

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.08.012

鼻敏方对变应性鼻炎肺脾气虚证模型大鼠鼻黏膜 TMEM16A/NF- κ B/MUC5AC 信号通路的影响徐宁聪¹, 画奕惟¹, 谭希², 王今晗³, 梁紫华¹, 周世卿²,
李云英², 陈文勇², 夏纪严², 罗秋兰²✉

1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东省广州市白云区机场路 12 号, 510405; 2. 广州中医药大学第二附属医院; 3. 广州中医药大学中药学院

[摘要] **目的** 探讨鼻敏方治疗变应性鼻炎 (AR) 肺脾气虚证黏液高分泌的可能作用机制。**方法** 34 只 SD 大鼠随机分为空白组 (8 只)、模型组 (8 只)、鼻敏方低剂量组 (8 只)、鼻敏方高剂量组 (10 只)。除空白组外, 其余各组大鼠以烟熏+番泻叶灌胃+卵清蛋白法建立 AR 肺脾气虚证大鼠模型。造模结束后, 鼻敏方低、高剂量组大鼠分别给予鼻敏方浓缩液 (浓度为 2.16 g/ml) 1.08 g/100 g、2.16 g/100 g 灌胃, 模型组给予 0.5 ml/100 g 生理盐水灌胃, 均每日 1 次, 持续 28 天; 空白组不干预。干预后进行行为学评价, ELISA 法检测大鼠外周血总免疫球蛋白 E (IgE) 水平, HE 染色观察大鼠鼻上皮黏膜病理学变化, 免疫组化法检测鼻上皮黏膜的跨膜蛋白 16A (TMEM16A)、黏蛋白 5AC (MUC5AC) 蛋白表达, Western Blot 法检测鼻上皮黏膜核转录因子 κ B (NF- κ B) 蛋白表达, RT-PCR 法检测鼻上皮黏膜 TMEM16A、MUC5AC、NF- κ B mRNA 表达。**结果** HE 染色显示, 空白组大鼠鼻上皮黏膜上皮细胞结构完整无脱落, 无水肿、坏死等病变; 模型组大鼠鼻上皮黏膜上皮组织增厚且部分脱落, 可见嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润; 鼻敏方高、低剂量组大鼠鼻上皮黏膜组织病理均有改善, 且鼻敏方高剂量组改善更明显。与空白组比较, 模型组大鼠行为学积分及外周血总 IgE 水平显著升高, 鼻上皮黏膜 TMEM16A、MUC5AC、NF- κ B 蛋白及 mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 鼻敏方高剂量组大鼠行为学积分及外周血总 IgE 水平降低, 鼻上皮黏膜 TMEM16A、MUC5AC、NF- κ B 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 鼻敏方低剂量组大鼠行为学积分及外周血总 IgE 水平降低, 鼻上皮黏膜 TMEM16A、MUC5AC 蛋白及 mRNA 表达降低, NF- κ B 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), NF- κ B mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与鼻敏方低剂量组比较, 鼻敏方高剂量组 NF- κ B 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。**结论** 鼻敏方可能通过调控鼻上皮黏膜 TMEM16A/NF- κ B/MUC5AC 信号通路改善 AR 肺脾气虚症状及黏液高分泌。

[关键词] 变应性鼻炎; 肺脾气虚证; 鼻敏方; 跨膜蛋白 16A; 核转录因子 κ B; 黏蛋白 5AC; 黏液高分泌

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是特异性个体暴露于过敏原后发生的主要由免疫球蛋白 E

(IgE) 介导的鼻黏膜非感染性慢性炎性疾病^[1], 全球患病率为 10%~40%^[2]。黏液高分泌是 AR 的主要病理特征, 临床表现为频繁流涕, 目前指南建议酌情使用二线药物鼻用抗胆碱能药^[1]。中医学认为, AR 由于正气不足, 卫表不固, 感受邪气而发病^[3], 肺脾气虚、水湿泛鼻是 AR 最常见的证型^[4], 玉屏风散和补中益气汤是治疗 AR 最常用的方药^[5]。本项目组临床使用经验方鼻敏方即由上述两方化裁并增加通窍敛涕的药物组合而成, 以培土生

基金项目:国家自然科学基金(81603667);广州市科学技术局 2022 年基础研究计划项目(202201020473);2021 年度广东省基础与应用基础研究基金企业联合基金(公共卫生与医药健康领域)项目(2021A1515220007);全国名老中医专家传承工作室建设项目(粤中医办函[2022]52 号);2023 年度广东省中医药局中医药科研项目(科研平台专项)(20233018);2021 年度广东省普通高校青年创新人才类项目(2021KQNCX014);广东省中医院中医药科学技术研究专项(YN2020MS10, YN2018ML09)

✉ 通讯作者: doctorluoql77@gzucm.edu.cn

金为法,具有健脾补肺、通窍敛涕之效。前期研究发现,培土生金法可有效改善肺脾气虚 AR 患者的鼻部症状^[6],而鼻敏方的作用机制可能是通过抑制核转录因子 κ B (NF- κ B) 信号通路而减少水通道蛋白 5 (AQP5) 的表达^[7]。

流涕的主要病理机制是鼻上皮黏膜黏液高分泌。黏液的主要成分是黏蛋白,其中黏蛋白 5AC (MUC5AC) 是人鼻黏膜上皮细胞中最主要表达的黏蛋白,也是衡量气道黏液分泌强度的重要指标^[8]。研究发现,气道黏液调控与钙激活氯离子通道的跨膜蛋白 16A (TMEM16A) 有关^[9],且支气管上皮 MUC5AC 的表达受 TMEM16A/NF- κ B 调控^[10]。本研究从 TMEM16A/NF- κ B/MUC5AC 通路探讨鼻敏方对 AR 肺脾气虚证模型大鼠黏液高分泌的影响,以期揭示鼻敏方治疗 AR 肺脾气虚证的可能作用机制。本研究已通过广东省中医院实验动物伦理委员会审批(伦理编号:2021037)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 34 只,雌雄各半,体质量 160~180 g,周龄 8~10 周,由广东省医学实验动物中心提供,实验动物许可证号为 SCXK (粤) 2018-0002。动物饲养于中国中医科学院广东分院动物实验中心,温度为 23~26 °C,相对湿度为 40%~60%,实验前先适应性喂养 3 天。

1.2 药物

鼻敏方组成:黄芪 15 g,白术 10 g,防风 10 g,党参 10 g,北柴胡 10 g,五味子 5 g,辛夷 10 g,炙甘草 5 g 等。中药饮片均购自广东康美药业有限公司,所有中药浸泡 30 min,再进行武火 25 min、文火 40 min 煎煮,纱布过滤药液,在药渣中加入相同水量按照前述方法进行二次煎煮。收集两次药液后采用旋蒸仪浓缩,浓缩后药液浓度为含生药 2.16 g/ml,浓缩液用 50 ml 试管分装后 -20 °C 保存。番泻叶购自广东康美药业有限公司,按照番泻叶:沸水=1 g:10 ml 的比例浸泡 1 h,滤膜过滤药液,浓度为 0.1 g/ml,4 °C 冰箱冷藏保存。

1.3 主要试剂及仪器

卵清蛋白 (OVA, 批号: A5503-10G)、氢氧化铝干粉 (批号: 239186-25G)、白细胞介素 13 (IL-13, 批号: I1771)、牛血清白蛋白 (BSA, 批号: A1933), Sigma 公司;抗 NF- κ B 抗体 (批号: 8242S)、抗 MUC5AC 抗体 (批号: 61193S)、抗

TMEM16A 抗体 (批号: 14476S)、兔抗荧光二抗 (批号: 4413S), CST 公司;异氟烷 (批号: 217181101), 瑞沃德生命科技有限公司;双喜牌香烟 (批号: 6901028001618), 广东中烟工业有限责任公司;苏木素-伊红染色液 (批号: C0105S)、CCK8 检测试剂盒 (批号: C0038)、RIPA 裂解液 (批号: P0013B), 碧云天生物技术有限公司;血清 IgE ELISA 试剂盒 (批号: CSB-E07983m), 武汉华美生物工程有限公司;Trizol (批号: 15596026), Invitrogen 公司;BCA 试剂盒 (批号: 23225), Thermo Fisher 公司;逆转录试剂盒 (批号: R223-01)、SYBR 染料 (批号: Q341-02/03), 诺唯赞生物科技股份有限公司;二氨基联苯胺 (DAB) 显色液 (批号: ZLI-9018), 北京中杉金桥生物技术有限公司;4% 多聚甲醛 (批号: 22052433), Biosharp 公司。

全波长多功能酶标仪 (型号: M1000pro), 瑞士 Tecan 公司;实时荧光定量 PCR 仪 (型号: ABI ViiA 7), Thermo 公司;正置荧光显微镜 (型号: BX53+DP72), 奥林巴斯公司;垂直板电泳装置 (型号: 1658033)、高灵敏度化学发光成像分析系统 (型号: ChemiDoc Touch), 美国 Bio-Rad 公司。

1.4 分组及造模方法

SD 大鼠雌性与雄性分别按 1 至 17 编号,同时采用 WPS Office 软件在 1~17 范围内随机生成 17 个不重复的随机数,每个动物编号均对应一个随机数,按随机数的顺序将雌性和雄性大鼠各分为 4 组,分别为空白组、模型组及鼻敏方低、高剂量组,其中空白组、模型组、鼻敏方低剂量组每组各 8 只,鼻敏方高剂量组 10 只,每组均雌雄各半。

采用《实用中医证候动物模型学》^[11]145-199 中 AR 肺脾气虚证大鼠造模方法,造模周期共 60 天。除空白组外,其余大鼠从实验第 1 天起开始进行肺气虚造模,第 31 天增加脾气虚造模,第 40 天再增加 AR 造模,至第 60 天造模结束。1) 肺气虚造模:采用烟熏法,将大鼠置于自制塑料烟熏箱内 (长×宽×高: 60 cm×40 cm×35 cm),将烟熏箱放置于通风橱中,每次烟熏使用 8 根香烟,密闭烟熏 20 min,通风 10 min,如此反复,共烟熏 3 次,通风 2 次。每日烟熏共 60 min,烟熏周期为 60 天。2) 脾气虚造模:采用番泻叶灌胃法,番泻叶药液从冷藏中取出恢复常温后,按照 1 ml/100 g 进行灌胃,每日 1 次,造模周期为 30 天。3) AR 造模:以 OVA 为致敏剂,分为腹腔致敏、滴鼻激发和滴鼻维持。腹腔致敏是在造模第 40 天给每只大鼠腹腔注射混悬液

(OVA 0.3 mg+氢氧化铝 30 mg+1 ml 生理盐水), 每 2 日 1 次, 共注射 7 次, 持续 14 天; 腹腔致敏 14 天后滴鼻激发, 以 10% OVA 生理盐水滴鼻, 双侧鼻孔各 20 μ l, 每日 1 次, 连续 7 天。滴鼻维持是滴鼻激发 7 天后, 采用 10% OVA 生理盐水滴鼻, 双侧鼻孔内侧 20 μ l, 每日 1 次, 持续至给药结束。空白组在造模第 40 天开始用 1 ml 生理盐水腹腔注射 14 天, 在造模滴鼻激发期间予生理盐水滴鼻, 双侧鼻孔各 20 μ l, 每日 1 次, 至造模组给药结束。

每日观察大鼠的鼻部症状(喷嚏、流涕、挠鼻)及大鼠精神、活动、毛发、大便、饮食, 每次观察 30 min。评价时间点为造模结束后(指烟熏、腹腔致敏、滴鼻激发均结束后), 给药结束后。空白组、模型组行为学评分时间在造模结束后, 鼻敏方高、低剂量组在给药结束后。参照《中医证候鉴别诊断学》^[12]、《实用中医证候动物模型学》^{[11]314-315}及文献[13]拟定变应性鼻炎模型大鼠行为学评分表(表 1)及模型成功判定标准: 行为学积分 ≥ 5 分即表明 AR 造模成功; 大鼠毛发发黄无光泽且蓬乱易脱落, 精神萎靡倦怠, 活动减少, 喜欢蜷缩聚堆, 食欲不振, 便溏, 表明肺脾气虚证模型建立成功。

表 1 变应性鼻炎模型大鼠行为学评分表(滴鼻后 30 min 内)

Table 1 Behavior scoring criteria of allergic rhinitis rats (30min after nasal drip)			
计分	喷嚏	流涕	挠鼻
1 分	1~3 个	流至鼻前孔	轻擦鼻几次
2 分	4~10 个	超过鼻前孔	时擦鼻, 但无抓鼻面部不止
3 分	11 个及以上	泪流满面	搔抓鼻面部不止、四处摩擦

注: 行为学积分为喷嚏、流涕、挠鼻三者评分合计。

1.5 给药方法

造模结束后次日, 鼻敏方低、高剂量组分别给予鼻敏方浓缩液 1.08 g/100 g、2.16 g/100 g 灌胃, 其中鼻敏方高剂量组给药剂量为临床等效剂量, 模型组给予 0.5 ml/100 g 生理盐水灌胃, 均每日 1 次, 持续 28 天; 空白组不进行灌胃干预。给药期间除空白组外, 其余各组持续滴鼻维持, 直至给药结束。

1.6 标本采集及处理

大鼠采用异氟烷 0.1 ml/100 g 麻醉后腹主动脉采血, 每只大鼠采血约 10 ml, 血样均室温静置 2 h, 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心(离心半径 7 cm) 10 min, 取上层血清, 用于 ELISA 检测。按照随机数字表法各组选出 3 只大鼠取血后取两侧鼻上皮黏膜组织, 一侧鼻上皮黏膜-80 $^{\circ}$ C 保存, 用于 Western Blot 和 RT-PCR

检测; 另一侧鼻上皮黏膜在 4% 多聚甲醛中固定, 脱水后进行石蜡包埋, 用于 HE 染色和免疫组化实验。

1.7 观察指标及方法

1.7.1 大鼠一般情况 实验期间观察大鼠毛发、饮食、精神、大便等情况, 干预 28 天后记录挠鼻、流涕和喷嚏发生情况并进行评分, 计算行为学积分。

1.7.2 ELISA 法检测外周血总 IgE 水平 具体操作严格按照 ELISA 说明书进行, 酶标仪测量各孔在 450 nm 处吸光度值, 计算标准曲线下各样品 IgE 水平。

1.7.3 HE 染色观察鼻上皮黏膜病理学变化 鼻上皮黏膜组织脱水包埋后切片(厚度 3 μ m), 置于烤箱中 60 $^{\circ}$ C 烘烤 1 h, 严格按照标准程序进行 HE 染色、中性树胶封片后在显微镜下观察大鼠鼻上皮黏膜病理改变并采集图像。

1.7.4 免疫组化法检测鼻上皮黏膜 TMEM16A、MUC5AC 蛋白表达 将已固定、脱水、包埋的鼻上皮黏膜组织, 二甲苯脱蜡、不同浓度酒精复水、枸橼酸微波修复后冷却, 山羊血清封闭, 滴加一抗(MUC5AC 和 TMEM16A 抗体分别按 1:200 和 1:500 比例稀释)于 4 $^{\circ}$ C 过夜, DAB 显色, 梯度酒精脱水、二甲苯透明, 中性树胶封片, 通风干燥后在显微镜下观察并采集图像。使用 Image J 1.51 软件对阳性表达进行分析, 计算 AOD 值。

1.7.5 Western Blot 检测鼻上皮黏膜 NF- κ B 蛋白表达 将冻存的鼻上皮黏膜组织加入裂解液于冷冻研磨机研磨后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心(离心半径 7 cm) 15 min, 取上清, BCA 法蛋白定量, 根据蛋白浓度体系计算后加入 5 $\times$ loading buffer 配置蛋白样品。蛋白样品上样至 8% SDS-PAGE 胶进行分离, 然后 300 mA、2 h 转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 抗体 NF- κ B、GAPDH 以 1:1000 浓度稀释, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后滴加稀释好的对应种属二抗(1:3000), 室温孵育 60 min, 洗膜后显色。灰度值分析使用 Image J1.51 软件进行。以 GAPDH 为内参, 目标蛋白/GAPDH 的灰度值比值为检测指标的半定量分析结果。

1.7.6 RT-PCR 法检测鼻上皮黏膜 TMEM16A、NF- κ B、MUC5AC mRNA 表达 将冻存的鼻上皮黏膜组织加入 Trizol 于冷冻研磨机研磨后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心(离心半径 7 cm) 15 min, 取上清, 取少量溶解的 RNA, 稀释后用紫外分光光度计读取 OD 值。按照试剂盒说明书配置 20 μ l 样本体系, 加入逆转录反应液, 放入金属浴锅 50 $^{\circ}$ C、15 min, 85 $^{\circ}$ C、5 s 进行逆转录反应。应用 3 步法程序, 预变性

95℃、30 s, 40 个循环反应, 即 95℃、10 s, 60℃、30 s, 最后熔解曲线 95℃、15 s, 60℃、60 s, 95℃、15 s。引物由广州威佳生物公司合成, 引物序列: TMEM16A: 上游 TGCCAGTCACCTCTTTGACA, 下游 ATCACAGCTACTCACCTCCTCT, 产物长度 160 bp; NF-κB: 上游 CAGACGACGATCCTTTTCGGA, 下游 TTGCAGGCCCCACATAGTT, 产物长度 270 bp; MUC5AC: 上游 GTGTTGGCCGGAGAAAGTTG, 下游 GGTGAAGGCTCGTACCACA, 产物长度 213 bp; β-actin: 上游 GCAGGAGTACGATGAGTCCG, 下游 GGGTGTAACGCGAGCTCAG, 产物长度 83 bp。结果用基因相对表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计分析。计量资料均符合正态分布, 用 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐者多组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验法; 方差不齐者多组间比较采用 KruskalWallis *H* 检验, 两两比较采用 Dunnett's *t* 检验。所有假设检验均采用双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况及外周血总 IgE 水平比较

空白组大鼠毛发蓬松柔软有光泽, 饮食无异常, 精神正常且较为活泼, 大便成形无便溏现象, 偶有挠鼻现象, 但未出现流涕和喷嚏的症状。造模大鼠行为学积分均 ≥ 5 分, 均出现喷嚏、挠鼻频繁、流涕等症状, 同时伴有毛发发黄无光泽且蓬乱易脱落, 精神萎靡倦怠, 活动减少, 喜欢蜷缩聚堆, 食欲不振, 便溏。鼻敏方低、高剂量组大鼠随着干预时间各症状逐渐趋于正常, 毛发虽发黄蓬乱但不容易脱落, 精神从萎靡变得喜好活动, 便溏情况缓解, 偶有挠鼻, 喷嚏和流涕症状并不明显, 且鼻敏方高剂量组较鼻敏方低剂量组症状减轻明显。

表 2 示, 与空白组比较, 模型组大鼠行为学积分及外周血总 IgE 水平显著升高 ($P<0.05$); 与模

型组比较, 鼻敏方高、低剂量组大鼠行为学积分及外周血总 IgE 水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 鼻敏方高、低剂量组组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组大鼠行为学积分及外周血总 IgE 水平比较
Table 2 Comparison of behavioral scores and peripheral blood total IgE levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	行为学积分/分	总 IgE/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
空白组	8	2.50±0.76	0.955±0.428
模型组	8	6.51±1.51 ^{a)}	1.613±0.206 ^{a)}
鼻敏方低剂量组	8	2.25±1.16 ^{b)}	1.089±0.288 ^{c)}
鼻敏方高剂量组	10	1.50±0.93 ^{b)}	0.821±0.254 ^{c)}

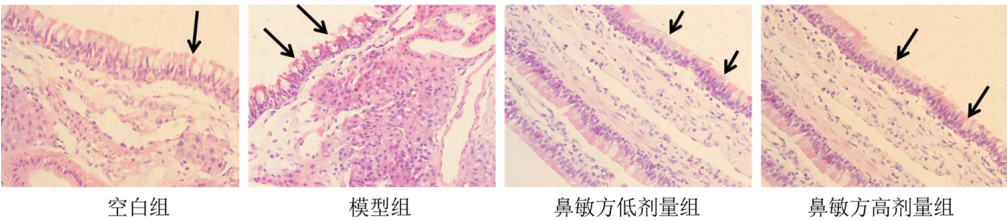
注: IgE, 免疫球蛋白 E。
a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.01$;
c) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠鼻上皮黏膜组织 HE 染色病理结构改变比较

图 1 示, 空白组大鼠鼻上皮黏膜上皮细胞结构完整无脱落, 纤毛排列整齐, 无水肿、坏死等病变。模型组大鼠鼻上皮黏膜上皮组织增厚且部分脱落, 纤毛结构受损脱落, 部分出现倒伏现象, 可见炎症细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润。鼻敏方高、低剂量组大鼠鼻上皮黏膜组织病理改变均有改善, 上皮组织结构基本恢复完整, 黏膜下仅见少量炎症细胞浸润, 嗜酸性粒细胞和淋巴细胞数量减少。鼻敏方高剂量组炎症细胞浸润较鼻敏方低剂量组减少更明显, 黏膜组织、上皮组织结构更完整。

2.3 各组大鼠鼻上皮黏膜 TMEM16A、MUC5AC 蛋白和 mRNA 表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组大鼠鼻上皮黏膜 TMEM16A、MUC5AC 蛋白及 mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 鼻敏方高、低剂量组大鼠鼻上皮黏膜 TMEM16A、MUC5AC 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 鼻敏方高、低剂量组组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: 图中黑色箭头指示为鼻上皮黏膜组织。

图 1 各组大鼠鼻上皮黏膜组织病理图 (HE 染色, ×400)

Figure 1 Histopathological images of nasal epithelial mucosa of rats in each group (HE staining, ×400)

表 3 各组大鼠鼻上皮黏膜 TMEM16A、MUC5AC 蛋白和 mRNA 表达比较

Table 3 Comparison of TMEM16A and MUC5AC proteins and mRNA expression in nasal epithelial mucosa of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TMEM16A		MUC5AC	
		蛋白/AOD	mRNA/ $2^{-\Delta\Delta CT}$	蛋白/AOD	mRNA/ $2^{-\Delta\Delta CT}$
空白组	3	0.44±0.04	1.12±0.59	0.35±0.12	0.80±0.62
模型组	3	2.58±0.16 ^{a)}	14.88±2.81 ^{b)}	2.70±0.13 ^{a)}	35.20±2.38 ^{a)}
鼻敏方低剂量组	3	0.57±0.44 ^{c)}	2.13±2.79 ^{c)}	0.79±0.24 ^{c)}	4.04±1.60 ^{d)}
鼻敏方高剂量组	3	0.54±0.38 ^{c)}	1.76±1.28 ^{c)}	0.46±0.31 ^{c)}	0.61±0.81 ^{d)}

注：TMEM16A，跨膜蛋白 16A；MUC5AC，黏蛋白 5AC。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

2.4 各组大鼠鼻上皮黏膜 NF-κB 蛋白和 mRNA 表达比较

表 4 示，与空白组比较，模型组大鼠鼻上皮黏膜 NF-κB 蛋白及 mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组比较，鼻敏方高、低剂量组大鼠鼻上皮黏膜 NF-κB 蛋白及鼻敏方高剂量组 NF-κB mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与鼻敏方低剂量组比较，鼻敏方高剂量组 NF-κB 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。各组大鼠鼻上皮黏膜 NF-κB 蛋白电泳图见图 2。

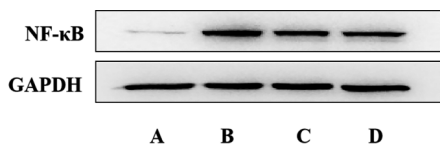
表 4 各组大鼠鼻上皮黏膜 NF-κB 蛋白和 mRNA 表达比较

Table 4 Comparison of NF-κB protein and mRNA expression in nasal epithelial mucosa of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NF-κB 蛋白 /GAPDH	NF-κB mRNA / $2^{-\Delta\Delta CT}$
空白组	3	0.06±0.01	2.48±0.31
模型组	3	1.28±0.06 ^{a)}	9.46±0.78 ^{b)}
鼻敏方低剂量组	3	0.64±0.01 ^{c)}	9.75±4.41
鼻敏方高剂量组	3	0.49±0.01 ^{c)} ^{e)}	6.07±0.25 ^{d)}

注：NF-κB，核因子 κB。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与鼻敏方低剂量组比较， $P<0.01$ 。



注：NF-κB，核因子 κB；A，空白组；B，模型组；C，鼻敏方低剂量组；D，鼻敏方高剂量组。

图 2 各组大鼠鼻上皮黏膜 NF-κB 蛋白电泳图

Figure 2 NF-κB protein electrophoresis pattern of nasal epithelial mucosa of rats in each group

3 讨论

中医学认为，肺在液为涕，涕属“津液”的范畴，属水湿之邪。《素问·经脉别论篇》曰：“饮入于胃，游溢精气，上输于脾，脾气散精，上归于

肺，通调水道”，提示肺、脾在津液代谢过程的重要作用。本项目组经验方鼻敏方以健脾补肺为法，方中以黄芪为君药，为培土生金常用药，既能补肺脾之气，又能固实卫表；臣以白术、防风、党参，白术、党参健脾益气，助黄芪健脾补肺，肺气虚则表虚，故加防风以祛风固表；佐以北柴胡升举阳气，五味子收涩止涕，辛夷芳香温通鼻窍，兼以解表温肺，助君药固表；使以炙甘草调和诸药。全方温而不燥，补中寓散，散不伤正，补不留邪，共奏培土生金、通窍止涕之功。既往临床观察和基础实验^[6-7]结果均提示鼻敏方能改善 AR 症状。本研究结果显示，模型组大鼠出现典型喷嚏、频繁抓鼻、流清涕等 AR 症状，行为学积分 ≥ 5 分，同时伴有毛发发黄无光泽且蓬乱易脱落、精神萎靡倦怠、活动减少、喜欢蜷缩聚堆、食欲不振、便溏等肺脾气虚证候；鼻上皮黏膜呈现增厚且部分脱落、纤毛结构受损脱落、嗜酸性粒细胞浸润等病理改变，外周血总 IgE 较空白组升高，以上结果说明 AR 肺脾气虚证造模成功。而经鼻敏方高、低剂量干预后，大鼠鼻部症状及肺脾气虚症状均明显改善，病理提示鼻上皮黏膜组织恢复，炎症细胞浸润明显减少，说明鼻敏方干预 AR 肺脾气虚证疗效肯定，表明鼻敏方可明显改善鼻上皮黏膜组织结构，减轻炎症，减少黏液高分泌。

现代研究显示，TMEM16A 是钙激活氯离子通道主要分子基础，参与多种细胞功能，其中最主要的调控作用是调节液体分泌^[14-15]，在 AR 患者鼻上皮黏膜组织中可见 TMEM16A 表达增强^[16]。MUC5AC 高表达与黏液过度分泌密切相关，病理情况下气道黏蛋白以 MUC5AC 占优势，故 MUC5AC 的含量和其转录水平代表了气道黏液产生分泌的强度^[8]。有研究^[17-18]发现，NF-κB 及其下游炎症因子参与 MUC5AC 的表达调控，支气管上皮的 MUC5AC 表达受 TMEM16A/NF-κB 调控。NF-κB 抑制剂可显著

抑制 TMEM16A 介导 MUC5AC 的产生, TMEM16A/NF- κ B 通路正向参与白细胞介素 13(IL-13)诱导的支气管上皮黏液产生^[10]。本研究结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠鼻上皮黏膜 TMEM16A、NF- κ B、MUC5AC 蛋白和 mRNA 表达升高; 经鼻敏方低、高剂量干预后大鼠鼻上皮黏膜 TMEM16A、MUC5AC 蛋白和 mRNA 表达降低, 高剂量组 NF- κ B mRNA 表达亦降低, 提示鼻敏方可能通过抑制 TMEM16A/NF- κ B 通路活性, 使 MUC5AC 表达下降而抑制鼻上皮黏膜高分泌, 而鼻敏方高剂量抑制 NF- κ B 蛋白表达较鼻敏方低剂量效果明显。

综上所述, 鼻敏方可能通过调控 TMEM16A/NF- κ B/MUC5AC 信号通路, 从而发挥减少鼻上皮黏膜黏液高分泌以治疗 AR 的作用。其中鼻敏方高、低剂量之间行为学指标差异无统计学意义, 仅 NF- κ B 蛋白表达差异有统计学意义, 鼻敏方高剂量为临床等剂量, 低剂量组为临床的半量, 说明鼻敏方药量减半后疗效仍较明显。本研究初步验证了 AR 黏液高分泌的一条信号通路, 但尚未探索 TMEM16A/NF- κ B/MUC5AC 信号通路的上下游关系, 且鼻敏方的有效成分有待进一步明确。今后将继续开展相关实验, 深入探索鼻敏方的作用机制及相关物质基础, 以更全面阐述鼻敏方治疗 AR 的作用机制。

参考文献

- [1] 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. 中国变应性鼻炎诊断和治疗指南(2022 年, 修订版)[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2022, 57(2): 106-129.
- [2] BROŹEK JL, BOUSQUET J, AGACHE I, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) guidelines: 2016 revision [J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 140(4): 950-958.
- [3] 阮岩. 中医耳鼻咽喉科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 133-136.
- [4] 史军, 刘玉. 1710 例变应性鼻炎患者中医辨证分型调查分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(10): 42-44.
- [5] 李云英, 薛长利. 中医药临床循证丛书(第一辑): 变应性鼻炎[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 31-46, 56-88.
- [6] 李晓珊. “培土生金”法干预变应性鼻炎随机双盲对照

- 临床研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [7] 冯小聪, 黄唯, 周世卿, 等. 鼻敏方通过 NF- κ B 信号通路对肺脾气虚变应性鼻炎大鼠鼻黏膜水通道蛋白 5 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8): 81-88.
- [8] EVANS CM, RACLAWSKA DS, TIOFALI F, et al. The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity [J]. Nat Commun, 2015, 6: 6281. doi: 10.1038/ncomms7281.
- [9] 张涛, 王向东, 张罗. 跨膜蛋白 16A 在呼吸道黏膜上皮细胞的表达和功能研究[J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2018, 42(2): 67-72.
- [10] LIN J, JIANG Y, LI L, et al. TMEM16A mediates the hypersecretion of mucus induced by Interleukin-13 [J]. Exp Cell Res, 2015, 334(2): 260-269.
- [11] 陈小野, 艾景录, 吕爱平, 等. 实用中医证候动物模型学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993.
- [12] 赵金铎, 张镜人, 张震, 等. 中医证候鉴别诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 173-175.
- [13] 黄唯, 冯小聪, 周世卿, 等. 肺脾气虚证变应性鼻炎大鼠模型的建立及评价[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(6): 1502-1505.
- [14] YANG YD, CHO H, KOO JY, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance [J]. Nature, 2008, 455(7217): 1210-1215.
- [15] SCHROEDER BC, CHENG T, JAN YN, et al. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit [J]. Cell, 2008, 134(6): 1019-1029.
- [16] KANG JW, LEE YH, KANG MJ, et al. Synergistic mucus secretion by histamine and IL-4 through TMEM16A in airway epithelium [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 313(3): 466-476.
- [17] WANG W, ZHENG M. Mucin 5 subtype AC expression and upregulation in the nasal mucosa of allergic rhinitis rats [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2012, 147(6): 1012-1019.
- [18] RYU J, KIM KI, HOSSAIN R, et al. Meclofenamate suppresses MUC5AC mucin gene expression by regulating the NF- κ B signaling pathway in human pulmonary mucopidermoid NCI-H292 cells [J]. Biomol Ther (Seoul), 2023, 31(3): 306-311.

Effects of *Bimin Formula* (鼻敏方) on the Nasal Mucosa TMEM16A/NF- κ B/MUC5AC Signaling Pathway in a Rat Model of Allergic Rhinitis with Lung-Spleen *Qi* Deficiency

XU Ningcong¹, HUA Yiwei¹, TAN Xi², WANG Jinhan³, LIANG Zihua¹, ZHOU Shiqing², LI Yunying², CHEN Wenyong², XIA Jiyan², LUO Qiulan²

1. Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510405; 2. Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Bimin Formula* (鼻敏方) in treating lung-spleen *qi* deficiency syndrome of allergic rhinitis (AR) with high mucin secretion. **Methods** Thirty-four SD rats were randomly divided into a blank group (8 rats), a model group (8 rats), a low-dose *Bimin Formula* group (8 rats), and a high-dose *Bimin Formula* group (10 rats). Except for the blank group, the other groups were subjected to AR lung-spleen *qi* deficiency rat models induced by smoking, gavage of Ginkgo biloba leaf extract, and ovalbumin. After modeling, rats in the low- and high-dose *Bimin Formula* groups were given *Bimin Formula* concentrate (concentration of 2.16 g/ml) by gavage at doses of 1.08 g/100 g and 2.16 g/100 g, respectively, while rats in the model group were given 0.5 ml/100 g of normal saline by gavage, once daily for 28 days; the blank group was not intervened. Behavioral assessments were performed after intervention. ELISA was used to detect the levels of peripheral blood total immunoglobulin E (IgE). HE staining was used to observe the pathological changes of nasal mucosa epithelium in rats, while immunohistochemistry was used to detect the expression of transmembrane protein 16A (TMEM16A) and mucin 5AC (MUC5AC) protein in nasal mucosa. Western Blot was used to detect the expression of nuclear factor kappa B (NF- κ B) protein, and RT-PCR was used to detect the expression of TMEM16A, MUC5AC, and NF- κ B mRNA in nasal mucosa.

Results HE staining showed that the nasal mucosa epithelial cell structure in the blank group was intact without shedding, swelling, or necrosis; the nasal mucosa epithelial tissue of rats in the model group was thickened and partially shed, with infiltration of eosinophils and lymphocytes visible; the pathological changes in nasal mucosa tissue of rats in the high- and low-dose *Bimin Formula* groups were improved, and more improvement was shown in the high-dose group. Compared with those in the blank group, the behavioral scores and peripheral blood total IgE levels of rats in the model group significantly increased, as well as the expression of TMEM16A, MUC5AC, and NF- κ B proteins and mRNA in nasal mucosa ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with those in the model group, the behavioral scores and peripheral blood total IgE levels of rats in the high-dose *Bimin Formula* group decreased, and the expression of TMEM16A, MUC5AC, and NF- κ B proteins and mRNA in nasal mucosa also decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the behavioral scores and peripheral blood total IgE levels of rats in the low-dose *Bimin Formula* group were reduced, and the expression of TMEM16A and MUC5AC proteins and mRNA in nasal mucosa, as well as the expression of NF- κ B protein decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but the difference in NF- κ B mRNA expression was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with the low-dose *Bimin Formula* group, the expression of NF- κ B protein in the high-dose group decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** *Bimin Formula* may improve the symptoms and high mucus secretion of AR lung-spleen *qi* deficiency by regulating the TMEM16A/NF- κ B/MUC5AC signaling pathway in nasal mucosa.

Keywords allergic rhinitis; lung-spleen *qi* deficiency syndrome; *Bimin Formula* (鼻敏方); transmembrane protein 16A; nuclear factor kappa B; mucin 5AC; high mucin secretion

(收稿日期: 2023-10-17; 修回日期: 2023-12-15)

[编辑: 邓媛]