

基于过敏性鼻炎免疫途径探讨镰形棘豆总黄酮调控 Toll 样受体的作用机制

郭敏^{1,2,3}, 李晓东^{1,2}, 黄聪琳¹, 王晓琳^{1,2}, 顾立萍² (1. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃省中医药研究院, 甘肃 兰州 730050; 3. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 基于过敏性鼻炎(AR)免疫途径探讨镰形棘豆总黄酮调控 Toll 样受体的作用机制。**方法** 将 50 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组, 分别为空白组、模型组、西替利嗪组及镰形棘豆总黄酮组低、高剂量组。除空白组外, 其余 4 组大鼠采用卵蛋白(OVA)制作过敏性鼻炎模型, 西替利嗪组及镰形棘豆总黄酮组低、高剂量组分别给予西替利嗪($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、镰形棘豆总黄酮(0.47 、 $1.87\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 按生药计)灌胃 2 周。HE、免疫组化染色观察各实验组大鼠鼻黏膜组织变化; ELISA 法测定血清中转化生长因子(TGF)- γ 、白细胞介素(IL)-2 及 IL-4 含量; Western Blot 法检测鼻黏膜中 TLR2、TLR4 蛋白表达。**结果** 与空白组比较, 模型组行为学评分增加($P<0.01$), 差异有统计学意义; 鼻黏膜纤毛及上皮细胞脱落, 基底膜增厚, 炎性细胞浸润, TLR2、TLR4 阳性细胞增多; 血清 IL-2($P>0.05$)、TGF- γ 含量降低($P<0.05$)、IL-4 含量升高($P<0.05$); 鼻黏膜 TLR2、TLR4 蛋白的表达增强($P<0.01$), 差异有统计学意义。与模型组比较, 西替利嗪组($P<0.01$)、镰形棘豆总黄酮低剂量组($P<0.05$)、镰形棘豆总黄酮高剂量组($P<0.01$)行为学评分均降低, 差异有统计学意义; 各药物组鼻黏膜组织结构均改善、炎性浸润减少、TLR2、TLR4 阳性细胞减少; 西替利嗪组、镰形棘豆总黄酮高剂量组血清 TGF- γ 含量升高($P<0.05$)、IL-4 含量降低($P<0.05$), 差异有统计学意义; 镰形棘豆总黄酮低剂量组血清 IL-2 和 TGF- γ 含量升高, IL-4 含量降低, 但差异无统计学意义($P>0.05$); 西替利嗪组、镰形棘豆总黄酮高剂量组鼻黏膜 TLR2、TLR4 蛋白表达减弱($P<0.05$), 差异有统计学意义。**结论** 镰形棘豆总黄酮对 卵清蛋白诱导的过敏性鼻炎具有改善作用且与剂量正相关, 可能是通过调节 TLR2 和 TLR4 蛋白表达及 Th1/Th2 平衡影响机体免疫。

关键词: 镰形棘豆总黄酮; 过敏性鼻炎; Toll 样受体; 免疫功能; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)11-1657-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.11.009

Regulation Mechanism of the Total Flavone in Oxytropis Falcate Bunge on Toll-like Receptor Based on Allergic Rhinitis Immune Pathway

GUO Min^{1,2,3}, LI Xiaodong^{1,2}, HUANG Conglin¹, WANG Xiaolin^{1,2}, GU Liping² (1. Gansu Provincial Hospital of TCM, Lanzhou 730050 Gansu, China; 2. Gansu Provincial Academy of TCM, Lanzhou 730050 Gansu, China; 3. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000 Gansu, China)

Abstract: **Objective** To explore the regulation mechanism of the total flavone in Oxytropis falcate Bunge (TFO) on Toll-like receptor based on allergic rhinitis (AR) immune pathway. **Methods** 50 Wistar rats were randomly divided into five groups: blank group (A), AR model group (B), cetirizine group (C), low-dose TFO group (D), high-dose TFO group (E). Except group A, the other four groups were made AR models by ovalbumin (OVA). Group C, D and E were given cetirizine ($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and TFO (0.47 , $1.87\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) by intragastric administration for 2 weeks,

收稿日期: 2021-04-30

作者简介: 郭敏, 女, 副主任药师, 医学硕士, 研究方向: 中(藏)药活性筛选。Email: 610672144@qq.com。

基金项目: 甘肃省引导科技创新发展竞争性专项(甘财科[2017]168号); 甘肃省卫生行业专项(GSWSKY2018-46); 甘肃省中医药科研项目(GZK-2018-54, GZK-2018-55)。

the histomorphologic changes in the nasal mucosa of rats were observed by HE and immunohistochemical staining. The serum levels of IFN- γ , IL-2 and IL-4 were detected by ELISA, and the expression of TLR2 and TLR4 in nasal mucosa was detected by Western Blot. **Results** Compared with group A, the behavioral score was increased in model groups ($P < 0.01$). Desquamated nasal mucosa cilia and epithelial cells, thickened basement membrane and infiltrated inflammatory cells were observed. The positive rates of TLR2 and TLR4 increased, serum levels of IL-2 ($P > 0.05$), IFN- γ decreased ($P < 0.05$), levels of IL-4 increased ($P < 0.05$), and the expression of TLR2 and TLR4 in nasal mucosa increased significantly ($P < 0.01$). Compared with group B, the behavioral scores of group C ($P < 0.01$), group D ($P < 0.05$) and group E ($P < 0.01$) were all decreased. The tissue structure of nasal mucosa was improved, inflammatory infiltration was decreased, and the positive rates of TLR2 and TLR4 were decreased in each drug group. The levels of IFN- γ in group C and group E were significantly increased ($P < 0.05$), and the levels of IL-4 were significantly decreased ($P < 0.05$). Moreover, the levels of IL-2 and IFN- γ in group D were increased, and the levels of IL-4 were decreased ($P > 0.05$). The expressions of TLR2 and TLR4 in the nasal mucosa of group C and group E were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** TFO can improve OVA-induced AR and the effect was positively correlated with the dose. It may affect the immune response by regulating the TLR2, TLR4 protein expression and Th1/Th2 balance.

Keywords: Total flavone in *Oxytropis falcate* Bunge (TFO); allergic rhinitis (AR); Toll-like receptor; immune function; rats

过敏性鼻炎(AR)是一种慢性气道炎症性疾病,其发病率高达40%,在过去的20年间增加了1倍^[1-3]。从临床角度而言,过敏性鼻炎的主要特征是鼻部和眼部症状,如眼睛和鼻子发痒、鼻塞、打喷嚏、流鼻涕、眼睛发红和流泪,若不加控制,可能会引起哮喘合并症,对情绪、睡眠、社交活动、工作产生不利影响,生命质量明显受损。

镰形棘豆是藏医“三大抗炎药”之一,为藏族习用药材,总黄酮为其抗炎作用的药效部位^[4]。本项目组前期研究^[5-7]表明:镰形棘豆总黄酮具有非特异性抗炎作用、非特异性免疫调节作用,对免疫抑制小鼠具有免疫增强效应,且与剂量正相关,可调节慢性支气管炎中细胞因子的失衡。本实验以镰形棘豆总黄酮为研究对象,通过考察其对过敏性鼻炎模型大鼠行为、鼻黏膜组织结构、相关因子的影响,初步揭示藏药镰形棘豆对过敏性鼻炎的治疗作用和临床应用潜力。

1 材料与方法

1.1 动物 Wistar大鼠50只,雌雄各半,SPF级,8周龄,体质量(200 ± 20)g,兰州大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(甘)2018-0002,动物质量合格证号:62000800000308,饲养于温度为(22 ± 2)℃、相对湿度为(60 ± 5)%的环境下。实验经甘

肃中医药大学动物伦理委员会批准,批准号:2019-084。

1.2 药物及试剂 镰形棘豆总黄酮按前期方法^[7]制备。卵清蛋白(OVA),美国Sigma公司,批号:A5503;氢氧化铝,分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司,批号:20190603;盐酸西替利嗪片,苏州东瑞制药有限公司,批号:H19980014; β -actin(批号:GB12001)、HRP标记山羊抗小鼠(批号:GB23301)、HRP标记山羊抗大鼠(批号:GB23302)、HRP标记驴抗山羊(批号:GB23404),均购自武汉塞维生物技术有限公司;IL-4、IL-2、IFN- γ 试剂盒,购自武汉博士德生物工程有限公司,批号:06/2019。

1.3 仪器 PL-203电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;neofuge 13R冷冻离心机,上海heal force公司;Ci-L显微镜,日本Nikon公司;TS800酶标仪,美国Biotech公司;DYCZ-24DN双垂直电泳仪、DYCZ-40D转印电泳仪,北京六一生物科技有限公司;Alpha Ease FC灰度分析软件,美国Alpha Innotech公司;Adobe PhotoShop图像分析软件,美国Adobe公司。

1.4 分组及给药方法 50只Wistar大鼠,采用随机数字法分为2组(空白组10只、造模组40只)。除空白组外,其余大鼠制备过敏性鼻炎模型。模型复制结束后,造模组再随机分为模型组、西替利嗪

组、镰形棘豆总黄酮低剂量组、镰形棘豆总黄酮高剂量组，每组 10 只。按照“实验动物与人体表面积等效量换算比例”计算给药量，镰形棘豆总黄酮低、高剂量组和西替利嗪组分别灌胃予以镰形棘豆总黄酮(0.47、1.87 g·kg⁻¹，按生药计)和西替利嗪(1 mg·kg⁻¹)，空白组和模型组给予等体积的生理盐水灌胃，每日 1 次，连续 2 周。

1.5 过敏性鼻炎模型复制 参照并改良相关报道^[8-9]中的方法，复制过敏性鼻炎模型。①基础致敏：配制卵清蛋白溶液，每 100 mL 生理盐水含 0.03 g 卵清蛋白和 3 g 氢氧化铝；每只大鼠腹腔注射 1 mL，隔日 1 次，共 7 次。②鼻腔激发：基础致敏后，以 3% 卵清蛋白溶液双侧滴鼻，每侧鼻孔每日 1 次，每次 50 μL，连续 8 d。③维持阶段：模型复制成功后给药期间，以 1% 卵清蛋白溶液双侧滴鼻，每侧鼻孔每日 1 次，每次 50 μL，直至实验结束。

1.6 行为学评分 在鼻腔末次激发后 30 min 观察行为学指标并评分^[10]。大鼠行为学评分 > 5 分，且与空白组比较，差异有统计学意义，说明模型复制成功。评分标准见表 1。

表 1 过敏性鼻炎行为学评分标准

Table 1 Behavioral scoring criteria for AR

评分/分	喷嚏/个	流涕	鼻痒/次
0	无	无	无
1	1 ~ 3	流到鼻前孔	轻度挠鼻 1 ~ 4
2	4 ~ 10	流出鼻孔	中度挠鼻 5 ~ 10
3	> 11	涕流满面	重度挠鼻 > 11

1.7 血清 IFN-γ、IL-2 和 IL-4 水平测定 各组大鼠末次给药后，乙醚麻醉，使用一次性真空采血管(分离胶/促凝剂)腹主动脉取血，以 800×g 离心 15 min，分离血清，采用定量 ELISA 法测定血清 IFN-γ、IL-2 和 IL-4 含量。

1.8 鼻黏膜组织病理学检查 脱臼处死大鼠，沿矢中线向下剪开鼻骨，暴露并取出鼻中隔，分离两侧鼻黏膜组织，用 4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，组织切片。分别进行 HE、免疫组化染色，观察大鼠鼻黏膜组织病理学改变。

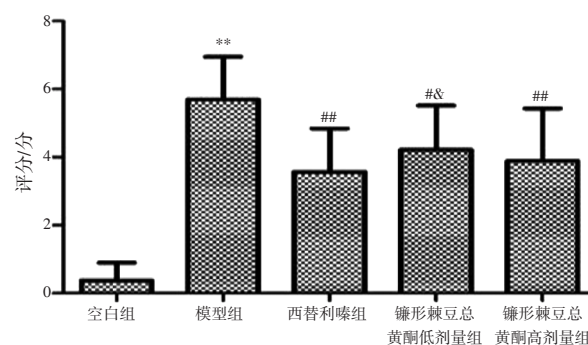
1.9 Western Blot 法检测过敏性鼻炎模型大鼠鼻黏膜组织 TLR2、TLR4 蛋白表达 提取各组大鼠鼻黏膜总蛋白，于 4 ℃、10 000×g 离心 10 min，以 BCA 试剂盒对蛋白进行定量分析。各组蛋白调整至等浓度后，100 ℃中加热 10 min 进行蛋白变性；随后进行

SDS-PAGE 电泳分离、转膜；5% 脱脂奶粉室温封闭；分别加入 TLR2、TLR4 抗体(1:1 000)，4 ℃孵育过夜；TBST 洗膜，加入相应 HRP 标记二抗稀释液(1:3 000)，室温避光孵育 1 h；TBST 洗膜，ECL 发光试剂盒发光，凝胶成像系统采集图像。以 ImageJ 软件计算灰度值，以目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值的比值作为该蛋白的相对表达水平，进行统计分析。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计学处理，实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析，方差齐采用 LSD 法，方差不齐采用 Dunnett T3 法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学评分比较 结果见图 1。模型组行为学叠加评分为(5.70±1.25)分，与空白组(0.38±0.52)分比较，明显升高，差异有统计学意义($P < 0.01$)，表明过敏性鼻炎模型复制成功。治疗后，与过敏性鼻炎模型组比较，西替利嗪组($P < 0.01$)及镰形棘豆总黄酮低($P < 0.05$)、高剂量组($P < 0.01$)行为学评分均降低，分别为(3.57±1.27)、(4.22±1.30)和(3.89±1.54)分，差异均有统计学意义。与西替利嗪组比较，镰形棘豆总黄酮高剂量组行为学评分与之相近，差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与西替利嗪组比较，# $P < 0.05$

图 1 各组大鼠行为学评分图

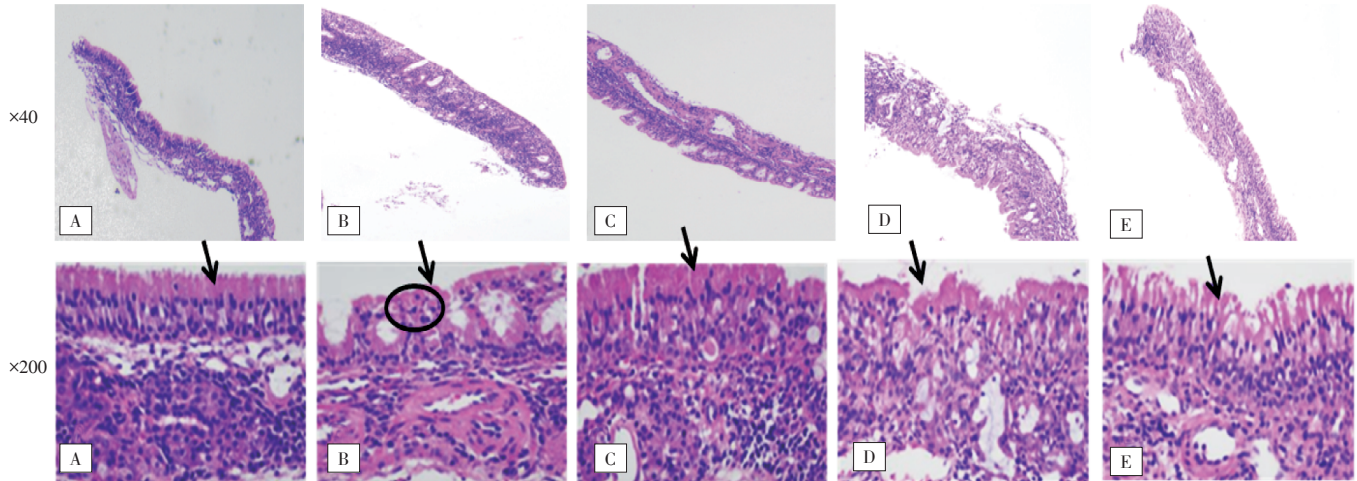
Figure 1 Behavior score map of rats in each group

2.2 各组大鼠鼻黏膜组织病理学比较 HE 染色结果(图 2)显示：过敏性鼻炎模型大鼠鼻黏膜上皮细胞部分脱落，固有层增厚，炎性细胞浸润。给药后，与模型组比，西替利嗪组有少量炎性细胞浸润，水肿减轻；镰形棘豆总黄酮组鼻黏膜组织结构明显恢

复, 偶见炎性浸润。免疫组化染色结果(图 3~4)显示: 与空白组比较, 过敏性鼻炎模型组 TLR2、TLR4 阳性细胞(棕黄色颗粒)增加, 给药后, 与模型组比, 西替利嗪组及镰形棘豆总黄酮低、高剂量组

TLR2、TLR4 阳性细胞减少。

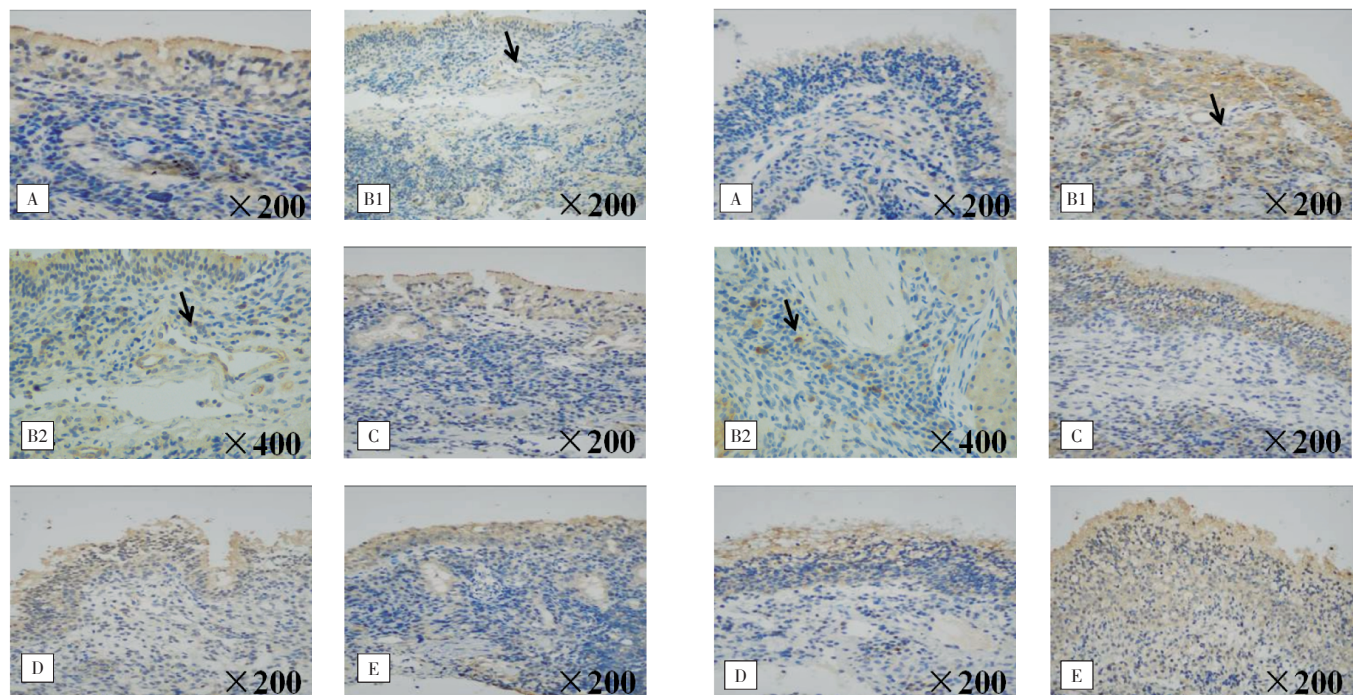
2.3 各组大鼠血清中 IL-2、IFN- γ 及 IL-4 水平比较 结果见图 5。与空白组比较, 模型组血清中 IL-2 含量降低($P>0.05$), 但差异无统计学意义;



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 西替利嗪组; D, 镰形棘豆总黄酮低剂量组; E, 镰形棘豆总黄酮高剂量组。A 中箭头所示黏膜完整; B 中箭头所示黏膜纤毛及上皮细胞脱落, 圆圈所示基底层增厚; C 中箭头所示黏膜趋于完整; D 中箭头所示纤毛及上皮细胞少量脱落; E 中箭头所示黏膜结构趋于完整

图 2 各组大鼠鼻黏膜 HE 染色图

Figure 2 HE staining of nasal mucosa from each group of rats



注: A, 空白组; B1、B2, 模型组; C, 西替利嗪组; D, 镰形棘豆总黄酮低剂量组; E, 镰形棘豆总黄酮高剂量组。B1、B2 中箭头所示为阳性细胞

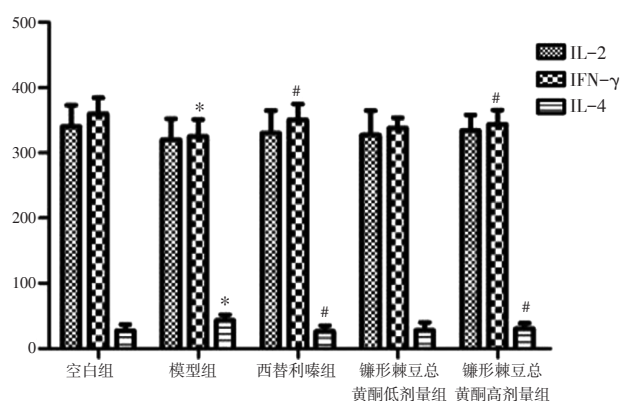
图 3 各组大鼠鼻黏膜免疫组化染色图(TLR2)

Figure 3 Immunohistochemical staining of the nasal mucosa from each group of rats(TLR2)

图 4 各组大鼠鼻黏膜免疫组化染色图(TLR4)

Figure 4 Immunohistochemical staining of the nasal mucosa from each group of rats(TLR4)

IFN- γ 含量降低 ($P < 0.05$)、IL-4 含量升高 ($P < 0.05$)，差异有统计学意义。药物治疗后，与模型组比，西替利嗪组血清中 IL-2 含量升高 ($P > 0.05$)，但差异无统计学意义；INF- γ 含量升高 ($P < 0.05$)、IL-4 含量降低 ($P < 0.05$)，差异有统计学意义。与模型组比，镰形棘豆总黄酮低剂量组血清 IL-2、INF- γ 含量有升高趋势，IL-4 含量有降低趋势，但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。镰形棘豆总黄酮高剂量组血清中 IL-2 含量较模型组有升高趋势 ($P > 0.05$)，但差异无统计学意义；INF- γ 含量较模型组升高 ($P < 0.05$)，IL-4 含量较模型组降低 ($P < 0.05$)，差异均有统计学意义。与西替利嗪组比，镰形棘豆总黄酮低、高剂量组 IL-2、INF- γ 及 IL-4 含量与之相近，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

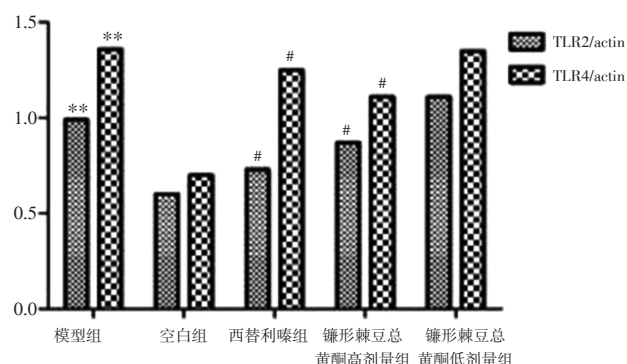
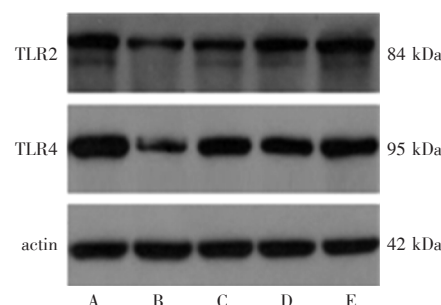
图 5 各组大鼠血清细胞因子水平

Figure 5 Levels of serum cytokines in rats of each group

2.4 各组大鼠鼻黏膜组织中 TLR2、TLR4 蛋白表达比较 结果见图 6。与空白组比较，模型组大鼠鼻黏膜组织中 TLR2、TLR4 蛋白的表达明显增强 ($P < 0.01$)，差异有统计学意义。药物治疗后，与模型组比较，西替利嗪组、镰形棘豆总黄酮高剂量组鼻黏膜组织中 TLR2、TLR4 蛋白表达减弱，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；镰形棘豆总黄酮低剂量组鼻黏膜组织中 TLR2、TLR4 蛋白表达与模型组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与西替利嗪组比较，镰形棘豆总黄酮低、高剂量组 TLR2、TLR4 蛋白表达与之相近，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

免疫细胞对炎症介质的浸润和释放在过敏性疾病的发生发展中起着至关重要的作用，T 淋巴细胞是过敏反应的关键免疫细胞，尤其是 Th1 和 Th2^[11]。过敏



注：A，模型组；B，空白组；C，西替利嗪组；D，镰形棘豆总黄酮高剂量组；E，镰形棘豆总黄酮低剂量组。与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$

图 6 过敏性鼻炎鼻黏膜中 TLR2、TLR4 蛋白检测结果

Figure 6 WB results of TLR2 and TLR4 in nasal mucosa

性鼻炎发生时，Th2 细胞被抗原激活，产生 Th2 细胞因子；Th1 细胞功能被抑制，细胞因子分泌减少，从而，Th1 和 Th2 之间的动态平衡被打破^[12]。Th2 细胞细胞因子，如 IL-4，是促进 B 淋巴细胞产生特殊的免疫球蛋白 E (IgE)^[13]。随后，肥大细胞被激活，产生脱颗粒反应，并分泌过敏性介质，包括炎症细胞因子、组胺、趋化因子和花生四烯酸衍生物，导致炎症细胞随后发生急性或慢性鼻黏膜炎症^[14]。Toll 样受体作为免疫与炎症通路的枢纽因子，可以调节 Th1 和 Th2 之间的动态平衡，影响过敏性鼻炎的发生发展。

临床上过敏性鼻炎的治疗通常采用抗过敏疗法，用药以抗组胺药和鼻内皮质类固醇为主，这些药物尽管能有效改善部分过敏症状，均不能治愈过敏。此外，长期使用此类药物可能会产生明显的副作用，因此寻找安全、有效的自然药物已成为医药界关注的热点。

本研究结果显示，镰形棘豆总黄酮与阳性药西替利嗪均可改善过敏性鼻炎模型大鼠鼻黏膜结构，可明显降低行为学评分 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；升高血清

中 IL-2、INF- γ 含量,降低 IL-4 水平($P<0.05$);减弱鼻黏膜组织中 TLR2、TLR4 蛋白的表达($P<0.05$)。以上结果表明,镰形棘豆总黄酮有可能是通过调节 TLR2 和 TLR4 蛋白表达、纠正 Th1 和 Th2 之间的动态平衡达到对过敏性鼻炎的治疗效果。

本实验结果与本项目组前期研究成果^[5-7]一致,进一步验证了镰形棘豆总黄酮的抗炎、调节失衡的免疫功能作用,对过敏性鼻炎的中医药临床防治具有一定参考意义。本项目组将在以后的实验研究中,进一步对其抗过敏性鼻炎作用机制进行继续探索。

参考文献:

- [1] ZHANG Y, ZHANG L. Increasing prevalence of allergic rhinitis in China[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2019, 11(2): 156-169.
- [2] LAMBRECHT B N, HAMMAD H. The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis[J]. Nat Immunol, 2017, 19; 18 (10): 1076-1083.
- [3] MIN Y G. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of allergic rhinitis[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2010, 2(2): 65-76.
- [4] 才让草,李魁,杨红岩,等.藏药莪大夏的研究进展[J].中国药事,2018,32(8):1069-1072.
- [5] 郭敏,张丽,姜华.藏药镰形棘豆鼠李柠檬素对免疫抑制小鼠非特异性免疫功能的影响[J].中国中医药信息杂志,2015,22(5): 57-59.
- [6] 姜华.镰形棘豆鼠李柠檬素抗炎免疫作用及对治疗慢性支气管炎的机制研究[Z].甘肃省,甘肃省中医院,2017-03-10.
- [7] 郭敏,王晓琳,黄聪琳,等.镰形棘豆总黄酮提取工艺的比较研究[J].西部中医药,2014,27(2): 34-35.
- [8] YASAR M, SAVRANLAR Y, KARAMAN H, et al. Effects of propolis in an experimental rat model of allergic rhinitis[J]. Am J Otolaryngol, 2016, 37(4): 287-293.
- [9] 苗明三,项丽玲,苗艳艳.变应性鼻炎动物模型制备规范(草案)[J].中草药,2018,49(1): 50-57.
- [10] 彭波,凌艳君.鼻敏宁颗粒对变应性鼻炎大鼠行为及鼻黏膜组织形态的影响[J].湖南中医杂志,2021,37(8): 178-180
- [11] BERNSTEIN D I, SCHWARTZ G, BERNSTEIN J A. Allergic rhinitis: mechanisms and treatment[J]. Immunol Allergy Clin North Am, 2016, 36(2): 261-278.
- [12] COSMI L, LIOTTA F, MAGGI L, et al. Role of type 2 innate lymphoid cells in allergic diseases[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2017, 17(10): 66.
- [13] GAO W, XIONG Y, LI Q. Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: a journey from molecular to nano therapeutics[J]. Frontiers in Physiology, 2017, 8: 508.
- [14] 彭冲,易浪,吕彦军,等.青藤碱对FLS增殖及 $\alpha 7nAChR$ 、TLR2和TLR4表达的影响[J].中药新药与临床药理,2016,27(4): 503-508.

(编辑:修春)