

响应面法优化油腻型痤疮方中药配比

董银卯¹, 林楠¹, 孟宏^{2*}

(1. 北京工商大学, 北京 100048; 2. 中国中医科学院, 北京 100700)

[摘要] **目的:**通过响应面优化方法得到中医验方油腻型痤疮方的最佳复配比例。**方法:**采用体外抑菌实验、体外抑制透明质酸酶和凝血酶实验、抑制人体皮脂分泌实验,以这些实验结果为指标,进行响应面优化设计,最终找到最佳配比。**结果:**模拟预测最佳中药组方的复配比例是:蒲公英提取物 1.19 份,厚朴提取物 2.19 份,川芎提取物 2.24 份,在此复配比例下可得到相对抑脂率的理论值为 38.9%。由于 3 种中药提取物都是 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,因此提取物的比例可以表示为它们中药材本身的质量比。实验实际检测值为 40.25%。**结论:**用响应面优化法模拟预测的抑脂率与实测值非常相似,响应面优化法可较好地用于复方配伍比例的研究。

[关键词] 痤疮; 响应面; 皮脂; 痤疮丙酸杆菌; 凝血酶

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0069-05

Response Surface Method for Optimizing Ratio of Oily-acne Herbs Proportioning

DONG Yin-mao¹, LIN Nan¹, MENG Hong^{2*}

(1. Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize mixed proportion for prescription of oily acne herbs through response surface method. **Method:** Bacteriostasis experiment, hyaluronic acid and inhibiting thrombin experiment *in vitro* and inhibiting human sebum secretion experiment were carried out. Based on the results of these experiments, the indicators were analyzed by response surface method to find the best ratio finally. **Result:** Simulation and prediction of the best ratios of the herb extracts showed dandelion extract (1.19), Magnolia bark extract (2.19) and ligusticumchuanxiong extract (2.24). The prediction estimated a relative-inhibiting compound fat rate of 38.9%. Because all three kinds of Chinese traditional medicine extract is $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, extracts can be expressed as a proportion of their own quality of Chinese herbal medicines. The real experimental value of the relative-inhibiting compound fat rate was 40.25%. **Conclusion:** The predicted value of the relative-inhibiting compound fat rate though response surface method is very similar to the experimental value. Response surface method can be employed in the proportion study of compound prescriptions.

[Key words] acne, response surface, sebum, propionibacterium acnes, thrombin

寻常性痤疮一般简称为痤疮,是一种慢性皮脂腺炎症,临床上主要表现在面部、胸部及背部出现粉刺、丘疹、疱疹、囊肿和结节,有的可形成瘢痕。痤疮

病因复杂,根据痤疮类型,严重程度的不同,其治疗手段多种多样,近年来国内外学者对痤疮在发病机制和临床研究方面有了很大进展^[1-3]。

[收稿日期] 20120703(433)

[第一作者] 董银卯,教授,硕士生导师,主要从事中草药化妆品理论与技术、中医体质与皮肤养生、化妆品功效添加剂, Tel: 010-68987110, E-mail: ymdong2008@163.com

[通讯作者] *孟宏,副教授,从事中医药对损容性疾病的作用研究及对相关优势病种的作用研究, Tel: 010-64014411, E-mail: menghong2000@163.com

1 材料

油膩型痤疮方,由北京工商大学提供,配伍为蒲公英、厚朴、川芎,购自北京同仁堂航天桥店;无水乙醇,北京化学试剂厂,批号 20120301;丙二醇,北京化学试剂厂,批号 20120504;脑心浸液琼脂,北京陆桥技术有限责任公司,批号 20100221;营养肉汤,北京陆桥技术有限责任公司,批号 20101120;凝血酶标准品, Sigma 公司,批号 20101114;透明质酸酶, Sigma 公司,批号 20110715;透明质酸钠, Sigma 公司,批号 20110623。

UV2550 型分光光度计(北京普析通用仪器有限公司), Sebumeter SM810 皮肤油脂测试仪(德国 CK 公司)。

2 方法及结果

2.1 中药提取液的制备 对蒲公英、厚朴和川芎进行提取,方法分别为:以 13 倍药材量的 85% 乙醇提取蒲公英 2 次,每次 1 h^[4],70% 的乙醇溶液加热回流提取厚朴酚及和厚朴 3 酚,当提取时间为 3 h,料液比 1:10^[5],8~10 倍量 95% 乙醇回流提取川芎 3 次,每次 1.5 h^[6]。

2.2 对皮脂分泌功能的影响 受试人群 22~26 岁,共 30 人,男女各半。选择受试者额头(分左右两部分)依次循环标记:受试区域样品组和空白对照区域。技术人员使用皮肤油脂测试仪测试测试部位 3~5 次,取平均值,记为空白值。在受试者实验部位涂抹样品,依次使用测试样品。受试者在连续使用样品 0,1,2,3 h 后,由技术人员使用皮肤油脂测试仪测量 3~5 次,取平均值。

$$\text{相对抑脂率} = \frac{(\text{油脂含量}_{\text{空白对照区}} - \text{油脂含量}_{\text{受试区}}) / \text{油脂含量}_{\text{空白对照区}}}{\text{油脂含量}_{\text{空白对照区}}}$$

此值越大,说明样品抑脂效果越明显。

2.3 提取液对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌活力的影响

2.3.1 受试菌种 金黄色葡萄球菌 ATCC100817;痤疮丙酸杆菌 ATCC11827。以上菌种从广东微生物菌种保藏中心购买,为装入安瓿管中的冻干粉。于北京工商大学进行传代培养,菌种保存于 2~6℃ 冰箱。

实验时,滴加 0.1 mL 的液体培养基于安瓿管中,用手震荡摇匀,管中菌种冻干粉为黏稠状。用接种环挑菌接入相对应的平板和斜面上进行活化,细菌置于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h。在无菌条件下,分别挑取一环已活化好的菌种放入 9 mL 无菌超纯水中震荡摇匀、分级制成一系列菌悬液。麦氏比浊管制成菌悬液密度为 10⁶ 个/mL。然后将培养皿

分成 2 份,向其中倒入预先融化好、并灭菌处理过的培养基,一部分培养皿倒入脑心浸提琼脂培养基,另一部分倒入营养肉汤培养基,冷却,凝固。分别取 2 种细菌的菌悬液 300 μL 于相应培养基(痤疮丙酸杆菌悬液移至含有脑心浸提琼脂的培养皿中,金黄色葡萄球菌悬液移至含有营养肉汤的培养皿中),均匀涂布,在每个培养皿上方均匀摆放 3 个牛津杯,3 个牛津杯中注入 200 μL 同种中药提取液,作为 3 个平行。将放有痤疮丙酸杆菌的培养皿放入 37℃ 的厌氧生化培养箱中培养 72 h,放有金黄色葡萄球菌的培养皿放入 37℃ 的生化培养箱中,均培养 48 h。

2.4 对透明质酸酶的影响(体外) 采用透明质酸酶体外抑制法测定抗过敏功效。

取 0.1 mL 0.25 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 溶液和 0.5 mL 透明质酸酶液 37℃ 保温培养 20 min;加入样品液 0.5 mL,继续 37℃ 保温培养 20 min;加入 0.5 mL 透明质酸钠液 37℃ 保温 30 min,常温放置 5 min;加入 0.1 mL 0.4 mol·L⁻¹ NaOH 溶液和 0.5 mL 乙酰丙酮溶液,置于沸水浴中加热 15 min 后立即用冰水冷却 5 min;加入埃尔利希试剂 1.0 mL 并用 3.0 mL 无水乙醇进行稀释,放置 20 min 显色,用分光光度计测定其吸光度 A。

$$\text{抑制率} = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}) - (A_{\text{试验}} - A_{\text{试验空白}})}{A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}} \times 100\%$$

式中:A_{对照} 用醋酸缓冲溶液代替样品溶液,A_{对照空白} 用醋酸缓冲溶液代替样品溶液及酶液,A_{试验空白} 用醋酸缓冲溶液代替酶液。

先对 A 对照溶液进行 450~700 nm 范围的波长扫描,以确定最大吸收波长,然后以去离子水作为参比,在该最大吸收波长处分别进行相关组 ABS 值测定。

2.5 对凝血酶的影响(体外) 纤维蛋白原平板的制作用 2.5% 琼脂糖与 0.1% 纤维蛋白原(1:1 体积)制作成纤维蛋白原平板,厚度约为 2 mm,冷却后即制成纤维蛋白原平板。按 1.6 cm 的间距打孔。孔径约为 4 mm。

凝血酶标准曲线的制作及样品测定用 0.05 mol·L⁻¹ pH 7.4 磷酸缓冲液溶解凝血酶标准品,并稀释成 28,14,7,3.5,1.75 U·mL⁻¹ 系列浓度。用同样的缓冲液 2 mL 溶解凝血酶检品,并作 100 倍稀释。将稀释后的对照品、检品分别在上述板孔中加样,每孔加样 18 μL。平皿加盖后置 37℃ 恒温扩散反应 9 h。用游标卡尺测量各反应孔沉淀圈直径(mm),以各凝血酶对照品反应孔沉淀圈直径为纵

坐标,凝血酶活性为横坐标绘制标准曲线,并进行方程回归计算。

在孔板中加入 $9 \mu\text{L}$ 样品,然后加入 $9 \mu\text{L}, 1.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 凝血酶,根据前面步骤对其进行沉淀圈直径检测,然后对应标准曲线计算抑制率,计算公式为:

抑制率 = (凝血酶沉淀圈直径 - 样品沉淀圈直径) / 凝血酶沉淀圈直径 $\times 100\%$

2.6 单因素试验 将上述提取物浓缩至 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,考察蒲公英、厚朴、川芎 3 种提取物混合时,其中 2 种比例不变,另外 1 种中药提取物在不同含量下的抑脂、抑菌抗炎和改善微循环的效果,即厚朴与川芎提取物各占 1 份,考察蒲公英提取物占 0, 1, 2, 3, 8 份复配比例和只加入蒲公英提取物的样品,即蒲公英提取物所占组方浓度百分比为 0%, 33.3%, 50%, 60%, 80%, 100%;其余厚朴提取物和川芎提取物以此类推,分别考察其对皮脂分泌的影响,对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌活力的影响,对透明质酸酶体外抑制作用,对凝血酶的体外抑制作用。图 1, 2, 3 分别为不同含量的蒲公英提取物、厚朴提取物和川芎提取物对组方各指标的影响。

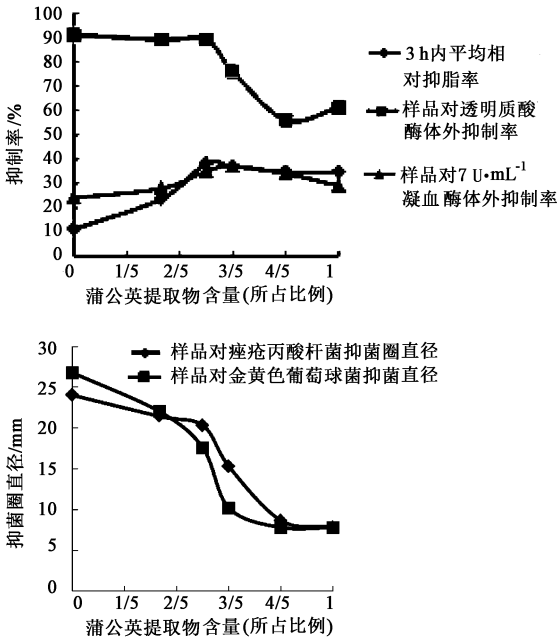


图 1 不同含量蒲公英提取物对组方各指标的影响

可以看出,当这 3 种中药提取物在质量浓度为 33.3%, 50%, 60% 这 3 个浓度时,提取物各方面的指标能达到均衡较好。

2.7 响应面优化 通过前面的筛选确定了蒲公英、厚朴和川芎 3 种中药提取物作为响应面优化组方的 3 个因素;通过单因素试验,分别以 3 种中药所占份数作为水平,即所占份数分别为 1~3 份。针对油腻

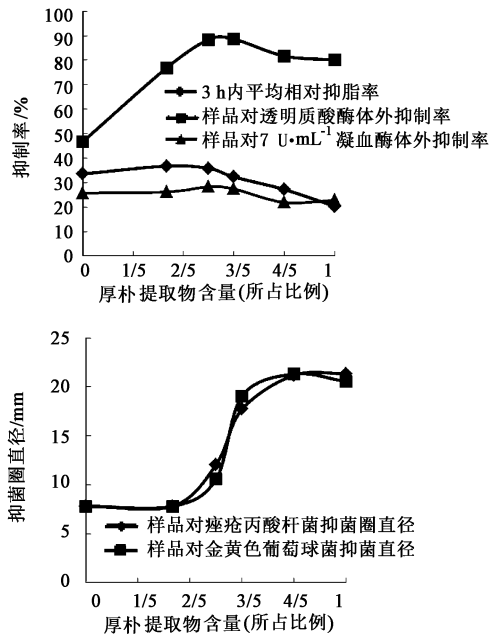


图 2 不同含量厚朴提取物对组方各指标的影响

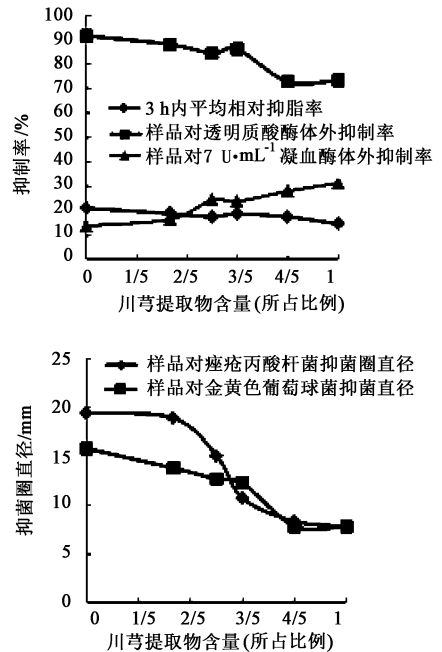


图 3 不同含量川芎提取物对组方各指标的影响

型痤疮的皮脂分泌旺盛这一特征,以相对抑脂率作为响应值,对组方中药进行综合分析确定最佳复配比例。具体实验方案和结果见表 1。

平均相对抑脂率的测定方法同 2.2,实验采用 SAS(SAS Package, Version 8.01) RSREG 程序对所得实验数据进行拟合回归分析,所得回归方程见公式:

$$Y_1 = 37.08 - 3.43A + 1.37B + 2.61C - 1.86A^2 - 2.55B^2 - 2.85C^2 + 0.39AB + 1.43AC - 0.34BC$$

通过软件分析,当“Prob > F”值 < 0.05 即表示

表 1 提取物混合后对皮脂分泌作用响应面分析方案

No.	A 蒲公英 提取物份数	B 厚朴 提取物份数	C 川芎 提取物份数	平均相对 抑脂率/%
1	1.00	1.00	2.00	34.1
2	2.00	1.00	1.00	26.9
3	1.00	2.00	1.00	36.1
4	1.00	2.00	3.00	39.0
5	2.00	2.00	2.00	37.7
6	2.00	3.00	3.00	35.8
7	2.00	2.00	2.00	36.7
8	3.00	1.00	2.00	30.0
9	2.00	1.00	3.00	32.2
10	2.00	2.00	2.00	36.5
11	2.00	2.00	2.00	38.9
12	2.00	3.00	1.00	31.8
13	2.00	2.00	2.00	35.6
14	3.00	2.00	1.00	22.9
15	3.00	2.00	3.00	31.5
16	1.00	3.00	2.00	34.6
17	3.00	3.00	2.00	32.0

表 2 提取物混合后抑制皮脂作用的响应面法

回归方程方差分析					
方差来源	SS	f	MS	F	P
回归模型	257.38	9	28.60	5.53	0.001 73
A	93.91	1	93.91	18.15	0.003 7
B	14.99	1	14.99	2.90	0.032 5
C	54.39	1	54.39	10.51	0.014 2
A ²	14.55	1	14.55	2.81	0.037 5
B ²	27.46	1	27.46	5.31	0.044 7
C ²	34.23	1	34.23	6.62	0.036 9
AB	0.62	1	0.62	0.12	0.740 1
AC	8.18	1	8.18	1.58	0.248 9
BC	0.45	1	0.45	0.087	0.776 9
残差	36.21	7	5.17		
失拟项	29.77	3	9.92	6.17	0.055 6
净误差	6.44	4	1.61		
总离差	293.59	16			
回归系数(R ²)	0.976 7				

该项指标显著,从表 2 看出,整体模型的“Prob > F”值 < 0.01,表明该二次方程模型高度显著。在选取的 3 因素中,对结果影响大小依次为:蒲公英提取物 > 厚朴提取物 > 川芎提取物。回归系数 R² 为 0.9527,说明此模型响应值(平均相对抑脂率)有 95.27% 来自于所选自变量(蒲公英提取物、厚朴提取物、川芎提取物),同时模型可以解释实验数据中 95.27% 的点,回归方程可以较好地描述与响应值之间的真实关系,利用此回归方程对实验结果进行计算是合理的,可以用回归方程来确定最佳复配条件。

固定回归方程的不同因素,做出各个因素的相互影响的响应曲面图和等高图,见图 4~6。从中可以直观地看出,随着相应值的增加,形成一个顶点或小山的形状,A,B,C 为明显的交互影响。

模拟预测最佳中药组方的复配比例是:蒲公英提取物 1.19 份,厚朴提取物 2.19 份,川芎提取物 2.24 份,在此复配比例下可得到相对抑脂率的理论值为 38.9%。由于 3 中药提取物都是 0.2 g·mL⁻¹,因此提取物的比例可以表示为它们中药材本身的质量比。实验实际检测值为 40.25%。理论预测值与实测值相近。说明响应面法模型可以较好的反映出中药组方抑制皮脂作用的复配条件。因此,采用响应面法优化得到的配比可信,具有可行性。

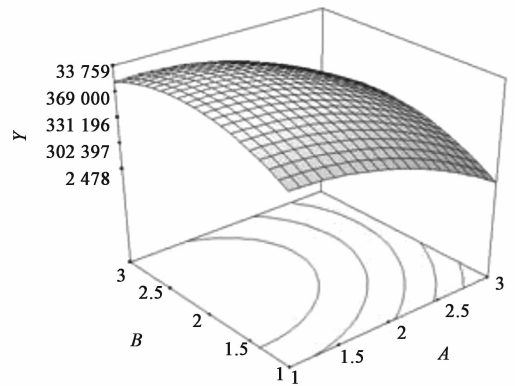


图 4 蒲公英含量(A)与厚朴含量(B)对平均相对抑脂率(Y)影响的等高线和曲面

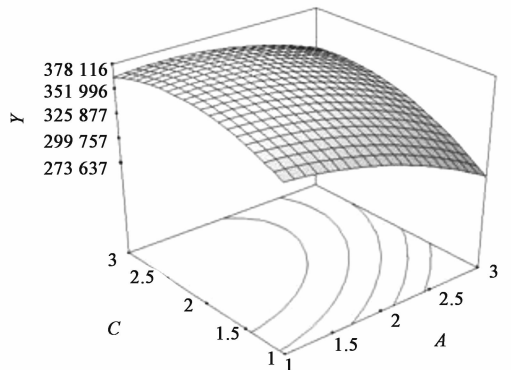


图 5 蒲公英含量(A)与川芎含量(C)对平均相对抑脂率影响(Y)的等高线和曲面

3 讨论

赵永青^[7]通过调查得出痤疮的总发病率为 29.53%,男性居多;李灿东等人^[8]通过流行病学调查发现,青春期寻常痤疮患病率为 86.9%,男性患

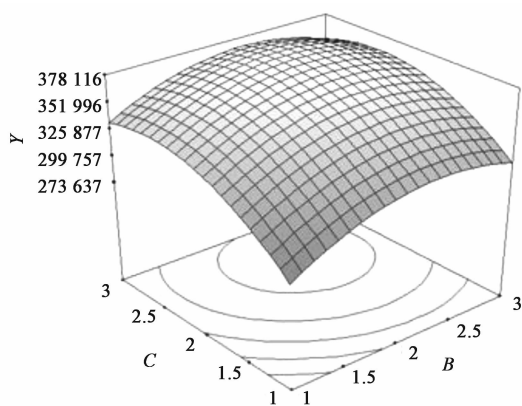


图6 厚朴含量(B)与川芎含量(C)对平均相对抑脂率(Y)影响的等高图和曲面

病率高于女性。

痤疮的发病机制尚不完全清楚,多数认为与痤疮丙酸杆菌的高水平、雄激素水平增高、皮脂分泌增多及毛囊口上皮角化过度以及血液微循环不畅有关^[9]。痤疮丙酸杆菌对寻常性痤疮的产生具有重要作用。痤疮丙酸杆菌为人体毛囊正常共生菌,大量的研究表明,痤疮患者的皮损部位和毛囊导管内存在明显高于常人水平的痤疮丙酸杆菌,但与痤疮严重程度无明显关联^[10]。许多研究将痤疮丙酸杆菌归结为痤疮炎症的首要因素^[11]。将痤疮患者皮损处的细菌分离后,痤疮丙酸杆菌占痤疮患者皮损细菌分离率的32.72%~61.12%,其次便是金黄色葡萄球菌、中间型葡萄球菌、表皮葡萄球菌和颗粒丙酸杆菌等革兰阳性菌^[12]。将活的痤疮丙酸杆菌的菌悬液注入健康人体皮肤中,可诱发炎症反应^[13],并进而诱发角质形成细胞分泌高水平的IL-1 α ,促进毛囊口角化^[14]。痤疮丙酸杆菌可通过Toll样受体(TLR)诱导人单核细胞及角质形成细胞等产生IL-12及IL-8等多种促炎因子,IL-12可介导原始Th0细胞向Th1细胞的分化,诱导Th1型免疫应答发生^[15]。

游离脂肪酸(FFA)与痤疮炎症的发生密切相关^[16]。FFA在皮肤表面的产生既来自于痤疮丙酸杆菌对甘油三酯的分解,又来自于人体自身方面。FFA能够促进皮脂腺细胞增殖和分化,导致毛囊皮脂腺角化异常,从而形成微粉刺。另外亚油酸能够抑制中性粒细胞氧自由基的产生和吞噬作用,维持皮肤屏障功能^[17],过多的皮脂分泌会稀释亚油酸,使这种作用下降。

根据临床表现不同,痤疮可分为多种证型,如油腻型痤疮、红肿型痤疮、痘印型痤疮还是综合型痤疮等。在治疗方面也会有所区别。本文主要针对油腻

型痤疮,对油腻型痤疮方中3味组成药物蒲公英、厚朴、川芎提取物组成配比进行响应面法优化研究,模拟预测出的抑脂率与实际检测值非常相似,说明此方法可信度高,有应用价值。

[参考文献]

- [1] 开雁. 中药内服外敷治疗轻中度寻常痤疮82例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 227.
- [2] 朱黎明. 异维A酸胶丸联合清肝祛毒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] 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.
- [4] 马丽春, 魏凤玲. 蒲公英提取工艺优选[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(13): 995.
- [5] 张朝晖, 王秋兰, 姚茂君. 厚朴枝中厚朴酚及和厚朴酚提取工艺比较[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 32.
- [6] 宋小妹, 唐志书. 中药化学成分提取分离与制备[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 124.
- [7] 赵永青, 彭海平, 陈振南, 等. 寻常性痤疮的患病率及相关因素分析[J]. 临床与实践, 2001, 19(10): 90.
- [8] 李灿东, 高碧珍, 成改霞, 等. 青少年寻常痤疮发病规律的流行病学研究[J]. 河南中医学院学报, 2006, 21(1): 24.
- [9] Harald Gollnick, William Cunliffe. Management of Acne [J]. J Am Acad Dermatol 2003, 49: S1.
- [10] 郝飞. 痤疮的系统抗生素疗法[J]. 临床皮肤科杂志, 2008, 37(9): 618.
- [11] 厉夏女, 孔令春. 痤疮的致病因素及治疗药物[J]. 药学建设, 2000, 9(12): 61.
- [12] 李继安. 痤疮病因的研究进展[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2000, 3(7): 677.
- [13] Bialecka A, Mak M, Biedron R, et al. Different pro-inflammatory and immunogenic potentials of Pmpionibacterium acnes and Staphylococcus epidermidis; implications for chronic inflammatory acne [J]. Arch Inll/UUnOITherExp (Warsz). 2005, 53(1): 79.
- [14] 鞠强, 石继海, 夏隆庆. 白介素-1与痤疮[J]. 国外医学: 皮肤性病学分册, 2001, 27(1): 24.
- [15] 蔡丽敏, 周展超. 痤疮炎症与天然免疫识别机制的研究进展[J]. 国际皮肤性病学期刊, 2008, 34(1): 51.
- [16] Zouboulis C C. Is acne vulgaris a genuine inflammatory disease? [J]. Dermatology, 2001, 203: 277.

[责任编辑 何伟]