

DOI:10.16781/j.CN31-2187/R.20220037

· 论 著 ·

雷西莫特对特应性皮炎模型小鼠的影响

孙 刚, 朱晓辰, 贺 旭, 毕新岭*

海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院皮肤科, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察雷西莫特对特应性皮炎小鼠的治疗效果, 并探究其作用机制。**方法** 30只BALB/c小鼠随机分为空白组、模型组、治疗组, 每组10只。模型组及治疗组小鼠耳部予卡泊三醇搽剂(连续14d, 每天2nmol)诱导特应性皮炎模型, 同时模型组予200 μ L PBS每天腹腔注射、治疗组予50nmol雷西莫特(溶于200 μ L PBS)每天腹腔注射; 空白组小鼠不给予任何处理。实验第15天观察各组小鼠耳部皮损红斑、肿胀及鳞屑情况; 采用H-E染色及甲苯胺蓝染色观察皮损组织炎症细胞浸润情况; 采用ELISA检测血清IgE、IL-4、IL-13水平; 采用qPCR检测皮损组织中胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)、 γ 干扰素mRNA的表达。**结果** 与空白组相比, 模型组小鼠耳部皮肤出现明显肿胀发红、鳞屑, 血清中IgE、IL-4、IL-13水平均升高(P 均 <0.01), 说明小鼠特应性皮炎模型构建成功。与模型组小鼠相比, 治疗组小鼠耳部皮肤红肿、鳞屑及炎症细胞浸润情况均好转, 血清IgE、IL-4、IL-13水平均降低(P 均 <0.05), 皮损组织中 γ 干扰素mRNA表达量升高($P<0.05$)。皮损组织中TSLP mRNA表达量在模型组和治疗组间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 雷西莫特可改善特应性皮炎小鼠的皮损症状, 其机制可能与调节辅助性T细胞(Th)1/Th2免疫反应、影响相关细胞因子的表达有关。

[关键词] 雷西莫特; 特应性皮炎; Toll样受体; Th1细胞; Th2细胞

[中图分类号] R 758.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2022)09-1007-05

Effect of resiquimod on atopic dermatitis model mice

SUN Gang, ZHU Xiao-chen, HE Xu, BI Xin-ling*

Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe the therapeutic effect of resiquimod on atopic dermatitis model mice and explore its mechanisms. **Methods** Thirty BALB/c mice were randomly divided into blank group, model group, and treatment group, with 10 mice in each group. The atopic dermatitis model was induced by calcipotriol liniment (2 nmol daily for 14 d) on the ear in the model group and treatment group. At the same time, the model group was intraperitoneally injected with 200 μ L phosphate-buffered saline (PBS) every day, and the treatment group was intraperitoneally injected with 50 nmol resiquimod (dissolved in 200 μ L PBS) every day. The mice in the blank group was not given any treatment. On the 15th day, the erythema, swelling and scale of the ear lesions of mice in each group were observed. The infiltration of inflammatory cells in skin lesions was observed by hematoxylin-eosin staining and toluidine blue staining. The levels of serum immunoglobulin E (IgE), interleukin (IL)-4 and IL-13 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and interferon γ mRNA in the skin lesions was detected by quantitative polymerase chain reaction. **Results** Compared with the blank group, erythema, swelling and scale appeared on the ear skin of mice in the model group, and the levels of serum IgE, IL-4 and IL-13 were significantly increased (all $P<0.01$), indicating that the atopic dermatitis model was successfully constructed. Compared with the model group, the erythema, swelling, scale and infiltration of inflammatory cells of the ear lesions in the treatment group were improved, the levels of serum IgE, IL-4 and IL-13 were significantly decreased (all $P<0.05$), and the mRNA expression of interferon γ was significantly increased

[收稿日期] 2022-01-10 **[接受日期]** 2022-04-29

[基金项目] 促进市级医院临床技能与临床创新能力三年行动计划(SHDC2020CR1014B), 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院“234学科攀峰计划”(2019YXK028). Supported by Three-year Action Plan to Promote Clinical Skills and Clinical Innovation in Municipal Hospitals (SHDC2020CR1014B) and “234 Discipline Peak Climbing Plan” of The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University) (2019YXK028).

[作者简介] 孙 刚, 硕士生. E-mail: 1057905809@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161567, E-mail: bixinling@163.com

($P < 0.05$). The mRNA expression of *TSLP* in skin lesions was not significantly different between the model group and treatment group ($P > 0.05$). **Conclusion** Resiquimod can improve the symptoms of atopic dermatitis mice, and its mechanism may be related to regulating helper T cell (Th)1/Th2 immune response and affecting the expression of related cytokines.

[Key words] resiquimod; atopic dermatitis; Toll-like receptor; Th1 cells; Th2 cells

[Acad J Naval Med Univ, 2022, 43(9): 1007-1011]

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 是一种常见的炎症性皮肤病, 其特征是反复出现湿疹样病变和剧烈瘙痒, 该病可发生在所有年龄和种族的人群, 对患者及其家庭造成了巨大的心理及经济负担^[1]。WHO 数据显示, 全世界有至少 2.3 亿人患有 AD, 儿童 AD 患病率为 15%~25%^[2]。雷西莫特是咪唑啉类免疫应答调节剂, 可促进 γ 干扰素和 IL-12 的产生、减少 IL-4 和 IL-5 的生成, 从而促进辅助性 T 细胞 (helper T cell, Th) 1 反应和抑制 Th2 反应, 同时降低健康人、变应性鼻炎及 AD 人群的 IgE 水平^[3]。因此, 科研人员尝试将雷西莫特应用于变应性疾病, 目前已有相关动物实验开展^[4]。本研究通过对 AD 模型小鼠腹腔注射雷西莫特, 观察其对 AD 的治疗效果, 并探讨可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与设备 卡泊三醇搽剂 (丹麦利奥制药有限公司, 批号 H20150664)。小鼠 IgE、IL-4、IL-13 ELISA 检测试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司), TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司)。酶标检测仪 (美国 Bio-Tek 公司), 荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司)。

1.2 实验动物 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 (SPF 级) 30 只, 体重 18~20 g, 购自北京维通利华实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号为 SCXK (京) 2018-0013], 饲养于海军军医大学 (第二军医大学) 第一附属医院动物实验中心 [实验动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2020-0033]。

1.3 动物分组及处理 将 30 只小鼠随机分为空白组、模型组、治疗组, 每组 10 只。模型组及治疗组小鼠耳部连续 14 d 涂抹卡泊三醇搽剂 (每天 2 nmol 卡泊三醇) 诱导 AD 模型, 模型组同时予 200 μ L PBS 每天腹腔注射、治疗组予 50 nmol 雷西莫特 (溶于 200 μ L PBS) 每天腹腔注射^[4]; 空白组小鼠不给予任何处理。

1.4 观察指标

1.4.1 耳部皮损情况 实验第 15 天观察各组小鼠的耳部皮损红斑、肿胀及鳞屑情况, 同时用游标卡尺测量小鼠耳厚度。

1.4.2 耳部组织病理学检查 实验第 15 天, 经眼眶取血后以颈椎脱臼法处死小鼠, 沿耳根部剪下鼠耳。将取下的鼠耳纵向一分为二, 一半放入组织固定液中固定并经石蜡包埋后切片, 通过 H-E 染色观察真皮炎症细胞浸润情况, 通过甲苯胺蓝染色观察肥大细胞分布情况; 另一半放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.4.3 ELISA 检测血清 IgE、IL-4、IL-13 水平 实验第 15 天, 将采集的血液于室温静置 2 h, 4 $^{\circ}$ C 3 996 \times g 离心 15 min, 取血清分管冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。按照相关试剂盒说明书进行血清 IgE、IL-4、IL-13 检测。

1.4.4 qPCR 检测耳部皮损组织中胸腺基质淋巴细胞生成素 (thymic stromal lymphopoietin, *TSLP*)、 γ 干扰素 mRNA 表达 取 -80 $^{\circ}$ C 冻存的小鼠耳部皮损组织, 在液氮中剪切及研磨, 采用 TRIzol 法提取总 RNA, 使用 Nanodrop 2000 超微量分光光度计 (美国 ThermoFisher Scientific 公司) 检测 RNA 浓度及纯度。通过反转录合成 cDNA 第一链, 以该链为模板、*GAPDH* 为内参照进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。*GAPDH* 上游引物序列为 5'-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3', 下游引物序列为 5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT-3'; *TSLP* 上游引物序列为 5'-AGAGAAGCCCTCAATG-ACCAC-3', 下游引物序列为 5'-TGAGGTTTGAT-TCAGGCAGATGT-3'; γ 干扰素上游引物序列为 5'-CTCAAGTGGCATAGATGTGGAAG-3', 下游引物序列为 5'-TGACCTCAAACCTTGCAA-TACTC-3'。所有引物均由上海擎熙生物科技有限公司合成。

1.5 统计学处理 应用 GraphPad Prism 8 软件进行

数据分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,任意两组间资料的比较采用独立样本 t 检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 各组小鼠耳部皮损大体情况 空白组小鼠耳部皮肤未见异常(图1A);模型组小鼠耳部皮肤

明显肿胀发红、毛细血管扩张,其上附有细小的鳞屑(图1B);与模型组相比,治疗组小鼠耳部皮肤红肿、鳞屑明显缓解,有轻度毛细血管扩张(图1C)。模型组小鼠耳厚度为 (0.48 ± 0.02) mm,与空白组 $[(0.19\pm 0.01)$ mm]相比增厚($P<0.01$);治疗组小鼠耳厚度 $[(0.35\pm 0.02)$ mm]较模型组变薄($P<0.01$)。

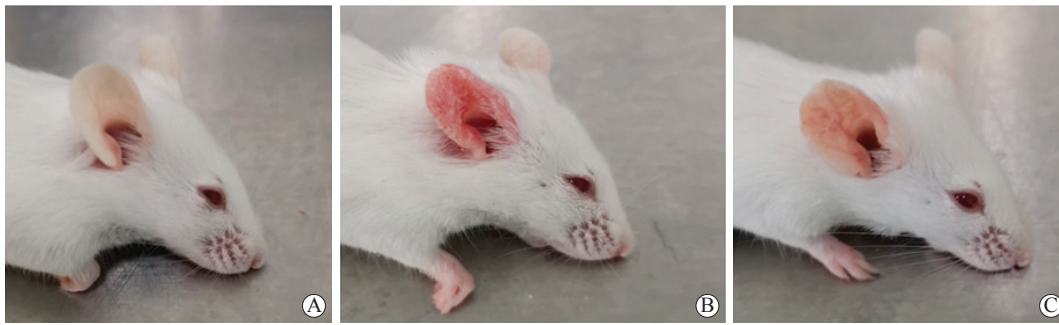


图1 各组小鼠实验第15天时耳部皮损情况

Fig 1 Ear skin lesions of mice in each group on the 15th day of experiment

A: Blank group; B: Model group (treatment with 2 nmol calcipotriol liniment on the ear daily for 14 d); C: Treatment group (treatment with 2 nmol calcipotriol liniment on the ear and intraperitoneal injection of 50 nmol resiquimod daily for 14 d).

2.2 各组小鼠耳部组织病理学变化 H-E染色可见空白组小鼠耳部组织表皮、真皮结构正常,真皮内散在少量组织细胞,未见明显炎症细胞浸润(图2A);模型组小鼠表皮角化过度、角化不全,棘层明显增厚,皮突延长,棘细胞间水肿,真皮全层见大量炎症细胞浸润,并可见毛细血管扩张充血(图2B);治疗组小鼠表皮角化、棘层增厚

较模型组明显缓解,未见棘细胞间水肿,真皮内可见淋巴细胞及组织细胞,淋巴细胞分布数量减少(图2C)。甲苯胺蓝染色可见空白组小鼠真皮内散在少量肥大细胞(图3A),模型组真皮内肥大细胞明显增多(图3B),治疗组小鼠真皮内肥大细胞较模型组明显减少(图3C)。

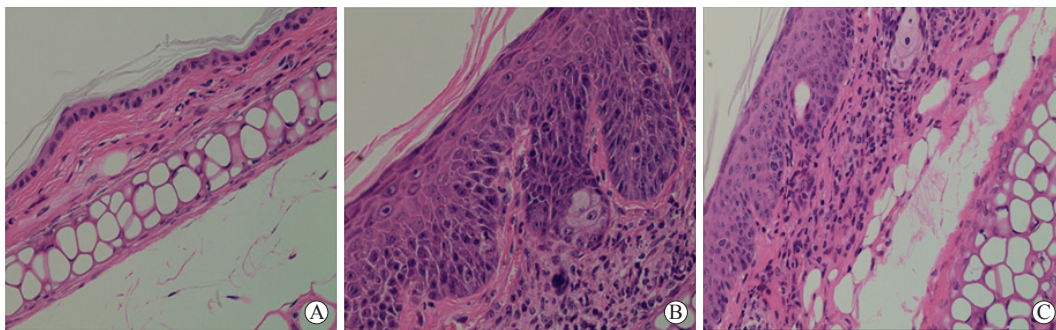


图2 苏木精-伊红染色观察各组小鼠耳部组织病理学变化(400×)

Fig 2 Histopathological changes of ears of mice in each group observed by hematoxylin-eosin staining (400×)

A: Blank group; B: Model group (treatment with 2 nmol calcipotriol liniment on the ear daily for 14 d); C: Treatment group (treatment with 2 nmol calcipotriol liniment on the ear and intraperitoneal injection of 50 nmol resiquimod daily for 14 d).

2.3 各组小鼠血清IgE、IL-4、IL-13水平 ELISA检测结果(图4)显示,与空白组相比,模型组小鼠血清中IgE、IL-4、IL-13水平均升高(P 均 <0.01),

说明小鼠AD模型构建成功。与模型组相比,治疗组小鼠血清IgE、IL-4、IL-13水平均下降,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。

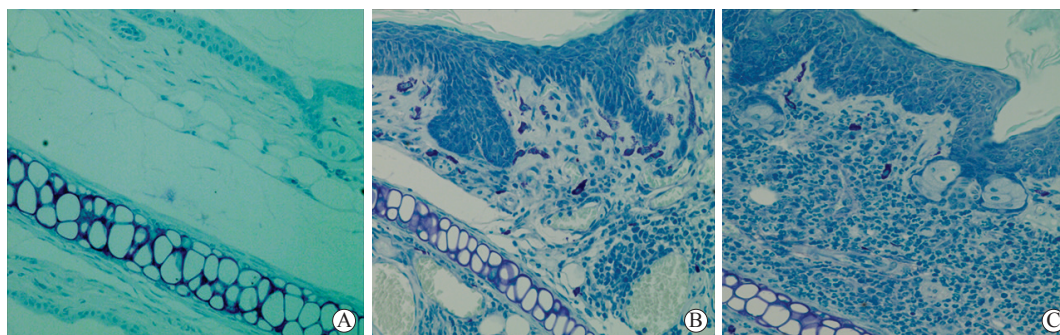


图3 甲苯胺蓝染色观察各组小鼠耳部组织病理学变化(400×)

Fig 3 Histopathological changes of the ears of mice in each group observed by toluidine blue staining (400×)

A: Blank group; B: Model group (treatment with 2 nmol calcipotriol liniment on the ear daily for 14 d); C: Treatment group (treatment with 2 nmol calcipotriol liniment on the ear and intraperitoneal injection of 50 nmol resiquimod daily for 14 d).

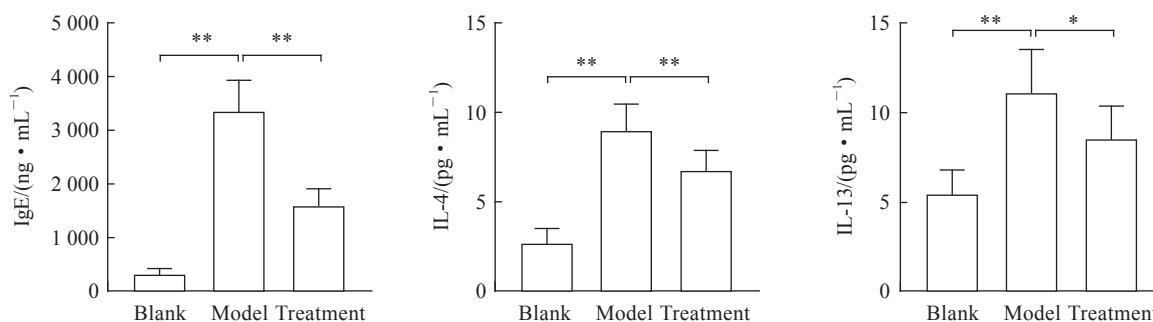


图4 各组小鼠血清IgE、IL-4、IL-13水平检测结果

Fig 4 Levels of serum IgE, IL-4 and IL-13 of mice in each group

Model group: The mice were treated with 2 nmol calcipotriol liniment on the ear daily for 14 d; Treatment group: The mice treated with 2 nmol calcipotriol liniment on the ear and intraperitoneal injection of 50 nmol resiquimod daily for 14 d. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. IgE: Immunoglobulin E; IL: Interleukin.

2.4 各组小鼠耳部组织中 *TSLP*、 γ 干扰素 mRNA 表达 qPCR 检测结果显示, 模型组小鼠耳部组织中 *TSLP* mRNA 表达量 (0.97 ± 0.24) 较空白组 (0.34 ± 0.09) 升高 ($P < 0.01$), 治疗组 *TSLP* mRNA 表达量 (0.80 ± 0.17) 与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组小鼠耳部组织中 γ 干扰素 mRNA 表达量 (0.81 ± 0.48) 与空白组 (1.05 ± 0.08) 相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但治疗组 γ 干扰素 mRNA 表达量 (1.20 ± 0.14) 较模型组升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

AD 的病因复杂, 包括遗传、免疫和环境等因素, 其中皮肤屏障功能异常和免疫功能障碍被认为是 AD 发病机制的关键。免疫功能障碍相关的发病机制包括血清 IgE 水平升高、Th1/Th2 免疫反应失衡、Th2 细胞因子过表达、表达皮肤淋巴细胞相关抗原的 T 细胞增加、表皮炎症性树突状细胞 (包

括朗格汉斯细胞) 中 Fc ϵ 受体 I 及 TSLP 表达增加等^[5]。卡泊三醇能够诱导小鼠角质形成细胞过表达 TSLP, 导致 AD 样皮损; 在卡泊三醇诱导的 AD 小鼠模型中可见表皮增生, 真皮内嗜酸性粒细胞和肥大细胞等炎症细胞浸润, 皮损处 TSLP、IL-4、IL-5、IL-13、IL-31、IL-10、IL-8 等 Th2 细胞因子表达增加, 同时小鼠血清中 IgE 水平升高^[6]。因此, 卡泊三醇诱导的动物模型很好地再现了 AD 免疫功能障碍的特征。本实验即采用卡泊三醇搽剂诱导 AD 模型, 观察雷西莫特对 AD 小鼠的治疗效果及可能的作用机制。

Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 是一种模式识别受体, 是固有免疫的重要组成部分, 可对入侵的病原体产生防御性炎症反应^[7]。研究表明, 雷西莫特作为 TLR7/8 激动剂可诱导细胞因子如 α 干扰素、 γ 干扰素和 IL-12 表达, 从而增加 Th1 免疫应答, 同时抑制 Th2 细胞产生 IL-4 和 IL-5^[8]。本研究中, 治疗组小鼠耳部皮损肿胀、红斑、鳞屑

情况较模型组改善,耳部皮损组织中炎症细胞浸润程度减轻,肥大细胞数量减少,血清IL-4、IL-13水平下降,耳部皮损组织中 γ 干扰素表达增加。结果表明腹腔注射雷西莫特可以通过调节Th1/Th2免疫应答反应改善小鼠AD症状。

IgE在哮喘、变应性鼻炎、AD等变应性疾病的发病中起着至关重要的作用, Th2细胞因子有助于激活B淋巴细胞促进IgE产生,而IgE可促进肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒进而导致过敏反应,两者可协同放大皮肤炎症反应^[9]。雷西莫特可直接作用于B淋巴细胞而抑制IgE的合成,也可通过促进 γ 干扰素和IL-12的分泌抑制IgE的产生^[10]。本实验中,治疗组小鼠血清IgE水平低于模型组,提示腹腔注射雷西莫特可能通过抑制IgE分泌改善AD皮损情况。

TSLP作为一种细胞因子,能够促进B淋巴细胞和髓系树突状细胞的活化,参与人和小鼠AD及相关疾病的发生、发展。TSLP通过TNF受体超家族成员4配体促使树突状细胞产生CC趋化因子配体17及22,招募CD4⁺Th2,还可以刺激肥大细胞和自然杀伤T细胞活化,从而增加Th2细胞因子的产生^[11]。雷西莫特可下调TNF受体超家族成员4配体的表达并促进IL-10、IL-12的产生,消除TSLP相关树突状细胞参与的Th2免疫应答,有助于缓解或预防变应性炎症^[12]。本实验中,治疗组小鼠皮损组织中TSLP mRNA表达量与模型组比较差异无统计学意义,提示腹腔注射雷西莫特可能不会直接影响TSLP表达,其机制可能与下调TNF受体超家族成员4配体表达有关。

综上所述,本实验结果显示腹腔注射雷西莫特可以改善AD小鼠的皮炎状况,作用机制可能与雷西莫特抑制Th2反应、减少IL-4和IL-13分泌,增强Th1反应、增加 γ 干扰素mRNA表达,同时抑制IgE的合成有关,但其发挥作用的具体通路及不良反应有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] LANGAN S M, IRVINE A D, WEIDINGER S. Atopic dermatitis[J]. Lancet, 2020, 396: 345-360.
- [2] TORRES T, FERREIRA E O, GONÇALO M, MENDES-BASTOS P, SELORES M, FILIPE P. Update on atopic dermatitis[J]. Acta Med Port, 2019, 32: 606-613.
- [3] FROTSCHER B, ANTON K, WORM M. Inhibition of IgE production by the imidazoquinoline resiquimod in nonallergic and allergic donors[J]. J Invest Dermatol, 2002, 119: 1059-1064.
- [4] QU S H, QIN T J, LI M, ZHANG S J, YE L S, WEI J Z, et al. The effects of resiquimod in an ovalbumin-induced allergic rhinitis model[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 59: 233-242.
- [5] ZANIBONI M C, SAMORANO L P, ORFALI R L, AOKI V. Skin barrier in atopic dermatitis: beyond filaggrin[J]. An Bras Dermatol, 2016, 91: 472-478.
- [6] MOOSBRUGGER-MARTINZ V, SCHMUTH M, DUBRAC S. A mouse model for atopic dermatitis using topical application of vitamin D3 or of its analog MC903[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1559: 91-106.
- [7] TAKEDA K, AKIRA S. Toll-like receptors[J]. Curr Protoc Immunol, 2015, 109: 14.12.1-14.12.10.
- [8] WAGNER T L, AHONEN C L, COUTURE A M, GIBSON S J, MILLER R L, SMITH R M, et al. Modulation of TH1 and TH2 cytokine production with the immune response modifiers, R-848 and imiquimod[J]. Cell Immunol, 1999, 191: 10-19.
- [9] OETTGEN H C. Fifty years later: emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137: 1631-1645.
- [10] SHEN E, LU L, WU C. TLR7/8 ligand, R-848, inhibits IgE synthesis by acting directly on B lymphocytes[J]. Scand J Immunol, 2008, 67: 560-568.
- [11] INDRA A K. Epidermal TSLP: a trigger factor for pathogenesis of atopic dermatitis[J]. Expert Rev Proteomics, 2013, 10: 309-311.
- [12] TORII Y, ITO T, AMAKAWA R, SUGIMOTO H, AMURO H, TANIJIRI T, et al. Imidazoquinoline acts as immune adjuvant for functional alteration of thymic stromal lymphopoietin-mediated allergic T cell response[J]. J Immunol, 2008, 181: 5340-5349.

[本文编辑] 商素芳