药 学 文章编号:0253-3626(2009)04-0463-03

丙酸氯倍他索脂质体的药效和安全性评价

谭 敏[1],胡 敢[1],王 昆[2]

(1. 重庆医科大学附属第二医院皮肤科,重庆 400010;2. 重庆科美药友公司,重庆 401121)

【摘 要】目的:考察丙酸氯倍他索(Clobetasol propionate liposomes,CP)脂质体对豚鼠慢性湿疹模型的疗效,并进行安全性评价。方法:采用小剂量二硝基氯苯(Dinitrochlorobenzene)反复刺激豚鼠右耳建立豚鼠慢性皮炎湿疹模型;外用 CP 脂质体、CP 乳膏、空白脂质体和生理盐水,2 次 /d,连用 14 d,以真皮炎症细胞计数和两耳肿胀度差值为指标,反映 CP 脂质体对湿疹模型的疗效。豚鼠右侧腹分别给予 CP 脂质体和 CP 乳膏,1 次 /d,连续 8 周,计算并比较各组表皮细胞层数,评价其安全性。结果:脂质体能有效减少真皮内浸润的炎细胞数量和耳朵肿胀度。该制剂连续应用 8 周,不引起表皮细胞层数减少。结论:CP 脂质体较传统 CP 乳膏疗效更好,安全性更高。

【关键词】丙酸氯倍他索;脂质体;慢性皮炎 - 湿疹

【中国图书分类法分类号】R758.23;R965 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-16

Pharmacodynamics and safety evaluation of clobetasol propionate liposomes

TAN Min, et al

(*Department of Dermatovenereology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate pharmacodynamics and safety of clobetasol propionate (CP) liposomes on guinea pigs with chronic dermatitis-eczema. *Methods*: Right ears of guinea pigs were repeatedly challenged with a small dose of dinitrochlorobenzene (DNCB) for the establishment of model of chronic dermatitis-eczema. The curative effect of CP liposomes was evaluated by cellular infiltrates in dermis and ear swelling thickening. Guinea pigs were given CP liposomes and CP cream on the right abdominal once a day for eight weeks, and the epidermal cell layers was calculated and compared. *Results*: CP liposomes could effectively reduce the number of cellular infiltrates in dermis and ear swelling thickening. This preparation for the application of eight weeks did not cause reduction of epidermal cells layers. *Conclusion*: CP liposomes is more effective on guinea pigs model of chronic dermatitis-eczema with less side effects.

【Key words】Clobetasol propionate; Liposomes; Chronic dermatitis-eczema

丙酸氯倍他索(Clobetasol propionate,CP)是一种外用皮质类固醇制剂,适用于慢性湿疹、银屑病、神经性皮炎等多种皮肤病。但有研究发现,CP 乳膏经多次给药后,血药峰浓度和谷浓度呈上升趋势,说明 CP 乳膏中的 CP 在体内有累积作用[1]。因此,长期反复应用 CP 乳膏,会引起严重的副作用,主要有:用药部位皮肤萎缩、对皮肤屏障功能的损害,以及肾上腺皮质形态和功能的抑制[2]等。因此,有理由研制一种高效、安全的 CP 外用新剂型。

脂质体是一种具有类似生物膜双分子层结构的微囊,是近年来研究较多的新型药物载体。脂质体经皮给药时,可通过水合作用、融合机制和穿透作用促进药物透过皮肤角质层[3],在表皮-真皮之间形成药物贮库,使药物最大量地保留在皮肤中,尽量少地进入血液循环,减少药物吸收入血引起的全身毒副反应;在局部,通过其双膜结构对病变部位实现缓释,延长药物作用时间,起到提高药物治疗指数的作用,还减少了药物一次大量释放引起的局部毒副反应[4]。除此之外,脂质体还具有皮肤靶向性,毒性低,刺激性小,本身可生物降解等优点,是皮肤局部给药较理想的载体。

因此,本实验将 CP 包被在脂质体中,制备成 CP 脂质体制剂,前期体外透皮(Franze 扩散池)实验已经证实:CP 脂质体较传统乳膏有更优越的透皮性能,累积在皮肤层的药量明显高于乳膏组,而吸收液中的药量在各个检测时间点均低于乳膏组,表明脂质体可使药物最大量地保留在皮肤中,而尽量少地进入血液循环。本试验为 CP 脂质体的活体研究,以传统 CP 乳膏作为对照,对新型 CP 脂质体制剂的

作者介绍:谭 敏(1983-),女,硕士,
研究方向:脂质体在皮肤疾病中的应用。

通讯作者:胡 敢,男,副教授,E-mail: granthg@163.com。

基金项目:重庆市科技攻关计划项目(编号:CSTC,2006AB5011)。

药效和安全性进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料

CP 脂质体制剂(0.01%)和空白脂质体(重庆科美药友公司提供),本试验用 HPLC 法测得脂质体的包封率为(90.1 ± 2.3)%;恩肤霜(0.02%CP 乳膏,重庆科瑞制药有限责任公司,批号:070402);2,4- 二硝基氯苯(DNCB)(中国上海试剂一厂,批号:060810);纯白短毛豚鼠 70 只,雌雄各半,体重 250~300 g,购于重庆医科大学实验动物中心;显微摄像系统:OLYMPUS I×71 倒置式研究型显微镜(日本)。

1.2 方法

1.2.1 CP 脂质体的制备 精密量取丙酸氯倍他索(CP)10 mg,卵磷脂(LC)4 g,胆固醇(CH)1 g,共溶于 15 ml 乙醇中,45℃条件下旋转蒸发,挥干成膜。加入 pH=7.5 的 PBS 缓冲液 20 ml,50℃下,搅拌水化 60 min,得乳白色脂质体混悬液。进一步通过超声波细胞破碎仪进行 1 min 处理,得到半澄清液体,PBS 缓冲液补足体积到 100 ml,即得浓度为 0.01%的 CP 脂质体。测得包封率为(90.1 ± 2.3)%。

1.2.2 建立豚鼠慢性皮炎湿疹模 参照 Boyera[5]方法造模。取豚鼠 50 只,每只颈背部剪毛 2 cm^2 大小,5%DNCB 溶液 25 μl 外涂致敏。2 周后,每只豚鼠右耳内侧以 0.1%DNCB 溶液 100 μl 作为激发,每周 1 次,连续 4 次。第 4 次激发 3 d 后,随机处死 10 只豚鼠,取右耳组织作病理切片,并在光学显微镜下观察切片结果。

1.2.3 药效试验 将剩余的 40 只豚鼠皮炎湿疹模型随机分为四组,A 组:CP 脂质体组;B 组:CP 乳膏组;C 组:脂质体基质组;D 组:生理盐水组,每组 10 只,分别外用 0.01%CP 脂质体,0.02% CP 乳膏,脂质体基质和生理盐水,2 次 /d,连续 14 d。观察指标:(1)停药 1 d,外径千分尺单盲法测量每只豚鼠左右耳廓中部厚度,计算其差值,以反映炎症程度。(2)断颈处死豚鼠,取约 0.5 cm^2 右耳组织块,10% 福尔马林固定,苏木精—伊红(HE)常规染色,光学显微镜下观察病理切片,分别记数 10 个高倍视野真皮炎细胞数,取其平均值。

1.2.4 安全性评价(重复给药实验) 取豚鼠 20 只,右侧腹 8% Na_2S 脱毛,面积约 6 cm,将豚鼠随机分为 2 组,A 组:CP 脂质体组,B 组:CP 乳膏组,于脱毛处分别外用以上药物,1次 /d,连续 8 周。观察指标:连续用药 8 周后,将豚鼠断颈处死,取用药部位中间皮肤 0.5 cm^2 大小组织块,标本用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋切片,HE 常规染色,光学显微镜下,分别记数 10 个高倍视野表皮细胞层数,取其平均值。

1.3 统计学方法

所得数据用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析,组间差异采用 q 检验,设定 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 豚鼠慢性皮炎-湿疹模型

0.1%DNCB 溶液激发 3 次后,豚鼠右耳轻度肿胀增厚,少许脱屑;第 4 次激发后右耳肿胀、增厚明显,表面结痂,组织病理显示:表皮增厚,细胞层数增加,可见角化过度,灶性角化不全,真皮内炎性细胞浸润明显,以单个核细胞为主。无论肉眼还是镜下表现,均与人类慢性湿疹表现相似。

2.2 药效试验

CP 脂质体组真皮内浸润的炎细胞数量约为 CP乳膏组的一半,在减少真皮内浸润的炎细胞数量方面,二者差异有统计学意义($P<0.05$);在左右耳厚度差值方面,CP 脂质体组和 CP 乳膏组差异无统计学意义($P>0.05$),但较空白脂质体组和生理盐水组均有明显改善,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 1。

2.3 重复给药实验

连续用药 8 周后,CP 乳膏组豚鼠右侧腹皮肤明显变薄,毛细血管扩张,光镜下表皮变薄,细胞层数减少,真皮 - 表皮连接处变扁,而 CP 脂质体组表皮厚度和细胞层数与正常表皮相似,约 4 ~ 6 层,且排列有序,见图 1 ~ 3。CP 脂质体组在整个用药过程中,未出现红斑及其他刺激反应,在表皮细胞层数方面,CP 乳膏组较 CP 脂质体组明显变薄, 差异有统计学意义($P<0.05$)。不同药物对表皮细胞层数的影响见表 2。

表 2 不同药物对表皮细胞层数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 n	表皮细胞层数
CP 脂质体组	10	4.93 ± 0.75^{a}
CP 乳膏组	10	2.00 ± 0.44

注:与 CP 乳膏组进行比较,a:$P<0.05$

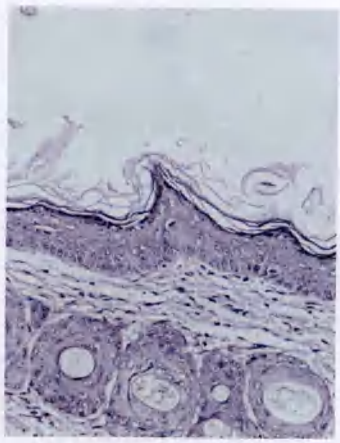
3 讨 论

湿疹是一种以反复发作、瘙痒剧烈和多形性损害为特征的迟发型变态反应性皮肤病,目前多以外用糖皮质激素对症

表 1 不同药物对两耳肿胀度差值和真皮内炎细胞数的影响($\bar{x} \pm s$)

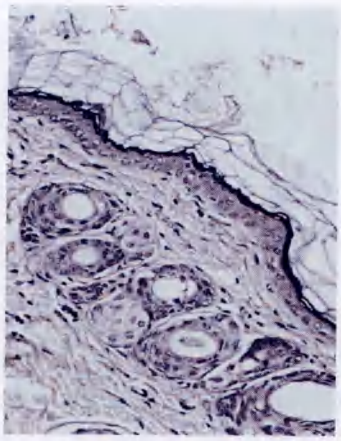
组别	样本数(n)	两耳肿胀度差值(mm)	真皮炎细胞数量(HPF)
CP 脂质体组	10	$0.15 \pm 0.04^{a,c}$	$9.46 \pm 0.48^{a,b}$
CP 乳膏组	10	0.14 ± 0.05	18.52 ± 1.94
空白脂质体组	10	0.19 ± 0.05	40.77 ± 3.08
生理盐水组	10	0.19 ± 0.02	38.64 ± 2.29

注:与空白脂质体组和生理盐水组比较,a:$P<0.05$;与 CP 乳膏组比较,b:$P<0.05$,c:$P>0.05$



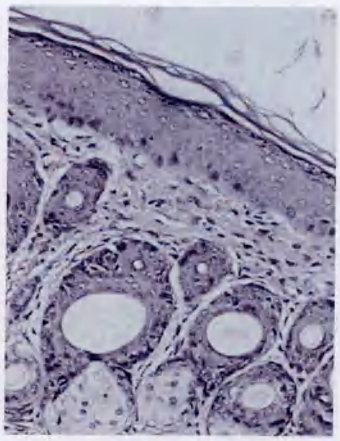
细胞层数约 4～6 层

图 1 正常表皮（HE 染色×400）



表皮变薄，由 2～3 层细胞组成，基底细胞胞体变小

图 2 0.02%CP 乳膏组（E 染色×400）



表皮由 4～6 层细胞组成，基底细胞排列整齐而紧密，与正常表皮相似

图 3 0.01%CP 脂质体组（HE 染色×400）

治疗为主，但该病病因复杂，容易反复，长期反复使用此类药物会出现一系列局部和全身的毒副反应，这使得湿疹成为一难治病。CP 是治疗慢性湿疹的经典外用药物，属于超强效类糖皮质激素，在临床应用中疗效较好，但易经皮吸收入血，在体内有累积作用，患者长程使用耐受性差，副作用大，目前在临床上应用已较少，逐渐被新一代毒副作用较小的激素类外用药所取代。

脂质体作为一种新型的药物载体，在呼吸、血液、肿瘤等多种系统疾病的治疗中已获得了广泛的应用，取得了相当大的进展，其作为经皮给药的载体，是近年来研究的热点。脂质体经皮给药时，能与细胞膜相互作用，减弱表皮屏障作用，促进药物透过皮肤角质层，缩短药物透过表皮的时间，增加累积在皮肤深层的药量。药物经脂质体包封以后，粘滞度增高，弥散速度减慢，不能由局部直接弥散入循环系统，而是在局部形成一药物贮库，缓慢释放药物，使得病变组织中药物浓度恒定，一可以延长药物作用时间，二可以减少局部副反应。因此，近年来脂质体在皮肤疾病的治疗研究方面获得了很大的进展。Dubey 等[6]用脂质体包封 MTX（1.0% w/v），通过体外透皮研究发现：脂质体包封的 MTX 在皮肤的滞留量和穿透入表皮的时间分别为为（57.2 ± 4.34）μg/（h·cm²）和 0.9 h，而单纯 MTX 溶液则为（2.2 ± 0.72）μg/（h·cm²）和 2.9 h。由此可见：脂质体能明显增加累积在皮肤中的药量，并缩短药物透过表皮的时间。Paolino 等[7]在人体皮肤红斑模型中应用甘草酸铵脂质体制剂，发现其抗炎效果较传统药物得到明显改善。不仅如此，脂质体本身还具有无毒、不产生皮肤刺激性等优点，是目前经皮给药系统最理想的载体材料之一。

本实验以脂质体为载体，CP 为主要成分，制备成浓度为 0.01%的 CP 脂质体制剂，以传统 CP 乳膏作为对照，应用豚鼠慢性接触性湿疹模型对该新型制剂的药效和安全性进行初探，以期最终成功研制高效、低毒的 CP 外用新剂型，使湿疹的治疗能够摆脱目前局部应用激素类药物副作用过大的困境。本实验以小剂量 DNCB 反复刺激豚鼠右耳，成功复制了豚鼠慢性接触性湿疹模型，通过药效试验证实：CP脂质体组真皮内浸润的炎细胞数量约为传统 CP 乳膏组的一半，表明其抗炎效果明显优于传统 CP 乳膏；在改善两耳厚度差值方面，二者无明显差异。安全性试验证实了：CP 脂质体制剂在 2 个月长过程的重复给药过程中，未观察到红斑、水肿等明显的刺激反应，也未引起表皮萎缩、表皮细胞层数减少等现象，而 CP 乳膏组出现了明显的表皮细胞层数减少。因此，本实验初步结果表明：新型 CP 脂质体制剂对豚鼠接触性湿疹模型的疗效明显优于传统的 CP 乳膏，且长程使用安全性高，是一种高效的、安全的皮肤局部用药制剂，为临床应用提供了理论依据。本实验只是前期动物实验，其体内药代动力学还需进一步研究，为后期临床试验提供依据。

参 考 文 献

[1] 陈 琼，朱学骏.丙酸氯倍他索乳膏家兔体内药代动力学[J]. 中国药理学通报，1998，14(5)：447-449.

[2 王振超，黄壮雄.复方丙酸氯倍他索乳膏对小型猪皮肤长程涂布的毒性观察[J]. 广东医学院学报，2004，22(6)：563-565.

[3] 罗淑青，刘晓昱. 药物经皮给药新型载体的研究进展[J].药学实践杂志，2006，24(5)：257-260.

[4] 杨 静，周绍兵.载药脂质体的研究与应用进展[J].现代生物医学进展，2007，7(10)：1597-1600.

[5] Boyera N，Cavey D，Bouclier M，et al. Repeated application of dinitrochlorobenzene to the ears of sensitized guinea pigs：a preliminary characterization of a potential new animal model for contact eczema in humans Skin[J]. Pharmacol，1992，5(3)：184.

[6] Dubey V，Mishra D，Dutta T，et al. Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes[J]. Journal of Controlled Release，2007，123(2)：148-154.

[7] Paolino D，Lucania G，Mardente D，et al. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate：in vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers[J]. Journal of Controlled Release，2005，106(1-2)：99-110.

（责任编辑：冉明会）