

艾叶挥发油对兔耳痤疮模型的作用及其机制的实验研究*

纪 薇¹, 沈德凯^{2△}, 唐 洁¹

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学针灸研究所, 安徽 合肥 230038)

摘要: **目的** 建立兔耳实验性痤疮模型, 观察各组兔耳痤疮组织病理学改变、皮肤肥大细胞改变及艾叶挥发油对模型兔的痤疮治疗作用。**方法** 将 2% 煤焦油溶液外涂于家兔右耳内侧, 2 周后按实验步骤随机分为空白对照组、基质组、艾叶挥发油乳膏高、中、低浓度组和 0.025% 维 A 酸乳膏对照组共 6 组。在显微镜下观察各组兔耳痤疮组织病理学改变和皮肤肥大细胞改变。**结果** 外涂煤焦油 2 周后, 肉眼可见兔耳出现人类粉刺样改变; 在光镜下呈现与人类痤疮类似的病理改变; 肥大细胞数目明显增多, 经艾叶挥发油治疗后有所减少。**结论** 艾叶挥发油对实验性痤疮治疗效果较好, 减轻炎症反应, 减少肥大细胞数量。艾叶挥发油治疗痤疮的作用机制可能与抑制肥大细胞增殖、趋化及脱颗粒有关。

关键词: 痤疮; 艾叶挥发油; 肥大细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)01-0018-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.01.005

痤疮(acne)是好发于毛囊皮脂腺的慢性炎症性疾病, 因其发病原因比较复杂, 并且随着现代生活方式的改变、生存环境的影响、营养状况的改善、饮食结构的变化, 痤疮患者日益增多, 其发病年龄跨度变大, 治疗难度也增大。现代医学多对其采取对症治疗, 主要用药有抗雄激素药、抑制皮脂腺分泌和抗角化药、抗生素等, 这些药物有着较大的副作用和局限性^[1-2]。艾叶挥发油是基于沈德凯研究员对艾叶挥发油^[3-4]的多年研究而制得的乳剂, 经多年实验研究发现艾叶挥发油具有抗炎、抗过敏、增强免疫功能等良好药理作用; 根据中医西医学对痤疮发病机理及临床表现的认识, 本课题研究以艾叶挥发油治疗痤疮的作用及其作用机理, 探讨肥大细胞在痤疮发病中的可能作用, 为今后进一步临床开发治疗痤疮的新药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

成年家兔, 雄性, 体质量 2~2.5kg, 由安徽省实验

动物中心提供, 合格证号: SCXK(皖)2011-002。动物房为普通级饲养室, 普通饲料喂养, 实验前先适应性饲养 1 周, 动物自由摄食、饮水, 室温控制 18~25℃。

1.1.2 药物与试剂

(1) 药物

艾叶挥发油乳膏: 艾叶挥发油由安徽中医学院经络所提取, 加基质配成质量分数为 20% 的乳膏剂, 再用基质配置成 10% 和 5% 的浓度备用。

阳性对照药: 0.025% 维 A 酸乳膏: 15g/支, (国药准字 H20055512), 湖北康正药业有限公司。

(2) 煤焦油

由马钢(合肥)钢铁有限责任公司提供, 为黑色、糊状, 纯度为 50%, 临时用 95% 的酒精配制成 2% 煤焦油溶液。

(3) 其它

伊红、苏木素、二甲苯、乙醇、甲苯胺蓝、甲醛溶液、10% 水合氯醛等均购自合肥大药房。

1.1.3 主要仪器和设备

S21-6-I 型恒温水浴箱、OLYMPUS PM-C35DX

* 基金项目: 安徽中医药大学校级课题(2015zr012)

收稿日期: 2016-12-28

作者简介: 纪薇(1979-), 女, 辽宁抚顺人, 医学硕士, 讲师, 研究方向: 痤疮的发病机制与防治。

△通信作者: 沈德凯, E-mail: 909152471@qq.com

显微镜,Leits 石蜡切片机。

1.2 方法

取雄性家兔 38 只,第 1 组 6 只为正常对照组,不涂煤焦油;余下 32 只兔,按文献[5-6]方法右耳内侧耳管开口处 2cm×2cm 范围,每天涂 0.5mL 煤焦油 1 次,连续 2 周。于第 15 天,随机取 2 只兔,用 3mm 直径打孔器制备右耳涂煤焦油处的 2 个耳片,用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片。苏木精-伊红染色,于光镜下观察组织学变化和兔耳实验性痤疮模型的建立是否成功。

将余下的 30 只家兔分为 5 组(第 2~6 组),每组 6 只。第 2 组为基质组;第 3、4、5 组为艾叶挥发油高、中、低浓度组;第 6 组为 0.025%维 A 酸乳膏对照组。

各治疗组均在造模成功后开始外用给药,基质组每日于右耳病灶处涂 0.1g 乳膏基质;艾叶挥发油高、中、低浓度组,每天于右耳病灶处分别涂 0.1g 的 20%、10%、5%的艾叶挥发油;0.025%维 A 酸乳膏组每天于右耳病灶处涂 0.025%维 A 酸乳膏 0.1g。以上各组均每天涂药 2 次,连续 3 周。于末次给药后 24h,给药处皮肤组织活检,制作耳片标本(皮肤全层)。并制作石蜡切片。

1.3 观察指标及指标检测方法

1.3.1 兔耳的变化

适应性饲养 1 周后、模型复制过程中、用药过程中分别观察对照兔左右耳毛孔变化情况,毛囊口是否可见黑色角栓,呈黑头粉刺状,毛囊口是否有隆起的红色丘疹及少许脓疱,以便判断造模情况和艾叶挥发油对痤疮的疗效作出评价。

1.3.2 组织病理学改变

光镜下观察组织病理学改变,皮肤的厚度变化,毛囊漏斗部及皮脂腺变化、毛细血管、白细胞、淋巴细胞等的变化,并进行显微照相。

按参考文献[7-9],根据其表皮增厚及毛囊口扩张程度和角化物多少将标本的组织病理变化分为 4 级:①无痤疮,记为(-);②毛囊轻度角化、皮脂腺轻度增生或无明显增生,记为(+);③毛囊面积轻度扩大、漏斗部可见中等量的角化物质、皮脂腺轻度增生,记为(++);④毛囊面积明显扩大、内有大量的角化物质、皮脂腺直径明显增大,记为(+++)。

1.3.3 皮肤肥大细胞改变

采用甲苯胺蓝法,0.5%甲苯胺蓝染液 20~30min,稍水洗。0.5%冰醋酸液分化,直到细胞核和肥大细胞颗粒清晰(在显微镜下控制)。稍水洗,用风扇吹干。二甲苯透明,中性树胶封固。光镜下观察肥大细胞的分布、数量及其脱颗粒等情况,并进行显微照相。

1.4 数据统计与分析

实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法;等级资料采用非参数检验进行分析。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。数据统计由 SPSS17.0 软件处理,统计图表绘制采用 EXCEL2003 软件。

2 结果

2.1 一般情况

外涂煤焦油造模 2 周后,兔造模 2 周后饮水、饮食较造模前无明显变化,活动度无明显变化;用药 3 周后,饮水、饮食量、活动度无明显变化。

2.2 兔耳的变化

外涂煤焦油造模 2 周后:各组兔右耳皮肤干燥、粗糙,毛孔变粗大,毛囊口见明显黑色角栓,呈黑头粉刺状,同时毛囊口隆起见较多红色丘疹及少许脓疱。左耳菲薄、柔软,毛囊口排列整齐,无粉刺、丘疹及脓疱等。

用药 3 周后:高浓度组、维 A 酸组示丘疹、脓疱完全消退,粉刺大部分消退,毛孔缩小,毛囊角栓明显减少,兔耳皮肤变薄、柔软,基本接近正常对照兔。中浓度组示丘疹大部分消退,粉刺部分减少,耳中央毛孔未见缩小,仅两侧毛孔有所改善,皮肤变薄,柔软;低浓度组耳部丘疹有所变平,但仍可见明显的毛囊角栓,毛孔无缩小,皮肤较柔软;基质组表现为耳部丘疹有所变平,但仍可见明显的毛囊角栓,毛孔无缩小,皮肤粗糙有改善但仍较肥厚。

2.3 组织病理学改变

病理组织学检查显示,空白对照组兔耳表皮较薄,约一层颗粒层,2~4 层棘细胞层,可见毛囊,真皮、表皮交界清楚;模型对照组家兔耳可见表皮角化过度,表皮和毛囊上皮的颗粒层增厚,棘层肥厚,相邻扩张的毛囊互相融合,毛囊口及漏斗部充满角化物质,并向皮脂腺延伸,毛囊口被角质栓堵塞,毛囊漏斗部充满角化物质并扩大呈壶状,真皮上皮的毛细血管扩张,毛囊周围散在以慢性炎细胞浸润为主,还

有少量中性白细胞的炎细胞浸润；各给药组家兔表皮增厚状况明显减轻，毛囊口扩张程度减轻，其内角化物质疏松、减少，部分已接近正常组织。

正常对照组表皮不厚，角化物很少且疏松（图 1A）。分组给药三周后，用基质涂搽的模型组皮肤病变无明显改善，表皮层仍增厚，毛囊有大量角化物（图 1B）；艾叶挥发油和维甲酸乳膏治疗组的涂煤焦

油部位的皮肤病变明显改善，20%艾叶挥发油组表皮变薄，毛囊无角化物（图 1C）；10%艾叶挥发油组表皮层也变薄，毛囊有中等量角化物切较疏松（图 1D）；5%艾叶挥发油组表皮层变薄，毛囊角化物少到大量（图 1E）；0.025%维 A 酸乳膏组表皮层变薄，毛囊角化物少且疏松或无角化物（图 1F）。高浓度和低浓度等剂量组比较，高浓度比低浓度有明显减轻。见表 1。

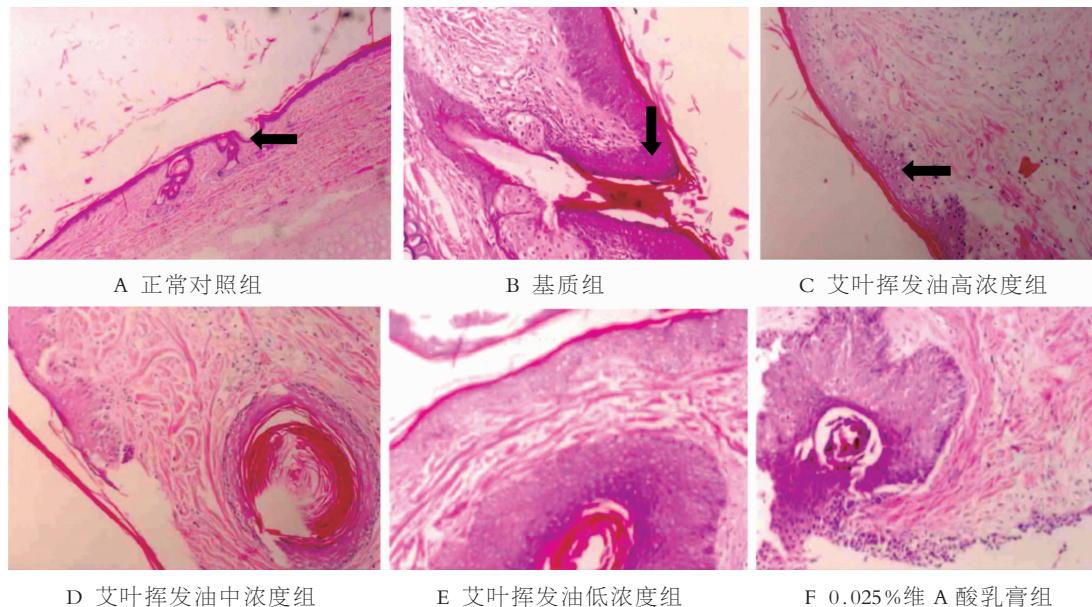


图 1 不同方法对家兔实验性痤疮耳病理组织学的影响 (HE, $\times 200$)

表 1 艾叶挥发油对兔耳实验性角化模型的影响

组别	n	组织病理学变化				P 值
		-	+	++	+++	
空白对照组	6	6	0	0	0	<0.05
基质组	6	0	2	2	2	
艾叶挥发油高浓度组	6	0	6	0	0	<0.01
艾叶挥发油中浓度组	6	0	4	2	0	<0.05
艾叶挥发油低浓度组	6	0	0	2	4	>0.05
0.025%维 A 酸乳膏组	6	0	6	0	0	<0.01

注：P 值为与基质组相比较结果

2.4 皮肤肥大细胞改变

在相同的放大倍数下，所观察到的肥大细胞数目和脱颗粒的细胞比例：模型组肥大细胞数量明显增多（图 2A），经艾叶挥发油治疗后有所减少（图 2B）。

3 讨论

3.1 艾灸在痤疮治疗中的影响

张燕梅^[10]曾在痤疮的治疗中，利用艾灸的增强细胞吞噬作用、抗炎及镇痛等作用提高疗效；张蕾^[11]也

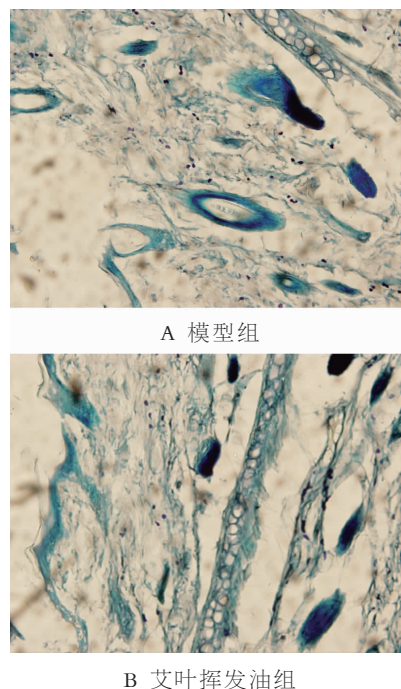


图 2 家兔实验性痤疮耳经艾叶挥发油治疗前后肥大细胞的情况 (甲苯胺蓝染色, $\times 200$)

是利用针刺结合艾灸来治疗痤疮,并与针刺进行了比较,得出比单用针刺疗效更佳。在艾灸中,除了利用灸的热来调节气血,改善微循环外,还利用了艾叶的抗炎、抗菌作用,而艾叶中主要发挥作用的是艾叶挥发油,本课题也是从中得到启发,以此来观察艾叶挥发油的疗效,通过实验得出,艾叶挥发油对治疗痤疮有较好的疗效。

3.2 艾叶挥发油对肥大细胞影响的探讨

肥大细胞广泛分布于皮肤、呼吸道和胃肠道等易与外界接触的部位,亦分布于血管周围组织。这就使得肥大细胞不仅能时刻监视病原菌的入侵,而且肥大细胞所释放的介质和细胞因子也能迅速作用于血管内皮细胞和血液中的炎性细胞,并经血液分布到全身各组织器官中^[12]。肥大细胞在天然免疫中的作用包括:对病原菌早期的吞噬和清除、释放炎性介质募集中性粒细胞等,另一方面,炎症介质的失控性释放也是造成组织损伤的重要因素^[13]。肥大细胞的这些功能,对宿主抵御病原菌的侵袭和痤疮的发病有重要意义。

通过细胞在天然免疫中对病原菌的吞噬和清除、释放大量子及募集中性粒细胞、启动早期的炎症反应等方面的作用,来探讨肥大细胞介导的炎症反应与痤疮发病之间的可能的机制。本实验根据上述机理,采用甲苯胺蓝染色法观察艾叶挥发油是否具有抑制肥大细胞的作用,实验结果显示,在相同的放大倍数下,所观察到的肥大细胞数目:模型组肥大细胞数量明显增多,经艾叶挥发油治疗后有所减少。提示艾叶挥发油可抑制肥大细胞增殖、趋化及脱颗粒情况,这也可能是艾叶挥发油抑制痤疮生成的机制之一。

3.3 关于痤疮发病机制及开发药物方面的探讨

痤疮的发病机制较为复杂,性激素分泌及对皮脂腺的调控异常、皮脂腺角化异常、毛囊内微生物、炎症损害及免疫反应都是痤疮发病的重要环节,本实验所研究的艾叶挥发油来源于艾叶,艾叶具有药源丰富、价格低廉、不良反应小、安全性好的特点而被广泛使用,经大量实验研究表明,艾叶挥发油具有抗炎^[14]、抗菌^[15]、增强免疫功能^[16]等良好药理作用。

针对痤疮发病的重要环节进行调节,可阻断发病因素,起到预防治疗的作用。中医药治疗痤疮在显效的同时又避免了副作用和耐药性的出现,值得推广。

但艾叶新剂型的研发比较滞后,仍沿用汤剂、灸剂等传统的剂型。我们本着研发艾叶新剂型、方便临床用药为目的设计了本课题,在探讨其治疗机理的过程的同时,也为临床开发新药提供基础。面对痤疮发病人群的上升趋势,艾叶挥发油有良好的应用前景和社会经济效益。

参考文献:

- [1] 杨国亮,王侠生. 现代皮肤病学[M]. 上海:上海医科大学出版社,1996:735-736.
- [2] Ahmed Al-Qahtani 原著,周展超主译. 真相:皮肤科学护理[M]. 北京:北京大学医学出版社,2016:102-103.
- [3] 刘先华,周安,刘碧山,等. 艾叶挥发油体内外抑菌作用的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(8):25-26.
- [4] 万毅,刘碧山,沈德凯,等. 艾叶挥发油治疗疮疡的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2007,13(8):595-597.
- [5] 郑慕雄,王建中,郭义龙,等. 清肺饮颗粒对家兔实验性耳痤疮影响的研究[J]. 实用皮肤病学杂志,2011,4(2):105-108.
- [6] 叶寿山,韩传环,王萍,等. 克痒酮凝胶对实验性兔耳痤疮模型等的治疗作用[J]. 上海实验动物科学,2002,22(3):155-158.
- [7] 张晓东,张国斌,张建新,等. 清热消痤颗粒对兔耳痤疮模型的抗角化作用[J]. 解放军医药杂志,2012,24(1):5-7.
- [8] 曾明辉,谭正怀,李秀婵. 兔耳微痤疮模型的复制及药物治疗的实验研究[J]. 中国药理学杂志,2001,36(8):560-561.
- [9] 叶冬梅,韦海明,兰顺,等. 消痤乳液对兔耳痤疮模型治疗作用的实验研究[J]. 中国药师,2010,13(6):820-822.
- [10] 张燕梅. 火针、走罐、艾灸配合体针治疗痤疮 32 例[J]. 中国中医药信息杂志,2008,15(6):67.
- [11] 张蕾. 针刺结合艾灸治疗痤疮 160 例[J]. 北京中医,2006,25(8):497-498.
- [12] Marshall JS, Jawdat DM. Mast cells in innate immunity[J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 114(1):21-27.
- [13] 周艳春,何韶衡. 肥大细胞在细菌和病毒感染中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2006,22(3):607-611.
- [14] 赵桂芝,王绪平,俞忠明,等. 艾叶挥发油对耳肿胀急性炎症模型小鼠的抗炎作用研究[J]. 浙江中医杂志,2016,51(4):288-289.(下转第 32 页)

Study on Social Psychological Factors and TCM Syndrome Element Characteristics of Male Heroin Addicts in Gansu

JIN Li, AN Huiru, LIN Huajian, LIU Xinai, GONG Pu, ZHANG Jinling, LI Chandong, YANG Zhaoyang
(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore the Social psychological factors and TCM syndrome element characteristics of Male heroin addicts in Gansu province. **Methods** To carry out the collection of Epidemiological characteristics and TCM-PRO scale of Drug addicts in three compulsory rehabilitation centers which has 298 heroin addicts volunteers for the survey in 3 subordinate cities (Pingliang, Jiuquan, Jiayuguan) of Gansu province. Extracting the TCM syndrome elements with the syndrome factor differentiation method. **Results** Multiple syndrome elements have high proportion of establishment. The top three syndrome elements of disease location is liver, kidney, spleen; excess syndrome elements is Qi stagnation, dampness, phlegm; deficiency syndrome elements is Qi deficiency, Yang deficiency, blood deficiency. The drug addicts cause moderate impact on social relations of majority addicts. There is relationship between social relations and multiple Syndrome Elements ($P < 0.01$). **Conclusion** The drug addiction is the result of multiple Zang Fu dysfunctions. Liver depression is an important cause of the formation of drug addiction, Deficiency of the Spleen and Kidney is the main pathological basis, Phlegm is the root cause of drug addiction lingering. Apart from the physiological factors, drug-withdrawal is closely related to social and psychological factors.

KEY WORDS: Heroin; addicts; social relations; psychology; TCM; syndrome elements

(上接第 21 页)

[15] 游思湘,何湘蓉,隆雪明,等. 艾叶挥发油体外抗菌作用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2011, 30(3): 18-20.

[16] 梅全喜,高玉桥. 艾叶化学及药理研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(7): 1030-1032.

(编辑:徐建平)

Artemisia Volatile Oil in Rabbit Ear Acne Model and the Experimental Research of the Mechanism

JI Wei¹, SHEN Dekai², TANG Jie¹

(1. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. Anhui University of Traditional Chinese Medicine Institute of Acupuncture, Hefei 30038, China)

ABSTRACT: **Objective** In this study, we established an experimental acne model of rabbit ears, observed the histopathological changes of rabbit ear acne, the changes of skin mast cell and the effect of Artemisia volatile oil on acne in model rabbits. **Methods** 2 percent of coal-tar solution coated on the inner ear in rabbits, after 2 weeks, according to the experimental procedure, the rabbits were randomly divided into Blank control groups, Matrix groups, Artemisia volatile oil of high, medium and low concentration groups, 0.025% dimensional A acid cream group, a total of six group. Under the microscope observed the histopathological changes of rabbit ear acne and the changes of skin mast cell. **Results** After 2 weeks of coal-tar oil, Visible to the naked eye of rabbit ear appear human kind acne change; Under light microscopy show similar pathological changes likes human acne; The number of mast cells increased obviously, after the treatment of Artemisia volatile oil has decreased. **Conclusion** Artemisia volatile oil has a good effect on the experimental acne, reduced the inflammatory reaction, reduced the number of mast cells. In the treatment of acne the mechanism of Artemisia volatile oil is probably by inhibiting proliferation, chemotaxis and degranulation of mast cells.

KEY WORDS: acne; Artemisia volatile oil; mast cell