

除湿止痒软膏抗炎及止痒作用研究

曾怡 史梦琪 杨欢 何萍 王有为 杜俊蓉

【摘要】 目的 探讨除湿止痒软膏的抗炎及止痒作用。方法 用 2,4-二硝基氟苯(DNFB)腹部致敏和背部反复激发建立 BALB/c 小鼠特异性皮炎模型。实验动物分为正常对照组(未致敏也未治疗)、模型对照组(致敏但未治疗)、氢化可的松乳膏组(致敏+氢化可的松)、除湿止痒软膏组(致敏+除湿止痒软膏)。连续用药 14 d,末次给药 12 h 后取背部皮肤,测定皮肤厚度及质量,进行 HE 染色和甲苯胺蓝染色,ELISA 法检测皮损组织中干扰素(IFN) γ 、肿瘤坏死因子(TNF) α 、白细胞介素(IL)-4、IL-5 含量。利用磷酸组胺诱发 Hartley 豚鼠局部皮肤瘙痒模型,观察除湿止痒软膏对豚鼠致痒阈的影响。结果 用药后第 15 天,与模型对照组相比,氢化可的松乳膏和除湿止痒软膏均可明显减少小鼠的背部皮肤厚度和质量($P < 0.01$),减少淋巴细胞和肥大细胞浸润($P < 0.01$)以及降低皮损组织中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 及 IL-5 水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与正常对照组相比,氢化可的松乳膏组小鼠背部皮肤厚度和质量减小($P < 0.01$),除湿止痒软膏组无明显变化。此外,除湿止痒软膏也可显著提高豚鼠耐受磷酸组胺的致痒阈($P < 0.01$)。结论 除湿止痒软膏可明显抑制 DNFB 引起的小鼠特异性皮炎,其抗炎机制可能与恢复体内 Th1/Th2 型细胞因子平衡有关。除湿止痒软膏可明显减轻磷酸组胺所致豚鼠皮肤瘙痒反应。

【关键词】 皮炎,特异性; 抗炎药(中药); 止痒药; 组胺; 除湿止痒软膏

Experimental study on anti-inflammatory and antipruritic effects of Chushizhiyang ointment in animal models ZENG Yi1, SHI Meng-qi1, YANG Huan1, HE Ping1, WANG you-wei2*, DU Jun-rong1*. 1Department of Pharmacology, West China School of Pharmacy, Sichuan University 610041, Chengdu, China

*Corresponding author: Wang you-wei, Email: wangyouwei2000@163.com; Du Jun-rong, Email: dujr_1@163.com

【Abstract】 Objective To explore the anti-inflammatory and antipruritic effects of Chushizhiyang ointment in animal models. Methods A murine model of atopic dermatitis (AD) was established by repeated application of 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) for sensitization on shaved abdominal skin and challenge on shaved dorsal skin. 40 BALB/c mice were randomly divided into four groups: control group (with neither no sensitization nor drug treatment), model group (without treatment), positive control group (with Hydrocortisone Butyrate) and Chushizhiyang ointment group. The treatment lasted for 14 days. The thickness and weight of dorsal skin were measured 12 h after the last treatment, and the number of leukocytes and mast cells were evaluated by hematoxylin eosin (HE) stain and toluidine blue stain, respectively. The levels of cytokines including interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 4 (IL-4) and interleukin 5 (IL-5) in skin lesions were determined by Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). In addition, a guinea pig pruritis model induced by histamine phosphate was established to explore the antipruritic effect of Chushizhiyang ointment. Results Compared with model group, both Chushizhiyang ointment and Hydrocortisone Butyrate could reduce the degree of edema and inflammation in the DNFB-induced AD mice, with a significant decrease in the number of lymphocytes and mast cells ($P < 0.01$), as well as the levels of IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-5 in skin lesions ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with control group, Chushizhiyang ointment didn't reduce the thickness of dorsal skin as Hydrocortisone Butyrate did. Additionally, Chushizhiyang ointment could significantly increase the itching threshold in the guinea pig pruritis model ($P < 0.01$) Conclusions Chushizhiyang ointment exerted the anti-inflammatory effect in murine AD model at least partly through restoration of the balance between Th1 and Th2 cell responses. Moreover, Chushizhiyang ointment could relieve pruritus induced by histamine phosphate in guinea pig.

【Key words】 Dermatitis, atopic; ANTI-INFLAMMATORY DRUGS (TCD); Antipruritics; Histamine; Chushizhiyang ointment

目前临床上治疗特异性皮炎(atopic dermatitis,

AD)以外用糖皮质激素和口服抗组胺药为主,长期使用不良反应明显。除湿止痒软膏由蛇床子、苦参、黄连、黄柏、白鲜皮、虎杖、紫花地丁、地肤子、篇蓄、茵陈、苍术、花椒、冰片十三味中药组成,有清热除湿、祛风止痒功效,临床上已用于治疗湿疹^[1-2]。本实验通过 2,4-二硝基氟苯(DNFB)诱导小鼠 AD 模型

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4030.2015.08.■■■

作者单位:610041 成都,四川大学华西药学院药理学(曾怡、史梦琪、杨欢、何萍、杜俊蓉);四川省医学科学院、四川省人民医院皮肤病性病研究所(王有为)

通信作者:王有为,Email:wangyouwei2000@163.com;杜俊蓉,Email:dujr_1@163.com

和磷酸组胺诱发豚鼠局部瘙痒模型,评价除湿止痒软膏的抗炎及止痒作用。

资料与方法

一、材料

1. 实验动物:Hartley 豚鼠 24 只,雌雄各半,体重(222.6 ± 26.1) g,由成都彭县养殖场提供,合格证号 0007476。SPF 级 8 周龄 BALB/c 雄鼠 40 只,体重(22.9 ± 1.5) g,由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号 0003282。

2. 实验药品:除湿止痒软膏(规格 0.777 g 生药/g 膏,成都明日制药有限公司,批号 140803);氢化可的松乳膏(10 g:10 mg,天津金耀药业有限公司,批号 12041337);赛庚啶乳膏(10 g:50 mg,湖南五洲通药业有限责任公司,批号 130630);DNFB(成都格雷西亚化学技术有限公司,批号 D16877),溶于丙酮橄榄油溶液(4:1)中配成 0.15% DNFB 溶液;磷酸组胺(成都科龙化工试剂厂,批号 201312); $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (成都市科龙化工试剂厂,批号 20130844),脱毛剂配方:8 g $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 用温水 60 ml 溶解后,加入 40 ml 75%乙醇配制而成。

3. 主要试剂及设备:小鼠 IL-5 ELISA 试剂盒(美国 RB 公司),小鼠 IL-4、小鼠 IFN- γ 、小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司);Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);外径千分尺(青海量具刃具有限责任公司),全波长多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

二、小鼠 AD 模型实验^[3-4]

1. 实验分组及小鼠 AD 模型建立:将 40 只 BALB/c 小鼠按体重分为正常对照组、模型对照组、氢化可的松乳膏组、除湿止痒软膏组,每组 10 只。实验前 1 天均剃除并脱去小鼠腹部毛发,面积约 $2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$;第 1 天,实验组小鼠均于腹部脱毛处外涂 $100\text{ }\mu\text{l}$ 0.15% DNFB 致敏,正常对照组外涂 $100\text{ }\mu\text{l}$ 丙酮橄榄油溶液;第 3 天均剃除并脱去小鼠背部毛发,面积约 $2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$;第 7 天,实验组小鼠于背部脱毛处涂 $100\text{ }\mu\text{l}$ 0.15% DNFB 激发,正常对照组外涂 $100\text{ }\mu\text{l}$ 丙酮橄榄油溶液,每周激发 2 次,连续 4 周。共激发 9 次。

2. 给药方案:造模成功 24 h 后开始给药,给药时程为 14 d。除湿止痒软膏每天 3 次(9:00/15:00/21:00),每次 0.04 g;氢化可的松乳膏每天 2 次(9:00/21:00),每次 0.04 g;模型对照组和正常对照组同

时给予 $100\text{ }\mu\text{l}$ 生理氯化钠液,每天 3 次。用药第 8 天给予 $100\text{ }\mu\text{l}$ 0.15% DNFB 进行第 10 次激发。

3. 观察指标:末次给药 12 h 后,小鼠断颈处死并作以下处理:①选取小鼠背部皮肤 3 个不同固定部位,用 8 mm 金属打孔器打孔,去除皮下脂肪组织后立即用外径千分尺测量厚度,分析天平称重;②背部皮肤标本制成 10%组织匀浆,ELISA 法测定上清液中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5 含量,以 1 g/L 匀浆组织中细胞因子含量作为相对细胞因子含量^[5];③背部皮肤标本 4%甲醛固定、石蜡包埋、切片,HE 染色和甲苯胺蓝染色,高倍镜($\times 400$)下取 10 个 HE 染色切片无重叠视野计数淋巴细胞,100 倍镜下取 5 个甲苯胺蓝染色切片无重叠视野计数肥大细胞。

三、局部瘙痒模型实验^[6]

将 24 只 Hartley 豚鼠按体重随机分为模型对照组、赛庚啶乳膏组、除湿止痒软膏组,每组 8 只。实验前 1 天将豚鼠右后足背剪毛并脱毛,面积约 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$,并在脱毛处涂药 1 次,0.03 g/只。实验当日将脱毛处皮肤用细砂纸轻轻擦伤,使之发红,但以不出血为度,再给药 1 次。10 min 后开始在创面处滴 0.01% 磷酸组胺溶液,以后每隔 3 min 以 0.02%、0.03%、0.04%……递增浓度,每次 $30\text{ }\mu\text{l}$,直至豚鼠回头舔右后足,以此时给予的磷酸组胺总量为致痒阈值,比较各组致痒阈值差异。

四、统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS16.0 软件进行随机区组设计资料的方差分析,方差齐时组间多重比较用 LSD 法,方差不齐时用 Dunnett's T3 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、药物对各组小鼠皮肤厚度及质量的影响

用药后第 15 天,氢化可的松乳膏组皮肤萎缩,皮肤厚度和质量均减小,与正常对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。除湿止痒软膏组小鼠皮肤质量和厚度均已恢复至正常,与正常对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

二、药物对各组小鼠皮肤组织结构的影响

小鼠 AD 模型建立后,背部皮肤出现增厚、红斑、水肿、厚痂(图 1A)。用药后第 7 天,模型对照组部分痂皮脱落,有鳞屑、中度红斑及水肿(图 1B);氢化可的松软膏组背部有轻度红斑,水肿消去(图 1C);除湿止痒软膏组仍有轻度红斑及水肿,无明显痂皮(图 1D)。用药后第 15 天,模型对照组背部皮损

程度(图 1F)基本同第 7 天,HE 染色可见表皮突下延,表皮细胞中度水肿,棘层、颗粒层肥厚,角化过度伴角化不全;真皮层大量炎症细胞浸润,以淋巴细胞为主(图 2B),可见肥大细胞。氢化可的松乳膏组红斑水肿消失,皮肤变薄皱缩(图 1G),真皮层细胞层数减少,淋巴细胞(图 2C)和肥大细胞浸润减轻。除湿止痒软膏组轻度红斑,水肿消失,表皮增厚不明显(图 1H),真皮层淋巴细胞(图 2D)和肥大细胞浸润减轻。淋巴细胞和肥大细胞计数结果见表 1。

三、药物对各组小鼠皮损组织匀浆细胞因子水平的影

响
与正常对照组相比,模型对照组 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5 水平均升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);氢化可的松乳膏和除湿止痒软膏组 4 类细胞因子恢复正常,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型对照组相比,氢化可的松乳膏和除湿止痒软膏均可明显抑制这 4 类细胞因子水平升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且氢化可的松乳膏对 TNF- α 抑制作用强于除湿止痒软膏($P < 0.05$)。见表 2。

四、药物对磷酸组胺诱发豚鼠局部瘙痒的影响

与模型对照组相比,除湿

止痒软膏和赛庚啶乳膏均可明显提高豚鼠耐受磷酸组胺的致痒阈($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 3。

讨 论

中医认为 AD 是先天禀性不耐而素体热耐;或后天脾失健运或营血不足,复感风湿热邪,风燥湿热郁结于肌肤而发病^[7]。近年来,Th1/Th2 失衡学说成为该病发病机制研究热点。一般认为急性阶段以 Th2 型免疫反应为主,细胞因子如 IL-4、IL-5 表达

表 1 用药 14 d 对特异性皮炎小鼠皮肤质量及厚度、皮损淋巴细胞及肥大细胞的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | 皮肤质量 (mg) | 皮肤厚度 (mm) | 淋巴细胞 (个/mm ²) | 肥大细胞 (个/mm ²) |
|----------------------------|----|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 | 10 | 23.04 ± 1.11 | 0.677 ± 0.025 | 128.3 ± 17.2 | 7.5 ± 0.6 |
| 模型对照组 | 10 | 39.06 ± 1.90 ^a | 1.073 ± 0.040 ^a | 488.6 ± 43.8 ^a | 42.9 ± 1.1 ^a |
| 氢化可的松乳膏组 | 10 | 13.52 ± 0.44 ^{ab} | 0.293 ± 0.011 ^{ab} | 205.6 ± 11.4 ^{ab} | 18.7 ± 2.5 ^{ab} |
| 除湿止痒软膏组 | 10 | 25.02 ± 1.25 ^b | 0.748 ± 0.036 ^b | 252.9 ± 13.7 ^{ab} | 22.8 ± 2.5 ^{ab} |
| $F_{\text{药物}}(P\text{值})$ | | 66.040(0.000) | 108.189(0.000) | 25.763(0.000) | 50.808(0.000) |
| $F_{\text{区组}}(P\text{值})$ | | 0.932(0.660) | 0.845(0.626) | 0.782(0.684) | 1.580(0.160) |

注:组间多重比较,^a:与正常对照组相比, $P < 0.01$;^b:与模型对照组相比, $P < 0.01$

表 2 用药 14 d 对特异性皮炎小鼠组织匀浆相对细胞因子含量的影响($\bar{x} \pm s$) ng/L

| 组别 | 只数 | 干扰素 γ | 肿瘤坏死因子 α | 白细胞介素 4 | 白细胞介素 5 |
|----------------------------|----|---------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 | 10 | 22.98 ± 3.39 | 332.03 ± 52.59 | 44.48 ± 5.86 | 10.58 ± 1.58 |
| 模型对照组 | 10 | 57.22 ± 9.09 ^a | 617.25 ± 48.45 ^b | 77.62 ± 5.96 ^b | 14.84 ± 1.12 ^a |
| 氢化可的松乳膏组 | 10 | 17.26 ± 2.38 ^c | 255.48 ± 64.65 ^c | 38.40 ± 10.74 ^d | 8.03 ± 1.01 ^c |
| 除湿止痒软膏组 | 10 | 25.96 ± 2.68 ^d | 415.11 ± 49.01 ^{de} | 52.05 ± 2.09 ^c | 9.77 ± 0.58 ^c |
| $F_{\text{药物}}(P\text{值})$ | | 6.470(0.003) | 6.899(0.002) | 4.741(0.007) | 5.599(0.003) |
| $F_{\text{区组}}(P\text{值})$ | | 0.806(0.655) | 0.911(0.589) | 0.560(0.885) | 1.052(0.430) |

注:^a:与正常对照组相比, $P < 0.05$;^b:与正常对照组相比, $P < 0.01$;^c:与模型对照组相比, $P < 0.01$;^d:与模型对照组相比, $P < 0.05$;^e:与氢化可的松乳膏相比, $P < 0.05$

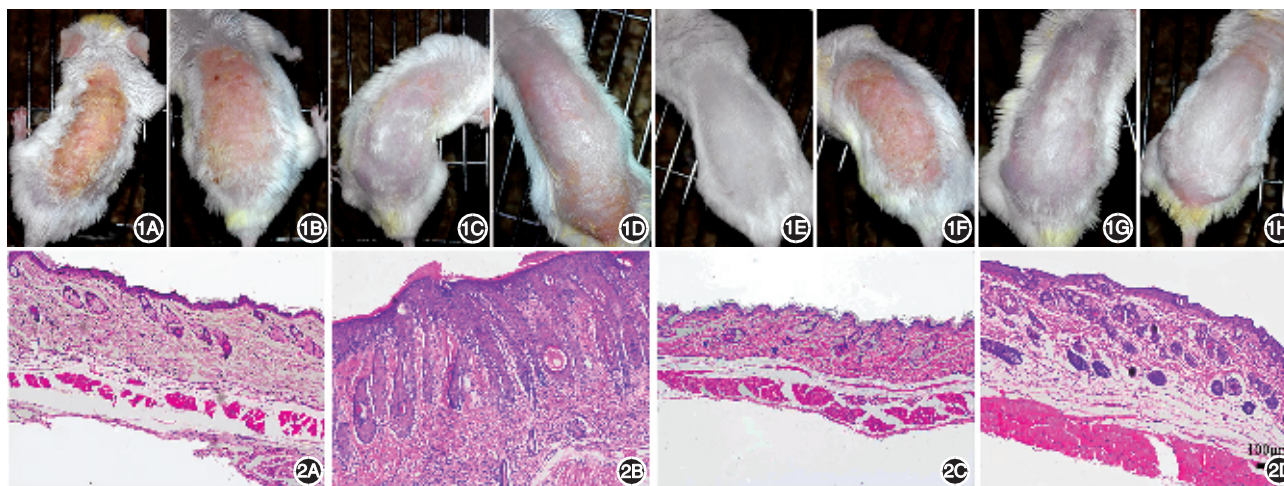


图 1 小鼠特异性皮炎模型皮损及用药后第 7、15 天各组小鼠皮损情况 1A:建模后小鼠背部出现增厚、潮红、水肿、厚痂;1B:模型对照组第 7 天痂皮脱落,有鳞屑,中度红斑及水肿;1C:氢化可的松乳膏组第 7 天小鼠背部有轻度红斑,水肿消失;1D:除湿止痒软膏组第 7 天仍有轻度红斑及水肿,无明显痂皮;1E:正常对照组第 15 天;1F:模型对照组第 15 天背部皮损程度基本同第 7 天;1G:氢化可的松乳膏组第 15 天红斑水肿消失,皮肤变薄皱缩;1H:除湿止痒软膏组第 15 天轻度红斑,水肿消失,表皮增厚不明显 图 2 用药后第 15 天各组小鼠皮损 HE 染色($\times 100$) 2A:正常对照组;2B:模型对照组表皮增厚明显,大量炎症细胞浸润;2C:氢化可的松乳膏组炎症细胞浸润减少;2D:除湿止痒软膏组炎症细胞浸润减少

表 3 除湿止痒软膏对磷酸组胺所致豚鼠
瘙痒反应的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | 致痒阈(μg) | 涂抹次数 |
|----------------------------|----|-------------------------------|----------------------------|
| 模型对照组 | 8 | 22.1 \pm 6.5 | 2.9 \pm 0.5 |
| 赛庚啶乳膏组 | 8 | 134.3 \pm 50.6 ^a | 7.5 \pm 1.4 ^a |
| 除湿止痒软膏组 | 8 | 201.3 \pm 44.2 ^b | 9.8 \pm 1.3 ^b |
| $F_{\text{药物}}(P\text{值})$ | | 4.895(0.022) | 7.820(0.004) |
| $F_{\text{区组}}(P\text{值})$ | | 0.374(0.931) | 0.379(0.929) |

注:与模型对照组相比,^a: $P < 0.05$;^b: $P < 0.01$

增加,随着病程发展,逐渐转以 Th1 型免疫反应为主,且搔抓可诱导这一过程的转化^[8-9]。抗原种类,接触剂量、频率、剂量和途径等均可影响 Th1/Th2 平衡偏向^[10]。本研究建立的小鼠 AD 模型具有潮红、结痂和鳞屑、肥厚、苔藓化、浸润等特点,被认为处于亚急性阶段。AD 模型对照组皮损组织 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5 水平均增加,呈现 Th1、Th2 混合型变态反应,与已有文献^[4]结果一致。有文献^[2]报道,该模型细胞因子表达呈 Th2 优势型,我们认为可能与本实验中使用的 DNFB 激发剂量更大有关。用药后第 15 天后,除湿止痒软膏和氢化可的松乳膏均可明显减轻小鼠的皮肤水肿和炎症细胞浸润,不同程度恢复皮损组织中上述 4 类细胞因子水平,提示其抗炎作用可能与纠正 Th1/Th2 平衡相关。与氢化可的松乳膏不同的是,除湿止痒软膏并未引起皮肤萎缩,且对 TNF- α 抑制作用弱于氢化可的松乳膏。对 TNF- α 抑制作用的差异可能是两种药物治疗强度不同的原因之一,其具体机制有待进一步探讨。

瘙痒是各类皮炎湿疹的一个重要特征,也是影响患者生活质量的关键所在。组胺是最早发现的瘙痒介质之一。在小鼠 AD 模型中,除湿止痒软膏可减少皮损组织肥大细胞浸润,提示该药还可能抑制组

胺释放。因此,本实验建立外源性磷酸组胺诱发豚鼠局部瘙痒模型,结果证实除湿止痒软膏确可显著抑制磷酸组胺所致豚鼠皮肤的局部瘙痒。

本文结果表明,除湿止痒软膏对 DNFB 诱导小鼠 AD 模型及磷酸组胺诱导豚鼠局部瘙痒模型具有良好的治疗作用,值得进一步分析其抗炎止痒有效成分、考察量效关系,进而优化配方及开发新剂型,以发挥更大的临床应用价值。

声明 本研究由成都明日制药有限公司资助

参 考 文 献

- [1] 饶瑛. 除湿止痒软膏治疗湿疹疗效观察[J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(7): 459.
- [2] 吴晓金, 于小兵, 沈惠良. 除湿止痒软膏治疗阴囊湿疹疗效观察[J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(7): 496.
- [3] 李园园, 李邻峰. 青鹏软膏对小鼠特异性皮炎模型的影响及机制研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2013, 46(1): 24-28.
- [4] Shah MM, Miyamoto Y, Yamada Y, et al. Orally supplemented Lactobacillus acidophilus strain L-92 inhibits passive and active cutaneous anaphylaxis as well as 2,4-dinitrofluorobenzene and mite fecal antigen induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice [J]. Microbiol Immunol, 2010, 54(9): 523-533.
- [5] Ayush O, Lee CH, Kim HK, et al. Glutamine suppresses DNFB-induced contact dermatitis by deactivating p38 mitogen-activated protein kinase via induction of MAPK phosphatase-1 [J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(3): 723-731.
- [6] 郭青云, 潘成军, 林清, 等. 复方黄倍软膏抗过敏及止痒作用的实验研究[J]. 解放军药学学报, 2013, 29(1): 39-41.
- [7] 中华中医药学会皮肤科专业委员会. 特应性皮炎中医诊疗方案专家共识 [J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2013, 12(1): 60-61.
- [8] Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, et al. New insights into atopic dermatitis[J]. J Clin Invest, 2004, 113(5): 651-657.
- [9] Matsushima H, Hayashi S, Shimada S. Skin scratching switches immune responses from Th2 to Th1 type in epicutaneously immunized mice[J]. J Dermatol Sci, 2003, 32(3): 223-230.
- [10] Ulrich P, Grenet O, Bluemel J, et al. Cytokine expression profiles during murine contact allergy: T helper 2 cytokines are expressed irrespective of the type of contact allergen [J]. Arch Toxicol, 2001, 75(8): 470-479.

(收稿日期:2015-02-12)

(本文编辑:吴晓初)