藏药二十五味儿茶凝胶对慢性湿疹模型大鼠血清中CCL17及CCL18表达的影响

费晓影，王思农*，王亚红，李丹
（甘肃中医药大学，甘肃　兰州　730000）

摘　要：目的：探讨藏药二十五味儿茶凝胶对慢性湿疹大鼠血清中CCL17及CCL18表达的影响。方法：将60只SD大鼠随机分为空白组、模型组、阳性药物组（对照组）、藏药二十五味儿茶凝胶低剂量组（低剂量组）、藏药二十五味儿茶凝胶中剂量组（中剂量组）和藏药二十五味儿茶凝胶高剂量组（高剂量组），每组10只。除空白组外，其余各组大鼠采用2,4－二硝基氯苯（DNCB）诱导的方式制备背部慢性湿疹模型，造模成功后开始干预。对照组涂抹青鹏软膏0.02 g/(cm²·d)，模型组涂抹凡士林0.02 g/(cm²·d)，低、中、高剂量组分别涂抹0.002 5、0.005、0.01 g/(cm²·d) 剂量的藏药二十五味儿茶凝胶。肉眼观察大鼠背部慢性湿疹皮损程度并进行评分，采用ELISA法检测大鼠血清中趋化因子CCL17和CCL18水平。结果：藏药二十五味儿茶凝胶各剂量组和对照组均能够有效减轻大鼠背部慢性湿疹症状，降低皮损程度评分（$P<0.05$），降低血清CCL17、CCL18水平（$P<0.05$），藏药二十五味儿茶凝胶各剂量组呈剂量依赖性，其中高剂量组效果最优（$P<0.05$）；与对照组相比，高剂量组大鼠皮损程度、评分及血清CCL17、CCL18水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。结论：藏药二十五味儿茶凝胶能够有效改善湿疹模型大鼠背部皮损症状，可能与下调慢性湿疹大鼠模型趋化因子CCL17及CCL18血清水平有关。

关键词：慢性湿疹；藏药二十五味儿茶凝胶；CCL17；CCL18
中图分类号：R285.5　　**文献标识码**：A　　**DOI**：10.19656/j.cnki.1002－2406.XXXXXX01

引用格式
费晓影，王思农，王亚红，等. 藏药二十五味儿茶凝胶对慢性湿疹模型大鼠血清中CCL17及CCL18表达的影响[J]. 中医药信息，XXXX，XX(XX)：1－5.
FEI X Y，WANG S N，WANG Y H，et al. Effect of Tibetan medicinal 25 flavor catechu gel on serum expressions of CCL17 and CCL18 in rats with chronic eczema[J]. Information on TCM，XXXX，XX(XX)：1－5.

Effect of Tibetan Medicinal 25 Flavor Catechu Gel on Serum Expressions of CCL17 and CCL18 in Rats with Chronic Eczema

FEI Xiaoying，WANG Sinong*，WANG Yahong，LI Dan
（*Gansu University of Chinese Medicine*，*Lanzhou* 730000，*China*）

Abstract：Objective：To investigate the effect of Tibetan medicinal 25 flavor catechu gel on serum expressions of CCL17 and CCL18 in rats with chronic eczema. Methods：60 SD rats were randomly divided into the blank group，the model group，the positive control group，the Tibetan medicinal groups of high－dose，medium－dose and low－dose，with 10 rats in each group. 2，4－dinitrochlorobenzene（DNCB）was used to induce chronic dorsal eczema in rats. The positive control group was given external application of Qingpeng ointment（0.02 g/cm²·d），the model group was treated with Vaseline（0.02 g/cm²·d），and the Tibetan medicinal groups were treated with Tibetan medicinal 25 flavor

基金项目：西北中藏药协同中心重点项目（XBXT2015－3）
作者简介：费晓影（1996－），女，中医外科学专业在读研究生，主要研究方向：中医药治疗皮肤病的临床与实验研究。
通讯作者：王思农（1966－），男，教授，博士研究生导师，主要研究方向：中医药治疗皮肤病的临床与实验研究。

catechu gel with the dose of 0.0025 g/cm²·d, 0.005 g/cm²·d and 0.01 g/cm²·d, respectively. The lesions of chronic eczema on the back of rats were observed by naked eyes and were scored. Serum chemokines of CCL17 and CCL18 were detected by ELISA. Results: The chronic eczema symptoms were significantly alleviated, the scores of skin lesions were remarkably decreased, and the serum levels of CCL17 and CCL18 were greatly reduced in the Tibetan medicinal groups of different doses and in the positive control group ($P<0.05$), among the Tibetan medicinal groups, the high-dose had the most significant effect. There were no statistical differences in the degree and scores of skin lesion, as well as in the serum levels of CCL17 and CCL18 between the positive control group and the high-dose group ($P>0.05$). Conclusion: Tibetan medicinal 25 flavor of catechu gel can effectively improve the back lesions of rats with eczema, which may be related to the down-regulation of serum levels of chemokine CCL17 and CCL18 in rats with chronic eczema.

Key words: Chronic eczema; Tibetan medicinal 25 catechu gel; CCL17; CCL18

湿疹又称特应性皮炎,是一种复杂的慢性皮肤病,儿童患病率高达30%,通常会持续到成年期[1]。有研究发现湿疹属于基因性疾病,遗传因素是构成湿疹发病的重要原因,加之皮肤屏障破坏、功能受损导致变应原侵入和细菌定植[2],引发皮肤异常的免疫反应和炎症。慢性湿疹主要是以Th2为主的异常免疫反应、调节性T细胞功能障碍、免疫球蛋白E(immunoglobulin E,IgE)过度产生和嗜酸粒细胞增高等[3],从而导致器官的变态反应炎症,一般伴有持续的瘙痒和皮肤组织的炎症反应,如慢性湿疹皮肤样变。有实验研究发现,IgE介导的慢性湿疹的发病和全病程均有趋化因子CCL17、CCL18参与。本研究主要基于血清趋化因子CCL17和CCL18研究探讨藏药二十五味儿茶凝胶方对慢性湿疹模型大鼠的影响,从而明确其治疗慢性湿疹的作用机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物

SPF级SD大鼠60只,雌雄各半,体质量(200±20)g,由甘肃中医药大学实验动物中心提供。实验动物许可证号:SCXK(甘)2015-001。在SPF级实验动物中心统一饲养环境的标准要求下进行喂养,适应环境后开始实验。

1.2　主要试剂及药物

青鹏软膏(西藏奇正藏药股份有限公司,批号:2011271);医用白凡士林(山东利尔康医疗科技股份有限公司,批号:201203);2,4-二硝基氯苯(DNCB,上海中秦化学试剂有限公司,批号:150409);丙酮(上海久德化学试剂有限公司,批号:140916);CCL17、CCL18 ELISA试剂盒(上海信裕生物科技有限公司,批号:)

1.3　动物分组及造模

采用随机数字表法将60只大鼠随机分为空白组、模型组、阳性药物组(对照组)、藏药二十五味儿茶凝胶低剂量组(低剂量组)、藏药二十五味儿茶凝胶中剂量组(中剂量组)和藏药二十五味儿茶凝胶高剂量组(高剂量组),每组10只。除空白组外,其余各组大鼠以致敏物质DNCB反复多次激发,按照文献[4]制备湿疹动物模型。大鼠在实验前1日于背部取3 cm×3 cm的面积进行脱毛处理,次日脱毛区外涂5% DNCB 50 μL进行第1次致敏。2周后剪毛区再次去毛,次日外涂1% DNCB 100 μL,进行第2次致敏。此后继续致敏,每周1次,连续4周。第4周致敏结束3 d后观察各组实验大鼠背部的皮肤状态,出现红斑、丘疹、水肿、抓痕、脱屑,即为造模成功。随后各组开始治疗干预。

1.4　给药治疗

根据大鼠背部面积与人脸面积之间外用药物剂量等效换算公式计算给药剂量。对照组大鼠涂抹青鹏软膏0.02 g/(cm²·d),模型组大鼠涂抹凡士林0.02 g/(cm²·d),高、中、低剂量组分别涂抹0.01、0.005、0.002 5 g/(cm²·d)剂量的藏药二十五味儿茶凝胶,空白组不予处理。每日给药1次,连续给药10 d。

1.5　评价指标

1.5.1　大鼠背部湿疹皮损程度评分

各组大鼠于末次给药24 h后,按照湿疹皮损程度评分标准进行皮损程度计分[4]。见表1。

表1　湿疹皮损程度评分

症状	分值/分
正常皮肤,无糜烂、水肿、红斑、渗出	0
糜烂、红斑、水肿均不明显,有轻度渗出,皮毛基本无光泽	1~2
糜烂、红斑、水肿较轻,皮毛无光泽,有中度渗出或角化	2~3
糜烂、水肿、渗出、角化结痂,无光泽且竖毛,皮损面积大	3~5

1.5.2　大鼠血清趋化因子CCL17和CCL18水平

根据试剂盒要求,采用ELISA法检测各组大鼠血清中趋化因子CCL17和CCL18水平。检测过程严格按照说明书进行操作。

1.6　统计学方法

本研究采用SPSS 24.0进行统计学分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间数据比较采用单

因素方差分析,以$P<0.05$代表差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　各组大鼠背部组织皮损程度及评分比较

与空白组大鼠相比,模型组大鼠背部皮肤糜烂、红斑、水肿、渗出、角化结痂等皮损程度明显,皮损程度评分增加($P<0.05$);与模型组相比,低、中、高剂量组大鼠背部皮肤糜烂、红斑、水肿等症状普遍减轻或消失不见,角化、渗出等现象普遍减轻,皮损程度评分降低($P<0.05$);低、中、高剂量组治疗效果呈剂量依赖性;与对照组相比,高剂量组皮损程度及评分差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2　各组大鼠背部湿疹皮损程度评分结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量[g/(cm²·d)]	皮损程度评分(分)
空白组	10	0.02	0
模型组	10	0.02	$4.81\pm0.17^{*}$
对照组	10	0.02	$1.92\pm0.33^{*\#@\&}$
低剂量组	10	0.002 5	$3.80\pm0.28^{*\#}$
中剂量组	10	0.005	$3.20\pm0.29^{*\#@}$
高剂量组	10	0.01	$1.93\pm0.27^{*\#@\&}$

注:与空白组相比,$^{*}P<0.05$;与模型组相比,$^{\#}P<0.05$;与低剂量组相比,$^{@}P<0.05$;与中剂量组相比,$^{\&}P<0.05$。

2.2　各组大鼠血清趋化因子CCL17、CCL18表达比较

与空白组相比,模型组大鼠血清中CCL17、CCL18水平明显升高($P<0.05$);与模型组相比,各治疗组CCL17、CCL18水平均下降($P<0.05$);低、中、高剂量组对CCL17、CCL18的影响呈剂量依赖性;与对照组相比,高剂量组大鼠血清CCL17、CCL18含量差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表3　各组大鼠血清中CCL17,CCL18的表达水平
($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	n	CCL17	CCL18
空白组	10	89.5 ± 4.8	152.6 ± 7.1
模型组	10	$157.6\pm7.9^{*}$	$207.6\pm6.7^{*}$
对照组	10	$110.6\pm6.2^{*\#@\&}$	$158.1\pm6.8^{*\#@\&}$
低剂量组	10	$144.9\pm13.9^{*\#}$	$193.1\pm7.0^{*\#}$
中剂量组	10	$125.5\pm5.5^{*\#}$	$185.5\pm6.0^{*\#}$
高剂量组	10	$109.9\pm5.4^{*\#@\&}$	$157.1\pm6.9^{*\#@\&}$

注:与空白组相比,$^{*}P<0.05$;与模型组相比,$^{\#}P<0.05$;与低剂量组相比,$^{@}P<0.05$;与中剂量组相比,$^{\&}P<0.05$。

3　讨论

湿疹在中医学中有“湿疮”“湿癣”之称,中医学认为慢性湿疹发于肌肤,病在脾胃,主要由于禀赋不耐,饮食失节,或贪嗜辛辣刺激等发物,以致脾胃运化失司,湿热内生,又感风湿或暑湿等外邪,内外之邪搏结于肌肤而发病;或因肝气郁结,肾阳不足致水湿泛溢肌肤而发病。本病以外感六淫之邪为标,其本为五脏虚损,分为湿热蕴肤、脾虚湿蕴、血虚风燥三型,临床多以清热利湿止痒为主要治法。本方为甘肃中医药大学附属医院院内试生产阶段的院内制剂,藏药二十五味儿茶膏最早记载于《四部医典》,其组方主要包括乳香、红花、儿茶、余甘子、毛诃子、诃子、肉豆蔻、木香、豆蔻、荜茇、黄精、天冬、甘肃棘豆、黄葵子、决明子、安息香、麝香、水牛角、秦艽花、蒺藜、藏菖蒲、宽筋藤、铁棒锤、珍珠母、西藏棱子芹等[5]。上述诸药相和能够健脾利湿、清热祛风、润肤养血,加之藏医学理论认为,黄水由水谷入于脾胃而形成,人体功能异常失衡时就会形成“黄水证”,而本方也具有干黄水、消肿毒的作用,因此藏医用其治疗湿疹、渗出性皮肤病、黄水病等。藏药二十五味儿茶凝胶是导师在原方的基础上加减药味、改良剂型,运用现代科学技术和传统工艺制成。其中乳香消肿生肌,治疗痈肿疮疡;红花活血通脉以化瘀消斑;儿茶止血生肌、收湿敛疮,治疗湿疹、湿疮;余甘子、诃子、毛诃子配伍使用,是藏药方中常见的基础方,称为藏药大三果,具有清热、调和气血、化解坏血的功效;木香、肉豆蔻行气止痛;豆蔻、荜茇化湿;天冬、黄精养阴润燥;安息香、人工麝香行气活血、消肿止痛;蒺藜、秦艽花祛风湿、清湿热,活血止痒,治疗皮肤瘙痒;珍珠母解毒生肌、润肤祛斑从而促进创面愈合;西藏棱子芹是传统常用的藏药材资源,能愈合疮伤。且凝胶剂作为一种新型制剂,具有亲和性好、渗透性高、局部见效快、药物经皮吸收快、透气性好的特点,并可长时间作用于患处,发挥药物作用。

现代药理学研究表明,乳香中含有乳香酸类物质acetyl-11-keto-β-boswellicacid(AKBA),AKBA能够调节由产生干扰素γ的CD_4^+T(Th1)细胞和IL-17产生的CD_4^+T(Th17)细胞介导的自身免疫性疾病[6],可以通过影响炎症因子以及细胞分子达到抗炎免疫的作用。红花中的红花多糖具有免疫调节活性,可通过TLR4激活NF-κB信号通路并诱导巨噬细胞产生各种炎症因子(IL-1,IL-6,IL-12和IFN-γ),参与炎症反应[7]。此外,红花黄色素能够降低黑色素,作为皮肤美白剂。实验研究发现豆蔻中的有效成分2-羟基-3-甲氧基苯甲酸对于活动性全身过敏反应,以及由IgE介导的被动皮肤过敏反应具有预防和保护作用;此外豆蔻中的1,2,4,5-四甲氧基苯能抑制Th2细胞因子在组织中的表达,还能改善由粉尘螨诱导的过敏性炎症,其机制是通过抑制细胞因子和趋化因子的表达,降低血清组胺、炎症细胞和嗜酸性粒细胞的组织渗透[8]。大三果的药理活性丰富,具有抗氧化、抗炎、调节免疫、愈合创面等功效,其醇提取物能抑制脂多糖

诱导的巨噬细胞炎症,减轻小鼠特应性皮炎的临床症状,其机制可能与降低促炎症因子释放及减弱过度激活的免疫功能有关[9-10]。麝香的主要活性物质麝香酮,化学名为3-甲基环十五烷酮,临床疗效与天然麝香基本一致,可作为麝香的替代用品抑制炎症反应[11]。安息香可通过降低炎性介质LDH、TNF-α及IL-8的活性,从而修复、改善内皮细胞损伤,同时还可抑制炎症相关细胞因子(IL-1β、IL-6和TNF-α)的表达[12]。藏菖蒲的水提取物可通过多重机制抑制由人体皮肤永生化角质细胞产生的促炎细胞因子IL-6和IL-8形成,从而发挥抗炎作用,并有可能成为一种新的、有效的皮肤抗炎药;同时,菖蒲根中提取出的多糖能刺激M1极化巨噬细胞和促进小鼠体内的Th1免疫反应[13]。秦艽、黄精、甘肃棘豆、决明子、宽筋藤均具有抗炎和免疫调节作用,黄精的主要活性成分黄精多糖、黄精皂苷,能够调节炎症信号通路;宽筋藤能抑制毛细血管的通透性、降低炎性因子的渗出率[14-18]。

目前慢性湿疹的病因病机尚未完全明确,有实验发现遗传因素、环境因素以及免疫功能异常相互作用导致了湿疹的发生[19]。慢性湿疹是由T淋巴细胞浸润为主的炎症性疾病,而各种趋化因子参与调节和完成了疾病发病机制中T细胞的迁移和招募的关键过程。CC趋化因子功能包括趋化、免疫、迁移、炎症反应以及诱导组胺释放参与过敏反应等[20],在慢性湿疹的发生、发展过程中有重要作用。CCL17被称为胸腺和激活调节趋化因子,其生物学的功能丰富,能够参与到机体的炎症、超敏反应及自身免疫性疾病等多种病理生理过程,CCR4作为CCL17的受体,其募集的Th2细胞可以诱导CCR4配体在一个正反馈回路中进一步表达,从而增强过敏性炎症。并且Th2细胞可以通过IL-4、IL-5和IL-13促进炎症的发作,CCL17诱导Th2细胞在趋化过程中发挥重要作用[21]。因此,CCL17被认为是湿疹发生、发展过程中的关键趋化因子,是反映湿疹疾病活动性可靠的生物标志物之一[22]。CCL18由Th2型有关的细胞因子IL-4、IL-13和IL-10诱导产生[23],CCR8作为CCL18的受体高表达于Th2淋巴细胞上,CCR8能够招募Th2型细胞趋化因子在慢性湿疹中的高度表达。研究显示CCL18通过自分泌或旁分泌的方式作用于单核细胞、巨噬细胞和T细胞等参与机体的免疫和炎症过程,CCL18可以作为一种结构性的产物诱导趋化因子或吸引淋巴细胞、未成熟树突状细胞,使Th1和Th2均可参与细胞介导的免疫反应,特别是耐受性免疫应答,如对抗感染、促使伤口愈合或是平衡过度免疫应答等[24],据此表明CCL18在慢性湿疹的发病机制及免疫调节中发挥了重要的作用。

本研究通过ELISA法检测各组大鼠血清CCL17、CCL18的表达,进一步验证了血清CCL17及CCL18参与、影响慢性湿疹的发病及预后,其血清水平与病情的程度联系密切。由此结果可知,藏药二十五味儿茶凝胶对下调血清CCL17和CCL18表达有重要作用,这可能是本方治疗慢性湿疹的机制之一。同时本研究也可证实,血清中CCL17和CCL18的表达是治疗慢性湿疹的又一靶点,值得在基础研究和临床治疗中予以一定的关注。

参考文献:

[1] BOORGULA M P, TAUB M A, RAFAELS N, et al. Replicated methylation changes associated with eczema herpeticum and allergic response[J]. Clin Epigenetics, 2019, 11(1): 122.
[2] 张琦,禹卉千,李振鲁. 接触性皮炎与特应性皮炎相关性的研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2019, 33(7): 840-844.
[3] 谭汉旭,王文革. IgE在湿疹发病中的作用机制[J]. 中国医药导报, 2020, 17(20): 34-37.
[4] 苗明三,田硕,白明. 湿疹动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 6-10.
[5] 王永慧,王思农,肖静秋,等. 藏药二十五味儿茶凝胶对大鼠慢性湿疹模型LTB-4、LTC-4因子的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2018, 32(5): 568-570.
[6] 哈瑞雯,周海燕,詹志来. 乳香化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J/OL]. 中华中医药学刊: 1-24. (2021-03-30)[2021-04-20]http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20210329.1621.002.html.
[7] 李馨蕊,刘娟,彭成. 红花化学成分及药理活性研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2021, 44(1): 102-112.
[8] 咸魁锋,尹虹. 豆蔻属植物化学成分和药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(10): 1831-1836.
[9] 周坤,简平,梁文仪. 藏药大三果化学成分及药理作用研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(9): 1608-1614.
[10] 王阳,范潇晓,杨军. 木香的萜类成分与药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(24): 5917-5928.
[11] 齐娜,段文娟,李雅婧. 麝香酮药理作用的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(8): 3042-3047.
[12] 谢巧,车静,廖莉. 安息香属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2020, 43(1): 243-248.
[13] 母茂君,赵辉,伍七林. 藏菖蒲化学成分及生理活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(15): 9-12.
[14] 陈宇,周芸湄,李丹,等. 黄精的现代药理作用研究进展[J]. 中药材, 2021, 44(1): 240-244.
[15] 聂安政,林志健,王雨,等. 秦艽化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(3): 597-608.
[16] 李海燕,沈丹丹,黄新异,等. 甘肃棘豆的研究进展[J]. 中成药, 2018, 40(3): 663-670.
[17] 杨冰,任娟,秦昆明. 决明子药理作用及其机制研究进展[J]. 中药材, 2018, 41(5): 1247-1251.

[18] 塔娜. 宽筋藤的化学成分与药理作用研究[D]. 武汉:中南民族大学,2018:23.

[19] 陈丽洁,梁景耀,刘玉梅. 特应性皮炎转录组学及靶点治疗研究进展[J]. 中华皮肤科杂志,2018,51(2):157-159.

[20] 冯萍萍,李婷婷,赵娟. 荨麻疹患者生活质量心理状态及趋化因子和炎症因子的表达水平研究[J]. 新疆医学,2021,51(3):254-257.

[21] KORBECKI J, OLBROMSKI M, DZIĘGIEL P. CCL18 in the progression of cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(21):7955.

[22] MORIMURA S, SUGAYA M, OKA T, et al. Increased regulatory T cells and decreased myeloid-derived suppressor cells induced by high ccl17 levels may account for normal incidence of cancers among patients with atopic dermatitis[J]. Int J Mol Sci. 2021; 22(4):2025.

[23] 顾猛,丁翠君,陆冬明. CCL18检测在儿童过敏性疾病中的临床价值[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(20):2737-2738.

[24] 孙莉,劳成军,孙其乐. 趋化因子CCL18在常见慢性炎症性疾病中的作用[J]. 现代医药卫生,2017,33(11):1661-1663.

(收稿日期:2021-07-26)