

· 论 著 ·

麻风树叶提取物体外 抗蠕形螨活性及皮肤安全性的实验研究

钱江, 陈锦珊, 文磊, 洪小兰, 田雅兰

[摘要] 目的 探讨麻风树叶治疗蠕形螨病的应用价值。方法 用80%乙醇热回流提取法提取麻风树叶提取液。取蠕形螨感染者面部皮脂, 分离并鉴定蠕形螨备用。设不同浓度麻风树叶实验组、2%浓度的甲硝唑对照组和生理盐水对照组, 进行体外抗螨实验。pH仪测定不同浓度麻风树叶提取物pH值。设麻风树叶实验组和75%乙醇对照组, 用健康家兔进行皮肤刺激实验和急性皮肤毒性实验。结果 50、25、12 mg/ml麻风树叶组与2%甲硝唑组毛囊蠕形螨死亡时间分别为(1.55±0.67) min、(1.61±0.67) min、(2.47±0.80) min和(1.20±0.48) min。50、25 mg/ml麻风树叶组以及2%甲硝唑组两两之间差异无统计学意义(P 均>0.05)。50、25、12 mg/ml麻风树叶提取液pH值分别为6.07±0.73、6.27±0.82、6.35±0.83, 对家兔完整皮肤及破损皮肤刺激评分均为0, 且无明显毒性。结论 麻风树叶提取物具有较强的体外抗蠕形螨活性且具有皮肤安全性。

[关键词] 麻风树叶; 蠕形螨; 抗螨

[中国图书资料分类号] R757.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-8134(2017)06-0355-03

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2017.06.010

Anti-demodicidosis activity and skin safety of *Jatropha curcas.l* leaves extract *in vitro*

QIAN Jiang, CHEN Jin-shan, WEN Lei, HONG Xiao-lan, TIAN Ya-lan

Department of Dermatology, 175 Hospital of PLA/Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou 363000, China

[Abstract] **Objective** To test the application value of the extract of *Jatropha curcas.l* leaves in treatment of demodicidosis. **Methods** *Jatropha curcas.l* leaves were extracted with 80% ethanol by using heat reflux method. Facial sebum specimen from demodicidosis-infected patients were used to isolate and identify demodicidosis. Different concentration groups of *Jatropha curcas.l* leaves, 2% metronidazole control group and physiological saline control group were defined. The anti-demodicidosis experiment was performed *in vitro*. The pH value of different concentrations of *Jatropha curcas.l* leaves extract was determined. Skin irritation test and acute skin toxicity test were carried out in healthy rabbits, and *Jatropha curcas.l* leaves and 75% ethanol served as experiment and control groups, respectively. **Results** The mite-killing time was (1.55±0.67) min with 50 mg/ml *Jatropha curcas.l* leaves extract, (1.61±0.67) min with 25 mg/ml *Jatropha curcas.l* leaves extract, (2.47±0.80) min with 12 mg/ml *Jatropha curcas.l* leaves extract, and (1.20±0.48) min with 2% metronidazole. There was no significant different between 50, 25 mg/ml *Jatropha curcas.l* leaves extract groups and 2% metronidazole group ($P > 0.05$). The pH value was 6.07±0.73 of 50 mg/ml *Jatropha curcas.l* leaves extract, 6.27±0.82 of 25 mg/ml *Jatropha curcas.l* leaves extract and 6.35±0.83 of 12 mg/ml *Jatropha curcas.l* leaves extract. Score for irritation to normal and wounded rabbit skin was both 0, and acute toxicity test showed no significant toxicity. **Conclusions** *Jatropha curcas.l* leaves extract shows a remarkable activity to demodicidosis with skin safety *in vitro*.

[Key words] *Jatropha curcas.l* leaves; demodicidosis; anti-demodicidosis

人体蠕形螨病多表现为面部皮肤病, 治疗多采用依维菌素、甲硝唑等化学药物^[1], 但治疗效果不稳定。麻风树大量野生于我国南方, 是民间常用药物, 全身均可入药, 根、茎、皮及叶外用能起到止血、消肿散淤、杀虫止痒的作用。已有实验研究发现麻风树提取物具有体外抗病毒和杀菌的作用, 麻风树全株有杀灭钉螺作用^[2-3]。本实验对麻风树叶提取物体外抗蠕形螨活性及其皮肤安全性进行了初步研究。

1 对象与方法

1.1 蠕形螨的获取 选4周内未经任何抗螨治疗的

[基金项目] 漳州市自然科学基金(ZZ2014J33)

[作者单位] 363000 漳州, 解放军第一七五医院 厦门大学附属东南医院皮肤科(钱江、陈锦珊、洪小兰、田雅兰); 361000, 厦门大学医学院中医系(文磊)

中、重度蠕形螨感染患者, 在室温(25~30℃)适应1h, 经常规消毒后, 用一次性刺血针钝端用挤压刮拭法刮取患者面部皮脂并置于洁净载玻片上。

1.2 实验动物来源 选取厦门大学动物实验中心提供的成年、健康、无皮肤性疾病的清洁级家兔(体质量2.0~2.5kg)进行实验。

1.3 材料与试剂 载玻片(25.4 mm×75.6 mm, 1.0~1.2 mm)、盖玻片(24 mm×24 mm, 0.13~0.17 mm)均为盐城市弘达医学器材有限公司产品, 一次性刺血针为重庆华鸿医疗器械有限公司产品。95%乙醇(江西草珊瑚消毒用品有限公司产品, 批号: 20150917)。pH计为贝尔分析仪器(大连)有限公司BPH-210型实验室pH计。麻风树叶由

漳州市林业局苗圃培育中心收集提供, 并均经厦门大学医学院中药教研室鉴定。

1.4 麻风树叶提取物的制备 取麻风树叶 20 g, 清洗后分别干燥、粉碎, 用 80% 乙醇回流提取的方法制备提取物, 减压回收至乙醇无醇味。制成 200 mg/ml 药液。无菌生理盐水将麻风树提取液稀释为 50、25、12 mg/ml 3 个浓度备用。甲硝唑制成 2% 浓度的甲硝唑溶液。

1.5 药液 pH 值测定 分别提取 10 次麻风树叶提取物, 在 20 °C、70% 湿度下测定 50、25、12 mg/ml 浓度麻风树叶的 pH 值, 每个样品平行测定 3 次, 数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。同样方法测定对照组 75% 乙醇的 pH 值。

1.6 体外抗螨实验 实验随机分为 5 组, 实验组为麻风树叶提取液 50、25、12 mg/ml 浓度组, 阴性对照为生理盐水组, 阳性对照为 2% 甲硝唑药物组。每组各观察蠕形螨 15 只。在 (28±1) °C 室温进行。首先将刮取的皮脂均匀涂于各载玻片上, 将光学显微镜 (40×) 下鉴定活动良好的蠕形螨, 调至视野中央, 滴加等量药液与皮脂混匀, 使之与虫体充分接触, 加盖玻片, 然后跟踪观察并详细记录其活动变化和死亡的时间 (从蠕形螨接触药液开始至死亡经历的时间)。蠕形螨颚体、足及末体停止活动超过 1 min 即判为死亡。

1.7 皮肤刺激实验 按照文献 [4-5] 方法进行。

1.7.1 皮肤准备 家兔分为 4 组, 每组 8 只, 雌雄各半, 适应环境 2 d, 标记后分笼饲养。于给药前 24 h, 先用手术剪刀在家兔背部两侧各剪出 2.5 cm × 2.5 cm 面积的皮肤, 再用备皮刀剃净兔毛, 不可损伤表皮。无毛区左右对称, 一侧用刺血针作“井”字形划痕的“破损皮肤”, 以划破皮肤、渗血为度。另一侧为完好无破损的“完整皮肤”。

1.7.2 给药 取的浓度为 50、25、12 mg/ml 麻风树叶提取液各 0.2 ml, 分别涂抹于“完整皮肤”和“破损皮肤”的 2.5 cm × 2.5 cm 的面积区内, 涂药后湿巾覆盖, 用无刺激胶布固定, 重复施药, 24 h 内共施药 4 次, 每次 0.2 ml, 保证湿巾湿润。给药 24 h 后观察结果。以 75% 乙醇作阳性对照。

1.7.3 结果观察 分别用温开水除去受试药物后, 于 1、24、48 h 观察受试部位有无红斑、水肿等变化, 根据皮肤刺激反应评分标准 (表 1) 进行评分, 并计算积分, 积分值 = (Σ1 + Σ2) / 合计动物数。然后依皮肤刺激强度评价表 (表 2) 评价麻风树叶提取物对皮肤的刺激强度。

1.8 急性皮肤毒性实验 按照文献 [6] 方法进行。

1.8.1 皮肤准备及给药 家兔分为 4 组, 每组 8 只, 雌雄各半, 去毛及给药方法同皮肤刺激性实验。

表 1 皮肤刺激反应评分标准

标准	刺激反应	分值
红斑	无红斑	0
	勉强可见	1
	明显红斑	2
	严重红斑	3
	紫红色红斑并有焦痂形成	4
水肿	无水肿	0
	勉强可见	1
	皮肤隆起, 边缘高出周围皮肤	2
	水肿隆起约 1 mm	3
	水肿隆起大于 1 mm 范围扩大	4

表 2 皮肤刺激强度评价

分值	刺激强度
0 ~	无刺激性
0.6 ~	轻度刺激性
2.1 ~	中度刺激性
6.1 ~	强刺激性

1.8.2 结果观察 贴敷 24 h 后用温开水除去残留药物。给药后详细观察并记录动物的行为表现和死亡情况, 包括皮肤、毛发、黏膜及眼睛的改变, 循环、呼吸和中枢神经系统、四肢活动、自主活动及行为方式等相关变化, 尤其注意有无流涎、震颤、惊厥、嗜睡、昏迷、腹泻等现象, 连续观察 2 周。实验过程中死亡的动物和 / 或有出现毒性反应的动物均进行病理组织学镜检。以 75% 乙醇作为对照。

1.9 统计学处理 以 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析进行多组间比较, SNK 法进行两组间比较。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pH 值测定 见表 3。

表 3 不同浓度麻风树叶提取液 pH 值

药物	pH 值
50 mg/ml 麻风树叶提取液	6.07±0.73
25 mg/ml 麻风树叶提取液	6.27±0.82
12 mg/ml 麻风树叶提取液	6.35±0.83
75% 乙醇	6.70

2.2 体外抗螨实验 如表 4 所示, 麻风树叶组蠕形螨死亡时间明显短于生理盐水组。50、25、12 mg/ml 麻风树叶组与 2% 甲硝唑组蠕形螨死亡时间分别为 (1.55±0.67) min、(1.61±0.67) min、(2.47±0.80) min 和 (1.20±0.48) min, 50、25 mg/ml 麻风树叶组之间以及与 2% 甲硝唑组之间差异无统计学意义。

12 mg/ml麻风树叶组与50、25 mg/ml麻风树叶组、2%甲硝唑组之间差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。生理盐水组死亡时间均 > 120 min。蠕形螨死亡记录显示:麻风树叶提取物作用于蠕形螨后,螨的体位逐渐固定,足和螯肢停止活动。死亡后可见螨体收缩或破裂,破裂后外周有油滴样堆积物。

表4 不同药物作用下抗毛囊蠕形螨死亡时间 (min)

Table 4 Survival time of follicle mites under the action of different drugs (min)

药物	n	最短死亡时间	最长死亡时间	平均死亡时间
50 mg/ml 麻风树叶提取物 (A)	15	0.5	2.6	1.55±0.67
25 mg/ml 麻风树叶提取物 (B)	15	0.7	2.8	1.61±0.67
12 mg/ml 麻风树叶提取物 (C)	15	1.0	4.0	2.47±0.80 ^{ab}
2% 甲硝唑 (D)	15	0.5	2.1	1.20±0.48 ^c
生理盐水 (E)	15	> 120	> 120	> 120

注: A、B、C、D 4组平均死亡时间单因素方差分析结果, $F=9.878$, $P=0.000$; 两两比较结果, a. 与A组比较, $P < 0.05$, b. 与B组比较, $P < 0.05$, c. 与C组比较, $P < 0.05$

2.3 皮肤刺激性实验 麻风树叶提取物对家兔的完整皮肤和破损皮肤均无刺激性 (表5)。

表5 皮肤刺激实验结果

Table 5 The result of skin irritation test

组别	完整皮肤		破损皮肤	
	评分	刺激强度	评分	刺激强度
50 mg/ml 麻风树叶提取物	0	无刺激	0.4	无刺激
25 mg/ml 麻风树叶提取物	0	无刺激	0.3	无刺激
12 mg/ml 麻风树叶提取物	0	无刺激	0.3	无刺激
75% 乙醇	0.6	轻刺激	2.2	中刺激

注: 根据皮肤刺激反应评分标准 (表1) 和公式 (积分值 = $(\Sigma 1 + \Sigma 2) /$ 合计动物数) 计算出每组积分值, 参照表2 评估出刺激强度

2.4 急性皮肤毒性实验 给药后2周内实验组和对照组实验家兔活动正常, 皮肤、毛发、黏膜、眼睛无明显改变, 循环、呼吸和中枢神经系统等方面未见异常变化, 初步显示麻风树叶提取物经皮肤短期接触吸收后未产生急性毒性作用。

3 讨论

蠕形螨俗称毛囊虫, 分毛囊蠕形螨和皮脂蠕形螨2种, 通过直接与间接方式传播, 人群普遍易感。蠕形螨可破坏皮脂腺、毛囊, 引起皮脂排出通道堵塞, 造成局部皮肤病理损害, 常继发细菌感染, 引起毛囊炎、酒渣鼻、痤疮、脂溢性脱发等表现。从健康或者医学美容的角度出发, 蠕形螨的防治日益引起重视^[7-9]。蠕形螨繁殖力强, 迅速向临近毛囊迁徙, 至今尚无特效药治疗^[10]。

麻风树又名小油桐、芙蓉树、黄肿树、假花生、

吗啡罕、亮桐、南洋油桐, 属大戟科麻风树属植物, 主要分布于热带和亚热带地区, 在我国分布于云南、贵州、广东、四川、广西、福建等省区。现代药理研究表明, 麻风树的茎、叶、皮的白色乳剂内含有毒蛋白、酮类、氰氢酸与川芍萜等成分; 果仁含油、蛋白质、多种氨基酸、萜类、酮类、醇类物质及衍生物以及蛋白质和多肽等物质。具有营养、抗菌、杀病毒、杀虫、抗肿瘤、保健等作用。作为一种新兴的资源植物, 麻风树在新药开发方面具有巨大的研究价值。

本研究结果初步表明, 麻风树叶提取物具有体外抗蠕形螨作用。50、25 mg/ml 麻风树叶提取液的体外抗蠕形螨效果与2% 甲硝唑无明显差异。12 mg/ml 麻风树叶提取液体外抗蠕形螨效果差于2% 甲硝唑。初步表明麻风树叶提取液的抗螨效果与其浓度相关。体外安全性实验显示: 麻风树叶提取物对家兔的破损皮肤和完整皮肤均未引起红斑、水肿等过敏反应, 提示麻风树叶提取物对皮肤无刺激性。麻风树叶提取物对家兔破损皮肤和完整皮肤均无急性皮肤毒性反应, 提示麻风树叶提取物短期作用不会产生毒性反应。50、25、12 mg/ml 麻风树叶提取液 pH 值完全符合适应皮肤的最佳 pH 值范围 (4.5 ~ 6.6), 不会破坏皮肤表面的弱酸环境对酸、碱的一定的缓冲能力, 因此不会导致皮肤的衰老和损害^[11]。

综上所述, 麻风树叶提取物具有较强的体外抗螨作用, 且具有皮肤安全性, 若能进一步进行临床研究, 有望开发研制成新的抗螨药物。

【参考文献】

- [1] Clyti E, Sayavong K, Chanthavisouk K. Demodicidosis in a patient infected by HIV: successful treatment with ivermectin [J]. *Ann Dermatol Venereol*, 2005, 132(5):459-461.
- [2] 刘娟, 雷蕾, 唐琳, 等. 麻风树提取物体外抗病毒和杀菌作用的初步研究 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(8):1890-1893.
- [3] 徐明星, 程忠跃, 杨燕, 等. 麻风树素对钉螺及淡水鱼的生物毒性研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2008, 3(5):353-354.
- [4] 国家食品药品监督管理局. 药物研究技术指导原则 (2005年) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2006:234-250.
- [5] 王北婴, 李仪奎. 中药新药开发技术与方法 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001:807-813.
- [6] 中华人民共和国卫生部药政局. 中药新药研究指南 (药理学、毒理学) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994:209-212.
- [7] Baima B, Sticherling M. Demodicidosis revisited [J]. *Acta Derm Venereol*, 2002, 82(1):3-6.
- [8] 田晔, 李朝品. 人面部蠕形螨感染致病及其防治 [J]. *疾病控制杂志*, 2004, 8(4):355-357.
- [9] Farina MC, Requena L, Sarasa JL, et al. Spinulosis of the face as a manifestation of demodicidosis [J]. *Br J Dermatol*, 1998, 138(5):901-903.
- [10] 詹希美. 人体寄生虫学 [M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:273-275.
- [11] 于淞. 皮肤医学美容学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997:78, 81.

(2017-09-26 收稿 2017-10-25 修回)

(本文编辑 张云辉)