

变应性鼻炎豚鼠血清 IgE 和 IL-6, IL-17 的变化及消风宣窍汤的调节作用

李萌, 汪受传*, 魏肖云
(南京中医药大学, 南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨实验性变应性鼻炎 (Allergic rhinitis, AR) 发病机制中白介素 (IL)-6、IL-17 和免疫球蛋白 E (IgE) 水平的变化及其意义, 分析消风宣窍汤对这 3 种细胞因子的调节作用。方法: 用卵蛋白 (OVA) 通过腹腔注射结合滴鼻的方式建立 AR 豚鼠模型, 造模周期共 21 d, 将 60 只 Hartley 豚鼠随机分为正常组、模型组、消风宣窍汤高、中、低剂量组 (42, 21, 10.5 g·kg⁻¹)、氯雷他定组 (1.34 mg·kg⁻¹)。用被动皮肤过敏试验 (PCA) 检验豚鼠模型制备情况, 治疗 1 周, ELISA 法检测各组血清中免疫球蛋白 (IgE) 和 IL-6, IL-17 的水平。结果: 与正常组比较, 模型组 IgE 和 IL-6, IL-17 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 消风宣窍汤高、中剂量组 IgE 水平显著降低 ($P < 0.01$), IL-6, IL-17 水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 低剂量组 IgE 水平降低 ($P < 0.05$); 氯雷他定组 IgE 水平降低 ($P < 0.05$), IL-6, IL-17 水平显著降低 ($P < 0.01$)。结论: 消风宣窍汤降低 AR 的 IgE 水平的机制可能是通过降低 IgE 和 IL-6, IL-17 水平实现的, 并且两者呈正相关关系, 提示 IL-6 和 IL-17 在 AR 发病机制中有重要作用。

[关键词] 消风宣窍汤; 变应性鼻炎; 免疫球蛋白 E; 白介素 6; 白介素 17

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0164-04

[doi] 10.11653/syfy2014060164

Regulative Effect of Xiaofeng Xuanqiao Decoction Serum IgE and IL-6, IL-17 in Allergic Rhinitis Guinea Pig

LI Meng, WANG Shou-chuan*, WEI Xiao-yun

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of immunoglobulin E (IgE) and interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17) in the pathogenesis of allergic rhinitis (AR), and the regulative effect of Xiaofeng Xuanqiao decoction on the above 3 cytokines. **Method:** AR guinea pig model was established by intraperitoneal injection and intranasal way with ovalbumin (OVA), and modeling cycle is 21 days. Sixty guinea pigs were randomized into 6 groups: normal control group, AR group, high-dosage, middle-dosage, low-dosage Xiaofeng Xuanqiao decoction group (42, 21, 10.5 g·kg⁻¹), and loratadine group (1.34 mg·kg⁻¹). Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test was performed in all guinea pigs. Xiaofeng Xuanqiao decoction and loratadine were applied to intervene AR guinea pig. The serum levels of IgE and IL-6, IL-17 were determined by enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) method. **Result:** The expression levels of IgE and IL-6, IL-17 significantly increased compared with the normal group ($P < 0.01$). Compared with that in AR model group, the serum level of IgE in high-dosage Xiaofeng Xuanqiao decoction group significantly was decreased ($P < 0.01$), the levels of IL-6, IL-17 were decreased ($P < 0.05$); the levels of IgE and IL-6, IL-17 in equivalent-dosage Xiaofeng Xuanqiao decoction group significantly were decreased ($P < 0.01$); the level of IgE in low-dosage Xiaofeng

[收稿日期] 20130602(007)

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程项目(苏政办发[2011]6号)

[第一作者] 李萌, 硕士研究生, 从事小儿肺系疾病研究, E-mail: xiaoci1987124@126.com

[通讯作者] *汪受传, 教授, 博士生导师, 从事小儿肺系疾病研究, 中医药标准化研究, Tel: 025-86798182, E-mail: wscnj@126.com

Xuanqiao decoction group decreased ($P < 0.05$), the levels of IL-6, IL-17 have no obvious changes; the level of IgE in loratadine group decreased ($P < 0.05$), and the levels of IL-6, IL-17 significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Xiaofeng Xuanqiao decoction down-regulate serum level of IgE through decreasing the levels of IL-6 and IL-17, and there is a positive correlation between them, suggesting that IL-6 and IL-17 are important factors in the mechanism of AR.

[**Key words**] Xiaofeng Xuanqiao decoction; allergic rhinitis; IgE; IL-6; IL-17

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是儿科常见病、多发病,近年来发病率呈上升趋势,影响儿童的学习和生活质量。免疫学研究表明,AR 是多种细胞因子参与的免疫球蛋白 E (IgE) 介导的 I 型变态反应性疾病,体内白细胞介素水平的失调可能是 AR 发生的分子生物学基础之一^[1]。其中白细胞介素 6 (IL-6) 对调节 IgE 免疫应答具有重要作用,可上调黏附分子的表达,参与多种白细胞黏附与聚集,从而加强炎症反应,是参与 AR 炎性反应的一种重要的促炎细胞因子^[2]。白细胞介素 17 (IL-17) 是目前新发现的主要由 CD4⁺ 记忆 T 淋巴细胞、单核细胞等分泌的一种前炎症细胞因子,具有强大的招募中性粒细胞及促进多种细胞释放炎性因子的作用,参与了机体多种炎症疾病^[3]。本研究选用 OVA 滴鼻制备豚鼠 AR 模型,从调控 IgE 和 IL-6、IL-17 表达的角度探讨消风宣窍汤治疗 AR 的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 消风宣窍汤(由炙麻黄 3 g, 桂枝 3 g, 辛夷 6 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 8 味药物组成), 由南京中医药大学植物药与新药开发研究中心(江苏省植物药深加工工程中心)制备和质控, 分别加适量水, 水煎 2 次, 合并 2 次滤液并分别减压浓缩至含生药 2.1, 1.05, 0.525 g·mL⁻¹ 3 个质量浓度冷藏备用, 该药以麻黄中的麻黄碱、辛夷中的辛夷挥发油的定性鉴别为质量流量控制标准。氯雷他定片(开瑞坦, 上海先灵葆雅制药有限公司生产, 批号 10KRXF1047), 用蒸馏水溶解并稀释为 0.1 g·L⁻¹。卵白蛋白(OVA, 美国 Sigma 公司, 批号 326A053); 氢氧化铝凝胶(上海美兴化工有限公司生产, 批号 20080506)。豚鼠 IL-6, IL-17 ELISA 检测试剂盒(美国 RD 公司生产, 上海韵涵生物科技有限公司分装, 批号 201304)。

1.2 动物 清洁级幼龄 Hartley 豚鼠 60 只, 雄性, 体重(300 ± 25) g, 南京中医药大学实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK(苏)2012-0008。饲养条件: 室温(23 ± 2) °C, 相对湿度(60 ± 5)%, 每笼 5

只, 自由摄取水和食物, 保持室内安静。

1.3 仪器 EXL800 型酶标仪(美国 BioTek 公司), DMIL 型倒置显微镜(德国 Leica 公司), 5810R 型大容量高速冷冻离心机, 面包式离心机(德国 Eppendorf 公司), MCO-20 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司), 生物安全柜(苏州净化设备厂)。

2 方法

2.1 分组及处理 适应性饲养 1 周后开始正式实验。随机分为正常组, 模型组, 消风宣窍汤高、中、低剂量组, 氯雷他定组, 每组 10 只。

豚鼠 AR 模型的建立参考文献[4], 并作相应改进。致敏组均首先选用 OVA 0.30 mg 作抗原, Al(OH)₃ 凝胶 30 mg 作佐剂, 加生理盐水 1 mL 制成混悬液, ip 隔日 1 次, 共 7 次。ip 完成后的第 2 天, 行被动皮肤免疫反应试验(passive-cutaneous-anaphylaxis, PCA), 待确定豚鼠体内 OVA 特异性抗体阳性后, 每侧鼻腔均以 2% 卵白蛋白溶液 50 μL 局部免疫, 每日 1 次, 共 7 次。正常对照组则以生理盐水代替。从第 1 次 OVA 滴鼻当日起, 将药品按人鼠剂量换算后按 20 mL·kg⁻¹ ig, 每天 2 次, 共 7 d。正常组、模型组予生理盐水 ig; 消风宣窍汤高、中、低剂量组分别以生药 2.1, 1.05, 0.525 g·mL⁻¹ 药汁 ig(剂量为 42, 21, 10.5 g·kg⁻¹); 氯雷他定组予氯雷他定混悬液 ig(剂量为 1.34 mg·kg⁻¹)。给药期间记录鼻部症状, 以观察药物治疗后豚鼠鼻部情况。

2.2 血清 IgE, IL-6, IL-17 检测 末次灌胃给药 24 h 后, 将豚鼠用 10% 水合氯醛 ip 麻醉(0.4 mL·kg⁻¹), 颈动脉插管采取 5 mL, 离心(3 000 r·min⁻¹) 10 min 后分离出血清, 于 -70 °C 保存。按试剂盒说明步骤检测血清 IL-6, IL-17 水平的变化。

2.3 病理学观察 豚鼠取血后处死, 剥离鼻部皮肤后, 将连同鼻腔的上颌骨取下, 从中切齿间分离双侧鼻腔, 小心取出鼻腔黏膜组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 5% 甲酸脱钙, 经脱水包埋、切片、HE 染色, 显微镜下观察各组豚鼠鼻黏膜组织学改变, 进行比较对比和评价。为了解抗原刺激是否引起哮喘样病理改变, 其气管、支气管和肺组织也做相同的处理和观

察。高倍镜下每张切片任选 10 个视野,进行病理变化分级打分和疗效评定。病变程度分级评分标准如下:0 级 柱状上皮正常,无炎性细胞浸润,少量杯状细胞,为 0 分;I 级 少数散落的炎症细胞,上皮的化生程度小于全部黏膜上皮的 1/3,膜固有层的腺体增生程度小于黏膜固有层的 1/3,为 1 分;II 级

较多嗜酸性细胞游出,伴少量中性粒细胞及嗜碱性粒细胞,上皮的化生程度为全部黏膜上皮的 1/3~2/3,膜固有层的腺体增生程度为黏膜固有层的 1/3~2/3,为 2 分;III 级 大量嗜酸性细胞游出,大于全部上皮炎症细胞的 2/3,上皮的化生程度大于全部黏膜上皮的 2/3,出现鳞状上皮化生,膜固有层的腺体增生大于黏膜固有层的 2/3,伴见固有层腺体增生,为 3 分。

2.4 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件处理,组间均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 豚鼠 PCA 试验结果比较 正常对照组 PCA 试验阳性率为 0%,模型组的阳性率为 90%。

3.2 豚鼠鼻部症状观察 第 1 次鼻腔激发后大部分豚鼠出现不同程度的搔鼻、喷嚏症状,随着激发次数的增多,上述症状加重,但流鼻涕症状不明显,至

最后 1 次激发实验结束,造模各组豚鼠均表现为明显的 AR 症状,并有活动减少、倦卧嗜睡、被毛蓬松等症状,流鼻涕较前亦明显增多。正常对照组豚鼠均反应灵活,活动频繁,毛色润洁,仅个别偶见擦鼻、喷嚏、流涕等症状。消风宣窍汤各剂量组及氯雷他定组治疗 7 d 后,上述症状均明显好转,但 1 周治疗未使其鼻部症状完全恢复正常;模型组的上述症状及体征无明显变化。实验过程中,各组均有豚鼠陆续死亡,其中 5 只为豚鼠饲养过程中不明原因死亡,解剖尸体未发现明显异常;5 只为造模后鼻塞明显,出现气喘惊厥症状,窒息死亡;3 只豚鼠为灌药时操作不当,药液呛入气管,窒息死亡;1 只为互相撕咬致死。各组豚鼠死亡只数经比较,差异均无显著性意义。治疗结束后各组豚鼠数量如下:正常组 9 只;模型组 8 只;消风宣窍汤高、中、低剂量组依次为 7, 8, 8 只;氯雷他定组 8 只。

3.3 用药后 IgE, IL-6, IL-17 的表达 与正常组比较,模型组的 IgE, IL-6, IL-17 水平显著上升 ($P < 0.01$);与模型组比较,消风宣窍汤高、中剂量组 IgE 水平显著降低 ($P < 0.01$), IL-6, IL-17 降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);低剂量组 IgE 降低 ($P < 0.05$);氯雷他定组 IgE 降低 ($P < 0.05$), IL-6, IL-17 显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 消风宣窍汤对变应性鼻炎豚鼠血清各组 IL-6, IL-17 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	IgE/mg·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	IL-17/ng·L ⁻¹
正常	-	9	117.58 ± 5.00	99.06 ± 1.26	180.22 ± 7.70
模型	-	8	224.01 ± 9.09 ¹⁾	133.84 ± 2.51 ¹⁾	230.35 ± 11.91 ¹⁾
消风宣窍汤	42	7	162.73 ± 3.04 ³⁾	120.44 ± 12.54 ²⁾	205.29 ± 5.38 ²⁾
	21	8	139.50 ± 1.80 ³⁾	110.29 ± 5.14 ³⁾	203.93 ± 16.30 ³⁾
	10.5	8	206.89 ± 1.89 ²⁾	130.22 ± 1.09	228.32 ± 7.14
氯雷他定	1.34 × 10 ⁻³	8	191.03 ± 7.31 ²⁾	111.01 ± 4.53 ³⁾	202.11 ± 7.48 ³⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.4 IL-6 和 IL-17 相关性 采用 Person 秩相关检验, $r = 0.970$, $P = 0.00$,说明此两项指标呈正相关关系。

3.5 病理形态学的变化 与正常组比较,模型组鼻腔黏膜病理分级评分增加,炎症明显;与模型组比较,消风宣窍汤高、中剂量组和氯雷他定组评分显著降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

4 讨论

变应性鼻炎属于中医学鼻鼈范畴。近年来相关的临床^[5-6]及实验研究^[4]表明中医药治疗本病具有一定的优势。传统观念认为鼻鼈以脏腑虚损为主。

表 2 消风宣窍汤对变应性鼻炎豚鼠鼻腔黏膜组织病理分级评分的影响

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	病变动物数/只				病变评分/分
			0 级	I 级	II 级	III 级	
正常	-	9	7	2	0	0	0.22 ± 0.44
模型	-	8	0	0	2	6	2.75 ± 0.46 ¹⁾
消风宣窍汤	42	7	0	3	3	1	1.71 ± 0.76 ³⁾
	21	8	0	5	2	1	1.50 ± 0.76 ³⁾
	10.5	8	0	1	3	4	2.38 ± 0.74
氯雷他定	1.34 × 10 ⁻³	8	0	5	3	0	1.38 ± 0.52 ³⁾

全国名老中医汪受传教授认为,在小儿鼻鼽的发病中,风邪是主要的致病邪气,风痰束窍为其主要病机。临证中善用风药治疗本病,消风宣窍汤是汪受传教授治疗小儿鼻鼽的有效验方,具有消风化痰、宣肺利窍之功效。该方具有中医理论及现代药理基础^[7],临床疗效确切。

关于AR的发病机制目前尚未完全明确。Th1/Th2细胞免疫失衡是AR的重要发病机制,主要表现为Th2主导及相关细胞因子参与的炎症性疾病^[8]。IgE介导AR的发生,并受遗传、变应原的接触、抗原的性质和Th细胞及其产生的细胞因子等多种因素的调节。IL-6为Th2细胞所释放的主要细胞因子,主要反映疾病是否处于急性期^[9],对调节IgE免疫应答具有重要作用。它同时是白介素家族中多功能细胞因子,是机体内复杂的细胞因子网络中的关键成员^[10],具有刺激细胞生长、促进细胞分化和加速急性期蛋白合成的作用,并与其他因子协同作用诱导特异性过敏介质释放,诱导和加重哮喘和变应性鼻炎等疾病。Th17是近年来发现的参与变应性疾病的另一类关键的T细胞亚群,其分泌产生的细胞因子中最重要的是IL-17,参与自身免疫和炎症反应,与免疫调节、免疫病理和宿主免疫关系密切^[11-12]。IL-17的主要效应是诱导基质细胞分泌IL-6,IL-8,NO,PGF₂和GM-CSF等促炎因子,而IL-6不仅促进IL-17的分泌,而且是IL-17重要的靶基因之一^[13]。在IL-17产生过程中起着重要的作用。本实验结果可见AR豚鼠模型血清中IL-6,IL-17表达水平增高,并且IL-6与IL-17水平呈正相关($P < 0.01$)。消风宣窍汤干预后能降低AR豚鼠血清IL-6,IL-17水平,从而减少炎症细胞的浸润和活化,抑制IgE的合成与分泌,这可能是该方治疗AR的机制之一。

总结本次研究的设计、实施过程,引发了以下几点思考:通过现代药理学研究,进一步探索对名医经验方的组方用药规律,是中医药传承与创新的关键问题之一;辨证论治是中医学的特色,如能建立病证相结合的AR动物模型^[14-16],体现了中医辨证论治的思维方式,是中医药现代化研究的出发点和落脚点;文献报道中AR建模方法所使用的过敏原以OVA居多,但所选用致敏剂量有所差别,对于过敏原的种类、剂量与AR症状的关系及药物对其的影响,值得我们继续深入研究。

[参考文献]

[1] 林志斌,李添应,陈冬,等. 白介素细胞因子在变应性

鼻炎的作用机理[J]. 当代医学,2010,16(4):15.
[2] 董震,王荣光. 鼻科学基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社,2006:319.
[3] Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha [J]. J Immunol, 1999, 162(1):494.
[4] 王维斌,谭晓梅,梁少瑜,等. 麻黄附子细辛汤和小青龙汤对过敏性鼻炎豚鼠作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):176.
[5] 陈文英. 固本健脾方治疗小儿肺脾两虚型过敏性鼻炎35例[J]. 中医学报,2010,25(147):316.
[6] 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.
[7] 李萌,戴启刚,汪受传. 汪受传教授治疗小儿鼻鼽药对经验[J]. 中医儿科杂志,2013,9(2):1.
[8] Agrawal D K, Shao Z. Pathogenesis of allergic airway inflammation [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2010, 10(1):39.
[9] 李亚灏,林向阳. 慢性支气管炎急性期患者血清白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 水平变化的研究[J]. 海南医学,2008,19(5):14.
[10] 郭景鹏,席焕久. 白细胞介素-6及其基因启动子多态性研究进展[J]. 解剖科学进展,2006,12(2):187.
[11] McAllister F, Henry A, Kreindler J L, et al. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis [J]. J Immunol, 2005, 175(1):404.
[12] G Ciprandi, M De Amici. Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis [J]. Allergy, 2009, 64:1275.
[13] Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, et al. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction [J]. Immunity, 2008, 29(4):628.
[14] 高爱平,华浩明. 方证相应的寒热证动物模型研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):313.
[15] 王宇,严道南. 脾气虚与变应性鼻炎模型大鼠相关机理的研究[J]. 南京中医药大学学报,2011,27(2):140.
[16] 徐启华,胡明华,马方励,等. 虚证动物模型的研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):307.

[责任编辑 聂淑琴]