

## [药 理]

**二妙丸对特应性皮炎小鼠皮损炎症及巨噬细胞 MAPK/NF-κB 信号通路的影响**

杨胜晋， 刘燕娇， 鲁诚， 邓世俊， 李婧， 张欣佳， 张祎， 王睿睿， 张丽娟\*  
(云南中医药大学，云南昆明 650500)

**摘要：**目的 探讨二妙丸对特应性皮炎小鼠的缓解作用。**方法** 体内实验：将 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、地塞米松组 (2 mg/kg) 和二妙丸高、中、低剂量组 (4.68、2.34、1.17 g/kg)，采用反复涂抹 DNBC 溶液构建特应性皮炎小鼠模型，造模同时灌胃给药，连续 21 d，观察并记录小鼠背部皮损状况、耳肿胀度、耳片重量差，HE 染色观察皮损组织病理变化，甲苯胺蓝 (TB) 染色观察皮损组织肥大细胞浸润，IHC 法检测皮损组织巨噬细胞标志物 F4/80 表达，ELISA 法检测血清 TSLP、IL-4、IL-5 和总 IgE 水平。体外实验：取对数生长期 RAW264.7 细胞，给予 400、200、100 μg/mL 二妙丸进行干预，CCK-8 法检测细胞增殖情况，Griess 法检测细胞上清液 NO 水平，ELISA 法检测细胞上清液 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平，Western blot 法检测细胞 MAPK/NF-κB 信号通路相关蛋白表达。**结果** 体内实验：与模型组比较，二妙丸高剂量组小鼠背部皮损评分、右耳肿胀度、左右耳片重量差均降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，皮损组织表皮厚度减小，肥大细胞、巨噬细胞浸润减轻 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，血清炎症因子 TSLP、IL-4、IL-5、总 IgE 水平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，皮损组织 F4/80 表达降低 ( $P < 0.01$ )。体外实验：与模型组比较，二妙丸 400、200 μg/mL 组细胞 NO、TNF-α、IL-1β、IL-6 水平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，P38、JNK 和 P65 蛋白磷酸化水平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 二妙丸能够缓解 DNBC 诱导的特应性皮炎小鼠皮损炎症，其机制可能与抑制巨噬细胞 MAPK/NF-κB 信号通路激活，减轻巨噬细胞浸润和降低 Th2 细胞因子有关。

**关键词：**二妙丸；特应性皮炎；巨噬细胞；炎症因子；MAPK/NF-κB 信号通路

**中图分类号：**R285.5      **文献标志码：**A      **文章编号：**1001-1528(2025)11-3591-10

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2025.11.009

## Effects of Er Miao Wan on skin lesion inflammation in atopic dermatitis mice and the MAPK/NF-κB signaling pathway of macrophage

YANG Sheng-jin, LIU Yan-jiao, LU Cheng, DENG Shi-jun, LI Jing, ZHANG Xin-jia, ZHANG Yi, WANG Rui-rui, ZHANG Li-juan\*

(Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

**ABSTRACT: AIM** To explore the relieving effect of Er Miao Wan on atopic dermatitis in mice. **METHODS** *In vivo* experiment: BALB/c mice were randomly divided into normal group, model group, dexamethasone group (2 mg/kg) and high, medium and low dose groups of Er Miao Wan (4.68, 2.34 and 1.17 g/kg). The mouse model of atopic dermatitis was established by repeatedly smearing DNBC solution, and the model was given orally for 21 days. The skin lesion condition on the back of mice, ear swelling degree, and the weight difference between ear lobes were observed and recorded. HE staining was used to observe the histopathological changes in the skin lesion tissues of mice. Toluidine blue (TB) staining was used to observe the infiltration of mast cells in skin lesions.

收稿日期：2025-01-13

基金项目：国家自然基金地区基金项目（81760741, 82160782）；云南省科技厅中医联合专项重点项目（202301AZ070001-006）；云南省科技厅中医联合专项面上项目（202101AZ070001-187）；云南省国医大师工作站（202305AF150029）；云南中医药大学中药学院研究生自主创新研究项目（30271108100）

作者简介：杨胜晋（1998—），女，硕士生，研究方向为药物筛选与评价。Tel: 18608705376, E-mail: 846954360@qq.com

\*通信作者：张丽娟（1978—），女，硕士，讲师，研究方向为中西医结合治疗炎症。Tel: 13108680109, E-mail: zhanglijuan@ynucm.edu.cn

The expression of macrophage marker F4/80 in skin lesions was detected by IHC. The serum levels of TSLP, IL-4, IL-5 and total IgE were detected by ELISA. *In vitro* experiment: RAW264.7 cells in logarithmic growth period were given 400, 200 and 100 µg/mL Er Miao Wan for intervention. Cell proliferation was detected by CCK-8 method. NO level in cell supernatant was detected by Griess method. TNF-α, IL-1β and IL-6 levels in cell supernatant were detected by ELISA method. The expressions of proteins related to the MAPK/NF-κB signaling pathway in cells was detected by Western blot. **RESULTS** *In vivo* experiment: Compared with the model group, the scores of back skin lesions, the swelling degree of right ear and the weight difference between left and right ear pieces in the high-dose group of Er Miao Wan decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), the thickness of skin lesions decreased, the infiltration of mast cells and macrophages decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the inflammatory factors TSLP, IL-4, IL-5 and total IgE levels in serum decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the expression of F4/80 in the skin lesions decreased ( $P<0.01$ ). *In vitro* experiment: Compared with the model group, the levels of NO, TNF-α, IL-1β and IL-6 in Er Miao Wan 400 and 200 µg/mL groups decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the phosphorylation levels of P38, JNK and P65 proteins decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **CONCLUSION** Er Miao Wan can alleviate skin lesion inflammation in DNCB-induced atopic dermatitis mice, and its mechanism may be related to inhibiting the activation of MAPK/NF-κB signaling pathway of macrophage, reducing macrophage infiltration and reducing Th2 cytokines.

**KEY WORDS:** Er Miao Wan; atopic dermatitis; macrophages; inflammatory factors; MAPK/NF-κB signaling pathway

特应性皮炎是常见的过敏性炎症皮肤病之一，临床表现为反复发作的湿疹、皮肤干燥和强烈的瘙痒，严重影响特应性皮炎患者的日常生活<sup>[1]</sup>。目前，治疗特应性皮炎药物有糖皮质激素、钙调神经磷酸酶抑制剂及全身免疫抑制剂，有一定疗效，但存在严重不良反应<sup>[2]</sup>。生物制剂（度普利尤单抗）治疗特应性皮炎副作用较小<sup>[3]</sup>，但价格昂贵。因此，寻找安全有效、经济适用的治疗特应性皮炎药物备受关注。中药复方二妙丸由黄柏和苍术 2 味中药组成，黄柏清热解毒，苍术燥湿健脾，两药合用具有清热燥湿、杀菌止痒的功效。临幊上二妙丸常作为基础方用于治疗特应性皮炎、湿疹等皮肤病，可改善患者皮肤炎症症状，疗效较为确切<sup>[4]</sup>，但二妙丸改善特应性皮炎的机制尚未完全阐明。故本研究拟通过构建特应性皮炎小鼠模型，探讨二妙丸改善特应性皮炎小鼠皮损炎症症状的作用及机制。

## 1 材料

1.1 动物与细胞 雌性 BALB/c 小鼠，6~8 周龄，体质量 20~22 g，购自斯贝福（北京）生物科技有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK（京）2019-0010]，饲养于云南中医药大学动物房，环境温度（22±2）℃，相对湿度 50%~60%，昼夜交替各 12 h，适应性喂养 1 周。本研究动物实验已通过云南中医药大学动物伦理委员会批准（伦理审批编号 R-062021107）。小鼠单核巨噬细胞白血病细

胞系 RAW264.7 细胞，购自武汉普诺赛生命科技有限公司，使用含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM 高糖培养基，于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，每 1~2 d 传代 1 次。

1.2 药物与试剂 二妙丸（北京同仁堂制药有限公司，国药准字 Z11020566），取 9.36 g 二妙丸研磨为粉末，加入 40 mL 0.5% CMC-Na 充分混匀作为高剂量，分别稀释 2、4 倍得中、低剂量，用于体内实验；另取二妙丸浸泡于无菌 PBS 溶液中，超声使其充分混悬，过滤后配制成为 0.3 g/mL 混悬液作为母液，用于体外实验，实验时取适量母液用完全培养基稀释，配成所需质量浓度。醋酸地塞米松片（浙江仙琚制药股份有限公司，批号 LB2252）。2, 4-二硝基氯苯（DNCB，成都贝斯特试剂有限公司，批号 97-00-7）；IL-6、TNF-α、IL-1β、IL-4、IL-5 ELISA 试剂盒（深圳欣博盛生物科技有限公司，货号 EMC004. 96、EMC102a. 96、EMC001b. 96、EMC003. 96、EMC108. 96）；脂多糖（LPS，北京索莱宝科技有限公司，货号 L8880）；一氧化氮（NO）试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（上海碧云天生物技术股份有限公司，货号 S0021S、批号 060723231122）；超敏 ECL 化学发光检测试剂盒、一抗 P38、p-P38、p-JNK、JNK、P65、p-P65、β-actin 抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，批号 20033104、货号 14064-1-AP）、

28796-1-AP、82335-1-RR、80979-1-RR、81115-1-RR)。

**1.3 仪器** 酶标分析仪(南京德铁实验设备有限公司, 型号 HBS-1096C); 电子分析天平(美国奥豪斯仪器有限公司, 型号 AR224CN); 游标卡尺(上海美耐特实业有限公司, 型号 Metr-ISO); 电泳仪、电泳槽(北京六一生物科技有限公司, 型号 DYY-7C、DYZC-24DN7); 水平摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司, 型号 TS-1); 玻片扫描影像分析系统(深圳市生强科技有限公司, 型号 SQS-1000)。

## 2 方法

### 2.1 体内实验

**2.1.1 小鼠分组、造模及给药** 实验前 1 d, 将 48 只小鼠随机分为正常组、模型组、地塞米松组( $2 \text{ mg/kg}$ )和二妙丸高、中、低剂量组( $4.68$ 、 $2.34$ 、 $1.17 \text{ g/kg}$ ), 每组 8 只, 使用脱毛膏对各组小鼠背部( $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ )进行脱毛处理。参照文献[5]报道方法造模, 第 1、3 天, 正常组小鼠背部脱毛部位及右耳分别涂抹基质溶液(丙酮与橄榄油比例为 4:1)  $100$ 、 $50 \mu\text{L}$ , 左耳不做任何处理; 其余各组小鼠背部脱毛部位及右耳分别涂抹 1% DNCB(按照比例称取一定量 DNCB 固体溶于基质溶液中)  $100$ 、 $50 \mu\text{L}$  进行致敏, 左耳涂抹  $50 \mu\text{L}$  基质溶液。第 7 天开始, 正常组小鼠造模方法不变, 其余各组小鼠背部脱毛部位及右耳分别涂抹 0.5% DNCB  $100$ 、 $50 \mu\text{L}$  进行激发, 左耳涂抹  $50 \mu\text{L}$  基质溶液, 隔天 1 次。从造模第 1 天起, 正常组和模型组小鼠灌胃给予 0.5% CMC-Na 溶液, 二妙丸和地塞米松组灌胃给予相应药物, 灌胃体积  $0.2 \text{ mL}/10 \text{ g}$ , 每天 1 次, 给药 21 d。

**2.1.2 背部皮损炎症评分** 第 1、8、14、18、21 天, 观察小鼠背部皮损炎症, 参照文献[6]报道对干燥或脱屑、出血或红疹、溃烂或表皮脱落症状进行判定, 每种症状依次计为 1 分(轻度)、2 分(中度)、3 分(重度), 无症状则计为 0 分, 计算各组小鼠皮损评分。

**2.1.3 右耳肿胀度测定** 第 1、8、14、18、21 天, 用游标卡尺对小鼠左右耳中部进行测量, 重复 3 次, 分别取平均值, 进行右耳肿胀度统计。右耳肿胀度 = 右耳厚度 - 左耳厚度。

**2.1.4 左右耳片重量差** 小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠进行麻醉, 腹主动脉取血后, 剪下左右耳朵, 剃毛处理后用打孔器取直径 8 mm 的耳片, 快速称重, 计算左右耳片重量差。公式为耳片重量差 = 右耳片重量 - 左耳片重量。

**2.1.5 HE 染色检测** 小鼠右耳、背部皮损组织表皮厚度 取右耳片和背部皮肤置于 4% 多聚甲醛固定后送检, 制备石蜡切片后进行 HE 染色。用 ImageViewerG 软件在 200 倍数下观察右耳片和背部皮损组织病理变化, 测量表皮角质层至基底层垂直距离, 记录表皮增厚情况。

**2.1.6 甲苯胺蓝(TB)染色检测** 右耳、背部皮损组织肥大细胞浸润 取“2.1.5”项下制备的右耳和背部皮肤石蜡切片, 行 TB 染色, 用 ImageViewerG 软件在 200 倍镜下观察肥大细胞浸润情况。

**2.1.7 ELISA 法检测** 血清 TSLP、IL-4、IL-5、总 IgE 炎症因子水平 取“2.1.4”项下收集的血液, 室温静置 30 min 后,  $4^\circ\text{C}$ 、 $3000 \text{ r/min}$  离心 15 min, 取上清。按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清 TSLP、IL-4、IL-5、总 IgE 水平。

**2.1.8 免疫组织化学(IHC)法检测** 背部皮损组织巨噬细胞浸润 取“2.1.5”项下制备的背部皮肤石蜡切片, 经脱蜡、抗原修复后封闭, 加 F4/80 抗体  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 加二抗室温孵育 50 min, DAB 显色, 复染细胞核, 于光学显微镜下观察细胞核表面棕黄色沉积颗粒, 脱水后封片。用 ImageViewerG 软件在 200 倍镜下观察巨噬细胞浸润情况。

### 2.2 体外实验

**2.2.1 CCK-8 法检测** RAW264.7 细胞活力 取对数生长期 RAW264.7 细胞, 以  $1 \times 10^5$  个/ $\text{mL}$  密度接种于 96 孔板中, 将细胞分为空白组、对照组及二妙丸组, 每组 3 个复孔。空白组每孔加入完全培养基  $100 \mu\text{L}$ , 对照组及二妙丸组每孔加入细胞悬液  $100 \mu\text{L}$ , 在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养 12 h, 吸弃培养基后, 空白组和对照组每孔加入完全培养基  $100 \mu\text{L}$ , 二妙丸组加入含不同质量浓度二妙丸( $6.25$ 、 $12.5$ 、 $25$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $200$ 、 $400$ 、 $800 \mu\text{g/mL}$ )的完全培养基  $100 \mu\text{L}$ , 每组浓度设 3 个复孔, 孵育 12 h, 每孔中加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱中继续孵育 1 h, 用酶标仪在 450 nm 波长处测定光密度(OD)值, 计算细胞存活率。

**2.2.2 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平检测** 取对数生长期 RAW264.7 细胞, 以  $2 \times 10^5$  个/ $\text{mL}$  密度接种于 24 孔板中。根据 CCK-8 筛选得到的结果, 将细胞分为正常组、模型组及二妙丸高、中、低剂

量组(400、200、100 μg/mL),每组3个复孔,每孔加入细胞悬液500 μL,于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养12 h。吸弃培养液,正常组和模型组每孔加入500 μL完全培养基,二妙丸组加入含不同质量浓度二妙丸的完全培养基500 μL预处理细胞2 h。模型组和二妙丸组弃去完全培养基20 μL后加入20 μL LPS(1 μg/mL终浓度),于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养12 h,收集细胞上清液,按照试剂盒说明书测定NO、TNF-α、IL-6、IL-1β水平。

**2.2.3 Western blot法检测细胞MAPK/NF-κB信号通路相关蛋白表达** 取对数生长期RAW264.7细胞,以 $2\times10^5$ 个/mL密度接种于6孔板中,按“2.2.2”项下方法分组、给药。收集各组细胞,提取细胞总蛋白,用BCA试剂盒对样品蛋白进行定量。使用10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至

PVDF膜上,5%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h,加入p-JNK、JNK、p-P38、P38、P65、p-P65、β-actin一抗,4 °C孵育过夜,次日加入辣根过氧化物标记的二抗,摇床上室温孵育90 min,加入ECL显色液显影,使用Image J软件分析蛋白条带灰度值。

**2.3 统计学分析** 通过Graphpad Prism 8.0.2软件进行处理,数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 二妙丸对特应性皮炎小鼠背部皮损外观的影响** 正常组小鼠背部毛发光滑、结构完整;模型组小鼠背部表皮剥脱、干燥、结痂等皮肤组织受损;地塞米松组及二妙丸高、中剂量组小鼠背部皮肤结痂减少、新生毛发增多,表明二妙丸能有效改善特应性皮炎小鼠皮损,见图1。



图1 各组小鼠皮损外观图

Fig. 1 Appearance diagram of skin lesions of mice in each group

**3.2 二妙丸对特应性皮炎小鼠背部皮损评分的影响** 第8天起,与正常组比较,模型组小鼠皮损评分升高( $P<0.01$ );与模型组比较,第18、21天

地塞米松组及二妙丸各剂量组小鼠皮损评分降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),表明二妙丸能降低皮损评分、修复皮损,见表1。

表1 各组小鼠背部皮损评分比较( $\bar{x}\pm s$ , n=8)

Tab. 1 Comparison of back skin lesion scores of mice in each group ( $\bar{x}\pm s$ , n=8)

组别	皮损评分/分				
	1 d	8 d	14 d	18 d	21 d
正常组	0	0	0	0	0
模型组	0	1.500±0.500 <sup>##</sup>	2.067±0.687 <sup>##</sup>	2.317±0.471 <sup>##</sup>	2.361±0.471 <sup>##</sup>
地塞米松组	0	1.323±0.471	1.323±0.441 <sup>*</sup>	1.333±0.471 <sup>**</sup>	1.300±0.500 <sup>**</sup>
二妙丸高剂量组	0	1.500±0.500	1.567±0.471	1.500±0.500 <sup>**</sup>	1.467±0.471 <sup>*</sup>
二妙丸中剂量组	0	1.567±0.373	1.662±0.471	1.547±0.471 <sup>*</sup>	1.533±0.373 <sup>*</sup>
二妙丸低剂量组	0	1.667±0.471	1.650±0.500	1.567±0.471 <sup>*</sup>	1.567±0.471 <sup>*</sup>

注:与正常组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

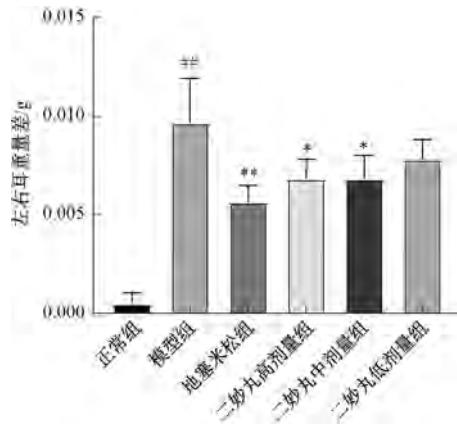
**3.3 二妙丸对特应性皮炎小鼠右耳肿胀度的影响** 与正常组比较,模型组小鼠第8、14、18、21天右耳肿胀度增加( $P<0.01$ );与模型组比较,第14、18、21天地塞米松组及二妙丸高、中剂量组小鼠右耳肿胀度降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),见表2。

**3.4 二妙丸对特应性皮炎样小鼠左右耳片重量差的影响** 与正常组比较,模型组小鼠左右耳片重量差增加( $P<0.01$ );与模型组比较,地塞米松组和二妙丸高、中剂量组小鼠耳片重量差减少( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),见图2。

表2 各组小鼠右耳肿胀度比较 ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)Tab. 2 Comparison of swelling degree of right ear of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

组别	右耳肿胀度/mm				
	1 d	8 d	14 d	18 d	21 d
正常组	0.010±0.004	0.014±0.009	0.009±0.003	0.008±0.005	0.013±0.005
模型组	0.010±0.006	0.094±0.031 <sup>##</sup>	0.133±0.025 <sup>##</sup>	0.137±0.018 <sup>##</sup>	0.137±0.017 <sup>##</sup>
地塞米松组	0.013±0.005	0.057±0.020	0.050±0.013 <sup>**</sup>	0.050±0.018 <sup>**</sup>	0.050±0.013 <sup>**</sup>
二妙丸高剂量组	0.010±0.004	0.073±0.022	0.076±0.012 <sup>**</sup>	0.083±0.012 <sup>*</sup>	0.087±0.009 <sup>*</sup>
二妙丸中剂量组	0.010±0.004	0.064±0.027	0.083±0.026 <sup>*</sup>	0.083±0.025 <sup>*</sup>	0.083±0.020 <sup>*</sup>
二妙丸低剂量组	0.010±0.004	0.074±0.021	0.087±0.014 <sup>*</sup>	0.087±0.024 <sup>*</sup>	0.096±0.017

注: 与正常组比较, <sup>##</sup>P<0.01; 与模型组比较, <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01。



注: 与正常组比较, <sup>##</sup>P<0.01; 与模型组比较, <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01。

图2 各组小鼠左右耳片重量差比较 ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)Fig. 2 Comparison of weight difference between left and right ear pieces of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

3.5 二妙丸对特应性皮炎小鼠皮损组织病理形态的影响 正常组小鼠右耳和背部皮肤结构完整, 层次清晰, 表皮层薄, 无水肿和炎性反应; 与正常组比较, 模型组小鼠右耳及背部皮损组织可见表皮组织增生, 棘层肥厚, 基底层下移, 水肿和严重炎症反应; 与模型组比较, 地塞米松组和二妙丸各剂量组右耳及背部皮肤表皮增厚减轻, 水肿及炎性反应减轻, 见图3。

3.6 二妙丸对特应性皮炎小鼠皮损组织真皮层肥大细胞浸润的影响 肥大细胞的浸润参与特应性皮炎炎症发展<sup>[7]</sup>, TB染色能够特异地染色肥大细胞颗粒。如图4所示, 正常组小鼠右耳和背部皮损组织真皮层见少量肥大细胞颗粒浸润; 与正常组比较, 模型组小鼠真皮层肥大细胞颗粒浸润增多; 与模型组比较, 地塞米松组和二妙丸各剂量组真皮层肥大细胞颗粒积聚减少, 浸润数减少, 见图4。

3.7 二妙丸对特应性皮炎小鼠血清 TSLP、IL-4、IL-5、总 IgE 水平的影响 TSLP、Th2 细胞因子及

IgE 水平与特应性皮炎疾病进展呈正相关<sup>[8]</sup>。如图5所示, 与正常组比较, 模型组小鼠血清 TSLP、IL-4、IL-5、总 IgE 水平均升高 (P<0.01); 与模型组比较, 地塞米松组和二妙丸高剂量组 TSLP、IL-4、IL-5、总 IgE 水平均降低 (P<0.05, P<0.01), 中剂量组 IL-4、IL-5、总 IgE 水平降低 (P<0.05), 低剂量组总 IgE 水平降低 (P<0.05)。

3.8 二妙丸对特应性皮炎小鼠背部皮损组织巨噬细胞浸润的影响 在特应性皮炎炎症反应过程中, 巨噬细胞在炎症区域的聚集和活化推动炎症的发展<sup>[9]</sup>。如图6所示, 与正常组比较, 模型组小鼠皮损组织巨噬细胞表面标记物 F4/80 表达升高 (P<0.01); 与模型组比较, 地塞米松组和二妙丸各剂量组小鼠皮损组织 F4/80 表达降低 (P<0.05, P<0.01)。

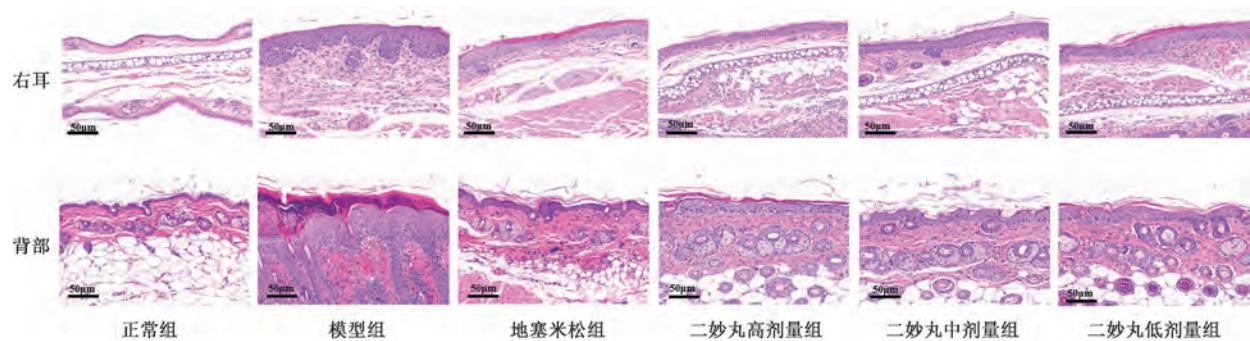
3.9 二妙丸对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响 与对照组比较, 二妙丸质量浓度在 0~400 μg/mL 时对 RAW264.7 细胞增殖无影响 (P>0.05), 见图7。因此选择 400、200、100 μg/mL 质量浓度进行后续实验。

3.10 二妙丸对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞释放 NO、TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的影响 与正常组比较, 模型组细胞上清液中 NO、TNF-α、IL-1β、IL-6 水平升高 (P<0.01); 与模型组比较, 二妙丸高、中剂量组细胞上清液中 NO、TNF-α、IL-1β、IL-6 水平降低 (P<0.05, P<0.01), 见图8。

3.11 二妙丸对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 MAPK/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组细胞 p-P38、p-JNK 和 p-P65 蛋白表达升高 (P<0.01); 与模型组比较, 二妙丸高、中剂量组细胞 p-P38、p-JNK 和 p-P65 蛋白表达降低 (P<0.05, P<0.01), 见图9。

#### 4 讨论

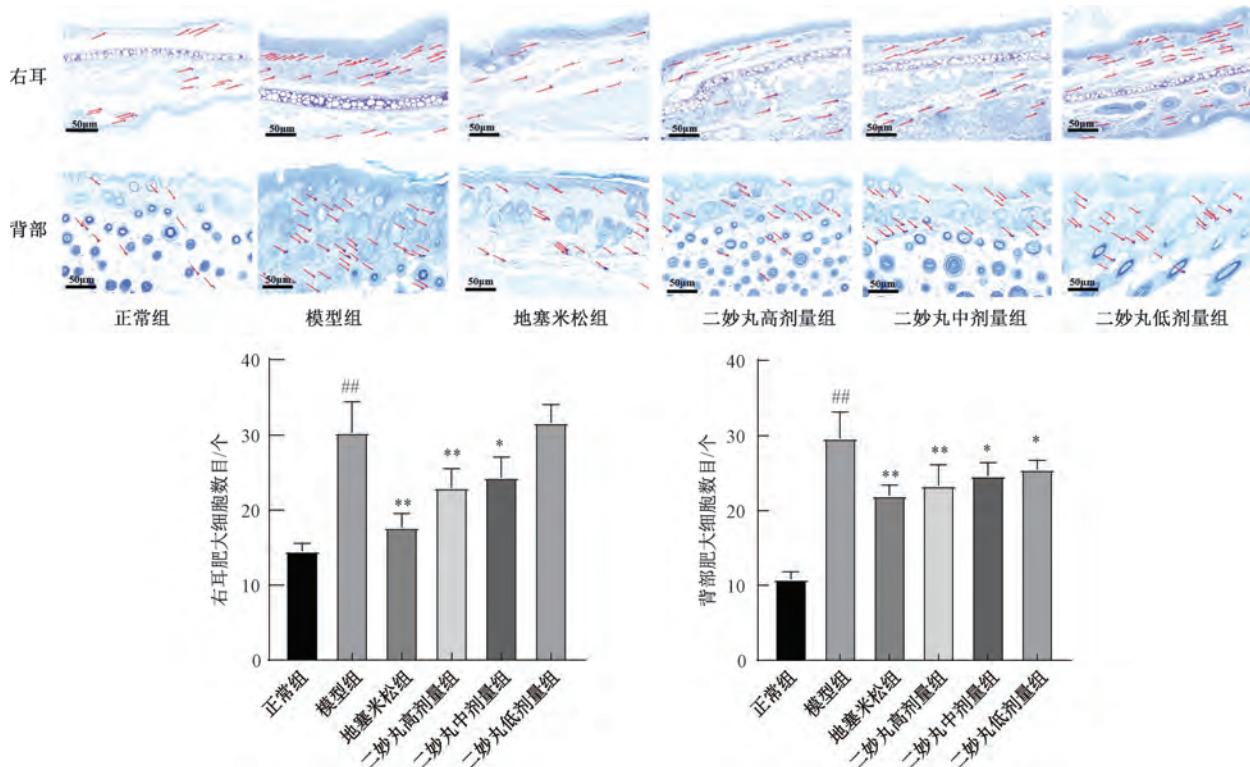
特应性皮炎在中医中属“四弯风”“奶癣”



注：与正常组比较， $^{**}P<0.01$ ；与模型组比较， $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

图3 各组小鼠右耳和背部皮损组织HE染色及表皮厚度比较 ( $\times 200$ ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

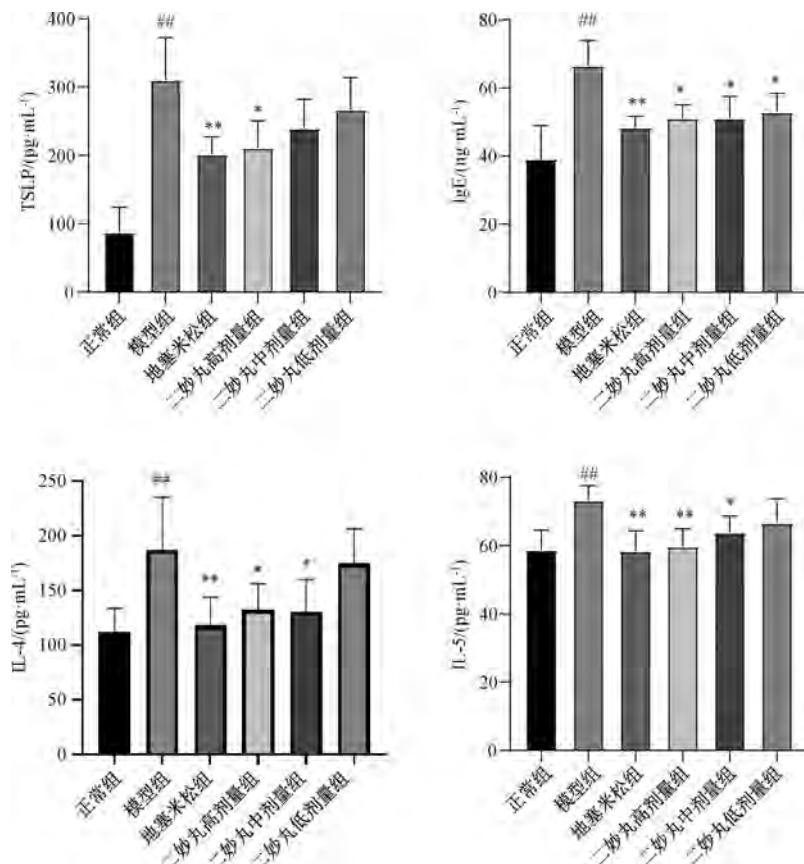
Fig. 3 Comparison of HE staining and epidermal thickness of skin lesions in right ear and back of mice in each group ( $\times 200$ ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )



注：红色箭头所示为肥大细胞。与正常组比较， $^{**}P<0.01$ ；与模型组比较， $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

图4 各组小鼠右耳和背部皮损组织TB染色及肥大细胞浸润数比较 ( $\times 200$ ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

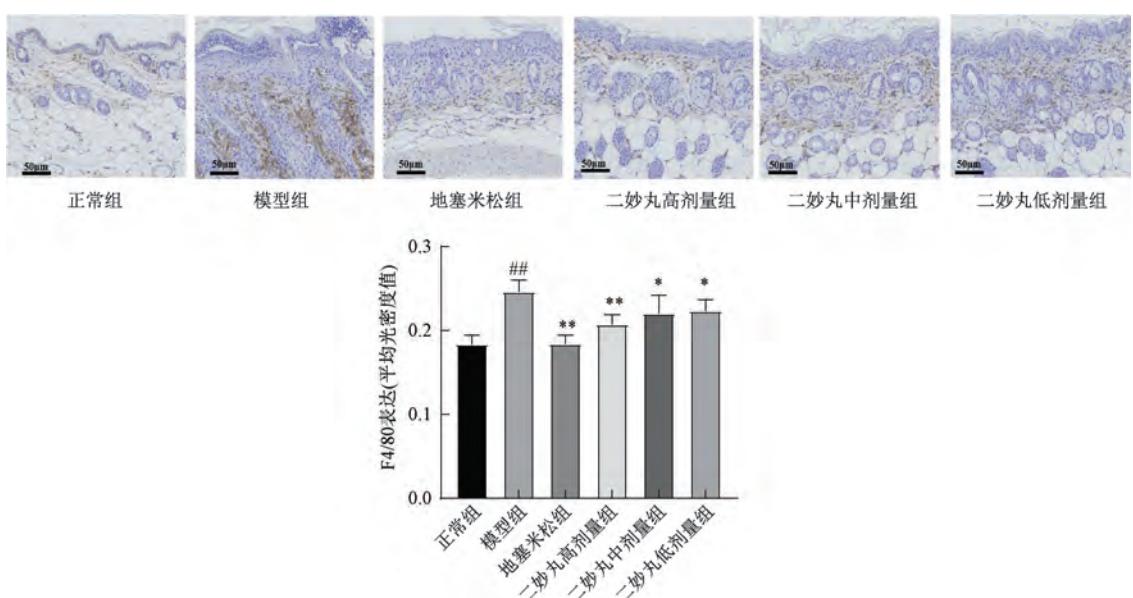
Fig. 4 Comparison of TB staining and mast cell infiltration in skin lesions of right ear and back of mice in each group ( $\times 200$ ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )



注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

图 5 各组小鼠血清 TSLP、IL-4、IL-5 和总 IgE 水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

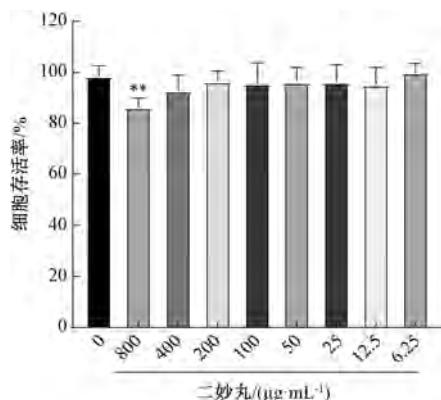
Fig. 5 Comparison of serum TSLP, IL-4, IL-5 and total IgE levels in mice of each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )



注：与正常组比较，<sup>##</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

图 6 各组小鼠背部皮损组织 F4/80 表达比较 ( $\times 200$ ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

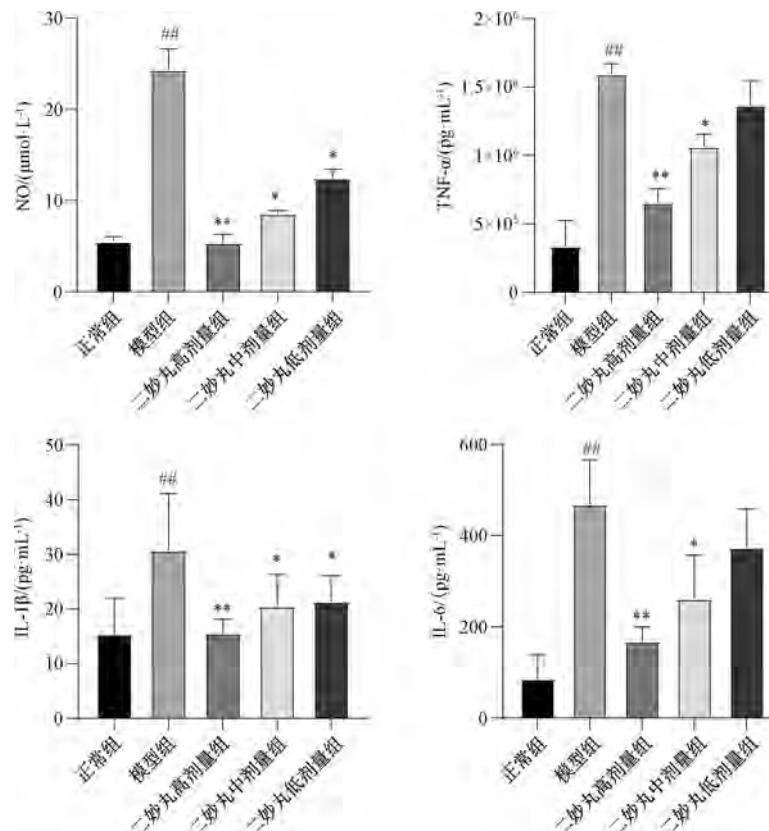
Fig. 6 Comparison of F4/80 expression in back lesions of mice in each group ( $\times 200$ ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )



注：与对照组比较，\*\*  $P < 0.01$ 。

图 7 二妙丸对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 7 Effect of Er Miao Wan on viability of RAW264.7 macrophages ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



注：与正常组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ 。

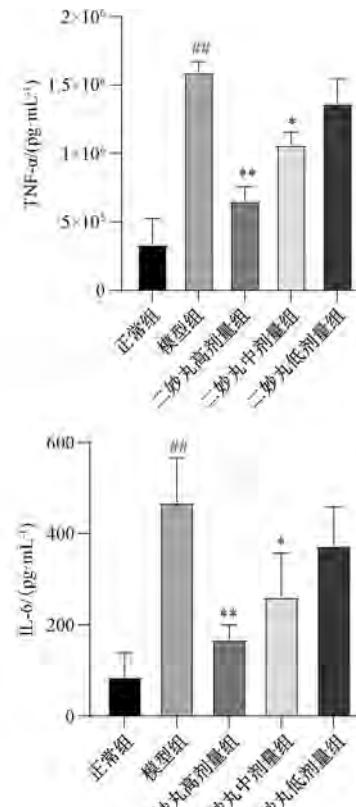
图 8 各组细胞上清液中 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 8 Comparison of NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 levels in cell supernatants of each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

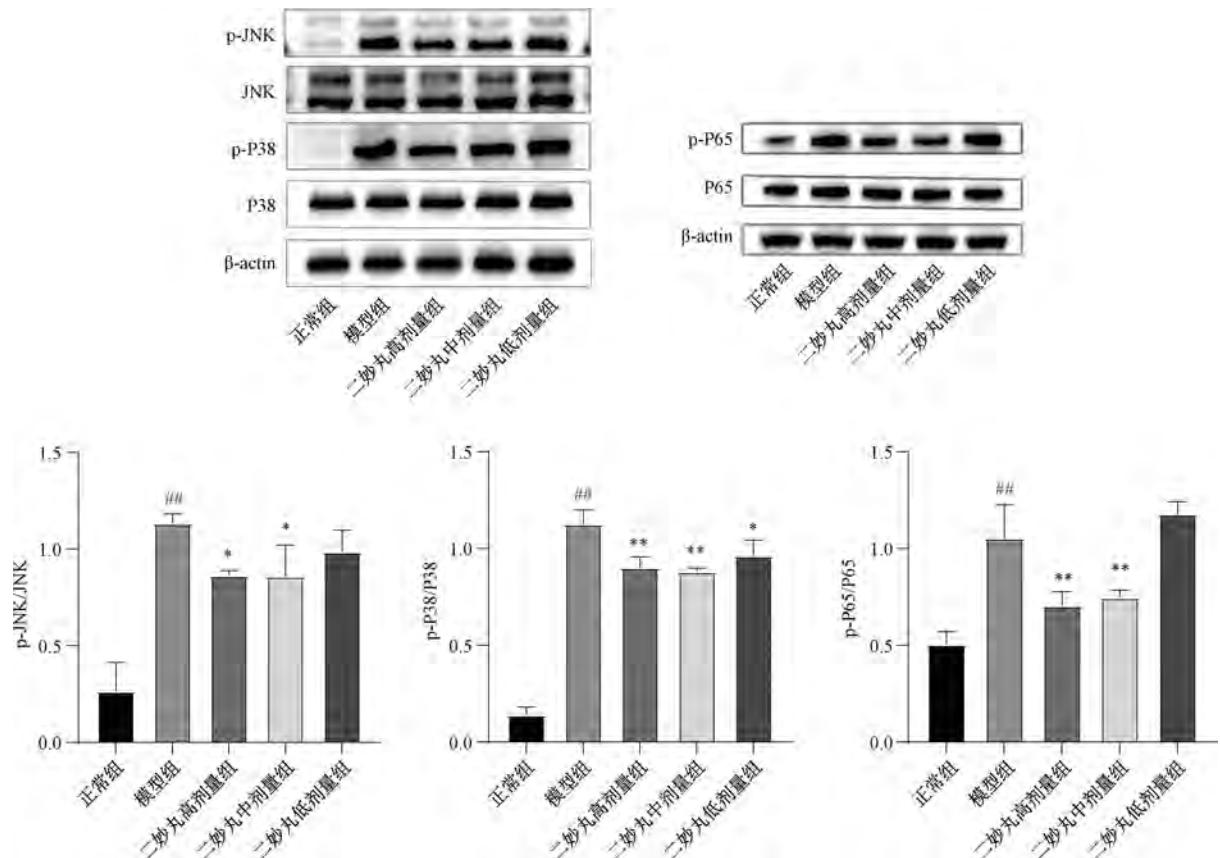
用，激活和放大炎症反应<sup>[12-13]</sup>。F4/80 是一种在成熟巨噬细胞中高表达的细胞表面糖蛋白，是识别和区分成熟小鼠巨噬细胞的重要标志物。本研究发现，模型组小鼠背部皮损组织 F4/80 表达增加，表明巨噬细胞浸润增多；二妙丸干预后巨噬细胞浸润减少，说明二妙丸可能通过抑制巨噬细胞浸润发挥

“湿疮”等范畴，其病因病机主要为先天禀赋不耐，胎毒遗热，心火亢盛，外感六淫，饮食失调，脾虚失运而发病。特应性皮炎病情迁延不愈，反复发作，致使阴虚血燥，肌肤失养<sup>[10]</sup>。主要采取以健脾渗湿、清热祛风、养血润肤为主的治疗方法。二妙丸因其具有清热燥湿的特性而被广泛用于治疗特应性皮炎，且疗效显著。

使用 DNCB 诱导的 BALB/c 小鼠特应性皮炎模型被广泛运用于各类研究中<sup>[11]</sup>。DNCB 作为一种与过敏原相关的小分子半抗原，与皮肤组织蛋白接触后刺激机体 T 淋巴细胞致敏，产生过敏炎症。在上述炎症过程中，巨噬细胞发挥抗原呈递和吞噬作用，促进炎症发展，并在皮肤炎症中大量浸润，与炎症免疫细胞（如肥大细胞和 T 细胞）相互作



其抗炎作用，修复皮损组织。在特应性皮炎模型中，致敏 T 淋巴细胞分化成 Th2 细胞，分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子；IL-4 促进 B 细胞活化并产生免疫球蛋白 IgE，而 IL-5 则可促进嗜酸性粒细胞的增生和肥大细胞的增殖，IgE 与肥大细胞表面高亲和力受体 Fc $\epsilon$ RI 结合，导致肥大细胞浸润<sup>[14-16]</sup>。TSLP



注：与正常组比较，<sup>#</sup> $P<0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

图9 各组细胞 p-P38、p-JNK 和 p-P65 蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 9 Comparison of p-P38, p-JNK and p-P65 protein expressions in cells of each group ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

属于IL-2细胞因子家族的I型细胞因子，通过激活树突状细胞(DC)诱导Th0细胞分化为Th2细胞，产生IL-4、IL-5和IL-13等炎症因子促进Th2介导的免疫反应<sup>[8]</sup>。本研究发现，模型组小鼠血清炎症因子TSLP、IL-4、IL-5、总IgE水平升高，二妙丸干预可降低炎症因子水平，说明二妙丸可抑制Th2免疫反应过程，从而抑制特应性皮炎炎症反应。

通常由LPS诱导RAW264.7巨噬细胞建立细胞炎症模型，通过模拟细菌入侵，激活巨噬细胞，引发炎症反应<sup>[17-18]</sup>。LPS是革兰氏阴性菌细胞外壁的一种特殊成分，与巨噬细胞表面上Toll样受体4(TLR4, 一种模式识别受体)结合，通过髓样分化因子88(MyD88)途径，激活下游丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和核转录因子κB(NF-κB)信号转导通路，导致促炎细胞因子(如NO、TNF-α、IL-1β、IL-6等)的释放<sup>[19-20]</sup>，这些细胞因子引起氧化应激和组织损伤，促进炎症细胞的募集和激活，从而引起和加剧炎症反应<sup>[21]</sup>。本研究发现，LPS诱导的巨噬细胞中MAPK P38、JNK及NF-κB

P65蛋白磷酸化水平升高，促炎细胞因子NO、IL-1β、IL-6和TNF-α水平升高；经二妙丸处理后，RAW264.7巨噬细胞MAPK P38、JNK及NF-κB P65蛋白磷酸化水平降低，NO、IL-1β、IL-6和TNF-α水平也降低，表明二妙丸可能通过调控RAW264.7巨噬细胞MAPK/NF-κB信号通路，降低炎症因子水平，减轻细胞炎症。

综上所述，二妙丸能够减轻DNCB诱导的特应性皮炎小鼠皮损组织中炎性细胞及肥大细胞浸润，缓解皮损炎症，其机制可能与抑制巨噬细胞MAPK/NF-κB信号通路激活，减轻巨噬细胞浸润，降低Th2细胞因子水平有关，这为二妙丸的临床用药提供了实验依据。

#### 参考文献：

- [1] 丁张军, 吴志鹏, 陈晓栋. 维生素D对特应性皮炎小鼠的保护作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(6): 884-888.
- [2] 吴悠, 张菡, 王睿, 等. 小分子药物治疗特应性皮炎的研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2024, 53(2): 118-122.
- [3] 陈倩茹, 沈晓峰, 康晓静. 生物制剂治疗特应性皮炎的新进

- 展[J]. 实用皮肤病学杂志, 2024, 17(1): 36-39; 63.
- [4] 应振毅, 王松挺. 二妙丸联合抗组胺药治疗湿疹120例[J]. 福建中医药, 2008, 39(4): 40-42.
- [5] 高娟, 谭伟, 陈桂芳, 等. 皮敏消胶囊对特应性皮炎小鼠皮损的改善作用[J]. 中成药, 2023, 45(11): 3764-3769.
- [6] 王欣欣, 李思佳, 关洪全, 等. DNB 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.
- [7] 陈玉迪, 刘琬, 杨敏, 等. 肥大细胞在特应性皮炎发病中的作用及相关治疗进展[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2024, 18(2): 174-180.
- [8] Luo J, Zhu Z, Zhai Y, et al. The role of TSLP in atopic dermatitis: from pathogenetic molecule to therapeutical target[J]. *Mediators Inflamm*, 2023, 2023: 7697699.
- [9] Luo M, Zhao F, Cheng H, et al. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1352946.
- [10] 熊鑫, 黄传奇, 程璐. 野菊花水提物对 RAW264.7 炎症细胞模型的抗炎作用及其机制[J]. 医药导报, 2024, 43(8): 1192-1198.
- [11] Ku J M, Hong S H, Kim S R, et al. The prevention of 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced inflammation in atopic dermatitis-like skin lesions in BALB/c mice by Jawoongo[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 215.
- [12] Kasraie S, Werfel T. Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 942375.
- [13] Lee S B, Park H, Lee J E, et al. *In vivo* optical reporter-gene-based imaging of macrophage infiltration of DNB-induced atopic dermatitis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6205.
- [14] Holgate S T. The role of mast cells and basophils in inflammation[J]. *Clin Exp Allergy*, 2000, 30 Suppl 1: 28-32.
- [15] Lee Y, Choi H K, N'Deh K, et al. Inhibitory effect of centella asiatica extract on DNB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 411.
- [16] Tominaga M, Takamori K. Peripheral itch sensitization in atopic dermatitis[J]. *Allergol Int*, 2022, 71(3): 265-277.
- [17] Homey B, Meller S, Savinko T, et al. Modulation of chemokines by staphylococcal superantigen in atopic dermatitis[J]. *Chem Immunol Allergy*, 2007, 93: 181-194.
- [18] Triggiani M, Petraroli A, Loffredo S, et al. Differentiation of monocytes into macrophages induces the upregulation of histamine H1 receptor[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(2): 472-481.
- [19] 杨一新, 李桂源. LPS 所介导的信号转导通路研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2006, 31(1): 141-145.
- [20] 乌里盼·托乎达阿里, 丁宛婷, 孙媛, 等. 鞣花酸通过 TLR4-SRC/MAPK/NF-κB 途径抑制脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应[J]. 中南药学, 2024, 22(4): 943-949.
- [21] 马守宝, 林丹丹, 刘海燕. 炎症细胞因子在肿瘤微环境中的作用及其作为治疗靶点的研究进展[J]. 生命科学, 2016, 28(2): 182-191.