

地塞米松热敏性凝胶鼓室内局部治疗 大鼠梅尼埃病的研究

王 勤 敖华飞 顾 健 李 聪

摘 要 **目的** 评价地塞米松热敏性凝胶对大鼠自身免疫性梅尼埃病的治疗效果。**方法** 采用冷凝法制备以泊洛沙姆 407 为基质的地塞米松热敏性凝胶,采用同种粗制内耳抗原免疫大鼠建立自身免疫性大鼠的模型。将诱导自身免疫性梅尼埃病成功的模型动物随机分为 3 组:生理盐水组(A 组),地塞米松溶液组(B 组),地塞米松热敏性凝胶组(C 组),在用药当天及用药后 7、14 天分别测定其 ABR 阈值。**结果** 用药后第 7、14 天 B、C 组与 A 组比较各频率 ABR 阈值均降低($P < 0.05$)。用药后第 7 天频率在 16kHz 时,C 组比 B 组 ABR 阈值较低($P < 0.05$),用药后第 14 天 C 组比 B 组各频率(4kHz、8kHz、16kHz)均较低($P < 0.05$)。**结论** 地塞米松热敏性凝胶对自身免疫性梅尼埃病的治疗有效果,可以作为临床治疗梅尼埃病的新剂型进行进一步研究。

关键词 地塞米松 热敏性凝胶 自身免疫性 梅尼埃病 局部治疗

[中图分类号] R764 [文献标识码] A

Tympanic Dexamethasone Thermosensitive Gel in the Treatment of Meniere's Disease in Rats. Wang Qin, Ao Huafei, Gu Jian, Li Cong. Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery, The Third People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

Abstract **Objective** To evaluate the therapeutic effects of dexamethasone thermosensitive gel in treatment of Meniere's disease in rats. **Methods** Dexamethasone thermosensitive gel of poloxamer 407 as the matrix was prepared by the condensation method. Autoimmune Meniere's disease model was established by using the same kind of crude inner ear rats immunized. Then models were randomly divided into three groups: the normal saline group (A), dexamethasone solution group (B), dexamethasone thermosensitive gel group (C). The ABR thresholds after treatment of 7, 14 days were measured. **Results** After treatment of 7, 14 days, compared with group A at each frequency ABR thresholds were lower in B, C group ($P < 0.05$). On the 7th day after treatment, were lower than B group ABR threshold of the 16kHz frequency ($P < 0.05$) of C group. On the 14th day after treatment, each frequency of C group were lower than that of B group ($P < 0.05$). **Conclusion** Dexamethasone thermosensitive gel was effective for Autoimmune Meniere's disease which suggested that it could be used as a new form for treating Autoimmune Meniere's disease.

Key words Dexamethasone; Thermosensitive gel; Autoimmune; Meniere's disease; Local treatment

梅尼埃病是临床上较为常见的一种的内耳疾病,主要病理改变为膜迷路积水,但其病因至今仍未完全明确。而自身免疫性梅尼埃病属于自身免疫性内耳病的一种,临床上其有效、合理的治疗方案就包括激素的应用,而激素全身应用的不良反应较大,限制了其使用人群。泊洛沙姆 407 是研究、应用最为广泛的一种热敏型凝胶,且具有低温时为液体,温度升高时转变为凝胶的反向热敏凝胶特性。这样可以以液体形式给药,药液在中耳内立刻转变成凝胶,能够达到延长药物在中耳内的滞留时间,提高药物生物利用度

的效果。故笔者将泊洛沙姆 407 作为载体将地塞米松应用于鼓室局部,观察其治疗效果,以期使之成为治疗的理想制剂。

材料与方法

1. 材料:(1)实验动物:清洁级 SD 雄性大鼠 40 只,体重 220 ~ 250g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[SCXK(沪)2008-0016],实验动物合格证号:2008001628690,无噪声暴露和药物使用史,耳廓反射灵敏,电子耳镜检查外耳道、鼓膜均无异常,术前均进行听性脑干反应(ABR),结果均在正常范围内。(2)试剂:地塞米松(上海楷洋生物有限公司),泊洛沙姆 407(poloxamer407,德国 BASF 公司),地塞米松对照品(中国药品生物制品检定所);其他试剂均为分析纯。(3)仪器设备:十万分之一电子天平(AE240 型,梅特勒-托利多有限公司),DK-8D 型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司),88-I 型定时恒温磁力搅拌器(上海思乐仪器有限公

作者单位:201900 上海交通大学医学院附属第三人民医院耳鼻喉-头颈外科

通讯作者:顾健,电子邮箱:gujian73858@sina.com

司),UV-9200 型紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司),TK-20A 型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易公司)。

2. 地塞米松热敏性凝胶的制备:参照本实验组已报道的耳用地塞米松热敏性凝胶的制备及性能的检测。用等渗 PBS 溶液配成浓度为 17% 的泊洛沙姆 407 溶液,然后加入一定量的地塞米松(浓度为 10mg/ml),磁力搅拌器搅拌均匀,置于 4℃ 左右冰箱冷藏溶胀 48h,使凝胶充分溶解膨胀,分散均匀,得到澄清透明溶液。

3. 自身免疫性梅尼埃病模型的建立及评估:(1)抗原制备:制备同种粗制内耳抗原(isologous crude inner ear antigens, ICIEAg),具体方法如下:清醒状态下断头,取听泡,分离膜迷路,置于 PBS 中,经研磨、粉碎及均浆,离心直径 15cm,1500r/min 离心 10min,取上清测定蛋白质含量,分装后低温干燥,制成冻干粉备用。(2)全身免疫:实验组按常规免疫方法,每次分别注射于 SD 大鼠右后足和背部及腹部多点皮下。首次采用 ICIEAg 0.4mg 加弗氏佐剂免疫 0.2ml,再分别采用 ICIEAg 0.2mg 加弗氏佐剂 0.2ml 全身强化免疫 2 次,每次免疫中间间隔 10 天。末次免疫后 10 天,用 ICIEAg 0.05mg 加弗氏佐剂 0.025ml 行淋巴囊局部免疫。对照组 SD 大鼠采用 PBS 代替 ICIEAg,余步骤同上。(3)观察指标:在免疫前和内淋巴囊局部免疫后 2 周检测 ABR。动物经腹腔注射戊巴比妥(80mg/kg)麻醉,在声电屏蔽室内接受功能检测,测试中由恒温加热垫维持体温。刺激信号的产生和诱导电位记录均由美国 TDT (System3)听觉诱发电位工作站完成。刺激声采用短纯音,刺激频率为 21.37 次/秒,范围为(8~32)kHz,采集放大倍数为 100k,采集宽度为(0.3~3.0)kHz,叠加次数为 500 次,测试从 90dB SPL 开始,以Ⅲ波存在的最低声强为反应阈值。

4. 分组与干预:将造模成功的实验组 SD 大鼠按照随机原则分成 3 组:A 组:生理盐水组;B 组:含地塞米松 10mg/ml 的地塞米松溶液组;C 组:地塞米松热敏性凝胶组。用药方式为显微镜下经鼓膜 1 次性直接注射 0.1ml 至鼓室内。各组 SD 大鼠分别在用药当天及用药后 7、14、21 天分别测定其 ABR 阈值。

5. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 地塞米松热敏性凝胶的特性:本实验组制备的凝胶在常温下成液体状态,在接近人体中耳内温度 34℃ 时形成凝胶。

2. 动物模型构建结果:免疫前后 ABR 阈值比较,SD 大鼠双耳均有提高,免疫前后各个频率比较 $P < 0.05$,差异均具有统计学意义(表 1)。

表 1 免疫前后 ABR 阈值(dB SPL)

分组	4kHz	8kHz	16kHz
免疫前	29.00 ± 2.03	21.00 ± 2.49	15.17 ± 2.15
免疫后	35.17 ± 3.34	26.5 ± 2.33	21.67 ± 2.40

3. 药物治疗效果:用药后第 7、14 天 B、C 组大鼠与 A 组比较均出现各频率 ABR 阈值降低,且差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明经地塞米松局部治疗后听力均有恢复,即,地塞米松对自身免疫性梅尼埃病具有一定的治疗作用。用药后第 7 天 B、C 组之间进行比较可得频率在 4kHz、8kHz 时,C 组比 B 组 ABR 阈值有所降低,差异无统计学意义($P = 0.074$);而频率在 16kHz 时,B、C 组之间比较,ABR 阈值差异较明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。用药后第 14 天 B、C 组各频率均存在明显差异,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明自制的地塞米松热敏性凝胶在治疗自身免疫性梅尼埃病比常规的地塞米松溶液具有较明显的疗效(表 2、表 3)。

表 2 用药后 7 天各组 ABR 阈值(dB SPL)

分组	4kHz	8kHz	16kHz
A 组	36.00 ± 3.16	26.50 ± 2.42	21.50 ± 2.42
B 组	33.00 ± 2.58	23.00 ± 2.58	19.00 ± 2.11
C 组	31.00 ± 2.11	21.00 ± 2.11	16.00 ± 2.11

表 3 用药后 14 天各组 ABR 阈值(dB SPL)

分组	4kHz	8kHz	16kHz
A 组	36.00 ± 3.16	26.50 ± 2.42	21.50 ± 2.42
B 组	32.50 ± 2.64	22.50 ± 2.64	18.50 ± 2.42
C 组	29.50 ± 2.84	20.00 ± 2.36	15.00 ± 2.36

讨 论

中内耳疾病是损害人民身体健康和降低生活质量的多发病之一,发生率高,英国约 0.9%,我国也是中内耳疾病的高发区,发生率为 0.5%~4.3%。中内耳疾病患者治疗需大量糖皮质激素,但血-外淋巴屏障严重限制药物到达中内耳组织,为达到有效药物浓度,需要使用较大剂量。然而全身应用激素不良反应较大,更为高血压、糖尿病、胃溃疡等患者的禁忌,传统局部应用也存在不同的弊端,严重限制了其应用。所以,近年来鼓室内局部药物治疗中、内耳疾病成为国内外学者探讨的热点,如何在局部保持药物的高浓度长期给药成了研究的关键,在以往的研究中,主要采用如下方式给药:鼓室内直接注射、药物注射至蜗窗龛处的预置材料、半种植式微导管持续给药装置等,这些方式均存在各自的不足之处。笔者认为理想中的制剂应当满足 3 个条件:①较好的缓释性,能长期释药;②局部药物浓度恒定,作用时间长,在鼓室内能够长时间滞留;③用药方式简便,减少患者的痛

苦。

近年来,由于材料科学的发展,出现大量的药物缓释材料,为中内耳疾病的局部治疗提供帮助,热敏性凝胶是一种环境敏感型凝胶,其在室温下为溶液状态,在体温下能够发生相转化,形成非化学交联型半固体凝胶,目前,常见的热敏凝胶为泊洛沙姆 407^[1-3]。泊洛沙姆 407 是 70% 乙烯氧化物(POE)秘 30% 丙烯氧化物(POP)组成,具有低温时为液体,随着度的升高则变成凝胶的性质,由于这种特性,常常制成不同给药途径,加载不同类型药物的控释凝胶给药系统^[4-7]。泊洛沙姆 407 经美国 FDA 批准,由于其很好的生物相容性,很快便被使用于临床治疗研究的各个领域。Gupta 等^[8]将毛喉素热敏凝胶用于青光眼治疗,取得较好的效果。Mansoor 等^[9]制成了用于肿瘤治疗的紫杉醇泊洛沙姆 407 原位凝胶注射液,结果肿瘤的生长速率,动物死亡率大大降低。OH 等^[10]制备了以泊洛沙姆 407 为外壳的纳米粒,效果良好。此外泊洛沙姆也被用于口腔黏附给药系统的生物黏附性^[11]。故笔者结合当前药剂学研究进展,就将泊洛沙姆 407 作为地塞米松的缓释载体制成地塞米松热敏性凝胶。

前期笔者已采用立式 Franz 扩散池来检测过该凝胶药物的体外释放过程,结果表明,制备的地塞米松耳用热敏型凝胶累计释放百分率接近 90% 时需要 10 天时间,整个药物释放过程完全,且具有一定的控释作用,符合理性制剂的条件。经过这次体内实验说明,随着药物作用时间的延长,地塞米松凝胶组的疗效明显优于地塞米松溶液组。体外与体内实验是吻合的,配置的地塞米松热敏性凝胶最突出的特点就是黏附力很强,药物表面活性高,增加药物与局部的接触时间和面积,同时减少了用药次数,增加了药物疗效,降低了对局部的刺激。

本实验在已经全身致敏的大鼠中采用局部 ICIEAg 局部免疫后,大鼠出现明显的听力损失,成功制备的大鼠自身免疫性梅尼埃病的动物模型。再次基础上将照模成功的动物模型进行随机分组干预,经过观察用药后第 7、14 天的 ABR 阈值的观察,B 组与 A 组相比各频率之间均有统计学意义的差异,地塞米松局部治疗对自身免疫性梅尼埃病有一定的疗效。而 B 组与 C 组之间进行比较,在用药后第 7 天时,频率在 16kHz 开始出现具有统计学意义的差异,而此时 4kHz、8kHz 虽有不同,但差异无统计学意义。到用药后第 14 天时,各频率(4kHz、8kHz、16kHz)均存在统

计学意义的差异,即说明地塞米松热敏性凝胶局部治疗对自身免疫性梅尼埃病具有一定的疗效,而且较地塞米松水溶液具有更好的疗效。这种优越性应该就是剂型的改变产生的,将泊洛沙姆 407 作为载体的地塞米松热敏性凝胶在鼓室内可以缓慢释放,长期缓慢作用于病灶局部,可以产生持久的疗效,所以疗效优于地塞米松水溶液。

将泊洛沙姆 407 作为地塞米松的缓释载体制成地塞米松热敏性凝胶,结合了泊洛沙姆 407 的良好的载体缓释作用和地塞米松治疗梅尼埃病的作用,使地塞米松局部作用的药效进一步提高,具有一定的临床应用前景。

参考文献

- 1 Cho HJ, Balakrishnan P, Park EK, *et al.* Poloxamer/cyclodextrin/chitosan - based thermoreversible gel for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride[J]. J Pharm Sci, 2010,100(2):681 - 691
- 2 Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, *et al.* A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics[J]. Pharm Res, 2006,23(12):2709 - 2728
- 3 Monti D, Bungalassi S, Rossato MS, *et al.* Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug delivery. Part II: In vitro/in vivo evaluation[J]. Int J Pharm, 2010,400(1 - 2):32 - 36
- 4 Niu G, Du F, Song L, *et al.* Synthesis and characterization of reactive poloxamer 407s for biomedical applications[J]. J Control Release, 2009,138(1):49 - 56
- 5 Yong CS, Choi JS, Quan QZ, *et al.* Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium[J]. Int J Pharm, 2001,226(1 - 2):195 - 205
- 6 Albertini B, Passerini N, Di Sabatino M, *et al.* Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug delivery. Part I: Formulation, manufacturing and characterization[J]. Int J Pharm, 2010,399(1 - 2):71 - 79
- 7 Monti D, Bungalassi S, Rossato MS, *et al.* Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug delivery. Part II: in vitro/in vivo evaluation[J]. Int J Pharm, 2010,400(1 - 2):32 - 36
- 8 Gupta S, Samanta MK, Raichur AM. Dual - drug delivery system based on In situ gel - forming nanosuspension of forskolin to enhance efficacy[J]. AAPS PharmSci Tech, 2010,11(1):322 - 335
- 9 Amili MM, Lai PK, Shenov DB, *et al.* Intratumoral administration of paclitaxel in an in situ gelling poloxamer 407 formulation[J]. Pharm Dev Technol, 2002,7(2):195 - 202
- 10 Oh KS, Lee KE, Han SS, *et al.* Formation of core/shell nanoparticles with a lipid core and their application as a drug delivery system[J]. Biomacromolecules, 2005,6(2):1062 - 1067
- 11 Cafaggi S, Leardi R, Parodi B, *et al.* Preparation and evaluation of a chitosan salt - poloxamer 407 based matrix for buccal drug delivery[J]. J Control Release, 2005,102(1):159 - 169

(收稿日期:2013 - 10 - 20)

(修回日期:2013 - 10 - 25)