

防风醇提物对肥大细胞 PAR-2 及相关细胞因子的影响

吴贤波¹, 金沈锐², 李世明¹, 金贤国¹, 李泰峰¹, 王明谊², 朱海燕^{1*}

(1. 延边中医医院, 延吉市中医医院, 吉林 延吉 133000;

2. 成都中医药大学基础医学院, 成都 611137)

[摘要] **目的:**观察防风醇提物对肥大细胞过氧化物酶体增殖因子活化受体-2(PAR-2)及相关细胞因子的影响,探索防风抗过敏的新机制。**方法:**用胰蛋白酶刺激 P815 细胞的方法建立肥大细胞脱颗粒模型,设空白组,模型组,防风高、低剂量组(0.02, 0.01 g·mL⁻¹),药物作用 6 h 后,采用 ELISA 检测细胞上清液中组胺,白细胞介素-4(IL-4), IL-13 水平, Western blot, RT-PCR 检测 PAR-2 蛋白及其 mRNA 的表达。**结果:**与空白组比较,模型组组胺, IL-4, IL-13 含量及 PAR-2 蛋白及 mRNA 的表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,防风醇提物在体外抑制肥大细胞组胺, IL-4, IL-13 含量及 PAR-2 蛋白及 mRNA 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**防风醇提物可能通过抑制 PAR-2 表达,阻断肥大细胞脱颗粒,且选择性减少相关细胞因子分泌,继而抑制肥大细胞“瀑布效应”,达到抗过敏作用。

[关键词] 防风; 蛋白酶激活受体 2; 白细胞介素-4; 白细胞介素-13

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0123-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050123

Effect of Saposhnikoviae Radix Extract on PAR-2 Expression and Related Cytokine Secretion of Mast Cells

WU Xian-bo¹, JIN Shen-ru², LI Shi-ming¹, JIN Xian-guo¹, LI Tai-feng¹, WANG Ming-yi², ZHU Hai-yan^{1*}

(1. Yanbian Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Yanji Hospital of TCM, Yanji 133000, China;

2. Basic Medical College, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Saposhnikoviae Radix on protease-activated receptors-2 (PAR-2) expression and the related cytokine secretion of mast cells, and explore new anti-allergic mechanism of Saposhnikoviae Radix. **Method:** Mast cell degranulation models were established by stimulating P815 cells with trypsin *in vitro*. Blank group, model group, Saposhnikoviae Radix high dose group and low dose group (0.02, 0.01 g·mL⁻¹) were set up. After 6 h of treatment, ELISA assay was used to detect histamine, interleukin-4 (IL-4) and IL-13 levels in cell supernatant. Western blot and RT-PCR were used to detect PAR-2 protein and mRNA expression of P815 cells. **Result:** Compared with the blank group, histamine, IL-4, IL-13 levels and PAR-2 protein and mRNA expression were significantly increased in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, Saposhnikoviae Radix *in vitro* significantly inhibited the histamine, IL-4, IL-13 levels and PAR-2 protein and mRNA expression in mast cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** By reducing the expression of PAR-2, Saposhnikoviae Radix extract can inhibit mast cell degranulation, selectively decrease the secretion of related cytokines and then suppress the “waterfall effect” of mast cells, eventually resulting in anti-allergic effect.

[Key words] Saposhnikoviae Radix; protease-activated receptors-2; interleukin-4; interleukin-13

[收稿日期] 20150113(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102677)

[第一作者] 吴贤波, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事过敏性疾病中医药防治研究, Tel: 0433-8336005 E-mail: cduetcmwu@163.com

[通讯作者] * 朱海燕, 博士, 主治医师, 从事方剂配伍规律研究, Tel: 0433-8336005, E-mail: zhu Haiyan19791@126.com

过敏性疾病的发病率逐年上升,对该类疾病发病机制的研究不断深入。最近研究发现肥大细胞脱颗粒信号自身放大机制引起国内外研究者的关注^[1-2]。研究认为人体内肥大细胞被过敏原激活后,释放出肥大细胞特异性类胰蛋白酶和组胺,被释放出的类胰蛋白酶再通过特异性受体过氧化物酶体增殖因子活化受体-2(PAR-2)激活相邻的肥大细胞;而组胺则通过它的 H₁ 和 H₂ 受体激活相邻的肥大细胞,从而产生肥大细胞脱颗粒的“瀑布效应”。研究表明,防风显著抑制组胺所致豚鼠离体气管、回肠平滑肌收缩;对组胺所致的药物性哮喘及卵白蛋白所致的过敏性休克也有保护作用,提示防风具有良好的抗过敏作用^[3,4]。课题组前期研究表明,防风醇提物高(0.02 g·mL⁻¹),中(0.01 g·mL⁻¹)质量浓度可抑制肥大细胞脱颗粒模型 PAR 蛋白表达,低质量浓度(0.005 g·mL⁻¹)无抑制作用,提示防风可能通过抑制肥大细胞 PAR 起到抗过敏作用。本研究拟进一步深入探讨防风抗过敏机制,为防风治疗过敏性疾病提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠肥大细胞株 P815,购于中国典型培养物保藏中心 CCTCC,武汉大学。用 ATCC 完全培养液(DMEM 内含 4 mmol·L⁻¹ L-谷氨酰胺,1.5 g·L⁻¹碳酸氢钠,4.5 g·L⁻¹葡萄糖,10%胎牛血清)培养。

1.2 药物及试剂 防风药材购于成都杏林大药房,经成都中医药大学中药鉴定教研室卢先明教授鉴定,为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* 的干燥根。DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基(赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司,批号 NXE0631),胰蛋白酶(Trypsin,美国 Sigma 公司,批号 27043C),PD98059 (PAR-2,美国 Sigma 公司,批号 117K1050),TRIzol Reagent(美国 Invitrogen 公司,批号 14105),RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 00128829);小鼠组胺,白细胞介素-4(IL-4)和白细胞介素-13(IL-13)ELISA 试剂盒(均购自美国 R&D 公司,批号分别为 13021913,13021911,13021912)。

1.3 仪器 HFsafe-1200 型安全柜(力康公司),Thermo Hybaid PX2 型梯度 PCR 扩增仪(美国 Thermo Hybaid 公司),POWER PAC1000 型电泳仪及电泳槽和 Gel. Doc2000 型凝胶成像仪(均购自美国 Bio-Rad 公司),MK3 型 Thermo 多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 取防风 50 g 用 300 mL 75% 乙醇提取,各 2 次。将浸膏用 DMEM 培养基稀释为生药 1 g·mL⁻¹,0.22 μm 滤器过滤除菌,-20 ℃ 避光保存,临用前用 DMEM 培养液稀释至实验所需的终浓度

2.2 细胞模型建立及细胞处理 采用胰蛋白酶刺激(终质量浓度 1 mg·L⁻¹)方法建立肥大细胞脱颗粒模型,取对数生长期的 P815 细胞计数,用 DMEM 培养基稀释成 1 × 10⁶ 个/mL 密度的单细胞悬液,接种到 6 孔板上,置 37 ℃,5% CO₂,饱和湿度的细胞培养箱中,培养 48 h,待细胞至 80% 融合度,设空白组、细胞模型组、防风高、低剂量组。空白组加入等体积 DMEM 培养液;细胞模型组用等体积 DMEM 培养液代替受试药物,防风高、低剂量组加入不同质量浓度的药物(每个质量浓度设 5 复孔)。置 37 ℃,5% CO₂,饱和湿度的细胞培养箱中,在药物作用 6 h 后,加入胰蛋白酶(终质量浓度 1 mg·L⁻¹)刺激(空白组加等量的 DMEM 培养基),分别收集刺激 1 h 后的细胞检测 PAR-2 表达,收集细胞上清液,检测组胺,IL-4,IL-13 的分泌情况。

2.3 RT-PCR 检测 PAR-2 mRNA 表达 Trizol 法提取各组 1 × 10⁶ 个细胞总 RNA,取合格 RNA 样品 1 μg 按试剂盒说明进行逆转录。引物序列设计见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列	片段长度 /bp
PAR-2	上游 5'-CACCTGGCAAGAAGGCTAAG-3'	298
	下游 5'-ACGCAGAGGAGGTAAGCAAA-3'	
β-actin	上游 5'-GCTACAGCTTACCACCACAG-3'	288
	下游 5'-GGTCTTTACGGATGTCAACGTC-3'	

PCR 反应体系如下:取 cDNA 3 μL,2 × Taq Master Mix 12.5 μL,上下游引物各 1 μL,灭菌蒸馏水 7.5 μL,经 94 ℃ 变性 2 min 后,94 ℃ 变性 20 s,53 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s(30 个循环),循环终止 72 ℃ 10 min 终止反应,取 PCR 产物 8 μL,用 2% 琼脂糖凝胶进行 DNA 电泳,在凝胶电泳分析仪上进行灰度分析。电泳条带的平均积分吸光度 IA,可反映 PAR-2 mRNA 表达的强度表示。

2.4 Western blot 检测 PAR-2 蛋白检测 取 P815 细胞提取总蛋白,BCA 法测定样品蛋白浓度,取每

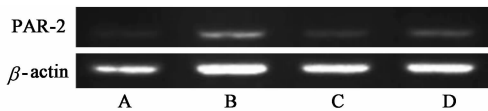
孔按蛋白量 100 μg , 进行 10% SDS-PAGE 电泳, 将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 TBST Buffer 稀释的 5% BSA 液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。加入一抗(稀释比例: PAR-2 为 1:1 000; β -actin 为 1:5 000)中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。加入二抗(稀释比例为 1:5 000)中, 摇振 2 h, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。采用 Western 印迹荧光发光检测试剂盒发光、显影、定影、晾干、拍照并进行图像分析。用凝胶图像处理系统进行蛋白条带的灰度测定, 结果以蛋白相对表达量表示, 以目的蛋白条带的吸光度与内参 β -actin 的吸光度之比作为蛋白相对表达量。

2.5 检测组胺, IL-4 和 IL-13 分泌量 用 ELISA 方法检测上述实验收集的细胞上清液中组胺, IL-4 和 IL-13 水平, 按照试剂盒说明进行操作。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 进行统计学处理, 所有资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对胰蛋白酶刺激后 P815 细胞 PAR-2 mRNA 表达的影响 细胞模型组与空白组比较 PAR-2 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$), 而防风高、低剂量组可抑制 P815 细胞 PAR-2 mRNA 表达, 且呈现浓度依赖性, 防风高剂量组与细胞模型组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 防风 0.02 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组; D. 防风 0.01 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 防风对 P815 细胞 PAR-2 mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effects of Saposhnikoviae Radix on PAR-2 mRNA in P815 cells

表 1 防风对 P815 细胞 PAR-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of Saposhnikoviae Radix on PAR-2 mRNA in P815 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	PAR-2 mRNA(<i>I</i> A)
空白	-	86.24 \pm 8.51 ²⁾
模型	-	115.75 \pm 9.74
防风	0.01	105.50 \pm 8.27
	0.02	92.50 \pm 8.66 ¹⁾

注: 与细胞模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 对胰蛋白酶刺激后 P815 细胞 PAR-2 蛋白表达的影响 细胞模型组与空白组比较 PAR-2 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), 而防风高、低剂量组明显

抑制 P815 细胞 PAR-2 蛋白表达, 呈现浓度依赖性, 与细胞模型组比较有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 2, 表 2。

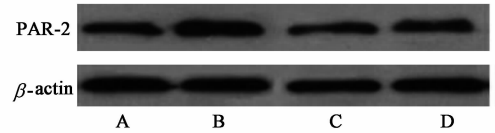


图 2 防风对胰蛋白酶刺激后 P815 细胞 PAR-2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of Saposhnikoviae Radix on PAR-2 protein in P815 cells

表 2 防风对胰蛋白酶刺激后 P815 细胞 PAR-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effects of Saposhnikoviae Radix on PAR-2 protein in P815 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	PAR-2/ β -actin
空白	-	3.98 \pm 0.76 ¹⁾
模型	-	5.93 \pm 0.68
防风	0.01	3.03 \pm 0.36 ¹⁾
	0.02	2.68 \pm 0.24 ²⁾

3.3 对胰蛋白酶刺激后 P815 细胞组胺的影响 细胞模型组与空白组比较组胺分泌明显升高 ($P < 0.01$), 而防风高、低剂量组明显抑制 P815 细胞组胺分泌, 防风低剂量组与细胞模型组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 防风对胰蛋白酶刺激后 P815 细胞分泌组胺水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effects of Saposhnikoviae Radix on histamine levels in P815 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	组胺/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	2.43 \pm 0.62 ²⁾
模型	-	7.30 \pm 0.90
防风	0.01	5.03 \pm 1.10 ¹⁾
	0.02	5.68 \pm 1.12

3.4 对胰蛋白酶刺激后 P815 细胞 Th2 类细胞因子的影响 细胞模型组与空白组比较 Th2 类细胞因子 IL-4, IL-13 分泌明显升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而防风高、低剂量组均无抑制 P815 细胞分泌 IL-4, IL-13 的作用, 与模型组比较无统计学意义。见表 4。

4 讨论

中医虽无过敏性疾病病名, 但根据记载我国是最早认识过敏性疾病的国家。中医过敏性疾病是内因和外因内外合邪所致, 内因责之于指先天禀赋、或肺脾肾三脏虚弱; 外因责之于风、寒、湿、热等外邪侵

表 4 防风对胰蛋白酶刺激后 P815 细胞分泌 IL-4, IL-13 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effects of *Saposhnikovia Radix* on IL-4, IL-13 in P815 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度 /g·mL ⁻¹	IL-4/ng·L ⁻¹	IL-13/ng·L ⁻¹
空白	-	129.28 ± 22.57 ¹⁾	69.90 ± 19.04 ²⁾
模型	-	277.35 ± 17.29	107.15 ± 21.86
防风	0.01	246.10 ± 35.47	117.05 ± 16.42
	0.02	241.95 ± 37.04	99.17 ± 15.74

袭有关。过敏性疾病的发病快、骤发骤止、易反复发作的特点和过敏原接触即发的症状,与风邪“散行而数变”等特点相似,因此诸多医家治疗过敏性疾病中,“祛风”放在首要位置^[5]。防风为伞形科多年生草本植物防风 *Saposhnikovia divaricata* 的未抽花茎植株的干燥根,始载于《神农本草经》,列为上品,入膀胱、肝、脾经,是祛风之圣药,又是风药中的润剂,其味辛甘而微温,辛散而不温燥,甘润而不滋腻,因此常用于治疗哮喘、过敏性鼻炎、荨麻疹等疾病,其祛风止痉、止痒之功效^[6-8]。研究结果显示,防风醇提物在 mRNA 和蛋白质水平均抑制肥大细胞 PAR-2 表达;还可抑制组胺分泌。提示防风可能通过抑制 PAR-2 表达,阻断肥大细胞脱颗粒,减少组胺分泌,从而抑制肥大细胞“瀑布效应”,起到抗过敏作用。

过敏反应中肥大细胞和嗜碱性粒细胞可分泌 IL-4, IL-13, 肿瘤坏死因子 (TNF), 集落刺激因子 (CSF) 等细胞因子^[9-10], 既可以参与炎症反应, 亦能募集中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞等多种炎症因子至局部, 在 I 型超敏反应的迟发相反应中起重要作用。实验结果表明, 防风对肥大细胞分泌 IL-4 和 IL-13 无抑制作用。实验中防风可通过抑制

PAR-2 表达, 阻断肥大细胞脱颗粒, 减少组胺分泌, 但对 IL-4 和 IL-13 无抑制作用, 推测防风对肥大细胞脱颗粒中细胞因子分泌的影响具有选择性, 具体机制有待于进一步研究。

综上所述, 防风可能通过抑制 PAR-2 表达, 阻断肥大细胞脱颗粒, 且选择性减少相关细胞因子分泌, 继而抑制肥大细胞“瀑布效应”达到抗过敏作用。

[参考文献]

[1] 隋丽, 陈冬, 张慧云, 等. IL-29 对胰蛋白酶诱导的肥大细胞 PARs 表达的调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(5):609-610,622.

[2] 张慧云, 钱久荣, 沈道明, 等. 肥大细胞在哮喘气道损伤及重塑中的作用机制[J]. 海南医学, 2014, 25(3):376-379.

[3] 窦红霞, 高玉兰. 防风的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(2):15-17.

[4] 李杨, 董银卯, 孟宏, 等. 7 种中草药提取物抗过敏功效及刺激性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4):191-194.

[5] 杨世英. 中医病因风邪与过敏原的相关性研究[D]. 杭州:浙江中医药大学, 2010.

[6] 周明萍. 防风治疗咳嗽变异性哮喘的体会[J]. 黑龙江中医药, 2011, 40(3):34-36.

[7] 张玉珊. 浅谈蔡友敬老中医对防风的运用体会[J]. 中外医学研究, 2012, 10(4):62-63.

[8] 李文, 李丽, 是元艳, 等. 防风有效部位的药理作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(6):29-31.

[9] 金纪伟, 姜玉新, 刘文艳, 等. IL-4R、IL-13、ADAM33 基因多态性与中国皖南地区汉族人群支气管哮喘的相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 17(2):135-139.

[10] 李沫民. 支气管哮喘患儿治疗前后血清 GM-CSF、TNF-α、IL-6 水平的变化[J]. 医药论坛杂志, 20(8):83-84.

[责任编辑 周冰冰]