DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.07.032

秦艽五味方对DNFB诱导的特应性皮炎样小鼠皮损改善作用及机制研究

张暇蔚[1,2,3],杨丹阳[1,2,3],朱昊玥[1,2,3],王亚卓[1,2,3],陈佳[1,2],赵宁[1,2,3],曲保全[1,2],马慧可[1,2,3],李萍[1,2,3],蒙玉娇[1,2],赵京霞[1,2,3]
(1.首都医科大学附属北京中医医院,北京 100010;2.北京市中医药研究所,北京 100010;
3.首都医科大学,北京 100069)

摘要:目的 观察秦艽五味方对2,4-二硝基氟苯(DNFB)诱导的特应性皮炎样小鼠模型皮损的改善作用并探索其机制。方法 以地塞米松为阳性药,将小鼠随机分为空白组(Ctrl)、模型组(DNFB)、阳性药组(DXMS)和秦艽五味方组(QJF),建立DNFB诱导的小鼠特应性皮炎样模型,观察各组小鼠特应性皮炎积分(SCORAD)指数,并拍照记录;取材后,光镜下观察皮损组织形态学变化及表皮层厚度;甲苯胺蓝染色法检测肥大细胞数量;免疫组织化学法检测皮损中丝聚蛋白(FLG)的表达;ELISA法检测小鼠血清IgE的表达;流式细胞术检测小鼠脾脏和淋巴结中Th1/Th2比例、淋巴结中Th17细胞比例;高通量液相蛋白芯片技术检测血清中炎症因子的差异表达。结果 与模型组相比,秦艽五味方组小鼠皮损SCORAD评分及搔抓指数明显降低,皮损变薄,皮损部位肥大细胞个数明显减少,FLG阳性表达恢复,IgE的表达降低,脾脏和淋巴结中Th1/Th2比例上升,淋巴结中Th17细胞比例降低。经秦艽五味方治疗后,小鼠血清中炎症因子均有降低,其中秦艽五味方对Th2型相关细胞因子表达的调控作用效果最显著。结论 秦艽五味方能够改善DNFB诱导的特应性皮炎样小鼠的皮损,对Th2型相关细胞因子炎症反应的调控作用最明显。

关键词:秦艽五味方;特应性皮炎;炎症
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)07-0155-11

Effect and Mechanism of Qinjiao Wuwei Formula(秦艽五味方) on DNFB-induced Atopic Dermatitis in Mice

ZHANG Xiawei[1,2,3], YANG Danyang[1,2,3], ZHU Haoyue[1,2,3], WANG Yazhuo[1,2,3], CHEN Jia[1,2], ZHAO Ning[1,2,3], QU Baoquan[1,2], MA Huike[1,2,3], LI Ping[1,2,3], MENG Yujiao[1,2], ZHAO Jingxia[1,2,3]
(1. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China;
2. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China;
3. Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: *Objective* This study aimed to investigate the ameliorating effect of Qinjiao Wuwei Formula(秦艽五味方, QJF) on skin lesions in a mouse model of 2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)-induced atopic dermatitis(AD)-like mice and its mechanism. *Methods* The DNFB-induced mouse AD-like model was established, and the mice were randomly divided into blank control, model(DNFB), positive control(dexamethasone, DXMS) and QJF groups. The severity of skin lesions was evaluated using the Scoring Atopic Dermatitis Index(SCORAD), and the histomorphological changes and epidermal thickness of the lesions were observed under light microscopy. The number of mast cells was detected by toluidine blue staining, the expression of filaggrin(FLG) in skin lesions was detected by immunohistochemistry, and the expression of serum IgE was detected by ELISA. The proportion of Th1/Th2 cells in the spleen and lymph nodes, the proportion of Th17 cells in lymph nodes were tested by flow cytometry, and the differential expressions of inflammatory factors in serum were detected by high-throughput liquid-phase protein chip technology. *Results* Compared with the model group, the QJF group had significantly reduced SCORAD scores and scratching index, thinner skin lesions, and a significant decrease in the number of mast cells in the lesions. The positive expression of FLG was restored, and the expression of IgE was reduced. The ratio of Th1/Th2 in the spleen and lymph nodes increased, while the proportion of Th17 cells in the lymph nodes was decreased. Furthermore, inflammatory cytokines in serum were all decreased after

基金项目:国家自然科学基金项目(82205122);国家中医药管理局青年岐黄学者项目(国中医药人教函〔2022〕256号)
作者简介:张暇蔚(1996-),女(满族),河北承德人,硕士在读,研究方向:中医药调节免疫。
通讯作者:赵京霞(1981-),女,河南漯河人,研究员,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药调节免疫。E-mail:zhaojingxia@bjzhongyi.com。

treatment with QJF, with the most significant regulatory effect on the expressions of Th2 – related cytokines. *Conclusion* QJF can effectively improve the skin lesions of DNFB – induced AD – like mice while regulating the inflammatory response of Th2 – related cytokines.

Keywords: Qinjiao Wuwei Formula(秦艽五味方); atopic dermatitis; inflammation

秦艽五味方[1]是皮肤科常用方剂,本方是著名中医皮外科泰斗赵炳南先生根据古籍《医宗金鉴·外科心法要诀》中的秦艽丸方加减化裁而来,临床常用本方治疗多种缠绵不愈、反复瘙痒、皮损肥厚的皮肤病。秦艽五味方由秦艽、乌蛇、川连、漏芦、白花蛇舌草组成,有散风清热,除湿解毒,调和气血的功效[2]。

特应性皮炎(AD)[3]是一种常见的炎症性皮肤病,其特征是反复发作的湿疹样病变和剧烈的瘙痒。这种疾病影响所有年龄段和所有种族的人,且发病率逐年升高,给患者造成严重的社会心理影响。AD 发病机制复杂,涉及遗传易感性、表皮功能障碍和 T 细胞驱动的炎症等[3]。目前,尚无根治方法。AD 中医辨证以湿为本,风湿热毒为标[4],与秦艽五味方的治疗思路相一致。本次研究采用 2,4 – 二硝基氟苯(DNFB)背部涂抹刺激 BALB/c 小鼠的方式,建立 AD 样皮损小鼠模型[5],观察秦艽五味方对 AD 样小鼠皮损的影响,明确其治疗作用,探索其作用机制为秦艽五味方的临床应用提供理论依据,为探索其作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,体质量 18 ~ 20 g,6 ~ 8 周龄,由北京斯贝福生物技术股份有限公司提供,许可证编号 SCXK(京)2019 – 0008。实验经北京市中医药研究所实验动物管理委员会批准,伦理审查号:BJTCM – M – 2023 – 10 – 01。

1.2 药物与试剂

地塞米松片购自浙江仙琚制药有限公司;DNFB 溶液购自上海安耐吉化学试剂公司;秦艽五味方(秦艽 10 g,乌蛇 6 g,川连 6 g,漏芦 10 g,白花蛇舌草 30 g)中药材来源于首都医科大学附属北京中医医院中药房。DAB 显色液和山羊血清工作液均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;甲苯胺蓝染色液、FLG 抗体购自 Cell Signaling Technology。APC anti – mouse CD3、FITC anti – mouse CD4、BV421 anti – mouse IL – 4、PE – cy7 anti – Rat and mouse IL – 17A、PE ani – mouse IFN – γ 试剂购自 Biolegend。

1.3 方法

1.3.1 分组、造模及给药 参考文献中的模型制备方法[6],实验前 70 只 BALB/c 雄性小鼠戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(80 mg/kg),背部去毛约 3 cm × 2 cm,随机分为空白组(Ctrl)、模型组(DNFB)、阳性药组(DXMS)、秦艽五味方组(QJF)。

小鼠造模方法:除空白组外,第 1 周的第 1、4、7 天其余各组小鼠背部涂抹 1% DNFB 溶液 100 μL,进行致敏,第 2 周休息,第 3 周开始,隔天背部涂抹 0.1% DNFB 溶液 100 μL,激发和维持背部皮肤炎症反应,持续 2 周;空白组同时间点同位置涂抹等量基质(丙酮 + 橄榄油,体积比 1∶4),共 4 周,第 29 天取材。地塞米松(阳性药)按照 10 mg/kg 计算,0.2 mL/20 g 溶解于蒸馏水中备用。秦艽五味方以常规煎服法制备水煎剂,并按照成人(60 kg)剂量换算成小鼠灌胃用量,以临床等药量为此次用药剂量,1 次/d 灌胃给药。

第 29 天取材,实验结束后 24 h 内给予颈椎脱臼处死后取血,血液常温静置 2 h 后,1500 r/min 离心 15 min,获取上清,–80 ℃保存。取脾脏,快速称重后,放于预冷的流式缓冲液或 PBS 中,待用;取小鼠腹股沟和颈部引流淋巴结,放于预冷的 PBS 中,待用。取背部全层皮肤,一部分液氮保存,一部分福尔马林固定。

1.3.2 小鼠特应性皮炎样皮损表现及严重程度评分 在第 1、7、14、21、28 天观察小鼠搔抓行为,并记录 10 min 内搔抓次数。用数码相机隔天拍照,记录小鼠背部/耳部皮损动态变化,参考临床特应性皮炎积分(SCORAD)指数[7],在实验开始第 1、7、14、21 天评估皮损严重程度,包括 4 个方面:红斑/出血、水肿/渗出、干燥/脱屑、表皮剥脱,分值代表严重程度,分为无(0)、轻度(1)、中度(2)、重度(3)4 个等级,4 项症状相加为最后评分,分值为 0 ~ 12 分。

1.3.3 苏木精 – 伊红(HE)染色观察小鼠皮损组织形态学改变 每组小鼠脱颈处死后,剪取相对应皮损处组织,固定于多聚甲醛中,经石蜡包埋、切片、脱蜡水化、HE 染色、脱水、封片,显微镜下观察并拍照。每个标本选 4 张染色切片观察组织病理学改变,并在 20 及 40 倍物镜下拍照,对 40 倍物镜下图片采用 ZEN 图像分析系统测量表皮厚度。

1.3.4 甲苯胺蓝染色法检测真皮层肥大细胞异常增殖情况 利用甲苯胺蓝染色法对小鼠皮肤石蜡切片进行染色,观察 200 倍光学显微镜下,3 个视野内肥大细胞数目,各组小鼠肥大细胞数量采用 3 个视野内细胞数的平均值。

1.3.5 免疫组织化学法检测小鼠皮损中丝聚蛋白(FLG)表达 每组小鼠脱颈处死后,剪取相对应皮损处组织,固定于多聚甲醛中,经石蜡切片,脱蜡水化,柠檬酸缓冲液高温高压进行抗原修复,封闭,Ⅰ抗 4 ℃孵育过夜,Ⅱ抗孵育,DAB 显色,脱水、透明、封片,显微镜下观察并拍照,并根据小鼠皮肤表皮角质层和颗粒层 FLG 阳性表达细胞数量和颜色进行评分从而对其结果进行半定量的评估[8]。显微镜下观察切片的整体染色情况:(1)200 倍视野下选择 5 个代表性区域,每个区域计数 200 个细胞,阳性细胞所占百分比计分为 0 ~ 3 分,若无阳性细胞计 0 分;阳性细胞 <25% 计 1 分;阳性细胞在 25% ~ 50% 计 2 分,阳性细胞 >50% 计 3 分。(2)着色强度计分:不着色计 0 分;轻着色(淡棕黄色)计 1 分;中等着色(棕黄色)计 2 分;强着色(明显棕黄色)计 3 分。最后,将以上两部分评分相加,进行统计分析。

1.3.6 ELISA 法检测血清中 IgE 水平 严格按照 IgE 检测盒的操作步骤,采用双抗体夹心法检测血清中 IgE 的含量。

1.3.7 流式细胞术检测脾脏中 Th1/Th2 比例 取脾脏,采用流式细胞术检测各组小鼠脾脏 Th1 与 Th2 细胞的比例。

1.3.8 流式细胞术检测淋巴结中 Th17 细胞比例和 Th1/Th2 比例 获取小鼠腹股沟和颈部引流淋巴结、制备单细胞悬液,用流式细胞术检测各组小鼠淋巴结中 Th17 细胞的比例以及

Th1/Th2 的比例。

1.3.9 高通量液相蛋白芯片技术检测血清中炎症因子的差异表达 采用 Luminex 液相蛋白芯片技术，检测不同组别血清中 48 种细胞因子的表达水平，48 种细胞因子包括：干扰素 - γ（IFN - γ），白细胞介素（IL）- 12p70，IL - 13，IL - 1β，IL - 2，IL - 4，IL - 5，IL - 6，肿瘤坏死因子 - α（TNF - α），粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子（GM - CSF），IL - 18，IL - 10，IL - 17A，IL - 9，IL - 22，IL - 23，IL - 27，IP - 10，MCP - 1，MCP - 3，GRO - α，MIP - 1α，MIP - 1β，MIP - 2，RANTES，Eotaxin，ENA - 78，G - CSF，IFN - α，IL - 15/IL - 15R，IL - 1α，IL - 28，IL - 3，IL - 31，LIF，M - CSF，Rankl，BTC，IL - 7，IL - 25，ST2（IL - 33R），IL - 19，BAFF，VEGF - A，Leptin，IL - 2RA，IL - 33，IL - 7R。

1.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9. 0 软件进行统计分析。实验数据均采用均数 ± 标准差（mean ± SD）表示。多组间均数比较采用单因素方差分析（one - way ANOVA），组间两两比较采用 SNK - q 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 秦艽五味方可改善小鼠特应性皮炎样的皮损，减少搔抓次数

空白组小鼠涂抹基质（丙酮 + 橄榄油）后，背部皮肤无明显炎症性损害，与之相比，模型组小鼠首次涂抹 DNFB 后，皮肤首先出现明显水肿、渗出等急性炎性反应，随着涂抹次数的增加，开始出现红斑、糜烂等慢性变化，并伴干燥、脱屑，皮肤表面逐渐形成黄褐色痂，结痂处毛发稀疏无光泽，与特应性皮炎临床表现相符。与模型组相比较，阳性药组和秦艽五味方组小鼠皮损部位的红斑、糜烂及结痂在用药 7 d 后逐渐消退，表明秦艽五味方对 DNFB 诱导的 AD 样皮炎有明显的抑制作用。同一时间段内，模型组小鼠搔抓次数明显多于空白组（$P < 0.01$）；模型组 SCORAD 评分明显高于空白组，而给予秦艽五味方治疗后，小鼠搔抓行为明显减少，SCORAD 评分降低，秦艽五味方用药效果与阳性药效果相一致，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见插页XLⅣ图 1。

皮损 HE 染色显示，空白组小鼠表皮、真皮结构正常；模型组小鼠皮损部位表皮增生明显，伴随有部分区域有角化过度和角化不全，表皮厚度明显高于空白组（$P < 0.01$），棘层肥厚。与模型组相比，秦艽五味方组表皮增生明显减轻，表皮厚度明显低于模型组（$P < 0.01$），但秦艽五味方组与阳性药组相对比，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。提示秦艽五味方对 DNFB 诱导的小鼠 AD 样模型有治疗作用。见插页XLⅣ图 2。

2.2 秦艽五味方可减少真皮肥大细胞的浸润

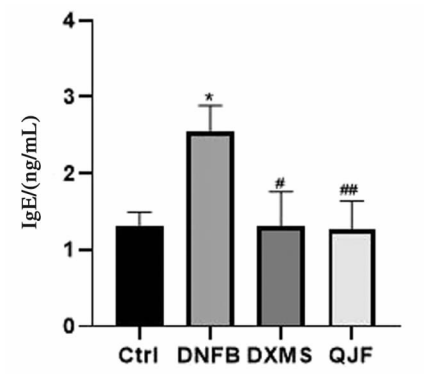
空白组小鼠皮损部位肥大细胞零星、稀疏存在；模型组小鼠肥大细胞浸润明显，数量增多（$P < 0.01$）。与模型组比较，秦艽五味方组肥大细胞数明显减少，差异有显著统计学意义（$P < 0.01$）；与阳性药组比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见插页XLⅤ图 3。

2.3 秦艽五味方改善皮肤中丝聚蛋白的表达

根据小鼠皮肤表皮角质层和颗粒层 FLG 阳性表达细胞数量和颜色进行评分从而对其结果进行半定量的评估。可以观察空白组可见表皮部位棕褐色网状连续结构，颜色较深，与空白组相比，模型组 FLG 蛋白表达量减少（$P < 0.01$），颜色明显变浅，且蛋白的完整性、连续性被破坏，提示皮肤屏障功能异常。QJF 组与模型组比较，蛋白表达量明显升高（$P < 0.05$），且连续性和完整性得到一定程度的恢复；与阳性药组相比，对皮肤屏障的改善作用差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见插页XLⅤ图 4。

2.4 秦艽五味方可降低血清中 IgE 的表达水平

血清 IgE 水平升高是 AD 的特征变化，结果显示，与空白组相比，模型组血清 IgE 水平明显升高（$P < 0.05$）；秦艽五味方组与模型组比较，IgE 水平均显著下降（$P < 0.01$）；秦艽五味方组与阳性药组相比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见图 5。



注：* 与 Ctrl 组比较，$P < 0.05$；# 与 DNFB 组比较，$P < 0.05$；## 与 DNFB 组比较，$P < 0.01$。

图 5 各组小鼠血清中 IgE 水平情况

2.5 秦艽五味方可逆转 AD 样小鼠脾脏 Th1/Th2 比例

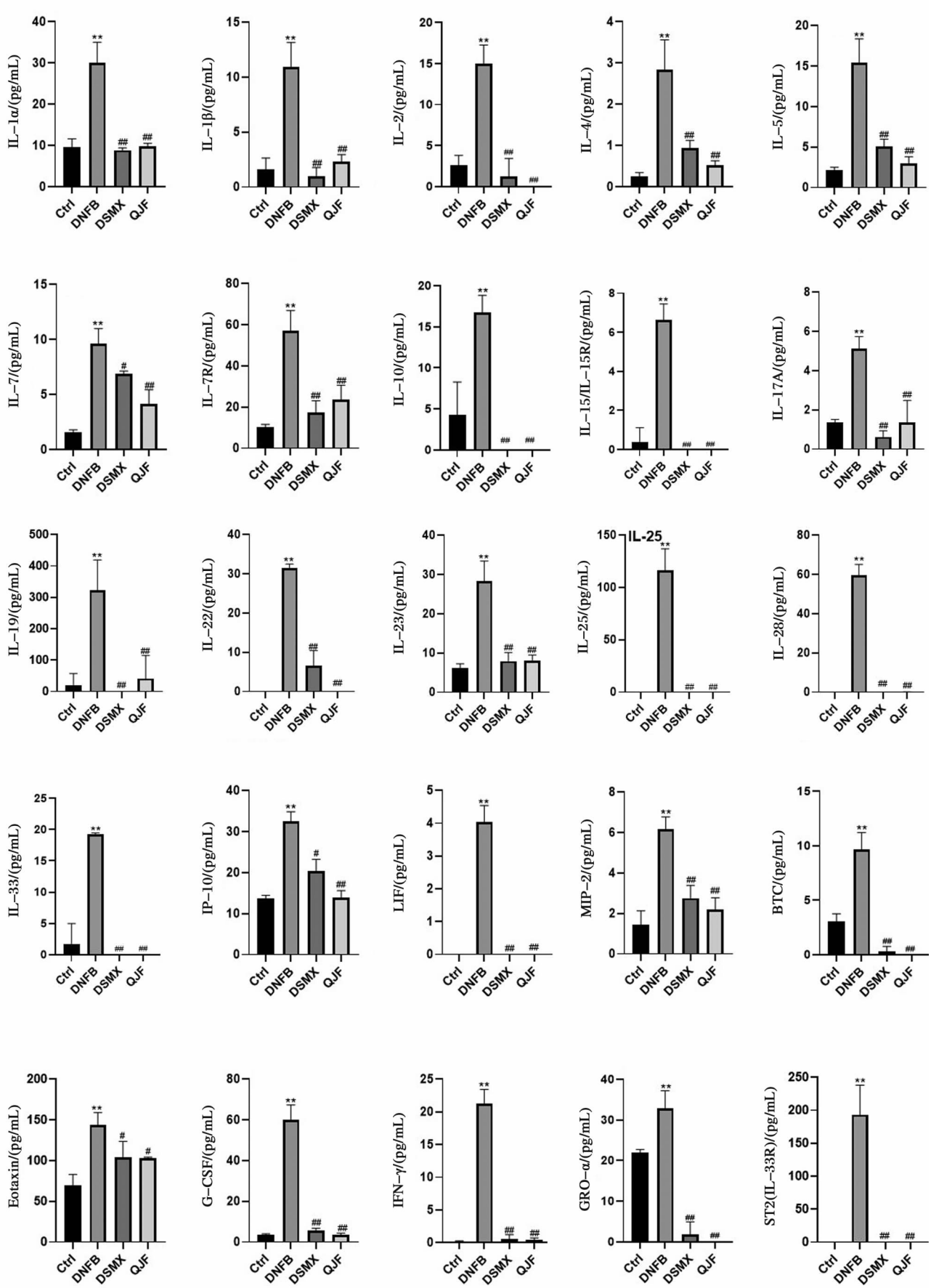
流式细胞术检测小鼠的脾脏中 Th1/Th2 情况。流式细胞术细胞群比例显示，模型组小鼠 Th1 和 Th2 细胞比例明显升高，同时 Th1/Th2 比例显著下降（$P < 0.01$）；应用秦艽五味方治疗后，可以降低 Th1 和 Th2 型细胞比例，逆转 Th1/Th2 失衡（$P < 0.05$）。但秦艽五味方组与阳性药组相比，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见插页XLⅥ图 6。

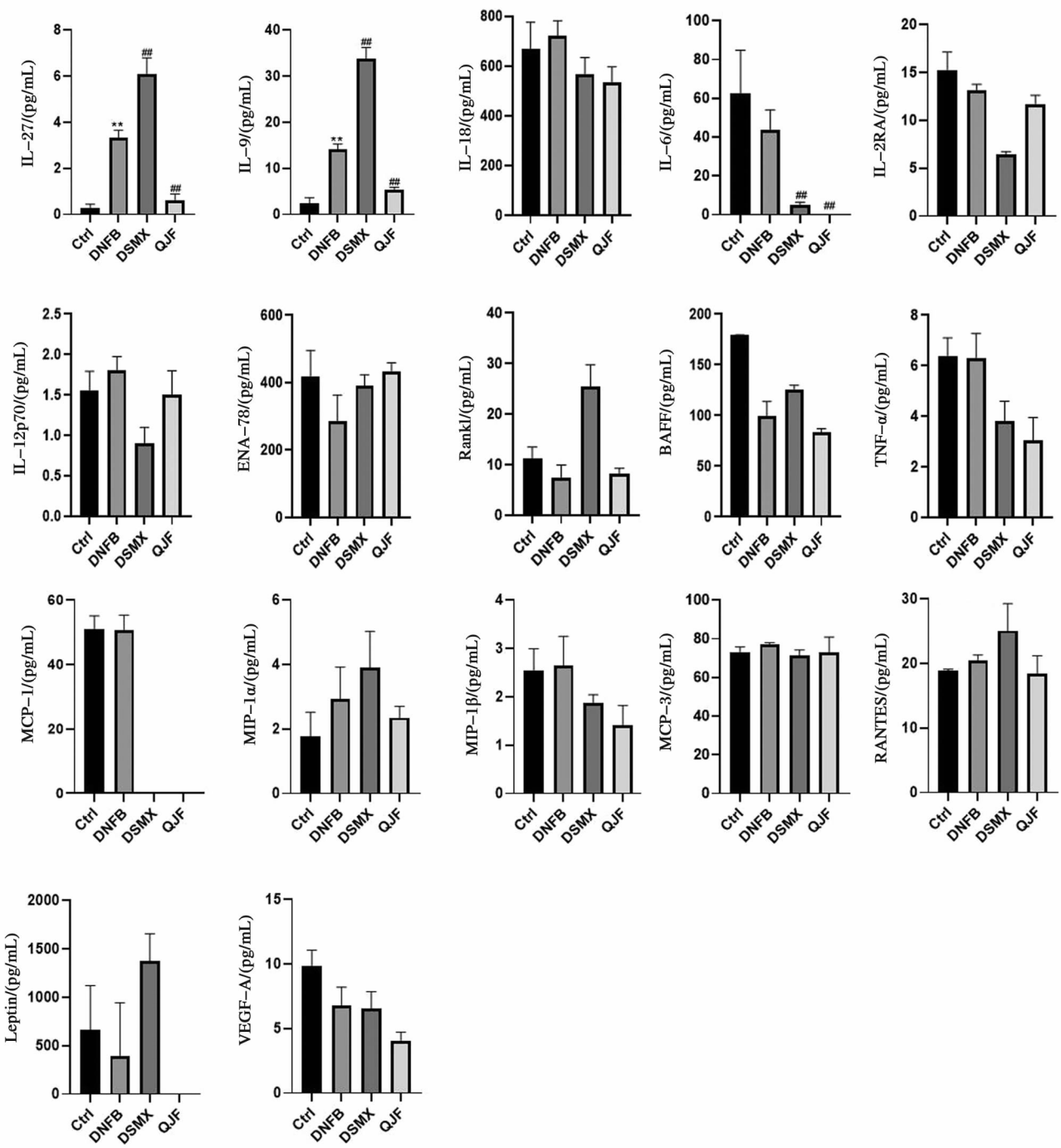
2.6 秦艽五味方降低 AD 小鼠淋巴结 Th17 细胞比例、逆转淋巴结 Th1/Th2 比例的失衡

流式细胞术细胞群比例显示，模型组小鼠 Th17 细胞比例明显升高（$P < 0.01$），应用秦艽五味方治疗后，可以降低 Th17 型细胞比例（$P < 0.05$）。检测淋巴结中 Th1/Th2 比例趋势与脾脏中 Th1/Th2 比例相一致。秦艽五味方组与阳性药组相比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见插页XLⅦ图 7。

2.7 秦艽五味方改变 AD 小鼠血清中多种细胞因子表达

结果显示，与空白组相比，模型组小鼠血清中炎症因子 IL - 1β、IL - 1α、IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 7、IL - 7R、IL - 10、IL - 17A、IL - 15/15R、IL - 19、IL - 22、IL - 23、IL - 25、IL - 27、IL - 9、IL - 28、IL - 33、ST2、IFN - γ、Eotaxin、IP - 10、LIF、MIP - 2、G - CSF、BTC、GRO - α 均有升高，差异有显著统计学意义（$P < 0.01$）。经秦艽五味方治疗后血清炎症因子水平均有下降，差异有显著统计学意义（$P < 0.01$），说明秦艽五味方对特应性皮炎样小鼠的炎症反应具有调节作用。与空白组相比，模型组血清中炎症因子 IL - 2RA、IL - 6、IL - 18、IL - 12p70、ENA - 78、Rankl、BAFF、TNF - α、MCP - 1、MIP - 1α、MIP - 1β、MCP - 3、RANTES、VEGF - A、Leptin 的水平无显著差异。见图 8。


IL-1α/(pg/mL)
IL-1β/(pg/mL)
IL-2/(pg/mL)
IL-4/(pg/mL)
IL-5/(pg/mL)
IL-7/(pg/mL)
IL-7R/(pg/mL)
IL-10/(pg/mL)
IL-15/IL-15R/(pg/mL)
IL-17A/(pg/mL)
IL-19/(pg/mL)
IL-22/(pg/mL)
IL-23/(pg/mL)
IL-25
IL-25/(pg/mL)
IL-28/(pg/mL)
IL-33/(pg/mL)
IP-10/(pg/mL)
LIF/(pg/mL)
MIP-2/(pg/mL)
BTC/(pg/mL)
Eotaxin/(pg/mL)
G-CSF/(pg/mL)
IFN-γ/(pg/mL)
GRO-α/(pg/mL)
ST2(IL-33R)/(pg/mL)
Ctrl
DNFB
DSMX
QJF



注：＊＊与 Ctrl 组比较，$P<0.01$；#与 DNFB 组比较，$P<0.05$；##与 DNFB 组比较，$P<0.01$。

图 8 各组小鼠血清中多种因子表达

3 讨论

AD 又称特应性湿疹，是皮肤科的常见病，患者服用抗组胺药物通常只能短暂缓解瘙痒症状，外用糖皮质激素类软膏虽然能够消除肥厚且苔藓化样皮损，但停药后则会复发，甚至因长期应用糖皮质激素而出现一些不良反应，会影响患者生活质量[9]。AD 属于中医学“奶癣”“四弯风”等范畴。中医认为患者先天禀赋不耐的特应性体质是本病的发病基础[10]。赵炳南教授认为，AD 发病多由先天禀赋不足，脾虚运化水湿无力，日久则内生湿热，外感邪气侵袭，搏结于腠理，故发为本病[11]。由于病程日久会致使脾虚，气血生化乏源，肌肤失于滋润濡养而反复发作不止[12]。

秦艽五味方功效为散风清热、除湿解毒、调和气血。方中秦艽为君，味苦、辛，性微寒，能祛风湿、舒筋络、清虚热；乌蛇味甘，性平，可祛风、活络、定惊，善搜剔血中伏风为臣药，可辅助秦艽祛除肌表、经络之风湿而止痒；黄连味苦，性寒，清热燥湿，泻火解毒；漏芦味苦、咸，性寒，能清热解毒、消痈脓、下乳汁；白花蛇舌草苦、甘，性寒，能清热解毒，消痈利湿。三药配合，能佐助君药、臣药除湿热而解毒。诸药配合，能散能降，攻补兼施[13]。赵炳南先生在多年临床总结的基础上将秦艽五味方进行加减来治疗多种皮损肥厚、瘙痒剧烈、缠绵难愈型皮肤病，并

取得了较好的疗效。临床应用[2]表明此方能调节机体机能、减少疾病复发。赵炳南先生治疗诸多皮肤病时经常使用秦艽，除发挥其除湿热、退虚热、止痒消疹功能外，还特别强调秦艽有散结除邪、调和气血、扶正祛邪的特殊作用。现代药理学研究发现，秦艽中丰富的龙胆苦苷和獐芽菜苦苷，是发挥其抗炎活性的主要成分，其作用机制可能：(1)与 IL－1β 等炎症因子的减少，IL－10、IL－4 抗炎因子的加速释放及调节核转录因子－κB(NF－κB)抑制蛋白(IκB)等因素有关；(2)与血清中 Th1 型细胞因子 IFN－γ、抗环瓜氨酸肽抗体与 TNF－α 水平降低及血清 IL－4 水平升高有关[14]。体外研究发现，采用刀豆素 A(ConA)诱导脾 T 淋巴细胞的增殖反应对大叶秦艽调节免疫的有效部位进行筛选，结果发现大叶秦艽正丁醇提取部位对调节免疫具有显著作用。研究表明秦艽醇提物可抑制小鼠脾脏淋巴细胞和胸腺淋巴细胞增殖，且对脾脏淋巴细胞增殖的抑制作用存在一定的量效关系[15]。这有助于进一步理解秦艽五味方发挥药效的物质基础。

IgE 介导的过敏反应会激活肥大细胞，刺激肥大细胞脱颗粒、释放组胺，这是造成瘙痒的主要原因之一[16]。在本研究中，与空白组小鼠相比，模型组小鼠的搔抓次数明显增多，表皮出现红斑、鳞屑、渗出和苔藓化特征。HE 染色及甲苯胺蓝染色提示了该小鼠模型较好地还原了特应性皮炎的特征性病理状态。而秦艽五味方的治疗减轻了模型小鼠的搔抓反应，皮损减轻，组织学染色显示皮肤中的炎性细胞及肥大细胞数量明显减少，表明秦艽五味方能够抑制特应性皮炎样小鼠的炎性反应，减少肥大细胞浸润，并缓解瘙痒症状。

皮肤屏障功能破坏也可引发 AD[17]，而 FLG 是调节皮肤屏障系统的关键环节，是人体皮肤角质层中连接角蛋白纤维的重要分子，在 FLG 单体协助连接下，角蛋白纤维规则地聚集，在表皮的最外层形成坚实的物理屏障，可以防止表皮水分的丢失和外界过敏物质的入侵[18]。本研究免疫组化结果显示，与模型组小鼠相比，秦艽五味方组小鼠皮损处的 FLG 的表达明显增加，提示秦艽五味方对特应性皮炎样小鼠表皮屏障有良好的修复作用。

AD 患者存在免疫功能异常[19]，以 Th1/Th2 比例失衡为主要特点，Th17 作为一个不同于 Th1 和 Th2 的 CD_4^+ T 细胞亚群，在特应性皮炎发生发展中也起了重要的作用。Th17 通过分泌 IL－17 等细胞因子诱发炎症反应及免疫反应，参与特应性皮炎发病[20]。通过检测脾脏和淋巴结中 Th1/Th2 比例和淋巴结中 Th17 情况，观察秦艽五味方对小鼠免疫功能的影响。结果显示与模型组相比，秦艽五味方组的小鼠脾脏和淋巴结中 Th1/Th2 比例失衡情况有明显升高且趋势一致，同时淋巴结中 Th17 细胞的比例也有显著降低。这表明秦艽五味方可逆转 Th1/Th2 失衡和 Th17 细胞的比例，从而调节免疫功能。

研究发现[16]，AD 的发病机制除了以 Th1/Th2 比例失衡的经典通路外，树突状细胞、嗜酸性粒细胞、角质形成细胞、T 细胞、肥大细胞等免疫细胞也参与了特应性皮炎的免疫学发生机制。本研究通过高通量液相蛋白芯片技术检测血清中 48 种炎症因子的差异表达，其中包括 Th1、Th2、Th17 相关细胞因子，嗜酸性粒细胞，DC 细胞，巨噬细胞，其他免疫细胞相关细胞因子以及趋化因子等多种细胞因子。结果显示，模型组中 Th1 型相关细胞因子 IFN－γ[21]，Th2 型相关细胞因子 IL－2、IL－4、IL－5、IL－19、IL－25、IL－33、IL－33R[22－23]，Th17 型相关细胞因子 IL－17A、IL－22、IL－23[24－25]表达升高，其他免疫细胞相关细胞因子均上升，如由巨噬细胞产生的 IL－1α、IL－1β、G－CSF[26－27]与炎症反应呈正相关；趋化因子 GRO－α 可以通过激活巨噬细胞和 T 细胞等免疫细胞，促进炎症反应，还可以诱导角质细胞增殖和分化，从而加速皮肤屏障的破坏和修复过程[28]；IL－15/15R 与特应性皮炎患者的免疫异常有关，血清中 IL－15 与 IL－4 水平呈正相关、与 IFN－γ 无相关性，表明 IL－15 参与了 Th2 类细胞因子 IL－4 的调节，对于 Th1 类细胞因子 IFN－γ 无明显调节作用[29－30]；嗜酸性粒细胞趋化因子 Eotaxin 能够吸引并激活嗜酸性粒细胞从而加剧炎性反应[31]；IFN－γ 刺激诱导产生干扰素诱导蛋白 IP－10，从而加剧炎性反应，IP－10 是 Th1 细胞介导的免疫反应的标志物之一[32]；巨噬细胞炎性蛋白 MIP－2 能够刺激炎症细胞合成和释放炎症介质，如细胞因子 IL－1β、IL－8 等，从而加剧炎性反应[33]。根据以往的研究结果已知，在 AD 样皮炎的急性期，Th2 相关细胞因子主要在血清和皮肤病变中升高[22]；在 AD 样皮炎的慢性期，Th2 相关细胞因子仍高表达，而 Th1 和 Th17 相关细胞因子也逐渐增加[20,24]；在免疫细胞浸润方面，T 细胞、ILC2 型细胞、DC 细胞以及其他髓系细胞在急性期表达以增加为主要特征，在慢性期表达则会加剧上调[19,34]。这说明在本研究中，DNFB 诱导的特应性皮炎样小鼠模型处于疾病发展的慢性期。在经过秦艽五味方的治疗后，上述上升的细胞因子均下降，以 Th2 型相关细胞因子表达下降最为显著。这说明，秦艽五味方对 Th2 型相关细胞因子表达的调控作用效果最好。在本研究中，阳性药地塞米松组细胞因子 IL－9、IL－27 的水平高于模型组，我们推测与地塞米松的不良反应相关 。地塞米松是糖皮质激素类药，吸收快、作用迅速，可避免局部皮疹范围扩大和消除瘙痒的症状，使皮肤在短期内恢复正常，但当通过全身途径给药时，它会引起严重的不良反应，如高血压、消化性溃疡、高血糖症和水电解紊乱[35]；秦艽五味方无明显不良反应，适合长期使用，更适合 AD 慢性期的疾病状态。

本研究结果显示，与空白组相比，模型组炎症因子 IL－2RA、IL－6、IL－18、IL－12p70、ENA－78、Rankl、BAFF、TNF－α、MCP－1、MIP－1α、MIP－1β、MCP－3、RANTES、VEGF－A、Leptin 水平无明显变化，这可能表明在 DNFB 诱导的小鼠 AD 样模型中，DNFB 对这些因子没有调控作用。其中 MCP－1、MCP－3、RANTES、MIP－1α 和 MIP－1β 都是单核细胞相关的趋化因子[36]，说明在 DNFB 诱导的小鼠 AD 样皮损模型中单核细胞的功能变化不显著。IFN－γ、TNF－α 和 IL－18 是 AD 患者的角质形成细胞中 IP－10 表达和分泌的有效刺激剂，角质形成细胞的凋亡主要由 T 细胞诱导，由 IFN－γ 介导，这是 AD 发病中不可缺少的致病因素[37]，但在本研究中与空白组相比，模型组中 IFN－γ 有差异，TNF－α 和 IL－18 没有显著差异。之前有报道发现在 AD 患者急性期血清中 IL－18 和 TNF－α 的表达水平显著增高[38－39]，但关于慢性期这两种因子在血清中的表达情况暂时不明，在动物模型上的研究不充分，这一现象值得后续关注和研究。

本研究结果表明，DNFB 诱导的 AD 样小鼠皮损模型与 AD 的慢性期相似[22]，秦艽五味方对改善 AD 慢性期症状有着较好的作用，可改善 AD 样小鼠的炎性反应，其作用机制可能与调控 Th2 型相关细胞因子表达有关。但秦艽五味方对特应性皮炎样小鼠的免疫反应具体的调节机制仍需进一步探索。

综上所述，本研究证实了秦艽五味方能够减轻特应性皮炎皮损，恢复皮肤屏障功能，减轻机体炎症反应，调节机体的免疫

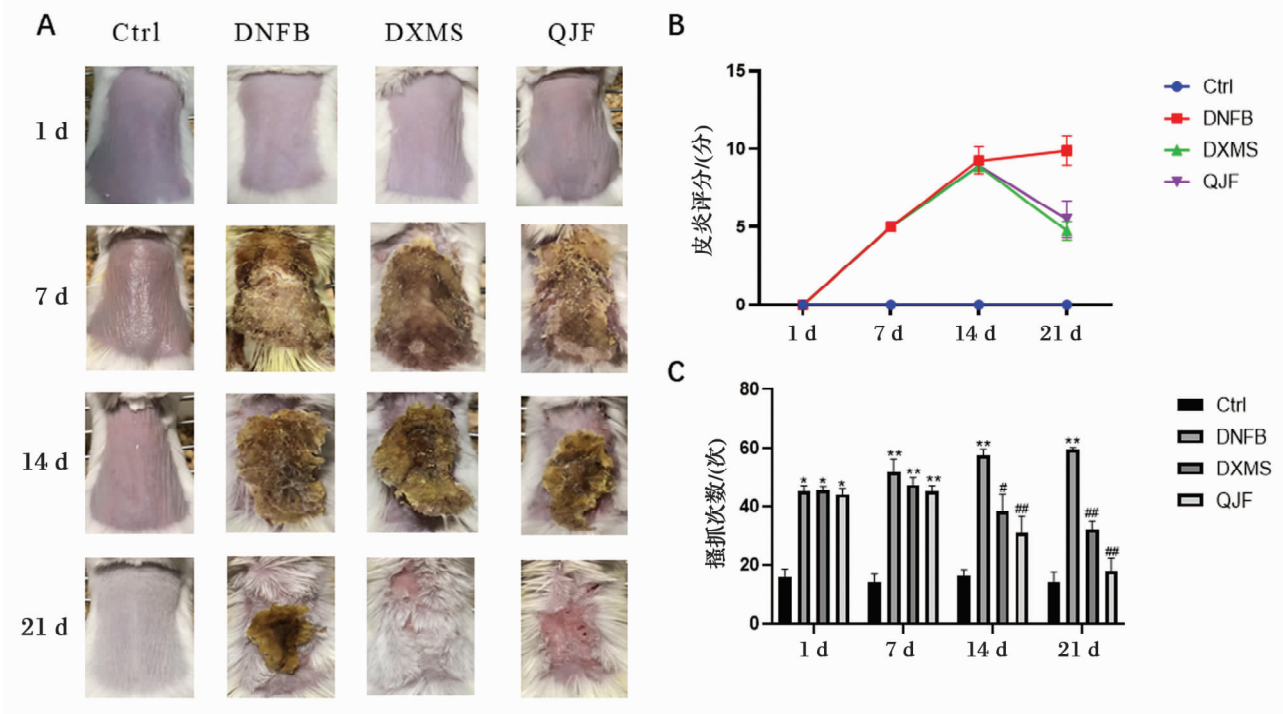
功能，尤其是 Th2 型相关细胞因子的炎症反应，从而达到改善特应性皮炎的目的，为秦艽五味方的临床应用提供了理论依据。

参考文献

[1] 赵恩道. 赵炳南学术经验浅谈[J]. 北京中医药, 2009, 28(6): 417 - 421.
[2] 周冬梅, 张苍, 李伯华. 赵炳南验方十一讲[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2016.
[3] STÄNDER S. Atopic dermatitis[J]. N Engl J Med, 2021, 384(12): 1136 - 1143.
[4] 张理涛. 特应性皮炎中医诊疗方案专家共识[C]//第六次全国中西医结合变态反应学术大会论文汇编. 天津, 2013: 71 - 73.
[5] RIDOLO E, MARTIGNAGO I, RIARIO - SFORZA G G, et al. Allergen immunotherapy in atopic dermatitis[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2018, 14(1): 61 - 68.
[6] JIN H L, HE R, OYOSHI M, et al. Animal models of atopic dermatitis[J]. J Invest Dermatol, 2009, 129(1): 31 - 40.
[7] WOLLENBERG A, CHRISTEN - ZÄCH S, TAIEB A, et al. ETFAD/EADV Eczema task force 2020 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adults and children[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2020, 34(12): 2717 - 2744.
[8] FANTON N, SANTORO D, CORNEGLIANI L, et al. Increased filaggrin - metabolizing enzyme activity in atopic skin: a pilot study using a canine model of atopic dermatitis[J]. Vet Dermatol, 2017, 28(5): 79 - 111.
[9] 曾凡钦, 王晓琳. 特应性皮炎治疗研究近况[J]. 广东医学, 2003, 24(9): 905 - 907.
[10] 赵炳南, 张志礼. 简明中医皮肤病学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2014.
[11] 耿学英, 宋乃光, 赵岩松, 等. 赵炳南教授学术思想研究概况[J]. 中医研究, 2008, 21(10): 58 - 61.
[12] 朱慧婷, 李伯华, 姜春燕, 等. 燕京赵氏皮科流派后学辨治特应性皮炎经验总结[J]. 北京中医药, 2019, 38(12): 1155 - 1158.
[13] 张晓明. 高益民老中医临证经验集[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
[14] 钟瑶. 秦艽裂环环烯醚萜经皮给药制剂及其抗炎活性的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2023.
[15] 谢欣娟, 王丽华, 刘红艳, 等. 大叶秦艽研究现状[J]. 现代农业科技, 2022(2): 65 - 67, 70.
[16] 李云卿. 特应性皮炎发病机制与治疗研究进展[J]. 黄河科技学院学报, 2022(2): 51 - 55.
[17] YANG G, SEOK J K, KANG H C, et al. Skin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2867.
[18] 王焕丽, 刘玉梅. FLG 基因与特应性皮炎[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2014, 28(5): 521 - 523.
[19] DAVID BOOTHE W, TARBOX J A, TARBOX M B. Atopic dermatitis: pathophysiology[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1027: 21 - 37.
[20] 王相华, 李冬芹, 张金凤, 等. Th1/Th2/Th17/Treg 平衡在特应性皮炎中的变化规律[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2018, 32(5): 503 - 506.
[21] DING H H, WANG G F, YU Z, et al. Role of interferon - gamma (IFN - γ) and IFN - γ receptor 1/2 (IFNγR1/2) in regulation of immunity, infection, and cancer development: IFN - γ - dependent or independent pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 155: 113683.
[22] JIANG P J, WU Y G, LIU L, et al. Combined application of dinitrofluorobenzene and ovalbumin induced AD - like dermatitis with an increase in helper T - cell cytokines and a prolonged Th2 response[J]. BMC Immunol, 2022, 23(1): 60.
[23] HO I C, MIAW S C. Regulation of IL - 4 expression in immunity and diseases[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 941: 31 - 77.
[24] YANG J F, SUNDRUD M S, SKEPNER J, et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases[J]. Trends Pharmacol Sci, 2014, 35(10): 493 - 500.
[25] MOSCHEN A R, TILG H, RAINE T. IL - 12, IL - 23 and IL - 17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(3): 185 - 196.
[26] ALIPER A M, FRIEDEN - KOROVKINA V P, BUZDIN A, et al. A role for G - CSF and GM - CSF in nonmyeloid cancers[J]. Cancer Med, 2014, 3(4): 737 - 746.
[27] WEBER A, WASILIEW P, KRACHT M. Interleukin - 1beta (IL - 1beta) processing pathway[J]. Sci Signal, 2010, 3(105): 2.
[28] CHANG K T, LIN H Y, KUO C H, et al. Tacrolimus suppresses atopic dermatitis - associated cytokines and chemokines in monocytes[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2016, 49(3): 409 - 416.
[29] KARLEN H, YOUSEFI S, SIMON H U, et al. IL - 15 expression pattern in atopic dermatitis[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2020, 181(6): 417 - 421.
[30] 赵凯姝, 张云峰, 郭世杰, 等. 白细胞介素 15 在小鼠支气管哮喘发病中的作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2009, 35(5): 832 - 836, 972.
[31] WILLIAMS T J. Eotaxin - 1 (CCL11)[J]. Front Immunol, 2015, 6: 84.
[32] RUFFILLI I, FERRARI S M, COLACI M, et al. IP - 10 in autoimmune thyroiditis[J]. Horm Metab Res, 2014, 46(9): 597 - 602.
[33] CHO K A, WOO S Y, PARK Y S, et al. Macrophage inflammatory protein - 2 (MIP - 2)/CXCR2 blockade attenuates acute graft - versus - host disease while preserving graft - versus - leukemia activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 426(4): 558 - 564.
[34] SALVATI L, COSMI L, ANNUNZIATO F. From emollients to biologicals: targeting atopic dermatitis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10381.
[35] MADAMSETTY V S, MOHAMMADINEJAD R, UZIELIENE I, et al. Dexamethasone: insights into pharmacological aspects, therapeutic mechanisms, and delivery systems[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2022, 8(5): 1763 - 1790.
[36] UGUCCIONI M, D'APUZZO M, LOETSCHER M, et al. Actions of the chemotactic cytokines MCP - 1, MCP - 2, MCP - 3, RANTES, MIP - 1 alpha and MIP - 1 beta on human monocytes[J]. Eur J Immunol, 1995, 25(1): 64 - 68.
[37] DI BARI F. Atopic dermatitis and alpha - chemokines[J]. Clin Ter, 2015, 166(3): 182 - 187.
[38] 王丹, 陈秋霞, 孟琼, 等. 特应性皮炎患儿血清 IL - 18、sFas 和 sFasL 测定的意义[J]. 右江医学, 2004, 32(3): 201 - 202.
[39] BEHNIAFARD N, GHARAGOZLOU M, FARHADI E, et al. TNF - α single nucleotide polymorphisms in atopic dermatitis[J]. Eur Cytokine Netw, 2012, 23(4): 163 - 165.

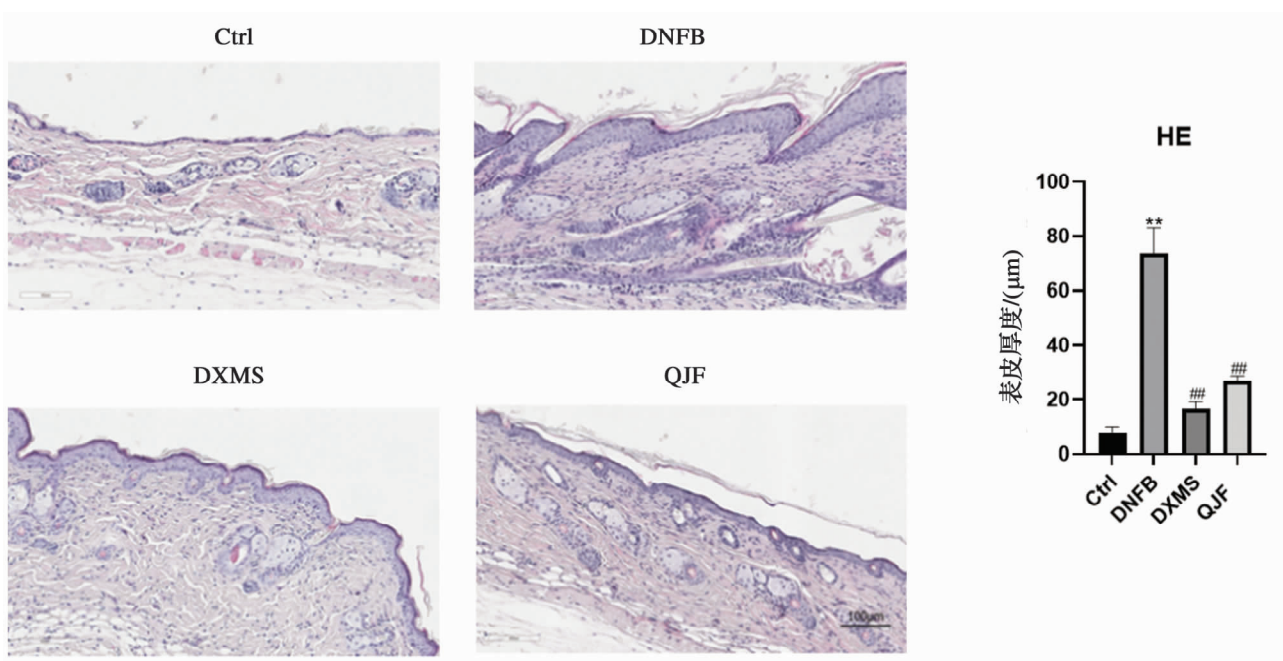
秦艽五味方对 DNFB 诱导的特应性皮炎样小鼠皮损改善作用及机制研究

（正文见 155－161 页）



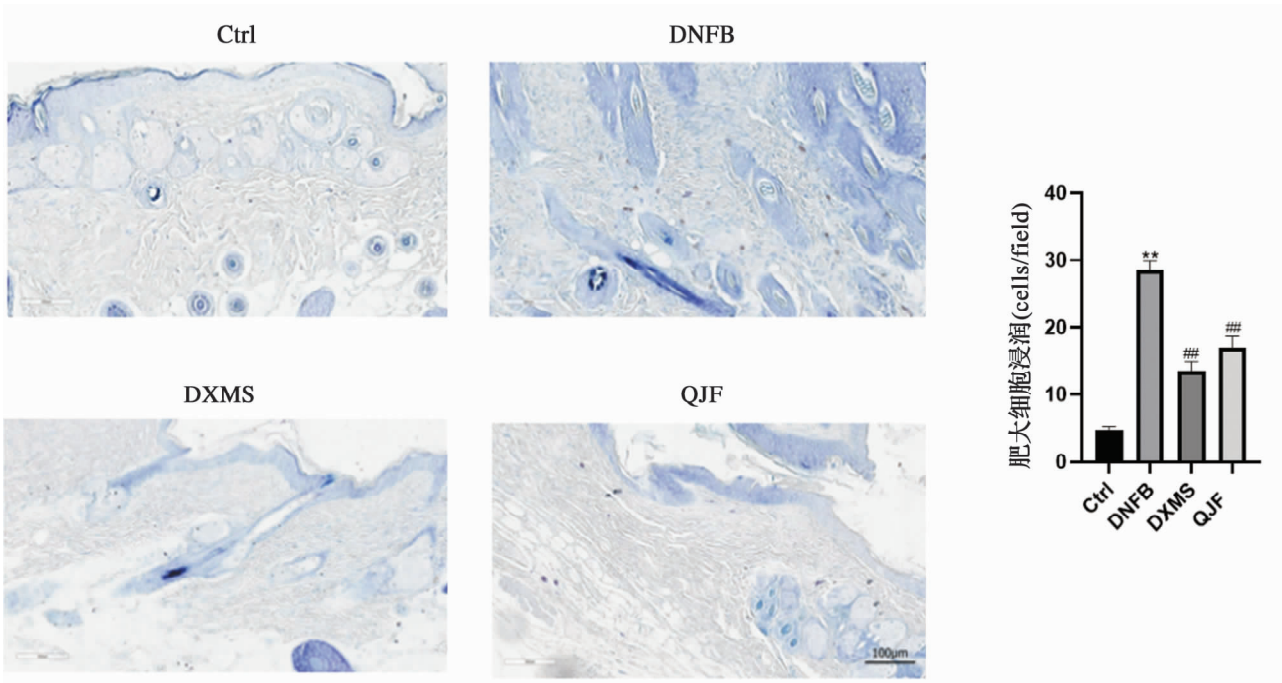
注：＊与 Ctrl 组比较，$P<0.05$；＊＊与 Ctrl 组比较，$P<0.01$；#与 DNFB 组比较，$P<0.05$；##与 DNFB 组比较，$P<0.01$。

图 1　各组小鼠的皮损表现（A）、炎症评分（B）、搔抓行为评分（C）比较



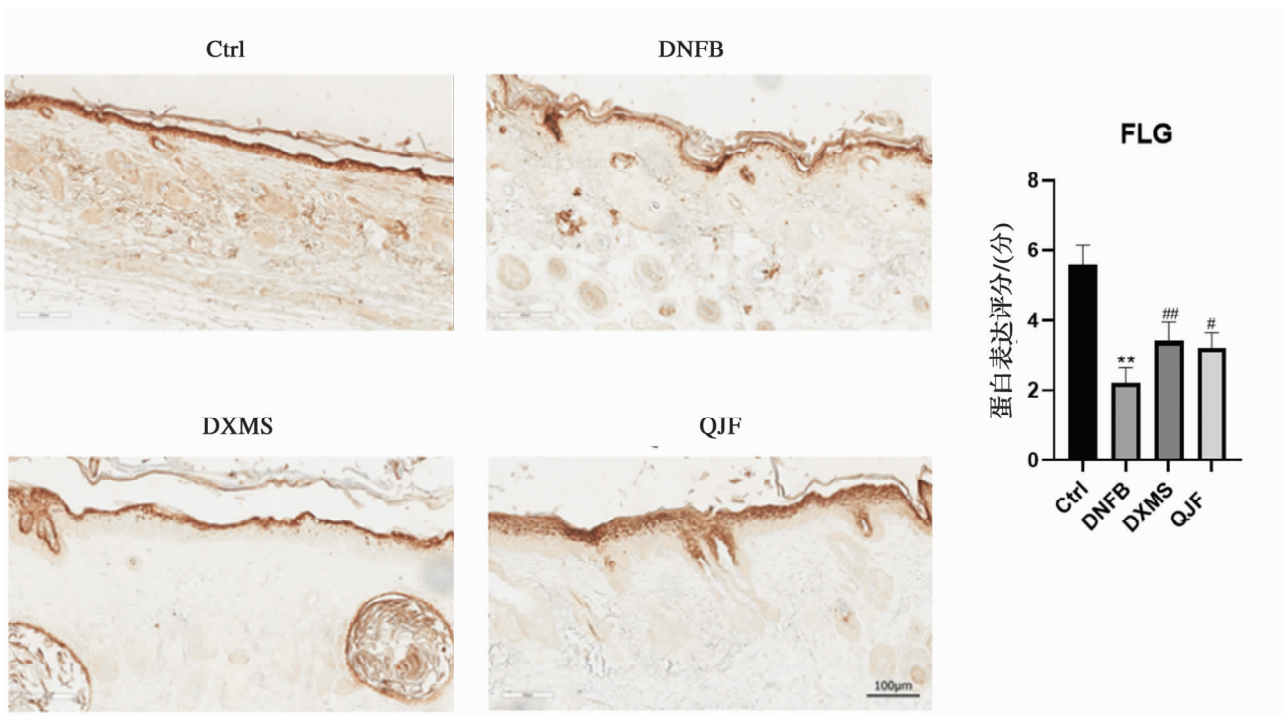
注：＊＊与 Ctrl 组比较，$P<0.01$；##与 DNFB 组比较，$P<0.01$。

图 2　各组小鼠背部皮损病理改变（HE 染色，×200）



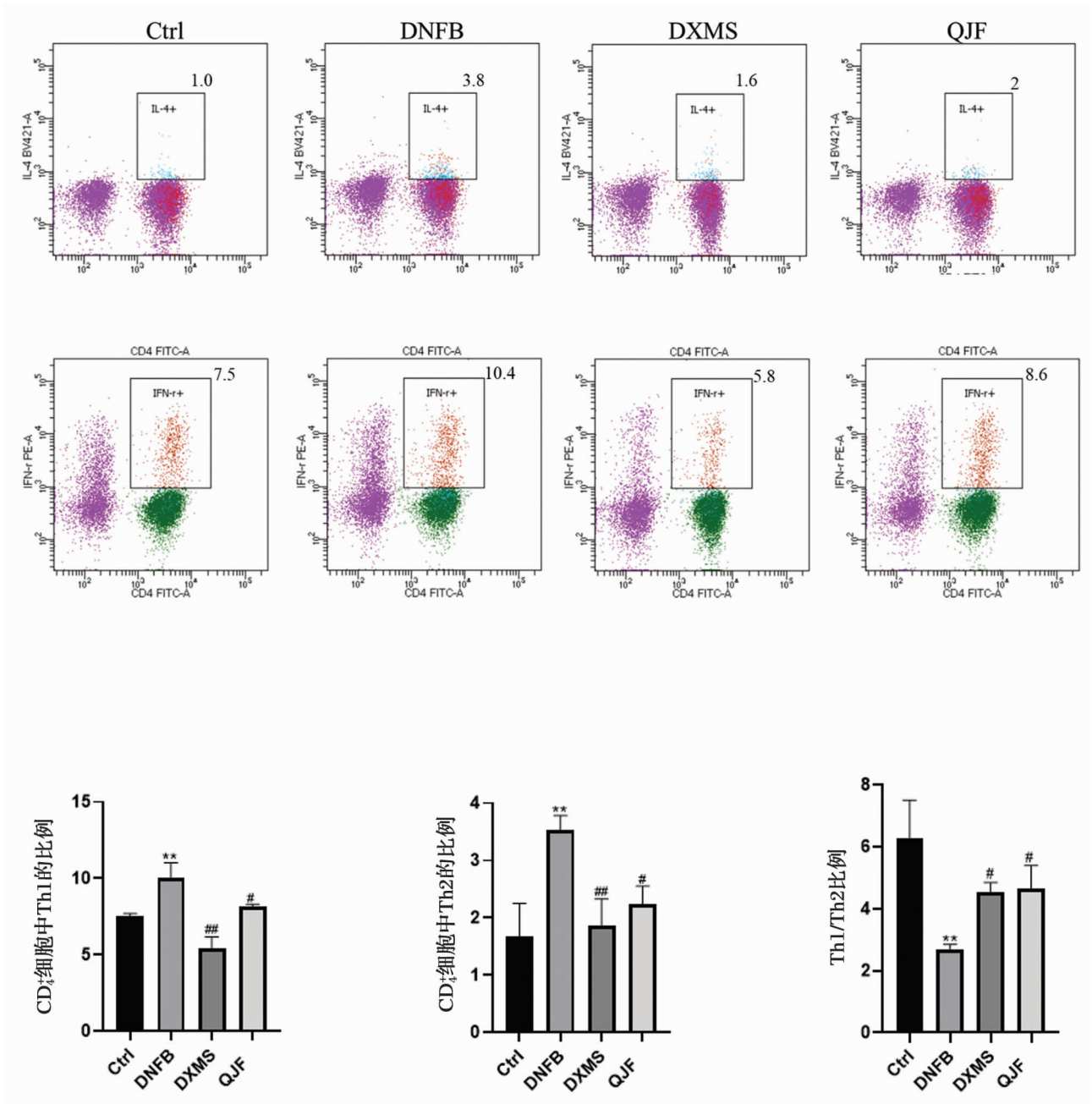
注：＊＊与 Ctrl 组比较，$P<0.01$；##与 DNFB 组比较，$P<0.01$。

图 3　各组小鼠真皮层中肥大细胞浸润情况，甲苯胺蓝染色（×200）



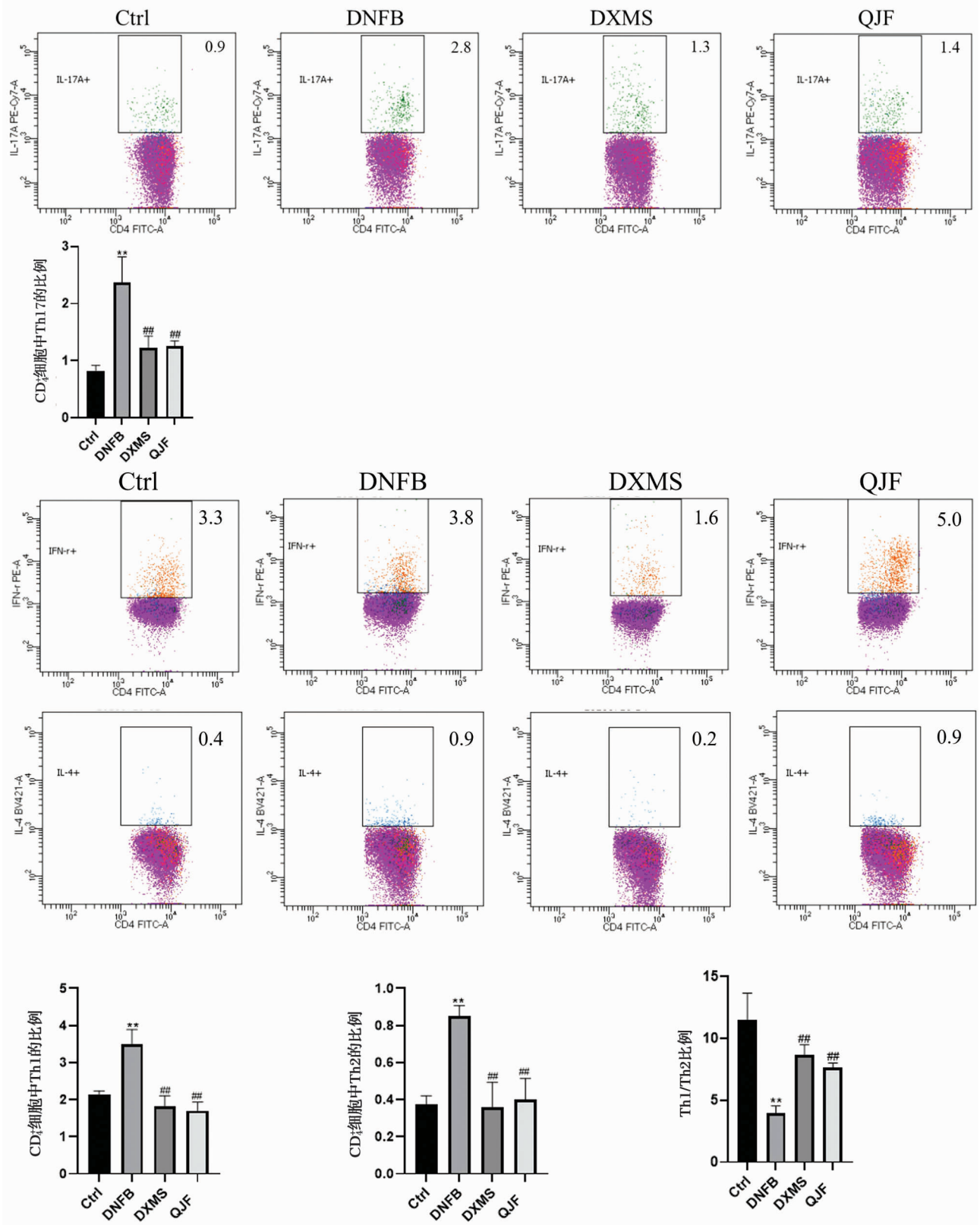
注：＊＊与 Ctrl 组比较，$P<0.01$；#与 DNFB 组比较，$P<0.05$；##与 DNFB 组比较，$P<0.01$。

图 4　各组小鼠角质层 FLG 蛋白表达情况（IHC ×200）



注：＊＊与 Ctrl 组比较，$P<0.01$；#与 DNFB 组比较，$P<0.05$；##与 DNFB 组比较，$P<0.01$。

图 6　各组小鼠脾脏 Th1/Th2 比例检测



注：＊＊与 Ctrl 组比较，$P<0.01$；##与 DNFB 组比较，$P<0.01$。

图 7 各组小鼠淋巴结 Th17 比例和淋巴结中 Th1/Th2 比例检测