

·基础研究·

# 基于鼻黏膜-海马神经免疫机制探讨醒鼻凝胶滴鼻剂对变应性鼻炎大鼠的影响

范雪琪<sup>1</sup>, 邱彩霞<sup>1,2\*</sup>, 颜水平<sup>3</sup>, 庄翔莉<sup>1</sup>, 艾斯<sup>1</sup>, 郭丽华<sup>1</sup>, 郑健<sup>1</sup>

1 福建中医药大学附属人民医院, 福建 福州 350004;

2 福建中医药大学附属康复医院, 福建 福州 350003;

3 深圳市中医院, 广东 深圳 518033

\* 通信作者: 邱彩霞, E-mail: 343832754@qq.com

收稿日期: 2023-12-20; 接受日期: 2024-05-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(81873110); 福建省自然科学基金项目(2021J01900); 国家中医药管理局第七批全国

老中医药专家学术经验继承工作项目(国中医药人教函[2021]272号)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2024.04008

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**摘要** **目的** 基于鼻黏膜-海马神经免疫机制探讨醒鼻凝胶滴鼻剂对变应性鼻炎(AR)大鼠的影响。**方法** 选择21日龄(PND21)SPF级SD大鼠40只,采用随机数字表法分为正常组、模型组、中药组、西药组,每组10只。除正常组外,其余3组均采用卵清蛋白(OVA)致敏的方法构建AR动物模型。造模成功后,正常组和模型组均给予生理盐水滴鼻(50 μL/次),中药组给予醒鼻凝胶滴鼻剂滴鼻(50 μL/次),西药组给予布地奈德鼻喷雾剂滴鼻(20 μL/次),2次/d,连续治疗12 d。采用AR大鼠行为学评分标准对大鼠进行鼻炎行为学评分;采用Morris水迷宫实验评估大鼠学习记忆功能;采用酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测血清免疫球蛋白E(IgE)、转化生长因子-β1(TGF-β1)含量;采用苏木精-伊红染色法(HE)观察鼻黏膜组织病理变化及嗜酸性粒细胞(EOS)计数;采用免疫组化法检测海马组织非受体酪氨酸激酶Fyn、P物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)、神经肽Y(NPY)表达水平;采用实时聚合酶链式反应(RT-PCR)检测海马组织Fyn、SP、VIP、NPY mRNA转录水平。**结果** ① 鼻炎行为学评分:与正常组比较,模型组、中药组、西药组治疗前鼻炎行为学评分均明显更高( $P<0.05$ );与模型组比较,中药组和西药组治疗后鼻炎行为学评分均明显更低( $P<0.05$ )。与治疗前比较,中药组和模型组治疗后鼻炎行为学评分均明显更低( $P<0.05$ )。② 学习记忆功能:与正常组比较,模型组平台潜伏期、游泳总路程均明显更长( $P<0.05$ ),穿越平台次数、目标象限停留时间均明显更低( $P<0.05$ );与模型组比较,中药组和西药组治疗后平台潜伏期和游泳总路程均明显更短( $P<0.05$ ),穿越平台次数、目标象限停留时间均明显更高( $P<0.05$ )。③ 血清IgE、TGF-β1含量:与正常组比较,模型组血清IgE、TGF-β1含量均明显更高( $P<0.05$ );与模型组比较,中药组和西药组治疗后血清IgE、TGF-β1含量均明显更低( $P<0.05$ )。④ 鼻黏膜组织病理变化及EOS计数:模型组鼻黏膜水肿,上皮细胞排列紊乱;中药组和西药组治疗后鼻黏膜水肿明显减轻,上皮细胞结构较完整。与正常组比较,模型组、中药组、西药组治疗后大鼠鼻黏膜EOS计数均明显增多( $P<0.05$ );与模型组比较,中药组和西药组治疗后鼻黏膜EOS计数均明显减少( $P<0.05$ )。⑤ 海马组织Fyn、SP、VIP、NPY mRNA转录水平和蛋白表达水平:与正常组比较,模型组海马组织Fyn、SP、VIP mRNA转录水平和Fyn、SP、VIP平均OD值均明显升高( $P<0.05$ ),NPY mRNA转录水平和NPY平均OD值均明显降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,中药组和西药组治疗后海马组织Fyn、SP、VIP mRNA转录水平和Fyn、SP、VIP平均OD值均明显降低( $P<0.05$ ),NPY mRNA转录水平和NPY平均OD值均明显升高( $P<0.05$ )。**结论** 醒鼻凝胶滴鼻剂可改善AR大鼠鼻炎行为学和学习记忆功能,可能与通过Fyn信号通路调节鼻黏膜-海马神经免疫机制有关。

**关键词** 变应性鼻炎;醒鼻凝胶滴鼻剂;鼻炎行为学;学习记忆功能;神经免疫机制;鼻黏膜;海马

**引用格式:** 范雪琪, 邱彩霞, 颜水平, 等. 基于鼻黏膜-海马神经免疫机制探讨醒鼻凝胶滴鼻剂对变应性鼻炎大鼠的影响[J]. 康复学报, 2024, 34(4): 361-369.

FAN X Q, QIU C X, YAN S P, et al. Effect of Xingbi gel nasal drops on rats with allergic rhinitis based on the nasal mucosa-hippocampus neuroimmune mechanism [J]. Rehabil Med, 2024, 34(4): 361-369.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2024.04008

©《康复学报》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 4.0 协议

© Rehabilitation Medicine, OA under the CC BY-NC-ND 4.0

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)临床主要表现为鼻塞、鼻痒、流涕、打喷嚏、鼻充血。2022年流行病学调查显示,儿童AR自报患病率18.10%~49.68%,确诊患病率10.80%~21.09%,并呈增长趋势<sup>[1]</sup>。儿童发病后,常伴有记忆力下降、注意力不集中等神经系统症状,有学者证实AR与注意力缺陷多动障碍、抽动障碍等神经系统疾病相关<sup>[2]</sup>。因此,治疗AR及其相关神经系统症状需进一步开展相关研究。AR属于中医学“鼻鼽”“鼽嚏”范畴,传统鼻内喷药、针灸、穴位贴敷、穴位埋线等中医治疗毒副作用小,被临床广泛应用,并获得较好的临床疗效<sup>[3]</sup>。

醒鼻凝胶滴鼻剂为福建中医药大学附属人民医院院内制剂(闽药制字Z2011S0006),临床应用十余年,疗效显著。本研究团队前期研究显示,醒鼻凝胶滴鼻剂在缓解鼻部症状的同时,AR患儿睡眠障碍、注意力低下等神经系统症状也有所改善,患儿鼻结膜炎生活质量调查问卷(rhinoconjunctivitis quality of life questionnaire, RQLQ)评分明显提高<sup>[4]</sup>。此外,前期研究显示AR患儿唾液淀粉酶及AMY1基因、蛋白表达高于正常儿童,证实AR与海马神经调节有关<sup>[5]</sup>。醒鼻凝胶滴鼻剂可通过介导鼻黏膜非受体酪氨酸激酶Fyn信号通路减少组胺和各类炎性细胞因子的释放从而调节AR<sup>[6]</sup>。Fyn作为重要的突触后致密物质之一,对诱导海马Schaffer侧支CA1突触的可塑性至关重要<sup>[7]</sup>,抑制海马组织Fyn活化,可保护海马神经元以改善认知功能障碍<sup>[8-9]</sup>。本实验采用醒鼻凝胶滴鼻剂干预AR大鼠,通过检测鼻黏膜、海马组织中相关神经肽、免疫因子的变化,旨在阐明醒鼻凝胶滴鼻剂干预AR的神经免疫作用机制,为其临床应用提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验动物** 选择21日龄(PND21)SPF级SD幼鼠40只,体质量(225±25)g,雌雄各半,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2012-0011]。实验大鼠饲养于满足动物饲养基本条件的福建中医药大学实验动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(闽)2020-0003]。本实验方案已通过福建中医药大学伦理委员会审批(审批号:2021022)。实验过程中根据中华人民共和国科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》处置实验动物。

**1.1.2 实验药物** 醒鼻凝胶滴鼻剂(闽药准字Z2011S0006),由徐长卿、蝉蜕、人工牛黄、天然冰片等组成(药物浓度25 μg/mL,此剂量为前期研究的最佳有效剂量<sup>[10]</sup>),由福建中医药大学附属人民医院制剂室提供;布地奈德鼻喷雾剂(雷诺考特)由阿斯利康制药有限公司分包装(批号:J20140048),主要活性成分为布地奈德(药物浓度:1.28 g/mL)。

### 1.1.3 主要试剂与仪器

**1.1.3.1 主要试剂** 卵清蛋白(批号:A5503)、氢氧化铝粉末(批号:239186-25G)、戊巴比妥钠(批号:061222)均购自美国Sigma公司;血清免疫球蛋白E(immunoglobulin E, IgE)、转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)ELISA试剂盒(批号均为Lot 06/2022)均购自上海酶联生物科技有限公司;免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号SA1020);TriZol试剂盒(美国Thermo公司,批号15596026);mRNA逆转录试剂盒(批号CW2569)、miRNA逆转录试剂盒(批号CW2141)均购自北京康为世纪生物科技有限公司;Fyn抗体(批号AF6102)、P物质(substance P, SP)抗体(批号DF7522)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)抗体(批号DF6627)、神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)抗体(批号DF6431)均购自美国Affinity Biosciences公司。

**1.1.3.2 主要仪器** Thermo Multiskan FC酶标仪(美国Thermo公司);CFX96实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司);ChemiDoc XRS+化学发光成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 实验动物分组及模型制备

**1.2.1.1 实验动物分组** 将40只大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、中药组、西药组,每组10只。

**1.2.1.2 动物模型制备** 除正常组外,其余各组SD大鼠参照参考文献<sup>[11]</sup>采用卵清蛋白(ovalbumin, OVA)致敏的方法建立AR模型大鼠。①致敏:大鼠以OVA溶液0.5 mg为抗原,氢氧化铝粉末30 mg作佐剂,加入0.9% NaCl溶液1 mL形成混悬液,腹腔注射(无菌操作),隔日1次,共7次,正常组大鼠以等量生理盐水腹腔注射。②激发:腹腔注射致敏完成后的第4天,大鼠取头低位,用微量加样器每侧鼻腔滴以配制成2%浓度OVA溶液50 μL激发,隔日1次,共5次。激发时间为当日第1次滴鼻给药1 h

后。正常组大鼠以等量生理盐水替代OVA溶液,方法和步骤同模型组。参照参考文献[12]建立AR大鼠鼻部症状评分标准,见表1。每次OVA溶液双侧

鼻腔滴鼻激发后,观察记录30 min内大鼠喷嚏、搔鼻次数、流涕量,采用叠加法计算总分,总分 $\geq 5$ 分表示造模成功。

表1 AR大鼠行为学评分标准

Table 1 Scoring criteria of behavior of rats with AR

症状	轻度(1分)	中度(2分)	重度(3分)
喷嚏/(个/次)	1~3	4~10	>10
搔鼻	轻抓鼻数次	频繁抓挠鼻、面	全身四处抓挠
流涕	鼻涕到达鼻前孔处	鼻涕超过鼻前孔	涕流满面

**1.2.2 干预方法** 正常组和模型组滴0.9% NaCl溶液50  $\mu$ L/次;中药组滴醒鼻凝胶滴鼻剂50  $\mu$ L/次;西药组滴布地奈德鼻喷雾剂20  $\mu$ L/次。腹腔注射致敏完成后的第1天开始给药,大鼠取头低位,用微量加样器分别将药液滴入大鼠双侧鼻孔,2次/d,连续治疗12 d。

### 1.2.3 观察指标

**1.2.3.1 鼻炎行为学评分** 参考AR大鼠行为学评分标准对大鼠进行鼻炎行为学评分。

**1.2.3.2 学习记忆功能评估** 采用Morris水迷宫实验评估大鼠学习记忆功能,包括定位航行实验和空间探查实验。于治疗后第8天对4组大鼠进行获得性训练,将大鼠头朝池壁置入水中,置入位置依次选择4个象限,大鼠行为学分析软件自动监测大鼠游泳距离及入水后至爬上水中隐藏平台的时间。如大鼠90 s内仍未找到隐藏平台,则引导大鼠爬上平台,使大鼠在平台上停留10~15 s后将其移开并擦干,每组大鼠训练4次/d,连续训练5 d,第6天休息,第7天进行定位航行实验,软件记录大鼠平台潜伏期、游泳总路程。随后进行空间探查实验,撤去水中的隐藏平台,随机象限将大鼠置入水中,60 s内大鼠自由游泳,软件记录大鼠穿越平台次数、目标象限停留时间。

**1.2.3.3 IgE、TGF- $\beta$ 1含量检测** 采用酶联免疫吸附试验法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测IgE、TGF- $\beta$ 1含量。根据IgE、TGF- $\beta$ 1试剂盒说明书,于450 nm处以空白对照孔调零后测各孔吸光度(optical density, OD)。以标准品的已知浓度与测定的OD值绘制标准曲线,通过测得的OD值计算各组大鼠血清IgE、TGF- $\beta$ 1含量。

**1.2.3.4 鼻黏膜组织病理变化观察及嗜酸性粒细胞计数** 采用苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin

staining, HE)观察鼻黏膜组织病理变化及嗜酸性粒细胞(eosinophil, EOS)计数。取大鼠鼻黏膜制备石蜡切片,二甲苯脱蜡至水后行苏木素染液、伊红染液复染,透明,中性树胶封片,HE染色下EOS为分叶双核,细胞质被染成红色。光镜下每张切片取5个400倍不同视野,观察其病理变化并记录每个视野EOS数目。

**1.2.3.5 海马组织蛋白表达水平检测** 采用免疫组化法检测海马组织非受体酪氨酸激酶Fyn、SP、VIP、NPY表达水平。取大鼠海马组织制备石蜡切片,脱蜡至水后孵育一抗,4  $^{\circ}$ C孵育过夜,洗涤后孵育二抗,37  $^{\circ}$ C孵育30 min,洗涤封片,显微镜下观察,阳性染色为棕黄色或褐色染色。每张切片取3个400倍不同视野,应用ImageJ图像分析系统进行半定量分析,记录平均OD。

**1.2.3.6 海马组织Fyn、SP、VIP、NPY mRNA转录水平检测** 采用实时聚合酶链式反应(real-time PCR, RT-PCR)检测海马组织Fyn、SP、VIP、NPY mRNA转录水平。取大鼠海马组织后,用TriZol试剂提取总RNA。用紫外分光光度法测定提取的总RNA含量,取总RNA/miRNA 1  $\mu$ g进行逆转录反应,设计引物序列,采用RT-PCR定量试剂盒(SYBR Green)于荧光定量PCR仪中进行PCR扩增。采用参照基因的 $\Delta\Delta$ Ct法计算目的基因mRNA转录水平。引物序列见表2。

## 1.3 统计学方法

采用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。计量资料服从正态分布以( $\bar{x}\pm s$ )表示,组内比较采用配对样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐两两比较采用LSD-t法,方差不齐两两比较采用Games-Howell法。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

表2 引物序列  
Table 2 Primers sequence

基因	引物序列	长度/ bp
GAPDH	F:ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
	R:TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	
Fyn	F:TCTAGTCGTGGCAAAGGTCAG	111
	R:TGCACACAGCCCATTATCCAA	
SP	F:CTTCTGTAGCTCGGTGTCCC	83
	R:CCTGCACCCACATACTAGGC	
VIP	F:TGCAAGGGTAGCAATCGAGG	122
	R:CACGGCAGCCTATCTGCTTA	
NPY	F:TACTCCGCTCTGCGACACTA	118
	R:TGGGGGCATTTTCTGTGCTT	

## 2 结果

### 2.1 4组鼻炎行为学评分比较

与正常组比较,模型组、中药组、西药组治疗前鼻炎行为学评分均明显更高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,中药组和西药组治疗后鼻炎行为学评分均明显更低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。与治疗前比较,中药组和西药组治疗后鼻炎行为学评分均明显更低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

表4 4组学习记忆功能比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 4 Comparison of learning and memory function in four groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	平台潜伏期/s	游泳总路程/cm	穿越平台次数/次	目标象限停留时间/s
正常组	10	13.36±1.78	967.45±63.61	6.80±1.32	35.07±4.55
模型组	10	15.37±1.90 <sup>1)</sup>	1 030.09±51.74 <sup>1)</sup>	5.40±1.07 <sup>1)</sup>	30.75±3.39 <sup>1)</sup>
中药组	10	13.51±1.54 <sup>2)</sup>	981.05±45.59 <sup>2)</sup>	6.70±1.42 <sup>2)</sup>	34.04±2.56 <sup>2)</sup>
西药组	10	13.64±1.68 <sup>2)</sup>	974.88±47.32 <sup>2)</sup>	6.80±1.30 <sup>2)</sup>	34.53±3.58 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较,1)  $P<0.05$ ;与模型组比较,2)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the model group, 2)  $P<0.05$ .

### 2.3 4组血清IgE、TGF-β1含量比较

与正常组比较,模型组血清IgE、TGF-β1含量均明显更高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,中药组和西药组治疗后血清IgE、TGF-β1含量均明显更低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表5。

### 2.4 4组鼻黏膜组织病理变化及EOS计数比较

HE染色结果显示,正常组鼻黏膜上皮未见明显异常表现;模型组鼻黏膜组织水肿,纤毛大部分

表3 4组鼻炎行为学评分比较( $\bar{x}\pm s$ ) 分

Table 3 Comparison of rhinitis behavioral

组别	<i>n</i>	scores in four groups ( $\bar{x}\pm s$ )		Scores
		治疗前	治疗后	
正常组	10	1.20±1.03	1.00±1.05	
模型组	10	6.70±1.34 <sup>1)</sup>	6.90±1.20 <sup>1)</sup>	
中药组	10	6.40±0.84 <sup>1)</sup>	4.50±0.85 <sup>1)2)3)</sup>	
西药组	10	6.50±1.27 <sup>1)</sup>	4.20±0.92 <sup>1)2)3)</sup>	

注:与正常组比较,1)  $P<0.05$ ;与模型组比较,2)  $P<0.05$ ;与治疗前比较,3)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the model group, 2)  $P<0.05$ ; compared with that before treatment, 3)  $P<0.05$ .

### 2.2 4组学习记忆功能比较

定位航行实验结果显示,与正常组比较,模型组平台潜伏期、游泳总路程均明显更长,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,中药组和西药组治疗后平台潜伏期和游泳总路程均明显更短,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。空间探查实验结果显示,与正常组比较,模型组穿越平台次数、目标象限停留时间均明显更低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,中药组和西药组治疗后穿越平台次数、目标象限停留时间均明显更高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表4。

脱落,上皮细胞排列紊乱,血管扩张增生明显,可见EOS浸润;中药组和西药组鼻黏膜组织水肿明显减轻,上皮细胞结构较完整,未见明显血管充血扩张,仍可见少量EOS浸润。与正常组比较,模型组、中药组、西药组治疗后鼻黏膜EOS计数均明显增多,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,中药组和西药组治疗后鼻黏膜EOS计数均明显减少,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表6、图1。

表5 4组血清IgE、TGF-β1含量比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 5 Comparison of serum IgE and TGF-β1 in four groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	IgE/(μg/mL)	TGF-β1/(ng/L)
正常组	10	13.05±2.11	37.38±6.79
模型组	10	21.93±1.48 <sup>1)</sup>	72.74±6.17 <sup>1)</sup>
中药组	10	16.68±1.20 <sup>1)2)</sup>	39.22±4.16 <sup>2)</sup>
西药组	10	17.79±1.74 <sup>1)2)</sup>	41.54±3.91 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较,1)  $P<0.05$ ;与模型组比较,2)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the model group, 2)  $P<0.05$ .

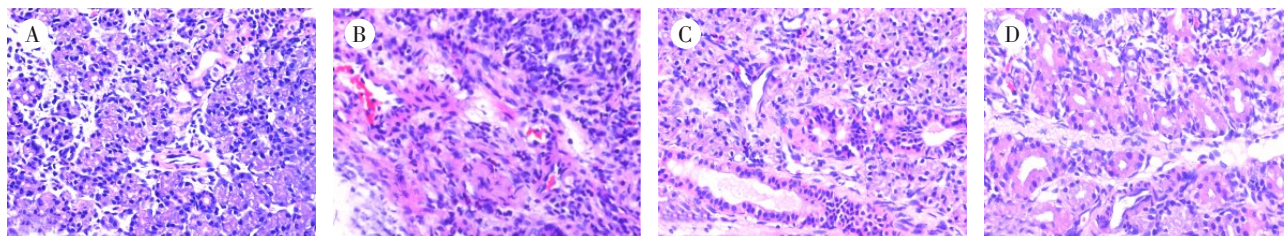
表6 4组鼻黏膜嗜酸性粒细胞计数比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 6 Comparison of eosinophilic counts in nasal mucosa in four groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	EOS/个
正常组	10	5.14±0.44
模型组	10	15.60±2.02 <sup>1)</sup>
中药组	10	8.42±1.15 <sup>1)2)</sup>
西药组	10	7.36±0.69 <sup>1)2)</sup>

注:与正常组比较,1)  $P<0.05$ ;与模型组比较,2)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the model group, 2)  $P<0.05$ .



注:A为正常组;B为模型组;C为中药组;D为西药组。

Note: A is the normal group; B is the model group; C is the traditional Chinese medicine group; D is the western medicine group.

图1 4组鼻黏膜HE染色( $\times 400$ )

Figure 1 HE staining of nasal mucosa in four groups ( $\times 400$ )

## 2.5 4组海马组织Fyn、SP、VIP、NPY mRNA转录水平比较

与正常组比较,模型组海马组织Fyn、SP、VIP mRNA转录水平均明显升高,NPY mRNA转录水平明显降低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与模

型组比较,中药组和西药组治疗后海马组织Fyn、SP、VIP mRNA转录水平均明显降低,NPY mRNA转录水平明显升高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表7。

表7 4组海马组织Fyn、SP、VIP、NPY mRNA转录水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 7 Comparison of mRNA transcription levels of Fyn, SP, VIP and NPY in hippocampal tissues in four groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	Fyn	SP	VIP	NPY
正常组	3	1.06±0.48	0.17±0.05	1.02±0.24	1.02±0.22
模型组	3	2.36±0.72 <sup>1)</sup>	0.37±0.05 <sup>1)</sup>	2.17±0.96 <sup>1)</sup>	0.60±0.15 <sup>1)</sup>
中药组	3	1.11±0.54 <sup>2)</sup>	0.22±0.07 <sup>2)</sup>	1.10±0.28 <sup>2)</sup>	1.10±0.23 <sup>2)</sup>
西药组	3	1.27±0.45 <sup>2)</sup>	0.18±0.04 <sup>2)</sup>	1.04±0.38 <sup>2)</sup>	0.97±0.16 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较,1)  $P<0.05$ ;与模型组比较,2)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the model group, 2)  $P<0.05$ .

## 2.6 4组海马组织Fyn、SP、VIP、NPY蛋白表达水平比较

与正常组比较,模型组海马组织中可见棕褐色或棕黄色颗粒聚集,海马组织Fyn、SP、VIP均呈强阳性表达,NPY呈弱阳性表达。与模型组比较,中药组和西药组治疗后海马组织Fyn、SP、VIP阳性区域表达均明显减少,NPY阳性区域表达明显增多,差

异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。与正常组比较,模型组海马组织Fyn、SP、VIP平均OD值均明显升高,NPY平均OD值明显降低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。与模型组比较,中药组和西药组治疗后海马组织Fyn、SP、VIP平均OD值均明显降低,NPY平均OD值明显升高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表8、图2。

表8 4组海马组织Fyn、SP、VIP、NPY平均OD值比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 8 Comparison of average OD of Fyn, SP, VIP and NPY in hippocampal tissue in four groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	Fyn	SP	VIP	NPY
正常组	3	0.135±0.018	0.140±0.021	0.105±0.010	0.204±0.009
模型组	3	0.173±0.010 <sup>1)</sup>	0.210±0.013 <sup>1)</sup>	0.187±0.012 <sup>1)</sup>	0.141±0.015 <sup>1)</sup>
中药组	3	0.126±0.010 <sup>2)</sup>	0.138±0.013 <sup>2)</sup>	0.119±0.014 <sup>2)</sup>	0.186±0.017 <sup>2)</sup>
西药组	3	0.118±0.004 <sup>2)</sup>	0.133±0.020 <sup>2)</sup>	0.115±0.011 <sup>2)</sup>	0.193±0.024 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较,1)  $P<0.05$ ;与模型组比较,2)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the model group, 2)  $P<0.05$ .

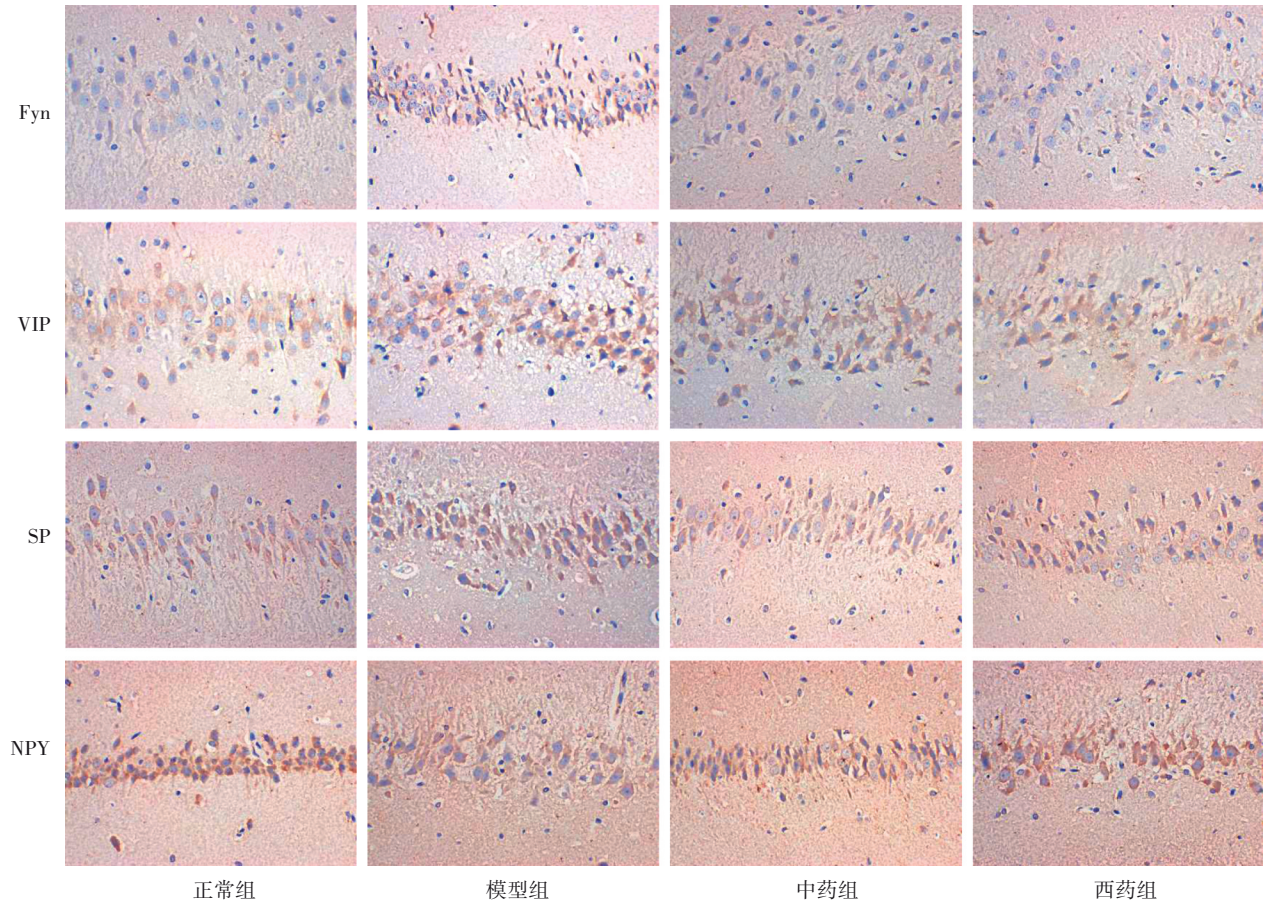


图2 4组海马组织Fyn、SP、VIP、NPY蛋白表达( $\times 400$ )

Figure 2 Expression of Fyn, SP, VIP and NPY in hippocampal tissues in four groups ( $\times 400$ )

### 3 讨论

#### 3.1 醒鼻凝胶滴鼻剂可有效改善AR大鼠鼻炎行为和学习记忆功能

本研究结果显示,与模型组比较,中药组干预后鼻炎行为学评分明显更低。定位巡航实验结果显示,与模型组比较,中药组平台潜伏期和游泳总路程均明显更短;空间探索实验结果显示,与模型组比较,中药组穿越平台次数、目标象限停留时间均明显更高。这提示,醒鼻凝胶滴鼻剂可有效改善

AR大鼠鼻炎行为学和学习记忆功能。可能与以下因素有关:儿童AR及其神经症状的中医病机为肺经伏风,兼夹寒热湿,循经入络,络汇于脑;肺气闭塞,痰瘀交阻,经窍不利,神机失运,神识不明<sup>[13]</sup>。“纳鼻通关”是中医鼻腔给药治疗脑部疾病的重要给药途径,且为儿科常用给药途径。醒鼻凝胶滴鼻剂是本课题组前期研究开发出的新型纳米制剂<sup>[14]</sup>,可吸附在鼻黏膜表面形成药物膜,最大限度发挥疗效,同时减少全身给药所致毒副作用。徐长卿为方

中君药,味辛性温,功擅祛风止痒,其所含的丹皮酚具有抗炎、抗菌、抗变态反应、免疫调节作用;蝉蜕为臣药,味甘性寒,长于疏散肺经风热,可助徐长卿止痒,同时防其过于辛燥,能有效降低肥大细胞脱颗粒,阻滞过敏介质释放,抑制变态反应;牛黄为佐药,味甘性平,功能清热解毒、化痰通窍,其有效成分牛磺酸对抗氧化应激和缺血再灌注损伤有保护作用,能减轻脑缺血区灰质和白质损伤,具有全脑保护作用;冰片为方中使药,味辛苦性微寒,可清热止痛、通窍醒神,引诸药上行,又可提高脑组织抗氧化酶的活性,减轻炎症反应,从而使脑组织免受损伤,还可通过提高血脑屏障通透性,增强药物吸收速率。

### 3.2 醒鼻凝胶滴鼻剂改善AR大鼠鼻炎行为学和学习记忆功能可能与调节鼻黏膜-海马神经免疫机制有关

本研究结果显示,与模型组比较,中药组海马组织 Fyn、SP、VIP mRNA 转录水平均明显降低, NPY mRNA 转录水平明显升高,海马组织 Fyn、SP、VIP 平均 OD 值均明显降低, NPY 平均 OD 值明显升高,提示醒鼻凝胶滴鼻剂改善 AR 大鼠鼻炎行为学和学习记忆功能可能与调节鼻黏膜-海马神经免疫机制有关。可能与以下因素有关:①醒鼻凝胶滴鼻剂可能通过 Fyn 信号通路,调节鼻黏膜-海马神经免疫机制。中枢神经系统可接收来自外周的免疫炎症信号,将其整合并传出至外周靶器官,实现对免疫系统的精准调控,构成 AR 的中枢-外周双向网络<sup>[15]</sup>。支配鼻腔黏膜的神经末梢接受外界刺激后释放神经肽,与 EOS、肥大细胞等核心免疫细胞相互作用,构成 AR 发病的外周神经-免疫网络<sup>[16]</sup>, SP、VIP、NPY 等神经肽在其中发挥重要作用,可与免疫细胞直接通信,从而调控 AR 的发展,为 AR 提供了新的治疗靶点<sup>[7]</sup>。EOS 对鼻腔黏膜的浸润及高反应性病变是 AR 的重要特征,是过敏性疾病发生、发展、迁延不愈的重要原因之一<sup>[17]</sup>,也是 SP、VIP、NPY 等神经肽的关键效用细胞。醒鼻凝胶滴鼻剂可提高 AR 大鼠的免疫调控能力,在受到外界刺激后释放神经肽,提高神经免疫功能,从而改善 AR 大鼠鼻炎行为学和学习记忆功能。这与 ZHOU 等<sup>[18]</sup>研究结果相似。②醒鼻凝胶滴鼻剂可抑制鼻黏膜 EOS 聚集:有研究显示,SP 可抑制神经激肽-1 受体(neurokinin-1 receptor, NK-1R)表达,减轻 AR 相关的临床症状和鼻黏膜的 EOS 聚集<sup>[19]</sup>。VIP 对 EOS 趋化作用通过 CRTH2 受体介导并借助蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C

途径进行<sup>[20]</sup>。NPY 通过 NPY-Y1 途径作用于 EOS 减轻气道炎症,同时驱使树突状细胞向局部淋巴组织迁移,促进辅助型 T 细胞 2(T helper 2 cell, Th2)分化,加快 2 型免疫反应发生<sup>[21]</sup>。本课题组前期研究显示,醒鼻凝胶滴鼻剂可通过降低 Fyn 表达,减少组胺和各类炎性细胞因子释放,同时通过上调信号传导及 STAT5,抑制 EOS 聚集,拮抗 IgE 合成,抑制 Fyn-STAT5 信号传导通路调节 AR<sup>[22]</sup>。因此,本研究认为,醒鼻凝胶滴鼻剂可减少 EOS 在鼻黏膜浸润,抑制 SP、VIP,上调 NPY 等神经肽释放,减少 IgE、TGF- $\beta$ 1 等免疫因子表达,通过鼻黏膜-海马神经免疫机制改善 AR 大鼠鼻炎行为学和学习记忆功能。

## 4 小 结

AR 发病机制复杂,单纯的免疫学说并不能完全解释 AR 发生、发展,本研究从神经免疫机制角度对 AR 的发病机制进行了补充。醒鼻凝胶滴鼻剂改善 AR 大鼠鼻炎行为学和学习记忆功能,可能与通过 Fyn 信号通路调节鼻黏膜-海马神经免疫机制,抑制 EOS、IgE、TGF- $\beta$ 1 等免疫因子和 SP、VIP 表达水平,上调 NPY 等神经肽释放有关。

## 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、小儿学组. 儿童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(4): 392-404. Subspecialty Group of Rhinology of Editorial Board of Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Subspecialty Groups of Rhinology and Pediatrics and Society of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery of Chinese Medical Association. Guideline for diagnosis and treatment of pediatric allergic rhinitis (2022, revision) [J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2022, 57(4): 392-404.
- [2] 中国医师协会儿科医师分会儿童耳鼻咽喉专业委员会. 儿童过敏性鼻炎诊疗: 临床实践指南[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(3): 169-175. Otolaryngology Professional Committee, Pediatrician Branch, Chinese Medical Doctor Association. Diagnosis and treatment of allergic rhinitis in children: a guide to clinical practice [J]. Chin J Pract Pediatr, 2019, 34(3): 169-175.
- [3] HAN X, KREMPSKI J W, NADEAU K. Advances and novel developments in mechanisms of allergic inflammation [J]. Allergy, 2020, 75(12): 3100-3111.
- [4] 邱彩霞, 郑健, 艾斯, 等. 醒鼻凝胶滴鼻剂干预儿童变应性鼻炎与 IL-4、IL-13 及 TSLP 的临床研究[J]. 中国中西医结合儿科学, 2017, 9(3): 212-215. QIU C X, ZHENG J, AI S, et al. Xingbi gel in the treatment of allergic rhinitis and its effect on the expression of interleukin-

- 4, -13 and thymic stromal lymphopoietin in children [J]. *Chin Pediatr Integrat Tradit West Med*, 2017, 9(3): 212-215.
- [5] QIU C X, AI S, ZHUANG X L, et al. Increased salivary fluid flow in children with newly diagnosed allergic rhinitis [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2019, 117: 105-109.
- [6] 庄翔莉, 吴博, 邱彩霞, 等. 醒鼻凝胶滴鼻剂对变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜成纤维细胞 Fyn-STAT5 信号通路的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5): 1794-1799.
- ZHUANG X L, WU B, QIU C X, et al. Effect of Xingbi gel nasal drops on Fyn-STAT5 signal pathway of nasal mucosa fibroblasts in guinea pigs with allergic rhinitis [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(5): 1794-1799.
- [7] RAJANI V, SENGAR A S, SALTER M W. Src and Fyn regulation of NMDA receptors in health and disease [J]. *Neuropharmacology*, 2021, 193: 108615.
- [8] NIU H M, MA D L, WANG M Y, et al. Epimedium flavonoids protect neurons and synapses in the brain via activating NRG1/ErbB4 and BDNF/Fyn signaling pathways in a chronic cerebral hypoperfusion rat model [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 162: 132-140.
- [9] TANG S J, FESHARAKI-ZADEH A, TAKAHASHI H, et al. Fyn kinase inhibition reduces protein aggregation, increases synapse density and improves memory in transgenic and traumatic Tauopathy [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8(1): 96.
- [10] 邱彩霞, 郑健, 林东红, 等. 醒鼻温敏凝胶剂对变应性鼻炎大鼠血清白细胞介素-4、转化生长因子- $\beta$ 1 和鼻黏膜嗜酸性粒细胞的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2018, 25(2): 47-50.
- QIU C X, ZHENG J, LIN D H, et al. Effects of Xingbi thermosensitive gel on serum interleukin-4, transforming growth factor- $\beta$ 1 and nose mucosa eosinophils in rats with allergic rhinitis [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2018, 25(2): 47-50.
- [11] GUIBAS G V, SPANDOU E, MEDITSKOU S, et al. N-acetylcysteine exerts therapeutic action in a rat model of allergic rhinitis [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2013, 3(7): 543-549.
- [12] NABE T, MIZUTANI N, SHIMIZU K, et al. Development of pollen-induced allergic rhinitis with early and late phase nasal blockage in guinea pigs [J]. *Inflamm Res*, 1998, 47(9): 369-374.
- [13] 艾斯, 郑健. 郑健从肺经伏风论治儿童变应性鼻炎经验[J]. *中医杂志*, 2020, 61(24): 2145-2147.
- AI S, ZHENG J. ZHENG Jian's experience in treating children's allergic rhinitis based on the theory of latent wind in the lung channel [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 61(24): 2145-2147.
- [14] CHU K D, ZHENG J, LI H, et al. Studies on ciliotoxicity of nasal thermosensible gels of Chinese medicine Xingbi [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2012, 21(1): 76-80.
- [15] 蔡诗茹, 娄鸿飞. 变应性鼻炎的神经免疫调节机制[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2021, 35(9): 859-864.
- CAI S R, LOU H F. Neuroimmunomodulation in allergic rhinitis [J]. *J Clin Otorhinolaryng Head Neck Surg*, 2021, 35(9): 859-864.
- [16] 康瑞, 程冯丽, 赵长青. 变应性鼻炎神经-免疫机制的研究进展[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2023, 29(3): 121-126.
- KANG R, CHENG F L, ZHAO C Q. Research progress of the neuro-immune mechanism in allergic rhinitis [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2023, 29(3): 121-126.
- [17] 刘瑾, 祝戎飞. 嗜酸性粒细胞与过敏性鼻炎[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2021, 15(6): 707-708.
- LIU J, ZHU R F. Eosinophils and allergic rhinitis [J]. *Chin J Allergy Clin Immunol*, 2021, 15(6): 707-708.
- [18] ZHOU Y, CHEN R, KONG L L, et al. Neuroimmune communication in allergic rhinitis [J]. *Front Neurol*, 2023, 14: 1282130.
- [19] 程冯丽, 张艳廷, 康瑞, 等. 生物钟调控呼吸道过敏性疾病的研究新进展[J]. *中华医学杂志*, 2021, 101(18): 1377-1380.
- CHENG F L, ZHANG Y T, KANG R, et al. Research progress of biological clock regulating respiratory allergic diseases [J]. *Natl Med J China*, 2021, 101(18): 1377-1380.
- [20] EL-SHAZLY A E, BEGON D Y, KUSTERMANS G, et al. Novel association between vasoactive intestinal peptide and CRTH2 receptor in recruiting eosinophils: a possible biochemical mechanism for allergic eosinophilic inflammation of the airways [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(2): 1374-1384.
- [21] ODA N, MIYAHARA N, TANIGUCHI A, et al. Requirement for neuropeptide Y in the development of type 2 responses and allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(3): L407-L417.
- [22] 邱彩霞, 郑健, 艾斯, 等. 基于 JAK-STAT5 信号转导的醒鼻温敏凝胶剂干预变应性鼻炎的机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(10): 4672-4676.
- QIU C X, ZHENG J, AI S, et al. Intervention mechanism of Xingbi gel on allergic rhinitis based on JAK-STAT5 signaling pathway [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(10): 4672-4676.

## Effect of Xingbi Gel Nasal Drops on Rats with Allergic Rhinitis Based on the Nasal Mucosa-Hippocampus Neuroimmune Mechanism

FAN Xueqi<sup>1</sup>, QIU Caixia<sup>1,2\*</sup>, YAN Shuiping<sup>3</sup>, ZHUANG Xiangli<sup>1</sup>, AI Si<sup>1</sup>, GUO Lihua<sup>1</sup>, ZHENG Jian<sup>1</sup>

<sup>1</sup> People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350004, China;

<sup>2</sup> Rehabilitation Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China;

<sup>3</sup> Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518033, China

\*Correspondence: QIU Caixia, E-mail: 343832754@qq.com

**ABSTRACT Objective** To explore the effect of Xingbi gel nasal drops on rats with allergic rhinitis (AR) based on the nasal mucosa-hippocampus neuroimmune mechanism. **Methods** A total of 40 SPF SD rats at postnatal day 21 (PND21) were randomly divided into normal group, model group, traditional Chinese medicine group and western medicine group, with 10 cases in each group. Except for the normal group, the other three groups were sensitized by ovalbumin (OVA) to establish AR animal models. After the model was successfully established, the normal group and model group were both given normal saline nasal drops (50  $\mu$ L once), the traditional Chinese medicine group was given Xingbi gel nasal drops (50  $\mu$ L once), and the western medicine group was given budesonide nasal spray (20  $\mu$ L once), twice a day, and the interventions were continued for 12 days. The AR rat behavioral scoring criteria was used to evaluate rhinitis behavior of rats; Morris water maze test was used to evaluate learning and memory function of rats; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum levels of immunoglobulin E (IgE) and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1); hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes of nasal mucosa and eosinophil (EOS) count; immunohistochemistry method was used to detect expression levels of non-receptor tyrosine kinases Fyn, substance P (SP), vasoactive intestinal peptide (VIP) and neuropeptide Y (NPY) in the hippocampus; and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect mRNA transcription levels of Fyn, SP, VIP and NPY in the hippocampus. **Results** (1) Behavioral scores of rhinitis: compared with the normal group, behavioral scores of rhinitis were significantly higher in the model group, the traditional Chinese medicine group and the western medicine group before treatment ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, behavioral scores of rhinitis were significantly lower in the traditional Chinese medicine group and the western medicine group after treatment ( $P < 0.05$ ). Compared with that before treatment, behavioral scores of rhinitis were significantly lower in the traditional Chinese medicine group and the model group after treatment ( $P < 0.05$ ). (2) Learning and memory function: compared with the normal group, the model group showed significantly longer platform latency and the total distance of swimming, as well as lower platform crossing frequency and shorter stay time in the target quadrant ( $P < 0.05$ ); compared with the model group, both the traditional Chinese medicine group and the western medicine group showed significantly shorter platform latency and total distance of swimming, and more times of platform crossing and longer stay in the target quadrant ( $P < 0.05$ ). (3) IgE and TGF- $\beta$ 1 contents in serum: compared with the normal group, IgE and TGF- $\beta$ 1 contents in serum were significantly higher in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, IgE and TGF- $\beta$ 1 contents in serum in both the traditional Chinese medicine group and the western medicine group were significantly lower ( $P < 0.05$ ). (4) Pathological changes of nasal mucosa and EOS counts: the nasal mucosa in the model group was edematous and the epithelial cells were arranged in disorder; the nasal mucosa edema were alleviated significantly in the traditional Chinese medicine group and the western medicine group after treatment, and the epithelial cell structure was more intact. Compared with the normal group, the nasal mucosal EOS counts all significantly increased in the model group, the traditional Chinese medicine group and the western medicine group after treatment ( $P < 0.05$ ); compared with the model group, the nasal mucosa EOS counts decreased significantly in the traditional Chinese medicine group and the western medicine group after treatment ( $P < 0.05$ ). (5) mRNA transcription levels and protein expression levels of Fyn, SP, VIP and NPY in hippocampus: compared with the normal group, mRNA transcription levels of Fyn, SP and VIP and average OD values of Fyn, SP and VIP increased significantly in the hippocampus in the model group ( $P < 0.05$ ), while mRNA transcription levels of NPY and average OD values of NPY decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, mRNA transcription levels of Fyn, SP and VIP and average OD values of Fyn, SP and VIP in the hippocampus decreased significantly in the traditional Chinese medicine group and the western medicine group after treatment ( $P < 0.05$ ), while mRNA transcription levels of NPY and average OD values of NPY increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Xingbi gel nasal drops can improve the behavioral scores of rhinitis and learning and memory functions of rats with AR, which may be related to the regulation of nasal mucosa-hippocampus neuroimmune mechanism through the Fyn signaling pathway.

**KEY WORDS** allergic rhinitis; Xingbi gel nasal drops; rhinitis behavior; learning and memory function; neuroimmune mechanism; nasal mucosa; hippocampus

DOI:10.3724/SP.J.1329.2024.04008