

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.05.018

川椒方含药血清对大鼠嗜碱性白血病细胞脱颗粒的影响

沈志华, 宋剑涛, 尹连荣, 张丽霞, 接传红, 杨 薇, 高健生*

(中国中医科学院眼科医院, 北京市石景山区鲁谷路 33 号, 100040)

摘要 目的 探讨川椒方治疗变态反应性结膜炎的可能作用机制。方法 SD 大鼠 20 只, 随机分为川椒方低、中、高剂量含药血清组和空白血清组, 每组 5 只。川椒方低、中、高含药血清组分别以含川椒方生药 0.334、0.668、1.336 g/ml 的水煎剂 20 ml/kg 灌胃, 空白血清组给予相同剂量的生理盐水灌胃, 每日 2 次, 连续给药 3 日, 制备 SD 大鼠含药血清。筛选不同浓度含药血清对大鼠嗜碱性白血病细胞 (RBL-2H3) 的最佳作用浓度, 并筛选含药血清最佳作用时间。实验再分为模型组、川椒方治疗高、中、低剂量组、酪氨酸激酶抑制剂 (PP2) 治疗组、对照组。川椒方高、中、低剂量含药血清组按筛选所得浓度和作用时间每孔分别给予含药血清 40 μ l; PP2 治疗组于加抗原前 30 min 给予终浓度为 1 μ M 的 PP2 40 μ l; 对照组于加抗原前 2 h 给予 10% 空白血清 40 μ l, 酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测 β -氨基己糖苷酶释放率。结果 川椒方浓度为 10% 时细胞活力较好, 故本实验选择了 10% 浓度血清作为实验浓度。川椒方高、中剂量组含药血清作用 120 min 时, 释放量最少 ($P < 0.01$), 故选用 120 min 作为作用时间。与正常组比较, 模型组和对照组 β -氨基己糖苷酶释放率升高明显 ($P < 0.01$); 川椒方各剂量组及 PP2 治疗组 β -氨基己糖苷酶释放率下降 ($P < 0.01$)。结论 川椒方治疗变态反应性结膜炎的作用机制可能与抑制肥大细胞脱颗粒有关。

关键词 川椒方; 变态反应性结膜炎; 肥大细胞; 脱颗粒; 免疫球蛋白 G

变态反应性结膜炎 (allergic conjunctivitis, AC) 一般分为季节性和常年性过敏性结膜炎、春季卡他性结膜炎、特异性结膜炎、巨乳头结膜炎 5 类, 其共同的特征是眼部刺痒和肥大细胞脱颗粒。免疫球蛋白 E (IgE) 和抗原刺激可诱导肥大细胞活化、脱颗粒, 释放介质如组胺等^[1]。 β -氨基己糖苷酶是肥大细胞特有的标志性颗粒, 广泛运用于检测肥大细胞脱颗粒^[2]。大鼠嗜碱性白血病细胞 (RBL-2H3) 是一种常用的黏膜肥大细胞模型, 抗原刺激后 RBL-2H3 细胞释放介质组胺、 β -氨基己糖苷酶等^[3]。本课题组前期研究结果显示, 川椒方对变态反应性结膜炎有良好疗效, 并具有稳定肥大细胞, 抑制其脱颗粒的作用^[4-7]。本研究运用 IgE 诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒, 观察川椒方含药血清对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响。

1 材料

1.1 动物及细胞

SD 大鼠 20 只, 雄性, SPF 级, 3~8 周龄, 体

重 (220 $\pm$ 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号 SXXK(京)2012-0001。RBL-2H3 细胞购于中国科学院细胞库。

1.2 药物

川椒方 (组成: 荆芥 10 g、防风 10 g、地肤子 10 g、蛇床子 10 g、川芎 10 g、知母 10 g、川椒 3 g) 中药材购自北京燕北药材公司 (批号 20120116), 加适量水煮沸后, 文火煎 15 min, 取汁, 滤渣再加适量水, 煮沸后, 文火煎 20 min, 合 2 次药汁用双层消毒纱布过滤 2 次, 取汁再浓缩, 制成含生药 0.334、0.668、1.336 g/ml 的水煎剂, 分装灭菌后 4 $^{\circ}$ C 保存备用。Src 家族激酶抑制剂 (PP2) (美国 Sigma 公司, 批号 041M4602)。

1.3 主要试剂和仪器

IgE (批号 052M4812)、4-硝基苯基-2-乙酰氨基-2-脱氧-B-D-吡喃葡萄糖霉 (批号 SLBF1695V)、四甲基偶氮唑盐 (MTT, 批号 410C052) 均由美国 Sigma 公司生产, 二硝基苯基化牛血清白蛋白 (DNP-BSA, 美国 Invivogen 公司, 批号 1256154), 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 1347556),

* 通讯作者: gjsdoctor@163.com, (010) 68680969

MEM/ebss hyclone (美国 Hyclone 公司, 批号 NYCO831), 盐酸氯胺酮 (福建古田药业有限公司, 批号 130222), 陆眠宁 (吉林省华牧动物保健品有限公司, 批号: 201103)。IX81 型荧光倒置显微镜 (Olympus 公司), 5% CO₂ 培养箱 (美国热电公司), RT-6000 型全自动酶标仪 (美国 Rayto 公司), 5417R 型台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 川椒方含药血清的制备

20 只 SD 大鼠, 按照随机数字表分为川椒方低、中、高剂量含药血清组和空白血清组, 每组 5 只。川椒方低、中、高含药血清组分别给予含川椒方生药 0.334、0.668、1.336 g/ml 的水煎剂, 灌胃体积均为 20 ml/kg, 每日 2 次, 连续给药 3 天。空白血清组给予等量生理盐水灌胃。末次给药 1 h 后, 下肢肌肉注射盐酸氯胺酮和陆眠宁混合液麻醉动物, 无菌条件下腹主动脉采血, 静置 2 h, 3000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 56℃ 灭菌 30 min, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, -20℃ 保存备用。

2.2 川椒方含药血清浓度的筛选

取对数生长期的 RBL-2H3 细胞, 0.25% 胰酶消化并计数, 以 1×10^5 个/ml 的密度接种于 96 孔培养板中, 每孔 10 μl, 细胞继续生长 12 h 后, 用体积分数分别为 5%、10%、15%、20%、25% 和 30% 的川椒方低、中、高浓度含药血清和空白血清作用于细胞, 以正常条件培养的细胞做为对照, 每组 4 个平行标本。含药血清分别作用细胞 24 h 后, 吸去旧培养基, 换以新鲜无血清培养基 90 μl, 并加入 5 g/L 的 MTT 10 μl, 继续孵育 4 h。弃液, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砷 (DMSO), 振荡 10 min, 待蓝紫色结晶充分溶解, 于 570 nm (参考波长 630 nm) 波长处用酶标仪测定各孔 OD 值。

2.3 川椒方含药血清作用时间的筛选

参考文献 [8] 建立 IgE 和 DNP-BSA 诱导的

RBL-2H3 细胞脱颗粒模型。细胞计数 2×10^5 个/ml, 400 μl/孔接种于 24 孔板中, 贴壁后, 加入含 anti-DNP IgE 25 ng/ml 致敏细胞, 孵育过夜。弃液, 用 200 μl 的 PBS 缓冲溶液冲洗细胞 2 次。加入川椒方高、中剂量含药血清 40 μl (浓度为所筛选的最佳浓度)、360 μl PIPES 缓冲液, 37℃ 孵育 30、60、120、180、240 min, 弃液, 用 200 μl 的 PBS 缓冲溶液冲洗细胞 2 次。加入抗原 DNP-BSA (终浓度为 25 ng/ml), 37℃ 孵育 15 min 激活 RBL-2H3 细胞。冰浴 10 min 终止反应。4℃ 1000 r/min 离心 5 min 收集反应上清。利用酶底物法进行检测, 比较各组在 405 nm 光吸收值。

2.4 MTT 法检测川椒方对 RBL-2H3 细胞释放 β-氨基己糖苷酶的影响

建立 IgE 和 DNP-BSA 诱导的 RBL-2H3 细胞脱颗粒模型, 并将其分为模型组、PP2 治疗组、对照组和川椒方治疗高、中、低剂量组。川椒方各组分别于加抗原前 2 h 给予所筛选浓度的川椒方含药血清, 每孔 40 μl; PP2 治疗组于加抗原前 30 min 给予终浓度为 1 μM 的 PP2, 每孔 40 μl。对照组于加抗原前 2 h 给予终浓度为 10% 空白血清 40 μl, 作用时间选用筛选的最佳作用时间。每组 4 个平行标本。细胞经药物处理后, 加入抗原激发 15 min, 冰浴终止反应, 离心以收集反应上清, 于多功能酶标仪检测 405 nm 光吸收值。β-氨基己糖苷酶释放率 = (治疗组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (模型组 OD 值 - 空白组 OD 值)。

2.5 统计学方法

运用 SPSS 16.0 软件进行统计, 计量数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用方差分析; 两组间比较, 采用 *t* 检验。所有统计检验均采用双侧检验。

3 结果

3.1 川椒方含药血清浓度筛选结果

表 1 示, 与正常组比较, 各含药血清组细胞活力下降, 其中浓度为 20% 和 30% 的空白血清组,

表 1 各组 RBL-2H3 在川椒方不同浓度含药血清作用下细胞活性比较 (OD, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	0	5%	10%	15%	20%	25%	30%
正常组	4	0.41 ± 0.05	—	—	—	—	—	—
空白血清组	4	—	0.34 ± 0.02	0.37 ± 0.05	0.35 ± 0.03	0.29 ± 0.04**	0.34 ± 0.13	0.22 ± 0.01**
川椒方高剂量组	4	—	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.03*	0.33 ± 0.04*	0.27 ± 0.03**	0.28 ± 0.05**
川椒方中剂量组	4	—	0.31 ± 0.05*	0.32 ± 0.02*	0.32 ± 0.05*	0.31 ± 0.03*	0.30 ± 0.04*	0.29 ± 0.02**
川椒方低剂量组	4	—	0.39 ± 0.01	0.40 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.33 ± 0.02*	0.34 ± 0.04	0.31 ± 0.04*

注: 与正常组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

浓度为 15%、20%、25%、30% 的川椒方高剂量组,各浓度川椒方中剂量组及浓度 20%、30% 的川椒方低剂量组活力下降明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。浓度为 10% 时细胞活力较好,故选择 10% 浓度血清作为实验浓度。

3.2 川椒方含药血清不同作用时间筛选结果

表 2 示,随着含药血清作用时间的延长,β-氨基己糖苷酶释放率呈下降趋势。在 120 min 内,作用时间越长,OD 值就越小 ($P < 0.01$),作用 180 min 后,OD 值有所增加 ($P < 0.01$)。提示川椒方作用 120 min,抑制 RBL-2H3 细胞脱颗粒效果最好。

表 2 川椒方含药血清作用不同时间对 β-氨基己糖苷酶净释放度比较 ($\bar{x} \pm s$)

10% 血清作用时间 (min)	样本数	川椒方高剂量组	川椒方中剂量组
0	4	2.65 ± 0.18	2.65 ± 0.18
30	4	1.68 ± 0.51 ^{*△}	1.92 ± 0.11 ^{*△}
60	4	1.54 ± 0.21 ^{*△}	1.79 ± 0.08 ^{*△}
120	4	1.11 ± 0.07 [*]	1.13 ± 0.20 [*]
180	4	1.96 ± 0.21 ^{*△}	2.1 ± 0.22 ^{*△}
240	4	1.68 ± 0.29 ^{*△}	2.36 ± 0.15 ^{*△}

注:与本组作用 0 min 相比, $* P < 0.01$; 与本组血清作用 120 min 相比, $\Delta P < 0.01$

3.3 各组 RBL-2H3 细胞 β-氨基己糖苷酶净释放率比较

表 3 示,以模型组 β-氨基己糖苷酶净释放率为参照 (释放率为 1),对照组和各治疗组释放率均明显下降 ($P < 0.01$); 和对照组比较,各治疗组释放率下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 PP2 治疗组比较,川椒方各组抑制 β-氨基己糖苷酶释放率作用力明显不足 ($P < 0.01$); 川椒方各剂量组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组 RBL-2H3 细胞 β-氨基己糖苷酶净释放率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	释放率
模型组	4	1
对照组	4	0.58 ± 0.09 ^{*▲}
PP2 治疗组	4	0.18 ± 0.04 ^{*△△}
10% 川椒方含药血清低剂量组	4	0.42 ± 0.1 ^{*▲▲}
10% 川椒方含药血清中剂量组	4	0.35 ± 0.03 ^{*△△▲}
10% 川椒方含药血清高剂量组	4	0.32 ± 0.08 ^{*△△▲}

注:与模型组比较, $* P < 0.01$; 与对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 PP2 治疗组比较, $\Delta P < 0.01$

4 讨论

AC 主要属 I 型超敏反应,且 AC 患者多伴有

过敏性鼻炎、过敏性哮喘等系统反应^[4]。临床上运用具有抗组胺和稳定肥大细胞双重作用的滴眼液治疗 AC,一般治疗用药前 1~2 周效果明显,随后效果欠佳,甚至无效。我们针对 AC 寒热相搏的中医病机总结出川椒方。方中防风祛风止痒,蛇床子杀虫止痒,二者共为君药。荆芥与防风相须为伍,增强防风祛风之功;知母清热泻火、滋阴润燥;地肤子清热、止痒,与蛇床子配伍,助其止痒,与知母相伍,助其清利湿热,三者共为臣药。川椒温中止痛、杀虫止痒,既可以助蛇床子、地肤子止痒,又因其性温热,可以防止寒凉太过而伤脾胃,且能引火下行为佐药。川芎活血行气,祛风止痛,既可清气分之热,又可理血分之郁,温而不燥,寒而不凝;且辛香升散,上行头目,引诸药上行达病所。与川椒相伍,一升一降,使气机条畅为佐使药。全方寒热并用,解表与清里并施,升降相宜,共奏祛风、清热、利湿、止痒、明目的功效。前期临床研究证实,川椒方能治疗 AC,且近期疗效与 0.1% 奥洛他定滴眼液相当,远期疗效则明显优于 0.1% 奥洛他定滴眼液^[4,7]。动物实验亦证实川椒方可以治疗 AC,具有稳定肥大细胞、抑制其脱颗粒的作用^[5-7]。

本研究观察了川椒方不同浓度含药血清对 RBL-2H3 细胞活力的影响,结果显示,对细胞活力影响不大,且细胞活力较好的作用浓度为 10%,故选择 10% 含药血清作为实验浓度。还观察了 10% 川椒方高、中剂量含药血清作用不同时间对 β-氨基己糖苷酶释放量的影响。结果发现,在 120 min 内川椒方对 β-氨基己糖苷酶释放量的抑制力逐渐加强,随后作用力下降,故本实验确定川椒方作用时间为 120 min。RBL-2H3 细胞质内含有丰富的嗜碱性颗粒。当 IgE 攻击细胞时,可以引发脱颗粒现象,β-氨基己糖苷酶是肥大细胞颗粒中所包含的物质之一,存在于溶酶体中,是标记肥大细胞脱颗粒的特异性蛋白。β-氨基己糖苷酶的释放与肥大细胞脱颗粒程度一致,与组胺释放呈正相关。因此,β-氨基己糖苷酶广泛运用于检测肥大细胞脱颗粒^[8]。本研究结果显示,10% 川椒方含药血清作用 120 min 可有效抑制 RBL-2H3 细胞脱颗粒,再次证明川椒方具有稳定肥大细胞、抑制脱颗粒作用。

参考文献

- Leonardi A. The Central Role of Conjunctival Mast Cells in the Pathogenesis of Ocular Allergy [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2002, 2(4): 325-331.

- [2] Vo TS, Kong CS, Kim SK. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on degranulation and cytokine generation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells [J]. Carbohydr Polym, 2011, 84(1): 649 - 655.
- [3] Chung MJ, Sohng JK, Choi DJ, et al. Inhibitory effect of phloretin and biochanin A on IgE-mediated allergic responses in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells [J]. Life Sci, 2013, 93(9-11): 401-408.
- [4] 宋剑涛, 杨薇, 高健生, 等. 川椒方治疗过敏性结膜炎的临床观察 [J]. 中国中医眼科杂志, 2010, 20(1): 17-19.
- [5] 李素毅, 高健生, 接传红, 等. 川椒方治疗小鼠变应性结膜炎的实验研究 [J]. 世界中医药, 2012, 7(3): 263-265.
- [6] 沈志华, 宋剑涛, 接传红, 等. 川椒方对小鼠变应性结膜炎脱颗粒的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(9): 190-193.
- [7] 孟青青, 高健生, 接传红, 等. 川椒方和奥洛他定滴眼液治疗过敏性结膜炎的疗效观察 [J]. 中国中医眼科杂志, 2013, 23(6): 398-402.
- [8] Park KL, Ko NY, Lee JH, et al. 4-Chlorotetrazolo [1,5-a] quinoxaline inhibits activation of Syk kinase to suppress mast cells in vitro and mast cell-mediated passive cutaneous anaphylaxis in mice [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 257(2): 235-241.
- [9] Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA (2) LEN and AllerGen) [J]. Allergy, 2008, 63 (suppl 86): 8-160.

Impact of Drug-Containing Serum of *Chuanjiao Formula* on the Degranulation of RBL-2H3 Cells

SHEN Zhihua, SONG Jiantao, YIN Lianrong, ZHANG Lixia, JIE Chuanhong, YANG Wei, GAO Jiansheng
(Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100040)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of *Chuanjiao Formula* (CJF) in the treatment of allergic conjunctivitis (AC). **Methods** Totally 20 SD rats were randomly divided into the blank group, the low, medium, and high dose CJF groups, each with 5 rats. Rats in the low, medium, and high dose CJF groups were given CJF 20 ml/kg at the dose of 0.334, 0.668, 1.336 g/ml by gavage, twice a day for 3 days. Rats in the blank group were given same amount of normal saline by gavage, twice a day for 3 days. Then drug-containing serum was made. The optimal concentration of serum on rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3) was screened and the optimal action time were screen as well. Experiments subdivided into model group, high, medium and low dose CJF group, tyrosine kinase inhibitor (PP2) treatment group and control group. The low, medium, and high dose CJF groups were given drug-containing serum 40 μ l each well using the screened serum concentration and time. PP2 treatment group were given 40 μ l of PP2 with the concentration of 1 μ M 30 min before adding the antigen. The control group were given 10% blank serum 40 μ l 2 hours before adding the antigen. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect β -hexosaminidase release rate. **Results** With the concentration of 10% CJF contained serum, cells showed better viability, so in this study, the concentration of 10% was chosen as the experimental concentration. Cell incubation with serum 120 min in medium, and high dose CJF groups showed the least degranulation ($P < 0.01$), so 120 min was chosen as the incubation time. Compared with the normal group, β -hexosaminidase release rates of the model group and the control group increased significantly ($P < 0.01$). The β -hexosaminidase release rates of each dose CJF group and PP2 treatment group declined ($P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of CJF in treating allergic conjunctivitis may be related to the inhibition of degranulation in mast cells.

Keywords *Chuanjiao Formula*; allergic conjunctivitis; mast cell; degranulation; immunoglobulin G

(收稿日期: 2014-04-15; 修回日期: 2014-07-20)

编辑: 焦爽

欢 迎 投 稿

欢 迎 订 阅