

桉柠蒎肠溶软胶囊基于 AQP5-TLR4/MyD88/NF- κ B 通路缓解小鼠分泌性中耳炎研究

何碧瑶¹, 杨俊杰¹, 党龙蛟¹, 孙萌萌², 刘佳宇¹, 辛文好^{1*}

1. 滨州医学院 药学院, 山东 烟台 264003

2. 烟台大学 药学院, 山东 烟台 264005

摘要: 目的 基于水通道蛋白5 (AQP5)-Toll样受体4 (TLR4)/髓样分化因子88 (MyD88)/核转录因子 κ B (NF- κ B) 通路探讨桉柠蒎肠溶软胶囊对小鼠分泌性中耳炎 (OME) 模型的治疗作用及机制。方法 昆明小鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松组和桉柠蒎肠溶软胶囊低、中、高剂量 (55、110、220 mg·kg⁻¹) 组。采用经鼓膜注入脂多糖 (LPS) 的方法建立小鼠 OME 模型, 显微镜观察各组小鼠鼓膜结构变化, 苏木精-伊红 (HE) 染色法评估中耳组织病理学改变, ELISA 法检测中耳灌洗液中白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平, Western blotting 检测中耳黏膜组织 AQP5 及 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达。结果 与对照组比较, 模型组小鼠鼓室积液, 鼓室黏膜增厚, 有明显的炎症细胞浸润, 中耳灌洗液中 IL-6、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$), AQP5 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), TLR4、MyD88、p-I κ B α 、p-p65 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 桉柠蒎肠溶软胶囊各剂量可以减轻鼓室积液, 减少炎症细胞浸润, 明显降低中耳灌洗液中 IL-6、TNF- α 水平 ($P < 0.01$), 显著升高 AQP5 蛋白表达 ($P < 0.01$), 明显降低 TLR4、MyD88、p-I κ B α 、p-p65 蛋白表达 ($P < 0.01$)。结论 桉柠蒎肠溶软胶囊通过提高 AQP5 蛋白的表达, 抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的激活, 减轻 LPS 诱导的 OME。

关键词: 桉柠蒎肠溶软胶囊; 分泌性中耳炎; 脂多糖; 水通道蛋白5; TLR4/MyD88/NF- κ B 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 08-1820-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.015

Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules relieve otitis media with effusion in mice based on AQP5-TLR4/ MyD88/NF- κ B pathway

HE Biyao¹, YANG Junjie¹, DANG Longjiao¹, SUN Mengmeng², LIU Jiayu¹, XIN Wenyu¹

1. School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

2. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules on otitis media with effusion (OME) model in mice based on aquaporin 5 (AQP5)-Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/ nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) pathway. **Method** Kunming mice were randomly divided into control group, model group, dexamethasone group, low-, medium- and high- dose (55, 110, and 220 mg·kg⁻¹) groups of Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules. The mice OME model was established by injecting LPS through the tympanic membrane. The structural changes of tympanic membrane in each group were observed microscopically. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to assess the histopathological changes of the middle ear. ELISA was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the middle ear lavage fluid. Western blotting was used to detect the expression of AQP5 and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway-related proteins in the middle ear mucosa. **Results** Compared with the control group, the tympanic empyema, tympanic mucosa thickening, inflammatory cell infiltration, IL-6 and TNF- α levels in the middle ear lavage fluid were considerably increased ($P < 0.01$), AQP5 protein expression was significantly decreased ($P < 0.01$), and TLR4, MyD88, p-I κ B α , and p-p65 protein expression was significantly increased ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, each dose of Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules could reduce tympanic

收稿日期: 2024-03-12

第一作者: 何碧瑶 (1999—), 女, 硕士研究生。研究方向为抗炎免疫药理学。E-mail: 18274390480@163.com

*通信作者: 辛文好 (1985—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为抗炎免疫药理学。E-mail: xinwenyu1391139@163.com

empyema, reduce inflammatory cell infiltration, considerably reduce IL-6 and TNF- α levels in middle ear lavage fluid ($P < 0.01$), significantly increase AQP5 protein expression ($P < 0.01$), and significantly reduce TLR4, MyD88, p-I κ B α , and p-p65 protein expression ($P < 0.01$). **Conclusion** Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules can reduce LPS-induced OME by increasing the expression of AQP5 protein and inhibiting the activation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway.

Key words: Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules; otitis media with effusion; LPS; AQP5; TLR4/MyD88/NF- κ B pathway

分泌性中耳炎(OME)是一种中耳非化脓性炎症疾病,常出现听力下降,中耳腔积液等临床症状^[1]。OME在儿童早期的发病率较高,影响儿童听力及言语发育且容易反复^[2-4]。西医认为OME可能发生在上呼吸道感染期间,由于咽鼓管功能障碍而自发发生,在中医学研究中,OME属于“耳胀耳闭”的范畴,常因风邪入体而发病,体内邪毒滞留,导致病情经久不愈^[5]。

OME的临床常用治疗药物主要为抗生素类、类固醇激素类^[6]。抗生素在治疗OME方面的获益较小,并容易引起细菌耐药。口服类固醇激素虽然有短期疗效,但1~2个月后的长期疗效不确定,且不良反应大,不推荐长期使用治疗OME^[7-8]。桉柠蒎肠溶软胶囊由桃金娘科桉属 *Eucalyptus* L'Hér.、芸香科桔属 *Citrus* L. 和松科松属 *Pinus* L. 的桉树、柠檬等植物的有关提取物组成,主要成分为桉油精、柠檬烯和 α -蒎烯。该药为黏液纤毛清除系统恢复剂,可以碱化黏液,增强纤毛的摆动,恢复纤毛的活性,促进黏液分泌物排出^[9]。近年来,有研究发现桉柠蒎肠溶软胶囊在临床治疗OME效果显著,能够缓解耳鸣、耳痛等临床症状,提升患者听力功能,同时可以降低耳积液中炎症因子水平^[10-11]。据临床研究表明桉柠蒎肠溶软胶囊对OME疗效确切,其机制可能是通过消除炎症,促进黏性分泌物排出,从而达到治疗作用^[12]。目前,由于OME的发病机制复杂且尚未全面阐述,需要对其机制深入分析和研究。基于此,本研究通过制备小鼠OME模型,观察桉柠蒎肠溶软胶囊对OME的作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物

雄性 SPF 级昆明小鼠,体质量18~20 g,购自济南朋悦动物繁育有限公司[动物生产许可证号 SCXK(Lu)20190003]饲养于温度(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度(55 ± 5)%的环境中,严格按照标准喂养。本研究动物福利和实验过程均经滨州医学院实验动物伦理委员会审查批准(伦理编号2022-178)。

1.2 药物

桉柠蒎肠溶软胶囊,每粒0.3 g,由北京远大九

和药业有限公司生产,批号22210610;醋酸地塞米松片,每粒0.75 mg,由辰欣药业股份有限公司生产,批号2106030211。

1.3 试剂

脂多糖(LPS,美国Sigma公司,货号L2880-100MG),用0.9%氯化钠溶液配制成 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6) ELISA试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号SEKR-0009、SEKR-0005);多聚甲醛(兰杰柯科技有限公司,货号BL539A);髓样分化因子88(MyD88)、核因子 κ B抑制蛋白 α (I κ B α)、磷酸化核因子 κ B抑制蛋白 α (p-I κ B α)、核转录因子 κ B磷蛋白65(NF- κ B p65)、核转录因子 κ B磷酸化磷蛋白65(p-NF- κ B p65)p-NF- κ B p65抗体(美国Cell Signaling Technology公司,货号4283S、4814S、2859S、8242S、3033S);水通道蛋白5(AQP5)、Toll样受体4(TLR4)(Santa Cruz Biotechnology公司,货号sc-514022、sc-293072)。

1.4 仪器

Legend micro 17R型低温高速离心机(赛默飞世尔科技公司);Synergy H1型多功能酶标仪(美国BioTek公司);ChemiDoc XRS+型高灵敏化学发光成像系统(美国Bio Rad公司);Neofuge 15R型高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司);Leica倒置荧光显微镜DM IL LED(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 动物分组、给药及造模

60只昆明小鼠采用随机数字法分为6组(每组10只):对照组、模型组、地塞米松($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组和桉柠蒎肠溶软胶囊低、中、高剂量(55、110、220 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组。各组按照上述剂量ig给药,每天1次,连续7 d。第7天给药后2 h进行OME模型的制备,采用经鼓膜注入LPS的方法制备小鼠OME模型^[13],模型制备前对所有小鼠进行耳镜检查,以确保鼓膜完整,无中耳积液。外耳道消毒,采用微量注射器将LPS($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)经鼓膜前下方缓慢注入造模小鼠一侧中耳腔,对照组小鼠在同侧位置注入等量的0.9%氯化钠溶液。造模完成后,继续ig给药3 d,进行后续实验。

2.2 ELISA法检测小鼠中耳灌洗液中炎症因子水平

模型建立3 d后,收集中耳灌洗液,于4℃离心10 min($4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),严格按照ELISA试剂盒标准操作说明书,测定各组小鼠中耳灌洗液中炎症因子TNF- α 、IL-6水平。

2.3 小鼠OME模型的评价

模型建立3 d后,断头处死小鼠,打开外耳道,暴露鼓膜,显微镜下拍照观察。收集各组小鼠的中耳组织,多聚甲醛固定24 h后,包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察各组小鼠中耳组织的病理变化,保存病理图片。

2.4 Western blotting检测小鼠中耳黏膜组织AQP5-TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路相关蛋白的表达

将中耳黏膜组织置于RIPA裂解液中进行匀浆,匀浆液于4℃, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心15 min,离心完成后收集上清液,采用BCA试剂盒测定蛋白浓度,经SDS-PAGE电泳、转膜、脱脂牛奶,一抗

AQP5、TLR4、MyD88、I κ B α 、p-I κ B α 、p65以及p-p65(1:1 000),4℃过夜孵育,TBST清洗3次,二抗(1:1 000)孵育1 h,TBST清洗3次,高灵敏化学发光成像系统拍照,Quantity One软件分析蛋白条带灰度值。

2.5 统计分析

采用SPSS 23.0统计软件进行数据分析,数据差异以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据进行方差齐性检验,组间两两比较采用LSD- t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 桉柠蒎肠溶软胶囊对OME小鼠鼓膜的影响

观察鼓膜结构发现,对照组鼓膜结构完整,清澈透明,无炎症反应。模型组鼓膜外观增厚且不透明,鼓膜中有大量中耳积液产生,说明OME模型建立成功。经不同药物处理治疗后,地塞米松组及桉柠蒎肠溶软胶囊高剂量组可以明显减少中耳积液,减轻鼓膜损伤。见图1。

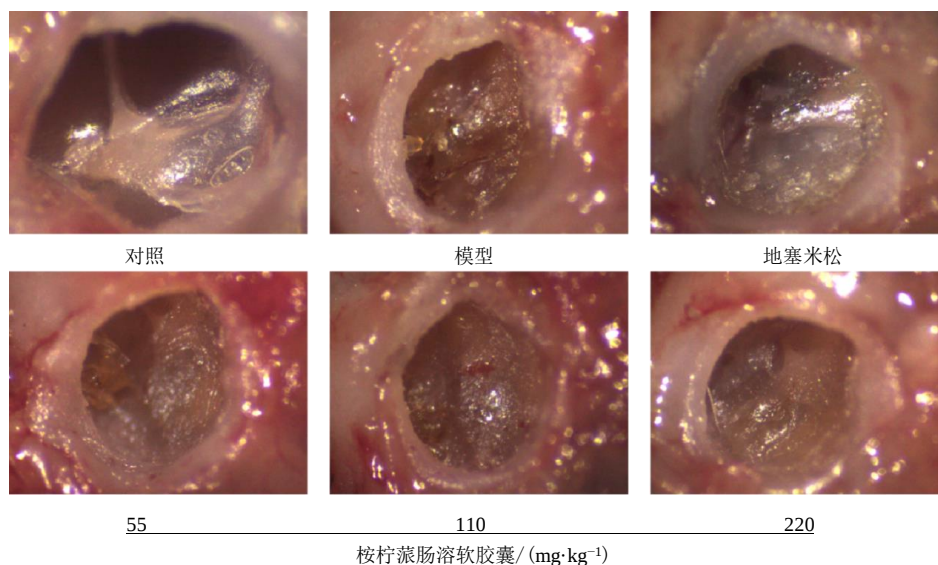


图1 桉柠蒎肠溶软胶囊对OME小鼠鼓膜的影响($\times 4$)

Fig. 1 Effect of Eucalyptol Limonene Pinene Enteric Soft Capsules on tympanic membrane of OME mice ($\times 4$)

3.2 桉柠蒎肠溶软胶囊对OME小鼠中耳组织病理的影响

对照组可见中耳鼓室被覆单层纤毛柱状上皮细胞,上皮细胞排列整齐,鼓室内无脓液分泌。模型组可见鼓室积液,鼓室黏膜增厚,上皮细胞变性、坏死、增生,上皮见血管扩张、大量以嗜中性粒细胞为主的炎症细胞浸润,提示造模成功。地塞米松组可见鼓室内大量纤维素渗出物、少量炎症细胞;鼓室上皮细胞未见明显异常。桉柠蒎肠溶软胶囊低剂量组见鼓室积液,黏膜上皮细胞变性;桉柠蒎肠溶软胶囊中剂量组鼓室见脓液分泌物,鼓室上皮细

胞轻度变性;桉柠蒎肠溶软胶囊高剂量组仅见鼓室上皮空泡化,无明显炎症细胞浸润。提示桉柠蒎肠溶软胶囊减少了炎症细胞浸润到中耳,减轻LPS诱导的小鼠中耳损伤,见图2。

3.3 桉柠蒎肠溶软胶囊对OME小鼠中耳灌洗液炎症因子水平的影响

与对照组相比,模型组小鼠中耳灌洗液中TNF- α 、IL-6的水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,地塞米松组及桉柠蒎肠溶软胶囊低、中、高剂量组小鼠中耳灌洗液中TNF- α 、IL-6的水平显著降低($P<0.01$)。见表1。

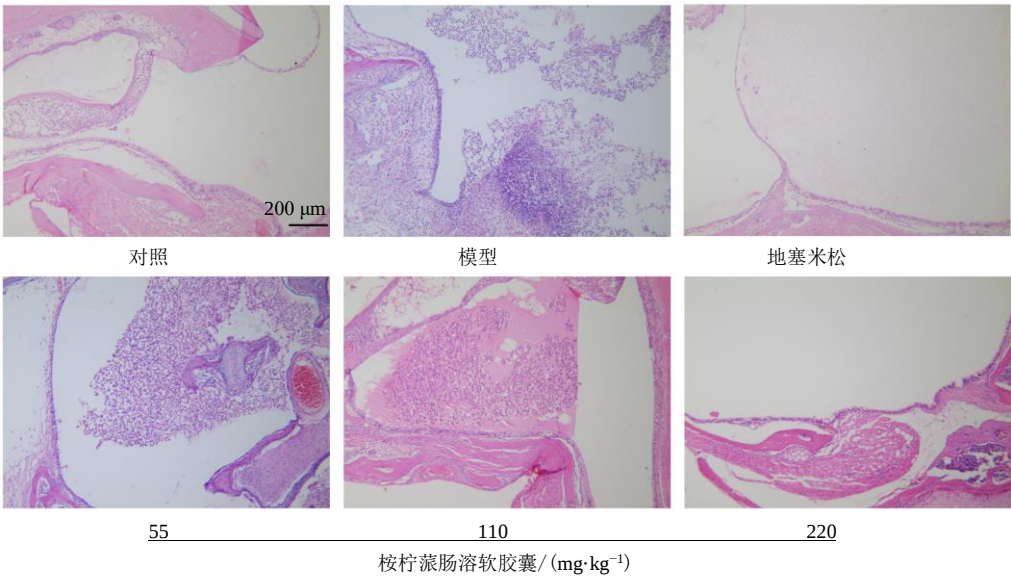


图 2 桉柠蒎肠溶软胶囊对 OME 小鼠中耳组织病理变化的影响($\times 100$)
Fig. 2 Effect of Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules on pathological changes of middle ear tissue in OME mice ($\times 100$)

表 1 桉柠蒎肠溶软胶囊对 OME 小鼠中耳灌洗液 TNF- α , IL-6 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effects of Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules on TNF- α and IL-6 levels in middle ear lavage fluid of OME mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	TNF- α / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	15.12 $\pm$ 4.22	33.39 $\pm$ 3.39
模型	—	66.17 $\pm$ 3.41**	207.90 $\pm$ 35.62**
地塞米松	2	48.08 $\pm$ 5.82 ^{##}	96.68 $\pm$ 6.32 ^{##}
桉柠蒎肠溶	55	57.75 $\pm$ 4.83 ^{##}	133.50 $\pm$ 5.88 ^{##}
软胶囊	110	54.65 $\pm$ 3.51 ^{##}	107.36 $\pm$ 5.40 ^{##}
	220	47.22 $\pm$ 4.02 ^{##}	91.80 $\pm$ 5.63 ^{##}

与对照组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:^{##} $P < 0.01$ 。

^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group.

表 2 桉柠蒎肠溶软胶囊对 OME 小鼠中耳黏膜组织 AQP5 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsule on AQP5 protein expression in middle ear mucosa of OME mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	AQP5/GAPDH
对照	—	1.23 $\pm$ 0.05
模型	—	0.58 $\pm$ 0.02**
地塞米松	2	1.03 $\pm$ 0.01 ^{##}
桉柠蒎肠溶软胶囊	55	0.86 $\pm$ 0.02 ^{##}
	110	1.12 $\pm$ 0.05 ^{##}
	220	1.22 $\pm$ 0.06 ^{##}

与对照组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:^{##} $P < 0.01$ 。

^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group.

3.4 桉柠蒎肠溶软胶囊对 OME 小鼠中耳黏膜组织 AQP5 蛋白表达的影响

Western blotting 检测了 AQP5 蛋白的表达,如表 2、图 3 所示,与对照组比较,模型组 AQP5 蛋白表达明显下降($P < 0.01$);地塞米松及桉柠蒎肠溶软胶囊低、中、高剂量组 AQP5 蛋白表达均显著提高($P < 0.01$)。

3.5 桉柠蒎肠溶软胶囊对 OME 小鼠中耳黏膜组织 TLR4、MyD88 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组 TLR4、MyD88 蛋白表达明显上升($P < 0.01$);地塞米松及桉柠蒎肠溶软胶囊

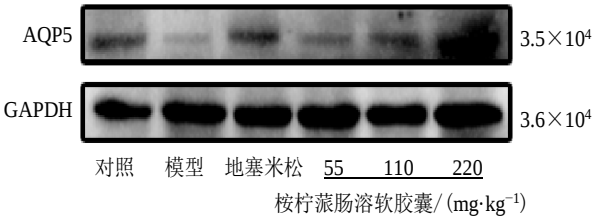


图 3 桉柠蒎肠溶软胶囊对 OME 小鼠中耳黏膜组织 AQP5 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules on AQP5 protein expression in middle ear mucosa of OME mice

高剂量组可以明显抑制TLR4蛋白表达($P<0.05$), 桉柠蒎肠溶软胶囊各剂量组显著抑制MyD88蛋白表达($P<0.01$)。见表3、图4。

表3 桉柠蒎肠溶软胶囊对OME小鼠中耳黏膜组织TLR4, MyD88蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules on TLR4 and MyD88 protein expression in middle ear mucosa of OME mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)			
组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	TLR4/ GAPDH	MyD88/ GAPDH
对照	—	0.84±0.07	0.79±0.04
模型	—	1.11±0.03**	1.18±0.02**
地塞米松	2	0.82±0.07 [#]	0.93±0.02 [#]
桉柠蒎肠溶软	55	1.17±0.05	1.10±0.02 [#]
胶囊	110	1.08±0.04	1.08±0.03 [#]
	220	0.99±0.01 [#]	0.93±0.08 [#]

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group.

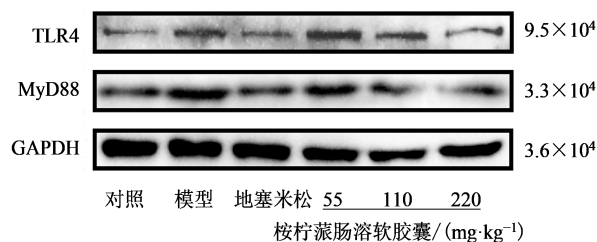


图4 桉柠蒎肠溶软胶囊对OME小鼠中耳黏膜组织TLR4, MyD88蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules on TLR4 and MyD88 protein expression in middle ear mucosa of OME mice

3.6 桉柠蒎肠溶软胶囊对OME小鼠中耳黏膜组织p-p65、p-IκBα信号通路的影响

Western blotting 结果显示,与对照组比较,模型组p-IκBα、p-p65蛋白表达显著上升($P<0.01$);地塞米松及桉柠蒎肠溶软胶囊中、高剂量组p-IκBα、p-p65蛋白表达明显降低($P<0.05$ 、 0.01)。见表4、图5。

4 讨论

OME是一种十分常见的儿童疾病,高发于2岁以下的儿童,是耳科最活跃的研究领域之一^[7, 14]。OME的发病机制尚不完全清楚,流行病学提示,OME的发病机制是多因素的,涉及解剖、免疫、遗传、微生物、环境等因素^[15]。目前认为咽鼓管功能障碍和感染在OME发展中起重要作用^[16]。OME的动物模型已成为研究该疾病的重要方法之一。内

表4 桉柠蒎肠溶软胶囊对OME小鼠中耳黏膜组织p-p65, p-IκBα蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 4 Effect of Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules on expression of p-p65 and p-IκBα protein in middle ear mucosa of OME mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	p-p65/p65	p-IκBα/IκBα
对照	—	0.69±0.02	1.00±0.07
模型	—	1.43±0.06**	1.21±0.09**
地塞米松	2	0.94±0.04 [#]	0.91±0.05 [#]
桉柠蒎肠	55	1.12±0.04 [#]	1.22±0.03
溶软胶	110	1.09±0.03 [#]	1.02±0.04 [#]
囊	220	0.85±0.09 [#]	0.94±0.05 [#]

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group.

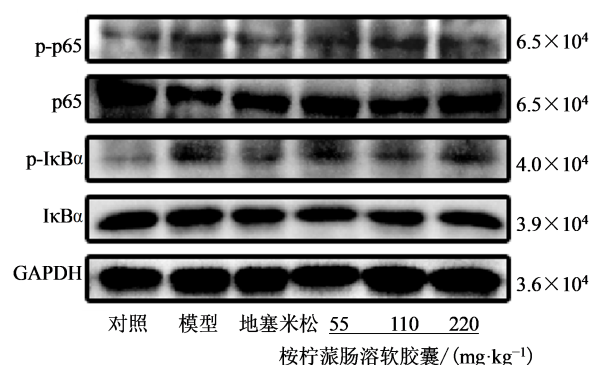


图5 桉柠蒎肠溶软胶囊对OME小鼠中耳黏膜组织p-p65, p-IκBα蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of Eucalyptol, Limonene and Pinene Enteric Soft Capsules on expression of p-p65 and p-IκBα protein in middle ear mucosa of OME mice

毒素是细菌细胞壁的一种成分,被认为是引起中耳炎症的原因,本研究通过向中耳腔注射LPS,观察发现模型组小鼠鼓膜外观增厚且不透明,有大量中耳积液产生,存在以嗜中性粒细胞为主的炎症细胞浸润,说明小鼠OME模型建立成功。应用桉柠蒎肠溶软胶囊发现,小鼠中耳积液减少,鼓膜损伤减轻,说明桉柠蒎肠溶软胶囊可以缓解LPS诱导的中耳损伤。

研究表明,细胞因子介导并调节免疫和炎症反应,因此在免疫系统中发挥重要作用^[17]。在人中耳积液中可以检测到TNF-α,在肺炎链球菌及LPS诱导的中耳炎动物模型中TNF-α表达上调,说明TNF-α是中耳炎中最显著的炎症介质之一^[18]。IL-6的表达与OME和听力损失程度显著相关,咽鼓管功能障碍、中耳局部感染会引起血清和中耳积液中IL-6水平增高^[19]。本研究结果显示,模型组中耳灌洗液中TNF-α、IL-6水平显著上升,而桉柠蒎肠溶软胶囊可以显著降低中耳灌洗液中TNF-α、IL-6水平,说明

桉柠蒎肠溶软胶囊可以缓解LPS诱导的中耳炎症。

水通道蛋白(AQPs)是在人体各组织上皮屏障中发现的蛋白质,它们控制组织水的运输和稳态。有研究发现11种AQPs在哺乳动物的中耳及咽鼓管中表达,AQP5主要分布于纤毛上皮细胞的顶端,参与中耳积液的转运与清除^[20]。本实验研究了中耳黏膜中AQP5的表达,结果显示,模型组AQP5蛋白表达显著下降,桉柠蒎肠溶软胶囊可以升高AQP5蛋白的表达,说明桉柠蒎肠溶软胶囊可能参与中耳积液的清除与转运,具体作用机制有待进一步阐明。

TLRs是一类在先天性免疫系统中起关键作用的蛋白质,可识别不同的病原体相关分子模式^[21]。NF- κ B活化是炎症性疾病发病机制中的关键,它可以被TLRs激活,特别是TLR4^[22]。NF- κ B通过TLR4/MyD88信号通路被激活,随后迁移至细胞核,作为转录因子,诱导细胞因子的产生^[23-24]。有研究表明,在OME患者的中耳渗出液中可以检测到TLR4 mRNA,另一项研究表明TLR4信号通路在LPS诱导的急性中耳炎中发挥作用^[25-26]。因此本研究基于TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路探讨桉柠蒎肠溶软胶囊缓解中耳炎的机制,结果显示,桉柠蒎肠溶软胶囊高剂量可以降低TLR4、MyD88、p-p65蛋白的表达,抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的激活,减轻LPS诱导的OME。

本研究表明,桉柠蒎肠溶软胶囊可通过减少鼓室积脓,减轻鼓膜损伤,缓解LPS诱导的中耳损伤,作用机制与提高AQP5蛋白表达,抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的激活,降低中耳灌洗液中TNF- α 、IL-6的水平有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Rosenfeld R M, Shin J J, Schwartz S R, et al. Clinical practice guideline: Otitis media with effusion (update) [J]. Otolaryngology, 2016, 154: S1-S41.
- [2] Managing otitis media with effusion in young children. Agency for health care policy and research [J]. Clin Pract Guide Quick Ref Guide Clin, 1994, (12): 1-13.
- [3] Ball S S, Prazma J, Dais D, et al. Nitric oxide: A mediator of endotoxin-induced middle ear effusions [J]. Laryngoscope, 1996, 106(8): 1021-1027.
- [4] Paradise J L, Rockette H E, Colborn D K, et al. Otitis media in 2253 Pittsburgh-area infants: Prevalence and risk factors during the first two years of life [J]. Pediatrics, 1997, 99(3): 318-333.
- [5] 杨军, 田进强. 活血聪耳方联合丹参酮II-A磺酸钠治疗分泌性中耳炎急性期的疗效及对中医证候积分的影响 [J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2017, 25(6): 412-415.
Yang J, Tian J Q. Effects of Huoxue conger decoction combined with Sodium II-A sulfonate on secretory otitis media at acute stage and TCM syndrome integral [J]. Chin J Otorhinolaryngol Integr Med, 2017, 25(6): 412-415.
- [6] 温莹莹, 宗世民, 杜沛宇, 等. 儿童分泌性中耳炎的药物治疗 [J]. 中华耳科学杂志, 2021, 19(5): 846-849.
Wen Y Y, Zong S M, Du P Y, et al. Drug therapies for otitis media with effusion in children [J]. Chin J Otol, 2021, 19(5): 846-849.
- [7] Simon F, Haggard M, Rosenfeld R M, et al. International consensus (ICON) on management of otitis media with effusion in children [J]. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis, 2018, 135(1S): S33-S39.
- [8] Venekamp R P, Burton M J, van Dongen T M A, et al. Antibiotics for otitis media with effusion in children [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2016, 2016(6): CD009163.
- [9] 骆平莉, 殷婷. 桉柠蒎肠溶软胶囊联合糠酸莫米松治疗慢性鼻炎的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(7): 1421-1425.
Luo P L, Yin T. Clinical study on Eucalyptus Carabinieri Enteric Soft Capsule combined with mometasone furoate in treatment of chronic rhinitis [J]. Drugs Clin, 2020, 35(7): 1421-1425.
- [10] 于清波. 桉柠蒎肠溶软胶囊治疗分泌性中耳炎的效果及对耳积液IL-8、IL-10、IL-1 β 水平的影响 [J]. 中国医学创新, 2021, 18(33): 40-43.
Yu Q B. Efficacy of eucalyptol, limonene and pinene enteric soft capsules in the treatment of secretory otitis media and its influence on the levels of IL-8, IL-10, IL-1 β in ear effusion [J]. Med Innov China, 2021, 18(33): 40-43.
- [11] 朱冬平, 陈士贵, 郭军. 化痰通窍汤联合桉柠蒎肠溶软胶囊治疗分泌性中耳炎对患者水通道蛋白及听力的影响 [J]. 四川中医, 2021, 39(11): 193-196.
Zhu D P, Chen S G, Guo J. Effect of Huatan Tongqiao Decoction combined with *Eucalyptus* lime capsules on water channel protein and hearing for patients with secretory otitis media [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2021, 39(11): 193-196.
- [12] 宋中霞. 通气复聪汤合桉柠蒎肠溶软胶囊治疗分泌性中耳炎临床分析 [J]. 实用中西医结合临床, 2021, 21(3): 98-100.
Song Z X. Clinical analysis of tongfengfucong decoction combined with eucalyptus globulus enteric-coated soft capsules in the treatment of secretory otitis media [J]. Pract

- Clin J Integr Tradit Chin West Med, 2021, 21(3): 98-100.
- [13] 李祥翠, 张奕, 李吉平, 等. 经鼓膜注入脂多糖诱导的大鼠分泌性中耳炎模型 [J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(6): 410-413.
- Li X C, Zhang Y, Li J P, et al. Establishment of otitis media with effusion induced by lipopolysaccharides in rat [J]. Lab Anim Comp Med, 2011, 31(6): 410-413.
- [14] Schilder A G M, Darrow D H, Rosenfeld R M. Antibiotics for otitis media with effusion in children [J]. Otolaryngology-Head Neck Surg, 2013, 148(6): 902-905.
- [15] Buzatto G P, Tamashiro E, Proenca-Modena J L, et al. The pathogens profile in children with otitis media with effusion and adenoid hypertrophy [J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171049.
- [16] Li X P, Ye M X. The expression of VEGF and VEGFR in endotoxin induced otitis media with effusion in rats [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2021, 144: 110669.
- [17] Mosmann T R, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more [J]. Immunol Today, 1996, 17 (3): 138-146.
- [18] Juhn S K, Jung M K, Hoffman M D, et al. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of otitis media and sequelae [J]. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2008, 1(3): 117-138.
- [19] Lee H Y, Chung J H, Lee S K, et al. Toll-like receptors, cytokines & nitric oxide synthase in patients with otitis media with effusion [J]. Indian J Med Res, 2013, 138(4): 523-530.
- [20] Jung S Y, Kim S S, Kim Y I, et al. A review: Expression of aquaporins in otitis media [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18 (10): 2164.
- [21] Jung S Y, Kim D, Park D C, et al. Toll-like receptors: Expression and roles in otitis media [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 7868.
- [22] Nicholas C, Batra S, Vargo M A, et al. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality *in vivo* and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF- κ B through the suppression of p65 phosphorylation [J]. J Immunol, 2007, 179(10): 7121-7127.
- [23] Chen R J, Yuan H H, Zhang T Y, et al. Heme oxygenase-2 suppress TNF- α and IL6 expression via TLR4/MyD88-dependent signaling pathway in mouse cerebral vascular endothelial cells [J]. Mol Neurobiol, 2014, 50 (3): 971-978.
- [24] Huang W C, Ju T K, Hung M C, et al. Phosphorylation of CBP by IKK α promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF- κ B [J]. Mol Cell, 2007, 26(1): 75-87. 4
- [25] Guo H, Li M, Xu L J. Apigenin treatment attenuates LPS-induced acute otitis media through suppressing inflammation and oxidative stress [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1978-1987.
- [26] Lee Y C, Kim C, Shim J S, et al. Toll-like receptors 2 and 4 and their mutations in patients with otitis media and middle ear effusion [J]. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2008, 1(4): 189-195.

[责任编辑 齐静雯]