·实验研究·

甘草酸载入普朗尼克 F127/聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯混合纳米胶束的制备及对小鼠特应性皮炎的研究

朱君君[1,2],沈成英[1,2],王　镜[1,2],申宝德[1],戴　博[1],袁海龙[1]
(1 空军特色医学中心药学部,北京 100142;2 成都中医药大学药学院,成都 611137)

[摘要] **目的:**研究甘草酸(glycyrrhizic acid,GL)载入普朗尼克 F127/聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯(TPGS)混合纳米胶束(MMs)后对小鼠特应性皮炎(atopic dermatitis,AD)的治疗作用。**方法:**采用薄膜分散法制备 GL-F127/TPGS-MMs,并对其粒径、包封率、形态等进行表征。用 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene,DNCB)对雌性 BALB/c 小鼠建立特应性皮炎模型。小鼠分为 9 组:空白对照组、模型对照组、地塞米松组(30 mg·kg^{-1})、GL 溶液低、中、高剂量组(25,50,100 mg·kg^{-1})、GL-F127/TPGS-MMs 低、中、高剂量组(25,50,100 mg·kg^{-1})。灌胃给药 14 d,检测小鼠血清免疫球蛋白 E(IgE)水平、耳肿胀度、胸腺指数、脾脏指数、皮肤厚度、皮损组织病理变化等指标,评价 GL-F127/TPGS-MMs 对小鼠特应性皮炎的治疗效果。**结果:**与模型组比较,造模 d 28 GL-F127/TPGS-MMs 组皮损评分均显著降低($P<0.05$)。灌胃给药 14 d,与模型组比较,GL-F127/TPGS-MMs 各剂量组小鼠 IgE 含量、耳肿胀度、胸腺指数、脾脏指数、皮损厚度显著降低($P<0.05$ 或 0.01)。通过观察皮损组织病理变化,模型对照组的表皮和真皮的厚度明显增加,GL-F127/TPGS-MMs 治疗组的表皮和真皮厚度明显变薄。与 GL 溶液组相比,GL-F127/TPGS-MMs 高剂量组小鼠 AD 病理变化明显改善,表皮增生、真皮炎性浸润和细胞内及细胞间的水肿程度明显减轻。**结论:**GL-F127/TPGS-MMs 对小鼠特应性皮炎具有显著的治疗作用。

[关键词] 甘草酸;纳米胶束;特应性皮炎;炎症;皮肤
[中图分类号] R943　[文献标志码] A　[文章编号] 1003-3734(2021)15-1413-08

Preparation of glycyrrhizic acid-loaded F127/TPGS mixed nanomicelles and its therapeutic effects on atopic dermatitis in mice

ZHU Jun-jun[1,2], SHEN Cheng-ying[1,2], WANG Jing[1,2], SHEN Bao-de[1], DAI Bo[1], YUAN Hai-long[1]
(1 *Department of Pharmacy, Air Force Medical Center, Beijing* 100142, *China*; 2 *College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu* 611137, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effect of glycyrrhizic acid (GL)-loaded F127/TPGS-MMs in mice model of atopic dermatitis (AD). **Methods**: GL-F127/TPGS-MMs was prepared by thin film dispersion method and characterized by particle size, entrapment efficiency, drug loading and morphology. A AD model was induced by 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in female BALB/c mice. And then the mice were divided into 9 groups: normal control group, model group, dexamethasone positive group (30 mg·kg^{-1}), low (25 mg·kg^{-1}), medium (50 mg·kg^{-1}) and high (100 mg·kg^{-1}) doses of glycyrrhizic acid solution groups and GL-F127/TPGS-MMs group. After oral administration for 14 days, the mice's serum level of IgE, ear swelling degree, thymus index, spleen index, skin

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81803741);北京市科委重点资助项目(Z171100001717026);军事飞行人员用药目录研究资助项目(BKJ15J005)

[作者简介] 朱君君,女,硕士研究生,研究方向:中药新制剂、新剂型、新技术。联系电话:(010)66928506,E-mail:2250952057@qq.com。
[通讯作者] 袁海龙,男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药新型给药系统。联系电话:(010)66928505,E-mail:yhlpharm@126.com。

thickness, and pathological changes of skin lesions were detected to evaluate the therapeutic effects of GL-F127/TPGS-MMs on AD in mice. **Results**: Compared with the model group, the skin lesion scores of the GL-F127/TPGS-MMs groups significantly decreased on the 28th day of model establishment ($P < 0.05$). After intragastric administration for 14 days, the levels of IgE, ear swelling degree, thymus index, spleen index and skin lesion thickness of mice in GL-F127/TPGS-MMs groups significantly decreased ($P < 0.05$ or 0.01) compared with the model group. The thickness of the epidermis and dermis significantly increased in the model control group and significantly reduced in GL-F127/TPGS-MMs group according to the pathological changes of the skin lesions. Compared with the GL solution groups, the AD pathological changes of the mice in GL-F127/TPGS-MMs high-dose group were significantly improved, and the epidermal hyperplasia, dermal inflammatory infiltration, and intracellular and intercellular edema were significantly reduced. **Conclusion**: GL-F127/TPGS-MMs has a significant therapeutic effect on AD in mice.

[**Key words**] glycyrrhizic acid; nanomicelles; atopic dermatitis; inflammation; skin

特异性皮炎(atopic dermatitis,AD)又称异位性湿疹、遗传过敏性皮炎、泛发性神经性皮炎[1],是一种以 T 淋巴细胞浸润为主的炎症性皮肤疾病,发病率高,以湿疹样皮疹和剧烈瘙痒为特征[2],但其病因和发病机制尚未明确。目前,针对 AD 的治疗药物主要包括抗组胺药物、皮质类固醇、免疫抑制剂等[3-4],但此类药物长期使用,不良反应较多,停药后病情易复发,临床上尚缺乏治愈或长期缓解的药物。近年来研究发现[5-7],甘草、白芍、雷公藤等天然药物对 AD 的治疗具有不良反应少、疗效显著等优势。

甘草酸(glycyrrhizic acid,GL)是甘草中主要的活性成分,此前研究证实,GL 具有抗病毒[8]、抗动脉粥样硬化[9]、防治糖尿病[10]等药理作用,近年来发现其对炎症性皮肤疾病如银屑病[11]、AD[12]等有良好的疗效,其化学结构类似于皮质类激素,可以减少皮肤黏膜的组织水肿[13],且不良反应较少,对 AD 的治疗意义重大。但 GL 极性大,在水溶液中易形成聚集体,在胃肠道的渗透性极差,导致其口服吸收较差。前期研究采用薄膜分散法,以普朗尼克 F127 与聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯(TPGS)为载体,制备得到粒径小、稳定性好、生物利用度较高的 GL-F127/TPGS 混合纳米胶束(MMs)[14]。在此基础上,本研究进一步考察 GL-F127/TPGS-MMs 对小鼠 AD 的疗效,并与 GL 溶液进行比较,以期为 AD 的治疗及 GL 制剂的开发提供参考。

材料与方法

1 仪器

LC-20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);DF101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(北京恒丰长伟科技有限公司);N-1300D 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);Lab-1A-50 型冻干机(北京博医康实验仪器有限公司);Epoch 型酶标检测仪(美国 BioTeK 公司);电子数显千分尺 0~25 mm(桂林广陆数字测控公司);DESIGN 型小鼠耳朵打孔器(博睿达实验仪器);3000SH 型 Zeta 粒度仪(英国马尔文仪器有限公司);Tecnai G2 型 F30 场发透射电子显微镜(TEI 格林海外有限公司);RM2016 型包埋机病理切片机(德国徕卡有限公司);NIKON 型 CI-S 显微镜(日本尼康株式会社)。

2 试药与试剂

GL 对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号:PS010448,质量分数≥99.0%);GL 原料药(北京世纪奥科生物技术有限公司,批号:190421,质量分数≥95.0%);地塞米松片(广东南国药业有限公司,批号:20181205);2-氯-2,4-二硝基苯(安耐吉化学有限公司,批号:GL100072);普朗尼克 F127(北京中生瑞泰科技有限公司,批号:160713);TPGS(Sigma 公司,批号:BCBW9938);无水乙醇(北京化工厂,批号:20190418);大豆油(浙江田雨山药用油有限公司,批号:202003115);丙酮(北京益利精细化学品有限公司,批号:20190511);薇婷脱毛膏(利洁时家化有限公司,批号:20190217);小鼠免疫球蛋白 E(IgE)酶联免疫吸附测定试剂盒(伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:3M3QNX1BTH);苏木素染液(北京雪邦科技有限公司,批号:20200703);二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号:13302007)。

3 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 72 只,雌性,体重 18 ~ 22 g,购于北京斯贝福生物技术有限公司。许可证号:SCXK(京)2019-0010。

4 GL-F127/TPGS-MMs 的制备[15]

精密称取 GL 70 mg,F127 270 mg 和 TPGS 180 mg,加入无水乙醇 5 mL 超声 5 min 使之完全溶解,45 ℃减压旋转蒸发除去溶剂,加入预热至 50 ℃的 PBS[pH 为(7.4 ±0.1)]10 mL,在 50 ℃下加热搅拌水化 3 h,10 000 r·min^{-1}离心 10 min 后,取上清过 0.22 μm 微孔滤膜,即得浓度为 7 mg·mL^{-1}的 GL-F127/TPGS-MMs。

5 GL-F127/TPGS-MMs 的表征

5.1 包封率、载药量测定

精密吸取载药胶束溶液 20 μL,加入适量甲醇,超声,定容至 10 mL,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,测定胶束中 GL 的含量,计算包封率,同时将载药胶束溶液在 -80 ℃冰箱中预冻 5 h 后,取出,放入冻干机 12 h 后取出,得到胶束冻干粉,称定质量。称取 1.4 mg 的胶束冻干粉,加入适量甲醇,超声,定容至 10 mL,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,测定 GL 的量,计算载药量[15]。

包封率 = 胶束中甘草酸质量/甘草酸投药量

载药量 = 胶束中甘草酸质量/甘草酸胶束质量

5.2 粒径、多分散系数(PDI)及 Zeta 电位测定

取适量 GL-F127/TPGS-MMs 溶液,装入比色皿中,采用 Zeta 粒度仪,重复测定 3 次,测得平均粒径、PDI 和 Zeta 电位。

5.3 形态观察

采用透射电子显微镜(TEM)观察纳米胶束粒子形态。取适量的 GL-F127/TPGS-MMs 溶液滴加在铜网上,用滤纸吸去边缘多余的纳米胶束,自然晾干后观察胶束粒子形态。

6 GL-F127/TPGS-MMs 的药效评价

6.1 分组

取经检疫合格的 72 只 SPF 级 BALB/c 小鼠,随机分为 9 组,分别为空白对照组、模型对照组、地塞米松组(30 mg·kg^{-1})、GL 溶液低、中、高剂量组(25,50 和 100 mg·kg^{-1})、GL-F127/TPGS-MMs 低、中、高剂量组(25,50 和 100 mg·kg^{-1})。

6.2 造模及给药

检疫期 d 3(实验期 d 0),脱毛膏脱去小鼠背部毛发(面积 2 cm × 2 cm)。实验 d 1 和 d 4,模型对照组与各给药组小鼠于背部脱毛区涂抹含 5% 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene,DNCB)的基质溶液(丙酮∶大豆油溶液 = 3∶1 配制)100 μL,并取 20 μL 涂抹于小鼠右耳双面,进行致敏(左耳不做处理作为正常对照)。空白对照组小鼠相应部位涂抹等体积空白基质溶液。在实验 d 7,d 10,d 14,d 17,d 21,d 25 和 d 28 时采用同法涂抹 0.5% DNCB 基质溶液于小鼠右耳相同位置[16-17],并在 d 15 涂抹 1 h 后,灌胃(*ig*)给药,空白与模型对照组给予等体积蒸馏水、地塞米松组(30 mg·kg^{-1}),GL 溶液低中高剂量组、GL-F127/TPGS-MMs 低中高剂量组[12],给药体积为 15 mL·kg^{-1},*qd*,连续给药 14 d,方法见图 1。

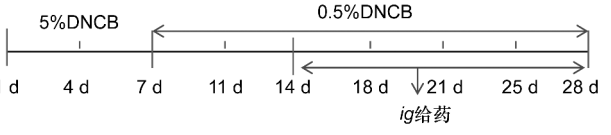


图 1 小鼠模型的建立与给药

6.3 药效学相关指标观察与测定

6.3.1 小鼠背部皮肤情况 建立小鼠 AD 皮损评分标准,每 4 d 评价一次小鼠背部皮肤损伤严重程度。背部皮损包括 4 个症状:① 红斑/出血。② 干燥、结痂。③ 剥脱/糜烂。④ 水肿。每个症状根据皮损严重情况可评为 0 ~ 3 分:无症状计 0 分、轻度计 1 分、中度计 2 分、重度计 3 分。所有症状评分之和即为皮损严重程度,得分越高,皮损越严重,最高不超过 12 分,并对数据作出统计[18]。比较 28 d 各组小鼠背部红斑、水肿、干燥、渗液及结痂等 AD 样皮损表现,并拍照记录。

6.3.2 小鼠血清 IgE 的含量测定 小鼠摘眼球取血,室温放置 5 min,离心取血清(4 ℃,5 000 r·min^{-1},10 min),放入 -20 ℃冰箱中保存,采用 ELISA 法测定小鼠血清中 IgE 的含量。

6.3.3 小鼠耳肿胀度测定 实验完成后,从小鼠耳根沿耳廓剪下外耳,用打孔器取直径约为 8 mm 的左右耳片并称重,计算小鼠耳肿胀度(mg)和肿胀抑制率(%)。

肿胀度/mg = 右耳耳片质量/mg - 左耳耳片质量/mg

肿胀抑制率/% =(模型对照组平均肿胀度 - 给药组平均肿胀度)/模型对照组平均肿胀度 × 100%

6.3.4 小鼠皮肤厚度测定 取小鼠背部致敏区皮

肤,采用电子数显千分尺测定小鼠的皮肤厚度。

6.3.5 小鼠脏器指数测定 依次取出小鼠脾脏、胸腺并记录其质量,计算脏器指数。

脏器指数/mg·g^{-1} = 脏器质量/mg/体质量/g

6.3.6 小鼠皮肤病理改变 取小鼠背部致敏区皮肤,放入4%多聚甲醛中固定24 h后,取一部分进行石蜡包埋,常规切片,苏木精伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色后100倍显微镜下观察组织病理改变;另取一部分进行石蜡包埋,常规切片后,甲苯胺蓝(toluidine blue,TB)染色后200倍显微镜下观察肥大细胞数。

6.4 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 GL-F127/TPGS-MMs的表征

1.1 包封率与载药量的测定

制备GL-F127/TPGS-MMs的包封率为(96.89 ± 4.19)%,载药量为(13.21 ± 0.68)%。

1.2 粒径、PDI及Zeta电位

GL-F127/TPGS-MMs平均粒径为(28.20 ± 5.63) nm,PDI为(0.20 ± 0.06),Zeta电位为 -(5.24 ± 1.55) mV。

1.3 GL-F127/TPGS-MMs的形态观察

在TEM观察下,GL-F127/TPGS-MMs呈均匀球形颗粒,形态完整,分布均匀,结果见图2。

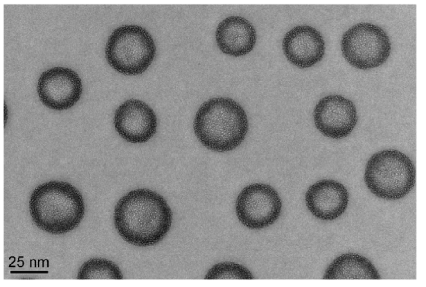
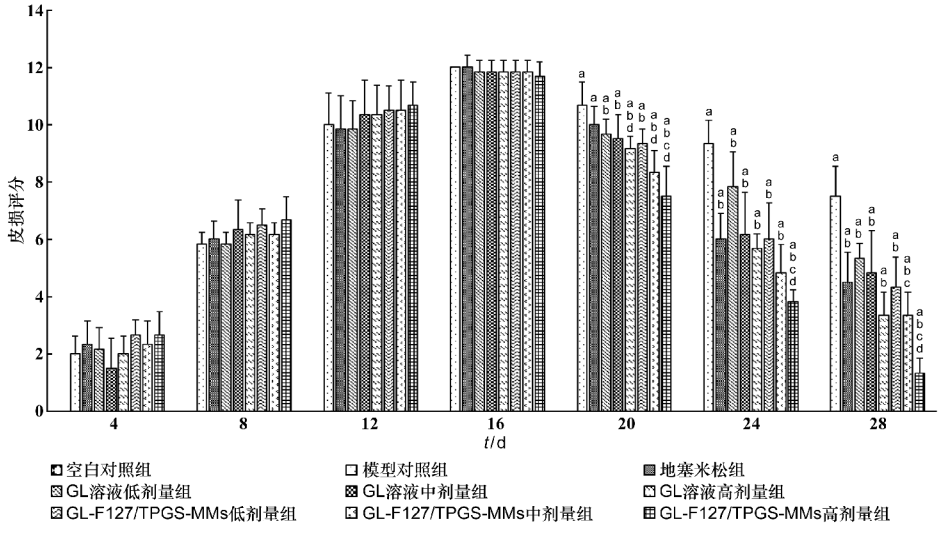


图2 GL-F127/TPGS-MMs的TEM图(×50 000)

2 GL-F127/TPGS-MMs对DNCB诱导小鼠AD的影响

2.1 GL-F127/TPGS-MMs对AD小鼠腹部受试区皮肤情况的影响

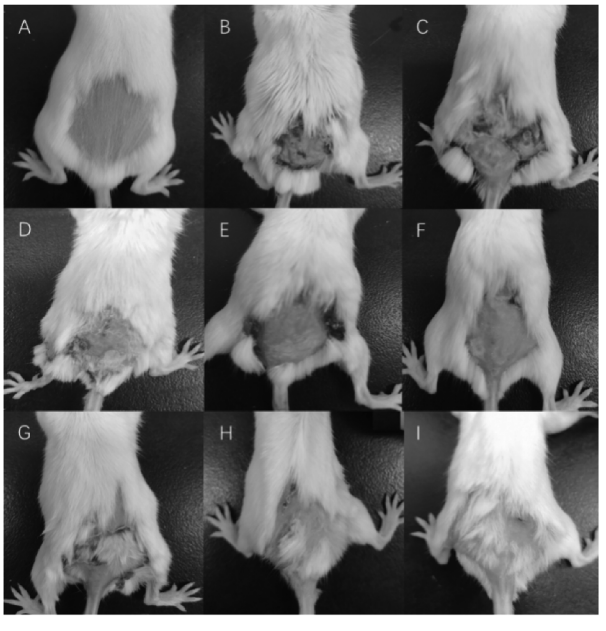
实验d 0,各组小鼠皮肤均无损伤,评分均为0分。各实验组d 4,d 8,d 12,d 16,d 20,d 24和d 28皮损严重程度评分比较见图3。实验d 20,与模型对照组比较,各给药组小鼠皮损严重程度评分明显降低($P < 0.05$),且GL-F127/TPGS-MMs高剂量组的皮损严重程度相比地塞米松组、GL溶液高剂量组均显著降低($P < 0.05$);实验d 24,GL-F127/TPGS-MMs各剂量组小鼠的皮损严重程度均比GL溶液组显著降低($P < 0.05$),且GL-F127/TPGS-MMs高剂量组小鼠的皮损严重程度显著低于地塞米松组($P < 0.05$);实验d 28,与等剂量的GL溶液组相比,GL-F127/TPGS-MMs中高剂量组小鼠皮损情况显著改善($P < 0.05$),且高剂量的GL-F127/TPGS-MMs皮损改善情况显著高于地塞米松组($P < 0.05$)。



与空白对照组比较,a:$P < 0.05$;与模型对照组比较,b:$P < 0.05$;与等剂量的GL溶液组比较,c:$P < 0.05$;与地塞米松组比较,d:$P < 0.05$

图3 小鼠皮损严重程度评分

实验 d 28 小鼠皮损情况见图 4，空白对照组背部皮肤无异常；模型对照组背部皮肤可见红斑、点状出血、干燥及结痂，且皮肤厚度明显增厚，少量新生毛发；地塞米松组、GL 溶液低中剂量组未见点状出血，仍可见红斑、干燥及结痂，部分痂皮脱落，少量新生毛发；GL-F127/TPGS-MMs 低剂量组未见点状出血，痂皮大部分脱落，可见部分新生皮肤及毛发，皮肤干燥及红斑缓解；GL-F127/TPGS-MM 中高剂量组、GL 溶液高剂量组无红斑、出血、干燥、结痂，毛发生长良好。



A：空白对照组；B：模型对照组；C：地塞米松组；D：GL 溶液低剂量组；E：GL 溶液中剂量组；F：GL 溶液高剂量组；G：GL-F127/TPGS-MMs 低剂量组；H：GL-F127/TPGS-MMs 中剂量组；I：GL-F127/TPGS-MMs 高剂量组

图 4 d 28 小鼠皮肤损伤情况

2.2 小鼠血清 IgE 的含量测定

与空白对照组比较，模型对照组小鼠血清 IgE 含量显著增加（$P<0.001$），说明造模成功；与模型对照组比较，地塞米松组、GL-F127/TPGS-MMs 组和溶液各剂量组小鼠血清 IgE 含量均显著降低（$P<0.05$），说明地塞米松和 GL 药物均有效；与等剂量的 GL 溶液组相比，GL-F127/TPGS-MMs 高中低剂量组小鼠血清 IgE 含量显著降低（$P<0.05$）。结果见表 1。

表 1 GL-F127/TPGS-MMs 对小鼠血清 IgE 含量的影响 $\bar{x}\pm s, n=8$

组别	剂量/mg·kg^{-1}	血清 IgE 含量/μg·mL^{-1}
空白对照组	—	2.65 ± 1.62
模型对照组	—	13.24 ± 1.77^{b}
地塞米松组	30	5.75 ± 0.55^{ad}
GL 溶液组	25	11.51 ± 0.61^{be}
	50	8.65 ± 4.42^{ac}
	100	4.41 ± 1.59^{d}
GL-F127/TPGS-MMs 组	25	7.89 ± 0.82^{bde}
	50	5.00 ± 0.10^{de}
	100	2.58 ± 0.15^{de}

与空白对照组比较，a：$P<0.05$，b：$P<0.001$；与模型对照组比较，c：$P<0.05$，d：$P<0.001$；与等剂量的 GL 液组比较，e：$P<0.05$

2.3 小鼠耳肿胀度测定

与空白对照组比较，模型对照组小鼠耳廓肿胀度显著增加（$P<0.001$），说明造模成功；与模型对照组比较，地塞米松组、GL-F127/TPGS-MMs 和溶液各剂量组小鼠耳廓肿胀度均显著降低（$P<0.05$），说明地塞米松和 GL 药物均有效；与等剂量的 GL 溶液组相比，GL 胶束高中低剂量组小鼠耳廓肿胀度显著降低（$P<0.05$）。结果显示，地塞米松和 GL-F127/TPGS-MMs 对二甲苯所致的小鼠耳肿胀有抑制作用，见表 2。

表 2 GL-F127/TPGS-MMs 对小鼠耳肿胀的影响 $\bar{x}\pm s, n=8$

组别	剂量/mg·kg^{-1}	耳肿胀度/mg	肿胀抑制率/%
空白对照组	—	2.0 ± 1.3	—
模型对照组	—	22.9 ± 6.0^{c}	—
地塞米松组	30	4.1 ± 1.7^{b}	82.23
GL 溶液组	25	19.5 ± 3.2^{c}	14.79
	50	15.6 ± 5.7^{b}	31.68
	100	12.7 ± 7.3^{ad}	44.50
GL-F127/TPGS-MMs 组	25	11.3 ± 6.4^{bdf}	50.69
	50	8.7 ± 3.1^{bef}	62.13
	100	4.1 ± 2.2^{ef}	82.23

与空白对照组比较，a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，c：$P<0.001$；与模型对照组比较，d：$P<0.05$，e：$P<0.01$；与等剂量的 GL 液组比较，f：$P<0.05$

2.4 各组小鼠皮损表皮厚度比较

与空白对照组比较，模型对照组小鼠致敏区皮肤厚度显著增加（$P<0.05$），说明造模成功；与模型对照组比较，地塞米松组、GL-F127/TPGS-MMs 和溶液各剂量组小鼠致敏区皮肤厚度均显著降低（$P<0.05$），说明地塞米松和 GL 药物均有效；与等剂量

的 GL 溶液组相比,GL-F127/TPGS-MMs 高中剂量组小鼠致敏区皮肤厚度显著降低($P<0.05$)。结果见表 3。

表 3 GL-F127/TPGS-MMs 对小鼠皮肤厚度的影响

$\bar{x}\pm s, n=8$

组别	剂量/mg·mL^{-1}	皮肤厚度/mm
空白对照组	—	0.401 ± 0.019
模型对照组	—	1.100 ± 0.269^{b}
地塞米松组	30	0.591 ± 0.046^{bc}
GL 溶液组	25	0.569 ± 0.098^{bc}
	50	0.616 ± 0.039^{bc}
	100	0.449 ± 0.087^{adf}
GL-F127/TPGS-MMs 组	25	0.725 ± 0.124^{bc}
	50	0.474 ± 0.090^{def}
	100	0.394 ± 0.067^{def}

与空白对照组比较,a:$P<0.01$,b:$P<0.001$;与模型对照组比较,c:$P<0.05$,d:$P<0.001$;与等剂量的 GL 溶液组比较,e:$P<0.05$;与地塞米松组比较,f:$P<0.05$

2.5 小鼠脏器指数测定

脾脏指数:与空白对照组比较,模型对照组小鼠脾脏指数显著升高($P<0.001$),说明造模成功;与模型对照组比较,地塞米松组、GL-F127/TPGS-MMs 和 GL 溶液各剂量组小鼠脾脏指数均显著降低($P<0.05$),说明地塞米松和 GL 药物均有效;与等剂量的 GL 溶液组相比,GL-F127/TPGS-MMs 高剂量组小鼠脾脏指数显著降低($P<0.05$)。胸腺指数:与空白组对照组比较,模型对照组小鼠胸腺指数显著升高($P<0.001$),说明造模成功;与模型对照组比较,地塞米松组、GL-F127/TPGS-MMs 和 GL 溶液各剂量组小鼠胸腺指数显著降低($P<0.05$);与等剂量的 GL 溶液比较,GL-F127/TPGS-MMs 高中低剂量组小鼠胸腺指数显著降低($P<0.05$),结果见表 4。

表 4 GL-F127/TPGS-MMs 对小鼠脏器指数的影响

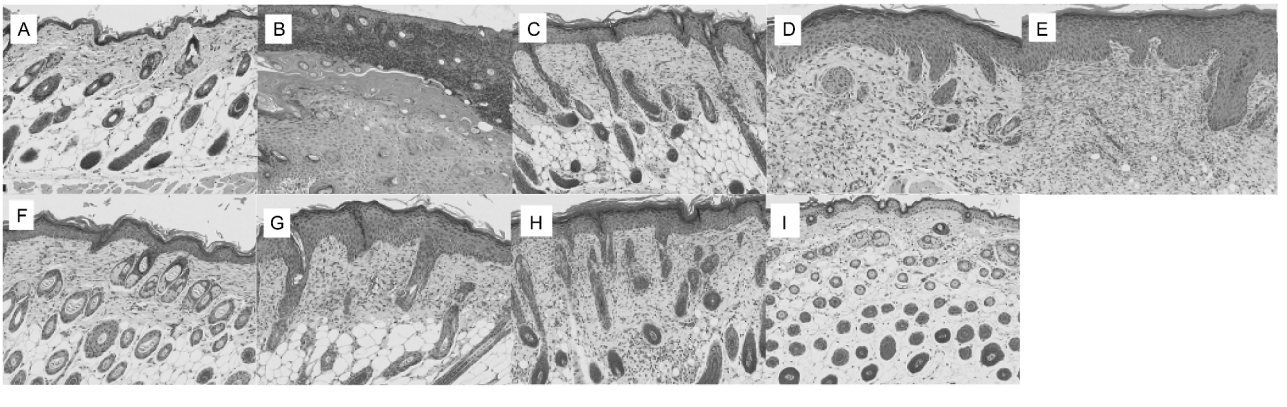
$\bar{x}\pm s, n=8$

组别	剂量/mg·kg^{-1}	脾脏指数	胸腺指数
空白对照组	—	4.67 ± 0.49	2.03 ± 0.19
模型对照组	—	13.10 ± 1.08^{c}	3.58 ± 0.22^{c}
地塞米松组	30	7.33 ± 1.47^{af}	2.33 ± 0.073^{f}
GL 溶液组	25	8.34 ± 1.64^{cf}	3.03 ± 0.41^{cd}
	50	6.87 ± 1.12^{bf}	2.74 ± 0.23^{cf}
	100	6.37 ± 0.53^{bf}	2.27 ± 0.13^{af}
GL-F127/TPGS-MMs 组	25	7.91 ± 2.52^{be}	2.39 ± 0.20^{bfg}
	50	6.14 ± 0.11^{f}	2.34 ± 0.22^{fg}
	100	4.63 ± 1.72^{fg}	1.91 ± 0.22^{fg}

与空白对照组比较,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$;与模型对照组比较,d:$P<0.05$, e:$P<0.01$,f:$P<0.001$;与等剂量的 GL 液组比较,g:$P<0.05$

2.6 各组小鼠皮损组织病理变化

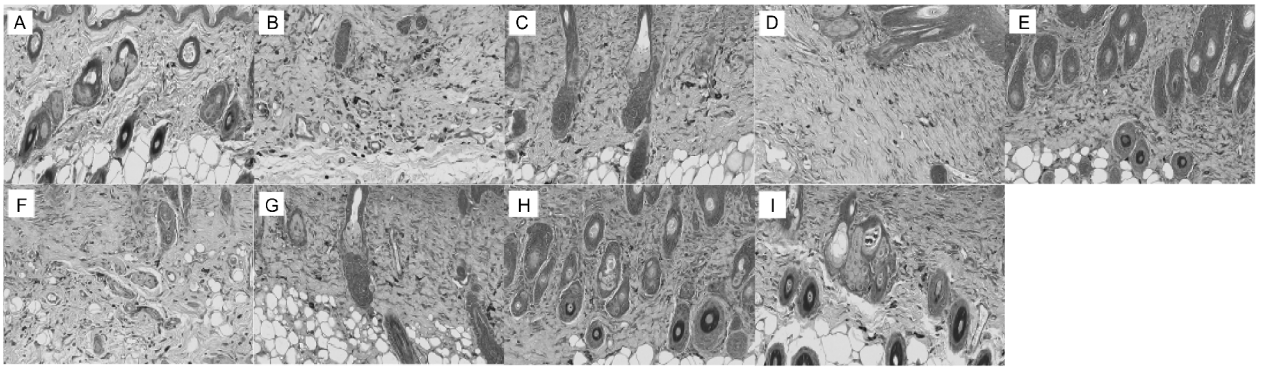
由小鼠皮肤 HE 染色观察可知,正常组表皮真皮结构正常,真皮层未见血管扩张及炎症细胞(见图 5A);模型组角化过度,棘层肥厚明显伴灶性海绵水肿,真皮血管扩张充血较多单核炎性细胞浸润,无毛囊结构(见图 5B);阳性对照组表皮各层较清晰,少量真皮血管扩张,炎性细胞较模型组明显减轻,毛囊结构增多(见图 5C);GL 溶液中高剂量组明显缓解了炎症细胞侵润,表皮相对较厚,GL 溶液高剂量组毛囊结构明显增加;GL-F127/TPGS-MMs 各剂量组表皮增厚明显降低、细胞间水肿、表皮和真皮内炎性细胞浸润明显减少,且成剂量依赖性,其中 GL-F127/TPGS-MMs 高剂量组表皮厚度与空白对照组无显著性差异,结果见图 5。



A:空白对照组;B:模型对照组;C:地塞米松组;D:GL 溶液低剂量组;E:GL 溶液中剂量组;F:GL 溶液高剂量组;G:GL-F127/TPGS-MMs 低剂量组;H:GL-F127/TPGS-MMs 中剂量组;I:GL-F127/TPGS-MMs 高剂量组

图 5 各组小鼠皮损组织病理变化(苏木精伊红染色,×100)

通过 TB 观察 AD 动物模型中肥大细胞的数量和分布,正常对照组中浸润的肥大细胞数量为(16 ± 2);模型对照组中肥大细胞数量显著增加(99 ± 15);阳性对照组中浸润的肥大细胞数量为(41 ± 11);GL 溶液各剂量组 25 mg·kg^{-1}组为(71 ± 19),50 mg·kg^{-1}组为(55 ± 20),100 mg·kg^{-1}组为(35 ± 8);GL-F127/TPGS-MMs 各剂量组 25 mg·kg^{-1}组为(59 ± 6),50 mg·kg^{-1}组为(41 ± 12),100 mg·kg^{-1}组为(26 ± 4)。结果显示,GL-F127/TPGS-MMs 可以减少肥大细胞的真皮浸润,结果见图 6。



A:正常对照组;B:模型对照组;C:地塞米松组;D:GL 溶液低剂量组;E:GL 溶液中剂量组;F:GL 溶液高剂量组;G:GL-F127/TPGS-MMs 低剂量组;H:GL-F127/TPGS-MMs 中剂量组;I:GL-F127/TPGS-MMs 高剂量组

图 6 各组小鼠肥大细胞数量和分布(甲苯胺蓝染色,×200)

讨 论

小鼠 AD 症状模型大致分为 3 类[20-22]:① 抗原诱导的 AD 模型。② 转基因和基因敲除建立的 AD 模型。③ 自发发生的 AD 样皮损模型。其中 Nc/Nga 小鼠是较为理想的 AD 模型小鼠品系,但是该种小鼠较为稀有,难以获得,而近交系 BALB/c 小鼠易于获得,喂养简便,是免疫性疾病中常用的动物模型[23]。DNCB 是一种亲电和细胞毒性的苯衍生物,经过多次刺激可在小鼠体内诱发 AD 疾病特点,获得稳定的 AD 小鼠模型[24-25]。预实验中发现,给予常用剂量 1% DNCB 100 μL 涂抹小鼠背部皮肤 1 周 3 次,进行致敏刺激,后续给予 0.2% DNCB 1 周 2 次进行激发,刺激 2 周后,观察到小鼠皮损程度较轻,因此,本研究采用 5% DNCB 刺激 1 周后,后续给予 0.5% DNCB 进行激发,成功建立了 AD 样小鼠模型。

据报道,GL 治疗 AD 的主要机制与 T 淋巴细胞功能有关。GL 可以抑制 T 辅助细胞 Th1,Th2,Th17 和调节性 T 细胞(Treg)因子的表达,调节 Th1/Th2 和 Treg/Th17 的平衡[19],减轻皮肤炎症反应。同时,GL 还可以调节局部皮损和脾淋巴细胞中 IL-4 和 IL-13 等炎症因子水平下降,说明 GL 可以从炎症因子方面缓解 AD 的皮炎症状[5,13]。但是,GL 口服后由于其在水中的溶解性差,并且其盐在胃肠道黏膜中的渗透性也较差,导致口服吸收较差,限制了临床应用。近年来,已经开发了多种制剂来增加 GL 的水溶性和口服吸收,例如脂质体、壳聚糖纳米颗粒。但是,这些制剂存在着载药能力差、稳定性差、药物泄漏、残留有机溶剂等缺点。聚合物胶束因其粒径小、载药量高、稳定性高、增加细胞摄取等优点而备受关注,其中 F127 和 TPGS 具有良好的生物相容性、生物易降解性而被广泛用作纳米载体。故本研究选用 TPGS 和 F127 为聚合物胶束材料,制备纳米混合胶束。

研究结果显示,地塞米松组、GL-F127/TPGS-MMs 组、GL 溶液各剂量组与模型对照组比较,皮肤厚度、肿胀度、IgE、脏器指数显著降低,与 GL 溶液各剂量组比较 GL-F127/TPGS-MMs 组各指标显著下降,且以上作用与 GL-F127/TPGS-MMs 给药剂量呈正相关。结合小鼠皮肤病理学结果,表明 GL 可以降低小鼠表皮、真皮厚度,炎性细胞浸润,减少肥大细胞数量,且 GL-F127/TPGS-MMs 高剂量组与空白对照组无显著性差异。与 GL 溶液相比,GL-F127/TPGS-MMs 对小鼠 AD 有显著的治疗作用,其原因可能是 GL-F127/TPGS-MMs 中药物为纳米颗粒,具有较好的黏模吸附特性[26],提高了胃肠道吸收,进而提高了生物利用度,但其作用的具体信号机制有

待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] TORRES T, FERREIRA EO, GONÇALO M, *et al*. Update on atopic dermatitis[J]. *Acta Med Port*, 2019, 32(9): 606 – 613.

[2] MOUNSEY SJ, AGIUS E. Atopic dermatitis[J]. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2017, 78(12): C183 – C187.

[3] NGUYEN HL, ANDERSON KR, TOLLEFSON MM. New and emerging therapies for pediatric atopic dermatitis[J]. *Paediatr Drugs*, 2019, 21(4): 239 – 260.

[4] PENG W, NOVAK N. Pathogenesis of atopic dermatitis[J]. *Clin Exp Allergy*, 2015, 45(3): 566 – 574.

[5] 谭琦, 甘立强, 任发亮, 等. 甘草酸对小鼠特应性皮炎炎症的影响及机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2017, 42(12): 1536 – 1539.

[6] 刘斌, 李静, 胡惠清, 等. 白芍总苷对 Nc/Nga 小鼠特应性皮炎的保护作用[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2017, 33(1): 31 – 33.

[7] 张丽霞, 王倩, 赵蓓, 等. 雷公藤多苷与复方甘草酸苷配合抗组胺药治疗特应性皮炎疗效对比[J]. 中国美容医学, 2019, 28(2): 73 – 77.

[8] CHEN T, FU LX, GUO ZP, *et al*. Involvement of high mobility group box-1 in imiquimod-induced psoriasis-like mice model[J]. *J Dermatol*, 2017, 44(5): 573 – 581.

[9] 黄金花, 马俐, 杜芬, 等. 甘草酸对动脉粥样硬化斑块的消退作用[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(7): 571 – 575.

[10] KANG DG, SOHN EJ, MUN YJ, *et al*. Glycyrrhizin ameliorates renal function defects in the early-phase of ischemia-induced acute renal failure[J]. *Phytother Res*, 2003, 17(8): 947 – 951.

[11] ASHFAQ UA, MASOUD MS, NAWAZ Z, *et al*. Glycyrrhizin as antiviral agent against Hepatitis C Virus[J]. *J Transl Med*, 2011, 9(4): 112.

[12] WANG Y, ZHANG Y, PENG G, *et al*. Glycyrrhizin ameliorates atopic dermatitis-like symptoms through inhibition of HMGB1[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 60(16): 9 – 17.

[13] 蔡夏叶, 徐恩国, 唐梦丹, 等. 复方甘草酸苷调控 SDF-1/CXCR-4 轴治疗特应性皮炎小鼠的作用机制[J]. 中国药师, 2020, 23(4): 638 – 642.

[14] SHEN CY, ZHU JJ, SONG JW, *et al*. Formulation of pluronic F127/TPGS mixed micelles to improve the oral absorption of glycyrrhizic acid[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2020, 46(7): 1100 – 1107.

[15] 朱君君, 沈成英, 王镜, 等. 甘草酸-F127/TPGS 混合纳米胶束的制备及其大鼠在体肠吸收研究[J]. 中草药, 2020, 51(7): 1845 – 1851.

[16] 袁艳丽, 梁艳粉, 李刚刚, 等. 雷帕霉素软膏对 Nc/Nga 小鼠特应性皮炎的治疗作用及相关机制研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(24): 2419 – 2422.

[17] KU JM, HONG SH, KIM HI, *et al*. Effects of angelicae dahuricae Radix on 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice model[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 98.

[18] YU HY, LI HY, LI YX, *et al*. Effect of isoliquiritigenin for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions in mice[J]. *Arch Dermatol Res*, 2017, 309(10): 805 – 813.

[19] 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.

[20] GUTERMUTH J, OLLERT M, RING J, *et al*. Mouse models of atopic eczema critically evaluated[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2004, 135(3): 262 – 276.

[21] JIN H, HE R, OYOSHI M, *et al*. Animal models of atopic dermatitis[J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(1): 31 – 40.

[22] 纪莲, 马铁, 狄正鸿, 等. 小鼠特应性皮炎建模方法的改进[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(4): 267 – 271.

[23] 王欣欣, 李思佳, 关洪全, 等. DNCB 对 BALB/c 小鼠特应性皮炎的诱导作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020,46(3): 439 – 443, 669.

[24] LIN L, ZHOU YW, LI HF, *et al*. Polysaccharide extracted from Chinese white wax scale ameliorates 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like symptoms in BALB/c mice[J]. *Saudi Pharm J*, 2017, 25(4): 625 – 632.

[25] 吴春燕,白方树,徐晓静. 益肤透明质酸凝胶配合复方甘草酸苷治疗过敏性皮肤病的疗效观察及对外周血 T 淋巴细胞平衡的影响[J]. 世界临床药物, 2020(6):451 – 455.

[26] CHEN C, WANG LS, CAO FR, *et al*. Formulation of 20(S)-protopanaxadiol nanocrystals to improve oral bioavailability and brain delivery[J]. *Int J Pharm*, 2016, 497(1 – 2): 239 – 247.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 – 01 – 14