

解表方对寒冷刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下模型的作用

李 爽， 杨居崩， 廖 陈， 晏雪梅， 代 蓉， 肖 纯， 李秀芳*
(云南中医药大学，云南 昆明 650500)

摘要：目的 探究解表方对寒冷刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下模型的作用。方法 采用冷热循环刺激复制大鼠鼻黏膜免疫屏障低下模型，分别给予含生药量 33.48 g/kg 的银翘散和含生药量 2.43 g/kg 的麻黄汤进行干预。ELISA 试剂盒检测大鼠鼻腔灌洗液中 sIgA 水平，Western blot 法检测鼻黏膜中 IgA、BAFF、APRIL、TGF-β1、TACI 和 pIgR 蛋白表达。**结果** 与正常组比较，模型组大鼠鼻腔灌洗液中 sIgA 水平降低 ($P<0.05$)，鼻黏膜中 IgA、BAFF、APRIL、TGF-β1 和 pIgR 蛋白表达降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，给予银翘散后大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，鼻腔灌洗液中 sIgA 水平升高 ($P<0.05$)，给予麻黄汤后大鼠鼻黏膜中 IgA、BAFF、pIgR 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，鼻腔灌洗液中 sIgA 水平升高 ($P<0.05$)。**结论** 麻黄汤可通过升高大鼠鼻黏膜组织中 BAFF、IgA、pIgR 的蛋白表达，促进 sIgA 的分泌来提高大鼠鼻黏膜免疫屏障功能，而银翘散可升高大鼠鼻黏中 IgA 蛋白表达。

关键词：解表方；寒冷刺激；鼻黏膜；免疫屏障功能低下

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2022)01-0227-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.01.044

上呼吸道感染是临床常见病，在全球范围内，每年的流感疫情会造成 25~50 万人死亡，并导致 500 万例严重疾病^[1-2]。上呼吸道感染大多数与鼻病毒、呼吸道合胞病毒和腺病毒等病毒感染有关，亦可由肺炎支原体、溶血性链球菌和肺炎链球菌等直接引起或继发感染。目前对上呼吸道感染防治措施主要采取疫苗接种结合非甾体类抗炎药物对症治疗的方法，由于绝大多数上呼吸道感染由病毒感染引起，而病毒具有变异速度快的特点，要准确预测即将流行的病毒亚型非常困难，因此疫苗接种往往难以取得理想的效果，非甾体抗炎药物的作用多限于改善临床症状，不能防止疾病进一步发展及并发症的发生，所以寻找有效防治上呼吸道感染的药物具有重要的现实意义。

中医积累了大量治疗上呼吸道感染的经验，上呼吸道感染典型的临床症状与中医学“表证”的症状相似，因此中医临床多用解表方剂进行治疗。课题组前期研究发现，给予银翘散可提高小鼠上呼吸道黏膜免疫屏障功能，进而达到降低滴鼻感染肺炎链球菌后小鼠的死亡率，延长小鼠生存时间^[3-4]。本实验在前期研究的基础上，采用冷热循环刺激复制大鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下模型^[4-5]，给予 2 种代表性的解表方银翘散和麻黄汤进行干预，进一步探究解表方提高大鼠鼻黏膜免疫屏障功能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 180~200 g，由辽宁长生生物技术股份有限公司提供，动物生产许可证号

SCXK(辽)2015-0001，合格证号 211002300049725。

1.2 试剂 DTT、Tris、过硫酸胺、10% SDS、四甲基乙二胺、甘氨酸、吐温-20 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司；30% 丙烯酰胺、1 mol/L Tris-HCL 缓冲液、1.5 mol/L Tris-HCL 缓冲液均购自北京索莱宝科技有限公司；PMSF、RIPA 裂解液(强)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司；大鼠 sIgA ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所；APRIL 抗体、TGF-β1 抗体均购自英国 Abcam 公司；TACI 抗体、pIgR 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司；BAFF 抗体、IgA 抗体均购自美国 Novus Biologicals 公司；二抗兔抗山羊、山羊抗兔、山羊抗鼠、β-actin、GAPDH、β-tubulin 均购自美国 Proteintech 公司。

1.3 药物 按《方剂学》^[6]配伍比例受试方剂的药物组成和剂量如下：银翘散为连翘 30 g、金银花 30 g、苦桔梗 18 g、薄荷 18 g、竹叶 12 g、生甘草 15 g、芥穗 12 g、淡豆豉 15 g、牛蒡子 18 g，加 6 倍水，除薄荷、芥穗外其余药材浸泡 30 min，水沸开始计时 15 min，10 min 时加入芥穗、薄荷，2 000 W 煮沸后改用 400 W 煎煮，纱布过滤，真空抽滤，45 ℃旋蒸至 55.5 mL；麻黄汤为麻黄 9 g、桂枝 6 g、杏仁 6 g、甘草 3 g，先加 500 mL 双蒸水浸泡麻黄 30 min，2 000 W 煎煮麻黄水沸后改用 800 W 煎煮，计时 20 min，300 mL 双蒸水浸泡余药 30 min，倒入锅中，2 000 W 共煎至水沸时改用 800 W，计时 30 min，纱布过滤，真空抽滤，

收稿日期：2020-02-28
基金项目：国家自然科学基金资助项目(81860724)；云南省科技计划-中医联合专项(2019FF002-054)；云南省科技厅科技计划项目(202001AZ070001-001)
作者简介：李 爽(1992—)，女，硕士生，研究方向为中药药理。Tel: 15887868857, E-mail: 576553605@qq.com
* 通信作者：李秀芳(1978—)，女，博士，教授，研究方向为中药防治上呼吸道感染。Tel: 13908856005, E-mail: 179464538@qq.com

55 ℃ 旋蒸至 111 mL。按人和动物的体表面积计数法根据临床药效剂量换算，大鼠银翘散的给药剂量是临床等效量的 2 倍量（含生药量 33.48 g/kg），麻黄汤的给药剂量是临床等效量（含生药量 2.43 g/kg），灌胃剂量均为 1 mL/100 g 体质量。以上药材均购自云南慈慧药业有限公司。

1.4 仪器 分析天平购自瑞士普利赛斯公司；酶标仪购自瑞士 Tecan 公司；冰箱购自青岛海尔股份有限公司；垂直电泳仪、湿转仪购自美国伯乐公司；转移脱色摇床、漩涡混悬器购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司；UVP 凝胶成像分析系统购自美国 Spectrum 公司；-80 ℃ 超低温冰箱购自美国 Thermo 公司。

2 方法

2.1 建立寒冷刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下模型 参考文献 [4-5] 报道，取 42 只大鼠，随机分为正常组、模型组，造模前禁食不禁水 12 h，正常组不得以任何刺激；将模型组大鼠置于 -15 ℃ 环境中 1 h，再转移至 25 ℃ 环境 30 min，循环 4 次，结束后正常给予水和饲料，在实验第 9 天，再次对模型组大鼠进行相同的刺激，各组分别在刺激后 1、3、5、7、9、11 d 每个时间点取 6 只，取鼻黏膜组织，采用 Western blot 法检测 IgA 蛋白表达。结果，与正常组比较，模型组鼻黏膜 IgA 蛋白表达降低，差异具有统计学意义 ($P<0.05$) 作为评价模型成功的标志 [4,7]。

2.2 解表方对寒冷刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下模型的影响 取 24 只大鼠，随机分为正常组、模型组、银翘散组和麻黄汤组，造模前禁食不禁水 12 h，正常组不得以任何刺激，其余各组大鼠置于 -15 ℃ 环境 1 h，再转至 25 ℃ 环境 30 min，反复循环 4 次，造模结束后正常给予水和食物。在造模结束后 6 h，正常组和模型组灌胃给予蒸馏水，银翘散组和麻黄汤组灌胃给予受试药物，每天 1 次，连续 7 d。在第 9 天时，正常组不得以任何刺激，其余各组大鼠再次置于 -15 ℃ 环境 1 h 后转至 25 ℃ 环境 30 min，反复循环 4 次，刺激结束后正常给予水和饲料。在造模结束后 6、22 h，正常组和模型组灌胃给予蒸馏水，银翘散组和麻黄汤组灌胃给予受试药物。造模结束后 24 h，取大鼠鼻腔灌洗液及鼻黏膜组织，ELISA 试剂盒检测鼻腔灌洗液中 sIgA 水平，Western blot 法检测鼻黏膜中 IgA、BAFF、APRIL、TGF-β1、TACI、pIgR 蛋白表达。Western blot 检测方法为取总蛋白 40 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，通过湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h，一抗（IgA、TGF-β1、pIgR、GAPDH、β-actin、β-tubulin 稀释倍数为 1：1 000，BAFF、APRIL 稀释倍数为 1：500，TACI 稀释倍数为 1：100）4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗涤 4 次，每次 5 min，二抗（兔抗山羊、山羊抗兔、山羊抗鼠稀释倍数为 1：2 000）室温孵育 2 h，TBST 洗涤 4 次，每次 5 min，最后滴加 ECL 发光液显色。

2.3 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），方差齐性则采用 LSD 检验，方差不齐则采用

Tamhane's 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 寒冷刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下模型中 IgA 蛋白表达 如表 1、图 1 所示，与正常组比较，寒冷刺激后第 1、3 天时模型组大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)；寒冷刺激第 5 天后，模型组大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达呈上升趋势；寒冷刺激后第 11 天时，模型组大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达仍较低。

表 1 各组大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	IgA/β-actin
正常组	1.20±0.27
模型组-1 d	0.28±0.12**
模型组-3 d	0.48±0.09*
模型组-5 d	0.87±0.23
模型组-7 d	0.98±0.47
模型组-9 d	0.90±0.38
模型组-11 d	1.05±0.20

注：与正常组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

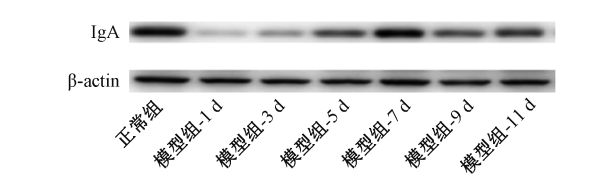


图 1 各组大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达

3.2 解表方对寒冷刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下模型的影响 如表 2、图 2 所示，与正常组比较，模型组大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，银翘散组和麻黄汤组大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与银翘散组比较，麻黄汤组大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白表达升高更为显著 ($P<0.05$)。与正常组比较，模型组大鼠鼻腔灌洗液中 sIgA 的水平降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，银翘散组和麻黄汤组 sIgA 水平均升高 ($P<0.05$)。

表 2 解表方对寒冷刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下模型的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IgA/β-actin	sIgA/(ng·L ⁻¹)
正常组	—	1.13±0.17	12.29±2.78
模型组	—	0.26±0.14**	7.60±4.89**
银翘散组	33.48	0.55±0.13 [#]	9.16±2.18 [#]
麻黄汤组	2.43	0.85±0.33 ^{##▲}	9.22±1.44 [#]

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与银翘散组比较，[▲] $P<0.05$ 。

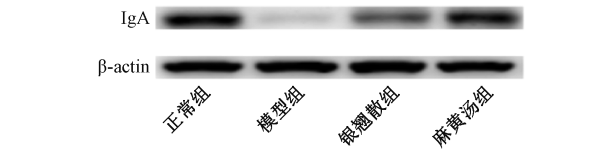


图 2 解表方对寒冷刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下模型的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.3 解表方对寒冷刺激致大鼠鼻黏膜屏障功能低下模型中 BAFF、APRIL、TGF-β1 和 TACI 蛋白表达的影响 如表 3、图 3 所示,与正常组比较,模型组大鼠鼻黏膜中 BAFF、APRIL、TGF-β1 蛋白表达降低 ($P<0.01$),TACI 蛋白表达有降低趋势;与模型组比较,麻黄汤组大鼠鼻黏膜中 BAFF

蛋白表达升高 ($P<0.01$),银翘散组无明显变化 ($P>0.05$);与银翘散组比较,麻黄汤组 BAFF 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,麻黄汤组和银翘散组大鼠鼻黏膜中 TACI 和 TGF-β1 蛋白表达均无明显变化 ($P>0.05$)。

表 3 各组大鼠鼻黏膜中 BAFF、APRIL、TGF-β1、TACI 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	BAFF/GAPDH	APRIL/GAPDH	TACI/β-tublin	TGF-β1/GAPDH
正常组	—	0.89±0.19	1.02±0.22	0.85±0.21	1.26±0.34
模型组	—	0.31±0.12**	0.32±0.25**	0.67±0.19	0.68±0.36**
银翘散组	33.48	0.38±0.13	0.57±0.17	0.75±0.14	0.62±0.22
麻黄汤组	2.43	0.80±0.16 ^{##▲}	0.45±0.38	0.75±0.14	0.77±0.30

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与银翘散组比较,[▲] $P<0.01$ 。

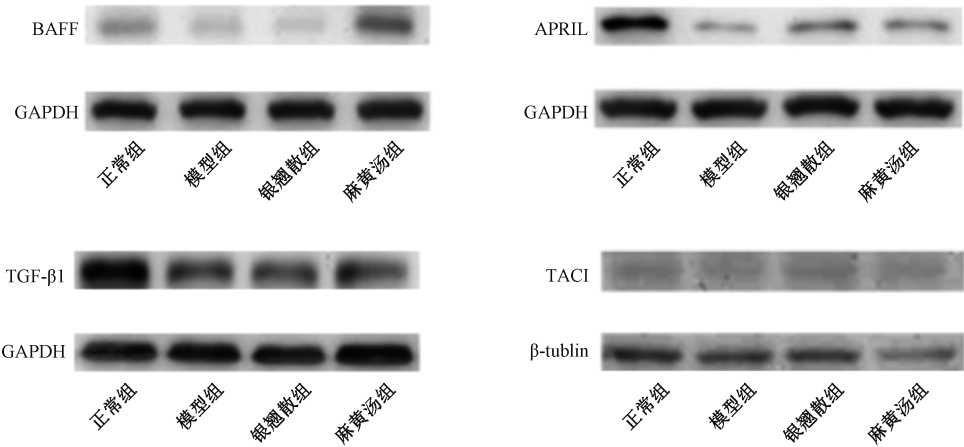


图 3 各组大鼠鼻黏膜中 BAFF、APRIL、TGF-β1、TACI 蛋白表达

3.4 解表方对寒冷刺激致大鼠鼻黏膜屏障功能低下模型 IgA 分泌过程中 pIgR 蛋白表达的影响 如表 4、图 4 所示,与正常组比较,模型组大鼠鼻黏膜中 pIgR 蛋白表达降低 ($P<0.01$);与模型组比较,麻黄汤组大鼠 pIgR 蛋白表达升高 ($P<0.05$),银翘散组无明显变化 ($P>0.05$)。

表 4 各组大鼠鼻黏膜中 pIgR 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	pIgR/β-actin
正常组	—	1.11±0.28
模型组	—	0.61±0.10**
银翘散组	33.48	0.67±0.30
麻黄汤组	2.43	0.94±0.32 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

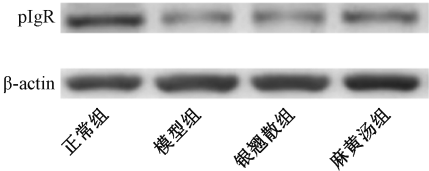


图 4 各组大鼠鼻黏膜中 pIgR 蛋白表达

4 讨论

目前,上呼吸道感染仍然是威胁人类健康的严重传染性疾 病,并伴随着多种并发症,其发病通常由细菌或病毒感染引起。作为机体直接与外界相通的门户之一,位于气道黏膜表面的先天性和适应性免疫屏障对消除入侵的病原体起着关键作用。分泌型免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, sIgA) 是呼吸道免于病原体侵犯的重要效应分子,可以阻止细菌在黏膜表面的黏附、溶解细菌、中和毒素,其水平的变化与呼吸系统疾病的发生有着密切关系^[8]。维持或提高呼吸道 sIgA 水平可提高黏膜免疫功能,有助于降低呼吸道疾病的发生,防止疾病向下呼吸道发展。

为进一步探究中医临床常用的解表方对鼻黏膜屏障的影响,本实验采用反复冷热循环刺激的方法复制大鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下模型,给予麻黄汤和银翘散进行干预,考察其潜在的作用。结果显示,麻黄汤和银翘散均能提高模型组大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白的表达及鼻腔灌洗液中 sIgA 的水平,提示两个解表方均能提高鼻黏膜免疫屏障的功能。IgA 在上呼吸道黏膜的合成途径主要分为 T 细胞依赖途径和非 T 细胞依赖途径,而大量文献表明,体内大多数共生细菌都是定向的通过非 T 细胞依赖的途径产生 IgA^[9]。树突状细胞 (dendritic cell, DC) 是一种广泛分布于器官和组

织的特殊的抗原递呈细胞，当病原体入侵时，DC 会直接摄取病原体，递呈给 B 细胞。并表达 B 细胞活化因子（B cell activating factor, BAFF）、增殖诱导配体（a proliferation inducing ligand, APRIL）激活 B 细胞^[10-11]，与跨膜激活剂和钙调节环素配体（transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor, TACI）共同作用^[12]，使膜上表达的免疫球蛋白类别转换成免疫球蛋白 A^[13]。而转化生长因子 β 1（transforming growth factor β 1, TGF- β 1）直接参与 IgA 的类别转换^[14]。在这些细胞因子的作用下增殖分化出的 IgA 与黏膜上皮细胞基底层的多聚免疫球蛋白受体（polymeric immunoglobulin receptor, pIgR）结合，最终以胞吐的方式将 sIgA 释放入黏膜腔^[15]，作为黏膜免疫的效应分子发挥作用。

实验结果显示，大鼠在寒冷刺激后，鼻黏膜中 BAFF、APRIL 和 TGF- β 1 蛋白表达降低，TACI 蛋白表达有降低趋势，同时，鼻黏膜中 pIgR 蛋白降低，这解释了大鼠鼻腔灌洗液中 sIgA 降低的原因。给予麻黄汤后，大鼠鼻黏膜组织中 BAFF 蛋白表达升高，说明麻黄汤可能是通过促进 B 淋巴细胞的成熟，促进了 IgA 的蛋白合成，麻黄汤干预后还促进了 pIgR 的蛋白表达，提示其可携带 sIgA 进入鼻腔发挥作用；给予银翘散后，仅对 APRIL 有升高的趋势，对 BAFF、TACI、TGF- β 1 和 pIgR 的蛋白表达均无明显作用，提示，银翘散促进鼻黏膜 IgA 蛋白合成可能是通过其它途径而达到，具体机制有待进一步研究。

综上所述，通过本实验的研究，进一步证实了中医临床常用解表方麻黄汤和银翘散在提高上呼吸道黏膜屏障功能方面的作用，并揭示了麻黄汤的部分作用机制。但目前的研究结果尚无法解释银翘散促进 IgA 的蛋白表达和分泌的原因，并且在本研究中，辛温解表和辛凉解表代表方剂之间的作用差异还不明显，两方作用差异的原因还有待进一步研究。

参考文献：

[1] Wardhana, Datau E A, Sultana A, *et al.* The efficacy of Bacillus Calmette-Guerin vaccinations for the prevention of acute upper respiratory tract infection in the elderly[J]. *Acta Med Indones*, 2011, 43(3): 185-190.

[2] Falkeborn T, Hinkula J, Olliver M, *et al.* The intranasal adjuvant Endocine™ enhances both systemic and mucosal immune responses in aged mice immunized with influenza antigen[J]. *Viol J*, 2017, 14(1): 44.

[3] 柳丽松, 殷 红, 王维丽, 等. 银翘散对呼吸道黏膜免疫功能低下合并甲型流感病毒感染模型小鼠的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2015, 22(8): 70-72.

[4] 李 娴, 雷 娜, 段小花, 等. 寒冷刺激致小鼠上呼吸道黏膜免疫功能低下模型的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(8): 1662-1664.

[5] Xiao M M, Pan C S, Liu Y Y, *et al.* Post-treatment with Ma-Huang-Tang ameliorates cold-warm-cycles induced rat lung injury[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 312.

[6] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 30.

[7] Gould V M W, Francis J N, Anderson K J, *et al.* Nasal IgA provides protection against human influenza challenge in volunteers with low serum influenza antibody titre[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 900.

[8] 罗珍瑶, 梁爱武. SIgA 在呼吸道免疫中的作用及中医药干预研究进展[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2019, 7(11): 72-73.

[9] Bunker J J, Flynn T M, Koval J C, *et al.* Innate and adaptive humoral responses coat distinct commensal bacteria with immunoglobulin A[J]. *Immunity*, 2015, 43(3): 541-553.

[10] Stephens W Z, Round J L. IgA Targets troublemakers[J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 16(3): 265-267.

[11] Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, *et al.* Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(11): 3903-3908.

[12] Castigli E, Wilson S A, Scott S, *et al.* TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells[J]. *J Exp Med*, 2005, 201(1): 35-39.

[13] Cerutti A, Cols M, Gentile M, *et al.* Regulation of mucosal IgA responses: lessons from primary immunodeficiencies[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1238(1): 132-144.

[14] Fujihashi K, Boyaka P N, Mcghee J R. 19-Host defenses at mucosal surfaces[J]. *Clin Immunol*, 2008: 287-303.

[15] Brandtzaeg P. Secretory IgA: designed for anti-microbial defense[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 222.