

# 基于HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路研究木兰脂素对急性鼻窦炎大鼠的治疗作用及机制

张瑞芹<sup>1</sup>, 胡云磊<sup>1</sup>, 王芳<sup>1</sup>, 闫保星<sup>2</sup> (1. 信阳市中心医院, 信阳 464000; 2. 郑州市第二人民医院, 郑州 450015)

**摘要** 目的: 观察木兰脂素对急性鼻窦炎(ARS)大鼠的治疗作用, 并探讨其通过高迁移率家族蛋白1/Toll样受体4/核因子- $\kappa$ B(HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B)信号通路的调控机制。方法: 49只大鼠, 随机取9只作为正常组, 40只用鼻腔内接种金黄色葡萄球菌法制备ARS模型, 36只建模成功大鼠随机分为模型组、木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组、阳性组, 各9只。木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组分别灌胃20、80 mg·kg<sup>-1</sup>体质量的木兰脂素, 模型组和正常组灌胃等体质量溶媒, 阳性组灌胃40 mg·kg<sup>-1</sup>体质量左氧氟沙星, 连续7 d。给药前、末次给药后1 h评估各组鼻窦炎症评分; 测定给药后各组血白细胞(WBC)计数及中性粒细胞占比, 观察鼻窦黏膜病理组织学变化, 检测鼻腔灌洗液中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素(IL)-6水平及鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B mRNA和蛋白表达情况。结果: 给药后, 木兰脂素低剂量组、高剂量组、阳性组的急性鼻窦炎症评分及血WBC计数均低于模型组, 但仍高于正常组, 且木兰脂素高剂量组及阳性组均低于木兰脂素低剂量组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而木兰脂素高剂量组与阳性组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与给药前比较, 给药后木兰脂素低剂量组、高剂量组及阳性组急性鼻窦炎症评分均降低( $P < 0.05$ ), 正常组及模型组给药前后无明显差异( $P > 0.05$ )。与模型组比较, 木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组、阳性组中性粒细胞占比均降低, 且木兰脂素高剂量组低于木兰脂素低剂量组, 阳性组低于木兰脂素高剂量组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而阳性组与正常组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。HE染色显示, 模型组大鼠纤毛脱落、缺失、排列紊乱, 黏膜上皮破损、变性, 黏膜内及黏膜下可见大量炎症细胞浸润; 木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组及阳性组上述病理变化均减轻, 且木兰脂素高剂量组和阳性组炎症反应减轻更为明显。与模型组比较, 木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组、阳性组鼻腔灌洗液中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平及鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B mRNA和蛋白相对表达量均降低, 但仍高于正常组, 且木兰脂素高剂量组及阳性组均低于木兰脂素低剂量组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而木兰脂素高剂量组及阳性组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论: 木兰脂素治疗ARS效果显著, 可能通过HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路抑制鼻黏膜炎症反应。

**关键词:** 急性鼻窦炎; 木兰脂素; 高迁移率家族蛋白1; Toll样受体4; 核因子- $\kappa$ B; 信号通路; 大鼠

中图分类号: R961.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)05-0526-09

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.05.006

## Therapeutic Effects and Mechanism of Magnolidin Against Acute Sinusitis in Rats Based on HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway

Zhang Ruiqin<sup>1</sup>, Hu Yunlei<sup>1</sup>, Wang Fang<sup>1</sup>, Yan Baoxing<sup>2</sup> (1. Xinyang Central Hospital, Xinyang 464000, China; 2. Zhengzhou Second Hospital, Zhengzhou 450015, China)

**Abstract Objective:** To observe the therapeutic effect of magnolidin against acute rhinosinusitis (ARS) in rats, and investigate its regulatory mechanism through the high-mobility family proteins 1/Toll-like receptor 4/nuclear factor- $\kappa$ B (HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B) signaling pathway. **Methods:** Nine rats were randomly selected from 49 rats as the normal group. Forty rats were prepared by intranasal sinus inoculation with staphylococcus aureus to make ARS model. 36 successfully modeled rats were randomly divided into the model group, the magnolidin low-dose group, the magnolidin high-dose group and the positive group, with nine rats in each group. The rats in the magnolidin low-dose and high-dose groups were intragastrated with 20 and 80 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> body mass of magnolian respectively, the rats in the model group and the normal group were administrated with the equal volume of vehicle, and the rats in the positive group were given 40 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> body mass of levofloxacin for 7 days in a row. The symptom scores of nasosinusitis in each group before administration and 1 hour after the last administration were evaluated. After administration, the white blood cell (WBC) count and the proportion of neutrophils were measured, the histopathological changes of the nasal sinus mucosa were observed and the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in nasal lavage fluid and the expressions of HMGB1, TLR4, NF- $\kappa$ B mRNA and proteins in nasal mucosa were detected. **Results:** After administration, the acute sinusitis symptom scores and blood WBC count in the magnolidin low-dose and high-dose groups and the positive group were lower than those of the model group, but they were still higher than those of the normal group. The scores and the count in magnolidin high-dose group and the positive group were lower than those in low-dose group. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), while there was no significant difference between the magnolidin high-dose group and the positive group ( $P > 0.05$ ). Compared with the scores before administration, the acute sinusitis symptom scores in magnolidin low-dose and high-dose groups and the positive group after administration had all decreased ( $P < 0.05$ ), while there was no significant difference in the normal group and model group before and after administration ( $P > 0.05$ ). Compared with that of the model group, the proportion of neutrophils in the magnolidin low-dose and high-dose groups and the positive group had decreased. The proportion in the high-dose group was lower than that in the low-dose group, and the proportion in the positive group was lower than that in the high-dose group. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), while there was no significant difference between the positive group and the normal group ( $P > 0.05$ ). HE staining showed that the rat cilia of the model group were exfoliated or missing or arranged disorderly, the mucosal epithelium was damaged or degenerated and a large number of inflammatory cells inside and below the mucosa were infiltrated. The pathological changes in the magnolidin low-dose and high-dose groups and positive group all reduced. In addition, the inflammatory response in the magnolidin high-dose group and positive group was even obvious. Compared with those of the model group, the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the nasal lavage fluid and the relative expressions of HMGB1, TLR4, NF- $\kappa$ B mRNA and proteins in the nasal mucosa of the low-dose group, high-dose group and positive group of mularin had all decreased, but they were higher than those of the normal group. Those in the magnolidin high-dose group and positive group were lower than those of low-dose group. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), while there was no significant difference between magnolidin high dose group and positive group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Magnolinin has significant effects on ARS, which may inhibit the inflammatory reaction of nasal mucosa through HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Keywords:** acute sinusitis; magnolidin; high-mobility family proteins 1; Toll-like receptor 4; nuclear factor- $\kappa$ B; signaling pathway; rats

急性鼻窦炎 (Acute Rhinosinusitis, ARS) 是临床常见的鼻窦黏膜炎症性疾病, 以鼻塞、流涕、嗅觉障碍等为典型表现, 若急性发作期治疗不及时, 则极易发展为慢性鼻窦炎, 迁延难愈, 对患者的工作和生活造成严重影响<sup>[1]</sup>。目前, 临床治疗ARS主要药物包括抗菌药物、激素等, 以抗菌药物治疗为首选, 但由于抗菌药物不合理应用, 导致耐药现象普遍, 因此, 亟需寻找新型有效药物治疗ARS, 减少临床耐药现象、提高患者生活质量<sup>[2]</sup>。木兰脂素是从常用中草药辛夷干燥花蕾中提取的一种木脂素, 药理研究证实其具有抗病毒、抗菌及抗过敏等活性, 尤其以抗炎作用显著<sup>[3]</sup>。研究发现, 多种中药复方剂中的主要活性成分含有木兰脂素, 但尚无关于木兰脂素单体用于ARS治疗的报道, 部分报道木兰脂素具有抗癌作用<sup>[4-5]</sup>。本研究通过建立ARS大鼠模型, 观察木兰脂素在治疗ARS的作用, 并进一步探讨可能调控机制, 为ARS的临床治疗提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠, 49只, 7周龄, 体质量180~220 g, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 生产许可证号SCXK(京)2019-0010。排除呼吸系统疾病, 实验开展前适应性饲养1周。

#### 1.1.2 药物、主要试剂和仪器

金黄色葡萄球菌标准菌株 (*Staphylococcus aureus*, 上海工业微生物研究所, 货号LA9200), 木兰脂素 (纯度 $\geq 98\%$ , 四川省维克奇生物科技有限公司), 白介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA试剂盒均为德国Merck公司产品, 一步法RT-PCR试剂盒 (北京百奥莱博科技有限公司), BCA蛋白定量分析试剂盒 (美国Thermo公司), 兔抗大鼠高迁移率家族蛋白1 (High Mobility Group Protein 1, HMGB1)、Toll样受体4 (Toll-Like Receptor 4, TLR4)、核转录因子 $\kappa$ B (Nuclear Transcription Factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 多抗, 山羊抗兔HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B单抗均为美国Abcam公司产品; SM2010R徕卡切片机 (德国徕卡显微系统贸易公司), Synergy LX酶标仪 (美国Bio Tek公司), 7500实时荧光定量PCR仪 (美国

ABI公司), CheniDoc XRS化学发光成像分析系统 (美国Bio-rad公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 急性鼻窦炎大鼠模型制备

随机取40只大鼠, 采用鼻窦腔内接种金黄色葡萄球菌法<sup>[6]</sup>制备ARS大鼠模型: 腹腔注射 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量的盐酸氯胺酮麻醉, 鼻部剃毛、消毒备皮, 鼻中线皮下注入0.1 mL浓度为2%盐酸利多卡因, 局部浸润麻醉后, 沿鼻中线切开皮肤约1.5 cm, 扩大术野, 暴露上颌窦前壁, 将无菌明胶海绵塞入窦腔, 将0.2 mL金黄色葡萄球菌混悬液 ( $10^{18} \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 缓慢注入窦腔, 依次缝合骨膜、皮肤切口。以鼻窦炎症评分 $\geq 6$ 分为模型成功: 将轻擦鼻 (1~4次/30 min、5~9次/30 min、 $>10$ 次/30 min)、喷嚏 (1~4个/30 min、5~9个/30 min、 $>10$ 个/30 min)、鼻腔分泌物 (少量流涕、流涕至鼻孔、鼻腔周围分泌物附着)、鼻腔炎症 (充血、红肿、红肿出血) 4个症状按照严重程度评分1~3分, 累计总分为鼻窦炎症评分。

#### 1.2.2 分组及干预

49只大鼠随机留取9只作为正常组, 40只建立ARS模型, 1周内建模成功36只 (无麻醉或手术意外死亡, 鼻窦炎症评分低于6分4只), 36只建模成功大鼠随机分为模型组、木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组、阳性组, 各9只。木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组建模第7天分别灌胃20、80  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量的木兰脂素溶液 (将木兰脂素溶于体积比为1:2:1的DMSO-丙二醇-水混合液中), 模型组和正常组灌胃等体质量溶媒, 阳性组灌胃40  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量左氧氟沙星 (临床成人等效剂量), 均按照10  $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量灌胃, 连续7 d。

#### 1.2.3 鼻窦炎症评分及血白细胞 (White Blood Cell, WBC) 计数及中性粒细胞占比测定

给药前、末次给药后1 h采用鼻窦炎症评分标准, 观察大鼠30 min内鼻窦炎症症状。症状评分结束后4%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉取血3 mL, 放入含有EDTA的抗凝管中, 摇匀, 4~10 h内应用血球仪进行WBC计数及中性粒细胞占比测定。

#### 1.2.4 鼻腔灌洗液及鼻黏膜样本采集

采血完毕后打开大鼠胸腔, 用预冷磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer, PBS) 进行心脏灌注, 待



肝脏发白时停止灌注,脱颈处死,完整剪去下颚并倒置,暴露器官部位,将留置针软管插入气管中,用注射器吸取0.75 mL预冷PBS,经留置针缓慢灌注,收集鼻腔流出液(该过程保持上颚基本干燥)即鼻腔灌洗液,2500 r·min<sup>-1</sup>离心8 min(离心半径12 cm),取上清液-80 ℃保存备用。

剥离头部皮肤及肌层,沿嗅球剪下鼻部,清理鼻背部组织,暴露鼻骨前缘,钝性分离鼻骨前端暴露鼻黏膜上端,从鼻中隔软骨及鼻背部外侧壁游离出鼻黏膜,沿中线剪断鼻骨后缘,剪断骨性中隔,完整取出鼻黏膜组织,从9只大鼠中随机取4只制作1 mm×1 mm鼻黏膜组织,放置于4%多聚甲醛中固定备用,另取剩余5只大鼠的鼻黏膜置于液氮中速冻后,转至-80 ℃保存备用。

### 1.2.5 鼻窦黏膜病理组织学观察

取固定于4%多聚甲醛中的鼻黏膜(每组4只),常规石蜡切片,制成厚度为4 μm连续切片,每只大鼠取3张切片进行二甲苯脱蜡、酒精梯度水化,常规苏木精-伊红(Hematoxylin Eosin, HE)染色法进行染色,中性树胶封片后,于光学显微镜下观察鼻窦黏膜组织病理学改变情况。

### 1.2.6 鼻腔灌洗液中TNF-α、IL-6水平检测

取鼻腔灌洗液离心上清液(每组9只),采用酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)检测各组待测TNF-α、IL-6浓度,严格按照试剂盒说明书步骤执行,于酶标仪检测波长470 nm处测定吸光度值,根据标准品建立的吸光度值-浓度标准曲线,计算待测样中TNF-α、IL-6浓度。

### 1.2.7 鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF-κB mRNA相对表达量检测

取固定于-80 ℃的鼻黏膜组织(每组5只),Trizol法提取鼻黏膜中总RNA含量,并进行逆转录获得互补链cDNA,产物经鉴定和定量后,进行实时荧光定量PCR反应,按照说明书设定反应体系,反应条件为94 ℃预变性5 min;94 ℃变性40 s,56 ℃退火40 s,72 ℃延伸55 s,设置40个循环,72 ℃再延伸2 min,以β-actin为内参,计算HMGB1、TLR4、NF-κB相对表达强度(2<sup>-ΔΔCT</sup>)。引物序列:HMGB1:F:5'-ACTGTAGTGCTGATGTC-3',R:5'-CTGATCAACGTGATGCT-3';TLR4:

F:5'-CTGATGCTGATCCAAGTCTGAGC-3',R:5'-ATGATGCTGATGCTGATGCTA-3';NF-κB:F:5'-CTGATGTCCCGCTAGTGCTGA-3',R:5'-GTGAGCTGATGCTTGAGCTGAT-3';β-actin:F:5'-GTAGGTCGTGATGCTGTAGCTG-3',R:5'-CGTAGTCCGTGATGCTGATGCTA-3'。

### 1.2.8 鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF-κB蛋白相对表达量检测

取固定于-80 ℃的鼻黏膜组织(每组5只,剔除1只无效样本,最终每组4只),加入RIPA裂解液,置于冰上用研磨棒反复研磨,并应用超声破碎仪破碎(冰上进行操作),4 ℃预冷离心机12000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径10 cm),收集上清液,采用BCA法测定蛋白总量,然后将蛋白提取液进行沸水浴10 min变性,再次离心后收集上清液,进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜,加入5%脱脂奶粉进行室温封闭1 h,加入兔抗大鼠HMGB1、TLR4、NF-κB(1:1000),4 ℃摇床孵育过夜,TBST洗涤3次×10 min,加入山羊抗兔二抗(1:3000),常温孵育1 h,TBST洗涤3次×10 min,暗房中进行胶片曝光、显影,扫描仪扫描保存,用Image J软件分析HMGB1、TLR4、NF-κB灰度值与内参β-actin灰度值比值,即蛋白相对表达量。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件分析数据,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,重复计量资料比较采用重复测量方差分析,两样本比较采用LSD-t检验;多样本计量资料比较采用单因素方差分析,两样本比较采用SNK-q检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 急性鼻窦炎症评分比较

给药前,模型组、木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组、阳性组的急性鼻窦炎症评分组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),且上述各组急性鼻窦炎症评分均高于正常组( $P < 0.05$ )。给药后,木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组、阳性组的急性鼻窦炎症评分均低于模型组,但仍高于正常组,且木兰脂素高剂量组及阳性组均低于木兰脂素低剂量组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而木兰脂素高剂量组及阳性组比

较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与给药前比较, 给药后木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组及阳性组急性鼻窦炎症状评分均降低 ( $P < 0.05$ ), 正常组及模型组给药前后无明显差异 ( $P > 0.05$ )。见表1。

表1 急性鼻窦炎症状评分比较 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	给药前	给药后
正常组	0.54 ± 0.06	0.50 ± 0.09
模型组	7.45 ± 1.03 <sup>a</sup>	7.22 ± 1.11 <sup>ae</sup>
木兰脂素低剂量	7.22 ± 1.13 <sup>a</sup>	3.85 ± 0.94 <sup>abe</sup>
木兰脂素高剂量	7.20 ± 1.06 <sup>a</sup>	2.78 ± 0.65 <sup>abce</sup>
阳性组	7.38 ± 1.14 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.52 <sup>abce</sup>
<i>F</i> 值	32.371	20.144
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001

注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与木兰脂素低剂量组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与给药前比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

## 2.2 血WBC计数及中性粒细胞占比比较

血WBC计数及中性粒细胞占比组间比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组、阳性组血WBC计数均降低, 但仍高于正常组, 且木兰脂素高剂量组及阳性组均低于木兰脂素低剂量组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而木兰脂素高剂量组及阳性组比较, 差异无统计学意义 ( $P >$

0.05)。与正常组比较, 模型组、木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组中性粒细胞占比均升高 ( $P < 0.05$ ), 阳性组无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 与模型组比较, 木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组、阳性组中性粒细胞占比均降低, 且木兰脂素高剂量组低于木兰脂素低剂量组, 阳性组低于木兰脂素高剂量组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 血WBC计数及中性粒细胞占比比较 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

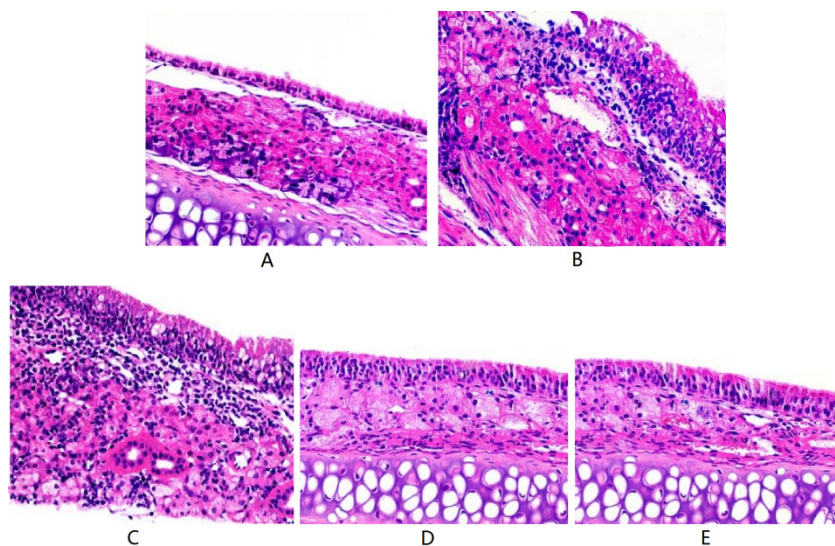
组别	WBC 计数 / ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	中性粒细胞占比 / %
正常组	7.01 ± 1.14	22.35 ± 2.64
模型组	16.24 ± 2.06 <sup>a</sup>	40.26 ± 5.85 <sup>a</sup>
木兰脂素低剂量	13.40 ± 1.42 <sup>ab</sup>	32.71 ± 3.06 <sup>ab</sup>
木兰脂素高剂量	10.22 ± 1.13 <sup>abc</sup>	25.47 ± 2.87 <sup>abc</sup>
阳性组	10.05 ± 1.17 <sup>abc</sup>	22.58 ± 2.50 <sup>abcd</sup>
<i>F</i> 值	55.020	41.152
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001

注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与木兰脂素低剂量组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与木兰脂素高剂量组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.3 鼻窦黏膜病理组织学观察

正常组大鼠黏膜组织结构完整、纤毛整齐,未见炎性细胞浸润(图1A);模型组大鼠纤毛脱落、缺失、排列紊乱,黏膜上皮破损、变性,黏膜内及黏膜下可见大量炎症细胞浸润(图1B);经

低剂量的木兰脂素干预后,纤毛脱落减少,黏膜内及黏膜下炎症细胞浸润减少,炎症反应较模型组减轻(图1C),且木兰脂素高剂量组和阳性组炎症反应减轻更为明显(图1D、E)。



A. 正常组; B. 模型组; C. 木兰脂素低剂量组; D. 木兰脂素高剂量组; E. 阳性组。

图1 鼻黏膜病理组织学观察(HE × 400)

### 2.4 鼻腔灌洗液中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平比较

鼻腔灌洗液中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组、阳性组鼻腔灌洗液中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平均降低,但仍高于

正常组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );木兰脂素高剂量组及阳性组鼻腔灌洗液中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平均低于木兰脂素低剂量组( $P < 0.05$ ),而木兰脂素高剂量组及阳性组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表3。

表3 鼻腔灌洗液中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平比较( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	TNF- $\alpha$ / (pg · mL <sup>-1</sup> )	IL-6 / (pg · mL <sup>-1</sup> )
正常组	9.12 ± 1.24	35.26 ± 4.71
模型组	23.40 ± 1.87 <sup>a</sup>	80.24 ± 10.22 <sup>a</sup>
木兰脂素低剂量	17.89 ± 1.94 <sup>ab</sup>	57.62 ± 8.78 <sup>ab</sup>
木兰脂素高剂量	13.44 ± 2.05 <sup>abc</sup>	45.40 ± 7.21 <sup>abc</sup>
阳性组	13.01 ± 2.23 <sup>abc</sup>	44.23 ± 6.42 <sup>abc</sup>
<i>F</i> 值	74.603	45.911
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与木兰脂素低剂量组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

## 2.5 鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B mRNA相对表达量比较

鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B mRNA相对表达量组间比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组、阳性组鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B

mRNA相对表达量均降低, 但仍高于正常组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 木兰脂素高剂量组及阳性组鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B mRNA相对表达量均低于木兰脂素低剂量组 ( $P < 0.05$ ), 而木兰脂素高剂量组及阳性组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表4。

表4 鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B mRNA相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

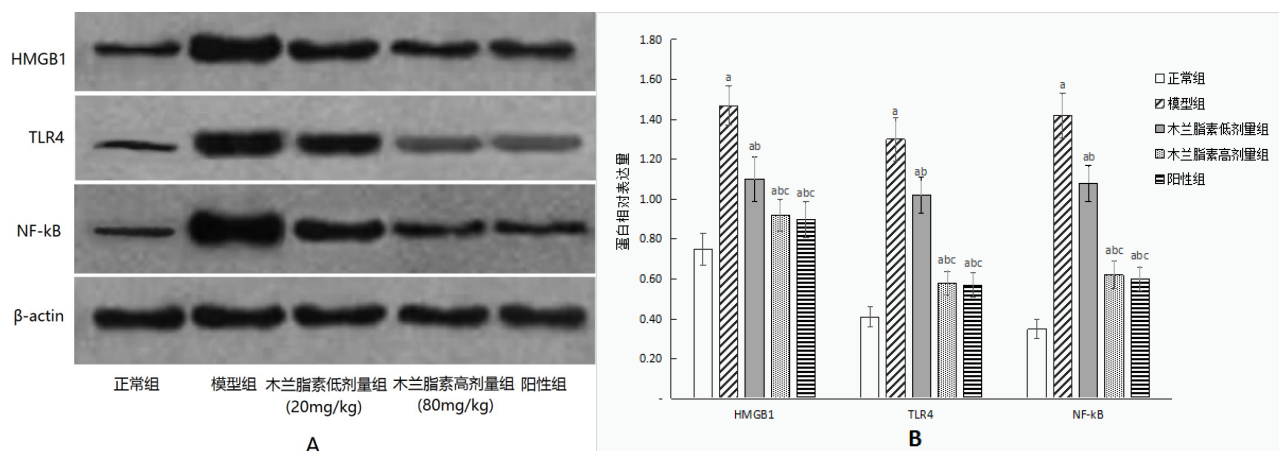
组别	HMGB1	TLR4	NF- $\kappa$ B
正常组	0.81 $\pm$ 0.09	1.01 $\pm$ 0.16	1.24 $\pm$ 0.24
模型组	1.42 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	2.21 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	2.65 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>
木兰脂素低剂量	1.20 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	1.90 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	2.04 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>
木兰脂素高剂量	0.96 $\pm$ 0.14 <sup>abc</sup>	1.53 $\pm$ 0.22 <sup>abc</sup>	1.70 $\pm$ 0.23 <sup>abc</sup>
阳性组	0.95 $\pm$ 0.10 <sup>abc</sup>	1.51 $\pm$ 0.18 <sup>abc</sup>	1.62 $\pm$ 0.19 <sup>abc</sup>
F值	34.644	176.050	162.532
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与木兰脂素低剂量组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

## 2.6 鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B蛋白相对表达量比较

鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B蛋白相对表达量组间比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 木兰脂素低剂量组、木兰脂素高剂量组、阳性组的鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B

蛋白相对表达量均降低, 但仍高于正常组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 木兰脂素高剂量组及阳性组的鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B蛋白相对表达量均低于木兰脂素低剂量组 ( $P < 0.05$ ), 而木兰脂素高剂量组及阳性组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图2A、B。



A. 鼻黏膜中各蛋白表达的免疫印迹图; B. 鼻黏膜中各蛋白相对表达量柱状图; 与正常组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与木兰脂素低剂量组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

图2 鼻黏膜中HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )



### 3 讨论

ARS发病机制复杂,继发于以鼻黏膜炎症为特征的鼻炎,临床常见细菌性和病毒性ARS,前者多在病毒感染后继发细菌感染,目前认为,双重感染是ARS最重要的发病机制<sup>[7-8]</sup>。ARS属于自愈性疾病,早期干预使多数患者在发病7 d内能够自愈,但仍有10%左右的患者会继发细菌性ARS或转化为慢性鼻-鼻窦炎<sup>[9]</sup>。早期治疗ARS首要药物为抗菌药物,主要作用是抗菌、缩短治愈时间、预防慢性转化等,但目前临床中抗菌药物不合理应用或滥用现象普遍,导致其治疗效果日趋下降,耐药现象也日益突出,继发细菌性ARS或转化为慢性鼻-鼻窦炎患者占比逐渐增加<sup>[10]</sup>,因此,寻找新型的安全有效的治疗药物迫在眉睫。

ARS常见致病菌包括金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、嗜血杆菌等,链球菌属所致ARS自愈率约15%,本研究选取金黄色葡萄球菌复制ARS模型大鼠,符合细菌性ARS致病机制,临床症状评分及病理组织学检查均符合既往文献报道<sup>[11]</sup>。模型组大鼠主要表现为WBC计数及鼻腔灌洗液中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平升高等典型的鼻黏膜炎症反应。木兰脂素是中草药辛夷中活性成分,具有显著的抗炎作用,辛夷提取物中主要含有挥发油、木脂素等。Lee等<sup>[12]</sup>研究表明,辛夷提取物对大鼠结扎性牙周炎具有保护作用,可抑制血清炎症因子水平。Chung等<sup>[13]</sup>从白玉兰嫩枝中分离出木兰脂素衍生物,并证实其可抑制人嗜中性白细胞(FMLP/CB)诱导弹性蛋白酶释放,半数抑制浓度最低为 $(0.71 \pm 0.13) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,证实木兰脂素具有抗炎作用。本研究发现采用不同剂量木兰脂素灌胃后,大鼠急性鼻窦症状评分、血WBC计数、中性粒细胞占比及鼻腔灌洗液中TNF- $\alpha$ 及IL-6水平均降低,木兰脂素高剂量组较低剂量组降低更为明显;HE染色显示,木兰脂素低、高剂量组及阳性组纤毛脱落、缺失、排列紊乱,黏膜上皮破损、变性,黏膜内及黏膜下可见大量炎症细胞浸润等病理变化均减轻,且木兰脂素高剂量组和阳性组炎症反应减轻更为明显,说明木兰脂素治疗ARS效果显著,具有显著的抗炎作用。

HMGB1广泛存在于真核生物细胞中,具有调节基因转录及染色体构象等作用。HMGB1可以由单核巨噬细胞、树突状细胞等炎症细胞分泌,作为

炎症介质增加TNF- $\alpha$ 、IL-6等炎症因子释放<sup>[14]</sup>。研究显示, HMGB1可与细菌LPS特异性结合,经膜表面分子CD14的经典受体TLR4发挥免疫原性,TLR4激活后通过髓样分子依赖途径激活下游NF- $\kappa$ B,进而介导下游炎症级联反应<sup>[15-16]</sup>。黄耀光等<sup>[17]</sup>研究表明, HMGB1介导的TLR4/NF- $\kappa$ B炎症反应通路在慢性鼻-鼻窦炎发病中起重要调控作用。以上研究表明HMGB1介导的炎症反应通路参与ARS发病机制。本研究给予ARS大鼠灌胃木兰脂素后HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B mRNA和蛋白表达水平均较模型组降低,但仍高于正常组,且木兰脂素高剂量组及阳性组降低更为明显,提示木兰脂素可能通过HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路抑制ARS鼻黏膜炎症反应。

综上所述,木兰脂素治疗ARS效果显著,可能通过HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路抑制鼻黏膜炎症反应,且 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的木兰脂素效果更佳,本研究希望为木兰脂素相关药物的研发及应用于ARS的防治提供参考。

#### 参考文献:

- [1] Michalowski A, Kacker A. Is Sinus Surgery Indicated for Recurrent Acute Rhinosinusitis[J]. Laryngoscope, 2017, 127(6): 1255-1256.
- [2] Aring AM, Chan MM. Current Concepts in Adult Acute Rhinosinusitis[J]. Am Fam Physician, 2016, 94(2): 97-105.
- [3] Poivre M, Duez P. Biological Activity and Toxicity of the Chinese Herb Magnolia Officinalis Rehder & E. Wilson (Houpo) and Its Constituents[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2017, 18(3): 194-214.
- [4] 宫鹏, 余剑萍, 肖雷, 等. 高效液相色谱法测定苍辛滴鼻剂中绿原酸及木兰脂素的含量[J]. 安徽医学, 2017, 38(9): 1099-1102.
- [5] 余俊, 史志华, 肖智朋. 木兰脂素联合顺铂对肺癌小鼠的影响研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(18): 49-52.
- [6] 俞晨杰, 陆玲, 顾亚军, 等. 大鼠慢性鼻-鼻窦炎模型的建立及其生物学特性观察[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2011, 17(6): 419-424.
- [7] Autio TJ, Koskenkorva T, Koivunen P, et al. Inflammatory Biomarkers During Bacterial Acute Rhinosinusitis[J]. Curr



- Allergy Asthma Rep, 2018, 18 (2) : 13.
- [8] Virtanen J, Hokkinen L, Karjalainen M, et al. In Vitro Detection of Common Rhinosinusitis Bacteria by the eNose Utilising Differential Mobility Spectrometry[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2018, 275 (9) : 2273-2279.
- [9] 朱宁, 姚晓燕, 王志平. 川芎茶调散合苍耳子散联合西医常规疗法治疗急性鼻窦炎临床研究[J]. 国际中医中药杂志, 2018, 40 (8) : 719-721.
- [10] 谢朝云, 陈东, 陈应强, 等. 慢性鼻窦炎多重耐药菌感染危险因素Logistic回归分析[J]. 中国医学科学院学报, 2019, 40 (6) : 803-808.
- [11] Ye J, He JP, Liu ZJ. Olfactory Mucosal Microstructural Changes in a Rat Model of Acute Rhinosinusitis with Dysosmia[J]. Genet Mol Res, 2014, 13 (2) : 3859-3868.
- [12] Lee HJ, Lee DR, Choi BK, et al. Antiperiodontitis Effects of Magnolia Biondii Extract on Ligature-Induced Periodontitis in Rats[J]. Nutrients, 2019, 11 (4) : 934.
- [13] Chung CY, Kuo WL, Hwang TL, et al. Biphenyl-Type Neolignan Derivatives from the Twigs of Magnolia Denudata and Their Anti-Inflammatory Activity[J]. Chem Biodivers, 2015, 12 (8) : 1263-1270.
- [14] Zhang C, Dong H, Chen F, et al. The HMGB1-RAGE/TLR-TNF- $\alpha$  Signaling Pathway May Contribute to Kidney Injury Induced by Hypoxia[J]. Exp Ther Med, 2019, 17 (1) : 17-26.
- [15] Michel HE, Menze ET. Tetramethylpyrazine Guards Against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats Through Inhibiting HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B and Activating Nrf2 and PPAR- $\gamma$  Signaling Pathways[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 857: 172422.
- [16] Rosciszewski G, Cadena V, Murta V, et al. Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 (TREM-2) Activation Balance Astrocyte Polarization into a Proinflammatory Phenotype[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55 (5) : 3875-3888.
- [17] 黄耀光. HMGB1/PTEN/TLR4/NF- $\kappa$ B在慢性鼻-鼻窦炎的表达及作用[D]. 广州: 暨南大学, 2016.
- (收稿日期 2021年12月21日 编辑 王雅雯)