

皮炎洗剂对小鼠慢性变应性接触性皮炎的影响及其作用机制

刘青¹, 王琮², 陈慧³, 姜誉弘³, 王丽灵³, 王思农^{1*}

(1. 甘肃中医药大学中医临床学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029; 3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 评价皮炎洗剂治疗小鼠慢性变应性接触性皮炎(ACD)的疗效。方法 采用 2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱导小鼠背部 ACD。60 只小鼠随机分为空白对照组、ACD 组、阳性组、皮炎洗剂大剂量组(0.4 g/mL)、中剂量组(0.2 g/mL)、小剂量组(0.1 g/mL), 每组 10 只, 于致敏后给药, 观察各组小鼠第 4 次激发 24 h 后皮损炎症程度、组织病理切片、炎症细胞数量改变及血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平的变化。结果 皮炎洗剂中、大剂量能有效减轻 ACD 小鼠引起的免疫器官肿大、皮损炎症程度, 减少皮损组织炎症细胞数量, 调节 ACD 组小鼠血清中 γ -干扰素(IFN- γ)和白细胞介素-4(IL-4)水平。结论 皮炎洗剂对小鼠 ACD 具有明显的治疗作用, 其作用机制可能与皮炎洗剂调节 Th1、Th2 型细胞因子有关。

关键词:皮炎洗剂; 小鼠; 慢性变应性接触性皮炎; IFN- γ ; IL-4

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2016)03-0279-04

DOI: R285.510.14148/j.issn.1672-0482.2016.0279

Study of the Effect and Mechanism of Dermatitis Lotion in the Treatment of Allergic Contact Dermatitis in Mice

LIU Qing¹, WANG Qiong², CHEN Hui³, JIANG Yu-hong³, WANG Li-ling³, WANG Si-nong^{1*}

(1. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730000, China; 2. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China; 3. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the efficacy of dermatitis lotion in the treatment of allergic contact dermatitis in mice. **METHODS** The 2,4-dinitro chlorobenzene(DNCB) was applied on the dorsum of mice to induce the allergic contact dermatitis models. 60 mice were randomly divided into control, model(ACD), mometasone furoate, dermatitis lotion (0.4, 0.2, 0.1 g/mL) groups, with 10 mice in each group. Mice were sensitized by DNCB and then treated topically with different drugs on lesions. The inflammation degree of skin lesion were observed, histopathological analysis was measured by HE stain and the levels of serum IFN- γ and IL-4 were detected by ELISA. **RESULTS** The dermatitis lotion of 0.4 g/mL restrained the increase of thymus index, alleviated the inflammation degree of lesion on dorsum of mice and reduced the pathological score significantly, compared with the model group. In addition, the dermatitis lotion of 0.4 g/mL adjusted the expression of serum IFN- γ and IL-4 to return to normal levels. **CONCLUSION** These results suggest that dermatitis lotion can be used for the treatment of allergic contact dermatitis (ACD) mainly through the regulation Th1/Th2 cytokines.

KEY WORDS: dermatitis lotion; mice; allergic contact dermatitis; IFN- γ ; IL-4

变应性接触性皮炎(Allergic contact dermatitis, ACD)又称接触性过敏,是由 T 细胞介导的迟发型超敏反应而引起的炎症性皮肤病^[1]。其病因复杂,其中致敏 T 淋巴细胞与相应抗原结合而活化释放细胞因子进而引起皮肤炎症反应^[2]。目前治疗 ACD 多采用激素和组胺类药物的对症治疗,长期使用有副作用明显、药物依赖性及停药易复发等问题。因此疗效确切且副作用较小的治疗 ACD 的药物研

发成为临床迫切需求。

皮炎洗剂为南京中医药大学附属医院制剂,由大黄、黄芩、黄柏、苦参等组成,具有清热、解毒、杀虫、止痒之功效,用于急性、亚急性湿疹,过敏性皮炎及部分感染性皮肤病,临床使用 30 多年,疗效确切,未见毒副作用,但其相关药效作用机制尚未明确。由于 ACD 与湿疹的临床表现和病理特征一致,因此,本研究采用慢性 2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱导

收稿日期:2016-02-27;修稿日期:2016-04-02

基金项目:甘肃省教育厅高等学校科研项目(2014A-081)

作者简介:刘青(1991-),女,江苏南京人,甘肃中医药大学 2015 级硕士研究生。* 通信作者:15095319507@163.com

的小鼠 ACD 模型,探讨皮炎洗剂对 ACD 的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

皮炎洗剂,南京中医药大学附属医院提供,批号:1506022。糠酸莫米松乳膏,上海先灵葆雅制药有限公司提供,批号:15NGFA115。2,4-二硝基氟苯(DNCB),上海试剂一厂,批号:110901。丙酮,上海久德化学试剂有限公司,批号:120305。IL-4 试剂盒,美国 R&D 公司,批号:20150805BX。IFN- γ 试剂盒,美国 R&D 公司,批号:20150716LK。

1.2 实验动物及分组

BALB/c 小鼠:由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。动物许可证号:SCXK(京)2012-0001。将 60 只 BALB/c 小鼠随机分成 6 组,每组 10 只。分别为空白对照组、ACD 模型组(ACD 组)、阳性组(糠酸莫米松组)、皮炎洗剂小剂量组、皮炎洗剂中剂量组、皮炎洗剂大剂量组。

1.3 造模及给药方法

在实验前 1 天将小鼠背部进行去毛处理,范围一般为 $2.00\text{ cm} \times 2.00\text{ cm}$ 。分别于第 1 天和第 2 天在背部去毛部位均匀涂上 $25\text{ }\mu\text{L}$ 7%DNCB 的丙酮溶液致敏。慢性小鼠 ACD 模型的激发:第 6 天开始,在实验小鼠背部剪毛区涂抹 $20\text{ }\mu\text{L}$ 1%DNCB 溶液背部激发,每隔 3 日 1 次,共 4 次。第 4 次激发后

24 h 取小鼠背部皮肤。

1.4 药物干预及观察指标

阳性组(1 mg/g)、皮炎洗剂大剂量组(0.4 g/mL)、中剂量组(0.2 g/mL)、小剂量组(0.1 g/mL),于致敏后给药治疗,皮炎洗剂各剂量组每日给药 2 次,每次用药物保持创面湿润 15 min。在第 4 次激发后 24 h 观察小鼠激发部位皮肤反应,1 周后观察各治疗组背部皮损的形态变化。分别在造模成功 24 h 和第 4 次激发 1 周后,剪去小鼠背部皮损部位标本,HE 染色,观察皮肤病理变化,并统计炎症细胞浸润。采用 ELISA 试剂盒检测各组血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平的变化。

1.5 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本统计分析采用组间 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 皮炎洗剂对慢性 ACD 小鼠皮肤形态学的影响

如图 1 所示,第 4 次激发后 24 h,与空白对照组比较,ACD 组小鼠背部皮损潮红、轻度水肿、渗出、结痂,符合 ACD 皮损表现;与 ACD 组小鼠比较,阳性组小鼠背部皮损改善,丘疹、渗出消失,可见少量结痂;皮炎洗剂 3 个剂量组背部皮损改善,基本恢复正常,潮红、渗出、结痂均消失。

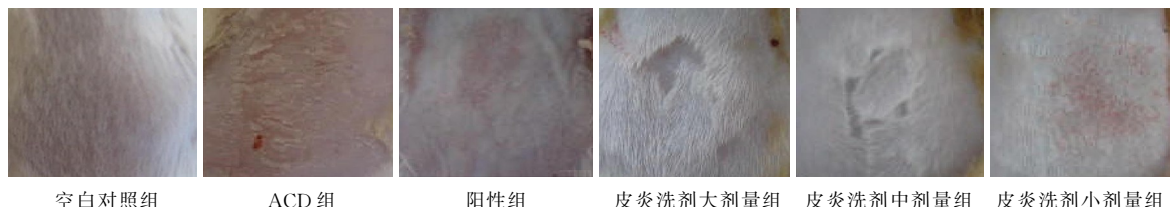


图 1 各组小鼠皮肤形态学的比较

2.2 皮炎洗剂对慢性 ACD 小鼠脾指数、胸腺指数的影响

如表 1 所示,ACD 模型小鼠脾指数、胸腺指数显著升高,与空白对照组比较有显著性差异($P < 0.05 \sim 0.01$)。与 ACD 组比较,皮炎洗剂 3 个剂量组小鼠脾指数均不同程度降低,但未见统计学差异($P > 0.05$)。阳性组、皮炎洗剂大剂量组和中剂量组小鼠胸腺指数均显著降低,与 ACD 组比较有显著性差异($P < 0.01$)。

2.3 皮炎洗剂对慢性 ACD 小鼠组织病理学的影响

如图 2、表 2 所示,空白对照组小鼠表皮无坏

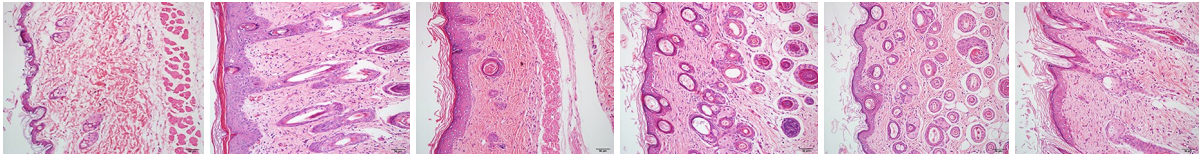
死;ACD 组小鼠皮肤表皮增厚,表面角化过度伴角化不全和痂皮形成,痂皮由变性、坏死的上皮组织和炎性渗出物组成,病理评分结果与空白对照组比较有显著性差异($P < 0.01$)。阳性组小鼠表皮增厚伴轻微、轻度或中度角化过度,无角化不全现象,皮肤表面仍存留有中等量或多量痂皮,病理评分结果为 3.7 ± 1.0 。皮炎洗剂大剂量组、中剂量组和小剂量组小鼠表皮增厚程度减轻,伴轻微或轻度角化过度,无角化不全现象,皮肤表面也未查见痂皮。其中皮炎洗剂大剂量组病理评分结果与 ACD 组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠脾指数、胸腺指数比较($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	脾指数	胸腺指数
空白对照组	32.3±3.5	11.0±2.3
ACD 组	36.6±3.0 ^{##}	15.9±2.2 ^{##}
阳性组(1 mg/g)	28.3±2.9 [*]	8.5±3.6 ^{**}
皮炎洗剂大剂量(0.4 g/mL)	34.7±3.8	11.2±2.2 ^{**}
皮炎洗剂中剂量(0.2 g/mL)	35.0±2.3	11.4±2.3 ^{**}
皮炎洗剂小剂量(0.1 g/mL)	37.1±4.9	13.3±3.8

注:与空白对照组比较,## $P<0.01$;与 ACD 组比较,** $P<0.01$ 。

采用“显微镜用网型目镜侧微尺”在 200 倍光镜



空白对照组 ACD 组 阳性组 皮炎洗剂大剂量 皮炎洗剂中剂量 皮炎洗剂小剂量

图 2 各组小鼠组织病理学比较(HE,×200)

表 2 各组小鼠病理评分及真皮内炎性细胞计数比较($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	病理评分	炎性细胞 计数/mm ²
空白对照组	0.0±0.0	0.0±0.0
ACD 组	3.8±1.7 ^{##}	9.8±8.4 ^{##}
阳性组(1 mg/g)	3.7±1.0	7.3±7.1
皮炎洗剂大剂量(0.4 g/mL)	1.2±0.9 [*]	1.9±2.1 [*]
皮炎洗剂中剂量(0.2 g/mL)	1.3±0.8	0.4±0.4 [*]
皮炎洗剂小剂量(0.1 g/mL)	1.4±0.8	2.0±2.2 [*]

注:与空白对照组比较,## $P<0.01$;与 ACD 组比较,* $P<0.05$ 。

表 3 各组小鼠血清 IFN- γ 、IL-4、IFN- γ /IL-4 水平的比较($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ /IL-4
空白对照组	241.2±30.3	109.9±69.3	2.7±2.0
ACD 组	276.4±19.5 [#]	56.1±6.7 [#]	5.0±0.9 [#]
阳性组(1 mg/g)	245.7±42.0	100.6±40.3 [*]	2.7±0.9 ^{**}
皮炎洗剂大剂量(0.4 g/mL)	207.8±43.3 ^{**}	94.3±39.8 [*]	2.5±0.8 ^{**}
皮炎洗剂中剂量(0.2 g/mL)	239.8±51.3	97.5±28.4 ^{**}	2.6±1.4 ^{**}
皮炎洗剂小剂量(0.1 g/mL)	254.1±20.0	75.8±31.4	4.3±2.7

注:与空白对照组比较,## $P<0.05$;与 ACD 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3 讨论

ACD 是一种常见的皮肤过敏性疾病,其发病率高、病程漫长而难以痊愈,严重影响患者的生活质量。ACD 病因复杂,是由 T 细胞介导的针对皮肤接触致敏原的迟发型变态反应(Ⅳ型)。辅助性 T 淋巴细胞(Th 细胞)是根据功能分类的 T 细胞亚群,其中 Th1 细胞因子主要介导细胞免疫反应;Th2 细胞因子主要介导体液免疫反应,Th1/Th2 亚群及其相互之间的平衡在免疫应答的调节中起关键作用^[3]。

下测量 10 mm²内炎细胞数,如图 2、表 2 所示,空白对照组真皮及皮下组织无充血、水肿及炎细胞浸润等病变;ACD 组小鼠真皮内有炎细胞浸润,炎细胞以嗜酸性白细胞和单核巨噬细胞为主,(9.8±8.4)/mm²,与空白对照组比较有显著性差异($P<0.01$)。阳性组真皮内炎细胞数量较 ACD 组减少,(7.3±7.1)/mm²。皮炎洗剂大剂量组、中剂量组和小剂量组小鼠真皮内炎细胞数量较 ACD 组明显减少,与 ACD 组比较均有显著性差异($P<0.05$)。

2.4 皮炎洗剂对慢性 ACD 小鼠血清 IFN- γ 和 IL-4 水平的影响

如表 3 所示,ACD 模型小鼠血清中 IFN- γ 显著升高、IL-4 水平显著降低、IFN- γ /IL-4 比值显著升高,与空白对照组比较有显著性差异($P<0.05$)。与 ACD 组比较,皮炎洗剂大剂量组血清中 IFN- γ 显著降低($P<0.01$);阳性组、皮炎洗剂大剂量组和皮炎洗剂中剂量组 IL-4 水平显著升高($P<0.05\sim 0.01$),IFN- γ /IL-4 比值显著降低($P<0.01$)。

Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ 等;Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5 等^[4]。IFN- γ 和 IL-4 异常引起 Th1/Th2 平衡与 ACD 的发生、发展和预后密切相关^[5]。

本研究采用 DNCB 诱导的慢性 ACD 模型,采用低浓度抗原多次激发的方式造模,与简单、快速的急性模型比较,更符合临床疾病发生过程。机体发生超敏反应时脾脏和胸腺肿大,脾指数和胸腺指数可衡量药物对免疫器官的抑制作用^[6]。本研究复制的 ACD 小鼠背部皮损潮红、轻度水肿、渗出、结痂;模

型小鼠脾指数、胸腺指数显著升高,与空白对照组比较有显著性差异($P<0.05$);进一步病理研究表明,ACD 组小鼠皮肤表皮增厚,表面角化过度伴角化不全和痂皮形成,痂皮有变性、坏死的上皮组织和炎性渗出物组成,与空白对照组比较,病理评分显著升高($P<0.01$)。ACD 组小鼠真皮内有炎细胞浸润,炎细胞以嗜酸性白细胞和单核巨噬细胞为主,与空白对照组比较有显著性差异($P<0.01$)。上述结果表明 ACD 模型复制成功。

本研究中采用的皮炎洗剂具有清热解毒、杀虫、止痒的功效。方中大黄具有清热泻火、凉血解毒、散瘀通经的功效;黄芩、黄柏具有清热燥湿、泻火解毒、止血的功效;苦参具有燥湿抗感染的功效,诸药合用共奏清热解毒、行气散瘀、除湿化浊、截毒肃毒之功。皮炎洗剂 3 个剂量组背部皮损改善,基本恢复正常,潮红、渗出、结痂均消失;与 ACD 组比较,皮炎洗剂大、中剂量组小鼠胸腺指数均显著降低($P<0.01$)。皮炎洗剂大、中、小剂量组小鼠表皮增厚程度减轻,伴轻微或轻度角化过度,无角化不全现象,皮肤表面也未查见痂皮,其中皮炎洗剂大剂量组,与 ACD 组比较有显著性差异($P<0.05$)。与 ACD 组比较,皮炎洗剂 3 个剂量组小鼠真皮内炎细胞数量显著减少($P<0.05$)。上述结果表明皮炎洗剂能减轻Ⅳ型超敏反应的炎症损伤程度,同时对机体免疫器官肿大也有一定的抑制作用,本研究采用中效糖皮质激素糠酸莫米松软膏作为阳性药,对皮损形态学、病理改变及真皮内炎性细胞计数等指标未见显著改善,本研究结果进一步证实糖皮质激素乳膏不能过度使用,长期大量使用会使用药部位出现不同程度萎缩、变薄、结痂等不良反应。由于 ACD 药物治疗需要长期坚持应用,本研究结果表明皮炎洗剂长期用药在改善皮损方面疗效优于阳性药糠酸莫米松;提示长期应用皮炎洗剂在治疗 ACD 中具有明显的优势。

研究表明,ACD 主要是由 Th1 细胞介导,Th2 细胞参与其调节过程;通过注射细胞因子或抗体抑制 Th1 细胞,促进 Th2 细胞分化,可抑制 ACD 的发展^[7-8]。本研究采用 DNCB 诱导的慢性 ACD 模型,模型小鼠血清中 IFN- γ 显著升高、IL-4 水平显著降低、IFN- γ /IL-4 比值显著升高;与相关研究报道一致^[9-10]。与 ACD 组比较,皮炎洗剂大剂量组血清中

IFN- γ 显著降低;阳性组、皮炎洗剂大剂量、中剂量组 IL-4 水平显著升高、IFN- γ /IL-4 比值显著降低($P<0.01$)。上述研究结果表明皮炎洗剂通过调节 Th1、Th2 型相关细胞因子,维持 Th1/Th2 细胞平衡,从而对慢性 ACD 起治疗作用。

综上所述,皮炎洗剂通过抑制 ACD 引起的免疫器官肿大,有效减轻 ACD 小鼠皮损炎症程度,调节 ACD 组小鼠血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平,对小鼠慢性 ACD 起治疗作用。调节血清中相关细胞因子,影响机体 Th1/Th2 细胞平衡时皮炎洗剂治疗 ACD 的作用机制之一,深入地作用机理尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Yuan XY, Liu W, Zhang P, et al. Effects and mechanisms of aloperine on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced allergic contact dermatitis in BALB/c mice[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 10(1/3): 147-152.
- [2] 陈妍,郭在培.变应性接触性皮炎的原位免疫学研究[J].华西医学,2006, 21(1):217-218.
Chen Y, Guo ZP. In situ immunology research of allergic contact dermatitis[J]. West China Med J, 2006, 21(1): 217-218.
- [3] Harskamp CT, Armstrong AW. Immunology of atopic dermatitis: novel insights into mechanisms and immunomodulatory therapies[J]. Semin Cutan Med Surg, 2013, 32(3): 132-139.
- [4] Yoon HJ, Jang MS, Kim HW, et al. Protective effect of diet supplemented with rice prolamin extract against DNCB-induced atopic dermatitis in BALB/c mice[J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15: 353.
- [5] Baeck M, Soria A, Marot L, et al. Characterization of the T cell response in allergic contact dermatitis caused by corticosteroids[J]. Contact Dermatitis, 2013, 68(6): 357-368.
- [6] 梁秀宇.消风散对变应性接触性皮炎的抑制作用及其免疫学机制的实验研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2007.
Liang XY. The Experimental Study on Xiaofeng Powder in the Inhibiting Function and the Immunology Mechanism to Allergy Contact Dermatitis[D].Shenyang:Liaoning University of Chinese Medicine,2007.
- [7] Yamashita-Kanemaru Y, Takahashi Y. CD155 (PVR/Nec15) mediates a costimulatory signal in CD4⁺T cells and regulates allergic inflammation[J]. J Immunol, 2015, 194(12): 5644-5653.
- [8] Pennino D, Eyerich K, Scarponi C, et al. IL-17 amplifies human contact hypersensitivity by licensing hapten nonspecific Th1 cells to kill autologous keratinocytes[J]. J Immunol, 2010, 184(9): 4880-4888.
- [9] Choi JK, Oh HM, Lee S, et al. Oleonic acid acetate inhibits atopic dermatitis and allergic contact dermatitis in a murine model[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 269(1): 72-80.
- [10] 芦源.养血消风饮对变应性接触性皮炎的作用及免疫学机制研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2009.
Lu Y. The Effects and Immunological Mechanisms of Yangxue Xiaofeng Yin on Allergic Contact Dermatitis[D].Shenyang:Liaoning University of Chinese Medicine,2009.

(编辑:董宇 杨巍敏)