牛樟芝水提取物抗过敏作用及其机制研究

王 冲，侯 娟，徐 琳，芮 菁*
天津市药品检验研究院，天津 300070

摘 要：目的 研究牛樟芝水提物的抗过敏作用并初步探讨其作用机制。**方法** 采用大鼠被动皮肤过敏模型、小鼠迟发型超敏模型、小鼠全身皮肤瘙痒模型、小鼠腹腔毛细血管通透性模型，观察牛樟芝水提物在体抗过敏作用。采用体外培养的RBL-2H3肥大细胞，观察牛樟芝水提物对细胞增殖及凋亡的影响，初步探讨其抗过敏反应的作用机制。**结果** 体内试验中，牛樟芝水提物显著降低大鼠被动皮肤过敏反应，明显降低小鼠耳肿胀度、胸腺指数及脾指数，提高右旋糖酐所致皮肤瘙痒阈值，减少小鼠瘙痒次数，抑制组胺所致血管通透性上升；体外试验中，其剂量相关性的抑制RBL-2H3细胞增殖，促进细胞凋亡。**结论** 牛樟芝水提取物有一定的抗过敏作用，其机制与促进RBL-2H3细胞凋亡有关。

关键词：牛樟芝；牛樟芝水提物；抗过敏；肥大细胞；细胞凋亡
中图分类号：R965 **文献标志码：**A **文章编号：**1674-6376（2019）03-0462-05
DOI：10.7501/j.issn.1674-6376.2019.03.014

Anti-allergic effects of aqueous extract from *Antrodia camphorata* and its mechanism

WANG Chong, HOU Juan, XU Lin, RUI Jing
Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To explore the anti-allergic effects and possible mechanism of aqueous extract from *Antrodia camphorata* (EAC). **Methods** The anti-allergic effects of EAC were investigated in the passive cutaneous anaphylaxis (PCA) model of rat, in the delayed-type hypersensitivity (DTH) model of mice, in the dextran induced pruritus reaction model of mice, and in the peritoneal capillary permeability model of mice. RBL-2H3 mast cells were cultured *in vitro* to observe the effects of EAC on cell proliferation and apoptosis. **Results** EAC *in vivo* significantly reduced PCA reaction in rats, decreased the ear swelling degree, the index of thymus and spleen, and also significantly improved dextran-induced pruritic threshold and reduced the scratching number, and inhibited vascular permeability caused by histamine. EAC *in vitro* concentration-dependently inhibited RBL-2H3 mast cell proliferation and raised cell apoptosis level. **Conclusion** EAC has certain anti-allergic effects and its mechanism partially related to promote mast cell apoptosis.

Key words: *Antrodia camphorata*; aqueous extract from *Antrodia camphorata*; anti-allergic effects; mast cell; apoptosis

牛樟芝*Antrodia camphorata*又名牛樟菇、红樟菇，系产于我国台湾地区的食、药两用真菌，用于解毒保肝、补肾强心、益胃整肠，疗效显著，且目前未见副作用报道，在台湾地区享有“药中之王”“森林中的红宝石”的美誉[1]。近年来的研究证实牛樟芝含有多糖类、三萜类、维生素类及固醇类等多种生物活性物质，具有抗肿瘤、抗氧化、保肝、增强免疫及抗炎等生物活性[2-5]，但关于其是否具有抗过敏活性尚未见文献报道。

过敏与炎症虽是机体对异物的不同反应，但却涉及许多共同的细胞类型、化学介质及发病机制，因此本文通过大鼠同种被动皮肤过敏试验、小鼠迟发型超敏试验、小鼠右旋糖酐皮肤瘙痒试验及小鼠组胺毛细血管通透性试验，研究牛樟芝水提物的抗过敏作用，并采用肥大细胞初步探讨其作用机制，为这一新兴的食药两用真菌的临床应用及深入开

收稿日期：2018-06-16
第一作者：王 冲（1983—），男，硕士，主管药师，研究方向为药品生物检测与安全性评价。Tel：（022）83710670 E-mail：wang10chong20@aliyun.com
***通信作者：**芮 菁（1964—），女，硕士，主任药师，研究方向为药品生物检测与安全性评价。Tel：（022）83710670 E-mail：rui599@sina.com

发提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 动物及细胞株

SPF级KM大、小鼠，北京维通利华实验动物公司提供，生产许可证号SCXK（京）2016-0011；大、小鼠维持饲料，北京科澳协力饲料有限公司提供，许可证号SCXK（京）2014-0010。动物饲养室温度20～25 ℃，相对湿度40%～70%，实验动物使用许可证号SYXK（津）2016-0006。人工照明，12 h明/12 h暗，动物于环境中适应3 d后用于实验。大鼠嗜碱性白血病细胞株（RBL-2H3），购自中科院上海细胞库，以含10%胎牛血清（FBS）的1640培养基培养，定期传代。

1.2 仪器

SpectiaMax M2型酶标仪，Molecular Devices公司生产；BA-310S电子天平，沙多利斯公司生产；XS-205电子天平，梅特勒公司生产；Velocity 18R离心机，Dynamica公司生产；Attune NxT流式细胞仪，life technologies公司生产。

1.3 试剂

牛樟芝菌丝体的水提取物（EAC），天津市现代医药开发研究所制备并提供。制备方法：取牛樟芝菌丝体于烘箱烘干，磨碎过筛得粗粉，以蒸馏水为提取溶剂，回流提取3次，过滤后合并滤液，真空浓缩至干作为样品备用。EAC干粉质量不低于药材总质量的3%，苯酚-硫酸法测定干粉中总多糖的量不少于干粉总质量的70%。

右旋糖酐40注射液，西安万隆制药股份有限公司生产，产品批号A131231-2；地塞米松，天津金耀氨基酸有限公司生产，批号1301161；2，4-二硝基氯苯（DNCB），天津市光复精细化工研究所生产，生产日期2012年8月26日，临用前以丙酮分别配置成3%的致敏液及1%的激发液；弗氏完全佐剂（FCA），Sigma公司生产，批号SLBJ2846V；伊文斯蓝，华东试剂厂生产，批号130525；卵白蛋白（OVA），Sigma公司生产，批号SLBK1399V；磷酸组胺，中国食品药品检定研究院生产，批号150510-200412。FITC Annexin V/Dead细胞凋亡试剂盒，Invitrogen公司生产，批号1809491。

2 实验方法

2.1 对大鼠被动皮肤过敏反应的影响

选取SD大鼠6只，体质量180～220 g，雌雄各半。称取20 mg/mL卵白蛋白生理盐水溶液与等体积FCA混合均匀后作为致敏液，每只动物ip致敏液1 mL致敏，隔日1次，共3次，于首次致敏后第14天将动物麻醉后腹主动脉采血，2 500 r/min离心分离血清，置−4 ℃冰箱备用。

另取雄性SD大鼠50只，体质量180～220 g，按体质量随机分为模型组、阳性对照组及EAC低、中、高剂量组，每组10只。模型组ig给予纯化水，阳性对照组ig给予1.8 mg/kg地塞米松，EAC低、中、高剂量组分别ig给予0.45、0.9、1.8 g/kg EAC混悬液，1次/d，连续给药10 d。末次给药后60 min，大鼠背部脊柱两侧常规备皮（4 cm×4 cm），以1∶5抗血清生理盐水稀释液背部皮内注射，每侧2点，间隔约1.5 cm/点，每点0.1 mL。48 h后，尾iv 1%伊文思蓝与1%卵白蛋白生理盐水混合溶液1 mL/只，30 min后动物颈椎脱位处死，翻转背部皮肤，剪下带有蓝色的部分，剪碎置入盛有5 mL丙酮-生理盐水（7∶3）的试管内浸泡24 h，2 500 r/min离心10 min，取上清液于610 nm波长处测定吸光度（A）值，计算平均A值及抑制率[4]。

抑制率=（模型组A_{610}值−实验组A_{610}值）/模型组A_{610}值

2.2 对DNCB诱发的小鼠迟发型超敏反应的影响

选取KM小鼠60只，体质量18～22 g，雌雄兼用，按体质量随机分为空白组、模型组、阳性对照组及EAC低、中、高剂量组，每组10只。空白组及模型组ig给予纯化水，阳性对照组给予2.5 mg/kg地塞米松，EAC低、中、高剂量组分别给予0.6、1.2、2.4 g/kg EAC混悬液。致敏前3 d开始给药，1次/d，连续ig给药10 d。给药第4天致敏，各组小鼠腹部常规备皮（3 cm×3 cm）后，除空白组外，将3% DNCB丙酮液20 μL均匀涂抹腹部皮肤致敏，空白组涂抹等体积丙酮溶液，第2天强化致敏1次。给药第9天除空白组外，各组小鼠右耳廓前后两面均匀涂抹1% DNCB丙酮溶液15 μL进行抗原攻击，以自身左耳廓作为对照，空白组涂抹等体积丙酮溶液。于第10天给药后1 h，颈椎脱位处死各组小鼠，剪下两耳廓后用0.8 cm打孔器取耳片并称重，按公式计算耳肿胀度及耳肿胀抑制率。同时取小鼠胸腺及脾脏称质量，计算脾指数和胸腺指数[6]。

耳肿胀度=致敏侧耳片质量−非致敏侧耳片质量

耳肿胀抑制率=（模型组耳肿胀度−给药组耳肿胀度）/模型组耳肿胀度

2.3 对右旋糖酐所致小鼠全身皮肤瘙痒的影响

选取KM小鼠50只，体质量18～22 g，雌雄兼用，按体质量随机分为模型组、阳性对照组及EAC低、中、高剂量组，每组10只。模型组ig给予纯化

水，阳性对照组给予2.5 mg/kg地塞米松，EAC低、中、高剂量组分别给予0.6、1.2、2.4 g/kg EAC混悬液，1次/d，连续给药10 d。末次给药后1 h，各组动物尾iv 40 mg/kg右旋糖酐40注射液。以前爪搔抓头部、后爪抓挠躯干、嘴咬全身各部位作为皮肤瘙痒指征，即刻观察并记录各组小鼠30 min内出现的瘙痒次数及首次开始瘙痒时间，即瘙痒阈值[7]。

2.4 对组胺致小鼠毛细血管通透性增加的影响

选取KM小鼠50只，体质量18～22 g，雌雄兼用，分组及给药剂量同“2.1”。给药第9天小鼠腹部正中常规备皮（3 cm×3 cm），第10天末次给药后1 h，尾iv 1%伊文思蓝生理盐水溶液0.01 ml/g，即刻于腹部备皮处皮内注射0.1%磷酸组胺0.1 mL/只致敏。致敏后30 min，将小鼠颈椎脱位处死，分离腹部皮肤，以直径1.2 cm打孔器取下腹部蓝染皮肤，剪碎置盛有2 mL丙酮-生理盐水（7∶3）混合液的试管内浸泡24 h，2 500 r/min离心10 min，取上清液于610 nm处测定A值，计算抑制率[8]。

血管通透性抑制率=（模型组A值－给药组A值）/模型组A值

2.5 对RBL-2H3细胞增殖的影响

取处于对数生长期的RBL-2H3细胞，0.25%胰酶消化后，调整为5×10^4个/mL的细胞悬液接种于96孔细胞培养板，每孔100 μL。37 ℃，5%CO_2条件下培养24 h后，弃去上清液，分别加入25、50、100、200、300、400、500、600、700 mg/L的EAC，空白对照组加入10% FBS 1640，每孔0.1 mL，每组8个复孔，置CO_2培养箱37 ℃培养48 h。终止培养前4 h，每孔加入20 μL质量浓度为5 mg/mL的MTT溶液，继续培养4 h后弃去培养板孔内液体，每孔加入150 μL DMSO溶解，在酶标仪540 nm波长下测定A值，以死亡率表示药物对细胞生长的抑制作用[9]。

死亡率=（1－药物反应孔A值/空白对照组A值）

2.6 对RBL-2H3细胞凋亡的影响

采用Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡。取处于对数生长期的RBL-2H3细胞，0.25%胰酶消化后，调整为5×10^5个/mL的细胞悬液接种于6孔细胞培养板，每孔2 mL。培养24 h后，分别设空白对照组及EAC低、中、高剂量组，每组3个复孔。弃去原培养液，空白对照组加入10% FBS 1640处理，EAC低、中、高剂量组分别加入100、200、400 mg/L EAC处理，每孔2 mL，置CO_2培养箱37 ℃培养。分别培养24、48 h后，收集细胞以PBS洗涤2次，加入Annexin-binding缓冲液，调整细胞密度为1×10^6个/mL，取100 μL混悬液先后加入Annexin Ⅴ-FITC及PI抗体避光染色15 min后，各管加入400 μL Annexin-binding缓冲液，混匀后以流式细胞仪进行检测[10]。

2.7 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件包处理。符合正态分布的数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用方差分析。

3 结果

3.1 对大鼠被动皮肤过敏反应的影响

结果显示，EAC 0.90、1.80 g/kg显著降低大鼠被动皮肤过敏反应的A值，与模型组比较，有极显著性差异（$P<0.01$），提示EAC可抑制大鼠被动皮肤过敏反应。见表1。

表1 EAC对大鼠被动皮肤过敏反应的影响（$\bar{x}\pm s$, n=10）

Table 1 Effect of EAC on passive cutaneous anaphylaxis in rat（$\bar{x}\pm s$, n=10）

组别	剂量/（g·kg^{-1}）	A值$_{610}$	抑制率/%
模型	-	0.410±0.078	-
地塞米松	0.001 8	0.145±0.072	64.9
EAC	0.45	0.354±0.113	26.5
	0.90	0.301±0.078**	42.0
	1.80	0.292±0.091**	49.7

与模型组比较：*$P<0.05$ **$P<0.01$

*$P<0.05$ **$P<0.01$ *vs* model group

3.2 对DNCB诱发的小鼠迟发型超敏反应的影响

小鼠腹部涂抹DNCB致敏，耳部激发后，耳部肿胀、胸腺指数及脾指数均增高，与空白组比较有显著差异（$P<0.05$）。EAC 1.2 g/kg可显著降低小鼠迟发型过敏反应后脾指数，2.4 g/kg显著降低耳肿胀度，降低胸腺指数及脾指数，提示EAC对DNCB诱导的迟发型过敏反应有一定的抑制作用。见表2。

3.3 对右旋糖酐所致小鼠全身皮肤瘙痒的影响

结果显示，EAC 1.2、2.4g/kg显著减少右旋糖苷所致小鼠瘙痒次数，且成一定的剂量相关性；1.2及2.4 g/kg显著延长小鼠的首次瘙痒时间，提高瘙痒阈值，与模型组比较，有极显著性差异（$P<0.01$），提示EAC具有一定的止痒作用。见表3。

3.4 对组胺致小鼠毛细血管通透性增加的影响

结果显示EAC 1.2、2.4g/kg显著降低组胺所致血管通透性增高，且呈一定的剂量相关，提示EAC可拮抗过敏反应物质组胺的活性作用。见表4。

表 2 EAC对DNCB诱发的小鼠迟发型超敏反应的影响($\bar{x}\pm s$,n=10)

Table 2 Effect of EAC on delayed-type hypersensitivity (DTH) induced by DNCB in mice($\bar{x}\pm s$,n=10)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	耳肿胀度/mg	耳肿胀抑制率/%	胸腺指数/(mg·g^{-1})	脾指数/(mg·g^{-1})
空白	-	-	-	3.851±1.061	4.283±0.793
模型	-	11.3±5.5	-	4.957±1.007$^{\#}$	5.550±1.238$^{\#}$
地塞米松	0.002 5	3.1±1.9	64.9	2.308±0.986*	3.032±0.664*
EAC	0.6	7.9±4.0	26.5	4.356±1.418	4.448±1.385
	1.2	7.4±3.2	42.0	4.251±1.288	4.461±0.894*
	2.4	4.5±2.8**	49.7	3.955±0.787*	4.306±0.809*

与空白组比较:$^{\#}P$<0.05;与模型组比较:$^{*}P$<0.05,$^{**}P$<0.01

$^{\#}P$<0.05 *vs* bland group; $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01 *vs* model group

表 3 EAC对右旋糖酐所致小鼠全身皮肤瘙痒的影响($\bar{x}\pm s$,n=10)

Table 3 Effect of EAC on dextran induced pruritus reaction in mice ($\bar{x}\pm s$,n=10)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	瘙痒次数	瘙痒阈值/s
模型	-	23.1±6.7	116.7±61.7
地塞米松	0.002 5	8.8±5.8*	250.8±172.3**
EAC	0.6	19.2±4.7	177.3±86.3
	1.2	15.1±8.7*	294.9±118.5**
	2.4	11.0±4.9**	275.0±106.9**

与模型组比较:$^{*}P$<0.05,$^{**}P$<0.01

$^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01 *vs* model group

表 4 EAC对组胺致小鼠毛细血管通透性增加的影响 ($\bar{x}\pm s$,n=10)

Table 4 Effect of EAC on peritoneal capillary permeability induced by histamine in mice ($\bar{x}\pm s$,n=10)

组别	剂量/(g· kg^{-1})	A值$_{610}$	抑制率/%
模型	-	0.275±0.036	-
地塞米松	0.002 5	0.175±0.035	36.4
EAC	0.6	0.266±0.035	3.38
	1.2	0.232±0.046*	15.9
	2.4	0.219±0.045**	20.5

与模型组比较:$^{*}P$<0.05,$^{**}P$<0.01

$^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01 *vs* model group

3.5 对RBL-2H3细胞增殖的影响

EAC质量浓度大于50 mg/L开始,对RBL-2H3细胞增殖具有明显的抑制作用,且量效关系明显,经计算,其半数抑制浓度(IC_{50})为70 mg/L。见图1。

3.6 对RBL-2H3细胞凋亡的影响

结果显示,培养24 h后检测,空白组RBL-2H3细胞早期凋亡率(Annexin Ⅴ单阳性细胞占总细胞数的百分率)为0.8%,总凋亡率(Annexin Ⅴ及PI双阳性细胞占总细胞数的百分比)为12.5%,EAC各剂量组均能明显促进RBL-2H3细胞凋亡。培养48 h后检测,空白组RBL-2H3细胞早期凋亡率为2.1%,总凋亡率为18.6%,EAC各剂量组也表现出明显的促细胞凋亡作用。见表5。

图 1 EAC对RBL-2H3细胞的毒性作用

Fig. 1 Toxicity of EAC on RBL-2H3 cells

表 5 EAC对RBL-2H3细胞凋亡的影响(n=3)

Table 1 Effect of EAC on apoptosis of RBL-2H3 cells (n=3)

组别	剂量/(mg·L^{-1})	早期凋亡率/%		总凋亡率/%	
		24 h	48 h	24 h	48 h
空白	-	0.8	2.1	12.5	18.6
EAC	100	14.5$^{\#\#}$	20.6$^{\#\#}$	23.7$^{\#\#}$	32.0$^{\#\#}$
	200	20.2$^{\#\#}$	26.8$^{\#\#}$	32.4$^{\#\#}$	40.6$^{\#\#}$
	400	36.8$^{\#\#}$	47.2$^{\#\#}$	54.2$^{\#\#}$	62.4$^{\#\#}$

与空白组同期比较:$^{\#\#}P$<0.01

$^{\#\#}P$<0.01 *vs* bland group at same time

4 讨论

过敏反应又称为变态反应,系指已免疫的机体于再次接受相同物质刺激时所发生的反应,依其发病机制分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 4种类型,临床上尤以Ⅰ型、Ⅳ型反应最为常见。大鼠被动皮肤过敏试验为

抗Ⅰ型过敏反应药物的常用筛选方法，该类反应主要由IgE抗体介导。卵白蛋白作为一种异种蛋白，首次注射入大鼠体内，可致敏机体产生富含IgE的抗体。抗体再次注入体内，与肥大细胞表面特异性受体结合为IgE抗体复合物，使机体处于高敏状态。卵白蛋白作为抗原，再次进入体内时，即可发生特异性免疫反应，可引起MC脱颗粒，释放组胺、白三烯等过敏介质，使局部血管通透性升高，通过染料的渗出度，可衡量被动皮肤过敏反应的作用强弱[11]。EAC显著降低大鼠被动皮肤过敏反应，表明其对Ⅰ型变态反应有一定的抑制作用。

Ⅳ型过敏反应又称迟发型超敏反应，主要由T淋巴细胞介导。本实验中选用的二硝基氯苯系一种半抗原，将其溶液涂抹于腹部皮肤，可与皮肤蛋白结合成完全抗原，由此刺激T细胞增殖成致敏T细胞，4～7 d后于皮肤处再次涂抹激发，可使局部致敏T细胞释放淋巴因子，引起组织损伤，通常于激发后24～48 h到达高峰。小鼠左右耳质量差可说明过敏反应的程度，差值越小，药物作用愈明显[6]。EAC高剂量显著降低小鼠DTH后耳肿胀度、胸腺指数及脾指数，说明其对于Ⅳ型变态反应也有一定的抑制作用。

肥大细胞脱颗粒释放的组胺是最具有特征性的血管强活性物质之一，其与过敏反应有强相关性，可致皮肤瘙痒，血管通透性增加等过敏反应，组胺水平的变化可作为过敏反应检测的重要指标。小鼠尾静脉注射右旋糖酐，可引起内源性组胺释放致皮肤瘙痒症状[7]。EAC 1.2、2.4 g/kg显著减少右旋糖苷所致小鼠瘙痒次数，提高瘙痒阈值，表明其可以缓解组胺所致的皮肤瘙痒症状；另一方面，EAC 1.2、2.4 g/kg显著降低组胺所致血管通透性增高，且呈一定的剂量相关性，提示EAC抗过敏作用与拮抗组胺的生物活性密切相关。

RBL-2H3是大鼠嗜碱性粒细胞株，具有许多肥大细胞的生物学特性，是体外研究肥大细胞的常用细胞株[9]。体外实验显示，靶细胞EAC可抑制RBL-2H3增殖并促进凋亡，可能为EAC抗过敏反应的作用机制，其潜在分子调控机制尚待进一步深入研究。

综上，通过体内动物实验及体外细胞实验研究，证实了牛樟芝水提取物的抗过敏活性并初步探讨了其作用机制，为牛樟芝更为广发的临床应用及后续抗过敏活性物质基础的研究提供了实验依据。

参考文献

[1] 王 宫, 王 瑾, 徐 蔚. 牛樟芝多糖提取条件研究 [J]. 福建中医药, 2011, 42(1): 52-53.

[2] Lee Y P, Chitsai W, Jan C, et al. Anticancer effects of eleven triterpenoids drived from *Antrodia camphorate* [J]. Anticancer Res, 2012, 32: 2727-2734.

[3] Chen Y Y, Sheu M J. Crude extracts of *Antrodia cinnamomea* inhibit invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells [J]. FASEB J, 2013, 27: 1105-1109.

[4] Tsou H T, Yang H L, Hseu Y C. The anti-tumor activity of *Antrodia camphorate* in melanoma cells: modulation of Wnt/β-catenin signaling [J]. FASEB J, 2011, 25: 979-984.

[5] 张远腾, 李晓波. 牛樟芝化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 1034-1042.

[6] 王 哲, 于 柳, 龚锡平, 等. 荆防散乙酸乙酯提取部位抗过敏作用机制的实验研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(11): 963-966.

[7] 张莉莉, 王 洁, 江 涛, 等. 香鳞毛蕨有效部位的止痒和抗过敏作用 [J]. 中成药, 2016, 38(11): 2476-2480.

[8] 王 哲, 于 柳, 龚锡平, 等. 荆防散的抗过敏作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(5): 92-95.

[9] 张银萍, 朱吾元, 赵 变, 等. 小青龙汤对体外培养RBL-2H3细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(6): 1443-1445.

[10] 白 煜, 朱志超, 蒋丽佳, 等. 苦参碱对人原代白血病细胞的体外作用研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(3): 262-266.

[11] 王 冲, 侯 娟, 戚文军, 等. 大鼠被动皮肤过敏试验影响因素探讨 [J]. 天津药学, 2016, 28(5): 1-5.