

消风散对 IV 型变态反应中白细胞介素 10 的影响

梁秀宇^{1,2*}, 关洪全¹

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032; 2. 沈阳市第七人民医院皮肤科, 辽宁 沈阳 110003)

白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10) 是体内重要的炎症反应抑制因子, 主要由 Th2 细胞产生, 还可来源于 Th0 细胞、某些 Th1 细胞、单核-吞噬细胞、B 细胞淋巴瘤、肥大细胞及角质细胞。目前国内外对 IV 型变态反应中 IL-10 表达的研究报道较少。消风散是临床上治疗急性荨麻疹、湿疹、神经性皮炎的常用方剂, 本文研究消风散对 IV 型变态反应中 IL-10 生成的影响, 探讨作用机理, 为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品 消风散采用经典方剂组成: 当归 10g、生地 10g、防风 10g、蝉蜕 10g、苦参 10g、胡麻仁 10g、荆芥 10g、苍术 10g、牛蒡子 10g、石膏 10g、木通 5g、甘草 5g。药材由沈阳市第七人民医院中药局提供。煎煮方法: 加水量 1 L, 浸泡 20 min, 煎 20 min; 二煎加水量为 1 L, 煎 20 min。两次药液混合, 浓缩成 100% 药液, 冰箱保存备用。2, 4-二硝基氯苯(DNCB): 北京市兴津化工厂生产, 批号为 20020522。强的松片(醋酸泼尼松片): 5 mg/片, 天津力生制药股份有限公司生产, 批号: 0402004-06。

1.2 试剂 SABC 免疫组化染色试剂盒(包括兔抗小鼠 IL-10 多克隆抗体, 二抗为山羊抗小鼠 IgG 亲和纯化抗体。二氨基联苯胺 DAB 显色剂), 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器 冰冻切片(OTF 型, 英国 Bright 公司生产); 显微图像分析系统(Meta Morph/DP10/BX41 及 Meta Morph/C-5050/BX41, UIC/OLYMPUS, US/JP, 中国医科大学提供)。

1.4 动物 雄性 BALB/c 小鼠, 清洁级。(25±2)g, 由辽宁中医药大学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 实验分组及处理 将 48 只小鼠按随机表随机分成 4 组, 每组 12 只, 分别为空白组、DNCB 模型组、强的松组及消风散组。空白组及 DNCB 模型组小鼠生理盐水灌胃, 每日每只 0.4 mL。强的松组: 强的松用量为 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 每只鼠每日灌胃 0.4 mL, 强的松的配制浓度为 62.5 mg/L。消风散组: 使用的中药浓度为 100% 浓度, 每只鼠每日灌胃剂量为 0.4 mL, 剂量为生药 20 g/kg(成人中药用量约为 100 mL/60 kg)。灌药自致敏前 1 d 开始, 每天 1 次, 连续 9 d。

2.2 造模方法 采用王国江^[1]背部变应性接触性皮炎模型。将 DNCB 加入丙酮橄榄油溶液, 配成 0.5%、0.2% 的溶液。第 1 天用剃须刀对 4 组 BALB/c 雄性小鼠去除腹部及背部毛发, 面积约 2 cm×2 cm。第 2 天在除空白组外的小鼠腹部剃毛区涂 0.5% DNCB 溶液 25 μL 进行首次致敏, 第 3 天加强 1 次; 第 8 天在除空白组外的小鼠背剖剃毛区涂 0.2% DNCB 丙酮液 20 μL 进行抗原攻击, 攻击 24 h 后(第 9 天)处死全部小鼠。

2.3 免疫组织化学方法 按照 SABC 免疫组化染色试剂盒使用说明书进行操作。取各组小鼠背部全层皮肤, 用福尔马林固定, 石蜡包埋。切片脱蜡脱水。苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片, 观察。另设不加 IL-10 抗体的阴性对照。

2.4 图像分析与统计学处理 应用 Meta Morph/DP10/BX41 及 Meta Morph/C-5050/BX41 显微图像分析系统对切片进行照像及图像分析。光密度值使用 Microsoft Excel 记录。结果采用 spss 13.0 统计软件进行统计, Univariate Analysis of Variance 方法。

3 结果

3.1 DNCB 诱导的鼠 IV 型变态反应中 IL-10 的表达 正常小鼠皮肤镜下观察阳性结果为棕黄色颗粒。IL-10 在空白组小鼠皮肤组织中主要表达于毛发细胞、毛囊细胞中, 表皮、真皮、皮下脂肪等细胞呈低水平表达, 肌肉内有高水平表达。经 DNCB 诱导的 IV 型变态反应模型组小鼠皮肤镜下可见在毛发、毛囊细胞、皮下组织中 IL-10 的表达有所增加, 但表皮、真皮组织中 IL-10 表达仍较少。阴性对照示无棕黄色颗粒。

3.2 消风散及强的松对 IV 型变态反应中 IL-10 表达的影响 消风散组及强的松组小鼠皮肤镜下观察示毛发、毛囊细胞、皮下组织中 IL-10 的表达明显增强, 且表皮、真皮组织中 IL-10 表达。

3.3 各组小鼠皮肤组织中 IL-10 表达的积分光密度值 见表 1。

表 1 IL-10 表达的积分光密度值的比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量(g/kg)	积分光密度(OD)
空白组	—	50.65±17.65
DNCB 模型组	—	52.96±11.00
消风散组	20.0	63.77±5.95 ¹⁾³⁾
强的松组	0.001	71.23±8.44 ²⁾⁴⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与 DNCB 模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.001$ 。

[收稿日期] 2006-07-24

[通讯作者] * 梁秀宇, Tel: (024) 23874297; E-mail: liangxiuyu888@126.com

应用半定量图像分析系统统计结果示,空白组、DNFB 模型组组织中 IL-10 的表达较低,消风散、强的松组组织中 IL-10 的表达升高,与前两组比较有显著性差异($P < 0.05$)。消风散组 IL-10 的表达不及强的松组,但在统计学上无明显意义。

4 讨论

IL-10 首先于 1999 年由 Fiorentino 等发现^[2],它是一重要的免疫多效性调节因子,它的基本功能是抑制 Th1 产生细胞因子及其活性,被称为细胞因子合成抑制因子。但 IL-10 具有免疫抑制和免疫刺激双重作用。IL-10 与变态反应性疾病的研究发现,它可以抑制脂多糖诱导的嗜酸性粒细胞生长和细胞因子合成,以后又发现它能够抑制肥大细胞合成 TNF 和 IL-6。IL-10 对接触性变态反应的抑制作用主要表现为:抑制朗格汉斯细胞迁移和发育成熟,从而影响其呈递抗原和启动免疫反应能力;抑制 Th0 向 Th1 极化及 IFN- γ 分泌,从而抑制细胞免疫反应,以及 IFN- γ 系列的免疫放大效应^[3]。故有效的 IL-10 诱生剂将缓解或消除变态反应性炎症反应。目前国外对 IL-10 与 IV 型变态反应之间关系报道不多,尤其药物对 IL-10 的作用方面,国内鲜有报道。消风散可治疗急性荨麻疹、湿疹、神经性皮炎等过敏性疾病^[4],深入研究其作用机制,可为临床上应用此类方剂提供可靠的依据。本实验研究表明在正常皮肤组织中 IL-10 的表达很少,但肌肉组织中高

表达。在形成迟发型变态反应后其表达略高,但无明显的统计学意义。这种升高考虑与机体自身的免疫调节有关,体内的特异性调节性 T 细胞可通过释放 IL-10 来抑制免疫反应^[5]。在使用消风散、强的松干预后,IL-10 的表达明显增强,消风散的作用虽不及强的松,但经统计学处理后并无明显差异,说明消风散具有较强促进 IL-10 分泌的作用。

[参考文献]

- [1] 王国江,顾军.小鼠背部变应性接触性皮炎模型的建立[J].中国职业医学,2004,2,31(1):17-19.
- [2] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin 10 and the interleukin 10 receptor[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 683-765.
- [3] Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, et al. CD4(+) and CD8(+) anergic T cell induced by interleukin 10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity[J]. Blood, 2002, 99(7): 2468-2476.
- [4] 高等医药院校教材方剂学.上海:上海科学技术出版社,1991.162-163.
- [5] Roncarolo MC, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. J Exp Med, 2001, 193(2): 5-9.