

# 祛风胜湿方对变应性鼻炎小鼠免疫球蛋白 E 及水通道蛋白 5 的影响

彭 瑶 连增林 张晓阳 李晋生 张文谨 张孟仁 陈 霞 崔雅忠

**摘 要** **目的** 观察祛风胜湿方对变应性鼻炎小鼠血清免疫球蛋白 E(IgE)及水通道蛋白 5(AQP5)的影响。**方法** 以卵清蛋白(OVA)+氢氧化铝基础致敏、局部以 OVA 激发复制变应性鼻炎小鼠模型,将其分为正常对照组、模型组、祛风胜湿方组、氯雷他定组。灌胃给药 14 天,观察各组对变应性鼻炎小鼠血清 IgE、AQP5 及鼻黏膜组织病理形态学的影响。**结果** 与正常对照组比较,模型组小鼠血清 IgE 及 AQP5 均显著增高( $P < 0.05$ );与模型组比较,各药物干预组的上述指标均显著降低( $P < 0.05$ )。**结论** 祛风胜湿方作用机制可能与其抑制 IgE 及 AQP5 表达有关。本实验为揭示中医“风能胜湿”与“祛风止痒”理论提供了实验数据支持。

**关键词** 变应性鼻炎 祛风胜湿方 免疫球蛋白 E 水通道蛋白 5

**中图分类号** R2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.06.012

**Effects of Qufeng Shengshi Fang on the Behavior Index and AQP5 Expression in Allergic Rhinitis Mouse Model.** Peng Yao, Lian Zenglin, Zhang Xiaoyang, et al. Peking Union Medical College, Peking Union Hospital, Beijing 100730, China

**Abstract** **Objective** To observe the effects of Chinese medicine Qufeng Shengshi Fang (QSF) on serum immunoglobulin E (IgE) and aquaporin 5 (AQP5) in allergic rhinitis mouse model. **Methods** Allergic rhinitis (AR) mouse model was built by the basic stimulation of ovalbumin (OVA) and aluminum hydroxide with local excitation of OVA in mice. Animals were divided into four groups: normal control group, model group, QSF group and loratadine group. The effects of drugs on IgE, AQP5 and nasal mucosa pathological morphology was observed in different group after 14 days oral administration. **Results** Compared with the normal control group, levels of IgE and AQP5 were significantly increased in the model group ( $P < 0.05$ ), and they were significantly decreased in QSF and loratadine group than those in the model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The effects of QSF on AR mouse model might be related to the inhibition of IgE level and AQP5 expression. Also, the results may provide experimental data support for the theory of “Wind wins wet” and “Qufeng Zhiyang” in Chinese medicine.

**Key words** Allergic rhinitis; Qufeng Shengshi Fang; Immunoglobulin E (IgE); Aquaporin 5 (AQP5)

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是一种由免疫球蛋白 E 介导的通过释放组胺、激肽类和白三烯诱发的鼻黏膜 I 型变态反应,针对环境过敏原的鼻黏膜炎性反应<sup>[1]</sup>。临床上主要表现为流涕、鼻塞、鼻痒、喷嚏等。其全球发生率达 10%~25%,并且患病人数仍在逐渐增加<sup>[2]</sup>。特别是近年来环境急剧恶化,雾霾天气频发,导致其发生率逐年增高,成为普遍性健康问题。西医目前采用抗过敏及激素类药物治疗虽可暂时缓解症状,但远期疗效不佳,易反复发作或

出现不良反应。

现代研究显示 AR 属中医风病范畴,与风邪密切相关,大量临床研究提示,风药是治疗 AR 的核心药物<sup>[3]</sup>。临床应用经验处方“祛风胜湿方”(由辛夷花、防风、白芷等共 8 味中药组成)治疗该病取得较好的疗效。本研究选用祛风胜湿方干预变应性鼻炎小鼠模型,旨在研究其作用机制,藉以揭示中医“风能胜湿”与“祛风止痒”的科学内涵。

## 材料与方法

1. 实验材料:(1)实验动物:SPF 级 6 周龄雄性 BALB/c 小鼠 44 只,体重 18~20g,在空调恒温恒湿的环境下,适应性饲养 3 天后开始正式实验。小鼠随机分为 4 组:正常对照组、模型组、祛风胜湿方组、氯雷他定组,每组 11 只。饲养时注意避免接触过敏原。(2)主要试剂:致敏原为卵清蛋白(OVA)购自美国 Sigma 公司,佐剂为氢氧化铝(美国 Pierce Chemical 公

基金项目:首都医学发展科研基金资助项目(SF-2009-Ⅲ-28)

作者单位:100730 中国医学科学院北京协和医院(彭瑶、张晓阳、张孟仁、崔雅忠);100075 北京,中药复方新药开发国家工程研究中心(连增林、李晋生、张文谨、陈霞);650500 昆明医科大学分子临床医学研究院(彭瑶)

通讯作者:张晓阳,电子信箱:zhangxymz@163.com

司)。小鼠免疫球蛋白 IgE 试剂盒 (ELISA, 96T 购自北京方源生物科技有限公司)。水通道蛋白 5 抗体 (羊抗小鼠 AQP5 多克隆抗体, 美国 Santa cruz 公司) 1:150。

2. 实验方法: (1) 复制模型: 参照文献方法建立变应性鼻炎小鼠模型<sup>[4]</sup>。具体方法如下: ①致敏: 除正常对照组外, 其他各实验组小鼠采用卵清蛋白 10 $\mu$ g、氢氧化铝 2mg 加入生理盐水 0.1ml 比例制成混悬液, 自第 1 天开始腹腔注射, 每天 1 次, 共 7 天, 正常对照组用生理盐水代替致敏剂同法注射; ②激发: 致敏模型的建立成功后, 以卵清蛋白 1g 加生理盐水 10ml 溶解, 用微量加样器, 每侧鼻腔 5 $\mu$ l 激发, 每 1 天激发 1 次, 连续激发 7 天。对照组以生理盐水代替卵清蛋白滴鼻; ③造模成功后, 第 1 天开始按组分别灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 14 天, 第 7~14 天给药后进行卵清蛋白 1g 加生理盐水 10ml 溶液, 用微量加样器, 每侧鼻腔 5 $\mu$ l 再次激发。 (2) 药物配制: ①祛风胜湿方的制备与给药剂量: 在祛风胜湿方药材中加入处方药物重量的 8 倍水量, 浸泡 30min, 水煎 2 次, 合并两次滤液减压浓缩至 1g/ml 浓度的储备液, 冷藏备用, 给药剂量按照人与小鼠的等效用药剂量进行换算, 每只灌胃 0.3ml; ②氯雷他定配制与给药剂量: 氯雷他定按成人用量换算, 将氯雷他定研成细粉末后, 用生理盐水溶解, 灌胃 0.3ml。正常对照组灌胃生理盐水 0.3ml。

3. 观察项目: 从造模第 1 天开始观察小鼠行为、状态、体征、摄食、饮水、大小便性状、体温、体质量等, 并在每次鼻腔激发后, 观察记录 5min 内小鼠喷嚏及抓鼻次数, 采用叠加法计算总分, 总分 > 5 分为模型成功<sup>[5]</sup>。

4. 指标检测: (1) 检测样品制备: 给药 14 天末次激发, 记录行为学变化。禁食过夜, 各组小鼠测量体重后, 进行眼眶取血, 加抗凝剂制备血清用于检测相关指标。取血后解剖小鼠, 取其鼻甲和中隔黏膜于 10% 甲醛中固定, 石蜡包埋, 每标本切两片, 采用 HE 染色及免疫组化染色, 检测鼻黏膜形态学及病理学指标。将上述步骤制备的鼻黏膜进行 HE 染色, 观察鼻黏膜的结构及病理变化。采用 SABC 法, 组织标本经 4% 多聚甲醛固定, 乙醇系列脱水, 石蜡包埋, 组织切片为 5 $\mu$ m。切片滴加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 室温 10min 阻断内源性过氧化物酶。3% 牛血清白蛋白和 5% 正常羊血清封闭 60min, 磷酸盐缓冲液冲洗。加入 1:150 羊抗鼠 AQP5 多克隆抗体, 室温静置 1.5h, PBS 洗涤 3 次, 每次 5min。加二抗室温下孵育 30min, PBS 洗涤 2 次后缓冲甘油封片。在显微镜下选背景清晰、阳性表达好的切

片进行图像分析及做统计学处理。每只动物选择 3 张切片, 每张切片取 3 个高倍视野, 测量视野中所有阳性细胞的灰度值。 (2) 检测小鼠血清 IgE 的水平: 采用 ELISA 试剂盒检测各组小鼠血清 IgE 的水平。按照试剂盒使用说明书操作。

5. 统计学方法: 采用 SPSS 11.5 统计软件 (One - Way ANOVA) 进行数据处理, 各组实验数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 行 *t* 检验进行统计学分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同给药组对变应性鼻炎小鼠血清 IgE 的影响: 模型组小鼠血清 IgE 水平明显高于正常对照组 (*P* < 0.05); 与模型组相比, 祛风胜湿方组及氯雷他定组小鼠血清 IgE 含量明显降低 (*P* < 0.05), 祛风胜湿方组与氯雷他定组比较, 其相应 IgE 含量未见明显区别 (*P* > 0.05), 详见表 1。

表 1 祛风胜湿方对变应性小鼠血清免疫球蛋白 IgE 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | <i>n</i> | IgE                         |
|--------|----------|-----------------------------|
| 正常对照组  | 11       | 260.35 $\pm$ 5.32           |
| 模型组    | 11       | 342.50 $\pm$ 9.61 *         |
| 祛风胜湿方组 | 11       | 287.05 $\pm$ 12.35 $\Delta$ |
| 氯雷他定组  | 11       | 303.24 $\pm$ 8.26 $\Delta$  |

与正常对照组比较, \* *P* < 0.05; 与模型组比较,  $\Delta$  *P* < 0.05

2. 不同给药组对变应性鼻炎小鼠鼻黏膜的影响: 变应性鼻炎小鼠鼻黏膜 HE 染色结果显示, 正常对照组小鼠鼻黏膜假复层柱状上皮完整、无损伤, 未见炎性细胞浸润, 未见腺体增生, 未见血管扩张充血 (图 1A); 与正常对照组比较, 模型组小鼠鼻黏膜上皮损伤、破坏, 黏膜层可见嗜酸性粒细胞浸润, 腺体水肿, 血管扩张充血 (图 1B); 与模型组比较, 祛风胜湿方组小鼠鼻黏膜柱状上皮完整、无损伤, 未见血管扩张充血, 可见慢性炎性细胞浸润 (图 1C); 与模型组比较, 氯雷他定组小鼠鼻黏膜柱状上皮较完整, 软骨、腺体、血管扩张充血不明显 (图 1D)。

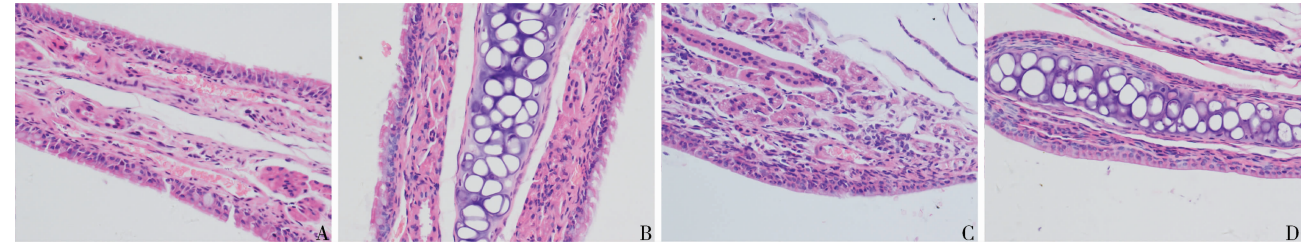


图 1 不同组别变应性鼻炎小鼠鼻黏膜组织染色图 (HE 染色,  $\times 200$ )

A. 正常对照组; B. 模型组; C. 祛风胜湿方组; D. 氯雷他定组

3. 不同给药组对变应性鼻炎小鼠鼻黏膜水通道蛋白(AQP5)表达的影响:免疫组化染色结果显示,正常对照组黏膜上皮细胞中水通道蛋白(AQP5)有一定程度的表达(图 2A);与正常对照组比较,模型组小鼠鼻黏膜上皮细胞中水通道蛋白表达明显增高,炎性细胞中未见表达(图 2B);与模型组比较,祛风胜湿方组小鼠鼻黏膜上皮细胞中水通道蛋白表达明显降低,

炎性细胞中未见该蛋白表达(图 2C)。与模型组比较,氯雷他定组小鼠鼻黏膜上皮细胞中水通道蛋白表达明显下降(图 2D)。各组 AQP5 的平均灰度值,与正常组比较,模型组小鼠 AQP5 灰度值明显升高( $P < 0.05$ );与模型组相比,祛风胜湿方组及氯雷他定组小鼠 AQP5 灰度值明显降低( $P < 0.05$ ),祛风胜湿方组与氯雷他定组比较未见明显区别( $P > 0.05$ ),详见表 2。

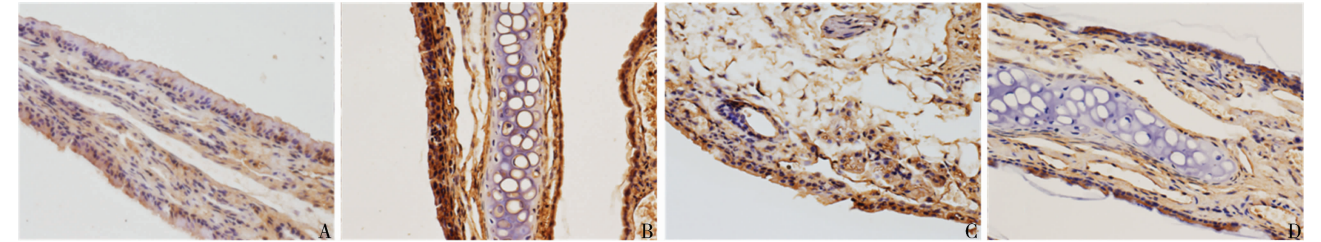


图 2 不同组别变应性鼻炎小鼠鼻黏膜水通道蛋白(AQP5)的表达(免疫组化染色,×200)

A. 正常对照组;B. 模型组;C. 祛风胜湿方组;D. 氯雷他定组

| 表 2 祛风胜湿方对变应性鼻炎小鼠 AQP5 的影响( $\bar{x} \pm s$ ) |    |                  |
|-----------------------------------------------|----|------------------|
| 组别                                            | n  | 平均灰度(A)          |
| 正常对照组                                         | 11 | 225.24 ± 13.61   |
| 模型组                                           | 11 | 376.16 ± 17.39 * |
| 祛风胜湿方组                                        | 11 | 263.18 ± 18.72 △ |
| 氯雷他定组                                         | 11 | 282.21 ± 15.16 △ |

与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,△ $P < 0.05$

讨 论

变应性鼻炎是典型的 IgE 介导的 I 型变态反应,致敏的鼻黏膜细胞再次与致敏原接触后,发生抗原抗体反应,导致肥大细胞、嗜碱和嗜酸性粒细胞脱颗粒,炎性介质释放,引起毛细血管通透性增加,腺体分泌增多等病理变化<sup>[6]</sup>。现代研究证实,AR 患者或动物模型的血清 IgE 值显著升高,是诊断 AR 的试验依据之一<sup>[7]</sup>。Casale 等<sup>[8]</sup>临床研究显示,应用重组抗 IgE 单克隆抗体可降低 AR 患者血清中 IgE 值,改善临床症状评分及所需抗组胺药物用量。

水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是一组与水转运有关的细胞膜转运蛋白,它在体内液体转运和某些腺体分泌方面具有重要作用。在 AR 的实验动物鼻黏膜存在 AQP5 的过度表达,AQPs 参与了变应性鼻炎时腺体过度分泌的病理过程。临床研究发现变应性鼻炎组患者鼻黏膜有腺体增生、炎性反应和嗜酸粒细胞浸润的同时,还有大量 AQP5 阳性细胞,AQP5 的表达与变应性鼻炎严重程度密切相关。目前尚未见到中药治疗对 AQP5 表达产生影响的研究文献。

本实验采用国内外公认的造模方法复制成 AR 小鼠模型,观察中药祛风胜湿方对 AR 病变的影响及其可能的作用机制。研究结果表明,祛风胜湿方能够显著降低 AR 小鼠血清 IgE 的含量及鼻黏膜中 AQP5 的表达,提示祛风胜湿方减轻鼻道的变态反应可能与其抑制 IgE 分泌及水通道蛋白的表达相关。该结果证明祛风湿胜方具有的祛风胜湿、止痒止嚏、通窍止涕功效,有一定实验依据,并为揭示中医“风能胜湿”与“祛风止痒”的理论提供了佐证。

参考文献

1 刘雪梅,李浩. 变应性鼻炎的中西医结合诊治进展[J]. 四川中医, 2009,27(1):50-53

2 陈灏珠. 实用内科学[M]. 12 版. 北京:人民卫生出版社,2007: 2496

3 张晓阳,李颖,连增林. 中医药治疗变应性鼻炎临床研究的思考与展望[J]. 中国中药杂志,2009,34(18):2419-2422

4 李许娜,李浩. 固本祛风汤对变应性鼻炎豚鼠模型免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2008, 16(5): 331-334

5 徐轩,蒋中秋,严道南. 鼻敏合剂治疗常年性变应性鼻炎的疗效观察[J]. 南京中医药大学学报,1997, 13: 340-341

6 师小径,马艳红,李亮明,等. 变应性鼻炎血清特异性 IgE 及皮肤点刺实验与症状的相关性[J]. 实用预防医学,2008, 15(4): 1063-1064

7 刘闰红,张新民,张素琴,等. 中药复方别敏治疗变应性鼻炎的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2007, 27(7): 623

8 Casale TB, Condemi J, Laforce C, et al. Effect of omalizumab on symptoms of seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled trial [J]. JAMA,2001,286(23): 2956-2967

(收稿日期:2014-10-29)

(修回日期:2014-12-16)