

天然水蛭素水凝胶的皮肤渗透性能及毒理学考察

韦淑怡,殷国前*,韩志强,潘新元,林博杰
(广西医科大学第一附属医院整形美容外科,南宁 530021)

[摘要] 目的:探讨天然水蛭素凝胶经皮渗透给药的可行性及其对动物皮肤的毒性作用。方法:制备天然水蛭素凝胶,采用改良的 Franz 扩散池进行经皮渗透试验,使用 Markwardt 法检测水蛭素活性。选择健康 Wistar 大鼠进行急性皮肤毒性试验、单次及多次给药皮肤刺激性试验,健康豚鼠进行皮肤致敏性试验。结果:试验组的纤维蛋白原凝结时间均有延迟($P < 0.05$),于 3 h 时达最大值(85.4 ± 1.454)s,而对照组纤维蛋白原凝结时间则无明显延迟;短期内大剂量使用天然水蛭素凝胶对皮肤无毒性,对 Wistar 大鼠完整皮肤和破损皮肤均无刺激性,对豚鼠完整皮肤无致敏性。结论:天然水蛭素可渗透进入完整皮肤组织,其凝胶剂皮肤局部用药对试验动物较为安全。

[关键词] 天然水蛭素;皮肤渗透试验;皮肤刺激性试验;皮肤致敏性试验

[中图分类号] R283.6;R945 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0005-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014090005

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000066.html>

[网络出版时间] 2014-02-25 13:48

Research of Skin Penetration Properties and Toxicology
of Natural Hirudin Hydrogels

WEI Shu-yi, YIN Guo-qian*, HAN Zhi-qiang, PAN Xin-yuan, LIN Bo-jie
(The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss feasibility of permeation percutaneous administration of natural hirudin hydrogels and its toxic action on animal skin. **Method:** Natural hirudin hydrogels was prepared, improved Franz diffusion cells was adopted to make a permeability test, activity of natural hirudin was determined by Markwardt. Health Wistar rats were adopted to take an acute position skin test and single or multiple dose skin irritation test,

[收稿日期] 20130829(010)

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅重点科研项目(2011101)

[第一作者] 韦淑怡,在读硕士,从事天然水蛭素研究,Tel:18277187785,E-mail:pp99.student@qq.com

[通讯作者] *殷国前,博士生导师,主任医师,Tel:13807817282,E-mail:yingq61@163.com

[8] Yatsunenko T,Rey F E,Manary M J,et al. Human gut microbiome viewed across age and geography [J]. Nature,2012,486(7402):222.

[9] Wang Y X,Harvey C B,Hollox E J,et al. The genetically programmed down-regulation of lactase in children[J]. Gastroenterology,1998,114(6):1230.

[10] Bacsi K,Kosa J P,Balla B,et al. The decreased activity of lactase phlorizin hydrolase and bone mineral density in postmenopausal women[C]. J Bone Miner Res,2007, 22(S1):S186.

[11] 蒋艳荣,张振海,孙娥,等. 淫羊藿黄酮类成分抗骨质疏松作用及其机制研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(4):260.

[12] 陈彦,贾晓斌,谭晓斌,等. 大鼠在体肠灌流模型研究淫羊藿不同黄酮苷的吸收代谢[J]. 中国中药杂志, 2009,34(22):2928.

[13] 金朝晖,徐珽,马音,等. 口服吸收促进剂研究进展概述[J]. 华西医学,2008,23(4):940.

[责任编辑 刘德文]

health guinea pigs were used to make skin sensitization test. **Result:** Fibrinogen clotting times of experimental groups were delayed with $P < 0.05$, it reached the maximum of (85.4 ± 1.454) s at 3 h, while the control group had no significant delay; High-dose of natural hirudin hydrogels in short-term had no toxicity for skin, and no irritation for intact skin and broken skin of Wistar rats, no sensitization for intact skin of guinea pigs. **Conclusion:** Natural hirudin could penetrate into intact skin tissue, its gels was safety for skin topical administration of experimental animals.

[**Key words**] natural hirudin; skin permeation test; skin irritation test; skin sensitization test

静脉淤血为各种皮瓣移植或组织移植后常见的并发症,如果静脉淤血未被及时纠正,就会危及皮瓣的成活^[1]。传统方法(如外科修复、切开放血、局部注射肝素等)往往存在继发创伤且疗效多不确定。国内外已有学者应用活体水蛭吸血治疗皮瓣静脉淤血取得了良好效果^[2-3],但在应用过程中常受到某些主、客观条件(如病人精神心理因素、医学伦理、地域、气候等)的限制,使得临床难以普及该疗法。

天然水蛭素是存在于水蛭唾液腺中的主要生物活性物质,属于天然的凝血酶抑制剂,具有抗凝、抗血栓等药理作用,是国内外正在研究和开发的高效特异性抗凝、抗栓药物^[4]。近年药理研究证实水蛭素能改善皮瓣静脉淤血,提高淤血皮瓣的成活率^[5-6]。针对诸如浅表皮瓣淤血、微循环抗凝等情况,若以外用制剂的形式给药则更为方便、直接和安全,但目前天然水蛭素作为外用凝胶制剂在国内外罕有报道。本实验通过对自主研发的天然水蛭素凝胶进行系列的临床前试验研究,以探讨天然水蛭素通过局部外用给药作用于皮瓣组织的可行性,并观察该凝胶制剂的安全性。

1 材料

RYJ-6B 型透皮扩散仪(上海精胜科学仪器有限公司,接受池体积 6.50 mL,透皮有效扩散面积 2.8 cm^2)。卡波姆 934(carbopol 934,美国诺誉化工有限公司),人纤维蛋白原(上海莱士),天然水蛭素冻干粉(广西科康生物科技有限责任公司,专利号 ZL03113566.8,纯度 99.9%),氮酮(Azone,阿拉丁),丙二醇、三乙醇胺(天津市富宇精细化工有限公司),Tris-HCl 缓冲液($1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,Solarbio 公司)。

健康裸鼠,体重 $(20 \pm 2)\text{ g}$,健康 Wistar 大鼠,体重 $(200 \pm 20)\text{ g}$,健康豚鼠,体重 $(250 \pm 20)\text{ g}$,雌雄各半,由广西医科大学动物中心提供,合格证号桂检证字(2000)第 001 号,温度 $(25 \pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度 70%。

2 方法与结果

2.1 皮肤渗透试验^[7-9]

2.1.1 空白凝胶基质的配置 称取 carbopol 934 1 g

溶于适量水中,静置充分溶胀后,加 25% 三乙醇胺水溶液调节 pH 7,加入氮酮 0.2 g,乙醇 3.6 g,丙二醇混合液 5 g,将剩余水分补足总量至 100 g,均匀搅拌,即得。

2.1.2 天然水蛭素凝胶的配置 取适量空白凝胶基质,加入试验剂量的天然水蛭素冻干粉,按需要配成 $100\text{ ATU}\cdot\text{g}^{-1}$ 天然水蛭素凝胶。

2.1.3 体外透皮吸收试验 常规处死裸鼠,无菌条件下剥离腹部完整皮肤,去除皮下组织,露出真皮层。将皮片剪裁成适当大小,安装在透皮扩散杯上,角质层朝上。试验组给予含天然水蛭素凝胶 1 g,对照组予空白凝胶 1 g,将凝胶均匀涂于皮肤表面。向接受室中注入 0.9% 氯化钠注射液 6.5 mL,置于 $(37 \pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中,转速设置 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。分别于 0.5,1,2,3,4 h 吸取接受室溶液 0.5 mL 进行储存,每次取样后补充同体积生理盐水,每个样本重复 3 次。

2.1.4 水蛭素的活性检测 采用 Markwardt 法进行水蛭素活性的检测。分别配置好 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 凝血酶溶液和 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的纤维蛋白原溶液(使用 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 溶液配置)。使用移液器向一次性试管中加入纤维蛋白原溶液 200 μL 和

2.1.3 项下取出的样品 50 μL ,吹吸混匀,在加入凝血酶溶液 5 μL 的同时使用计时器计时,记录试管中纤维蛋白原凝结时的时间。若纤维蛋白原溶液 1 min 未凝集,则再加入凝血酶溶液 5 μL ,每个试验样本重复 5 次,结果见图 1。表明在各观察时间点,试验组的纤维蛋白原凝结时间均有延迟($P < 0.05$),于 3 h 时达最大值 $(85.4 \pm 1.454)\text{ s}$,而对照组纤维蛋白原凝结时间则无明显延迟。

2.2 急性皮肤毒性试验 选用 Wistar 大鼠 20 只,分成正常量组(予天然水蛭素凝胶 10 ATU/只)、高剂量组(予天然水蛭素凝胶 2 000 ATU/只),每组 10 只,雌雄各半,安静单笼饲养 7 d。试验前 24 h 对背部皮肤使用电动理发器进行脱毛处理,去除范围 $6\text{ cm}\times 5\text{ cm}$ 。给药时取天然水蛭素凝胶 10 g 直接

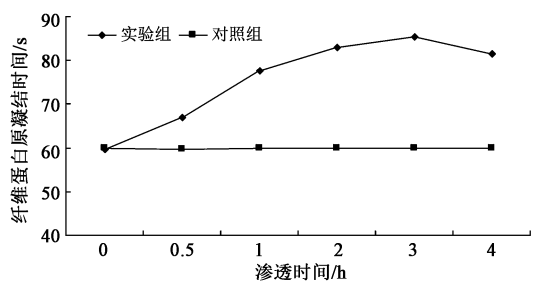


图1 天然水蛭素凝胶体外经皮渗透情况

涂抹于已去毛的皮肤上,用二层纱布和一层玻璃纸覆盖,再用无刺激性胶布和绷带加以固定,敷贴时间4 h。敷贴结束后,使用生理盐水清洁给药部位。在去除药物后注意观察大鼠状况,包括动物饮食、皮肤、毛发、眼睛变化、呼吸、中枢神经系统、四肢活动等。若动物死亡,应及时尸检和肉眼观察,必要时进行病理学检查。在去除凝胶1 h开始观察,直至第14 d,结果发现动物无死亡,活动自如,觅食正常,涂药区域毛发生长正常、皮肤色泽正常、毛发光泽正常,眼与黏膜无变化,呼吸未见异常,未见中枢神经系统异常表现,未见全身中毒反应。

2.3 皮肤刺激性试验 选用 Wistar 大鼠 18 只,等分成正常量组(A组,予天然水蛭素凝胶 10 ATU/只)、高剂量组(B组,予天然水蛭素凝胶 50 ATU/只)、完整皮肤组(C组,予天然水蛭素凝胶 10 ATU/只),安静单笼饲养 7 d。试验前 24 h 对背部皮肤使用电动理发器进行脱毛处理,在脊柱两旁各去除范围 3 cm×3 cm。给药前用砂纸将 A,B 组大鼠的皮肤磨削,以渗血为度。给药时取适量天然水蛭素凝胶直接涂抹于已去毛的皮肤上,适当包扎固定,敷贴时间 4 h,左边予天然水蛭素凝胶,右边予空白凝胶基质。敷贴结束后,使用生理盐水清洁给药部位。在敷贴结束后第 1,24,48,72 h 在自然光线下肉眼观察皮肤反应,按文献[10]中皮肤刺激性评分标准给出的标准对皮肤红斑和水肿进行评分。在首次敷贴观察后继续每日连续给药,连续给药 14 d,并在敷贴结束后第 1,24,48,72 h 在自然光线下肉眼观察并记录涂敷部分有无红斑和水肿等情况,而后进行评分。结果显示 3 组试验动物平均反应分值差异均无统计学意义($P>0.05$),在整个试验过程中,大鼠均未出现刺激性反应,分值均为 0。

2.4 皮肤致敏性试验 选择 2,4-二硝基氯苯(使用灭菌水将其配成 1% 致敏溶液和 0.1% 激发溶液)为致敏剂。豚鼠 30 只,等分为正常剂量组(A组,予天然水蛭素凝胶 10 ATU/只)、阴性对照组(B组,予

空白凝胶基质 2 g/只)、阳性对照组(C组,予 2,4-二硝基氯苯 3 mg/只),雌雄各半,安静单笼饲养 7 d。给药前常规备皮。

2.4.1 诱导期给药 取适量药物直接涂抹于已去毛的皮肤上,用纱布和绷带适当固定,敷贴时间为每天 6 h,隔日 1 次,共 5 次,第 1 次敷贴后 1 h 记录皮肤反应。

2.4.2 激发期给药 在末次诱导给药后 14 d 进行激发,取适量药物直接涂抹于已去毛的皮肤上,纱布和绷带固定,敷贴时间 6 h。敷贴时间结束后使用生理盐水清洁豚鼠皮肤,在第 24,48 h 读取结果,按皮肤过敏反应评分标准^[8]对皮肤红斑和水肿进行评分,见表 1,观察大鼠有无哮喘、站立不稳或休克等严重的全身性过敏反应。结果发现 A,B 组在诱导及激发后的观察期内,皮肤反应未见异常,无水肿、红斑,无哮喘、站立不稳及休克现象,致敏率 0%;C 组在诱导后有水肿形成,激发后有明显水肿、红斑形成,大鼠出现咳嗽、站立不稳现象,各试验观察点均存在明显过敏反应,致敏反应发生率 100%。

表 1 天然水蛭素凝胶皮肤致敏性的平均反应分值($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	诱导 1 h	激发 24 h	激发 48 h
A	0	0	0
B	0	0	0
C	3.300±0.437	5.100±0.513	4.000±0.739

3 讨论

活体水蛭吸血疗法可明显改善患处的血液循环^[11],是救治静脉淤血并发症的一种标准疗法^[12],但活体水蛭来源有限且应用不便。研究证实天然水蛭素理论上可改善随意皮瓣淤血组织的血液循环。前期研究表明局部皮下注射天然水蛭素能促进淤血皮瓣的血管生成,改善静脉淤血,提高皮瓣成活率^[13-15],但皮下注射存在给药不均匀、药物流空、继发创伤、不便于大面积给药等缺点,而静脉注射则存在吸收清除过快、易致敏等情况,故有必要进行水蛭素外用给药途径的可行性探索。

carbopol 为外用凝胶剂最常用的配方之一,凝胶中有效促渗成分为氮酮及丙二醇,稳定渗透能力强且毒副作用极少^[16]。carbopol 作为骨架结构,能使凝胶内分子均匀分散在基质中,使用时可稳定释放药物;制剂中主要促渗成分氮酮能增加细胞类脂双分子层的流动性、降低相转变的温度,促进药物在细胞间的扩散;而丙二醇分布在类脂极性基团间的亲水性区域,使氮酮更容易分配进入细胞间作用部

位,促进药物通过细胞内途径转运,提高氮酮的渗透作用。药物可通过上述机制渗透皮肤,释放活性成分,达到治疗的目的。

水蛭素的分析方法可大致分为 4 类,即生物测定法、免疫测定法、同位素标记法和光散射法。综合考虑 4 类方法的特点和试验条件后,最终采用了 Markwardt 法,该法方便经济、灵敏度高,但误差较大,故本实验通过增加试验次数以加强最终结果的可信度。

皮肤渗透试验表明天然水蛭素能顺利释放并透过完整裸鼠皮肤进入皮下,渗透活性在 2 ~ 3 h 达到高峰,此时累积渗透药物量最大,提示最佳给药方式为持续给药 2 ~ 3 h。肖汉、郭应信^[17-18]等研究表明,每个 10 cm × 3 cm 的随意皮瓣淤血模型每天注射 2 ATU 单位天然水蛭素即能达到治疗效果,根据体外透皮试验大约预计本实验制得天然水蛭素凝胶的渗透效率约 20%,故设计时正常组剂量定为 10 ATU/只,大剂量组的剂量为正常组的 200 倍。急性毒性试验表明正常剂量和大剂量外用时均未出现任何急性毒性反应。皮肤刺激性试验中平均反应分值差异均无统计学意义,表明正常剂量、高剂量的天然水蛭素凝胶对正常皮肤及破损皮肤均无刺激性。皮肤致敏性试验各观察点大鼠均无明显过敏反应,致敏反应发生率 0%。按国家标准^[19-20],证实了天然水蛭素外用凝胶药物的开发具备可行性与安全性,但凝胶剂的渗透效率较低有待提高。

[参考文献]

[1] Koch C A, Olsen S M, Moore E J. Use of the medicinal leech for salvage of venous congested microvascular free flaps of the head and neck [J]. Am J Otolaryng, 2012, 33 (1) : 26.

[2] Porshinsky B S, Saha S, Grossman M D, et al. Clinical uses of the medicinal leech; a practical review [J]. J Postgrad Med, 2011, 57 (1) : 65.

[3] Lemonas P, Hussain M A, Edwards D. Letter: Leeches as a cost-effective measure in plastic and reconstructive surgery [J]. Int Wound J, 2011, 8 (2) : 212.

[4] Hildebrandt J P, Lemke S. Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* [J]. Naturwissenschaften, 2011, 98 (12) : 995.

[5] 孙智勇,王刚,杨晓楠,等.天然水蛭素对猪随意型皮瓣静脉淤血影响的实验研究 [J].中国修复重建外科杂志,2008,22(11):1296.

[6] 林丁盛,郑鑫,李志杰,等.水蛭素对大鼠随意型皮瓣存活的影响 [J].中华整形外科杂志,2011,27(1):35.

[7] 吴静澜,郭璐玫,刘文,等.三七总皂苷透皮凝胶膏剂的制备和含量测定 [J].中国实验方剂学杂志,2013,19(7):20.

[8] 王彦礼,王岚,杜茂波,等.黄连巴布剂的镇痛抗炎作用、刺激性及过敏性研究 [J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):143.

[9] Markwardt F. Hirudin as an inhibitor of thrombin naturally occurring activators and inhibitors [J]. Methods Enzymol, 1970 (69) : 924.

[10] 徐叔云.药理实验方法学 [M]. 3 版.北京:人民卫生出版社,2001:1861.

[11] Lemonas P, Hussain M A, Edwards D. Letter: Leeches as a cost-effective measure in plastic and reconstructive surgery [J]. Int Wound J, 2011, 8 (2) : 212.

[12] Gröbe A, Michalsen A, Hanken H, et al. Leech therapy in reconstructive maxillofacial surgery [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2012, 70 (1) : 221.

[13] Guo-Qian Y, Gang W, Zhi-Yong S. Investigation on the microcirculation effect of local application of natural hirudin on porcine random skin flap venous congestion [J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62 (1) : 141.

[14] 王春艳,童庭辉,韩寅,等.低分子肝素和重组水蛭素对兔耳静脉淤血皮瓣成活的影响 [J].中国组织工程研究,2012,16(18):3329.

[15] Ying-Xin G, Guo-Qian Y, Jia-Quan L, et al. Effects of natural and recombinant hirudin on VEGF expression and random skin flap survival in a venous congested rat model [J]. Int Surg, 2013, 98 (1) : 82.

[16] 郑俊民.经皮给药新剂型 [M].北京:人民卫生出版社,2006:34.

[17] 肖汉,殷国前,郭应信,等.天然、重组水蛭素对大鼠随意皮瓣 ET、TXB2 的影响 [J].中国美容整形外科杂志,2010,21(10):633.

[18] 郭应信,殷国前,李佳荃,等.天然、重组水蛭素对随意皮瓣淤血模型血管内皮细胞生长因子的影响 [J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(7):1210.

[19] 中华人民共和国卫生部药政局.新药临床前研究指导原则汇编(药理学、毒理学) [M].北京:人民卫生出版社,1994:204.

[20] 中华人民共和国卫生部药政局.中国医院制剂规范(西药制剂) [M].2 版.北京:中国医药科技出版社,1995:24.

[责任编辑 刘德文]