

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.13.013

# 鼻敏煎对变应性鼻炎模型小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响

赵竞一, 闫新宇, 艾建伟, 王曼, 韩金帅, 王俊阁✉

首都医科大学附属北京中医医院, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010

**摘要** 目的 探讨鼻敏煎治疗变应性鼻炎的可能作用机制。方法 60 只 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组、模型组、鼻敏煎低剂量组、鼻敏煎高剂量组、氯雷他定组, 每组 12 只。除正常对照组外, 其余小鼠均由卵清蛋白致敏和激发制备变应性鼻炎小鼠模型, 每日激发前 30 min, 鼻敏煎低、高剂量组小鼠分别给予 120、600 mg/(kg·d) 鼻敏煎药液灌胃, 氯雷他定组小鼠给予氯雷他定 2 mg/(kg·d) 溶液灌胃, 正常对照组及模型组小鼠给予 0.2 ml 蒸馏水灌胃, 共持续 7 天。末次激发后先进行小鼠过敏样症状评分并计算总分, 再检测各组小鼠外周血淋巴细胞因子水平、各淋巴细胞亚群比例及鼻黏膜淋巴细胞亚群转录因子或受体表达。结果 模型组小鼠过敏样症状总分高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 而鼻敏煎高剂量组和氯雷他定组过敏样症状总分较模型组显著降低 ( $P < 0.05$ )。鼻敏煎高剂量组小鼠外周血白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 5 (IL-5)、白细胞介素 17 (IL-17)、干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 及转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 水平, 辅助性 T 细胞 2 (Th2)、辅助性 T 细胞 17 (Th17)、 $\gamma\delta$  T 细胞比例, 以及鼻黏膜组织中转录因子 GATA3、ROR $\gamma$ t 和  $\gamma\delta$  T 细胞受体 ( $\gamma\delta$  TCR) 表达水平均显著低于模型组, 白细胞介素 10 (IL-10) 水平高于模型组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 鼻敏煎可调节变应性鼻炎小鼠外周血和鼻黏膜 T 淋巴细胞亚群比例, 抑制 Th2、Th17、 $\gamma\delta$  T 细胞的分化, 相关细胞因子的释放及其介导的炎症反应。这可能是其治疗变应性鼻炎的部分作用机制。

**关键词** 变应性鼻炎; 鼻敏煎; T 淋巴细胞; 淋巴细胞因子; 转录因子

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是鼻黏膜对多种气传变应原的炎性反应, 主要症状为阵发性鼻塞、鼻痒、喷嚏及水样涕等, 常伴有睡眠及情绪障碍, 严重影响患者生活质量。其发病机制是由 IgE 介导的 I 型超敏反应, 嗜酸性粒细胞和肥大细胞等炎性细胞广泛浸润并释放多种细胞因子, 导致黏膜血管通透性增加、腺体分泌增强<sup>[1]</sup>。在 AR 发病过程中辅助性 T 细胞 2 (Th2) 分化显著增加, 其释放白细胞介素 4 (IL-4) 并抑制辅助性 T 细胞 1 (Th1) 释放干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>[2]</sup>。辅助性 T 细胞 17 (Th17) 分泌的以白细胞介素 17A (IL-17A) 为代表的白细胞介素 17 (IL-17) 家族细胞因子使中性粒细胞发生募集和活化, 另外可增强 Th2 细胞介导的嗜酸性粒细胞向鼻黏膜迁移<sup>[3]</sup>。调节性 T 细胞 (Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T) 则可抑制 Th1 和 Th2 型细

胞反应。T 淋巴细胞中还有少部分表达  $\gamma\delta$  受体的  $\gamma\delta$  T 细胞, 研究发现其可能作为一种促炎性细胞参与变应性气道炎症的发生和发展<sup>[4]</sup>。前期研究表明, 北京中医医院用于治疗 AR 的验方鼻敏煎临床疗效肯定<sup>[5]</sup>, 可调节 AR 患者外周血 Th17/Treg 细胞平衡<sup>[6]</sup>。本研究通过分析鼻敏煎对 AR 模型小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群及其细胞因子及转录因子的影响, 进一步明确鼻敏煎治疗 AR 的生物学基础。本研究符合动物实验伦理学要求。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 60 只, 6 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号 SCXK (京) 2016-0006。适应性饲养 1 周, 自由进食及饮水, 温度 23 ~ 26 °C, 相对湿度 50% ~ 70%, 12 h 光亮/黑暗循环。

### 1.2 药物

鼻敏煎组成: 防风 10 g, 黄芪 15 g, 白术 10 g,

基金项目: 国家自然科学基金 (81674034); 北京市中医管理局燕京流派创新性传承“拳台工程”建设项目

✉ 通讯作者: wangjunge@bjzhongyi.com

桂枝 6g, 白芍 10g, 乌梅 6g, 诃子 6g, 炙甘草 6g, 细辛 3g, 五味子 6g, 麻黄 3g。中药饮片均购自首都医科大学附属北京中医医院药事部。将饮片置于烧瓶内加蒸馏水浸泡 30 min 后, 加蒸馏水没过饮片 3 cm, 大火煮沸后继续小火煎煮 20 min, 过滤药液; 剩余药渣加入蒸馏水至没过饮片, 大火煮沸后再小火煎煮 15 min, 过滤药液。合并两次药液并浓缩至 1.2 g/ml, 4℃ 冷藏备用。氯雷他定粉剂 (批号: S135802) 购自上海 Selleck 公司。

### 1.3 主要试剂及仪器

卵清蛋白 (OVA, 批号: SLBD23), Sigma 公司; 白细胞介素 2 (IL-2, 批号: 195553041)、IL-4 (批号: 216153031)、白细胞介素 5 (IL-5, 批号: 211328028)、白细胞介素 10 (IL-10, 批号: 201072023)、IL-17 (批号: 214114029)、IFN- $\gamma$  (批号: 215502003)、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ , 批号: 216506031) ELISA 试剂盒, 鼠单抗 CD4 PerCP-Cy5.5 (批号: 21624425)、鼠单抗 CD8 PE-Cy7 (批号: 21425624), eBioscience 公司; 鼠 T 淋巴细胞亚群抗体 (批号: 2065194), BD 公司; 转录因子 T-bet (批号: GR48436-1)、转录因子 GATA3 (批号: GR48265-1)、转录因子 ROR $\gamma$ t (批号: GR25391-1)、转录因子 Foxp3 (批号: GR48113-1)、鼠单抗 CD3 FITC (批号: GR24552-1)、 $\gamma\delta$  T 细胞受体 ( $\gamma\delta$  TCR) 抗体 (批号: GR35112-1), Abcam 公司; 鼠单抗  $\gamma\delta$  TCR 抗体 (批号: 10941), ImmunoTech 公司; RPMI-1640 培养基 (批号: P1504), GIBCO 公司; 佛波酯/莫能霉素混合物 (批号: 16861-29), 中国联科生物; IL-4 APC (批号: E01253-1733)、IFN- $\gamma$  FITC (批号: B184952)、IL-17 PE (批号 E151241)、Foxp3 PE-Cy5 (批号: E01575-5900), Biolegend 公司。

全自动酶标仪 (BioTek 公司, 型号: ELx800); 流式细胞仪 (BD Biosciences 公司, 型号: Canto 2); 全自动免疫组化仪 (Roche 公司, 型号: Benchmark XT); 离心机 (Beckman 公司, 型号: Allegra X-15R); 鼓风干燥箱 (上海一恒公司, 型号: DHG-9140A)。

### 1.4 动物分组及干预方法

60 只小鼠按体重区组后采用随机数字表法分为正常对照组、模型组、鼻敏煎低剂量组、鼻敏煎高剂量组、氯雷他定组, 每组 12 只。除正常对照组外, 其余小鼠均在实验前及实验第 7、14 天给予 500  $\mu$ l 1  $\times$  PBS OVA 溶液腹腔注射致敏, 在第 21 至 27 天每天以 0.4 ml 含有 50  $\mu$ g/ml OVA 的 PBS 滴鼻

激发。正常对照组小鼠给予等量 PBS 滴鼻。以人和动物等效剂量设为低剂量、5 倍等效剂量设为高剂量<sup>[7]</sup>, 每日滴鼻激发前 30 min, 鼻敏煎低、高剂量组小鼠分别给予鼻敏煎药液 120、600 mg/(kg $\cdot$ d) 灌胃, 氯雷他定组小鼠给予 1  $\times$  PBS 氯雷他定溶液 2 mg/(kg $\cdot$ d) 灌胃, 正常对照组及模型组小鼠给予 0.2 ml 蒸馏水灌胃。各组小鼠均灌胃 7 天。

### 1.5 观察指标及方法

1.5.1 小鼠过敏样症状评分 末次激发 30 min 后, 观察各组小鼠过敏样症状, 包括喷嚏、流涕及抓鼻。依据 Narita 等<sup>[8]</sup>的评分标准, 喷嚏计为 1 分 (1~3 个)、2 分 (4~10 个)、3 分 ( $\geq 11$  个); 流涕计为 1 分 (仅前鼻孔)、2 分 (超过前鼻孔)、3 分 (涕流满面); 抓鼻计为 1 分 (偶有)、2 分 (频繁)。采用叠加计分, 总积分超过 5 分则造模成功。

1.5.2 细胞因子检测 末次灌胃 24 h 后, 所有小鼠麻醉 (1% 戊巴比妥钠 0.1 ml/20 g 腹腔注射) 后摘取眼球取外周血 2 ml 保存于肝素抗凝管, 另取 2 ml 外周血, 室温 3000 r/min (离心半径为 10 cm) 离心 10 min 后, 取上清置于 -80℃ 保存。取各组小鼠上清液, 放至室温后以 6000 r/min (离心半径为 10 cm) 离心 15 min, 去除碎片, 使用 ELISA 试剂盒将样品稀释 10 倍后在已进行酶标包被的 96 孔板中加入不同浓度标准品及稀释后的样品, 检测 IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-17、IFN- $\gamma$  及 TGF- $\beta$  在 450 nm 波长下各孔吸光度值, 并计算样品浓度。操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.5.3 外周血 T 淋巴细胞亚群检测 采用流式细胞术检测。加入 2 ml PBS 及淋巴细胞分离液, 3000 r/min (离心半径为 10 cm) 离心 10 min, 并吸取淋巴细胞, 重悬于含 10% 血清 RPMI-1640 的培养基中, 台盼蓝染色确保细胞存活率大于 95%。调整细胞浓度至  $5 \times 10^6$  个/ml, 分装于 24 孔培养板, 加入 10  $\mu$ l 佛波酯 (12.5  $\mu$ g/ml) 及莫能霉素 (0.35 mg/ml) 混合物后置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h, 间隔 1 h 混匀。流式管收集细胞, PBS 重悬后加入 5  $\mu$ l 鼠单抗 CD4 PerCP-Cy5.5 及 CD8 PE-Cy7 抗体, 4℃ 避光孵育 30 min, 细胞固定、破膜后分别加入 5  $\mu$ l IL-4 APC、IFN- $\gamma$  FITC、IL-17 PE、Foxp3 PE-Cy5 抗体, 再次 4℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗涤并重悬细胞后上机检测。对于  $\gamma\delta$  T 细胞检测, 在佛波酯及莫能霉素刺激后分别加入鼠单抗 CD3 FITC 及鼠单抗  $\gamma\delta$  TCR 抗体染色。使用 CellQuest 5.1 软件分析 Th1、Th2、Th17、Treg

及  $\gamma\delta$  T 细胞百分率。

1.5.4 鼻黏膜 T 淋巴细胞亚群转录因子及细胞受体检测 采用免疫组化法检测鼻黏膜组织中转录因子 T-bet、GATA3、ROR $\gamma$ t、Foxp3 及  $\gamma\delta$  TCR 的表达。麻醉后 12 h 内剥离小鼠鼻部皮肤，取上颌骨自中切齿间分离双侧鼻腔，分离双侧鼻甲及鼻中隔黏膜。鼻黏膜经 4  $\mu$ m 石蜡切片，60  $^{\circ}$ C 烤片 2 h，二甲苯脱蜡 10 min  $\times$  2 次、无水乙醇 3 min  $\times$  2 次、95% 乙醇 2 min  $\times$  2 次、80% 乙醇 2 min、70% 乙醇 2 min，高温高压抗原修复，滴加血清封闭 20 min 后加入相应一抗于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。滴加二抗室温孵育 1 h 后，二氨基联苯胺显色 1 min，自来水冲洗终止反应，苏木素复染 1 min，无水乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片，Image J 1.52 软件分析单位面积阳性细胞表达的平均光密度值 (AOD)。免疫组化染色黄色或棕黄色为阳性，细胞核衬染为蓝色。

## 1.6 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件分析数据。所有计量资料均符合正态分布且方差齐，以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，采用方差分析，同时应用 Post-Hoc 进行组间比较， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

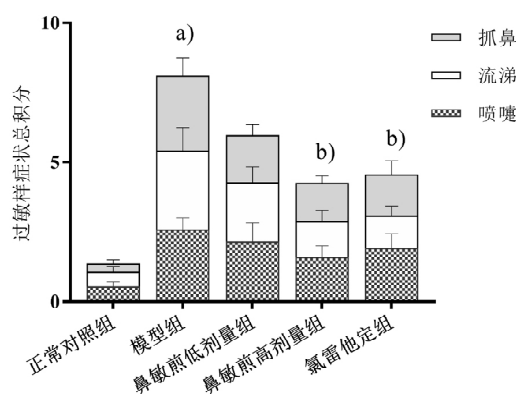
## 2 结果

### 2.1 各组小鼠过敏样症状总积分比较

图 1 示，模型组小鼠过敏样症状总积分显著高于正常对照组 ( $P < 0.01$ )。鼻敏煎高剂量组及氯雷他定组过敏样症状总积分均显著低于模型组 ( $P < 0.05$ )，而两组之间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。鼻敏煎高、低剂量组组间相比，过敏样症状总积分差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 各组小鼠血清细胞因子水平比较

表 1 示，与正常对照组比较，模型组小鼠血清 IL-2、IL-4、IL-5、IL-17、IFN- $\gamma$  及 TGF- $\beta$  水平均升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )，IL-10 水平降低 ( $P <$



注: a) 与正常对照组比较,  $P < 0.01$ ; b) 与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

图 1 各组变应性鼻炎小鼠过敏样症状总积分比较

0.01)。鼻敏煎低剂量组小鼠血清 IL-4、IFN- $\gamma$  水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ )；鼻敏煎高剂量组血清 IL-2、IL-4、IL-5、IL-17、IFN- $\gamma$  及 TGF- $\beta$  水平低于模型组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )，IL-10 水平则高于模型组 ( $P < 0.01$ )。鼻敏煎高剂量组 IL-5 水平显著高于氯雷他定组 ( $P < 0.05$ )，其余细胞因子水平两组间差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 各组小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群细胞比例比较

表 2 示，模型组小鼠外周血 Th2、Th17、Treg、 $\gamma\delta$  T 细胞比例较正常对照组小鼠均明显升高 ( $P < 0.05$ )；鼻敏煎低剂量组 Th2 细胞，鼻敏煎高剂量组 Th2、Th17、 $\gamma\delta$  T 细胞比例显著低于模型组 ( $P < 0.05$ )。与氯雷他定组相比，鼻敏煎高剂量组 Th2、Th17 细胞比例较低 ( $P < 0.05$ )，其余 T 细胞亚群比例差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。各组小鼠 Th1 细胞比例差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 各组小鼠鼻黏膜 T 淋巴细胞亚群转录因子及细胞受体蛋白水平比较

表 3 示，模型组 T-bet、GATA3、ROR $\gamma$ t、 $\gamma\delta$ TCR 表达均高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )；与模

表 1 各组变应性鼻炎小鼠血清细胞因子水平比较

(pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 鼠数 | IL-2                             | IL-4                             | IL-5                             | IL-10                           | IL-17                          | IFN- $\gamma$                    | TGF- $\beta$                     |
|---------|----|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 正常对照组   | 12 | 65.03 $\pm$ 5.05                 | 48.67 $\pm$ 8.77                 | 67.41 $\pm$ 9.78                 | 105.92 $\pm$ 11.59              | 54.70 $\pm$ 5.63               | 72.07 $\pm$ 12.21                | 155.88 $\pm$ 16.98               |
| 模型组     | 12 | 154.49 $\pm$ 16.05 <sup>a)</sup> | 166.51 $\pm$ 30.68 <sup>a)</sup> | 170.38 $\pm$ 20.75 <sup>a)</sup> | 38.83 $\pm$ 4.12 <sup>a)</sup>  | 91.87 $\pm$ 8.21 <sup>b)</sup> | 115.10 $\pm$ 21.45 <sup>b)</sup> | 242.16 $\pm$ 35.66 <sup>a)</sup> |
| 鼻敏煎低剂量组 | 12 | 122.53 $\pm$ 15.97               | 125.15 $\pm$ 13.32 <sup>c)</sup> | 162.76 $\pm$ 25.56               | 25.37 $\pm$ 2.65                | 78.05 $\pm$ 6.58               | 62.01 $\pm$ 5.37 <sup>c)</sup>   | 252.19 $\pm$ 18.31               |
| 鼻敏煎高剂量组 | 12 | 75.06 $\pm$ 5.98 <sup>d)</sup>   | 80.26 $\pm$ 9.35 <sup>d)</sup>   | 131.43 $\pm$ 20.17 <sup>d)</sup> | 74.35 $\pm$ 14.99 <sup>d)</sup> | 61.02 $\pm$ 5.32 <sup>c)</sup> | 60.83 $\pm$ 2.88 <sup>e)</sup>   | 200.89 $\pm$ 18.63 <sup>c)</sup> |
| 氯雷他定组   | 12 | 69.72 $\pm$ 12.51                | 95.19 $\pm$ 19.83                | 78.78 $\pm$ 16.12 <sup>e)</sup>  | 60.11 $\pm$ 5.55                | 80.37 $\pm$ 3.53               | 78.90 $\pm$ 8.22                 | 206.23 $\pm$ 16.37               |

注: IL-2, 白细胞介素 2; IL-4, 白细胞介素 4; IL-5, 白细胞介素 5; IL-10, 白细胞介素 10; IL-17, 白细胞介素 17; IFN- $\gamma$ , 干扰素  $\gamma$ ; TGF- $\beta$ , 转化生长因子  $\beta$ 。

a) 与正常对照组比较,  $P < 0.01$ ; b) 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; c) 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; d) 与模型组比较,  $P < 0.01$ ; e) 与鼻敏煎高剂量组比较,  $P < 0.05$ 。

表 2 各组变应性鼻炎小鼠外周血 T 细胞亚群细胞比例比较

(%,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 鼠数 | Th1              | Th2                            | Th17                           | Treg                          | $\gamma\delta$ T              |
|---------|----|------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常对照组   | 12 | 19.95 $\pm$ 2.14 | 4.89 $\pm$ 1.33                | 14.57 $\pm$ 3.30               | 1.33 $\pm$ 0.20               | 1.82 $\pm$ 0.25               |
| 模型组     | 12 | 24.70 $\pm$ 1.20 | 11.55 $\pm$ 1.25 <sup>a)</sup> | 21.00 $\pm$ 2.82 <sup>a)</sup> | 2.04 $\pm$ 0.07 <sup>a)</sup> | 6.52 $\pm$ 0.64 <sup>a)</sup> |
| 鼻敏煎低剂量组 | 12 | 27.38 $\pm$ 3.04 | 7.14 $\pm$ 1.13 <sup>b)</sup>  | 18.51 $\pm$ 1.11               | 2.73 $\pm$ 0.63               | 5.12 $\pm$ 0.53               |
| 鼻敏煎高剂量组 | 12 | 21.70 $\pm$ 2.98 | 6.91 $\pm$ 1.03 <sup>b)</sup>  | 16.66 $\pm$ 2.65 <sup>b)</sup> | 1.81 $\pm$ 0.73               | 4.13 $\pm$ 0.61 <sup>b)</sup> |
| 氯雷他定组   | 12 | 23.87 $\pm$ 3.13 | 12.64 $\pm$ 2.02 <sup>c)</sup> | 25.42 $\pm$ 3.07 <sup>c)</sup> | 1.70 $\pm$ 0.29               | 4.85 $\pm$ 0.68               |

注: Th1, 辅助性 T 细胞 1; Th2, 辅助性 T 细胞 2; Th17, 辅助性 T 细胞 17; Treg, 调节性 T 细胞;  $\gamma\delta$  T,  $\gamma\delta$  T 细胞。

a) 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; b) 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c) 与鼻敏煎高剂量组比较,  $P < 0.05$ 。

表 3 各组变应性鼻炎小鼠鼻黏膜 T 淋巴细胞亚群转录因子及细胞受体蛋白表达比较

(平均光密度值,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 鼠数 | T-bet                           | GATA3                           | Foxp3             | ROR $\gamma$ t                  | $\gamma\delta$ TCR              |
|---------|----|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 正常对照组   | 12 | 0.117 $\pm$ 0.012               | 0.135 $\pm$ 0.020               | 0.141 $\pm$ 0.021 | 0.131 $\pm$ 0.011               | 0.112 $\pm$ 0.022               |
| 模型组     | 12 | 0.284 $\pm$ 0.032 <sup>a)</sup> | 0.297 $\pm$ 0.024 <sup>a)</sup> | 0.178 $\pm$ 0.035 | 0.229 $\pm$ 0.037 <sup>a)</sup> | 0.195 $\pm$ 0.021 <sup>a)</sup> |
| 鼻敏煎低剂量组 | 12 | 0.236 $\pm$ 0.028               | 0.223 $\pm$ 0.019               | 0.175 $\pm$ 0.035 | 0.161 $\pm$ 0.015               | 0.170 $\pm$ 0.032               |
| 鼻敏煎高剂量组 | 12 | 0.210 $\pm$ 0.040               | 0.162 $\pm$ 0.024 <sup>b)</sup> | 0.143 $\pm$ 0.028 | 0.147 $\pm$ 0.014 <sup>b)</sup> | 0.120 $\pm$ 0.020 <sup>b)</sup> |
| 氯雷他定组   | 12 | 0.160 $\pm$ 0.034 <sup>b)</sup> | 0.172 $\pm$ 0.019 <sup>b)</sup> | 0.198 $\pm$ 0.035 | 0.165 $\pm$ 0.025 <sup>b)</sup> | 0.132 $\pm$ 0.044               |

注: T-bet, 转录因子 T-bet; GATA3, 转录因子 GATA3; Foxp3, 转录因子 Foxp3; ROR $\gamma$ t, 转录因子 ROR $\gamma$ t;  $\gamma\delta$  TCR,  $\gamma\delta$  T 细胞受体。

a) 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; b) 与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

型组相比, 鼻敏煎高剂量组 GATA3、ROR $\gamma$ t、 $\gamma\delta$ TCR 表达降低 ( $P < 0.05$ ), 氯雷他定组 T-bet、GATA3、ROR $\gamma$ t 表达降低 ( $P < 0.05$ ); 各组间 Foxp3 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

OVA 诱导的 AR 小鼠模型以 Th2 型免疫反应为主, 多种 T 淋巴细胞共同参与变态反应的发展<sup>[8]</sup>。IL-4 作为 IgE 分泌最重要的调节因子, 可促进免疫球蛋白类转向 IgE 转换<sup>[9]</sup>。IL-4 刺激初始 T 细胞向 Th2 细胞分化, Th2 细胞又可分泌 IL-4、IL-5 并浸润鼻黏膜细胞, 引起局部肥大细胞和嗜酸性粒细胞浸润<sup>[10]</sup>。Th1 细胞产生的 IFN- $\gamma$  可以抑制 IL-4 诱导的 IgE 合成<sup>[11]</sup>。IL-2 及 IFN- $\gamma$  可增强 Th1 细胞的活性并通过抑制 Th2 细胞增殖来减弱体液免疫的反应程度<sup>[12]</sup>。IL-10 对 Th2 细胞的分化及其相关细胞因子的合成具有抑制作用<sup>[13]</sup>, 同时抑制嗜酸性粒细胞 CD40 表达并加速其凋亡<sup>[14]</sup>。本研究鼻敏煎高剂量组小鼠外周血 IL-2、IL-4、IL-5、IFN- $\gamma$  水平均显著低于模型组, IL-10 水平显著高于模型组, 外周血 Th2 细胞比例及鼻黏膜 Th2 细胞转录因子 GATA3 表达明显下降, 提示鼻敏煎可显著抑制 Th2 型变态反应。

IL-17 是 Th17 细胞分泌的促炎因子, 通过调节 Th2 细胞因子 IL-5 来调控 AR 的发生与发展。IL-17 具有强烈的促炎作用, 能够促进中性粒细胞的增殖并抑制其凋亡, 增加气道高反应性<sup>[15]</sup>。Treg 细胞是起负调节作用的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞亚群, 通过

分泌 IL-10 等诱导免疫耐受, 包括抑制 IgE 的产生<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, 鼻敏煎高剂量组小鼠外周血 Th17 细胞比例、IL-17 及 TGF- $\beta$  水平显著低于模型组, Treg 细胞比例差别不明显; 而鼻黏膜中 ROR $\gamma$ t 表达较低, Foxp3 表达量较模型组无显著变化。由此推测, 鼻敏煎主要作用于下调外周血 Th17 细胞及 IL-17 分泌, 降低鼻黏膜 Th17 转录因子 ROR $\gamma$ t 表达水平, 对 OVA 诱导的小鼠变态反应呈现抑制性作用, 未见明显的负调节现象。

研究证实, AR 患者鼻黏膜中存在  $\gamma\delta$  T 细胞广泛浸润, 细胞比例较正常人显著增高, 且细胞数量与患者外周血嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞、IL-17<sup>+</sup>T 细胞水平呈正相关<sup>[18-19]</sup>。 $\gamma\delta$  T 细胞可增强 B 细胞分泌 IgE, 从而促进其介导的级联反应<sup>[20]</sup>。在本研究中, 鼻敏煎高剂量组外周血  $\gamma\delta$  T 细胞比例及鼻黏膜中  $\gamma\delta$  TCR 的表达均低于模型组, 提示鼻敏煎对  $\gamma\delta$  T 细胞的分化具有抑制作用, 从而减弱其诱发的下级炎症反应。

AR 归属中医学“鼻渊”范围, 是中医药治疗的优势病种之一。本病病因多见于脏腑虚损、正气不足, 受风邪、寒邪或异气侵袭<sup>[21]</sup>。鼻敏煎中黄芪益气固表、升阳利水, 为君药。白术培土生金, 助黄芪固表, 防风祛风寒, 使机体外无所扰, 二者共为臣药。桂枝、细辛温阳散寒、化饮通窍, 桂枝配麻黄解表散寒, 白芍敛阴和营, 诃子配乌梅、五味子收敛肺气, 既助黄芪固本, 又可制约防风宣散太过, 共为佐药。炙甘草调和诸药, 缓和麻黄和桂

枝辛散太过,为使药。诸药合用,补中有泻,散中有收,共奏温肺固表、散寒化饮、通窍止嚏、益气固表之功效。

综上所述,鼻敏煎可调节 AR 模型小鼠外周血和鼻黏膜 T 淋巴细胞不同亚群比例,抑制 Th2、Th17、 $\gamma\delta$  T 细胞的分化,相关细胞因子的释放及其介导的炎症反应,为鼻敏煎治疗 AR 提供了理论基础。进一步研究鼻敏煎对 T 淋巴细胞的干预机制将有助于寻找 AR 新的治疗靶点。

## 参考文献

- [1] 程雷,董震,孔维佳,等. 变应性鼻炎诊断和治疗指南 (2015 年,天津) [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016,51(1):6-24.
- [2] SCAVUZZO MC, ROCCHI V, FATTORI B, et al. Cytokine secretion in nasal mucus of normal subjects and patients with allergic rhinitis [J]. Biomed Pharmacother, 2003, 57(8):366-371.
- [3] WAKASHIN H, HIROSE K, MAEZAWA Y, et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178(10):1023-1032.
- [4] ZHANG LY, LIU J, WANG EH, et al. Respiratory syncytial virus protects against the subsequent development of ovalbumin-induced allergic responses by inhibiting Th2-type  $\gamma\delta$  T cells [J]. J Med Virol, 2013, 85(1):149-156.
- [5] ZHAO JY, YAN XY, GAI JQ, et al. Efficacy of Bimin decoction for patients with perennial allergic rhinitis: an open-label non-inferiority randomized controlled trial [J]. Trials, 2019, 20(1):802.
- [6] 赵竞一,盖建青,闫新宇,等. 鼻敏煎治疗变应性鼻炎及对 Treg/Th17 免疫平衡的影响 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2018, 25(9):497-502.
- [7] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 1535.
- [8] NARITA SI, ASAKURA K, KATAURA A. Effects of thromboxane A2 receptor antagonist (Bay u 3405) on nasal symptoms after antigen challenge in sensitized guinea pigs [J]. Int Arch Allergy Immunol, 1996, 109(2):161-166.
- [9] FAN XH, CHENG L, YAN AH. Ameliorative effect of acetylshikonin on ovalbumin (OVA)-induced allergic rhinitis in mice through the inhibition of Th2 cytokine production and mast cell histamine release [J]. APMIS, 2019, 127(10):688-695.
- [10] AKDIS M, BURGLER S, CRAMERI R, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases [J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 127(3):701-721.
- [11] FULKERSON PC, SCHOLLAERT KL, BOUFFI C, et al. IL-5 triggers a cooperative cytokine network that promotes eosinophil precursor maturation [J]. J Immunol, 2014, 193(8):4043-4052.
- [12] LIU M, ZHENG SS, WANG XD, et al. Regulatory roles of IL-12, IL-4 and IFN- $\gamma$  on IgE synthesis in atopic patients [J]. Chin Med J (Engl), 1999, 112(6):550-553.
- [13] ZHU BN, DONG J, GAO XY, et al. Antiasthmatic effects of Sanglong Pingchuan Decoction through inducing a balanced Th1/Th2 immune response [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018:1-10. doi: 10.1155/2018/2629565. eCollection 2018.
- [14] SKAPENKO A, NIEDOBITEK GU, KALDEN JR, et al. Generation and regulation of human Th1-biased immune responses in vivo: a critical role for IL-4 and IL-10 [J]. J Immunol, 2004, 172(10):6427-6434.
- [15] HATA H, SAKAGUCHI N, YOSHITOMI H, et al. Distinct contribution of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice [J]. J Clin Invest, 2004, 114(4):582-588.
- [16] HE R, KIM HY, YOON JH, et al. Exaggerated IL-17 response to epicutaneous sensitization mediates airway inflammation in the absence of IL-4 and IL-13 [J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124(4):761-770.
- [17] PARK BS, HONG GU, RO JY. Foxp3<sup>+</sup>-Treg Cells Enhanced by repeated low-dose gamma-irradiation attenuate ovalbumin-induced allergic asthma in mice [J]. Radiat Res, 2013, 179(5):570-583.
- [18] YANG QT, LI CW, WANG WH, et al. Infiltration pattern of gammadelta T cells and its association with local inflammatory response in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis [J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2019, 9(11):1318-1326.
- [19] HUANG XK, YANG QT, CHEN YL, et al. Correlation of gammadelta-T-cells, Th17 cells and IL-17 in peripheral blood of patients with allergic rhinitis [J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2014, 32(3):235-239.
- [20] GASCAN H, AVERSA GG, GAUCHAT JF, et al. Membranes of activated CD4<sup>+</sup> T cells expressing T cell receptor (TcR) alpha beta or TcR gamma delta induce IgE synthesis by human B cells in the presence of interleukin-4 [J]. Eur J Immunol, 1992, 22(5):1133-1141.
- [21] 王士贞. 中医耳鼻咽喉科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 125.

(下转第 1178 页)

君药以谷精草、青箱子疏风散热，清肝明目；臣以蔓荆子、薄荷、桑叶、菊花、蝉蜕清散上焦风热；佐以黄芩、夏枯草清肝热，决明子泻肝热；甘草调和诸药；加玄参、麦冬养阴清肺，郁金行气疏肝。四诊肝热之象尚在，故守前方以巩固疗效。

## 参考文献

- [1] 魏永祥,刘钢,刘剑锋,等. 嗅觉障碍诊断和治疗专家共识(2017 年) [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2018,53(7):484-494.
- [2] 姜彦,张增潇. 嗅觉功能障碍诊治研究进展 [J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2020,28(3):165-169.
- [3] UPADHYE S, KUMBHARE D. Potential harms with long-term glucocorticoid use [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2018,97(1):72-74.
- [4] 邱恩惠,李志春,方文旭. 嗅觉障碍的中西医治疗 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2008,22(3):253-257.
- [5] 胡原,施磊,张守杰. 嗅觉障碍的中医古典文献解读 [J]. 医学信息,2018,31(20):150-151.
- [6] 黄帝内经素问 [M]. 田代华,整理. 北京: 人民卫生出版社,2005:75.

- [7] 难经 [M]. 孙桐,整理. 北京: 中国医药科技出版社,1996:57-58.
- [8] 普济方 [M]. 朱棣,编撰. 上海: 上海古籍出版社,1991:119.
- [9] 张璐. 张氏医通 [M]. 王兴华,整理. 北京: 人民卫生出版社,2006:408.
- [10] 龚廷贤. 寿世保元 [M]. 鲁兆麟,整理. 北京: 人民卫生出版社,1993:428.
- [11] 李东垣. 内外伤辨惑论 [M]. 李一鸣,整理. 北京: 人民卫生出版社,2007:8.
- [12] 李灿东,吴承玉. 中医诊断学 [M]. 北京: 中国中医药出版社,2012:30.
- [13] 白东林,吴文先,高雅. 小儿过敏性鼻炎中医诊疗思路探析 [J]. 新中医,2019,51(11):313-316.
- [14] 陶洁. 张磊运用谷青汤临证验案辨析 [J]. 上海中医药杂志,2008,42(7):13-15.
- [15] 邓秀娟,谭宇军,黄乐. 肖相如教授从肺肾相关论治过敏性鼻炎经验 [J]. 广西中医药大学学报,2020,23(1):17-19.

(收稿日期: 2020-08-26; 修回日期: 2021-03-02)

编辑: 侯建春

(上接第 1168 页)

## Effect of *Bimin Decoction* (鼻敏煎) on T Lymphocyte Subsets in Model Mice of Allergic Rhinitis

ZHAO Jingyi, YAN Xinyu, AI Jianwei, WANG Man, HAN Jinshuai, WANG Junge

Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing, 100010

**ABSTRACT Objective** To explore the possible mechanism of *Bimin Decoction* (鼻敏煎) in treating allergic rhinitis (AR). **Methods** Sixty BALB/c mice were randomised into normal control group, model group, *Bimin Decoction* low-dose and high-dose groups, and loratadine group, with 12 mice in each group. Except for the normal control group, mice were sensitized and stimulated with ovalbumin to develop the AR model; 30 minutes before the stimulation on each day, *Bimin Decoction* at a dose of 120 and 600 mg/(kg·d) were given to the mice by gavage in *Bimin Decoction* low-dose and high-dose groups, respectively; 2 mg/(kg·d) loratadine was administered by gavage in loratadine group, and 0.2 ml distilled water was given by gavage in normal group and model group; all the interventions lasted for seven days. After the last stimulation, the score of the allergy-like symptoms was assessed firstly, and the total score was calculated; the peripheral blood lymphocyte factor level, the proportions of lymphocyte subsets, and the expression of transcription factors or receptors of nasal mucosal lymphocyte subsets were then detected. **Results** The total score of allergy-like symptoms in the model group was higher than that of the normal control group ( $P < 0.01$ ), and the score was significantly lower in *Bimin Decoction* high-dose group and loratadine group than in the model group ( $P < 0.05$ ). *Bimin Decoction* high-dose group had significantly decreased levels of peripheral blood interleukin 2, interleukin 4, interleukin 5, interleukin 17, interferon  $\gamma$  and transforming growth factor  $\beta$ , decreased proportions of helper T cell 2 (Th2), helper T cell 17 (Th17) and  $\gamma\delta$  T cell, decreased expression levels of transcription factors including GATA3, ROR $\gamma$ t and  $\gamma\delta$  T cell receptor ( $\gamma\delta$  TCR) in nasal mucosa tissue, and increased level of interleukin 10 (IL-10) compared to the model group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Bimin Decoction* can regulate the proportions of T lymphocyte subsets in peripheral blood and nasal mucosa, inhibit the differentiation of Th2, Th17 and  $\gamma\delta$  T cells, adjust the release of the related cytokines and the mediated inflammatory responses in mice with allergic rhinitis. That might be part of the possible mechanism of *Bimin Decoction* in treating AR.

**Keywords** allergic rhinitis; *Bimin Decoction* (鼻敏煎); T lymphocytes; lymphocyte factor; transcription factor

(收稿日期: 2020-10-30; 修回日期: 2020-12-07)

编辑: 姜冰