

没食子酸与环丙沙星联用对小鼠慢性鼻-鼻窦炎模型的作用

姜玉秋, 唐桥斐, 张爽*, 闫智永

(沈阳医学院附属第二医院耳鼻喉科, 沈阳 110002)

摘要 探讨没食子酸与环丙沙星联用对小鼠慢性鼻-鼻窦炎模型(CRS)的作用。收集难治性 CRS 患者鼻黏膜样本, 分离铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)构建小鼠 CRS 模型, 没食子酸(GA)与环丙沙星(CIP)单独或联合灌胃治疗, HE 染色观察小鼠鼻黏膜病理变化, ELISA 检测血清炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-8 的表达、试剂盒检测 SOD 活性、MDA 及 ROS 含量, Western blot 检测鼻黏膜组织中 TNF- α 、IL-6、IL-8、I κ B 及 NF- κ B p65 的表达。结果显示, GA 与 CIP 可显著降低 CRS 小鼠 TNF- α 、IL-6、IL-8、MDA、ROS 及 NF- κ B p65 的含量, 增加 SOD 活性及 I κ B 的表达, 且联合用药效果更显著。结果说明, GA 与 CIP 联用治疗 CRS 效果优于单独用药, 可能通过抑制 NF- κ B 信号通路, 下调 TNF- α 、IL-6、IL-8 表达发挥作用。

关键词 慢性鼻-鼻窦炎; 没食子酸; 环丙沙星; 铜绿假单胞杆菌; 联合用药

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)05-0600-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150514

Combined effects of gallic acid and ciprofloxacin on the murine chronic rhinosinusitis model in mice

JIANG Yuqiu, TANG Qiaofei, ZHANG Shuang*, YAN Zhiyong

Department of Otorhinolaryngology, the Second Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110002, China

Abstract This study aimed to detect the combined effects of gallic acid (GA) and ciprofloxacin (CIP) on the murine chronic rhinosinusitis (CRS) model in mice. *Pseudomonas aeruginosa* from refractory CRS nasal samples were isolated and a CRS model in mice was induced. GA and CIP were intragastrically administered singly or in combination. The nasal histopathologic change was observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. The concentration of TNF- α , IL-6 and IL-8 in serum were determined by ELISA assay. The activity of SOD and contents of MDA and ROS were measured with commercially available kits. The expressions of I κ B, NF- κ B p65, TNF- α , IL-6 and IL-8 in nasal mucosa tissues were measured by Western blotting assay. The results showed that the inflammation of CRS in each treatment group was significantly attenuated. The expression level of TNF- α , IL-6, IL-8, MDA, NF- κ B p65 and the contents of ROS were reduced significantly in treated groups, while the activity of SOD and the expression level of I κ B were increased. More obvious effects were achieved in CA and CIP combined group. The data showed that combination of GA and CIP was superior to GA or CIP alone, and the combined therapy might be related with inhibiting NF- κ B signaling pathway and downregulating the expressions of TNF- α , IL-6 and IL-8.

Key words chronic rhinosinusitis; gallic acid; ciprofloxacin; *Pseudomonas aeruginosa*; drug combination

This study was supported by the Science and Technology Projects of Liaoning Province (No. 2012225019)

慢性鼻-鼻窦炎(chronic rhinosinusitis, CRS)是耳鼻咽喉科的常见疾病之一,多由于急性鼻-鼻窦炎未彻底治愈反复发作、迁延不愈形成,常伴

有鼻塞、鼻漏、头昏、嗅觉减退、记忆力减退等症状,严重影响患者的生活质量^[1-2]。临床上常用糖皮质激素、大环内酯类(14元环)及氟喹诺酮

类药物进行治疗,但长期使用化药不良反应大,且易出现耐药现象。中药具有安全、低毒、不易产生耐药性等优势,与化药结合后能起到更好的治疗效果^[3]。

没食子酸(gallic acid, GA)是广泛存在于茶叶、葡萄等植物中的天然多酚类化合物,具有抗菌^[4-5]、抗病毒^[6]、抗肿瘤^[7-9]、抗氧化^[10]、控制胰岛素水平^[11]等多种药理活性,能较好地被人吸收,在体内代谢成4-O-甲基没食子^[12]。环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)为第3代氟喹诺酮类抗菌药物,具广谱抗菌活性,临床上主要用于敏感菌所致的呼吸道、泌尿道、消化道等的感染。本研究建立CRS小鼠模型,观察GA与CIP联用对CRS的治疗效果,以期为CRS的中西医结合临床治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 试剂

没食子酸(纯度大于98%,上海经科化学科技有限公司);环丙沙星(美国Sigma公司);苏木精-伊红(HE)染色液、小鼠TNF- α 、IL-6、IL-8 ELISA检测试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、活性氧(ROS)检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);I κ B抗体、NF- κ B p65抗体、TNF- α 抗体、IL-6抗体、IL-8抗体、 β -actin抗体、Histone H3抗体(沈阳万类生物科技有限公司);辣根过氧化物酶标记二抗(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 仪器

VITEK全自动微生物鉴定仪(法国生物梅里埃股份有限公司);DP73显微镜(日本奥林巴斯公司);ELX-800全自动酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);UV752紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司);DYY-7C电泳仪、WD-9413B凝胶成像系统(北京六一生物科技有限公司)。

1.3 动物与临床标本

动物:SPF级C57BL/6小鼠(18~22 g),雄性,6~8周龄,由辽宁长生生物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(辽)2010-0001。

临床标本:难治性慢性鼻-鼻窦炎(refractory chronic rhinosinusitis, RCRS)病例:2013年1月至2013年12月在沈阳医学院附属第二医院耳鼻喉科经规范化药物和鼻内镜手术治疗后CRS症状和体征仍持续存在的患者20例。

2 方法

2.1 细菌分离培养与鉴定

20例RCRS患者于鼻内镜下行鼻窦开放术,切除筛泡,手术台下分离出筛泡上的鼻黏膜,剪成约3 mm×3 mm大小,生理盐水冲洗收集黏膜表面游离菌。按《全国临床检验操作规程》^[13]进行接种、分离,用手工法和全自动微生物鉴定仪进行细菌鉴定,于MBH培养基中培养。接种前用灭菌生理盐水稀释菌液浓度至 1.0×10^9 CFU/mL。

2.2 小鼠CRS模型的制备

小鼠麻醉后于鼻背正中做一5 mm切口,向右侧掀起皮瓣,牙科微小钻头沿鼻腔刮骨3 mm,切开黏膜进入右侧鼻腔,Merocel高膨胀止血海绵进行鼻腔堵塞,注射器抽取铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. a.*)悬浊液(1×10^9 CFU)0.1 mL缓慢注入该侧鼻腔内。对照组小鼠用同样方式打开鼻腔,不置入Merocel海绵及菌液^[14]。

2.3 给药和分组

小鼠随机分为5组,每组8只,即对照组、模型组、没食子酸组(20 mg/kg GA)、环丙沙星组(40 mg/kg CIP)、没食子酸与环丙沙星联用组(20 mg/kg GA + 40 mg/kg CIP)。造模4周后,没食子酸与环丙沙星单独或联合灌胃给药0.4 mL,连续7 d,对照组和模型组给予等体积生理盐水,末次给药24 h后,收集小鼠血清及鼻黏膜组织,用于后续检测。

2.4 检测指标

2.4.1 HE染色观察鼻黏膜组织形态 收集鼻黏膜组织,用10%甲醛溶液固定24 h,标本切片,石蜡包埋,载玻片上予苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察组织形态学变化。

2.4.2 ELISA法检测血清炎性因子TNF- α 、IL-6、IL-8的表达 按照ELISA试剂盒说明分别检测血清中炎性因子TNF- α 、IL-6、IL-8的表达,实验重复3次,检测结果以pg/mL表示。

2.4.3 血清中 SOD 活性及 MDA 含量的检测

SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定,MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定,按照试剂盒说明分别在 550,532 nm 处测定吸收度。

2.4.4 鼻黏膜组织中 ROS 活性的检测 采用化学荧光法检测鼻黏膜组织中 ROS 活性,取 10% 组织匀浆液按照试剂盒说明书步骤操作。

2.4.5 Western blot 法检测鼻黏膜组织中炎症因子及 NF-κB 通路相关蛋白的表达 采用 RIPA 裂解液裂解鼻黏膜组织,试剂盒提取组织胞浆蛋白和胞核蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。用 5 × 上样缓冲液混匀后沸水浴 10 min,取蛋白 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,转膜至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶进行封闭,胞浆蛋白中加入 1:1 000 倍稀释的 TNF-α、IL-6、IL-8、IκB 一抗,胞核蛋白中加入 1:1 000 倍稀释的 NF-κB p65 一抗,4 ℃ 孵育过夜。洗涤后加入 1:5 000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记二抗,37 ℃ 孵育 45 min,加入 ECL 发光液曝光显色。将胶片进行扫描,凝胶图像处理系统分析目标条带的吸收度,以 β-actin 和 Histone H3 为内参进行标化处理。

2.4.6 统计学处理 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPASS 15.0 进行单因素方差分析,LSD 检验分析组间差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 铜绿假单胞杆菌的分离与鉴定

经鉴定,在所有鼻黏膜样本中,铜绿假单胞杆菌阳性率为 100%。

3.2 组织形态学观察

HE 染色结果如图 1 所示,对照组未见炎症细胞浸润,上皮细胞形态完好,纤毛排列整齐。模型组鼻黏膜呈慢性炎症表现,大量炎症细胞浸润,上皮细胞萎缩,纤毛减少或消失。各药物治疗组均能不同程度减轻组织炎症反应,且联合用药组比单独用药组改善更为明显。

3.3 血清炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-8 的水平

ELISA 检测血清中 TNF-α、IL-6、IL-8 的水平,结果如图 2 所示。与对照组相比,CRS 模型组 TNF-α、IL-6、IL-8 含量均显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,药物单用组(GA、CIP)TNF-α 与 IL-6 含量显著下降,IL-8 含量无显著性变化,药物联用

组(GA + CIP)TNF-α、IL-6、IL-8 的表达均显著下降($P < 0.01$),且各指标变化程度比药物单用组更为明显。说明 GA 与 CIP 联用能有效降低 CRS 模型小鼠血清炎症因子的表达水平。

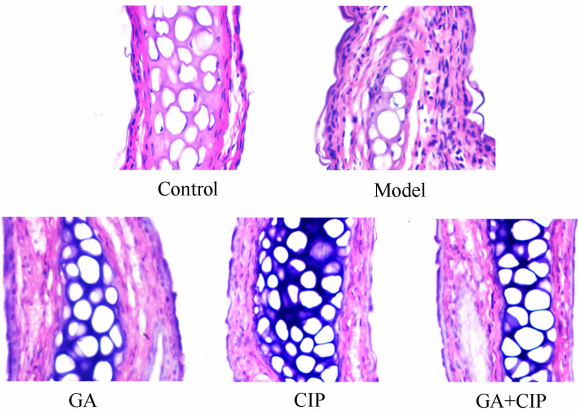


Figure 1 Effects of gallic acid (GA) and ciprofloxacin (CIP) on the nasal histopathologic change (HE, ×400)

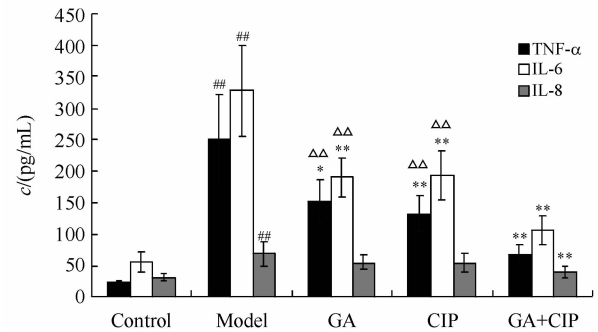


Figure 2 Effects of GA and CIP on expression of TNF-α, IL-6 and IL-8 in murine chronic rhinosinusitis(CRS) model by ELISA ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; ΔΔ $P < 0.01$ vs GA + CIP group

3.4 血清 SOD 活性、MDA 含量及鼻黏膜组织中 ROS 含量

如表 1 所示,与对照组相比,CRS 模型组小鼠 SOD 活性显著降低($P < 0.01$),为对照组的 0.5 倍;MDA 及 ROS 含量显著升高($P < 0.01$),分别是对照组的 2.47 和 2.18 倍。与模型组相比,药物单用组(GA、CIP)SOD 活性分别增加了 47% ($P < 0.01$) 和 61% ($P < 0.01$),MDA 含量分别下降 28% ($P < 0.05$) 和 36% ($P < 0.05$),ROS 含量分别降低了 35% ($P < 0.05$) 和 33% ($P < 0.05$)。药物联用组(GA + CIP)各指标变化更为明显,与模型组相比,SOD 活性增加 86% ($P < 0.01$),MDA 及 ROS 含量分别降低 52% ($P < 0.01$) 和 49% ($P < 0.01$)。

Table 1 Effects of GA and CIP on superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in murine CRS model ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	SOD /(U/mL)	MDA/ (nmol/mL)	ROS /(U/μg prot)
Control	105.02 ± 15.13	3.62 ± 1.28	34.34 ± 8.22
Model	52.87 ± 10.63 ^{##}	8.94 ± 2.73 ^{##}	74.92 ± 14.24 ^{##}
GA	77.58 ± 12.78 ^{* * Δ}	6.43 ± 1.81 ^{* Δ Δ}	48.82 ± 9.67 ^{* Δ Δ}
CIP	85.23 ± 13.88 ^{* *}	5.69 ± 1.56 [*]	50.02 ± 14.31 ^{* Δ}
GA + CIP	98.32 ± 18.11 ^{* *}	4.31 ± 0.77 ^{* *}	38.18 ± 8.82 ^{* *}

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs GA + CIP group

3.5 鼻黏膜组织中炎性因子 TNF-α、IL-6、IL-8 的表达

Western blot 检测鼻黏膜组织中炎性因子 TNF-α、IL-6 和 IL-8 的蛋白表达水平,结果如图 3 所示。与对照组相比,CRS 模型组鼻黏膜组织中 TNF-α、IL-6、IL-8 含量均显著升高($P < 0.01$)。与

模型组相比,各药物治疗组 TNF-α、IL-6、IL-8 表达水平显著下降($P < 0.01$)。与药物单用组(GA、CIP)相比,药物联用组(GA + CIP)降低炎性因子的效果更加明显($P < 0.01$),表明 GA 与 CIP 联用比单独作用更能有效抑制 CRS 小鼠鼻黏膜组织中炎性因子的表达。

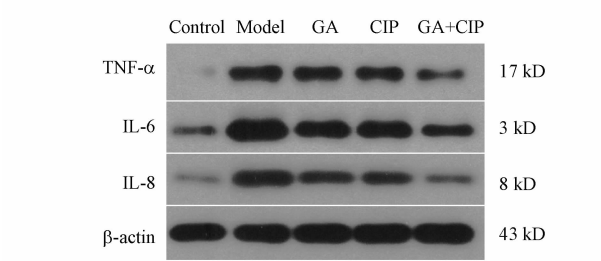
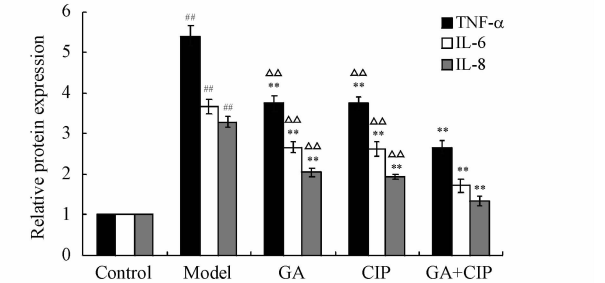


Figure 3 Effects of GA and CIP on expression of TNF-α, IL-6 and IL-8 in nasal mucosa tissues of murine CRS model by Western blot ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.01$ vs model group; ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs GA + CIP group



3.6 鼻黏膜组织中 IκB 和 NF-κB p65 的表达

Western blot 检测鼻黏膜组织中 IκB 和 NF-κB p65 的表达,结果如图 4 所示。与对照组相比,CRS 模型组胞浆蛋白 IκB 表达显著下降($P < 0.05$),胞核蛋白 NF-κB p65 表达显著升高($P < 0.01$)。与

模型组相比,各药物治疗组胞浆蛋白 IκB 表达显著上升($P < 0.05$),胞核蛋白 NF-κB p65 表达显著下降,且药物联用组比药物单用组 IκB 和 NF-κB p65 的变化更明显。说明 GA 与 CIP 药物联用比单独作用对 NF-κB 信号通路的抑制作用更强。

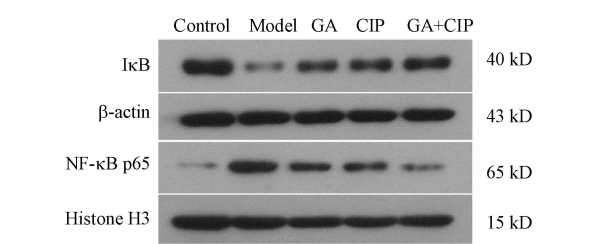
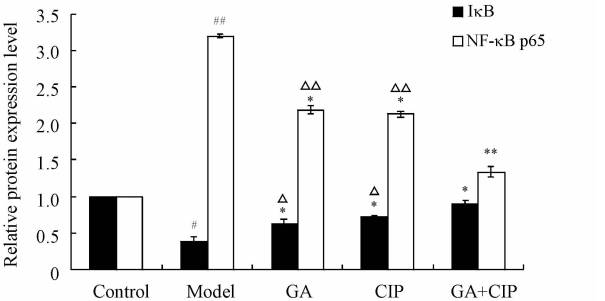


Figure 4 Effects of GA and CIP on expression of IκB and NF-κB p65 in murine CRS model by Western blot ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs GA + CIP group



4 讨论

CRS 是鼻腔和鼻窦的慢性炎症,随着对 CRS 病理机制的深入研究,人们发现细菌生物膜的形成可

能是 CRS 迁延不愈以及抗生素耐药的主要原因^[15-17],铜绿假单胞杆菌广泛分布于人体皮肤、呼吸道和肠道,是重要的条件致病菌,能产生由糖蛋白构成的生物被膜而达到多药耐药作用^[18]。本研究

通过鼻腔阻塞加铜绿假单胞杆菌接种的方法成功构建小鼠 CRS 模型,组织形态学观察符合 CRS 标准。

CRS 患者鼻黏膜组织中炎症细胞大量浸润,产生多种炎性细胞因子(如 TNF- α 、IL-6、IL-8 等)及氧自由基,使机体 ROS 含量升高,氧自由基参与并通过脂质过氧化反应产生分解产物 MDA 等,引起细胞膜结构受损,炎症介质大量释放。SOD 能有效清除氧自由基,抑制鼻黏膜组织中的脂质过氧化反应,维持机体 ROS 平衡,抑制炎症反应。本研究结果表明 GA 或 CIP 能有效降低血清及鼻黏膜组织中炎性因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的表达水平,减少 MDA 及 ROS 含量,增强 SOD 活性,且药物联用比单用效果更明显,提示 GA 与 CIP 联用能有效抑制 CRS 小鼠炎症反应及氧化应激水平。

正常情况下 NF- κ B 二聚体与 I κ B 结合以非活性形式存在于细胞质中,当细胞受到外界刺激后, NF- κ B 二聚体与 I κ B 分离,进入细胞核调控靶基因的表达,诱导产生促炎因子、趋化因子、黏附因子等,扩大炎症反应。NF- κ B 通路抑制剂在慢性炎症疾病和肿瘤的治疗中发挥重要作用^[19]。本研究结果表明 GA 或 CIP 能有效降低鼻黏膜组织中胞核蛋白 NF- κ B p65 表达水平,增加胞浆蛋白 I κ B 的含量,且 GA 与 CIP 联用作用效果更为显著,提示 GA 与 CIP 联用比单用抑制 NF- κ B 通路激活的作用更强。

GA 与 CIP 联用对 CRS 的初步研究结果表明药物联用可显著降低 CRS 的炎症水平,降低血清及鼻黏膜中炎性因子的表达,减少 MDA、ROS 释放,增加 SOD 活性,抑制 NF- κ B 通路的激活。与药物单独作用相比,GA 与 CIP 联合用药效果更佳,可能通过抑制 NF- κ B 通路激活,下调 TNF- α 、IL-6、IL-8 的表达发挥作用。

参考文献

- [1] Hamilos DL. Chronic rhinosinusitis: epidemiology and medical management[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, **128**(4): 693–707.
- [2] Dykewicz MS, Hamilos DL. Rhinitis and sinusitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, **125**(2 Suppl 2): S103–115.
- [3] Wu KQ. Antitumor activity and mechanism of saikosaponin D combined with oxaliplatin on A549 cells- bearing nude mice[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2015, **46**(3): 355–358.
- [4] Lee DS, Eom SH, Kim YM, *et al.* Antibacterial and synergic effects of gallic acid-grafted-chitosan with beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *Can J Microbiol*, 2014, **60**(10): 629–638.
- [5] Alkan D, Aydemir LY, Arcan I, *et al.* Development of flexible antimicrobial packaging materials against *Campylobacter jejuni* by incorporation of gallic acid into zein-based films [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, **59**(20): 11003–11010.
- [6] Choi HJ, Song JH, Bhatt LR, *et al.* Anti-human rhinovirus activity of gallic acid possessing antioxidant capacity[J]. *Phytother Res*, 2010, **24**(9): 1292–1296.
- [7] Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: molecular rival of cancer[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, **35**(3): 473–485.
- [8] Hsu JD, Kao SH, Ou TT, *et al.* Gallic acid induces G₂/M phase arrest of breast cancer cell MCF-7 through stabilization of p27 (Kip1) attributed to disruption of p27 (Kip1)/Skp2 complex [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, **59**(5): 1996–2003.
- [9] You BR, Moon HJ, Han YH, *et al.* Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, **48**(5): 1334–1340.
- [10] Pal C, Bindu S, Dey S, *et al.* Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, **49**(2): 258–267.
- [11] Jayamani J, Shanmugam G. Gallic acid, one of the components in many plant tissues, is a potential inhibitor for insulin amyloid fibril formation[J]. *Eur J Med Chem*, 2014, **85**: 352–358.
- [12] Shahrzad S, Aoyagi K, Winter A, *et al.* Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans [J]. *J Nutr*, 2001, **131**(4): 1207–1210.
- [13] *The National Clinical Test Regulation of Operation* (全国临床检验操作规程) [M]. Nanjing: Southeast University Press, 2006: 290.
- [14] Jacob A, Faddis BT, Chole RA. Chronic bacterial rhinosinusitis: description of a mouse model [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, **127**(6): 657–664.
- [15] Danielsen KA, Eskeland O, Fridrich-Aas K, *et al.* Bacterial biofilms in patients with chronic rhinosinusitis: a confocal scanning laser microscopy study [J]. *Rhinology*, 2014, **52**(2): 150–155.
- [16] Al-Mutairi D, Kilty SJ. Bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2011, **11**(1): 18–23.
- [17] Du J, Zhao CY, Wang X. Research progresses on the pathogenesis of bacterial biofilm in chronic rhinosinusitis [J]. *J Clin Otorhinol Head Neck Surg* (临床耳鼻咽喉头颈外科杂志), 2013, **27**(8): 446–448.
- [18] Masak J, Cejkova A, Schreiberova O, *et al.* *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2014, **89**(1): 1–14.
- [19] Xiao J, Duan X, Yin Q, *et al.* The inhibition of metastasis and growth of breast cancer by blocking the NF- κ B signaling pathway using bioreducible PEI-based/p65 shRNA complex nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(21): 5381–5390.