

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.10.029

## 黄柏对湿疹小鼠颗粒蛋白前体的影响\*

江永青<sup>1</sup>, 胡颖<sup>1</sup>, 吴义翔<sup>2</sup>, 周小娟<sup>1△</sup>

1. 九江学院附属医院检验科, 江西九江 332000; 2. 九江学院, 江西九江 332000

**摘要:**目的 分析黄柏对湿疹小鼠颗粒蛋白前体(PGRN)的影响。方法 将 30 只昆明种雄性小鼠按照随机数字表法分为空白对照组、湿疹模型组、黄柏治疗组, 每组各 10 只。湿疹模型组与黄柏治疗组采用 2,4-二硝基氯苯(DNCB)溶液建立小鼠湿疹模型。评估小鼠皮肤损伤状况, 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测小鼠皮肤损伤处 PGRN 基因相对表达水平, 采用酶联免疫吸附试验检测外周血 PGRN 蛋白表达水平和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  水平。结果 与空白对照组相比, 湿疹模型组有明显红肿、角化结痂、渗出等皮肤损伤, 小鼠皮肤损伤程度评分、皮肤 PGRN 基因相对表达水平、外周血 PGRN 蛋白表达水平及 TNF- $\alpha$  水平明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与湿疹模型组比较, 黄柏治疗组红肿、角化结痂、渗出等皮肤损伤减轻, 小鼠皮肤损伤程度评分、皮肤 PGRN 基因相对表达水平、外周血 PGRN 蛋白表达水平及 TNF- $\alpha$  水平明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 湿疹小鼠 PGRN 基因和蛋白表达水平异常, 且黄柏可通过抑制 PGRN, 抑制炎症反应, 有效治疗湿疹。

**关键词:** 湿疹; 黄柏; 颗粒蛋白前体**中图分类号:** R275.9**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2023)10-1467-03

湿疹是一种慢性复发炎症性皮肤病, 合并强烈瘙痒, 是最常见的皮肤病之一, 成年人患病率为 2%~10%, 儿童患病率高达 20%<sup>[1]</sup>。湿疹是一种嗜酸性海绵状皮肤炎症, 具有年龄依赖性分布特征<sup>[2]</sup>。近年来, 研究发现颗粒蛋白前体(PGRN)是多种系统功能(如先天免疫反应、炎症反应及组织再生)的关键参与者和调节剂<sup>[3]</sup>。中医认为湿疹多因禀赋不耐, 饮食失节, 脾胃受损, 湿热内生, 又兼外受风邪, 内外两邪相搏, 充于腠理, 浸淫肌肤, 发为本病。湿疹病位在表, 外治药物不仅可以直达病所, 透达腠理发挥局部的治疗作用, 还能通过肌腠毛窍, 深入脏腑起到内外合治的作用。黄柏是治疗湿疹的常用药物, 但作用机制尚不明了<sup>[4]</sup>。PGRN 与湿疹之间存在何种联系, 中药黄柏对湿疹小鼠 PGRN 有何种影响, 仍待研究。本研究拟检测湿疹小鼠 PGRN 的表达情况, 探讨中药黄柏对湿疹小鼠的作用, 为中医药治疗湿疹提供客观的实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 昆明种雄性小鼠 30 只, 体质量(20±2)g, 由江西中医药大学实验动物中心提供。饲养条件: 自然光照, 温度 25℃, 相对湿度 50%, 保持动物房环境及鼠笼清洁、透气。小鼠自由进食、饮水。

**1.2 仪器与试剂** 2,4-二硝基氯苯(DNCB)购于山东西亚化学股份有限公司。聚合酶链反应(PCR)引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; 总

RNA 抽提试剂 TRIzol、反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 检测用 SYBR Green mix 荧光染料均购自 TaKaRa 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 实验分组及建立急性湿疹模型** 采用随机数字表法将 30 只小鼠分为空白对照组、湿疹模型组、黄柏治疗组, 每组各 10 只。除空白对照组外, 湿疹模型组和黄柏治疗组均建立急性湿疹模型。造模前所有小鼠在饲养条件下适应性喂养 1 周。实验第 1 天起, 在小鼠耳内侧涂抹 50  $\mu$ L 5% DNCB 溶液, 每日 1 次, 持续 5 d, 第 6 天起, 在小鼠耳部涂抹 50  $\mu$ L 1% DNCB 溶液, 每日 1 次, 持续 5 d。涂抹后 24 h 见耳部皮肤出现红肿、丘疹、渗出、结痂等典型急性湿疹表现, 证明造模成功。

黄柏治疗组采用黄柏洗剂(药物浓度为 1 000 mg/mL)涂抹于小鼠皮肤损伤处, 每天 3 次, 每次 2 mL, 连续 10 d, 于停药后 24 h、末次治疗结束 24 h 后, 留取湿疹皮肤损伤处皮肤组织。

**1.3.2 皮肤损伤评分** 由 2 位研究者分别进行皮肤损伤评分, 并在评分前隐去组别信息。参照湿疹面积及严重度指数评分法肉眼观察小鼠皮肤损伤情况, 根据红斑、水肿/丘疹、渗出/结痂、抓痕/表皮剥脱 4 种临床表现, 按照 0 分(无)、1 分(轻度)、2 分(中度)、3 分(重度)对皮肤损伤评分, 分值可记半分(0.5 分)。每组小鼠皮肤损伤评分的平均分为该组的分数, 取 2

\* 基金项目: 九江市科技计划项目(S2021ZDYFN185)。

△ 通信作者, E-mail: 37404851@qq.com。

位研究者的平均分纳入统计分析。

**1.3.3 提取组织标本进行实时荧光定量 PCR** 采用颈椎脱臼法处死小鼠后,沿耳基线剪下患耳耳廓,采用 8 mm 打孔器取得耳廓组织,将其置于液氮中磨成粉末,并提取 RNA,采用实时荧光定量 PCR(美国, A&B7500 Real Time PCR System)检测 PGRN mRNA 及  $\beta$ -actin 表达水平。 $\beta$ -actin F:GTGCTATGT-TGCTCTAGACTTCG; R: ATGCCACAGGATTC-CATACC。PGRN F:CAACAGGGCAGTGTCTT TGC; R: AGATGGCATTGGGCATTGGA。PGRN 基因相对表达水平采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。

**1.3.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 PGRN 蛋白和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  水平** PGRN 半衰期为 40 h<sup>[5]</sup>,早晨 8:00—9:00 眼眶采血。取小鼠外周血 50  $\mu$ L,采用 ELISA 检测 PGRN 蛋白表达水平。小鼠 PGRN ELISA 试剂盒购自 R&D 公司。取小鼠外周血 50  $\mu$ L,采用 ELISA 检测 TNF- $\alpha$  水平, TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS26.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。呈正态分布、方差齐的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析,多组间中的两两比较采用 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 3 组小鼠耳部湿疹皮肤损伤程度及评分比较

空白对照组、湿疹模型组和黄柏治疗组皮肤损伤评分分别为 0、(2.40 $\pm$ 0.52)、(1.80 $\pm$ 0.54)分。与空白对照组比较,湿疹模型组有明显红肿、角化结痂、渗出等皮肤损伤,皮肤损伤程度评分明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与湿疹模型组比较,黄柏治疗组耳部皮肤红肿、角化结痂、渗出等损伤减轻,皮肤损伤评分明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 3 组小鼠 PGRN 基因相对表达水平比较** 空白对照组、湿疹模型组和黄柏治疗组 PGRN 基因相对表达水平分别为(0.43 $\pm$ 0.16)、(2.09 $\pm$ 0.31)、(1.44 $\pm$ 0.17)。与空白对照组比较,湿疹模型组 PGRN 相对表达水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与湿疹模型组比较,黄柏治疗组 PGRN 相对表达水平明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.3 3 组小鼠外周血 PGRN 蛋白表达水平比较** 空白对照组、湿疹模型组和黄柏治疗组外周血 PGRN 蛋白表达水平分别为(865.90 $\pm$ 60.37)、(1 556.31 $\pm$ 68.16)、(1 202.20 $\pm$ 90.06)ng/mL。与空白对照组比较,湿疹模型组外周血 PGRN 蛋白表达水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与湿疹模型组比较,黄柏治疗组外周血 PGRN 蛋白表达水平明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.4 3 组小鼠外周血 TNF- $\alpha$  水平比较** 空白对照组、湿疹模型组和黄柏治疗组 TNF- $\alpha$  水平分别为(155.97 $\pm$ 16.43)、(374.01 $\pm$ 24.04)、(226.83 $\pm$ 20.02)ng/mL。与空白对照组比较,湿疹模型组外周血 TNF- $\alpha$  水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与湿疹模型组比较,黄柏治疗组 TNF- $\alpha$  水平明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨 论

湿疹是最常见的炎症性皮肤病,导致皮肤干燥、开裂和发痒。轻度湿疹患者的皮肤有小块干燥,而中度湿疹患者的皮肤损伤区域更大、更红或肿胀。患有严重湿疹的人会出现全身发红的皮痂和破损的皮肤(可能会渗出液体)。反复抓挠会触发自我持续的瘙痒-抓挠循环,这会对患者的生活质量产生重大影响。湿疹的病因复杂,但皮肤屏障异常和免疫失调是主要因素,包括辅助性 T 细胞(TH 细胞)活性增加等。BIEDERMANN 等<sup>[6]</sup>的研究表明,免疫细胞调节湿疹的发展,其中 CD4 TH 细胞亚群的异常表达是该疾病的主要原因之一。TH1、TH2、TH17 和 TH22 的增加,以及炎症细胞因子的过度积累不可避免地导致湿疹发生。2 型免疫反应和增强的 IgE 反应是诱发湿疹的主要因素<sup>[7]</sup>。抗原引发的 TH2 细胞及其相关细胞因子包括白细胞介素(IL)-4、IL-5 和 IL-13 会诱导免疫功能障碍,随后破坏皮肤组织的完整性,导致湿疹发生<sup>[8]</sup>。

PGRN 是一种多效性生长因子,能够调节细胞生长周期,在免疫反应的调节中发挥着核心作用<sup>[9]</sup>。PGRN 可诱导多种炎症细胞因子的分泌,如 IL-8、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 。在对硬皮病的研究中发现,PGRN 的过表达将抑制真皮成纤维细胞对 TNF- $\alpha$  的抗纤维化作用<sup>[10]</sup>。在对糖尿病小鼠的研究中发现,PGRN 缺乏会增加肾损伤,PGRN 可防止高糖诱导的足细胞损伤<sup>[11]</sup>。PGRN 可通过抑制高迁移率族蛋白 1 负调节自噬来防止哮喘气道重塑。同时 PGRN 还可抑制气道上皮细胞中自噬标志物和自噬体水平,从而控制体内和体外的纤维化过程<sup>[12]</sup>。PGRN 在多种免疫介导的疾病发展中具有保护作用,在包括类风湿关节炎、炎症性肠病、1 型糖尿病和多发性硬化症等多种疾病中参与调节重要的免疫信号通路,特别是 TNF- $\alpha$ /TNF 受体信号通路。然而,PGRN 在银屑病、系统性红斑狼疮和系统性硬化症中的作用仍存在争议。

目前,关于湿疹发病机制的研究取得了重大进展,但缺乏持久且耐受性良好的治疗方法。免疫抑制药物,如类固醇,最常用于治疗湿疹,但不良反应严重,可导致免疫抑制、机会性感染和骨质疏松症<sup>[13]</sup>。因此,迫切需要长期有效且耐受性良好的新型疗法。中医药对免疫炎症疾病具有理想的治疗效果。黄柏

是治疗湿疹的高频中药,味苦,性寒,归肾、膀胱经,具有清热燥湿,泻火解毒,消肿祛腐等作用,其临床作用还包括调节免疫功能、抗菌、抗氧化、抗癌等。研究表明,黄柏治疗可明显抑制湿疹小鼠瘙痒和皮肤损伤,减少炎症细胞的浸润,黄柏可减少炎症细胞因子的表达,包括 IL-1 $\beta$ 、IL-4、干扰素(IFN)- $\gamma$ 、IL-13 和 IL-17,并增加炎症细胞因子 IL-10 的表达,减轻了皮肤炎症,同时促进调节性 T 细胞表达,降低 CD4<sup>+</sup> T 细胞的表达<sup>[14]</sup>。黄柏外用治疗糖尿病足溃疡可促进溃疡愈合,提高生长因子水平,促进血清表皮生长因子水平升高<sup>[15]</sup>。在溃疡性结肠炎小鼠结肠中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、核因子(NF)- $\kappa$ B 和环氧化酶-2(COX-2)表达水平升高,而给予复方黄柏液灌肠后,IL-6、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 和 COX-2 的表达水平明显降低,该实验结果表明复方黄柏液可能通过抑制 NF- $\kappa$ B /COX-2 信号通路的激活,进一步降低炎症介质 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达水平,对湿疹起到治疗作用<sup>[16]</sup>。

综上所述,本实验证实 PGRN 与湿疹密切相关。湿疹模型小鼠 PGRN 基因相对表达水平、外周血 PGRN 蛋白表达水平及 TNF- $\alpha$  水平均明显升高。黄柏对湿疹有显著治疗效果,其作用机制可能与 PGRN 有关。黄柏治疗湿疹小鼠,湿疹小鼠皮肤红肿、角化结痂、渗出等损伤减轻,小鼠皮肤 PGRN 基因相对表达水平、外周血 PGRN 蛋白表达水平及 TNF- $\alpha$  水平均明显降低。

### 参考文献

[1] MORTZ C G, ANDERSEN K E, DELLGREN C, et al. Atopic dermatitis from adolescence to adulthood in the TOACS cohort: prevalence, persistence and comorbidities [J]. *Allergy*, 2015, 70(7): 836-845.

[2] WERFEL T, ALLAM J P, BIEDERMANN T, et al. Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis [J]. *Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(2): 336-349.

[3] LAN Y J, SAM N B, CHENG M H, et al. Progranulin as a potential therapeutic target in immune-mediated diseases [J]. *Inflamm Res*, 2021, 14: 6543-6556.

[4] 陈平, 杨志波, 杨光艳, 等. 外用中药治疗慢性湿疹研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2012, 3(10): 523-526.

[5] TANG W, LU Y, TIAN Q Y, et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic a-

gainst inflammatory arthritis in mice [J]. *Science*, 2011, 332(6028): 478-484.

[6] BIEDERMANN T, SKABYTSKA Y, KAESLER S, et al. Regulation of T cell immunity in atopic dermatitis by microbes: the yin and yang of cutaneous inflammation [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 353.

[7] WEIDINGER S, NOVAK N. Atopic Dermatitis [J]. *Lancet*, 2016, 387(10023): 1109-1122.

[8] DAINICHI T, KITO A, OTSUKA A, et al. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(12): 1286-1298.

[9] LIU C, LI J, SHI W, et al. Progranulin regulates inflammation and tumor [J]. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, 2020, 19(2): 88-102.

[10] MIYAGAWA T, ICHIMURA Y, NAKAMURA K, et al. Progranulin overproduction due to constitutively activated c-Abl/PKC- $\delta$ /Fli1 pathway contributes to the resistance of dermal fibroblasts to the anti-fibrotic effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  in localized scleroderma [J]. *Dermatol Sci*, 2018, 92(2): 207-214.

[11] ZHOU D, ZHOU M, WANG Z Y, et al. Progranulin alleviates podocyte injury via regulating CAMKK/AMPK-mediated autophagy under diabetic conditions [J]. *Mol Med (Berl)*, 2019, 97(11): 1507-1520.

[12] LIU M X, SHAN M T, ZHANG Y X, et al. Progranulin protects against airway remodeling through the modulation of autophagy via HMGB1 suppression in house dust mite-induced chronic asthma [J]. *Inflamm Res*, 2021, 14: 3891-3904.

[13] NGUYEN H L, ANDERSON K R, TOLLEFSON M M, et al. New and emerging therapies for pediatric atopic dermatitis [J]. *Paediatr Drugs*, 2019, 21(4): 239-260.

[14] ZHENG T, FAN M, WEI Y B, et al. Huangbai liniment ameliorates skin inflammation in atopic dermatitis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 726035.

[15] LIU Y L, LI Y S, DU Y Q, et al. Multicenter clinical trials analyzing efficacy and safety of topical cortex phello-dendri compound fluid in treatment of diabetic foot ulcers [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e923424.

[16] 李多, 梁娜, 吴娜, 等. 复方黄柏液对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜的保护作用 [J]. *中国新药杂志*, 2021, 20(16): 1519-1523.