

依托泊苷对小鼠变应性接触性皮炎的影响及作用机制探讨

谢青¹, 颜会兰^{1*}, 李应全^{2*}, 王进², 王菊英²

(山东大学 1. 齐鲁医院 药学部, 2. 医学院 药理学研究所, 山东 济南 250012)

摘要: 观察依托泊苷 (etoposide, VP-16) 对小鼠变应性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 的抗炎作用并探讨其可能的机制。采用 2, 4-二硝基氟苯 (dinitrofluorobenzene, DNFB) 致小鼠 ACD 模型, 观察 VP-16 给药后皮肤炎症反应程度, 应用放射免疫分析法测定血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 的水平, 免疫组化法测定皮肤中细胞间粘附分子 (intercellular adhesion molecule, ICAM-1) 的表达。结果显示, VP-16 可显著降低炎性细胞浸润, 减轻炎症反应程度, 明显降低血清中炎症促发因子 TNF- α 的水平及皮肤中 ICAM-1 的表达。VP-16 可以有效抑制 DNFB 诱发的小鼠 ACD, 可能通过对某些细胞因子的抑制而发挥作用。

关键词: 依托泊苷; 皮炎; 变应性接触性; 细胞因子

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)10 - 1050 - 04

Effect of etoposide on allergic contact dermatitis induced by dinitrofluorobenzene and its action mechanism in mice

XIE Qing¹, YAN Hui-lan^{1*}, LI Ying-quan^{2*}, WANG Jin², WANG Ju-ying²

(1. Department of Pharmacy, Qilu Hospital, 2. Institute of Pharmacology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: This study is to observe the inhibition of etoposide on allergic contact dermatitis (ACD) and explore its possible mechanism of action. Dinitrofluorobenzene was used to induce the allergic contact dermatitis in mouse ear. Three groups of animals were orally administered with different doses of VP-16 (5, 10, and 20 mg·kg⁻¹), separately, for six days. The degree of skin inflammatory reaction was observed by optical microscope. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) was detected by immunohistochemical staining. Radioimmunoassay was applied to measure the serum level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10). VP-16 significantly decreased inflammatory cell infiltration and the degree of infiltration reaction, and decreased the level of TNF- α in serum and the expression of ICAM-1 in skin. VP-16 can significantly inhibit allergic contact dermatitis induced by DNFB. This therapeutic effect of VP-16 on murine ACD may be due to inhibiting expression of some cytokines.

Key words: etoposide; dermatitis; allergic contact; cytokine

依托泊苷 (etoposide, VP-16) 是从植物鬼臼中提取的木脂素类有效成分——鬼臼毒素的半合成衍生物, 为一种抗肿瘤植物药。目前关于 VP-16 的研究多集中于对肿瘤细胞的作用, 其对小鼠实验性银屑病

病模型的治疗作用已得到了证实^[1], 但是 VP-16 对小鼠变应性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 作用的研究少有报道。本研究观察不同剂量 VP-16 对小鼠 ACD 的影响, 并通过测定相关细胞因子的水平, 初步探讨其可能的作用机制。

材料与方法

实验动物与药品 昆明种健康小鼠, 雌雄各半, 体重 23 ~ 25 g, 山东大学实验动物中心提供。

收稿日期: 2007-04-06.

基金项目: 山东省卫生厅科技发展计划项目 (2005HW084).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 531 - 88382036,

E-mail: liyingquan@sdu.edu.cn

Tel / Fax: 86 - 531 - 89834976,

E-mail: chb112003@yahoo.com.cn

实验动物质量合格证号:鲁动质字 20021023; VP-16 原料药为白色结晶粉末 (M_r 588.56, 纯度 98.2%), 齐鲁制药厂提供, 批号: 20030216; 地塞米松 (dexamethasone, DEX) 为山东鲁抗辰欣药业有限公司生产, 批号: 0302093; DNFB (AR级) 为中国医药集团上海化学试剂公司产品, 批号: F2003029; TNF- α 放射免疫测定试剂盒, 北方生物技术研究所提供, 批号: 031001; IL-10 放射免疫测定试剂盒, 北方生物技术研究所提供, 批号: 031116; 兔抗小鼠 ICAM-1 单克隆抗体及试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司提供, 批号: 20030506。

ACD模型的建立^[2] DNFB以丙酮橄榄油(4:1)为基质配成1%溶液,除正常对照组外,各组小鼠在腹部去毛区涂以1% DNFB溶液 50 μ L致敏,实验第6天各组小鼠(除正常对照组外)右耳涂以1% DNFB溶液 10 μ L进行攻击,左耳涂以基质 20 μ L作为对照,攻击后24 h右耳出现肿胀高峰。

分组与给药方法 小鼠72只,随机分为6组,即正常对照组、DNFB组(DNFB+生理盐水)、阳性对照组(DNFB+地塞米松 0.5 mg·kg⁻¹), DNFB+VP-16 5 mg·kg⁻¹组, DNFB+VP-16 10 mg·kg⁻¹组, DNFB+VP-16 20 mg·kg⁻¹组。各组药物以0.5%羧甲基纤维素钠溶液配成适当浓度混悬液,除正常对照组及DNFB组给予相同体积生理盐水(NS)外,其余各组小鼠灌胃给予相应药物,连续6 d。

VP-16对小鼠体重的影响 实验前、后测量各组小鼠体重,计算实验前、后体重差。

VP-16对小鼠变应性接触性皮炎的影响 用直径9 mm打孔器分别打取左右两耳圆片,称重后,以两耳片重量之差作为耳肿胀程度(mg),10%福尔马林固定,乙醇常规脱水,石蜡包埋,HE染色,在光学显微镜下进行耳片组织学检查,用网形目镜测微尺以单盲法计数每平方毫米(mm²)单核及多形核白细胞数,判断炎症反应程度,计算抑制率(inhibition rate, IR)。

VP-16对小鼠耳部皮肤 ICAM-1 表达的影响 ICAM-1 染色方法严格按照试剂盒说明书,采用链霉亲和素生物素过氧化物酶复合物(streptavidin-biotin-peroxidase complex)法进行操作。将免疫组织化学染色结果输入 MPIASI 000 图像分析系统,每个标本切片1张,在每张切片中随机选取5个非重叠高倍视野,对表皮中 ICAM-1 的表达进行定量检测,

以5个高倍视野平均光密度值的平均值表示每个标本中 ICAM-1 的相对含量,计算抑制率。

VP-16对血清 TNF- α 及 IL-10 含量的影响 每组小鼠处死前摘除眼球取血约1.5 mL,静置15 min后,400 \times g离心20 min,分离收集血清。按试剂盒说明书操作,采用液相平衡竞争放射免疫分析法检测血清 TNF- α 和 IL-10 的含量,计算抑制率。

数据处理及统计学分析 $IR(\%) = [1 - (T_E - T_S)] \times 100\%$, T_E 是给药组小鼠的各检测指标, T_S 是模型组小鼠的各检测指标。计量资料的结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

结果

实验前各组小鼠体重无明显差异,VP-16 各剂量组给药过程中体重略有下降,但差异无统计学意义,说明 VP-16 对小鼠生长无明显影响,各组动物一般状况良好。

1 VP-16对小鼠 ACD模型耳肿胀程度的影响

结果表明,地塞米松 0.5 mg·kg⁻¹组及 VP-16 20 mg·kg⁻¹组可明显降低 DNFB所致耳部肿胀程度,并且能够明显减轻炎症反应,减少皮肤中炎性细胞浸润,统计学差异显著($P < 0.01$),但 VP-16 各剂量组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1和表2。

2 VP-16对小鼠 ACD模型耳部皮肤组织 ICAM-1 表达的影响

用免疫组化法检测发现,ICAM-1 主要定位于细胞浆与细胞膜,阳性反应部位以基底层及棘层细胞为主,表现为细胞浆与细胞膜的棕黄色深染。正常小鼠耳部皮肤组织 ICAM-1 低度表达, DNFB 组小鼠 ICAM-1 阳性染色高度表达, VP-16 10 及 20 mg·kg⁻¹组与地塞米松组的 ICAM-1 轻度表达,统计学差异显著($P < 0.01$),但 VP-16 各剂量组间比较均无统计学差异($P > 0.05$)。见表1。

3 VP-16对小鼠 ACD模型炎症细胞因子水平的影响

结果显示,VP-16 10 及 20 mg·kg⁻¹组与地塞米松组均可降低小鼠血清 TNF- α 的水平,与 DNFB 组相比有显著性差异($P < 0.05$),但 VP-16 组的作用弱于地塞米松组。地塞米松组可升高小鼠血清 IL-10 的水平,与 DNFB 组相比有显著性差异($P < 0.05$),VP-16 各剂量组有使 IL-10 水平升高的趋势,但无统计学差异($P > 0.05$)。见表3。

Table 1 Effect of VP-16 on ear swelling and expression of ICAM-1 of auricle skins in mice with ACD induced by DNFB

Group	Dose /mg• kg ⁻¹	Ear weight/mg	IR /%	Expression of ICAM-1	IR /%
Control	-	0.43 ± 0.12	-	0.18 ± 0.02	-
DNFB	-	11.30 ± 3.91 ^{##}	-	0.49 ± 0.01 ^{##}	-
DNFB + DEX	0.5	3.72 ± 1.20 [*]	67.08	0.22 ± 0.03 [*]	55.10
DNFB + VP-16	5	7.82 ± 2.10	30.80	0.36 ± 0.06 [*]	26.53
	10	6.68 ± 1.65 [*]	40.89	0.29 ± 0.02 [*]	40.82
	20	4.36 ± 1.81 ^{**}	61.42	0.25 ± 0.01 ^{**}	48.98

DNFB was given for sensitization and challenged with DNFB on the right ear 6 d later. Round ear piece of 9 mm diameter was cut from both right and left ear 24 h after challenge, and weighted separately. Degree of ear swelling was expressed as the weight difference of right and left ear piece. Expression of ICAM-1 was detected by immunohistochemical method. The result was analyzed by computer imaging analysis system (MPIASI 000), and recorded as mean absorbance of each slide, the data expressed in Table 1 are the average of 12 slides, each from one mice. *n* = 12, $\bar{x} \pm s$. ^{##} *P* < 0.01 vs control group; ^{*} *P* < 0.05, ^{**} *P* < 0.01 vs DNFB group

Table 2 Effect of VP-16 on infiltration of inflammatory cells of auricle skins in mice with ACD induced by DNFB

Group	Dose /mg• kg ⁻¹	Infiltration of inflammatory cell/mm ²			
		Mononuclear cell (× 10 ⁻³)	IR /%	Polymorphonuclear cell	IR /%
DNFB	-	1.35 ± 0.53	-	152 ± 72	-
DNFB + DEX	0.5	0.16 ± 0.11 ^{**}	88.15	26 ± 19 [*]	82.89
DNFB + VP-16	5	0.81 ± 0.37	40.00	93 ± 42	38.82
	10	0.68 ± 0.24 [*]	49.63	68 ± 39 [*]	55.26
	20	0.50 ± 0.32 [*]	62.96	59 ± 36 [*]	61.12

See Table 1 for DNFB treatment. Inflammatory cell infiltration was observed under light microscope (× 400) and cell counting was observed under micrometer eyepiece. *n* = 12, $\bar{x} \pm s$. ^{*} *P* < 0.05, ^{**} *P* < 0.01 vs DNFB group

Table 3 Effect of VP-16 on serum level of TNF-α and IL-10 in mice with ACD induced by DNFB

Group	Dose /mg• kg ⁻¹	TNF-α /pmol• L ⁻¹	IR /%	IL-10 /ng• mL ⁻¹
Control	-	10.58 ± 1.51	-	32.95 ± 3.46
DNFB	-	21.99 ± 4.53 ^{##}	-	35.49 ± 4.25
DNFB + DEX	0.5	12.42 ± 2.67 [*]	43.52	67.88 ± 3.61 [*]
DNFB + VP-16	5	20.82 ± 2.80	5.32	37.27 ± 4.98
	10	17.51 ± 1.95 [*]	20.37	39.21 ± 5.12
	20	15.58 ± 3.06 [*]	29.15	40.18 ± 5.36

See Table 1 for DNFB treatment. Blood was collected from mice and centrifuged at 400 × *g* for 20 min. The serum levels of TNF-α and IL-10 were measured by radioimmunoassay. *n* = 12, $\bar{x} \pm s$. ^{##} *P* < 0.01 vs control group; ^{*} *P* < 0.05, ^{**} *P* < 0.01 vs DNFB group

讨论

DNFB是一种半抗原,将其涂抹至皮肤后可与皮肤中的蛋白质结合形成完全抗原复合物,被朗格汉斯细胞摄取,经加工、处理、降解为抗原多肽,并与主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC)分子结合为 MHC-抗原肽复合物,转移至抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC)的细胞膜,APC与 T细胞通过双信号识别使 T细胞活

化,增殖成为致敏淋巴细胞^[3],已致敏的淋巴细胞返回淋巴结形成效应性 T细胞,效应性 T细胞自淋巴结输出进入体内循环,形成全身致敏状态,当再一次接触 DNFB(攻击)时,效应 T细胞被活化,释放多种细胞因子如 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、TNF-α、IFN-γ、ICAM-1等,使大量淋巴细胞、单核巨噬细胞及中性粒细胞聚集于炎症区,巨噬细胞释放溶酶体酶等,引起以单核细胞浸润、组织变性坏死为特征的迟发型超敏反应^[4]。

目前大多数观点认为,ACD主要由 Th1型细胞介导,而 Th2型细胞参与其调节过程, Th1细胞主要分泌 IL-2、IFN-γ、TNF-α等, TNF-α在 ACD的发病过程中发挥重要作用^[5],有研究表明, TNF-α基因敲除的小鼠或者应用 TNF-α中和抗体均不能产生明显的 ACD反应^[6]。作为重要的炎症前介质, TNF-α可诱导炎症反应中多种细胞因子的产生、粘附分子和协同刺激因子的表达,刺激角质形成细胞来源的 CXC类趋化因子 IL-8在皮肤中高度表达,使其靶细胞中性粒细胞趋化至皮肤局部。Kataranovski等^[7]报道在 ACD小鼠耳部皮肤培养液 TNF-α水平与耳肿胀度呈正相关。本研究结果显示, VP-16 10及 20

mg·kg⁻¹组均可明显降低血清中 TNF- α 的水平,间接下调多种炎症因子的水平而抑制炎症反应。

ICAM-1 能促进 T 细胞活化及白细胞自血管内向炎症部位浸润,并增强表皮朗格汉斯细胞 MHC II 类抗原的表达能力^[8],在 ACD 炎症细胞浸润中发挥关键作用。本研究结果表明,模型组中 ICAM-1 在表皮呈高度表达,地塞米松与 VP-16 各剂量组可有效降低 ICAM-1 表达。提示 VP-16 抑制炎症细胞浸润的作用可能与下调 ICAM-1 的表达有关,而从何种水平发挥作用尚需进一步研究。IL-10 为 Th2 型细胞因子,能抑制 MHC-II 型及巨噬细胞表面共刺激分子的表达,下调单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞的抗原提呈能力^[9],在 ACD 中发挥有益的作用。本研究结果发现,VP-16 各剂量组有使 IL-10 水平升高的趋势,但无统计学意义。

本研究显示,VP-16 能有效缓解变应性接触性皮炎动物模型的炎症反应和炎症细胞浸润程度,减少 Th1 型细胞因子 TNF- α 的表达,抑制 ICAM-1 在皮肤局部的表达,对 Th2 型细胞因子 IL-10 水平无明显影响。提示 VP-16 可能系通过抑制血清中 Th1 型细胞因子 TNF- α 水平,促进 T 细胞向 Th2 型的分化,从而发挥其抑制变应性接触性皮炎的作用。

References

- [1] Li YQ, Xie Q, Wang J, et al. Influence of vepesid on the formation of mouse tail epidermis granular layer and the level of IL-2 in serum [J]. *China J Lepr Skin Dis* (中国麻风皮肤病杂志), 2004, 20: 220 - 221.
- [2] Li YT, Zhong M, Deng YJ, et al. Expression of interleukin-6 in delayed type hypersensitivity and inhibition effects of resveratrol on interleukin-6 biosynthesis [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34: 189 - 191.
- [3] Tsiopoulos A, Hamid Q. Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells in classical delayed-type hypersensitivity reactions in human skin [J]. *J Immunol*, 1992, 148: 2058 - 2061.
- [4] DiLillo NA, Xu H, Fairchild RL. Diversion of CD4 + T cell development from regulatory T helper to effector T helper cells alters the contact hypersensitivity response [J]. *Eur J Immunol*, 1996, 26: 2606 - 2612.
- [5] Nakae S, Komiyama Y, Nanami S, et al. IL-1 induced tumor necrosis factor-alpha elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing IFN-gamma-inducible protein in the elicitation phase of the contact hypersensitivity response [J]. *Int Immunol*, 2003, 15: 251 - 260.
- [6] Westphal GA, Schnuch A, Moessner R, et al. Cytokine gene polymorphisms in allergic contact dermatitis [J]. *Contact Dermatitis*, 2003, 48: 93 - 98.
- [7] Kataranovski M, Kandolf-Sekulovic L, Milosavljevic I. Production of TNF-alpha by skin explants of dinitrochlorobenzene-challenged ears in rats: a model for the evaluation of contact hypersensitivity [J]. *Vojnosanit Pregl*, 2002, 59: 581 - 586.
- [8] Boone M, Lespagnard L, Renard N, et al. Adhesion molecule profiles in atopic dermatitis vs. allergic contact dermatitis: pharmacological modulation by cetirizine [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2000, 14: 263 - 266.
- [9] Watanabe H, Unger M, Tuvel B, et al. Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2002, 22: 407 - 412.