

通窍脱敏方介导 Notch 信号通路调控变应性鼻炎大鼠 Th1/Th2 免疫失衡的作用机制

马凤梅¹, 荣婷¹, 马蕴蕾²

(河北省中医院 1.耳鼻咽喉科;2.呼吸重症科,河北 石家庄 050017)

摘要:目的 探讨通窍脱敏方调控变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)大鼠 Th1/Th2 免疫失衡的作用机制。方法 采用鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)混合氢氧化铝制备 AR 大鼠模型,造模成功后将大鼠分为 AR 模型组、阳性对照组(氯雷他定,0.9 mg/kg)、通窍脱敏方低、中、高剂量组(5.54、11.08、22.16 g/kg),另设健康对照组,每组 12 只。造模后,给予相应剂量的氯雷他定和通窍脱敏方灌胃干预,1 次/d,连续 2 周。记录大鼠鼻部症状并评分;采用苏木精-伊红染色观察鼻黏膜组织病理学变化;ELISA 检测血清中 OVA 特异性血清免疫球蛋白(OVA-specific serum immunoglobulin, OVA-sIg)E、IgG1 水平以及鼻灌洗液中 Th1 细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-1、IL-2、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、TNF- β 、干扰素(interferon, IFN)- γ 和 Th2 细胞因子 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 水平;流式细胞术检测血清中 Th1/Th2 细胞比率;采用 qRT-PCR 法和 Western blotting 法检测鼻黏膜组织中 Notch1、Notch1 胞内域(Notch1 intracellular domain, NICD)、Hes1 mRNA 和蛋白表达水平。结果 与健康对照组相比,AR 模型组大鼠鼻黏膜组织损伤严重,鼻部症状评分明显升高($P < 0.05$);血清中 OVA-sIgE、IgG1 水平以及鼻灌洗液中 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 水平显著升高(P 均 < 0.05),血清中 Th1/Th2 细胞比率以及鼻灌洗液中 IL-1、IL-2、TNF- α 、TNF- β 、IFN- γ 水平显著降低(P 均 < 0.05);鼻黏膜组织中 Notch1、NICD、Hes1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高(P 均 < 0.05)。与 AR 模型组相比,阳性对照组和通窍脱敏方各剂量组大鼠鼻黏膜组织病理学改变明显改善,鼻部症状评分明显降低($P < 0.05$);血清中 OVA-sIgE、IgG1 水平以及鼻灌洗液中 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 水平显著降低(P 均 < 0.05),血清中 Th1/Th2 细胞比率以及鼻灌洗液中 IL-1、IL-2、TNF- α 、TNF- β 、IFN- γ 水平显著升高(P 均 < 0.05);鼻黏膜组织中 Notch1、NICD、Hes1 mRNA 和蛋白表达水平显著降低(P 均 < 0.05)。结论 通窍脱敏方和氯雷他定都能调控 Th1/Th2 免疫失衡,改善 AR 大鼠鼻黏膜损伤及炎症,其机制可能与抑制 Notch 信号通路激活有关。

关键词:变应性鼻炎;通窍脱敏方;Th1/Th2;免疫平衡;Notch 信号通路

中图分类号:R765 文献标志码:A

Mechanism of Tongqiao desensitization prescription mediated Notch signaling pathway on regulating Th1/Th2 immune imbalance in allergic rhinitis rats

MA Fengmei¹, RONG Ting¹, MA Yunlei²

(1. Otolaryngology Department; 2. Respiratory Intensive Care Department, Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017, Hebei, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Tongqiao desensitizing prescription in regulating Th1/Th2 immune imbalance in rats with allergic rhinitis (AR). **Method** AR rat model was established using ovalbumin (OVA) emulsified with aluminum hydroxide. Following successful model establishment, the rats were allocated into five groups: model group, positive control group (loratadine, 0.9 mg/kg), Tongqiao desensitizing prescription low, medium, and high dose groups (5.54, 11.08, and 22.16 g/kg respectively), and a healthy control group, with 12 rats

in each group. Post-modeling, loratadine and the Tongqiao desensitizing prescription were administered via oral gavage once daily for two weeks. Nasal symptoms were recorded and scored. Histopathological changes in the nasal mucosa were examined using hematoxylin and eosin (HE) staining. Serum levels of OVA specific serum immunoglobulin (OVA-sIgE) and IgG1, as well as Th1 cytokines (IL-1, IL-2, TNF- α , TNF- β , IFN- γ) and Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) in nasal lavage fluid were quantified by ELISA. The ratio of Th1 to Th2 cells in serum was determined by flow cytometry. Expression levels of Notch1, Notch1 intracellular domain (NICD), and Hes1 mRNA and protein in the nasal mucosa were assessed by qRT-PCR and Western blotting analysis. **Results** Compared with the healthy control group, the nasal mucosal tissue of rats in the model group exhibited pronounced pathological damage, and the nasal symptom scores were significantly elevated ($P < 0.05$). The serum levels of OVA-sIgE and IgG1, as well as the concentrations of IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, and IL-13 in nasal lavage fluid, were markedly increased (all $P < 0.05$). Conversely, the ratio of Th1/Th2 cells in the serum and the levels of IL-1, IL-2, TNF- α , TNF- β , and IFN- γ in nasal lavage fluid were significantly reduced (all $P < 0.05$). Additionally, the mRNA and protein expression levels of Notch1, NICD, and Hes1 in the nasal mucosa were notably upregulated (all $P < 0.05$). In comparison to the model group, the histopathological alterations in the nasal mucosa of rats in both the positive control group and the Tongqiao desensitizing prescription dose groups were substantially ameliorated, with a significant decrease in nasal symptom scores ($P < 0.05$). The serum levels of OVA-sIgE and IgG1, along with the concentrations of IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, and IL-13 in nasal lavage fluid, were markedly decreased (all $P < 0.05$). Moreover, the ratio of Th1/Th2 cells in the serum and the levels of IL-1, IL-2, TNF- α , TNF- β , and IFN- γ in nasal lavage fluid were significantly elevated (all $P < 0.05$). The mRNA and protein expression levels of Notch1, NICD, and Hes1 in the nasal mucosa were also notably downregulated (all $P < 0.05$). **Conclusion** Both Tongqiao desensitizing prescription and loratadine are capable of modulating Th1/Th2 immune imbalance and ameliorating nasal mucosal injury and inflammation in AR rats. The underlying mechanism may involve the inhibition of Notch signaling pathway activation.

Key words: Allergic rhinitis; Tongqiao desensitizing prescription; Th1/Th2; Immune balance; Notch signaling pathway

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是由多种免疫活性细胞等参与的鼻黏膜非感染性炎性疾病,因其症状涉及呼吸障碍、睡眠障碍等多方面问题,严重影响患者的社会交际和日常生活质量^[1-2]。目前对于AR患者的治疗原则是尽量避免过敏原暴露,或是使用抗组胺药物和糖皮质激素,但长期使用这些药物易导致精神、代谢、消化道等多种不良反应^[3]。AR属于中医“鼻鼽”范畴,现代中医学在结合古代文献基础上,已研制出益气温阳方、六君子汤合苍耳子散等多种AR治疗中药自拟方,且效果显著,但其作用机制仍缺乏有效验证^[4-5]。本课题组通过长期临床观察,以“患者脏腑虚损,元阳无火,正气不足,腠理疏松,卫表不固,外邪侵袭,邪聚鼻窍,发为鼻鼽”为中医理论基础,结合AR的患者体征,研制出自拟方“通窍脱敏方”治疗AR,并对其效果和作用机制进行探索。T细胞在变应性疾病中发挥着重要的免疫抑制作用,研究表明,AR与CD4⁺T细胞亚群中Th1/Th2免疫失衡导致的炎性反应相关,调节Th1/Th2细胞因子平衡可治疗AR^[6-8]。本研究采用通窍脱敏方口服干预AR大鼠模型,观察通窍脱敏方介导Notch信号通路调控AR大鼠Th1/Th2的免疫失衡作用机制,以期通窍脱敏方治疗AR提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

72只雄性SPF级SD大鼠购自中国科学院动物研究所,8周龄,体质量200~220g,生产许可证号:SCXK(京)2021-0012。大鼠饲养于独立通风换气系统中,12h/12h明/暗交替,辐照饲料喂养。本研究动物实验伦理相关问题由河北省中医院医学伦理委员会审查通过(批号:HBZY2022-KY042-01)。

1.1.2 药物

通窍脱敏方由苍耳子6g、辛夷9g、白芷12g、薄荷6g、黄芪12g、防风9g、白术12g、当归9g、川芎9g、地龙6g、徐长卿6g、鹿角霜9g、茜草6g、路路通3g、鹅不食草3g、蝉蜕3g、甘草3g组成,为河北省中医院耳鼻喉科科内协定方,由河北省中医院中药房提供,经河北省中医院刘胜春副主任药师鉴定为正品。以上药材使用蒸馏水浸泡40min,先后煎煮2次,40min/次,过滤,并浓缩至每1mL含原药材2g,即生药含量为2g/mL。4℃保存备用。

1.1.3 主要试剂

鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)、氢氧化铝购自

美国 sigma 公司;氯雷他定购自上海先灵葆雅制药有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;OVA 特异性血清免疫球蛋白(OVA-specific serum immunoglobulin, OVA-sIg)E、IgG1 以及白细胞介素(interleukin, IL)-1、IL-2、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、TNF- β 、干扰素(interferon, IFN)- γ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司;CD3⁺、CD4⁺、IFN- γ ⁺、IL-4⁺流式抗体购自美国 Biologend 公司;Notch1 抗体、Notch1 胞内域(Notch1 intracellular domain, NICD)抗体、Hes1 抗体、GAPDH 抗体购自美国 CST 公司。

1.1.4 主要仪器

生物显微镜(型号:DM500)购自德国徕卡公司;酶标仪、流式细胞仪(型号:Multiskan FC、Attune NxT)购自美国 Thermo Fisher 公司;凝胶成像系统、实时荧光 PCR 仪(型号:GelDoc Go、CFX96 Deepwell)购自美国 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立

将 72 只大鼠随机分为健康对照组($n=12$)和 AR 模型组($n=60$)。造模方法如下:将 30 mg OVA 与 3 g 氢氧化铝共同溶解于 100 mL 生理盐水中,每只大鼠每隔 1 d 腹腔注射 1 mL 混悬液,共注射 7 次进行基础致敏;7 d 后,大鼠双侧鼻腔每侧滴入 0.05 mL 的 2% OVA,1 次/d,共 7 次进行滴鼻激发,大鼠出现反复抓鼻、喷嚏、流涕现象,且血清 OVA-sIgE 水平较健康大鼠明显升高即为造模成功^[9]。

1.2.2 分组与给药

将造模成功大鼠随机分为模型组、阳性对照组和通窍脱敏方低、中、高剂量组,每组 12 只。根据药物临床推荐用药剂量[氯雷他定 10 mg/(70kg·d)、通窍脱敏方 123 g/(70kg·d)],按照人与大鼠的单位质量折算系数 6.3 换算大鼠给药剂量,即分组后阳性对照组和通窍脱敏方低、中、高剂量组大鼠分别给予 0.9 mg/kg 的氯雷他定或 5.54、11.08、22.16 g/kg 的通窍脱敏方灌胃干预,而健康对照组和模型组大鼠给予等量生理盐水灌胃干预,1 次/d,连续 2 周。末次给药 24 h 后取材,所有大鼠于取材前 12 h 开始禁食不禁水饲养。

1.2.3 鼻部症状评分

激发结束和末次给药后,观察记录大鼠在 30 min 内抓鼻、打喷嚏、流鼻涕情况,并根据严重程度计

分^[10],总分超过 5 分即为造模成功,评分标准见表 1。

表 1 鼻部症状评分标准

Table 1 Scoring criteria for nasal symptoms		
症状	程度	评分/分
抓鼻	0 次	0
	1~2 次	1
	3~5 次	2
	≥6 次	3
打喷嚏	0 次	0
	1~2 次	1
	3~5 次	2
	≥6 次	3
流鼻涕	无	0
	单鼻孔	1
	双鼻孔	2
	涕流满面	3

1.2.4 采用 HE 染色法检测鼻黏膜组织病理学改变

末次给药后,取大鼠鼻部于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋后连续切片,厚度为 4 μ m,将切片脱蜡,然后按照试剂盒说明书要求操作进行 HE 染色,染色后切片再经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片,于显微镜下 200 倍处观察各组大鼠鼻黏膜组织病变情况。

1.2.5 采用 ELISA 法检测血清 OVA-sIgE、IgG1 含量及鼻腔 Th1、Th2 细胞因子含量

末次给药后麻醉大鼠,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)灌洗双侧鼻腔收集鼻腔灌洗液待测,经腹主动脉取血,3 000 r/min,离心 10 min,分离血清待测。按照 ELISA 试剂盒说明书操作,设置空白孔,酶标仪读取 OD 值并绘制标准曲线,计算大鼠血清中 OVA-sIgE、IgG1 含量以及鼻腔灌洗液中 Th1、Th2 细胞因子含量。

1.2.6 流式细胞术检测全血中 Th1 细胞和 Th2 细胞阳性表达率

末次给药后,取大鼠腹主动脉血加入乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗凝,将 100 μ L 全血和 100 μ L 培养基、1 μ L 刺激液共同加入流式管中培养 4 h,分别加入 CD3⁺、CD4⁺、IFN- γ ⁺、IL-4⁺ 抗体 0.625 μ L/管,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,3 000 r/min,离心 10 min,弃上清,加入红细胞裂解液重悬,再次离心弃上清,加入 200 μ L PBS 重悬后上流式仪检测,分析细胞阳性表达率,CD3⁺ CD4⁺ IFN- γ ⁺ 细胞比率即为 Th1 细胞阳性表达率,CD3⁺ CD4⁺ IL-4⁺ 细胞比率即为 Th2 细胞阳性表达率。

1.2.7 采用 qRT-PCR 法检测鼻黏膜组织中 Notch1、NICD 和 Hes1 mRNA 相对表达量

末次给药后,取大鼠鼻黏膜组织加入 TRIzol 提

取总 RNA,使用逆转录试剂盒合成第一链 cDNA。设计引物序列(表 2),取 2 μ L cDNA 根据 Beyo-Fast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增,扩增条件:95 $^{\circ}$ C 40 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,共 45 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 Notch1、NICD、Hes1 mRNA 与内参 mRNA 的相对表达量。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequence

基因	序列(5'-3')	长度(bp)
Notch1	F:CTGTGTCTGCCGACGCAC	18
	R:CTCGTTCCGGATCAGGAT	19
NICD	F:ACGCTGCTGTTGTGCTCCT	19
	R:GGCAATCGGTCCATGTGAT	19
Hes1	F:CTACCCCAGCCAGTGTC AAC	20
	R:ATGCCGGGAGCTATCTTCT	20
GAPDH	F:ACCACTTTGTCAAGCTCATTTC	23
	R:TGCTGTAGCCAAATTCGTTGTC	22

1.2.8 采用 Western blotting 法检测鼻黏膜组织中 Notch1、NICD 和 Hes1 蛋白相对表达量

末次给药后,取大鼠鼻黏膜组织加入 RIPA 裂解液充分研磨,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μ g 变性后蛋白,经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,然后转移至聚偏氟乙烯膜上脱脂乳封闭 1 h,加入 Notch1(1:1 000 稀释)、NICD(1:1 000 稀释)、Hes1(1:1 000 稀释)、GAPDH(1:1 000 稀释)一抗孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:10 000 稀释)二抗孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次。ECL 化学发光法显影,分析条带灰度值,计算目的蛋白与内参蛋白条带灰度值比值即为 Notch1、NICD、Hes1 蛋白相对表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件。数据均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比

较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 通窍脱敏方对 AR 大鼠鼻部症状的影响

健康对照组、模型组、阳性对照组和通窍脱敏方低、中、高剂量组大鼠鼻部症状评分 6 组间比较,差异有统计学意义($F=65.415, P<0.001$)。与健康对照组相比,模型组大鼠鼻部症状评分显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,阳性对照组以及通窍脱敏方低、中、高剂量组大鼠鼻部症状评分显著降低(P 均 <0.05)。见表 3。

表 3 通窍脱敏方对 AR 大鼠鼻部症状的影响
Table 3 Effect of Tongqiao desensitizing prescription on nasal symptoms in AR rats

组别	评分/分
健康对照组	0.50 \pm 0.55
模型组	7.67 \pm 0.52 [*]
阳性对照组	1.83 \pm 0.75 ^{**}
通窍脱敏方低剂量组	6.33 \pm 0.82 ^{**&}
通窍脱敏方中剂量组	5.33 \pm 1.21 ^{**&}
通窍脱敏方高剂量组	2.67 \pm 1.03 ^{**}

注:^{*} $P<0.05$ vs. 健康对照组;[#] $P<0.05$ vs. 模型组;[&] $P<0.05$ vs. 阳性对照组。

2.2 通窍脱敏方对 AR 大鼠鼻黏膜组织病理学变化的影响

如图 1 所示,健康对照组大鼠鼻黏膜组织纤毛柱状上皮细胞结构清晰,未见明显病理学改变。模型组大鼠鼻黏膜组织上皮细胞增生、水肿、排列紊乱,大量坏死脱落,同时可见炎性细胞浸润。阳性对照组及通窍脱敏方各剂量组大鼠鼻黏膜组织上皮细胞基本排列整齐,未见明显坏死脱落,炎性细胞浸润明显改善。

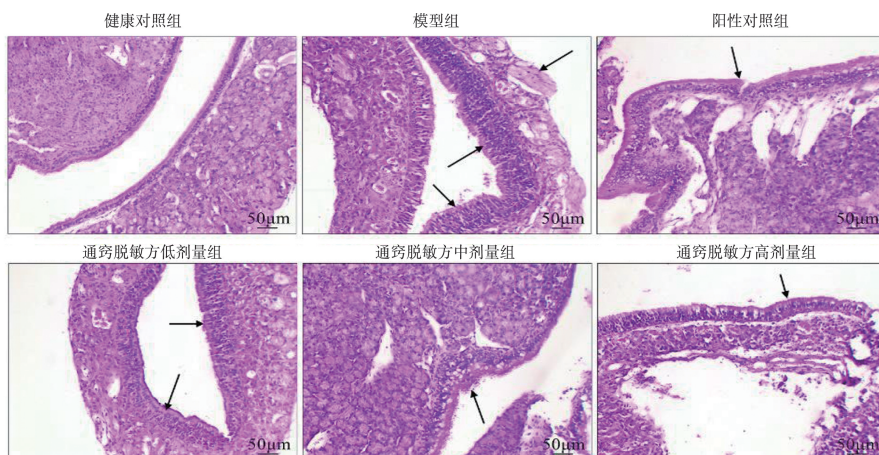


图 1 通窍脱敏方对 AR 大鼠鼻黏膜组织病理学变化的影响(HE 染色, $\times 200$, 箭头所指处为上皮增生、水肿、坏死脱落等病理学改变)
Figure 1 Effect of Tongqiao desensitizing prescription on pathological changes of nasal mucosa in AR rats (HE staining, $\times 200$, the arrow indicates pathological changes such as epithelial hyperplasia, edema, necrosis and shedding)

2.3 通窍脱敏方对 AR 大鼠血清中 OVA-sIgE、IgG1 水平的影响

健康对照组、模型组、阳性对照组和通窍脱敏方低、中、高剂量组大鼠血清中 OVA-sIgE、IgG1 水平 6 组间比较,差异有统计学意义 ($F_{OVA-sIgE} = 195.393$,

$F_{IgG1} = 234.48$, P 均 <0.001)。与健康对照组比较,模型组大鼠血清中 OVA-sIgE、IgG1 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照组以及通窍脱敏方低、中、高剂量组大鼠血清中 OVA-sIgE、IgG1 水平显著降低 (P 均 <0.05)。见表 4。

表 4 通窍脱敏方对 AR 大鼠血清中 OVA-sIgE、IgG1 水平的影响

Table 4 Effect of Tongqiao desensitizing prescription on serum OVA-sIgE and IgG1 levels in AR rats

组别	OVA-sIgE/(pg/mL)	IgG1/(pg/mL)
健康对照组	35.19±2.54	13.42±1.06
模型组	122.70±8.02*	45.55±3.61*
阳性对照组	58.65±4.66*#	16.84±1.03*#
通窍脱敏方低剂量组	111.35±7.16*#&	42.90±2.84*#&
通窍脱敏方中剂量组	87.49±5.90*#&	31.47±2.01*#&
通窍脱敏方高剂量组	65.73±5.01*#&	20.45±1.17*#&

注: * $P < 0.05$ vs. 健康对照组; # $P < 0.05$ vs. 模型组; & $P < 0.05$ vs. 阳性对照组。

2.4 通窍脱敏方对 AR 大鼠鼻灌洗液中 Th1、Th2 细胞因子水平的影响

健康对照组、模型组、阳性对照组和通窍脱敏方低、中、高剂量组大鼠鼻灌洗液中水平 Th1 细胞因子和 Th2 细胞因子水平 6 组间比较,差异有统计学意义 ($F_{IL-1} = 185.492$, $F_{IL-2} = 103.241$, $F_{TNF-\alpha} = 147.303$, $F_{TNF-\beta} = 60.149$, $F_{IFN-\gamma} = 161.515$, $F_{IL-4} = 193.222$, $F_{IL-5} = 221.109$, $F_{IL-6} = 267.128$, $F_{IL-10} = 66.358$, $F_{IL-13} = 133.179$, P 均 <0.001)。与健康对照组比较,模型组大鼠鼻灌

洗液中 Th1 细胞因子 IL-1、IL-2、TNF- α 、TNF- β 和 IFN- γ 水平显著降低 (P 均 <0.01), Th2 细胞因子 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13 水平显著升高 (P 均 <0.01)。与模型组比较,阳性对照组以及通窍脱敏方低、中、高剂量组大鼠鼻灌洗液中 Th1 细胞因子 IL-1、IL-2、TNF- α 、TNF- β 和 IFN- γ 水平显著升高 (P 均 <0.05), Th2 细胞因子 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13 水平显著降低 (P 均 <0.05)。见表 5、6。

表 5 通窍脱敏方对 AR 大鼠鼻灌洗液中 Th1 细胞因子水平的影响

Table 5 Effect of Tongqiao desensitizing prescription on Th1 cytokine levels in nasal lavage fluid of AR rats

组别	IL-1/(pg/mL)	IL-2/(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)	TNF- β /(pg/mL)	IFN- γ /(pg/mL)
健康对照组	22.15±1.16	18.24±1.35	32.12±2.08	83.25±3.72	53.97±3.62
模型组	8.20±0.73*	8.34±0.51*	13.82±1.01*	55.43±2.20*	20.90±1.57*
阳性对照组	20.99±1.36#	18.67±1.10#	33.15±1.83#	78.68±4.30*#	50.52±3.31*#&
通窍脱敏方低剂量组	9.82±0.70*#&	11.22±0.79*#&	16.50±1.12*#&	59.94±2.33*#&	24.66±1.84*#&
通窍脱敏方中剂量组	12.45±1.01*#&	12.41±0.80*#&	20.94±1.46*#&	65.42±3.47*#&	30.46±2.32*#&
通窍脱敏方高剂量组	17.61±1.22*#&	15.26±1.13*#&	27.43±2.02*#&	72.85±3.99*#&	46.70±3.15*#&

注: * $P < 0.05$ vs. 健康对照组; # $P < 0.05$ vs. 模型组; & $P < 0.05$ vs. 阳性对照组。

表 6 通窍脱敏方对 AR 大鼠鼻灌洗液中 Th2 细胞因子水平的影响

Table 6 Effect of Tongqiao desensitizing prescription on Th2 cytokine levels in nasal lavage fluid of AR rats

组别	IL-4/(pg/mL)	IL-5/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)	IL-13/(pg/mL)
健康对照组	13.13±0.78	18.52±1.06	9.52±0.84	63.94±4.16	28.26±1.52
模型组	36.92±2.18*	58.21±3.44*	30.67±1.49*	124.91±8.82*	56.25±3.02*
阳性对照组	18.17±1.32*#	27.01±1.50*#	10.85±0.85#	87.46±5.61*#	31.54±1.89*#
通窍脱敏方低剂量组	33.56±1.97*#&	54.16±3.94*#&	27.79±1.55*#&	114.57±7.70*#&	52.29±2.88*#&
通窍脱敏方中剂量组	25.59±1.85*#&	45.14±2.11*#&	22.78±1.97*#&	102.13±5.48*#&	47.11±2.79*#&
通窍脱敏方高剂量组	21.23±1.06*#&	36.47±1.98*#&	15.77±0.82*#&	90.94±6.12*#	36.61±2.17*#&

注: * $P < 0.05$ vs. 健康对照组; # $P < 0.05$ vs. 模型组; & $P < 0.05$ vs. 阳性对照组。

2.5 通窍脱敏方对 AR 大鼠血清中 Th1/Th2 细胞比率的影响

健康对照组、模型组、阳性对照组和通窍脱敏方

低、中、高剂量组大鼠血清中 Th1/Th2 细胞比率 6 组间比较,差异有统计学意义 ($F_{Th1/Th2} = 200.247$, $P < 0.001$)。与健康对照组相比,模型组大鼠血清中

Th1/Th2 细胞比率显著降低(均 $P < 0.01$)。与模型组相比,阳性对照组以及通窍脱敏方中、高剂量组大

鼠血清中 Th1/Th2 细胞比率显著升高(P 均 < 0.01)。见表 7。

表 7 通窍脱敏方对 AR 大鼠血清中 Th1/Th2 细胞比率的影响

Table 7 Effect of Tongqiao desensitizing prescription on the ratio of Th1/Th2 cells in the serum of AR rats

组别	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ /%	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL-4 ⁺ /%	Th1/Th2
健康对照组	1.54 \pm 0.13	0.40 \pm 0.05	3.96 \pm 0.56
模型组	0.35 \pm 0.04 [*]	5.81 \pm 0.67 [*]	0.06 \pm 0.01 [*]
阳性对照组	1.40 \pm 0.17 ^{*#}	1.06 \pm 0.08 ^{*#}	1.32 \pm 0.23 ^{*#}
通窍脱敏方低剂量组	0.75 \pm 0.06 ^{*#&}	2.85 \pm 0.25 ^{*#&}	0.27 \pm 0.03 ^{*#&}
通窍脱敏方中剂量组	1.03 \pm 0.06 ^{*#&}	2.23 \pm 0.30 ^{*#&}	0.47 \pm 0.06 ^{*#&}
通窍脱敏方高剂量组	1.28 \pm 0.12 ^{*#}	1.55 \pm 0.14 ^{*#&}	0.83 \pm 0.11 ^{*#&}

注: * $P < 0.05$ vs. 健康对照组; # $P < 0.05$ vs. 模型组; & $P < 0.05$ vs. 阳性对照组。

2.6 通窍脱敏方对 AR 大鼠鼻黏膜组织中 Notch1、NICD、Hes1 mRNA 和蛋白表达水平的影响

健康对照组、模型组、阳性对照组和通窍脱敏方低、中、高剂量组大鼠鼻黏膜组织中 Notch1、NICD、Hes1 mRNA 和蛋白表达水平 6 组间比较,差异有统计学意义($F_{\text{Notch1 mRNA}} = 219.906$, $F_{\text{NICD mRNA}} = 243.216$, $F_{\text{Hes1 mRNA}} = 186.983$, $F_{\text{Notch1 蛋白}} = 136.298$, $F_{\text{NICD 蛋白}} =$

96.895, $F_{\text{Hes1 蛋白}} = 70.977$, P 均 < 0.001)。与健康对照组相比,模型组大鼠鼻黏膜组织中 Notch1、NICD、Hes1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高(P 均 < 0.01)。与模型组相比,阳性对照组以及通窍脱敏方低、中、高剂量组大鼠鼻黏膜组织中 Notch1、NICD、Hes1 mRNA 和蛋白表达水平显著降低(P 均 < 0.05)。见图 2,表 8。

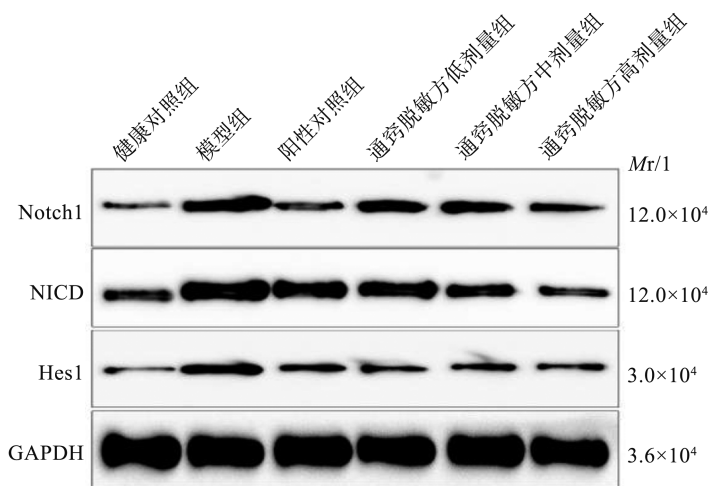


图 2 通窍脱敏方对 AR 大鼠鼻黏膜组织中 Notch1、NICD、Hes1 蛋白表达水平的影响

Figure 2 Effect of Tongqiao desensitizing prescription on Notch1, NICD and Hes1 protein expressions is in nasal mucosa of AR rats

表 8 通窍脱敏方对 AR 大鼠鼻黏膜组织中 Notch1、NICD、Hes1 mRNA 和蛋白表达水平的影响

Table 8 Effect of Tongqiao desensitization prescription on Notch1, NICD, Hes1 mRNA and protein expressions levels in nasal mucosa of AR rats

组别	mRNA			蛋白		
	Notch1	NICD	Hes1	Notch1	NICD	Hes1
健康对照组	1.02 \pm 0.05	1.00 \pm 0.03	1.01 \pm 0.03	0.13 \pm 0.02	0.26 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02
模型组	3.43 \pm 0.28 [*]	2.46 \pm 0.12 [*]	2.81 \pm 0.16 [*]	0.50 \pm 0.04 [*]	0.73 \pm 0.05 [*]	0.38 \pm 0.04 [*]
阳性对照组	1.30 \pm 0.08 ^{*#}	1.09 \pm 0.09 [#]	1.33 \pm 0.12 ^{*#}	0.20 \pm 0.02 ^{*#}	0.48 \pm 0.05 ^{*#}	0.21 \pm 0.02 ^{*#}
通窍脱敏方低剂量组	3.20 \pm 0.22 ^{*#&}	2.30 \pm 0.13 ^{*#&}	2.61 \pm 0.17 ^{*#&}	0.35 \pm 0.03 ^{*#&}	0.54 \pm 0.04 ^{*#&}	0.30 \pm 0.02 ^{*#&}
通窍脱敏方中剂量组	2.37 \pm 0.15 ^{*#&}	1.67 \pm 0.09 ^{*#&}	2.04 \pm 0.16 ^{*#&}	0.30 \pm 0.02 ^{*#&}	0.43 \pm 0.03 ^{*#&}	0.23 \pm 0.03 ^{*#}
通窍脱敏方高剂量组	1.44 \pm 0.13 ^{*#}	1.25 \pm 0.11 ^{*#&}	1.51 \pm 0.09 ^{*#&}	0.23 \pm 0.03 ^{*#}	0.35 \pm 0.03 ^{*#&}	0.20 \pm 0.02 ^{*#}

注: * $P < 0.05$ vs. 健康对照组; # $P < 0.05$ vs. 模型组; & $P < 0.05$ vs. 阳性对照组。

3 讨论

传统中医认为“鼻鼽”的病机主要在寒邪为患、热邪为患、外寒内热、脏腑虚弱等方面,而 AR 的主要病因为内外因相互作用而发。内因为脏腑功能失调即元阳无火及卫气失固,外因为寒邪袭肺或热优肺经,首犯鼻窍,正邪相搏,肺气不利,鼻窍壅塞,津水停留,引起喷嚏或流涕,故治疗 AR 需温补元阳,扶正祛邪^[11]。通窍脱敏方中以苍耳子、辛夷、白芷、薄荷、鹅不食草宣通鼻窍,以黄芪、防风、白术、鹿角霜甘温益气,补肺健脾温肾,以当归、川芎、茜草活血化瘀,以徐长卿、蝉蜕、地龙、路路通疏经通络,辅以甘草调和诸药。此药方药力强大,临床疗效显著,可快速改善患者鼻炎症状,降低远期复发率^[12]。OVA-sIgE 和 IgG1 分别是呼吸道黏膜固有层和血清中免疫球蛋白的主要成分,其指标升高常见于超敏反应性疾病中,AR 发生时机体血清 OVA-sIgE 和 IgG1 水平明显升高^[13-14]。本研究结果显示,经不同剂量通窍脱敏方治疗后,AR 大鼠鼻黏膜上皮细胞损伤和炎性细胞浸润明显改善,喷嚏、清涕、抓鼻等鼻部症状明显减轻,同时血清中 OVA-sIgE 和 IgG1 水平显著降低,与阳性药物结果一致,说明通窍脱敏方可抑制 AR 大鼠过敏反应,改善鼻炎症状。

辅助性 T 淋巴细胞参与多种免疫反应疾病过程,当机体受到健康威胁时,T 细胞一方面刺激 Th1 细胞释放 IL-1、IL-2、TNF- α 、TNF- β 和 IFN- γ 等促进 T 细胞介导免疫反应的细胞因子,另一方面又刺激 Th2 细胞释放 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13 等抑制 T 细胞活化的细胞因子,Th1/Th2 细胞因子失衡后嗜酸性粒细胞和肥大细胞过度渗透,从而诱导局部炎症和鼻黏膜损伤,是 AR 的主要发病机制之一^[15-17]。IFN- γ 和 IL-4 分别是 Th1 和 Th2 分泌的代表性细胞因子,其比值通常被作为 Th1/Th2 细胞因子平衡状况的衡量指标^[18-19]。Xiang 等^[20]研究表明,sema3A 可通过下调 IL-4 水平,上调 IFN- γ 水平调节 Th1/Th2 免疫平衡,抑制 AR 中的过敏性炎症。You 等^[21]研究表明,D-松醇通过调节 Th1 和 Th2 相关细胞因子水平,可改善 AR 小鼠鼻症状,平衡 AR 期间的 Th1/Th2 免疫反应。本研究结果显示,模型组大鼠鼻灌洗液中 Th1 细胞因子水平降低,Th2 细胞因子水平升高,且 Th1/Th2 细胞比率降低,提示机体发生 Th2 细胞因子功能亢进,导致了特异性过敏反应发生。经不同剂量通窍脱敏方治疗后,AR 大鼠鼻灌洗液中 Th1 细胞因子水平升高,

Th2 细胞因子水平降低,且 Th1/Th2 细胞比率升高,说明通窍脱敏方能有效调节 Th1/Th2 免疫平衡,从而抑制过敏反应发生。

Notch1 是 Notch 信号通路中的受体之一,通过与相应配体结合被激活,使其胞内结构域 NICD 被释放并发生核转移,进一步调节 Hes1 等下游靶基因,在炎症、免疫性疾病中发挥作用^[22-23]。研究表明,Notch 信号通路参与 T 细胞的功能调控,可通过调节 Th2 细胞因子改善 Th1/Th2 细胞失衡,在呼吸道疾病中发挥作用,阻断 Notch 信号通路是 AR 的潜在治疗方法^[24-25],提示通窍脱敏方可能通过调控 Notch 信号通路在 AR 中发挥作用。本研究从基因和蛋白层面,分别对各组大鼠鼻黏膜组织中 Notch 信号通路相关指标进行检测,结果显示,模型组大鼠鼻黏膜组织中 Notch1、NICD、Hes1 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高,表明 AR 过程中 Notch 信号通路被激活。不同剂量通窍脱敏方治疗后,AR 大鼠鼻黏膜组织中 Notch1、NICD、Hes1 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,表明通窍脱敏方通过抑制 Notch 信号通路激活发挥改善 AR 作用。

综上所述,通窍脱敏方可能通过抑制 Notch 信号通路激活,调控机体 Th1/Th2 免疫失衡,进而改善 AR 大鼠鼻黏膜炎性症状。然而,通窍脱敏方是否还对 T-bet、GATA 结合蛋白 3、叉头框蛋白 P3 等 Th1、Th2、Treg 细胞特异性转录因子具有调控作用,且 AR 过程中 Th1、Th2、Treg 细胞三者之间关系如何,目前尚不明确,需要对此进行深入研究,为 AR 的临床辅助治疗提供新的依据。

参考文献:

- [1] Siddiqui ZA, Walker A, Pirwani MM, et al. Allergic rhinitis: diagnosis and management [J]. Br J Hosp Med, 2022, 83(2): 1-9.
- [2] Ponda P, Carr T, Rank MA, et al. Nonallergic rhinitis, allergic rhinitis, and immunotherapy: advances in the last decade [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2023, 11(1): 35-42.
- [3] 陈利红, 潘萌, 郑捷, 等. 长期外用或系统应用糖皮质激素对小鼠代谢水平及器官的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 27-34.
- [4] CHEN Lihong, PAN Meng, ZHENG Jie, et al. Influence of long-term topical or systemic glucocorticoid administration on the metabolism and organs of rats [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2022, 32(8): 27-34.
- [4] 赵雪飞. 益气温阳方治疗肺脾两虚型过敏性鼻炎的临床

- 效果[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(2): 132-134.
- ZHAO Xuefei. Clinical effect of Yiqi Wenyang recipe on allergic rhinitis with deficiency of both lung and spleen [J]. Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use, 2022, 15(2): 132-134.
- [5] 梁艳冰. 六君子汤合苍耳子散加减治疗小儿过敏性鼻炎临床观察[J]. 实用中西医结合临床, 2021, 21(24): 137-138.
- [6] 刘尚耀, 胡环宇, 吴智深. 孟鲁司特对变应性鼻炎大鼠 Th1/Th2 失衡的免疫调节作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(6): 674-677.
- LIU Shangyao, HU Huanyu, WU Zhishen. Study of immunomodulatory effects of montelukast on the Th1/Th2 imbalance in rats with allergic rhinitis[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2020, 36(6): 674-677.
- [7] Xiao CW, Feng LZ, Yang W. Inhibition of dendritic cell autophagy alleviates the progression of allergic rhinitis by inhibiting Th1/Th2/Th17 immune imbalance and inflammation[J]. Histol Histopathol, 2025, 40(2): 237-247.
- [8] Li YX, An R, Wu MJ, et al. miR-224-5p attenuates allergic responses in mice with allergic rhinitis by modulating the Th1/Th2 response[J]. Anal Cell Pathol, 2024, 2024: 5531970. doi:10.1155/2024/5531970
- [9] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 变应性鼻炎动物模型制备规范(草案)[J]. 中草药, 2018, 49(1): 50-57.
- The Chinese Medicine Pharmacology Experiment Professional Committee of China Association of Chinese Medicine. Specification for preparation of allergic rhinitis animal model (draft) [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(1): 50-57.
- [10] 杨玲, 刘杰, 李江平, 等. 麻黄碱介导 TSLP/OX40L 通路调节变应性鼻炎大鼠 Th2 型免疫反应的作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(3): 319-323.
- YANG Ling, LIU Jie, LI Jiangping, et al. Effect of ephedrine mediated TSLP/OX40L pathway in regulating Th2 type immune response in rats with allergic rhinitis[J]. Chinese Journal of Immunology, 2022, 38(3): 319-323.
- [11] 付莹坤, 王欢, 房玉涛, 等. 中医治疗过敏性鼻炎临床证法轨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2024, 30(2): 213-215.
- FU Yingkun, WANG Huan, FANG Yutao, et al. Clinical practice of treating allergic rhinitis with Chinese medicine[J]. Journal of Basic Chinese Medicine, 2024, 30(2): 213-215.
- [12] 马凤梅, 李丛丛, 马雷, 等. 通窍脱敏方治疗变应性鼻炎疗效观察及安全性评价[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(6): 236-239.
- MA Fengmei, LI Congcong, MA Lei, et al. Efficacy observation and safety evaluation of Tongqiao Tuomin prescription (通窍脱敏方) in treatment of allergic rhinitis [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2024, 42(6): 236-239.
- [13] 张启迪, 祝婉婷, 邹知欣, 等. 小鼠局部变应性鼻炎耐受模型的研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2022, 36(12): 944-950.
- ZHANG Qidi, ZHU Wanting, ZOU Zhixin, et al. Establishment of local allergic rhinitis tolerance in mouse model[J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2022, 36(12): 944-950.
- [14] Testera-Montes A, Palomares F, Jurado-Escobar R, et al. Sequential class switch recombination to IgE and allergen-induced accumulation of IgE+ plasmablasts occur in the nasal mucosa of local allergic rhinitis patients [J]. Allergy, 2022, 77(9): 2712-2724.
- [15] 陈黔, 杨霞, 谭亚茜. 中医药对过敏性鼻炎患者 Th1/Th2 细胞因子影响的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(11): 217-220.
- CHEN Qian, YANG Xia, TAN Yaqian. Research progress on effects of TCM on Th1/Th2 cytokines in patients with allergic rhinitis [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 49(11): 217-220.
- [16] Ke X, Chen ZQ, Wang XQ, et al. Quercetin improves the imbalance of Th1/Th2 cells and Treg/Th17 cells to attenuate allergic rhinitis [J]. Autoimmunity, 2023, 56(1): 2189133. doi:10.1080/08916934.2023.2189133
- [17] Hu XY, Liu S, Jing Z, et al. Immunomodulation in allergic rhinitis: Insights from Th2 cells and NLRP3/IL-18 pathway[J]. Cell Biochem Funct, 2024, 42(3): e3997. doi:10.1002/cbf.3997
- [18] Yan ZF, Liu LL, Yuan JJ, et al. Yiqi Jiemin decoction alleviates allergic rhinitis in a guinea pig model by suppressing inflammation, restoring Th1/Th2 balance, and improving cellular metabolism [J]. Aging, 2021, 13(14): 18423-18441.
- [19] Luo WH, Hu JD, Xu WF, et al. Distinct spatial and temporal roles for Th1, Th2, and Th17 cells in asthma [J]. Front Immunol, 2022, 13: 974066. doi:10.3389/fimmu.2022.974066
- [20] Xiang R, Xu Y, Zhang W, et al. Semaphorin 3A inhibits allergic inflammation by regulating immune responses in a mouse model of allergic rhinitis [J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2019, 9(5): 528-537.
- [21] You XY, Sun XP, Kong JF, et al. D-pinitol attenuated ovalbumin-induced allergic rhinitis in experimental mice via balancing Th1/Th2 response[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2021, 20(6): 672-683.