

加味小青龙汤及其拆方对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜病理形态和 IL-4 含量的影响

王树鹏 郭晓东 李海波 张丽艳 曲道炜

【摘要】 目的 观察加味小青龙汤及其拆方对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜病理形态和血浆白细胞介素 4(IL-4)含量的影响,探讨该方益气温阳化饮的作用机制及其组方配伍规律。**方法** 将 90 只大鼠随机分成正常对照组、模型组、益气组、温阳组、化饮组、益气温阳组、益气化饮组、温阳化饮组和加味小青龙汤组,每组 10 只。采用抗原佐剂全身致敏与局部攻击方法,制备大鼠变应性鼻炎模型,正常对照组和模型组灌服生理盐水,其它各治疗组给予相应的药物,每天一次灌胃给药,连续 4 周。检测加味小青龙汤及其拆方对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜病理形态和血浆 IL-4 含量的影响。**结果** 模型组可见鼻黏膜水肿、充血,上皮不完整,重度炎细胞浸润,嗜酸粒细胞浸润明显,黏膜上皮坏死。各治疗组炎症浸润程度均有改善,以加味小青龙汤组效果最好。模型组血浆 IL-4 含量明显升高,加味小青龙汤治疗组及其拆方组血浆 IL-4 含量明显降低,与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中以加味小青龙汤组与各拆方组比较有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 加味小青龙汤及其拆方各组药物,均具有不同程度的改善鼻黏膜病理炎症浸润程度、降低血浆 IL-4 含量的作用,加味小青龙汤组的疗效最好,体现了温阳、益气、化饮的合理配伍表现出协同增效的整体调节作用,揭示了加味小青龙汤配伍的高度科学内涵。

【关键词】 加味小青龙汤; 变应性鼻炎; 病理形态; 白细胞介素 4

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.03.003

Added Xiaqinglong Decoction and its ingredient-reduced prescription on pathological nasal allergic rhinitis in rats and plasma levels of IL-4 WANG Shu-peng, GUO Xiao-dong, LI Hai-bo, et al. Basic Medical College of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China
Corresponding author: WANG Shu-peng, E-mail: sywangshupeng@163.com

【Abstract】 Objective To observe the added Xiaqinglong Decoction and its ingredient-reduced prescription on pathological nasal allergic rhinitis in rats and plasma levels of interleukin-4 (IL-4), and to explore the mechanism of tonifying qi and warming yang to expel retained morbid fluid and their combination compatibility of the law. **Methods** The 90 rats were randomly divided into nine groups, namely, normal control group, model group, reinforcing qi group, warming yang group, expelling retained morbid fluid group, reinforcing qi and warming yang group, tonifying qi and expelling retained morbid fluid group, warming yang to expel retained morbid fluid group, the added Xiaqinglong Decoction group, 10 rats in each group. Rat model of allergic rhinitis was made by the use of adjuvant systemic antigen sensitization and local attack, the normal control group and model group were fed with normal saline, the other group was treated with appropriate drugs, once a day oral administration, continuous for 4 weeks. The pathological nasal allergic rhinitis and plasma IL-4 level in rats were tested. **Results** The control group showed that nasal was swelling, congestion, epithelial incomplete, severe inflammatory cell infiltration, eosinophil infiltration, epithelial necrosis. Inflammatory infiltration in all treatment groups had improved and the added Xiao-

基金项目:辽宁省教育厅课题(2008444)

作者单位:110847 沈阳,辽宁中医药大学基础医学院

作者简介:王树鹏(1973-),博士,副教授。研究方向:《伤寒论》理论与方药治疗免疫性疾病的研究。E-mail:sywangshupeng@163.com

文献标引格式:

王树鹏,郭晓东,李海波,等.加味小青龙汤及其拆方对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜病理形态和IL-4含量的影响[J].环球中医药,2012,5(3):170-174.

qinglong Decoction was best. Compared with control group, Plasma IL-4 Content was significant lower in the added Xiaoqinglong Decoction and its ingredient-reduced prescription group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). While compared with other its ingredient-reduced prescription groups, there was statistical significance in the added Xiaoqinglong Decoction group ($P < 0.05$). **Conclusion** The added Xiaoqinglong Decoction and its ingredient-reduced prescription can improve inflammatory infiltration of nasal pathological and regulate plasma levels of IL-4. The added Xiaoqinglong Decoction demonstrated best effects, which implied that the compatibility of the overall regulatory role of synergies of tonifying qi and warming yang to expel retained morbid fluid and a high degree of compatibility of scientific content.

【Key words】 The added Xiaoqinglong Decoction; Allergic rhinitis; Pathology; Interleukin-4

加味小青龙汤临床应用治疗变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 疗效确切^[1], 临证中发现很多 AR 患者存在阳气不足, 水饮内停之表现, 加味小青龙汤具有益气温阳化饮之功用, 为深入研究加味小青龙汤益气温阳化饮的作用机制和配伍规律, 本课题组制备了变应性鼻炎的大鼠模型, 以 AR 大鼠血浆 IL-4 和鼻黏膜病理形态为指标, 对加味小青龙汤进行拆方研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 90 只, 体重为 200 ~ 240 g。由辽宁中医药大学实验动物中心提供, 动物合格证号: 2000 量认 (辽) 字 (S2011) 号。

1.2 分组方法

按照成组实验设计方法, 将大鼠按体重采用随机区组法分为 9 组, 每组 10 只。分别为: (1) 正常对照组; (2) 模型组; (3) 益气组 (黄芪 6 g、白术 9 g、防风 6 g); (4) 温阳组 (麻黄 9 g、桂枝 9 g、白芍 9 g、炙甘草 9 g); (5) 化饮组 (干姜 9 g、细辛 5 g、五味子 9 g、半夏 9 g); (6) 益气温阳组 (黄芪 6 g、白术 9 g、防风 6 g、麻黄 9 g、桂枝 9 g、白芍 9 g、炙甘草 9 g); (7) 益气化饮组 (黄芪 6 g、白术 9 g、防风 6 g、干姜 9 g、细辛 5 g、五味子 9 g、半夏 9 g); (8) 温阳化饮组 (麻黄 9 g、桂枝 9 g、白芍 9 g、炙甘草 9 g、干姜 9 g、细辛 5 g、五味子 9 g、半夏 9 g); (9) 加味小青龙汤组 (麻黄 9 g、桂枝 9 g、白芍 9 g、炙甘草 9 g、干姜 9 g、细辛 5 g、五味子 9 g、半夏 9 g、黄芪 6 g、白术 9 g、防风 6 g)。

1.3 试验用药

实验用中药购自辽宁中医药大学附属医院, 经辽宁中医药大学药用植物教研室鉴定均为正品。生药剂量根据《伤寒论》小青龙汤原方剂量比例进行配比。各治疗组药物煎煮后浓缩成含生药量

1 g/ml 的浓缩液。

1.4 试剂与仪器

(1) 试剂: 卵白蛋白: 上海化学试剂厂 (20090508)。吸附白百破疫苗由辽宁中医药大学疾病预防控制中心提供, 规格 5.0 ml/支, 批号: 201001009-2。氢氧化铝: 沈阳市试剂三厂 (批号: 20080912)。(2) 主要仪器: 切片机型号为 AO-820 (美国制造); 荧光显微镜型号为 OLYMPUS (日本制造); 照相机型号为 OLYMPUS C-35AD-2 (日本制造)。

1.5 造模方法^[2]

乙醚麻醉大鼠, 在大鼠左右前肢、后肢跖部分别注射 0.1 ml、0.2 ml 的抗原佐剂混悬液致敏。初次致敏 5 天后强化致敏, 将 0.5 mg 卵白蛋白溶解于 1 ml 生理盐水注入大鼠背部。初次致敏第 7 天开始用卵白蛋白滴鼻, 1 次/天, 10 μ l/次。连续滴鼻 7 天。之后隔日给予卵白蛋白 1 g/L 滴鼻, 以维持对鼻黏膜的刺激。连续灌胃给药 4 周, 每隔 7 天观察一次鼻部滴蛋白液 30 分钟内搔鼻次数和喷嚏次数。

1.6 症状分级标准

采取记分法记录鼻分泌物量、喷嚏次数及鼻痒程度。方法如下: (1) 鼻涕: 流至前鼻孔 1 分; 超过前鼻孔 2 分; 涕流满面 3 分。(2) 喷嚏: 4 个以内 1 分; 5 ~ 10 个 2 分; 10 个以上 3 分。(3) 鼻痒: 轻度抓鼻 1 分; 频繁抓鼻 2 分; 抓鼻不止 3 分。自鼻腔激发开始观察 30 分钟, 采用叠加法记分, 总分超过 5 分为动物造模成功^[3]。

1.7 给药方法

按照《药理实验方法学》^[4]人与动物等效剂量换算方法, 人与大鼠药物每公斤体重剂量之比约为 1: 6, 因此各组药物灌胃剂量如下: (1) 正常对照组: 按照每 100 g 大鼠体重予以 1 ml 生理盐水灌胃; (2) 模型组: 同正常对照组; (3) 益气组: 按每 1 kg 大鼠体重予以 2.1 ml 所试药物煎剂 (相当于 2.1 g

生药)灌胃;(4)温阳组:按每 1 kg 大鼠体重予以 3.6 ml 所试药物煎剂(相当于 3.6 g 生药)灌胃;(5)化饮组:按每 1 kg 大鼠体重予以 3.2 ml 所试药物煎剂(相当于 3.2 g 生药)灌胃;(6)益气温阳组:按每 1 kg 大鼠体重予以 5.7 ml 所试药物煎剂(相当于 5.7 g 生药)灌胃;(7)益气化饮组:按每 1 kg 大鼠体重予以 5.3 ml 所试药物煎剂(相当于 5.3 g 生药)灌胃;(8)温阳化饮组:按每 1 kg 大鼠体重予以 6.8 ml 所试药物煎剂(相当于 6.8 g 生药)灌胃;(9)加味小青龙汤组:按每 1 kg 大鼠体重予以 9.0 ml 所试药物煎剂(相当于 9.0 g 生药)灌胃。各组每天一次灌胃给药。

1.8 疗效评定标准

参考 1997 年在海口修订 AR 诊断标准和疗效评定标准^[5],治疗后症状累计积分减少 2 或 3 分为显效,减少 1 分为有效,无变化或加重为无效。

1.9 取样及检测方法

将大鼠用 25% 乌拉坦腹腔麻醉,仰卧位固定。剪开颈部皮肤,钝性分离,暴露颈动脉,用一次性注射器抽取颈动脉血 3 ml,立即注入抗凝管中,静置 2 小时后 3000 转/分离心 15 分钟,分取血浆, -20℃ 保存并送检。IL-4、TNF- α 含量检测采用 ELISA 法,严格按试剂盒说明进行操作。

1.10 统计学方法

实验数据经 SPSS 13.0 软件处理,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用方差分析,各组间比较用 q 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 给药前后症状积分情况

造模后,造模各组大鼠症状累计积分平均达到 5 分以上,与正常对照组有统计学意义($P < 0.05$),

表明造模成功。经过药物治疗,各药物治疗组大鼠症状较模型组均有所减轻,与模型组相比具有统计学意义($P < 0.05$)。其中加味小青龙汤组明显降低,与益气组、温阳组、化饮组、益气化饮组、益气温阳组、温阳化饮组相比较有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 给药前后症状积分比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g/kg 生药)	给药前积分	给药后积分
正常对照组	-	1.2 \pm 0.6	1.4 \pm 0.5
模型组	-	6.6 \pm 0.5 ^a	6.1 \pm 0.9 ^a
益气组	2.1	6.0 \pm 1.2 ^a	4.4 \pm 0.5 ^{ab}
温阳组	3.6	6.5 \pm 0.8 ^a	4.2 \pm 0.8 ^{ab}
化饮组	3.2	6.2 \pm 0.9 ^a	4.3 \pm 0.7 ^{ab}
益气温阳组	5.7	6.0 \pm 0.8 ^a	4.2 \pm 0.6 ^{ab}
益气化饮组	5.3	6.3 \pm 0.9 ^a	4.1 \pm 0.6 ^{ab}
温阳化饮组	6.8	6.1 \pm 1.0 ^a	4.5 \pm 1.2 ^{ab}
加味小青龙汤组	9.0	6.0 \pm 1.0 ^a	3.0 \pm 0.9 ^{abc}

注:与正常对照组比较^a $P < 0.05$,与模型组相比较^b $P < 0.05$,加味小青龙汤组与各治疗组相比较^c $P < 0.05$

2.2 鼻黏膜组织病理形态学的变化

鼻黏膜组织光镜检查:正常对照组鼻黏膜上皮完整,无炎症反应(见图 1);模型组可见鼻黏膜水肿、充血,上皮不完整,重度炎细胞浸润,嗜酸粒细胞浸润明显,黏膜上皮坏死(见图 2);益气组、温阳组、化饮组鼻黏膜有充血,中度炎细胞浸润(见图 3、4、5);益气温阳组、益气化饮组鼻黏膜有充血,少量炎细胞浸润(见图 6、7);温阳化饮组鼻黏膜上皮完整、黏膜少有充血,有少量炎细胞浸润(见图 8);加味小青龙汤组鼻黏膜轻度充血,炎细胞消失(见附图 9),尤以加味小青龙汤治疗组恢复最好。

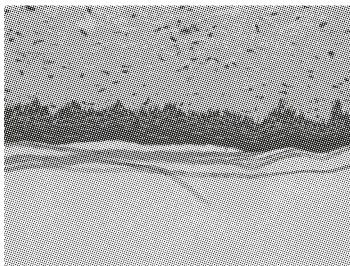


图 1 正常对照组鼻黏膜组织形态(HE 染色 10 \times 40)

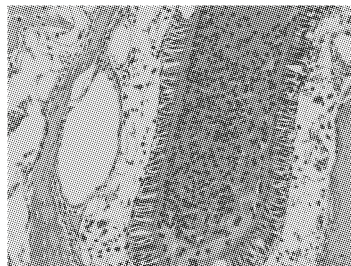


图 2 模型组鼻黏膜组织形态(HE 染色 10 \times 40)

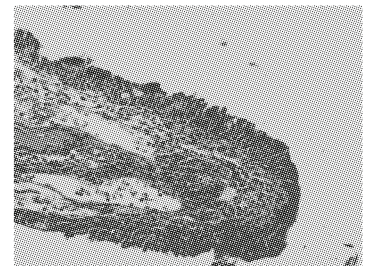


图 3 益气组鼻黏膜组织形态(HE 染色 10 \times 40)

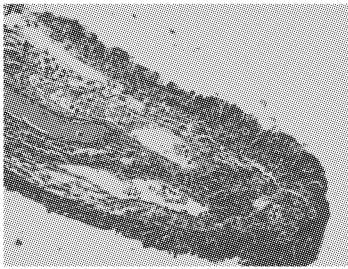


图4 温阳组鼻黏膜组织形态(HE染色10×40)

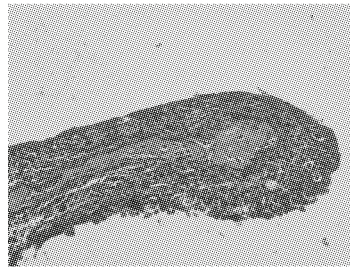


图5 化饮组鼻黏膜组织形态(HE染色10×40)

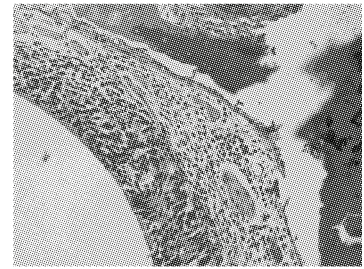


图6 益气温阳组鼻黏膜组织形态(HE染色10×40)

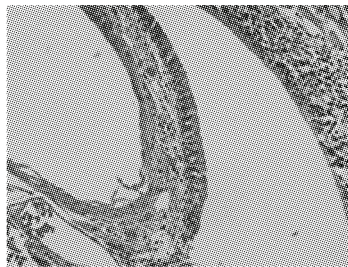


图7 益气化饮组鼻黏膜组织形态(HE染色10×40)

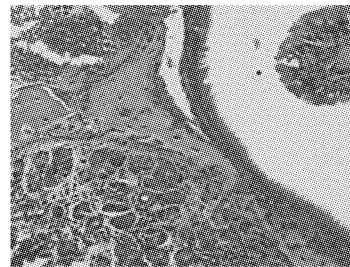


图8 温阳化饮组鼻黏膜组织形态(HE染色10×40)

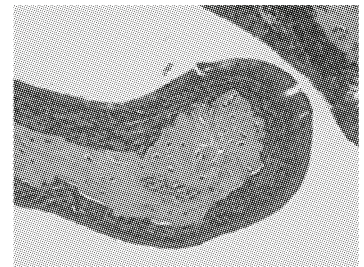


图9 加味小青龙汤组鼻黏膜组织形态(HE染色10×40)

2.3 AR大鼠血浆IL-4含量测定结果

模型组IL-4含量明显升高,与正常对照组比较有统计学意义($P < 0.01$),各治疗组IL-4的含量降低,与模型组相比具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示各给药组均具有不同程度的降低IL-4含量的作用。化饮组、益气温阳组、益气化饮组、温阳化饮组与益气组、温阳组比较有统计学意义($P < 0.01$)。其中以加味小青龙汤治疗组效果最好,与益气组、温阳组、化饮组、益气化饮组、益气温阳组、温阳化饮组相比较有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表2。

表2 加味小青龙汤对AR大鼠血浆IL-4含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g/kg生药)	IL-4(mg/L)
正常对照组	-	40.0 ± 6.7
模型组	-	58.0 ± 8.2
益气组	2.1	51.7 ± 4.6 ^a
温阳组	3.6	50.9 ± 2.8 ^a
化饮组	3.2	49.7 ± 4.0 ^{bd}
益气温阳组	5.7	48.9 ± 6.7 ^{bd}
益气化饮组	5.3	49.1 ± 4.9 ^{bd}
温阳化饮组	6.8	47.0 ± 4.1 ^{bd}
加味小青龙汤组	9.0	42.2 ± 4.2 ^{bcd}

注:与模型组相比较^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,加味小青龙汤组与各治疗组相比较^c $P < 0.05$,各治疗组与益气组、温阳组相比较^d $P < 0.01$

3 讨论

加味小青龙汤治疗AR临床效验显著,是在中医基本理论指导下,结合现代药理学研究成果进行组方的。本方是以小青龙汤、玉屏风散合方,具有益气温阳化饮之功用。而AR在发作期多数体现出其病机特点为阳气虚弱,水饮内停^[6],故用作加味小青龙汤及其拆方的实验研究。

3.1 症状积分观察

AR属I型变态反应反应,以鼻局部的集中症状鼻痒、喷嚏、流涕为主要临床表现,因此减轻局部症状是改善和调整I型变态反应的客观依据,构成了变态反应性鼻炎的诊断和疗效评定标准的主要内容^[7]。本实验的研究结果提示:在给药前,各治疗组和模型组症状积分与正常对照组相比具有统计学意义($P < 0.05$),并且总积分超过5分,表明模型制造成功。经过治疗后,各治疗组喷嚏、搔鼻、流涕的积分值显著减少,与模型组相比具有统计学意义($P < 0.05$),且总积分减少2~3分,表明各治疗组均能改善AR大鼠的症状,其中以加味小青龙汤治疗组效果最显著。

3.2 鼻黏膜病理形态的观察

根据对大鼠AR鼻黏膜形态学的观察,模型组可见鼻黏膜水肿、充血,上皮不完整,重度炎细胞浸润,嗜酸粒细胞浸润明显,黏膜上皮坏死(见图2),

与文献报道一致^[8],各治疗组均不同程度的改善了鼻黏膜的病理形态,其中尤以加味小青龙汤治疗组鼻黏膜病理形态恢复最好,其治疗作用是通过抑制了炎症细胞在鼻黏膜的聚集,减少了肥大细胞脱颗粒,进一步促进了鼻黏膜的修复,这与症状积分改善程度相一致,提示鼻黏膜组织形态学的改变与疗效相一致,因此鼻黏膜组织形态学研究可用于 AR 疗效评价。

3.3 对 IL-4 含量的影响

在变应性鼻炎中细胞因子能调节急性和慢性变应性炎症反应,这些因子主要由 CD₄⁺T 细胞分泌,使患者分别出现速发相反应和迟发相反应症状。其主要免疫病理特征是 Th₁ 和 Th₂ 免疫反应失衡而引发的、以鼻腔黏膜 Th₂ 免疫反应为主的变应性炎症反应,在组织中大量表达 Th₂ 细胞因子的细胞浸润。当接触变应原时,Th₀ 细胞在抗原呈递细胞分泌的 IL-10 的作用下向 Th₂ 细胞分化,Th₂ 细胞分泌 IL-4 刺激 B 细胞合成 IgE。当再次接触变应原时,肥大细胞产生炎性介质,引发急性变应性反应,同时,肥大细胞也产生 IL-4,与 Th₂ 细胞分泌的 IL-4 共同参与迟发相反应的调节。IL-4 为 IgE 的正性调节因子,故致 AR 患者体内 IgE 合成过多。因此降低 IL-4 含量,减少 IgE 合成能缓解 AR 的症状。

本研究通过检测 AR 大鼠血浆中 IL-4 含量反映 Th₂ 细胞亚群的状况,并从此角度来探讨加味小青龙汤及其拆方对 IL-4 含量的影响。由实验结果可知,各治疗组与模型组比较均有统计学意义,提示各治疗组均有不同程度调节 IL-4 含量的作用。其中,化饮组、益气化饮组、温阳化饮组优于益气组、温阳

组,说明化饮在治疗 AR 中具有重要作用。益气温阳组优于益气组、温阳组,揭示二者起协同作用。加味小青龙汤组疗效优于各治疗组,说明温阳、益气、化饮在治疗 AR 中表现出协同增效的整体调节作用,体现了加味小青龙汤配伍的高度科学内涵。当然,单纯依据血浆 IL-4 含量这一指标,也不可能对加味小青龙汤及其拆方的作用进行综合评价,目前我们正在从免疫调节网络的角度开展相关研究,有望获得更加系统全面的结果,为加味小青龙汤配伍规律的研究提供新的线索。

参 考 文 献

- [1] 王树鹏,郭晓东,张丽艳,等. 小青龙汤加味对变应性鼻炎大鼠 IL-5 和 TNF- α 含量的影响[J]. 中医学杂志, 2006, 24(4): 635-637.
- [2] 陈忠,唐法娣. 大鼠过敏性鼻炎模型建立及应用[J]. 浙江大学学报:医学版, 2001, 30(6): 276-278.
- [3] 张志明,孙树岩,季文樾. 真菌性抗原致变应性鼻炎豚鼠模型建立[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2005, 12(5): 313-315.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:178-179.
- [5] 中华医学会耳鼻咽喉科学分会. 变应性鼻炎诊断标准与疗效评定标准[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1998, 33(3): 134-135.
- [6] 王树鹏,刘书宇. 小青龙汤加味治疗变应性鼻炎的中医理论探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(5): 575-576.
- [7] 顾瑞金,顾之燕. 变应性鼻炎诊断和疗效评定标准专题学术讨论会纪要[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1991, 26(3): 131-133.
- [8] 刘建国,刘月辉. 变应性鼻炎鼻黏膜结构变化及微血管重塑实验研究[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2010, 17(1): 15-17.

(收稿日期:2011-10-27)

(本文编辑:刘群)

· 信息之窗 ·

欢迎浏览环球中医药杂志网站

2009 年 3 月,环球中医药杂志网站(www.hqzyy.com)全面更新。

本刊网站有我刊在线、作者中心、投稿、征订、本刊资讯、关于我们、留言板等栏目。读者登陆环球中医药杂志网站,可浏览并下载本刊所有过刊文章和部分当期杂志文章,现在已经更新至 2012 年第 2 期(2012 年 2 月 6 日出刊)。现阶段免费下载。读者可以借助网站与杂志进行沟通联络,了解杂志投稿与订阅方式,了解杂志社近期学术活动信息。新版网站特别开辟作者中心专栏,提供写作技巧、学术信息、投稿指南等实用内容。

环球中医药杂志网站(www.hqzyy.com)为《环球中医药》杂志唯一官方网站。网络上与环球中医药杂志社相关信息均以此网站内容为准。