论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2462-03

4种抗组胺药对体外培养鼻息肉组织炎症因子表达影响的比较

潘 虎,郝 飞 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 比较多种药物对鼻息肉体外培养组织中趋化因子表达的影响。**方法** 咪唑斯汀、氯雷他定、西替利嗪、非索非那定、地塞米松、环孢素A等抗炎药物和鼻息肉组织体外共同培养,同时加入组胺、花生四烯酸致炎刺激物,培养24 h后逆转录PCR法测定上述药物作用后鼻息肉组织中MCP-1、MCP-3、RANTES、eotaxin等趋化因子mRNA表达,ELISA法测定培养上清液中细胞因子IL-4、IL-5和TNF-α等炎症介质的含量,观察不同药物对其影响的情况。**结果** 咪唑斯汀组中MCP-3基因的表达显著低于氯雷他定、西替利嗪组($P<0.05$);MCP-1基因的表达显著低于氯雷他定、非索非那定组($P<0.05$);Eotaxin的表达显著低于西替利嗪组;而RANTES表达显著低于氯雷他定、非索非那定组($P<0.05$);培养上清液中的IL-4含量显著低于氯雷他定和西替利嗪组,IL-5的含量显著低于西替利嗪、氯雷他定组($P<0.05$),TNF-α的含量与其他拮抗药物组均无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 比较不同的抗组胺药,咪唑斯汀显示有较强的抗炎症作用。

关键词: 抗组胺药;咪唑斯汀;趋化因子;细胞因子

中图法分类号: R392.11;R765.25;R976 **文献标识码:** A

Comparing inhibition effects of four antihistamines on chemokines and cytokines expression of cultured nasal polyps *in vitro*

PAN Hu, HAO Fei (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibition effects of different antihistamines on the expressions of chemokines and cytokines released by nasal polyps *in vitro*. **Methods** The fresh nasal polyps resected under endoscope from the patients admitted to our hospital were cultured with mizolastine, cetirizine, loratadine, fexofenadine, dexamethasone, or ciclosporin A respectively for 24 h, with the addition of histamine and arachidonic acid. The total RNA of polyps was obtained and purified with tripure isolation reagent. The mRNA expression levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), eotaxin were analyzed by RT-PCR. The concentrations of interleukin (IL)-4, IL-5 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in cultured supernatant was detected by ELISA. **Results** The MCP-1 mRNA expression in nasal polyps treated by mizolastine was weaker than those by loratadine and fexofenadine; the MCP-3 mRNA expression by mizolastine was weaker than those by cetirizine and loratadine; the RANTES mRNA expression by mizolastine was weaker than those by loratadine and fexofenadine; the eotaxin mRNA expression by mizolastine was weaker than that by cetirizine (all $P<0.05$). The levels of IL-4 and IL-5 in supernatant by mizolastine was lower than those by cetirizine and loratadine, while the levels of TNF-α had no significant difference by all antihistamines. **Conclusion** Mizolastine can inhibit the expression of chemokines and cytokines more strongly than other antihistamines.

Key words: antihistamine; mizolastine; chemokine; cytokine

近年来研究表明,Ⅰ型变态反应的发生不仅存在以组胺介导的速发相反应,还存在以白三烯等炎症因子介导的以炎症细胞浸润为主的迟发相反应,两者相互影响[1]。组胺和花生四烯酸及其代谢产物一方面可引起皮肤黏膜一系列反应,另一方面其本身也可以作为一种炎症信号,促进细胞表达和释放炎症因子,如单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、单核细胞趋化蛋白-3(monocyte chemoattractant protein-3, MCP-3)、活化后可调节的正常T细胞表达分泌的因子(regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, RANTES)和嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)以及白介素(interleukin, IL)-4、IL-5和TNF-α等,以维持变态反应性炎症(al-

作者简介:潘 虎(1974-),男,江苏省常州市人,硕士研究生,主治医师,主要从事变态反应性皮肤病方面的研究,现在解放军第102医院皮肤科。电话:13775124200,E-mail:panhu1974@yahoo.com.cn

通讯作者:郝 飞,电话:(023)68754416,E-mail:haofei@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-12-27;修回日期:2006-06-17

lergic inflammation，AI）的过程[2-5]。鉴于 AI 成为Ⅰ型变态反应过程中重要的病理生理环节，故对抗组胺药的作用提出更高的要求，即在拮抗组胺的同时应兼有明确的抗炎作用。为探讨抗组胺药体外抗炎作用的机制及差别，本实验观察不同抗组胺药物对体外培养的鼻息肉中多种趋化因子 mRNA 表达和培养上清液中 IL-4、IL-5 和 TNF-α 等细胞因子含量的影响，并与经典的抗炎药物作比较，为临床合理选择具有抗炎作用的抗组胺药提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　鼻息肉组织来源及分离培养

选取本院耳鼻咽喉科内镜下手术切下的新鲜鼻息肉 14 例。将手术切下的新鲜鼻息肉组织用新洁尔灭溶液浸泡 5 min 后，无菌生理盐水冲洗 3 次，用眼科剪剪成约 0.2 cm×0.2 cm×0.2 cm 大小的组织块，混合后接种在 6 孔培养板中（每孔放 10 块），每次均接种 8 孔；然后各孔中加入青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml 和 10% 小牛血清的 1640 细胞培养液（Hyclone 公司）约 2 ml，于 37 ℃，5% CO_2 孵箱中培养 24 h 后备用。

1.2　实验分组及处理

选取选择的抗组胺药：咪唑斯汀、氯雷他定、西替利嗪、非索非那定，用去离子水稀释成 10^{-4} mmol/L 的溶液。选择地塞米松、环孢素 A（浓度 10^{-4} mmol/L）作阳性抗炎药物对照。向培养板孔中分别加入咪唑斯汀、氯雷他定、西替利嗪、非索非那定、地塞米松、环孢素 A 溶液 50 μl，孵育 30 min 后，每孔加入 10^{-4} mmol/L 的组胺、花生四烯酸（Sigma 公司）溶液各 50 μl；同时设加入无菌生理盐水 150 μl 而无任何拮抗药物及组胺及花生四烯酸处理作阴性对照组及仅加入组胺、花生四烯酸溶液及生理盐水各 50 μl 而不加入任何拮抗药物的阳性对照组。37 ℃，5% CO_2 孵育 24 h。每组设 8 孔。

1.3　检测方法

组织中炎症因子 mRNA 表达的检测 采用逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）。简单过程如下。取出培养的鼻息肉组织块，称取湿重 0.1 g 组织，加入 1 ml 的 Tripure 提取 RNA；用逆转录试验盒逆转录为 cDNA 后，PCR 分别扩增 MCP-1、MCP-3、RANTES、eotaxin 目的基因片段，引物由上海生工生物公司合成，分别为：MCP-1 正义：5′-AGCATGAAAGTCTCTGCCGCC-3′，反义：5′-TCAAGTCTTCGGAGTTTGGG-3′，共合成长度 303 bp；MCP-3 正义：5′-AACATGAAAGCCTATGCAGCAC-3′，反义：5′-TGTTCAAAGCTTTGGAGTTTG-3′，共合成长度 306 bp；RANTES 正义：5′-ACCACACCCTGCTGCTTTGCCTACATTGCC-3′，反义：5′-CTCCCGAACCCATTTCTTCTCTGGGTTGGC-3′，共合成长度 168 bp；eotaxin 正义：5′-CCCAACCACCTGCTGCTTTAACCTG-3′，反义：5′-TGGCTTTGGAGTTGGAGATTTTTGG-3′，共合成长度 208 bp；β-actin 正义：5′-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3′，反义：5′-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3′，共合成长度540 bp。同时加入目的基因和内参 β-actin 的引物作内参对照；反应过程为 94 ℃变性 10 min 1 次；94 ℃变性 1 min、55 ℃退火 1 min 和 74 ℃延伸 1 min，共进行 30 个循环；末次循环后 74 ℃延伸 10 min。PCR 产物凝胶电泳，电泳图像采用 Doc GEL 2000 凝胶图像分析系统（UVP 公司）分析，PCR 产物量以吸光度×面积表示；以目的基因产物量与内参 β-actin 产物量的比值表示结果。

培养上清中细胞因子的测定：用酶联免疫吸附试验（ELISA）检测各组培养上清液中 IL-4、IL-5 和 TNF-α 的含量，按照 ELISA 试剂盒（深圳晶美生物公司）的说明书操作。

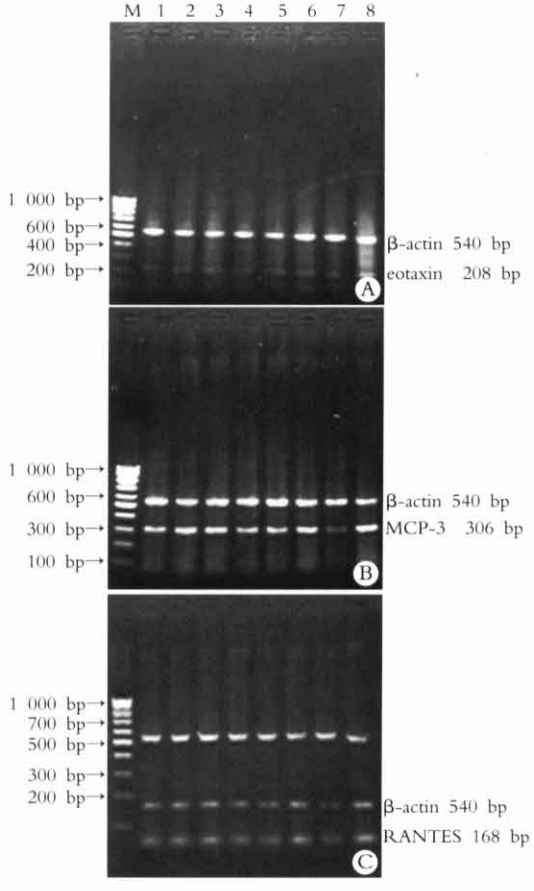
1.4　统计学处理

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2　结果

2.1　各抗组胺药对各炎症因子 mRNA 表达的影响

炎症因子 mRNA 表达电泳图见图 1。经组胺和花生四烯酸刺激后，与阴性对照组比较各炎症因子 mRNA 表达条带明显增强，而经不同药物拮抗后其各条带与阳性对照组比较均有不同程度的减弱。咪唑斯汀组中 MCP-1、MCP-3、RANTES、eotaxin 等趋化因子 mRNA 的表达稍弱于氯雷他定、西替利嗪、非索非那定组。应用紫外扫描软件对上述图像进行半定量分析，以 RT-PCR 目的基因的产物与内参 β-actin 灰度比值进行均数比较，结果见表 1。



A：eotaxin PCR 产物电泳图；B：MCP-3 PCR 产物电泳图；C：RANTES PCR 产物电泳图

M：标准（100～1 000 bp）；1～6：分别为加入咪唑斯汀、氯雷他定、西替利嗪、地塞米松、环孢素 A、非索非那定拮抗药物组的 PCR 产物；7：阴性对照组；8：阳性对照组

图 1　3 种目的基因的 PCR 产物扩增电泳图

表1 各药物组中目的基因与内参灰度比值结果

组别	MCP-3/β-actin	MCP-1/β-actin	eotaxin/β-actin	RANTES/β-actin
咪唑斯汀	0.55±0.04	0.52±0.06	0.14±0.01	0.54±0.01
西替利嗪	0.67±0.03[a]	0.95±1.69	0.22±0.01[a]	0.49±0.04
氯雷他定	0.95±0.26[b]	0.84±0.08[a]	0.29±0.06	0.84±0.08[a]
地塞米松	0.38±0.06	0.46±0.07[a]	0.13±0.03	0.43±0.01[a]
环孢素A	0.55±0.12	0.53±0.11	0.16±0.01	0.49±0.05
非索非那定	0.75±0.19	0.95±0.06[a]	0.19±0.02[a]	0.61±0.01[a]
阴性对照	0.32±0.26[a]	0.29±0.16	0.06±0.01[a]	0.31±0.07[a]
阳性对照	1.64±0.68[a]	1.65±0.05[b]	0.43±0.06[a]	1.25±0.59[a]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与咪唑斯汀组比较

2.2 ELISA法检测各组培养上清液中细胞因子的含量

见表2，在相同的浓度10^{-4} mmol/L时，咪唑斯汀组培养上清液中各种细胞因子的表达显著低于氯雷他定、西替利嗪、非索非那定等药物组（$P<0.05$，$P<0.01$）。

表2 各药物组上清液中细胞因子的含量

组别	IL-4(ng/ml)	IL-5(ng/ml)	TNF-α(ng/ml)
咪唑斯汀	261.55±79.08	288.20±51.10	170.84±29.97
西替利嗪	369.70±24.72[a]	411.90±81.97[a]	219.94±65.55
氯雷他定	377.49±15.82[a]	454.45±108.80[a]	199.51±106.93
地塞米松	219.80±56.51	273.88±73.58	140.01±27.57
环孢素A	369.86±226.23	305.21±96.70	156.14±20.85
非索非那定	375.62±36.60[a]	420.47±91.72[a]	127.83±19.52
阴性对照	64.97±25.83[b]	144.59±51.07[b]	28.55±19.89[b]
阳性对照	516.88±51.95[b]	669.43±79.52[b]	350.75±43.47[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与咪唑斯汀组比较

3 讨论

鼻息肉是IgE介导的Ⅰ型变态反应，是嗜酸性粒细胞浸润和细胞因子参与等多种发病因素作用的产物。息肉组织中的细胞如肥大细胞、上皮细胞、嗜酸性粒细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞能产生多种细胞因子，所以它是炎症反应的产物，又能在受刺激的情况下产生炎症反应[6]。有研究证实，变应原和组胺在体外可以刺激鼻息肉组织表达炎症因子[7]。我们的研究也提示，组胺和花生四烯酸共同作用下，可以使多种细胞内炎症因子mRNA呈过度表达，培养上清液中多种细胞因子呈显著升高，这一方面反映了鼻息肉是作为体外研究药物抗AI作用一个良好的模型，另一方面也进一步证实了组胺和花生四烯酸也是炎症诱发物，可以刺激各种细胞释放炎症因子，促进AI的形成和发展。

已有研究证实，氯雷他定、西替利嗪、非索非那定等药物可以对抗以组胺介导的细胞炎症因子表达；而咪唑斯汀除了可以明确地对抗组胺介导的细胞炎症因子表达，还可以对抗花生四烯酸介导的细胞炎症因子表达[7]。我们的研究结果显示，咪唑斯汀能明显抑制组胺、花生四烯酸等刺激物诱导的鼻息肉中MCP-1、MCP-3、RANTES、eotaxin等趋化因子mRNA的表达和培养上清中各种细胞因子的表达，并且在相同的浓度10^{-4} mmol/L时，其抑制功能显著高于氯雷他定、西替利嗪、非索非那定等其他抗组胺药物。因为咪唑斯汀可明确地抑制5-脂氧合酶活性[8,9]，从而对抗花生四烯酸介导的细胞炎症因子表达，表现出更强的抗炎作用。总之，本实验从结果来看，与其他抗组胺药相比，咪唑斯汀对组胺及花生四烯酸介导的细胞炎症因子表达显示出较全面而更强的抑制作用，显示其在抗组胺同时具有明确的抗炎作用，为临床选择治疗包括荨麻疹、特应性皮炎等存在AI疾病提供实验依据。

（致谢：感谢第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室的全体老师在实验技术和方法上给予的指导和帮助！）

参考文献：

[1] LEUNG D Y. Molecular basis of allergic diseases[J]. Mol Genet Metab, 1998, 63(2): 157-167.

[2] ABDELAZIZ M M, DEVALIA J L, KHAIR O A, *et al*. Effect of fexofenadine on eosinophil-induced changes in epithelial permeability and cytokine release from nasal epithelial cells of patients with seasonal allergic rhinitis[J]. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101(3): 410-420.

[3] BRADDING P, MEDIWAKE R, FEATHER I H, *et al*. TNF alpha is localized to nasal mucosal mast cells and is released in acute allergic rhinitis[J]. Clin Exp Allergy, 1995, 25(5): 406-415.

[4] KELSO A. Cytokines: principles and prospects[J]. Immunol Cell Biol, 1998, 76(4): 300-317.

[5] LEURS R, CHURCH M K, TAGLIALATELA M. H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects[J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32(4): 489-498.

[6] 顾之燕. 鼻息肉和鼻息肉病[J]. 耳鼻咽喉-头颈外科, 1999, 6(1): 60-65.

[7] 郝 飞, 叶庆俯. 第二代抗组胺药临床应用中的若干问题[J]. 临床皮肤科杂志, 2003, 32(5): 300-302.

[8] 刘玲玲, 朱学骏, 姜 薇, 等. 咪唑斯汀治疗慢性荨麻疹的随机双盲研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36(6): 306-309.

[9] PICHAT P, ANGEL I, ARBILLA S. Anti-inflammatory properties of mizolastine after oral administration on arachidonic acid-induced cutaneous reaction in the rat[J]. Arzneimittelforschung, 1998, 48(2): 173-178.

（编辑 陈聪连）