

参柏洗液抗菌、抗炎及皮肤刺激性研究

安梦培¹, 邸志权¹, 朱振娜¹, 姜一朴², 袁启航³, 胡金芳^{1*}, 余嘉璇^{3*}

(1 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301;

2 安徽医科大学药学院, 安徽合肥 230000; 3 广州一品红制药有限公司, 广东广州 510623)

【摘要】目的 评价参柏洗液抗菌、抗炎活性, 并对其皮肤给药的局部刺激性进行研究。**方法** 采用琼脂稀释法测定参柏洗液对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、乙型溶血性链球菌、加德纳菌、表皮葡萄球菌和大肠埃希氏菌产生抑菌作用最大稀释倍数。通过测定角叉菜胶致大鼠足跖肿胀度, 考察其抗炎作用。通过家兔完整和破损皮肤局部给药刺激性试验, 评价参柏洗液的局部刺激作用。**结果** ①参柏洗液最高稀释 640、320、40、320、40、20 倍即可分别表现出对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、乙型溶血性链球菌、加德纳菌、大肠埃希氏菌的抑制作用。②参柏洗液母液、稀释 2、4 倍均能够显著抑制大鼠足跖肿胀度。③参柏洗液母液持续给药 7 d, 成年家兔表现轻到中度刺激, 停药 5 ~ 12 d 可恢复, 幼龄家兔对于刺激更为耐受, 且恢复速度更快。④参柏洗液 5 倍稀释后持续给药 7 d, 成年家兔仅出现轻度刺激且 2 ~ 3 d 可恢复用药前状态。稀释 5 倍后对幼龄家兔无明显刺激性。**结论** 参柏洗液稀释 5 ~ 10 倍即可有效抑制湿疹等皮肤瘙痒性疾病以及外阴、阴道炎等妇科疾病常见病原体生长。参柏洗液亦具有良好的抗炎作用, 推断日用 1 ~ 2 次即可满足临床抗炎需求。刺激性较小且可耐受, 儿童亦可安全应用。

【关键词】 参柏洗液; 抗菌; 抗炎; 局部刺激; 琼脂稀释法

Study on the anti-bacterial, anti-inflammatory and skin irritation of Shenbai Lotion AN Meng-pei¹, DI Zhi-quan¹, ZHU Zhen-na¹, et al. 1 TIPR Drug Assessment Co. Ltd., Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China; 2 Anhui Medical University College of Pharmacy, Hefei, Anhui 230000, China; 3 Guangzhou Yipinhong Pharmacy Limited Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong 510623, China.

【Abstract】Objective To evaluate the anti-bacterial and anti-inflammatory effects of Shenbai Lotion, and to study the local irritation of Shenbai Lotion on skin. **Methods** The maximum dilution factor of bacteriostatic effects of Shenbai Lotion against *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), β -hemolytic streptococcus (HS), *Gardnerellavaginalis* (GV), *Staphylococcus epidermidis* (SE) and *Escherichia coli* (EC) were determined by agar dilution method. The anti-inflammatory effect was investigated by carrageenin-induced paw swelling of rats. The local irritation effect of Shenbai Lotion was evaluated by local irritation test on intact and damaged skin of the rabbits. **Results** ① The maximum dilution factor of bacteriostatic effect to SA, SE, PA, HS, GV, EC were 640, 320, 40, 320, 40 and 20 times dilution, respectively. ② The Shenbai Lotion and 2 or 4 times dilution could significantly inhibit the degree of paw swelling in rats. ③ After 7 days of administration of Shenbai Lotion, moderate irritation appeared in adult rabbits. After 5 ~ 12 days of withdrawal, it could be recovered. The young rabbits are more tolerant to stimulate and recover faster. ④ After 7 days of administration of 5 times dilution of Shenbai Lotion, mild irritation appeared in adult rabbits. After 2 ~ 3 days of withdrawal, it could be recovered. There was no obvious irritation to young rabbits. **Conclusion** The 5 ~ 10 times dilution of Shenbai Lotion could effectively inhibit the growth of common pathogenic bacterium in skin pruritus diseases induced by eczema and gynecological diseases such as vulva or vaginitis, also has a good anti-inflammatory effect, slight irritation, and it is safe for young children. It is suggested that the clinical anti-inflammatory effect can be achieved by 1 ~ 2 times daily use.

【Key words】 Shenbai Lotion; Anti-bacterial; Anti-inflammatory; Skin irritation; Agar dilution method

参柏洗液是中药复方洗剂, 清热燥湿、杀虫止痒, 用于慢性湿疹类皮炎, 以及阴痒、带下等症的治疗, 疗效显著^[1]。为证实其抑菌、抗炎作用, 本研究采用体外抗菌法、角叉菜胶诱导大鼠足跖模型法进行试验研究, 并结合其给药方式进行皮肤局部刺激试验, 为临床应用提供依据。

1 材料

1.1 主要药品和试剂

参柏洗液(广州一品红制药有限公司, 批号: 20161203); 三水合氨苄青霉素(北京索莱宝科技有限公司, 批号: 220B033); 吡啶美辛搽剂(广东恒健制药有限公司, 批号: 170801); 生理盐水(石家庄四药有限公司, 批号: 1704133401); 哥伦比亚血琼脂培养基(天津市金章科技发展有限公司, 批号: 79240412); 麦氏比浊管(温州市康泰生物科技有限公司, 批号: QJ20040); 胰蛋白酶大豆琼脂(广东恒健制药有限公司, 批号: 20170911)。

1.2 受试菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)、乙型溶血性链球菌(β -hemolytic streptococcus, HS)、加德纳菌(*Gardnerellavaginalis*, GV), 购自北纳创联生物技术有限公司; 表皮葡萄球菌(*Staphylococcus*

epidermidis, SE)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, EC), 购自南京便诊生物科技有限公司。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠, 体重 160 ~ 180 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2016-0006。日本大耳白兔, 体重 2.0 ~ 2.5 kg, 购自北京隆安实验动物养殖中心, 许可证号: SCXK(京)2014-0003。饲养温度: 20℃ ~ 26℃, 湿度: 40% ~ 70%, 12 h 明暗光照。动物使用方案经天津药物研究院新药评价有限公司实验动物管理和使用委员会(IACUC)审查并批准。

1.4 主要仪器

A + K portable 投影仪, D-22851 Norderstedt/Germany; MIR-553 型培养箱, 日本三洋(SANYO)公司; 垂直超净工作台, 天津市拉贝尔试验室设备有限公司; CL-32L 型自动蒸汽灭菌器, ALP Co., Ltd.; HPX-90502MBE 数显电热培养箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; VIP5J-F2 樱花全封闭组织脱水机, 日本樱花检验仪器株式会社; Histocore Arcadia H + C 组织石蜡包埋机, 德国 Leica 公司; DRS-2000J-D2 樱花自动染色装置, 日本樱花检验仪器株式会社。

2 试验方法

2.1 体外抗菌试验^[2]

采用琼脂稀释法测定参柏洗液的体外抗菌活性, 菌株使用相应培养基增菌活化 2 次, 并调整菌悬液浓度至 0.5 麦氏

* 通信作者: 胡金芳, Email: hujf@tjipr.com;

余嘉璇, Email: mani-yu@163.com

(10^8 CFU/ml)。将参柏洗液按倍比法稀释 10、20、40、80、160、320、640、1280 倍, 掺入肉汤培养基, 取 1 ml 加入 24 孔板, 设不含药培养基作为对照孔, 氨苄西林($2 \mu\text{g/ml}$) 为阳性对照孔, 该孔加入金黄色葡萄球菌。所有菌株同时进行体外抗菌试验, 但仅金黄色葡萄球菌设立阳性对照孔。待培养基凝固冷却至室温后, 取 $20 \mu\text{l}$ 菌液滴于培养基, 培养约 20 h 后观察各稀释浓度下参柏洗液对不同菌种的抗菌活性。

2.2 抗炎试验^[2]

健康雄性 SD 大鼠随机分为模型组、吲哚美辛组、参柏洗液母液组、2 倍稀释组、4 倍稀释组, 每组 10 只。连续皮肤给药 3 d, 模型组给予去离子水。于末次给药后 1 h, 在大鼠右后足垫部皮下注射 1% 角叉菜胶浆 0.05 ml 致炎。分别在致炎前和致炎后 1、2、4、6、24 h, 放大 8 倍测量每只大鼠右后肢踝关节下方 0.5 cm 处直径, 用致炎前与致炎后不同时间点的肿胀差值作为肿胀度。

2.3 家兔局部皮肤刺激性试验

参考相关指导原则^[3-4], 方法简述如下: 健康成年兔和刚离乳幼龄兔各 4 只, 雌雄各半。采用自身对照法, 每只动物分别在背部左右两侧设置两处完整皮肤区和两处破损皮肤区, 破损皮肤区用温水清洗并用碘伏消毒后, 用无菌针头在去毛区划“#”以渗血为度造成皮肤破损, 备皮提前 24 h 进行, 左侧均涂抹去离子水, 右侧均涂抹参柏洗液母液, 面积 $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$, 敷药时间 4 ~ 6 h, 给药后用二层纱布覆盖对照和给药皮肤, 再用透气胶布固定, 敷药结束后清洗去除药物, 连续给药 7 d。每日于给药前和给药后 1 h 观察记录红斑和水肿, 末次药后 30 ~ 60 min、24、48 和 72 h 继续观察。若存在中度及以上刺激, 则继续恢复观察 14 d, 恢复期结束对给药部位进行组织病理学检查。按皮肤刺激反应评分标准进行评分, 计算平均分值, 进行刺激强度评价。无红斑、水肿计 0 分, 轻度红斑、水肿(勉强可见) 各计 1 分, 中度水肿、红斑(明显可见) 各计 2 分, 重度水肿(皮肤隆起 1 mm, 轮廓清楚)、红斑各计 3 分, 紫红色红斑到轻度焦痂形成、严重水肿(皮肤隆起 1 mm 以上并有扩大) 各计 4 分; 各项评分取平均值后, 0 ~ 0.49 为无刺激性, 0.5 ~ 2.99 为轻度刺激性, 3 ~ 5.99 为中度刺激性, 6 ~ 8 为重度刺激性。

3 数据处理

计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 首先进行方差齐性检验, 方差齐则采用单因素方差分析进行整体比较, 两两比较采用 Dunnett t 检验, 方差不齐则采用秩和检验进行整体比较, 两两比较采用 Kruskal-wallis 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

4 结果

4.1 体外抗菌试验结果

结果显示, 对照孔所有菌种正常生长, 氨苄西林孔中未见受试菌株生长, 表明数据可靠。参柏洗液对 6 种病原菌均有较强的抑制作用, 金黄色葡萄球菌以及表皮葡萄球菌对其较为敏感。对各细菌有效抑菌作用最高稀释倍数见表 1。

4.2 抗炎试验

与模型组比较, 参柏洗液母液、2 倍稀释液、4 倍稀释液在致表 2: 大鼠足趾肿胀度测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	基础值 (cm)		肿胀度 (cm)				
	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
模型	8.1 ± 0.3	0.7 ± 0.4	2.0 ± 0.4	2.5 ± 0.4	1.6 ± 0.5	0.4 ± 0.3	
吲哚美辛	8.1 ± 0.2	0.3 ± 0.3^a	1.0 ± 0.7^b	1.2 ± 0.5^b	0.7 ± 0.3^b	0.1 ± 0.2^a	
参柏洗液母液	8.0 ± 0.2	0.4 ± 0.3	1.2 ± 0.6^b	1.4 ± 0.4^b	1.2 ± 0.4	0.3 ± 0.3	
参柏洗液 2 倍稀释液	8.2 ± 0.3	0.4 ± 0.2	1.1 ± 0.6^b	1.9 ± 0.4^b	1.3 ± 0.4	0.2 ± 0.2	
参柏洗液 4 倍稀释液	8.3 ± 0.4	0.4 ± 0.4	1.0 ± 0.3^b	1.7 ± 0.4^b	1.2 ± 0.5	0.2 ± 0.2	

注: ^a 与模型组比较, $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

表 1: 参柏洗液对 6 种病原菌有效抑菌最高稀释倍数测定结果

菌种	稀释倍数
SA	640
SE	320
PA	40
HS	320
GV	40
EC	20

炎 2 ~ 4 h 内均可降低大鼠足趾肿胀度, 差异具有显著的统计学。见表 2。

4.3 家兔局部皮肤刺激性试验

一般观察显示, 参柏洗液给药 3 d 后, 全部动物给药部位出现轻度红斑和水肿, 至给药 7 d 成年及幼龄家兔表现为轻到中度刺激。幼龄家兔与成年家兔分别在停药后第 5 天和第 12 天大致恢复至用药前状态; 组织病理学检查显示, 家兔给药部位皮肤表皮细胞增多, 表皮增厚, 幼龄家兔皮肤增厚程度更轻; 成年破损皮肤给药组与成年破损皮肤对照组比较, 皮下炎细胞浸润、水肿或组织修复程度较重。幼龄组动物与成年组动物比较恢复程度较好, 恢复速度更快。结果见图 1-2。

调整剂量重复试验基于以上结果, 将参柏洗液稀释 5 倍后, 重复该试验。一般观察显示, 稀释后的参柏洗液对成年家兔刺激性明显降低, 停药后 72 h, 即可恢复至用药前状态。幼龄家兔给药期及停药恢复期给药部位均未见明显异常。结果见图 3。

5 讨论

参柏洗液是一种中药制剂的洗液, 主要成分为苦参、黄柏、丹参、大青叶、大黄、黄芩、黄连、蛇床子、土茯苓、甘草等, 苦参、

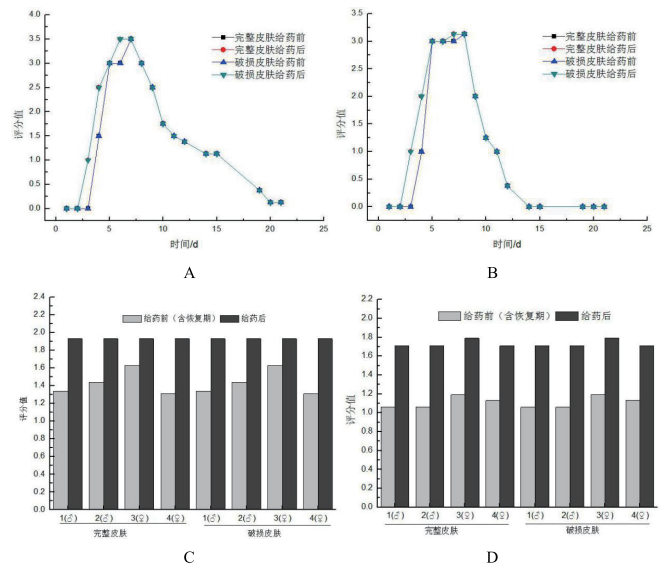


图 1: 参柏洗液母液对家兔皮肤刺激评分图 (A: 成年家兔皮肤刺激评分均值曲线, B: 幼龄家兔刺激评分均值曲线, C: 每只成年家兔皮肤刺激评分均值, D: 每只幼龄家兔皮肤刺激评分均值)

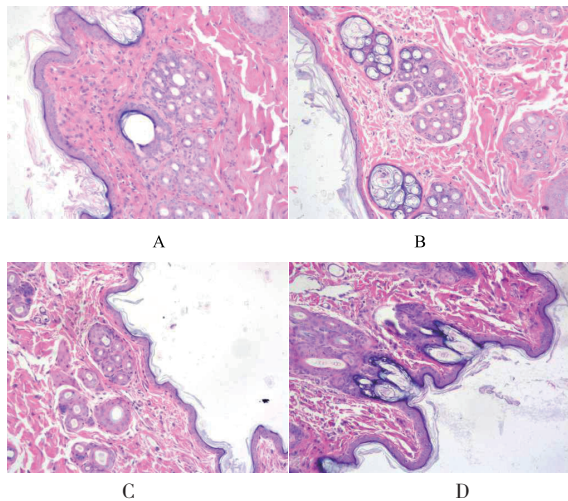


图2: 参柏洗液对皮肤刺激的组织病理学检查结果(A: 成年家兔正常对照皮肤, B: 成年家兔正常给药皮肤, C: 幼龄家兔正常对照皮肤, D: 幼龄家兔正常给药皮肤)

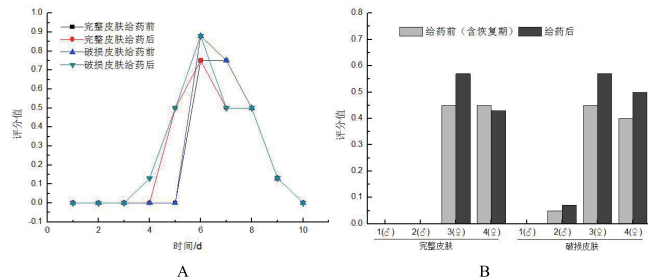


图3: 参柏洗液5倍稀释液对成年家兔皮肤刺激评分图(A: 成年家兔皮肤刺激评分均值曲线, B: 每只成年家兔皮肤刺激评分均值)

黄柏清热燥湿, 丹参凉血解毒, 大黄抗菌、收敛、消炎, 黄芩、大青叶有抗炎抑制真菌抗病毒作用, 黄连、蛇床子有抑制真菌, 杀虫止痒之功效, 土茯苓、甘草有清热除湿, 抗炎抗过敏作用^[5]。临床中, 多用于各类人群的如湿疹等皮肤瘙痒性疾病以及阴道及外阴炎等妇科常见疾病的治疗。基于参柏洗液的功能主治以及临床应用, 本研究对其抗菌、消炎的药理作用进行了进一步的探索, 得到了肯定的研究结果。

现代药理研究表明, 黄柏、土茯苓等药物具有广谱抗菌、消炎作用, 对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌有不同的抑制作用^[6-7]。本研究结果与文献报道一致, 同时发现其对加德纳菌、铜绿假单胞菌、乙型溶血性链球菌也具有抑制活性, 提示参柏洗液对多数炎症常见致病菌均有显著的抑制作用。各菌株对参柏洗液的敏感性不同, 参柏洗液稀释20倍后, 对大肠杆菌仍显示良好的抑菌作用, 而葡萄球菌、溶血性链球菌对其更为敏感, 稀释300倍甚至更高时, 仍能起到有效抑菌的效果。表明参柏洗液对湿疹等各类皮肤瘙痒性疾病、外阴及阴道炎等妇科疾病常见病原体有显著的杀灭作用。

本试验采用角叉菜胶诱发大鼠足爪急性炎症模型确认参柏洗液的抗炎作用, 角叉菜胶作为异种蛋白大分子, 使大鼠局部血管扩张、血管通透性增高, 致炎局部前列腺素合成增加, 并与血管活性物质和激肽类物质一起诱发水肿, 常用于观察药物对急性炎症过程的影响, 是筛选抗炎药物的常规模型^[2,8]。试验结果表明, 参柏洗液对该模型明显的抑制作用, 稀释4倍仍具有活性。另外, 试验结果显示, 参柏洗液在稀释4倍以下时, 抗炎活性的剂量依赖性不强, 提示稀释更大倍数时, 可能仍具有抗炎活性。该药理活性与处方中的苦参、黄柏等密不可分, 它们为抗炎作用提供了丰富的物质基础^[9-10]。大鼠足趾部有丰富的易释放的5-羟色胺, 5-羟色胺是参与该部位炎症反应的主要炎症因

子^[11-12], 参柏洗液中含有的大黄、土茯苓、甘草等成分可能通过稳定肥大细胞的细胞膜, 可减少组胺、5-羟色胺及白三烯等炎症介质的释放而发挥止痒、抗炎及抑制变态反应的作用。研究数据提示: 日用1~2次参柏洗液即可满足抗炎需求。

本试验拟探讨参柏洗液的皮肤用药安全性, 选用了不同年龄段的试验动物—幼龄及成年家兔, 并对完整皮肤和破损皮肤均进行了试验, 以期更为全面的描绘参柏洗液的作用特点。幼兔为刚离乳动物, 依日本大耳白兔的生长周期, 按比例折算约相当于人类7岁儿童。研究结果显示, 不论从刺激强度方面, 还是症状出现及持续时间方面, 幼龄动物对于参柏洗液刺激性更为耐受。之后将参柏洗液稀释了5倍, 再次进行试验, 发现其刺激性显著降低, 因此可推测参柏洗液皮肤刺激性与使用浓度负相关, 故推荐适当稀释后使用, 表皮刺激性更小。另外, 研究结果亦提示, 与完整正常皮肤比较, 参柏洗液对破损皮肤的刺激性未见加重, 提示受损皮肤亦是相对安全使用的。

儿科药物安全性评价具有不同于成人的独特之处, 试验难度大, 目前世界上针对儿科用药非临床安全性评价尚未达成协调一致, 儿科药开发正成为热点^[13], 但幼龄动物的发育特点、相关背景资料仍有大量空白未知^[14]。因此, 本研究中参柏洗液皮肤刺激性所表现出的特点, 可能与幼龄动物的基础代谢率, 皮肤厚度、“皮肤屏障”相关蛋白表达等多种因素有关, 从而造成幼龄动物的损伤恢复加快, 但具体机制有待进一步研究。

综上, 参柏洗液稀释5~10倍即可有效抑制湿疹等皮肤瘙痒性疾病以及外阴、阴道炎等妇科疾病常见致病菌生长。参柏洗液亦具有良好的抗炎作用, 推断日用1~2次即可满足临床抗炎需求。刺激性较小且可耐受, 儿童亦可安全应用。

参考文献

- [1] 甄淑芬, 刘晓波, 王博, 等. 参柏洗液体外抑菌效力检测[J]. 中国处方药, 2018, 16(8): 39-41.
- [2] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心. 【Z】GPT4-1 中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究的技术指导原则[S]. 2005-3.
- [4] 国家食品药品监督管理总局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S]. 2014-5-13.
- [5] 杨旭, 张禁, 姜功平. 洁悠神联合参柏洗剂治疗肛周湿疹的疗效观察[J]. 中国医药指南, 2011, 9(25): 321-322.
- [6] 姚丽娟, 杨浩, 王勇伟, 等. 清心莲子饮加减联合参柏洗液坐浴治疗复发性尿路感染20例[J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(9): 648-649.
- [7] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上海: 上海科技出版社, 1997: 2121.
- [8] 肖百全, 朱少璇, 杨威, 等. 角叉菜胶致大鼠足肿胀模型探讨及其机制研究[J]. 中国实用医药, 2008, 3(23): 63-65.
- [9] 龚森. 黄柏的化学成分和药理作用研究. 中国医院用药评价与分析, 2009, 9(4): 318-320.
- [10] 谭焕然, 张宝恒. 苦参碱抗炎作用的实验研究. 中西医结合杂志, 1985, 5(2): 108-110.
- [11] 施黎明, 张小元. 参柏洗剂治肛周瘙痒症疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2017, 33(7): 844-845.
- [12] 王艳宁, 陈兆霓, 吴曙粤. 婴幼儿支气管炎中药外洗液的皮肤安全性研究[J]. 中医药导报, 2018, 24(6): 45-47.
- [13] 黄芳华, 王庆利, JIM Ridings, 等. 幼龄动物毒理学研究: 试验设计、实施和结果分析. 中国新药杂志, 2017, 26(2): 151-161.
- [14] 井潇, 高杰, 吴纯启, 等. 儿童药物安全性评价研究进展. 国际药学研究杂志, 2016, 43(4): 608-614.