

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.12.016

穴位贴敷对过敏性鼻炎模型大鼠鼻黏膜组织 TLR-NF- κ B 信号通路的影响

金禹彤¹, 朱正阳¹, 吴凌韬¹, 宣丽华^{2*}

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江省杭州市滨文路 548 号, 310053; 2. 浙江中医药大学附属第一医院)

摘要 目的 探讨穴位贴敷治疗过敏性鼻炎的可能作用机制。方法 40 只 Wistar 大鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组、丙酸氟替卡松组、穴位贴敷组, 每组 10 只。除对照组外其余各组应用鸡卵白蛋白腹腔注射、滴鼻和雾化建立过敏性鼻炎大鼠模型。造模后模型组大鼠每侧鼻孔 5 μ l 生理盐水滴鼻; 穴位贴敷组大鼠在其双侧“肺俞”、“脾俞”、“肾俞”处贴敷 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的膏药 2 h 后取下; 丙酸氟替卡松组大鼠每侧鼻孔丙酸氟替卡松鼻腔喷雾剂 5 μ l 滴鼻。各组大鼠均隔日 1 次, 共 7 次。采用 HE 染色法观察鼻黏膜形态, 并计数嗜酸性粒细胞数; 实时定量 PCR 法检测鼻黏膜组织中 toll 样受体 4 (TLR4) 和核转录因子 κ B (NF- κ B) mRNA 表达情况; 免疫组织化学法检测鼻黏膜组织 TLR4、NF- κ B 蛋白表达。结果 HE 染色显示模型组大鼠鼻黏膜破坏明显, 大量嗜酸性粒细胞等炎性细胞浸润; 鼻黏膜中嗜酸性粒细胞数、TLR4 和 NF- κ B mRNA 及蛋白表达均较正常组升高 ($P < 0.05$); 丙酸氟替卡松组和穴位贴敷组大鼠鼻黏膜嗜酸性粒细胞数、TLR4 和 NF- κ B mRNA 及蛋白表达量均较模型组降低 ($P < 0.05$), 且穴位贴敷组较丙酸氟替卡松组降低更明显 ($P < 0.05$)。结论 穴位贴敷可能通过对大鼠鼻黏膜 TLR-NF- κ B 通路的调节, 改善鼻黏膜炎性症状, 从而治疗过敏性鼻炎。

关键词 过敏性鼻炎; 穴位贴敷; Toll 样受体; 核转录因子 κ B; TLR-NF- κ B 通路

过敏性鼻炎是一种由多种免疫活性细胞和细胞因子参与的鼻黏膜非感染性炎症疾病, 其病因复杂, 反复发作严重影响患者生活质量。大量文献报道, 穴位贴敷作为中医学的一种外治法, 可有效预防和治疗过敏性鼻炎^[1-4]。现代研究认为^[5], 过敏性鼻炎的发病机制主要是体质、环境等因素导致机体发生免疫紊乱, 从而产生 I 型超敏反应。TLR-NF- κ B 信号通路是近年来发现的与抗炎免疫机制密切相关的信号通路, 该通路在过敏性鼻炎发病中发挥重要作用^[6]。本研究通过鸡卵白蛋白建立过敏性鼻炎大鼠模型, 采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测大鼠鼻黏膜中 toll 样受体 4 (TLR4) 和核转录因子 κ B (NF- κ B) 的表达, 探讨穴位贴敷治疗过敏性鼻炎的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 40 只, 体重 250 ~

300 g, 6 周龄, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 实验动物许可证号: SYXK (浙) 2013-0184。本实验遵守动物福利和伦理原则, 实验方案通过浙江中医药大学动物伦理委员会批准, 批准号: ZSLL-2017-039。动物适应性喂养 1 周。

1.2 药物

穴位贴敷膏药, 由白芥子、细辛、甘遂、延胡索以 2 : 2 : 1 : 1 的比例混合, 由浙江中医药大学第一附属医院配制; 丙酸氟替卡松鼻腔喷雾剂 (GlaxoSmithKline, S. A 公司, 批号: H20140117)。

1.3 主要试剂及仪器

鸡卵白蛋白 (OVA, 批号: SLBB430V, Sigma 公司); NF- κ B p65 抗体 (货号: 8242S, CST 公司); 兔抗大鼠 TLR4 多克隆抗体 (货号: NB100-56566, Novus 公司); 苏木色精 (批号: 150701, High Pure 公司); HE 染色液 (批号: 20141112, 国药集团化学试剂有限公司); Trizol 试剂盒 (批号: AK5302, TaKaRa 公司); 逆转录试剂盒 (批号: AK5101, TaKaRa 公司)。PCR 扩增仪 (型号: Step One Plus, ABI 公司); HE 染色机

基金项目: 浙江省重大科技专项计划项目 (2014C03046-2)

* 通讯作者: xlh1083@163.com

(型号: AUTOSTAINER XL, Leica 公司); 光镜 (型号: eclipse 80, Nikon 公司)。

1.4 分组及模型制备

参考文献 [7] 方法, 将 40 只大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、穴位贴敷组、丙酸氟替卡松组, 每组 10 只。除对照组外其余各组大鼠分别从第 1 天开始腹腔注射新鲜配置的 1 ml 生理盐水中含 OVA 0.3 mg + Al(OH)₃ 30 mg 致敏, 隔日 1 次, 连续 7 次, 第 15 天进行加强免疫, 给予 5% OVA 滴鼻 (每侧 50 μg) 和 1% OVA 喷雾吸入 10 min, 连续 7 天。对照组予以等量生理盐水腹腔注射、滴鼻和雾化, 方法同上。末次滴鼻雾化致敏后即刻观察所有大鼠鼻涕、喷嚏和流涕等行为进行评分, 评分方法见表 1。每只大鼠置于透明箱子中观察 30 min, 将观测时 3 个症状分数相加即为总症状评分, 总评分 ≥ 5 分为造模成功。

表 1 过敏性鼻炎模型大鼠症状评分表

评分	喷嚏 (次)	抓鼻	流涕
1 分	1~3	轻擦鼻	溢至鼻孔
2 分	4~10	反复挠抓面部	流涕出鼻前孔
3 分	≥11	抓鼻不止	涕流满面及挂满须毛

1.5 干预方法

造模后对照组正常饲养; 模型组每侧鼻孔 5 μl 生理盐水滴鼻, 隔日 1 次; 穴位贴敷组将大鼠背部剃毛, 并在其双侧“肺俞”、“脾俞”、“肾俞”处, 定位参考《实验针灸学》[8]。穴位贴敷 0.5 cm × 0.5 cm 的膏药, 用胶布固定, 2 h 后取下膏药, 隔日 1 次, 共贴 7 次; 丙酸氟替卡松组滴鼻, 每侧鼻孔 5 μl, 隔日 1 次, 共 7 次。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 鼻黏膜病理观察 脱颈处死大鼠, 从鼻正中缝处开裂鼻腔, 其中每组采用随机数字表法选取 5 只, 取下带有鼻黏膜的鼻中隔软骨, 用 4℃ 生理盐水漂洗后置于 10% 中性甲醛溶液中固定 24 h, 石蜡包埋、切片, 每一标本选取 5 张切片进行 HE 染色, 观察在光镜下鼻黏膜组织病理形态变化, 并统计 5 个高倍视野下嗜酸性粒细胞数。

1.6.2 鼻黏膜组织 TLR4 和 NF-κB mRNA 检测

另外 5 只大鼠剥离鼻中隔及鼻腔外侧壁黏膜组织, 放入 EP 管中, 取材后将组织立即投入液氮中保存待测。取鼻黏膜组织, 用 Trizol 一步法提取总 RNA。引物由上海生工生物工程有限公司合成, TLR4: 正向引物 5'-CGCTCTGGCATCATCTTCAT-

3', 反向引物 5'-AGCATTGTCCTCCCACTCG-3'; NF-κB: 正向引物 5'-GGGCTGACCTGAGTCTTCTG-3', 反向引物 5'-GCTGCCTTGCTGTTCTTGAG-3'; 内参 β-actin: 正向引物 5'-GGCACAGTCAAGGCT-GAGAATG-3', 反向引物 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'。将已提取的总 RNA 反转录为 cDNA, 步骤按照逆转录试剂盒操作, 将 cDNA 保存于 4℃ 冰箱备用。进行实时定量 PCR 反应, PCR 反应体系 20 μl。所有反应信息资料由扩增仪收集, 转录水平以 2^{-ΔΔCt} 表示。

1.6.3 鼻黏膜组织 TLR4 和 NF-κB 蛋白表达 采用免疫组织化学测定, 按 1.6.1 中的方法将鼻中隔组织固定、石蜡包埋、切片。切片常规脱蜡、水化, 用两步法染色, 用 PBS 缓冲液进行阴性对照。其中棕黄色颗粒为 TLR4 和 NF-κB 的阳性表达, 用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件测定平均光密度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件处理, 计量数据结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析进行多组数据比较, LSD-*t* 法进行组间两两比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠嗜酸性粒细胞计数比较

表 2 示, 模型组较对照组嗜酸性粒细胞明显增加 (P < 0.05), 丙酸氟替卡松组和穴位贴敷组嗜酸性粒细胞计数较模型组明显降低 (P < 0.05), 且穴位贴敷组较丙酸氟替卡松组降低更加显著 (P < 0.05)。

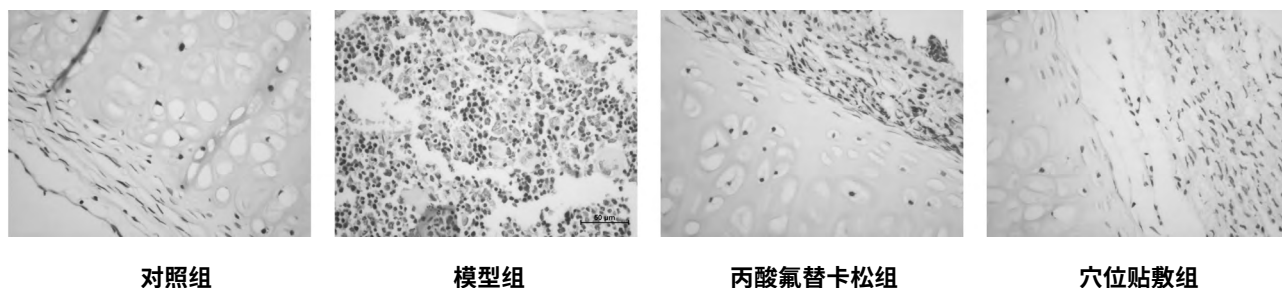
表 2 各组大鼠鼻黏膜嗜酸性粒细胞数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	嗜酸性粒细胞
对照组	5	1.4 ± 0.49
模型组	5	16.2 ± 2.71*
丙酸氟替卡松组	5	8.2 ± 0.75 ^Δ
穴位贴敷组	5	3.6 ± 0.49 ^{Δ▲}

注: 与对照组比较, * P < 0.05; 与模型组比较, Δ P < 0.05; 与丙酸氟替卡松组比较, ▲ P < 0.05

2.2 各组大鼠鼻黏膜 HE 染色结果

图 1 示, 对照组大鼠鼻黏膜组织黏膜上皮结构完整、细胞排列整齐, 嗜酸性粒细胞等炎性细胞浸润不明显; 模型组鼻黏膜组织黏膜上皮结构不完整, 有大量脱落, 黏膜下层大量嗜酸性粒细胞浸润; 丙酸氟替卡松组和穴位贴敷组鼻黏膜结构有脱落, 黏膜少量嗜酸性粒细胞浸润。

图1 各组大鼠鼻黏膜组织病理改变 (HE 染色, $\times 400$)

2.3 各组大鼠鼻黏膜组织中 TLR4 和 NF- κ B mRNA 表达比较

表3示,模型组较对照组大鼠鼻黏膜组织中 TLR4 和 NF- κ B mRNA 表达明显增高 ($P < 0.05$); 丙酸氟替卡松组和穴位贴敷组 TLR4 和 NF- κ B 的 mRNA 表达较模型组明显降低 ($P < 0.05$), 且穴位贴敷组降低更显著 ($P < 0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠鼻黏膜组织中 TLR4 和 NF- κ B mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TLR4 mRNA	NF- κ B mRNA
对照组	5	0.80 $\pm$ 0.17	0.85 $\pm$ 0.15
模型组	5	1.57 $\pm$ 0.08*	1.58 $\pm$ 0.03*
丙酸氟替卡松组	5	1.04 $\pm$ 0.08 Δ	1.12 $\pm$ 0.04 Δ
穴位贴敷组	5	0.76 $\pm$ 0.04 $\Delta\blacktriangle$	0.82 $\pm$ 0.07 $\Delta\blacktriangle$

注: TLR4, toll 样受体 4; NF- κ B, 核转录因子 κ B; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与丙酸氟替卡松组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

2.4 各组大鼠鼻黏膜组织中 TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达比较

免疫组织化学染色后,对照组大鼠鼻黏膜中几乎无棕黄色颗粒;模型组大鼠鼻黏膜染色后可见大量棕黄色颗粒;丙酸氟替卡松组、穴位贴敷组棕黄色颗粒数量较模型组均显著减少。表4示,模型组大鼠鼻黏膜中 TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达较对照组明显升高 ($P < 0.05$);丙酸氟替卡松组、穴位贴敷组 TLR4 和 NF- κ B 表达较模型组均降低 ($P < 0.05$), 且穴位贴敷组降低较丙酸氟替卡松组更明显 ($P < 0.05$)。

表4 各组大鼠鼻黏膜组织中 TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达比较 (平均光密度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TLR4	NF- κ B
正常组	5	0.02 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01
模型组	5	0.46 $\pm$ 0.10*	0.71 $\pm$ 0.12*
丙酸氟替卡松组	5	0.29 $\pm$ 0.02 Δ	0.35 $\pm$ 0.06 Δ
穴位贴敷组	5	0.11 $\pm$ 0.02 $\Delta\blacktriangle$	0.15 $\pm$ 0.05 $\Delta\blacktriangle$

注: TLR4, toll 样受体 4; NF- κ B, 核转录因子 κ B; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与丙酸氟替卡松组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

3 讨论

过敏性鼻炎属中医学“鼻渊”范畴,多为本虚标实之证,主要与人体肺、脾、肾气亏虚,卫外不固关系密切,加之外感六淫、饮食劳倦等原因触发。实验中所用穴位贴敷膏药中白芥子能搜剔内外痰结及胸膈寒痰;细辛性辛、温,用以温里散寒,发汗解表,与甘遂、延胡索共用加强化痰平喘的作用;加生姜汁辛温解表,兼做引经之用。诸药合用,可以温肺化饮、利气散结。将药物贴敷在肺俞、脾俞、肾俞三对穴位上,达到益气扶正的目的。

Toll 样受体 (TLR) 是天然的免疫受体,它可以直接识别病原体及产物并与之结合,引发信号传导,从而导致炎症介质的释放^[8]。TLR4 广泛表达于呼吸道鼻黏膜的树突状细胞、巨噬细胞、黏膜上皮细胞表面,在腺体细胞及少许细胞基质内也有表达^[9]。TLR4 在识别配体后,能激活信号通路,诱导一系列基因活化,使协同刺激因子增加,抗原提呈能力增强,炎症因子分泌增加,从而引发免疫应答反应^[10]。研究显示,TLR4 在季节性变应性鼻炎患者鼻黏膜组织中^[12]呈高表达,TLR4 在正常大鼠鼻黏膜组织中呈低表达^[13]。作为一种诱导性核转录因子, NF- κ B 的激活可导致大量促炎症因子的释放,从而引起炎症反应^[14]。赵建东等^[15]研究结果显示,过敏性鼻炎大鼠鼻黏膜细胞中的 NF- κ B 的表达明显高于对照组。

本研究结果显示,经穴位贴敷和丙酸氟替卡松治疗后大鼠均较模型组大鼠鼻部炎症症状明显改善,鼻黏膜病理切片中炎症改变显著减少,TLR4 和 NF- κ B mRNA 水平以及蛋白表达均显著降低,且穴位贴敷组比丙酸氟替卡松组效果更加显著。说明穴位贴敷疗法能有效治疗过敏性鼻炎,其机制可能为干预鼻黏膜 TLR-NF- κ B 通路,有效降低 TLR4 对于外来抗原的敏感性,从而下调 NF- κ B 的表达,减少炎症细胞因子的释放,从而发挥抗炎治疗作用。

参考文献

[1] 韩东岳,刘畅,郝丽丽,等. 基于数据挖掘技术的穴位

- 贴敷治疗过敏性鼻炎的选穴与用药规律分析 [J]. 中国针灸, 2015, 35(11): 1177-1180.
- [9] 陈勇, 汪泽栋, 丛文杰. 三伏贴敷治疗过敏性鼻炎随机对照研究 [J]. 上海针灸, 2016, 35(6): 700-703.
- [10] 林勇凯, 梁桂洪, 黄宇新, 等. 三伏贴敷疗法治疗不同证型过敏性鼻炎疗效观察 [J]. 中国针灸, 2014, 34(10): 967-971.
- [11] 陈静, 邓桂珠, 陈芳, 等. 三伏天与非三伏天穴位贴敷对变应性鼻炎患者生活质量影响的比较研究 [J]. 中国针灸, 2012, 32(1): 31-34.
- [12] 魏欣. 变应性鼻炎的发病机制 [J]. 海南医学, 2011, 22(10): 8-12.
- [13] 张敏, 王守安, 刘黎星. 雷公藤多苷干预 TLR-NF- κ B 通路发挥免疫抑制作用 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1288-1292.
- [14] 赵秀杰, 董震, 杨占泉, 等. 鼻超敏反应实验模型建立 [J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1993, 28(1): 17-18.
- [15] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 301-307.
- [16] MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. Nature, 1997,

388(6640): 394-397.

- [17] DERETIC V, DELGADO M, VERGNE I, et al. Autophagy in immunity against mycobacterium tuberculosis: a model system to dissect immunological roles of autophagy [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2009, 335: 169-188. doi: 10.1007/978-3-642-00302-8_8.
- [18] MOSER M, MURPHY KM. Dendritic cell regulation of TH1/TH2 development [J]. Nat Immunol, 2000, 1(3): 199-205.
- [19] FRANSSON M, ADNER M, ERJEFALT J, et al. Up-regulation of Toll-like receptors 2, 3 and 4 in allergic rhinitis [J]. Respir Res, 2005, 6(1): 100-109.
- [20] 方建林, 高兴强, 赵德安. TLR2、TLR3 和 TLR4 在变应性鼻炎大鼠鼻黏膜组织中的表达 [J]. 山东大学耳鼻喉眼科学报, 2010, 24(4): 40-44.
- [21] BHAKAR AL, TANNIS LL, ZEINDLER C, et al. Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival [J]. Neurosci, 2002, 22(19): 8466-8475.
- [22] 赵建东, 王延君, 孔维佳, 等. 核因子- κ B 及 ICAM-1 mRNA 在变应性鼻炎鼻黏膜中的表达 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2008, 22(2): 57-60.

Effect of Acupoint Application on TLR-NF- κ B Signal Pathway in Nasal Mucosa of Allergic Rhinitis Model Rats

JIN Yutong¹, ZHU Zhengyang¹, WU Lingtao¹, XUAN Lihua²
(1. The First Clinical Medical College of Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053; 2. The First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of acupoint application therapy for allergic rhinitis. **Methods** Forty Wistar rats were randomly divided into control group, model group, fluticasone propionate group and acupoint application group, with 10 rats in each group. The rat model of allergic rhinitis was established by intraperitoneal injection of ovalbumin, intranasal instillation, and nebulization except for the control group. After modeling, rats in the model group received 5 μ l saline nasal drip per side in the nostril; the rats in the acupoint application group were removed after applying a 0.5 cm $\times$ 0.5 cm plaster at both acupoints of “Feishu (BL13)”, “Pishu (BL20)” and “Shenshu (BL23)” for 2 h. In the fluticasone propionate group, 5 μ l nasal drops of fluticasone propionate nasal spray were applied to each side of the rat. Each group of rats was performed every other day for 7 times. HE staining was used to observe the morphology of the nasal mucosa and the number of eosinophils was counted. Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) mRNA in the nasal mucosa. Chemical methods were used to detect the expression of TLR4 and NF- κ B protein in nasal mucosa. **Results** HE staining showed that the nasal mucosa of the model group was significantly damaged, and a large number of eosinophils and other inflammatory cells infiltrated; the number of eosinophils, TLR4 and NF- κ B mRNA and protein in the nasal mucosa were all increased compared with the normal group ($P < 0.05$); The number of eosinophils, TLR4 and NF- κ B mRNA and protein expression in the fluticasone propionate group and acupoint application group were lower than those in the model group ($P < 0.05$), and the decrease in the acupoint application group was more significant than fluticasone propionate group ($P < 0.05$). **Conclusion** Acupoint application may improve the nasal mucosal inflammatory symptoms by regulating the TLR-NF- κ B pathway in rat nasal mucosa, thereby treating allergic rhinitis.

Keywords allergic rhinitis; acupoint application; Toll-like receptor; nuclear transcription factor- κ B; TLR-NF- κ B pathway

(收稿日期: 2017-10-24; 修回日期: 2018-01-04)

编辑: 邓 媛