

川芎茶调散对变应性鼻炎小鼠的作用及机制研究

任孟月，肖颖，唐铭蔚，王宓

(广东药科大学中药学院，广东广州 510006)

摘要：目的 探讨川芎茶调散对变应性鼻炎小鼠的干预作用及机制。方法 将小鼠随机分为空白组、模型组、阳性组(地塞米松, 0.05 mg/mL)及川芎茶调散低、中、高剂量组(0.25、0.5、1 g/mL)，通过腹腔注射卵清蛋白(OVA)致敏加滴鼻激发制备小鼠变应性鼻炎模型，给药组灌胃相应药物，连续2周，灌胃后30 min给予4% OVA滴鼻刺激，末次滴鼻后，观察30 min内小鼠挠鼻及喷嚏次数。小鼠摘眼球取血，取鼻黏膜，制备苏木素-伊红和过碘酸雪夫染色切片。ELISA法检测血清中OVA-sIgE水平，RT-qPCR法检测鼻黏膜IL-6、IL-1 β 、IL-4、IFN- γ 、T-bet、GATA3、STAT1、STAT6 mRNA表达。结果 与空白组比较，模型组小鼠喷嚏和挠鼻次数增多($P<0.01$)，出现严重鼻黏膜组织间水肿、嗜酸性粒细胞浸润及杯状细胞增生，OVA-sIgE水平和IL-6、IL-1 β 、IL-4、GATA-3、STAT6 mRNA表达升高($P<0.01$)，IFN- γ 、T-bet、STAT1 mRNA表达降低($P<0.01$)；与模型组比较，川芎茶调散中、高剂量组均可改善上述指标($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 川芎茶调散可有效改善OVA所致小鼠变应性鼻炎，可能是通过调控JAK/STAT信号通路，回调Th1/Th2漂移，从而发挥作用。

关键词：川芎茶调散；变应性鼻炎；Th1/Th2免疫平衡；JAK/STAT信号通路

中图分类号：R285.5

文献标志码：B

文章编号：1001-1528(2022)12-4014-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.046

变应性鼻炎又称过敏性鼻炎，是由易感个体鼻黏膜接触应变原后引起的I型变态反应疾病，随着对变应性鼻炎机制的研究深入，Th1/Th2免疫失衡被认为是变应性鼻炎发病的关键^[1-2]。变应性鼻炎患者通常表现出清水样鼻涕、阵发性喷嚏、鼻痒和鼻塞等症状，严重影响生活质量。据统计，变应性鼻炎的发病率为10%~40%，且呈逐年增长趋势^[3]。目前变应性鼻炎的西医治疗常使用糖皮质激素类药、抗组胺药等，虽能缓解过敏症状，但作用局限，且可能存在多种不良反应^[4-7]。因此，寻找安全有效的变应性鼻炎治疗药物十分重要。

川芎茶调散始载于宋代《太平惠民和剂局方》，由川芎、白芷、羌活、细辛、防风、荆芥、薄荷、甘草组成，具疏风止痛之效，广泛用于治疗偏头痛^[8]。临幊上，川芎茶调散也常被用于治疗变应性鼻炎，疗效显著且副作用小^[9-12]，但其药理研究较少。因此，本研究采用卵清蛋白(OVA)刺激制备变应性鼻炎小鼠模型，探究川芎茶调散的干预作用，同时通过检测鼻黏膜Th1、Th2型细胞因子及酪氨酸激酶/信号传导子和转录激活子(JAK/STAT)通路相关基因表达，初步探讨川芎茶调散对变应性鼻炎小鼠的作用机制，以期为该方的临床使用及新药开发提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 BABL/c 雄性小鼠 60只，体质量(18±2)g，

由南方医科大学实验动物管理中心提供，实验动物生产许可证号SCXK(粤)2016-0041，小鼠适应性饲养1周，自由饮水和进食标准饲料。动物实验经广东药科大学实验动物委员会审查并批准(批准号gdplac2021133)。

1.2 试剂与药物 川芎茶调散由甘草、羌活、川芎、防风、荆芥、白芷、薄荷、细辛组成，饮片来源见表1，经广东药科大学刘基柱教授鉴定为正品。地塞米松、卵清蛋白(批号D1756、A5253)均购自美国Sigma公司；OVA特异性IgE(OVA-sIgE)ELISA试剂盒(批号439807)购于美国BioLegend公司；逆转录试剂盒(货号)及TB Green荧光定量试剂盒(货号RR047A、RR820A)均购自日本TaKaRa公司。生理盐水(批号120040901)购置浙江天瑞药业有限公司；氢氧化铝(批号201907Q1)购自天津市大茂化学试剂厂；二甲苯购自国药集团化学试剂有限公司。

表1 饮片信息

饮片	产地	生产厂家	批号
甘草	内蒙古	广州至信中药饮片有限公司	200902
羌活	四川	广东省药材公司中药饮片厂	Q1020511
川芎	四川	昆明蓝海中药材饮片有限公司	20200432
防风	内蒙古	广东和翔制药有限公司	HX20D01
荆芥	江西	广东源生泰药业有限公司	20030104
白芷	四川	广东省药材公司中药饮片厂	B5220611
薄荷	安徽	国药集团冯了性(佛山)药材饮片有限公司	C22008158
细辛	吉林	广东天泰药业有限公司	201001

收稿日期：2022-04-19

基金项目：国家自然科学基金项目(82004252)；广东省医学科学技术研究基金项目(A2020456)

作者简介：任孟月，女，博士，讲师，研究方向为中药配伍及方剂组方原理。Tel：13268268218，E-mail：Rmy0711@163.com

1.3 仪器 TGL-16型高速冷冻离心机(广州仪风电子商务有限公司); SHZ-D(Ⅲ)型循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); BX53型荧光显微镜(日本Olympus公司); Multiskan Sky型全波长酶标仪(美国赛默飞公司); CFX96型实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 药物制备 称取薄荷72g,川芎、荆芥各36g,白芷、羌活、甘草各18g,细辛9g,防风13.5g。除薄荷、荆芥外,其余6味药加10倍量水浸泡30min,武火煮沸,转文火保持微沸40min,加入薄荷、荆芥继续煎煮10min,四层纱布趁热过滤;滤渣加8倍量水,煮沸后文火煎煮30min,四层纱布趁热过滤,合并滤液,减压浓缩至1g/mL,即为高剂量川芎茶调散,倍比稀释后,分别制得中、低剂量川芎茶调散(0.25、0.5g/mL)。

2.2 变应性鼻炎小鼠模型建立 实验第0、7、14天,小鼠腹腔注射混悬致敏剂(OVA 0.5mg/mL、氢氧化铝0.50mg/mL),每只小鼠200μL,共3次,为基础致敏;实验第21~34天,以4% OVA溶液滴鼻进行激发,每侧20μL,即建立变应性鼻炎模型。

2.3 分组及给药 随机将小鼠分为空白组、模型组、阳性(地塞米松,0.05mg/mL)组和川芎茶调散低、中、高剂量组(0.25、0.5、1g/mL),每组10只,除空白组外,其余组小鼠均按“2.2”项下方法制备变应性鼻炎模型。给药组于第21天起,每天灌胃给药1次(0.2mL/20g),持续2周,给药期间每天给予4% OVA溶液滴鼻刺激,每侧20μL;模型组与空白组均灌胃蒸馏水,实验共持续35d。

2.4 行为学观察 末次滴鼻刺激后,观察并记录30min内各组小鼠挠鼻及喷嚏次数。

2.5 样本采集 小鼠摘眼球取血,血液室温静置2h,4℃、4000r/min离心10min,取上清液,于-80℃保存,用于ELISA检测;分离小鼠上颌骨,沿鼻中线剪开鼻腔,小心分离鼻中隔,保证鼻中隔所粘附的鼻黏膜的完整,一部分鼻黏膜置于40%甲醛中固定,用以制作病理切片,另一部分冻存于-80℃,用于RT-qPCR检测。

2.6 鼻黏膜组织病理学观察 离体鼻黏膜固定24h后,逐级置于不同体积分数乙醇中脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,切片(厚度4μm),常规制片,分别进行苏木素-伊红(HE)染色和过碘酸雪夫(PAS)染色,光学显微镜观察鼻黏膜损伤、嗜酸性粒细胞浸润及杯状细胞增生情况,对病理切片进行分级评分,评分标准见表2。

表2 鼻黏膜组织病理学评分标准

评分/分	鼻黏膜完整度	嗜酸性粒细胞浸润	杯状细胞增生
1	无明显破损(≤3处)	无明显浸润(≤3处)	无明显增生(≤3处)
2	中度破损(3~10处)	适中浸润(3~10处)	中度增生(3~10处)
3	严重破损(>10处)	严重浸润(>10处)	严重增生(>10处)

2.7 ELISA法检测小鼠血清中OVA-sIgE水平 按照ELISA试剂盒说明书准备各工作液,绘制标准曲线,检测

小鼠血清中OVA-sIgE水平。

2.8 RT-qPCR法检测小鼠鼻黏膜IL-6、IL-1β、IL-4、IFN-γ、T-bet、GATA-3、STAT1、STAT6 mRNA表达 取50mg鼻黏膜组织,加0.5mL细胞裂解液,按照试剂盒说明书提取总RNA,测定其浓度及纯度,按照试剂盒说明书配置逆转录反应液,进行逆转录反应,于-20℃下保存,再按照试剂盒说明书配制PCR反应液,通过PCR仪进行扩增反应,反应条件为95℃预变性5min;95℃变性10s,55℃退火30s,72℃延伸20s,共40个循环。引物序列见表3。

表3 引物序列

基因	序列(5'→3')
IL-1β	正向 GCAACTGTTCTGAACCTCAACT 反向 ATCTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6	正向 TAGTCCTCCATACCCCAATTCTCC 反向 TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
INF-γ	正向 TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 反向 TGGCTCTGCAGGATTTCTATG
IL-4	正向 ACAGGAGAAGGGACGCCAT 反向 CAACCCCTACAGACGAGCTCA
T-bet	正向 AGCAAGGACGGCGAACATGTT 反向 GTGGACATATAACCGGTTCCCG
GATA-3	正向 AAGCTCAGTATCCGCTGACG 反向 GTTCCGTAGTAGGACGGGAC
STAT1	正向 TCACAGTGGTCGAGCTTCAG 反向 CGAGACATCATAGGCAGCGTG
STAT6	正向 CTCTGTGGGGCTAATTCTCA 反向 CATCTGAACCGACCAGGAACT
GAPDH	正向 ACCTGCCAAGTATGATGACATCA 反向 GGTCCTCAGTGTAGCCAAGAT

2.9 统计学分析 通过SPSS 20.0软件进行处理,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 川芎茶调散对变应性鼻炎小鼠喷嚏及挠鼻次数的影响 如表4所示,与空白组比较,模型组小鼠喷嚏次数与挠鼻次数增加($P < 0.01$),表明变应性鼻炎模型造模成功;与模型组比较,川芎茶调散各剂量组可减少小鼠喷嚏次数($P < 0.01$),川芎茶调散中、高剂量组可减少小鼠挠鼻次数($P < 0.01$),其中高剂量组作用与阳性组相当。

表4 各组小鼠喷嚏及挠鼻次数比较(次, $\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	喷嚏次数	挠鼻次数
空白组	6.2±1.7	4.1±1.8
模型组	54.4±6.8 ^{##}	27.6±4.6 ^{##}
阳性组	20.7±3.7 ^{**}	15.2±2.9 ^{**}
川芎茶调散低剂量组	35.8±6.1 ^{**}	24.8±3.7
川芎茶调散中剂量组	26.9±5.8 ^{**}	18.1±3.1 ^{**}
川芎茶调散高剂量组	21.3±4.2 ^{**}	13.8±3.1 ^{**}

注:与空白组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

3.2 川芎茶调散对变应性鼻炎小鼠鼻黏膜组织病理学的影响 如图1~2所示,空白组小鼠鼻黏膜组织结构完整连续,上皮细胞排列紧密有规则,无纤毛缺失,无明显炎症

细胞浸润现象，杯状细胞较少；模型组小鼠鼻黏膜破损伤严重，有大量纤毛脱落，存在明显的嗜酸性粒细胞浸润和组织间水肿现象，并可见杯状细胞明显增生；各给药组小鼠鼻黏膜损伤均得到不同程度的缓解，川芎茶调散低剂量组小鼠鼻黏膜仍存在一定炎症细胞浸润与杯状细胞增生，而

川芎茶调散高剂量与阳性药作用相当，小鼠鼻黏膜组织结构均较为完整，纤毛脱落极少，嗜酸性粒细胞及杯状细胞存在较少。如表5所示，与模型组比较，川芎茶调散中、高剂量组可降低鼻黏膜病理学损伤评分 ($P<0.01$)，其中高剂量组作用与阳性组相当。

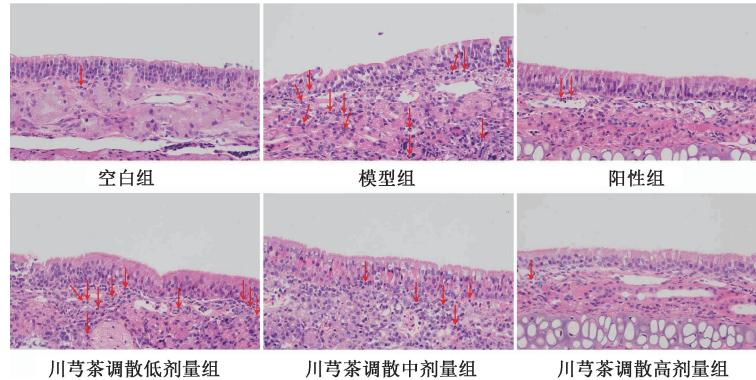


图1 各组小鼠鼻黏膜组织HE染色($\times 400$)

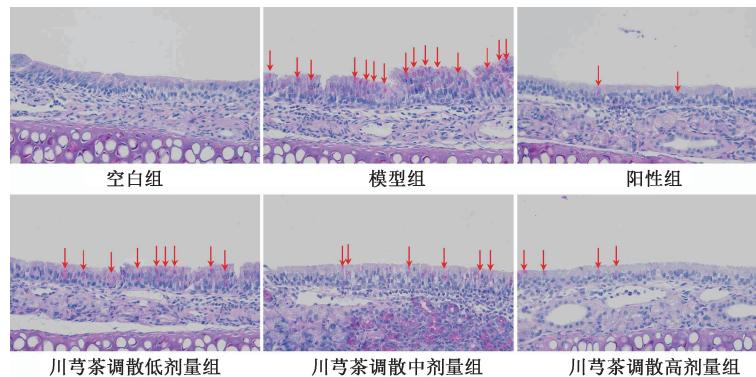


图2 各组小鼠鼻黏膜组织PAS染色($\times 400$)

表5 各组小鼠鼻黏膜组织病理学评分比较(分, $\bar{x} \pm s$, n=4)

组别	评分
空白组	3.25±0.50
模型组	8.25±0.96 ^{##}
阳性组	4.00±0.82 ^{**}
川芎茶调散低剂量组	8.00±0.82
川芎茶调散中剂量组	6.00±0.82 ^{**}
川芎茶调散高剂量组	4.50±0.58 ^{**}

注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

3.3 川芎茶调散对变应性鼻炎小鼠血清OVA-sIgE水平的影响 如表6所示，与空白组比较，模型组小鼠血清OVA-sIgE水平升高 ($P<0.01$)，表明变应性鼻炎小鼠造模成功；与模型组比较，川芎茶调散各剂量组小鼠血清OVA-sIgE水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，其中高剂量组作用与阳性组相当。

3.4 川芎茶调散对变应性鼻炎小鼠鼻黏膜组织IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-4 mRNA表达的影响 如图3所示，与空白组比较，模型组小鼠鼻黏膜组织炎症因子IL-6、IL-1 β 和Th2型因子IL-4 mRNA表达升高 ($P<0.01$)，Th1型因子

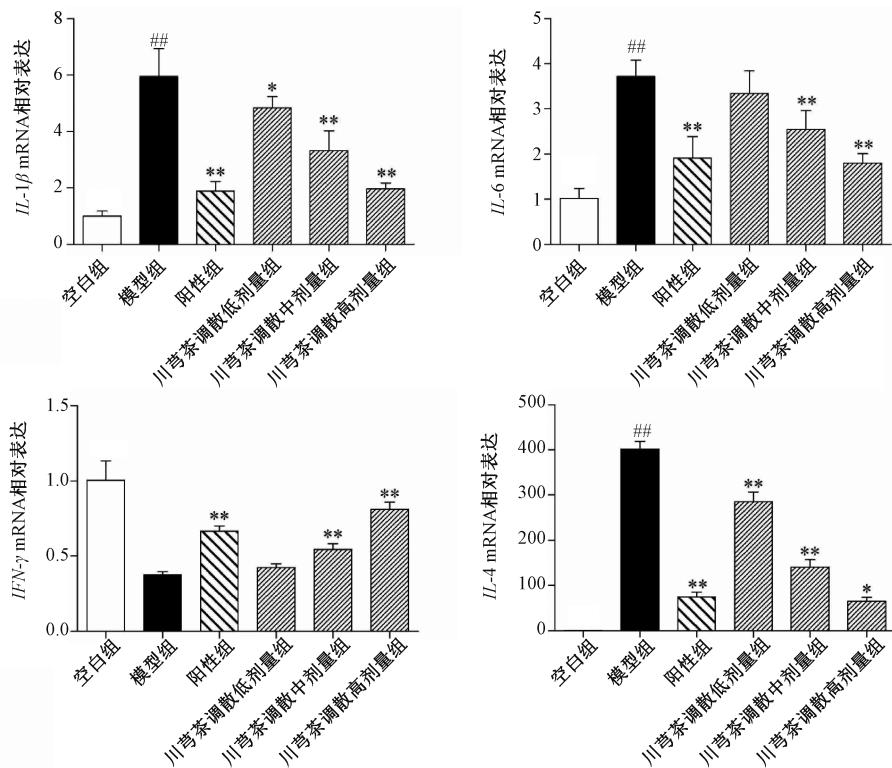
IFN- γ mRNA表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，川芎茶调散各剂量组小鼠鼻黏膜组织IL-1 β 、IL-4 mRNA表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，川芎茶调散中、高剂量组小鼠鼻黏膜组织IL-6 mRNA表达降低 ($P<0.01$)，IFN- γ mRNA表达升高 ($P<0.01$)，其中高剂量组作用与阳性组相当。

表6 各组小鼠血清OVA-sIgE水平比较(pg/mL, $\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	OVA-sIgE
空白组	39.07±5.77
模型组	184.64±13.17 ^{##}
阳性组	79.47±6.82 ^{**}
川芎茶调散低剂量组	146.24±23.18 [*]
川芎茶调散中剂量组	109.19±16.24 ^{**}
川芎茶调散高剂量组	77.80±8.77 ^{**}

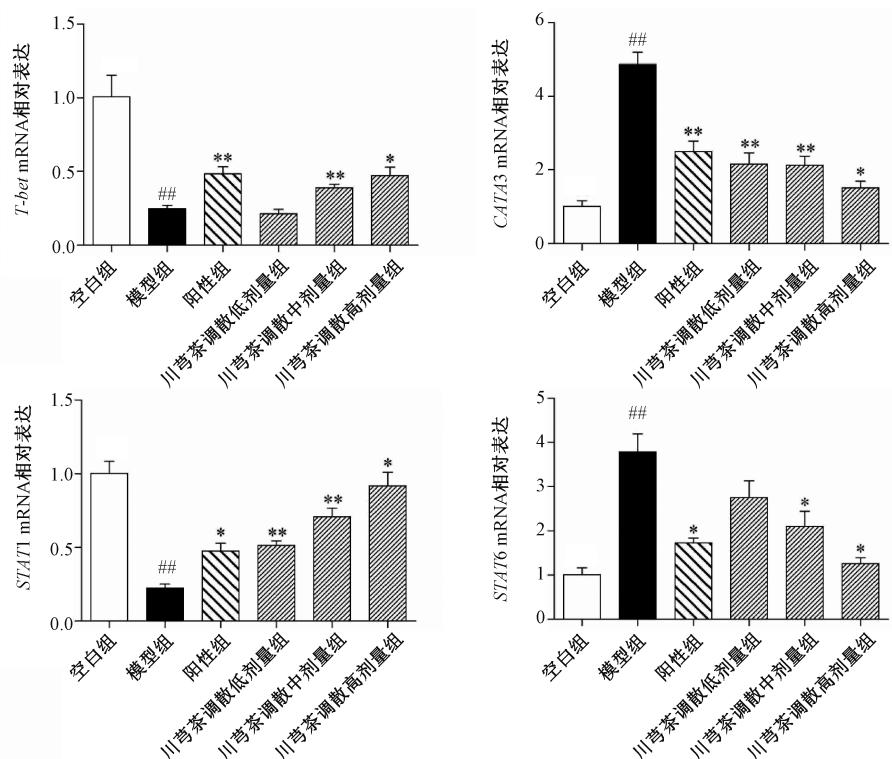
注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

3.5 川芎茶调散对变应性鼻炎小鼠鼻黏膜组织JAK/STAT通路相关基因表达的影响 如图4所示，与空白组比较，模型组小鼠鼻黏膜组织T-bet、STAT1 mRNA表达降低 ($P<0.01$)，GATA3、STAT6 mRNA表达升高 ($P<0.01$)；与模



注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图3 各组小鼠鼻黏膜组织 *IL-6*、*IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-4* mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, n=4)



注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图4 各组小鼠鼻黏膜组织 *T-bet*、*GATA3*、*STAT1*、*STAT6* mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, n=4)

型组比较，川芎茶调散中、高剂量组小鼠鼻黏膜组织 *T-bet* mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，*STAT6* mRNA 表达

降低 ($P<0.05$)，川芎茶调散各剂量组小鼠鼻黏膜组织 *GATA3* mRNA 表达降低 ($P<0.01$)，*STAT1* mRNA 表达升高

($P<0.01$)，其中高剂量组作用效果略优于阳性组。

4 讨论

变应性鼻炎是由易感个体接触变应原引起的鼻黏膜慢性炎症，其发病与 Th1/Th2 漂移相关。正常情况下，CD4⁺ 原始 T 细胞 (Th0) 会按一定比例向 Th1 和 Th2 细胞分化，两者处于相对平衡状态，Th1 细胞产生的 IL-2 和 INF-γ 等能够抑制 Th0 向 Th2 细胞分化，Th2 细胞产生的 IL-4 和 IL-13 能够抑制 Th1 细胞生成^[13-14]。变应性鼻炎在机体引起异常免疫反应，会导致 Th1 和 Th2 免疫反应平衡被打破。本实验发现，与空白组比较，模型组小鼠鼻黏膜 Th1 型因子 IFN-γ mRNA 表达降低，Th2 型因子 IL-4 mRNA 表达升高，表明 OVA 所致变应性鼻炎小鼠存在明显的 Th1/Th2 漂移现象。

JAK/STAT 信号通路是 Th1 和 Th2 免疫应答过程的重要通路^[15-16]。Th1 型因子 IFN-γ 与其受体结合后，可通过 JAK/STAT1 信号转导通路激活 *T-bet* 基因，诱导其表达，对 Th1 应答形成正性反馈作用^[17]。Th2 型细胞因子 IL-4 与其受体结合后，通过 JAK/STAT6 信号转导通路激活 *GATA3* 基因，可进一步促进 IL-4 的分泌从而增强 Th2 免疫分化^[18]。因此，本研究选择 JAK/STAT 信号通路为切入点，探究川芎茶调散干预变应性鼻炎的作用机制。

实验发现，川芎茶调散可以减少变应性鼻炎小鼠的喷嚏及挠鼻次数，减轻鼻黏膜组织病理学损伤，降低血清 OVA-sIgE 水平及鼻黏膜相关炎症因子表达，还可升高鼻黏膜组织 Th1 型因子表达，降低 Th2 型因子表达，表明川芎茶调散对变应性鼻炎有明显的治疗效果，且对 Th1/Th2 漂移有回调作用。同时，川芎茶调散还可升高变应性鼻炎小鼠鼻黏膜组织 *T-bet* 和 *STAT1* mRNA 表达，降低 *GATA3* 和 *STAT6* mRNA 表达，表明该方可能是通过 JAK/STAT 通路，共同调节 Th1/Th2 漂移。

综上所述，川芎茶调散可缓解变应性鼻炎小鼠鼻炎症状，减轻炎症反应，可能是通过调控 JAK/STAT 信号通路，回调 Th1/Th2 漂移，发挥治疗变应性鼻炎作用。本研究可为川芎茶调散的临床使用及新药开发提供一定实验及理论依据。

参考文献：

- [1] Galli S J, Tsai M, Piliponsky A M. The development of allergic inflammation[J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 445-454.
- [2] Farhadi M, Barati M, Tabatabaii A, et al. Th1 and Th2 cytokine gene expression in atopic and nonatopic patients with nasal polypsis[J]. *Ear Nose Throat J*, 2015, 94(6): 228-235.
- [3] Meng Y F, Wang C S, Zhang L. Advances and novel developments in allergic rhinitis[J]. *Allergy*, 2020, 75(12): 3069-3076.
- [4] 梁美君, 徐睿, 许庚. 变应性鼻炎研究新进展[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 29(3): 202-206.
- [5] 李伟梅, 王玲莉, 宣伟军. 变应性鼻炎的中西医治疗研究进展[J]. 广西中医药大学学报, 2019, 22(1): 71-75.
- [6] 黄海葵, 万世恒, 胡金成. 过敏性鼻炎药物的研究进展[J]. 药物生物技术, 2019, 26(2): 186-188.
- [7] 张世海. 变应性鼻炎的药物治疗进展[J]. 天津药学, 2019, 31(4): 72-75.
- [8] 王国有, 王云, 张雪, 等. 川芎茶调散的现代研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13): 228-234.
- [9] 阎晓琳, 杨莎莎, 高洪娇, 等. 张勤修教授运用川芎茶调散加减治疗鼻鼽的临床经验[J]. 中医耳鼻喉科学研究, 2018, 17(2): 49-50.
- [10] 李静, 姜朱林, 吕丹, 等. 刘铁军教授运用川芎茶调散加味治疗过敏性鼻炎举隅[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(64): 156; 159.
- [11] 袁书贤, 张慧敏, 张勤修. 张勤修教授运用川芎茶调散治疗变应性鼻炎医案分析[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(3): 112-113.
- [12] 贺晋芳, 秦欣欣, 苏惠萍. 苏惠萍教授治疗过敏性鼻炎经验总结[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(2): 74-76.
- [13] Kumar Y, Bhatia A. Immunopathogenesis of allergic disorders: current concepts[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2013, 9(3): 211-216.
- [14] Frei R, Lauener R P, Crameri R, et al. Microbiota and dietary interactions: an update to the hygiene hypothesis[J]. *Allergy*, 2012, 67(4): 451-461.
- [15] Villarino A V, Kanno Y, Ferdinand J R, et al. Mechanisms of JAK/STAT signaling in immunity and disease[J]. *J Immunol*, 2015, 194(1): 21-27.
- [16] Bowen H, Kelly A, Lee T, et al. Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells[J]. *Clin Exp Allergy*, 2008, 38(9): 1422-1431.
- [17] Oestreich K J, Weinmann A S. Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation[J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(2): 191-195.
- [18] Zeng W P. ‘All things considered’: transcriptional regulation of T helper type 2 cell differentiation from precursor to effector activation[J]. *Immunology*, 2013, 140(1): 31-38.