

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-1β）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-κB p50、NF-κB 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-1β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-κB p50、NF-κB 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-κB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-κB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，购自上海辰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±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±2）℃，相对湿度（50±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-1β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κB（nuclear transcription factor κB, NF-κB）p50、NF-κB 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 1×10^9 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，鼻部正中线皮下经利多卡因局部浸润麻醉，沿鼻部正中线行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，主治中医师，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 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

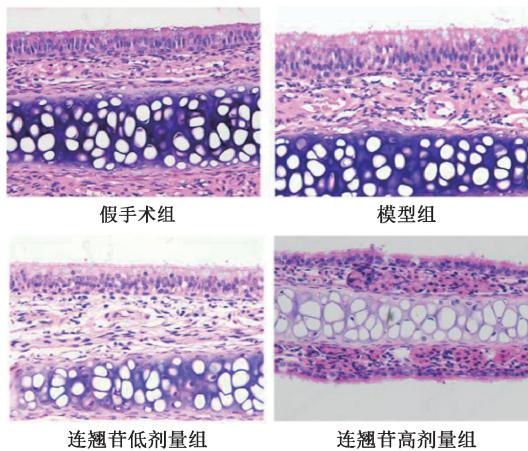
表 3 各组大鼠血清 TNF-α、IL-8、IL-1β 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$, n=10)

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, $\times 400$)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 ($P<0.01$)。

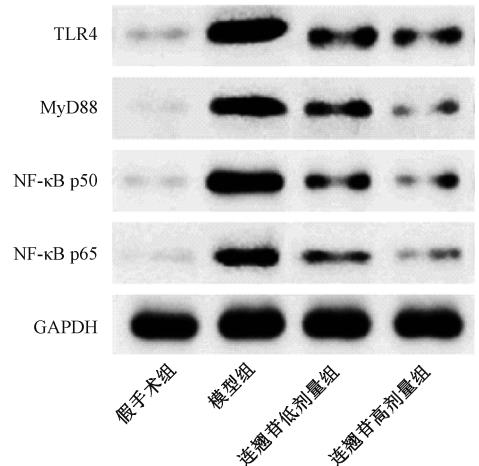


图2 各组大鼠鼻黏膜组织 TLR4、MyD88、NF-κB p50、NF-κB p65 蛋白条带

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组织重塑过程, 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,徐信蜂,王 静.高效液相一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窦黏膜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-Głos 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.从火热论治鼻鼽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,刘禹康,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.