

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20250410005

基于调节炎症因子和肠道紧密连接蛋白探究 乌梅丸对寒热错杂型变应性鼻炎大鼠的影响

史宗康¹, 李林¹, 任宏伟^{1,2}, 张楠^{1,3}, 尤晓苗¹, 孙丹雨¹, 董冠中¹, 王启阳¹, 张恒^{1,4}1. 内蒙古医科大学(内蒙古 呼和浩特 010100); 2. 呼伦贝尔市中蒙医院(内蒙古 呼伦贝尔 021000);
3. 包头医学院(内蒙古 包头 014040); 4. 呼和浩特市第三医院(内蒙古 呼和浩特 010100)

【摘要】 目的 基于乌梅丸对白细胞介素(IL)-10、IL-17细胞因子及闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、闭锁蛋白(Occludin)等紧密连接蛋白的调控效应,探究其对寒热错杂型变应性鼻炎(AR)大鼠模型的作用机制。方法 从108只Wistar大鼠中随机抽取空白组($n=16$)大鼠,其余大鼠采用丙硫氧嘧啶与知母石膏水煎液交替灌胃联合卵清蛋白致敏法,构建寒热错杂型AR病证结合模型。造模成功后的大鼠再随机分为模型组($n=14$)、氯雷他定组(1.2 mg/kg, $n=14$)及乌梅丸高(2.0 g/kg, $n=16$)、中(1.0 g/kg, $n=14$)、低(0.5 g/kg, $n=14$)剂量组。空白组和模型组灌胃给予0.9%氯化钠溶液,其余组别灌胃给予相应药物,每日1次,持续6周。治疗后记录大鼠行为学评分、酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测大鼠血清中IL-10、IL-17水平,Western blot法测定大鼠肠组织及鼻黏膜组织ZO-1、Occludin蛋白表达,剂量效应分析明确乌梅丸不同剂量间的效应差异及最佳有效剂量。结果 模型组行为学评分显著高于空白组($P<0.01$);乌梅丸各剂量组及氯雷他定组评分均低于模型组($P<0.01$)。与空白组比较,模型组大鼠IL-10明显降低,IL-17明显升高($P<0.001$)。经过乌梅丸高、中、低剂量以及氯雷他定的干预后,各治疗组大鼠血清IL-10浓度与模型组比较均明显升高($P<0.01$, $P<0.001$),且乌梅丸高、中剂量及氯雷他定组大鼠血清IL-17浓度与模型组比较均明显降低($P<0.001$)。乌梅丸高、中剂量组及氯雷他定组大鼠肠组织及鼻黏膜组织ZO-1、Occludin蛋白表达均高于模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。剂量效应分析结果显示,随着乌梅丸剂量升高,大鼠行为学评分呈逐渐降低趋势,血清IL-10浓度及肠组织ZO-1、Occludin蛋白表达呈逐渐升高趋势,血清IL-17浓度呈逐渐降低趋势,其中高剂量组效应最优($P<0.05$)。结论 乌梅丸可改善寒热错杂型AR大鼠的症状,其机制与下调血清IL-17、上调IL-10及肠组织ZO-1、Occludin蛋白表达有关。

【关键词】 变应性鼻炎;寒热错杂证;乌梅丸;经典名方;紧密连接蛋白;大鼠模型;作用机制

Exploring effect of Wumei Wan on rats with allergic rhinitis of cold-heat complex pattern by regulating inflammatory factors and intestinal tight junction proteins

SHI Zongkang¹, LI Lin¹, REN Hongwei^{1,2}, ZHANG Nan^{1,3}, YOU Xiaomiao¹, SUN Danyu¹, DONG Guanzhong¹, WANG Qiyang¹, ZHANG Heng^{1,4}

1. Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010100, China; 2. Hulunbeier Zhongmeng Hospital, Hulunbeier, Inner Mongolia 021000, China; 3. Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014040, China; 4. Hohhot Third Hospital, Hohhot, Inner Mongolia 010100, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic mechanism of Wumei Wan on a rat model of allergic rhinitis (AR) with the pattern of cold-heat complex based on its regulatory effects on interleukin (IL)-10, IL-17 cytokines and tight junction proteins including zonula occludens-1 (ZO-1) and Occludin. **Methods** Sixteen rats were randomly selected from 108 Wistar rats as the control group. The remaining rats were used to establish a cold-heat complex pattern AR model via alternating intragastric

[基金项目] 内蒙古自然科学基金项目(2024ZD33)

[作者简介] 史宗康,男,硕士研究生,主要从事中医内科学方向的研究工作

[通信作者] 李林,主任医师,教授,博士研究生导师;

E-mail: 1979869162@qq.com

administration of propylthiouracil and the decoction of Anemarrhenae Rhizoma and Gypsum Fibrosum, combined with ovalbumin sensitization. After successful modeling, the remaining successfully modeled rats were randomly divided into the model group ($n=14$), loratadine group (1.2 mg/kg, $n=14$), and high- (2.0 g/kg, $n=16$), medium- (1.0 g/kg, $n=14$), and low- (0.5 g/kg, $n=14$) dose Wumei Wan groups. The control group and model group were administered 0.9% sodium chloride solution via intragastric administration, while the other groups received their respective treatments once daily for 6 consecutive weeks. After treatment, rat behavioral scores were recorded. Serum levels of IL-10 and IL-17 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the protein expressions of ZO-1 and Occludin in intestinal tissues and nasal mucosa tissues were determined by Western blot. Dose-effect analysis was conducted to clarify the differences in effects among different doses of Wumei Wan and to identify the optimal effective dose. **Results** Behavioral score of the model group was significantly higher than that in the blank control group ($P<0.01$); the scores of all Wumei Wan groups and the loratadine group were all significantly lower than that of the model group ($P<0.01$). Compared with the blank control group, the serum IL-10 level of the model group decreased markedly and the IL-17 level increased markedly ($P<0.001$). After intervention with high-, medium- and low-doses of Wumei Wan and loratadine, the serum IL-10 levels of all treatment groups were obviously higher than that of model group ($P<0.01$, $P<0.001$) and serum IL-17 in the medium-, high-dose groups of Wumei Wan and the loratadine group were significantly lower than that of the model group ($P<0.001$). Additionally, the protein expressions of ZO-1 and Occludin in intestinal and nasal mucosa tissues of medium-, high-dose Wumei Wan groups and loratadine group were obviously higher than those of the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). The dose-effect analysis results showed that as the dosage of Wumei Wan increased, the behavioral score of rats gradually decreased while the serum IL-10 level and the expression of ZO-1 and Occludin proteins in intestinal tissue and nasal mucosa tissues gradually increased, and the serum IL-17 level gradually decreased. Among them, the high-dose group had the best effect ($P<0.05$). **Conclusion** Wumei Wan can improve the symptoms of cold-heat complex pattern AR in rats. Its therapeutic mechanism is related to downregulating serum IL-17, upregulating serum IL-10, and enhancing the protein expressions of ZO-1 and Occludin in intestinal tissues.

Keywords: allergic rhinitis; syndrome of cold-heat complex pattern; Wumei Wan; classic famous formula; tight junction protein; rat model; action mechanism

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR),又称过敏性鼻炎,是人体接触过敏原后由免疫球蛋白E(IgE)介导的非感染性鼻黏膜慢性炎症性疾病,典型表现为喷嚏、流涕、鼻痒和鼻塞^[1]。AR作为普遍流行的慢性病,影响全球约40%的人口,我国近年来AR患者数逐步上升,约有2.5亿人受到影响^[2]。西医在AR发作时通常采用抗组胺和皮质类固醇等药物治疗^[3],长期使用可能导致依赖性、耐药性等不良反应。中医与之相比具有辨证论治、标本兼治的独特优势,在临床上其有效性和安全性已得到广泛验证^[4]。AR在中医属于“鼻鼽”范畴,其发病与肺、脾、肾三脏密切相关,病机总属正气亏虚,外邪侵袭。乌梅丸源自《伤寒论》厥阴病篇,原方主治蛔厥、久利之症,现作为主治寒热错杂证的有效经方,可用于多种慢性及疑难病症,亦适用于寒热错杂型鼻鼽的治疗。乌梅丸具有抗炎、抗过敏及调节免疫的药理特性^[5],且近年来临床已有将其用于AR治疗的相关报道^[6-7]。现代药理研究和临床观察虽已证明乌梅丸对寒热错杂型AR有效,但其免疫调节、屏障修复机制仍有待阐明,本研究拟通过检测细胞因子白细胞介素(IL)-10、IL-17调控机制和紧密连接蛋白闭锁

小带蛋白-1(ZO-1)、闭锁蛋白(Occludin)表达水平,尝试从调节性T细胞(Treg)/辅助性T细胞(Th17)免疫平衡及黏膜屏障功能的角度切入,以补充乌梅丸治疗AR机制中尚未充分阐明的部分,初步探究乌梅丸对寒热错杂型AR的治疗效果和作用机制,为后续研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级Wistar雌性大鼠108只,体质量(200±20)g。实验动物生产许可证号:SCXK(蒙)2020-0002。实验动物使用许可证号:SYXK(蒙)2020-003。实验大鼠由内蒙古医科大学实验动物中心提供并饲养。室温(20±2)℃,相对湿度45%~55%,提供标准常规颗粒饲料,自由饮水和进食,12 h/12 h昼夜光照节律,适应性喂养后进行实验。实验过程均符合动物实验伦理原则,由内蒙古医科大学医学伦理委员会审批通过(伦理审批号:YKD202401273)。

1.1.2 药物与试剂 乌梅丸(批号:20230905),云南腾药制药股份有限公司;番泻叶(批号:107240401),河北悦康志德药业有限公司;石膏(批号:

C145230302), 荣华本草中药材有限公司; 知母(批号: 230901080), 河北美康药业有限公司; 氯雷他定片(批号: H20040797), 万通药业集团有限公司; 丙硫氧嘧啶片(批号: 23102), 上海朝晖药业有限公司; 高活性安琪干酵母(批号: S0742050550053), 安琪酵母股份有限公司; 卵清蛋白(OVA)(批号: A7641-250), 美国 Sigma 公司; 氢氧化铝(批号: QT60001G), 北京百奥莱博科技有限公司。大鼠 IL-10(批号: QT-ER20006)、IL-17(批号: ER0035)酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒, 武汉菲恩生物科技有限公司; 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒(批号: P1200)、高效放射免疫沉淀分析法(RIPA)裂解液(批号: R0010)、蛋白浓度试剂盒(批号: PC0020)、蛋白酶抑制剂(批号: A826)、蛋白上样缓冲液(批号: P1040)、丽春红染液(批号: P0012)、三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(TBS)粉剂(批号: T1080)、电泳液(批号: T1072)、转膜液(批号: D1061)、聚山梨酯-20(Tween-20)(批号: T8220)、脱脂奶粉(批号: D8340), 北京索莱宝科技有限公司; 超敏增强化学发光(ECL)试剂检测盒(批号: P0018)、苯甲基磺酰氟(PMSF)(批号: ST506), 上海碧云天生物技术有限公司; 蛋白酶抑制剂混合物(批号: 04693159001), 瑞士 Roche 公司; 蛋白分子量标准(Marker)(批号: 26616), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 兔抗大鼠 ZO-1 单克隆抗体(批号: ab221547)、兔抗大鼠 Occludin 单克隆抗体(批号: ab216327)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号: ab6721), 英国 Abcam 公司。

1.1.3 主要仪器 酶标仪(型号: FlexA-200), 杭州奥盛仪器有限公司; 石蜡切片机(型号: RM2255), 德国 Leica 公司; 盖片机(型号: CS500), 深圳达科为生物技术股份有限公司; 生物电子显微镜(型号: EX31), 宁波舜宇光学科技有限公司; 冷冻研磨机(型号: YM-2D), 上海豫明仪器有限公司; 电泳槽(型号: DYCZ-2N)、转印槽(型号: DYCZ-4), 北京六一生物科技有限公司; 高速水平转子离心机(型号: HC-3018), 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 电磁炉(型号: C22-IH65), 浙江苏泊尔股份有限公司; 数字式翘板摇床(型号: 673)、旋涡混合器(型号: 068)、磁力搅拌器(型号: 104), 上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 造模方法 正式实验前, 对大鼠进行 7 d 的适应性饲养。抽取其中 1 组为空白组($n=16$), 其余大

鼠依据宋捷民等^[8]方法制备寒热错杂证模型, 每日上午灌胃给予丙硫氧嘧啶 10 mL/kg, 灌胃后放入冰水($\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$)游泳 8 min(隔天 1 次), 下午灌胃 100% 知母石膏水煎液(石膏知母比例 3:4, 煎煮浓缩混合药液浓度为 1 g/mL)0.4 mL, 第 26 天起加番泻叶, 共灌胃 4 周, 其间各组正常饮水, 再于第 29 天时皮下注射 20% 干酵母混悬液(10 mL/kg)。在整个实验周期内, 每日上午灌胃前测量大鼠体温, 重复测量 3 次并取平均值。注射 20% 干酵母混悬液后, 收集每只大鼠 0.5 ~ 1 g 新鲜粪便装入离心管。将粪便转入称量瓶精密称定, 开盖在 100 ~ 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 5 h, 重复干燥 1 h 至恒重(两次称量差 ≤ 5 mg)。根据质量损失计算粪便含水量, 公式为: 粪便含水量(%)=(干燥前质量-恒重后质量)/干燥前质量 $\times 100\%$ ^[9]。若实验期间发现大鼠体温明显升高、粪便含水量大于 30% 且质软、呈蜷缩姿态聚集、活动量明显减少且嗜睡、被毛光泽度降低、体质量明显下降等典型症状, 则表明寒热错杂证模型构建成功。参照文献^[9]方法制备 AR 模型, 以 OVA 0.3 mg 作抗原, 氢氧化铝 3 mg 作佐剂, 加 0.9% 氯化钠溶液腹腔注射, 隔日 1 次, 共 7 次, 作为基础致敏, 再用 2% OVA 溶液滴鼻, 每侧 5 μL , 每日 1 次, 连续 7 d, 作为强化致敏, 造模后以行为学评分判断是否造模成功。

1.3 分组与干预 造模 29 d, 造模成功的大鼠按随机数字表法分为模型组($n=14$)、氯雷他定组($n=14$)以及乌梅丸高($n=16$)、中($n=14$)、低($n=14$)剂量组, 根据公式: $D_{鼠} = D_{人} \times (W_{鼠}^{0.42} \times K_{鼠} / W_{人}^{0.42} \times K_{人})$, 计算大鼠乌梅丸剂量, 其中中剂量为等效剂量(乌梅丸 3.4 g 溶解于 0.9% 氯化钠溶液 34 mL), 高剂量 $\times 2$ (乌梅丸 7.6 g 溶解于 0.9% 氯化钠溶液 38 mL), 低剂量 $\times 0.5$ (乌梅丸 1.7 g 溶解于 0.9% 氯化钠溶液 34 mL)。乌梅丸高剂量组予 2.0 g/kg, 乌梅丸中剂量组予 1.0 g/kg, 乌梅丸低剂量组予 0.5 g/kg。成人每日口服氯雷他定 10 mg, 按上述公式换算得大鼠临床等效剂量为 1.2 mg/kg, 氯雷他定组予 1.2 mg/kg 氯雷他定片(研磨成细粉的氯雷他定 3.36 mg 溶解于 0.9% 氯化钠溶液 28 mL), 空白组与模型组予等量 0.9% 氯化钠溶液灌胃。每日灌胃 1 次, 连续 6 周。

末次给药后禁食 1 d, 大鼠采用 3% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉, 腹主动脉采血, 每只大鼠采血约 10 mL, 离心后取上层血清, 采血后取鼻黏膜和结肠组织置于冻存管, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 大鼠的行为症状观察 观察各组大鼠的行为症状,包括喷嚏、搔抓、流涕3项症状及总分的评价,致敏后以总分超过5分为AR造模成功,评分标准^[10]见表1。

表1 大鼠症状评分

计分	搔抓	流涕	喷嚏
0分	无	无	无
1分	轻擦	流至鼻前孔	1~3个
2分	抓挠鼻面	超过鼻前孔	4~10个
3分	浑身抓挠	流涕满面	>10个

1.4.2 大鼠鼻黏膜的病理变化 采用苏木精-伊红(HE)染色法观察大鼠鼻黏膜的病理变化。大鼠鼻黏膜组织做常规处理后置于4%多聚甲醛中固定,常规脱钙,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋,修块,并切成4 μm的薄片,常规染色、盖片,光学显微镜下观察鼻黏膜的病理改变。

1.4.3 大鼠血清IL-10和IL-17水平 采用ELISA技术,对大鼠血清中的IL-10和IL-17浓度展开检测,严格按照试剂盒说明书所规定的操作流程,室温环境下让样本和试剂充分静置30 min后,分别加样温育,加入IL-10及IL-17的抗体稀释液,洗板,进行显色反应,终止反应,终止后于酶标仪45 nm波长段读取吸光度,并通过标准曲线法计算浓度。

1.4.4 大鼠结肠及鼻黏膜组织ZO-1和Occludin蛋白表达 采用Western blot法检测结肠及鼻黏膜组织ZO-1和Occludin蛋白表达。取冻存的结肠及鼻黏膜组织,研磨提取结肠及鼻黏膜组织蛋白,二辛可酸(BCA)法进行定量,加5倍上样缓冲液高温变性后,经制灌胶、电泳及转膜,室温下质量分数5%脱脂奶粉封闭,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)稀释一

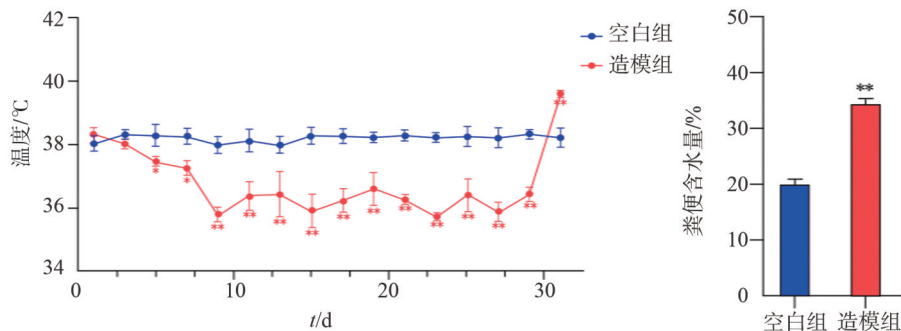
抗,4℃摇床过夜,二抗脱脂奶粉稀释,室温摇床避光孵育,膜蛋白面侧滴加增强型化学发光液(ECL)混合溶液,显影、定影,采用ImageJ软件对每条蛋白质电泳带进行灰度值分析。

1.5 统计学方法 数据分析使用SPSS 27.0软件,实验中所有计量检测结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多个组别进行比较采用单因素方差分析,两组间比较方差齐性时采用LSD检验,方差不齐时则采用Tamhane检验或Kruskal-Wallis H秩和检验,针对乌梅丸高、中、低3个剂量组的剂量效应关系,采用Cochran-Armitage趋势检验分析线性趋势,同时通过Pearson相关性分析评估剂量与各效应指标的线性关联强度,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠寒热错杂证模型制备与行为学评分 本实验中存在动物死亡情况,实验初共采用108只Wistar大鼠,在模型建立(冰水游泳刺激、皮下注射干酵母及造模药物灌胃)过程中,20只大鼠因对造模刺激不耐受死亡,最终共88只大鼠完成实验,实验过程中所有操作及样本处理均符合伦理审查要求,最终样本量满足统计学分析需要。实验数据表明,接受第29天皮下注射干酵母混悬液处理的造模组大鼠体温较空白组明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),其粪便含水量也呈现出明显增加并超出正常范围($P<0.01$, $P<0.001$),证明寒热错杂证大鼠模型已经成功建立。见图1。

与空白组比较,模型组大鼠行为学评分值大于5分,差异有统计学意义($P<0.01$),且临床症状表现加重。各给药组干预后行为学评分较模型组均明显降低($P<0.01$),且喷嚏、搔抓、流涕等症状也有所缓解。见表2。



注:与空白组比较,** $P<0.01$ 。

图1 寒热错杂证模型判定量化指标比较

表2 各组大鼠行为学评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	n	行为学评分
空白组	16	1.44±0.89
模型组	14	7.14±1.35**
乌梅丸低剂量组	14	3.21±1.42##
乌梅丸中剂量组	14	2.93±1.33##
乌梅丸高剂量组	16	2.19±1.05###
氯雷他定组	14	2.64±1.22##

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

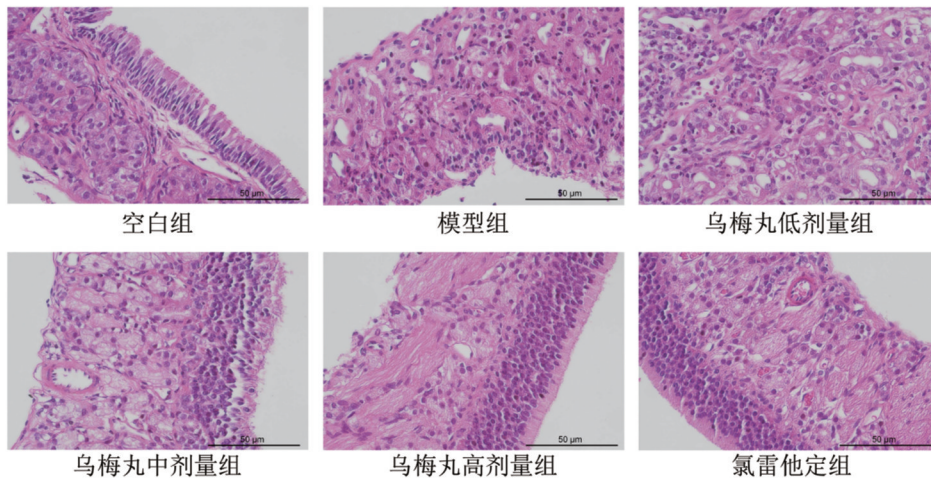


图2 各组大鼠鼻黏膜组织病理学的变化(苏木精-伊红染色,×200)

2.2 对大鼠鼻黏膜组织病理学的影响 HE染色结果显示,空白组大鼠鼻黏膜结构形态正常,未见炎症细胞浸润。与空白组比较,模型组鼻黏膜组织增生,上皮细胞坏死、脱落,胞核破碎,大量纤毛脱落,腺体形态排列紊乱,可见嗜酸性粒细胞浸润。乌梅丸不同剂量组及氯雷他定组大鼠鼻黏膜组织病理改变均有改善,上皮组织结构逐渐恢复,水肿、炎症浸润等现象逐渐减轻。乌梅丸高剂量及氯雷他定组炎症细胞浸润较乌梅丸中、低剂量组减少更明显,黏膜组织、上皮组织结构更完整。见图2。

2.3 对大鼠血清IL-10和IL-17水平的影响 与空白组相比,模型组大鼠血清IL-10水平明显降低($P<0.001$),IL-17水平明显升高($P<0.001$)。与模型组相比,乌梅丸各剂量组及氯雷他定组血清IL-10水平均有不同程度升高($P<0.01, P<0.001$);乌梅丸高、中剂量组与氯雷他定组血清IL-17水平明显下降($P<0.001$)。见表3。

表3 各组大鼠血清IL-10、IL-17水平比较($\bar{x}\pm s$,ng/L)

组别	n	IL-10	IL-17
空白组	16	83.08±12.76	29.23±5.70
模型组	14	54.55±10.74***	56.88±10.39***
乌梅丸低剂量组	14	68.16±11.12##	54.36±9.87
乌梅丸中剂量组	14	72.24±10.81###	40.59±7.56###
乌梅丸高剂量组	16	75.27±13.60###	38.83±7.29###
氯雷他定组	14	67.95±8.76##	42.82±6.98###

注:IL为白细胞介素。与空白组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

与之相反,乌梅丸高、中剂量组及氯雷他定组大鼠结肠组织ZO-1蛋白表达量均较模型组明显升高($P<0.05$),Occludin蛋白表达量亦呈明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,乌梅丸低剂量组ZO-1和Occludin表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表4、图3。

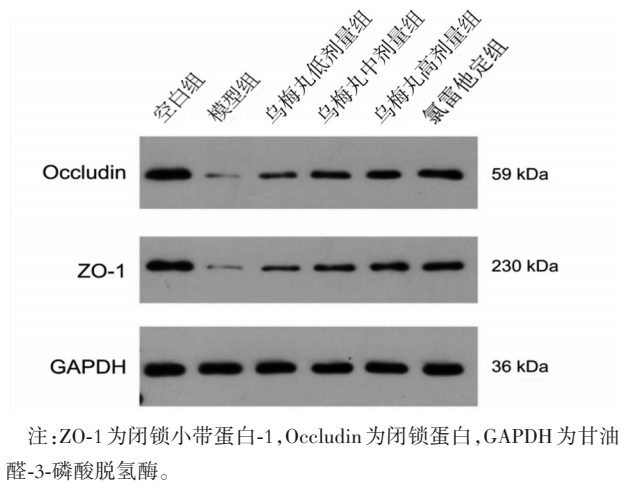
表4 各组大鼠结肠组织ZO-1和Occludin蛋白表达比较($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	ZO-1	Occludin
空白组	1.13±0.06	1.12±0.07
模型组	0.09±0.04***	0.12±0.03***
乌梅丸低剂量组	0.29±0.10	0.27±0.12
乌梅丸中剂量组	0.64±0.13#	0.57±0.08##
乌梅丸高剂量组	0.66±0.15#	0.58±0.12#
氯雷他定组	0.72±0.19#	0.76±0.13##

注:ZO-1为闭锁小带蛋白-1,Occludin为闭锁蛋白。与空白组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

2.4 对大鼠结肠组织ZO-1和Occludin蛋白表达水平的影响 与空白组相比,模型组大鼠结肠组织中ZO-1和Occludin蛋白表达量均明显降低($P<0.001$),

2.5 对大鼠鼻黏膜组织ZO-1和Occludin蛋白表达水平的影响 与空白组相比,模型组大鼠鼻黏膜组织中ZO-1和Occludin蛋白表达量降低($P<0.001$);



注:ZO-1为闭锁小带蛋白-1,Occludin为闭锁蛋白,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

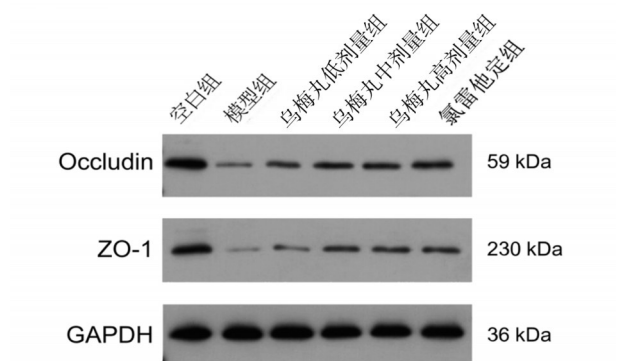
图3 各组大鼠结肠组织ZO-1和Occludin蛋白条带图

经药物干预后,乌梅丸高、中剂量组及氯雷他定组鼻黏膜ZO-1、Occludin蛋白表达量均较模型组明显升高($P<0.05, P<0.01$),乌梅丸低剂量组与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表5。

表5 各组大鼠鼻黏膜组织ZO-1和Occludin蛋白表达比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	ZO-1	Occludin
空白组	1.15±0.08	1.11±0.06
模型组	0.11±0.05***	0.13±0.04***
乌梅丸低剂量组	0.32±0.11	0.29±0.10
乌梅丸中剂量组	0.67±0.14#	0.60±0.09##
乌梅丸高剂量组	0.70±0.16#	0.62±0.11#
氯雷他定组	0.75±0.20#	0.78±0.14##

注:ZO-1为闭锁小带蛋白-1,Occludin为闭锁蛋白。与空白组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。



注:ZO-1为闭锁小带蛋白-1,Occludin为闭锁蛋白,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图4 各组大鼠鼻黏膜ZO-1和Occludin蛋白条带图

2.6 乌梅丸对寒热错杂型AR大鼠的剂量效应分析 随着乌梅丸剂量从0.5 g/kg增至2.0 g/kg,大鼠

行为学评分、IL-17水平呈线性下降,IL-10水平及ZO-1、Occludin蛋白表达呈线性升高。各指标与剂量的相关系数绝对值为0.678~0.715,呈中等强度线性关联,且趋势检验均具有统计学意义($P<0.05$)。其中高剂量组效应最优($P<0.05$)。见表6。

表6 乌梅丸剂量与寒热错杂型AR大鼠各效应指标的剂量-效应关系趋势检验结果

检测指标	Pearson相关系数(r)	Cochran-Armitage趋势 χ^2 值	P 值
行为学评分	-0.682	10.252	0.001
IL-10水平	0.715	11.384	<0.001
IL-17水平	-0.693	10.670	0.001
ZO-1蛋白表达	0.701	10.925	<0.001
Occludin蛋白表达	0.678	9.960	0.002

注:IL为白细胞介素,ZO-1为闭锁小带蛋白-1,Occludin为闭锁蛋白。

3 讨论

鼻鼽作为中医耳鼻喉科最常见的鼻病之一,其特征为突然和反复出现的鼻痒、喷嚏、鼻分泌物增多、鼻黏膜肿胀,在现代医学中与AR相对应^[11]。本病属本虚标实之证,寒热错杂型鼻鼽病机在里,因肺、脾、肾三脏受损,正气不足,虚寒内生,功能失司,鼻窍失养,在表因正气亏虚后,卫表不固,加之外感风寒湿热等邪气入里,内壅于肺,郁而化热,鼻窍受蒙而发,上热下寒,寒热错杂导致全身气机受阻,阴阳不相顺接,表里不相通达,进而发病。

乌梅丸出自张仲景《伤寒论》厥阴病篇。方中重用乌梅,酸收敛肺,能收敛散越之清气,固本培元,为君药;细辛药性辛温,芳香通窍,祛风化湿,温肺化饮,为治鼻鼽之良药,而黄连、黄柏性味苦寒,能清上焦之肺热,燥湿除鼻之浊涕,蜀椒味辛性温,芳香祛湿,温脾暖肾,祛下焦之脏寒,共为臣药;附子、干姜、桂枝辛温,温脏祛寒,人参、当归甘润,益气养血,扶正祛邪,共为佐药。全方寒热同施以调和阴阳,苦辛并进以调畅气机,补泻兼施以标本兼顾^[12]。本研究发现,在经乌梅丸治疗后大鼠寒热错杂型AR有关症状明显好转,行为学评分明显下降,HE染色结果显示乌梅丸可改善鼻黏膜病理损伤,提示乌梅丸对寒热错杂型AR大鼠具有治疗作用。剂量效应分析结果进一步显示,乌梅丸的治疗作用存在剂量依赖性,随着剂量的增加,大鼠行为学评分、血清IL-17水平呈线性下降,IL-10水平及结肠组织、鼻黏膜组织ZO-1、Occludin蛋白表达呈线性升高,各指标与剂量呈中等强度线性关联,且高剂量

组的改善效应更为突出。

机体免疫的失衡是诱导 AR 发生的重要机制, 涉及辅助性 T 细胞 2(Th2)、Treg 和树突状细胞(DC) 等不同的免疫细胞亚群^[13]。Th1/Th2 细胞免疫失衡是 AR 发病发展的经典机制, 近年来研究^[14]发现 Th17/Treg 失衡也与之密切相关。IL-17 是由 Th17 分泌的促炎性细胞因子, 能调节 IL-5 的水平, 对机体免疫功能有重要影响, 在自身免疫性疾病和慢性炎症的发展中起着促进作用, 而 IL-10 是由 Treg 分泌的抑炎因子, 具有抑制细胞增殖及细胞因子的作用, 继而诱导免疫耐受^[15], 两者的水平差异直接影响 Th17/Treg 平衡。本研究结果发现, 模型组 IL-17 含量明显升高、IL-10 含量显著降低且 HE 染色病理损伤严重, 说明模型组已产生大量炎症, 继而削弱了鼻黏膜的正常功能, 提示造模成功。药物干预后: 乌梅丸高、中剂量组和氯雷他定组 IL-17 水平明显降低, 表明乌梅丸和氯雷他定能减轻炎症细胞产生, 提示其可修复鼻黏膜相关炎症反应, 而乌梅丸低剂量组与模型组相比差异无统计学意义($P < 0.05$), 推测可能是乌梅丸剂量不足导致难以发挥其药理作用; 与模型组相比, 给药各组 IL-10 水平均有所上升, 其中乌梅丸高、中剂量组及氯雷他定组显著升高($P < 0.01$, $P < 0.001$), 表明乌梅丸可以提升抑炎因子 IL-10 水平, 进而阻断炎症反应的继续发生, 修复 Th17/Treg 失衡, 从而达到治疗 AR 的作用。

肠-鼻轴作为黏膜免疫系统的重要调控通路, 其核心在于肠道屏障功能与远端黏膜炎症的关联效应。肠道是人体最大的黏膜免疫器官, 肠道紧密连接蛋白构成的物理屏障, 可阻止未被完全消化的过敏原、病原体及炎症代谢产物进入血液循环^[16]。当肠道屏障功能受损时, 肠黏膜通透性增加, 过敏原及炎症物质入血后可通过血液循环到达鼻黏膜, 激活局部免疫细胞, 诱发或加重鼻部炎症反应。紧密连接蛋白作为一种具有蛋白黏合结构的复杂超分子实体, 如 ZO-1 和 Occludin 蛋白, 广泛分布于人体的屏障结构中^[17], 其可以有效阻挡细胞外环境中的病原体等物质通过细胞间隙进入细胞内部, 起到屏障作用。相关研究^[18-19]发现, ZO-1 和 Occludin 蛋白均具有修复黏膜损伤, 维持黏膜屏障等作用。本研究发现, 寒热错杂型 AR 大鼠模型不仅鼻黏膜 ZO-1、Occludin 表达降低, 结肠组织中紧密连接蛋白水平亦显著下调, 提示肠道屏障功能损伤与鼻部炎症存在病理关联; 而乌梅丸高、中剂量干预后, 结肠与鼻

黏膜组织 ZO-1、Occludin 蛋白表达同步上调, 结合免疫指标的改善趋势, 推测乌梅丸可能通过修复肠道物理屏障, 减少过敏原及炎性物质入血, 进而减轻全身免疫负荷, 间接缓解鼻黏膜局部炎症, 这一作用路径符合肠-鼻轴的调控规律。此外, 肠道屏障修复后, 肠道菌群结构可能趋于稳定, 而肠道菌群代谢产物可进一步调控 Treg 细胞分化, 这也可能是乌梅丸调节 Th17/Treg 平衡的间接机制, 有待后续研究进一步验证^[20]。

本研究尚存若干局限性, 仅检测血清 IL-10、IL-17 两种细胞因子, 未同步检测 Th17/Treg 细胞比例及其特异性转录因子(ROR γ t、Foxp3), 难以充分证实 Th17/Treg 免疫平衡的修复效应; 肠道屏障修复与鼻部炎症缓解的因果关联及具体作用机制尚未明确, 后续需补充鼻黏膜屏障功能指标, 结合肠-鼻轴相关通路分子的检测, 同时完善 Th17/Treg 细胞亚群及转录因子的分析, 以深入阐明乌梅丸治疗寒热错杂型 AR 的作用机制。

综上所述, 乌梅丸能有效改善寒热错杂型 AR 大鼠症状, 降低促炎性细胞因子 IL-17 血清水平、提高抑炎因子 IL-10 血清水平, 推测与修复 Th17/Treg 细胞失衡相关, 升高肠组织及鼻黏膜 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达, 缓解炎症反应, 修复黏膜损伤, 从而证明乌梅丸对寒热错杂型 AR 具有一定的治疗作用, 但其机制仍需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 中国变应性鼻炎诊断和治疗指南(2022年, 修订版)[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2022, 57(2): 106-129.
- [2] WANG C, BAO Y, CHEN J, et al. Chinese guideline on allergen immunotherapy for allergic rhinitis: The 2022 update[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2022, 14(6): 604-652.
- [3] BERNSTEIN J A, BERNSTEIN J S, MAKOL R, et al. Allergic rhinitis: A review[J]. JAMA, 331(10): 866-877.
- [4] YUE J, HAO D, LIU S, et al. Research progress of traditional Chinese medicine in the treatment of allergic rhinitis [J]. Heliyon, 2024, 10(7): e29262.
- [5] 任娜, 韩秀珍, 刘微微, 等. 乌梅丸及其单味药有效成分在消化系统疾病中的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(1): 128-133.
- [6] 司杰鑫, 杜威, 吴英杰, 等. 乌梅丸加减治疗子宫肌瘤、鼻炎验案举隅[J]. 中国民族民间医药, 2024, 33(10): 102-104.
- [7] 原梦雪, 陈兰兰, 李莉. 李莉副教授乌梅丸治疗鼻鼾临床经验[J]. 光明中医, 2023, 38(10): 1968-1971.
- [8] 宋捷民, 钱旭武, 滕晔, 等. “寒热并见”大鼠模型的建立及评

- 价[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(1): 39-41.
- [9] 徐新, 刘畅, 曹佳渊, 等. 加减苍耳子散通过调控 SYK/PI3K/AKT 信号通路治疗变应性鼻炎的作用与机制[J]. 中药药理与临床, 2025, 41(4): 28-36.
- [10] 苗明三, 项丽玲, 苗艳艳. 变应性鼻炎动物模型制备规范(草案)[J]. 中草药, 2018, 49(1): 50-57.
- [11] 李想, 张华敏, 张宇, 等. 变应性鼻炎中医病名探析[J]. 中国中医药图书情报杂志, 2023, 47(3): 24-28.
- [12] 王鹤, 凌云. 基于龙砂医学流派思维运用乌梅丸汤方验案 3 则[J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(5): 29-32.
- [13] ZHANG Y, LAN F, ZHANG L. Update on pathomechanisms and treatments in allergic rhinitis [J]. Allergy. 2022, 77(11): 3309-3319.
- [14] 崔智博, 张俊清. 变应性鼻炎发病机制的研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2024, 38(4): 91-94.
- [15] 刘伟, 鲍晓林, 郭家亮. 变应性鼻炎免疫活性细胞及细胞因子研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(7): 1303-1307.
- [16] 宋杰. 甘草次酸钆配合物的合成、表征及其在鼻炎大鼠治疗中的应用[D]. 银川: 宁夏大学, 2022.
- [17] HAN X, ZHANG E, SHI Y, et al. Biomaterial-tight junction interaction and potential impacts [J]. J Mater Chem B, 2019, 7(41): 6310-6320.
- [18] SLIFER Z M, BLIKSLAGER A T. The integral role of tight junction proteins in the repair of injured intestinal epithelium [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 972.
- [19] 顾文哲, 史军, 严道南, 等. 探讨益气温阳方抑制变应性鼻炎小鼠鼻黏膜细胞自噬及保护 ZO-1 及 occludin 的作用[J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(3): 364-373.
- [20] 马永利, 安云芳, 韩兰, 等. 肠道微生物菌群对变应性鼻炎的影响[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2024, 30(3): 109-115.

编辑: 季春来

收稿日期: 2025-04-08

