

氯霉素泼尼松搽剂抗IV型变态反应实验研究

马朝晖¹, 宋 栩², 陈 芳¹, 陈少秀¹, 常明泉^{1*}

1. 十堰市太和医院, 湖北 十堰 442000

2. 湖北医药学院, 湖北 十堰 442000

摘要:目的 研究氯霉素泼尼松搽剂抗IV型(迟发型)变态反应的药理作用。方法 C57BL/6/ICR健康小鼠随机分为对照组、基质组、模型组、莫米松乳膏组和氯霉素泼尼松搽剂高、中、低剂量组[分别给予高、中、低浓度(含氯霉素20、10、5 mg/mL, 泼尼松1.00、0.50、0.25 mg/mL)的氯霉素泼尼松搽剂]。采用二硝基氯苯(DNCB)丙酮溶液诱发小鼠IV型变态反应, 观察耳肿胀度、胸腺/脾脏指数; 以4-氨基吡啶(4-AP)诱发小鼠皮肤局部瘙痒模型, 观察舔体反应次数; 用磷酸组织胺的累计剂量为指标测定小鼠致痒阈。结果 与模型组比较, 氯霉素泼尼松搽剂各剂量组均能显著抑制小鼠耳肿胀度增加($P < 0.05$), 显著抑制胸腺指数的增加($P < 0.05$), 高剂量组能显著抑制脾脏指数的增加($P < 0.05$); 中、高剂量组小鼠舔体反应次数显著下降($P < 0.05$); 各剂量组的磷酸组织胺致痒阈显著高于模型组和基质组($P < 0.05$); 且作用均呈剂量相关性。结论 氯霉素泼尼松搽剂局部外用具有良好的抗IV型变态反应和止痒作用, 该制剂适用于临床具有IV型变态反应特征的皮损治疗。

关键词: 氯霉素泼尼松搽剂; IV型变态反应; 舔体次数; 致痒阈

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)01-0057-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.009

Experimental study on resistance of chloramphenicol prednisone liniment to type IV allergy

MA Zhaohui¹, SONG Xu², CHEN Fang¹, CHEN Shaoxiu¹, CHANG Mingquan¹

1. Shiyen Taihe Hospital, Shiyen 442000, China

2. Hubei Medical University, Shiyen 442000, China

Abstract: Objective To study the pharmacological effect of chloramphenicol prednisone liniment on hypersensitivity of type IV (delayed type). **Method** C57BL/6/ICR healthy mice were randomly divided into control group, matrix group, model group, mometasone cream group, chloramphenicol prednisone liniment low, medium and high dose groups [chloramphenicol prednisone liniment with high, medium and low concentrations (containing chloramphenicol 20, 10, 5 mg / ml, prednisone 1.00, 0.50, 0.25 mg / ml) was given respectively]. With allergy IV induced by DNCB (dinitrochlorobenzene) acetone solution, the effects of chloramphenicol prednisone liniment on allergy IV were observed by ear swelling, thymus index and spleen index. The local pruritus model of mice was induced by 4-aminopyridine (4-AP). The effects of licking times on the itching response were observed. The cumulative dose of histamine phosphate was used to determine the itching threshold of mice. **Results** Compared with the model group, chloramphenicol prednisone liniment can significantly inhibit the increase of ear swelling ($P < 0.05$), thymus index ($P < 0.05$), and spleen index ($P < 0.05$) in high dose group. The times of licking response decreased significantly in the middle and high dose groups ($P < 0.05$), the itching threshold of histamine phosphate in each dose group was significantly higher than that in the model group and matrix group ($P < 0.05$), and the effects were dose-dependent. **Conclusion** The topical application of chloramphenicol prednisone liniment has good anti-type IV allergic reaction and antipruritic effect. It is suitable for the treatment of skin lesions with type IV allergic reaction.

Key words: chloramphenicol prednisone liniment; type IV allergy; licking frequency; itch threshold

收稿日期: 2019-09-07

基金项目: 太和科研基金项目(2018JJXM057)

第一作者: 马朝晖(1974—), 女, 湖北十堰人, 硕士, 主管药师, 研究方向为医院药学。

*通信作者: 常明泉 E-mail: 907622985@qq.com Tel: 18872927107

氯霉素泼尼松搽剂是医院制剂,该制剂由氯霉素、泼尼松、蓖麻油、无水乙醇、清鱼肝油组成,具有抗菌消炎、抗变态反应的作用,主要用于蚊虫叮咬、脓疱疮、病毒性疱疹的外用治疗^[1]。近年来,氯霉素泼尼松搽剂在临床上的用途得到扩展,陆续用于小儿重症葡萄球菌性烫伤样皮肤综合症护理、慢性腹泻肛周皮损患者的护理、糜烂性皮损护理、治疗中耳炎和隐翅虫皮炎、药疹的治疗和护理^[2-3],广受患者欢迎。为指导临床合理用药、安全用药,进一步明确其药理作用,本课题组拟对其抗IV变态反应的药理作用进行研究。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

莫米松乳膏(湖北宜昌恒安制药生物公司,批号20180319);氯霉素泼尼松搽剂(十堰市太和医院制剂室生产,批准文号:鄂药制字H20111437,规格10 mL,批号20180416);氯霉素泼尼松搽剂高、中、低浓度(分别含氯霉素20、10、5 mg/mL、泼尼松1.0、0.5、0.25 mg/mL,临时配制);氯霉素泼尼松搽剂基质(按氯霉素泼尼松搽剂制备方法制备,由蓖麻油、无水乙醇、清鱼肝油组成,不含泼尼松和氯霉素,临时配制)。

二硝基氯苯(DNCB,武汉江岸化试有限公司提供,规格100 g,质量分数98.0%,批号20161206);4-氨基吡啶(4-AP,阿尔法公司生产,规格100 g,质量分数94.1%,批号20170411);磷酸组织胺(上海哈灵生物科技有限公司提供,规格250 mg,质量分数99.0%,批号20161513);0.9%氯化钠溶液(四川科伦药业股份有限公司,规格250 mL,批号L118060801)。

1.2 实验动物

C57BL/6/ICR小鼠,体质量(20±2)g,6周龄,雌雄各半,由湖北医药学院动物实验中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(鄂)2016-0008;实验场所:湖北医药学院实验动物中心,实验动物使用许可证号SYXK(鄂)2016-0031。饲养条件:恒温、恒湿,每天给予固体饲料和足量维生素,自由饮水。

2 方法

2.1 氯霉素泼尼松搽剂对IV型变态反应的抑制作用^[4]

取C57BL/6/ICR健康小鼠84只,随机将其分为7组,每组12只,雌雄各半,分组情况为:对照组、模型组、基质组、莫米松乳膏组和氯霉素泼尼松搽剂高、中、低剂量组。将每组小鼠腹部剃毛,左耳廓给

药,对照组和模型组每只小鼠给0.9%氯化钠溶液0.05 mL,基质组小鼠每只给予氯霉素泼尼松搽剂基质0.05 mL,莫米松乳膏组每只小鼠给予莫米松乳膏0.05 g,氯霉素泼尼松搽剂高、中、低剂量组分别给予高、中、低浓度(分别含氯霉素20、10、5 mg/mL,泼尼松1.00、0.50、0.25 mg/mL)的氯霉素泼尼松搽剂0.05 mL。每天1次,连续给药7 d。

除对照组外,其他6组小鼠在第1次给药24 h后,在剃毛处给予5% DNCB 丙酮溶液0.05 mL致敏,第2天再增强给药1次,第6天给药1 h后,每组小鼠左耳廓内外两面都均匀涂抹5% DNCB 丙酮溶液,剂量为20 μ L,施行激敏攻击。最后1次给药1 h后处死小鼠,左右耳对应部位分别用直径6 mm的打孔器打取相同面积的耳片,用分析天平称取双耳片质量,计算耳肿胀度;摘取小鼠胸腺、脾脏,用分析天平称质量,计算胸腺、脾脏指数。

耳肿胀度=左耳质量(mg)-右耳质量(mg)

胸腺/脾脏指数=胸腺/脾脏质量(mg)/体质量(g)×10

2.2 氯霉素泼尼松搽剂对4-AP致痒反应的作用^[5]

取健康C57BL/6/ICR小鼠84只,随机将其分为7组,每组12只,雌雄各半,分组情况为同“2.1”项。实验前24 h,将小鼠背部剃毛约2 cm×2 cm,谨慎操作,避免伤及皮肤,剃毛完毕后查看每只小鼠剃毛区域是否有皮肤破损,将剃毛区皮肤有损伤的小鼠淘汰。对照组、模型组小鼠剃毛处均给予0.9%氯化钠溶液0.05 mL/cm²,基质组给予基质0.05 mL/cm²,莫米松乳膏组给予莫米松乳膏0.05 g/cm²,氯霉素泼尼松搽剂的高、中、低剂量组小鼠分别给予高、中、低浓度(分别含氯霉素20、10、5 mg/mL,泼尼松1.00、0.50、0.25 mg/mL)的氯霉素泼尼松搽剂0.05 mL/cm²;每天1次,连续给药7 d。于末次给药30 min后,除对照组外,每只小鼠在背部剃毛处sc 4-AP(注射剂量按1 mg/kg计算),对照组在背部剃毛处sc相同剂量的0.9%氯化钠溶液。给药结束后观察各组动物在10 min内的舔体反应,小鼠连续舔体直至短暂停顿时记录为1次舔体。

2.3 氯霉素泼尼松搽剂对磷酸组织胺的致痒阈^[5]

取健康C57BL/6/ICR小鼠60只,将其随机分成6组,每组10只,雌雄各半,即基质组、模型组、莫米松乳膏组和氯霉素泼尼松搽剂高、中、低剂量组。实验前24 h,将各组小鼠左后足背剃毛,氯霉素泼尼松搽剂的高、中、低剂量组小鼠分别给予高、中、低浓度(分别含氯霉素20、10、5 mg/mL,泼尼松1.00、0.50、0.25 mg/mL)的氯霉素泼尼松搽剂0.05 mL/cm²;模

型组给予0.9%氯化钠溶液0.05 mL/cm²;莫米松乳膏组给予莫米松乳膏0.05 g/cm²;基质组给予氯霉素泼尼松搽剂基质0.05 mL/cm²。实验时取零号砂纸磨擦实验小鼠左后足剃毛部位,磨擦面积约1 cm²,磨擦程度以表皮有轻度出血、轻度损伤为度,备皮成功,每只实验小鼠在皮损部位滴加浓度为0.01%磷酸组织胺溶液0.05 mL,随后每5 min追加磷酸组织胺溶液1次(0.05 mL),剂量依次按0.01%、0.02%、0.03%……0.1%递增,实验时注意观察动物表现,待小鼠扭头舔左后足时停止给药,所用磷酸组织胺溶液的总剂量即为致痒阈。

2.4 实验数据处理与结果分析

数据应用SPSS 13.0软件处理,各组实验结果

表1 氯霉素泼尼松搽剂对DNCB所致小鼠IV型变态反应的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 1 Inhibitory effect of chloramphenicol prednisone liniment on DNCB induced type IV allergic reaction in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/mg	耳肿胀度/mg	胸腺指数/(10×mg·g ⁻¹)	脾脏指数/(10×mg·g ⁻¹)
对照	—	0.6±0.3	1.199±0.291	1.530±0.592
模型	—	23.7±5.6 [△]	2.402±0.529 [△]	3.711±0.498 [△]
基质	—	18.9±4.4	2.300±0.592	3.834±0.505
莫米松乳膏	50	12.2±2.3 ^{*#}	1.292±0.487 ^{*#}	2.197±0.223
氯霉素泼尼松搽剂	1 + 0.05	16.0±3.2 ^{*#}	1.699±0.317 ^{*#}	3.602±0.284
(氯霉素+泼尼松)	0.5 + 0.025	15.0±2.8 ^{*#}	1.662±0.391 ^{*#}	3.231±0.306
	0.25 + 0.012 5	12.9±2.5 ^{*#}	1.351±0.523 ^{*#}	2.328±0.313 ^{*#}

与对照组比较:△ $P < 0.05$;与模型组比较:° $P < 0.05$;与基质组比较:° $P < 0.05$

△ $P < 0.05$ vs control group; ° $P < 0.05$ vs model group; ° $P < 0.05$ vs matrix group

3.2 氯霉素泼尼松搽剂对4-AP致痒反应的抑制作用

注射4-AP后,与对照组比较,模型组小鼠舔体反应次数显著增多($P < 0.05$)。与模型组比较,基质组小鼠舔体反应次数呈下降趋势,但无统计学意义;氯霉素泼尼松搽剂中、高剂量组小鼠舔体反应次数显著下降($P < 0.05$)。结果表明,氯霉素泼尼松搽剂能抑制4-AP诱发的搔痒反应,且呈剂量相关性。结果见表2。

3.3 氯霉素泼尼松搽剂对磷酸组织胺致痒阈的作用

氯霉素泼尼松搽剂各剂量组的磷酸组织胺致痒阈显著高于模型组和基质组($P < 0.05$),且呈剂量相关性。结果见表3。

4 讨论

氯霉素泼尼松搽剂在本院的用途越来越宽泛,不仅在成人、而且在幼儿也陆续有些应用,基于该药物中含有抗生素、激素,尽管其在临床应用方面疗效得到肯定,但其作用机制、适宜性需要得到进一

均以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间实验结果的分析应用方差法,成对组间结果分析应用LSD- t 检验。

3 结果

3.1 氯霉素泼尼松搽剂对IV型变态反应的抑制作用

结果显示,与对照组比较,5% DNCB 丙酮溶液可引起小鼠耳肿胀度显著增加,胸腺、脾脏指数显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,氯霉素泼尼松搽剂各剂量组均能显著抑制小鼠耳肿胀度增加($P < 0.05$),显著抑制胸腺指数的增加($P < 0.05$),高剂量组能显著抑制脾脏指数的增加($P < 0.05$)。结果表明,氯霉素泼尼松搽剂局部外用能显著抑制5%DNCB 丙酮溶液诱发的小鼠IV型变态反应,且呈剂量相关性。结果见表1。

表2 氯霉素泼尼松搽剂对4-AP诱发小鼠舔体反应的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 2 Effect of chloramphenicol prednisone liniment on licking response induced by 4-AP in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/mg·cm ⁻²	舔体反应次数
对照	—	5.9±2.8
模型	—	34.80±8.5 [△]
基质	—	33.80±9.9
莫米松乳膏	50	22.70±10.3
氯霉素泼尼松搽剂	1 + 0.05	25.30±11.31
(氯霉素+泼尼松)	0.5 + 0.025	23.40±14.90 ^{*#}
	0.25 + 0.012 5	22.10±12.12 ^{*#}

与对照组比较:△ $P < 0.05$;与模型组比较:° $P < 0.05$;与基质组比较:° $P < 0.05$

△ $P < 0.05$ vs control group; ° $P < 0.05$ vs model group; ° $P < 0.05$ vs matrix group

步验证和甄别,在不同年龄人群的使用方法也需要通过多角度的药理研究提供科学依据。对小鼠IV型变态反应的研究可满足、填补临床部分要求,为

表3 氯霉素泼尼松搽剂对小鼠磷酸组织胺致痒阈的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Determination of itching threshold of chloramphenicol prednisone liniment on histamine phosphate in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/mg·cm ⁻²	致痒阈/ μ g
模型	—	85.2±26.2
基质	—	110.4±26.9
莫米松乳膏	50	326.9±44.2 [#]
氯霉素泼尼松搽剂	1 + 0.05	180.6±33.7 [#]
(氯霉素+泼尼松)	0.5 + 0.025	248.6±41.4 [#]
	0.25 + 0.012 5	364.9±69.5 [#]

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与基质组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs matrix group

该制剂其他方面的药理研究奠定基础。

研究发现,氯霉素泼尼松搽剂对DNCB诱导的小鼠IV型变态反应具有显著的抑制作用,并能够抑制4-AP导致的瘙痒,显著提升磷酸组织胺致痒阈,这与氯霉素泼尼松搽剂含泼尼松和氯霉素密切相关,糖皮质激素与抗生素联合应用,可产生叠加抗毒、抗炎、抗过敏效应,能抑制组胺、毒性物质的形成与释放^[7-8]。氯霉素泼尼松搽剂通过脂溶性可弥散进入小鼠皮下组织细胞内,抑制、延迟细胞介导免疫反应、过敏反应,降低免疫球蛋白与细胞表面受体的结合并抑制白介素的合成与释放,产生免疫抑制作用^[9-10]。它可能通过抑制组胺的释放抑制小鼠IV型变态反应,也可能通过抑制N-型钙通道,阻滞小鼠神经传导、钝化皮下末梢神经对瘙痒的反应,而对瘙痒产生抑制作用。

IV型变态反应是由特异性致敏效应T细胞介导的细胞免疫应答的一种类型^[11],T淋巴细胞产生大量白细胞介素-2(IL-2)反作用于中枢免疫器官,胸腺内的T淋巴细胞诱导早期T淋巴细胞向CD8⁺单阳性细胞转化,使凋亡的双阳性细胞减少,进而使胸腺增质量,胸腺指数变大;大量初始T淋巴细胞同时识别特异性变应原及免疫相关分子发生活化效应,产生包括IL-2在内的多种淋巴因子,刺激CD4⁺T淋巴大量增殖,造成相应的脾脏质量增加,脾脏指数变大;在小鼠体内,绝大多数蛋白质抗原的DTH反应均可经CD4⁺T细胞被动转移;皮肤源性瘙痒是由组胺敏感性的无髓C类神经纤维进行传导的,在湿疹、特异性皮炎等皮肤疾病的病理过程中,IV型变态反应所释放的炎症介质也与皮肤瘙痒的产生有密切的关系^[12-13]。

氯霉素泼尼松搽剂的分散介质为清鱼肝油,还含有14%的蓖麻油,制备过程中经过超声波的空化效应^[14],使难溶于乙醇的泼尼松被粉碎成极小的微粒分散于这些油性介质中,形成油性搽剂,这类油性搽剂具有粘附性,用药后使药物能较长时间与皮损部位接触,形成油膜防护层,防止药物及皮肤水分流失,有效发挥治疗作用。IV型变态反应一般接触抗原24 h后出现反应,通过氯霉素泼尼松搽剂对IV型变态反应的药理作用研究,显示其对该型反应具有良好的治疗作用,提示在临床可用于蚊虫叮咬、隐翅虫皮炎等具有IV型变态反应特征的皮损治疗。

参考文献

- [1] 湖北省食品药品监督管理局. 湖北省医院制剂规范[S]. 2011: 345-346.
- [2] 韦 祝, 刘向宇, 罗勇奇, 等. 374例金黄色葡萄球菌烫伤样皮肤综合征患儿病原菌及其药敏试验结果[J]. 中国药师, 2016, 19(6): 1099-1101.
- [3] 陈艳红, 陈 敏, 李 钊. 氯强油治疗慢性腹泻患儿肛周皮肤损伤及护理[J]. 护理学杂志, 2014, 29(16): 10-11.
- [5] 丛 欢, 刘吉成, 崔红霞, 等. 白鲜皮水提取物对小鼠迟发型变态反应的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2016, 37(30): 3741-3742.
- [6] 王永辉, 房树标, 高 丽, 等. 蛇床子素微乳止痒及抗IV型变态反应的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(8): 1932-1934.
- [7] 任志强, 付亚芳. 糖皮质激素治疗感染性休克的临床分析[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(10): 1551-1553.
- [8] 王振璞, 蒋 欣, 苗书斋, 等. 甲泼尼龙与醋酸泼尼松治疗肾移植术后肺部感染[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(1): 22-26.
- [9] 邓小元. 皮肤源性瘙痒发生机制的研究进展[J]. 中国医药科学, 2012, 2(3): 42-43.
- [10] 段 冲, 郑 瑞. 皮肤性瘙痒相关机制的研究进展[J]. 中国医学创新, 2017, 14(11): 136-140.
- [11] 高仙灵, 红 琳, 贾红梅, 等. 蝉蜕超微粉抗变态反应作用及初步机制研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(23): 22-25, 311.
- [12] 刘利艳, 邱宇安, 武 乐, 等. 苜蓿素抗变态反应作用[J]. 广东医学, 2018, 39(6): 811-815.
- [13] 彭艳梅, 刘 青, 邓 博, 等. 表皮生长因子受体抑制剂致相关皮肤瘙痒的机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(5): 28-33.
- [14] 常明泉, 陈 芳, 陈学珍, 等. 超声波法制备氯强油搽剂的工艺及质量控制研究[J]. 中国药事, 2008(10): 892-894.