研究报告

沙棘油对小鼠变应性接触性皮炎的治疗作用

沈　琪,王　梅*,康金森

(新疆医科大学药学院,乌鲁木齐　830011)

【摘要】　目的　研究沙棘油对小鼠变应性接触性皮炎(allergic contact dermatitis,ACD)的治疗作用。**方法**　60 只 ICR 小鼠随机分为 6 组:空白对照组、模型对照组、高中低 3 个剂量沙棘油外用组(100%,50% 和 25%)及阳性药对照组(复方醋酸地塞米松乳膏),每组 10 只。以 2,4-二硝基氯苯(DNCB)致敏和激发建立小鼠 ACD 模型,耳部皮损情况评分作为模型建立成功与否的指标,在激发后 48 h 测定各试验组小鼠的耳廓肿胀度和脾指数,并以苏木精-伊红(hematoxylin and eosin,HE)染色观察小鼠耳部皮肤炎性细胞浸润等病理变化情况。**结果**　小鼠耳肿胀度测定结果表明沙棘油高剂量组(9 mL/kg,外用)可明显抑制 DNCB 诱发的小鼠耳廓肿胀,与模型组比较差异有显著性($P < 0.01$),与阳性对照组比较差异无显著性($P > 0.05$),小鼠脾指数测定结果表明沙棘油各剂量组可能通过促进免疫器官发育来发挥一定的免疫调节作用。病理学检查结果表明,沙棘油各剂量组与模型组比较耳组织表皮增厚程度减小,表皮及真皮水肿明显减轻,淋巴细胞浸润明显减少,真皮血管扩张充血现象缓解,抑制炎性细胞浸润。**结论**　沙棘油对 DNCB 诱发的小鼠 ACD 有明显的治疗作用,其作用机制有待进一步考察。

【关键词】　沙棘油;变应性接触性皮炎;免疫
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2017) 11-0050-06
doi: 10.3969.j.issn.1671 -7856. 2017.11.010

Therapeutic effect of sea buckthorn oil on allergic contact dermatitis in mice

SHEN Qi, WANG Mei*, KANG Jin-sen
(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

【Abstract】　Objective　To study the therapeutic effect of sea buckthorn oil on allergic contact dermatitis (ACD) in mice. **Methods**　A total of 60 ICR mice were randomly divided into 6 groups: blank control group, model control group, three groups of high-dose, medium-dose and low-dose sea buckthorn oil (100%, 50%, 25%, *ad us. ext.*), respectively, and positive control group (compound dexamethasone acetate cream), with 10 mice in each group. The mouse model of ACD was established by sensitization and stimulation with 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), and injuries in the ear skin of the mice were scored and used as the indicator of successful establishment of the model. The degree of ear swelling and the spleen index of the mice in each group were measured at 48 h after stimulation. Hematoxylin and eosin staining was used to observe the pathological changes in the mouse ear skin. **Results**　Measurement of the degrees of ear swelling showed that the high-dose sea buckthorn oil group (9 mL/kg, *ad us. ext.*) obviously inhibited the DNCB-induced ear swelling in the mice, with a significant difference compared with the model group ($P < 0.01$) and non-significant difference compared with the positive control group ($P > 0.05$). The result of the spleen index assessment showed that sea

[基金项目]沙棘油纳米乳的制备研究(编号:CXCY096)。
[作者简介]沈琪(1992 -),女,硕士研究生,专业:药物新剂型。E-mail: 2529110682@qq.com
[通讯作者]王梅(1978 -),女,副教授,研究方向:药物新剂型和药物传输系统。E-mail: wm630@163.com

buckthorn oil at each dose may play an immune-regulatory role by promoting the development of immune organs. The pathological examination showed that epidermis thickening of the ear tissue, epidermal and dermal edema and infiltration of lymphocytes were reduced, dermal vasodilatation and congestion were alleviated, and inflammatory cell infiltration was inhibited in the three groups of different doses of sea buckthorn oil compared with the model control group. **Conclusions** Sea buckthorn oil has an obvious inhibitory effect on the DNCB-induced allergic contact dermatitis in mice. However, its related mechanisms remain to be further investigated.

【**Key words**】 Sea buckthorn oil; Allergic contact dermatitis, ACD; Immunity

沙棘系胡颓子科沙棘属落叶灌木或小乔木,为药食两用植物。沙棘油是由沙棘的籽或果实中提取,可修复黏膜、皮肤损伤,临床上用于预防和治疗胃溃疡、皮肤烧烫伤等疾病。文献报道沙棘油对醋酸引起小鼠腹膜炎[1]和角叉菜胶所致大鼠足肿胀均有明显抑制作用[2],抑制炎症递质释放,可降低毛细血管通透性。

变应性接触性皮炎(allergic contact dermatitis, ACD)是 T 细胞介导的针对皮肤接触致敏原的免疫反应[3],是最常见的皮肤病之一,具有难预防、发病机制复杂多样的特点。减少炎性细胞聚集、促进皮肤屏障功能恢复是目前治疗 ACD 的一个突破口。研究表明沙棘油对皮肤损伤具有一定的修复作用,但其对 ACD 是否有抑制作用少有报道,本实验通过建立 2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱发的小鼠 ACD 模型,研究沙棘油对小鼠 ACD 的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 ICR 小鼠,体重 18 ~ 22 g,60 只,来源于新疆医科大学实验动物中心[SCXK(新)2016 - 0013];饲养于新疆医科大学实验动物中心屏障环境[SYXK(新)2016 - 0002],SPF 级动物房,饲养温度:恒温(21℃ ~ 23℃),相对湿度:恒湿(45% ~ 65%),光照:12 h/12 h 明暗交替,每笼 5 只饲养,自由进食和饮水;并在动物实验过程中按实验动物使用的“3R”原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

2,4-二硝基氯苯(DNCB)(西亚试剂有限公司),二甲苯、丙酮、吐温-80、甲醛溶液(天津市福晨化学试剂厂,分析纯),沙棘油(新疆慧华沙棘生物科技有限公司,批号:20160302),复方醋酸地塞米松乳膏(华润三九医药股份有限公司,批号:0503261)。

PQ202 型飞利浦电动剃毛刀(珠海经济特区飞利浦家庭电器有限公司),AB135-S 型天平(瑞士梅特勒 Mettler Toledo),打孔器自制,DSX100 型光学显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 沙棘油各剂量组的制备

以吐温-80 为溶剂,将沙棘油制备成 100%、50% 和 25%(高、中、低)3 个剂量的沙棘油给药组[2]。

1.3.2 小鼠 ACD 模型建立

按文献建立动物模型[4-7],腹部脱毛(3 cm × 3 cm)后,用 1% DNCB 丙酮橄榄油溶液 100 μL 致敏,第 2 天再次涂 100 μL 强化致敏。第 5 天小鼠右耳内外侧耳面涂以 1% DNCB 丙酮橄榄油溶液 20 μL 进行激发。

1.3.3 实验分组与给药方案

实验动物随机分为 6 组,即空白对照组、模型对照组、阳性对照组、及沙棘油高、中、低剂量组(9 mL/kg、4.5 mL/kg、2.25 mL/kg),每组 10 只。空白对照组给予等量吐温-80。按人与小鼠剂量换算公式,小鼠复方醋酸地塞米松乳膏用量为 10 mL/kg。所有药物均于致敏前 1 d 开始腹部外用给药,每日 1 次,每次给药量 180 μL,连续给药 7 d。除模型组,其它各组于给药第 2、3 天进行致敏和强化致敏,给药第 6 天各组进行激发。

1.3.4 小鼠 ACD 模型评价指标

激发前、激发后 48 h 分别对小鼠耳部红斑、水肿、抓痕进行评分作为耳部皮损情况评价指标,评分标准见表 1;耳部皮损情况评分为建模成功与否及过敏反应程度的评价指标。

1.3.5 小鼠耳廓肿胀度及脾指数测定

激发后 48 h 脱臼处死小鼠,沿耳廓基线剪下双耳,用 7 mm 打孔器分别在两耳同一部位打下耳片,称重,以两耳片的重量差异为肿胀度。耳廓肿胀抑制率计算如下:抑制率(%) = (模型对照组肿胀度 - 实验组肿胀度)/模型对照组肿胀度 × 100%。同时取小鼠脾脏称重,以每 10 g 体重的脾质量作为脾指数。

表 1 小鼠耳部皮损情况评分标准

Tab. 1 Scoring criteria of the ear skin injury in mice

评分项目 Grading items	反应强度 Response intensity	分值 Grades
红斑 Erythema	无红斑 No erythema	0
	轻微红斑 Slight erythema	1
	中度红斑无痂皮 Moderate erythema without crusts	2
	中重度红斑伴轻微痂皮 Moderate and severe erythema with minor crusts	3
	重度红斑伴重度痂皮 Severe erythema with severe crusts	4
水肿 Edema	无水肿 No edema	0
	轻微水肿 Slight edema	1
	中度水肿 Moderate edema	2
	重度水肿 Severe edema	3
抓痕 Scratch	无 No scratch	0
	有 With scratch	1

1.3.6 小鼠耳廓组织病理学检查

激发后 48 h,每组分别取 5 只小鼠,取右耳皮肤组织标本经石蜡包埋固定,制成 5 μm 薄层切片,以苏木精-伊红(hematoxylin and eosin,HE)进行染色,并使用光学显微镜观察皮肤组织的病理变化,主要包括真皮水肿程度、炎症细胞浸润及其数目变化等情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行分析,实验数据用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料满足正态分布时,多组比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)法,满足方差齐性时两两比较用 LSD 法,方差不齐时采用 Dunnet's T3 法;实验数据不满足正态分布时,多组比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,计数资料用秩和检验分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 小鼠 ACD 模型评价指标

结果见表 2。小鼠经耳部给予 1% DNCB,激发 30 min 后,可见耳部激发处皮肤开始红肿,小鼠搔抓现象明显,48 h 后小鼠耳部红肿且均有挠抓痂皮,部分小鼠耳部水肿化脓。与空白对照组相比,ACD 建模小鼠耳部皮损情况评分均明显增加($P < 0.01$),提示小鼠 ACD 模型成功建立。

2.2 各组药物对 ACD 模型小鼠耳肿胀度的影响

结果见表 3。由表可见,沙棘油给药组和阳性对照组均能抑制小鼠耳肿胀度的增加,其中沙棘油高剂量组(9 mL/kg,外用)可明显抑制 DNCB 诱发的小鼠耳廓肿胀,与模型组比较差异有显著性($P < 0.01$),与阳性对照组比较差异无显著性($P > 0.05$),抑制效果与阳性对照组接近。

表 2 各组小鼠耳部皮损情况评分($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 2 Scoring of the ear skin injury in the mice in each group

组别 Groups	剂量/mL/kg Dose	耳变态评分 Scores of ear abnormalities	
		致敏前 Before sensitization	激发后 48 h 48 h after stimulation
空白对照组 Blank control group		0	0.0 ± 0.0
模型对照组 Model control group		0	5.2 ± 0.8 **
阳性对照组 Positive control group	10	0	5.2 ± 0.8 **
沙棘油高剂量组 High-dose sea buckthorn oil group	9	0	5.2 ± 0.4 **
沙棘油中剂量组 Medium-dose sea buckthorn oil group	4.5	0	5.3 ± 0.7 **
沙棘油低剂量组 Low-dose sea buckthorn oil group	2.25	0	6.6 ± 0.8 **

注:与模型对照组相比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$。

Note. Compared with the model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 3 各组小鼠耳肿胀度及耳肿胀程度抑制率比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 3 Comparison of the degree and inhibitory rate of mouse ear swelling in each group

组别 Groups	剂量/mL/kg Dose	耳肿胀度/mg Ear swelling degrees	抑制率/% Inhibitory rate
空白对照组 Blank control group		0.65 ± 0.16 **	
模型对照组 Model control group		12.22 ± 2.30	
阳性对照组 Positive control group	10	5.34 ± 3.03 **	59.53
沙棘油高剂量组 High-dose sea buckthorn oil group	9	5.80 ± 2.30 **	54.47
沙棘油中剂量组 Medium-dose sea buckthorn oil group	4.5	10.44 ± 0.65	23.62
沙棘油低剂量组 Low-dose sea buckthorn oil group	2.25	10.30 ± 5.70	21.72

注:与模型对照组相比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$。

Note. Compared with the model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 小鼠 ACD 模型耳廓皮肤组织病理变化

2.3.1 建模后小鼠耳廓皮肤组织病理变化

正常小鼠耳部组织学结构清楚,层次分明,表皮厚度正常,细胞内及细胞间无水肿,无明显炎性细胞浸润,见图 1A。ACD 模型组小鼠耳表皮增厚,创面有部分缺失,可见轻度细胞内水肿及中度细胞间水肿,真皮浅层大量炎症细胞浸润,真皮血管扩张充血明显,与典型接触性皮炎病理相符,见图 1B。

2.3.2 药物处理后小鼠耳廓皮肤组织病理变化

ACD 模型组小鼠经不同剂量沙棘油及复方醋酸地塞米松乳膏腹部外用处理后,耳部组织表皮增厚程度减小,表皮及真皮水肿减轻,炎症细胞浸润明显减少,真皮血管扩张充血现象缓解,见图 1C ~ 1F。在细胞间水肿减少程度上,阳性对照组更为明显;在炎性细胞浸润渗出减少程度上,沙棘油高剂量的抑制效果与阳性对照组接近,且沙棘油给药组可见肉芽组织。以上表明沙棘油及复方醋酸地塞米松乳膏均能改善小鼠 ACD 模型耳部炎症浸润,在抑制血管扩张充血效果上沙棘油高剂量组更为明显。

2.4 各组药物对 ACD 模型小鼠脾指数影响

结果见表 4。由表可见阳性对照组小鼠的脾指数低于空白对照组,而沙棘油各剂量组小鼠脾指数均高于空白对照组。复方醋酸地塞米松乳膏为糖皮质激素类药物,有免疫抑制作用,用药后小鼠脾指数降低。沙棘油各组可能通过增强机体的细胞免疫、促进免疫器官发育、恢复异常体液免疫功能,使免疫系统趋于平衡来发挥作用。

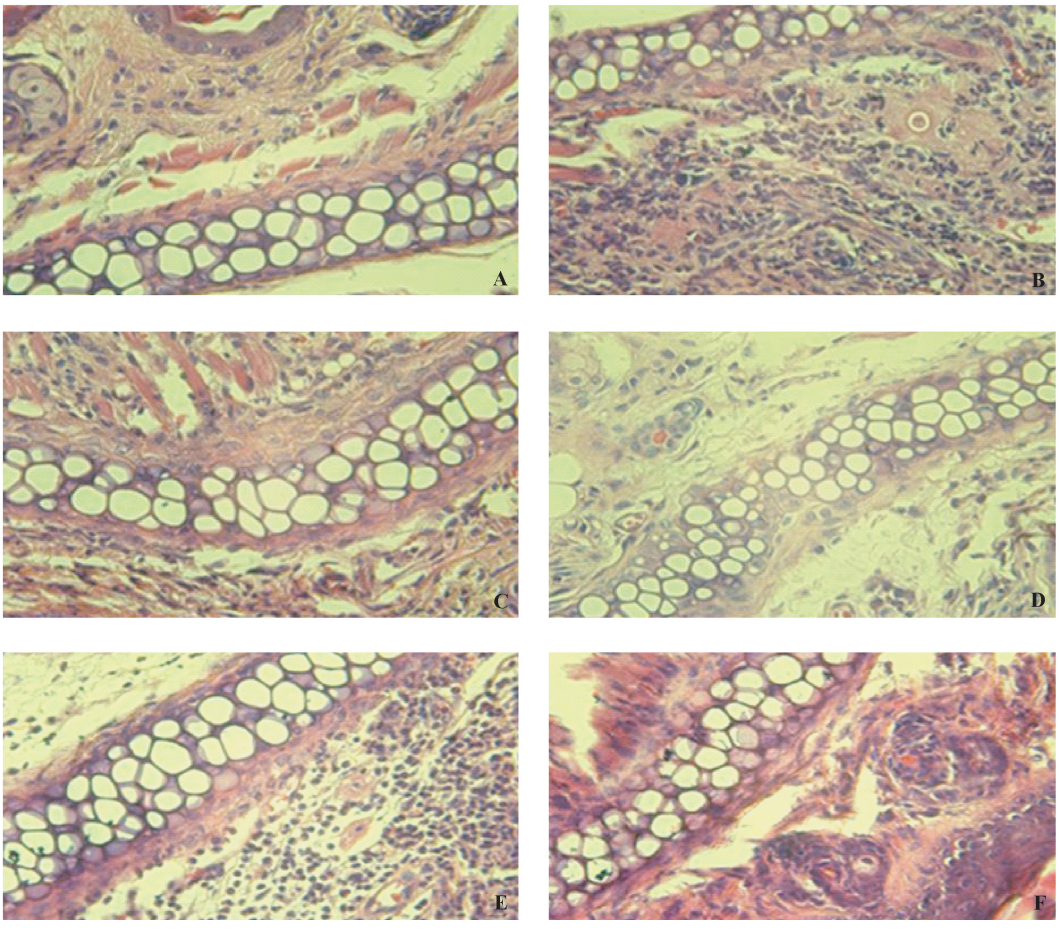
表 4 各组小鼠脾指数比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 4 Comparison of spleen indexes of the mice in each group

组别 Groups	剂量/mL/kg Dose	脾指数/10 mg/g Spleen index
空白对照组 Blank control group		51.52 ± 13.26
模型对照组 Model control group		60.07 ± 15.64
阳性对照组组 Positive control group	10	35.13 ± 8.13 *
沙棘油高剂量组 High-dose sea buckthorn oil group	9	73.18 ± 18.78 **
沙棘油中剂量组 Medium-dose sea buckthorn oil group	4.5	69.71 ± 9.96 **
沙棘油低剂量组 Low-dose sea buckthorn oil group	2.25	64.50 ± 6.10 *

注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$。

Note. Compared with the model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.



注:A:空白对照组;B:模型对照组;C:阳性对照组;D:沙棘油高剂量组;E:沙棘油中剂量组;F:沙棘油低剂量组。

图 1 各组小鼠耳廓皮肤组织病理变化的比较(× 20)

Note. A: Blank control group; B: Model control group; C: Positive control group; D: Group of high-dose sea buckthorn oil; E: Group of medium-dose sea buckthorn oil; F: Group of low-dose sea buckthorn oil.

Fig. 1 Comparison of pathological changes in the ear skin of each group

3 讨论

ACD 是最常见的皮肤病之一,具有难预防、发病机制复杂多样的特点,目前治疗 ACD 的常用药中,抗组胺药对炎症介质有拮抗作用,对 I 型超敏反应有效,但不能抑制 IV 型超敏反应病变部位的炎细胞浸润;糖皮质激素类虽然显效快、作用强、疗效确切,但不适合长期临床应用。因此,寻找能安全、有效抑制 IV 型超敏反应的药物是目前的一个研究重点。小鼠 ACD 模型是免疫学上研究 IV 型变态反应的经典模型[5],且不同诱导物产生的动物模型与药物作用靶位有相关性。目前多数学者认为,DNCB 诱发 Th_1 细胞介导的变态反应[8],且 DNCB 与细胞的蛋白质载体结合刺激细胞因子释放;异硫氰酸荧光素(FITC)诱发 Th_2 细胞介导的变态反应,FITC 与血清中的蛋白质载体结合刺激细胞因子释放[9],本实验采用 DNCB 作为小鼠 ACD 模型诱导物,研究沙棘油对小鼠 ACD 的治疗作用。

因为脾脏是机体最大的免疫器官,占全身淋巴组织总量的 25%,含有大量的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和巨噬细胞,是机体细胞免疫和体液免疫的中心,故本实验对小鼠脾指数进行测定。实验结果表明沙棘油各剂量组小鼠脾指数均高于空白对照组,而复方醋酸地塞米松乳膏给药组低于空白对照组,提示复方醋酸地塞米松乳膏等糖皮质激素类药物是通过抑制机体的多个免疫环节,从而发挥治疗 ACD 的作用,但长期使用此类药物会诱发感染或加重感染,可使体内潜在的感染灶扩散或静止感染灶复燃,特别是原有抵抗力下降者。沙棘油各剂量组小鼠脾指数升高,推测沙棘油是通过增强细胞免疫

功能,恢复异常体液免疫功能,使免疫系统趋于平衡来发挥作用,这对具有复发特点的 ACD 治疗有长期应用优势。

另外,根据小鼠耳肿胀度和耳廓皮肤组织病理切片结果发现沙棘油和复方醋酸地塞米松乳膏均具有良好的抗炎症作用,可以抑制炎性介质释放,降低毛细管通透性。研究报道表明沙棘油具有减少炎症物质产生、调节免疫、促进小鼠巨噬细胞的吞噬功能、恢复免疫抑制状态下的天然杀伤细胞(natural killer cells, NK)水平的作用[10-11],因此推断沙棘油是通过控制炎性因子和免疫性因子而发挥治疗 ACD 的作用[5]。沙棘油各组小鼠耳廓皮肤组织病理切片镜下可见肉芽组织,而阳性对照组中未观察到。因复方醋酸地塞米松乳膏等糖皮质激素类药物,有抑制肉芽组织增生作用,防止炎症后期粘连和瘢痕形成,但这也将降低机体的防御和修复功能,可导致感染的扩散和延缓创口的愈合。与复方醋酸地塞米松乳膏比,尽管沙棘油不能防止炎症后期粘连和瘢痕形成,但可以促进创伤的愈合和修复[12-13]。

本文对沙棘油治疗 ACD 药效进行了初步研究,结果表明沙棘油在治疗 ACD 方面疗效明显,且无糖皮质激素类药物副作用,提示沙棘油在治疗 ACD 中具有明显的优势。目前沙棘油治疗 ACD 作用机制尚不明确,有待进一步考察。

参考文献:

[1] 车锡平, 霍海如. 沙棘果油对小白鼠的镇痛作用及对大鼠实验性胃溃疡的影响 [J]. 沙棘, 2001, 14(1): 34-37.

[2] 车锡平, 霍海如, 封卫毅, 等. 沙棘油栓局部用药对小白鼠等的抗炎作用和毒性实验 [J]. 沙棘, 1995, 8(3): 40-44.

[3] 李林峰. 接触性皮炎与皮肤变态反应 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2003.

[4] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011.

[5] 许宗严, 吴铁, 吴志华. 鼠皮炎湿疹模型建立的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(7): 730-733.

[6] 李圆圆, 阎春林, 马莉, 等. 变应性接触性皮炎小鼠模型评价指标探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(5): 353-356, 404.

[7] 孙明立, 魏敏杰, 金万宝, 等. 两种变应性接触性皮炎动物模型的建立及比较 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(2): 132-134, 68.

[8] Tang A, Judge TA, Nickoloff BJ, et al. Suppression of murine allergic contact dermatitis by CTLA4Ig. Tolerance induction of Th2 responses requires additional blockade of CD40-ligand. [J]. J Immunol, 1996, 157(1): 117-125.

[9] Hopkins JE, Naisbitt DJ, Kitteringham NR, et al. Selective haptenation of cellular or extracellular protein by chemical allergens: association with cytokine polarization [J]. Chem Res Toxicol, 2005, 18(2): 375-381.

[10] 车锡平, 徐威, 霍海如, 等. 沙棘果油的抗炎作用和对免疫功能影响的实验研究 [J]. 沙棘, 2000, 13(4): 28-32.

[11] 任力飒. 沙棘籽油抗突变抗免疫抑制作用的观察 [J]. 沙棘, 1992, 5(4): 23-26.

[12] 周卫东, 王玲, 邹凤, 等. 耳内镜下沙棘油棉片贴补治疗外伤性鼓膜穿孔 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2011, 19(3): 273-274.

[13] 王志远, 罗小林, 何彩萍. 沙棘油治疗烧伤创面的临床观察 [J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(1): 124-125.

〔**收稿日期**〕2017-03-19