文章编号:1000-5404(2010)09-0951-03

论著

四物消风颗粒对变应性接触性皮炎小鼠胸腺、脾脏及其T、B淋巴细胞增殖的影响

王辰允[1],孙学刚[2],刁建新[2],赵晓山[3] (100853 北京,中国人民解放军总医院药材处[1];510515 广州,南方医科大学:中医药学院中医证候实验室[2],南方医院中医科[3])

[摘要] **目的** 探讨中药四物消风颗粒对变应性接触性皮炎(allergic contact dermatitis, ACD)小鼠免疫器官胸腺、脾脏及其T、B淋巴细胞增殖的影响。**方法** 将60只小鼠完全随机分为6组,分别为正常对照组,ACD模型对照组,氢化可的松阳性对照组及四物消风颗粒高、中、低剂量组,每组10只。观测各组小鼠耳肿胀程度、胸腺指数、脾脏指数以及丝裂原诱导的脾T、B淋巴细胞的增殖反应。**结果** 与模型对照组小鼠耳肿胀程度比较,氢化可的松组,四物消风颗粒低、中、高剂量组小鼠耳肿胀程度差异均有统计学意义($P<0.05$)。两两比较显示四物消风颗粒中、高剂量组优于低剂量组($P<0.05$),与阳性对照组比较无明显差异($P>0.05$)。与模型对照组小鼠胸腺指数、脾脏指数比较,氢化可的松阳性对照组、四物消风颗粒低剂量组、中剂量组、高剂量组均显著减低($P<0.05$),四物消风颗粒高、中剂量组优于低剂量组($P<0.05$),四物消风颗粒高剂量组与阳性对照组无明显差异($P>0.05$)。与模型对照组脾脏T、B淋巴细胞增殖活性比较,氢化可的松阳性对照组、四物消风颗粒低剂量组、中剂量组、高剂量组差异均有统计学意义($P<0.05$)。同时两两比较显示四物消风颗粒中、高剂量组优于低剂量组($P<0.05$),与阳性对照组比较无明显差异($P>0.05$)。**结论** 四物消风颗粒防治小鼠ACD的药理机制可能与其调节T、B淋巴细胞功能作用有关。

[关键词] 四物消风颗粒;变应性接触性;皮炎;免疫器官;淋巴细胞
[中图法分类号] R286;R392.12;R758.22 **[文献标志码]** A

Effect of four ingredients for dispersing pathogenic wind granules on thymus, spleen and proliferation of their T and B lymphocytes in mice with allergic contact dermatitis

Wang Chenyun[1], Sun Xuegang[2], Diao Jianxin[2], Zhao Xiaoshan[3] ([1]Bureau of Materia Medica, General Hospital of PLA, Beijing, 100853; [2]Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome, College of Traditional Chinese Medicine, [3]Department of Traditional Chinese Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of four ingredients for dispersing pathogenic wind (FIDPW) granules on thymus, spleen and proliferation of their T and B lymphocytes in mice with allergic contact dermatitis (ACD). **Methods** Sixty mice were randomly divided into normal group, ACD group, hydrocortisone (HC) group and high, medium, and low FIDPW dose groups, 10 mice in each group. Auricle swelling, spleen and thymus indexes, mitogen-induced proliferation of spleen T and B lymphocytes were determined. **Results** The auricle swelling was lower in HC, low, medium and high FIDPW dose groups than in ACD group ($P<0.05$). The effect of high and medium FIDPW dose was better than that of low FIDPW dose on auricle swelling ($P<0.05$) with no difference in HC, high and medium FIDPW dose groups ($P>0.05$). The thymus and spleen indexes were significantly lower in HC, low, medium and high FIDPW dose groups than in ACD group ($P<0.05$). The effect of high and medium FIDPW dose was better than that of low FIDPW dose on thymus and spleen indexes with no difference between high FIDPW dose and HC groups ($P>0.05$). A significant difference was found in mitogen-induced proliferation of spleen T and B lymphocytes in ACD, HC, low, medium and high FIDPW dose groups ($P<0.05$). The effect of medium and high FIDPW dose was better than that of low FIDPW dose on mitogen-induced proliferation of spleen T and B lymphocytes ($P<0.05$) with no difference between low and high FIDPW dose and HC groups ($P>0.05$). **Conclusion** FIDPW granules can prevent and treat ACD in mice by regulating the function of T and B lymphocytes.

[Key words] four ingredients for dispersing pathogenic wind granules; allergic contact dermatitis; dermatitis; immune organ; lymphocytes

Corresponding author: Zhao Xiaoshan, Tel: 86-20-61641671, E-mail: zhaoxs2004@yahoo.com.cn

[通信作者] 赵晓山,电话:(020)61641671,E-mail:zhaoxs2004@yahoo.com.cn

四物消风颗粒源于《医宗金鉴》所载四物消风饮，由生地、当归、赤芍、川芎、荆芥、防风、独活、白蒺皮、薄荷、蝉蜕等多味中药组成，具有养血、活血、消风的功效，临床常用于治疗接触性皮炎、湿疹、荨麻疹等变态反应性皮肤病[1-3]。然而，目前对于四物消风颗粒的药理机制尚未明确。本研究拟探讨四物消风颗粒对变应性接触性皮炎（allergic contact dermatitis，ACD）小鼠免疫器官胸腺、脾脏及其T、B淋巴细胞增殖的影响，为其临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂、药物和仪器

10～12周龄雄性SPF级BALB/c小鼠60只，体质量18～22 g，由广东省医学实验动物中心提供。

刀豆蛋白A（ConA）、脂多糖（LPS）购自Sigma公司，CCK-8试剂盒购自碧云天公司，RPMI1640干粉培养基购自HyClone公司，胎牛血清购自杭州四季青公司，2、4二硝基氟苯（DNFB）为日本东京化成工业株式会社产品，橄榄油（化学纯）为中国医药上海试剂公司产品，丙酮（分析纯）为广东光华化学厂有限公司出品，其他试剂均为国产分析纯。

氢化可的松注射剂为哈尔滨东方制药有限公司生产。四物消风颗粒剂的中药生药处方由生地30 g、当归10 g、赤芍10 g、川芎6 g、荆芥10 g、防风10 g、独活10 g、白蒺皮10 g、薄荷6 g、蝉蜕6 g、柴胡6 g、大枣10 g组成，将上述各单味中药的免煎颗粒混合，以制作四物消风颗粒，由广东一方制药有限公司生产。

CO_2培养箱：美国Heraeus公司生产，超净工作台：上海净化设备制造公司生产，倒置显微镜：日本OLYMPUS公司生产，SARTORIUS R2000型分析天平：德国制造，外径千分尺：桂林量具刃具厂生产，打孔器：北京吉安得尔科技有限公司，Bio-Rad酶标仪：美国制造。

1.2 实验方法

1.2.1 ACD小鼠模型的建立　参照文献[4,5]方法，建立ACD小鼠模型。BALB/c小鼠于实验前1 d于腹部去毛，面积约3 cm×3 cm，实验前1 d和实验第1天分别于去毛部位涂布0.5% DNFB（DNFB以4∶1丙酮橄榄油为基质配置）25 μl各致敏1次，末次致敏后于实验第5天于小鼠左耳背部涂0.25% DNFB（DNFB以4∶1丙酮橄榄油为基质配置）25 μl诱发皮炎，右耳涂等量丙酮橄榄油基质作对照。造模成功标准：左耳部组织病理表现符合ACD的病理改变，可见小鼠左侧耳廓表皮出现细胞内及细胞间水肿，网状变性及海绵形成，真皮乳头水肿，浅层可见血管扩张，大量单一核细胞及少量多核细胞浸润。

1.2.2 实验分组及处理方法　将60只小鼠完全随机分为6组，分别为正常对照组，模型对照组，氢化可的松阳性对照组，四物消风颗粒高、中、低剂量组，每组10只。处理方法：实验开始后4 d每天灌服药物或生理盐水1次，每只小鼠灌胃量为0.4 ml，实验第5天诱发前2 h、诱发后8 h各灌服1次。正常对照组、模型对照组灌服生理盐水，阳性对照组灌服氢化可的松24 mg/（kg·d），四物消风颗粒高、中、低剂量组分别按照等效剂量的4倍[生药75.2 g/（kg·d）]、2倍[生药37.6 g/（kg·d）]、1倍[生药18.8 g/（kg·d）]给药。正常对照组除每天灌服相应的生理盐水外不予任何处理。小鼠灌胃方法：每次灌胃0.4 ml/10 g。将上述四物消风颗粒免煎剂，加入相应体积的蒸馏水，加热充分溶解后，配制四物消风颗粒高（1.88 g/ml）、中（0.94 g/ml）、低剂量（0.47 g/ml）。

1.2.3 观测指标　实验各组在实验第6天，即诱发皮炎24 h，处死小鼠，取材并检测以下指标。

1.2.3.1 小鼠耳肿胀程度　以直径0.8 cm的打孔器取左右耳中部的组织块，分析天平称质量，计算左右耳块的质量差，即为小鼠耳肿胀程度。

1.2.3.2 胸腺指数和脾脏指数　实验结束后处死小鼠，取胸腺、脾脏称质量，分别与小鼠体质量相比，即得胸腺指数、脾脏指数。

1.2.3.3 ConA、LPS分别诱导的脾T、B淋巴细胞增殖反应　参照文献[6]方法，制备脾脏淋巴细胞悬液1×10^6/ml，于96孔无菌细胞培养板中每孔加入细胞悬液100 μl（10^5细胞），过夜（12～18 h），分别加入5 μl ConA（终浓度5 mg/L）或LPS（终浓度5 mg/L），设3个复孔。置37 ℃，5% CO_2培养箱内培养72 h后，每孔加入10 μl的CCK-8工作液，再放入37 ℃，5% CO_2培养箱继续培养4 h。结束培养后在酶标仪上于450 nm波长处读每孔光密度值[D(450)]。

1.3 统计学方法

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，选用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析，统计检验水平为$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 实验各组小鼠耳肿胀程度、胸腺指数及脾脏指数

诱发后除正常对照组外各组小鼠左耳均有不同程度的肿胀，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与模型对照组比较，四物消风颗粒高、中、低剂量组及氢化可的松组小鼠的耳肿胀程度差异均有统计学意义（$P<0.05$）。同时两两比较显示四物消风颗粒中、高剂量组优于低剂量组（$P<0.05$），与阳性对照组比较无明显差异（$P>0.05$，表1）。提示随着四物消风颗粒给药剂量的增高，对小鼠耳片炎症的抑制作用增强。

表1 实验各组小鼠耳肿胀程度、胸腺指数及脾脏指数比较（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	耳肿胀程度（mg）	胸腺指数（$\times10^{-3}$）	脾脏指数（$\times10^{-3}$）
正常对照组	0.032±0.012	0.79±0.12	3.65±0.26
模型对照组	9.795±2.339^{a}	1.17±0.23^{a}	4.54±0.45^{a}
氢化可的松阳性对照组	2.856±1.316^{ab}	0.88±0.11^{ab}	3.83±0.29^{ab}
四物消风颗粒低剂量组	5.942±0.968^{abc}	1.08±0.19^{abc}	4.19±0.53^{abc}
四物消风颗粒中剂量组	3.095±1.289^{abd}	0.99±0.10^{abcd}	4.01±0.32^{abcd}
四物消风颗粒高剂量组	2.975±1.120^{abd}	0.90±0.20^{abd}	3.92±0.58^{abd}

a：$P<0.05$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与模型对照组比较；c：$P<0.05$，与阳性对照组比较；d：$P<0.05$，与四物消风颗粒低剂量组比较

与正常对照组比较，其他各组胸腺指数、脾脏指数均有所增加（$P<0.05$）。与模型对照组比较，氢化可的松阳性对照组，

四物消风颗粒高、中、低剂量组胸腺指数和脾脏指数均显著减低($P<0.05$)。四物消风颗粒高、中剂量组优于低剂量组($P<0.05$),四物消风颗粒高剂量组与阳性对照组比较无明显差异($P>0.05$,表1)。提示随着四物消风颗粒给药剂量的增高,对小鼠免疫调节功能增强。

2.2 实验各组小鼠T、B淋巴细胞的增殖反应

与正常对照组比较,其他各组T、B淋巴细胞增殖活性均明显增高($P<0.05$)。四物消风颗粒高、中、低剂量组及氢化可的松组对小鼠脾脏T、B淋巴细胞增殖活性与模型对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。同时两两比较显示四物消风颗粒中、高剂量组优于低剂量组($P<0.05$),与阳性对照组比较无明显差异($P>0.05$,表2)。提示随着四物消风颗粒给药剂量的增高,对小鼠T、B淋巴细胞增殖转化的抑制作用增强。

表2 实验各组小鼠T、B淋巴细胞增殖反应比较[$D(450)$, $n=10$, $\bar{x}\pm s$]

组别	T淋巴细胞	B淋巴细胞
正常对照组	0.386±0.089	0.237±0.064
模型对照组	0.556±0.165[a]	0.428±0.125[a]
氢化可的松阳性对照组	0.392±0.096[ab]	0.279±0.055[ab]
四物消风颗粒低剂量组	0.492±0.157[abc]	0.389±0.143[abc]
四物消风颗粒中剂量组	0.406±0.129[abd]	0.282±0.092[abd]
四物消风颗粒高剂量组	0.403±0.136[abd]	0.276±0.108[abd]

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与模型对照组比较;c:$P<0.05$,与阳性对照组比较;d:$P<0.05$,与四物消风颗粒低剂量组比较

3 讨论

变应性接触性皮炎(ACD)是以T细胞及巨噬细胞为主要效应细胞的迟发型超敏反应,是一种引起以单核细胞浸润及组织细胞的损害为主要病理特征的炎性反应[7]。传统中医药对此疾病有着大量的临床实践,积累了丰富的经验,包括四物消风饮等多种方药被广泛地应用在临床上,疗效显著。针对抗变态反应中药作用机制的研究,20世纪90年代有学者开始应用DNFB诱导的小鼠变应性接触性皮炎动物模型来筛选有效抑制Ⅳ型变态反应的中药[8]。在本实验中,应用DNFB诱发建立经典的小鼠迟发型超敏反应的皮炎模型,观测小鼠炎症局部耳廓的肿胀程度,以评价药物抗变态反应的疗效。结果表明,当在变应性接触性皮炎的致敏期及激发期给予中药四物消风颗粒的干预后,可显著抑制ACD小鼠耳部的炎症肿胀($P<0.05$),而且随着药物剂量的增高,抑制效果越明显,存在量效关系。另外,本实验之所以选择中药免煎颗粒,因为它不但具有不需煎煮、直接冲服、用量准确、溶解迅速等特点,又保持中药的药效、效能,同时在制取过程中采取现代先进技术,使中药真正做到安全、高效、方便、可控,且服用、携带、储藏均十分方便,十分适合临床大量应用[9]。

本研究在动物实验上验证了四物消风颗粒对ACD的疗效,为了探讨四物消风颗粒的药理机制我们又进一步观察其对ACD小鼠免疫器官及T、B淋巴细胞增殖分化的影响。胸腺及脾脏是机体重要的免疫器官,其中胸腺是T淋巴细胞分化成熟的场所,而脾脏则为各类免疫细胞居住的场所,但B淋巴细胞在脾脏中所占比例相对较大[10]。本实验结果表明,在DNFB诱导的小鼠ACD模型中,其胸腺指数、脾脏指数明显增加($P<0.05$),脾脏B淋巴细胞与T淋巴细胞对丝裂原敏感的增殖反应均显著增强($P<0.05$),说明免疫器官胸腺、脾脏及其T、B淋巴细胞均参与了ACD的病理过程。四物消风颗粒可显著抑制ACD小鼠胸腺指数、脾脏指数的增加,抑制脾脏T、B淋巴细胞增殖转化作用,存在一定的量效关系。但是,四物消风颗粒高、中剂量组对ACD小鼠的免疫调节实验结果未见明显差异,说明四物消风颗粒中剂量可能已达到最佳有效剂量,提示临床应用时应注意中药的量效关系,可适当的增大剂量。总之,四物消风颗粒可通过调节机体T、B淋巴细胞的功能发挥免疫抑制作用,以防治变应性接触性皮炎。

参考文献:

[1] 田刚. 四物消风饮治疗慢性荨麻疹30例总结[J]. 湖北中医杂志, 2007, 23(6): 21-22.
[2] 黄剑. 四物消风饮治疗慢性湿疹疗效观察[J]. 四川中医, 2009, 27(8): 110.
[3] 杨卫兵, 李欣, 张栋, 等. 金属所致系统性接触性皮炎81例临床分析[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(17): 1590, 1597.
[4] 林熙然, 涂彩霞, 杨春梅, 等. 抗Ⅳ型变态反应中药治疗湿疹的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(4): 258-260.
[5] 李莉, 梁刘萍, 后桂荣, 等. 加味玉屏风颗粒对变应性接触性皮炎NF-κB表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(8): 1582-1584.
[6] 胡庭俊, 康乐, 帅学宏, 等. 山豆根多糖对小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖及分泌一氧化氮的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(5): 70-72.
[7] Douglas J D. Allergic contact dermatitis[J]. Dermatol Nurs, 2009, 21(5): 287-291.
[8] 涂彩霞, 林熙然, 谷玲. 四种中药复方对小鼠实验性皮炎作用的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 1998, 31(4): 244-246.
[9] 丁青龙, 李莹, 丁舒, 等. 中药生药颗粒剂与传统饮片及免煎颗粒临床疗效比较研究[J]. 吉林中医药, 2008, 28(7): 530.
[10] Krecisz B, Chomiczewska D, Kiec-Swierczynska M. The role of regulatory T cells in allergic contact dermatitis[J]. Med Pr, 2009, 60(4): 315-319.

(**收稿**:2010-02-25;**修回**:2010-03-07)
(编辑 王 红)