

## 基于自噬途径探讨当归饮子缓解CU模型小鼠 过敏反应的效应机制

徐风, 李代乾, 张美恒, 张晓桐, 魏芹, 郭静\*, 曾进浩\*  
(成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

**[摘要]** 目的:探讨当归饮子对慢性荨麻疹(CU)小鼠模型过敏反应的影响及自噬干预机制。方法:选用SPF级BALB/c小鼠,腹腔注射卵白蛋白与氢氧化铝悬液复制CU小鼠模型,设立分组并灌胃给药:空白组(生理盐水 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),模型组(生理盐水 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),开瑞坦组( $0.0013\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),当归饮子高、中、低剂量组( $39.3, 19.6, 9.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )。苏木素-伊红(HE)染色观察CU小鼠皮肤组织病理学改变;透射电镜观察皮肤组织细胞的自噬形态学;免疫组化(IHC)检测皮肤组织微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)和p62蛋白的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测皮肤组织LC3B, p62 mRNA转录水平。结果:当归饮子可显著改善CU小鼠皮肤真皮水肿、胶原束分离、毛细血管扩张等病理表现;并促进自噬小体形成,改善胞核染色质浓聚、线粒体肿胀、内质网扩张等异常细胞超微结构;与空白组比较,模型组CU小鼠皮肤组织中LC3B蛋白表达显著增加( $P<0.01$ ),LC3B mRNA水平有升高趋势,p62 mRNA水平及蛋白表达均显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,当归饮子各剂量组小鼠皮肤组织LC3B mRNA水平及蛋白表达明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),小鼠皮肤组织的p62 mRNA水平及蛋白表达明显下降( $P<0.05, P<0.01$ ),以高剂量组疗效最佳。结论:当归饮子可调节LC3B, p62 mRNA及蛋白表达,增强细胞自噬水平,进而改善CU小鼠皮肤病理状态。

**[关键词]** 慢性荨麻疹;自噬;当归饮子;微管相关蛋白1轻链3B(LC3B);泛素结合蛋白p62(p62)

**[中图分类号]** R2-0;R289;R392.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)12-0056-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201136

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200304.1247.004.html>

**[网络出版日期]** 2020-3-4 14:30

### Effect of Danggui Yinzi on Relieving Allergic Reaction in CU Model Mice by Autophagy Pathway

XU Feng, LI Dai-qian, ZHANG Mei-heng, ZHANG Xiao-tong, WEI Qin, GUO Jing\*, ZENG Jin-hao\*  
(Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Danggui Yinzi on allergic reaction in chronic urticaria (CU) mice model and the mechanism of autophagy intervention. **Method:** The SPF BALB/c mice were used to replicate the CU mice model by intraperitoneal injection of ovalbumin and aluminum hydroxide suspension. The animals were randomly allocated into six groups: a normal group (normal saline  $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), a model group (normal saline  $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), a loratadine group ( $0.0013\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), a Danggui Yinzi high, medium and low-dose group ( $39.3, 19.6, 9.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ). The pathological changes of skin tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Morphological changes of autophagy in skin tissues epithelial cells were observed by transmission electron microscope. The mRNA levels of microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) and ubiquitin-binding protein p62 mRNA in skin tissues were detected by real-time

**[收稿日期]** 20191119(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81573986,81873310);四川省科学技术厅科技计划应用基础研究项目(2018JY0660)

**[第一作者]** 徐风, 硕士, 医师, 从事皮肤病的临床及实验研究, E-mail: 553671184@qq.com

**[通信作者]** \*郭静, 博士, 教授, 从事皮肤病的临床及实验研究, E-mail: 80620404@qq.com;

\*曾进浩, 博士, 讲师, 从事中医药防治脾胃病及皮肤病的实验研究, E-mail: zengjinhao0018@126.com

quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The expressions of LC3B and p62 in skin tissues were detected by immunohistochemistry (IHC). **Result:** Danggui Yinzi can significantly improve the pathological manifestations of dermal edema, collagen bundles separation, telangiectasia in CU mice, it can also improve autophagosomes formation and abnormal cell ultrastructure such as nuclear chromatin condensation, mitochondrial swelling, endoplasmic reticulum expansion, etc. Compared with the normal group, the protein expressions of LC3B in skin tissues of the model group was significantly increased ( $P < 0.01$ ), LC3B mRNA level was increased too, while p62 mRNA levels and its protein expressions were decreased-regulated ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, levels of LC3B mRNA and protein expressions of the Danggui Yinzi groups were significantly increased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), while p62 mRNA levels and its protein expressions were significantly decreased-regulated ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** Danggui Yinzi can regulate the expression of LC3B, p62 mRNA and protein expressions, enhance the level of autophagy, and improve the pathological state of CU mice.

**[Key words]** chronic urticaria; autophagy; Danggui Yinzi; microtubule-associated protein 1 light chain 3B(LC3B); ubiquitin-binding protein p62(p62)

慢性荨麻疹(CU)是一种临床常见的慢性皮肤病,是皮肤黏膜由于暂时性血管通透性增加而发生的局限性水肿<sup>[1]</sup>。临床表现为皮肤瘙痒、风团、血管性水肿,常骤起骤消<sup>[2]</sup>。西医治疗常易反复<sup>[3]</sup>,中医治疗具有不易复发、不良反应低等优势。

自噬即“自我消化”,是细胞将老旧受损的细胞器以及聚集成团的蛋白质递送至溶酶体以进行降解的细胞内分解代谢过程。自噬在正常的生理过程中起着“管家”的作用,可清除细胞内有害物质,调节生长和衰老,在细胞稳态中起重要作用<sup>[4-5]</sup>。自噬还在免疫系统中发挥着特定的作用,其可作为抗原呈递过程中抗原肽的来源,是细胞内病原体吞噬和降解的机制,也是控制因过敏引起的炎症反应的关键<sup>[6-7]</sup>。微管相关蛋白1轻链3(LC3)蛋白的功能是促进自噬小体体积扩大,膜不断延长,识别并包裹自噬底物,因此是自噬的起始标志物。LC3蛋白分为3个亚型:LC3A, LC3B, LC3C,功能高度类似。其中微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)是目前公认实现自噬小体膜伸长的最主要的一种<sup>[8]</sup>,因此最具有代表性。泛素结合蛋白p62(p62)同样是自噬的重要生物学标志,其功能主要是标记并招募泛素化蛋白(通常是有毒或错误折叠的蛋白)作为自噬底物。p62可与LC3直接结合,使底物不断浓缩、聚集,一起转运到自噬小体囊泡中,最终通过与溶酶体的结合,形成自噬溶酶体而被降解<sup>[9]</sup>。现已证实自噬异常与多种皮肤病如系统性红斑狼疮、银屑病、白癜风、单纯疱疹等疾病的发病机制息息相关<sup>[10-12]</sup>。中药治疗瘙痒性皮肤病疗效可靠<sup>[13-15]</sup>,但目前鲜有报道中药通过调控自噬治疗皮肤病的相

关研究,干预CU的研究更是空缺。当归饮子养血润燥,祛风止痒,作为治疗CU的古代名方已有悠久的历史。临床观察表明,当归饮子治疗CU疗效显著<sup>[16-17]</sup>,笔者团队相关动物实验也证实了这一点<sup>[18]</sup>。本实验旨在前期研究的基础上,观察当归饮子对CU小鼠模型过敏反应及组织病理学的干预作用,及对皮肤组织细胞自噬形态学和自噬相关LC3B, p62的影响,探讨当归饮子调控自噬途径缓解CU模型小鼠过敏反应的效应机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级BALB/c小鼠,雌雄各半共60只,鼠龄6周,体质量(20±2)g,成都达硕实验动物有限公司提供,动物合格证号SCXK(川)2015-030,养于四川大学华西医院科技园SPF实验动物中心。动物实验经四川大学华西医院实验动物伦理委员会批准,审批号2019240A。

**1.2 药品与试剂** 当归饮子水煎剂组成:当归15g,川芎15g,白芍10g,生地黄15g,制首乌9g,黄芪15g,防风18g,地肤子12g,白蒺藜9g,僵蚕9g,蝉蜕9g,鸡血藤15g,中药饮片购于成都中医药大学附属医院,由成都中医药大学中药教研室鉴定为正品。上述药物加水浸泡40min后煎煮2次,每次以大火煎至水开后改为小火继续煎煮30min,纱布过滤,合并药液,浓缩至含生药质量浓度1g·mL<sup>-1</sup>,制得当归饮子水煎液,无菌条件装瓶,4℃冰箱保存备用,限用时间7d,使用时以生理盐水稀释至相应浓度;开瑞坦片(上海先灵葆雅公司,国药准字H10970410,规格10mg×12片);氢氧化铝(Al(OH)<sub>3</sub>,上海源叶生物科技有限公司,批号S30353);卵白蛋白(合肥博美生物科技有限责任公司,批号AL7514-

25 g); 0.9%NaCl注射液(辰欣药业股份有限公司, 批号1707240725); LC3B抗体, SQSTM1/p62抗体(美国Abcam公司, 货号分别为ab48394, ab56416); 抗兔二抗, 抗鼠二抗(北京中杉金桥公司, 货号分别为SP-9001, SP-9002); 动物组织总RNA提取试剂盒, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)Easy™试剂盒(成都福际生物技术有限公司, 货号分别为RE-03014, QP-01014); TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒, PrimeScript RT试剂盒(宝日医生物技术有限公司, 货号分别为RR820A, RR047A); 醋酸双氧铀, 柠檬酸铅染液(北京中镜科仪技术有限公司, 货号分别为GS02624, GZ02616)。

**1.3 仪器** PIKORed 96型 Real-time PCR仪, TCA0096型热循环仪(美国ThermoFisher仪器有限公司); BA400Digital型数码三目摄像显微镜(厦门麦克奥迪实业集团有限公司); C2500型低温离心机(湖南湘仪实验仪器厂); JEM-1400PLUS型透射电子显微镜(日本电子株式会社); EMUC7型超薄切片机(德国徕卡公司); Image-Pro Plus 6.0型图像分析软件(美国Media Cybernetics公司)。

## 2 方法

**2.1 模型制备与分组干预** 60只小鼠随机分为空白组、模型组、开瑞坦组、当归饮子高、中、低剂量组, 每组10只。分组当日将空白组小鼠腹腔注射生理盐水, 0.2 mL/只, 于第10日重复1次, 共注射2次; 其余5组小鼠参考文献制备CU小鼠模型<sup>[19-20]</sup>; 分组当日进行初次致敏, 予腹腔注射卵白蛋白悬液0.1 mL(含卵白蛋白10 μg)与氢氧化铝悬液0.1 mL(含氢氧化铝100 μL), 液体容积共计0.2 mL, 第10日重复上述致敏步骤, 共计致敏2次。并按照全身致敏性评价标准, 以“正常”为过敏反应阴性, 记0分; 出现“躁动、竖毛、颤抖、搔抓”症状为过敏反应弱阳性, 记1分; 出现“喷嚏、咳嗽、呼吸急促、排尿、排粪、流泪”症状为过敏反应阳性, 记2分; 出现“呼吸困难、哮鸣音、紫癜、步态不稳、跳跃、喘息、痉挛、旋转、潮式呼吸”症状为过敏反应强阳性, 记3分; 以“死亡”为过敏反应极强阳性, 记4分, 进行小鼠过敏反应强度评分。与此同时, 分组当日开始灌胃, 开瑞坦组按0.001 3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃治疗; 依据人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值<sup>[21]</sup>, 将当归饮子水煎剂折算后, 当归饮子高、中、低剂量组分别按39.3, 19.6, 9.8 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃; 正常组与模型组小鼠给予灌胃生理盐水20 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 连续灌胃治疗

21 d<sup>[22]</sup>。灌胃期间观察并记录小鼠精神状态、皮毛、饮食、大小便情况、体质量变化、过敏反应和死亡情况, 第22日将小鼠腹腔注射2%水合氯醛(20 μL·g<sup>-1</sup>)麻醉, 取背部皮肤组织后处死小鼠。

**2.2 透射电镜检测上皮细胞超微结构及自噬情况** 取小鼠皮肤组织, 经3%戊二醛预固定, 1%四氧化锇再固定。丙酮梯度脱水后经脱水剂和环氧树脂(型号为Epon812)渗透, 包埋液包埋形成固体基块。采用超薄切片机制备约50 nm厚的超薄切片后, 漂浮于刀槽液面上, 捞至铜网。醋酸铀和枸橼酸铅双染色, 室温下染色15~20 min, 置于透射电镜下观察细胞超微结构及自噬情况。

**2.3 免疫组化检测LC3B, p62的蛋白表达** 将石蜡包埋的皮肤组织切片, 脱蜡至水, 柠檬酸修复液微波修复, 3%双氧水灭活过氧化物酶, 4℃孵育一抗LC3B(1:200), SQSTM1/p62(1:1000)过夜, 37℃孵育二抗30 min, DAB显色, 常规脱水、透片、封片。结果判断: 细胞质中见弥漫分布的浅黄色或棕黄色颗粒定义为LC3B, p62染色阳性。200倍光镜下随机选取3个视野, 运用Image pro plus 6.0图像处理软件进行分析, 选取积分吸光度IA进行阳性表达评分。

**2.4 Real-time PCR检测LC3B, p62 mRNA的表达水平** 常规提取皮肤总RNA, 根据试剂盒步骤逆转录合成第一链(first-strand) cDNA。从美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中搜索基因全序列, 使用Primer Premier引物设计软件设计筛选各基因特异性引物。所有引物均交由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成, 并以变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化。设计的引物序列如表1所示。其后, 将反应混合物放入PCR仪扩增, 步骤: 95℃, 30 s预变性; 95℃, 5 s变性; 55℃, 30 s退火; 72℃, 30 s充分延伸, 采集荧光(45个循环)。记录样本扩增反应的C<sub>t</sub>值, 运用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算mRNA相对表达量。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 GAAGATCAAGATCATTGCTCC	111
	下游 TACTCTGCTTGCTGATCCA	
LC3	上游 TGACTCGGCTGCGGACTGAGACACA	199
	下游 CTTGCGGCAGGAGAACCTACTGGGAT	
p62	上游 TCCAGCACAGGCACAGAAGACAAGAG	191
	下游 CAGTCATCGTCTCTCTCTGAGCAGTT	

2.5 统计学方法 采用SPSS 23.0统计软件对实验数据进行分析,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐时,组间均值两两比较采用Student Newman Keuls法(SNK)检验;方差不齐时,改用Dunnett T3检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 对CU小鼠过敏反应评分的影响 灌胃过程中,各组小鼠精神状态、饮食及大小便正常,皮毛光亮,动作灵敏,体质量正常增长,均无死亡情况。除空白组仅有1例出现短暂的躁动表现外,其他各组小鼠经腹腔注射卵白蛋白与氢氧化铝悬液致敏后,均出现不同程度的搔抓、躁动、排粪排尿等行为。以模型组小鼠表现最为明显,频繁搔抓、排粪排尿,二次致敏30 min内出现短暂的步态不稳。与空白组比较,模型组小鼠过敏反应评分显著上升( $P < 0.01$ ),与模型组比较,开瑞坦组和当归饮子干预各组过敏反应评分显著下降( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表2。

表2 当归饮子对CU小鼠过敏反应评分的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

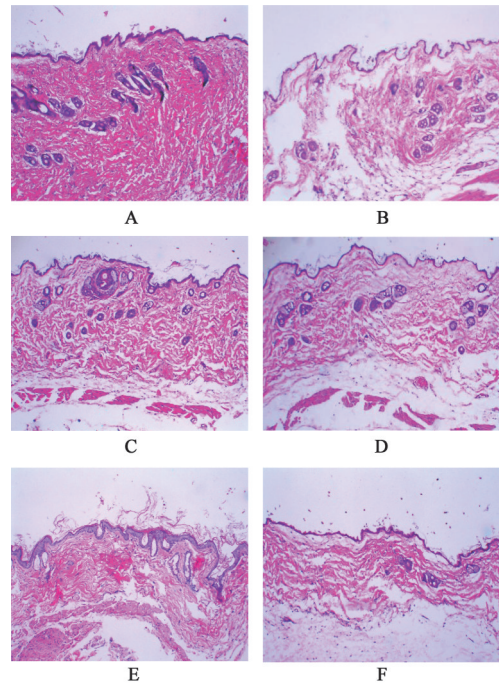
Table 2 Effect of Danggui Yinzi on allergic reaction score in CU mice( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	评分/分
空白	-	0.100±0.316
模型	-	2.600±0.516 <sup>2)</sup>
开瑞坦	0.001 3	1.100±0.316 <sup>4)</sup>
当归饮子	39.3	1.300±0.483 <sup>4)</sup>
	19.6	1.500±0.707 <sup>3)</sup>
	9.8	1.600±0.699 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ 。

3.2 对CU小鼠表皮组织病理学变化的影响 HE染色结果显示,空白组小鼠可见皮肤组织表皮结构完整:表皮厚薄均匀,表皮层基底细胞结构完整,排列规则;真皮层胶原纤维排列整齐,粗细一致,胶原纤维染色均匀,胶原间间隙紧密;未见明显毛细血管扩张及炎性细胞浸润。与空白组比较,模型组小鼠皮肤组织明显变薄,表皮基底细胞排列混乱,细胞破碎;真皮颗粒层胶原排列紊乱,粗细不均,纤维断裂,水肿明显,纤维间间隙增宽,透光度强,纤维染色浅;部分小鼠皮肤组织可见明显的毛细血管扩张及炎细胞浸润。与模型组比较,经开瑞坦和当归饮子干预后各组小鼠皮肤组织可见真皮层胶原纤维排列稍有不齐,粗细不完全均匀,无纤维断裂,水

肿程度均较模型组轻;胶原纤维间间隙稍有增宽,透光度稍有增强,胶原纤维未见明显染色变淡。见图1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 开瑞坦组;D. 当归饮子高剂量组;E. 当归饮子中剂量组;F. 当归饮子低剂量组(图2~4同)

图1 当归饮子对CU小鼠表皮病理学变化的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of Danggui Yinzi on pathological changes of epidermis in CU mice(HE,×100)

3.3 对CU小鼠皮肤组织细胞超微结构及自噬小体的影响 空白组小鼠细胞超微结构完整,无明显自噬小体形成;与空白组比较,模型组可见明显异常细胞超微结构,表现为细胞核肿胀破碎,核膜消失,细胞质肿胀,线粒体肿胀破碎伴空泡样变形,线粒体嵴断裂,内质网扩张,同一视野下可见数个正在形成自噬小体的吞噬泡,提示自噬体形成增强,自噬小体数量有所增加;与模型组比较,当归饮子干预后小鼠皮肤细胞异常超微结构明显减轻,可见细胞核轻度肿胀,染色质轻度浓聚,线粒体肿胀及内质网扩张程度相对较轻,有较多囊泡状的自噬小体或自噬溶酶体出现,自噬小体数目明显增多。见图2。

3.4 对CU小鼠皮肤组织LC3B表达的影响 空白组小鼠皮肤组织偶见LC3B蛋白阳性表达;模型组CU小鼠皮肤组织LC3B蛋白表达明显增强,表达定位于细胞质,呈棕黄色颗粒;经当归饮子干预后,LC3B蛋白表达较模型组均有不同程度的增强,阳性染色细胞数量增加,以高剂量组最显著,见图3。

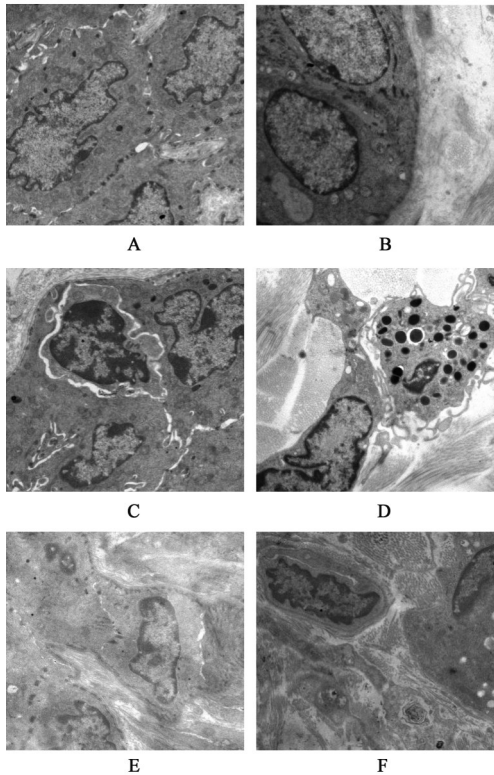


图2 当归饮子对CU小鼠皮肤组织细胞超微结构及自噬小体形成的影响(透射电镜,×12 000)

Fig. 2 Effect of Danggui Yinzi on cell ultrastructure and autophagosomes formation in skin tissue of CU mice(TEM,×12 000)

与空白组比较,模型组CU小鼠LC3B蛋白表达评分显著上升( $P<0.01$ );与模型组比较,当归饮子各组LC3B蛋白表达评分明显上升( $P<0.05, P<0.01$ );与开瑞坦组比较,当归饮子各组LC3B蛋白表达评分明显上升( $P<0.05, P<0.01$ );与当归饮子低剂量组比较,高剂量组LC3B蛋白表达评分明显上升( $P<0.05$ ),见表3。

Real-time PCR结果显示,与空白组比较,模型组CU小鼠LC3B mRNA表达水平上升;与模型组比较,当归饮子高剂量组LC3B mRNA表达明显上升( $P<0.05$ );与开瑞坦组比较,当归饮子高、中剂量组LC3B mRNA表达进一步上升( $P<0.05, P<0.01$ )。与当归饮子低剂量组比较,高剂量组LC3B mRNA表达显著上升( $P<0.05$ )。综上可知,当归饮子可显著上调CU小鼠皮肤组织LC3B mRNA及蛋白表达水平。见表3。

**3.5 对CU小鼠皮肤组织p62表达的影响** 空白组小鼠皮肤组织可见p62蛋白阳性表达,散在分布于细胞质,呈棕黄色颗粒,部分染色较深;模型组CU小鼠皮肤组织p62表达较空白组降低,阳性细胞数量减少、染色变浅;经当归饮子干预后,p62蛋白表

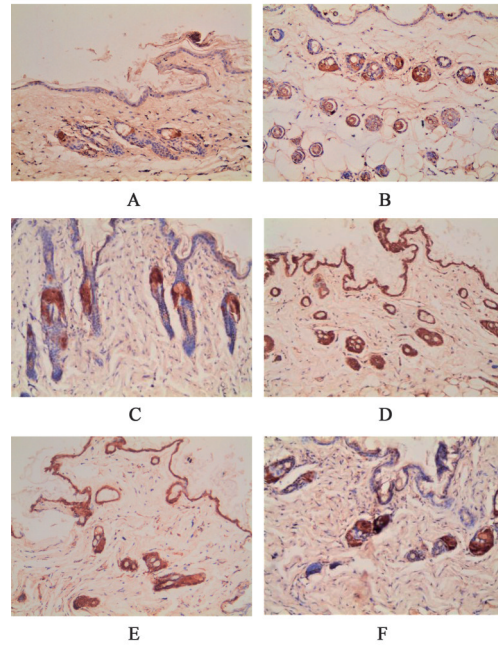


图3 当归饮子对CU小鼠皮肤组织中LC3B的蛋白表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 3 Effect of Danggui Yinzi on protein expression of LC3B in CU mice(IHC,×200)

表3 当归饮子对小鼠皮肤组织LC3B蛋白表达和mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of Danggui Yinzi on mRNA and protein expression of LC3B in CU mice( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	蛋白表达/A	mRNA
空白	-	4.609±1.600	1.000±0.188
模型	-	15.495±3.496 <sup>1)</sup>	1.239±0.194
开瑞坦	0.001 3	18.467±3.941	1.119±0.089
当归饮子	39.3	33.770±9.435 <sup>3,5,8)</sup>	2.597±0.582 <sup>4,6,8)</sup>
	19.6	25.061±5.597 <sup>3)</sup>	1.592±0.183 <sup>5)</sup>
	9.8	21.982±4.691 <sup>4)</sup>	1.533±0.257

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ,<sup>2)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.01$ ,<sup>4)</sup> $P<0.05$ ;与开瑞坦组比较<sup>5)</sup> $P<0.01$ ,<sup>6)</sup> $P<0.05$ ;与当归饮子低剂量组比较<sup>7)</sup> $P<0.01$ ,<sup>8)</sup> $P<0.05$ (表4同)。

达较模型组均有不同程度的降低,阳性数量进一步减少,细胞浅染,以当归饮子高剂量组改善最显著。见图4。与空白组比较,模型组CU小鼠p62蛋白表达评分显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,当归饮子各组p62蛋白表达评分均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ );与开瑞坦组比较,当归饮子各组p62蛋白表达的积分吸光度进一步降低( $P<0.05, P<0.01$ )。见表4。

Real-time PCR结果显示,与空白组比较,模型组CU小鼠p62 mRNA表达显著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,当归饮子各组p62 mRNA表达均明

显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与开瑞坦组比较,当归饮子各组 p62 mRNA 表达均显著下降( $P < 0.01$ )。与当归饮子低剂量组比较,当归饮子高、中剂量组 p62 mRNA 表达显著下降( $P < 0.01$ )。综上可知,当归饮子可显著下调 CU 小鼠皮肤组织 p62 的 mRNA 及蛋白表达水平。见表 4。

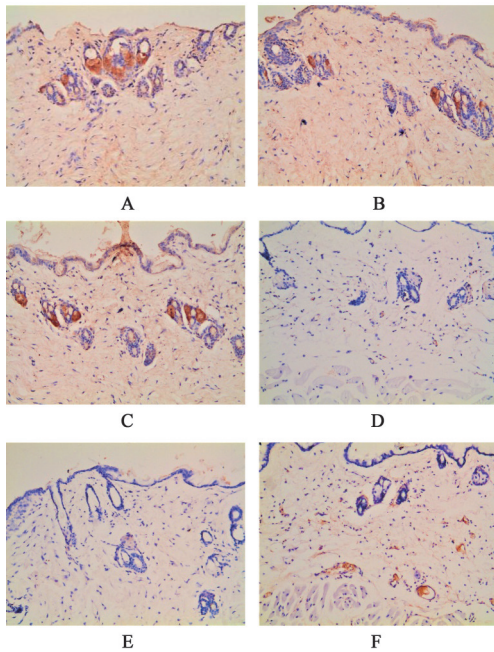


图4 当归饮子对 CU 小鼠皮肤组织中 p62 蛋白表达的影响(免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 4 Effect of Danggui Yinzi on protein expression of p62 in CU mice(IHC,  $\times 200$ )

表4 当归饮子对小鼠皮肤组织 p62 蛋白表达和 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of Danggui Yinzi on mRNA and protein expression of p62 in CU mice( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	蛋白表达/A	mRNA
空白	-	5.549±1.187	1.000±0.088
模型	-	3.725±1.009 <sup>1)</sup>	0.818±0.039 <sup>1)</sup>
开瑞坦	0.001 3	3.892±1.279	0.881±0.075
当归饮子	39.3	1.530±0.923 <sup>3,5)</sup>	0.560±0.086 <sup>3,5,7)</sup>
	19.6	2.442±0.759 <sup>4,6)</sup>	0.600±0.035 <sup>3,5,7)</sup>
	9.8	2.436±0.808 <sup>4,6)</sup>	0.719±0.054 <sup>4,5)</sup>

#### 4 讨论

慢性荨麻疹属于中医“瘾疹”“风疹”等范畴,其病机属血虚风燥<sup>[23]</sup>。当归饮子出自明·王肯堂《重订严氏济生方》,“主心血凝滞,内蕴风热,皮肤疮疥,或肿或痒,或脓水浸淫,或发赤疹瘡瘤”。全方由当归、川芎、白芍、生地黄、制首乌、黄芪、防风、地肤子、白蒺藜、僵蚕、蝉蜕、鸡血藤共十二味中药组

成。方中四物汤(当归、川芎、白芍、生地黄)养血活血,补中有通,补而不滞;制首乌滋阴养血,润肤止痒;黄芪补脾益气,达表益卫;白蒺藜、荆芥、防风祛风散邪。全方精妙组合共奏和营养血、祛风散邪之功,与慢性荨麻疹“血虚风燥”的发病机制契合,可谓面面俱到。本次研究中,模型组小鼠出现明显搔抓行为;HE染色可见胶原紊乱,粗细不均,纤维断裂,水肿明显,部分可见毛细血管扩张及炎细胞浸润,成功复制了 CU 小鼠模型。经当归饮子治疗后,小鼠皮肤组织异常病理状态均得到不同程度的改善,说明当归饮子能有效治疗 CU。

自噬通过靶向清除细胞内容物和细胞器进行溶酶体降解来维持细胞稳态,并在不同压力和不利条件下维持细胞的基因组完整性,维持细胞代谢和细胞存活<sup>[24]</sup>。当自噬出现缺陷时,线粒体会受损,由基因突变引起的自噬缺陷会破坏细胞器的消除,从而诱导炎症反应的异常活化,导致严重的组织损伤<sup>[25-26]</sup>。CU 是一种变态反应性疾病,发病时免疫应答常常被错误的激活,引发炎症反应,导致血管扩张、通透性增加、组织水肿。因此调节过敏引起的炎症反应对抑制慢性荨麻疹发作和减轻症状尤为重要。综上所述,通过调控自噬来防御细胞内环境紊乱,控制过敏反应,清除因炎症反应被破坏的细胞器和蛋白质,维持细胞稳态是解开 CU 反复发作、难以根治这一难题的关键钥匙。

LC3B 促进自噬小体膜的形成,并结合到自噬小体的膜上,因此其代表着自噬小体的水平高低,是完整自噬小体稳定的标记物<sup>[27-28]</sup>。研究证实 LC3B 与角质形成密切相关,是表皮皮肤维持稳态的重要因素<sup>[29]</sup>。除此之外,大量的文献报道了,LC3B 还与免疫、心脏和神经退行性疾病以及抑制肿瘤进展、促进肿瘤凋亡有关<sup>[30-33]</sup>。p62 蛋白是自噬机制被激活的标志物,它相当于是自噬中的“垃圾转运车”。p62 通过其特殊的结构域连接泛素化的底物与 LC3B 相互作用,当自噬被激活时自噬小体与溶酶体融合,p62 蛋白与其转运的底物在自噬溶酶体内被降解<sup>[34-35]</sup>。因此,当自噬被激活时,自噬溶酶体增加,p62 水平降低;当自噬被抑制时,自噬溶酶体减少,p62 水平升高。研究报道,p62 蛋白水平的降低或对 p62 功能的干扰显著增加由亨廷顿蛋白表达诱导的细胞死亡<sup>[36]</sup>。同时 p62 的缺乏也与几种神经退行性疾病中的神经病理学包涵体相关,如额颞叶变性,肌萎缩侧索硬化和阿尔茨海默病<sup>[37]</sup>。本次研究发现,LC3B mRNA 及蛋白表达在模型组 CU

小鼠中升高,当归饮子各剂量组较模型组显著上升;同时 p62 mRNA 及蛋白表达在模型组 CU 小鼠中下降,当归饮子各治疗组小鼠较模型组显著下降,提示自噬的激活可能是抑制 CU 的重要因素。结合治疗前后 CU 小鼠的行为学评分及病理改变对比,提示当归饮子可显著上调 LC3B,抑制 p62 的表达,激活细胞自噬,降解自噬溶酶体中有害的细胞器,维持细胞稳态,缓解过敏反应,从而起到防治 CU 的作用。

综上所述, CU 小鼠模型可见细胞自噬小体形成增多, LC3B 表达上调, p62 下调,说明自噬被激活,这可能是机体为抑制 CU,维持自身稳态的重要分子事件。当归饮子可显著改善 CU 小鼠皮肤真皮水肿、胶原束分离、毛细血管扩张等病理改变,其机制可能与其调节 LC3B, p62 mRNA 及蛋白表达,进一步增强细胞自噬水平缓解荨麻疹样病变有关。

#### [参考文献]

[1] 张学军,陆洪光,高兴华,等. 皮肤性病学[M]. 8版. 北京:人民卫生出版社,2017:116-117.

[2] CLIVE G. The urticarias: pathophysiology and management[J]. Clin Med, 2012, 12(2): 164-167.

[3] LEZNOFF A. Urticaria and angioedema [J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2012, 2(2): 272.

[4] NAGAR R. Autophagy: a brief overview in perspective of dermatology [J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2017, 83(3): 290-297.

[5] RAVANAN P, SRIKUMAR I F, TALWAR P. Autophagy: the spotlight for cellular stress responses [J]. Life Sci, 2017, 188: 53-67.

[6] HARRIS J, LANG T, THOMAS J P W, et al. Autophagy and inflammasomes [J]. Mol Immunol, 2017, 86: 10-15.

[7] SAITOH T, AKIRA S. Regulation of inflammasomes by autophagy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138(1): 28-36.

[8] SCHAAF M B, KEULERS T G, VOOIJS M A, et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy- (un) related functions [J]. FASEB J, 2016, 30(12): 3961-3978.

[9] 刘诗濛,董越娟,刘彬. p62与蛋白降解途径的研究进展[J]. 生理学报, 2015, 67(1): 48-58.

[10] CLARKE A J, ELLINGHAUS U, CORTINI A, et al. Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development [J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(5): 912-920.

[11] DOUROUDIS K, KINGO K, TRAKS T, et al. Polymorphisms in the ATG16L1 gene are associated with psoriasis vulgaris [J]. Acta Derm Venereol, 2012, 92(1): 85-87.

[12] KIM J Y, LEE E J, SEO J, et al. Impact of high-mobility group box 1 on melanocytic survival and its involvement in the pathogenesis of vitiligo [J]. Br J Dermatol, 2017, 176(6): 1558-1568.

[13] 孙梦涵,唐宗湘,袁晓琳.《外科正宗》消风散止痒作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 206-213.

[14] 郑伟灏,覃骊兰. 过敏煎及其单味药抗过敏作用的实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 194-201.

[15] 孙彬,刘文珊,李宏坤,等. 中药调节慢性荨麻疹免疫机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 206-211.

[16] 陈甜甜. 药物敷脐疗法联合当归饮子治疗血虚风燥型慢性荨麻疹临床疗效观察[D]. 成都:成都中医药大学, 2018.

[17] 宋宗谔,张静静,彭丽,等. 从“玄府”角度浅探当归饮子治疗慢性荨麻疹[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 420-421.

[18] 郭敏,彭丽,郭静. 当归饮子对慢性荨麻疹小鼠外周血清 IL-17、IL-23 水平的抑制作用[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(9): 4121-4123.

[19] TOSHIHARU H, TAEKO F. Acute urticaria-like lesions in allergen-unexposed cutaneous tissues in a mouse model of late allergic rhinitis [J]. Int J Exp Pathol, 2008, 89(3): 188-200.

[20] 王垣芳,王琳,赵峰,等. 防风通圣颗粒对大鼠慢性荨麻疹模型的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(11): 1374-1378.

[21] 魏伟,吴希美,李元建,等. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2010: 1678.

[22] 郭静,艾儒棣,段渠,等. 当归饮子治疗气血两虚型慢性荨麻疹小鼠的机理研究[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(6): 884-887, 943.

[23] 何清湖,秦国政,裴晓华,等. 中医外科学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2017: 215-217.

[24] DAS C K, BANERJEE I, MANDAL M. Pro-survival autophagy: an emerging candidate of tumor progression through maintaining hallmarks of cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2019, doi: 10.1016/j.semcancer. 2019. 08. 020.

[25] SHI C S, SHENDEROV K, HUANG N N, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated

- inflammasomes for destruction [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(3):255-263.
- [26] CHEN R J, LEE Y H, YEH Y L, et al. The roles of autophagy and the inflammasome during environmental stress-triggered skin inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12):2063.
- [27] 孙静, 宋卫东, 闫思源, 等. 氯喹抑制肾癌细胞活性促进舒尼替尼诱导的细胞凋亡[J]. *北京大学学报:医学版*, 2018, 50(5):778-784.
- [28] 卢娜, 李成长, 罗晓秋, 等. Beclin-1 shRNA对低氧诱导的SH-SY5Y细胞自噬的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2018, 34(5):464-469.
- [29] RAMKUMAR A, MURTHY D, RAJA D A, et al. Classical autophagy proteins LC3B and ATG4B facilitate melanosome movement on cytoskeletal tracks [J]. *Autophagy*, 2017, 13(8):1331-1347.
- [30] HUANG J, PAN W, OU D, et al. LC3B, a protein that serves as an autophagic marker, modulates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015, 66(6):576-583.
- [31] DHINGRA A, BELL B A, PEACHEY N S, et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3B, (LC3B) is necessary to maintain lipid-mediated homeostasis in the retinal pigment epithelium [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12:351-370.
- [32] NIKLAUS M, ADAMS O, BEREZOWSKA S, et al. Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(33):54604-54615.
- [33] SATYAVARAPU E M, DAS R, MANDAL C, et al. Autophagy-independent induction of LC3B through oxidative stress reveals its non-canonical role in anoikis of ovarian cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10):934-952.
- [34] MOSCAT J, DIAZ-MECO M T. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer [J]. *Cell*, 2009, 137(6):1001-1004.
- [35] LAMARK T, SVENNING S, JOHANSEN T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6):609-624.
- [36] BJØRKØY G, LAMARK T, BRECH A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death [J]. *J Cell Biol*, 2005, 171(4):603-614.
- [37] CACCAMO A, FERREIRA E, BRANCA C, et al. p62 improves AD-like pathology by increasing autophagy [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(6):865-873.

[责任编辑 孙丛丛]