

本文引用: 刘芳榕, 徐翠萍, 刘朝圣, 成雪, 程晓, 张语林. 止痒润肤乳对特应性皮炎小鼠模型皮损组织 IL-4、IFN- γ 蛋白质与基因表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(1): 22-29.

止痒润肤乳对特应性皮炎小鼠模型皮损组织 IL-4、 IFN- γ 蛋白质与基因表达的影响

刘芳榕¹, 徐翠萍¹, 刘朝圣^{2*}, 成雪¹, 程晓¹, 张语林³

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007;

3. 浏阳市中医医院, 湖南浏阳 410399

[摘要] **目的** 观察止痒润肤乳对小鼠特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)样模型皮损组织中 Janus 激酶信号转导子和转录激活子(janus kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)信号转导通路关键细胞因子白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)表达水平的影响。**方法** 将 50 只 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为空白组、模型组、糠酸莫米松软膏组、迪高替尼软膏组、止痒润肤乳组, 每组 10 只。采用 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB)溶液诱导 AD 样反应, 实验过程观察小鼠抓挠行为并进行皮损评分, 取材后进行 HE 染色观察皮损组织病理学改变, 采用 Real-time PCR 法和 Western blot 法分别测定皮损组织中 IL-4、IFN- γ 的 mRNA 表达水平和蛋白含量。**结果** 与空白组相比, 模型组小鼠皮损组织 IL-4 mRNA 和蛋白表达量上升($P<0.05$), IFN- γ mRNA 和蛋白表达量下降($P<0.05$); 与模型组相比, 止痒润肤乳组、糠酸莫米松软膏组、迪高替尼软膏组 IL-4 mRNA 和蛋白表达量减少($P<0.01$), IFN- γ mRNA 和蛋白表达量升高($P<0.01$); 与糠酸莫米松软膏组相比, 止痒润肤乳组 IL-4 mRNA 和蛋白表达量降低($P<0.01$), IFN- γ mRNA 和蛋白表达明显升高($P<0.01$); 与迪高替尼软膏组相比, 止痒润肤乳组 IL-4 mRNA 和蛋白表达量差异无统计学意义($P>0.05$), IFN- γ mRNA 和蛋白表达量升高($P<0.01$)。**结论** 止痒润肤乳对 DNCB 诱导的 AD 样症状有明显疗效, 其作用机制可能通过抑制 JAK-STAT 信号转导通路中关键细胞因子 IL-4 基因表达、上调 IFN- γ 基因表达, 进而减轻炎症反应来实现的。

[关键词] 特应性皮炎; 止痒润肤乳; JAK-STAT 信号通路; 白细胞介素-4; γ 干扰素; 迪高替尼软膏

[中图分类号] R275.9

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.01.004

Effects of Zhiyang Runfu Cream on protein and gene expressions of IL-4 and IFN- γ in skin lesions of mice with atopic dermatitis

LIU Fangrong¹, XU Cuiping¹, LIU Chaosheng^{2*}, CHENG Xue¹, CHENG Xiao¹, ZHANG Yulin³

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Liuyang Hospital of Chinese Medicine, Liuyang, Hunan 410399, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of Zhiyang Runfu Cream on the expression levels of interleukin-4 (IL-4) and interferon- γ (IFN- γ), the key cytokines of janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) signaling pathway in skin lesions of mice with atopic dermatitis (AD). **Methods** Fifty SPF BALB/c mice were randomized into blank,

[收稿日期] 2023-08-20

[基金项目] 湖南省临床医疗技术创新引导项目(2021SK51503); 湖南中医药大学研究生创新课题(2022CX149)。

[通信作者]* 刘朝圣, 男, 博士, 副主任医师, E-mail: 57846224@qq.com。

model, Mometasone Furoate Ointment (MFO), Delgocitinib Ointment (DO), and Zhiyang Runfu Cream (ZYRFC) groups, with 10 rats in each group. The AD-like reaction was induced by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) solution. The scratching behavior of mice was observed and the condition of skin lesions was scored during the experiment. The AD lesions of mice were peeled back for pathological observation through HE staining. The mRNA expression levels and protein content of IL-4 and IFN- γ in the AD lesions were determined by Real-time PCR and Western blot, respectively. **Results** Compared with blank group, the mRNA and protein expression levels of IL-4 in the AD lesions of model group increased ($P<0.05$), while those of IFN- γ decreased ($P<0.05$). Compared with model group, the mRNA and protein expression levels of IL-4 in the AD lesions of ZYRFC, MFO, and DO groups were reduced ($P<0.01$), while those of IFN- γ increased ($P<0.01$). Compared with MFO group, the mRNA and protein expression levels of IL-4 in the AD lesions of ZYRFC group were lower ($P<0.01$), while those of IFN- γ were significantly higher ($P<0.01$). Compared with DO group, the mRNA and protein expression levels of IL-4 in the AD lesions of ZYRFC group were not significantly different ($P>0.05$), while those of IFN- γ were elevated ($P<0.01$). **Conclusion** Zhiyang Runfu Cream has obvious curative effects on AD-like symptoms induced by DNCB. And its mechanism of action is probably inhibiting the expression of IL-4 gene and increasing the expression of IFN- γ gene in the JAK-STAT signal transduction pathway, and thus alleviating inflammatory reaction.

[**Keywords**] atopic dermatitis; Zhiyang Runfu Cream; JAK-STAT signaling pathway; interleukin-4; interferon- γ ; Digotininb Ointment

特应性皮炎(atopic dermatitis,AD)又名“异位性湿疹”“遗传过敏性皮炎”,是一种具有遗传倾向的变态反应性疾病,临床上以具有“特应性”体质的人群反复出现皮肤湿疹样皮损及瘙痒为主要特点。如今全世界受到AD影响的人口至少有2.3亿,80%~90%的病例发病在5岁之前^[1],儿童AD由于发病年龄早、病程持续时间长、临床缺乏特效药物而成为中国家庭经济负担排名第一的儿童皮肤疾病,积极开发有效防治AD的药物具有重大临床价值。近年来,越来越多研究聚焦于Janus激酶信号转导子和转录激活子(janus kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)信号通路与AD的关系, JAK-STAT信号通路与AD的发生发展密切相关,而白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)和 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)是AD发病机制中的重要调控因子,IL-4和IFN- γ 通过JAK-STAT信号通路来转导信号,这一过程可能是引起AD发病的重要因素。

中医药疗法以整体观念和辨证论治为核心,强调个体化施治,取得了丰富且显著的临床疗效,是临床防治AD的重要手段。止痒润肤乳作为湖南中医药大学第一附属医院自制的纯中药外用复方乳膏,在前期研究中发现其对AD疗效确切,无明显不良反应^[2]。本研究着眼于JAK-STAT信号通路,探究止痒润肤乳对AD样小鼠模型的治疗作用及其分子

机制,研究结果报道如下。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雌性BALB/c小鼠50只,6周龄,体质量18~20g,购自湖南长沙斯莱克景达动物公司,合格证号:43072711102946448。饲养于学校SPF级动物实验室,环境洁净,昼夜明暗交替时间10h/14h,温度22~26℃,相对湿度55%~70%。按照动物伦理学要求善待动物,伦理审批号:ZYFY20201212-07。

1.2 实验药物

止痒润肤乳由医院制剂室提供^[3],批号:20191130。中药组成:生地黄、当归、制首乌、薄荷、苦杏仁、桃仁、红花、地肤子、苦参、大枫子仁、蚕砂、瓜蒌霜、冰片。基质组成:水相包括甘油、苯甲酸钠、氢氧化钾。油相包括硬脂酸、单双甘油酯、白凡士林、液体石蜡、羟苯乙酯。药剂制备按乳剂制备法:(1)取中药薄荷和当归,以水蒸汽蒸馏法提取蒸馏液,并加TW-80乳化剂;(2)取“(1)”所得药渣和其余药材(除冰片外)以乙醇渗漉法提取其中有效成分,制至稠膏状;(3)取配方中油相所含原料高温加热,融化后加入稠膏和冰片搅拌均匀;(4)取3种水相原料将“(1)”制备的混合物加热融化;(5)将以上工序所制两种液体在85℃时合并,连续搅拌至冷凝成膏,最后包装为规格50g/盒的成品制剂。湖北恒安芙林药业股份有

限公司提供的规格为 10 g 的糠酸莫米松软膏(生产批号:200516);日本烟草及鸟居制药株式会社提供的规格为 5 g 的 5% 迪高替尼软膏(货号:BCP34832)。

1.3 主要试剂与仪器

2,4-二硝基氯苯(美国 Sigma 公司,批号:237329);通用逆转录试剂盒(批号:11141ES60)、Real time PCR 荧光定量试剂盒(批号:11201ES08)均购自上海翊圣生物科技有限公司;IL-4 抗体(批号:AF5142)、IFN- γ 抗体(批号:DF6045)均购自美国 Affinity Biosciences 公司;羊抗兔-HRP(北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-0295G-HRP);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:PC0020)。

台式低速离心机(上海医疗器械股份有限公司,型号:80-2);普通 PCR 仪(西安天隆科技有限公司,型号:Genesy 98T);实时荧光定量 PCR 仪(江苏迅睿生物技术有限公司,型号:MA-6000);核酸检测仪(杭州遂真生物技术有限公司,型号:F-1100);蛋白 marker(赛默飞世尔科技公司,型号:26617);电泳仪(美国 Bio-rad 公司,型号:1645070);电转仪(美国 Bio-rad 公司,型号:BE6085);酶标仪(上海倍特生物技术有限公司,型号:800TS);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:5200)。

2 实验方法

2.1 动物分组和造模

实验前,将 50 只小鼠在 SPF 级实验室适应性饲养 5 d。采用随机数字表法将小鼠分为空白组、模型组、糠酸莫米松软膏组、迪高替尼软膏组、止痒润肤乳组,每组 10 只。第 0 天称量每只小鼠体质量并记录,在小鼠背部制备 2 cm \times 3 cm 脱毛区域。参考造模方法^[4-7],实验第 1~7 天,每天将 1% 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB)溶液 100 μ L 均匀涂抹于除空白组外小鼠背部脱毛处皮肤激发 AD 样反应,第 2 周开始每周 2 次使用 0.2% DNCB 溶液 100 μ L 维持 AD 样反应,持续 3 周(规定每周的第 3 天和第 6 天进行造模,时间均为上午 9 点开始),具体造模时间线图如图 1。成功的小鼠 AD 模型可见其背部脱毛处皮肤具有红斑、丘疹、水肿、鳞屑覆盖等症状。

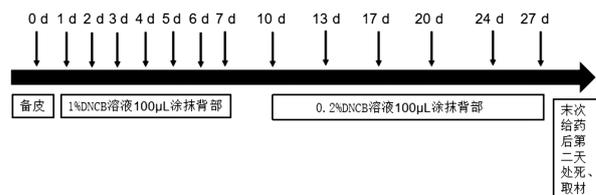


图 1 AD 小鼠造模时间线图

2.2 动物给药

实验第 15 天起,模型稳定,各组开始给予相应的受试物:糠酸莫米松软膏组每天涂抹糠酸莫米松软膏(100 μ g/次,1 次/d),迪高替尼软膏组每天涂抹迪高替尼软膏(100 μ g/次,1 次/d),止痒润肤乳组每天涂抹止痒润肤乳(100 μ g/次,1 次/d),空白组及模型组均不予以处理,连续 14 d。小鼠每天给药时间均为造模后 1 h,防止给药时将造模药物擦蹭掉。

2.3 实验取材

实验第 29 天采取颈部脱臼法处死小鼠,取背部典型部位皮损约 1.0 cm \times 0.5 cm,分离剔除皮下脂肪,用 PBS 清洗后,将每份标本分为两部分:用于病理观察部分置于离心管中,用 4% 多聚甲醛浸泡进行固定;用于指标检测部分用离心管装好,冻存在 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱备用。

2.4 观测指标与方法

2.4.1 小鼠一般情况观察 (1)小鼠抓挠行为评价:实验第 5、10、15、20、25、28 天定时统计,小鼠抬起爪持续性搔抓皮损区记为 1 次,小鼠将爪放下或出现停顿、舔舐后再次抓挠记为第 2 次,连续搔抓计为 1 次,统计时间为 10 min。观察过程中将小鼠放入透明有孔的聚丙烯盒子内,保持环境安静无人,用摄像机记录以方便统计。(2)皮损状况评分:实验第 5、10、15、20、25、28 天使用湿疹面积及严重程度指数(eczema area and severity index, EASI)评分评估 AD 严重程度^[8],并用数码相机拍照记录。①红斑和出血:无为 0 分,轻微红斑为 1 分,明显红斑但无出血为 2 分,明显红斑伴出血为 3 分;②水肿:无为 0 分,轻度为 1 分,中度为 2 分,重度为 3 分;③撕裂和糜烂:无为 0 分,轻度撕裂为 1 分,明显撕裂但无糜烂为 2 分,明显撕裂伴糜烂为 3 分;④干燥和结垢:无为 0 分,轻度干燥为 1 分,明显干燥但无结垢为 2 分,明显干燥伴结垢为 3 分。为最大限度减少技术差异,在每个实验过程中,都有一名研究人员对治疗视而不见进行测量。

2.4.2 HE染色观察皮损组织病理学表现 将各组小鼠皮损组织经多聚甲醛固定、脱水、包埋切片、核染、着色封片后,在光学显微镜下观察表皮有无角化过度或角化不全、棘层及颗粒层厚度、真皮炎性细胞浸润等情况。

2.4.3 Real time PCR检测皮损组织中IL-4、IFN- γ mRNA表达水平 将适量组织样本完全破碎,应用TRNzol总RNA提取试剂提取样本RNA,运用4 \times Hifair[®] III SuperMix plus进行cDNA反转录,冰上配制反应液后,应用三步扩增程序法PCR扩增程序进行扩增,得到CT值,最终计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值并作图比较。

表1 目的基因PCR引物序列

基因名称	引物序列	长度/bp
IL-4	正向 GCCATATCCACGGATGCGACAA	22
	反向 GGTGTTCTTCGTTGCTGTGAGGA	23
IFN- γ	正向 AACTCAACTGGCATAGATGTGGAAGA	26
	反向 AACTCAACTGGCATAGATGTGGAAGA	26
GAPDH	正向 GGCAAGTTCAACGGCACAG	19
	反向 GGCAAGTTCAACGGCACAG	20

2.4.4 Western blot检测皮损组织中IL-4、IFN- γ 蛋白表达量 将适量皮损组织破碎后采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度,根据目的蛋白的分子量配置相应比例的分离胶和浓缩胶,样本以每孔10 μ L的总量进行上样,电泳结束后运用湿转法转膜,室温封闭2 h。进行一抗、二抗孵育后显色曝光,采用全自动化学发光图像分析系统进行曝光。曝光结束后,进行膜洗脱再生、再次封闭2 h,洗涤后进行显色曝光成像,曝光结果使用Image J软件分析灰度值,制作Western blot图表,每个蛋白至少测量3个标本以保证精确。

2.5 统计学分析

统计学分析使用GraphPad Prism 8.0软件进行

处理,本实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。若符合正态性且方差齐性时,采用单因素方差分析,LSD法进行两两比较;方差不齐时采用Dunnnett T3法;否则使用非参数检验。

3 结果

3.1 一般情况观察

3.1.1 小鼠抓挠行为 空白组小鼠抓挠频率在整个实验过程中一直较低;模型组小鼠抓挠频率数值起伏较大,但总体趋势偏高,和空白组相比差异有统计学意义($P<0.01$);3个给药组小鼠随着实验进行,抓挠频率总趋势下降,和模型组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。详见图2、表2。

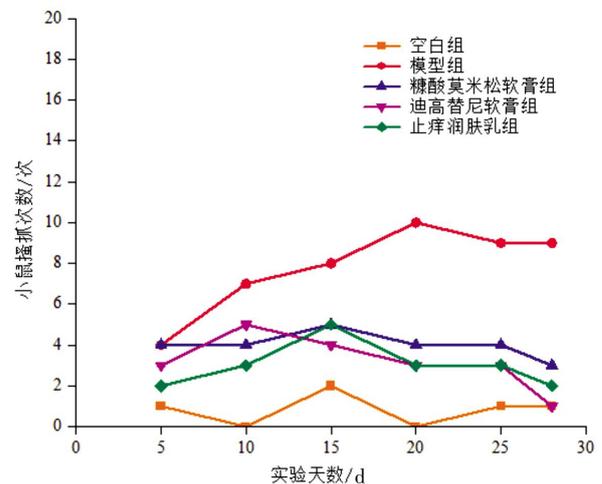


图2 各组小鼠搔抓次数统计图

3.1.2 皮损状况观察 空白组小鼠在整个实验过程中,被剔除的毛发随着实验进程推进逐渐长出,质地光亮顺泽。模型组小鼠随着实验的推进,DNCB刺激次数增多,皮肤受损程度加重,搔抓次数变频繁,其皮损区域进一步出现抓痕、血痂等损害,皮毛数量、光亮顺泽度也随之降低。糠酸莫米松软膏组小鼠在

表2 各组小鼠搔抓次数($n=10, \bar{x}\pm s$,次)

天数	空白组	模型组	糠酸莫米松软膏组	迪高替尼软膏组	止痒润肤乳组
5	1.00 \pm 0.10	4.10 \pm 0.33 ^{##}	4.20 \pm 0.52*	3.47 \pm 0.62*	2.82 \pm 0.49*
10	0.00 \pm 0.00	7.62 \pm 0.41 ^{##}	4.23 \pm 0.17*	5.18 \pm 0.26*	3.98 \pm 0.14*
15	2.10 \pm 0.52	8.16 \pm 0.72 ^{##}	5.62 \pm 0.68*	4.41 \pm 0.78*	5.52 \pm 0.29*
20	0.00 \pm 0.00	10.14 \pm 0.13 ^{##}	4.19 \pm 0.37*	3.88 \pm 0.40*	3.49 \pm 0.78*
25	1.20 \pm 0.40	9.55 \pm 0.87 ^{##}	4.87 \pm 0.16*	3.52 \pm 0.22*	3.71 \pm 0.65*
28	1.10 \pm 0.30	9.73 \pm 0.62 ^{##}	3.28 \pm 0.81*	1.16 \pm 0.11*	2.41 \pm 0.36*

注:与空白组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

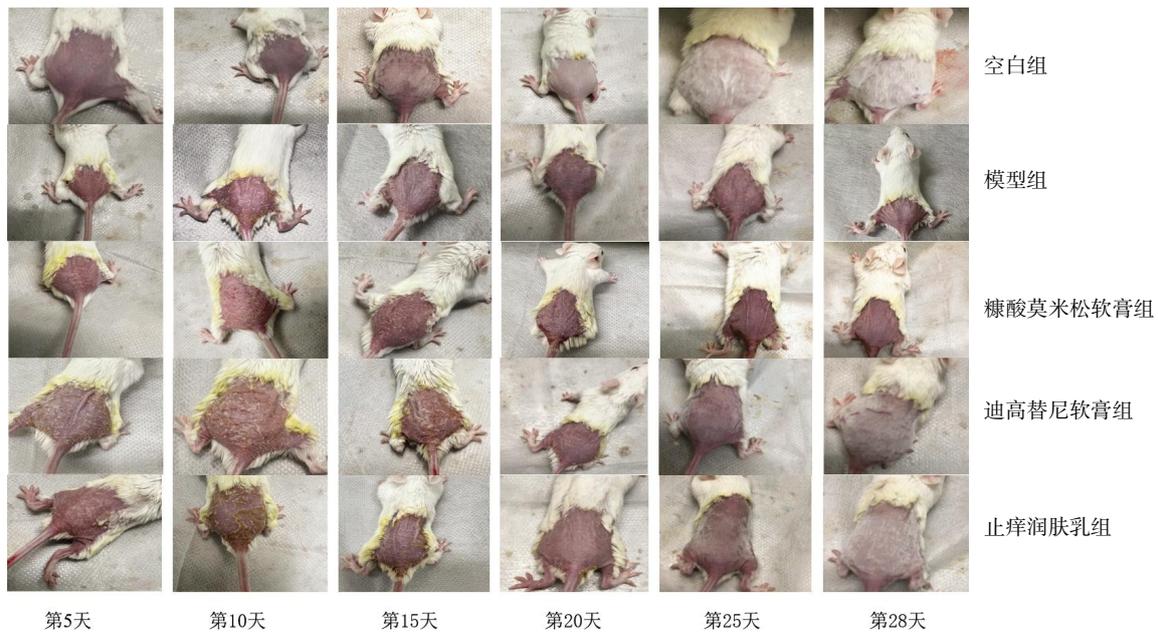


图 3 各组小鼠第 5、10、15、20、25、28 天背部皮损照片

给予 DNCB 溶液的第 10 天背部皮肤出现红斑、水肿、渗出、抓痕等明显炎症反应,在给予糠酸莫米松软膏治疗后,红斑颜色逐渐变浅、水肿减轻,第 28 天仍有少量抓痕,血痂未完全脱落。迪高替尼软膏组小鼠皮肤在给予治疗后红斑颜色明显变浅、水肿明显减轻,第 28 天已有部分毛发长出。止痒润肤乳组小鼠在用药后红斑和水肿明显改善,毛发长出,质地柔顺,皮肤光滑,接近空白组和迪高替尼软膏组皮肤颜色。详见图 3。

给药治疗后,与模型组相比,糠酸莫米松软膏组、迪高替尼软膏组、止痒润肤乳组皮损评分降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与糠酸莫米松软膏比较,迪高替尼软膏组、止痒润肤乳组评分稍低,但差异无统计学意义 ($P>0.05$);迪高替尼软膏组和止痒润肤乳组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。详见表 3。

3.2 各组小鼠局部皮损组织病理学变化

空白组小鼠皮肤组织表皮层、真皮层结构基本未见明显异常,细胞形态正常,真皮浅层未见明显炎

表 3 各组小鼠治疗后的皮损评分($\bar{x}\pm s$, 分)

组别	<i>n</i>	皮损评分
空白组	10	0.00±0.00
模型组	10	5.33±0.57
糠酸莫米松软膏组	10	3.00±1.00**
迪高替尼软膏组	10	2.33±1.15**
止痒润肤乳组	10	2.00±1.00*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

症反应。与空白组相比,模型组皮损可看到明显炎症增生性改变,可见角化过度、棘层肥厚、海绵水肿、真皮血管扩张充血,可见真皮层大量淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等炎性细胞浸润,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组相比,各给药组可见表皮厚度明显减小,表皮层与真皮层的肥大细胞和粒细胞浸润减轻,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与迪高替尼软膏组、止痒润肤乳组比较,糠酸莫米松软膏组小鼠棘层肥厚、海绵水肿、真皮血管扩张充血较严重,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。详见图 4。

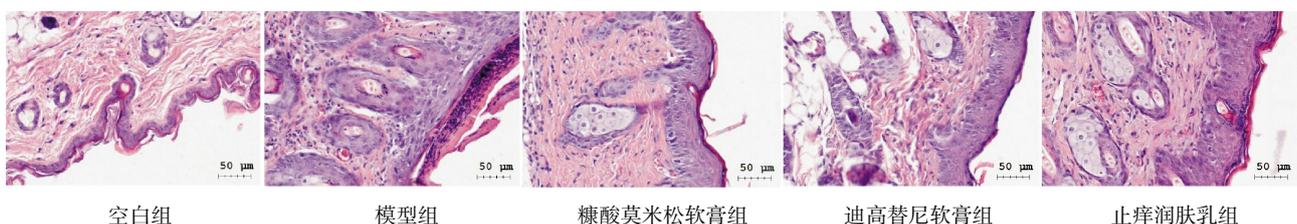


图 4 各组小鼠皮损组织病理图片(HE,×200)

表4 各组小鼠皮损组织 HE 染色评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	n	病理评分
空白组	10	0.00±0.00
模型组	10	2.60±0.55 [#]
糠酸莫米松软膏组	10	1.60±0.89*
迪高替尼软膏组	10	1.20±0.45*□
止痒润肤乳组	10	1.40±0.55*□

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与糠酸莫米松软膏组比较,[□] $P<0.05$ 。

3.3 止痒润肤乳对 AD 小鼠背部皮损组织 IL-4、IFN- γ mRNA 表达量的影响

与空白组相比,模型组小鼠皮损组织 IL-4 mRNA 表达量明显升高($P<0.05$),IFN- γ mRNA 表达量降低($P<0.05$)。与模型组相比,止痒润肤乳组、迪高替尼软膏组、糠酸莫米松软膏组小鼠 IL-4 mRNA 表达量明显降低($P<0.01$),IFN- γ mRNA 表达量升高($P<0.01$)。与糠酸莫米松软膏组比较,止痒润肤乳组小鼠 IL-4 mRNA 表达量明显降低($P<0.01$)。与迪高替尼软膏组相比,止痒润肤乳组 IL-4 mRNA 表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。与糠酸莫米松软膏组、迪高替尼软膏组相比,止痒润肤乳组 IFN- γ mRNA 表达升高($P<0.01$)。详见图 5。

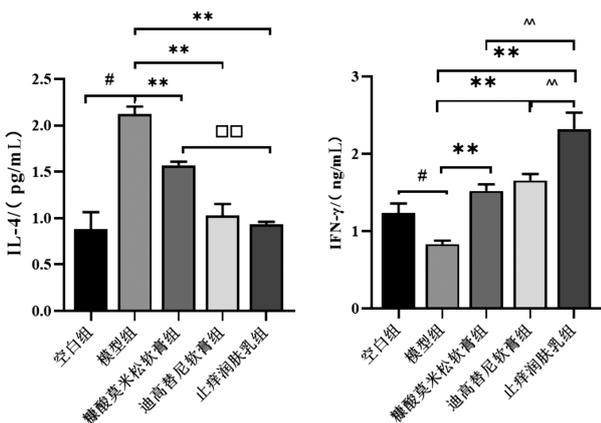


图5 止痒润肤乳对 AD 小鼠皮损组织 IL-4、IFN- γ mRNA 表达量的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与糠酸莫米松软膏组比较,[□] $P<0.05$;与止痒润肤乳组比较,[~] $P<0.01$ 。

3.4 止痒润肤乳对 AD 小鼠背部皮损组织 IL-4、IFN- γ 蛋白表达水平的影响

与空白组相比,模型组小鼠 IL-4 蛋白水平明显上升($P<0.05$),IFN- γ 蛋白水平下降($P<0.05$)。与模

型组相比,用药干预后 3 个治疗组小鼠 IL-4 蛋白含量明显下降($P<0.01$),IFN- γ 蛋白含量明显上升($P<0.01$)。与糠酸莫米松软膏组相比,止痒润肤乳组和迪高替尼软膏组 IL-4 蛋白含量下降($P<0.01$)。与迪高替尼软膏组相比,止痒润肤乳组 IL-4 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。与迪高替尼软膏组、糠酸莫米松软膏组相比,止痒润肤乳组 IFN- γ 蛋白含量明显上升($P<0.01$)。详见图 6。

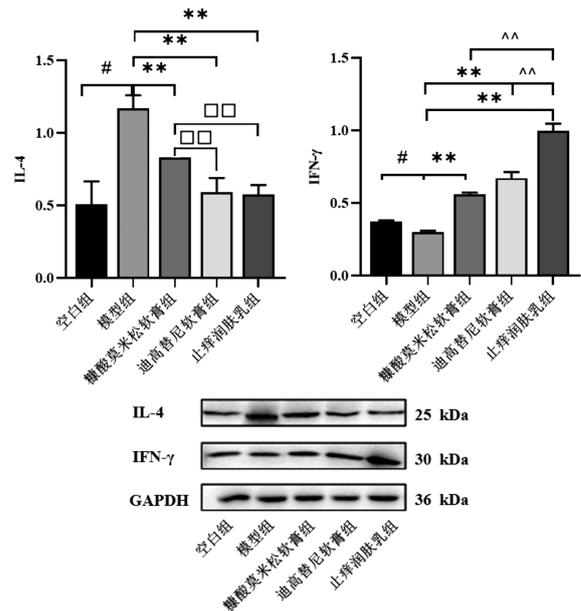


图6 止痒润肤乳对 AD 小鼠皮损组织 IL-4、IFN- γ 蛋白表达水平的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与糠酸莫米松软膏组比较,[□] $P<0.01$;与止痒润肤乳组比较,[~] $P<0.01$ 。

4 讨论

特应性皮炎作为目前皮肤科最为常见、治疗难度大的一种慢性炎症性皮肤病,随着对疾病内在机制的深入研究,虽然精准的靶向药物治疗包括免疫抑制剂、生物制剂、磷酸二酯酶-4 抑制剂被投入重度 AD 患者的治疗当中^[9],但其复发风险和不良反应依然显著。既往研究表明,JAK-STAT 信号通路作为多种细胞因子的经典信号传导途径,包括 4 个受体相关激酶和 7 个蛋白^[10],在 AD 发病机制中具有重要意义,是 AD 治疗的新突破点。而 IL-4 和 IFN- γ 作为参与机体免疫反应的细胞因子,是 AD 发病机制中的重要调控因子。IL-4 存在两类受体^[11]:I 型受体只与 IL-4 结合,在造血细胞中表达;II 型受体在其他细胞类型中表达。IL-4 主要通过 JAK-STAT 信

号通路调节参与免疫调节和炎症反应基因的表达, IL-4R α 链上的 3 个中心酪氨酸残基在受体的刺激下被磷酸化,在 STAT6 的激活中起重要作用^[12]。除此之外, JAK-STAT 信号转导通路经过提供 IL-4 刺激,促使白细胞分化抗原 4(cluster of differentiation 4, CD4⁺) 细胞分化为 T 辅助细胞 2(T helper cell 2, Th2) 细胞,催化 B 细胞的成熟,诱导其分化的浆细胞分泌的抗体类别向 IgE 转换,从而促进组胺释放,加重 AD 的发生^[13]。IFN- γ 主要由 T 辅助细胞 1(T helper cell 1, Th1) 细胞表达^[14]。经过 JAK-STAT 信号通路的转导,可抑制 Th2 细胞因子受体包括 IL-4R α 、IL-13R α 1 等及其下游信号介质的表达来抑制 AD 的发生^[15],使由 IL-4 介导的 IgE 合成减少,降低 IgE 受体的表达。除此之外, IFN- γ 还能在发挥免疫作用的同时恢复皮肤屏障功能,总之, IFN- γ 能够参与皮肤乃至全身的免疫反应中。IL-4 和 IFN- γ 通过 JAK-STAT 信号通路来转导信号,这一过程可能在 AD 的发展中发挥着关键作用。

中医学认为 AD 的发病与心脾关系密切,辨证多从湿热内蕴、脾虚湿盛和阴虚血燥等论治。大多数医家认为 AD 病机是禀赋不耐,后天复感外邪,客于肌表而发病。本研究团队长期关注 AD 的基础和临床研究,认为 AD 病因在于先天禀赋不足,复感风、湿、燥邪,蕴于肌表,阻遏气机,郁热化火,基本病机是脾虚津伤燥胜。因此,治疗上应以固护脾胃、养阴润燥为原则,提出“健脾滋阴、培土生金”的 AD 辨治基本法则,并在此基础上形成了内治以“七味白术散”为主方,外治以医院特色制剂“止痒润肤乳”为主的中医治疗方案,临床疗效肯定。止痒润肤乳作为本院的纯中药乳膏制剂,中药成分为生地黄、当归、制何首乌、薄荷、苦杏仁、桃仁、红花、地肤子、苦参、大枫子仁、蚕砂、瓜蒌霜、冰片。方中君药当归、制何首乌滋阴养血,生地黄养阴生津;桃仁、红花活血行气,地肤子、苦参长于祛风除湿止痒,为治疗皮肤湿疮瘙痒要药,大枫子仁性热味辛,长于攻毒除湿,蚕砂温燥祛风,上六味共为臣药;五脏之中肺主皮毛,故加佐药杏仁、瓜蒌霜治肺利气;使药薄荷疏风散邪,冰片凉开芳香促渗。全方有养血滋阴、祛风除湿止痒的功效。

止痒润肤乳在治疗银屑病、老年性瘙痒症、湿疹

等疾病的临床作用已被证实^[16-18]。本团队在前期研究中,发现止痒润肤乳对儿童 AD 疗效确切,无明显不良反应^[2],并围绕皮肤微生态影响方面进行了初步基础研究,发现止痒润肤乳具有较好保护皮肤屏障、改善皮肤微生态、抑制角质形成细胞增生的作用^[19]。本实验在此基础上,验证了止痒润肤乳对 DNCB 致敏的 BALB/c 特异性皮炎小鼠模型免疫功能的影响,是能够抑制皮损组织的 IL-4 基因表达及其蛋白含量,上调 IFN- γ 基因表达及其蛋白含量,从而达到抑制炎症、调节免疫的作用,具有良好的科学性及参考价值。

本研究结果显示,止痒润肤乳能够显著改善 DNCB 致敏的 BALB/c AD 小鼠瘙痒症状、真皮及棘层炎性细胞浸润情况,降低 EASI 评分,提示止痒润肤乳对 AD 模型有确切治疗效果。研究结果还显示,止痒润肤乳能够抑制皮损组织的 IL-4 基因表达及其蛋白含量,上调 IFN- γ 基因表达及其蛋白含量,本研究团队从已证实的 JAK-STAT 信号通路在 AD 发病机制中具有重要意义,推测止痒润肤乳的疗效作用机制可能是通过调控 JAK-STAT 信号通路中的关键因子,使 Th1/Th2 细胞亚群达到平衡,起到免疫调控作用。但本实验对于 JAK-STAT 信号通路的研究较为局限,该通路激活还涉及各种蛋白的复杂变化,止痒润肤乳对有关蛋白的特异性调节作用还需大量深层次的实验来验证,未来可聚焦于多种炎症因子检测指标,并与迪高替尼软膏多方面对比治疗效果,或许能够为止痒润肤乳的优势性提供更多实验依据。

基于以上研究结果,本研究团队推测止痒润肤乳可能通过抑制 DNCB 致敏的 AD 小鼠皮损组织中 IL-4 基因表达及其蛋白含量,上调 IFN- γ 基因表达及其蛋白含量,以达到治疗 AD 的目的,这在一定程度上揭示了止痒润肤乳通过 JAK-STAT 信号通路治疗 AD 的可能作用机制。

参考文献

- [1] BOGUNIEWICZ M, ALEXIS A F, BECK L A, et al. Expert perspectives on management of moderate-to-severe atopic dermatitis: A multidisciplinary consensus addressing current and e-

- merging therapies[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology in Practice*, 2017, 5(6): 1519–1531.
- [2] 钟 昕. 止痒润肤乳对特异性皮炎样小鼠皮肤屏障功能影响的实验研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- [3] 唐 林, 鹿爱娟, 王 璐, 等. 止痒润肤乳成型工艺的优化[J]. *中成药*, 2022, 44(11): 3614–3618.
- [4] 莫俊奎, 周继昌, 刘小立, 等. DNCB致敏诱导BALB/c小鼠特异性皮炎模型的建立[J]. *中国热带医学*, 2013, 13(12): 1439–1442.
- [5] 王欣欣, 李思佳, 关洪全, 等. DNCB对BALB/c小鼠特异性皮炎的诱导作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2020, 46(3): 439–443, 669.
- [6] KIM J, LEE J, SHIN S, et al. Molecular mechanism of atopic dermatitis induction following sensitization and challenge with 2, 4-dinitrochlorobenzene in mouse skin tissue[J]. *Toxicological Research*, 2018, 34(1): 7–12.
- [7] HOU D D, DI Z H, QI R Q, et al. Sea buckthorn (*hippophæ rhamnoides L.*) oil improves atopic dermatitis-like skin lesions via inhibition of NF- κ B and STAT1 activation[J]. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2017, 30(5): 268–276.
- [8] 赵 辨. 湿疹面积及严重程度指数评分法[J]. *中华皮肤科杂志*, 2004, 37(1): 3–4.
- [9] SINGH S, BEHL T, SHARMA N, et al. Targeting therapeutic approaches and highlighting the potential role of nanotechnology in atopic dermatitis[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2022, 29(22): 32605–32630.
- [10] CHAPMAN S, KWA M, GOLD L S, et al. Janus kinase inhibitors in dermatology: Part I. A comprehensive review [J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2022, 86(2): 406–413.
- [11] JIANG H, HARRIS M B, ROTHMAN P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000, 105(6 Pt 1): 1063–1070.
- [12] MIYAZAKI T, KAWAHARA A, FUJII H, et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits[J]. *Science*, 1994, 266(5187): 1045–1047.
- [13] DUBIN C, DEL DUCA E, GUTTMAN-YASSKY E. The IL-4, IL-13 and IL-31 pathways in atopic dermatitis[J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2021, 17(8): 835–852.
- [14] MEEPHANSAN J, TSUDA H, KOMINE M, et al. Regulation of IL-33 expression by IFN- γ and tumor necrosis factor- α in normal human epidermal keratinocytes[J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2012, 132(11): 2593–2600.
- [15] KIM J, LEE S K, JUNG M, et al. Extracellular vesicles from IFN- γ -primed mesenchymal stem cells repress atopic dermatitis in mice[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 526.
- [16] 吴世婷, 刘丽芳, 熊家青. 养血润燥法对银屑病皮损中IRF-4表达的影响[J]. *亚太传统医药*, 2019, 15(11): 15–18.
- [17] 熊家青, 刘丽芳, 范洪桥. 止痒润肤乳联合当归饮子治疗血虚风燥型老年性皮肤瘙痒症临床观察[J]. *中医药临床杂志*, 2015, 27(8): 1129–1131.
- [18] 祁 林, 刘丽芳, 席建元. 润肤止痒乳剂治疗血虚风燥证慢性湿疹临床研究[J]. *中国中西医结合皮肤性病学期刊*, 2011, 10(5): 294–296.
- [19] 洪培育. 七味白术散治疗儿童脾虚型特异性皮炎的临床观察(附: 学龄前儿童特异性皮炎患病影响因素的调查)[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.

(本文编辑 匡静之)