

本文引用:张锐,凌瑜双,梁和,熊强,刁华,汪洋.黄桉兰乙醇溶液对小鼠止痒作用的初步研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(5):508-512.

黄桉兰乙醇溶液对小鼠止痒作用的初步研究

张锐¹,凌瑜双²,梁和³,熊强¹,刁华¹,汪洋^{4*}

(1.重庆医科大学公共卫生与管理学院、医学与社会发展研究中心、国民健康社会风险预警协同创新中心,重庆 400016;

2.重庆市渝中区疾病预防控制中心,重庆 402760;3.湖南省湘潭市卫生监督所,湖南 湘潭 411100;

4.重庆医科大学实验教学管理中心公共卫生实验教学中心,重庆 401331)

[摘要] **目的** 探讨黄桉兰乙醇溶液是否对蚊痒小鼠有治疗作用。**方法** 选择健康成年昆明小鼠 60 只,雌雄各半,在其耳后注射磷酸组胺建立瘙痒模型。根据体质量随机分组,每组 10 只,将不同浓度组(高、中、低)的黄桉兰乙醇溶液和其他处理组的药物涂抹于小鼠耳后,观察并记录用药后 30 min 之内小鼠的搔抓次数和搔抓潜伏期;断头取血,用 ELISA 法检测血清中 IL-6 的浓度;取耳后皮肤制作病理切片观察炎症细胞浸润、增生程度;用 SPSS 20.0 对数据进行统计学分析。**结果** 低浓度(0.02 g/mL)的黄桉兰乙醇溶液可以明显减少搔抓次数($P<0.05$),高浓度(0.5 g/mL)的黄桉兰乙醇溶液对炎症细胞的浸润、增生有显著的抑制作用,各组间血清 IL-6 浓度差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 黄桉兰乙醇溶液对小鼠瘙痒有一定的抑制作用,且低剂量溶液止痒效果好,但尚需在以后的研究中扩大样本量进行进一步研究,进而探讨黄桉兰乙醇溶液的作用机制。

[关键词] 瘙痒;黄桉兰;组胺;IL-6

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.05.005

Preliminary Study of Antipruritic Effect of Huangjuelan Ethanol Solution on Mice

ZHANG Rui¹, LING Yushuang², LIANG He³, XIONG Qiang¹, DIAO Hua¹, WANG Yang^{4*}

(1.College of Public Health and Administration, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Center for Disease Control and Prevention of Bishan District, Chongqing 402760, China; 3. Xiangtan Health Supervision Institute, Xiangtan, Hunan 411100, China; 4. Experimental Teaching and Management Center, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China)

[Abstract] **Objective** To explore the antipruritic effect of Huangjuelan ethanol solution on the mosquito biting model mice. **Methods** 60 mice, half male and half female, were selected and 10 mice in each group. Itching model was established through the intradermal injection of histamine phosphate at the back of mouse ear. Different concentrations of Huangjuelan ethanol solution and other treatment were applied on the mouse ear, scratching frequency and scratching latency were observed and recorded within 30 minutes at the wake of intradermal injection of histamine phosphate. All the mice were sacrificed by cutting heads, blood was collected. Serum concentration of IL-6 was detected with ELISA. Skin tissues of mice ear were collected to prepare for the pathological section, inflammatory cell infiltration as well as hyperplasia degree was observed under microscope. SPSS 20.0 was used for statistical analysis. **Results** The low concentration of Huangjuelan ethanol solution (0.02 g/mL) reduced the scratching frequency significantly ($P<0.01$), while high concentration of Huangjuelan ethanol solution

[收稿日期] 2017-07-18

[基金项目] 重庆医科大学大学生科研与创新实验项目(201420)。

[作者简介] 张锐,女,在读硕士研究生,研究方向:流行病与卫生统计学。

[通讯作者] * 汪洋,女,博士,副教授, E-mail: yangwang@cqmu.edu.com。

(0.5 g/mL) could significantly inhibit the inflammatory cell infiltration and hyperplasia of mouse ear. No significant difference in serum IL-6 concentration was observed among these groups ($P>0.05$). **Conclusion** Huangjuelan ethanol solution has a certain inhibitory effect on itching in mice, and low concentration of Huangjuelan solution shows better inhibitory effect. Therefore, it is still necessary to increase the sample size in future studies, and then to explore the mechanism of action of ethanol solution of this plant.

[**Keywords**] itching; Huangjuelan ethanol solution; histamine; IL-6

瘙痒是主要由化学介质、机械损伤和热刺激等因素引起的一种非常不愉快的感觉,在一定程度上给患者的生理、心理及社会活动等方面造成严重的影响,从而降低患者生活质量^[1]。瘙痒会导致皮肤出现抓痕、色素沉着。不仅如此,瘙痒还能使人们出现尴尬、烦闷、焦虑、抑郁等情绪波动,间接影响人们的身体健康,进而严重影响人们的日常生活^[2-4]。目前对瘙痒的发病机制尚不清楚,但组胺被认为是人类瘙痒的主要介质之一,其在各类荨麻疹、昆虫咬伤反应、表皮肥大细胞增生或药物性皮炎所引起的瘙痒中起介导作用^[5]。

虫咬皮炎,又称丘疹性荨麻疹,指昆虫叮咬人类皮肤而引起的炎性皮肤病,常于好发部位出现局部红肿、丘疹、风团或淤点,表面可出现水疱及大疱,皮损中心可见叮咬痕迹^[6-7]。现今针对虫咬性皮炎的治疗方法主要包括内服抗组胺药物、适当选用外用安抚止痒药物等。常用的外用止痒药物如炉甘石洗剂等,效果比较理想,但是在使用后,残留在皮肤表面的药物会影响个人美观,给社交活动造成不便。而某些外用药如复方醋酸地塞米松乳膏(俗名皮炎平),含有一定剂量的糖皮质激素。长期大量使用糖皮质激素会导致局部皮肤变黑萎缩、引起毛囊炎、毛细血管扩张及血糖升高、血压升高等不良反应^[8]。内服的抗组胺药物如抗组胺 H1 和 H2 受体拮抗剂等,常有不同程度的副反应,包括嗜睡、眩晕、口干及胃肠道不适等。大多数止痒药物单独应用时疗效往往不够理想,药物的联用可能会引起其他更严重的不良反应^[9]。黄桉(*Michelia alba* DC),又称白兰花,含有氧代黄心树宁碱,柳叶木兰碱,白兰花碱,黄心树宁碱等成分,其新鲜花瓣含 0.7%挥发油,油中主要成分为芳樟醇、甲基丁香油酚和苯乙醇^[10-11]。研究表明,黄桉的部分成分如芳樟醇具有抗炎作用^[12],但黄桉在民间作为止痒的偏方的作用^[10]还尚未证实。因此,研究价廉易得的天然植物黄

桉的止痒作用及其机理,具有重要的临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

6 周龄的昆明小鼠,雌雄各半,体质量 18~22 g,由重庆医科大学实验动物中心提供[SCXK(渝)2012-001]。

磷酸组胺(上海源叶生物科技有限公司);皮炎平(华润三九医药股份有限公司);IL-6 ELISA 小鼠血清检测试剂盒 96T(韵博生物科技有限公司);黄桉鲜花(重庆医科大学创新实验室提供);黄桉乙醇溶液储备液(0.5 g/mL)(由 100 g 新鲜黄桉兰花溶于 200 mL 无水乙醇中制成);1 g/mL 的黄桉乙醇溶液(由黄桉乙醇溶液储备液蒸馏水 5 倍稀释而成);0.02 g/mL 的黄桉乙醇溶液(由 0.1 g/mL 的黄桉乙醇溶液蒸馏水 5 倍稀释而成);Bouin 氏固定液(由 5 mL 冰醋酸、25 mL 甲醛溶液和 75 mL 饱和苦味酸水溶液配置成);其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 健康成年昆明小鼠 60 只,雌雄各半,根据体质量随机分组,每组 10 只。分为黄桉乙醇溶液高、中、低三个浓度组,模型组,生理盐水组,阳性药物(皮炎平)组。

1.2.2 建立瘙痒模型 用脱毛剂(硫化钡和滑石粉按 3:7 比例混合后由蒸馏水配置而成)脱去小鼠耳后毛发,面积为 1.5 cm×2.0 cm,并用纱布蘸蒸馏水清洁、擦干。40 min 后,分别在 6 组小鼠的去毛部位皮下注射 0.05%磷酸组胺溶液 0.1 mL。

1.2.3 给药 用医用棉签连续两次于注射部位涂抹给药,每次给药量为 2 mL。黄桉乙醇溶液高剂量组、中剂量组、低剂量组给药浓度分别为 0.5 g/mL、0.1 g/mL、0.02 g/mL;模型组未给予任何处理;生理盐水组给予 0.9%氯化钠;阳性药物组涂

抹 0.25 g 皮炎平膏剂。

1.2.4 小鼠搔抓行为的观察 注射组胺后立即将小鼠放入自制观察笼(30 cm×30 cm×45 cm,由6个小格组成)。观察小鼠从注射组胺开始到出现第一次搔抓反应的时间即潜伏期,随后用摄像机拍摄小鼠30 min内活动情况。依据录像回放,由经过培训的人员进行搔抓次数统计。1次搔抓是小鼠四肢对耳后涂药部位的1次或连续多次搔抓。

1.2.5 血清 IL-6 的检测 小鼠的搔抓次数记录结束后立即断头取血 1 mL,静置至血液分层后以 3 500 r/min 的速度离心 10 min 制备血清,放置于-20 ℃的冰箱保存,30 d 后用 ELISA 试剂盒测定各组小鼠血清中 IL-6 的浓度。

1.2.6 HE 染色 断头取血后取注射部位周围皮肤切成小块(面积为 1 cm×1 cm)置于 Bouin 氏固定液(由 5 mL 冰醋酸、25 mL 甲醛溶液和 75 mL 饱和苦味酸水溶液配置成)中保存 1 周,1 周后做石蜡切片,然后对石蜡切片进行 HE 染色,观察并比较各处理组之间的皮肤中炎症细胞的数量及形态差异。

1.3 统计学分析

用 SPSS 20.0 进行统计分析。血清中 IL-6 的浓度服从正态分布,采用均值和标准差表示数据的集中趋势和离散程度,用方差分析对其进行检验;搔抓潜伏期、搔抓次数及炎症细胞数量不服从正态分布,采用中位数和四分位间距表达数据的集中趋势和离散程度,用秩和检验对其进行分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学结果

2.1.1 搔抓潜伏期 各组小鼠在给予相应的药物处理后,小鼠无明显的行为学改变,偶有梳理毛发和对面部、腹部等处的搔抓行为,潜伏期过后开始出现搔抓反应。其中模型组潜伏期最短,黄桉兰乙醇溶液低剂量组潜伏期最长。对搔抓潜伏期进行正态性检验, $P=0.00<0.05$,潜伏期不服从正态分布。故采用随机区组资料秩和检验对潜伏期进行分析, $\chi^2=6.020$, $P=0.304>0.05$,故差异无统计学意义。各组搔抓潜伏期如表 1 所示。

2.1.2 搔抓次数 各组 30 min 搔抓次数如表 2 所

表 1 黄桉兰乙醇溶液对瘙痒小鼠搔抓潜伏期的影响

组别	例数	搔抓潜伏期/s	
		中位数	四分位间距 (Q1, Q3)
黄桉兰乙醇溶液高剂量组	10	95	(56.25, 212.75)
黄桉兰乙醇溶液中剂量组	10	120.5	(68.25, 194.50)
黄桉兰乙醇溶液低剂量组	10	172.5	(80.00, 396.25)
模型组	10	75	(45.00, 136.25)
生理盐水组	10	124	(79.25, 222.75)
阳性药物(皮炎平)组	10	156	(103.25, 222.25)
统计量(χ^2)		6.02	
P 值		0.304>0.05	

示,在所记录到的搔抓反应中,搔抓主要集中在注射处及其附近的皮肤。对搔抓次数进行正态性检验, $P=0.031<0.05$,搔抓次数不服从正态分布。故采用随机区组资料秩和检验对搔抓次数进行分析, $\chi^2=32.971$, $P=0.00<0.05$,故总体差异有统计学意义。多重比较结果如表 3 所示,在搔抓高峰时,其他各组的搔抓次数明显小于模型组($P<0.05$);阳性对照组搔抓次数明显低于高剂量组、中剂量组、低剂量组、生理盐水组($P<0.05$);高剂量组搔抓次数高于低剂量组、生理盐水组,差异具有统计学意义($P<0.05$);生理盐水组和中剂量组、低剂量组的差异无统计学意义($P>0.05$),说明中剂量和低剂量组的效果与生理盐水类似;随着注射黄桉兰乙醇溶液浓度的递减,搔抓次数依次减少。

表 2 30 min 内黄桉兰乙醇溶液对瘙痒小鼠搔抓次数的影响

组别	例数	搔抓次数/30 min	
		中位数(M)	四分位间距(Q1, Q3)
黄桉兰乙醇溶液高剂量组	10	179.5	(157.50, 316.00)
黄桉兰乙醇溶液中剂量组	10	166	(69.00, 240.50)
黄桉兰乙醇溶液低剂量组	10	124	(93.50, 151.50)
模型组	10	278.5	(219.00, 371.75)
生理盐水组	10	135.5	(97.00, 187.25)
阳性药物(皮炎平)组	10	37	(17.50, 112.00)
统计量(χ^2)		32.971	
P 值		0.00<0.05	

2.2 HE 染色结果

2.2.1 黄桉兰乙醇溶液对瘙痒小鼠血清 IL-6 的影响 对血清中 IL-6 的浓度进行正态性检验, $P=0.569>0.05$,服从正态分布。故采用随机区组资料方差分析对血清中 IL-6 的浓度进行分析, $F=1.507$, $P=0.148>0.05$,故差异无统计学意义。结果见表 4。

表3 各组搔抓次数的多重比较P值

组别	黄桉兰乙醇溶液 高剂量组	黄桉兰乙醇溶液 中剂量组	黄桉兰乙醇溶液 低剂量组	空白 模型组	生理 盐水组
黄桉兰乙醇溶液中剂量组	0.14				
黄桉兰乙醇溶液低剂量组	0.00	0.046			
模型组	0.05	0.001	0.000		
生理盐水组	0.03	0.430	0.219	0.000	
阳性药物(皮炎平)组	0.00	0.000	0.040	0.000	0.001

表4 黄桉兰乙醇溶液对瘙痒小鼠血清IL-6的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	IL-6/pg·mL ⁻¹
黄桉兰乙醇溶液高剂量组	10	32.89±8.04
黄桉兰乙醇溶液中剂量组	10	31.68±8.80
黄桉兰乙醇溶液低剂量组	10	31.33±6.01
模型组	10	38.24±7.74
生理盐水组	10	34.73±3.88
阳性药物(皮炎平)组	10	31.09±6.57
统计量(F)		1.507
P值		0.148>0.05

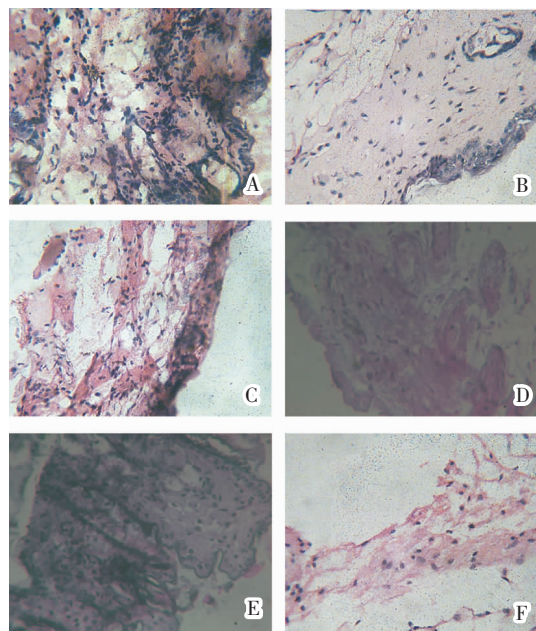
2.2.2 HE染色镜下观察结果 病理切片用HE染色后(图1),可观察到细胞核大而圆、染色较深的炎症细胞,对炎症细胞数进行正态性检验, $P=0.04<0.05$,炎症细胞数不服从正态分布。故采用随机区组资料秩和检验对炎症细胞数进行分析, $\chi^2=6.971$, $P=0.223>0.05$,故差异无统计学意义。炎症细胞观察结果如表5所示。

表5 黄桉兰乙醇溶液对瘙痒小鼠炎症细胞数的影响

组别	动物数	中位数(M)	四分位间距(Q1,Q3)
黄桉兰乙醇溶液高剂量组	10	11.5	(10.00,16.50)
黄桉兰乙醇溶液中剂量组	10	13.5	(10.75,16.50)
黄桉兰乙醇溶液低剂量组	10	11	(8.50,14.00)
模型组	10	12	(6.00,19.50)
生理盐水组	10	14	(12.75,17.75)
阳性药物(皮炎平)组	10	12	(9.50,13.75)
统计量(χ^2)		6.971	
P值		0.223>0.05	

3 讨论

瘙痒是皮肤科最常见的症状之一,是一种能引起搔抓欲望的不愉快感觉。蚊虫叮咬所致的瘙痒是最常见的一种皮肤源性瘙痒。当蚊子叮咬人类时,会从口器注入唾液。其唾液含有蚁酸(HCOOH)、抗凝血剂及目前成分不明的蛋白质等很多外来物质。引



注:A.模型组;B.黄桉兰乙醇溶液低剂量组;C.黄桉兰乙醇溶液中剂量组;D.黄桉兰乙醇溶液高剂量组;E.生理盐水组;F.阳性药物(皮炎平)组

图1 各组大鼠皮肤切片光镜图(HE染色,×400)

起身体的免疫系统会释放出一种称为组织胺的蛋白质,组胺引起被“咬”部位周围血管扩张,形成小红疹。组胺可促进多种细胞和组织合成及分泌 interleukin-1A (IL-1A), interleukin-1B (IL-1B), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) 或 RANTES 等促炎细胞因子及趋化因子,促进过敏-炎症反应^[13],引起瘙痒。组胺还会刺激皮肤中的神经末梢,直接引起瘙痒并且释放P物质(SP),SP又会促肥大细胞脱颗粒释放组胺进一步引起瘙痒^[14]。同时,瘙痒引起的搔抓可导致炎性介质的释放,加大瘙痒的严重程度,从而形成瘙痒-搔抓的恶性循环^[15]。

虫咬性皮炎的发生主要是由于蚊虫叮咬后体内组胺物质的升高导致的,因此本次实验用组胺建立瘙痒模型,进而模拟虫咬性皮炎在体内的发生机制。本实验通过在小鼠耳后皮内注射0.05%的磷酸组胺

溶液成功建立瘙痒模型。在组胺注射部位涂抹药物,观察不同处理组小鼠的搔抓潜伏期以及30 min内的搔抓次数,用ELISA法测定小鼠血清中IL-6浓度,取耳后的皮肤组织制作病理切片,观察组织中炎症细胞的浸润增生程度。

从行为学结果来看,黄桉乙醇溶液对小鼠的搔抓反应有一定的抑制作用。我们发现注射低剂量的黄桉乙醇溶液的小鼠搔抓次数与涂抹生理盐水的相近,且都低于其他各组,因此低剂量的黄桉乙醇溶液的止痒效果较好。血清ELISA检测的结果表明黄桉乙醇溶液会降低瘙痒发生后小鼠血清内的IL-6浓度,但结果没有统计学意义,分析其原因可能是样本量较小。病理切片的结果表明黄桉乙醇溶液可以减少瘙痒模型小鼠体内的炎症细胞的浸润和增生,且结果表明浓度越高其作用效果越好。这和血清学和行为学上的结果有一定的差异,可能由于高剂量组的浓度过高,对小鼠皮肤产生一定的脂溶性,造成损伤,进而导致病理学结果和血清学、行为学的结果不一致。

综上所述,黄桉乙醇溶液对虫咬皮炎引起的瘙痒有一定的抑制作用,且低剂量溶液止痒效果较好。本研究表明黄桉乙醇溶液的止痒机制可能是其叶中的挥发性油性成分抑制炎症细胞的浸润和增生,减少炎症介质的释放来止痒的,但还需要更进一步的实验来验证该假设。

参考文献:

[1] ANDERSEN H H, YOSIPOVITCH G, GALOR A. Neuropathic symptoms of the ocular surface: dryness, Pain, and Itch[J]. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2017, 17(5): 373-

381.

- [2] 廖万清,朱宇.皮肤瘙痒的研究进展及治疗现状[J].解放军医学杂志,2011,36(6):555-557.
- [3] 周卫东,匡琳,杨年华,等.紫红消风散治疗老年性皮肤瘙痒症的临床观察[J].湖南中医药大学学报,2009,29(1):53-55.
- [4] 杨洁,贺晶,漆军,等.男性老年瘙痒症患者瘙痒与生活质量关系的评价研究[J].中华老年多器官疾病杂志,2009,8(2):152-155.
- [5] 邓小元.皮肤源性瘙痒发生机制的研究进展[J].中国医药科学,2012,2(3):42-43.
- [6] 王伟庆,程松玲.山东省莱州市城区居民夏季虫咬性皮炎患病情况调查[J].中国媒介生物学及控制杂志,2015,26(6):628-629.
- [7] 楼爱芳.某中学虫咬性皮炎273例现场调查[J].中国乡村医药,2011,18(11):67.
- [8] 刘淮,刘景楨.外用糖皮质激素的适应症与副作用[J].皮肤病与性病,2016,38(1):19-20.
- [9] 刘曼,孙亭方,王贵林.止痒药物的主要药效学研究方法和观察指标[J].长江大学学报(自科版),2013,10(15):101-103.
- [10] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].1版2册6卷.上海:上海科技出版社,1999:870.
- [11] WANG H M, LO W L, HUANG L Y, et al. Chemical constituents from the leaves of *Michelia alba*[J]. Natural Product Research, 2010, 24(5):398-406.
- [12] AWEN B Z, UNNITHAN C R. Essential oils of *Retama raetam* from Libya: chemical composition and antimicrobial activity[J]. Nat Prod Res, 2011,25(9):927-933.
- [13] BAYRAM H, DEVALIA J L, KHAIR O A, et al. Effect of loratadine on nitrogen dioxide-induced changes in electrical resistance and release of inflammatory mediators from cultured human bronchial epithelial cells[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1999,104(1):93-99.
- [14] 陈亮.皮肤中的肥大细胞与神经肽P物质[J].中国临床康复,2004,8(2):334-335.
- [15] 沈非沉.复合因素所致瘙痒模型的建立及薄荷醇止痒作用的研究[D].东莞:广东医学院,2007.

(本文编辑 苏维)