

# 基于 IL-23/IL-17 炎症轴探讨玉屏风颗粒治疗 CU 大鼠的效应机制

张美恒<sup>1</sup>, 曾进浩<sup>2</sup>, 徐凤<sup>1</sup>, 陈儒康<sup>1</sup>, 彭丽<sup>1</sup>, 郭静<sup>2\*</sup>

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

**[摘要]** **目的:** 研究玉屏风颗粒对慢性荨麻疹(CU)大鼠皮肤肥大细胞脱颗粒的影响及白细胞介素-23(IL-23), 白细胞介素-17(IL-17)炎症轴的干预机制。**方法:** 选用 SPF 级 SD 大鼠, 取 60 只随机分为正常组, 模型组, 氯雷他定组(0.9 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 玉屏风颗粒高、中、剂量组(4.05, 2.7, 1.35 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。运用腹腔注射卵白蛋白与氢氧化铝悬液和百白破疫苗进行致敏复制 CU 大鼠模型。苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠皮肤组织病理学改变; 甲苯胺蓝染色观察大鼠皮肤组织肥大细胞脱颗粒现象; 免疫组化(IHC)检测皮肤组织 IL-23, IL-17 蛋白表达; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测皮肤组织 IL-23, IL-17 mRNA 转录水平。**结果:** 玉屏风颗粒可显著改善 CU 大鼠皮肤真皮水肿、胶原束距离增宽、炎性细胞浸润等病理表现, 同时可减轻 CU 大鼠皮肤组织肥大细胞脱颗粒反应。与正常组比较, 模型组 CU 大鼠皮肤的 IL-23, IL-17 mRNA 水平及蛋白表达评分均明显增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 玉屏风颗粒能显著下调 CU 大鼠皮肤的 IL-23 mRNA 水平及蛋白表达评分( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 以高剂量组疗效最佳; 玉屏风颗粒对 IL-17 无显著调控作用。**结论:** 玉屏风颗粒可显著减轻 CU 大鼠皮肤组织肥大细胞脱颗粒, 改善真皮水肿、浆液性渗出、炎性细胞浸润等病理表现, 其机制可能与其抑制 IL-23 促炎细胞因子分泌而改善 CU 病变有关。

**[关键词]** 玉屏风颗粒; 慢性荨麻疹; 肥大细胞脱颗粒; 白细胞介素-23 (IL-23); IL-17

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)09-0036-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200606

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191206.1749.014.html>

**[网络出版时间]** 2019-12-07 09:32

## Mechanism of Yupingfeng Granule on CU Rats Based on IL-23/IL-17 Inflammation Axis

ZHANG Mei-heng<sup>1</sup>, ZENG Jin-hao<sup>2</sup>, XU Feng<sup>1</sup>, CHEN Ru-kang<sup>1</sup>, PENG Li<sup>1</sup>, GUO Jing<sup>2\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;

2. Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Yupingfeng granule on the degranulation of skin mast cells in chronic urticaria (CU) rats and the intervention mechanism of interleukin-23 (IL-23), interleukin-17 (IL-17) inflammation axis. **Method:** Totally 60 SPF SD rats were selected and randomly divided into normal group (normal saline), model group (normal saline), and loratadine group (0.9 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), high-dose Yupingfeng granules group (4.05 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), middle-dose group (2.7 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), low-dose group (1.35 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). The CU rat model was reproduced through intraperitoneal injection of ovalbumin with aluminum hydroxide suspension and DTP vaccine. Histopathological changes of rat skin were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Degranulation of mast cells in rat skin was determined by toluidine blue staining. IL-23 and IL-17 protein expressions in skin tissue were determined by immunohistochemistry (IHC). IL-23 and IL-17 mRNA transcription levels in skin tissue were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Yupingfeng

**[收稿日期]** 20190927(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81573986); 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]** 张美恒, 在读硕士, 从事皮肤病的临床及实验研究, E-mail: 395567429@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

granules can significantly alleviate the pathological manifestations of dermal edema, collagen beam distance, inflammatory cell infiltration of CU rats, and reduce the degranulation reaction of skin tissue mast cells in CU rats. The IL-23, IL-17 mRNA and protein expressions of the skin of model group were significantly increased compared with the normal group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, Yupingfeng granules can significantly down-regulate IL-23 mRNA and protein expressions of CU rats ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Yupingfeng granules had no significant regulatory effect on IL-17. **Conclusion:** Yupingfeng granule can significantly reduce the degranulation of mast cells in skin tissue of CU rats, and improve the pathological manifestations, such as dermal edema, serous exudation and inflammatory cell infiltration. The mechanism may be related to inhibiting the secretion of IL-23 pro-inflammatory cytokines and improving CU lesions.

[**Key words**] Yupingfeng granule; chronic urticaria; mast cell degranulation; interleukin-23 (IL-23); IL-17

慢性荨麻疹(CU)是一种常见的过敏性、反复发作风团伴瘙痒持续 6 周以上的慢性皮肤病<sup>[1-3]</sup>。本病为难治型常见变应性疾病,西医治疗荨麻疹的主要药物有组胺 H 受体拮抗剂、免疫抑制剂、激素类药物等<sup>[4-5]</sup>,但根治疾病较为困难,并且 CU 复发后再次使用该药往往难以见效<sup>[6]</sup>。玉屏风散益气固表,养血和营,众多临床研究发现玉屏风散治疗 CU 疗效显著,提高患者生活质量,降低复发率<sup>[7-9]</sup>。

CU 发病机制有多种因素,近期研究发现与患者免疫功能异常有关<sup>[10]</sup>,细胞免疫成为研究热点方向,细胞免疫失衡的作用越来越受到重视<sup>[11-12]</sup>。皮肤中的肥大细胞通过细胞因子和炎症介质的合成和释放,是 I 型超敏反应(包括荨麻疹)的主要效应细胞。活化的肥大细胞通过细胞间相互作用或相关活性物质的释放来募集、激活和调节其他免疫细胞,以构成和放大自身免疫过程的局部炎症微环境<sup>[13]</sup>。研究表明肥大细胞参与了调节性 T 细胞(Treg)和辅助性 T 细胞 17(Th17)这两类细胞的平衡调控,通过与肿瘤坏死因子受体配体(OX40L)-肿瘤坏死因子受体(OX40)与 Treg 相互作用,抑制肥大细胞脱颗粒,从而减轻过敏反应<sup>[14]</sup>。白细胞介素-23(IL-23)由 IL-23 特异的 p19(IL-23 p19)和白细胞介素 12 特异的 p40(IL-12 p40)2 个亚基组成,为 IL-12 细胞因子家族成员,主要功能体现在它是一种促进炎症反应的细胞因子<sup>[15]</sup>。同时,IL-23 是 Th17 细胞增殖及活化的上游分子,可促进 Th17 细胞产生 IL-17,形成 IL-23/IL-17 炎症轴<sup>[16]</sup>,介导免疫应答及炎症级联反应。此外,肥大细胞的成熟时期会表达多种膜内外受体,该类受体与相应配体结合后会发生双相反应,可促使肥大细胞在第二阶段从头合成并释放介质,包括 IL-17, IL-12, IL-10, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等也可被肥大细胞所影响<sup>[17]</sup>。近期研究发现

IL-23/IL-17 炎症轴活化参与荨麻疹的发病,而越来越受到重视<sup>[18-24]</sup>。本研究通过观察玉屏风颗粒对 CU 模型大鼠皮肤组织病理、肥大细胞脱颗粒的干预作用,及对 IL-23/IL-17 炎症轴的调控效应,旨在为玉屏风颗粒治疗 CU 的临床治疗提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 SD 大鼠 70 只,鼠龄 6~8 周,体重(200  $\pm$  20) g,雌雄各半,成都达硕生物科技有限公司提供,动物生产合格证号 SCXK(川)2015-030,动物实验部分均符合成都中医药大学伦理委员会批准,伦理备案号 2019236A。

**1.2 药物与试剂** 玉屏风颗粒(广东环球制药有限公司,国药准字 Z10930036),实验时按需要配制成临床用剂量和 3 倍临床用剂量 2 种质量浓度药液备用;氯雷他定片(拜耳医药保健有限公司启东分公司,国药准字 H10970410);卵清白蛋白(OVA,合肥博美生物科技有限责任公司,货号 AL7514-25g);氢氧化铝(成都市科隆化学品有限公司, CAS 号 21645-51-2);百白破疫苗(武汉生物制品研究所有限责任公司,批号 201802018-1);伊文思蓝溶液(美国 Sigma 公司,批号 10117443);苏木素(北京百灵威科技有限公司,批号 LM10N13);IL-17 一抗(美国 Novusbio 公司,货号 NBP1-42746),伊红(东京化成工业株式会社,批号 GL01-GMPC);IL-23 一抗(武汉博欧特生物科技有限公司,货号 orb184437);甲苯胺蓝(进口分装,上海如吉生物科技发展有限公司,批号 190118);兔抗二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 SP-9001);总 RNA 提取试剂盒,RT Easy<sup>TM</sup> II(用于实时 PCR 的第一链 cDNA 合成),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Easy<sup>TM</sup>(成都福际生物技术有限公司,货号分别为 RE-03014, RT-01023, QP-01014);无水乙醇(AR 级,成

都科龙化工试剂有限公司,批号 170523)。

**1.3 仪器** PIKORed 96 型 Real-time PCR 仪, TCA0096 型热循环仪(美国 Thermo Fisher 仪器有限公司);BA400Digital 型数码三目摄像显微镜(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);UPH-II-10T 型优普超纯水制造系统(成都超纯科技有限公司);EMUC7 型超薄切片仪(德国徕卡公司);图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0(美国 Media Cybernetics 公司)。

## 2 方法

**2.1 抗血清的制备** 取 10 只 SD 大鼠,每只足跖注射 OVA( $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) $0.1 \text{ mL}$ ,共  $0.4 \text{ mL}$ ,同时腹腔注射百白破疫苗  $0.5 \text{ mL}$ ;隔日 1 次,共 3 次,于末次致敏 10 d 后处死,从腹主动脉取血, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 取上清液,制得抗血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

**2.2 CU 大鼠模型制备及分组干预** 取 60 只 SD 大鼠,随机分为正常组(生理盐水  $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),模型组(生理盐水  $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),氯雷他定组( $0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),玉屏风颗粒高、中、低剂量组( $4.05, 2.7, 1.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。除正常组外,其余 5 组参考文献制备 CU 大鼠模型<sup>[25-26]</sup>:第 1 天初次致敏,50 只大鼠均腹腔注射卵白蛋白、氢氧化铝与  $1 \text{ mL}$  生理盐水混匀制成的悬液,第 10 天重复致敏 1 次。同时,从初次致敏后第 6 天开始给药,正常组及模型组灌胃生理盐水,治疗组大鼠灌胃相应药物,每天 1 次,连续 14 d。CU 大鼠末次给药后再次激发,乙醚浅麻醉后于背部两侧剪毛处皮内注射 10% 抗血清生理盐水溶液  $0.1 \text{ mL}$ ,给药后 1 h 进行抗原攻击,采用尾静脉注射伊文思兰加鸡 OVA 白生理盐水溶液(质量浓度为  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,含 OVA  $1 \text{ mg}$ ) $1 \text{ mL}$ ,对大鼠瘙痒、抓痕面积、红肿、红斑面积表现进行评价,分为无、轻度、中度、重度 4 级,分别积 0,1,2,3 分,每个症状相加,观察 30 min 后处死动物采取标本。

**2.3 HE 染色观察大鼠皮肤组织病理学变化** 取出皮肤组织经 4% 多聚甲醛固定后进行脱水、修剪、包埋、切片、HE 染色、封片等,最后镜检。在光学显微镜下观察皮肤组织表皮结构、真皮层胶原纤维、炎

性细胞浸润及毛细血管扩张等皮肤组织病理形态学改变。

**2.4 甲苯胺蓝染色观察大鼠皮肤组织肥大细胞脱颗粒情况** 标本切片常规脱蜡,1% 甲苯胺蓝染色,蒸馏水洗,乙醇浸泡、分化,脱水,透明封固,镜检。观察大鼠皮肤组织真皮层肥大细胞形态,及肥大细胞脱颗粒现象。

**2.5 免疫组化检测 IL-23,IL-17 的蛋白表达** 将脱蜡后的切片放入染色缸,3% 甲醇双氧水室温 10 min;磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,每次 5 min;将切片浸入  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉中高火加热至沸腾后断电,间隔 5 min 后,反复 1 次,冷却后,PBS 洗 2 次,每次 5 min;滴加山羊血清封闭液,室温 20 min;滴加稀释后一抗 IL-23 (1:400),IL-17 (1:5 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜;滴加生物素化二抗(即用型), $37 \text{ }^\circ\text{C}$  30 min;PBS 水洗 3 次,每次 5 min;使用 DAB 显色试剂盒,混匀试剂后滴加到切片上,室温显色;苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树脂胶封片。运用 Image Pro Plus6.0 图像处理软件进行分析,选取累积分吸光度 IA 进行阳性表达评分。

**2.6 Real-time PCR 测定 IL-23,IL-17 mRNA 的表达水平** 取材时将新鲜大鼠皮肤组织置液氮速冻并转移至  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱。每 10 ~ 20 mg 皮肤组织加入 Buffer RL  $10.5 \text{ mL}$ ,用电动匀浆器将组织研磨均匀;取上清液;向上述上清液中加入 1.6 倍体积的 Buffer RL2,轻柔混匀;然后将混合液  $0.7 \text{ mL}$  转移至 RNA-only Column 中, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min,弃掉收集管中的废液;将纯化柱转移至新的离心管中,向纯化柱的膜中央滴加已于  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  预热的无核酸酶双蒸水  $50 \sim 200 \text{ } \mu\text{L}$ ,室温放置 2 min; $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min 收集 RNA 溶液,待测或者  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。其后,将反应混合物放入 PCR 仪扩增, $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s (1 循环); $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$  50 s (50 个循环)。记录样本扩增反应的  $C_t$  值,运用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因相对表达量。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 ULTRAPAGE 纯化,以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参。设计的引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列上游(5'-3')	序列下游(5'-3')	长度/ bp
$\beta$ -actin	GAAGATCAAGATCATTGCTCC	TACTCCTGCTTGCTGATCCA	111
IL-17	TGTGCCTGATGCTGTGCTGCTACTG	GGTCCTCATTGCGGCTCAGAGTCCA	228
IL-23	ACCTGCTGGACTCGGACATCTTCACA	AAGGCTTGGAGGCTCGGAAGGATCT	211

**2.7 统计学处理** 采用 SPSS 23.0 统计软件,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 SNK 法;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 一般情况观察** 在造模及给药过程中无大鼠死亡,正常组大鼠毛色光亮,饮食及大小便正常,其他各组大鼠通过卵白蛋白、氢氧化铝凝胶及百白破疫苗致敏后,出现毛色晦暗,饮食减少,有明显的搔抓行为。正常组偶有搔抓现象,无皮损表现;其他各组 CU 大鼠出现不同程度的前爪搔抓头部、后爪搔抓躯干、嘴咬全身部位现象,皮肤出现红肿、红斑、抓痕情况等。模型组 CU 大鼠表现最为明显,搔抓皮损处,舔舐足底,相互挤蹭,玉屏风颗粒和氯雷他定干预各组表现较轻, CU 大鼠搔抓现象及皮损均有改善<sup>[27]</sup>。与正常组比较,模型组过敏反应评分显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组过敏反应评分显著降低( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 玉屏风颗粒对 CU 大鼠搔抓现象及皮损严重程度评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

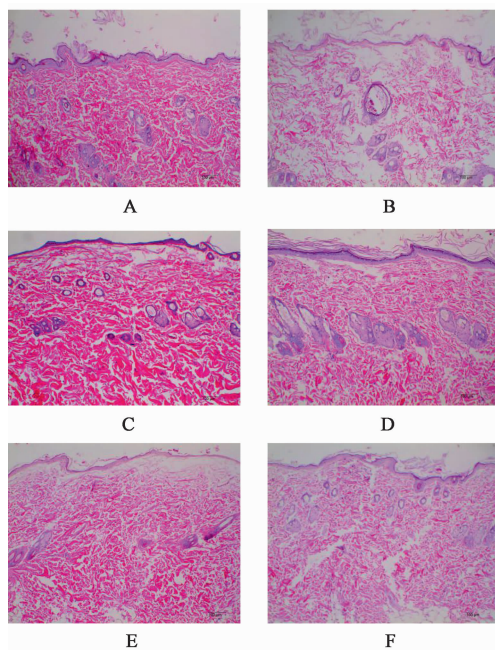
Table 2 Effect of Yupingfeng granule on scratching and severity of severity in CU rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	评分/分
正常	-	1.200 ± 1.032
模型	-	10.400 ± 1.349 <sup>1)</sup>
氯雷他定	0.000 9	5.000 ± 0.816 <sup>2)</sup>
玉屏风颗粒	4.05	6.700 ± 0.948 <sup>2)</sup>
	2.7	8.000 ± 1.054 <sup>2)</sup>
	1.35	8.500 ± 0.849 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 对 CU 大鼠表皮病理学变化的影响** 正常组可见大鼠皮肤组织表皮结构完整,厚薄均匀,表皮层基底细胞结构完整;真皮层胶原纤维排列整齐,粗细一致,胶原间隙紧密,胶原纤维染色均匀;毛囊结构正常,分布在真皮层,毛囊周围细胞排列整齐;毛细血管未见明显扩张及炎性细胞浸润,均未见明显的组织病理学变化。CU 模型大鼠皮肤组织表皮结构不完整,真皮水肿,真皮层乳头层胶原纤维排列紊乱,有浆液性渗出,胶原纤维染色变淡,胶原纤维间隙增宽,部分 CU 大鼠皮肤组织可见明显毛细血管扩张且血管周围有少量炎性细胞浸润。玉屏风颗粒和氯雷他定各组干预后, CU 大鼠皮肤组织的

病理形态均有不同程度改善,表现为真皮水肿减轻,胶原束距离缩小,毛细血管扩张减少。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 氯雷他定组; D. 玉屏风颗粒高剂量组; E. 玉屏风颗粒中剂量组; F. 玉屏风颗粒低剂量组(图 2~4 同)

图 1 玉屏风颗粒对 CU 大鼠表皮病理学变化的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Yupingfeng granule on pathological changes of epidermis in CU rats(HE, ×100)

**3.3 对 CU 大鼠皮肤组织肥大细胞及脱颗粒的影响** 正常组大鼠皮肤组织真皮层见少许肥大细胞,胞质呈异染性紫红色,呈圆形或卵圆形,胞体较小,分布较为分散,偶见脱颗粒现象。模型组 CU 大鼠皮肤组织肥大细胞数量明显增多,可见肥大细胞结构改变,呈崩解状,颗粒向四周分散,形态多样,脱颗粒的肥大细胞露出蓝色的细胞核,肥大细胞脱颗粒显著增多,同时伴见组织水肿,胶原束距离增宽且血管扩张明显。经玉屏风颗粒干预后, CU 大鼠皮肤组织可见肥大细胞数量减少、脱颗粒现象缓解、血管扩张减轻。见图 2。

**3.4 对 CU 大鼠皮肤组织 IL-23 表达的影响** 正常组大鼠皮肤组织见 IL-23 蛋白阴性表达或偶见 IL-23 弱阳性表达;模型组 CU 大鼠皮肤组织 IL-23 蛋白强阳性表达,位于细胞质,阳性细胞染色深,呈棕褐色至棕黄色;药物干预后, IL-23 蛋白表达较模型组均有不同程度的降低,阳性细胞染色数量减少、变浅,以高剂量组改善最显著。见图 3。与正常组比较,模型组 CU 大鼠皮肤组织 IL-23 蛋白和 mRNA 表达显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,氯雷他定组、玉屏风颗粒各组 CU 大鼠皮肤组织 IL-23 蛋白和

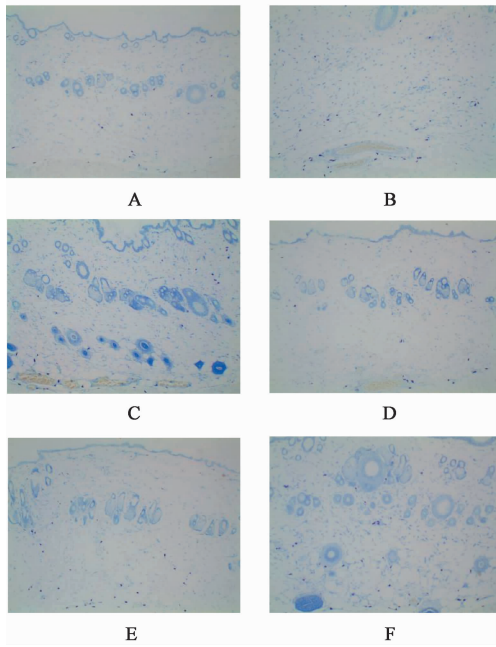


图 2 玉屏风颗粒对 CU 大鼠皮肤组织肥大细胞及脱颗粒的影响(甲苯胺蓝,  $\times 100$ )

Fig. 2 Effect of Yupingfeng granule on skin tissue mast cells and degranulation in CU rats (toluidine blue,  $\times 100$ )

mRNA 表达均明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与氯雷他定组比较, 玉屏风颗粒高剂量组 CU 大鼠皮肤组织 IL-23 蛋白和 mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与玉屏风颗粒低剂量组比较, 高剂量组 CU 大鼠皮肤组织 IL-23 蛋白和 mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 3。

**3.5 对 CU 大鼠皮肤组织 IL-17 表达的影响** 正常组大鼠皮肤组织 IL-17 阳性表达, 主要散在于细胞质; 模型组 CU 大鼠皮肤组织可见 IL-17 阳性细胞增多, 位于细胞质, 阳性细胞染色深, 呈棕褐色至棕黄色; 治疗组 CU 大鼠皮肤组织 IL-17 阳性细胞略有不同程度减少。见图 4。与正常组比较, 模型组 CU 大鼠皮肤组织 IL-17 蛋白 IA 和 mRNA 的表达显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各治疗组 CU 大鼠皮肤组织 IL-17 蛋白 IA 和 mRNA 表达有下降趋势, 但差异无统计学意义。见表 4。

#### 4 讨论

中医学源远流长, 荨麻疹在中医学中早有记载, 中医称之为瘾疹; 《黄帝内经·素问·四时刺逆从论》有: “少阳有余, 病皮瘾疹”, 《诸病源候论·风病诸候》云: “人皮肤虚, 为风邪折, 则起瘾疹。” 风邪外袭, 郁于肌表而发为风团, 瘙痒。瘾疹的反复发作与患者素体禀赋不足、气血虚弱、肌肤腠理不固密切相关, 临床多选用玉屏风散, 以达到益气固表、扶正祛

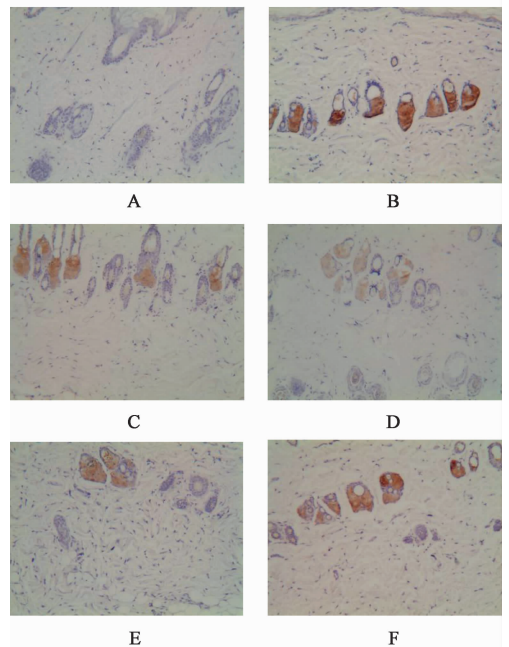


图 3 玉屏风颗粒对 CU 大鼠皮肤组织 IL-23 蛋白表达的影响(免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of Yupingfeng granule on protein expression of IL-23 in skin tissue of CU rats (IHC,  $\times 200$ )

表 3 玉屏风颗粒对 CU 大鼠皮肤组织 IL-23 蛋白和 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 3 Effect of Yupingfeng granule on expression of IL-23 protein and mRNA in skin tissue of CU rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	IA	mRNA
正常	-	0.597 $\pm$ 0.927	1.000 $\pm$ 0.131
模型	-	20.211 $\pm$ 2.062 <sup>1)</sup>	3.781 $\pm$ 0.499 <sup>1)</sup>
氯雷他定	0.000 9	14.782 $\pm$ 4.036 <sup>2)</sup>	3.060 $\pm$ 0.314 <sup>3)</sup>
玉屏风颗粒	4.05	9.594 $\pm$ 1.696 <sup>3,4,7)</sup>	1.606 $\pm$ 0.355 <sup>3,4,6)</sup>
	2.7	12.515 $\pm$ 2.936 <sup>3)</sup>	1.882 $\pm$ 0.738 <sup>3,5)</sup>
	1.35	14.936 $\pm$ 3.259 <sup>3)</sup>	2.420 $\pm$ 0.442 <sup>3,4)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; 与氯雷他定组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>5)</sup>  $P < 0.01$ ; 与玉屏风颗粒低剂量组比较<sup>6)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>7)</sup>  $P < 0.01$  (表 4 同)。

邪的功效。玉屏风散最早记载于宋代张松的《究原方》, 因该方有益气固表之功效, 且防风具有“屏风”之称, 故名玉屏风。玉屏风散以黄芪为君药, 具有补气升阳的作用同时兼以固表, 白术为臣药健脾益胃, 更助黄芪固表之功, 防风为佐解表祛风, 善祛在表之风邪, 助芪术达到益气之功, 三药同用, 补中寓散, 使固表之功益甚, 表固则邪无以干, 同时黄芪还有一定的免疫调节作用, 防风能有一定的免疫调节与抗菌消炎的功效<sup>[28-29]</sup>。本次实验成功复制 CU 大鼠模型, HE 染色可见模型组 CU 大鼠皮肤组织表皮正

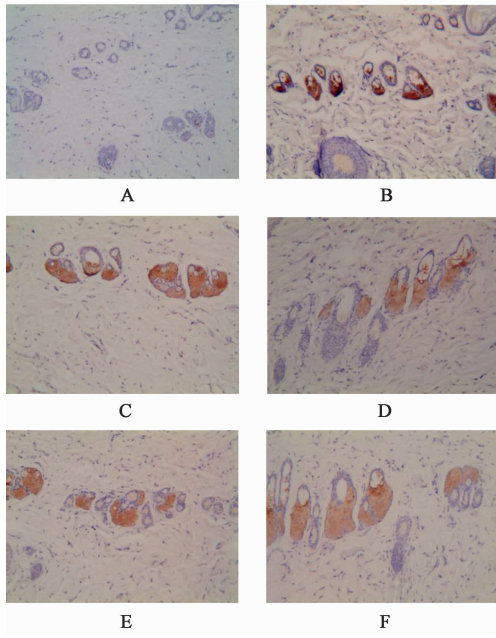


图 4 玉屏风颗粒对 CU 大鼠皮肤组织 IL-17 表达的影响 (免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 4 Effect of Yupingfeng granule on protein expression of IL-17 in skin tissue of CU rats(IHC,  $\times 200$ )

表 4 玉屏风颗粒对 CU 大鼠皮肤组织 IL-17 蛋白和 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of Yupingfeng granule on expression of IL-17 protein and mRNA in skin tissue of CU rats( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IA	mRNA
正常	-	1.427 $\pm$ 1.367	1.000 $\pm$ 0.103
模型	-	20.334 $\pm$ 2.028 <sup>1)</sup>	2.279 $\pm$ 0.295 <sup>1)</sup>
氯雷他定	0.000 9	20.112 $\pm$ 3.491	2.141 $\pm$ 0.222
玉屏风颗粒	4.05	17.954 $\pm$ 3.419	1.953 $\pm$ 0.629
	2.7	19.449 $\pm$ 2.125	2.124 $\pm$ 0.972
	1.35	19.390 $\pm$ 1.906	2.111 $\pm$ 0.506

常,真皮水肿、胶原束距离增宽,毛细血管扩张且血管周围有少量炎性细胞浸润,甲苯胺蓝染色中,模型组 CU 大鼠皮肤组织中肥大细胞脱颗粒明显增加。经过玉屏风颗粒和氯雷他定干预后, CU 大鼠皮肤组织病理表现均有不同程度改善。说明玉屏风颗粒能缓解 CU 大鼠皮肤组织炎症状态。

肥大细胞脱颗粒释放炎症介质是荨麻疹的主要病理过程。肥大细胞产生的 IL-6, TNF 等可诱导 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化成 Th17,肥大细胞来源的细胞因子甚至还可以将 Treg 转化成 Th17<sup>[30-31]</sup>。发生双相反应后的肥大细胞可释放多种介质,包括 IL-17 和 IL-12<sup>[17]</sup>,可影响 IL-23 的释放及炎症的发展。本研

究甲苯胺蓝染色结果表明,模型组 CU 大鼠皮肤组织中肥大细胞脱颗粒较正常大鼠皮肤组织显著升高,同时,玉屏风颗粒能不同程度抑制肥大细胞脱颗粒,减轻 CU 大鼠皮肤组织炎症反应。

IL-23 属于 IL-12 细胞因子家族成员,其主要作用是促进 CD4<sup>+</sup>T 细胞炎性细胞因子的分泌并增加分化的 Th17 细胞的数量,维持其存活率和调节 IL-17 的水平<sup>[15]</sup>,IL-17 可通过参与中性粒细胞的增殖、成熟与分化,诱导巨噬细胞、上皮细胞、内皮细胞等分泌各种细胞因子来发挥作用,IL-23 与 IL-17 形成炎症轴。有学者发现某些病理情况下机体 IL-23/IL-17 炎症轴激活,促进机体炎症反应,在免疫性疾病中发挥重要作用<sup>[32]</sup>。在临床研究中表明<sup>[22-23,33-34]</sup>,CU 患者血清中 IL-23, IL-17 水平较正常人明显升高,表明 IL-23/IL-17 炎症轴在自身免疫性疾病的发病机制中占有重要地位。本次研究发现,模型组 CU 大鼠皮肤组织中的 IL-23 mRNA 及蛋白表达较正常大鼠显著升高,表明 IL-23 上调可能为促进 CU 炎症反应的重要因素。同时,中药治疗组 IL-23 mRNA 及蛋白表达显著下降,结合 IL-23 是炎症反应调控的重要生物学标志物,提示玉屏风颗粒可显著下调 IL-23 水平,良性调节皮肤炎症反应继而抑制 CU 病理状态。

同时,本次实验也发现玉屏风颗粒对 IL-17 无明显的调控作用,分析其可能存在原因如下,①这可能由于卵白蛋白、氢氧化铝凝胶和百白破疫苗诱导的是一个暂时的炎症爆发,细胞因子 mRNA 表达水平随着致敏时间呈动态的变化。②玉屏风颗粒中药复方,其药理成分复杂,可能存在功效强但含量较低的药效成分,或复方药效成分在不同时段发挥不同作用,导致其对 IL-17 影响不明显。③可能也是由于皮损采集时间错过了 IL-17 的峰值表达时间,致玉屏风颗粒的抑制作用难以显现。此外,T 细胞发挥作用的效能多种多样,因此,对于玉屏风颗粒调控 IL-23/IL-17 炎症轴的详细生物学机制还需要进一步实验探索。

综上所述, CU 模型大鼠皮肤组织可见荨麻疹样病理改变、肥大细胞脱颗粒增多,并伴见 IL-23, IL-17 表达上调,提示 IL-23/IL-17 炎症轴活跃在 CU 的发病中起着重要作用。玉屏风颗粒可显著减轻 CU 大鼠皮肤组织肥大细胞脱颗粒,改善真皮水肿、浆液性渗出、炎性细胞浸润等病理表现,其机制可能与其抑制 IL-23 促炎细胞因子而遏制 CU 荨麻疹样病变有关。

[参考文献]

- [1] LEZNOFF A. urticaria and angioedema [J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2012, 2(2): 272.
- [2] ZUBERBIER T, ASERO R, BINDSLEV-JENSEN C, et al. EAACI/GA2LEN/EDF/WAO guideline: definition, classification and diagnosis of urticaria [J]. Allergy, 2009, 61(3): 1417-1426.
- [3] HUANG X, LI Z, SUN R. Synergistic actions of histamine-releasing factor and histamine releasing factor-reactive Ig E in chronic urticaria [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2017, 172(1): 27-32.
- [4] SACKESSEN C, SEKERELE B E, ORHAN F, et al. The etiology of different forms of urticaria in childhood [J]. Pediatr Dermatol, 2004, 21(2): 102-108.
- [5] 孙诗黠, 何文丽. 慢性自发性荨麻疹发病机制及治疗研究进展 [J]. 西南国防医药, 2017, 27(10): 1141-1143.
- [6] 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.
- [7] 梁绮敏. 加味玉屏风治疗慢性荨麻疹表虚不固证的临床效果 [J]. 中国医药科学, 2017, 7(3): 74-76.
- [8] 曾文军, 王柳均, 徐彦春, 等. 玉屏风散加味方联合咪唑斯汀治疗慢性荨麻疹临床观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 17(21): 2883-2884.
- [9] 赵春华, 金艺, 钱晓莺, 等. 枸地氯雷他定联合玉屏风颗粒治疗慢性荨麻疹疗效观察 [J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(9): 74-77.
- [10] 孙彬, 刘文珊, 李宏坤. 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.
- [11] FERRER M, LUQUIN E, SANCHEZ-IHARROLA A, et al. Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2002, 129(3): 254-260.
- [12] 毛长智, 何俊慧, 李冬梅. 拟黑多刺蚁活性组分对系统性红斑狼疮的治疗作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 65-70.
- [13] REBER L L, FROSSARD N. Targeting mast cells in inflammatory diseases [J]. Pharmacol Ther, 2014, 142: 416-435.
- [14] GRI G, PICONESI S, FROSSI B, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction [J]. Immunity, 2008, 29(5): 771-781.
- [15] TAHERIAN M, RAZAVI A R, IZAD M, et al. The role of interleukin-23 in stability of *in vitro* T helper-17 cells [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2014, 13(2): 131-137.
- [16] MIOSSEC P, KORN T, KUCHROO V K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells [J]. N Eng J Med, 2009, 361(9): 888-898.
- [17] DA SILVA E Z, JAMUR M C, OLIVER C. Mast cell function: a new vision of an old cell [J]. J Histochem Cytochem, 2014, 62(10): 698-738.
- [18] DOS SANTOS J C, AZOR M H, NOJIMA V Y, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic idiopathic urticaria [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(10): 1433-1440.
- [19] DASCHNER A, RODERO M, DE FRUTOS C, et al. Different serum cytokine levels in chronic vs. acute Anisakis simplex sensitization-associated urticaria [J]. Parasite Immunol, 2011, 33(6): 357-362.
- [20] 沈斌, 冷建杭, 王克义, 等. 慢性特发性荨麻疹患者外周血调节性 T 细胞和 IL-17 水平的研究 [J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(12): 871-872.
- [21] KOM T, BETTELLI E, OUKKA M, et al. IL-17 and Th17 cells [J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 485-517.
- [22] 何沅莉, 单葵, 曹雨微, 等. 慢性荨麻疹患者血清 IL-17, IL-23 TGF- $\beta$  水平检测分析 [J]. 现代医药卫生, 2018, 34(3): 364-365, 368.
- [23] LIN W, ZHOU Q, LIU C, et al. Increased plasma IL-17, IL-31, and IL-33 levels in chronic spontaneous urticaria [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17797.
- [24] 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.
- [25] 国家食品药品监督管理局. 《中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光过敏反应)研究的技术指导原则》[S]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2005.
- [26] 陈文培, 张子扬, 周成浩, 等. 大鼠被动皮肤过敏反应实验条件的优化 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(7): 747-753.
- [27] 苗明三, 温亚娟, 曹利华. 瘙痒动物模型制备规范(草案) [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(2): 610-613.
- [28] 江小燕, 王慧珠, 桂黎黎, 等. 升麻素通过调节 2 型细胞因子抑制过敏性炎症 [J]. 中国药理与临床, 2014, 30(2): 28-30.
- [29] 郑伟, 灏覃, 骊兰, 等. 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.
- [30] WALKER M E, HATFIELD J K, BROWN M A. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action? [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(1): 57-65.
- [31] XU Y, CHEN G. Mast cell and autoimmune diseases [J]. Mediators Inflamm, 2015, doi: 10. 1155/2015/246126.
- [32] XU C, HAO K, YU L, et al. Serum interleukin-17 as a diagnostic and prognostic marker for non-small cell lung cancer [J]. Biomarkers, 2014, 19(4): 287-290.
- [33] 李瑞祥, 梁碧华, 杨婧, 等. 慢性自发性荨麻疹患者血清 IL-17、IL-23 水平的检测及意义 [J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2013, 20(1): 19-21.
- [34] 张杰, 窦侠, 邵勇, 等. IL-17/IL-23 炎症轴在慢性自发性荨麻疹中的表达及临床意义 [J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2015, 22(2): 102-104.

[责任编辑 周冰冰]