



消炎止痒颗粒通过降低白三烯水平对小鼠特异性皮炎急性瘙痒的治疗作用研究

丁华敏, 郭羽晨, 秦春霞, 宋志兵, 孙莉莉

Therapeutic effect of Xiaofeng Zhiyang Keli on acute itching in mice with atopic dermatitis by decreasing Leukotriene

DING Huamin, GUO Yuchen, QIN Chunxia, SONG Zhibing, SUN Lili

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202306031>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

白三烯受体拮抗剂改善哮喘患者炎症及免疫功能的效果分析

Effect of leukotriene receptor antagonist on anti-inflammation and immune function in asthmatic patients

药学实践与服务. 2017, 35(6): 562-564,568 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.020

夏枯草消瘤合剂对Lewis肺癌小鼠的药效作用

Therapeutic effect of Xiakucao Xiaoliu mixture on Lewis lung cancer mice

药学实践与服务. 2020, 38(1): 57-62 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201812070

双波长HPLC法测定止痒地霜中地塞米松和羟苯乙酯的含量

Determination of dexamethasone sodium phosphate and ethylparaben in Zhiyang dishuang cream by HPLC of double wavelength

药学实践与服务. 2019, 37(4): 361-364 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.015

动脉粥样硬化高脂饲料对小鼠糖脂水平的作用研究

Effect of atherosclerotic high-fat diet on the level of glucose and lipid in mice

药学实践与服务. 2021, 39(2): 121-125 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202012002

养胃颗粒对实验性胃溃疡的治疗作用研究

Studies on the therapeutical effect of Yangwei granules for experimental gastric ulcer

药学实践与服务. 2018, 36(5): 438-442,452 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.012

四烯甲萘醌保护成骨细胞氧化损伤的作用研究

Study on the protective effect of menatetrenone against the oxidative stress of osteoblasts

药学实践与服务. 2020, 38(6): 523-527 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202005047



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

消风止痒颗粒通过降低白三烯水平对小鼠特应性皮炎急性瘙痒的治疗作用研究

丁华敏¹, 郭羽晨^{1,2}, 秦春霞¹, 宋志兵², 孙莉莉¹ (1. 上海市浦东新区浦南医院, 上海 200125; 2. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012)

[摘要] **目的** 建立小鼠特应性皮炎急性瘙痒模型, 研究消风止痒颗粒的止痒作用及其机制探讨。**方法** 采用诱导法制备特应性皮炎小鼠模型。小鼠每天先后用卡泊三醇和卵清蛋白(OVA)涂抹右耳致敏 10 天, 然后在小鼠右颊皮内注射 OVA 进行激发, 致使小鼠出现急性瘙痒, 记录小鼠激发后 30 min-60 min 的抓挠次数。实验分为 5 组: 空白对照组、模型组、消风止痒颗粒低剂量组(7.2 g/kg)和高剂量组(14.4 g/kg)、阳性对照组(孟鲁司特 5 mg/kg)。各组于激发前 12 h 及 30 min 各灌胃给药一次。通过 ELISA 检测小鼠血清中白三烯水平, 通过流式细胞术检测血液中嗜碱性粒细胞比例及激活状态。**结果** 小鼠经致敏和激发后出现明显的抓挠行为, 模型组小鼠激发后 30min-60 min 内抓挠次数均值为 56 次, 消风止痒颗粒低和高剂量组小鼠抓挠次数均值分别为 42 次和 23 次, 较模型组均显著降低($P<0.05$)。消风止痒颗粒低和高剂量组血清中白三烯水平和嗜碱性粒细胞比例与模型组比较, 均明显降低($P<0.05$)。**结论** 消风止痒颗粒对小鼠特应性皮炎急性瘙痒具有一定治疗作用, 作用机制与其降低特应性皮炎小鼠血清中白三烯水平和降低嗜碱性粒细胞比例有关。

[关键词] 消风止痒颗粒; 特应性皮炎; 瘙痒; 嗜碱性粒细胞; 白三烯

[文章编号] 2097-2024(2024)00-0001-06

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202306031

Therapeutic effect of Xiaofeng Zhiyang Keli on acute itching in mice with atopic dermatitis by decreasing Leukotriene

DING Huamin¹, GUO Yuchen^{1,2}, QIN Chunxia¹, SONG Zhibing², SUN Lili¹ (1. Punan Hospital of Pudong New Area, Shanghai 200125, China; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To establish a mice model of atopic dermatitis with acute itching and investigate the antipruritic effect and its mechanism of Xiaofeng Zhiyang Keli (XFZYKL). **Methods** A mice model of atopic dermatitis was prepared by induction method. Mice were sensitized by calcipotriol and ovalbumin (OVA) applying to the right ear daily for 10 days, and then stimulated by OVA injected intradermally into the right cheek to resulting in acute itching. These mice were divided into 5 groups: blank control group, model group, low dose (7.2 g/kg) and high dose (14.4 g/kg) of XFZYKL, and positive control group (montelukast 5 mg/kg). Drugs were administered by gavage at 12 h and 30 min before stimulation. The leukotriene levels in the serum of the mice were measured by ELISA and the basophil ratio and activation status in the blood were measured by flow cytometry. **Results** The mean number of scratches in the model group was 56 between 30 min and 60 min after stimulation, while the mean number of scratches in the low and high dose of XFZYKL groups were 42 and 23 respectively, which were significantly lower than those in the model group ($P<0.05$). The serum leukotriene levels and the proportion of basophils in the low and high dose of XFZYKL groups were significantly lower than those in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** XFZYKL had certain therapeutic effect on acute itching of atopic dermatitis in mice, and the mechanism of its action was related to the reduction of leukotriene level and basophil ratio in serum of mice with atopic dermatitis.

[Key words] Xiaofeng Zhiyang Keli; atopic dermatitis; pruritus; basophils; leukotrienes

特应性皮炎(AD)是一种慢性、复发性、炎症

性皮肤病, 在全球疾病负担研究(GBD)中以伤残调整寿命年的率衡量时, 其造成的疾病负担在非致命性疾病中居于第 15 位, 在所有疾病和损伤中居于 59 位^[1], 同时 AD 造成的负担还与一个国家的国内生产总值呈正相关^[2]。在过去的几十年里, 亚洲国家居民的 AD 的患病率一直上升, AD 亦成为中国当前严重的公共卫生问题之一。中国居民 AD 的

[基金项目] 上海市浦东新区卫生系统优秀青年医学人才培养计划资助(PWRq2020-25)

[作者简介] 丁华敏, 主管药师, 研究方向: 中药药理学, 临床药理学, Email: huaming1987@163.com

[通信作者] 孙莉莉, 副主任药师, 研究方向: 临床药理学, Email: sunlili3033@sina.cn

发病率逐年增加,儿童和老年人在亚洲五国均具有较高的AD发病风险,且中国居民的AD发病风险随时期的推进而加重^[3]。

消风止痒颗粒现行质量标准收载于《部颁标准》中药成方制剂第十五册,标准编号:WS3-B-2975-98,处方中包括防风、蝉蜕、地骨皮、苍术(炒)、亚麻子、当归、地黄、木通、荆芥、石膏和甘草十一味药材^[4]。消风止痒颗粒不仅对接触性荨麻疹作用明显,有缓解皮肤红肿,抑制风团之效^[5],还能改善尿毒症患者皮肤瘙痒症状^[6]。本研究旨在通过消风止痒颗粒对AD引起的急性瘙痒的缓解作用,探究其可能的作用机制,为中药在止痒方面的研究提供一定的基础和参考依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

健康C57BL/6小鼠115只,雄性,体重18-20g,SPF级,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006。饲养条件:室温20~25℃,湿度40%~70%,标准饲料,动物自由饮食和饮水。

1.2 药物与试剂

消风止痒颗粒由烟台东诚大洋制药有限公司提供,批号:Z20113054,规格:每袋装3g,临用前用纯净水配制所需浓度。卡泊三醇(aladdin,批号:C126438);卵清蛋白(OVA,SAITONC,批号:A80003);无水乙醇(aladdin,批号:E111991);小鼠白三烯C4(LTC4)ELISA试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号:JM-02678M1);红细胞裂解液(BD,Cat:555899);FITC anti-mouse FcεRIα Antibody(BioLegend, Cat:134305);PE anti-mouse IgE Antibody(BioLegend, Cat:406907);PerCP/Cyanine 5.5 anti-mouse CD49b Antibody(Bio Legend, Cat:103519);APC anti-mouse CD200R(OX2R) Antibody(BioLegend, Cat:123915)。

1.3 仪器与设备

JA2003A型电子天平(上海精天电子仪器有限公司);A51119500C型全自动酶标仪(美国Thermo科技公司);5420型高速离心机(美国Eppendorf公司);CytoFLEX型流式细胞仪(美国贝克曼公司)。

2 实验方法

2.1 小鼠特异性皮炎急性瘙痒模型建立

参照Wang等人的小鼠特异性皮炎急性瘙痒模型制备方法^[7]。8周龄的C57小鼠每天先用卡泊

三醇(0.5 nmol,溶于15 μl的100%乙醇中)涂抹右侧耳皮肤(右耳内外侧各7.5 μl),然后用卵清蛋白(OVA,5 mg/ml,溶于20 μl磷酸盐缓冲盐水PBS中)进行涂抹(右耳内外侧各10 μl),连续处理10d(从第0天到第9天)以使小鼠敏感。对照组小鼠先用15 μl乙醇处理,然后用20 μl PBS处理。在第10天,在小鼠右颊皮内(i.d.)注射OVA(2.5 mg/ml,溶于生理盐水中)20 μl进行激发。

2.2 分组给药

60只雄性C57BL/6小鼠随机分为空白对照组、模型组、消风止痒颗粒低(7.2 g/kg)和高剂量组(14.4 g/kg)、阳性对照组(孟鲁司特,5 mg/kg)5组,每组12只,适应性饲养一周后开始进行造模。消风止痒颗粒低剂量是按体表面积换算方法由人临床使用剂量(15岁以上患者1日分2-3次口服36g,按60kg体重计算即0.6 g/(kg·d))换算成小鼠剂量(7.2 g/kg),高剂量设为低剂量的2倍即14.4 g/kg。各组小鼠给药途径均为灌胃给药,各组药物均在给药前现配。消风止痒颗粒低剂量组药物加饮用水后配成1 g/ml浓度,消风止痒颗粒高剂量组药物加饮用水后配成2 g/ml浓度;阳性对照组孟鲁司特加饮用水后配成0.695 mg/ml浓度,空白对照组用饮用水灌胃,各组小鼠均按7.2 ml/kg体积灌胃给药。各组于激发前12h及激发前30min各灌胃给药一次。

2.3 观察指标

2.3.1 小鼠瘙痒行为学实验

瘙痒行为在第10天上午8点至11点之间进行的。测试前2天将右侧脸颊备皮,测试前一天即第9天将动物在测试室中适应60min。测试当天给药30min后在小鼠右颊皮内(i.d.)注射OVA(2.5 mg/ml,溶于0.9%生理盐水中)20 μl进行激发,录像60min,记数30~60min小鼠抓挠次数。抓挠的定义是前脚或后脚直接对背部、脸颊或耳朵进行连续抓挠的情况,当这种情况在鼠将前爪或后爪离开或放在嘴巴为计数1次。

2.3.2 ELISA检测小鼠血清中白三烯含量

在小鼠瘙痒行为学实验结束后,每组随机取6只小鼠进行眼眶取血,在离心管中4℃静置2h后,3000 r/min离心10min,取上清到新的离心管中备用。血清样本按ELISA试剂盒操作说明书进行实验。

2.3.3 流式细胞术检测小鼠血液中嗜碱性粒细胞

外周血淋巴细胞样本制备:每组各取3只小鼠,腹主动脉取血于抗凝管中(500 μl左右),每个

样品加入 1 ml 红细胞裂解液, 室温孵育 15 min, 1000 rpm 离心 5 min, 弃去上清, 再次加入 1 ml 红细胞裂解液, 室温孵育 15 min, 1000 rpm 离心 5 min, 弃去上清后加入 1 ml PBS 重悬离心, 得到外周血淋巴细胞。抗体孵育: 各样品管外周血淋巴细胞用 300 μ l 的 PBS 重悬, 每管加入 1 μ l 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 流式细胞仪进样检测。

2.4 统计学方法

实验数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 GraphPad Prism 软件进行统计处理, 采用单因素方差分析(ONA-way ANOVA)进行差异的显著性检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 消风止痒颗粒对小鼠急性瘙痒抓挠次数的影响

空白对照组小鼠无明显的急性抓挠行为, 模型组小鼠激发后出现明显的抓挠行为, 模型组抓挠次数均值为 56 次, 与模型组相比, 各给药组均不同程度显著减少小鼠抓挠次数($P<0.05$), 阳性对照组为 34 次、消风止痒颗粒低剂量组为 42 次、消风止痒颗粒高剂量组为 23 次, 结果见图 1。消风止痒颗粒能明显减少小鼠抓挠次数, 改善小鼠 AD 急性瘙痒症状。

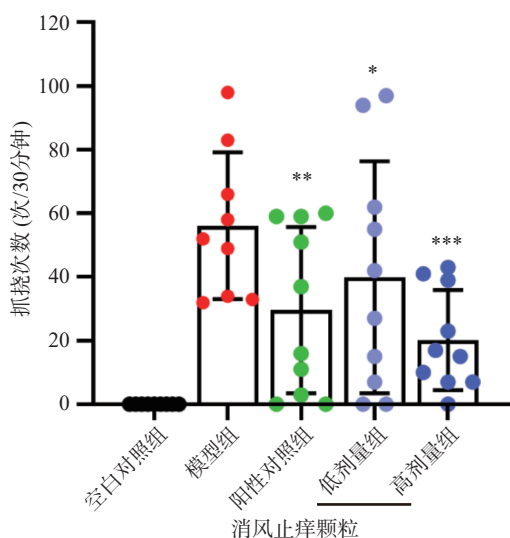


图 1 小鼠激发后 30-60 min 内的抓挠次数 ($n=10, \bar{x}\pm s$)
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 与模型组比较。

3.2 消风止痒颗粒对小鼠血清中白三烯含量的影响

与空白对照组相比, 模型组小鼠血清中白三烯含量明显升高($P<0.001$); 各给药组相较于模型组小鼠血清中白三烯含量均显著下调($P<0.05$), 结果见图 2。结果表明消风止痒颗粒能明显降低 AD 小鼠血清中白三烯水平, 降低炎症水平。

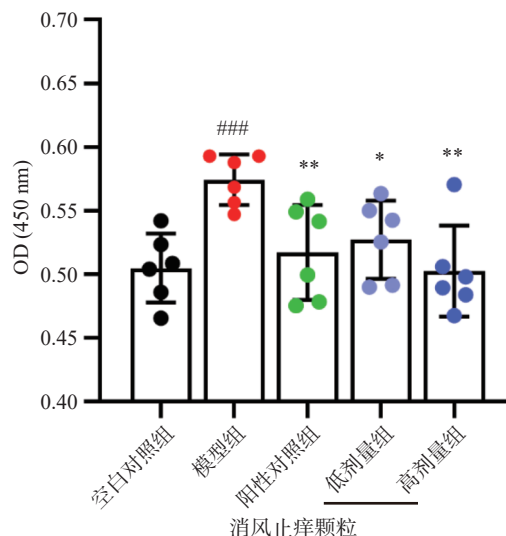


图 2 激发后小鼠血清中白三烯水平 ($n=6, \bar{x}\pm s$)
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与模型组比较; ### $P<0.001$, 与空白对照组比较。

3.3 消风止痒颗粒对小鼠血液中嗜碱性粒细胞的影响

模型组小鼠血液中 CD49b+细胞和 Fc ϵ R1a+细胞以及 CD200R 细胞的比例显著高于空白对照组 ($P<0.05$), 消风止痒颗粒高剂量组与模型组相比较, 能明显降低 CD49b+细胞和 Fc ϵ R1a+细胞以及 CD200R 细胞的比例 ($P<0.05$), 结果如图 3 和图 4 和图 5 所示。CD49b 和 Fc ϵ R1a 以及 CD200R 为嗜碱性粒细胞表面抗原^[7], 两者升高表明小鼠血液中嗜碱性粒细胞比例升高, 而消风止痒颗粒能降低由特异性皮炎引起增多的嗜碱性粒细胞, 减少炎症反应, 进而减轻瘙痒症状。

4 讨论

AD 是一种以皮肤持续瘙痒为特征的复发性、慢性、非感染性炎症性皮肤病。其发病机制是多种因素共同作用的结果, 涉及表皮屏障功能受损、免疫异常、宿主遗传因素和环境因素的相互作用。表皮的最外层, 角质层和颗粒层的紧密连接形成蛋白质和脂质屏障, 防止皮肤水分的流失、微生物病原体的入侵、以及过敏原、毒素和刺激物引起的炎症反应。AD 发生后, 皮肤屏障受损, 表皮分化蛋白 (特别是聚丝蛋白) 和紧密连接蛋白表达减少, 脂质, 特别是长链脂肪酸和神经酰胺缺乏。由于抗菌肽 (AMP) 对环境病原体 (包括金黄色葡萄球菌) 的反应不足, 使皮肤对微生物的屏障作用也被削弱^[8]。国内外报道中, 皮肤源性瘙痒动物模型是药物止痒研究实验最常使用的类型, 由于不同药物作用机制、疾病生理病理特征不同, 使用的模型也不尽相同。近年来越来越多新品系、新技术、新途径应用

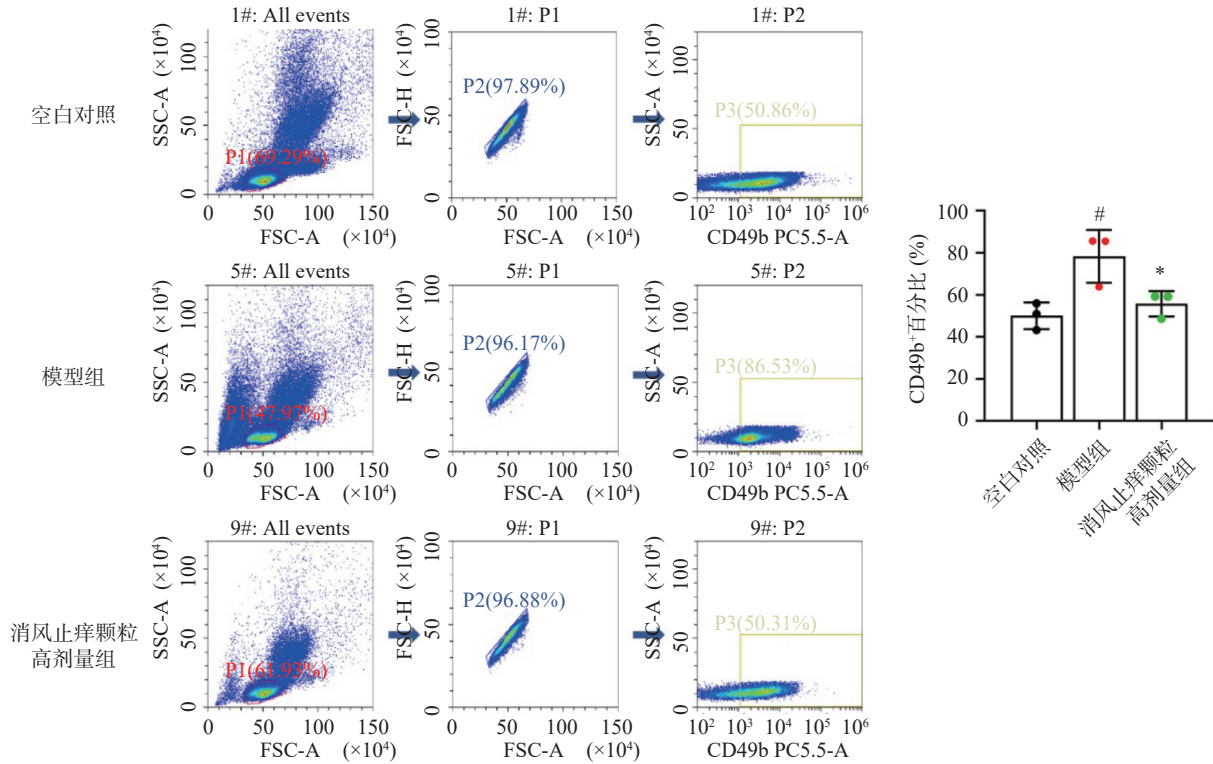


图3 CD49b+细胞的流式细胞结果 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

* P<0.05, 与模型组比较; # P<0.05, 与空白对照组比较。

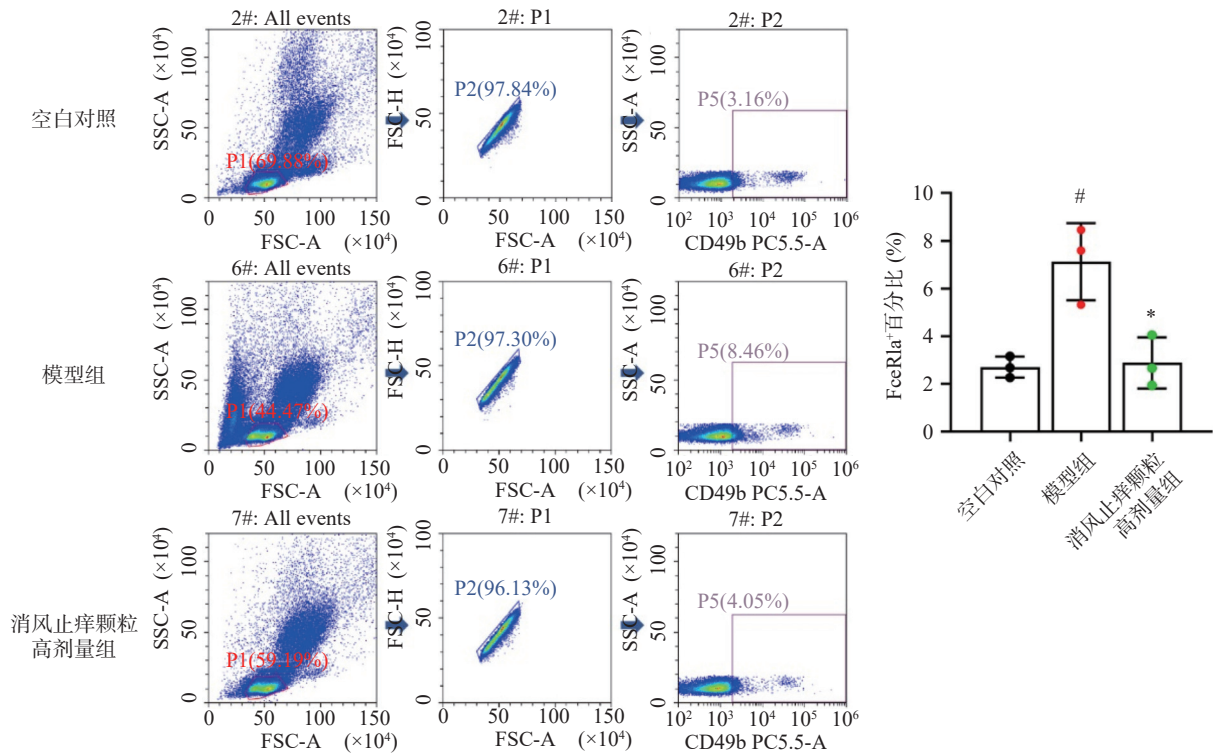


图4 FceR1a+细胞的流式细胞结果 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

* P<0.05, 与模型组比较; # P<0.05, 与空白对照组比较。

于皮肤源性急慢性瘙痒动物模型的建立, 为机制研究提供基础, 同时也出现了更加经济、造模周期短和更符合疾病生理病理特征等优势动物模型, 如同

时使用 4-氨基吡啶(4-AP)和组胺能更好地诱发动物瘙痒行为, AD 的卡泊三醇模型操作更简便, 瘙痒更明显, 并且具备更多 AD 临床特征^[9]。本研究造

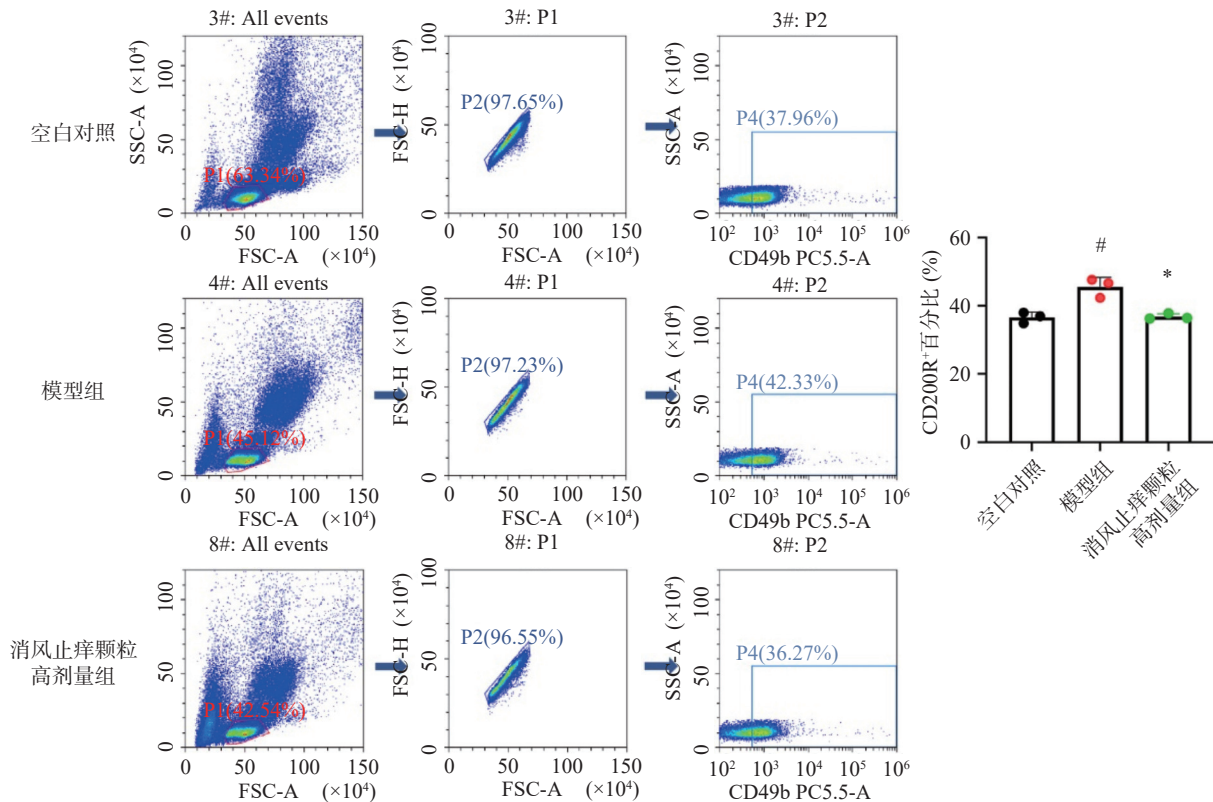


图5 CD200R⁺细胞的流式细胞结果 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

* P<0.05, 与模型组比较; # P<0.05, 与空白对照组比较。

模方法参考 Wang 等人的方法^[7], 在小鼠皮内注射 OVA 激发后的 30~60 min 内, 小鼠出现明显的抓挠行为, 说明该方法能很好的诱发小鼠瘙痒行为。通过对各组小鼠 30 min 内抓挠次数的统计, 发现消风止痒颗粒给药后能显著减少小鼠急性瘙痒后的抓挠次数, 说明口服消风止痒颗粒能减轻 AD 后急性瘙痒的症状。

尽管嗜碱性粒细胞是哺乳动物体内最不常见的粒细胞群体, 但在许多人类疾病中, 如过敏性疾病、器官排斥反应、自身免疫疾病及癌症, 都有发现其积累。例如, 嗜碱性粒细胞被认为与过敏性接触性皮炎、AD、药物过敏反应、超敏反应、哮喘、大疱性类天疱疮、狼疮肾炎、克罗恩病、皮肤和肾脏同种异体移植反应以及急性和慢性骨髓性白血病的发病机制有关^[10]。还有许多研究表明, 在急性 AD、慢性 IgE 介导的皮炎、气道炎症和嗜酸性粒细胞性食管炎疾病中, 嗜碱性粒细胞在诱导 TH2 细胞因子介导的炎症中发挥重要作用^[11, 12, 13]。本研究通过流式细胞术检测了小鼠血清中 CD49b⁺和 FcεR1a⁺细胞的比例, 发现口服消风止痒颗粒能明显减少由 AD 诱导增加的嗜碱性粒细胞, 说明消风止痒颗粒能够缓解小鼠 AD 引起的瘙痒症状的机制是通过降低小鼠血清中嗜碱性粒细胞数量。

此外, 有研究报道 AD 患者的病变皮肤或尿液中检测到多种前列腺素和白三烯, 如 PGE₂、LTB₄ 和 CysLTE₄^[14, 15], 提示前列腺素和白三烯可能参与 AD 症状的发展。在 OVA 诱导的小鼠 AD 模型中, 抓挠行为诱导中性粒细胞向皮肤浸润, 浸润的中性粒细胞产生的 LTB₄ 作用于中性粒细胞和 Th 2 细胞上表达的 BLT1, 促进其向皮肤浸润^[16]。有文献报道作为白三烯拮抗剂的孟鲁司特可治疗 AD, 我们选用了孟鲁司特作为特异性阳性对照药^[17]。本研究在分离小鼠血清后, 检测了血清中白三烯含量, 结果发现消风止痒颗粒能明显降低 AD 小鼠血清中白三烯水平, 说明消风止痒颗粒口服后改善 AD 小鼠瘙痒症状的机制可能与降低血清中白三烯水平有关。

综上所述, 本研究证实了消风止痒颗粒能够改善 AD 小鼠的急性瘙痒症状, 其机制可能是与减少小鼠血液中嗜碱性粒细胞数量及血清中白三烯水平相关。本研究为将来进一步进行消风止痒颗粒在特应性皮炎急性瘙痒方面的研究提供了深入的实验与理论依据。

【参考文献】

[1] LAUGHTER M R, MAYMONE M B C, MASHAYEKHI S, et

- al. The global burden of atopic dermatitis: lessons from the Global Burden of Disease Study 1990-2017[J]. *Br J Dermatol*, 2021, 184(2): 304-309.
- [2] TSAI T F, RAJAGOPALAN M, CHU C Y, et al. Burden of atopic dermatitis in Asia[J]. *J Dermatol*, 2019, 46(10): 825-834.
- [3] 樊文龙, 陈东宇, 王红心, 等. 亚洲 5 国居民 1990—2019 年特应性皮炎发病趋势年龄-时期-队列分析 [J]. *中国公共卫生*, 2023, 39(5): 650-655.
- [4] 庞威, 樊杰, 孙继泽, 等. 消风止痒颗粒中防风薄层鉴别优化 [J]. *人参研究*, 2022, 34(6): 29-31.
- [5] 庞博, 徐英莉, 刘晓峰, 等. 氯雷他定与消风止痒颗粒对 3 种荨麻疹动物模型的药效评价研究 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(21): 3026-3032.
- [6] 葛杰. 消风止痒颗粒、氯雷他定片内服联合血液透析治疗尿毒症皮肤瘙痒症的临床研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(6): 1497-1499.
- [7] WANG F, TRIER A M, LI F X, et al. A basophil-neuronal axis promotes itch[J]. *Cell*, 2021, 184(2): 422-440. e17.
- [8] PUAR N, CHOVIYIYA R, PALLER A S. New treatments in atopic dermatitis[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2021, 126(1): 21-31.
- [9] 邱彩雄, 李康良, 何爽, 等. 皮肤源性急性慢性瘙痒动物模型研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2022, 19(33): 45-48.
- [10] SIRACUSA M C, KIM B S, SPERGEL J M, et al. Basophils and allergic inflammation[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(4): 789-801;quiz788.
- [11] OBATA K, MUKAI K R, TSUJIMURA Y, et al. Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation[J]. *Blood*, 2007, 110(3): 913-920.
- [12] NOTI M, WOJNO E D, KIM B S, et al. Thymic stromal lymphopoietin-elicited basophil responses promote eosinophilic esophagitis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(8): 1005-1013.
- [13] POTO R, QUINTI I, MARONE G, et al. IgG autoantibodies against IgE from atopic dermatitis can induce the release of cytokines and proinflammatory mediators from basophils and mast cells[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 880412.
- [14] FOGH K, HERLIN T, KRAGBALLE K. Eicosanoids in skin of patients with atopic dermatitis: Prostaglandin E2 and leukotriene B4 are present in biologically active concentrations[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1989, 83(2): 450-455.
- [15] CAPRA V, THOMPSON M D, SALA A, et al. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends[J]. *Med Res Rev*, 2007, 27(4): 469-527.
- [16] OYOSHI M K, HE R, LI Y T, et al. Leukotriene B4-driven neutrophil recruitment to the skin is essential for allergic skin inflammation[J]. *Immunity*, 2012, 37(4): 747-758.
- [17] 孟聪聪, 王晓琴, 韩秀萍. 孟鲁司特治疗特应性皮炎研究进展 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2017, 33(12): 759-762.
- [收稿日期] 2023-06-19 [修回日期] 2023-10-26
[本文编辑] 费永和