

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201806014

· 论 著 ·

槲皮素对大鼠变应性鼻炎血清 Th1/Th2 细胞因子表达的影响

彭 炜,王 为,赵艾君,李志伟,李凡玲,熊子云
(仙桃市第一人民医院 耳鼻咽喉科,湖北 仙桃 433000)

摘 要: **目的** 分析槲皮素 (QUE) 对大鼠变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 血清 T 细胞辅助因子 Th1/Th2 表达的影响。**方法** 采用二异氰酸甲苯酯 (TDI) 制作大鼠实验性 AR 模型并进行评分,45 只大鼠按照数字随机法平分为 3 组:正常对照组、模型组和实验组,正常对照组为正常大鼠,模型组和实验组大鼠进行变应性鼻炎造模。实验组利用 QUE 80 mg/kg 腹腔注射治疗 2 周,而正常对照组和模型组均注射等量生理盐水。2 周后 HE 染色观察各组大鼠鼻黏膜组织学变化;ELISA 法检测血清中细胞因子白细胞介素 - 2 (IL-2)、干扰素 - γ (IFN- γ) 以及 IL-4、IL-5 水平;实时荧光定量 PCR (q-PCR) 检测基因 Tim1、Tim3 表达。**结果** 2 周后实验组评分显著低于正常对照组与模型组 ($P < 0.05$);ELISA 检测显示模型组 IL-2、IFN- γ 显著低于正常对照组 ($P < 0.05$),IL-4、IL-5 显著高于正常对照组 ($P < 0.05$);实验组 IL-2、IFN- γ 显著高于模型组 ($P < 0.05$),IL-4、IL-5 显著低于模型组 ($P < 0.05$);q-PCR 检测显示实验组大鼠鼻黏膜组织 Tim1、Tim3 表达明显低于模型组 ($P < 0.05$),模型组大鼠鼻黏膜组织 Tim1、Tim3 表达明显高于正常对照组 ($P < 0.05$),实验组大鼠鼻黏膜组织 Tim1、Tim3 表达明显高于正常对照组 ($P < 0.05$)。**结论** QUE 能不同程度减轻大鼠变应性鼻炎鼻部症状,改善鼻黏膜炎症程度;通过调节 Th1 和 Th2 细胞因子表达,从而调节大鼠变应性鼻炎 Th1/Th2 细胞因子平衡,对变应性鼻炎具有一定保护作用。

关 键 词: 变应性鼻炎;炎症反应;Th1/Th2;槲皮素;大鼠

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,2018,24(6):557-560]

Effects of quercetin on expressions of Th1/Th2 cytokines in serum of experimental allergic rhinitis in rats

PENG Wei, WANG Wei, ZHAO Ai-jun, LI Zhi-wei, LI Fan-ling, XIONG Zi-yun
(Department of Otolaryngology, the First People's Hospital of Xiantao City, Xiantao 433000, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of quercetin on expressions of Th1/Th2 cytokines in serum of experimental allergic rhinitis (AR) in rats. **Methods** 45 rats were equally divided into 3 groups, the control group, model group and experiment group. Rats in the control group received no treatment, while those in the model group and the experiment group were treated with toluene diisocyanate for model establishment of AR. Then, the rats in the experiment group were given intraperitoneal injection of quercetin (80mg/kg) for 2 weeks, and those in the control group and model group were treated with physiological saline equivalently. Histological changes of nasal mucosa were observed by HE staining. Besides, the levels of serum interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ), IL-4 and IL-5 were evaluated by ELISA, and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was adopted to the expressions of Tim1 and Tim3. **Results** The scores of nasal symptoms in the experiment group were significantly lower than those in the control group and the model group (both $P < 0.05$). ELISA showed that the serum levels of IL-2 and IFN- γ in model group were significantly lower than those in the control group (both $P < 0.05$), while the serum levels of IL-4 and IL-5 in model group were significantly higher than those in the control group (both $P < 0.05$). Compared with the model group, the serum levels of IL-2 and IFN- γ in the experiment group were increased, and those of IL-4 and IL-5 got decreased (all $P < 0.05$). qRT-PCR revealed that the mRNA expressions of Tim1 and Tim3 in the experiment group were markedly lower than those in the model group, but higher

作者简介:彭 炜,男,主治医师。
通信作者:彭 炜,Email:397933045@qq.com

than those in the control group (all $P < 0.05$). Meanwhile, their expressions in the model group were significantly higher than those in the control group (both $P < 0.05$). **Conclusion** Quercetin can improve nasal symptoms and relief mucosal inflammation in AR rats. It protects the nasal mucosa by regulating the expressions of Th1 and Th2 cytokines.

Key words: Allergic rhinitis; Quercetin; Th1/Th2; Inflammatory reaction; Rat
[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2018, 24(6) :557 – 560]

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是由 IgE 介导的 I 型变态反应疾病, 近期来随着空气污染及重工业的普及, AR 在全球范围内患病率逐渐升高, 国内外研究显示, 白细胞介素-4 (IL-4)、IL-5 细胞因子过度表达和 Th2 细胞优势分化在 AR 发病机制中起重要作用^[1]。槲皮素 (QUE) 是一类黄酮类化合物, 具有调节人体免疫功能、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、抗疲劳、降血脂和抗过敏等多种药理作用, 可用于变应性疾病的防治, 但作用于 AR 的研究鲜有报道^[2]。本研究通过建立大鼠 AR 模型, 利用槲皮素干预, 探索槲皮素对于 AR 大鼠血清 T 细胞辅助因子 Th1/Th2 的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

无特定病原体 (SPF 级) SD 大鼠 45 只, 雄性, 200 ~ 250 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 实验前适应性喂养 1 周。槲皮素 (批号: 117-39-5, 成都曼思特生物科技有限公司); 二异氰酸甲苯酯 (TDI) (中国医药集团上海化学试剂公司提供); 大鼠 IL-2、IL-4、IL-5 ELISA 试剂盒 (Abcam 公司); 大鼠干扰素- γ 、IFN- γ ELISA 试剂盒 (Sant Cruz 公司); 0.9% 氯化钠溶液 (由华中科技大学同济医学院附属同济医院提供)。

1.2 模型的制作和评分

45 只大鼠按照数字随机法平分为 3 组: 正常对照组、模型组和实验组, 每组 15 只。实验组于造模成功后第 2 天, QUE 80 mg/kg 腹腔注射, 每日 1 次, 治疗 2 周, 正常对照组和模型组注射等量生理盐水, 方法同上。根据文献^[3]的方法, 每只大鼠给予二异氰酸甲苯酯 (TDI) 滴鼻。利用醋酸乙酯作为溶剂, 配置 10% TDI 溶液, 分别于大鼠双侧前鼻孔内滴入 10 μ l 含 10% TDI 溶液, 每日清晨给药 1 次, 连续 5 次为一个致敏期, 共致敏 2 次, 间隔期为 3 周。在第 2 次致敏期结束后 1 周, 用 5% TDI 滴鼻行激发试验, 每日 1 次, 共激发 4 周。正常对照组只给予不含 TDI 溶剂的醋酸乙酯滴鼻, 方法同上。造模后大鼠喷嚏、流涕及挠鼻程度越来越强烈。记录各组大鼠

鼻分泌物量、喷嚏次数及鼻痒程度, 各项指标采取叠加量化记分, 总分超过 5 分为动物造模成功。记录方法见表 1。

表 1 大鼠鼻部症状评分

评分	喷嚏 (次)	鼻涕	挠鼻 (次)
1 分	1 ~ 4	流到鼻孔前	轻度挠鼻 1 ~ 5
2 分	5 ~ 10	流出鼻孔	中度挠鼻 6 ~ 10
3 分	> 11	流体满面	中度挠鼻 > 11

1.3 实验检测方法

1.3.1 HE 染色 2 周后断颈法处死各组大鼠, 取鼻中隔黏膜, 10% 甲醛固定后, 将鼻中隔黏膜石蜡包埋, 常规切片行苏木精-伊红染色, 光镜下观察组织学改变。

1.3.2 ELISA 法检测 Th1/Th2 细胞因子 2 周后断颈法处死各组大鼠, 取腹主动脉血 5.0 ml, 严格按照 ELISA 说明书测定 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5 水平。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 Tim1、Tim3 表达 取鼻黏膜组织后充分剪碎, 加入 Trizol 试剂提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 利用 SYBR green I real time PCR Kit 试剂盒扩增目的基因, 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 以 GAPDH 作为内参, 各引物序列见表 2, 采用 2- $\Delta\Delta$ Ct 法检测相关基因的相对表达量。

表 2 目的基因引物序列

目的基因	基因序列	产物长度 (bp)
Tim1	上游 5'TGGTTGTCACCAAGGTACATCATTATA-3'	170
	下游 5'TGCGTTCTGCAAAGCTCTACTC-3'	
Tim3	上游 5'CAATTCCCTGCCCAATGAATGA-3'	150
	下游 5'ACTTCCCTCAGTGTTAGGGTTCT-3'	
GAPDH	上游 5'ACAGCAACAGGGTGGTGAC-3'	252
	下游 5'TTTGAGGGTGACGCGAAGCTT-3'	

1.4 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析或 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻部症状评分

各组大鼠评分分别为: 空白对照组 (0.51 $\pm$

0.39)分,模型组(5.86 ± 0.72)分,实验组(1.84 ± 0.29)分,模型组评分明显高于空白对照组($t = 20.71, P < 0.05$),而实验组评分显著低于模型组,差异具有统计学意义($t = 9.24, P < 0.05$)。

2.2 组织病理学观察

HE 染色显示,正常对照组鼻黏膜组织结构排列有序,可见少量嗜酸性粒细胞浸润;模型组可见鼻黏膜水肿、血管扩张、腺体增生,固有层内可见大量嗜酸性细胞浸润;实验组鼻黏膜仍有水肿,血管轻度扩张,较模型组明显好转。见图 1。

2.3 槲皮素对 Th1/Th2 细胞因子的影响

ELISA 检测结果显示,模型组 IL-2、IFN- γ 显著低于对照组(t 分别为 16.96、11.25, P 均 < 0.05), IL-4、IL-5 显著高于对照组(t 分别为 9.34、17.85, P 均 < 0.05),而实验组 IL-2、IFN- γ 显著高于模型组但(t 分别为 8.39、12.09, P 均 < 0.05), IL-4、IL-5 水平显著低于模型组(t 分别为 12.46、10.71, P 均 < 0.05)。同时,实验组 IL-2、IFN- γ 仍明显低于正常对照组(t 分别为 9.38、11.71, P 均 < 0.05), IL-4、IL-5 明显高于正常对照组(t 分别为 8.79、13.06, P 均 < 0.05)。具体数据见表 3。

表 3 各组大鼠血清 Th1/Th2 细胞因子变化 ($\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$)

分组	只数	Th1		Th2	
		IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-5
正常对照组	15	27.45 $\pm$ 3.69	136.12 $\pm$ 10.64	7.96 $\pm$ 1.42	55.74 $\pm$ 7.12
模型组	15	14.86 $\pm$ 2.17 [*]	59.44 $\pm$ 9.02 [*]	22.05 $\pm$ 1.55 [*]	106.39 $\pm$ 9.84 [*]
实验组	15	19.25 $\pm$ 1.97 [#]	87.15 $\pm$ 11.71 [#]	11.86 $\pm$ 1.32 [#]	91.44 $\pm$ 10.51 [#]
<i>F</i>		10.27	15.64	22.49	19.56
<i>P</i>		0.019	0.006	0.002	0.001

注: * 与对照组比较 $P < 0.05$; # 与模型组比较 $P < 0.05$

2.4 槲皮素对 Tim1、Tim3 mRNA 表达的影响

荧光定量 PCR 检测显示,模型组 Tim1、Tim3 mRNA 表达显著高于正常对照组(t 分别为 13.08、10.17, P 均 < 0.05),实验组 Tim1、Tim3 mRNA 表达明显低于模型组,差异具有统计学意义(t 分别为 9.16、14.08, P 均 < 0.05)。同时,实验组 Tim1、

Tim3 mRNA 表达显著高于正常对照组(t 分别为 9.58、15.94, P 均 < 0.05)。具体数据见表 4。提示槲皮素可抑制 Tim1、Tim3 mRNA 表达。

表 4 各组大鼠鼻黏膜 Tim1、Tim3 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

分组	只数	Tim1	Tim3
正常对照组	15	1.06 $\pm$ 0.34	1.03 $\pm$ 0.29
模型组	15	2.07 $\pm$ 0.37	1.94 $\pm$ 0.27
实验组	15	1.69 $\pm$ 0.31	1.51 $\pm$ 0.32
<i>F</i>		17.48	10.23
<i>P</i>		0.011	0.009

3 讨论

变应性鼻炎(AR)是一类由特异性个体接触特异性变应原后由免疫球蛋白 E(IgE)作为中间介质引起的,由炎性介质释放并作用于效应器官的鼻黏膜慢性非感染性炎症反应^[4]。槲皮素有调节免疫、抗肿瘤、抗炎症反应等功能。槲皮素能够抑制抗 DHP IgE 引起的被动皮肤过敏反应和腹膜肥大细胞释放组胺^[2,5]。此外,槲皮素还是通过抑制 COX-2 和抗 IgE 抑制一型变态反应^[6]。

近期研究表明,AR 的发病与 Th1/Th2 失衡密切相关,AR 后 Th1/Th2 失衡表现在 Th1 细胞因子表达受抑制和 Th2 细胞因子表达量增加^[7]。Th 细胞可分为 Th1 细胞、Th2 细胞以及 Th0 细胞。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2 等细胞因子,而 Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 等^[8]。生理条件下,Th1/Th2 细胞因子可相互调节,Th1/Th2 比率恒定并维持动态平衡^[9]。临床上多种疾病可诱导 Th1/Th2 失衡,如手术创伤、糖尿病、哮喘、系统性红斑狼疮、变应性鼻炎等^[10]。IL-2 和 IFN- γ 是 Th1 细胞主要功能性细胞因子,IL-2 能促进 T 细胞活化、增殖,IFN- γ 能抑制 B 细胞合成 IgE 并抑制 Th0 细胞向 Th2 型细胞分化^[8,11]。研究显示,Th2 细胞优势分化和 Th2 过度分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子在 AR 发病机制中起重

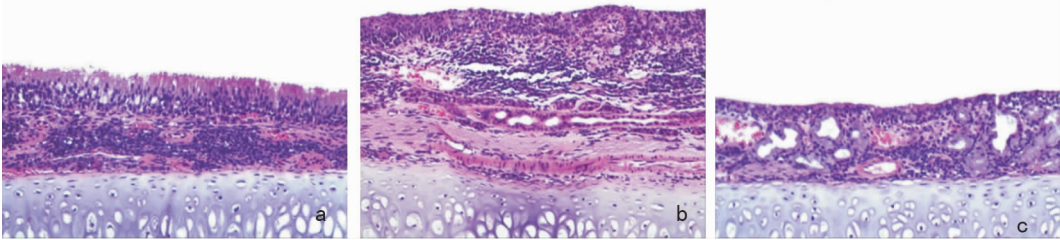


图 1 各组大鼠鼻黏膜病理图片(HE $\times 20$) a:正常对照组;b:模型组;c:实验组

要作用^[12]。IL-4 不仅能促进 B 细胞合成 IgE,还能促进 Th0 细胞分化为 Th2 细胞,拮抗 IFN- γ ,并具有炎症趋化作用,可诱导肥大细胞和巨噬细胞的细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 和血管内皮细胞黏附分子-1 (VEAM-1) 的表达^[13-14]。此外,IL-4 可促进炎症细胞穿透血管壁,参与变态反应的发生。IL-5 作为 Th2 细胞主要细胞因子,可诱导激活人嗜酸性粒细胞增殖和分化,抑制嗜酸性粒细胞凋亡并延长其存活时间^[12,15]。此外,研究表明 IL-5 还可协同 IL-4 提高 ICAM-1 水平,促进 IgE 的分泌。本研究发现,槲皮素可显著抑制变应性鼻炎大鼠鼻黏膜嗜酸性细胞浸润,显著改善鼻黏膜水肿、血管扩张、腺体增生。而通过实验室检查发现,槲皮素能显著提高 IL-2、IFN- γ ,抑制 IL-4,IL-5 水平,调节 Th1/Th2 细胞因子平衡,从而对变应性鼻炎大鼠产生保护作用。Tim1 的主要作用是刺激 T 细胞增殖及促进细胞因子的分泌,主要在 Th2 细胞以及一些初始 T 细胞表面表达,高表达常见于过敏性疾病和自身免疫性疾病;而 Tim3 是一种辅助 T 细胞免疫功能的关键分子,可选择性地在活化的 Th1 细胞表面表达,当 Tim3 与配体结合后,可抑制 Th1 型免疫应答,从而起负性调节作用^[16]。本研究发现,变应性鼻炎后大鼠鼻黏膜组织 Tim1 及 Tim3 显著表达,而槲皮素可显著抑制 Tim1 及 Tim3 表达,从而在基因层面对 Th1/Th2 细胞因子进行调控。

综上所述,槲皮素可通过调节 Th1 和 Th2 细胞因子表达,调节大鼠变应性鼻炎 Th1/Th2 细胞因子平衡,对变应性鼻炎具有一定保护作用,然而变应性鼻炎病理机制较为复杂,槲皮素是否通过其他通路对变应性鼻炎产生影响仍需进一步探索。

参考文献:

- [1] Scadding GW, Calderon MA, Shamji MH, et al. Effect of 2 years of treatment with sublingual grass pollen immunotherapy on nasal response to allergen challenge at 3 years among patients with moderate to severe seasonal allergic rhinitis: The GRASS randomized clinical trial[J]. JAMA, 2017,317(6):615-625.
- [2] Kim JY, Lee OS, Ha S, et al. In vivo assessment of the effect of taxifolin glycoside on atopic dermatitis-like skin lesions using biomedical tools in NC/Nga mice[J]. Clin Expl Dermatol,2015,40(5):547-555.
- [3] Tamura T, Komai M. Effect of olopatadine hydrochloride, an anti-histamine drug, on rhinitis induced by intranasal instillation of toluene-2,4-diisocyanate in rats[J]. Int Immunopharmacol,2008,8(6):916-921.
- [4] Li X, Liu Y, Zhang Q, et al. Effect of catgut implantation at acupoints for the treatment of allergic rhinitis: a randomized, sham-controlled trial[J]. BMC Complement Altern Med,2016,16(1):454.
- [5] Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, et al. Molecular targets of quercetin with anti-inflammatory properties in atopic dermatitis[J]. Drug Discov Today,2016,21(4):632-639.
- [6] Gupta K, Kumar S, Gupta RK, et al. Reversion of asthmatic complications and mast cell signalling pathways in BALB/c mice model using quercetin nanocrystals[J]. J Biomed Nanotechnol,2016,12(4):717-731.
- [7] Harima-Mizusawa N, Kano M, Nozaki D, et al. Citrus juice fermented with Lactobacillus plantarum YIT 0132 alleviates symptoms of perennial allergic rhinitis in a double-blind, placebo-controlled trial[J]. Benef Microbes, 2016,7(5):649-658.
- [8] Looijen MG, New DJ, Fischer CD, et al. Expression of T helper cell-associated inflammatory mediator mRNAs in cells of bronchoalveolar lavage fluid samples and oxygen concentration in arterial blood samples from healthy horses exposed to hyperbaric oxygen[J]. Am J Vet Res, 2016, 77(10):1148-1156.
- [9] Salehi M, Bagherpour B, Shayghannejad V, et al. Th1, Th2 and Th17 cytokine profile in patients with multiple sclerosis following treatment with rapamycin[J]. Iran J Immunol, 2016, 13(2):141-147.
- [10] Doedée AM, Kannegieter N, Öztürk K, et al. Higher numbers of memory B-cells and Th2-cytokine skewing in high responders to hepatitis B vaccination[J]. Vaccine, 2016, 34(19):2281-2289.
- [11] Wang XT, Lv M, Gou HY. Effects of epidural block combined with general anesthesia on antitumor characteristics of T helper cells in hepatocellular carcinoma patients[J]. J Biol Regul Homeost agents, 2016,30(1):67-77.
- [12] Yuan J, Li J, Huang SY, et al. Characterization of the subsets of human NKT-like cells and the expression of Th1/Th2 cytokines in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. J Reprod Immunol, 2015,110:81-88.
- [13] Jemima EA, Prema A, Thangam EB. Functional characterization of histamine H4 receptor on human mast cells[J]. Mol Immunol, 2014,62(1):19-28.
- [14] 孙洁, 薛子超, 葛瑞峰, 等. 流式细胞术检测 IFN- γ 、IL-4 在鼻息肉及变应性鼻炎患者外周血表达的差异[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2008,14(5):324-327.
- [15] Sun J, Xue ZC, Ge RF, et al. Differences between expression of IFN- γ , IL-4 in peripheral blood of patients with nasal polyps and allergic rhinitis[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2008,14(5):324-327.
- [16] Alzolibani AA, Al Robaee AA, Al Shobaili HA, et al. Interleukin-4-590 T > C and interleukin-4 receptor Q551R A > G gene polymorphisms in Saudi cases with alopecia areata[J]. J Egypt Public Health Assoc,2015,90(1):20-23.
- [17] Barlow JL, Wong SH, Ballantyne SJ, et al. Tim1 and Tim3 are not essential for experimental allergic asthma[J]. Clin Exp Allergy, 2011,41(7):1012-1021.

(收稿日期:2018-01-04)