皮肤病学 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000951

甘草酸对小鼠特应性皮炎炎症的影响及机制研究

谭 琦,甘立强,任发亮,杨 欢,王 华
(重庆医科大学附属儿童医院皮肤科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨甘草酸对实验性特应性皮炎(atopic dermatitis,AD)炎症的抑制作用及可能机制。**方法**:用 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene,DNCB)在 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠建立实验性特应性皮炎模型。将小鼠分为 4 组:对照组,甘草酸治疗组(分别 50 mg/kg、20 mg/kg 和 10 mg/kg)每天腹腔注射。分别在第 8、15 天,HE 染色观察皮肤病理学改变,用 qRT-PCR 方法测定局部皮损组织 Th2 型细胞因子的 mRNA 水平。同时,在第 15 天,取小鼠脾淋巴细胞体外培养,刀豆蛋白刺激 24 h 后,ELISA检测 Th2 型细胞因子的表达。**结果**:在第 8 天,与对照组相比,甘草酸各治疗组的皮肤病理学改变、局部皮损中细胞因子的 mRNA 水平以及脾淋巴细胞分泌的细胞因子无统计学差异。但在第 15 天,与对照组表皮厚度(194.00 ± 18.43)和真皮厚度(374.70 ± 40.01)比较,甘草酸 50 mg/(kg·d)治疗组小鼠表皮厚度(141.00 ± 7.61)(P=0.005)和真皮厚度(281.20 ± 69.42)(P=0.012)显著降低。qRT-PCR 结果显示皮损中白介素(inteleukin,IL)-4 mRNA(0.036 ± 0.011)和 IL-13 mRNA(0.051 ± 0.022)水平分别低于对照组(0.073 ± 0.007,0.100 ± 0.015)(P=0.000,P=0.001)。ELISA 方法检测脾淋巴细胞分泌的 IL-4(42.94 ± 9.26)和 IL-13(43.34 ± 12.59)均明显低于对照组(61.87 ± 10.20,77.42 ± 10.71)(P=0.002,P=0.000)。**结论**:甘草酸能缓解小鼠特应性皮炎皮肤炎症,可能是通过下调 Th2 细胞因子水平发挥作用。

【关键词】甘草酸;特应性皮炎;皮肤;炎症
【中图分类号】R758.2 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2016-01-17

Impact of glycyrrhizin on atopic dermatitis in mice model

Tan Qi, Gan Liqiang, Ren Faliang, Yang Huan, Wang Hua
(*Department of Dermatology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorder*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of glycyrrhizin on atopic dermatitis in mice model. ***Methods***: A model of atopic dermatitis was established in 6-8-week-old female BALB/c mice by applying 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB) to shaved dorsal skin. During the process of establishment of model, the mice were divided into four groups: control group, three glycyrrhizin groups treated with 50 mg/(kg·d), 20 mg/(kg·d) and 10 mg/(kg·d), respectively. The treatment lasted for 14 days. On day 8 and 15, dorsal skin tissue samples were obtained from these mice and for the observation of histopathological changes by using hematoxylin and eosin(HE) staining. The mRNA levels of Th2 cytokines were evaluated by qRT-PCR. Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) was carried out to determine the levels of IL-4 and IL-13, secreted by spleen lymphocytes followed by stimulation of ConA. ***Results***: Compared with the control mice, those treated with different doses of glycyrrhizin showed no difference in pathological changes of skin tissue and mRNA levels and cytokine production of IL-4 and IL-13 on day 8 after the treatment. However, on day 15, dermal and epidermal thickness of skin lesions(141.00 ± 7.61) vs. (194.00 ± 18.43); (281.20 ± 69.42) vs. (374.70 ± 40.01)(P=0.005, P=0.012, respectively) as well as the mRNA expression of IL-4(0.036 ± 0.011 vs. 0.073 ± 0.007, respectively) and IL-13(0.051 ± 0.022 vs. 0.100 ± 0.015)(P=0.000, P=0.001, respectively)and the levels of IL-4(42.94 ± 9.26 vs. 61.87 ± 10.20) and IL-13(43.34 ± 12.59) vs.(77.42 ± 10.71)(P=0.002, P=0.000, respectively) secreted by spleen lymphocytes from mice treated with glycyrrhizin 50 mg/(kg·d) group showed a significantly decrease compared with those of control mice. ***Conclusion***: Glycyrrhizin can inhibit the inflammation in mice model of atopic dermatitis, possibly by down regulating the expression cytokines of type T helper2 cells.

【Key words】glycyrrhizin; atopic dermatitis; skin; inflammation

作者介绍:谭 琦,Email:Qitan_dermatol@aliyun.com,研究方向:特应性皮炎发病机制。
通信作者:王 华,Email:huawang63@hotmail.com。
基金项目:中华医学会皮肤性病学分会美能皮肤病学研究基金。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20160513.1025.048.html (2016-05-13)

特应性皮炎(atopic dermatitis,AD)是好发于儿童的一种常见慢性复发性的炎症性皮肤疾病。发病机制复杂,病情反复。系统治疗涉及抗组胺药、糖皮质激素、免疫抑制剂、免疫调节药等多类药物。本文主要研究中药提取物甘草酸对 AD 炎症的影响及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

BALB/c 小鼠购自重庆医科大学动物实验中心,并在该中心 SPF 级别饲养。恒定室温,过滤空气,湿度 55%~60%,光照 10~12 h/d。饲料、饮用水均经过消毒处理。6~8 周成年鼠雌雄配对,生新生小鼠备用。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准(SYXK 渝 2012-0015)。主要仪器:高速低温离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),超净工作台(苏州净化设备公司),TC2323 型 CO_2 恒温培养箱(美国 SHEL LAB 公司),Jung RM2065 石蜡切片机(Leica 公司,德国)。主要试剂:引物(中国 ShineGene 公司),DEPC(美国 Sigma 公司),氯仿、异丙醇(上海化学试剂公司),无水乙醇(重庆川东化工厂)。甘草酸(美国 Sigma 公司),ELISA 试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司),标准胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限公司),胰酶(Hyclone,美国)。

1.2 特应性皮炎动物模型建立和药物干预

参照文献[1],6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,麻醉后,后背剃毛,面积约 1 cm × 1 cm 大小,外擦 1% DNCB100 μL,每 3 d 1 次,连续 2 次。第 2 周起,同一部位外擦 0.2%DNCB,每 3 d 1 次,连续 4 次。小鼠分为 4 组,每组 6 只小鼠:对照组(生理盐水)、苷草酸治疗组,甘草酸溶于磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)中,调整其浓度,按照 50、20、10 mg/kg 的剂量腹腔注射甘草酸 PBS 溶液 0.2 mL。分别于第 8、15 天取皮肤组织做皮肤病理检测和细胞因子 mRNA 测定。第 15 日处死小鼠,取脾脏制备淋巴细胞悬液,刀豆蛋白刺激 24 h,留上清液备用。

1.3 小鼠皮炎皮肤病理镜下观察

表皮厚度:HE 染色下,100 倍显微镜下,每个标本随机选取 5 个视野,测量表皮至真皮的距离,取平均值;真皮厚度:HE 染色下,100 倍显微镜下,每个标本随机选取 5 个视野,测量真皮至皮下组织的距离,取平均值[2]。

1.4 qRT-PCR 检测皮损中 Th2 型细胞因子的表达

TRIzol 法提取皮肤组织 RNA 提取,反转录成 cDNA。荧光定量 PCR 反应体系的配制(总体积 50 μL)2 × PCR buffer 25 μL,Primers(25 pmol/μL)2 μL,Sybr green I 0.5 μL,cDNA 0.5 μL,DEPC 水 20.5 μL。扩增条件的设置:94 ℃ 4 min;94 ℃ 20 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 循环 35 次,72 ℃检测信号。白介素(inteleukin,IL)-4、IL-13 及 β-actin 的引物序列:IL-4 F-GTCATCCTGCTCTTCTTTCTCG,R-GTGTTCTTCGTTGCTGTG-AGG,161 bp;IL-13 F-CTTGCTTGCCTTGGTGGTC,R-TGC-ACAGGGGAGTCTGGTC,124 bp;β-actin F-GAGACCTTCAA-CACCCCAGC R-ATGTCACGCACGATTTCCC,263 bp。结果用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 值表示。

1.5 小鼠脾淋巴细胞体外刺激

小鼠眼球静脉放血后,颈椎脱臼处死,75%的乙醇浸泡 3 min,取出小鼠置于超净工作台上,腹侧朝上。打开腹腔沿肋骨下缘腹正中,用镊子提起腹壁切开腹壁肌肉,至耻骨联合,从肋骨下端向脊柱方向,将两侧腹壁剪开,充分暴露腹腔内脏器用眼科镊提取脾脏,分离结缔组织,将完整的脾脏取出放入含 5 mL Hank 液的培养皿中。置于 300 目锈钢筛于平皿中,脾脏置于筛网中,用剪刀剪碎脾,用 5 mL 玻璃注射器针芯轻轻捻磨脾脏,使分散的细胞滤过金属网进入平皿的液体中,红细胞裂解液冲洗 1 次;用吸管吸取冲洗液,300 目筛过滤 1 次后收集至离心管中;1 000 r/min,离心 10 min,弃上清;加入约 1 mL 冰 PBS 溶液吸管打匀后洗涤细胞,5 000 r/min,离心 5 min,弃上清,用含有 1 mmol/L 的谷氨酸胺、100 IU/mL 青霉素 G、100 g/mL 链霉素、10%的胎牛血清的 RPMI1640 重悬细胞,调节细胞浓度为 2×10^6/mL,台盼兰染色检测细胞存活率大于 95%。加入刀豆蛋白(终浓度 5 μg/mL)刺激 24 h 后收取上清,离心备用。

1.6 ELISA 检测

按试剂盒说明书进行。

1.7 统计学方法

运用 Graphpad Prism 5.03 软件进行统计分析,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,其组间两两比较采用 Dunnett t 检验,检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 小鼠皮炎皮肤病理改变

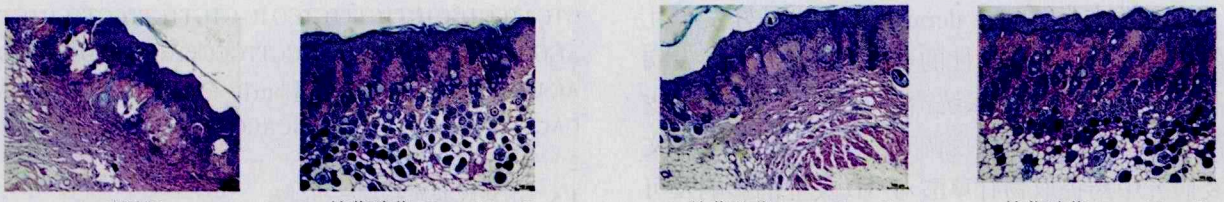
如图 1 所示,在第 8 天,甘草酸各治疗组小鼠表皮和真皮厚度与对照组比较,无统计学差异,但在第 15 天(图 2,见附件),无论是表皮还是真皮厚度,甘草酸 50 mg/(kg·d)治疗组均低于对照组,具有统计学意义(P=0.005,P=0.012)(表1)。

2.2 小鼠皮损中 Th2 型细胞因子的 mRNA 水平

在第 8 天,甘草酸各治疗组小鼠皮损中细胞因子 IL-4和 IL-13 mRNA 水平较对照组比较,无统计学差异;随着病程的进展,第 15 天,50 mg/(kg·d)甘草酸治疗组小鼠皮损中细胞因子 IL-4 和 IL-13 mRNA 水平明显低于对照组,差异具有统计学意义(P=0.000,P=0.001)(表 2)。

2.3 小鼠脾淋巴细胞体外分泌的 Th2 型细胞因子

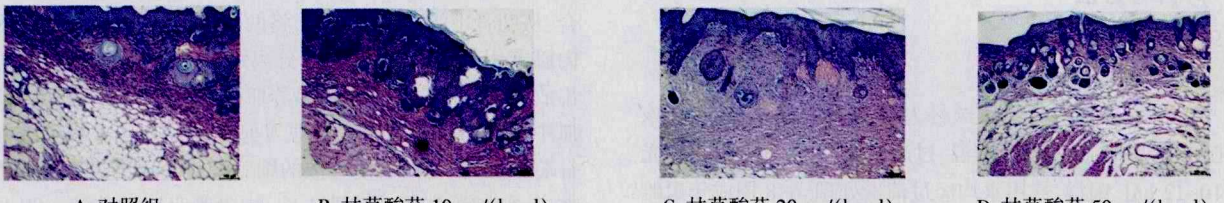
如表 3 所示,不论是 IL-4 还是 IL-13,在第 8 天,各甘草酸干预组的水平较对照组并无统计学差异;但在第 15 天,50 mg/(kg·d)甘草酸治疗组小鼠脾淋巴细胞分泌的细胞因子IL-4 和 IL-13 的水平明显低于对照组,差异具有统计学意义(P=0.002,P=0.000)。



A. 对照组　B. 甘草酸苷 10 mg/(kg·d)　C. 甘草酸苷 20 mg/(kg·d)　D. 甘草酸苷 50 mg/(kg·d)

图 1　第 8 天 HE 染色下对照组与实验组小鼠皮肤组织病理学改变（100×）

Fig.1　Changes of pathology of skin lesions on 8th day（100×）



A. 对照组　B. 甘草酸苷 10 mg/(kg·d)　C. 甘草酸苷 20 mg/(kg·d)　D. 甘草酸苷 50 mg/(kg·d)

图 2　第 15 天 HE 染色下对照组与实验组小鼠皮肤组织病理学改变（100×）

Fig.2　Changes of pathology of skin lesions on 15th day（100×）

表 1　HE 染色下小鼠表皮与真皮厚度

Tab.1　Epidermal and dermal thickness

组别	表皮厚度 μm		真皮厚度 μm	
	第 8 天	第 15 天	第 8 天	第 15 天
对照组	174.1 ± 20.29	194.0 ± 18.43	294.7 ± 35.09	374.7 ± 40.01
50 mg/(kg·d)组	151.0 ± 24.51	141.0 ± 7.61[a]	282.9 ± 20.76	281.2 ± 69.42[b]
20 mg/(kg·d)组	148.6 ± 19.38	193.6 ± 44.60	269.5 ± 60.25	324.5 ± 23.41
5 mg/(kg·d)组	155.2 ± 28.46	187.1 ± 14.91	282.4 ± 74.84	340.7 ± 26.86
F 值	1.461	5.968	0.164	4.703
P 值	0.255	0.005	0.920	0.012

注：与对照组比较，a，*P*=0.005；b：*P*=0.012，*n*=6

表 2　小鼠皮损中 Th2 型细胞因子 IL-4 和 IL-13mRNA 水平的表达

Tab.2　mRNA levels of IL-4 and IL-13 in skin lesions

组别	IL-4		IL-13	
	第 8 天	第 15 天	第 8 天	第 15 天
对照组	0.053 ± 0.007	0.073 ± 0.007	0.079 ± 0.015	0.100 ± 0.015
50 mg/(kg·d)组	0.049 ± 0.004	0.036 ± 0.011[a]	0.073 ± 0.015	0.051 ± 0.022[b]
20 mg/(kg·d)组	0.047 ± 0.006	0.062 ± 0.003	0.070 ± 0.015	0.086 ± 0.019
10 mg/(kg·d)组	0.050 ± 0.005	0.063 ± 0.007	0.073 ± 0.017	0.091 ± 0.013
F 值	1.132	24.590	0.320	9.042
P 值	0.360	0.000	0.982	0.001

注：与对照组比较，a，*P*=0.000；b：*P*=0.001，*n*=6

表 3　脾淋巴细胞分泌的 IL-4 和 IL-13 的水平（pg/mL）

Tab.3　Expressions of IL-4 and IL-13 secreted by splenocyte（pg/mL）

组别	IL-4		IL-13	
	第 8 天	第 15 天	第 8 天	第 15 天
对照组	56.87 ± 12.42	61.87 ± 10.20	75.22 ± 2.09	77.42 ± 10.71
50 mg/(kg·d)组	57.94 ± 7.22	42.94 ± 9.26[a]	79.51 ± 7.46	43.34 ± 12.59[b]
20 mg/(kg·d)组	71.23 ± 6.31	67.89 ± 6.31	66.40 ± 4.46	75.88 ± 9.32
10 mg/(kg·d)组	53.41 ± 12.37	60.07 ± 11.69	69.17 ± 9.38	71.34 ± 11.27
F 值	3.675	7.514	4.948	12.580
P 值	0.029	0.002	0.010	0.000

注：与对照组比较，a，*P*=0.000；b：*P*=0.001，*n*=6

3 讨 论

AD是一种常见的慢性、复发性、炎症性皮肤疾病，好发于儿童，90%在 5 岁以内起病。在美国，AD 的发病率为 17%，是最常见的儿童慢性疾病[3]。AD 发病机制仍然不清，涉及内外环境等多个因素，可能与遗传易感、环境、感染、免疫异常等有关。AD 的靶向治疗主要面向于皮肤的免疫调节和屏障功能的修复。目前，对于 AD 的免疫学治疗，普遍采取的治疗手段包括糖皮质激素的外用、病情严重者甚至采用免疫抑制剂系统治疗、窄谱中波紫外线照射等多个方面。由于 AD 病因复杂，病情反复，需要间歇多次治疗，糖皮质激素或免疫抑制剂的长期使用，可引起物质代谢和电解质紊乱、骨质疏松、缺血性股骨头坏死、诱发或加重感染等一系列并发症。而甘草酸是中药甘草有效成分的提取物，其化学结构与醛固酮的类固醇环相似，易于与类固醇的靶细胞相结合，可阻碍可的松与醛固酮的灭活，从而发挥类固醇样作用[4]，故甘草酸很可能成为糖皮质激素的替代物而广泛应用于临床。甘草酸对儿童生长发育无影响，不形成依赖。

目前的研究报道认为甘草酸除了具有经典的抗炎、抗病毒、抗过敏、免疫调节、保肝、抗纤维化等多种生物学效应，还能抑制血栓引起的血小板聚集、抑制 PGE2[5]。尤其在抗炎、抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭转移中越来越受到重视。根据甘草酸的生物学特性，临床上已经开始应用于各种炎症性皮肤疾病的系统治疗。研究发现[6]，甘草酸能调节角质形成细胞的炎症反应，减少 ICAM 的表达，抑制 NF-κB 的活性。动物实验表明，甘草酸能减轻咪喹莫特诱导的皮肤银屑病样反应，减轻组织损伤，减少中性粒细胞浸润[6-7]。

AD 是一种以 T 淋巴细胞浸润为主的炎症性皮肤疾病，急性期以 Th2 为主，慢性期则以 Th1 为主。甘草酸治疗 AD 的机制尚不确切，可能与调节 T 淋巴细胞功能相关。研究发现[8-9]，甘草酸能调控 Th1/Th2 淋巴细胞平衡，诱导树突状细胞表面 CD40、CD86、MHC-II 分子表达增加，促进其成熟分化，同时，刺激 T 淋巴细胞增殖，减少 IL-4 表达。与此一致，在本实验中，甘草酸能减轻皮肤炎症反应，表现为表皮和真皮厚度减少，局部皮损和脾淋巴细胞中 IL-4、IL-13 的水平下降，说明甘草酸从系统方面能缓解 AD 的皮炎症状，其可能的机制在于抑制急性期 Th2 型细胞因子的表达从而减轻炎症，但其作用的具体信号机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Lee SH, Heo Y, Kim YC. Effect of German chamomile oil application on alleviating atopic dermatitis-like immune alterations in mice[J]. J Vet Sci, 2010, 1(11): 35-41.

[2] Oyoshi MK, He R, Kanaoka Y, et al. Eosinophil-derived leukotriene C4 signals via type 2 cysteinyl leukotriene receptor to promote skin fibrosis in a mouse model of atopic dermatitis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(13): 4992-4997.

[3] Laughter D, Istvan JA, Tofte SJ, et al. The prevalence of atopic dermatitis in Oregon school children[J]. J Am Acad Dermatol, 2000, 43(4): 649-655.

[4] Niwa K, Lian Z, Onogi K. Preventive efects of glycyrrhizin on estrogen-related endometrial carcinogenesis in mice[J]. Oncol Rep, 2007, 17(3): 617-622.

[5] Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, et al. Antiviral Activity of Glycyrrhizin against Hepatitis C Virus In Vitro[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68992.

[6] Xiong H, Xu Y, Tan G, et al. Glycyrrhizin Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Skin Lesions in BALB/c Mice and Inhibits TNF-α-Induced ICAM-1 Expression via NF-κB/MAPK in HaCaT Cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(4): 1335-1346.

[7] Fakhari S, Abdolmohammadi K, Panahi Y, et al. Glycyrrhizin attenuates tissue injury and reduces neutrophil accumulation in experimental acute pancreatitis[J]. Int J Clin Exp Pathol 2013, 7(1): 101-109.

[8] Bordbar N, Karimi MH, Amirghofran Z. The effect of glycyrrhizin on maturation and T cell stimulating activity of dendritic cells[J]. Cell Immunol, 2012, 280(1): 44-49.

[9] Tu CT, Li J, Wang FP, et al. Glycyrrhizin regulates CD4+ T cell response during liver fibrogenesis via JNK, ERK and PI3K/AKT pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(4): 410-421.

（责任编辑：张辉洁）