

玉屏风散抑制小鼠 Th2 型变应性接触性皮炎

邵建华¹, 洪敏^{1,2*}, 牛艳¹, 禹良艳¹, 廖湘君¹, 沈丹丹¹

(1. 南京中医药大学国家规范化中药药理实验室, 南京 210029;

2. 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210029)

[摘要] **目的:**应用异硫氰酸荧光素(FITC)诱导的 Th2(Ⅱ型辅助性 T 细胞)型小鼠变应性接触性皮炎的模型,探讨玉屏风散对 Th2 型变应性接触性皮炎的作用。**方法:**小鼠在第 1,2 天用 1.5% 的 FITC 溶液致敏腹部皮肤 2 次,同时给予玉屏风散至第 5 天(诱导相给药),第 6 天用 0.5% 的 FITC 溶液攻击小鼠耳部皮肤,24 h 后测定小鼠耳肿胀程度,并做耳病理组织学检查和耳匀浆中白介素-4(IL-4)测定。**结果:**玉屏风散 6.5 g·kg⁻¹(临床等效量)和 13 g·kg⁻¹诱导相给药均能显著抑制小鼠耳肿胀度,光镜下测量的耳厚度也表明玉屏风散明显抑制模型小鼠耳肿胀程度;病理组织学检查显示给予玉屏风散小鼠的耳炎症反应减轻,炎细胞浸润明显减少;玉屏风散 6.5 g·kg⁻¹组耳组织匀浆中 IL-4 水平较模型组显著降低。**结论:**玉屏风散诱导相给药对 FITC 诱导的小鼠 Th2 型变应性接触性皮炎有显著的抑制作用,作用机制可能与调节 IL-4 有关。

[关键词] 玉屏风散;异硫氰酸荧光素;变应性接触性皮炎;耳肿胀;白介素-4

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0173-03

Yupingfeng San Inhibits Th2 Cell-mediated Allergic Contact Dermatitis in Mice

SHAO Jian-hua¹, HONG Min^{1,2*}, NIU Yan¹, YU Liang-yan¹, LIAO Xiang-jun¹, SHEN Dan-dan¹

(1. National Standard Laboratory of Pharmacology for Chinese Materia, Nanjing University of Chinese medicine, Nanjing 210029, China; 2. Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** Yupingfeng San (YPFS) is a traditional formula used for allergy such as asthma, allergic rhinitis, and urticaria. Mice Th2 cell-mediated allergic contact dermatitis was utilized in this study to explore the effect of YPFS on allergic inflammatory. **Method:** The mice were topically sensitized on the shaved abdomens with 1.5% FITC solution on abdominal skin in the day 1 and day 2 and elicited on the right ear with 0.5% FITC solution at day 6. Mice were treated with either YPFS or normal saline from day 1 to day 5 (induction phase). Ear thickness was measured using a calibrated thickness gauge 24 h after the elicitation. Ear pathohistological examination was carried out by HE staining and IL-4 level of ear tissue was detected by ELISA. **Result:** The ear thickness, measured either by calibrated thickness gauge or under the microscope, was inhibited significantly by administration with YPFS 6.5 g·kg⁻¹ and YPFS 13 g·kg⁻¹ in induction phase. The pathohistological examination showed that the ear inflammation and infiltration of inflammatory cells was significantly reduced by YPFS. The levels of IL-4 in ear tissue were significantly lower in YPFS 6.5 g·kg⁻¹ group compared with that in model group. **Conclusion:** Administration with YPFS in induction phase could inhibit Th2 cell-mediated allergic contact dermatitis in mice significantly, and the mechanism may be related with regulating IL-4.

[Key words] Yupingfeng San; fluorescein isothiocyanate; allergic contact dermatitis; ear swelling; interleukin-4

[收稿日期] 20110402(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073121);国家教育部留学回国人员科研启动基金;江苏省青蓝工程资助;南京中医药大学科技创新团队资助(200807020)

[通讯作者] * 洪敏, 博士, 副研究员, 从事免疫网络的中药调节研究, E-mail: hongmin72@hotmail.com

玉屏风散源自朱丹溪的《丹溪心法》，由黄芪、防风、白术 3 味中药组成，具有益气固表、扶正止汗、驱邪御风之功效，是扶正固本的经典方剂。临床除用于反复上呼吸道感染外，还普遍用于哮喘、过敏性鼻炎、荨麻疹、接触性皮炎等变态反应性疾病^[1]。本实验室之前的研究表明玉屏风散对 Th1 细胞介导的变应性接触性皮炎有显著的抑制作用^[2-3]，而多数的变态反应性炎症是由 Th2 细胞介导的，以 Th2 细胞因子（如 IL-4, IL-5, IL-13 等）水平升高为主要特征^[4]，玉屏风散对 Th2 型变态反应是否有影响？有研究提示玉屏风散或加味对哮喘、过敏性鼻炎有一定的效应^[5-6]，为进一步探讨玉屏风散对 Th2 型变态反应性疾病的作用，本研究选用 FITC 诱导小鼠产生 Th2 型变应性接触性皮炎模型，来考察玉屏风散对 Th2 型变态反应的影响。

1 材料

1.1 药物与试剂 黄芪、防风、白术，购于安徽省亳州市药材总公司，由南京中医药大学王春根教授鉴定。玉屏风散提取物，由黄芪、白术、防风，按照 3:1:1 投料，加入 10 倍量的 95% 乙醇提取 2 次，每次 2 h，合并后减压蒸馏浓缩至含生药 1.524 g·g⁻¹ 提取物。地塞米松，福建三爱药业有限公司；异硫氰酸荧光素（FITC），美国 Sigma 公司；IL-4 Elisa 试剂盒，美国 Ebioscience 公司。

1.2 仪器 电子天平，瑞典 METTLER 公司；测厚规，哈尔滨量具刃具集团有限责任公司；酶标仪，美国 MD 公司；显微镜，日本 Olympus 公司。

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

2007-0005。

2 方法

2.1 Th2 型变应性接触性皮炎模型的建立^[7]

Balb/c 小鼠于第 0 天腹部脱毛 2 cm × 2 cm，第 1 天和第 2 天于腹部涂 1.5% FITC 溶液（溶剂为丙酮：邻苯二甲酸丁二酯 1:1）80 μL 致敏，第 6 天用 0.5% FITC 溶液 20 μL 涂于小鼠右耳攻击，左耳涂等体积溶剂。24 h 后，用测厚规测量小鼠两耳厚度，并计算耳肿胀度（右耳厚度 - 左耳厚度）。

2.2 分组及给药 42 只小鼠随机分成 6 组，每组 7 只，分别为空白、模型、地塞米松、玉屏风散按生药量计为 3.25, 6.5, 13 g·kg⁻¹ 组。地塞米松 ip 剂量为 0.67 mg·kg⁻¹，玉屏风散组 ig 给药，空白组和模型组 ig 给予等体积生理盐水，各组小鼠从致敏第 1 天开始给药，每天 1 次，共 5 次（d1 ~ d5），于攻击前 24 h 停止给药，即诱导相给药。

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耳组织厚度并统计。

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，3 000 r·min⁻¹ 4 °C 离心 15 min，取上清液 ELISA 法测定 IL-4。

2.5 统计方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 Student-*t* 检验，*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 耳肿胀度的影响 与空白对照组比较，模型组小鼠耳肿胀度显著增加；玉屏风散 6.5, 13 g·kg⁻¹ 组对模型小鼠耳肿胀度均有显著的抑制作用（表 1）。

表 1 玉屏风散诱导相给药对小鼠耳肿胀度及耳匀浆 IL-4 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	耳肿胀度/μm	耳厚度/μm	IL-4/ng·L ⁻¹
空白	-	-7 ± 8 ²⁾	231.5 ± 49.1 ²⁾	195.37 ± 15.73 ²⁾
模型	-	170 ± 27	371.7 ± 85.8	266.99 ± 22.62
地塞米松	6.7 × 10 ⁻⁴	30 ± 18 ²⁾	253.1 ± 89.4 ²⁾	202.65 ± 12.10 ²⁾
玉屏风散	3.25	173 ± 33	324.6 ± 72.3 ²⁾	273.35 ± 42.69
	6.5	102 ± 26 ²⁾	265.7 ± 55.0 ²⁾	227.66 ± 21.79 ²⁾
	13	124 ± 41 ²⁾	305.9 ± 49.6 ²⁾	249.41 ± 28.01

注：与模型组相比¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01。

3.2 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，玉屏风散 6.5 g·kg⁻¹ 组能够显著降低造模小鼠耳组织匀浆中 IL-4 的水平（表 1）。

3.3 对耳组织病理学改变的影响 空白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。

玉屏风散 6.5, 13 g·kg⁻¹ 组有减轻耳病理组织学改变的影响,主要表现在耳肿胀减轻,炎细胞浸润显著减少(图 1)。

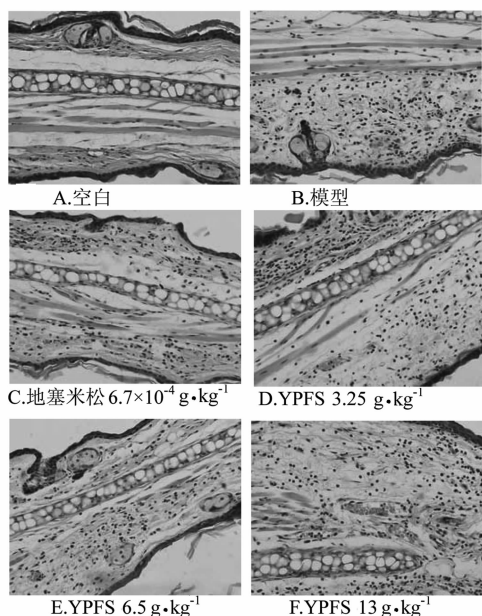


图 1 玉屏风散诱导相给药对小鼠耳组织病理学影响(HE, ×400)

4 讨论

研究变应性接触性皮炎常用的模型是用 DNCB 或 DNFB 诱导的,属于 Th1 细胞介导的变态反应性炎症,而 FITC 所诱导的是 Th2 细胞介导的变态反应性炎症。FITC 作为一种小分子半抗原,与表皮细胞中载体蛋白结合后,由朗格汉斯细胞摄取并提呈给 T 细胞,并使其活化为记忆 T 细胞,当机体再次接触相同半抗原时,记忆 T 细胞迅速分化为效应 T 细胞^[8],并产生大量的 Th2 炎症因子,从而导致变态反应性炎症的产生。因此本研究选用 FITC 诱导的小鼠变应性接触性皮炎模型来评价玉屏风散对 Th2 型变态反应的作用。

实验室前期研究显示,玉屏风散全程给药可以抑制 FITC 诱导的小鼠耳肿胀,但其具体作用环节不明,本研究发现诱导期给予玉屏风散即能够抑制 FITC 诱导的小鼠变应性接触性皮炎,表现为显著抑制小鼠耳肿胀度和炎细胞的浸润,并对 Th2 细胞因子 IL-4 也有显著的抑制作用,表明玉屏风散在 Th2 型变态反应的诱导期即可发挥其抑制作用。然而在研究中发现玉屏风散对小鼠变应性接触性皮炎作用

的量效关系不明显,出现这种现象的原因可能与玉屏风散中不同成分在不同剂量下作用的表现差异有关。

在变态反应性疾病发生的众多机制学说中 Th1/Th2 的漂移学说倍受重视,调节 Th1/Th2 (IFN- γ /IL-4) 的比值趋于平衡有利于治疗变态反应性疾病^[9]。本实验室之前的研究发现玉屏风散能够抑制 DNCB 诱导的小鼠 Th1 型变应性接触性皮炎模型 IFN- γ 水平,并调节 IFN- γ /IL-4 比值^[2-3],而本研究中发现玉屏风散对 FITC 诱导的小鼠 Th2 型变应性接触性皮炎模型也表现出显著的抑制作用,且降低 IL-4 水平,这种作用是否与调节 Th1/Th2 平衡有关正在进一步确证中。至于玉屏风散对于两种不同类型的变态反应或者说在不同的病理状态下的效应及机制的异同,是值得进一步探索的问题。

[参考文献]

- [1] 杨苏敏,邓桂平.玉屏风散的临床应用进展[J].西北药学杂志,2008,23(3):192.
- [2] 郑劼,洪敏,华永庆,等.玉屏风散对小鼠变应性接触性皮炎及脾细胞增殖的影响[J].中药药理与临床,2008,24(4):7.
- [3] 洪敏,王亮,郑劼,等.玉屏风散不同提取物抑制迟发型超敏反应的特点[J].中药药理与临床,2010,26(2):4.
- [4] Soumelis V,Reche P A,Kanzler H,et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP[J]. Nat Immunol,2002,3(7):673.
- [5] 韩建秋,朱永先.玉屏风散佐治小儿哮喘的疗效及体液免疫调节的研究[J].中国当代儿科杂志,2009,11(7):587.
- [6] 张仲林.从“肺开窍与鼻”理论探讨玉屏风散对变应性鼻炎的治疗[J].江苏中医药,2009,41(10):11.
- [7] Suto H,Nakae S,Kakurai M,et al. Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration [J]. J Immunol,2006,176(7):4102.
- [8] 王海涛,何聪芬,董银卯,等.化妆品接触性皮炎的发病机理探究[J].香料香精化妆品,2008,(5):23.
- [9] Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease [J]. Altern Med Rev,2003,8(3):223.

[责任编辑 聂淑琴]