

· 经典名方 ·

小青龙汤对变应性鼻炎小鼠 IL-33/ST2 信号通路的影响

张嘉骏¹, 贺雪成¹, 刘沁东¹, 徐玮祯¹, 闫亚杰², 周敏², 阮岩^{2*}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510004)

[摘要] 目的:探讨小青龙汤对鸡卵清白蛋白(OVA)诱导的变应性鼻炎(AR)小鼠的治疗作用及对白细胞介素-33(IL-33)/IL-1受体样2(ST2)信号通路的影响。**方法:**72只雌性SPF级BALB/c小鼠随机分为正常组、模型组、氯雷他定组(2.05 mg·kg⁻¹)、小青龙汤高、中、低剂量(20.02、10.01、5.005 g·kg⁻¹)组。除正常组外,其余各组小鼠腹腔注射OVA溶液造成基础致敏,而后OVA溶液滴鼻激发致敏造成AR模型。每日局部滴鼻前30 min给药1次,正常组和模型组按20 mL·kg⁻¹给与磷酸盐缓冲液(PBS),共7 d。记录末次OVA溶液滴鼻后10 min内小鼠打喷嚏和挠鼻的次数。给药7 d后收集血液,取小鼠鼻骨并脱钙制作病理切片。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清OVA特异性免疫球蛋白E(OVA-sIgE)、白细胞介素-4(IL-3)、白细胞介素-5(IL-4)、白细胞介素-13(IL-13)含量;苏木素-伊红(HE)染色观察鼻黏膜组织形态,糖原(PAS)染色观察鼻黏膜杯状细胞增生情况,吉姆萨(Giemsa)染色观察鼻黏膜嗜酸性粒细胞浸润情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测鼻黏膜IL-33、ST2、IL-1受体辅助蛋白(IL-1RAP)蛋白表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠打喷嚏,挠鼻次数显著升高($P<0.01$),鼻黏膜水肿增厚,出现杯状细胞增生和嗜酸性粒细胞浸润,血清中OVA-sIgE、IL-4、IL-5、IL-13水平显著升高($P<0.01$),鼻黏膜组织IL-33、ST2、IL-1RAP蛋白表达均有明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。给药后,与模型组比较,高剂量小青龙汤组小鼠打喷嚏,挠鼻次数降低($P<0.01$),鼻黏膜病理情况改善,血清中OVA-sIgE、IL-4、IL-5、IL-13水平降低($P<0.01$),鼻黏膜组织IL-33、ST2、IL-1RAP蛋白的表达均有明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**小青龙汤对于OVA致敏AR小鼠有治疗作用,其作用可能与其调节IL-33/ST2信号通路及2型T辅助细胞(Th2)炎症因子,从而减轻Th2型免疫反应,缓解鼻黏膜损伤有关。

[关键词] 变应性鼻炎; 小青龙汤; 2型T辅助细胞(Th2); 白细胞介素-33(IL-33); IL-1受体样2(ST2)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)14-0013-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220806

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220218.1704.006.html>

[网络出版日期] 2022-02-21 17:47

Effect of Xiao Qinglongtang on IL-33/ST2 Signaling Pathway in Mice with Allergic Rhinitis

ZHANG Jiajun¹, HE Xuecheng¹, LIU Qindong¹, XU Weizhen¹, YAN Yajie², ZHOU Min², RUAN Yan^{2*}

(1. First College of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006,

China; 2. First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine,

Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic effect of Xiao Qinglongtang (XQLT) on ovalbumin (OVA)-induced allergic rhinitis (AR) in mice and its effect on the interleukin-33 (IL-33)/suppression of tumorigenicity 2 (ST2) signaling pathway. **Method:** Seventy-two female BALB/c mice of SPF grade were randomly divided into a control group, a model group, a positive control group (loratadine, 2.05 mg·kg⁻¹), and low-, medium-, and high-dose (5.005, 10.01, 20.02 g·kg⁻¹) XQLT groups. All mice except for those in the control group were sensitized by intraperitoneal injection of OVA solution, and the AR model

[收稿日期] 2021-11-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(8197151813);广东省基础与应用基础研究基金项目(2021A1515110444)

[第一作者] 张嘉骏,在读博士,从事鼻病的临床和实验研究,E-mail:zjjhero@qq.com

[通信作者] *阮岩,博士,教授,主任医师,从事鼻病的临床和实验研究,E-mail:ruanyan63@163.com

was induced by intranasal drops of OVA solution. Thirty minutes before local intranasal drops, drugs were administered once, and mice in the control group and the model group received phosphate buffered saline (PBS) at $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 7 days. After the last intranasal drop of OVA solution, the times of sneezing and nasal rubbing of mice within 10 min was recorded. After drug administration for 7 days, blood samples were collected, and nasal bones of mice were decalcified for the preparation of pathological sections. The content of OVA-specific immunoglobulin E (OVA-sIgE), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), and interleukin-13 (IL-13) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Hematoxylin-eosin (HE) staining, periodic acid-Schiff (PAS) staining, and Giemsa staining were used to observe the pathological changes, goblet cell hyperplasia, and eosinophil infiltration of nasal mucosa, respectively. Western blot was used to detect the expression levels of IL-33, ST2, and IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAP) in nasal mucosa. **Result:** Compared with the control group, the model group showed increased times of sneezing and nasal rubbing ($P < 0.01$), edema and thickening of nasal mucosa, goblet cell hyperplasia and eosinophil infiltration, increased serum levels of OVA-sIgE, IL-4, IL-5 and IL-13 ($P < 0.01$), and increased protein expression of IL-33, ST2, and IL-1RAP in nasal mucosa ($P < 0.05, P < 0.01$). After drug administration, compared with the model group, the high-dose XQLT group showed reduced times of sneezing and nasal rubbing ($P < 0.01$), improved pathological conditions of nasal mucosa, reduced serum levels of OVA-sIgE, IL-4, IL-5, and IL-13 ($P < 0.01$), and declining protein expression of IL-33, ST2, and IL-1RAP in nasal mucosa ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** XQLT has a therapeutic effect on OVA-sensitized AR mice, and the mechanism may be related to the regulation of the IL-33/ST2 signaling pathway and Th2 inflammatory cytokine to reduce Th2 inflammatory response and alleviate nasal mucosal injury.

[Keywords] allergic rhinitis; Xiao Qinglongtang; T helper cell type 2 (Th2); interleukin-33 (IL-33); suppression of tumorigenicity 2 (ST2)

变应性鼻炎(AR),又称为过敏性鼻炎,是一种由免疫球蛋白E(IgE)介导的免疫反应驱动的常见的非感染性慢性炎症性鼻病,常易合并支气管哮喘、过敏性结膜炎、鼻窦炎等疾病。该疾病的典型症状是鼻痒、打喷嚏、流清涕和鼻塞,部分患者甚至出现眼痒、皮肤痒、咳嗽等临床表现^[1-3]。目前为止,AR的发病机制尚未完全阐明,其主要的发病因素有遗传、环境以及感染因素等。在AR发病机制的众多学说中,1型T辅助细胞(Th1)/2型T辅助细胞(Th2)细胞因子的失衡在AR发病机制中占主导地位。白细胞介素-33(IL-33)是IL-1细胞因子家族的成员,是一种组织来源核细胞因子,作为Th2导向的细胞因子,能促进2型T辅助细胞因子的产生,特别是白细胞介素-5(IL-4)、白细胞介素-13(IL-13)^[4-7]。IL-33通过其受体IL-1受体样2(ST2)和联合受体IL-1受体辅助蛋白(IL-1RAP)激活过敏性炎症相关的嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞和2组先天淋巴细胞(ILC2),在2型免疫反应中发挥重要作用^[8-10]。临床研究发现,AR患者鼻黏膜上皮中IL-33和ST2的表达显著升高^[11-12],应用皮质类固醇治疗可以降低IL-33与ST2的表达,减轻AR

的症状。

鼽者,鼻出清涕也。中医将AR称之为鼻鼽。一般认为本病为本虚标实之证,主要病机为外感风寒,肺失宣降^[13-14]。肺开窍于鼻,当疾病表现在鼻部时,则出现鼻息不利——鼻塞,津液不能自收——流清涕、打喷嚏^[15-16]。根据六经辨证理论,外感风寒,内有停饮,当治在太阳^[17]。小青龙汤出自于张仲景的《伤寒论》。原本用于外寒里饮的喘咳之症。在现代的应用中,常用于治疗肺气虚寒型AR^[18-20]。实验研究发现,小青龙汤对AR小鼠有改善鼻黏膜病理形态,降低卵清白蛋白-特异性免疫球蛋白E(OVA-sIgE)和Th2细胞因子的分泌,减轻鼻黏膜炎症的作用^[21-24]。本实验通过OVA致敏建立AR小鼠模型,以IL-33/ST2信号通路和Th2炎症因子为切入点,探讨小青龙汤治疗AR的效应机制是否与起调控IL-33/ST2通路有关,为临床应用小青龙汤治疗AR提供科学依据。

1 材料

1.1 动物及饲料 雌性BALB/c小鼠(SPF级)72只,体质量18~22g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0010。饲养于

广州中医药大学第一附属医院动物房,伦理委员会编号TCMF1-2020020。

1.2 药物 小青龙汤组成为麻黄9 g(批号0106931)、白芍9 g(批号0069181)、细辛3 g(批号0069481)、干姜9 g(批号0100701)、炙甘草9 g(批号0069221)、桂枝9 g(批号0105201)、五味子9 g(批号0109431)、法半夏9 g(批号0092081)。购于广东一方制药有限公司。经广州中医药大学中药学院黄海波教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》标准,可用于动物实验。氯雷他定片(拜耳医药有限公司,批号JS13459,国药准字H10970410)。

1.3 试剂 OVA粉末(美国Sigma-Aldrich公司,批号A5503-5G Lot#SLBQ9036V);苏木素-伊红(HE)染液套装、瑞士吉姆萨染液套装、糖原(PAS)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1003、G1009、G1008);RIPA裂解液、BCA蛋白测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、ECL显影液(碧云天生物技术有限公司,批号分别为Lot No.020521210315、Lot No.122120210310、Lot No.030421210402、Lot No.052021210908);山羊抗兔IL-33、ST2、IL-1RAP抗体(英国Affinity公司,批号分别为Lot#44c1378、Lot#34k3470、Lot#12a6294);山羊抗兔甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Abcam公司,批号GR3346940-1);小鼠OVA-sIgE、IL-4、IL-5、IL-13定量酶联免疫吸附剂测定法(ELISA)试剂盒(江莱生物科技有限公司,批号分别为20210312、20210312、20210401、20210401)。

1.4 仪器 Eclipse E100型尼康正置光学显微镜(日本Nikon公司);Pannoramic MIDI型数字病理切片扫描系统(3D HISTEC公司),CS-15R型冷冻离心机(美国Beckman公司);Mini-PROTEAN Tetra+ Mini Trans-Blot小型垂直电泳转印系统(美国Bio-Rad公司);1510型全波长多功能酶标仪(美国Thermo Scientific公司);OSE-Y50型第三代变速组织研磨器[天根生化科技(北京)有限公司]。

2 方法

2.1 分组及给药 72只小鼠随机分为正常组、模型组、氯雷他定组、小青龙汤低、中、高剂量组,每组12只。除正常组外小鼠在第1、8、15天腹腔注射含25 μg OVA和2 mg氢氧化铝的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液200 μL 造成基础致敏后,于第22天使用含1 000 μg OVA的PBS 40 μL (20 μL /侧)进行滴鼻,滴鼻1周后造成AR模型^[25-27]。根据体表面积法换

算,小鼠的等效剂量比值为9.1,正常成人体质量按60 kg计^[28],则小鼠每日的用药量为10.01 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。此为小青龙汤中剂量组浓度。则小青龙汤低剂量和高剂量分别为5.005、20.02 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。在每日滴鼻激发30 min前,小青龙汤高、中、低剂量组分别按上述剂量给与中药浓煎液,正常组和模型组小鼠按20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予PBS;阳性药组按0.52 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予氯雷他定片剂水溶液灌胃;灌胃每日1次,共7 d。动物饲养期间自由饮食及饮水。

2.2 标本采集 小鼠麻醉后摘眼球取血,采血后处死小鼠,并将部分小鼠的鼻骨连同上颌骨从头骨上分离下来,投入4%多聚甲醛溶液里固定12 h后,置于乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙液脱钙,脱钙结束后进行相应包埋切片等后续处理。剩余小鼠将鼻骨分离后,沿中线剪开,将鼻中隔暴露,并将双侧鼻中隔及上下鼻甲上附着的鼻黏膜分离下来,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于后续的检测。

2.3 指标检测

2.3.1 小鼠打喷嚏和挠鼻次数计数 每组小鼠每次OVA溶液滴鼻激发后10 min内小鼠打喷嚏和挠鼻的次数。

2.3.2 鼻黏膜组织病理学观察 鼻骨经EDTA脱钙液脱钙4周后进行石蜡包埋,包埋后切成5 μm 的病理切片,随后进行脱蜡处理,并进行常规HE及吉姆萨和PAS染色。HE染色用于观察小鼠鼻黏膜形态结构;PAS染色用于观察鼻黏膜中杯状细胞数量,吉姆萨染色用于观察鼻黏膜中嗜酸性粒细胞浸润情况。

2.3.3 OVA-sIgE、IL-4、IL-5、IL-13检测 取血后室温静置1 h,再于离心机上4 $^{\circ}\text{C}$,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径7 cm),取上清液。根据ELISA试剂盒说明书检测血清OVA-sIgE、IL-4、IL-5、IL-13水平。

2.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测鼻黏膜IL-33、ST2、IL-1RAP蛋白表达水平 将小鼠的鼻黏膜加入RIPA裂解液200 μL 并用电动匀浆器充分裂解;BCA法测定样品蛋白含量并根据上样量进行配平;上样后记可开始电泳(浓缩胶电压为80 V,跑至分离胶时调为120 V,条带跑至底部时即停止);随后开始电转(300 mA,70 min);电转结束后,PVDF膜置于5%脱脂牛奶溶液,摇床上室温封闭120 min;TBST洗膜后置于一抗稀释液(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。次日,TBST漂洗10 min,漂洗3次后置于二抗稀释液(1:1万)中4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床室温孵

育90 min;TBST再漂洗3次,时间同前,最后显影。显影结果用Image J软件进行灰度值分析。

2.4 统计学处理 使用SPSS 25.0软件进行数据处理,所有数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,若数据满足正态性和方差齐性,各组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),各组间的两两比较采用Bonferroni检验方法,方差不齐则采用Dunnett's *t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对AR小鼠打喷嚏和挠鼻的影响 在OVA溶液滴鼻激发1周后,与正常组比较,模型组小鼠打喷嚏和挠鼻次数显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,氯雷他定组和小青龙汤高、中、低剂量组的打喷嚏、挠鼻次数均显著下降($P<0.01$)。见表1。

表1 小青龙汤对AR小鼠打喷嚏、挠鼻次数的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

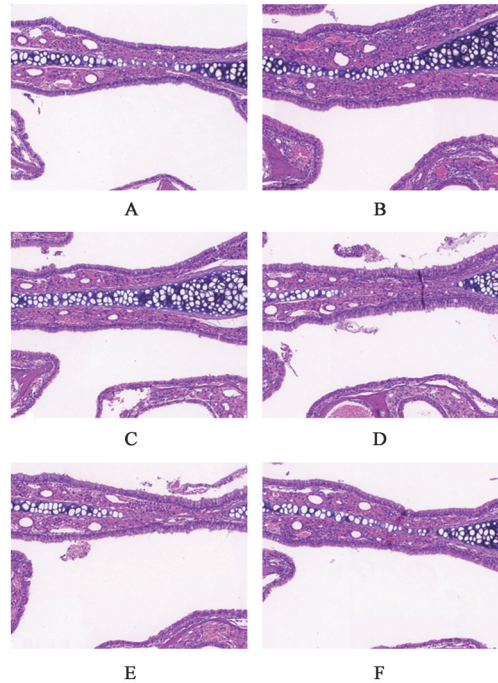
Table 1 Effect of Xiao Qinglongtang (XQLT) on sneezing and nasal rubbing in mice with AR ($\bar{x}\pm s, n=8$) 次

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	打喷嚏次数	挠鼻次数
正常组		17.80±3.85	9.30±1.98
模型组		88.40±9.61 ²⁾	36.90±7.97 ²⁾
氯雷他定组	2.05×10 ⁻³	40.60±9.38 ⁴⁾	15.90±3.52 ⁴⁾
小青龙汤低剂量组	5.005	57.50±11.19 ⁴⁾	18.80±6.21 ⁴⁾
小青龙汤中剂量组	10.01	34.38±7.19 ⁴⁾	20.30±4.03 ⁴⁾
小青龙汤高剂量组	20.02	28.63±3.11 ⁴⁾	16.50±6.12 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2和表3同)

3.2 对AR小鼠鼻黏膜病理变化的影响 最终染色结果显示,正常组小鼠的鼻黏膜组织结构完整,黏膜纤毛整齐,上皮细胞排列规则,无明显嗜酸性粒细胞浸润及杯状细胞增生。模型组小鼠鼻黏膜充血水肿,细胞排列紊乱,可见嗜酸性粒细胞浸润和杯状细胞增生。氯雷他定组小鼠鼻黏膜各层结构基本正常,稍有充血水肿,无明显杯状细胞产生和嗜酸性粒细胞浸润。小青龙汤低、中、高剂量组黏

膜各层亦基本完整,黏膜充血水肿较模型组改善,部分区域见嗜酸性粒细胞浸润和杯状细胞增生。见图1-图3。



注:A.正常组;B.模型组;C.氯雷他定组;D.小青龙汤低剂量组;E.小青龙汤中剂量组;F.小青龙汤高剂量组(图2-图4同)

图1 小青龙汤对AR小鼠鼻黏膜组织病理变化的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of XQLT on pathological changes of Nasal mucosa tissue in mice with AR (HE,×200)

3.3 对AR小鼠血清OVA-sIgE、IL-4、IL-5、IL-13表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清中的OVA-sIgE、IL-4、IL-5、IL-13含量显著增高($P<0.01$),表明用OVA刺激的AR小鼠的模型成功,同时Th2型免疫反应明显,Th2炎症因子分泌增加。与模型组比较,阳性药氯雷他定和低、中、高剂量小青龙汤均能降低血清中OVA-sIgE、IL-4、IL-5、IL-13的浓度($P<0.01$)。见表2。

3.4 对AR小鼠IL-33、ST2、IL1RAP蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠鼻黏膜组织IL-33、

表2 小青龙汤散对小鼠血清Th2细胞因子表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of XQLT on expression of Th2 cytokines in serum of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	OVA-sIgE/ $\mu g\cdot L^{-1}$	IL-4/ $ng\cdot L^{-1}$	IL-5/ $ng\cdot L^{-1}$	IL-13/ $ng\cdot L^{-1}$
正常组	7		0.90±0.02	12.52±2.52	11.21±1.57	13.05±3.43
模型组	7		2.41±0.10 ²⁾	31.91±6.78 ²⁾	32.21±4.12 ²⁾	31.57±5.01 ²⁾
氯雷他定组	7	2.05×10 ⁻³	1.16±0.02 ⁴⁾	16.40±3.40 ⁴⁾	11.97±1.28 ⁴⁾	14.44±1.81 ⁴⁾
小青龙汤低剂量组	6	5.005	1.61±0.09 ⁴⁾	21.43±3.50 ⁴⁾	22.27±2.65 ⁴⁾	18.46±2.54 ⁴⁾
小青龙汤中剂量组	7	10.01	1.40±0.06 ⁴⁾	17.38±2.54 ⁴⁾	13.51±2.41 ⁴⁾	15.55±0.76 ⁴⁾
小青龙汤高剂量组	7	20.02	1.44±0.04 ⁴⁾	19.12±7.39 ⁴⁾	11.51±1.31 ⁴⁾	12.72±1.95 ⁴⁾

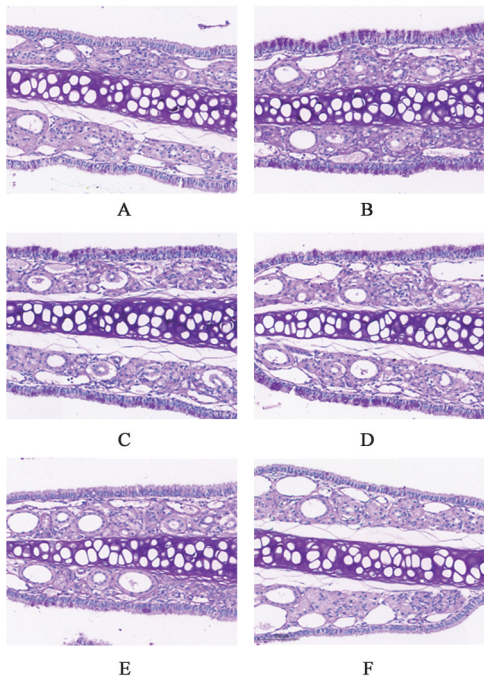


图2 小青龙汤对AR小鼠鼻黏膜组织病理变化的影响(PAS, ×400)
Fig. 2 Effect of XQLT on pathological changes of nasal mucosa tissue in mice with AR (PAS, ×400)

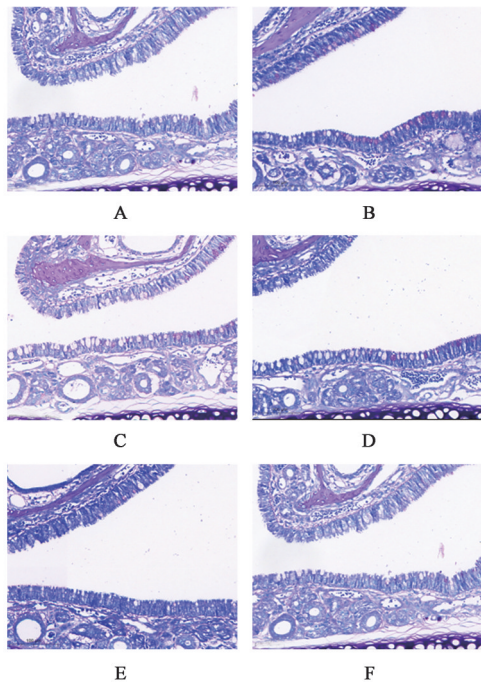


图3 小青龙汤对AR小鼠鼻黏膜组织病理变化的影响(瑞士吉姆萨, ×400)
Fig. 3 Effect of XQLT on pathological changes of nasal mucosa tissue in mice with AR (Giemsa, ×400)

ST2、IL-1RAP 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。而与模型组比较, 氯雷他定组小鼠的 IL-33、ST2 蛋白表达有所降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。而在小青龙汤各剂量组中, 以小青龙汤高剂量组的调

控最为明显, 与模型组比较, IL-33、ST2、IL-1RAP 3 种蛋白均能下调其表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其次是中剂量组, ST2、IL-1RAP 蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而低剂量小青龙汤组, 与模型组比较, 仅 ST2 表达下降 ($P < 0.05$)。见图4、表3。

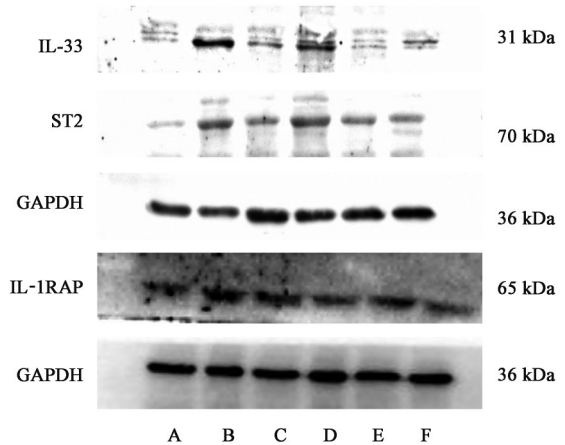


图4 各组小鼠鼻黏膜组织 IL-33、ST2、IL-1RAP 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of IL-33, ST2 and IL-1RAP protein expression in nasal mucosa tissue of AR mice

表3 小青龙汤对小鼠 IL-33、ST2、IL-1RAP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of XQLT on IL-33, ST2 and IL-1RAP protein expression in nasal mucosa of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-33 /GAPDH	ST2 /GAPDH	IL-1RAP /GAPDH
正常组		0.32±0.11	0.16±0.10	0.35±0.09
模型组		0.82±0.16 ²⁾	0.71±0.15 ²⁾	0.64±0.14 ¹⁾
氯雷他定组	2.05×10 ⁻³	0.37±0.19 ³⁾	0.35±0.05 ⁴⁾	0.39±0.16
小青龙汤低剂量组	5.005	0.73±0.23	0.44±0.12 ³⁾	0.49±0.11
小青龙汤中剂量组	10.01	0.54±0.20	0.39±0.05 ³⁾	0.36±0.17 ³⁾
小青龙汤高剂量组	20.02	0.36±0.09 ³⁾	0.28±0.15 ⁴⁾	0.33±0.13 ⁴⁾

4 讨论

IL-33 在多种人体组织内皮细胞和上皮细胞中丰富表达, 当细胞坏死或组织受损时 IL-33 被动释放。ST2 是 IL-33 的特异性受体, 在 Th2 细胞、ILC2s 及其他免疫细胞如肥大细胞、嗜碱性细胞、嗜酸性细胞等细胞表面选择性稳定表达。IL-33 通过与细胞表面的 ST2 结合, 同时募集 IL-1RAP, 使 IL-1RAP 与 ST2L 形成异二聚体复合物, 从而导致细胞内的信号级联反应, 激活嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞等免疫反应相关的炎症细胞, 在 2 型先天免疫中发挥重要作用^[29-32]。在 AR 的发病过程中, 当变应原反复刺激鼻黏膜, 导致鼻黏膜上皮细胞受损或坏死并释放 IL-33, 并与各种免疫细胞表面的 ST2

受体结合激活 IL-33/ST2 信号转导通路,从而促进炎症细胞的增殖、活化并释放 Th2 炎症细胞因子^[31,33]。

对于 AR 的动物模型,实验研究发现,小鼠价格低廉,易于操作,对变应原刺激敏感,因此较豚鼠和大鼠使用更为广泛^[34-35]。同时,对于变应原的选择,常见的有甲苯二异甲苯二异氰酸酯(TDI)、OVA、尘螨致敏。其中,以 OVA 联合氢氧化铝佐剂建立 AR 模型的方法使用最为广泛,具有经济可靠和易于复制的优点。因此,此方法被国内外研究人员广泛认可和采用^[27,35]。本实验中,采用 OVA 联合氢氧化铝佐剂建立小鼠 AR 模型。激发阶段持续 1 周后,计算末次 OVA 溶液刺激小鼠鼻腔 10 min 内打喷嚏和挠鼻的次数,以此来评价鼻敏感症状的严重程度。同时,检测小鼠外周血 OVA-sIgE 的水平,用于评价 OVA 刺激的 AR 模型的成功与否。此外,血清中 IL-4、IL-5、IL-13 的水平直接反映了 Th2 型免疫反应的严重程度。而对于局部的观察,使用 HE、PAS 和 Giemsa 染色观察鼻黏膜组织的病理情况。其中,HE 用于观察鼻骨和鼻黏膜的总体情况,PAS 和 Giemsa 染色分别观察鼻黏膜中杯状细胞增生和嗜酸性粒细胞的情况。综合病理染色的结果,可用于判断鼻黏膜具体的炎症表现^[18]。最后,则对于各组小鼠 IL-33/ST2 通路的变化进行了初步的检测。

小青龙汤原方由麻黄、桂枝、干姜、细辛、芍药、五味子、半夏、甘草 8 味药组成,具有解表散寒、温肺化饮的功效。现代应用中,小青龙汤多用于支气管哮喘、支气管炎、AR、肺心病、慢性阻塞性肺病等呼吸系统疾病。对于在 AR 的应用,国家中医药管理局《鼻渊(变应性鼻炎)中医临床路径》,“十三五”规划教材《中医耳鼻喉科学》都将小青龙汤列为治疗肺气虚寒型鼻渊的代表方剂,临床应用取得较好的疗效。在关于小青龙汤的前期的实验研究中发现小青龙汤可降低 AR 小鼠血清特异性 IgE,抑制 Th2 细胞因子合成与释放,具有抗组胺的作用。本实验中,不仅再次验证了小青龙汤对于 AR 小鼠 Th2 炎症反应的抑制作用,还试图对其作用机制进行探讨,经研究发现,小青龙汤可抑制 AR 小鼠鼻黏膜内 IL-33 及其特异性受体 ST2 和 IL-1RAP 蛋白的表达,从而抑制 IL-33/ST2 通路及其信号级联反应,减少其激活后所激活的 Th2 炎症因子。

综上所述,小青龙汤能够改善 AR 小鼠的免疫反应,改善其鼻黏膜的病理损伤。其治疗作用可能是通过调节 IL-33/ST2 通路及 Th2 炎症因子的表达

来缓解鼻黏膜的炎症反应有关。本实验为临床应用小青龙汤治疗 AR 的作用机制提供了一定的事实依据。同时,本研究也存在一定的不足之处,如对于 IL-33/ST2 通路的下游没有进一步的验证,对于 IL-33/ST2 通路影响的肥大细胞、嗜酸性粒细胞和 2 组先天淋巴细胞没有进行更直观的观察和检测。因此,这将是下一步研究的方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BOUSQUET J, ANTO J M, BACHERT C, et al. Allergic rhinitis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1):95.
- [2] INCORVAIA C, CAVALIERE C, FRATI F, et al. Allergic rhinitis [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2018, 32(Suppl 1):61-66.
- [3] 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.
- [4] DATTAGUPTA A, IMMANENI S. ST2: Current status [J]. Indian Heart J, 2018, 70(Suppl 1):S96-S101.
- [5] ZHANG L, JIANG L L, CAO Z W. Interleukin-33 promotes the inflammatory reaction in chronic rhinosinusitis with nasal polyps by NF- κ B signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(20):4501-4508.
- [6] DE GROVE K C, PROVOOST S, BRAUN H, et al. IL-33 signalling contributes to pollutant-induced allergic airway inflammation [J]. Clin Exp Allergy, 2018, 48(12):1665-1675.
- [7] ZOLTOWSKA NILSSON A M, LEI Y, ADNER M, et al. Mast cell-dependent IL-33/ST2 signaling is protective against the development of airway hyperresponsiveness in a house dust mite mouse model of asthma [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018, 314(3):L484-L492.
- [8] LI D, GUABIRABA R, BESNARD A G, et al. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice [J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 134(6):1422-1432. e11.
- [9] KOTSIUO O S, GOURGOULIANIS K I, ZAROGIANNIS S G. IL-33/ST2 axis in organ fibrosis [J]. Front Immunol, 2018, 9:2432.
- [10] 孟欣, 张晓敏, 戴启刚, 等. IL-33/ST2 信号转导通路与过敏性鼻炎的研究进展 [J]. 中华中医药杂志,

- 2015,30(6):2032-2035.
- [11] LAM E P, KARIYAWASAM H H, RANA B M, et al. IL-25/IL-33-responsive Th2 cells characterize nasal polyps with a default Th17 signature in nasal mucosa [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137(5): 1514-1524.
- [12] ZHENG R, CHEN Y, SHI J, et al. Combinatorial IL-17RB, ST2, and TSLPR signaling in dendritic cells of patients with allergic rhinitis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:207.
- [13] 谢慧. 变应性鼻炎的中医治疗 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2016, 30(4):22-25.
- [14] 刘静. 基于整体观念变应性鼻炎的中医辨证论治 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2017, 31(3):28-30.
- [15] 李鸣婧, 张晓阳. 变应性鼻炎中医临床辨证研究现状与思考 [J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(7): 1635-1637.
- [16] 忻耀杰, 滕磊, 魏慈芸, 等. 变应性鼻炎的中医诊疗心悟 [J]. *中国中西医结合耳鼻喉科杂志*, 2018, 26(3):163-165.
- [17] 刘敏, 程发峰, 王庆国, 等. 基于六经辨证的变应性鼻炎诊治思路 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(1): 17-19.
- [18] 郭晓黎, 任小宁. 小青龙汤治疗肺气虚寒型变应性鼻炎 27 例临床观察 [J]. *云南中医中药杂志*, 2019, 40(5):60-61.
- [19] 潘虹. 小青龙汤治疗变应性鼻炎临床观察 [J]. *中医药临床杂志*, 2018, 30(7):1326-1328.
- [20] 刘铮, 阮岩. 中医健康管理联合小青龙汤治疗儿童变应性鼻炎临床研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(4):1846-1849.
- [21] 郑永艳, 周园, 周联, 等. 小青龙汤抗过敏作用及其机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(5):1052-1055.
- [22] 杨荣刚, 阮岩, 潘增烽, 等. 小青龙汤对变应性鼻炎小鼠胸腺基质促淋巴细胞生成素及 Th2 细胞因子的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(8):1758-1761.
- [23] PAN Z, ZHOU Y, LUO X, et al. Against NF- κ B/thymic stromal lymphopoietin signaling pathway, catechin alleviates the inflammation in allergic rhinitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 61: 241-248.
- [24] 邓楠, 杜欣, 李长香, 等. 小青龙汤对变应性鼻炎小鼠树突状细胞的影响 [J]. *中南药学*, 2020, 18(3): 458-461.
- [25] XU H, OHGAMI N, SAKASHITA M, et al. Intranasal levels of lead as an exacerbation factor for allergic rhinitis in humans and mice [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 148(1):139-147. e10.
- [26] PAN Z, ZHOU Y, LUO X, et al. Against NF- κ B/thymic stromal lymphopoietin signaling pathway, catechin alleviates the inflammation in allergic rhinitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 61: 241-248.
- [27] 叶茂宇, 谭国林. 变应性鼻炎小鼠造模方法研究进展 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 54(9): 712-716.
- [28] 黄娟萍, 罗裕, 江力, 等. 中药药动学研究中给药剂量的现状分析 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(21):1685-1689.
- [29] CHAN B, LAM C, TAM L S, et al. IL33: Roles in allergic inflammation and therapeutic perspectives [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:364.
- [30] LIEW F Y, GIRARD J P, TURNQUIST H R. Interleukin-33 in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(11):676-689.
- [31] CHEN W Y, TSAI T H, YANG J L, et al. Therapeutic strategies for targeting IL-33/ST2 signalling for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(1): 349-358.
- [32] MOLOFSKY A B, SAVAGE A K, LOCKSLEY R M. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation [J]. *Immunity*, 2015, 42(6):1005-1019.
- [33] LOTT J M, SUMPTER T L, TURNQUIST H R. New dog and new tricks: Evolving roles for IL-33 in type 2 immunity [J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 97(6): 1037-1048.
- [34] 赖其廷, 曾军. 变应性鼻炎动物模型的研究进展 [J]. *国际呼吸杂志*, 2009, 29(17):1086-1088.
- [35] 张永靖. 变应性鼻炎动物模型的研究进展 [J]. *内蒙古医学杂志*, 2014, 46(6):693-696.

[责任编辑 周冰冰]