

· 实验研究 ·

消风宣窍汤对变应性鼻炎豚鼠免疫调节作用研究

夏 晨¹ 汪受传^{2▲} 李 萌³ 魏肖云⁴

摘要 目的:探究消风宣窍汤对变应性鼻炎豚鼠的免疫调节作用。方法:40只 Hartley 豚鼠被随机分成正常组、模型组、消风宣窍汤组及氯雷他定组,每组各10只。建立变应性鼻炎豚鼠模型,药物干预7 d后,比较各组豚鼠鼻部症状行为学评分、鼻黏膜分泌物阳性细胞计数、血清 IgE、组胺及 Th1、Th2、Th17 相关细胞因子水平。结果:与模型组相比,消风宣窍汤组及氯雷他定组的鼻部症状行为学评分、两种阳性细胞计数、血清 IgE、组胺、NF-κB、IL-4、IL-6、IL-17 水平、病理组织评分均明显降低($P<0.05$), IFN-γ、IL-12 水平均明显升高($P<0.05$);消风宣窍汤组的血清 IgE、组胺水平较氯雷他定组下降更明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:消风宣窍汤可有效改善鼻部症状行为学评分,减少鼻黏膜分泌物阳性细胞计数,降低 Th2 相关细胞因子 IL-4、IL-6 水平,并增高 Th1 相关细胞因子 IFN-γ、IL-12 水平,同时还抑制了血清 NF-κB、IL-17 的表达,减少 IgE 的合成及组胺的释放,达到免疫调节的作用。

关键词 消风宣窍汤;变应性鼻炎;细胞因子

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是由于变应原刺激特异性个体,导致鼻黏膜产生 IgE,进而使得各种免疫细胞共同作用的I型变态反应,属于祖国医学中“鼻鼽”范畴。近年来,AR患病率逐渐增加。目前西医多使用鼻用糖皮质激素、第二代抗组胺药等来控制AR症状,但停药后症状容易复发;而中药治疗既可减轻AR症状,还能改善机体免疫功能,受到越来越多学者的关注。汪受传教授从“伏风”论治,自拟消风宣窍汤治疗小儿鼻鼽,临床效果好,不良反应少,有独特的优势^[1]。前期研究已经证实,消风宣窍汤治疗儿童AR的作用机制与免疫调节相关^[2]。本实验以AR模型豚鼠为实验对象,进一步探究其免疫调节的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 40只 Hartley 豚鼠,体重(300±35)g,清洁级,4~5 w龄,雄性,来源于南京中医药大学实验动物中心,动物许可证号为SCXK(苏)(2012-0008)。

1.2 药品与试剂 (1)消风宣窍汤(由炙麻黄3 g、桂枝3 g、辛夷3 g、苍耳子6 g、五味子6 g、乌梅6 g、胆南星6 g、广地龙6 g组成),来源于南京中医药大学附

属医院中药房制成浓缩滤液,生药含量为1.05 g/mL;(2)氯雷他定来源于上海先灵葆雅制药有限公司(批号为10KRXF1047),规格为10 mg/片,用蒸馏水稀释为0.1 g/mL;(3)卵白蛋白(OVA)来源于美国Sigma公司(批号为326A05);(4)氢氧化铝凝胶来源于上海美兴化工有限公司(批号为2008050);(5)酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒来源于美国R&D公司(批号为201304)。

1.3 仪器与设备 DMIL型倒置显微镜来源于德国Leica公司;EXL 800型酶标仪来源于美国BioTek公司。

1.4 分组、建模及给药 40只 Hartley 豚鼠被随机分成正常组、模型组、消风宣窍汤组、氯雷他定组,每组10只。在正式试验之前,将每只豚鼠鼻腔分泌物行Wright染色,观察嗜酸性粒细胞(EOS)的分布情况,发现染色结果均为阴性。除正常组外,其余3组采用OVA模型的建立方法^[3]制备豚鼠变应性鼻炎模型,并用鼻部分泌物EOS分布情况、鼻部症状行为学评分评估造模成功与否(局部致敏30 min,若鼻腔分泌物涂片EOS阳性且鼻部症状行为学评分总分>5分,表示AR豚鼠模型构建成功)。待造模成功,按照1岁儿童临床等效剂量并根据《药理试验方法学》公式进行人和动物给药剂量的换算,消风宣窍汤组等效剂量为14 g/(kg·d),氯雷他定组等效剂量为1.88 mg/(kg·d)。给药方式为消风宣窍汤组、氯雷他定组每只豚鼠

▲通讯作者 汪受传,男,主任医师,教授,博士研究生导师。研究方向:小儿肺脾系疾病研究、中医药标准化研究。E-mail:wscnj@126.com
·作者单位 1.南京医科大学附属儿童医院(江苏南京210017);2.南京中医药大学(江苏南京210029);3.首都儿科研究所附属儿童医院(北京100020);4.扬州市广陵区中医院(江苏扬州225001)

每8 h灌胃1次,每日2次;AR模型组、正常组则按照相同次数、方法给予相等量的生理盐水。共灌胃7 d。

1.5 观察指标

1.5.1 鼻部行为学观察 给药7 d后,对豚鼠给予致敏物,给致敏物即开始计时,共计时30 min,观察各组豚鼠鼻部症状、行为,根据过敏反应行为的评分标准评分^[3]:喷嚏次数1~3次为1分,4~10次为2分,≥11次为3分;擦鼻次数1~4次为1分,4次以上为4分;清涕流至前鼻孔为1分,超出前鼻孔为2分,涕流满面为3分。

1.5.2 鼻黏膜分泌物阳性细胞计数 鼻部行为学观察后,将每只豚鼠鼻腔分泌物涂片滴加Wright染色液,油镜下每张涂片观察10个视野(视野倍数:10×40),分别计算嗜酸性粒细胞(EOS)和肥大细胞(MC)的比率。

1.5.3 免疫指标 鼻黏膜分泌物涂片后,麻醉豚鼠,采颈动脉血5 mL,以3000 r/min离心10 min,分离出血清,并于-70 ℃冰箱保存。用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)分别检测四组豚鼠的血清IgE、组胺及Th1、Th2、Th17细胞相关细胞因子水平。

1.5.4 病理指标 豚鼠取血后处死,取出其鼻腔黏膜组织,在4%多聚甲醛溶液中固定72 h,依次经过75%~85%~95%~100%梯度酒精脱水、二甲苯透明、常规石蜡包埋。以4~5 μm切片,最后行HE染色,观察高倍镜下各组豚鼠的鼻黏膜组织学改变情况,并进行病理变化分级评分^[3]。

1.6 统计学方法 采用SPSS 16.0统计软件进行处理。数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析进行组间比较,采用Bonferroni法进行两两比较。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 豚鼠死亡情况 实验过程中,共死亡10只豚鼠。正常组不明原因死亡1只;模型组因鼻塞严重死亡2只;消风宣窍汤组因鼻塞死亡1只;氯雷他定组因鼻塞死亡1只、不明原因死亡1只。治疗结束后各组豚鼠数量如下:正常组9只,模型组8只,消风宣窍汤组9只,氯雷他定组8只。经比较,各组豚鼠死亡数量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组豚鼠鼻部症状行为学评分比较 模型组的各项症状及症状积分明显高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比,消风宣窍汤组与氯雷他定组的各项症状及症状积分均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);而消风宣窍汤组与氯雷他定组相

比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 各组豚鼠鼻部症状行为学评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	流涕	擦鼻	喷嚏	症状积分
正常组	9	0.00±0.00	0.12±0.35	0.25±0.46	0.37±0.13
模型组	8	2.14±0.69 ^a	2.47±0.53 ^a	2.71±0.48 ^a	8.75±1.67 ^a
消风宣窍汤组	9	1.00±0.00 ^{ab}	1.33±0.57 ^{ab}	1.00±0.81 ^{ab}	6.00±0.53 ^{ab}
氯雷他定组	8	1.20±0.83 ^{ab}	1.71±0.75 ^{ab}	1.51±0.53 ^{ab}	6.25±0.71 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

2.3 各组豚鼠鼻黏膜分泌物阳性细胞计数比较 和正常组比较,模型组豚鼠鼻腔分泌物中EOS、MC计数均有明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。和模型组比较,消风宣窍汤组和氯雷他定组两种阳性细胞计数值均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);而消风宣窍汤组与氯雷他定组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 各组豚鼠鼻黏膜分泌物EOS、MC计数比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	EOS(%)	MC(%)
正常组	9	0.33±0.50	0.55±0.52
模型组	8	13.12±1.88 ^a	10.50±1.41 ^a
消风宣窍汤组	9	7.75±1.28 ^{ab}	5.87±1.12 ^{ab}
氯雷他定组	8	7.70±1.05 ^{ab}	6.50±0.85 ^{ab}

注:和正常组相比,^a $P < 0.05$;和模型组比较,^b $P < 0.05$

2.4 各组豚鼠血清IgE、组胺水平比较 模型组豚鼠血清IgE、组胺水平较正常组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。和模型组相比,消风宣窍汤组与氯雷他定组豚鼠血清IgE、组胺水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);消风宣窍汤组较氯雷他定组下降更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 各组豚鼠血清IgE、组胺水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	IgE(μg/mL)	组胺(ng/mL)
正常组	9	117.57±5.00	12.58±0.92
模型组	8	224.00±9.09 ^a	16.31±0.10 ^a
消风宣窍汤组	9	139.50±1.80 ^{abc}	28.14±0.05 ^{abc}
氯雷他定组	8	191.03±7.31 ^{ab}	34.46±2.01 ^{ab}

注:和正常组相比,^a $P < 0.05$;和模型组比较,^b $P < 0.05$;和氯雷他定组比较,^c $P < 0.05$

2.5 各组豚鼠Th1、Th2、Th17细胞相关细胞因子水平比较 与正常组相比,模型组豚鼠血清中的NF-κB、IL-4、IL-6、IL-17水平均明显升高,IFN-γ、IL-12水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比,消风宣窍汤组及氯雷他定组豚鼠血清中NF-κB、IL-4、IL-6、IL-17水平均显著降低,IFN-γ、IL-12水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。消风宣

窍汤组与氯雷他定组各细胞因子水平相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 4 各组豚鼠血清中 Th17、Th1、Th2 细胞相关细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	NF-κB(pg/mL)	IL-4(pg/mL)	IL-6(ng/L)	IFN-γ(pg/mL)	IL-12(μg/L)	IL-17(ng/L)
正常组	9	329.58±38.11	36.46±1.16	99.05±1.25	43.69±1.23	17.37±1.25	180.21±7.69
模型组	8	480.22±24.55 ^a	45.30±2.62 ^a	133.84±2.51 ^a	32.14±1.13 ^a	10.58±0.66 ^a	230.35±11.90 ^a
消风宣窍汤组	9	398.54±41.23 ^{ab}	28.14±0.05 ^{ab}	110.29±5.13 ^{ab}	36.70±2.00 ^{ab}	15.18±1.31 ^{ab}	203.93±16.30 ^{ab}
氯雷他定组	8	348.80±20.36 ^{ab}	34.46±2.01 ^{ab}	111.01±4.52 ^{ab}	36.18±0.45 ^{ab}	16.90±0.72 ^{ab}	202.11±7.47 ^{ab}

注:和正常组相比,^a $P<0.05$;和模型组比较,^b $P<0.05$

2.6 各组豚鼠病理组织评分比较 正常组的豚鼠鼻黏膜组织结构基本正常,HE 染色未见 EOS。模型组鼻黏膜组织上皮细胞坏死脱落或化生,固有层组织水肿,大量 EOS 浸润,腺体增生明显,病理组织评分明显高于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$)。消风宣窍汤与氯雷他定组的上述病理学改变均有所减轻,鼻黏膜组织炎症反应明显减轻,黏膜血管轻度扩张,稍有水肿,病理组织评分明显低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。消风宣窍汤组与氯雷他定组的病理组织评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

表 5 各组豚鼠鼻黏膜病理组织评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	评分
正常组	9	0.22±0.44
模型组	8	2.75±0.46 ^a
消风宣窍汤组	9	1.50±0.75 ^{ab}
氯雷他定组	8	1.37±0.51 ^{ab}

注:和正常组相比,^a $P<0.05$;和模型组比较,^b $P<0.05$

3 讨论

AR 已经成为儿童主要呼吸道慢性炎症性疾病,有报道^[4]显示 2016 年美国儿童变应性鼻炎的自报患病率达到 40%,确诊患病率为 13%。2020 年内蒙古 12 个市 6~18 岁儿童青少年变应性鼻炎的标化自报患病率为 18.20%,标化确诊患病率为 9.71%^[5]。尽管有很多治疗 AR 的西药,如抗组胺药、鼻用糖皮质激素、鼻减充血剂和肥大细胞稳定剂等,但长期治疗的不良反应多,复发率高。因此,对改善过敏症状的新方法或替代方法的需求日益增加。临床研究显示消风宣窍汤不仅可治疗患儿变应性鼻炎发作症状,而且可以逐步改善患儿过敏体质,减少鼻鼾反复发作,长期应用不良反应少^[6],但其作用机制尚不清楚。本研究通过实验研究初步探讨了消风宣窍汤治疗 AR 的免疫作用机制。

AR 是以 IgE 明显升高为特征的 I 型变态反应疾病,发病机制复杂,重要原因之一为 Th1/Th2 平衡失

调。纠正 Th1/Th2 细胞的分化,Th1/Th2 细胞因子分泌的失衡,可有效抑制变应性炎症反应。IL-4 为 Th2 细胞重要的特征因子之一,可以诱导免疫球蛋白 IgM 至 IgE 的同型转换,使得 MC 的脱颗粒作用增强。通过 Pearson 相关性分析表明,AR 感染后血清 IL-4 水平与其 SFAR、VAS 评分以及外周血清 IgE 均呈正相关^[7]。IFN-γ 能激活巨噬细胞,促进静止的 Th0 细胞向 Th1 细胞的分化,还能抑制 Th2 细胞的增殖^[8]。IL-4 和 IFN-γ 的表达异常提示 Th 细胞的分化偏移。IL-4 逐渐增多和 IFN-γ 减少,乃是变应性鼻炎机体内 IgE 合成增多的主要机制,INF-γ 在 AR 炎症早期发生可能起主导作用,而 IL-4 在晚期发展可能发挥主要作用^[9]。IL-6 是 Th2 细胞分泌的另一种重要的细胞因子,参与多种靶细胞黏附和集聚,并具有重要的免疫调节功能,可提示气道炎症的活跃程度,促进气道炎症的发生和气道结构重建。研究证实 IL-6 在 CRS 的鼻腔黏膜高表达^[10]。IL-12 是诱导 Th0 向 Th1 细胞分化的重要因素,可促进产生 Th1 型细胞因子,并抑制 Th2 型细胞因子,还可以通过抑制 IL-4 发育从而拮抗 Th2 型细胞应答。IL-12 为诱导产生 IFN-γ 的最主要的细胞因子^[11]。当血清 IL-12 过高表达时,EOS 分化、生成得到抑制,使进入靶组织的 EOS 和 T 细胞减少,进一步抑制由 IgE 介导的 I 型变态反应,改善 AR 症状^[12]。NF-κB 参与炎症和免疫反应,并起枢纽作用,可调节各类炎症递质和免疫因子之间的级联放大连锁效应,因此抑制其激活可有效防止 AR 的产生^[13]。NF-κB 表达增加,可诱发 Th2 细胞因子 IL-4 等分泌,从而促进 B 淋巴细胞合成 IgE,同时增强 EOS 的黏附聚集^[14]。Th17 细胞可上调 Th2 细胞介导的嗜酸性气道炎症,IL-17 是其分泌的特征性细胞因子,可增强气道平滑肌收缩和气道上皮细胞对变应原的通透性^[15]。IL-17 可增加气道上皮细胞黏液的表达,并通过 NF-κB 依赖通路激活黏液蛋白基因表达和蛋白生成^[16]。炎症性疾病和自身免疫性疾病发生可能与 IL-17 过度产生有关。

本研究显示,消风宣窍汤治疗后可减轻豚鼠流

涕、擦鼻、喷嚏等AR症状,显著减少鼻腔分泌物中EOS和MC计数,降低血清中IgE、组胺水平,证实了消风宣窍汤可以减轻局部免疫反应,起到抗炎、抗过敏的作用,并可以改善鼻黏膜的病理损伤。其中消风宣窍汤治疗后豚鼠血清IgE、组胺水平下降较氯雷他定组更为明显,提示消风宣窍汤抗过敏方面可能更有优势。AR感染前,各细胞因子之间相互联系、协调及作用,Th1和Th2则通过这些细胞因子的变化保持着动态平衡。临床证实AR感染后,存在Th1/Th2平衡被破坏及Th17细胞比例升高的情况^[17]。本研究通过豚鼠感染前后细胞因子情况的对比,得到了类似的结论,并通过观察Th17、Th1、Th2细胞分泌的不同细胞因子的水平变化,证实消风宣窍汤治疗后可以降低豚鼠血清Th2相关细胞因子IL-4、IL-6含量,增高Th1分泌IFN- γ 、IL-12相关细胞因子的含量,同时抑制了血清NF- κ B、IL-17表达,其细胞因子的水平变化较氯雷他定组无显著差异。通过本次实验研究,推测消风宣窍汤治疗变应性鼻炎模型可能通过降低机体Th2相关细胞因子含量,同时升高Th1相关细胞因子含量,来抑制Th2免疫反应,增强Th1的免疫反应,纠正Th1/Th2免疫失衡来治疗疾病,也提示调节机体中Th1/Th2、IL-17免疫平衡状态成为该疾病新的治疗方向^[18]。

参考文献

[1]邹建华,汪受传.汪受传教授自拟消风宣窍汤治疗小儿鼻鼽经验[J].成都中医药大学学报,2018,41(4):72-74.
 [2]魏肖云,汪受传.消风宣窍汤对变应性鼻炎豚鼠模型NGF和IL-5表达的影响及其相关性[J].中医儿科杂志,2014,10(2):21-24.
 [3]中华中医药学会中药实验药理专业委员会.变应性鼻炎动物模型制备规范(草案)[J].中草药,2018,49(1):50-57.
 [4]MELTZER EO. Allergic Rhinitis: Burden of Illness, Quality of Life, Comorbidities, and Control[J]. Immunology and allergy clinics of North America, 2016, 36(2): 235-48.

(上接第30页)

助气化,或仿古人急开支河思想,或开太阳以降水饮等,巧妙地将水邪祛于体外。现临床已将五苓散广泛应用于消化、泌尿、心血管、神经、代谢等系统疾病^[5]。本文对《临证》中五苓散医案进行探析,以期对当代临床运用五苓散提供一定的参考价值与指导。

参考文献

[1]张景岳.景岳全书[M].北京:人民卫生出版社,2007:1074.

[5]赵羽芊.内蒙古地区6-18岁儿童青少年变应性鼻炎的流行病学特征及其影响因素[D].内蒙古:内蒙古医科大学,2021.
 [6]CORSICO AG, DE AMICI M, RONZONI V, et al. Allergen-specific immunoglobulin E and allergic rhinitis severity[J]. Allergy Rhinol(Providence), 2017, 8(1): 1-4.
 [7]曹慧,郑成彩,杜小燕.IL-4、PPAR- γ 表达与过敏性鼻炎疾病活动度的相关性分析[J].现代医学,2021,49(8):970-974.
 [8]张清全,姜孝芳,孙勇,等.新疆维、汉人群变应性鼻炎患者与正常人表观遗传现象IFN- γ 基因甲基化比较研究[J].免疫学杂志,2012,28(1):54-58.
 [9]陈冬,李玉晓,李添应.实验性过敏性鼻炎大鼠血浆细胞因子IL-4和IFN- γ 时相的变化[J].中华临床免疫和变态反应杂志,2009,3(4):254-258.
 [10]王冰,舒艳,梁佳.IL-6在儿童慢性鼻窦炎中的表达及其意义[J].重庆医学,2016,45(1):19-23.
 [11]张鲁壮,宋晓洁,崔喜才,等.IL-12、IFN- γ 、EPO及铁蛋白在急性白血病患者血清中的表达及临床意义[J].现代生物医学进展,2017,17(22):4311-4313,4329.
 [12]尹雪,任秀敏,王建星.IL-12细胞因子家族在变应性鼻炎中的研究进展[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2017,31(3):237-241.
 [13]OH SW, JY, CHA, JE, JUNG. Curcumin attenuates allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice through NF-kappaB inhibition[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(3): 414-421.
 [14]肖丽容,郑仕洁,侯宸,等.小鼠视网膜体外电转化及Transwell体外培养的方法[J].眼科新进展,2018,38(7):620-624.
 [15]ZHENG R, CHEN Y, SHI J, et al. Combinatorial IL-17RB, ST2, and TSLPR Signaling in Dendritic Cells of Patients With Allergic Rhinitis[J/OL]. Front Cell Dev Biol, (2020-4-3) [2021-11-20]. DOI: 10.3389/fcell.2020.00207.
 [16]ST L A, HANSEN A M, KARAUZUM H, et al. STAT-3-independent production of IL-17 by mouse innate-like alphabeta T cells controls ocular infection[J]. J Exp Med, 2018, 215(4): 1079-1090.
 [17]MENTELLA MC, SCALDAFERRI F, PIZZOFERRATO M, et al. Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review[J]. Nutrients, 2020, 12(4): 944.
 [18]彭慧慧,冷建杭,沈俊娅. Th17/Treg和Th1/Th2细胞失衡对变应性鼻炎发病机制的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 3(18): 2234-2237.

(收稿日期:2021-12-19)

(本文编辑:黄明愉)

[2]陈颖.尤建良教授治疗晚期大肠癌合并肠梗阻经验[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(4):203-205.
 [3]施今墨.施今墨对药[M].北京:人民军医出版社,1996:2.
 [4]叶桂.温热论[M].北京:人民卫生出版社,2016:17.
 [5]程亚楠,周小平.五苓散临床应用研究综述[J].光明中医,2017,32(11):1674-1676.

(收稿日期:2021-09-28)

(本文编辑:蒋艺芬)