

文章编号: 0253-2239(2007)03-0526-5

噻酮对离体乳猪皮肤光透明效果影响的实验研究^{*}

毛宗珍^{1,2} 胡亚婷¹ 郑英¹ 陆为¹ 骆清铭¹ 朱 1* *

(¹ 华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉光电国家实验室(筹), 武汉 430074)
(² 武汉体育学院健康科学学院, 武汉 430079)

摘要: 研究一种新型促渗剂——噻酮对皮肤组织光透明效果的影响。分别用单纯聚乙二醇 400(PEG400)溶液以及 PEG400 与噻酮的混合溶液作用于含角质层及去角质层的离体乳猪皮肤, 利用积分球系统动态检测样品对 632.8 nm 光的透射率变化, 并对样品拍照获得直观图。结果表明: 混合溶液作用于两种皮肤模型后, 其光透明性均有不同程度的增加, 即衰减系数降低; 比较去角质层皮肤与含角质层皮肤的衰减系数的变化, 前者比后者大 19 倍; 单纯的 PEG400 仅对去角质层皮肤有一定的光透明效果, 并且所导致的皮肤衰减系数的降低仅为混合液作用后的 2/3。因此, 噻酮作为良好的促渗剂能与 PEG400 产生协同效应, 有效提高皮肤光透明效果。

关键词: 医用光学与生物技术; 组织光学; 光增透剂; 噻酮; 乳猪皮肤; 衰减系数

中图分类号: R318.51 文献标识码: A

Experimental Study on influence of Thiazone on Optical Clearing of Piglet Skin in Vitro

Mao Zongzhen^{1,2} Hu Yating¹ Zheng Ying¹ Lu Wei¹ Luo Qingming¹ Zhu Dan¹

(¹ Key Laboratory of Biomedical Photonics, Ministry of Education, National Laboratory for Optoelectronics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)
(² Institute of Health Sciences, Wuhan Institute of Physical Education, Wuhan 430079)

Abstract: Thiazone, a kind of new enhancer, is introduced to investigate the effect of optical clearing on skin tissue. The samples including skin with or without stratum corneum (SC), are treated with pure polyethyleneglycol 400 and mixed solution (thiazone in combination with polyethyleneglycol 400) respectively. The transmittance of light with wavelength 632.8 nm is measured dynamically by using an integrating sphere system, and then photos of the samples are taken by CCD. Experimental results show that mixed solutions have optical clearing effect on both kinds of skin. The change in attenuation coefficient of skins without SC is 19 times of that with SC. Single PEG400 can only do some effect on the sample without SC, and the change in attenuation coefficient of samples is just 2/3 of that treated by mixed solution. It is illustrated that thiazone can increase the effect of optical clearing on skin, because it is an efficient enhancer and has synergistic effects with PEG400.

Key words: medical optics and biotechnology; tissue optics; optical clearing agent; thiazone; piglet skin; attenuation coefficient

1 引 言

近红外光学技术因其能够用于生物组织结构与功能的实时、无损检测而受到光学界和生物医学界的关注^[1,2]。但生物组织的高散射特性限制了光在组织的穿透深度, 严重影响着该技术在临床中的应用。基于 V. V. Tuchin^[2] 提出的组织光学特性参

量的控制而发展起来的光透明技术为本领域的发展带来了新的活力, 并成为人们关注的热点之一^[2~5]。它通过向生物组织内引入高折射率的生物相容性的化学试剂, 即光增透剂 (Optical clearing agent, OCA), 使组织内的有形成分和无形成分间折射率匹配, 以此来降低生物组织的光散射, 提高光在组织

* 国家自然科学基金(60410131, 30500115)资助课题。

作者简介: 毛宗珍 (1973—), 女, 湖北麻城人, 博士研究生, 主要从事生物组织光学特性控制方面的研究。

* * 通信联系人。E-mail: dawnzhu@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2006-10-18; 收到修改稿日期: 2006-11-23

中的穿透深度^[2~7]。

近年来,人们利用不同光增透剂对不同组织开展了广泛的研究,尤其是位于体表的皮肤组织。目前,用于皮肤光透明作用研究的光增透剂主要有甘油、葡萄糖、二甲基亚砷(DMSO)等^[5~7]。由于一般的光增透剂难以通过角质层,将物理、化学方法相结合的手段也被用于提高光透明效果,如利用混合溶液产生的协同效应、添加促渗剂、通过皮肤表面物理打孔以及电泳等^[8~11]。但这些对皮肤不同层次结构的作用及机理并不特别清楚;有些促渗剂甚至对人体存在一定的毒副作用(如 DMSO);而物理打孔方法操作复杂,实现起来较为繁琐。另外,位于皮肤表面的角质层是一道天然屏障,使得药物难以通过,皮肤组织的光透明效果始终不尽人意。

为此,选用一种新型促渗剂——噻酮,并与光增透剂聚乙二醇 PEG400 结合,以含角质层及去角质层的离体乳猪皮肤为研究对象,对不同试剂作用后光透明效果的变化进行了动态监测,以探讨光增透剂、促渗剂对不同结构皮肤光透明作用的影响。

2 材料与方法

2.1 皮肤与试剂的制备

所有皮肤样品均取自刚断奶的纯种乳猪,与人体皮肤层次结构和渗透性最接近,是最理想的皮肤模型^[12]。

乳猪放血处死后,用眼科手术剪紧贴毛根剪除两侧腹背部毛,剥取皮肤,置于低温冰箱(-80℃)保存,并于两周内实验。

实验前解冻皮肤,小心剔除皮下组织和脂肪,得到含角质层的皮肤;将强力胶完全粘附于去毛动物皮肤表面后揭下,如此重复 50 次左右,至皮肤表面光洁,剔除皮下组织和脂肪,即得到去角质层皮肤^[12]。将皮肤剪成 5 cm×5 cm 的方块[厚度(0.90±0.10) mm]。每组实验 7~9 个样品,结果取平均值。

PEG400 试剂由天津市科密欧化学试剂开发公司提供,分析纯,折射率 1.47,约等于皮肤中胶原纤维的折射率。PEG400 能与噻酮相溶,是一种双亲性试剂,有利于透过表皮到达真皮层(皮肤的表皮角质层脂质膜状物为亲脂性,而活性表皮是水溶性组织)。

噻酮由广州市和明贸易有限公司提供。是一种新型高效无毒促渗剂,能破坏角质层的结构,增加皮肤通透性^[13]。噻酮室温下为白色晶体,熔点为 40℃,折射率约 1.47,加热后可溶于 PEG400。在实验中,

噻酮与 PEG400 以 1:10 体积比配成混合液。

NaCl 分析纯,分子量 58.44,由武汉天运盐化产品开发有限公司生产,配成生理盐水。

2.2 实验系统与测量方法

2.2.1 实验系统

自制的水平扩散池(如图 1 所示),由两个 5 cm×5 cm×0.5 cm 的比色皿组成,各在一侧的光通面挖去直径 3 cm 的圆形区域。皮肤样品夹在两圆孔之间,可以与试剂充分作用。给药池每次可以定量给试剂 12 ml,而且便于清洗。

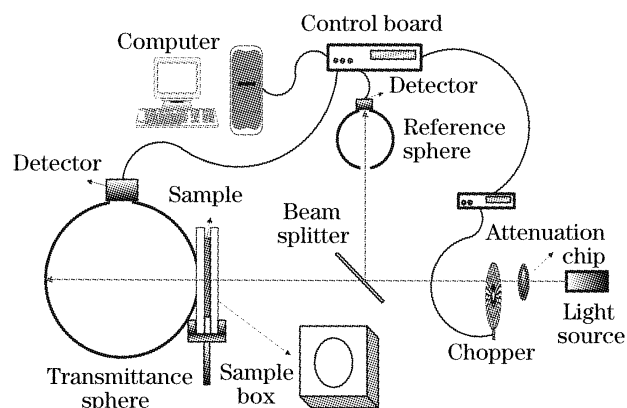


图 1 实验系统图(sample box 显示水平扩散池中的给药池)

Fig. 1 Experimental setup (the sample box shows the donor cell of the horizontal diffusion chambers)

样品的透射光强通过积分球系统检测。He-Ne 激光(波长 632.8 nm,输出功率 1.6 mW,光斑直径为 1 mm)经斩波器后,被分束镜分成两束,其中一束被参考球上的探测器所接收,另一束穿过样品后被透射球上的探测器所接收。两球上的探测器将光信号转换为电信号,依次送入光电处理电路,最后为计算机所采集^[14]。系统中参考球主要用于消除光功率波动对测量所造成的影响^[15]。实验中所测量的透过样品的光强均为透射球与参考球测量值之比。

2.2.2 测量方法

皮肤样品夹在两水平池圆孔中间,橡皮筋固定,真皮侧贴近积分球上直径 2.5 cm 的样品口。在真皮侧池内加入 12 ml 生理盐水,然后在表皮侧池内加入 12 ml 试剂(单纯 PEG400、PEG400 与噻酮混合液、生理盐水对照),以此来模拟生理环境。利用积分球系统监测各试剂作用于皮肤样品后不同时刻(0、1 min、2 min、3 min、4 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、40 min、50 min、60 min)的透射光强。

在实验检测完毕后,将皮肤覆盖在特定的背景上拍照,获得直观图。

3 结果与分析

3.1 两种皮肤光学特性参量改变

由于组织样品的厚度较薄,激光光斑直径也比较小,当光照射样品时透射光可被样品口径为 2.5 cm 的积分球所接收。此时,样品的透射光强可根据修正的比尔-朗伯(Beer-Lambt)定律描述光的衰减:

$$I_d = I_0 \exp(-\mu_t d), \quad (1)$$

式中 I_0 为入射光强, I_d 为穿过厚度为 d 的样品的透射光强。则样品的透射率为:

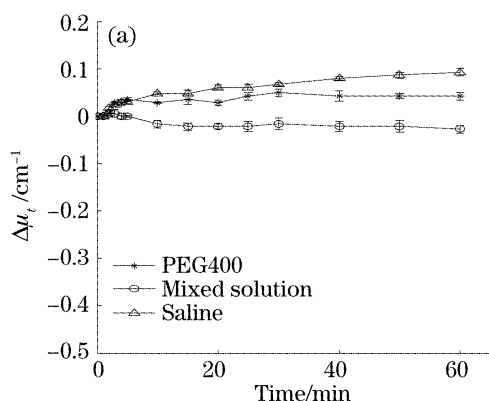
$$T_d = \frac{I_d}{I_0} = \exp(-\mu_t d), \quad (2)$$

式中 $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ 为总的衰减系数,我们可以推算出衰减系数的表达式:

$$\mu_t = -\frac{1}{d} \ln T_d, \quad (3)$$

在实验中,各种试剂对样品厚度的影响非常小,可以认为样品厚度不变。但样品的透过率会受到不同程度的影响,此时,样品的衰减系数的变化可用下式来表示:

$$\begin{aligned} \Delta\mu_t &= \mu_t|_t - \mu_t|_{t=0} = \\ &= -\left(\frac{1}{d} \ln T_d|_t - \frac{1}{d} \ln T_d|_{t=0}\right) = \\ &= -\frac{1}{d} \ln \frac{T_d|_t}{T_d|_{t=0}}, \end{aligned} \quad (4)$$



当入射光强不变时,我们可以用不同时刻透射光强来反映衰减系数的变化:

$$\begin{aligned} \Delta\mu_t &= \mu_t|_t - \mu_t|_{t=0} = \\ &= -\left(\frac{1}{d} \ln I_d|_t - \frac{1}{d} \ln I_d|_{t=0}\right) = \\ &= -\frac{1}{d} \ln \frac{I_d|_t}{I_d|_{t=0}}, \end{aligned} \quad (5)$$

式中 $|_t$ 与 $|_{t=0}$ 分别对应于 t 时刻与初始时刻的值。结合(4)式改为结合(5)式。

图 2 显示三组试剂(单纯 PEG400、混合溶液及生理盐水)分别作用于含角质层及去角质层乳猪皮肤后 0、1 min、2 min、3 min、4 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、40 min、50 min、60 min 各时间点衰减系数变化值。从图中看出,不同光增透剂作用后,含角质层皮肤衰减系数变化幅度小,并且随时间延长逐渐稳定;而去角质层皮肤变化显著,60 min 内一直呈下降趋势。另外,混合溶液作用后,皮肤衰减系数减小最明显。

结合(5)式和图 2(a),对于含角质层皮肤,生理盐水对照组 60 min 内透射光强缓慢减弱,衰减系数亦随之逐渐增大;PEG400 作用后,衰减系数变化趋势与对照组相似,但变化幅度较小,40 分钟时是对照组的 0.5 倍,此后逐渐趋于稳定;只有混合溶液使透过皮肤的透射光强增加,衰减系数减小,且 15 min 后基本稳定。

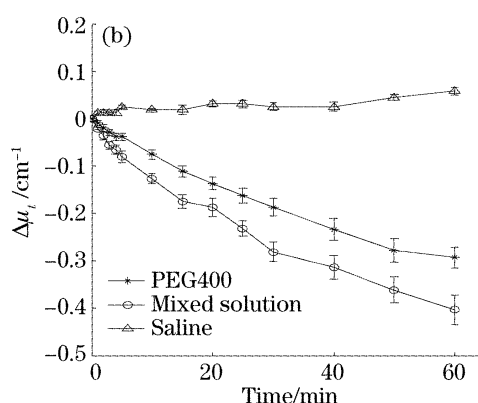


图 2 三种试剂作用于含角质层(a)和去角质层(b)乳猪皮肤后衰减系数变化

Fig. 2 Changes in attenuation coefficient of piglet skin with SC (a) and without SC (b) treated by three different agents

图 2(b)显示去角质层皮肤衰减系数的变化,生理盐水对照组逐渐增大;结合(4)式看出,两种光增透剂均使透过皮肤的透射光强增加,相应衰减系数减小,其中混合溶液变化更加显著,60 min 时单纯 PEG400 作用后衰减系数变化幅度只有混合溶液的 2/3。

比较图 2(a)、图 2(b),混合溶液的作用能使含角质层与去角质层皮肤对光的衰减系数降低,相比之下,对去角质层皮肤的光学透明效果更好,60 min

后其衰减系数的改变约为含角质层皮肤的 19 倍。

3.2 乳猪皮肤光学透明效果的直观改变

为进一步评价不同试剂对不同皮肤的光透明效果,在以上测量完毕后对皮肤样品进行拍照。图 3 是不同试剂作用于两种类型的皮肤 1 小时后的典型结果,其中图 3(a)是作为参照的背景图片;图 3(b)~图 3(d)是含角质层的完整乳猪皮,图 3(e)~图 3(g)为去角质层的乳猪皮;图 3(b)、图 3(e)是生理盐水作用皮肤,图 3(c)、图 3(f)是 PEG400 作用皮肤,

图 3(d)、图 3(g)是混合溶液作用皮肤。

图 3 非常直观地显示各组溶液作用后皮肤光学特性变化。横向看,光增透剂作用后,去角质皮肤更加透明。纵向看,三组实验中,生理盐水组皮肤最混浊,难以辨别背景图片;PEG400 作用后,含角质皮

肤透明度仍然很差,去角质皮肤较透明,能辨认部分字母;混合溶液组皮肤透明度最好,去角质皮肤是最清晰的一张图片,透过它可以清晰识别背景字母。这一结果与皮肤光学特性参量——衰减系数的变化是一致的。

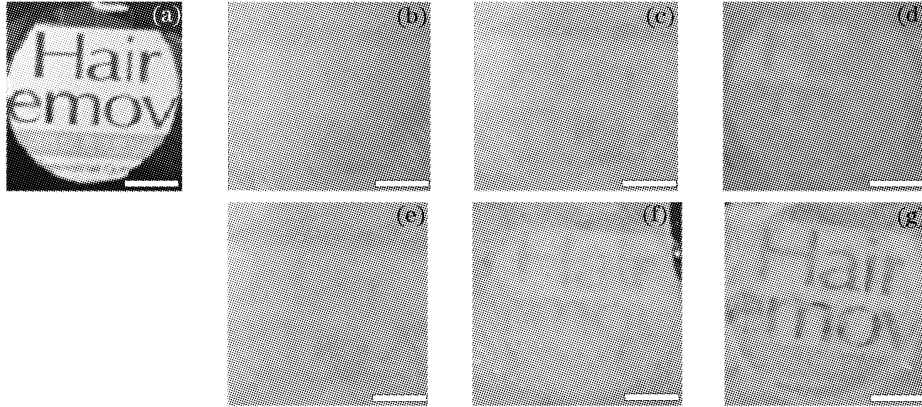


图 3 三种试剂作用于乳猪皮肤后 60 min 照片 (标尺=1 cm)

Fig. 3 Photos of piglet skin samples taken after 60 min treatment by different agents (scale bar=1 cm)

4 讨 论

生物组织的形态和结构都相当复杂,组织的高散射特性是影响光穿透深度的重要因素,而导致组织高散射的最主要因素是组织和细胞内部各种不同成分的折射率不匹配:有形成分折射率高,而无形成分折射率低。主要表现为细胞和细胞间液、细胞器(线粒体等有形结构)与细胞质基质间折射率不匹配^[2~5,15]。光增透剂扩散到组织内,因为物质交换引起组织脱水和(或)缩水^[16~18],从而使组织的有形成分和无形成分间折射率匹配,光散射减小,衰减亦减小,所以组织变得透明,同时光穿透的深度在增加。

皮肤由表皮、真皮和皮下组织构成。覆盖在最外面的角质层由几层到几十层死亡的扁平角质细胞组成,相邻细胞边缘相互重叠,成为人体最好的天然屏障,也是限制光增透剂进入深层组织的主要障碍^[12]。

含角质层的完整皮肤通透性小,单纯 PEG400 作用后,仅有少许试剂通过角质层,产生的效应不足以改变组织的光学特性;同时,实验中真皮侧与折射率低的生理盐水相互作用,它们之间的物质交换使得组织散射增加,所以皮肤的透射光强反而下降,衰减系数增大。混合溶液中噻酮能破坏角质层的结构,增加皮肤通透性^[13],使较多光增透剂进入组织并产生效应,所以光衰减减少,透射增加。但衰减系数的变化幅度很小,可能是噻酮只能部分或局部破

坏角质层的空间结构,能通过表皮到达真皮的试剂剂量仍然有限,产生的光透明作用较弱。

去角质皮肤通透性大,两组光增透剂均能到达真皮层产生良好的透明效果,混合溶液的效果更明显,可能是不同试剂间存在协同效应^[9,12,18]。

5 结 论

研究表明,由于角质层的屏障作用,单纯 PEG400 溶液不能很好通过,含角质乳猪皮肤不透明;混合溶液中,噻酮作为促渗剂可以提高皮肤的通透性,使一定剂量的光增透剂与组织相互作用,产生光透明效果。去角质皮肤的通透性有较大程度的改善,单纯 PEG400 溶液和混合溶液均有良好的透明效果;混合溶液作用更显著,可能是噻酮和 PEG400 间存在协同作用。本实验对生物组织光透明技术的研究有着重要的参考价值。

由于促渗剂发挥最佳效应依赖于所用试剂及适宜的比例^[13]。因此,噻酮与 PEG400 之间协同效果的最合适比例还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Luo Qingming. Advances of optoelectronics in biology and medicine[J]. *Optics & Optoelectronic Technology*, 2003, 1(1): 7~14 (in Chinese)
骆清铭. 光电技术在生物医学中的应用-现状与发展[J]. *光学与光电技术*, 2003, 1(1): 7~14
- 2 Valery V. Tuchin, Irina L. Maksimova, Dmitry A. Zimnyakov et al.. Light propagation in tissues with controlled optical properties[J]. *J. Biomed. Opt.*, 1997, 2(4): 401~417

- 3 Xu Xiangqun, Wu Liu. Influence of permeation characteristics of hyperosmotic agents on optical clearing of gastric tissue studied with near-infrared spectroscopy[J]. *Chinese J. Lasers*, 2005, **32**(5): 717~722 (in Chinese)
徐向群, 吴 柳. 近红外反射光谱研究光透明剂渗透特性对胃组织光学透明的影响[J]. *中国激光*, 2005, **32**(5): 717~722
- 4 V. V. Tuchin. Optical Immersion as a new tool for controlling the optical properties of tissues and blood[J]. *Laser Physics*, 2005, **8**(15): 1109~1136
- 5 Valery V. Tuchin. Optical clearing of tissues and blood using the immersion method[J]. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2005, **38**: 2497~2518
- 6 Chen Jian, Zhu Dan, Luo Qingming *et al.*. Monitoring osmotic agents induced the change in optical properties of mouse skin[J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(7): 873~876 (in Chinese)
岑 建, 朱 丹, 骆清铭 等. 渗透剂对小鼠皮肤光学特性影响的实时动态监测[J]. *光学学报*, 2004, **24**(7): 873~876
- 7 Gracie Vargas, Kin. F. Chan, Sharon L. Thomsen *et al.*. Use of osmotically active agents to alter optical properties of tissue; effects on the detected fluorescence signal measured through skin [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2001, **29**(3): 213~220
- 8 Misbah H. Khan, Bernard Choi, Samuel Chess *et al.*. Optical clearing of in vivo human skin; implications for light-based diagnostic imaging and therapeutics[J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2004, **34**(2): 83~85
- 9 Jingying Jiang, Ruikang Wang. Comparing the synergistic effects of oleic acid and dimethyl sulfoxide as vehicles for optical clearing of skin tissue in vitro[J]. *Phys. Med. Biol.*, 2004, **49**(23): 5283~5294
- 10 A. A. Gavrilova, D. Tabatadze, J. Childs *et al.*. Preliminary investigations in vitro optical clearing of rat skin using island damage method for accelerated delivery of index-matching agents [C]. *Proc. SPIE*, 2005, **5771**: 344~348
- 11 Svetlana P. Chemova, Natalya V. Kuznetsova, Alexander B. Pravdin *et al.* On the dynamics of optical clearing of human skin in vivo[C]. *Proc. SPIE*, 2000, **4162**: 227~235
- 12 Zheng Junmin. *New Transdermal Deliver Preparations* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997 (in Chinese)
郑俊民. *经皮给药新剂型* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997
- 13 Xiong Lizeng. A new skin penetration promoter; Thiazone[J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2004, **12**(21): 9~11 (in Chinese)
熊丽曾. 新型促渗剂噻酮[J]. *精细与专用化学品*, 2004, **12**(21): 9~11
- 14 Zhu Dan, Luo Q ingming, Zeng Shaoqun *et al.*. Changes in the optical properties of slowly heated human whole blood and albumen[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2003, **22**(3): 369~373
朱 丹, 骆清铭, 曾绍群 等. 热作用下蛋白及全血光学特性变化的实验研究[J]. *光学学报*, 2003, **22**(3): 369~373
- 15 Zhu Dan, Luo Q ingming, Zeng Shaoqun *et al.*. Modified double-integrating sphere system formeasuring the optical properties of tissue[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2001, **30**(10): 1175~1181 (in Chinese)
朱 丹, 骆清铭, 曾绍群 等. 用于组织光学特性参量测量的改进型双积分球系统[J]. *光子学报*, 2001, **30**(10): 1175~1181
- 16 Valery V. Tuchin, Alexy N. Bashkatov, Elina A. Genina *et al.*. Optics of living tissues with controlled scattering properties[C]. *Proc. SPIE*, 1999, **3863**: 10~21
- 17 Yonghong He, Ruikang K. Wang. Dynamic optical clearing effect of tissue impregnated with hyperosmotic agents and studied with optical coherence tomography[J]. *J. Biomedical Optics*, 2004, **9**(1): 200~206
- 18 Xiangqun Xu, Ruikang Wang. Synergistic effect of hyperosmotic agents of dimethyl sulfoxide and glycerol on optical clearing of gastric tissue studied with near infrared spectroscopy[J]. *Phys. Med. Biol.*, 2004, **49**(3): 457~468