

黄芪甲苷通过抑制 Th2 型细胞因子减轻变应性接触性皮炎

魏筱^{1,2}, 洪敏^{1,2*}, 沈丹丹^{1,2}, 桂黎黎^{1,2}, 江小燕^{2,3}, 于曦^{1,2}, 刘海亮^{1,2}, 江国荣⁴

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023;

2. 国家规范化中药药理实验室, 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏南京 210029;

3. 中国药科大学中药学院, 南京 210009; 4. 苏州市中医医院, 江苏苏州 215003)

[摘要] 目的:应用异硫氰酸荧光素(FITC)诱导的 Th2 型小鼠变应性接触性皮炎的模型,评价黄芪甲苷(AS-IV)对 Th2 过敏性皮炎的作用。方法:BALB/c 小鼠在 day 1, day 2 用 1.5% 的 FITC 溶液致敏腹部皮肤 2 次,同时给予地塞米松 ip 剂量为 0.67 mg·kg⁻¹, AS-IV(6.25, 12.5, 25, 50 mg·kg⁻¹, ig)至 day 5(诱导相给药), day 6 用 0.5% FITC 溶液攻击小鼠耳部皮肤, 24 h 后测定小鼠耳肿胀程度,耳组织 HE 染色,同时部分耳组织制匀浆以 ELISA 方法检测白介素(IL)-4, IL-13, IL-9 水平。结果:与正常组比较,模型组小鼠耳肿胀明显,耳组织真皮层明显水肿,炎症细胞大量浸润,Th2 型细胞因子 IL-4, IL-13, IL-9 水平显著升高;黄芪甲苷 25, 50 mg·kg⁻¹ 诱导相给药能显著抑制模型的耳肿胀度;病理组织学检查亦显示与模型组比较,给予黄芪甲苷小鼠的耳炎症反应减轻,炎症细胞浸润明显减少;同时能显著降低耳组织匀浆中 IL-4, IL-13, IL-9 水平。结论:黄芪甲苷诱导相给药对 FITC 诱导的小鼠 Th2 型变应性接触性皮炎有显著的抑制作用,该作用与抑制 Th2 型细胞因子的产生有关。

[关键词] 黄芪甲苷; 变应性接触性皮炎; 白介素-4; 白介素-13; 白介素-9;

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0121-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100121

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000083.html>

[网络出版时间] 2014-03-07 10:52

Astragaloside IV Inhibits Allergic Contact Dermatitis through Reduction of Type 2 Cytokines Production

WEI Xiao^{1,2}, HONG Min^{1,2*}, SHEN Dan-dan^{1,2}, GUI Li-li^{1,2},
JIANG Xiao-yan^{2,3}, YU Xi^{1,2}, LIU Hai-liang^{1,2}, JIANG Guo-rong⁴

[收稿日期] 20131222(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073121,81373549);江苏高校优势学科建设工程(YSXK-2010);“青蓝工程”项目;国家教育部留学回国人员科研启动基金

[第一作者] 魏筱, 硕士, 从事免疫药理学研究, E-mail: wx8754@126.com

[通讯作者] * 洪敏, 教授, 硕士生导师, 从事免疫药理学研究, Tel: 025-86798184, E-mail: hongmin72@hotmail.com

[6] 陈孟平, 乔为平, 赵云华, 等. 黔产棘茎梅木抗炎作用及部分机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 156.

[7] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 742.

[8] Wang J X, Tang W, Zhou R, et al. The new water-soluble artemisinin derivative SM905 ameliorates collagen-induced arthritis by suppression of inflammatory and Th17 responses[J]. B J Pharmacol, 2008, 153(6): 303.

[9] 周茹, 杨以阜, 左建平. II 型胶原诱导的小鼠关节炎

动物模型的建立及影响因素[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(12): 1532.

[10] Estelle Bettelli, Thomas Korn, Mohamed Oukka, et al. Induction and effector functions of TH17 cells [J]. Nature, 2008, 453(19): 1051.

[11] Ferretti S, Bonneau O, Dubois G R, et al. A IL17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia; IL-15 as a possible trigger [J]. J Immunol, 2003, 170: 2106.

[责任编辑 聂淑琴]

- (1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. National Standard Laboratory of Pharmacology for Chinese Materia Medica, Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Laboratory for High Technology of Traditional Chinese Medicine (TCM) Formulate Research, Nanjing 210029, China;
3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
4. Suzhou Hospital of TCM, Suzhou 215003, China)

[Abstract] **Objective:** Mice Type2 allergic contact dermatitis induced by fluoresceiniso thiocyanate (FITC) was utilized in this study to explore the effect of astragaloside IV (AS-IV) on allergic inflammatory. **Method:** The BALB/c mice were topically sensitized on the shaved abdomens with 1.5% FITC solution at day 1 and day 2 and elicited on the right ear with 0.5% FITC at day 6. Mice in the dexamethasone group were intraperitoneal injection with dexamethasone ($0.67 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and the AS-IV group were intragastrically administered with astragaloside IV (6.25, 12.5, 25, 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) from day 1 to day 5 (induction phase). Auricle swelling was measured 24 h after the elicitation. Pathohistological examination was carried out by HE staining. Interleukin-4 (IL-4), IL-13 and IL-9 levels of ear tissue homogenates were detected by ELISA. **Result:** Compared with the normal group, ear swelling in model group was stimulated by FITC treatment significantly and ear tissue local edema, angiectasis and lymphocytic infiltration were observed simultaneously. Meanwhile, IL-4, IL-13 and IL-9 levels increased remarkably in FITC treated mice. Wherein, AS-IV $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ evidently inhibited the auricle inflammation of the FITC treated mice. Pathohistological results indicated that AS-IV alleviated local edema and angiectasis of mice models and reduced lymphocytic infiltration significantly. Furthermore, IL-4, IL-13 and IL-9 levels in ear tissue homogenates were markedly decreased by AS-IV treatment. **Conclusion:** Administration with AS-IV in induction phase could inhibit Th2 cell-mediated allergic contact dermatitis in mice significantly and this effect was related with regulation on type 2 cytokines.

[Key words] astragaloside IV; allergic contact dermatitis; interleukin-4; interleukin-13; interleukin-9

本实验室前期研究发现玉屏风散提取物对变应性接触性皮炎(ACD)^[1]及哮喘^[2]等Th2型过敏性炎症模型有显著的抑制作用,黄芪为玉屏风散中的君药并有很明显的免疫调节作用^[3],而黄芪的重要单体成分黄芪甲苷^[4-5]对Th2型过敏性炎症是否有抑制作用,其是否是玉屏风散该种作用的有效成分之一尚无实验证实。FITC诱导的ACD与DNCB模型对比,以Th2反应为主,表现为白介素(IL)-4, IL-13, IL-9等Th2类细胞因子明显升高^[6-8]。本研究以BALB/c小鼠为研究对象,以小鼠Th2型变应性接触性皮炎作为过敏性皮炎的代表性模型,观察黄芪甲苷的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂 黄芪甲苷(AS-IV,纯度>98%,批号QZ-0811102,南京泽朗医药科技有限公司),地塞米松(批号10092011,天津药业焦作有限公司),异硫氰酸荧光素(FITC,美国Sigma公司),丙酮和邻苯二甲酸二丁酯(上海九亿化学试剂有限公司),Mouse IL-4 ELISA Kit, Mouse IL-13

ELISA Kit, Mouse IL-9 ELISA Kit(均为美国eBioscience公司)。

1.2 仪器 电子天平(瑞典Mettler Toledo公司), Z-323台式离心机(德国TM公司),全波长酶标仪SPECTRA MAX 190(美国AD公司),测厚规(哈尔滨量具刃具集团有限责任公司)。

1.3 动物 BALB/c小鼠,雄性,体重18~22g,上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号SCXK(沪)2007-2005。

2 方法

2.1 Th2型变应性接触性皮炎模型的建立 小鼠于第0天腹部脱毛 $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$,第1天(d1)和d2于腹部无毛部位涂1.5% FITC溶液(溶剂为丙酮-邻苯二甲酸丁二酯1:1)80 μL , d6用0.5% FITC溶液20 μL 涂于小鼠右耳,左耳涂相同体积的溶剂。24 h后,测定小鼠两耳厚度,计算耳肿胀度及质量差值(右耳厚度-左耳厚度,右耳质量-左耳质量)。

2.2 分组及给药 小鼠随机分成7组,每组8只,分别为空白对照组、模型组、地塞米松组(Dex)、

AS-IV(6.25,12.5,25,50 mg·kg⁻¹组)。地塞米松 ip 剂量为 0.67 mg·kg⁻¹,AS-IV 组 ig 给药,空白对照组和模型组 ig 给予等体积生理盐水,各组小鼠从致敏 d 1 开始给药,每天 1 次,共 5 次(d 1~5),于激发前 24 h 停止给药(诱导相给药)。

2.3 小鼠耳病理组织学检查 激发后 24 h 取小鼠耳廓固定后,从耳根至耳尖切开,取半只耳廓,垂直于切面石蜡包埋,常规切片,HE 染色,光镜下在耳廓全长的中点左右各取同倍率视野拍照,图像分析系统定标后测量淋巴细胞个数并统计。

2.4 耳组织匀浆的制备 用 8 mm 直径的打孔器敲取小鼠耳片,用预冷的 PBS 研磨得 2% 的耳匀浆,4 000 r·min⁻¹,4 °C 离心 15 min,取耳匀浆上清液,-20 °C 保存。

2.5 细胞因子 IL-4,IL-13,IL-9 的测定 将取得的耳匀浆上清液按照 ELISA 测定试剂盒的操作步骤进行各项细胞因子测定。

2.6 统计学处理 数据采用 SPSS 12.0 软件进行分析,检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据采用方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 Student-t 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 诱导相给药对鼠耳肿胀度的影响 AS-IV 从致敏 d 1 开始给药,每天 1 次,共 5 次(d 1~5),观察其对 FITC 诱导的 Th2 型变应性接触性皮炎耳肿胀的影响。结果可见,模型组小鼠耳肿胀明显,厚度及质量均显著增加,AS-IV 各个剂量组均能显著降低小鼠耳组织厚度差,AS-IV 25,50 mg·kg⁻¹ 组能显著降低小鼠耳组织质量差(表 1)。

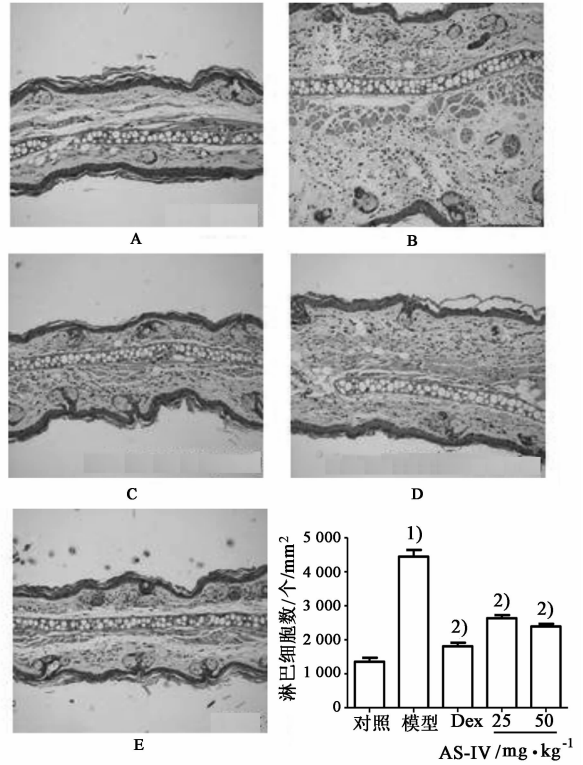
表 1 AS-IV 诱导相给药对小鼠耳肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	耳厚度差/ μm	耳质量差/mg
对照	-	-2.9 ± 9.5	0.0 ± 0.4
模型	-	107.1 ± 21.4 ¹⁾	8.6 ± 2.4 ¹⁾
地塞米松	0.67	45.0 ± 19.3 ²⁾	5.0 ± 1.7 ²⁾
黄芪甲苷	6.25	62.5 ± 10.4 ²⁾	7.3 ± 2.7
	12.5	70.0 ± 18.5 ²⁾	7.4 ± 1.6
	25	55.0 ± 12.0 ²⁾	4.1 ± 2.1 ²⁾
	50	75.0 ± 12.0 ²⁾	6.1 ± 1.7 ³⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对耳组织病理学改变的影响 激发后 24 h 取小鼠耳廓固定后,从耳根至耳尖切开,取半只耳廓,垂直于切面石蜡包埋,常规切片,HE 染色,光镜下观察。结果可见空白对照组小鼠耳组织结构清晰,未见炎性细胞浸润,无充血、水肿等病理改

变,而模型组耳组织较空白对照组明显增厚,且有大量的炎症细胞浸润,耳组织真皮层组织明显水肿。AS-IV 25,50 mg·kg⁻¹ 组能够减轻耳病理组织学改变,主要表现在耳肿胀减轻,炎细胞浸润显著减少(图 1)。



A. 对照组; B. 模型组; C. AS-IV 25 mg·kg⁻¹; D. 50 mg·kg⁻¹; E. 0.67 mg·kg⁻¹; 与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$

图 1 AS-IV 对小鼠耳组织病理学及淋巴细胞计数的影响(HE, ×200)

3.3 对耳组织匀浆中 IL-4 的影响 与空白对照组比较,模型组的 IL-4 水平显著升高,AS-IV 25,50 mg·kg⁻¹ 组能显著降低模型小鼠耳组织匀浆中 IL-4 的水平(表 2)。

表 2 AS-IV 诱导相给药对小鼠耳匀浆

IL-4,IL-13,IL-9 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$) ng·L⁻¹

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	IL-4	IL-13	IL-9
对照	-	15.0 ± 3.4	35.2 ± 2.2	564.9 ± 186.3
模型	-	41.0 ± 8.2 ¹⁾	39.3 ± 2.4 ¹⁾	926.9 ± 94.3 ²⁾
地塞米松	0.67	26.1 ± 10.8 ³⁾	33.7 ± 1.4 ⁴⁾	747.3 ± 64.9 ⁴⁾
黄芪甲苷	6.25	33.1 ± 7.5	38.6 ± 2.0	796.1 ± 137.9
	12.5	34.7 ± 7.6	37.5 ± 3.1	765.9 ± 128.3 ³⁾
	25	26.6 ± 8.8 ⁴⁾	36.8 ± 1.3 ³⁾	759.2 ± 105.7 ⁴⁾
	50	27.3 ± 6.7 ⁴⁾	37.8 ± 1.9	808.7 ± 104.3 ³⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 对耳组织匀浆中 IL-13 的影响 与空白对照组比较,模型组的 IL-13 水平显著升高,AS-IV 25 mg·kg⁻¹组能显著降低模型小鼠耳组织匀浆中 IL-13 的水平(表 2)。

3.5 对耳组织匀浆中 IL-9 的影响 与空白对照组比较,模型组的 IL-9 水平显著升高,黄芪甲苷 12.5, 25, 50 mg·kg⁻¹组均能显著降低模型小鼠耳组织匀浆中 IL-9 的水平(表 2)。

4 讨论

FITC 诱导的小鼠 Th2 型变应性接触性皮炎模型,表现为 Th2 型细胞因子如 IL-4 占优势的 ACD^[6-7],是过敏性炎症的代表性模型,因此我们利用该模型来研究 AS-IV 对 Th2 型过敏性炎症的影响。

本课题组在对玉屏风散的研究中,发现玉屏风散提取物对 Th2 型变应性接触性皮炎及哮喘有显著的抑制作用,黄芪为玉屏风散中的君药,AS-IV 是黄芪中的重要单体成分且被报道有强心、清除氧自由基、减少炎症物质产生、抗衰老、降糖等活性^[9],但其对 Th2 型 ACD 影响及其是否是玉屏风散抑制 ACD 的有效成分尚无实验证实。

应用 FITC 诱导的 ACD 模型研究 AS-IV 的作用。FITC 诱导的 ACD 以 Th2 反应为主,表现为 IL-4, IL-13, IL-9 等 Th2 类细胞因子明显升高^[6-8]。本研究结果表明在 FITC 诱导的 ACD 小鼠,AS-IV 诱导相给药有显著的抑制 Th2 型 ACD 的作用,表现为显著抑制小鼠耳肿胀度和炎细胞的浸润,提示该成分是玉屏风散抗过敏性炎症作用的效应成分之一。

IL-4, IL-13 是反映 Th2 型炎症反应的主要细胞因子,由 Th2 型细胞产生,主要介导体液免疫应答,辅助抗体生成,在过敏反应中起主导作用^[10]。IL-9 主要由 Th2, Th9, Th17 细胞产生,在哮喘病人肺组织中高表达^[11]并促使 Th2 型免疫应答^[12]。本研究中发现黄芪甲苷能够抑制 Th2 型细胞因子 IL-4, IL-13, IL-9 的分泌,从而达到抑制 Th2 型炎症的作

用,提示其抑制过敏性炎症的作用与其对 Th2 型细胞因子的抑制有关,其进一步的机制值得继续研究。

[参考文献]

- [1] 邵建华,洪敏,牛艳,等. 玉屏风散抑制小鼠 Th2 型变应性接触性皮炎[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):173.
- [2] 王慧珠,洪敏,桂黎黎,等. 玉屏风散抗 OVA 致小鼠过敏性哮喘的作用研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(7):1052.
- [3] 房宇,刘尧. 黄芪的免疫调节作用研究进展[J]. 亚太传统医药,2012,8(7):208.
- [4] 王金山. 黄芪中有效成分环黄芪醇皂苷和黄芪甲苷的含量测定[J]. 海峡药学,2009,02.
- [5] 黄小平,刘晓丹,邓常清. 黄芪和三七主要有效成分配伍对氧化损伤所致的 PC12 细胞凋亡及其活性氧、线粒体膜电位的影响[J]. 中西医结合学报,2012,10(10):1127.
- [6] 郭丽芳,范卫新,汤爱民. 两种变应原致小鼠变应性接触性皮炎的研究[J]. 中华皮肤科杂志,2005,38(4):229.
- [7] Ryan P Larson, Simone C Zimmerli. Dibutyl phthalate (DBP) induced thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is required for Th2 contact hypersensitivity responses[J]. J Immunol,2010,184(6):2974.
- [8] 董正邦,张美华. 特异性皮炎小鼠模型研究进展[J]. 国际皮肤性病学期刊,2006,32(1):32.
- [9] 孙豪栋,庞晓斌,李继扬. 黄芪甲苷生物活性研究进展[J]. 中国药房,2011,22(7):657.
- [10] Liu Y J. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation [J]. J Exp Med, 2006, 203(2):269.
- [11] Christoph Wilhelm, Keiji Hirota, Benjamin Stieglitz, et al. Interleukin 9 fate reporter reveals induction of innate IL-9 response in lung inflammation[J]. Nat Immunol, 2012,12(11):1071.
- [12] Ritobrata Goswami, Mark H, Kaplan I. A brief history of IL-9[J]. J Immunol,2011,186(6):3283.

[责任编辑 聂淑琴]