

## · 基础研究 ·

# 固本抗敏方对荨麻疹小鼠皮肤肥大细胞脱颗粒的影响

刘丽娟<sup>1</sup> 赵瑞芝<sup>1</sup> 卢传坚<sup>2,3</sup>

**摘要** **目的** 探讨固本抗敏方治疗荨麻疹的作用机制。**方法** 将 40 只 BALB/c 小鼠根据体重随机数字表法分为空白组(6 只)、模型组(7 只)、固本抗敏方低、中、高剂量组(各 7 只)和氯雷他定组(6 只)。采用皮下注射卵清蛋白和氢氧化铝混悬液构建荨麻疹模型,观察固本抗敏方对模型小鼠皮肤肥大细胞脱颗粒影响,测定脾指数、胸腺指数及血清免疫球蛋白 E(IgE)、干扰素- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )、IL-4 及 IL-10 表达量。**结果** 模型组肥大细胞脱颗粒明显,各给药组肥大细胞脱颗粒数显著降低,脾指数、胸腺指数和血清中 IgE 水平显著降低( $P<0.01$ ),固本抗敏方不同剂量组血清中 IL-4 表达量显著降低、INF- $\gamma$  表达量显著升高( $P<0.01$ )。**结论** 固本抗敏方可通过下调血清中 IgE 表达量,升高 INF- $\gamma$  表达量,减少 IL-4 分泌,进而抑制皮肤肥大细胞脱颗粒,稳定肥大细胞,以达到防治荨麻疹的作用。

**关键词** 荨麻疹;肥大细胞脱颗粒;血清免疫球蛋白 E;干扰素- $\gamma$ ;白介素-4;固本抗敏方

**Effects of Guben Kangmin Decoction on Degranulation of Mast Cells in Urticaria Model Mice** LIU Li-juan<sup>1</sup>, ZHAO Rui-zhi<sup>1</sup>, and LU Chuan-jian<sup>2,3</sup> 1 TCM Property Theory Innovative Research Team, Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510006); 2 Department of Dermatology, Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510120); 3 Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou (510120)

**ABSTRACT** **Objective** To study the possible mechanism of Guben Kangmin Decoction (GBKMD) in treating urticaria. **Methods** A total of 40 BALB/c mice were divided into blank group ( $n=6$ ), model group ( $n=7$ ), low, medium and high dose GBKMD groups ( $n=7$ ), and Loratadine group ( $n=6$ ) by random digit table. The chronic urticaria-like BALB/c mouse model was established by OVA and Al-U-Creme. The degranulation of skin mast cells, the spleen index, and thymus index were studied, and serum expressions of IgE, INF- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 were determined. **Results** Degranulation of mast cells was obviously seen in the model group. The number of degranulation of mast cells significantly decreased in each medicated group. The spleen index, thymus index, and the IgE expression in serum significantly decreased in each medicated group ( $P<0.01$ ). The expression of IL-4 in serum significantly decreased, INF- $\gamma$  expression significantly increased in each GBKMD group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** GBKMD treated and prevented urticaria possibly by down-regulating the expression of IgE, increasing the expression of INF- $\gamma$ , and reducing the secretion of IL-4 in the serum, thus inhibiting the degranulation of skin mast cells and stabilizing mast cells.

**KEYWORDS** urticaria; the degranulation of mast cells; IgE; INF- $\gamma$ ; IL-4; Guben Kangmin Decoction

基金项目: 国家中医药管理局“岐黄工程”项目(No.国中医药办人教函(2019)62号); 广东省科技计划项目(No.2017B030314166)

作者单位: 1. 广州中医药大学第二附属医院中药药性理论现代阐释创新团队(广州 510006); 2. 广州中医药大学第二附属医院皮肤科(广州 510120); 3. 广东省中医证候临床研究重点实验室(广州 510120)

通讯作者: 卢传坚, Tel: 020-81887233 转 31223, E-mail: luchuanjian888@gzhtcm.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20200303.143

慢性荨麻疹是一种以反复发作的风团瘙痒, 伴或不伴血管性水肿、持续 6 周以上为特征的常见疾病, 其反复发作, 瘙痒难忍, 严重影响着患者的生活质量<sup>[1, 2]</sup>。目前指南推荐使用的抗组胺药物在部分患者中治疗效果并不理想, 二线治疗方案包括加大抗组胺药物剂量, 或与免疫抑制剂、糖皮质激素联用, 其价格昂贵、不良反应剧烈, 且疗效欠佳、极易复发<sup>[3-6]</sup>, 故寻找安全有效的药物治疗尤为重要。

“岐黄学者”卢传坚教授根据慢性荨麻疹发病机制与规律拟定固本抗敏方。该方具有健脾温肾, 祛风化湿作用<sup>[7]</sup>, 在临床使用了十余年, 对慢性荨麻疹疗效显著, 且可降低复发率, 并无临床不良反应报道, 提示该方具有良好的开发前景<sup>[8]</sup>。为验证固本抗敏方药效, 探讨其作用机制, 为进一步开发奠定基础, 本实验采用卵清蛋白多次致敏的荨麻疹小鼠模型进行药理学研究, 现报道如下。

## 材料与方 法

1 动物与分组 SPF 级 BALB/c 小鼠 40 只, 雌雄各半, 体质量 (20±2) g, 购自广东省医学实验动物中心, 生产许可证号 SCXK(粤)2013-0002。实验动物饲养于广东省中医院屏障环境动物房, 室温 20~25℃, 相对湿度 40%~70%, 12 h/12 h 昼夜明暗交替。本实验经广东省中医院伦理委员会审批 (No. 2018040)。40 只 BALB/c 小鼠, 根据体重随机数字表法分为空白组 (6 只)、模型组 (7 只)、固本抗敏方低、中、高剂量组 (各 7 只)、氯雷他定组 (6 只)。

2 药物 固本抗敏方由干姜、黄芪、防风、白鲜皮按 2:6:1:1 组成, 饮片均购于广东省中医院药房, 经陈文良主管药师鉴定符合《中国药典》2015 年版项下标准。煎制法: 将药物放入圆底烧瓶加 10 倍量水浸泡 30 min, 回流提取, 以武火煮沸, 后文火微沸 1 h, 趁热将药液滤出, 剩余药渣以同法煎煮后滤出药液, 合并两次药液并浓缩至 1.379 g/mL, 备用。氯雷他定片, 每片 10 mg, 拜耳医药 (上海) 有限公司, 产品批号: LJS08307, 使用时加纯水配制成 0.129 mg/mL, 置 4℃冰箱中冷藏备用。

3 主要试剂和仪器 卵清蛋白, 批号: SL-BQ9036V, Sigma 公司产品; 氢氧化铝, 批号: 20180502, 购自天津福晨化学试剂厂; 肥大细胞染色液 (甲苯胺蓝法), 批号: L31J10G94293, 购自上海源叶生物科技有限公司; Mouse IL-4 quantikine ELISA Kit (批号: P200239) 和 Mouse interferon (INF)- $\gamma$  quantikine Elisa Kit (批号: P197375) 购自 R&D systems;

小鼠免疫球蛋白 E (IgE, 批号: Y05010876) 和小鼠 IL-10 (批号: Y05010876) 酶联免疫试剂盒, 购自武汉华美生物科技有限公司。万分之一电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; Leica TP1020 脱水机, Leica EG1160 包埋机, Leica SM2000 滑动切片机, 德国徕卡仪器有限公司产品; BX53 电子显微镜, 日本 Olympus 公司; 5430R 低温离心机, 美国 Eppendorf 公司; M1000pro 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司。

4 造模和给药方法 模型组和药物组小鼠分别在 0、7、14、21 天皮下注射含 50  $\mu$ g 卵清蛋白和 1.5 mg 氢氧化铝混悬液 0.5 mL 致敏<sup>[9]</sup>, 于第 19 天开始给药, 固本抗敏方组按成人 (60 kg) 临床所用剂量作为中剂量<sup>[8]</sup>, 临床剂量的 0.5 倍和 2 倍分别作为固本抗敏方低和高剂量组, 即固本抗敏方低、中、高剂量及氯雷他定组每天分别按 6.89、13.79、27.58 g/kg 及 1.29 mg/kg 灌胃, 空白组和模型组给予等体积纯水灌胃, 每天 1 次, 连续 7 天, 第 25 天腹腔注射 1% 卵清蛋白 0.5 mL, 3 h 后取材。

## 5 观察指标及检测方法

5.1 观察一般情况 每次致敏后观察并记录小鼠精神状态、呼吸、皮毛、饮食、大小便情况, 有无抓挠瘙痒等症状。

5.2 脾指数与胸腺指数的测定 取小鼠脾脏和胸腺, 使用电子天平精密称定, 按照公式<sup>[10]</sup>计算各组小鼠脾指数和胸腺指数。脾指数 = 脾脏重量 (mg) / 小鼠体重 (10 g), 胸腺指数 = 胸腺重量 (mg) / 小鼠体重 (10 g)。

5.3 小鼠皮肤肥大细胞脱颗粒计数 参照参考文献 [11, 12], 取小鼠背部中线 3 cm×2 cm 区域皮肤, 制石蜡切片, 脱蜡, 甲苯胺蓝染色, 显微镜下控制呈色后透明、封片。通过高倍镜计数 100 个肥大细胞中脱颗粒细胞数, 计算抑制率。抑制率 (%) = (1 - 给药组脱颗粒率 / 模型组脱颗粒率) × 100%。

5.4 血清 IgE、INF- $\gamma$ 、IL-4 及 IL-10 表达量测定 按照试剂盒说明书操作, 用多功能酶标仪检测血清 IgE、INF- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-10 的吸光度, 根据标准曲线方程计算血清中各指标的浓度。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较若方差齐性选择 LSD, 方差不齐则使用 Dunnett's T3 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 小鼠一般情况 小鼠初次致敏后, 未发现小鼠有异常行为, 再次致敏后, 模型组小鼠出现不同程度的

抓耳挠腮、烦躁不安、易惊、皮毛光泽度变差、23.53% (8 只) 小鼠背部皮肤出现皮损等阳性反应, 皮损部位呈暗红色, 以点状凸起、结痂为主; 第 3 次致敏后, 阳性反应更为显著, 58.82% (20 只) 小鼠背部出现皮损, 符合荨麻疹模型表现。给药后小鼠症状相对减轻, 空白组小鼠无上述表现。

2 小鼠脾指数和胸腺指数比较(表 1) 与空白组比较, 模型组脾指数和胸腺指数均显著升高 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。与模型组比较, 固本抗敏方低、中、高剂量组及氯雷他定组脾指数和胸腺指数均显著降低 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。各给药组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 其中固本抗敏方中、高剂量组的脾指数和胸腺指数与氯雷他定组更相近。

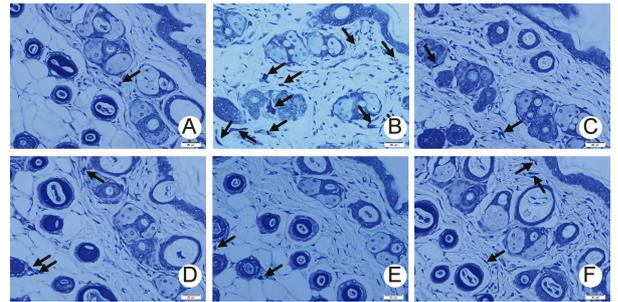
表 1 各组小鼠脾指数、胸腺指数比较 (0.1 mg/g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	脾指数	胸腺指数
空白	6	38.70±7.00	15.17±3.93
模型	7	52.44±6.08 <sup>*</sup>	23.47±8.25 <sup>*</sup>
固本抗敏方低剂量	7	40.42±3.19 <sup>△△</sup>	16.99±4.42 <sup>△</sup>
中剂量	7	37.15±3.78 <sup>△△</sup>	13.88±2.17 <sup>△△</sup>
高剂量	7	38.72±4.81 <sup>△△</sup>	15.01±4.47 <sup>△</sup>
氯雷他定	6	39.41±4.01 <sup>△△</sup>	12.60±2.52 <sup>△△</sup>

注: 与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>△</sup>  $P < 0.05$ , <sup>△△</sup>  $P < 0.01$

3 各组小鼠皮肤肥大细胞脱颗粒百分率和抑制率比较(图 1, 表 2) 各组肥大细胞染色呈蓝紫色, 空白组肥大细胞脱颗粒不显著, 模型组肥大细胞脱颗粒明显, 各给药组肥大细胞脱颗粒数均较模型组低。与空白组比较, 模型组小鼠皮肤肥大细胞脱颗粒数量显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 固本抗敏方低、中、高剂量组和氯雷他定组肥大细胞脱颗粒百分率均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 抑制率分别为 53.59%、61.87%、68.83% 及 61.54%, 组间比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

4 各组小鼠血清 IgE、IFN- $\gamma$ 、IL-4 及 IL-10 表达量比较(表 3) 与空白组比较, 模型组小鼠血清 IgE、IL-4、IL-10 表达量显著升高, IFN- $\gamma$  含量减少 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 固本抗敏方低、中、高剂量组小



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为固本抗敏方低剂量组; D 为固本抗敏方中剂量组; E 为固本抗敏方高剂量组; F 为氯雷他定组, 箭头所指可见肥大细胞脱颗粒

图 1 各组小鼠肥大细胞脱颗粒图 (甲苯胺蓝染色,  $\times 400$ )

表 2 各组小鼠肥大细胞脱颗粒百分率及抑制率比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	肥大细胞脱颗粒百分率	肥大细胞脱颗粒抑制率
空白	6	8.67±1.21	—
模型	7	63.71±5.56 <sup>*</sup>	—
固本抗敏方低剂量	7	29.57±8.08 <sup>△</sup>	53.59 <sup>△</sup>
中剂量	7	24.29±4.03 <sup>△</sup>	61.87 <sup>△</sup>
高剂量	7	19.86±3.80 <sup>△</sup>	68.83 <sup>△</sup>
氯雷他定	6	24.50±5.13 <sup>△</sup>	61.54 <sup>△</sup>

注: 与空白组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>△</sup>  $P < 0.01$

鼠血清 IgE、IL-4 水平显著降低, IFN- $\gamma$  表达量增加 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), 氯雷他定组小鼠血清 IgE 含量减少 ( $P < 0.01$ ), IFN- $\gamma$  表达量无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 各给药组虽可降低 IL-10 在血清中的含量, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 讨论

慢性荨麻疹是临床常见的过敏性皮肤病, 主要与风邪外袭、禀赋不耐, 冲任失调、中焦湿蕴, 饮食不节、情志所伤, 脏腑失调等有关。卢教授认为气虚不足证表现突出, 与脾肾的关系密切, 且岭南人体质以湿热质为主, 故确立“健脾温肾治其本, 祛风化湿治其标”的治法, 创立“固本抗敏方”。方中干姜为君, 黄芪为臣, 干姜温阳力强, 得黄芪之助力, 可使肌表之阳气充盛而

表 3 各组小鼠血清 IgE、IFN- $\gamma$ 、IL-4 及 IL-10 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IgE (ng/mL)	INF- $\gamma$ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
空白	6	7.07±0.68	32.91±8.59	54.29±21.09	48.12±23.34
模型	7	13.55±2.36 <sup>*</sup>	16.21±6.29 <sup>*</sup>	143.09±50.63 <sup>*</sup>	319.62±52.77 <sup>*</sup>
固本抗敏方低剂量	7	9.37±0.60 <sup>△△</sup>	26.61±3.29 <sup>△</sup>	44.30±22.83 <sup>△△</sup>	242.74±50.31
中剂量	7	9.30±1.08 <sup>△△</sup>	30.54±9.62 <sup>△△</sup>	30.85±17.24 <sup>△△</sup>	268.01±29.84
高剂量	7	9.08±1.48 <sup>△△</sup>	30.02±13.00 <sup>△△</sup>	61.84±11.70 <sup>△</sup>	242.20±40.49
氯雷他定	6	9.27±1.05 <sup>△△</sup>	24.93±3.19	84.24±48.04	279.84±56.70

注: 与空白组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>△</sup>  $P < 0.05$ , <sup>△△</sup>  $P < 0.01$

连绵不绝,解决阳气生化不足之根本,且方中重用黄芪,与治卫表肌腠之疾时多用较大剂量一致<sup>[13]</sup>;防风和白鲜皮为佐,防风长于祛风,与黄芪配伍,一攻一补,既可驱邪,又可扶正;白鲜皮长于清热解毒,除湿止痒,四药合用,寒热结合,标本兼顾,共奏奇效。

目前关于荨麻疹的动物实验研究较少<sup>[14]</sup>,本研究采用多次致敏原刺激以模拟荨麻疹的发病机制,即卵清蛋白首次刺激诱导特异性 B 细胞产生 IgE,使机体处于高致敏状态,当卵清蛋白多次刺激,通过与致敏靶细胞表面的 IgE 抗体特异性结合,促使其脱颗粒,释放一系列生物活性介质(如组胺、白三烯、缓激肽、前列腺素等)<sup>[12]</sup>,引起小鼠不同程度的抓耳挠腮、烦躁不安、易惊、以及皮损等阳性反应,小鼠血清中 IgE 水平显著升高,该结果与荨麻疹患者血清中 IgE 水平普遍高于健康人群相符<sup>[15]</sup>。本研究中固本抗敏各剂量组均可显著降低小鼠血清中 IgE 水平,抑制肥大细胞脱颗粒,其中中、高剂量组优于氯雷他定,表明固本抗敏方治疗荨麻疹疗效确切,且具有一定的剂量依赖性,其作用机制与降低外周血中 IgE 水平有关。

现代研究发现荨麻疹除了与肥大细胞脱颗粒, IgE 自身免疫反应相关以外,还与 Th1/Th2 细胞亚群失衡密切相关<sup>[16]</sup>。Th 为辅助性 T 细胞,可分为 Th1 细胞和 Th2 细胞,前者主要分泌 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  及 IL-2 等;后者可分泌 IL-4 和 IL-10。本次实验研究发现卵清蛋白致敏后 IFN- $\gamma$  分泌显著降低,表明造模可抑制 Th 细胞向 Th1 转化, Th 细胞向 Th2 细胞分化增加, IL-4 和 IL-10 分泌增加,从而诱导 B 淋巴细胞增殖及其 IgE 分泌;给予固本抗敏方后, IFN- $\gamma$  分泌增加,诱导 Th 细胞向 Th1 转化,抑制 IL-4 诱导 Th 细胞向 Th2 细胞分化,提高 Th1 细胞数及细胞活力,拮抗 IL-4 诱导 B 淋巴细胞增殖及其分泌 IgE 的功能。

综上所述,固本抗敏方或直接降低荨麻疹小鼠血清中 IgE 水平,或通过升高 IFN- $\gamma$  表达量,降低 IL-4 表达量,进而减少 IgE 的释放,抑制皮肤肥大细胞脱颗粒,稳定肥大细胞,以达到治疗荨麻疹的作用。

利益冲突:无。

#### 参 考 文 献

- [1] 陈教全,梁碧华,李华平,等. 奥马珠单抗在慢性荨麻疹治疗中的应用[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2019, 26(3): 195-198.
- [2] Hoskin B, Ortiz B, Paknis B, et al. Exploring the real-world profile of refractory and non-refractory

chronic idiopathic urticaria in the USA: clinical burden and healthcare resource use[J]. *Curr Med Res Opin*, 2019, 35(8): 1387-1395.

- [3] 随永敏,陈国杰,杨云,等. 慢性荨麻疹临床诊疗研究进展[J]. *临床误诊误治*, 2018, 31(11): 106-110.
- [4] 陆莉,万屏. 慢性荨麻疹的治疗进展[J]. *医学理论与实践*, 2017, 30(8): 1125-1127.
- [5] Manti S, Salpietro C, Cuppari C. Antihistamines: Recommended dosage-divergence between clinical practice and guideline recommendations [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2019, 178(1): 93-96.
- [6] Weinberger M. Another look at cyclosporine for treating antihistamine-resistant chronic spontaneous urticaria [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2019, 122(4): 425-427.
- [7] 卢传坚,郭洁. 基于发病特点探讨慢性荨麻疹的治疗法则[J]. *中医杂志*, 2017, 58(15): 1296-1298.
- [8] 沈萃萃. 固本抗敏方治疗慢性自发性荨麻疹的临床疗效观察及机制初探[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [9] Zheng W, Wang J, Zhu W, et al. Upregulated expression of substance P in basophils of the patients with chronic spontaneous urticaria: induction of histamine release and basophil accumulation by substance P [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 32(3): 217-228.
- [10] 邵传森,周丽萍主编. 医学免疫学[M]. 浙江大学出版社, 2003, 68-72.
- [11] 龙声志,文昌晖,朱海燕,等. 加味过敏煎对荨麻疹小鼠皮肤肥大细胞脱颗粒的影响[J]. *中医杂志*, 2019, 60(4): 322-326.
- [12] 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.
- [13] 张林,林轶群,傅延龄. 历代黄芪临床用量分析[J]. *中医杂志*, 2015, 56(6): 518-521.
- [14] 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): 1-6.
- [15] Altrichter S, Hawro T, Liedtke M, et al. In chronic spontaneous urticaria, IgE against staphylococcal enterotoxins is common and functional [J]. *Allergy*, 2018, 73(7): 1497-1504.
- [16] Manka LA, Wechsler ME. New biologics for allergic diseases [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2018, 14(4): 285-296.

(收稿: 2019-11-15 在线: 2020-04-09)

责任编辑: 段碧芳  
英文责编: 张晶晶