

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.04.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 04-0017-05

微针对 5-氨基酮戊酸经皮渗透的作用研究*

梁齐飞, 云健健, 杨凤元, 黄熙
(桂林医学院附属医院, 广西 桂林, 541001)

摘要: 目的 研究微针作用于鲜红斑痣鸡冠模型后, 5-氨基酮戊酸(5-ALA)代谢产生的原卟啉 IX (PpIX) 在鸡冠组织中含量变化, 观察是否可增强 5-ALA 渗透。**方法** 以鸡冠为模型, 分为 5-ALA 组和微针联合 5-ALA 组, 5-ALA 组鸡冠直接涂抹 5-ALA, 微针联合 ALA 组用皮肤滚针滚磨鸡冠后涂抹 5-ALA, 均以未处理侧为自身对照, 荧光分光光度计测定 5-ALA 在鸡冠组织中合成 PpIX 的情况, 倒置荧光相差显微镜观察 PpIX 在鸡冠组织中的分布。**结果** 在鸡冠组织内, 5-ALA 吸收后产生的 PpIX 量随时间逐渐增加, 3 h 出现明显聚集, 4 h 达到高峰, 6 h 后明显减少, 微针联合 5-ALA 组 PpIX 含量高于单纯 5-ALA 组, 且荧光强度下降更慢, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。冷冻切片显示 PpIX 弥漫性分布于表皮层和真皮血管组织中, 微针联合 5-ALA 组荧光强度高于 5-ALA 组。**结论** 微针作用可促进 5-ALA 渗透, 为临床更好的使用光敏剂 5-ALA 提供了实验依据。

关键词: 5-氨基酮戊酸; 鲜红斑痣; 原卟啉 IX; 微针; 鸡冠

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of microneedle on transdermal permeation of 5-aminolevulinic acid*

Qi-fei Liang, Jian-jian Yun, Feng-yuan Yang, Xi Huang
(Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective To determine the content of protoporphyrin IX (PpIX) in chicken comb tissues after using microneedles and topical application of 5-aminolevulinic acid (5-ALA), so as to observe whether microneedles can help 5-ALA permeate through epidermis of the comb. **Methods** Using chicken comb as the animal model of port wine stain, the chickens were divided into ALA group and microneedle combined with ALA group. In the ALA group, 5-ALA was applied only; in the microneedle combined with ALA group, the chicken comb was applied with 5-ALA after grinding with microneedles; both groups used untreated side as self-control. The localization of PpIX was observed under inverted fluorescence phase contrast microscope, and the fluorescence intensity of PpIX was calculated by fluorospectrophotometer. **Results** In the comb, PpIX content increased gradually after applying ALA and reached the peak level at 4 hours in the two groups, and obviously decreased after 6 hours, but the PpIX level in the microneedle combined with ALA group was significantly higher than that in the ALA group ($P < 0.05$). Inverted fluorescence phase contrast microscopy showed that PpIX distributed evenly in the vascular tissue of epidermis and dermis, and the fluorescent intensity in the microneedle combined with ALA group was stronger than that in the ALA group. **Conclusions** Microneedles can help 5-ALA better permeate through epidermis. This experiment also provides reference base for optimizing 5-ALA usage in clinic.

Keywords: 5-aminolevulinic acid; port wine stain; protoporphyrin IX; microneedle; chicken comb

收稿日期: 2017-02-07

* 基金项目: 广西自然科学基金面上项目 (No: 桂科计字 [2016]380 号)

[通信作者] 黄熙, E-mail: 1352215665@qq.com

鲜红斑痣 (port wine stains, PWS) 是皮肤毛细血管的扩张及畸形, 对患者容貌影响较大, 是临床治疗的难点。光动力疗法 (photo dynamic therapy, PDT) 近年来应用于 PWS 的临床治疗, 取得一定疗效。PDT 根据光敏剂使用方法不同主要分为静脉注射 (如血卟啉单甲醚) 和局部外用 (如 5-氨基酮戊酸) 等, 前者疗效较好, 但存在用量大、费用高、代谢慢、治疗后需长时间避光、易引起光敏反应等缺点, 限制了临床使用。为避免静脉注射光敏剂的缺点, 局部外用 5-氨基酮戊酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 光动力疗法已尝试用于 PWS 治疗, 但存在经皮渗透较弱的问题。基于外用药物经皮渗透的最大障碍是表皮角质层的特点, 已有研究证实微针作用下表皮角质层的完整性破坏, 可使药物经皮吸收增强。为提高 5-ALA 的经皮渗透性, 设想通过微针作用来增加 5-ALA 渗透。因此本实验开展了微针作用于鸡冠后, 5-ALA 代谢产生的 PpIX 在鸡冠组织中的药代动力学研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

5-ALA (规格 118 mg, 复旦张江生物制药有限公司), 原卟啉 IX (PpIX) (250 mg, Aladdin-阿拉丁试剂上海有限公司), 抗荧光衰减封片剂 (5 ml, 北京索莱宝科技有限公司), 皮肤滚针 (针长 0.25 mm, 苏州秀诺光电科技有限公司), 荧光分光光度计 (RF-5301pc, 岛津企业管理中国有限公司), 倒置荧光相差显微镜 (日本 OLYMPUS 公司), 半微量天平 (MS105DU, 瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.2 实验动物

成年雄性莱亨鸡 (动物合格证号 4104035) 24 只, 体重 2.0 ~ 2.5 kg。鸡冠厚度 8 ~ 10 mm, 色泽红润, 颜色均匀, 无溃疡坏死等, 实验前口服水合氯醛 (2 ml/kg) 麻醉。

1.3 实验方法

1.3.1 PpIX 在组织内分布 取 12 只莱亨鸡, 随机分为 5-ALA 组和微针联合 5-ALA 组, 每组 6 只。鸡冠一侧用亚甲蓝和碘伏标记 6 块 0.6 cm × 0.6 cm 区域为实验区域, 对侧不做处理为自身对照。使用灭菌注射用水配制 20% 浓度的 5-ALA, 5-ALA 组: 实验区域放置等面积纱布 2 层, 将 5-ALA 溶液滴于纱布上, 塑料薄膜封包, 锡纸包扎后避光放置; 微针联合 5-ALA 组: 鸡冠先用微针滚磨后, 将 20% 5-ALA 涂抹于实

验区域, 避光放置。两组均在 6 h 内每 h 用皮肤环钻切取一块组织做冷冻切片, 抗荧光衰减封片剂封片后, 倒置荧光相差显微镜下观察 PpIX 分布, 选择黄色激发块 (BP545-580, DM600, BA610-1F), 明视场对应 3 号滤光片, 曝光指数 400, 观察放大 × 200 倍图像, 并拍照记录。

1.3.2 鸡冠组织 PpIX 含量 ①标准液的配制及标准方程确定: 结合张波等^[1]的方法配制标准液。Matlab 多项式拟合得出标准方程: $y=0.0296X^4-0.1450X^3+0.2751X^2-0.2253X+0.0688$; 其中 X 为 PpIX 荧光强度对数值, y 为抽提液 PpIX 浓度 (mg/L), 拟合度 0.9989, 曲线拟合成立。组织 PpIX 含量 (Y_i) = y × 抽提液体积 / 组织质量 (ng/g); ②另 12 只莱亨鸡, 同样随机分为 5-ALA 组和微针联合 5-ALA 组, 两组处理与第一步相同, 从第 2 ~ 7 h 每 h 用皮肤环钻切取一块组织, 电子天平称重后放入陶瓷研钵内, 加入适量液氮碾磨成粉, 加入 1.0 ml hepes buffer, 室温下混匀, 再加入 1.0 ml hepes buffer, 充分混匀后, 移入离心试管中, 加入 5 ml 乙酸乙酯: 冰醋酸 (4 : 1) 混合液, 混匀, 转速 2 000 r/min 离心 1 min, 以除去蛋白质, 取上清液, 并加入 4 ml 0.5 NHCl, 剧烈振摇、混匀, 转速 2 000 r/min 离心 1 min, 静置, 待充分分层后, 取下层液体行荧光分光光度计检测。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 测得结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 不同时间点比较采用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PpIX 组织内分布

选取第 1 ~ 6 h 每 h 切取一块鸡冠组织。由于石蜡切片自发荧光强, 而且在脱蜡处理中会造成 PpIX 丢失与荧光淬灭, 采用冷冻切片后在倒置荧光相差显微镜下观察 PpIX 荧光分布。由于表皮层有自发荧光现象, 拍摄正常鸡冠组织切片作比较, 可观察到正常鸡冠表皮层有微弱的荧光。5-ALA 组和微针联合 5-ALA 组表皮和真皮组织都观察到有弥漫性 PpIX 荧光分布, 真皮中 PpIX 主要集中在血管组织周围, 荧光强度随时间逐渐增强, 3 ~ 5 h 荧光最强, 6 h 开始减弱, 且微针联合 5-ALA 组荧光强度较 5-ALA 组高。见图 1、2。

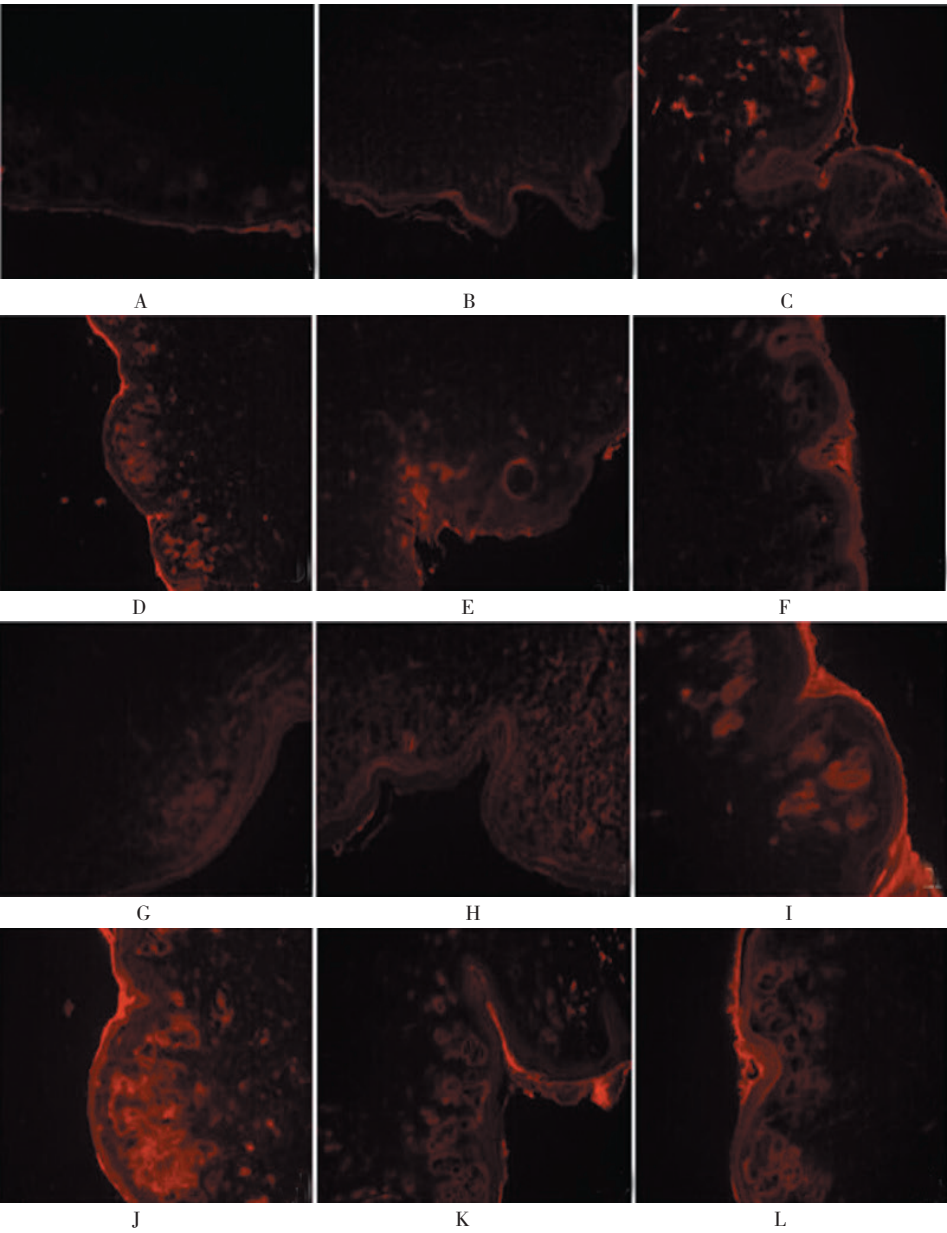
2.2 鸡冠组织 PpIX 含量

根据冷冻切片观察结果, 从第 3 h 开始荧光强



A: 5-ALA 组 3 h 明视场图像, B: 微针联合 5-ALA 组 4 h 明视场图像, C: 正常鸡冠组织切片, 可见表皮层发出微弱荧光, 真皮层未观察到荧光

图 1 部分切片明视场图像和正常对照组图片 (× 200)



A ~ F: 5-ALA 组 1 ~ 6 h 荧光图片, 可见荧光主要分布在表皮层及真皮血管组织中, 荧光强度呈先增高、后降低趋势, 3 ~ 5 h 荧光强度最强; G ~ L: 微针联合 5-ALA 组 1 ~ 6 h 荧光图片, 荧光强度呈先增高、后降低的趋势, 且荧光强度整体较 5-ALA 组高, 下降速度较 5-ALA 组慢

图 2 不同时间 PpIX 在鸡冠组织内荧光分布 (× 200)

度增强,第 6 h 开始下降,因此选择于第 2 ~ 7 h 切取组织测定 PpIX 含量。结果显示,PpIX 含量随时间增加逐渐增多,第 3 h 开始增多,第 4 h 达高峰,第 5 h 开始缓慢下降。微针联合 5-ALA 组和 5-ALA 组第 2 ~ 7 h 静息状态下产生 PpIX 含量的比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点间的 PpIX 含量有差别 ($F=601.005, P=0.000$);②微针联

合 5-ALA 组与 5-ALA 组静息状态下相同时间产生 PpIX 含量有差别 ($F=36.997, P=0.000$),且微针联合 5-ALA 组与 5-ALA 组比较每 h 产生 PpIX 量更多,说明 2 种不同处理方法对生成 PpIX 影响差异有统计学意义;③两组 PpIX 含量变化趋势有差别 ($F=6.390, P=0.000$),说明时间与处理方法的交互作用差异有统计学意义。见附表、图 3。

附表 两组各时间点 PpIX 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/g)

组别	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h
5-ALA 组	151.94 ± 10.33	354.68 ± 5.33	636.27 ± 27.55	530.66 ± 51.91	429.23 ± 24.51	336.02 ± 25.26
微针联合 5-ALA 组	180.88 ± 7.08	389.06 ± 6.36	689.76 ± 41.30	643.67 ± 36.41	470.65 ± 22.41	381.97 ± 8.01

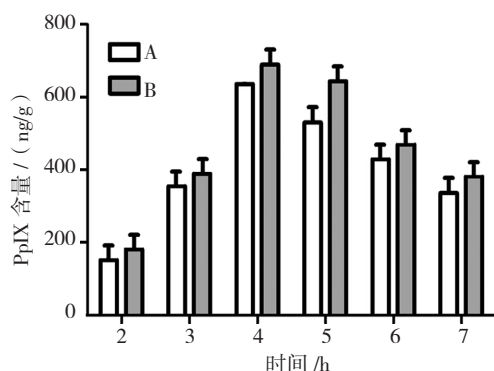


图 3 5-ALA 组 (A) 和微针联合 5-ALA 组 (B) PpIX 含量不同时间变化趋势

3 讨论

1994 年,我国学者吴洋等^[2]研究发现鸡冠与人毛细血管瘤组织结构相似,血红蛋白和皮肤光吸收特性也基本相同,因此用鸡冠作为 PWS 动物模型是可行的。PWS 是一种先天性疾病,病理改变为真皮浅层毛细血管扩张畸形。PDT 是目前治疗 PWS 的最佳方法^[3],它对于不同年龄段和不同类型的 PWS 都显示出很好疗效,且不良反应很少^[4]。但是目前 PDT 治疗 PWS 常用的静脉用光敏剂血卟啉单甲醚 (HMME) 存在着用量大、费用高、治疗后需长时间避光、可引起光敏反应^[4]等缺点,给患者生活带来不便。

5-ALA 是生成亚铁血红素生物合成通路中的 PpIX 的前体物质。PpIX 是一种内源性光敏剂,当暴露于它的作用光谱后,可产生活性氧进而破坏靶细胞。李伟等^[5]采用局部注射或静脉注射的方法在鸡冠中测得高水平 PpIX 聚集,王娇等^[6]研究发现外用 5-ALA PDT 对鸡冠毛细血管有明显损伤,都提示 5-ALA 可用于 PWS 的治疗。PDT 的效果取决于光、光敏剂和

氧 3 个因素,在光和氧一定的情况下,提高光敏剂效果将会对 PDT 疗效产生重要影响。因为 5-ALA 的亲水和有两性离子特性,皮肤渗透存在一些障碍。为提高外用 5-ALA 的渗透,学者们采用了很多方法,如电离子透入、皮内注射、口服和静脉注射等。皮内注射存在着用量不容易控制和用药不均的缺点,而口服和静脉注射有潜在的副作用^[7]。DONNELLY^[8]等通过裸鼠模型研究发现,使用微针可以缩短应用时间和需要的 5-ALA 剂量,而获得皮肤中高水平的 PpIX。受其启发,本研究采用微针处理后外用 5-ALA 的方式,研究 5-ALA 在鸡冠组织中合成 PpIX 量的情况,观察是否可促进 5-ALA 渗透,进而提高 PDT 疗效。

微针一般是指尖端直径在几十微米以下,长度 > 1 ~ 2 mm 的微型针头。它通过短暂、可逆地破坏皮肤的致密屏障角质层,形成与皮肤垂直的微小通道,有效促进药物的经皮渗透和在特定部位蓄积^[9]。通常治疗用的微针阵列长度 < 700 μm,仅穿透角质层,不会深达神经和血管分布丰富的真皮层,故不会产生疼痛感和出血^[10]。李伟泽等^[11]研究发现,微针在皮肤上形成的孔道不会促进细菌进入小鼠机体引起感染,也不会引起新生大鼠皮肤损伤的基因异常表达。光镜下清晰显示,微针处理后 72 h,角质层受损区会自动且完全修复,故皮肤刺激性短暂、轻微^[12]。微针滚磨情况可能是实验的影响因素之一,为了最大程度减少误差,本实验由同一位操作者在相同的环境下(包括温度、湿度等),每只实验动物滚磨相同的次数,用力尽量保持一致。

本实验观察到,5-ALA 代谢产生的 PpIX 主要在表皮层和真皮血管组织中聚集,而 PWS 治疗的靶组织就是毛细血管,微针联合 5-ALA 后再使用一定波

长激光照射,将会更有效地损伤毛细血管。在实验观察的7 h内,3 h两组PpIX含量开始增多,4 h达高峰,5 h时仍有很高浓度,提示4~5 h是PDT最佳照光时间。且微针联合5-ALA组的PpIX含量与单纯5-ALA组比较,差异有统计学意义,说明5-ALA能够进入完整鸡冠皮肤,而微针作用破坏了角质层的完整性,可以更好的促进5-ALA的渗透。

本实验是微针促进外用光敏剂渗透的初步探索,对于微针联合5-ALA后,选择多少能量及功率密度的激光照射更合适,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 张波,张阳德,王绍闯,等. 5-氨基乙酰丙酸诱导原卟啉 IX 在大肠癌模型大鼠血液中积聚的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(23): 53-58.
- [2] 吴洋,吕春堂,赵晋龙,等. 鸡冠、肉垂与国人毛细血管瘤区皮肤光吸收特性的比较研究[J]. 实用口腔医学杂志, 1994, 10(4): 282-284.
- [3] 甄洁,王颖,顾瑛. 鲜红斑痣组织光学模型构建的研究进展[J]. 中国激光医学杂志, 2015, 24(2): 95-100.
- [4] 苑凯华,李勤,张超,等. 脉冲染料激光与光动力疗法治疗鲜红斑痣临床对比分析[J]. 临床皮肤科杂志, 2009, 38(2): 126-128.
- [5] 李伟,周兆平,桥本贤二. 5-氨基酮戊酸代谢产物原卟啉 IX 在葡萄酒色斑动物模型鸡冠中的积聚[J]. 中国美容医学, 2009, 18(1): 60-63.
- [6] 王娇,黄熙. 氨基酮戊酸光动力疗法对鲜红斑痣动物模型鸡冠的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2015, 48(5): 353-357.
- [7] FERNANDA H S, APOSTOLOS G D, WILLIAM A F, et al. Intracutaneous ALA photodynamic therapy: dose-dependent targeting of skin structures[J]. Laser Surg Med, 2011, 43(7): 621-631.
- [8] DONNELLY R F, MORROW D I J, MCCARRON P A, et al. Microneedle-mediated intradermal delivery of 5-aminolevulinic acid: potential for enhanced topical photodynamic therapy[J]. J Control Release, 2008, 129(3): 154-162.
- [9] ITA K. Transdermal delivery of drugs with microneedles-potential and challenges[J]. Pharmaceutics, 2015, 7(3): 90-105.
- [10] KAURA M, ITAA K B, POPOVAB I E, et al. Microneedle-assisted delivery of verapamil hydrochloride and amlodipine besylate[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2014, 86(2): 284-291.
- [11] 李伟泽,张寒,韩文霞,等. 实体微针透皮给药的安全性研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(23): 1818-1822.
- [12] ITO Y, HAGIWARA E, SAEKI A, et al. Feasibility of microneedles for percutaneous absorption of insulin[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 29(1): 82-88.

(张蕾 编辑)