

- 杂志,2008,33(5):560-562.
- [6] 李凡,阿曼古力,阿不力克木,等.维吾尔药槌果藤治疗硬皮病6例[J].中华皮肤科杂志,1997,30(1):51-52.
- [7] 庞才滨,严煜林,韩福海,等.系统性硬皮病皮损血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-1的检测及意义[J].中华临床医师杂志:电子版,2012,13(6):175-176.
- [8] CHOI J J, MIN D J, CHO M L, et al. Elevated vascular endothelial growth factor in systemic sclerosis [J]. J Rheumatol, 2003, 30(7): 1529-1533.
- [9] AGUILERA A, YANEZ-MO M, SEJGAS R, et al. Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2005, 6(3): 262-268.
- [10] TAKAGI K, KAWAGUCHI Y, HARA M, et al. Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features [J]. Clin Exp Immunol, 2003, 134(3): 538-544.
- [11] 宋克敏,杨蓉娅.转化生长因子- β 、内皮素-1及血管紧张素Ⅱ与硬皮病纤维化关系研究进展[J].临床皮肤科杂志,2011,40(3):184-186.
- [12] 康小龙,何承辉,田红林,等.刺山柑总生物碱乳膏外用对系统性硬皮病小鼠组织纤维化的改善作用[J].中国现代应用药学,2016,33(1):32-35.
- [13] 康小龙,何承辉,刘晶,等.刺山柑总生碱对系统性硬皮病小鼠Ⅲ型胶原表达的影响[J].中国医科大学学报,2016,45(8):688-691.
- [14] 张炜,蔡雷鸣,张燕,等.sE-选择素和sVCAM-1与糖尿病性视网膜病变的相关性研究[J].中国保健营养,2015,25(6):23-24.
- [15] ALZAWAWY A I, SULIMAN I, HAMIMI A, et al. Serum soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) in scleroderma patients and its relation to pulmonary involvement and disease activity [J]. Egypt Rheum, 2011, 33(1): 21-26.

甘草酸软膏对慢性湿疹小鼠模型 Th1/Th2 免疫机制的影响*

佘姝娅,李晋奇,陈璐

(四川省医学科学院·四川省人民医院中医科,成都 610072)

摘要 目的 研究甘草酸软膏对慢性湿疹小鼠模型的免疫学机制的影响。**方法** 小鼠随机分为空白对照组、模型对照组、基质对照组、醋酸地塞米松乳膏组、甘草酸软膏大、中、小剂量组,除空白对照组外其他组分别建立2,4-硝基氯苯反复刺激的慢性湿疹小鼠模型,给药14 d后检测血清白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-18和干扰素(IFN)- γ 含量及对外周血中T细胞亚群进行测定。**结果** 甘草酸软膏大、中剂量组能降血清IL-2、IL-5、IL-6、IL-18和IFN- γ 的含量,与模型对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);甘草酸软膏大、中剂量组能升高血清IL-4的含量,与模型对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。甘草酸软膏大、中剂量组CD₄⁺百分比和CD₄⁺/CD₈⁺明显升高,而CD₈⁺百分比明显降低,与模型对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论** 甘草酸软膏可通过调节Th1和Th2平衡,纠正免疫功能失调而达到治疗慢性湿疹的目的。

关键词 甘草酸软膏;湿疹,慢性;辅助性T细胞1;辅助性T细胞2;T细胞亚群

中图分类号 R285.5;R751

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)12-1370-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.12.009

Effects of Glycyrrhizic Acid Ointment on Th1/Th2 Immunologic Mechanism in Mice with Chronic Eczema

SHE Shuya, LI Jinqi, CHEN Lu (Department of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

ABSTRACT Objective To observe the immunological mechanism of glycyrrhizic acid ointment on chronic eczema mouse model. **Methods** Mice were randomly divided into blank control group, model control group, base material group, dexamethasone acetate cream group, glycyrrhizic acid ointment high, medium and low dose groups. Except for the blank control group, chronic eczema mouse model was established by chronic repeated 2,4-nitrochlorobenzene stimulation. The contents of IL-4, IL-18, IFN- γ in serum and the T lymphocyte subpopulation in the peripheral blood were all determined after 14 days. **Results** Glycyrrhizic acid ointment in high, medium groups could significantly reduce the contents of interleukin (IL)-2, IL-5, IL-6, IL-

18, interferon (IFN)- γ in serum, with significant differences as compared with the model control group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The content of IL-4 in serum was significantly increased in the glycyrrhizic acid ointment high, medium groups as compared with the model control group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with model control group, CD_4^+ T lymphocyte percentage and CD_4^+/CD_8^+ T in peripheral blood were significantly increased, and CD_8^+ T lymphocyte percentage decreased significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$).

Conclusion Glycyrrhizic acid ointment's effect of treating chronic eczema may be related to regulating the balance of Th1 and Th2 and correcting the immune disorders.

KEY WORDS Glycyrrhizic acid ointment; Eczema, chronic; Helper T cell 1; Helper T cell 2; T lymphocyte subpopulation

湿疹是由多种因素引起的具有明显渗出倾向性的炎症性皮肤病,其病因复杂,临床表现多样,如丘疱疹、渗液、肥厚增生等。而慢性湿疹往往呈现出皮损处浸润肥厚、结痂、脱屑及苔藓样变等,严重影响患者的身心健康。现代研究表明甘草酸具有肾上腺皮质激素样及抗炎、抗变态反应等作用。临床在复方甘草酸制剂内服治疗慢性湿疹有效的基础上,笔者将甘草酸制成软膏制剂,课题组在前期的研究中发现甘草酸软膏具有抗炎、止痒及治疗慢性湿疹的药效作用^[1]。能降低皮损处皮肤一氧化氮(nitric oxide, NO)含量,并对耳廓皮肤的病理改变有一定的改善作用^[2]。本研究采用甘草酸软膏治疗慢性湿疹小鼠模型,观察其外周血清白细胞介素(interleukin, IL)2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-18、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)含量,外周血 CD_4^+ T 淋巴细胞、 CD_8^+ T 淋巴细胞及其比值作为主要观察指标,以进一步探讨甘草酸软膏对慢性湿疹 Th1/Th2 免疫机制的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取健康昆明种白色小鼠 70 只,雌雄各半,体质量 18~22 g,购自成都中医药大学实验动物中心。实验动物生产许可证号:SCXK(川)2008-0024;实验动物质量合格证 NO:0017566,检疫后备用。实验动物均饲养于通风、恒温的实验室(国家中医药管理局认证的四川省人民医院二级中药药理实验室,编号:川药[2010]2-001)。

1.2 药物及试剂 甘草酸(成都普瑞法科技开发有限公司生产,纯度 99.1%,批号:130116,有效期至 2015 年 1 月 15 日)。白凡士林(南昌白云药业有限公司生产,批准文号:赣食药准字 F20050006,批号:20090606)。治疗药物:甘草酸软膏。白凡士林文火融

化后,将甘草酸均匀倒入,同时不断地用玻棒充分搅匀。分别制成每克含 10, 20, 40 mg 甘草酸的甘草酸小、中、大剂量软膏,装瓶备用。复方醋酸地塞米松乳膏(广州白云山制药股份有限公司生产,批准文号:国药准字 H44024374,批号:S1017)。丙酮(成都化学试剂厂生产,批号:040408)。2,4-硝基氯苯(DNCB,成都科龙化工试剂厂生产,批号:20091013)。小鼠 IL-2 ELISA 试剂盒(批号:201302)、小鼠 IL-4 ELISA 试剂盒(批号:201302)、小鼠 IL-5 ELISA 试剂盒(批号:201302)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(批号:201302)、小鼠 IL-18 ELISA 试剂盒(批号:201302)、小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒(批号:201302)均为美国 R&D 公司产品。FITC anti-Mouse CD_3e (批号:2293688),PE anti-Mouse CD_4 (批号:2216831)及 PER CP-CY5.5 anti-Mouse CD_8A (批号:00058-1631),小鼠抗 TIM4 多克隆抗体均为美国 BD 公司产品。

1.3 主要仪器 Tecan spectra III 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 B-D 公司)。

1.4 对小鼠慢性湿疹模型血清 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-18、IFN- γ 的影响

1.4.1 小鼠慢性湿疹模型造模与用药 造模方法参照文献[3-4],70 只小鼠,雌雄各半,随机分为空白对照组、模型对照组、基质对照组、醋酸地塞米松乳膏组、甘草酸软膏大、中、小剂量组,每组 10 只。每只小鼠腹部剃毛 2 cm \times 2 cm 大小,除空白对照组外,其他各组均以 5% DNCB 丙酮溶液 25 μ L 外涂致敏。2 周后,外涂 0.1% DNCB 丙酮溶液 100 μ L 于小鼠右耳内侧处激发,每周激发 1 次,连续 4 周。在第 4 次激发后 72 h,除空白对照组、模型对照组外,各组分别用凡士林、醋酸地塞米松乳膏,甘草酸大、中、小剂量软膏,均匀涂抹于小鼠两耳壳两面,2.5 g \cdot kg⁻¹,每天 1 次,连续 14 d。

1.4.2 小鼠血清 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-18、IFN- γ 的测定 给药 14 d 后,小鼠摘眼球取血,室温下静置 30 min,再以 3 000 r \cdot min⁻¹($r=62$ mm),离心 10 min,收集血清,根据 ELISA 试剂盒说明书步骤,测量小鼠血清 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-18、IFN- γ 的含量。

1.5 对小鼠慢性湿疹模型外周血 T 细胞亚群的影

收稿日期 2016-10-19 修回日期 2016-11-23

基金项目 * 四川省科技厅支撑计划项目(2013SZ0137)

作者简介 余姝娅(1980-),女,四川绵阳人,主治医师,硕士,从事中医儿科(皮肤及肾病方向)工作。电话:028-87394912, E-mail:sharonssy554@126.com。

通信作者 李晋奇(1979-),男,山西大同人,副研究员,硕士生导师,博士,从事中药新药研发。电话:028-87393362, E-mail:lijinqi2002@126.com。

响 动物分组及造模方法同“1.4.1”,给药 14 d 后,小鼠摘眼球取血,EP 试管中加入肝素抗凝。以 $2\,500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ($r=62\text{ mm}$),离心 5 min,弃上层清,收集红细胞,根据文献方法加入磷酸盐缓冲液(PBS)进行洗涤、离心后分别装入 EP 管中^[5]。分别加入抗小鼠 CD3e、CD₄及 CD₈A 单克隆抗体,充分混匀,反应 45 min 后上流式细胞仪检测分析。

1.6 统计学方法 数据采用 SPSS17.0 版统计软件处理分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 5 组小鼠血清 Th1 和 Th2 细胞因子含量的比较

治疗 14 d 后,醋酸地塞米松乳膏组、甘草酸软膏大、中剂量组血清 IL-4 含量较模型对照组升高,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);醋酸地塞米松乳膏组、甘草酸软膏大、中剂量组血清 IL-2、IL-6 含量较模型对照组降低,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);醋酸地塞米松乳膏组和甘草酸软膏大剂量组血清 IL-5、IL-18 和 IFN- γ 含量较模型对照组降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 1、2。

表 1 7 组小鼠血清 Th1 细胞因子含量的比较

Tab.1 Comparison of the serum level of Th1 cytokines among seven groups of mice $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}, \bar{x} \pm s, n=10$

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	IL-2	IL-18	IFN- γ
空白对照组	—	223.79±8.26	112.82±5.85	130.34±3.29
模型对照组	—	418.44±18.39	142.94±7.13	217.40±7.14
基质对照组	—	413.17±7.32	141.15±3.72	210.78±7.75
醋酸地塞米松乳膏组	1.875	325.52±8.33 ^{*1}	125.31±6.04 ^{*1}	143.48±4.37 ^{*1}
甘草酸软膏大剂量组	100	342.48±15.93 ^{*1}	126.86±3.66 ^{*1}	148.62±10.29 ^{*1}
中剂量组	50	376.14±7.34 ^{*2}	133.46±6.51	207.08±11.21
小剂量组	25	407.75±8.68	140.32±4.47	214.53±6.03
<i>F</i>		257.464	27.597	180.424
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000

与模型对照组比较, ^{*1} $P<0.01$, ^{*2} $P<0.05$

Compared with model control group, ^{*1} $P<0.01$, ^{*2} $P<0.05$

2.2 5 组小鼠外周血 T 细胞亚群的比较 治疗 14 d 后,与模型对照组比较,醋酸地塞米松乳膏组、甘草酸软膏大、中剂量组 CD₄⁺/CD₈⁺ 明显升高,而 CD₈⁺ 明显降低,两组差异均有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);而醋酸地塞米松乳膏组和甘草酸软膏大剂量组 CD₄⁺ 较模

型对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 3。

表 2 7 组小鼠血清 Th2 细胞因子含量的比较

Tab.2 Comparison of the serum level of Th2 cytokines among seven groups of mice $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}, \bar{x} \pm s, n=10$

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	IL-4	IL-5	IL-6
空白对照组	—	153.49±5.33	73.65±2.60	48.25±1.58
模型对照组	—	86.01±4.47	109.00±5.12	92.26±2.41
基质对照组	—	87.75±2.76	105.79±4.71	89.70±1.57
醋酸地塞米松乳膏组	1.875	127.21±3.60 ^{*1}	86.21±2.59 ^{*1}	57.92±2.87 ^{*1}
甘草酸软膏大剂量组	100	116.90±4.07 ^{*1}	92.70±2.06 ^{*1}	65.26±2.88 ^{*1}
中剂量组	50	94.94±4.18 ^{*2}	102.28±5.16	85.09±3.94 ^{*2}
小剂量组	25	89.53±2.29	104.04±4.73	87.94±1.58
<i>F</i>		295.760	69.182	339.480
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000

与模型对照组比较, ^{*1} $P<0.01$, ^{*2} $P<0.05$

Compared with model control group, ^{*1} $P<0.01$, ^{*2} $P<0.05$

表 3 7 组小鼠外周血 T 细胞亚群的比较

Tab.3 Comparison of T lymphocyte subpopulation in peripheral blood among seven groups of mice $\bar{x} \pm s, n=10$

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	CD ₄ ⁺ %	CD ₈ ⁺ %	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺
空白对照组	—	49.65±2.07	16.71±0.79	2.98±0.17
模型对照组	—	33.51±1.76	32.16±1.02	1.04±0.04
基质对照组	—	34.81±1.42	31.81±0.72	1.10±0.07
醋酸地塞米松乳膏组	1.875	45.45±2.08 ^{*1}	21.71±1.13 ^{*1}	2.09±0.06 ^{*1}
甘草酸软膏大剂量组	100	44.80±1.20 ^{*1}	21.65±0.94 ^{*1}	2.07±0.11 ^{*1}
中剂量组	50	35.84±0.75	29.75±1.19 ^{*2}	1.21±0.05 ^{*1}
小剂量组	25	34.69±0.76	31.66±0.65	1.10±0.04
<i>F</i>		130.332	316.731	500.908
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000

与模型对照组比较, ^{*1} $P<0.01$, ^{*2} $P<0.05$

Compared with model control group, ^{*1} $P<0.01$, ^{*2} $P<0.05$

3 讨论

甘草在临床上的使用迄今为止已有两千多年的历史。传统医学认为甘草具有补脾益气、祛痰止咳、缓急止痛、清热解毒、调和诸药等作用。现代药理研究发现,甘草酸作为甘草最主要的活性物质,其具有抗炎、调节免疫、抗病毒、抗肿瘤、抗纤维化等作用,其中抑制免疫和抗炎症反应是最主要的作用^[6-7]。

慢性湿疹是Ⅳ型变态反应,最主要是由于 Th1/Th2 出现失衡而导致。Th1 与细胞免疫及迟发型超敏性炎症形成有关,而 Th2 可辅助 B 细胞分化为抗体分泌细胞,与体液免疫相关。由产生 IL-2、IL-18、和 IFN- γ 等细胞因子的 CD $_4^+$ T 细胞(Th1)以及产生 IL-4、IL-5 和 IL-6 等细胞因子的 CD $_4^+$ T 细胞(Th2)控制着该反应的严重程度和持续时间。作为 Th1 细胞分泌的 IFN- γ 和 Th2 细胞分泌的 IL-4 是一对相互抑制的细胞因子,两者是反映 Th1、Th2 细胞免疫应答参与程度的重要指标。IFN- γ 可促进 Th1 细胞的成熟,抑制 Th2 细胞的增殖^[8]。而 IL-4 能促进 Th2 细胞扩增,同时抑制 Th1 细胞增殖并下调 Th1 细胞介导的免疫应答^[9-10]。二者的相互拮抗,维持了 Th1/Th2 的平衡。IL-18 是一种强有力的前炎症递质,可以激活 Th1 反应,在各种过敏性疾病、自身免疫性疾病中起免疫调节作用^[11]。另外 IL-18 也可诱导 T 淋巴细胞生成 IFN- γ , 从而影响慢性湿疹的发病过程。研究发现,慢性湿疹患者的皮损和血清中的 IL-18 水平与湿疹的严重程度、持续时间及病变范围有一定关系^[12]。IL-5、IL-6 具有拮抗 Th1 类细胞因子的作用,可以有效抑制炎症性细胞因子和化学因子前体的产生,同时增强其自然拮抗物的表达,从而进一步抑制了免疫排斥反应的发生。

迟发性超敏反应是 T 淋巴细胞介导的主要细胞免疫现象。当Ⅳ型迟发型变态反应发生时,T 细胞受到抗原刺激后转化为致敏的淋巴细胞,产生临床症状。CD $_4^+$ 和 CD $_8^+$ 的比值上升,提示免疫应答的正向调节优势,而比值下降,提示免疫功能低下。慢性湿疹患者免疫异常是其发病的关键环节^[13]。有研究表明,湿疹患者外周血 CD $_4^+$ 减少,而 CD $_8^+$ 增加,从而导致 CD $_4^+$ /CD $_8^+$ 比值下降,说明湿疹患者外周血 T 细胞亚群出现紊乱^[14]。

慢性湿疹是Ⅳ型变态反应,笔者在前期研究中发现甘草酸软膏对慢性湿疹的疗效明确,为进一步探究其疗效产生的免疫学机制。笔者选择了 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-18、IFN- γ 、T 细胞亚群中 CD $_4^+$ 、CD $_8^+$ 和 CD $_4^+$ /CD $_8^+$ 来判断甘草酸软膏对机体免疫系统的影响。结果显示,甘草酸软膏大、中剂量组能降低血清 IL-2 和 IL-6 的含量;甘草酸软膏大剂量组能降低血清 IL-5、IL-18 和 IFN- γ 的含量;甘草酸软膏大、中剂量组能升高血清 IL-4 的含量。甘草酸软膏大、中剂量组 T 细胞亚群 CD $_4^+$ /CD $_8^+$ 明显升高,而 CD $_8^+$ 明显降低;仅甘草酸软膏大剂量组 T 细胞亚群 CD $_4^+$ 升高。T 细胞中的 IL-5、IL-6 会表现为异常升高,而其他细胞因子经治疗后含量降低,说明 Th1 细胞因子在慢性湿疹中具有相对较高的

含量,而 Th2 细胞因子是处于相关缺乏状态。而甘草酸软膏可能是通过逆转外周 Th1 和 Th2 细胞因子的表达异常,纠正了 CD $_4^+$ T 淋巴细胞相对减少,CD $_8^+$ T 淋巴细胞百分比相对增多,从而恢复 Th1/Th2 平衡状态而起到治疗慢性湿疹的作用。

参考文献

- [1] 李晋奇,余姝娅,王勤.甘草酸软膏治疗豚鼠慢性湿疹模型的实验研究[J].中华皮肤科杂志,2012,45(8):595-596.
- [2] 李晋奇,童荣生,余姝娅,等.甘草酸软膏对慢性湿疹豚鼠皮肤 NO 和病理形态学改变的影响[J].中医药学报,2015,43(6):28-29.
- [3] BOYERA N,CAVEY D,BOUCLIER M,et al.Repeated application of dinitrochlorobenzene to the ears of sensitized guinea pigs: a preliminary characterization of a potential new animal model for contact eczema in humans[J].Skin Pharmacol,1992,5(3):184-188.
- [4] 李春光,王月飞,赵红晔,等.化湿汤结合润肤止痒膏对湿疹小鼠细胞免疫功能的影响[J].中国药物警戒,2015,12(3):137-139.
- [5] 刘蓉,武志强,何敏,等.桂枝挥发油与桂皮醛对病毒性肺炎小鼠细胞因子及 T 细胞亚群的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(18):140-141.
- [6] 王兵,王亚新,赵红燕,等.甘草的主要成分及其药理作用的研究进展[J].吉林医药学院学报,2013,34(3):215-217.
- [7] 刘金城,潘旭旺,蒋小琴.甘草酸类固醇样药理作用及机制研究进展[J].中国药业,2010,19(9):86-87.
- [8] 肖常青,邓景航,罗育武,等.白芍总苷胶囊治疗慢性湿疹的疗效观察及对外周血 IFN- γ 、IL-4 水平的影响[J].中医药导报,2015,21(13):64-65.
- [9] 李瑞奇,白明,缪君娴,等.蛤壳油糊外用对小鼠湿疹模型及豚鼠瘙痒模型的影响[J].中华中医药杂志,2013,28(6):1699-1701.
- [10] 苗明三.对细胞凋亡研究的认识——疾病与细胞凋亡[J].河南中医学院学报,2003,18(3):27-31.
- [11] 宋萍,郑成云.白细胞介素-2 协同白细胞介素 18 活化自然杀伤细胞活性的作用[J].西安交通大学学报(医学版),2006,27(3):227-229.
- [12] 胡文学.慢性湿疹患者皮损 IL-18 的表达及意义[J].中华皮肤科杂志,2009,42(2):129-131.
- [13] 赵宏伟.清热除湿汤治疗湿热浸淫型湿疹疗效观察及对血清 T 细胞亚群的影响[J].中国中西医结合皮肤性病杂志,2015,14(1):43-44.
- [14] 周建华,高顺强,林元珠.慢性湿疹皮损中 SP 和 VIP 表达及与 CD $_4^+$ 和 CD $_8^+$ T 细胞的关系[J].中国麻风皮肤病杂志,2007,23(9):769-772.