

青蒿素在小鼠花粉过敏性结膜炎早期反应相中的作用

朱敬敬¹, 李兵²

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(No. 2013022001)
作者单位:¹(121001)中国辽宁省锦州市,锦州医科大学研究生学院;²(121001)中国辽宁省锦州市,锦州医科大学附属第一医院眼科
作者简介:朱敬敬,在读硕士研究生,研究方向:角膜病、眼表疾病。
通讯作者:李兵,医学博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:角膜病、眼表疾病。jzslibing@163.com
收稿日期:2016-02-29 修回日期:2016-05-18

Effects of artemisinin on early - phase response of allergic conjunctivitis in a murine model induced by pollen

Jing-Jing Zhu¹, Bing Li²

Foundation item: Natural Science Foundation of Liaoning (No. 2013022001)

¹Graduate School, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Bing Li. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province. jzslibing@163.com

Received:2016-02-29 Accepted:2016-05-18

Abstract

• **AIM:** To investigate the immunosuppression of artemisinin in the early-phase response(EPR) of allergic conjunctivitis in a murine model induced by pollen.

• **METHODS:** Twenty-five Balb/c mice were divided into five groups at random: A: model group, B: artemisinin topical treatment group, C: oral artemisinin group, D: dexamethasone topical treatment group, E: negative control group. Balb/c mice were first sensitized with mixture of ragweed crude extract and complete Freund's adjuvant by left footpad and root of tails injection at days 0. At days 7 and 14, mice were strengthen sensitized by intraperitoneal injection. Negative control group replacd with a mixture of equal amounts of Freund's adjuvant and PBS mixture. Treatment time was between 21-27d: group B received 1% topical artemisinin eye drops 4 times per day; group C received artemisinin at doses of 600mg/kg orally once per day; group D received topical dexamethasone eye drops 4 times per day. The model and naive groups replaced with solvent for control. After treatment, mice were excited by ragweed pollen crude infusion drops. Within 1h after the excitation, the eyes

were taken for histopathology testing, the serum for detection of specific IgE for ragweed pollen.

• **RESULTS:** After excitation, allergy symptoms of model group were more significantly compared with negative control group and the treatment groups; allergy symptom score, mast cell degranulation ratios and the ragweed pollen specific IgE in serum in the topical treatment groups and oral group were higher than that in the negative control group, but significantly lower than that in model group.

• **CONCLUSION:** Artemisinin topical treatment and oral treatment for mice could inhibit the symptoms of pollen allergic conjunctivitis, early-phase response of mast cell degranulation ratio and specific IgE generation for ragweed pollen, suggesting that artemisinin has some therapeutic effect for pollen allergic conjunctivitis.

• **KEYWORDS:** artemisinin; allergic conjunctivitis; mast cell degranulation

Citation: Zhu JJ, Li B. Effects of artemisinin on early-phase response of allergic conjunctivitis in a murine model induced by pollen. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2016;16(6):1032-1035

摘要

目的:探讨青蒿素对小鼠花粉过敏性结膜炎早期反应相的免疫抑制作用。

方法:选取 Balb/c 雌性小鼠 25 只,随机分为五组:A 组:模型组;B 组:青蒿素滴眼组;C 组:青蒿素灌胃组;D 组:地塞米松磷酸钠滴眼组;E 组:阴性对照组。初次诱导采用小鼠尾根部及足垫皮下注射豚草花粉粗浸液与弗氏佐剂的混合液,第 7d 和 14d 加强致敏采用腹腔注射。阴性对照组使用等量的弗氏佐剂与 PBS 混合液代替。在第 21~27d 进行治疗,青蒿素滴眼组给予 1% 青蒿素滴眼液滴眼,4 次/d;青蒿素灌胃组按 600mg/kg 的剂量进行灌胃,1 次/d;地塞米松磷酸钠滴眼组给予地塞米松磷酸钠滴眼液滴眼,4 次/d;模型组及阴性对照组给予青蒿素滴眼液基质液滴眼。治疗后采用豚草花粉变应原滴眼激发后 1h 内,取眼球用于组织病理学检测,取血清用于豚草花粉特异性 IgE 测定。

结果:模型组小鼠激发后过敏症状较其他各用药组明显严重;地塞米松磷酸钠滴眼组、青蒿素滴眼组及灌胃组过敏症状评分、肥大细胞脱颗粒比率及血清中豚草花粉特异性 IgE 浓度均高于阴性对照组,而显著低于模型组。

结论:青蒿素滴眼及灌胃治疗均可明显抑制小鼠花粉过敏性结膜炎症状、早期反应相中肥大细胞脱颗粒比率和豚草花粉特异性 IgE 的产生,推测青蒿素对花粉过敏性结膜炎具有一定的治疗作用。

关键词:青蒿素;过敏性结膜炎;肥大细胞脱颗粒

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.6.07

引用:朱敬敬,李兵.青蒿素在小鼠花粉过敏性结膜炎早期反应相中的作用.国际眼科杂志 2016;16(6):1032-1035

0 引言

过敏性结膜炎是一种常见的眼表过敏性疾病,由于眼部组织接触到环境中的药物及其他过敏原而产生的超敏反应性炎症。过敏性结膜炎分两个反应期:早期反应相(the early-phase reaction, EPR)和晚期反应相(the late-phase reaction, LPR)。诸多研究表明,EPR 主要包括眼部症状的评估,组织学上包括肥大细胞浸润、脱颗粒以及组胺的释放;而 LPR 则主要是各种炎性细胞的浸润(嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、T 细胞)^[1]。当机体初次接触过敏原时,体内变应原特异性 IgE 与肥大细胞膜表面 FcεRI 相结合,使机体处于致敏状态;当相同变应原再次与已处于致敏状态的机体接触时,变应原与已致敏的结膜肥大细胞膜表面 FcεRI 上的 IgE 相结合,受体交联就会触发结膜肥大细胞脱颗粒,进而导致其他一些中间介质的释放,如组胺、色氨酸、前列腺素、白三烯等^[2]。这就导致了过敏性结膜炎 EPR 的形成,主要特征是血管扩张、血管壁通透性增高、瘙痒。此过程持续时间约 20~30min。肥大细胞释放的趋化因子通过诱导局部活化的血管内皮细胞表达新的黏附分子,启动了 LPR。LPR 发生在机体再次接触致敏原后 6~8h。各种炎细胞特别是嗜酸性粒细胞的浸润是 LPR 主要的组织学表现,此外还有嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、T 淋巴细胞。抗原特异性 T 细胞启动嗜酸性粒细胞向结膜移动,进而导致组织损伤^[3-4]。本实验通过建立小鼠过敏性结膜炎模型,并给予青蒿素进行干预治疗,探讨青蒿素对小鼠花粉过敏性结膜炎早期反应相的免疫抑制作用,为使青蒿素成为治疗过敏性结膜炎的一种安全有效的方法提供实验及理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料 6~8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠(25 只)购自辽宁本溪长生生物技术有限公司,SPF 级实验室饲养。弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂、ELISA 试剂盒购自沈阳鼎国昌盛股份有限公司。羊抗小鼠 IgE 抗体购自深圳研顺生物科技有限公司。地塞米松磷酸钠滴眼液购自武汉五景药业(5mL:1.25mg)。青蒿素购自重庆华方武陵山制药有限公司(用加入微量的注射用大豆油及丙二醇的 PBS 混合液制成滴眼液的基质液,取一定量的青蒿素加入基质液中制成 1% 的青蒿素滴眼液,避光保存。)

1.2 方法

1.2.1 动物分组及治疗 选取 6~8 周龄 Balb/c 雌性小鼠 25 只,分为过敏性结膜炎模型组 A 组(5 只),青蒿素滴眼液治疗组 B 组(5 只),青蒿素灌胃治疗组 C 组(5 只),地塞米松磷酸钠滴眼液治疗组 D 组(5 只),阴性对照组 E 组(5 只)。参考以往的豚草花粉过敏性结膜炎模型^[5-8],将含有 50μg 豚草花粉的 PBS 液与弗氏完全佐剂按 1:1 的体积比例混合完全,除阴性对照组外其余各组均分别于小鼠尾根部及左后足垫皮下注射进行初次致敏,每个部位 150μL,于注射后第 7d 将等量的豚草花粉 PBS 液与弗氏不完全佐剂按 1:1 的体积比例混合完全后腹腔注射进行增强致敏,第 14d 以同样的方法再次增强致敏。治疗过程在末次增强致敏后 7d(第 21~27d),A 组给予青蒿素滴眼液基质液滴眼 4 次/d,B 组给予 1% 青蒿素滴眼

液 4 次/d,C 组按 600mg/kg 的剂量给予青蒿素灌胃 1 次/d,D 组给予地塞米松磷酸钠滴眼液 4 次/d,E 组给予青蒿素滴眼液基质液滴眼 4 次/d。治疗结束后,各实验组每只小鼠给予 300μg 花粉蛋白粗浸液进行滴眼激发。激发后 1h 内,10% 水合氯醛麻醉,采用眼球放血将小鼠处死,取下眼球用于制作病理切片行肥大细胞检测,收集的血清用于 ELISA 检测豚草花粉特异性 IgE。

1.2.2 临床症状评估 所有实验组小鼠经过相应药物(模型组及阴性对照组为青蒿素滴眼液基质液)的治疗后,经豚草花粉变应原激发后,在 30min 内于显微镜下观察小鼠体征并进行临床评估。参考以往的文献^[8],评估指标包括:结膜水肿、结膜充血、眼睑肿胀、流泪,按 0~3 分评分,制定评分标准:无:0 分;轻度:1 分;中度:2 分;重度:3 分。这四个类别各自得分的总和为总的评分:眼睛有严重的结膜充血、水肿、眼睑肿胀、流泪者最高评分为 12 分,中度者最高评分为 8 分,轻度者最高评分为 4 分。

1.2.3 组织病理学检测 采用眼科剪将小鼠眼球连同周边睑结膜一同剪下,此过程不要破坏穹隆部结膜,4% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,制 4μm 切片,每只小鼠取不同层面的 5 张切片进行瑞氏-吉姆萨染色,中性树脂胶封片,镜检。每张切片在×400 倍光学显微镜下随机观察 5 个视野,对视野中肥大细胞总数与肥大细胞脱颗粒数进行统计,然后计算出每组小鼠肥大细胞脱颗粒百分比。

1.2.4 血清中豚草花粉特异性 IgE 水平检测 激发 30min 后处理小鼠,眼球取血,室温静置 2h 后保存于 4℃ 冰箱过夜。离心后吸取上层血清,利用间接 ELISA 法检测血清中豚草花粉特异性 IgE 水平。依照本实验室常规方法,用豚草花粉粗蛋白(2ng/μL)包被,4℃ 过夜,3% BAS-PBS 封闭,洗板后依次加入小鼠血清、生物素标记的 HRP-羊抗小鼠 IgE 二抗,最后加入显色液、底物及终止液,酶标仪 450nm 处读取 OD 值。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行分析,各实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多个样本所代表的总体均值比较采用单因素方差分析,多个样本均数两两之间的比较采用最小显著差值法(least-significant difference, LSD)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床症状评分结果 各组小鼠结束治疗后,用豚草花粉蛋白粗浸液进行滴眼激发,激发后 30min 内,对各实验组小鼠临床症状进行评分,结果见图 1。模型组小鼠出现了明显的过敏症状,包括结膜充血、水肿、眼睑肿胀、流泪;青蒿素滴眼组与灌胃组均能观察到轻度的过敏性结膜炎的临床症状,与模型组比较,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);地塞米松磷酸钠滴眼组小鼠可见轻度的过敏性结膜炎症状,较青蒿素滴眼组及灌胃组有所减轻,但差异无统计学意义($P > 0.05$);青蒿素滴眼组与灌胃组比较差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

2.2 组织病理学染色结果 瑞氏-吉姆萨染色见图 2。阴性对照组的肥大细胞脱颗粒百分比为(26.4±8.47)%,模型组为(66.6±9.61)%,地塞米松滴眼液组为(37.6±7.30)%,青蒿素灌胃组为(38.4±8.38)%,青蒿素滴眼组为(40.6±9.84)%。与阴性对照组比较,其余各组小鼠结膜组织中肥大细胞浸润明显,肥大细胞脱颗粒百分

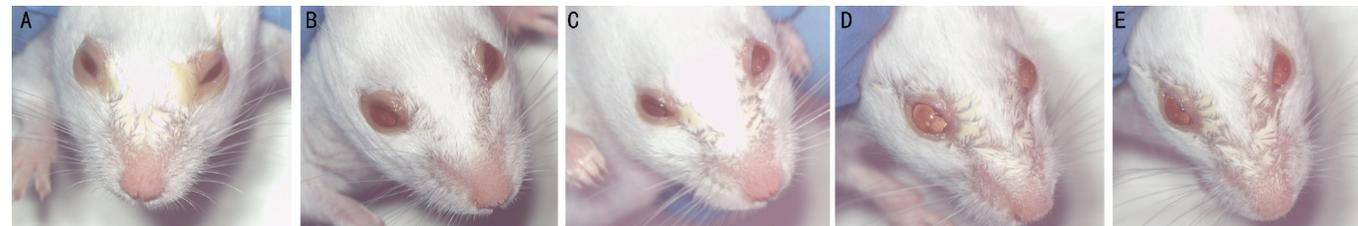


图1 各组小鼠花粉过敏原激发后眼部过敏反应的表现 A:模型组小鼠可见严重的眼睑肿胀、结膜充血、结膜水肿及分泌物增多等过敏性症状;B:青蒿素灌胃组小鼠眼睑肿胀、结膜充血、结膜水肿及分泌物增多症状较轻;C:青蒿素滴眼组小鼠眼睑肿胀、结膜充血、结膜水肿、分泌物增多程度较轻;D:地塞米松滴眼组小鼠眼睑肿胀、结膜充血、结膜水肿、分泌物增多较轻;E:阴性对照组小鼠眼睑肿胀、结膜充血、结膜水肿及分泌物增多不明显。

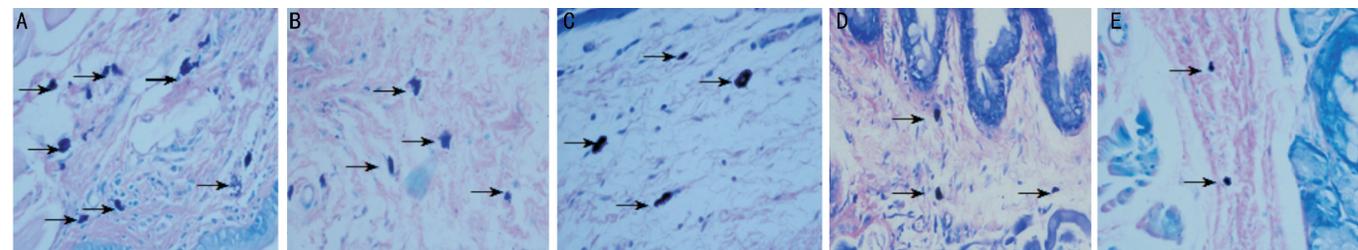


图2 各组小鼠结膜组织吉姆萨染色结果($\times 400$) A:模型组小鼠结膜组织可见大量肥大细胞浸润,并见明显的脱颗粒现象;B:青蒿素灌胃组小鼠结膜组织见少量肥大细胞浸润,脱颗粒现象不明显;C:青蒿素滴眼组小鼠结膜组织见少量肥大细胞浸润,脱颗粒现象不明显;D:地塞米松滴眼组小鼠结膜组织见少量肥大细胞浸润,脱颗粒现象不明显;E:阴性对照组小鼠结膜组织见极少量的肥大细胞浸润,无明显脱颗粒现象。

表1 各组小鼠过敏原激发后眼部体征评分比较

组别	眼睑肿胀	流泪	结膜充血	结膜水肿	总分
阴性对照组	0.4±0.55	1.0±0.71	0.2±0.45	0.8±0.45	2.4±0.89
模型组	2.8±0.45	2.6±0.55	3.0±0.00	2.8±0.45	11.2±0.45 ^a
地塞米松滴眼组	1.2±0.84	1.2±0.45	1.0±0.71	1.2±0.45	4.6±0.55 ^{a,b}
青蒿素灌胃组	1.6±0.89	1.2±0.83	1.2±0.44	1.4±0.54	5.4±0.89 ^{a,b,c}
青蒿素滴眼组	1.6±0.54	1.6±0.89	1.2±0.83	1.4±0.54	5.8±1.30 ^{a,b,c,e}

注:^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组;^b $P < 0.01$ vs 模型组;^c $P > 0.05$ vs 地塞米松滴眼组;^e $P > 0.05$ vs 青蒿素灌胃组。

比增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);青蒿素滴眼组和青蒿素灌胃组小鼠结膜组织中肥大细胞浸润程度及脱颗粒百分与模型组比较显著降低,差异有显著统计学意义($P < 0.01$),地塞米松磷酸钠滴眼组小鼠结膜组织中可见轻度的肥大细胞浸润与脱颗粒,较青蒿素滴眼组及灌胃组有所减少,但差异无统计学意义($P > 0.05$);青蒿素滴眼组与灌胃组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 血清中豚草花粉特异性 IgE 的测定结果 各组小鼠血清中豚草花粉特异性 IgE 抗体水平分别为:阴性对照组 0.65 ± 0.20 ,模型组 2.37 ± 0.23 ,地塞米松滴眼组 1.23 ± 0.10 ,青蒿素灌胃组 1.35 ± 0.12 ,青蒿素滴眼组 1.43 ± 0.07 。各组小鼠与阴性对照组小鼠血清中豚草花粉特异性 IgE 的水平比较,差异均有显著统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,地塞米松磷酸钠滴眼组、青蒿素滴眼组及灌胃组血清中豚草花粉特异性 IgE 水平显著下降,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);地塞米松磷酸钠滴眼组豚草花粉特异性 IgE 水平较青蒿素治疗组有所下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$);青蒿素滴眼组与青蒿素灌胃组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

过敏性结膜炎类型有很多种,其中临床上发病率最高及最常见的是季节性过敏性结膜炎中花粉过敏导致的过敏性结膜炎。过敏性结膜炎常常伴有过敏性鼻炎、过敏

性哮喘,由于该病发病率高、病程长、易反复发作、疗效有限,故严重影响患者的生活质量,属于眼科难治性疾病之一。全世界过敏性结膜炎的发病率达到 15% ~ 20% (甚至有报道达到 40%),并且发病率日益增长^[9]。

肥大细胞被认为是导致过敏性结膜炎症状发生的主要细胞,肥大细胞通过产生炎症介质在早期反应相及晚期反应相中均发挥着重要作用^[10]。有实验研究显示,结膜组织中肥大细胞浸润的数量与过敏性结膜炎的症状呈正相关^[11]。此外,肥大细胞脱颗粒诱导激活血管内皮细胞,并促进细胞因子及黏附分子的分泌和表达。变应原特异性 IgE 在过敏反应中是非常重要的免疫分子,介导 I 型超敏反应的发生,诱导结膜组织中肥大细胞脱颗粒,从而引起一系列过敏性症状。当机体受到过敏原的刺激后,体内的 IgE 会在 6 ~ 8h 内升高,因此检测血清中抗原特异性 IgE 水平有助于检测机体的过敏情况。

传统的治疗过敏性结膜炎的药物有肥大细胞稳定剂、抗组胺药、皮质类固醇等。然而,抗组胺药和皮质类固醇仅仅能够缓解症状,不能从根本上治疗过敏性结膜炎,而且皮质类固醇在治疗的同时还可能会带来一些严重的副作用,如眼压增高、导致青光眼的发生以及白内障的形成;当过敏性结膜炎已经表现出症状时,肥大细胞稳定剂并不总是有效的。因此,传统的治疗过敏性疾病的药物并不能完全消除复杂的免疫反应所引起的过敏症状,并且药物一旦停止,症状还会复发^[12]。

青蒿素是从中药青蒿中提取的有过氧基团的倍半萜内酯药物,经化学改造可以生成多种衍生物,如双氢青蒿素、蒿甲醚、青蒿琥酯、蒿乙醚等^[13]。青蒿素作为一种治疗疟疾的有效药物已经有很多年的历史了,然而近年研究发现,青蒿素除了具有抗疟活性外,还具有免疫抑制作用。青蒿素在抗肿瘤、治疗小鼠变应性接触性皮炎、系统性红斑狼疮等^[14-16]以及其他自身免疫性疾病方面具有一定的作用。有研究显示,青蒿素及其衍生物可以通过对细胞免疫和体液免疫的抑制作用,阻止白细胞介素和各种炎症因子的释放^[17-19]。本研究中,将青蒿素用于小鼠花粉过敏性结膜炎模型,结果显示青蒿素滴眼组及灌胃组小鼠的过敏症状均较模型组减轻;组织切片瑞氏-吉姆萨染色发现,结膜组织肥大细胞浸润程度及脱颗粒比率明显较模型组减少;各组小鼠血清中豚草花粉特异性 IgE 水平比较,青蒿素灌胃组与滴眼组较模型组显著降低。地塞米松磷酸钠滴眼组各项指标虽较青蒿素用药组有所下降,但差异无统计学意义。结果表明青蒿素对于治疗豚草花粉所致过敏性结膜炎具有一定的疗效,提示青蒿素有望成为治疗过敏性结膜炎的一种新药。

参考文献

- 赵堪兴,杨培增.眼科学.北京:人民卫生出版社 2011: 99
- Miyazaki D, Ishida W, Tominaga T, et al. Aggravation of Conjunctival Early-Phase Reaction by Staphylococcus Enterotoxin B via Augmentation of IgE Production. *Jpn J Ophthalmol* 2010; 54(5): 476-480
- Niederhorn JY. Immune regulatory mechanisms in allergic conjunctivitis: insights from mouse models. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8(5): 472-476
- 陈大复,于琨瑛.过敏性结膜炎的免疫学机制研究进展.中国医药导报 2014;11(33):162-165
- Giavina-Bianchi P, Kalil J, Rizzo Luiz V. Development of an animal model for allergic conjunctivitis: influence of genetic factors and allergen concentration on immune response. *Acta Ophthalmol* 2008; 86(6): 670-675
- Kocatürk T, Kocatürk O, Kaplan A, et al. Heparin Treatment for Allergic Conjunctivitis in the Experimental Balb/c Model. *Ophthalmic Res* 2013; 50(1):65-71

- Stern ME, Siemasko K, Gao J, et al. Role of interferon-gamma in a mouse model of allergic conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(9):3239-3246
- Magone MT, Chan C, Rizzo LV, et al. A Novel Murine Model of Allergic Conjunctivitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 87(1): 75-84
- Ridolo E, Montagni M, Caminati M, et al. Emerging drugs for allergic conjunctivitis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2014; 19(2): 291-302
- Semsettin B, Sinan E, Nigar V. Comparison of the Effects of Topical Cyclosporine A 0.05%, Cyclosporine A 2%, Epinastine Hydrochloride 0.05%, and Prednisolone Acetate 1% on Allergic Inflammation in an Experimental Allergic Conjunctivitis Model. *Cornea* 2013; 32(11): 1465-1469
- Nagata T, Nabe T, Fujii M, et al. Effects of multiple dexamethasone treatments on aggravation of allergic conjunctivitis associated with mast cell hyperplasia. *Biol Pharm Bull* 2008; 31(3):464-468
- Magone MT, Chan CC, Beck L, et al. Systemic or mucosal administration of immunostimulatory DNA inhibits early and late phases of murine allergic conjunctivitis. *Eur J Immunol* 2000; 30(7):1841-1850
- Yang SX, Xie SS, Gao HL, et al. Artemisinin and its derivatives enhance T lymphocyte-mediated immune responses in normal mice and accelerate immunoreconstitution of mice with syngeneic bone marrow transplantation. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 69(2): 143-148
- Li T, Chen H, Wei N, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of artemisinin on contact hypersensitivity. *Int Immunopharmacol* 2012;12(1): 144-150
- 肖凤春,林隆,沈培强,等.青蒿素及其衍生物抗肿瘤研究进展.国外医学中医中药分册 2005; 27(3): 149-151
- 吴喜利,孙万森,石兴民,等.青蒿素对狼疮性肾炎小鼠外周血单个核细胞 GR α mRNA、GR β mRNA 及肾组织 P300/CBP 蛋白表达的影响.中药材 2012; 35(4): 608-612
- 李覃,陈虹,梅昕,等.青蒿素的免疫抑制作用及其调控机制研究.中国药理学通报 2011; 27(6):848-854
- 舒贝,马行一.青蒿素及其衍生物的免疫调节作用.中国中西医结合肾病杂志 2005;6(3):176-178
- Elisabetta A, Daniela A, Loredana B, et al. Artemisinin inhibits inducible nitric oxide synthase and nuclear factor NF-kB activation. *FEBS Lett* 2003; 552(2-3):141-144