

## • 研究论文 •

## 酮洛芬及其异丙酯对 HaCaT 细胞构建的组织工程皮肤的渗透作用

徐燕丰, 胡晋红\*, 朱全刚, 徐 术, 潘勇华

(第二军医大学 长海医院 药学部, 上海 200433)

**摘要:** 目的 体外构建适用于经皮给药研究的组织工程皮肤。方法 以表皮角质形成细胞系 HaCaT 细胞及真皮成纤维细胞为细胞来源, 用 I 型牛胶原蛋白为真皮基质包埋成纤维细胞, 其上接种 HaCaT 细胞, 采用气-液界面方式培养, 观察不同的培养介质对组织工程皮肤的影响, HE 染色切片观察培养皮肤结构形态。以酮洛芬及其异丙酯为模型药物研究经皮渗透和代谢特性。结果 HaCaT 细胞经气-液界面培养可形成类表皮层, 但不能形成完整的角质层。维生素 C 可明显促进细胞增殖, 维生素 D<sub>3</sub> 可促进细胞分化, 雌二醇对此组织工程皮肤没有明显的影响。同皮肤细胞匀浆代谢相似, 酮洛芬异丙酯被代谢成原药酮洛芬。结论 HaCaT 细胞在气-液界面培养条件下可形成多层分化不完全的表皮层, 保留了一定的酶活性, 可用于药物的经皮渗透和代谢等研究。

**关键词:** 组织工程皮肤; HaCaT 细胞; 经皮渗透

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)09 - 0782 - 05

## Percutaneous penetration of ketoprofen and ketoprofen isopropyl ester through a tissue engineering skin reconstructed with HaCaT cells

XU Yan-feng, HU Jin-hong\*, ZHU Quan-gang, XU Shu, PAN Yong-hua

(Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** **Aim** To reconstruct of a tissue engineering skin *in vitro* for the study of the use of drug percutaneous penetration and metabolism. **Methods** Dermal fibroblasts were embedded in collagen type I. HaCaT cells were seeded on the top of the gel. The skin was generated through air-liquid interface culture. Effects of various culture media on tissues morphology were investigated. Sections of the cultured skin were stained with hematoxylin and eosin and examined under microscope. Permeation and metabolism of ketoprofen and its isopropyl ester through the cultured skin were investigated. **Results** HaCaT cells initially developed a multilayer epithelium at the air-liquid interface, but it showed a parakeratotic stratum comeum. Vitamin C enhanced cell proliferation obviously. Vitamin D<sub>3</sub> promoted cell differentiation. And estradiol showed little effect on the tissue engineering skin. Ketoprofen isopropyl ester was hydrolyzed into ketoprofen when penetrated through the cultured skin, which resembled in the skin cell homogenates metabolism. **Conclusion** Cultured at the air-liquid interface, HaCaT cells developed a parakeratotic multilayer epithelium. Enzyme activity was reserved. This cultured skin could serve as an appropriate model for drug percutaneous metabolism and skin irritation.

**Key words:** tissue engineering skin; HaCaT cell; percutaneous penetration

经皮吸收是现代药剂学研究的重要领域之一,

通常采用动物(鼠、猪等)皮肤或人尸体皮肤在体外进行渗透和代谢研究,但它们与健康人皮肤的结构、生理等存在较大差异,因此组织工程皮肤(tissue engineering skin)成为健康人皮肤替代研究的热点。国外已有 EpiDem, SkinEthic, EpiSkin 等多种组织工

收稿日期: 2004-11-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271553).

\* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 21 - 25070665,  
E-mail: hujh@smmu.edu.cn

程皮肤获得商品化,应用这些组织工程皮肤研究药物或化妆品等经皮吸收的报道也越来越多<sup>[1-3]</sup>,显示它们作为经皮吸收模型具有非常广阔的应用前景。但是组织工程皮肤通常采用新鲜分离的健康人皮肤细胞构建,由于健康人皮肤来源有限,且供体间的差异可导致细胞间的不同,因此该方法所构建组织工程皮肤的应用受到很大限制。HaCaT细胞作为由正常人腹部表皮衍生而来的一种角质形成细胞系,在浸没培养时即具有同正常人角质形成细胞相似的分化特性<sup>[4]</sup>,而且培养、传代十分方便,从而解决皮肤细胞的来源问题,同时也可提高组织工程皮肤的重现性<sup>[5]</sup>。本文以 Transwell 多孔聚碳酸酯膜为支持物,采用胶原包埋成纤维细胞后接种 HaCaT 细胞,浸没培养一段时间后除去上室培养液进行气-液界面培养,得到多层结构的组织工程皮肤模型,以酮洛芬(ketoprofen)及其异丙酯(ketoprofen isopropyl ester)为模型药物,研究药物经组织工程皮肤渗透和代谢的特征。

## 材料和方法

**仪器和试剂** 高效液相色谱仪(包括 LC-10ADVP 泵, SPD-10AVP 检测器, C-R6A 积分仪, UV-2100 紫外检测器,日本岛津公司);DMEM 培养基、F-12 培养基、分散酶 Dispase II(Gibco 公司);新生牛血清(杭州四季青生物工程研究所);Vitamin C (Vit C), Vitamin D<sub>3</sub> (Vit D<sub>3</sub>)、雌二醇、I 型胶原酶(Sigma 公司);酮洛芬(重庆西南合成制药厂);酮洛芬异丙酯(第二军医大学长海医院国家临床药理基地范国荣博士合成);12 孔 Transwell 培养板(12 mm, 3 μm 孔径聚碳酸酯膜,Coming 公司);I 型牛胶原蛋白的提取按照孙海晨等<sup>[6]</sup>的方法提取;HaCaT 细胞由第二军医大学长海医院皮肤科顾军、米庆胜教授馈赠,并以他们提供的方法进行培养。

### 组织工程皮肤的构建

**皮肤的处理及细胞的分离和培养** 成纤维细胞的分离和培养参照文献[7]方法进行,即包皮经 0.2% 分散酶 II 消化,分离真皮和表皮。表皮保存在液氮中待用,真皮由 0.2% 胶原酶 I 消化,含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养。HaCaT 细胞以含 20% 新生牛血清的 DMEM 培养。

**真皮类似层构建** 取 8 份 I 型牛胶原蛋白醋酸溶液(5 g·L<sup>-1</sup>)和 1 份 10×D-Hanks 液置于冰浴中混匀,以 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 中和至 pH 7.4,冰浴中加 1 份含成纤维细胞(5.0×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup>)的新生牛血清

悬液,混匀。每个 Transwell 上室中接种细胞悬液 0.3 mL,置 37℃ 孵箱凝固 1 h,加含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基浸没培养过夜。

**组织工程皮肤的构建及培养** HaCaT 细胞用含 10% 新生牛血清的 DMEM 重悬(1.4×10<sup>6</sup>·mL<sup>-1</sup>),0.3 mL 接种于真皮类似层上。浸没培养 3 d,从 d 4 起进行气-液界面培养(即下室加 1 mL 培养基,上室不加培养基,每天换液),培养 4 周。培养基 A:含 10% 新生牛血清的 DMEM/F-12(3:1);B:含 10% 新生牛血清的 DMEM/F-12(3:1) + Vit C(50 μg·mL<sup>-1</sup>);C:含 10% 新生牛血清的 DMEM/F-12(3:1) + Vit D<sub>3</sub>(1×10<sup>-8</sup> mol·L<sup>-1</sup>);D:含 10% 新生牛血清的 DMEM/F-12(3:1) + 雌二醇(1×10<sup>-8</sup> mol·L<sup>-1</sup>)。

**组织学检查** 培养标本用 4% 多聚甲醛固定过夜,经脱水、石蜡包埋、5 μm 切片、HE 染色,置显微镜下观察。

### 酮洛芬异丙酯经组织工程皮肤的渗透和代谢

**酮洛芬及其异丙酯凝胶的制备** 卡泊姆-940 0.5 g 加蒸馏水约 30 mL 溶胀,加三乙醇胺约 0.3 mL 制成凝胶基质,另将酮洛芬异丙酯 1.01 g(或酮洛芬 0.87 g)溶于乙醇 2.4 mL,不断搅拌下加入凝胶基质中,加蒸馏水至 50 g,4℃ 保存。

**酮洛芬及其异丙酯凝胶经组织工程皮肤的渗透和代谢** 同组织工程皮肤相似,将正常人皮肤表皮层贴于 Transwell 上室的聚碳酸酯膜上培养。将凝胶分别均匀涂布于正常人皮肤表皮和组织工程皮肤,有效涂布面积 0.38 cm<sup>2</sup>(酮洛芬及酮洛芬异丙酯各 0.76 μmol·cm<sup>-2</sup>),Transwell 下室中加无血清 DMEM 培养基 1 mL 作为接受液(图 1),分别于 0.3, 0.6, 1, 1.5, 2, 3, 4 和 8 h 取接受液,并加入 37℃ 等体积新培养基。

**样品处理** 接受液 0.7 mL 以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 酸化至 pH 4.0,加乙醚 3.0 mL 萃取,涡旋振荡 1 min,醚层吹干,加流动相溶解后用高效液相色谱法测定。

**高效液相色谱测定** 按照文献[7]方法进行,即采用 Hypersil ODS C<sub>18</sub> 色谱柱(4 mm×200 mm, 5 μm,大连依利特科学仪器有限公司),以甲醇-水-磷酸(60:40:0.005)为流动相,流速 1.2 mL·min<sup>-1</sup>,20 μL 进样,检测波长 258 nm。

## 结果

### 1 组织工程皮肤培养 4 周初步形成

组织工程皮肤培养 d 3 即开始收缩,培养皮肤

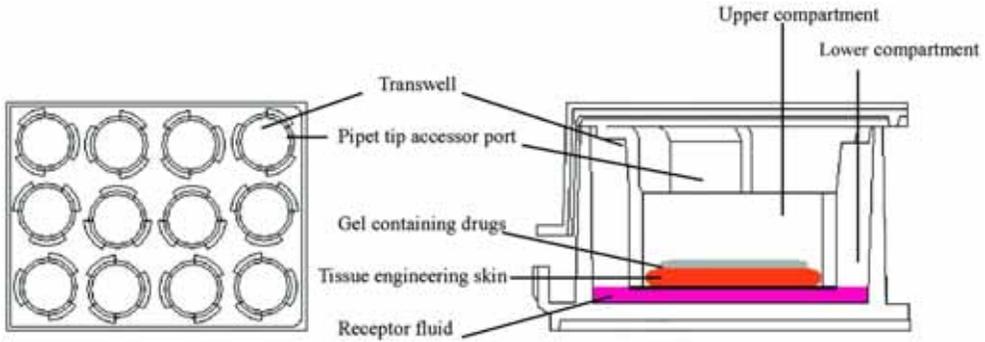


Figure 1 Schematic representation of the diffusion system with cultured skin in Transwell

与 Transwell 上室室壁开始分离, 透明度逐渐降低, 培养 d10, 培养皮肤不再收缩; 而仅在胶原中包埋成纤维细胞的真皮类似层收缩与前者相似; 当胶原中不包埋成纤维细胞而仅在上部接种 HaCaT 细胞, 胶原在培养过程中没有明显的收缩。经 4 周培养, 培养皮肤皱缩呈乳白色圆形, 具有一定的韧性。培养基中添加 Vit C, Vit D<sub>3</sub> 或雌二醇对培养皮肤外观没有明显的影响。

2 组织工程皮肤组织学形态呈多层结构

与正常人角质形成细胞气液界面培养的组织工程皮肤相似, HaCaT 细胞同样能形成由多层细胞构成的表皮层 (图 2), 但细胞排列的有序性略差, 不

能形成完整的皮肤角质层, 可观察到极少数细胞的终末分化, 部分细胞的细胞核残缺。为改善组织工程皮肤的组织结构, 作者在基本培养基中加入了 Vit C, Vit D<sub>3</sub> 和雌二醇等化学物质, Vit C 可明显促进 HaCaT 细胞增殖, 形成表皮层略厚于其他培养组 (图 2B); 用添加 Vit D<sub>3</sub> 的培养基培养后, 组织工程皮肤表皮层厚度不受明显影响, 但可见多处细胞核缺失 (图 2C); 添加雌二醇培养对组织工程皮肤形态学没有明显的影响。

3 高效液相色谱含量测定方法

酮洛芬异丙酯在单纯无血清 DMEM 中, 按样品处理方式处理, 未检测到分解产生的酮洛芬。酮洛

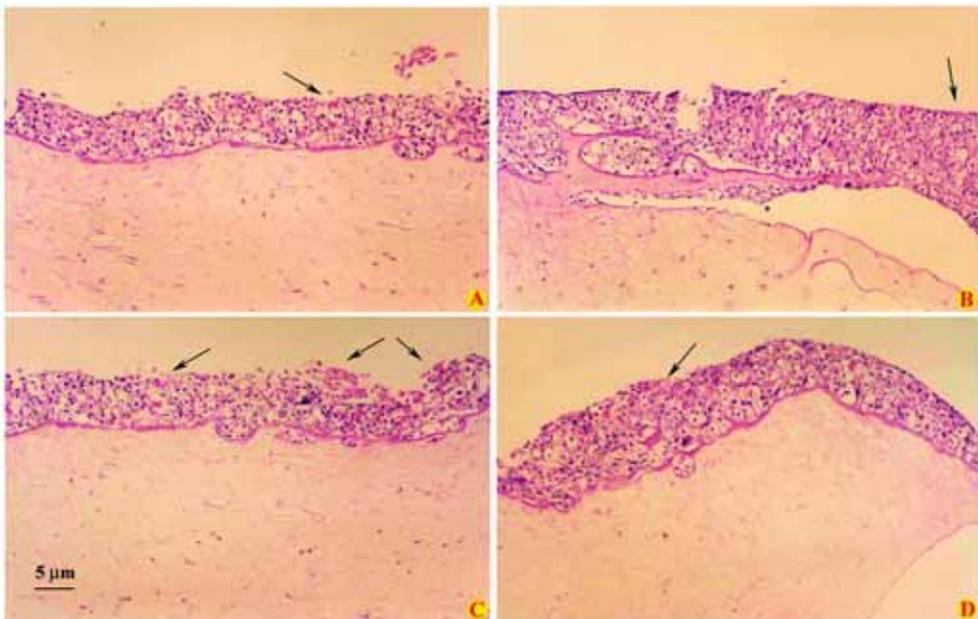


Figure 2 Histologic appearance of tissue engineering skins cultured with various media. Haematoxylin-eosin stained formalin-fixed section of cultured skin with various media. The arrows head point to the partly homy flattened cells. A: Basic media (DMEM/F-12 (3:1) with 10% bovine calf serum); B: Basic media plus Vit C (50 µg · mL<sup>-1</sup>); C: Basic media plus Vit D<sub>3</sub> (1 × 10<sup>-8</sup> mol · L<sup>-1</sup>); D: Basic media plus Estradiol (1 × 10<sup>-8</sup> mol · L<sup>-1</sup>)

芬  $t_R$  6.1 min, 酮洛芬异丙酯  $t_R$  13.4 min, 以峰面积 (A) 对药物浓度 (C) 回归, 在  $65 \sim 6.27 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 酮洛芬标准曲线为:  $C = 2.2 \times 10^{-5} A + 0.0099$ ,  $r = 0.9999$ ;  $276 \sim 11.02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  酮洛芬异丙酯标准曲线:  $C = 3 \times 10^{-5} A + 0.181$ ,  $r = 0.9991$ 。酮洛芬在  $65, 2.09$  和  $6.27 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的日内精密性分别为 2.2%, 1.4% 和 0.4%; 日间精密性为 3.4%, 2.8% 和 1.3%, 平均回收率为 102.3%。酮洛芬异丙酯在  $276, 4.41$  和  $11.02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的日内精密性分别为 1.4%, 2.6% 和 1.9%, 日间精密性分别为 3.8%, 3.3% 和 2.5%, 平均回收率为 100.3%。

#### 4 酮洛芬异丙酯经皮肤渗透过程中被代谢成酮洛芬

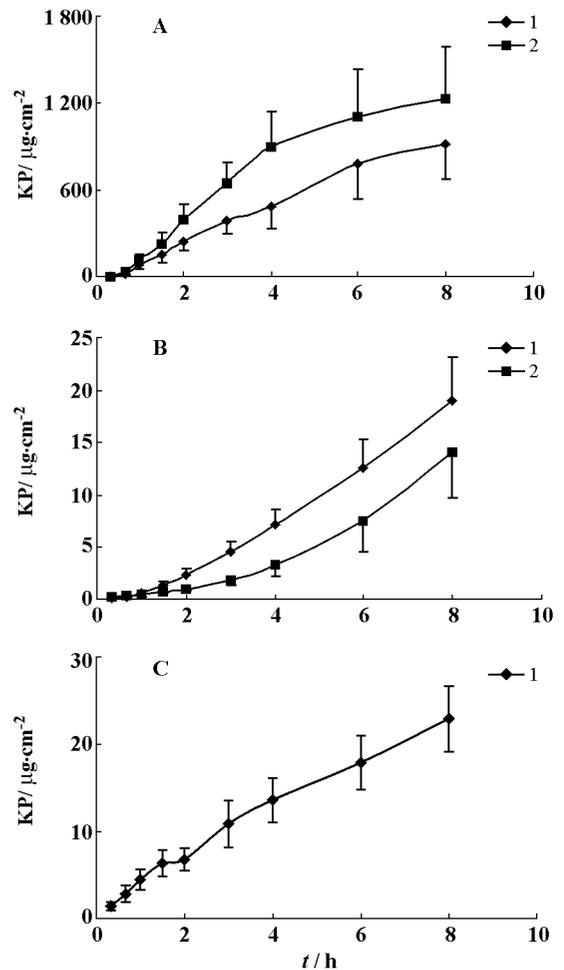
酮洛芬本身可透过正常人皮肤表皮和组织工程皮肤, 在表皮中的渗透转运速率 ( $125.13 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) 略低于组织工程皮肤 ( $174.14 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ); 酮洛芬异丙酯透过组织工程皮肤过程中被代谢成酮洛芬, 经 HPLC 测定, 组织工程皮肤接受液中只检测到酮洛芬而未检测到酮洛芬异丙酯, 而表皮接受液中可检测到少量的酮洛芬异丙酯透过, 酮洛芬异丙酯经组织工程皮肤的渗透代谢速率 ( $1.69 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) 小于正常皮肤表皮层 ( $2.49 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ )。酮洛芬及其异丙酯在正常人皮肤表皮和组织工程皮肤中的渗透行为见图 3。

#### 讨论

目前已研究的组织工程皮肤细胞来源包括常规分离皮肤角质形成细胞<sup>[8]</sup>、表皮干细胞<sup>[9]</sup>及角质形成细胞系<sup>[10]</sup>等。HaCaT 细胞移植至裸鼠后可形成与正常角质形成细胞相似的表皮层<sup>[11]</sup>, 具有较好的分化能力。本实验表明, 经基本培养基 4 周气液培养, HaCaT 细胞形成多层结构的表皮类似层, 顶部部分细胞的胞核残缺表明细胞发生分化, 但未能形成完整的角质层。为改善组织结构, 促进细胞分化, 研究中加入 Vit C 等化学物质。Vit C 可促进大鼠角质形成细胞的分化及增强其屏障功能<sup>[10]</sup>, Vit D<sub>3</sub> 可加速角质形成细胞的终末分化<sup>[12]</sup>。本研究中, 添加 Vit C 培养后表皮层略厚, 促进 HaCaT 细胞增殖明显; 添加 Vit D<sub>3</sub> 培养的组织工程皮肤与其他培养组相比, 靠近空气界面细胞的胞核残缺明显, 部分区域成片细胞呈无核状态, 表明 Vit D<sub>3</sub> 促进细胞分化明显。雌激素可促进胎鼠和体外移植皮肤屏障功能的形成<sup>[13]</sup>, 在本实验中, 雌二醇对 HaCaT 细胞构建的组织工程皮肤无论是外观、形态学还是酮洛芬异

丙酯的渗透代谢都没有显著影响。

其中, 与作者以前的研究<sup>[7,14]</sup>和人正常皮肤相似, 酮洛芬异丙酯经组织工程皮肤代谢成酮洛芬, 不同的是, 在接受液中未检测到酮洛芬异丙酯, 此前体药物可被组织工程皮肤完全代谢为原药, 而正常人表皮接受液中则可检测到少量的酮洛芬异丙酯透过, 这可能是组织工程皮肤对脂溶性药物通透性较正常皮肤差, 而在渗透过程中被完全代谢所致。酮洛芬异丙酯经组织工程皮肤的代谢转运速率显著小于酮洛芬本身的渗透转运, 这可能是由于该培养皮肤缺乏完整的角质层, 皮肤的亲水性较强, 酮洛芬异丙酯本身的渗透速率远小于酮洛芬, 且经进一步酯酶代谢才能在接受液中检测出所致。酮洛芬及其异



**Figure 3** Percutaneous absorption and metabolism of ketoprofen and ketoprofen isopropyl ester through tissue engineering skins and normal skins. A: Ketoprofen; B: Ketoprofen isopropyl ester was hydrolyzed into ketoprofen when penetrated through skins; C: Ketoprofen isopropyl ester ( $n = 3$ ). 1: Penetrated through normal skin epidermis; 2: Penetrated through tissue engineering skin

丙酯经正常人皮肤表皮层与组织工程皮肤的渗透和代谢略有差异,可能也是由于组织工程皮肤与正常人皮肤对不同脂溶性药物的通透性差异所致。

本研究证实,HaCaT细胞在气液界面培养条件下可形成多层分化不完全的表皮层,不能终末分化形成完整的角质层,但若能在培养中加入其他细胞或血液循环中的一些因子,或许可改善组织工程皮肤的组织结构。本研究中的组织工程皮肤保留了一定的酶,与细胞匀浆研究药物的经皮吸收代谢相比,组织工程皮肤更能模拟皮肤的代谢功能,可运用于药物的经皮代谢及药物皮肤刺激性等研究。

## References

- [ 1 ] Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in vitro* percutaneous absorption [ J ]. *Int J Pharm*, 2001, **215**(1 - 2): 51 - 56.
- [ 2 ] Lotte C, Patouillet C, Zanini M, *et al.* Permeation and skin absorption: reproducibility of various industrial reconstructed human skin models [ J ]. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2002, **15**( Suppl 1 ): 18 - 30.
- [ 3 ] Dreher F, Fouchard F, Patouillet C, *et al.* Comparison of cutaneous bioavailability of cosmetic preparations containing caffeine or alpha-tocopherol applied on human skin models or human skin *ex vivo* at finite doses [ J ]. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2002, **15**( Suppl 1 ): 40 - 58.
- [ 4 ] Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, *et al.* Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line [ J ]. *J Cell Biol*, 1988, **106**(3): 761 - 771.
- [ 5 ] Kehe K, Abend M, Ridi R, *et al.* Tissue engineering with HaCaT cells and a fibroblast cell line [ J ]. *Arch Dermatol Res*, 1999, **291**(11): 600 - 605.
- [ 6 ] Sun HC, Li D, Liu S, *et al.* Extraction of collagen type I [ J ]. *J Cap Univ Med Sci* (首都医科大学学报), 1998, **19**(2): 115.
- [ 7 ] Zhu QG, Hu JH, Fan GR. Studies on metabolism of ketoprofen isopropyl ester in HaCaT cells [ J ]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2002, **38**(1): 22 - 25.
- [ 8 ] van den Bogerdt AJ, van Zuijlen PP, van Galen M, *et al.* The suitability of cells from different tissues for use in tissue-engineered skin substitutes [ J ]. *Arch Dermatol Res*, 2002, **294**(3): 135 - 142.
- [ 9 ] Dunnwald M, Tomanek-Chalkley A, Alexandrinas D, *et al.* Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering [ J ]. *Exp Dermatol*, 2001, **10**(1): 45 - 54.
- [ 10 ] Pasonen-Seppanen S, Suhonen TM, Kirjavainen M, *et al.* Vitamin C enhances differentiation of a continuous keratinocyte cell line (REK) into epidermis with normal stratum corneum ultrastructure and functional permeability barrier [ J ]. *Histochem Cell Biol*, 2001, **116**(4): 287 - 297.
- [ 11 ] Breitkreutz D, Schoop VM, Mirancea N, *et al.* Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants [ J ]. *Eur J Cell Biol*, 1998, **75**(3): 273 - 286.
- [ 12 ] Kira M, Kobayashi T, Yoshikawa K. Vitamin D and the skin [ J ]. *J Dermatol*, 2003, **30**(6): 429 - 437.
- [ 13 ] Hanley K, Rassner U, Jiang Y, *et al.* Hormonal basis for the gender difference in epidermal barrier formation in the fetal rat. Acceleration by estrogen and delay by testosterone [ J ]. *J Clin Invest*, 1996, **97**(11): 2576 - 2584.
- [ 14 ] Zhu QG, Hu JH, Zeng HW, *et al.* Stereoselectivity of skin carboxylesterase metabolism [ J ]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2005, **40**(4): 322 - 326.