玉屏风加味鼻喷剂对AR模型大鼠鼻黏膜损伤的保护作用及机制研究Δ

习　媛*，贺心宁，刘玉鉴，张　娜，刘　婷，梁方琪，田　理#（成都中医药大学附属医院耳鼻喉科，成都 610032）

中图分类号　R965；R276.1　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）10-1204-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.10.10

摘　要　目的　研究玉屏风加味鼻喷剂（YPF+）对变应性鼻炎（AR）模型大鼠鼻黏膜损伤的保护作用及潜在机制。**方法**　以卵清蛋白（OVA）诱导建立大鼠AR模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、YPF+组（每侧50 μg，每天2次）和阳性对照组（糠酸莫米松鼻喷雾剂，每侧50 μg，每天1次），并设空白组，每组10只。各药物组大鼠给予相应药物，空白组和模型组大鼠给予等量生理盐水，连续4周。末次给药结束30 min后，记录各组大鼠的行为评分，观察其鼻黏膜组织的病理改变；检测其鼻黏膜组织中活性氧（ROS）水平，核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3（NLRP3）、胱天蛋白酶1（caspase-1）、gasdermin D（GSDMD）蛋白及mRNA的表达水平，以及血清中白细胞介素1β（IL-1β）、IL-18含量。**结果**　与空白组比较，模型组大鼠鼻黏膜组织结构紊乱，炎症细胞浸润严重，并可见固有层血管扩张；其行为学评分和病理评分，鼻黏膜组织中ROS水平，NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白及其mRNA的表达水平，以及血清IL-1β、IL-18含量均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，各药物组大鼠鼻黏膜损伤症状均有不同程度改善，上述指标均显著降低（$P<0.05$）。**结论**　YPF+可改善大鼠鼻黏膜损伤，减轻其喷嚏、鼻痒、鼻涕等AR症状，这种作用可能与其减少鼻黏膜ROS产生、下调NLRP3/caspase-1/GSDMD通路有关。

关键词　玉屏风加味鼻喷剂；变应性鼻炎；NLRP3/caspase-1/GSDMD通路；活性氧

Study on protective effect and mechanism of Modified Yupingfeng nasal spray on nasal mucosal injury in AR model rats

XI Yuan, HE Xinning, LIU Yuyin, ZHANG Na, LIU Ting, LIANG Fangqi, TIAN Li (Dept. of Otorhinolaryngology, the Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610032, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study protective effect and potential mechanism of Modified yupingfeng nasal spray (YPF+) on nasal mucosal injury in allergic rhinitis (AR) model rats. **METHODS** AR model was induced by ovalbumin (OVA) and randomly divided into model group, YPF+group (50 μg/side, twice a day), positive control group (Mometasone furoate aqueous nasal spray, 50 μg/side, once a day); the blank group was set up, with 10 rats in each group. Administration groups were given relevant medicine, and blank group and model group were given equivalent normal saline for consecutive 4 weeks. Thirty minutes after last medication, the behavioral scores of rats were recorded, and the pathological changes of their nasal mucosa tissue were observed. The level of reactive oxygen species (ROS) in nasal mucosa tissue was detected. The protein and mRNA expressions of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), caspase-1, gasdermin D (GSDMD) were detected; the contents of interleukin-1β (IL-1β) and IL-18 in serum were also determined. **RESULTS** Compared with blank group, in model group, the nasal mucosa tissue structure was disordered, inflammatory cells infiltrated seriously, and lamina propria vascular dilation was visible; its behavioral score and pathological score, the level of ROS, protein and mRNA expressions of NLRP3, caspase-1 and GSDMD, serum contents of IL-1β and IL-18 in nasal mucosa tissue were increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, the symptoms of nasal mucosal injury in rats of each drug group were improved to varying degrees, and the above indicators were significantly reduced ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** YPF+ may improve nasal mucosal injury of rats, relieve AR symptoms such as sneezing, itchy nose, runny nose, the mechanism of which may be associated with reducing the production of ROS in nasal mucosa and downregulating NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway.

KEYWORDS　Modified yupingfeng nasal spray; allergic rhinitis; NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway; reactive oxygen species

Δ **基金项目**　四川省科技计划项目（No.2021YFS0036）；四川省中医药院士后备人才培养项目（No.2100601）

＊ **第一作者**　医师，硕士研究生。研究方向：中医药防治变态反应性耳鼻咽喉疾病的基础。E-mail：2418079767@qq.com

通信作者　主任医师，教授，博士生导师。研究方向：中医药防治变态反应性耳鼻咽喉疾病。E-mail：ctcmdan@stu.cdutcm.edu.cn

变应性鼻炎（allergic rhinitis，AR）是一种以鼻塞、流涕、打喷嚏、鼻痒为特征且病因复杂的鼻黏膜变应性炎症性疾病。近年来，AR的发病率显著升高，使10%～40%的全球人口深受困扰，已成为耳鼻喉科医师和患者共同关注的重要医疗问题[1-2]。

细胞焦亡是近年来新发现的一种与炎症相关的细胞程序性死亡形式。有研究指出，活性氧（reactive oxygen species，ROS）/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3，NLRP3）/胱天蛋白酶1（caspase-1）/gasdermin D（GSDMD）作为经典的细胞焦亡通路，参与了AR的发生与发展[3-4]。当暴露于过敏原时，鼻黏膜会产生ROS，从而激活NLRP3炎症小体，使caspase-1活化，活化的caspase-1切割GSDMD，使鼻黏膜上皮细胞产生膜孔，同时使成熟的白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-18大量产生并分泌[5-6]，从而引发过度病理性炎症反应，导致鼻黏膜损伤；与此同时，鼻黏膜的损伤又会激活更多的复杂细胞信号转导并诱导炎症介质释放，形成“病理损伤-炎症反应-损伤加重”的恶性循环，最终加剧AR患者病情，甚至导致病情迁延不愈[7]。

玉屏风散（Yupingfeng powder，YPF）是治疗肺卫气不固证的经典名方，在调节AR患者鼻黏膜组织形态和免疫因子、炎症细胞因子分泌等方面的效果确切[8]。玉屏风加味鼻喷剂（原名克敏芪丹鼻喷剂，Modified yupingfeng nasal spray，YPF+）是成都中医药大学附属医院耳鼻喉科田理教授在YPF的基础上加入牡丹皮、川芎研制而成的纯中药鼻喷剂，较原方具有更强的活血通窍功效，临床疗效显著[9-10]。本课题组前期研究表明，YPF+可减轻AR模型大鼠鼻黏膜损伤，并筛选出了最佳药效浓度（1.05 g/mL）、最佳给药剂量（每侧50 μg）及使用频次（每天2次）[11-12]，但其作用机制尚不清楚。因此，本研究以卵清蛋白（ovalbumin，OVA）诱导的AR模型大鼠为对象，进一步观察YPF+对其鼻黏膜损伤的改善作用，以及对细胞焦亡通路ROS/NLRP3/caspase-1/GSDMD的影响，初步探究该药治疗AR的潜在机制，以期为YPF+的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括DNM-9602G型酶标仪（成都普朗医疗设备有限公司）、Q2000A型聚合酶链反应（PCR）仪（杭州朗基科学仪器有限公司）、CX31型光学显微镜（日本Olympus公司）、JY300LIE型电泳仪（北京君意东方电泳设备有限公司）、Chemiscope 6100型显影仪（上海勤翔科学仪器有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

YPF+[规格为每支装10 mL（每1 mL对应生药总量1.05 g）]由成都中医药大学附属医院药剂科根据现有工艺，以蜜炙黄芪、生白术、防风、酒川芎、牡丹皮5味中药为原料，煎煮并浓缩而得。

阳性对照糠酸莫米松鼻喷雾剂[货号U025821，规格为每瓶60揿，每揿含糠酸莫米松（mometasone furoate，MF）50 μg，药物含量0.05%（g/g）]购自斯洛文尼亚Lek Pharmaceuticals d.d.公司；OVA、氢氧化铝粉末（货号分别为M0228A、MKCM1237）均购自西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；小鼠源NLRP3抗体（货号381207）、辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔免疫球蛋白G（IgG）二抗（货号511203）、HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗（货号511103）均购自成都正能生物技术有限责任公司；兔源caspase-1抗体（货号22915-1-AP）、兔源GSDMD抗体（货号20770-1-AP）、小鼠源磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）抗体（货号60004-1-Ig）均购自武汉三鹰生物技术有限公司；大鼠IL-1β酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（货号ER008-48）购自依科赛生物科技（太仓）有限公司；大鼠IL-18 ELISA试剂盒（货号GWNVYR39MV）购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；ROS检测试剂盒（货号S0033S）购自上海碧云天生物技术有限公司；无血清RPMI-1640培养液（货号C11875500BT）购自美国Gibco公司；苏木精染液（批号201901）购自上海懿洋仪器有限公司；伊红染液（批号2021012501）购自成都科隆化学品有限公司；RNA抽提试剂盒（货号R1200）、组化DAB显色剂试剂盒（货号DA1016）均购自北京索莱宝科技有限公司；ECL化学发光试剂盒（货号MA0186）、BCA蛋白定量试剂盒（货号MA0082）均购自成都美仑生物科技公司；cDNA第一链合成试剂盒（货号FP205）购自天根生化科技（北京）有限公司；其余试剂均为实验室常用规格，水为蒸馏水。

1.3 实验动物

清洁级雄性SD大鼠40只，6～8周龄，体质量（170±10）g，由北京华阜康生物科技股份有限公司提供[动物生产许可证号SCXK（京）2019-0008]。所有实验程序和方案均经成都中医药大学附属医院实验动物伦理委员会批准（伦理审查编号2022DL-010）。所有大鼠均饲养于光线良好、温湿度适宜且通风的实验室内，自由摄食、饮水。

2 方法

2.1 造模、分组、给药与取材

所有大鼠适应性喂养3 d后，参照文献方法[13]，采用OVA 0.3 mg+氢氧化铝30 mg（以生理盐水1 mL为溶剂）

腹腔注射致敏，隔天1次，共7次。第14天，每只大鼠以2%OVA溶液（每侧50 μL）滴鼻，每天1次，共7天。在末次滴鼻结束30 min后，观察各组大鼠5 min内的行为并进行行为学评分——喷嚏：1～3个记1分，4～10个记2分，≥11个记3分；鼻痒：轻度瘙痒、抓挠1～2次记1分，剧烈瘙痒、抓挠＞2次记2分；鼻流涕：鼻涕流至鼻孔记1分，鼻涕超出鼻孔记2分，鼻涕流满面记3分；叠加各项评分得行为学评分，该评分超过5分即为造模成功[14]。

造模成功后，按照随机数字表法将大鼠分为模型组、YPF+组、MF组，另设空白组，每组10只。YPF+组大鼠给予YPF+滴鼻，每侧50 μg（剂量参考前期研究结果设置[11－12]），每天2次；MF组大鼠给予MF鼻喷雾剂滴鼻，每侧50 μg（剂量参考其药品说明书设置），每天1次；空白组和模型组大鼠给予等量生理盐水滴鼻，每天2次，连续4周。

末次给药并完成行为学评分后，采集各组大鼠腹主动脉血用于ELISA检测；取血后，处死大鼠，每组随机选取其中5只大鼠的鼻黏膜组织用于病理切片、流式细胞仪检测和免疫组化实验，剩余5只大鼠的鼻黏膜组织用于Western blot实验和反转录聚合酶链反应（reverse transcription PCR，RT-PCR）实验。

2.2 大鼠行为学评分

末次给药结束30 min后，观察各组大鼠5 min内的行为，并按“2.1”项下标准进行行为学评分[14]。

2.3 大鼠鼻黏膜病理切片观察

取“2.1”项下各组5只大鼠的鼻中隔及鼻腔外侧壁黏膜组织适量，置于4%多聚甲醛溶液中固定48 h，脱水，石蜡包埋后切片（厚度3 μm），经苏木精-伊红（HE）染色（苏木精染液按照Harris方法配制[15]；伊红染液以水为溶剂，浓度为0.25%），并使用显微镜观察其鼻黏膜组织的病理改变；同时，任选10个200倍视野，观察各组大鼠鼻黏膜上皮层、基底膜、固有层和黏膜下层的状况并进行量化评分——（1）炎症细胞浸润程度：未见炎症细胞记0分，可见少数散落炎症细胞记1分，可见较多炎症细胞记2分，炎症细胞占全部上皮面积的2/3以上记3分；（2）上皮的化生程度：未见上皮化生记0分，上皮化生占全部上皮面积的1/3以下记1分，上皮化生占全部上皮面积的1/3～2/3记2分，上皮化生占全部上皮面积的2/3以上记3分；（3）黏膜固有层腺体增生：未见腺体记0分，腺体占黏膜固有层面积的1/3以下记1分，腺体占黏膜固有层面积的1/3～2/3记2分，腺体占黏膜固有层面积的2/3以上记3分；（4）血管扩张充血：血管未见异常记0分，血管轻度扩张、充血记1分，血管明显扩张、充血记2分，血管明显扩张、充血并有增生记3分；叠加各项评分即为病理评分[16]。

2.4 大鼠鼻黏膜组织中ROS水平的检测

采用流式细胞仪进行检测。取“2.3”项下各组5只大鼠的鼻黏膜组织适量，切成面积约1 mm^2的小片，用磷酸盐缓冲液清洗后，加入胶原酶1 mL，于37 ℃下孵育10 min（每5 min振摇1次）；待组织解离完全后，用3%胎牛血清终止消化，并以70 μm滤网滤过；细胞加入磷酸盐缓冲液10 mL，离心，吸去上清液；细胞加入2′，7′-二氯荧光黄双乙酸盐（DCFH-DA）工作液（用无血清RPMI-1640培养液制备，终浓度为10 μmol/L）500 μL，于37 ℃下孵育20 min，以无血清RPMI-1640培养液清洗3次，再以磷酸盐缓冲液重悬，使用流式细胞仪检测其荧光强度，用以表示ROS水平（两者成正比）。

2.5 大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白表达的检测

2.5.1 免疫组化实验 取“2.3”项下各组大鼠的鼻黏膜组织石蜡切片，脱蜡至水，进行抗原修复以阻断内源性过氧化氢酶，滴加3%山羊血清封闭30 min，滴加NLRP3、caspase-1、GSDMD一抗（稀释比例均为1∶50），于4 ℃下孵育过夜；滴加相应二抗（稀释比例为1∶200），于37 ℃下孵育30 min；用磷酸盐缓冲液洗涤5 min×3次，加入DAB显色；用水冲洗，以苏木精染液轻度复染，脱水，以中性树胶封片，置于显微镜下观察。以棕黄色为阳性染色，采用Image-Pro Plus软件检测阳性区域的平均光密度（average optical，AO）值，用以表示NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白的表达水平（两者成正比）。

2.5.2 Western blot实验 取“2.3”项下各组剩余5只大鼠的鼻黏膜组织，提取总蛋白后使用BCA法测定蛋白浓度；蛋白变性后，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至聚偏二氟乙烯膜上，用5%脱脂奶粉封闭1 h；加入NLRP3、GSDMD、caspase-1、GAPDH一抗（稀释比例分别为1∶1 500、1∶1 000、1∶500、1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；用磷酸盐缓冲液清洗10 min×3次，加入相应二抗（稀释比例为1∶10 000），避光孵育45 min；用磷酸盐缓冲液清洗10 min×3次，以ECL发光试剂显色，于显影仪下成像并使用Image J软件分析各条带灰度值，以GAPDH作为内参，计算各目标蛋白的表达水平。

2.6 大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD mRNA表达的检测

采用RT-PCR进行检测。取“2.3”项下各组剩余5只大鼠的鼻黏膜组织100 mg，研磨匀浆，按照RNA抽提试剂盒说明书方法提取RNA，按照cDNA第一链合成试剂盒说明书方法反转录得cDNA。以上述cDNA为模板进

行PCR扩增，反应体系（共20 μL）包括cDNA模板1 μL，上、下游引物各1 μL，SYBR Green 10 μL，DEPC水7 μL。反应条件如下：95 ℃预变性5 min；94 ℃变性10 s，55 ℃退火20 s，72 ℃延伸30 s，进行40个循环。以β-actin为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目标基因mRNA的表达水平并以空白组为标准进行归一化处理。各目标基因引物由成都瑞普信生物技术有限公司设计，由赛默飞世尔科技（中国）有限公司合成，具体序列及产物长度见表1。

表1　目标基因引物序列及产物长度

目标基因	引物序列	产物长度/bp
NLRP3	上游：5′-TCTGTTCATTGGCTGCGGAT-3′	314
	下游：5′-GCCTTTTTCGAACTTGCCGT-3′	
caspase-1	上游：5′-CACGAGACCTGTGCGATCAT-3′	239
	下游：5′-CTTGAGGGAACCACTCGGTC-3′	
GSDMD	上游：5′-CAGTGGACTGCCTTCGGAAT-3′	197
	下游：5′-AGTCACACGCAGCATACACA-3′	
β-actin	上游：5′-CGTTGATATCCGTAAAGACC-3′	286
	下游：5′-TACATAACAGTCCGCCTAGAAG-3′	

2.7　大鼠血清中IL-1β、IL-18含量的检测

取“2.1”项下各组大鼠的腹主动脉血适量，于4 ℃下静置过夜，离心，取上层血清，使用ELISA法以酶标仪于450 nm波长下检测各组大鼠血清中IL-1β、IL-18含量，严格按照试剂盒说明书操作。

2.8　统计学方法

使用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

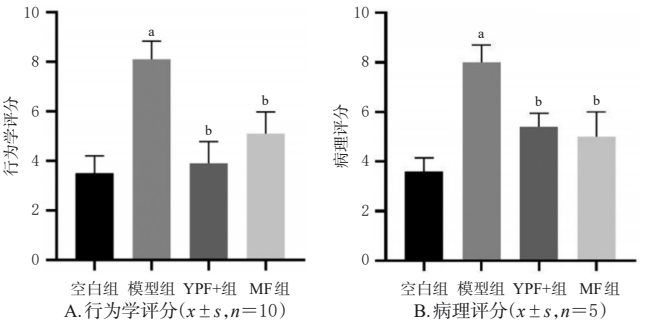
3　结果

3.1　YPF+对大鼠行为学评分的影响

与空白组比较，模型组大鼠的行为学评分显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，YPF+组和MF组大鼠的行为学评分均显著降低（$P<0.05$）。结果见图1A。

3.2　YPF+对大鼠鼻黏膜组织病理损伤的影响

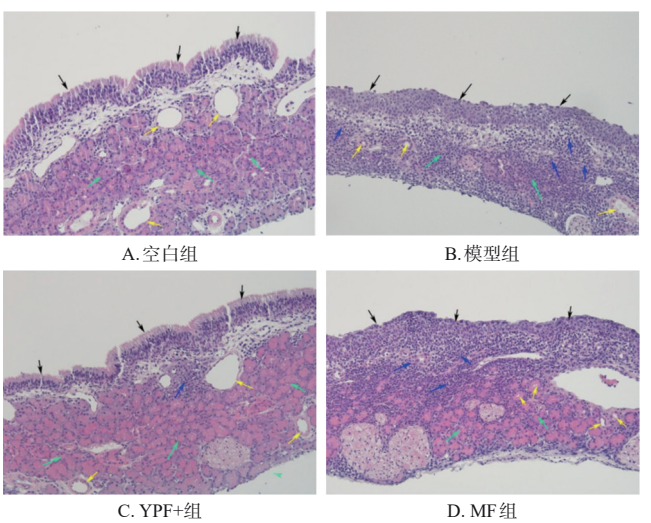
空白组大鼠鼻黏膜组织形态正常。模型组大鼠鼻黏膜组织结构紊乱，纤毛大片倒伏、脱落，炎症细胞浸润严重，固有层血管扩张，病理评分较空白组显著升高（$P<0.05$）。YPF+组大鼠鼻黏膜组织上皮排列整齐，纤毛完整、方向一致，炎症细胞浸润减轻，固有层血管无明显扩张；MF组大鼠鼻黏膜组织炎症细胞浸润改善，但上皮层恢复情况一般；两组大鼠的病理评分均较模型组显著降低（$P<0.05$）。结果见图1B、图2。



A.行为学评分（$x\pm s$，$n=10$）　B.病理评分（$x\pm s$，$n=5$）

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

图1　各组大鼠的行为学评分和病理评分



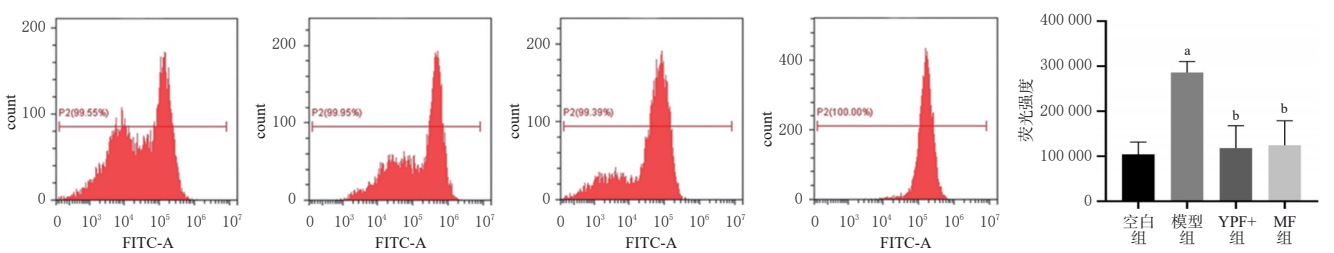
A.空白组　B.模型组　C. YPF+组　D. MF组

黑色箭头：纤毛及上皮细胞；绿色箭头：腺体；黄色箭头：血管；蓝色箭头：炎症细胞浸润

图2　各组大鼠鼻黏膜组织的病理变化（HE染色，×200）

3.3　YPF+对大鼠鼻黏膜组织中ROS水平的影响

与空白组比较，模型组大鼠鼻黏膜组织中ROS水平显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，YPF+组和MF组大鼠鼻黏膜组织中ROS水平均显著下降（$P<0.05$）。结果见图3。



A.空白组流式细胞图　B.模型组流式细胞图　C. YPF+组流式细胞图　D. MF组流式细胞图　E. ROS水平柱形图（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

图3　各组大鼠鼻黏膜组织中的ROS水平

3.4 YPF+对大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白表达的影响

3.4.1 免疫组化实验 与空白组比较，模型组大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，YPF+组和MF组大鼠鼻黏膜组织中上述蛋白的表达水平均显著下降（$P<0.05$）。结果见图4。

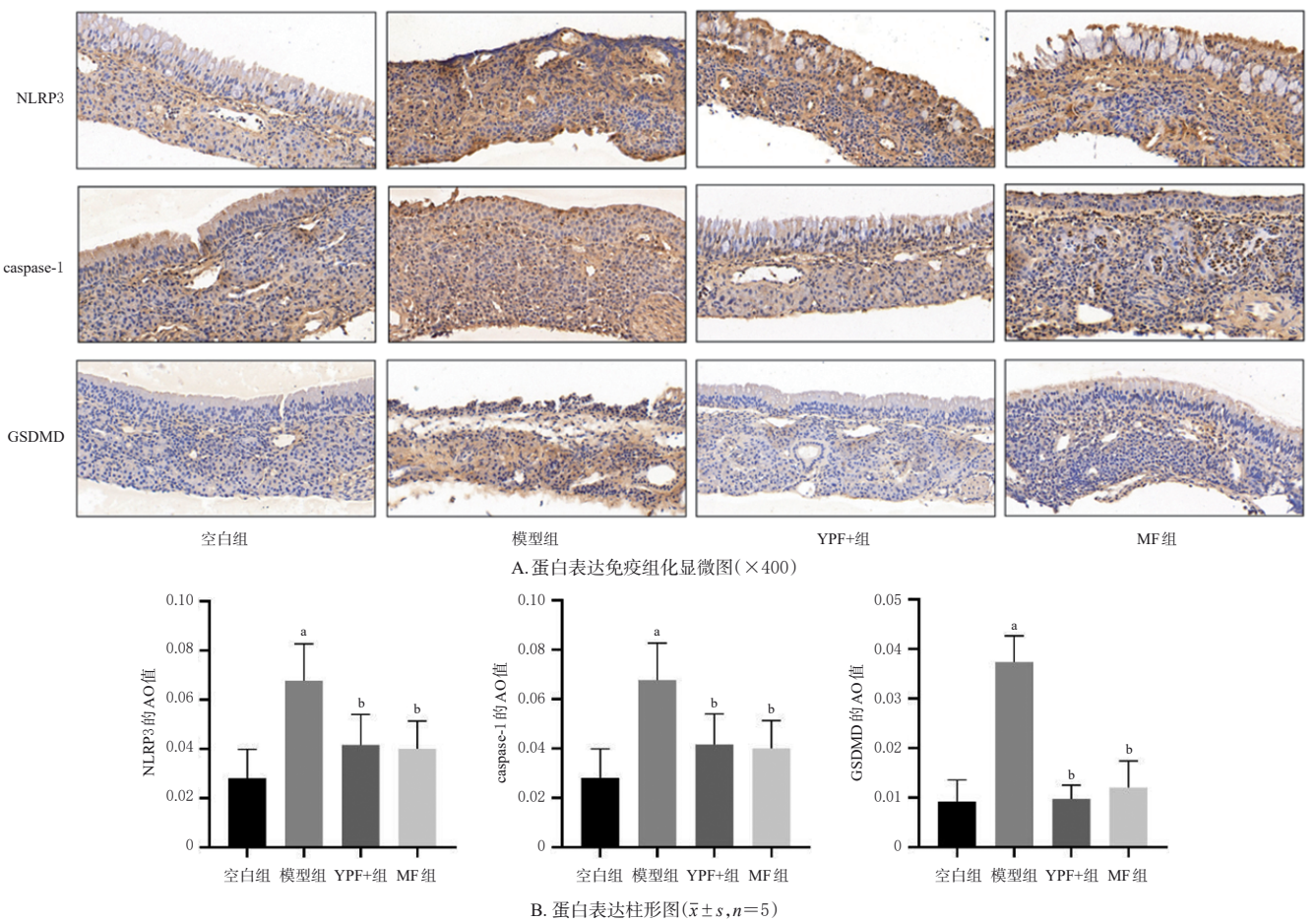
3.4.2 Western blot实验 与空白组比较，模型组大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白的表达均显著上调（$P<0.05$）。与模型组比较，YPF+组和MF组大鼠鼻黏膜组织中上述蛋白的表达均显著下调（$P<0.05$）。结果见图5。

3.5 YPF+对大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD mRNA表达的影响

与空白组比较，模型组大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD mRNA的表达均显著上调（$P<0.05$）。与模型组比较，YPF+组和MF组大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD mRNA的表达均显著下调（$P<0.05$）。结果见图6。

3.6 YPF+对大鼠血清中IL-1β、IL-18含量的影响

与空白组比较，模型组大鼠血清中IL-1β、IL-18含量均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，YPF+组和MF组大鼠血清中IL-1β、IL-18含量均显著下降（$P<0.05$）。结果见图7。

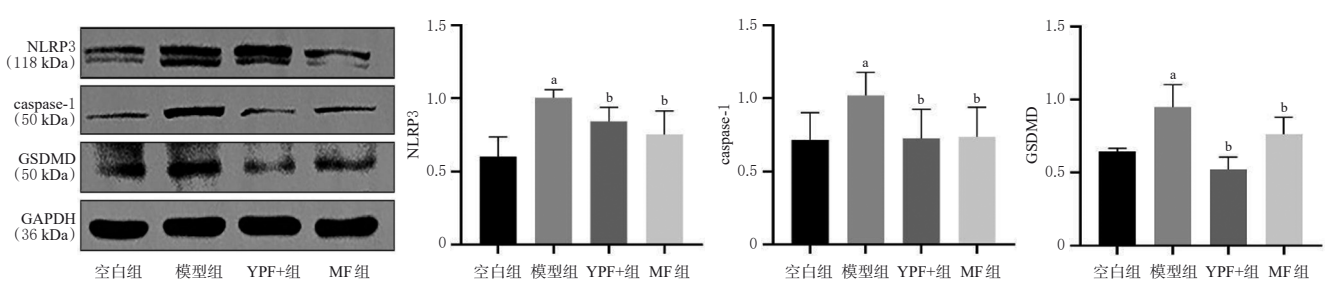


A. 蛋白表达免疫组化显微图（×400）

B. 蛋白表达柱形图（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

图4 各组大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白的表达（免疫组化法）

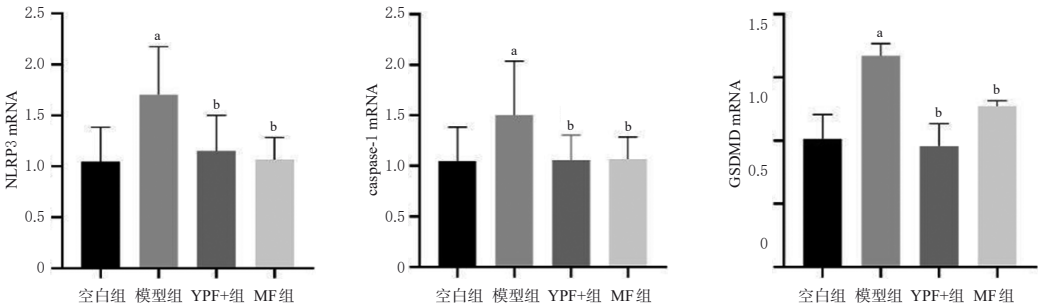


A. 蛋白表达电泳图

B. 蛋白表达柱形图（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

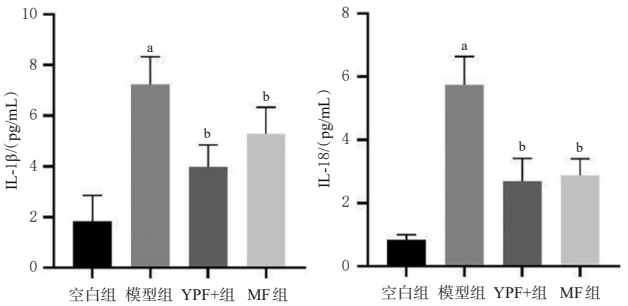
a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

图5 各组大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白的表达（Western blot法）



a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

图6　各组大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD mRNA的表达（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）



a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

图7　各组大鼠血清中IL-1β、IL-18含量（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

4　讨论

AR的发病率、复发率高，但防治手段有限，加之该症与过敏性结膜炎、分泌性中耳炎、鼻窦炎、鼻息肉、哮喘等疾病的发生密切相关，严重影响患者的生活质量，增加社会的经济负担[1]。目前，鼻用糖皮质激素和抗组胺药是AR临床治疗的常用手段，主要用于减轻患者症状，但长期使用可能会导致鼻出血、嗜睡等不良反应的发生[17－18]。随着中医药防治AR理论探索和临床研究的不断进展，中医药在AR防治中的优势逐渐显露，可弥补鼻用糖皮质激素和抗组胺药等现有药物的不足[18]。

AR属中医学“鼻鼽”范畴。中医学认为，鼻鼽主要病因病机与正气不足、脏腑虚损有关，尤以肺脏为主，因肺气虚，卫表不固，风、寒、戾气等外邪乘虚侵入而鼻窍不利。田理教授在长期临证中总结出“肺卫不固、血瘀鼻窍”的AR核心病机，并在《理瀹骈文》“外治之理，即内治之理”的启发下，提出了“益气固表、活血通窍”的中医外治法，即在YPF的基础上，加牡丹皮和川芎，制成YPF+，该制剂已在临床应用20余年，疗效确切。

AR作为发生在鼻黏膜上的慢性炎症性疾病，越来越多的证据表明由caspase-1介导的经典细胞焦亡通路NLRP3/caspase-1/GSDMD参与了AR的发生与发展[3－4,19－20]。一项关于AR的研究发现，大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD的表达，血清中IL-1β、IL-18含量与AR模型大鼠的行为学评分呈正相关，NLRP3炎症小体及其下游因子IL-1β、IL-18分泌越多，AR的炎症程度就越高，提示NLRP3炎症小体参与了AR鼻黏膜的炎症性损伤，IL-1β、IL-18是AR炎症反应不可缺少的一部分[20]。本研究结果显示，模型组大鼠鼻黏膜组织结构紊乱，固有层血管扩张，并可见明显的炎症细胞浸润，其行为学评分＞5分，AR模型复制成功；经YPF+干预后，大鼠鼻黏膜组织上皮排列整齐，固有层血管无明显扩张且炎症细胞浸润减少，行为学评分和病理评分均较模型组显著下降。本研究结果还显示，与空白组比较，模型组大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白及mRNA的表达水平，以及血清IL-1β、IL-18含量均显著升高，说明OVA诱导的AR模型大鼠的鼻黏膜组织发生了细胞焦亡和炎症反应，与Yu等[21]的研究结果基本一致。与模型组比较，YPF+组大鼠鼻黏膜组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白及mRNA的表达水平，以及血清中IL-1β、IL-18含量均显著降低，提示YPF+可下调NLRP3/caspase-1/GSDMD通路各蛋白的表达，降低血清中IL-1β、IL-18含量，从而影响细胞焦亡过程。

有研究表明，ROS是AR相关NLRP3炎症小体激活的原因[22－23]。因此，为了明确YPF+调控NLRP3炎症小体的上游机制，本研究检测了大鼠鼻黏膜组织中ROS水平。结果显示，模型组大鼠鼻黏膜组织中ROS水平显著高于空白组，提示大鼠鼻黏膜组织损伤和炎症反应的加剧可能与ROS水平的升高有关；经药物干预后，YPF+组大鼠鼻黏膜组织中ROS水平显著降低，提示YPF+对大鼠鼻黏膜组织损伤和炎症反应的改善作用可能与其降低ROS水平有关。

综上所述，YPF+可改善大鼠鼻黏膜损伤，减轻其喷嚏、鼻痒、鼻涕等AR症状，这种作用可能与其减少鼻黏膜ROS产生、下调细胞焦亡通路NLRP3/caspase-1/GSDMD有关。

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] ZHANG Y, ZHANG L. Increasing prevalence of allergic rhinitis in China[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2019, 11(2): 156-169.
[3] 魏亚宁,仇惠莺. NLRP3炎症小体活化促进上皮细胞焦亡诱导变应性鼻炎[J]. 免疫学杂志, 2021, 37(2): 140-144.
[4] ZHANG Y L, SONG Y L, WANG C Y, et al. *Panax notoginseng* saponin R_1 attenuates allergic rhinitis through AMPK/Drp1 mediated mitochondrial fission[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 202: 115106.
[5] YANG Z X, LIANG C Q, WANG T Y, et al. NLRP3 inflammasome activation promotes the development of allergic rhinitis via epithelium pyroptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 522(1): 61-67.
[6] 刘真,宋西成. 细胞焦亡在变应性鼻炎中的作用机制及研究进展[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2022, 36(3): 123-129.
[7] AKDIS C A. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions?[J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(11): 739-751.
[8] SONG J L. Effects of Yu-Ping-Feng granules combined with loratadine tablets on treatment efficacy and immune factor levels in allergic rhinitis patients[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(5): 5192-5199.
[9] LIU B, HUANG X M, XIA L N, et al. Effects of Yupingfeng nasal drops on serum cytokines, histopathology and eosinophil cationic protein in nasal mucosa of rats with allergic rhinitis[J]. Pak J Pharm Sci, 2021, 34(4): 1351-1358.
[10] 慕德宏,刘慧霞,李东棋,等. 克敏芪丹鼻喷剂对气虚血瘀证变应性鼻炎大鼠血清IL-4、PAF的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(24): 2981-2985.
[11] HUANG X, LIU B, TIAN L. Intranasal concentration gradient of Yupingfeng promotes induction of microRNA-21 by PTEN to reverse activation of OVA mimicking allergic rhinitis[J]. Revue Française d'Allergologie, 2019, 59(7): 481-486.
[12] WANG D, TIAN T, LIU B, et al. Mechanism of modified Yupingfeng naristillae in protecting the nasal mucosal epithelial barrier during allergic rhinitis[J]. Revue Française d'Allergologie, 2021, 61(3): 145-152.
[13] 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.
[14] 李佳锋,徐佳俊,高翔,等. 变应性鼻炎大鼠动物模型的建立及评价[J]. 四川解剖学杂志, 2016, 24(1): 4-6, 11.
[15] 黄柳明. 一种规范化的苏木素染色方法[J]. 中国当代医药, 2009, 16(16): 81-82.
[16] 吉晓滨,杜洪,臧林泉,等. 豚鼠变应性鼻炎模型鼻黏膜的病理改变[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2007, 21(4): 312-315.
[17] 杨钦泰,陈建军,谭国林,等. 鼻用糖皮质激素治疗变应性鼻炎专家共识:2021,上海[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2021, 27(4): 365-371.
[18] 刘莉莉,刘大新,刘锦峰,等. 中医药临床优势病种探讨:变应性鼻炎[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(2): 203-211.
[19] ZHOU H Q, ZHANG W, QIN D X, et al. Activation of NLRP3 inflammasome contributes to the inflammatory response to allergic rhinitis via macrophage pyroptosis[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 110: 109012.
[20] WAN H J, SU H X, WU Y Y, et al. Expression and significance of NLRP3 inflammasome and its downstream factors IL-1β/IL-18 in rat model of allergic rhinitis[J]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2015, 50(2): 145-150.
[21] YU X F, WANG M, ZHAO H, et al. Targeting a novel hsa_circ_0000520/miR-556-5p/NLRP3 pathway-mediated cell pyroptosis and inflammation attenuates ovalbumin (OVA)-induced allergic rhinitis (AR) in mice models[J]. Inflamm Res, 2021, 70(6): 719-729.
[22] SHI Q P, LEI Z W, CHENG G, et al. Mitochondrial ROS activate interleukin-1β expression in allergic rhinitis[J]. Oncol Lett, 2018, 16(3): 3193-3200.
[23] LI Y, OUYANG Y H, JIAO J, et al. Exposure to environmental black carbon exacerbates nasal epithelial inflammation via the reactive oxygen species (ROS)-nucleotide-binding, oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3)-caspase-1-interleukin 1β (IL-1β) pathway[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2021, 11(4): 773-783.

(收稿日期:2022-09-21 修回日期:2023-02-13)
(编辑:张元媛)