阿魏酸和绿原酸对特应性皮炎优势菌群及细胞活性的影响*

朱克彬，牛蔚露，王宁丽，王海燕

河南中医药大学第一附属医院皮肤科，河南 郑州 450000

摘要：目的：观察阿魏酸和绿原酸对特应性皮炎的体表优势菌群（金黄色葡萄球菌、表皮白葡萄球菌）以及相关细胞（HaCaT 细胞、RAW264.7 细胞）活性的影响。方法：采用微量液体倍比稀释法配制阿魏酸和绿原酸药液，浓度为 60、120、240、480、960、1 920、3 840、7 680、15 360 μmol·L^{-1}。取金黄色葡萄球菌和表皮白葡萄球菌，加入阿魏酸或绿原酸药液进行干预。采用 MMT 法检测细菌活性，结晶紫染色法检测细菌生物膜活性。取 HaCaT 细胞和 RAW264.7 细胞（0.1% 脂多糖诱导），加入阿魏酸或绿原酸药液进行干预，并采用 MTT 法检测细菌活性。结果：MTT 检测显示，阿魏酸浓度为 15 360 μmol·L^{-1}时，金黄色葡萄球菌和表皮白葡萄球菌活性降低（$P<0.05$）。阿魏酸浓度为 960 μmol·L^{-1}和 1 920 μmol·L^{-1}时，金黄色葡萄球菌活性增强（$P<0.05$）。绿原酸浓度为 15 360 μmol·L^{-1}时，表皮白葡萄球菌活性降低（$P<0.000\,05$）。阿魏酸和绿原酸浓度为 3 840、7 680、15 360 μmol·L^{-1}时，金黄色葡萄球菌生物膜活性降低（$P<0.05$）。阿魏酸浓度为 960 μmol·L^{-1}、15 360 μmol·L^{-1}时，表皮白葡萄球菌生物膜活性增强（$P<0.05$）。绿原酸浓度为 60 μmol·L^{-1}、15 360 μmol·L^{-1}时，表皮白葡萄球菌生物膜活性降低（$P<0.05$）。绿原酸浓度为 1 920 μmol·L^{-1}时，HaCaT 细胞存活率降低（$P<0.000\,5$）。绿原酸浓度为 30、120、240、480、960、1 920 μmol·L^{-1}时，RAW264.7 细胞存活率降低（$P<0.005$）。结论：阿魏酸和绿原酸对特应性皮炎的 2 种优势菌群（金黄色葡萄球菌和表皮白葡萄球菌）具有一定的抑制作用。

关键词：特应性皮炎；阿魏酸；绿原酸；金黄色葡萄球菌；表皮白葡萄球菌；HaCaT 细胞；RAW264.7 细胞；细胞活性
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.05.177
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)05－1101－07

Effect of Ferulic Acid and Chlorogenic Acid on Dominant Flora and Cell Activity in Atopic Dermatitis

ZHU Kebin，NIU Weilu，WANG Ningli，WANG Haiyan

Department of Dermatology，The First Affiliated Hospital to Henan University of Chinese Medicine，Zhengzhou Henan China 450000

Abstract：Objective：To observe the effects of ferulic acid and chlorogenic acid on the activities of dominant flora（Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis）and related cells（HaCaT cells and RAW264.7 cells）in atopic dermatitis（AD）. Methods：Ferulic acid and chlorogenic acid liquid were prepared by microliquid dilution method with concentrations of 60，120，240，480，960，1 920，3 840，7 680，15 360 μmol·L^{-1}. Staphylococcus aureus and Staphylococcus albicans epidermis were added to the solution of ferulic acid or chlorogenic acid for intervention. The MMT method was used to detect bacterial activity，and the crystal violet staining method was used to detect bacterial biofilm activity. HaCaT cells and RAW264.7 cells（0.1% lipopolysaccharide induction）were added to the ferulic acid or chlorogenic acid solution for intervention，and the bacterial activity was detected by MTT method. Results：MTT showed that the concentration of ferulic acid was 15 360 μmol· L^{-1}，the activities of Staphylococcus aureus and Staphylococcus albicans epidermis decreased（$P<0.05$）. The concentration of ferulic acid was 960 μmol· L^{-1} and 1 920 μmol· L^{-1}，the activity of Staphylococcus aureus was enhanced（$P<0.05$）. The concentration of chlorogenic acid was 15 360 μmol·L^{-1}，the activity of Staphylococcus

* **基金项目**：河南省卫生健康委员会国家中医临床研究基地科研专项课题项目（2022JDZX132，2022JDZX009，2019JDZX2014，2019ZY2130）

albicans epidermis decreased ($P < 0.000\ 05$). The concentrations of ferulic acid and chlorogenic acid were 3 840, 7 680 and 15 360 μmol · L^{-1}, the biofilm activity of Staphylococcus aureus decreased ($P < 0.05$). The concentration of ferulic acid was 960 μmol · L^{-1}, 15 360 μmol · L^{-1}, the biofilm activity of Staphylococcus albicans epidermis was enhanced ($P < 0.05$). The concentration of chlorogenic acid was 60 μmol · L^{-1}, 15 360 μmol · L^{-1}, the biofilm activity of Staphylococcus albicans epidermis decreased ($P < 0.05$). The concentration of chlorogenic acid was 1 920 μmol · L^{-1}, the viability of HaCaT cells decreased ($P < 0.000\ 5$). The concentrations of chlorogenic acid were 30, 120, 240, 480, 960, 1 920 μmol · L^{-1}, the survival rate of RAW264.7 cells decreased ($P < 0.005$). Conclusion: Ferulic acid and chlorogenic acid have certain inhibitory effects on two kinds of bacteria (Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermis).

Key words: atopic dermatitis; ferulic acid; chlorogenic acid; staphylococcus aureus; staphylococcus epidermidis; HaCaT cell; RAW264.7 cell; cell activity

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD),又名特应性湿疹,中医称为四弯风,是临床上常见的慢性、过敏性、炎症性皮肤病。AD 的发生与丝聚蛋白缺陷导致的皮肤屏障功能失调有关[1]。皮肤屏障功能失调诱发的炎症涉及多种细胞类型,包括角质形成细胞、肥大细胞、巨噬细胞等,并与皮肤表面菌群失衡有关。在 AD 进程中,金黄色葡萄球菌和表皮白葡萄球菌作为优势菌群发挥重要作用[2]。这两种菌形成的菌群结构和生物膜,不仅改变了皮肤表面的生物多样性,而且对角质细胞和宿主的免疫功能产生独特影响[3-5]。研究证明,金黄色葡萄球菌可分泌多种毒素加重 AD,如 δ-toxin 可刺激肥大细胞脱颗粒,α-toxin 对角质形成细胞造成损伤,protein A 刺激角质形成细胞的炎症反应,以及触发 B 细胞扩增和细胞因子释放的超抗原、促炎性脂蛋白等[6]。表皮白葡萄球菌分泌的蛋白酶 EcpA 通过诱导桥粒芯蛋白-1(desmoglein 1, DSG-1)和抗菌肽-37(LL-37)降解,破坏 AD 患者的皮肤屏障功能,导致经表皮失水量增加,并能诱导皮肤炎症[1]。基于以上研究,抑制表皮优势菌群的活性逐渐成为 AD 的治疗策略之一。

外用药物作用于皮肤不仅对表皮的优势菌群有影响,同时影响角质形成细胞和部分炎症细胞。在 AD 的研究中,药物对人永生化角质形成细胞(HaCaT)和鼠巨噬细胞(RAW264.7)的多重影响也具有重要的研究价值。有研究表明,Staphylococcus hominis A9(ShA9)对 AD 小鼠体表的金黄色葡萄球菌具有杀伤作用,并能抑制金黄色葡萄球菌分泌多种毒素,具有较高的安全性[7]。针对金黄色葡萄球菌的靶向治疗或共生微生物群的修饰,有望成为未来 AD 治疗领域的新兴研究方向[8]。中药外用治疗 AD 亦显示出独特优势。部分从植物中提取的药物在治疗 AD 的过程中表现出抑制金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的作用。有研究表明,芹菜素、皂苷、木犀草素等中药提取物,在发挥抗炎、抗过敏作用的同时,也能抑制金黄色葡萄球菌的活性[9-14]。

中医认为 AD 与风、湿、热邪有关,风胜则痒、热胜则痛、湿邪重浊黏腻。马齿苋具有清热解毒、凉血止血作用,亦能清除过敏性疾病中的病理因素。研究表明,马齿苋提取物外用对 2,4-二硝基氟苯诱发的 AD 小鼠具有治疗作用。该提取物不仅能明显降低 AD 小鼠的细胞因子如白细胞介素(interleukin, IL)-31、IL-4、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)、胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)等表达,还能增加丝聚蛋白的表达,修复皮肤的屏障功能[15]。但是,目前有关马齿苋对 AD 优势菌群金黄色葡萄球菌和表皮白葡萄球菌活性的研究较少,且其对 HaCaT 细胞和 RAW264.7 细胞影响的比较研究亦不充分。从中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)中查询到,阿魏酸和绿原酸是存在于马齿苋中的两种酚类化合物,两者均可在一定程度上抑制金黄色葡萄球菌和表皮白葡萄球菌活性[9],同时也可抑制 HaCaT 细胞和 RAW264.7 细胞活性。本研究将阿魏酸和绿原酸对上述两种菌群和两种细胞的抑制作用进行对比研究,为进一步探索和提取马齿苋的有效活性成分提供科学依据。

1　材料

1.1　菌种　金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、表皮白葡萄球菌(ATCC12228)均来自北京生物保藏中心。将菌株取出后,在哥伦比亚血琼脂平板上培养,每 24 h 转种 1 次。

1.2　细胞　人永生化角质形成细胞(HaCaT,上海

赛百慷生物技术股份有限公司，批号：ICELL－H066）；RAW264.7 细胞（武汉普诺赛生命科技有限公司，批号：ICELL－R100）。

1.3　试剂　DMEM 高糖培养基（含双抗）（凯基生物科技有限公司，货号：KGM12800－500）；胎牛血清（勃林格殷格翰公司，货号：04－001－1ACS）；0.25% 胰蛋白酶消化液（不含 EDTA 和酚红）、噻唑蓝（MTT）、脂多糖（lipopolysaccharides，LPS）（北京索莱宝科技有限公司，货号：T1350－100、M8180－1G、L8880－10）；阿魏酸、绿原酸（纯度≥98%，成都克洛玛生物科技有限公司，批号：537－98－4、327－97－9）；营养肉汤（青岛海博生物技术有限公司，批号：20201116）；哥伦比亚血琼脂平板（常德比克曼生物科技有限公司，批号：20201202）。

2　方法

2.1　试剂配制　阿魏酸和绿原酸分别用 1 mL DMSO 稀释后，配制成药物储备液，并用 0.22 μm 滤网过滤后备用。1 g 噻唑蓝用 200 mL 无菌 PBS 稀释后，用 0.22 μm 滤网过滤，分装入 10 mL 离心管备用，避光－80 ℃冰箱保存。另取 2 g 营养肉汤粉剂，溶于 100 mL 纯水中，搅拌均匀，120 ℃高压蒸汽灭菌 30 min，4 ℃冰箱保存备用。

2.2　微孔稀释法配制含药培养基　采用 96 孔板微孔稀释法分别测定 2 种药物对 2 种细菌活性的抑制作用。阿魏酸的分子式是 $C_{10}H_{10}O_4$，采用倍比稀释法配制含药培养基（灭菌肉汤培养基），药物浓度分别是 60、120、240、480、960、1 920、3 840、7 680、15 360 μmol·L^{-1}。绿原酸的分子式是 $C_{16}H_{18}O_9$，浓度与阿魏酸相同。

2.3　细菌活性检测　将配制好的菌液（金黄色葡萄球菌、表皮白葡萄球菌）加入 96 孔板内，每孔 10 μL；之后加入配制好的含药培养基，每孔 100 μL，每个浓度设置 3 个复孔。采用 4 个 96 孔板进行检测，编号为 1 号板、2 号板、3 号板及 4 号板。1 号板用于检测阿魏酸和绿原酸对金黄色葡萄球菌活性的影响，2 号板用于检测阿魏酸和绿原酸对金黄色葡萄球菌生物膜的影响，3 号板用于检测阿魏酸和绿原酸对表皮白葡萄球菌的影响，4 号板用于检测阿魏酸和绿原酸对表皮白葡萄球菌生物膜的影响。

将上述 4 个 96 孔板放入 37 ℃培养箱中，培养 24 h。取 0.5% MTT 溶液 2 mL，加入 18 mL 肉汤培养基，配制成 0.05% MTT 溶液。从培养箱中取 1 号板和 3 号板，吸弃肉汤培养基，加入 0.05% MTT 溶液，每孔 100 μL，37 ℃培养箱中继续培养 30 min。吸弃 MTT 溶液，加入 DMSO 溶解多余的甲瓒，每孔 100 μL[16]。摇床孵育 5 min，采用多功能酶标仪在 490 nm 波长处检测光密度值。

2.4　细菌生物膜活性检测　取 2 号板和 4 号板，吸弃培养基，每孔加入 100 μL 生理盐水洗 3 次。然后，每孔加入 0.01% 结晶紫溶液 100 μL，室温静置 5 min。吸弃结晶紫溶液，加入 30% 乙酸，室温静置 5 min。最后，采用多功能酶标仪在 595 nm 波长处检测光密度值。

2.5　HaCaT 细胞毒性实验　将处于对数生长期的 HaCaT 细胞用胰酶消化并离心后，加入新培养基重悬，细胞密度为 1×10^5 mL^{-1}。取 96 孔板，加入 200 μL 细胞悬液，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。每孔分别加入不同浓度阿魏酸或绿原酸（0、15、30、60、120、240、480、960、1 920 μmol·L^{-1}）200 μL，每个浓度设置 3 个复孔。继续培养 24 h 后弃液，加入 MTT 溶液培养 2 h 后弃液，每孔加入 150 μL DMSO 溶解多余的甲瓒，在摇床上以 90 r·min^{-1} 振荡 10 min 后，在 490 nm 波长下检测光密度值。

2.6　RAW264.7 细胞毒性实验　将 RAW264.7 细胞用 2 mL 完全培养基重悬后，移入 100 mm 细胞培养皿中，每皿 1 mL，并用 8 mL 培养基混匀。放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。取出细胞培养皿，吹打细胞，1 000 r·min^{-1} 离心 5 min，弃液。细胞沉淀用 20 mL 完全培养基混匀后，加入 96 孔板，每孔 200 μL，继续培养 24 h，用 0.1% LPS 进行干预，后续给药、换液、检测程序同 2.5。

2.7　统计学方法　采用 GraphPad Prism 8.0 软件分析数据，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。若数据服从正态分布，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析；若数据不服从正态分布，采用非参数检验。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　阿魏酸或绿原酸对 2 种细菌活性的影响

3.1.1　阿魏酸对 2 种细菌活性的影响　MTT 检测

显示,阿魏酸浓度为 15 360 μmol·L^{-1}时,金黄色葡萄球菌活性降低($P<0.000\ 05$);阿魏酸浓度为 960 μmol·L^{-1} 和 1 920 μmol·L^{-1}时,金黄色葡萄球菌活性增强($P<0.05$),见表 1。

阿魏酸浓度为 15 360 μmol·L^{-1}时,表皮白葡萄球菌活性降低($P<0.05$);低于此浓度时,表皮白葡萄球菌活性无显著变化($P>0.05$),见表 1。

表 1　不同浓度阿魏酸干预 2 种细菌活性比较　($\bar{x}\pm s$)

浓度(c/μmol·L^{-1})	金黄色葡萄球菌的存活率/%	表皮白葡萄球菌的存活率/%
0	99.99±3.38	100.00±10.34
60	93.22±4.21	97.57±4.75
120	93.86±3.60	118.50±13.49
240	100.53±3.18	98.81±22.98
480	107.65±3.57	103.35±4.49
960	107.11±3.93*	102.52±18.04
1 920	113.72±2.34**	99.17±17.48
3 840	107.85±3.65	104.59±7.88
7 680	100.13±5.95	74.88±10.6
15 360	51.53±6.22****	33.39±5.20*

注:与 0 μmol·L^{-1}比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.005$,$^{****}P<0.000\ 05$。

3.1.2　绿原酸对 2 种细菌活性的影响　MTT 检测显示,绿原酸浓度低于 15 360 μmol·L^{-1}时,金黄色葡萄球菌活性无显著变化($P>0.05$),见表 2。

绿原酸浓度为 15 360 μmol·L^{-1}时,表皮白葡萄球菌活性降低($P<0.000\ 05$);低于此浓度时,表皮白葡萄球菌活性无显著变化($P>0.05$),见表 2。

表 2　不同浓度绿原酸干预 2 种细菌活性比较　($\bar{x}\pm s$)

浓度(c/μmol·L^{-1})	金黄色葡萄球菌的存活率/%	表皮白葡萄球菌的存活率/%
0	100.05±13.91	100.00±3.99
60	89.19±3.10	73.70±3.12
120	99.56±9.41	93.51±9.16
240	93.26±12.59	133.87±8.14
480	98.41±12.03	136.28±22.35
960	106.39±11.88	142.91±8.78
1 920	100.62±10.74	126.77±1.94
3 840	76.46±4.91	131.13±5.57
7 680	69.73±4.79	79.80±1.84
15 360	5.62±0.49	8.99±1.28****

注:与 0 μmol·L^{-1}比较,$^{****}P<0.000\ 05$。

3.1.3　阿魏酸对 2 种细菌生物膜活性的影响　阿魏酸浓度为 960、3 840、7 680、15 360 μmol·L^{-1}时,金黄色葡萄球菌生物膜活性降低($P<0.05$)。随着阿魏酸浓度增加,金黄色葡萄球菌生物膜活性呈现出下降趋势,见表 3。

阿魏酸浓度为 960 μmol·L^{-1}、15 360 μmol·L^{-1}时,表皮白葡萄球菌生物膜活性增强($P<0.05$),见表 3。

表 3　不同浓度阿魏酸干预 2 种细菌生物膜活性比较　($\bar{x}\pm s$)

浓度(c/μmol·L^{-1})	金黄色葡萄球菌生物膜活性/%	表皮白葡萄球菌生物膜活性/%
0	100.00±0.58	100.00±5.07
60	80.13±5.23	102.18±4.09
120	100.57±3.31	119.58±4.21
240	75.73±16.15	121.59±0.50
480	94.29±1.84	117.78±2.78
960	63.84±11.98*	134.45±10.55*
1 920	67.18±0.20	126.51±5.75
3 840	58.09±0.60**	120.06±12.03
7 680	36.18±4.39***	118.62±5.14
15 360	28.22±1.26****	142.29±5.72**

注:与 0 μmol·L^{-1}比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.005$,$^{***}P<0.000\ 5$,$^{****}P<0.000\ 05$。

3.1.4　绿原酸对 2 种细菌生物膜活性的影响　绿原酸浓度为 3 840、7 680、15 360 μmol·L^{-1}时,金黄色葡萄球菌生物膜活性降低($P<0.000\ 05$)。低于此浓度时,金黄色葡萄球菌生物膜活性无显著变化($P>0.05$)。随着绿原酸浓度增加,金黄色葡萄球菌生物膜活性呈现出下降趋势,见表 4。

绿原酸浓度为 60 μmol·L^{-1}、15 360 μmol·L^{-1}时,表皮白葡萄球菌生物膜活性降低($P<0.05$),见表 4。

表 4　不同浓度绿原酸干预 2 种细菌生物膜活性比较　($\bar{x}\pm s$)

浓度(c/μmol·L^{-1})	金黄色葡萄球菌生物膜活性/%	表皮白葡萄球菌生物膜活性/%
0	100.01±2.58	100.00±1.82
60	103.48±8.24	84.92±2.47*
120	104.37±3.61	96.14±3.75
240	106.45±2.28	97.24±1.17
480	99.15±1.19	87.01±2.40
960	99.16±1.19	98.93±1.86
1 920	81.80±2.82	106.03±2.75
3 840	63.59±3.34****	100.78±1.60
7 680	48.08±1.10****	96.54±3.89
15 360	30.92±0.45****	84.36±3.57*

注:与 0 μmol·L^{-1}比较,$^{*}P<0.05$,$^{****}P<0.000\ 05$。

3.2　阿魏酸或绿原酸对 2 种细胞活性的影响

3.2.1　阿魏酸对 2 种细胞活性的影响　MTT 检测显示，阿魏酸浓度低于 1 920 μmol · L^{-1}时，HaCaT 细胞和 RAW264.7 细胞存活率无显著变化（$P > 0.05$），见表 5。

表 5　不同浓度阿魏酸干预 2 种细胞存活率比较　（$\bar{x} \pm s$）

浓度（c/μmol · L^{-1}）	HaCaT 细胞存活率/%	LPS 诱导的 RAW264.7 细胞存活率/%
0	100.00 ± 0.54	100.06 ± 2.39
15	102.02 ± 2.56	92.08 ± 8.62
30	92.23 ± 1.10	75.59 ± 13.77
60	96.96 ± 1.67	74.50 ± 7.14
120	93.66 ± 3.22	81.04 ± 6.01
240	101.45 ± 8.12	91.14 ± 7.13
480	91.52 ± 2.50	86.12 ± 7.34
960	80.57 ± 3.51	84.91 ± 4.55
1 920	86.67 ± 0.23	63.39 ± 5.83

3.2.2　绿原酸对 2 种细胞活性的影响　MTT 检测显示，绿原酸浓度为 1 920 μmol · L^{-1}时，HaCaT 细胞存活率降低（$P < 0.000\ 5$），见表 6。

绿原酸浓度为 30、120、240、480、960、1 920 μmol · L^{-1} 时，LPS 诱导的 RAW264.7 细胞存活率降低（$P < 0.005$），见表 6。

表 6　不同浓度绿原酸干预 2 种细胞存活率比较　（$\bar{x} \pm s$）

浓度（c/μmol · L^{-1}）	HaCaT 细胞存活率/%	LPS 诱导的 RAW264.7 细胞存活率/%
0	100.00 ± 0.54	100.06 ± 2.39
15	95.79 ± 1.21	101.35 ± 0.90
30	94.17 ± 2.71	91.42 ± 0.83**
60	98.07 ± 2.73	94.06 ± 0.73
120	100.31 ± 8.84	89.33 ± 1.48***
240	102.64 ± 8.78	86.97 ± 1.44****
480	92.58 ± 8.20	79.37 ± 1.22****
960	74.37 ± 6.47	65.37 ± 0.21****
1 920	55.43 ± 0.40***	51.61 ± 0.75****

注：与 0 μmol · L^{-1}比较，** $P < 0.005$，*** $P < 0.000\ 5$，**** $P < 0.000\ 05$。

4　讨论

4.1　中药外用治疗 AD 的有效性分析　相比于激素治疗 AD 的效力而言，中药在 AD 治疗中的有效性受到广泛关注。一项关于“三草方”的研究表明，薄荷、牡丹皮等外用不仅能够缓解 AD 的瘙痒症状，还能降低皮损组织内 IL－1、IL－6、IL－8、TNF－α、趋化因子 2（C C motif ligand 2，CCL2）等表达，以及减少 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中一氧化氮（nitric oxide，NO）的产生[17]。复方中药皮炎软膏能够改善 AD 症状，组成包括黄连、黄芩、当归、姜黄、地黄、芝麻油，具有抗菌、抗炎、抗过敏等多重功效。该软膏通过抑制血清中 Th1/2 细胞因子的产生，c－Jun 氨基末端激酶（c－Jun N－terminal kinase，JNK）、细胞外信号调节激酶（extracellular signal－regulated kinase，ERK）、p38、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen－activated protein kinase，MAPK）及核因子－κB（nuclear factor－κB，NF－κB）的磷酸化，下调瘙痒相关 P 物质水平，显著改善 AD 症状[18]。三七皂苷 R1 是三七的独特成分之一，在 AD 治疗中发挥抗炎、抗过敏等作用。细胞实验证明，三七皂苷 R1 能够降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 IL－1、IL－6β、TNF－α、NO 表达，从而减轻炎症反应[19]。由金银花、牡丹皮、薄荷、黄柏、白术组成的复方制剂，在治疗 AD、哮喘等多种过敏性疾病中发挥抗炎、抗过敏等作用，并能降低卵清蛋白诱导的 AD 小鼠模型血清 IgG、TNF－α、IL－10 水平，增加 Th1/2 型辅助性 T 细胞的比值，从而缓解过敏性疾病的症状[20]。苦参的提取物苦参碱通过降低钙通道活性从而抑制瘙痒[21]。从人参中分离的寡糖通过改善皮肤屏障功能来缓解 AD 症状[22]。综上，这些中药通过调节多种促炎细胞因子如 IL－4、IL－6、TNF－α、NF－κB 的表达，从而达到抗炎、抗过敏的疗效。

4.2　中药外用对体表菌群及细胞的影响　中药外用治疗 AD 主要作用于体表菌群、角质形成细胞及部分炎症细胞。健康个体的皮肤表面有多种常驻菌群和暂住菌群，包括金黄色葡萄球菌和表皮白葡萄球菌。在 AD 患者的皮肤表面，金黄色葡萄球菌和表皮白葡萄球菌作为优势菌群，分泌多种毒素影响其他细菌的增殖，破坏表皮的生物多样性，进而加重炎症反应。马齿苋具有治疗 AD 的作用，抑制皮肤常驻菌群和暂住菌群的定殖是其作用机制之一。阿魏酸和绿原酸是马齿苋的两种提取物，两者对金黄色葡萄球菌和表皮白葡萄球菌的活性及生物膜形成均具有抑制作用。结果显示，阿魏酸在较高浓度（7 680 μmol · L^{-1}）时，对金黄色葡萄球菌和表皮白葡萄球菌活性具有显著抑制作用。

细菌的生物膜作为最外层结构，发挥着关键的

机械屏障功能，对维护细菌生理功能及对抗生素的抗性均具有重要作用[23]，破坏细菌的生物膜有助于达到更好的抑菌效果。本研究中，阿魏酸在 960 μmol·L^{-1} 浓度时，绿原酸从 3 840 μmol·L^{-1} 浓度开始，对金黄色葡萄球菌生物膜具有显著抑制作用，且随着药物浓度的升高，生物膜形成具有下降趋势。但是，阿魏酸、绿原酸对表皮白葡萄球菌生物膜形成的抑制作用并不显著，在所检测浓度范围内未观察到明显变化趋势。通过分析阿魏酸、绿原酸对两种细菌生物膜形成的影响，可以看出其对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制作用优于表皮白葡萄球菌。

4.3　中药外用对角质细胞及炎症细胞的影响　阿魏酸、绿原酸主要作用于皮肤表面，两者也与表皮的角质形成细胞和一些炎症细胞直接接触。本研究采用 HaCaT 细胞和 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞模拟了中药单体作用于皮肤的状态，以评估两种单体对细胞存活状态的影响。结果显示，阿魏酸对两种细胞活性无明显作用，绿原酸对 HaCaT 细胞活性无显著影响。但绿原酸从 120 μmol·L^{-1}浓度开始，对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活性具有抑制作用，且随着药物浓度升高呈现明显的抑制趋势。

马齿苋是一种药食两用的草本植物，在欧洲和亚洲广泛分布。2020 版《中华人民共和国药典》记载其“性酸、寒，具有清热解毒的作用，用于治疗湿疹等疾病[24]”。湿疹与 AD 均属过敏性疾病，部分反复发作且有家族史的湿疹病例已被纳入 AD 范畴。中医将湿疹称为“湿疮”，《丹溪心法》中记载“马齿苋膏治疗两肩背湿疮疼痒”[25]。《全生类要湖海奇方》记载其“治下部湿疮热痒而痛或寒热或身面微肿，以马齿苋四两，青黛一两研烂涂之立效”，可见马齿苋外用治疗湿疮具有一定的功效。

中药外治法在 AD 治疗中具有多方面的积极作用，不仅能够调节皮肤表面菌群平衡，而且有助于改善皮肤屏障功能，并对炎症细胞产生影响。但是，这些影响的具体作用机制尚需深入研究，明确具体作用靶点，将为中医药国际化进程提供坚实基础。

参考文献：

[1] BOGUNIEWICZ M, LEUNG D Y. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation[J]. Immunol Rev, 2011, 242(1): 233 – 246.

[2] GONZALEZ T, BIAGINI M J M, HERR A B, et al. Staphylococcal biofilms in atopic dermatitis[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2017, 17(12): 81.

[3] WILLIAMS M R, NAKATSUJI T, GALLO R L. Staphylococcus aureus: master manipulator of the skin[J]. Cell Host Microbe, 2017, 22(5): 579 – 581.

[4] LIU H Y, ARCHER N K, DILLEN C A, et al. Staphylococcus aureus epicutaneous exposure drives skin inflammation via IL – 36 – mediated T cell responses[J]. Cell Host Microbe, 2017, 22(5): 653 – 666.

[5] NAKAGAWA S, MATSUMOTO M, KATAYAMA Y, et al. Staphylococcus aureus virulent PSMα peptides induce keratinocyte alarmin release to orchestrate IL – 17 – dependent skin inflammation[J]. Cell Host Microbe, 2017, 22(5): 667 – 677.

[6] GEOGHEGAN J A, IRVINE A D, FOSTER T J. Staphylococcus aureus and atopic dermatitis: a complex and evolving relationship[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(6): 484 – 497.

[7] NAKATSUJI T, HATA T R, TONG Y, et al. Development of a human skin commensal microbe for bacteriotherapy of atopic dermatitis and use in a phase 1 randomized clinical trial[J]. Nat Med, 2021, 27(4): 700 – 709.

[8] NAKATSUJI T, CHEN T H, NARALA S, et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against Staphylococcus aureus and are deficient in atopic dermatitis[J]. Sci Transl Med, 2017, 9(378): eaah4680.

[9] PARK C H, MIN S Y, YU H W, et al. Effects of apigenin on RBL – 2H3, RAW264.7, and HaCaT cells: anti – allergic, anti – inflammatory, and skin – protective activities[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(13): 4620.

[10] AN E J, KIM Y, LEE S H, et al. Ophiopogonin D ameliorates DNCB – induced atopic dermatitis – like lesions in BALB/c mice and TNF – α – inflamed HaCaT cell[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 522(1): 40 – 46.

[11] SINHA A, SURESH P K. Enhanced induction of apoptosis in HaCaT cells by luteolin encapsulated in PEGylated liposomes – role of caspase – 3/caspase – 14[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 188(1): 147 – 164.

[12] USMAN A M, KHURRAM M, KHAN T A, et al. Effects of luteolin and quercetin in combination with some conventional antibiotics against methicillin – resistant Staphylococcus aureus[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11): 1947.

[13] CHENG M J, ZHANG L, ZHANG H, et al. An ointment consisting of the phage lysin LysGH15 and apigenin for decolonization of methicillin – resistant Staphylococcus aureus from skin wounds[J]. Viruses, 2018, 10(5): 244.

[14] CHEN X Y, QIAN F, WANG Y Y, et al. Ginsenoside 20 (S) - Rh2 promotes cellular pharmacokinetics and intracellular antibacterial activity of levofloxacin against Staphylococcus aureus through drug efflux inhibition and subcellular stabilization[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(11): 1930 - 1941.

[15] LV W J, HUANG J Y, LI S P, et al. Portulaca oleracea L. extracts alleviate 2, 4 - dinitrochlorobenzene - induced atopic dermatitis in mice[J]. Front Nutr, 2022, 9: 986943.

[16] GHASEMI M, TURNBULL T, SEBASTIAN S, et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single - cell analysis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12827.

[17] WU X X, SIU W S, WAT C L, et al. Effects of topical application of a tri - herb formula on inflammatory dry - skin condition in mice with oxazolone - induced atopic dermatitis[J]. Phytomedicine, 2021, 91: 153691.

[18] ZHANG R R, ZHANG H Y, SHAO S, et al. Compound traditional Chinese medicine dermatitis ointment ameliorates inflammatory responses and dysregulation of itch - related molecules in atopic dermatitis[J]. Chin Med, 2022, 17(1): 3.

[19] WANG M M, MA J L. Effect of NGR1 on the atopic dermatitis model and its mechanisms[J]. Open Med, 2019, 14: 847 - 853.

[20] LI P, TSANG M S, KAN L L, et al. The immuno - modulatory activities of pentaherbs formula on ovalbumin - induced allergic rhinitis mice via the activation of Th1 and Treg cells and inhibition of Th2 and Th17 cells[J]. Molecules, 202, 27(1): 239.

[21] GENG X, SHI H, YE F, et al. Matrine inhibits itching by lowering the activity of calcium channel[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 11328.

[22] LI Z Z, JIANG R, JING C X, et al. Protective effect of oligosaccharides isolated from Panax ginseng C. A. Meyer against UVB - induced skin barrier damage in BALB/c hairless mice and human keratinocytes[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 283: 114677.

[23] 李弘昊, 温红侠. 细菌生物膜治疗研究新进展[J]. 中国临床研究, 2022, 35(12): 1758 - 1761, 1766.

[24] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 51.

[25] 朱震亨. 丹溪心法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.

收稿日期: 2024 - 11 - 13

作者简介: 朱克彬(1982 -), 男, 河南郑州人, 主治医师, 研究方向: 中医药治疗皮肤病的临床与基础研究。

通信作者: 牛蔚露(1983 -), 女, 河南荥阳人, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 中医药治疗皮肤病的临床与基础研究。E - mail: 604381583@qq.com

编辑: 刘凯歌