

· 药理 ·

芒柄花素抑制小鼠 Th2 型变应性接触性皮炎的机制分析

王燕¹, 陶羽^{1,2}, 王晓钰¹, 包凯帆¹, 王璨¹, 季律^{1,2}, 于曦¹, 刘海亮¹, 江国荣², 洪敏^{1*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210023;

2. 苏州市中医医院, 江苏苏州 215003)

[摘要] 目的:研究芒柄花素对过敏性炎症的影响及初步作用机制。方法:采用异硫氰酸荧光素(FITC)诱导 Th2 型变应性接触性皮炎(allergic contact dermatitis, ACD)模型的方法, BALB/c 小鼠 35 只, 随机分为 5 组, 分别为正常组, 模型组和芒柄花素 0.5, 5, 10 mg·kg⁻¹ 组, 每组 7 只, 在第 1 天, 第 2 天用 1.5% FITC 溶液进行腹部致敏, 每天 1 次, 第 6 天用 0.6% FITC 溶液对小鼠右耳进行攻击。各组小鼠从致敏前 2 d 开始给予芒柄花素至第 3 天, 每天 1 次, 共 5 次(致敏初期预防给药), 造模第 6 天攻击, 攻击 24 h 后观察小鼠耳肿胀度及苏木素-伊红(HE)染色观察耳组织病理组织学变化, 酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测耳组织匀浆中白细胞介素-4(IL-4), IL-5, IL-9 的水平。结果:与正常组比较, 模型组小鼠耳肿胀度显著增加, 并有大量的淋巴细胞浸润($P < 0.01$), 耳组织真皮层组织明显水肿, 耳组织中 IL-4, IL-5, IL-9 水平显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 致敏初期预防给予芒柄花素能明显减轻耳肿胀度, 减少淋巴细胞浸润($P < 0.05$, $P < 0.01$), 减轻耳病理组织学改变, 且不同程度地抑制耳组织中 2 型细胞因子 IL-5, IL-9 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:发现了芒柄花素具有抑制过敏性炎症的新活性, 其作用环节在致敏初期, 且机制可能与抑制 2 型细胞因子的分泌有关。

[关键词] 芒柄花素; 过敏性炎症; 变应性接触性皮炎; 耳肿胀

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0088-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016100088

Formononetin Inhibits Th2 Type Allergic Contact Dermatitis in Mice

WANG Yan¹, TAO Yu^{1,2}, WANG Xiao-yu¹, BAO Kai-fan¹, WANG Can¹,

JI Lv^{1,2}, YU Xi¹, LIU Hai-liang¹, JIANG Guo-rong², HONG Min^{1*}

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210023, China;

2. Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou 215003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and preliminary mechanism of formononetin on allergic inflammation. **Method:** Th2 Type allergic contact dermatitis (ACD) models were induced by fluorescein isothiocyanate (FITC). 35 BALB/c mice were randomly divided into normal group, model group, formononetin 0.5, 5, 10 mg·kg⁻¹ groups ($n = 7$). The mice were sensitized with 1.5% FITC solution on day 1 and day 2 on the shaved abdomen skin, once a day. On day 6, the mice were challenged on their right ears with 0.6% FITC solution. Formononetin was given to the mice from 2 days before sensitization to day 3 after sensitization, once a day for a total of 5 times (prophylactical administration in initial sensitization period); on day 6 of modeling, the mice were challenged on their right ears, and after 24 hours, ear swelling was observed and pathological changes

[收稿日期] 20150909(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473395, 81373549, 81073121); 江苏省自然科学基金项目(BK20141466); 江苏高校优势学科建设工程项目; 江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室项目(JKLPRD201405)

[第一作者] 王燕, 在读硕士, 从事中药免疫调节机制研究, Tel: 18795980843, E-mail: 1402997329@qq.com

[通讯作者] * 洪敏, 博士, 教授, 从事中药免疫调节机制研究, Tel: 025-85810248, E-mail: hongmin72@126.com

of the ears were investigated by hematoxylin and eosin (HE) staining. The levels of interleukin-4 (IL-4), IL-5 and IL-9 in homogenate of ear tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** As compared with the normal group, the ear swelling was significantly increased in mice of model group, with massive infiltration of lymphocytes ($P < 0.01$); dermis tissues of the ears had obvious edema; IL-4, IL-5 and IL-9 levels in the ear tissues were significantly increased ($P < 0.01$). As compared with the model group, prophylactical treatment with formononetin in initial sensitization period could significantly relieve the ear swelling and reduce lymphocytes infiltration ($P < 0.05$, $P < 0.01$), reduce the histopathological changes of ears, and inhibited type 2 cytokines IL-5 and IL-9 levels in the ear tissues to different degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Formononetin evidently inhibited allergic inflammation at the initial stage of sensitization, and its mechanism might be associated with inhibiting the secretion of type 2 cytokines.

[**Key words**] formononetin; allergic inflammation; allergic contact dermatitis; ear swelling

中医药在过敏性疾病的治疗中有显著的优势,尤其是在控制疾病反复发作、改善过敏体质方面。玉屏风散是广泛用于过敏性疾病的益气固表代表方,由黄芪、防风、白术组成,临床研究发现缓解期应用可减少过敏性疾病的复发^[1]。但其中的效应物质基础及作用机制不明确。

本课题组前期研究发现,玉屏风散可以抑制小鼠过敏性皮炎^[2]及过敏性呼吸道炎症^[3],进一步的研究发现,玉屏风散含药血清中芒柄花素的含量较高^[4]。芒柄花素又名刺芒柄花素,是黄酮类植物激素的一种,是黄芪中重要的成分之一^[5-6]。以往文献报道芒柄花素具有调节体内血脂代谢^[7],降低脑缺血再灌注损伤中的血脑屏障通透性等作用^[8],未见其其对过敏性炎症的效应报道。那么芒柄花素是否是复方中抗过敏的效应成分之一,这一成分是否具有干预过敏性炎症的作用,本研究将采用 FITC 诱导小鼠变应性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 模型,作为 Th2 型过敏性炎症的模型,观察芒柄花素对过敏性炎症的影响及初步机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 BALB/c 小鼠 35 只,体重 18 ~ 22 g, SPF 级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2012-0001,饲养于南京中医药大学动物实验中心,饲养环境温度保持 22 ~ 25 °C,相对湿度 50% ~ 65%,实验动物自由进食和饮水。

1.2 药物及试剂 芒柄花素 (formononetin, 天津马克生物技术有限公司,批号 PCM-AA-009-20120405,纯度 98.0%), 异硫氰酸荧光素 (FITC, 美国 Sigma 公司,批号 100125), 丙酮 (上海久亿化学试剂有限公司,批号 20090701), 邻苯二甲酸二丁酯 (上海久亿化学试剂有限公司,批号 20091102); 小鼠白细胞

介素-4 (IL-4), IL-5, IL-9 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (美国 eBioscience 公司,批号分别为 E09338-1631, E09352-1633, 16520-105); 总蛋白定量试剂盒 (南京建成生物工程研究所,批号 20131212)。

1.3 仪器 BSA224S-CW 型电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司), Synergy 2 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司), GS-15R 型低温离心机 (美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 Th2 型变应性接触性皮炎模型的建立^[9]、分组及给药 将 BALB/c 小鼠按体重随机分层平均分 5 组,每组 7 只,分别为正常组,模型组和芒柄花素 0.5, 5, 10 mg · kg⁻¹ 组。小鼠于第 0 天腹部剔毛 2 cm × 2 cm,第 1 天和第 2 天于腹部涂 1.5% FITC 溶液 80 μL [溶剂为丙酮-邻苯二甲酸二丁酯 (1:1)] 致敏。将芒柄花素组 *ig* 给药,正常组及模型组 *ig* 给予等体积生理盐水。各组小鼠于致敏前 2 d 即开始给药,于 2 次致敏结束后停止给药,共连续给药 5 d,每天 1 次。此为致敏初期预防给药。第 6 天用 0.6% FITC 溶液 20 μL 涂于小鼠右耳攻击,左耳涂等体积溶剂。24 h 后,用 8 mm 直径的打孔器敲取小鼠耳片,称取耳片质量,计算耳肿胀度和耳肿胀抑制率。并进行病理组织学检查以及耳组织匀浆的制备。

耳肿胀度 = (右耳质量 - 左耳质量) × 1 000

耳肿胀抑制率 = (模型组耳质量差 - 给药组耳质量差) / 模型组耳质量差 × 100%

2.2 小鼠耳病理组织学检查 攻击后 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,苏木素-伊红 (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。

2.3 耳组织匀浆的制备及细胞因子的检测 用 8 mm 直径的打孔器敲取小鼠耳片, 称重后用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 研磨得 2.5% 的耳组织匀浆, 4 000 r·min⁻¹ 下 4 ℃ 离心 15 min, 取上清液, 采用 ELISA 法检测耳组织匀浆中的 IL-4, IL-5, IL-9 水平, 并通过样本总蛋白含量进行校正, 结果以 ng·g⁻¹ 总蛋白表示。

2.4 统计学分析 采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 ANOVA 和 Dunnett 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 芒柄花素致敏初期预防给药对 ACD 模型耳肿胀度的影响 造模后, 模型组小鼠与正常组比较, 耳肿胀度显著增加 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 芒柄花素 5, 10 mg·kg⁻¹ 剂量组仅在致敏初期预防给药对小鼠耳肿胀度有明显的抑制作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 肿胀抑制率分别为 38.6% 和 42.5%。见表 1。

表 1 芒柄花素致敏初期预防给药对小鼠耳肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 1 Effect of formononetin administered at initial stage of sensitization on ear swelling in ACD mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	耳肿胀度/mg	耳肿抑制率/%
正常	-	0.39 ± 0.82	-
模型	-	9.56 ± 2.15 ¹⁾	-
芒柄花素	0.5	8.34 ± 2.98	12.8
	5	5.87 ± 2.35 ²⁾	38.6
	10	5.50 ± 2.31 ³⁾	42.5

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

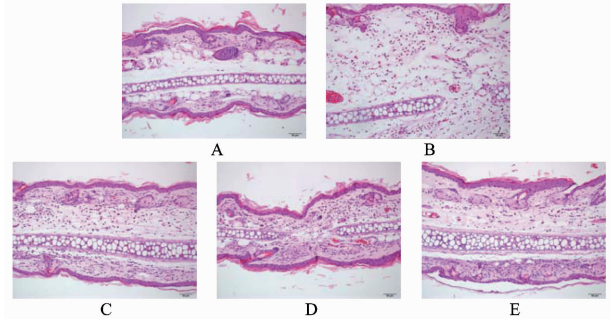
3.2 芒柄花素致敏初期预防给药对 ACD 模型耳组织病理学改变的影响 正常组小鼠耳组织结构清晰, 未见炎性细胞浸润, 无充血, 水肿等病理改变, 而模型组与正常组相比明显增厚, 并有大量的淋巴细胞浸润, 耳组织真皮层组织明显水肿。与模型组比

表 3 芒柄花素致敏初期预防给药对 IL-4, IL-5, IL-9 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 3 Effect of formononetin administered at initial stage of sensitization on level of IL-9 in ACD mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-4	IL-5	IL-9
正常	-	36.89 ± 4.55	40.52 ± 4.34	1 214.25 ± 117.90
模型	-	69.50 ± 27.60 ¹⁾	58.17 ± 9.46 ¹⁾	1 483.75 ± 206.92 ¹⁾
芒柄花素	0.5	58.86 ± 17.88	43.01 ± 11.98 ²⁾	1 227.74 ± 231.54 ²⁾
	5	55.63 ± 12.54	39.77 ± 9.39 ³⁾	1 228.17 ± 226.33 ³⁾
	10	55.41 ± 9.77	38.06 ± 3.15 ³⁾	1 119.75 ± 114.97 ³⁾

较, 芒柄花素 5, 10 mg·kg⁻¹ 组明显减轻耳病理组织学改变的影响, 主要表现在耳肿胀减轻, 淋巴细胞浸润显著减少 ($P < 0.01$)。见图 1, 表 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 芒柄花素 0.5 mg·kg⁻¹ 组; D. 芒柄花素 5 mg·kg⁻¹ 组; E. 芒柄花素 10 mg·kg⁻¹ 组

图 1 芒柄花素致敏初期预防给药对小鼠耳组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effects of formononetin administered at initial stage of sensitization on histopathological changes in ACD mice (HE, ×200)

表 2 芒柄花素致敏初期预防给药对小鼠耳组织浸润淋巴细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 2 Effects of formononetin administered at initial stage of sensitization number of lymphocytes in ACD ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	淋巴细胞数/个·mm ⁻²
正常	-	625.00 ± 75.00
模型	-	2 258.33 ± 302.42 ¹⁾
芒柄花素	0.5	1 908.33 ± 76.38
	5	916.67 ± 39.19 ³⁾
	10	1 000.00 ± 188.74 ³⁾

3.3 芒柄花素致敏初期预防给药对 ACD 模型耳组织 IL-4, IL-5, IL-9 的影响 与正常组相比较, 模型组小鼠耳组织中 IL-4, IL-5, IL-9 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 仅在致敏初期预防给药后发现, 芒柄花素 0.5, 5, 10 mg·kg⁻¹ 3 个剂量能显著降低 ACD 模型耳组织中 IL-5, IL-9 水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 抑制 IL-5, IL-9 的产生。芒柄花素 0.5, 5, 10 mg·kg⁻¹ 对 ACD 模型耳组织中 IL-4 水平有一定下降趋势, 但未见统计学差异。见表 3。

4 讨论

临床上玉屏风散对过敏性疾病可减少复发、改善过敏体质等方面的治疗优势引起笔者的思考,其作用发挥的关键物质基础和机制是什么,课题组前期研究发现芒柄花素是玉屏风散中重要的入血成分之一^[4],而在芒柄花素的文献报道中未发现其抗过敏性疾病的药理活性。笔者推测芒柄花素可能是玉屏风散抑制过敏性炎症效应物质之一。因此本研究建立 Th2 型 ACD 小鼠模型,仅在致敏初期预防给予芒柄花素,观察给药后对 Th2 型 ACD 小鼠的影响。结果表明,模型组小鼠与正常组比较,耳肿胀度显著增加,给予芒柄花素(5, 10 mg·kg⁻¹)后,能显著性的减轻耳肿胀及炎细胞浸润,该结果发现了芒柄花素具有抑制 Th2 型过敏性炎症的新活性,并且特别值得注意的是,这种作用的起效环节在致敏初期,不同于非特异性的抗炎作用。提示玉屏风散在致敏初期的效应及临床抗过敏性疾病复发的作用有芒柄花素这一成分的贡献。

过敏性疾病是以 2 型免疫反应为主导的炎症,以 2 型细胞因子如 IL-4, IL-5, IL-9 等的产生为主要特征。IL-4 是调节 IgE 合成的重要调节因子,能促进 T, B 细胞增殖以及黏附分子表达^[10]。IL-9 可引起气道嗜酸性粒细胞增多,血总 IgE 升高和气道高反应^[11]。IL-5 可诱导嗜酸性粒细胞从骨髓嗜酸性粒细胞释放^[12]。同时这些细胞因子之间存在相互作用,如 IL-9 可协同 IL-4 诱导 B 细胞产生 IgE 抗体^[10], IL-9 可上调骨髓祖细胞上 IL-5 受体 α 链的表达,继而促进嗜酸性粒细胞的分化^[13]。可见这些细胞因子是促进过敏性炎症产生的重要因素。本研究所用的 FITC 诱导的 Th2 型 ACD 模型,主要表现为 Th2 型细胞因子占优势的 ACD^[9],因此可作为过敏性炎症的代表模型应用。本研究发现该模型小鼠与空白组相比,耳组织中 IL-4, IL-5, IL-9 水平显著升高,给予芒柄花素后 IL-5, IL-9 的表达水平明显下降,这提示芒柄花素可能通过抑制 2 型细胞因子分泌从而发挥抑制过敏性炎症的作用。

综上,本研究首次报道了芒柄花素具有抑制过敏性炎症的新活性,提示芒柄花素是玉屏风散抗过敏的物质基础之一,其作用环节在致敏初期,且机制可能与抑制 2 型细胞因子的分泌有关。而芒柄花素

在致敏初期作用的机制及对致敏初期关键的病理环节是笔者将进一步探索的问题。

[参考文献]

- [1] 康立媛. 加味玉屏风散治疗儿童哮喘缓解期 25 例[J]. 中医儿科杂志, 2012, 8(3): 23-25.
- [2] 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): 172-175.
- [3] 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): 1052-1055.
- [4] 沈丹丹, 刘海亮, 洪敏, 等. 从血清成分分析探寻玉屏风散的抗过敏效应物质[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 145-149.
- [5] 田圣志, 杨玉涛, 张振凌, 等. HPLC 测定黄芪蜜炙前后毛蕊苷黄酮和芒柄花素的含量[J]. 中成药, 2010, 32(8): 1365-1368.
- [6] 王思路, 龚苏晓, 张铁军, 等. HPLC 法测定黄芪不同炮制品中芒柄花素[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 550-552.
- [7] 赵培, 杨媛, 徐扬, 等. 刺芒柄花素调节血脂代谢及改善动脉粥样硬化病变的实验研究[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(10): 925-929.
- [8] 唐传其, 顾明华, 洪文, 等. 芒柄花素保护前脑缺血再灌注损伤中的血脑屏障并抑制神经炎症[J]. 暨南大学学报, 2015, 36(1): 34-39.
- [9] Larson R P, Zimmerli S C, Comeau M R, et al. Dibutyl phthalate (DBP) induced thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is required for Th2 contact hypersensitivity responses[J]. J Immunol, 2010, 184(6): 2974-2984.
- [10] 刘颖慧, 成炜, 蒋捍东. 变应性鼻炎和哮喘患者血清 IL-9、IL-4、IL-5 变化及临床意义[J]. 山东医药, 2009, 49(5): 10-12.
- [11] 李华斌, 韩德民. IL-9 与呼吸道炎症[J]. 国外医学: 耳鼻喉科学分册, 2003, 27(2): 76-77.
- [12] Takatsu K, Kouro T, Nagai Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response[J]. Adv Immunol, 2009, 101: 191-236.
- [13] Louahed J, Zhou Y, Maloy W L, et al. Interleukin 9 promotes influx and local maturation of eosinophils[J]. Blood, 2001, 97(4): 1035-1042.

[责任编辑 周冰冰]