溶液(2.7 mg/mL)、10 mL H₂O₂(4 mmol/L)和100 μL不同质量浓度(25、50、100、200 μg/mL,浓度依据前期预实验结果得出)的FCN溶液避光反应10 min,在全功能酶标仪上测定其在560 nm波长处的*A*值,并计算自由基清除率(同“2.3.1”项下)。实验重复3次。

2.4 FCN的紫外线屏蔽能力评价

采用国际通用的SPF检测仪对样品进行标准化测试。根据ISO 24443:2021标准,在室温为20~30℃、相对湿度为40%~60%的条件下,将FCN按照0.3 mg/cm²的量涂布于空白聚甲基丙烯酸甲酯板的粗糙面,将样品在暗处静置20 min后,测定其SPF和UVA防护等级(protection grade of UVA,PA)。实验重复3次。

2.5 FCN的生物安全性评价

本研究根据《药品安全性评价指南》要求^[11],采用标准化的药理学检测方法对FCN进行系统的安全性评价。

2.5.1 常规9项检测

严格依据2020版《中国药典》(四部)中常规9项检测实验步骤(包括微生物限度与重金属检测)^[12]对FCN进行安全性评价,包括菌落总数、霉菌和酵母菌总数、耐热大肠菌群、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、铅、砷、汞、镉,其中重金属的药用辅料标准为铅<10 mg/kg、砷<2 mg/kg、汞<1 mg/kg、镉<5 mg/kg。

2.5.2 皮肤相容性评价

采用BALB/c小鼠皮肤刺激性模型进行评价。实验分为FCN组和对照组,每组3只小鼠。FCN组小鼠背部皮肤(面积为1 cm×1 cm)连续涂抹FCN(20 mg/cm²),对照组小鼠涂抹等量生理盐水。每隔1 d记录小鼠的体重,分别在实验初始(第0天)、早期(第3天)、中期(第11天)、晚期(第20天)对小鼠背部皮肤拍照观察,评价FCN对皮肤组织的刺激性(参考国际标准ISO 10993-10:2021)。

2.5.3 血液相容性检测

实验分为FCN组和对照组,每组6只小鼠。FCN组小鼠背部皮肤连续涂抹FCN(20 mg/cm²),对照组小鼠涂抹等量生理盐水。分别在第11天和第20天每组各取3只小鼠进行麻醉,进行眼球取血,将血液滴入EDTA抗凝管和无菌EP管中。EDTA抗凝管中样本轻轻颠倒混匀后,于4℃下暂存,用于血常规检测。无菌EP管中样本室温静置30 min,形成凝块,以3 000×g离心10 min,取上清液分装至无菌EP管中,用于生化指标检测。

2.6 FCN的皮肤黏附性能评价

本研究采用小动物三维活体成像技术对其皮肤驻留性和可清除性进行定量分析。实验分为人工汗液冲刷组和干态清洁组,每组3只小鼠。人工汗液冲刷组模拟人体生理环境,使用标准人工汗液(pH5.5,含0.5% NaCl和0.1%乳酸),以2 cm/min的生理流速对经过FCN处理30 min后的小鼠皮肤表面进行持续冲刷,采用标准清洁程序,在压力5 kPa下往复冲刷10次。干态清洁组对经过FCN处理30 min后的小鼠采用标准清洁程序,在压强0.5 N/cm²下往复擦拭10次。采用荧光定量获得经过30 min的汗液冲刷或经干态清洁前后皮肤表面残留的荧光物质的荧光强度,并计算材料清除率。材料清除率(%)=(初始荧光强度-残留荧光强度)/初始荧光强度×100%。

2.7 FCN的防晒伤能力评价

2.7.1 皮肤防晒伤观察

为系统评价FCN的体内光保护效果,本研究建立了BALB/c小鼠紫外线诱导皮肤光损伤模型^[13]。实验分为对照组、紫外线照射组、防护组,每组9只。实验过程中,将小鼠置于光源下方25 cm处,第一阶段紫外线照射4 d,每日总剂量约300 mJ/cm²;第二阶段紫外线照射3 d,以相同照射强度每日照射30 min,照射前30 min提前涂抹FCN样品1遍,涂抹量为2 mg/cm²。每日观察小鼠伤口愈合情况,总实验周期为20 d。在实验过程中,分别在实验第3、11、20天每组各取3只小鼠拍照记录其皮肤红斑、溃疡、晒伤创面情况。

2.7.2 组织病理学观察

在“2.7.1”实验基础上,分别在紫外线照射后的第3、11、20天记录创面情况后,各处死每组的3只小鼠,取背

部皮肤组织,常规制备石蜡切片(厚5 μm),分别进行HE染色和Masson染色,封片后通过高通量切片扫描仪观察小鼠背部皮肤组织病理学变化。

2.8 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件进行作图和统计分析。计量资料满足正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本t检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 材料表征结果

3.1.1 氧化铈纳米颗粒的表征结果

透射电镜结果(图1A)显示,氧化铈纳米颗粒呈不规则球形,平均粒径约20 nm。X射线衍射分析图谱结果(图1B)显示,氧化铈纳米颗粒具有典型的立方萤石晶体结构(JCPDS No.34-0394),衍射峰位与标准卡片完全吻合,表明所制备的氧化铈纳米颗粒具有良好的结晶性。紫外-可见吸收光谱表征结果(图1C)显示,氧化铈纳米颗粒在UVB(290~320 nm)和UVA(>320~400 nm)波段均表现出明显的吸收特性。

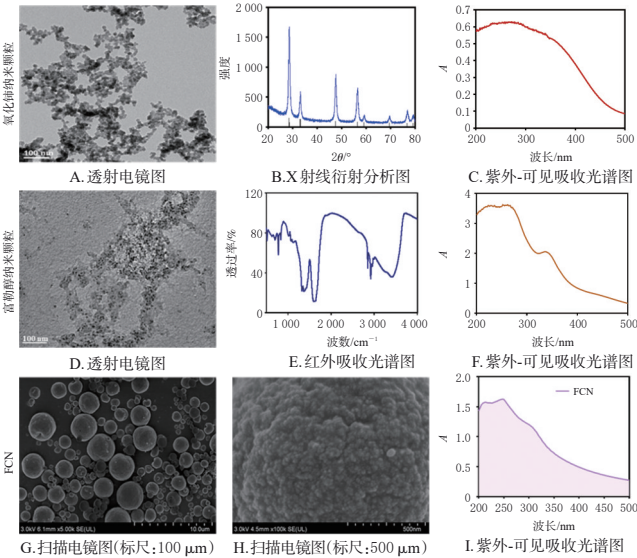


图1 不同材料的表征结果

3.1.2 富勒醇纳米颗粒的表征结果

透射电镜结果(图1D)显示,富勒醇纳米颗粒粒径分布均匀,平均粒径约10 nm。红外吸收光谱表征结果(图1E)显示,其特征吸收峰分别位于1 000~800 cm⁻¹(C—C键伸缩振动)、1 428~800 cm⁻¹(C=C键伸缩振动)、1 380~800 cm⁻¹(C—O键伸缩振动)、1 640~800 cm⁻¹(C=O键伸缩振动)以及3 400~800 cm⁻¹(O—H键伸缩振动)。紫外-可见吸收光谱表征结果(图1F)显示,富勒醇纳米颗粒在200~400 nm波长范围内具有较强吸收。

3.1.3 FCN的表征结果

扫描电镜结果(图1G、图1H)显示,FCN呈均匀的球形结构,且该球形结构是由大量纳米级小球自组装形成

的多级结构,粒径分布范围为50~100 μm。紫外-可见吸收光谱表征结果(图1I)显示,FCN在250~400 nm紫外波段表现出宽谱吸收特性。

3.2 FCN的自由基清除能力评价结果

由表1可知,FCN对各类自由基清除率呈明显的浓度依赖趋势。当FCN的质量浓度增加至200 μg/mL时,其对ABTS自由基、DPPH自由基、•OH和•O₂⁻的清除率分别为(62.56±1.41)%、(60.52±1.42)%、(89.02±1.04)%和(77.30±1.37)%,表明其具有较好的抗氧化活性。

表1 不同质量浓度FCN对各种自由基的清除率结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

质量浓度	ABTS自由基	DPPH自由基	•OH	•O ₂ ⁻
25 μg/mL	24.88±1.60	15.71±0.58	70.32±2.23	11.62±0.50
50 μg/mL	47.05±1.69	22.58±2.56	76.38±0.87	19.52±0.85
100 μg/mL	62.18±1.17	34.36±2.98	83.43±1.39	42.10±3.12
200 μg/mL	62.56±1.41	60.52±1.42	89.02±1.04	77.30±1.37

3.3 FCN的紫外线屏蔽能力评价结果

FCN在临界波长370 nm处的SPF值为58.95±0.82($n=3$),显著超越SPF 50+的超高防护分级;PA为6.21±0.15($n=3$),符合PA++++级(新规最高级)标准^[14]。以上结果表明,FCN具有广谱紫外线防护性能。

3.4 FCN的生物安全性评价结果

3.4.1 常规9项检测结果

FCN中未检出金黄色葡萄球菌等致病菌(检出限<10 cfu/g),铅(5 mg/kg)、砷(0.01 mg/kg)、汞(0.002 mg/kg)、镉(0.59 mg/kg)等重金属含量检测结果均符合药用辅料标准。

3.4.2 皮肤相容性评价结果

体重记录结果(图2A)显示,FCN组与对照组小鼠各时间点的体重差异均无统计学意义($P>0.05$),表明FCN对小鼠的一般状态无显著影响。背部皮肤观察结果(图2B)显示,FCN组小鼠未出现红斑、水肿、脱屑等刺激性反应,符合ISO 10993-10:2021医疗器械生物学评价标准中对无刺激性材料的要求。

3.4.3 血液相容性评价结果

FCN组和对照组小鼠在第11天和第20天的血常规

指标比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);血生化指标(丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、尿素氮、肌酐)虽然部分差异有统计学意义($P<0.05$),但均在正常参考值范围内,表明FCN不会引起系统毒性反应。结果见表2。

表2 两组小鼠第11、20天的血常规和血生化检测指标结果比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间	指标	FCN组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
第11天	白细胞计数($\times 10^9 L^{-1}$)	4.06±0.50	4.03±0.95	0.05	0.963
	红细胞计数($\times 10^{12} L^{-1}$)	10.87±0.11	10.52±0.21	2.68	0.056
	血小板计数($\times 10^9 L^{-1}$)	1 517.67±78.93	1 399.00±25.15	2.66	0.057
	丙氨酸转氨酶(U/L)	57.00±10.20	44.67±2.36	2.22	0.090
	天冬氨酸转氨酶(U/L)	137.00±6.53	131.70±11.56	0.79	0.457
	尿素氮/(mmol/L)	9.41±0.70	6.96±0.80	4.12	0.015
第20天	肌酐/(μmol/L)	9.67±0.47	12.00±2.04	-2.33	0.080
	白细胞计数($\times 10^9 L^{-1}$)	6.40±1.20	6.30±0.80	0.14	0.896
	红细胞计数($\times 10^{12} L^{-1}$)	10.90±0.00	10.60±0.10	5.20	0.007
	血小板计数($\times 10^9 L^{-1}$)	1 427.30±151.50	1 576.70±86.80	-1.63	0.178
	丙氨酸转氨酶(U/L)	56.33±7.93	38.33±2.49	4.13	0.015
	天冬氨酸转氨酶(U/L)	172.67±6.85	133.67±3.40	9.97	<0.001
	尿素氮/(mmol/L)	9.83±0.21	6.97±0.48	9.19	0.001
	肌酐/(μmol/L)	10.67±0.47	9.00±0.82	3.18	0.034

注:肝功能指标的正常参考范围为丙氨酸转氨酶26~80 U/L、天冬氨酸转氨酶50~200 U/L、尿素氮5~10 mmol/L、肌酐5~30 μmol/L。

3.5 FCN的皮肤黏附性能评价结果

与初始量100%比较,人工汗液冲刷组小鼠的皮肤表面仍保留(72.40±12.96)%($n=3$)的荧光物质($P<0.01$),材料清除率不到30%,表明FCN具有较强的皮肤黏附性能。与初始量100%比较,经干态清洁后,干态清洁组小鼠皮肤表面仅残留(7.96±3.86)%($n=3$)的荧光物质($P<0.01$),材料清除率约为92%。

3.6 FCN的防晒伤能力评价结果

3.6.1 皮肤防晒伤观察结果

与对照组相比,紫外线照射组小鼠在照射后第3天出现明显的红斑反应,第11天发展为典型的晒伤创面,直至实验终点(第20天)仍未完全恢复;防护组小鼠在整个实验过程中均未出现明显红斑或形成溃疡。结果见图3。

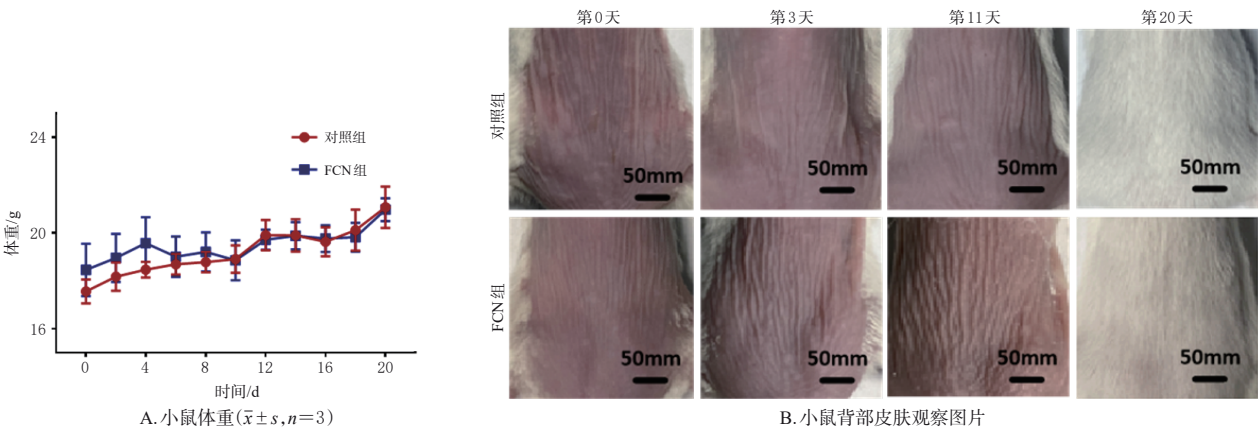


图2 FCN的皮肤相容性评价结果

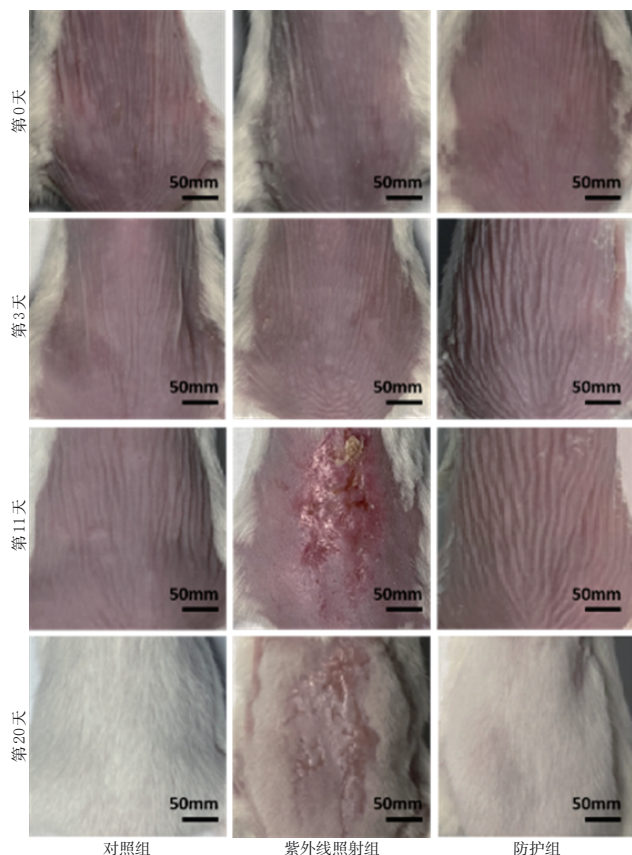


图3 各组小鼠背部皮肤防晒伤观察图

3.6.2 皮肤组织病理学观察结果

HE染色结果(图4)显示,对照组和防护组小鼠皮肤分层明显,纤维排列有序,表皮层及其内部的棘细胞层、透明层较薄,但随着时间的推移逐渐变厚;紫外线照射组小鼠第11天真皮、表皮层出现胶原纤维断裂,且真皮层出现明显的炎症细胞浸润,第20天表皮层明显增厚。

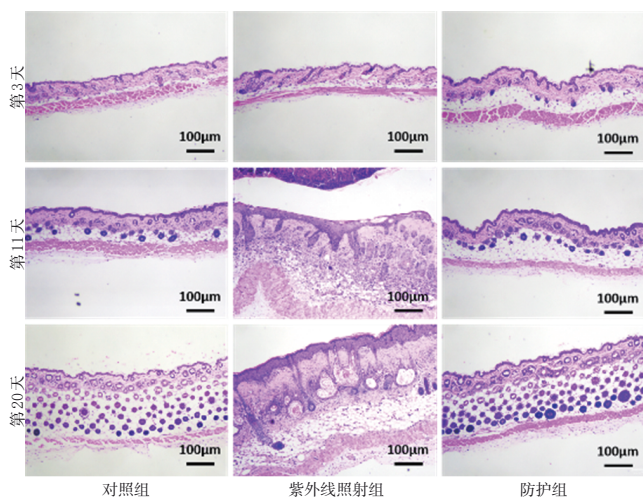


图4 各组小鼠背部皮肤组织HE染色图

Masson染色结果(图5)显示,紫外线照射组小鼠由于皮肤受到紫外线损伤,表皮有脱落现象,胶原纤维被破坏、数量明显减少、排列疏松且紊乱;与紫外线照射组比较,防护组小鼠皮肤组织中被染为蓝色的胶原纤维数量无明显减少,接近对照组。

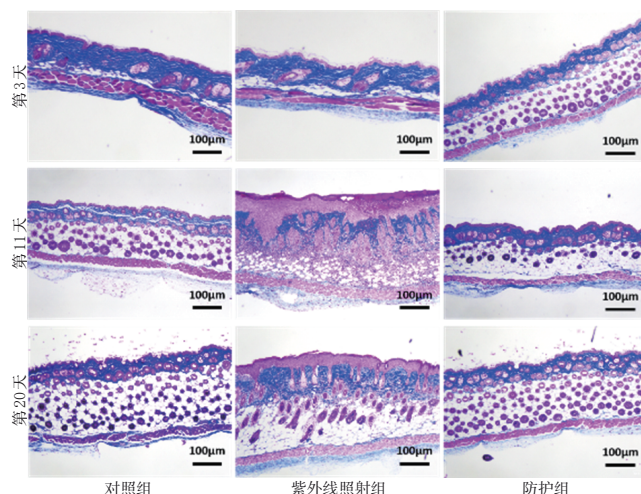


图5 各组小鼠背部皮肤组织Masson染色图

4 讨论

由于高原地区特殊的自然地理环境,造成其空气稀薄、氧分压低、太阳辐射强等独特的气候特点,这些气候因素均会对人体健康造成不同程度的损伤。研究显示,在雪线以上被冰雪覆盖的高山和高原,由于反射增加,人体接收的紫外线辐射强度明显增加,海拔每升高100 m,紫外线辐射强度增加1%~3%^[15]。长期暴露于高强度紫外线的环境导致高原人群出现暴露部位皮肤色素沉着、角质异常增生、表皮萎缩、毛细血管扩张及早期光老化等典型临床表现^[16]。流行病学调查结果亦显示,紫外线对高原人群造成的皮肤损伤主要表现在晒黑和光老化方面,表明紫外线是高原人群皮肤健康的主要“杀手”^[17]。

本研究开发的FCN创新性地整合了物理屏蔽与化学清除双重防护机制,为高原紫外线防护提供了新思路。从作用机制看,氧化铈纳米颗粒通过其特殊的半导体特性,可有效吸收UVB和UVA;其立方萤石晶体结构中的氧空位缺陷增强了紫外吸收能力,这种物理屏蔽作用直接从源头上降低了辐射损伤风险。

值得注意的是,单纯的物理屏蔽难以完全避开紫外线诱导的氧化损伤级联反应。紫外线辐射可引发皮肤组织内复杂的氧化应激过程:一方面,UVB直接作用于细胞DNA,导致环丁烷嘧啶二聚体和6-4光产物等损伤^[18];另一方面,UVA通过激活内源性光敏剂产生大量ROS,包括 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 $^1\text{O}_2$ ^[19]。临床数据显示,长期紫外线暴露可使皮肤中8-羟基脱氧鸟苷(氧化性DNA损伤标志物)水平升高5~8倍,显著增加光老化和皮肤癌风险^[20]。本研究制备的多功能复合纳米凝胶可以同时清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 等多种自由基,明显降低了紫外线照射后皮肤组织中的氧化应激水平,能够有效阻断ROS引发的脂质过氧化链式反应。

在FCN的实际应用中,皮肤黏附性能是决定防护效果持久性的关键因素。传统外用制剂黏附力不足,在出

汗等日常活动中流失率为60%~80%,导致防治效果明显下降。本研究通过仿生设计,以贻贝黏蛋白与透明质酸钠结合构建的水凝胶网络在防护持久性方面发挥了关键作用。该体系通过儿茶酚-皮肤蛋白共价键(汗液冲刷测试荧光信号保留率为72.40%)和三维网络结构(扫描电镜显示多级球形组装)实现了长效驻留。这种智能黏附特性既保证了其持续治疗作用,又解决了传统制剂需要频繁给药的问题。

病理学证据进一步验证了双重防护的协同效应。紫外线照射组小鼠皮肤呈现典型的皮肤光损伤病理改变,包括表皮增厚、真皮层可见胶原纤维断裂及炎症细胞浸润,胶原密度显著降低且排列紊乱;相比之下,涂抹FCN的防护组小鼠皮肤组织结构保持完整,纤维排列有序,真皮层胶原纤维数量与对照组接近。这表明FCN实现了对紫外线损伤的多层次防护。

综上所述,本研究构建的FCN创新性地结合了纳米技术与水凝胶载体,该制剂符合《中国药典》相关要求,安全性和皮肤相容性良好,实现了紫外线屏蔽、自由基清除双重协同防护,为高原人群光损伤防护提供了安全有效的解决方案。

参考文献

- [1] QIAO Y J, CHENG R Y, LI X H, et al. Plateau environment, gut microbiota, and depression: a possible concealed connection[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2025, 47(7):487.
- [2] JEONG D, QOMALADEWI N P, LEE J, et al. The role of autophagy in skin fibroblasts, keratinocytes, melanocytes, and epidermal stem cells[J]. *J Invest Dermatol*, 2020, 140(9):1691-1697.
- [3] 张静如,张翮,孙治国,等. 单兵用防晒防护用品的需求分析及配方设计[J]. *第二军医大学学报*, 2021, 42(1):75-80.
- [4] CHOI W, CHO J H, PARK S H, et al. Ginseng root-derived exosome-like nanoparticles protect skin from UV irradiation and oxidative stress by suppressing activator protein-1 signaling and limiting the generation of reactive oxygen species[J]. *J Ginseng Res*, 2024, 48(2):211-219.
- [5] XIE Y, YE J P, OUYANG Y Q, et al. Microneedle-assisted topical delivery of idebenone-loaded bioadhesive nanoparticles protect against UV-induced skin damage[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(6):1649.
- [6] LI N N, JI X H, MUKHERJEE S, et al. A bioinspired skin UV filter with broadband UV protection, photostability, and resistance to oxidative damage[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(8):10383-10397.
- [7] CAPUTO F, DE NICOLA M, SIENKIEWICZ A, et al. Cerium oxide nanoparticles, combining antioxidant and UV shielding properties, prevent UV-induced cell damage

- and mutagenesis[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(38):15643-15656.
- [8] YANG J L, CHEN X, LUODAN A, et al. Alleviation of photoreceptor degeneration based on fullerenols in rd1 mice by reversing mitochondrial dysfunction via modulation of mitochondrial DNA transcription and leakage[J]. *Small*, 2023, 19(44):e2205998.
- [9] CHENG H, SHI Z, YUE K, et al. Sprayable hydrogel dressing accelerates wound healing with combined reactive oxygen species-scavenging and antibacterial abilities[J]. *Acta Biomater*, 2021, 124:219-232.
- [10] BUKHARI S N A, ROSWANDI N L, WAQAS M, et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: a review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt B):1682-1695.
- [11] 赵紫楠,金鹏飞,张亚同,等. 药品安全性评价指南[J]. *临床药物治疗杂志*, 2024, 22(增刊1):5-8.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社, 2020:800, 1107.
- [13] DENG Y, EDIRIWICKREMA A, YANG F, et al. A sunblock based on bioadhesive nanoparticles[J]. *Nature Materials*, 2015, 14(12):1278-1285.
- [14] 食品药品监管总局. 总局关于发布防晒化妆品防晒效果标识管理要求的公告:2016年第107号[EB/OL]. (2016-06-01)[2025-03-24]. <https://www.nmpa.gov.cn/hzhp/hzhp-fgwj/hzhp-gzwj/20160601173101166.html>.
- [15] XU J, ZHANG C, REN L. Analysis of ultraviolet radiation characteristics and related factors in huangshan scenic area[J]. *J Risk Anal Crisis Resp*, 2018, 8(3):177.
- [16] 李莲,张禁. 高原特勤人员皮肤病防治研究进展[J]. *武警医学*, 2022, 33(9):821-823.
- [17] FENG Z, QIN Y F, HUO F, et al. NMN recruits GSH to enhance GPX4-mediated ferroptosis defense in UV irradiation induced skin injury[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2022, 1868(1):166287.
- [18] MOHANIA D, CHANDEL S, KUMAR P, et al. Ultraviolet radiations: skin defense-damage mechanism[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 996:71-87.
- [19] YANG C, RYBCHYN M S, DE SILVA W G M, et al. UV-induced DNA damage in skin is reduced by CaSR inhibition[J]. *Photochem Photobiol*, 2022, 98(5):1157-1166.
- [20] IVANOVA I, KURZ B, LANG K, et al. Investigation of the HelioVital filter foil revealed protective effects against UVA1 irradiation-induced DNA damage and against UVA1-induced expression of matrix metalloproteinases (MMP) MMP1, MMP2, MMP3 and MMP15[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2022, 21(3):361-372.

(收稿日期:2025-05-30 修回日期:2025-08-11)

(编辑:舒安琴)