

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00573

• 短篇论著 •

川芎挥发油对 HaCaT 细胞和皮肤的刺激性研究

胡 静¹, 朱全刚², 张娟娟³, 胡晋红², 张立超^{3*}

1. 上海市第七人民医院肾内科, 上海 200137

2. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433

3. 上海市第七人民医院药剂科, 上海 200137

[摘要] **目的** 阐明川芎挥发油的皮肤刺激性。**方法** 体外培养 HaCaT 细胞, 分别采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)和酶联免疫吸附法(ELISA法), 以经典化学促透剂油酸为对照, 考察不同浓度川芎挥发油对皮肤 HaCaT 细胞活力、HaCaT 细胞上清液中前列腺素 E₂ (PGE₂) 含量的影响; 采用豚鼠皮肤刺激评分表法考察不同浓度挥发油的皮肤累积刺激性, 光学显微镜下观察豚鼠皮肤组织学的形态学改变。**结果** 0.005%、0.015%、0.025%挥发油组 HaCaT 细胞活力分别为 0.005%油酸组的 1.79、1.65、1.48 倍, 而 0.05%挥发油组与 0.005%油酸组差异无统计学意义。0.005%、0.015%、0.025%、0.05%挥发油对 HaCaT 细胞上清液的 PGE₂ 含量影响分别为 (0.99±0.08)%、(1.63±0.09)%、(0.98±0.09)%、(0.04±0.01)%, 均低于 0.005%油酸组 (4.23±0.68)% ($P<0.05$)。各浓度挥发油豚鼠连续给药 7 d, 均仅见轻微红斑, 未见水肿、皮肤隆起等, 15%挥发油组红斑强度低于 5%油酸组。挥发油仅在 15%浓度时才出现角质层结构的改变, 而 5%油酸角质层就出现大面积剥离和缺失。**结论** 川芎挥发油的皮肤刺激性低于油酸, 有可能成为一种优良的化学促透剂。

[关键词] 川芎; 挥发油类; 化学促透剂; 皮肤给药; 皮肤刺激性

[中图分类号] R 943.43

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)05-0573-04

Stimulating effect of essential oils from *Ligusticum chuanxiong* Hort on HaCaT cells and skin

HU Jing¹, ZHU Quan-gang², ZHANG Juan-juan³, HU Jin-hong², ZHANG Li-chao^{3*}

1. Department of Nephrology, Shanghai Seventh People's Hospital, Shanghai 200137, China

2. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3. Department of Pharmacy, Shanghai Seventh People's Hospital, Shanghai 200137, China

[Abstract] **Objective** To investigate the skin stimulation effect of essential oils from *Ligusticum chuanxiong* Hort. **Methods** HaCaT cells were cultured *in vitro*. Using MTT and ELISA methods, we examined the effect of the essential oil (different concentrations) on HaCaT cell proliferation and prostaglandin E₂ (PGE₂) levels in culture supernatants of HaCaT cells, and the results were compared with those of oleic acid, a classic permeation enhancer. The cumulative skin stimulation effect was determined by visual scoring in guinea pigs and the histological changes were determined by light microscopy. **Results** The HaCaT cell viabilities of the 0.005%, 0.015%, and 0.025% essential oil groups were 1.79-, 1.65-, and 1.48-fold that of the 0.005% oleic acid group, respectively, and there was no significant difference between the 0.05% essential oil group and 0.005% oleic acid group. The 0.005%, 0.015%, 0.025%, and 0.05% essential oil influenced the supernatant PGE₂ levels by (0.99±0.08)%, (1.63±0.09)%, (0.98±0.09)%, and (0.04±0.01)%, respectively, which were all significantly lower than the influence of 0.005% oleic acid ([4.23±0.68]%, $P<0.05$). Only slight erythema was observed after continuous administration the essential oil (different concentrations) for 7 days, with no edema or skin uplift, and the erythema caused by 15% essential oil was lower than that caused by 5% oleic acid. Only 15% essential oil exhibited the mechanical injury of the stratum corneum. And 5% oleic acid group showed stripped and lost stratum corneum over large areas. **Conclusion** *Chuanxiong* oil is less cytotoxic and less stimulating to the skin compared with oleic acid, and may become an excellent skin permeation enhancer.

[收稿日期] 2013-01-04

[接受日期] 2013-03-27

[基金项目] 浦东新区学科带头人项目(PWRd2008-7), 浦东新区重点学科建设项目(PWZXK2010-11). Supported by Leading Scholar Program of Shanghai Pudong New Area (PWRd2008-7) and Key Discipline Program of Shanghai Pudong New Area (PWZXK2010-11).

[作者简介] 胡 静, 硕士生. E-mail: hujing@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-68660665, E-mail: changhaishin@yahoo.com.cn

[Key words] *Ligusticum chuanxiong*; volatile oils; permeation enhancer; cutaneous administration; skin irritation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(5): 573-576]

化学促透剂的经典机制是通过破坏角质细胞间高度规律的脂质结构,可逆地改变角质层的屏障功能^[1-2],因此皮肤促透作用越高,意味着角质层结构破坏越大,亦意味着皮肤刺激性越强。由于促透能力相对确实、成本低廉等优势,国内外研究者从未放弃破解促透强与皮肤刺激性大这一对矛盾,大量文献报道寻找高效但皮肤刺激性低的化学促透剂^[2-3]。

我们前期意外发现川芎挥发油具有强烈促透作用,经典促透机制已无法解释其体内促透作用高、体外促透作用低的特性^[3-5]。川芎挥发油并未明显通过改变皮肤角质层结构获得促透能力,而可能与其增加皮肤血流,促进药物从表皮和真皮层到毛细血管的消除,实现促透,其促透作用明显强于经典化学促透剂油酸^[5]。

国外评价化学促透剂的皮肤刺激性主要方法有经皮肤水分流失法(TEWL),激光多普勒仪测定皮肤血流改变、皮肤细胞活力和炎性介质改变,家兔或豚鼠多次皮肤刺激评分表法(SCORE法),动物皮肤组织学改变等方法^[6]。目前,国内并未高度重视研究中药成分的皮肤刺激性,评价方法相对单一,仅有SCORE法报道^[7]。本研究采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)和酶联免疫吸附法(ELISA法)分别考察挥发油对人表皮角质形成细胞 HaCaT 细胞活力、炎性介质前列腺素 E₂ (PGE₂) 释放的影响,并进一步采用豚鼠 SCORE 法、豚鼠皮肤组织学改变等方法,系统评价川芎挥发油的皮肤刺激性,以期揭示川芎挥发油高皮肤促透作用的同时,探讨其是否具有相对低的皮肤刺激性。

1 材料和方法

1.1 仪器 R200D 电子分析天平(德国 Sartorius GmbH 公司);SDJ-ZS 型生物洁净工作台(上海淀山湖净化设备厂);HF240 二氧化碳培养箱(Heal Force 公司);MK2 型酶标仪和 Multiskan 洗板机(芬兰 Labsystem 公司);BX40 光学显微镜(日本 Olympus 公司);PYX-DHS-BS 恒温箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 试剂 川芎挥发油(产于四川省灌县川芎药材,经超临界萃取制备得到,批号:070329);人表皮角质形成细胞 HaCaT 细胞株(美国国立医学研究所

米庆胜教授惠赠);人角质形成细胞无血清培养基和 DMEM 培养基(美国 Gibco BRL 公司);新生胎牛血清(杭州四季清生物制品公司);脱毛霜(法国 Cedex 公司, Veet[®]);ELISA 试剂盒(奥地利 Bender Medsystems GmbH 公司);豚鼠(第二军医大学实验动物中心);含不同浓度川芎挥发油、5%油酸的 Carbopol 980NF 凝胶为自制^[5]。

1.3 细胞培养 采用角质形成细胞无血清培养基和 10%新生胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 HaCaT 细胞,每 2~3 d 换液 1 次,待细胞生长至融合,进行传代。选择生长旺盛、形态良好的细胞用于实验^[8]。

1.4 MTT 法测定 HaCaT 细胞的细胞活力 将 HaCaT 细胞以 10⁴/孔密度接种至 96 孔板,培养至 70%~80%贴壁融合;小心吸弃培养液,加入含川芎挥发油或油酸的 DMEM 培养基,倍比稀释,使其浓度分别为油酸 0.005%,川芎挥发油 0.005%、0.015%、0.025%、0.050%,并设对照组,每组 8 个复孔,继续培养 24 h;吸出培养液,分装并置于-20℃冰箱保存待用。每孔加入 20 μL MTT 液,培养箱内孵育 12 h;加入 DMSO 150 μL,震荡混匀 4 h,用酶标仪在 550 nm 处测定光密度(D)值。以各组 D 值与乙醇对照组 D 值之比表示细胞活力。

1.5 ELISA 法测定 HaCaT 细胞上清液 PGE₂ 含量 取上述 1.4 项中所吸出的培养液,按 ELISA 试剂盒说明书进行。以各组 D 值与乙醇对照组 D 值之比表示 PGE₂ 含量。

1.6 皮肤刺激 SCORE 实验 豚鼠 12 只,采用自身同体左右侧对比法。4 个试验组:3%、10%、15%川芎挥发油组和 5%油酸组,每组 3 只豚鼠,单笼饲养。试验前 24 h 用剃毛剪将背部两侧毛轻轻剃除,左右侧各 2 cm×2 cm。4 组豚鼠右侧去毛皮肤每天分别涂抹适量 4 种试验浓度和种类的凝胶^[3,5],左侧涂空白凝胶为对照,称量纸和纱布覆盖,胶布固定。给药 6 h 后除去覆盖物,用温水清洁给药部位,连续 7 d。在每次去除凝胶后 1 h,再次贴敷前,以及末次给药后 1、24、48、72 h 肉眼观察,记录红斑及水肿、涂敷部位是否有色素沉着、出血点、皮肤粗糙或皮肤菲薄情况及其发生与消退时间。

皮肤刺激反应评分标准:红斑勉强可见为 1 分,

中度红斑为 2 分,严重红斑为 3 分,紫色红斑并有焦痂形成为 4 分;水肿勉强可见为 1 分,皮肤隆起轮廓清楚为 2 分,隆起 1 mm 为 3 分,隆起 1 mm 以上并有扩大为 4 分。皮肤刺激强度评价标准:分值 <0.50 为无刺激性, $0.50\leq$ 分值 <3.00 为轻度刺激性, $3.00\leq$ 分值 <6.00 为中度刺激性,分值 ≥ 6.00 为强刺激性。

1.7 皮肤组织学检查 另取豚鼠 4 只,按上述方法制备 3%、10%、15%川芎挥发油和 5%油酸 4 个实验组。给药 6 h 后立即温水洗净,过量戊巴比妥钠处死豚鼠,切除涂药部位皮肤,立即放入含 10% (体积分数) pH 7.2 磷酸缓冲液的甲醛溶液中至少 48 h,采用常规方法制备适合光学显微镜观察的皮肤样品。每个样品均取 3 个不同部位皮肤,光学显微镜观察。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件,对实验组间 MTT 法测得的 D 值差异进行 F 检验,ELISA 测得的 PGE_2 含量作 t 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 HaCaT 细胞的细胞活力 0.005%、0.015%、0.025%挥发油组 HaCaT 细胞的细胞活力分别为 $(85.78\pm 21.06)\%$ 、 $(79.01\pm 29.51)\%$ 、 $(71.23\pm 35.48)\%$,与 0.005%油酸组 $(48.12\pm 32.08)\%$ 比较

差异有统计学意义($P<0.05$)。而 0.05%挥发油组的 HaCaT 细胞活力为 $(41.72\pm 12.81)\%$,与 0.005%油酸组比较差异未见统计学意义($P>0.05$)。

2.2 HaCaT 细胞上清液 PGE_2 含量 0.005%油酸组对 HaCaT 细胞上清液 PGE_2 含量影响为 $(4.23\pm 0.68)\%$,刺激性最大。0.005%、0.015%、0.025%、0.05%挥发油对 HaCaT 细胞的 PGE_2 含量影响分别为 $(0.99\pm 0.08)\%$ 、 $(1.63\pm 0.09)\%$ 、 $(0.98\pm 0.09)\%$ 、 $(0.04\pm 0.01)\%$,与 0.005%油酸组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。0.005%、0.015%、0.025%挥发油各组间 PGE_2 含量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。但 0.05%挥发油组的 PGE_2 含量却急剧下降,与乙醇对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 皮肤刺激性 SCORE 实验 豚鼠皮肤刺激性实验结果见表 1。表 1 可见,3%、10%、15%挥发油组均未显示明显皮肤刺激性。3%挥发油组仅在第 6 天出现 1 只豚鼠轻微红斑,第 7 天继续用药,并未见红斑再现。10%和 15%挥发油组均出现 1 只豚鼠隐约红斑,但停药后均消退。5%油酸使用后第 2 天 3 只豚鼠均有隐约红斑,但继续用药,红斑亦有减轻趋势。整个实验过程,各实验组均未见水肿、皮肤隆起等症状。

表 1 不同给药时间豚鼠皮肤刺激性分值和强度

n=3

分组	不同给药时间皮肤刺激性分值										刺激强度
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	
3%挥发油	0	0	0	0	0	0.33	0	0	0	0	无
10%挥发油	0	0	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0	0	0	无
15%挥发油	0	0.67	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0	0	无
5%油酸	0	1	1	0.67	0.67	0.67	0.67	0.33	0	0	轻度

2.4 皮肤组织学形态 川芎挥发油或油酸处理 6 h 后豚鼠皮肤的光学显微改变结果见图 1。图 1A 可见,乙醇对照组未见豚鼠皮肤结构任何改变;图 1B~1D 可见,挥发油可浓度依赖性地增加皮肤刺激性。图 1B 显示,表皮中性粒细胞和淋巴细胞增加,表明 3%挥发油组中皮肤细胞出现了急性炎症。15%挥发油组显示了最高的皮肤刺激性,图 1D 显示,表皮和真皮层中均出现大量的中性粒细胞和淋巴细胞,角质层有部分缺失。挥发油组只有在 15%挥发油组出现角质层结构的改变。但是,5%油酸组

表皮层和真皮层出现了最多数量的中性粒细胞和淋巴细胞,角质层出现了大面积剥离和缺失(图 1E)。

3 讨 论

HaCaT 细胞来源于人类皮肤角质形成细胞的细胞系,占表皮细胞的 80% 以上,是国外评价皮肤刺激性的经典细胞模型^[8-9],但国内文献尚未见报道。川芎挥发油和油酸在 DMEM 培养基中溶解度较差,而乙醇与培养基互溶,为此,我们在实验过程中加入了少量乙醇作为助溶剂。结果表明,加入的

乙醇经过倍比稀释后,并未对 HaCaT 细胞造成影响。油酸为经典优秀化学促透剂,对亲脂性和亲水

性药物均有良好促透作用,其常用促透浓度为 5%^[9]。

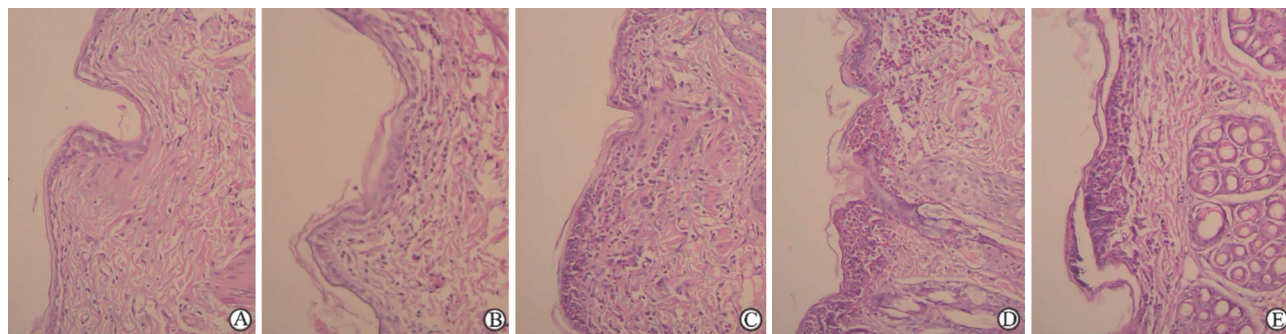


图1 豚鼠皮肤光学显微镜图

A: 乙醇对照组; B: 3%挥发油; C: 10%挥发油; D: 15%挥发油; E: 5%油酸。Original magnification: $\times 200$

川芎挥发油具有对 HaCaT 细胞的细胞毒性,但其强度低于相同浓度的油酸。挥发油 4 个浓度组(0.005%、0.015%、0.025%、0.05%)均显示了对 HaCaT 细胞的细胞毒性,且具有浓度依赖性($r=0.9920$)。对照组 0.005%油酸则具有相对较大的细胞毒性,相同浓度下,川芎挥发油组的细胞毒性低于油酸组($P<0.05$),而 0.005%油酸组的细胞毒性与浓度高 10 倍的 0.05%川芎挥发油组相似($P>0.05$)。

PGE₂是细胞炎性物质,其在细胞中含量的高低一定程度代表对细胞的刺激性大小。0.005%的油酸组人 HaCaT 细胞上清液 PGE₂含量高于川芎挥发油各浓度组($P<0.05$),提示相同浓度下,油酸对 HaCaT 细胞的刺激性高于川芎挥发油。有意思的是,川芎挥发油对 HaCaT 细胞的刺激性作用并未见浓度依赖性,甚至 0.05%浓度组 PGE₂含量最低,这可能与部分 HaCaT 细胞死亡有关。

本实验从动物整体水平发现,连续使用 7 d, 15%挥发油的刺激性低于 5%油酸。实验结果进一步证实,15%挥发油组处理皮肤后,显微镜下其皮肤刺激性低于 5%油酸组,提示相同浓度下,川芎挥发油的皮肤刺激性低于油酸。

综上,我们前期发现,川芎挥发油其促透原理可能有别于通过破坏角质层屏障功能而促透的传统理论,而是可能主要通过增加皮肤血流,加快药物从皮肤表皮和真皮层到毛细血管的消除,从而实现促透,其促透作用强于油酸。由于皮肤血流的增加并未改变角质层的结构,皮肤刺激性理应较传统化学促透剂轻微。本研究从多角度证实了川芎挥发油皮肤刺激性低于油酸,这为高效、低皮肤刺激性化学促透剂的寻找提供了一种新思路。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Lane M E. Skin penetration enhancers[J]. Int J Pharm, 2013,447(1-2):12-21.
- [2] Santos P, Watkinson A C, Hadgraft J, Lane M E. Influence of penetration enhancer on drug permeation from volatile formulations[J]. Int J Pharm, 2012,439(1-2):260-268.
- [3] Zhang L C, Hu J H, Li L, Gao L H, Zhu Q G, Li Z, et al. *In vivo* and *in vitro* evaluation of essential oils from *Ligusticum chuanxiong* HORT on the transdermal delivery of flurbiprofen in rabbits[J]. Biol Pharm Bull, 2006,29:1217-1222.
- [4] 张立超,高丽红,胡晋红,严翠霞,朱全刚. 川芎挥发油对氟比洛芬渗透离体大鼠皮肤的促进作用[J]. 药学服务与研究,2006,6:413-416.
- [5] 王慧菁,张立超,张永佳,顾伟鹰,吴志宏,胡晋红. 川芎挥发油增加皮肤血流的皮肤促透机制[J]. 中国药杂志,2010,45:1925-1929.
- [6] Kartono F, Maibach H I. Irritants in combination with a synergistic or additive effect on the skin response: an overview of tandem irritation studies[J]. Contact Dermatitis, 2006,54:303-312.
- [7] 蔡 铮,黄 娟,吴 越,龚 耘,刘中秋. 天麻苷元体外透皮特性与皮肤刺激性研究[J]. 中草药,2011,42:266-270.
- [8] 刘继勇,胡晋红,朱全刚,孙华君,刘少明. 苦参碱对 P 物质诱导 HaCaT 细胞表达 IFN- γ 和 IL-10 的影响[J]. 药学服务与研究,2006,6:94-97.
- [9] Fang J Y, Hwang T L, Leu Y L. Effect of enhancers and retarders on percutaneous absorption of flurbiprofen from hydrogels[J]. Int J Pharm, 2003,250:313-325.