

采用 DSC 技术观察正极性驻极体 对大鼠皮肤结构的影响

董法杰¹ 梁媛媛¹ 崔黎丽² 马琳¹ 刘鸿越² 江键¹

(1. 第二军医大学 基础部数理教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学 药学院无机教研室, 上海 200433)

摘要: 利用恒压电晕充电技术将聚丙烯制备成不同表面电位的正极性驻极体, 将驻极体作用于 SD 大鼠 2 h, 借助热分析技术对大鼠皮肤的差示扫描量热(DSC)图谱进行研究。结果显示: 1) 正常大鼠皮肤的 DSC 图谱中位于 63 °C、82.7 °C 和 115.1 °C 出现了 3 个特征相变峰。2) 与对照组的 DSC 图谱相比, 大鼠皮肤 DSC 图谱中相变峰的峰值和峰面积随驻极体表面电位的增加而减少。结果: 正极性驻极体的生物效应改变了大鼠皮肤角质层中层状类脂和蛋白质的空间结构, 增强了类脂的流动性, 正极性驻极体具有促进药物经皮渗透的作用。

关键词: 驻极体; 聚丙烯; DSC 图谱; 大鼠; 皮肤

中图分类号: O484.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-7162(2011)02-0091-04

差示扫描量热技术(Differential Scanning Calorimetry, DSC)是在程序控温条件下测量待测样品和参比物的温度差与温度关系的热分析技术。利用 DSC 技术可以获得待测样品的相变温度、系统焓变和系统内部分子转变协同性等参数,由此可获得待测样品结构变化的相关信息^[1]。驻极体是指能够长时间储存空间电荷和极化电荷的功能材料。驻极体储存电荷的分布及其变化而形成的静电场和微电流变化是驻极体生物效应的基础,驻极体的生物效应包括改善血液循环、促进骨折愈合、促进细胞生长和促进创面愈合等^[2-3]。

近年来,驻极体促进不同极性和不同分子量药物的体外经皮给药研究成为驻极体生物效应研究的新热点^[4]。本课题组较系统地开展了驻极体促进药物体外的透皮给药研究,并对驻极体促进药物的经皮渗透的机制做了探讨^[5-6]。为了进一步深入开展驻极体促进各类药物体外透皮给药机制的研究,本项目借助于差示扫描量热技术研究不同电位的正极性驻极体对大鼠皮肤角质层中类脂和蛋白质空间结构及其类脂流动性的影响,为进一步深化各类驻极体透皮制剂的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 驻极体制备

聚丙烯薄膜选用日本东丽工业株式会社生产的

商品膜,膜厚 13 μm。为了确保实验过程中所有样品具有相近的结构,聚丙烯薄膜取自同卷膜材。

常温下利用恒压电晕充电系统(大连理工大学研制)对双裸面聚丙烯薄膜实施恒压电晕充电,电晕电压为 20 kV,栅压分别为 500 V、1 000 V 和 2 000 V,充电时间为 5 min,相对湿度 77%,制备成不同表面电位的驻极体。充电后驻极体的表面电位由补偿法(ESR102A 型,北京华晶汇科技有限公司)测量。

1.2 试剂及配置方法

称取磷酸氢二钠(上海新华化工厂) 71.64 g 加入 1 000 mL 双蒸水配成溶液 A,称取磷酸二氢钠(上海新华化工厂) 31.21 g 加入 1 000 mL 双蒸水配成溶液 B,取溶液 A 72 mL、溶液 B 28 mL 混匀,调 pH 值到 7.2。取 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 50 mL,加入 50 mL 双蒸水,混匀。

称取乌拉坦(上海化学试剂公司) 20 g 加入 100 mL 双蒸水配成 20% 乌拉坦溶液,混匀。

1.3 实验动物及分组

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 12 只,体质量 (200 ± 10) g,由第二军医大学实验动物中心提供,随机分成对照组、500 V、1 000 V 和 2 000 V 驻极体实验组。

将大鼠用 20% 乌拉坦腹腔麻醉 (5 mL/kg) 后,呈仰卧位固定于操作台上。选取腹部中线两侧对称

收稿日期: 2011-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助(50977089); 军队“十一五”国际合作项目(06H022); 上海市自然科学基金资助(10ZR1437600)

作者简介: 董法杰(1979-) 男,讲师,主要研究方向为驻极体透皮机制。

通讯作者: 江键(1961-) 男,教授,硕士研究生导师,主要研究方向为生物驻极体及其透皮制剂。

部位(面积约 $8\text{ cm} \times 6\text{ cm}$)作为取皮区,小心剃净腹部鼠毛,注意勿伤及皮肤.实验区域被腹中线分为左右对称两部分,左右各部分再划分为 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 大小各3个条带区域,每条带间隔 1 cm ,按上述方法每只大鼠取皮区共被划分为6个条带实验区域.每个条带区域分别贴敷PP薄膜(表面电位为零)和不同表面电位的驻极体实验组.2 h后用过量麻醉处死实验动物.处死大鼠后,迅速剪取6个条带区域皮肤,用PBS溶液冲净皮肤,用医用棉球擦去皮肤下多余的结缔组织,备用.

1.4 DSC 实验

取一定量的各组皮肤样品置于Diamond TG/DTA热重差热综合热分析仪(珀金埃尔默,PE公司),从常温升至 $350\text{ }^\circ\text{C}$ (以 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速率进行).

2 实验结果

2.1 大鼠皮肤的 DSC 图谱

图1给出了正常SD大鼠皮肤的DSC图谱,其中横坐标表示温度(单位 $^\circ\text{C}$),纵坐标表示样品与参比物的温度差,本仪器用差热放大器的电压差值来直接表示(单位 μV).结果显示,在大鼠皮肤的DSC图谱中出现了位于 $63\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $82.7\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $115.1\text{ }^\circ\text{C}$ 3个特征相变峰.图中第1个相变峰(低温峰)主要源于线性加热过程中细胞间角质层类脂由类脂双层的层状凝胶态向液晶态的转变.第2个相变峰(中温峰)是角质层类脂由凝胶态向液晶态的转变而形成,且与角质层中的蛋白质密切相关.第3个相变峰(高温峰)是蛋白质的变性峰.这是因为大鼠皮肤角质层的类脂双层结构和各类蛋白质都是温度的敏感物质,在线性加热的实验过程中,不仅皮肤角质层的类脂双层会吸收热量从凝胶态向液晶态发生相变,而且蛋白质也因吸收外界热能引起各种原子键和化学键的伸缩振动、弯曲振动和内部转动,甚至发生氢键

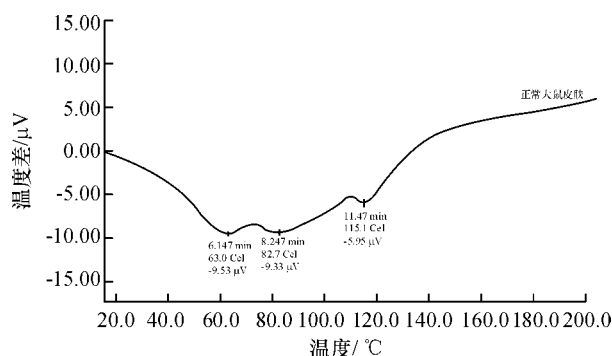


图1 正常大鼠皮肤的DSC谱

的断链导致蛋白质发生空间构象的改变和变性.此结果与其他学者研究的结果基本一致^[7].

2.2 正极性驻极体对皮肤结构的影响

图2分别给出了正常皮肤的DSC图谱和经 500 V 驻极体作用2 h后大鼠皮肤的DSC图谱.与对照组的DSC图谱相比, 500 V 驻极体作用大鼠皮肤的DSC图谱中不仅3个相变峰的峰位向低温区迁移,而且相应的相变峰的峰值和峰面积也显著减少.这充分反映了经 500 V 驻极体作用的大鼠皮肤内的类脂双层结构及其流动状态和蛋白质的二、三级结构发生了改变.正极性驻极体作用大鼠皮肤后,一方面驻极体产生的外静电场使皮肤类脂层的空间排列有序性得到改善,导致大鼠皮肤在线性加热过程中吸热相变所需的内能减少和类脂分子运动协同范围的增加.另一方面,驻极体产生的外静电效应和微电流效应也使大鼠皮肤类脂双层由凝胶态向液晶态转变,提高了类脂的流动性,增加了类脂分子的协同性.两种因素的综合结果使DSC图谱中出现低位温峰和中温峰峰位向低温区迁移及其峰面积的减少.相关的研究结果被本课题组前期对经 500 V 驻极体作用2 h大鼠皮肤的显微和超微结构的研究结果所证实.经正极性驻极体作用的大鼠皮肤的显微结构显示,与对照组相比,大鼠皮肤角质层出现脱落变薄的现象,且角质层的层与层之间的间距变大,同层砖墙结构的间隙展宽.大鼠皮肤的微结构研究和热分析研究结果均显示,正极性驻极体对大鼠皮肤的角质层的类脂排列及其流动具有显著的调节作用,有利于药物的经皮渗透.

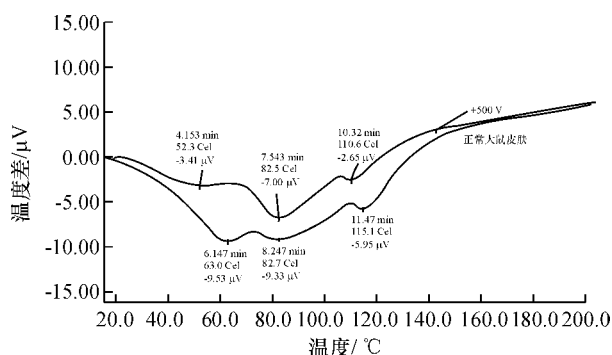


图2 500 V 驻极体作用大鼠皮肤的DSC图谱

图2的结果进一步显示,与对照组的DSC图谱相比,经驻极体作用大鼠皮肤的DSC图谱中的高温峰的峰值和峰面积也显著减少.这是因为正极性驻极体的生物效应使大鼠皮肤角质层中的大量蛋白质发生从 α 螺旋结构向 β 折叠转换,导致了角质层的结构松弛和有利于药物的经皮渗透.由于大量蛋白

质的二、三级空间结构在驻极体的静电场和微电流作用下已发生空间构象改变,因而减少了线性加热过程中皮肤内剩余蛋白质空间结构变化所需的内能,使大鼠皮肤的 DSC 图谱中因空间结构改变而形成的高温峰的峰值和峰面积显著减少。

2.3 不同电位驻极体对皮肤结构的影响

图 3 给出了对照组、500 V 组和 2 000 V 组大鼠皮肤的 DSC 图谱。结果显示:与对照组的 DSC 图谱相比,随着驻极体的表面电位从 500 V 增至 2 000 V,大鼠皮肤 DSC 图谱中 3 个特征相变峰的峰值及其所对应的峰面积持续下降,峰位基本保持不变。这说明了:1) 500 V 驻极体与 2 000 V 驻极体引起大鼠皮肤角质层中层状类脂和蛋白质空间结构改变及其增强类脂流动性的作用机制相似。2) 随着驻极体的表面电位增加,驻极体对类脂和蛋白质空间结构及其类脂流动性的调控能力越强,驻极体产生的生物效应更显著。

图 4 分别给出了对照组和 1 000 V 组大鼠皮肤的 DSC 图谱。结果显示,与对照组的 DSC 图谱相比,1 000 V 驻极体作用大鼠 2 h 后,DSC 图谱中的高温峰消失,这说明 1 000 V 驻极体对皮肤内蛋白质空间结构的调控能力强于 500 V 驻极体和 2 000 V 驻极体。1 000 V 驻极体较 500 V 驻极体具有最佳的促进药物体外经皮渗透的能力。

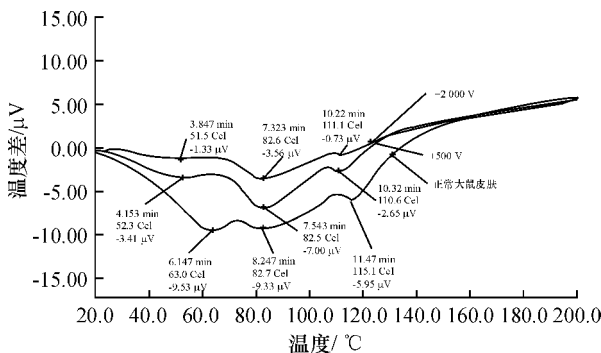


图 3 500 V 和 2 000 V 驻极体作用皮肤的 DSC 图谱

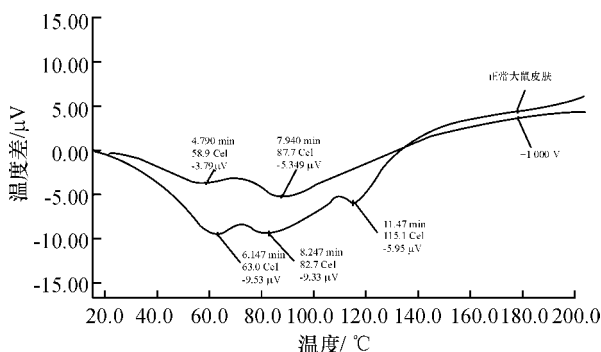


图 4 1 000 V 驻极体作用皮肤的 DSC 图谱

3 结论

本实验借助于热分析技术对大鼠皮肤的差示扫描量热(DSC)图谱进行研究,以期进一步探讨驻极体对大鼠皮肤结构影响的机制。研究结果表明:1) 正极性驻极体利用外静电场效应和微电流效应改变了大鼠皮肤角质层中层状类脂和蛋白质空间结构,增强类脂流动性。2) 随着驻极体的表面电位增加,驻极体对类脂和蛋白质空间结构及其类脂流动性的调控能力增强,驻极体产生的生物效应更显著。3) 正极性驻极体具有优异的促进药物经皮渗透的作用。皮肤表面显微结构的观察结果也进一步反映了驻极体对双分子脂质层的作用:经驻极体作用后,皮肤表面空穴增加及毛囊口径的拓宽,提示对角质层类脂质有溶解作用,使角质层屏障阻力降低,有利于药物的穿透。结果将另文发表。

有人早在多年前已用 DSC 从分子水平研究促进剂的增渗机理,认为皮肤角质层分子中紧密排列的双分子脂质层或镶嵌在其中的蛋白质在透皮促进剂的作用下会发生改变:其脂质分子在液相中的极性端及双分子层中的非极性端和角蛋白纤维的结构都发生了变化^[8]。

综上所述,可推测驻极体促进药物透皮吸收的机理是瓦解了角质层双分子脂质层紧密结构,破坏其在序叠集排列,增加分子流度,从而产生透皮促进效果的。

参考文献:

- [1] 袁骥,周新丽,王海松. 差示扫描量热法在红细胞研究中的应用[J]. 中国细胞生物学报 2010, 32(5): 795-799.
- [2] 梁媛媛,江键,崔黎丽,等. 驻极体促进药物透皮吸收的研究进展[J]. 中国医学物理学杂志 2007, 24(4): 264-266.
- [3] 江键,夏钟福. 生物驻极体研究及其医学应用现状[J]. 第二军医大学学报 2001, 22(5): 401-404.
- [4] Murthy N S, Boguda V A, Payasada K. Electret enhances transdermal drug permeation, Bio Pharm Bull, 2008, 31: 99-102.
- [5] 肖永恒,江键,李国栋,等. 驻极体美洛昔康贴剂对大鼠血液和肝脏组织中药物浓度的影响[J]. 河北大学学报:自然科学版, 2010, 30(5): 560-563.
- [6] 梁媛媛,江键,程亮,等. 负极性聚丙烯驻极体美洛昔康贴剂对大鼠皮肤结构的影响[J]. 解剖学杂志 2009, 32(4): 502-505.
- [7] Schiller R, Funke A P, Gunt her C. DSC measurements on

full thickness mice skin: An additional tool to investigate permeation enhancement of highly lipophilic drugs [J]. *J Therm Anal Calorimetry*, 2004, 77(2): 497-510.

[8] Barry B W. Mode of action of penetration enhancers in human skin [J]. *Journal of Controlled Release*, 1987, 6(1): 85-97.

DSC Analysis of the Effect of Positive Electret on Rat Skin

Dong Fa-jie¹, Liang Yuan-yuan¹, Cui Li-li², Ma Lin¹, Liu Hong-yue², Jiang Jian¹

(1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2. College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The positive electret was prepared by the constant voltage corona charging method. After the application of the electret on rat skin for 2 hours, the skin was analyzed by differential scanning calorimetry (DSC). The results indicate that (1) there are three peaks at 65 °C, 87 °C and 122 °C in the DSC spectra for control rat skin; (2) with the increase of electret surface potential, the peak temperature and peak area decrease as compared with control rat skin. Therefore, the biological effect of positive electret changes the space structure of lamellar lipid and protein, and increases the fluidity of lipid. Positive electret can enhance the drug transdermal delivery.

Key words: electret; polypropylene; differential scanning calorimetry spectra; rat; skin

(上接第87页)

[3] 丁少中, 武璇. 层次分析法在确定绩效指标权重中的应用 [J]. *中国电力教育*, 2005(4): 29-31.

[4] 汪应洛. 系统工程理论、方法与应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1998.

[5] 韩中庚. 数学建模方法及其应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.

[6] 赵国党. 河南省中小企业技术创新支持体系的模糊评价 [J]. *科技管理研究*, 2010(6): 72-74.

[7] 科学技术部发展计划司. 2010年科技统计报告全国及各地区科技进步统计 [R/OL]. [2011-03-03]. <http://www.sts.org.cn/tjbg/tjtc/documents/2011/201101311.htm>.

AHP-fuzzy Comprehensive Evaluation of the Technological Innovation Service System in Guangdong Province

Wu Yu-jie, Yuan Jia-feng

(School of Management, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510520, China)

Abstract: With regard to the actual situation of the technological innovation service system in Guangdong Province, the evaluation index of the technological innovation service system was established. AHP-fuzzy comprehensive evaluation was used for an empirical analysis of the service capacity of Guangdong Province Technological Innovation. The research provides a scientific basis for decision making to improve the service capacity of Guangdong Province Technological Innovation and to enhance the market competitiveness.

Key words: technological innovation; Guangdong Province; technological innovation service system; AHP-fuzzy comprehensive evaluation; index