

·实验研究·

本文引用: 田 赛, 贺 严, 黄 丽. 清解合剂通过 Nrf2/GPX4 信号调控嗜酸性粒细胞活化及免疫功能改善变应性鼻炎作用机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(10): 1806-1815.

清解合剂通过 Nrf2/GPX4 信号调控嗜酸性粒细胞活化及免疫功能改善变应性鼻炎作用机制研究

田 赛¹, 贺 严², 黄 丽^{1*}

1. 中国中医科学院眼科医院, 北京 100040; 2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091

〔摘要〕 目的 探讨清解合剂对变应性鼻炎(AR)小鼠嗜酸性粒细胞活化及免疫功能的影响, 以及其对核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)信号通路的调控机制。方法 通过卵白蛋白(OVA)诱导构建 AR 小鼠模型; 将小鼠随机分为对照组、模型组、清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组, 每组 10 只。统计小鼠鼻部症状评分; 迪夫快速(Diff-Quick)染色检测鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞活化; HE 染色检测鼻黏膜组织病理损伤; ELISA 检测血清中 OVA 特异性免疫球蛋白 E(IgE)、组胺、白细胞介素(IL)-4、 γ -干扰素(IFN- γ)、IL-17、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)含量; TUNEL 染色检测鼻黏膜组织中的细胞凋亡情况; 二氢乙啶(DHE)染色和 ELISA 检测鼻黏膜组织中的活性氧自由基(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)以及丙二醛(MDA)水平; qRT-PCR 检测 T 盒子转录因子(T-bet)、GATA 结合蛋白 3(GATA3)、叉头框蛋白 3(Foxp3)和维甲酸相关孤儿受体 γ t (ROR γ t)的 mRNA 表达; Western blot 检测 Nrf2、GPX4、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的蛋白表达。结果 与对照组相比, 模型组、清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织严重损伤, 鼻部症状评分、鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞数量, 血清中 OVA 特异性 IgE、组胺、IL-4 和 IL-17 含量, 鼻黏膜组织中细胞凋亡率、ROS 和 MDA 水平、GATA3 和 ROR γ t mRNA 表达以及 Bax 蛋白表达均升高($P<0.05$); 而血清中 IFN- γ 和 TGF- β 1 含量, 鼻黏膜组织中 SOD 水平、T-bet 和 Foxp3 mRNA 表达以及 Nrf2、GPX4 和 Bcl-2 蛋白表达均降低($P<0.05$)。与模型组相比, 清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组鼻黏膜组织损伤减轻, 鼻部症状评分、鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞数量, 血清中 OVA 特异性 IgE、组胺、IL-4 和 IL-17 含量, 鼻黏膜组织中细胞凋亡率、ROS 和 MDA 水平、GATA3 和 ROR γ t mRNA 表达以及 Bax 蛋白表达均降低($P<0.05$); 而血清中 IFN- γ 和 TGF- β 1 含量, 鼻黏膜组织中 SOD 水平、T-bet 和 Foxp3 mRNA 表达以及 Nrf2、GPX4 和 Bcl-2 蛋白表达均升高($P<0.05$)。与清解合剂高剂量组相比, ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻部症状评分、鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞数量, 血清中 OVA 特异性 IgE、组胺、IL-4 和 IL-17 含量, 鼻黏膜组织中细胞凋亡率、ROS 和 MDA 水平、GATA3 和 ROR γ t mRNA 表达以及 Bax 蛋白表达均升高($P<0.05$); 而血清中 IFN- γ 和 TGF- β 1 含量, 鼻黏膜组织中 SOD 水平、T-bet 和 Foxp3 mRNA 表达以及 Nrf2、GPX4 和 Bcl-2 蛋白表达均降低($P<0.05$)。结论 清解合剂能明显抑制 AR 小鼠中嗜酸性粒细胞的活性, 抑制氧化应激的进展, 改善动物的免疫功能, 这可能与调控 Nrf2/GPX4 信号通路有关。

〔关键词〕 清解合剂; 变应性鼻炎; 嗜酸性粒细胞活化; 免疫功能; 核因子 E2 相关因子 2/谷胱甘肽过氧化物酶 4 信号通路; 调节性 T 细胞/辅助性 T 细胞 17 细胞失衡

〔中图分类号〕R276.1

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.10.002

Mechanism of action of Qingjie Mixture in alleviating allergic rhinitis by regulating eosinophil activation and immune function through the Nrf2/GPX4 signaling pathway

TIAN Sai¹, HE Yan², HUANG Li^{1*}

〔收稿日期〕2025-05-22

〔基金项目〕中国中医科学院眼科医院中央高水平医院项目(GSP5-29); 中国中医科学院眼科医院院级科研启动基金人才项目(202028)。

〔通信作者〕* 黄 丽, 女, 硕士, 副主任医师, E-mail: cctm100@126.com。

1. Ophthalmology Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China;

2. Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Qingjie Mixture on the eosinophil activation and immune function in allergic rhinitis (AR) mice, as well as its regulatory mechanism on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway. **Methods** An AR mouse model was established by ovalbumin (OVA) induction. Mice were randomly divided into control, model, low-dose Qingjie Mixture, high-dose Qingjie Mixture, and ML385+high-dose Qingjie Mixture groups, with 10 mice in each group. Nasal symptom scores of mice were calculated. Diff-Quick staining was used to assess the eosinophil activation in nasal lavage fluid. HE staining was used to observe the histopathological damage in nasal mucosal tissue. ELISA was employed to measure the levels of OVA-specific immunoglobulin E (IgE), histamine, interleukin (IL)-4, interferon- γ (IFN- γ), IL-17, and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in serum. TUNEL staining was used to check the apoptosis in nasal mucosal tissue. dihydroethidium (DHE) staining kit and ELISA were used to examine the levels of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) in nasal mucosal tissue. The mRNA expression of T-box expressed in T cells (T-bet), GATA binding protein 3 (GATA3), forkhead box protein 3 (Foxp3), and retinoid-related orphan nuclear receptor γ t (ROR γ t) was determined using qRT-PCR. Protein expression of Nrf2, GPX4, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein (Bax) was examined by Western blot analysis. **Results** Compared with the control group, the model, low-dose Qingjie Mixture, high-dose Qingjie Mixture, and ML385+high-dose Qingjie Mixture groups showed severe nasal mucosal damage; the nasal symptom scores, eosinophil counts in nasal lavage fluid, serum content of OVA-specific IgE, histamine, IL-4, and IL-17, nasal mucosal apoptosis rates, ROS and MDA levels, GATA3 and ROR γ t mRNA expression, as well as Bax protein expression were all elevated ($P<0.05$). Meanwhile, IFN- γ and TGF- β 1 levels in serum, and SOD levels, T-bet and Foxp3 mRNA expression, and protein expression of Nrf2, GPX4, and Bcl-2 in nasal mucosal tissue were all reduced ($P<0.05$). Compared with the model group, the low-dose Qingjie Mixture, high-dose Qingjie Mixture, and ML385+high-dose Qingjie Mixture groups showed alleviated nasal mucosal damage; the nasal symptom scores, eosinophil counts in nasal lavage fluid, serum content of OVA-specific IgE, histamine, IL-4, and IL-17, nasal mucosal apoptosis rates, ROS and MDA levels, GATA3 and ROR γ t mRNA expression, as well as Bax protein expression were all reduced ($P<0.05$). Meanwhile, IFN- γ and TGF- β 1 levels in serum, and SOD levels, T-bet and Foxp3 mRNA expression, and protein expression of Nrf2, GPX4, and Bcl-2 in nasal mucosal tissue increased ($P<0.05$). Compared with high-dose Qingjie Mixture group, the ML385+high-dose Qingjie Mixture group showed increased nasal symptom score, eosinophil count in nasal lavage fluid, serum content of OVA-specific IgE, histamine, IL-4, and IL-17, nasal mucosal apoptosis rate, ROS and MDA levels, GATA3 and ROR γ t mRNA expression, as well as Bax protein expression ($P<0.05$). Meanwhile, IFN- γ and TGF- β 1 levels in serum, and SOD level, T-bet and Foxp3 mRNA expression, and protein expression of Nrf2, GPX4, and Bcl-2 in nasal mucosal tissue decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Qingjie Mixture can significantly inhibit eosinophil activity in AR mice, suppress oxidative stress progression, and improve the immune function, which may be related to the regulation of Nrf2/GPX4 signaling pathway.

[Keywords] Qingjie Mixture; allergic rhinitis; eosinophil activation; immune function; nuclear factor E2-related factor 2/ glutathione peroxidase 4 signaling pathway; regulatory T cells/T helper cells 17 cell imbalance

在变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)中,异常升高的免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)可促使患者鼻黏膜中嗜酸性粒细胞发生活化,增加炎症介

质分泌,引发患者出现打喷嚏、流鼻涕等诸多鼻部不适症状,严重影响患者的生活质量^[1]。因此深入揭示 AR 的病因机制,具有重要意义。针对 AR 的干预措

施中,中医药技术显示了较为满意的疗效^[2]。首都国医名师庄曾渊研究员提出经验方“清解合剂”(麻黄,辛夷,生石膏,生甘草,桑白皮,黄芩,荆芥,防风,地肤子,五味子,枳壳,炒麦芽)在小儿风热乳蛾等免疫性失衡疾病中疗效显著^[3],而该方剂具有宣通鼻窍、运水祛湿等效用,为其在 AR 的治疗提供了潜在的可能性。

除嗜酸性粒细胞外,AR 的免疫病理机制还涉及辅助性 T 细胞(T helper cells, Th)1/2 型细胞、调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)/Th17 细胞的动态失衡。研究发现,AR 患者体内 GATA 结合蛋白 3(GATA binding protein 3, GATA3)和维甲酸相关孤儿受体(retinoid acid-orphan nuclear receptor γ t, ROR γ t)的表达异常升高,而 T 盒子转录因子(T-box expressed in T cells, T-bet)与叉头框蛋白 3(forkhead box protein 3, Foxp3)的表达显著下调,形成鲜明对比^[4]。这种转录调控紊乱直接导致细胞因子网络失调;促炎性细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-4 和 IL-17 水平显著升高,而免疫调节因子 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和抗炎细胞因子转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)水平明显降低^[4]。这种双向免疫失衡最终引发鼻黏膜屏障功能受损,形成持续的炎症恶性循环,加剧患者鼻黏膜组织的免疫功能下降,诱使患者鼻黏膜组织出现明显的氧化应激,活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)难以实现及时清除,丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平升高,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性降低,推动鼻黏膜组织中细胞凋亡的进展,加剧鼻黏膜组织的病理损伤^[4-5]。

核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)信号在免疫功能调节中扮演重要角色。吴勇等^[6]研究显示,在慢性鼻窦炎小鼠模型中,上调 Nrf2、GPX4 的表达能明显升高 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)的水平,抑制 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)的表达,降低鼻黏膜组织中细胞凋亡,从而改善动物鼻黏膜组织中 Treg/Th17 失衡。本研究旨在探讨清解合剂对 AR 小鼠嗜酸性粒细胞活化和免疫功能的

调控机制,以期药物的临床应用提供可靠的数据支撑。

1 材料

1.1 实验动物

BALB/c 小鼠,雄性,SPF 级,50 只,7~8 周龄,体质量 20~22 g,购自中国医学科学院医学实验动物研究所,动物生产合格证:SCXK(京)2023-0013。在温度 22~24 ℃,湿度 50%~55%,光照 12 h/黑暗 12 h 交替循环的屏障系统内进行适应性喂养,小鼠喂食基础饲料,自由饮水、摄食,无干预措施。实验目的和操作已获得中国中医科学院眼科医院动物伦理委员会审核批准,伦理批准号:GSP5-29。

1.2 主要实验试剂

清解合剂的组方:麻黄 6 g、辛夷 10 g、生石膏 15 g、生甘草 6 g、桑白皮 8 g、黄芩 8 g、荆芥 6 g、防风 8 g、地肤子 10 g、五味子 6 g、枳壳 8 g、炒麦芽 8 g,以上药物均由中国中医科学院眼科医院中药房提供,并由专门人员进行煎制。煎制方法如下:将中药充分浸泡后,煎煮两次,每次 40 min,将两次煎煮药液合并,过滤药渣,至其浓度为 2 g/mL,分装灭菌后,置于冰箱中待用。

Nrf2/GPX4 信号特异性抑制剂 ML385(批号:2573375)、卵白蛋白(ovalbumin, OVA)(批号:2577539)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;IL-4 试剂盒(批号:L-001-286)、IFN- γ 试剂盒(批号:L-007-337)、IL-17 试剂盒(批号:L-009-259)、TGF- β 1 试剂盒(批号:J-006-764)、TUNEL 试剂盒(批号:L-009-961)均购自美国 Med Chem Express 公司;HE 染色试剂盒(批号:1753695)购自北京威格拉斯生物有限公司;二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)染色试剂盒(批号:2587-6008)购自安徽合肥白鲨生物工程有限公司;迪夫快速(Diff-Quick)染色试剂盒(批号:268569069)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号:268563579)、蛋白上样缓冲液(批号:268567285)、组织裂解液(批号:267415469)均购自武汉伊莱瑞特科技有限公司;Nrf2 抗体(批号:145873-007XD)、GPX4 抗体(批号:145873-008KL)、Bcl-2 抗体(批号:145759-002JM)、Bax 抗体(批号:145667-006FM)、GAPDH 抗体(批号:145633-005GL)均购自上海酶联

生物技术有限公司;磷酸盐缓冲液(批号:2589631456)购自武汉云克隆生物技术股份有限公司;RNA提取试剂盒(批号:3369854752)、Prime Script™反转录试剂盒(批号:3312756469)均购自上海江莱生物科技有限公司。

1.3 主要实验仪器

LKB-V型超薄切片机(瑞士LKB公司);CX20型生物显微镜(日本Olympus公司);Criterion型电泳仪以及ChemiDoc MP型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);ELx800型智能全自动酶标仪(美国BioTek公司)。

2 方法

2.1 AR小鼠模型的构建以及动物实验的分组处理

参照顾宸晟等^[7]的方法进行造模。AR小鼠造模由基础致敏和局部激发两个步骤,具体操作如下:在基础致敏阶段中(1~14 d),通过200 μ L的生理盐水将100 μ g的OVA和2 mg的Al(OH)₃配制成500 μ g/mL的OVA混悬液,在0、7、14 d分别进行腹腔注射OVA混悬液200 μ L以达到致敏效果;在局部激发阶段中(15~28 d),通过1 mL的生理盐水将25 mg的OVA和2 mg的Al(OH)₃配制成25 mg/mL的OVA混悬液,对小鼠进行滴鼻操作,每只动物单个鼻腔给药量为10 μ L,每日1次。激发操作完成后,观察小鼠鼻分泌物量、打喷嚏次数及搔鼻动作等行为进行评分,评分标准如下。鼻腔分泌物(主要指鼻涕):流至前鼻孔记为1分,流出前鼻孔记为2分,涕流满面或挂满须毛记为3分;打喷嚏:1~3个以内记为1分,4~10个记为2分,10个以上记为3分;搔鼻:轻轻抓鼻1分;频繁抓鼻或反复挠抓面部,甚至抓鼻不止记为2分;在观察时间内(30 min内)采用叠加法记分,总分超过5分视为动物造模成功(本研究中实验人员技术纯熟,造模成功率为100%)^[8-9]。

按照随机数字表法将实验小鼠分为对照组、模型组、清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组,每组10只;其中模型组、清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组进行AR造模,对照组在造模过程中以生理盐水进行腹腔注射以及滴鼻;清解合剂

低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组自造模开始的第22天开始给药,其中,清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组分别以5、20 mL/kg的清解合剂进行灌胃,ML385+清解合剂高剂量组在20 mL/kg的清解合剂进行灌胃的同时,腹腔注射10 mg/kg的ML385;对照组和模型组灌胃等量的无菌蒸馏水;各组小鼠每日定时定点干预一次,连续给药14 d。

2.2 各组小鼠鼻部症状评分

连续给药14 d后,观察小鼠的鼻部行为,并进行评分,评分标准如下^[10]。搔鼻:30 min内搔鼻少于10次,记为1分,搔鼻不止,记为2分;喷嚏:30 min内打喷嚏1~3个,记为1分,打喷嚏4~10个记为2分,打喷嚏多于10个,记为3分;鼻涕(鼻腔分泌物情况):流至前鼻孔记为1分,流出前鼻孔记为2分,涕流满面或挂满须毛记为3分。

2.3 各组小鼠鼻腔灌洗液的收集以及检测

鼻部评分结束后,以0.3%戊巴比妥钠按40 mg/kg剂量腹腔注射麻醉动物,颈部备皮,切开皮肤,显微镜下无菌分离气管前组织,插管,每侧鼻腔收集200 μ L Hank平衡盐液灌洗液,离心,弃上清,鼻腔灌洗液经Diff-Quick染色后,显微镜下镜观察小鼠鼻腔灌洗液中的嗜酸性粒细胞活化情况。

2.4 血清样本的收集以及检测

眼球摘除留取血样,离心后,收集血清,通过ELISA检测血清中OVA特异性IgE、组胺、IL-4、IFN- γ 、IL-17、TGF- β 1的水平。

2.5 HE染色观察鼻黏膜组织的组织病理学改变

收集小鼠鼻腔灌洗液和血清样本后处死实验动物,无菌剥离小鼠双侧鼻黏膜组织。取动物的鼻黏膜组织,经无水乙醇脱水,二甲苯透明,蜂蜡包埋,切片,置于二甲苯中脱蜡,梯度乙醇中水化,苏木素和伊红染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。

2.6 TUNEL染色检测各组小鼠鼻黏膜组织中细胞凋亡

按照2.5中所述制备鼻黏膜组织切片。将切片脱蜡,充分清洗,胰酶消化30 min,再次通过磷酸盐缓冲液清洗,TUNEL染色,室温下避光孵育2 h,磷

酸盐漂洗 3 次,经常规脱水,置于二甲苯溶液中透明,封片,镜下观察。

2.7 DHE 染色试剂盒和 ELISA 试剂盒检测各组小鼠鼻黏膜组织中 ROS、SOD 以及 MDA 水平

将鼻黏膜组织切片按照 DHE 染色试剂盒要求进行染色,避光孵育 60 min,磷酸盐冲洗后,滴加适量淬灭剂,中性树脂封片,显微镜下观察。

将鼻黏膜组织匀浆后,离心,吸取上清液,蛋白浓度定量后,按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,检测鼻黏膜组织中 SOD 和 MDA 的水平。

2.8 qRT-PCR 检测各组小鼠鼻黏膜组织中 T-bet、GATA、Foxp3、ROR γ t 的 mRNA 表达

通过 Trizol 试剂盒提取鼻黏膜组织中的总 RNA,待确定其纯度和浓度后,通过试剂盒 Prime ScriptTM 反转录合成 cDNA。qRT-PCR 扩增的反应体系:正向引物为 0.8 μ L,反向引物为 0.8 μ L,cDNA 为 0.8 μ L,Hot Start Taq DNA Polymerase 为 0.8 μ L,RNase Free dd H₂O 为 6.4 μ L;实验条件:95 $^{\circ}$ C,5 s;预变性:95 $^{\circ}$ C,5 s,变性:60 $^{\circ}$ C,60 s;退火,72 $^{\circ}$ C,30 s;延伸火,40 个循环。引物序列详见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence for qRT-PCR

基因	序列	长度/bp
T-bet	正向:GGACGAGCTACCCTTCGGT	168
	反向:CTGTCTCACCCCAGCATAG	
GATA3	正向:AACTGCATCTGCCCTAAGGT	138
	反向:ACTGTCACACTGGTCACTCC	
Foxp3	正向:ACCCTAATGCCTTGTTCCCA	152
	反向:TGGGGAAGTCTTCAGCAAC	
ROR γ t	正向:GGCAGACCTATTTTGCACGA	149
	反向:TAGCTGTCGATGGATGCCTC	
GAPDH	正向:CTGGTCTTCTGGAGTTCCTG	177
	反向:TGGTCCTTAGCCACTCCTTCT	

2.9 Western Blot 检测各组小鼠鼻黏膜组织中 Nrf2、GPX4、Bcl-2、Bax 的蛋白表达

取动物的鼻黏膜组织,在 4 $^{\circ}$ C 裂解液中放置 30 min,离心,并将上清液稀释,常规方法提取样本中的总蛋白,以 50 μ g 样品进行上样,电泳,转膜,封闭,加入一抗(Nrf2、GPX4、Bcl-2、Bax 的稀释比例均为 1:500)孵育过夜,充分洗膜后,加入二抗(HRP 山

羊抗兔 IgG 的稀释比例为 1:1 500),室温孵育后充分洗膜,显色 30 min,凝胶成像系统成像,统计分析目标蛋白的灰度值。

2.10 统计学分析

实验所得数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,采用 Graphpad 8.0 进行作图。计量资料均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐,两组间比较采用 LSD-*t* 检验,方差不齐则采用 Games Howell 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠鼻部症状评分比较

与对照组相比,模型组、清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠的鼻部症状评分均升高($P<0.05$);与模型组相比,清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠的鼻部症状评分均降低($P<0.05$);而与清解合剂高剂量组相比,ML385+清解合剂高剂量组小鼠的鼻部症状评分升高($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 各组小鼠鼻部症状评分比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Comparison of nasal symptom scores among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	鼻部症状评分/分
对照组	0.61 $\pm$ 0.07
模型组	6.62 $\pm$ 0.28*
清解合剂低剂量组	5.75 $\pm$ 0.24*
清解合剂高剂量组	3.19 $\pm$ 0.22*#
ML385+清解合剂高剂量组	4.17 $\pm$ 0.13*# [△]

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,* $P<0.05$;与清解合剂高剂量组相比,* $P<0.05$ 。

3.2 各组小鼠鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞的活化情况

与对照组相比,模型组、清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞的数量均增加($P<0.05$);与模型组相比,清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞的数量均减少($P<0.05$);而与清解合

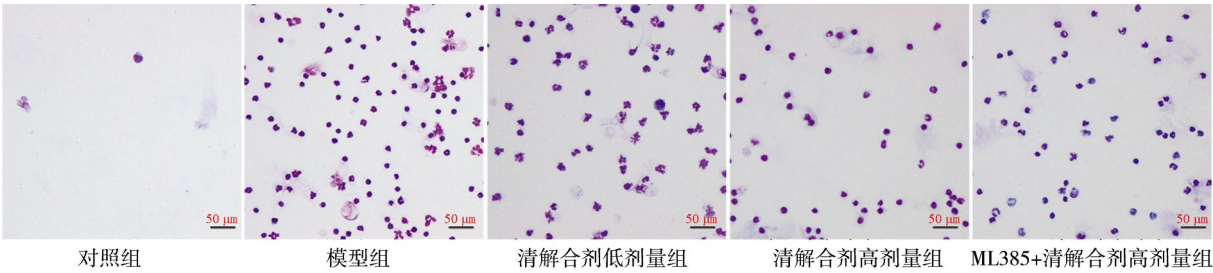


图 1 各组小鼠鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞的数量(Diff-Quick,×400)

Fig.1 Eosinophil counts in nasal lavage fluid in each group of mice (Diff-Quick, ×400)

剂高剂量组相比,ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞的数量增加($P<0.05$)。详见图 1 和表 3。

表 3 各组小鼠鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞数量比较
($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Comparison of eosinophil counts in nasal lavage fluid among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞的 数量/(10 ⁶ /mL)
对照组	0.07±0.02
模型组	0.45±0.07*
清解合剂低剂量组	0.36±0.05*#
清解合剂高剂量组	0.18±0.05*#
ML385+清解合剂高剂量组	0.25±0.05*#☆

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与清解合剂高剂量组相比,☆ $P<0.05$ 。

3.3 各组小鼠血清中 OVA 特异性 IgE、组胺、IL-4、IFN- γ 、IL-17、TGF- β 1 的含量

与对照组相比,模型组、清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠血清中 OVA 特异性 IgE、组胺、IL-4 和 IL-17 的含量均升高($P<0.05$),IFN- γ 和 TGF- β 1 的水平均降低($P<$

0.05);与模型组相比,清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠血清中 OVA 特异性 IgE、组胺、IL-4 和 IL-17 的含量均降低($P<0.05$),IFN- γ 和 TGF- β 1 的含量均升高($P<0.05$);而与清解合剂高剂量组相比,ML385+清解合剂高剂量组小鼠血清中 OVA 特异性 IgE、组胺、IL-4 和 IL-17 的含量均升高($P<0.05$),IFN- γ 和 TGF- β 1 的含量均降低($P<0.05$)。详见表 4。

3.4 各组小鼠鼻黏膜组织病理学变化

对照组小鼠鼻黏膜组织结构完整,未见异常;与对照组相比,模型组小鼠鼻黏膜组织中腺体增生,嗜酸性粒细胞浸润,可见明显的炎症性病变;与模型组相比,清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织损伤减轻,其中以清解合剂高剂量组改善最明显,表现为鼻黏膜组织中腺体增生、血管扩张以及炎症性浸润均减轻。详见图 2。

3.5 各组小鼠鼻黏膜组织中的细胞凋亡变化

与对照组相比,模型组、清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中的细胞凋亡率均升高($P<0.05$);与模型组

表 4 各组小鼠血清中 OVA 特异性 IgE、组胺、IL-4、IFN- γ 、IL-17、TGF- β 1 含量比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 4 Comparison of serum levels of OVA-specific IgE, histamine, IL-4, IFN- γ , IL-17, and TGF- β 1 among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	OVA 特异性 IgE/(pg/mL)	组胺/(pg/mL)	IL-4/(pg/mL)	IFN- γ /(pg/mL)	IL-17/(pg/mL)	TGF- β 1/(pg/mL)
对照组	107.33±5.67	12.76±0.77	31.99±1.67	127.73±3.61	14.77±1.09	26.72±0.96
模型组	1 355.72±85.37*	86.29±1.26*	129.73±2.16*	43.26±2.29*	57.05±1.96*	8.26±0.88*
清解合剂低剂量组	1 127.64±76.85*#	71.42±1.09*#	98.42±1.85*#	57.15±1.85*#	45.13±1.37*#	12.63±0.72*#
清解合剂高剂量组	543.97±97.29*#	38.63±0.98*#	57.19±1.26*#	108.37±1.64*#	22.69±1.13*#	21.54±0.61*#
ML385+清解合剂高剂量组	861.39±85.15*#☆	55.91±1.18*#☆	79.37±0.94*#☆	91.29±1.43*#☆	36.28±1.01*#☆	19.02±0.83*#☆

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与清解合剂高剂量组相比,☆ $P<0.05$ 。

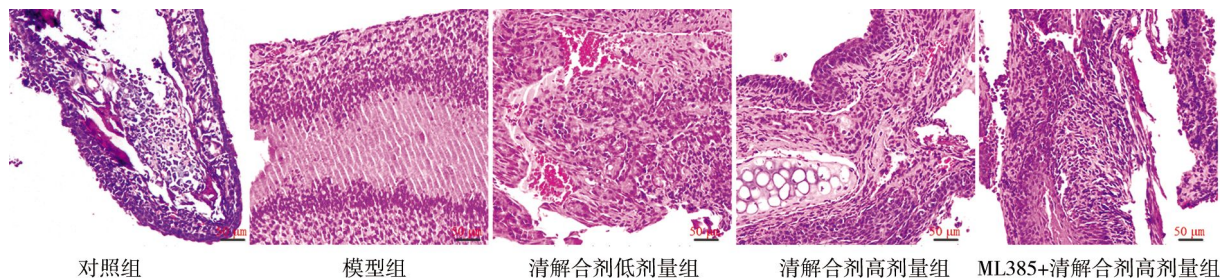


图 2 各组小鼠鼻黏膜组织病理损伤对比(HE,×400)

Fig.2 Comparison of histopathological damage in nasal mucosal tissue among different groups of mice (HE, ×400)

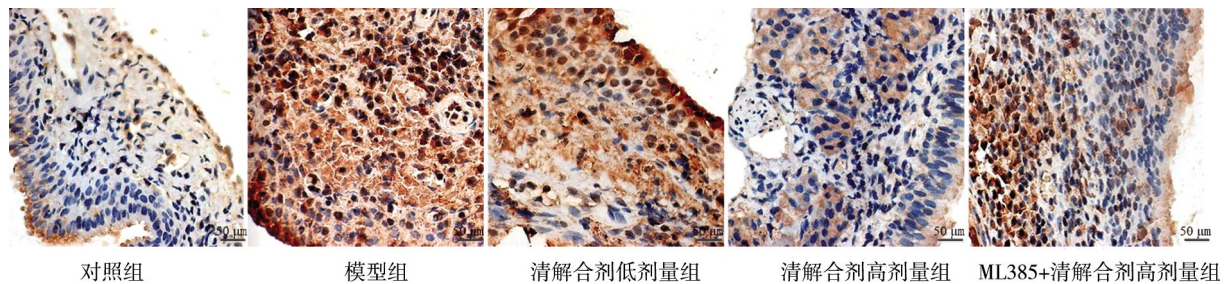


图 3 各组小鼠鼻黏膜组织中的细胞凋亡对比(TUNEL,×400)

Fig.3 Comparison of nasal mucosal apoptosis among different groups of mice (TUNEL, ×400)

相比,清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中的细胞凋亡率均下降($P<0.05$);而与清解合剂高剂量组相比,ML385+清解合剂高剂量组鼻黏膜组织中的细胞凋亡率升高($P<0.05$)。详见图 3 和表 5。

表 5 各组小鼠鼻黏膜组织中的细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)Table 5 Comparison of nasal mucosal apoptosis rates among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	细胞凋亡率/%
对照组	3.77±0.85
模型组	47.16±1.79*
清解合剂低剂量组	38.67±2.18**
清解合剂高剂量组	17.43±2.56**
ML385+清解合剂高剂量组	24.75±1.83**☆

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,** $P<0.05$;与清解合剂高剂量组相比,* $P<0.05$ 。

3.6 各组小鼠鼻黏膜组织中氧化应激水平

与对照组相比,模型组、清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中的 ROS 水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中的 ROS 水平均降低($P<0.05$);而与清解合剂高剂量组相比,ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中的 ROS 水平升高($P<0.05$)。详见图 4 和表 6。

与对照组相比,模型组、清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中 MDA 的水平均升高($P<0.05$),SOD 的水平均降低($P<0.05$);与模型组相比,清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中 MDA 的水平均降低($P<0.05$),

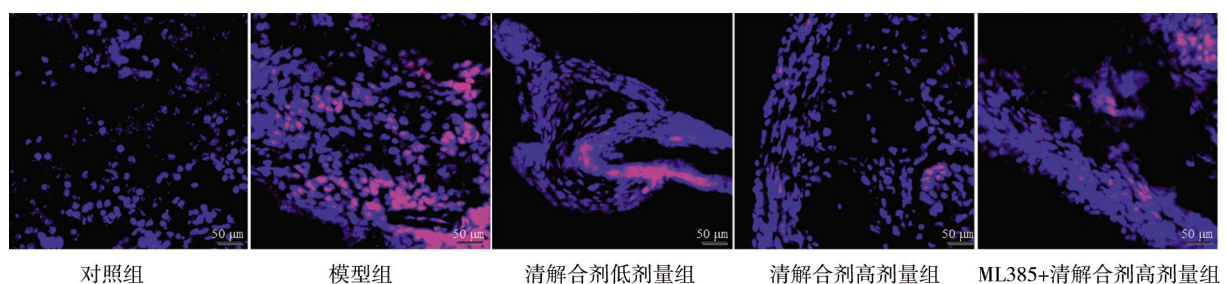


图 4 各组小鼠鼻黏膜组织中的 ROS 水平(DHE,×400)

Fig.4 ROS levels of nasal mucosal tissue in each group of mice (DHE, ×400)

表 6 各组小鼠鼻黏膜组织中氧化应激水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Comparison of oxidative stress levels in nasal mucosal tissue among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	ROS 荧光强度/相对值	SOD/(U/mg)	MDA/(nmol/mg)
对照组	1.06±0.09	133.76±8.57	18.53±1.43
模型组	2.62±0.36*	47.85±6.89*	72.15±1.37*
清解合剂低剂量组	2.16±0.16**	61.77±5.63**	57.13±1.42**
清解合剂高剂量组	1.38±0.09**	110.08±2.25**	26.91±1.47**
ML385+清解合剂高剂量组	1.81±0.17**☆	91.62±1.33**☆	38.33±1.02**☆

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,** $P<0.05$;与清解合剂高剂量组相比,☆ $P<0.05$ 。

SOD 的水平均升高($P<0.05$);而与清解合剂高剂量组相比,ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中MDA 的水平升高($P<0.05$),SOD 的水平降低($P<0.05$)。详见表 6。

3.7 各组小鼠鼻黏膜组织中 T-bet、GATA3、Foxp3、ROR γ t 的 mRNA 表达水平

与对照组相比,模型组、清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中 T-bet 和 Foxp3 的 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$),GATA3 和 ROR γ t 的 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中 T-bet 和 Foxp3 的 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$),GATA3 和 ROR γ t 的 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);而与清解合剂高剂量组相比,ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中 T-bet 和 Foxp3 的 mRNA 表达水平降低($P<0.05$),GATA3 和 ROR γ t 的 mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。详见表 7。

3.8 各组小鼠鼻黏膜组织中 Nrf2、GPX4、Bcl-2、Bax 的蛋白表达水平

与对照组相比,模型组、清解合剂低剂量组、清

解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中 Nrf2、GPX4、Bcl-2 的蛋白表达水平均降低($P<0.05$),Bax 的蛋白表达水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,清解合剂低剂量组、清解合剂高剂量组、ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中 Nrf2、GPX4、Bcl-2 的蛋白表达水平均升高($P<0.05$),Bax 的蛋白表达水平均降低($P<0.05$);而与清解合剂高剂量组相比,ML385+清解合剂高剂量组小鼠鼻黏膜组织中 Nrf2、GPX4、Bcl-2 的蛋白表达水平降低($P<0.05$),Bax 的蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。详见图 5 和表 8。

4 讨论

AR 迁延难愈,极易反复发作,严重影响患者的日常生活质量。因此,深入揭示 AR 发生、发展的分子机制,并在此基础上寻找可靠的治疗位点,具有重大临床意义。

AR 归属于中医学“鼻鼽”“鼽嚏”范畴,在漫长的历史发展中,中医药积累了一系列的方剂、针灸理疗等干预措施,显示了较为稳定的疗效^[1]。清解合剂是首都国医名师庄曾渊研究员总结的经验方,已在

表 7 各组小鼠鼻黏膜组织中 T-bet、GATA3、Foxp3、ROR γ t 的 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 7 Comparison of mRNA expression of T-bet, GATA3, Foxp3, and ROR γ t in nasal mucosal tissue among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	T-bet	GATA3	Foxp3	ROR γ t
对照组	1.01±0.05	0.98±0.08	0.95±0.08	1.02±0.06
模型组	0.11±0.07*	2.73±0.25*	0.12±0.08*	2.67±0.33*
清解合剂低剂量组	0.33±0.08**	2.43±0.11**	0.28±0.07**	2.31±0.15**
清解合剂高剂量组	0.78±0.06**	1.45±0.11**	0.76±0.09**	1.42±0.08**
ML385+清解合剂高剂量组	0.58±0.07**☆	1.76±0.15**☆	0.59±0.07**☆	1.85±0.12**☆

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,** $P<0.05$;与清解合剂高剂量组相比,☆ $P<0.05$ 。

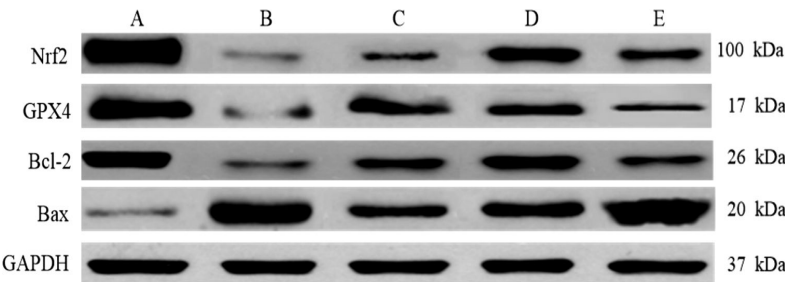


图 5 各组小鼠鼻黏膜组织中 Nrf2、GPX4、Bcl-2、Bax 蛋白条带图

Fig.5 Protein bands for Nrf2, GPX4, Bcl-2, and Bax in nasal mucosal tissue in each group of mice

表 8 各组小鼠鼻黏膜组织中 Nrf2、GPX4、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 8 Comparison of protein expression levels of Nrf2, GPX4, Bcl-2, and Bax in nasal mucosal tissue among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	Nrf2	GPX4	Bcl-2	Bax
对照组	1.03±0.06	0.97±0.07	0.94±0.09	1.01±0.08
模型组	0.12±0.07*	0.13±0.05*	0.16±0.07*	2.71±0.22*
清解合剂低剂量组	0.34±0.05*#	0.35±0.06*#	0.37±0.08*#	2.33±0.11*#
清解合剂高剂量组	0.72±0.07*#	0.71±0.06*#	0.73±0.07*#	1.51±0.09*#
ML385+清解合剂高剂量组	0.55±0.08*#☆	0.56±0.09*#☆	0.54±0.09*#☆	1.92±0.08*#☆

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与清解合剂高剂量组相比,☆ $P<0.05$ 。

临床使用多年并取得了较好的疗效^[12]。此方能明显增强机体的抗氧化能力、抗炎作用及免疫功能^[13]。本研究通过 OVA 诱导成功构建 AR 小鼠模型,结果显示,AR 组小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 和组胺的水平、鼻腔灌洗液中嗜酸性粒细胞的数量均高于对照组,组织病理检测进一步显示 AR 组小鼠鼻黏膜组织存在明显损伤;当以清解合剂低、高剂量进行干预后,上述指标明显改善,证实该药物对疾病具有确切的干预效果。

AR 的病理机制十分复杂,Th1/Th2 细胞、Treg/Th17 细胞及嗜酸性粒细胞等多种免疫细胞共同参与其免疫应答过程^[14]。其中 Th1/Th2 细胞失衡和Treg/Th17 细胞失衡直接推动 AR 的进展^[15]。Th2 细胞、Th17 细胞主要分泌 IL-4、IL-17 等炎症因子,诱导炎症因子募集嗜酸性粒细胞的活化以及浸润;而 Th1 细胞、Treg 细胞主要分泌 IFN- γ 、TGF- β 1 等拮抗炎症的介质,阻断炎症性应激进展^[16]。在 AR 中,Th2 细胞、Th17 细胞处在过度活化状态,鼻黏膜组织中的炎症应激持续性发展,从而推动 AR 的进展^[17]。本研究中以 Th1/Th2 细胞与 Treg/Th17 细胞各自的特异性转录因子以及分泌的细胞免疫因子来考察两类细胞亚群的失衡状态。结果显示,以清解合剂

干预 AR 小鼠后,鼻黏膜组织中 T-bet 和Foxp3 的 mRNA 表达升高,GATA3 和 ROR γ t 的 mRNA 表达降低;血清中 IL-4 和 IL-17 的含量降低,IFN- γ 和 TGF- β 1 的含量升高。这表明 AR 小鼠的免疫功能明显好转,同时证实清解合剂具有调控 AR 小鼠免疫功能的作用。

Nrf2/GPX4 信号是细胞中重要的通路之一,该信号的传导与细胞的氧化应激、免疫调节、物质代谢等生物过程关系密切^[18]。WANG 等^[19]研究显示,在溃疡性结肠炎大鼠模型中,激活 Nrf2/GPX4 信号可上调 Nrf2/GPX4 的表达,降低 IL-17 的含量,升高 TGF- β 1 的含量,并明显改善结肠组织中 Treg/Th17 的失衡状态。作为细胞中维系氧化/抗氧化平衡的重要因子,Nrf2 表达的异常会直接导致 GPX4 表达水平变化及胞内 ROS 稳态失衡^[20]。李江涛等^[21]研究显示,在急性肺损伤大鼠模型中,激活 Nrf2/GPX4 信号通路可明显降低 ROS 水平并改善动物的肺功能。本研究发现,清解合剂干预 AR 小鼠后,鼻黏膜组织中MDA 的水平降低,SOD 的水平升高,ROS 的水平下降,这表明氧化应激明显缓解,免疫功能明显改善。而功能挽救实验显示,ML385 处理部分逆转了清解合

剂对鼻黏膜的保护作用。据此推测,清解合剂可能通过调控 Nrf2/GPX4 信号通路发挥鼻黏膜保护作用。

综上所述,清解合剂能明显抑制 AR 小鼠中嗜酸性粒细胞的活性,抑制氧化应激的进展,改善动物的免疫功能,其作用机制可能与调控 Nrf2/GPX4 信号通路有关。但在实际应用中,还需要根据患者的证候以及个人体质差异对方剂进行加减化裁,以实现最佳疗效。

参考文献

- [1] 苟春铮,朱镇华.朱镇华教授防治儿童过敏性鼻炎-哮喘综合征的经验[J].湖南中医药大学学报,2025,45(6):1105-1110.
- [2] 王姝玥,孟瑜,汪咏春,等.小青龙汤配方颗粒剂及汤剂治疗变应性鼻炎小鼠的有效性与安全性比较[J].中药新药与临床药理,2025,36(6):899-906.
- [3] 王媛媛,徐莉,徐雯.清解合剂加减辅助治疗小儿风热乳蛾43例临床观察[J].中医儿科杂志,2017,13(4):47-49.
- [4] XU Y, XU L L, JIAN X L, et al. Baicalein attenuates ovalbumin-induced allergic rhinitis through the activation of nuclear receptor subfamily 4 group a member 1[J]. Immunologic Research, 2025, 73(1): 32.
- [5] QIU X Q, LI J Y, ZENG Y H, et al. IL-35 modulates Th2 and Tfr cell balance to alleviate allergic rhinitis[J]. Inflammation Research, 2025, 74(1): 21.
- [6] 吴勇,徐小鸿,曾丽霞.紫草素对慢性鼻窦炎小鼠鼻黏膜组织炎症反应及 SIRT1/Nrf2 信号通路的影响[J].现代药物与临床,2023,38(2):263-269.
- [7] 顾宸晟,赵水旺,王军艳,等.麻芥六君子联合方组对变应性鼻炎模型大鼠治疗与鼻黏膜菌群的影响[J].辽宁中医杂志,2024,51(6):200-205.
- [8] XIONG J R, WU Y, LUO L L, et al. Network pharmacology integrated with experimental validation reveals the mechanism of Xanthii Fructus against allergic rhinitis via JAK2/STAT3/HIF-1 α signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2025, 343(3): 119461.
- [9] 金建波,吕建森,顾兵,等.儿茶素对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜组胺受体表达和血清 IL-4、IL-33、组胺水平的影响[J].中国中医药科技,2025,32(2):231-235.
- [10] 张懿鹏,田升,陈祥静,等.鼻敏康合剂对变应性鼻炎最轻持续性炎症小鼠鼻黏膜 AQP1、AQP5、MUC5AC、MUC5B 的影响[J].中华中医药杂志,2025,40(1):402-407.
- [11] 田美慧,张亚男,孙维芳,等.基于 Toll 样受体 4/髓样分化因子 88/核转录因子 κ B 信号通路探讨针刺“蝶腭穴”改善变应性鼻炎大鼠免疫炎症反应的机制[J].针刺研究,2024,49(5):456-462.
- [12] 王媛媛,徐莉,徐雯.清解合剂加减辅助治疗小儿风热乳蛾43例临床观察[J].中医儿科杂志,2017,13(4):47-49.
- [13] 吉慧,史艳平,李霞,等.清解合剂联合更昔洛韦治疗儿童 EBV 感染传染性单核细胞增多症(热毒炽盛型)临床疗效及对免疫功能的影响[J].湖北中医药大学学报,2024,26(1):25-28.
- [14] 文艺群,宣伟军,陆灵娟.基于网络药理学和动物实验探究宣通鼻敏汤调控 Th2 细胞因子治疗变应性鼻炎大鼠的作用机制[J].中国医药导报,2025,22(11):16-23.
- [15] 马凤梅,荣婷,马蕴蕾.通窍脱敏方介导 Notch 信号通路调控变应性鼻炎大鼠 Th1/Th2 免疫失衡的作用机制[J].山东大学学报(医学版),2025,63(3):55-62,70.
- [16] 杪香,王铁山,秦瑜,等.脾氨肽口服溶液对大鼠变应性鼻炎复发的疗效及作用机制研究[J].环球中医药,2023,16(11):2161-2170.
- [17] 王润生,林庚,陶梦雨,等.过表达肝细胞生长因子的人牙髓来源间充质干细胞通过调节 Th2/Th1、Th17/Treg 平衡改善变应性鼻炎的研究[J].解放军医学院学报,2024,45(9):946-953,959.
- [18] 黎庆辉,曾永亮,陈雪梅,等. FoxO3a 影响过敏性鼻炎中巨噬细胞 M2 型极化及铁死亡水平[J].免疫学杂志,2024,40(11):831-838.
- [19] WANG C X, LI Z Q, LIU L X, et al. Oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranoside alleviates TNBS-induced ulcerative colitis in rat by regulating Nrf2/x-CIT/GPX4-mediated ferroptosis[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2025, 353: 120369.
- [20] 岳欣欣,付洋,金海哲,等.基于 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路探讨葫芦巴碱对 ARPE-19 铁死亡的干预研究[J].国际眼科杂志,2025,25(2):191-197.
- [21] 李江涛,李争,李翔鹏,等.基于 Nrf2/GPX4 铁死亡途径探讨甘露清瘟方对急性肺损伤大鼠的保护作用[J].中成药,2025,47(2):596-600.

(本文编辑 陈晨)