

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201701009

· 鼻 - 鼻窦疾病 ·

# 玉屏风散对大鼠变应性鼻炎的作用研究

赵斯君, 谢江, 刘光亮, 黄敏, 汤婷, 张梦萍, 赵伟亮, 吴付连

(南华大学儿科学院 湖南省儿童医院 耳鼻咽喉头颈外科, 湖南 长沙 410007)

**摘要:** **目的** 观察玉屏风散在卵清蛋白致敏大鼠变应性鼻炎模型的抗过敏作用。**方法** 实验在湖南省儿童医院动物实验室进行, 30只6周龄雌性封闭群SD大鼠随机分成空白对照组( $n=2$ )、对照组( $n=4$ )、酮替芬灌服组( $n=6$ )、玉屏风散灌服组( $n=6$ )、玉屏风散滴鼻组( $n=6$ )、布地奈德滴鼻组( $n=6$ )5组。建立卵清蛋白诱导的大鼠变应性鼻炎大鼠模型, 第1、8、15天, 分别腹腔注射1 000  $\mu\text{g}$  卵清蛋白, 自22 d开始300  $\mu\text{g}$  卵清蛋白滴每侧鼻孔。与此同时, 造模第22天开始给药。采用叠加量化法记录各鼻部症状得分, 然后计算总分。第37天, 解剖获取胸腔心脏血、鼻中隔和双侧鼻腔外侧壁黏膜并且进行分析。**结果** 实验各组与对照组比较, 鼻部症状得分减少, 纤毛上皮损伤较轻, 血清中组胺水平显著降低, 鼻黏膜中杯状细胞数量减少, 嗜酸性粒细胞数量减少。**结论** 玉屏风散对变应性鼻炎症状得分及鼻部组织具有抗过敏作用。

**关键词:** 变应性鼻炎; 玉屏风散; 嗜酸性粒细胞; 组胺; 动物模型

中图分类号: R765.21 文献标识码: A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(1): 39-42, 48]

## Study on the effect of Yupingfeng on allergic rhinitis in rats

ZHAO Si-jun, XIE Jiang, LIU Guang-liang, HUANG Min, TANG Ting, ZHANG Meng-ping, ZHAO Wei-liang, WU Fu-lian  
(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Pediatrics Institute, University of South China, Children's Hospital of Hunan Province, Changsha 410007, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the anti-allergenic effect of Yupingfeng (YPF) in rats with ovalbumin-sensitized allergic rhinitis (AR). **Methods** Thirty female SD rats were randomly divided into five groups including blank control group ( $n=2$ ), control group ( $n=4$ ), Ketotifen group ( $n=6$ ), oral YPF group ( $n=6$ ), intranasal YPF group ( $n=6$ ), and intranasal budesonide group ( $n=6$ ). Ovalbumin-induced animal model of AR was established in rats. Ovalbumin (1 000  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) was administrated to the rats except those of the blank control group by intraperitoneal injection on days of 1, 8 and 15. Since the 22nd day, 300  $\mu\text{g}$  of ovalbumin (diluted in 15  $\mu\text{l}$  of sterile normal saline) was applied intranasally per nostril. At the same time, medication treatment started and lasted for 2 weeks except in the blank control group. Superposition quantitative method was used to record the nasal symptom scores, and then total scores were calculated. At 37th day, all rats were executed. Abdominal aortic blood, mucous membranes were dissected from nasal septum and bilateral lateral nasal wall. All the specimens were analyzed. **Results** Compared with other groups, reductions in symptom scores, ciliated epithelium injury, serum histamine level, counts of eosinophil and goblet cell in nasal mucous membrane were observed in both oral and intranasal YPF groups. **Conclusion** Yupingfeng has anti-allergic effects on allergic rhinitis.

**Key words:** Rhinitis, allergic; Yupingfeng; Eosinophil; Histamine; Animal model

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(1): 39-42, 48]

变应性鼻炎即变态反应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR), 是易感个体接触变应原后, 主要由免疫球

蛋白 E 介导的组胺等介质释放, 并有多种免疫活性细胞和细胞因子等参与的鼻黏膜变态反应性炎症疾病<sup>[1]</sup>。临床症状有发作性喷嚏、鼻痒、流涕和鼻塞等, 60% ~ 70% 的患者还伴随眼部瘙痒、发红和流泪等症状<sup>[2-3]</sup>。变应性鼻炎时, 鼻腔分泌物中可出现较多嗜酸性粒细胞和杯状细胞<sup>[4]</sup>。AR 是一个全球性健康问题, 其患病率高达 10% ~ 20%, 且呈上升趋势<sup>[5-6]</sup>。口服抗组胺药和鼻用类固醇激素是目前

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2011TT2002); 湖南中医管理局项目(201178); 湖南省研究生科研创新项目(CX2016B500)。

作者简介: 赵斯君, 男, 硕士, 主任医师; 谢江, 男, 在读硕士研究生。赵斯君与谢江对本文有同等贡献, 为并列第一作者。

通信作者: 赵斯君, Email: zhaosj3991@sohu.com

治疗变应性鼻炎最有效和最常见的方法<sup>[7-8]</sup>,也有学者选择行翼管神经切断术来治疗难治性变应性鼻炎<sup>[9]</sup>。另外,中医有许多方剂具有抗过敏作用,通过动物实验来研究这些药物的作用机制。玉屏风散由黄芪、白术、防风3味中药组成,可益气固表,是中医的经典方<sup>[9]</sup>。据报道,该方常用于治疗现代医学的变应性鼻炎、哮喘、荨麻疹等变态反应性疾病<sup>[10]</sup>。本研究通过探讨玉屏风散对变应性鼻炎的治疗作用机制,从血清中组胺水平、鼻黏膜中纤毛上皮损伤度、杯状细胞数量、嗜酸性粒细胞数量及对大鼠变应性鼻炎模型鼻部症状的影响因素探讨玉屏风散对变应性鼻炎的抗过敏作用,为临床上应用该方治疗变应性鼻炎提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康SD清洁级大鼠,雌性,6周,(200±20)g(湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证号:43004700025493)。适应性喂养1周后备用。饲养环境条件为:分笼饲养(每笼5只),室内温度18~29℃,相对湿度40%~70%,控制饲养及实验环境的光照为12h明亮/12h黑暗的循环交替的光照周期。整个实验过程中允许动物自由取食和饮水。

### 1.2 实验药物和试剂

玉屏风灌服药物根据王慧珠方法加以改进提取<sup>[11]</sup>,由黄芪、白术、防风,按照3:1:1投料,加入10倍量的95%乙醇提取2次,每次2h,合并后减压蒸馏浓缩至含生药1.8g/g提取物,实验时按临床剂量浓度备用。玉屏风散滴鼻剂根据梁方琪方法加以改进提取<sup>[12]</sup>。由黄芪、白术、防风,按照3:1:1投料,白术、防风,加10倍量水,蒸馏提取5h,收集芳香香水1000ml,后重蒸馏收集芳香香水300ml,加入聚山梨酯3ml,混匀,备用。药液另器收集,备用。药渣与黄芪饮片加10倍量水,煎煮3次,每次1h,滤过,合并煎液及上述蒸馏后的药液,浓缩至相对密度1.10~1.20(40℃)的清膏,加95%乙醇使含醇量达60%,静置24h,滤过,滤液回收乙醇,浓缩至约600ml,用NaOH溶液调节pH至6.5,加入芳香水300ml,山梨酸2g,加水定容至1000ml,搅匀,静置,滤过,分装,即得;实验时玉屏风散滴鼻按生药量计为6.5g/kg。富马酸酮替芬片,海南制药厂有限公司制药一厂,国药准字H41023929,实验时按临床剂量浓度备用。布地奈德滴鼻剂,AstraZeneca Pty

Ltd,批准文号:进口药品注册证号H20140475,实验时按64μg/kg。卵清蛋白,Sigma-Aldrich(shanghai) Trading Co. Ltd,产品编号A5503。Imject Alum,Thermo scientific,产品编号77161。

### 1.3 实验方法

1.3.1 模型建立 准备30只SD大鼠,其中28只大鼠在第1、8、15天用卵清蛋白1000μg+氢氧化铝20mg溶于生理盐水腹腔注射致敏。第22天开始,每天300μg卵清蛋白溶于15μl生理盐水中滴每侧鼻腔行鼻腔激发,持续2周<sup>[13]</sup>。其余2只作为空白对照组,改用氢氧化铝+生理盐水行腹腔注射,生理盐水滴鼻。每天处理时间为下午4~5点。

1.3.2 分组与给药 将大鼠随机分为6组,富马酸酮替芬灌服组(10mg/kg,海南制药厂有限公司制药一厂,国药准字H41023929)。玉屏风散灌服组(玉屏风散按生药量计为6.5g/kg,n=6只)。玉屏风散滴鼻组(玉屏风散滴鼻剂按生药量计为6.5g/kg,n=6只)。布地奈德滴鼻组(64μg/kg,AstraZeneca Pty Ltd,批准文号:进口药品注册证号H20140475)。对照组(0.5ml生理盐水滴鼻,n=4只),空白对照组(n=2只)。造模第22天开始给药,持续14d,各组均在卵清蛋白滴鼻前30min灌胃/滴鼻给药。每天处理时间为下午4~5点。

1.3.3 卵清蛋白滴鼻给药现象观察 在卵清蛋白滴鼻给药30min内观察鼻部症状,记录挠鼻,喷嚏次数,流涕情况。第22天行药物干预前30min观察1次,第23天行卵清蛋白鼻腔激发后再行观察1次,之后每6天观察1次(观察均行于卵清蛋白鼻腔激发后30min内)。评分标准:用积分叠加法评分。挠鼻:轻挠鼻几次为1分,反复挠鼻面部不止为2分,鼻面部到处擦磨为3分。喷嚏:1~3个为1分,4~10个为2分,11个以上为3分。流涕:至鼻前孔为1分,过鼻前孔为2分,流涕满面为3分(表1)<sup>[14]</sup>。

表1 鼻部症状评分标准

鼻部症状	0分	1分	2分	3分
挠鼻	0	轻擦几次	反复挠鼻	鼻面部到处摩擦
喷嚏次数	0	1~3	4~10	>10
流涕	0	至鼻前孔	过鼻前孔	流涕满面

1.3.4 组胺测定 第37天后水合氯醛(30ml/kg)腹腔注射镇静,仰卧位固定,剪开腹部皮肤,钝性分离,打开胸腔,用1次性注射器(预先用1:25肝素湿润)抽取胸腔心脏血3ml,立即注入抗凝管中,静置2h后3000r/min离心15min,分取血清,-20℃保

存并检验。用ELISA法检测血清中组胺浓度。

1.3.5 鼻黏膜上皮细胞损伤程度测定 大鼠断头后,解剖显微镜下获取鼻中隔和双侧鼻腔外侧壁黏膜后用4%的多聚甲醛固定24 h,行苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色,石蜡包埋。做3 μm厚切片,在光镜下观察纤毛上皮损伤度、嗜酸性粒细胞数量。按照Ponikau JU方法将上皮细胞状态分4级(0级:纤毛上皮无损伤,纤毛完整;1级:纤毛缺失,无上皮细胞剥脱;2级:上皮细胞剥脱但未至基底膜;3级:上皮细胞全部剥脱,基底膜暴露)<sup>[15]</sup>。

1.3.6 嗜酸性粒细胞分类计数 行HE染色后,石蜡包埋,在光镜下观察嗜酸性粒细胞数量。

1.3.7 杯状细胞分类计数 行阿辛蓝-过碘酸-希夫染色后,石蜡包埋,做3 μm厚切片,在光镜下观察杯状细胞数量。

#### 1.4 统计学处理

通过对所得实验数据以SPSS 17.0进行处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示表示,组间比较采用两独立样本 $t$ 检验及多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 卵清蛋白滴鼻给药现象观察

除对照组小鼠外,其余各组小鼠在卵清蛋白溶液滴鼻激发后均出现挠鼻、喷嚏、流涕等现象。且与空白对照组相比较,对照组挠鼻、喷嚏、流涕积分均升高且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),经过10 mg/kg富马酸酮替芬灌服、6.5 g/kg玉屏风散灌服、6.5 g/kg玉屏风散滴鼻、64 μg/kg布地奈德滴鼻治疗后,积分均显著下降且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。实验各组之间积分均显著下降,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。具体情况和结果见表2。

表2 鼻部症状评分(分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物只数	鼻部症状评分			
		给药前	23 d	29 d	35 d
空白对照组	2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
对照组	4	0.50 ± 0.58	1.25 ± 0.50	3.50 ± 0.58	6.00 ± 0.82
酮替芬灌服组	6	0.50 ± 0.55	1.33 ± 0.52	2.33 ± 0.51	1.33 ± 0.52
玉屏风灌服组	6	0.50 ± 0.55	1.17 ± 0.75	2.50 ± 0.55	1.33 ± 0.52
玉屏风滴鼻组	6	0.50 ± 0.55	1.00 ± 0.63	2.50 ± 0.55	1.50 ± 0.55
布地奈德滴鼻组	6	0.50 ± 0.55	1.33 ± 0.52	2.00 ± 0.89	1.17 ± 0.41

注:第35天OVA行鼻腔激发后30 min内,空白对照组与对照组比较 $P_1 < 0.05$ ,实验组与对照组比较 $P_2 < 0.05$ ,各实验组间比较 $P_3 > 0.05$

### 2.2 ELISA法检测血清中组胺浓度

对照组血清中组胺较空白对照组显著增加( $P < 0.05$ ),10 mg/kg富马酸酮替芬灌服组、6.5 g/kg玉屏风散灌服组、6.5 g/kg玉屏风散滴鼻组、64 μg/kg布地奈德滴鼻组较对照组均显著降低且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。实验各组之间组胺浓度均显著降低,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。具体情况和结果见表3。

表3 鼻黏膜上皮细胞损伤度(分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物只数	上皮细胞损伤程度(%)			
		0级	1级	2级	3级
空白对照组	2	97.50 ± 0.71	2.50 ± 0.71	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
对照组	4	57.50 ± 2.08	28.50 ± 3.70	12.75 ± 1.89	1.25 ± 0.96
酮替芬灌服组	6	81.50 ± 2.66	15.33 ± 2.50	3.17 ± 2.32	0.00 ± 0.00
玉屏风灌服组	6	79.67 ± 1.63	17.17 ± 1.83	3.17 ± 1.17	0.00 ± 0.00
玉屏风滴鼻组	6	79.17 ± 2.93	19.00 ± 2.77	1.83 ± 0.98	0.00 ± 0.00
布地奈德滴鼻组	6	81.00 ± 2.36	17.00 ± 2.68	2.00 ± 2.00	0.00 ± 0.00

注:空白对照组与对照组比较 $P_1 < 0.05$ ,实验组与对照组比较 $P_2 < 0.05$ ,各实验组间比较 $P_3 > 0.05$

### 2.3 HE染色测定鼻黏膜上皮细胞损伤程度

测定各组大鼠鼻黏膜上皮细胞所占基底膜总长百分比。对照组与空白对照组相比可见明显上皮细胞损伤,10 mg/kg富马酸酮替芬灌服组、6.5 g/kg玉屏风散灌服组、6.5 g/kg玉屏风散滴鼻组、64 μg/kg布地奈德滴鼻组较对照组上皮细胞损伤0级的百分比均明显高于对照组,而上皮细胞损伤1级、2级和3级的百分比明显低于对照组( $F$ 检验, $P < 0.05$ )。实验各组之间上皮细胞损伤0级的百分比均较高,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。具体情况和结果见表3。

### 2.4 嗜酸性粒细胞分类计数

苏木素-伊红(Hematoxylin and eosin, HE)染色对照组铺片见大量嗜酸性粒细胞分布,空白对照组未见明显嗜酸性粒细胞分布,实验各组偶可见个别散在嗜酸性粒细胞分布。对照组鼻黏膜中嗜酸性粒细胞较空白对照组显著增加( $P < 0.05$ ),10 mg/kg富马酸酮替芬灌服组、6.5 g/kg玉屏风散灌服组、6.5 g/kg玉屏风散滴鼻组、64 μg/kg布地奈德滴鼻组较对照组均显著降低且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。实验各组之间嗜酸性粒细胞均显著降低,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。具体情况和结果见表4。

### 2.5 杯状细胞分类计数

阿辛蓝-过碘酸-希夫染色对照组铺片见4~

6个散在杯状细胞分布,空白对照组可见少量杯状细胞分布,实验各组可见散在杯状细胞分布。对照组鼻黏膜中杯状细胞较空白对照组显著增加( $P < 0.05$ ),10 mg/kg 富马酸酮替芬灌服组、6.5 g/kg 玉屏风散灌服组、6.5 g/kg 玉屏风散滴鼻组、64  $\mu\text{g}/\text{kg}$  布地奈德滴鼻组较对照组均显著降低且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。实验各组之间杯状细胞均显著降低,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。具体情况和结果见表4。

表4 血清组胺浓度及鼻黏膜嗜酸性粒细胞、杯状细胞计数( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物只数	嗜酸性粒细胞(个/张)	杯状细胞(个/张)	血清组胺水平( $\mu\text{g}/\text{L}$ )
空白对照组	2	0.00 $\pm$ 0.00	17.00 $\pm$ 1.41	5.50 $\pm$ 0.71
对照组	4	23.5 $\pm$ 3.70	34.00 $\pm$ 1.83	10.00 $\pm$ 0.82
酮替芬灌服组	6	4.67 $\pm$ 1.37	18.00 $\pm$ 1.41	6.17 $\pm$ 0.75
玉屏风灌服组	6	3.67 $\pm$ 2.16	17.67 $\pm$ 1.03	6.00 $\pm$ 1.26
玉屏风滴鼻组	6	4.17 $\pm$ 1.17	18.50 $\pm$ 1.52	6.12 $\pm$ 0.75
布地奈德滴鼻组	6	3.67 $\pm$ 1.51	17.67 $\pm$ 1.63	5.83 $\pm$ 0.98

注:嗜酸性粒细胞:空白对照组与对照组比较  $P_1 < 0.05$ ,实验组与对照组比较  $P_2 < 0.05$ ,各实验组间比较  $P_3 > 0.05$ 。杯状细胞:空白对照组与对照组比较  $P_1 < 0.05$ ,实验组与对照组比较  $P_2 < 0.05$ ,各实验组间比较  $P_3 > 0.05$ 。血清组胺浓度:空白对照组与对照组比较  $P_1 < 0.05$ ,实验组与对照组比较  $P_2 < 0.05$ ,各实验组间比较  $P_3 > 0.05$ 。

### 3 讨论

变应性鼻炎是易感个体接触致敏原后由 IgE 介导的 I 型变态反应性疾病。变应原进入机体后,被抗原呈递细胞吞噬并激活 B 淋巴细胞,导致变应原特异性 IgE 的产生,IgE 附着于肥大细胞和嗜酸性粒细胞表面,当再次接触变应原后,IgE 与受体结合交联,激活肥大细胞、嗜酸性粒细胞释放组胺等炎症递质,进而刺激鼻黏膜引发鼻痒、喷嚏、流涕等症状<sup>[16-18]</sup>。且变应性鼻炎的鼻黏膜组织存在重塑,表现为上皮细胞损伤、杯状细胞增生等特征性改变<sup>[19-20]</sup>。大多数学者认为上皮细胞的慢性损伤或修复缺陷以及由于上皮细胞活化而持续产生大量的促炎因子和生长因子导致炎症慢性化和组织重塑的发生<sup>[21]</sup>。本实验研究观察玉屏风散对变应性鼻炎有抑制作用。结果显示,玉屏风散不仅能明显改善变应性鼻炎大鼠的症状,能降低变应性鼻炎大鼠血清中组胺浓度,而且还能修复鼻黏膜上皮的损伤,同时减少嗜酸性粒细胞、杯状细胞总数,从而达到治疗变应性鼻炎的目的。因此,可见玉屏风散治疗变应

性鼻炎的机制可能是通过抑制肥大细胞的活化,从而抑制组胺的释放,同时减少激活下游的次级效应靶细胞,如嗜酸性粒细胞、杯状细胞的激活被抑制。从而改善变应性鼻炎的过敏性症状。

祖国医学中有“外治之理即内治之理,外治之药亦内治之药”这一传统经典理论,因此我们在本课题中运用梁方琪方法<sup>[12]</sup>加以改进提取玉屏风散滴鼻剂,但相关研究较少,本次实验当中玉屏风滴鼻剂的工艺标准仍有待进一步探讨,其局部剂量的用量浓度仍需后续的研究。

通过本次的研究,笔者发现在运用玉屏风散治疗变应性鼻炎大鼠模型的过程中,仍然存在一些有待改进的方面,比如此次造模过程中用卵清蛋白行鼻腔激发的时间较短(2周),不能准确反映慢性变应性鼻炎的特点,与实际临床当中变应性鼻炎反复不定期发作、时间长短不一的特点不完全一致,并且我们运用玉屏风散及布地奈德等药物干预对照时间较短,有关玉屏风散的远期疗效仍然有待长期的实验研究。另外,本次的研究样本量较小,其疗效稳定性仍然需要通过增加样本量进一步论证。

此次研究中单纯运用玉屏风散与各实验组对照,没有运用玉屏风散联合相关实验药物进行对照,后续仍需进一步完善相关对照研究。综上所述,在本次研究中证明了玉屏风散在变应性鼻炎模型大鼠中有一定的临床疗效,值得我们进一步不断探索研究。

### 参考文献:

- [1] 张罗,魏均民,韩德民. 变应性鼻炎诊疗现状调查[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 45(5): 420-423.
- [2] Canonica GW, Bousquet J, Mullol J, et al. A survey of the burden of allergic rhinitis in Europe[J]. Allergy, 2007, 62(85): 17-25.
- [3] Schatz M. A survey of the burden of allergic rhinitis in the USA [J]. Allergy, 2007, 62(85): 9-16.
- [4] 凌永伟,欧阳贵平,谢洪亮,等. 变应性鼻炎患者鼻腔分泌物中嗜酸性粒细胞的检测 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2012, 18(1): 58-60.
- [5] 程雷,张罗. 变应性鼻炎及其对哮喘的影响 (ARIA) 2010 年修订版解读[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 46(5): 437-440.
- [6] Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010, 126(3): 466-476.

(下转第48页)