

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.04.013

加味过敏煎对荨麻疹小鼠皮肤肥大细胞脱颗粒的影响

龙声志¹, 文昌晖¹, 朱海燕², 王永萍³, 李红日¹, 吴贤波^{*}

(1. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵州省贵阳市云岩区宝山北路 71 号, 550001; 2. 成都医学院第一附属医院; 3. 贵州中医药大学基础医学院; 4. 成都大学附属医院)

摘要 目的 探讨加味过敏煎治疗荨麻疹的可能作用机制。方法 60 只 BALB/c 小鼠随机分为空白组、单纯 IgE 组、模型组、过敏煎组、加味过敏煎组、氯雷他定组, 每组 10 只。过敏煎组给予过敏煎 10.27 g/(kg·d) 灌胃, 加味过敏煎组给予加味过敏煎 14.39 g/(kg·d) 灌胃, 氯雷他定组给予氯雷他定片 2.10 mg/(kg·d) 灌胃, 模型组、空白组及单纯 IgE 组给予等体积生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 7 次。第 6 日给药后除空白组外其余各组予尾静脉注射抗 DNP IgE 单克隆抗体 0.5 ml, 次日除空白组和单纯 IgE 组外其余各组小鼠耳部涂抹 2, 4-二硝基氟苯 50 μ l 激发建立荨麻疹动物模型。第 8 日检测各组小鼠皮肤肥大细胞脱颗粒情况及蛋白酶激活受体 2 (PAR-2) mRNA 表达和血清组胺浓度。结果 显微镜下观察, 空白组与单纯 IgE 组未见明显肥大细胞脱颗粒, 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, 加味过敏煎组脱颗粒数相对较少。与空白组、单纯 IgE 组比较, 模型组肥大细胞脱颗粒数、PAR-2 mRNA 及组胺表达明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 加味过敏煎组肥大细胞脱颗粒数、PAR-2 mRNA 及组胺表达均明显降低 ($P < 0.01$), 且均低于过敏煎组与氯雷他定组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 加味过敏煎可能通过下调皮肤 PAR-2 mRNA 表达, 降低血清组胺释放, 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; 加味过敏煎; 肥大细胞脱颗粒; 蛋白酶激活受体 2; 组胺

荨麻疹是皮肤病中最常见的过敏性疾患, 大约有 15% ~ 23% 成年人会发生荨麻疹^[1]。荨麻疹容易转变为慢性, 发病机制复杂, 目前运用抗过敏药物治疗荨麻疹虽起效快, 但易反复发作^[2], 可使患者生活质量严重下降。“以皮治皮”是以中医理论为指导, 以动物、植物的皮部入药治疗皮肤疾病^[3]。我们在临床中发现, 在“以皮治皮”理论指导下以加味过敏煎治疗荨麻疹疗效较好。有研究^[4]结果显示, 肥大细胞在荨麻疹的发病中起中心作用。本研究从肥大细胞角度探讨加味过敏煎防治荨麻疹的可能作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 60 只, 雌雄各半, 体重

(20 ± 2) g, 购于重庆腾鑫比尔公司, 实验动物许可证号: SCXK-(军) 2012-0011。适应性喂养 3 天后用于实验。

1.2 实验药物

过敏煎组成: 银柴胡 10 g, 乌梅 10 g, 防风 10 g, 五味子 10 g, 甘草 10 g。加味过敏煎组成: 银柴胡 10 g, 乌梅 10 g, 防风 10 g, 五味子 10 g, 甘草 10 g, 蝉蜕 10 g, 白鲜皮 10 g。饮片均购于北京同仁堂贵阳药店。煎制法: 将药物放入砂罐加蒸馏水 10 倍量浸泡 30 min, 以武火煮沸, 后用文火微沸 1 h, 搅拌后趁热将药液滤出, 剩余药渣以同法煎煮后滤出药液, 合并两次药液并浓缩备用, 过敏煎浓缩成含生药 0.4 g/ml, 加味过敏煎浓缩成含生药 0.56 g/ml。氯雷他定片 (国药准字 H20070030, 西安杨森制药有限公司), 使用时加蒸馏水配制成 0.084 mg/ml, 置 4℃ 冰箱中冷藏备用。

基金项目: 国家自然科学基金 (81460706)

* 通讯作者: edutcmwu@163.com, {028} 83970120

1.3 主要试剂和仪器

抗-二硝基苯酚 IgE (抗 DNP IgE) 单克隆抗体 (批号 D8406), 2,4-二硝基氟苯 (DNFB, 批号 D1529), 均为 Sigma 公司产品; 甲苯胺蓝染液 (货号 G3668), Solarbio 公司; 逆转录试剂盒 (批号 R101-01/02)、SYBR Green Master Mix (批号 Q111-02), 均为 Vazyme Biotech Co. Ltd 公司产品; 组胺 Elisa 试剂盒 (货号 YH9012), 上海研辉生物科技有限公司; 丙酮 (批号 20160912), 国药集团化学试剂有限公司; Trizol (货号 252250AX), 北京艾德莱生物科技有限公司。

包埋机 (型号 KD-BM), 浙江金华科迪有限公司; 切片机 (型号 RM2245), 德国 Leica 公司; 显微镜 (型号 DP73), 日本 Olympus 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (型号 QuantStudio 6), ABI 公司; 酶标仪 (型号 1510-01061C), Thermo Fisher 公司。

2 方法

2.1 分组与给药

60 只 BALB/c 小鼠根据随机数字表法分为空白组、单纯 IgE 组、模型组、过敏煎组、加味过敏煎组、氯雷他定组, 每组 10 只, 雌雄各半。按实验动物与人体标准体重计算公式换算用药量^[4], 过敏煎组给予过敏煎 10.27 g/(kg·d) 灌胃, 加味过敏煎组给予加味过敏煎 14.39 g/(kg·d) 灌胃, 氯雷他定组给予氯雷他定片 2.10 mg/(kg·d) 灌胃, 模型组、空白组及单纯 IgE 组给予 0.5 ml 生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 7 日。

2.2 模型建立

第 6 日给药后, 参照文献 [5-6] 方法建立荨麻疹小鼠模型。每组小鼠预先背部除毛 2 cm × 3 cm 区域, 空白组小鼠通过尾静脉注射生理盐水 0.5 ml, 其余各组小鼠尾静脉注射抗 DNP IgE 单克隆抗体 (1:5000) 0.5 ml。24 h 后, 除空白组和单纯 IgE 组小鼠左右耳涂予生理盐水外, 其余各组在小鼠左右耳均涂 0.15% DNFB 50 μl 进行激发, 稀释液为丙酮-橄榄油 (3:1) 混合液。次日麻醉取材。

2.3 皮肤肥大细胞脱颗粒计数

取小鼠背部皮肤, 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%。

2.4 实时荧光定量 PCR 法检测皮肤蛋白酶激活受体 2 (PAR-2) mRNA 表达

Trizol 法提取小鼠背部皮肤总 RNA, 按逆转录试剂盒说明将其逆转录成 cDNA, cDNA 做 2 倍稀释后进行实时荧光定量 PCR 检测。引物由天一辉远生物科技有限公司合成, 引物序列 PAR-2: 上游 5'-CGTCTTTCTCCCGGTCATCT-3', 下游 5'-ATAGGTC-CAGTCGTTGCCAT-3', 扩增长度 205bp; β-actin: 上游 5'-CAGCATGGAGGGGCCGACTCATC-3', 下游 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3', 扩增长度 240bp。反应条件为: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。绘制熔解曲线, 最终数据以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行分析。

2.5 Elisa 法检测血清组胺浓度

小鼠麻醉后眼眶取血分离血清, 采用组胺 Elisa 试剂盒检测, 按说明书严格操作, 测出吸光度, 描绘标准曲线, 计算血清组胺浓度。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 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 T^3 。P < 0.05 为差异有统计学意义。

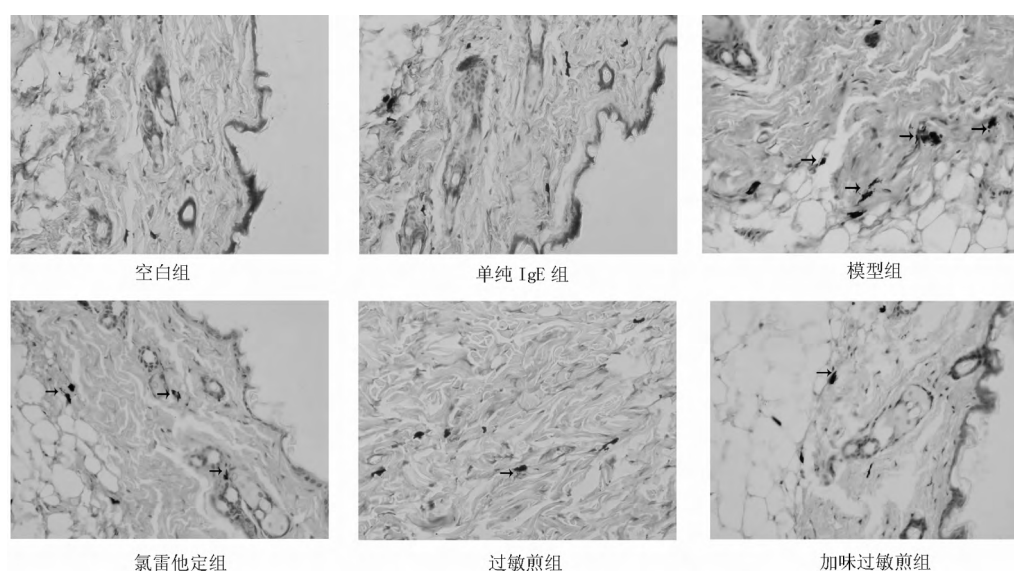
3 结果

3.1 各组小鼠皮肤肥大细胞脱颗粒计数比较

图 1 示, 各组肥大细胞染色呈紫色, 空白组与单纯 IgE 组未见明显肥大细胞脱颗粒, 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, 加味过敏煎组脱颗粒数相对其他给药组较少。此外, 模型组可见组织水肿, 胶原束距离增宽。表 1 示, 与空白组、单纯 IgE 组比较, 模型组肥大细胞脱颗粒数显著增多 (P < 0.01); 与模型组比较, 各给药组均能显著降低肥大细胞脱颗粒数 (P < 0.01); 与加味过敏煎组比较, 过敏煎组、氯雷他定组肥大细胞脱颗粒数明显增加 (P < 0.05)。氯雷他定组肥大细胞脱颗粒抑制率为 58.79%, 过敏煎组为 61.47%, 加味过敏煎组为 68.01%, 提示加味过敏煎组抑制作用最强, 过敏煎组次之, 氯雷他定组稍弱。

3.2 各组小鼠皮肤中 PAR-2 mRNA 表达比较

表 1 示, 与空白组、单纯 IgE 组比较, 模型组 PAR-2 mRNA 表达明显增加 (P < 0.05 或 P < 0.01); 与模型组比较, 过敏煎组与加味过敏煎组 PAR-2 mRNA 表达均明显下降 (P < 0.05 或 P < 0.01)。



注：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甲苯胺蓝染色图 (×40)

表 1 各组小鼠皮肤中肥大细胞脱颗粒数、PAR-2 mRNA 表达及血清组胺浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肥大细胞脱颗粒数(个)	PAR-2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	血清组胺 ($\mu\text{g/ml}$)
空白组	10	$2.70 \pm 2.12^{**}$	$1.17 \pm 0.47^{**}$	$2.80 \pm 1.33^{**}$
单纯 IgE 组	10	$2.90 \pm 2.38^{**}$	$2.32 \pm 0.94^{*}$	$3.20 \pm 1.15^{**}$
模型组	10	59.70 ± 12.50	3.28 ± 1.22	8.43 ± 1.69
氯雷他定组	10	$24.60 \pm 7.44^{**\Delta}$	$3.08 \pm 1.07^{\Delta\Delta}$	$6.26 \pm 2.04^{*\Delta}$
过敏煎组	10	$23.00 \pm 6.52^{**\Delta}$	$1.91 \pm 0.53^{*\Delta}$	$5.45 \pm 2.14^{**\Delta}$
加味过敏煎组	10	$19.10 \pm 4.89^{**}$	$1.39 \pm 0.51^{**}$	$4.85 \pm 1.76^{**}$

注：PAR-2，蛋白酶激活受体 2；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与加味过敏煎组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$

0.01)，氯雷他定组 PAR-2 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与加味过敏煎组比较，过敏煎组与氯雷他定组 PAR-2 mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.3 各组小鼠血清组胺浓度比较

表 1 示，与空白组、单纯 IgE 组比较，模型组血清组胺浓度明显升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组均能有效抑制血清组胺浓度 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；与加味过敏煎组比较，过敏煎组与氯雷他定组血清组胺浓度均明显升高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

荨麻疹属中医学“瘾疹”范畴，发病原因多由内外合邪所致，内因责之于禀赋不足、脏器虚弱，外因多由风、湿、寒、热等外邪侵袭，尤与风邪最为相关。“以皮治皮”是在中医“取象比类”思维方法指导下，在皮肤病治疗的临床实践中总结出的具有中医皮肤科特色的治法之一，运用这种思维去辨证治疗疾病可取得满意疗效^[4]。“以皮治

皮”是以动物或植物的皮作为药物来治疗皮肤相关疾病，属于中医治疗外科疾患的直观疗法之一，辨证组方过程中并非全用皮类药，临证可选择皮药为君，也可通过经方加皮药使用^[4]。

过敏煎是祝谌予之验方，全方补泻兼施、调和阴阳，共奏祛风止痒、养阴润燥之效，祝老常以此方治疗荨麻疹。在“以皮治皮”思想指导下，诸多医家临床实践中常在过敏煎基础上辨证使用蝉蜕、白鲜皮、牡丹皮等皮类药物治荨麻疹^[8-9]。加味过敏煎方中防风辛润而不温燥，善行皮毛与经脉之气；乌梅酸敛肺气，生津润肺，滋润皮毛；银柴胡味甘性凉，一可助防风疏风散邪，二可散邪壅皮毛而致郁热；五味子酸甘而温，育阴生津，既助肺布散津气，又防辛散伤肺；蝉蜕疏风透疹、熄风止痒；白鲜皮清热解毒、除湿止痒；甘草甘温补脾益气，防邪伤正，调和诸药。全方散敛并用，宣降相因，在过敏煎基础上加动物皮和植物皮，意在“以皮治皮”增强透疹止痒之奇效。

荨麻疹的发病机制至今尚未阐明，可能与多种

因素有关。有研究^[1]认为,肥大细胞是其发病的中心环节,脱颗粒释放的组胺等一系列介质是影响其发生发展和治疗预后的关键,故常以二代抗组胺药作为治疗的首选。PAR-2 是类胰蛋白酶的特异性受体,分布于全身多种组织器官,参与多种生理及病理过程,是皮肤炎症和超敏反应中皮肤肥大细胞功能的重要调节因子^[1],尤其是在皮肤痒觉过敏^[2]、炎症诱发^[3-14]等方面发挥重要作用,与荨麻疹发病息息相关^[5]。组胺是荨麻疹的重要介质,其 H1、H2、H4 受体都参与了荨麻疹的病理生理学,所致的瘙痒与风团也是荨麻疹的特征性表现^[14]。何韶衡等^[7-18]研究发现,肥大细胞可通过 PAR-2 和组胺将过敏原信号放大,加重过敏反应。本研究甲苯胺蓝染色结果表明,各给药组均能显著抑制肥大细胞脱颗粒,从抑制率上反映出加味过敏煎的抑制作用最具优势。并且各给药组均能有效降低小鼠血清组胺释放,尤以加味过敏煎效果最好。实时荧光定量 PCR 结果表明,过敏煎组与加味过敏煎组均能降低皮肤 PAR-2 mRNA 的表达,其中以加味过敏煎组抑制效果最为明显,而氯雷他定组与模型组之间差异无统计学意义,提示抗组胺药物并不能有效抑制 PAR-2 mRNA 的释放。有研究^[12,19]认为,PAR-2 所诱发的痒觉行为并不能被抗组胺药物降低,这也许是抗组胺药物治疗荨麻疹后仍反复发作的原因之一。

综上所述,加味过敏煎可能通过降低皮肤中 PAR-2 的表达、减少组胺释放,进一步抑制肥大细胞脱颗粒,从而有效防治荨麻疹。

参考文献

- [1] LEE SJ, HA EK, JEE HM, et al. Prevalence and risk factors of urticaria with a focus on chronic urticaria in children [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2017, 9(3): 212-219.
- [2] 宋红娟,王宝娟,李秋梅,等. 灭荨汤联合枸地氯雷他定片治疗慢性荨麻疹疗效观察 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2018, 17(1): 45-47.
- [3] 龙声志,吴贤波. “以皮治皮”理论源流及研究进展 [J]. 中医杂志, 2017, 58(24): 2147-2150.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1261-1264.
- [5] 李润祥,冯承恩,梁碧华,等. 小鼠免疫性接触性荨麻疹动物模型的构建 [J]. 中华皮肤科杂志, 2015, 48(6): 421-425.
- [6] 李润祥,冯承恩,梁碧华,等. Anti-DNP IgE 联合 DNFB 诱导免疫性接触性荨麻疹小鼠模型的建立 [J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2015, 22(1): 25-28, 32.
- [7] 欧阳恒. 论难治性皮肤病之诊治 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(4): 4-6.
- [8] 景冰,贾颖. 过敏煎加味治疗瘾疹临床经验举隅 [J]. 山西中医学院学报, 2017, 18(6): 63-64.
- [9] 刘永平. 李耀谦教授运用过敏煎治疗过敏性疾病的经验 [J]. 名医, 2018(1): 96-97.
- [10] 中华医学会皮肤性病学分会免疫学组. 中国荨麻疹诊疗指南(2014 版) [J]. 中华皮肤科杂志, 2014, 47(7): 514-516.
- [11] MOORMANN C, ARTUC M, POHL E, et al. Functional characterization and expression analysis of the proteinase-activated receptor-2 in human cutaneous mast cells [J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(4): 746-755.
- [12] AKIYAMA T, LERNER EA, CARSTENS E. Protease-activated receptors and itch [J]. Handb Exp Pharmacol, 2015, 226: 219-235. doi: 10.1007/978-3-662-44605-8_13.
- [13] PALMER HS, KELSO EB, LOCKHART JC, et al. Protease-activated receptor 2 mediates the proinflammatory effects of synovial mast cells [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(11): 3532-3540.
- [14] ISHIKAWA C, TSUDA T, KONISHI H, et al. Tetracyclines modulate protease-activated receptor 2-mediated proinflammatory reactions in epidermal keratinocytes [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(5): 1760-1765.
- [15] 吕静,刘娟娟,廖晓容. 类胰蛋白酶在慢性荨麻疹发病中的作用 [J]. 临床皮肤科杂志, 2013, 42(3): 197-199.
- [16] 李慧,刘玉峰,李巍. 荨麻疹及其亚型的诊断和治疗进展 [J]. 中国美容医学, 2014, 23(7): 594-597.
- [17] HE SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(3): 309-318.
- [18] 谢华,何韶衡,傅意玲. 蛋白酶激活受体-2 激动剂对大皮肤和扁桃体肥大细胞释放组胺和类胰蛋白酶的响应 [J]. 医学争鸣, 2005, 26(7): 599-602.
- [19] TSUJII K, ANDOH T, LEE JB, et al. Activation of proteinase-activated receptors induces itch-associated response through histamine-dependent and independent pathways in mice [J]. J Pharmacol Sci, 2008, 108(3): 385-388.

Effects of *Modified Guominjian Decoction* (加味过敏煎) on Degranulation of Mast Cells in Larva of Urticaria Model Mice

LONG Shengzhi¹, WEN Changhui¹, ZHU Haiyan², WANG Yongping³, LI Hongri¹, WU Xianbo⁴

(1. The First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001; 2. First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College; 3. School of Basic Medical Sciences, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine; 4. Affiliated Hospital of Chengdu University)

ABSTRACT **Objective** To study the possible mechanism of *Modified Guominjian Decoction* (加味过敏煎) in treating urticaria. **Methods** A total of 60 BALB/c mice were randomly divided into blank group, simple IgE group, model group, *Guominjian Decoction* group, *Modified Guominjian Decoction* group and loratadine group, with 10 rats in each group. The *Guominjian Decoction* group was given *Guominjian Decoction* 10.27 g/(kg · d), and the *Modified Guominjian Decoction* group was given *Modified Guominjian Decoction* 14.39 g/(kg · d), the loratadine group was given loratadine pills 2.10 mg/(kg · d), and the model group, blank group and simple IgE group were given equal volume normal saline, once a day, for constant 7 days. On the 6th day, except for the blank group, the other groups were injected with 0.5 ml of anti-DNP IgE monoclonal antibody in the tail vein. The next day, except for the blank group and the simple IgE group, the ears of the other groups were smeared with 2,4-dinitrofluorobenzene 50 μl to activate for the establishment of the animal model of urticaria. On the 8th day, the degranulation of skin mast cells, the expression of protease activated receptor 2 (PAR-2) mRNA and serum histamine concentration were detected in each group. **Results** With the observation of microscope, there was no obvious degranulation of mast cells in the blank group and the simple IgE group. The degranulation of mast cells in the model group was obvious. The number of degranulation of mast cells in each administration group was lower than that in the model group. The number of degranulation in the *Guominjian Decoction* group was relatively small. Compared with the blank group and the simple IgE group, the number of degranulation, PAR-2 mRNA and histamine expression in the model group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the number of degranulation, PAR-2 mRNA and histamine expression in the *Modified Guominjian Decoction* group were significantly decreased ($P < 0.01$), and were decreased more than those in the *Guominjian Decoction* group and the loratadine group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The *Modified Guominjian Decoction* may down-regulate the expression of PAR-2 in the skin, reduce the release of serum histamine, inhibit the degranulation of skin mast cells, stabilize mast cells to achieve the function of treating and preventing urticaria.

Keywords urticaria; *Modified Guominjian Decoction*; mast cell degranulation; PAR-2 mRNA; histamine

(收稿日期: 2018-05-26; 修回日期: 2018-11-02)

编辑: 王利芬

(上接第 290 页)

LAI Xinsheng's Experience in Treating Bipolar Disorder with Combination of Acupuncture and Medication

LI Mingzhu¹, WU Peilong¹, ZHOU Zunming², ZOU Chubing¹

(1. Clinical Medical College of Acupuncture and Rehabilitation, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT This paper introduced LAI Xinsheng's experience of treating bipolar disorder with combination of acupuncture and medication. Professor LAI believes that phlegm, stasis, stagnation and fire are the main etiological factors of bipolar disorder. The main pathogeneses are the disorder of five viscera, *yin* excess with stagnation, hyperactivity of *yang* with mania, deficiency syndrome, loss of primordial spirit and disorder of *yin* and *yang* transmission. It should be treated in stages with methods such as coordinating *yin* and *yang*, dispersing liver and regulating *qi*, focusing on healing spirit, balancing *yin* and *yang* and remitting for cure, and applying *Tongyuan acupuncture* (通元针法) for the balance of *yin* and *yang*.

Keywords bipolar disorder; *Tongyuan acupuncture*; combination of acupuncture and medication; experience of famous doctor; LAI Xinsheng

(收稿日期: 2018-07-28; 修回日期: 2018-12-11)

编辑: 侯建春