

当归饮子加减方对气血两虚模型小鼠迟发型超敏反应的影响

王栩芮¹ 周 策¹ 钟振东² 段 渠³ 杜艾媛³ 郭 静³

摘要 **目的** 探讨当归饮子对气血两虚型小鼠迟发型超敏变态反应的影响。**方法** SPF 级 KM 小鼠 48 只,其中 40 只采用利血平及乙酰苯胍制作动物气血两虚模型,随机分为模型组、氯雷他定组、当归饮子高剂量组、当归饮子中剂量组、当归饮子低剂量组,每组 8 只;另取 8 只相同标准小鼠作空白组。当归饮子高、中、低剂量组给予小鼠 60、30、15 g/kg 当归饮子加减方提取浓缩液灌胃,氯雷他定组给予 1.66 mg/kg 氯雷他定生理盐水溶液灌胃,模型组和空白组小鼠给予等体积生理盐水灌胃。每日 1 次,连续给药 1 周。除空白组外,每只小鼠腹部用 1% DNCB 溶液均匀涂抹进行致敏,致敏后第 5 天,将 1% DNCB 溶液均匀涂抹于小鼠右耳进行攻击,空白组同样涂耳但未致敏,攻击后 24 h,测定每组小鼠耳廓肿胀度及抑制率。各组实验动物眼眶取血,采用双抗夹心 ELISA 法测试血清中 IgE 水平。**结果** 与空白组比较,模型组耳肿胀度明显增加,IgE 水平升高($P < 0.01$);与模型组比较,氯雷他定组及当归饮子 3 个剂量组耳肿胀度降低,IgE 水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),同时当归饮子高、中剂量组耳肿胀度降低优于氯雷他定组($P < 0.05$)。用药各组耳廓肿胀度抑制率从高至低依次为:当归饮子高剂量组 67.3%,当归饮子中剂量组 56.0%,当归饮子低剂量组 48.1%,氯雷他定组 47.3%。**结论** 当归饮子方能抑制小鼠耳廓肿胀反应,降低血清中 IgE 水平,对气血两虚证小鼠迟发型超敏反应有一定抑制作用。

关键词 当归饮子;气血两虚证;迟发型变态反应

Effect of Modified Danggui Yinzi on Delayed Allergy in Model Mice with Qi-Blood Deficiency Syndrome WANG Xu-rui¹, ZHOU Ce¹, ZHONG Zhen-dong², DUAN Qu³, DU Ai-yuan³, and GUO Jing³
1 Clinical Medical College, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu (610075); 2 Institute of Laboratory Animal, Sichuan Academy of Medical Sciences, People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu (610075); 3 Faculty of TCM Surgery, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu (610075)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Danggui Yinzi (DY) on delayed allergy in model mice with qi-blood deficiency syndrome (QBDS). **Methods** QBDS model was established in 48 Kuming mice of SPF grade by using reserpine and acetophenone hydrazine. Forty of them were then randomly divided into the model group, the loratadine group, the high dose DY group, the middle dose DY group, and the low dose DY group, 8 in each group. Another 8 in line with the same standard were recruited as a blank group. Mice in high, middle, and low dose DY groups were administered with DY concentrated solution at 60, 30, 15 g/kg by gastrogavage. Mice in the loratadine group were administered with loratadine solution at 1.66 mg/kg by gastrogavage. Equal volume of normal saline was administered to mice in the model group and the blank group by gastrogavage. All medication was given once per day for 1 successive week. Except those in the blank group, the rest mice were evenly smeared with 1% DNCB solution

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81302982);国家自然科学基金面上项目(No. 81573986);四川省科技厅科技支撑项目(No. 2014SZ0090);四川省教育厅科研基金项目(No.15ZA0085);成都市科技局科研基金项目(No.2014-HM01-00133-SF);成都市卫生局科学研究基金项目(No.2014091)

作者单位:1.成都中医药大学临床医学院(成都 610075);2.四川省人民医院四川省医学科学院实验动物研究所(成都 610075);3.成都中医药大学中医外科教研室(成都 610075)

通讯作者:郭 静, Tel:18980880167, E-mail:80620404@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.03.0345

on the abdomen. Five days after skin allergy, 1% DNCB solution was smeared to right ear of all mice to stimulate allergic reaction. Mice in the blank group were smeared in the same way without allergenic reaction. The auricle swelling and the inhibition ratio were determined at 24 h after attack. Blood was collected from orbit and serum IgE level detected using double-antibody sandwich ELISA. Results Compared with the blank group, auricle swelling obviously increased and serum IgE level was obviously elevated in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, auricle swelling obviously decreased and serum IgE level was obviously reduced in the 3 dose DY groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Meanwhile, the auricle swelling degree was superior in high and middle dose DY groups to that in the loratadine group ($P < 0.05$). The inhibition ratio of auricle swelling was sequenced from high to low as 67.3% in the high dose DY group, 56.0% in the middle dose DY group, 48.1% in the low dose DY group, 47.3% in the loratadine group. Conclusions DY could inhibit auricle swelling and lower serum IgE level. It also could inhibit delayed allergic reaction in model mice with QBDS to some extent.

KEYWORDS Danggui Yinzi; qi-blood deficiency syndrome; delayed allergy

荨麻疹是世界范围内广泛存在的一种自身免疫性皮肤病,临床表现以皮肤、黏膜的局限性潮红斑及风团为主,且常有明显瘙痒。荨麻疹发病机制主要有免疫性和非免疫性两种^[1]。荨麻疹发病机制与免疫关系密切,主要涉及到变应原血清 IgE、炎症细胞等。本研究拟以当归饮子方对气血两虚型小鼠耳廓迟发型超敏反应(delayed type hypersensitivity, DTH)的影响,为临床治疗慢性荨麻疹提供药理学依据。

材料与方

1 动物 SPF 级 KM 小鼠,雌雄各半,48 只,体重 18~22 g,成都达硕生物科技有限公司,合格证号:SCXK(111)2008-24。

2 药物 当归饮子组成为:当归、川芎、生地、黄芪、鸡血藤、白芍各 15 g,僵蚕、刺蒺藜、制首乌、蝉蜕各 9 g,另加地肤子 12 g,防风 18 g。药材取 3 倍水用砂锅煎 1~1.5 h 至 1 倍水,取出滤液后,加适量水复煎 0.5 h 后滤出,合并 2 次滤液,静置 6 h,加热上清液浓缩成 6 g/mL 的水煎剂待用。氯雷他定片,10 mg/片,江苏恒瑞制药股份有限公司,批号:101119。将药片研磨成粉末加入生理盐水配成 1 mg/mL 溶液待用。

3 试剂及仪器 利血平,成都科伦医药贸易公司,批号:20101112;乙酰苯肼,太极集团,批号:20110208;2,4-二硝基氯苯(dinitrochlorobenzene, DNCB),成都科龙化工试剂厂,批号:100910;IgE ELISA 试剂盒, Sigma 公司,批号:S20110121。电子天平,上海良平仪器仪表有限公司,型号:FA1004;切片机,德国克林蓝公司,型号:徕卡-2015;手术剪、镊、解剖板等。

4 分组、造模及给药 将 40 只 KM 小鼠采用随

机区组法将动物随机分为模型组、氯雷他定组、当归饮子方高、中、低剂量组,每组 8 只。造模过程为:腹侧皮下注射 0.3 mL/kg 利血平溶液 1 次,7 天致小鼠气虚,同时,第 1、4、7 天按每只 6 mg 注射 2% 乙酰苯肼可致小鼠血虚^[2]。另选 8 只相同标准的实验小鼠作空白组。在造模同时当归饮子方高、中、低剂量组给予小鼠 60、30、15 g/kg 当归饮子加减方提取浓缩液(分别相当于成人临床用量的 12、6、3 倍)灌胃,氯雷他定组小鼠给予 1.66 mg/kg 氯雷他定生理盐水溶液,模型组和空白组小鼠给予等体积生理盐水灌胃。各组动物均连续灌胃给药或生理盐水 12 天,每天 1 次,在造模及给药过程中无小鼠死亡。

5 DTH 过程 将 5 mL 丙酮麻油溶液与 50 mg DNCB 混匀后形成 1% DNCB 溶液,密封。使用时用 250 μ L 注射器取用。连续给药 1 周后,除空白组外,将各组小鼠腹部去毛,大小约 3 cm \times 2 cm,均匀涂抹 1% DNCB 溶液进行致敏。致敏后第 5 天将 DNCB 0.4 mL 涂于各组小鼠右耳正反两侧进行攻击,空白组同样涂耳但未致敏。

6 小鼠耳廓肿胀度及平均抑制率检测 攻击后 24 h 后小鼠断颈处死,用直径 9 mm 的打孔器分别在左右耳同一部位打下圆耳片,称重,根据左右耳片重量计算肿胀度、抑制率。肿胀度和炎症抑制百分率计算公式:肿胀度 = 右耳重量 - 左耳重量;抑制率(%) = (正常组肿胀度 - 给药组肿胀度) / 正常组肿胀度 \times 100%。

7 IgE 水平检测 处死小鼠后眼眶取血 2 mL,分离血清,采用双抗夹心 ELISA 法测试血清中 IgE 含量。

8 统计学方法 采用 SPSS 13.5 软件进行统计分析,所有数据统计处理采 t 检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组耳廓肿胀度及抑制率比较(表 1) 与空白组比较,模型组耳廓肿胀度明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,氯雷他定组及当归饮子 3 个剂量组耳廓肿胀度均明显降低($P < 0.01$),同时当归饮子高、中剂量组耳廓肿胀度降低优于氯雷他定组($P < 0.05$)。用药各组耳廓肿胀度抑制率从高至低依次为:当归饮子高剂量组 67.3%,当归饮子中剂量组 56.0%,当归饮子低剂量组 48.1%,氯雷他定组 47.3%。

表 1 各组耳廓肿胀度及 IgE 水平结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	耳肿胀度(mg)	IgE(ng/mL)
空白	8	2.07 ± 0.24	1.9301 ± 0.2522
模型	8	13.02 ± 0.51*	9.3127 ± 0.3909*
氯雷他定	8	6.85 ± 0.42 ^{△△}	3.0168 ± 0.2586 ^{△△}
当归饮子高剂量	8	4.14 ± 0.10 ^{△△△}	3.1731 ± 0.2841 ^{△△}
当归饮子中剂量	8	5.92 ± 0.07 ^{△△△}	5.7299 ± 0.2769 [△]
当归饮子低剂量	8	6.75 ± 0.18 ^{△△}	6.3782 ± 0.8955 [△]

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与氯雷他定组比较,[▲] $P < 0.05$

2 各组 IgE 水平比较(表 1) 与空白组比较,模型组 IgE 水平明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,氯雷他定组及当归饮子 3 个剂量组 IgE 水平均有降低,其中氯雷他定组和当归饮子高剂量组最明显($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

中医学将荨麻疹称为“瘾疹”,《证治准绳·风门》^[3]中有记载:“夫邪热客于皮肤,遇风寒所伤则起瘾疹,热多则色赤,风多则色白,甚者痒痛,搔之则成疮。”归结起来,慢性荨麻疹的病因以风邪为主,可兼夹有寒、湿、热邪,故临床常以皮肤瘙痒为主症。病程日久,邪气与卫气交争,“卫气出于中焦”,则不断损坏脾胃中焦之气。脾胃为后天之本,气血生化之源,脾胃已伤,则化源不足,最终形成气血两虚。气虚卫外不固,血虚不能濡养肌肤,兼血虚生风,风邪逗留肌肤,而出现风团、瘙痒等症。因此,气血两虚是慢性荨麻疹转归过程中的关键病机,随着病情发展,久病入络,则因虚成瘀;气血亏虚,运行不畅,还可因虚成痰湿等而成虚实夹杂之证。然而气血两虚始终是慢性荨麻疹之根本病机。

当归饮子是出自明·王肯堂的《证治准绳》的方剂,其中当归,川芎,白芍,生地活血养血、和血通络,营血调和,滋阴以治久病伤津耗气,营卫不和之本,为君药。制首乌、鸡血藤益养血润燥,黄芪补气运血、托毒

外泄,为臣药,共助君药。防风,地肤子疏风止痒,为臣药。白藜芦疏泄肝风。僵蚕,蝉衣属虫类药,病久者以其搜风入络,搜剔化瘀通络药。全方系由四物汤和玉屏风散化裁,以活血养血、祛风益气、养血润燥、搜剔化瘀通络药物而成,故可治养血治血通络为主,有息风止痒之功。因此,后世医家多在原方基础随证加减治疗各型荨麻疹^[4]。

荨麻疹的发病机制非常复杂,涉及到许多炎症细胞、细胞因子和化学递质,它们互相牵制,互相影响,构成一个复杂的免疫网络,其中心环节是肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒,释放组胺和其他炎性因子和介质,引起一系列病理生理变化。近年来,越来越多的实验发现,无明显原因发作的慢性荨麻疹患者血清中 IL-4 水平明显高于正常,而 IFN- γ 水平又较低^[5]。这将人们探索荨麻疹发病的视线从体液免疫异常拉向细胞免疫的功能紊乱的研究中,而其中 Th1、Th2 细胞失衡的学说得到众多学者的青睐^[6]。尽管慢性荨麻疹发病过程中出现的持续性炎症尚未完全明确机制,但本实验结果证实了当归饮子可有效抑制致敏小鼠耳肿胀,降低其血清中 IgE 水平。同时,也有学者发现与当归饮子可显著减少动物外周血嗜酸性粒细胞及血管壁组织 IL-4,升高 IFN- γ 表达量^[2],这表明当归饮子方对小鼠耳廓迟发型变态反应具有明显的抑制作用,对临床应用当归饮子加减方治疗气血两虚型荨麻疹提供了宝贵依据。而本实验所选取的模型为模拟 IV 型过敏反应,与慢性荨麻疹的实际发病表现及发病机制仍有少部分差异,期望通过更多研究制定国际通用的慢性荨麻疹动物模型。

参 考 文 献

- [1] 赵辨主编. 临床皮肤病学[M]. 江苏科学技术出版社, 2001:613-614.
- [2] 郭静, 艾儒棣, 朱晓燕. 当归饮子对复合型慢性荨麻疹致敏小鼠模型细胞因子的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(2): 159-161.
- [3] 王肯唐. 证治准绳·风门[M]. 中国中医药出版社, 1999:226.
- [4] 刘传玲. 艾儒棣教授治疗荨麻疹的经验[J]. 四川中医, 2009, 27(3): 7.
- [5] 党倩丽, 陆学东, 张小艳. 慢性荨麻疹患者血清 IL-4、IFN- γ 及 IgE 水平观察[J]. 临床皮肤科杂志, 2000, 29(4): 14-15.
- [6] 吴伊旋, 沈惠风. 慢性荨麻疹部分发病机制的研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2008, 37(2): 136-137.

(收稿:2014-11-30 修回:2015-12-28)