

## 辛芷鼻敏胶囊对变应性鼻炎大鼠血清中细胞因子和鼻黏膜组织中相关基因表达的影响

杨清<sup>1</sup>, 马冬均<sup>3\*</sup>, 姜孝芳<sup>2</sup>, 王宏伟<sup>2</sup>, 司红莉<sup>2</sup>, 高丽<sup>2\*</sup>

1. 新疆医科大学第六附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830002

2. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830002

3. 乌鲁木齐市第一人民医院, 新疆 乌鲁木齐 831400

**摘要:** **目的** 探讨辛芷鼻敏胶囊对变应性鼻炎大鼠的血清中白细胞介素-5 (IL-5)、白细胞介素-13 (IL-13) 和鼻黏膜组织中的 eotaxin、CCR3、信号转导和转录激活因子-6 (STAT6) 基因表达的影响, 探讨其可能的作用机制。 **方法** 采用卵白蛋白制备变应性鼻炎大鼠模型。造模后大鼠随机分为模型组、辛芷鼻敏胶囊 (2.3 g/kg) 组、鼻炎康 (1.8 g/kg) 阳性对照组, 每天给药 1 次, 连续给药 10 d, 另设对照组。ELISA 法检测各组大鼠血清 IL-5、IL-13 水平; 用原位杂交 (ISH) 法半定量检测鼻黏膜中 eotaxin、CCR3、STAT6 基因的表达。 **结果** 辛芷鼻敏胶囊组大鼠血清 IL-5、IL-13 水平和鼻黏膜中 STAT6 基因表达明显低于模型组及鼻炎康组 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 辛芷鼻敏胶囊可能通过下调 STAT6 基因表达, 抑制大鼠变应性鼻炎发病过程中 IL-5、IL-13 的水平, 达到减少嗜酸性粒细胞浸润进而改善变应性鼻炎症状的目的。

**关键词:** 辛芷鼻敏胶囊; 变应性鼻炎; 细胞因子; 基因表达; 免疫调节

中图分类号: R987; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)20-2889-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.018

## Effects of Xinzhi Bimin Capsule on cytokines in serum and expression of related genes in nasal mucosa of rat model with allergic rhinitis

YANG Qing<sup>1</sup>, MA Dong-jun<sup>3</sup>, JIANG Xiao-fang<sup>2</sup>, WANG Hong-wei<sup>2</sup>, SI Hong-li<sup>2</sup>, GAO Li<sup>2</sup>

1. Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical College, Urumqi 830002, China

2. Xinjiang Medical College, Urumqi 830002, China

3. Urumqi First People's Hospital, Urumqi 831400, China

**Abstract: Objective** To explore the effects of Xinzhi Bimin Capsule (XBC) on the contents of interleukin (IL)-5 and IL-13 in serum and the expression of eotaxin, CCR3, and signal transducers and activators of transcription-6 (STAT6) in nasal mucosa of rat models with allergic rhinitis, and to identify the mechanism of pharmacodynamic action. **Methods** The allergic rhinitis rat model was established using ovalbumin, and forty rats were randomly divided into four groups, model, normal control, XBC (1.8 g/kg), and Biyan Kang Tablet (1.8 g/kg, positive control) groups. The rats were administered once daily for 10 d. The contents of IL-5 and IL-6 were detected by ELISA, and the expression of positive cell of eotaxin, CCR3, and STAT6 in nasal mucosa was detected in semi quantity by *in situ* hybridization (ISH) method. **Results** The expression of STAT6 in nasal mucosa and the levels of IL-5 and IL-13 in blood serum were markedly lower in XBC group than those in the model and positive control groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** XBC could reduce the expression of eotaxin, CCR3, and STAT6 in nasal mucosa of rats and down-regulate the contents of IL-5 and IL-13 in serum, so as to decrease the eosinophil infiltration and to treat allergic rhinitis in rats.

**Key words:** Xinzhi Bimin Capsule; allergic rhinitis; cytokine; gene expression; immuno-regulation

变应性鼻炎是临床常见的慢性疾病, 是由于机体向上呼吸道聚集, 释放大量相关炎症因子造成的体内发生一系列免疫失衡反应, 导致大量的炎症细胞鼻黏膜炎症反应, 以鼻痒、喷嚏、鼻分泌亢进、

收稿日期: 2012-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30560144); 新疆维吾尔自治区高校科研计划重点项目 (XJEDU20061041)

作者简介: 杨清 (1975—), 男, 硕士, 主治医师。Tel: (0909)2657560 E-mail: xjmuyq75@sina.com

\*通信作者 高丽 E-mail: xjmugaoli@gmail.com

马冬均 E-mail: madongjunxin@163.com

鼻黏膜肿胀等为主要临床表现。辛芷鼻敏胶囊是高丽等<sup>[1]</sup>根据新疆“风、寒、燥”气候特点,以调节机体免疫、扶正脱敏为切入点,研制开发的治疗变应性鼻炎的中药,由白芷、辛夷花、苍耳子、鹅不食草、葱白、黄芪、五味子、一枝蒿等组成,临床疗效显著。药理学实验表明,辛芷鼻敏胶囊对变应性鼻炎大鼠模型具有一定的抗炎和免疫调节作用。白细胞介素(IL)-5、IL-13、eotaxin 是嗜酸性粒细胞(EOS)特异性趋化因子,IL-13 依赖于 IL-5 和 eotaxin 诱导嗜酸性粒细胞<sup>[2-4]</sup>。本实验探讨辛芷鼻敏胶囊对变应性鼻炎发病过程中 IL-5、IL-13、eotaxin 的影响,以明确辛芷鼻敏胶囊的作用机制,为其用于变应性鼻炎的临床治疗提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

辛芷鼻敏胶囊(Xinzhi Bimin Capsule, XBC),新疆医科大学中医学院实验中心提供;鼻炎康片(由广藿香、苍耳子、鹅不食草、麻黄、野菊花、当归、黄芩、猪胆粉、薄荷油、马来酸氯苯那敏等组成),佛山德众药业有限公司,批号 08079;卵白蛋白(V级),美国 Sigma 公司;大鼠 IL-13、IL-5 ELISA 试剂盒,美国 ADL 公司;STAT6 mRNA 原位杂交检测试剂盒,天津灏洋生物制品科技有限责任公司。

### 1.2 动物

清洁级 SD 大鼠,体质量 180~200 g,雌雄各半,由新疆医科大学动物实验中心提供,许可证号 SCXK(新)2003-0001。适应喂养 2 d 后开始造模。

### 1.3 仪器

Bio-Rad Model 500 酶标分析仪,美国 Bio-Rad 公司;Olympus CX31 光学显微镜,日本 Olympus 公司;SC-2546 离心机,中佳科大创新股份有限公司。

## 2 方法

### 2.1 分组与模型的制备<sup>[5-6]</sup>

大鼠随机分为 4 组:对照组、模型组、鼻炎康阳性对照组、辛芷鼻敏胶囊组,每组 10 只,雌雄各半,分笼饲养,每笼 5 只。除对照组外,模型组用 30 mg 卵白蛋白作抗原,氢氧化铝粉末 3 g 作佐剂,加生理盐水 100 mL 制成混悬液,每只鼠 ip 1 mL,隔日 1 次,共注射 7 次,为基础致敏。完成基础致敏的次日用 5%卵白蛋白生理盐水攻击双侧鼻腔,每侧 50  $\mu$ L,每日 1 次,共 10 次。对照组给予等量生理盐水,方法同上。

### 2.2 给药

造模完成后开始给药。先将药物充分研磨,然后用蒸馏水配成混悬液 ig 给药。辛芷鼻敏胶囊组大鼠给予辛芷鼻敏胶囊 2.30 g/kg<sup>[7]</sup>(给药量按前期实验中剂量给药,鉴于中、高剂量均能达到良好疗效,故只选用中剂量),鼻炎康组大鼠给予鼻炎康 1.80 g/kg,每天 1 次,每次 2 mL,连续给药 10 d。对照组、模型组 ig 等体积生理盐水。

### 2.3 行为学观察

每次给予卵白蛋白和试药后均进行行为学观察 30 min,内容包括喷嚏、搔抓、流涕等。从各给药组第 1 次给药后第 2 日起,隔日记录大鼠行为学得分<sup>[2-3]</sup>(评分标准见表 1),计算总分,总分超过 5 分者为造模成功。

表 1 大鼠变应性鼻炎症状评分标准

Table 1 Score standard of symptoms of allergic rhinitis in rats

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	各计 1 分	各计 2 分	各计 3 分

### 2.4 样品采集与处理

**2.4.1 血清制备** 给药结束后,大鼠滴鼻卵白蛋白,2 h 后使用采血针眼球内眦取全血 3 mL,3 000 r/min 离心 10 min,血清分别置于 Enppendorf 管中,置-80  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

**2.4.2 鼻中隔黏膜样品制备** 大鼠取全血后 ip 10%水合氯醛 300 mg/kg 麻醉,处死,剥去大鼠上颌骨部皮肤,将上颌骨从颅骨中游离,取鼻中隔黏膜,固定于 10%中性甲醛溶液中,石蜡包埋,制成 4  $\mu$ m 厚切片,常规切片行 HE 染色,光镜下观察( $\times 160$ )组织学改变。

### 2.5 ELISA 法检测血清 IL-5、IL-13 水平

取“2.4.1”项下血清样本检测各组大鼠血清 IL-5、IL-13 水平,具体操作严格按相关试剂盒使用说明进行,酶标仪上测定 450 nm 波长处各孔吸光度(A)值,根据标准曲线计算 IL-5、IL-13 的质量浓度(敏感度为 1.0 pg/mL)。

### 2.6 原位杂交(ISH)法半定量检测鼻黏膜相关基因的表达

取“2.4.2”项下鼻黏膜样本,每张切片随机选取至少 5 个高倍视野,高倍光镜下( $\times 400$ )用图像

分析仪软件测定大鼠鼻黏膜 A 值, 该值作为该切片的代表值<sup>[4]</sup>, eotaxin、嗜酸性粒细胞趋化因子受体 3 (CCR3)、STAT6 mRNA 原位杂交过程, 比较鼻黏膜组织转录 eotaxin、CCR3、STAT6 mRNA 表达。鼻黏膜样本烤片 0.5 h, 石蜡切片, 脱蜡, 水化, 自来水、蒸馏水各洗 1 次, 去除内源性过氧化物酶。抗原修复, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 遍, 每次 5 min, 0.2×SSC 室温下洗 1 次 (3 min)。滴加预杂交工作液覆盖组织, 预杂交后洗涤; 滴加杂交工作液覆盖组织, 洗涤; 滴加小鼠抗地高辛生物素标记的抗体工作液, 高敏过氧化物酶链亲和素复合物工作液覆盖组织, DAB 显色, 蒸馏水冲洗, 盐酸乙醇快速洗一下, PBS 返蓝 10 min, 中性树脂封片保留。光学显微镜下观察, 细胞浆显棕黄色颗

粒为阳性反应。苏木素复染, 胞核为蓝色。

### 2.7 统计学处理

采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间计量资料采用单因素方差分析, 相关性研究采用 Pearson 直线相关检验。

## 3 结果

### 3.1 对变应性鼻炎大鼠行为的影响

除对照组外, 其他各组大鼠在第 7 次鼻腔给予卵白蛋白后, 均出现变应性鼻炎症状, 即频繁抓鼻、连续喷嚏、流清涕。给药后, 辛芷鼻敏胶囊组大鼠变应性鼻炎症状较模型组、鼻炎康组轻 ( $P < 0.05$ ); 在给药第 8 天, 辛芷鼻敏胶囊组大鼠仅有轻微抓鼻动作, 喷嚏偶见, 几乎没有鼻涕, 而鼻炎康组大鼠仍有少量清涕, 有抓鼻动作、喷嚏出现。结果见表 2。

表 2 辛芷鼻敏胶囊对变应性鼻炎大鼠鼻部症状评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of XBC on scores of nasal characters in rats with allergic rhinitis ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	给药后鼻部症状评分				
		第 2 天	第 4 天	第 6 天	第 8 天	第 10 天
对照	—	0.8±0.4	0.7±0.5	0.8±0.3	0.7±0.6	0.7±0.3
模型	—	6.4±0.5**	6.5±0.5**	6.7±0.5**	6.6±0.4**	6.7±0.2**
辛芷鼻敏胶囊	2.30	5.7±0.9	4.9±0.9	3.7±0.7	2.6±0.7 <sup>▲△</sup>	2.1±0.9 <sup>▲△</sup>
鼻炎康片	1.80	6.1±0.8	5.7±0.5	4.3±0.8	3.6±0.6 <sup>△</sup>	3.3±0.5 <sup>△</sup>

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与鼻炎康片组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs Biyankang Tablet group

### 3.2 对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜组织病理学的影响

HE 染色后光镜下观察可见, 对照组大鼠鼻黏膜组织结构清晰, 鼻黏膜无水肿, 充血, 可见黏膜上皮层和固有层。模型组大鼠鼻黏膜固有层充血、水肿, 黏膜下层呈病理性腺体增生, 血管增生, 并有大量炎性细胞及嗜酸性粒细胞浸润, 鼻黏膜表面纤毛破坏。鼻炎康组有轻微的鼻黏膜表面纤毛破坏

及散在的嗜酸性粒细胞及炎性细胞浸润; 辛芷鼻敏胶囊组鼻黏膜组织结构完整, 可见少量嗜酸性粒细胞浸润, 无充血、水肿, 腺体增生明显减轻。结果见图 1。

### 3.3 对变应性鼻炎大鼠血清 IL-5 和 IL-13 水平的影响

与模型组相比, 辛芷鼻敏胶囊组大鼠血清 IL-13、IL-5 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。与鼻炎康组

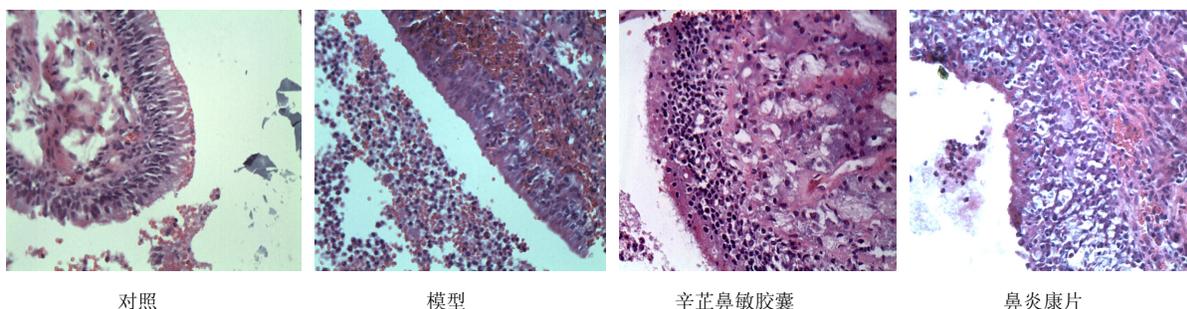


图 1 各组大鼠鼻黏膜组织病理学观察

Fig. 1 Pathological observation of nasal mucosa of rats in each group

相比, 辛芷鼻敏胶囊组大鼠 IL-13、IL-5 水平也显著降低。结果见表 3。

表 3 辛芷鼻敏胶囊对变应性鼻炎大鼠血清 IL-13 和 IL-5 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of XBC on levels of IL-13 and IL-5 in rats with allergic rhinitis ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	IL-13 / (pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-5 / (pg·mL <sup>-1</sup> )
对照	—	33.11 ± 1.33	2.68 ± 0.103
模型	—	48.80 ± 0.99*	2.95 ± 0.059*
辛芷鼻敏胶囊	2.30	42.81 ± 1.38 <sup>△</sup>	2.80 ± 0.076 <sup>△</sup>
鼻炎康片	1.80	44.91 ± 0.43 <sup>△</sup>	2.90 ± 0.035 <sup>△</sup>

与对照组比较: \*P<0.05; 与模型组比较: <sup>△</sup>P<0.05; 与鼻炎康片组比较: <sup>▲</sup>P<0.05, 表 4 同

\*P < 0.05 vs control group; <sup>△</sup>P < 0.05 vs model group; <sup>▲</sup>P < 0.05 vs Biyankang Tablet group, same as Table 4

表 4 辛芷鼻敏胶囊对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜 STAT6、eotaxin 和 CCR3 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of XBC on expression of eotaxin, CCR3, and STAT6 in nasal mucosa of rats with allergic rhinitis ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	STAT6	eotaxin	CCR3
对照	—	0.103 ± 0.012	0.090 ± 0.030	0.080 ± 0.032
模型	—	0.210 ± 0.014*	0.200 ± 0.016	0.182 ± 0.029
辛芷鼻敏胶囊	1.80	0.157 ± 0.008 <sup>△</sup>	0.178 ± 0.010 <sup>△</sup>	0.153 ± 0.020 <sup>△</sup>
鼻炎康片	2.30	0.167 ± 0.007 <sup>△</sup>	0.168 ± 0.011 <sup>△</sup>	0.126 ± 0.019 <sup>△</sup>

其配体是 eotaxin、eotaxin-2、eotaxin-3, CCR3 最强激动剂系 eotaxin<sup>[9]</sup>; 而 eotaxin 及其受体 CCR3 与变应性鼻炎的发生、发展密切相关。Eotaxin 主要通过嗜酸性粒细胞表面的 CCR3 发挥作用<sup>[10]</sup>。有研究认为, IL-13 依赖于 IL-5 和 eotaxin 诱导嗜酸性粒细胞, 因而提示 IL-13 激动剂可促进 IL-5 和 eotaxin 产生<sup>[11]</sup>。Schmid-Grendelmeier 等<sup>[4]</sup>发现人嗜酸性粒细胞通过人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或 IL-5 产生功能性 IL-13, IL-13 促进 IL-5 和 eotaxin 在肺组织中产生, IL-5 和 eotaxin 通过 EOS 调控 Th2 细胞因子的功能和 IL-13 的释放。可见细胞因子、趋化因子和转录调控信号间共同与免疫细胞存在复杂网络调控。

变应性鼻炎是由 Th2 细胞免疫主导的 I 型超敏反应在鼻黏膜局部的表现<sup>[12]</sup>, STAT6 是信号转导和转录激活因子 (STAT) 家族的一种蛋白质, 是 Th2 分化的特异性转录因子, 可促进 Th2 细胞增殖和产生 IL-4、IL-13 等 Th2 细胞因子, 是变应性鼻炎发

### 3.4 对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜相关基因表达的影响

与对照组相比, 模型组大鼠鼻黏膜 STAT6 基因大量表达 (P<0.05), 而 eotaxin 和 CCR3 基因表达无显著改变。与模型组相比, 辛芷鼻敏胶囊组大鼠鼻黏膜 STAT6、eotaxin、CCR3 基因表达显著下调 (P<0.05), 且对 STAT6 基因表达的作用强于鼻炎康片组 (P<0.05)。结果见表 4。

### 4 讨论

变应性鼻炎的病理学特征是局部鼻黏膜组织中 EOS 浸润, 而 EOS 的趋化、募集、浸润对治疗变应性鼻炎具有重要意义, 故 EOS 被认为是变应性鼻炎发病中关键的效应细胞<sup>[8]</sup>。随着变应性疾病发病机制的基本免疫反应中免疫细胞和炎性介质等基本环节被阐明, 细胞因子在变应性炎症中的调节作用也逐渐清晰。CCR3 分布广泛, 主要表达于 EOS,

病机制的重要原因。本实验结果显示, 变应性鼻炎大鼠鼻黏膜 STAT6 基因大量表达, 在外周血中 IL-13、IL-5 水平均显著升高; 辛芷鼻敏胶囊给药后, 大鼠鼻黏膜 STAT6 基因表达明显下调, 外周血中 IL-13、IL-5 水平明显降低, 进一步证实 IL-13、IL-5、STAT6 基因在变应性鼻炎发病机制中具有重要作用, 进而推测它们可能成为辛芷鼻敏胶囊治疗变应性鼻炎的新靶点。

实验结果还表明, 辛芷鼻敏胶囊能降低鼻部症状积分, 改善变应性鼻炎症状, 改善鼻黏膜病理组织的结构, 有效控制变应性鼻炎的发作, 减少鼻黏膜局部嗜酸性粒细胞的浸润与 IgE 合成, 从而抑制鼻黏膜的炎性反应。总之, 辛芷鼻敏胶囊通过降低 IL-5、IL-13 水平和 eotaxin、CCR3 的表达, 减轻变应性鼻炎的慢性炎症反应, 这为变应性鼻炎治疗的新靶点提供了实验依据。

### 参考文献

[1] 黄选兆, 汪吉宝. 实用耳鼻咽喉科学 [M]. 北京: 人民

- 卫生出版社, 1998.
- [2] 高丽, 王鹿, 安扬, 等. “鼻炎清胶囊”对变应性鼻炎大鼠药效实验观察 [J]. 新疆医科大学学报, 2002, 25(3): 249-250.
- [3] Blease K, Jakubzick C, Westwick J, *et al.* Therapeutic effect of IL-13 during chronic experimental fungal asthma [J]. *J Immunol*, 2001, 166(8): 5219-5224.
- [4] Schmid-Grendelmeier P, Altnauer F, Fischer B, *et al.* Eosinophils express functional IL-13 in eosinophilic inflammatory diseases [J]. *J Immunol*, 2002, 169(2): 1021-1027.
- [5] 变应性鼻炎诊断及疗效评定标准 [S]. 1998.
- [6] Kaplan M H, Grusby M J. Regulation of T helper cell differentiation by STAT molecules [J]. *J Leukoc Biol*, 1998, 64(1): 2-5.
- [7] 杨清, 李建荣, 姜孝芳, 等. 辛芷鼻敏胶囊对变应性鼻炎大鼠的药效学实验研究 [J]. 中国实验方剂学, 2009, 15(6): 66-68.
- [8] 刘建国, 杨政, 刘月辉. 变应性鼻炎大鼠模型建造 [J]. 江西医学院学报, 2008, 48(5): 33-37.
- [9] Ye J, Kohli L L, Stone M J. Characterization of binding between the chemokine eotaxin and peptides derived from the chemokine receptor CCR3 [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(35): 27250-27257.
- [10] 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(5): 304-306.
- [11] Pope S M, Brandt E B, Mishra A, *et al.* IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5 and eotaxin-dependent mechanism [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108(4): 594-601.
- [12] Rosenwasser L. New insights into the pathophysiology rhinitis [J]. *Allergy Asthma Proc*, 2007, 28(1): 10-15.