

# 噻酮提高在体大鼠皮肤光透明效果的实验研究

毛宗珍 韩珍珍 朱 芹\*

(华中科技大学武汉光电国家实验室(筹)Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 湖北 武汉 430074)

**摘要** 为探讨在体皮肤实验中最为简便有效的给药方式,将化学渗透促进剂噻酮与聚乙二醇 400(PEG400)的混合溶液直接作用于去除部分角质和含角质的在体大鼠皮肤,利用 CCD 拍照进行直观观察,并通过反射光谱的变化来反映皮肤光透明效果,同时与单纯 PEG400 作用进行了对比。结果表明:混合溶液可以使去除部分角质皮肤在 15 min 内反射光谱明显下降,并产生显著的光透明效果,30 min 后皮肤更加透明;而单纯 PEG400 以及未去除角质层的完整皮肤均无光透明效果。因此,结合物理方法去除部分角质层、并添加促渗剂噻酮,能以非侵入方式,快速、有效提高 PEG400 对在体皮肤的光透明效果。

**关键词** 医用光学;光透明效果;生物组织光透明技术;噻酮;在体皮肤

中图分类号 R318.51 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS20092907.1921

## Experimental Study on *in vivo* Rat Skin Optical Clearing at the Action of Thiazone

Mao Zongzhen Han Zhenzhen Zhu Dan

(Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

**Abstract** In quest of the most simple and effective treatment for *in vivo* skin experiments, thiazone was used as an enhancer in our study. To compare with the pure polyethyleneglycol 400 (PEG400) solution, the mixed solution (thiazone in combination with) was applied on the stratum corneum partly removed skin and intact skin respectively. For visual observation, photographs of the local skins were taken by CCD; and then the light reflectance spectra of skin were monitored. The results showed that a mixed solution could make the skin without stratum corneum more transparent in 15 min, with the reflectance spectrum decreased significantly; while there's no observable change in the intact skins. However, the pure PEG400 did not have optical clearing effects on any skins. In conclusion, the non-invasive drug delivery method, which is combined with physically abrading part of the stratum corneum and adding chemical enhancer-thiazone, can improve the effect of PEG400 in skin optical clearing quickly and effectively.

**Key words** medical optics; optical clearing; tissue optical clearing technique; thiazone; *in vivo* skin

## 1 引言

生物组织光透明技术能增加光在组织中的穿透深度<sup>[1~4]</sup>,给光子医学诊断与治疗技术在临床中的应用提供了新契机<sup>[5,6]</sup>。

皮肤天然的屏障作用限制了光透明剂进入组织内部的速度和剂量,因此,有关皮肤组织的光透明研究主要集中在离体水平,即通过浸泡的方式来获得好的光透明效果<sup>[7~10]</sup>。在体皮肤的光透明方法多直接采用皮内注射实现<sup>[11,12]</sup>,但在体皮内注射给药

技术要求较高、对机体有创伤,不便广泛开展。为此,许多学者尝试通过多种物理和化学手段辅助给药,如:砂纸打磨去除角质层<sup>[13]</sup>、皮肤表面物理打孔增加通透性等<sup>[14]</sup>。但这些方法操作力度难以量化,容易导致活性皮肤受损,而且实验可重复性较差,使得在体皮肤光透明效果始终不尽人意。

噻酮作为一种新型、高效、无毒的渗透促进剂,以其良好的性能引起重视,在医药、化妆品及纺织等诸多行业均具有广泛的应用前景<sup>[15]</sup>。作者前期已通过

收稿日期: 2008-10-26; 收到修改稿日期: 2008-11-15

基金项目: 国家自然科学基金(30770552, 30770552, 30911120074)资助项目。

作者简介: 毛宗珍(1973-),女,博士,主要从事生物组织光学特性控制方面的研究。E-mail: mm73@163.com

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

离体实验证实:噻酮结合 PEG400 直接作用于皮肤表面能取得良好的光透明效果<sup>[16]</sup>。但由于受机体内环境动态平衡的影响,在体与离体皮肤对药物的吸收代谢途径存在很大差距:活体细胞间隙含有大量循环不息的组织液,能不断稀释进入组织内的光透明剂;真皮内还含有丰富的毛细血管,当光透明剂到达真皮层后可以迅速通过血液转移,局部能发挥作用的剂量便微不足道,从而增加了在体实验的难度。

在本文的研究中,我们将进一步通过在体实验,探讨利用噻酮结合 PEG400 表面涂抹给药提高在体皮肤光透明效果的可行性。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 动物模型的制备

实验对象为雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠,体重 140 g~150 g,常温下标准啮齿动物饲料喂养,自由进水。采用腹腔麻醉(2%水合氯醛和 10%乌拉坦混合,0.7 ml/100 g 体重,必要时再适当补充少许剂量)。用外科剪剪掉脊背部毛发,再用脱毛膏仔仔细除掉剩余的绒毛,将皮肤清理干净并擦干。

#### 2.1.2 试剂的选择

PEG400:分析纯,由天津科密欧化学试剂开发中心提供。PEG400 为高折射率试剂( $n=1.47$ ),与皮肤中胶原纤维的折射率接近。而且试剂为双亲性,有利于透过皮肤。

噻酮与 PEG400 的混合溶液:噻酮由广州市和明贸易有限公司提供。它是一种新型的化学渗透促进剂,能破坏皮肤角质层的结构,增加皮肤的通透性。室温下为白色晶体,熔点 40 °C,折射率约 1.47。实验前将噻酮水浴加热后与 PEG400 以 1:10 体积比配成混合溶液。

NaCl:分析纯,分子量 58.44,由武汉天运盐化

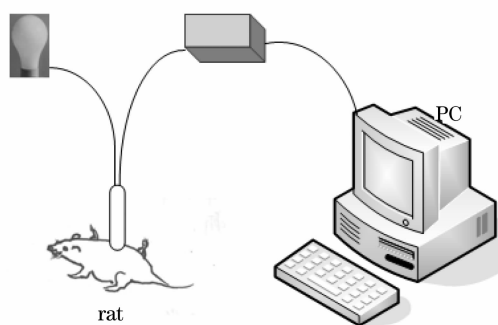


图 1 实验系统图

Fig. 1 Experimental setup

产品开发有限公司生产,配成生理盐水。

#### 2.1.3 光谱测量系统

由光源、光纤探头及可见-近红外光谱仪组成(USB-4000, Ocean Optics, USA),如图 1 所示。在实验中,入射光经光纤照射到样品表面,来自样品的漫反射光被光纤收集后送入光谱仪,经过信号转换储存在计算机内。

### 2.2 实验方法

根据实验皮肤是否去除部分角质层以及所给试剂的不同,实验共设置六个组:含角质层的 PEG400 与噻酮的混合溶液组、单纯 PEG400 组以及生理盐水对照组;去除部分角质层的 PEG400 与噻酮的混合溶液组、单纯 PEG400 组以及生理盐水对照组。每组实验重复 6~8 次。

去除部分角质层的方法:将胶带完全粘附于去毛动物皮肤表面后揭下,重复 20 次,以去除部分角质层<sup>[15]</sup>。

实验采用两种观测方法:

方法一,定性观察各组实验对皮肤产生的光透明效果,将 PEG400 与噻酮的混合溶液、单纯 PEG400 以及生理盐水分别涂抹于含有角质和去除部分角质的大鼠皮肤,跟踪观察 30 min,并用 CCD 相机拍照。然后擦掉试剂,滴加生理盐水,跟踪拍摄 5 min,以了解皮肤复性情况。

方法二,利用可见-近红外光测量系统对皮肤反射光谱的变化进行检测,以便定量比较各组间以及实验前后的光透明效果。为避免试剂引起的镜面反射,实验中未进行动态连续测量,而是在不同的作用时间点后间断检测。以实验前皮肤的反射光谱作为基准值( $R_0$ );按需要准备皮肤,然后将试剂直接涂抹于皮肤表面,保证试剂与皮肤充分作用,分别在作用 5 min、8 min、15 min 后擦干皮肤,再次测量皮肤的反射光谱( $R_t$ )。

### 2.3 数据分析

为了定量分析表面给药对皮肤光透明的影响,我们对特定波长皮肤反射率的变化进行了分析。以给药前所测反射光谱值为基础值  $R_0$ ,给药后各时间点测量的皮肤反射光强为  $R_t$ ,则各时间点的相对反射率  $\Delta R_t$  可用公式(1)表示:

$$\Delta R_t = \frac{R_t}{R_0} \quad (1)$$

利用 SPSS 13.0 软件对每组内反射率的变化进行了统计分析,就不同时间点所测数据采用配对  $T$  检验,分别比较实验后 8 min、15 min 与 5 min 反射

率的变化是否有显著差异(显著性检验水平  $P = 0.05$ ),从而推测皮肤光学特性是否因给药引起了显著性改变。

### 3 结果与分析

#### 3.1 大鼠皮肤反射光谱的典型变化

为比较 PEG400 与噻酮的混合溶液、单纯 PEG400 以及生理盐水作用于去除部分角质层以及含角质层的完整皮肤后所产生的光学变化,图 2 给出各组作用前和作用 15 min 后的大鼠皮肤反射光谱的典型曲线,其中(a)、(b)、(c)分别表示

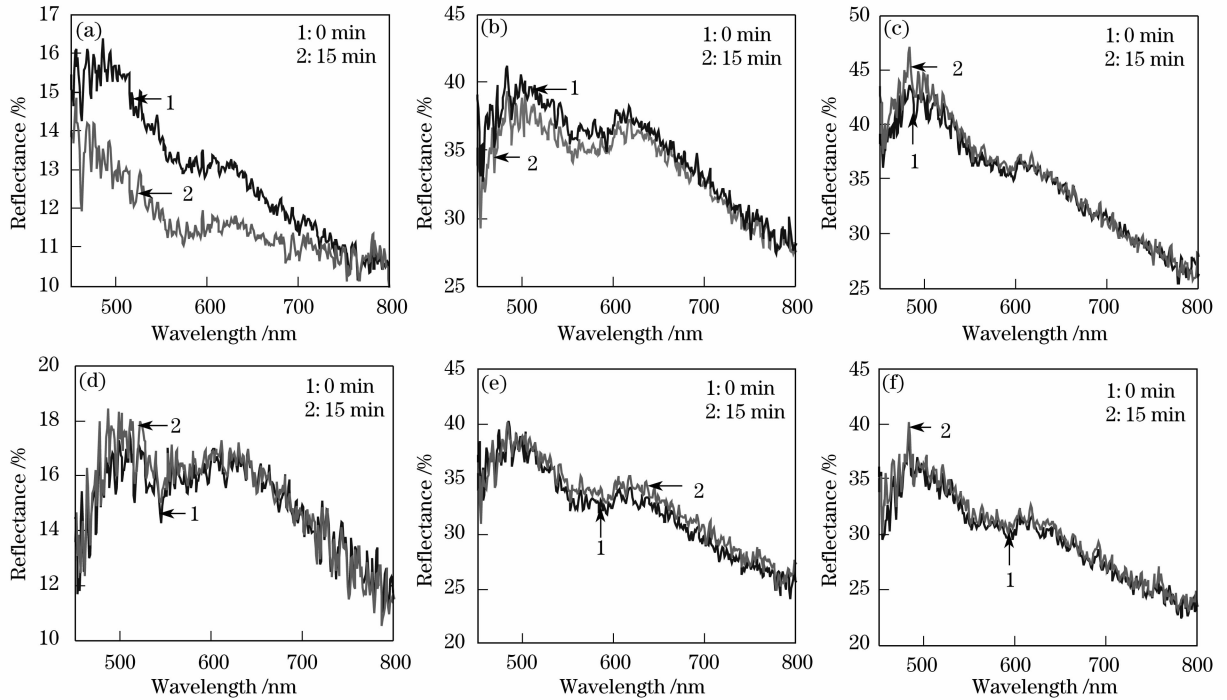


图 2 各组实验前以及试剂作用后 15 min 皮肤反射光谱的典型变化。(a)、(b)、(c)为 PEG400 与噻酮的混合溶液、单纯 PEG400 以及生理盐水作用于去部分角质层的大鼠皮肤;(d)、(e)、(f)分别为 PEG400 与噻酮的混合溶液、单纯 PEG400 以及生理盐水作用于完整大鼠皮肤

Fig. 2 Typical changes in light reflectance spectra of rat skin *in vivo*. (a), (b) and (c) were the three groups treated by PEG400 and thiazone-mixed solution, pure PEG400 and saline on the rat skin without stratum corneum; (d), (e) and (f) were the three groups treated by PEG400 and thiazone-mixed solution, pure PEG400 and saline on the rat skin with stratum corneum, respectively

#### 3.2 皮肤反射率在 632.8 nm 处的动态变化

为进一步定量分析皮肤表面给药对光透明效果的影响,我们针对不同皮肤给药后 5 min、8 min 和 15 min,波长为 632.8 nm 处皮肤的反射率对于初始时间的相对变化( $\Delta R_t$ )进行了分析。表 1 给出了不同实验组及对照组在各时间点反射率的相对变化,其均值与偏差源于 6~8 次的实验结果。

PEG400 与噻酮的混合溶液、单纯 PEG400 以及生理盐水作用于物理去除部分角质层的大鼠皮肤;(d)、(e)、(f)分别为 PEG400 与噻酮的混合溶液、单纯 PEG400 以及生理盐水作用于含角质层的完整皮肤。

从图 2 可以看出,对于去除部分角质皮肤,PEG400 与噻酮的混合溶液作用后 15 min 可见皮肤反射光谱显著下降[图 2(a)];单纯 PEG400 组仅略有减小[图 2(b)];生理盐水对照组几乎无变化,见图 2(c)。而图 2(d)、(e)、(f)显示未去除角质皮肤实验前后反射光谱几乎无变化。

从表中可以看出,只有混合溶液作用于去除部分角质皮肤后反射率有明显下降,15 min 时较初值下降了 15%;而其它各组变化均小于 7%。作组内配对  $T$  检验,以检验 8 min、15 min 相对 5 min 时的变化,仅混合溶液作用 15 min 后反射率有显著改变( $P < 0.01$ );而其他各组随时间变化,反射率的变化无统计学差异( $P > 0.05$ )。

表 1 试剂作用 5 min、8 min、15 min 后各组大鼠皮肤反射率( $\lambda=632.8\text{ nm}$ )Table 1 Relative reflectance ( $\Delta R_t$ ) of rat skin at 5 min, 8 min, 15 min after the application of agents ( $\lambda=632.8\text{ nm}$ )

Time	$\Delta R_t$					
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
5 min	0.91±0.04	0.92±0.03	1.03±0.06	0.95±0.05	0.93±0.04	0.97±0.05
8 min	0.89±0.03	0.93±0.03	0.98±0.04	0.91±0.04	0.94±0.04	1.01±0.07
15 min	0.85±0.06**	0.93±0.07	0.97±0.05	0.98±0.06	0.97±0.02	0.99±0.04

注:G1、G2、G3 分别代表混合溶液、PEG400、生理盐水作用于去除部分角质皮肤;G4、G5 和 G6 代表混合溶液、PEG400、生理盐水作用于含角质皮肤。\*\*表示  $P<0.01$ , 存在显著性差异。

### 3.3 在体皮肤组织光透明效果的直观评价

在反射光谱的测量中发现试剂直接涂抹于未处理的含角质层完整皮肤、单纯 PEG400 作用于去除部分角质层的皮肤均未见明显变化。

为此,我们跟踪拍摄了噻酮与 PEG400 的混合溶液涂抹于去除部分角质层的皮肤后的光透明过程。图 3 分别给出了 PEG400 与噻酮的混合溶液作用于去部分角质皮肤后 15 min、25 min、30 min 以及改用生理盐水作用 5 min 后的照片。

由图可见:混合溶液作用 15 min 后,被作用区

域皮肤相对周围皮肤变得较为透明,皮下血管清晰可见,如图 4 A 中箭头所示,与周边正常皮肤的浑浊度形成鲜明对比;图 4B 显示继续作用达 25 min 后,血管更加清晰,而持续至 30 min 后直观图片未见明显动态变化,皮肤光透明效果基本趋于稳定,另外局部皮肤未见出血、红肿等病理征象;擦掉试剂,涂抹足量生理盐水,可见皮肤逐渐变浑浊,5 min 后无法辨别血管轮廓,与周边对照区域混浊度接近。说明混合溶液产生的皮肤光透明效果是可逆的。

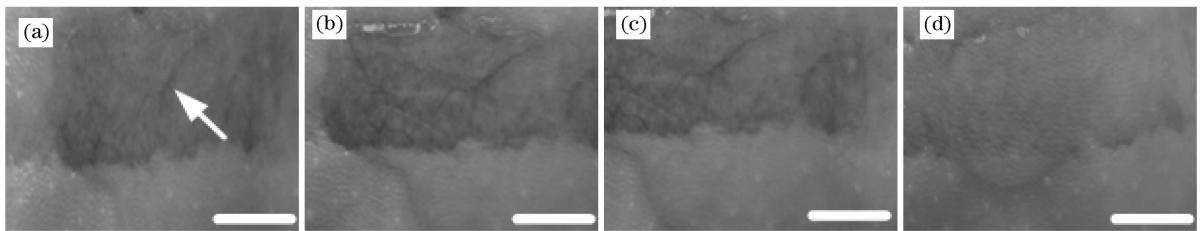


图 3 噻酮与 PEG400 的混合溶液涂抹于去部分角质层皮肤后的作用效果图。(a)~(d)分别为混合溶液作用后 15 min、25 min、30 min 以及改用生理盐水作用 5 min 后的照片(标尺=1 cm)

Fig. 3 Photos of rat skins obtained at 15 min (a), 25 min (b) and 30 min (c) after the topically application of the mixed solution; then after 5 min (d) treatment of saline (Scale bar=1 cm)

## 4 讨 论

### 4.1 角质层对皮肤光透明的阻挡作用

实验结果表明各组试剂不能对含角质层的完整皮肤产生光透明作用,这可能是由于皮肤的复杂结构造成的。皮肤由表皮、真皮和皮下组织三部分构成,角质层覆盖在表皮最外面,由几层到几十层死亡的扁平角质细胞组成;在角质层细胞的间隙中是脂质膜状物,可阻挡外界物质透过皮肤以及组织液外渗。前者似砖墙结构中的砖块,后者则似填充于砖块间并粘着砖块的水泥灰浆,是药物透皮吸收的主要屏障<sup>[17~19]</sup>。因此,单纯 PEG400 以及混合溶液在短时间内都不能透过含角质皮肤,对完整皮肤不产生光透明作用。这一结果与离体实验结果类似<sup>[16]</sup>。

为了去除部分角质层的阻挡,实验中采取了物理方法利用胶带反复粘贴以剥离部分角质<sup>[17]</sup>。虽

然皮肤的通透性增加了,但单纯 PEG400 仍不能发挥光透明效应。这可能由于 PEG400 进入皮肤的剂量和速度非常有限。

### 4.2 在体生理环境对皮肤光透明的影响

虽然混合溶液对去除部分角质层的在体和离体皮肤均能产生良好的光透明效果,但在体的光透明效果弱于离体;且光透明动态过程与离体存在差异。如在体大鼠皮肤给药 15 min 后明显透明,约 25 min 后几乎达到饱和状态,足量的生理盐水可以使皮肤迅速复性;而离体乳猪皮肤透射率在混合溶液作用 60 min 后仍缓慢增加,未达到饱和状态<sup>[16]</sup>。这可能源于在体与离体皮肤所处环境不同:在活体环境中,细胞间存在大量的组织液,可以迅速稀释试剂;而且组织液与血液之间不断进行物质交换,所以进入组织的化学试剂迅速进入血液,随血液循环代谢使得

进入细胞周围混合液的剂量有限,并达到一种动态平衡。而离体皮肤实验中,没有血液循环和物质代谢因素的影响,能使局部聚集的混合液越来越多,光透明作用也越来越强。由此可见活体皮肤光透明的研究更为复杂。

可能由于这些因素的影响,本实验中,PEG400对在体去部分角质皮肤无明显光透明作用;而以前的离体实验显示单纯 PEG400 对去除部分角质层皮肤能产生一定的光透明效果<sup>[16]</sup>。

#### 4.3 噻酮的作用机理及前景展望

噻酮的高效渗透作用机理:影响活性生物体表角质层,促使有效成份通过表皮层进入体内,但这一过程非常缓慢。

为了提高试剂的在体实验的作用效率,尽快达到理想的实验效果,我们通过结合物理和化学方法给药来实现的。首先采用物理方法去除部分角质,使得活性组织表面的细胞之间空隙增大以提高皮肤的通透性;进一步结合化学方法添加渗透促进剂噻酮,噻酮能更加有效地破坏角质层的结构,混合溶液通过皮肤的效率提高,局部真皮内聚集的有效浓度增加。因而,产生良好的光透明效果。可见,结合物理去除部分角质层以及添加化学渗透促进剂的方法,以非侵入式的方法、快速、有效排除角质层的阻挡作用,提高皮肤的光透明效果。

由于促渗剂发挥最佳效应依赖于所用试剂及适宜的比例<sup>[15]</sup>。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,而且更多的有效给药方式也有待探索。

## 5 结 论

针对在体大鼠皮肤采用简单的表面涂抹方式给药,对于完整皮肤,即使添加化学渗透促进剂噻酮,PEG400 仍不能透过皮肤,因而无光透明作用;利用物理方法去除部分角质层,PEG400 到达真皮层的剂量非常有限,仍不足以产生光透明效果;在此基础上,再添加渗透促进剂噻酮,能增加 PEG400 透过皮肤的效率,皮肤 15 min 后变得透明,并且维持 30 min 以上。因此,去除部分角质层后,噻酮能以非侵入方式、快速、有效地提高 PEG400 对在体皮肤的光透明效果,简化给药方法,对生物组织光透明技术的在体应用有重要的参考价值。

## 参 考 文 献

1 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
- 2 G. Vargas, K. F. Chan, S. 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 Surg. Med.*, 2001, **29**(3):213~220
- 3 Z. Mao, D. Zhu, Y. Hu *et al.*. Influence of alcohols on the optical clearing effect of skin in vitro [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2008, **13**(2):021104
- 4 D. Zhu, H. Cui, J. Zhang *et al.*. Transient response and hysteresis of blood vessel in chick chorioallantoic membrane by hyperosmotic agents [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2008, **13**(2):021106
- 5 M. H. Khan, B. Choi, S. Chess *et al.*. Optical clearing of in vivo human skin: implications for light-based diagnostic imaging and therapeutics [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2004, **34**(2):83~85
- 6 V. V. Tuchin. Optical clearing of tissues and blood using the immersion method [J]. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2005, **38**(7):2497~2518
- 7 Chen Jian, Zhu Dan, Luo Qingming *et al.*. Monitoring osmotical agents induced the change in optical properties of mouse skin [J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(7):873~876
- 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
- 8 J. Y. Jiang, R. K. 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
- 9 B. Choi, L. Tsu, E. Chen *et al.*. Determination of chemical agent optical clearing potential using in vitro human skin [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2005, **36**(2):72~75
- 10 M. H. Khan, S. Chess, B. Choi *et al.*. Can topically applied optical clearing agents increase the epidermal damage threshold and enhance therapeutic efficacy? [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2004, **35**(2):93~95
- 11 E. I. Galanzha, V. V. Tuchin, A. V. Solovieva *et al.*. Skin back reflectance and microvascular system functioning at the action of osmotic agents [J]. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2003, **36**(14):1739~1746
- 12 G. Vargas, E. K. Chan, J. K. Barton *et al.*. Use of an agent to reduce scattering in skin [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1999, **24**(2):133~141
- 13 O. F. Stumpp, B. Chen, A. J. Welch. Using sandpaper for noninvasive transepidermal optical skin clearing agent delivery [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2006, **11**(4):041118
- 14 V. V. Tuchin, G. B. Altshuler, A. A. Gavrilova *et al.*. Optical clearing of skin using flashlamp-induced enhancement of epidermal permeability [J]. *Lasers Surg. Med.*, 2006, **38**(9):824~836
- 15 Xiong Lizeng. A new skin penetration promoter: thiazone [J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2004, **12**(21):9~11
- 熊丽曾. 新型促渗剂噻酮[J]. *精细与专用化学品*, 2004, **12**(21):9~11
- 16 Mao Zongzhen, Hu Yating, Zheng Ying *et al.*. Experimental study of influence of thiazone on optical clearing of piglet skin in vitro [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(3):526~530
- 毛宗珍,胡亚婷,郑英等. 噻酮对离体乳猪皮肤光透明效果影响的实验研究[J]. *光学学报*, 2007, **27**(3):526~530
- 17 Zheng Junmin. *New Transdermal Deliver Preparations* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997, 36~37
- 郑俊民. *经皮给药新剂型* [M]. 北京:人民卫生出版社, 1997, 36~37
- 18 Zhu Shengshan. *New Form of Prepared Drugs* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003, 306~307
- 朱盛山. *药物新剂型* [M]. 北京:化学工业出版社, 2003, 306~307
- 19 S. Scheindlin. Transdermal drug delivery: past, present, future [J]. *Mol. Interv.*, 2004, **4**(6):308~312