

- D, eds. *Oxygen radicals in chemistry and biology*. Berlin: de Gruyter 1984 : 137-45
- 7 Bratigan BE, Rosen GM, Chai Y, Cohen MS. Do human neutrophils make hydroxyl radical? *J Biol Chem* 1986; 261 : 4426
- 8 Bannister JV, Bannister WH. Production of oxygen-centred radicals by neutrophils and macrophages as studied by electron spin resonance (ESR). *Environ Health Perspect* 1985; 64 : 37
- 9 Bachur NR, Gordon SL, Gee MV. Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. *Mol Pharmacol* 1977; 13 : 901
- 10 Doroshow JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. *J Clin Invest* 1980; 65 : 128

* * * * *

中国药理学报 · *Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Sep; 10 (5) : 447-449

月桂氮革酮对小鼠皮肤和肉瘤 180 细胞膜超微结构的影响

周金煦、戴志强、俞月桂、许建一、袁幸菊、沈新礼¹
(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

Influence of laurocapram on ultrastructures of mouse skin and sarcoma 180 membrane

ZHOU Jin-Xu, DAI Zhi-Qiang, YU Yue-Gui, XU Jian-Yi, YUAN Xing-Ju, SHEN Xin-Li¹
(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT Laurocapram (Lau), 1-dodecyl-hexahydro-2 H-azepin-2-one, (azone) is a new percutaneous penetration enhancer. However, the mechanism of its action for absorption promoter of other agents is still unknown. In this paper the effect of Lau on ultrastructures of skin surface and tumor cell membrane were studied. Lau (2%) suspension was applied to abdominal skin of ICR/JCL, C57 BL mice or one side of abdominal skin of nude mouse with drug and other side with the vehicle solvent once daily for 2-3 d. The skin was excised at 4 h after the final medication for examination under scanning electron microscope

(SEM). The results showed the numerous small infolding lines which divided the skin surface into small areas with vesiculation and peeled the epidermal surface to form a few minor holes. The cuticles of the hair shaft dropped off and became thinner. Numerous desquamated cells around the orifice of the hair were fractured, detached and widened.

Sarcoma 180 cells were incubated with Lau 25 µg/ml at 37°C for 4 h. The microvilli of some cells dropped off and the size of villi became thinner and shorter. The top of some villi of the cells appeared occasionally thick to make the profile as a bat. The surface of numerous naked cells became rugged and rough and showed many black minor holes in the area of denuded cell membrane or dropped microvilli. More

Received 1988 Sep 22 Accepted 1989 Mar 12
¹ Drug Analysis and Test Institute of Shanghai Pharmaceutical Administration, Shanghai 200434, China

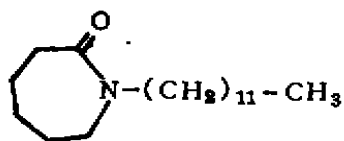
than 100 holes in the exposed surface of the naked cell were seen. It seemed that the Lau drilled holes on the biomembrane and enlarged the orifice of hair follicles and thus enhanced the transdermal absorption.

KEY WORDS laurocapram; skin; cell membrane; sarcoma 180; scanning electron microscopy

摘要 月桂氮萘酮 (laurocapram, Lau) 2% 外敷小鼠腹部皮肤 2—3 次后 4 h, 表皮可见小泡鼓起, 皮屑和裂隙增多, 毛干小皮脱落变细, 毛囊口增宽。Lau 25 μg/ml 与肉瘤 180 细胞温育 4 h, 部分细胞表面微绒毛脱落减少或呈裸细胞, 显露绒毛或表面膜剥脱处有数量不等的小黑洞形成。提示 Lau 对生物膜的钻孔作用及拓宽毛囊口外径 与其增加其他药物的透皮吸收有关。

关键词 月桂氮萘酮; 皮肤; 细胞膜; 肉瘤 180; 扫描电子显微镜检查

月桂氮萘酮 (Lau) 化学名为 1-正十二烷基氮萘六氢-2-氢-2-酮 (1-dodecylhexahydro-2H-azepin-2-one), 国外又名 azone, 是新型高效皮肤渗透促进剂, 对多种不同类型药物 (包括抗菌素、甾体激素和抗癌药等) 均有明显的促进透皮作用⁽¹⁻³⁾。在皮肤病或皮表局部病灶治疗的外用药剂中添加 Lau 有可能大大降低药物的剂量, 便可达到局部有效的治疗浓度。这样既可减轻药物的毒副作用, 又可节约药量。由于 Lau 又可促进 [¹⁴C] 乙双吗啉参入癌细胞 (未发表资料), 为此本文采用扫描电镜观察对皮肤和癌细胞膜表面超微结构的改变, 期望有助于其促进膜渗透性机理的阐明。



Laurocapram

MATERIALS AND METHODS

Lau 为无色无臭透明油状液, 不溶于水,

可溶于有机溶剂或油中, 系上海月桂氮萘酮科研组试制合成和馈赠。以酒精和丙二醇配制成 2% 溶液供外用。

皮肤 ICR 或 C 57 BL 近交系小鼠各 4 只, 体重 23 ± SD 2 g。于实验前 3 d 腹部皮肤硫化钠脱毛。实验时将小鼠四肢固定, 腹部约 2 × 2 cm 外涂 2% Lau 0.5 ml, 约 30 min 药液自然干燥后放回笼内, 每天 1 次, 共 2—3 d。于末次涂抹后 4 或 24 h, 颈椎拉脱处死, 剖取皮肤放在生理盐水中漂洗后剪成 1—2 mm² 小块制样。为排除个体差异, 又选用 27.2 ± 1.6 g 裸鼠 5 只, 腹部一侧涂 Lau 另一侧涂溶剂对照, 同样涂抹 2 d 后 4 h 解剖皮肤作扫描电镜制样。

肉瘤 180 瘤细胞 抽取传代 d 7 腹水瘤, 生理盐水洗涤后加 RPMI 1640 稀释至 5 × 10⁵/ml 分装试管中, 分别加终浓度为 25, 50, 100 和 200 μg/ml 的 Lau 药液和等量溶剂对照液。37℃ 温育 4 h 后 120 × g 离心, 沉淀细胞再洗涤 1—2 次, 分别置于 2.5% 戊二醛固定 4 h 以上, 二甲胍酸钠缓冲液洗 2 次后, 1% 锇酸固定 1—2 h, 而后逐级乙醇脱水及醋酸异戊酯置换, CO₂ 临界点干燥 IB-3 离子溅射仪喷金后, 用 Sigma-1 型扫描电镜作超微结构观察。

RESULTS

Lau 对小鼠皮肤表面超微结构的改变 给药组皮肤表面有较明显水肿, 可见表皮的小内褶将皮表分隔为许多肿胀的小区, 其上可见圆形、卵形或不规则形鼓起小泡, 呈散在或成堆分布 (Fig 1 A, Plate 3)。部分表皮出现许多小裂隙, 状似空穴, 直径多在 0.1—0.4 μm (Fig 1 B), 较大空穴长径可达 2—4 μm, 给药组, 裸鼠毛发稀疏, 外形不规整, 毛小皮明显损坏或成片地脱落, 从而使毛干变细, 表面模糊不清 (Fig 1 C)。毛囊口周围表面角化明显, 翘起表皮呈层状竖起, 其底层出现较宽空隙, 毛囊口径扩宽。皮表脱屑增多, 常见皮屑脱落面及整个毛囊乳头外露现象。裸鼠皮肤用药后改

变明显。若给药 3 d 后检查, 皮肤表面出现空穴更多, 穴径也较大, 可达 3-5 μm 。给溶剂对照的小鼠皮肤, 表皮内褶皱折纹理清晰, 但有些部位表皮也有较轻度水肿和脱屑细胞可见, 毛发从毛囊斜露于皮表面, 毛小皮紧密叠瓦式一个覆盖另一个状似鱼鳞, 其游离缘向毛发顶端 (Fig 1 D), 许多脱屑皮表细胞向心性排列围绕着毛囊口, 并见疏松脱落皮屑。裸鼠对照皮肤的脱屑较多, 表皮小内褶区较不清楚, 毛发极稀疏, 毛小皮叠瓦状排列较不清晰, 纹理浅薄。其他皮肤表面形态与近交系鼠类同, 未见明显的改变 (Fig 1 E)。

Lau 对体外肉瘤 180 瘤细胞表面超微结构的改变 短期原代培养的肉瘤 180 瘤细胞加 Lau 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 温育 4 h, 扫描电镜检查可见部分细胞表面微绒毛脱落减少, 残留绒毛呈点状或短棒状稀疏分布 (Fig 1 F)。有些顶端变粗大成小圆泡, 状似球拍 (Fig 1 F 箭头)。小部分细胞微绒毛全部脱落呈裸细胞, 并显露细胞膜表面凹凸不平的区域, 常见有数量不等的规则形或圆形的小黑洞 (Fig 1 G), 洞孔径一般在 0.05-0.5 μm 之内, 个别可达 1 μm , 在细胞暴露面洞数最多可达 100 个以上。少数细胞膜有斑片剥脱, 露出膜内胞浆内容物 (Fig 1 H)。给溶剂对照组的瘤细胞表面布满长短不一的细长形微绒毛, 长度在 0.2-2.3 μm 不等 (Fig 1 I)。对瘤细胞损伤程度与温育所用剂量无明显依赖关系, 而且应用 25, 50, 100 和 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4 个浓度 Lau 分别与肉瘤 180 瘤细胞一起温育 4 h, 经 0.2% 台盼兰染色光镜检查, 未见着色瘤细胞数增加。表示用药组短期内细胞毒作用不明显, 存活细胞数与对照组类似。

DISCUSSION

小鼠腹部皮肤的超微结构不很规整, 表皮

高低不平排列凌乱, 有序性差。角质层细胞脱屑处常见小裂隙, 以及表皮内褶及低谷凹陷处形成的假裂隙, 应与 Lau 特异性对细胞脂膜的打孔作用相区别, 后者数量多且常在一个平面上。此外, 皮表有小泡鼓起, 毛囊口周围皮屑脱落与瘤细胞微绒毛脱落和质膜表面形成小黑洞。提示 Lau 对生物膜类脂质具有特异性的溶解和破坏作用, 能增加表皮脂性膜的不连续性或开裂, 使其对药物的穿透阻力减少, 而且由于毛囊口拓宽, 药物可能更易通过毛干与毛囊壁之间的微孔隙和皮脂腺达到真皮或皮下组织, 增加其透皮吸收。由于 Lau 在低浓度下, 未见对瘤细胞有明显杀伤时, 已对细胞膜产生特异的选择性作用, 且膜改变出现早, 细胞膜受损面较广, 空洞较大, 这样不仅可能增加药物分子的渗透, 而且对一些较大分子的活性物质 (如聚合物和单克隆抗体), 也易于渗透吸收。Lau 对生物膜的专一性钻孔本领尚未见文献报道。这作用将为癌症综合治疗, 耐药性防治和生物导弹研制等方面提供新的治疗手段。故是个较有开发前景的工作。

敬谢 张素胤教授提供实验裸鼠。

REFERENCES

- 1 Stoughton RB, McClure WO. Azone: a new non-toxic enhancer of cutaneous penetration. *Drug Develop Indust Pharm* 1983; 9 : 725
- 2 Touitou E. Transdermal delivery of anxiolytics: *in vitro* skin permeation of midazolam maleate and diazepam. *Int J Pharm* 1986; 33: 37
- 3 Okamoto H, Ohyabu M, Hashida M, et al. Enhanced penetration of mitomycin C through hairless mouse and rat skin by enhancers with terpene moisties. *J Pharm Pharmacol* 1987; 39 : 531