

18-β 甘草次酸对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜上皮细胞内质网的影响

杨贵军¹ 席克虎^{1,2} 陈小婉^{1,2} 桂 岩^{1,2} 王有虎^{1,2} 张福宏^{1,2} 马春霞¹
洪 浩¹ 刘翔毅² 马 毅¹ 江 英¹ 董 明¹ 张小兵²

摘要 **目的** 探讨 18-β 甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)对变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)模型大鼠鼻黏膜上皮细胞内质网变化的影响。**方法** 96 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、AR 模型组、氯雷他定组、甘草次酸组,每组 24 只,腹腔注射卵清蛋白致敏建立大鼠 AR 模型,评定动物形态学评分。造模后给予甘草次酸 21.6 mg/kg 灌胃,干预后第 2、4、6、10 周取鼻黏膜组织送电镜检查。**结果** 空白组叠加评分(2.10 ± 0.45)分,氯雷他定组为(5.10 ± 0.56)分,AR 模型组为(5.10 ± 0.56)分,甘草次酸组为(5.20 ± 0.78)分,各组分别与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。透射电镜见 AR 模型组内质网较空白组增多,明显囊样扩张、大量空泡形成、脱颗粒,胞质内可见大量的游离核糖体。在变应原持续作用下,AR 模型组鼻黏膜上皮细胞内质网的上述变化呈进行性加重。而甘草次酸干预组内质网扩张、空泡化、脱颗粒均较模型组缓解,并随观察周期延长逐渐接近空白对照组。**结论** 18-β 甘草次酸可改善变应性鼻炎模型大鼠鼻黏膜上皮细胞内质网的扩张、空泡化及脱颗粒。

关键词 18-β 甘草次酸;上皮细胞内质网;变应性鼻炎

Effect of 18-β Glycyrrhetic Acid on the Endoplasmic Reticulum of Nasal Epithelial Cells in Allergic Rhinitis Model Rats YANG Gui-jun¹, XI Ke-hu^{1,2}, CHEN Xiao-wan^{1,2}, GUI Yan^{1,2}, WANG You-hu^{1,2}, ZHANG Fu-hong^{1,2}, MA Chun-xia¹, HONG Hao¹, LIU Xiang-yi², MA Yi¹, JIANG Ying¹, DONG Ming¹, and ZHANG Xiao-bing² 1 Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou (730000), China; 2 Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou (730020), China

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of 18-β glycyrrhetic acid (GA) on the endoplasmic reticulum of nasal epithelial cells in allergic rhinitis (AR) model rats. **Methods** Totally 96 Wistar rats were randomly divided into the blank group, the AR model group, the loratadine group, the GA group, 24 in each group. AR models were established by peritoneally injecting ovalbumin (OVA). Morphological scoring was performed. GA at 21.6 mg/kg was intragastrically administered to rats in the GA group. Nasal mucosal tissues were taken for electron microscopic examinations at the second, fourth, sixth, and tenth week after drug intervention. **Results** The overlapping score was 2.10 ± 0.45 in the blank group, 5.10 ± 0.56 in the loratadine group, 5.10 ± 0.56 in the AR model group, 5.20 ± 0.78 in the GA group, showing statistical difference when compared with the blank group ($P < 0.01$). Results under transmission electron microscope showed that the number of the endoplasmic reticulum increased in the AR model group, with obvious cystic dilatation, a lot of vacuole formation, and degranulation. A large number of free ribosomes could be seen in cytoplasm. With persistent allergen exposure, changes mentioned above was progressively aggravated in the endoplasmic reticulum of nasal mucosal epithelium in the AR model group. But the dilation of endoplasmic reticulum, vacuole formation, and degranulation were relieved in the

基金项目:国家自然科学基金资助项目(N0.81160449);甘肃省卫生厅行业科技计划项目(N0.GSWST2011-06);甘肃省中医药科学技术研究课题(N0.GZK-2011-22)

作者单位:1.兰州大学第一医院耳鼻咽喉头颈外科(兰州 730000);2.甘肃中医学院附属医院耳鼻咽喉头颈科(兰州 730020)

通讯作者:张小兵, Tel:0931-8356522, E-mail:790736924@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.05.0578

GA group, and got close to those of the blank group. Conclusion 18-β GA could improve the expansion, vacuolization, and degranulation of the endoplasmic reticulum of nasal epithelial cells in AR model rats.

KEYWORDS 18β-glycyrrhetic acid; epithelial cell endoplasmic reticulum; allergic rhinitis

变应性鼻炎是由 IgE 介导的鼻黏膜的变态反应性疾病。发病机制属于 1 型超敏反应,与细胞因子、细胞间黏附分子及部分神经肽密切相关,其过程涉及 T、B 等淋巴细胞的激活及白介素、肿瘤坏死因子等细胞因子的合成及相关炎症介质的释放^[1]。与线粒体一样内质网被认为在细胞生命活动中起着中枢性的作用,其形态结构变化反映着细胞的功能变化。甘草次酸是甘草提取物甘草甜素的代谢产物,现有研究表明其具有免疫调节、抗炎及类激素样作用^[2]。本研究通过 18-β 甘草次酸灌胃变应性鼻炎模型大鼠,透射电镜观察不同时间点大鼠鼻黏膜上皮细胞内质网的形态变化,客观反应其对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜上皮细胞内质网的影响。

材料与方法

1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 96 只,4~6 周龄,雌雄各半,体重 180~220 g[甘肃中医学院 SPF 级动物实验室提供,注册号:SCXK(甘 2011-0001)],甘肃中医学院 SPF 级动物实验室饲养。

2 试剂与仪器 卵清蛋白(ovalbumin, OVA, A5503, 5 g/瓶, V 级,美国 Sigma 公司,批号 1001445093);氢氧化铝[Al(OH)₃, 500 g/瓶, AR 级,天津市致远化学试剂有限公司];氯雷他定(10 mg/片,四川奥邦药业有限公司生产批号:121109);甘草次酸(500 g/袋, AR 级,甘肃泛植生物科技有限公司,生产批号:12081603)。透射电镜(JEM-1230 型,日本电子株式会社广州事务所)。

3 分组及 AR 模型的建立 采用随机数字表法将 96 只 Wistar 大鼠分成空白组、氯雷他定组、甘草次酸组、AR 模型组 4 组,每组各 24 只。造模方法参照参考文献[3],将 0.3 mg OVA 和 30 mg Al(OH)₃ 加生理盐水配成 1 mL 混悬液,AR 模型组、氯雷他定组和甘草次酸组大鼠行腹腔注射基础致敏,空白组以等量生理盐水替代,隔日 1 次,进行 7 次,共 14 天;自第 15 天开始鼻腔激发:2% OVA 滴鼻,50 μL/侧,2 侧鼻腔,空白组以等量生理盐水替代,每日 1 次,共 7 天。末次鼻腔激发后每只动物观察其鼻部喷嚏、流涕表现和挠鼻动作的出现时间及严重程度,计数 0.5 h 内喷嚏及挠鼻次数,根据动物形态学评分标准^[4]评分:(1)鼻痒,轻度:轻擦鼻数次为 1 分,重度:抓挠鼻、面不止,

动作快而反复为 2 分。(2)喷嚏,1~3 个为 1 分,4~10 个为 2 分,11 个以上为 3 分。(3)清涕流至前鼻孔为 1 分,超过前鼻孔为 2 分,流涕满面为 3 分。叠加量化评分超过 5 分者视为造模成功。

4 药物干预 按照体表面积法[5]计算给药剂量给予灌胃,本实验中所用大鼠的平均体重为 200 g,计算可得大鼠的体表面积约为:0.0311 m²。氯雷他定组参照氯雷他定胶囊,计算得出大鼠的氯雷他定给药量为:0.95 mg/kg,灌胃,每日 1 次;甘草次酸组给予甘草酸苷片,计算得出给药量为 21.6 mg/kg,灌胃,每日 1 次;空白组、AR 模型组给予等剂量的 0.9% 的氯化钠溶液灌胃,每周称量各组大鼠体重,并以各组大鼠体重的平均值为标准计算给药量。动物体表面积转换计算公式^[3]如下:

$$\text{大鼠的给药量(mg/kg)} = \frac{\text{人的给药量(mg/m}^2\text{)}}{\text{大鼠的体重(kg)}} \times$$

大鼠的体表面积(m²)

5 大鼠鼻黏膜电镜观察 各组动物均在治疗 2、4、6、10 周末次给药 24 h 后给予 10% 水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉,剪毛、打开胸腔,心脏放血后立即以 4% 多聚甲醛 50 mL 快速心脏灌注,断头,迅速打开鼻背取双侧鼻中隔黏膜,每组随机选 3 只大鼠取鼻黏膜做电镜:双侧鼻中隔黏膜用 0.1 mol PBS 漂洗后放入 2.5% 戊二醛溶液,4℃ 固定 24 h 制备透射电镜标本。透射电镜标本经 2.5% 戊二醛固定、1% 锇酸固定、丙酮脱水 and 浸透包埋,光镜下定位后 0.45 μm 超薄切片 JEM-1230 型透射电镜(TEM)观察。

6 统计学方法 应用 SPSS 19.0 软件包进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

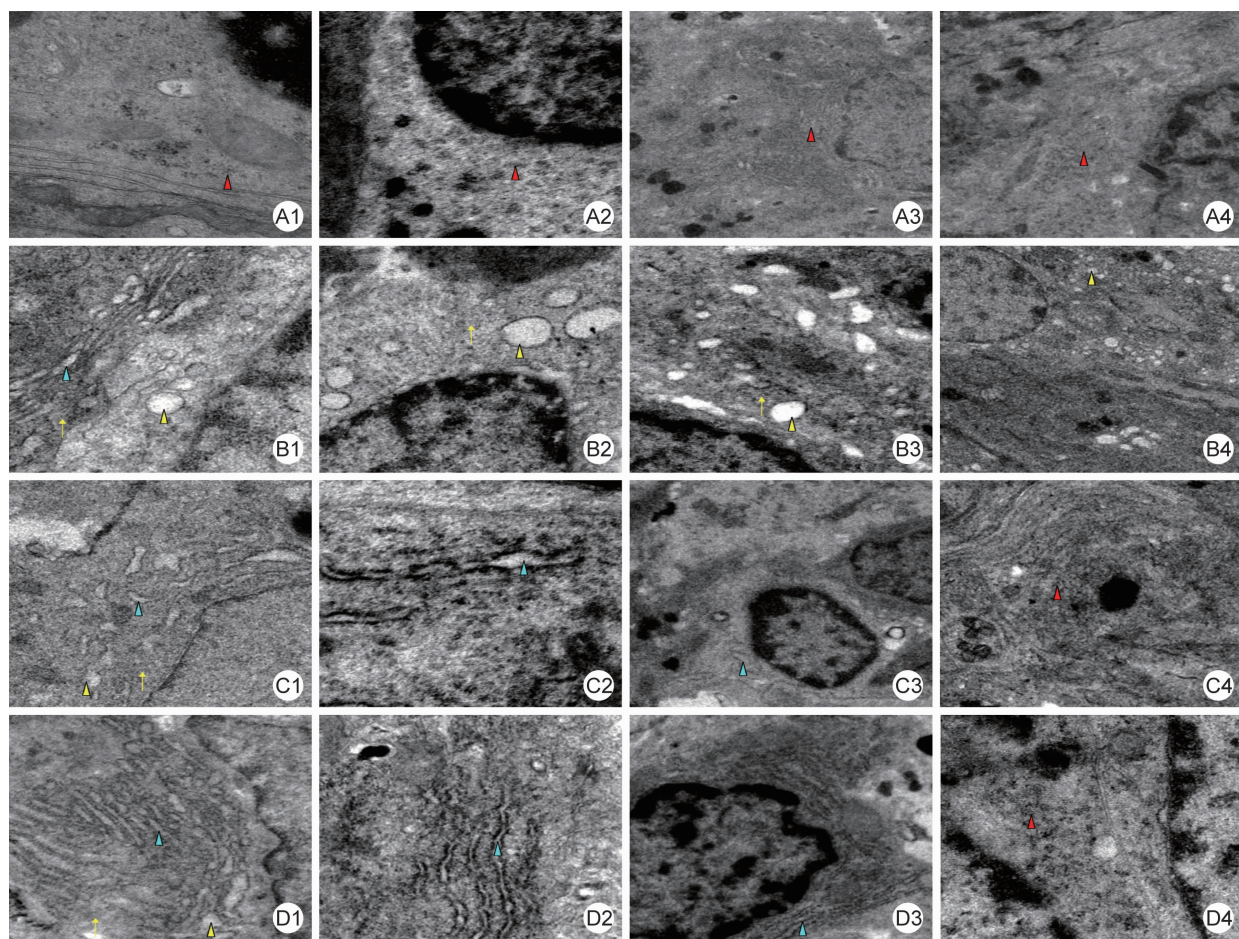
1 各组大鼠一般情况比较 AR 模型组、氯雷他定组和甘草次酸组每只大鼠均出现明显外鼻红肿、反复抓鼻、喷嚏和流涕症状。空白组叠加评分(2.10 ± 0.45)分,氯雷他定组为(5.10 ± 0.56)分,AR 模型组为(5.10 ± 0.56)分,甘草次酸组为(5.20 ± 0.78)分,各组分别与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2 各组鼻黏膜电镜结果比较(图 1) 空白组 2 周时粗、滑面内质网数量无明显增多,无扩张,无脱颗粒;4、6、10 周分别较 2 周时内质网无明显变化。AR 模型组维持激发 2 周时内质网数量较空白组增多,可见囊样扩张,空泡形成及脱颗粒,胞质内可见游离核糖体;维持激发 4、6、10 周内质网的囊样扩张、空泡形成及脱颗粒程度呈进行性加重,10 周时可见内质网数量较空白组明显增多,大量囊样扩张、空泡形成,胞质内可见大量游离核糖体。氯雷他定组干预 2 周时内质网数量较空白组增多,明显囊样扩张,较多空泡形成,大量脱颗粒;4 周时内质网数量较 2 周时减少,仍较空白组多,扩张程度较 2 周时缓解,轻度囊样扩张,无明显空泡化,少量脱颗粒;6 周时内质网数量较空白组仅略有增多,囊样扩张较 4 周时明显改善,脱颗粒现象消失。10 周时内质网与空白组比较已无明显增多、扩张,无空泡化及脱颗粒。甘草次酸组干预 2 周时内质

网较空白组明显增多,明显扩张,大量囊样扩张,有空泡形成,大量脱颗粒。4 周时内质网较 2 周时减少,较空白组增多,轻度扩张,2 周时的空泡消失,囊样扩张、脱颗粒缓解。6 周后内质网扩张程度较 4 周及 2 周时缓解,少量囊样扩张,无明显脱颗粒。10 周时内质网与空白组相比数量无明显增多、轻度扩张、无空泡形成及脱颗粒。

讨 论

甘草为多年生草本植物,是一味重要的中药,在临床应用已有两千年的历史。中药医学认为具有补脾益气、清热解毒、润肺止咳、缓急止痛、调和诸药之功能^[6],用于脾胃虚弱、倦怠乏力、心悸气短、咳嗽痰多、脘腹及四肢挛急疼痛、痈肿疮毒,并可缓解药物毒性和烈性^[7],内质网是由蛋白质与脂类构成的细胞内最大的膜网络系统,附有的多种酶,为生命活动的各种化学



注:A 为空白组;B 为 AR 模型组;C 为氯雷他定组;D 为甘草次酸组;1~4 分别表示治疗 2、4、6、10 周;A1 放大倍数 5 000,A2、A3、B1、B2 及 C3 放大倍数 10 000,A4、B3、B4、C1、C2、C4、D1~D4 放大倍数为 20 000;红三角所示为正常内质网形态结构;蓝三角所示为囊样扩张的内质网;黄三角所示为空泡样内质网;黄箭头所示为游离核糖体

图 1 各实验组不同时间点内质网变化图

反应的正常进行创造有利条件,内质网和线粒体共同调控细胞 Ca^{2+} 紊乱,在细胞凋亡、信号通路等方面起着中枢作用^[8]。内质网形态功能的正常对于细胞组织的正常功能具有重要意义。其形态变化主要包括数量的增多,扩张,脱颗粒等。Nagata H^[9]报道在过敏性鼻炎患者鼻黏膜细胞内可见内质网扩张,囊泡样变化。吉晓滨等^[10]报道电镜下豚鼠 AR 模型内质网扩张,可见小泡形成。本实验中 AR 模型组、氯雷他定组及甘草次酸组电镜下均可见内质网囊样扩张,小泡形成,明显脱颗粒,与先前报道的 AR 模型内质网变化相符。关于引起内质网扩张、小泡形成及脱颗粒的原因目前认识尚未统一。李源等^[11]认为 AR 过程中各化学介质和胆碱能神经活动增强,导致腺体的分泌功能增强,从而表现为内质网数量的增多。Banerjee A 等^[12]认为炎性介质介导内质网应激及神经肽分泌增强造成血管通透性增强,鼻黏膜细胞胞质增多,细胞器水肿从而出现内质网的扩张,小泡形成及脱颗粒。Ma T 等^[13]通过对离体的肝癌细胞的研究认为内质网应激可表现为内质网的扩张。本实验中随着持续的过敏原维持激发,AR 模型组内质网扩张及脱颗粒程度逐渐加重。

AR 是特异性个体接触致敏原后导致包含 IgE 介导的与 T、B 等淋巴细胞的激活,白介素(IL)、肿瘤坏死因子(TNF)等细胞因子的合成及相关炎症介质的释放密切相关的鼻腔慢性炎症性疾病^[1]。AR 疾病过程中由于分泌功能旺盛,相关蛋白等物质的合成增强,从而在超微结构上表现出内质网的扩张,小泡形成等^[4]。然而已有实验证明甘草次酸具有抑制炎症介质细胞质因子的释放、增加巨噬细胞等非特异性免疫的能力的作用,如 Yoshikawa M 等^[14]甘草甜素可选择性地增强辅助 T 淋巴细胞的增殖能力和活性,抑制细胞毒性 T 细胞对肝细胞的损害。Raphael TJ 等^[15]报道给小鼠腹腔注射甘草酸,能显著抑制迟发性超敏反应。Matsui S 等^[16]报道甘草酸和其衍生物有降低炎症活化因子 IL8 和嗜酸细胞活化趋化因子的作用。Bodet C 等^[17]报道甘草的提取物可抑制 LPS 诱导的巨噬细胞产生 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 及炎症细胞因子分泌。AR 大鼠给予甘草次酸干预后 2、4、6、10 周鼻黏膜上皮细胞电镜结果示:内质网扩张及脱颗粒程度较 AR 模型组明显减轻,且在不同时间点上显示随着干预时间的延长,内质网的形态与结构接近于空白对照组,但略逊于氯雷他定组。内质网的这种形态学的改变可能与甘草次酸通过抑制相关炎症介质的活性,缓解 AR 过程中的炎症反应,减少腺体的分泌,减

轻细胞水肿有关。

本实验通过观察变应性鼻炎大鼠模型及 18- β 甘草次酸灌胃变应性鼻炎大鼠鼻黏膜上皮细胞内质网超微结构在时间和空间上的变化过程,了解内质网这个细胞内决定细胞代谢的重要结构对变应性鼻炎病理反应的影响。同时,发现 18- β 甘草次酸可改善变应性鼻炎模型大鼠鼻黏膜细胞内质网的扩张、空泡化及脱颗粒。为进一步探讨 18- β 甘草次酸对过敏性鼻炎抗炎、抗水肿、抗变态反应作用途径和机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Bousquet J, Schünemann HJ, Samolinski B, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA): achievements in 10 years and future needs[J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 130(5): 1049-1062.
- [2] 张明发, 沈雅琴. 甘草酸及其衍生物的抗炎和抗变态反应研究进展[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5): 359-364.
- [3] 赵宇, van Hasselt CA, 吴港生等. 卵白蛋白经鼻致敏建立变应性鼻炎动物模型[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2005, 4(3): 176-180.
- [4] 赵秀杰, 董震, 杨占泉等. 鼻超敏反应实验模型的建立[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1993, 28(1): 17-18.
- [5] 徐平主编. 实验动物管理与使用操作技术规程[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007: 201-204.
- [6] 丛雅琴, 孔令嘉, 樊友平. 甘草研究新进展[J]. 日本医学介绍, 1991, 12(6): 286-288.
- [7] 高鸿霞, 韶世和, 王国庆. 中药甘草研究进展[J]. 井冈山医报, 2004, 1(5): 8-11.
- [8] Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, et al. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways[J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8608-8618.
- [9] Nagata H, Motosugi H, Sanai A, et al. Enhancement of submicroscopic damage of the nasal epithelium by topical allergen challenge in patients with perennial nasal allergy[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2001, 110(3): 236-242.
- [10] 吉晓滨, 谢景华, 柳息洪, 等. 豚鼠变应性鼻炎模型鼻黏膜超微结构的改变[J]. 中国临床医学, 2008, 15(4): 549-553.
- [11] 李源, 许庚, 刘贤. 常年性变应性鼻炎鼻黏膜的透射电镜观察[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 1993, 7(1): 31-33.
- [12] Banerjee A, Abdelmegeed MA, Jang S, et al. Zidovudine (AZT) and hepatic lipid accumulation: implication of inflammation, oxidative and endoplasmic reticulum stress mediators[J]. PLoS

- (收稿:2014-11-16 修稿:2015-02-08)

(以上名单按姓氏笔画为序)