

2000, 7(5): 509.

[18] 刘洪瑞, 郁韵秋, 孟琳懿, 等. 木鳖子活性提取物在制备抗
呼吸系统肿瘤药物中的应用: 中国, 201110442495 [P].
2013-06-26.

[19] An M J, Cheon J H, Kim S W, *et al.* Guggulsterone induces
apoptosis in colon cancer cells and inhibits tumor growth in mu-
rine colorectal cancer xenografts[J]. *Cancer Lett*, 2009, 279
(1): 93-100.

[20] 马 伟. 麝香提取物对肺腺癌 GLC-82 细胞增殖的影响
[D]. 西宁: 青海大学, 2012.

槲皮素抗大鼠速发型过敏反应

史丽颖^{1,2}, 丁 辉¹, 卢 轩^{1,2}, 冯宝民^{1,2}, 王永奇², 于大永^{1,2*}
(1. 大连大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622; 2. 大连大学药物研究所, 辽宁 大连 116622)

摘要: **目的** 研究槲皮素对免疫球蛋白 E (IgE) 介导的速发型过敏反应大鼠 IgE 和白三烯 (LT) 水平、嗜酸性粒细胞 (EOS) 数量及肺组织炎症面积的影响。**方法** 大鼠随机分为模型组, 孟鲁司特钠组, 槲皮素高 (40 mg/kg)、低 (10 mg/kg) 剂量组。除空白组 (未处理大鼠) 给予生理盐水外, 其他各组大鼠腹腔注射含氢氧化铝和卵白蛋白 (OVA) 的生理盐水, 14 d 后, 尾静脉注射卵白蛋白 (15 mg/kg) 以诱发速发型过敏反应 (3 d, 1 次/d)。大鼠血清中 LT 和 IgE 水平采用 ELISA 法确定, 肺泡灌洗液 (BALF) 和全血中 EOS 的数量通过细胞计数法统计, 肺组织炎症面积采用病理学检查进行评价。**结果** 槲皮素高、低剂量组大鼠血清中 LT 和 IgE 含量、BALF 和全血中 EOS 的数量及肺组织炎症面积均明显低于模型组 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 槲皮素可能通过抑制炎性介质释放、降低炎性反应而发挥抗速发型过敏反应的作用。

关键词: 槲皮素; 速发型过敏反应; 免疫球蛋白 E; 白三烯; 嗜酸性粒细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)09-1906-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.09.006

Anti-type I allergy effect of quercetin on rats

SHI Li-ying^{1,2}, DING Hui¹, LU Xuan^{1,2}, FENG Bao-min^{1,2}, WANG Yong-qi², YU Da-yong^{1,2*}
(1. School of Life Sciences and Biotechnology, Dalian University, Dalian 116622, China; 2. Institute of Materia Medica, Dalian University, Dalian 116622, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of quercetin on the levels of IgE and leukotriene (LT), the number of eosinophils (EOS), and the area of inflammation in pulmonary tissue in IgE-induced type I allergy rats. **METHODS** The rats were randomly assigned to model, montelukast, high-dose (40 mg/kg) and low-dose (10 mg/kg) quercetin groups. Except for the control group (untreated rats given with normal saline), the rats in other groups were injected intraperitoneally with normal saline containing Al (OH)₃ and OVA, and then administered intravenously (in tail vein) with 15 mg/kg OVA (3 d, once a day) after 14 d for inducing type I allergy. The LT and IgE levels in the serum of rats were assayed by ELISA, the numbers of EOS in BALF and whole blood were counted by cell counting, and the inflammation area in pulmonary tissue was evaluated by pathologic examination. **RESULTS** Compared with the model group, the levels of IgE and LT in the serum, the numbers of EOS in BALF and whole blood, and the area of inflammation in pulmonary tissue were significantly reduced after being treated with high dose or low dose quercetin ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** Quercetin's inhibition of

收稿日期: 2015-11-24
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81073012); 辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划 (LJQ2013134)
作者简介: 史丽颖 (1975—), 女, 博士, 副教授, 从事天然活性物质的研究。E-mail: shiliying99074@163.com
* 通信作者: 于大永 (1976—), 男, 博士, 副教授, 从事天然活性物质的研究。Tel: (0411) 87402107, E-mail: yudayong@dlu.edu.cn

type I allergy may be related to the suppression of inflammatory mediators' release and the reduction in inflammation reaction.

KEY WORDS: quercetin; type I allergy; IgE; leukotriene (LT); eosinophils (EOS)

I 型超敏反应又称速发型或免疫球蛋白 E (IgE) 依赖型超敏反应,是最常见的超敏反应类型,常见的临床疾病包括皮肤过敏、消化道过敏、过敏性哮喘、过敏性鼻炎和过敏性休克等。抗过敏药主要从抑制生物活性物质释放、拮抗生物活性介质作用和改善效应器官的反应性 3 个环节发挥疗效^[1]。槲皮素为黄酮醇类化合物,具有广泛的药理作用和生物活性^[2-7],如抗氧化、清除自由基、降血压、保护心肌缺血、抗癌、抗菌、抗病毒、镇痛、增强免疫功能等,还能够抑制小鼠被动皮肤过敏和抑制致敏豚鼠肺组织释放组胺及慢反应物质^[8-9],但槲皮素对致敏动物血清中白三烯(leukotriene, LT)和 IgE 水平影响的研究尚未见文献报道。本实验以卵白蛋白和氢氧化铝混合液致敏和诱发制成速发型过敏反应大鼠模型,通过观察槲皮素对速发型过敏反应大鼠血清中 LT 和 IgE 水平、肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和全血中嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)数量及肺组织炎症面积的影响,评价槲皮素对速发型过敏反应的抑制作用。

1 材料

1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠 50 只,体重 180 ~ 190 g,由中国医科大学实验动物部提供,动物合格证号 SCXK (辽) 2008-0005。

1.2 药品 槲皮素 (Sigma-Aldrich 公司,美国);孟鲁司特钠片 (montelukast, 杭州默沙东制药有限公司,批号 L049595),用时以 5% 吐温-80 配成混悬液,4 ℃ 保存,均灌胃给药。

1.3 试剂 卵白蛋白 (北京鼎国生物技术有限责任公司);瑞氏-姬姆萨染色液 (上海生工生物工程有限公司);大鼠 LT、IgE ELISA 检测试剂盒 (Rapid Bio Lab 公司,美国)。

1.4 主要仪器 显微镜 (Olympus 公司,日本);5415R 型高速离心机 (Eppendorf 公司,德国);石蜡切片机 (Leitz 公司,德国);680 型全自动酶标仪 (Bio-Rad 公司,美国)。

2 方法

2.1 大鼠速发型过敏反应模型^[10] 配制 10 mg/mL 氢氧化铝和 1 mg/mL 卵白蛋白生理盐水混合液,取 1 mL 生理盐水混合液腹腔注射大鼠,

两周后向大鼠尾静脉注射含 1 mg/mL 卵白蛋白的生理盐水以激发过敏,剂量为 15 mg/kg,每日一次,连续注射 3 次。

2.2 分组与给药 大鼠按体质量随机分为空白组、模型组、孟鲁司特钠组、槲皮素高剂量组 (40 mg/kg) 和低剂量组 (10 mg/kg),每组 10 只。孟鲁司特钠组和槲皮素组在首次注射 OVA 和 Al (OH)₃ 混合液前 1 h 至最后一次注射 OVA 前 1 h,每天灌胃给药一次,以等体积 5% 吐温-80 水溶液给模型组和空白组大鼠灌胃。

2.3 指标测定

2.3.1 LT 与 IgE 水平测定 各组大鼠于最后一次尾静脉注射 OVA 后 24 h,按 300 mg/kg 的剂量向大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉,腹主动脉采血转移至无菌离心管中,2 500 r/min 离心 (4 ℃),15 min 后取上清,采用 ELISA 试剂盒,根据试剂盒所附操作程序,利用酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度 (D) 值,分别绘制标准曲线并计算各组大鼠血清中 LT 与 IgE 水平。

2.3.2 BALF 中 EOS 计数^[11] 取血后处死大鼠,酒精消毒,剖开胸腔,将 5 mL D-Hanks 液通过与大鼠左侧肺支气管相连的导管缓慢注入大鼠左肺部,10 s 后缓慢回抽,重复 3 次后回收约 4 mL BALF 液,转移到 5 mL 无菌离心管中,1 000 r/min 离心 (4 ℃) 15 min,倒去上清,沉淀细胞用 4 mL 生理盐水重新悬浮稀释。取少量重悬液,镜下进行白细胞计数;取少量重悬液制作涂片,瑞氏-姬姆萨染色液染色,镜下进行白细胞分类计数,统计 200 个白细胞中 EOS 所占百分数。按 BALF 中白细胞数 × EOS% 来计算 EOS 数量。

2.3.3 全血中 EOS 计数 取全血,镜下计数白细胞数,制作涂片,瑞氏-姬姆萨染色液染色,镜下进行白细胞分类计数,统计 200 个白细胞中 EOS 所占百分数。按全血中白细胞数 × EOS% 来计算全血中 EOS 数量。

2.3.4 肺组织病理学检查^[12-13] 取血后处死大鼠,立即取右侧肺组织,以 10% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片机切片,HE 染色,在显微镜下观察肺组织病理学改变。以镜下目测炎症反应面积占总面积的百分比来评价炎症反应程度,并分为 5 个

等级：一级，未见炎症反应；二级，炎症面积占总面积 <25%；三级，炎症面积占总面积 <50%；四级，炎症反应面积占总面积 <75%；五级，炎症面积占总面积 >75%。

2.4 统计处理 采用 SPSS 16.0 统计软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两样本均数比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。计数资料采用秩和检验，以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 槲皮素对致敏大鼠血清中 LT、IgE 含有量的影响 模型组大鼠血清中 LT、IgE 含有量与空白组相比显著增高 ($P < 0.01$)，槲皮素高剂量组 (40 mg/kg) 和低剂量组 (10 mg/kg) 大鼠血清中 LT、IgE 含有量与模型组相比均明显降低 ($P < 0.01$)，见表 1。

表 1 槲皮素对致敏大鼠血清中 LT、IgE 含有量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Effects of quercetin on the contents of LT and IgE in serum of sensitized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	LT/ (pg·L ⁻¹)	IgE/ (ng·L ⁻¹)
空白组	—	3.21 ± 0.51	4.88 ± 1.77
模型组	—	19.96 ± 6.61 ^{##}	22.05 ± 13.93 ^{##}
孟鲁司特钠组	1	3.54 ± 0.55 ^{**}	7.44 ± 3.64 ^{**}
槲皮素高剂量组	40	3.04 ± 0.46 ^{**}	5.75 ± 0.77 ^{**}
槲皮素低剂量组	10	3.08 ± 0.48 ^{**}	7.54 ± 1.67 ^{**}

注：与空白组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$

3.2 槲皮素对致敏大鼠 BALF 和全血中 EOS 数量

表 3 槲皮素对致敏大鼠肺组织病理形态的影响

Tab. 3 Effect of quercetin on the pathomorphology in pulmonary tissue of sensitized rats

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	动物数/只	炎症面积					U	P
			>75%	<75%	<50%	<25%	正常		
空白组	—	10	0	0	0	0	10	—	—
模型组	—	10	7	2	1	0	0	—	—
孟鲁司特钠组	1	10	0	0	0	10	0	4.141	<0.01
槲皮素高剂量组	40	10	0	0	1	9	0	4.021	<0.01
槲皮素低剂量组	10	10	0	0	0	10	0	4.141	<0.01

4 讨论

过敏反应过程中，抗原呈递细胞初次暴露于过敏原，导致过敏原特异性 Th2 细胞活化和 IgE 合成，这一过程为变应性致敏；当抗原呈递细胞再次暴露于过敏原时，则导致炎性细胞募集和活化，过敏介质释放，这将引发速发型过敏反应和迟发型过敏反应。在速发型过敏反应中，抗原呈递细胞与过敏原接触的几分钟内，IgE 介导肥大细胞脱颗粒，释放组胺、白三烯、细胞因子等过敏介质，促使毛

的影响 模型组大鼠 BALF 和全血中 EOS 数量与空白组相比显著增高 ($P < 0.01$)，槲皮素高剂量组 (40 mg/kg) 和低剂量组 (10 mg/kg) 大鼠 BALF 和全血中 EOS 数量与模型组相比明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$)，见表 2。

表 2 槲皮素对致敏大鼠 BALF 和全血中 EOS 数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Effects of quercetin on the numbers of EOS in BALF and whole blood of sensitized rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	BALF 中 EOS 数量/ ($\times 10^7 \cdot L^{-1}$)	全血中 EOS 数量/ ($\times 10^8 \cdot L^{-1}$)
空白组	—	3.62 ± 0.96	2.26 ± 0.70
模型组	—	7.56 ± 3.51 ^{##}	4.60 ± 1.13 ^{##}
孟鲁司特钠组	1	4.39 ± 1.59 [*]	2.51 ± 1.08 ^{**}
槲皮素高剂量组	40	3.73 ± 1.18 ^{**}	2.42 ± 1.13 ^{**}
槲皮素低剂量组	10	4.21 ± 1.69 [*]	2.98 ± 0.84 ^{**}

注：与空白组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$

3.3 槲皮素对致敏大鼠肺组织病理形态的影响 空白组大鼠的肺泡腔清晰、结构完整、肺泡壁光滑、肺泡腔及间质内无炎性细胞浸润；模型组大鼠的肺泡、肺泡囊、肺泡管明显变小，肺泡间隔变宽，肺间质明显增生，其中以各类成纤维细胞、嗜酸性粒细胞为主，主要表现为成纤维细胞为主的炎症。经秩和检验发现，与模型组相比，孟鲁司特钠组 (1 mg/kg) 和槲皮素高 (40 mg/kg)、低剂量组 (10 mg/kg) 大鼠肺部炎症面积均明显减小 ($P < 0.01$)，见表 3。

细血管通透性增加、平滑肌收缩、黏液分泌^[14]。其中组胺和白三烯主要介导速发型过敏反应，而后者又是支气管哮喘发病的重要诱因，它能引起气管的收缩效应，其强度是前者的数千倍^[15]。肥大细胞和嗜酸性粒细胞是过敏性哮喘发病的主要效应细胞，可分泌多种炎症介质及细胞因子，引起气道高反应性和气道上皮损伤及炎症反应^[16]。

本实验以卵白蛋白为抗原，诱发大鼠速发型过敏反应。通过研究证实，大鼠致敏后血清中 LT、

IgE 水平明显升高, BALF 和全血中 EOS 数量明显升高, 肺组织炎症面积明显增加, 这说明致敏原致敏后, 引发 IgE 介导的肥大细胞脱颗粒及炎性介质释放, 导致炎症反应发生。与模型组相比, 槲皮素高、低剂量组均能降低致敏大鼠血清中 LT、IgE 水平, 降低 BALF 和全血中 EOS 数量, 减小肺组织炎症面积。因此, 槲皮素抑制过敏反应机理可能与抑制炎症细胞的活化和浸润, 稳定肥大细胞膜, 抑制炎症介质的释放和降低炎症介质的活性有关。

参考文献:

[1] 曹雪涛. 医学免疫学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013.

[2] Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, *et al.* The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(1): 6-15.

[3] Nijveldt R J, van Nood E, van Hoorn D E, *et al.* Flavonoids; a review of probable mechanisms of action and potential applications[J]. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74(4): 418-425.

[4] 孙 涓, 余世春. 槲皮素的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 85-88.

[5] Gibellini L, Pinti M, Nasi M, *et al.* Quercetin and cancer chemoprevention[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011: 591356.

[6] 谭赛男, 陆彩玲, 崔 熠, 等. 槲皮素对结肠癌细胞生长的影响[J]. 细胞生物学杂志, 2008, 30(1): 105-108.

[7] 柯尊金, 丁心喜, 董文奎, 等. 槲皮素对人膀胱癌 BIU-87 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 实用癌症杂志, 2008, 23(2): 116-118.

[8] Lee E J, Ji G E, Sung M K. Quercetin and kaempferol suppress immunoglobulin E-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 and Caco-2 cells [J]. *Inflamm Res*, 2010, 59 (10): 847-854.

[9] 张洪泉, 刘 发, 李观海. 槲皮素的免疫抑制和抗过敏作用[J]. 新疆医科大学学报, 1985, 8(3): 227-230.

[10] 迟 磊, 符 州, 戴继宏, 等. 过敏性哮喘大鼠模型的建立[J]. 重庆医学, 2003, 32(4): 429-431.

[11] 周旭东, 史丽颖, 于大永, 等. 葫芦茶抗 IgE 介导 I 型过敏有效部位的研究[J]. 中南药学, 2011, 9(1): 35-38.

[12] 倪 健, 董竞成. 三种中药药效成分抗支气管哮喘变应性炎症的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4): 49-51.

[13] 赵孟辉, 张丽芬, 张维萍, 等. 大鼠哮喘模型中气道炎症的定量研究[J]. 浙江医科大学学报, 1997, 26(3): 100-102.

[14] Holgate S T, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(3): 218-230.

[15] Humbles A A, Lloyd C M, Mc Millan S J, *et al.* A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling[J]. *Science*, 2004, 305(5691): 1776-1779.

[16] Finotto S, De Sanctis G T, Lehr H A, *et al.* Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by anti-sense-induced local blockade of GATA-3 expression[J]. *J Exp Med*, 2001, 193(11): 1247-1260.