

槲皮苷对小鼠变应性鼻炎的治疗作用研究[△]

董金叶^{1*}, 孙月², 秦红¹, 朱琳¹, 鞠叶^{2#} (1. 青岛大学附属妇女儿童医院耳鼻喉科, 山东青岛 266000; 2. 中国人民解放军海军第九七一医院耳鼻咽喉科, 山东青岛 266071)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)06-0700-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.06.015

摘要 目的:探索槲皮苷对变应性鼻炎(AR)模型小鼠的缓解作用及相关机制。方法:将小鼠随机分为对照组、模型组(卵蛋白)和治疗组(卵蛋白+槲皮苷),每组10只。模型组采用“卵蛋白注射及其鼻黏膜刺激法”构建AR模型,即卵蛋白0.3 mg、Al(OH)₃ 30 mg及0.9%氯化钠溶液1 mL混合后于小鼠腹腔注射初次免疫,第15—21日每侧鼻孔给予4%卵蛋白溶液(20 μL/只)刺激小鼠鼻孔;对照组小鼠腹腔注射Al(OH)₃,然后在第15—21日用0.9%氯化钠溶液刺激小鼠鼻孔;治疗组小鼠在模型组基础上,于第15—21日刺激鼻孔的同时加用槲皮苷50 mg/kg灌胃。记录各组小鼠最后一次卵蛋白激发后的鼻摩擦次数和喷嚏次数;对每组小鼠鼻中隔组织进行苏木精-伊红染色及高碘酸-希夫染色;检测各组小鼠鼻腔灌洗液中炎症因子肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素(IL)4、IL-10和IL-17水平;对鼻腔灌洗液中细胞进行Diff-Quik染色;对每组小鼠鼻黏膜上皮细胞中嗅觉标记蛋白(OMP)进行免疫荧光染色。结果:治疗组小鼠平均喷嚏次数及鼻摩擦次数明显少于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$)。与对照组相比,模型组小鼠鼻中隔组织中有明显的杯状细胞增生,且黏液分泌活跃;与模型组相比,治疗组小鼠鼻中隔组织中杯状细胞增生减轻,黏液分泌减少。与模型组相比,治疗组小鼠鼻腔灌洗液中细胞因子TNF-α、IL-4、IL-10和IL-17水平均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。模型组小鼠鼻腔灌洗液中总细胞数和分化细胞(包括上皮细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞)与对照组相比显著增加;与模型组相比,治疗组小鼠鼻腔灌洗液中细胞数量均明显减少。模型组小鼠嗅觉上皮细胞中的OMP表达明显减少;而治疗组小鼠嗅觉上皮细胞中的OMP表达减少得到一定程度的扭转,OMP表达增加。结论:槲皮苷可通过减轻炎症反应、增加鼻黏膜上皮细胞OMP表达,进而改善AR症状。

关键词 槲皮苷;变应性鼻炎;炎症反应;嗅觉标记蛋白

Therapeutic Effects of Quercitrin on Allergic Rhinitis in Mice[△]

DONG Jinye¹, SUN Yue², QIN Hong¹, ZHU Lin¹, JU Ye² (1. Dept. of Otolaryngology, Women and Children's Hospital Affiliated to Qingdao University, Shandong Qingdao 266000, China; 2. Dept. of Otolaryngology, No. 971 Hospital of the Navy of Chinese People's Liberation Army, Shandong Qingdao 266071, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the effects of quercitrin on alleviation and improvement of model mice with anaphylactic rhinitis (AR) and the related mechanisms. **METHODS:** The mice were randomly divided into the control group, the model group (ovalbumin) and the treatment group (ovalbumin + quercitrin), with 10 mice in each group. The AR model of the model group was established by “ovalbumin injection and nasal mucosa stimulation method”, namely, the mice were injected intraperitoneally with ovalbumin 0.3 mg, Al(OH)₃ 30 mg and 0.9% sodium chloride solution 1 mL after initial immunization, and the mice were stimulated with 4% ovalbumin solution (20 μL/mouse) on each nostril from 15th to 21st day. Mice in the control group were intraperitoneally injected with Al(OH)₃, and then stimulated with 0.9% sodium chloride solution from 15th to 21st day. On the basis of the model group, mice in the treatment group were given quercitrin 50 mg/kg intragastric administration at the same time of nostril stimulation from the 15th to 21st day. The number of nasal friction and sneezing were recorded after the last ovalbumin stimulation. Hematoxylin-eosin staining and periodic acid-Schiff staining were performed on the nasal septum of mice in each group. Levels of inflammatory immune factors tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin(IL)-4, IL-10 and IL-17 in nasal lavage fluid of mice were detected. Diff-Quik staining was performed on cells in nasal lavage fluid. Immunofluorescence staining of olfactory marker protein (OMP) in nasal mucosa epithelial cells of mice in each group was performed. **RESULTS:** The average number of sneezing and nasal friction in the treatment group was significantly less than that in the model group, with statistically significant difference ($P<0.01$). Compared with the control group,

△ 基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(No. BS2017SW13011)

* 副主任医师。研究方向:小儿耳鼻喉科专业。E-mail: p8x4rapezw@21cn.com

通信作者:主治医师。研究方向:鼻科学。E-mail: p8x4rapezw@21cn.com

the nasal septum tissue of mice in the model group showed obvious goblet cell proliferation and active mucus secretion. Compared with the model group, goblet cell proliferation and mucus secretion in nasal septum tissue of mice in the treatment group decreased. Compared with the model group, the levels of TNF- α , IL-4, IL-10 and IL-17 in nasal lavage fluid of mice in the treatment group decreased significantly, with statistically significant difference ($P < 0.01$). Compared with the control group, the total number of cells and differentiated cells (including epithelial cells, eosinophils, neutrophils, lymphocytes and macrophages) in the nasal lavage fluid of the mice in the model group increased significantly; compared with the model group, the number of cells in the nasal lavage fluid of the mice in the treatment group decreased significantly. The expression of OMP in olfactory epithelial cells decreased significantly in the model group. However, the reduction of OMP in olfactory epithelial cells of mice in the treatment group was reversed to a certain extent and the expression of OMP increased. CONCLUSIONS: Quercitrin can improve AR symptoms by reducing inflammatory immune response and increasing OMP expression in nasal mucosal epithelial cells.

KEYWORDS Quercitrin; Allergic rhinitis; Inflammatory response; Olfactory marker protein

变应性鼻炎(anaphylactic rhinitis, AR)为全世界常见的鼻腔疾病,指发生在鼻黏膜的由免疫球蛋白 E(IgE)介导的变态反应性疾病,以鼻塞、打喷嚏及鼻黏膜肿胀为主要表现,为临床常见病和多发病^[1]。流行病学调查结果显示,随着生活环境破坏、污染加重等,AR的发病率呈逐年升高趋势^[2]。AR会严重影响患者的生活质量,导致情绪障碍及经济负担等,但目前关于 AR 的治疗只能缓解其症状,因此,积极探索更有效的治疗方案和药物是首要任务。槲皮苷属于天然黄酮苷化合物,目前研究结果显示其具有广泛的治疗效果,不仅在抗心脑血管疾病^[3]、免疫调节^[4]、神经保护^[5]及调节血脂^[6]等方面具有良好的药理活性,而且具有抗过敏^[7]、抗氧化^[8]和抗肿瘤^[9]等重要作用。但目前尚无明确研究显示槲皮苷在 AR 中的确切效果。本研究通过 AR 模型小鼠,探讨槲皮苷对 AR 的治疗效果及相关作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

6 周龄 Balb/c 小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证编号为 SCXK(京)2017-0015,小鼠体质量为 26~32 g,均为雌性,饲养于 SPF 级动物房中适应 1 周,自由摄食进水,相关操作均符合动物医学伦理相关规定。

1.2 仪器

Centrifuge 5420 型离心机(德国 Eppendorf 公司);DM2700M 型显微镜(美国 Leica 公司);LSM-900 型激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)。

1.3 药品与试剂

槲皮苷(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号为 5280459);酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号为 H052-1);Diff-Quik 染色试剂盒(西安齐岳生物科技有限公司,批号为 148983);1:400 抗嗅觉标记蛋白(OMP)抗体(上海拜力生物科技有限公司,批号为 548985);4%卵蛋白溶液(北京博奥森生物技术有限公司,批号为 AH06C17756);Al(OH)₃(美国 Sigma 公司,批号为 V900163);乙二胺四乙酸溶液(美国 Sigma 公司,批号为 464534);PBS 缓冲液(美国赛默飞公司,批号为 627813);山羊血清(美国赛默飞公司,批号为 c545489);0.03% Triton X-100 封闭液(美国赛

默飞公司,批号为 5487558);FITC 结合的山羊抗兔二级抗体(美国赛默飞公司,批号为 4724869)HE 染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,批号为 164135a);PAS 染色试剂盒(美国 Sigma 公司,批号为 1649881)。

2 方法

2.1 卵蛋白诱导的 AR 小鼠模型和槲皮苷治疗

6 周龄雌性 Balb/c 小鼠在无特定病原体环境中随意获得无菌食物和水。所有动物均按照实验动物护理和使用委员会批准的方案处理。将小鼠随机分为三组($n = 10$),即对照组、模型组(卵蛋白)和治疗组(卵蛋白+槲皮苷)。AR 小鼠模型建立(模型组):采用目前国内常用的“卵蛋白注射及其鼻黏膜刺激法”,卵蛋白 0.3 mg、Al(OH)₃ 30 mg 及 0.9%氯化钠溶液 1 mL 混合后于小鼠腹腔注射初次免疫,第 2—14 日小鼠正常饲养,第 15—21 日每侧鼻孔给予 4%卵蛋白溶液(20 μ L/只)刺激小鼠鼻孔。对照组:腹腔注射 Al(OH)₃,然后在第 15—21 日用 0.9%氯化钠溶液刺激小鼠鼻孔。治疗组:在模型组基础上,第 15—21 日每侧鼻孔给予 4%卵蛋白溶液(20 μ L/只)刺激小鼠鼻孔,同时第 15—21 日每日加用槲皮苷(纯度 $\geq 98\%$)50 mg/kg 灌胃。

2.2 过敏症状评估和鼻腔灌洗液样品制备

在第 21 日最后一次卵蛋白鼻腔刺激后 20 min 内,对所有小鼠的早期反应(包括鼻摩擦次数和喷嚏次数)进行计数,并以盲法记录,共 10 min。在最后一次鼻腔刺激 2 h 后,采集小鼠血液和鼻腔灌洗液样本,以 1 600 r/min 离心 10 min(离心半径为 10 cm)。将血浆和鼻腔灌洗液上清液储存于-80 $^{\circ}$ C 以进行后续实验。此外,将小鼠颅骨矢状打开,获取鼻中隔及其黏膜,并储存于-80 $^{\circ}$ C 以进行后续实验。

2.3 组织病理学检查

鼻中隔的标本在 10%甲醛中固定 24 h;用去离子水清洗后浸泡在乙二胺四乙酸溶液中脱钙 3~4 周;然后石蜡包埋;组织切片(厚度为 3 μ m)用苏木精-伊红(HE)染色(用于组织病理学变化的定性评价)、高碘酸-希夫(PAS)染色(用于黏液染色),在光学显微镜下以 400 倍放大倍数观察并采集图像。

2.4 检测小鼠鼻腔灌洗液中炎症因子水平

对小鼠鼻腔灌洗液进行炎症因子检测,根据 ELISA 试剂

盒说明书,对三组小鼠鼻腔灌洗液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)4、IL-10 和 IL-17 水平进行测定,重复3次。

2.5 鼻腔灌洗液中细胞分析

将鼻腔灌洗液 150 μ L 以 1 000 r/min 离心 10 min (离心半径为 10 cm) 后涂片,利用 Diff-Quik 染色试剂盒进行染色,包括嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和上皮细胞,在光学显微镜下以 400 倍放大倍数观察并采集图像。

2.6 免疫荧光染色

将鼻中隔切片置于 4 $^{\circ}$ C、0.01 mol/L PBS 缓冲液中,复温 15 min 后滴加 10% 山羊血清+0.03% Triton X-100 封闭液室温 (25 $^{\circ}$ C) 封闭 2 h,组织切片中加入 1:400 OMP 抗体,置于 4 $^{\circ}$ C 孵育箱中过夜,再用 0.01 mol/L PBS 缓冲液清洗。37 $^{\circ}$ C 下用异硫氰酸荧光素结合的山羊抗兔二级抗体孵育 30 min,再次洗涤切片,滴加抗荧光衰减封片剂封片后置于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存,于激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

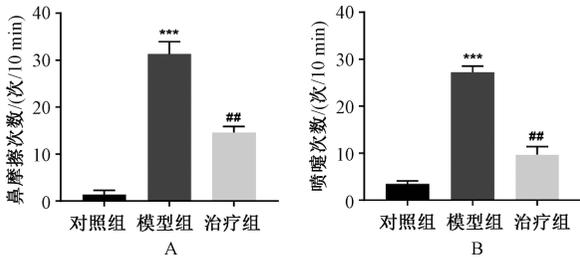
2.7 统计学方法

实验中的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验均至少重复 3 次,数据均采用 SPSS 13.0 软件进行分析。多组之间比较选择单因素方差分析 (One-Way ANOVA),组间两两比较选用 Tukey 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 槲皮苷可改善 AR 小鼠的鼻过敏症状

治疗组小鼠用槲皮苷灌胃,持续 1 周,记录最后 1 次卵蛋白激发后的鼻摩擦次数和喷嚏次数。结果显示,与对照组相比,模型组小鼠平均鼻摩擦次数显著增加 ($F = 11.76, P < 0.001$),而治疗组小鼠平均鼻摩擦次数明显少于模型组 ($F = 9.89, P < 0.01$);与对照组相比,模型组小鼠平均喷嚏次数显著增加 ($F = 13.21, P < 0.001$),而治疗组小鼠平均喷嚏次数明显少于模型组 ($F = 9.45, P < 0.01$),差异均有统计学意义,表明槲皮苷可减轻 AR 小鼠的鼻过敏症状,见图 1。



A. 各组小鼠平均鼻摩擦次数; B. 各组小鼠平均喷嚏次数; 与对照组相比, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, ## $P < 0.01$

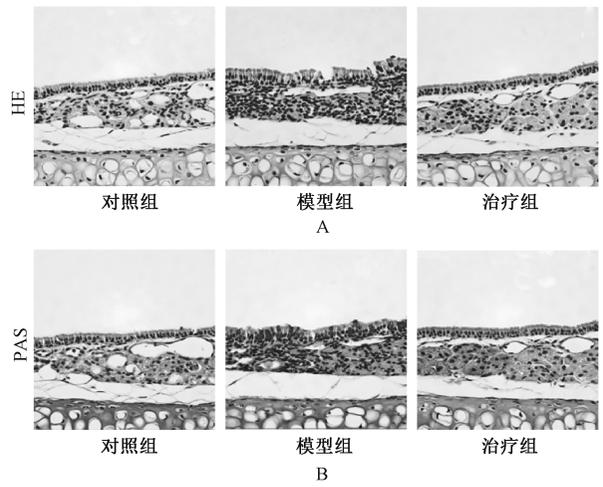
A. average number of nasal rubbing of mice in each group; B. average number of sneezing of mice in each group; vs. the control group, *** $P < 0.001$; vs. the model group, ## $P < 0.01$

图 1 槲皮苷对小鼠 AR 症状的影响

Fig 1 Effects of quercitrin on AR symptoms in mice

3.2 槲皮苷可改善 AR 小鼠鼻中隔组织病理学形态

与对照组相比,模型组小鼠鼻中隔组织中有明显的杯状细胞增生,且黏液分泌活跃;与模型组相比,治疗组小鼠鼻中隔组织中杯状细胞增生减轻,黏液分泌减少,表明槲皮苷可改善 AR 小鼠鼻中隔组织病理学形态,见图 2。



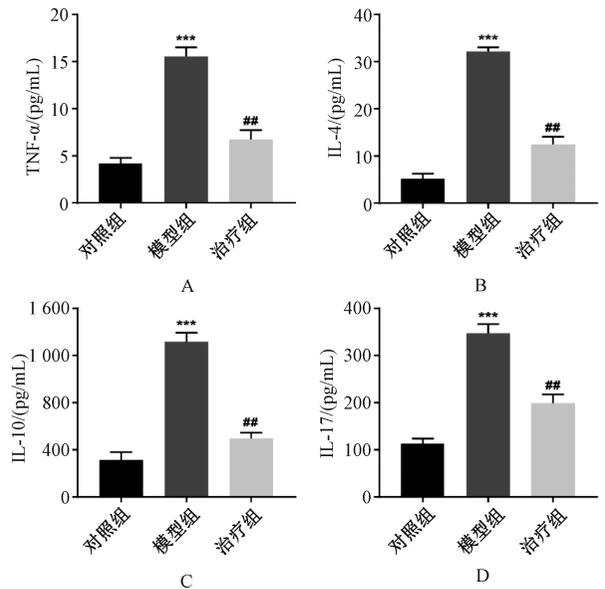
A. HE 染色; B. PAS 染色

A. HE staining; B. PAS staining

图 2 各组小鼠鼻中隔组织病理学染色代表性图像 ($\times 400$)
Fig 2 Representative images of histopathological staining of nasal septum of mice in each group ($\times 400$)

3.3 槲皮苷可降低 AR 小鼠鼻腔灌洗液中炎症因子水平

与对照组相比,模型组小鼠鼻腔灌洗液中 TNF- α ($F = 12.57$)、IL-4 ($F = 14.75$)、IL-10 ($F = 13.64$) 和 IL-17 ($F = 11.41$) 水平均明显升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.001$);与模型组相比,治疗组小鼠鼻腔灌洗液中 TNF- α ($F = 10.43$)、IL-4 ($F = 9.87$)、IL-10 ($F = 9.70$) 和 IL-17 ($F = 8.43$) 水平均明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),表明槲皮苷可抑制 AR 小鼠的炎症反应,见图 3。



A. TNF- α ; B. IL-4; C. IL-10; D. IL-17; 与对照组相比, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, ## $P < 0.01$

A. TNF- α ; B. IL-4; C. IL-10; D. IL-17; vs. the control group, *** $P < 0.001$; vs. the model group, ## $P < 0.01$

图 3 各组小鼠鼻腔灌洗液中 TNF- α 、IL-4、IL-10 和 IL-17 水平
Fig 3 Levels of TNF- α , IL-4, IL-10 and IL-17 in nasal lavage fluid of mice in each group

3.4 槲皮苷可减少小鼠鼻腔灌洗液中细胞数量

与对照组相比,模型组小鼠鼻腔灌洗液中总细胞数和分化细胞(包括上皮细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞)显著增加;与模型组相比,治疗组小鼠鼻腔灌洗液中细胞数量均明显减少,见图4。

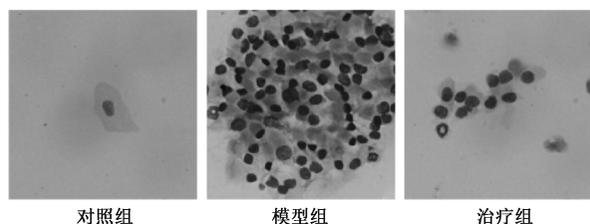


图4 各组小鼠鼻腔灌洗液中细胞数量(Diff-Quik, ×400)
Fig 4 Number of cells in nasal lavage fluid of mice in each group (Diff-Quik, ×400)

3.5 槲皮苷可提高小鼠嗅觉上皮细胞中 OMP 表达水平

对照组小鼠嗅觉上皮细胞中的 OMP 表达正常,呈现浓绿色;模型组小鼠嗅觉上皮细胞中的 OMP 表达明显减少;而治疗组小鼠嗅觉上皮细胞中的 OMP 表达减少得到一定程度的扭转,OMP 表达增加,见图5。

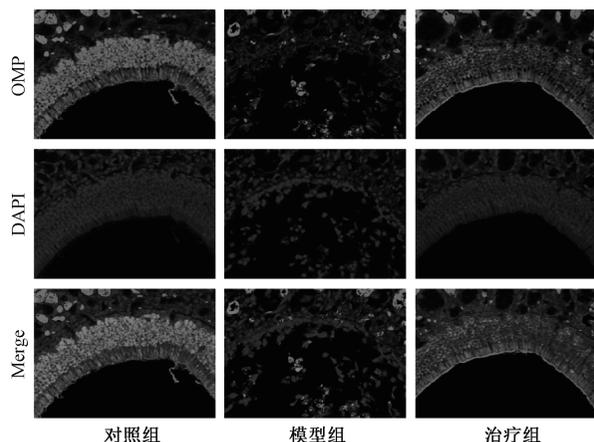


图5 各组小鼠嗅觉上皮细胞中 OMP 免疫荧光染色代表性图像

Fig 5 Representative images of OMP immunofluorescence staining in olfactory epithelial cells of mice in each group

4 讨论

AR 为常见的变态反应性疾病,IgE 抗体与肥大细胞和嗜碱性粒细胞结合,导致脱颗粒和释放预先形成的介质,如组胺、白三烯和前列腺素 D₂,导致血管通透性增加,气道平滑肌收紧,黏液分泌增加;另外,上述介质还可刺激感觉神经,在短时间内出现鼻塞、充血和打喷嚏的感觉,主要病理过程涉及免疫炎症反应的过度激活等^[10-11]。中重度 AR 患者需常年服用抗过敏药以缓解症状,但长期服用抗过敏药可能带来诸多不良反应^[12]。中医药是我国治疗过敏性疾病的常用疗法。研究结果表明,中医药治疗 AR 具有一定的有效性^[13]。但其中的作用机制尚无明确报道。

槲皮苷已被证明具有多种治疗作用,包括抗心脑血管疾病、免疫调节、神经保护、调节血脂、抗氧化及抗肿瘤等^[14]。

另有研究结果显示,槲皮苷具有抗过敏作用,其可减轻特异性皮炎,可能机制为其具有抗炎和抗氧化活性^[15]。本研究探讨了槲皮苷在小鼠 AR 模型中的作用及相关机制,结果显示,槲皮苷可有效减轻 AR 小鼠的过敏症状及黏液的产生。黏液分泌增多为变态反应的主要症状,IL-4 可增强组胺诱导 AR 的黏液过度分泌^[16-17]。IL-4 是由肥大细胞和淋巴细胞产生的重要细胞因子,在过敏性哮喘和 AR 的发病机制中起着重要作用^[18-19]。本研究结果说明槲皮苷可明显减轻 AR 小鼠局部炎症因子的产生,减轻局部炎症细胞浸润,由此表明槲皮苷可通过减少 AR 小鼠鼻腔灌洗液中 IL-4 等炎症因子的表达进而减轻 AR 症状。

研究结果显示,鼻黏膜上皮细胞中 OMP 表达的恢复与 AR 症状减轻密切相关,OMP 是反映嗅觉损伤程度较为可靠的指标^[20]。因此,本研究对各组小鼠嗅觉上皮细胞中 OMP 表达的变化进行研究,结果证实,槲皮苷治疗后 AR 小鼠嗅觉上皮细胞中 OMP 的表达得到恢复,进一步说明槲皮苷对 AR 小鼠具有较好的治疗作用。

综上所述,槲皮苷对 AR 小鼠具有较好的治疗效果,其可通过减轻炎症反应、增加鼻黏膜上皮细胞 OMP 表达来发挥作用。本研究结果可为 AR 的临床治疗提供新的诊疗思路及研究基础。

参考文献

- [1] 王孟,郑铭,王向东,等. 中国过敏性鼻炎流行病学研究进展[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2019,26(8):415-420.
- [2] 杨一兵. 2005—2011 年中国主要城市自我报告过敏性鼻炎患病率增加[J]. 中华预防医学杂志,2019,53(4):418.
- [3] 韩昊特. 乌药叶槲皮苷治疗心血管疾病药效学评价及作用机制研究[D]. 杭州:浙江大学,2017.
- [4] 陈龙云,周艳艳,徐安莉,等. 槲皮苷对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用[J]. 中国免疫学杂志,2019,35(19):2343-2349.
- [5] SUN Y, ZHANG H L, WU Z J, et al. Quercitrin rapidly alleviated depression-like behaviors in lipopolysaccharide-treated mice: the involvement of PI3K/AKT/NF- κ B signaling suppression and CREB/BDNF signaling restoration in the hippocampus[J]. ACS Chem Neurosci, 2021, 12(18):3387-3396.
- [6] 张家瑞. 槲皮苷和山奈酚对糖尿病小鼠血糖及血脂水平的影响[J]. 现代食品科技,2013,29(3):459-462.
- [7] DING Y, LI C, ZHANG Y, et al. Quercetin as a Lyn kinase inhibitor inhibits IgE-mediated allergic conjunctivitis [J]. Food Chem Toxicol,2020,135:110924.
- [8] OZELIN S D, SENEDESE J M, ALVES J M, et al. Preventive activity of Copaifera langsdorffii Desf. leaves extract and its major compounds, afzelin and quercitrin, on DNA damage in in vitro and in vivo models[J]. J Toxicol Environ Health A, 2021, 84(14):569-581.
- [9] LI H, TAN L, ZHANG J W, et al. Quercetin is the active component of Yang-Yin-Qing-Fei-Tang to induce apoptosis in non-small cell lung cancer[J]. Am J Chin Med,2019,47(4):879-893.

(下转第 707 页)