

加味麻黄蝉衣汤对变应性鼻炎模型豚鼠的改善作用及其机制研究

廖勇*, 龚成#, 谢琳玲, 杨雪, 黄卉(湖北民族学院附属民大医院耳鼻咽喉科, 湖北恩施 445000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)04-0491-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.04.19

摘要 目的:研究加味麻黄蝉衣汤对变应性鼻炎(AR)模型豚鼠的改善作用及其机制。方法:将32只豚鼠随机均分为正常(0.9%氯化钠注射液)组、模型(0.9%氯化钠注射液)组、实验[加味麻黄蝉衣汤,5.18 g(生药)/kg]组和对照[丙酸氟替卡松鼻喷雾剂,50 μg/(只·d)]组,除正常组外其余各组豚鼠ip卵清蛋白和氢氧化铝各30 mg复制AR模型。除对照组喷雾给药外,其余各组ig相应药物,每天2次,连续15 d。观察豚鼠的鼻部症状并进行评分,免疫组化法检测鼻黏膜酪氨酸磷酸酶1(SHP-1)的蛋白表达水平,酶联免疫吸附法检测血清中白细胞介素4(IL-4)、干扰素γ(IFN-γ)的含量。结果:与正常组比较,模型组豚鼠出现AR症状,评分增加,鼻黏膜SHP-1蛋白表达水平升高,血清中IL-4含量增加、IFN-γ含量减少($P<0.05$);与模型组比较,实验组和对照组豚鼠AR症状改善,评分降低,鼻黏膜SHP-1蛋白表达水平降低,血清中IL-4含量减少、IFN-γ含量增加($P<0.05$)。结论:加味麻黄蝉衣汤对AR有一定的改善作用,其机制可能与减少血清中IL-4的含量、增加血清中IFN-γ的含量有关。

关键词 加味麻黄蝉衣汤;变应性鼻炎;白细胞介素4;干扰素γ;豚鼠

Improvement Effect of Modified Mahuang Chanyi Decoction on Allergic Rhinitis Model Guinea Pigs and Its Mechanism Study

LIAO Yong, GONG Cheng, XIE Linling, YANG Xue, HUANG Hui(Dept. of Otorhinolaryngology, the Affiliated Minda Hospital of Hubei University for Nationalities, Hubei Enshi 445000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study improvement effect of modified mahuang chanyi decoction on allergic rhinitis (AR) model guinea pigs and its mechanism. METHODS: 32 guinea pigs were randomly divided into normal group (0.9% Sodium chloride injection), model group (0.9% Sodium chloride injection), experimental [Modified mahuang chanyi decoction, 5.18 g (medicinal materials)/kg] group and control [Fluticasone propionate nasal spray, 50 μg/(guinea pig·d)] group. Except for normal group, other groups received ovalbumin 30 mg and calmostrin 30 mg intraperitoneally to induce AR model. Except for control group, other groups were given relevant medicine intragastrically, twice a day for consecutive 15 d. Nasal symptoms of guinea pigs were observed and recorded, and then analyzed and scored. The protein expression of nasal mucosa SHP-1 was detected by immunohistochemistry, the serum contents of IL-4 and IFN-γ were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. RESULTS: Compared with normal group, model group suffered from AR symptom, and nasal symptoms score was increased; and the protein expression of nasal mucosa SHP-1 and the serum content of IL-4 increased, while the content of IFN-γ decreased ($P<0.05$). Compared with model group, AR symptom of experimental group and control group were improved; nasal symptoms score, the protein expression of nasal mucosa SHP-1 and the serum content of IL-4 decreased while the content of IFN-γ increased ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Modified mahuang chanyi decoction shows certain improvement effect on AR, and its mechanism is associated the decrease of IL-4 content and the increase of IFN-γ content in serum.

KEYWORDS Modified mahuang chanyi decoction; Allergic rhinitis; IL-4; IFN-γ; Guinea pig

近年来变应性鼻炎(AR)的发病率有升高的趋势,且发病人群趋于年轻化。虽然有多种传统药物治疗以及外科手术、免疫治疗等方法已经投入到AR的治疗中^[1-2],但是由于AR发病机制复杂,治疗效果均不佳。西药治疗AR虽见效快,但是具有多种副作用且复发率较高^[3];而中药具有多靶点治疗AR的特点,且安全性好、副作用小^[4]。加味麻黄蝉衣汤由麻黄、蝉衣、槐花、黄连、浮萍及甘草组成,具有抗过敏和散风热的功效,临床应用中发现加味麻黄蝉衣汤对AR的治疗效果要优于丙酸氟替卡松鼻喷雾剂,但无相关实验验证。在本研究中笔者将对加味麻黄蝉衣汤对AR模型豚鼠的改善作用进行考察,

* 主治医师, 硕士。研究方向:变应性鼻炎的诊疗及基础研究。E-mail: 13687100@qq.com

通信作者: 主治医师, 硕士。研究方向: 喉科疾病的基础与临床。E-mail: 2109472877@qq.com

并探讨其可能的作用机制,为其临床用于治疗AR提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

CX41-32RFL型荧光显微镜(日本 Olympus公司);XSZ-D型倒置显微镜(重庆光学仪器厂);自动曝光微拍摄像机(德国 Leica公司)。

1.2 药品与试剂

丙酸氟替卡松鼻喷雾剂(温州康宏医药公司,批号:3C5B,规格:50 μg×120喷/瓶);酪氨酸磷酸酶1(SHP-1)抗体(美国 Abcam公司,批号:ab51171);白细胞介素4(IL-4)、干扰素γ(IFN-γ)检测试剂盒(上海万疆生物公司,批号:BW02476B、BW02489B);其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

麻黄、蝉衣、槐花、黄连、浮萍和甘草均购自上海万仕诚国

药制品有限公司,均符合2010年版《中国药典》(一部)的相关质量标准。

1.4 动物

成年健康豚鼠32只,♀♂各半,体质量(350±70)g,购自湖北省实验动物中心,实验动物使用许可证号为SCXK(鄂)2012-0003。

2 方法

2.1 加味麻黄蝉衣汤的制备

称取麻黄7.5g、蝉衣15g、槐花10g、黄连5g、浮萍15g、甘草5g,加水1200ml,煎成400ml,经纱布过滤,收集药液;将剩余的药渣再加水600ml,煎至400ml后与第一次煎得的400ml药液混合。将上述混合药液浓缩至50ml[药物质量浓度为1.15g(生药)/ml],即得。

2.2 模型的制备、分组与给药

选取32只豚鼠,正常饲养1周后,随机分为正常组、模型组、实验组和对照组,每组8只,雌雄分笼饲养。正常组豚鼠进行假实验,单纯ig 0.9%氯化钠注射液;其余3组豚鼠均ip卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝各30g复制AR模型^[9]。模型复制成功后,模型组ig 0.9%氯化钠注射液,实验组ig加味麻黄蝉衣汤[5.81g(生药)/kg],每天2次,连续给药15d;对照组喷雾给予丙酸氟替卡松[50μg/(只·d)],连续给药15d。

2.3 鼻部症状观察

实验第7天开始记录各组豚鼠AR相关的鼻部症状(包括鼻痒、喷嚏和流涕)并进行评分^[9],评分标准见表1。

表1 鼻部症状评分标准

Tab 1 Nasal symptoms score criteria

症状	评分指标	评分
鼻痒	抓鼻1~5次	1分
	抓鼻5次以上	2分
喷嚏	1~3个	1分
	4~10个	2分
	>10个	3分
流涕	流至前鼻孔	1分
	超出前鼻孔	2分
	涕流满面	3分

2.4 血清中IL-4、IFN-γ含量测定

各组大鼠末次给药24h后,以10%水合氯醛(3ml/kg)进行麻醉,摘取眼球采血,将所采集血液缓慢置入采血管,摇匀,以离心半径为15cm、3000r/min离心15min,分离血清用于IL-4、IFN-γ含量检测,-80℃保存,备用。测定前室温复融血清,采用酶联免疫吸附法测定血清中IL-4、IFN-γ含量,所有操作严格按相应试剂盒说明书进行。

2.5 鼻黏膜SHP-1蛋白表达测定

大鼠采完血后,断头处死,迅速剥除上颌骨部皮肤,将上颌骨从颅骨中分离,打开鼻背,沿鼻中线切开,暴露鼻中隔和双侧鼻腔,分离鼻中隔与鼻黏膜。取双侧黏膜,生理盐水洗去血液后放入4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋后,5μm厚度切片,SP法染色(操作步骤严格按照SHP-1试剂说明书进行)。图像采集采用自动曝光微拍摄像机,图像分析采用上海山富科学仪器有限公司Biosens Digital Imagine System图像分析系统。每只豚鼠取5张图片,每张图片随机选取5个视野,计算SHP-1蛋白灰度值,以此分析蛋白水平。

2.6 统计学方法

采用SPSS 19.0进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用基于方差分析的SNK-*t*检验进行分析。 $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 鼻部症状观察结果

造模后给药前,与正常组比较,模型组、实验组和对照组豚鼠鼻部症状评分均明显升高($P < 0.05$),表明模型复制成功;给药7d后,与模型组比较,实验组和对照组豚鼠鼻部症状评分明显降低($P < 0.05$),但实验组和对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗10、15d后,实验组和对照组豚鼠鼻部症状评分均明显低于模型组($P < 0.05$),且实验组评分明显低于对照组($P < 0.05$),结果详见表2。

表2 治疗前后各组豚鼠鼻部症状评分比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Nasal symptoms score of guinea pigs before and after treatment in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	给药前	给药后7d	给药后10d	给药后15d
正常组	1.17±0.28	1.01±0.24	0.86±0.19	0.69±0.14
模型组	6.62±0.51*	6.17±0.62*	5.98±0.71*	5.58±0.73*
实验组	6.37±0.67*	4.26±0.61**	3.11±0.34** ^Δ	2.04±0.41** ^Δ
对照组	6.49±0.72*	4.41±0.83**	3.94±0.52**	3.37±0.53**

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.05$;与对照组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, ** $P < 0.05$; vs. control group, ^Δ $P < 0.05$

3.2 各组豚鼠血清中IL-4、IFN-γ含量测定结果

与正常组比较,模型组豚鼠血清中IL-4含量增加、IFN-γ含量减少($P < 0.05$);与模型组比较,实验组和对照组豚鼠血清中IL-4含量减少、IFN-γ含量增加($P < 0.05$);与对照组比较,实验组豚鼠血清中IL-4含量减少、IFN-γ含量增加($P < 0.05$),结果详见表3。

表3 各组豚鼠血清中IL-4、IFN-γ含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Serum content of IL-4 and IFN-γ in guinea pigs in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	IL-4, pg/ml	IFN-γ, pg/ml
正常组	126.71±31.49	416.28±51.36
模型组	248.19±40.22*	243.67±34.97*
实验组	134.05±35.73** ^Δ	386.14±35.91** ^Δ
对照组	167.95±36.86**	349.27±40.06**

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.05$;与对照组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, ** $P < 0.05$; vs. control group, ^Δ $P < 0.05$

3.3 各组豚鼠鼻黏膜SHP-1蛋白表达水平测定结果

与正常组比较,模型组豚鼠鼻黏膜SHP-1蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,实验组和对照组豚鼠SHP-1蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);与对照组比较,实验组豚鼠SHP-1蛋白表达水平降低($P < 0.05$),结果见图1、图2。

4 讨论

AR是发生在鼻腔的I型变态反应性疾病,以反复发作阵发性鼻痒、喷嚏、流大量清涕和发作时鼻黏膜苍白为特点,中医属“鼻鼽”范畴,因禀质特异、肺卫气虚、不耐风寒异气所致。研究显示,变应原进入人体经巨噬细胞等抗原呈递细胞处理后产生血清免疫球蛋白E(IgE)抗体,此抗体附着于肥大细胞等细胞的细胞膜上,使鼻黏膜致敏;当变应原再次进入人体后与IgE结合,使肥大细胞膜结构改变,释放出大量的生物活性物质(如白细胞三烯、激肽、前列腺素等)^[9],从而引发AR的各种临床表现。临床多用丙酸氟替卡松鼻喷雾剂治疗AR,

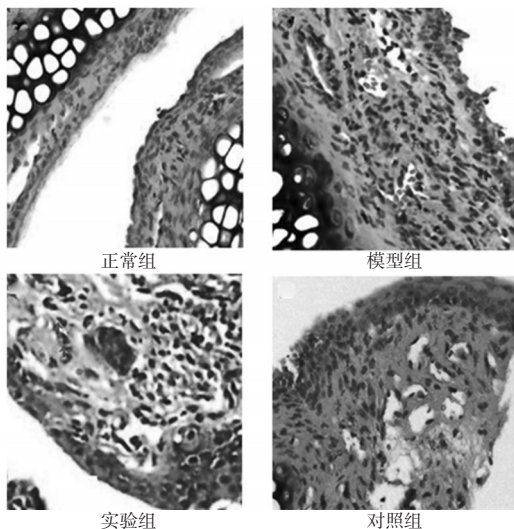


图1 各组豚鼠鼻黏膜SHP-1蛋白表达免疫组化图(×100)

Fig 1 Immunohistochemical pictures of the expression of nasal mucosa SHP-1 protein in guinea pigs in each group(×100)

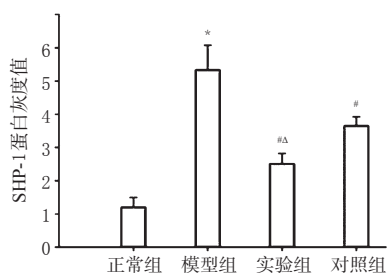


图2 各组豚鼠鼻黏膜SHP-1蛋白表达水平

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与对照组比较,## $P < 0.05$

Fig 2 The expression of nasal mucosa SHP-1 protein in guinea pigs in each group

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$; vs. control group, ## $P < 0.05$

且具有不错的疗效,故在本实验中笔者以其作为对照药物。加味麻黄蝉衣汤方中麻黄味苦辛性温,入肺与膀胱经,具有发汗解表、宣肺平喘之功;蝉衣宣肺、疏散风热、透疹止痒;黄连清热燥湿、泻火解毒;槐花清热凉血,能够保持毛细血管的正常抵抗力、降低血管通透性;甘草和中缓急、解毒润肺。诸药合用,既能抗过敏又能散风热。

随着免疫学研究的深入,研究者认为AR的发生发展中有多种免疫活性细胞及细胞因子的参与,而Th1/Th2(IL-4、IFN- γ 是Th1及Th2细胞所分泌的细胞因子,能够间接反映出Th1/Th2的比例)的失衡在AR发生发展中有重要的作用。变应原进入机体后会诱导Th0细胞向Th2细胞分化,导致Th2细胞增加、Th1细胞减少,破坏Th1/Th2的平衡,从而引发AR。林华等^[8]研究显示,在AR患者外周血清中IL-4表达显著升高,而IFN- γ 的表达显著降低,使Th1/Th2平衡向Th2偏移,与本实验结果相一致。SHP-1蛋白能够通过调节酪氨酸磷酸酶的活性起到调节信号转导的作用^[9]。有研究显示,SHP-1蛋白表达不足会导致红细胞、髓系细胞及淋巴细胞异常,SHP-1缺失的骨髓源性肥大细胞在IgE-Fc ϵ RI刺激后产生大量的致炎细胞因子,如IL-6、IL-13及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等^[10],从而引发炎

症。另有研究显示,小鼠体内SHP-1缺失的肥大细胞能增加变应原诱导的过敏性和致敏反应应答^[11]。本实验结果显示,加味麻黄蝉衣汤能够显著改善AR模型大鼠的鼻部症状,效果显著;给予加味麻黄蝉衣汤治疗后豚鼠外周血清中IL-4含量减少、IFN- γ 含量增加,提示加味麻黄蝉衣汤能改善豚鼠Th1/Th2的平衡,但在本实验中给予加味麻黄蝉衣汤后豚鼠鼻黏膜SHP-1表达较模型组降低,其机制有待进一步研究。

综上,加味麻黄蝉衣汤对AR有一定的改善作用,其机制可能与减少血清中IL-4的含量、增加血清中IFN- γ 的含量,从而改善Th1/Th2平衡有关。

参考文献

- [1] 李秀敏,谢宇朋.复方莫米松鼻喷剂对鼻炎的药效学实验研究[J].中国临床药理学杂志,2014,30(4):344.
- [2] 吴李仲,苏炳泽,黎才惠,等.鼻内镜下鼻中隔矫正联合下鼻甲等离子消融术治疗鼻炎的疗效[J].中国老年学杂志,2014,34(23):6789.
- [3] Farrokhi S, Gheybi MK, Movahed A, et al. Common aeroallergens in patients with asthma and allergic rhinitis living in southwestern part of Iran: based on skin prick test reactivity[J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2015, 14(2):133.
- [4] 陈静,张嘉玲,甘忠源,等.中药超微粉腧穴敷贴对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜重塑的影响[J].实用医学杂志,2014,30(9):1356.
- [5] 文洁,朱建梅,李婕,等.玉屏风颗粒治疗过敏性鼻炎的实验研究[J].中成药,2011,33(6):34.
- [6] 孙霄云,康健,陈冬,等.布地奈德联合泰斯花粉阻隔剂治疗过敏性鼻炎的临床观察[J].中国药房,2012,23(8):697.
- [7] Bousquet J, Bachert C, Jonathan B, et al. Advances in pharmacotherapy for the treatment of allergic rhinitis; MP29-02 (a novel formulation of azelastine hydrochloride and fluticasone propionate in an advanced delivery system) fills the gaps[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2015,16(6):913.
- [8] 林华,潘成军,陈赛赛,等.鼻炎患者血清Th1/Th2细胞因子水平变化及孟鲁司特的干预作用[J].中国基层医药,2014,21(18):2751.
- [9] Chun J, Li RJ, Cheng MS, et al. Alantolactone selectively suppresses STAT3 activation and exhibits potent anti-cancer activity in MDA-MB-231 cells[J]. *Cancer Lett*, 2015,357(1):393.
- [10] Yamashita T, Suzuki R, Backlund PS, et al. Differential dephosphorylation of the FcR γ immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines with dissimilar potential for activating Syk[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(42):28584.
- [11] Shiohara M, Shigemura T, Suzuki T, et al. MITF-CM, a newly identified isoform of microphthalmia-associated transcription factor, is expressed in cultured mast cells[J]. *Int J Lab Hematol*, 2009, 31(2):215.

(收稿日期:2015-06-17 修回日期:2015-09-17)

(编辑:林静)