

糖尿病大鼠皮肤的组织学改变及其对糖皮质激素药物经皮吸收的影响

王琳¹, 李国锋^{1*}, 胡文军², 朱晓亮³, 熊璐琪¹, 邓朝辉²

(1. 南方医科大学南方医院药材科, 广东 广州 510515; 2. 广州军区联勤部药品仪器检验所, 广东 广州 510500;
3. 南方医科大学南方医院皮肤科, 广东 广州 510515)

摘要: 探讨糖尿病大鼠皮肤改变及其对糖皮质激素药物氢化可的松经皮吸收的影响。Wistar 雄性大鼠随机分成正常组及造模 1 周组 (W1)、2 周组 (W2)、3 周组 (W3) 和 4 周组 (W4), 每组 6 只, 采用链脲菌素 (STZ, 40 mg·kg⁻¹) 对大鼠进行糖尿病造模, 取大鼠腹部皮肤进行体外透皮扩散实验, 接收液为磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4), HPLC 法测定接收液中的药物量, 计算出药物渗透速率; 将造模不同时间的大鼠皮肤组织做病理切片, 进行 HE 染色并观察是否存在组织学差异。结果发现, 正常组、W1、W2、W3 和 W4 组的渗透速率分别为 (2.39 ± 1.25)、(3.22 ± 1.72)、(3.02 ± 1.89)、(3.63 ± 2.02) 和 (5.00 ± 3.36) μg·h⁻¹·cm⁻²。造模 4 周组与正常组之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 其余各组之间均无显著性差异; 皮肤组织学观察结果显示: 造模 1 周时大鼠腹部皮肤改变并不明显, 1 个月时表皮有变薄的现象, 2 个月时这种现象变得尤为明显。与正常皮肤相比, 患糖尿病后的皮肤能引起药物经皮透过性的增加, 这与糖尿病后发生一定程度的皮肤组织学改变关系密切。因此, 提示糖尿病患者必要时需要调整经皮给药的剂量。

关键词: 糖尿病; 皮肤; 氢化可的松; 经皮吸收

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 01-0114-06

The histological changes of diabetic rats' skin and the effects on the percutaneous absorption of glucocorticoid

WANG Lin¹, LI Guo-feng^{1*}, HU Wen-jun², ZHU Xiao-liang³, XIONG Lu-qi¹, DENG Zhao-hui²

(1. Pharmaceutical Department of Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Institute for Drug and Instrument Control of Guangzhou Military Region, Guangzhou 510500, China;

3. Department of Dermatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: To examine the histological changes of diabetic rats' skin and the effects on the percutaneous absorption of hydrocortisone (HC, a glucocorticoid), male Wistar rats were randomly divided into five groups: control group, diabetes one-week group (W1), two-week group (W2), three-week group (W3), and four-week group (W4), while each group contained 6 rats. Diabetes mellitus (DM) rat model was prepared with the method of streptozocin (STZ, 40 mg·kg⁻¹) intraperitoneal injection. Abdominal skin was cut to carry out an *in-vitro* penetration experiment on an improved Franz diffusion cells, and phosphate buffer (PBS, pH 7.4) was used as receptor solution. The solution was analyzed with HPLC, and then the penetrating rate can be calculated. Meanwhile, rats' abdominal skins of different DM periods were HE stained and made into tissue slices to find if any histological changes occurred. The penetrating rate of control, W1, W2, W3, and W4 groups were 2.39 ± 1.25, 3.22 ± 1.72, 3.02 ± 1.89, 3.63 ± 2.02 and 5.00 ± 3.36 μg·h⁻¹·cm⁻², respectively. There was significant difference between the control and the W4 group ($P < 0.05$), but no significant differences were found between any other two groups ($P > 0.05$). The tissue slices showed that compared to the normal rats' skin, little change

收稿日期: 2009-07-30.

基金项目: 广东省科技攻关资助项目 (2008B060600068); 广东省自然科学基金资助项目 (00197662101126001).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-20-62787724, E-mail: lgfnf@fimmu.com

was observed in one-week DM rats' skin, but the skin of one-month DM rats' skin was observed thinner, and it became much thinner than that of rats with two-month diabetes, especially the epidermis. After making a rat into diabetic, the rats' skin goes through a pathological change, and this change is closely interrelated with the increase of the permeation of HC. Therefore, it is necessary to adjust the dose while some drug was applied on the skin in case of diabetes mellitus.

Key words: diabetes mellitus; skin; hydrocortisone; percutaneous absorption

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是常见的内分泌代谢系统疾病, 随着人们生活水平的提高, 其发病率呈逐年上升的趋势, 对人类健康的威胁正日益显现。众所周知, 糖尿病本身并不可怕, 可怕的是其各类并发症, 而有相当一部分患者都会出现不同程度的皮肤病变。如果仅考虑微循环代谢障碍及其对皮肤胶原蛋白的影响, 几乎所有糖尿病患者均有皮肤受累^[1]。对于糖尿病患者外用皮质激素是否合理, 目前尚无科学系统的评价。

氢化可的松 (hydrocortisone, HC) 是一种常用的糖皮质激素类药物, 具有抗炎、抗过敏、止痒及减少渗出作用, 外用能消除局部非感染性炎症引起的发热、发红及肿胀。本研究中, 选择氢化可的松乳膏作为模型药物, 对正常及糖尿病大鼠进行透皮扩散实验和皮肤组织学观察, 研究正常皮肤与糖尿病皮肤的组织学差异及其对糖皮质激素经皮吸收的影响, 希望对糖尿病患者外用皮质激素药物的合理使用提供一定的参照依据, 提高患者的生活质量。

材料与方法

仪器 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 1100 系列); OneTouch Ultra 2 血糖仪及试纸 (美国强生公司); TK-20A 型药物透皮扩散试验仪 (上海锴凯科技贸易有限公司); OLYMPUS BX51M 金相显微镜; 电动剃毛刀等。

药品与动物 HC 对照品 (Sigma 公司), HC 原料药 (纯度 99.3%, 深圳市益飞商贸有限公司), 链脲菌素 (streptozocin, STZ, Sigma 公司), HPLC 用甲醇为色谱纯, 水为双蒸去离子水, 乳膏基质辅料等其他试剂均为分析纯。SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体重 (250 ± 10) g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 合格证号为 SCXK (粤) 2006-0015。

大鼠分组及糖尿病模型的建立 30 只 Wistar 雄性大鼠, 随机分为 5 组, 其中 4 组为造模组, 即造模 1 周组 (W1), 造模 2 周组 (W2), 造模 3 周组 (W3) 和造模 4 周组 (W4), 另一组为正常对照组。实验动物室温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 (50 ± 5) %, 光照/黑暗

12 h 交替, 环境安静, 给予普通饲料和清洁饮水。用常规饲料喂养 2 周, 第 2 周末所有动物禁食 12 h 后, 于次日清晨空腹状态下测血糖浓度 (blood glucose concentration, BGC), 剔除血糖过高 (>6 mmol·L⁻¹)^[2] 或偏离正常值较大的动物, 称重, 给予大鼠腹腔注射 0.1 mol·L⁻¹ (pH 4.4) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液溶解的 1% 链脲菌素造模, 注射剂量 40 mg·kg⁻¹, 正常对照组大鼠单次腹腔注射等容量的 0.1 mol·L⁻¹ (pH 4.4) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。注射 1 周后, 用血糖仪测尾尖血糖, 以血糖 > 16.7 mmol·L⁻¹ 作为糖尿病成型标准^[3]。

HC 乳膏及其供试品的制备 (1% 含药量)^[4] 处方 HC 原料药 10 g, 硬脂酸 100 g, 单硬脂酸甘油酯 50 g, 液体石蜡 140 mL, 白凡士林 50 g, 甘油 50 g, 十二烷基硫酸钠 1 g, 三乙醇胺 3.5 g, 蒸馏水加至 1 000 g。取 HC 原料药用适量甘油研成糊状备用。

制备工艺 将上述药物水相和油相分别配制并加热至 80 °C (水相温度略高于油相), 将水相缓缓加入油相中, 按同一方向随加随搅拌, 继续搅拌冷却至 60 °C 左右时, 将此混合液逐步加入到氢化可的松的甘油糊状物中, 同法搅拌至冷凝, 即得。所制乳膏呈乳白色, 均匀细腻, 涂擦无刺激性。

乳膏供试品的制备 精密称取适量 (相当于氢化可的松 20 mg) 置烧杯中, 加甲醇约 30 mL, 在水浴上加热使溶解, 再置冰水中冷却, 滤过, 滤液置 100 mL 量瓶中, 如此提取 3 次, 滤液并入量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

体外透皮扩散实验^[5] 在大鼠糖尿病造模后 1 周、2 周、3 周和 4 周时分别取 W1、W2、W3、W4 组的大鼠进行透皮实验, 正常组每周取 1~2 只。将大鼠用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (40 mg·kg⁻¹), 用电剃刀除去腹部鼠毛, 取下已去毛的鼠皮, 放血处死动物。用沾有生理盐水的脱脂棉除去皮下脂肪待用。将大鼠腹部皮肤固定在扩散池中 (一张鼠皮最多可做 4 份样品)。透皮扩散有效内径为 1.8 cm, 接受室体积为 6.5 mL, 接受液为 PBS (pH 7.4)。整个实验过程恒温 (37 ± 0.2) °C, 300 r·min⁻¹ 搅拌。分别称取 HC 乳膏

1.5 g 加于供应室中, 供应室上用保鲜膜封口, 防止水分蒸发。分别于 0.5、1、2、3、5、8 和 12 h 从接受液中取样 0.4 mL, 同时补充相同体积相同温度的新鲜接受液。样品离心 10 min ($15\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液用 HPLC 法测定药物的含量。

HC 含量检测方法的建立

色谱条件 色谱柱: Kromasil C_{18} 柱 ($150.0\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 检测波长 242 nm ; 流动相: 甲醇-水 ($60:40$), 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

对照品溶液的制备 精密称定 HC 20 mg , 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 即得质量浓度为 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液。

标准曲线的绘制 将对照品储备液用甲醇稀释, 得到标准系列, 质量浓度分别为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56、0.78、0.39、0.20 和 $0.10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

精密度和回收率实验 取 200、25 和 $0.78\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 个浓度的对照品, 每日测定 5 次, 重复测定 5 d, 计算日内及日间精密度。分别以 PBS ($\text{pH } 7.4$) 为溶剂配制上述高、中、低 3 个浓度的溶液样品, 每个样品重复测定 3 次, 计算回收率。

组织学改变 分别取正常、造模 1 周、1 月及 2 月 (同批造模) 的大鼠腹部皮肤进行病理切片并做 HE 染色后观察。

统计学处理 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 统计软件分析处理数据, 采用单向方差分析 (One-Way ANOVA) 进行统计学处理。

结果

1 大鼠体重及血糖变化

造模前, 大鼠皮毛光泽油亮、顺滑, 精神状态佳, 行动敏捷, 粪尿正常。STZ 注射 1 周后, 大鼠发生较明显变化, 精神渐萎靡, 活动明显减少, 皮毛干燥粗糙, 尿量增多。造模组体重明显下降 (图 1)。

造模前各组血糖均在正常范围内, 各组间血糖比较均无显著性差异 ($P > 0.05$); 造模后第 4 天, 发现血糖有显著性升高, 之后维持在较高水平; 而正常组大鼠血糖正常, 造模组与正常组之间血糖比较均有显著性差异 ($P < 0.01$)。结果见图 2。

2 标准曲线及精密度、回收率、乳膏药物含量检测结果

HPLC 结果显示, 空白对照无干扰, HC 对照品、样品及空白对照液图谱见图 3。

HC 的标准曲线方程为 $A = 57.790C + 48.230$ ($r^2 = 0.9999$), 说明其质量浓度在 $0.10 \sim 200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内其

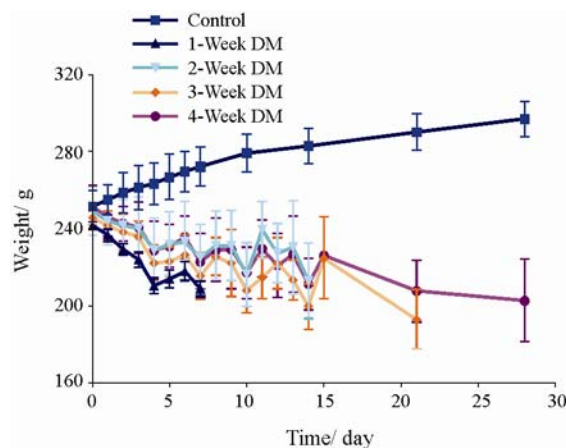


Figure 1 The weight-time curve of rats. DM: Diabetes mellitus

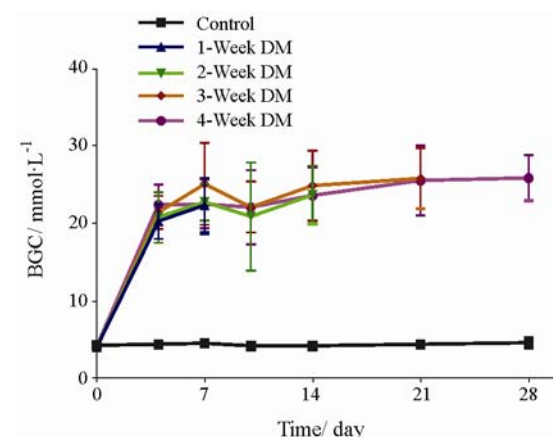


Figure 2 The blood glucose concentration (BGC)-time curve of rats

峰面积与浓度呈良好的线性关系。RSD%均 $< 2\%$, 说明系统稳定性良好, 回收率均 $> 90\%$, 说明方法可靠, 结果见表 1。

Table 1 Precision and recovery of hydrocortisone (HC)

Concentration $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /% ($n = 5$)		RE/% ($n = 3$)
	Intra-day	Inter-day	
200	0.59	1.11	96.17 ± 0.13
25	0.39	1.71	94.72 ± 0.41
0.78	1.66	1.93	90.45 ± 1.85

根据标准曲线求得乳膏供试品中药物含量为 21.01 mg , 为标示量的 105.47% , 符合药典规定的 $90\% \sim 110\%$ 标示量区间。

3 透皮实验结果

测得的药物浓度按下列公式计算单位面积累计透过量 (Q)。

$$Q = [C_n \times V + \sum C_i \times 0.4] / A$$

方程式中, V : 接受池的体积; C_n : 第 n 个取样点测得药物的浓度; A : 有效扩散面积 (本实验中为 2.543 cm^2)

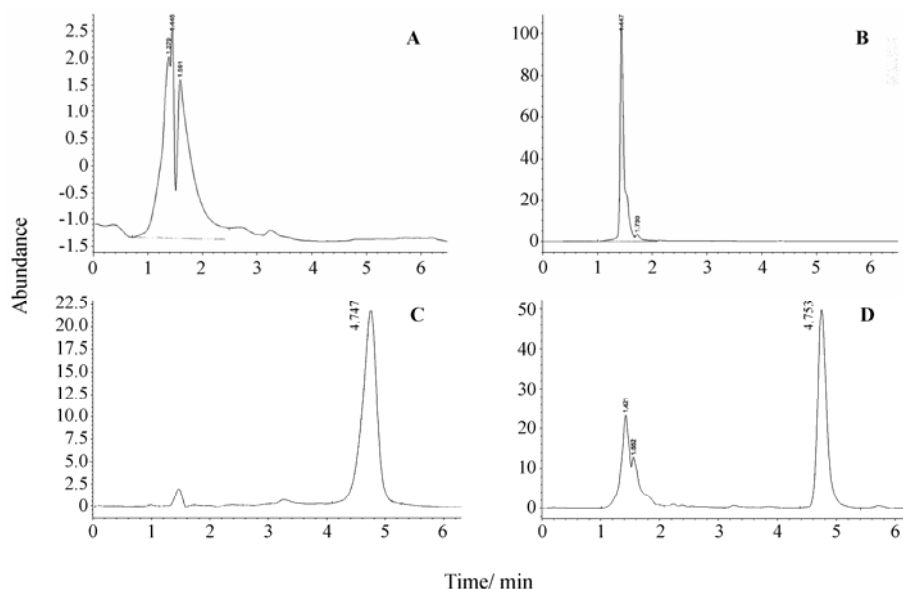


Figure 3 HPLC Chromatograms of HC. A: Blank PBS; B: Receptor liquid of blank cream; C: Reference substance; D: Sample (receptor liquid of HC cream)

cm^2); C_i : 第 i ($i \leq n-1$) 个取样点测得的药物浓度。

从图4可看出,与正常组相比,造模1~4周组大鼠的药物透过量均有不同程度的增加,尤以造模4周时为明显。将时间与单位面积累计透皮量进行回归,即得回归方程。图中各曲线回归方程分别为 $Q_C = 2.349t - 1.469$ ($r = 0.998\ 8$); $Q_{1w} = 3.192t - 1.125$ ($r = 0.999\ 7$); $Q_{2w} = 2.895t - 0.357$ ($r = 0.999\ 9$); $Q_{3w} = 3.619t - 0.030$ ($r = 0.998\ 6$); $Q_{4w} = 4.539t + 0.038$ ($r = 0.999\ 2$)。回归方程斜率即为药物渗透速率 (penetrating rate, PR, $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$), 直线在 x 轴上的截距即为滞后时间 (T_{lag})。正常组及 W1、W2、W3、W4 组的滞后时间分别为 0.63、0.35、0.12、0.01 和 -0.01 h。

求算出各个样本的渗透速率后进行统计分析,只有正常组与 W4 组的药物经皮渗透速率有差异 ($P < 0.05$), 其余各组之间均无显著性差异 ($P > 0.05$), 结果见表 2。

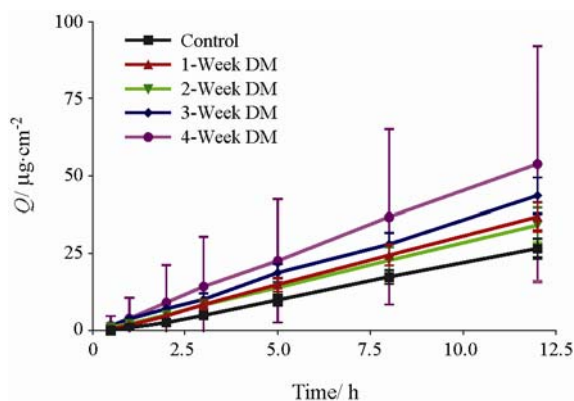


Figure 4 The HC permeated amount (Q)-time curve chart

Table 2 Penetrating rate of HC through the rats' skin

Group	PR/ $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	n
Control group	2.39 ± 1.25	24
1-Week DM group	3.22 ± 1.72	21
2-Week DM group	3.02 ± 1.89	19
3-Week DM group	3.63 ± 2.02	20
4-Week DM group	$5.00 \pm 3.36^*$	21

* $P < 0.05$ vs control group

4 组织学改变

从图5中可看出,给予DM 1周时,大鼠腹部皮肤改变不明显;1个月时,大鼠表皮组织变薄,表皮细胞层次欠清晰,部分表皮缺乏复层排列;2个月时,表皮变得更薄,复层排列基本消失,皮下脂肪进行性萎缩或消失。

讨论

糖尿病的并发症是引起糖尿病患者致死、致残的主要原因,在各种糖尿病诱发的并发症中,皮肤病的发病率非常高。据有关资料显示,糖尿病患者罹患皮肤病的比例约占25%~30%。在临床上,以皮肤病为首发症状或主诉前来就诊的糖尿病患者,约占皮肤科门诊患者总数的2%~3%。

然而,对于糖尿病患者而言,体内皮质激素的增加,会抑制胰岛素在血液中的分泌^[6, 7],将加重各种并发症的严重程度,极大的降低患者的预期寿命。此外,这些药物的使用也具有许多严重副作用^[8, 9]。所以,糖尿病患者忌口服使用皮质激素。但在皮肤病的对症治疗中,经常会局部使用皮质激素。Spravchikov

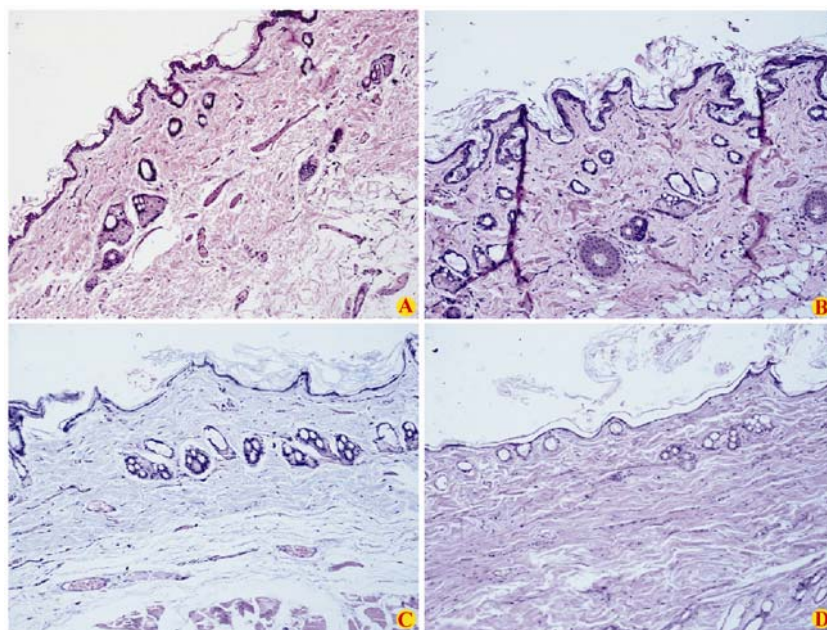


Figure 5 Observation of tissue slices of rats' abdominal skin ($\times 200$). A: Normal rat; B: 1-Week DM rat; C: 1-Month DM rat; D: 2-Month DM rat

等^[10]研究发现, DM 皮肤糖含量的明显升高, 有可能打破体内表皮细胞“增殖与分化的平衡”。这不仅可能导致组织细胞生存空间结构发生改变, 而且也会引起细胞赖以生存的微环境理化性质的紊乱, 这表明 DM 皮肤组织在无外源性创伤的情况下已处于病理状态^[11]。因此, 糖尿病患者外用皮质激素是否合理, 值得重视。

关于糖尿病大鼠模型是否成功的标准并非很明确, 只要出现多饮多食多尿等现象可认为造模成功。也有报道认为血糖 $>11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[12, 12] 甚至更低^[11, 13] 即可认定造模成功。在本研究中, 采用 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ STZ 建立大鼠 1 型糖尿病模型。有文献^[13]报道采用此剂量成功率较低, 但本实验研究结果证明此注射剂量完全可行, 成功率达到 100%。与很多文献报道的较高剂量相比, 如普遍认定的给药剂量为 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[14], 效果同样显著甚至更好。造模成功与否与大鼠禁食时间长短、STZ 药物保存及配制过程中的避光冰浴操作、腹腔注射给药速度和环境因素等均有关。禁食时间越久, 越容易造模成功, 但同样大鼠易死亡; STZ 很不稳定, 遇水极易分解, 所以要避光保存及操作, 配置时 also 需要注意在冰浴操作; 腹腔给药时, 速度不可过快, 否则容易造成大鼠死亡, 过慢也可能影响造模成功率。一般来说, 从 STZ 配制溶液开始 30 min 内完成注射。

透皮实验结果中显示, 与正常组相比, 糖尿病 1~4 周组 HC 的透过量有不同程度的增加, 在糖尿病

4 周时其透过量最多, 其渗透速率最大, 说明在造模 3~4 周后糖尿病大鼠皮肤可能开始发生较明显改变, 考虑与皮肤生长更新周期有关。人的皮肤更新周期一般为 28 d, 大鼠也存在皮肤更新的问题, 所以在 1 周时大鼠皮肤改变并不明显, 而随着时间的增加表皮的变化越来越明显。此外, 还发现, 随着大鼠造模时间的增加, HC 透皮的滞后时间逐渐缩短, 说明糖尿病皮肤确实产生了一定的损伤, 致使药物经皮透过发生改变。皮肤病理切片中, 糖尿病大鼠表皮组织变薄, 这也是导致氢化可的松透过糖尿病大鼠皮肤速率增加的直接原因之一。考虑上述情况, 类比人的皮肤可能存在相同问题, 建议糖尿病患者在使用 HC 等外用皮质激素类药物时, 酌情考虑药物的使用剂量。有关糖尿病大鼠使用 HC 后对血药浓度及皮下组织药物的分布正在实验研究中。

References

- [1] Hou MH, Zhu WY. Diabetes mellitus and skin diseases [J]. J Clin Dermatol (临床皮肤科杂志), 2006, 35: 122-124.
- [2] Shi J, Zhang YD, Lin XJ, et al. Effects of hyperglycemia and insulin intervention on the cerebral injury after ischemia-reperfusion in rats [J]. J Clin Neurol (临床神经病学杂志), 2007, 20: 284-287.
- [3] Lu YJ, Lian ZC, Zhong Y, et al. Detection of gastric emptying and helicobacter pylori in 30-weeks diabetic rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin (中国实验动物学报), 2007, 15: 313-316.

- [4] Yong DQ. New Hospital Preparation Techniques (新编医院制剂技术) [M]. 2nd ed. Beijing: People's medical publishing house, 2004: 271.
- [5] Li GF, Quan YS, Kamiyama F, et al. Influence of different layers of skin on the percutaneous absorption of drugs with different lipophilicity [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2002, 37: 833-836.
- [6] Lambillotte C, Gilon P, Henquin JC. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An *in vitro* study of dexamethasone effects in mouse islets [J]. J Clin Invest, 1997, 99: 414-423.
- [7] Ullrich S, Berchtold S, Ranta F, et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion [J]. Diabetes, 2005, 54: 1090-1099.
- [8] Wong VK, Croce CD, Schonfeld S, et al. Use and abuse of topical corticosteroids in infections of the skin and related structures [J]. J Drugs Dermatol, 2003, 2: 268-276.
- [9] Marney AM, Brown NJ. Aldosterone and end-organ damage [J]. Clin Sci, 2007, 113: 267-278.
- [10] Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, et al. Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications [J]. Diabetes, 2001, 50: 1627-1635.
- [11] Lin WD, Lu SL, Chen XF, et al. Histochemical changes of skin in diabetic rats [J]. Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志), 2005, 21: 230-233.
- [12] Li CR, You XF, Jiang JD. Advance in diabetes animal models [J]. Chin J Comp Med (中国比较医学杂志), 2005, 15: 59-63.
- [13] Cheng Y, Wei AY, Li YG. Establishment of a rat model of diabetic erectile dysfunction [J]. J South Med Univ (南方医科大学学报), 2008, 28: 564-566.
- [14] Zhang B, Cheng G, Liu HY, et al. Establishment of a diabetic-hypertensive rat model [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 575-580.