

海洋深层水对慢性湿疹小鼠的作用及其机制

范慧婕, 王英燊, 陈嘉莹, 乔熙倩, 李 婵, 蔡旻捷, 周迎春
(南方医科大学 中医药学院, 广东 广州 510515)

[摘 要] 目的: 探讨海洋深层水对慢性湿疹小鼠的疗效及其对免疫系统、炎症反应的调节作用. 方法: 把昆明小鼠随机分为空白对照组、模型组、阳性对照组及海洋深层水组, 每组 10 只, 用 DNCB 诱导慢性湿疹模型, 通过检测小鼠耳厚度, 耳变应评分, 脾脏体质量比, 脾脏 CD4 + /CD8 + 比值, 血清炎症因子及皮肤 HE 组织病理学染色等指标来评定海洋深层水的治疗效果. 结果: 海洋深层水减轻模型小鼠耳厚度肿胀度, 降低模型小鼠耳变应评分, 脾脏体质量比及脾脏 CD4 + /CD8 + 比值, 减少血清 IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α 的分泌, 改善皮肤炎症细胞的浸润和病变程度. 结论: 海洋深层水可通过调节免疫系统及减轻炎症反应起到治疗慢性湿疹的作用.

[关键词] 海洋深层水; 慢性湿疹; 抗炎; 免疫调节

[中图分类号] R965.1 [文献标志码] A [文章编号] 1000 - 9965 (2017) 02 - 0115 - 07
doi:10. 11778/j. jdx. 2017. 02. 004

Exploring the effects of deep sea water on chronic atopic dermatitis mice and its mechanism

FAN Huijie, WANG Yingyi, CHEN Jiaying, QIAO Xiqian, LI Chan, CAI Minjie, ZHOU Yingchun
(Department of traditional Chinese medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] Aim: To observe the anti-inflammation and restoring immune function effects of deep sea water in chronic atopic dermatitis mice induced by DNCB. Methods: 40 adult mice were randomly divided into control group, model group, positive group and deep sea water group. The chronic atopic dermatitis model was induced by DNCB. Ear thickness, allergic effect, spleen index, CD4 + /CD8 + in spleen, serum inflammatory factors and HE stains were used to assess. Results: Compared to model group, deep sea water can reduce ear thickness and score of allergic effect, regulate the ratio of CD4 + /CD8 + in spleen, decrease the inflammation factor in serum such as IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α . Conclusion: deep sea water might have a good effect on chronic atopic dermatitis by means of anti-inflammation and restoring immune function.

[Key words] deep sea water; chronic atopic dermatitis; anti-inflammation; immune function

慢性湿疹(chronic atopic dermatitis, CAD)是临床上常见的慢性复发性变态反应性疾病,以红斑、瘙痒、剥皮、水肿、皮肤增厚等为特征^[1]. CAD 发病率高,在全球范围内,有高达 18% 的儿童及 5% 的成人

[收稿日期] 2016 - 12 - 06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673805;81373575);广东省科技计划项目(2014A020221013);广东省大学生创新创业训练计划项目(201512121046)

[作者简介] 范慧婕(1990 -),博士研究生,研究方向:中西医结合临床

通信作者:周迎春(1963 -),教授,主任医师,医学博士,博士生导师,研究方向:中西医结合临床, E-mail: zhychun@126. com

受其困扰^[2],且在近 30 年,其发病率呈持续上升状态,已成为严重危害健康及影响生活质量的重大卫生问题^[3]. CAD 发病原因复杂,目前多认为与遗传、免疫、环境、化学物品接触等有关^[4]. 海洋深层水 (deep sea water, DSW) 是指水深在 200 m 以上,不能进行光合作用的海水,其具有低温性、营养性、无菌洁净性、稳定性等特点^[5]. 随着对海洋深层水药理研究的不断加深,其药理活性不断被发现. 本研究发现 DSW 对小鼠的 CAD 有着良好的缓解作用.

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄雄性昆明小鼠 40 只,体质量 20 ~ 24 g, 购买自南方医科大学实验动物中心,动物生产许可证号 SCXK (粤) 2011 - 0015, 动物使用许可证号 SCXK 2011 - 0015. 饲养温度为 (25 ± 2) °C, 自由饮食,适应性饲养 5d 后开始造模.

1.2 实验材料

(1)海洋深层水浓缩液 由台湾花东海矿股份有限公司和广东宏通信德科技股份有限公司提供,来自台湾花莲水深 500 m 的太平洋海岸,其离子成分见表 1,总硬度为 185 858. 75,硬度 = Ca (mg/L) × 2. 5 + Mg (mg/L) × 4. 1^[6]; (2)蛋白芯片试剂盒:货号 QAM-INT-1-4,瑞博奥生物科技有限公司; (3)皮炎平,采购自华润三九医药股份有限公司; (4)CD4 + /CD8 + 试剂盒,购买自 BD 公司,货号 343039; (5) DNCB (二硝基氯苯):上海化学试剂公司生产; (6) 丙酮:分析纯,广东光华化学厂有限公司生产.

1.3 实验方法

(1)AD 模型的建立 本实验通过 2,4-二硝基氯苯 (2,4-Dinitrofluorobenzene, DNCB) 颈背部致敏和反复耳部激发小鼠建立 CAD 模型. 各小鼠颈背部脱毛,范围为 2 cm × 2 cm. 除空白组外,其余组小鼠均在脱毛部位涂以含有质量分数为 7% DNCB 的丙酮橄榄油溶液 (4 : 1) 100 μL 致敏,5 d 后于小鼠右耳内外侧耳面均匀涂以质量分数为 0. 5% DNCB 溶液 5 μL 进行激发,每 3 天 1 次,连续 5 次. 空白组小鼠颈背部及右耳均涂以丙酮橄榄油溶液对照,以相同的方式及相同的量进行涂抹.

(2)实验分组 将 40 只小鼠随机分为 4 个小组,分别是空白组、模型组、阳性对照组、DSW 组. 处理方法:空白组及模型组予以 2 mL 蒸馏水涂抹颈背部已脱毛皮肤及右耳内外侧;阳性对照组予以花生米大小皮炎平涂抹于相同位置;DSW 组予以 2 mL

用蒸馏水稀释为 1 200 硬度的 DSW 涂抹相同位置. 每天 2 次. 若给药当天需进行 DNCB 激发,则给药时间与激发时间间隔 2 h. 末次激发后 3 d 处死小鼠.

表 1 由 SGS Institut Fresenius Gmbh 机构检测所得的 DSW 浓缩液的矿物质质量浓度

Table 1 Mineral contents of DSW used in this study were analyzed by SGS Institut Fresenius Gmbh

Parameter	$\rho_{\text{Result}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
Magnesium (Mg)	45300
Calcium (Ca)	51. 5
Sodium (Na)	11. 6
Kalium (K)	14800
Ammonium (NH4)	13400
Chloride (Cl)	13200
Bromide (Br)	2400
Iodine (I)	4. 4
Nitrite (NO ₂)	0. 38
Nitrate (NO ₃)	100
Sulfate (SO ₄)	45700
Manganese (Mn)	<0. 05
Iron (Fe)	0. 05
Chromium (Cr)	0. 07
Cobalt (Co)	0. 007
Copper (Cu)	0. 044
Nickel (Ni)	0. 16
Selenium (Se)	0. 002
Rubidium (Rb)	4. 7
Zinc (Zn)	<0. 05
Chromium (Cr)	0. 07
Boron (B)	135

(3)观察指标 ①耳厚度:于致敏前、致敏后 24 h、每次激发后 24 h 后用螺旋测微仪分别测小鼠右耳厚度;②耳变应评分:每次激发后 24 h 及末次激发后 3 d 从红斑、水肿、抓痕 3 个方面进行小鼠右耳变应反应评分,最高分值 8 分,取每组的平均值,见表 2. ③脾脏指数:摘取小鼠的脾脏,用滤纸吸干残血后,称质量 (mg),分别除以小鼠体质量 (g),再乘以 10,得到脾脏指数;④脾脏 CD4 + /CD8 + 比值:摘取小鼠脾脏放入冷 PBS 清洗后置于含有质量分数为 1% FBS 的 1640 培养基的筛网上研磨,1 000 r/min 离心 5 min,再加入红细胞裂解液裂解 5 min,重复 1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,冷 PBS 重悬,调整细胞密度为 7 × 10⁶ /mL. 参考 BD 的 CD4 + /CD8 + 检测试剂盒说明书进行后续操作.

表 2 CAD 小鼠的耳变应评分标准

Table 2 The standard of allergic effect in CAD mice		
评分项目	反应强度	分值
红斑	无红斑	0
	轻微红斑	1
	中度红斑无痂皮	2
	中重度红斑伴轻微痂皮	3
	重度红斑伴重度痂皮	4
水肿	无水肿	0
	轻度水肿	1
	中度水肿	2
抓痕	中度水肿	3
	重度水肿	3
抓痕	无	0
	有	1

⑤血清炎症因子:小鼠经眼球摘除取血,不抗凝,室温静置 1 h,3 000 r/min,离心 15 min,取出血清置于微量离心管内,−80 ℃冰箱保存备用.采用蛋白芯片技术测定血清 IL-1 α ,IL-1 β ,IL-2,IL-4,IL-6,TNF- α 等细胞炎症因子;

⑥HE 染色:小鼠颈背部皮肤组织标本经石蜡

包埋固定,制成 5 μ m 厚薄层切片,以苏木素 – 伊红 (hematoxylin eosin,HE)进行染色,实验光学显微镜观察过敏反应过程中皮肤组织的病理变化,主要包括角化程度、真表皮水肿程度、淋巴细胞浸润等情况.

(4)统计学分析统计实验数据 用 SPSS 21.0 统计软件包对数据进行统计分析,结果用($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA), $P < 0.05$ 表示有统计学差异.

2 实验结果

2.1 耳厚度检测

于致敏前、致敏后、每次激发后 24 h 后分别测小鼠右耳厚度.记录如表 3 所示,各组变化差值如图 1 所示.结果显示致敏各组的右耳厚度均比空白组有不同程度的肿胀($P < 0.05$).与模型组相比,阳性对照组($P < 0.01$)及 DSW 组肿胀程度较低($P < 0.05$),说明皮炎平及 DSW 对湿疹模型小鼠的耳朵炎症有抑制作用.

表 3 CAD 小鼠耳厚度变化
Table 3 The record of ear thickness in CAD mice

小鼠分组	致敏前	致敏后	第 1 次激发	第 2 次激发	第 3 次激发	第 4 次激发	第 5 次激发
空白组	0.36 $\pm$ 0.25	0.37 $\pm$ 0.41	0.37 $\pm$ 0.31	0.37 $\pm$ 0.35	0.35 $\pm$ 0.41	0.34 $\pm$ 0.33	0.38 $\pm$ 0.66
模型组	0.37 $\pm$ 0.31	0.37 $\pm$ 0.39	0.40 $\pm$ 0.42	0.47 $\pm$ 0.44	0.49 $\pm$ 0.46	0.56 $\pm$ 0.49	0.64 $\pm$ 0.64
阳性对照组	0.38 $\pm$ 0.32	0.38 $\pm$ 0.25	0.41 $\pm$ 0.56	0.44 $\pm$ 0.57	0.45 $\pm$ 0.51	0.46 $\pm$ 0.61	0.50 $\pm$ 0.72
DSW 组	0.35 $\pm$ 0.45	0.37 $\pm$ 0.26	0.39 $\pm$ 0.51	0.42 $\pm$ 0.63	0.45 $\pm$ 0.39	0.50 $\pm$ 0.47	0.52 $\pm$ 0.69

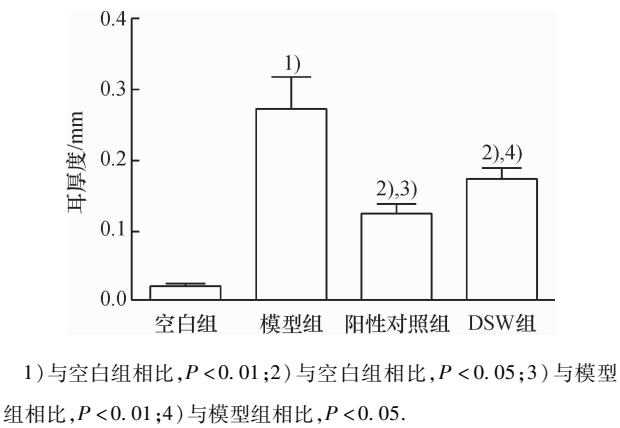


图 1 各组小鼠耳厚度变化比较
Fig. 1 The difference of alternative ear thickness in different groups

2.2 小鼠耳变应评分

从红斑、水肿、抓痕 3 个方面根据表 2 的评分标准对各组小鼠进行评分.结果如图 2 所示.从首次激

发后 24 h 开始评分,到最后处死小鼠时共计评分 6 次.从结果分析,与空白组比较,从首次激发后,各组耳变应评分均有上升,而模型组小鼠耳变应评分在整个阶段都处于最高,说明造模成功.与模型组相比,DSW 组及阳性对照组对小鼠的耳变应程度有明显的改善.

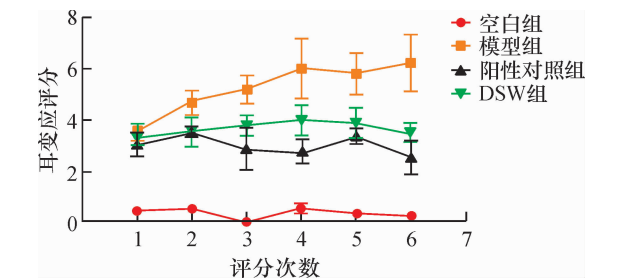


图 2 小鼠耳变应评分变化曲线图
Fig. 2 The curve of ear allege effect

2.3 脾脏指数

脾脏指数(表4). 本实验结果表明, 在 DNCB 诱导的小鼠痤疮模型中, 其脾脏指数明显增加($P < 0.05$), 说明免疫器官脾脏参与了 CAD 的病理过程. 本研究中 DSW 组与模型组相比可显著抑制 CAD 小鼠脾脏指数的增加($P < 0.01$), 而阳性对照组与空白组、模型组相比, 过度抑制机体免疫反应($P < 0.01$).

表4 脾脏指数
Table 4 Spleen index

组别	脾脏指数
空白对照组	29.3 ± 3.3
模型组	42.3 ± 5.1 ¹⁾
阳性对照组	23.5 ± 3.1 ^{2),3)}
DSW 组	33.1 ± 3.9 ⁴⁾

1) 与空白组相比, $P < 0.01$; 2) 与空白组相比, $P < 0.05$; 3) 与模型组相比, $P < 0.01$; 4) 与模型组相比, $P < 0.05$.

2.4 脾脏 CD4 + /CD8 + 细胞比值

在图3左侧的图中, 左上象限为 CD4 + 单阳性细胞, 左下象限为 CD4 + 和 CD8 + 双阴性细胞, 右上象限为 CD4 + 和 CD8 + 双阳性细胞, 右下象限为 CD8 + 单阳性细胞. 根据统计结果, 见表5, 与空白组相比, 模型组的 CD4 + /CD8 + 比值升高($P < 0.05$), 说明在该小鼠慢性湿疹模型中, 有 T 细胞介导的细胞免疫发生. 而阳性对照组 CD4 + /CD8 + 比值与空白组($P < 0.05$) 及模型组($P < 0.01$) 相比降低明显, 表现出皮炎平对细胞免疫的过度抑制. 而 DSW 组的小鼠与模型组相比, CD4 + /CD8 + 比值降低($P < 0.05$), 与空白组相比无统计学差异($P > 0.05$).

表5 脾脏 CD4 + /CD8 + 比值
Table 5 the ratio of CD4 + /CD8 + in spleen

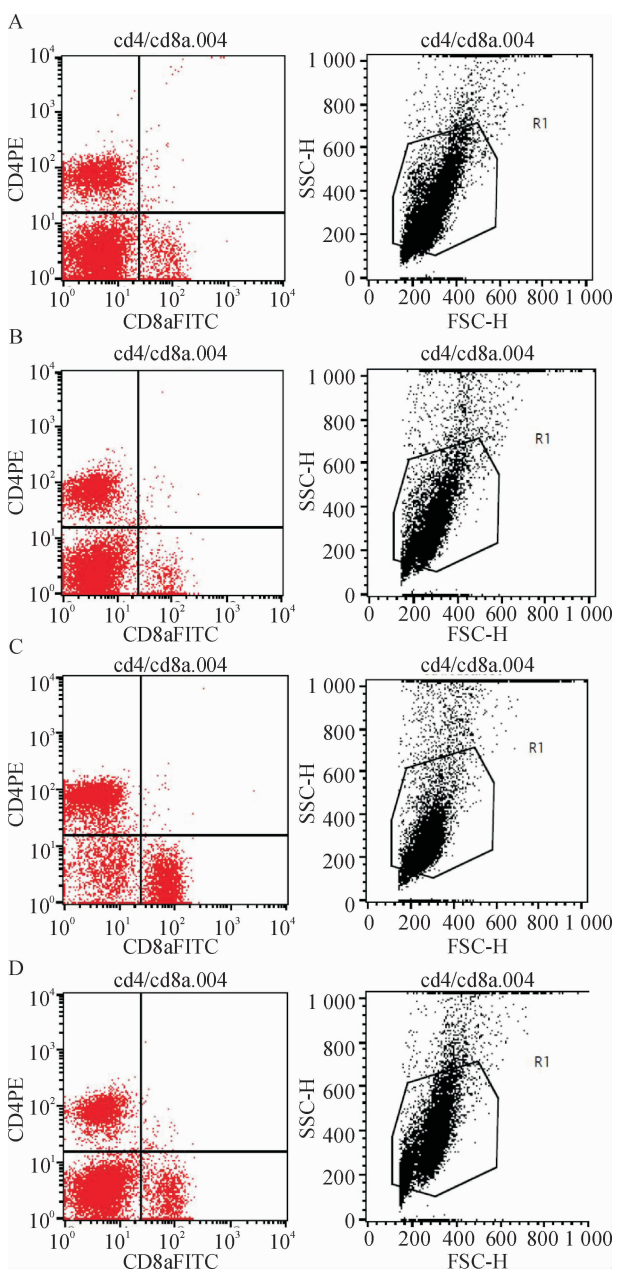
组别	CD4 + /CD8 + 细胞比值
空白对照组	1.98 ± 0.35
模型组	2.69 ± 0.42 ¹⁾
阳性对照组	1.20 ± 0.19 ^{2),3)}
DSW 组	2.02 ± 0.21 ⁴⁾

1) 与空白组相比, $P < 0.05$; 2) 与空白组相比, $P < 0.01$; 3) 与模型组相比, $P < 0.01$; 4) 与模型组相比, $P < 0.05$.

2.5 血清炎症因子

DNCB 可诱发小鼠炎症反应, 造成小鼠血清 IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α 细胞炎症因子表达增高, 模型组与空白组相比, 炎症因子增高有统计

学差异($P < 0.01$). 阳性对照组与 DSW 组均可降低血清炎症因子含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$).



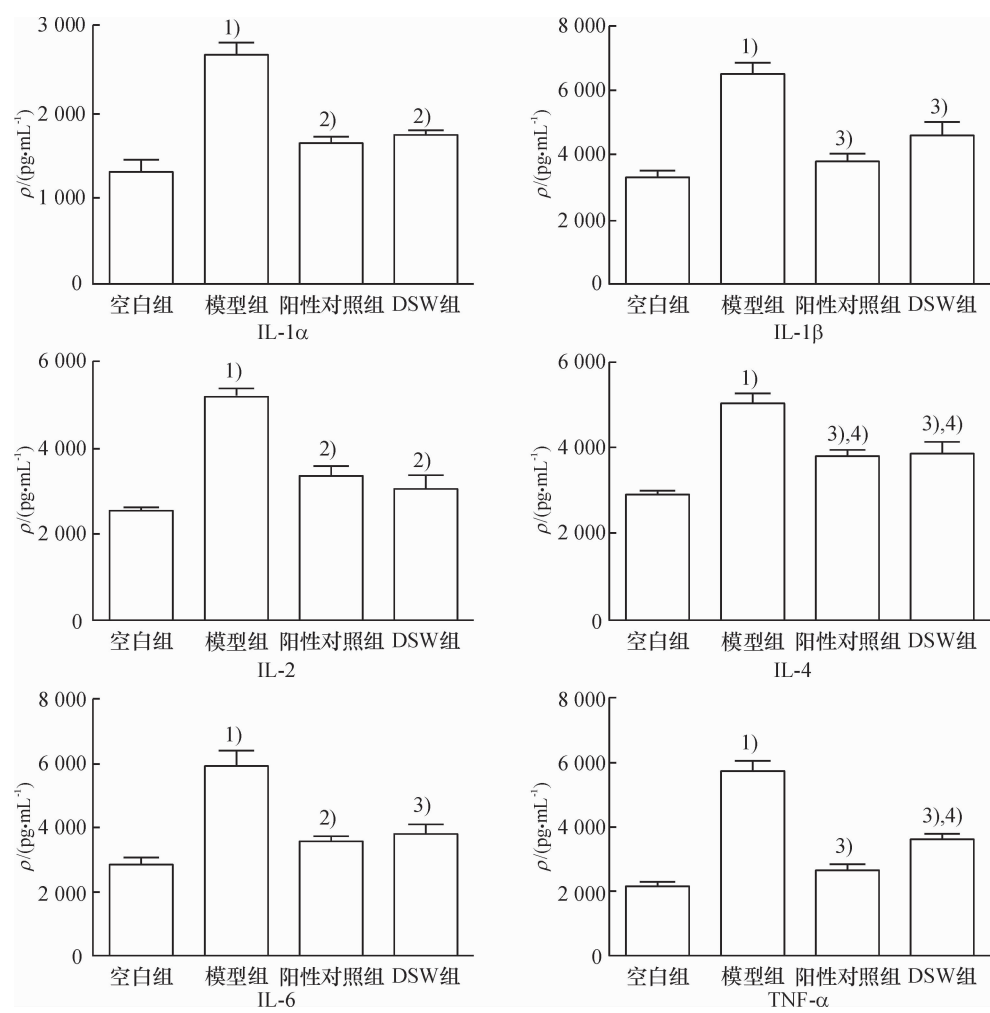
A: 空白对照组; B: 模型组; C: 阳性对照组; D: DSW 组

图3 流式细胞术检测脾脏 CD4 + /CD8 + 图

Fig. 3 The ratio of CD4 + /CD8 + in spleen

2.6 HE 染色

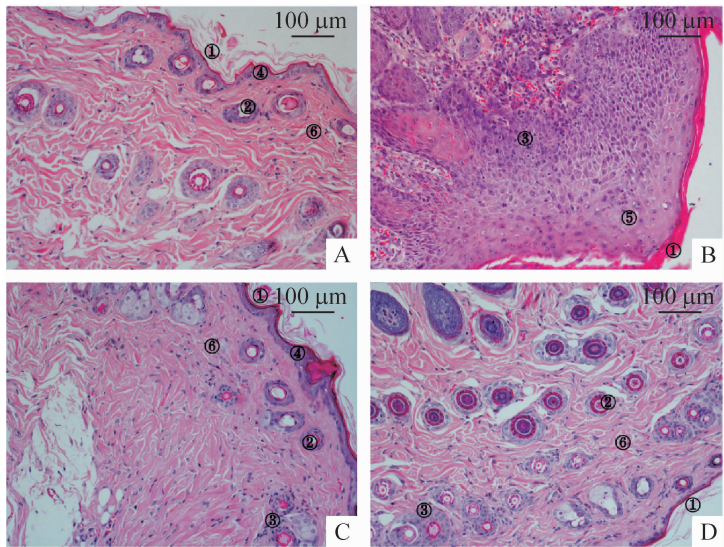
与空白组相比, 模型组表皮角化过度, 增厚, 真皮水肿, 淋巴细胞、中性粒细胞浸润, 毛囊消失, 说明该造模方法正确有效. 海洋深层水组能明显减少表皮角化, 改善皮肤炎性浸润及减轻真皮水肿, 毛囊皮脂腺未受炎性浸润影响, 与阳性对照皮炎平组相比, 疗效一致. 见图5(光学显微镜下 200 $\times$ 观察).



1) 与空白组相比, $P < 0.05$; 2) 与空白组相比, $P < 0.01$; 3) 与模型组相比, $P < 0.05$; 4) 与模型组相比, $P < 0.01$.

图 4 各组小鼠血清炎症因子比较

Fig. 4 Inflammation factors of different groups



①角质层 (corneum); ②毛囊 (hair follicle); ③炎症细胞浸润 (lymphocytic, neutrophil and eosinophilic dermal infiltrate); ④表皮 (epidermis); ⑤表皮海绵层水肿 (spongiosis); ⑥真皮层 (dermis).

A. 空白对照组; B. 模型组; C. 阳性对照组; D. DSW 组.

图 5 HE 病理染色

Fig. 5 HE staining

3 讨论

尽管AD是一种常见的慢性复发性变态反应,其发病机制及治疗手段仍未完全阐明^[7].近年来,对于慢性湿疹的治疗大都从抗炎、抗变态反应、调节免疫等入手^[8].在临床上,类固醇激素是最广泛应用于AD的药物,但其能引起一系列副作用^[9].在本研究中采用的DSW来自深海,与水深少于200 m的表层海水相区别,其压力超过60倍大气压,与空气完全隔绝,远离现代环境污染且不受陆地、大气以及病原菌影响,保持着最纯净的状态.其药理作用多样,国内外学者对DSW进行了药理研究及实验观察,证实DSW有抗疲劳、抗肿瘤、抗骨质疏松、抗动脉粥样硬化、治疗皮肤病、改善代谢综合征等生物活性^[6,10-14].

本实验使用DNCB诱发小鼠慢性湿疹模型,通过小鼠耳厚度、小鼠耳变应评分,血清炎症因子检测,背部皮肤HE染色等手段可推断造模方式是成功的.同时,DSW对DNCB诱发的小鼠湿疹样改变有着良好的调节作用,功能学上改善了小鼠右耳组织肿胀度,减轻小鼠红斑、搔抓等症状以及皮肤的炎性浸润,抑制了湿疹小鼠炎症因子的表达,还通过降低炎症诱导增高的脾脏CD4+/CD8+比值起到免疫调节作用.

AD的发生发展与免疫系统中的Th1和Th2细胞失衡相关,AD的严重程度与IL-4,IL-6等炎症因子的表达量呈正相关关系^[15-16].能否抑制前炎症因子IL-1 β ,IL-6,TNF- α 的表达,是用来衡量药物的抗炎作用的一个关键指征^[14].在炎症发生发展过程中,IL-1由受抗原或者丝裂原等刺激后由单核巨噬细胞大量分泌,分为IL-1 α 及IL-1 β 两种亚型,以相同的亲和力结合于相同的细胞表面受体,并可与抗原协同作用活化CD4+T细胞,CD4+T细胞的活化则可刺激IL-2及IL-4的合成增加.TNF- α 是一种潜在的炎症反应调节因子,可诱导其他炎症因子的分泌及内皮细胞黏附分子,进一步激活级联式的免疫反应和炎症反应^[17].在本课题中,用DNCB成功诱导了昆明小鼠血清炎症因子IL-1 α ,IL-1 β ,IL-2,IL-4,IL-6,TNF- α 的增高,而DSW组和阳性对照组疗效一致,有效地降低了该炎症因子的表达,说明降低血清炎症因子的分泌是DSW抗慢性湿疹作用机制之一.

T细胞在免疫系统有着关键的地位,包括

CD4+和CD8+细胞,CD4+细胞主导抗致病原效应,而CD8+细胞主导终止免疫反应^[18].在慢性湿疹模型中,小鼠的免疫机能处于亢进状态,CD4+/CD8+比例升高以及脾脏体质量比增加.为了探讨DSW对慢性湿疹小鼠的免疫系统的作用,通过计算脾脏体质量比和使用流式细胞术检测小鼠脾脏的CD4+和CD8+细胞数量,发现DSW可以调节免疫亢进状态下小鼠的CD4+/CD8+的比值,使其趋于正常.在这同时,研究结果表明皮炎平组小鼠CD4+/CD8+的比值和脾脏体质量比皆明显降低,甚至低于空白对照组,提示长期使用皮炎平对小鼠的免疫系统有过度抑制作用,这也是长期使用激素的一种副作用.

同时,亦有研究表明,CAD与微量元素失衡相关,微量元素不足可增加湿疹风险,同时在湿疹患者中血清镁离子和锌离子低于正常人水平^[19-20].DSW含有丰富的微量元素,尤其是镁离子,故推测其可能通过纠正小鼠的微量元素失衡状态,达到抗炎调节免疫,改善CAD.

根据本实验,发现DSW可通过调节免疫系统及减轻炎症反应起到改善慢性湿疹的功效.本课题不足之处是没有设计不同质量浓度DSW组,对DSW起效的具体分子机制仍有待深入探讨.期望本研究为DSW治疗CAD起到抛砖引玉的作用,为后面继续深入研究DSW的作用机理打下基础.

[参考文献]

- [1] CHEN Y, XIAN Y, LAI Z, et al. Anti-inflammatory and anti-allergic effects and underlying mechanisms of Huang-Lian-Jie-Du Extract: Implication for atopic dermatitis treatment[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 185(3): 41-52.
- [2] KIM G D, LEE S E, PARK Y S, et al. Immunosuppressive effects of fisetin against dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 66(4): 341-349.
- [3] BIEBER T. Atopic dermatitis[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(14): 1483-1494.
- [4] KIM T H, KIM G D, AHN H J, et al. The inhibitory effect of naringenin on atopic dermatitis induced by DNFB in NC/Nga mice[J]. *Life Sci*, 2013, 93(15): 516-524.

- [5] FAN H, TAN Z, HUA Y, et al. Deep sea water improves exercise and inhibits oxidative stress in a physical fatigue mouse model[J]. *Biomed Rep*, 2016, 4(6):751–757.
- [6] LI P C, PAN C H, SHEN M J, et al. Deep sea water prevents balloon angioplasty-induced hyperplasia through MMP-2: an in vitro and in vivo study[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e96927.
- [7] MORAR N, WILLIS-OWEN S A, MOFFATT M F, et al. The genetics of atopic dermatitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118(1):24–36.
- [8] HONG S W, CHOI E B, MIN T K, et al. An important role of alpha-hemolysin in extracellular vesicles on the development of atopic dermatitis induced by *Staphylococcus aureus* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e100499.
- [9] FISHER D A. Adverse effects of topical corticosteroid use[J]. *West J Med*, 1995, 162(2):123–126.
- [10] YANG C C, YAO C A, LIN Y R, et al. Deep-sea water containing selenium provides intestinal protection against duodenal ulcers through the upregulation of Bcl-2 and thioredoxin reductase 1[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e96006.
- [11] KIM S, CHUN S Y, LEE D H, et al. Mineral-enriched deep-sea water inhibits the metastatic potential of human breast cancer cell lines[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(5):1691–700.
- [12] HA B G, PARK J E, SHIN E J, et al. Modulation of glucose metabolism by balanced deep-sea water ameliorates hyperglycemia and pancreatic function in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e102095.
- [13] HOU C W, TSAI Y S, JEAN W H, et al. Deep ocean mineral water accelerates recovery from physical fatigue[J]. *J Int Soc Sports Nutr*, 2013, 10(1):7.
- [14] BAK J P, KIM Y M, SON J, et al. Application of concentrated deep sea water inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12(1):108.
- [15] BERK R, SINGH A, GURALNICK M. Atopic dermatitis: an overview[J]. *Am Fam Physician*, 2012, 86(1):35–42.
- [16] LEUNG D Y, BOGUNIEWICZ M, HOWELL M D, et al. New insights into atopic dermatitis[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(5):651–657.
- [17] CHEN G, LI K K, FUNG C H, et al. Er-Miao-San, a traditional herbal formula containing *Rhizoma Atractylodis* and *Cortex Phellodendri* inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages through inhibition of NF-kappaB pathway and MAPKs activation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(3):711–718.
- [18] WANG B, FUJISAWA H, ZHUANG L, et al. CD4 + Th1 and CD8 + type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity[J]. *J Immunol*, 2000, 165(12):6783–6790.
- [19] TOYRAN M, KAYMAK M, VEZIR E, et al. 3 Trace element levels in children with atopic dermatitis[J]. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 2012, 22(5):341.
- [20] SHAHEEN S O, NEWSON R B, HENDERSON A J, et al. Umbilical cord trace elements and minerals and risk of early childhood wheezing and eczema[J]. *Eur Respir J*, 2004, 24(2):292–297.

[责任编辑:刘蔚绥]