

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.14.013

银翘散对鼻黏膜屏障功能低下模型小鼠的影响*

杨居崩,李 爽,聂发龙,赵显芳,朱紫陌,代 蓉,李秀芳[△]

(云南中医药大学中药学院,云南 昆明 650500)

摘要:目的 研究银翘散对模型小鼠鼻黏膜屏障功能低下的改善作用。方法 实验分为正常对照组及模型A、B组,模型A、B组小鼠分别予脂多糖(LPS, 2 mg/kg)单次或连续多次滴鼻,正常对照组小鼠予等体积磷酸盐缓冲液滴鼻;于LPS单次滴鼻后第1、3、5、7天,以及连续滴鼻(每天1次;1、3、5、7次)后24 h时,采用Western blot法检测小鼠鼻黏膜中免疫球蛋白A(IgA)和紧密连接蛋白(Occludin)的表达水平;于第7次滴鼻前1 h以异硫氰酸荧光素(FITC)标记的葡聚糖滴鼻,采用酶标仪测定小鼠血清中葡聚糖水平。实验分为正常对照组(等体积蒸馏水)、模型C组(等体积蒸馏水)及银翘散低、高剂量组(生药24.18, 72.54 g/kg),均于LPS滴鼻后6 h灌胃相应药物(0.2 mL/10 g)或蒸馏水,每天1次,连续7 d,检测小鼠鼻黏膜中IgA和Occludin蛋白表达水平及血清葡聚糖水平。结果 LPS单次滴鼻,与正常对照组比较,模型A组小鼠鼻黏膜组织中IgA和Occludin蛋白表达水平仅分别在滴鼻后第1天和第3天时显著降低($P < 0.05$);LPS多次滴鼻,与正常对照组比较,模型B组小鼠连续滴鼻1、3次时的鼻黏膜组织中IgA蛋白表达水平显著降低,连续滴鼻3、5、7次时的Occludin蛋白表达水平显著降低及血清葡聚糖水平显著升高($P < 0.05$)。与正常对照组比较,模型C组小鼠鼻黏膜组织中Occludin蛋白表达水平显著降低,血清葡聚糖水平显著升高。与模型C组比较,银翘散低、高剂量组小鼠鼻黏膜组织中Occludin蛋白表达水平显著升高,血清葡聚糖水平显著降低;银翘散高剂量组小鼠鼻黏膜组织中IgA蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。结论 银翘散可改善模型小鼠鼻黏膜免疫屏障功能,机制为促进鼻黏膜Occludin蛋白表达,降低鼻黏膜上皮屏障的通透性,从而提高鼻黏膜机械屏障的功能。还可通过促进IgA的表达,提高鼻黏膜免疫屏障功能。

关键词:银翘散;脂多糖;鼻黏膜屏障功能低下;小鼠;紧密连接蛋白;免疫球蛋白A;葡聚糖

中图分类号:R932;R285

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)14-0055-05

Improvement Effect of Yinqiao Powder on the Model Mice with Low Nasal Mucosal Barrier Function

YANG Jubeng, LI Shuang, NIE Falong, ZHAO Xianfang, ZHU Zimo, DAI Rong, LI Xiufang

(School of Traditional Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, Yunnan, China 650500)

Abstract: **Objective** To study the improvement effect of Yinqiao Powder on the model mice with low nasal mucosal barrier function. **Methods** The experiment was divided into the normal control group and the model groups A and B. The mice in the model groups A and B were given single and continuous multiple nasal drops of lipopolysaccharide (LPS, 2 mg/kg) respectively, and the mice in the normal control group were given an equal volume of phosphate buffer nasal drops. The expression levels of immunoglobulin (IgA) and Occludin protein in the nasal mucosa of mice were detected by the Western blot on the first, third, fifth and seventh days after administration of single nasal drip of LPS and at the 24 h after continuous nasal drip of LPS (once a day, 1, 5, 7 times). Fluorescein isothiocyanate (FITC) - dextran was used for nasal drip at 1 h before the seventh nasal drip, and the serum dextran level in mice was determined by the enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). The experiment was divided into the normal control group (equal volume of distilled water), model group C (equal volume of distilled water) and Yinqiao Powder low - and high - dose groups (24.18, 72.54 g crude drug/kg), with eight mice in each group. The corresponding drugs (0.2 mL/10 g) or equal volume of distilled water were administered by gavage at 6 h after nasal drip of LPS, once a day for 7 d. The expression levels of IgA and Occludin protein in nasal mucosa and the serum dextran level were detected. **Results** Compared with those in the normal control group, the expression levels of IgA and Occludin protein in the nasal mucosa of mice in the model group A were significantly lower only on the first and third days after single nasal drip of LPS ($P < 0.05$). Compared with those in the normal control group, the expression level of IgA protein in the nasal mucosa of mice was significantly lower after continuous nasal drip of LPS for 1 and 3 times in the model group B, the expression level of Occludin protein was significantly lower and the level of serum dextran was significantly higher after continuous nasal drip of LPS for 3, 5, 7 times in the model group B ($P < 0.05$). Compared with those in the normal control group, the expression level of Occludin protein in the nasal mucosa was significantly lower, while the level of serum dextran was significantly higher in model group C. Compared with

*基金项目:国家自然科学基金[81860724];云南省科技厅基础研究计划项目[202001AZ070001-001];云南省科技厅中医联合面上项目[2019FF002(-054)]。

第一作者:杨居崩,女,哈尼族,在读硕士研究生,研究方向为中药药理与应用,(电子信箱)1742312505@qq.com。

[△]通信作者:李秀芳,女,汉族,教授,硕士生导师,研究方向为中药药理与应用,(电子信箱)sofinelxf@163.com。

that in the model group C, the expression level of Occludin protein in the nasal mucosa of mice in Yinqiao Powder low - and high - dose groups was significantly higher, the level of serum dextran in Yinqiao Powder low - and high - dose groups was significantly lower, while the expression level of IgA protein in the nasal mucosa of mice in high - dose Yinqiao Powder group was significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Yinqiao Powder can improve the function of immune barrier of nasal mucosal in model mice, its mechanism relates to promoting the expression level of Occludin protein in nasal mucosa, reducing the permeability of nasal mucosal epithelial barrier, so as to improve the mechanical barrier function of nasal mucosa. It can also improve the immune barrier function of nasal mucosa by promoting the expression of IgA.

Key words: Yinqiao Powder; lipopolysaccharide; low nasal mucosa barrier function; mice; Occludin protein; immunoglobulin A; dextran

上呼吸道感染(URTI)是外鼻孔至环状软骨下缘包括鼻、咽或喉部急性炎症的总称,常由病毒和细菌相互作用引起,包括普通感冒、流行性感、病毒性咽炎等^[1-2]。由于引起URTI的病原微生物绝大部分经口鼻进入机体,因此鼻黏膜屏障对于防御病原体进入机体至关重要。该屏障由机械屏障、化学屏障、微生物屏障和免疫屏障有机地结合在一起,共同阻止病原微生物对机体的侵袭^[3]。鼻黏膜免疫功能低下是URTI发生的重要原因,也与URTI反复发作密切相关^[4-5]。银翘散源于清代医家吴鞠通《温病条辨》,被称为“辛凉平剂”,临床常用于治疗普通感冒、流行性感、急性支气管炎等疾病,疗效良好。课题组前期研究发现,银翘散可通过增强上呼吸道免疫屏障功能发挥预防及改善URTI的作用^[6-8],本研究中探讨了银翘散对模型小鼠鼻黏膜屏障功能低下的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器: Infinite M200 PRO型酶标仪(瑞士Tecan公司); EPS-301型垂直电泳仪、Mini Trans-Blot® Cell型湿转仪,均购自美国Bio-Rad公司; UVP凝胶成像分析系统(美国Bio Spectrum公司); XS125A型分析天平(瑞士Precisa公司)。

试剂: BCA蛋白浓度检测试剂盒(批号为090321211027)、RIPA裂解液(批号为20211104)、过硫酸铵(APS)(批号为ST005)、TEMED(批号为ST728),均购自上海碧云天生物技术有限公司; 吐温-20(德国Biofroxx公司,批号为EZ6789B150); 10%十二烷基硫酸钠(SDS,批号为G522KA5701)、二硫苏糖醇(DTT,批号为A620058-0025),均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Tris(批号为1109U071)、1 mol/L Tris-HCl缓冲液(批号为20191217)、1.5 mol/L Tris-HCl缓冲液(批号为20211230)、甘氨酸(批号为1210J061),均购自北京索莱宝科技有限公司; 免疫球蛋白A抗体(Anti-IgA,美国Novus Biologicals公司,批号为NB7501); Rabbit Anti-Goat IgG(H+L)(批号为20000332)、Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(批号为20000373)、 β -Actin Mouse McAb(批号为10021787)、紧密连接蛋白(Occlu-

din) Rabbit PolyAb(批号为13409-1-AP),均购自美国Proteintech公司; 脂多糖(LPS,批号为068M4093V)、异硫氰酸荧光素(FITC)-葡聚糖(批号为CBW4630),均购自美国Sigma公司; 水为去离子水。

饮片: 金银花(批号为C180301)、连翘(批号为C180601)、桔梗(批号为C181001)、竹叶(批号为C190201)、生甘草(批号为C180501)、淡豆豉(批号为C190401)、牛蒡子(批号为C180801)、苇根(批号为C180901)、薄荷(批号为C181204)、荆芥穗(批号为C190701),均购自云南慈慧药业有限公司。

动物: SPF级雄性KM小鼠,5周龄,体质量18~20 g,购自成都达硕实验动物有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(川)2020-030,饲养于云南中医药大学动物实验室[SYXK(滇)K2017-0005],饲养期间小鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料。饲养环境: 昼夜各半、循环照明,湿度恒定,温度为22~25℃。所有操作均符合云南中医药大学实验动物伦理学要求(审批号R-06202009)。

1.2 方法

1.2.1 药液制备

除薄荷和荆芥穗外,取其余药材饮片,加入12倍量的水,浸泡30 min,煎煮10 min,再将薄荷和荆芥穗倒入共煎5 min,滤过,取续滤液,45℃下旋蒸至所需浓度。4℃保存,使用时以温水预热,1周内使用^[9]。

1.2.2 LPS单次滴鼻刺激实验

分组与建模: 将40只小鼠分为正常对照组(8只)和模型A组(32只)。模型A组小鼠以LPS(2 mg/kg,每20 g体质量20 μ L,每侧鼻腔各10 μ L)单次滴鼻,正常对照组小鼠滴鼻等体积磷酸盐缓冲液(PBS)。

IgA及Occludin蛋白表达: 采用Western blot法。模型A组滴鼻结束后1,3,5,7 d时各取8只小鼠,过量麻醉处死,剥取小鼠鼻黏膜,剪碎,加入1 mL RIPA裂解液,冰上匀浆,14 000 r/min离心5 min,取上清,以BCA法检测蛋白浓度。SDS-PAGE电泳,电转,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,清洗3次,加入一抗,4℃孵育过夜,清洗3次,加入二抗,室温振荡孵育1 h,清洗3次,加入ECL化学发光试剂,显影、成像。将条带灰度值数字化,目的条带与内

参条带灰度比值为各目的蛋白相对表达量。

1.2.3 LPS 连续滴鼻刺激实验

分组与建模:将40只小鼠分为正常对照组(8只)和模型B组(32只)。滴鼻剂量同1.2.2项。模型B组各取8只小鼠分别连续1,3,5,7 d滴鼻给药,每天1次,均于末次滴鼻前1 h以FITC-葡聚糖滴鼻。正常对照组小鼠滴鼻等体积PBS。

IgA及Occludin蛋白表达:末次给药后处死小鼠,剥取鼻黏膜,按1.2.2项下Western blot法测定蛋白相对表达量。

鼻黏膜上皮屏障通透性:采用酶标仪测定小鼠血清葡聚糖水平,以评估小鼠鼻黏膜上皮屏障通透性,水平越高表明通透性越好。

1.2.4 银翘散对模型小鼠的影响

分组与建模:将32只小鼠分为正常对照组(等体积蒸馏水)、模型C组(等体积蒸馏水),以及银翘散低、高剂量组(相当于生药24.18 g/kg和72.54 g/kg),各8只。除正常对照组外(等体积PBS滴鼻),其余组小鼠以LPS(剂量同1.2.2项)滴鼻后6 h灌胃相应药物(0.2 mL/10 g)或等体积蒸馏水,每天1次,连续7 d。

IgA及Occludin蛋白表达:末次给药后处死小鼠,剥取鼻黏膜,按1.2.2项下Western blot法测定蛋白相对表达量。按1.2.3项下方法评估小鼠鼻黏膜上皮屏障通透性。

1.3 统计学处理

采用SPSS 26.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。资料符合正态分布且各组方差齐,两组间比较行 t 检验,两组以上行单因素方差分析,两两比较行 $LSD-t$ 检验;资料符合正态分布但各组方差不齐,或资料不符合正态分布且各组方差不齐,行Kruskal-Wallis非参数检验,两两比较,采用Bonferroni法校正 P 值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用GraphPad Prism 9.0软件作图。

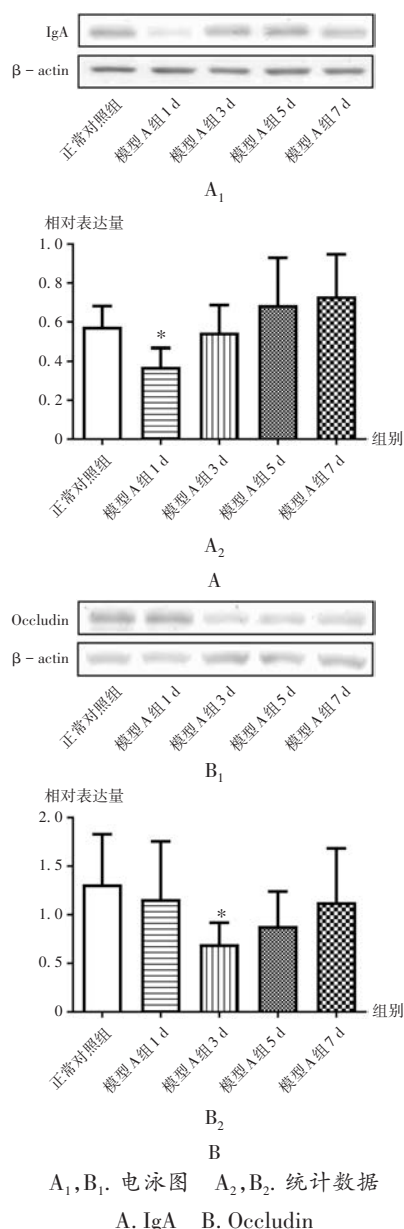
2 结果

2.1 LPS 单次滴鼻后小鼠鼻黏膜组织中 IgA 及 Occludin 蛋白表达水平

与正常对照组比较,模型A组小鼠鼻黏膜组织中IgA蛋白表达水平仅在滴鼻后1 d时显著降低($P < 0.01$),3,5,7 d时持续升高且3 d时基本恢复正常;Occludin蛋白表达水平仅在3 d时显著降低($P < 0.01$)。详见图1。

2.2 LPS 连续滴鼻后小鼠鼻黏膜组织中 IgA 及 Occludin 蛋白表达、鼻黏膜上皮屏障通透性

与正常对照组比较,模型B组予LPS滴鼻1次(1 d 1次,下同)和连续滴鼻3次时,小鼠鼻黏膜组织中IgA



注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。图2同。
图1 LPS单次滴鼻后小鼠鼻黏膜组织中IgA,Occludin蛋白表达水平

A₁,B₁. Electrophoretogram A₂,B₂. Statistical data
A. IgA B. Occludin

Note:Compared with those in the normal control group,* $P < 0.05$,
** $P < 0.01$ (for Fig. 1-2).

Fig. 1 Expression levels of IgA and Occludin protein in nasal mucosa of mice after single nasal drip of LPS

蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$),连续滴鼻5,7次时,IgA蛋白表达水平虽持续升高,但未恢复至正常水平;Occludin蛋白表达水平在连续滴鼻3次时显著降低($P < 0.01$)。与正常对照组比较,模型B组连续滴鼻3,5,7次后,小鼠血清葡聚糖水平显著升高($P < 0.05$)。详见图2。

2.3 银翘散对模型小鼠相关指标的影响

与正常对照组比较,模型C组小鼠鼻黏膜组织中

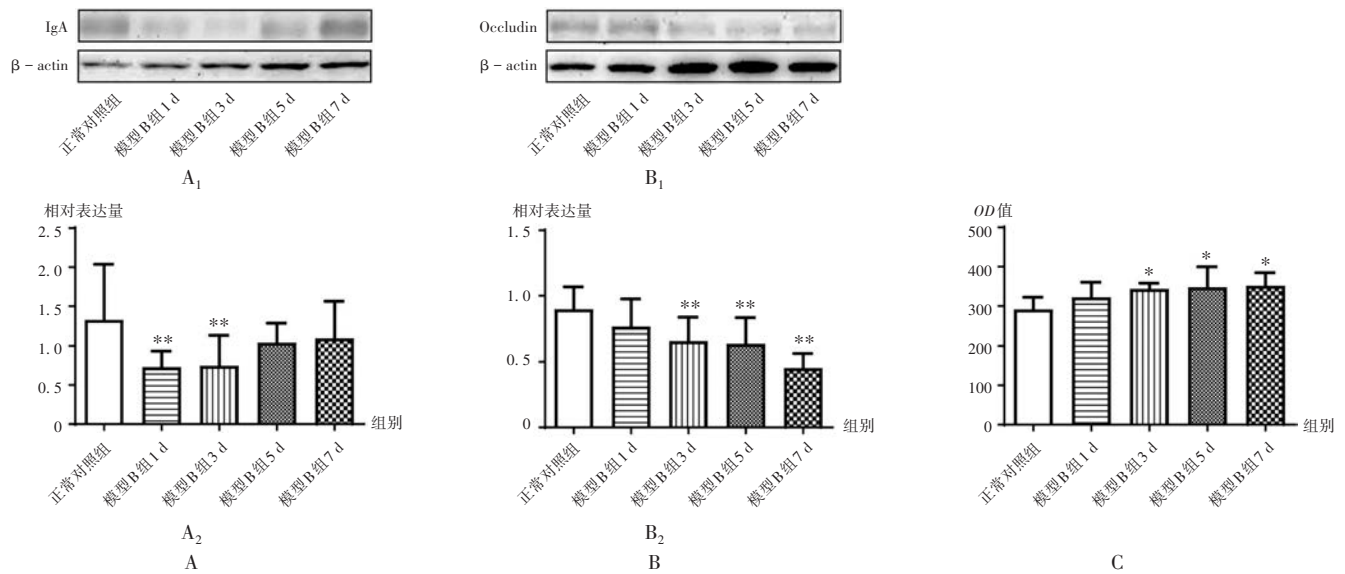


图2 LPS连续滴鼻后小鼠鼻黏膜组织中IgA、Occludin蛋白表达水平及血清葡聚糖水平
A₁, B₁. Electrophoretogram A₂, B₂. Statistical data
A. IgA B. Occludin C. 葡聚糖

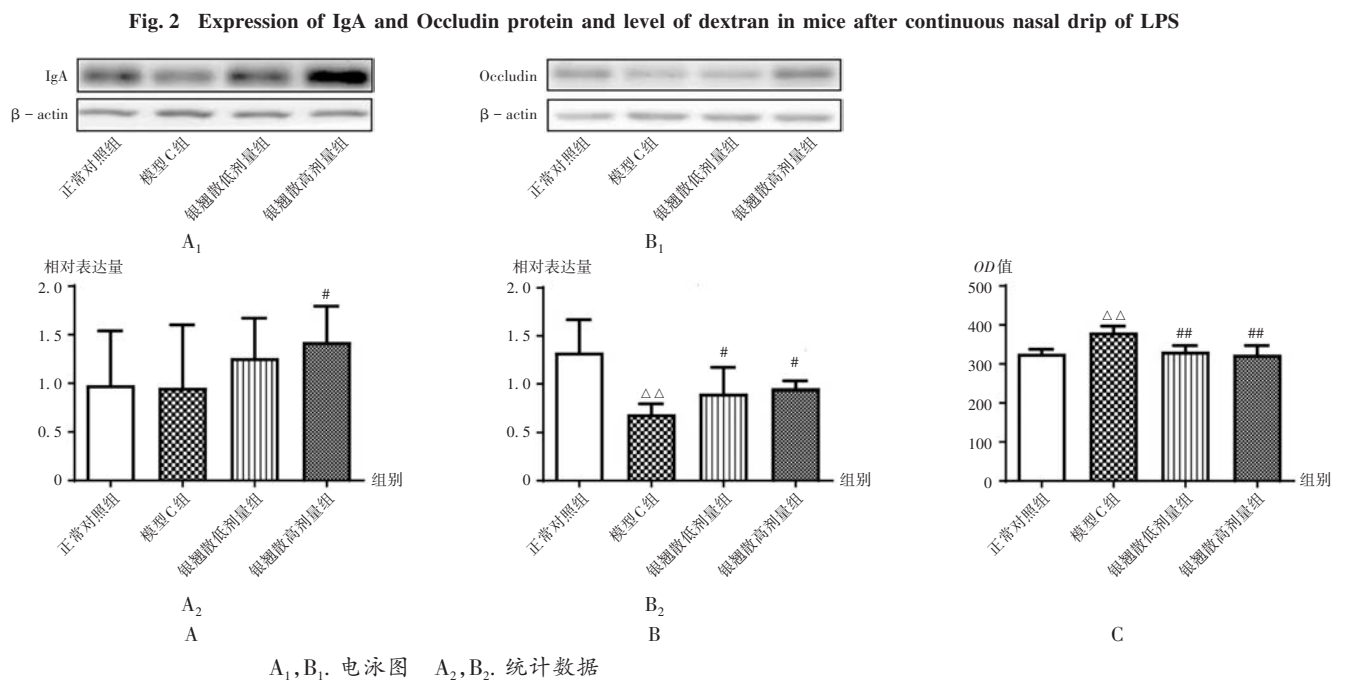


图3 银翘散对模型小鼠相关指标的影响($\bar{X} \pm s, n = 10$)
A₁, B₁. Electrophoretogram A₂, B₂. Statistical data
A. IgA B. Occludin C. 葡聚糖

注:与正常对照组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与模型C组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ 。
Note: Compared with those in the normal control group, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; Compared with those in the model group C, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$.

Fig.3 Effect of Yinqiao Powder on relevant indexes of model mice

Occludin蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$),血清葡聚糖水平显著升高($P < 0.01$);与模型C组比较,银翘散低、高剂量组小鼠鼻黏膜组织中Occludin蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),血清葡聚糖水平显著降低($P < 0.01$);

银翘散高剂量组小鼠鼻黏膜组织中IgA蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。详见图3。

3 讨论

鼻黏膜屏障功能低下是URTl发病的重要原因,气

管炎、支气管炎、肺炎等严重的下呼吸道感染也常始于URTI^[10-11],故保持鼻黏膜屏障功能的完整性对于防治URTI具有重要意义。有研究表明,IgA有助于预防流感,鼻腔或血清中IgA含量较高的H1N1流感患者,恢复时间更短^[12-13]。Occludin蛋白是首个完整的形成紧密连接的跨膜蛋白^[14-15],在维持上皮细胞紧密连接屏障中起关键作用,Occludin蛋白缺失将导致大分子的选择通透性增加^[16]。本研究结果表明,以LPS分别单次滴鼻后第1天和第3天,小鼠鼻黏膜组织中IgA和Occludin蛋白表达水平明显降低,随后开始升高至接近正常水平,说明LPS单次刺激诱导的炎症较轻,免疫屏障和机械屏障破坏程度轻,容易恢复至正常水平。LPS连续滴鼻诱导持续炎症刺激,滴鼻1次和连续3次时,小鼠鼻黏膜组织中IgA蛋白表达水平明显降低,Occludin蛋白表达水平在连续滴鼻3,5,7次时明显降低,血清中FITC-葡聚糖水平升高,即鼻黏膜上皮屏障的通透性升高,说明持续的炎症刺激可降低鼻黏膜免疫屏障、机械屏障的功能,这为病原微生物的入侵提供了便利。

银翘散是治疗URTI的代表方,具有辛凉透表、清热解毒的功效,用于温病初起、邪犯肺卫证。方中以金银花、连翘为君药,可疏散风热、清热解毒;薄荷、牛蒡子可辛凉解表、清利咽喉,桔梗可开宣肺气、止咳利咽,芦根、竹叶可清热生津,同为佐药;生甘草既可调和药性、护胃安中,又合桔梗清利咽喉,为佐使。现代药理学研究表明,银翘散具有一定的解热^[17]、镇痛^[18]、抗炎^[19]、抗病毒^[20]的作用。课题组前期研究表明,银翘散可明显降低寒冷刺激后模型大鼠血清中炎症因子水平,并能提高鼻黏膜局部免疫防御能力^[21]。本研究结果表明,与模型C组比较,银翘散低、高剂量组小鼠鼻黏膜组织中IgA、Occludin蛋白表达水平明显升高,鼻黏膜上皮屏障通透性明显降低。

综上所述,银翘散可改善模型小鼠鼻黏膜免疫屏障功能,机制可能为促进鼻黏膜中Occludin蛋白表达,降低鼻黏膜上皮屏障的通透性,从而提高鼻黏膜机械屏障功能。还可通过促进IgA的表达,提高鼻黏膜免疫屏障功能。

参考文献

- [1] GRIEF SN. Upper respiratory infections[J]. Prim Care, 2013, 40(3):757-770.
- [2] JAIN N, LODHA R, KABRA SK. Upper respiratory tract infections[J]. Indian J Pediatr, 2001, 68(12):1135-1138.
- [3] 李立,廖星,赵静,等. 中国小儿急性上呼吸道感染相关临床指南的解读[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(8):1510-1513.
- [4] ZUERCHER AW, CEBRA JJ. Structural and functional differences between putative mucosal inductive sites of the rat[J]. Eur J Immunol, 2002, 32(11):3191-3196.
- [5] PIATTI G, ALLEGRA L, AMBROSETTI U, et al. Nasal ciliary function and ultrastructure in Down syndrome[J]. Laryngoscope, 2001, 111(7):1227-1230.
- [6] LAI K, LIN L, LIU B, et al. Eosinophilic airway inflammation is common in subacute cough following acute upper respiratory tract infection[J]. Respirology, 2016, 21(4):683-688.
- [7] 柳丽松,殷红,王维丽,等. 银翘散对呼吸道黏膜免疫功能低下合并甲型流感病毒感染模型小鼠的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(8):70-72.
- [8] 李娟,雷娜,段小花,等. 寒冷刺激致小鼠上呼吸道黏膜免疫功能低下模型的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(8):1662-1664.
- [9] 贾波,李冀. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2014:35.
- [10] YAN Y, TAN KS, LI C, et al. Human nasal epithelial cells derived from multiple subjects exhibit differential responses to H3N2 influenza virus infection *in vitro* [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138(1):276-281.
- [11] 杨居崩,赵显芳,聂发龙,等. 反复冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫屏障功能的影响及中医解表方的作用研究[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6):715-723.
- [12] TIERNAN C, LYONS M, COMYNS T, et al. Salivary IgA as a Predictor of Upper Respiratory Tract Infections and Relationship to Training Load in Elite Rugby Union Players [J]. J Strength Cond Res, 2020, 34(3):782-790.
- [13] 段训新,石玉英,黄龙,等. 反复上呼吸道感染患儿血清25羟维生素D₃与LL-37及Ig水平的相关性[J]. 医学信息, 2020, 33(9):162-164.
- [14] FURUSE M, HIRASE T, ITOH M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions[J]. J Cell Biol, 1993, 123(6 Pt 2):1777-1788.
- [15] RAHIMI N. Defenders and Challengers of Endothelial Barrier Function[J]. Front Immunol, 2017, 8:1847.
- [16] AL-SADI R, KHATIB K, GUO S, et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 300(6):G1054-G1064.
- [17] 刘亚娟,李悦,霍炳杰. 银翘散及银翘散加玄参对致热大鼠体温的影响及作用机制浅析[J]. 河北中医, 2010, 32(4):594-597.
- [18] 潘竞镛,刘惠纯,韩超,等. 银翘散浓缩袋泡剂抗炎解热镇痛 抗菌和抗病毒作用[J]. 广东药学, 2003, 13(1):43-47.
- [19] 霍炳杰,常靓. 不同煎煮方式对银翘散汤剂抗炎解热作用的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(5):1031-1033.
- [20] 石钺,石任兵,刘斌,等. 银翘散抗流感病毒有效部位群中黄酮类成分研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(5):320-322.
- [21] 肖纯. 解表方对寒冷刺激大鼠鼻黏膜免疫功能低下的影响[D]. 昆明:云南中医药大学, 2019.

(收稿日期:2021-12-01;修回日期:2022-03-14)