

本文引用:胡彬,杨逸璇,杨婉婷,王峰,陶梦颖,朱明芳.不同浓度的石榴皮多酚软膏对兔耳粉刺模型组织病理形态学的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(4):397-401.

不同浓度的石榴皮多酚软膏对兔耳粉刺模型组织病理形态学的影响

胡彬¹,杨逸璇¹,杨婉婷¹,王峰¹,陶梦颖¹,朱明芳^{2*}

(1.湖南中医药大学研究生学院,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙410005)

[摘要] **目的** 观察不同浓度的石榴皮多酚软膏对兔耳粉刺模型组织病理形态学的影响,确定痤疮治疗的最佳石榴皮多酚软膏浓度。**方法** 采用家兔左、右外耳道外缘处约2.0 cm×2.0 cm范围涂抹2%煤焦油溶液约0.5 mL,1次/d,连续2周以制成动物粉刺模型。将不同浓度(18%、9%、3%)的石榴皮多酚制备成软膏,均匀涂抹于兔耳粉刺模型,2次/d,连续4周。取材后在光镜下观察兔耳粉刺模型组织病理形态的变化。**结果** 石榴皮多酚中剂量组与阳性药物(异维A酸)组对粉刺模型病理组织形态学兔耳炎症程度、角化程度、毛囊扩张程度的影响最为显著;模型组与空白组相比,兔耳炎症、角化、毛囊扩张显著($P<0.01$);与模型组相比,石榴皮多酚中剂量组与阳性药物组均能显著降低兔耳炎症程度、角化程度、毛囊扩张程度($P<0.01$);石榴皮多酚高剂量组与石榴皮多酚低剂量组也能降低兔耳炎症程度、角化程度、毛囊扩张程度($P<0.05$),但不如石榴皮多酚中剂量组与阳性药物组($P<0.05$)。**结论** 石榴皮多酚中剂量组及阳性药物组对兔耳粉刺模型的抗角化及抗炎作用最显著。

[关键词] 石榴皮多酚软膏;抗角化;粉刺;组织病理学

[中图分类号] R285.5;R758.73+3

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.04.008

Study on the Preparation of Pomegranate Peel Polyphenol Ointment and its Effect on the Pathomorphology of Rabbit Ear Acne Model

HU Bin¹, YANG Yixuan¹, YANG Wanting¹, WANG Feng¹, TAO Mengying¹, ZHU Mingfang^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

[Abstract] **Objective** To observe the different concentration of pomegranate peel polyphenols ointment on histopathologic morphology in rabbit ear acne model, and to determine the best concentration of pomegranate peel polyphenols ointment on acne. **Methods** The 2% coal tar daub solution about 0.5 mL was smeared at about 2.0 cm x 2.0 cm range of rabbit left and right outer edge, once daily for two weeks to make rabbit ear acne model. The different concentration (18%, 9%, 3%) of pomegranate peel polyphenols ointment was prepared, which was smeared evenly on the rabbit ear acne model, twice daily for four weeks. The histopathologic changes were observed under light microscopy. **Results** The medium dose of pomegranate peel polyphenols group and the control group (isotretinoin) showed the most obvious effect on the pathological histology of acne model in the degree of inflammation, keratinization, hair follicles expansion. Compared with blank group, the degree of inflammation, keratinization, hair follicles expansion of model group was more significant ($P<0.01$). Compared with the model group, the medium dose of pomegranate peel polyphenols group and the control group could significantly decrease the degree of inflammation, keratinization, hair follicles expansion ($P<0.01$); the low dose and high dose of pomegranate peel polyphenols groups also could obviously decrease the degree of inflammation, keratinization, hair follicles expansion ($P<0.05$), the decreased degree in which was lower than medium dose of pomegranate peel polyphenols group and the control group ($P<0.05$). **Conclusion** The medium dose of pomegranate peel polyphenols group and the control group show the most significant anti-keratinization and anti-inflammatory effect on the rabbit ear acne model.

[Keywords] pomegranate peel polyphenols ointment; anti-keratinization; acne; histopathology

[收稿日期] 2017-04-11

[基金项目] 湖南省中医药科研基金资助项目(201425,201705);湖南中医药大学研究生创新项目(CX2016B379,2017CX18)。

[作者简介] 胡彬,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治皮肤病。

[通讯作者] *朱明芳,女,教授,博士研究生导师,E-mail:26715858@qq.com。

痤疮(acne)是一种发生在青少年和成人中常见的毛囊皮脂腺的慢性炎症性皮肤病,好发于颜面及胸背部皮脂腺,形成毛囊性丘疹、结节、脓疱、囊肿、瘢痕等^[1]。目前,西医治疗痤疮的主要药物包括维甲酸类药物、抗生素类、抗雄激素和雌性激素类药物、糖皮质激素、锌制剂等^[2-5],以上治疗虽可使症状明显减轻,但还是出现诸多问题,如症状易反复、副作用大、疗程长、耐药性及致畸性等,例如异维A酸^[6]在临床使用中可发生唇炎、眼干、鼻黏膜干燥等皮肤黏膜反应^[7-9]。由此可见,西药的不良反应及副作用大大降低了患者的依从性,从而使临床应用局限^[10]。近年来,中医药治疗痤疮,疗效明显,且剂型多样,副作用小,来源丰富,很受患者的青睐。因此,中药制剂治疗痤疮的研究已成为皮肤科研究中的热点,导师朱明芳临床应用发现无论是内服还是外用石榴皮治疗痤疮都有较好疗效,而以石榴皮为主的多种中药打粉制成面膜疗效尤为显著,经前期研究得出石榴皮中石榴皮多酚起着决定性的作用^[11]。因此,本研究观察了不同浓度石榴皮多酚软膏对痤疮治疗的疗效,并确定最佳浓度。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级新西兰大耳白兔42只,雌雄各半,体重(2.5±0.5)kg,湖南中医药大学动物实验中心提供,每只分笼圈养于动物中心实验室兔豚鼠实验室。饲养温度20~25℃,湿度50%~70%。

1.2 主要试剂

煤焦油(上海源叶生物科技有限公司),0.025%维A酸乳膏(重庆华邦制药股份有限公司),自制高、中、低浓度石榴皮多酚软膏[按处方量分别称取十二烷基硫酸钠0.250~0.375g、甘油10g、白凡士林4.5g、十八醇5g、单硬脂酸甘油酯5g、液体石蜡3g、硬脂酸2.5~3.5g、月桂氮酮1.2~1.8g,水适量,总量至100g。水油两相分别水浴加热至70~80℃,搅拌至熔融。将水相以细流状缓缓加入油相中,70~80℃水浴下持续搅拌10min,室温下继续搅拌至冷凝,得水包油(O/W)型软膏基质]。无水乙醇、0.9%氯化钠注射液、10%水合氯醛、4%多聚甲醛,均为谷歌生物(长沙)生物科技有限公司提供。

1.3 主要仪器

ES-1000E型电子天平(湖南长沙湘平科技发展有限公司);Sigma1-15K高速冷冻离心机(德国Sigma公司);双目倒置显微镜(OLYMPUS公司);3mm直径打孔器等。

1.4 动物造模^[12]

将新西兰大耳兔在适应性喂养1周后,于第2周开始在左、右外耳道外缘处约2.0cm×2.0cm范围涂抹2%煤焦油溶液约0.5mL,1次/d(煤焦油临时用95%酒精配制成2%的煤焦油溶液),连续2周以制成动物粉刺模型。

1.5 实验分组与干预

42只兔随机分为7组,为空白组、模型组、基质组、阳性组、低剂量组、中剂量组、高剂量组。空白组正常饲养,其余6组均于第2周给予造模处理,造模成功后于第4周开始干预,空白组和模型组给予0.1mL生理盐水涂抹两耳;基质组每日在兔耳角化处涂0.1g的基质(不含石榴皮多酚);高剂量、中剂量、低剂量组每日于左右角化处分别涂0.1g的浓度为18%、9%、3%的石榴皮多酚软膏(90%石榴皮多酚购自陕西腾迈生物科技有限公司,软膏基质于湖南中医药大学药学院自制)。阳性组每天于左右耳角化处涂0.025%维A酸乳膏0.1g。每天涂2次,连续3周,给药部位均为兔耳造模处。

在第42天,即末次给药24h后取材,取材时乌拉坦耳缘静脉缓慢注射麻醉,待动物进入麻醉状态后,用3mm直径打孔器制备左右耳涂煤焦油处的4个耳片,用10%的福尔马林固定,石蜡包埋,切片,HE染色,于光镜下观察组织变化,拍照,测量。

1.6 指标测定

光镜下观察各组组织病理学表现,主要集中在炎性细胞浸润、角质层厚度、皮脂腺大小、毛囊扩张程度等方面。光镜下随机选5个高倍视野测量角质层厚度、皮脂腺长短径、炎性细胞浸润程度、毛囊扩张程度。按以下标准进行评分和分级^[13]。炎性细胞评分与分级标准,正常:无炎性细胞浸润;轻度:局部性炎细胞浸润,细胞散在(1分);中度:局灶性炎细胞浸润,细胞较密集,或出现多个浸润灶(2分);重度:弥漫性炎细胞浸润(3分)。毛囊扩张程度评分与分级标准,正常:与空白组相同(0分);轻度:角化物质增多,但不致密,且为未充满毛囊(1分);中度:角化物

质致密,但为充满毛囊;或角化物质不致密,但充满毛囊(2分);重度:角化物质致密,充满毛囊(3分)。

1.7 统计方法

统计学分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料进行正态性检验。符合正态分布者,采用单因素方差分析,方差齐者采用 *LSD* 法,方差不齐采用非参数检验。计数资料采用卡方检验进行描述统计,用卡方检验进行数据分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

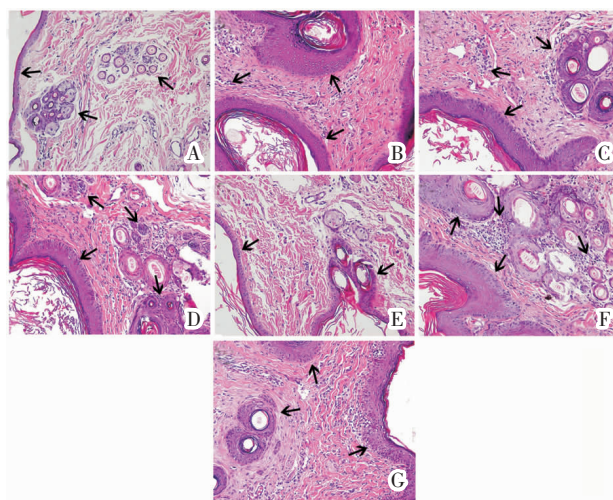
2 结果与分析

2.1 不同浓度石榴皮多酚软膏对粉刺模型兔耳组织病理学的影响

空白组兔耳皮肤上皮结构完整,细胞无水肿,排列整齐,深层毛囊、皮脂腺、汗腺组织无炎症细胞浸润,毛囊壁无反应性增生等情况。模型组兔耳皮肤上皮明显充血肿胀,细胞结构不完整,排列欠连续;表皮角质层结构排列不规则,局部出现增生增厚;深层毛囊、皮脂腺、汗腺组织有大量炎症细胞浸润,毛囊壁反应性增生增厚严重,毛囊内出现大量组织沉积物,皮脂腺结构呈现反应性增大,角质化严重;血管内皮出现细胞肿胀,充血,有反应性增生;耳廓间质纤维组织有纤维化倾向,有大量单核细胞、中性粒细胞浸润,出现急慢性炎症改变。基质组在角质化及毛囊增生、炎症反应方面与模型组表现类似。低剂量组、高剂量组兔耳皮肤组织病理学观察与模型组有一定的区别,炎症程度、毛囊增生程度等较模型组减轻,呈现一定的治疗作用。中剂量组、阳性药物组从组织病理染色结果来看疗效比较显著,主要体现在减轻角质化程度、局部组织充血、炎症程度等方面。见图 1。

2.2 不同浓度石榴皮多酚软膏对粉刺模型兔耳炎性细胞浸润程度的影响

各组大鼠炎性细胞浸润程度分级及评分结果见表 1,在炎性细胞浸润程度分级上模型组与空白组经卡方检验, $\chi^2=22,P<0.001$,而炎性细胞浸润评分模型组也显著高于空白组, $P<0.01$,说明粉刺模型局部出现较强的炎症反应;基质组与模型组的炎性细胞浸润程度经卡方检验, $\chi^2=1.725,P=0.422$,且在炎性评分上经统计学比较两者无显著性差异($P>0.05$);



注:A.空白组;B.模型组;C.基质组;D.低剂量组;E.中剂量组;F.高剂量组;G.阳性药物组

图 1 各组家兔耳组织病理学观察光镜图(HE,×250)

低剂量组与模型组在炎性细胞浸润程度上经卡方检验, $\chi^2=11.511,P=0.009$,而局部组织炎性评分相比也显示出统计学差异 $P<0.05$;中剂量组与模型组的比较时发现中剂量组能显著改善兔耳炎性等级,经卡方检验 $\chi^2=9.455,P=0.024$,且对炎性评分的两两比较时发现 $P<0.01$,差异具有显著统计学意义;高剂量组与模型组炎性程度相比经卡方检验 $\chi^2=9.055,P=0.029$,炎性评分比较 $P<0.05$;阳性药物炎性细胞浸润程度分级及评分的组间比较,结果发现与模型组经卡方检验 $\chi^2=12.067,P=0.007$,炎性评分比较 $P<0.01$ 。从表中可知,在对兔耳炎性细胞浸润程度的影响上,中剂量组与阳性药物组作用相当,均有较强的治疗作用,低剂量组与高剂量组也存在治疗作用,但效果不如中剂量组与阳性药物组。

表 1 各组兔耳炎性细胞浸润程度分级及评分的比较

组别	分级/例				评分 $t(\text{分}\bar{x}\pm s)$
	正常	轻	中	重	
空白组	11	1	-	-	0.09±0.3
模型组	-	1	2	9	2.45±0.25 ^{###}
基质组	-	-	4	8	2.33±0.31
低剂量组	2	2	7	1	2.08±0.54*
中剂量组	3	4	3	2	1.62±0.28**
高剂量组	1	1	8	2	2.21±0.34*
阳性药物组	4	3	4	1	1.68±0.31**

注:与空白组相比,### $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

2.3 不同浓度石榴皮多酚软膏对粉刺模型兔耳角质层厚度及皮脂腺大小的影响

不同浓度石榴皮多酚软膏对粉刺模型兔耳均存在一定的影响,但各组之间差异明显,模型组与空白组比较皮肤角质层厚度、皮脂腺长短径出现明显增厚、增长,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),说明粉刺模型兔耳皮肤角质化明显,皮脂腺出现明显增生。基质组与模型组比较差异并不明显,角质层厚度及皮脂腺长短径经统计学比较($P>0.05$),说明石榴皮多酚基质物质对粉刺兔耳皮肤角质化、皮脂腺增生没有影响。低剂量组、高剂量组与模型组比较皮肤角质层厚度、皮脂腺长短径明显降低($P<0.05$),但与空白组、中剂量组和阳性药物组比较明显增厚($P<0.05$),说明高、低剂量的石榴皮多酚软膏对粉刺模型兔耳皮肤角质层厚度有一定的改善作用,但作用一般。而中剂量组、阳性药物与模型组比较,其皮肤角质层厚度、皮脂腺长短径要显著低于模型组($P<0.01$),说明中剂量石榴皮多酚软膏在降低皮肤角质层厚度上作用明确,与阳性药物作用相当。见表2。

表2 各组兔耳角质层厚度、皮脂腺长短径的比较
($\bar{x}\pm s, n=12$, 分)

组别	角质层厚度/ μm	皮脂腺长短径值/ μm	
		短径值	长径值
空白组	25.42±1.08	24.18±3.21	27.32±4.28
模型组	68.28±10.25 ^{###}	33.26±4.89 ^{###}	38.75±5.11 ^{###}
基质组	69.75±8.76 ^{###}	35.06±5.72 ^{###}	40.12±6.19 ^{###}
低剂量组	58.46±12.62 ^{###*}	30.14±6.78 ^{###}	34.79±4.58 ^{###}
中剂量组	42.24±4.58 ^{###**}	27.32±2.87 ^{###*}	31.64±4.75 ^{###*}
高剂量组	60.31±11.58 ^{###**}	31.28±3.52 ^{###}	35.25±4.22 ^{###}
阳性药物组	43.46±5.66 ^{###**}	28.18±2.34 ^{###**}	32.36±5.62 ^{###**}
F 值	13.01	4.58	3.86
P 值	0.00	0.01	0.01

注:与空白组相比,### $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$;** $P<0.01$ 。

2.4 不同浓度石榴皮多酚软膏对粉刺模型兔耳毛囊扩张程度的影响

各组大鼠毛囊扩张程度分级及评分结果如表3,在毛囊扩张程度分级上模型组与空白组经卡方检验, $\chi^2=21.8, P<0.001$,而毛囊扩张程度评分模型组也显著高于空白组($P<0.01$),说明粉刺模型局部毛囊扩张明显;基质组与模型组的毛囊扩张程度经卡方检验, $\chi^2=1.245, P=0.458$,且在毛囊扩张评分上经统

计学比较两者无显著性差异 $P>0.05$;低剂量组与模型组在毛囊扩张程度上经卡方检验, $\chi^2=12.313, P=0.007$,而局部组织毛囊扩张评分相比也显示出统计学差异 $P<0.05$;中剂量组与模型组的比较时发现中剂量组能显著改善兔耳毛囊扩张程度,经卡方检验 $\chi^2=10.232, P=0.032$,且对毛囊扩张评分的两两比较时发现 $P<0.01$,差异具有显著统计学意义;高剂量组与模型组毛囊扩张程度相比经卡方检验 $\chi^2=10.036, P=0.031$,毛囊扩张评分比较 $P<0.05$;阳性药物毛囊扩张程度分级及评分的组间比较,结果发现与模型组经卡方检验 $\chi^2=11.027, P=0.008$,评分比较 $P<0.01$ 。从表中可知,在对兔耳毛囊扩张程度的影响上,中剂量组与阳性药物组作用相当,均有较强的治疗作用,低剂量组与高剂量组也存在治疗作用,但疗效不如中剂量组与阳性药物组。见表3。

表3 各组兔耳毛囊扩张程度的分级及评分比较

组别	n	分级/例			评分 /(分, $\bar{x}\pm s$)	
		正常	轻	中		重
空白组	12	12	-	-	0	
模型组	12	-	2	2	8	3.35±0.15 ^{###}
基质组	12	-	1	4	7	3.21±0.28
低剂量组	12	1	2	8	1	2.12±0.62*
中剂量组	12	4	3	3	2	1.59±0.24**
高剂量组	12	2	-	9	1	2.18±0.36*
阳性药物组	12	3	4	3	2	1.71±0.42**

注:与空白组相比,### $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$;** $P<0.01$ 。

3 讨论

痤疮是多种因素共同导致的皮肤病,痤疮丙酸杆菌的定殖及炎症反应、皮脂腺分泌异常增多、毛囊口过度角化等是其发生的最重要的机制^[4]。其中,毛囊皮脂腺导管的角化过度是痤疮发病的基础,是构成痤疮病理过程的主要环节之一,由导管角质形成细胞过度增生和导管内皮角化的细胞脱落减少引起^[15]。炎症反应是痤疮发病机制中的重要组成部分,多种细胞因子作用其中,导致局部炎症反应和机体对其发生免疫反应^[16-17]。由此可知,抗角化和抗炎症因子是痤疮治疗的重要手段^[13]。

欧阳恒教授“以皮治皮”理论认为,在辨病与辨证准确的基础上选用皮类的药物治疗相关皮肤疾病,常可收到事半功倍的效果^[18-19]。例如,根据痤疮表现出来的粉刺、丘疹、结节、囊肿等病变的不同皮

损形态,选用其皮损外形酷似或近似的药材如石榴皮以治疗。且经过本课题组前期研究发现石榴皮治疗痤疮疗效突出,因此,进一步探索石榴皮中某种成份是否能有效治疗痤疮具有较大的研究价值。

前期研究发现石榴皮中石榴皮多酚为最主要的活性物质,目前应用广泛,多个研究报道了石榴皮多酚有降脂、抗菌、抗炎等作用,且通过前期研究也发现了石榴皮多酚能有效抑制痤疮发病的重要致病菌——痤疮丙酸杆菌^[7],因此,本研究从石榴皮多酚外用剂型软膏入手,通过对兔耳粉刺模型的干预,观察了不同浓度石榴皮多酚软膏对兔耳粉刺模型皮肤的抗炎、抗角化作用。通过研究得出低、中、高剂量的石榴皮多酚软膏均对兔耳粉刺模型有抗角化及抗炎作用,其中中剂量疗效最显著。本研究结果为“以皮治皮”理论提供了一定的实验依据,也为临床开发和应用石榴皮多酚软膏新药提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 张丽,王凡,尹小娥,等.消痤胶囊对兔耳痤疮模型抗角化作用及血清睾酮、雌二醇含量的影响[J].长春中医药大学学报,2014,30(5):796-798.
- [2] 卢春丽,熊霞.痤疮治疗研究进展[J].中国卫生标准管理,2014,5(3):79-80.
- [3] RIDD M J. The management of acne in primary care [J]. Br J Dermatol, 2017,176(1):1-2.
- [4] COOPER A J, HARRIS V R. Modern management of acne[J]. Med J Aust, 2017,206(1):41-45.
- [5] GLOOR M. Modern therapy of acne vulgaris. A therapy proposal for the management of uncomplicated cases[J]. Fortschr Med, 1979,97(1):26-32.
- [6] 邹迪.异维A酸联合阿达帕林凝胶治疗痤疮患者疗效及不良反应研究[J].中国高等医学教育,2016,11(12):143-144.
- [7] TORZECKA J D, DZIANKOWSKA-BARTKOWIAK B, GERLICZ-KOWALCZUK Z, et al. The use of isotretinoin in low doses and unconventional treatment regimens in different types of acne: a literature review[J]. Postepy Dermatol Alergol, 2017,34(1):1-5.
- [8] MELNIK B C. Apoptosis May Explain the Pharmacological Mode of Action and Adverse Effects of Isotretinoin, Including Teratogenicity[J]. Acta DermVenereol, 2017, 97(2):173-181.
- [9] TAN T H, HALLETT R, YESUDIAN P D. Efficacy and relapse rates of different Isotretinoin dosages in treating acne vulgaris: systemic review[J]. Clin Med (Lond), 2016,16(3):s34.
- [10] 陈德宇,钟建桥,许颀.复方紫金霜对兔耳粉刺模型治疗及P物质的影响[J].中国皮肤性病杂志,2007,21(9):527-530.
- [11] 张晓玲,朱明芳,杨柳,等.石榴皮多酚对痤疮丙酸杆菌体外抑菌活性的研究[J].湖南中医药大学学报,2015,35(9):23-25.
- [12] 顾炜,张小卿,吴景东.痤疮合剂对兔耳痤疮模型 MAPK 相关信号通路影响[J].辽宁中医药大学学报,2017,19(8):12-17.
- [13] 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.
- [14] 李晓娟,林新瑜.痤疮丙酸杆菌与痤疮炎症反应关系的研究进展[J].临床皮肤科杂志,2017,46(2):142-145.
- [15] ARAVIISKAIA E, DRÉNO B. The role of topical dermocosmetics in acne vulgaris[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol,2016,30(6):926-935.
- [16] DRENO B, GOLLNICK H P, KANG S, et al. Understanding innate immunity and inflammation in acne: implications for management[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol,2015,29(4):3-11.
- [17] GOLLNICK H P. From new findings in acne pathogenesis to new approaches in treatment[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2015,29(5):1-7.
- [18] 谭金华,薛素琴.欧阳恒“以皮治皮”法治疗皮肤病临床经验[J].河南中医,2015,35(7):1505-1506.
- [19] 朱慧婷,张苍,蔡念宁.中医取类象思维在皮肤科的应用[J].中医杂志,2013,54(15):1286-1288.

(本文编辑 杨 瑛)