

· 药理 ·

芦竹碱对2,4-二硝基氯苯诱导的特应性皮炎小鼠模型的机制

蒋淼, 王家葵*, 吴纯洁*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用
重点实验室, 省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] 目的:探讨芦竹碱对2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱导的特应性皮炎(AD)小鼠模型的药效及其潜在作用机制。方法:分别设立正常组,模型组,地塞米松组($0.05\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),芦竹碱高、低剂量($0.12, 0.06\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,除正常组外,其余各组均用DNCB刺激。在DNCB刺激后的13 d各组给予相应药物,治疗后观察皮损变化,测量各组皮肤厚度、水分含量,皮肤经皮水分丢失(TWEL);苏木素-伊红(HE)染色观察皮损组织病理形态学改变,流式细胞术分析药物对脾脏 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 比值的影响,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中免疫球蛋白E(IgE),白细胞介素(IL)-4, IL-6水平的变化;微板法检测血清中肝肾功能相关指标丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),血尿素氮(BUN),血清肌酐(CRE)的变化;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测皮损中炎症因子 γ -干扰素($\text{IFN-}\gamma$), IL-13, IL-17, IL- 1β , IL-6和肿瘤坏死因子- α ($\text{TNF-}\alpha$)的mRNA表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测皮损中核转录因子- κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$)和 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 抑制蛋白 α ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$)的表达。结果:与正常组比较,模型组皮损出现水肿、红斑、结痂伴有搔抓,皮损组织可见淋巴细胞、中性粒细胞浸润,皮损厚度增加,皮肤水分含量降低,经皮水分丢失显著升高($P<0.01$),脾脏指数和脾脏 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T淋巴细胞的比值明显升高($P<0.05$),皮损组织中 $\text{IFN-}\gamma$, IL-13, IL-17, IL- 1β , IL-6和 $\text{TNF-}\alpha$ 的mRNA表达明显升高($P<0.05$),血清中IgE, IL-4, IL-6含量明显升高($P<0.05$),皮损组织中 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 和 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,地塞米松组和芦竹碱各剂量组皮损红斑、鳞屑及痂均有不同程度的减轻,炎症细胞浸润明显减少,抑制皮肤增厚,升高皮肤水分含量,降低经皮水分丢失,降低脾脏指数和脾脏 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T淋巴细胞的比值,降低皮损中炎症因子的mRNA表达,降低血清中IgE及炎症因子含量,降低皮损中 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 和 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 蛋白表达,尤其以地塞米松组和芦竹碱高剂量组最为明显($P<0.05, P<0.01$)。结论:芦竹碱能够通过 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路抑制相关炎症因子的表达以及调节AD小鼠免疫功能发挥治疗作用,是治疗AD的潜在药物。

[关键词] 芦竹碱; 2,4-二硝基氯苯; 小鼠模型; 特应性皮炎; 免疫调节; 炎症因子

[中图分类号] R2-0; R285; R33; R246.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0019-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220439

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211215.1318.003.html>

[网络出版日期] 2021-12-16 13:59

Ameliorative Effect of Gramine on 2,4-Dinitrochlorobenzene-Induced Atopic Dermatitis in Mice

JIANG Miao, WANG Jia-kui*, WU Chun-jie*

(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine,
Key Laboratory of Standardization for Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education,
National Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research,
Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the pharmacodynamic effect of gramine on 2,4-dinitrochlorobenzene

[收稿日期] 20210812(016)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81903812)

[第一作者] 蒋淼,在读博士,讲师,从事中药基础理论及应用研究, E-mail: jiangmiaocc@163.com

[通信作者] *王家葵,博士,教授,从事本草文献考证及药理学方面的研究, E-mail: wjkms@163.com;

*吴纯洁,教授,博士生导师,从事中药炮制与制剂方面的研究, E-mail: wucjcdtem@163.com

(DNCB)-induced atopic dermatitis (AD) in mice and its potential mechanism. **Method:** The mice were divided into the normal control group, model group, dexamethasone ($0.05 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and high- and low-dose ($0.12, 0.06 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) gramine groups. Mice in all groups except for the normal control group were stimulated with DNCB, followed by medication 13 d later. The changes in skin lesions were then observed, and the skin thickness, moisture content, and transepidermal water loss (TWEL) in each group were measured. The pathological changes in skin lesions were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the effects of drugs on $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T-cell ratio in the spleen were detected by flow cytometry. The levels of immunoglobulin E (IgE), interleukin (IL)-4, and IL-6 in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the changes in serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), and creatinine (CRE) by microplate method. The mRNA expression levels of inflammatory cytokines γ -interferon (IFN- γ), IL-13, IL-17, IL-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in skin lesions were assayed by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein expression levels of nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) and NF- κ B inhibitory protein α (I κ B α) in skin lesions by Western blot. **Result:** Compared with the normal control group, the model group showed skin edema, erythema, scab, scratch, and lymphocyte and neutrophil infiltration, decreased skin moisture content, as well as increased skin thickness, TWEL ($P<0.01$), spleen index, $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T-cell ratio in the spleen ($P<0.05$), mRNA expression of IFN- γ , IL-13, IL-17, IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the skin lesions ($P<0.05$), serum contents of IgE, IL-4, and IL-6 ($P<0.05$), and protein expression of I κ B α and NF- κ B in skin lesions ($P<0.05$). Compared with the model group, dexamethasone and gramine at different doses alleviated skin erythema, scale, scab, and inflammatory cell infiltration, elevated skin moisture content, inhibited skin thickening and TWEL, and decreased spleen index, $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T-cell ratio in the spleen, mRNA expression of inflammatory factors in the skin lesions, serum contents of IgE and inflammatory factors, and protein expression of I κ B α and NF- κ B in skin lesions, especially in the dexamethasone group and the high-dose gramine group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Gramine can inhibit the expression of related inflammatory factors and regulate the immune function of AD mice via the I κ B α /NF- κ B pathway, enabling it become a potential drug for treating AD.

[Keywords] gramine; 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB); mouse model; atopic dermatitis (AD); immunoregulation; inflammatory factors

特应性皮炎(AD)是一种以复发性、瘙痒性、炎症性为特点的具有遗传倾向的皮肤病。全球约有15%~30%的儿童和2%~10%的成人患有AD,患病后生活质量显著下降^[1-2]。该病具有反复性并伴有剧烈瘙痒,给患者的生活及身心健康带来了极大的困扰,其发病机制尚不明确,主要与遗传、免疫异常、皮肤屏障功能障碍有关^[3-4]。目前,避免过敏原刺激、保护皮肤屏障功能、外用皮质类固醇、钙调神经磷酸酶抑制剂、紫外线治疗和抗炎治疗是AD的主要临床治疗方法。然而,这些疗法存在高昂的医疗费用投入,严重的副作用和药物耐受性等弊端。因此,寻找新的药物和治疗手段显得尤为必要。

芦竹根具有清热泻火,止呕生津之效,用于热病烦渴,呕吐,高热不退,小便不利等^[5-6]。其主要化学成分为多种吡啶类生物碱,具有降压解痉作用,能拮抗组织胺,5-羟色胺、乙酰胆碱引起的痉挛等药

理作用^[7-8]。生物碱中的主要成分芦竹碱,化学名为 N,N -二甲基-3-甲基吡啶,是一种已知的天然产物并被广泛应用于医药,芦竹碱及其衍生物在抗肿瘤方面有较好的作用^[9]。

本研究以芦竹碱为研究对象,以2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱导的AD小鼠为动物模型,给予不同浓度的芦竹碱进行治疗,采用苏木素-伊红(HE)染色、流式细胞术,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),酶联免疫吸附测定法(ELISA),蛋白免疫印迹法(Western blot)等技术探讨药物对免疫、炎症因子及信号通路的影响,最后评价芦竹碱在本实验剂量下对肝肾功能的影响。阐释芦竹碱治疗AD的科学内涵,为进一步研究提供基础。

1 材料

1.1 动物 6~8周龄雌性BALB/c小鼠60只,体重18~25 g,购于成都达硕实验动物有限公司,合格

证号 SCXK(川)2020-030。SPF级条件饲养,正常给予食物和水,饲养温度 18~22 °C,湿度 50%~60%。本实验涉及的动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准后进行,批号 CDU2019S121。

1.2 药物与试剂 芦竹碱由上海源叶生物科技有限公司提供,批号 M17J10S77626,溶液配置方法:准确称量芦竹碱 5, 10 mg 分别溶解于 1 mL 蒸馏水中,配制 5 g·L⁻¹的芦竹碱水溶液作为低剂量组溶液灌胃,配制 10 g·L⁻¹的芦竹碱水溶液作为高剂量组溶液灌胃。DNCB(西格玛奥德里奇中国公司,批号 STBG7838);cDNA 合成试剂盒,Real-time PCR 试剂盒(武汉莫纳生物科技有限公司,批号分别为 140503,120447);小鼠免疫球蛋白(Ig)E,白细胞介素(IL)-4,IL-6 ELISA 试剂盒(上海联科生物技术股份有限公司,批号分别为 A27581234,A204490554,A20681154);一抗 IκBα(杭州华安生物技术有限公司,批号 HM0415);一抗 NF-κB(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 16);抗体甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉三鹰生物科技有限公司,批号 10008047);TRIzol 试剂[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号 B511311-0100];苏木素,伊红染色液(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 C0107,C0109);丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),血尿素氮(BUN),血清肌酐(CRE)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 260734,260742,260731,260521)。

1.3 仪器 MPA10 型皮肤测定仪(德国 CK 公司);MJ mini 型 PCR 扩增仪,iMark 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);Light Cycler 480 型 Real-time PCR 仪(美国 Roche 公司);CM1950 型冰冻切片机,SP8 型激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司);Tanon 5200 Multi 型全自动化学发光系统(中国天能科技有限公司);OSE-Y30 型电动组织研磨器[天根生化科技(北京)有限公司]。

2 方法

2.1 DNCB 诱导小鼠 AD 模型、分组及给药 小鼠适应性喂养 1 周后随机分为 5 组,每组 12 只,分别为正常组,模型组,地塞米松组(0.05 g·kg⁻¹),芦竹碱高、低剂量组(0.06,0.12 g·kg⁻¹)^[10]。小鼠于实验 0 d 背部脱毛处理,实验第 1 周和第 2 周给予每周 2 次的 1%DNCB(100 μL)刺激,实验第 3 周和第 4 周给予每周 2 次的 0.5%DNCB(100 μL)刺激,前期高剂量的 DNCB 刺激后小鼠背部皮肤出现水肿、红斑、结痂伴有搔抓,后期 0.5%DNCB 刺激后出现暗红斑及

鳞屑,表明小鼠造模成功^[11-12]。同时于实验第 3 周至实验结束期间给予药物干预,每天取相应药物灌胃 1 次,实验结束后摘眼球取血、并摘取脾脏、皮损用于后续检测。

2.2 皮肤厚度测量 第 29 天实验结束时采用游标卡尺测量每只小鼠皮肤厚度(mm),测量时在背部造模区域选取不同位置,测量 5 次并计算平均值。

2.3 皮肤水分测定及经皮水分丢失(TWEL)测定 使用药物干预终止后,对各组小鼠背部皮损区皮肤进行水分和经皮水分丢失测定,在室温(20~25) °C,空气相对湿度 50%~60%的条件下进行测定,测定前 1 h 将小鼠放置于检测环境中安静适应。每组每只小鼠选取不同位置测量 3 次,取平均值。

2.4 苏木素-伊红(HE)染色观察病理形态改变 取各组小鼠皮损组织,置于中性甲醛中固定 24 h。乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,HE 染色,中性树胶封片,光镜下观察。制好的切片标本在镜下观察皮损组织病理形态学改变。

2.5 脾脏指数 称量小鼠体质量与脾脏质量,按照公式计算小鼠脾脏指数,脾脏指数=[脾脏质量(mg)/体质量(g)]×10。

2.6 流式细胞术检测脾脏 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值 小鼠脾脏称质量后浸泡在磷酸盐缓冲液(PBS)中,用注射器活塞充分研磨后过滤制备单细胞悬液,室温,1 000×g 离心 10 min 后弃上清,红细胞裂解工作液重悬细胞,冰上孵育裂红,室温,1 000×g 离心 10 min,孵育一抗,上机检测脾脏 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值。

2.7 ELISA 检测小鼠血清 IgE,IL-4,IL-6 含量 取出冻存的小鼠血清,严格按照 IgE,IL-4,IL-6 试剂盒说明书操作,显色终止立即在酶标仪上测定吸光度 A,制作标准曲线,按曲线换算 IgE,IL-4,IL-6 浓度。

2.8 Real-time PCR 检测小鼠皮损炎症因子 收集各组小鼠组织,采用 TRIzol 法提取皮损总 RNA,根据 Roche 公司试剂盒进行逆转录合成双链 cDNA。再以 cDNA 为模版,Real-time PCR 实时检测荧光强度。的 PCR 反应体系包括 2×PCR buffer 10 μL,ddH₂O 6 μL,cDNA 2 μL,引物各 1 μL。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,40 个循环;溶解曲线 95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 1 min,95 °C 退火 1 s;50 °C 冷却 30 s,按照相对定量方法分析,以 GAPDH 为内参,用 2^{-ΔΔC_t}法表示 mRNA 的相对表达量。引物全部由北京擎科生物科技有限公司合成,序列见表 1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 TCACTGCCACCCAGAAGACTG	153
	下游 GCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG	
IFN- γ	上游 GAGCCTAGAGACTATCACACCG	147
	下游 TACCAGAGGGTGTAGTTAGCGG	
IL-13	上游 AACGGCAGCATGGTATGGAGTG	104
	下游 TGGGTCTGTAGATGGCATTGC	
IL-17	上游 CAGACTACCTCAACCGTTCAC	130
	下游 TCCAGCTTCCCTCCGCATTGA	
IL-1 β	上游 TGGACCTTCCAGGATGAGGACA	148
	下游 GTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG	
IL-6	上游 TACCACTTCAAGTCGGAGGC	116
	下游 CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTC	
TNF- α	上游 GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT	139
	下游 GCCATAGAAGTATGATGAGAGGGAG	

2.9 Western blot检测小鼠背部皮损组织 I κ B α , NF- κ B蛋白表达 取小鼠背部皮损充分剪碎后用研磨器研磨后提取总蛋白,BCA法测蛋白浓度,SDS-PAGE电泳分离(80 V, 30 min; 120 V, 60 min),湿转法转到PVDF膜(100 V, 90 min),5%脱脂牛奶封闭

1 h, I κ B α (1:1 000), NF- κ B(1:1 000)及 GAPDH(1:5 000)一抗4℃孵育过夜,次日TBST洗4次,每次10 min,二抗(1:5 000)室温孵育1 h. TBST洗4次,每次10 min,加入现配发光液于曝光仪上曝光。利用Image J软件对条带进行灰度分析。

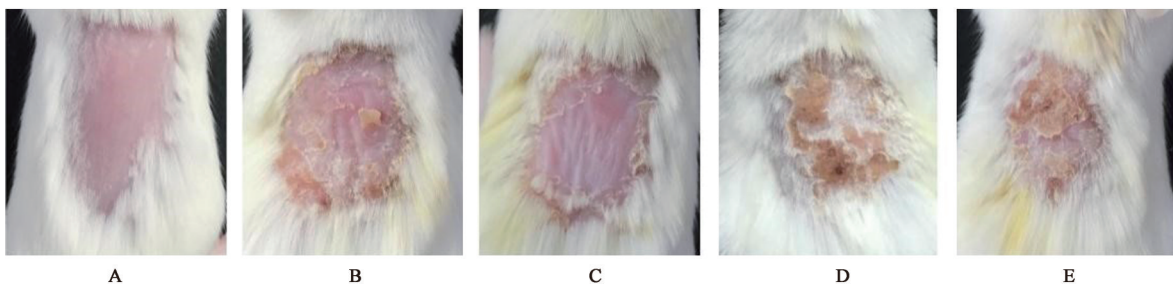
2.10 微板法检测小鼠血清中 ALT, AST, BUN, CRE含量 取出冻存的小鼠血清,严格按照ALT, AST, BUN, CRE试剂盒说明书操作,显色终止立即在酶标仪上测定A,制作标准曲线,按曲线换算样品中ALT, AST, BUN, CRE浓度。

2.11 统计学分析 数据采用SPSS 13.0软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数比较采用One-way ANOVA分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对DNCB诱导的小鼠模型的影响

3.1.1 对小鼠皮损症状的影响 连续观察29 d,正常组背部皮肤无明显变化,模型组前期经1%DNCB刺激后出现水肿、红斑、结痂伴有搔抓,后期0.5%DNCB刺激后出现暗红斑及鳞屑。地塞米松组治疗后红斑明显消退,鳞屑及痂明显减少;芦竹碱高、低剂量组治疗后红斑、鳞屑及痂均有不同程度的减轻,以高剂量组疗效最佳。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 地塞米松组;D. 芦竹碱低剂量组;E. 芦竹碱高剂量组(图2~4同)

图1 芦竹碱对DNCB诱导的AD小鼠中皮损的影响

Fig. 1 Effect of gramine on skin lesions in AD mice induced by DNCB

3.1.2 对小鼠皮肤组织形态学的影响 正常组小鼠背部皮肤组织厚度正常,各层次清晰,未见明显炎症细胞浸润。模型组皮肤组织表皮浆痂形成,轻度增生,海绵水肿,并见淋巴细胞、中性粒细胞,真皮

内淋巴细胞浸润明显。与模型组比较,地塞米松及芦竹碱干预后各组皮肤组织厚度均降低,炎症细胞浸润明显减少,地塞米松和芦竹碱高剂量组最为明显。见图2。

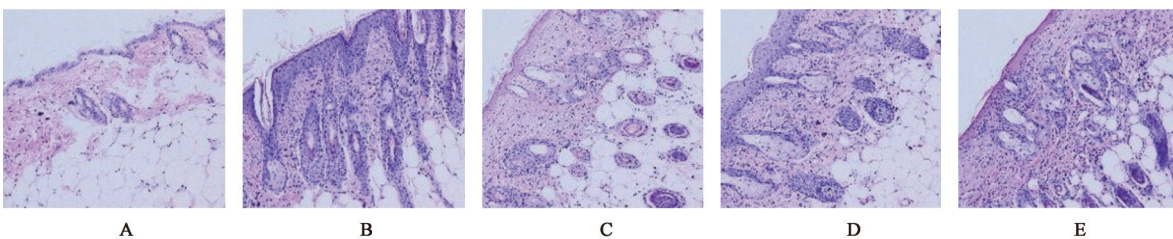


图2 芦竹碱对小鼠背部皮肤组织形态学的影响(HE, $\times 20$)

Fig. 2 Effect of gramine on histomorphology of mouse dorsal skin (HE, $\times 20$)

3.1.3 对小鼠皮损厚度、皮肤水分含量、经皮水分丢失的影响 与正常组比较,模型组小鼠皮肤厚度显著增加,皮肤水分含量显著减少,经皮水分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松组小鼠皮肤

厚度及经皮水分丢失显著减少,皮肤水分显著升高($P<0.01$),芦竹碱高剂量组皮肤厚度显著降低($P<0.01$),高、低剂量皮肤水分含量显著增加($P<0.01$),经皮水分丢失明显减少($P<0.05$)。见表2。

表2 芦竹碱对小鼠皮损厚度、皮肤水分含量、经皮水分丢失的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Effect of gramine on skin thickness, skin hydration and transepidermal water loss ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	皮肤厚度/mm	皮肤水分/%	经皮水分丢失/g·hm ⁻²
正常		0.49±0.05	91.70±1.47	10.90±1.02
模型		0.99±0.07 ²⁾	49.50±3.59 ²⁾	44.77±1.10 ²⁾
地塞米松	0.05	0.58±0.07 ⁴⁾	69.95±3.16 ⁴⁾	27.85±3.69 ⁴⁾
芦竹碱	0.06	0.85±0.05	66.67±2.83 ⁴⁾	36.53±1.18 ³⁾
	0.12	0.79±0.09 ³⁾	65.40±2.19 ⁴⁾	36.27±0.67 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3~7同)。

3.2 对小鼠脾脏指数和脾脏CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值的影响 与正常组比较,模型组脾脏指数和脾脏CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值显著升高($P<0.01$);与模型组比较,芦竹碱组高剂量组的脾脏指数及CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞的比率明显降低($P<0.05$),低剂量组脾脏指数明显降低($P<0.05$)。见表3。

表3 芦竹碱对小鼠脾脏指数和脾脏CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 3 Effect of gramine on spleen index and CD4⁺/CD8⁺T lymphocyte ratio in mice ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	脾脏指数	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T淋巴细胞的比例/%
正常		32.05±3.73	1.54±0.07
模型		59.01±6.39 ²⁾	2.33±0.12 ²⁾
地塞米松	0.05	36.39±4.04 ⁴⁾	1.64±0.04 ⁴⁾
芦竹碱	0.06	42.98±1.49 ³⁾	2.08±0.05
	0.12	41.78±1.59 ³⁾	1.75±0.07 ³⁾

3.3 对小鼠皮损中相关炎症因子mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠皮肤组织中TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-13, IL-17, IL-1 β 的mRNA水平显著增加($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松组和芦竹碱药物干预后的炎症因子mRNA水平均有下降,其中芦竹碱高剂量组明显降低皮损中炎症因子TNF- α , IFN- γ , IL-13和IL-1 β 的mRNA表达水平($P<0.05$,

$P<0.01$);芦竹碱各剂量组均可显著降低皮损中IL-6和IL-17的mRNA表达水平($P<0.01$)。见表4。

表4 芦竹碱对小鼠皮损炎症因子IFN- γ , IL-13, IL-17, IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 4 Effect of gramine on mRNA expression of inflammatory cytokines IFN- γ , IL-13, IL-17, IL-1 β , IL-6, TNF- α in mouse skin lesions ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IFN- γ	IL-13	IL-17	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常		1.66±0.65	1.05±0.15	1.02±0.08	1.73±0.52	1.26±0.75	1.39±0.46
模型		1.73±0.52 ²⁾	8.09±0.93 ²⁾	4.45±0.21 ²⁾	42.67±2.02 ²⁾	13.47±2.35 ²⁾	5.11±0.77 ²⁾
地塞米松	0.05	2.23±0.29 ⁴⁾	2.58±0.12 ⁴⁾	3.78±0.29 ⁴⁾	23.81±2.28 ⁴⁾	2.54±0.64 ⁴⁾	1.70±0.16 ⁴⁾
芦竹碱	0.06	8.48±0.89	3.78±0.29	1.23±0.07 ⁴⁾	35.31±2.62	4.76±0.44 ⁴⁾	5.35±0.32
	0.12	6.15±0.20 ³⁾	3.25±0.46 ³⁾	1.15±0.16 ⁴⁾	32.18±3.18 ³⁾	4.76±0.95 ⁴⁾	4.51±0.29 ⁴⁾

3.4 对小鼠血清IgE, IL-4, IL-6含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清中IgE, IL-4和IL-6的含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松和芦竹碱各剂量组血清IgE, IL-4和IL-6含量均显著降低($P<0.01$)。见表5。

地塞米松组及芦竹碱各剂量组皮损组织中I κ B α 蛋白表达显著降低($P<0.01$),地塞米松组及芦竹碱高剂量组皮损组织中NF- κ B蛋白表达均显著降低($P<0.01$)。见图3,表6。

3.5 对小鼠皮损组织中I κ B α 和NF- κ B蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组皮损中I κ B α 和NF- κ B蛋白水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,

3.6 对小鼠血清中ALT, AST, BUN, CRE含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清中ALT, AST含量有升高趋势,BUN, CRE含量有降低趋势,但差异无统计学意义;与模型组比较,地塞米松组及芦

表5 芦竹碱对小鼠血清中IgE, IL-6和IL-4的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 5 Effect of gramine on cytokines of IgE, IL-6 and IL-4 in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IgE/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-4/ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹
正常		111.60±41.61	23.48±0.53	73.91±2.34
模型		447.70±45.18 ²⁾	43.27±0.44 ²⁾	143.30±1.27 ²⁾
地塞米松	0.05	259.60±33.79 ⁴⁾	30.19±0.29 ⁴⁾	84.93±3.47 ⁴⁾
芦竹碱	0.06	296.30±8.51 ⁴⁾	32.24±0.56 ⁴⁾	117.20±3.99 ⁴⁾
	0.12	276.50±9.47 ⁴⁾	28.69±0.24 ⁴⁾	83.23±2.31 ⁴⁾

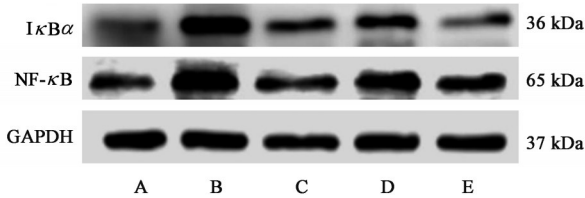


图3 小鼠皮损中IκBα和NF-κB蛋白表达电泳

Fig 3 Electrophoresis of IκBα and NF-κB expression in mice skin tissue

竹碱各剂量组血清中ALT, AST, BUN, CRE含量均有升高趋势, 但差异均不具有统计学差异。说明在0.06~0.12 g·kg⁻¹剂量下灌胃芦竹碱对小鼠的肝肾功

表6 芦竹碱对小鼠皮损中IκBα和NF-κB蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 6 Effect of gramine on IκBα and NF-κB expression in mice skin tissue ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IκBα/GAPDH	NF-κB/GAPDH
正常		0.43±0.01	0.69±0.02
模型		1.45±0.05 ²⁾	1.58±0.06 ²⁾
地塞米松	0.05	1.01±0.02 ⁴⁾	0.62±0.04 ⁴⁾
芦竹碱	0.06	1.03±0.02 ⁴⁾	0.89±0.04
	0.12	0.90±0.03 ⁴⁾	0.62±0.03 ⁴⁾

能无明显损伤。见表7。

表7 芦竹碱对小鼠血清中ALT, AST, BUN, CRE含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 7 Effects of gramine on contents of ALT, AST, BUN and CRE in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	CRE/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常		6.95±0.32	8.07±1.39	20.55±11.42	190.54±35.52
模型		5.95±0.73	9.85±1.71	21.50±7.24	174.31±46.21
地塞米松	0.05	7.54±0.31	11.16±1.28	22.40±4.80	183.65±46.34
芦竹碱	0.06	8.63±0.57	13.41±1.02	23.11±4.15	179.44±43.15
	0.12	8.79±0.63	12.87±1.51	22.59±5.62	177.21±49.13

4 讨论

本研究采用了药效研究中应用较为广泛的化学刺激诱导的接触性皮炎小鼠模型, 皮肤给予阳性药地塞米松和不同浓度的芦竹碱进行药物干预, 以观察芦竹碱对AD小鼠模型的影响。结果显示芦竹碱干预后能够改善临床症状, 增加皮肤水分含量, 抑制皮损增厚, 降低经皮水分丢失。同时在HE病理组织中, 可见芦竹碱能明显减少炎症细胞浸润, 说明芦竹碱具有抗炎的作用。以及进一步通过脾脏指数结合流式分析脾脏CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值, 可在一定程度上反应药物对免疫功能的影响。同文献报道一致, DNCB刺激诱导后小鼠模型组脾脏CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值升高^[13]。在AD中, CD4⁺产生T淋巴细胞Th1细胞因子(IFN- γ 和IL-2), Th2细胞因子(IL-4, IL-5, IL-10, IL-13)和非Th细胞因子(IL-1 α , IL-1 β , IL-6及TNF- α)^[14]。IL-17是Th17细胞的主要效应因子, 在AD中的表达与疾病

严重程度呈正相关^[15]。实验结果显示芦竹碱可降低脾脏中CD4⁺/CD8⁺T淋巴细胞比值, 可降低皮损中Th1细胞分泌的IFN- γ , Th2细胞分泌的IL-13, Th17分泌的IL-17, 以及非Th细胞分泌的炎症因子IL-1 β , TNF- α , IL-6的mRNA表达。血清IgE, 在AD的发病机制中具有关键作用, IgE可以通过与IgE受体结合(Fc ϵ R1)来诱导肥大细胞增加其脱颗粒反应, 反过来增强释放组胺和炎症介质, 从而进一步加强炎症反应^[16-17]。通过ELISA检测, 结果显示芦竹碱可显著降低血清中IgE, Th2特异性IL-4和促炎性因子IL-6的水平。NF- κ B则是免疫及炎症的重要调节因素, 并可介导多种炎症与免疫相关的细胞因子^[18]。正常情况下NF- κ B和I κ B结合形成的二聚体处于非活化状态, 可被炎症细胞因子、病毒及细菌刺激激活, 活化后的NF- κ B可增加IL-1 β , IL-6, TNF- α 等炎症因子的表达, 在AD的发病过程中, 这些炎症因子可再次与NF- κ B受体结合, 形成正反馈

调节,从而使炎症反应不断扩大^[19]。文献报道 DNCB 诱导的 AD 小鼠皮损中 I κ B α 和 NF- κ B 蛋白水平升高, NF- κ B 通路的激活会进一步导致炎症细胞向组织浸润^[20]。本文通过 Western blot 检测显示芦竹碱可减低皮损中 I κ B α 和 NF- κ B 的蛋白表达,说明芦竹碱可通过抑制 I κ B α 和 NF- κ B 的激活,从而减轻背部皮损的炎症反应。ALT 和 AST 主要存在于肝细胞内,两者可在一定程度上反应了肝细胞的损害。GRE 和 BUN 两者为肾功能损害的指标。本研究通过对上述 4 个指标的测定发现芦竹碱在本实验剂量为 0.06~0.12 g·kg⁻¹ 对肝、肾功均无明显损害。

综上所述,本研究通过观察临床表现、组织形态学变化情况、相关免疫细胞因子及炎症因子的表达情况,肝肾功能的损害情况,考察了芦竹碱对 AD 模型小鼠的治疗作用,为芦竹碱可作为潜在的治疗 AD 的药物提供了必要的实验证据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] MILAM E C, JACOB S E, COHEN D E. Contact dermatitis in the patient with atopic dermatitis [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2019, 7(1): 18-26.

[2] WILLIAMS H, STEWART A, VON MUTIUS E, et al. Is eczema really on the increase worldwide? [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 121(4): 947-954.

[3] LEUNG A K, HON K L, ROBSON W L. Atopic dermatitis [J]. *Adv Pediatr*, 2007, 54: 241-273.

[4] STÄNDER S, STEINHOFF M. Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview [J]. *Exp Dermatol*, 2002, 11(1): 12-24.

[5] 白权, 孙琪华. 芦根与芦竹根的鉴别探讨 [J]. *川北医学院学报*, 1994(4): 38-39.

[6] 刘清茹, 李娟, 赵小芳, 等. 芦竹根化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(7): 1084-1089.

[7] ZHALOLOV I, KHUZHAEV V U, LEVKOVICH M G, et al. Alkaloids of *Arundo donax*. V III. 3-alkylindole derivatives in *A. donax* [J]. *Chem Nat Comp*, 2000, 36(5): 528-530.

[8] BURAGOHAJIN J. Folk medicinal plants used in gynecological disorders in Tinsukia district, Assam, India [J]. *Fitoterapia*, 2008, 79(5): 388-392.

[9] RAMU A, KATHIRESAN S, AHMED B A. Gramine inhibits angiogenesis and induces apoptosis via modulation of TGF- β signalling in 7, 12 dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) induced hamster buccal pouch carcinoma [J]. *Phytomedicine*, 2017, 33(15): 69-76.

[10] RAMU A, KATHIRESAN S, RAMADOSS H, et al. Gramine attenuates EGFR-mediated inflammation and cell proliferation in oral carcinogenesis via regulation of NF- κ B and STAT3 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 523-530.

[11] KIM H I, HONG S H, LEE S Y, et al. Gardenia jasminoides ameliorates antibiotic-associated aggravation of DNCB-induced atopic dermatitis by restoring the intestinal microbiome profile [J]. *Nutrients*, 2021, 13(4): 1349.

[12] KU J M, HONG S H, KIM H I, et al. Effects of Angelicae Dahuricae Radix on 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice model [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 98.

[13] KANG H, LEE C H, KIM J R, et al. Theobroma cacao extract attenuates the development of dermatophagoides farinae-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice [J]. *Food Chem*, 2017, 216: 19-26.

[14] BAI X Y, LIU P, CHAI Y W, et al. Artesunate attenuates 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis by down-regulating Th17 cell responses in BALB/c mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 874: 173020.

[15] LIU F T, GOODARZI H, CHEN H Y. IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2011, 41(3): 298-310.

[16] DHOSSCHE J, SIMPSON E, HAJAR T. Topical corticosteroid withdrawal in a pediatric patient [J]. *JAAD Case Rep*, 2017, 3(5): 420-421.

[17] XIONG X, HUANG C, WANG F, et al. Qingxue jiedu formulation ameliorated DNFB-induced atopic dermatitis by inhibiting STAT3/MAPK/NF- κ B signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 270: 113773.

[18] PARK J H, HWANG M H, CHO Y R, et al. Combretum quadrangulare extract attenuates atopic dermatitis-like skin lesions through modulation of MAPK signaling in BALB/c mice [J]. *Molecules*, 2020, 25(8): 2003.

[19] 王欣欣. 基于 Th1/Th2 平衡研究沙棘果油及其有效成分对特异性皮炎小鼠的干预作用 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2020.

[20] CHUN S Y, LEE K S, NAM K S. Refined deep-sea water suppresses inflammatory responses via the MAPK/AP-1 and NF- κ B signaling pathway in LPS-treated RAW 264.7 macrophage cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2282.

[责任编辑 孙丛丛]