

## 不同助溶剂作用下桉叶油对痤疮丙酸杆菌的作用

杨 柳<sup>1</sup>, 胡 彬<sup>1</sup>, 谢 遥<sup>1</sup>, 蒋 丹<sup>1</sup>, 朱明芳<sup>2\*</sup>

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005)

**〔摘要〕**目的 观察不同助溶剂作用下桉叶油对痤疮丙酸杆菌的作用, 为痤疮的治疗提供一定实验参考, 同时为开发利用桉叶油资源提供支撑。**方法** 采用平板牛津杯法及试管法, 观察桉叶油在不同助溶剂作用条件下对痤疮丙酸杆菌的抑菌环直径及最低抑菌浓度。**结果** 纯桉叶油(80%浓度)、桉叶油乙醇溶液(40%浓度)及桉叶油丙酮溶液(40%浓度)对痤疮丙酸杆菌能表现出完全抑菌作用, 平板上无细菌生长, 阳性对照药(16  $\mu\text{g/mL}$  红霉素)对痤疮丙酸杆菌平均抑菌圈直径为29.44 mm; 助溶剂95%乙醇及丙酮对痤疮杆菌无抑菌作用; 空白对照(蒸馏水)对痤疮丙酸杆菌无抑菌作用; 当以丙酮为助溶剂时, 桉叶油的最低抑菌浓度为浓度0.625%; 当以95%乙醇为助溶剂时, 桉叶油的最低抑菌浓度为1.25%。**结论** 桉叶油对痤疮丙酸杆菌有较好的抑菌作用; 助溶剂95%乙醇、丙酮对痤疮丙酸杆菌无抑菌作用; 助溶剂对桉叶油的最低抑菌浓度有一定的影响, 丙酮为助溶剂时较95%乙醇为助溶剂时最低抑菌浓度低。

**〔关键词〕** 桉叶油; 助溶剂; 乙醇; 丙酮; 痤疮丙酸杆菌; 抑菌作用; 最低抑菌浓度

**〔中图分类号〕** R285.5

**〔文献标识码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.02.012

Study of Eucalyptus Oil with Different Cosolvent on *Propionibacterium acnes*YANG Liu<sup>1</sup>, HU Bin<sup>1</sup>, XIE Yao<sup>1</sup>, JIANG Dan<sup>1</sup>, ZHU Mingfang<sup>2\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

**〔Abstract〕 Objective** To observe eucalyptus oil with different cosolvent on *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) and provide certain references for the treatment of acne, at the same time provide the support for the development and utilization of eucalyptus oil resources. **Methods** The eucalyptus oil with different cosolvent on bacillus bacteriostatic ring diameter and the minimum bacteriostasis concentration of acne propionic acid were observed by using tablet Oxford cup method and test tube method. **Results** 80% pure eucalyptus oil, 40% eucalyptus oil ethanol solution and 40% eucalyptus oil acetone solution show completely bacteriostatic action on *P. acnes*, there is no bacterial growth on tablet. The average bacteriostatic circle positive control medicine (16  $\mu\text{g/mL}$  erythromycin) on *P. acnes* was 29.44 mm; Cosolvent 95% ethanol and acetone didn't show bacteriostatic action on *P. acnes*; Blank control (distilled water) had no bacteriostatic action on *P. acnes*. When acetone as cosolvent, the minimal inhibitory concentrations (MIC) of eucalyptus oil was 0.625%; When 95% ethanol as cosolvent, the MIC of eucalyptus oil was 1.25%. **Conclusion** Eucalyptus oil show good bacteriostasis on *P. acnes*. The cosolvent 95% ethanol and acetone didn't exhibit bacteriostatic action. Cosolvent has a certain influence on the MIC of eucalyptus oil, when acetone as cosolvent the minimum bacteriostasis concentration was lower than 95% ethanol as cosolvent.

**〔Keywords〕** eucalyptus oil; cosolvent; alcohol; acetone; *Propionibacterium acnes*; bacteriostatic action; minimum bacteriostasis concentration

痤疮是一种累积毛囊皮脂腺的慢性炎症性皮肤病, 目前多认为与雄激素、皮脂分泌、痤疮丙酸杆菌增殖、毛囊皮脂腺导管的异常角化、心理及遗传,

以及 IL-1、TNF- $\alpha$  等细胞因子、P 物质有关<sup>[1-3]</sup>。红霉素对痤疮丙酸杆菌高度敏感, 是目前临床治疗痤疮的首选药物<sup>[4]</sup>, 但具有一定的副作用, 因此迫切需要

**〔收稿日期〕** 2015-09-23

**〔基金项目〕** 湖南省科技厅项目(2014SK4051); 湖南省教育厅基金项目(13B086)。

**〔作者简介〕** 杨 柳, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药对皮肤病的防治与研究。

**〔通讯作者〕** \* 朱明芳, 女, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: 26715858@qq.com。

寻找安全有效的药物。中药具有疗效确切,副作用小、价格低廉等特点,桉叶油是桉树叶油腺细胞分泌的芳香精油,具有抗菌、抗炎、杀虫、促渗透、抗氧化等生理活性<sup>[5]</sup>,许多美容医院发现桉叶油对痤疮患者能起到较好的治疗效果。但药用桉叶油要求高,英国药典规定,药用桉叶油桉叶油素的含量必须 $\geq 70\%$ <sup>[6]</sup>。蓝桉叶油为我国的主要桉叶油种类,具有产量多,桉叶油素含量高(大于或等于80%)等特点,因此我们以蓝桉叶油为研究对象,通过检测不同助溶剂(95%乙醇及丙酮)作用下蓝桉叶油对痤疮主要致病菌(痤疮丙酸杆菌)的抑菌环直径及最低抑菌浓度,为桉叶油对痤疮的治疗提供更多的理论依据,同时也为桉叶油资源的开发利用提供更广阔平台。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 受试菌株 痤疮丙酸杆菌 (*propionibacterium acnes*) 标准菌株 ATCC6919 由广东省微生物研究所菌种保藏中心提供。

1.1.2 试验药物 80%桉叶油(桉叶素含量 $\geq 80\%$ )购自德信行(珠海)香精香料有限公司,批号140923-1#;红霉素购自solarbio公司,批号325B034。

1.1.3 仪器与试剂 SW-CJ-1BU 垂直流超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;DZF-6090 真空干燥箱,上海一恒科技有限公司;PL202-S 精密电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;95%乙醇、丙酮均为分析纯。

### 1.2 实验方法

1.2.1 培养基制备 称取32.0 g 庖肉培养基基础,放入烧杯中,加入1L蒸馏水中,煮沸制成庖肉培养基基础液;同时按照2.5%的比例称取一定量的琼脂条放入其中,加热煮沸至完全溶解,制成固体培养基;取中号试管加入庖肉牛肉粒,倒入庖肉培养基基础液,没过牛肉粒2 cm,配成液体培养基,放入121 °C高压灭菌锅中灭菌15 min 制备成固体培养基及液体培养基备用。

1.2.2 菌种的活化 将装有痤疮丙酸杆菌的安瓿管尖端放在火焰上加热;滴少量无菌水至加热处使之破裂;用镊子轻轻敲下安瓿管顶端;用镊子取出小管内的脱脂棉,将小管开口处在火焰上过一遍,并保持在火焰旁操作;用无菌吸管吸取0.5 mL 液体培养基滴入小管内;轻轻震荡,使冻干菌体溶解呈悬浮状,吸取全部菌体悬液移植在斜面及平板培养基上,

并在37 °C厌氧环境中培养48 h,将菌种两次继代培养后使用。

1.2.3 药液及菌悬液的制备 将浓度为80%的桉叶油用95%乙醇及丙酮分别采用两倍稀释的方法稀释为40%、20%、10%、5%、2.5%、1.25%、0.625%几个浓度;称取一定量的红霉素,将其用灭菌蒸馏水稀释为16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  备用;取痤疮丙酸杆菌菌落,采用比浊仪,使用灭菌生理盐水将菌落调整为0.5个麦氏比浊单位(约为 $1.0 \times 10^8$  cfu/mL)菌悬液备用。

1.2.4 平板的制备 将培养基加热溶解,待其温度为55 °C时,每个平板中倒入2/3的固体培养基,待其冷却固定后备用。

1.2.5 桉叶油的抑菌圈直径检测 取制备好的平板,每组平行做3个平板,每个平板中用吸管滴入0.1 mL的菌悬液,用涂布棒将菌悬液涂布均匀,待其干燥2 min后。第一组平板中放入1个牛津杯,杯中放入浓度为80%的桉叶油;第二组平板中放入1个牛津杯,杯中放入浓度为40%桉叶油乙醇溶液;第三组平板中放入1个牛津杯,杯中放入浓度为40%桉叶油丙酮溶液;第四组平板中放入4个牛津杯,杯中分别放入浓度为16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的红霉素、95%乙醇、丙酮、灭菌蒸馏水,以上药液每个牛津杯中加入200  $\mu\text{L}$ ,放入37 °C厌氧环境中培养48 h,观察抑菌圈的情况。

1.2.6 桉叶油的最低抑菌浓度 取桉叶油乙醇及丙酮溶液20%、10%、5%、2.5%、1.25%、0.625%几个浓度,将桉叶油与液体培养基充分混合,使最终浓度为5%、2.5%、1.25%、0.625%、0.3125%、0.15625%,分别设为1-6号管,每个试管中加入0.1 mL的菌悬液,同时设置丙酮及95%乙醇、培养基+菌悬液、培养基对照,分别标为7-9号管,放入37 °C厌氧环境中培养48 h 观察细菌生长情况,以完全没有细菌生长的精油浓度为最小抑菌浓度。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 桉叶油对痤疮丙酸杆菌的抑菌圈测定

由表1可知,桉叶油对痤疮丙酸杆菌能起到较好的抑菌效果,纯桉叶油(80%浓度)、桉叶油乙醇溶液(40%浓度)及桉叶油丙酮溶液(40%浓度)对痤疮丙酸杆菌能表现出完全抑菌作用,平板上无细菌生长;阳性对照药(16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红霉素)对痤疮丙酸杆菌平均抑菌圈的直径为29.44 mm;助溶剂95%乙醇及丙酮对痤疮杆菌无抑菌作用;空白对照(蒸馏水)对痤疮丙酸杆菌无抑菌作用。

表1 桉叶油对痤疮丙酸杆菌的抑菌圈测定 (n=3)

组别	抑菌圈直径(mm)
80%桉叶油	完全抑菌
40%桉叶油乙醇溶液	完全抑菌
40%桉叶油丙酮溶液	完全抑菌
红霉素(16 μg/mL)	29.44
95%乙醇	无抑菌圈
灭菌蒸馏水	无抑菌圈

## 2.2 桉叶油对痤疮丙酸杆菌的最低抑菌浓度测定

由表2可知,桉叶油对痤疮丙酸杆菌有抑菌作用,助溶剂95%乙醇及丙酮对痤疮丙酸杆菌无抑菌作用,但是对痤疮丙酸杆菌的最低抑菌作用有一定的影响,当以丙酮为助溶剂时,桉叶油的最低抑菌浓度为0.625%,95%乙醇为助溶剂时,最低抑菌浓度为1.25%,以丙酮为助溶剂时其最低抑菌浓度较以95%乙醇为助溶剂时低。

表2 桉叶油对痤疮丙酸杆菌的最低抑菌浓度测定 (n=3)

组别	无菌生长管	MIC(%)
桉叶油乙醇组	1-3,7,9	1.25
桉叶油丙酮组	1-4,7,9	0.625

## 3 讨论

痤疮是发生于毛囊皮脂腺的慢性炎性皮肤病,具有一定的损容性,给患者的带来一定的身体损伤和心理压力。目前多认为与雄激素、皮脂腺分泌增加、毛囊皮脂腺开口处过度角化和痤疮丙酸杆菌感染四大因素有关。雄激素水平增高可使皮脂腺分泌增大及皮脂腺分泌增加,皮脂为毛囊内寄生菌(痤疮丙酸杆菌、卵圆形糠秕孢子丝菌、表皮葡萄菌等)的生长提供物质基础,痤疮丙酸杆菌可水解油脂中的甘油三酯,产生的游离脂肪酸可刺激毛囊皮脂腺开口处上皮增生及角化过度,后者使皮脂腺分泌通道受阻、排泄不畅,当皮脂、角质团块等淤积在毛囊口时即形成粉刺,富有刺激性的游离脂肪酸可刺激毛囊引起炎症性皮损。另外由痤疮丙酸杆菌产生的一些低分子多肽可趋化中性粒细胞,后者产生的水解酶也可使毛囊壁损伤破裂,上述各种毛囊内容物溢入真皮引起毛囊周围程度不等的深部炎症,引发从炎性丘疹到囊肿等一系列临床表现。因此,痤疮丙酸杆菌在痤疮的发病及炎症形成中起着重要作用。

痤疮的西医治疗目前多采用维生素类、激素类、抗生素及抗菌药物,这些药物虽然有一定的治疗作用,但同时存在口唇发干,脱屑,血脂升高,致畸,影响电解质平衡等副作用,因此,寻找安全有效的治疗药物很重要<sup>[7]</sup>。

桉叶油是桉树叶油腺细胞分泌的芳香精油,具有较强的抗菌作用,对多种细菌、真菌及霉菌等表现出一定的抗菌活性。近年来桉叶油的抗菌作用研究越来越多,倪木兰等研究表明桉叶油对革兰阳性菌有抑菌作用<sup>[8]</sup>,但桉叶油的抑菌作用多集中在对金黄色葡萄球菌方面,对痤疮的主要致病菌痤疮丙酸杆菌的研究比较少。

本研究对桉叶油进行了痤疮丙酸杆菌的抑菌试验,结果显示,桉叶油对痤疮丙酸杆菌有较好的抑制作用,与夏静明等的研究,桉叶油中主要含有桉叶素具有较强的抗痤疮丙酸杆菌的作用,其抑菌圈平均直径为20.75 mm,属高敏范围<sup>[9]</sup>,结果一致。同时,我们还发现助溶剂对痤疮丙酸杆菌没有作用,但是对桉叶油的最低抑菌浓度有一定的影响,当以丙酮为助溶剂时其最低抑菌浓度为0.625%,乙醇为助溶剂时其最低抑菌浓度为1.25%,丙酮为助溶剂时其最低抑菌浓度较乙醇低。

## 参考文献:

- [1] 纪薇,沈德凯.痤疮的病因病机研究进展[J].中国美容医学,2012,21(3):528-530.
- [2] Tasli L, Turgut S, Kacar N, et al. Insulin-like growth factor-1 gene polymorphism in acne vulgaris [J]. Eur Acad Dermatol Venereol.2013,27(2):254-7.
- [3] 陈德宇,钟建桥,许颺.复方紫金霜对兔耳粉刺模型治疗及P物质的影响[J].中国皮肤性病杂志,2007,21(9):527-530.
- [4] El-Mahdy TS, Abdalla S, El-Domany R, et al. Systemic antibiotic therapy of acne vulgaris[J].J Dtsch Dermatol Ges,2010,8(Suppl 1):31-46.
- [5] 陈默,余永莉.桉叶油的化学成分及其生物活性研究进展[J].中国现代医药杂志,2014,16(4):97-100.
- [6] 张克建.中国桉叶油的开发与利用[J].林业科技开发,1997(4):20-21.
- [7] 莫琼.寻常痤疮的治疗药物及制剂研究进展[J].中国现代应用药学杂志,2001,18(7):153-156.
- [8] 倪木兰.桉叶油体外抗菌作用的初步实验研究[J].遵义医学院学报,1995,18(3):178-180.
- [9] 夏明静,曹煜,杨捷,等.22种抗菌消炎中药有效成分对痤疮丙酸杆菌的抑制作用[J].中华皮肤科杂志,2001,34(6):435-436.

(本文编辑 杨瑛)