

# 鼻敏康合剂对变应性鼻炎大鼠 IgE、AQP5 表达的影响

杜启雪<sup>1,2</sup>, 王仁忠<sup>3\*</sup>

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250000; 2. 济南市中医医院耳鼻喉科, 山东 济南 250000; 3. 山东中医药大学附属医院耳鼻喉科, 山东 济南 250000)

**摘要:** 目的 探究鼻敏康合剂对变应性鼻炎大鼠血清 IgE、OVA-sIgE、AQP5 表达的影响。方法 60 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、氯雷他定组 (0.9 mg/kg) 以及鼻敏康合剂低、中、高剂量组 (2.53、5.06、10.12 g/kg), 每组 10 只。除对照组外, 其余各组大鼠均采用卵清蛋白 (OVA) 致敏法建立变应性鼻炎大鼠模型。造模结束后, 各组大鼠灌胃给予相应药物, 连续 2 周。采用叠加量化法记录各组大鼠症状积分, ELISA 法检测血清 IgE、OVA-sIgE、AQP5 水平, 免疫组化及 RT-qPCR 法检测鼻黏膜 AQP5 蛋白及 mRNA 表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠症状积分, 血清 IgE、OVA-sIgE、AQP5 水平, 鼻黏膜 AQP5 蛋白及 mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 氯雷他定组与鼻敏康合剂各剂量组症状积分, 血清 IgE、OVA-sIgE、AQP5 水平, 鼻黏膜 AQP5 蛋白及 mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ ), 且鼻敏康合剂各剂量组与氯雷他定组比较, 各指标无显著差异 ( $P > 0.05$ )。结论 鼻敏康合剂可通过抑制 IgE、OVA-sIgE、AQP5 表达, 改善鼻腔局部水液代谢, 减轻鼻腔黏膜炎症, 对变应性鼻炎起到治疗作用。

**关键词:** 鼻敏康合剂; 变应性鼻炎; IgE; OVA-sIgE; AQP5

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2023)05-1658-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.05.047

变应性鼻炎中医病名为“鼻鼽”, 是指以突然和反复发作的鼻痒、连续喷嚏、流清涕、鼻塞为主要特征的疾病, 发病率逐年升高, 且易出现鼻窦炎、哮喘等并发症, 严重影响患者的生活质量<sup>[1-2]</sup>。《灵枢·口问》云“阳气不和, 出于鼻, 故为嚏”<sup>[3]</sup>, 王仁忠主任据此提出“阳气失于和利”是变应性鼻炎发病的核心因素, 并研制出基于“和利阳气”治疗变应性鼻炎的制剂——鼻敏康合剂, 临床应用效果显著。本研究采用卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 致敏法制作变应性鼻炎大鼠模型, 观察鼻敏康合剂对水通道蛋白 5 (aquaporin5, AQP5)、免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)、卵清蛋白特异性免疫球蛋白 E (ovalbumin specific immunoglobulin E, OVA-sIgE) 表达的影响, 明确鼻敏康合剂的作用机制, 以期为“和利阳气”法治治疗变应性鼻炎提供实验依据。

## 1 材料

1.1 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 60 只, 42~48 日龄, 体重 180~230 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2016-0006。饲养于山东中医药大学眼科研究所, 自由进食及饮水, 温度、湿度适宜, 适应性喂养 1 周后开始实验。

1.2 试剂与药物 鼻敏康合剂由山东省中医院药剂科提

供, 生产批号 Z01080047, 由黄芪、白术、防风、细辛、干姜、五味子等组成。鼻敏康合剂饮片煎煮浓缩至生药量 10.12 g/mL, 备用。氯雷他定片, 批号 H10970410, 购自拜耳医药 (上海) 有限公司, 蒸馏水溶解并稀释为 0.1 mg/mL, 现配现用。卵清蛋白 (批号 912E052, 北京索莱宝科技有限公司); 氢氧化铝 (批号 21645-51-2, 天津市大茂化学试剂厂); 一抗 AQP5 (批号 bs-1554R, 北京博奥森生物科技有限公司); AQP5 酶测试剂盒 (批号 JYM0359Ra, 武汉基因美生物科技有限公司); PCR 引物 (批号 XY-TE-0840, 上海烜雅生物科技有限公司)。

1.3 仪器 XDS-1B 型光学倒置生物显微镜 (重庆光电仪器有限公司); LightCycler480 II 型实时荧光定量 PCR 仪 (山东恒美电子科技有限公司); K5600 型微量紫外可见分光光度计 (北京凯奥科技发展有限公司); DW-HL398S 型超低温冰箱 (中科美菱低温科技股份有限公司); 酶联免疫仪 (美国 BioTek 公司); 脱水机 (武汉俊杰电子有限公司); 石蜡切片机 (德国 Slee 公司)。

## 2 方法

2.1 分组、造模与给药 SD 大鼠采用随机数字表法分成对照组、模型组、氯雷他定组以及鼻敏康合剂低、中、高剂量组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组均建立变应性

收稿日期: 2021-11-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81974580); 济南市卫生健康委员会中医药科技计划专项项目 (2022-中-03)

作者简介: 杜启雪 (1991—), 女, 博士, 主治医师, 从事耳鼻喉疾病的理论及中医治疗研究。Tel: 17705418807, E-mail: utsjdqx@163.com

\* 通信作者: 王仁忠 (1964—), 男, 博士, 主任医师, 从事鼻病的理论及临床研究。Tel: 17705418816, E-mail: 2731600104@qq.com

鼻炎大鼠模型<sup>[4-5]</sup>。0.3 mg OVA 和 30 mg 氢氧化铝加入生理盐水配成 1 mL 混悬液，腹腔注射基础致敏，隔天 1 次，持续 2 周。第 15 天起用 10% OVA 溶液（生理盐水配制）滴鼻行鼻腔激发，每侧 50 μL，连续 1 周。最后 1 次滴鼻结束 30 min 后，观察 30 min 内大鼠鼻痒、喷嚏及流涕的情况，症状积分 ≥ 5 分者视为造模成功。采用叠加量化计分法<sup>[6-7]</sup>。①鼻痒，轻度搔鼻，记为 1 分；反复抓挠面部，记为 2 分；抓鼻不止，记为 3 分。②喷嚏，1~3 次，记为 1 分；4~10 次，记为 2 分；≥ 11 次，记为 3 分。③流涕，流至鼻孔，记为 1 分；流出鼻前孔，记为 2 分；涕流满面及挂满须毛，记为 3 分。

造模成功后，按照人鼠剂量换算给药<sup>[8]</sup>，氯雷他定组大鼠灌胃给予氯雷他定混悬液 0.9 mg/kg；鼻敏康合剂低、中、高剂量组大鼠分别灌胃给予鼻敏康合剂 2.53、5.06、10.12 g/kg；对照组、模型组大鼠灌胃给予等容量生理盐水，剂量均为 1 mL/100 g，每天 2 次，连续 2 周。

2.2 行为学评分 观察造模前、造模后及给药后各组大鼠鼻痒、喷嚏及流涕的情况，根据变应性鼻炎模型动物评分标准，采用叠加量化计分法记录。

2.3 标本采集 末次给药 24 h 后采集标本，各组大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 3 mL/kg 进行麻醉，腹主动脉取血 5 mL，静置 1~2 h 后，2 000 r/min 离心 10 min，血清分离至 EP 管中，快速剥离鼻中隔及鼻腔外侧壁呼吸区黏膜组织，生理盐水冲洗后置于 EP 管中，-80 °C 冰箱冷冻保存，备用。

2.4 ELISA 法检测血清 IgE、OVA-sIgE、AQP5 水平 冰上融化各组大鼠血清，严格按照试剂盒说明书操作，使用酶标仪在酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度值并计算血清 IgE、OVA-sIgE、AQP5 水平。

2.5 免疫组化法检测鼻黏膜 AQP5 表达 取各组大鼠鼻黏膜组织切片，采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接（streptavidin-peroxidase, SP）法检测，每张切片随机取 3 个高倍镜视野，采用 Image Pro Plus 6.0 图片分析软件计算每张图像阳性面积占比。

2.6 RT-qPCR 法检测鼻黏膜 AQP5 mRNA 表达 按 RNA 提取试剂盒说明书提取鼻黏膜总 RNA，按反转录试剂盒说明书反转录合成 cDNA，加入扩增反应体系，进行 PCR 扩增，程序设定为 95 °C 预变性 30 s；95 °C 10 s，60 °C 10 s，72 °C 20 s，共 40 个循环；95 °C 溶解 10 s，65 °C 60 s，95 °C；45 °C 退火 10 s。按 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算各组大鼠鼻黏膜 AQP5 mRNA 基因相对表达量，重复 3 次，取平均值。引物序列见表 1。

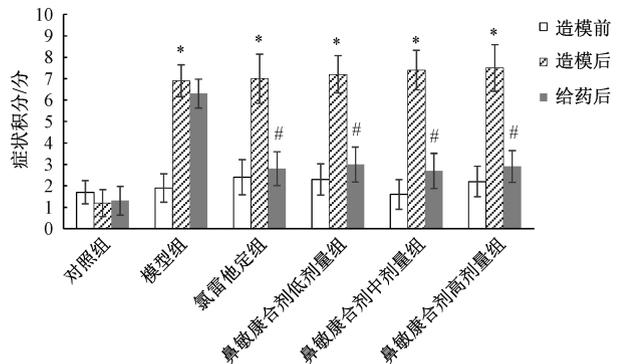
表 1 引物序列

引物	序列
AQP5	正向 5'-CCATGGTGGTGGAGTTAATCTTGA-3' 反向 5'-CATGGAACAGCCGGTGAAGTAG-3'
GAPDH	正向 5'-CACGGCAAGTTCAACGGCACAGT-3' 反向 5'-AGCGGAAGGGGCGGAGATCAT-3'

2.7 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，经 Levene 检验方差齐性，多组间比较采用单因素方差分析，进一步比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 变应性鼻炎大鼠症状积分变化 造模前，各组大鼠症状积分均小于 5 分；造模后，模型组、氯雷他定组、鼻敏康合剂各剂量组大鼠症状积分均大于 5 分，提示造模成功。造模后，与对照组比较，模型组、氯雷他定组、鼻敏康合剂各剂量组症状积分升高 (*P* < 0.05)；给药后，与模型组比较，氯雷他定组与鼻敏康合剂各剂量组症状积分降低 (*P* < 0.05)，见图 1。



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

图 1 各组大鼠症状积分 ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 10)

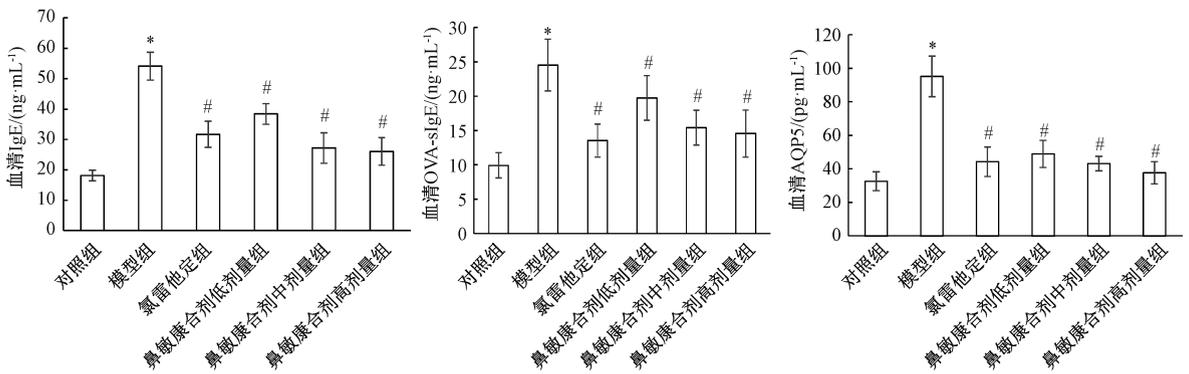
3.2 鼻敏康合剂对变应性鼻炎大鼠血清 IgE、OVA-sIgE、AQP5 水平的影响 与对照组比较，模型组大鼠血清 IgE、OVA-sIgE、AQP5 水平升高 (*P* < 0.05)；与模型组比较，氯雷他定组及鼻敏康合剂各剂量组血清 IgE、OVA-sIgE、AQP5 水平降低 (*P* < 0.05)，见图 2。

3.3 鼻敏康合剂对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜 AQP5 蛋白及 mRNA 表达的影响 鼻黏膜内 AQP5 阳性表达呈棕黄色或棕褐色。结果显示，对照组大鼠鼻黏膜中 AQP5 阳性细胞表达较少，且呈散在分布；模型组大鼠鼻黏膜中 AQP5 阳性细胞表达增加；氯雷他定组与鼻敏康合剂各剂量组大鼠鼻黏膜中 AQP5 阳性表达减少，见图 3。

与对照组比较，模型组大鼠鼻黏膜 AQP5 平均光密度值及 mRNA 表达升高 (*P* < 0.05)；与模型组比较，氯雷他定组与鼻敏康合剂各剂量组 AQP5 平均光密度值及 mRNA 表达降低 (*P* < 0.05)，见图 4。

### 4 讨论

变应性鼻炎是一种因机体接触过敏原后由 IgE 介导的发生于鼻腔黏膜的慢性炎症性疾病<sup>[9]</sup>，其发病机制较为复杂，涉及多种细胞因子，在过敏性疾病中，IgE 是肥大细胞活化的关键介质，是变应性鼻炎病理过程中重要的免疫分子<sup>[10]</sup>。本研究，模型组大鼠血清 IgE、OVA-sIgE 水平升高，结合症状积分，表明造模成功。氯雷他定是一种长效三环类抗组胺药，能降低血清 IgE 水平，抑制过敏反应，迅速缓解患者的临床症状，是治疗变应性鼻炎的一线药



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

图2 各组大鼠血清 IgE、OVA-sIgE、AQP5 水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

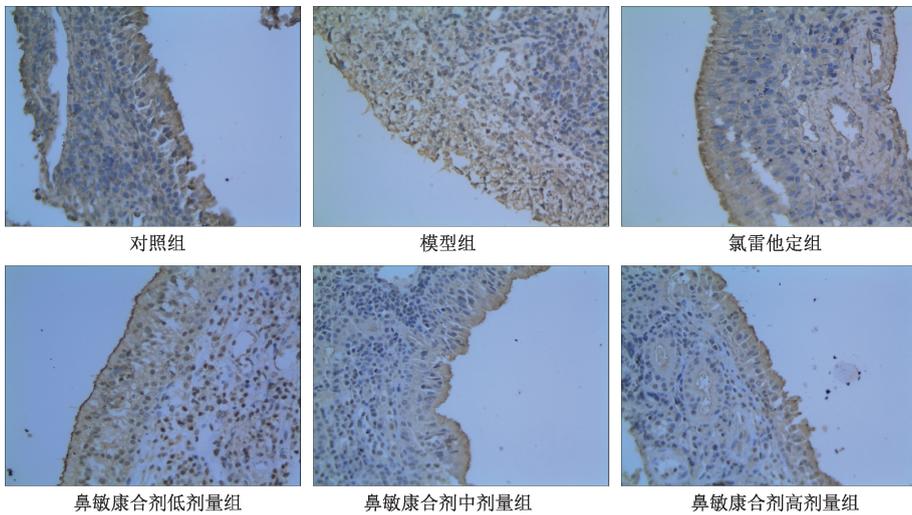
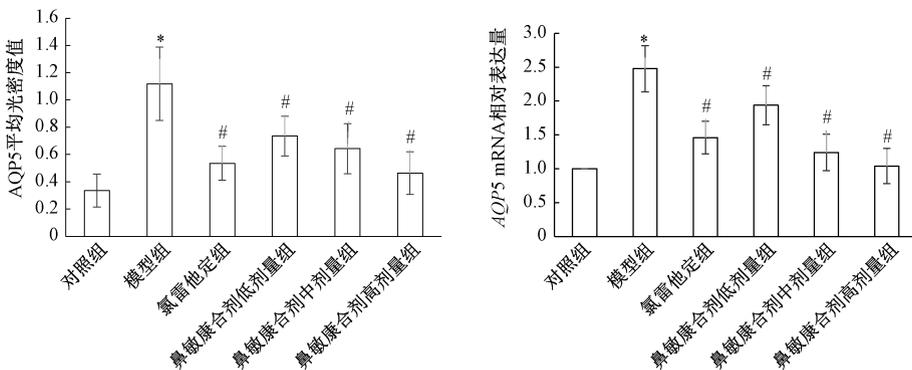


图3 各组大鼠鼻黏膜 AQP5 阳性细胞表达 ( $\times 400$ )



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

图4 各组大鼠鼻黏膜 AQP5 平均光密度值及 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

物<sup>[11-12]</sup>。本研究采用氯雷他定作为对照，研究鼻敏康合剂治疗变应性鼻炎的作用机制。

AQPs 是一组调节水跨膜转运的细胞膜蛋白家族，具有升高细胞膜水通透力的功能，可促进液体快速转运和吸收，调控水液代谢及黏液分泌。AQP5 大量表达于鼻腔黏膜中，其表达升高可引起跨上皮细胞水转运过程中水被过度地分泌至腺腔，导致腺体分泌量增多，进而出现大量水样鼻涕<sup>[13-14]</sup>。且 AQP5 是黏膜下层浆液性腺体分泌的限速

屏障，表达越多，腺上皮细胞水通透性越高，腺体分泌的速率也就越快<sup>[15]</sup>。本研究发现，模型组大鼠 AQP5 阳性表达及 mRNA 水平升高，提示在变应性鼻炎发病过程中，AQP5 大量表达，鼻腔腺体过度分泌，与既往研究结果一致<sup>[13]</sup>。

中医学认为，鼻鼽所因，多责之于阳气失和。阳气失和，卫外功能异常，则风寒邪气易于侵袭，口鼻、肺经首当受累，出现鼻塞、流涕、喷嚏的症状。同时阳气失和，

气化不利,水饮内停,壅塞鼻窍,亦见鼻塞、鼻胀、鼻流涕等症。鼻敏康合剂以调和阳气为主,辅以祛风通窍,为治疗变应性鼻炎的经验用方。方中麻黄、桂枝、防风、甘草在表发散风寒,在里温助阳气;黄芪、白术益气固表,健脾化饮;干姜、细辛、半夏温化寒饮;五味子、白芍、墨旱莲敛阴和营润燥,防辛温发散之品耗伤肺气;痒自风来,止痒必先疏风,故以蝉蜕、蒺藜、地龙、川芎、紫草祛风通络止痒。全方共奏温肺散寒、益气化饮之功。前期研究显示,鼻敏康合剂可以改善阳气虚型变应性鼻炎患者的过敏症状,临床有效率达90%以上,能够降低变应性鼻炎大鼠血清分泌型黏蛋白5A<sub>C</sub>及5B水平,调节鼻腔黏膜纤毛清除系统及鼻腔黏膜的防御功能,减轻鼻腔高分泌状态<sup>[16-18]</sup>。本研究结果表明,致敏大鼠经药物干预后,其抓鼻、喷嚏、流涕等症状改善,血清IgE、OVA-sIgE水平降低,AQP5阳性细胞数及mRNA表达降低,鼻敏康合剂与氯雷他定两种药物效果相当。

综上所述,鼻敏康合剂可通过降低血清IgE、OVA-sIgE水平,降低AQP5表达,抑制过敏反应,调节鼻腔局部水液代谢,从而改善变应性鼻炎临床症状。后续实验将进一步明确鼻敏康合剂对AQP5的调控机制,为鼻敏康合剂治疗变应性鼻炎提供新的靶点。

#### 参考文献:

[1] 李杰,赵翡翠,王明礼,等.《内经》鼻鼽刍议[J]. 中国中医基础医学杂志,2011,17(1):33-34;50.

[2] 张晓阳,连增林,孙劲旅,等.祛风胜湿法治疗变应性鼻炎的理论与临床依据[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(20):198-205.

[3] 钟萍,田理.《内经》对鼻鼽的认识[J]. 四川中医,2010,28(12):46-48.

[4] 李莉珠,吴卿,易欣,等.变应性鼻炎中医证候动物模型的研究进展[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2017,31(3):60-63.

[5] 刘敏,张大铮,李昕荣,等.卵白蛋白鼻腔强化激发制作变应性鼻炎大鼠模型效果观察[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志,2013,21(5):325-328.

[6] 赵秀杰,董震,杨占泉,等.鼻超敏反应实验模型的建立[J]. 中华耳鼻喉科杂志,1993,28(1):17-18;58-59;63.

[7] 郭小艳,耿曼英,李仲,等.布地奈德预防应用对变应性鼻炎大鼠模型IL-4和IL-5表达影响的研究[J]. 临床耳鼻喉头颈外科杂志,2014,28(14):1057-1060.

[8] 陈奇,王建华.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:33-34.

[9] 黄选兆,汪吉宝,孔维佳.实用耳鼻咽喉头颈外科学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2007:218-220.

[10] 王佳图,刘娜,张曼.总IgE及嗜酸性粒细胞计数在过敏性鼻炎诊断中的价值[J]. 标记免疫分析与临床,2020,27(10):1642-1645.

[11] 黎桥,席克虎,桂岩,等.18 $\beta$ -甘草次酸对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜中水通道蛋白1和5表达的影响[J]. 中国医科大学学报,2015,44(11):961-965.

[12] 白雪峰,吴正祥,胡正燊.18 $\beta$ -甘草次酸对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜重塑的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(14):2103-2106.

[13] 雷霏,赵小冬,朱建国,等.实验性变应性鼻炎大鼠鼻黏膜水通道蛋白5的表达及意义[J]. 中华耳鼻喉头颈外科杂志,2005,40(3):172-175.

[14] Zhang J P, Li S W, Liu J, et al. Higher expression levels of aquaporin (AQP) 1 and AQP5 in the lungs of arid-desert living *Lepus yarkandensis* [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2020, 104(4): 1186-1195.

[15] Song Y, Verkman A S. Aquaporin-5 dependent fluid secretion in airway submucosal glands [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(44): 41288-41292.

[16] 孟伟,杜启雪,王仁忠.鼻敏康合剂对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜病理及血清分泌型黏蛋白水平的影响[J]. 山东医药,2018,58(34):37-40.

[17] 王仁忠,孟伟,宁云红.和利阳气法治疗变应性鼻炎临床疗效观察[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(8):16-17.

[18] 孙蒙,王仁忠.鼻敏康合剂治疗阳气虚型变应性鼻炎72例疗效观察[J]. 云南中医中药杂志,2013,34(6):39-40.