

补肾清透方对肾虚型慢性荨麻疹小鼠模型细胞因子的影响

展照双¹,王加锋¹,郭 炜¹,梁晓东¹,高 萌²,施 新¹,冯一凡¹

(1. 山东中医药大学,山东 济南,250355;

2. 山东省医学科学院颈肩腰腿痛医院,山东 济南,250001)

[摘要] 目的:研究补肾清透方(以下简称“补清方”)对肾虚型慢性荨麻疹的作用机制。方法:选取昆明种雄性小鼠50只,随机分为空白对照组、模型组、氯雷他定组及补清方高、低剂量组,每组各10只。将除空白组外的40只小鼠与发情期雌鼠同笼,诱导其房事不节以制备肾虚模型,并采用注射卵白蛋白、氢氧化铝结合百日咳疫苗模拟荨麻疹模型。眼眶取血并分离血清,采用双抗夹心ELISA法测试血清免疫球蛋白E(IgE)、组胺(HIS);剥取小鼠主动脉,中性甲醛固定,采用免疫组织化学法检测血管壁组织中白细胞介素-4(IL-4)、细胞干扰素- γ (IFN- γ)的表达量。结果:与空白组比较,模型组血清IgE、HIS水平及血管壁组织中IL-4、IFN- γ 的表达量均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,补清方高、低剂量组及氯雷他定组小鼠IgE、HIS、IL-4、IFN- γ 含量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);3个用药组各个指标差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论:补清方可调整T细胞对相关细胞因子异常分泌以改善荨麻疹病情,是本病行之有效的治疗方剂。

[关键词] 慢性荨麻疹;肾虚型;补肾清透方;实验研究

[中图分类号] R275.982.4 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.10.062

Effect of Bushen Qingtou prescription on cytokines in a mouse model of chronic urticaria with kidney deficiency

ZHAN Zhaoshuang¹, WANG Jiafeng¹, GUO Wei¹, LIANG Xiaodong¹, GAO Meng², SHI Xin¹, FENG Yifan¹

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong, China;

2. Hospital of Neck, Shoulder, Lower Back, and Leg Pain, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250001, Shandong, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of action of Bushen Qingtou prescription in the treatment of chronic urticaria with kidney deficiency. Methods: A total of 50 male Kunming mice were randomly divided into blank control group, model group, loratadine group, and high- and low-dose Bushen Qingtou prescription groups, with 10 mice in each group. All mice except those in the blank control group were caged with female mice in estrus to induce excess of sexual intercourse, in order to establish a model of kidney deficiency, and they were given injection of ovalbumin, aluminum hydroxide, and pertussis vaccine to establish a model of urticaria. Orbital blood samples were collected, serum was isolated, and double-antibody sandwich ELISA was used to measure the serum levels of immunoglobulin E (IgE) and histamine (HIS); the aorta was collected and fixed by neutral formalin, and immunohistochemistry was used to measure the expression of interleukin-4 (IL-4) and interferon- γ (IFN- γ) in vascular wall. Results: Compared with the blank control group, the model group had significant increases in the serum levels of IgE and HIS and the expression of IL-4 and IFN- γ in vascular wall ($P < 0.05$). Compared with the model group, the high- and low-dose Bushen Qingtou prescription groups and the loratadine group had signif-

基金项目:山东省高校科研计划项目(编号:J18KA289);山东省中医药科技发展计划项目(编号:2013-023,2015-033);山东中医药大学科研创新团队项目(中药理论应用及药效筛选团队)

第一作者:展照双,女,副教授,硕士研究生导师,研究方向:感染性疾病的中医药防治研究,温病学理论及临床应用研究,肺系疾病中医临床防治研究

通讯作者:王加锋,男,副教授,硕士研究生导师,研究方向:中药药性理论与临床应用研究,炮制对药性、功效影响研究, E-mail: wjffeng2000@126.com

ificant reductions in IgE, HIS, IL-4, and IFN- γ ($P < 0.05$), and there were no significant differences in the above indices between the three treatment groups ($P > 0.05$). Conclusion: Bushen Qingtong prescription can improve urticaria by regulating the effect of T cells on the abnormal secretion of related cytokines and is thus an effective prescription for the treatment of this disease.

[Key words] chronic urticaria; kidney deficiency; Bushen Qingtong prescription; experimental study

慢性荨麻疹(chronic urticaria, CU)为由多种致病原引发的过敏性皮肤病,病程反复发作长达6周以上。因其具有易复发、病情顽固、迁延难愈的特点,对患者健康与正常生活造成极大的影响^[1]。临床上对于本病的诊断较为直接,通过患者的临床表现结合现代医学检验即可确诊。该病在治疗方面多从抑制变态反应出发,采取诸如抗组胺药物、糖皮质激素等,该类药物多易产生身体倦怠、体质量增加、嗜睡等不良反应,且久服后机体耐药性逐步增加从而影响疗效,临床使用效果欠佳^[2]。

中医学称荨麻疹为“瘾疹”,“瘾者,即疹之属,肿而易痒”(《临证指南医案》)。其发病时可见红疹居无定处、瘙痒难耐、病情反复等风邪为病的症状,故一般认为其发生与风邪息息相关。春季风热邪气多发,亦为CU高发季节,结合其临床特征与发病时间,依据温病学理论,本病可归属于“春温”范畴。叶天士曾指出:“春温一证,由冬令收藏未固”,即为精亏于前,热发于内。本课题组在前期研究^[3-4]基础上认为,本病以肾精亏虚为发病之本,风热外袭、卫营同病为标,创补肾清透方(以下简称“补清方”),临床疗效满意。本研究以补清方干预肾虚型CU小鼠模型,观察此方对模型小鼠血清中血清免疫球蛋白E(IgE)、组胺(HIS),血管壁组织中白细胞介素-4(IL-4)、细胞干扰素- γ (IFN- γ)表达量的影响,探究其对CU的治疗作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 昆明种健康小鼠,体质量(20 ± 5)g,250只,其中雌性200只,雄性50只,由山东大学实验中心提供,实验动物许可证号:SCXK(鲁)20130009。在山东中医药大学动物实验中心规范饲养,温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度40%~60%,动物自由摄食饮水。小鼠饲料由山东中医药大学动物实验中心提供。

1.2 药物及试剂 补清方组成:干地黄6g,山茱萸6g,山药6g,牡丹皮6g,金银花6g,连翘6g,大青叶6g,玄参6g。免煎颗粒,购于山东中医药大学中鲁医院,配制成高剂量(浓度为3.33g/ml)和低剂量(浓度为0.83g/ml)。氯雷他定片,华瑞制药有限公司,批号:H20040797,配制成浓度为0.67mg/ml;戊酸雌二醇,DELPHARM Lille S. A. S,批号:J20130009;右旋糖酐溶液,泓源制药有限公司,批号:H22026293;氢氧化铝,上海青平药业有限公司,批号:H31020657;百日咳疫苗,成都生物制品研究所有限责任公司,批号:T-CJ2016-0703。细胞干扰素试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:LOT#M20170315;免疫球蛋白试剂盒,南京建成生物工程研究所,

批号:LOT#20170318;白细胞介素试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:LOT#M20170315;组胺试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:LOT#20170318;中性甲醛,上海国药化学试剂有限公司,批号:20160428。

1.3 仪器 YP*N型电子天平,上海精密科学仪器有限公司;高速冷冻离心机,Thermo Fisher Scientific;DHP-420型电热恒温培养箱,北京永光明医疗仪器有限公司;SpectraMax M5型多功能酶标仪,美国Molecular Devices。

2 实验方法

2.1 动物分组及给药 将40只雄性小鼠随机分为模型组、氯雷他定组、补清方高剂量组、补清方低剂量组,每组10只,每只雄性小鼠配5只雌性小鼠诱导房事不节以制造肾虚模型。10只雄性小鼠为空白组。补清方高剂量组每天给药量1g(0.3ml),补清方低剂量组每天给药量0.25g(0.3ml),氯雷他定组每天给药0.2mg(0.3ml),空白组和模型组灌胃给予等体积0.9%氯化钠注射液,各组动物在造模的同时均连续灌胃给药21d,1次/d。

2.2 造模及处理

2.2.1 肾虚型模型制备 参考文献^[5]制备肾虚型动物模型。动情期雌鼠准备:200只健康昆明种雌鼠,每天灌胃戊酸雌二醇混悬液0.2ml(0.1mg/ml),促雌鼠进入动情期,以阴道涂片检查角化细胞证实。雄鼠筛选:将每只雄鼠与2只动情期雌鼠同笼,次日取出雌鼠有阴道栓,其笼中的雄鼠为实验用雄鼠,每只雄鼠与5只雌鼠同笼,注意每天及时更换动情期雌鼠以诱导房事不节制备肾虚模型。

2.2.2 变态反应及处理 参考文献^[6]制备慢性荨麻疹模型。除空白组外,其余各组动物在给药前第1天和第5天肌肉注射致敏物质:10mg卵白蛋白、100mg氢氧化铝溶于1ml 0.9%氯化钠注射液中,在小鼠两后腿各肌肉注射0.1ml,在给药前1d小鼠腹腔注射百日咳疫苗 2×10^{10} /只。

2.3 指标检测 给药结束后处死动物,眼眶取血,3000r/min离心10min分离血清,另剥取小鼠主动脉置于中性甲醛固定。1)采用双抗夹心ELISA法测试血清IgE, HIS; 2)免疫组织化学检测血管壁组织中IL-4、IFN- γ 表达量。严格按照试剂盒操作。

2.4 统计学方法 应用SPSS 17.0统计软件,采用组间对照和组内治疗前后自身对照,以单因素方差分析。所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,先进行方差齐性检验,方差齐用LSD检验,方差不齐则用Dunnett t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组小鼠 IgE、HIS 测定结果比较 与空白组比较、模型组 IgE、HIS 含量显著升高,差异有统计学意义;与模型组比较,氯雷他定组、补清方高剂量组、补清方低剂量组 IgE、HIS 含量均明显降低,差异有统计学意义;与氯雷他定组比较,补清方高、低剂量组 IgE、HIS 含量差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。(见表 1)

表 1 各组小鼠 IgE、HIS 测定结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	IgE (ng/ml)	HIS (ng/ml)
空白组	10	3.88 ± 1.17	14.13 ± 3.51
模型组	10	10.26 ± 4.58 ^a	25.89 ± 7.99 ^a
氯雷他定组	10	5.68 ± 1.66 ^b	16.45 ± 3.88 ^b
补清方高剂量组	10	4.91 ± 1.69 ^b	15.12 ± 4.91 ^b
补清方低剂量组	10	6.18 ± 2.23 ^b	17.83 ± 4.37 ^b

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

3.2 各组小鼠 IL-4、IFN- γ 测定结果比较 与空白组比较,模型组小鼠血管壁组织中 IL-4、IFN- γ 的表达水平明显升高,差异有统计学意义;与模型组比较,氯雷他定组、补清方高剂量组、补清方低剂量组 IL-4、IFN- γ 表达水平明显降低,差异有统计学意义;与氯雷他定组比较,补清方高、低剂量组 IL-4、IFN- γ 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。(见表 2)

表 2 各组小鼠 IL-4、IFN- γ 测定结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	IL-4	IFN- γ
空白组	10	26.95 ± 4.30	181.54 ± 58.10
模型组	10	47.44 ± 12.51 ^a	235.42 ± 89.54 ^a
氯雷他定组	10	33.39 ± 8.98 ^b	189.38 ± 76.54 ^b
补清方高剂量组	10	28.29 ± 3.58 ^b	148.49 ± 43.20 ^b
补清方低剂量组	10	31.39 ± 5.21 ^b	170.78 ± 46.04 ^b

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

4 讨 论

CU 通常被认为是变态反应性疾病之一^[7],其发病机制尚未完全阐明,一般以组胺的异常释放为其病变的中心环节。组胺主要来自肥大细胞与嗜碱粒细胞,组胺及其受体在炎症过程中相互作用,从而引发血管渗漏,使得血管通透性上升,造成红斑、水肿等病变,与炎症细胞一起导致变态反应的发生^[8]。李朝阳等^[9]研究发现,CU 患者发病时血清中组胺释放因子的含量显著超过于常人,且在血清中发现组胺释放因子反应性 IgE 含量亦高于常人。既往研究认为,T 淋巴细胞与 CU 发病之间存在着十分密切的关系^[10]。施林林等^[11]进行临床实验时发现,CU 患者血清中 IL-4 等细胞因子水平提高明显,进一步揭示 CU 患者较高的 T 辅助细胞表达,身体处于超敏反应状态。Th 细胞是对 T、B 淋巴细胞应答起辅助作用的细胞亚群。Kim Y 等^[12]认为,IFN- γ 与 IL-4 分别作为 Th1 与 Th2 的特征性细胞因子,两者的比

值即为 Th1 与 Th2 细胞的应答模式,可产生对 IgE、IgG 起正负调节的作用因子。IgE 表达水平与 IL-4 表达水平二者呈正相关,与 IFN- γ 水平呈负相关。且在免疫调节中,IL-4 在 IgE 正馈效应中起到重要的作用^[13]。IgE 是介导 I 型变态反应的主要抗体,是变态反应中的关键因素之一。血清中 IgE 水平、抗高亲和力 IgE 受体自身抗体水平升高均可导致失衡^[13],进一步使得肥大细胞与嗜碱粒细胞处于致敏状态,造成组胺等介质的异常分泌,于肌肤表面出现风团等变态反应。张敏等^[14]学者的研究指明,血清中 IgE 表达含量与 CU 的病程与严重程度关系密切,当 IgE 总量高于 175IU/ml 时,与 CU 的轻、中、重度成正相关。

本研究实验结果显示,模型组在进行造模后,其 IgE、HIS、IL-4、IFN- γ 血清含量均高于空白组,且差异具有统计学意义,说明造模成功。经补清方治疗之后,IgE、HIS、IL-4 的含量较模型组明显降低,差异具有统计学意义;各项指标数据均优于氯雷他定治疗组,但差异无统计学意义。综上所述,补清方对于肾虚型 CU 通过降低 IgE、HIS、IL-4 的表达水平,从而对 Th1/Th2 细胞因子的平衡状态产生影响,降低炎症因子的释放,抑制 I 型变态反应的发生从而产生治疗效果。

“冬不藏精,春必病温”,肾精宜收宜藏,若素体禀赋不足或后天摄生不慎,不知持满则可使肾精先亏于前。精血同源皆属阴,肾精不足者,多伴有营血亏虚,阴虚生内热,营热阴伤,伏热内羁,迨发陈之春,厥阴风木行令,风热袭肺,内伏之热被引,风火相煽即发为瘾疹^[3]。“伏气自内而动,一达于外,表里皆热也”(《时病论·卷一》)。综上所述,肾精亏虚、风热外袭、卫营同病为本病基本病机,故临证当以补肾填精、疏风清热、凉营透疹为法。

补肾清透方创制参考《温病条辨》中银翘散去豆豉加细生地丹皮大青叶倍元参方。遵叶氏治疗发疹“酌以辛凉辛胜,及甘寒苦寒咸寒淡渗等法而治之”(《临证指南医案·卷五》)的原则用药。方中干地黄甘苦寒,“乃补肾家之要药,益阴血之上品”(《本草经疏》);玄参甘咸寒,功可“清金补水”(《玉楸药解》),补肾水之时又合陆子贤“疹为太阴风热”之论。二药合用,又合增液汤方义,于补肾养阴中,寓清营分邪热之效。金银花甘寒,清补两可,《本草通玄》记载本药“补虚疗风”;连翘苦微寒,其性上浮,疏散风热,清热解毒。与银翘配伍,清凉透达,卫营同治,有轻可去实之能。“营分受热,则血液受劫”(《温热论》),大青叶苦寒凉血,牡丹皮苦、辛、寒,主温病发斑,入营血分又可和血散血。山药甘平,归肺、脾、肾三经,功可固肾填精,“肾者,胃之关也”,其又可补脾,先后天同调以复其本;山茱萸酸温,补肾之余又可涩精,使诸药补肾而不泄。此二药合用,治此病肾精亏虚之本。诸药合用,寓补、清、透三法,标本兼治。现代药理学研究发现,山药可以增强机体免疫力,调节血清中 IL-1 β 、

IL-6等细胞因子含量^[15];山茱萸可对大鼠T淋巴细胞的增殖产生有效的抑制效应^[16];生地黄中所富含的多糖物质,可以促进Th1与Th2细胞因子的表达^[17];《中华本草》中又载诸如丹皮、金银花、连翘、玄参等药,均有抗感染之效。

从现代研究及本实验发现,补清方通过调节人体免疫系统,消炎抗敏干预CU发病,然对于补清方具体作用机制以及CU发病原理至今尚未明确。近年来研究发现,Th17作为与Th1、Th2同为CD4⁺效应T细胞的分化亚群,在CU的发病机制与治疗上同时起到了关键性作用^[18],是对原Th1/Th2模式的重要补充。对Th17细胞因子在CU中的相关研究,将会是进一步阐明CU发病以及补清方治疗作用机制的方向。

参考文献

- [1] 潘立文,丁昭莉,赵桂刚,等. 从少阳经论治慢性荨麻疹[J]. 吉林中医药,2018,38(8):876-879.
- [2] 陆江涛,孔珍珍,刘春保,等. 瘾疹丸联合盐酸西替利嗪片治疗慢性荨麻疹疗效观察[J]. 新中医,2018,50(7):154-156.
- [3] 展照双,王加锋. 从“冬不藏精,春必病温”探讨荨麻疹发病机制[J]. 山东中医杂志,2014,33(11):879,899.
- [4] 王加锋,展照双. 基于“藏于精者,春不病温”理论辨治荨麻疹[J]. 上海中医药杂志,2018,52(8):65.
- [5] 杨裕华,李震,陶汉华. 金匱肾气丸、右归丸对肾虚小鼠模型影响的脑基因组图谱研究[J]. 北京中医药大学学报,2008,31(9):600-607.
- [6] 郭静,艾儒棣,段渠,等. 当归饮子治疗气血两虚型慢性荨麻疹小鼠的机理研究[J]. 广州中医药大学学报,2013,30(6):884-887.
- [7] 王朵勤,徐金华. 2016年慢性荨麻疹临床进展回顾[J]. 皮肤病与性病,2017,39(1):16-18.
- [8] 钟斐,蒋瑾瑾. 组胺及组胺受体对免疫系统调节作用[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(21):9753-9755.
- [9] 李朝阳,孙仁山,李菁,等. 慢性荨麻疹血清中组胺释放因子(HRF)及HRF反应性IgE的检测[J]. 中国皮肤性病学杂志,2014,28(5):461-463.
- [10] 朱海,邓侃,连粤湘,等. 自拟中药汤联合非索非那定、匹多莫德治疗难治性慢性特发性荨麻疹的疗效观察及安全性分析[J]. 辽宁医学杂志,2017,31(2):20-21,24.
- [11] 施林林,刘振强,戚建明. 复方甘草酸苷片对慢性荨麻疹患者血清中白细胞介素水平的影响[J]. 临床和实验医学杂志,2017,16(19):1931-1934.
- [12] Kim Y, Lee S, Kim YS, et al. Regulation of Th1/Th2 cells in asthma development: a mathematical model [J]. Math Biosci Eng, 2013,10(4):1095-1133.
- [13] 何泽生,安国芝,赵海春,等. 慢性特发性荨麻疹患者外周血总IgE与C3、C4、IL-2、IL-4、IFN- γ 的相关性[J]. 中国皮肤性病学杂志,2013,27(3):246-249.
- [14] 张敏,李桂珍,宋蒙蒙,等. 慢性荨麻疹患者血清二胺氧化酶活性和总IgE检测及意义[J]. 天津医药,2011,39(6):514-516.
- [15] 邵礼梅,许世伟. 山药化学成分及现代药理研究进展[J]. 中医药学报,2017,45(2):125-127.
- [16] 曹喻灵,雷小勇. 山茱萸现代药理作用研究进展[J]. 湖南学院学报:医学版,2013,15(2):76-78.
- [17] 冯建明,赵仁. 三种地黄炮制品现代研究进展[J]. 云南中医学院学报,2000,23(4):40-42.
- [18] 何沅莉,单葵,曹雨微,等. 慢性荨麻疹患者血清IL-17 IL-23 TGF- β 水平检测分析[J]. 现代医药卫生,2018,34(3):364-365,368. (收稿日期:2019-03-28)

(上接第142页)

本实验通过观察PNS对脑缺血再灌注损伤小鼠海马区损伤相关蛋白缺氧诱导因子Bax和Bcl-2表达的影响,结果表明PNS可以减少脑组织细胞的凋亡,在脑缺血再灌注损伤可以起到一定的神经元保护作用。这种保护效应可以通过Bax和Bcl-2在脑的表达间接显示出来。本实验结果显示,给予PNS后脑缺血再灌注损伤中Bax的表达明显下降,且Bax的表达,由此推测PNS能明显降低缺血再灌注损伤的脑组织中Bax的表达,有效修复对脑缺血再灌注引起的损伤,在头颈部手术后的并发症治疗有的预防作用。

参考文献

- [1] 李琳,张志强. 脑缺血再灌注损伤中脑细胞凋亡的研究进展[J]. 中华物理医学与康复杂志,2005,27(1):60-62.
- [2] 宋达,魏鑫,袁云云,等. 三七总皂苷治疗脑血管疾病研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2017,24(8):129-132.
- [3] 令狐艳,余资江,肖朝伦,等. 双侧颈总动脉夹闭法构建脑缺血再灌注损伤模型的经验总结[J]. 四川解剖学杂志,2010,18(4):19-20.
- [4] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. 江西医学院学报,1997,37(4):41.
- [5] 孙幼芳,余景瑞,王凡英. 简便快速敏感的一种免疫组化染色法——SABC法[J]. 铁道医学,1995,32(4):197-198.
- [6] 黄文琴. 三七的临床应用功效及药理分析[J]. 医学信息(中旬刊),2011,24(1):304.
- [7] 黄小平,邓常清,邱咏园,等. 黄芩甲苷和三七的三种有效成分分配伍对小鼠脑缺血/再灌注后氧化应激和Nrf2/HO-1途径的影响[J]. 中国药理学通报,2013,29(11):1596-1601.
- [8] 高阳,吴婷,丁新生,等. 伊达拉奉对沙土鼠全脑缺血再灌注损伤后海马CA1区神经元凋亡相关基因Bcl-2、Bax表达的影响[J]. 江苏大学学报:医学版,2004,14(5):19-20,23,97. (收稿日期:2019-03-13)