

鼻敏爽胶囊对变应性鼻炎豚鼠模型 Th1/Th2 细胞因子表达的影响

李 芸¹, 周家璇^{2△}, 陈晓宇³, 罗 晃⁴

(1. 景德镇市中医医院, 江西景德镇 333000; 2. 云南中医学院第一附属医院, 云南昆明 650021;
3. 青岛市海慈医疗集团, 山东青岛 266033; 4. 赣州市南康区中医院, 江西赣州 341400)

摘要: 目的 探讨云南省中医医院院内制剂鼻敏爽胶囊治疗变应性鼻炎(AR)豚鼠的作用机制。方法 选用 60 只健康豚鼠, 随机选 50 只豚鼠进行 AR 造模。剩余 10 只为空白对照组。用白蛋白(鸡蛋)致敏激发制造 AR 模型, 然后造模成功的 50 只豚鼠随机分为 5 组, 予不同浓度鼻敏爽胶囊进行治疗, 平行设醋酸泼尼松片对照组。治疗 15d, 测定各组动物血清中 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5 的含量。结果 变应性鼻炎豚鼠较正常豚鼠血清中 Th1 细胞(IL-2、IFN- γ)表达水平及 Th1/Th2 比例值下降, Th2 细胞(IL-4、IL-5)表达显著提高;“鼻敏爽胶囊”与醋酸泼尼松片都可使 AR 豚鼠模型血清中的 Th1 表达水平及 Th1/Th2 比值都有所上升, Th2 表达显著下降。结论 鼻敏爽胶囊具有降低变应性鼻炎豚鼠 Th2 提高 Th1 细胞因子水平的表达来调节血清中 Th1/Th2 平衡, 以达到治疗 T 辅助细胞介导的鼻部非特异性炎症反应。

关键词: 鼻敏爽胶囊; 变应性鼻炎; Th1; Th2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)05-0024-03

变态反应性鼻炎(AR), 简称变应性鼻炎, 又称为过敏性鼻炎。是易感个体接触变应原后, 鼻黏膜的变应性炎症性疾病^[1]。变应性鼻炎的治疗, 一直倍受关注, 但尚缺乏十分有效的治疗。当代耳鼻喉科的重要课题之一是揭示变应性鼻炎发病机制并寻找疗效高、毒副作用小、稳定持久的治疗手段。“鼻敏爽胶囊”由云南省中医医院耳鼻喉科主任周家璇教授多年临床经验总结而研制的院内中药制剂。“鼻敏爽胶囊”2001 年 12 月和 2009 年 6 月先后获得云南省卫生厅课题基金资助, 通过进行“‘鼻敏爽’对变应性鼻炎的抗过敏、抗炎及扶正的实验研究”和“‘鼻敏爽胶囊’治疗鼻鼾肺脾气虚证临床疗效观察”两专项课题研究已证实: 鼻敏爽胶囊能改善小鼠非特异性免疫和体液免疫, 经毒理实验研究表明该药无明显毒副作用, 通过临床研究证实有效率达到 80% 左右^[2]。本实验从 T 细胞方面探讨鼻敏爽胶囊治疗 AR 豚鼠的作用机制, 为其治疗 AR 提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 药物与试剂

鼻敏爽胶囊为云南省中医医院院内制剂, (滇

药制字(Z)20080052A 批号: 20111204, 主要由黄芪、白术、防风、麻黄、荆芥等中草药组成。醋酸泼尼松片由天津力生制药股份有限公司生产, 批号 20110119。卵白蛋白(OVA)上海伯奥生物科技有限公司生产, 批号 20110106。氢氧化铝由上海金山兴塔美兴化工厂, 批号 20120411。IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 测定试剂盒均由美国 RD 公司生产, 批号 201101。

1.2 仪器

连续波长酶标仪 Epoch(美国 Bio-Tek)、大型台式离心机 MultifugeR4KR(德国 Thermo Scientific Heraeus)、洗板机 1575(美国 Bio-rad)、移液器 F2(美国 Thermo-fisher)、恒温水浴锅 SC150(美国 Thermo-fisher)、超低温冰箱 88400(美国 Thermo-fisher)、电子分析天平 MS104S/PL600-S(瑞士 Mettler 公司瑞士 METTLER TOLEDO)、冰箱 BCD-186KB(海尔)、恒温磁力搅拌器 85-2 型(常州国华电器有限公司)、由云南省中医医院中心实验室提供; 外科手术包由云南省中医医院耳鼻喉科提供。

1.3 实验动物

健康雄性豚鼠 60 只, 购于四川省医学科学院

收稿日期: 2014-03-18

作者简介: 李芸(1987-), 女, 江西抚州人, 住院医师, 主要从事耳鼻喉疾病的中西医结合治疗。

△通信作者: 周家璇, E-mail: jiaxuanzhou@163.com.

实验动物研究所,合格证号 SCK(川)2008-22,动物批号:0000213,普通级,6~9 周龄,体质量(230±20)g,选用豚鼠须双眼明亮瞳孔清澈,鼻腔干净、无损伤。对每只豚鼠进行编号。

1.4 造模

选用 60 只健康、活泼雄性豚鼠,常规喂养 1 周后,随机选 50 只豚鼠进行 AR 造模。剩余 10 只为空白对照组。采用卵清蛋白(OVA)致敏造模^[3-4],首先基础致敏:用 30mg 卵白蛋白作抗原,氢氧化铝粉末 3g 作佐剂,加生理盐水 100mL 制成混悬液,每只豚鼠 1mL 腹腔注射,隔日 1 次,共 7 次。强化致敏:配制 2% 卵白蛋白生理盐水滴入双侧鼻腔,每侧 0.05mL,每日 1 次,共 7 次。在第 21 天的致敏操作后观察 30min,观察鼻部症状如鼻痒、流清涕、打喷嚏等情况及轻重,并按按下表记录豚鼠行为学得分,若豚鼠鼻部局部症状积分超过 5 分则表明造模成功。

变应性鼻炎症状评分表

症状	1 分	2 分	3 分
鼻痒	轻擦鼻几次	反复挠鼻面部不止	鼻面部到处擦磨
喷嚏	1-3 个	4-10 个	11 个以上
清涕	流到鼻前孔	超过鼻前孔	流涕至面部

1.5 实验动物分组

将 50 只造模成功的豚鼠随机分为 5 组,即模型组、阳性对照组、实验组(高、中、低浓度)3 组;10 只未造模豚鼠为空白对照组。

1.6 给药

于造模第 22 天起,分别用 1% 卵白蛋白(鸡蛋)和生理盐水分别滴入变应性鼻炎豚鼠和空白对照组豚鼠双侧鼻腔,每侧 0.05mL,30min 后再灌胃给药,连续给药 15d。每天鼻腔滴药后,模型组

和空白组给予生理盐水 2mL 灌胃,阳性对照组给予等效的醋酸泼尼松片(3.7mg/kg·d⁻¹)灌胃,鼻敏爽高、中、低剂量组分别给予鼻敏爽胶囊溶液 3.996,1.998,0.999g/kg·d⁻¹(为临床用药量的 12、6、3 倍)。

1.7 标本采集

末次 OVA 激发 24h 后将豚鼠仰卧位固定,于胸前心尖搏动处,用一次性注射器经心脏穿刺取血约 5mL,迅速注入抗凝管中,立即 3 000r/min 离心 10min,分取上层血清,血清标本置于-20℃保存并立即送检。

1.8 分子生物学实验

酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测豚鼠血清中 IL-2、IFN-γ、IL-4、IL-5 含量。

1.9 统计学处理

实验数据经 SPSS17.0 统计软件处理,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;组间比较独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 豚鼠血清中 IFN-γ 含量测定

从表 1 看出,与正常对照组比较,模型组豚鼠血清中 IFN-γ 水平明显低于正常对照组($P < 0.01$);醋酸泼尼松片对照组、“鼻敏爽”高及中剂量组与模型组比较,显著升高($P < 0.01$);“鼻敏爽”低剂量组与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。“鼻敏爽”高、中、低剂量与西药组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),说明变应性鼻炎豚鼠血清中 IFN-γ 的水平较正常豚鼠有所下降,醋酸泼尼松治疗时可使变应性鼻炎豚鼠的 IFN-γ 水平提升,不同剂量的“鼻敏爽”也具有一定提高 IFN-γ 水平。

2.2 豚鼠血清中 IL-2 含量测定

从表 1 看出,模型组豚鼠与正常对照组比较,血清中 IL-2 值极显著下降($P < 0.01$);“鼻敏爽”高中

表 1 “鼻敏爽胶囊”对变应性鼻炎豚鼠血清中各指标水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	血清 IFN-γ/(pg/mL)	血清 IL-2/(pg/mL)	血清 IL-4/(pg/mL)	血清 IL-5/(pg/mL)
正常对照组	10	43.78±3.96	192.08±16.47	16.08±2.46	37.24±5.79
模型组	10	29.90±4.28 [△]	170.14±8.71 [△]	26.86±7.53 [△]	45.46±6.77 [△]
阳性对照组	10	41.22±4.69 ^{△△}	178.59±8.47 [*]	16.98±1.68 ^{△△}	38.50±5.59 [*]
高剂量组	10	38.21±6.39 ^{△△▲}	186.23±18.62 ^{*▲}	19.44±3.40 ^{*▲}	38.82±7.00 ^{*▲}
中剂量组	10	37.92±3.79 ^{△△▲}	181.79±12.12 ^{*▲}	17.84±3.94 ^{△△▲}	39.83±4.15 ^{*▲}
低剂量组	10	36.54±6.78 ^{*▲}	182.93±16.53 ^{*▲}	17.59±4.36 ^{△△●}	39.64±6.77 [▲]

注:与正常对照组比较,[△] $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与阳性对照组比较,[▲] $P > 0.05$,[●] $P < 0.05$ 。

低剂量组、醋酸泼尼松片对照组剂量组与模型组比较,显著升高($P<0.05$);各剂量的“鼻敏爽”与阳性药物对照差异无显著意义($P>0.05$)。说明经药物治疗,变应性鼻炎豚鼠血清中 IL-2 含量可维持在一个较低的表达水平;“鼻敏爽”可有效提高 AR 血清中 IL-2 含量,且其提高 IL-2 水平的表现与醋酸泼尼松片无明显差异。

2.3 豚鼠血清中 IL-4 含量测定

从表 1 可看出,变应性鼻炎豚鼠模型血清中 IL-4 含量与空白对照组豚鼠相比,极明显升高($P<0.01$);与 AR 模型组比较,醋酸泼尼松片、“鼻敏爽”中和低剂量组比较差异有统计学意义($P<0.01$),而“鼻敏爽”高剂量组与其相比具有差异性($P<0.05$)也可使变应性鼻炎血清中 IL-4 含量降低;“鼻敏爽”高、中剂量组与阳性对照药相比差异无统计学意义($P>0.05$),而“鼻敏爽”低剂量组与阳性对照药相比差异有统计学意义($P<0.05$)。试验表明变应性鼻炎豚鼠血清中 IL-4 含量较正常豚鼠含量增加,而不同剂量“鼻敏爽”可以不同程度的减少变应性鼻炎血清中 IL-4 含量。

2.4 豚鼠血清中 IL-5 含量测定

从表 1 看出,变应性鼻炎豚鼠模型血清中 IL-5 含量明显高于空白对照组血清中此值的含量($P<0.01$);醋酸泼尼松片组、“鼻敏爽”高及中剂量组与 AR 豚鼠模型比较有所下降($P<0.05$);“鼻敏爽”低剂量组与模型组相比较,显示为不同程度有所下降,差异无统计学意义($P>0.05$);不同剂量的“鼻敏爽”与醋酸泼尼松片进行比较,组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。说明变应性鼻炎会使豚鼠血清中 IL-5 含量增加,而“鼻敏爽”及醋酸泼尼松片可以不同程度上减低 IL-5 的含量。

表 2 “鼻敏爽胶囊”对变应性鼻炎豚鼠血清中 Th1/Th2 比值的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	(IFN- γ /IL-4)/%	比较	T 值
正常对照组	2.77 \pm 0.47		
模型组	1.21 \pm 0.46 Δ	与正常对照组	7.481
醋酸泼尼松组	2.45 \pm 0.35 $\Delta\Delta$	与模型组	6.704
高剂量组	2.01 \pm 0.44 $\ast\blacktriangle$	与模型组	3.972
中剂量组	2.23 \pm 0.55 $\Delta\Delta$	与模型组	4.476
低剂量组	1.92 \pm 0.77 $\ast\blacktriangle$	与模型组	2.511

注:与正常对照组比较, $\Delta P<0.01$;与模型组比较, $\ast P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与西药对照组比较, $\blacktriangle P>0.05$ 。

2.5 豚鼠血清中 Th1/Th2 比例测定

从表 2 看出,变应性鼻炎豚鼠模型血清中 Th1/Th2 比例明显低于空白对照组血清中此值的百分比($P<0.01$);与 AR 豚鼠模型比较,醋酸泼尼松片组和“鼻敏爽”中剂量组有所上升($P<0.01$);“鼻敏爽胶囊”高、低剂量组比 AR 豚鼠有所降低($P<0.05$);不同剂量的“鼻敏爽胶囊”与阳性对照药相比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。说明变应性鼻炎豚鼠血清中 Th1/Th2 比例与正常豚鼠明显降低,且不同剂量的“鼻敏爽胶囊”与醋酸泼尼松都可使 Th1/Th2 比例升高。

3 讨论

近年来,T 细胞因子在免疫系统和炎症反应过程中的多种调节作用被逐步阐明。Th1 与 Th2 是辅助性 T 淋巴细胞在变应性炎症反应中释放的细胞因子,因功能不同而分出的两种亚型^[5]。本实验结果显示:模型组血清 IL-2、IFN- γ 表达低于正常对照组,而 IL-4、IL-5 却高于正常对照组;不同浓度的鼻敏爽实验组和阳性对照组 AR 豚鼠可降低 IL-4、IL-5 的高表达;IL-2、IFN- γ 的表达等得到提高。变应性鼻炎患者体内激活的 T 淋巴细胞是 Th2 细胞,并释放 Th2 细胞因子,Th1 细胞和 Th1 细胞因子的分泌则受抑制,Th2 细胞因子在调节变应性鼻炎 IgE 合成及嗜酸性细胞浸润等病理生理机制上起重要作用^[6-8]。IL-2、IFN- γ 可反映 Th1 细胞的表达水平、IL-4、IL-5 可反映 Th2 细胞的表达水平。其中 Th1 以 IFN- γ 为代表性细胞因子,IL-4 是 Th2 的自分泌细胞因子,能促进 Th2 细胞分化并抑制 Th1 细胞的生长与分泌。可由 IFN- γ /IL-4 来表现 Th1/Th2 之间的平衡走向。本实验结果表明,鼻敏爽胶囊通过影响 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5 的表达水平,来纠正 Th1/Th2 细胞因子的失衡,逆转 Th2 细胞的分化偏移,从而达到治疗 AR 的作用。变应性鼻炎为耳鼻喉科的常见病、多发病,目前尚无根治方法。鼻敏爽胶囊为纯中药制剂,通科学方法观测对变应性鼻炎细胞因子方面的影响,来进一步确认中药制剂在治疗变应性鼻炎过程中的作用机理之一。进而说明中医药为人类对抗变应性鼻炎中的一大瑰宝,更有待中西医药、生物药剂等各界人士的挖掘与探索。

参考文献:

[1] 孔维佳.耳鼻咽喉头颈外科学[M].北京:人民卫生出版社,2010:8,288-289.

(下转第 35 页)

- [J]. 天然产物研究与开发, 2006(18):549-554.
- [9] 姜彬慧, 王承志, 韩颖, 等. 三七叶中微量活性皂苷的分离与鉴定[J]. 中药材, 2004, 27(7):489-491.
- [10] 魏均娴, 唐宝书, 王菊芳, 等. 三七叶皂苷成分研究[J]. 华西药学杂志, 1986, 1(1):7-10.
- [11] 王军. 三七茎叶资源综合利用的化学基础研究 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2009.
- [12] Mao Q, Yang J, Cui X M, et al. Target separation of a new anti-tumor saponin and metabolic profiling of leaves of *Panax notoginseng* by liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2012, 59:67-77.
- [13] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.

(编辑: 杨阳)

Comparative Analysis and Quantitative of Rb₃ Leaves and Stems of *Panax notoginseng* by HPLC

ZHENG Li-xiong^{1,2}, CHEN Jin-dong^{1,2}, REN Yang-fan^{1,2}, YANG Chong-ren^{1,2,3}

(1. Yunnan Weihe Pharmaceuticals Co., Ltd, Yuxi 653100, China;

2. Yunnan Engineering Research Center of Plant Extracts, Yuxi 653100, China;

3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

ABSTRACT: **Objective** Comparison of the Saponins content of *Panax notoginseng* stems and leaves, and to provide technical support for the quality of related products. **Methods** Rb₃ content was used as indicator to compare the difference between the leaves and stems of *Panax notoginseng* by HPLC. **Results** The leaves' main components are Ginsenoside Rb₃, Rc, Fc, et al. and the stems' main component is Ginsenoside Rb₁. **Conclusion** The main saponin components in leaves and stems have significant difference, in order to ensure the stable quality of product we should pay attention to the selection of raw material, control the proportion of leaf and stem of *Panax notoginseng*.

KEY WORDS: leaves and stems of *Panax notoginseng*; HPLC; quantitative of Ginsenoside Rb₃

(上接第 26 页)

- [2] 王浩. “鼻敏爽胶囊”治疗鼻鼈肺脾气虚证临床疗效[J]. 云南中医学院学报, 2010, 33(4):29-32.
- [3] Bjermer L, Diamant Z. Current and emerging nonsteroidal anti-inflammatory therapies targeting specific mechanisms in asthma and allergy [J]. Treat Respir Med, 2004, 3(4):235-246.
- [4] Hansen I, Klimek L, Mosges R, et al. Mediators of inflammation in the early and the late phase of allergic rhinitis [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004, 4(3):159-163.
- [5] Brown V, Warke TJ, Shields MD, et al. T cell cytokine profiles in childhood asthma. Thorax [J]. 2003, 58:311-316.
- [6] 黄少鹏, 张锐生. 变应性鼻炎患者白细胞介素 4、 γ 干扰素水平与 IgE 的相关性研究[J]. 福建医药杂志, 2004, 26:14.
- [7] 黄少鹏, 张锐生, 陈明, 等. 变应性鼻炎患者外周血单个核细胞 Th1/Th2 细胞因子的检测及其意义 [J]. 山东医大基础医学院学报, 2002, 16:144.
- [8] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor. T β , directs Th1 lineage commitment. Cell [J]. 2000, 100:655-669.

(编辑: 徐建平)