

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.07.012

含不同剂量酸枣仁的敷和汤对特应性皮炎模型小鼠 IgE 水平及肠道菌群的影响

青千裕¹, 赵子第², 姜楚洋¹, 赵雅飞¹, 李艳彦^{1,2}✉

1. 山西中医药大学, 山西省晋中市榆次区乌金山镇大学街 121 号, 030619; 2. 山西中医药大学附属医院

[摘要] **目的** 探讨含不同剂量酸枣仁的敷和汤治疗特应性皮炎的作用机制。**方法** 48 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为正常组, 模型组, 氯雷他定组, 含高、中、低剂量酸枣仁的敷和汤组, 每组 8 只。除正常组外, 其余各组均用 2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 连续刺激制备特应性皮炎模型。造模后含高、中、低剂量酸枣仁的敷和汤组分别给予敷和汤 24、18、15 g/(kg·d) 灌胃, 氯雷他定组给予氯雷他定干混悬剂 0.001 g/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组给予 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃, 各组均灌胃 14 天。分别于造模第 7、14 天和给药第 7、14 天观察小鼠 10 min 内搔抓次数和皮损评分; ELISA 法检测血清中免疫球蛋白 E (IgE) 含量; HE 染色观察皮肤组织病理形态学改变; 对小鼠结肠中粪便进行 16S rRNA 基因测序检测肠道菌群多样性及丰度变化。**结果** 与正常组比较, 造模第 7、14 天和灌胃第 7、14 天模型组小鼠 10 min 内搔抓次数增加且皮损评分升高 ($P<0.05$), 灌胃后小鼠表皮角化过度或不全、棘层细胞明显增厚、大量炎性细胞浸润; 血清中 IgE 含量升高 ($P<0.05$), 厚壁菌门丰度降低, 拟杆菌门、细菌丰度升高, 乳杆菌属和普雷沃菌属相对丰度降低, 拟杆菌属和颤螺菌属相对丰度升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 灌胃第 7、14 天氯雷他定组和含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠 10 min 内搔抓次数和皮损评分均降低 ($P<0.05$), 血清中 IgE 含量降低, 含中剂量酸枣仁的敷和汤组厚壁菌门丰度升高、拟杆菌门丰度降低, 氯雷他定组拟杆菌属丰度降低, 含中剂量酸枣仁的敷和汤组拟杆菌属丰度降低、乳杆菌属和普雷沃菌属丰度均升高 ($P<0.05$)。与氯雷他定组比较, 灌胃第 7、14 天含低剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠皮损评分升高, 含高、低剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠搔抓次数增多; 灌胃后含低剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠 IgE 含量升高, 含中剂量酸枣仁的敷和汤组厚壁菌门升高、拟杆菌门降低, 乳杆菌属和普雷沃菌属升高, 含高剂量酸枣仁的敷和汤组拟杆菌属升高 ($P<0.05$)。**结论** 含不同剂量酸枣仁的敷和汤能改善特应性皮炎的临床症状, 调节肠道菌群的相对丰度纠正菌群的紊乱情况, 其中以含中剂量酸枣仁的敷和汤组效果最优, 且与氯雷他定组效果相当, 降低血清中的 IgE 炎症反应可能是其作用机制之一。

[关键词] 特应性皮炎; 酸枣仁; 敷和汤; 2,4-二硝基氟苯; 免疫球蛋白 E; 肠道菌群

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 是以皮肤瘙痒为主的慢性炎症性皮肤病, 属于中医学“湿疹”“湿疮病”“四弯风”“浸淫疮”等范畴^[1]。近年来, AD 的发病率在我国呈逐年上升趋势, 尤其是在儿童和青年中发病率较高, 重度病例甚至高达 20%, 并且极易复发, 严重影响患者生活质量^[2]。

目前, 西医治疗 AD 常规药物包括抗组胺类、免疫调节类、糖皮质激素类等, 虽可以暂时有效缓解 AD 症状, 但也会导致很多不良反应^[3]。研究表明, AD 的发生发展与肠道菌群密切相关^[4], 肠道菌群作为机体最大的外来抗原库, 参与机体的营养代谢、免疫调节等多项生理活动^[5]。

敷和汤出自陈无择《三因极一病证方论》, 具有养肝熄风、健脾祛湿、补肺固表功效, 为肝脾肺同调、气血湿同治之方, 可治疗血虚风盛、脾虚湿

基金项目: 山西省中医药管理局科研项目 (2019ZYCY017); 山西中医药大学科技创新能力培育计划 (2020PY-YC-13)

✉ 通讯作者: liyy1002@163.com

阻所致皮肤疾患。AD 多由气血生化不足, 导致血虚生风而致皮肤瘙痒, 敷和汤恰合其病机。方中酸枣仁具有养肝宁心、养血安神、生津敛汗的功效, 是敷和汤中的君药, 在方中起重要作用。现代药理学研究表明, 酸枣仁含有皂苷、黄酮、生物碱、脂肪酸等活性成分, 具有镇静催眠、增强机体免疫力、调节肠道菌群结构等多种作用^[6], 故本研究将敷和汤中酸枣仁分为高、中、低剂量进行研究以探寻酸枣仁在方中起效的最佳剂量。

本研究以 2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 诱导的 AD 小鼠为模型, 给予含高、中、低剂量酸枣仁的敷和汤进行干预, 观察其对 AD 模型小鼠免疫球蛋白 E (IgE) 水平及肠道微生物的影响, 旨在从肠道菌群调控角度探究含不同剂量酸枣仁的敷和汤治疗 AD 的可能作用机制, 为其治疗 AD 提供实验依据。本研究经山西中医药大学动物伦理委员会审查批准 (编号: 2022DW271)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 48 只, 体重 17~20 g, 购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物合格证号: SCXK (京) 2019-0010。饲养条件: 明暗循环各 12 h, 室内温度 20~25 °C, 湿度 50%~60%, 自由进食、饮水, 适应性饲养 7 天后进行实验。

1.2 药物

敷和汤组成: 法半夏 6 g、酸枣仁 (高、中、低剂量分别为 60、30、15 g)、五味子 9 g、麸炒枳实 9 g、茯苓 12 g、炮诃子 6 g、炮姜 6 g、陈皮 6 g、炙甘草 6 g。饮片均购自于北京同仁堂药店, 经山西中医药大学附属医院主任中药师鉴定为正品。饮片用 8 倍量纯化水 (720 ml) 浸泡 30 min, 煎煮 30 min 后滤出, 再取 6 倍量纯化水 (540 ml) 煎煮 30 min 后滤出, 合并 2 次药液, 浓缩至含生药量 3 g/ml, 4 °C 冰箱保存备用。氯雷他定干混悬剂 (浓度为 0.001 g/ml) 购于海南普利制药股份有限公司, 批号: H20041111。

1.3 主要试剂及仪器

DNFB、基质 (丙酮: 橄榄油=4:1) 试剂 (上海麦克林生化科技有限公司, 批号分别为 C12844135、C12004122); 4% 多聚甲醛 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号 AR1068); HE 染色液 (珠海贝索生物技术有限公司, 批号 BA4025);

小鼠 IgE (武汉贝茵莱生物科技有限公司, 批号 MU30387); Real-time PCR 试剂盒 (北京聚合美生物科技有限公司, 批号 21KB2210); 电泳缓冲液 TAE 生工生物 (上海) 股份有限公司, 批号 B548101-500; 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (上海博尔森生物科技有限公司, 批号: BES21191KB)。

BX51 型光学显微镜 (日本奥林巴斯公司); Histocore BIOCUT 切片机 (德国 Leica 公司); OSE-Y30 型电动组织研磨器 (天根生化科技有限公司); AMR-100 型酶标仪 (杭州奥盛仪器有限公司); 高速冷冻离心机 (安徽中科中佳科技仪器有限公司); NovaSeq 6000 型 16S rRNA 高通量测序仪 (美国 Illumina 公司); 2100 型核酸定量分析仪 (美国 Agilent 公司); A200 型 PCR 扩增仪 (杭州朗基科学仪器有限公司)。

1.4 动物分组、造模及给药

48 只小鼠适应性饲养 7 天后采用随机数字表法分为正常组, 模型组, 氯雷他定组, 含高、中、低剂量酸枣仁的敷和汤组, 每组 8 只。除正常组外, 其余各组进行脱毛处理, 实验第 1 天使用移液器吸取 0.5% DNFB (50 μ l) 溶液均匀涂抹小鼠背部脱毛部位皮肤, 第 2、4、6、8、10、12、14 天改用 0.2% DNFB (50 μ l) 溶液进行连续致敏刺激, 使用移液器吸取药液均匀涂抹小鼠背部脱毛部位皮肤; 正常组给予溶液基质刺激, 时间频率和模型组相同。小鼠背部皮肤出现红斑、部分糜烂、结痂伴有搔抓次数增多等症状, 即为造模成功^[7-8]。各组小鼠均造模成功。

造模完成后, 根据临床等效剂量换算^[9], 含高、中、低剂量酸枣仁的敷和汤组分别给予敷和汤 24、18、15 g/(kg·d) 灌胃, 氯雷他定组给予氯雷他定干混悬剂 0.001 g/(kg·d) 灌胃, 正常组、模型组给予 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃。各组均每日 1 次, 共灌胃 14 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 小鼠背部皮损评分及瘙痒程度 分别在造模第 7、14 天和灌胃第 7、14 天各评价 1 次, 根据 AD 积分评定标准^[10] 对小鼠背部出现的红斑、水肿、表皮脱落、瘢痕情况分为无 (0 分)、轻 (1 分)、中 (2 分)、重 (3 分) 4 个等级进行评分。分别将每只小鼠单独放置进行摄像评价瘙痒程度, 记录小鼠在 10 min 内搔抓和咬自身的行为, 前爪搔抓耳部和头部、后爪搔抓躯干和背部, 前后爪分别或同时连续搔抓 2 次及以上的搔抓动作, 计为 1 次。

1.5.2 HE 染色观察背部皮损病理形态改变 灌胃结束 24 h 后, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 然后切除背部皮损约 1 cm×1 cm 的皮肤标本, 立即放置于 4% 的多聚甲醛固定 24 h。常规脱水、二甲苯透明、石蜡包埋组织、切片、HE 染色, 中性树胶封片, 在光学显微镜下观察结果并采集图像。

1.5.3 ELISA 法检测小鼠血清 IgE 灌胃结束 24 h 后, 小鼠眼内眦取血, 4 ℃ 下以 1500 r/min 离心 30 min, 离心半径 6.5 cm, 获得血清。根据 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 IgE 水平, 用酶标仪测定 450 nm 的 OD 值, 绘制出标准曲线, 并根据标准曲线计算 IgE 浓度。

1.5.4 肠道菌群检测及多样性、差异性分析 灌胃结束 24 h 后, 采用随机数字表法每组取 3 只小鼠, 取血后颈椎脱臼法处死用 16S rRNA 高通量测序技术进行肠道菌群的检测。以 75% 酒精消毒眼科剪剪开结肠收集肠内容物, 每份约 1 g 左右, 放置无酶 EP 管中保存, 选择 CTAB 法对微生物组样本提取 DNA, 引物由上海生物工程有限公司合成, 引物序列: 上游 341F (5'- CCTACGGGNGGCWG-CAG-3'), 下游 805R (5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), 长度 290 bp。混样和纯化后使用 2100 型核酸定量分析仪和 Illumina Miseq 测序进行评估, 将合格的样本进行上机测序, 并经过 NaOH 变性为单链使用 16S rRNA 高通量测序仪进行双端测序, 将数据上传到 Silva 数据库 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release138/>) 进行物种注释。使用 R 软件进行 Alpha、Beta 多样性分析、菌群物种组成及差异分析。Alpha 多样性结果以 Chao 1 指数、Ace 指数、Shannon 指数、Simpson 指数表示; Beta 多样性使用主成分分析 (PCoA) 来反映和研究样本群落组成的相似性或差异性, 即判断不同分组间的群落组成的差异性 or 相似性; LEfSe 分析采用线

性判断筛选组间丰度差异显著的物种, 最后用线性回归分析 (LDA) 估算每组丰度差异效果影响大小。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析。计量资料符合正态分布用均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐时多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐时采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠各时间点背部皮损评分比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组各时间点小鼠皮损评分升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 灌胃第 7 天含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组与氯雷他定组小鼠皮损评分降低 ($P < 0.05$); 灌胃第 14 天含不同剂量酸枣仁的敷和汤组及氯雷他定组小鼠皮损评分降低 ($P < 0.05$)。与氯雷他定组比较, 灌胃第 7、14 天含低剂量酸枣仁的敷和汤组皮损评分升高 ($P < 0.05$), 含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组皮损评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与含低剂量酸枣仁的敷和汤组比较, 灌胃第 7 天含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠皮损评分降低 ($P < 0.05$)。与灌胃第 7 天含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠皮损评分降低 ($P < 0.05$)。与灌胃第 7 天含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组比较, 造模第 7 天及灌胃第 7、14 天含不同剂量酸枣仁的敷和汤组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠各时间点 10 min 内搔抓次数比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组各时间点小鼠搔抓次数显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 灌胃第 7、14 天含不同剂量酸枣仁的敷和汤组及氯雷他定组小鼠搔抓次数显著减少 ($P < 0.05$)。与氯雷他定组比较, 灌胃第 7 天含高、低剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠搔抓次数增加, 灌胃第 14 天含不同剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠搔抓次数均增加 ($P < 0.05$)。与含低剂量酸枣仁的敷和汤组比较, 灌

表 1 各组小鼠各时间点背部皮损评分比较

Table 1 Comparison of skin lesion scores in back at each time point in each group of mice

(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	造模第 7 天	造模第 14 天	灌胃第 7 天	灌胃第 14 天
正常组	8	0.13±0.35	0.06±0.17	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	8	5.43±0.49 ^{a)}	8.62±0.58 ^{a)}	8.81±0.75 ^{a)}	8.81±0.65 ^{a)}
低剂量酸枣仁敷和汤组	8	5.37±0.74	8.56±0.49	8.50±0.53 ^{c)}	3.87±0.83 ^{b) c)}
中剂量酸枣仁敷和汤组	8	5.43±0.49	8.37±0.51	5.00±0.75 ^{b) d)}	3.43±0.90 ^{b)}
高剂量酸枣仁敷和汤组	8	5.31±0.45	8.50±0.53	5.37±0.91 ^{b) d)}	3.56±0.72 ^{b)}
氯雷他定组	8	5.37±0.74	8.12±0.99	6.12±0.64 ^{b)}	2.75±0.70 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与氯雷他定组比较, $P < 0.05$; d) 与低剂量酸枣仁敷和汤组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 各组小鼠各时间点 10 min 内搔抓次数比较

Table 2 Comparison of the number of scratching within 10 mins at each time point in each group of mice (次, $\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	造模第 7 天	造模第 14 天	灌胃第 7 天	灌胃第 14 天
正常组	8	1.25±0.46	1.25±0.46	1.12±0.35	1.37±0.52
模型组	8	5.50±0.53 ^{a)}	14.25±1.03 ^{a)}	11.75±0.70 ^{a)}	13.25±1.03 ^{a)}
低剂量酸枣仁敷和汤组	8	5.62±0.51	13.75±1.03	9.50±0.53 ^{b) c)}	8.12±1.12 ^{b) c)}
中剂量酸枣仁敷和汤组	8	5.50±0.53	13.81±0.65	7.00±0.75 ^{b) d)}	5.25±0.71 ^{b) c) d)}
高剂量酸枣仁敷和汤组	8	5.50±0.53	13.62±1.06	8.50±0.76 ^{b) c) d) e)}	6.62±0.51 ^{b) c) d) e)}
氯雷他定组	8	5.75±0.46	13.00±0.75	6.50±0.53 ^{b)}	4.37±0.74 ^{b)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与氯雷他定组比较， $P<0.05$ ；d) 与低剂量酸枣仁敷和汤组比较， $P<0.05$ ；e) 与中剂量酸枣仁敷和汤组比较， $P<0.05$ 。

胃第 7、14 天含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠搔抓次数均减少 ($P<0.05$)。与含中剂量酸枣仁的敷和汤组比较，灌胃第 7、14 天含高剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠搔抓次数均增加 ($P<0.05$)。

2.3 各组小鼠背部皮损组织形态学结果

图 1 示，正常组小鼠棘层细胞较薄，各层次清晰。模型组棘层细胞明显增厚，角化过度，海绵水肿，并见淋巴细胞、中性粒细胞、真皮内淋巴细胞浸润明显。与模型组比较，氯雷他定组和含不同剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠棘层细胞厚度均有所降低，炎性细胞浸润明显减少，其中含中剂量酸枣仁的敷和汤组和氯雷他定组改善效果最明显。

2.4 各组小鼠血清 IgE 含量比较

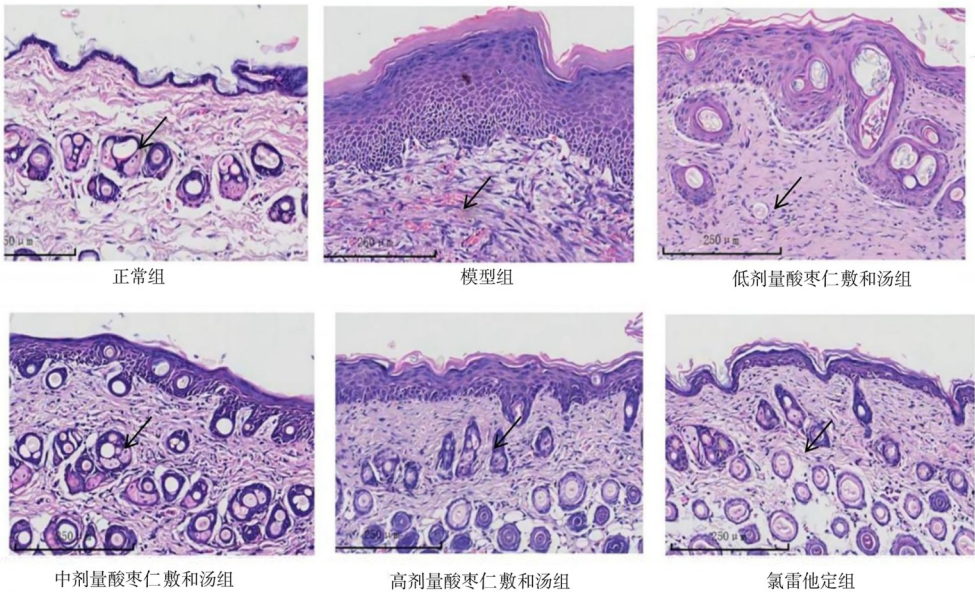
表 3 示，与正常组比较，模型组小鼠血清 IgE 含量升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，氯雷他定组和含不同剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠 IgE 含量降低 ($P<0.05$)。与氯雷他定组比较，含低剂量酸

枣仁的敷和汤组小鼠 IgE 含量升高 ($P<0.05$)，含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠 IgE 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与含低剂量酸枣仁的敷和汤组比较，含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组 IgE 含量均降低 ($P<0.05$)。

表 3 各组小鼠血清免疫球蛋白水平比较

Table 3 Comparison of serum immunoglobulin levels in each group of mice (ng/ml, $\bar{x}\pm s$)		
组别	鼠数	免疫球蛋白
正常组	8	139.58±12.64
模型组	8	302.39±46.60 ^{a)}
低剂量酸枣仁敷和汤组	8	230.38±17.30 ^{b) c)}
中剂量酸枣仁敷和汤组	8	175.97±13.12 ^{b) d)}
高剂量酸枣仁敷和汤组	8	199.92±10.58 ^{b) d)}
氯雷他定组	8	183.89±11.74 ^{b)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与氯雷他定组比较， $P<0.05$ ；d) 与低剂量酸枣仁敷和汤组比较， $P<0.05$ 。



注：图中箭头所示为炎症细胞浸润。

图 1 各组小鼠背部皮损组织形态学结果 (HE 染色, ×100)

Figure 1 Histomorphology of skin lesions in back of mice in each group (HE staining, ×100)

表 4 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数及丰度比较

Table 4 Comparison of Alpha diversity index and abundance of intestinal flora of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Chao 1	Ace	Shannon	Simpson
正常组	3	1000.23±86.58	900.11±52.50	4.78±0.36	0.98±0.01
模型组	3	853.21±33.99	846.48±32.47	4.57±0.30	0.97±0.01
低剂量酸枣仁敷和汤组	3	926.12±129.88	944.59±149.13	4.62±0.15	0.97±0.01
中剂量酸枣仁敷和汤组	3	984.77±32.66	984.65±105.51	4.73±0.07	0.98±0.01
高剂量酸枣仁敷和汤组	3	1007.61±94.78	976.79±16.83	4.67±0.19	0.98±0.01
氯雷他定组	3	891.48±114.80	869.96±95.43	4.49±0.26	0.97±0.01

2.5 小鼠肠道菌群结构分析

2.5.1 Alpha 计算肠道菌群多样性和丰度结果 表 4 示, 与正常组比较, 模型组 Chao 1、Ace 肠道菌群丰度降低, Shannon、Simpson 菌群多样性减少, 但差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与模型组比较, 氯雷他定组和含不同剂量酸枣仁的敷和汤组肠道菌群多样性和丰度都有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与氯雷他定组比较, 含不同剂量酸枣仁的敷和汤组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

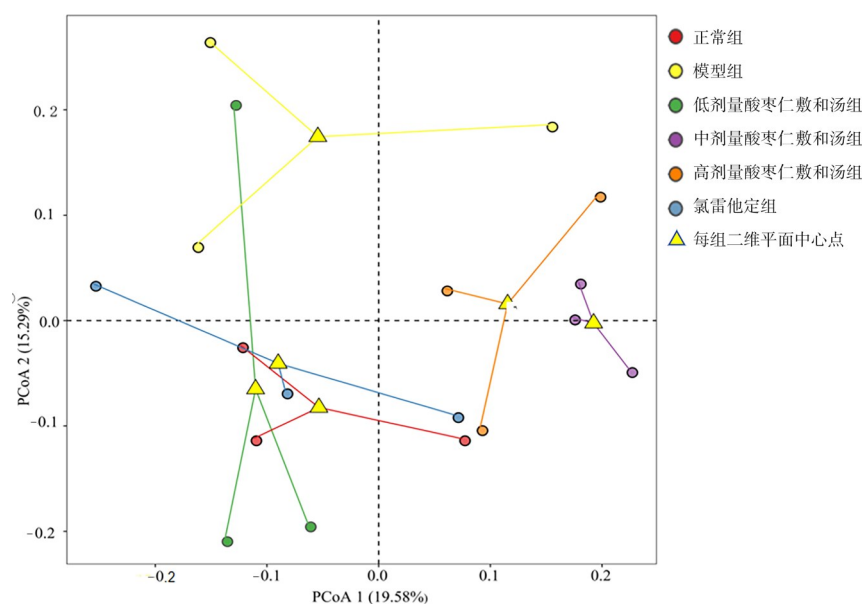
2.5.2 Beta 计算肠道菌群多样性结果 使用 Beta 多样性比较各样本之间肠道菌群结构差异。评估观察个体和群体间差异, 具有相同颜色的斑点代表来自同一组的样本, 任何两个斑点之间的距离代表两个样本之间肠道微生物区系组成的差异。图 2 示, 正常组与模型组样本距离较远, 表明群落组成存在明显差异; 与模型组比较, 含高、中剂量酸枣仁的

敷和汤组较为集中, 表明聚类性较好, 与模型组基本分开且距离较远; 含低剂量酸枣仁的敷和汤组和氯雷他定组较为分散, 但大部分与模型组分开。

2.5.3 各组小鼠肠道菌群门、属水平分布比较

表 5 示, 门水平分布上, 与正常组比较, 模型组厚壁菌门丰度降低和拟杆菌门、细菌丰度升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 氯雷他定组细菌降低 ($P<0.05$), 含中剂量酸枣仁的敷和汤组厚壁菌门丰度升高、拟杆菌门丰度降低 ($P<0.05$); 与氯雷他定组比较, 含中剂量酸枣仁的敷和汤组厚壁菌门升高和拟杆菌门降低 ($P<0.05$); 与含中剂量酸枣仁的敷和汤组比较, 含高、低剂量酸枣仁的敷和汤组厚壁菌门丰度降低 ($P<0.05$), 含低剂量酸枣仁的敷和汤组拟杆菌门丰度升高 ($P<0.05$); 与含高剂量酸枣仁的敷和汤组比较, 含低剂量酸枣仁的敷和汤组各菌门差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 6 示, 属水平分布上, 与正常组比较, 模型组



注: PCoA1, 主成分 1; PCoA2, 主成分 2。

图 2 主成分分析小鼠肠道微生物区系的 Beta 多样性结果

Figure 2 Beta diversity results of mice gut microbiota by principal component analysis

表 5 各组小鼠肠道菌群门水平组成比较

Table 5 Comparison of the composition of intestinal flora gate levels in each group of mice (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	厚壁菌门	拟杆菌门	细菌	放线菌门
正常组	3	49.570±5.268	41.860±2.820	0.022±0.002	0.134±0.084
模型组	3	25.924±5.363 ^{a)}	66.000±6.237 ^{a)}	0.046±0.003 ^{a)}	0.043±0.033
低剂量酸枣仁煎和汤组	3	27.077±2.112 ^{d)}	61.445±2.096 ^{d)}	0.038±0.017	0.016±0.730
中剂量酸枣仁煎和汤组	3	36.877±5.326 ^{b) c)}	50.979±6.170 ^{b) c)}	0.038±0.014	0.096±0.035
高剂量酸枣仁煎和汤组	3	29.298±6.504 ^{d)}	56.949±9.446	0.032±0.001	0.104±0.025
氯雷他定组	3	27.908±2.936	63.718±2.729	0.034±0.012 ^{b)}	0.135±0.395

注：a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与氯雷他定组比较， $P<0.05$ ；d) 与中剂量酸枣仁煎和汤组比较， $P<0.05$ 。

表 6 各组小鼠肠道菌群属水平组成比较

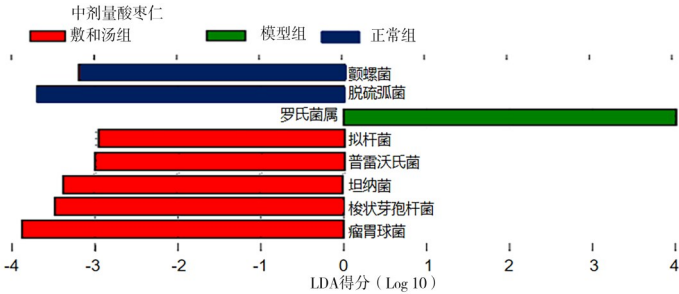
Table 6 Comparison of the genus level composition of intestinal flora in mice in each group (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	乳杆菌属	拟杆菌属	颤螺菌属	普雷沃氏菌属
正常组	3	16.303±4.503	3.012±1.516	2.482±1.042	27.618±6.721
模型组	3	8.951±1.676 ^{a)}	12.008±2.991 ^{a)}	9.584±0.587 ^{a)}	11.575±1.968 ^{a)}
低剂量酸枣仁煎和汤组	3	10.993±0.806 ^{d)}	9.943±1.472 ^{c) d)}	10.115±1.343	11.174±3.602 ^{d)}
中剂量酸枣仁煎和汤组	3	19.628±3.101 ^{b) c)}	4.822±61.350 ^{b)}	9.275±0.918	25.182±5.175 ^{b) c)}
高剂量酸枣仁煎和汤组	3	11.174±2.475 ^{d)}	10.101±1.376 ^{c) d)}	9.556±1.198	15.277±1.998 ^{d)}
氯雷他定组	3	11.365±1.255	4.292±0.205 ^{b)}	9.123±2.003	16.726±0.869

注：a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与氯雷他定组比较， $P<0.05$ ；d) 与中剂量酸枣仁煎和汤组比较， $P<0.05$ 。

乳杆菌属和普雷沃氏菌属相对丰度降低，拟杆菌属和颤螺菌属相对丰度升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，氯雷他定组拟杆菌属丰度降低 ($P<0.05$)，含中剂量酸枣仁的煎和汤组拟杆菌属丰度降低、乳杆菌属和普雷沃氏菌属相对丰度均升高 ($P<0.05$)；与氯雷他定组比较，含中剂量酸枣仁的煎和汤组乳杆菌属和普雷沃氏菌属丰度升高，含高剂量酸枣仁的煎和汤组拟杆菌属升高 ($P<0.05$)；与含中剂量酸枣仁的煎和汤组比较，含高、低剂量酸枣仁的煎和汤组乳杆菌属和普雷沃氏菌丰度降低，拟杆菌属丰度升高 ($P<0.05$)；含高、低剂量酸枣仁的煎和汤组各菌属丰度比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5.4 各组小鼠肠道菌群 LEfSe 多级物种差异判断分析 采用线性判断筛选组间差异菌种。经过以上数据结果分析选用正常组、模型组和含中剂量酸枣仁的煎和汤组进一步分析组间在丰度上有显著差异的物种。条形图长度代表差异物种的贡献度，以 $LDA>3$ 为筛选标准即具有统计学意义的生物标志物 (Biomaker)。图 3 示，正常组有丰度差异的物种为：颤螺菌属、脱硫弧菌；模型组有丰度差异的物种为：罗氏菌属；含中剂量酸枣仁的煎和汤组有丰度差异的物种为：瘤胃球菌、梭状芽孢杆菌、坦纳菌、普雷沃氏菌、拟杆菌。通过 LEfSe 分析以上菌群是正常组、模型组和含中剂量酸枣仁的煎和汤组小鼠肠道内的主要贡献菌群。



注：LDA，线性回归分析。

图 3 线性回归分析各组小鼠差异菌丰度结果

Figure 3 Differential bacterial abundance results for each group of mice by linear regression analysis

3 讨论

中医学认为 AD 病因为禀赋不耐,脾虚湿盛,肺卫气虚,血虚风燥,兼外感风、湿、热邪等,内外相搏于皮肤而发病^[11]。AD 患者由于脾失运化不能散精于肺,肺气虚,卫气防御外邪之力弱,易遭外风致营卫失和而皮肤瘙痒;或因肝血不足不能濡养肌肤,血(津)虚风燥,则见皮肤瘙痒,故 AD 发病与肺、肝、脾关系最为密切。本研究选用陈无择《三因极一病证方论》敷和汤,方中君药酸枣仁养血敛肝、熄风止痒;臣以陈皮、半夏燥湿化痰、理气健脾,茯苓渗湿健脾,枳实降气导滞,炮姜辛温助运。君臣相伍,养血敛肝,脾胃健运,使气血生化有源。诃子、五味子敛肺止咳、收敛止汗,为佐药。炙甘草调和诸药,为使药,合酸枣仁酸甘化阴以加强补阴血之力。全方共奏养肝熄风、健脾祛湿、补肺固表之效。

本研究结果显示,灌胃第 7、14 天,氯雷他定组和含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组皮损评分与搔抓次数均较模型组显著降低,其中含中剂量酸枣仁的敷和汤组仅灌胃第 14 天搔抓次数显著高于氯雷他定组,其余均与氯雷他定组差异无统计学意义。HE 病理结果表明,含不同剂量酸枣仁的敷和汤组和氯雷他定组明显改善角化程度并能减少炎性细胞浸润。这些结果表明,含不同剂量酸枣仁的敷和汤组具有抗炎和修复皮肤屏障损伤的作用,且含中剂量酸枣仁的敷和汤组和氯雷他定组效果最为接近。

AD 是一种常见的炎症性皮肤病,其特征是复发性湿疹病灶和强烈的瘙痒感^[12]。其发病机制复杂,主要与遗传、免疫、环境等因素相关^[13]。由辅助型 T 细胞 2 (Th2) 介导的相关细胞因子白细胞介素 4 (IL-4) 促进 B 细胞产生 IgE,通过与 IgE 受体结合诱导肥大细胞和嗜碱性粒细胞形成抗体,刺激释放大量的组胺和炎性介质,导致辅助型 T 细胞 1 (Th1) /Th2 细胞失衡,造成免疫系统紊乱,从而诱发 AD 的临床症状^[14]。本研究结果显示,氯雷他定组和含不同剂量酸枣仁的敷和汤组小鼠 IgE 含量均较模型组降低,且含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组与氯雷他定组小鼠 IgE 含量差异无统计学意义,表明含不同剂量酸枣仁的敷和汤组和氯雷他定组均可降低血清中 IgE 炎性因子水平,可能是通过抑制 AD 小鼠机体中的炎症反应,恢复 Th1/Th2 细胞平衡,纠正免疫系统紊乱从而缓解 AD,且含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组与氯雷他定组效果相当。

肠道菌群是人体肠道内存在的微生物群体,对

维持人体的健康发挥着重要作用。Alpha 多样性分析可用于反映菌群中的丰富度和多样性,Chao 1 和 Ace 指数用来估计群落的丰富度,Shannon 和 Simpson 指数用于反映菌群多样性的指数。本研究结果显示,氯雷他定组和含不同剂量酸枣仁的敷和汤组之间差异虽无统计学意义,但经干预后,小鼠肠道菌群多样性和丰富度均较模型组有所改善。Beta 多样性结果显示,模型组明显区别于正常组,氯雷他定组和含不同剂量酸枣仁的敷和汤组大部分与模型组分开。说明含不同剂量酸枣仁的敷和汤组和氯雷他定组在一定程度上调节了肠道菌群的组成及结构变化,使得紊乱的肠道菌群趋向一种平衡的状态。其中氯雷他定组和含低剂量酸枣仁的敷和汤组较为分散,但含高、中剂量酸枣仁的敷和汤组聚类性较好,优于相对分散的氯雷他定组。

本研究通过分析含不同剂量酸枣仁的敷和汤对小鼠肠道微生物组成的影响发现,厚壁菌门和拟杆菌门是其优势菌群。厚壁菌门具有发酵产生碳水化合物的特性,是丁酸盐、丙酸盐和乙酸盐重要的生产者,通过刺激调节性 T 细胞 (Treg) 细胞生成,参与效应 T 细胞和调节性 T 细胞之间的平衡,从而进一步降低炎症性疾病的风险^[15]。拟杆菌拥有大量碳水化合物活性酶基因,通过发酵产生脂肪酸,为机体提供能量来源^[16]。研究表明,机体碳水化合物降解酶主要来源于厚壁菌门和拟杆菌门的微生物^[17]。本研究结果显示,模型组厚壁菌门丰度降低和拟杆菌门、细菌丰度升高导致菌群占比失调,含中剂量酸枣仁的敷和汤组较模型组厚壁菌门丰度显著升高、拟杆菌门丰度显著降低,提示含中剂量酸枣仁的敷和汤可以通过纠正肠道菌群结构改善 AD 的炎症反应。

乳杆菌可产生抗菌肽阻止病原菌生长和入侵,亦可抑制核因子 κ B (NF- κ B) 诱导的炎症;同时分泌的细胞外囊泡可降低金黄色葡萄球菌诱导 IL-4 等炎性因子^[18]。有研究证实,乳杆菌对 AD 的预防和治疗均取得一定疗效^[19]。普雷沃菌是丁酸盐的重要合成者,随着丁酸含量的增加,可降低血清中 5-羟色胺 (5-HT) 的产生,缓解 AD 的瘙痒症状,进一步修复皮肤屏障功能^[20]。肠道菌群对 T 细胞的分化及功能具有调节免疫稳态的作用^[21]。Toll 样受体是触发先天性和适应性免疫反应的关键受体,在许多机体免疫细胞或组织中广泛表达,但宿主的 Toll 样受体能识别肠道菌群,分泌 Treg,促进与 Th17 细胞的新平衡^[22]。本研究结果显示,氯雷他

定组拟杆菌属丰度降低, 而含中剂量酸枣仁的敷和汤组对拟杆菌属、乳杆菌属和普雷沃菌属均有所改善, 说明药物干预后能够有效改善菌群的多样性和增加优势菌群占比, 且含中剂量酸枣仁的敷和汤组整体效果优于氯雷他定组。

梭状芽孢杆菌是小肠内革兰阳性孢子的肠道微生物, 可以通过产生短链脂肪酸 (SCFAs) 而抑制白细胞介素 17 (IL-17) 的释放, 从而减轻 Th1 向 Th17 的细胞分化, 发挥 Tregs 样诱导作用, 减轻炎症反应, 恢复免疫平衡^[23]。瘤胃球菌是最早发现的胃部细菌之一, 在新陈代谢中起着至关重要的作用, 以葡甘露聚糖多糖的形式产生代谢物, 可以激活免疫系统, 产生肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的释放, 亦可诱导皮肤屏障功能快速修复^[24], 提示瘤胃球菌可作为治疗 AD 的有益菌群。选用正常组、模型组和含中剂量酸枣仁的敷和汤组进行 LEfSe 分析小鼠肠道内有显著差异的菌群。本研究结果显示, 正常组主要贡献菌群有颤螺菌属、脱硫弧菌, 模型组有罗氏菌属, 含中剂量酸枣仁的敷和汤组有瘤胃球菌、梭状芽孢杆菌、坦纳菌、普雷沃菌、拟杆菌。说明含中剂量酸枣仁的敷和汤通过调控肠道菌群产生 SCFAs 和抑制炎症反应对 AD 起到治疗和保护作用。

综上所述, 含不同剂量酸枣仁的敷和汤可以减轻 AD 皮损评分和搔抓次数, 以含中剂量酸枣仁的敷和汤组效果最优, 且与氯雷他定组效果相当, 其作用机制可能是通过重塑肠道菌群结构, 降低血清中 IgE 含量, 从而稳定免疫平衡。本研究从肠道菌群和免疫角度出发, 初步筛选了较为重要的菌属, 然而肠道菌群结构组成复杂且多样, 目前尚未完全检测与阐释, 在后续研究中可进一步加大样本量, 通过多组学联合, 对肠道菌群的具体参与机制进行更深入的研究。

参考文献

- [1] 陈曙光, 赵栋, 陈乐乐, 等. 特应性皮炎的皮肤屏障机制及中医药防治研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 275-282.
- [2] 吴盼倩, 舒虹. 特应性皮炎流行病学及疾病负担研究进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2023, 38(9): 700-704.
- [3] MANDLIK DS, MANDLIK SK. Atopic dermatitis: new insight into the etiology, pathogenesis, diagnosis and novel treatment strategies[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2021, 43(2): 105-125.
- [4] KEMTER AM, NAGLER CR. Influences on allergic

- mechanisms through gut, lung, and skin microbiome exposures[J]. J Clin Invest, 2019, 129(4): 1483-1492.
- [5] 张英杰, 毛骁, 肖艳, 等. 痛风宁对高尿酸血症脾虚湿盛证模型小鼠肠道菌群及肠道尿酸代谢的影响[J]. 中医杂志, 2023, 64(21): 2232-2240.
- [6] 段慧竹, 刘佳星, 闫艳, 等. 肠道菌群介导的酸枣仁总黄酮体内代谢轮廓研究[J]. 中草药, 2022, 52(14): 4376-4387.
- [7] FANG Z, LI L, ZHAO J, et al. Bifidobacteria adolescentis regulated immune responses and gut microbial composition to alleviate DNFB-induced atopic dermatitis in mice[J]. Eur J Nutr, 2020, 59(7): 3069-3081.
- [8] 郑心茹, 张晓清, 杨洋, 等. 2,4-二硝基氯苯诱导 BALB/c 小鼠特异性皮炎模型的建立[J]. 实验动物科学, 2022, 39(6): 57-62.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 28.
- [10] KIM EC, LEE HS, KIM SK, et al. The bark of *Betula platyphylla* var. *japonica* inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 116(2): 270-278.
- [11] 金秋百, 任飞鸿, 李佳琦, 等. 基于《脾胃论》思想论治特应性皮炎[J]. 中医杂志, 2023, 64(11): 1165-1170.
- [12] LI H, ZHANG Z, ZHANG H, et al. Update on the pathogenesis and therapy of atopic dermatitis[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2021, 61(3): 324-338.
- [13] BAYLET A, LACLAVERIE M, MARCHAND L, et al. Immunotherapies in cutaneous pathologies: an overview[J]. Drug Discov Today, 2021, 26(1): 248-255.
- [14] GANDHI NA, BENNETT BL, GRAHAM NM, et al. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15(1): 35-50.
- [15] JUNG TH, JEON WM, HAN KS. In vitro effects of dietary inulin on human fecal microbiota and butyrate production[J]. J Microbiol Biotechnol, 2015, 25(9): 1555-1558.
- [16] LI X, LIANG S, XIA Z, et al. Establishment of a *Maca fascicularis* gut microbiome gene catalog and comparison with the human, pig, and mouse gut microbiomes[J]. Gigascience, 2018, 7(9): giy100. doi: 10.1093/gigascience/giy100.
- [17] ALESSANDRI G, RIZZO SM, OSSIPRANDI MC, et al. Creating an atlas to visualize the biodiversity of the mammalian gut microbiota[J]. Curr Opin Biotechnol, 2022, 73: 28-33. doi: 10.1016/j.copbio.2021.06.028.
- [18] HONG SW, CHOI EB, MIN TK, et al. An important role of α -hemolysin in extracellular vesicles on the development of atopic dermatitis induced by staphylococcus aureus[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e100499.

- [19] JANG HM, LEE KE, KIM DH. The preventive and curative effects of lactobacillus reuteri NK33 and bifidobacterium adolescentis NK98 on immobilization stress-induced anxiety/depression and colitis in mice [J]. *Nutrients*, 2019, 11(4):819.
- [20] VIDAL-VEUTHEY B, GONZÁLEZ D, CÁRDENAS JP. Role of microbial secreted proteins in gut microbiota-host interactions [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 964710. doi: 10.3389/fcimb.2022.964710.
- [21] 苏阳, 任文晨, 李珊珊, 等. 基于肠-免疫-皮肤轴探讨洋金花对银屑病小鼠肠道 Th17/Treg 轴的影响 [J]. *现代中药研究与实践*, 2018, 32(5):27-30.
- [22] XU J, JIA Z, CHEN A, et al. Curcumin ameliorates Staphylococcus aureus-induced mastitis injury through attenuating TLR2-mediated NF- κ B activation [J]. *Microb Pathog*, 2020, 142: 104054. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104054.
- [23] 吴桐. 芪参地黄颗粒对 MG 患者及 EAMG 大鼠肠道菌群影响的研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [24] HUAN X, LUO S, ZHONG H, et al. In-depth peripheral CD4⁺ T profile correlates with myasthenic crisis [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2021, 8(4):749-762.

Study on the Effect of *Fuhe Decoction* (敷和汤) with Different Doses of Suanzaoren (*Ziziphus jujuba*) on IgE Levels and Intestinal Flora in Atopic Dermatitis Model Mice

QING Qianyu¹, ZHAO Ziwei², JIANG Chuyang¹, ZHAO Yafei¹, LI Yanyan^{1,2}

1. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, 030619; 2. Affiliated Hospital of Shanxi University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the effect of *Fuhe Decoction* (敷和汤) with different doses of Suanzaoren (*Ziziphus jujuba*) for atopic dermatitis (AD). **Methods** Forty-eight female BALB/c mice were randomly divided into normal group, model group, loratadine group, and *Fuhe Decoction* groups with high, medium, and low doses of *Fuhe Decoction* (*Fuhe Decoction* high-, medium-, and low-dose groups), with eight mice in each group. The AD model was prepared by continuous stimulation with 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) in all groups but the normal group. After modelling, the *Fuhe Decoction* high-, medium- and low-dose groups were given 24, 18 and 15 g/(kg·d) of *Fuhe Decoction*, the loratadine group was given 0.001 g/(kg·d) of loratadine dry suspension, and the normal group and the model group were given 10 ml/(kg·d) of normal saline by gavage. All groups were gavaged for 14 days. The number of scratches within 10 min and the score of skin lesions were observed on the 7th and 14th days of modelling and on the 7th and 14th days of drug administration, respectively; serum immunoglobulin E (IgE) was detected by ELISA; the histopathological and morphological changes of the skin were observed by HE staining; and the diversity and abundance of intestinal flora were detected by 16S rRNA sequencing of fecal matter from the colon of the mice. **Results** Compared with the normal group, mice in the model group on the 7th day and the 14th day of modelling and the 7th day, the 14th day of gavage showed increased scratching within 10 min and higher skin lesion scores ($P < 0.05$), with hyperkeratotic or incomplete epidermis, marked thickening of spiny cells, and a large number of inflammatory cells infiltrated in the mice after gavage; serum levels of IgE elevated ($P < 0.05$), and the abundance of Bacillota decreased, that of the Bacteroidota and bacteria elevated, and relative abundance of Lactobacillus spp. and Prevotella spp. decreased, and relative abundance of Anaplasma spp. and Treponema spp. increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the number of scratches within 10 min and the skin lesion scores of mice in the loratadine group and the *Fuhe Decoction* medium- and high-dose groups decreased on the 7th day and the 14th day of gavage ($P < 0.05$), serum IgE reduced, and the bacteria reduced in the loratadine group, the abundance of Bacteroidesmus spp. increased and Bacteroidesmus spp. decreased in the medium-dose group of *Fuhe Decoction*, the abundance of Bacteroidesmus spp. decreased in the loratadine group, the abundance of Bacteroidesmus spp. decreased, and that of both Lactobacillus spp. and Prevotella spp. increased in *Fuhe Decoction* medium-dose group ($P < 0.05$). Compared with the loratadine group, the skin lesion scores increased in *Fuhe Decoction* low-dose group, and the number of scratching increased in the *Fuhe Decoction* low- and high-dose groups on the 7th day and the 14th day of gavage; the IgE content increased in *Fuhe Decoction* low-dose group, the Bacillota increased and the Bacteroidota decreased, the Lactobacillus spp. and Prevotella spp. increased in *Fuhe Decoction* middle-dose group, and Anopheles spp. increased in *Fuhe Decoction* high-dose group after gavage ($P < 0.05$). **Conclusion** *Fuhe Decoction* can improve the clinical symptoms of AD, regulate the relative abundance of intestinal flora to correct the disorders of the bacterial flora, among which the effect of *Fuhe Decoction* medium-dose group is optimal and comparable to that of the loratadine group, and the reduction of serum IgE inflammatory response may be one of its mechanisms of action.

Keywords atopic dermatitis; Suanzaoren (*Ziziphus jujuba*); *Fuhe Decoction* (敷和汤); 2,4-dinitrofluorobenzene; immunoglobulin E; intestinal flora

(收稿日期: 2023-09-26; 修回日期: 2024-02-07)

[编辑: 王利芬]