

连翘苷对鼻窦炎大鼠炎症因子及鼻黏膜重塑的影响

孟 欣, 张晓敏, 韩 雪*
(郑州大学附属儿童医院中医科, 河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 考察连翘苷对鼻窦炎大鼠炎症因子及鼻黏膜重塑的影响。**方法** 通过鼻窦腔注入金黄色葡萄球菌建立鼻窦炎模型, 大鼠随机分为模型组和连翘苷低、高剂量组 (50、100 mg/kg), 每组 10 只; 另取 10 只大鼠, 鼻窦腔注入生理盐水, 作为假手术组, 各组灌胃给药 6 周。观察大鼠鼻窦炎相关症状并评分, 检测血清炎症因子 (TNF- α 、IL-8、IL-1 β) 水平, HE 染色观察鼻黏膜组织病理变化 (包括嗜酸粒细胞、肥大细胞数量), Western blot 法检测鼻黏膜组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p50、NF- κ B p65 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 连翘苷各剂量组症状评分, 血清 TNF- α 、IL-8、IL-1 β 水平, 鼻黏膜组织嗜酸粒细胞、肥大细胞数量, 鼻黏膜组织 TLR4、MyD88、NF- κ B p50、NF- κ B p65 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 连翘苷可减轻鼻窦炎大鼠症状, 抑制炎症反应及鼻黏膜重塑, 可能与抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路活化有关。

关键词: 连翘苷; 鼻窦炎; 炎症因子; 鼻黏膜重塑; TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)04-1345-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.04.047

鼻窦炎是鼻窦黏膜炎症性疾病的总称, 通常由感染、过敏反应或机械性阻塞引起, 可导致黏膜肿胀、分泌物增多及鼻窦通气和排液功能受损, 其全球发病率为 5% ~ 12%, 并呈逐年上升趋势, 在工业化程度较高的国家和地区更为常见^[1]。本病临床表现多样, 包括鼻塞、脓涕、面部疼痛或压力感、头痛、嗅觉减退或丧失等, 不仅影响患者的生活质量, 还可导致鼻息肉、慢性咳嗽、哮喘等并发症, 同时与精神不振、慢性疲劳、注意力不集中、记忆力下降等全身症状相关, 对患者心理健康和社会功能造成负面影响^[2]。目前, 临床治疗鼻窦炎的方式主要包括药物、理疗和手术, 但均存在一定局限性, 整体疗效不理想^[3]。

连翘苷提取自传统中药连翘, 具有抗炎、抗氧化等多种药理作用, 是中成药鼻炎片的主要成分之一, 被广泛用于流感、发热等外感疾病的治疗^[4-6], 但目前连翘苷对鼻窦炎的效果及其作用机制尚不明确。因此, 本研究建立鼻窦炎大鼠模型, 观察连翘苷对其炎症因子水平及鼻黏膜结构、功能的影响, 并探究可能的机制。

1 材料

1.1 菌株 金黄色葡萄球菌, 购自上海恒科生物科技有限公司, 经药敏实验及全自动微生物分析系统鉴定。

1.2 动物 50 只 SD 大鼠, SPF 级, 8 周龄, 雌雄各半, 体质量 (240 \pm 20) g, 购自上海属源生物科技有限公司

[实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2024-0001], 适应性饲养 1 周, 温度 (23 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (50 \pm 10)%, 12 h/12 h 明暗交替。

1.3 试剂与药物 连翘苷 (纯度>98%, 货号 ab87987) 由杭州兴韵生物科技有限公司提供。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 (interleukin, IL) -8、IL-1 β 试剂盒 (上海烜雅生物科技有限公司); HE 染色试剂盒 (美国 Abcam 公司); 兔抗鼠 Toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4)、髓样细胞分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)、核转录因子 κ B (nuclear transcription factor κ B, NF- κ B) p50、NF- κ B p65 一抗 (日本 MBL 公司)。

1.4 仪器 Infinite M200 Pro 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); CX43 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); GelDoc Go 凝胶成像分析仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 菌悬液制备 MBH 培养基培养金黄色葡萄球菌, 血球计数板计数, 无菌生理盐水稀释, 调整浓度为 1 \times 10⁹ CFU/mL。

2.2 模型建立 30 只大鼠固定于手术板上, 腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉, 鼻背部脱毛, 鼻部正中线下经利多卡因局部浸润麻醉, 沿鼻部正中线下行 5 mm 长切口, 将皮肤瓣翻起, 暴露上颌窦前壁, 沿鼻腔骨壁刮骨 3 mm,

收稿日期: 2024-09-10

基金项目: 河南省自然科学基金青年基金 (212300410268)

作者简介: 孟 欣 (1987—), 男, 博士, 主治医师, 从事中医药防治儿童呼吸系统疾病研究。Tel: 15237171059, E-mail: mengxin9737@163.com

*通信作者: 韩 雪 (1968—), 女, 硕士, 主任中医师, 从事中医药防治儿童呼吸系统、神经系统疾病研究。Tel: 13700881016, E-mail: 716168815@qq.com

切开黏膜进入右侧鼻腔内，在窦腔及窦口位置放置 Merocel 止血海绵，将 0.1 mL 菌悬液注入鼻腔，完成后逐层缝合切口，并确保手术区域严密闭合；另取 10 只大鼠作为假手术

组，将菌悬液更换为生理盐水，其余操作相同，鼻窦炎症状评分>7 分表明模型建立成功，从擦鼻、喷嚏、鼻腔分泌物、鼻腔炎症 4 个方面评价^[7]，见表 1。

表 1 鼻窦炎症状评分标准

评分/分	擦鼻	喷嚏	鼻腔分泌物	鼻腔炎症
1	30 min 内 1~4 次	30 min 内 1~4 个	少量鼻涕	鼻腔充血
2	30 min 内 5~9 次	30 min 内 5~9 个	鼻涕流至鼻孔	鼻腔红肿
3	30 min 内 ≥10 次	30 min 内 ≥10 个	鼻腔周围有分泌物	鼻腔出血

2.3 分组及给药 将造模成功的大鼠随机分为模型组和连翘苷低、高剂量组，连翘苷低、高剂量组灌胃给予 50、100 mg/kg 连翘苷溶液^[8]，假手术组和模型组灌胃给予等容量生理盐水，每天 1 次，持续 6 周。

2.4 血清 TNF-α、IL-8、IL-1β 水平检测 大鼠最后 1 次给药后禁水禁食 12 h，腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉，腹主动脉取血 5 mL，静置，3 500 r/min 离心 10 min，取血清，按照试剂盒说明书检测 TNF-α、IL-8、IL-1β 水平。

2.5 鼻黏膜组织病理变化观察 采血后颈椎脱臼处死大鼠，冰上解剖分离出鼻黏膜组织，切取部分组织块，4% 多聚甲醛固定，梯度乙醇脱水，透明，浸蜡，制成石蜡切片，用于 HE 染色；其余组织迅速保存于液氮中，用于 Western blot 检测。将石蜡切片脱蜡、水化后行 HE 染色，苏木精染色 5 min，蒸馏水冲洗 3 次，伊红复染 2 min，蒸馏水冲洗 3 次，乙醇梯度脱水，二甲苯透明，中性树脂封片，于光学显微镜下观察，拍照并记录鼻黏膜组织病理改变。以 400 倍放大倍数观察大鼠鼻黏膜组织中的肥大细胞和嗜酸粒细胞，选取 5 个不重复视野，ImageJ 软件扫描，计算每个视野中肥大细胞、嗜酸粒细胞数量。

2.6 Western blot 法检测鼻黏膜组织 TLR4、MyD88、NF-κB p50、NF-κB p65 蛋白表达 取液氮中保存的大鼠鼻黏膜组织，加 PBS 研磨匀浆，裂解液裂解，12 000 r/min 离心 15 min，取上清，BCA 法测定蛋白浓度，与 4 倍体积上样缓冲液混合，金属浴加热 5 min 变性，取 40 μg 上样，进行 12% SDS-PAGE 电泳，湿法转膜至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉溶液封闭，加入兔抗鼠 TLR4、MyD88、NF-κB p50、NF-κB p65 一抗（1：500），4 ℃ 孵育过夜，TBST 液清洗后加入山

羊抗兔二抗（1：2 000），室温孵育 1 h，ECL 化学发光法显色，暗室中曝光、显影、定影。以 GAPDH 为内参，通过成像分析仪扫描并分各蛋白条带的灰度值，并以蛋白、内参条带灰度值比值为蛋白表达量。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 24.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 连翘苷对鼻窦炎大鼠症状的影响 由表 2 可知，给药前，与假手术组比较，模型组和连翘苷各剂量组大鼠症状评分升高（*P*<0.01）；给药后，与假手术组比较，模型组大鼠症状评分升高（*P*<0.01）；与模型组比较，连翘苷各剂量组大鼠症状评分降低（*P*<0.01），以高剂量组更明显（*P*<0.01）。

表 2 各组大鼠症状评分比较（分， $\bar{x} \pm s$ ，*n*=10）

组别	给药前	给药后
假手术组	0.10±0.03	0.20±0.03
模型组	8.50±1.01**	8.40±0.99**
连翘苷低剂量组	8.40±0.98**	3.20±0.46##
连翘苷高剂量组	8.60±1.04**	2.30±0.54##△△

注：与假手术组比较，** *P*<0.01；与模型组比较，## *P*<0.01；与连翘苷低剂量组比较，△△ *P*<0.01。

3.2 连翘苷对鼻窦炎大鼠血清 TNF-α、IL-8、IL-1β 水平的影响 由表 3 可知，与假手术组比较，模型组大鼠血清 TNF-α、IL-8、IL-1β 水平升高（*P*<0.01）；与模型组比较，连翘苷各剂量组大鼠血清 TNF-α、IL-8、IL-1β 水平降低（*P*<0.05，*P*<0.01），以高剂量组更明显（*P*<0.05，*P*<0.01）。

表 3 各组大鼠血清 TNF-α、IL-8、IL-1β 水平比较（pg/mL， $\bar{x} \pm s$ ，*n*=10）

组别	TNF-α	IL-8	IL-1β
假手术组	62.14±10.32	81.15±13.29	52.16±10.30
模型组	179.35±26.19**	299.87±37.44**	145.16±23.31**
连翘苷低剂量组	113.27±21.84##	203.35±50.13##	103.52±20.07#
连翘苷高剂量组	87.33±19.46##△	129.97±21.33##△△	82.20±16.97##△

注：与假手术组比较，** *P*<0.01；与模型组比较，# *P*<0.05，## *P*<0.01；与连翘苷低剂量组比较，△ *P*<0.05，△△ *P*<0.01。

3.3 连翘苷对鼻窦炎大鼠鼻黏膜病理变化的影响 由图 1 可知，假手术组大鼠鼻黏膜结构完整，纤毛柱状上皮纤毛完好，无炎症细胞浸润及血管扩张；模型组大鼠鼻窦黏膜上皮细胞散在脱落、坏死，黏膜下层有纤维组织及部分腺体增长，有大量炎症细胞浸润；连翘苷各剂量组大鼠上皮缺损和炎症浸润有所减轻，黏膜结构有所改善，其中高剂

量组改善效果更优。由表 4 可知，与假手术组比较，模型组大鼠鼻黏膜组织嗜酸粒细胞、肥大细胞数量增加（*P*<0.01）；与模型组比较，连翘苷各剂量组大鼠鼻黏膜组织嗜酸粒细胞、肥大细胞数量减少（*P*<0.01），以高剂量组更明显（*P*<0.05，*P*<0.01）。

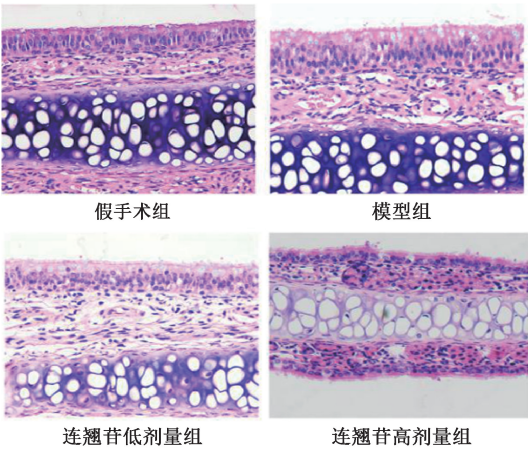


图 1 各组大鼠鼻黏膜组织病理变化 (HE, ×400)

表 4 各组大鼠鼻黏膜组织嗜酸粒细胞、肥大细胞数量比较 (个/视野, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	嗜酸粒细胞	肥大细胞
假手术组	0.20±0.05	0.60±0.16
模型组	9.40±1.63**	25.40±4.16**
连翘苷低剂量组	4.60±0.98##	16.40±3.37##
连翘苷高剂量组	2.80±0.57##△△	12.20±3.10##△

注：与假手术组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ ；与连翘苷低剂量组比较，△ $P < 0.05$ ，△△ $P < 0.01$ 。

表 5 各组大鼠鼻黏膜组织 TLR4、MyD88、NF-κB p50、NF-κB p65 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	TLR4	MyD88	NF-κB p50	NF-κB p65
假手术组	0.11±0.02	0.09±0.02	0.12±0.03	0.08±0.02
模型组	1.15±0.19**	0.98±0.13**	1.09±0.15**	0.98±0.13**
连翘苷低剂量组	0.53±0.07##	0.48±0.06##	0.41±0.06##	0.35±0.04##
连翘苷高剂量组	0.40±0.05##△△	0.31±0.05##△△	0.28±0.04##△△	0.19±0.02##△△

注：与假手术组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ ；与连翘苷低剂量组比较，△△ $P < 0.01$ 。

4 讨论

鼻窦炎的发病机制复杂，由病原体感染、宿主免疫反应、环境、遗传等多种因素交互作用而引发，其中病原体感染是直接诱因，宿主免疫反应则在疾病发生发展中起关键作用^[9-10]。此外，鼻窦炎可能由多种细菌或真菌引起，传统抗生素难以彻底清除，加之空气污染、过敏原等环境因素加重症状，导致难以治愈^[11-12]。

中药在鼻窦炎治疗中显示出独特的优势，具有整体调节、多靶点作用特性。连翘性味苦、寒，是中医常用清热解毒药物，具有清热解毒、散结消肿功效，能缓解鼻黏膜的充血和水肿，改善鼻塞症状，张青青等^[13]通过发掘鼻鼽用药规律发现，连翘是组方核心之一。连翘苷是连翘主要活性成分之一，具有抗炎、抗氧化、免疫调节等多种药理作用，能抑制炎症因子释放，减轻炎症反应，抑制多种呼吸道病毒复制，减少病毒感染引起的细胞损伤，从而对鼻窦炎的病理过程产生干预作用；还具有清除自由基的能力，能减轻氧化应激损伤，保护细胞免受氧化损伤，同时可调节免疫细胞功能，增强机体免疫功能^[14]。

嗜酸性粒细胞浸润是鼻窦炎的显著特征之一，通常与

3.4 连翘苷对鼻窦炎大鼠鼻黏膜组织 TLR4、MyD88、NF-κB p50、NF-κB p65 蛋白表达的影响 由图 2、表 5 可知，与假手术组比较，模型组大鼠鼻黏膜组织 TLR4、MyD88、NF-κB p50、NF-κB p65 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，连翘苷各剂量组大鼠鼻黏膜组织 TLR4、MyD88、NF-κB p50、NF-κB p65 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)，以高剂量组更明显 ($P < 0.01$)。

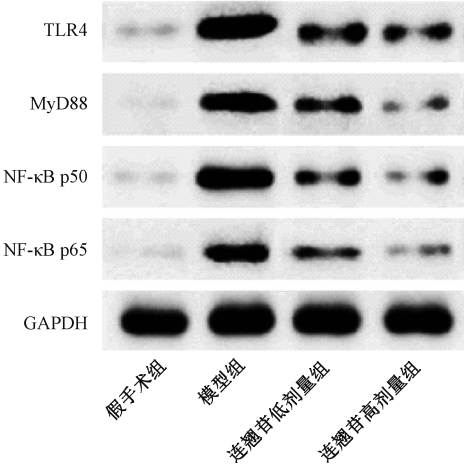


图 2 各组大鼠鼻黏膜组织 TLR4、MyD88、NF-κB p50、NF-κB p65 蛋白条带

Th2 型炎症及过敏反应有关，肥大细胞可释放组胺、白三烯、血小板活化因子、细胞因子等多种炎症介质，参与炎症反应的调节，其活化和数量增加与疾病的严重程度有关，并与嗜酸性粒细胞参与鼻窦炎的組織重塑过程，影响鼻黏膜的结构和功能^[15-16]。本研究结果显示，连翘苷可降低鼻窦炎大鼠症状评分及血清 TNF-α、IL-8、IL-1β 水平，减少鼻黏膜组织嗜酸粒细胞、肥大细胞数量，可改善症状，减轻炎症反应，抑制鼻黏膜重塑。

TLR4 是一种模式识别受体，能识别脂多糖相关分子模式，并激活下游信号传导途径，导致炎症因子的表达增加^[17]。MyD88 是 TLR4 信号通路中的关键分子，能将 TLR4 的信号传递给 NF-κB，后者激活后从 IκB 中解离，转移到细胞核中，激活细胞因子、趋化因子、黏附分子等炎症相关基因表达。在鼻窦炎中，TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路的激活可能导致炎症反应的持续和加剧，影响黏膜屏障功能和炎症反应^[18]，还可能促进炎症细胞的募集和活化，以及炎症介质的产生^[19]，因此，该信号通路可能在鼻窦炎的发病机制中扮演着关键角色，通过调节炎症反应和免疫应答来影响疾病的进展和治疗，而抑制该信号通路成为治疗

鼻窦炎的潜在策略。本研究发现，与假手术组比较，模型组大鼠鼻黏膜组织 TLR4、MyD88、NF-κB p50、NF-κB p65 蛋白表达升高，而连翘苷可降低以上蛋白表达。

综上所述，TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路在鼻窦炎中被激活，而连翘苷可能通过抑制该通路活化来减轻鼻窦炎大鼠症状，抑制炎症反应及鼻黏膜重塑。

参考文献：

[1] Hellings P W, Fokkens W J, Orlandi R, *et al.* The EUFOREA pocket guide for chronic rhinosinusitis[J]. *Rhinology*, 2023, 61(1): 85-89.

[2] Keating M K, Phillips J C, Phillips J. Chronic rhinosinusitis[J]. *Am Fam Physician*, 2023, 108 (4): 370-377.

[3] Ge M, Liu D H, Ference E H. Pediatric chronic sinusitis: diagnosis and management[J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2022, 30(1): 68-77.

[4] 李洪彬, 徐信峰, 王 静. 高效液相—测多评法测定鼻炎片中羧基苍术苷、苍术苷、连翘酯苷 B、连翘酯苷 A、连翘苷、升麻素苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷[J]. *药物评价研究*, 2021, 44(8): 1681-1687.

[5] Chen Y, Wu C, Li H, *et al.* Antiviral effect and mechanism of phillyrin and its reformulated FS21 against influenza[J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2023, 17(3): e13112.

[6] Zhang S, Sun F, Zhu J, *et al.* Phillyrin ameliorates influenza a virus-induced pulmonary inflammation by antagonizing CXCR2 and inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. *Virol J*, 2023, 20(1): 262.

[7] 徐辉聪, 钟零珠, 梁卫勤, 等. 黄连解毒汤对急性鼻窦炎模型大鼠鼻黏膜 MAPK/NF-κB 信号通路的影响[J]. *中医药导报*, 2022, 28(10): 18-23.

[8] Chen S, Zhang S, Wu H, *et al.* Protective effect of phillyrin against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats and oxidative stress-induced cell apoptosis and autophagy in neurons[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 7940-7950.

[9] Kato A, Peters A T, Stevens W W, *et al.* Endotypes of chronic

rhinosinusitis: Relationships to disease phenotypes, pathogenesis, clinical findings, and treatment approaches[J]. *Allergy*, 2022, 77(3): 812-826.

[10] Bai J, Tan B K, Kato A. Endotypic heterogeneity and pathogenesis in chronic rhinosinusitis[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2024, 24(1): 1-8.

[11] Zawadzka-Glos L. Microbiota and antibiotic therapy in rhinosinusitis[J]. *Otolaryngol Pol*, 2023, 77(5): 36-42.

[12] 陈俊涛, 陈 丽, 柴 强, 等. 辛芷鼻康汤对慢性鼻鼻窦炎中小学生患者的临床疗效[J]. *中成药*, 2023, 45 (1): 344-346.

[13] 张青青, 王 敏, 刘午阳, 等. 从火热论治鼻鼈古文献用药规律的发掘研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(8): 1278-1282.

[14] 梁 勇, 武军元, 刘禹赓, 等. 连翘苷调控 miR-146a 对脂多糖诱导的肾小管上皮细胞 HK-2 凋亡及氧化应激的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(10): 2438-2443.

[15] Iwasaki N, Poposki J A, Oka A, *et al.* Single cell RNA sequencing of human eosinophils from nasal polyps reveals eosinophil heterogeneity in chronic rhinosinusitis tissue[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2024, 154(4): 952-964.

[16] Gevaert P, Han J K, Smith S G, *et al.* The roles of eosinophils and interleukin-5 in the pathophysiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2022, 12(11): 1413-1423.

[17] 董 敏, 徐 敏, 陈一源. 葛根素对多囊卵巢综合症大鼠糖代谢及 TLR4/NF-κB 信号通路的影响[J]. *中成药*, 2022, 44(3): 758-763.

[18] Du X, Yu L, Wang L, *et al.* Reduced proliferative capacity and defense against staphylococcus aureus in human nasal mucosal epithelium lacking ZNF365[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2024, 185(5): 466-479.

[19] Khayer N, Jalessi M, Farhadi M, *et al.* S100a9 might act as a modulator of the toll-like receptor 4 transduction pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 9722.