

金匱肾气丸对肾阳虚变应性鼻炎缓解期小鼠 Th1/Th2 细胞因子的影响

李 笋, 王培源, 钟 萍, 阮 岩(广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察金匱肾气丸对肾阳虚变应性鼻炎(AR)缓解期小鼠 Th1/Th2 细胞因子的影响, 探讨中医在 AR 缓解期“治未病”的可能机理。**方法** 建立肾阳虚 AR 小鼠模型, 实验分肾阳虚 AR 组、金匱肾气丸组和正常对照组。采用酶联免疫吸附法测定小鼠血清中 Th1/Th2 细胞因子和组胺, 并观察小鼠鼻黏膜肥大细胞、嗜酸性粒细胞浸润情况。**结果** 金匱肾气丸能改善肾阳虚 AR 模型小鼠鼻黏膜的变态反应症状; 降低肾阳虚 AR 小鼠血清 IL-4 水平, 升高 IFN- γ 、IL-2 水平, 降低组胺含量($P < 0.01$)。**结论** 金匱肾气丸对肾阳虚 AR 小鼠的治疗作用可能与其下调小鼠血清 IL-4, 上调 IFN- γ 、IL-2 水平, 纠正失衡的 Th1/Th2 有关。

关键词: 金匱肾气丸; 变应性鼻炎; 鼻黏膜; 治未病; 细胞因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)03-0258-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.03.013

Effects of *Jinkui Shenqi* Pills on Th1/Th2 Cytokines in Mice with Kidney-*yang* Deficiency Allergic Rhinitis in Remission Stage

LI Sun, WANG Peiyuan, ZHONG Ping, RUAN Yan (The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects on *Jinkui Shenqi* pills, which is for tonifying-kidney *yang*, on Th1/Th2 cytokines in mice with kidney-*yang* deficiency allergic rhinitis (AR) in remission stage, and to explore the possible mechanism of the theory of preventive treatment of disease for AR in remission stage. **Methods** We set up the kidney-*yang* deficiency AR mice model with ovalbumin and adenine. The mice were divided into model group, *Jinkui Shenqi* Pills group and normal control group. Enzyme linked immunosorbent assay was adopted for the observation of cytokines and histamine in serum, and we also observed the nasal symptoms, and the infiltration of mast cells and eosinophils in nasal mucosa. **Results** *Jinkui Shenqi* Pills relieved allergic reaction of mice nasal mucosa, decreased serum IL-4 and histamine, increased IFN- γ and IL-2 cytokines in AR mice ($P < 0.01$). **Conclusion** The therapeutic mechanism of *Jinkui Shenqi* Pills may be related with down-regulation of serum IL-4, up-regulation of IFN- γ and IL-2, and restoring Th1/Th2 cytokines network imbalance in kidney-*yang* deficiency allergic rhinitis mice.

Keywords: *Jinkui Shenqi* pills; Allergic rhinitis; Preventive treatment of disease; Cytokines

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR), 中医称为鼻鼽, 以反复发作的鼻痒、喷嚏、流清涕、鼻塞为主要症状。中医认为本病的发生主要和肺、脾、肾三脏功能失调相关。对于本病的治疗, 历代医家积累了非常丰富和宝贵的经验, 在提高临床疗效方面取

得了较好的效果^[1-2]。AR 发病一般分为发作期和缓解期, 医生和患者常因为缓解期症状很轻或没有而忽略了治疗。在中医治未病理论的指导下, 临床上根据变应性鼻炎的发病特点, 在缓解期给病人予积极治疗, 能有效改善病人体质和减少发作次数。本研

收稿日期: 2012-10-18

作者简介: 李笋, 女, 博士研究生, 研究方向: 变应性鼻炎的中西医结合研究。Email: lisunzy@163.com。通讯作者: 阮岩, 教授, 博士生导师, 主要从事变应性鼻炎的中西医结合研究工作。Email: ruanyan63@163.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(2008B030301222)。

究观察金匱肾气丸对肾阳虚 AR 缓解期小鼠 Th1/Th2 细胞因子白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-4(IL-4)及肿瘤坏死因子- γ (IFN- γ) 等指标的影响,初步探讨中医温补肾阳法对 AR 缓解期“治未病”的可能机理。

1 材料与方

1.1 动物 雄性 C57BL/6 小鼠, SPF 级, 8 周龄, 体质量 18~22 g, 广东省医学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(粤)2008-0002, 适应性饲养 1 周后开始实验。

1.2 药物及试剂 金匱肾气丸, 根据《金匱要略》中“肾气丸”原方药物及剂量, 以中医传统方法水煎浓缩成每毫升含生药 1 g。酶联免疫吸附法(ELISA)测定试剂盒, 法国 Diaclone 公司, 批号: F981016; 腺嘌呤(adenine), 中国科学院生物化学研究所, 批号: 04096; 卵清蛋白(OVA, Ovalbumin), 美国 Sigma 公司, 批号: F990618。

1.3 分组 将小鼠随机分为肾阳虚 AR 模型组、金匱肾气丸组、正常对照组。

1.4 小鼠模型的建立 参考文献方法^[3-5]复制 AR 小鼠模型: 小鼠腹腔注射含 OVA 1 μ g、氢氧化铝 2 mg 的生理盐水溶液 0.1 mL, 每 5 天 1 次, 共 5 次。末次注射后的第 2 天, 于小鼠眼底静脉采血, 行被动皮肤免疫实验 (passive cutaneous anaphylaxis, PCA), 方法是将血液离心, 取血清并用生理盐水稀释; 取白色豚鼠, 将其背部毛剃掉, 用红色油性笔在背部划数个直径为 1.5 cm 的圆圈, 将不同浓度的血清各 40 μ L 在圆圈内皮下注射, 72 h 后, 将伊文斯蓝 5 mg、OVA 1mg 溶解于 1 mL 的生理盐水, 并注射到豚鼠的静脉里, 30 min 后观察豚鼠背部情况, 若注射血清部位出现蓝斑, 证明豚鼠内有 OVA 特异抗体, 表示造模成功。确认造模成功后, 用含 400 μ g OVA 的生理盐水溶液 2 μ L 滴鼻, 进行鼻腔诱发, 1 天 1 次, 共 4 次。

肾阳虚 AR 小鼠模型: 在用 OVA 致敏的同时, 每天以腺嘌呤研细末与饲料粉末按 0.5 % 比例均匀混合作模型组饲料, 腺嘌呤剂量为约 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 连续 3 周。

1.5 给药 在动物造模成功后给予普通饲料喂养 7 d, 以模拟小鼠处于肾阳虚 AR 的缓解期。第 8 天开始, 金匱肾气丸组给予金匱肾气丸 10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (约为成

人临床常用量 10 倍), 正常对照组和模型组给予等量的生理盐水, 灌胃给药, 给药容积为 10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 共 21 d。给药后再进行鼻腔诱发, 每天 1 次, 连续 4 次。

1.6 观察指标

1.6.1 小鼠的一般状态 观察并记录小鼠饮食、大小便、活动及毛发等情况。

1.6.2 测定血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 和组胺的含量 小鼠眼底静脉取血, 离心后取血清备用, 采用 ELISA 法测定血清中细胞因子 IL-2、IL-4、IFN- γ 和组胺的含量。

1.6.3 鼻黏膜组织病理学观察 采血后, 断颈椎处死小鼠, 显微镜下取小鼠鼻中隔前中部黏膜, 常规固定于 10 % 甲醛溶液中, 经石蜡包埋、切片、染色, 采用甲苯胺蓝染色法观察肥大细胞, 采用苏木素-伊红(HE)染色法观察嗜酸性粒细胞的浸润情况。

1.7 统计学处理方法 全部实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 使用 SPSS17.0 统计软件, 用单因素方差分析方法, 均数两两比较用 q 检验(Newman-Keuls 法)。

2 结果

2.1 小鼠一般状态 模型复制进行到第 10 天时, 肾阳虚 AR 模型组、金匱肾气丸组小鼠表现为精神不振、食欲减退、毛发凌乱枯槁、易脱落, 畏寒肢冷, 行动迟缓, 蜷缩懒动, 尿多, 体质量下降。随着实验时间的延长, 肾阳虚症状更为明显, 至肾阳虚造模成功后第 1 次鼻腔诱发期间, 肾阳虚 AR 模型组、金匱肾气丸组各有 2 只小鼠死亡, 死亡小鼠解剖可见典型的大白肾。正常对照组在整个实验过程中进食正常、毛发光滑柔顺、机警灵敏、体质量增加; 在缓解期给药后, 金匱肾气丸组小鼠一般状态较肾阳虚 AR 模型组明显改善, 活动增多, 毛发比较润泽; 正常对照组无异常。

2.2 金匱肾气丸对肾阳虚 AR 小鼠血清细胞因子的影响 与正常对照组比较, 肾阳虚 AR 模型组小鼠血清组胺明显升高($P < 0.01$), Th1 细胞因子 IL-2、IFN- γ 水平明显降低($P < 0.01$), Th2 细胞因子 IL-4 水平明显升高($P < 0.01$), 表明 AR 小鼠模型复制成功。与肾阳虚 AR 模型组比较, 金匱肾气丸组 IL-2、IFN- γ 水平明显升高($P < 0.01$), 组胺、IL-4 水平降低($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 金匱腎氣丸对肾阳虚 AR 小鼠血清细胞因子的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 1 The effects of *Jinkui Shenqi* pills on cytokines in kidney-
yang deficiency AR mice

组别	n	组胺 /pg·mL ⁻¹	IL-2/pg·mL ⁻¹	IL-4/pg·mL ⁻¹	IFN- γ /pg·mL ⁻¹
正常对照组	8	0.52 $\pm$ 0.310	178.64 $\pm$ 23.16	97.12 $\pm$ 22.98	198.24 $\pm$ 23.45
肾阳虚 AR 模型组	6	2.29 $\pm$ 0.10**	90.65 $\pm$ 42.98**	168.511 $\pm$ 13.16**	147.02 $\pm$ 21.25**
金匱腎氣丸组	6	1.12 $\pm$ 0.78 $\Delta\Delta$	231.24 $\pm$ 23.26 $\Delta\Delta$	119.822 $\pm$ 24.02 $\Delta\Delta$	211.97 $\pm$ 34.14 $\Delta\Delta$

注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ；与肾阳虚 AR 模型组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.3 鼻黏膜组织病理学观察结果 鼻中隔黏膜切片病理观察，正常对照组纤毛上皮无短缩，黏膜下腺细胞，淋巴细胞无增多，毛细血管无扩张，上皮组织下无浮肿，结缔组织无增生变性；HE 染色后找不到淡红色嗜酸性粒细胞；甲苯胺蓝染色找不到肥大细胞。肾阳虚 AR 模型组纤毛上皮缩短，纤毛上皮被鳞状上皮替代，黏膜下腺细胞、淋巴细胞增多，毛细血管扩张，上皮苍白水肿，结缔组织增生变性，嗜酸性粒细胞增多，呈淡红色，几乎每张片中都能找到嗜酸性粒细胞，甲苯胺蓝染色后可找到肥大细胞。与肾阳虚 AR 模型组比较，金匱腎氣丸组黏膜上皮结缔组织增生变性减少，淋巴细胞数减少，纤毛上皮有所恢复。HE 染色后嗜酸性粒细胞减少，甲苯胺染色后未找到肥大细胞。

3 讨论

人 CD4⁺T 细胞分为二个亚群：Th1 和 Th2 亚群，Th1 细胞主要产生 IL-2、IFN- γ ，与细胞免疫有关；Th2 细胞主要产生 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等，与体液免疫有关。在变态反应的局部，Th2 细胞占优势时，细胞因子的平衡被破坏，由于 Th2 细胞因子的作用，促进 B 细胞 IgE 产生，引起过敏性亢进，即 IL-3、IL-5、IL-9 等诱导肥大细胞、嗜碱性白细胞的分化、增殖，进一步促使变态反应亢进。Th1/Th2 细胞因子平衡决定着免疫反应的式样，在变态反应中有着十分重要的意义。中医学认为 AR 的发生是阴阳平衡失调所致，这和西医学认为 AR 发病和 Th1/Th2 细胞因子平衡失调的观点相似，其中阴阳平衡失调主要是阳虚阴盛，肾阳虚是其病因之一，临床上常用的温补肾阳方剂金匱腎氣丸能取得较好疗效^[6]。

本研究表明，AR 造模后均出现挠鼻现象，PCA 实验确认卵清蛋白 IgE 抗体增高，鼻中隔黏膜嗜酸性粒细胞增多，黏膜下腺细胞、淋巴细胞增多等符合变态反应的病理改变，说明 AR 的造模是成功的。肾

阳虚 AR 模型组出现精神不振、食欲减退、毛发凌乱枯槁、易脱落，畏寒肢冷，行动迟缓，蜷缩懒动，尿多，体质量下降等符合肾阳虚的病理改变，说明肾阳虚造模成功。

肾阳虚 AR 模型组造模后出现黏膜下腺细胞、淋巴细胞增多，毛细血管扩张，上皮组织苍白水肿，嗜酸性粒细胞、肥大细胞浸润等是典型的变态反应病理改变。缓解期服用金匱腎氣丸后，上皮结缔组织增生变性减少，淋巴细胞数减少，纤毛上皮有所恢复，嗜酸性粒细胞及肥大细胞数减少，说明金匱腎氣丸能减轻肾阳虚状态下 AR 小鼠鼻黏膜的变态反应。

缓解期应用温补肾阳的金匱腎氣丸，血清 Th1 细胞因子 IL-2、IFN- γ 水平升高，而 Th2 细胞因子 IL-4 水平降低，与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，说明金匱腎氣丸能纠正肾阳虚 AR 小鼠失衡的 Th1/Th2 细胞因子。金匱腎氣丸能使肾阳虚 AR 小鼠血清组胺含量明显降低，说明金匱腎氣丸可通过抑制组胺释放，减轻变态反应症状。

本实验结果提示，肾阳虚 AR 小鼠服用金匱腎氣丸后，能减轻上皮组织嗜酸性粒细胞、肥大细胞浸润等，减轻鼻黏膜变态反应状况，可能与金匱腎氣丸能纠正失衡的 Th1/Th2 细胞因子，使体内 T 细胞分化偏移发生逆转，促进 Th1/Th2 分泌的细胞因子恢复平衡有关，这与我们的前期研究结果一致^[6]，同时为温补肾阳法在 AR 缓解期“治未病”提供药理学依据。

参考文献：

[1] 王世贞. 中医耳鼻喉科学[M]. 北京：中国中医药出版社，2003：124-125.

[2] 王德鉴. 中医耳鼻喉口腔科学[M]. 北京：人民卫生出版社，1994：347-348.

[3] 邱宝珊，王士贞. 肾阳虚型变应性鼻炎动物模型的建立[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志，2002，10(1)：16.

[4] 徐慧贤，阮岩. 豚鼠肾阳虚变应性鼻炎动物模型的建立[J]. 中药新药与临床药理，2005，16(6)：427-429.

[5] 阮岩. 麻黄汤抗过敏作用的实验研究[J]. 中药新药与临床药理，2002，13(3)：152-154.

[6] 阮岩，杨占军. 温肾补阳法对肾阳虚变应性鼻炎大鼠模型血清 Th1/Th2 细胞因子表达的影响[J]. 中药新药与临床药理，2006，17(1)：29-32.

(编辑：梁进权)