

“消疹方”水提液对盐酸厄洛替尼所致小鼠皮肤毒性的治疗作用研究及机制初探

邢海燕^{1,3} 刘玉萍^{1,2} 蒋祥亮^{1,2} 陈彦^{1,2}

(1.南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏南京 210028 ;

2.江苏省中医药研究院中药组与微生态研究中心, 江苏南京 210028 ;

3.江苏省中医药研究院肿瘤科, 江苏南京 210028)

摘要 目的:观察消疹方水提液对表皮生长因子受体抑制剂致小鼠皮肤毒性的疗效,并探索其治疗机制。方法:35只BALB/c小鼠按体重随机分为空白对照组、模型组、消疹方低剂量组、消疹方高剂量组及阳性药物组。除空白对照组外,其余各组采用盐酸厄洛替尼混悬液灌胃制成皮肤毒性小鼠模型。造模第50日开始,消疹方低、高剂量组分别加用消疹方水提液18、45 g/kg灌胃并擦洗患处,阳性药物组加用克林霉素软膏外涂患处,空白对照组和模型组予等量生理盐水灌胃,各组给药或给生理盐水均每日1次,持续15 d。比较各组小鼠给药15 d后皮肤毒性程度、毛发再生状况。治疗结束后采用ELISA法检测各组小鼠血清中干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-2、IL-6、IL-10及IL-12A等炎症因子水平;采用免疫组化的方法检测各组小鼠皮肤组织中信号传导及转录激活蛋白3 (STAT3)、非受体酪氨酸激酶janus激酶1 (JAK1)等相关蛋白水平。结果:造模后所有造模小鼠背部、四肢、眼睑及唇周皮肤出现了肉眼可见的皮肤毒性(四肢红肿、疱疹、皮疹),各给药组小鼠经药物干预后毛发再生,胡须、眼周部分脱毛症状减轻,四肢红肿程度显著改善。与空白对照组比较,模型组小鼠皮肤组织角质层异常增厚($P<0.0001$),皮肤组织中STAT3、JAK1等蛋白的表达异常增高($P<0.001$, $P<0.0001$),血清IL-10、IL-12A、IL-2、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 的表达显著升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,消疹方高剂量组与阳性药物组小鼠IL-2、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 指标明显改善($P<0.05$, $P<0.01$),消疹方高剂量组IL-10指标明显改善($P<0.05$),且消疹方高剂量组与阳性药物组作用相当。结论:从模型动物角度验证了消疹方水提液对盐酸厄洛替尼所致皮肤毒性的治疗作用,其机制可能与抑制炎症有关。

关键词 药疹;消疹方;验方;炎症因子;转录激活蛋白;非受体酪氨酸激酶;病理学;实验研究

中图分类号 R289.55 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X (2021) 02-0074-05

基金项目 江苏省中医药局科技项目(FY201705);江苏省科教强卫医学重点人才项目(ZDRCA2016036)

以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)为靶点的抗肿瘤分子靶向治疗药物即EGFR抑制剂(EGFRI),如吉非替尼、厄洛替尼等,已被广泛应用于肺癌、结直肠癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤的治疗^[1]。然而,由于EGFR在体内的分布特点,该类物质对皮肤及其附属器官具有特殊的不良反应,其中以皮肤毒性最为常见也最难以耐受,一般于用药后1周左右出现,发生率高达79%~88%。临床大数据显示,44%~100%服用EGFRI的患者会出现丘疹脓疱型皮疹,21%的患者会出现毛发再生异常尤其表现在头发和眼睑处,12%~16%的患者会出现皮肤干燥发痒,还有12%~16%的患者则会出现甲周炎症和牙痛感等^[2-4]。临床常采用局部使用抗生素、类固醇或口服抗生素、免疫调节剂及中药进行治疗^[5]。中医认为,这种

药物性皮炎属“药毒疹”“中药毒”的范畴,主要由于患者素体禀赋不足,血热内蕴,复感药物特殊之毒,致风、湿、热毒等邪毒外达肌肤,多主张采用清热解毒、清热凉血、益气养阴等治则治法进行防治^[6-7]。“消疹方”为江苏省国医名师徐荷芬主任团队常用的肿瘤辅助治疗临床验方,临床对EGFRI所致皮疹具有较好的疗效^[8]。本研究我们建立了EGFRI致皮肤毒性小鼠模型,考察消疹方的疗效,并对其作用机制进行初步分析,为进一步研发和临床使用提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 BALB/c小鼠(体质量20 g左右,雌性),购自南通大学,合格证号:201702736,饲养于江苏省中西医结合医院实验动物中心。本动物实验符合国家及江苏省中医药研究院实验动物中心规定的伦理学要求。

1.2 药物与试剂 盐酸厄洛替尼(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, CAS号: 183319-69-9); 消疹方中所有组成药物饮片均购自江苏省中西医结合医院中药房; 脱毛膏(Nair公司); 克林霉素磷酸酯凝胶(湖北康正药业有限公司); 干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-2、IL-6、IL-10及IL-12A炎症因子Elisa试剂盒(凯基生物有限公司)。

1.3 主要仪器 酶标仪(Thermo scientific, MULTISKAN GO); 倒置显微镜(奥林巴斯, IX73); 超低温冰箱(TCL, BCD-118KA9); 超净工作台(ESCO公司, ESCOAC2); 纯水仪(Millipore公司, TANKPE 060); 分析电子天平(上海良平仪器仪表有限公司, FA2104); 台式高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司, TG16W); 调温电热套(江苏省通州市张芝山镇决心化工电器厂, DW-2型); 剃毛器(Codos公司CP-5000)。

2 实验方法

2.1 药物制备 盐酸厄洛替尼用去离子水配制成10 mg/mL的混悬液。消疹方水提液制备: 取6倍处方量药材(金银花、紫草、土茯苓、连翘、浮萍、夏枯草、牡丹皮)共计840 g, 加8.5 L水, 煎煮1.5 h, 提取2次, 合并滤液, 浓缩成4.50 g生药量/mL的浸膏。

2.2 分组、造模与给药 实验小鼠共35只, 饲养1周适应环境后按照体重随机分为空白对照组、模型组、消疹方低剂量组、消疹方高剂量组和阳性药物组。除空白对照组外其余4组参考文献[9]的方法造模, 前期按每日150 mg/kg灌胃盐酸厄洛替尼, 约2周后皮肤毒性反应开始出现, 50 d左右达到高峰。50 d时通过肉眼观察, 各造模小鼠都出现了不同程度的四肢红肿、毛发再生障碍及疱疹、皮疹, 表明造模成功。造模第50日开始, 在盐酸厄洛替尼灌胃基础上, 消疹方低、高剂量组每日加用18 g/kg和45 g/kg消疹方水提液灌胃, 并对小鼠患处进行擦洗, 阳性药物组每日加用克林霉素磷酸酯凝胶涂抹患处, 空白对照组和模型组灌胃等剂量生理盐水。各组给药或生理盐水均每日1次, 持续15 d, 给药期间同时白炽灯光照10 h/d。

2.3 指标观察

2.3.1 小鼠皮肤毒性的外观和组织病理学观察 干预期间观察小鼠背部毛发再生状况, 四肢、嘴唇等裸露在外的皮肤变化。干预结束后, 取小鼠背部皮肤做HE染色病理切片, 观察皮肤炎症情况及表皮厚度。

2.3.2 免疫组化法检测皮肤组织炎症蛋白表达 干预结束后, 取小鼠皮肤组织于4%多聚甲醛中固定, 常

规石蜡包埋, 切成5 μ m厚度的切片; 0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH=6)修复抗原后, 将切片用PBS洗涤3次, 并用3% BSA封闭; 将切片分别与信号传导及转录激活蛋白3 (STAT3)、非受体酪氨酸激酶janus激酶1 (JAK1)一抗进行4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 洗涤后, 与二抗室温孵育, PBS洗涤, DAB显色试剂盒显色。每个切片随机选择5个中等放大倍率显微镜场($\times 200$), 每组3张用ImageJ软件计算阳性率并比较各组之间的差异。

2.3.3 Elisa法检测血清炎症因子 干预结束后, 各组小鼠摘眼球取血, 离心取血清, -80° C保存, 根据试剂盒说明书采用Elisa法检测各组小鼠血清IFN- γ 、IL-2、IL-6、IL-12A、IL-10及TNF- α 含量。

2.4 统计学方法 使用Graphpad prism 7.0软件作图, 统计学分析采用SPSS 21.0统计软件, 两样本间比较采用One-Way ANOVA检验, 多组间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组小鼠皮肤毒性的外观和组织病理学比较 药物干预期间模型组小鼠毛发停止生长, 颈部、肩部、眼周脱毛症状继续加重, 嘴周和四肢疱疹、皮疹等症状加重, 活动状态较差。给药15 d后, 与模型组比较, 消疹方低、高剂量组和阳性药物组小鼠毛发再生长, 胡须、眼周部分脱毛症状减轻, 四肢红肿程度显著改善。见图1。组织病理学检测发现: 与空白对照组比较, 模型组可见表皮明显增厚($P < 0.0001$), 角质层细胞增厚, 嗜中性粒细胞在毛囊管外集群致毛囊炎症; 各给药组小鼠表皮厚度明显小于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 炎症细胞聚集程度也较模型组明显减轻; 消疹方各剂量组与阳性药物组比较未见显著性差异($P > 0.05$), 作用相当。见图2、图3。

3.2 各组小鼠血清炎症因子及皮肤组织STAT3、JAK1蛋白表达比较 结果见表1、图4。与空白对照组比较, 模型组小鼠血清IL-10、IL-12A、IL-2、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 的表达均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 消疹方高剂量组与阳性药物组IL-2、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 表达显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并接近空白对照组。表明消疹方防治厄洛替尼诱导的皮肤毒性可能与其下调炎症因子有关。研究发现, EGFR1可通过增加JAK/STAT3的表达来诱导基底角质形成细胞生长的停止、早熟, 中性粒细胞分化和炎症因子释放。免疫组化结果证实盐酸厄洛替尼显著增加了模型组STAT3, JAK1的表达($P < 0.001$, $P < 0.0001$), 而消疹方水提液和阳性药物可显著减少这种异常高表达的炎症蛋白($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$), 其中消疹方高剂量组与阳性药

物组作用相当 ($P>0.05$), 见图 5。上述结果提示消疹方通过减轻因EGFRI引起的皮肤炎症起到皮肤保护的作用。

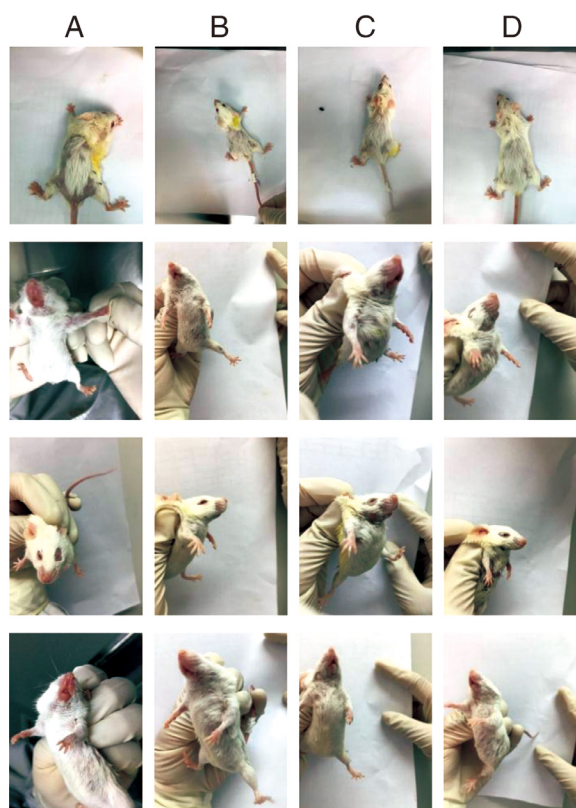


图1 干预后各组小鼠背部、四肢、眼睑及唇周皮肤情况比较

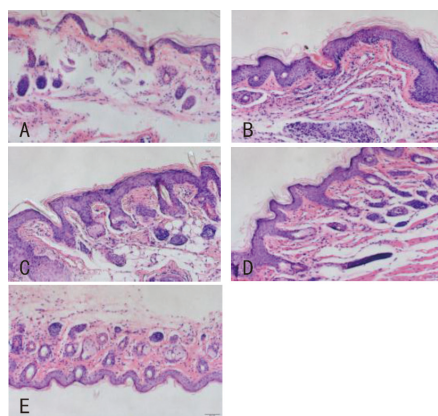


图2 干预后各组小鼠皮肤组织病理学比较 ($\times 200$)

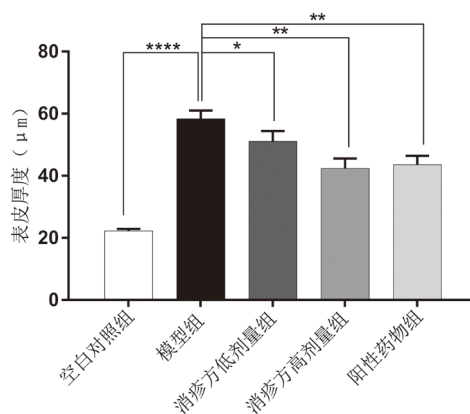


图3 干预后各组小鼠表皮厚度比较 ($n=3$)

表1 干预后各组小鼠炎症细胞因子含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

单位: pg/mL

组别	动物数/只	TNF- α	IL-6	IFN- γ	IL-2	IL-10	IL-12A
空白对照组	7	796.46 $\pm$ 15.40	384.93 $\pm$ 17.69	673.65 $\pm$ 54.05	1964.76 $\pm$ 76.22	527.78 $\pm$ 45.14	4.01 $\pm$ 0.47
模型组	7	1039.84 $\pm$ 82.00 ^{##}	512.94 $\pm$ 25.51	1396.65 $\pm$ 95.38 ^{##}	2597.38 $\pm$ 126.71 ^{##}	840.83 $\pm$ 82.59 [#]	5.58 $\pm$ 0.30 [#]
消疹方低剂量组	7	984.58 $\pm$ 45.26	486.18 $\pm$ 24.29	1309.35 $\pm$ 64.50	2224.76 $\pm$ 53.17	782.22 $\pm$ 54.03	5.31 $\pm$ 0.69
消疹方高剂量组	7	959.18 $\pm$ 14.79 [*]	474.10 $\pm$ 11.55 [*]	1100.15 $\pm$ 43.08 [*]	2112.38 $\pm$ 82.03 [*]	688.61 $\pm$ 36.87 [*]	4.94 $\pm$ 0.24
阳性药物组	7	884.74 $\pm$ 35.13 ^{**}	470.12 $\pm$ 15.29 ^{**}	1175.25 $\pm$ 25.46 [*]	2101.75 $\pm$ 76.32 [*]	697.14 $\pm$ 45.78	4.92 $\pm$ 0.22

注:与空白对照组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

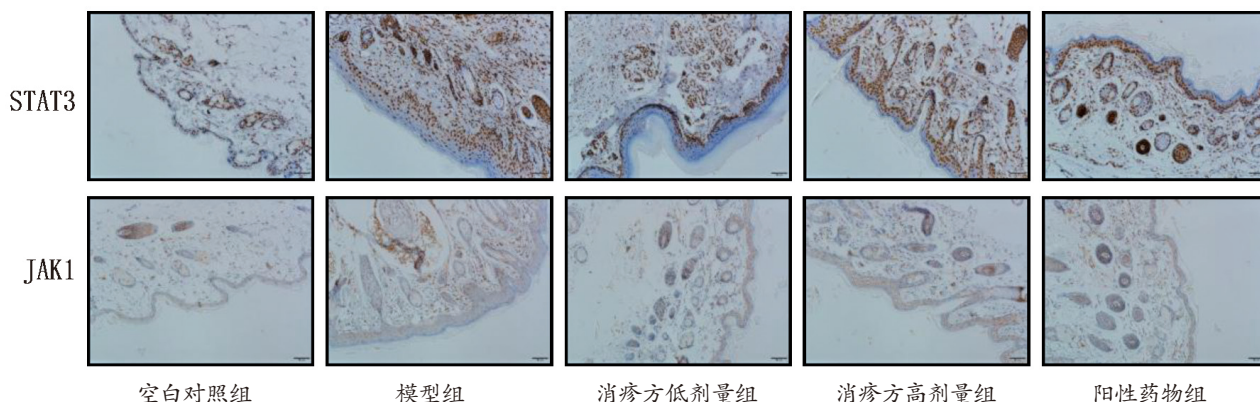
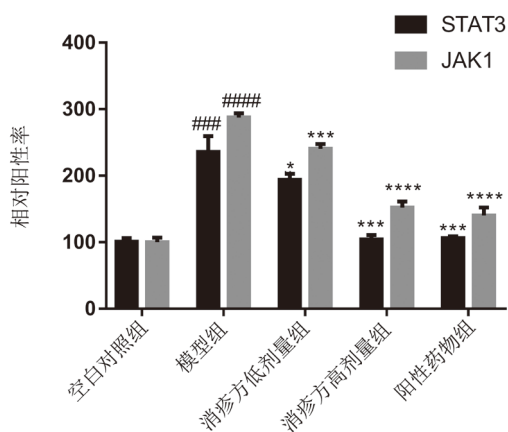


图4 各组小鼠皮肤组织炎症蛋白表达比较 ($\times 200$)



注:与空白对照组比较,### $P<0.001$,#### $P<0.0001$;与模型组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图5 各组小鼠皮肤组织炎症蛋白表达比较

4 讨论

厄洛替尼是一种分子靶向抗肿瘤药物,在抗癌过程中可特异性地通过抑制人体细胞内表皮生长因子上的一种特定酶的活性,进而抑制肿瘤细胞的形成、生长或促进肿瘤细胞凋亡,达到抗肿瘤的目的。目前厄洛替尼被证实对晚期非小细胞肺癌具有可靠疗效,能有效提高病人的带瘤生存率。但在临床使用的过程中,很多患者出现了不同程度的皮肤相关不良反应,出现皮疹、干燥、瘙痒等,这种皮肤毒性往往被认为是小分子靶向抗癌药物起效的象征,然而却影响了患者的生活质量,严重的皮肤毒性甚至会导致肿瘤治疗的中断及抗肿瘤治疗的失败。因此,对于EGFR所致的皮肤毒性的治疗越来越受到重视,寻找相关的治疗手段和药物十分必要。

在动物模型建立方面,我们选用盐酸厄洛替尼作为皮疹模型的诱导剂,并在给药的过程中使用光照进一步促进皮肤不良反应的产生。我们根据文献报道选择克林霉素磷酸酯凝胶作为阳性对照,克林霉素磷酸酯凝胶在临床上常用于治疗EGFR抑制剂所致肿瘤患者皮疹,具有较好的疗效。克林霉素磷酸酯凝胶属于抗生素类药物^[10],长期使用会产生耐药性,降低其疗效,且EGFR导致的皮肤毒性往往是全身性的,局部涂抹疗效有限。消疹方具有清热解毒、祛湿散结、凉血透疹的功效。方中金银花、紫草为君,清热解毒、凉血透疹;土茯苓、连翘、浮萍为臣,能够加强疏风、透疹、清热、祛湿的作用;夏枯草、牡丹皮为佐,清热、活血、散结。本研究发现消疹方高剂量口服、擦洗给药可达到与克林霉素磷酸酯凝胶类似的治疗结果。

此外,在皮肤毒性的发生发展过程中,炎症是其关键因素。有研究发现,血清中TNF- α 、IL-6等炎症因子的水平与皮肤毒性分级显著相关^[11]。TNF- α 水平升高可刺激释放并增加细胞因子(例如IL-2)的数量,导致细胞因子之间的平衡被打破;IL-6可以由很多细胞产生,如活化的T细胞和B细胞、内皮细胞、上皮细胞等,有炎症产生时会促进IL-6的表达^[12-13]。本研究结果证实,盐酸厄洛替尼可以诱导大多数促炎因子的释放,例如IL-10、IL-2、IL-6、TNF- α 和IL-12A,而消疹方水提液可以将它们降至正常水平。JAK-STAT信号通路功能广泛,参与很多重要的生物过程,其中炎症性疾病主要有银屑病、特应性皮炎、犬皮炎等^[13],在炎症的过程中表达增多。本研究结果表明,消疹方水提液可以抑制盐酸厄洛替尼诱导炎症的产生从而产生皮肤保护作用。

综上,消疹方水提液可以缓解盐酸厄洛替尼所致皮肤毒性,改善生活质量,其机制可能与其抗炎作用有关。在后续的实验,我们将进一步明确消疹方通过哪些具体的抗炎相关信号通路产生皮肤保护作用,也将继续观察消疹方水提液对盐酸厄洛替尼抗肿瘤效果的影响,还将优化消疹方水提液的提取方案,尽可能多保留其挥发性成分。

参考文献

- [1] AYATI A, MOGHIMI S, SALARINEJAD S, et al. A review on progression of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors as an efficient approach in cancer targeted therapy[J]. Bioorg Chem, 2020, 99: 103811.
- [2] HAMPTON T. New insight on preventing EGFR inhibitor-induced adverse effects[J]. JAMA, 2020, 323 (9): 814.
- [3] HIRAYAMA K, SU Y, CHIBA M, et al. Relationships between quality of life and skin toxicities of epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer patients: a literature review[J]. Jpn J Nurs Sci, 2020, 17 (3): e12321.
- [4] LACOUTURE M E. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6 (10): 803.
- [5] PETRELLI F, BORGONOVO K, CABIDDU M, et al. Antibiotic prophylaxis for skin toxicity induced by antiepidermal growth factor receptor agents: a systematic review and meta-analysis[J]. Br J Dermatol, 2016, 175 (6): 1166.
- [6] 刘贝贝, 陈培丰. 中医治疗表皮生长因子受体抑制剂相关皮疹研究进展[J]. 新中医, 2020, 52 (2): 19.
- [7] 彭霞, 燕忠生. 表皮生长因子受体抑制剂所致皮疹的中医防治[J]. 中医临床研究, 2019, 11 (19): 143.
- [8] 丁蓉, 霍介格, 邢海燕. “药疹方”为主防治厄洛替尼致皮肤毒性30例临床研究[J]. 江苏中医药, 2019, 51 (12): 49.

小儿湿疹的中医治疗进展

于政 陶嘉磊 袁斌

(南京中医药大学附属医院, 江苏省中医院儿科, 江苏南京 210029)

摘要 湿疹是儿科常见的病症之一,近年来中医药治疗小儿湿疹取得了一定进展,主要包括中药内治、中药外治、针灸推拿等治疗,疗效确切,且较西医治疗副作用少。但现有的研究还存在不足之处,未来应开展大样本量的随机对照试验,统一疗效标准,为临床和科研提供参考依据。

关键词 湿疹;中医药疗法;儿童;综述

中图分类号 R275.982.3 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X (2021) 02-0078-04

湿疹是儿科常见的病症之一,是由多种内外因素引起的表皮及真皮浅层的炎症性、变态反应性皮肤病^[1]。常表现为红斑、丘疹、水疱、渗液糜烂、干燥脱屑、瘙痒剧烈,且迁延不愈。其病因与发病机制尚不完全明确,目前认为与免疫反应、皮肤屏障功能、超敏反应和外界环境等多种因素有关^[2]。湿疹与遗传基因也密切相关,有研究表明,因其与哮喘有相同的遗传基因,患儿后期可并发哮喘,发为湿疹哮喘综合征^[3]。瘙痒剧烈、易复发、病程长等特点给患儿及家庭带来诸多困扰。西医常采用局部外用糖皮质激素、钙调神经磷酸酶抑制剂、抗菌药物、抗组胺药物等治疗^[4],但副作用不可避免,常需联合用药以规避

不良反应。中医治疗小儿湿疹疗效确切且不良反应较少,可达标本兼治、邪正兼顾之功。现将近几年小儿湿疹的中医治疗进展概述如下。

1 中药内治

小儿湿疹大致可分为湿热蕴结证、脾虚湿盛证、血虚风燥证,其治疗大法为清热利湿、健脾祛湿、养血祛风。娄方璐等^[5]通过总结古今湿疹内治处方用药规律发现,内治用药以清热药、利水渗湿药、补虚药为主,以白鲜皮、苦参、防风、地肤子、苍术、当归、甘草、生地等为核心药物,与湿疹辨证分型不谋而合。临证时医家根据患儿病情灵活选方化裁,收效满意。

- [9] 宋亚中,徐央波,邓博,等.厄洛替尼引起皮肤不良反应的小鼠模型建立[J].中国比较医学杂志,2017,27(1):16.
- [10] VACCARO M, GUARNERI F, BORGIA F, et al. Efficacy, tolerability and impact on quality of life of clindamycin phosphate and benzoyl peroxide for the treatment of cetuximab-associated acneiform eruption in patients with metastatic colorectal cancer[J]. J Dermatolog Treat, 2016, 27(2):148.
- [11] TOUGERON D, EMAMBUX S, FAVOT L, et al. Skin inflammatory response and efficacy of anti-epidermal growth factor receptor therapy in metastatic colorectal cancer (CUTACETUX) [J]. OncoImmunology, 2020, 9(1):1848058.
- [12] TENAUD I, KHAMMARI A, DRENO B. In vitro modulation of TLR-2, CD1d and IL-10 by adapalene on normal human skin and acne inflammatory lesions[J]. Exp Dermatol, 2007, 16(6):500.

- [13] SATO K, TAKAISHI M, TOKUOKA S, et al. Involvement of TNF- α converting enzyme in the development of psoriasis-like lesions in a mouse model[J]. PLoS One, 2014, 9(11):e112408.
- [14] CAI Y H, XUE F, QIN H, et al. Differential roles of the mTOR-STAT3 signaling in dermal $\gamma\delta$ T cell effector function in skin inflammation[J]. Cell Rep, 2019, 27(10):3034.

第一作者:邢海燕(1971—),女,医学硕士,主任中医师,研究方向为恶性肿瘤的中西医结合治疗和中医药防治化疗、靶向药物毒副反应。

通讯作者:陈彦,医学博士,研究员,博士研究生导师。ychen202@hotmail.com

收稿日期:2020-08-10

编辑:吴宁