

鼻炎喷剂对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜黏附分子的影响

袁颖, 符胜光, 郭忻*
(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 目的: 观察鼻炎喷剂对变应性鼻炎(AR)模型大鼠鼻黏膜黏附分子的影响, 探讨其治疗变应性鼻炎的作用机制。方法: 采用卵蛋白喷雾法致敏造成大鼠AR模型, 鼻炎喷剂鼻腔给药。用免疫组化法测定鼻黏膜中黏附分子ICAM-1、VCAM-1的表达。结果: 模型组黏膜上皮细胞、固有层炎性细胞及血管内皮细胞均大量地表达ICAM-1, 而鼻炎喷剂各剂量及立复汀喷雾组均能降低ICAM-1在鼻黏膜中表达。模型组鼻黏膜固有层血管内皮及上皮细胞有较强的VCAM-1阳性着色, 鼻炎喷剂各剂量组均有一定降低VCAM-1在鼻黏膜中表达的作用。立复汀喷雾组无明显作用。结论: 鼻炎喷剂治疗AR的作用途径之一是通过抑制鼻黏膜的黏附分子, 从而影响炎症细胞的聚集和迁移。

[关键词] 鼻炎喷剂; 变应性鼻炎; 黏附分子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)07-0067-03

Effects of Biyan Spray on Expression of Adhesion Molecule in Nasal Mucosa in Allergic Rhinitis Rat

YUAN Ying, FU Sheng-guang, GUO Xin*
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of the Biyan spray on expression of ICAM-1, VCAM-1 in nasal mucosa in allergic rhinitis(AR) rat and to explore the mechanism of Biyan spray treating AR. **Methods:** Using the model of AR rats caused by OVA, we observed the effect of Biyan spray on expression of ICAM-1, VCAM-1 in nasal mucosa by immunohistochemical staining method. **Results:** The expressions of ICAM-1, VCAM-1 in nasal mucosa were significantly higher than those in the control group. Biyan spray can depress the expression of ICAM-1 and VCAM-1. **Conclusions:** One of mechanisms of Biyan spray treating AR may restrain adhesion molecules in nasal mucosa to restrict the aggregation and migration of inflammation cells.

[Key words] Biyan spray; allergic rhinitis; adhesion molecule

变应性鼻炎(Allergic rhinitis, AR)是指机体接触过敏原后, 由IgE介导产生的鼻黏膜炎症反应。主要临床表现有鼻痒、鼻塞、流涕、喷嚏以及嗅觉功能障碍等。其病理过程涉及到神经递质、细胞因子、内分泌调节等诸多方面, 除了炎症前细胞因子外, 黏附分子在AR中也起重要作用。本研究观察鼻炎喷剂对鼻黏膜黏附分子细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和

血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)的影响。

1 材料

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠 60 只, 体重(140~160)g, 由上海中医药大学实验动物中心提供, 清洁级。合格证号: SCXK(沪)2003-0003。

1.2 药物试剂及设备 卵清蛋白(OVA), Sigma 公司, 批号: 0502; 中药鼻炎喷剂, 由当归、鹅不食草等经水煎醇沉浓缩成 $1.88 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 人日用剂量为 $0.023 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 上海中药二厂, 批号: 041025; 立复汀鼻喷雾剂, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 杨森制药公司, 批号: 20040315; 二抗 ICAM-1(羊), Santa cruz USA; 二抗

[收稿日期] 2007-11-05

[通讯作者] * 郭忻, Tel: (021) 51322195; E-mail: guoxin0112@yahoo.com.cn。

VCAM-1(R), Santa cruz USA; 402A 超声雾化器, 江苏鱼跃医疗器械公司; FR-2000 型图象分析系统, 复日科技有限公司。

2 方法

2.1 分组及造模 60 只大鼠随机分为 6 组, 鼻炎喷剂低剂量组、中剂量组、高剂量组, 西药对照组, 模型组和空白对照组各 10 只。动物模型参照文献方法加以改进^[1-3]。造模大鼠放入密闭玻璃干燥器内, 通过雾化吸入 20 mg·mL⁻¹ 卵蛋白生理盐水溶液喷雾致敏, 1 次/d, 每次 10 min, 连续 10 d。通过行为学评分判断模型成功与否。造模成功后隔日继续吸入相同浓度的卵蛋白生理盐水溶液, 直至用药结束。空白对照组用生理盐水雾化吸入。行为学评分标准: 鼻痒程度: 轻擦鼻几次, 记 1 分; 重度: 抓挠鼻、面不止, 到处磨擦记 2 分。喷嚏: 1~3 个为 1 分, 4~10 个为 2 分, 11 个以上为 3 分。流涕: 流至鼻前孔为 1 分, 超过鼻前孔为 2 分, 流涕满面为 3 分。各症状记分累计, 总分达到 5 分者为模型成功。观察时间为每次致敏动物后 30 min。

2.2 给药方法 中药鼻炎喷剂高, 中, 低剂量浓度分别为 1.88 g·mL⁻¹、0.94 g·mL⁻¹、0.47 g·mL⁻¹。于造模第 11 天起, 各组均每日滴鼻药 3 次, 中药鼻炎喷剂高, 中, 低剂量分别为 0.56, 0.28, 0.14 g·kg⁻¹·d⁻¹, 每次每侧鼻孔 10 μL 滴鼻。西药对照组用立复汀鼻喷雾剂 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹。每次每侧鼻孔 10 μL 滴鼻。模型组及空白对照组用等容积的 0.9% 生理盐水滴鼻。连续用药 15 d。

2.3 取材方法 末次给药后 1 h 用 2% OVA 生理盐水溶液雾化吸入激发动物, 腹主动脉放血处死动物。冰浴分离鼻腔鼻中隔鼻黏膜, 迅速放入 10% 中性甲醛溶液中固定。

2.4 鼻黏膜 ICAM-1、VCAM-1 表达的检测 用免疫组化染色法检测, 采用两步法(EnvisionTM)。取实验 2.3 所得之鼻黏膜, 常规 4 μm 石蜡切片, 贴在涂有切片黏合剂的干净载玻片上, 58℃ 烤 18 h, 常规二甲苯脱蜡至水; 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.4 PBS 洗 3×3 min, 抗原修复(AR) 95℃ 10 min×2, 自然冷却, PBS 洗 3×3 min; 适当稀释一抗, 4℃ 过夜, PBS 洗 3×3 min, 0.3% H₂O₂ 抑制内源性过氧化物酶; Envision 二抗(兔或羊) 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗 3×3 min; 0.05% DAB + 0.03% H₂O₂ 显色 10 min, 流水冲洗终止反应, 苏木素衬染 30 s, 水洗, 蓝化(37℃), 0.5% 盐酸乙醇分

化, 水洗蓝化; 常规树脂封片。阳性产物为棕黄色或呈棕褐色, 背景为紫蓝色。通过显微镜采集数字图像, 数字图像为标准的 BMP(位图) 文件格式。采用 IMS 细胞图像分析系统, 医学图像分析软件进行图像分析。显微镜倍数为 100, 进行距离测量定标后, 消除背景。选阴性区域、阳性区域进行测量。测量结果以免疫组化图像中阳性区域面积以及 OD 值表示。

2.5 统计方法 组间比较采用单因素方差分析, 采用 SPSS 11.5 for Windows 统计分析软件。

3 结果

3.1 鼻黏膜 ICAM-1 表达 结果见表 1。

表 1 鼻黏膜 ICAM-1 表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	阳性区域面积 (10 ³ μm ²)	OD 值
正常对照组	-	4.50 ± 1.17 ²⁾	0.047 ± 0.008 ²⁾
模型组	-	16.73 ± 5.18	0.101 ± 0.018
鼻炎喷剂组	0.56	7.22 ± 4.28 ²⁾	0.048 ± 0.007 ²⁾
	0.28	7.60 ± 2.65 ²⁾	0.079 ± 0.009 ¹⁾
	0.14	8.75 ± 1.60 ²⁾	0.067 ± 0.011 ²⁾
立复汀喷雾组	0.30	8.34 ± 4.27 ²⁾	0.058 ± 0.007 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01(下同)。

表 1 结果显示: 模型组鼻黏膜 ICAM-1 阳性区域面积较大, OD 值较高, 与正常对照组比较有显著差异(P < 0.01); 与模型组比较, 鼻炎喷剂各剂量组、立复汀喷雾组均显示 ICAM-1 阳性区域面积缩小、OD 值下降(分别为 P < 0.01、P < 0.05)。

3.2 鼻黏膜 VCAM-1 表达 结果表 2。

表 2 鼻黏膜 VCAM-1 表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	阳性区域面积 (10 ³ μm ²)	OD 值
正常对照组	-	2.62 ± 0.35 ²⁾	0.047 ± 0.008 ²⁾
模型组	-	10.15 ± 1.82	0.081 ± 0.007
鼻炎喷剂组	0.56	4.12 ± 0.74 ²⁾	0.051 ± 0.007 ²⁾
	0.28	4.21 ± 1.78 ²⁾	0.068 ± 0.007 ¹⁾
	0.14	5.43 ± 1.75 ²⁾	0.074 ± 0.007 ¹⁾
立复汀喷雾组	0.30	9.34 ± 1.92	0.078 ± 0.009

表 2 结果显示: 正常对照组鼻黏膜 VCAM-1 阳性细胞染色较少, 颜色较浅; 模型组阳性细胞染色较多, 颜色较深, 阳性染色主要表达在血管平滑肌细胞及内皮细胞胞浆中; 模型组鼻黏膜 VCAM-1 阳性区域面积和 OD 值均有明显增加, 与正常对照组比较

有显著差异($P < 0.01$)。与模型组比较,鼻炎喷剂各剂量组均显示 VCAM-1 阳性区域面积缩小,OD 值下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。而立复汀喷雾组 VCAM-1 阳性区域面积及 OD 值与模型组比较无显著差异($P > 0.05$)。

4 讨论

在多种炎性介质作用下,黏附分子可使内皮细胞与嗜酸性细胞、嗜碱性细胞和中性粒细胞产生黏附作用。

ICAM-1 和 VCAM-1 都是免疫球蛋白超家族的成员。ICMA-1 是淋巴细胞相关抗原-1(LFA-1)的配体,对变应性炎症中嗜酸细胞的聚集有重要作用,嗜酸性粒细胞表面的 LFA-1 受到刺激后迅速上调,与内皮细胞表达的 ICAM-1 相互作用,有助于嗜酸性粒细胞黏附^[4]。结果表明,模型组黏膜上皮细胞、固有层炎性细胞及血管内皮细胞均大量地表达 ICAM-1,而鼻炎喷剂各剂量及立复汀喷雾组均能降低 ICAM-1 在鼻黏膜中表达。

VCAM-1 主要表达在细胞因子活化的血管内皮细胞表面,能介导淋巴细胞和白细胞与内皮细胞的黏附作用,并能选择性地使嗜酸性细胞黏附至内皮细胞上。有研究表明 VCAM-1 在变应性鼻炎动物模型鼻黏膜固有层血管内皮及内皮细胞有较强表达^[5]。本实验结果发现模型组鼻黏膜固有层血管内

皮及上皮细胞有较强的阳性着色,说明被激活的血管内皮细胞大量表达 VCAM-1,鼻炎喷剂各剂量组均有一定降低 VCAM-1 在鼻黏膜中表达的作用。立复汀喷雾组对 VCAM-1 在鼻黏膜中表达无明显作用。

结果表明,鼻炎喷剂对黏附分子有较好的抑制作用,从而影响炎症细胞的聚集和迁移,这也可能是鼻炎喷剂治疗变应性鼻炎的机制之一。

[参考文献]

- [1] Nobuhisa T, Hironori S, Hideo Y, *et al.* The Effect of Anti-VLA-4 Monoclonal Antibody on Eosinophil Accumulation and Leukotriene Production in Nasal Mucosa [J]. *Acta Otolaryngol*, 1996, 116(6): 883-887.
- [2] Terashi Y, Yukawa T, Fukuda T, *et al.* Late phase response in the guinea pig airway caliber following inhaled antigen exposure [J]. *Jpn J Allergol*, 1988, 37(10): 980-981.
- [3] Yukawa T, Terashi Y, Fukuda T, *et al.* Histologic studies on guinea pig bronchi following inhaled antigen exposure [J]. *Jpn J Allergol*, 1987, 36(5): 227-237.
- [4] 张秋贵, 李 薇, 郑东淑, 等. 细胞间黏附分子-1 和白细胞介素-6 在变应性鼻炎鼻和支气管黏膜中的表达及意义 [J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2004, 18(5): 261-264.
- [5] 余洪猛, 臧朝平, 郑春泉, 等. 黏附分子在实验性变应性鼻炎鼻黏膜中的表达 [J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 2003, 38(6): 482-483.