

孙赞, 陈桂芳, 高娟, 等. 氧化苦参碱对特应性皮炎模型小鼠的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 10-15.
Sun Y, Chen GF, Gao J, et al. Protective effects of oxymatrine on atopic dermatitis model mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 10-15.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 002

氧化苦参碱对特应性皮炎模型小鼠的保护作用

孙 赞^{1,2}, 陈桂芳^{1,2}, 高 娟^{1,2}, 张丽娟¹, 张 祎^{1,2*}, 王睿睿^{1,2*}

(1. 云南中医药大学, 昆明 650500; 2. 云南省民族特色养生理论与健康产品工程实验室, 昆明 650500)

【摘要】 目的 探讨中药苦参中有效成分氧化苦参碱治疗特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)小鼠的药效作用和初步作用机制。**方法** (1)将KM小鼠随机分为5组:空白对照组、模型对照组、阳性对照组及氧化苦参碱低、高剂量(50、100 mg/kg)组,每日给药2次,连续给药7次,末次给药后10 min,于小鼠左后足脚垫内皮下注射右旋糖酐每只50 μ L,观察并记录15 min内小鼠舔后足的次数。(2)将BALB/c小鼠随机分为6组:空白对照组、模型对照组、阳性对照组及氧化苦参碱低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)组,除空白对照组外,其余5组小鼠均采用2,4-二硝基氯苯(DNCB)多次反复刺激皮肤建立AD模型,实验第1天起各组灌胃给予相应溶媒或药物,连续干预14 d。观察并记录AD模型小鼠的体重变化,测定脾及胸腺的脏器系数,ELISA法测定外周血中总IgE及Th2型细胞因子的含量,HE染色观察皮损组织病理学变化情况,甲苯胺蓝染色观察皮损组织中肥大细胞的浸润情况。**结果** 氧化苦参碱能显著抑制瘙痒模型小鼠的搔抓次数($P < 0.01$);灌胃给予氧化苦参碱治疗14 d后,AD模型小鼠湿疹样皮炎缓解;病理切片结果显示,小鼠真皮层增厚减轻,炎性细胞数目减少以及细胞间水肿减轻;真皮层中肥大细胞的浸润数目明显减少,外周血中总IgE和Th型细胞因子IL-4、IL-13的表达显著降低($P < 0.05$)。**结论** 氧化苦参碱对AD模型小鼠有一定的治疗作用,其机制与抑制皮肤真皮层中肥大细胞的浸润、减少Th2型细胞因子的表达有关。

【关键词】 特应性皮炎;氧化苦参碱;肥大细胞;Th2型细胞因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0010-06

Protective effects of oxymatrine on atopic dermatitis model mice

SUN Yun^{1,2}, CHEN Guifang^{1,2}, GAO Juan^{1,2}, ZHANG Lijuan¹, ZHANG Yi^{1,2*}, WANG Ruirui^{1,2*}

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China.

2. Yunnan Province Engineering Laboratory for National Healthcare Theories and Products, Kunming 650500)

【Abstract】 Objective To investigate the anti-atopic dermatitis (AD) effects of oxymatrine in a murine model of AD. **Methods** (1) Kunming mice were randomly divided into five groups: Blank Control group (BC), model control group (DEX), positive control group (DXM), OXY-L and OXY-H groups (50 and 100 mg/kg) oxymatrine groups. Vehicle or oxymatrine was orally administered twice daily for 7 times. Ten minutes after the last administration, 50 μ L of dextran was injected subcutaneously into the left hind foot pad of each mouse. The number of times the mouse licked the hind foot within 15 min was observed and recorded. (2) BALB/c mice were randomly divided into 6 groups: blank control group (BC), model control group (DNCB), positive control group (DXM), OXY-L, OXY-M and OXY-H groups (25, 50 and 100 mg/kg)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81760741, 81660737, 81760775); 云南省科技厅中医联合项目(2017FF117(-003), 2017FF117(-025), 2019FF002(-051), 2018FF001(-050), 2019FF002(-010)); 云南省教育厅科学研究基金项目(2020J0291)。

【作者简介】 孙赞(1982—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 中药民族药及天然产物活性。Email: 41546147@qq.com

【通信作者】 张祎(1985—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 中药民族药及天然产物活性及机制。Email: zy05041117@126.com

王睿睿(1980—), 女, 教授, 博士, 研究方向: 中药抗感染与免疫。Email: wangruiyucm@126.com

* 共同通信作者

oxymatrine groups. Except for the blank control group, the other groups were treated with 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) solution repeatedly to establish the AD model. From the first day of the experiment, vehicle or drugs were orally administered once daily for 14 d. Changes in weight were observed and recorded, and the organ coefficients of the spleen and thymus were determined. The contents of total IgE and T helper 2 (Th2) cytokines in the peripheral blood were detected using enzyme-linked immunosorbent assay kits. In addition, hematoxylin and eosin staining was used to observe the pathological changes of skin lesions, and toluidine blue staining was used to evaluate the infiltration of mast cells in skin lesions. **Results** Oral administration of oxymatrine significantly decreased the number of scratches in the itching model mice ($P < 0.01$). After 14 d of treatment with oxymatrine by gavage, the eczema-like dermatitis of the AD model mice was relieved, and thickening of the dermis, infiltration of inflammatory and mast cells, and intercellular edema were reduced. The expression of total IgE and Th2-type cytokines, such as interleukin IL-4 and IL-13, was significantly lowered in the peripheral blood ($P < 0.05$). **Conclusions** Traditional Chinese medicine refers to the experience and knowledge summarized by Chinese people in the long-term practice of diagnosis and treatment of diseases. Oxymatrine, an effective component of the commonly used Chinese medicine *Sophora flavescens*, has a therapeutic effect on AD mice. Its mechanism is related to a reduction in the infiltration of mast cells in the skin dermis and the reduced expression of Th2-type cytokines.

【Keywords】 atopic dermatitis; oxymatrine; mast cells; Th2-type cytokines

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种较为常见的慢性皮肤疾病,容易复发,常发病于婴儿和儿童,少见发病于成年人。AD是一种特殊类型的湿疹^[1-2],其主要症状是皮肤瘙痒,伴随不同程度的皮屑脱落和皮肤溃烂,严重者甚至会产生睡眠障碍,具有慢性迁延和反复发作的特征。近年来AD的发病是呈上升的趋势^[3],目前发病机制尚未完全阐明,其病因十分复杂,可能与遗传、免疫、环境、感染、精神心理、皮肤屏障受损等多种因素有关^[4]。

中西医治疗AD的方法各有不同^[5]。现代医学从基因、免疫、皮肤屏障功能、感染等多种因素进行了深入的研究,在诊断以及流行病学方面取得了一定成绩。对于AD的治疗,常用方法是使用抗组胺药,以及在局部使用润肤剂、皮质类固醇激素和免疫抑制剂等,但使用时间过长会产生副作用,患者耐受程度较低。中医对AD疾病的治疗药物较多,有汤剂,散剂、油膏剂、外洗剂等,包括了口服和外用等剂型,在治疗和减少复发方面均有一定特色和优势^[6]。

氧化苦参碱具有广泛的药理作用,如抗病毒、抗炎、抗心律失常、抗纤维化、免疫抑制及抗肿瘤等^[7-12],研究标明,氧化苦参碱可改善小鼠湿疹及慢性湿疹皮损,显著减轻炎症反应^[13-16]。本文拟探讨氧化苦参碱治疗AD小鼠模型的药效作用和初步作用机制,为AD治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级KM小鼠,雌雄各半,6~8周龄,体重(20±2)g;SPF级雌性BALB/c小鼠,6~8周龄,体重(20±2)

g,均购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2016-0002]。小鼠饲养于云南中医药大学实验动物中心屏障环境中[SYXK(滇)2017-005],温度:22℃~24℃,湿度:45%~55%,光照12h为一个循环。本实验经云南中医药大学实验动物伦理审查委员会审查(R-0620160015),符合国家实验动物福利相关规定。实验遵循实验动物使用的3R原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

氧化苦参碱,≥98%(HPLC),上海源叶生物科技有限公司,批号Y30S6Y17043;醋酸地塞米松,浙江仙琚制药股份有限公司,批号170512;右旋糖酐, Biotopped公司,批号17-0270-01;2,4-二硝基氯苯,成都贝斯特试剂有限公司,批号Z0016B5;丙酮,云南杨林工业开发区油滇药业有限公司,批号20160325;橄榄油,山东鲁花集团有限公司,批号20180803;羧甲基纤维素钠(CMC-Na),天津市光复精细化工研究所,批号50116;IgE ELISA试剂盒,联科生物,批号A27591234;IL-4 ELISA试剂盒,联科生物,批号A20481252;IL-13 ELISA试剂盒,联科生物,批号A21300855。全波长多功能酶标仪,昆明倍捷科技有限公司,型号:Plus384;-80℃超低温冰箱,美国Thermo Forma公司,型号:Forma 902;低温高速离心机,德国Eppendorf公司,型号:5810R;电子分析天平,奥豪斯仪器有限公司,型号:AR224CN。

1.3 实验方法

1.3.1 氧化苦参碱对右旋糖酐致小鼠瘙痒模型的影响

将50只KM小鼠按性别体重随机分为5组,设空白对照组、模型对照组、阳性对照组(醋酸地塞米

松 1.5 mg/kg) 以及氧化苦参碱高、低剂量 (100、50 mg/kg) 组, 每组 10 只; 地塞米松组、氧化苦参碱各剂量组分别灌胃给予相应药物, 每日 2 次, 连续 7 次。空白对照组、模型对照组灌胃等体积的 0.5% CMC-Na。末次给药后 10 min, 在每只小鼠左后足脚垫内注射右旋糖酐 50 μ L, 观察并记录 15 min 内小鼠舔后足的次数, 小鼠连续舔后足出现短暂停顿记为 1 次搔痒。

1.3.2 氧化苦参碱对 AD 模型小鼠的影响

60 只 BALB/c 小鼠经适应性饲养 1 周后, 随机分为空白对照组 (BC)、模型对照组 (DEX)、阳性对照组 (醋酸地塞米松 2 mg/kg) (OXM)、氧化苦参碱低、中、高剂量组 (25、50、100 mg/kg; OXY-L、OXY-M、OXY-H), 每组 8 只。实验前 1 d, 所有小鼠用电推剪加脱毛膏进行背部脱毛 (2 cm \times 2 cm), 暴露皮肤; 实验第 1、2 天, 除空白对照组外, 其余小鼠在背部皮肤涂抹以丙酮-橄榄油混合溶液为溶媒配制的 3% 2,4-二硝基氯苯 (DNCB) 溶液, 每次 100 μ L, 第 3~6 天不作任何处理, 第 7 天开始每隔 2 d 涂抹 1 次 1% DNCB 溶液, 每次 70 μ L, 共 3 次。空白对照组小鼠背部皮肤仅涂抹丙酮-橄榄油混合溶液, 涂抹时间和体积与造模组一致。自实验第 1 天开始各组分别灌胃给予相应药物, 每天 1 次, 连续给药 14 d, 每天称重。末次给药前禁食不禁水 12 h, 末次给药后 30 min 麻醉, 腹主动脉取血, 剖取脾和胸腺、称重, 计算脏器系数, 剪取背部造模处皮损组织切为两部分, 一部分置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱, 一部分置于 10% 中性福尔马林溶液中备用。

分离血清, 采用 ELISA 试剂盒测定血清中总 IgE 和 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-13 的含量; 10% 中性福尔马林固定的皮损组织经脱水、透蜡、包埋、切片等制备成病理切片, HE 染色观察一般组织病理学变化; 石蜡切片经脱蜡进行甲苯胺蓝 (TB) 染色以观察皮损组织真皮层中肥大细胞 (mast cell, MC) 的浸润情况, 每组随机选取 8 个视野, 拍照, 封片。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad prism 8.0.2 软件对所得数据进行统计学分析, 以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 用单因素方差分析和 *t* 检验分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化苦参碱对搔痒模型小鼠的影响

与模型对照组相比, 氧化苦参碱高低剂量可减

少小鼠的抓痒次数 ($P<0.01$), 对右旋糖酐所致搔痒有一定程度的抑制, 以 50 mg/kg 效果较佳, 因此选择此剂量为受试剂量继续探究氧化苦参碱对特异性皮炎实验的干预效果及初步作用机制 (图 1)。

2.2 氧化苦参碱对 AD 模型小鼠的影响

2.2.1 氧化苦参碱对 AD 小鼠一般情况的影响

与模型对照组相比, 阳性对照组小鼠体重偏低, 氧化苦参碱各剂量 12 d 后小鼠体重均呈现上升趋势 (图 2)。

2.2.2 氧化苦参碱对 AD 模型小鼠脏器系数的影响

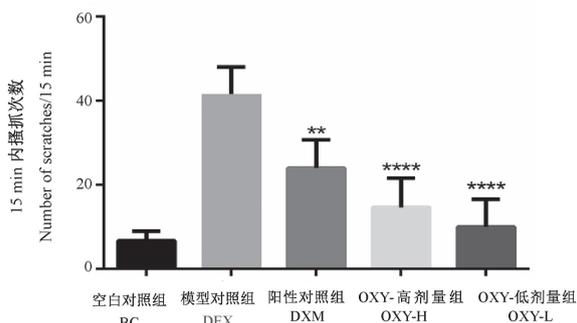
与模型对照组相比, 氧化苦参碱高剂量可降低 AD 模型小鼠的胸腺系数 ($P<0.01$) 表现出类似地塞米松样的免疫抑制作用; 氧化苦参碱高中剂量可降低小鼠脾系数 ($P<0.05$), 推测可能与抑制被过度激活的 B 淋巴细胞有关 (图 3)。

2.2.3 氧化苦参碱对血清总 IgE 含量的影响

与空白对照组相比, 模型对照组小鼠外周血总 IgE 含量增加, 差异无统计学意义; 与模型对照组比较相比, 阳性药和氧化苦参碱高剂量均能显著抑制 AD 模型小鼠外周血总 IgE 的表达 ($P<0.05$) (图 4)。

2.2.4 氧化苦参碱对外周血 Th2 型细胞因子含量的影响

与空白对照组相比, 模型对照组小鼠外周血 IL-4、IL-13 含量均有增加趋势, 但无统计学意义; 与模型对照组相比, 阳性药和氧化苦参碱均能显著抑制 AD 模型小鼠外周血 IL-4、IL-13 含量的表达 ($P<0.05$) (图 5)。



注: 与模型对照组相比, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

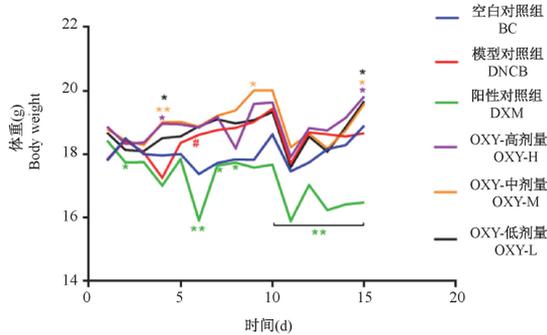
图 1 对右旋糖酐所致小鼠搔痒的影响 ($n=10$)

Note. Compared with model control group, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

Figure 1 Effect of oxymatrine on itching mice model induced by dextran

2.2.5 氧化苦参碱对 AD 模型小鼠皮损组织病理的影响

与空白对照组相比,模型对照组小鼠皮损处皮肤结构严重受损,角化过度,棘层肥厚明显伴灶性海绵水肿,真皮血管扩张充血并伴有大量炎症细胞浸润,

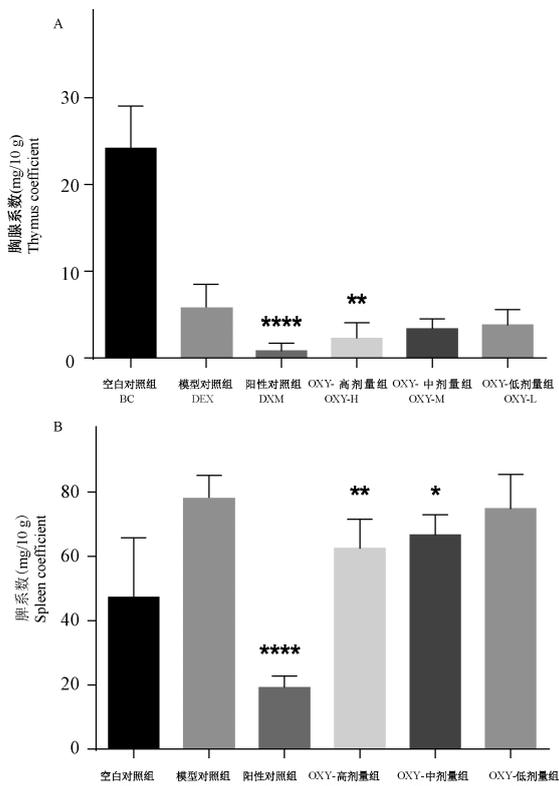


注:与空白对照组相比,# $P < 0.05$;与模型对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 2 对 AD 小鼠体重的影响 ($n = 8$)

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

Figure 2 Effect of oxymatrine on the body weight of AD mice



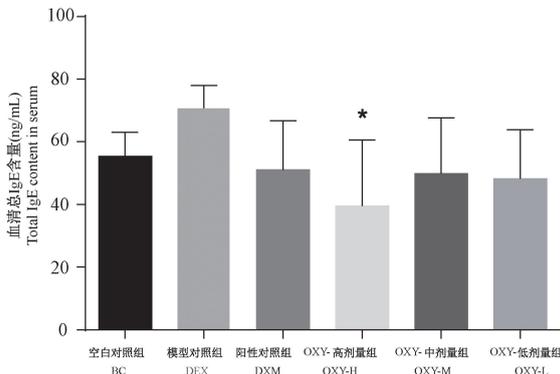
注:A:胸腺系数;B:脾脏系数。与模型对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,**** $P < 0.0001$ 。

图 3 对 AD 模型小鼠脏器系数的影响 ($n = 8$)

Note. A, Thymus coefficient. B, Spleen coefficient. Compared with model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

Figure 3 Effect of oxymatrine on organ coefficients of AD model mice

毛囊结构减少。与模型对照组相比,阳性对照组小鼠表皮各层结构较清晰,表皮增厚明显减轻,真皮未见血管扩张,炎性细胞较模型组明显减轻,毛囊结构明显增多;氧化苦参碱各剂量组小鼠皮肤炎性细胞浸润减少,角质层角化不全有所缓解(图6)。

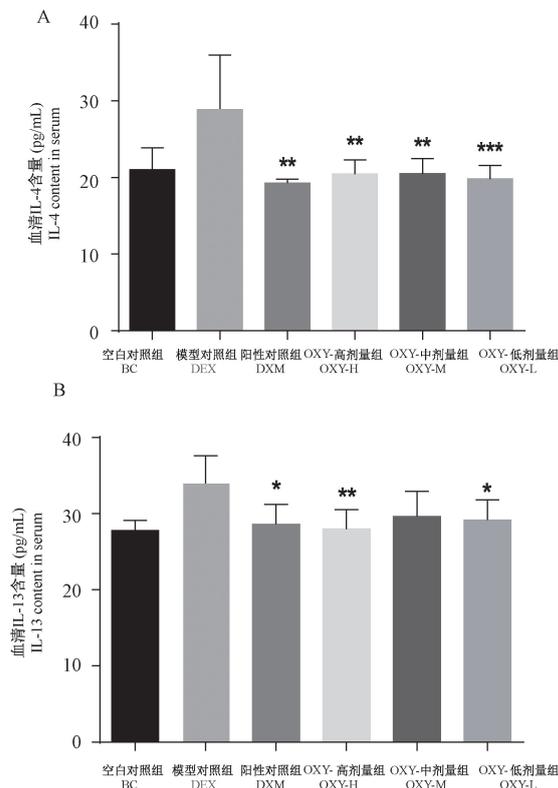


注:与模型对照组相比,* $P < 0.05$ 。

图 4 对 AD 小鼠外周血总 IgE 含量的影响 ($n = 8$)

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

Figure 4 Effect of oxymatrine on the total IgE content of peripheral blood in AD mice



注:A:血清 IL-4 含量;B:血清 IL-13 含量。与模型对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 5 对小鼠血清 Th2 型细胞因子的影响 ($n = 8$)

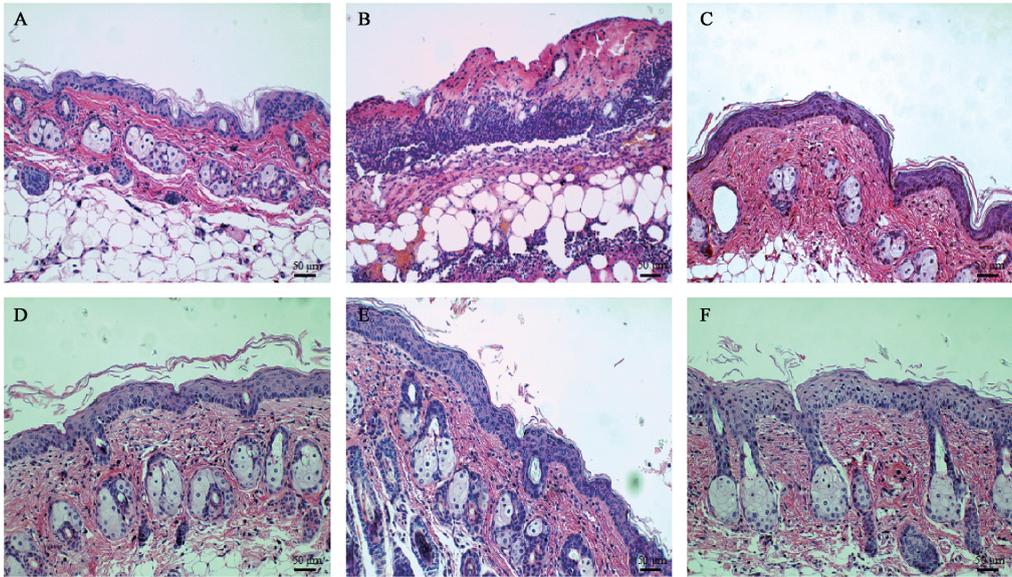
Note. A, IL-4. B, IL-13. Compared with model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Effect of oxymatrine on the content of Th2 type cytokine in AD mice serum

2.2.6 氧化苦参碱对 AD 模型小鼠皮损肥大细胞浸润的影响

与空白对照组相比,模型对照组小鼠皮损处肥

大细胞浸润明显增多;与模型对照组相比,地塞米松和氧化苦参碱各剂量均能显著减少皮损处肥大细胞的浸润,具体结果见图 7。

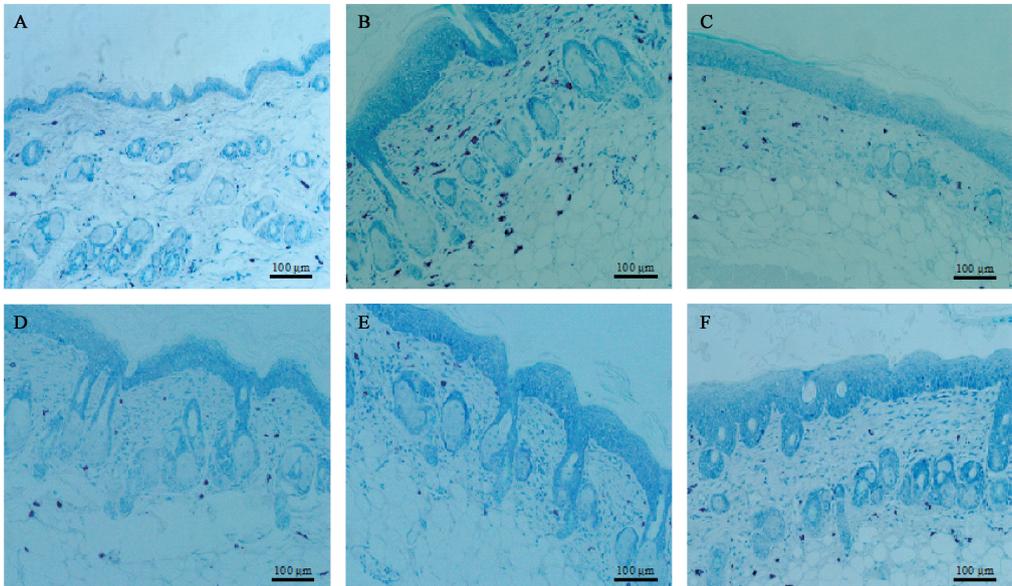


注:A:空白对照组;B:模型对照组;C:阳性对照组;D:氧化苦参碱高剂量组(100 mg/kg);E:氧化苦参碱中剂量组(50 mg/kg);F:氧化苦参碱低剂量组(25 mg/kg)。

图 6 对小鼠皮损皮肤一般组织病理的影响(HE 染色)

Note. A, Blank control group. B, Model control group. C, Positive control group. D, OXY-H(100 mg/kg). E, OXY-M(50 mg/kg). F, OXY-L(25 mg/kg).

Figure 6 Effect of oxymatrine on the general histopathology of skin lesions in mice(HE staining)



注:A:空白对照组;B:模型对照组;C:阳性对照组;D:氧化苦参碱高剂量组(100 mg/kg);E:氧化苦参碱中剂量组(50 mg/kg);F:氧化苦参碱低剂量组(25 mg/kg)。

图 7 对小鼠皮损肥大细胞浸润的影响(TB 染色)

Note. A, Blank control group. B, Model control group. C, Positive control group. D, OXY-H(100 mg/kg). E, OXY-M(50 mg/kg). F, OXY-L(25 mg/kg).

Figure 7 Effect of oxymatrine on mast cell infiltration in the lesions of AD model mice(TB staining)

3 讨论

AD 是慢性易复发的皮肤炎症性疾病,发病机制复杂,其中免疫功能异常是发病的关键环节。细胞免疫中 T 淋巴细胞在 AD 中的作用已较为明确,在急性期 AD 病变主要由 Th2 细胞和 IL-4、IL-5 和 IL-13 等细胞因子主导,慢性期以 Th1 型细胞反应为主^[17-19]。Th2 细胞分泌的 IL-4、IL-5、IL-13 可诱导淋巴 B 细胞产生 IgE,间接活化肥大细胞。因此,在 AD 发病机制中,Th2 型细胞因子 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 即是调控 AD 的关键细胞因子,同时肥大细胞活化后会产生一系列炎症因子,并与 T 细胞、嗜酸性粒细胞等相互作用,共同参与 AD 的皮肤瘙痒和炎症反应过程,证明 Th 细胞、B 淋巴细胞及肥大细胞均在 AD 机制中扮演重要角色。因此,抑制 Th2 型细胞因子表达,调控肥大细胞应该能够有效抑制 AD。

本研究表明,中药苦参中有效成分氧化苦参碱能明显改善小鼠的皮肤病理症状、减轻皮肤增厚,减少肥大细胞的数目以及 Th2 型细胞因子等在皮肤组织的表达,对 AD 小鼠有治疗作用,并提示氧化苦参碱治疗 AD 小鼠的作用机制可能与减少皮肤真皮层中肥大细胞浸润、减轻 Th2 型细胞因子的表达有关,但氧化苦参碱如何通过下调 Th2 型细胞因子表达进而减少肥大细胞的募集和激活还有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] 郝飞. 把握“特异性”涵义及其在皮炎湿疹诊断中的意义 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2009, 23(1): 1-2, 56.

[2] 赵作涛. 湿疹? 还是特异性皮炎? [J]. 医学与哲学(B), 2014, 35(6): 22-23, 30.

[3] 孙彩虹, 顾恒. 特异性皮炎的流行病学特征 [J]. 中国医学文摘(皮肤科学), 2016, 33(2): 101-106.

[4] 李云珠, 李邻峰. 特异性皮炎动物模型研究进展 [J]. 中国医学文摘(皮肤科学), 2016, 33(2): 138-143.

[5] 王雄. 基于免疫调节机制探讨龙牡汤对特异性皮炎小鼠模型

的治疗作用 [D]. 北京:中国中医科学院, 2017.

[6] 钱佳丽, 刘久利, 何静岩, 等. 健脾益肠方对脾虚型特异性皮炎小鼠模型的免疫调节作用及其机制研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(2): 211-214.

[7] 豆玉凤, 史艳平, 李丹, 等. 氧化苦参碱对病毒性心肌炎小鼠巨噬细胞移动抑制因子的影响研究 [J]. 陕西医学杂志, 2018, 47(8): 961-963.

[8] 史艳平, 汪琼, 李丹, 等. 氧化苦参碱对病毒性心肌炎小鼠的作用研究 [J]. 陕西中医, 2018, 39(1): 14-16.

[9] 兰露莎, 赵兵兵, 杨红宇, 等. 氧化苦参碱对小鼠哮喘模型保护作用的初步研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(4): 320-323.

[10] 郭伟, 张杰. 支气管哮喘与免疫 [J]. 中国医疗前沿, 2008, 3(2): 18-19.

[11] 李艳, 戚好文. 支气管哮喘与免疫调节 [J]. 国际呼吸杂志, 2008, 28(7): 400.

[12] Qiao M, Xiao DQ, Qian L, et al. The natural course of atopic dermatitis and the association with asthma [J]. *Inflammation*, 2017, 40(2): 546-554.

[13] 陈明亮, 伍斌, 谢红付, 等. 氧化苦参碱抑制二硝基氟苯所致小鼠接触性皮炎及淋巴细胞增殖(英文) [J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(24): 3685-3689, 3693.

[14] 伍斌, 任学群, 谢红付, 等. 氧化苦参碱对小鼠接触性皮炎的抑制作用 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(4): 643-645.

[15] 伍斌, 蔡小嫦, 曾耀英, 等. 氧化苦参碱抑制二硝基氟苯所致小鼠接触性皮炎及淋巴细胞增殖 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(5): 931-935.

[16] 韩春雷, 陈学荣, 马俊江, 等. 氧化苦参碱对大鼠变应性接触性皮炎药效学作用 [J]. 北京医科大学学报, 1996, 28(1): 59-61.

[17] Seki N, Miyazaki M, Suzuki W, et al. IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation [J]. *Immunology*, 2004, 172(10): 6158-6166.

[18] Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, et al. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(6): 536-542.

[19] 王珊, 刘玲玲. 肥大细胞在特异性皮炎发病机制中的作用 [J]. 中国医学文摘(皮肤科学), 2016, 33(2): 114-121.

[收稿日期] 2020-10-05