

## 基于芍药甘草汤的4种中药润肤霜对特应性皮炎的治疗作用及机制

王海林<sup>1</sup>, 刘陆<sup>2</sup>, 回连强<sup>1</sup>, 刘婷<sup>1\*</sup>, 李春<sup>1\*</sup>, 李成亮<sup>3</sup>, 曹春雨<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 河南中医药大学, 郑州 450000;

3. 莱博药妆技术(上海)股份有限公司, 上海 200233)

**[摘要]** 目的:探讨4种中药润肤霜对2,4-二硝基氟苯(DNFB)致特应性皮炎小鼠的治疗作用及机制。方法: BALA/c小鼠按体质量随机分成正常组、模型组、空白膏霜组(润肤霜A组),芍药甘草汤组(润肤霜B组),芍药甘草汤加马齿苋、人参和忍冬藤组(润肤霜C组),芍药甘草汤加人参和忍冬藤组(润肤霜D组),给药剂量均为 $25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,以及阳性药他克莫司软膏组( $3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),每组10~12只。除正常组外,其余各组用0.5% DNFB涂抹小鼠背部脱毛皮肤,每只 $100\ \mu\text{L}$ ,连续7 d。第7天起,各组给予相应润肤霜外用干预,1次/d,连续15 d,正常组和模型组不给药。每周称量动物体质量1次,每周对动物背部皮肤进行评分3次,记录皮损状况分值;处死小鼠后,取左右耳,打孔称量双耳质量并计算肿胀度;取背部皮肤固定,苏木素-伊红(HE)染色进行病理组织学检查,观察小鼠背部皮肤组织病理改变并评分;末次给药后取血,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中免疫球蛋白E(IgE)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测皮肤组织中信号传导与转录激活因子3(STAT3),磷酸化(p)-STAT3蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠体质量持续性降低,造模区出现红斑、水肿、干燥、脱屑、结痂剥脱等炎性改变,皮损状况分值显著增加;耳部皮肤角质层增厚,耳肿胀度明显增加;镜下见表皮局部坏死脱落、表皮增厚、表皮增生,角质层的角化过度及角化不全,以及皮下组织炎症细胞浸润等病变;血清IgE含量显著性增高;皮肤组织中p-STAT3的表达增加。与模型组比较,润肤霜C和D组小鼠体质量明显增加( $P<0.01$ ),皮损状况评分明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );润肤霜B、C、D组较模型组小鼠耳廓肿胀度显著减少( $P<0.01$ );润肤霜C组小鼠背部皮肤坏死缺损和表皮增生的病变程度较模型组明显减轻( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );润肤霜C和D组小鼠血清中IgE含量较模型组明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );润肤霜C组小鼠皮肤组织中p-STAT3蛋白表达明显低于模型组( $P<0.05$ )。结论:润肤霜B、C、D对特应性皮炎均有一定的治疗效果,其中润肤霜C的治疗作用最为明显,作用机制可能与其抑制血清IgE含量的升高,及抑制STAT3的磷酸化,从而降低炎性细胞因子的水平有关。

**[关键词]** 特应性皮炎; 芍药甘草汤; 中药润肤霜; 白芍总苷; 甘草总黄酮

**[中图分类号]** R2-0;R289;R246.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)22-0007-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202236

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200914.1312.002.html>

**[网络出版日期]** 2020-9-14 14:38

### Effect and Mechanism of Four Kinds of Traditional Chinese Medicine Moisturizers Based on Shaoyao Gancaotang on Atopic Dermatitis

WANG Hai-lin<sup>1</sup>, LIU Lu<sup>2</sup>, HUI Lian-qiang<sup>1</sup>, LIU Ting<sup>1\*</sup>, LI Chun<sup>1\*</sup>, LI Cheng-liang<sup>3</sup>, CAO Chun-yu<sup>1</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,

Beijing 100700, China; 2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

3. LB Cosmeceuticals Technology (Shanghai) Co. Ltd., Shanghai 200233, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the therapeutic effect and possible mechanism of four types of

**[收稿日期]** 20200429(019)

**[基金项目]** 北京市自然科学基金项目(7132152)

**[第一作者]** 王海林,博士,助理研究员,从事病理学研究,E-mail:hlwang@icmm.ac.cn

**[通信作者]** \*刘婷,硕士,研究员,从事药理毒理学研究,E-mail:tliu@icmm.ac.cn; \*李春,博士,研究员,从事中药化学研究,E-mail:cli@icmm.ac.cn

Chinese herbal moisturizers made in laboratory for atopic dermatitis induced by 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB) in mice. **Method:** According to the body weight, BALA/c mice were randomly divided into normal group, model group, blank cream group (moisturizer A), Shaoyao Gancaotang group (moisturizer B), Shaoyao Gancaotang with Portulacae Herba, Ginseng Radix et Rhizoma and Honeysuckle Stem group (moisturizer C), and Shaoyao Gancaotang with Ginseng Radix et Rhizoma and Honeysuckle Stem group (moisturizer D), with the dose of  $25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  per day, as well as tacrolimus ointment group of  $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  per day, with 10 to 12 mice in each group. Except the normal group, the mice in the other groups were treated with 0.5% DNFB in the hair removal skin of back,  $100 \mu\text{L}$  each for 7 days. Starting from the 7<sup>th</sup> day, each group was given the appropriate skin cream for external use intervention, once per day, for 15 consecutive days, except for the normal and the model groups. The animal body mass was measured once a week, and the animal back skin was graded three times a week, and the skin lesion score was recorded. After the mice were killed, the left and right ears were taken, the weight of both ears was punched and the degree of swelling was calculated. The back skin was fixed and stained with hematoxylin-eosin (HE) method, and then pathologic examination was conducted to observe and score the pathological changes of mouse back skin. Blood was obtained after the last dose and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the immunoglobulin (Ig) E content in serum. Western blot was used to measure the expression of signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3), phosphorylation (p)-STAT3 in the skin tissue. **Result:** Compared with the normal group, the body mass decreased continuously, a series of inflammatory changes such as erythema, edema, dryness, desquamation and callus exfoliation and so on occurred in the modeling area, and the skin lesion score increased significantly in the model group. Additionally, the cuticle of ear skin was thickened and the degree of ear swelling was obviously increased in the model group. Microscopically, the occurred changes in the model mice included the local necrosis of the epidermis, epidermal thickening, epidermal hyperplasia, and the hyperkeratosis and hypokeratosis in the cuticle, as well as the subcutaneous inflammatory cell infiltration and so on. Furthermore, the content of serum IgE and the expression of p-STAT3 in skin tissues increased significantly in the model group. Compared with the model group, the body mass of mice in group C and D was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the skin lesion status score was decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The degree of auricle swelling was significantly reduced in group B, C and D compared with that in the model group ( $P < 0.01$ ). The degree of skin necrosis and defect and epidermal hyperplasia of mice in moisturizer C group was significantly reduced compared with that in model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Serum IgE levels of mice in group C and D were significantly lower than those in the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of p-STAT3 protein in skin tissues of mice in moisturizer C group was significantly lower than that in model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The moisturizers B, C and D all have certain therapeutic effect on atopic dermatitis, among which moisturizers C has the most obvious therapeutic effect. The possible mechanism may be that it reduces the level of inflammatory cytokines by inhibiting the increase of serum IgE content and the phosphorylation of STAT3.

[Key words] atopic dermatitis; Shaoyao Gancaotang; traditional Chinese medicine moisturizers; total Paeoniae Radix Alba glycosides; total Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids

特应性皮炎(atopic dermatitis)是一种慢性复发性、炎症性皮肤病,多于儿童期发病,临床症状主要表现为皮肤湿疹、瘙痒和脱屑<sup>[1]</sup>。糖皮质激素、抗组胺药和免疫抑制剂是临床治疗特应性皮炎的常规用药,但这些药物都无法根治之,而且长期使用副作用大、复发率高,不易被患者接受<sup>[2]</sup>。中医治疗皮肤病历史悠久,经验丰富,尤其中医外治法治疗特

应性皮炎具有作用直接,副作用小、简便易行等特点,因此更适合畏惧激素的患者及儿童等特殊人群使用<sup>[3]</sup>。虽然经方大量用于皮肤科疾病如荨麻疹、带状疱疹及肌肤甲错等的治疗,但用药方式多为口服给药<sup>[4]</sup>。清代医学家吴尚先被后世誉为外治之宗”,在《理渝骈文》中提出了外治法可以统治百病的论断,认为凡属于内治的汤剂丸散,无一不可以

熬制成膏药;凡服汤、丸能治愈的病证,也无一不可以改用薄贴而收效。芍药甘草汤源于《伤寒杂论》,由白芍和甘草等比例配伍而成,具有养血敛阴、调和肝脾、缓急止痛之功效,用于血虚津伤和筋脉失濡所致的腿脚挛急、腕腹疼痛,被历代医家推崇并沿用至今<sup>[5]</sup>。现代研究和临床实践也证实,芍药甘草汤具有显著的解痉、抗炎、抗过敏、免疫调节等作用<sup>[5]</sup>。万鹏等<sup>[6]</sup>依据痒为痛之渐的中医理论,采用芍药甘草汤加减方治疗皮肤瘙痒证疗效显著。国医大师禩国维教授也善用芍药甘草汤治疗多种皮肤病,如湿疹、皮炎、硬皮病等<sup>[7]</sup>。因此,本文以芍药甘草汤为基础方制备了4种不同的中药润肤霜,采用2,4-二硝基氟苯(DNFB)致特异性皮炎小鼠模型考察了其对特异性皮炎的治疗作用并初步探讨了其作用机制,以优选最佳处方为今后相关制剂的开发奠定基础。

## 1 材料

**1.1 动物** BALA/c小鼠,74只,SPF级,雌性,体重17~21 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006。动物饲养于中国中医科学院中药研究所动物房,实验许可证号SYXK(京)2013-0035。屏障系统,人工光照,12 h明暗周期,温度20~26 °C范围,相对湿度40%~70%。动物饲养于聚碳酸酯小鼠饲养盒,每周2次更换清洁动物盒和垫料,每周3次更换动物饮用水。本实验经中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理委员会审查批准,伦理号20182008。

**1.2 药品与试剂** 白芍总苷(浙江宁波立华制药有限公司,批号160405,芍药苷质量分数≥40%);甘草总黄酮(西安小草植物科技有限责任公司,批号XC20160508,总黄酮质量分数≥70%);人参总皂苷(上海源叶生物有限公司,批号S25997,总皂苷质量分数≥80%);马齿苋饮片,忍冬藤饮片(北京东四同仁堂药店,批号分别为1703081,1602092);鲸蜡硬脂醇(马来西亚Emery公司,批号M160800030);硬脂醇聚醚-21,硬脂醇聚醚-2(德国BASF公司,批号分别为K88623C081,K87814C021);黄原胶(比利时Solvay公司,批号6142536108);丙烯酸羟乙酯/丙烯酸二甲基牛磺酸钠共聚物(法国Seppic公司,批号180129017928);他克莫司软膏(阿斯泰来制药有限公司,批号048640);DNFB(美国Sigma公司,批号BCBT6928);免疫球蛋白(Ig)E酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国IGL公司,批号E-90E#20);信号传导与转录激活因子3(STAT3)抗体,磷酸化(p)-

STAT3 抗体(英国Abcam公司,批号分别为GR3220487-3,GR287047-41); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗,BCA蛋白浓度测定试剂盒,苏木素-伊红(HE)染色液(中国Solarbio公司,批号分别为20190604,20190520,20190625,20171204);ECL发光液(美国Santa公司,批号E2019)。

**1.3 仪器** BSA 8201-CW型1/1万电子天平,BSA 223S-CW1/1万型电子天平(德国Sartorius公司);Varioskan Flash型多功能酶标仪,4317型摇床(美国Thermo公司);PowerPac™ Basic型蛋白电泳/电转仪(美国Bio-Rad公司);Excelsior ES型全自动脱水机,Histocentre 3型石蜡包埋机,Finesse 325型切片机,Varistain Gemini型全自动染色机(德国Shandon公司);BX51型显微镜及图像分析系统(日本Olympus公司);小熊牌电动煎药锅(中国小熊电器股份有限公司)。

## 2 方法

**2.1 各中药提取物及中药润肤霜A~D的制备** 马齿苋提取物:马齿苋饮片100 g,加蒸馏水1 000 mL,持续浸泡20 min,置于电动煎药锅中煎煮30 min,过滤,残渣同法再煎煮1次,合并2次滤液,回收,冷冻干燥成粉,备用。忍冬藤提取物:忍冬藤饮片100 g,加60%乙醇1 000 mL,回流提取1 h,过滤,残渣同法再提取1次,合并2次滤液,减压回收乙醇至无醇味,冷冻干燥成粉,备用。参考文献[8]方法制备4种中药润肤霜,四者均为米黄色霜剂,各制剂所含成分:中药润肤霜A为空白膏霜;中药润肤霜B(芍药甘草汤)为空白膏霜+白芍总苷+甘草总黄酮;中药润肤霜C为空白膏霜+白芍总苷+甘草总黄酮+马齿苋提取物+人参总皂苷+忍冬藤提取物;中药润肤霜D为空白膏霜+白芍总苷+甘草总黄酮+人参总皂苷+忍冬藤提取物。以上处方中,各中药组分占润肤霜总质量的百分比分别为白芍总皂苷0.05%,甘草总黄酮0.05%,马齿苋提取物0.001%,人参总皂苷0.05%,忍冬藤提取物0.002%。空白膏霜主要由水、甘油、丁二醇等保湿剂组成。采用鲸蜡硬脂醇、硬脂醇聚醚-21和硬脂醇聚醚-2作为乳化剂,黄原胶和丙烯酸羟乙酯/丙烯酸二甲基牛磺酸钠共聚物作为增稠剂。

**2.2 动物造模** BALA/c小鼠按体质量随机分成7组:正常组、模型组、润肤霜A,B,C,D组和阳性药他克莫司软膏组,每组10~12只。所有动物用脱毛膏涂抹动物背部,约1 min后用温水洗去,脱毛区域

面积约6 cm<sup>2</sup>。脱毛次日,除正常组外,其余各组用0.5% DNFB涂抹小鼠背部脱毛皮肤,每只100 μL,连续涂抹7 d,以小鼠背部皮肤形成红斑、水肿、表皮剥脱、鳞屑覆盖等症状为造模成功<sup>[9-12]</sup>。造模第7天,模型稳定,各组开始给予相应的受试物,连续给药15 d,给药期间,除正常组外,其余各组每周3次(即给药第1,3,6,8,10,13,15天,造模第7,9,12,14,16,19,21天)动物背部及右耳涂抹0.2%DNFB,其中背部100 μL,右耳50 μL。

**2.3 给药** 各治疗组从造模第7天开始外用涂抹给药,1次/d,连续15 d,将受试物少量涂于患病右耳及背部皮肤,模型组及正常组不涂抹。涂抹量:润肤霜A,B,C,D每次涂抹一小茶匙,约0.5 g,折合后给药剂量为25 g·kg<sup>-1</sup>,他克莫司软膏组每次涂抹约0.8 cm,约0.06 g,折合后给药剂量为3 g·kg<sup>-1</sup>。

#### 2.4 检测指标

**2.4.1 动物体质量称量** 用Sartorius BSA 8201-CW电子天平,称量小鼠未禁食体质量,分别在造模第7,14,21天进行。

**2.4.2 皮损状况评分** 分别于造模第7,9,12,14,16,19,21天对动物背部皮肤的红斑、水肿、鳞屑、剥脱情况进行评分,各项分数之和记为该动物的皮损状况分值。红斑、水肿、鳞屑、剥脱情况按严重程度,均分为0,1,2,3共4个等级。红斑的4个等级分别为无红斑,0分;轻度红斑,勉强可见,呈粉红色,1分;中度红斑,明显可见,呈暗红色,2分;重度红斑,呈深红色或火红色,3分。水肿的4个等级分别为无水肿,0分;轻度水肿,勉强可见,1分;中度水肿,明显可见边缘高出周围皮肤,2分;重度水肿,皮肤隆起1 mm,轮廓清楚,显著高出周围皮肤,3分。鳞屑的4个等级分别为无鳞屑,0分;轻度脱屑,1分;片状鳞屑稀薄覆盖,2分;厚鳞屑覆盖,3分。剥脱的4个等级分别为无剥脱,0分;少许剥脱,面积<20%,1分;较多剥脱,面积20%~60%,2分;弥漫性或深层表皮剥脱,面积>60%,3分<sup>[9]</sup>。

**2.4.3 耳肿胀度测定** 取血处死小鼠后,分别取左右耳,以6 mm打孔器打下小鼠双耳,称量双耳质量,按下述公式计算肿胀度(g)和抑制率(%)。肿胀度=右耳质量-左耳质量,抑制率=(模型组肿胀度-给药组肿胀度)/模型组×100%。

**2.4.4 皮肤组织的病理组织学检查** 分离受损皮肤组织,置于10%甲醛溶液中固定,常规制片,HE染色,进行病理组织学检查,根据表皮坏死、真皮炎细胞浸润及表皮增生程度对病变进行评分。0分,

皮肤结构正常,未见坏死、炎细胞浸润及增生。1分,表皮基本恢复,其与覆盖的痂皮间可见角化过度、角化不全的角化物;表皮下轻微的炎细胞浸润;表皮厚度基本恢复正常,仅见局部表皮细胞轻微增生。2分,表皮有轻度的缺损或表皮鳞状上皮基本完整,其与表面的痂皮间角质层尚未完全形成;表皮下轻度的炎细胞浸润;表皮厚度大部分正常,局部表皮增生。3分,表皮有中度的缺损;表皮下中度的炎细胞浸润;表皮细胞明显增生,局部增生减轻。4分,表皮有明显缺损;表皮下重度的炎细胞浸润;表皮细胞弥漫增生、增厚。

**2.4.5 ELISA检测血清中IgE含量** 末次给药后次日,眼底静脉丛取血,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min(离心半径13.5 cm)制备血清,根据ELISA试剂盒说明书步骤,分析血清中IgE含量。

**2.4.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测皮肤组织中STAT3,p-STAT3蛋白的表达** 取受损背部皮肤约100 mg,加RIPA裂解液1 mL进行裂解,离心,取上清液,BCA法测定提取液中的蛋白浓度。加入Loading buffer,于沸水中煮5 min使蛋白变性。调整每个样品的蛋白上样量为20 μg。配制10% SDS-PAGE胶进行分离,转移至PVDF膜上,室温下TBST配制的5%牛奶封闭1 h后,与p-STAT3抗体(1:2 000)进行杂交,以β-actin(1:1 000)为内参,4℃过夜,TBST洗膜3次,孵育二抗(1:500),室温下孵育1 h,TBST洗膜3次,进行化学发光。TBST将杂p-STAT3的膜洗3次,用膜再生液室温洗1 h,再用TBST洗膜3次,在杂p-STAT3的膜上重新杂一抗STAT3(1:1 000),4℃过夜,用TBST洗膜3次,与HRP标记的羊抗兔IgG(1:500)进行杂交,室温下孵育1 h,用TBST洗膜3次,然后进行化学发光。将STAT3,p-STAT3的灰度值用β-actin进行标准化,采用SPSS 13.0软件进行统计分析。

**2.5 统计学分析** 体质量、耳重、血清中IgE含量、皮肤组织中STAT3/p-STAT3的表达、背部皮肤皮损状况分值等各项指标数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用SPSS 13.0进行统计学检验,采用Student *t*-test进行组间分析;病理评分进行各等级数据的计数,用SPSS 13.0进行非参数检验进行统计,采用H检验(Kruskal-Wallis),若整体有差异,进一步采用U检验(mann-Whitney)进行组间比较,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对小鼠体质量的影响** 0.5%DNFB涂抹小鼠

背部连续造模7 d后,各组小鼠体质量与正常组比较均显著降低( $P<0.01$ ),说明DNFB可引起特异性皮炎小鼠的体质量降低;给药14 d后,模型组动物

体质量持续性降低,与模型组比较,中药润肤霜C和D组能显著升高特异性皮炎小鼠的体质量( $P<0.01$ ),而润肤霜A和B组作用不明显。见表1。

表1 润肤霜对特异性皮炎小鼠体质量的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$n$	0 d	7 d	14 d
正常	-	12	18.7±0.8	19.7±0.7	20.2±0.6
模型	-	12	17.2±0.4 <sup>2)</sup>	17.0±0.9 <sup>2)</sup>	16.4±0.7 <sup>2)</sup>
润肤霜A	25	10	17.5±1.2 <sup>1)</sup>	17.1±1.1	17.0±0.9
润肤霜B	25	10	17.1±0.9 <sup>2)</sup>	16.7±0.5	16.1±1.6
润肤霜C	25	10	17.3±0.9 <sup>2)</sup>	17.0±0.7	17.7±0.7 <sup>4)</sup>
润肤霜D	25	10	17.3±0.6 <sup>2)</sup>	17.2±1.0	18.0±0.7 <sup>4)</sup>
他克莫司软膏	3	9	17.1±0.7 <sup>2)</sup>	17.0±0.7	17.0±0.9

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表2~8同)。

3.2 对小鼠背部皮肤皮损状况的影响 模型组小鼠在整个实验期间,小鼠造模区肉眼可见红斑、丘疹、水肿、干燥、脱屑、结痂剥脱等炎性改变,其皮损状况评分分值与正常组比较明显升高( $P<0.01$ ),显

示造模成功。润肤霜C组在给药第12,14天,润肤霜D组和他克莫司软膏组小鼠在给药第14天与模型组比较皮损状况评分值明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),中药润肤霜A和B组未见该作用。见表2。

表2 润肤霜对特异性皮炎小鼠背部皮肤皮损状况评分的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$n$	0 d	2 d	5 d	7 d	9 d	12 d	14 d
模型	-	12	6.0±0.0 <sup>1)</sup>	7.3±1.1 <sup>2)</sup>	5.7±0.7 <sup>2)</sup>	4.4±1.7 <sup>2)</sup>	4.0±2.0 <sup>2)</sup>	3.6±1.7 <sup>2)</sup>	6.5±1.9 <sup>2)</sup>
润肤霜A	25	10	5.9±0.3	7.9±1.1	5.9±0.9	4.1±2.2	3.2±1.9	3.8±1.7	4.8±2.1
润肤霜B	25	10	5.8±0.6	7.6±1.0	6.2±0.6	4.2±1.1	5.0±0.9	3.9±1.1	5.1±1.6
润肤霜C	25	10	6.3±0.5	8.1±1.4	5.3±0.5	4.6±1.4	3.4±1.8	2.2±1.0 <sup>3)</sup>	2.9±1.4 <sup>4)</sup>
润肤霜D	25	10	6.0±0.0	7.2±1.4	5.7±0.7	5.2±1.7	5.4±1.3	3.4±1.4	3.6±1.6 <sup>4)</sup>
他克莫司软膏	3	9	6.0±0.0	6.8±1.3	5.8±0.7	5.6±1.7	4.9±2.4	4.4±2.5	4.1±1.6 <sup>4)</sup>

注:空白组小鼠背部皮肤皮损状况评分均为0分。

3.3 对小鼠耳部肿胀度的影响 0.2% DNFB每周3次涂抹小鼠右耳7次后,可导致小鼠耳廓明显肿胀,与正常组比较,模型组小鼠耳肿胀度显著增加( $P<0.01$ );他克莫司软膏组和润肤霜B,C,D组动物给药14 d,均可明显抑制小鼠耳廓肿胀,与模型组比较,肿胀度显著减少( $P<0.01$ ),其中润肤霜C组的作用最强;润肤霜A组未见明显的抑制作用。见表3。

表3 润肤霜对特异性皮炎小鼠耳部肿胀度的影响

Table 3 Effect of moisturizers on ear swelling of mice with atopic dermatitis

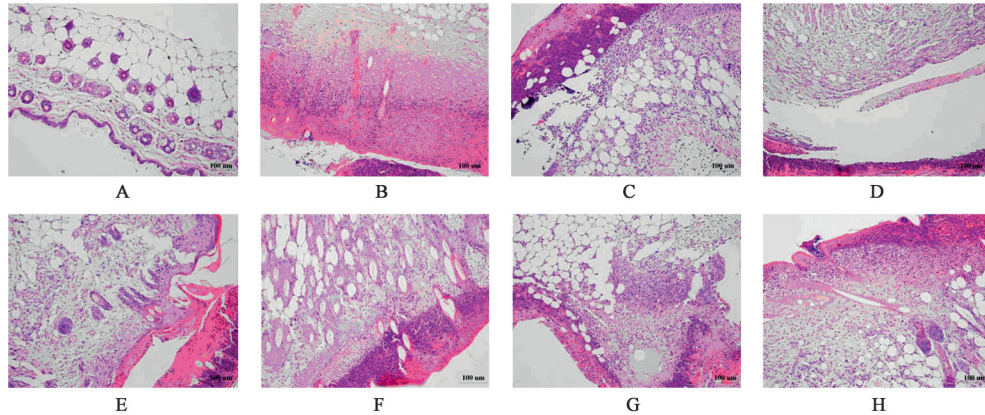
组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$n$	耳肿胀度( $\bar{x}\pm s$ )/mg	抑制率/%
正常	-	12	0.12±0.43	-
模型	-	12	20.23±8.59 <sup>2)</sup>	-
润肤霜A	25	10	15.53±5.31	23.2
润肤霜B	25	10	8.12±3.81 <sup>4)</sup>	59.9
润肤霜C	25	10	7.10±5.56 <sup>4)</sup>	64.9
润肤霜D	25	10	9.36±4.43 <sup>4)</sup>	53.7
他克莫司软膏	3	9	11.53±4.00 <sup>4)</sup>	43.0

3.4 对小鼠背部皮肤病理改变的影响 正常组12只小鼠背部皮肤表皮、真皮结构正常。模型组12只小鼠,背部皮肤表面有痂皮覆盖,角质层增厚,有角化过度、角化不全,表皮有坏死、缺损,表皮鳞状上皮层细胞明显增生、增厚,皮下组织有肥大细胞、淋巴细胞、中性粒细胞等炎细胞浸润。润肤霜A,B,C,D组与他克莫司软膏组背部皮肤病变与模型组

类似,亦可见上述病理改变。润肤霜C组表皮的坏死缺损程度明显减轻,与模型组比较,病变程度明显减轻,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),其余各组的表皮损伤程度与模型组比较未见明显差异。他克

莫司软膏与各中药润肤霜组的皮下炎症与模型组比较,均未见明显的统计学差异。润肤霜C组表皮

增生程度与模型组比较未见明显差异。见图1,表4~6。



A. 正常组; B. 模型组; C. 润肤霜A组; D. 润肤霜B组; E. 润肤霜C组; F. 润肤霜C组; G. 润肤霜D组; H. 他克莫司软膏组(图2同)

图1 润肤霜对特异性皮炎小鼠背部皮肤病理改变的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of moisturizers on pathological morphology of back skin of mice with atopic dermatitis(HE, ×200)

表4 润肤霜对特异性皮炎小鼠背部皮肤病理改变的影响-表皮坏死/缺损

Table 4 Effect of moisturizers on pathological changes of back skin of mice with atopic dermatitis-epidermal necrosis/defect

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	病变程度					Mean Rank
			0	1	2	3	4	
正常	-	12	12	0	0	0	0	6.5
模型	-	12	0	0	4	3	5	44.75 <sup>2)</sup>
润肤霜A	25	10	0	3	1	2	4	40.45
润肤霜B	25	10	0	0	1	7	2	44.05
润肤霜C	25	10	0	2	5	3	0	28.05 <sup>3)</sup>
润肤霜D	25	10	0	1	2	4	3	41.90
他克莫司软膏	3	9	0	0	0	1	8	60.17

表5 中药润肤霜对特异性皮炎小鼠背部皮肤病理改变的影响-皮下炎症

Table 5 Effect of moisturizers on pathological changes of back skin of mice with atopic dermatitis-subcutaneous inflammation

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	病变程度					Mean Rank
			0	1	2	3	4	
正常	-	12	12	0	0	0	0	6.50
模型	-	12	0	0	11	1	0	40.00 <sup>2)</sup>
润肤霜A	25	10	0	0	10	0	0	37.50
润肤霜B	25	10	0	0	8	2	0	43.50
润肤霜C	25	10	0	0	7	3	0	46.50
润肤霜D	25	10	0	0	6	3	1	50.05
他克莫司软膏	3	9	0	0	8	1	0	40.83

3.5 对小鼠血清中IgE含量的影响 与正常组比较,模型组血清中IgE含量显著增高(P<0.01);润肤霜C,D组给药14d,可明显抑制小鼠血清中IgE含量的升高,与模型组比较,润肤霜C,D组IgE含量明

显降低(P<0.05, P<0.01);润肤霜A,B组未见明显的抑制作用。见表7。

3.6 对小鼠皮肤组织中STAT3,p-STAT3表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠皮肤组织p-STAT3

表 6 润肤霜对特应性皮炎小鼠背部皮肤病理改变的影响-表皮增生

Table 6 Effect of moisturizers on pathological changes of back skin of mice with atopic dermatitis-epidermal hyperplasia

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	病变程度					Mean Rank
			0	1	2	3	4	
正常	-	12	12	0	0	0	0	6.50
模型	-	12	0	0	0	0	12	49.50 <sup>2)</sup>
润肤霜 A	25	10	0	0	0	2	8	43.40
润肤霜 B	25	10	0	0	0	2	8	43.40
润肤霜 C	25	10	0	0	0	6	4	31.20 <sup>4)</sup>
润肤霜 D	25	10	0	0	0	2	8	43.40
他克莫司软膏	3	9	0	0	0	1	8	46.11

表 7 润肤霜对特应性皮炎小鼠血清中 IgE 含量的影响

Table 7 Effect of moisturizers on serum IgE content in mice with atopic dermatitis

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	IgE( $\bar{x}\pm s$ )/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%
正常	-	12	34.36 $\pm$ 3.25	-
模型	-	12	135.27 $\pm$ 46.65 <sup>2)</sup>	-
润肤霜 A	25	10	159.46 $\pm$ 64.93	-17.9
润肤霜 B	25	10	103.60 $\pm$ 42.97	23.4
润肤霜 C	25	10	87.54 $\pm$ 19.44 <sup>4)</sup>	35.3
润肤霜 D	25	10	89.14 $\pm$ 27.73 <sup>3)</sup>	34.1
他克莫司软膏	3	9	338.66 $\pm$ 55.09	-150.4

表 8 润肤霜对特应性皮炎小鼠皮肤组织中 STAT3, p-STAT3 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of moisturizers on expression of STAT3 and p-STAT3 in the skin tissue of mice with atopic dermatitis ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	STAT3/ $\beta$ -actin	p-STAT3/ $\beta$ -actin
正常	-	0.055 $\pm$ 0.034	0.385 $\pm$ 0.207
模型	-	0.208 $\pm$ 0.099	0.693 $\pm$ 0.206 <sup>1)</sup>
润肤霜 A	25	0.233 $\pm$ 0.120	0.999 $\pm$ 0.369
润肤霜 B	25	0.109 $\pm$ 0.066	0.448 $\pm$ 0.116
润肤霜 C	25	0.059 $\pm$ 0.006	0.381 $\pm$ 0.111 <sup>3)</sup>
润肤霜 D	25	0.080 $\pm$ 0.028	0.561 $\pm$ 0.072
他克莫司软膏	3	0.227 $\pm$ 0.092	0.773 $\pm$ 0.355

的表达明显升高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),润肤霜 B, C, D 组动物给药 14 d, 对皮肤组织中 p-STAT3 表达的显著升高均显示出一定的抑制作用,抑制率分别为 47.6%, 71.6% 和 61.6%, 其中 C 组的作用最强,与模型组比较明显降低( $P<0.05$ );他克莫司软膏和润肤霜 A 组未见明显的抑制作用。各个受试物组 STAT3 的表达均未见明显差异。见图 2, 表 8。

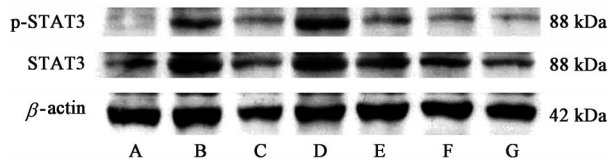


图 2 润肤霜对特应性皮炎小鼠皮肤组织中 STAT3, p-STAT3 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of STAT3 and p-STAT3 protein expression in skin tissues of mice with atopic dermatitis

#### 4 讨论

特应性皮炎以反复发作的慢性湿疹样皮疹为主要表现,伴有显著的皮肤干燥和剧烈瘙痒,严重影响生活质量。过去 30 年全球范围内特应性皮炎患病率逐渐增加,发达国家特应性皮炎儿童患病率

达 10%~20%,我国该病患病率的增加低于西方国家,但近 10 年来增长迅速;2014 年,采用临床医生诊断标准,我国 12 个城市 1~7 岁儿童特应性皮炎患病率达到 12.94%,1~12 月婴儿患病率达 30.48%<sup>[13]</sup>。外用保湿润肤剂是特应性皮炎的基础治疗,有助于恢复皮肤屏障功能。保湿润肤剂不仅能阻止水分丢失,还能修复受损的皮肤屏障,减弱外源性不良因素的刺激,从而减少疾病的发作次数和严重程度。

芍药甘草汤组方精简,白芍为君,甘草片为臣。其中白芍性微寒、味酸、苦,能够养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳;甘草片性平、味甘,能够补脾益气、清热解毒、缓急止痛、调和诸药;两药合用,酸甘化阴,阴液恢复,筋脉得养,挛急自平。人参甘、苦、平,微温,归脾、肺、心、肾经,具有大补元气、益气养阴之功效,匡扶身体正气;马齿苋具清热解毒、凉血止血之功效,以去邪为主;忍冬藤有清热解毒、疏风通络功效,走表,自古就是外用之良药。现代研究表明,从白芍中提取的有效部位白芍总苷外用可修复皮肤机械屏障受损,其机制可能与降低角质层中炎症介质白细胞介素(IL)-6 的含量、增加角

质层中神经酰胺的含量有关<sup>[14]</sup>。从甘草中提取的有效部位甘草总黄酮对药物诱发的小鼠皮肤瘙痒有明显的抑制作用<sup>[15]</sup>。从人参中提取的人参总皂苷能有效抑制皮肤细胞凋亡,对于皮肤老化具有一定的修复作用,广泛用于多种中药外用制剂中<sup>[16]</sup>。马齿苋临床上大量用于湿疹、尖锐湿疣和皮炎等的治疗<sup>[17]</sup>,在治疗特应性皮炎的外用中药中频数排名第三<sup>[18]</sup>。马齿苋水提取液外敷与依巴斯汀联合使用能有效改善特应性皮炎临床症状,提高疗效<sup>[19]</sup>。忍冬藤在婴幼儿湿疹、女性急性乳腺炎和慢性化脓性中耳炎治疗中疗效良好<sup>[20]</sup>。因此,本文以白芍总苷和甘草总黄酮代替芍药甘草汤作为基础方,通过加配人参总皂苷、马齿苋提取物和忍冬藤提取物制备不同组成的中药润肤霜,为开发治疗特应性皮炎的新药奠定基础。

虽然特应性皮炎的确切发病机制尚不清楚,但目前研究认为,免疫异常、皮肤屏障功能障碍、皮肤菌群紊乱等因素是本病发病的重要环节,Th2型炎症是特应性皮炎的基本特征<sup>[13]</sup>。特应性皮炎患者体内的Th2细胞活化过度,促进体内合成过量IgE,使患者呈现易过敏状态,有研究显示特应性皮炎伴随的皮肤红斑、湿疹、干燥、瘙痒等湿疹样皮损与血清中IgE的表达上调密切相关。特应性皮炎皮损往往伴有局部组织表达炎症细胞因子和趋化因子,这些因子与血管内皮细胞受体结合可激活对应的信号传导通路,诱导血管内皮细胞黏附因子的表达,从而使特应性皮炎患者在临床上的主要病理表现为T细胞为主的炎症细胞浸润和表皮增生过度<sup>[21-22]</sup>。两面神激酶(JAK)/STAT信号通路是一条与炎性细胞因子密切相关的细胞内信号转导通路,JAKs是许多下游炎性细胞因子必需的信号转导介质,其与自身免疫病的关系近年来受到越来越多的关注。研究表明,特应性皮炎患者体内存在免疫平衡失调,分泌异常的炎性细胞因子与相应的受体结合后引起膜通道开放,使与受体偶联的JAK激酶活化,引起JAKs发生自身磷酸化,进一步催化结合在受体上的STATs发生磷酸化修饰,活化的STATs以二聚体的形式进入细胞核内与DNA结合,对毛细血管增生、角质形成细胞异常增殖等过程发挥调控作用,从而促进疾病的发展,而抑制JAK/STAT信号通路相关蛋白的表达能够起到很好的治疗效果<sup>[23-24]</sup>。

他克莫司软膏是目前治疗特应性皮炎的一线用药,其作用机制可能在于阻断T细胞的活化与增殖,抑制干扰素(INF)- $\gamma$ , IL-2, IL-4 mRNA等的表

达,阻断前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)在肥大细胞中的合成,降低TNF- $\alpha$ 及IgE介导的组胺,5-羟色胺(5-HT)和白三烯的释放等<sup>[25]</sup>。本实验中,他克莫司能明显抑制特应性皮炎小鼠耳廓肿胀,改善皮损状况,但对IgE含量和p-STAT3的蛋白表达未见有明显降低作用,除了可能与特应性皮炎所处的疾病期不同有关外,还在于其作用机制可能并非与JAKs/STATs通路有关。实验室自制的4种中药润肤霜中,润肤霜C作用最强、能明显抑制特应性皮炎小鼠的体质量降低、降低皮损状况评分值、抑制小鼠耳廓肿胀、对小鼠背部皮肤坏死缺损和表皮增生均有一定的治疗作用,其作用机制可能与下调JAKs/STATs通路中p-STAT3的蛋白表达相关。因此,处方C的组成最佳,但该处方中各组分的最佳配比及其是否有量-效关系还需深入研究。

#### [参考文献]

- [1] EVELYNE D V, MICHEL S, CELINE E, et al. Atopic dermatitis studied through *in vitro* models [J]. *Front Med*, 2017, 4: 119.
- [2] DRUCKER A M, EYERICH K, BRUIN-WELLER M S, et al. Use of systemic corticosteroids for atopic dermatitis: international eczema council consensus statement [J]. *Br J Dermatol*, 2018, 178(3): 768-775.
- [3] 吴卿. 特应性皮炎的外用中药的筛选与评价研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [4] 林俊华, 王俊槐. 浅论经方在皮肤科的临床运用[J]. *湖北中医杂志*, 2001, 23(4): 37.
- [5] 曲缘章, 马生军, 朱广伟, 等. 芍药甘草汤的历史沿革与现代研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(6): 216-225.
- [6] 万鹏, 陈云慧. 运用芍药甘草汤治疗皮肤瘙痒症探析[J]. *陕西中医学院学报*, 2012, 35(1): 14-15.
- [7] 熊述清, 梁家芬, 杨琳琳, 等. 稠固维运用芍药甘草汤治疗皮肤病经验介绍[J]. *新中医*, 2018, 50(11): 257-259.
- [8] 杨沛丽, 郭丽梅. 抗氧化润肤霜的制备及其性能研究[J]. *天津科技大学学报*, 2019, 34(2): 45-49.
- [9] 王雄. 基于免疫调节机制探讨龙牡汤对特应性皮炎小鼠模型的治疗作用[D]. 北京: 中国医学科学院, 2017.
- [10] 温晓文, 赵巍, 孟威威, 等. 培土清心颗粒对特应性皮炎动物模型的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(5): 1992-1995.
- [11] 李云珠, 李邻峰. 特应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.
- [12] WANG A L, WEI J N, LU C J, et al. Genistein

- suppresses psoriasis-related inflammation through a STAT3-NF- $\kappa$ B-dependent mechanism in keratinocytes [J]. *Int Immunoharmacol*, 2019, 69:270-278.
- [13] 中华医学会皮肤性病学分会免疫学组特应性皮炎协作研究中心. 中国特应性皮炎诊疗指南(2020版) [J]. *中华皮肤科杂志*, 2020, 53(2):81-88.
- [14] 陆俊捷,李国娜,张成波,等. 白芍总苷对皮肤机械屏障障碍小鼠皮肤屏障功能的影响[J]. *上海中医药大学学报*, 2020, 34(1):65-68.
- [15] 康金森,程路峰,杨建,等. 甘草总黄酮止痒作用的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(12):2951-2953.
- [16] 鹿禛,邱智东,王蕾,等. 人参总皂苷对皮肤细胞的修复作用机制研究[J]. *吉林中医药*, 2020, 40(4):518-521.
- [17] 惠香香,白明,苗明三. 基于数据挖掘的马齿苋临床外用规律分析[J]. *世界中医药*, 2020, 15(3):369-372.
- [18] 裴悦,莫秀梅,曾剑波,等. 基于关联规则算法和复杂系统熵聚类的中医药治疗特应性皮炎的证治规律研究[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(3):124-127.
- [19] 李鹏英,李斌,刘红霞. 依巴斯汀联合马齿苋治疗特应性皮炎的临床观察[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(6):736-740.
- [20] 张武强,胡君,万雪梅. 张文泰老中医重用忍冬藤验案举隅[J]. *光明中医* 2015, 30(2):373-375.
- [21] 温晓文. 培土清心颗粒对特应性皮炎样小鼠模型的免疫干预研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2016.
- [22] Fiset P O, Leung D Y, Hamid Q. Immunopathology of atopic dermatitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118(1):287-290.
- [23] Banerjee S, Biehl A, Gadinam, et al. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects [J]. *Drugs*, 2017, 77(5):521-546.
- [24] 唐晓楠,张海婧,王文杰,等. 靶向JAK治疗自身免疫病的小分子药物研究进展[J]. *药学学报*, 2018, 53(10):1591-1597.
- [25] 蒋潇潇. 外用他克莫司治疗特应性皮炎[J]. *广州医药*, 2008, 39(6):6-9.

[责任编辑 孙丛丛]