



异甘草酸镁抗小鼠接触性过敏性皮炎的药效学研究

徐建国, 刘继勇, 彭程, 刘亚明, 胡晋红*

(第二军医大学 长海医院 药学部, 上海 200433)

[摘要] 目的: 考察异甘草酸镁注射液对小鼠接触性过敏性皮炎 (allergy contact dermatitis, ACD) 的治疗作用。方法: 采用 1% 2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 对小鼠腹部致敏和耳部激发建立小鼠接触性过敏性皮炎模型, 各组动物于致敏后开始尾静脉注射给药。激发后 24 h 考察耳部水肿红斑评分, 检测耳肿胀度变化, 检测激发后血清 INF- γ , IgE, IL-4 等细胞因子水平, 并对耳部皮肤组织进行病理组织学检查。结果: 异甘草酸镁注射液中、高剂量组及阳性对照组较模型组能显著降低小鼠耳部肿胀度, 显著抑制小鼠耳部水肿红斑形成 ($P < 0.05$), 异甘草酸镁注射液高剂量组和阳性对照组能显著降低血清 INF- γ 水平 ($P < 0.05$) 和 IgE 水平 ($P < 0.05$)。异甘草酸镁注射液还能明显改善耳部组织的炎性细胞浸润、血管扩张等炎症性病理改变。结论: 异甘草酸镁注射液对小鼠接触性过敏性皮炎有治疗作用, 这种作用可能与降低 INF- γ 和 IgE 的分泌有关。

[关键词] 异甘草酸镁注射液; 过敏性接触性皮炎; 干扰素 γ

过敏性接触性皮肤炎症是临床常见的一类皮肤病, 病因和发病机制复杂, 因其常伴有皮肤搔痒丘疹等症而严重影响生活质量。在临床治疗这类疾病中, 传统用药主要集中于 H1 受体拮抗剂和糖皮质激素类药物, 但由于这类药物的明显副作用, 使其在临床的应用受到很大限制, 新药的研发成为临床的迫切需求。甘草具有抗炎湿疹的作用, 欧阳雁红等^[1]制作的复方甘草软膏制剂, 在治疗过敏性皮炎和皮肤瘙痒症中取得了良好的疗效, 甘草中有效成分的研究, 必将为皮炎湿疹的临床治疗提供更多新的选择。异甘草酸镁注射液 (magnesium isoglycyrrhizinate, MgIG) 属于第 4 代甘草类制剂, 其主要成分异甘草酸镁系从甘草中提取的甘草酸经碱催化异构化后成盐精制而得, 具有抗炎、抗氧化、提高机体抗病毒能力等生物学作用, 目前主要作为保护肝脏的药物而应用于临床^[2], 其抗皮炎湿疹作用国内还没有报道。本研究通过建立小鼠过敏性接触性皮炎模型, 以临床治疗皮炎湿疹的美能注射液 (compound glycyrrhizin injection, CG, 主要有效成分为甘

草酸单铵盐) 为阳性对照药, 考察 MgIG 是否具有抗过敏性皮炎的疗效, 并通过观察 IL-4, IgE 和 IFN- γ 产生或表达水平的影响来探讨其可能的抗炎机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 ICR 小鼠, 雄性, 体重 (25 \pm 5) g, 4 ~ 5 周, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (沪) 2007-0003。

1.2 药品与试剂 异甘草酸镁注射液 (连云港正大天晴制药有限公司, 批号 0803052, 5 g \cdot L⁻¹); 美能注射液 (含甘草酸单铵盐 2.65 g \cdot L⁻¹, 日本米诺株式会社); 2,4 二硝基氟苯 (DNFB, 德国 Merck 公司, 分析纯); 小鼠 IL-4, IgE 和 INF- γ ELISA 试剂盒 (R&D Systems, Minneapolis, MN, 美国)。

1.3 仪器 测厚仪 (桂林广陆数字测控股份有限公司, 精度 10 μ m); KryoStat1720 石蜡切片机 (美国); BX50F4 光学显微镜 (日本 Olympus)。

2 方法

2.1 小鼠模型建立 参照《药理实验方法学》用 DNFB 丙酮橄榄油溶液 (丙酮-橄榄油 4:1) 致敏和激发小鼠皮肤建立小鼠过敏性接触性皮炎 (ACD) 模型^[3]。ICR 小鼠正常饲养于 SPF 屏障系统内 1 周, 于实验前 1 天腹部脱毛, 范围约 3 cm \times 3 cm, 实验第 1 天脱毛部位均匀涂以 1% DNFB 丙酮橄榄油溶液 50 μ L 致敏, 实验第 2 天重复强化致敏 1 次。实验第 5 天, 小鼠双耳各均匀涂 1% DNFB 丙酮橄榄油

[稿件编号] 20091012002

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30801557)

[通信作者] * 胡晋红, Tel: (021) 81873747, E-mail: hujh@smmu.edu.cn

[作者简介] 徐建国, 硕士研究生, 研究方向为皮肤药理学, Tel: (021) 81873724, E-mail: chxdejia@hotmail.com



溶液 10 μL 进行激发。正常对照组在相同部位仅涂以丙酮橄榄油溶液(丙酮-橄榄油 4:1)作对照。

2.2 分组与给药 将 48 只小鼠随机分为 6 组, 每组 8 只, 分别为正常组、模型组、异甘草酸镁注射液低剂量组(5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中剂量组(10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高剂量组(20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、阳性药物美能注射液组(8 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 以所含甘草酸单铵盐计)。小鼠按上述分组方法于致敏后每日尾静脉注射给药, 药物以生理盐水稀释至 0.5 mL 后尾静脉注射, 模型组给予等体积的生理盐水注射。造模成功并采集完水肿红斑评分和肿胀度数据后, 各组动物以摘眼球法取血, 随后颈椎脱臼处死, 取下小鼠双耳于 4% 中性多聚甲醛溶液中固定。

2.3 小鼠耳肿胀度 在激发前及激发后 24 h 以测厚仪测定小鼠双侧耳肿胀度, 并对激发后耳水肿红斑程度进行评分, 无红斑 0 分, 轻微可见红斑 1 分, 中度红斑 2 分, 严重红斑 3 分, 水肿性红斑 4 分; 无水腫 0 分, 轻度水肿 1 分, 中度水肿 2 分, 严重水肿 3 分。

2.4 耳组织标本病理组织学检查 取下的耳组织标本在 4% 中性多聚甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 切片厚 4 μm , 行 HE 染色, 在光镜下观察耳组织的病理变化。

2.5 ELISA 检测 血标本离心取上层血清, 采用 ELISA 试剂盒, 依照试剂盒说明书进行试验, 检测血清 IFN- γ , IgE, IL-4 水平, 并计算药物对细胞因子的抑制率(inhibition ratio, IR), $\text{IR} = (1 - \text{药物组数据} / \text{模型组数据}) \times 100\%$ 。

2.6 数据处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 组间比较采用 ANOVA One-way 检验和 SNK- q 检验。

3 结果

3.1 异甘草酸镁注射液对小鼠过敏性接触性皮炎模型耳红肿程度的影响 小鼠耳部激发 24 h 后模型组小鼠耳肿胀度明显($P < 0.01$), 与模型相比, 不同浓度异甘草酸镁注射液和阳性药物美能注射液不同程度的抑制了小鼠耳肿胀程度, 其中异甘草酸镁注射液中、高剂量组及阳性对照药组与模型组相比, 均具有显著差异($P < 0.05$)。表明异甘草酸镁注射液能够减轻小鼠 ACD 模型耳肿胀度, 且具有剂量依赖性, 见表 1。与模型组相比各给药组小鼠耳水肿红斑评分值有不同程

度降低, 其中异甘草酸镁注射液中、高剂量组及阳性对照药组与模型组相比, 均具有显著差异($P < 0.05$)。表明异甘草酸镁注射液能够减轻小鼠 ACD 模型耳水肿红斑评分值, 见表 1。

表 1 异甘草酸镁注射液对小鼠耳肿胀度和水肿红斑评分值的影响($n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肿胀度/mm	红斑评分
对照	-	0.01 \pm 0.01	-
模型	-	0.18 \pm 0.07 ¹⁾	5.88 \pm 1.64
异甘草酸镁	5	0.16 \pm 0.04	5.50 \pm 0.93
	10	0.12 \pm 0.04 ²⁾	3.71 \pm 0.76 ²⁾
	20	0.11 \pm 0.06 ²⁾	3.75 \pm 1.39 ²⁾
美能注射液	8	0.14 \pm 0.06 ²⁾	3.88 \pm 1.13 ²⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 异甘草酸镁注射液对小鼠过敏性接触性皮炎模型耳皮肤炎症的影响 小鼠耳部经 1% DNFB 丙酮橄榄油溶液激发后, 整个耳部逐渐出现充血肿胀, 小鼠搔抓明显, 与对照组比较模型中真皮层明显水肿增厚, 血管扩张, 真皮层可见大量中性粒细胞、淋巴细胞浸润, 可见有少量嗜酸性粒细胞浸润。给药处理后水肿可明显减轻, 炎性细胞浸润也相应减少。表明异甘草酸镁注射液能够改善小鼠 ACD 模型耳部炎症病理改变, 见图 1。

3.3 异甘草酸镁注射液对小鼠过敏性接触性皮炎模型血清 IFN- γ , IL-4 和 IgE 的影响 采用 ELISA 法检测血清 IFN- γ , IgE, IL-4 水平。模型组和对照组比较, 血清 IgE, IFN- γ 有明显的升高($P < 0.05$), 药物干预后出现剂量依赖性的下降趋势; 从抑制率可以明显看出, 异甘草酸镁注射液能较强的抑制血清 IgE, IFN- γ 水平; 而血清 IL-4 水平变化不明显。表明异甘草酸镁注射液能够减轻小鼠 ACD 模型血清 IgE, IFN- γ 等炎症因子的改变。见表 2。

4 讨论

接触性过敏性皮炎属于皮肤迟发型超敏反应, 是一种 T 细胞介导的细胞免疫反应, 参与的细胞包括 Th1 细胞, 1 型细胞毒细胞(Tc1), 以及 Th2 型细胞^[4]。本实验中建立的 ACD 模型是较为经典的动物模型, 成功模拟了由 Th1 细胞和 Tc1 细胞介导的抗原特异性皮肤过敏反应。

甘草酸为甘草的主要活性成分, 天然甘草酸中存在 18 α 体和 18 β 体结构, 异甘草酸镁是单一构型的 18 α 体甘草酸制剂, 具有亲脂性好, 抗炎活性强,

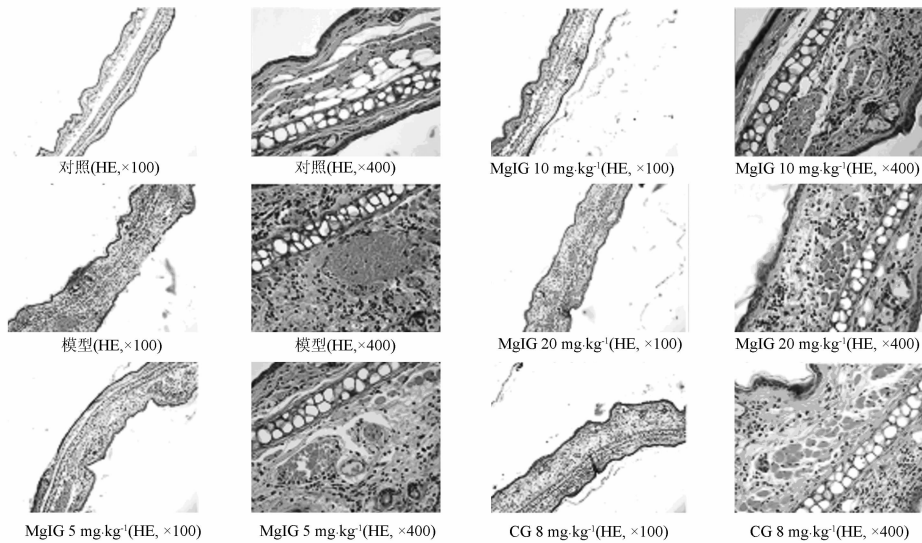


图 1 小鼠各组耳组织标本病理组织切片

表 2 异甘草酸镁注射液对 ACD 模型小鼠血清细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	IFN- γ /ng · L ⁻¹	IgE/ μ g · L ⁻¹	IL-4/ng · L ⁻¹	IR ₁ /%	IR ₂ /%
对照	-	35.70 \pm 6.00	66.75 \pm 21.56	21.33 \pm 5.13	-	-
模型	-	64.63 \pm 19.67 ¹⁾	94.54 \pm 35.44 ²⁾	25.10 \pm 7.18	-	-
异甘草酸镁	5	56.68 \pm 19.23	72.99 \pm 23.82	20.21 \pm 9.26	8.28 \pm 9.31	10.28 \pm 12.71
	10	48.65 \pm 9.02	43.41 \pm 11.74 ³⁾	22.99 \pm 6.50	12.82 \pm 12.98	40.28 \pm 34.03
	20	43.47 \pm 12.69 ³⁾	24.09 \pm 4.96 ⁴⁾	17.10 \pm 2.87	19.18 \pm 13.82	53.38 \pm 24.01
美能注射液	8	44.58 \pm 7.73 ³⁾	25.77 \pm 6.22 ⁴⁾	17.75 \pm 3.18	17.22 \pm 13.63	50.23 \pm 28.42

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。IR₁为各药物对 IFN- γ 的抑制率; IR₂为各药物对 IgE 的抑制率。

不良反应少等优点^[5]。目前对传统甘草酸制剂 18 β 体甘草酸的研究较为充分,而对 18 α 体甘草酸药理作用的研究仍然较为有限,特别是对抗皮炎的研究还未见报道。本研究通过成功建立小鼠 ACD 模型,考察了异甘草酸镁注射液对模型耳部红肿程度,血清炎性细胞因子水平以及耳部病理形态的影响,实验结果表明,异甘草酸镁能够减轻模型耳部肿胀度和抑制模型水肿红斑形成,同时耳部组织病理检查显示,异甘草酸镁注射液能够减轻模型耳部激发后的水肿、炎性细胞浸润、血管扩张等炎症性改变,说明异甘草酸镁具有良好的抗 ACD 的作用。通过检测血清 IFN- γ , IgE, IL-4 等细胞因子,本实验发现异甘草酸镁能够抑制模型 IFN- γ , IgE 的分泌,大量的 IFN- γ 能够刺激皮肤常驻细胞如角质形成细胞产生大量的细胞因子和趋化因子,从而引起外周炎性细胞对表皮和真皮的浸润,异甘草酸镁通过明显降低

血清 IFN- γ 水平,减少了皮肤炎症因子的级联反应。在临床可以观察到部分病人血清 IgE 水平较高,但也有一部分皮肤过敏患者血清 IgE 水平和正常人群没有明显差别^[6],在本实验中发现小鼠 ACD 模型血清 IgE 水平有明显升高,药物干预后血清 IgE 水平显著下降,说明 IgE 参与了模型炎症反应过程。同时本研究发现由 Th2 型细胞分泌的 IL-4 在本研究模型的血清中没有看到明显的改变。

以上药效学研究表明异甘草酸镁注射液对小鼠过敏性接触性皮炎有良好的治疗作用。异甘草酸镁减轻皮肤炎症反应的抑炎机制,降低血清 IFN- γ , IgE 水平的病理生理机制及分子机制,还有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 欧阳雁红,李宝山,袁素琴. 复方甘草软膏的制备及在治疗过敏性皮炎和皮肤瘙痒症的疗效观察[J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(10): 1028.



- [2] 金娟,许建明,刘晓昌,等. 异甘草酸镁对刀豆蛋白A诱导的小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中华肝脏病杂志,2009,17(5):389.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:1429.
- [4] Wagner A H, Wittjen I, Stojanovic T, et al. Signal transducer and activator of transcription 1 decoy oligodeoxynucleotide suppression of contact hypersensitivity[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008,121(1):158.
- [5] 范益,丁建花,刘苏怡,等. α -和 β -甘草酸在小鼠体内分布的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(6):61.
- [6] Reefer A J, Satinover S M, Wilson B B. The relevance of microbial allergens to the IgE antibody repertoire in atopic and nonatopic eczema[J]. J Allergy Clin Immunol, 2007,120(1):156.

Effect of magnesium isoglycyrrhizinate on allergy contact dermatitis(ACD) in mice

XU Jianguo, LIU Jiyong, PENG Cheng, LIU Yaming, HU Jinhong*

(Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of magnesium isoglycyrrhizinate(MgIG) on allergy contact dermatitis(ACD) in mice. **Method:** The model of ACD was sensitized and challenged by 1% dinitrofluorobenzene(DNFB). 48 SPF grade mice were divided into 6 groups randomly: a control group, a model group, three dosage groups and a positive group. The drug was injected through vena caudalis. The change of ear's swelling and the scores of ear's thickness and erythema of each mouse was observed. The level of INF- γ , IgE, IL-4 in serum was detected by ELISA method. Then the pathologic change of mice ears was using HE staining examined under light microscope. **Result:** MgIG could decrease ($P < 0.05$) the ear's swelling, the scores of ear's thickness and erythema, and INF- γ and IgE level in mice serum. It was observed that MgIG could significantly alleviate the infiltrate of inflam cell and the hemangiectasis in ear tissue. **Conclusion:** Certain concentration of MgIG has significant therapeutic effect on ACD in mice. Therapeutic mechanism of MgIG may be relevant with the suppression of INF- γ and IgE.

[Key words] magnesium isoglycyrrhizinate(MgIG); allergy contact dermatitis(ACD); INF- γ

doi: 10.4268/cjcmm20101020

[责任编辑 张宁宁]