沙棘果油对超抗原诱导的特应性皮炎小鼠激素抵抗的干预作用及机制Δ

王欣欣[1,2*]，陈小艳[3]，李思佳[4]，张文莲[2,5]，王　昆[2]，窦德强[1#]（1.辽宁中医药大学药学院，辽宁 大连　116600；2.包头医学院基础医学与法医学院，内蒙古 包头　014060；3.应急总医院病理科，北京　100028；4.辽宁中医药大学中医学院，沈阳 110847；5.包头医学院第一附属医院病理科，内蒙古 包头　014010）

中图分类号　R965；R758.2　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）17-2079-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.17.06

摘　要　目的　研究沙棘果油对超抗原诱导的特应性皮炎（AD）小鼠激素抵抗的干预作用，并探讨其作用机制。**方法**　将50只小鼠按照随机数字表法分为5组，即正常对照组（A组）、模型组（B组）、地塞米松干预组（阳性对照，C组）、沙棘果油干预组（D组）、地塞米松+沙棘果油干预组（E组），每组10只。除A组外，其余各组均采用2，4-二硝基氯苯+葡萄球菌肠毒素B法制备AD小鼠模型。自实验第7天起，分别使用地塞米松（1.5 mg/kg）和/或沙棘果油（10 mL/kg）对C、D、E组小鼠进行灌胃，每天1次，连续28 d。末次给药后，采用苏木素-伊红染色法观察小鼠耳部皮肤组织的病理形态学变化，采用酶联免疫吸附测定法检测小鼠血清中免疫球蛋白E（IgE）、白细胞介素4（IL-4）水平，采用免疫荧光单标法检测小鼠耳部皮肤组织中糖皮质激素受体α（GRα）、GRβ阳性细胞数，采用Western blot法检测小鼠耳部皮肤组织中GRα、GRβ蛋白及蛋白激酶B（AKT）/核糖体蛋白S6激酶1（S6K1）信号通路相关蛋白的表达情况。**结果**　与B组比较，C、D、E组小鼠左耳部皮肤炎症表现明显减轻；D、E组小鼠血清中IgE、IL-4水平显著降低（$P<0.05$），GRα阳性细胞数显著增加（$P<0.05$），核蛋白中GRα蛋白表达水平升高（$P<0.05$），总蛋白中Gαi1、Gαi3、p-S6K1、p-AKT蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；E组小鼠GRβ阳性细胞数显著减少（$P<0.05$），总蛋白中GRβ表达水平显著降低（$P<0.05$）。与C组比较，E组小鼠左耳部皮肤炎症表现趋于消退，血清中IgE、IL-4水平均显著降低（$P<0.05$）；D、E组小鼠GRα阳性细胞数显著增加（$P<0.05$），GRβ阳性细胞数显著减少（$P<0.05$），核蛋白中GRα蛋白表达水平升高（$P<0.05$），总蛋白中GRβ、Gαi1、p-S6K1、p-AKT的蛋白表达水平及E组小鼠Gαi3的蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。**结论**　沙棘果油对超抗原诱导的AD小鼠激素抵抗具有干预作用，该作用可能是通过抑制Gαi1/3诱导的AKT/S6K1信号通路而发挥的。

关键词　沙棘果油；超抗原；特应性皮炎；激素抵抗；蛋白激酶B/核糖体蛋白S6激酶1信号通路

Intervention effect and mechanism of *Hippophae rhamnoides* oil on glucocorticoid resistance in superantigen-induced atopic dermatitis mice

WANG Xinxin[1,2], CHEN Xiaoyan[3], LI Sijia[4], ZHANG Wenlian[2,5], WANG Kun[2], DOU Deqiang[1]（1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Dalian 116600, China; 2. College of Basic and Forensic Medicine, Baotou Medical College, Inner Mongolia Baotou 014060, China; 3. Dept. of Pathology, Emergency General Hospital, Beijing 100028, China; 4. College of Traditional Chinese Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 5. Dept. of Pathology, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia Baotou 014010, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the intervention effect of *Hippophae rhamnoides* oil on glucocorticoid resistance in superantigen-induced atopic dermatitis（AD）mice, and to explore the mechanism of action. **METHODS** Fifty mice were randomly divided into 5 groups, i.e. normal control group（group A）, model group（group B）, dexamethasone intervention group（positive control, group C）, *H. rhamnoides* oil intervention group（group D）, dexamethasone+*H. rhamnoides* oil intervention group（group E）, with 10 mice in each group. Except for group A, other groups were given 2, 4-dinitrochlorobenzene+staphylococcal enterotoxin B to induce the AD mice model. Starting from the 7th day of the experiment, groups C, D and E were given dexamethasone（1.5 mg/kg）and/or *H. rhamnoides* oil（10 mL/kg）intragastrically, once a day, for 28 consecutive days. After the last medication, the pathomorphological changes of ear tissue were observed by HE staining; the serum levels of immunoglobulin E（IgE）and interleukin 4（IL-4）were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Positive cell count of glucocorticoid

Δ **基金项目** 中国博士后科学基金面上项目（No.2022MD713761）；内蒙古自治区自然科学基金面上项目（No.2021MS08058）；包头医学院科学研究基金项目（No.BYJJ-BSJJ202004）；包头市2021年青年创新人才项目

＊**第一作者** 副教授，博士。研究方向：天然产物的抗炎及免疫调节作用。E-mail：57667478@qq.com

＃**通信作者** 教授，博士生导师，博士。研究方向：人参的规范化种植及药效。E-mail：doudeqiang01@126.com

receptor α（GRα）and GRβ in the ear tissue of mice was detected by tyramide signal amplification. The expressions of GRα protein，GRβ protein，and protein kinase B（AKT）/ribosomal protein S6 kinase 1，S6K1（S6K1）signaling pathway-related proteins were determined by Western blot assay. **RESULTS** Compared with group B，the skin inflammation in the left ear of the mice was significantly reduced in groups C，D and E，the serum levels of IgE and IL-4 were decreased significantly in groups D and E（$P<0.05$），while the number of GRα positive cells and GRα protein expression were increased significantly（$P<0.05$）；the protein levels of G protein inhibitory subunit 1（Gαi1），Gαi3，phosphorylated S6K1（p-S6K1）and phosphorylated AKT（p-AKT）were decreased significantly（$P<0.05$）；the number of GRβ positive cells and protein expression of GRβ was decreased significantly in group E（$P<0.05$）. Compared with group C，the skin inflammation in the left ear of the mice was almost clear away in group E，the serum levels of IgE and IL-4 were decreased significantly（$P<0.05$）；the number of GRα positive cells and GRα protein expression were increased significantly in groups D and E（$P<0.05$）；the protein levels of GRβ，Gαi1，p-S6K1 and p-AKT were all decreased significantly in groups D and E（$P<0.05$）；and protein level of Gαi3 was decreased significantly in group E（$P<0.05$）. **CONCLUSIONS** *H. rhamnoides* oil has an intervention effect on superantigen-induced glucocorticoid resistance of AD mice，which may be exerted by inhibition of the Gαi1/3-induced AKT/S6K1 signaling pathway.

KEYWORDS *Hippophae rhamnoides* oil；superantigen；atopic dermatitis；glucocorticoid resistance；AKT/S6K1 signaling pathway

特应性皮炎（atopic dermatitis，AD）是儿童常见的皮肤炎症性疾病，病情迁延，容易复发。在全球范围内，AD的发病率均表现出逐年上升的趋势[1-2]。针对我国儿童和青少年群体进行的第3次全国范围内流行病学调查显示，AD患病率已从1998年的0.69%上升到2014年的12.94%[3]。多国治疗指南均推荐外用糖皮质激素（glucocorticoid，GC）为AD局部治疗的一线药物[4-5]。然而，一些患者在外用GC治疗时，随着治疗时间延长会出现激素抵抗，影响治疗效果[6]。因此，寻找安全有效的替代或补充治疗方法，干预AD治疗时的激素抵抗具有重要的公共卫生意义。超抗原（superantigen，SAg）是一类来源于细菌或病毒的蛋白质，其不需要抗原呈递细胞加工，可以直接高效地激活免疫细胞[7]。且有研究表明，AD患者皮损局部异常定植的金黄色葡萄球菌产生的SAg参与了激素抵抗的发生[8-9]。

中药沙棘是植物沙棘*Hippophae rhamnoides* L.的干燥成熟果实，自古就被蒙医、藏医及中医用于皮肤疾病的治疗。沙棘果油是从沙棘果实中提取的重要生物活性物质，具有抗炎、抗氧化、免疫调节等作用[10-11]。本课题组前期研究发现，沙棘果油可通过丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号通路调节AD小鼠的免疫应答，改善Th1/Th2失衡，回调皮损局部皮肤屏障功能的蛋白表达，修复皮肤屏障[12]。本研究拟在前期研究的基础上，利用AD模型深入分析沙棘果油对SAg诱导的小鼠AD激素抵抗的干预作用及相关机制，为从天然产物中寻找AD激素抵抗的干预措施提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用仪器主要包括：ASP6025型全自动组织脱水机、EG1150H eagle型包埋机、RM2235型组织切片机（德国Leica公司），BSZY23S-Y型电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司），2800UV/VIS型紫外分光光度仪[尤尼柯（上海）仪器有限公司]，Biofuge primo R型低温高速离心机（美国Thermo Fisher Scientific公司），ESP200型电泳仪、4200SF型凝胶成像分析系统（上海天能科技有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

沙棘果油（批号GR-134-161229）购自辽宁东宁生物药业有限公司，主要成分为脂肪酸（主要包括油酸33.10%、棕榈油酸27.52%、软脂酸26.87%）、谷甾醇和β-胡萝卜素；2，4-二硝基氯苯（2，4-dinitrochlorobenzene，DNCB，批号BCCC2721，纯度≥99%）购自美国Sigma公司；地塞米松片（批号200311，规格0.75 mg/片）购自广东南国药业有限公司；兔源糖皮质激素受体α（glucocorticoid receptor alpha，GRα）抗体、兔源GRβ抗体、兔源G蛋白抑制性α亚单位1（G protein inhibitory subunit 1，Gαi1）抗体、兔源Gαi3抗体、兔源核糖体蛋白S6激酶1（ribosomal protein S6 kinase 1，S6K1）抗体、兔源磷酸化S6K1（phosphorylated S6K1，p-S6K1）抗体、兔源蛋白激酶B1/2（protein kinase B，AKT1/2）抗体、兔源磷酸化AKT（phosphorylated AKT，p-AKT）抗体、兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（批号分别为ab2768、ab233165、ab3580、ab23315、ab32529、ab59208、ab300473、ab38449、ab8245）均购自英国Abcam公司；FITC标记的山羊抗兔免疫球蛋白G（immunoglobulin G，IgG）二抗（批号GB22303）购自武汉塞尔维生物科技有限公司；IgE、白细胞介素4（interleukin 4，IL-4）酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（批号分别为SEA545Mu、SEA077Mu）均购自武汉云克隆科技股份有限公司；BCA蛋白浓度测定试剂盒、超敏ECL化学发光试剂盒（批号分别为P0012S、P0018S）均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级BALB/c小鼠，雌雄各半，6～8周龄，体重（20±2）g，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，实验动物生产许可证号为SCXK（辽）2020-0001。小鼠购入后饲养于SPF级标准动物室内，室内温度为（24±2）℃，相对湿度为（50±10）%，保持昼夜节律交替。饲养期间食用标准饲料，常规适应性饲养7 d。本实验方案已通过包头医学院动物伦理委员会批准（批准号为2022第59号）。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

将50只小鼠按照随机数字表法分为5组，即正常对照组（A组）、模型组（B组）、地塞米松干预组（阳性对照，C组）、沙棘果油干预组（D组）、地塞米松+沙棘果油干预组（E组），每组10只。除A组外，其余各组均采用DNCB+葡萄球菌肠毒素B（staphylococcal enterotoxin B，SEB）法制备AD小鼠模型。具体造模方法是在文献[12]的基础上改进的：实验第1天，给所有小鼠背部皮肤做除毛处理（除毛面积约2 cm×3 cm）；于实验第1、3、5天，使用2.5%SEB溶液（20 μL）、1%DNCB溶液（200 μL）涂抹于B、C、D、E组小鼠背部皮肤，每天1次，共3次；自实验第7天起，使用2.5%SEB溶液（20 μL）、0.5%DNCB溶液（20 μL）涂抹于B、C、D、E组小鼠左耳部皮肤处进行激发，每3天激发1次，共10次。自实验第7天起，分别使用地塞米松（1.5 mg/kg，剂量根据文献[13]设置）和/或沙棘果油（10 mL/kg）[12]对C、D、E组小鼠进行灌胃，每天1次，连续28 d。实验第35天，麻醉取血后处死小鼠（取血处死前，肉眼观察所有小鼠左耳部皮肤外观），取各组小鼠眼眶血，在4 ℃下以4 000×*g*离心10 min，取上清置于－80 ℃冰箱中冻存。

2.2 病理组织学观察

取部分小鼠左耳部皮肤组织，用4%多聚甲醛固定，经脱水、透明、浸蜡等常规步骤处理后，制作蜡块并切片（厚度为5 μm）。常规行苏木素-伊红（HE）染色后在显微镜下观察各组小鼠左耳部皮肤组织形态特点，并测量各组小鼠左耳部皮肤表皮层厚度。

2.3 血清中IgE、IL-4水平的检测

采用ELISA法检测。取“2.1”项下冻存血清，常规解冻处理后，按相应试剂盒说明书方法操作，检测各组小鼠血清中IgE、IL-4水平。

2.4 耳部皮肤组织中GRα、GRβ表达的检测

2.4.1 耳部皮肤组织中GRα、GRβ阳性细胞数检测

采用免疫荧光单标法检测。取小鼠左耳部皮肤组织，放入4%多聚甲醛中固定8 h，经脱水、透明、浸蜡等常规步骤处理后，制作石蜡切片（厚度为5 μm），经二甲苯及梯度乙醇脱蜡、抗原修复后，以5%牛血清白蛋白（albumin from bovine serum，BSA）封闭1 h，分别滴加GRα、GRβ抗体（稀释比例均为1∶500），4 ℃孵育过夜，洗片后滴加荧光二抗（稀释比例1∶1 000），复染淬灭后封片。在荧光显微镜下采集图像，于200倍放大倍数下计数每个视野中GRα、GRβ阳性细胞数（二者阳性表达均呈绿色荧光），同一张切片计数5个视野，计数平均每个视野中的阳性细胞数，作为该样本的阳性细胞数进行结果分析。

2.4.2 耳部皮肤组织中GRα、GRβ蛋白表达水平检测

取小鼠左耳部皮肤组织，采用组织匀浆细胞裂解法提取核蛋白和总蛋白，采用Western blot法检测核蛋白中GRα蛋白表达水平及总蛋白中GRβ蛋白表达水平。以BCA法测定蛋白浓度，用裂解液调整蛋白浓度至6.25 mg/mL，沸水浴中变性5 min。取50 μg变性后的蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（在80 V电压下电泳30 min，然后调整电压至120 V继续电泳120 min），湿法转膜（电压70 V，转膜时间70 min），以5%BSA封闭1 h；分别加入GRα、GRβ、GAPDH抗体（稀释比例均为1∶500），4 ℃孵育过夜；次日室温复温1 h，以TBST清洗5 min×6次，加入二抗（稀释比例1∶1 000），室温孵育2 h；再以TBST清洗5 min×6次，加入ECL发光液，采用凝胶成像系统曝光显影，并用系统自带的软件测定条带灰度值。以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白（GAPDH）条带灰度值的比值作为该样本中目的蛋白的相对表达水平。

2.5 耳部皮肤组织中AKT/S6K1信号通路相关蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。取小鼠左耳部皮肤组织，采用组织匀浆细胞裂解法提取总蛋白，具体方法及步骤同“2.4.2”项下。其中，Gαi1、Gαi3、S6K1、p-S6K1、AKT1/2、p-AKT一抗的稀释比例均为1∶500，二抗的稀释比例为1∶1 000。

2.6 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计分析。符合正态分布且方差齐的数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 小鼠左耳外观及耳组织病理学观察结果

A组小鼠左耳部皮肤外观无明显红肿等炎症表现；显微镜下显示该组小鼠左耳部皮肤表皮层细胞层次清晰、排列规整，真皮层无明显血管扩张及炎症细胞浸润。B组小鼠左耳部皮肤红肿、增厚、脱屑，部分区域溃烂；显微镜下显示该组小鼠左耳部皮肤表皮层明显增厚，角化过度伴角化不全，真皮层血管扩张，大量炎症细胞浸润。C、D组小鼠的左耳部皮肤红肿程度、过度角化现象及炎症细胞浸润程度相较于B组均明显减轻。E组小鼠的左耳部皮肤炎症表现趋于消退，过度角化现象消失，炎症细胞浸润极少。结果见图1（C、D组图略）。

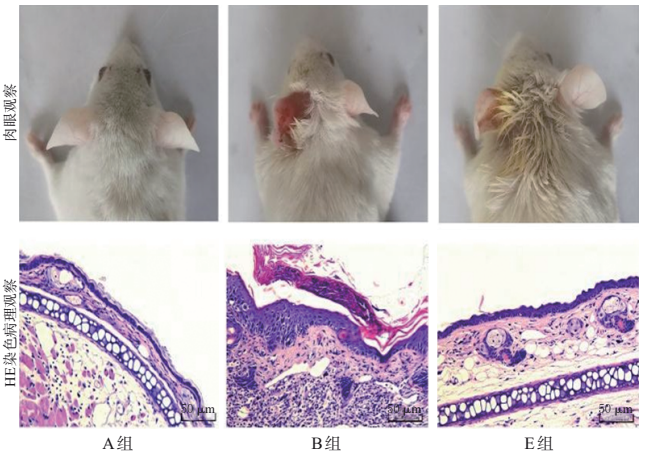


图1　各组小鼠左耳部皮肤外观及耳组织病理学观察的显微图

统计分析结果显示，与A组[(8.2±1.6) μm]比较，B组小鼠左耳部皮肤的表皮层厚度[(64.5±7.2) μm]显著增加($P<0.05$)；与B组比较，C、D、E组小鼠左耳部皮肤的表皮层厚度[分别为(39.1±5.4)、(34.5±5.0)、(20.9±3.5) μm]均显著减小($P<0.05$)；与C组比较，E组小鼠左耳部皮肤的表皮层厚度显著减小($P<0.05$)。

3.2　小鼠血清中IgE、IL-4水平测定结果

与A组比较，B组小鼠血清中IgE、IL-4水平均显著升高($P<0.05$)；与B组比较，C、D、E组小鼠血清中IgE、IL-4水平均显著降低($P<0.05$)；与C组比较，E组小鼠血清中IgE、IL-4水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

表1　各组小鼠血清中IgE、IL-4水平测定结果($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

组别	IgE/(pg/mL)	IL-4/(pg/mL)
A组	316.0±62.3	304.1±41.8
B组	1 979.5±272.9[a]	836.4±86.4[a]
C组	1 271.3±270.5[b]	610.1±74.2[b]
D组	1 309.5±244.0[b]	641.7±50.0[b]
E组	951.5±299.7[bc]	485.9±60.7[bc]

a：与A组比较，$P<0.05$；b：与B组比较，$P<0.05$；c：与C组比较，$P<0.05$。

3.3　小鼠耳部皮肤组织中GRα、GRβ表达的测定结果

3.3.1　GRα、GRβ阳性细胞数测定结果

与A组比较，B组小鼠GRα阳性细胞数差异无统计学意义($P>0.05$)，GRβ阳性细胞数显著增加($P<0.05$)；与B组比较，C组小鼠GRα阳性细胞数差异无统计学意义($P>0.05$)，D、E组小鼠GRα阳性细胞数显著增加($P<0.05$)，C组小鼠GRβ阳性细胞数显著增加($P<0.05$)，E组小鼠GRβ阳性细胞数显著减少($P<0.05$)；与C组比较，D、E组小鼠GRα阳性细胞数显著增加($P<0.05$)，GRβ阳性细胞数显著减少($P<0.05$)。结果见图2、表2。

3.3.2　GRα、GRβ蛋白表达水平测定结果

与A组比较，B组小鼠核蛋白中GRα蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)，总蛋白中GRβ蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与B组比较，C组小鼠核蛋白中GRα蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)，D、E组小鼠核蛋白中GRα蛋白水平及C组小鼠总蛋白中

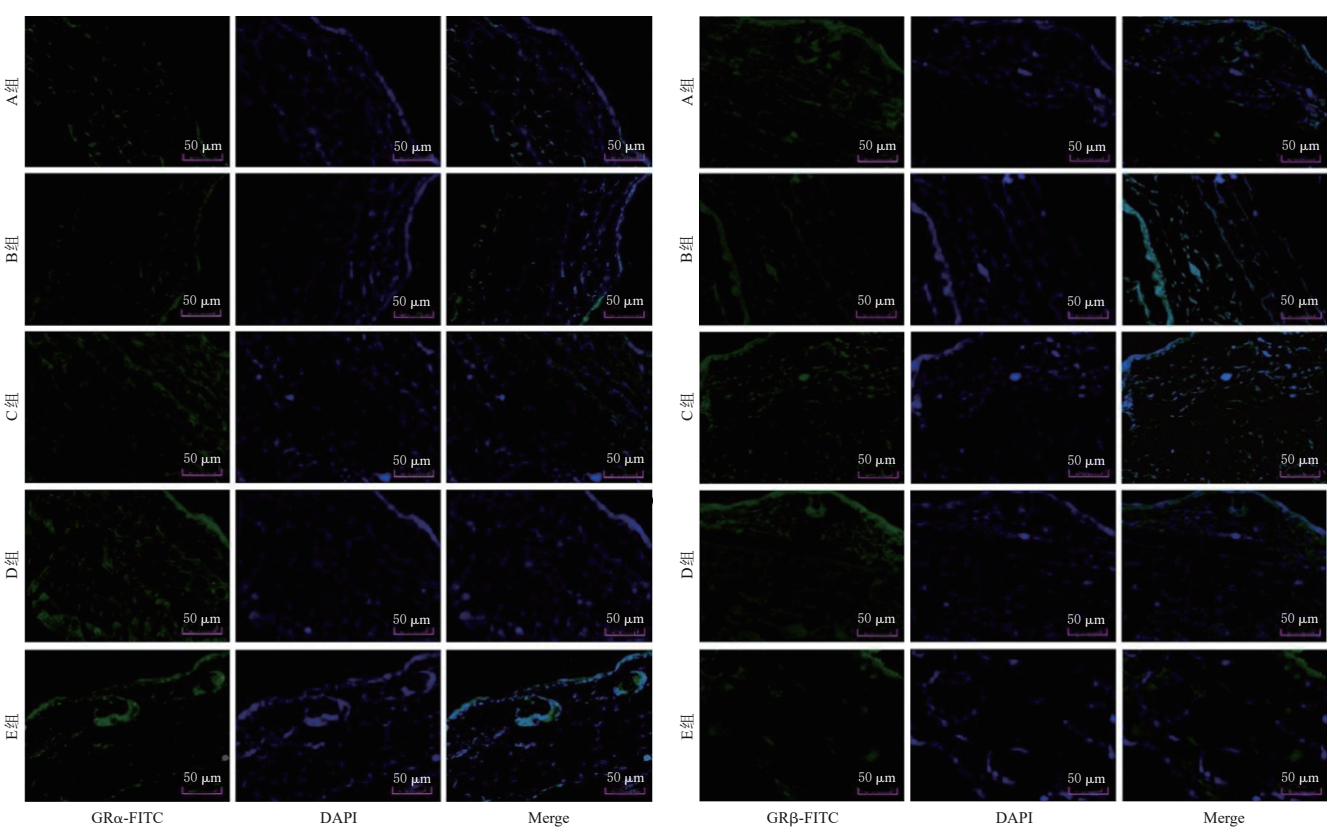


图2　各组小鼠耳部皮肤组织中GRα、GRβ表达的免疫荧光图

表2　各组小鼠耳部皮肤组织中GRα、GRβ表达情况的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	阳性细胞数/个		蛋白表达水平	
	GRα阳性细胞数	GRβ阳性细胞数	GRα/GAPDH	GRβ/GAPDH
A组	6.5±1.9	7.5±1.9	0.276±0.042	0.253±0.038
B组	6.7±2.3	24.8±2.5[a]	0.293±0.039	0.490±0.034[a]
C组	7.3±1.9	32.2±2.6[b]	0.291±0.030	0.645±0.070[b]
D组	22.5±1.9[bc]	22.7±2.1[c]	0.462±0.028[bc]	0.480±0.050[c]
E组	29.5±2.9[bc]	9.5±1.9[bc]	0.628±0.067[bc]	0.293±0.039[bc]

a：与A组比较，$P<0.05$；b：与B组比较，$P<0.05$；c：与C组比较，$P<0.05$。

GRβ蛋白表达水平均进一步升高（$P<0.05$），E组小鼠总蛋白中GRβ表达水平显著降低（$P<0.05$）。与C组比较，D、E组小鼠核蛋白中GRα蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$），总蛋白中GRβ蛋白水平显著减低（$P<0.05$）。结果见表2、图3。

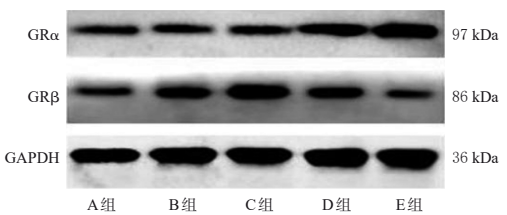


图3　各组小鼠耳部皮肤组织中GRα、GRβ蛋白表达的电泳图

3.4　小鼠耳部皮肤组织中AKT/S6K1信号通路相关蛋白表达的测定结果

与A组比较，B组小鼠Gαi1、Gαi3、p-S6K1、p-AKT的蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与B组比较，C、D、E组小鼠Gαi1、Gαi3、p-S6K1、p-AKT的蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与C组比较，D、E组小鼠Gαi1、p-S6K1、p-AKT的蛋白表达水平及E组小鼠Gαi3的蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图4、表3。

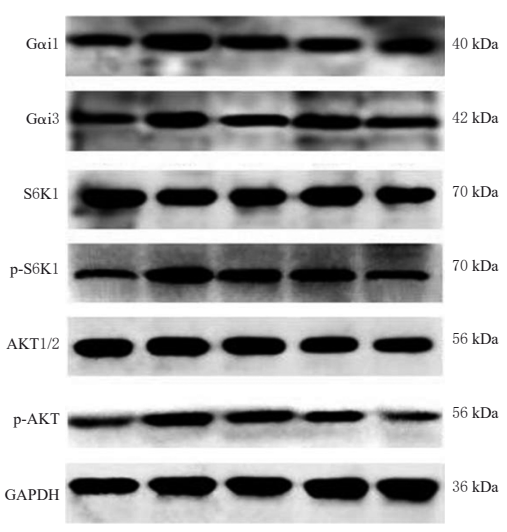


图4　各组小鼠耳部皮肤组织中AKT/S6K1信号通路相关蛋白表达的电泳图

表3　各组小鼠耳部皮肤组织中AKT/S6K1信号通路相关蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	Gαi1/GAPDH	Gαi3/GAPDH	S6K1/GAPDH	p-S6K1/GAPDH	AKT1/2/GAPDH	p-AKT/GAPDH
A组	0.274±0.045	0.296±0.050	0.798±0.074	0.280±0.050	0.785±0.076	0.288±0.042
B组	0.764±0.066[a]	0.761±0.063[a]	0.834±0.039	0.727±0.043[a]	0.812±0.034	0.758±0.081[a]
C组	0.591±0.067[b]	0.562±0.084[b]	0.801±0.054	0.570±0.053[b]	0.755±0.049	0.595±0.077[b]
D组	0.493±0.042[bc]	0.506±0.036[b]	0.785±0.047	0.462±0.067[bc]	0.763±0.029	0.482±0.050[bc]
E组	0.452±0.057[bc]	0.443±0.037[bc]	0.813±0.061	0.477±0.059[bc]	0.778±0.084	0.448±0.070[bc]

a：与A组比较，$P<0.05$；b：与B组比较，$P<0.05$；c：与C组比较，$P<0.05$。

4　讨论

中国医学科学院的研究人员早在20世纪60年代就对我国境内沙棘的资源分布及药理作用展开了研究，在后续的动物实验中证实沙棘油具有抗炎作用且无明显毒性[14]。近年来，随着对沙棘研究的深入，更多学者聚焦于沙棘果油的抗炎作用[15]。关于沙棘油在皮肤科的应用，早有报道其除了具有美容功效外，对皮肤烧伤、紫外线损伤、皮炎损伤等也有效，可促进皮肤再生、减轻组织炎症、促进伤口愈合[16]。在外用GC进行AD治疗时，即便严格遵守用药规范，仍有可能随着病程和治疗时间的延长出现激素抵抗，影响治疗效果[17]。本研究结果显示，使用DNCB联合SEB刺激后，小鼠皮肤组织炎症表现明显，血清IgE、IL-4水平显著升高；沙棘果油联合地塞米松对AD小鼠炎症反应的抑制作用较二者单独应用时更为显著，表现为皮损局部的炎症表现趋于消退，小鼠血清中IgE、IL-4水平降低。本研究结果进一步验证了沙棘果油在皮肤炎症性疾病中的抗炎作用。

GC需要与细胞内的GRα结合形成复合物转运至细胞核内方能发挥作用，GRβ是GC负调控因子，能够抑制GRα的活性[18]。本课题组通过免疫荧光单标法检测了各组小鼠皮损部位皮肤组织中GRα、GRβ阳性细胞数量。结果发现，使用DNCB联合SEB刺激后，小鼠皮肤组织中GRα阳性细胞数与正常小鼠比较差异无统计学意义，GRβ阳性细胞数显著增加。作为GC负调控因子，GRβ阳性细胞数的增加抑制了GC作用的发挥，促使激素抵抗发生。使用地塞米松（常用的GC药物）干预后，AD小鼠皮肤组织中GRα阳性细胞数与干预前比较差异无统计学意义，而应用沙棘果油或沙棘果油联合地塞米松干预后，小鼠皮肤组织中GRα阳性细胞数显著增加；单独应用地塞米松干预时，GRβ阳性细胞数增加最为显著，而沙棘果油单用或者联合地塞米松应用后能够减少GRβ阳性细胞数，抑制激素抵抗。为了进一步验证GRα、GRβ的蛋白表达情况，本课题组分别提取了各组小鼠皮肤组织中的核蛋白和总蛋白，并检测了GRα、GRβ蛋白在皮肤组织中的表达情况。结果显示，使用DNCB联合SEB刺激后，小鼠皮肤组织核蛋白中GRα蛋白表达水平与正常小鼠比较差异无统计学意义，总蛋白

中GRβ蛋白表达水平显著升高。应用沙棘果油或沙棘果油联合地塞米松干预后，AD小鼠皮肤组织核蛋白中GRα蛋白表达水平升高，总蛋白中GRβ蛋白表达水平降低。所得结果与免疫荧光单标法结果互为佐证，证实了沙棘果油对激素抵抗型AD小鼠的GRα、GRβ表达具有调节作用，其可通过上调GRα的表达及入核转位增强地塞米松的作用，抑制激素抵抗；并且可通过上调GRα的表达及增加地塞米松入核转位，进一步促进地塞米松发挥作用。G蛋白偶联受体（G-protein-coupled receptors，GPCRs）属于一大类大型膜蛋白受体，在静息状态下能与鸟嘌呤核苷酸结合蛋白的异源三聚体结合形成G蛋白，而G蛋白包括Gα、Gβ和Gγ这3个亚基。当GPCRs被激活后，受体构象发生变化，Gα与二聚体Gβγ分离，进而启动信号转导。Gαi1、Gαi3是Gα亚基中2种重要的蛋白，有研究发现Gαi1、Gαi3不仅能与GPCRs结合，还能与胞外配体结合[19]。本研究发现，Gαi1、Gαi3、p-AKT、p-S6K1蛋白在DNCB联合SEB刺激小鼠中均呈现出表达增加的特点，这表明AKT/S6K1信号通路呈活化状态，启动了炎症反应。单独使用地塞米松、沙棘果油干预或二者联合应用时，Gαi1、Gαi3、p-AKT、p-S6K1蛋白表达均呈下降趋势，与在激素抵抗型AD小鼠中的表达情况存在显著差异，其中以地塞米松与沙棘果油联合应用时降低最为显著。这表明沙棘果油对激素抵抗型AD小鼠的干预作用可能是通过抑制AKT/S6K1信号通路而发挥的。

综上所述，沙棘果油对SAg诱导的AD小鼠激素抵抗具有干预作用，该作用可能是通过抑制Gαi1/3诱导的AKT/S6K1信号通路而发挥的。然而，本研究仅限于从动物实验获取沙棘果油干预AD小鼠激素抵抗的证据，对其作用及机制的了解尚浅。本课题组后续拟通过体外实验对沙棘果油有效成分促使GRα的入核过程及激活的信号通路进行研究，以进一步探索沙棘果油对AD激素抵抗的干预作用及机制。

参考文献

[1] SUN D，ONG P Y. Infectious complications in atopic dermatitis[J]. Immunol Allergy Clin North Am，2017，37(1)：75-93.

[2] 马梦茜，王清滢，李亚琴，等. 特应性皮炎共病研究进展[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志，2023，22(3)：291-295.

[3] 陈丽萍，黄晓燕，肖易，等. 我国特应性皮炎、银屑病、痤疮和荨麻疹的患病率及危险因素[J]. 中南大学学报(医学版)，2020，45(4)：449-455.

[4] 王建琴. 中国特应性皮炎诊疗指南(2020版)解读[J]. 皮肤性病诊疗学杂志，2020，27(5)：359-361.

[5] 叶城斌，邹颖. 不同国家及地区特应性皮炎治疗指南的比较[J]. 中国皮肤性病学杂志，2020，34(11)：1331-1336，1340.

[6] NOWICKI R J，TRZECIAK M，KACZMARSKI M，et al. Atopic dermatitis. Interdisciplinary diagnostic and therapeutic recommendations of the Polish Dermatological Society，Polish Society of Allergology，Polish Pediatric Society and Polish Society of Family Medicine. Part Ⅰ. Prophylaxis，topical treatment and phototherapy[J]. Postepy Dermatol Alergol，2020，37(1)：1-10.

[7] 方博. 金黄色葡萄球菌Rbf调控毒力基因表达的分子机制[D]. 合肥：中国科学技术大学，2021.

[8] SKOV L，OLSEN J V，GIORNO R，et al. Application of staphylococcal enterotoxin B on normal and atopic skin induces up-regulation of T cells by a superantigen-mediated mechanism[J]. J Allergy Clin Immunol，2000，105(4)：820-826.

[9] 王为. 细菌超抗原SEB对角质形成细胞糖皮质激素受体的影响及机制研究[D]. 重庆：第三军医大学，2016.

[10] QI F，SUN J H，YAN J Q，et al. Anti-inflammatory effects of isorhamnetin on LPS-stimulated human gingival fibroblasts by activating Nrf2 signaling pathway[J]. Microb Pathog，2018，120：37-41.

[11] JIANG F，GUAN H N，LIU D Y，et al. Flavonoids from sea buckthorn inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages through the MAPK and NF-κB pathways[J]. Food Funct，2017，8(3)：1313-1322.

[12] WANG X X，LI S J，LIU J P，et al.Sea buckthorn oil ameliorates symptoms of atopic dermatitis DNCB induced in mice via regulation the balance of Th1/Th2[J]. BMC Complement Med Ther，2020，20(263)：1-11.

[13] 冉磊，何威，李昕，等. 细菌超抗原SEB对皮炎局部糖皮质激素受体β表达的影响[J]. 免疫学杂志，2015，31(4)：302-307.

[14] 张佑文. 药用植物沙棘的开发利用[J]. 药学情报通讯，1988，6(1)：39-40.

[15] 郑苏楠，程春雷，王永刚. 沙棘油中脂肪酸的GC-MS分析及其抗炎机制的网络药理学研究[J]. 药学研究，2021，40(11)：713-717，729.

[16] 沈琪，王梅，康金森. 沙棘油对小鼠变应性接触性皮炎的治疗作用[J]. 中国比较医学杂志，2017，27(11)：50-55.

[17] 李钦峰. 儿童特应性皮炎规范治疗与长期管理[J]. 中国实用儿科杂志，2021，36(9)：645-648.

[18] 彭瑾. TAC-NFAT轴调控GRβ在拮抗糖皮质激素快速减敏的作用机制研究[D]. 重庆：陆军军医大学，2019.

[19] 吴迪. Gαi蛋白介导TNF-α(肿瘤坏死因子α)诱导的信号转导及促炎反应[D]. 苏州：苏州大学，2020.

(收稿日期：2023-02-22　修回日期：2023-08-01)

(编辑：林　静)