

基于皮肤外燥模型小鼠的干燥皮肤综合评价及银耳多糖的干预研究

傅楷历, 刘晓媛, 吴淑辉, 耿忆薇, 邓燕* (南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

摘要: 目的 制备皮肤外燥模型小鼠, 对小鼠皮肤进行综合评价并研究银耳多糖内服、外用的干预作用。方法 10 只 KM 小鼠置于人工气候箱内按“温度-湿度-风”综合条件建立皮肤外燥小鼠模型; 另 90 只 KM 小鼠, 除空白组常规饲养, 其余各组按外燥造模条件饲养。银耳多糖的干预研究分为内服和外用, 内服给药动物随机分为空白组、模型组(等量生理盐水)和银耳多糖组(400, 200, 100 mg·kg⁻¹); 外用给药动物分为经皮空白组、经皮模型组(等量生理盐水)、经皮银耳多糖组(银耳多糖 10 mg·cm⁻²)和阳性对照组[透明质酸(hyaluronic acid, HA)10 mg·cm⁻²], 每日 1 次, 连续给药 20 d。观测不同给药方式在银耳多糖干预下小鼠皮肤外观特征、含水量、组织结构、HA 含量以及水通道蛋白 3(aquaporin-3, AQP3)表达量的影响。结果 皮肤综合评价结果表明, 外燥模型建立成功; 在银耳多糖干预下, 与空白组比较, 内服与外用给药的模型组皮肤含水量、HA 含量以及 AQP3 表达量降低($P<0.05$); 与模型组相比, 各给药组可显著提高皮肤含水量、HA 含量以及 AQP3 表达量($P<0.05$), 且内服以银耳多糖高剂量组效果最好($P<0.05$), 外用经皮银耳多糖组效果优于阳性对照组($P<0.05$)。各给药组较模型组皮肤恢复色泽, 未见明显皮屑与裂纹, 毛发可正常增长, 皮肤组织结构相对完整, 毛囊与皮脂腺数目增多。结论 外燥可致皮肤干燥的理论成立。银耳多糖对皮肤外燥模型小鼠内服外用具有延缓干燥的功效, 其作用可能与银耳多糖调节皮肤 HA 和 AQP3 表达量相关。

关键词: 银耳多糖; 皮肤; 干燥; 水通道蛋白 3; 透明质酸

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2019)15-1899-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.15.009

引用本文: 傅楷历, 刘晓媛, 吴淑辉, 等. 基于皮肤外燥模型小鼠的干燥皮肤综合评价及银耳多糖的干预研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(15): 1899-1904.

Comprehensive Evaluation of Dry Skin and Intervention of Tremella Polysaccharides Based on the Model Mice with Outer-dry Skin

FU Kaili, LIU Xiaoyuan, WU Shuhui, GENG Yiwei, DENG Yan* (School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the skin of mice comprehensively and study the effect of intervention with tremella polysaccharides by establishing mice model with outer-dry skin. **METHODS** Ten KM mice were placed in an artificial climate chamber to establish the model mice with outer-dry skin according to the "temperature-humidity-wind" comprehensive conditions; while other 90 KM mice, except the blank group, were kept under the conditions of external dryness. The intervention study of tremella polysaccharides was divided into oral and topical administration, mice of oral administration were randomly divided into blank control group and model control group (equal saline), tremella polysaccharide groups (400, 200, 100 mg·kg⁻¹ tremella polysaccharide); mice of topical administration were randomly divided into percutaneous blank group and model group (equal physiological saline), tremella polysaccharide group (tremella polysaccharide 10 mg·cm⁻²) and positive control group (HA 10 mg·cm⁻²), each group was treated by different ways of administration once a day for 20 days. The surface characteristics, water content, tissue structure, HA and AQP3 expression of mice were counted as observation indicators of the skin situation under the intervention of Tremella polysaccharides with different administration methods. **RESULTS** After comprehensive evaluation of skin, the model was established successfully. Under the intervention of Tremella polysaccharides, compared with the blank group, the skin water content, HA and AQP3 content of the model group with oral and topical administration was decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the water content, HA content and AQP3 expression were significantly increased in each drug group ($P<0.05$), and the effect of 400 mg·kg⁻¹ tremella polysaccharide group was the best among oral groups and the topical tremella polysaccharide group was better than that of the positive control group among the external administration groups ($P<0.05$). Compared with the model group, the skin of each drug group, without obvious dandruff and crack, became sleeker and glossier; the hair of mice grew normally, the skin structure was intact, and the number of hair follicles and sebaceous glands increase. **CONCLUSION** Based on the theory of external dryness resulting in skin dryness, tremella polysaccharides can alleviate dryness of skin effectively that may related to the regulation of HA and AQP3 in the skin. **KEYWORDS:** tremella polysaccharide; skin; dryness; AQP3; hyaluronic acid

基金项目: 南方医科大学科技开发培育计划项目(C1033036)

作者简介: 傅楷历, 男, 硕士 Tel: (020)61648259 E-mail: 1009300562@qq.com *通信作者: 邓燕, 女, 博士, 教授 Tel: (020)61648259 E-mail: 362186548@qq.com

中医认为燥邪袭表,则皮肤容易出现干燥、粗糙、皲裂甚至瘙痒等症状。正常皮肤含水量为全身水分的 18%~20%^[1],极易处于皮肤干燥的状态。轻度干燥可使皮肤粗糙,缺乏弹性和光泽;严重时,皮肤甚至出现瘙痒,脱屑,增厚,皲裂等症状^[2]。银耳为银耳科真菌银耳(*Tremella fuciformis* Berk)的干燥子实体,又名白木耳、雪耳,是营养价值较高的药食同源滋补良品^[3-6]。《神农本草经》《本草纲目》等典籍记载银耳具有补气和血,滋阴润燥的功效。在长期的临床和基础研究中发现银耳能有效改善皮肤干燥的状况。银耳多糖作为银耳的主要活性物质,现代药理研究表明其具有免疫调节^[7-10]、抗肿瘤^[11-12]、降血糖血脂^[13-14]、抗氧化衰老^[15-18]等功效。虽然目前已有银耳多糖补水保湿、润燥作用的相关报道^[19-20],但是研究较少。本实验采用体内灌胃、外用 2 种给药方法,使用银耳多糖干预皮肤外燥模型小鼠,首次利用温燥“温度-相对湿度-风”综合条件^[21-23]刺激小鼠皮肤,创建皮肤外燥小鼠模型的新方法,并对模型小鼠进行皮肤干燥综合评价,观测银耳多糖干预对小鼠皮肤表观特征、含水量、组织结构、透明质酸(hyaluronic acid, HA)含量以及水通道蛋白-3(aquaporin-3, AQP3)表达量的影响,系统论证内服、外用银耳多糖 2 种给药途径对皮肤外燥模型小鼠的疗效及机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级昆明小鼠 110 只,♀♂各半,体质量 18~22 g,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(粤)2013-0034。本实验获得广州中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准编号:S20180008)。

1.2 原料与试剂

银耳多糖是由南方医科大学中药研究室利用银耳(丑耳,购自南方大药房,批号:GB7096)湿法打浆辅助超声波法提取、分离、纯化得到的均一体多糖,硫酸-苯酚法^[24]测得质量分数为 88.37%,用时以生理盐水配制。

BCA 蛋白浓度测定试剂盒(南京恩晶生物技术有限公司,批号:EG20190925); EDTA 抗原修复液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G1206); HA 含量检测试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司,批号:201809); 兔抗 AQP3 多克隆抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:

GB11395); HRP 标记山羊抗兔鼠(丹麦 DAKO,批号:K5007); DAB 显色剂(丹麦 DAKO,批号:K5007); 无水乙醇、二甲苯、透明质酸钠等试剂均为分析纯,由广州化学试剂厂提供。

1.3 仪器

CP225D 型电子微量天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司); HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); LRH-250 人工智能气候箱(广东省医疗器械厂); FC-0501 皮肤水分测试仪(深圳凯尔); BMF-800 荧光显微镜(上海比目仪器有限公司); RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司); JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药

2.1.1 皮肤外燥小鼠模型的建立与观察 将 20 只昆明小鼠随机分为 2 组,即正常组和模型组。适应性喂养 3 d 后,推剪剃去背部鼠毛,约 2 cm×3 cm,保持背部无毛状态。正常组置于人工气候箱内按常规环境饲养;模型组按外燥“温度-相对湿度-风”综合条件[温度(22±2)℃,相对湿度(33±2)%,温度湿度恒定不变,风速 2.5 m·s⁻¹,风处理时间 5 h·d⁻¹]持续放至人工气候箱内,建立皮肤外燥小鼠模型,其余与正常组相同。连续干预 14 d 后禁饮禁食 4 h,颈椎脱臼法处死小鼠,观察模型组与正常组表观特征、皮肤含水量、背部和足垫皮肤组织细胞形态的差异。

2.1.2 内服法 将 50 只昆明小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,即空白组,模型组,银耳多糖高、中、低剂量组。按“2.1.1”项下方法造模。14 d 后,各组小鼠于人工气候箱内按“2.1.1”项下条件干预,连续给药 20 d,银耳多糖高、中、低剂量组分别每天灌胃 400, 200, 100 mg·kg⁻¹ 银耳多糖,空白组和模型组每天灌胃等量生理盐水,每日 1 次。颈椎脱臼法处死小鼠,实验前 4 h 禁饮禁食,迅速取下小鼠背部皮肤(约 2 cm×3 cm)与肺组织,保存,备用。

2.1.3 外用法 将 40 只昆明小鼠随机分为 4 组,每组 10 只,即经皮空白组、经皮模型组、经皮银耳多糖组、阳性对照组。造模方法与内服法相同。经皮银耳多糖组每天外涂银耳多糖(10 mg·cm⁻²),经皮阳性对照组每天外涂 HA(10 mg·cm⁻²),用时以生理盐水配制,空白组和模型组外涂等量生理盐水,每日 1 次,人工气候箱内按上述条件处理,

连续给药 20 d。颈椎脱臼法处死小鼠，实验前 4 h 禁饮禁食。

2.2 观察指标与方法

2.2.1 小鼠皮肤的表现特征观察 观察各组小鼠背部裸露皮肤的色泽、光滑程度、皮屑脱落程度、粗糙度等外观的形态。

2.2.2 小鼠皮肤干燥度的判定

2.2.2.1 体表法 按照皮肤测试相关指南，分别在造模前后、给药后使用皮肤水分测试仪于小鼠背部皮肤裸露部分测定，每次操作均在涂药前完成，位置固定，稳定后读数。

2.2.2.2 烘箱法 取小鼠 2 cm×2 cm 背部皮肤，刮去浅黄色的皮下脂肪组织，以电子天平称取湿重，再放入烘箱中于 80 ℃烘干 12 h，称干重，计算皮肤含水百分率=(湿重-干重)/湿重×100%。

2.2.3 皮肤组织细胞形态的观察 常规取背部皮肤(0.5 cm×0.5 cm)，置 4%多聚甲醛固定液固定，梯度脱水，石蜡切片(4 μm)，常规 HE 染色、镜检。

2.2.4 皮肤 HA 含量的测定 剪取背部皮肤 50 mg 左右，经预冷生理盐水漂洗，除去皮下脂肪和其他结缔组织，滤纸拭干，称重，制成 10%的皮肤匀浆，然后反复冻融 3 次，使其完全破碎，细胞内容物完全游离在液相中，离心后取其上清液，BCA 法测定蛋白浓度，按 ELISA 试剂盒说明书测定 HA 含量。

2.2.5 免疫组化法测定皮肤 AQP3 含量 常规留取背部皮肤后，应用 4%多聚甲醛溶液进行固定。组织包埋、切片后，按照免疫组化检测试剂盒进行 AQP3 检测。光学显微镜下观察，拍照，随机选取各组免疫组化切片各 6 张，每张随机选取 3 个视野，Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件对各切片的 AQP3 含量进行检测分析，选取相同的棕黄色作为判断所有照片阳性的统一标准，对每张照片进行分析得出每张照片阳性的累积光密度值(integrated optical density, IOD)以及组织的像素面积(AREA)。并求出平均光密度值(average optical, AO 值)，AO=IOD/AREA，AO 值越大表明阳性表达水平越高。

2.2.6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件处理数据，用 one-way ANOVA 进行分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 外燥模型小鼠的皮肤综合评价

与正常组相比，模型组小鼠饲料进食量减少，

进水量增高；皮肤缺乏光泽，干燥，表皮粗糙，可见皮肤脱屑，毛发生长减慢。除此之外，通过 2 种皮肤水分测定方法对小鼠背部裸露部分进行测定发现，2 种办法均表明与正常组相比，模型组皮肤含水量降低($P<0.05$)，见表 1。在光镜下观察 2 组的背部皮肤和足垫皮肤的组织细胞形态发现，模型组第 14 天背部皮肤全层变薄，角质层呈不规则皱缩状，结缔组织增生，毛发数目与新生毛乳头生长减少，尤其是皮肤毛球数减少和皮下脂肪层增厚；而正常组并不造成缺水改变，组织细胞变化不明显；正常组足垫部皮肤结构完整，汗腺丰富；模型组足垫皮肤角质层疏松易脱，真皮层增厚，皮下结缔组织增生，汗腺明显减少。结果见图 1。

表 1 模型组与正常组皮肤干燥度对比($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 1 Comparison of skin dryness between model group and normal group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	皮肤含水量/%	
	体表法	烘箱法
正常组	19.200±0.343	75.115±1.341
模型组	16.840±0.534 ¹⁾	64.514±1.608 ¹⁾

注：与正常组比较，¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$.

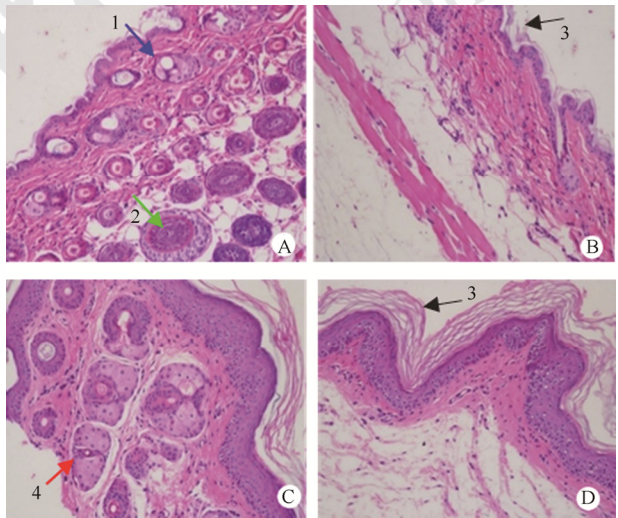


图 1 小鼠背部皮肤和足垫皮肤组织病理学变化(HE 染色，200×)

A-空白组小鼠背部皮肤；B-模型组小鼠背部皮肤；C-空白组小鼠足垫皮肤；D-模型组小鼠足垫皮肤；1-皮脂腺；2-毛囊；3-角质层；4-汗腺。

Fig. 1 Histopathological changes in the skin of the back and footpad of mice(HE staining, 200×)

A-back skin of blank group mice; B-back skin of model group mice; C-footpad skin of blank group mice; D-footpad skin of model group mice; 1-sebaceous gland; 2-hair follicle; 3-cuticle; 4-sweat gland.

3.2 银耳多糖对皮肤外燥模型小鼠的干预作用

3.2.1 对小鼠皮肤的表现特征的影响 内服给药

后,与空白组相比,模型组皮肤暗淡,缺乏光泽,干燥,表皮粗糙,可见皮肤脱屑,毛发生长减慢;与模型组相比,银耳多糖中、低剂量组部分小鼠皮肤变光滑细致,恢复色泽,未见明显皮屑与裂纹,毛发可正常增长,尤以银耳多糖高剂量组效果最佳。

外用给药后,与空白组相比,经皮银耳多糖组、经皮阳性对照组背部皮肤未见明显差别,皮肤光滑细致,未见皮屑与裂纹,毛发正常增长;而模型组皮肤暗淡,缺乏光泽,干燥,表皮粗糙,可见皮肤脱屑,毛发生长减慢。

3.2.2 对小鼠皮肤干燥度的影响 内服给药后,与空白组相比,银耳多糖中、低剂量组和模型组皮肤含水量降低($P<0.05$);银耳多糖高剂量组无明显差别,无统计学意义;与模型组相比,各给药组皮肤含水量显著升高($P<0.05$);与银耳多糖高剂量组相比,银耳多糖中、低剂量组皮肤含水量降低($P<0.05$),结果见表2。

表2 内服给药后各组含水量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 2 Comparison of water content of each group after oral administration ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	皮肤含水量/%	
	体表法	烘箱法
空白组	19.520±0.316 ²⁾	78.871±0.869 ²⁾
模型组	17.220±0.594 ¹⁾³⁾	64.060±0.940 ¹⁾³⁾
银耳多糖高剂量组	19.190±0.281 ²⁾	78.423±0.546 ²⁾
银耳多糖中剂量组	18.760±0.502 ¹⁾²⁾³⁾	75.700±1.021 ¹⁾²⁾³⁾
银耳多糖低剂量组	18.620±0.514 ¹⁾²⁾³⁾	73.167±0.946 ¹⁾²⁾³⁾

注:与空白组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$;与银耳多糖高剂量组比较,³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with high dose of tremella polysaccharide group, ³⁾ $P<0.05$.

外用给药后,与经皮空白组相比,经皮模型组、阳性对照组皮肤含水量降低($P<0.05$);与模型组相比,各给药组皮肤含水量增高且均有统计学意义($P<0.05$);与阳性对照组相比,经皮银耳多糖组皮肤含水量增高,具有统计学差异($P<0.05$),结果见表3。

3.2.3 对小鼠皮肤组织细胞形态的影响 内服给药后,与空白组相比,模型组皮肤角质层多呈皱缩状,易脱落,毛囊和皮脂腺数目严重减少,甚至视野下未见毛囊组织结构,结缔组织增生明显,皮下脂肪层变厚;与模型组相比,各给药组皮肤组织结构相对完整,角质层减少剥脱,毛囊与皮脂腺数目增多,银耳多糖高剂量组效果最优,中、低剂量组的镜下皮肤组织细胞结构仍有部分毛囊

减少,角质层轻微皱缩。结果见图2。

外用给药后,与经皮空白组相比,经皮银耳多糖组、经皮阳性对照组镜下结构差别不大;与经皮模型组相比,各外用给药组皮肤结构较完整,角质层少见增厚或脱落,毛囊和皮脂腺数目增加。结果见图2。

表3 外用给药后各组含水量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 3 Comparison of water content of each group after topical administration($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	皮肤含水量/%	
	体表法	烘箱法
经皮空白组	19.290±0.509 ²⁾³⁾	78.771±0.688 ²⁾³⁾
经皮模型组	17.560±0.703 ¹⁾³⁾	64.048±1.028 ¹⁾³⁾
经皮银耳多糖组	18.920±0.388 ²⁾³⁾	78.299±1.474 ²⁾³⁾
阳性对照组	18.330±0.377 ¹⁾²⁾	72.322±0.940 ¹⁾²⁾

注:与经皮空白组比较,¹⁾ $P<0.05$;与经皮模型组比较,²⁾ $P<0.05$;与阳性对照组比较,³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with positive group, ³⁾ $P<0.05$.

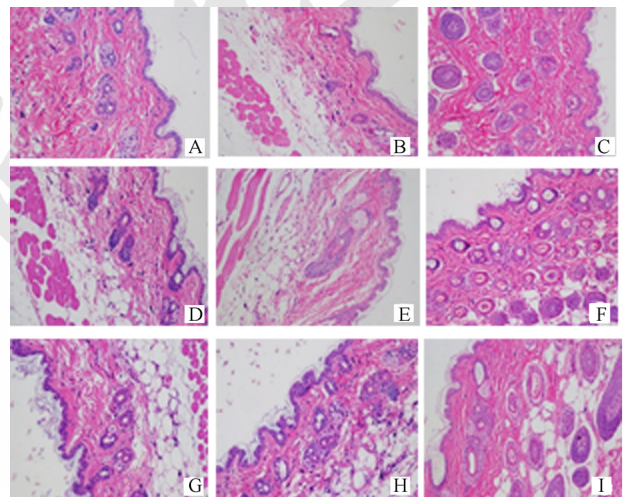


图2 给药后各组小鼠背部皮肤组织病理学变化(HE染色, 200×)

A-口服空白组; B-口服模型组; C-口服银耳多糖高剂量组; D-口服银耳多糖中剂量组; E-口服银耳多糖低剂量组; F-经皮空白组; G-经皮模型组; H-经皮银耳多糖组; I-阳性对照组。

Fig. 2 Histopathological changes in the back skin of mice in each group after administration(HE staining, 200×)

A-oral blank group; B-oral model group; C-oral administration of high-dose tremella polysaccharides group (400 mg·kg⁻¹); D-oral administration of medium-dose tremella polysaccharides group(200 mg·kg⁻¹); E-oral administration of low-dose tremella polysaccharides group (100 mg·kg⁻¹); F-percutaneous blank group; G-percutaneous model group; H-percutaneous tremella polysaccharide group; I-positive control group.

3.2.4 对小鼠皮肤 HA 和 AQP3 的影响 皮肤中 AQP3 阳性表达主要位于细胞膜上,呈棕黄色,其中表皮和皮脂腺位置可见强阳性,毛囊部分可见弱阳性。各组小鼠皮肤 AQP3 表达情况见图3。

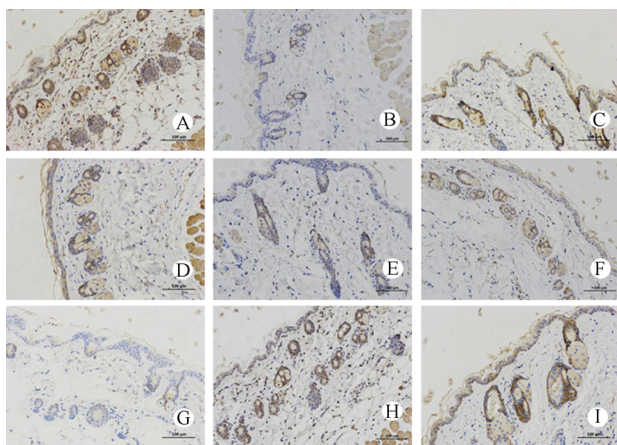


图3 免疫组化检测各组小鼠背部皮肤 AQP3 的表达情况(200×)

A-口服空白组; B-口服模型组; C-口服银耳多糖高剂量组; D-口服银耳多糖中剂量组; E-口服银耳多糖低剂量组; F-经皮空白组; G-经皮模型组; H-经皮银耳多糖组; I-阳性对照组。

Fig. 3 Expression of AQP3 in the back skin of the mice detected by immunohistochemistry(200×)

A-oral blank group; B-oral model group; C-oral administration of high-dose tremella polysaccharides group (400 mg·kg⁻¹); D-oral administration of medium-dose tremella polysaccharides group (200 mg·kg⁻¹); E-oral administration of low-dose tremella polysaccharides group(100 mg·kg⁻¹); F-percutaneous blank group; G-percutaneous model group; H-percutaneous tremella polysaccharide group; I-positive control group.

内服给药后,与空白组相比,模型组与银耳多糖中、低剂量组小鼠皮肤 HA 和 AQP3 含量显著降低($P<0.05$)。与模型组相比,各给药组均能上调小鼠皮肤 HA 含量和 AQP3 总灰度值,尤以高剂量组效果最佳,差异具有统计学意义($P<0.05$),结果见表 4。

表4 内服给药对小鼠皮肤 HA 和 AQP3 的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effect of oral administration on HA and AQP3 content in mouse skin($\bar{x} \pm s$)

组别	HA (n=10)	AQP3($\times 10^3$) (n=6)
空白组	56.303 $\pm$ 2.714 ²⁾	25.080 $\pm$ 1.514 ²⁾
模型组	37.967 $\pm$ 7.801 ¹⁾	7.006 $\pm$ 2.410 ¹⁾
银耳多糖高剂量组	55.542 $\pm$ 4.323 ²⁾	22.190 $\pm$ 2.650 ²⁾
银耳多糖中剂量组	49.419 $\pm$ 3.322 ¹⁾²⁾	17.609 $\pm$ 1.761 ¹⁾²⁾
银耳多糖低剂量组	45.407 $\pm$ 4.210 ¹⁾²⁾	16.885 $\pm$ 3.637 ¹⁾²⁾

注:与空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

外用给药后,与经皮空白组相比,模型组皮肤 HA 和 AQP 含量明显降低($P<0.05$);与经皮模型组相比,各组皮肤 HA 和 AQP3 含量明显增高($P<0.05$);与经皮阳性对照组相比,经皮银耳多糖组的 HA 含量和 AQP3 总灰度值显著增高,具有统计学意义($P<0.05$),结果见表 5。

表5 外用给药对小鼠皮肤和 HA 和 AQP3 的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effect of topical administration on HA and AQP3 content in mouse skin($\bar{x} \pm s$)

组别	HA(n=10)	AQP3($\times 10^3$)(n=6)
经皮空白组	61.413 $\pm$ 8.445 ²⁾³⁾	26.186 $\pm$ 4.535 ²⁾³⁾
经皮模型组	31.983 $\pm$ 3.277 ¹⁾³⁾	4.146 $\pm$ 2.431 ¹⁾³⁾
经皮银耳多糖组	59.346 $\pm$ 3.555 ²⁾³⁾	21.535 $\pm$ 3.231 ¹⁾²⁾³⁾
阳性对照组	44.309 $\pm$ 3.968 ¹⁾²⁾	16.918 $\pm$ 4.264 ¹⁾²⁾

注:与经皮空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$;与经皮模型组比较, ²⁾ $P<0.05$;与阳性对照组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with percutaneous blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with percutaneous model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with positive group, ³⁾ $P<0.05$.

4 讨论

本实验利用季节气候结合现代气象医学研究,在“温度-湿度-风”综合改变下创造了外燥的条件,小鼠的皮肤在该条件下发生了干燥的病理改变,成功建立了皮肤外燥的小鼠模型。与正常组相比,模型组小鼠皮肤可见干燥、脱屑、新毛生长受阻等外燥的表现,镜下皮肤角质层呈不规则皱缩状,易脱落,毛球数和皮脂腺数目急剧减少与皮下脂肪增生;足垫部皮肤角质层疏松易脱,真皮层增厚,皮下结缔组织增生,汗腺明显减少。小鼠模型的成功建立为今后研究皮肤干燥提供了动物模型的基础,同时为下一步探讨银耳多糖干预皮肤外燥小鼠模型提供了合理的依据。

清·张仁安称银耳“有麦冬之润而无其寒,有玉竹之甘而无其腻,诚润肺滋阴之要品”。银耳多糖作为银耳的主要活性物质,更能直接、高效地体现出银耳药用价值和使用价值。本实验结果表明,内服与外用银耳多糖可有效缓解皮肤干燥程度,显著提高皮肤含水量;在光镜下,各用药组与模型组相比,小鼠皮肤角质层更不易脱落,毛囊与皮脂腺数目增多。结果表明内服与外用银耳多糖对皮肤外燥模型小鼠具有一定疗效;其中,内服法随着银耳多糖浓度升高,缓解皮肤干燥症状效果更好,两者存在剂量效应关系,而外用法经皮银耳多糖组效果优于阳性对照组,为下一步探讨更合理的剂量提供了依据。目前研究认为,皮肤缓解干燥,补水保湿机制主要与甘油、HA 和水通道蛋白相关^[25]。其中,HA 和 AQP3 含量的改变对皮肤干燥度起到了决定性的作用,在干燥的环境下,皮肤中 HA 和 AQP3 的表达量将下调。HA 作为理想的保湿因子,具有特殊的保水作用,是国际公认的生物大分子保湿剂^[26]。内服与外用银耳多糖较模型组能显著上调皮肤的 HA 含量,因

此可认为银耳多糖可以增加皮肤内 HA 的含量,而对皮肤外燥模型小鼠起到缓解干燥的疗效。而 AQP3 主要在皮肤的表皮层表达^[27], 不仅可增加细胞膜的水通透性, 还可提高甘油、尿素等溶质的通透性, 其水转运与甘油转运机制对皮肤保湿至关重要^[28]。免疫组化中发现, 各给药组较模型组 AQP3 表达呈强阳性。内服和外用银耳多糖较模型组也能显著上调皮肤的 AQP3 总灰度值, 提示皮肤外燥模型小鼠缓解皮肤干燥的机制与银耳多糖可以增加皮肤内 HA 的含量相关。其中, HA 与 AQP3 关系紧密, 共同参与银耳多糖的补水润燥机制, 相互作用, 且两者与皮肤含水量存在正相关关系, 当皮肤缺水干燥、含水量降低时, 皮肤中 HA 含量与 AQP3 表达量越低。

综上所述, 内服与外用银耳多糖对皮肤外燥模型小鼠具有确切疗效, 能有效改善皮肤缺水干燥的状态; 除此之外, 银耳多糖能显著上调皮肤 HA 和 AQP3 含量, 增加皮肤含水量, 说明银耳多糖对治疗皮肤外燥模型小鼠的作用机制与 HA、AQP3 有关。

REFERENCES

- [1] 任海毅, 王巧娥, 董银卯, 等. 皮肤干燥机制研究进展[C]// 第九届中国化妆品学术研讨会论文集. 上海, 2013: 93-98.
- [2] 赵丹妮. 干燥性皮肤问题分析及护理措施 [J]. 魅力中国, 2017(21): 280.
- [3] SUN D. The Study of Extraction and Ability of Polysaccharide from Tremella [D]. Tianjin University of Science and Technology, 2015.
- [4] LI X W. Tremella best extraction process of research [J]. Metrol Measure Tech(计量与测试技术), 2014, 41(8): 90, 93.
- [5] XU C, DIAO J Y, WANG S M. Recent progress in pharmacological studies of polysaccharide from Tremella fuciformis berk [J]. Pharm Today (今日药学), 2018, 28(3): 207-210.
- [6] WU Y J, DENG J Y, WEI Z Y. Research progress on preparation, characteristics and product development of functional polysaccharid of Tremella fuciformis [J]. Edib Med Mushroom(食药菌), 2018, 26(3): 161-165.
- [7] ZHOU Y L, CHEN X Y, YI R K, et al. Immunomodulatory effect of Tremella polysaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. Molecules, 2018, 23(2): E239. Doi: 10.3390/molecules23020239.
- [8] SHI Z W, LIU Y, XU Y, et al. Tremella Polysaccharides attenuated Sepsis through inhibiting abnormal CD4⁺ CD25 (high) regulatory T cells in mice [J]. Cell Immunol, 2014, 288(1/2): 60-65.
- [9] HU M H, DENG X L, XU L. Effect of compound polysaccharide with Lentinan, Pachymaran and Tremella polysaccharide on mouse macrophage function [J]. Chin J Immunol(中国免疫学杂志), 2018, 34(1): 44-49.
- [10] 梁金强, 王园园, 胡明华, 等. 复合多糖对CTX致免疫低下小鼠的免疫增强作用 [J]. 中药材, 2017, 40(4): 953-956.
- [11] BIN C. Optimization of extraction of Tremella fuciformis polysaccharides and its antioxidant and antitumour activities in vitro [J]. Carbohydr Polym, 2010, 81(2): 420-424.
- [12] SUN L, LI W, QIU X. Application of polysaccharide of traditional Chinese drug in tumor treatment [J]. Chin J Conval Med (中国疗养医学), 2016, 25(1): 19-21.
- [13] BO H M, TIAN C Y, LI J A. Effect of Tremella polysaccharide on experimental type 2 diabetic rats with insulin resistance [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2011, 22(8): 1926-1927.
- [14] BACH E, COSTA S, OLIVEIRA H, et al. Use of polysaccharide extracted from Tremella fuciformis Berk for control diabetes induced in rats [J]. Emir J Food Agric, 2015, 27(7): 585-591.
- [15] SHEN T, DUAN C, CHEN B D, et al. Tremella fuciformis polysaccharide suppresses hydrogen peroxide-triggered injury of human skin fibroblasts via upregulation of SIRT1 [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 1340-1346.
- [16] WU Z Y. Study on extraction, purification, physicochemical properties and antioxidant activity of tremella polysaccharide [C]. Sichuan Agricultural University, 2015, 34-35.
- [17] SHI X, CHENG X Q, YANG Y, et al. Optimization the extraction process of polysaccharide by response surface methodology from the Tremella fuciformis pedicel and its antioxidant activity [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2017, 38(2): 297-301, 318.
- [18] WEI H, ZHANG D, LU L. Extraction, purification and antioxidant activities of several polysaccharides from edible and medicinal fungi [J]. J Nanjing Norm University(Nat Sci Ed)(南京师范大学学报: 自然科学版), 2017, 40 (2): 72-76.
- [19] LIU H, HE L. Comparison of the moisture retention capacity of tremella polysaccharides and hyaluronic acid [H]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2012, 40(26): 13093-13094.
- [20] LAI J X, HE C F, ZHAO J, et al. Optimization of extraction technology of polysaccharide from Tremella fuciformis on commercialized basis and its function in skin care cosmetics [J]. China Surfactant Deterg Cosmet(日用化学工业), 2010, 40(4): 259-262.
- [21] 倪圣, 丁建中, 张六通, 等. 外燥对两种品系小鼠气道与皮肤组织影响的病理特征与评价[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(2): 487-488.
- [22] HU L Q, DING J Z, LIU G P. Study on effects of external dryness to the airway immune and secretory function of mice [J]. China Foreign Med Treat(中外医疗), 2015, 34(21): 19-21.
- [23] 王静平, 魏宁颐, 唐朝, 等. 外燥实验动物模型的研究进展 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2017, 26(1): 35-37.
- [24] CHEN Q, ZHANG Y L, LIU H N, et al. Comparison of the content of functional components in different parts of vine tea [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(11): 1542-1545.
- [25] 陈小娥, 朱文元. 皮肤的保湿机制研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2011, 27(18): 2802-2804.
- [26] CUI Y, LI Y H, LANG F F. The research progress in hyaluronic acid [J]. J Changchun Univ Sci Technol(Nat Sci Ed)(长春理工大学学报: 自然科学版), 2011, 34(3): 101-105.
- [27] ZHANG J X, LI Z J. Research progress in role of AQP3 in pathogenesis of skin diseases [J]. Med Recapitul (医学综述), 2013, 19(17): 3101-3103.
- [28] ZHU D X, FANG H. Aquaporin 3 and skin [J]. Int J Dermatol Venereol(国际皮肤性病杂志), 2010, 36(6): 340-343.

收稿日期: 2019-01-03

(本文责编: 曹粤锋)