

7 种中草药提取物抗过敏功效及刺激性研究

李杨¹, 董银卯^{1*}, 孟宏², 祝钧¹

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

[摘要] 目的: 考查地肤子皂苷、防风多糖、桃仁和金银花水提物、茶多酚、洋甘菊和仙人掌提取物的抗皮肤过敏作用, 探究其刺激性大小, 为作为具有抗过敏功效化妆品添加剂提供依据。方法: 采用透明质酸酶体外抑制试验和红细胞溶血试验, 对 7 种中草药提取物抗过敏特性及其刺激性进行探究。结果: 7 种中草药有效部位或成分的抗过敏抑制率分别为洋甘菊提取物(77.04%) > 金银花水提物(69.54%) > 茶多酚(68.01%) > 仙人掌提取物(62.67%) > 防风多糖(55.51%) > 地肤子皂苷(43.09%) > 桃仁水提物(32.74%); 其中只有茶多酚添加浓度超过 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时显示出一定的刺激性, 其他有效成分的溶血率均低于 20%, 刺激性很小。结论: 7 种中草药有效部位或成分均表现一定的抗过敏特性, 且在规定的添加量范围内刺激性均很小, 适合作为抗过敏化妆品添加剂使用。

[关键词] 中草药; 抗过敏; 抗刺激; 化妆品

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0191-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121206.1027.005.html>

[网络出版时间] 2012-12-6 10:27

[收稿日期] 20121008(548)

[第一作者] 李杨, 硕士研究生, E-mail: yangyangna@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 董银卯, 教授, 从事植物源化妆品功能成分开发与功效检测的研究, Tel: 010-68984917, E-mail: ymdong2008@163.com

揭示纳米雄黄可通过诱导肿瘤细胞凋亡和抑制其增殖发挥抗肿瘤作用, 其作用机制可能与上调 Caspase-3 的表达和下调 Survivin 的表达有关。

[参考文献]

[1] 赵辨. 临床皮肤病学 [M]. 3 版. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001: 1106.

[2] 王晓波, 袭荣刚, 李忠亮, 等. 纳米级雄黄粉体的制备 [J]. 解放军药学报, 2002, 18(3): 129.

[3] 赵蓉, 贾荣娣, 汪华君. 紫杉醇对人口腔鳞癌 KB 细胞生长抑制作用及诱导凋亡作用的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 177.

[4] 王秀娟. 六神丸联合化疗治疗中晚期胃癌的临床与诱导肿瘤细胞凋亡的实验研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2011: 27.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 316.

[6] 陈明亮, 谭帅, 张桂英, 等. 雷公藤内酯醇对皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞株增殖与凋亡的影响 [J]. 中南大学学报, 2009, 34(7): 638.

[7] 叶晓川, 杨祥良, 徐辉碧. 纳米雄黄研究进展 [J]. 化学进展, 2009, 21(5): 934.

[8] 詹秀琴, 赵凤鸣, 郭立玮. 超细微粒径雄黄的药代动力学研究及抑瘤作用比较 [J]. 实用中医药杂志, 2009, 22(7): 397.

[9] 杨玥, 陈静, 易娟, 等. 纳米雄黄对肺癌 A549 细胞及其肿瘤干细胞的凋亡诱导作用 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(6): 36.

[10] 高天舒, 韩晓晴, 尹慧丝. 补中益气汤对甲状腺功能减退大鼠心肌细胞凋亡及 Fas, FasL 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 236.

[11] 陈旭, 王娟, 蒋晓山, 等. 莪术醇对肺癌 A549 细胞凋亡诱导因子、聚 ADP 核糖聚合酶及 Caspase-3 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 157.

[12] Kavurma M M, Khachigian L M. Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression [J]. Cell Death Differ, 2003, 10(3): 36.

[13] Chakravarti A, Noll E, Black P M, et al. Quantitatively determined Survivin expression levels are of prognostic value in humangiomas [J]. Clin Oncol, 2002, 20(7): 1063.

[责任编辑 何伟]

Experimental Study on Anti-allergic Effect of Extracts from Seven Kinds of Chinese Herbal Medicine

LI Yang¹, DONG Yin-mao^{1*}, MENG Hong², ZHU Jun¹

(1. Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-allergic effect of extracts from Fructus Kochia Scoparia, *Saposhnikovia divaricata*, Peach seed, Lonicera, tea polyphenols, Chamomile Extract and Opuntia, to evaluate their irritating effect, and to provide data for the herbal medicine as potential additives in cosmetic. **Method:** The method of hyaluronidase inhibition *in vitro* was used to explore the anti-allergic properties of the extracts of the seven Chinese herbal medicine. And hemolysis of red blood cell was used to evaluate their irritating effects. **Result:** The anti-allergy inhibition rates of the extracts were as following: Chamomile Extract (77.04%) > Lonicera water extract (69.54%) > tea polyphenols (68.01%) > Opuntia extract (62.67%) > *S. divaricata* (55.51%) > Fructus Kochia Scoparia (43.09%) > Peach seed water extract (32.74%). In the seven extracts, only tea polyphenols (concentration over 6 g·L⁻¹) showed certain irritation, hemolysis rates of other extracts were lower than 20%, so irritation was very light. **Conclusion:** Extracts from seven kinds of Chinese herbal medicine show certain anti-allergic properties. And within a predetermined addition amount, their irritating can be very light. So they might be used as allergy cosmetic additives.

[Key words] Chinese herbal medicine; anti-allergy; anti-irritant; cosmetics

皮肤过敏是目前常见的皮肤疾病,严重影响人们的身心健康。近年来,化学药物治疗皮肤过敏的副作用日益显现,因此皮肤过敏的防治和含抗过敏中草药的新的护肤品的研制已经成为研究的热点。动物实验研究表明,地肤子皂苷能抑制速发型变态反应^[1]。防风多糖能增强机体的免疫能力^[2]。亦有实验研究表明防风 and 地肤子的组合方剂对皮肤过敏和瘙痒有很好的治疗作用^[3]。桃仁水提物对小鼠血清中的皮肤过敏抗体的产生有抑制作用^[4]。金银花水提物具有潜在的抗过敏功效,其对卵清蛋白介导的小鼠被动皮肤过敏反应的影响显示其有对抗 I 型变态反应的作用^[5]。临床试验表明金银花可以用来治疗皮肤过敏慢性荨麻疹,并且疗效显著^[6]。茶多酚对小鼠被动性皮肤过敏反应和组胺所引起的回肠收缩有明显的抑制作用^[7]。仙人掌多糖能调节免疫抑制小鼠特异性免疫功能,且具有增殖体外淋巴细胞的作用,是一种良好的免疫调节剂^[8]。利用小鼠耳异种被动皮肤过敏试验和右旋糖酐致小鼠皮肤瘙痒试验证明洋甘菊的精油、水提物对实验性过敏症状的确有一定的抑制作用^[9]。本实验考查了以上 7 种中草药提取物对皮肤抗过敏的作用,并检测其刺激性大小,以探讨其用于抗过敏化妆品添加剂的可行性和作用效果。

1 材料

1.1 药品与试剂 防风、地肤子、桃仁、金银花(购于北京市白塔寺药店,茶多酚、洋甘菊提取物、仙人掌提取物(本实验室提供),柠檬酸三钠、柠檬酸、葡萄糖、十二烷基硫酸钠(SDS)透明质酸酶(Sigma 公司),透明质酸钠(Solarbio 公司,分析纯),无水乙醇、氢氧化钠、浓盐酸、对一二甲氨基苯甲醛、冰乙酸、乙酸钠结晶、无水氯化钙、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠(北京化工厂,国产分析纯),乙酰丙酮(国药集团化学试剂有限公司),新鲜兔血取自北京市海淀区兴隆实验动物养殖场。

1.2 仪器 UV2550 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),BP3100s/CP224S 电子/分析天平(Sartorius),F80C 碎冰制冰机(博威兴业科技发展有限公司),868 精密 pH 计(热电仪器有限公司),HH·S1-Ni 电热恒温水浴锅(北京长安科学仪器厂),200~1 000 μL/1 000~5 000 μL 移液枪(Eppend of Reference),Ultra Bioscience PurelabUltra 超纯水机(英国 Elga 公司),Axiovert200 显微镜(德国 CarlZeiss 公司),4K15 离心机(Sigma 公司),FMe-100B 摇床(上海福玛实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 透明质酸酶体外抑制试验

2.1.1 溶液配制 用冰乙酸稀释溶液和乙酸钠结晶水溶液配制 pH 5 的醋酸缓冲液;再用配制好的醋酸缓冲液配制透明质酸酶溶液(最终工作浓度 $1\ 250\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)和透明质酸钠溶液($0.5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);阳性对照甘草酸二钾溶液和样品溶液均配制 1%;氯化钙浓度为 $0.25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;氢氧化钠溶液配制成 $0.4\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;碳酸钠溶液配制成 $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,待配制乙酰丙酮溶液;最后称取 $1.6\ \text{g}$ 对-二甲氨基苯甲醛溶于 $30\ \text{mL}$ 浓盐酸和 $30\ \text{mL}$ 无水乙醇中配制成埃尔利希试剂(Ehrlich reagent)。

2.1.2 步骤 采用透明质酸酶体外抑制试验 Elson-Morgan 法^[10-11]进行。取 $0.1\ \text{mL}\ 0.25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CaCl}_2$ 溶液和 $0.5\ \text{mL}$ 透明质酸酶液 $37\ ^\circ\text{C}$ 保温培养 $20\ \text{min}$;加入样品液 $0.5\ \text{mL}$,继续 $37\ ^\circ\text{C}$ 保温培养 $20\ \text{min}$;加入 $0.5\ \text{mL}$ 透明质酸钠液 $37\ ^\circ\text{C}$ 保温 $30\ \text{min}$,常温放置 $5\ \text{min}$;加入 $0.1\ \text{mL}\ 0.4\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaOH}$ 溶液和 $0.5\ \text{mL}$ 乙酰丙酮溶液,置沸水浴中加热 $15\ \text{min}$ 后立即用冰水冷却 $5\ \text{min}$;加入埃尔利希试剂 $1.0\ \text{mL}$ 并用 $3.0\ \text{mL}$ 无水乙醇进行稀释,放置 $20\ \text{min}$ 显色,用分光光度计测定其吸光度(A)。

$$\text{透明质酸酶抑制率} = \frac{(A - B) - (C - D)}{A - B} \times 100\%$$

式中:A 为对照溶液吸光度(用醋酸缓冲溶液代替样品溶液),B 为对照空白溶液吸光度(用醋酸缓冲溶液代替样品溶液及酶液),C 为试样溶液吸光度值,D 为试样空白溶液吸光度(用醋酸缓冲溶液代替酶液)实验时先对 A 组试样进行 $450\sim 700\ \text{nm}$ 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吸光度测定。

2.2 红细胞溶血试验检测眼刺激

2.2.1 溶液配制 用超纯水溶解 Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl 和葡萄糖配制成 pH 7 的磷酸缓冲液(PBS);同样用超纯水按 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot \text{H}_2\text{O} = 66:44\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 配制柠檬酸;用 PBS 缓冲液配制为 0.1% 标准表面活性剂溶液[十二烷基硫酸钠(SDS)],用于测试 SDS 溶血标准曲线;同样在 pH 控制下,用 PBS 溶解样品为 1%。

2.2.2 血红细胞(RBC)悬液制备 取新鲜兔血装于聚乙烯塑料容器中,按 1:9 比例加入柠檬酸缓冲液混匀。立即将混匀血样保温于保温箱中,温度为 $21\sim 22\ ^\circ\text{C}$ 。 $30\ \text{min}$ 内运至实验室。用 $10\ \text{mL}$ 聚乙烯无菌离心管分装采集的血液样本,室温下, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $15\ \text{min}$ 。小心吸弃上清液。再用 2.5 倍 PBS 缓冲液洗涤 RBC 2 次($3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}\times$

$15\ \text{min}$)。

2.2.3 RBC 完整性分析 用 PBS 缓冲液溶解形成质量分数为 0.1% 的表面活性剂溶液[十二烷基硫酸钠(SDS)]。在 EP 管中依次加入测试样 $0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100\ \mu\text{L}$ 的 SDS 溶液,加入 PBS 补齐到 $975\ \mu\text{L}$,快速加入 $25\ \mu\text{L}$ RBC;将各管置于摇床,室温 $180\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 孵育 $10\ \text{min}$;室温 $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $1\ \text{min}$;吸取上清液 $200\ \mu\text{L}$, $530\ \text{nm}$ 处测吸光度。结果显示新鲜配制的 RBC 悬液其半溶血量为 $60\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右,表明 RBC 完整性良好。同时在显微镜下计数 RBC 为 9.4×10^9 个/mL。

2.2.4 分析方法 用 PBS 缓冲液溶解形成质量分数为 1% 的测试样品。在 EP 管中分别按表 1 中的量加入测试样品,然后加入 PBS 补齐到 $975\ \mu\text{L}$,然后在各管中快速加入 $25\ \mu\text{L}$ RBC;将各管置于摇床,室温 $180\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 孵育 $10\ \text{min}$;终止孵育,室温 $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $1\ \text{min}$;吸取上清液 $200\ \mu\text{L}$, $530\ \text{nm}$ 处测吸光度。阴性对照: $975\ \mu\text{L}$ PBS + $25\ \mu\text{L}$ RBC 的溶血率为 0%;阳性对照: $975\ \mu\text{L}$ 水 + $25\ \mu\text{L}$ RBC 的溶血率为 100%。溶血率高于 20% 时,可表示样品的刺激性较大。

表 1 样品溶血实验测定

序号	样品量/ μL	PBS 量/ μL	RBC 量/ μL
1(阴性对照)	0	975	25
2	100	875	25
3	200	775	25
4	300	675	25
5	400	575	25
6	500	475	25
7	600	375	25
8	700	275	25
9	800	175	25
10(阳性对照)	水 975	25	

3 结果

3.1 7 种中草药有效成分抗过敏效果测定 7 种中草药有效成分的抗过敏效果分别为:洋甘菊提取物(抑制率 77.04%) > 金银花水提物(抑制率 69.54%) > 茶多酚(抑制率 68.01%) > 仙人掌提取物(抑制率 62.67%) > 防风多糖(抑制率 55.51%) > 地肤子皂苷(抑制率 43.09%) > 桃仁水提物(抑制率 32.74%)。表明 7 种中草药有效成分均具有一定程度的抗过敏作用,但由于抑制率的不同表现出不同程度的抗过敏效果。洋甘菊提取物、茶多酚、仙人掌提取物和金银花水提物具有较好的抗过敏效果,是添加到抗过敏化妆品中的良好用材,见图 1。

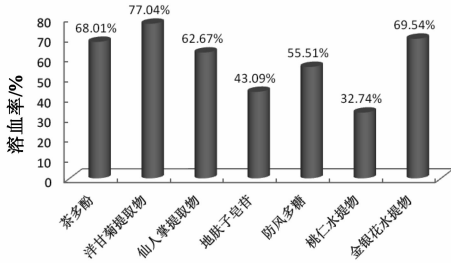


图 1 7 种中草药有效部分的透明质酸酶体外抑制率

3.2 7 种中草药有效成分刺激性测定 7 种中草药有效成分在不同添加浓度下,除了茶多酚,溶血率均 < 20%,刺激性很低,安全性很好,化妆品中可以安全添加。当茶多酚的添加质量浓度 > 6 g·L⁻¹时,溶血率近于 20%。可见其刺激性大,因此,为保证安全,建议茶多酚在化妆品中的添加质量浓度要控制在 6 g·L⁻¹以下,见图 2。

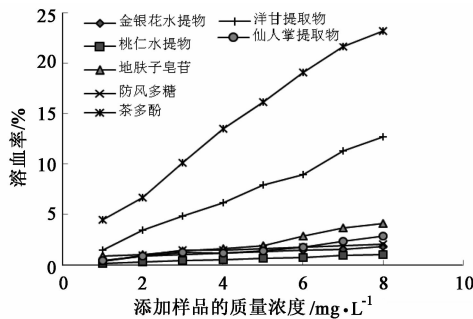


图 2 7 种中草药有效部分溶血率

4 讨论

研究表明,透明质酸酶是过敏反应参与者,其与过敏有强相关性,许多抗过敏药物有强抑制透明质酸酶活性的作用^[12]。红细胞溶血试验是体内眼刺激试验(Draize eye irritation test, Draize 试验)的替代实验,其基于测定从红细胞中漏出的血红蛋白的量来评价细胞膜的损伤程度,二者的相关性分析显示较好的一致性^[13]。

本实验采用透明质酸酶体外抑制试验对 7 种中草药有效成分进行抗过敏效用研究,并运用红细胞溶血试验进一步检测上述中草药的刺激性大小。由于透明质酸酶体外抑制试验具有在同一时间可以分析多种样品的优点,与传统方法相比样本量小,时间短,成本低^[14],被广泛用于检测抗过敏特性成分的筛选与评价。红细胞溶血试验作用机制明确,方法快速简单^[13],同样被广泛应用于检测刺激性大小分析研究中。试验结果表明,7 种中草药有效成分均表现不同程度的抗过敏特性,且其刺激性很小。

7 种中草药有效成分中,洋甘菊提取物、茶多酚、仙人掌提取物、金银花水提物和防风多糖表现出了良好的抗过敏特性,其中茶多酚提取物在高浓度添加量下会表现出刺激性大,而其他几种有效成分均有很小的刺激性,因此,洋甘菊提取物、仙人掌提取物、金银花水提物和防风多糖具有良好的开发前景,可以作为未来抗过敏化妆品的选用添加剂。

[参考文献]

[1] 刘建萍,刘仲华,由宝昌,等.地肤子皂苷抗变态反应作用及其量效关系的研究[J].江苏农业科学,2007(5):177.

[2] 周勇,马学清,严宣佐,等.防风多糖 JBO-6 体内对小鼠免疫功能的影响及抗肿瘤作用[J].北京中医药大学学报,1996,19(4):25.

[3] 张海娣,董银卯,孟宏.舒敏方对过敏和瘙痒模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):177.

[4] 王博,强雁鸿,张凤霞.中药抗过敏作用研究的现状与前景[J].中华医学研究杂志,2007,7(12):1118.

[5] 李斐,黎海芪.金银花水提物对卵清蛋白致敏小鼠的抗过敏作用研究[J].重庆医科大学学报,2004,29(3):288.

[6] 陈永忠,范淑玲,欧琦.抗敏汤配合腧穴自血疗法治疗慢性荨麻疹[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):254.

[7] 江涛,徐为人.茶多酚抗过敏作用的研究[J].中药药理与临床,1999,15(2):19.

[8] 赵龙岩,张松连,袁清霞.野生仙人掌多糖对小鼠特异性免疫功能的调节作用[J].中药材,2012,35(1):98.

[9] 徐勇.西洋甘菊挥发性成分及抗过敏抗炎研究[D].上海:上海交通大学,2007.

[10] 李晚谊.云南茶叶、甜菜和紫苏抗过敏功能的研究[D].重庆:西南农业大学,2001.

[11] 井上俊夫.薄荷中的抗过敏成分[J].国外医学:中医中药分册,2003,25(4):249.

[12] Mosaru, K. *in vitro* antiallergic activity of flavonoids in histamine release assay using rat basophilic leukemia cells[J]. Food Hyg Soc. Japan, 1994, 35(5):497.

[13] 廖艳,王雪,张立实,等.溶血试验作为眼刺激试验替代方法的研究[J].现代预防医学,2002,29(4):593.

[14] Sun-Hee Moon, Kee-Tae Kim, Na-Kyoung Lee, et al. Inhibitory effects of naringenin and its novel derivatives on hyaluronidase [J]. Food Sci Biotechnol, 2009, 18(1):267.

[责任编辑 何伟]