

外用丹参酮乳膏抗痤疮药效及机制

刘文彬¹, 梁庆², 王晖^{1*}, 黄钊¹

(1. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 2. 佛山普正医药科技有限公司, 广东 佛山 528231)

[摘要] **目的:**观察外用丹参酮乳膏对兔耳痤疮模型的影响及其抗痤疮机制。**方法:**新西兰兔 48 只,随机分为空白对照组、模型对照组、阳性对照组(克林霉素凝胶)及丹参酮乳膏高、中、低剂量组、丹参酮乳膏+薄荷醇组、乳膏基质组。模型制备成功后,在造模部位 2 cm×2 cm 范围涂抹对应药物 0.5 g,每日 1 次,给药 2 周后,测定局部血管微循环、耳片重、血清中白细胞介素-1α(IL-1α)、白细胞介素-6(IL-6)和二氢睾酮(DHT)含量。**结果:**模型组家兔炎症相关指标耳片重为(0.210 0±0.038 5)g,IL-1α为(90.22±15.00)ng·L⁻¹,IL-6为(135.88±11.28)ng·L⁻¹,丹参酮乳膏高、中、低剂量组、3%丹参酮乳膏+1%薄荷醇组和阳性药物组相对于模型组均有显著性降低($P<0.01$)。与模型组兔耳涂药部位的微血管灌注量(41.17±5.34)比较,丹参酮乳膏高、中、低剂量组和阳性药物组均能显著的提高兔耳涂药部位的微血管灌注量($P<0.01$)。与模型组比较,丹参酮乳膏高、中剂量组、丹参酮乳膏 3%+薄荷醇 1%组均能显著的降低血清中 DHT 含量($P<0.01$)。对痤疮丙酸杆菌克林霉素的最低抑菌浓度(MIC)为 31.25 mg·L⁻¹,丹参酮乳膏的 MIC 为 195.31 mg·L⁻¹,薄荷醇的 MIC 为 6 250 mg·L⁻¹。**结论:**丹参酮乳膏具有显著的抗痤疮作用,丹参酮乳膏抗痤疮机制可能通过对痤疮丙酸杆菌的杀灭作用,通过降低二氢睾酮来抑制皮脂的生成,降低 IL-1α 和 IL-6 来抑制痤疮部位的炎症,及改善局部的血液循环促进痤疮的愈合。薄荷醇能够提高丹参酮乳膏的治疗作用。

[关键词] 丹参酮乳膏;外用;痤疮;治疗机制;薄荷醇

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0212-05

Experimental Study on Anti-acne Mechanism of Tanshinone Cream

LIU Wen-bin¹, LIANG Qing², WANG Hui^{1*}, HUANG Zhao¹

(1. Department of Chinese Herbal Medicine Pharmacology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Foshan Prizen Medical Technology Co., LTD, Foshan 528231, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the therapeutic effect of the tanshinone cream and investigate the probable mechanism. **Method:** According to smeared coal tar on the inside of New Zealand Rabbit's auricle and

[收稿日期] 20110929(006)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2009B060300027)

[第一作者] 刘文彬,在读硕士生,Tel:15989044033,E-mail:408011126@qq.com

[通讯作者] * 王晖,教授,从事皮肤药理学和数学药理学研究,Tel:13424124711,E-mail:gdwanghui2006@126.com

可见,本实验结果中胰康胶囊的降血糖作用与其临床拟定的功能主治相吻合,为临床用药提供了试验依据。

[参考文献]

[1] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1516.
[2] 陈远航,邓诗清,黄小玲. 黄连素的降血糖药效学试验与临床观察[J]. 中国实用医药,2006,1(1):23.
[3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版

社,1993:719.

[4] 陈旭健,张原. 红菇多糖的提取及其降血糖、血脂作用研究[J]. 食品科学,2010,31(9):262.
[5] 朱明磊,唐微,官守涛. 山药多糖对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J]. 现代预防医学,2010,37(8):1524.
[6] 罗良胜,屈磊磊,杨丽英,等. 紫茉莉对高血糖模型小鼠降血糖作用研究[J]. 云南中医中药杂志,2009,30(4):51.

[责任编辑 聂淑琴]

injected acne for two weeks to built acne complex animal model. We used tanshinone cream to treat it for two week. After that, we measured the local microcirculation, ear slice weight, the concentration of dihydrotestosterone (DHT), interleukin-1 alpha (IL-1 α), interleukin-6 (IL-6) in the serum. **Result:** Compared to the model group, tanshinone cream high, middle, low dose group, tanshinone cream middle with Penetration enhancers (1% menthol) group and positive drug all could reduced the weight of ear slice ($P < 0.01$), tanshinone cream high, middle, tanshinone cream middle with Penetration enhancers (1% menthol) group and positive drug all could reduced the concentration of IL-1 α ($P < 0.01$), tanshinone cream high, middle, low group, tanshinone cream middle with Penetration enhancers (1% menthol) group and positive drug all could reduce the concentration of IL-6 ($P < 0.01$), tanshinone cream high, middle, low group, tanshinone cream middle with Penetration enhancers (1% menthol) group and positive drug all could reduced the local microcirculation ($P < 0.01$), tanshinone cream high, middle, low group and tanshinone cream middle with Penetration enhancers (1% menthol) group all could reduced the concentration of DHT ($P < 0.01$). The minimal inhibitory concentraton (MIC) of positive drug (Clindamycin) was 31.25 mg $\cdot$ L $^{-1}$. The MIC of tanshinone cream was 31.25 mg $\cdot$ L $^{-1}$. The MIC of tanshinone cream was 6 250 mg $\cdot$ L $^{-1}$. **Conclusion:** We supposed that tanshinone cream has a notable anti-acne effect, the mechanism of tanshinone cream anti-acne may depend on four field: suppressing and killing acne, suppressing sebum synthetize by reduced the concentration of DHT, remitting local inflammation by reduce IL-1 α , IL-6 in serum, promoting acne recover via improved local microcirculation. Menthol could promote tanshinone cream absorbing into skin to improve the tanshinone cream therapy effect.

[**Key words**] tanshinone cream; external; acne; therapy mechanism; menthol

痤疮为常见的皮脂腺疾病,其发病率高,约90%以上青春期男女可有程度不等的痤疮发生。丹参酮乳膏临床上常用于痤疮的治疗,但其具体治疗机制尚不明确。本实验在复合因素致痤疮模型上观察外用丹参酮乳膏对痤疮的治疗作用并对其作用机制进行探讨,并联合薄荷醇观察其对丹参酮乳膏抗痤疮的影响。

1 材料

1.1 动物 新西兰家兔,普通级,体重1.8~2.2 kg,雄性,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号SCXK(粤)2008-0020。

1.2 仪器 PeriFlux system 5000 激光多普勒循环仪[瑞典帕瑞医学(中国)公司],TGL-16G-A 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),AE240 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),Moedel680 酶标仪(伯乐生命医学产品有限公司),倒置光学显微镜(日本 Olympus),RM2255 石蜡切片机(德国莱卡)。

1.3 试剂和药品 兔二氢睾酮(DHT) ELISA 试剂盒(lot 201101),RB、兔白介素-1 α (IL-1 α) ELISA 试剂盒(lot Q25070733, Cusabio Biotech)、兔 IL-6 ELISA 试剂盒(lot Q25070736, Cusabio Biotech),厌氧袋(日本,三菱 MGC),厌氧产气剂(日本,三菱 MGC),痤疮丙酸杆菌由广东省微生物菌种保藏中心提供(ATCC 11827)。克林霉素凝胶(lot 101102,

金日制药),丹参酮(lot 100428,含量25%,潮州市润泽制药有限公司),丹参酮乳膏自制。其他试剂均为分析纯。

1.4 丹参酮乳膏的制备 取硬脂酸2 g,十六醇0.4 g,单硬脂酸甘油酯0.2 g,液体石蜡0.2 g,分别加入4.8,2.4,1.2 g丹参酮混合加热熔化后,搅匀,于80℃保温,加入氢氧化钾溶液(取氢氧化钾0.1 g,加适量水溶解)、羟苯甲酯及羟苯丁酯乙醇溶液(取羟苯甲酯0.016 g,羟苯丁酯0.004 g,分别加适量乙醇溶解)、甘油2.8 g,制成乳膏20 g,降至室温即可制备6%,3%,1.5%丹参酮乳膏。在2.4 g丹参酮内加入0.2 g薄荷醇混合同上述方法制备含1%薄荷醇的3%丹参酮乳膏。

2 方法

2.1 动物分组 上述新西兰兔48只,适应性饲养1周后,按体重随机分为造模组42只,空白对照6只。对造模组42只家兔进行为期2周的造模,模型制备成功后,将42只新西兰兔按体重分为7组,分别为模型对照组、阳性对照组(克林霉素凝胶)及丹参酮乳膏高、中、低剂量组、丹参酮乳膏+薄荷醇组、乳膏基质组,每组6只。

2.2 造模 在兔右耳内侧耳管出口处2 cm $\times$ 2 cm范围,每日涂2%煤焦油溶液1次,每次0.5~1 mL,连续14 d。痤疮丙酸杆菌菌种直接接种于生梭孢菌

培养基,置于厌氧袋中,37℃培养 48 h 后观察。使用生理盐水洗下菌苔调整痤疮丙酸杆菌为 6×10^8 /mL,备用。隔日兔耳皮内注射痤疮丙酸杆菌菌液,如若出现可见囊肿即可停止接种。2 周后,随机抽取 2 只模型对照组家兔挤出毛囊口白色内容物进行划线接种确定是否为痤疮丙酸杆菌感染。并对造模部位打孔取皮肤活检进行 HE 染色确定模型制备是否成功。

2.3 给药 各组均在造模部位 2 cm×2 cm 范围涂抹对应药物 0.5 g,每日 1 次,于给药 8 h 后使用温水洗净。丹参酮乳膏高、中、低剂量组分别给予 6%,3%,1.5% 丹参酮乳膏,丹参酮+薄荷醇组为含 1% 薄荷醇的 3% 丹参酮乳膏,阳性药物组给予 1% 克林霉素凝胶。空白组和模型组均给予等量生理盐水。

2.4 指标检测 末次给药后,采用激光多普勒循环仪测量兔耳涂抹药物处表面微循环微血管灌注量(PU)。使用 5 mm 打孔器在涂药部位打孔制备耳片,并测量其质量。取造模部位耳朵 10% 甲醛固定后,石蜡包埋切片,HE 染色后待病理组织学分析。心脏取血,离心取血清按 ELISA 试剂盒要求测定 IL-1 α 、IL-6、DHT 含量。

2.5 对痤疮丙酸杆菌的抑菌试验 用接种环挑取形态相似待检菌落 3~5 个,接种于 4~5 mL 的水解酪蛋白(MH)肉汤中,37℃孵育 48 h。增菌后的对数生长期菌液用 MH 肉汤校正密度至 1×10^8 /mL。用 MH 肉汤将上述菌悬液进行 1:100 稀释后备用。取无菌试管 9 支,排成一排,每管加入 MH 肉汤 1 mL,在第 1 管加入抗菌药物原液 1.0 mL 混匀,然后吸取 1 mL 至第 2 管,混匀后再吸取 1 mL 至第 3

3.2 对炎症相关指标的影响 丹参酮乳膏高、中、低剂量组和阳性药物组兔耳片重,血清中 IL-6 水平相对于模型组均有显著性降低($P < 0.01$),丹参酮乳膏高、中剂量组和阳性药物组兔血清中 IL-1 α 均

管,如此连续倍比稀释至第 9 管,此时各管药物浓度依次为 1/2,1/4,1/8,1/16,1/32,1/64,1/128,1/256,1/512。然后在每管内加入上述制备好的接种物各 1 mL,使每管最终菌液密度约为 5×10^5 /mL。37℃无氧条件下培养 48 h,与空白不加入药液管比较抑制 80% 细菌生长即为该药物最低抑菌浓度(MIC)。

2.6 统计方法 所有统计在 SPSS 12.0 软件上完成,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用进行 t 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 外观观察

3.1.1 一般观察 正常组家兔耳廓菲薄,柔软,毛细血管清晰,内侧可见清晰细胞毛囊和纤细毛发。模型组家兔耳明显增厚,触之异常粗糙,毛孔粗大,毛囊口可见黑色角栓,挤压可见白色内容物。与模型组比较,丹参酮乳膏高、中、低剂量组和丹参酮乳膏+薄荷醇组均能不同程度的降低兔耳的增厚,毛孔孔径降低,挤压未见白色物质,触摸光滑柔软。

3.1.2 病理学观察 模型组:表皮角化过度增厚,颗粒层、棘层肥厚,毛囊口充满角化物质,毛囊口由于过多的内容物而膨胀突出,毛囊漏斗部破裂,可见炎症细胞浸润。各给药组均可见表皮增厚降低,毛囊壶状膨胀结构消失,真皮炎症细胞减少,颗粒层、棘层肥厚随给药剂量增加而减少,丹参酮乳膏剂量组毛囊几无角化物,低剂量组可见毛囊少量角化物质。阳性药物组表皮角化增厚明显降低,颗粒层和棘层变薄,组织结构类似正常组。给药各组与模型组对比,均能在不同程度上减轻病症。

有显著性降低($P < 0.01$)。丹参酮乳膏中剂量组在添加 1% 薄荷醇后,IL-1 α ,IL-6 较丹参酮乳膏中剂量组均有一定的改善,较丹参酮乳膏高剂量组疗效接近。见表 1。

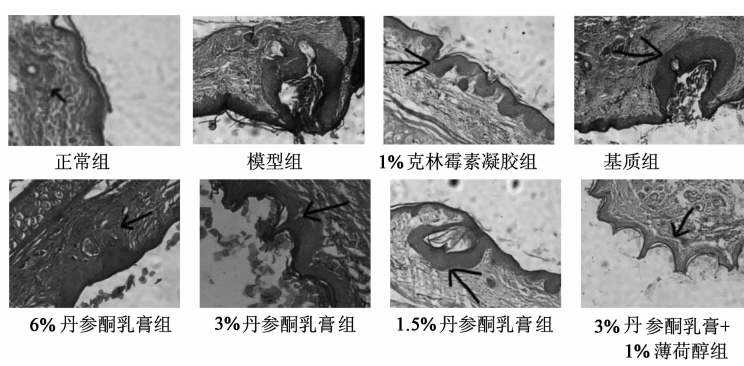


图 1 药物对家兔耳廓病理组织结构的影响(HE,×100)

表 1 丹参酮乳膏对炎症相关指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量分数/%	耳片重/mg	IL-1 α /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹
空白对照	—	58.3 $\pm$ 7.5	45.78 $\pm$ 12.60	46.29 $\pm$ 12.92
模型对照	—	210.0 $\pm$ 38.5	90.22 $\pm$ 15.00	135.88 $\pm$ 11.28
乳膏基质	—	131.6 $\pm$ 46.2	83.55 $\pm$ 30.38	125.25 $\pm$ 30.93
克林霉素凝胶	1	71.7 $\pm$ 9.8 ²⁾	46.89 $\pm$ 8.07 ²⁾	81.08 $\pm$ 12.62 ²⁾
丹参酮乳膏	6	80.0 $\pm$ 14.1 ²⁾	52.44 $\pm$ 14.09 ²⁾	74.00 $\pm$ 12.0 ²⁾
	3	88.3 $\pm$ 7.5 ²⁾	68.56 $\pm$ 10.02 ²⁾	78.58 $\pm$ 19.57 ²⁾
	1.5	105.0 $\pm$ 10.5 ²⁾	86.89 $\pm$ 15.00	85.04 $\pm$ 17.27 ²⁾
丹参酮 + 薄荷醇	3% 丹参酮 + 1% 薄荷醇	86.7 $\pm$ 23.4 ²⁾	50.22 $\pm$ 11.09 ²⁾	72.33 $\pm$ 10.68 ²⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

3.3 对兔耳廓微循环血流灌注量的影响 与模型组比较,丹参酮乳膏高、中、低和阳性药物组均能显著的提高兔耳涂药部位的微血管灌注量 ($P < 0.01$),丹参酮乳膏中剂量组在使用薄荷醇作为促透剂后,改善微循环作用明显 ($P < 0.01$),丹参酮乳膏高剂量组和阳性药物治疗效果接近。见表 2。

表 2 丹参酮乳膏对兔耳廓微循环血流灌注量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量分数/%	血流灌注量/PU
空白对照	—	131.00 $\pm$ 10.71
模型对照	—	41.17 $\pm$ 5.34
乳膏基质	—	42.33 $\pm$ 5.69
克林霉素	1	90.33 $\pm$ 6.74 ²⁾
丹参酮乳膏	6	84.17 $\pm$ 5.60 ²⁾
	3	71.83 $\pm$ 5.23 ²⁾
	1.5	61.33 $\pm$ 2.58 ²⁾
丹参酮乳膏 + 薄荷醇	3% 丹参酮乳膏 + 1% 薄荷醇	86.33 $\pm$ 3.51 ²⁾

3.4 丹参酮对兔血清中 DHT 的影响 与模型组比较,丹参酮乳膏高、中、低组均能显著的降低血清中 DHT 含量 ($P < 0.01$),丹参酮乳膏中剂量组在使用薄荷醇作为促透剂后,DHT 降低和 丹参酮乳膏高剂量组相当。见表 3。

3.5 抑菌效果 克林霉素对于痤疮丙酸杆菌的 MIC 为 31.25 mg·L⁻¹,丹参酮乳膏对于痤疮丙酸杆菌的 MIC 为 195.31 mg·L⁻¹,薄荷醇对于痤疮丙酸杆菌的 MIC 为 6 250 mg·L⁻¹。溶剂 DMSO 对于痤疮丙酸杆菌无抑制作用,对实验结果无干扰。

4 讨论

痤疮病因复杂,迄今为止尚无理想的治疗药物,如维 A 酸类药物可致畸^[1]、黏膜干燥、肝功能异常等^[2], 抗生素具有耐药性,抗雄性激素易导致男性乳房发育、女性月经紊乱等^[3]。丹参酮乳膏主要

表 3 各组血清中 DHT 含量($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量分数/%	DHT/ng·L ⁻¹
空白对照	—	19.36 $\pm$ 2.84
模型对照	—	41.45 $\pm$ 4.71
乳膏基质	—	31.46 $\pm$ 5.34
克林霉素	1	30.22 $\pm$ 4.77 ¹⁾
丹参酮乳膏	6	23.17 $\pm$ 4.38 ²⁾
	3	24.65 $\pm$ 2.48 ²⁾
	1.5	25.66 $\pm$ 1.50 ²⁾
丹参酮乳膏 + 薄荷醇	3% 丹参酮乳膏 + 1% 薄荷醇	23.72 $\pm$ 2.79 ²⁾

有效成分有隐丹参酮、二氢丹参酮 I、羟丹参酮 II_A、丹参酮 II_B^[4],均具有抑菌抗炎^[5] 抗雄性激素和温和的雌激素活性、抗炎作用。除此之外,还具有活血通经、改善微循环的作用,这对炎症的消退、皮损修复起到良好的促进作用。

在痤疮的发病机制中,DHT 与皮脂腺细胞内受体结合^[6],刺激皮脂腺细胞的增生和分泌^[7],毛囊皮脂腺角化过度而使排泄皮脂的通道变窄导致的厌氧环境促进了痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)繁殖,形成了皮脂增生-排脂受阻-细菌感染为轴心的痤疮发病机制^[8]。*P. acne* 和 Toll 样受体结合^[9],引发一系列的炎症反应,诱导 IL-1 α 和 IL-6 的产生进一步引起毛囊的炎症损伤^[10]。在以往的研究中发现^[11-12],煤焦油致兔耳痤疮模型可见异常的睾酮升高,在我们的研究中发现 DHT 也可见一个异常的升高,这可能由睾酮的大量增加而导致 DHT 合成的增加所导致。可推测在治疗过程中,丹参酮通过抑制 DHT 从而降低了皮脂的分泌和缓解了皮脂腺的过度角化,从而使毛囊皮脂腺的厌氧环境不适

合 *P. acne* 的生长,结合丹参酮本身对 *P. acne* 的抑制作用^[13],进一步抑制了 *P. acne* 在毛囊皮脂腺的生长,从而降低了 *P. acne* 和 Toll 样受体结合导致的炎症反应。此外,通过改善微循环,加强了局部的微血管灌注量,提升了血液和组织液之间的物质交换,促进了痤疮部位的恢复,进一步促进了痤疮的愈合。通过添加薄荷醇能促进丹参酮的治疗效果,这可能与促透作用及抑制 IL-6 作用有关^[14]。5- α 还原酶能在体内促进睾酮合成 DHT^[15],丹参酮能抑制 DHT 的合成,但其是否通过抑制 5- α 还原酶,或者直接抑制睾酮的合成来抑制 DHT 的合成有待进一步研究发现。虽然体外实验已经证实丹参酮能够抑制 *P. acne* 的繁殖,但对于丹参酮是否直接作用与 Toll 样受体产生抑制炎症的作用仍需深入研究。

在本实验中,利用痤疮复合模型发现,其可能主要从 4 个方面产生抗痤疮作用:抑制 DHT 的合成;抑制痤疮丙酸杆菌的生长、繁殖;抗炎作用,抑制炎症因子的产生;改善微循环,提高局部的微血管灌注量,促进病患部位的愈合。

[参考文献]

[1] Brelsford M, Beute M. Preventing and managing the side effects of isotretinoin[J]. Semin Cutan Med Surg,2008, 27:197.

[2] 朱黎明. 异维 A 酸胶丸联合清肝祛瘀方治疗囊肿聚合性痤疮的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(5):211.

[3] James C Shaw, Lucile E White. Long-term safety of spironolactone in acne: results of an 8-year followup study[J]. J Cutan Med Surg,2002,6(6):541.

[4] 周立运、朱晓新. 丹参及其化学成分药代动力学研究的进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(3):66.

[5] 刘棠, 宋阳, 李玫. 丹参的药理作用研究及临床应用[J]. 中国误诊学杂志, 2006, 6(20): 4732.

[6] 陈利远, 肖玉凤, 蔺承艳. 枇杷去渣汤对痤疮患者血浆睾酮受体水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(11):229.

[7] Weon Ju Lee, Hong Dae Jung, Seong Geun Chi, et al. Effect of dihydrotestosterone on the upregulation of inflammatory cytokines in cultured sebocytes[J]. Arch Dermatol Res,2009,publish online.

[8] 呼健,赵宏. 自拟清肝活血饮治疗面部痤疮 67 例临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(4):165.

[9] Amie E McInturff, Robert L Modlin, Jenny Kim. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease [J]. J Invest Dermatol, 2005, 125:1.

[10] Estás T, Ganceviciene R, Fimmel S, Muller-Decker K, Zouboulis C C. Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4 and prostaglandin E₂ are active in sebaceous glands[J]. J Mol Med,2006; 84: 75.

[11] 徐骅,陈钧,刘炯,等. 加味枇杷清肺颗粒对兔耳痤疮模型抗角化作用及睾酮水平的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志,2009,23(1):13.

[12] 余远遥. 痤疮乳膏治疗轻、中度痤疮的疗效观察及机理初探[D]. 北京:中国中医科学院西苑医院,2008.

[13] 林楠,董银卯,时宇静,等. 5 种中药醇提物体外抑制 2 种革兰阳性菌的活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,1(18):206.

[14] 王晖,沈非沉,陈垦,等. 薄荷醇的止痒作用及对瘙痒相关因子的影响[J]. 中草药,2009,40(10):1617.

[15] 周继刚,陈良金,李诺飞,等. 龙胆泻肝汤加减治疗寻常痤疮 320 例疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009,15(4):92.

[责任编辑 聂淑琴]