

辛芷鼻敏胶囊对变应性鼻炎大鼠骨髓及外周血 IL-5 及嗜酸性粒细胞的影响

杨清,高丽*,姜孝芳,王宏伟,司红丽,刘富太
(新疆医科大学第六附属医院,新疆医科大学中医学院,乌鲁木齐 830002)

[摘要] 目的:探讨辛芷鼻敏胶囊对变应性鼻炎(AR)大鼠骨髓及外周血中 IL-5 和外周血及骨髓中嗜酸性粒细胞(EOS)的影响。方法:用卵清蛋白(OVA)致敏 SD 大鼠制成模型,分正常对照组、模型组、鼻炎康组、辛芷鼻敏胶囊组,分别 ig 生理盐水、鼻炎康片(3 g·kg⁻¹)和辛芷鼻敏胶囊(3.6 g·kg⁻¹),连续 10 d。采用双抗体夹心酶联免疫吸附技术(ELISA)定量测定骨髓及外周血中白介素-5(IL-5)含量,骨髓和外周血涂片瑞氏染色计数 EOS。结果:辛芷鼻敏胶囊组骨髓及外周血中 IL-5、EOS 比模型组有显著降低($P<0.05$),且与鼻炎康组比较有统计学意义($P<0.05$);辛芷鼻敏胶囊组大鼠鼻黏膜 EOS 计数明显低于模型组和鼻炎康组($P<0.01$, $P<0.05$)。结论:辛芷鼻敏胶囊可以减少 IL-5 水平,减少嗜酸性粒细胞浸润,而起到一定的治疗作用。

[关键词] 辛芷鼻敏胶囊;变应性鼻炎;白介素-5;嗜酸性粒细胞
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2011)06-0217-03

Action of Xinzhi Bimin Capsule in Model of Rats with Allergic Rhinitis and Influence on levels of Interleukin-5 and Eosinophil

YANG Qing, GAO Li*, JIANG Xiao-fang, WANG Hong-wei, SI Hong-li, LIU Fu-tai
(The Sixth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University; Traditional Chinese medicine College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of Xinzhi Bimin capsule on the model of rats with allergic rhinitis (AR) and the effect on Interleukin-5 (IL-5) and eosinophil (EOS). **Method:** Fourty rats were randomly divided into control group, sensitized group, the positive control (BeiYankang, 3 g·kg⁻¹) and experimental groups (3.6 g·kg⁻¹). The rats were sensitized by ovalbumin. **Result:** IL-5 content in bone marrow of the experimental group was significantly lower than those of the model group and the positive control group ($P<0.05$); IL-5 content of blood serum in the experimental group was significantly lower than those of the model group and the positive control group ($P<0.05$); the numbers of EOS, compared with the control group and the model group, there were significant difference ($P<0.05$). **Conclusion:** Xinzhi Bimin capsule can reduce IL-5 content of bone marrow and in serum, and relieve EOS infiltration.

[Key words] Xinzhi Bimin capsule; allergic rhinitis; interleukin-5; eosinophil (EOS)

[收稿日期] 2010-06-07
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30560144)
[第一作者] 杨清,主治医师,从事中西医结合治疗变态反应性疾病的 基础 研究, Tel: 0991-2657560, E-mail: xjmuyq75@sina.com
[通讯作者] * 高丽,教授,从事中西医结合治疗变态反应性疾病的 基础 研究, Tel: 0991-4365113, E-mail: xjmugaoli@gmail.com

辛芷鼻敏胶囊是新疆医科大学研制开发治疗变应性鼻炎的中药新药,临床疗效观察,治疗变应性鼻炎(AR)具有疗效快、毒副作用小等优势^[1]。AR 是以变态反应为基础的疾病,其特点是局部鼻黏膜组织大量嗜酸性粒细胞浸润。在变应性鼻炎大鼠的药效机制系列研究中,包晓玲等发现,辛芷鼻敏胶囊在降低 NF-κB 阳性细胞数量、抑制 NF-κB 活性有一定

作用,从而减少变应性鼻炎大鼠脾脏 Th2 细胞表达的细胞因子 IL-5 的水平,进而减少嗜酸性粒细胞浸润而控制症状和炎症过程的发展^[2]。

本研究旨在探讨其对骨髓和外周血中白细胞介素-5(IL-5)及鼻黏膜嗜酸性粒细胞(EOS)的影响,探明辛芷鼻敏胶囊对 AR 免疫调节的作用,为其应用于 AR 临床提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 辛芷鼻敏胶囊由新疆医科大学中医学院实验中心提供,鼻炎康片(佛山德众药业有限公司,批号 08079),卵清蛋白(OVA, Sigma 公司,美国);IL-5 ELISA 检测试剂盒(ADL 公司,美国)。

1.2 动物 健康普通清洁级 SD 大鼠 40 只,体重(200±20)g,雌雄各半,新疆医科大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(新)2003-0001。

1.3 仪器 酶标分析仪(Bio-RAD Model 500,日本);光学显微镜(Olympus CX31,日本);离心机(SC-2546,Zonkia 中佳,科大创新股份有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模 成年大鼠 40 只,体重(220±20.12)g,随机分为 4 组,即正常对照组,模型组,鼻炎康组,辛芷鼻敏胶囊组,每组 10 只,每 5 只 1 笼,雌雄各半分笼饲养。采用 OVA 致敏的方法,除正常组外其余动物用 31 mg OVA 作抗原,氢氧化铝粉末 3 g 作佐剂,加生理盐水 100 mL 制成混悬液,每鼠 1 mL ip,隔日 1 次,共 7 次,为基础致敏,再用 2% OVA 生理盐水滴双侧鼻腔,每侧 0.05 mL,每日 1 次,共 7 次。正常对照组用等量生理盐水代替。每次滴鼻后观察 30 min,包括喷嚏、搔抓、流涕等,记录大鼠行为学得分^[3],评分标准见表 1。每鼠超过 5 分,鼻分泌物涂片见大量嗜酸性粒细胞为造模成功^[4]。

表 1 大鼠 AR 症状分级标准

症状	轻度	中度	重度
鼻痒	轻碰数次	两者之间	四处摩擦
鼻涕	可见鼻涕少量	涕过中线	涕流满面
喷嚏	1~3 次	3~9 次	9 次以上
评分	1 分	2 分	3 分

2.2 给药方法 辛芷鼻敏组(3.6 g·kg⁻¹·d⁻¹),鼻炎康组(3.0 g·kg⁻¹·d⁻¹)ig。药物充分研磨用蒸馏水配成混悬液,调整浓度,使每鼠每日 ig 量均为 2 mL,空白对照组、模型组 ig 2 mL 生理盐水。造模 14 d 后起连续服药 10 d。

2.3 标本采集

2.3.1 鼻分泌物涂片检查 微型小棉棒伸入大鼠鼻腔轻擦鼻甲表面 3 次,制作涂片。均匀涂抹在载玻片上,染色后,光镜下寻找 EOS,大量 EOS 为造模成功。所有动物实验前和造模完成后各检查 1 次。

2.3.2 外周血、骨髓收集及鼻黏膜取材 所有动物以 12% 乌拉坦 ip 麻醉后,心脏穿刺取血 2 mL 以肝素钠抗凝保存,少量涂片后行瑞氏染色,其余外周血 3 000 r·min⁻¹,离心 10 min 取上清,-20 ℃ 冻存备用。骨髓标本采集:取大鼠后肢股骨,截断两端骨髓剖开骨干髓腔,以磷酸盐缓冲液(肝素抗凝)反复冲洗骨髓腔并收集,少量涂片后行瑞氏染色,余离心后吸取上清 -20 ℃ 冻存备用。腹主动脉放血处死后取鼻黏膜组织:分离鼻骨前皮肤,咬除鼻骨,游离腭盖双侧鼻腔呼吸区黏膜,4 ℃ 0.01 mol·L⁻¹ PBS 中洗去血液和黏液后,4% 多聚甲醛固定 48 h,常规制片。

2.4 指标检测

2.4.1 外周血和骨髓 IL-5 含量 采用 ELISA 法检测外周血及骨髓中 IL-5 含量,参照试剂盒说明进行,检测灵敏度 1.0 pg·mL⁻¹。

2.4.2 鼻黏膜 EOS 计数 常规切片 4 μm,HE 染色。选取 5 个高倍视野(×1 000)计数 EOS,计算其平均值。

2.4.3 外周血及骨髓 EOS 计数 常规涂片,瑞氏染色,光镜下计数 EOS。

2.5 统计学方法 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用 SPSS16.0 统计软件中单因素方差分析和 pearson 相关检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 辛芷鼻敏胶囊对 AR 大鼠骨髓和外周血 IL-5, EOS 的影响 见表 2。与正常组比,模型组骨髓和外周血 IL5, EOS 明显升高($P < 0.01$);与模型组比,两治疗组骨髓和外周血 IL-5, EOS 明显降低,其中辛芷鼻敏的改善作用又强于鼻炎康组($P < 0.01$)。

3.2 鼻黏膜 EOS 计数影响 见表 3。模型组鼻黏膜 EOS 计数明显高于正常组($P < 0.01$);辛芷鼻敏组明显低于模型组及鼻炎康组(均 $P < 0.01$)。

3.3 鼻黏膜中 EOS 高倍镜下计数与其他指标的关联性 见表 3。鼻黏膜中 EOS 数量与骨髓及外周血中 IL-5 含量相关系数 r 值分别为 0.64, 0.67, P 值分别为 0.011, 0.013, 呈正相关。

表 2 辛芷鼻敏胶囊对骨髓和外周血中 IL-5, EOS 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	骨髓		外周血	
		IL-5/pg·mL ⁻¹	EOS/×10 ⁵ /mL	IL-5/pg·mL ⁻¹	EOS/×10 ⁵ /mL
正常对照	—	2.46±0.086 ²⁾	3.8±1.6 ²⁾	2.68±0.103 ²⁾	3.8±1.6 ²⁾
模型	—	2.89±0.076	17.8±1.4	2.95±0.059	17.8±1.4
鼻炎康	3.0	2.80±0.102 ¹⁾	15.4±1.5 ²⁾	2.90±0.035 ¹⁾	15.4±1.5 ²⁾
辛芷鼻敏	3.6	2.60±0.136 ^{2,3)}	12.0±1.2 ^{2,3)}	2.80±0.076 ^{2,3)}	12.0±1.2 ^{2,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;辛芷鼻敏与鼻炎康比较³⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

表 3 辛芷鼻敏胶囊对鼻黏膜 EOS 计数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	EOS/个/HP
正常对照	—	0.58±0.48 ²⁾
模型	—	4.57±1.53
鼻炎康	3.0	3.40±1.12
辛芷鼻敏	3.6	2.13±0.62 ^{2,3)}

表 4 鼻黏膜 EOS 高倍镜下计数与其他指标的相关分析

指标	r 值	P 值
鼻黏膜 EOS 高倍镜下计数	—	—
骨髓中 IL-5	0.64	0.011
外周血中 IL-5	0.67	0.013

4 讨论

辛芷鼻敏胶囊处方,源于南宋严用和《严氏济生方》“苍耳散”,其在“苍耳散”之“散用”基础上,益以黄芪等其余药材成补固收敛之功。其由白芷、辛夷、苍耳子、等 8 味中药组成,方中白芷祛风散寒、宣肺通窍为君药;辛夷、苍耳子、鹅不食草散风寒、通鼻窍,葱白散寒解表通阳,共为臣药;黄芪益气健脾,百部润肺止咳,五味子敛肺固津,一枝蒿祛风解毒活血,共为佐药。既可疏散风寒而祛除邪气,又能温肺强卫而宣通鼻窍,且有益气固表而强卫敛津,兼益脾肾,散中有收,泻中寓补,使祛邪而不伤正,辛温而无燥窜。由于新疆干旱燥胜的地域特点,结合春末秋初时节多发的气候性质,守因地因时制宜的治则,伍以调节免疫功能的地产药一枝蒿^[5]。

本实验通过 AR 大鼠模型,探讨了辛芷鼻敏胶囊治疗 AR 的药理作用。EOS 的发育和分化以全能造血干细胞为基础,IL-5 被视作 EOS 系特异性的刺激因子。是 EOS 增殖、分化、趋化和活化特异性的调节因子^[6]。骨髓中的 EOS 是在 IL-5 刺激下由 CD34⁺ 远祖细胞分化而来^[4]。研究表明循环中 IL-5 在调节 EOS 骨髓反应中发挥重要的作用^[3]。王向东等采用免疫组化研究表明骨髓表达 IL-5 的细胞是处于不同分化阶段的 EOS^[7]。有报道增高的 IL-5 可以促使骨髓池 EOS 释放进入外周血并定向聚集到炎症部位^[8],进而鼻黏膜发生特征性 EOS 化。Suzuki 等的^[9]研究证实 IL-5 是抑制 EOS 凋亡的主要细胞因子。

实验结果显示,模型组骨髓和外周血中 IL-5、EOS 及鼻黏膜中 EOS 计数水平增高,经治疗后,辛芷鼻敏组骨髓和外周血中 IL-5、EOS 减少,鼻黏膜中 EOS 计数减少,与模型组比较有统计学意义;鼻黏膜中 EOS 计数与骨髓和外周血中 IL-5 呈正相关;提示辛芷鼻敏胶囊可降低骨髓和外周血中 IL-5 水平,与本课题组包晓玲等实验结果相似。由于 IL-5 被视作 EOS 系特异性的刺激因子,辛芷鼻敏组的以上作用可能与骨髓池 EOS 释放进入外周血减少并定向聚集到炎症部位亦减少有关,可能提示辛芷鼻敏胶囊可以通过下调 IL-5 水平,减少对骨髓炎性祖细胞的刺激作用,影响 EOS 增殖、分化、趋化和活化,而发挥治疗作用。

[参考文献]

[1] 高丽,安扬,田树革,等.中药复方制剂治疗变应性鼻炎临床与实验研究[J].农垦医学,2002,24(3):170.

[2] 包晓玲,高丽,刘俊昌,等.NF-κB 和 IL-5 在豚鼠变应性鼻炎脾脏组织表达及意义[J].中国中西医结合耳鼻喉杂志,2006,14(6):341.

[3] Wang J Palmer K, Lotvall J, et al. Circulating, but not local lung, IL-5 is required for the development of antigen-induced airway eosinophilia[J]. J Clin Immunol, 1998, 102(6): 1132.

[4] 万欢英,周敏,黄绍光等.过敏性哮喘与骨髓反应[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25:304.

[5] 陶海英,孙玉华,胡正梅,等.复方一枝蒿颗粒的抗炎、抗菌作用和对免疫功能的影响[J].中药药理与临床,2007,23(2):64.

[6] 张辉,张大良,张红萍,等.变应性鼻炎患者外周血 CD34 和白介素 5 及嗜酸性粒细胞的检测[J].中华耳鼻喉-头颈外科杂志,2005,40(7):541.

[7] 王向东,韩德民,周兵,等.白细胞介素 5 调节变应性鼻炎骨髓反应的实验研究[J].中华耳鼻喉科杂志,2003,38(6):448.

[8] Hogan M B, Picktel D, Landreth K S. IL-5 production by bone marrow cell: implications for eosinophilia associated with asthma [J]. J Aller Clin Immuno, 2000, 106(2):329.

[9] Suzuki S, Okubo M, Kaise S, et al. Gold sodium thiomalate selectivity inhibits interleukin-5-mediated eosinophilia survival[J]. J Aller clin Immunol, 1995, 96(2):251.

[责任编辑 何伟]