

囊制剂工艺改进的二次开发研究, 提供数据支持。

参考文献:

- [1] 吴沅晖, 刘维, 刘晓亚, 等. 痹祺胶囊对兔骨关节炎软骨代谢的作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(8): 1608-1610.
- [2] Wang Q S, Cui Y L, Wang Y F, et al. Effects of compounds from Bi-Qi Capsule on the expression of inflammatory mediators in lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 macrophages[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 136(3): 480-487.
- [3] Green L A, Wagner D A, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids[J]. *Anal Biochem*, 1982, 126(1): 131-138.
- [4] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta DeltaCT) Method[J]. *Methods(San Diego Calif)*, 2001, 25(4): 402-408.
- [5] 刘维, 周艳丽, 张磊, 等. 痹祺胶囊抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(5): 315-316.
- [6] Hinz B, Brune K, Pahl A, et al. Nitric oxide inhibits inducible nitric oxide synthase mRNA expression in RAW 264.7 macrophages[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271(2): 353-357.
- [7] Cho J Y, Kim P S, Park J, et al. Inhibitor of tumor necrosis factor-alpha product in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells from *Amorpha fruticosa*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 70(2): 127-133.
- [8] Suh N, Honda T, Finlay H J, et al. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase(iNOS) and inducible cyclooxygenase(COX-2) in mouse macrophages[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(4): 717-723.
- [9] Moncada S, Palmer R M J, Higgs E A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology[J]. *Pharmacol Rev*, 1991, 43(2): 109-142.
- [10] Vincenzo M, Carolna M, Emanuela M. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors[J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(2): 217-252.
- [11] Nathan C, Xie Q W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls[J]. *Cell*, 1994, 78(6): 915-918.
- [12] Dinarello C A. Role of pro-and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1997, 11(3): 91-103.
- [13] Liu J, Marino M W, Wong G. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination[J]. *Nat Med*, 1998, 4(1): 78-83.

## 鼻渊舒对慢性鼻-鼻窦炎模型鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体功能的影响

李辉<sup>1</sup>, 朱天民<sup>2\*</sup>

(1. 成都大学医护学院, 四川 成都 610106; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 610075)

**摘要:** 目的 观察鼻渊舒(辛夷、苍耳子、栀子、黄芪、白芷、黄芩、柴胡、薄荷、细辛、川木通、川芎)对慢性鼻-鼻窦炎模型鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体的受体亲和力及转录激活能力等功能的影响, 从细胞抑炎机制角度, 探讨鼻渊舒治疗慢性鼻-鼻窦炎的可能机制。方法 选取100只健康新西兰大白兔, 按每组20只, 随机分为正常、模型、假手术、克拉霉素、鼻渊舒组, 建立慢性鼻-鼻窦炎模型, 正常、模型、假手术组不干预, 克拉霉素组、鼻渊舒组分别予以克拉霉素25 mg/(kg·d)、鼻渊舒口服液1.5 mL/(kg·d)灌胃, 治疗14 d后取各组鼻窦黏膜上皮, HE染色后观察鼻窦黏膜组织的病理形态学改变, 受体的放射性配基结合分析及报告质粒分析法观察糖皮质激素受体的受体结合容量、解离常数及转录激活能力。结果 模型组鼻窦黏膜呈慢性炎症改变, 黏膜炎细胞浸润, 腺体及杯状细胞明显增生; 模型组黏膜上皮糖皮质激素受体解离常数较正常组显著增高( $P < 0.01$ ), 转染质粒pMTV-CAT后, 氯霉素乙酰转移酶(CAT)表达较正常及假手术组显著下降( $P < 0.01$ )。鼻渊舒治疗后, 鼻窦黏膜上皮得到较好修复, 上皮组织炎细胞浸润、杯状细胞及腺体少见增生; 糖皮质激素受体解离常数显著低于模型组( $P < 0.01$ ), 与正常组比较无显著性差异( $P > 0.05$ ), 转染pMTV-CAT质粒后, CAT表达显著高于模型组( $P < 0.01$ ), 与正常及假手术组比较无显著差异( $P > 0.05$ )。结论 鼻渊舒能显著改善慢性鼻-鼻窦炎模型鼻窦黏膜慢性炎症状态, 其机制与提高黏膜上皮糖皮质激素受体的受体亲和力及转录激活能力有关。

**关键词:** 鼻渊舒口服液; 慢性鼻-鼻窦炎; 鼻窦黏膜上皮; 糖皮质激素受体; 受体亲和力; 转录激活能力

收稿日期: 2013-04-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102621; 30801480); 成都中医药大学科技发展基金资助项目(ZRYB200945)

作者简介: 李辉(1977—), 男, 副教授, 医学博士, 研究方向: 中医药治疗慢性炎症性疾病的机制。Tel: 13980753275, E-mail: ttilihui@163.com

\*通信作者: 朱天民(1977—), 女, 教授, 医学博士, 研究方向: 中西医结合康复的实验与临床。E-mail: tmzhu66@aliyun.com

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2014)01-0030-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2014.01.008

## Influence of Biyuanshu Oral Liquid on glucocorticoid receptors of nasal mucosal epithelial cells in rabbit with chronic rhinosinusitis

LI Hui<sup>1</sup>, ZHU Tian-min<sup>2\*</sup>

(1. Medical and Nursing School, Chengdu University, Chengdu 610106, China; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To investigate the influence of Biyuanshu Oral Liquid (*Magnoliae Flos*, *Xanthii Fructus*, *Gardeniae Fructus*, *Astragali Radix*, *Angelicae dahuricae Radix*, *Scutellariae Radix*, *Bupleuri Radix*, *Methae Herba*, *Asari Herba*, *Clematidis armandii Caulis*, *Chuanxiong Rhizoma*) on the affinity and transcriptional activity to glucocorticoid receptors (GR) of nasal sinuses mucosal epithelial cells in rabbit with chronic rhinosinusitis (CRS). **METHODS** One hundred New Zealand rabbits with CRS were randomly assigned into model group, sham operation group, clarithromycin group, Biyuanshu Oral Liquid group, and normal group without CRS, 20 in each group. There were not any interventions on normal group, model group and sham operation group. Clarithromycin group was given clarithromycin 25 mg/(kg·d), and Biyuanshu Oral Liquid group was given Biyuanshu Oral Liquid 1.5 mL/(kg·d) for 14 days. After the treatment, nasal sinuses mucosal tissue was collected to observe their pathological changes after HE dyeing, and to detect the maximum binding capacity, dissociation constant (KD) and transcriptional activity of GR with radioligand binding assay and reporter plasmids analysis. **RESULTS**

In model group, chronic inflammation and inflammatory cell infiltration, epithelial cells and hyperplasia of glandular organs and goblet cells with CRS were obvious. The dissociation constant of nasal sinuses mucosal epithelium cytoplasm GR was higher than that in the normal group ( $P < 0.01$ ). After plasmid pMTV-CAT transfection, the CAT expression was lower than that in the normal and sham operation group ( $P < 0.01$ ). After the treatment with Biyuanshu Oral Liquid, the nasal sinuses mucosa epithelium was repaired, and inflammatory cell infiltration, hyperplasia of epithelial cells and glandular organs and goblet cells were rare. The dissociation constant of GR was obviously lower than that in the model group ( $P < 0.01$ ) with out apparent difference in the normal group ( $P > 0.05$ ). After plasmid pMTV-CAT transfection, the CAT expression was significantly higher than that in the model group ( $P < 0.01$ ) with out apparent difference in the normal and sham operation group ( $P > 0.05$ ). **CONCLUSION** Biyuanshu Oral Liquid could significantly regulate the chronic inflammation nasal sinuses mucosa epithelial cells in rabbit with CRS. Its therapeutic mechanism could be possibly related to improving the affinity and transcriptional activity of GR of nasal sinuses mucosal epithelial cells.

**KEY WORDS:** Biyuanshu Oral Liquid; chronic rhinosinusitis; nasal sinuses mucosal epithelium; glucocorticoid receptors; receptor affinity; transcription activity

慢性鼻-鼻窦炎 (chronic rhinosinusitis) 治疗困难, 反复发作, 对呼吸系统可产生不利影响。鼻渊舒口服液作为临床治疗慢性鼻-鼻窦炎的有效中成药, 其临床研究较多, 但其治疗机制尚未明了。糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor) 介导了体内重要的抑炎激素——糖皮质激素 (glucocorticoid) 的生物学效应<sup>[1]</sup>。其在鼻渊舒口服液治疗慢性鼻-鼻窦炎中的作用未见报道, 本实验采用受体

的放射性配基结合分析 (Radioligand Binding Assay of Receptors, RBA) 及报告质粒分析法观察了鼻渊舒口服液对慢性鼻-鼻窦炎模型鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体功能的影响, 以探讨其治疗机制。

### 1 材料

1.1 实验动物 健康新西兰大耳白兔 100 只, 体重 1.5 ~ 3.0 kg, 雌雄各半。于四川实验动物专业委员会繁育场购买, 合格证号: SCXL (川) -

2008-14, 成都中医药大学实验动物中心饲养。

1.2 主要药品、试剂与仪器 金葡菌菌液(四川省中医院细菌室制备), 克拉霉素片(南京瑞尔制药公司, 批号为090301), 鼻渊舒口服液(成都华神公司制药厂, 国药准字: Z51020208, 10 mL/支, 批号: 090425), <sup>3</sup>H-地塞米松(<sup>3</sup>H-Dex, 放射比活性 34 Ci/mmol, Amersham 公司), 地塞米松(Sigma 公司), GF/C 型玻璃纤维滤膜(Whatman 公司), 二甲苯(重庆化学试剂总厂), 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 北京化工厂), 氯霉素乙酰转移酶(CAT)检测试剂盒(GBD 公司), pMTV-CAT 质粒(成都医学院惠赠), MEM/F12 培养基(Hyclone 公司), 标准胎牛血清(兰州民海生物技术有限公司), KeyGenTrans III 质粒转染试剂(南京凯基生物发展有限公司)。ZT-II 型多头细胞收集器(绍兴卫星机械有限公司), LS 6500 型液体闪烁计数器(计数效率 26%, Beckman 公司), 酶标仪(Thermo 公司)等。

## 2 方法

2.1 分组方法 适应性喂养 1 周后, 依照 SAS8.0 软件生成的随机数字表, 随机分为正常、模型、假手术、克拉霉素、鼻渊舒组, 每组各 20 只。

### 2.2 建立慢性鼻-鼻窦炎模型

2.2.1 制备菌种 取慢性鼻窦炎患者上颌窦冲洗液, 细菌鉴定仪分离筛选出金黄色葡萄球菌, 血平板接种, 37 °C 培养 24 h, 收集菌落, 稀释成 1 麦氏单位的菌液。

2.2.2 造模方法 使用窦口不完全阻塞结合窦腔留置棉絮法, 建立慢性鼻-鼻窦炎模型<sup>[2]</sup>。将兔用氯氨酮 50 mg/kg 肌注麻醉, 鼻背正中的毛剪短、刮光, 消毒、铺巾, 1% 利多卡因浸润麻醉, 选取一侧上颌窦前壁, 逐层分离皮下组织及骨膜, 钻一直径 1.5 mm 的孔。通过该孔将少量棉絮放置在窦口及窦腔, 窦口不完全堵塞, 将骨膜、皮肤逐层缝合。术后第 2 天, 取 1 mL 细菌悬浊液, 通过小孔注入模型、鼻渊舒及克拉霉素组窦腔, 饲养 42 d, 建立慢性鼻-鼻窦炎模型。假手术组手术方法同上, 不注射细菌及处理窦口。正常组不做处理, 各组均精饲料喂养、自由饮食饮水。

2.3 治疗方法 造模后第 43 天开始, 鼻渊舒组给予鼻渊舒口服液 1.5 mL/(kg·d) 灌胃, 克拉霉素组给予克拉霉素 25 mg/(kg·d) 灌胃, 共 14 d<sup>[3]</sup>; 正常、模型、假手术组不给药。

### 2.4 检测指标及方法

2.4.1 一般情况及症状、体征 观察各组兔造模及治疗前后的活动、毛色、进食进水量, 及鼻塞、流涕、喷嚏等症状。

2.4.2 鼻窦黏膜组织病理改变 HE 染色后, 光镜观察上颌窦黏膜上皮排列, 炎细胞浸润程度, 腺体和杯状细胞分布、数量等。

2.4.3 鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体的放射性配基结合分析 兔鼻黏膜组织剪碎, 加入适量体积的匀浆液, 5 000 r/min 匀浆, 800 × g 离心 15 min, 收集上清, 30 000 × g 离心 20 min, 收集上清, -70 °C 贮存, Lowry 法测定胞浆蛋白浓度。受体结合实验采用标记配基多点饱和法, 整个实验过程在冰浴中进行。用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.4) 分别配置 6.25、12.5、25、50、100、200 nmol/L 的<sup>3</sup>H-Dex, 于对应实验管中各加入 50 μL, 形成终浓度分别为 1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50 nmol/L 的<sup>3</sup>H-Dex, 非特异结合管另加入 100 μmol/L 地塞米松 50 μL (终浓度 25 μmol/L), 胞浆蛋白 80 μg, 加入 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液补足反应体积 200 μL, 混匀, 24 °C 1.5 h。用多头细胞收集器收集受体-配基复合物至玻璃纤维滤膜, 蒸馏水洗涤 3 次。滤膜 37 °C 烘干后置闪烁瓶内, 加入 0.5% PPO 二甲苯闪烁液 5 mL, 避光 2 h 后在 LS 6500 型液体闪烁计数器进行放射计数, 检测各管的放射性。以公式: [RL] (受体配体复合物浓度) = 标本的特异性结合 (specific binding, SB) 放射性 / (计数效率 × 配基放射比活性 × 标本蛋白量), 求得 [RL]; 然后根据以 [RL] 为变量的饱和曲线方程:  $[RL]^2 - [RL] \times \{ [RT] + [LT] + KD \} + [RT] \times [LT] = 0$ , 将以上各<sup>3</sup>H-Dex 浓度点的 [LT] (总配体浓度) 和测得的 [RL] 代入该方程, 用计算机拟合求出糖皮质激素受体的解离常数 (KD, nmol/L) 和受体结合容量 (RT, fmol/mg 蛋白质)。该计算过程由专用放射性配体与受体结合分析软件自动进行。

### 2.4.4 糖皮质激素受体转录激活能力测定

2.4.4.1 鼻窦黏膜上皮细胞培养 超净台冰盘上取出的鼻窦黏膜上皮用氟康唑、庆大霉素无菌生理盐水冲洗 5~6 遍, 将黏膜片剪为 1 mm × 1 mm 大小黏膜块, 0.1% 胶原酶 37 °C 消化 30 min, 振荡使上皮细胞脱落。然后将细胞悬液移至另一个离心管, 加入等量 0.25% 胰蛋白酶, 吹打 5 min, 1 000 r/min 4 °C 离心 5 min 后弃上清, 加入适量胎牛血清

培养基制成细胞悬液，锥虫蓝染色证实95%以上为活细胞，调整细胞数为 $3 \times 10^7/L$ ，接种于6孔培养皿中， $37^\circ C$ 、5%  $CO_2$ 、95%  $O_2$ 培养24 h后更换无血清生长因子DMEM/F12 1:1培养基，每3日换液，使细胞达到60%~80%融合率。

2.4.4.2 质粒转染及CAT活性测定 转染前1日用完全培养基在24孔细胞培养板上，每孔接种900  $\mu L$ 细胞培养液及 $2 \times 10^5$ 个细胞，转染前细胞密度达到70%~90%。将1  $\mu g$  pMTV-CAT质粒与100  $\mu L$ 无血清、无抗生素的培养基在1.5 mL无菌EP管中混匀后，再加入2  $\mu L$  KeyGenTrans III质粒转染试剂混匀，室温放置10~15 min，获得100  $\mu L$ 转染复合物。将前述的100  $\mu L$ 转染复合物直接滴加到含900  $\mu L$ 完全培养基的细胞上清中，轻轻摇动细胞培养板使转染复合物均匀分散。 $37^\circ C$ 、5%  $CO_2$ 条件下孵育转染细胞48 h后，分别向转染质粒的培养瓶中加入相应100 nmol/L地塞米松，继续培养12 h后，收集细胞，ELISA法检测CAT活性。

2.5 统计方法 数据采用SPSS 17.0软件处理，以均数 $\pm$ 标准差表示计量资料，单因素方差分析进行组间比较，双侧 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准， $P < 0.05$ 具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 一般情况及症状、体征变化 造模前，各组兔进食正常，活动敏捷，皮毛光泽，鼻、唇部清洁，大便正常，无兔死亡。造模后，正常和假手术组兔无死亡，模型组4只、鼻渊舒组2只兔因肺部感染死亡；克拉霉素组分别因灌胃不当及肺部感染致2只兔死亡；除正常、假手术组，其余各组兔普遍活动迟缓，鼻塞、脓涕明显，时发喷嚏（约每分钟3~4个）。治疗后，鼻渊舒、克拉霉素组兔行为活跃，鼻塞、脓涕、喷嚏消失；至处死前，模型组活动较为迟缓，鼻塞、脓涕、喷嚏等症状未见改善；正常及假手术组，未见鼻塞、脓涕、喷嚏等症状。

3.2 鼻窦黏膜病理改变 正常及假手术组鼻窦黏膜上皮结构完整，细胞排列整齐；散在分布少量杯状细胞，黏膜下层无炎细胞浸润，腺体数量少；模型组鼻窦黏膜呈慢性炎症改变，上皮增生，纤毛脱落，部分区域鳞状上皮化生，杯状细胞增生；黏膜下腺体增生，单核细胞、淋巴细胞、浆细胞明显浸润，提示慢性鼻-鼻窦炎模型建立成功；鼻渊舒组鼻窦黏膜上皮及其纤毛排列较为整齐，炎细胞浸润

程度不如模型及克拉霉素组明显；克拉霉素组鼻窦黏膜上皮损伤较严重，纤毛脱落，炎细胞浸润较假手术、鼻渊舒组明显（见图1）。

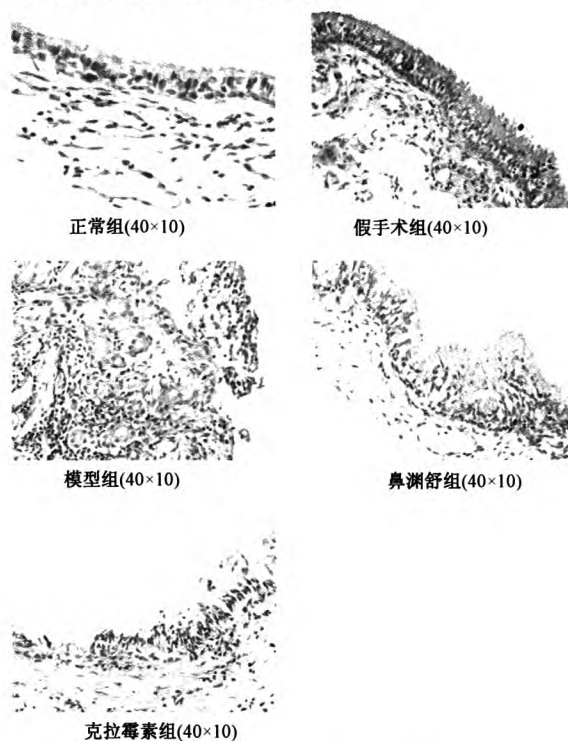


图1 各组鼻窦黏膜HE染色

Fig. 1 HE staining of nasal sinuses mucosa from different groups

3.3 鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体结合容量及解离常数比较 各组鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体结合容量比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ )；模型组鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体解离常数较正常组显著增高 ( $P < 0.01$ )，假手术、克拉霉素、鼻渊舒组糖皮质激素受体解离常数显著低于模型组 ( $P < 0.01$ )，与正常组比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。见表1。

3.4 各组鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体转录激活能力比较 模型组、克拉霉素组鼻窦黏膜上皮转染质粒 pMTV-CAT 后，氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 表达较正常及假手术组显著下降 ( $P < 0.01$ )，提示模型组和克拉霉素组鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体转录激活能力较正常组及假手术组显著降低；鼻渊舒组转染 pMTV-CAT 后，CAT 表达显著高于模型组 ( $P < 0.01$ )，与正常及假手术组比较无显著差异 ( $P > 0.05$ )，提示鼻渊舒组糖皮质激素受体转录激活能力较模型组显著增高，且与正常及假手术组比较无显著变化；鼻渊舒组 CAT 表达与克拉

**表1 各组糖皮质激素受体结合容量及解离常数比较**  
( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab. 1 Comparisons of the maximum binding capacity and dissociation constant of glucocorticoid receptor among groups ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数/ 只	受体结合容量/ ( $\text{fmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	解离常数/ ( $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
正常组	20	308.70 ± 26.25	5.29 ± 0.94
模型组	16	328.68 ± 51.66	8.92 ± 2.33 <sup>##</sup>
假手术组	20	332.65 ± 34.71	6.07 ± 0.84 <sup>▲▲</sup>
克拉霉素组	18	309.45 ± 42.82	5.58 ± 1.22 <sup>▲▲</sup>
鼻渊舒组	18	321.13 ± 37.89	5.92 ± 1.68 <sup>▲▲</sup>

注:与正常组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

霉素组比较无显著差异 ( $P > 0.05$ ),提示鼻渊舒与克拉霉素组糖皮质激素受体转录激活能力无显著变化。见表2。

**表2 各组糖皮质激素受体转录激活能力比较**  
( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab. 2 Assessment of transcriptional activation function of glucocorticoid receptor among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数/只	CAT活性/( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
正常组	20	12.34 ± 1.34
模型组	16	9.82 ± 1.41 <sup>##</sup>
假手术组	20	12.44 ± 1.38 <sup>▲▲</sup>
克拉霉素组	18	10.98 ± 1.19 <sup>##▲▲</sup>
鼻渊舒组	18	11.59 ± 1.25 <sup>▲▲</sup>

注:与正常组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ;与假手术组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

#### 4 讨论

慢性鼻-鼻窦炎 (chronic rhinosinusitis) 是一种常见慢性炎症性疾病,反复发作,迁延不愈,严重影响健康。许多证据显示慢性鼻-鼻窦炎的发生、发展是多因素相互作用的结果,在此过程中,存在由免疫活性细胞及其释放的多种细胞因子相互作用导致持续性炎症性反应的复杂关系<sup>[4-5]</sup>。

鼻渊舒口服液为临床应用多年的常用鼻科中成药,主要由辛夷、苍耳子、栀子、黄芪、白芷、黄芩、柴胡、薄荷、细辛、川木通、川芎等组成。其味甘、微苦,具有清热益气通窍的功效。方中黄芩、栀子清热燥湿泻火。黄芪补中益气固表。辛夷、苍耳子、白芷、柴胡、细辛、薄荷等辛散风邪,开通鼻窍。川木通、川芎祛风利湿。目前该药被临床广泛用于慢性鼻-鼻窦炎的治疗,多中心随机对照试验证实其对慢性鼻-鼻窦炎具有良好的治疗效果<sup>[6]</sup>。

糖皮质激素具有抗炎、免疫抑制等作用,其生物学效应依赖于糖皮质激素受体<sup>[1]</sup>。糖皮质激素

受体既是激素核受体,又是重要的核转录因子,调控了多种基因表达<sup>[7]</sup>。失活状态的糖皮质激素受体其配体结合区 (ligand binding domain, LBD) 结合有热休克蛋白,当糖皮质激素与糖皮质激素受体的LBD结合后,热休克蛋白解离,糖皮质激素受体活化并移位到核内<sup>[8]</sup>,与靶基因DNA上的糖皮质激素调控元件及负糖皮质激素应答元件 (Negative glucocorticoid response element, nGRE) 结合,从而调控基因的转录。大量研究证实,糖皮质激素-糖皮质激素受体可抑制IL-1、TNF- $\alpha$ 等多种炎症细胞因子的生成和释放,发挥显著的抗炎作用<sup>[9-10]</sup>。Nonoyama等<sup>[11]</sup>研究发现IL-1能诱导黏附分子在内皮细胞表达,促进慢性鼻-鼻窦炎炎症组织中的多形核中性粒细胞浸润,引起鼻窦黏膜功能和形态的变化。李延忠等<sup>[12]</sup>报告,TNF- $\alpha$ 可促进白细胞向炎症区域浸润,在鼻窦慢性炎症和息肉性病变中其可激活嗜酸性细胞并提高其生存能力。因此,糖皮质激素受体与慢性鼻-鼻窦炎的发生发展及鼻窦黏膜的炎性病理改变密切相关。

自1980年代以来,在受体研究方法领域出现了点突变,单克隆抗体、荧光和酶等方法,但这些方法都不能检测受体亲和力。至今,研究受体亲和力和受体数量最基本的方法仍然是受体的放射性配基结合分析 (Radioligand Binding Assay of Receptors, RBA),其具有灵敏度高、特异性强的优点<sup>[13]</sup>。因此,本实验利用<sup>3</sup>H-Dex作为放射配基进行多点结合饱和实验,观察了各组鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体的受体结合容量及解离常数的变化。受体结合容量反映了能够与配体结合的受体数量,解离常数反映了受体与其配体的亲和力即结合能力,解离常数与亲和力呈负相关,解离常数越低,受体与配体的亲和力越高,结合能力越强。本研究结果显示:模型组糖皮质激素受体的解离常数较正常组显著升高 ( $P < 0.01$ ),鼻渊舒及克拉霉素组糖皮质激素受体的解离常数显著低于模型组 ( $P < 0.01$ ),与正常组比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。提示慢性鼻-鼻窦炎时,鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体与糖皮质激素的亲和力下降,鼻渊舒可提高鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体与糖皮质激素的亲和力,加强鼻窦黏膜上皮的抗炎作用。

此外,糖皮质激素的抗炎等作用除与糖皮质激素受体的数量及亲和力有关外,还与糖皮质激素受体在细胞核内的转录激活能力有关<sup>[14]</sup>。质粒pMTV-CAT是糖皮质激素受体、雄激素受体等的报

告载体,其启动子含有多种激素效应元件,氯霉素乙酰转移酶(CAT)为其报告基因,当细胞转染了此质粒后,只要体系中存在糖皮质激素-糖皮质激素受体,细胞中就会有CAT生成。因此,通过检测CAT的活性变化就能准确地了解糖皮质激素受体的转录激活能力<sup>[15]</sup>。本研究发现慢性鼻-鼻窦炎模型组鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体转录激活能力较正常及假手术组显著降低,提示慢性鼻-鼻窦炎时存在糖皮质激素受体的转录激活能力下降。鼻渊舒组糖皮质激素受体转录激活能力较模型组显著增高,提示鼻渊舒治疗慢性鼻-鼻窦炎亦与其增强糖皮质激素受体的转录激活能力有关。

总之,本研究发现慢性鼻-鼻窦炎时存在鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体的受体亲和力及转录激活能力下降,鼻渊舒可通过改善鼻窦黏膜上皮糖皮质激素受体亲和力、转录激活能力等功能,干预鼻窦黏膜上皮慢性炎症,其机制有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Ito K, Chung K F, Adcock I M. Update on glucocorticoid action and resistance[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(3): 522-543.
- [2] 林 彬, 王挥戈. 窦口不完全堵塞加金黄色葡萄球菌诱导的兔慢性鼻-鼻窦炎模型[J]. 汕头大学医学院学报, 2004, 17(3): 163-164.
- [3] 朱天民, 周 桦, 李 辉. 鼻渊舒口服液对兔慢性鼻-鼻窦炎模型IL-8、TNF- $\alpha$ 影响的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(4): 759-761.
- [4] Benninger M S, Ferguson B J, Hadley B J, et al. Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003, 129(3 Suppl): S1232.
- [5] Meltzer E O, Hamilos D L, Hadley J A, et al. Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004, 131(Suppl): 6.
- [6] 梁传余, 温 蓓, 郑 艳, 等. 鼻渊舒口服液改善慢性鼻窦炎/鼻息肉鼻内窥镜手术预后的多中心随机对照试验[J]. 中国循证医学杂志, 2004, 4(6): 377-381.
- [7] Kumar R, Thompson E B. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure; function relationship[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, 94(5): 383-394.
- [8] Pratt W B, Galigniana M D, Morishima Y, et al. Role of molecular chaperones in steroid receptor action[J]. *Essays Biochem*, 2004, 40(3): 41-58.
- [9] Caldenhoven E, Liden J, Wissinl S. et al. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids[J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 9(4): 401-412.
- [10] De-Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: Negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors[J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 109(1): 16-22.
- [11] Nonoyama T, Harada T, Shinogi J, et al. Immunohistochemical localization of cytokines and cell adhesion molecules in maxillary sinus mucosa in chronic sinusitis[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2000, 27(1): 51-58.
- [12] 李延忠, 房振胜, 杜志华, 等. 促炎细胞因子在慢性鼻窦炎发病中的作用[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2003, 17(2): 68-70.
- [13] 吕宝璋, 卢 建, 安明榜. 受体学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2000: 299-320.
- [14] Vanderbilt J N, Miesfeld R, Maler B A, et al. Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity[J]. *Mol Endocrinol*, 1987, 1(1): 68-74.
- [15] Iyama K, Zhang Shimin, Lo S C. Effects of mycoplasmal LAMPs on receptor responses to steroid hormones in mammalian cells[J]. *Curr Microbiol*, 2001, 43(3): 163-169.