

杨居崩,赵显芳,聂发龙,等. 反复冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫屏障功能的影响及中医解表方的作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 715-723.

Yang JB, Zhao XF, Nie FL, et al. Effect of the superficies-resolving formula of traditional Chinese medicine on cold-warm cycle stimulation and nasal mucosal immune barrier function in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 715-723.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.002

反复冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫屏障功能的影响 及中医解表方的作用研究

杨居崩,赵显芳,聂发龙,肖纯,代蓉,李秀芳*

(云南中医药大学,昆明 650500)

【摘要】 目的 探讨反复冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫屏障功能的影响,考察中医常用解表方麻黄汤和银翘散的作用。**方法** 将SD大鼠置于-15℃ 1 h,再转入25℃ 30 min,冷-热交替刺激4次,末次刺激后检测不同时间点鼻黏膜中IgA蛋白表达水平,检测1 d后鼻腔灌洗液中溶菌酶、sIgA及PGE2含量,血清中的炎症因子含量;冷-热刺激后第9天,再次给予相同条件刺激,分别于末次刺激后1~11 d检测鼻黏膜中IgA蛋白动态变化,鼻腔灌洗液中溶菌酶、PGE2动态变化,血清中炎症因子动态变化,再次刺激1 d后鼻腔灌洗液中sIgA含量;解表方麻黄汤2.43 g生药/kg BW水煎液、银翘散33.48 g生药/kg BW水煎液对两轮冷-热刺激的大鼠进行干预,经第二轮冷-热刺激24 h后检测相应指标。**结果** 反复冷-热刺激后,大鼠鼻黏膜IgA蛋白表达在刺激后1、3 d明显降低,随后逐渐上升,刺激后7 d恢复正常;刺激后1 d sIgA明显降低,溶菌酶及炎症因子无明显变化。当大鼠再次受到冷-热刺激后,鼻黏膜IgA蛋白表达显著下降,鼻腔灌洗液中溶菌酶及PGE2的含量明显降低;血清中TNF- α 、PGE2、IL-1 β 及IL-6的含量显著升高。麻黄汤和银翘散干预后,两方均可升高大鼠鼻黏膜中IgA蛋白表达及鼻腔灌洗液中sIgA的含量,银翘散还可升高溶菌酶含量,降低血清的TNF- α 、IL-1 β 含量。**结论** 反复冷-热刺激可导致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能下降,血清中多种炎症因子或炎症介质释放增加,麻黄汤和银翘散均可提高大鼠鼻黏膜免疫屏障功能,麻黄汤增加IgA含量的作用较明显,银翘散减少炎症因子的作用更明显。

【关键词】 冷-热刺激;鼻黏膜免疫;炎症;解表方

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)06-0715-09

Effect of the superficies-resolving formula of traditional Chinese medicine on cold-warm cycle stimulation and nasal mucosal immune barrier function in rats

YANG Jubeng, ZHAO Xianfang, NIE Falong, XIAO Chun, DAI Rong, LI Xiufang*

(Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Corresponding author: LI Xiufang. E-mail:sofinelxf@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of cold-warm cycle stimulation on nasal mucosal immune barrier function in rats and determine the difference between Mahuang decoction and Yinqiao powder, which are commonly used in traditional Chinese medicine. **Methods** For cold-warm cycle stimulation, SD rats were exposed to four cycles of -15℃ for 1 hour and then 25℃ for 30 minutes. At different time points after the last stimulation, the protein expression of IgA in the

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860724),云南省科技厅-中医联合专项项目(202001AZ070001-001,2019FF002(-054))。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81860724), Yunnan Provincial Department of Science and Technology(202001AZ070001-001, 2019FF002(-054))。

[作者简介] 杨居崩(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理与应用研究。Email:1742312505@qq.com

[通信作者] 李秀芳(1978—),女,教授,硕士生导师,研究方向:中药药理与应用研究。Email:sofinelxf@163.com

nasal mucosa was detected by Western blot. Seven days after the first cold-warm cycle stimulation, the rats were re-subjected to cold-warm cycle stimulation under the same conditions. The dynamic changes in IgA protein expression in the nasal mucosa, lysozyme and prostaglandin E2 (PGE2) levels in nasal lavage fluid and PGE2, TNF- α , IL-6 and IL-1 β serum contents were detected on days 1 ~ 11 after the last stimulation. The rats were randomly divided into negative control, model, Mahuang decoction and Yinqiao powder groups. After repeated cold-warm stimulation for 6 hours, the rats in the negative control group and model group were given distilled water, the Mahuang decoction group was given 2.43 g crude drug/kg body weight Mahuang decoction, and the Yinqiao powder group was given 16.74 g crude drug/kg body weight Yinqiao powder once a day for 7 days 30 minutes after the last stimulation. Except for the negative control group, the other groups were re-subjected to repeated cold-warm stimulation, and the medicines were given twice at 6 and 22 hours after stimulation. Nasal lavage fluid was prepared, nasal mucosal tissue was extracted, and blood was obtained for detecting the corresponding indexes at 24 hours. **Results** After repeated cold-warm cycle stimulation, IgA protein expression in the nasal mucosa was significantly decreased at days 1 and 3 and then gradually increased and returned to normal on day 7. When rats were re-stimulated by cold-warm cycles, IgA protein expression in the nasal mucosa was significantly decreased, and the amounts of lysozyme and PGE2 in nasal lavage fluid were significantly decreased on days 1 and 3. The serum level of TNF- α remained high, and the contents of PGE2 and IL-1 β were significantly increased on days 1 and 3. In contrast, the IL-6 content only increased on day 1 after stimulation. Both Mahuang decoction and Yinqiao powder interventions increased IgA protein expression in the nasal mucosa and sIgA content in nasal lavage fluid. Yinqiao powder also increased the amount of lysozyme in nasal lavage fluid and decreased the serum contents of TNF- α and IL-1 β . **Conclusions** Repeated cold-warm stimulation decreases the function of the nasal mucosal immune barrier and increases the release of several types of inflammatory factors in rats. Mahuang decoction and Yinqiao powder improve the function of the nasal mucosal immune barrier. Mahuang decoction increases the IgA content, and Yinqiao powder reduces inflammatory factors to a greater extent.

【Keywords】 cold-warm cycles stimulation; nasal mucosal immunity; inflammation; superficies-resolving formula

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

近年来,随着 SARS 病毒^[1-2]、MERS 病毒^[3-4]、H1N1 流感病毒^[5-6]、H7N9 禽流感病毒^[7-8]的相继肆虐,目前,新型冠状病毒肺炎在全球流行^[9-13],呼吸系统感染性疾病的防治引起了全世界广泛的关注,这些高致病性病毒的共同特点是均可由呼吸道进入机体进而引发疾病,并且它们的传播途径也主要是呼吸道,其中肺炎等严重的下呼吸道感染(lower respiratory tract infection, LRTI)往往始于上呼吸道感染(upper respiratory tract infection, URTI)研究证实^[12],冠状病毒及流感病毒引起的严重感染均与呼吸道黏膜屏障结构破坏或功能低下密切相关,提高呼吸道黏膜屏障的防御能力是防治呼吸系统感染性疾病的重要途径之一。上呼吸道覆盖于除鼻前庭外鼻腔结构的鼻黏膜,直接与外界接触,是机体与吸入抗原及病原体接触的第一个部位,也是机体天然免疫系统的重要组成部分,其不仅具有一般性的机械屏障作用,还参与体液免疫和细胞免疫过程,是执行局部非特异性免疫功能的主要场所。鼻黏膜免疫屏障的功能易受多种因素的影响,其中,温度变化的刺激尤其重要。研究表明^[14-15],暴露于寒冷的气候环境中会增加机体对普通感冒的易感性,其原因与寒冷刺激引起机体免疫功能抑

制,病毒在低温环境下更容易复制等因素有关^[16]。为进一步考察温度变化的刺激对 SD 大鼠鼻黏膜局部免疫功能及机体炎症反应的影响,本实验采用冷-热循环刺激的方式干预 SD 大鼠,检测其鼻黏膜免疫屏障相关效应分子的变化,并同时考察了循环系统中炎症因子的变化。

解表方是中医临床治疗表证的常用方剂,由于中医表证症状的描述与现代医学的 URTI 症状非常相似,故中医常用解表方治疗上呼吸道感染,并取得了较好的效果。课题组前期研究发现解表方麻黄汤和银翘散均可提高寒冷所致上呼吸道黏膜屏障功能低下模型小鼠唾液中 sIgA 的含量,对鼻腔接种乙型溶血性链球菌感染小鼠有生存保护作用^[17],提示,两个解表方治疗上呼吸道感染的机制与其提高上呼吸道黏膜免疫功能有关。因此在本实验中同时对这两个解表方的作用进行了考察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

120 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重 180 ~ 200 g,购于成都达硕实验动物有限公司【SCXK(川)

2020-030】，饲养于云南中医药大学动物实验室【SYXK(滇)K2017-0005】，饲养期间各组大鼠自由饮水，饲喂普通维持饲料由成都达硕实验动物有限公司提供。饲养环境：昼夜各半循环照明，湿度恒定，温度控制在 22 ~ 25℃。所有操作均符合云南中医药大学实验动物伦理学要求（审批号：R-082018034）。

1.1.2 主要试剂与仪器

BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (Beyotime, P0010), RIPA 裂解液 (强) (Beyotime, P0013B), 吐温-20 (Biofroxx, 1247ML100), 过硫酸胺 (Sangon Biotech, A600072-0025), 10% SDS (Sangon Biotech, B548118), Tris (Genview, BT350-500G), 四甲基乙二胺 (Cellcook, A100761-0100), 甘氨酸 (Biofroxx, 1275GR5009), DTT (Sangon Biotech, A620058-0025), 1 mol/L Tris-HCL 缓冲液 (Solarbio, T1020), 1.5 mol/L Tris-HCL 缓冲液 (Solarbio, T1010), 30% 丙烯酰胺缓冲液 (Solarbio, A1010), Anti-IgA (Novus Biologicals, NB7501); Anti-Goat (Proteintech, SA00001-4), Anti-Rabbit (Proteintech, SA00001-2), Anti-beta Actin (Proteintech, 20536-1-AP), 溶菌酶 (南京建成生物工程研究所, A050-1-1), PGE2 (南京建成生物工程研究所, H099-1), TNF- α (南京建成生物工程研究所, H052-1), IL-1 β (南京建成生物工程研究所, H002), IL-6 (南京建成生物工程研究所, H007-1-2), sIgA (南京建成生物工程研究所, H108-2)。

酶标仪 (Tecan, Infinite M200 PRO, 瑞士), 垂直电泳仪 (Bio-Rad, EPS-301, 美国), 湿转仪 (Bio-Rad, 18113002, 美国), UVP 凝胶成像分析系统 (Bio Spectrum, 美国), 分析天平 (Precisa, XS125A, 瑞士), 冰箱 (青岛海尔, BCD-392MNE, 中国)。

1.1.3 实验药物

银翘散：按《方剂学》^[18] 配伍比例，称取银翘散，全方除薄荷、荆芥外，12 倍水浸泡 30 min，煎煮 15 min，在 10 min 时加入薄荷、荆芥。纱布滤过，再经真空抽滤后液体在 40° 旋蒸至所需浓度相应体积。大鼠的给药剂量为临床等效量 (16.74 g 生药/kg 体重) 的 2 倍 (33.48 g 生药/kg 体重)。

麻黄汤：按《方剂学》^[18] 配伍比例，称取麻黄汤，10 倍水浸泡全方 30 min，先煎麻黄 20 min，再与余药共煎 30 min，纱布滤过，再经真空抽滤后液体在 55° 旋蒸至所需浓度相应体积。大鼠的给药剂量为

换算成人临床等效量 2.43 g 生药/kg 体重。

1.2 方法

1.2.1 单轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

参考文献^[19]稍作修改，取雄性 SD 大鼠 54 只，随机分为阴性对照组、模型组。造模前禁食不禁水 12 h，正常组不予任何刺激；模型组将动物先置于 -15℃ 环境中 1 h，再转移入 25℃ 环境 30 min，循环 4 次，造模结束后恢复进食。模型组于寒冷刺激后 0、6 h、1、3、5、7、9、11 d 每个时间点取 6 只动物，常规方法制备鼻黏膜组织、血清、鼻腔灌洗液，用 Western Blot 法检测鼻黏膜组织中 IgA 的蛋白表达，以 IgA 蛋白表达最低的时间点，ELISA 试剂盒检测大鼠鼻腔灌洗液中溶菌酶、sIgA 及 PEG2 含量，及血清中的 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。

1.2.2 两轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

取雄性 SD 大鼠 42 只，随机分为阴性对照组、模型组。造模前禁食不禁水 12 h，正常组不予任何刺激；各模型组将动物先置于 -15℃ 环境中 1 h，再转移入 25℃ 环境 30 min，循环 4 次，造模结束后恢复进食，各组动物在刺激结束后第 9 天，再次采用相同的冷-热刺激条件刺激大鼠，各组动物于再次刺激后 1、3、5、7、9、11 d 每个时间点取 6 只动物，常规方法制备鼻黏膜组织、血清及鼻腔灌洗液，Western Blot 法检测鼻黏膜组织 IgA 的蛋白表达，ELISA 试剂盒检测鼻腔灌洗液中溶菌酶、sIgA 及 PEG2 的含量，以及血清中 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。

1.2.3 解表方对两轮冷-热刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能下降的影响

取雄性 SD 大鼠 24 只，随机分为阴性对照组、模型组、银翘散组和麻黄汤组。造模前禁食不禁水 12 h，正常组不予任何刺激；其余各组进行首次寒冷刺激，在造模 6 h 后，正常组和模型组灌胃给予蒸馏水 (1 mL/100 g)，银翘散组和麻黄汤组给予相应的药物 (1 mL/100 g)，连续给予 7 d，每天 1 次，在第 9 天时进行第 2 次寒冷刺激，阴性对照组和模型组在第 2 次寒冷刺激后 6 h 后灌胃给予蒸馏水，银翘散组和麻黄汤组给予相应的药物，22 h 时再灌胃给予受试物 1 次，24 h 时按常规方法制备血清、鼻腔灌洗液和鼻黏膜组织。鼻黏膜组织用于检测 IgA 的蛋白表达，大鼠鼻腔灌洗液用于检测溶菌酶、sIgA 及

PGE2 的含量,血清用于检测血清中 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。

1.3 统计学分析

实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析法 (One-way analysis of variance ANOVA),方差齐者采用 LSD 法检验,方差不齐者采用 Tamhane's 法检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。数据统计用 SPSS 26.0,作图用 GraphPad Prism 9 软件。

2 结果

2.1 单轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

结果显示,SD 大鼠在 -15°C 环境中 1 h,再转移入 25°C 环境 30 min,循环 4 次刺激后,随着时间的延长,鼻黏膜中 IgA (图 1a) 蛋白表达持续下降 ($P < 0.05$);单轮冷-热刺激后 1 d,与阴性对照组相比,模型组大鼠鼻腔灌洗液中 sIgA (图 1b) 的含量降低 ($P < 0.05$),而溶菌酶、PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β (图 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h) 无明显差异 ($P < 0.05$)。

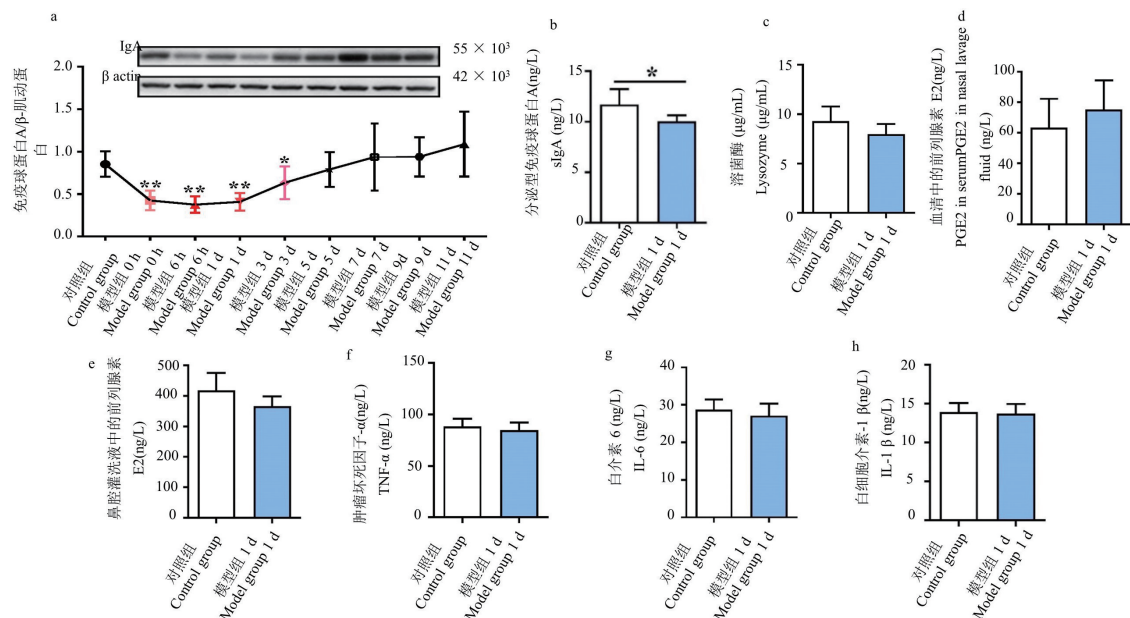
2.2 两轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

结果显示,大鼠在单轮冷-热刺激后第 9 天,对

大鼠进行再次刺激后,随着时间的延长,大鼠鼻黏膜中 IgA (图 2a) 蛋白表达持续下降 ($P < 0.05$),刺激后 1、3、11 d 时鼻腔灌洗液中溶菌酶 (图 2b) 的含量明显低于对照组动物 ($P < 0.05$);刺激后 1 d 时鼻腔灌洗液中 sIgA (图 2c) 含量明显高于对照组动物 ($P < 0.05$);与阴性对照组相比,1、3 d 时模型组血清中 PGE2 (图 2d) 的含量明显高于对照组动物 ($P < 0.05$);而鼻腔灌洗液中的 PGE2 (图 2e),1、3 d 时含量明显低于对照组 ($P < 0.05$);血清中的 TNF- α (图 2f) 含量持续上升,1、3、5、7、11 d 时血清中 TNF- α 的含量明显高于对照组 ($P < 0.05$);刺激后 1、11 d 时血清中 IL-6 (图 2g) 的含量明显高于对照组动物 ($P < 0.05$);1、3、11 d 时血清中 IL-1 β (图 2h) 的含量明显高于对照组 ($P < 0.05$) (见图 2)。

2.3 单轮刺激与两轮刺激大鼠鼻黏膜组织 IgA 蛋白含量的动态变化结果对比

为了比较 SD 大鼠受到单轮冷-热刺激与两轮冷-热刺激后,鼻黏膜中 IgA 蛋白表达的差异,结果显示,SD 大鼠再次受到刺激后,随着时间的延长,鼻黏膜中 IgA 蛋白表达持续下降,恢复速率更慢,1、3、9 d 鼻黏膜中 IgA 蛋白明显低于单轮刺激动物 ($P < 0.05$) (见图 3)。



注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 单轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effects of single-cycle cold-warm stimulation on immune function of nasal mucosa and serum inflammatory indexes in rats

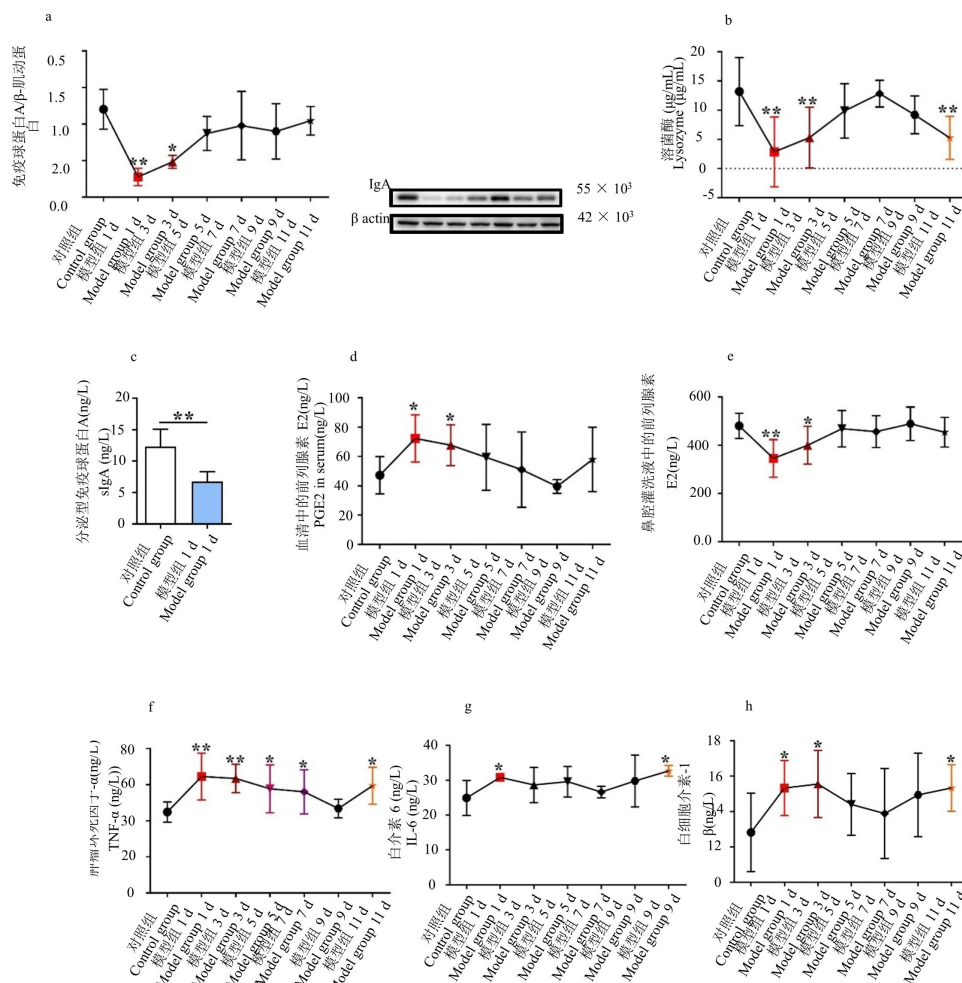
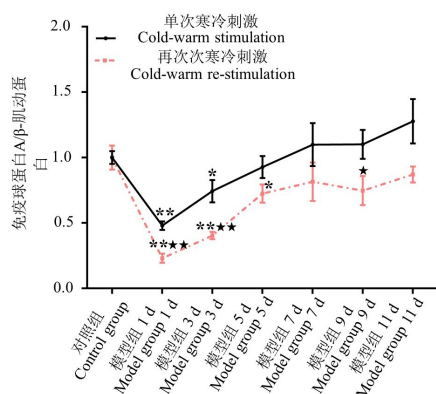


图2 两轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

Figure 2 Effects of two rounds of cold-warm stimulation on immune function of nasal mucosa and serum inflammatory indexes in rats



注:与单次寒冷刺激相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 单轮刺激与两轮刺激大鼠鼻黏膜组织 IgA 蛋白含量的动态变化结果对比

Note. Compared with cold-warm stimulation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

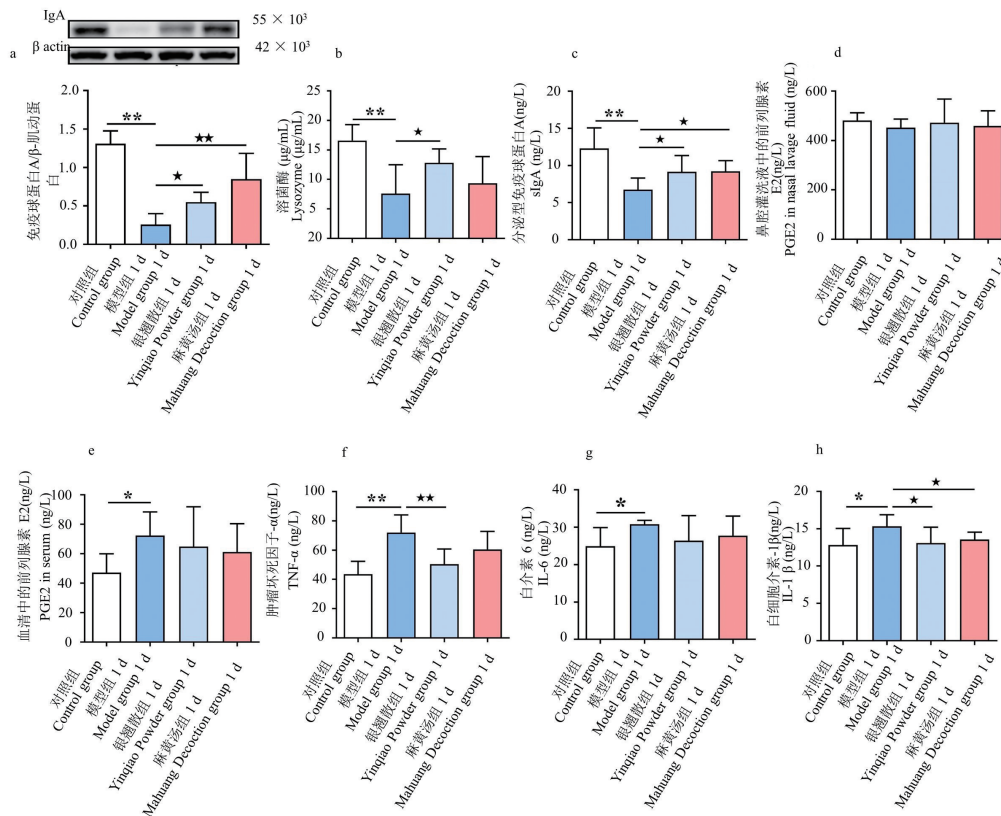
Figure 3 Comparison of dynamic changes of IgA protein content in nasal mucosa between single-round stimulation and two-round stimulation in rats

2.4 解表方对两轮冷-热刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能下降的影响

结果显示,与阴性对照组比较,模型组大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达、鼻腔灌洗液中溶菌酶和 sIgA 明显降低($P < 0.05$),而血清中的炎症因子 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,银翘散组大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白表达、鼻腔灌洗液中溶菌酶含量和 sIgA 含量均明显升高,血清中的炎症因子 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量均明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,麻黄汤组大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白表达、鼻腔灌洗液中的 sIgA 含量均明显升高,而血清中仅 IL-1 β 含量下降, PGE2、TNF- α 、IL-6 含量无明显差异($P > 0.05$)(见图 4)。

3 讨论

URTI 常发生于季节交替之时^[20-22],其症状为



注:与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 4 解表方对两轮冷-热刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能下降的影响

Note. Compared with Model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

Figure 4 Effect of superficies-resolving formulas on the decline of nasal mucosal immune barrier function induced by two rounds of cold-warm stimulation in rats

鼻塞、流涕、喉咙痛、咳嗽以及打喷嚏等^[23-24],为自限性疾病,但可发展为肺炎、支气管炎等严重的LRTI,特别是老人、婴幼儿以及具有潜在疾病的人可能造成致命后果^[25-27],研究表明,大多数呼吸道感染具有季节性。在温带地区,URTI在秋季和春季出现的频率增加,并在整个冬季高度流行^[22,28]。冬季寒冷、干燥的气候特点是呼吸道感染增加的主要驱动因素,可促使病毒稳定性增加并加快传播,削弱宿主的免疫系统^[29-31],如2002~2003年重症急性呼吸综合征(SARS-CoV)和最近出现的新型冠状病毒肺炎(SARS-CoV-2)等^[32-35]进一步表明了冬季环境容易促进各种呼吸道病毒感染的传播,并在健康人群中高度流行,研究表明^[36-37]人体暴露于寒冷环境中会增加呼吸道感染的风险及其严重程度,每年冬季都会因气温的下降而导致死亡率和发病率的大幅上升,其死亡率比其他季节平均高出26%,其中24%的人死于呼吸系统疾病^[38]。另

外平均气温每降低1℃,冬季死亡人数就增加8000人^[39]。根据英国230名全科医生在1970年8月至1991年7月期间统计的每万名登记病人的发病率数据显示^[40],随着气温的下降,流感样疾病的发病率增加,发病高峰出现在2月份平均温度最低的时期,其最大的因素是呼吸冷空气会导致气道降温,从而导致呼吸道上皮温度下降,并降低局部呼吸防御功能,如降低粘液纤毛清除率和抑制白细胞吞噬,最终导致呼吸道感染^[41-42]。呼吸道黏膜免疫系统是机体抵御经口鼻入侵病原体的第一道防线,鼻黏膜作为RMIS的重要组成部分,也是病原体入侵的首个接触部位,鼻黏膜免疫功能低下是URTI发生的重要原因,也与URTI反复发作密切相关,故维持鼻黏膜屏障功能的完整性对于URTI防治具有重要意义。结合临床的这些研究报道,本实验探讨了反复冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫屏障功能的影响,并考察了中医常用解表方麻黄汤和银翘散的作用。

sIgA 作为黏膜免疫系统的主要效应分子,可通过限制病原体的上皮定植,防止病原体进入黏膜上皮,保护黏膜表面免受环境病原体和抗原的侵害^[43-45]。溶菌酶是体液中的非特异性杀菌物质,可反映机体非特异性免疫机能的水平,溶菌酶含量下降,则机体局部抗菌、抗感染能力下降^[46-47]。当受到反复的冷-热刺激后,SD 大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白表达明显下降,在刺激后的第 1 天表达最低,此时鼻腔灌洗中分泌型的 sIgA 显著下降,但溶菌酶含量无明显变化,血清中炎症介质 PGE2 及炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 也都无明显变化,在刺激后的 3 d 内,SD 大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白均呈低表达,但第 3 天后开始呈上升趋势,至第 7 天则完全恢复至正常水平,提示,在短暂的反复冷-热刺激后,会使得鼻黏膜的免疫屏障功能暂时低下,但此时机体的炎症反应不明显。

研究显示,小鼠在初次感染细菌或病毒性肺炎后即使被治愈,再次感染肺炎的机率也会明显升高,会出现免疫系统对相同致病因素的反应性下降的现象^[48]。在本实验研究中,大鼠受到单轮冷-热刺激后 7 d 鼻黏膜中 IgA 蛋白表达就能恢复正常,那如果大鼠再次受到相同条件的冷-热刺激时,大鼠鼻黏膜免疫效应分子 IgA 是否能够再次在短时间内恢复正常呢?为了回答这个问题,大鼠在单轮冷-热刺激后的第 9 天,对大鼠进行相同条件的再次冷-热刺激,结果发现,再次刺激后,随着时间的延长,大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达持续下降,刺激后 1、3、9 d 鼻黏膜中 IgA 蛋白表达明显低于单轮冷-热刺激,虽然鼻黏膜中 IgA 蛋白表达在 3 d 后也呈上升趋势,但较单轮冷-热刺激后上升速率更慢,至第 11 天时,鼻黏膜中 IgA 蛋白表达也未恢复正常,同时,再次的冷-热刺激后,模型大鼠鼻腔灌洗液中 sIgA 和溶菌酶的含量均显著下降,血清中 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 均显著升高,提示,大鼠在受到冷-热刺激后,即使鼻黏膜中 IgA 蛋白表达恢复正常,再次受到冷-热刺激后,鼻黏膜免疫系统功能下降会更明显,机体的防御能力下降,这可能与机体受到反复的冷-热刺激后会造成上呼吸道感染的易感性提高的原因相关。

银翘散源于《温病条例》,由清代温病学家吴鞠通创制,是中医用于治疗风热表证的代表方,使用

至今已有两百多年历史,具有辛凉透表、清热解毒的功效,主要用于温病初起,微恶风寒,头痛口渴,咳嗽咽痛,舌尖红,苔薄白或薄黄,脉浮数等。麻黄汤源于张仲景所著《伤寒论》,是中医用于治疗风寒表证的代表方,具有发汗解表、宣肺平喘、利水消肿的功效,主治外感风寒表实证,恶寒发热,头身疼痛,无汗而喘,舌苔薄白,脉浮紧等。由于两个解表方的主治病症与现代医学中 URTI 的临床症状非常相似,因此,两个解表方被广泛用于 URTI 的治疗,在临床上显示了较好的疗效。本研究的结果显示,反复冷-热刺激后,SD 大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白表达明显下降,鼻腔灌洗中分泌型的 sIgA 显著下降,提示鼻黏膜的免疫屏障功能下降,分别给予麻黄汤和银翘散后,均能升高鼻黏膜 IgA 的蛋白表达和鼻腔灌洗中 sIgA 的含量,并且以麻黄汤提高鼻黏膜 IgA 的蛋白表达的作用更加明显。提示,麻黄汤侧重于促进鼻黏膜 IgA 的蛋白表达来发挥提高鼻黏膜免疫功能的作用。银翘散组溶菌酶的含量升高,麻黄汤组无明显变化,提示银翘散可通过提高 sIgA、溶菌酶的含量而发挥增强鼻腔局部非特异性免疫功能的作用。再次冷-热刺激导致 SD 大鼠多种炎症因子明显升高,银翘散和麻黄汤对大鼠鼻腔灌洗液中和血清中 PGE2 均无明显影响,但银翘散可显著降低模型大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 的含量,提示其具有减轻炎症反应的作用,麻黄汤仅能降低 IL-1 β 的含量,提示,银翘散在缓解炎症反应方面作用更为突出。本研究显示,不同药性的麻黄汤与银翘散对寒冷刺激致大鼠鼻黏膜免疫功能低下模型具有相同的作用也有不同的作用,但其具体的作用机制尚不清楚,因此在后续的研究中将对两种解表方的作用机制进行深入研究。为临床治疗 URTI 提供科学的理论依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] Zeng F, Chow KY, Leung FC. Estimated timing of the last common ancestor of the SARS coronavirus [J]. N Engl J Med, 2003, 349(25): 2469-2470.
- [2] Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, et al. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome [J]. Lancet, 2003, 362(9380): 263-270.
- [3] Memish ZA, Perlman S, Van Kerkhove MD, et al. Middle East respiratory syndrome [J]. Lancet, 2020, 395(10229): 1063-1077.

- [4] Chan JF, Lau SK, To KK, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus; another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(2): 465–522.
- [5] Mitka M. H1N1 influenza virus reassorting in pigs, poses unknown risk to human health [J]. *JAMA*, 2010, 304(6): 626–627.
- [6] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus [J]. *Nature*, 2009, 459(7249): 931–939.
- [7] Wang X, Jiang H, Wu P, et al. Epidemiology of avian influenza A H7N9 virus in human beings across five epidemics in mainland China, 2013 – 17: an epidemiological study of laboratory-confirmed case series [J]. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17(8): 822–832.
- [8] Butler D. Flu genomes trace H7N9 evolution [J]. *Nature*, 2015, 519(7542): 137.
- [9] Pascarella G, Strumia A, Piliengo C, et al. COVID-19 diagnosis and management; a comprehensive review [J]. *J Intern Med*, 2020, 288(2): 192–206.
- [10] Carfi A, Bernabei R, Landi F, et al. Persistent symptoms in patients after acute COVID-19 [J]. *JAMA*, 2020, 324(6): 603–605.
- [11] McElvaney OJ, McEvoy NL, McElvaney OF, et al. Characterization of the inflammatory response to severe COVID-19 illness [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202(6): 812–821.
- [12] Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(5): 315–328.
- [13] Yu P, Qi F, Xu Y, et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19 [J]. *Animal Model Exp Med*, 2020, 3(1): 93–97.
- [14] Mourtoukou EG, Falagas ME. Exposure to cold and respiratory tract infections [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2007, 11(9): 938–943.
- [15] Mäkinen TM, Juvonen R, Jokelainen J, et al. Cold temperature and low humidity are associated with increased occurrence of respiratory tract infections [J]. *Respir Med*, 2009, 103(3): 456–462.
- [16] Foxman EF, Storer JA, Fitzgerald ME, et al. Temperature-dependent innate defense against the common cold virus limits viral replication at warm temperature in mouse airway cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(3): 827–832.
- [17] 雷娜, 李艳, 何芳雁, 等. 解表方通过调节黏膜免疫保护上呼吸道感染模型小鼠的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(18): 174–177.
Lei N, Li Y, He FY, et al. Study on the protective effect of Jiebiao prescription on upper respiratory tract infection model mice by regulating mucosal immunity [J]. *Chin J Exp Tradit Med* Formulae, 2013, 19(18): 174–177.
- [18] 李冀. 方剂学 [M]. 高等教育出版社; 2009.
Li J. *Pharmaceutics* [M]. Higher Education Press; 2009.
- [19] Xiao MM, Pan CS, Liu YY, et al. Post-treatment with Ma-Huang-Tang ameliorates cold-warm-cycles induced rat lung injury [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 312.
- [20] Moriyama M, Hugentobler WJ, Iwasaki A. Seasonality of respiratory viral infections [J]. *Annu Rev Virol*, 2020, 7(1): 83–101.
- [21] Nam HH, Ison MG. Respiratory syncytial virus infection in adults [J]. *BMJ*, 2019, 366: l5021.
- [22] Price RHM, Graham C, Ramalingam S. Association between viral seasonality and meteorological factors [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 929.
- [23] Jackson GG, Dowling HF, Spiesman IG, et al. Transmission of the common cold to volunteers under controlled conditions. I. The common cold as a clinical entity [J]. *AMA Arch Intern Med*, 1958, 101(2): 267–278.
- [24] Barrett B, Brown RL, Mundt MP, et al. Validation of a short form Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey (WURSS-21) [J]. *Health Qual Life Outcomes*, 2009, 7: 76.
- [25] Zhang SY, Luo YP, Huang DD, et al. Fatal pneumonia cases caused by human adenovirus 55 in immunocompetent adults [J]. *Infect Dis (Lond)*, 2016, 48(1): 40–47.
- [26] Moreno-Perez D, Calvo C. Epidemiological and clinical data of hospitalizations associated with respiratory syncytial virus infection in children under 5 years of age in Spain: FIVE multicenter study [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2014, 8(2): 209–216.
- [27] Hashem M, Hall CB. Respiratory syncytial virus in healthy adults; the cost of a cold [J]. *J Clin Virol*, 2003, 27(1): 14–21.
- [28] Heikkinen T, Järvinen A. The common cold [J]. *Lancet*, 2003, 361(9351): 51–59.
- [29] Shaw SP. Seasonality and selective trends in viral acute respiratory tract infections [J]. *Med Hypotheses*, 2016, 86: 104–119.
- [30] Peci A, Winter AL, Li Y, et al. Effects of absolute humidity, relative humidity, temperature, and wind speed on influenza activity in Toronto, Ontario, Canada [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(6): e02426–18.
- [31] Shaman J, Kohn M. Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(9): 3243–3248.
- [32] Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome [J]. *Lancet*, 2003, 361(9366): 1319–1325.
- [33] Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, et al. Newly discovered

- coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome [J]. *Lancet*, 2003, 362(9380): 263–270.
- [34] Paules CI, Marston HD, Fauci AS. Coronavirus infections-more than just the common cold [J]. *JAMA*, 2020, 323(8): 707–708.
- [35] Bartoszko JJ, Siemieniuk RAC, Kum E, et al. Prophylaxis against Covid-19: living systematic review and network meta-analysis [J]. *BMJ*, 2021, 373: n949.
- [36] Mäkinen TM, Juvonen R, Jokelainen J, et al. Cold temperature and low humidity are associated with increased occurrence of respiratory tract infections [J]. *Respir Med*, 2009, 103(3): 456–462.
- [37] Sigelman CK. Age and ethnic differences in cold weather and contagion theories of colds and flu [J]. *Health Educ Behav*, 2012, 39(1): 67–76.
- [38] Ou CQ, Song YF, Yang J, et al. Excess winter mortality and cold temperatures in a subtropical city, Guangzhou, China [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77150.
- [39] Alderson MR. Season and mortality [J]. *Health trends*, 1985, 17: 87–96.
- [40] Curwen M. Excess winter mortality in England & Wales with special reference to the effects of temperature and influenza [J]. 1997.
- [41] Foxman EF, Storer JA, Fitzgerald ME, et al. Temperature-dependent innate defense against the common cold virus limits viral replication at warm temperature in mouse airway cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(3): 827–832.
- [42] Eccles R, Wilkinson JE. Exposure to cold and acute upper respiratory tract infection [J]. *Rhinology*, 2015, 53(2): 99–106.
- [43] Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(12): 821–832.
- [44] Mantis NJ, Forbes SJ. Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders [J]. *Immunol Invest*, 2010, 39(4–5): 383–406.
- [45] Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, et al. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms [J]. *Microbes Infect*, 2001, 3(12): 1021–1035.
- [46] Callewaert L, Van Herreweghe JM, Vanderkelen L, et al. Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors [J]. *Trends Microbiol*, 2012, 20(10): 501–510.
- [47] Sarkar S, Gulati K, Mishra A, et al. Protein nanocomposites: Special inferences to lysozyme based nanomaterials [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 151: 467–482.
- [48] Roquilly A, McWilliam HEG, Jacqueline C, et al. Local Modulation of antigen-presenting cell development after resolution of pneumonia induces long-term susceptibility to secondary infections [J]. *Immunity*, 2017, 47(1): 135–147.

[收稿日期] 2021-07-02