

● 实验研究 ●

引用:熊静,吴婷,兰超,田道法,蔺婷,何迎春,周振峰. 基于 HMGB1/TLR4/NF- κ B 途径探讨藿胆鼻渊丸抑制急性鼻窦炎大鼠炎症反应的研究[J]. 湖南中医杂志,2024,40(3):146-152.

基于 HMGB1/TLR4/NF- κ B 途径探讨 藿胆鼻渊丸抑制急性鼻窦炎大鼠炎症反应的研究

熊静¹,吴婷¹,兰超¹,田道法^{1,2,3},蔺婷^{2,3},何迎春^{2,3},周振峰¹

(1. 岳阳市中医医院,湖南 岳阳,414000;

2. 湖南中医药大学中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室,湖南 长沙,410208;

3. 湖南中医药大学湖南省中医药防治眼耳鼻喉疾病与
视功能保护工程技术研究中心,湖南 长沙,410208)

[摘要] 目的:观察藿胆鼻渊丸对急性鼻窦炎大鼠炎症的影响及其分子机制。方法:将36只SD大鼠按随机数字表法分为正常组,模型组,阳性药物组,藿胆鼻渊丸低、中、高剂量组,每组各6只。采用鼻腔填塞联合鼻腔滴注脂多糖(LPS)法建立急性鼻窦炎大鼠模型。造模完成后,阳性药物组以阿莫西林克拉维酸钾(4:1)干混悬剂灌胃(98.4375 g/kg),低、中、高剂量组予藿胆鼻渊丸灌胃(1.26 g/kg、2.52 g/kg、5.04 g/kg),正常组和模型组予0.9%氯化钠注射液灌胃,每只SD大鼠灌胃总体积为3 ml/次,2次/d,连续干预21 d。采用苏木精-伊红染色法(HE)观察大鼠鼻窦黏膜炎症变化;酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量;免疫组化(IHC)和蛋白质印迹法(WB)检测IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白表达情况;WB检测HMGB1、TOLL样受体4重组蛋白(TLR4)、核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)和磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)蛋白表达情况。结果:与正常组比较,模型组鼻窦黏膜组织中炎症细胞浸润明显,阳性药物组和藿胆鼻渊丸不同剂量组炎症细胞聚集减少。与正常组比较,模型组血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量及IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达均明显升高($P < 0.05$),鼻窦黏膜组织中的HMGB1、TLR4、NF- κ B p65和p-NF- κ B p65蛋白表达均明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性药物组、藿胆鼻渊丸不同剂量组血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量及IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达均明显降低($P < 0.05$),鼻窦黏膜组织中的HMGB1、TLR4、NF- κ B p65和p-NF- κ B p65蛋白表达均下降($P < 0.05$)。与阳性药物组比较,高剂量组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量及IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达均明显降低($P < 0.05$),HMGB1、TLR4、NF- κ B p65和p-NF- κ B p65蛋白表达下降($P < 0.05$)。结论:藿胆鼻渊丸可以有效抑制急性鼻窦炎大鼠炎症反应,其机制可能是通过下调HMGB1分子,抑制TLR4/NF- κ B信号通路,减少IL-1 β 、IL-6和TNF- α 释放,从而达到抑制炎症的作用。

[关键词] 急性鼻窦炎;藿胆鼻渊丸;HMGB1/TLR4/NF- κ B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2024.03.032

基金项目:湖南省自然科学基金项目(2021JJ70052);湖南省中医药科研计划项目(2021070)

第一作者:熊静,女,医学硕士,副主任医师,研究方向:中西医结合防治耳鼻喉咽喉疾病

通信作者:周振峰,男,主任医师,研究方向:中西医结合防治耳鼻喉咽喉疾病,E-mail:1061094881@qq.com

蔺婷,女,医学硕士,实验师,研究方向:中西医结合防治耳鼻喉咽喉疾病,E-mail:834426640@qq.com

Effect of Huodan Biyuan pills in inhibiting inflammatory response in rats with acute sinusitis based on the high-mobility group box 1/Toll-like receptor 4/nuclear factor-κappa B pathway

XIONG Jing¹, WU Ting¹, LAN Chao¹, TIAN Daofa^{1,2,3}, LIN Ting^{2,3}, HE Yingchun^{2,3}, ZHOU Zhenfeng¹

(1. Yueyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yueyang 414000, Hunan, China;

2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Eye, Ear, Nose and Throat Diseases in Hunan Province, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

3. Engineering and Technical Research Center of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Eye, Ear, Nose and Throat Diseases and Protection of Optical Function in Hunan Province, Changsha 410208, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Huodan Biyuan pills on inflammation in rats with acute sinusitis and its molecular mechanism. Methods: A total of 36 Sprague-Dawley rats were divided into normal group, model group, positive drug group, and low-, middle-, high-dose Huodan Biyuan pills groups using a random number table, with 6 rats in each group. Nasal cavity occlusion combined with nasal dripping of lipopolysaccharide were performed to establish a rat model of acute sinusitis. After modeling, the rats in the positive drug group were given the dry suspension of amoxicillin and clavulanate potassium (4:1) at a dose of 98.4375 g/kg by gavage; the rats in the low-, middle-, high-dose Huodan Biyuan pills groups were given Huodan Biyuan pills by gavage at a dose of 1.26 g/kg, 2.52 g/kg, and 5.04 g/kg, respectively; the rats in the normal group and the model group were given 0.9% sodium chloride by gavage at a volume of 3 mL each time, twice a day for 21 consecutive days. HE staining was used to observe the inflammatory changes of sinus mucosa; ELISA was used to measure the serum levels of interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor-α (TNF-α), and immunohistochemistry and Western blotting were used to measure the protein expression levels of IL-1β, IL-6, TNF-α; Western blotting was used to measure the protein expression levels of high-mobility group box 1 (HMGB1), Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor-κappa B p65 (NF-κB p65), and phosphorylated NF-κB p65 (p-NF-κB p65). Results: Compared with the normal group, the model group had significant inflammatory cell infiltration in sinus mucosa, while the positive drug group and the Huodan Biyuan pills groups had a reduction in inflammatory cell infiltration. Compared with the normal group, the model group had significant increases in the serum levels and protein expression levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α ($P < 0.05$), as well as significant increases in the protein expression levels of HMGB1, TLR4, NF-κB p65, and p-NF-κB p65 in sinus mucosa ($P < 0.05$). Compared with the model group, the positive drug group and the Huodan Biyuan pills groups had significant reductions in the serum levels and protein expression levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α ($P < 0.05$), as well as significant reductions in the protein expression levels of HMGB1, TLR4, NF-κB p65, and p-NF-κB p65 in sinus mucosa ($P < 0.05$). Compared with the positive drug group, the high-dose Huodan Biyuan pills group had significant reductions in the serum levels and protein expression levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α ($P < 0.05$), as well as significant reductions in the protein expression levels of HMGB1, TLR4, NF-κB p65, and p-NF-κB p65 ($P < 0.05$). Conclusion: Huodan Biyuan pills can effectively inhibit inflammatory response in rats with acute sinusitis, possibly by downregulating HMGB1, inhibiting the TLR4/NF-κB signaling pathway, and reducing the release of IL-1β, IL-6, and TNF-α.

[Keywords] acute sinusitis; Huodan Biyuan pills; high-mobility group box 1/Toll-like receptor 4/nuclear factor-κappa B

鼻窦炎是指发生在鼻窦黏膜的炎症性疾病^[1-2],临床以鼻塞、流脓涕、头痛、嗅觉减退为主要症状,根据病程长短分为急性鼻窦炎和慢性鼻窦炎^[3]。据有关研究报道,全球范围内鼻窦炎的发病

率日趋上升^[4],我国的鼻窦炎发病率高达8%^[5-6],其中中青年人群的发病率呈上升趋势。急性鼻窦炎未得到及时规范的治疗,迁延不愈、反复发作可转化为慢性鼻窦炎,影响人们的生活和工作^[7-8]。

鼻窦炎归属于中医学“鼻渊”“脑漏”的范畴。中医学对鼻渊最早的描述可见于《素问·气厥论》：“胆移热于脑，则辛頞鼻渊，鼻渊者，浊涕下不止也”，书中指出鼻渊为胆移热于脑所致。《普济方》载：“夫脑为髓海……令胆移邪热，上入于脑，则阴气不固，而藏者泻矣，故脑液下渗于鼻，其证浊涕出不已”。清代医家费伯雄所著《医醇賸义》记载到“脑漏者，鼻如渊泉，涓涓流涕，致病有三：曰风也，火也，寒也……阳邪外铄，肝火内燔，鼻窍半通，时流黄水，此火伤之脑漏也”。上述医书中详尽地论述了鼻渊的病因病机，认为本病多为反复感受外邪，余邪未尽久滞鼻窍，病位在肺与胆；或脏腑亏虚，反复感邪，邪毒留恋窦窍所致^[9]，病位在肺、脾、肾。纵观古今，众多医家治疗鼻渊以“胆热犯鼻，湿郁窍闭”立论，以清泄胆热、利湿通窍为治疗原则^[9]。

藿胆鼻渊丸(湘药制备字 Z20190109000,曾用名:龙胆通窍丸^[10])是湖南省岳阳市中医院耳鼻喉科的自制药,临床治疗急性或慢性鼻窦炎效果显著^[11-12]。藿胆鼻渊丸治疗急性鼻窦炎的作用机制尚不明确,故本研究采用鼻腔填塞联合鼻腔滴注脂多糖(LPS)的方法建立急性鼻窦炎大鼠模型,以阿莫西林克拉维酸钾(4:1)干混悬剂作为阳性对照药,观察藿胆鼻渊丸对炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响以及重组人高迁移率族蛋白B1/ToLL样受体4重组蛋白/核转录因子- κ B(HMGB1/TLR4/NF- κ B)信号通路关键分子的蛋白表达,拟探讨藿胆鼻渊丸对急性鼻窦炎大鼠炎症的作用及其机制,为藿胆鼻渊丸的临床推广及应用提供更多的基础理论。

1 实验材料

1.1 动物 36只SPF级SD雄性大鼠,8周龄,体重(200 \pm 20)g,购自湖南斯莱克景达动物有限公司(SCXK湘2019-0004)。使用高温高压灭菌的水和标准饲料饲养于湖南中医药大学SPF级屏障系统的小鼠房内,温度(25 \pm 1) $^{\circ}$ C、相对湿度40%~60%。本次动物实验均严格遵守动物伦理学原则,经湖南中医药大学实验动物伦理会批准(批号:LL-BH202210310002)。

1.2 药物与试剂 藿胆鼻渊丸(成份:龙胆草、藿

香、辛夷、细辛、苍耳子、金银花等,岳阳市中医医院制剂室生产,规格:60g/瓶,批号:220701)。阿莫西林克拉维酸钾(4:1)干混悬剂(国药集团威奇达药业有限公司,规格:2g:0.3125g,批号:2220701)购自岳阳市中医医院西药房。LPS(美国sigma,批号:L2880),BCA蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液、SDS PAGE凝胶配制试剂盒(康为世纪生物科技股份有限公司,批号分别为CW0014S-500T、CW2333s、CW0022S),蛋白Marker(美国Thermo公司,批号:26616),TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为:E-EL-R2856c、E-EL-M0037c、E-EL-R0015c),一抗:HMGB1(美国abcam公司,批号:ab79823)、TLR4(美国abcam公司,批号:ab13556)、核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)(美国abcam公司,批号ab141588)、磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)(美国CST公司,批号:3033S)、IL-1 β (Sigma Aldrich公司,货号:SAB5700678)、IL-6(华安生物,批号:EM1701-45)、TNF- α (华安生物,货号:ER65189),二抗:IRDye 680RD Goat anti-Rabbit IgG(H+L)、IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG(H+L)(美国Licor公司,批号分别为:D30110-05、D00115-03),通用二步法试剂盒(中杉金桥,批号:2125D1214);DAB显色试剂盒(中杉金桥,批号:224031124)。

1.3 主要仪器 多功能荧光成像仪(Odyssey CLX型,美国Licor公司),全自动酶标分析仪(ELX800型,美国BioTek公司),蛋白转印电泳槽(JY-ZY5型,北京君意东方电泳设备有限公司),台式冷冻离心机(L535R型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),半自动石蜡切片机(Lecia HistoC型,德国莱卡公司),全自动组织包埋机(HistoCore Arcadia C/H型,德国莱卡公司),全自动染色机(ST5010型,德国莱卡公司),全自动封闭脱水机(PEARL型,德国莱卡公司),正置荧光显微镜(DM4 B型,德国莱卡公司)。

2 实验方法

2.1 动物分组 将36只SD大鼠按随机数字表法分为6组,分别为正常组、模型组、阳性药物组及藿胆鼻渊丸低、中、高剂量组,每组各6只。

2.2 模型制备 参考王艳^[13]、卢志宾等^[14]的建模方法并适当优化,以鼻腔填塞联合鼻腔滴注LPS的

方法建立急性鼻窦炎大鼠模型。各组SD大鼠腹腔注射8%戊巴比妥钠麻醉大鼠,用镊子取2 cm×1 cm×0.5 cm大小的鼻腔止血海绵塞入大鼠一侧鼻腔内,随后同侧鼻腔内滴入1 mg/L的LPS 200 μ l,正常组大鼠鼻腔内滴0.9%氯化钠注射液200 μ l。造模3周后进行药物干预。

2.3 药物制备 藿胆鼻渊丸溶解于0.9%氯化钠注射液中,灌胃前配制成浓度1.26 g/kg(低剂量)、2.52 g/kg(中剂量)、5.04 g/kg(高剂量);以阿莫西林克拉维酸钾(4:1)干混悬剂作为阳性对照药,阿莫西林克拉维酸钾溶解于0.9%氯化钠注射液中,配制成浓度98.4375 g/kg。

2.4 给药方法 根据黄继汗等^[15]的动物等效剂量换算各组给药剂量。阳性药物组以阿莫西林克拉维酸钾(4:1)干混悬剂灌胃(98.4375 g/kg),藿胆鼻渊丸低(1.26 g/kg)、中(2.52 g/kg)、高剂量组(5.04 g/kg)分别灌胃,正常组和模型组予以0.9%氯化钠注射液灌胃,每只大鼠灌胃总体积为3 ml/次,2次/d,连续干预21 d,末次给药24 h后取材。

2.5 观察指标

2.5.1 苏木精-伊红(HE)染色观察各组大鼠鼻窦黏膜炎症变化 末次给药24 h后,取大鼠鼻窦黏膜4%多聚甲醛固定组织,经乙醇逐级(70%~100%)脱水,二甲苯透明、浸蜡、包埋。使用石蜡切片机切片,鼻窦黏膜切片脱蜡至水,苏木素5 min,自来水冲洗10 min,盐酸乙醇分化3 s,碳酸锂水溶液2 min(返蓝),伊红25 s至1 min后自来水冲洗。鼻窦黏膜切片依次放入乙醇(75%~100%)脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。显微镜下观察并拍照。

2.5.2 酶联免疫吸附法(ELISA)测定各组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的含量变化 末次给药24 h后,取大鼠全血标本放于室温静置2 h,12000 r/min离心10 min(离心半径7 cm),收集上清。按照IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的ELISA试剂盒说明书将标准液、样品液分别加入酶标板中的标准孔、样品孔,加抗体工作液,37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育1 h,洗板,加底物,37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育15 min,加终止液,酶标仪检测450 nm波长处的吸光度,绘制标准曲线并计算各组样品浓度。

2.5.3 免疫组化法(IHC)检测各组大鼠鼻窦黏膜组织IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达 末次给药24 h后,取大鼠鼻窦黏膜4%多聚甲醛固定组织,经乙醇逐级(70%~100%)脱水;然后鼻窦黏膜组织二甲苯透明、浸蜡、包埋。切片后,按照通用二步法试剂盒进行操作,封片后,置于高倍显微镜下,随机选择3个视野,出现棕黄或棕褐色染色则判定为阳性染色,拍照后用Image J软件进行分析。

2.5.4 蛋白质印迹法(WB)检测各组大鼠鼻窦黏膜组织IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、HMGB1、TLR4、NF- κ B p65和p-NF- κ B p65蛋白表达 末次给药24 h后,取大鼠鼻窦黏膜用预冷的PBS清洗组织,加入150 μ l RIPA裂解液于组织研磨仪中反复研磨组织直至看不见组织块;冰上,裂解10 min;4 $^{\circ}$ C,12000 r/min离心15 min(离心半径7 cm);将离心后的上清转移到1.5 ml的离心管中;BCA试剂盒测定总蛋白含量。制备10%分离胶和4.8%浓缩胶,转移到PVDF膜上。5%脱脂牛奶中封闭后,与以下一抗孵育:IL-1 β (1:1000)、IL-6(1:1000)、TNF- α (1:1000)、HMGB1(1:1000)、TLR4(1:1000)、NF- κ B p65(1:1000)和p-NF- κ B p65(1:1000);使用以下二抗:HRP goat anti-mouse IgG,HRP goat anti-rabbit IgG,洗膜后放入Odyssey CLX型多功能荧光成像仪显影,分析各蛋白条带的相对灰度值。

2.5.5 统计学方法 采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。实验数据用均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,单因素设计、多组间计量资料比较采用单因素方差分析,满足方差齐性,多重比较用LSD检验;方差不齐用Dunnett T3检验。所有的结果分析图使用GraphPad Prism 8.0软件制作完成。

3 实验结果

3.1 各组大鼠鼻窦黏膜炎症变化 藿胆鼻渊丸不同剂量组和阳性药物组均可改善大鼠鼻窦黏膜炎症情况,其中,阳性药物组和藿胆鼻渊丸高剂量组大鼠鼻窦黏膜炎症细胞聚集最少。与正常组比较,模型组鼻窦黏膜组织内可见纤维组织大量增生,大量炎症细胞聚集;与模型组比较,藿胆鼻渊丸不同剂量组与阳性药物组鼻窦黏膜组织内偶有炎症细胞聚集;与阳性药物组比较,藿胆鼻渊丸高剂量组大鼠鼻窦黏膜炎症细胞聚集情况接近。(见图1)

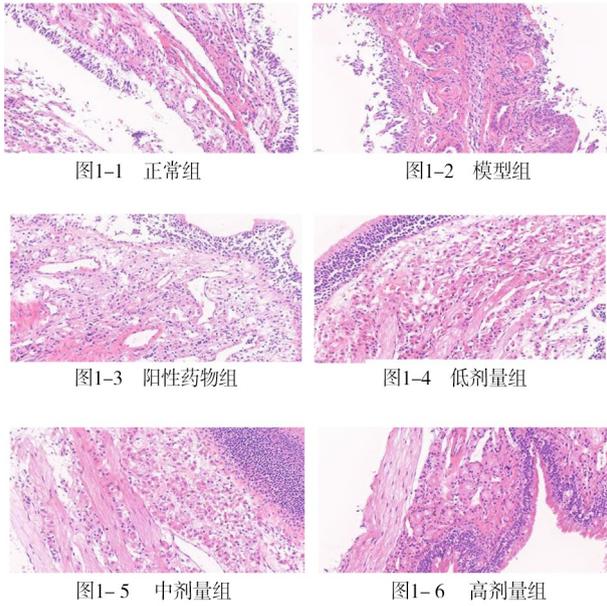


图1 各组鼻窦黏膜炎症变化(HE,×40倍)

3.2 各组血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量比较 与正常组比较,模型组 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量均明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,阳性药物组、藿胆鼻渊丸不同剂量组 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含

量明显降低 ($P < 0.05$);与阳性药物组比较,高剂量组血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量降低 ($P < 0.05$)。(见表1)

表1 各组血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$)

组别	只数	IL-1β	IL-6	TNF-α
正常组	6	29.00±2.34	36.93±2.86	53.65±3.57
模型组	6	37.55±1.51 ^a	73.91±3.13 ^a	94.65±4.03 ^a
阳性药物组	6	27.08±2.26 ^{ab}	37.59±2.87 ^{ab}	51.24±3.42 ^{ab}
低剂量组	6	30.18±2.25 ^{ab}	56.91±2.91 ^{ab}	66.43±3.89 ^{ab}
中剂量组	6	26.63±1.73 ^{ab}	41.14±3.08 ^{ab}	47.98±3.71 ^{ab}
高剂量组	6	16.32±1.64 ^{abc}	28.18±3.21 ^{abc}	32.04±3.87 ^{abc}

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与阳性药物组比较,^c $P < 0.05$ 。

3.3 各组鼻窦黏膜组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 蛋白表达比较 与正常组比较,模型组鼻窦黏膜组织 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 蛋白表达呈强阳性;与模型组比较,阳性药物组和藿胆鼻渊丸不同剂量组鼻窦黏膜组织 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 蛋白表达均减弱。与阳性药物组比较,高剂量组 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$)。(见图2)

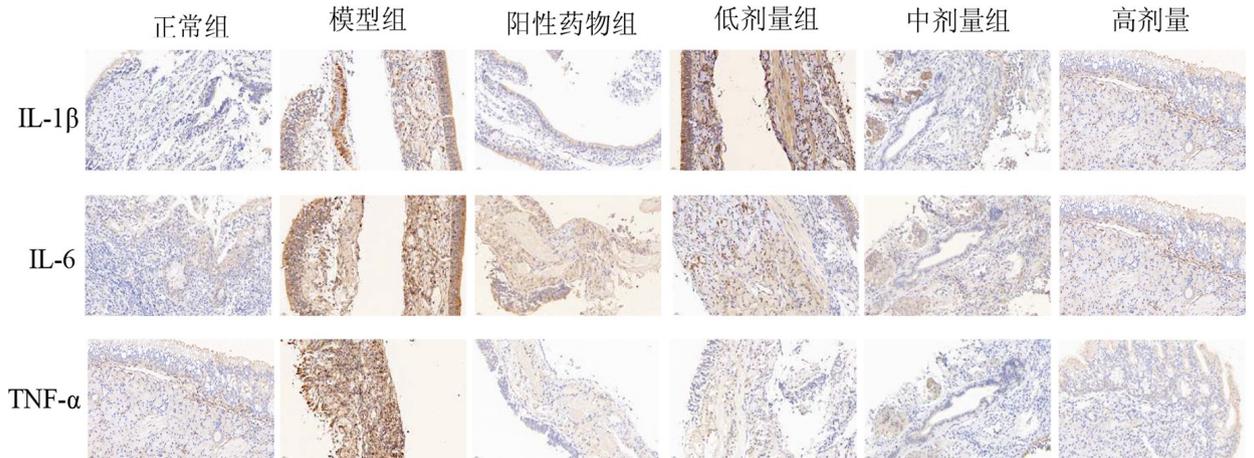
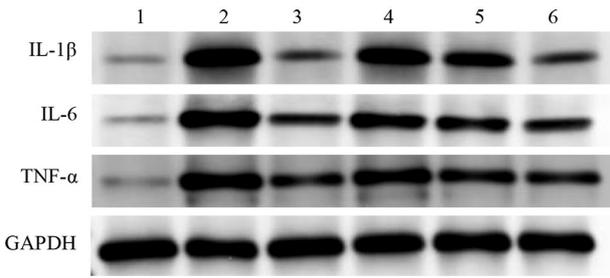


图2 各组鼻窦黏膜组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 蛋白表达(IHC,×40倍)

3.4 各组鼻窦黏膜组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 蛋白表达比较 与正常组比较,模型组鼻黏膜组织中的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,阳性药物组、藿胆鼻渊丸不同剂量组鼻黏膜组织中的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 蛋白表达均下降 ($P < 0.05$);与阳性药物组比较,高剂量组鼻黏膜组织中的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 蛋白表达下降 ($P < 0.05$)。(见图3、表2)

3.5 各组鼻窦黏膜组织 HMGB1、TLR4、NF-κB p65、

p-NF-κB p65 蛋白表达比较 与正常组比较,模型组鼻黏膜组织中的 HMGB1、TLR4、NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,阳性药物组、藿胆鼻渊丸不同剂量组鼻黏膜组织中的 HMGB1、TLR4、NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 蛋白表达均下降 ($P < 0.05$);与阳性药物组比较,高剂量组的 HMGB1、TLR4、NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 蛋白表达下降 ($P < 0.05$)。(见图4、表3)



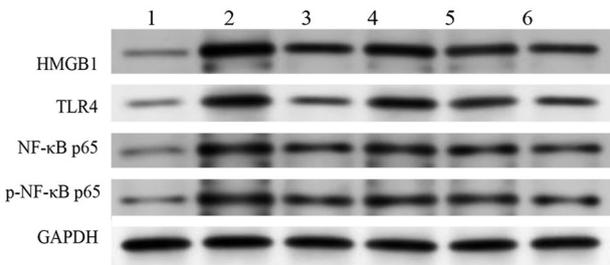
注:1—正常组,2—模型组,3—阳性药物组,4—低剂量组,5—中剂量组,6—高剂量组。

图3 各组鼻窦黏膜组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 蛋白表达电泳图

表2 各组鼻窦黏膜组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IL-1β	IL-6	TNF-α
正常组	6	0.09±0.01	0.08±0.01	0.10±0.01
模型组	6	1.12±0.03 ^a	1.14±0.02 ^a	1.19±0.01 ^a
阳性药物组	6	0.47±0.02 ^{ab}	0.62±0.02 ^{ab}	0.61±0.02 ^{ab}
低剂量组	6	0.94±0.03 ^{ab}	0.86±0.01 ^{ab}	0.88±0.01 ^{ab}
中剂量组	6	0.69±0.02 ^{ab}	0.73±0.01 ^{ab}	0.56±0.02 ^{ab}
高剂量组	6	0.36±0.01 ^{abc}	0.51±0.01 ^{abc}	0.49±0.01 ^{abc}

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与阳性药物组比较,^c $P < 0.05$ 。



注:1—正常组,2—模型组,3—阳性药物组,4—低剂量组,5—中剂量组,6—高剂量组。

图4 各组鼻窦黏膜组织 HMGB1、TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达电泳图

表3 各组鼻窦黏膜组织 HMGB1、TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	HMGB1	TLR4	NF-κB p65	p-NF-κB p65
正常组	6	0.23±0.01	0.218±0.01	0.23±0.01	0.28±0.02
模型组	6	1.14±0.03 ^a	1.00±0.02 ^a	0.98±0.01 ^a	1.03±0.03 ^a
阳性药物组	6	0.70±0.02 ^{ab}	0.53±0.02 ^{ab}	0.60±0.02 ^{ab}	0.70±0.02 ^{ab}
低剂量组	6	0.92±0.03 ^{ab}	0.92±0.01 ^{ab}	0.82±0.01 ^{ab}	0.84±0.01 ^{ab}
中剂量组	6	0.83±0.02 ^{ab}	0.78±0.01 ^{ab}	0.71±0.02 ^{ab}	0.78±0.02 ^{ab}
高剂量组	6	0.63±0.01 ^{abc}	0.41±0.01 ^{abc}	0.52±0.01 ^{abc}	0.54±0.01 ^{abc}

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与阳性药物组比较,^c $P < 0.05$ 。

4 讨 论

急性鼻窦炎是耳鼻咽喉科的常见病、多发病。所有人群均可发病,尤其是儿童、老年人等免疫力较低者。临床对于本病的治疗以非手术治疗为主,其治疗原则是最大限度地恢复窦腔引流和鼻腔正常生理功能。西医治疗包括全身抗炎治疗、局部激素治疗、体位引流等手段,治疗效果因人而异,且容易引起患者鼻部细菌形成细菌生物膜造成耐药性,或对鼻窦腔黏膜和纤毛造成一定破坏,影响以后鼻腔的正常功能^[16]。中医治疗鼻渊以升清降浊为法则,用药以宣肺通窍、排脓为主,用药后患者症状改善明显,且对鼻窦鼻腔生理功能影响较小。

藿胆鼻渊丸由龙胆草、藿香、细辛、辛夷、苍耳子、黄柏、黄芩、栀子等药物组成,具有清热解毒、活血通窍的功能,临床治疗鼻窦炎效果显著^[13-14]。现代医学研究表明,龙胆草、栀子、黄芩、细辛、辛夷有明显的抗菌作用,尤其对金黄色葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌效果显著^[17]。课题组前期研究证实,藿胆鼻渊丸可提高急性鼻-鼻窦炎术后的临床疗效并可以有效地改善鼻黏膜纤毛的传输功能,有助于恢复鼻腔生理功能^[18]。本研究采用鼻窦炎大鼠炎症模型对藿胆鼻渊丸进行研究,结果发现,藿胆鼻渊丸可以明显改善鼻窦炎大鼠炎症的病理变化,藿胆鼻渊丸各组中的炎症细胞显著减少;在炎症因子的检测中,与正常组相比,模型组大鼠血清中促炎细胞因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量明显升高,该结果提示,IL-1β、IL-6 和 TNF-α 参与了急性鼻窦炎的发生发展过程。与模型组比较,藿胆鼻渊丸不同剂量组中的炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量明显降低,藿胆鼻渊丸高剂量组中的各炎症因子下降最为显著,表明藿胆鼻渊丸可以降低鼻窦炎大鼠血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 炎症因子。此外,我们通过 WB 和 IHC 法对大鼠黏膜组织中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 蛋白水平进行了检测,结果提示藿胆鼻渊丸可以下调大鼠黏膜组织中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 蛋白水平。上述研究结果均证实,藿胆鼻渊丸可以抑制急性鼻窦炎大鼠炎症反应。

HMGB1 是一种高度保守的蛋白质,是内毒素血症、脓毒症、关节炎和局部炎症的重要介质。在动物模型中,抑制 HMGB1 释放对炎症反应具有显著的保护作用,因此在各种炎症性疾病的临床治疗中具有潜力^[19]。近年来的研究发现,HMGB1 可由

活化的固有免疫细胞如单核巨噬细胞主动释放或坏死细胞被动释放,其主动分泌和被动释放的机制是不同的^[20]。TLR4为HMGB1炎症通路调控作用中的重要受体^[21],当HMGB1被激活后,可与HMGB1结合,激活炎症相关信号通路。当机体感染病原菌后,体内的免疫系统被激活,并通过信号通路之间的级联反应刺激全身炎症反应,释放IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等炎症因子^[22-23],进一步刺激HMGB1激活,反之,HMGB1也可刺激单核巨噬细胞分泌某些促炎因子,如IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α ^[24];而HMGB1可激活TLR4,进而通过活化核转录因子NF- κ B导致下游炎症反应发生^[25]。为深入研究藿胆鼻渊丸抑制急性鼻窦炎大鼠炎症反应的机制,课题组对HMGB1/TLR4/NF- κ B p65信号通路相关蛋白进行了检测。结果显示,与正常组比较,各实验组中的HMGB1、TLR4、NF- κ B p65和p-NF- κ B p65蛋白表达明显升高;藿胆鼻渊丸不同剂量组均抑制急性鼻窦炎大鼠鼻黏膜中HMGB1、TLR4、p-NF- κ B p65蛋白表达,抑制程度呈剂量依赖性。因此,我们推测HMGB1是急性鼻窦炎大鼠炎症过程中的关键分子,藿胆鼻渊丸通过下调HMGB1分子,抑制TLR4/NF- κ B通路,减少IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子和趋化因子的产生,这些炎症因子和趋化因子募集炎症细胞浸润的能力减弱,从而抑制鼻窦炎黏膜炎症损伤。

综上所述,藿胆鼻渊丸对于急性鼻窦炎大鼠炎症有明显的抑制作用,其作用机制与下调HMGB1分子,抑制TLR4/NF- κ B通路有关。

参考文献

- ROSENFELD R M, Piccirillo J F, Chandrasekhar S S, et al. Corrigendum. Clinical practice guideline (update): Adult sinusitis executive summary [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 152(4):598-609.
- 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 中国慢性鼻窦炎诊断和治疗指南(2018) [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 54(2):81-100.
- FOKKENS W J, LUND V J, MULLOL J, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012 [J]. *Rhinol Suppl*, 2012, 23:3 p preceding table of contents, 1-298.
- SHI J B, FU Q L, ZHANG H, et al. Epidemiology of chronic rhinosinusitis: Results from across-sectional survey in seven Chinese cities [J]. *Allergy*, 2015, 70(5):533-539.
- 于蕾, 许彤. 慢性鼻窦炎的内在型分型与治疗反应性的研究进展 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2020, 34(11):1049-1052.
- FOKKENS W J, LUND V J, HOPKINS C, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2020 [J]. *Rhinology*, 2020, 58(Suppl S29):1-464.
- 曹守霞. 慢性鼻窦炎药物治疗的研究进展 [J]. *山东医学高等专科学校学报*, 2022, 44(6):2.
- 四霄雪, 韩雪, 赵闪闪. 黄芩贝母汤治疗儿童慢性鼻-鼻窦炎的临床疗效 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(10):160-165.
- 杨正佳. 加减龙胆泻肝汤治疗胆腑郁热型鼻渊的临床观察 [D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2013.
- 熊静, 周振峰, 吴婷. 龙胆通窍丸对湿热型慢性鼻窦炎抗炎效应的临床研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36(12):34-36.
- 熊静, 周振峰, 吴婷. 龙胆通窍丸对湿热型慢性鼻窦炎患者血清IL-6和IL-8水平的影响 [J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2017, 25(4):241-243, 249.
- 周振峰, 熊静, 卢娅. 龙胆通窍丸治疗湿热型慢性鼻窦炎的临床观察 [J]. *中医临床研究*, 2013, 5(16):27-28.
- 王艳. P2X7R/NLRP3信号通路在慢性鼻窦炎伴鼻息肉及小鼠急性鼻窦炎中的作用机制 [D]. 武汉:华中科技大学, 2021.
- 卢志宾, 王旭燕, 田素景, 等. 槲皮素通过调控高尔基应激对脂多糖诱导小鼠副鼻窦炎的机制 [J]. *贵州医科大学学报*, 2021, 46(4):404-409.
- 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069-1072.
- 肖佳宁. 基于NF- κ B信号通路探讨鼻渊合剂治疗急性鼻窦炎的作用机制 [D]. 南京:南京中医药大学, 2022.
- 王锦鸿. 新编常用中药手册 [M]. 北京:金盾出版社, 2009.
- 熊静, 兰超, 吴婷, 等. 分析藿胆鼻渊丸对慢性鼻-鼻窦炎术后鼻黏膜恢复的影响 [J]. *内蒙古中医药*, 2023, 42(5):21-22.
- CHEN G, WARD MF, SAMA AE, et al. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2004, 24(6):329-33.
- 翟莺莺. 特异性皮下免疫治疗对哮喘气道炎症及HMGB1/TLR4/NF- κ B信号通路的影响 [D]. 广州:南方医科大学, 2020.
- SHI X, YU L, ZHANG Y, et al. Glycyrrhetic acid alleviates hepatic inflammation injury in viral hepatitis disease via a HMGB1-TLR4 signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84:106578.
- MCGINLEY A M, SUTTON C E, EDWARDS S C, et al. Interleukin-17A serves a priming role in autoimmunity by recruiting IL-1 β -producing myeloid cells that promote pathogenic T cells [J]. *Immunity*, 2020, 52(2):342-356.
- LIU Q Y, WANG Y X, WU Z S, et al. High mobility group protein 1 reverses immune system paralysis in late-phase sepsis [J]. *Infect Immun*, 2018, 86(9):e00455-18.
- WANG H, BLOM O, ZHANG M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice [J]. *Science*, 1999, 285(5425):248-251.
- JIANG H, DUAN J, XU K, et al. Resveratrol protects against asthma-induced airway inflammation and remodeling by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1):459-466.

(收稿日期:2023-10-25)

[编辑:徐霜俐]