

川椒方治疗小鼠变应性结膜炎的实验研究

李素毅 高健生 接传红 宋剑涛 严 京

(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:验证川椒方对变应性结膜炎的治疗作用,并初步探讨其作用机制。方法:通过实验观察不同浓度川椒方对小鼠变应性结膜炎模型的临床体征及结膜病理切片改善作用评价其疗效,并通过其对血清 IgG1、IgE、IL-4 的改变初步探讨其作用机制。结果:川椒方能明显改善模型小鼠眼部急性体征、减少晚期细胞反应,降低血清 IgG1、IgE、IL-4 的水平。结论:川椒方对小鼠的变应性结膜炎有明显的治疗作用,其作用机理与能有效降低相关血清免疫球蛋白及免疫因子水平有关。

关键词 变应性结膜炎;动物模型;川椒方

Lab Research of Pricklyash Peel Decoction for Treatment of Allergic Conjunctivitis in Mice

Li Suyi, Gao Jiansheng, Jie Chuanhong, et al.

(Ophthalmic Hospital of CACMS, Add.: No. 33, Lugu Road, Shijingshan District, Beijing, Post code: 100040)

Abstract Objective: To confirm efficacy of Pricklyash Peel Decoction on allergic conjunctivitis, and to make a preliminary analysis on its action mechanism. **Methods:** To observe improvement of vital signs and changes of pathological section by various concentrations of the decoction. Blood serum was taken to determine changes of parameters including IgG1, IgE and IL-4. **Results:** Pricklyash Peel Decoction has significantly improved the model rats' eye acute symptoms, decreased reaction of late cell and reduced the levels of IgG1, IgE and IL-4 in blood serum. **Conclusions:** Pricklyash Peel Decoction has active effect on allergic conjunctivitis. Its action mechanism is related to effective decrease of immune-globulin and immune factors in blood serum.

Key Words Allergic conjunctivitis; Animal model; Pricklyash Peel Decoction

变应性结膜炎(Allergic Conjunctivitis, AC)是最常见的眼表疾病之一,属于中医的“目痒”“痒如虫行症”“时复证”范畴,病情复杂难治。川椒方为高健生主任医师的经验方,临床上取得了良好的疗效。本研究通过建立小鼠变应性结膜炎的动物模型,选择症状学、细胞学和血清免疫学中的较为重要的指标,验证川椒方对变应性结膜炎的治疗作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Balb/c 雌性小鼠,6~8 周,体重 18~20g。(中国医学科学院动物实验中心提供。动物合格证号:SCXK 京 2009-0007)。

1.2 主要试剂 OVA(美国 Sigma 公司, A5503), Al(OH)₃(美国 Sigma 公司, A4682), ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司, CK-E90529M), 川椒方水提液(中药材购自北京燕北药材公司, 知母、地肤子、牛蒡子、川芎、川椒、防风等煎煮后取煎液蒸发浓缩), 盐酸奥罗他定滴眼液(爱尔康公司)。

1.3 主要仪器 高速冷冻离心机(日本久保田 3740), 病理包埋机(北京海鹰达科技发展公司 BMG-011), 病理切片机(德国 LEIC-RM2235), 正置式显微镜+图像分析系统(日本 OLYMPUS-BX51), 全自动酶标仪(Rayto 公司, RT-6000)。

2 方法

2.1 动物模型制备及实验流程 参照 Nakamura 的

AC 小鼠模型方法^[1], balb/c 小鼠进入动物房适应 1 周后开始实验。1) 致敏阶段:于实验第 0 天、7 天、14 天分别给予腹腔注射含 OVA100 μ g 与佐剂 Al(OH)₃5mg 共 200 μ L 的混合物使小鼠致敏。2) 局部加强致敏:第 15 天至 21 天, 每天每眼用 OVA400 μ g 溶于生理盐水中点眼以加强致敏。3) 激发:第 24 天将 OVA(每眼 400 μ g)溶于 pH7.2 的 PBS 液中滴入双眼进行致敏原攻击, 以诱导 AC 症状。4) 治疗:第 25 天开始至 31 天治疗 7 天。5) 再次激发:7 天治疗结束后, 再次 OVA 点眼局部激发, 激发后 20min 观察记录 AC 超敏反应情况, 24h 后摘眼球法采血, 处死动物, 取结膜行 HE、甲苯胺蓝染色, 观察切片变化并计数嗜酸性粒细胞数量; 取血清, ELISA 法检测免疫球蛋白 IgE、IgG1 及免疫因子 IL-4。

2.2 分组及处理 随机分为 6 组, 每组 10 只。1) 空白组为非模型正常小鼠, 生理盐水灌胃; 2) 模型组为 AC 模型小鼠, 生理盐水灌胃; 3) 阳性药物对照组:AC 模型小鼠, 盐酸奥罗他定滴眼液点眼; 4)、5)、6) 组用 AC 模型小鼠, 分别以 5 倍、10 倍、20 倍川椒方水提液灌胃。

2.3 体征评分标准 于点眼激发 20min 后裂隙灯显微镜观察眼部体征。采取盲法由临床眼科医师分别对结膜水肿、结膜充血、眼睑浮肿、分泌物产生 4 项指标的不同程度进行评分(0~3 分)。最后将 4 项指标各

自的分值相加得出总分,最低0分,最高12分。评分标准参照 Magone^[2]、吕秋军^[3]、徐岩等^[4]标准,改良后具体见表1。

表1 改良后体征评分标准

项目	0	1	2	3
分值				
结膜充血	无	血管鲜红 (结膜粉红)	血管深红不易辨 (结膜红色)	弥漫性紫红色
结膜水肿	无	轻微	穹隆深	穹隆浅
眼睑水肿	无	轻微/眼睑外翻	半闭合	超过半闭合
分泌物	无	少量	眼睑及周围 毛发潮湿	全周湿、稠症状

注:总分0~12分。

2.4 细胞计数方法 再次激发24h后放血处死小鼠并立即取材。眼球及眼睑一同取出后10%中性甲醛溶液固定,制蜡块,4 μ m连续切片,苏木素-伊红(HE)、甲苯胺兰染色,显微镜下计数嗜酸性粒细胞、观察肥大细胞。

2.5 免疫血清制备 用摘眼球法采血,4℃恒温离心,3000r/min,15min,-20℃冰箱中低温保存。

2.6 统计学方法 采用SAS 8.02软件进行统计,所有结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示。多组间的比较采用完全随机设计的方差分析。2组间的比较,采用 t 检验;所有统计检验均采用双侧检验。结果以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表2 裂隙灯下小鼠眼部体征评分($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	眼部体征积分
正常组	1.60 $\pm$ 0.84
模型组	10.80 $\pm$ 1.23**
阳性药物组	5.50 $\pm$ 1.08
川椒方低浓度组	7.10 $\pm$ 1.52 $\Delta\Delta^*$
川椒方中浓度组	7.00 $\pm$ 1.25 $\Delta\Delta^*$
川椒方高浓度组	6.00 $\pm$ 1.05 $\Delta\Delta^*$

注:模型组与正常组相比,** $P < 0.01$;川椒方各浓度组与模型组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$;川椒方高浓度组与阳性药物组相比,* $P > 0.05$;川椒方中、低浓度组与阳性药物组相比,* $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 AC小鼠模型观察 模型较正常小鼠易激惹或倦怠,易脱毛。裂隙灯下观察见睑裂较小,充血水肿明显,部分严重小鼠内眦部可见瘙痒后的抓痕。明显畏光、流泪,黏液性分泌物增多,严重的浸湿全眼周皮毛。结膜充血呈乌红色,血管迂曲,水肿明显。病理切片显示:结膜组织疏松,充血水肿明显,固有层内嗜酸性粒细胞及中粒细胞浸润,肥大细胞明显增多,脱颗粒现象明显。

3.2 川椒方的治疗作用

3.2.1 临床症状评分 见表2。模型组较正常对照组评分增高,各川椒方组体征评分值较模型组明显降低,均具有统计学意义($P < 0.01$);与阳性药物对照组相比,高浓度组无统计学意义($P > 0.05$),低、中浓度有统计学意义($P < 0.05$)。

3.2.2 病理切片观察川椒方对晚期炎症的影响 见表3。1)结膜内嗜酸性粒细胞计数结果显示:模型组小鼠结膜内细胞计数较正常组增高具有统计学意义;各川椒方组结膜内嗜酸性粒细胞数目较模型组明显降低,其中,中浓度组和低浓度组与模型组比较具有统计学意义($P < 0.05$),高浓度组与模型组比较有统计学意义($P < 0.01$);与阳性药物对照组相比,高浓度组无统计学意义($P > 0.05$),低、中浓度有统计学意义($P < 0.05$)。2)肥大细胞:模型组小鼠结膜内肥大细胞聚集增多脱颗粒明显。治疗后的各组以上特点都明显减轻。其中高浓度组和阳性药物组表象基本一致。

表3 川椒方对小鼠结膜嗜酸性粒细胞的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	嗜酸性粒细胞计数
正常组	0.40 $\pm$ 0.70
模型组	24.50 $\pm$ 5.62**
阳性药物组	8.20 $\pm$ 2.10
川椒方低浓度组	13.90 $\pm$ 2.60 Δ^*
川椒方中浓度组	12.50 $\pm$ 1.90 Δ^*
川椒方高浓度组	8.60 $\pm$ 1.51 Δ^*

注:模型组与正常组相比,** $P < 0.001$;川椒方高浓度组与模型组相比, $\Delta P < 0.01$;川椒方中、低浓度组与模型组相比, $\Delta P < 0.05$;川椒方高浓度组与阳性药物组相比,* $P > 0.05$;川椒方中、低浓度组与阳性药物组相比,* $P < 0.05$ 。

表4 ELISA检测川椒方对AC小鼠血清指标的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	IgE(μ g/mL)	IgG1(μ g/mL)	IL-4(pg/mL)
正常组	3.51 $\pm$ 0.79	3.54 $\pm$ 0.97	16.19 $\pm$ 3.04
模型组	7.53 $\pm$ 0.84*	9.13 $\pm$ 0.62*	26.32 $\pm$ 5.53*
阳性药物组	4.27 $\pm$ 0.69	4.71 $\pm$ 0.52	22.88 $\pm$ 4.02
川椒方低浓度组	6.98 $\pm$ 0.88 $\Delta\Delta\Delta$	8.77 $\pm$ 1.86 $\Delta\Delta\Delta$	20.76 $\pm$ 4.75 $\Delta\Delta\Delta$
川椒方中浓度组	5.33 $\pm$ 1.21 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	6.24 $\pm$ 1.01 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	20.27 $\pm$ 3.77 $\Delta\Delta\Delta$
川椒方高浓度组	5.13 $\pm$ 0.73 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	5.59 $\pm$ 0.68 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	20.11 $\pm$ 1.98 $\Delta\Delta\Delta$

注:与正常组相比,* $P < 0.01$;与模型组相比, $\Delta P > 0.05$;与模型组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组相比, $\Delta\Delta P < 0.05$;与阳性药物组相比,* $P > 0.05$;与阳性药物组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3.3 川椒方的作用机理 ELISA检测血清指标显示:1)模型组IgG1、IgE、IL-4升高,具有统计学意义($P < 0.01$)。2)与模型组比较,中、高浓度组小鼠血清IgG1、IgE水平降低,具有统计学意义($P < 0.01$),低浓度组无统计学意义($P > 0.05$);各浓度组IL-4均降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。3)与阳性药物对照组相比,高浓度组IgG1、IgE无统计学意义($P > 0.05$),疗效相当,中低浓度组比较有统计学意义,疗效差于西药。

组($P < 0.01$);各浓度组 IL-4 均降低,与阳性药物相比差异无统计学意义。结果见表 4。

4 讨论

变应性结膜炎是一种高发的眼表疾病,人群患病率约 20%^[5]。随着环境变化、污染加重,发病率仍有增长的趋势。局部用药起效快,但作用不持久。长期用药尤其是使用糖皮质激素类药物会带来干眼症^[6]、青光眼等严重并发症。

川椒方是汲取《黄帝内经》、金代医家刘完素学术思想“六气发病皆从火化”的学术观点,发挥中医学整体观念的治疗优势,灵活运用中医的辨证法,将温热药物川椒与寒凉药物同用,去性取用,是用于治疗 AC 的经验方。作为内服中药汤剂,川椒方能有效改善 AC 急性期各项症状,并能减轻晚期细胞反应带来的损伤。不仅避免了局部用药对眼表微环境的影响和严重的眼部并发症而且对患者常合并的变应性鼻炎、哮喘等其他系统的变应性疾病症状起到改善作用。

AC 反应机制复杂,涉及多种免疫机理及免疫因子参与。虽然机制尚不十分清楚,但 I 型变态反应为主,IV 型变态反应参与作为基本机理是无异议的。起到

了与西药相当的疗效,并且有其独特的优势,值得推广和进一步研究。

参考文献

- [1] Nakamura, Takao MD. Detailed Criteria for the Assessment of Clinical Symptoms in a New Murine Model of Severe Allergic Conjunctivitis. Cornea, Volume 22(7) Supplement 1, October 2003, pp S13 - S18.
- [2] M. Teresa Magone, Chi - Chao Chan. A Novel Murine Model of Allergic Conjunctivitis. Clinical Immunology And Immunopathology, 1998, 87: 75 - 84.
- [3] 吕秋军. 新药药理学研究方法[M]. 北京:化学工业出版社, 2007, 433 - 434.
- [4] 徐岩, 陈祖基. 变应性结膜炎动物模型[M]. 眼科研究, 2001, 19(2): 181.
- [5] Berdy GJ, Hedqvist B. Ocular allergic disorders and dry eye disease; associations, diagnostic dilemmas, and management. Acta Ophthalmol Scand Supp, 2000, 230: 32237.
- [6] Xiong C, Chen D, Liu J, et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(5): 1850 - 1856.
- [7] 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. 中国中医眼科杂志, 2010, 20(1): 17 - 19.

(2011-09-08 收稿)

自拟中药方治疗顽固性失眠 38 例临床观察

丁树栋 管恩兰

(1 山东省诸城市精神卫生中心, 262200; 2 山东省诸城市和平药店总店)

关键词 顽固性失眠/中医药疗法

近年来我们以自拟中药方治疗顽固性失眠 38 例, 疗效显著, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组 38 例患者中男 18 例, 女 20 例; 年龄 22 - 61 岁, 平均 42.3 岁; 病程 1 ~ 3 年者 25 例, 6 ~ 12 个月者 13 例, 平均 8.3 个月。本组失眠患者均系以顽固性失眠为主要临床表现的神经衰弱患者。

1.2 治疗方法 基本方: 酸枣仁 30g, 夜交藤 15g, 党参 12g, 黄芪 15g, 熟地黄 12g, 白芍 12g, 佛手 12g, 甘草 6g。失眠甚者加合欢皮 10g, 远志 6g, 柏子仁 10g。若心脾两虚, 症见心悸健忘, 头晕目眩, 神疲乏力, 食少纳呆, 面色萎黄, 舌淡, 苔白, 脉细者, 加当归 20g, 大枣 10g, 陈皮 10g, 茯苓 10g; 若心胆气虚, 症见胆怯心悸, 遇事善惊, 气短倦怠, 舌淡, 苔薄, 脉弦细者, 加龙骨 20g, 石菖蒲 10g, 茯神 10g, 川芎 10g; 若心肾不交, 症见头晕目眩, 心悸健忘, 腰酸膝软, 舌红, 苔少, 脉细者, 加黄连 10g, 肉桂 6g, 制首乌 10g。服药方法: 每日 1 剂, 水煎, 早晚分服。30d 为 1 个疗程, 服药期间停用其他药物。

1.3 疗效标准 治愈: 睡眠正常, 伴随症状消失, 随访半年未复发; 显效: 睡眠时间基本正常, 伴随症状大部分消失; 有效: 睡眠时间有所延长, 伴随症状部分消失; 无效: 治疗 1 个疗程后, 睡眠及伴随症状均无改善或加重。

2 结果

所有患者均治疗 1 个疗程后评定疗效。其中治愈 20 例, 显效 12 例, 有效 4 例, 无效 2 例, 总有效率 94.7%。

3 讨论

失眠是指以不能获得正常睡眠为特征的一种病症。中医学又称其为不寐、不得眠、不得卧、目不眠等。中医学认为, 失眠的病因病机以七情内伤为主, 情志变化与该病关系密切, 或因情志不遂, 致肝气郁结, 郁而化火, 邪火扰动心神所致; 或由五志过极, 心火内炽, 心神被扰所致; 或因思虑过度, 损伤心脾, 心血暗耗, 脾胃生化之源不足, 营血亏虚, 不能上奉于心, 心失所养所致。故在治疗上应以健脾疏肝, 养心安神为主。自拟方中酸枣仁、夜交藤养心安神; 党参、黄芪益气健脾; 熟地黄、白芍养血柔肝; 佛手疏肝理气; 甘草调和诸药。诸药合用, 使心神得养, 气血得充, 肝郁得解, 故获良效。

(2011-02-21 收稿)