

# 寒、热证豚鼠变应性鼻炎细胞 功能及形态学观察<sup>\*</sup>

周小军<sup>1△</sup> 安 辉<sup>1</sup> 田道法<sup>2</sup> 唐发清<sup>4</sup> 曾庆善<sup>3</sup> 蒙旭光<sup>1</sup> 文 志<sup>2</sup>

**内容提要** 目的:研究寒证及热证豚鼠变应性鼻炎(AR)细胞功能和形态学特征。方法:以寒性、热性中药分别给予豚鼠造成寒证、热证模型,然后以甲苯二异氰酸酯和盐酸萘甲唑啉点鼻,分别造成 AR 和鼻炎模型,观察其细胞功能、数量及电镜下超微形态学特点。结果:AR 模型豚鼠血嗜碱性粒细胞(BC)脱颗粒指数高于鼻炎模型豚鼠,其中寒证 AR 豚鼠又高于热证 AR 豚鼠( $P < 0.05$ )。寒证 AR 豚鼠鼻粘膜肥大细胞(MC)及嗜酸性粒细胞(EC)数量多,浸润广泛,颗粒包膜不清,密度不均,颗粒内见空泡、融合及管道,而热证 AR 豚鼠及对照组豚鼠 MC 及 EC 数量少,无浸润,颗粒包膜清,密度均一,无颗粒空泡、融合及管道。结论:寒证 AR 豚鼠 BC、MC、EC 呈明显活化状态。

**关键词** 变应性鼻炎 寒证 热证 肥大细胞 嗜酸性粒细胞 嗜碱性粒细胞 超微形态学

**Functional and Morphological Observation on Cells in Allergic Rhinitis Guinea-Pigs with Cold or Heat Syndrome** ZHOU Xiao-jun, AN Hui, TIAN Dao-fa, et al *Department of ENT, Liuzhou Municipal Hospital of TCM, Guangxi (545001)*

**Objective:** To investigate the functional and morphological characteristics of cells in allergic rhinitis (AR) guinea-pigs with Cold or Heat Syndrome. **Methods:** The Cold Syndrome or Heat Syndrome guinea-pig model was made, and then reformed into AR model or rhinitis medicamentosa (RM) model by using nose drops of 10% toluene di-isocyanate (TDI) or 0.1% naphazoline hydrochloride. The cell function, count and ultramicroscopic morphology characteristics in the model animals were observed. **Results:** The degranulation index (DI) of blood basophils and the count of mast cells (MC) in nasal mucosa were higher in AR guinea-pigs with Cold Syndrome than that in Heat Syndrome guinea-pigs, but the two parameters in AR with both Cold and Heat Syndrome were higher than those in the RM model. Mast cell and eosinophilic granulocyte in AR guinea-pigs with Cold Syndrome were high in count, widely infiltrated, indiscernible cellular capsule, heterogeneous in density, and vacuoles, fusions and tubules in granules while in those with Heat Syndrome, mast cells and eosinophils were scarcely found, without infiltration, granules with discernible membrane and homogeneous in density, no vacuoles, fusions and tubules in granules. **Conclusion:** The basophilic cells, mast cells and eosinophilic granulocytes in AR guinea-pigs with Cold Syndrome are in activated condition.

**Key words** allergic rhinitis, Cold Syndrome, Heat Syndrome, mast cell, eosinophilic granulocyte, basophilic granulocyte, ultrastructural morphology

变应性鼻炎(AR,中医称鼻鼽)为临床常见多发病,中医辨证多属虚寒证型(肺脾肾阳虚为主),既往实验<sup>(1)</sup>显示:AR 好发于寒证豚鼠,而热证豚鼠相对少发。肥大细胞(MC)、嗜碱性粒细胞(BC)及嗜酸性粒细胞(EC)为 AR 的重要效应细胞,观察其不同证型之

AR 模型的功能及形态学改变,对深入研究及探讨 AR 发病学的病理基础很有意义。

## 材料与方法

1 实验动物及分组 清洁级豚鼠,体重 150~300g,平均 201g,雌雄各半,购自湖南省卫生防疫站,按体重及性别随机分成 3 组,即热证组 15 只,寒证组 15 只,对照组 10 只。

## 2 造模方法

2.1 寒、热证豚鼠造模方法 参见文献<sup>(2)</sup>,即热

<sup>\*</sup> 国家中医药管理局资助课题(No. 97Y020)

1. 广西柳州市中医院耳鼻喉科(广西 545001); 2. 湖南中医学院附属第一医院耳鼻喉科; 3. 湖南医科大学电镜室; 4. 湖南医科大学湘雅医院中心实验室, △ 现为湖南中医学院博士生

万方数据

证组豚鼠用复方热药(附子、干姜、肉桂按 1:1:1 比例取药,煎成 180% 浓度),每天 10g/kg(稀释成 3ml)灌胃,每天 1 次,用药 4 周;寒证组豚鼠用复方凉药(知母、黄柏、生石膏、龙胆草按 1.5:1:1:1.5 比例取药,煎成 180% 浓度)灌胃,每天 10g/kg(稀释成 3ml),每天 1 次,用药 4 周。

2.2 AR 造模方法 参见文献<sup>[3]</sup>。豚鼠寒、热证造模完成后,以 10% 甲苯二异氰酸酯的橄榄油溶液(TDI,西安化学试剂厂产品)10 $\mu$ l/鼻孔滴鼻,每天 1 次,1 周后隔天 1 次,用药 17 天。对照组用 0.1% 盐酸萘甲唑啉滴鼻液(河北宏宝药业股份有限公司产品)10 $\mu$ l/鼻孔滴鼻,每天 1 次,1 周后隔天 1 次,用药 40 天造成药物性鼻炎模型。

### 3 检测方法及指标

3.1 血清甲状腺素( $T_4$ )测定 证型造模完成后随机处死寒、热证两组豚鼠各 5 只,取心脏血(上午 9:00 左右),离心后保存血清待测,用放射免疫法测定,试剂盒购自中国原子能研究院同位素研究所。

3.2 血 BC 脱颗粒试验 证型、AR 两期造模完成后,于上午 9:00 左右快速处死余下豚鼠,收集(抗凝)心脏血,分离 BC,以  $10^{-5}$  螨虫变应原(北京协和医院试剂室提供)刺激 BC,观察 BC 脱颗粒情况,以脱颗粒指数(DI)表示,具体操作及脱颗粒指数计算方法参见文献<sup>[4]</sup>。

3.3 鼻粘膜 MC 计数 证型、AR 两期造模完成后处死 3 组豚鼠各 10 只,随机选取寒、热证豚鼠各 6 只及药物性鼻炎豚鼠 1 只,行鼻腔中线剖开,取双侧下鼻甲粘膜,分别行光镜和电镜检查。光镜检查时,常规固定,半薄片厚度为 4 $\mu$ m,连续切片,每隔 10 片取切片 1 张,每只共取 5 张切片,经甲苯胺蓝染色显示 MC,在西德 OPTON 多能研究显微镜  $\times 250$  下观察,每张切片从鼻粘膜上皮层、粘膜下层、固有层、肌层随机计数 5 个视野的 MC,以每张切片内所计数的 MC 总数作为计量单位。

3.4 鼻粘膜 MC 及 EC 形态学观察 取材同上,电镜检查时以 3% 戊二醛(0.1mol/L PBS, pH 为 7.4)固定 2h,1% 锇酸后固定 1h,梯度丙酮脱水, Epon-812 环氧树脂浸泡、包埋。包埋块经瑞典 LKB 11800 型修块机切半薄片,瑞典 LKB III 型超薄切片机切超薄片(700 $\text{\AA}$ )醋酸双氧铀-柠檬酸铅电子染色后,日立 H-600 型透射电镜观察鼻粘膜 MC 及 EC 细胞质颗粒形态。所有检查均采用双盲法。

4 统计学方法 采用  $t$  检验及方差分析。

## 结 果

### 1 动物造模情况

1.1 寒、热证造模情况 寒证豚鼠经灌服凉性药后豚鼠活动减弱,抵抗力下降,食欲下降,饮水减少,毛发稀疏,舌质淡红,心率减慢,肛温变化不明显。热证豚鼠经灌服热性药后豚鼠活动亢奋,好斗殴,食欲亢进,饮水增多,毛发正常,心率增快,肛温略高,舌质淡红,睾丸出现红肿现象。 $T_4$  含量:寒证豚鼠( $n=5$ )为  $(7.65 \pm 2.10)$  ng/ml,热证豚鼠( $n=5$ )为  $(14.61 \pm 6.31)$  ng/ml。证型造模符合中医临床寒、热症状特点。

1.2 AR 造模情况 寒、热证两组豚鼠用 TDI 液点鼻后均出现喷嚏、抓鼻(鼻痒)等鼻过敏症状,随用药时间延长,过敏症状逐渐明显,并出现流鼻涕,至 10 天左右较典型。以抓鼻程度、喷嚏数及鼻流涕情况衡量豚鼠 AR 病情,均以寒证组为重。与以往实验相同<sup>[1]</sup>。

1.3 药物性鼻炎造模情况 对照组豚鼠鼻腔点 0.1% 盐酸萘甲唑啉滴鼻液后无明显打喷嚏及抓鼻情况,随用药时间延长至 1 个月左右可出现流鼻涕情况,示鼻炎模型成立。

2 寒、热证 AR 豚鼠血 BC 脱颗粒测定结果 BC/DI 以寒证 AR 为高( $0.44 \pm 0.09$ ,  $n=10$ ),热证 AR 为次( $0.29 \pm 0.10$ ,  $n=10$ ),两者比较差异有显著性( $P<0.05$ )。两者均高于对照组( $0.13 \pm 0.07$ ,  $n=10$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),显示寒证 AR 豚鼠 BC 处于较活化状态。

3 寒、热证 AR 豚鼠鼻粘膜 MC 计数(个)结果 光镜下见寒证 AR 豚鼠鼻粘膜 MC 数较多( $30.17 \pm 10.65$ ,  $n=6$ ),热证 AR 豚鼠鼻粘膜 MC 数较少( $11.17 \pm 6.91$ ,  $n=6$ ,  $P<0.01$ ),而对照组豚鼠鼻粘膜基本上很少见 MC。

4 鼻粘膜 MC 显微形态学观察 鼻粘膜 MC 在寒证 AR 豚鼠与热证 AR 豚鼠比较,无论是数量、浸润范围以及超微结构差异均有显著性,即寒证 MC 数量多,浸润范围广,至粘膜上皮层,伴有基底膜破坏,而热证 MC 数量少,无浸润。超微结构显示寒证 AR 豚鼠 MC 呈现典型活化状态:细胞及颗粒包膜结构不清,特异颗粒的大小形态和电子密度差异较大,具体表现为:(1)细胞质颗粒互相融合,颗粒内可见空泡及脱颗粒管道(见图 1~3)(2)颗粒内脱颗粒后留有颗粒剩余物之脱颗粒管道(见图 2)(3)管道内可见完整颗粒释放,或絮状的颗粒剩余物,颗粒呈松散细颗粒(见图 3)。而热证 AR 豚鼠 MC 则细胞膜及颗粒包膜清楚,

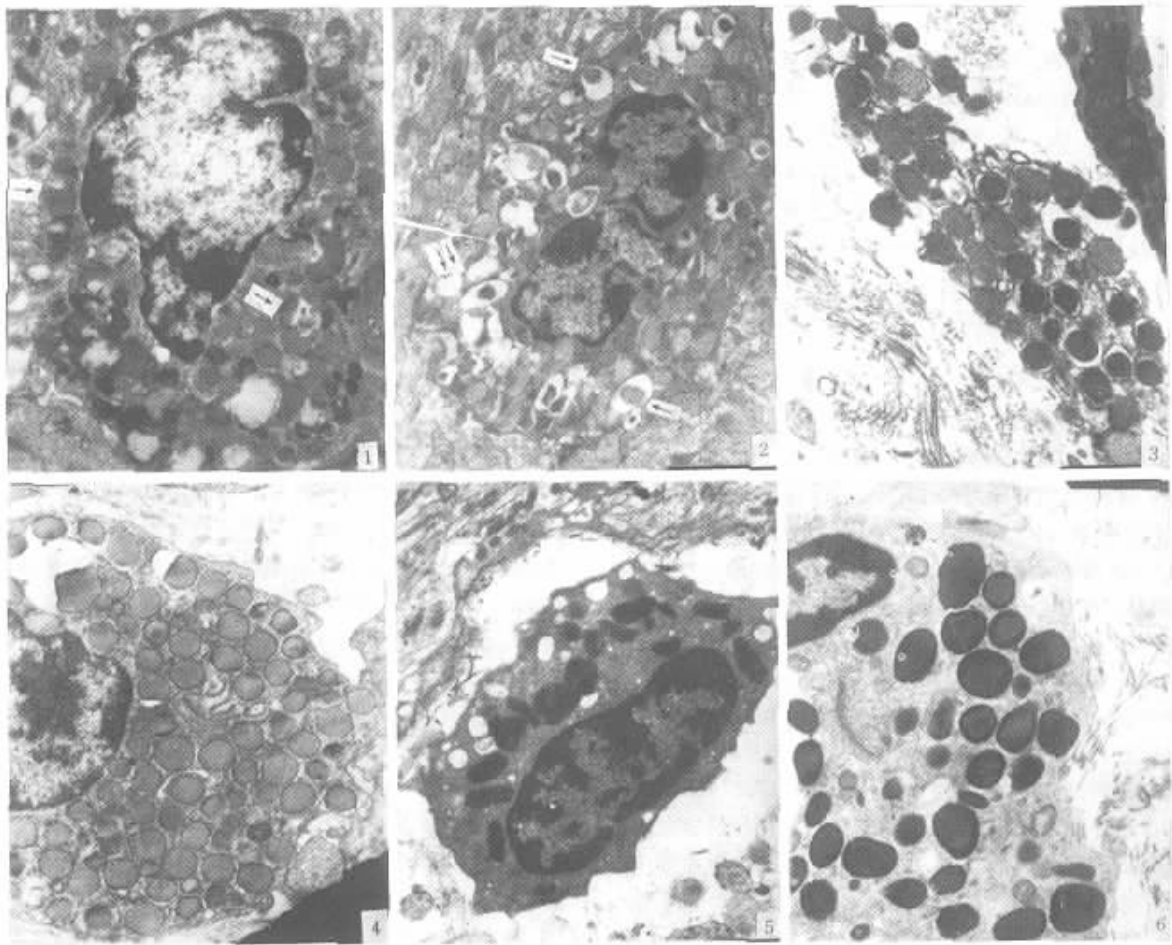


图1 寒证AR之MC胞内颗粒融合(↑),空泡、管道;×1000 图2 寒证AR之MC胞内颗粒空泡(↑↑),留有颗粒剩余物之脱颗粒管道(↑);×8000 图3 寒证AR之MC脱颗粒管道内松散细颗粒(↑);×15000 图4 热证AR之MC颗粒均质;×1000 图5 寒证AR之EC颗粒空泡、管道;×8000 图6 热证AR之EC颗粒正常;×12000

颗粒内容物为均质物质,无颗粒内空泡和颗粒融合现象,也无脱颗粒管道(见图4)。对照组豚鼠鼻粘膜少见MC,MC及其颗粒正常,显示为非变应性鼻炎的特征。

5 鼻粘膜EC显微形态学观察 鼻粘膜EC:寒证与热证豚鼠其数量、浸润及显微形态差异均有显著性,即寒证AR豚鼠EC数量多,广泛浸润并在结缔组织中聚集,细胞膜结构不清楚,颗粒大小形状不规则,并通过脱颗粒管道释放颗粒(见图5)。而热证AR及对照组豚鼠EC数量少,无明显浸润及聚集现象,颗粒包膜清楚,无脱颗粒管道可见(见图6)。

讨 论

参照国内公认的寒、热证及AR造模方法和既往实验<sup>(1)</sup>,本研究行证、病结合方法造模。寒、热证及AR造模后,模型动物具有典型寒、热证及AR临床表现。甲状腺素为体内重要能量代谢调节物质,其值低下多见于寒证。MC、BC、EC为AR的重要效应细胞,可特

征性出现于AR。本模型支持如上观点。  
中医学认为素体虚寒、卫表不固、外邪(变应原)侵袭是鼻鼽的基本病因病机。自然界变应原是广泛存在并无法避免的,但鼻鼽(AR)只发生于特定人群,即虚寒证患者,可知虚寒是鼻鼽发病的根本。实验发现寒证AR豚鼠BC更易于脱颗粒,靶器官上MC、EC效应细胞更多地聚集并大量脱颗粒,从而引发和加剧变应性反应及炎症。由此可见,寒证存在着BC、MC、EC功能活化并特异性聚集于靶器官上特点,一旦外邪(变应原)侵袭,便引发AR,这是寒证易于发生AR的潜在机理。形态学显示其颗粒包膜不清,颗粒电子密度不均一,颗粒互相融合,颗粒内见脱颗粒管道进行脱颗粒(颗粒内容释放后成颗粒空泡),这是寒证鼻鼽发病的病理学基础。

参 考 文 献

1. 周小军,田道法,安辉. 实验性鼻鼽与证候相关性初步研究. 中医药研究 1998 (1):10—12.

2. 梁月华,李薪萍,任 红.寒证热证时中枢、内脏、尿内儿茶酚胺及 5-羟色胺的变化.中医杂志 1991 ;32( 12 ):742—744.
3. 赵秀杰,董 震,杨占泉,等.鼻超敏反应实验模型的建立.中华耳鼻咽喉科杂志 1993 ;28( 1 ):17—18.
4. 许以平,胡炳熊,俞永娟,等.从嗜碱性粒细胞水平研究过敏原的简易方法及在过敏性哮喘的应用.中国免疫学杂志 1987 ( 3 ):50—54.
5. 杨少军.中医不同证型非甲状腺疾病甲状腺激素改变及其临床意义研究.中医杂志 1999 ;40( 6 ):372—375.

( 收稿 2000-03-10 第 3 次修回 2000-10-14 )