

· 基础研究 ·

青蒿琥酯对豚鼠经皮激素诱导后病理性改变的影响

权哲,张蓓蓓,殷芳,王婷婷,杜霖儒,支媛婷,钱苗,刘玮,许瑾,宋宁静*

上海交通大学医学院附属同仁医院皮肤科,上海 200336

[摘要] 目的:观察青蒿琥酯对豚鼠经皮激素诱导后病理性改变及炎症因子的影响。方法:30只雄性豚鼠背腹部剃毛区外用0.05%丙酸氯倍他索溶液复制模型,并将其随机等分为5组:模型组给予0.9%氯化钠溶液腹腔注射,治疗组分别给予低、中、高剂量[5、10、20 mg/(kg·d)]青蒿琥酯注射液腹腔注射,糖皮质激素受体阻断组给予米非司酮腹腔注射;另取6只豚鼠作为空白对照组,仅剃毛区外涂75%乙醇溶液。观察各组皮肤组织病理学改变,ELISA法检测各组血清中白细胞介素(interleukin, IL)-1、IL-4含量,采用RT-PCR检测各组皮肤中糖皮质激素受体 α (GR α)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 表达。结果:模型组血清IL-1、IL-4含量明显高于空白对照组和糖皮质激素受体阻断组($P < 0.05$),青蒿琥酯腹腔注射中、高剂量组血清中IL-1、IL-4含量均低于模型组($P < 0.05$),治疗组间比较差异无统计学意义。各组豚鼠皮肤组织GR α mRNA的表达差异无统计学意义。模型组皮肤组织TNF- α mRNA含量高于空白对照组,青蒿琥酯腹腔注射中、高剂量组皮肤组织TNF- α mRNA含量低于模型组($P < 0.05$),中、高剂量组间比较差异无统计学意义。结论:青蒿琥酯能抑制豚鼠类固醇诱导的皮炎,以中、高剂量最为明显,其作用可能与IL-1、IL-4、TNF- α 有关,具体机制有待进一步深入研究。

[关键词] 青蒿琥酯;炎症因子;疾病模型;豚鼠

[中图分类号] R392.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)02-201-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20190208

Effects of artesunate on pathological changes induced by glucocorticoid in guinea pigs

Quan Zhe, Zhang Beibei, Yin Fang, Wang Tingting, Du Jiru, Zhi Yuanting, Qian Miao, Liu Wei, Xu Jin, Song Ningjing*
Department of Dermatology, Tongren Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200336, China

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of artesunate on pathological changes and inflammatory factors induced by glucocorticoid in guinea pig models. **Methods:** Thirty male guinea pigs were used 0.05% clobetasol propionate solution continuously on the shaved belly areas for 30 days to establish guinea pig models of steroid-induced dermatitis. They were randomly and equally divided into 5 groups: model groups were intraperitoneal injected with 0.9% sodium chloride solution, treatment groups were intraperitoneal injected with 5, 10 and 20 mg/kg artesunate solution separately, glucocorticoid receptor blocking groups were intraperitoneal injected with mifepristone, and 6 guinea pigs only external used with 75% ethanol solution on shaving back as blank control groups. Pathological changes in skin tissue of each group were observed. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the content of IL-1 and IL-4 in the serum of each group. The expressions of GR α mRNA and TNF- α mRNA in the skin of each group were detected by RT-PCR. **Results:** The levels of IL-1 and IL-4 in the serum of model groups were significantly higher than those in the blank control groups and the glucocorticoid receptor blocked groups. The levels of IL-1 and IL-4 in the serum of artesunate groups were lower than those in the model group ($P < 0.05$). There was no significant difference between the treatment groups. There was no significant difference in the expression of GR α mRNA in the skin tissues of guinea pigs. The TNF- α mRNA content in the skin tissue of the model group was higher than that in the blank control group and the glucocorticoid receptor blocked group ($P < 0.05$). The content of TNF- α mRNA in the skin tissue of the high dose and middle dose group of artesunate was lower than that of the model group ($P < 0.05$). There was no significant difference in TNF- α mRNA between the middle dose artesunate group and the high dose artesunate group. **Conclusion:** Artesunate can inhibit steroid dermatitis in guinea pig models, especially the middle and high dose artesunate, which may associate with IL-1, IL-4 and TNF- α , and the mechanism needs to be further studied.

[Key words] artesunate; inflammatory factors; disease models; guinea pigs

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(02):201-204]

[基金项目] 上海市长宁区卫计委科研基金(20164Y005);上海市同仁医院院级课题基金(TRYJ201508)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: song_ningjing@163.com

长期外用皮质类固醇(topical corticosteroids, TCS),尤其是氟化类固醇所致面部毛细血管扩张及口周皮炎改变可与玫瑰痤疮皮损相似,称为玫瑰痤疮样类固醇性皮炎(steroid dermatitis resembling rosacea,SDRR^[1]),亦称为痤疮样疹或酒糟鼻样皮炎,炎症反应和血管改变参与该病发生。主要临床表现为面部发红、灼热、毛细血管扩张,伴或不伴丘疱疹,以及停用类固醇后的反跳现象。研究发现青蒿琥酯具有抗炎、免疫调节和抑制血管新生的作用^[2-3]。本研究观察青蒿琥酯对豚鼠经皮激素诱导后病理性改变及炎症因子的影响,为临床应用青蒿琥酯治疗激素诱导的皮肤病以及可能机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

丙酸氯倍他索干粉(货号41491A,Adamas-beta阿达马斯,中国),用75%的乙醇溶液溶解成0.05%丙酸氯倍他索溶液;青蒿琥酯注射液(国药准字H10930195,桂林南药股份有限公司),溶于5%碳酸氢钠溶液中,加入生理盐水中配置所需浓度。白细胞介素(interleukin,IL)-1和IL-4 ELISA试剂盒(上海广锐生物科技有限公司)。TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国),逆转录试剂盒(大连宝生物公司)。实时荧光定量PCR系统(ABI公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组

清洁级2月龄白色雄性豚鼠36只,平均体重250 g,购自上海交通大学医学院动物室,许可证号SCXK(沪)2004-0001。采用随机数字表法将其分为2组。6只为空白对照组,30只为造模组。将造模组随机分为模型组、治疗组(低、中、高剂量青蒿琥酯组)和糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)阻断组,每组6只。

1.2.2 动物模型制备

参阅潘炜华等^[4]方法制备模型,豚鼠背部选取3 cm×3 cm区域,用电推剪剃毛后,使用0.05%丙酸氯倍他索溶液均匀涂于剃毛皮肤(空白对照组使用溶剂涂抹),每天涂2次,每3 d剃毛1次,连续用药30 d停药。各组随机处死1只豚鼠,取背部皮肤组织病理HE染色,以明确是否造模成功。

1.2.3 分组与给药

模型组给予0.9%氯化钠溶液0.2 mL腹腔注射,3个治疗组分别给予5 mg/kg(低剂量组)、10 mg/kg

(中剂量组)、20 mg/kg(高剂量组)青蒿琥酯溶液腹腔注射,GR阻断组给予20 mg/kg的米非司酮腹腔注射。

1.2.4 HE染色观察肺组织形态学改变

取各组豚鼠背部皮肤组织,置4%多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片,HE染色,BX5/TF显微镜下(Olympus公司,日本)观察皮肤组织病理学改变。

1.2.5 ELISA法检测血清中IL-1及IL-4含量

各组取豚鼠股动脉血,室温下静置30 min,离心3 000 r/min,30 min。取上清收集,-80 ℃保存,严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作,使用酶标仪于450 nm处测定吸收光度值,参照标准曲线,计算IL-1、IL-4含量。

1.2.6 实时荧光定量PCR检测皮肤组织GR α 及TNF- α mRNA表达

获取的皮肤组织用TRIzol试剂根据说明书进行总RNA提取。采用分光光度计测定总RNA含量和纯度。cDNA合成具体步骤按照TaKaRa试剂盒说明书进行,引物序列和反应条件见表1。

表1 实时荧光定量PCR所用引物

Table 1 Primers for real-time PCR

名称	引物序列	长度
TNF- α	正文:5'-GCTCACACTCAGATCAGCTTCT-3' 反义:3'-TCCTCTGCTTGCTGGTTTGC-5'	78 bp
GR	正文:5'-AGGCAATCCCAGGATTCAAAA-3' 反义:3'-TCTCCACCCAGTGCAAATG-5'	98 bp
β -actin	正文:5'-GCACCAGGGAGTCATGGTAG-3' 反义:3'-CAGTTGGTAACGATGCCGTG-5'	120 bp

1.3 统计学方法

用SPSS19.0统计软件进行分析,计量资料符合方差齐性采用*t*检验,组间用方差分析,等级资料采用秩和检验,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 激素诱导豚鼠皮炎模型构建

造模组停药3 d后,用药侧背部皮肤开始陆续出现红肿及点状、片状红斑等炎症现象,空白对照组则未见明显红斑等炎症现象,同时模型组较空白对照组豚鼠搔抓现象明显增多(图1)。

空白对照组豚鼠皮肤全层无明显改变;模型组较之表现为表皮轻度萎缩变薄,角质层分离明显,基底层细胞排列不整,真皮水肿、血管扩张。GR block组和低、中青蒿琥酯组组织病理变化与模型组

相似,高剂量青蒿琥酯组组织病理接近空白对照组(图2)。

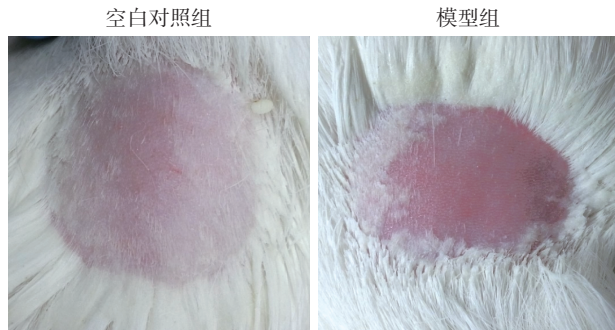


图1 豚鼠背部皮肤外观

Figure 1 Dorsal skin lesion of guinea pigs

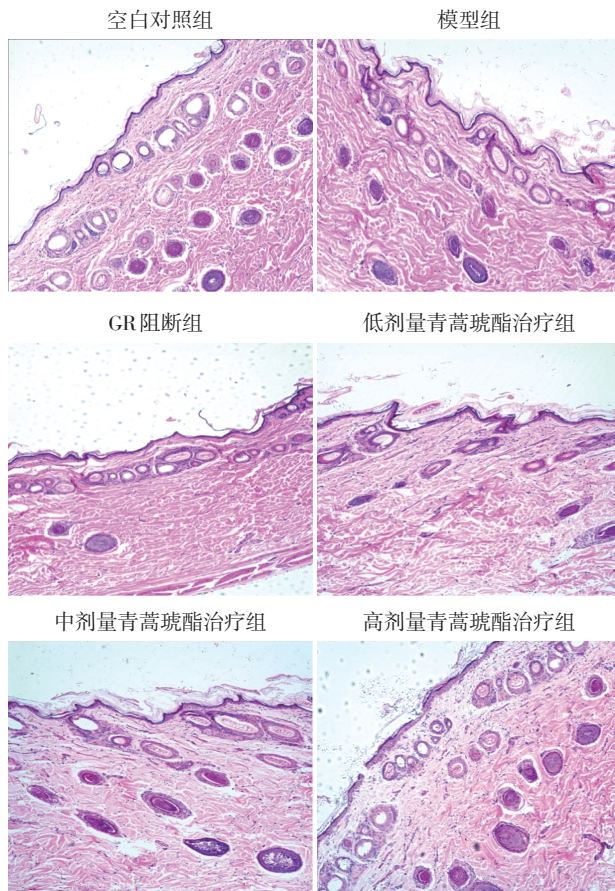


图2 豚鼠背部皮肤组织病理(HE,×100)

Figure 2 Histopathology of dorsal skin lesion of guinea pigs(HE,×100)

2.2 ELISA 检测血清中细胞因子 IL-1、IL-4 含量

模型组豚鼠血清中 IL-1、IL-4 含量明显高于空白对照组和糖皮质激素受体阻断组($P < 0.05$),青蒿琥酯腹腔中、高剂量注射组豚鼠血清中 IL-1、IL-4 含量明显低于模型组($P < 0.05$),治疗组间两两比较,IL-1、IL-4 含量差异无统计学意义(表2)。

表2 各组豚鼠血清 IL-1、IL-4 含量比较

Table 2 Comparison of the levels of IL-1 and IL-4 in the serum of each group (ng/L)

组别	IL-1	IL-4
模型组	143.85 ± 8.42	41.99 ± 3.79
治疗组		
5 mg/kg	144.97 ± 7.27	43.98 ± 3.94
10 mg/kg	127.23 ± 7.83 [#]	40.71 ± 2.59 [#]
20 mg/kg	117.75 ± 7.41 [#]	36.04 ± 2.89 [#]
GR 阻断组	126.88 ± 12.35 [*]	36.48 ± 4.05 [*]
空白对照组	137.93 ± 10.31 [*]	37.60 ± 1.75 [*]
F 值	4.21	0.99
P 值	< 0.05	< 0.05

与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与空白对照组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测各组豚鼠皮肤 GR 及 TNF-α 表达

与模型组比较,青蒿琥酯各治疗组 GRα mRNA 水平无明显变化($P > 0.05$,图3)。模型组 TNF-α mRNA 表达水平高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。青蒿琥酯各组均可降低皮肤组织中 TNF-α mRNA 的表达水平,中、高剂量可明显降低皮肤组织中 TNF-α mRNA 的表达水平,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4)。

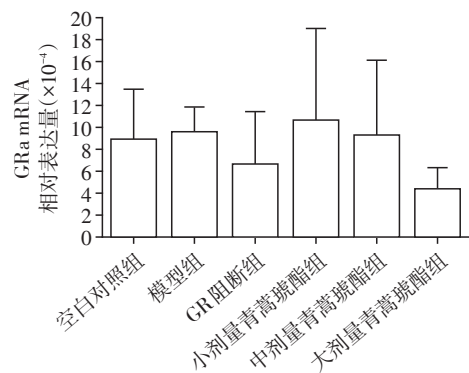
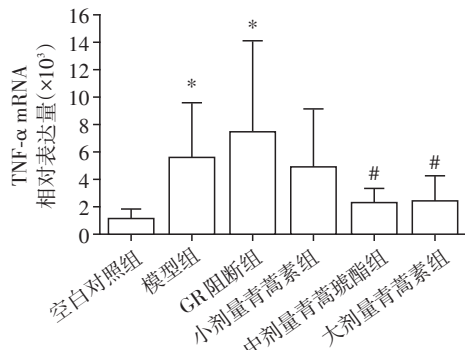


图3 各组豚鼠皮肤组织 GRα mRNA 的表达水平比较

Figure 3 Expression of GRα mRNA in the skin lesion of all groups

3 讨论

外用类固醇是血管收缩剂,而一氧化氮、前列腺素等的产生可中和此作用。长期作用后,一氧化氮与类固醇开始失衡,后期内皮中累积的一氧化氮释放致血管扩张超出原始直径。这也是反跳现象假说,反跳现象被认为是一氧化氮和类固醇失衡所致。类固醇的免疫抑制作用可促进皮肤表面各种细菌、真菌或其他微生物的过度生长,这些微生物



与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。

图4 各组豚鼠皮肤组织 TNF- α mRNA 的表达水平比较

Figure 4 Expression of TNF- α mRNA in the skin lesion of all groups

可作为超抗原。当停用皮质类固醇后,可能出现超抗原介导的免疫反应,表现为促炎症反应细胞因子的释放^[5]。

类固醇性皮炎通常发生于面部外用类固醇1~3个月,也可发生在阴囊部位。系统治疗药物目前包括亲脂性四环素类抗生素如多西环素和米诺环素、甲硝唑、异维A酸、羟氯喹和中药雷公藤多甙等,以上药物虽然有一定效果,但均不宜长期服用。因此寻找用于患者的其他抗炎药物非常必要。

青蒿琥酯是青蒿素衍生物,被用作疟疾治疗的一线药物。除了抗疟疾作用外,研究发现青蒿琥酯还具有其他非抗疟药活性^[7]。有研究发现青蒿琥酯能抑制抗菌肽 LL-37 致小鼠玫瑰痤疮样炎症反应,且发现青蒿琥酯可能通过抑制 JAK/STAT 信号通路治疗玫瑰痤疮^[7-8]。梁爱华等^[9]发现青蒿琥酯对内毒素诱导的一氧化氮合成有抑制作用,能减轻炎症反应。长期使用皮质类固醇是 SDRR 产生的初始原因,因为皮质类固醇是通过与胞内 GR 结合相互作用的。IL-1 是一种单核细胞因子,可由多种细胞合成和分泌,主要由巨噬细胞产生,此外几乎所有有核细胞,如 B 细胞、NK 细胞、T 细胞、皮肤角质形成细胞、树突状细胞、成纤维细胞及平滑肌细胞均可产生 IL-1。在体内诱导发热和急性期反应,促进 T 细胞活化、增殖和分化,刺激中性粒细胞产生。IL-4 是 Th2 细胞分泌的细胞因子,可一定程度反映体液免疫抗体水平和 Th1/Th2 平衡状态^[10]。本研究发现模型组豚鼠血清 IL-1、IL-4 水平明显高于空白对照组和 GR 阻断组,提示 IL-1、IL-4 可能参与 SDRR 的病理生理过程。Th1/Th2 失衡可能在 SDRR 发生中起重要作用。本研究观察豚鼠经皮激素诱导后病理性改变模型,不同剂量青蒿琥酯注射液腹腔注

射后,中、高剂量的青蒿琥酯能显著降低血清中 IL-1、IL-4 含量,与模型组差异有统计学意义。提示青蒿琥酯可降低体液免疫,调控 Th1/Th2 淋巴细胞的平衡。本研究还发现豚鼠模型组皮肤组织中 TNF- α mRNA 的表达水平高于空白对照组,青蒿琥酯中、高剂量组可以下调皮肤组织中 TNF- α mRNA 的表达水平。青蒿琥酯能抑制豚鼠激素性皮炎,以中、高剂量最为明显,提示其作用可能与 IL-1、IL-4、TNF- α 有关,具体机制有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Hamed AF. Steroid dermatitis resembling rosacea: A clinical evaluation of 75 patients[J]. *Dermatol*, 2013, 21(4): 491376
- [2] Kuang M, Cen Y, Qin R, et al. Artesunate attenuates pro-inflammatory cytokine release from macrophages by inhibiting TLR4-mediated autophagic activation via the TRAF6 - Beclin1 - PI3KC3 pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2): 475-488
- [3] Meng QF, Zhang XX, Zhang Z, et al. Therapeutic potential of artesunate in experimental autoimmune myasthenia gravis by upregulated T regulatory cells and regulation of Th1/Th2 cytokines[J]. *Pharmazie*, 2018, 73(9): 526-532
- [4] 潘炜华,温海,刘晓刚,等. 豚鼠激素依赖性皮炎模型的建立及皮肤变化动态观察[J]. *中国美容医学杂志*, 2005, 14(5): 622-623
- [5] Chen AY, Zirwas MJ. Steroid-induced rosacealike dermatitis: case report and review of the literature [J]. *Cutis*, 2009, 83(4): 198-204
- [6] Ho WE, Peh HY, Chan TK, et al. Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(1): 126-139
- [7] Li T, Zeng Q, Chen X, et al. The therapeutic effect of artesunate on rosacea through the inhibition of the JAK/STAT signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6): 8385-8390
- [8] 李婷,曾庆文,陈向明,等. 青蒿琥酯对小鼠玫瑰痤疮样炎症的作用观察[J]. *中华皮肤科杂志*, 2017, 50(9): 650-653
- [9] 梁爱华,薛宝云,李春英,等. 青蒿琥酯对内毒素诱导的一氧化氮合成的抑制作用[J]. *中国中药杂志*, 2002, 11(26): 770-772
- [10] Anuradha R, George PJ, Hanna LE, et al. IL-4, TGF- β , and IL-1 dependent expansion of parasite antigen-specific Th9 cells is associated with clinical pathology in human lymphatic filariasis[J]. *Immunology*, 2013, 191(5): 2466-2473

[收稿日期] 2018-11-03