

紫苏叶乙醇提取物的抗过敏活性及其作用机制

邢钰彬, 刘思佳, 星萍, 陈晓平

(吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130118)

摘要: 为探讨紫苏叶乙醇提取物抗过敏活性及作用机制, 利用小鼠进行被动皮肤过敏反应试验, 测定小鼠血清中免疫球蛋白 E、白三烯 B₄、血小板活化因子水平探究紫苏叶乙醇提取物对 I 型超敏反应抗过敏作用及作用机制, 并进行 DNCB 诱发迟发型小鼠超敏反应试验探究紫苏叶乙醇提取物对 IV 型过敏反应抗过敏作用。结果显示, 小鼠被动皮肤过敏反应试验中, 紫苏叶乙醇提取物高剂量组与模型组相比极显著降低小鼠瘙痒次数 ($p<0.01$), 由 24.3 次降低至 15.8 次。首次瘙痒时间由 121.59 s 显著延长至 231.90 s。高剂量组小鼠血清中 IgE、PAF、LTB₄ 水平分别下降了 30.92%、15.50%、22.45%; DNCB 诱发迟发型小鼠超敏反应试验中, 紫苏叶乙醇提取物高剂量组与模型组比较, 在第 3 d、6 d 显著降低小鼠耳肿胀度 ($p<0.05$), 第 9 d 极显著降低小鼠耳肿胀度 ($p<0.01$), 高剂量组耳组织液中 IL-4、IFN- γ 、TNF- α 水平分别下降了 19.14%、32.52%、16.61%。紫苏叶提取物对 I 型过敏和 IV 型过敏具有较明显的抗过敏作用, 其对 I 型过敏的抗过敏机制与阻止过敏反应生物活性物质释放、干预花生四烯酸代谢产物的生成有关。

关键词: 紫苏叶; 抗过敏; 乙醇提取物; 活性

文章编号: 1673-9078(2021)07-23-30

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.7.1138

Antiallergic Activity and Mechanism of Ethanol Extract from *Perilla* Leaves

XING Yu-bin, LIU Si-jia, XING Ping, CHEN Xiao-ping

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: In order to investigate the anti allergic activity and mechanism of ethanol extract from *Perilla frutescens* leaves *in vivo*, passive skin anaphylaxis test was carried out in mice. The serum levels of immunoglobulin E, leukotriene B₄ and platelet activating factor in mice were determined to explore the anti allergic effect and mechanism of perilla leaf ethanol extract on type I hypersensitivity. To explore the antiallergic effect of ethanol extract from *Perilla frutescens* leaves on type IV anaphylaxis, DNCB induced delayed type hypersensitivity test was carried out in mice. The results showed that in the passive skin anaphylaxis test of mice, compared with the model group, the high-dose ethanol extract of perilla leaves significantly reduced the itching times of mice ($p<0.01$), from 24.3 times to 15.8 times. The first itching time was significantly prolonged from 121.59 s to 231.90 s. The levels of IgE, PAF and LTB₄ in serum of high dose group decreased by 30.92%, 15.5% and 22.45%, respectively; compared with the DNCB-induced delay model group, the high-dose ethanol extract of perilla leaves significantly reduced the ear swelling degree of mice on the 3rd and 6th days ($p<0.05$) hypersensitivity in mice, on the 9th day, the ear swelling was significantly reduced ($p<0.01$). The levels of IL-4, IFN- γ and TNF- α in high-dose group decreased by 19.14%, 32.52% and 16.61% respectively. In conclusion, the extract of *Perilla frutescens* has obvious anti allergic effect on type I and type IV allergy. Its anti allergic mechanism to type I allergy is related to preventing the release of bioactive substances and interfering with the production of arachidonic acid metabolites.

Key words: *Perilla* leaf; antiallergic; ethanol extract; activity

引文格式:

邢钰彬,刘思佳,星萍,等.紫苏叶乙醇提取物的抗过敏活性及其作用机制[J].现代食品科技,2021,37(7):23-30

XING Yu-bin, LIU Si-jia, XING Ping, et al. Antiallergic activity and mechanism of ethanol extract from perilla leaves [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(7): 23-30

收稿日期: 2020-12-07

基金项目: 吉林省医药健康产业发展专项项目 (20200708054YY)

作者简介: 邢钰彬 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物活性成分与功能性食品

通讯作者: 陈晓平 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物化学与功能性食品

紫苏 (*Perilla frutescens*) 为唇形科一年生草本植物, 又名回回苏、红紫苏、赤苏、苏子等。国家卫健委公布 2019 最新版药食同源目录里, 将紫苏、紫苏子归纳到了药食同源可用种类里。我国已有 2000 多年的栽培历史, 在我国多作为香辛配料, 食用方式单一。紫苏叶中含有多种化学成分都具有很好的生物活性, 如挥发油、黄酮类、花色苷类、酚酸类、苷类、和三萜类等。国外研究者发现紫苏一类香料植物, 除了具有香辛料特有的增进食欲、矫臭、赋香、着色等四大作用外, 还具有抗氧化性^[1,2]、抗菌性^[3,4]、抗过敏性等多种机能^[5,6]。Shin T Y^[7]等通过对紫苏叶水提物进行研究, 发现紫苏的水提物在老鼠体内或体外均有治疗 I 型过敏和 C48/80 引发的过敏, 阻止组织胺的释放。Takagi S^[8]从紫苏叶中首次分离出了紫苏糖肽, 紫苏糖肽具有抑制组胺释放及蛋白激酶 C 活性的作用, 认为该种物质能够阻止 Ca^{2+} 触发靶细胞脱颗粒, 干扰组胺物质的释放, 达到抗过敏的作用。

近年来, 全球化进程加快, 食品的种类和加工工艺越来越多, 致使潜在过敏人群不断扩大, 由食品过敏引发的过敏疾病已占过敏总数的 90% 左右^[9,10]。过敏引发的皮肤瘙痒难耐, 红肿等一系列反应使许多患者深受其害^[11,12]。近年来发现一些天然活性物质具有抗过敏活性, 并且天然活性物质的作用靶点多, 对机体不易产生毒性和副作用, 因此越来越多的研究开始转向天然活性物质^[13,14]。本研究在构建小鼠全身皮肤瘙痒模型和小鼠迟发型超敏反应模型基础上, 通过小鼠被动皮肤过敏反应试验和 DNCB 诱发迟发型小鼠超敏反应试验, 确定紫苏叶乙醇提取物对目前最常见的 I、IV 型过敏的抗过敏作用, 以期明确紫苏叶乙醇提取物的抗过敏作用, 并进一步探讨其作用机制, 为紫苏叶这一种食药两用植物的应用及高值化开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂

紫苏叶: 由课题组采购市售皱叶紫苏鲜叶。自然晾干, 去杂, 粉碎过 80 目筛, 密封袋保存备用。

主要试剂: 无水乙醇、丙酮天津市富宇精细化工有限公司; 生理盐水石家庄四药有限公司; 卵白蛋白范德北京生物科技有限责任公司; 地塞米松索莱宝生物科技有限公司; 2,4-二硝基氯苯天津市光复精细化工研究所; 免疫球蛋白 E (IgE) 试剂盒、白三烯 B₄ (LTB₄) 试剂盒、血小板活化因子 (PAF) 试剂盒、 α

肿瘤坏死因子 (TNF- α) 试剂盒、白细胞介素 4 (IL-4) 试剂盒、 γ -干扰素 (IFN- γ) 试剂盒上海抚生实业有限公司。

1.1.2 实验动物

SPF 级 KM 小鼠, 5~7 周龄, 体质量 30~35 g, SPF 级, 购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK (京) 2019-0010; 小鼠维持饲料, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 生产许可证号 (SCXK (京) 2019-0008)。

饲养条件: 饲养于吉林农业大学实验动物中心清洁级动物饲养室。室温 20~25 °C、湿度 40%~60%, 人工照明, 12 h 明/12 h 暗, 笼具及垫料定期清洗更换, 动物于饲养中心隔离适应一周后用于试验。

1.1.3 仪器与设备

FW100 微型高速万能粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; BSA2202S 电子天平、BSA124S 电子天平, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; RE-52A 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; FD-2A-30 真空冷冻干燥机, 江苏天翔仪器有限公司; S-1-150S 高速冷冻离心机, 巩义市宏华仪器设备工贸有限公司; HBS-1101 酶标分析仪, 南京德铁实验设备有限公司; SG330H 超声仪, 上海冠特超声仪器有限公司; 电子数显千分尺, 由吉林农业大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 紫苏叶乙醇提取物制备

紫苏叶由课题组采购。自然晾干, 去杂, 粉碎过 80 目筛, 密封袋保存备用。精密称取紫苏叶粉末, 每 50 g 加入 1000 mL 60% 乙醇浸泡 2 h, 间歇式超声提取, 功率 200 W, 时间 1 h, 温度 50 °C。将上清液滤出, 相同条件下将滤渣再提取 2 次, 合并滤液, 离心除去残渣, 所得上清液用旋转蒸发仪减压浓缩, 超低温冰箱预冻后冷冻干燥, 备用^[15]。

1.2.2 紫苏叶乙醇提取物对小鼠被动皮肤过敏反应的影响

选取 KM 小鼠 5 只, 5~7 周龄, 体质量 30~35 g, 雌雄各半。称取 20 mg/mL 卵白蛋白生理盐水溶液与等体积紫苏叶乙醇提取物 (Folium Perillae Extract, FPE) 水溶液混合均匀后作为致敏液, 每只动物腹腔注射致敏液 0.2 mL 致敏, 隔日 1 次, 共 3 次, 于首次致敏后第 14 d 对小鼠进行眼球取血, 将采集的血液样本常温放置 40 min, 3000 r/min 4 °C 离心 10 min, 分离血清, 置 4 °C 冰箱, 用于后续抗血清生理盐水稀释液制备^[16]。

另取 KM 小鼠 60 只, 体质量 30~35 g, 雌雄兼用,

按体质量随机分为 6 组即正常对照组 (Control)、模型组 (Model)、阳性对照组 (Positive)、紫苏叶乙醇提取物低剂量组 (FPE-L)、中剂量组 (FPE-M)、高剂量组 (FPE-H), 每组 10 只。Control 组和 Model 组灌胃给予纯化水, FPE-L、FPE-M、FPE-H 组分别灌胃给予 0.25、0.5、1 g/kg FPE 水溶液, 除 Positive 组于实验第 12 d 开始腹腔注射给药外, 其余各组小鼠均在实验第 1 d 开始灌胃给药, 每只 0.1 mL/10 g, 1 次/d, 连续给药 14 d。Positive 组于第 12 d 开始腹腔注射 1.6 mg/kg 地塞米松, 注射剂量每只 0.1 mL/10 g。连续注射给药 3 d。试验期间自由采食、采水, 每 2 d 称量一次体重。

末次灌胃后 60 min, 小鼠背部常规备皮 (3 cm×3 cm), 除 Control 组外, 其他试验组背部皮内注射 0.2 mL 抗血清生理盐水稀释液 (将之前制备并于 4 °C 保存备用的抗血清: 0.9%生理盐水=1:5 的混合配制液)。48 h 后, 尾静脉注射 1%卵白蛋白生理盐水混合溶液 0.2 mL/只致敏。以前后爪搔抓头部和躯干、嘴咬身体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^[17,18]。

瘙痒阈值测试后, 小鼠眼球取血, 将采集的血液样本常温放置 40 min, 3000 r/min 4 °C 离心 10 min, 分离血清, 按试剂盒说明测定血清中免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)、白三烯 B₄ (leukotriene B₄, LTB₄)、血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 水平。取血后将小鼠颈椎脱臼致死, 分离完整的胸腺、脾脏、心脏、肝脏称重, 根据公式 (1) 计算脏器系数。

$$\text{脏器系数}/\% = \frac{\text{脏器质量 (g)}}{\text{小鼠体质量 (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 紫苏叶乙醇提取物对 DNCB 诱发的小鼠迟发型超敏反应的影响

选取 KM 小鼠 60 只, 5~7 周龄, 体质量 30~35 g, 雌雄兼用, 按体质量随机分为 6 组即正常对照组 (Control)、模型组 (Model)、阳性对照组 (Positive) 紫苏叶乙醇提取物低剂量组 (FPE-L)、中剂量组 (FPE-M)、高剂量组 (FPE-H), 每组 10 只。Control 组和 Model 组灌胃给予纯化水, FPE-L、FPE-M、FPE-H 组分别灌胃给予 0.25、0.5、1 g/kg 紫苏叶乙醇提取物水溶液, 除 Positive 组于试验第 12 d 开始腹腔注射给药外, 其余各组小鼠均在试验第 1 d 开始灌胃给药, 每只 0.1 mL/10 g, 1 次/d, 连续给药 13 d。Positive 组于第 11 d 开始腹腔注射 1.6 mg/kg 地塞米松, 注射剂

量每只 0.1 mL/10 g。连续注射给药 3 d^[19]。试验期间自由采食、采水, 每 2 d 称量一次体重。

试验开始前 1 d 小鼠背部常规备皮 (3 cm×3 cm), 各组试验动物除空白对照组外于脱毛 24 h 后 (试验第 1 d) 在其脱毛区域均匀涂抹 3% DNCB (4:1 丙酮橄榄油混合液配制) 40 μL 致敏 1 次, 第 2 d 加强致敏一次, 涂抹剂量减半。空白组给予等量 4:1 丙酮橄榄油。实验第 5 d 在小鼠右耳内外侧均匀涂抹 1% DNCB 20 μL 激发, 左耳涂等量 4:1 丙酮橄榄油, 实验第 8、11 d 重复此刺激。从小鼠背部致敏前 1 d 开始, 利用电子数显千分尺分别测量每组小鼠左、右耳中部的厚度, 平行测量 2 次, 取平均值, 根据公式 (2) 计算耳肿胀度。每隔 2 d 同法测定耳肿胀度 (即耳部激发 24 h 后)。末次激发 48 h 后 (第 13 d) 脱颈处死小鼠, 用打孔器摘取各鼠右耳相同部位同样大小的耳片, 加入 0.9 mL 冰冷的生理盐水, 于冰水浴中充分研磨, 匀浆, 3000 r/min、4 °C 离心 15 min 取上清液, 按试剂盒说明测定 α 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF-α)、白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4)、γ-干扰素 (interferon-γ, IFN-γ) 水平^[20,21]。取耳后分离完整的胸腺、脾脏、心脏、肝脏称重, 根据公式 (1) 计算脏器系数。

$$\text{耳肿胀度}/\text{mm} = \text{致敏侧耳片厚度 (mm)} - \text{非致敏侧耳片厚度 (mm)} \quad (2)$$

1.3 数据处理与统计学分析

应用 Excel 2019 对数据进行处理。应用 SPSS 23.0.0 软件进行统计分析, 所有数据均以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 组间 *t* 检验, *p*<0.05 表示组间差异有统计显著性, *p*<0.01 表示组间差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 紫苏叶乙醇提取物对小鼠被动皮肤过敏反应的影响

2.2.1 紫苏叶乙醇提取物对被动皮肤过敏模型小鼠脏器系数的影响

脏器系数是试验动物某脏器的重量与其体重之比值。正常时各脏器与体重的比值比较恒定。脏器系数增大, 表示脏器充血、水肿或增生肥大等; 脏器系数减小, 表示脏器萎缩及其他退行性改变。由表 1 可见, 各组小鼠脾脏、胸腺、心脏、肝脏无显著性变化, 差异无统计学意义 (*p*>0.05)。

表 1 FPE 对被动皮肤过敏模型小鼠脏器系数的影响

Table 1 Effect of FPE on organ coefficient of mice with passive skin allergy ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g/kg)	脾系数/%	胸腺系数/%	心脏系数/%	肝脏系数/%
Control	-	0.37±0.06	0.45±0.04	0.53±0.06	4.41±0.44
Model	-	0.40±0.07	0.43±0.03	0.51±0.05	4.41±0.45
Positive	0.0016	0.41±0.08	0.43±0.04	0.54±0.04	4.43±0.56
FPE-L	0.25	0.34±0.05	0.41±0.05	0.55±0.05	4.10±0.42
FPE-M	0.50	0.34±0.05	0.45±0.05	0.56±0.06	4.11±0.48
FPE-H	1.00	0.37±0.04	0.46±0.05	0.55±0.06	4.25±0.63

注：与 Control 组比较：[#]表示差异显著 ($p<0.05$)，^{##}表示差异极显著 ($p<0.01$)；与 Model 组比较：^{*}表示差异显著 ($p<0.05$)，^{**}表示差异极显著 ($p<0.01$)。下表同。

2.1.2 紫苏叶乙醇提取物对被动皮肤过敏模型小鼠瘙痒次数及瘙痒阈值的影响

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，首次注射入小鼠体内，可致敏机体产生富含 IgE 的抗体。抗体再次注入体内，IgE 抗体与肥大细胞或嗜碱粒细胞结合，形成致敏靶细胞，使机体呈高敏状态。当机体再次接触同种抗原时，抗原与特异性 IgE 发生联桥，导致肥大细胞活化及脱颗粒，释放包括组胺、PAF、LTB₄ 等多种生物活性物质，引起平滑肌收缩、黏膜水肿、血管通透性增高形成过敏症候群，包括皮肤红肿、瘙痒等一系列局部或全身反应^[22]。本试验中，结果由表 2 可以看出，FPE-M、FPE-H 组小鼠与 Model 组小鼠相比，瘙痒次数明显减少，有极显著性差异 ($p<0.01$)。FPE-L、FPE-M、FPE-H 组与 Model 组相比显著延长小鼠首次瘙痒时间，提高瘙痒阈值，FPE-M 与 Model 组比较，有显著性差异 ($p<0.05$)，FPE-H 组与 Model 组有极显著性差异 ($p<0.01$)，且呈现一定的剂量相关性。提示 FPE 对被动皮肤过敏小鼠全身瘙痒有一定的止痒作用，对 I 型过敏反应有一定的抑制作用。但效果没有阳性对照组显著。

表 2 FPE 对被动皮肤过敏模型小鼠瘙痒次数及瘙痒阈值的影响

Table 2 Effects of FPE on pruritus frequency and pruritus threshold in mice with passive skin allergy ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g/kg)	瘙痒次数	瘙痒阈值/s
Control	-	-	-
Model	-	24.30±5.30	121.59±40.32
Positive	0.0016	9.70±3.60 ^{**}	251.59±121.93 ^{**}
FPE-L	0.25	21.30±5.60	165.19±60.09
FPE-M	0.50	17.40±6.80 ^{**}	206.87±80.17 [*]
FPE-H	1.00	15.80±6.50 ^{**}	231.90±76.73 ^{**}

2.1.3 紫苏叶乙醇提取物对被动皮肤过敏模型小鼠血清中 IgE、PAF、LTB₄ 水平的影响

结果见图 1。Model 组 (11.90 ng/mL) 小鼠与

Control 组 (4.68 ng/mL) 相比，血清中 IgE 水平显著提高 ($p<0.01$)，显示建模成功。与 Model 组相比，各剂量组小鼠血清中 IgE 水平均有所下降。其中 FPE-M 组小鼠血清中 IgE 水平 (10.15 ng/mL) 下降了 14.7%，存在显著差异 ($p<0.05$)，FPE-H 组小鼠血清中 IgE 水平 (8.22 ng/mL) 下降了 30.92%，存在极显著差异 ($p<0.01$)。说明紫苏叶乙醇提取物可显著降低致敏小鼠血清中 IgE 的水平，高剂量作用效果更加显著。日本学者 ImaokaK 等人的研究也表明，日本种绿叶紫苏的提取物能够显著的抑制 IgE 类抗体，但对 IgG 类抗体无影响，表明了日本种绿叶紫苏的提取物对 IgE 类抗体产生的过敏性疾病有疗效作用^[23]。

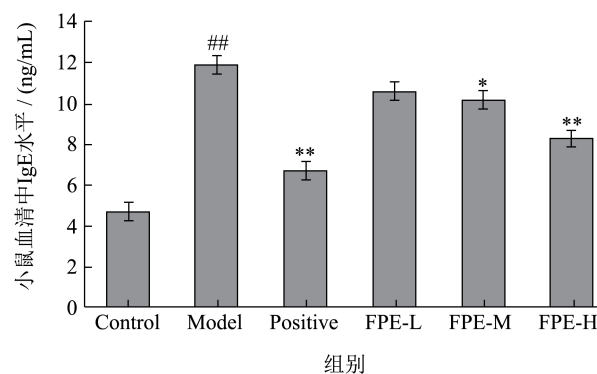


图 1 紫苏叶乙醇提取物对被动皮肤过敏模型小鼠血清中 IgE 水平的影响

Fig.1 Effect of ethanol extract of perilla leaf on serum IgE level in mice with passive skin allergy

注：与 Control 组比较：[#]表示差异显著 ($p<0.05$)，^{##}表示差异极显著 ($p<0.01$)；与 Model 组比较：^{*}表示差异显著 ($p<0.05$)，^{**}表示差异极显著 ($p<0.01$)。下同。

血小板激活因子 (PAF) 是另一种炎症介质，乃由 IgE 致敏的嗜碱性粒细胞在结合抗原后产生。PAF 一方面可直接作用于靶细胞，还可刺激细胞合成其他炎症介质，特别是前列腺素和白三烯的合成。由图 2 可知，Model 组小鼠血清中 PAF 水平 (22.27 pg/mL) 明显高于 Control 组 (14.98 pg/mL) ($p<0.01$)，显示建

模成功。与 Model 组相比较,各剂量组小鼠血清 PAF 水平均有所下降,低、中、高剂量组中 PAF 的含量分别下降 4.2%、13.8%和 15.5%。其中 FPE-M 组 (19.20 pg/mL) 和 FPE-H 组 (18.86 pg/mL) 与 Model 组比较存在极显著差异 ($p < 0.01$)。上述数据表明: Model 组致敏小鼠血清中 PAF 含量会增加,紫苏叶乙醇提取物可以有效的控制致敏小鼠血清中 PAF 的含量,暂时未发现明显的剂量依赖关系。

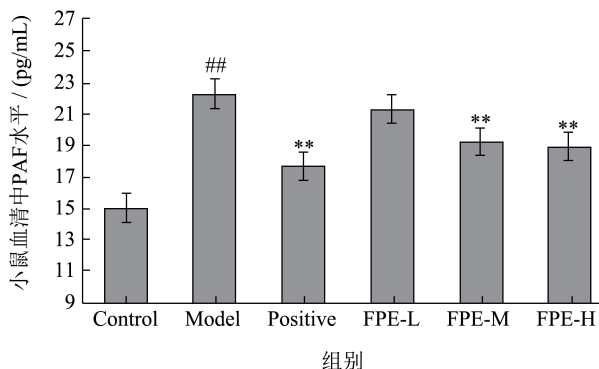


图2 紫苏叶乙醇提取物对被动皮肤过敏模型小鼠血清中 PAF 水平的影响

Fig.2 Effect of ethanol extract of perilla leaf on serum PAF level in mice with passive skin allergy

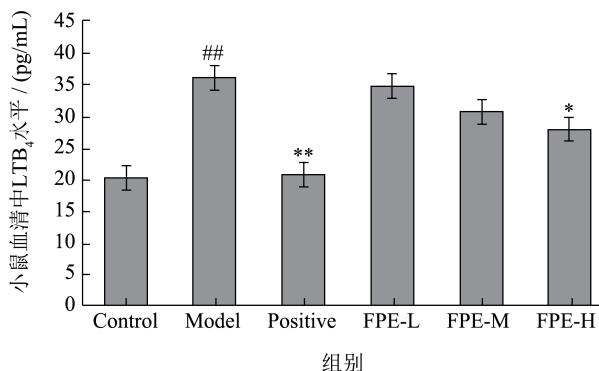


图3 紫苏叶乙醇提取物对被动皮肤过敏模型小鼠血清中 LTB₄ 水平的影响

Fig.3 Effect of ethanol extract of perilla leaf on serum LTB₄ level in mice with passive skin allergy

白三烯是花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 分别经环氧酶、5-脂氧合酶代谢途径生成的重要的炎症

介质,广泛参与机体炎性、过敏性反应的发生,还可强化肥大细胞释放炎症介质的效应参与过敏反应发病机制的调节^[24]。由图3可以看出,与 Control 组 (20.22 pg/mL) 相比, Model 组 (36.17 pg/mL) 小鼠血清中 LTB₄ 水平显著提高,显示建模成功。与 Model 组相比,各剂量组小鼠血清中 LTB₄ 水平均有所下降。以 FPE-H 组 (28.05 pg/mL) 效果最明显,血清中 LTB₄ 含量下降了 22.45%,与 Model 组存在极显著差异,差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。说明紫苏叶乙醇提取物可以有效控制致敏小鼠血清中 LTB₄ 水平的上升,对过敏有一定的对抗作用。

2.2 紫苏叶乙醇提取物对 DNCB 诱发的小鼠迟发型超敏反应的影响

2.2.1 紫苏叶乙醇提取物对 DNCB 诱发的迟发型超敏反应小鼠脏器系数的影响

除 FPE-H 组小鼠胸腺系数有所下降外 ($p < 0.05$),其余各组小鼠脾脏、胸腺、心脏、肝脏无显著性变化,差异无统计学意义 ($p > 0.05$)。结果见表 3。

2.2.2 紫苏叶乙醇提取物对 DNCB 诱发的迟发型超敏反应小鼠耳肿胀度的影响

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。本试验中选用的二硝基氯苯系一种半抗原,常被用作制备变应性接触性皮炎动物模型,以评价药物抑制IV型变态反应的效果。本试验中,小鼠致敏侧与非致敏侧的耳片厚度差可说明过敏反应的程度,差值越小,说明抗过敏作用越明显。与空白组小鼠比较,模型组小鼠耳肿胀度均显著提高 ($p < 0.01$),显示建模成功。与模型组相比,各组耳肿胀度均有所下降,其中以 FPE-H 组抑制 DNCB 引起的小鼠耳肿胀效果最好,在耳部致敏第 3 d、第 6 d 耳肿胀度显著降低 ($p < 0.05$),第 9 d 耳肿胀度极显著降低 ($p < 0.01$)。结果见表 4。相关研究也发现,佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯、花生四烯酸或噁唑酮诱导的耳炎小鼠灌胃给予 1 kg/L 野生紫苏的水提取物 0.4 mL,可显著缓解耳肿胀^[25]。

表 3 FPE 对 DNCB 诱发的迟发型超敏反应小鼠脏器系数的影响

Table 3 Effect of FPE on organ coefficient of DNCB induced delayed hypersensitivity mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g/kg)	脾系数/%	胸腺系数/%	心脏系数/%	肝脏系数/%
Control	-	0.35±0.04	0.47±0.07	0.57±0.05	4.49±0.31
Model	-	0.35±0.05	0.45±0.05	0.55±0.04	4.38±0.22
Positive	0.0016	0.34±0.05	0.47±0.03	0.55±0.05	4.28±0.20
FPE-L	0.25	0.36±0.04	0.45±0.04	0.55±0.05	4.51±0.34
FPE-M	0.50	0.38±0.06	0.45±0.04	0.56±0.04	4.55±0.34
FPE-H	1.00	0.38±0.05	0.42±0.03 [*]	0.56±0.05	4.47±0.40

表 4 FPE 对 DNCB 诱发的迟发型超敏反应小鼠耳肿胀度的影响

Table 4 Effect of FPE on ear swelling in DNCB induced delayed hypersensitivity mice ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	剂量/(g/kg)	3 d/mm	6 d/mm	9 d/mm
Control	-	0.000±0.010	-0.006±0.021	-0.000±0.006
Model	-	0.032±0.009 ^{###}	0.142±0.021 ^{###}	0.389±0.069 ^{###}
Positive	0.0016	0.016±0.007 ^{**}	0.091±0.312 ^{**}	0.303±0.379 ^{**}
FPE-L	0.25	0.028±0.006	0.151±0.340	0.351±0.036
FPE-M	0.50	0.025±0.007	0.120±0.284	0.328±0.462 [*]
FPE-H	1.00	0.023±0.006 [*]	0.112±0.236 [*]	0.321±0.496 ^{**}

2.2.3 紫苏叶乙醇提取物对 DNCB 诱发的迟发型超敏反应小鼠耳组织液 IL-4、IFN- γ 、TNF- α 水平影响

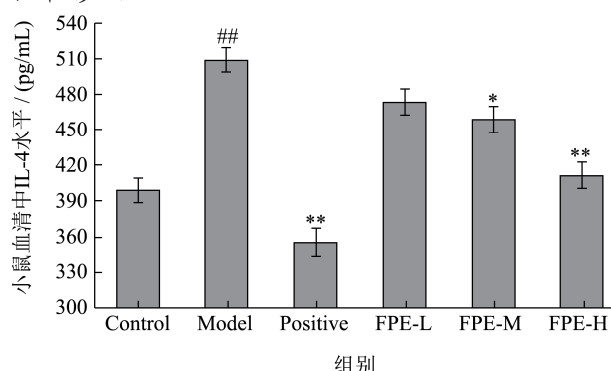


图 4 紫苏叶乙醇提取物对 DNCB 诱发的迟发型超敏反应小鼠耳组织液 IL-4 水平影响

Fig.4 Effect of ethanol extract from *Perilla frutescens* leaves on IL-4 level in ear tissue of mice with DNCB induced delayed hypersensitivity

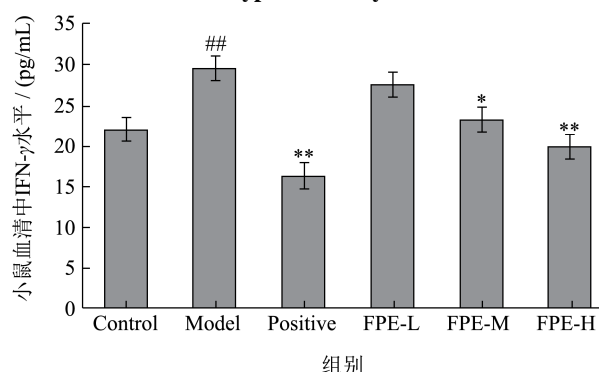


图 5 紫苏叶乙醇提取物对 DNCB 诱发的迟发型超敏反应小鼠耳组织液 IFN- γ 水平影响

Fig.5 Effect of ethanol extract from *Perilla frutescens* leaves on IFN- γ level in ear tissue of mice with DNCB induced delayed hypersensitivity

IL-4 是 T 细胞自身分泌的生长因子，在过敏反应中能促进巨噬细胞提呈抗原。本文试验中，FPE-M 组 (458.10 pg/mL) 小鼠与 Model 组 (507.94 pg/mL) 相比，耳组织液中 IL-4 水平显著降低 ($p<0.05$)，FPE-H 组 (410.67 pg/mL) 与 Model 组比较耳组织液中 IL-4

水平下降了 19.14%，效果极显著 ($p<0.01$)。说明紫苏叶乙醇提取物可显著降低致敏小鼠耳组织液中 IL-4 水平，缓解过敏过程中过敏介质的释放。高剂量作用效果更加显著。结果见图 4。

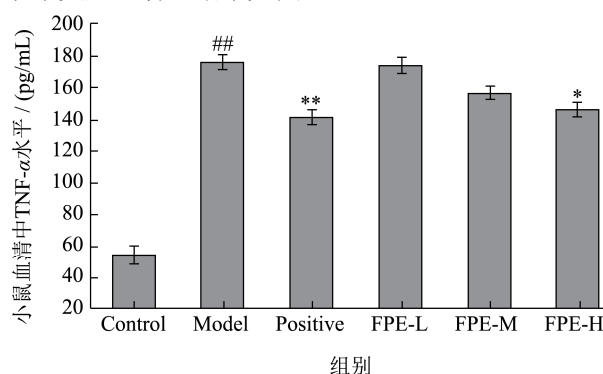


图 6 紫苏叶乙醇提取物对 DNCB 诱发的迟发型超敏反应小鼠耳组织 TNF- α 水平影响

Fig.6 Effect of ethanol extract from *Perilla frutescens* leaves on TNF- α level in ear tissue of mice with DNCB induced delayed hypersensitivity

IFN- γ 能作用于内皮细胞和巨噬细胞等，提高将抗原呈递给局部 CD4+T 细胞的效率，是迟发性超敏反应中最重要的细胞因子。与 Model 组 (29.52 pg/mL) 相比，低、中、高剂量组小鼠耳组织液中 IFN- γ 含量分别降低了 7.3%、21.1%、32.52%。FPE-M 组 (23.29 pg/mL) 致敏小鼠耳组织液中 IFN- γ 水平显著降低 ($p<0.05$)，FPE-H 组 (19.83 pg/mL) 效果极显著 ($p<0.01$)。结果见图 5。数据显示紫苏叶乙醇提取物对于 DNCB 诱发的迟发型超敏反应小鼠耳部 IFN- γ 上升有所抑制，对 DNCB 诱发的 IV 型超敏反应有一定的对抗作用，且紫苏叶乙醇提取物的抗过敏效果与用量呈一定的剂量相关性。

TNF- α 能放大小静脉内皮细胞结合和活化白细胞的能力，从而导致炎症反应。本试验结果如图 6 所示，Model 组 (175.63 pg/mL) 小鼠与 Control 组 (54.84 pg/mL) 相比，耳组织液中 TNF- α 水平显著提高 ($p<0.01$)，显示建模成功。与 Model 组相比，各剂量组小鼠耳组织液中 TNF- α 水平均有不同程度的下降，

其中 FPE-H 组(146.45 pg/mL)小鼠耳组织液中 TNF- α 水平显著性降低 ($p<0.05$), 与 Model 组相比下降了 16.6%。

3 结论

本试验结果显示, 紫苏叶乙醇提取物对小鼠脏器生长没有影响。小鼠被动皮肤过敏试验中, FPE 具有抗 I 型过敏反应活性, 能显著降低小鼠瘙痒次数延长首次瘙痒时间。高剂量组与模型组相比极显著降低小鼠瘙痒次数 ($p<0.01$), 由 24.3 次降低至 15.8 次, 首次瘙痒时间由 121.59 s 显著延长至 231.90 s。FPE 能显著降低致敏小鼠血清中 IgE、PAF、LTB₄ 水平, 高剂量组小鼠血清中 IgE、PAF、LTB₄ 水平分别下降了 30.92%、15.50%、22.45%, 表明 FPE 抗过敏作用机制与阻止过敏反应生物活性物质释放、干预花生四烯酸代谢产物的生成有关。DNCEB 诱发的小鼠迟发型超敏反试验中, FPE 能显著降低小鼠耳肿胀度, 第 9 d 极显著降低小鼠耳肿胀度 ($p<0.01$)。高剂量组水平小鼠耳组织液中 TNF- α 、IL-4、IFN- γ 水平分别下降了 19.14%、32.52%、16.61%。综上所述, 通过体内动物试验, 证实紫苏叶乙醇提取物水溶液对 I 型过敏和 IV 型过敏的抗过敏活性, 并初步探讨其对 I 型过敏作用机制与阻止过敏反应生物活性物质释放、干预花生四烯酸代谢产物的生成从而发挥抗过敏作用有关。但更深入的分子生物学机制和功效因子尚不明确, 有待今后进一步研究。

参考文献

- [1] Jung-Soo Bae, Mira Han, Hee Soon Shin, et al. *Perilla frutescens* leaves extract ameliorates ultraviolet radiation-induced extracellular matrix damage in human dermal fibroblasts and hairless mice skin [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 195: 334-342
- [2] Emi Saita, Yoshimi Kishimoto, Mariko Tani, et al. Antioxidant activities of *Perilla frutescens* against low-density lipoprotein oxidation *in vitro* and in human subjects [J]. *Journal of Oleo Science*, 2012, 61(3): 113-120
- [3] LI Na, ZHANG Zhi-Jun, LI Xiao-Jun, et al. Microcapsules biologically prepared using *Perilla frutescens* (L.) Britt. essential oil and their use for extension of fruit shelf life [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(3): 1033-1041
- [4] 何育佩, 郝二伟, 谢金玲, 等. 紫苏药理作用及其化学物质基础研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(16): 3957-3968
HE Yu-pei, HAO Er-wei, XIE Jin-ling, et al. Research progress on pharmacological action and chemical substance basis of *Perilla frutescens* [J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2018, 49(16): 3957-3968
- [5] 张世林. 紫苏抗过敏成分的研究与开发[D]. 太原: 中北大学, 2020
ZHANG Shi-lin. Research and development of anti allergic components from *Perilla frutescens* [D]. Taiyuan: North China University, 2020
- [6] Chen Chun-Yu, Leu Yann-Lii, Fang Yu, et al. Anti-inflammatory effects of *Perilla frutescens* in activated human neutrophils through two independent pathways: Src family kinases and calcium [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18-20
- [7] Shin T Y, Kim S H, Kim Y K, et al. Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Perilla frutescens* [J]. *Arerugi*, 1993, 42(1): 74-80
- [8] Takagi S. Anti-allergic activity of glycopeptide isolated from *Perilla frutescens* Britton [J]. *Journal of Traditional Medicines*, 2001, 18(6): 239-244
- [9] 聂晶, 冉域辰, 张亚果, 等. 成都市 0~24 月龄儿童食物过敏流行病学调查[J]. *中国妇幼健康研究*, 2017, 28(2): 382-383
NIE Jing, RAN Yu-chen, ZHANG Ya-guo, et al. Epidemiological investigation of food allergy in children aged 0~24 months in Chengdu [J]. *China Maternal and Child Health Research*, 2017, 28(2): 382-383
- [10] 陈利华, 李巍. 西北地区过敏性疾病食物过敏原点测试结果[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2012, 3: 218-222
CHEN Li-hua, LI Wei. Results of food allergy origin prick test in northwest China [J]. *Chinese Journal of Clinical Immunology and Allergy*, 2012, 3: 218-222
- [11] Sicherer S H, Sampson H A. Food allergy [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125(2): 116-125
- [12] Sicherer S H, Sampson H A. Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2014, 133(2): 291-307
- [13] Du T G, Sampson H A, Plaut M, et al. Food allergy: update on prevention and tolerance [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(1): 30-40
- [14] Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, et al. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007, 119(1): 192-198
- [15] 王亚楠, 张志军, 李会珍. 紫苏叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用[J]. *中成药*, 2020, 42(2): 462-465

- WANG Ya-nan, ZHANG Zhi-jun, LI Hui-zhen. Inhibitory effect of perilla leaf extract on xanthine oxidase [J]. Chinese Patent Medicine, 2020, 42(2): 462-465
- [16] 王冲,侯娟,徐琳,等.牛樟芝水提取物抗过敏作用及其机制研究[J].药物评价研究,2019,42(3):462-466
- WANG Chong, HOU Juan, XU Lin, et al. Study on anti-allergic effect and mechanism of water extract from *Cinnamomum camphora* [J]. Drug Evaluation Research, 2019, 42(3): 462-466
- [17] 杨慧,马培,林明宝,等.紫苏叶化学成分、抗炎作用及其作用机制研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2017,31(3): 279-285
- YANG Hui, MA Pei, LIN Ming-bao, et al. Chemical constituents, anti-inflammatory effects and mechanism of perilla leaves [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2017, 31(3): 279-285
- [18] 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].中国药理学杂志,2014,49(11):963-966
- WANG Zhe, YU Liu, GONG Xi-ping, et al. Experimental study on anti-allergic mechanism of ethyl acetate extract of Jingfang powder [J]. Chinese Journal of Pharmacy, 2014, 49(11): 963-966
- [19] 周洪莉,阙昌田,王学,等.荆防散乙酸乙酯萃取部位及分离物的抗过敏作用研究[J].中药材,2017,40(9):2182-2186
- ZHOU Hong-li, QUE Chang-tian, WANG Xue, et al. Study on the anti-allergic effect of ethyl acetate extract and its extract from Jingfang powder [J]. Chinese Herbal Medicine, 2017, 40(9): 2182-2186
- [20] 易娟娟,谢家骏,张立波,等.RBL-2H3 细胞体外试验评价药物过敏的方法学研究和适用性考察[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(13):180-184
- YI Juan-juan, XIE Jia-jun, ZHANG Li-bo, et al. Methodology and applicability of RBL-2H3 cell in vitro evaluation of drug allergy [J]. Chinese Journal of Experimental Prescriptions, 2014, 20(13): 180-184
- [21] 马青松,王丹,庞玉新,等.艾纳香油对小鼠耳肿胀的抗炎效果[J].贵州农业科学,2016,44(4):100-102
- MA Qing-song, WANG Dan, PANG Yu-xin, et al. Anti-inflammatory effect of Aina sesame oil on ear swelling in mice [J]. Guizhou Agricultural Science, 2016, 44(4): 100-102
- [22] Nurmatov U, Dhimi S, Arasi S, et al. Allergen Immunotherapy for IgE-mediated food allergy: a systematic review and meta-analysis [J]. Allergy, 2017, 72(8): 1133-1147
- [23] Imaoka K, Inouye S, Takahashi T, et al. Effect of Perilla frutescens extract on anti-DNP IgE antibody production in mice [J]. Allergy, 1993, 42(1): 74-80
- [24] Yanl, Liao K H. The role of leukotrienes in the pathogenesis of atopic dermatitis and chronic urticaria [J]. J Clin Dermatol, 2013, 32(10): 625-626
- [25] Ueda H, Yamazaki M. Anti-inflammatory and anti-allergic actions by oral administration of a perilla leaf extract in mice [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(7): 1673-1675

(上接第 309 页)

- [19] Abrahamsen E B, Milazzo M F, Selvik J T, et al. Prioritising investments in safety measures in the chemical industry by using the analytic hierarchy process [J]. Reliability Engineering & System Safety, 2020, 198: 106811
- [20] 王智远,李国栋,王勇华.基于 AHP-TOPSIS 的桥梁设计方案优选决策模型[J].吉林大学学报(工学版), 2017,47(2): 478-482
- WANG Zhi-yuan, LI Guo-dong, WANG Yong-hua. Optimization decision model for bridge design based on AHP-TOPSIS [J]. Journal of Jilin University (Engineering and Technology Edition), 2017, 47(2): 478-482
- [21] He H, Li P, Tang X, et al. Developing cysteamine-modified SERS substrate for detection of acidic pigment with weak surface affinity [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, 212: 293-299
- [22] Ou Y, Wang X, Lai K, et al. Gold nanorods as surface-enhanced raman spectroscopy substrates for rapid and sensitive analysis of allura red and sunset yellow in beverages [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(11): 2954-2961
- [23] Pei L, Ou Y, Yu W, et al. Au-Ag core-shell nanospheres for surface-enhanced Raman scattering detection of Sudan I and Sudan II in chili powder [J]. Journal of Nanomaterials, 2015, 48: 1-8