

脾气虚与变应性鼻炎模型大鼠相关机理的研究

王宇, 严道南* (南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210046)

摘要:目的 建立脾气虚变应性鼻炎病证复合模型, 探讨脾气虚体质与变应性鼻炎发病的内在联系, 为临床运用温阳益气法治疗变应性鼻炎提供实验依据。方法 利用大黄泻下法、饮食不节加劳倦过度等综合因素再加上卵清蛋白建立脾气虚变应性鼻炎动物模型, 运用温阳益气的中药进行药物反证。结果 观察模型动物出现的鼻部症状(鼻痒、喷嚏、清涕)、鼻分泌物及血中嗜酸粒细胞(EOS), 被动皮肤免疫反应(PCA)试验作用明显, 大鼠血清中 IL-5、嗜酸性细胞阳离子蛋白(ECP)含量升高($P < 0.01$); 而经过中药治疗后的模型组症状减轻, 大鼠血清中 IL-5、ECP 含量降低($P < 0.01$)。结论 在同样的致敏原作用下, 脾气虚动物较正常动物更易于造成变应性鼻炎模型, 而温阳益气方对脾气虚变应性鼻炎模型大鼠有一定治疗效应。

关键词:脾气虚; 变应性鼻炎; 复合模型

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-5005(2011)02-0140-04

Related Mechanism Between Spleen-qi Deficiency and Allergic Rhinitis in Rats

WANG Yu, YAN Dao-nan*

(The First Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a compound model of allergic rhinitis caused by spleen-qi deficiency and to explore the internal relation between spleen-qi deficient constitution and allergic rhinitis so as to provide experimental evidence for applying the method of warming yang and invigorate qi into clinic. **METHODS** The allergic rhinitis models caused by spleen-qi deficiency was set up though purgative therapy of Dahuang, improper diet, overtiredness as well as ovalbumin and then the method of warming yang and invigorating qi was used to treat the condition. **RESULTS** The model animals appeared of nasal symptoms (nasal itching, sneezing, and nasal mucus), nasal secretions and blood acidophilus granulocyte (EOS), the passive-cutaneous-anaphylaxis (PCA) test showed obvious positive, and rat serum IL-5, eosinophilic cells cationic protein (ECP) content increased ($P < 0.01$). After herbal treatment, the symptoms of the model group were reduced, and the content of IL-5 and ECP in rats' serum lowered. **CONCLUSION** Animals with spleen-qi deficiency are more likely to have allergic rhinitis compared with normal ones under the same condition of sensitization, so warming yang and invigorating qi Fang has certain efficacy in treating allergic rhinitis caused by spleen-qi deficiency.

KEY WORDS: Spleen-qi deficiency; Allergic rhinitis; Compound model

变应性鼻炎(AR)是一种由易感个体接触致敏变应原后导致的包含 IgE 介导的炎症介质(主要是组胺)的释放和多种免疫活性细胞、细胞因子参与的鼻黏膜慢性炎症性疾病。主要临床表现有鼻塞、流鼻涕、鼻痒、打喷嚏以及嗅觉功能障碍等。祖国医学认为本病病位在肺, 与脾肾有关。许多现代研究表明, 变应性鼻炎脾气虚证较多见^[1]。本实验采用制作脾气虚模型和脾气虚 AR 证病复合模型的方法, 试图为探讨脾虚与变应性鼻炎的

相关性提供实验资料, 现将结果报道如下。

1 材料

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠 50 只, 体质量 200~220 g, 雌雄各半, 由南京中医药大学实验动物中心提供, 随机分为 5 组, 即: 空白组; 脾气虚模型组; AR 组; 脾气虚 + AR 组; 脾气虚 + AR + 中药组, 每组 10 只。

1.2 仪器与试剂

收稿日期: 2010-11-09; 修稿日期: 2010-12-28

基金项目: 国家科技部“十一五”支撑计划(2007BAI20B037)

作者简介: 王宇(1985-), 男, 江苏南京人, 南京中医药大学 2004 级 7 年制硕士研究生。* 通信作者: yandaonan2006@yahoo.com.cn

1.2.1 试剂

实验用卵白蛋白(美国 SIGMA 公司生产);伊文思兰(中国医药集团上海化学试剂公司);氢氧化铝粉末(上海美兴化工有限公司);嗜酸性粒细胞直接计数液,南京建成生物工程研究所;大鼠 IL-5、ECP 试剂盒(美国 RD 公司生产,上海韵涵生物科技公司分装)。

1.2.2 仪器

高速台式离心机,南京大学南达生物技术开发公司;电子天平(FA2004)上海良平仪器仪表有限公司;显微镜(Olympus AX80 型日本);隔水式恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;自动酶标读数仪 ELX-800 美国 BIOTEK 生产;数显恒温水浴锅,南京大学普阳科学仪器研究所。

1.2.3 中药制备

实验所用中药材由南京中医药大学附属医院中药房提供。

1)100%大黄冷浸液:取生大黄按 1:5 比例加水,浸泡 24 h,文火煎 15 min,自然冷却,4 层纱布过滤,于 80℃ 的恒温水浴里浓缩成相当于生药 1 g/mL 浓度的溶液,放入 4℃ 冰箱冷藏备用。

2)温阳益气方:由黄芪、党参、白术、防风、陈皮、乌梅、地龙、甘草等组成,所需药材加水浸泡 1 h,煮沸 2 次,每次 1 h,过滤后并浓缩滤液,每 mL 含生药 1.5 g,放冰箱冷藏备用。

2 方法与结果

2.1 造模方法

2.1.1 AR 模型

按文献^[2-3]的方法 AR 组实验组动物以卵白蛋白 0.3 mg 作抗原,氢氧化铝粉末 30 mg 作佐剂,加生理盐水 1 mL 形成混悬液,腹腔内注射,隔日 1 次,共 7 次。腹腔注射完成后的第 2 天,行被动皮肤免疫反应(passive-cutaneous-anaphylaxis, PCA)试验,确定 OVIgE 抗体效价升高后,每侧鼻腔均以 5% 卵白蛋白溶液 10 μ L 局部免疫,每日 1 次,共 7 次。

2.1.2 脾气虚模型

参照文献^[4]脾气虚组采用大黄法、游泳力竭法、饥饿法等多因素复合伤脾的方法,即:①每日上午以 3 mL/只灌服大黄制剂液,日 1 次;②每日下午于大鼠尾部缠绕质量为该大鼠体质量 10% 的保险丝,放入水深 50 cm、水温 20℃ 的水槽中游泳,以力竭为度——大鼠鼻尖没入水面 10

s,每日 1 次;③控制饮食,每日上午 8:00 给食,下午 8:00 撤食。共 21d。

2.1.3 复合模型

脾气虚 AR 组先造成脾气虚模型,再造 AR 病证复合模型,造模方法同 AR 组实验动物。

2.1.4 复合模型中药组

对大鼠脾气虚及致敏造模方法同复合模型组,在鼻腔局部攻击开始的第 1 天,用温阳益气方 5.85 g/kg 灌胃,每日 1 次,共 7 d。

空白组不作任何处理。

2.2 观察指标

2.2.1 动物的一般情况

从造模第 1 天开始,观察动物的一般状态:包括摄食、饮水、大小便性状、体质量、活动情况,着重鼻部症状观察,鼻痒、喷嚏、鼻分泌物等情况。

鼻部症状观察:每次鼻腔激发后 30 min 内,分别观察动物搔鼻动作,喷嚏、流清涕等鼻部症状,各指标采用叠加量化记分法。鼻痒:抓鼻 1~5 次为 1 分,5 次以上为 2 分;喷嚏:1~3 个为 1 分,4~10 个为 2 分,11 个以上为 3 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。将每只大鼠 7 次激发得分的均数作为该大鼠的行为学计分^[5]。若计分 > 5 分,则证明变应性鼻炎模型复制成功。

2.2.2 PCA 试验

正常组、脾气虚组大鼠用 0.1 mL 生理盐水皮内注射,AR 组、脾虚 AR 组及脾虚 AR 中药组大鼠用含有 1 mg 卵清蛋白和 1% 伊文斯兰混合液 0.1 mL 皮内注射,30 min 后观察注射部位的皮肤硬结和染料扩散情况,当直径 < 5 mm 记为(-)、直径在 5~10 mm 之间记为(±)、直径 > 10 mm 记为是(+)PCA 反应。若 PCA 反应阳性证明大鼠体内有 OVA 特异抗体,表示造模(过敏模型)成功。

2.2.3 鼻腔分泌物、血嗜酸细胞(EOS)及血清中 IL-5、ECP 的含量测定

于末次鼻腔局部致敏后 30 min,将各组大鼠以 10% 水合氯醛注射液按 3 mg/kg 腹腔注射麻醉,眼眶取血 20 μ L 加入 0.38 mL 嗜酸性粒细胞直接计数液中混匀,滴入血球计数板低倍镜下计数嗜酸性粒细胞,将大鼠处死,并将上颌骨从颅骨中游离出来,沿鼻中线剪开鼻腔,暴露鼻中隔及双侧鼻腔。用小棉签取鼻中隔表面分泌物涂片,用

瑞氏-姬姆萨染,共计数 200 个白细胞,计算嗜酸性粒细胞(EOS)的阳性率。血清 IL-5、ECP 检测,采用 ELISA 法。具体操作方法严格按使用说明书进行,于酶标仪 450 nm 处读吸光度值,根据标准曲线计算血清中和 IL-5、ECP 含量。

2.3 统计学方法

数据用 SPSS 12.0 统计软件处理。计数资料采用卡方检验,计量资料采用单因素方差分析及非参数检验。

2.4 结果

2.4.1 一般情况

脾虚组、脾虚 AR 组及脾虚 AR 中药组进行脾气虚模型造模后,出现反应迟钝、精神不振、毛

发枯槁、稀疏易脱落、便溏、腹泻、脱肛、喜扎堆等症状。AR 组、脾虚 AR 组及脾虚 AR 中药组动物在变应性鼻炎模型造模 10 min 内,均不同程度地出现了抓鼻和喷嚏、流涕症状,脾虚 AR 组及脾虚 AR 中药组积分比 AR 组高,表明这 2 组的症状比 AR 组更为严重。随着给药时间的延长,上述症状逐渐加重,而脾虚 AR 中药组在局部致敏后第 3 天,鼻部症状积分与脾虚 AR 组相似,至第 5 天,脾虚 AR 中药组症状积分比脾虚 AR 组低($P<0.05$),到实验结束时,其积分值明显比脾虚 AR 组低,表明脾虚 AR 中药组在用药期间激发时症状(鼻痒、喷嚏、清涕)逐渐减轻,与脾虚 AR 组相比有统计学($P<0.05$)意义(表 1)。

表 1 各组动物鼻部症状评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	n	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
空白组	10	1.25±0.86**	1.27±1.08**	1.78±0.92**	1.21±0.94**
脾虚组	10	3.03±0.65 $\Delta\Delta$ **	3.56±0.62 $\Delta\Delta$ **	4.07±0.70 $\Delta\Delta$ **	4.16±0.69 $\Delta\Delta$ **
AR 组	10	4.09±0.97 $\Delta\Delta$ *	4.54±1.11 $\Delta\Delta$	5.19±0.92 $\Delta\Delta$	5.66±0.97 $\Delta\Delta$
脾虚 AR 组	10	5.04±1.02 $\Delta\Delta$	5.49±1.27 $\Delta\Delta$	5.88±1.08 $\Delta\Delta$	5.95±0.84 $\Delta\Delta$
脾虚 AR 中药组	10	5.09±0.55 $\Delta\Delta$	5.01±0.80 $\Delta\Delta$	4.83±0.65 $\Delta\Delta$ *	4.05±0.76 $\Delta\Delta$ **

注:与空白组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与脾虚 AR 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

2.4.2 PCA 试验

末次腹腔注射卵清蛋白后,对各组大鼠进行 PCA 试验,结果见表 2。结果表明各造模组致敏成功。实验结束取材时,空白组与脾气虚组血清接种的大鼠背部未见蓝圈反应。说明 AR 组、脾虚 AR 组、脾虚 AR 中药组 AR 模型造模成功。

表 2 各组大鼠 PCA 试验结果比较(只)

组别	n	PCA 试验结果		
		-	±	+
空白组	10	10	0	0
脾虚组	10	10	0	0
AR 组	10	0	1	9
脾虚 AR 组	10	0	0	10
脾虚 AR 中药组	10	0	0	10

2.4.3 用药后各组大鼠鼻腔分泌物及血嗜酸细胞(EOS)的含量的变化

表 3 结果表明,脾气虚组、AR 组、脾气虚 AR 组与空白组相比,鼻腔分泌物中 EOS 百分率均有显著升高($P<0.05$, $P<0.01$);而脾气虚 AR 中药组与空白组比较,无显著差异($P>0.05$)。脾气虚 AR 组与空白组、脾气虚组、AR 组、脾气虚 AR

中药组比较鼻腔分泌物中 EOS 百分率显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。血中 EOS 含量以脾气虚 AR 组最高,AR 组次之,与空白组相比有显著差异($P<0.05$),而脾气虚 AR 中药组与空白组比较,无显著差异($P>0.05$)。

表 3 各组大鼠鼻腔分泌物、血 EOS 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	鼻腔分泌物	
		EOS/%	血 EOS $\times 10^9/L$
空白组	10	1.28±0.40**	1.35±0.94
脾虚组	10	1.74±0.54 Δ **	1.69±0.43
AR 组	10	2.27±0.64 $\Delta\Delta$ *	2.09±0.44 Δ
脾虚 AR 组	10	2.94±0.43 $\Delta\Delta$	2.41±0.70 Δ
脾虚 AR 中药组	10	1.83±0.73**	1.87±0.95

注:与空白组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与脾虚 AR 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

2.4.4 用药后各组大鼠血清中 IL-5、ECP 含量的变化

表 4 结果显示,AR 组、脾气虚 AR 组大鼠血清中 IL-5 含量与空白组相比有显著性差异($P<0.01$);脾气虚、AR 组、脾气虚 AR 组血清中 ECP 含量与空白组相比显著升高($P<0.05$, $P<0.01$);脾气虚 AR 中药组与脾气虚 AR 组相比,

有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);而与空白组比较,无显著差异($P > 0.05$),提示,温阳益气方能调节血清中的 IL-5、ECP 含量。

表 4 各组大鼠血清中 IL-5、ECP 的含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-5		ECP	
		/(pg · mL ⁻¹)		/(ng · mL ⁻¹)	
空白组	10	45.33 ± 6.35**	1.29 ± 0.20**		
脾虚组	10	47.81 ± 3.55**	1.50 ± 0.21 [△] *		
AR 组	10	53.18 ± 4.91 ^{△△} *	1.72 ± 0.32 ^{△△}		
脾虚 AR 组	10	59.93 ± 9.06 ^{△△}	1.86 ± 0.39 ^{△△}		
脾虚 AR 中药组	10	48.63 ± 2.94**	1.36 ± 0.38***		

注:与空白组比较,△ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$;与脾虚 AR 组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

AR 是 IgE 介导的 I 型变态反应性疾病,其发病机理复杂,有多种炎症细胞及多种细胞因子参与,其中嗜酸性粒细胞(EOS)作为变态反应主要效应细胞,其功能与其所产生和释放的化学性介质,颗粒相关蛋白和某些细胞因子有关。嗜酸性粒细胞产生的强碱性蛋白颗粒,如 ECP 和 MBP 等,具有很强的细胞毒性和神经毒性。这种 EOS 既存在于组织中,又存在于循环血液中,因此激活的 MC 脱颗粒不仅可激发鼻部症状,而且可以改变 EOS 的密度,使 EOS 的代谢活性大大增强,释放其内的颗粒,导致组织的炎症^[6],进而产生一系列 AR 的临床症状。

研究发现,IL-5 是调节 EOS 功能最重要的细胞因子,在变态反应性炎症组织中处于枢纽地位^[7],促进变应性鼻炎等变态反应性疾病的发生。

ECP 反映了 EOS 的活化程度,已被看作是变态反应性炎症活化的指标,具有一定的致炎作用,许多研究表明 ECP 可诱导嗜碱细胞和肥大细胞释放组胺从而诱发 AR^[8]。

祖国医学认为,脾主运化,为后天之本,气血生化之源,脾虚易致水湿运化失常,且机体抵抗力下降,易受外邪的侵袭,这可能是导致变应性鼻炎发病的重要原因之一。

本实验结果显示脾虚组大鼠模型造模结束后均出现了脾虚症状,如逐渐消瘦、便溏甚至腹泻、反应迟钝、活动减少、毛发失去光泽等,提示脾虚

实验模型的成功。在基础致敏 2 周后,应用 OV 进行鼻腔局部攻击时,脾气虚 AR 组动物出现抓鼻、打喷嚏、流鼻涕等症状的积分值明显高于 AR 组,鼻分泌物及血中嗜酸细胞的含量,脾气虚 AR 组亦高于 AR 组,说明在相同的致敏因素作用下,脾气虚状态下的动物更容易产生变态反应。脾气虚 AR 组大鼠血清中 IL-5、ECP 含量升高;而脾气虚 AR 中药组在用药 1 周后症状减轻,血清中 IL-5、ECP 含量降低。说明中药能使 AR 大鼠血清 IL-5 和 ECP 水平降低,防止 EOS 活化、增殖、分化,并防止 EOS 释放 ECP,从而有效抑制炎症细胞在变应性鼻炎大鼠鼻黏膜的汇集,稳定了细胞膜,防止其脱颗粒,减少组织水肿,进而达到对 AR 的治疗作用。

参考文献:

- [1]鹿道温,王明辉,赵晔波,等. 变态反应性鼻炎的中医辨证分型与变态反应学指标的相关性研究[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志,1996,4(3):112-114.
- [2]Konno A, Terada N, Okamoto Y. changes of adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in nasal mucosa in nasal allergy[J]. ORL, 1987, 49:103.
- [3]安云芳,赵长青,朱庆义,等. 变应性鼻炎鼻黏膜 P 物质受体的研究[J], 中华耳鼻喉科杂志, 1998, 33(3): 139.
- [4]宋红,郑小伟,王颖. 多因素复合建立脾气虚证大鼠模型及以方测证研究[J]. 浙江中医杂志, 2008, 43(3):136.
- [5]赵秀杰,董震,杨占泉,等. 鼻超敏反应实验模型建立[J]. 中华耳鼻喉科杂志, 1993, 28(1):17-18.
- [6]洪苏玲,柳青,黄江菊. 变应性鼻炎鼻腔灌洗液和血清中嗜酸粒细胞阳离子蛋白和 E-选择素的检测[J]. 中华耳鼻喉科杂志, 2003, 38(2):92.
- [7]Kramer MF, Ostertag P, Pfrogner E, et al. Nasal IL-5, IgE, ECP, and Sicam-1 in chronic Sinusitis, allergic rhinitis, and nasal polyposis[J]. Laryngoscope, 2000, 110:1056-1062.
- [8]Goda K, Tanada T, Monden M, et al. Characterization of an apparently conserved epitope in E- and P-selectin identified by dual-specific monoclonal antibodies[J]. Eur J Immunol, 1999, 29:1551-1560.

(编辑:李伟东)