

小青龙汤联合玉屏风散对变应性鼻炎大鼠 AQP5、NF- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ B p65 表达下调,而 PKA 抑制剂 H89 能上调 NF- κ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ B p65 and p-CREB in nasal mucosa of allergic rhinitis rats in NF- κ 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- κ 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- κ 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- κ B p65 in the model group was increased, and the expression of NF- κ 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 Xiaqinglong decoction and Yupingfeng power group was decreased, while the PKA inhibitor H89 could increase the expression of NF- κ B p65. **Conclusion** Xiaqinglong decoction and Yupingfeng powder treatment of allergic rhinitis mechanism may be related to the inhibition of NF- κ 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; Xiaqinglong decoction; Yupingfeng power; NF- κ B signal 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%^[1],部分地区甚至高达 44.2%^[2]。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^[3],故从“阳气虚弱,水饮内停”立论,基于 NF- κ 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- κ B p65 抗体(批号:bs-20160R),购自北京博奥森生物技术有限公司; β -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^[4]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 μ L 双侧滴鼻,每侧 50 μ 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 μ L 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 μ L 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 κ B p65 (nuclear transcription factor κ B p65, NF- κ B 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 \pm 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($P<0.05$),说明变应性鼻为小鼠造模成功。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	<i>n</i>	鼻抓痒次数	喷嚏次数	鼻涕计分
正常对照组	8	4.1 \pm 1.5	2.4 \pm 0.9	1.1 \pm 0.4
模型组	8	31.4 \pm 3.7 ^a	18.5 \pm 3.6 ^a	2.8 \pm 0.5 ^a
Forskolin 干预组	8	4.9 \pm 1.8 ^b	3.0 \pm 0.8 ^b	1.5 \pm 0.5 ^b
H89 干预组	8	34.8 \pm 3.3 ^{bc}	23.3 \pm 2.9 ^{bc}	2.9 \pm 0.4 ^c
PDTC 干预组	8	4.9 \pm 1.5 ^b	3.4 \pm 0.9 ^b	1.4 \pm 0.5 ^b
小青龙汤联合玉屏风散组	8	4.5 \pm 1.5 ^b	2.8 \pm 0.7 ^b	1.3 \pm 0.5 ^b

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

2.2 治疗后各组大鼠 AQP5、NF- κ B 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($P<0.01$)。

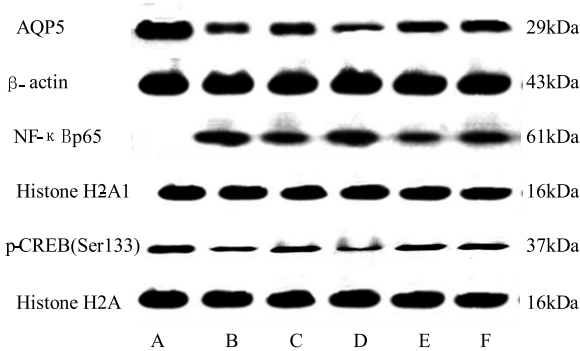
模型组 NF- κ B p65 相对蛋白表达量较正常组显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,H89 干预组 NF- κ B p65 表达量升高($P<0.05$),Forskolin 干预组、PDTC 干预组、小青龙汤联合玉屏风治疗组 NF- κ B p65 表达量显著降低($P<0.01$)。Forskolin 干预组、PDTC 干预组与小青龙汤联合玉屏风散组比较无显著性差异($P>0.05$),H89 干预组与小青龙汤联合玉屏风散组比较有显著性差异($P<0.01$)。

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 ^a	0.66±0.05 ^a	0.43±0.06 ^a
Forskolin 干预组	8	0.63±0.05 ^b	0.60±0.08 ^b	0.65±0.04 ^b
H89 干预组	8	0.23±0.02 ^{bc}	0.72±0.03 ^{bc}	0.23±0.05 ^{bc}
PDTC 干预组	8	0.65±0.04 ^b	0.58±0.04 ^b	0.67±0.05 ^b
小青龙汤联合玉屏风散组	8	0.60±0.04 ^b	0.57±0.05 ^b	0.62±0.05 ^b

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



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^[5]。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^[6]。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^[7]，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^[8]。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^[9]。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)