

鼻渊舒口服液对兔慢性鼻-鼻窦炎模型鼻窦黏膜上皮 NF- κ B p65 蛋白表达的影响

李辉¹, 朱天民^{2*}

(1. 成都大学医护学院, 成都 610106; 2. 成都中医药大学, 成都 610075)

[摘要] 目的: 观察兔慢性鼻-鼻窦炎 (chronic rhinosinusitis, CRS) 模型鼻窦黏膜上皮核因子- κ B (NF- κ B) p65 蛋白表达的变化及鼻渊舒口服液对其的影响, 探索鼻渊舒治疗 CRS 的可能机制。方法: 取新西兰大白兔 100 只, 适应性喂养 1 周后, 随机分为正常组、模型组、假手术组、鼻渊舒组、西药治疗组, 每组 20 只, 建立 CRS 模型; 鼻渊舒组、西药治疗组分别给予鼻渊舒口服液 $ig\ 4.05\ g \cdot kg^{-1}$, 克拉霉素 $ig\ 25\ mg \cdot kg^{-1}$, 共 14 d, 处死后取鼻窦黏膜组织 HE 染色光镜观察鼻窦黏膜病理变化, Western blotting 法检测鼻窦黏膜上皮细胞胞质及细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达。结果: 模型组鼻窦黏膜呈慢性炎症表现, 黏膜炎细胞浸润, 上皮细胞、腺体和杯状细胞明显增生; 胞质及细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达较正常组显著增高 ($P < 0.01$)。经鼻渊舒治疗后鼻窦黏膜上皮修复较好, 炎细胞浸润、腺体和杯状细胞增生不明显; 胞浆 NF- κ B p65 蛋白表达虽显著低于模型组 ($P < 0.01$), 但显著高于正常、假手术及西药组 ($P < 0.01$); 胞核 NF- κ B p65 蛋白表达显著低于模型组 ($P < 0.01$), 与正常、假手术及西药组比较无显著性差异。结论: NF- κ B 参与了 CRS 的发生, 鼻渊舒口服液主要通过抑制 NF- κ B p65 向细胞核易位而起治疗作用。

[关键词] 鼻渊舒; 慢性鼻-鼻窦炎; 黏膜上皮; 核因子- κ B p65

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0151-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120113.1030.004 **[网络出版时间]** 2012-01-13 10:30

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120113.1030.004.html>

Influence of Biyuanshu on NF- κ B p65 Expression of Nasal Sinuses Mucosa Epithelial in Rabbit Chronic Rhinosinusitis Model

LI Hui¹, ZHU Tian-min^{2*}

(1. College of Health Care, Chengdu University, Chengdu 610106, China; 2. China College of Acupuncture and Massage, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Biyuanshu (BYS) nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 expression of nasal sinuses mucosa epithelial in rabbit chronic rhinosinusitis (CRS) model, and explore its possible molecular mechanism. **Method:** One hundred New Zealand rabbits were randomly divided into normal group, model group, sham operation group, BYS group, western medicine group, with 20 in each group, and CRS model was established. BYS group was given BYS $4.05\ g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, western medicine group given clarithromycin $25\ mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ for 14 days. Nasal sinuses mucosa tissue was collected to observe nasal sinuses mucosa pathological changes with light microscopy after HE dyeing, and detect nasal sinuses mucosal epithelium cytoplasm and nucleus NF- κ B p65 protein expression with Western Blotting. **Result:** Model group appeared chronic inflammation and inflammatory cell infiltration, epithelial cells and glandular organs and goblet cells were hyperplasia obviously. Nasal sinuses mucosal epithelium cytoplasm and nucleus NF- κ B p65 protein expression was higher than normal group ($P < 0.01$). After the treatment with BYS, the nasal sinuses mucosa epithelium was

[收稿日期] 20110726(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801480,81102621);成都中医药大学科技发展基金项目(ZRYB200945)

[第一作者] 李辉, 博士学位, 副教授, 从事中西医结合康复的实验研究, Tel:13980753275, E-mail: tlihui@163.com

[通讯作者] * 朱天民, 博士学位, 副教授, 从事中西医结合康复的实验与临床研究, Tel:13608216905, E-mail: tmzhu@yahoo.cn

improved, inflammatory cells and glandular organs and goblet cells were not hyperplasia obviously. Nasal sinuses mucosal epithelium cytoplasm NF- κ B p65 protein expression was higher than normal group and sham operation group and western medicine group obviously ($P < 0.01$), nasal sinuses mucosal epithelium nucleus NF- κ B p65 protein expression was lower than model group obviously ($P < 0.01$), but there were no differences among normal group and sham operation group and western medicine group. **Conclusion:** NF- κ B may take part in the development of CRS, BYS and suppress transposing of NF- κ B p65 to cell nucleus.

[**Key words**] Biyuanshu; chronic rhinosinusitis; mucosa epithelial; nuclear factor-kappa B p65

慢性鼻-鼻窦炎 (chronic rhinosinusitis, CRS) 是临床常见病及多发病,其病程长,反复发作,难以治愈,对耳、鼻、咽、喉以及气管、支气管、肺的生理功能均可产生不利影响。鼻渊舒口服液是临床治疗 CRS 的常用中成药,其相关临床研究较多,但关于其治疗 CRS 的机制尚不明了,鲜见相关报道。核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 做为一种细胞内普遍存在的核转录因子,参与了多种基因的转录调控,是调节多种细胞因子和炎性介质表达最为关键的转录因子^[1]。为了探索鼻渊舒治疗 CRS 的机制,笔者观察了其对 CRS 模型鼻窦黏膜上皮 NF- κ B p65 蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 动物 健康新西兰大白兔 100 只,体重 1.5 ~ 3.0 kg,雌雄各半。由四川省实验动物专委会养殖场提供,合格证号 SCXL(川)-2008-14,饲养于成都中医药大学实验动物中心。

1.2 药品、试剂 鼻渊舒口服液(由辛夷、苍耳子、薄荷、白芷、黄芩、栀子、柴胡、细辛、黄芪、川芎、川木通等组成,10 mL/支,每 10 mL 口服液相当于 27 g 原生药)。金黄色葡萄球菌菌液(四川省中医医院细菌培养室制备),克拉霉素分散片(南京瑞尔制药有限公司,批号 090301),鼻渊舒口服液(成都华神集团股份有限公司制药厂,批号 090425),兔 NF- κ B p65 抗体、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(beyotime 公司),脱脂奶粉(完达山),HRP 标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥),化学发光底物(Pierce 公司),PVDF 膜(Millipore 公司),X 光片(柯达公司)、显影液、定影液(乐凯公司)。

1.3 仪器 离心机(Micro Centaur),超低温高速离心机(Sigma 公司),电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),转膜仪(美国 Bio-Rad 公司),水平摇床(北京市六一仪器厂),恒温培养箱(上海医疗仪器器械厂)等。

2 方法

2.1 动物分组 动物适应性喂养 1 周后,按随机数

字表分为 5 组,即正常组、模型组、假手术组、西药治疗组、鼻渊舒组,每组各 20 只。各组均精饲料喂养、自由饮水。

2.2 慢性鼻-鼻窦炎模型的建立

2.2.1 菌种的制备 取门诊慢性鼻-鼻窦炎患者上颌窦穿刺冲洗液进行细菌培养,用 VITEK260 全自动细菌鉴定仪分离筛选出单一菌株金黄色葡萄球菌,接种于血平板上,置于培养箱中 24 h,从血平板收集菌落,用生理盐水稀释成 1 麦氏单位的细菌悬浊液备用。

2.2.2 造模 采用林彬等^[2]报道的窦口不完全堵塞+窦腔留置棉絮的建模方法,建立兔慢性鼻窦炎模型,具体方法如下:整个手术过程在无菌操作的前提下进行。将新西兰兔氯氨酮 50 mg·kg⁻¹ im 麻醉,沿鼻背正中中线切一纵长切口,随机选取一侧上颌窦前壁,分离皮下组织及骨膜。用显微电钻在上颌窦前壁钻开一直径大约 1.5 mm 的孔。取少量棉絮通过上颌窦前壁所钻的小孔,将其置放在窦口及窦腔里,不必完全堵塞窦口。碘伏消毒手术创面,将骨膜、皮肤逐层缝合。术后第 2 天用 1 mL 注射器抽取上述 1 mL 细菌悬浊液,小心通过小孔注入模型组、鼻渊舒治疗组、西药治疗组窦腔内,饲养 42 d,建立 CRS 模型。假手术组手术步骤同上,但不处理窦口及注射细菌。正常组无需任何处理,在正常环境中喂养,自由饮食进水。

2.3 治疗 造模后第 43 天开始,鼻渊舒组 ig 鼻渊舒口服液 1.5 mL·kg⁻¹(相当于 4.05 g·kg⁻¹·d⁻¹原生药),西药组 ig 克拉霉素 25 mg·kg⁻¹,共 14 d。正常、模型、假手术组不给药。

2.4 检测指标

2.4.1 一般情况及症状体征观察 观察各组新西兰兔造模前后及治疗前后的精神状态、毛色、活动情况、进食进水量增减、体重变化及鼻塞、喷嚏、脓涕等主要症状。

2.4.2 鼻窦黏膜组织的病理形态学改变 HE 染色,光学显微镜观察上颌窦黏膜假复层纤毛上皮排

列,腺体分布排列,杯状细胞数量,炎细胞浸润,纤维及骨质增生等病理现象。

2.4.3 胞浆及胞核 NF- κ B p65 蛋白表达的检测

采用 Western blotting 法检测,取血后处死动物,超净台冰盘上取出鼻窦黏膜上皮,经预冷的 PBS 洗涤 2 次,剪碎,参考 Beyotime 公司细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒操作说明,提取胞浆蛋白及胞核蛋白,BAC 法测定蛋白浓度。每个样本取 80 μ g 蛋白,10% SDS-PAGE 电泳,PVDF 膜转印 75 min 后,将膜放入含 10% 脱脂奶粉的 PBST 中封闭,4 $^{\circ}$ C 过夜。胞浆样本以 1:300 的兔 NF- κ B p65 一抗、胞核样本以 1:500 的兔 NF- κ B p65 一抗孵育 2 h 后,加入 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,孵育 1 h 后,化学发光法显色,X 光片摄片。胞质蛋白表达以 β -actin 为内参照,胞核蛋白表达以 Histone 为内参照,以指标条带蛋白的荧光强度/内参蛋白条带的荧光强度表示蛋白相对含量。

2.5 统计方法 采用 SPSS 13.0 统计软件处理实验相关数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况及主要症状体征 适应性喂养至造模前,各组新西兰兔行动敏捷,进食正常,被毛密集而有光泽,鼻、唇部湿润清洁,眼睛明亮,大便正常,无死亡。造模及给药期间,正常组、假手术组动物无死亡,模型组 4 只死亡(均为肺部感染死亡)、鼻渊舒组 2 只兔死亡(均为肺部感染死亡);西药组 2 只兔死亡(1 只灌胃不当死亡,1 只肺部感染死亡)。造模后,除正常组、假手术组外,其余各组陆续普遍出现精神差,行动迟缓,活动减少,进食及饮水量有所下降;鼻塞、喷嚏时发(约 3~4 个/min)、脓涕症状明显。治疗后,鼻渊舒组、西药组鼻塞、喷嚏、脓涕症状消失;模型组从造模成功至处死时,鼻塞、喷嚏、脓涕症状明显;正常组和假手术组,始终无鼻塞、喷嚏、脓涕症状。

3.2 鼻窦黏膜病理形态学改变 正常组及假手术组鼻窦黏膜假复层纤毛上皮结构完整,排列整齐;少量杯状细胞散在分布,黏膜下层无充血及明显炎细胞浸润,腺体数量较少,排列整齐。模型组鼻窦黏膜呈慢性炎症表现,黏膜上皮细胞增生,部分区域可见鳞状上皮化生;上皮细胞之间杯状细胞增生,黏膜下层腺体及纤维组织增生明显,可见明显的淋巴细胞、浆细胞、单核细胞浸润,提示 CRS 模型建立成功。鼻渊舒组鼻窦黏膜上皮修复较好,炎细胞浸润、腺体

和杯状细胞增生不如模型及假手术、西药组明显。假手术组鼻窦黏膜的各项病理变化与鼻渊舒组相似,不如西药组明显。西药组鼻窦黏膜上皮损伤较严重,腺体及杯状细胞增生较鼻渊舒组明显。

3.3 鼻黏膜上皮胞浆及胞核 NF- κ B p65 蛋白表达比较 模型组胞浆及胞核 NF- κ B p65 蛋白表达较正常组显著增高($P < 0.01$);西药组胞浆 NF- κ B p65 蛋白表达较正常组显著降低($P < 0.01$);假手术、西药组胞浆及胞核 NF- κ B p65 蛋白表达较模型组显著降低($P < 0.01$),西药组胞核 NF- κ B p65 蛋白表达显著低于假手术组($P < 0.01$);鼻渊舒组胞浆 NF- κ B p65 蛋白表达显著低于模型组($P < 0.01$),但显著高于正常组、假手术及西药组($P < 0.01$);鼻渊舒组胞核 NF- κ B p65 蛋白表达显著低于模型组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组胞浆及胞核 NF- κ B p65 蛋白表达相对含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	胞浆 NF- κ B p65 表达	胞核 NF- κ B p65 表达
正常	-	20	0.338 \pm 0.034	0.398 \pm 0.018
模型	-	16	0.509 \pm 0.021 ¹⁾	0.810 \pm 0.029 ¹⁾
假手术	-	20	0.323 \pm 0.022 ²⁾	0.414 \pm 0.025 ²⁾
克拉霉素	0.025	18	0.307 \pm 0.027 ^{1,2)}	0.386 \pm 0.027 ^{1,2)}
鼻渊舒	4.05	18	0.387 \pm 0.020 ^{1,2,3)}	0.402 \pm 0.022 ²⁾

注:与正常组及假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与克拉霉素组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

CRS 属中医学“鼻渊”范畴,中医学认为 CRS 的发生系因急性鼻窦炎迁延日久,而致肺脾虚弱,脾虚运化失职,痰湿停聚,滞留鼻窦;肺虚卫外不固,不能抗御外邪,易感受风热、风寒等外邪,终致热毒、湿浊积聚鼻窦,腐蚀鼻窦黏膜而成。鼻渊舒口服液方中苍耳子、辛夷、薄荷、细辛、白芷辛散风邪,芳香通窍。柴胡疏散风热,开郁升阳;黄芩清热燥湿,泻火解毒,配以栀子清热之力更甚。黄芪补气升阳,益卫固表。川芎、川木通祛风活血利湿。诸药同用,清热益气通窍,正合 CRS 之病机。经大量临床研究证实鼻渊舒口服液对成人、儿童急慢性鼻炎、鼻窦炎都有良好的治疗效果^[3]。

NF- κ B 是一个细胞中普遍存在的核转录因子,具有多项转录调节功能,它通过调节免疫和炎症相关因子及炎症递质的表达,在炎症和免疫反应中起枢纽作用^[4]。起始了组织因子、黏附分子(VCAM-1, ICAM-1)、肿瘤坏死因子等多种在炎症中起重要

作用的蛋白表达^[5]。NF- κ B 主要以最具活性的 p50/p65 异源性二聚体形式存在,其 p65 可直接参与基因转录的起始调节,是重要的亚单位^[6]。通常情况下,NF- κ B 与其抑制蛋白(IKB)结合,以无活性的 NF- κ B/IKB 复合物形式存在于细胞质中。当各种细胞外刺激信号激活 IKB 激酶(IKK)时,IKK 将 IKB 磷酸化,磷酸化的 IKB 进而泛素化,被 ATP 依赖性 26S 蛋白酶识别并降解,其与 NF- κ B 的 Rel 同源域(rel-homology domain, RHD)区分离,NF- κ B 核定位信号暴露,易位到细胞核,与多种基因的启动子部位的 kB 位点发生特异性结合^[7],参与相关基因的转录调控和细胞凋亡的调控^[8]。

受 NF- κ B 调控的基因表达产物囊括了大多数参与炎症形成的主要细胞因子和炎症介质,如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素、酶及一些趋化因子、黏附分子、集落刺激因子、诱导型一氧化氮合酶等^[1]。此外,NF- κ B 活化还可抑制中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞凋亡,导致炎症细胞数量异常增加,炎症细胞过度激活后释出大量细胞因子和炎症介质,可造成组织损伤,而组织损伤、大量的促炎细胞因子和炎症介质又可进一步促进 NF- κ B 的活化,形成复杂的网络^[9-10]。李同丽等^[11]发现 NF- κ B 在 CRS 患者黏膜中表达显著增强,且其与 DNA 蛋白结合活性显著增高,提示 CRS 黏膜炎症反应中 NF- κ B 被激活。陈金辉等^[12]研究显示 NF- κ B p65 阳性表达主要分布在 CRS 组织黏膜上皮细胞、炎性细胞、腺上皮细胞及血管内皮细胞胞浆和部分胞核内。

本研究经蛋白免疫印迹检测,发现兔 CRS 模型黏膜上皮胞浆及胞核 NF- κ B p65 蛋白表达较正常组显著增高($P < 0.01$),亦证实 NF- κ B p65 参与了 CRS 黏膜上皮的炎症反应过程;经鼻渊舒口服液治疗后,鼻窦黏膜上皮胞浆及胞核 NF- κ B p65 蛋白表达较模型组显著降低($P < 0.01$),提示鼻渊舒口服液可能通过抑制 NF- κ B p65 蛋白的表达和向细胞核易位而发挥治疗作用。同时,本研究发现一个有趣的现象,即鼻渊舒治疗后胞浆 NF- κ B p65 蛋白表达虽低于模型组,但显著高于正常组、假手术及西药组($P < 0.01$),而胞核 NF- κ B p65 蛋白表达与正常组、假手术及西药组比较无显著性差异。因 NF- κ B 需易位至细胞核与多种基因的启动子和增强子结合,才能调控细胞因子及炎症介质的表达,提示抑制 NF- κ B 向细胞核易位可能在鼻渊舒治疗 CRS 过程

中有重要作用。

总之,本研究证实 NF- κ B 参与了 CRS 的发生;鼻渊舒口服液对 CRS 的治疗作用可能与抑制 NF- κ B p65 蛋白的表达和向细胞核易位有关,其具体机制有待下一步研究。

[参考文献]

- [1] Kim J, Sanders S P, Siekierski E S, et al. Role of NF- κ B in cytokine production induced from human airway epithelial cells by rhinovirus infection[J]. J Immunol, 2000, 165(6):3384.
- [2] 林彬,王挥戈. 窦口不完全堵塞加金黄色葡萄球菌诱导的慢性鼻-鼻窦炎模型[J]. 汕头大学医学院学报, 2004, 17(3):163.
- [3] 梁传余,温蓓,郑艳,等. 鼻渊舒口服液改善慢性鼻窦炎/鼻息肉鼻内镜手术预后的多中心随机对照试验[J]. 中国循证医学杂志, 2004, 4(6):377.
- [4] Pahl H L. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors[J]. Oncogene, 1999, 18:6853.
- [5] 刘政,张玥,郝清智,等. 消栓通脉颗粒对深静脉血栓形成大鼠静脉壁 NF- κ B, I κ B 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20):210.
- [6] Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, et al. Nuclear factor-kappa B p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(12):4136.
- [7] 朱金华,万红娇,熊秋迎,等. 槐定碱对内毒素致小鼠肺损伤的抗氧化作用及对 NF- κ B 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20):182.
- [8] Shin Maeda, Masao Omata. Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappa B activation[J]. Cancer Sci, 2008, 99(5):836.
- [9] Wang C Y, Mayo M W, Korneluk R G, et al. NF-kappa B anti-apoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation[J]. Science, 1998, 281(5383):1680.
- [10] 尹光明,喻田,余志豪. 核因子 kappa B 与体外循环炎症反应[J]. 国外医学:麻醉学与复苏分册, 2004, 25(6):353.
- [11] 李同丽,李源,张革化,等. 慢性鼻-鼻窦炎黏膜组织中核因子- κ B 的表达及其与 DNA 结合活性研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2004, 39(8):489.
- [12] 陈金辉,杨武,陶泽璋,等. NF- κ B p65, I κ B α 在人鼻息肉组织中的表达[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2006, 12(2):96.

[责任编辑 聂淑琴]