

# 小青龙汤联合玉屏风散对变应性鼻炎大鼠 AQP5、NF- $\kappa$ B p65 和 p-CREB 表达的影响

马岩 王金昌 王树鹏

**【摘要】** 目的 基于 NF- $\kappa$ B 信号通路观察小青龙汤联合玉屏风散对变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 大鼠鼻黏膜 AQP5、NF- $\kappa$ B p65 和 p-CREB 表达的影响,揭示小青龙汤联合玉屏风散治疗 AR 的作用机制及以饮论治 AR 的合理性。**方法** 将清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 48 只随机分为 6 组,即分为正常组、AR 模型组、Forskolin 干预组、H89 干预组、PDTC 干预组、小青龙汤联合玉屏风散组,每组 8 只。采用卵蛋白全身致敏与局部攻击方法制作 AR 大鼠模型,观察小青龙汤联合玉屏风散组在治疗后鼻黏膜 AQP5、NF- $\kappa$ B p65 和 p-CREB 的表达。**结果** 模型组 AQP5、p-CREB 表达下调;Forskolin 干预组、PDTC 干预组、小青龙汤联合玉屏风散组均能使 AQP5、p-CREB 表达上调,而 cAMP 依赖蛋白激酶 (protein kinase A, PKA) 抑制剂 H89 能下调 AQP5、p-CREB 表达。模型组 NF- $\kappa$ B p65 表达上调,Forskolin 干预组、PDTC 干预组、小青龙汤联合玉屏风散组均能使 NF- $\kappa$ B p65 表达下调,而 PKA 抑制剂 H89 能上调 NF- $\kappa$ B p65 表达。**结论** 小青龙汤联合玉屏风散治疗变应性鼻炎作用机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路和兴奋 cAMP-PKA 信号通路使 AQP5 表达上调有关,为以饮论治 AR 奠定了现代生物学基础。

**【关键词】** 变应性鼻炎; 小青龙汤; 玉屏风散; NF- $\kappa$ B 信号通路; cAMP-PKA 信号通路

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.11.009

**Exploring the effect of *Xiaoqinglong* decoction and *Yupingfeng* powder on the expression of AQP5, NF- $\kappa$ B p65 and p-CREB in rats with allergic rhinitis** MA Yan, WANG Jin-chang, WANG Shu-peng. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Corresponding author: WANG Shu-peng, E-mail: sywangshupeng@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of the *Xiaoqinglong* decoction and *Yupingfeng* powder on the expression of AQP5, NF- $\kappa$ B p65 and p-CREB in nasal mucosa of allergic rhinitis rats in NF- $\kappa$ B signaling pathway, and reveal the mechanism of the *Xiaoqinglong* decoction and *Yupingfeng* powder in treating AR and the rationality of treating AR by phlegm and retained fluid. **Methods** 48 healthy male Wistar rats were divided into 6 groups by randomized blocks design: normal group, AR model group, Forskolin (cAMP activator) group, H89 (PKA inhibitor) group, PDTC (NF- $\kappa$ B inhibitor), and the *Xiaoqinglong* decoction and *Yupingfeng* powder group, 8 rats in each group. The AR rat model was made by the method of whole body sensitization and local attack. The expression of AQP5, NF- $\kappa$ B p65 and p-CREB were observed after the treatment. The results were statistically analyzed. **Results** The expression of AQP5 and p-CREB in the model group was decreased, and the expression of AQP5 and p-CREB in the Forskolin group, PDTC group, the *Xiaoqinglong* decoction and *Yupingfeng* powder group was increased, while the PKA inhibitor H89 could decrease the expression of AQP5. The expression of NF- $\kappa$ B p65 in the model group was increased, and the expression of NF- $\kappa$ B p65 in the Forskolin group, PDTC

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2013374)

作者单位: 110847 沈阳, 辽宁中医药大学基础医学院

作者简介: 马岩(1985-), 硕士, 医师。研究方向: 经方治疗免疫性疾病的研究。E-mail: 894957892@qq.com

通讯作者: 王树鹏(1973-), 博士, 教授, 硕士生导师。研究方向: 经方治疗免疫性疾病的研究。E-mail: sywangshupeng@163.com

group, the *Xiaoqinglong* decoction and *Yupingfeng* powder group was decreased, while the PKA inhibitor H89 could increase the expression of NF- $\kappa$ B p65. **Conclusion** *Xiaoqinglong* decoction and *Yupingfeng* powder treatment of allergic rhinitis mechanism may be related to the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway and cAMP-PKA signaling pathway to increase the AQP5 expression, which has laid the foundation of modern biology for treating AR by phlegm and retained fluid.

**【Key words】** Allergic rhinitis; *Xiaoqinglong* decoction; *Yupingfeng* powder; NF- $\kappa$ B signaling pathway; cAMP-PKA signaling pathway

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是临床上的常见病、多发病。据统计,其在全球发病率约为 25% ~ 35%<sup>[1]</sup>,部分地区甚至高达 44.2%<sup>[2]</sup>。AR 发病率呈现逐年上升的趋势,严重影响了患者的生活质量,已经成为影响人类健康的全球性问题之一。AR 发作时会流大量清水涕,此症状与中医学“饮”的特点相似,而“饮”的生成又与肺脾肾三脏阳气虚弱密不可分<sup>[3]</sup>,故从“阳气虚弱,水饮内停”立论,基于 NF- $\kappa$ B 信号通路,探讨“以饮论治”AR 生物学基础研究,为“以饮论治”变应性鼻炎提供实验理论依据,进一步证实中医“以饮论治”的科学性。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 48 只,体质量为 200 ~ 240 g,由辽宁中医药大学实验动物中心提供。合格证号:SCXK(辽)2010-0001。动物的一般状态好,鼻周无分泌物、无抓挠鼻现象、无喷嚏,皮毛光滑,活动及饮食正常,饲养于辽宁中医药大学动物实验中心,湿度适宜,室内通风及光线良好。饲料为标准动物饲料,由动物室提供。

### 1.2 药品与试剂

卵白蛋白:上海化学试剂厂,批号:20130108;卵白蛋白:上海化学试剂厂,批号:20130108。

抗原佐剂混悬液的组成:含卵白蛋白 1 mg、氢氧化铝凝胶 50 mL;核蛋白提取试剂盒(批号:BB-3166),购自上海邦奕生物科技有限公司;AQP5 抗体(批号:bs-1554R),购自北京博奥森生物技术有限公司;p-CREB 抗体(批号:bs-5270R),购自北京博奥森生物技术有限公司;HRP 标记的二抗(批号:bs-0295G-HRP),购自北京博奥森生物技术有限公司;PVDF 膜,购自北京索莱宝科技有限公司;蛋白 marker,购自 frements 生产;Forskolin(批号:S1612),购自碧云天生物技术有限公司;H89(批号:S1582),购自 selleck 生产。PDTC(批号:S1808),购自碧云天

生物技术有限公司;NF- $\kappa$ B p65 抗体(批号:bs-20160R),购自北京博奥森生物技术有限公司; $\beta$ -actin 抗体(批号:bs-0061R),购自北京博奥森生物技术有限公司;Histone H2A 抗体(批号:bs-3781R),购自北京博奥森生物技术有限公司;ECL 发光试剂盒、SDS-Page 凝胶试剂盒和总组蛋白提取试剂盒均购于碧云天生物。

### 1.3 分组和造模

将大鼠按体重采用随机区组法分为 6 组,即分成正常对照组、AR 模型组、Forskolin 干预组、H89 干预组、PDTC 干预组、小青龙汤联合玉屏风散组,每组 8 只。按照刘建国等<sup>[4]</sup>对变应性鼻炎大鼠模型建造,采用卵蛋白全身致敏与局部攻击方法制作 AR 大鼠模型。除正常对照组外,各组以 5% 卵蛋白混悬液致敏,腹腔注射,1 次/天,共 7 次;正常对照组:以等量生理盐水替代 5% 卵蛋白混悬液,方法和步骤同实验组。除正常对照组外,各组于第 15 天起,用 5% 卵蛋白混悬液 100  $\mu$ L 双侧滴鼻,每侧 50  $\mu$ L,1 次/天,共 7 次;正常对照组:以等量生理盐水替代 5% 卵蛋白混悬液,方法和步骤同实验组。

症状分级标准:鼻痒计分,轻擦鼻几下(<5)计 1 分;抓挠鼻面不止,到处擦(5 ~ 10),计 2 分;抓挠鼻面不止,到处擦(>10)计 3 分;喷嚏计分,1 ~ 3 个计 1 分,4 ~ 10 个计 2 分,11 个以上计 3 分;鼻涕计分,流到鼻前孔计 1 分,超过鼻前孔计 2 分,流涕满面计 3 分。记录时以叠加记总分,总分超过 5 分者为模型成功。观察时间为给药后 30 分钟。

### 1.4 给药

按照《药理实验方法学》人与动物等效剂量换算方法,人与大鼠药物每公斤体重剂量之比约为 1 : 6,因此各组药物灌胃剂量如下:(1)正常对照组:按照每 100 g 大鼠体质量予以 1 mL 生理盐水灌胃;(2)模型组:同正常对照组;(3)Forskolin 干预组:按按 5 mg/(kg · d)腹腔注射;(4)H89 干预组:按按 5 mg/(kg · d)腹腔注射;(5)PDTC 干预

组:按50 mg/(kg·d)腹腔注射;(6)小青龙汤联合玉屏风散组:按每1 kg大鼠体重予以8.4 mL所试药物煎剂(相当于8.4 g生药)灌胃。每天灌胃1次。

### 1.5 喷嚏、鼻抓痒计数

在处死前,给予5%卵蛋白混悬液100 μL滴鼻,观察30分钟并计数。鼻涕计分:在处死前,给予5%卵蛋白混悬液100 μL滴鼻,观察30分钟并计分。

### 1.6 取材

大鼠于最后1次灌胃后,腹腔注射1%苯巴比妥(40 mg/kg)麻醉,断头处死大鼠,同时取外周血,静置,3000 rpm,离心5分钟,取上清于冻存管中,-80℃存放备用。鼻背正中切开,迅速取出鼻中隔和鼻腔外侧壁呼吸区粘膜组织,黏膜组织迅速投入4%中性多聚甲醛溶液中(PH值约7.2)中,4℃固定过夜,双蒸水冲洗25分钟,存放于75%乙醇溶液,4℃保存。

### 1.7 检测指标

应有Western blotting检测核转录因子κB p65(nuclear transcription factor κB p65, NF-κB p65)表达、磷酸化cAMP应答元件结合蛋白(phosphorylated cAMP response element binding protein, p-CREB)(Ser133)表达、水通道蛋白5(aquaporin 5, AQP5)表达,具体操作方法按照说明书进行。抗体的稀释比例:AQP5多克隆抗体1:200、p-CREB(Ser133)单克隆抗体1:500、β-actin多克隆抗体1:1000、Histone H2A-1多克隆抗体1:300、β-actin多克隆抗体1:250。

### 1.8 统计学处理

实验数据采用SPSS 18.0统计软件进行分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组数据均符合正态分布,且方差齐,故多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 治疗后各组大鼠行为学指标比较

模型组与正常对照组相比较有显著性差异( $P < 0.05$ ),说明变应性鼻为大鼠造模成功。与模型组相比较,Forskolin干预组、PDTC干预组、H89干预组鼻和小青龙汤联合玉屏风散组大鼠在治疗后抓痒次数、喷嚏次数以及鼻涕计分均有所下降,差异

均有统计学意义( $P < 0.05$ )。Forskolin干预组、PDTC干预组与小青龙汤联合玉屏风散组比较无显著性差异( $P > 0.05$ ),H89干预组与小青龙汤联合玉屏风散组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 变应性鼻炎大鼠行为学指标改变次数与计分( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	鼻抓痒次数	喷嚏次数	鼻涕计分
正常对照组	8	4.1±1.5	2.4±0.9	1.1±0.4
模型组	8	31.4±3.7 <sup>a</sup>	18.5±3.6 <sup>a</sup>	2.8±0.5 <sup>a</sup>
Forskolin干预组	8	4.9±1.8 <sup>b</sup>	3.0±0.8 <sup>b</sup>	1.5±0.5 <sup>b</sup>
H89干预组	8	34.8±3.3 <sup>bc</sup>	23.3±2.9 <sup>bc</sup>	2.9±0.4 <sup>c</sup>
PDTC干预组	8	4.9±1.5 <sup>b</sup>	3.4±0.9 <sup>b</sup>	1.4±0.5 <sup>b</sup>
小青龙汤联合玉屏风散组	8	4.5±1.5 <sup>b</sup>	2.8±0.7 <sup>b</sup>	1.3±0.5 <sup>b</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与小青龙汤联合玉屏风散组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.2 治疗后各组大鼠AQP5、NF-κB p65和p-CREB表达量的比较

与正常对照组比较,模型组AQP5相对蛋白表达量显著降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );H89干预组AQP5相对表达量与模型组相比较显著降低( $P < 0.01$ )。Forskolin干预组、PDTC干预组、小青龙汤联合玉屏风治疗组AQP5相对蛋白表达量与模型组相比较显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。Forskolin干预组、PDTC干预组与小青龙汤联合玉屏风散组比较无显著性差异( $P > 0.05$ ),H89干预组与小青龙汤联合玉屏风散组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。

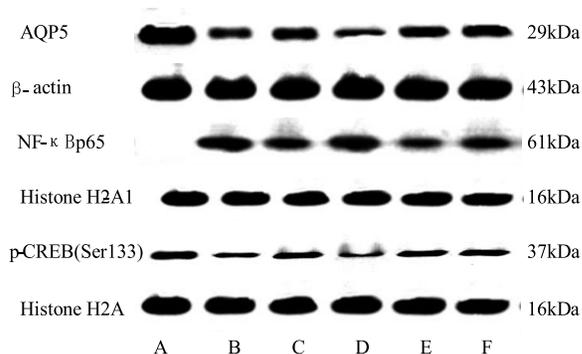
模型组NF-κB p65相对蛋白表达量较正常组显著升高,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,H89干预组NF-κB p65表达量升高( $P < 0.05$ ),Forskolin干预组、PDTC干预组、小青龙汤联合玉屏风治疗组NF-κB p65表达量显著降低( $P < 0.01$ )。Forskolin干预组、PDTC干预组与小青龙汤联合玉屏风散组比较无显著性差异( $P > 0.05$ ),H89干预组与小青龙汤联合玉屏风散组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。

与正常对照组比较,模型组p-CREB(Ser133)相对蛋白表达量显著降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,H89干预组p-CREB(Ser133)表达量显著降低( $P < 0.01$ ),而Forskolin干预组、PDTC干预组、小青龙汤联合玉屏风治疗组p-CREB(Ser133)相对蛋白表达量显著升高( $P < 0.01$ )。Forskolin干预组、PDTC干预组与小青龙汤联合玉屏风散组比较无显著性差异( $P > 0.05$ ),H89干预组与小青龙汤联合玉屏风散组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。见表1、图1。

表 2 治疗后各组大鼠 AQP5、NF-κB p65 和 p-CREB 相对表达量比较(  $\bar{x} \pm s$  )

组别	n	AQP5	NF-κB p65	p-CREB
正常对照组	8	0.66±0.06	0.00±0.00	0.66±0.05
模型组	8	0.31±0.04 <sup>a</sup>	0.66±0.05 <sup>a</sup>	0.43±0.06 <sup>a</sup>
Forskolin 干预组	8	0.63±0.05 <sup>b</sup>	0.60±0.08 <sup>b</sup>	0.65±0.04 <sup>b</sup>
H89 干预组	8	0.23±0.02 <sup>bc</sup>	0.72±0.03 <sup>bc</sup>	0.23±0.05 <sup>bc</sup>
PDTC 干预组	8	0.65±0.04 <sup>b</sup>	0.58±0.04 <sup>b</sup>	0.67±0.05 <sup>b</sup>
小青龙汤联合玉屏风散组	8	0.60±0.04 <sup>b</sup>	0.57±0.05 <sup>b</sup>	0.62±0.05 <sup>b</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与小青龙汤联合玉屏风散组比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$ 。



注:A.正常对照组;B.模型组;C.Forskolin 干预组;D.H89 干预组;E.PDTC 干预组;F.小青龙汤联合玉屏风散组

图 2 治疗后各组大鼠 AQP5、NF-κB p65 和 p-CREB 在鼻黏膜的相对表达量

### 3 讨论

#### 3.1 AQP5 与变应性鼻炎

腺体过度分泌是 AR 最基本病理特征之一,临床表现多为鼻腔大量清水涕,严重影响人们的工作与生活质量。研究 AR 过度分泌性的机制和如何有效地控制腺体的过度分泌是当前 AR 研究的重点之一。AQP5 可能参与气道液体分泌的过程,同时还是腺体上皮细胞腔膜面水转的限速屏障。在本实验中模型组 AQP5 的表达下调,说明 AQP5 是变应性鼻炎发病环节之一,水通道蛋白对维持人体的生理状态的作用十分重要<sup>[5]</sup>。有研究资料表明,水通道蛋白在体内液体转运和分泌方面发挥着重要的作用。随着对体内各系统水通道蛋白的深入研究,鼻腔黏膜水通道蛋白的分布、调节及生理学意义也逐渐清晰,其中 AQP5 与气道内液体转运密切相关<sup>[6]</sup>。cAMP 激活剂 Forskolin 干预组、NF-κB 抑制剂 PDTC 干预组、小青龙汤联合玉屏风散治疗组均能使 AQP5 表达上调,而 PKA 抑制剂 H89 能下调

AQP5 表达,说明小青龙汤合玉屏风散作用机制可能与 NF-κB 信号通路和 cAMP-PKA 信号通路有关。

#### 3.2 NF-κB p65 与变应性鼻炎

在本实验中,正常组 NF-κB p65 未能检测到,可能与其表达量很少有关。当 AR 大鼠经过卵蛋白基础致敏和局部鼻腔激发后,NF-κB 被激活后大量表达,AQP5 表达下调,NF-κB 抑制剂 PDTC 干预 AR 大鼠抑制 NF-κB 通路后,致使 AQP5 表达上调,表明 NF-κB 是变应性鼻炎发病的中心环节。小青龙汤联合玉屏风散组亦能减少 NF-κB 表达,而其又能使 AQP5 表达上调,其可能的作用机制是抑制 NF-κB 信号通路的激活使 AQP5 表达上调,因激活后的 NF-κB 信号通路与 cAMP-PKA-p-CREB 竞争性结合转录辅助因子 CBP,从而下调 AQP5 的表达。

#### 3.3 p-CREB(Ser133)与变应性鼻炎

cAMP 激活剂 Forskolin 能上调 p-CREB (Ser133) 表达,PKA 抑制剂 H89 能下调 p-CREB (Ser133) 表达,表明 cAMP-PKA-CREB 信号转导通路是变应性鼻炎发病重要环节之一。在 NF-κB 被激活后,p-CREB 表达下调;PDTC 干预 AR 大鼠抑制 NF-κB 通路后,p-CREB (Ser133) 表达上调,这可能与 NF-κB p65 和转录辅助因子 CBP 相互作用有关。NF-κB 和 CREB 都易受到 CBP 的调控<sup>[7]</sup>,NF-κB 只有在细胞核内与 CBP 结合才具有基因转录活性,但是 CBP 除了与 NF-κB 结合诱导基因转录以外,还能和 p-CREB 结合<sup>[8]</sup>。NF-κB 与 p-CREB (Ser133) 竞争性结合 CBP 诱导特定靶基因转录,而细胞核内 CBP 表达量是相对有限的,NF-κB 与 p-CREB (Ser133) 竞争性结合相对有限的 CBP 必然会导致依赖 cAMP-PKA-CREB 的基因转录下调<sup>[9]</sup>。小青龙汤联合玉屏风散能够抑制 NF-κB 信号通路的激活,通过 cAMP-PKA-CREB 信号通路与 CBP 的结合,上调 p-CREB 表达,从而使 AQP5 表达增加。

综上所述,小青龙汤联合玉屏风散治疗 AR 的作用机制是抑制 NF-κB 信号通路的激活和兴奋 cAMP-PKA 信号通路使 AQP5 表达上调,从而使 AR 的症状缓解,为以饮论治 AR 奠定了现代生物学基础。

#### 参 考 文 献

[1] Weber RW. Allergic rhinitis [J]. PrimCare, 2008, 35 (1): 1-10.  
 [2] Sakashita M, Hirota T, Harada M, et al. Prevalence of allergic rhinitis and sensitization to common aeroallergens in a Japanese

- population [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 151 (3): 255-261.
- [3] 王树鹏,刘书宇. 小青龙汤加味治疗变应性鼻炎的中医理论探讨[J]. *辽宁中医杂志*, 2007, 34(5): 575-576.
- [4] 刘建国,杨政,刘月辉. 变应性鼻炎大鼠模型建造[J]. *江西医学院学报*, 2008, 48(5): 33-34,37.
- [5] 庞涛,郭洪源,梁亚. 水通道蛋白 5 在变应性鼻炎鼻黏膜的表达及意义[J]. *贵州医药*, 2007, (1): 7-9.
- [6] 姜军合,范学政. 变应性鼻炎患者鼻黏膜水通道蛋白-5 的表达[J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18(16): 2356-2358, 2361.
- [7] Shenkar R, Yum HK, Arcaroli J, et al. Interactions between CBP, NF-kappaB, and CREB in the lungs after hemorrhage and endotoxemia[J]. *American Journal of Physiology Lung Cellular & Molecular Physiology*, 2001, 281(2): 418-426.
- [8] Janknecht R, Hunter T. Transcription a growing coactivator network[J]. *Nature*, 1996, 383(6595): 22-23.
- [9] Zhong H, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300[J]. *Mol Cell*, 1998, 1(5): 661-671.

(收稿日期: 2016-01-08)

(本文编辑: 韩虹娟)