

## **ĐẶC ĐIỂM MÔ HỌC VÀ MIỄN DỊCH VIÊM DA CƠ ĐỊA KÍCH THÍCH BỞI 2,4-DINITROCHLOROBENZENE TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG THỤY SĨ**

**Huỳnh Anh Phương<sup>(1)</sup>, Lê Thu Hoài<sup>(1)</sup>, Trương Đình Kiều Diễm<sup>(1)</sup>,  
Hoàng Minh<sup>(2)</sup>, Vũ Diễm My<sup>(1)</sup>**

*(1) Trung tâm Y sinh học phân tử, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh*

*(2) Khoa Vi sinh miễn dịch, Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh*

*Ngày nhận bài 22/5/2025; Chấp nhận đăng 20/7/2025*

*Liên hệ email: diemmyvu@ump.edu.vn, tdkdiem@ump.edu.vn*

### **Tóm tắt**

Viêm da cơ địa (VDCĐ) là một trong những bệnh viêm da mạn tính phổ biến nhất hiện nay với nguyên nhân gây bệnh phức tạp. Do hiện vẫn chưa có liệu pháp phòng ngừa và điều trị bệnh hiệu quả, nhiều nghiên cứu trên mô hình tế bào hay động vật khác nhau đã được thực hiện nhằm cung cấp thêm thông tin về cơ chế bệnh sinh. 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) là hóa chất được sử dụng trong kích thích phát triển VDCĐ trên nhiều chủng chuột khác nhau như SKH1, BALB/c, C57BL/6 và Nc/Nga. Tuy nhiên hiện vẫn còn ít dữ liệu trên chủng chuột nhắt trắng Thụy Sĩ. Do đó, nghiên cứu tiến hành khảo sát đặc điểm mô học mô da và miễn dịch trên mô hình VDCĐ ở chủng chuột nhắt trắng Thụy Sĩ kích thích bởi hóa chất DNCB. Sau quá trình kích thích, các chỉ số bao gồm độ dày các tầng da, thâm nhiễm tế bào mast và nồng độ Immunoglobulin (Ig) E huyết thanh được đánh giá. Kết quả ghi nhận sự dày sừng các lớp da, tăng số lượng tế bào mast thâm nhiễm và nồng độ IgE huyết thanh trên nhóm chuột có bôi DNCB.

**Từ khóa:** *chuột nhắt trắng Thụy sĩ, DNCB, viêm da cơ địa*

### **Abstract**

#### **HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS AND IMMUNE RESPONSE OF ATOPIC DERMATITIS INDUCED BY TOPICAL APPLICATION OF 2,4- DINITROCHLOROBENZENE IN SWISS ALBINO MICE**

Atopic dermatitis (AD) is a common inflammatory skin disorder with complex etiologies. Since there is no satisfactory therapy for AD treatment, the development of animal models provides a better understanding of AD pathogenesis. Induction of AD-like symptoms by 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) has been conducted in different mouse strains such as SKH1, BALB/c, C57BL/6 và Nc/Nga. However, such data is limited in Swiss albino mice. This study aimed to characterize the alteration of skin histology and immune responses in Swiss albino mice with AD-like symptoms induced by topical application of DNCB. Following the induction, pathological parameters including skin thickness, immunoglobulin (Ig) E level and mast cell infiltration were then measured. Histopathological analysis showed that topical application of DNCB exerted epidermal and dermal thickening and increased mast cell infiltration in the dermis. The serum level of IgE was also elevated in DNCB-treated mice.

## 1. Đặt vấn đề

Viêm da cơ địa là một trong những bệnh viêm da phổ biến nhất ở trẻ em và cả người lớn. Bệnh đặc trưng bởi triệu chứng ngứa dai dẳng và tần suất tái phát cao. Cho đến nay, cơ chế gây bệnh chính xác của VDCĐ vẫn chưa được hiểu rõ. Một số các yếu tố di truyền và môi trường đã được biết làm tăng nguy cơ mắc bệnh bao gồm các khiếm khuyết về chức năng của hàng rào bảo vệ da, rối loạn đáp ứng miễn dịch và/hoặc các tác động của tác nhân kích thích từ môi trường (Schneider và cs., 2013).

Các nghiên cứu gần đây báo cáo tỷ lệ mắc VDCĐ toàn cầu có xu hướng tăng trên cả trẻ em và người lớn (Langan và cs., 2023). Một trong những giả thiết về sự gia tăng tần suất mắc VDCĐ là do quá trình đô thị hóa nhanh chóng và tình trạng ô nhiễm gia tăng. Nghiên cứu thực hiện trên 12 đô thị Trung Quốc ghi nhận tỷ lệ mắc VDCĐ ở trẻ em nông thôn (37,6%) thấp hơn đáng kể so với trẻ em thành thị (62,4%;  $p < 0,001$ ) (Guo và cs., 2016). Xu hướng tương tự cũng được báo cáo ở Hàn Quốc, nơi tỷ lệ mắc bệnh ở trẻ em từ 1-18 tuổi là 86,6% tại khu vực thành thị trong khi tỷ lệ này ở khu vực nông thôn là 13,4% ( $p = 0,0380$ ) (Cheng, Wu và Han, 2021). Với tỷ lệ mắc VDCĐ ngày càng tăng, các nghiên cứu cải thiện hiệu quả phòng ngừa và điều trị bệnh hiện đang rất được chú ý.

Hiện vẫn chưa có phương pháp chữa trị hoàn toàn hoặc phòng ngừa VDCĐ. Việc quản lý và điều trị được quyết định dựa trên mức độ nghiêm trọng của bệnh, với mục tiêu làm giảm số lượng và độ nặng của các đợt cấp, kéo dài thời gian tái phát và giảm thiểu các tác dụng phụ. Phác đồ điều trị thường bao gồm kết hợp giữa dưỡng ẩm, sử dụng các thuốc kháng viêm tại chỗ (corticosteroid, thuốc ức chế calcineurin, antihistamines...), tăng cường kháng khuẩn và giảm/loại bỏ hoàn toàn việc sử dụng các chất kích ứng da. Tuy các thuốc kháng viêm có thể làm nhẹ bớt triệu chứng VDCĐ, việc sử dụng thuốc trong thời gian dài đã được báo cáo là gây ra các tác dụng phụ đáng kể như teo da, tổn thương mạch máu, bong da và nhiễm trùng lan rộng. Hơn nữa, điều trị kéo dài bằng corticosteroid hoặc chất ức chế calcineurin cũng đã được liên hệ với tăng nguy cơ tái phát (Nowicki và cs., 2015). Do đó, việc phát triển các liệu pháp mới cho điều trị VDCĐ hiện là nhu cầu cấp thiết.

Một số mô hình tế bào và động vật VDCĐ đã và đang được phát triển phục vụ cho nghiên cứu về bệnh học phân tử và thử nghiệm điều trị (Martel, Lovato, Bäumer và Olivry, 2017). Trong đó, mô hình VDCĐ kích thích bởi hóa chất thường được sử dụng do dễ dàng kiểm soát thời gian và liều lượng, không yêu cầu can thiệp biến đổi di truyền. 2,4-Dinitrochlorobenzene là chất gây dị ứng thường gặp có thể sử dụng kích thích sự phát triển các triệu chứng VDCĐ trên các dòng chuột như SKH1, BALB/c và C57BL/6. Tuy nhiên, vẫn còn ít thông tin về sự thay đổi mô da và đáp ứng miễn dịch khi sử dụng DNCB trên chủng chuột nhất trắng Thụy Sĩ. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát các đặc điểm mô học và miễn dịch dưới tác động của DNCB trên chủng chuột nhất trắng Thụy Sĩ, qua đó hỗ trợ sự lựa chọn mô hình phù hợp trong nghiên cứu về kiểu hình VDCĐ khác nhau.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1 Nguyên vật liệu

Dung dịch DNCB 0,5% được chuẩn bị bằng cách hòa tan DNCB (#138630, Sigma-Aldrich) trong hỗn hợp có chứa acetone (#100014, Sigma-Aldrich) và dầu ô liu (Olivoilà) với tỉ lệ 3:1. Dung dịch dexamethasone (#D1756, Sigma-Aldrich) được chuẩn bị bằng cách hòa tan hoá chất trong dung dịch đệm phosphate-buffered saline (PBS).

## 2.2 Đối tượng nghiên cứu

Chuột nhắt trắng Thụy Sĩ (chuột cái, 6 tuần tuổi, cân nặng 20g-25g) được mua từ Viện Pasteur tại Thành phố Hồ Chí Minh. Chuột được nuôi một tuần trong điều kiện nhiệt độ  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  và chu kỳ sáng/tối 12 giờ để thích nghi trước khi tiến hành thí nghiệm. Thức ăn là cám viên và nước uống lấy từ nguồn nước lọc dân dụng.

## 2.3 Kích thích sự phát triển VDCĐ

Thí nghiệm được thực hiện trong bốn tuần. Ở tuần đầu, tiến hành cạo lông vùng da lưng (diện tích khoảng  $3\text{cm}^2$ ) của tất cả nhóm chuột và bôi  $100\mu\text{L}$  dung dịch DNCB 1% một lần mỗi ngày trong năm ngày để gây đáp ứng miễn dịch theo nghiên cứu trước đó (Jang và cs., 2020). Ở tuần thứ 2, chuột được nuôi trong điều kiện bình thường. Ở tuần 3-4, chuột được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm: nhóm chứng không bôi DNCB ( $n = 6$ ) mà chỉ bôi dung dịch acetone và dầu ô liu theo tỉ lệ 3:1, nhóm bôi 0,5% DNCB ( $n = 4$ ) và nhóm bôi DNCB 0,5% + Dexamethasone  $25\mu\text{M}$  ( $n = 4$ ) sử dụng như đối chứng có điều trị. Các nhóm chuột được bôi dung dịch một lần/ngày trong năm ngày và kéo dài liên tục trong 2 tuần.

## 2.4 Đánh giá mô học

Mẫu da lưng chuột được thu thập và cố định bằng dung dịch đệm Neutral Buffered Formalin 10% trong ít nhất 24 giờ, sau đó đúc khối parafin, cắt lát với độ dày  $5\mu\text{m}$  và nhuộm màu với Hematoxylin và Eosin để đánh giá độ dày các lớp da. Để đánh giá sự thâm nhiễm tế bào mast, mẫu da được nhuộm với toluidine blue 0,01%. Mẫu nhuộm sẽ được chụp ở độ phóng đại 10X để đánh giá cấu trúc và đếm số lượng tế bào. Thực hiện đo lường bằng phần mềm ImageJ với độ lặp lại ba lần.

## 2.5 Đo nồng độ IgE huyết thanh

Tại thời điểm kết thúc thí nghiệm, tiến hành thu máu chuột vào các ống tách huyết thanh, sau đó ly tâm ở tốc độ 5.000rpm trong 15 phút để thu nhận huyết thanh. Mẫu được bảo quản ở  $-80^\circ\text{C}$  cho đến khi đo lường. Nồng độ IgE huyết thanh được đo bằng bộ kit Mouse IgE Uncoated ELISA Kit (#88-50460-22, Thermo Fisher). Mật độ quang học được đọc ở bước sóng 450nm bằng máy đọc đĩa Varioskan LUX (Thermo Fisher).

## 2.6 Xử lý số liệu

Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn. Phân tích thống kê được thực hiện bằng phép thử ANOVA bằng phần mềm Graphpad Prism phiên bản thứ 8. Giá trị  $P < 0,05$  được coi là có ý nghĩa thống kê.

## 2.7 Đạo đức trong nghiên cứu

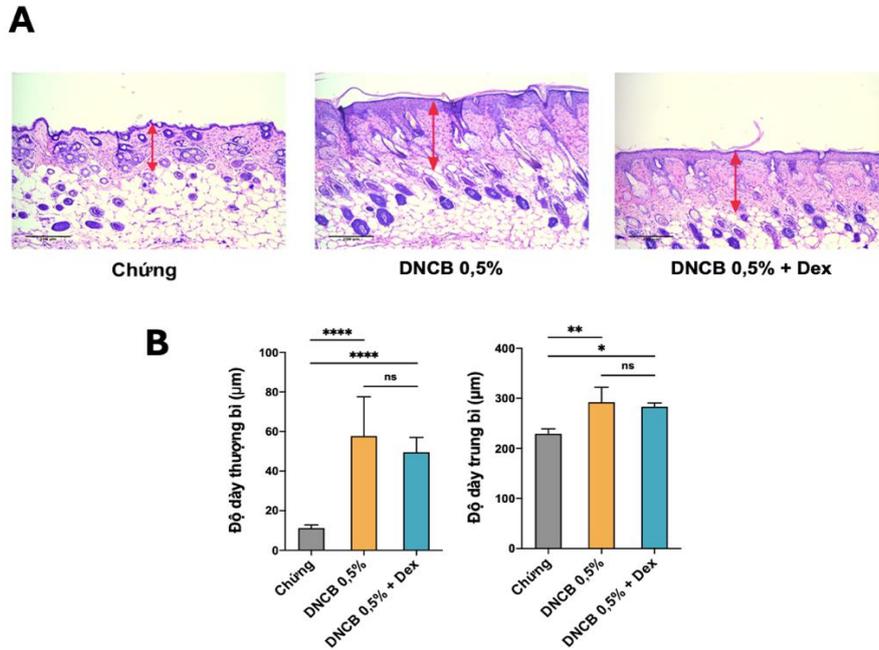
Nghiên cứu được phê duyệt bởi Hội đồng đạo đức của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh (303/GCN-HĐĐDNCTĐV).

# 3. Kết quả nghiên cứu

## 3.1 Tác động của DNCB đến mô da

Khi tiến hành nhuộm H&E, mẫu da chuột không bôi DNCB có cấu trúc bình thường với lớp biểu bì gồm 3-4 hàng tế bào, lớp trung bì chứa ít tế bào viêm. Giá trị trung bình độ dày thượng bì lần lượt là  $11,2\mu\text{m}$  ở nhóm chứng,  $57,7\mu\text{m}$  ở nhóm bôi DNCB 0,5% và  $49,6\mu\text{m}$  ở nhóm bôi DNCB 0,5% + Dex. Đối với lớp trung bì, độ dày trung bình là  $229,1\mu\text{m}$  ở nhóm chứng,  $292,2\mu\text{m}$  ở nhóm bôi DNCB 0,5% và  $283,2\mu\text{m}$  ở nhóm bôi DNCB 0,5% + Dex. Như vậy, ở nhóm bôi DNCB 0,5% có biểu hiện tăng sản làm dày lớp

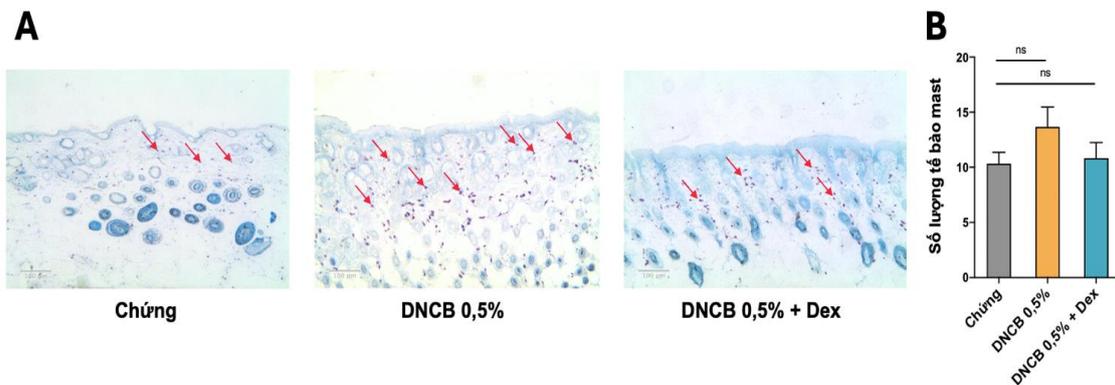
biểu bì và trung bì (hình 1A). Ở nhóm chuột bôi đồng thời DNCB 0,5% + Dex cũng ghi nhận tình trạng tăng sản với mức độ thấp hơn ở nhóm bôi DNCB 0,5% (hình 1A). So sánh giữa các nhóm, độ dày biểu bì và trung bì ở nhóm chuột bôi DNCB 0,5% cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không bôi (hình 1B).



**Hình 1.** Đặc điểm mô học vùng da lưng chuột ở các điều kiện thử nghiệm khác nhau. Thanh tỉ lệ: 100µm (ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ ).

### 3.2 DNCB làm tăng sự thâm nhiễm tế bào mast

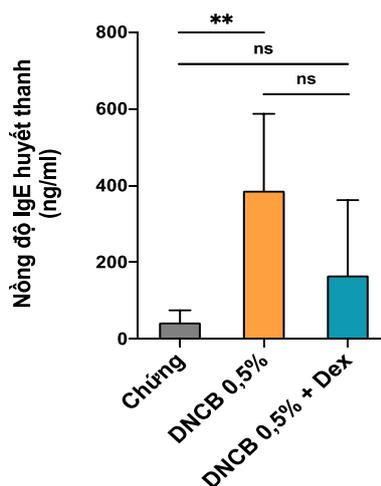
Tiến hành đánh giá sự thâm nhiễm tế bào mast bằng phương pháp nhuộm toluidine blue, sau đó đếm số lượng tế bào trên mỗi ảnh chụp, với số lượng ảnh chụp ngẫu nhiên là ba tấm cho từng mẫu mô. Kết quả cho thấy sự tăng số lượng tế bào mast ở lớp trung bì của nhóm chuột bôi DNCB 0,5% (hình 2A). Ở nhóm chuột bôi đồng thời DNCB 0,5% + Dex cũng ghi nhận tình trạng tăng số lượng tế bào mast tuy ít hơn ở nhóm bôi DNCB 0,5% (hình 2A). Tuy nhiên, không ghi nhận khác biệt có ý nghĩa thống kê về số lượng tế bào mast ở mô da giữa các nhóm chuột (hình 2B).



**Hình 2.** Mô da chuột nhuộm với Toluidine blue. Thanh tỉ lệ: 100µm (ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê).

### 3.3 Tăng nồng độ IgE huyết thanh dưới tác dụng của DNCB

Các rối loạn miễn dịch như tăng nồng độ IgE huyết thanh thường được quan sát thấy ở các trường hợp VDCĐ. Trong nghiên cứu này, sự tăng nồng độ IgE huyết thanh cũng được ghi nhận trên nhóm chuột có bôi DNCB 0,5% (hình 3). Nồng độ IgE trung bình ở các nhóm lần lượt là 43,1ng/mL ở nhóm chứng, 386,9ng/mL ở nhóm bôi DNCB 0,5% và 165,5ng/mL ở nhóm bôi đồng thời DNCB 0,5% + Dex. Như vậy, nhóm chuột bôi DNCB 0,5% có sự tăng nồng độ IgE gấp khoảng 9 lần so với nhóm chứng, trong khi nhóm chuột bôi đồng thời DNCB 0.5% + Dex có nồng độ IgE tăng khoảng 4 lần.



**Hình 3.** Nồng độ IgE huyết thanh chuột ở các điều kiện thử nghiệm khác nhau. (ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê, \*\* $P < 0,01$ ).

## 4. Bàn luận

Kết quả của nghiên cứu cho thấy dung dịch DNCB 0,5% có khả năng kích thích sự phát triển triệu chứng giống VDCĐ ở chủng chuột nhắt trắng Thụy Sĩ, với các thay đổi về cấu trúc mô da, thâm nhiễm tế bào miễn dịch và tăng nồng độ IgE huyết thanh.

Như đã đề cập trước đó, VDCĐ là bệnh lý phổ biến trong các bệnh viêm da tại Việt Nam. Theo một nghiên cứu thực hiện tại Bệnh viện Da liễu TP.HCM, tuy chi phí điều trị trong nước cho một bệnh nhân thấp hơn so với tại châu Âu hay Hàn Quốc, nhưng với số lượng lớn bệnh nhân mắc VDCĐ, đây vẫn và là gánh nặng đáng kể cho ngành y tế (Phạm và cs., 2019). Một số công trình về cải thiện hiệu quả điều trị hay phát triển các thuốc y dược học cổ truyền cho bệnh VDCĐ cũng đã được triển khai, như việc kết hợp sử dụng kháng sinh Cefuroxim, bào chế kem có chứa cao đặc long đờm, hay chế phẩm chiết xuất trà bà. Tuy nhiên, các nghiên cứu sâu hơn tìm hiểu về cơ chế phân tử, hay thiết lập các mô hình động vật cho thử nghiệm điều trị VDCĐ trong nước là hoàn toàn chưa có. Bên cạnh đó, chủng chuột BALB/c hay C57BL/6 trong các mô hình VDCĐ ở các nghiên cứu trước đó thường ít được sử dụng cho nghiên cứu tại Việt Nam do ít phổ biến và chi phí tốn kém. Vì vậy, việc thiết lập mô hình VDCĐ trên chủng chuột nhắt trắng Thụy Sĩ, là chủng chuột phổ biến tại Việt Nam, cũng là hướng nghiên cứu được cân nhắc.

Ở bệnh VDCĐ, tình trạng gãi và viêm mãn tính thường dẫn đến sự dày hóa biểu bì. Nhiều nghiên cứu trên mô hình động vật VDCĐ kích thích bằng cơ chế khác nhau như các chất gây dị ứng (oxazolone, DNCB, ovalbumin...), mô hình chuyển gen có sự

tăng/giảm biểu hiện của các gen mục tiêu (IL-4, IL-31, lymphopoietin mô đệm tuyến ức...), mô hình tiến triển VDCĐ (chủng Nc/Nga, DS-Ng) (Jin và cs., 2009). Do không đòi hỏi điều kiện nhân giống chặt chẽ và chăm sóc đặc biệt, mô hình kích thích VDCĐ thường được sử dụng trong nhiều các nghiên cứu khác nhau (Jang và cs., 2020). Trong đó, khi sử dụng các chất gây dị ứng ovalbumin hoặc mạt bụi trên một số chủng chuột như BALB/c hoặc C57BL/6 nhà điều ghi nhận tình trạng tăng sản biểu bì (Jin và cs., 2009). Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy trong nghiên cứu này trên chủng chuột nhắt trắng Thụy Sĩ.

Khi kích thích sự phát triển VDCĐ với DNCB, tăng số lượng tế bào mast thâm nhiễm vào mô da đã được quan sát thấy ở chủng chuột BALB/c và C57BL/6 (Kim, Kobayashi và Nagao, 2019). Kết quả của chúng tôi trên chủng chuột nhắt trắng Thụy sĩ cũng cho thấy xu hướng tương tự, gợi ý cơ chế hoạt hóa đáp ứng miễn dịch tương đồng bởi DNCB trên các chủng chuột có đặc điểm di truyền khác nhau.

Sự mất cân bằng các tế bào T hỗ trợ (Th) trong bệnh VDCĐ có thể dẫn đến tình trạng tăng biểu hiện các cytokine. Trong đó, nồng độ IgE trong máu tăng có thể được ghi nhận trên ~80% trường hợp bệnh nhân VDCĐ (Hill và cs., 2008). Hiện tượng này cũng được ghi nhận trên các nhóm chuột có bôi DNCB 0,5%.

## 5. Kết luận

Bôi chất gây dị ứng DNCB ở nồng độ 0,5% lên vùng da lưng chuột nhắt trắng Thụy Sĩ có thể kích thích sự phát triển các triệu chứng tương tự VDCĐ với các thay đổi về mô học da, thâm nhiễm tế bào miễn dịch và tăng nồng độ IgE huyết thanh. Tuy nhiên, cần có thêm các nghiên cứu khảo sát sự phát triển triệu chứng VDCĐ và đáp ứng miễn dịch ở những nồng độ DNCB khác nhau.

### *Lời cảm ơn*

*Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh theo hợp đồng số 64/2023/HĐ-ĐHYD, ngày 20 tháng 03 năm 2023.*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. C. Martel, P. Lovato, W. Bäumer, and T. Olivry (2017). Translational Animal Models of Atopic Dermatitis for Preclinical Studies. *Yale J Biol Med*, 90(3), 389-402.
- [2] D. J. Hill et al. (2008). Confirmation of the association between high levels of immunoglobulin E food sensitization and eczema in infancy: an international study. *Clin Exp Allergy*, 38(1), 161-168. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02861.x.
- [3] D. Kim, T. Kobayashi, and K. Nagao (2019). Research Techniques Made Simple: Mouse Models of Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*, 139(5), 984-990.e1. doi: 10.1016/j.jid.2019.02.014.
- [4] H. Jin, R. He, M. Oyoshi, and R. S. Geha (2009), Animal Models of Atopic Dermatitis', *Journal of Investigative Dermatology*, 129(1), 31-40. doi: 10.1038/jid.2008.106.
- [5] J. Cheng, J. J. Wu, and G. Han (2021). Epidemiology and Characterization of Atopic Dermatitis in East Asian Populations: A Systematic Review. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 11(3), 707-717. doi: 10.1007/s13555-021-00516-w.

- [6] L. D. Pham, T. Q. Vo, D. T. H. Tran, N. C. M. Ha, V. T. Nguyen, and N. X. Vo (2019). Economic burden of eczema in a middle-income country: A public hospital-based retrospective study in 2016-2017 in Vietnam. *J Pak Med Assoc*, 69.
- [7] L. Schneider et al. (2013). Atopic dermatitis: A practice parameter update 2012'. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(2), 295-299.e27. doi: 10.1016/j.jaci.2012.12.672.
- [8] R. Nowicki et al. (2015). Atopic dermatitis: current treatment guidelines. Statement of the experts of the Dermatological Section, Polish Society of Allergology, and the Allergology Section, Polish Society of Dermatology. *Postepy Dermatol Alergol*, 32(4), 239-249. doi: 10.5114/pdia.2015.53319.
- [9] S. Jang et al. (2020). Caffeoyl-Pro-His amide relieve DNCB-Induced Atopic Dermatitis-Like phenotypes in BALB/c mice. *Sci Rep*, 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-65502-2.
- [10] S. M. Langan et al. (2023). Trends in eczema prevalence in children and adolescents: A Global Asthma Network Phase I Study. *Clinical & Experimental Allergy*, 53(3), 337-352. doi: 10.1111/cea.14276.
- [11] Y. Guo et al. (2016). Prevalence of Atopic Dermatitis in Chinese Children aged 1–7 ys. *Sci Rep*, 6(1). doi: 10.1038/srep29751.