

基于 TGF- β 1/Foxp3/ROR γ t 通路探讨清窍胶囊对分泌性中耳炎大鼠的作用机制*

钟伦坤, 胡文健**, 周兴玮, 何 娴, 朱佳丽, 陈 龙,
田 柳, 邵建华, 孙永东

(西南医科大学附属中医医院 泸州 646699)

摘要:目的 基于 TGF- β 1/Foxp3/ROR γ t 通路探讨清窍胶囊对分泌性中耳炎大鼠的作用机制。方法 36 只雌性 SD 大鼠, 其中 30 只构建分泌性中耳炎大鼠模型, 造模成功后, 30 只大鼠随机分为模型组、强的松组(0.003 g/100 mL)、清窍胶囊低剂量治疗组(0.36 g/100 mL)、清窍胶囊中剂量治疗组(0.54 g/100 mL)、清窍胶囊高剂量治疗组(0.72 g/100 mL), 每组 6 只, 另 6 只设为空白对照组。治疗组分别按不同剂量灌胃给药, 模型组与空白对照组灌服相同容积的蒸馏水, 1 次/天, 连续 14 天。给药结束采血, 处死, 采样待检。苏木精-伊红染色(Hematoxylin-eosin stain, HE)染色观察各组大鼠中耳炎症细胞的变化; 酶联免疫吸附(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清白介素-4(Interleukin-4, IL-4)、 β -转化生长因子(Transforming growth factor beta, TGF- β)、白介素-6(Interleukin-6, IL-6)、 γ -干扰素(Interferon γ , IFN- γ)、白介素-10(Interleukin-10, IL-10)、白介素-17(Interleukin-17, IL-17)水平; 流式细胞技术检测脾脏和胸腺 Th17/Treg 细胞含量; 实时荧光定量 PCR 检测脾脏和胸腺组织叉头盒 P3(Forkhead Box P3, FOXP3)、IL-17、维甲酸相关核孤儿受体 γ t(Retinoic acid-related orphan receptor γ t, ROR γ t)mRNA 表达; 蛋白质免疫印迹(Western Blot, WB)检测脾脏和胸腺组织 ROR γ T、Foxp3 表达。结果 与空白组比较, 分泌性中耳炎大鼠黏膜层明显增厚, 有大量炎症细胞浸润; 且 TGF- β 、IL-6、IFN- γ 、Th17、Treg 细胞、IL-17、ROR γ T 水平明显升高, IL-10、IL-4、Foxp3 水平明显降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 清窍胶囊高剂量组可明显改善中耳炎炎症细胞浸润, 明显降低模型大鼠 TGF- β 、IL-6、IFN- γ 、IL-17 水平, 明显升高 IL-10、IL-4 水平($P < 0.05$), 并明显降低模型大鼠 Treg 细胞、ROR γ T 水平, 明显升高 Foxp3 表达($P < 0.05$)。结论 清窍胶囊可有效地调节 TGF- β /Foxp3/ROR γ t 信号通路, 进而调节 Treg 和 Th17 细胞介导的中耳炎的发生及发展, 改善分泌性中耳炎。

关键词:分泌性中耳炎 清窍胶囊 免疫失衡 大鼠

doi: 10.11842/wst.20210309009 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

分泌性中耳炎(secretory otitis media, SOM)又称粘液性中耳炎、渗出性中耳炎、卡他性中耳炎等, 多发于 2-7 岁儿童, 是一种顽固性耳科疾病, 病程长, 是儿童听力受损的最常见原因, 主要以中耳积液、听力下降、

反复发作为表现特征, 治疗不彻底或迁延不愈可引发多种严重的并发症, 严重影响患儿的言语、学习和行为问题^[1]。目前, SOM 的发病机制尚未完全明确, 其病因机制仍然存在争议, 但目前认为中耳的液-气平衡

收稿日期: 2021-03-09

修回日期: 2021-12-17

* 四川省中医药管理局-青年中医药课题资助项目(2014-k-140); 清窍胶囊治疗分泌性中耳炎的临床与实验观察, 负责人: 钟伦坤; 西南医科大学-西南医科大学附属中医医院联合课题(2018XYLE-018): 基于 Th17/Treg 细胞失衡研究清窍胶囊对分泌性中耳炎大鼠的免疫机制, 负责人: 钟伦坤。

** 通讯作者: 胡文健, 教授, 主要研究方向: 中西医结合耳鼻喉。

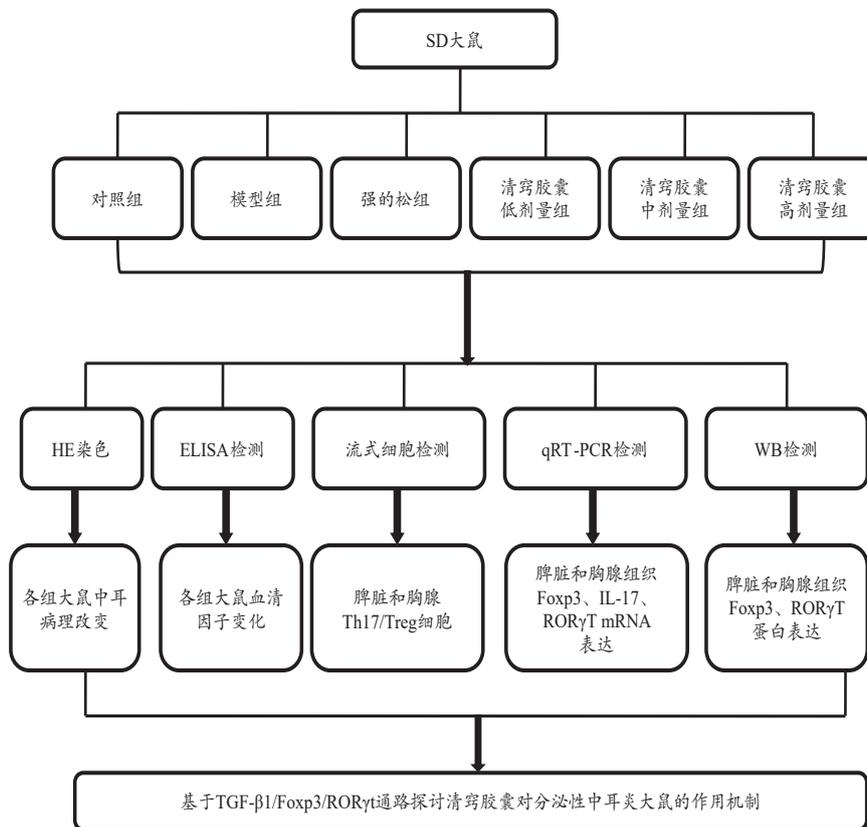


图1 实验流程图

被打破继而导致中耳积液是分泌性中耳炎疾病发展的中心环节,中耳黏膜的免疫反应类似于鼻粘膜,其通过抗原抗体结合,免疫因子的释放及下游信号一系列的瀑布级联网络效应,放大免疫反应,最终表现为中耳黏膜水肿、渗出,造成中耳积液^[2]。但对于如何快速有效的治疗SOM尚无统一的治疗方案,目前临床主要以抗感染、抗变态反应及手术治疗等为主要治疗方式^[3]。因此,寻找疗效确切的药物治疗SOM尤为重要。

清窍胶囊是我科独创治疗SOM的经验协定方药,清窍胶囊主要成分包括玄参、生地、丹参、川牛膝等,具有清热、活血化瘀及抑菌抗菌的作用,主要用于治疗肝肾不足、脾气虚弱型的SOM,2008年清窍胶囊批准生产为院内制剂,在临床上应用于SOM及咽喉炎的治疗,效果显著。SOM主要病理因素鼓膜充血、光锥消失、鼓室混浊、鼓室积液征与SOM的中医病机咽鼓管闭塞不通、鼓室腔积液而发病、耳窍失聪、湿困耳窍相契合。现代药理学研究表明清窍胶囊能改善机体免疫功能和中耳粘膜的排泄清理功能,可以达到标本兼治,减缓中耳分泌液的产生,最终吸收消失,使闭塞

的咽鼓管逐渐通畅,同时改善耳蜗微循环^[4]。但其治疗SOM的具体机制及作用机理还有待进一步研究。

T细胞功能紊乱在SOM发病中起重要作用。最近的研究表明,调节性T细胞(Regulatory T cells, Treg)和辅助性T细胞(T helper cells-17, Th17)参与了SOM的发病^[5]。转化生长因子-β1(Transforming growth factor-β1, TGF-β1)是幼稚T细胞发育为Treg细胞或Th17细胞所必需的,而IL-6将使幼稚T细胞极化为Th17细胞^[6]。叉头盒P3(Forkhead Box P3, FOXP3)是Treg细胞的关键转录因子,维甲酸相关核孤儿受体γt(Retinoic acid-related orphan receptor γt, RORγt)是Th17细胞的关键转录因子^[7]。针对SOM中Th17/Treg细胞失衡的治疗方法可能是一个突破。因此,本研究基于TGF-β1/Foxp3/RORγt通路探讨清窍胶囊对SOM大鼠的作用机制,为SOM的治疗提供依据,同时也为清窍胶囊的机制研究及今后基于网络药理学分析,系统综合地观察清窍胶囊对SOM的干预与影响奠定基础,为清窍胶囊未来的药物开发及应用研究打下更加扎实的理论基础。本文研究流程图如图1。

1 材料

1.1 实验动物

雌性SD大鼠36只,体质量 240 ± 10 g,购于成都达硕实验动物有限公司,使用许可证号:SYXK(川)2019-189,生产许可证号:SCYK(川)2020-030。

1.2 药物

清窍胶囊为医院内制剂,批准文号:川药制字Z20080310,配方为:玄参9 g、生地9 g、丹参12 g、川牛膝6 g、僵蚕4 g、当归9 g、薏苡仁18 g、豆蔻6 g、甘草9 g。强的松购自浙江仙琚制药股份有限公司,国药准字H33021207。

1.3 实验仪器和试剂

FACSCalibur 流式细胞仪(美国BD公司);sigma 3K15离心机(德国Sigma公司产品);BMJ-A型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂);SpectraMAX Plus384酶标仪(美谷分子仪器有限公司);PIKORed 96实时荧光定量(RT-PCR)仪(美国ThermoFisher);化学发光凝胶成像仪5200(上海天能科技有限公司)。

卵清蛋白(OVA)购自Sigma(美国);IL-4(货号:ZC-36402)、TGF- β (货号:ZC-37644)、IL-6(货号:ZC-36404)、IFN- γ (货号:ZC-36294)、IL-10(货号:ZC-36379)、IL-17(货号:ZC-36386)ELISA试剂盒(上海茁彩);TRIzol 试剂RNA提取试剂盒(批号:14105,Invitrogen公司);PCR扩增试剂盒(批号:AK9906, TaKaRa);Foxp3(批号:MD4713)和ROR γ T(批号:MD6907)相关抗体(Medical Discovery Leader(MDL)公司)。

2 实验方法

2.1 分泌性中耳炎大鼠模型构建

大鼠饲养于恒温(20-25) $^{\circ}\text{C}$ 、恒湿(50% \pm 5%),自然采光,自由饮水条件下。随机选取30只进行分泌性中耳炎造模^[8]:将1.2 mg卵清蛋白溶于0.6 mL PBS缓冲液配置成溶液,同时使用5.14 mg的氢氧化铝作为免疫佐剂,腹腔注射,每周1次,共2周,此过程为全身致敏阶段,2周后,用20%乌拉坦以 $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量腹腔内注射麻醉大鼠,将 $15\ \mu\text{L}$ 配置的OVA/PBS混合液经鼓膜前下方注入鼓室,24h后再次麻醉大鼠,观察鼓膜状态,注射第2次,此为耳内激发阶段。24 h后用耳内镜观察和记录鼓膜形态和中耳腔积液情况,正常大鼠鼓膜无充血,光滑透亮,锤骨柄和光锥标志清晰,鼓室

无积液。建模后可见大鼠鼓膜充血,光锥消失,鼓室混浊,鼓室积液征,建模基本成功。

2.2 试验分组及给药方法

30只分泌性中耳炎大鼠造模成功后,随机分为模型组(SOM)、强的松治疗组(PDN,0.003 g/100 mL)、清窍胶囊低剂量治疗组(QQJN-L,0.36 g/100 mL)、清窍胶囊中剂量治疗组(QQJN-M,0.54 g/100 mL)、清窍胶囊高剂量治疗组(QQJN-H,0.72 g/100 mL),每组6只,并设置健康空白对照组(Control,剩余未造模大鼠6只)。灌胃药物容积均为0.2 mL/10 g体质量,清窍胶囊高剂量溶液配成浓度为0.72 g/100 mL,清窍胶囊中剂量溶液配成浓度为0.54 g/100 mL,清窍胶囊低剂量溶液浓度为0.36 g/100 mL,强的松配成0.003 g/100 mL溶液。模型组与空白对照组灌服相同容积的蒸馏水,1次/天给药,连续给药14天。

2.3 样本采集

血样采集:给药结束后,抽取所有大鼠腹主动脉血液, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低温离心15 min,分离血清, -80°C 冰箱保存。组织样本采集:脱颈处死大鼠,取出双侧听泡,10%甲醛溶液固定;并立即分离出大鼠脾脏和胸腺,剪少量脾脏和胸腺组织,加入适量淋巴细胞分离液,充分碾磨胸腺组织至无块状物,过滤,加入1640培养基, $15\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 20°C 离心30 min,吸取淋巴细胞层,用于后续流式细胞检测。另取部分脾脏和胸腺组织,放入DEPC处理过的1.5 mL EP管中,冻存于 -80°C 冰箱,留待做WB及qRT-PCR检测。

2.4 检测指标及方法

2.4.1 HE染色观察组织病理变化

取固定的听泡,脱钙,脱水,常规石蜡包埋切片,二甲苯脱蜡15 min(5 min/次),梯度乙醇水化,1%磷酸盐缓冲液冲洗3次,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察中耳病理变化。

2.4.2 ELISA检测血清因子

将离心采集的血清,按照ELISA试剂盒说明操作检测血清IL-4、TGF- β 、IL-6、IFN- γ 、IL-10、IL-17的浓度。

2.4.3 流式细胞检测脾脏和胸腺Th17/Treg细胞

取分离好的脾脏和胸腺淋巴细胞,稀释至 1×10^8 mL,取 $100\ \mu\text{L}$ 加入流式测定管中,分别加入 $5\ \mu\text{L}$ FITC标记的CD4 McAb、 $5\ \mu\text{L}$ APC标记的IL-17 McAb或 $5\ \mu\text{L}$ FITC标记的CD4 McAb、 $5\ \mu\text{L}$ APC标记的CD25 McAb后混匀,避光孵育约20 min,Flow

Cytometry Staining Buffer 1mL 洗涤后, $1400r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, 加 PBS 洗 2 遍, 弃上清液, 加入 PBS 缓冲液, 调整细胞浓度至 1×10^6 个细胞/mL, 于 FACSCalibur 流式细胞仪检测, $CD4^+IL-17^+$ 为 Th17 含量, $CD4^+CD25^+Treg$ 细胞为 Treg 含量。

2.4.4 qRT-PCR 检测脾脏和胸腺组织 Foxp3、IL-17、ROR γ T mRNA 表达

根据制造者的说明, 使用 TRIzol[®] 试剂从脾脏和胸腺组织样本中提取总 RNA, 电泳确定 RNA 的完整性后, 互补 DNA 用 RT 试剂盒反转录。使用 SYBR Green 试剂进行 RT-PCR, GAPDH 作为内参。qPCR 引物序列为: Foxp3: 上游 5'-CACCTATGCCACCCTTATCCG-3', 下游 5'-CATGCCAGTAAACCAATGGTAGA-3', IL-17: 上游 5'-TGGAATCTCCACCGCAATG A-3', 下游 5'-TGTGGTAGTCCACGTTCCCA-3', ROR γ T: 上游 5'-CCGCTGAGAGGGCTTC A-3', 下游 5'-TGCAGGAGTAGGCCACATTACA-3', GAPDH: 上游 5'-AGGTCGGTGAACG GATTTG-3', 下游 5'-GGGGTCGTTGATG GCAACA-3'。PCR 循环条件为 95 °C、30 s; 95 °C、5 s; 60 °C、30 s; 40 个循环。记录 CT 值, 并采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析 mRNA 相对表达水平。

2.4.5 WB 检测脾脏和胸腺组织 Foxp3、ROR γ T 蛋白表达

采用 RIPA 裂解液从脾脏和胸腺组织中提取总蛋白, 应用 BCA 检测进行蛋白质定量, 使用 50 μ g 蛋白在

10% 的 SDS-PAGE 进行分离, PVDF 膜转膜, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 封闭结束后按照实验目的结合一抗 Foxp3 (1:500)、ROR γ T (1:500) 和 β -catin (1:2000) 4 °C 孵育过夜, 随后与辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的二级抗体孵育 (1:3000) 室温孵育 1h, TBST 清洗, ECL 暗室显色。显色后的蛋白使用 Bio-Rad 全功能成像系统采集图像, Image-ProPlus 分析光密度, 以 β -actin 为内参, 阴性对照组目标蛋白质相对含量为 1, 计算各组蛋白质的相对表达量, 实验重复 3 次。

2.5 统计分析

采用 SPSS 22.0 进行数据统计分析, 数据表示为平均值 \pm 标准差 ($\pm s$), 两组间均数比较采用 LSD- t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠中耳病理改变

对照组: 中耳内有连续黏膜覆盖, 单层黏膜上皮细胞排列整齐, 上皮下为薄层固有层, 内含丰富的血管及纤维细胞等, 未见明显炎性细胞浸润或纤维组织增生。模型组: 中耳内有连续黏膜覆盖, 黏膜上皮细胞严重坏死、缺失, 上皮细胞基本不可见; 黏膜层明显增厚, 大量炎性细胞浸润, 以核呈杆状的中性粒细胞和核呈圆形深染的淋巴细胞为主, 较多纤维组织增

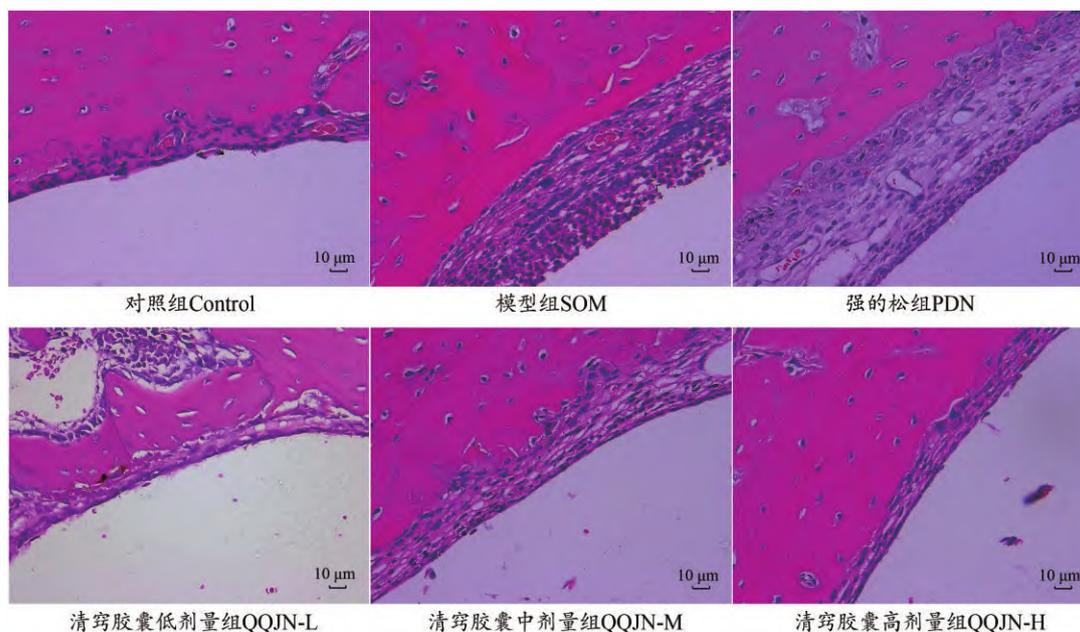


图2 各组大鼠中耳病理改变 (HE, 400 \times)

生,见核呈长梭形的纤维细胞,部分细胞坏死,见胞核崩解、碎裂,胞质溶解。强的松治疗组:中耳内有连续黏膜覆盖,单层黏膜上皮细胞排列整齐;黏膜层明显增厚,少量炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主,较多纤维组织增生,见较多核呈长椭圆形的成纤维细胞和少量纤维细胞,固有层略微水肿,见细胞之间距离显著增宽。清窍胶囊低剂量治疗组:中耳内有连续黏膜覆盖,单层黏膜上皮细胞排列整齐;黏膜层略微增厚,少量炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主,少量纤维组织增生。清窍胶囊中剂量治疗组:中耳内有连续黏膜覆盖,少量炎性细胞浸润以及极少量纤维组织增生。清窍胶囊高剂量治疗组:中耳内有连续黏膜覆盖,单层黏膜上皮细胞排列整齐;黏膜层极少量炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主,以及极少量纤维组织增生。提示清窍胶囊改善 SOM 大鼠中耳组织病理形态变化(图2)。

3.2 各组大鼠血清中 IL-4、TGF- β 、IL-6、IFN- γ 、IL-10、IL-17 水平

ELISA 检测结果显示,与空白对照组比较,模型组 TGF- β 、IL-6、IFN- γ 、IL-17 水平明显升高,IL-10、IL-4 水平明显降低($P<0.01$);经不同处理治疗后,清窍胶囊高剂量组可明显降低模型大鼠 TGF- β 、IL-6、IFN- γ 、IL-17 水平,明显升高 IL-10、IL-4 水平($P<0.05$),提示清窍胶囊抑制促炎性细胞因子的分泌(表1)。

3.3 各组大鼠胸腺、脾脏 Th17、Treg 细胞含量

流式细胞检测结果显示,与空白对照组比较,模型组大鼠胸腺、脾脏 Th17、Treg 细胞百分比明显升高($P<0.05$);经不同处理治疗后,清窍胶囊高剂量组可明显降低模型大鼠胸腺、脾脏 Treg 细胞($P<0.05$),治疗组胸腺、脾脏中 Th17 细胞含量较模型组无统计学意义($P>0.05$),提示清窍胶囊可能对 Th17/Treg 细胞失衡起到积极作用(图3-图4)。

3.4 各组大鼠胸腺、脾脏 Foxp3、IL-17、ROR γ T mRNA 表达

qRT-PCR 检测结果显示,与空白对照组比较,模型组大鼠胸腺、脾脏组织中 IL-17、ROR γ T mRNA 表达水平明显升高, Foxp3 mRNA 表达水平明显降低($P<0.01$),经不同处理治疗后,清窍胶囊高剂量组可明显降低模型大鼠胸腺、脾脏组织中 IL-17、ROR γ T mRNA 表达水平,明显升高脾脏组织中 Foxp3 mRNA 表达($P<0.05$),对胸腺组织中 Foxp3 mRNA 表达水平无统计意义($P>0.05$),提示清窍胶囊治疗后 Th17/Treg 细胞失衡有所抑制(表2)。

3.5 各组大鼠胸腺、脾脏 Foxp3、ROR γ T 蛋白表达

与空白对照组比较,模型组大鼠胸腺、脾脏组织中 ROR γ T 蛋白水平明显升高, Foxp3 蛋白水平明显降低($P<0.01$),经不同处理治疗后,强的松组、清窍胶囊高剂量组可明显降低模型大鼠胸腺、脾脏组织中

表1 各组大鼠血清中 IL-4、TGF- β 、IL-6、IFN- γ 、IL-10、IL-17 水平($\pm s, n=6$)

组别 Group	IL-4($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	TGF- β ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-6($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IFN- γ ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-17($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-10($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照组 Control	22.34 \pm 0.32	20.79 \pm 1.36	10.94 \pm 1.24	157.69 \pm 10.57	4.47 \pm 0.43	7.01 \pm 0.27
模型组 SOM	20.39 \pm 0.26*	25.49 \pm 1.61**	13.80 \pm 0.80**	180.84 \pm 6.00**	5.59 \pm 0.45**	5.61 \pm 0.44**
强的松组 PDN	21.98 \pm 0.45#	23.48 \pm 0.29	11.85 \pm 0.72#	163.29 \pm 7.93#	4.91 \pm 0.20#	6.64 \pm 0.64#
QQJN 低剂量 QQJN-L	21.19 \pm 1.11	23.87 \pm 0.75	12.43 \pm 0.69	167.36 \pm 3.91	5.05 \pm 0.18	6.36 \pm 0.57
QQJN 中剂量 QQJN-M	21.85 \pm 1.06	22.91 \pm 1.02	12.34 \pm 0.64	165.42 \pm 3.63	4.86 \pm 0.16	6.46 \pm 0.56
QQJN 高剂量 QQJN-H	22.08 \pm 1.13#	22.38 \pm 2.06#	12.22 \pm 0.97#	164.55 \pm 9.88#	4.69 \pm 0.51#	6.62 \pm 0.36#

注:模型组与空白组比较,** $P<0.01$,* $P<0.05$;治疗组与模型组比较,# $P<0.05$ 。

表2 各组大鼠胸腺和脾脏 Foxp3、IL-17、ROR γ T mRNA 表达($\pm s, n=6$)

组别 Group	胸腺 Thymus			脾脏 spleen		
	IL-17	ROR γ T	Foxp3	IL-17	ROR γ T	Foxp3
对照组 Control	1.01 \pm 0.17	1.01 \pm 0.17	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.07	1.01 \pm 0.14	1.01 \pm 0.19
模型组 SOM	1.63 \pm 0.13**	1.99 \pm 0.31**	0.63 \pm 0.19**	2.35 \pm 0.38**	1.89 \pm 0.16**	0.52 \pm 0.09**
强的松组 PDN	1.33 \pm 0.37	1.43 \pm 0.14#	0.76 \pm 0.12	1.48 \pm 0.14##	1.56 \pm 0.05##	0.78 \pm 0.04#
QQJN 低剂量 QQJN-L	1.59 \pm 0.12	1.87 \pm 0.16	0.58 \pm 0.17	2.13 \pm 0.51	1.82 \pm 0.07	0.53 \pm 0.13
QQJN 中剂量 QQJN-M	1.31 \pm 0.25	1.52 \pm 0.12	0.72 \pm 0.20	1.63 \pm 0.31	1.79 \pm 0.15	0.68 \pm 0.13
QQJN 高剂量 QQJN-H	1.22 \pm 0.16#	1.48 \pm 0.34#	0.74 \pm 0.06	1.56 \pm 0.30#	1.77 \pm 0.04#	0.70 \pm 0.12#

注:模型组与空白组比较,** $P<0.01$;治疗组与模型组比较,# $P<0.05$ 。

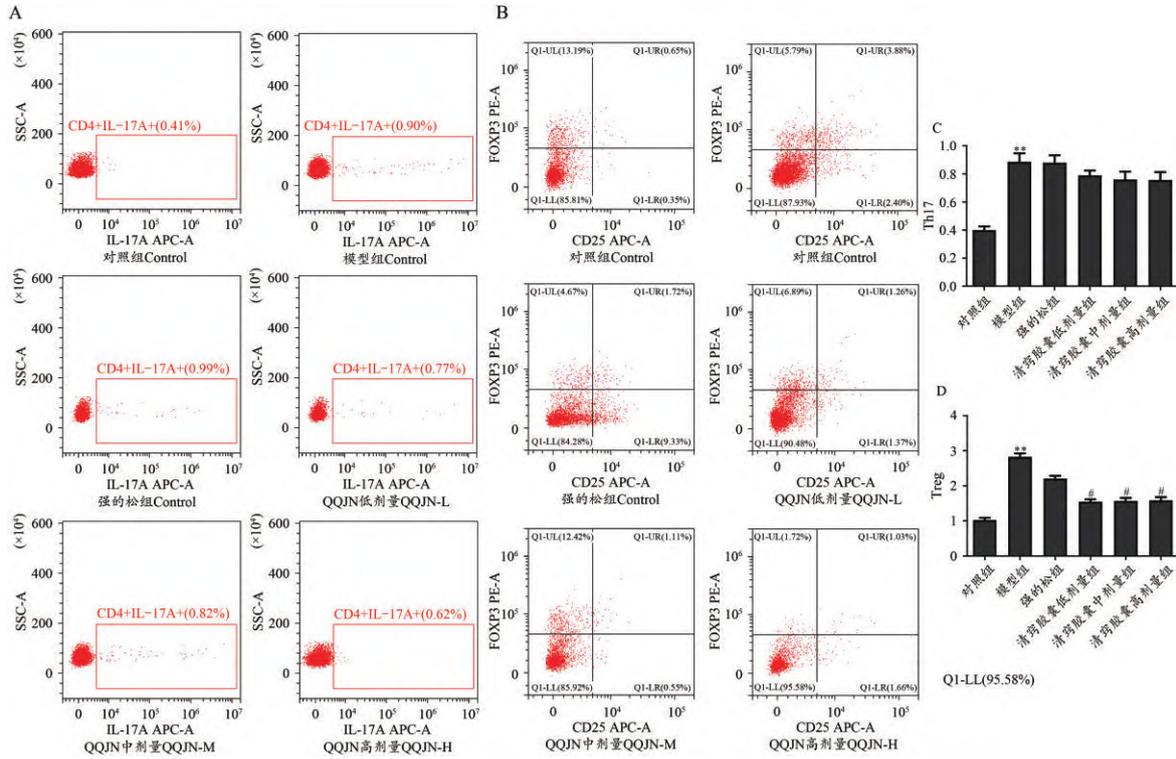


图3 各组大鼠流式细胞检测图及结果比较

注:A:胸腺Th17流式细胞图;B:胸腺Treg流式细胞图;C:胸腺Th17细胞含量;D:胸腺Treg细胞含量。模型组与空白组比较,** $P<0.01$;治疗组与模型组比较,## $P<0.01$,# $P<0.05$ 。

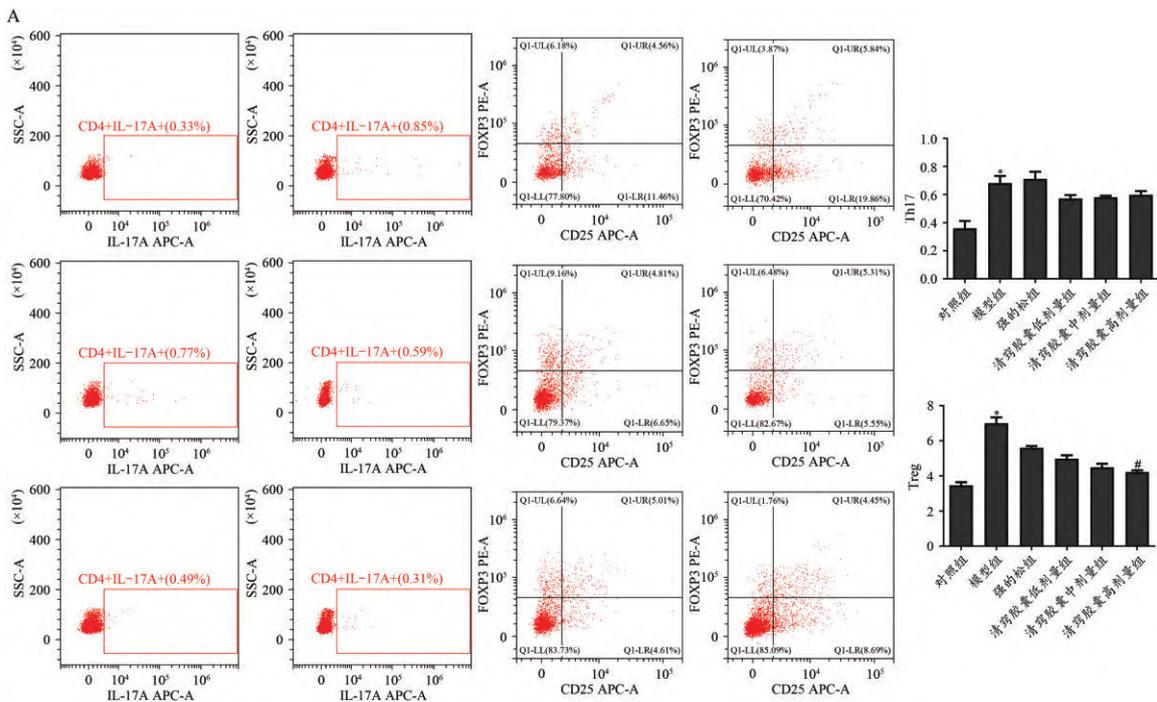


图4 各组大鼠流式细胞检测图及结果比较

注:A:脾脏Th17流式细胞图;B:脾脏Treg流式细胞图;C:脾脏Th17细胞含量;D:脾脏Treg细胞含量。模型组与空白组比较,** $P<0.01$;治疗组与模型组比较,## $P<0.01$,# $P<0.05$ 。

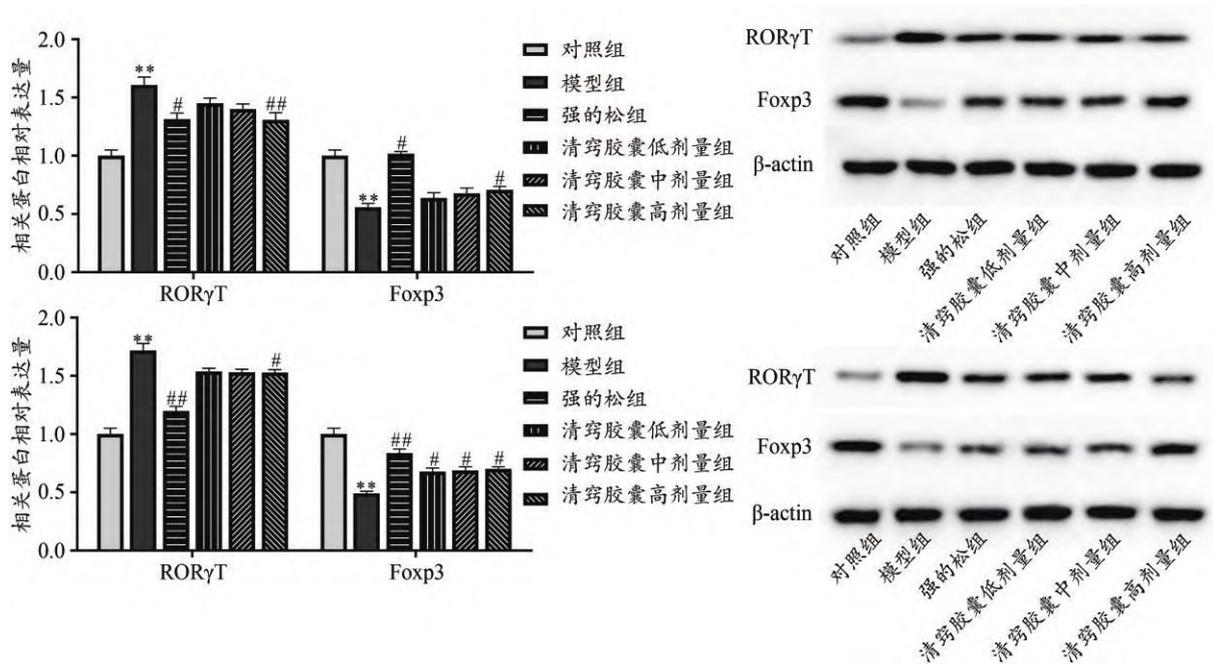


图5 各组大鼠胸腺和脾脏Foxp3、RORγT蛋白表达

注:A:胸腺Foxp3、RORγT蛋白表达及蛋白条带;B:脾脏Foxp3、RORγT蛋白表达及蛋白条带。模型组与空白组比较,** $P<0.01$;治疗组与模型组比较,## $P<0.01$,# $P<0.05$ 。

RORγT蛋白水平,明显升高Foxp3蛋白水平($P<0.05$),提示清窍胶囊可调节TGF-β/Foxp3/RORγT信号通路来调节Treg和Th17细胞介导的中耳炎(图5)。

4 讨论

针对SOM的治疗目前尚无统一有效的药物,已有证据发现中药具有副作用小,药物作用靶点多等优势,对于SOM治疗中医界目前也正在寻找疗效确切并且对全身及局部均有效的中成药来治疗^[9-10]。前期研究证实清窍胶囊可通过降低SOM动物模型血清粘附分子表达水平来减轻大鼠听泡粘膜炎症反应,抑制大鼠听泡粘膜细胞增生,从而治疗分泌性中耳炎^[11]。此外,清窍胶囊可抑制SOM小鼠模型HIF-VEGF信号通路因子缺氧诱导因子-1a(hypoxia inducible factor-1a, HIF-1a)、血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial cell growth factor, VEGF)浓度^[4]。由此看出,清窍胶囊是通过多个靶点起作用,但由于更进一步机制研究尚缺乏,故本研究基于TGF-β1/Foxp3/RORγT通路探讨清窍胶囊对分泌性中耳炎大鼠的作用机制,为SOM的治疗提供依据。首先从病理角度观察发现分泌性中耳炎大鼠中耳内有连续黏膜覆盖,黏膜层明显增厚,有大量炎性细胞浸润,清窍胶囊高剂

量治疗后大鼠中耳内单层黏膜上皮细胞排列较整齐,黏膜层极少量炎性细胞浸润。提示清窍胶囊改善SOM病理变化,对SOM具有治疗作用。

目前,SOM的发病机制尚不清晰,然而研究显示免疫因素在SOM发生发展中起着重要作用,但免疫反应的调控机制有待深入研究^[12]。在自身抗原的刺激下,Treg细胞和其他T细胞亚群可以在胸腺中发育。胸腺Treg细胞在维持免疫耐受中的关键作用已通过观察3日龄新生小鼠胸腺切除诱导T细胞介导的自身免疫得到证实^[13]。Treg抑制功能的维持需要转录因子Foxp3的表达,其功能本身受多种翻译后修饰的调节。Treg细胞分泌抑制性细胞因子(TGF-β、IL-10)及通过CD39胞核水解ATP抑制免疫反应,而Foxp3可在TGF-β存在的情况下在体外诱导Treg^[14]。辅助性T细胞(Th17)由视黄醇相关孤儿受体γt(RORγT)诱导,在慢性炎症和自身免疫性疾病中发挥重要作用^[15]。全基因组关联研究强调了Th17细胞在免疫性疾病中的中心作用,这些研究将Th17细胞中优先表达的基因与多种疾病联系起来,包括牛皮癣、炎症性肠病和强直性脊柱炎^[16-17]。此外,Th17细胞可分泌IL-17,Treg细胞是CD4⁺T细胞的一个亚型,具有维持免疫稳态、降低炎症强度和诱导免疫耐受的作用,细胞间相互作用和分

泌IL-10是Treg细胞调节免疫的主要途径^[18]。与Treg细胞相反,Th17细胞被指出具有促炎功能,Th17细胞分泌过多的IL-17会招募中性粒细胞和单核细胞,增加肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)和IL-1 β 的产生,进而加重疾病^[19]。ROR γ T是治疗Th17细胞介导的疾病的一个有吸引力的药理靶点,尽管这些分子抑制了某些在Th17细胞中优先表达的基因的转录,但ROR γ T抑制剂的直接转录效应尚未被分析,也没有全面研究这些分子对ROR γ T靶点及其转录网络的影响^[20]。研究报道Klotho蛋白可能通过调控TGF- β 1/Foxp3/ROR γ T信号通路抑制宫颈癌荷瘤小鼠体内Treg和Th7细胞介导的免疫逃逸,从而发挥抗肿瘤作用^[21]。本实验研究清窍胶囊对分泌性中耳炎

TGF- β 1/Foxp3/ROR γ T信号通路的调节作用结果显示,与空白对照组比较,分泌性中耳炎模型大鼠TGF- β 、IL-6、Th17细胞、Treg细胞、IL-17、ROR γ T、IFN- γ 水平明显升高,IL-10、IL-4、Foxp3水平明显降低,而清窍胶囊可明显降低模型大鼠TGF- β 、IL-6、Treg细胞、IL-17、ROR γ T水平,明显升高IL-10、IL-4、Foxp3水平。表明清窍胶囊可有效地调节TGF- β /Foxp3/ROR γ T信号通路来调节Treg和Th17细胞介导的中耳炎。

综上所述,清窍胶囊可有效地调节TGF- β /Foxp3/ROR γ T信号通路,进而调节Treg和Th17细胞介导的中耳炎的发生及发展,调节免疫细胞因子分泌,调节Treg/Th17细胞失衡状态,改善分泌性中耳炎。

参考文献

- Pang K, Di Y, Li G, et al. Can reflux symptom index and reflux finding score be used to guide the treatment of secretory otitis media in adults? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2020, 82(3):130-138.
- 李佳佳, 赵守琴. 分泌性中耳炎免疫学发病机制研究进展. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2020, 44(4):198-201.
- Chen S, Zhao M, Zheng W, et al. Myringotomy and tube insertion combined with balloon eustachian tuboplasty for the treatment of otitis media with effusion in children. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2020, 277(5):1281-1287.
- 钟伦坤, 周兴玮, 何娴, 等. 清窍胶囊治疗分泌性中耳炎的临床疗效以及相关机制. 实用医学杂志, 2018, 34(17):2930-2933, 2945.
- 陈沛维, 赵春丽, 王丹妮, 等. Th17/Treg细胞介导的分泌性中耳炎发病机制研究. 中华耳科学杂志, 2020, 18(3):431-437.
- Habets M N, van Selm S, van Opzeeland F J, et al. Role of antibodies and IL17-mediated immunity in protection against pneumococcal otitis media. *Vaccine*, 2016, 34(48):5968-5974.
- Luo C T, Li M O. Transcriptional control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol*, 2013, 34(11):531-539.
- 李兰芳, 于娟. 利水通窍汤对急性分泌性中耳炎大鼠VEGF表达的影响. 新中医, 2018, 50(6):17-20.
- 童兴科, 孙永东, 向小红. 基于水通道蛋白清窍胶囊治疗分泌性中耳炎小鼠模型机制的研究. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(72):20-21, 23.
- 戴祖文, 詹根龙. 健脾通窍化湿汤联合西医疗法治疗慢性分泌性中耳炎44例. 中国中医药科技, 2021, 28(1):144-145.
- 童兴科. 清窍胶囊对分泌性中耳炎小鼠模型水通道蛋白AQP1, 4, 5表达水平的影响. 泸州: 西南医科大学硕士研究生学位论文, 2019.
- Hirano T, Kodama S, Kawano T, et al. Accumulation of regulatory T cells and chronic inflammation in the middle ear in a mouse model of chronic otitis media with effusion induced by combined eustachian tube blockage and nontypeable haemophilus influenzae infection. *Infect Immun*, 2015, 84(1):356-364.
- Deng G. Tumor-infiltrating regulatory T cells: origins and features. *Am J Clin Exp Immunol*, 2018, 7(5):81.
- Cepika A M, Sato Y, Liu J M H, et al. Tregopathies: monogenic diseases resulting in regulatory T-cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(6):1679-1695.
- Qiu R, Zhou L, Ma Y, et al. Regulatory T cell plasticity and stability and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2020, 58(1):52-70.
- Bao S, Zheng J, Shi G. The role of T helper 17 cells in the pathogenesis of hepatitis B virus-related liver cirrhosis. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4):3713-3719.
- Xiao S, Yosef N, Yang J, et al. Small-molecule ROR γ T antagonists inhibit T helper 17 cell transcriptional network by divergent mechanisms. *Immunity*, 2014, 40(4):477-489.
- Rothstein D M, Camirand G. New insights into the mechanisms of Treg function. *Curr Opin Organ Transplant*, 2015, 20(4):376-384.
- Kushnareva Y, Mathews I T, Andreyev A Y, et al. Functional analysis of immune signature genes in Th1* memory cells links ISOC1 and pyrimidine metabolism to IFN- γ and IL-17 production. *J Immunol*, 2021, 206(6):1181-1193.
- Eberl G. ROR γ T, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(1):27-34.
- 李美, 张红艳, 邵海鸥. Klotho蛋白通过TGF- β 1/Foxp3/ROR γ T通路抑制Treg和Th7细胞介导的宫颈癌细胞的免疫逃逸. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(11):1196-1202.

Action Mechanism of Qingqiao Capsule on Secretory Otitis Media in Rats Based on TGF- β 1/Foxp3/ROR γ T Pathway

Zhong Lunkun, Hu Wenjian, Zhou Xingwei, He Xian, Zhu Jiali, Chen Long,
Tian Liu, Shao Jianhua, Sun Yongdong

(The Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646699, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of Qingqiao capsule on secretory otitis media in rats based on TGF- β 1/Foxp3/ROR γ T pathway. Methods A total of 36 female SD rats, of which 30 rats with secretory otitis media were randomly divided into model group, prednisone group (0.003 g/100 mL), low dose Qingqiao capsule group (0.36 g/100 mL), medium dose Qingqiao capsule group (0.54 g/100 mL) and high dose Qingqiao capsule group (0.72 g/100 mL), with 6 rats in each group and the other 6 rats were set as control group. The treatment group was given intragastric administration according to different doses, and the model group and control group were given the same volume of distilled water once a day for 14 days. After administration, the blood was collected, and then killed rats. The samples were collected for examination. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the changes of inflammatory cells in the secretory otitis media of rats in each group; The levels of serum interleukin-4, transforming growth factor beta, interleukin-6, interferon γ , interleukin-10, interleukin-17 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The content of Th17/Treg cells in thymus and spleen was detected by flow cytometry. The expression of forkhead Box P3, IL-17 and retinoic acid-related orphan receptor γ T mRNA in thymus and spleen tissue was detected by real-time fluorescence quantitative PCR, and the expression of ROR γ T and Foxp3 in thymus and spleen tissue was detected by Western Blot. Results Compared with the control group, the mucosal layer of secretory otitis media rats was significantly thickened with a large number of inflammatory cell infiltration; and the levels of TGF- β , IL-6, IFN- γ , Th17, Treg cells, IL-17 and ROR γ T in secretory otitis media were significantly higher, while the levels of IL-10, IL-4, and Foxp3 were significantly lower in secretory otitis media ($P < 0.01$); Compared with the model group, the infiltration of secretory otitis media was significantly improved, and the levels of TGF- β , IL-6, IFN- γ , IL-17 were significantly decreased. The level of IL-10, IL-4 were significantly increased in Qingqiao capsule high-dose group ($P < 0.05$), and the high dose group of Qingqiao capsule could significantly decrease the levels of Treg cells and ROR γ T and increase the expression of Foxp3 in the model rats ($P < 0.05$). Conclusion Qingqiao capsule can effectively regulate TGF- β /Foxp3/ROR γ T signal pathway, and then regulate the occurrence and development of otitis media mediated by Treg and Th17 cells, and improve secretory otitis media.

Keywords: Secretory otitis media, Qingqiao capsule, Immune imbalance, Rats

(责任编辑: 周阿剑、刘玥辰, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)