

角质层及其类脂对雌二醇经皮渗透的作用

平其能 孙国庆 刘国杰

(药剂学研究室)

摘要 采用扩散装置和放射性同位素标记物测定,辅以 FTIR 和 DSC 技术,研究了雌二醇(OE)在角质层、去脂角质层、表皮以及活性表皮中的渗透性质和分配性质,分析角质层及其类脂在亲脂性药物经皮渗透中的作用。实验表明角质层是该类药物渗透的屏障,OE 在其中的渗透速度受到角质层通透性和药物在角质层分配系数的双重控制,而 OE 从角质层转运至活性表皮的过程不成为限速因素。角质层的屏障性质仅部分来源于角质层类脂,而角质层细胞膜产生的阻力则是角质层屏障性质的重要组成部分。角质层类脂同时又可能是 OE 扩散的途径,该类物质通过对亲脂性药物增溶、提高后者在角质层中的分配产生影响。促进剂 1,8-桉油精(1,8-CN)对 OE 的促渗作用也部分地依赖于角质层类脂的存在,通过一种可逆的物理相互作用改变类脂途径的通透性。

关键词 角质层;类脂;雌二醇(OE);扩散系数;分配系数;1,8-桉油精(1,8-CN)

研究皮肤结构层次及其组成对了解药物经皮吸收机理和改善药物经皮渗透具有重要意义。传统上认为药物渗透是经由角质细胞膜向皮肤深层扩散的过程,并且认为角质层类脂是皮肤屏障性质形成的主要因素^[1,2]。根据角质层结构特点,即角质细胞膜不是类脂双分子层膜而是交联角蛋白致密膜,角质细胞内容物由大量非纤维蛋白组成,仅含少量类脂,大量类脂填充在角质细胞间隙,很早以前就有研究者提出过所谓“砖块和砂浆(Bricks and mortar)”双室模型假设,形象地比喻了角质细胞和细胞间隙的通透性质^[3]。但事实上直至近几年研究者们才注意到这一假设的意义。一些实验研究业已证明汞离子经由角质细胞间隙扩散;细胞间隙类脂影响水分子蒸发速度以及在人工重组的角质层中类脂组分改变水分子转运速度等^[4-6]。笔者曾利用 5-氟脲嘧啶为模型药物,证实了角质层类脂途径对此类非离子型亲水性药物扩散以及作为渗透促进剂增效部位的重要性^[7]。本文则以 OE 为药物模型,通过比较角质层、去

脂角质层、活性表皮和表皮在促进剂 1,8-CN 存在和缺乏情况下的通透性,推测角质层及其类脂在亲脂性药物经皮渗透中的作用。

1 实验部分

1.1 药品和仪器

OE (Aldrich); 2,4,6,7-³H(N)-OE (NEN Research Products, 37 MBq/ml); 1,8-CN (Sigma); 放射性测定闪烁液(Pharmacia); 透皮扩散装置(自制); 液体闪烁计数器(Packard Tri-Carb 460C); 傅利叶透射红外分光光度计(Galaxy FTIR first system); 差示扫描热分析仪(Perkin-Elmer Series 7); 扫描电子显微镜(SX-40)等。

1.2 实验方法

1.2.1 皮肤样品制备 取-20℃冷藏的人体腹部皮肤,置 60℃热水中 45 s 后分离表皮,贮于 0.002% (W/V) 叠氮化钠溶液中或干燥备用。角质层的制取系将表皮内侧即活性表皮用 0.0025% (W/V) 胰酶溶液消化 16 h,洗净消化后粘液即得。另取适度干燥之表

皮固定在玻璃板上, 用粘胶带反复粘贴 20 次, 剥去角质层即得活性表皮。取干燥角质层按 1 ml/mg 用量浸没在 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (40 : 10 : 1) 溶剂中, 轻微振摇 30 min, 取出干燥即得去脂角质层。用 SEM 观察各皮肤样品的组织形态。

1.2.2 角质层和去脂角质层的 DSC 分析与 FTIR 分析 取干燥皮肤样品剪成约 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 小块, 称重后置于相对湿度为 98% 的密闭器皿中, 俟组织水含量达 20~30%, 迅速密封在热分析用不锈钢样品皿中, 以相同空皿为参照。DSC 温度范围为 $-10\text{~}140^\circ\text{C}$, 升温速度为 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 。为了检查 1,8-CN 的影响, 可取水合皮肤样品先行在其中浸泡 30 s, 取出后用纸吸干表面液体, 然后同法装样分析。FTIR 分析系将水合皮肤样品直接固定在仪器透射窗, 检测范围为 $4000\text{~}600\text{ cm}^{-1}$ 。

1.2.3 OE 经皮渗透系数的测定 渗透试验用不锈钢双室扩散池及自动集样系统进行。将充分溶胀的皮肤样品剪成约 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 小块, 外侧向上固定在扩散室和接受室之间。渗透条件是: 扩散液为 0.25 ml OE 饱和水溶液 (0.003 mg/ml 和 0.75 MBq/ml), 每 8 h 更换一次; 扩散面积为 0.126 cm^2 ; 接受液为 0.002% (W/V) 叠氮化钠水溶液, 流速 2 ml/h, 每 1.5 h 集样一次, 连续 24 h。将各时间收集的样液分别加 5 ml 放射性测定闪烁液, 混匀, 用 Packard Tri-Carb 460 C 型闪烁计数器测定。以累积放射性计数 (CPM) 对集样时间 (h) 作图, 曲线稳态段斜率即为 OE 渗透系数 K_{p} 。

在完成 24 h 集样后, 原位清洗残留药物和标记物, 拭干扩散室, 加入 0.1 ml 1,8-CN 使与皮肤样品接触, 12 h 后用纸吸干剩余促进剂, 重新按上述渗透条件操作 24 h 及测定, 即得 1,8-CN 预处理后 OE 的渗透系数。

1.2.4 OE 分配系数 (皮肤样品/水) 的测定

取溶胀皮肤样品剪成 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 小块, 称

重后置小玻管中或称重后在 1,8-CN 中浸泡 12 h 再转移至相同小玻管中, 分别加入 1 ml 已经稀释 5 倍的 OE 扩散液, 密闭振荡 24 h。将达分配平衡后的皮肤样品及 0.01 ml 药液分置闪烁计数瓶中, 各加入 0.5 mol/L 氢氧化季铵甲苯溶液 1 ml, 俟组织溶解后, 续加醋酸 0.1 ml, 闪烁液 5 ml, 混匀, 测定放射性, 用下式计算 OE 的分配系数 PC:

$$PC = \frac{\text{每 mg 组织的放射性计数 (cpm)}}{\text{每 mg 溶液的放射性计数 (cpm)}}$$

2 结果和讨论

2.1 溶剂提取后角质层结构的变化

已有文献报道采用透射电子显微镜技术研究有机溶剂提取角质细胞间隙类脂后角质层的细胞结构^[8,9]。本实验仅用扫描电子显微镜验证角质层去脂后组织的完整性以及用 FTIR 和 DSC 技术核实去脂有效性。SEM 检查未见有裂隙、孔洞形成, 表明角质细胞间隙类脂的提取不影响角质细胞之间的联结, 这符合角质细胞的相互联系依赖于其间的角质蛋白链锁结构而与镶嵌其中的类脂双分子层结构无关的理论^[10], 也与前述透射电镜研究结果相吻合。FTIR 透射图谱表明, 与类脂分子结构相关的 C=O 伸缩振动 (1743 cm^{-1}) 和 C-H 对称或不对称伸缩振动 (2919 和 2850 cm^{-1}) 在溶剂提取后分别完全消失和强度减弱, 但代表蛋白质分子结构的 C-N 伸缩振动和 N-H 弯曲振动 (1463 和 1407 cm^{-1}) 未发生变化。DSC 图谱亦指出, 在溶剂提取后, 角质层类脂的三个热转变峰 (39°C , 72°C 和 86°C) 完全消失, 而蛋白质变性的热转变峰没有改变。这些结果均证明溶剂有效地提取了角质层类脂而不损害角质层蛋白质结构。

2.2 角质层的屏障性质

OE 在皮肤样品中的各种渗透性参数列于表 1。

Tab 1. The permeability parameters of oestradiol through the various skin membranes at 32°C

Skin membranes	K , cm/h $\times 10^3$	n	PC	n	h ^a cm $\times 10^3$
Epidermis	4.38 \pm 0.66	3	14.40 \pm 3.28	3	0.8
Stripped epidermis	18.52 \pm 2.86	5	12.29 \pm 2.26	3	0.5
Stratum corneum	5.44 \pm 0.99	5	8.89 \pm 1.73	3	0.3
Delipidated stratum corneum	3.53 \pm 0.44	7	2.85 \pm 0.78	3	0.3

^a The thickness of fully hydrated tissue, and the date from ref^[11].

OE 在表皮和角质层有相近的渗透系数($P=0.10$), 从表皮剥去角质层以及角质层去脂后, 二者的 K 值出现方向相反的变化($P=0.10$)。因为表皮与活性表皮内 OE 的分配无显著性差异($P=0.10$), 而在角质层去脂后 OE 的分配显著减小($P=0.05$), 所以可以初步认为这种 K 值方向相反的改变, 前者是因为活性表皮自身的通透性大于角质层和表皮; 后者则是由于角质层类脂的损失导致

了 OE 在角质层中浓度梯度的下降。为了更直接地分析各皮肤层次的通透性, 可按下式计算出 OE 在各组织中的扩散系数 D , D 是仅与药物性质及组织通透性有关的参数。

$$D = \frac{K_p \cdot h}{PC}$$

计算结果列于表 2, 表中还列出了扩散阻力 r (扩散系数的倒数)和渗透阻力(渗透系数的倒数)。

Tab 2. The diffusion coefficients and tissue resistances of oestradiol in the skin membranes

Skin membranes	n	D cm ² $\times 10^6$	r(1/D) h/cm ² $\times 10^{-3}$	R(1/k _p) h/cm
Epidermis	3	2.43 \pm 0.37	428 \pm 58	238 \pm 32
Stripped epidermis	5	7.53 \pm 1.16	148 \pm 27	60 \pm 11
Stratum corneum	5	1.84 \pm 0.33	646 \pm 141	218 \pm 48
Delipidated stratum corneum	7	3.71 \pm 0.46	290 \pm 30	306 \pm 32

由表 2 可知, 表皮渗透阻力大致上是角质层和活性表皮二者渗透阻力的和, 但角质层明显占有更大比例。比较二者的扩散系数或扩散阻力则更清楚地表明, 角质层的通透性是 OE 经皮渗透的限速因素, OE 在其中的扩散速度仅为在活性表皮中 $1/4$ ($P=0.05$), 活性表皮的扩散阻力也仅为完整表皮扩散阻力的 $1/3$ 左右。曾有研究认为, 由于活性表皮的亲水性质, 亲脂性药物从角质层转运至该组织的过程可能成为该类药物经皮渗透的限速因素^[12]。但根据本实验结果, OE 在活性表皮和角质层中有近似的分配系数(参见表 1)以及 OE 在活性表皮中有大得多的扩散速度; 同时根据活性表皮细胞膜不同于角质细胞膜而是类脂双分子层结构的特征^[10], 可以认为, 活性表皮以及上述转运过程不大可能成为 OE 经皮渗透的限速因素。

2.3 类脂在构成角质层通透性质中的作用

角质层去脂后 OE 的扩散系数明显增加($P=0.05$)(表 2), 说明类脂的存在是角质层屏障性质的因素之一。但检查去脂角质层的扩散阻力, 相对于活性表皮仍显示很高的屏障性质, 该阻力仍占去脂角质层阻力的 50% 左右。很显然, 这部分阻力系来自类脂以外的角质细胞膜结构。换言之, 角质细胞膜和角质细胞间隙类脂在形成角质层屏障性质时至少具有相同的重要性, 类脂不是角质层扩散阻力产生的唯一因素。另一方面, 可以注意到, 虽然 OE 在去脂角质层中的扩散系数增加了近一倍(表 2), 但总的渗透速度却有所下降。这种现象的出现显然是由于角质层去脂后 OE 在其中分配的显著减小抵消了扩散系数增加的影响。由此可知, 角质层类脂对 OE 的渗透并不完全是产生屏障作用, 同时也对此

类亲脂性药物产生明显的增溶作用并因此提高渗透速度,这也可能是类脂对5-氟脲嘧啶等亲水性药物产生较大屏障作用的原因之一。所以,对于亲脂性药物而言,在角质层中的分配性质与其扩散性质具有同等的重要性,其渗透速度受其分配因素和扩散因素共同支配。虽然本实验结果不能直接证明角质细胞间隙是OE转运的途径,但根据类脂大量富集在细胞间隙的结构特点以及OE的分配性质,亦可了解该途径对OE转运的重要性。

2.4 存在促进剂时角质层及其类脂对OE渗透的作用

用1,8-CN对皮肤样品预处理12 h后,

Tab 3. The permeability parameters of oestradiol through the various skin membranes at 32°C after treatment with 1,8-cineole for 12 h

Skin membranes	K_p cm/h $\times 10^3$	n	P_C	n	h^a cm $\times 10^3$
Epidermis	18.54 \pm 3.51	3	28.05 \pm 3.72	3	0.8p
Stripped epidermis	59.67 \pm 6.77	5	24.74 \pm 3.23	3	0.5
Stratum corneum	21.07 \pm 4.74	5	24.00 \pm 2.83	3	0.3
Delipid stratum corneum	28.97 \pm 5.77	6	23.38 \pm 0.88	3	0.3

^a The thickness of fully hydrated tissue and the date from ref^[11].

利用表3数据如前计算出1,8-CN预处理后OE的扩散系数、扩散阻力和渗透阻力,见表4。表中除去脂角质层的扩散系数和相应扩散阻力维持基本不变($P=0.10$),其它各层皮肤样品的扩散性均有一定改善,这种变化表明1,8-CN对皮肤通透性的影响可能依赖于皮肤中类脂的存在,对缺乏类脂的去脂角质层不发生分配以外的改变,从而造成去脂角质层扩散阻力相对升高(占角质层扩散阻力的70%)。这一结果符合许多促进剂均通过改变角质细胞间隙类脂双分子层结构

OE的渗透性有不同程度的提高(见表3),OE在皮肤各层间的分配系数则趋向一致,较预处理前均有显著提高($P=0.05$)。这是由于1,8-CN可能以相近比例的饱和度滞留在各皮肤层中,而1,8-CN对OE有比水强得多的溶解能力(8.02 mg/ml),所以,只要有少许1,8-CN存在就能很大程度地提高OE的分配。这一现象也从另一方面说明,在皮肤中的亲脂性物质如类脂的存在有利于亲脂性药物的渗透。但也很明显,鉴于去脂角质层中OE的分配系数也大幅度增加,可见1,8-CN对皮肤分配性质的影响与角质层类脂存在与否无关。

发生促渗作用的假设^[13]。比较预处理前后OE在角质层的渗透曲线(图1)亦可发现,1,8-CN对角质层的促渗性质的影响并非永久性的改变,在到达伪稳态后,OE的渗透性随集样时间延长逐渐下降直到恢复与预处理前伪稳态曲线平行,这也表明1,8-CN的作用可能是一种可逆的物理结构的变化或者是一种物理吸附。用1,8-CN浸泡30 s的角质层的DSC图谱亦表明类脂热转变峰的前移以及洗净1,8-CN后热转变峰恢复到原温度,均证实类脂与促进剂间存在可逆的物理相互作用。

Tab 4. The diffusion coefficients and tissue resistances of oestradiol in various skin membranes at 32°C after treatment with 1,8-cineole for 12 h

Skin membranes	n	D cm ² /h $\times 10^6$	$r(1/D)$ h/cm ² $\times 10^{-3}$	$R(1/K_p)$ h/cm
Epidermis	3	5.29 \pm 1.00	202 \pm 34	58 \pm 10
Stripped epidermis	5	12.06 \pm 1.37	87 \pm 9	18 \pm 2
Stratum corneum	5	2.63 \pm 0.59	478 \pm 118	46 \pm 9
Delipid stratum corneum	6	3.72 \pm 0.74	341 \pm 75	438 \pm 96

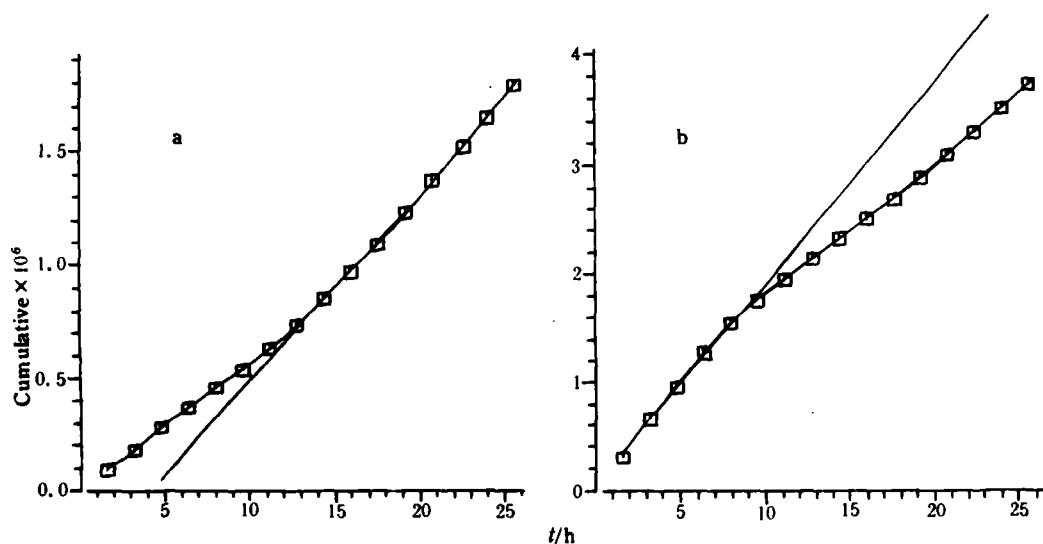


Fig 1. The cumulative curve of OE penetration through human epidermis before (a) and after (b) treatment with 1,8-cineole for 12h

从表4数据分析可以看出,活性表皮在表皮扩散阻力中所占分数仍维持在40%左右,角质层渗透阻力仍占表皮渗透阻力的更大比例等,故仍可推论,角质层是OE经皮渗透的主要限速屏障,而且,促进剂1,8-CN的使用不能逆转这一基本性质,只能相对减小其阻力,OE渗透性的增加,依然是扩散因素及分配因素控制的结果。

参考文献

- 1 Scheuplein RJ. Mechanism of percutaneous absorption I. Routes of penetration and the influence of solubility. *J Invest Derm*, 1965; **45**:334
- 2 Blank IH, Moloney JJ, Emslie AG. The Diffusion of water across the stratum corneum as a function of its water content. *J Invest Derm*, 1984; **82**:188
- 3 Williams ML and Elias PM. The extracellular matrix of stratum corneum; Role of lipids in normal and pathological function. *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1987; **8**:95
- 4 Bodde HE, VandenBrink L, Koerten HK, et al. Visualiza-
- tion of *in vitro* percutaneous penetration of mercuric chloride; transport through intercellular space versus cellular uptake through dermosomes. *J Contr Rel*, 1991; **15**:227
- 5 Ward AJ and Reau C. The essential role of lipids bilayers in the determination of stratum corneum permeability. *Int J Pharm*, 1991; **74**:137
- 6 Friberg SE and Kayali I. Water evaporation rates from a model stratum corneum lipids. *J Pharm Sci*, 1989; **78**:639
- 7 平其能,孙国庆,刘国杰.角质层及其类脂对5-氟脲嘧啶经皮渗透的作用.药学学报. (待发表)
- 8 Wertz PW, Swartzendruber DC, Kitko DJ, et al. The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum. *J Invest Derm*, 1989; **93**:169
- 9 Imokawa G, Kuno H and Kawai M. Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator. *J Invest Derm*, 1991; **96**:845
- 10 Kydoniess AF and Berner B. *Transdermal Delivery of Drug*. vol 1. Inc New York, CRC press, 1987; 35-7
- 11 Marks R. Measurement of biological ageing in human epidermis. *Br J Dermatol*, 1981; **104**:627
- 12 梁秉文主编.经皮给药制剂.第一版.北京:中国医药科技出版社,1992;35
- 13 Barry BW. Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *J Contr Rel*, 1991; **15**:237

Essential Effect of Stratum Corneum and Its Lipids on Permeability of Oestradiol through Human Skin

Ping Qineng, Sun Guoqing, Liu Guojie

Department of Pharmaceutics

The effect of stratum corneum (SC) and its lipids in human skin permeation was assessed *in vitro* in a diffusion system, combined with the determination of partition coefficients. OE and 1,8-CN were used as the model lipophilic drug and penetration enhancer respectively. The results showed SC constituted the main barrier of OE penetrating through skin, its permeability was controlled by both the tissue resistance and partitioning behaviour of OE in SC. However, OE transporting process between SC and living epidermis did not be found to be the rate-limited factor. Both lipids and cells were responsible for the formation of SC barrier characteristics, but SC lipids may also play a role in solubilization of lipophilic drug in SC, and reversely interact with penetration enhancer, so as to become the possible route and contribute towards the improvement of OE penetration.

Key words Stratum corneum (SC); Lipids; Oestradiol (OE); Diffusion coefficients; Partition coefficients; 1,8-Cineole (1,8-CN)

【文摘 001】昆明山海棠化学成分研究 张亮, 张正行, 盛龙生, 安登魁, 吕扬, 郑启泰, 王树春. 药学学报, 1993, 28(1): 32-4

从昆明山海棠 [*Tripterygium hypoleucum* (Levl.) Hutch] 根的氯仿提取物中分得三个单体, 经光谱分析鉴定晶 1 为已知物雷藤二萜酸 (triptoditerpenic acid), 晶 2 和晶 3 为新二萜化合物, 分别命名为雷藤二萜酸 B (triptoditerpenic acid B) 和山海棠二萜内酯 A (hypodiolide A)。

【文摘 002】薄层色谱选择性优化新方法及其在药物分析中的应用 胡育筑, 何华, 赖宇红, 倪坤仪. 药学学报, 1993, 28(1): 50-6

提出一套合理的溶剂选择性优化方法及优化指标——逐步登高法和 NRC 优化指标。适用于建立薄层色谱溶剂系统时通过实验迅速确定展开剂的最佳配比。并成功地应用于丹参注射液、人工牛黄和头孢

噻吩钠的薄层色谱展开系统的优化。

【文摘 003】当归对变态反应性炎症的影响 胡娟, 李佩珍, 杭秉茜. 中药材, 1993, 16(1): 39-40

当归水煎剂 (含生药 1 g/ml), 8 g/kg 灌胃对豚鼠 Forssman 皮肤血管炎及大鼠反向皮肤过敏反应具有显著的抑制作用, 且能明显抑制大鼠被动 Arthus 反应。提示当归对 I、II 型变态反应性炎症有抑制作用。

【文摘 004】二十种贝母药材的蛋白质电泳鉴别 刘惠娟, 李萍, 徐珞珊, 徐国钧. 中药材, 1992, 15(11): 23-5

应用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法对 20 种贝母药材样品的蛋白质进行了对比分析研究。结果表明各种贝母的蛋白质电泳图谱存在明显差异, 同种植物栽培品与野生品之间存在差异。结果可作为鉴别贝母类药材的依据之一。