

金银花-蒲公英提取液纳米相态凝胶剂制备及对大鼠痤疮模型的药效评价

付佳宁¹, 赵氏淳¹, 郝凌峰¹, 刘志勇², 朱卫丰^{1,3}, 管咏梅^{1,3*}, 臧振中^{1*}

1. 江西中医药大学, 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学, 实验动物科技中心, 江西 南昌 330004

3. 经典名方现代中药创制全国重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 以金银花 *Lonicerae Japonicae Flos*-蒲公英 *Taraxaci Herba* 提取液纳米相态为对象进行凝胶剂制备处方研究并对其进行药效评价。方法 通过适量卡波姆 940、甘油、透明质酸钠、1,3-丁二醇、丙二醇及蒸馏水合成金银花-蒲公英提取液纳米相态凝胶剂并构建评价方法, 采用单因素考察及 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 考察卡波姆 940、甘油、pH 值、载药量对凝胶剂综合评分的影响并对凝胶剂外观性状、涂展性、离心稳定性、低温稳定性、高温稳定性进行评价以确定最优工艺; 建立大鼠痤疮模型, 通过耳廓肿胀率、炎症因子含量等对比考察金银花-蒲公英提取液纳米相态凝胶剂内服、外用、内外合用的抗炎药效。结果 金银花-蒲公英提取液纳米相态凝胶剂最优制备处方为金银花-蒲公英提取物纳米相冻干粉 6.89%、卡波姆 940 1.31%、甘油 4.82%、透明质酸钠 0.05%、1,3-丁二醇 2.5%、丙二醇 2.5%, pH 5.09; 金银花-蒲公英提取液纳米相态凝胶剂内服、外用、内外合用均可显著降低痤疮模型大鼠耳廓肿胀率 ($P < 0.01$ 、 0.001) 及大鼠血清炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 含量 ($P < 0.001$), 有效改善痤疮大鼠耳部的病理损害。结论 金银花-蒲公英提取液纳米相态凝胶剂对痤疮丙酸杆菌诱导的痤疮炎症反应具有显著的抑制作用, 为中药药对提取液纳米相态治疗痤疮的制剂开发提供参考。

关键词: 金银花; 蒲公英; 药对; 纳米相态; 凝胶制备; 痤疮; 药效学

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)24-8416-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.010

Preparation of nano-phase gel from extract of *Lonicerae Japonicae Flos-Taraxaci Herba* and its pharmacodynamic evaluation on rat acne model

FU Jianing¹, ZHAO Shichun¹, HAO Lingfeng¹, LIU Zhiyong², ZHU Weifeng^{1,3}, GUAN Yongmei^{1,3}, ZANG Zhenzhong¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Laboratory Animal Science and Technology Center, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. National Key Laboratory of Classical Prescription Modern Traditional Chinese Medicine Innovation Manufacturing, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective The preparation process of the gel was studied and its pharmacodynamic evaluation was carried out with the nano phase state of the extract of Jinyinhua (*Lonicerae Japonicae Flos*, LJF)-Pugongying (*Taraxaci Herba*, TH). **Methods** The LJF-TH extract nanophase was subjected to gel preparation by using appropriate amount of carbomer 940, glycerol, sodium hyaluronate, 1,3-butanediol, propylene glycol, and distilled water, and the gel evaluation method was established. The effects of carbomer 940, glycerol, pH value and drug load on the comprehensive score of gels were investigated by single factor investigation and Box-Behnken design-response surface method, and the appearance properties, spreadability, centrifugal stability, low temperature stability and high

收稿日期: 2024-08-24

基金项目: 江西省重点研发计划项目 (20224BBG71023); 江西省高层次高技能领军人才培养工程 (12623001); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ2400801); 中药学重点学科项目 (2023jzzdxk016); 博士科研启动基金项目 (2023WBZR007)

作者简介: 付佳宁, 硕士研究生, 从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: 18296539309@163.com

*通信作者: 管咏梅, 博士生导师, 教授, 从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: guanym2008@163.com

臧振中, 博士, 副教授, 主要从事中药制造新工艺和新装备研究。E-mail: zwf0322@126.com

temperature stability of gels were evaluated to determine the optimal process. The experimental model of acne was established in rats, and the anti-inflammatory effects of taking the nano phase gel orally, applying it and internal-external combination's methods of administration were investigated by comparing the swelling rate of auricle and the content of inflammatory factors. **Results** The optimal preparation process of LJF-TH extract nanophase gel was as follows: LJF-TH extract nanophase lyophilized powder 6.89%, carbomer 940 1.31%, glycerol 4.82%, sodium hyaluronate 0.05%, 1,3-butanediol 2.5%, propylene glycol 2.5%, pH 5.09. All of taking the nano phase gel orally, applying it and internal-external combination's method of administration can significantly reduce the swelling rate of the auricle ($P < 0.01, 0.001$) and the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the serum of rats, and effectively improve the pathological damage of the ears of acne rats ($P < 0.001$). **Conclusion** The nano phase gel of LJF-TH extract has a significant inhibitory effect on acne inflammation induced by *Propionibacterium acnes*, which provides a reference for the development of Chinese medicine pair extract nano phase preparation for acne treatment.

Key words: *Lonicerae Japonicae Flos*; *Taraxaci Herba*; drug pair; nanophase; gel preparation; acne vulgaris; pharmacodynamics

痤疮是一种发生于毛囊皮脂腺的慢性炎症性常见皮肤病,多出现在面部、前胸后背等皮脂腺丰富的地方。根据痤疮严重程度可分为粉刺、炎性丘疹、脓疱、结节、囊肿等多种程度皮损,且治愈后往往会造成持续性或终身性红斑和色素沉着。痤疮的发病机制较为复杂,其中致病菌感染引起的炎症在痤疮的发病中起到重要作用,致病菌有痤疮丙酸杆菌 *Propionibacterium acnes* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 等,其中痤疮丙酸杆菌是最主要的致病菌^[1-3]。胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 是青春期最主要的生长激素,青春期后,雄激素在人体中十几年内仍维持在高水平,而痤疮一般已自行消退,IGF-1 水平则在青春期后不断降低,因此 IGF-1 水平与痤疮的临床表现直接相关^[4]。IGF-1 和胰岛素 (insulin) 可激活磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3 kinases-protein kinase B, PI3K-AKT) 通路,进而使核内的叉头框蛋白 1 (Forkhead box O1, FoxO1) 磷酸化,促使 FoxO1 向胞质转移,从而解除 FoxO1 对雄激素受体 (androgen receptor, AR) 的抑制,一系列信号分子活化,影响促炎反应和免疫应答,可诱导炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 表达升高,增加皮脂合成和痤疮的发生^[5-8]。

金银花 *Lonicera japonica* Thunb.、蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. 皆清热解毒之专品,凡热毒炽盛之痈疮,用之效佳,是临床上用于治疗痤疮的高频药物^[9-11]。金银花富含黄酮、有机酸、三萜皂苷和环烯醚萜类化合物,现代研究证明其提取物具有显著的抗菌和防腐活性,可广泛应用于各类制剂及化妆品中^[12];蒲公英含有倍半萜烯、皂苷、酚类化合物、类黄酮等成分^[13],其对各类炎

症损伤均具有较好疗效且对机体存在保护作用^[14-16],二者具有较强的抑菌作用^[17-18]。药对是方剂配伍的关键所在,通过中国期刊全文数据库 (CNKI) 痤疮治疗临床文献及各类中医古籍得出五味消毒饮、银翘解毒汤、立消汤、消炎解毒丸、加味三星汤等众多方剂中均含有金银花、蒲公英 2 味清热解毒之要药,且二者多为君、臣药,证明两药于相须使用的前景广阔。

研究证明中药汤剂作为复杂的多分散相体系,其多含有皂苷、生物碱、多糖、黄酮、氨基酸等,上述成分多可形成氢键、范德华力等非共价键进而聚集并自组装成纳米相态^[19];而中药汤剂纳米相态不仅能保证复方药性表达,而且能提高生物利用度、细胞内有效积累等^[20]。临床上中药治疗痤疮方法多样,有外用制剂、内服的汤剂或二者联合应用,不同给药方式均有良好的治疗效果。金银花-蒲公英提取液本身颜色深、较混浊,含各类成分与杂质,不适宜直接制备制剂,而外用制剂的载药量较低^[21],一般小于 5%,通过前期研究证明通过透析-离心法拆分金银花-蒲公英提取液获得的纳米相态,关键成分含量最高、粒径适中,为有效相态^[22],而凝胶剂有制备简单、质量稳定、附着力强等特点,与内服用药相比治疗皮肤病手段简单,故对金银花-蒲公英提取液纳米相态进行凝胶剂的制备,可增加制剂载药量,使其更易被皮肤吸收,且美观性强。通过探究金银花蒲公英纳米相态不同给药方式对痤疮的药效及可能作用机制研究,为金银花配伍蒲公英的纳米相态治疗痤疮的产品开发奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ZNCL-BS 型智能磁力搅拌器,河南胜博仪器设备有限公司;Zano-90 型马尔文激光粒径检测仪,英

国 Malvern 公司; TGL-20MC 型台式高速冷冻离心机, 湖南湘鑫仪器仪表有限公司; JB-L5 型包埋机, 武汉俊杰电子有限公司; JT-12J 型脱水机, 武汉俊杰电子有限公司; TECNAI G2 Spirit BioTWIN 120 kV 型透射电子显微镜 (TEM), 美国 FEI 公司; RM2016 型病理切片机, 徕卡显微系统有限公司; Panoramic Scan II 型扫描仪, 济南丹吉尔电子有限公司; LightCycler 480 II 型实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Roche 公司; ABI7300 型梯度 PCR 仪, 美国 Applied Biosystem 公司; NanoDrop-2000 型核酸蛋白测定仪, 美国 Thermo Fisher 公司; SPARK 10M 型多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司。

1.2 药品与试剂

蒲公英(批号 221127)、金银花(批号 221221) 购自江西江中中药饮片有限公司, 经江西中医药大学邓可众教授鉴定, 金银花为忍冬科忍冬属植物忍冬 *L. japonica* Thunb. 的干燥花蕾, 蒲公英为菊科蒲公英属植物蒲公英 *T. mongolicum* Hand. -Mazz. 的干燥全草, 各饮片质量经本课题组前期检测均符合《中国药典》2020 年版标准; 丙三醇(批号 2210312)、三乙醇胺(批号 2109101)、丙二醇(批号 2106041) 均购自西陇科学股份有限公司; 1,3-丁二醇(批号 RH196127) 购自上海易恩化学技术有限公司; 无水乙醇(批号 100092683)、二甲苯(批号 10023418)、正丁醇(批号 10005218)、中性树胶(批号 10004160) 均购自国药集团化学试剂有限公司; 卡波姆 940(批号 C14569191)、油酸(批号 C14371601)、甘油三酯(TG, 批号 C15454501)、霍霍巴油(批号 C15299399)、角鲨烯(批号 C14200179) 均购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 空白凝胶基质(实验室自制); 解毒痤疮丸(Jiedu Cuochuang Pills, JCP, 批号 2203001) 购自江西汇仁药业股份有限公司; 玫芦消痤膏(Meilu Xiaocuo Ointment, MXO, 批号 20230401028) 购自贵州良济药业有限公司; 痤疮丙酸杆菌 *P. acnes* (菌种编号 BNCC336649, 批号 220921) 购自商城北纳创联生物科技有限公司; 哥伦比亚血平板(批号 20231005) 购自青岛海博生物技术有限公司; HE 染色液套装(批号 S191003) 购自皮诺飞生物科技有限公司; TNF- α 、IL-6、IGF-1 试剂盒(批号分别为 A382H30342、A306H31042、A913130932) 购自杭州联科生物技术股份有限公司; 超纯 RNA 提取试剂盒、EasyScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix、BCA 蛋白

定量试剂盒(批号分别为 ER501、R20515、20230404) 均购自北京全式金生物技术有限公司; Cham Q Universal SYBR qPCR Master Mix (批号 R20703) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 动物

健康 SD 雄性大鼠 80 只, 体质量 180~220 g, 实验动物由江西中医药大学实验动物中心提供, 合格证号: SYXK(赣) 2022-0002。本次实验已通过江西中医药大学实验动物中心伦理审查, 伦理编号为 JZLLSC20240504。

2 方法与结果

2.1 金银花-蒲公英提取液纳米相态及其冻干粉的制备

以 1:1 比例称取金银花、蒲公英饮片, 加 12 倍量水回流提取 30 min, 趁热滤过, 药渣加 10 倍量水回流提取 20 min, 合并滤液, 参考文献方法^[23-26]将提取液室温 10 000 r/min 离心(离心半径 5 cm) 30 min, 取上清液透析 30 min 后 13 000 r/min 高速离心(离心半径 5 cm) 30 min, 重复操作 3 次, 获得分布于 1~100 nm 的纳米相态, 符合纳米体系粒径要求。最后, 对上清液纳米相态减压浓缩至 0.5 g/mL, 进行冷冻干燥, 得到金银花-蒲公英提取液纳米相态冻干粉, 得率为 27.7%。

2.2 金银花-蒲公英提取液纳米相态的表征

前期研究发现^[22], 金银花-蒲公英提取液中纳米相态的多分散指数(polydispersity index, PDI) 平均值最高、指标成分含量最高, 平均粒径最低。此外, 采用 TEM 对纳米相态部分外观形态进行观察, 发现其外观多为不规则形, 结果见图 1。

2.3 金银花-蒲公英提取液纳米相态凝胶剂的制备

称取适量卡波姆 940、甘油、透明质酸钠及蒸馏水, 搅拌后过夜溶胀。待完全溶胀后依次加入金银花-蒲公英提取液纳米相态冻干粉、1,3-丁二醇、

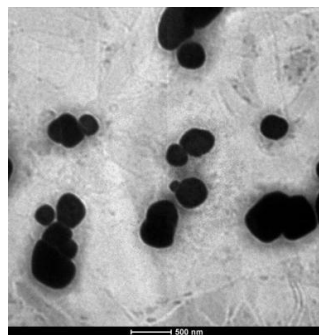


图 1 金银花-蒲公英提取液纳米相态 TEM 表征

Fig. 1 LJF-TH extract nanophase TEM characterization

丙二醇及剩余的蒸馏水，滴加三乙醇胺调节 pH 值至 6，搅拌，直至形成均匀细腻黄色透明凝胶，凝胶剂具体制备处方为卡波姆 940 0.5%~3.0%、甘油 0~20%、透明质酸钠 0.05%、金银花-蒲公英提取液纳米相态冻干粉 5%~30%、1,3-丁二醇 2.5%、丙二醇 2.5%、三乙醇胺加至 pH 值 4~7，纯水补足剩余质量。

2.4 金银花-蒲公英提取液纳米相态凝胶剂评价方法的建立

依据《中国药典》2020 年版要求及相关文献报道^[27-28]，将凝胶剂评价指标确定为外观性状、涂展性、离心稳定性、低温稳定性、高温稳定性，对凝

胶剂进行评分，并计算其综合评分。外观性状：取 3 批凝胶适量，凝胶剂应较透明、无颗粒团块，细腻，在常温下时保持胶状，不干涸，不液化；涂展性：取 3 批凝胶适量，涂抹于手上，以其涂抹难易程度进行评分；离心稳定性：取 3 批凝胶剂适量，分别置于 3 支离心管中，在离心半径 5 cm、3 000 r/min 的条件下离心 30 min，观察凝胶的外观性状；低温稳定性：取 3 批凝胶剂适量，于-20 ℃左右冰箱中放置 24 h，取出后恢复至室温，观察凝胶的外观性状；高温稳定性：取 3 批凝胶剂适量，于 55 ℃条件下恒温加热 6 h，取出后恢复至室温，观察凝胶的外观性状。评分细则见表 1。

表 1 凝胶评分细则

Table 1 Gel scoring rules

评分	外观性状	涂展性	离心稳定性	低温稳定性	高温稳定性
0~4	不透明、有较大颗粒团块、不细腻	不易涂展	严重分层	严重分层、变色	严重分层、变色
5~7	透明性较差、少量颗粒团块、细腻程度较低	较难涂展	轻微分层	轻微分层、变色	轻微分层、变色
8~10	透明性较好、无颗粒团块、细腻	易于涂展	无分层	无分层、变色	无分层、变色

综合评分=25%×(外观性状+涂展性+离心稳定性+低温稳定性+高温稳定性)

2.5 单因素考察金银花-蒲公英提取液纳米相态凝胶剂制备处方

对金银花-蒲公英提取液纳米相态凝胶剂制备处方进行单因素实验，考察卡波姆 940、甘油、载药量、pH 值 4 个因素对凝胶剂综合评分的影响，将各因素考察下制得的样品进行外观性状、涂展性、离心稳定性、低温稳定性、高温稳定性 5 个方面分析，结果见表 2。结果显示，卡波姆的最适宜用量在 1.0%~2.0%；从保湿性能考虑，甘油的最适宜用量在 0~10.0%；根据凝胶的外观及黏度进行选择，最适宜载药量在 5.0%~10.0%；依据综合评分，凝胶剂 pH 值在 4~6 最佳。

表 2 卡波姆用量、甘油用量、pH 值、载药量对综合评分的影响 (n=3)

Table 2 Effect of carbomer dosage, glycerol dosage, pH value, drug loading on composite score (n=3)

卡波姆用量/%	综合评分	甘油用量/%	综合评分	载药量/%	综合评分	pH 值	综合评分
0.5	37.50	0	46.50	5.0	47.50	4.0	43.50
1.0	48.00	5.0	48.00	8.0	48.00	5.0	46.00
1.5	45.50	10.0	47.50	10.0	47.00	6.0	43.50
2.0	42.50	15.0	44.75	15.0	45.00	7.0	41.50
2.5	39.50	20.0	42.75	30.0	37.00		

2.6 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 实验设计及结果

采用 Design Expert 8.0 软件，对上述 4 个因素卡波姆用量 (X_1)、甘油用量 (X_2)、pH 值 (X_3)、载药量 (X_4) 进行 29 组 BBD-RSM 实验，每组平行制备 3 份，进行评分，取平均值记为综合评分结果，实验结果见表 3，各项因素回归系数见表 4，各因素的交互作用对综合评分的影响见图 2。

应用 Design Expert 8.0 软件对实验数据进行二次多项式逐步拟合，得到回归方程：综合评分=44.47-0.97 X_1 -0.28 X_2 -0.36 X_4 -0.25 X_1X_2 -0.33 X_1X_3 +0.17 X_2X_3 -0.25 X_2X_4 +0.17 X_3X_4 -1.27 X_1^2 -1.48 X_2^2 -0.48 X_3^2 -0.69 X_4^2 ， $P<0.01$ ，说明模型达到极显著水平，表明处方优化试验设计合理可靠，模型相关系数 $R^2=0.9371$ ，进一步说明模型可信度较高；且模型失拟项不显著，表明拟合程度良好，试验点均能用模型描述，由上述可得：可用此模型来预测和分析金银花-蒲公英提取液纳米相态凝胶剂的处方配比。模型中的 F 值大小，反映了该因素对凝胶综合评分影响的大小， F 值越大影响越大，各因素影响大小顺序为 $X_1>X_4>X_2>X_3$ ，即卡波姆 940 用量>载药量>甘油用量>pH 值。通过软件拟合，确定凝胶剂最优处方：卡波姆 940 用量为 1.31%，甘油用量为 4.82%、pH 值为 5.09，载药量为 6.89%，

表 3 BBD-RSM 实验设计与结果 (n = 3)
Table 3 Experimental design and results of BBD-RSM (n = 3)

序号	X ₁ /%	X ₂ /%	X ₃	X ₄ /%	综合评分	序号	X ₁ /%	X ₂ /%	X ₃	X ₄ /%	综合评分	序号	X ₁ /%	X ₂ /%	X ₃	X ₄ /%	综合评分
1	1.5 (0)	0 (-1)	5 (0)	5.0	42.67	11	2.0	5	6	7.5	41.67	21	1.5	5	4	10.0	43.33
2	1.0 (-1)	0	5	7.5	42.67	12	1.0	5	4	7.5	43.00	22	1.5	5	5	7.5	45.00
3	1.5	5 (0)	5	7.5	44.00	13	1.5	10	6	7.5	42.00	23	2.0	5	5	10.0	41.00
4	1.5	0	4 (-1)	7.5	43.00	14	1.5	5	5	7.5	44.33	24	1.0	10	5	7.5	43.00
5	1.5	5	5	7.5	44.33	15	2.0	5	4	7.5	41.67	25	1.5	5	6	5.0	43.33
6	2.0 (+1)	5	5	5.0	41.67	16	1.0	5	5	10.0	43.00	26	1.5	10	4	7.5	41.67
7	1.5	5	6 (+1)	10.0	43.00	17	1.0	5	5	5.0	43.67	27	1.5	5	4	5.0	44.33
8	1.5	10 (+1)	5	10.0	41.33	18	2.0	0	5	7.5	41.33	28	2.0	10	5	7.5	40.67
9	1.5	0	5	10.0	42.33	19	1.0	5	6	7.5	44.33	29	1.5	5	5	7.5	44.67
10	1.5	0	6	7.5	42.67	20	1.5	10	5	5.0	42.67						

表 4 因子的回归系数
Table 4 Regression coefficients for factors

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	36.37	14	2.60	14.91	<0.000 1	极显著	X ₃ X ₄	0.11	1	0.11	0.64	0.437 8	
X ₁	11.34	1	11.34	65.11	<0.000 1	极显著	X ₁ ²	10.54	1	10.54	60.53	<0.000 1	极显著
X ₂	0.93	1	0.93	5.32	0.037 0	显著	X ₂ ²	14.27	1	14.27	81.93	<0.000 1	极显著
X ₃	0.00	1	0.00	0.00	1.000 0		X ₃ ²	1.52	1	1.52	8.70	0.010 6	
X ₄	1.56	1	1.56	8.98	0.009 6	极显著	X ₄ ²	3.10	1	3.10	17.81	0.000 9	极显著
X ₁ X ₂	0.25	1	0.25	1.44	0.250 8		残差	2.44	14	0.17			
X ₁ X ₃	0.44	1	0.44	2.55	0.132 5		失拟项	1.86	10	0.19	1.29	0.434 7	不显著
X ₁ X ₄	0.00	1	0.00	0.00	1.000 0		纯误差	0.58	4	0.14			
X ₂ X ₃	0.11	1	0.11	0.64	0.437 8		总离差	38.80	28				
X ₂ X ₄	0.25	1	0.25	1.44	0.250 8								

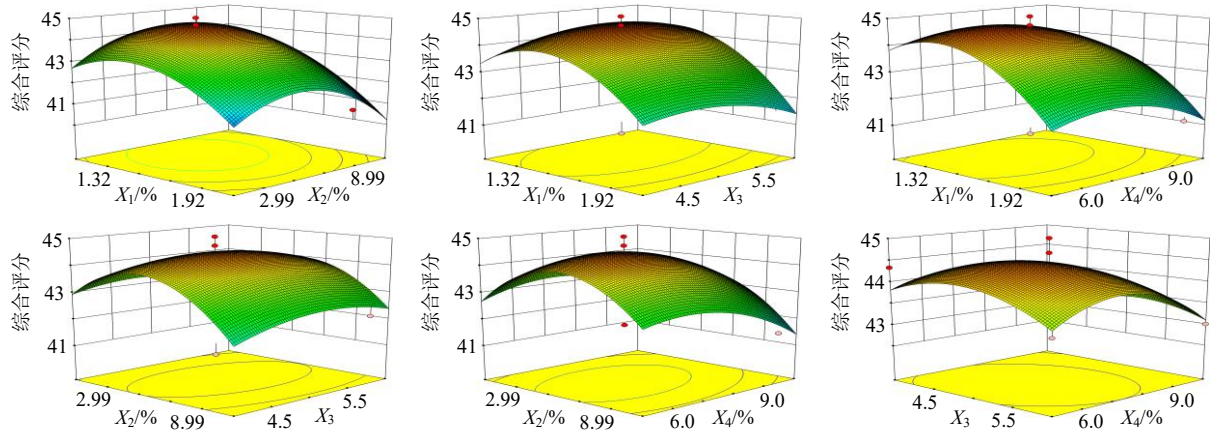


图 2 各因素响应面图
Fig. 2 Response surface plots for various factors

在此条件下模型预测的最大综合评分为 45.00。

实验采用 BBD-RSM, 与中心组合设计结合响应面法相比, 存在实验数更少的优势, 其采用多种模型方程回归来拟合因素与响应值之间的函数关系, 从而建立合适模型, 再通过模型拟合函数来寻找最优处方; 最终得出最佳处方及制备工艺: 取卡波姆 940 1.31%、甘油 4.82%、透明质酸钠 0.05%及蒸馏

水于烧杯中, 搅拌溶胀, 待完全溶胀后依次加入金银花-蒲公英提取液纳米相态冻干粉 6.89%、1,3-丁二醇 2.5%、丙二醇 2.5%, 剩余比例为蒸馏水, 最后滴加三乙醇胺调节 pH 值至 5.09, 搅拌直至形成均匀细腻黄色透明状凝胶, 制备的凝胶的外观、涂展性、稳定性良好。

在最佳处方工艺参数下进行 3 次验证实验, 结

果见表 5。结果显示最佳处方工艺条件下的综合评分都与预测值差异不明显。

表 5 验证实验结果
 Table 5 Verification experimental results

序号	外观 性状	涂展性	稳定性			综合 评分	RSD/ %
			离心	低温	高温		
1	9	9	9	8	9	44	1.30
2	9	9	9	8	9	44	
3	9	9	9	9	9	45	

2.7 金银花-蒲公英纳米相态凝胶剂对大鼠痤疮模型的药效考察

2.7.1 动物分组、建立模型与给药 取 80 只 SD 大鼠按随机数字表法将大鼠分为空白组 ($n=10$, 雌雄各半)、模型组 ($n=70$, 雌雄各半)。除空白组外, 其余各组大鼠右耳廓 sc 20 μ L 痤疮丙酸杆菌 (每只大鼠 8.0×10^7 cfu) [29-30], 连续 7 d 诱导痤疮模型, 第 8 天开始每天用人工混合皮脂 (17%油酸、45% TG、25%荷荷巴油和 13%角鲨烯) 涂抹 100 μ L 于大鼠右耳廓以加速诱导痤疮形成。左耳不做任何处理作为对照。据《中成药治疗寻常痤疮专家共识 (2016)》中, MXO 主治以粉刺丘疹为主要表现的痤疮; JCP 主治皮肤局部粉刺、丘疹、脓疱, 二者治疗症状与模型症状吻合。

除空白组外, 将上述模型组大鼠按数字法随机分为 7 组, 每组 10 只, 分别为模型组、阳性药内服组 (JCP)、阳性药外用组 (MXO)、阳性药内外合用组 (JCP+MXO)、金银花-蒲公英纳米相态汤剂内服给药组 (JPdec 组)、金银花-蒲公英纳米相态凝胶剂外用给药组 (JPgel 组)、金银花-蒲公英纳米相态汤剂内服与凝胶剂外用合用组 (JPdec + JPgel 组)。各组进行相应给药, JPdec 组给予金银花-蒲公英纳米相态汤剂, JPgel 组给予金银花-蒲公英纳米相态凝胶剂、JPdec + JPgel 组给予金银花-蒲公英纳米相态汤剂及凝胶剂、MXO 组给予 MXO、JCP 组给予 JCP、JCP + MXO 组给予 MXO 及 JCP。

金银花、蒲公英成人用生药量为 15 g/d, 成人 体质量按 70 kg 计, 则成人 生药量为 214.29 mg/(kg·d), 根据人与实验动物等效剂量换算, $15\text{ g}/70\text{ kg}\times 6.3=1.35\text{ g/kg}$, 换算成纳米相态剂量为 0.15 g/(kg·d)纳米相态冻干粉。以耳廓为中心的面积为 1 cm $\times$ 1 cm 的区域为金银花-蒲公英纳米相态凝胶剂施药区, 涂抹厚度 0.5~1.0 mm。JCP 成人用量 18 g/d, 成人体质量按 70 kg 计, 则成人 生药量约 0.26

g/kg, 根据人与实验动物等效剂量进行换算, 给药剂量为每天 18 g/70 kg $\times$ 6.3=1.62 g/kg; 同理涂抹 MXO (0.025%) 0.2 mL/d; 空白组及模型组涂抹空白凝胶基质 0.2 mL/d。每日 1 次, 连续给药 14 d。

2.7.2 表观指标观察及评分 于第 14 天用药后, 对 各组大鼠从耳廓组织肿胀度、颜色变化、表皮角化 度、丘疹脓疱 4 个考察对象, 根据右侧耳廓外观及 形态进行观察评分、拍照、记录。评分标准见表 6。

耳廓肿胀率=(末次处理后耳廓厚度-处理前耳廓厚 度)/处理前耳廓厚度

2.7.3 各组大鼠耳廓组织形态学观察及表观评分 各组大鼠耳廓组织形态学观察结果 (图 3) 表明, 治疗期间空白组耳廓组织柔软细腻, 颜色呈淡粉色, 皮下毛细血管无扩张, 毛囊口未见扩张及角化物堆 积, 与左耳对比无明显变化。模型组可见右侧耳廓 颜色呈红色, 肿胀明显, 触摸时皮肤温度较高, 耳 廓组织较左耳增厚明显, 表皮粗糙并有角质皮屑, 皮下毛细血管扩张明显, 耳导管开口处有明显脓疱、 丘疹。阳性药及金银花-蒲公英纳米相态各给药组:

表 6 大鼠耳廓痤疮模型表观指标评分量表
 Table 6 Rat auricular acne model apparent indicator score scale

评分项目	皮损变化	分值	评分项目	皮损变化	分值
肿胀度	$\leq 1\text{ mm}$	0	角化程度	正常	0
	$2\text{ mm}\leq X<1\text{ mm}$	1		轻度增厚	1
	$3\text{ mm}\leq X<2\text{ mm}$	2		中度增厚	2
	$\geq 3\text{ mm}$	3		明显增厚	3
颜色	淡粉色 (正常)	0	丘疹、 脓疱	无丘疹、脓疱	0
	淡红色	1		丘疹、脓疱较少	1
	红色	2		丘疹、脓疱中等	2
	暗红	3		丘疹、脓疱较大	3



图 3 各组大鼠形态学观察
 Fig. 3 Morphological observation of rats in each group

大鼠耳廓呈淡红色,耳廓增厚有改善,轻度肿胀,皮下无毛细血管扩张,表面皮屑减少,丘疹、脓疱减少。对大鼠耳廓肿胀度、颜色、角化物、丘疹脓疱进行观察评分比较发现:与模型组相比阳性药组及金银花-蒲公英纳米相态各给药组耳廓各项指标评分情况均有不同程度改善($P<0.001$),结果见表 7。其中 JCP+MXO 组评分最低,金银花-蒲公英纳米相态各给药组内外合用组评分最低,3 种给药方式组无显著性差异,说明金银花-蒲公英纳米相态内服、外用、内外合用均能够明显改善痤疮皮损。

2.7.4 各组大鼠耳廓肿胀率 各组大鼠耳廓肿胀率结果见表 7,与空白组比较,模型组大鼠耳廓肿胀率显著升高($P<0.001$),与模型组比较,阳性药及金银花-蒲公英纳米相态各给药组大鼠耳廓肿胀率显著

降低($P<0.01$ 、 0.001),金银花蒲公英纳米相态 3 种给药方式无显著性差异。

2.7.5 各给药组对大鼠炎症因子代谢调节因子的影响 取各组大鼠血清进行 ELISA 试剂盒检测,炎症因子、代谢调节因子水平结果见表 8。与空白组相比,模型组大鼠耳廓 IGF-1、TNF- α 、IL-6 含量均有增加($P<0.001$);与模型组相比,阳性药及金银花-蒲公英纳米相态各给药组大鼠耳廓 IGF-1、TNF- α 、IL-6 均降低($P<0.001$);金银花-蒲公英纳米相态各给药组检测大鼠耳廓 TNF- α 、IL-6 含量结果均低于各阳性药组。

逆转录聚合酶链式扩增反应检测耳廓组织中 IGF-1、PI3K、AKT 信号通路及其效应蛋白 FoxO1 的 mRNA 表达情况,结果见表 8。与空白组比较,模型组 IGF-1、PI3K、AKT 的 mRNA 表达水平明显上升($P<0.01$ 、 0.001),FoxO1 的 mRNA 水平下降($P<0.001$);与模型组比较,阳性药组 IGF-1、PI3K、AKT mRNA 表达均有下降,FoxO1 的 mRNA 水平上升,差异有统计学意义($P<0.001$),其中 JCP+MXO 组趋势更为明显;与模型组比较,JPdec 组 IGF-1、PI3K、AKT 的 mRNA 表达水平均有下降,FoxO1 的 mRNA 水平上升,差异有统计学意义($P<0.001$);JPgel 组 IGF-1、PI3K、AKT 的 mRNA 表达水平均有下降($P<0.01$ 、 0.001),FoxO1 的 mRNA 水平上升($P<0.01$);JPdec+JPgel 组 IGF-1、PI3K、AKT 的 mRNA 表达水平均下降($P<0.001$),FoxO1 的 mRNA 水平上升($P<0.001$)。其中金银花-蒲公英纳米相态各给药组组间 IGF-1、PI3K、AKT、FoxO1 的 mRNA 水平无显著差异,结果见表 8。

表 7 各组大鼠给药 14 d 后耳廓表现评分和耳廓肿胀率
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Auricular apparent scores and auricular swelling rate of rats in each group after 14 d of drug administration
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	评分	耳廓肿胀率/%
空白	—	0.00	7.95±5.14
模型	—	9.00±0.53	99.66±30.06***
JCP	1.62	2.25±0.89###	32.03±3.10###
MXO	1.50	2.00±0.53###	29.80±3.42###
JCP+MXO	1.50	1.75±0.71###	23.57±7.74###
JPdec	0.15	2.38±0.74###	36.57±10.16###
JPgel	0.15	2.38±0.74###	38.87±13.96##
JPdec+JPgel	0.15	2.00±0.53###	34.16±16.32###

与空白组比较:*** $P<0.001$;与模型组比较:## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs blank group; ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

表 8 各组大鼠耳廓组织中 TNF- α 、IL-6、IGF-1 水平及 IGF-1、PI3K、AKT、FoxO1 mRNA 相对表达水平($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 8 ELISA results of TNF- α , IL-6 and IGF-1 content and relative expression levels of IGF-1, PI3K, AKT, FoxO1 in auricular tissue of each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	质量浓度/(pg·mL ⁻¹)			mRNA 相对表达水平			
		TNF- α	IL-6	IGF-1	IGF-1	PI3K	AKT	FoxO1
空白	—	11.70±4.73	37.76±6.35	91.50±25.64	1.03±0.07	1.00±0.06	1.00±0.03	1.00±0.08
模型	—	72.41±16.19***	71.73±12.15***	191.10±40.54***	1.47±0.07***	1.71±0.13***	1.27±0.12**	0.39±0.08***
JCP	1.62	27.27±5.98###	49.13±5.91###	112.34±18.24###	1.10±0.13###	0.75±0.16###	0.86±0.09###	1.01±0.29###
MXO	1.50	26.46±6.86###	43.52±6.24###	106.97±19.98###	0.83±0.15###	0.86±0.27###	0.68±0.09###	0.92±0.15###
JCP+MXO	1.50	17.85±8.48###	43.45±11.01###	100.48±16.28###	0.68±0.09###	0.64±0.22###	0.57±0.06###	0.92±0.19###
JPdec	0.15	17.48±8.17###	40.38±7.57###	107.51±19.93###	1.04±0.20###	1.01±0.10###	0.53±0.13###	0.99±0.19###
JPgel	0.15	17.48±7.60###	38.64±8.75###	105.88±20.81###	0.89±0.04###	1.23±0.25##	0.62±0.10###	0.78±0.06##
JPdec+JPgel	0.15	12.25±3.60###	38.51±9.34###	106.27±23.17###	0.85±0.10###	0.90±0.33###	0.48±0.15###	0.83±0.14###

与空白组比较:** $P<0.01$ *** $P<0.001$;与模型组比较:## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

综上结果表明, 金银花-蒲公英纳米相态内服、外用、内外合用均能改善痤疮, 且疗效与阳性药比较优。

2.7.6 HE 染色观察耳廓组织病理学变化 显微镜下观察大鼠耳廓组织 HE 染色见图 4, 空白组大鼠耳廓以耳廓软骨为支架, 内外面覆盖以皮肤, 皮肤的表皮层薄, 表皮细胞无明显的异常, 真皮层内胶原纤维数量丰富, 相互交织成网状排列, 可见毛囊以及皮脂腺等附属器散在分布, 软骨厚薄均匀, 细

胞排列规则, 未见明显异常。模型组大鼠耳廓可见皮肤组织增厚, 皮肤表皮可见棘细胞增生, 表皮明显的增厚, 真皮层内局部可见水肿, 结构疏松, 偶见灶性坏死, 坏死灶内可见大量的坏死细胞碎片以及脓细胞, 伴有大量的炎性细胞浸润, 毛囊、皮脂腺等附属器轻度减少, 毛囊上皮无明显的异常, 局部可见软骨断裂。与模型组比较阳性药及金银花-蒲公英纳米相态各给药组组织结构较为正常, 但仍有毛细血管轻微扩张, 炎性细胞浸润减少。

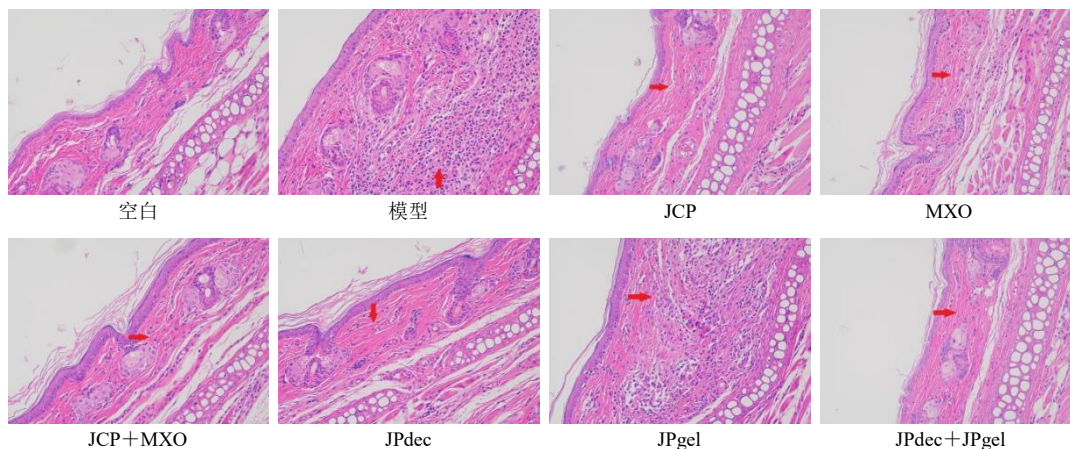


图 4 各组大鼠耳廓 HE 染色 (×200)

Fig. 4 HE staining of rat auricles in each group (× 200)

3 讨论

中药凝胶剂作为一种新型的外用制剂, 适用于对患者皮肤及黏膜类疾病进行治疗, 可以避免口服给药为其带来的首过效应, 还可减轻药物对其产生的不良反应^[31]。本实验在金银花-蒲公英提取液纳米相态基础上以卡波姆为基质制备凝胶剂, 具有易涂展、附着性和均匀性良好, 对皮肤和黏膜无刺激性等优点, 且在一定程度上控制药物的释放, 提高药物的使用效率^[32]; 甘油作为常用保湿剂, 在外用制剂及护肤品等各方面均有广泛运用, 具有较好的皮肤渗透性^[33]; 卡波姆分子中含有 52%~68% 的酸性基团, 与三乙醇胺等碱性物质发生中和后, 羟基开始解离, 离子化产生负电荷间相互排斥作用, 使卷曲的聚合物分子链伸展, 聚合物溶胀形成凝胶, 黏度增加, 故本实验选用三乙醇胺为 pH 调节剂^[34]。

金银花甘寒, 清热解毒, 散痈消肿; 蒲公英味苦甘性寒, 既能散痈肿解热毒, 又可泄湿热通淋浊, 二药配对, 相须为用, 清热解毒, 散痈消肿作用更佳。本研究将金银花-蒲公英提取液纳米相态及卡波姆、甘油制成的凝胶剂应用于大鼠痤疮模型。与模型组比较阳性药及金银花-蒲公英纳米相态各给药

组组织结构较为正常, 但仍有毛细血管轻微扩张, 炎性细胞浸润减少且各给药组大鼠耳廓 IGF-1、TNF- α 、IL-6 含量均降低, IGF-1、PI3K、AKT mRNA 表达均有下降, FoxO1 mRNA 水平上升, 以上实验结果表明金银花-蒲公英纳米相态凝胶剂内服、外用及内外合用对痤疮丙酸杆菌诱导的痤疮炎症反应具有显著的抑制作用。

综上表明, 金银花-蒲公英纳米相态凝胶剂在临床治疗痤疮上的潜力, 本研究为丰富中药提取工艺的科学性和合理性及金银花-蒲公英治疗痤疮的产品开发提供依据, 为中药药对的研究开发提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 顾思逸, 章欣. 寻常性痤疮治疗的研究进展 [J]. 中国美容医学, 2019, 28(12): 170-173.
- [2] Cong T X, Hao D, Wen X, et al. From pathogenesis of acne vulgaris to anti-acne agents [J]. Arch Dermatol Res, 2019, 311(5): 337-349.
- [3] Dréno B. What is new in the pathophysiology of acne, an overview [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2017, 31(Suppl 5): 8-12.
- [4] Isard O, Knol A C, Ariès M F, et al. Propionibacterium

- acnes* activates the IGF-1/IGF-1R system in the epidermis and induces keratinocyte proliferation [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(1): 59-66.
- [5] Kim H, Moon S Y, Sohn M Y, *et al.* Insulin-like growth factor-1 increases the expression of inflammatory biomarkers and sebum production in cultured sebocytes [J]. *Ann Dermatol*, 2017, 29(1): 20-25.
- [6] Mirdamadi Y, Thielitz A, Wiede A, *et al.* Insulin and insulin-like growth factor-1 can modulate the phosphoinositide-3-kinase/Akt/FoxO1 pathway in SZ95 sebocytes *in vitro* [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 415: 32-44.
- [7] Im M, Kim S Y, Sohn K C, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate suppresses IGF-I-induced lipogenesis and cytokine expression in SZ95 sebocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(12): 2700-2708.
- [8] Dozsa A, Mihaly J, Dezso B, *et al.* Decreased peroxisome proliferator-activated receptor γ level and signalling in sebaceous glands of patients with acne vulgaris [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2016, 41(5): 547-551.
- [9] Su X R, Zhu Z H, Zhang L, *et al.* Anti-inflammatory property and functional substances of *Lonicerae Japonicae Caulis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113502.
- [10] 张振华, 马青, 王艳艳, 等. 蒲公英药效物质基础研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(11): 148-152.
- [11] Zhang Y, Hu Y F, Li W, *et al.* Updates and advances on pharmacological properties of *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. and its potential applications [J]. *Food Chem*, 2022, 373(Pt A): 131380.
- [12] Shang X F, Pan H, Li M X, *et al.* *Lonicera japonica* Thunb.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(1): 1-21.
- [13] Martinez M, Poirrier P, Chamy R, *et al.* *Taraxacum officinale* and related species-An ethnopharmacological review and its potential as a commercial medicinal plant [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169: 244-262.
- [14] Yang N, Li C, Tian G, *et al.* Organic acid component from *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. alleviates inflammatory injury in lipopolysaccharide-induced acute tracheobronchitis of ICR mice through TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 34: 92-100.
- [15] Ma C H, Zhu L P, Wang J, *et al.* Anti-inflammatory effects of water extract of *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury by suppressing PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168: 349-355.
- [16] Ge B J, Zhao P, Li H T, *et al.* *Taraxacum mongolicum* protects against *Staphylococcus aureus*-infected mastitis by exerting anti-inflammatory role via TLR2-NF- κ B/ MAPKs pathways in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113595.
- [17] 黄丽荣, 王星慧, 骆衡. 3 味中草药组方提取物的抗菌与抗癌活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(12): 2888-2891.
- [18] 王同慧, 凌保东. 抗细菌生物被膜感染中药的研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(1): 260-264.
- [19] 高玉霞, 胡君, 巨勇. 基于天然小分子化合物的超分子自组装 [J]. 化学学报, 2016, 74(4): 312-329.
- [20] 管庆霞, 周小影, 吕邵娃, 等. 中药复方汤剂多成分自组装纳米相态的形成原理及现状探析 [J]. 海南医学院学报, 2023, 29(11): 872-880.
- [21] 朱红梅, 刘涛, 何秋蓉, 等. 中药经皮凝胶的研究进展 [J]. 中成药, 2018, 40(8): 1811-1814.
- [22] 赵氏淳, 陶颖, 卢艺, 等. 金银花-蒲公英提取液不同相态主要成分含量测定及其对痤疮丙酸杆菌抑制作用的有效相态筛选 [J]. 中草药, 2024, 55(18): 6167-6173.
- [23] 郭玉岩, 李春成, 孙爽, 等. “甘草-马钱子”配伍前后及其拆分相态指纹图谱对比研究 [J]. 中医学报, 2020, 48(10): 1-6.
- [24] 吕邵娃, 武印奇, 李英鹏, 等. 白虎汤相态拆分及不同相态中主要成分的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(11): 154-160.
- [25] 尚尔雨, 马晓乾, 于新, 等. 六君子汤相态拆分及表征研究 [J]. 药学研究, 2021, 40(4): 216-220.
- [26] 窦金金, 张喜武, 王璐璇, 等. 以有效相态为视角的生脉饮有效迭代相态研究及药效学验证 [J]. 中草药, 2021, 53(4): 993-999.
- [27] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 18.
- [28] 颜红, 高司琪, 骆慧婷, 等. 透明质酸修饰的栀子苷传递体凝胶的制备及其对佐剂型关节炎药效学评价 [J]. 中草药, 2023, 54(18): 5867-5879.
- [29] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 痤疮动物模型制备规范 (草案) [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(1): 197-200.
- [30] Contassot E, French L E. New insights into acne pathogenesis: *Propionibacterium acnes* activates the inflammasome [J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(2): 310-313.
- [31] 刘立章. 对中药凝胶剂的研究 [J]. 当代医药论丛, 2014, 12(15): 29-29.
- [32] 王敏. 卡波姆凝胶剂的临床应用研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(6): 1078-1080.
- [33] 朱钰鑫, 慕昱杰, 孙洋, 等. 化妆品常见保湿剂应用现状分析及研究趋势展望 [J]. 中国化妆品, 2022(11): 80-83.
- [34] 卢秀霞, 潘婷婷, 洪于琦, 等. 茶树油微乳凝胶的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1892-1900.

[责任编辑 郑礼胜]