DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202625492

·论著·

通鼻消涕颗粒对慢性鼻窦炎大鼠 PACAP/巨噬细胞/ECP 的调节作用

邱博文,吴敏曼,曲比衣作,毛元尔,周颖云,刘子豪,王慧,郭兆刚

(云南中医药大学第一附属医院 耳鼻咽喉科,云南 昆明 650021)

摘 要: 目的 探讨通鼻消涕颗粒(TBXTG)对卵清蛋白诱导的慢性鼻窦炎(CRS)大鼠模型垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP)/巨噬细胞/嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)的调节作用。**方法** 采用超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS)分析 TBXTG 的化学成分,将 60 只 SPF SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、克拉霉素组和低、中、高剂量 TBXTG 组,每组各 10 只。通过卵清蛋白致敏和激发建立 CRS 大鼠模型,造模成功后,所有治疗组均予以灌胃给药治疗 2 周。通过 HE 染色评估鼻黏膜炎症;免疫荧光染色检测 M1/M2 巨噬细胞极化;免疫组织化学检测鼻黏膜中 PACAP、白细胞介素(IL)-10、转化生长因子 β(TGF-β)及 ECP 表达;ELISA 法测定血清 PACAP 和细胞因子 IL-10、TGF-β、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IL-6 水平。使用 GraphPad Prism 9.5.0 和 Image Pro Plus 6.0 软件对数据进行分析。**结果** 通过 UPLC-MS 从 TBXTG 中鉴定出 31 种化合物,主要为黄酮类、酚酸类和黄酮苷类。与正常对照组比较,模型组大鼠鼻黏膜呈现明显的慢性炎症改变,大量炎性细胞浸润,腺体增生;与模型组相比,TBXTG 各剂量组鼻黏膜炎症细胞浸润、腺体增生等病理变化显著减轻;TBXTG 能显著抑制 M1 型巨噬细胞标志物 CD86 的表达,并促进 M2 型巨噬细胞标志物 CD206 的表达;上调鼻黏膜和血清中的 PACAP 水平($P<0.05$);提高抗炎细胞因子 IL-10、TGF-β 的表达,降低促炎细胞因子 TNF-α、IL-6 以及 ECP 的表达($P<0.05$)。**结论** TBXTG 具有一定的抗炎作用,可上调 PACAP 表达,促进巨噬细胞从 M1 型向 M2 型极化,调节促炎和抗炎细胞因子平衡,从而减轻 CRS 大鼠的鼻黏膜炎症反应。

关 键 词:慢性鼻窦炎;通鼻消涕颗粒;垂体腺苷酸环化酶激活肽;巨噬细胞;细胞因子;嗜酸性粒细胞阳离子蛋白

中图分类号:R765.4^{+}1

Regulatory effect of Tongbi Xiaoti Granules on PACAP/macrophage/ECP in rats with chronic rhinosinusitis

QIU Bowen, WU Minman, QUBI Yizuo, MAO Yuaner, ZHOU Yingyun, LIU Zihao, WANG Hui, GUO Zhaogang

(*Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of Yunnan Universitiy of Traditional Chinese Medicine, Kunming* 650021, *China*)

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of Tongbi Xiaoti Granules (TBXTG) on the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/macrophage/eosinophil cationic protein (ECP) in a rat model of ovalbumin-induced chronic rhinosinusitis (CRS). **Methods** The chemical composition of TBXTG was analyzed using ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). Sixty SPF SD rats were randomly divided into six groups: normal control group, model group, clarithromycin group, and low-, medium-, and high-dose TBXTG groups, with 10 rats in each group. A CRS rat model was established by ovalbumin sensitization and challenge. After successful modeling, all treatment groups received oral gavage for two weeks. Nasal mucosal inflammation was assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining, M1/M2 macrophage polarization was detected by immunofluorescence staining, and the expressions of PACAP, interleukin (IL)-10, transforming growth factor-β (TGF-β), ECP in nasal mucosa were examined

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81960890);云南省科技厅院联合基金项目重大项目(XYLH2024004)。
第一作者简介:邱博文,男,在读硕士研究生,住院医师。
通信作者简介:吴敏曼,女,博士,副主任医师。

by immunohistochemistry. Serum levels of PACAP and cytokines [IL-10, TGF-β, tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-6] were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data were analyzed using GraphPad Prism 9.5.0 and Image-Pro Plus 6.0. **Results** A total of 31 compounds were identified from TBXTG, mainly flavonoids, phenolic acids, and flavonoid glycosides. Compared with the normal control group, rats in the model group exhibited marked chronic inflammatory changes in the nasal mucosa, characterized by substantial inflammatory cell infiltration and glandular hyperplasia. In contrast to the model group, the pathological changes such as inflammatory cell infiltration and glandular hyperplasia in the nasal mucosa of each dose group of TBXTG were significantly alleviated. TBXTG significantly inhibited the expression of the M1 macrophage marker CD86 and promoted the expression of the M2 macrophage marker CD206. Furthermore, it upregulated the levels of PACAP in mucosa and serum ($P<0.05$), increased anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF-β), and reduced pro-inflammatory cytokine TNF-α, IL-6 and ECP expression ($P<0.05$). **Conclusions** TBXTG exerts certain anti-inflammatory effects. It can upregulate the expression of PACAP, promote macrophage polarization from M1 type to M2 type, and regulate balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, thereby alleviating the nasal mucosal inflammatory responses in CRS rats.

Keywords: Chronic rhinosinusitis; Tongbi Xiaoti Granules; Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; Macrophage; Cytokines; Eosinophil cationic protein

慢性鼻窦炎(chronic rhinosinusitis,CRS)是耳鼻咽喉科常见病,发病率为 10%~12%,临床定义为鼻腔和鼻窦黏膜慢性炎症,鼻部典型症状持续 12 周以上。传统的西医治疗主要包括使用抗生素和糖皮质激素,通常辅以免疫调节剂和黏液溶解剂。然而,传统治疗疗效有限,患者仍需进行鼻内镜鼻窦手术,且长期用药可能会导致明显的不良反应。大量研究表明,多种中药具有强效的抗感染、抗炎和免疫调节特性,长期使用安全性高。因此,中药用于 CRS 治疗具有独特优势和研究价值。通鼻消涕颗粒(Tongbi Xiaoti Granules,TBXTG)是由云南省中医院名中医郭兆刚教授根据数十年 CRS 的临床治疗经验研发的医院制剂。该药经云南省食品药品监督管理局批准,在云南省中医院临床使用 30 多年(最新批准文号:ZJZ2022076)。之前的临床研究表明,TBXTG 可以显著缓解 CRS 的主观症状,减少鼻黏膜充血、肿胀及鼻腔分泌物,临床治愈率高达 85%[1-3]。动物实验进一步表明,TBXTG 可以改善免疫功能,抑制炎性细胞的浸润,降低炎性细胞因子的水平[4]。

我们之前对 CRS 和鼻息肉组织的差异蛋白质组学研究发现了一种鼻黏膜保护蛋白-垂体腺苷酸环化酶激活肽(pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide,PACAP),这是一种由淋巴细胞在抗原或炎症刺激下产生的具有强效抗炎特性的神经肽[5]。它通过与各种免疫活性细胞上的受体结合来调节免疫稳态,并通过调节促炎和抗炎细胞因子的水平来发挥抗炎作用[6-7]。PACAP 不仅可以维持免疫系统的平衡,还可以调节神经内分泌系统的平衡[8-9]。此外,PACAP 具有抗氧化活性[10],并对多种微生物具有体外抗菌作用,包括对金黄色葡萄球菌和真菌等耐药微生物的强抑制作用[11-14]。

慢性炎症常有先天性免疫和适应性免疫的参与。巨噬细胞是先天性免疫的主要参与者,通过吞噬作用杀灭病原体而启动炎症反应,释放毒性氧、氮中间体和 TNF-α,同时释放细胞因子和趋化因子,募集和激活其他免疫细胞。巨噬细胞不仅执行先天免疫的效应功能,也在适应性免疫应答的各阶段发挥作用,在免疫反应中起着关键作用。PACAP 主要与Ⅰ型血管活性肠肽受体结合,抑制活化的巨噬细胞释放炎症细胞因子肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素(interleukin, IL)-6,并促进抗炎因子 IL-10、转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)分泌,从而对活化的巨噬细胞发挥调节作用[15-20]。

PACAP 还可以抑制肺肥大细胞释放介质,并抑制嗜酸性粒细胞(eosinophils,Eos)迁移[21]。此外,它还能促进分化簇(cluster of differentiation, CD)4^+ $CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T(regulatory T cell,Treg)细胞的分化,从而诱导免疫耐受并表现出抗炎作用[22-23]。Eos 是 CRS,特别是鼻息肉的关键致病效应细胞。Eos 浸润程度越深,鼻息肉复发的可能性越高。因此,Eos 浸润程度与鼻息肉复发直接相关。Eos 通过释放各种炎症介质和细胞因子,包括白三烯、血小板活化因子(platelet-activating factor,PAF)、IL-5、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage-colony stimucating factor, GM-CSF)以及嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(eosinophil cationic protein,ECP)和主要碱性蛋白(major basic protein,

MBP),导致慢性气道炎症损伤。其中,ECP 尤为重要,因为其浓度反映 Eos 活化的程度,可作为 Eos 活化的特异性生物标志物。因此,ECP 可以作为评估疾病严重程度和监测治疗效果的重要指标[24-27]。

本研究将采用 CRS 大鼠模型,研究 TBXTG 是否可以调节 PACAP/巨噬细胞/ECP 的表达,从而控制慢性炎症反应。

1 材料和方法

1.1 TBXTG 的制备

TBXTG 由 14 种中草药组成,包括黄芪、金银花、蒲公英、败酱草、茵陈、桔梗、葛根、皂角刺、白芷、天花粉、麸炒苍术、薏苡仁、广藿香、甘草,称取上述药物并混合,加入 10 倍量的水,煎煮 30 min,过滤得到液体,然后减压浓缩得到 TBXTG 提取物干粉。低温、避光保存。

1.2 超高效液相色谱-质谱(ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry,UHPLC-MS)分析

1.2.1 样品制备 取 TBXTG 提取物干粉约 0.1 g,准确称重,移入带塞锥形瓶中。精确加入 50 mL 50%甲醇水溶液,超声处理 30 min(功率 500 W,频率 40 kHz),冷却,重新称重,用 50%甲醇补足减失的重量,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,收集滤液备用。

1.2.2 色谱条件 色谱柱采用 Waters Acquity UHPLC BEH C18 柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相体系为乙腈(A)-0.05% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱程序:0~10 min,流动相 A 体积分数由 5% 升至 13%;10~15 min,维持 13% A 恒定;15~25 min,13% A 升至 20% A;25~36 min,20% A 升至 45% A;流速 0.2 mL·min^{-1},柱温 30 ℃,进样量 2 μL。

1.2.3 质谱条件 HRESI 离子源,正负离子检测模式;喷雾电压 3 000 V;辅助气体流量 10 mL·min^{-1};离子转移管温度 350 ℃;辅助气体温度 350 ℃。扫描模式为全 Ms/dd-Ms2;完整的 Ms 分辨率为 30 000;dd-Ms2 分辨率为 17 500;离子扫描范围为 100~1 000 m/z。

1.3 动物实验

1.3.1 实验动物 将 60 只 6~8 周龄的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)Sprague-Dawley(SD)大鼠饲养在受控条件下(温度 18~24 ℃,相对湿度 50%~60%),光照/黑暗周期为 12 h。所有大鼠都被关在通风良好的笼子里,喂食标准的颗粒饲料,并可以自由饮水。本动物实验方案经云南省中医医院医学伦理委员会审核批准,伦理审批号:YL[2022]伦审字(032)-02。

1.3.2 主要试剂和设备 卵清蛋白(美国 Sigma)、氢氧化铝(美国 Sigma)、SEB(美国 Sigma)、克拉霉素片(上海雅培制药)、TBXTG(云南省中医院院内制剂)、酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(中国武汉 GeneMean)、PACAP、IL-10、TGF-β 和 ECP 多克隆抗体(美国 Abcam)。

1.3.3 CRS 大鼠模型建立

1.3.3.1 实验分组 60 只实验大鼠随机分为 6 组(每组 10 只):正常对照组,模型组,克拉霉素组,低、中、高剂量 TBXTG 组。

1.3.3.2 模型建立[28] 适应性喂养 1 周后,开始模型诱导。第一阶段(初级致敏):对来自除正常对照组外的其他 5 组的 50 只大鼠进行腹腔注射,以进行基础致敏。卵清蛋白 0.3 mg 作为敏化剂、氢氧化铝悬浮液 30 mg 作为佐剂,在生理盐水中制备(最终体积 1 mL),每隔 1 天腹腔注射 1 次,共注射 7 次。第二阶段(鼻内激发):在最后 1 次腹腔注射后 2 周(第 21 天),相同的 50 只大鼠每个鼻孔经鼻给予 50 μL 的 5%卵清蛋白悬浮液。此外,它们连续 10 d 接受 1%卵清蛋白悬浮液的超声雾化,每次吸入持续 5 min。第三阶段(慢性刺激):相同的 50 只大鼠每隔 1 天通过鼻内滴注每个鼻孔 25 μL 的 5%卵清蛋白悬浮液。同时,每只大鼠通过鼻内给药每周 1 次,持续 6 周,接受 5 ng 的葡萄球菌肠毒素 B。

1.3.3.3 灌胃给药 在完成第三阶段(第 74 天)后,除正常对照组与模型组外的其他 4 组的大鼠接受相应的药物治疗,分别经口灌胃给予克拉霉素 15 mg/kg 以及 TBXTG 3 g/kg、6 g/kg 和 12 g/kg,每天 1 次,连续 15 d。实验所用 TBXTG 予 SD 大鼠的给药剂量,依据体表面积归一化法由成人临床用量折算,人与大鼠剂量换算系数为 6.25。参照中药复方药理实验剂量设置要求,设立低、中、高剂量 TBXTG 组,剂量依次为临床等效剂量的 1、2、4 倍,灌胃给药体积统一为 10 mL/kg。正常对照组与模型组未接受治疗。

1.3.3.4 动物标本的病理学检查 在治疗完成后的第 2 天,将大鼠麻醉并处死以进行样品采集。①收集鼻黏膜组织进行 HE 染色,以评估鼻腔鼻窦黏膜炎症的程度。②通过免疫组织化学检测鼻腔鼻窦黏膜组织中 PACAP、IL-10、TGF-β 和 ECP 的表达。鼻黏膜标本进行固定、石蜡包埋和切片。石蜡

切片进行脱蜡、再水化,并用 3%过氧化氢孵育。用柠檬酸盐缓冲液(Servicebio,武汉;目录号:G1202)进行抗原修复。用 10%山羊血清封闭 30 min 后,将切片在 4 ℃下与第一抗体一起孵育过夜,然后在 37 ℃下用 HRP 偶联的第二抗体孵育 30 min。最后,使用 DAB 检测试剂盒(Servicebio,目录号:G1212)对切片进行染色,并在显微镜下采集图像。③对鼻黏膜组织进行免疫荧光染色,以检测鼻腔鼻窦黏膜组织内的 M1 和 M2 型巨噬细胞。

使用免疫荧光染色试剂盒(Servicebio,目录号:G1226)分析鼻黏膜组织中 CD86 和 CD206 的表达。简而言之,组织切片被脱蜡,进行抗原修复,并用 10%的山羊血清封闭。然后将切片与抗 CD86(1∶50)或抗 CD206(1∶100)一抗在 4 ℃下孵育,然后与 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG 在室温下孵育 1 h。用 PBS 洗涤后,将切片与 iFluor 488 或 iFluor 555 酪胺工作溶液在黑暗中孵育 10 min,分别标记 CD86 和 CD206。进一步清洗和 DAPI 核复染后,安装载玻片,并使用 SQS-20 Pro 荧光载玻片扫描系统在 400 倍放大倍数下成像。

1.3.3.5　ELISA 法测定血清 PACAP、IL-10、TGF-β、TNF-α 和 IL-6 水平　将冷冻的大鼠静脉血清样本解冻后,根据酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒的说明,测定血清中 PACAP、IL-10、TGF-β、TNF-α 和 IL-6 的水平。按照制造商的方案,使用 ELISA 试剂盒(GeneMean,武汉)测量这些指标的浓度。使用微孔板读数器在 450 nm 处测量光密度。

1.4　统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.5.0 和 Image Pro Plus 6.0 软件进行统计分析和图形绘制。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示并进行单因素方差分析(ANOVA)和半定量分析,然后再进行 Duncan's 多重比较检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　TBXTG 的 UHPLC-MS 总离子色谱图

为了进一步表征 TBXTG 的主要化学成分,我们对样品进行了 UHPLC-MS 分析。已鉴定的化合物主要分为黄酮类、酚酸类,其中黄酮类包含黄酮苷类。总离子色谱图如图 1 所示。通过整合系统分析报告和现有文献,共鉴定出 31 种化合物。图 2 显示 TBXTG 的主要化学成分比例。

2.2　各组大鼠鼻黏膜组织病理变化

如图 3 所示,与正常对照组相比,模型组鼻黏膜出现慢性炎症变化,包括淋巴细胞、浆细胞、Eos 和中性粒细胞等炎性细胞浸润,纤维增生,中度至重度腺体增生,杯状细胞增生,黏液分泌过多。克拉霉素组减轻了鼻黏膜的慢性炎症,伴有轻度浆液性腺体增生和纤毛柱状上皮细胞轻度紊乱。在低、中、高剂量 TBXTG 组中,鼻黏膜的慢性炎症在不同程度上得到了缓解。观察到中度浆液性腺体增生,鼻黏膜的纤毛柱状上皮基本恢复正常结构。

2.3　各组大鼠鼻黏膜组织 M1 和 M2 表型巨噬细胞变化

免疫荧光检测用于评估鼻黏膜组织中 CD86 和 CD206 蛋白的表达水平,并在 400 倍放大倍数下拍摄图像($n=10$)。图 4 免疫荧光染色显示,TBXTG 组可以抑制鼻黏膜组织中 M1 巨噬细胞的极化过程,同时促进 M2 巨噬细胞的极化,从而发挥抗炎作用。图中红色荧光代表 CD86(M1 型巨噬细胞标志物),绿色荧光代表CD206(M2型巨噬细胞标志

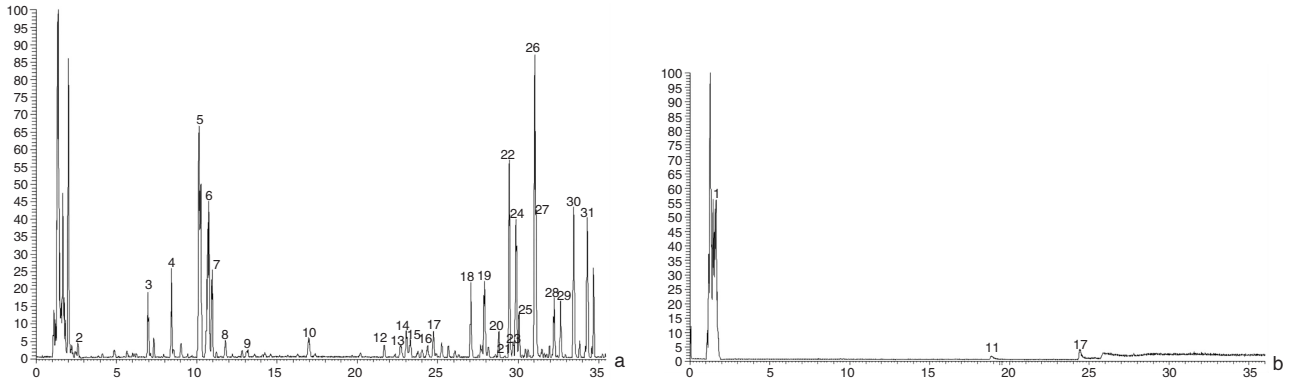


图 1　TBXTG 的 UHPLC-MS 总离子色谱图　a:正离子模式;b:负离子模式　注:TBXTG(通鼻消涕颗粒);UHPLC-MS(超高效液相色谱-质谱)。下同。

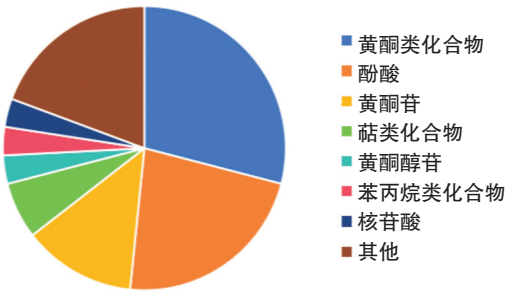


图 2　TBXTG 中主要化学成分的比例

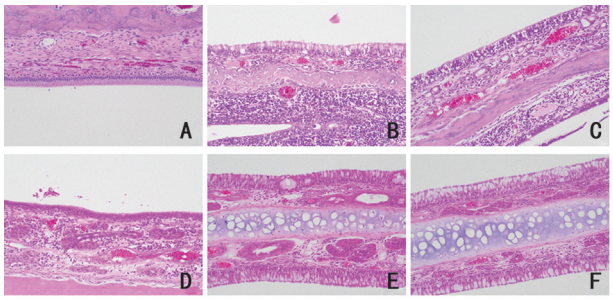


图 3　各组大鼠鼻黏膜炎症情况　（HE ×400）　A：正常对照组；B：模型组；C：克拉霉素组；D：低剂量 TBXTG 组；E：中剂量 TBXTG 组；F：高剂量 TBXTG 组

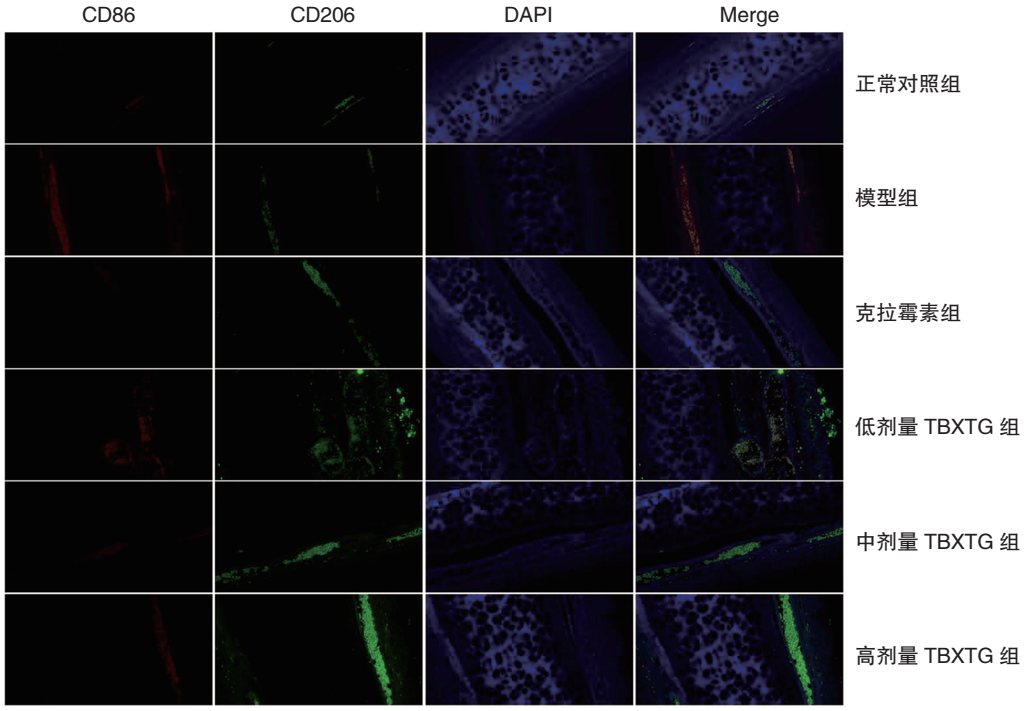


图 4　各组大鼠鼻黏膜 M1/M2 型巨噬细胞标志物表达情况　（免疫荧光 ×400）

物），蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核。与正常对照组相比，模型组 CD86 表达增强（红色荧光增多）。与模型组相比，中、高剂量 TBXTG 组 CD86 表达减弱，而 CD206 表达增强（绿色荧光增多），表明 TBXTG 能抑制 M1 型巨噬细胞极化，并促进其向 M2 型转化。克拉霉素组亦有类似趋势，但效果较弱。

2.4　各组大鼠鼻黏膜 PACAP、IL-10、TGF-β 和 ECP 的表达

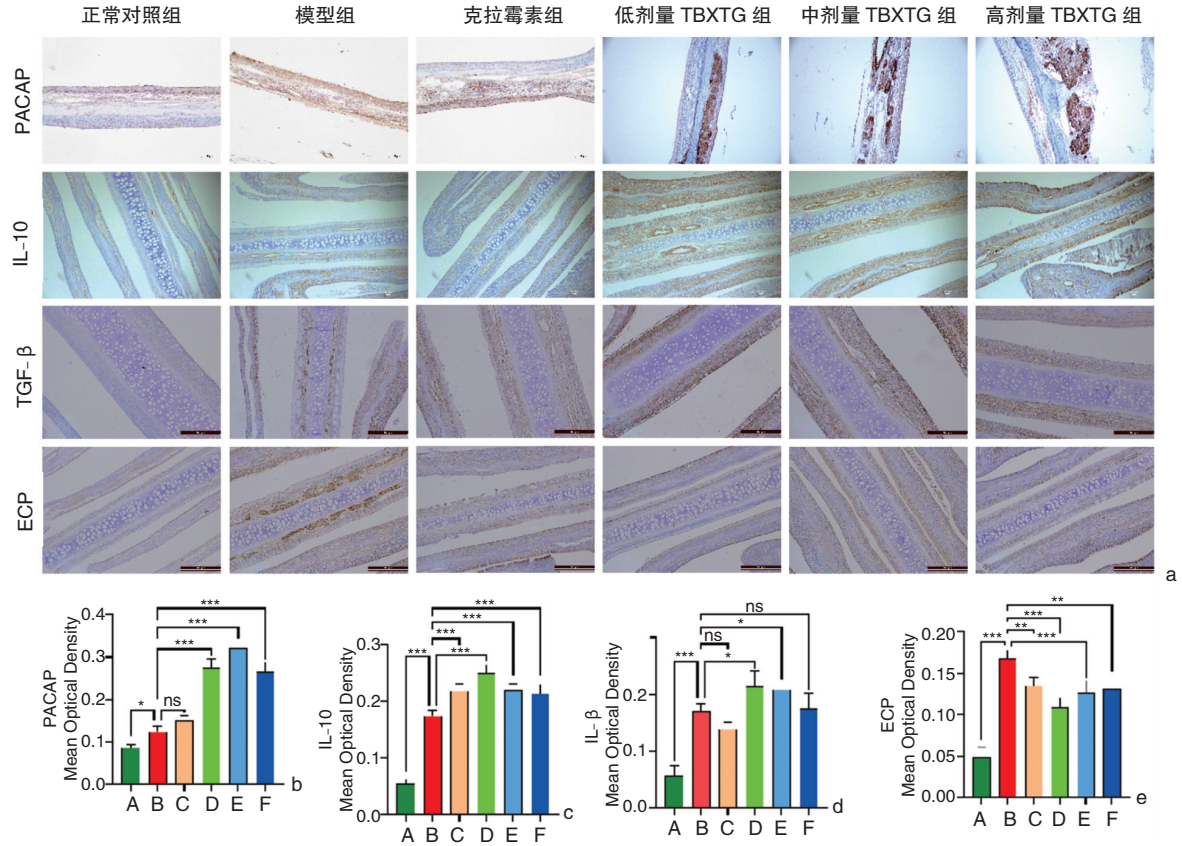
通过半定量分析测量 PACAP、IL-10、TGF-β 和 ECP 的平均光密度，数据见表 1。图 5 免疫组织化学染色显示，TBXTG 组在鼻黏膜组织中 PACAP 表达增加。TBXTG 治疗还提高了抗炎细胞因子 IL-10 和 TGF-β 的水平，同时降低了促炎介质 ECP 的表达，从而发挥了抗炎作用。

2.5　ELISA 法测定血清 PACAP、IL-10、TGF-β、TNF-α 和 IL-6 水平

ELISA 检测血清中 PACAP、IL-10、TGF-β、TNF-α 和 IL-6 浓度。表 2、图 6 ELISA 结果显示，TBXTG 组显著增加了血清 PACAP 浓度以及抗炎细胞因子 IL-10、TGF-β 的浓度，同时降低了促炎细胞因子 TNF-α 和 IL-6 的浓度，表明其具有较强的抗炎作用。

表 1　各组大鼠鼻黏膜组织中 PACAP、IL-10、TGF-β 及 ECP 的表达　($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	正常对照组	模型组	克拉霉素组	低剂量 TBXTG 组	中剂量 TBXTG 组	高剂量 TBXTG 组
PACAP	0.087±0.008	0.125±0.013	0.150±0.013	0.274±0.022	0.321±0.013	0.266±0.022
IL-10	0.054±0.008	0.175±0.009	0.218±0.012	0.250±0.014	0.219±0.011	0.214±0.015
TGF-β	0.057±0.017	0.171±0.013	0.139±0.012	0.215±0.026	0.209±0.011	0.175±0.027
ECP	0.049±0.012	0.168±0.010	0.135±0.009	0.109±0.012	0.126±0.015	0.131±0.023

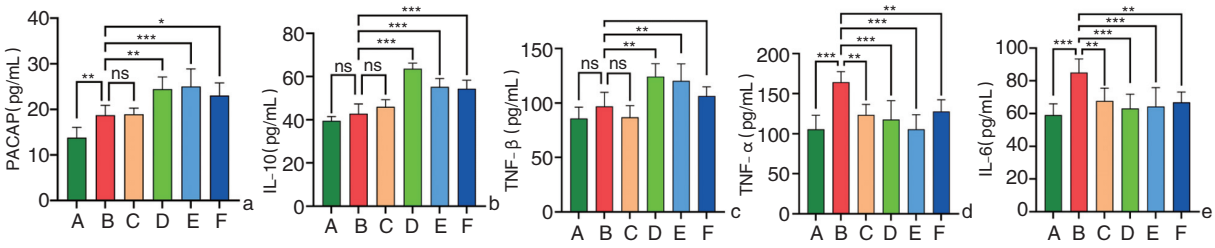


注:A(正常对照组);B(模型组);C(克拉霉素组);D(低剂量 TBXTG 组);E(中剂量 TBXTG 组);F(高剂量 TBXTG 组);$^{*}P<0.05$;$^{**}P<0.01$;$^{***}P<0.001$;PACAP(垂体腺苷酸环化酶激活多肽);IL(白细胞介素);TGF-β(转化生长因子-β);ECP(嗜酸性粒细胞阳离子蛋白)。下同。

图 5　PACAP、IL-10、TGF-β 及各组大鼠 ECP 在鼻黏膜组织中的表达　a:免疫组化图,棕色为阳性染色(免疫组化 ×100);b~e:平均光密度半定量分析柱状图

表 2　各组大鼠血清中 PACAP、IL-10、TNF-α、TGF-β 及 IL-6 的含量　(pg/mL, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	正常对照组	模型组	克拉霉素组	低剂量 TBXTG 组	中剂量 TBXTG 组	高剂量 TBXTG 组
PACAP	13.81±2.28	18.76±2.11	18.94±1.36	24.46±2.66	25.02±3.87	23.05±2.77
IL-10	39.55±1.96	42.81±4.58	46.05±3.26	63.61±2.61	55.21±3.89	54.37±3.92
TGF-β	85.80±10.36	96.99±12.76	86.88±10.73	124.23±11.80	120.32±15.65	106.46±8.39
TNF-α	105.54±17.48	164.18±13.31	123.65±12.88	117.69±23.64	105.61±18.09	127.81±14.47
IL-6	59.08±6.87	85.07±8.30	67.74±7.72	63.14±8.61	64.32±11.44	66.87±6.22



注:TNF-α(肿瘤坏死因子-α)。下同。

图 6　ELISA 检测细胞因子含量柱状图　a:PACAP;b:IL-10;c:TGF-β;d:TNF-α;e:IL-6

3 讨论

TBXTG 化合物的 UHPLC-MS 指纹图谱显示出广泛的药理活性,其核心活性集中在抗炎和抗氧化特性上,如迷迭香酸、灯盏花素和木犀草素等[29-31],这些特性与涉及鼻黏膜炎症和氧化应激的 CRS 病理生理机制高度相关。此外,多种化合物也表现出抗菌活性,如獐牙菜苦碱、芦丁和金丝桃苷[32-34],这些化合物与 CRS 中微生物诱导的鼻黏膜上皮损伤和异常修复有关。CRS 的发病并非由单一因素介导,而是炎症级联反应、氧化应激损伤与微生物菌群紊乱共同驱动的慢性病理过程,单一靶点药物往往难以全面阻断其进展[23]。大多数已鉴定的化合物表现出多种药理活性,表明 TBXTG 对 CRS 的治疗作用可能是由于这些不同化合物的协同作用。

从病理表型来看,模型组大鼠鼻黏膜呈现典型的慢性炎症特征,包括淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等多型炎性细胞弥漫浸润、黏膜下腺体增生及纤毛柱状上皮结构紊乱,与临床 CRS 患者的黏膜病理改变高度吻合,提示本研究造模方式稳定可靠。用 TBXTG 治疗 2 周后,HE 染色的鼻黏膜组织病理学检查显示鼻黏膜炎症有显著改善(图 3)。已有研究证实,慢性气道炎症状态下巨噬细胞向 M1 型偏移,M1/M2 极化失衡是驱动黏膜慢性炎症持续进展的重要机制,纠正这一失衡也成为抗炎治疗的潜在方向[6,15]。本研究中的免疫荧光染色显示,TBXTG 抑制 M1 巨噬细胞的极化,同时促进 M2 巨噬细胞的极化,从而发挥抗炎作用(图 4)。免疫组织化学染色显示,PACAP 表达定位于鼻黏膜的纤毛柱状上皮和黏膜下腺体。这些发现表明,在 TBXTG 治疗后,鼻黏膜的上皮和黏膜下腺细胞表现出反应性增生,PACAP 的产生增加,这有助于抵抗慢性炎症和促进炎症消退[35](图 5)。相比之下,克拉霉素主要促进炎症消退,但没有显著增强鼻黏膜中 PACAP 等保护性蛋白的产生,导致局部黏膜防御能力没有显著改善。

免疫组织化学分析还显示,在 TBXTG 治疗组中,抗炎细胞因子 IL-10 和 TGF-β 显著升高,而促炎介质 ECP 降低(图 5)。ELISA 结果表明,TBXTG 增加了血清 PACAP 浓度,提高了抗炎细胞因子 IL-10 和 TGF-β 的水平,降低了促炎细胞因子 IL-6 和 TNF-α,表明其具有全身抗炎作用(图 6)。这一结果与本团队前期临床研究中 TBXTG 可调节 CRS 患者全身及局部免疫功能、减轻炎症反应的结论相互印证[2-3],为该制剂的临床推广应用提供了更扎实的实验依据。

本研究动物实验表明,TBXTG 可以增强 PACAP 的表达,调节巨噬细胞从 M1 表型到 M2 表型的极化,减少促炎细胞因子 TNF-α、IL-6 和促炎介质 ECP 的释放,促进抗炎细胞因子 IL-10 和 TGF-β 的分泌,从而有效控制鼻黏膜组织的慢性炎症反应。

作者贡献声明:邱博文负责研究方案构思、论文初稿撰写、数据统计分析;吴敏曼和曲比衣作负责课题整体指导、稿件修改、学术内容审核;周颖云负责图表绘制;刘子豪负责文献检索;毛元尔负责实验操作、数据整理;王慧负责全文专业校对。

利益冲突声明:所有作者均声明无任何利益冲突。

参考文献:

[1] 吴敏曼, 郭兆刚, 黄春江, 等. 通鼻消涕颗粒治疗慢性鼻窦炎的临床观察[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2022, 30(1): 10-13.

[2] 吴敏曼, 王旋, 谭凌翔, 等. 通鼻消涕颗粒对慢性鼻窦炎患者全身免疫功能及炎症因子的影响[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2023, 31(5): 321-324, 328.

[3] 吴敏曼, 张翰文, 王旋, 等. 通鼻消涕颗粒对慢性鼻窦炎患者局部免疫功能及炎症细胞的影响[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2024, 32(2): 136-139, 130.

[4] 吴敏曼, 邱博文, 王旋, 等. 通鼻消涕颗粒治疗大鼠慢性鼻窦炎的作用机制研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2024, 30(4): 23-28.

[5] Wu M M, Sun H, Xiao Z Q, et al. Differential proteomic analysis of nasal polyps, chronic sinusitis, and normal nasal mucosa tissues[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2009, 141(3): 364-368.

[6] Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2002, 13(3): 229-237.

[7] Delgado M, Abad C, Martinez C, et al. PACAP in immunity and inflammation[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 992: 141-157.

[8] Chao M V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways[J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(4): 299-309.

[9] Zhou C J, Shioda S, Yada T, et al. PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways[J]. Curr Protein Pept Sci, 2002, 3(4): 423-439.

[10] Sadanandan N, Cozene B, Park Y J, et al. Pituitary adeny-

late cyclase-activating polypeptide: a potent therapeutic agent in oxidative stress[J]. Antioxidants, 2021, 10(3): 354.

[11] Lee E Y, Chan L C, Wang H Y, et al. PACAP is a pathogen-inducible resident antimicrobial neuropeptide affording rapid and contextual molecular host defense of the brain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(1): e1917623117.

[12] Starr C G, Maderdrut J L, He J, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent broad-spectrum antimicrobial peptide: structure-activity relationships[J]. Peptides, 2018, 104: 35-40.

[13] Debbabi S, Groleau M C, Létourneau M, et al. Antibacterial properties of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a new human antimicrobial peptide[J]. PLoS One. 2018, 13(11):e0207366.

[14] Lin L, Ibrahim A S, Xu X, et al. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against Staphylococcus aureus and Candida albicans infection in mice[J]. PLoS Pathog, 2009, 5(12): e1000703.

[15] Ganea D, Delgado M. Neuropeptides as modulators of macrophage functions. Regulation of cytokine production and antigen presentation by VIP and PACAP[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2001, 49(2): 101-110.

[16] Delgado M, Munoz-Elias E J, Gomariz R P, et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies[J]. J Immunol, 1999, 162(3): 1707-1716.

[17] Delgado M, Martinez C, Pozo D, et al. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6[J]. J Immunol, 1999, 162(2): 1200-1205.

[18] Delgado M, Pozo D, Martinez C, et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production by macrophages: in vitro and in vivo studies[J]. J Immunol, 1999, 162(4): 2358-2367.

[19] Kinhult J, Adner M, Uddman R, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, effects in the human nose[J]. Clin Exp Allergy, 2003, 33(7): 942-949.

[20] Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation[J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(2): 249-290.

[21] Szema A M, Hamidi S A, Golightly M G, et al. VIP regulates the development & proliferation of treg in vivo in spleen[J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2011, 7(1): 19.

[22] Tan Y V, Abad C, Lopez R, et al. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(6): 2012-2017.

[23] Jiang N, Kern R C, Altman K W. Histopathological evaluation of chronic rhinosinusitis: a critical review[J]. Am J Rhinol Allergy, 2013, 27(5): 396-402.

[24] Aslan F, Altun E, Paksoy S, et al. Could eosinophilia predict clinical severity in nasal polyps?[J]. Multidiscip Respir Med, 2017, 12(1): 21.

[25] Gitomer S A, Fountain C R, Kingdom T T, et al. Clinical examination of tissue eosinophilia in patients with chronic rhinosinusitis and nasal polyposis[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2016, 155(1): 173-178.

[26] Lou H F, Meng Y F, Piao Y S, et al. Predictive significance of tissue eosinophilia for nasal polyp recurrence in the Chinese population[J]. Am J Rhinol Allergy, 2015, 29(5): 350-356.

[27] Ferguson B J. Categorization of eosinophilic chronic rhinosinusitis[J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2004, 12(3): 237-242.

[28] Kim D W, Eun K M, Jin H R, et al. Prolonged allergen exposure is associated with increased thymic stromal lymphopoietin expression and Th2-skewing in mouse models of chronic rhinosinusitis[J]. Laryngoscope, 2016, 126(8): E265-E272.

[29] Ijaz S, Iqbal J, Abbasi B A, et al. Rosmarinic acid and its derivatives: current insights on anticancer potential and other biomedical applications[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 162: 114687.

[30] Wen L, He T, Yu A X, et al. Breviscapine: a review on its phytochemistry, pharmacokinetics and therapeutic effects[J]. Am J Chin Med, 2021, 49(6): 1369-1397.

[31] Liu Q, Zuo R, Wang K, et al. Oroxindin inhibits macrophage NLRP3 inflammasome activation in DSS-induced ulcerative colitis in mice via suppressing TXNIP-dependent NF-kappaB pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(6): 771-781.

[32] Muhamad Fadzil N S, Sekar M, Gan S H, et al. Chemistry, pharmacology and therapeutic potential of swertiamarin-a promising natural lead for new drug discovery and development[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 2721-2746.

[33] Negahdari R, Bohlouli S, Sharifi S, et al. Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations[J]. Phytother Res, 2021, 35(4): 1719-1738.

[34] Wang Q, Wei H C, Zhou S J, et al. Hyperoside: a review on its sources, biological activities, and molecular mechanisms[J]. Phytother Res, 2022, 36(7): 2779-2802.

[35] Wu M M, Qiu B W, Xu Y, et al. The expression and significance of nasal mucosal glandular hyperplasia and eosinophil infiltration in chronic rhinosinusitis[J]. Acta Otolaryngol, 2025, 145(6): 522-527.

(收稿日期:2025-12-22)

本文引用格式:邱博文,吴敏曼,曲比衣作,等. 通鼻消涕颗粒对慢性鼻窦炎大鼠 PACAP/巨噬细胞/ECP 的调节作用[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2026,32(4):40-47. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202625492

Cite this article as: QIU Bowen, WU Minman, QUBI Yizuo, et al. Regulatory effect of Tongbi Xiaoti Granules on PACAP/macrophage/ECP in rats with chronic rhinosinusitis[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2026,32(4):40-47. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202625492