

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.17.013

复方肿节风雾化剂对慢性咽炎模型大鼠咽部黏膜组织炎症因子的影响



陈方园¹, 张燕平²✉, 杨荣刚², 李云松², 刘小东², 朱福钗¹

1. 贵州中医药大学研究生院, 贵州省贵阳市南明区市东路 50 号, 550025; 2. 贵州中医药大学第二附属医院

摘要 **目的** 探讨复方肿节风雾化剂治疗慢性咽炎的可能作用机制。 **方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组 10 只和造模组 50 只。造模组大鼠采用 A 族乙型溶血性链球菌注射液咽部注射构建慢性咽炎大鼠模型, 将造模成功的 42 只大鼠随机分为模型组 10 只, 氨苄西林钠组及复方肿节风低、中、高剂量组, 每组 8 只。复方肿节风低、中、高剂量组分别给予 20 ml 含有复方肿节风雾化剂 2.33、4.66、9.32 g/(kg·d) 的氯化钠溶液进行超声雾化, 正常组、模型组给予等体积生理盐水雾化, 氨苄西林钠组腹腔注射氨苄西林钠 0.93 g/(kg·d)。在造模开始后第 4、14 天观察各组大鼠毛发、精神状态、口腔分泌物、咽部黏膜等情况, 14 天后 HE 染色观察咽部黏膜组织病理; ELISA 法检测咽部黏膜组织肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 含量。采用 RT-qPCR 和免疫组化法检测咽部黏膜组织中肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6)、核因子 κ B p65 (NF- κ B p65) 蛋白及 mRNA 表达。 **结果** 与正常组比较, 模型组大鼠咽部黏膜结构不完整, 破坏明显, 上皮脱落、坏死, 见大量炎性细胞浸润, 咽部黏膜组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, TRAF-6、NF- κ B p65 蛋白及 mRNA 表达量均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 复方肿节风高、中剂量组及氨苄西林钠组咽部黏膜上皮未见明显角质化, 复合鳞状上皮未见明显增生, 可见少量炎症细胞浸润, 肌层纤维排列整齐; 复方肿节风低剂量组咽部黏膜组织复层鳞状上皮角质化、增生、脱落, 黏膜下层水肿, 大量炎症细胞浸润, 肌层纤维排列欠规则。与模型组比较, 复方肿节风高、中剂量组及氨苄西林钠组大鼠咽部黏膜组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量, TRAF-6、NF- κ B p65 蛋白及 mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$)。 **结论** 复方肿节风雾化剂能有效改善慢性咽炎模型大鼠咽部黏膜炎性状态, 其中高、中剂量效果更好, 其作用机制可能与调控咽部黏膜组织 TRAF6/NF- κ B p65 通路有关。

关键词 慢性咽炎; A 族链球菌; 复方肿节风雾化剂; 肿瘤坏死因子受体相关因子 6; 核因子 κ B p65

A 族链球菌 (the group A streptococcus, GAS) 感染是儿童和成人细菌性咽炎最常见的病因^[1-2], 临床多表现为咽痛、咽痒、咽部异物感、咽部烧灼感等, 急性发作时可伴发热、头痛、呕吐、腹痛等^[3], GAS 感染的慢性咽炎还可诱发猩红热、扁桃体肥大、睡眠呼吸暂停等症, 甚至诱发自身免疫性疾病^[4-5]。青霉素类抗生素是西医治疗 GAS 感染的慢性咽炎的首选药^[6], 但由于存在对青霉素类药过敏、耐药、毒副作用等问题, 使得寻求更好的抗感染方法十分重要。复方肿节风雾化剂根据名老中医专家李声岳教授经验方改良而成, 是贵州中医药大学第二附属医院治疗咽炎的经验方, 临床疗

效较好^[6-7], 具有清热解毒、活血祛瘀、消肿止痛、养阴利咽的功效。肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6)/核因子 κ B p65 (NF- κ B p65) 通路是调控慢性咽炎炎症反应的重要通路, 与慢性咽炎局部炎症反应密切相关^[8-9]。本研究采用咽部注射 GAS 的方法建立 GAS 感染的慢性咽炎大鼠模型^[10-11], 以 TRAF6/NF- κ B p65 信号通路为靶标, 探讨复方肿节风雾化剂治疗 GAS 感染的慢性咽炎的可能作用机制。本研究经贵州中医药大学动物医学伦理委员会批准 (批号: 1705051)。

1 材料与方法

1.1 动物及细菌

SPF 级健康 SD 大鼠 60 只, 5~6 周龄, 雌雄各半, 体质量 (210 ± 30) g, 由南京市青龙山动

基金项目: 国家自然科学基金 (81760882)

✉ 通讯作者: 952988229@qq.com, (0851) 85557518

物繁殖中心提供, 实验动物合格证号: SCXK (苏) 2017-0001, 饲养温度 (18 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 (50 ± 2) %。大鼠正常饮食及活动, 适应性喂养 1 周后开始实验。A 族乙型溶血性链球菌注射液 (批号: FSCC225016), 广州环凯微生物科技有限公司。

1.2 药物

复方肿节风雾化剂组成: 肿节风、鱼腥草、麦冬、桔梗、红花比例为 4:1:3:1:2, 由贵州中医药大学第二附属医院药房提供 (批准文号: 黔药制字 Z20140036, 每毫升制剂相当于生药 2 g); 注射用氨苄西林钠 (1.0 g/支, 批号: H13020426), 华北制药股份有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

二甲苯 (批号 1330-20-7), 国药集团化学试剂有限公司; 苏木素 (批号 BA4097)、伊红染液 (BA4099), 珠海贝索生物有限公司; 水合氯醛 (批号 302170), AMEKO 公司; ELISA 试剂盒: 肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 批号 CSB-E11987r)、白细胞介素 1 β (IL-1 β , 批号 CSB-E08055r)、白细胞介素 6 (IL-6, 批号 CSB-E04640r), Cusabio 公司; 逆转录试剂盒 (批号 RR047A)、SYBR Green 溶液 (批号 RR820A)、Trizol 试剂盒 (批号 9108), 日本 Takara 公司; DEPC (批号 D105557), 上海阿拉丁生化公司; TRAF6 兔抗体 (批号 GR142247-2), 英国 Abcam 公司; NF- κ B p65 兔抗体 (批号 00057397), 美国 Proteintech 公司。

80 mm 额戴反光镜, 江苏远燕医疗设备有限公司; H550S 型显微镜、DS-R12 型成像系统, 日本 Nikon 公司; ECS000282 Nano drop 2000 型超微量分光光度计, 美国赛默飞世尔科技公司; Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪、Veriti 型 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; LDZ5-2 型离心机, 北京离心机厂; Mini Protean3 SDS-PAGE 型电泳仪、170-3930 型湿法转膜仪, Bio-Rad 公司; Tanon5200 型化学发光检测系统, Tanon 公司; JEM1011 透射电镜仪, 日本电子公司; EM UC6 型超薄切片机, Leica 公司。

1.4 GAS 感染的慢性咽炎大鼠模型的建立

SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法分为正常组 10 只及造模组 50 只。参照文献 [10-11] 方法造模, 造模组大鼠于实验第 1、4、7、10、13、16 天咽部黏膜点刺 15 μl 浓度为 1108 CFU/ml A 族乙型溶血性链球菌注射液。第 16 天注射结束后额戴反光镜下观察大鼠咽部组织肿胀

且暗红充血, 采用随机数字表法取 3 只造模组大鼠处死, 取咽部黏膜组织, 见咽部黏膜大量复合鳞状上皮脱落、坏死, 间质水肿, 固有膜内小血管扩张充血, 见大量炎症细胞浸润, 肌层纤维排列紊乱, 符合慢性咽炎动物模型特征 [1], 并与《中药新药临床研究指导原则》中诊断标准体征“咽部黏膜慢性充血, 色暗红, 血管扩张, 或咽侧索肿大, 咽黏膜增生肥厚, 或树枝状充血, 咽后壁淋巴滤泡增生, 或干燥、萎缩、变薄, 有分泌物附着” [2] 相近, 则判断为建模成功。

1.5 分组及给药

5 只大鼠在造模过程中死亡, 造模成功的 42 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为模型组 10 只, 氨苄西林钠组及复方肿节风低、中、高剂量组, 每组 8 只。按照人与动物剂量换算方法 [3] 计算大鼠给药等效剂量为 2.33 g/(kg·d)。复方肿节风低、中、高剂量组分别给予 20 ml 含有复方肿节风雾化剂 2.33、4.66、9.32 g/(kg·d) 的氯化钠溶液进行超声雾化, 正常组、模型组给予等体积生理盐水雾化, 氨苄西林钠组腹腔注射氨苄西林钠 0.93 g/(kg·d), 各组均干预 14 天。

1.6 观察指标及方法

末次给药 24 h 后用 10% 水合氯醛 1 ml/100 g 腹腔注射麻醉处死大鼠, 分离两侧嘴角, 暴露咽部, 剥离咽后壁黏膜及其下组织面积大小约 7 mm $\times$ 5 mm。均分为两份, 一份置于 4% 多聚甲醛固定, 室温保存; 另一份置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.6.1 各组大鼠一般情况 造模开始后第 4、14 天, 观察各组大鼠毛发、精神状态、口腔分泌物等情况; 使用医用胶布将大鼠固定于大鼠固定版, 额镜下观察咽部黏膜情况。

1.6.2 咽部黏膜组织形态学 咽部黏膜组织经 4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水洗后, 置于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 石蜡包埋切片, HE 染色后再次脱水透明, 最后用中性树胶封片, 光学显微镜下观察。

1.6.3 咽部黏膜组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量 正常组、模型组根据随机数字表法分别取 8 只大鼠, 与其余各组大鼠各取面积大小约 3.5 mm $\times$ 2.5 mm 咽后壁黏膜及其下组织, 加入 500 μl PBS 溶液, 经组织匀浆后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4000 r/min 离心 10 min (离心半径 13.5 cm), 取其上清即为匀浆液, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 ELISA 法检测咽部组织匀浆液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平。具体操作按试剂盒说明书进行。

1.6.4 咽部黏膜组织 TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达 各组根据随机数字表法分别取 3 只大鼠咽部黏膜组织进行裂解, qPCR 法测定 mRNA, 根据 Trizol 试剂盒说明书提取大鼠咽部黏膜组织总 RNA, 定量并检测样本 RNA 浓度, 按照 PrimeScript™ RT Master Mix 使用说明书进行反转录合成 cDNA, 扩增目的基因。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。引物序列: TRAF6 上游: 5'-AGCAGATGG-GACACTCATACTT-3', 下游: 5'-AAACAGTTG-GAGAGTCGCCTA-3', 扩增片段 470 bp; NF- κ B p65 上游: 5'-TTGCTCCAGGTCTCGCTTCTTCACA-3', 下游: 5'-TCCTTTCAATGGACCAACTGAA-3', 扩增片段 342 bp; 内参基因 GAPDH 上游引物 5'-CAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTAA-3', 下游 5'-GGGTGGAATCATATTGGAACATGT-3', 扩增片段 101 bp。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。

1.6.5 咽部黏膜组织 TRAF6、NF- κ B p65 蛋白表达 采用随机数字表法每组取 3 只大鼠面积约 3.5 mm × 2.5 mm 咽部黏膜组织, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 石蜡包埋、切片、封闭, 采用免疫组化法测定蛋白表达, 切片滴加稀释的一抗 (1:200), 孵育过夜, 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入二抗, 4℃ 恒温孵育 50 min, 洗膜 3 次, 滴加 DAB 工作液 (约 50 μ l/片, 以覆盖组织为度), 显微镜下观察显色。显色完全后, 苏木素染料复染, 氨水返蓝, 切片经脱水干燥、二甲苯溶液透明、中性树胶封片, 置于光学显微镜下观察。观察到 TRAF6、NF- κ B p65 抗体在细胞浆呈棕黄色染色为阳性, 不着色为阴性。以 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行分析, 计算每个视野中阳性细胞相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。计量资料均符合正态分布以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用单因素方差分析; 两两比较, 数据方差齐用 LSD 法, 方差不齐用 Tamhane's T^2 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

正常组大鼠全程表现无异常, 其毛发茂密有光泽, 行动灵活, 无口流分泌物、抓挠口腔等症状, 额镜下观察咽部黏膜未见明显异常。模型组大鼠在注射 A 族乙型溶血性链球菌 4 天后出现精神倦怠、少动, 毛发稀疏无光泽, 口腔分泌物增多, 偶见血丝, 频繁抓挠口腔周围, 饮水增多, 纳差等症状,

造模 14 天后在额戴反光镜下观察发现咽部黏膜充血肿大, 暗红干燥, 光泽度差, 见少量淡黄分泌物。复方肿节风高、中、低剂量组及氨苄西林钠组大鼠上述症状、体征逐步缓解及消失。

2.2 各组大鼠咽部组织形态学结果

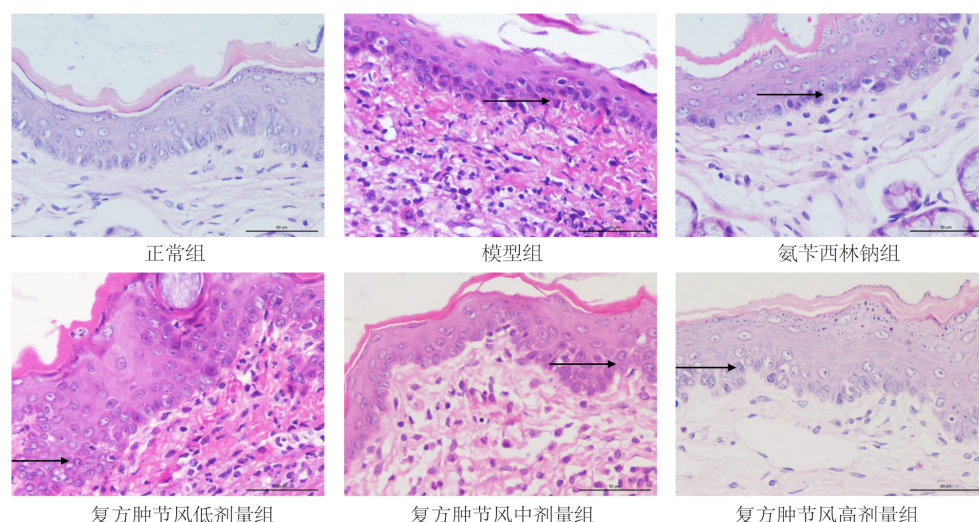
正常组大鼠咽部黏膜各层次分界清晰, 复层鳞状上皮形态完好, 黏膜下层未见明显水肿, 未见明显炎症细胞浸润; 模型组大鼠咽部黏膜表层角质化, 大量复合鳞状上皮脱落、坏死, 与黏膜下层边界不清, 间质水肿, 固有膜内小血管扩张充血, 可见大量炎症细胞浸润, 肌层纤维排列紊乱; 复方肿节风高、中剂量组及氨苄西林钠组咽部黏膜上皮未见明显角质化, 复合鳞状上皮未见明显增生, 可见少量炎症细胞浸润, 肌层纤维排列整齐; 复方肿节风低剂量组黏膜咽部组织复层鳞状上皮角质化、增生、脱落, 黏膜下层水肿, 大量炎症细胞浸润, 肌层纤维排列欠规则。详见图 1 (彩图请扫描本文二维码获取)。

2.3 各组大鼠咽部黏膜组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠咽部黏膜组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 氨苄西林钠组及复方肿节风各剂量组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均降低 ($P < 0.05$); 与氨苄西林钠组比较, 复方肿节风中剂量组 IL-1 β 及复方肿节风低剂量组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均升高 ($P < 0.05$), 复方肿节风中剂量组 TNF- α 、IL-6 及复方肿节风高剂量组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与复方肿节风低剂量组比较, 复方肿节风高剂量组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均降低 ($P < 0.05$); 复方肿节风高、中剂量组各指标相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠咽部黏膜组织 TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组大鼠咽部黏膜组织 TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 复方肿节风中、高剂量组及氨苄西林钠组 TRAF6、NF- κ B p65 mRNA, 复方肿节风低剂量组 NF- κ B p65 mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$); 与氨苄西林钠组比较, 复方肿节风中、高剂量组大鼠咽部黏膜组织 TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 复方肿节风低剂量组 TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$); 与复方肿节风低剂量组比较,



注: 图中箭头所指为黏膜层。

图 1 各组大鼠咽部黏膜组织病理形态 (HE 染色, ×400)

表 1 各组大鼠咽部黏膜组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较(pg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常组	8	42.78 $\pm$ 5.50	202.36 $\pm$ 23.30	29.19 $\pm$ 4.19
模型组	8	149.12 $\pm$ 14.50 ^{a)}	895.71 $\pm$ 84.14 ^{a)}	98.64 $\pm$ 8.34 ^{a)}
氨苄西林钠组	8	57.10 $\pm$ 12.47 ^{b)}	343.91 $\pm$ 32.22 ^{b)}	42.22 $\pm$ 6.10 ^{b)}
复方肿节风低剂量组	8	111.04 $\pm$ 14.78 ^{b)c)}	702.40 $\pm$ 86.26 ^{b)c)}	73.00 $\pm$ 11.24 ^{b)c)}
复方肿节风中剂量组	8	86.72 $\pm$ 11.26 ^{b)}	575.58 $\pm$ 62.64 ^{b)c)}	58.17 $\pm$ 4.88 ^{b)}
复方肿节风高剂量组	8	62.11 $\pm$ 4.41 ^{b)d)}	451.18 $\pm$ 45.87 ^{b)d)}	46.08 $\pm$ 9.84 ^{b)d)}

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-6, 白细胞介素 6。a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与氨苄西林钠组比较, $P < 0.05$; d) 与复方肿节风低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

复方肿节风高剂量组 TRAF6、NF- κ B p65 mRNA, 复方肿节风中剂量组 NF- κ B p65 mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$); 复方肿节风中、高剂量组 TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠咽部黏膜组织 TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TRAF6	NF- κ B p65
正常组	3	1.00 $\pm$ 0.31	1.00 $\pm$ 0.22
模型组	3	2.64 $\pm$ 0.38 ^{a)}	4.25 $\pm$ 0.10 ^{a)}
氨苄西林钠组	3	1.37 $\pm$ 0.27 ^{b)}	1.61 $\pm$ 0.35 ^{b)}
复方肿节风低剂量组	3	2.29 $\pm$ 0.32 ^{c)}	3.00 $\pm$ 0.37 ^{b)c)}
复方肿节风中剂量组	3	1.88 $\pm$ 0.39 ^{b)}	2.20 $\pm$ 0.15 ^{b)d)}
复方肿节风高剂量组	3	1.48 $\pm$ 0.30 ^{b)d)}	1.91 $\pm$ 0.26 ^{b)d)}

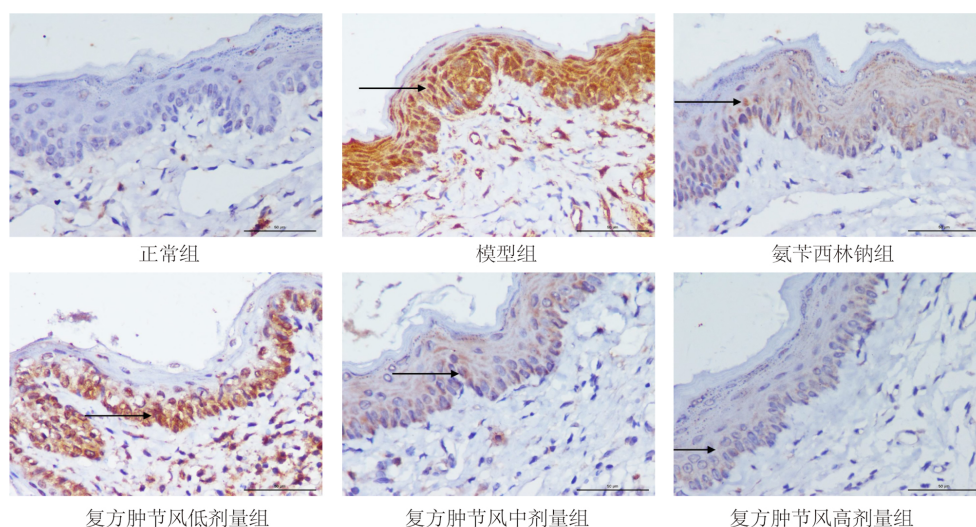
注: TRAF6, 肿瘤坏死因子受体相关因子 6; NF- κ B p65, 核因子 κ B p65。a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与氨苄西林钠组比较, $P < 0.05$; d) 与复方肿节风低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 各组大鼠咽部黏膜组织 TRAF6、NF- κ B p65 蛋白表达比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组大鼠咽部黏膜

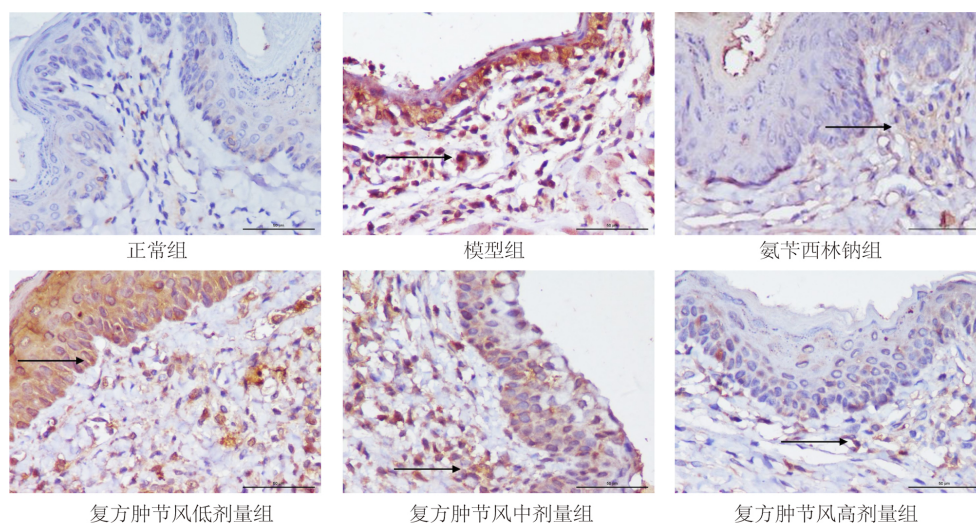
组织 TRAF6 及 NF- κ B p65 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 复方肿节风各剂量组及氨苄西林钠组 TRAF6、NF- κ B 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$); 与氨苄西林钠组比较, 复方肿节风高剂量组 TRAF6、NF- κ B p65 蛋白表达及复方肿节风中剂量组 NF- κ B p65 蛋白表达无统计学意义 ($P > 0.05$), 复方肿节风中剂量组 TRAF6 及复方肿节风低剂量组 TRAF6、NF- κ B p65 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$); 与复方肿节风低剂量组比较, 复方肿节风高剂量组 TRAF6、NF- κ B p65, 复方肿节风中剂量 TRAF6 表达均降低 ($P < 0.05$)。复方肿节风中、高剂量组 TRAF6、NF- κ B p65 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

模型组中咽黏膜免疫染色见 TRAF6、NF- κ B p65 高表达, 其表现为黏膜层、黏膜下层内出现棕色颗粒或棕色染色, 而正常组则未见上述明显表现; 氨苄西林钠组、复方肿节风各剂量组中 TRAF6、NF- κ B p65 表达均低于模型组, 其中氨苄西林钠组、复方肿节风高、中剂量组更明显。详见图 2、图 3 (彩图请扫描本文二维码获取)。



注：图中箭头所指为黏膜层，棕色颗粒及棕色染色为免疫反应阳性物质；TRAF6，肿瘤坏死因子受体相关因子 6。

图 2 各组大鼠咽部黏膜组织 TRAF6 蛋白表达（免疫组化法，×400）



注：图中箭头所指为黏膜层，棕色颗粒及棕色染色为免疫反应阳性物质；NF-κB p65，核因子 κB p65。

图 3 各组大鼠咽部黏膜组织 NF-κB p65 蛋白表达（免疫组化法，×400）

表 3 各组大鼠咽部黏膜组织 TRAF6 和 NF-κB p65 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TRAF6	NF-κB p65
正常组	3	1080 ± 129	1035 ± 166
模型组	3	9187 ± 604 ^{a)}	9139 ± 566 ^{a)}
氨苄西林钠组	3	2959 ± 275 ^{b)}	3492 ± 724 ^{b)}
复方肿节风低剂量组	3	7228 ± 308 ^{b) c)}	6427 ± 532 ^{b) c)}
复方肿节风中剂量组	3	5197 ± 308 ^{b) c) d)}	4970 ± 588 ^{b)}
复方肿节风高剂量组	3	3768 ± 347 ^{b) d)}	3768 ± 347 ^{b) d)}

注：TRAF6，肿瘤坏死因子受体相关因子 6；NF-κB p65，核因子 κB p65。

a) 与正常组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；c) 与氨苄西林钠组比较， $P < 0.05$ ；d) 与复方肿节风低剂量组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

我们认为，GAS 感染的慢性咽炎为本虚标实之证，以气阴两虚为本，瘀血、痰饮、火邪等为标。复方肿节风雾化剂中以肿节风清热解毒、活血祛瘀、祛风止痛，为君药。红花、鱼腥草助肿节风活血祛瘀、清热解毒，为臣药。佐以麦冬养阴润肺、益胃生津而利咽。桔梗开提肺气、宣肺祛痰、利咽排脓以为使。全方攻补兼施，活血而不伤正、补而不滞，共奏清热解毒、活血祛瘀、消肿止痛、养阴利咽之功。

本实验通过咽部注射 A 族乙型溶血性链球菌注射液的方法构建 GAS 感染的慢性咽炎大鼠模型，

造模 14 天后,模型组大鼠出现频繁抓挠口腔、口腔分泌物增多、咽部黏膜暗红充血等现象,而复方肿节风各剂量组大鼠上述症状、体征的程度较轻;HE 染色发现,模型组咽部黏膜表层角质化,上皮脱落、坏死,间质水肿,小血管充血,可见大量炎症细胞浸润,经过中、高剂量复方肿节风雾化剂治疗后,大鼠抓挠口腔、咽部黏膜充血等减轻,口腔分泌物减少,提示复方肿节风雾化剂可改善咽部黏膜组织损伤,减少炎症细胞浸润,减轻咽组织水肿。

咽炎主要病理特征为咽部黏膜等组织中具有多种感染或非感染性炎症细胞浸润^[4]。急性咽炎由病毒、细菌感染引起,慢性咽炎继发于急性咽炎之后。研究发现,在 GAS 感染的慢性咽炎期间,促炎转录因子 NF- κ B 介导了促炎基因的表达^[5]。核因子 κ B (NF- κ B) 由 p65、p52 等五个结构相关成员组成,可调节大量免疫、炎症反应基因^[6];经典 NF- κ B 途径响应模式识别受体 (PRR)、T 细胞受体 (TCR) 等的刺激^[7],而后核因子复合物释放 NF- κ B 二聚体 p65/p50 并迅速磷酸化^[8]。TRAF6 是 TRAF6/NF- κ B 通路中关键介体,NF- κ B 是调节 mRNA 的重要转录因子,病原菌入侵机体激活 TRAF6,后进一步激活 NF- κ B^[9],诱导 NF- κ B 信号通路活化,从而启动 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子 mRNA 的转录与表达,进而触发炎症反应^[10,11]。NF- κ B 是促炎基因表达的核心调节因子,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎因子可通过激活 NF- κ B 信号通路,进而诱导炎症反应^[12];TRAF6 缺失或 NF- κ B 信号抑制剂干预,则导致 IL-1 β 、IL-6 等促炎因子明显减少^[13]。本研究结果显示,复方肿节风雾化剂可抑制 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达,且以高、中剂量效果更佳,提示复方肿节风雾化剂可通过抑制炎症因子的分泌而起到抗炎作用。NF- κ B 依赖性促炎因子在气道炎症反应中发挥着核心作用^[14]。本研究亦发现,模型组大鼠咽部组织中 TRAF6、NF- κ B p65 的蛋白及 mRNA 表达明显升高,复方肿节风中、高剂量组 TRAF6、NF- κ B p65 的 mRNA 和蛋白表达显著降低,提示复方肿节风雾化剂可能通过下调 TRAF6 水平,抑制 NF- κ B p65 进入细胞核,从而有效地抑制 TRAF6/NF- κ B p65 信号通路活化,抑制炎症反应,发挥抗炎作用。复方肿节风高剂量组与氨苄西林钠组之间差异无统计学意义,说明高剂量与氨苄西林钠疗效相当。由于慢性咽炎发病机制较复杂,影响因素较多,本研究只探讨了复方肿节风雾化剂治疗慢性咽炎的一个环节,是否有其他通路参与亟待进一步研究。

参考文献

- [1] SODERHOLM AT, BARNETT TC, SWEET MJ, et al. Group A streptococcal pharyngitis: immune responses involved in bacterial clearance and GAS-associated immunopathologies [J]. J Leukoc Biol, 2018, 103(2): 193-213.
- [2] MURRAY RC, CHENNUPATI SK. Chronic streptococcal and non-streptococcal pharyngitis [J]. Infect Disord Drug Targets, 2012, 12(4): 281-285.
- [3] SHULMAN ST, BISNO AL, CLEGG HW, et al. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America [J]. Clin Infect Dis, 2012, 55(10): e86-e102.
- [4] HOLLINGSHEAD SK, SIMECKA JW, MICHALEK SM. Role of M protein in pharyngeal colonization by group A streptococci in rats [J]. Infect Immun, 1993, 61(6): 2277-2283.
- [5] WESSEL MR. Pharyngitis and scarlet fever [C] // FERRETTI JJ, STEVENS DL, FISCHETTI VA. Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016: 705-722.
- [6] 廖龙燕, 张燕平. 复方肿节风雾化剂联合穴位注射治疗风热型急性咽炎临床研究 [J]. 新中医, 2019, 51(3): 210-212.
- [7] 李云松, 张燕平. 复方肿节风雾化剂治疗慢性咽炎的随机对照研究 [J]. 全科口腔医学电子杂志, 2018, 5(33): 190-191, 193.
- [8] CHEN L, LAI Y, DONG L, et al. Polysaccharides from Citrus grandis L. Osbeck suppress inflammation and relieve chronic pharyngitis [J]. Microb Pathog, 2017, 113: 365-371. doi: 10.1016/j.micpath.2017.11.018.
- [9] 刘雨娟, 王莉, 姚兰, 等. TNF- α 介导的 NF- κ B 通路在沙尘导致大鼠慢性咽炎中的作用及射干对其影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(17): 4254-4256.
- [10] ROBERTS S, SCOTT JR, HUSMANN LK, et al. Murine models of Streptococcus pyogenes infection [J]. Curr Protoc Microbiol, 2006, 9: 9-45. doi: 10.1002/9780471729259.mc09d05s02.
- [11] 彭顺林, 钟渠, 熊大经, 等. 慢性咽炎动物模型研究 [J]. 成都中医药大学学报, 1999, 22(1): 51-53.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 (第一辑) [M]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1993: 308.
- [13] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [14] KOCIOLEK LK, SHULMAN ST. In the clinic. Pharyngitis [J]. Ann Intern Med, 2012, 157(5): ITC3-4-ITC3-46.
- [15] OECKINGHAUS A, GHOSH S. The NF- κ B family of

- transcription factors and its regulation [1]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(4): a000034.
- [6] LIU T, ZHANG L, JOO D, et al. NF- κ B signaling in inflammation [1]. Signal Transduct Target Ther, 2017, 2: 17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- [7] RINKENBAUGH AL, COGSWELL PC, CALAMINI B, et al. IKK/NF- κ B signaling contributes to glioblastoma stem cell maintenance [1]. Oncotarget, 2016, 7(43): 69173-69187.
- [8] FENG Z, WANG Z, YANG M, et al. Polysaccharopeptide exerts immunoregulatory effects via MyD88-dependent signaling pathway [1]. Int J Biol Macromol, 2016, 82: 201-207. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.11.002.
- [9] GRATZ N, HARTWEGER H, MATT U, et al. Type I interferon production induced by Streptococcus pyogenes-derived nucleic acids is required for host protection [1]. PLoS Pathogens, 2011, 7(5): e1001345.
- [20] REDHU NS, SALEH A, HALAYKO AJ, et al. Essential role of NF- κ B and AP-1 transcription factors in TNF- α -induced TSLP expression in human airway smooth muscle cells [1]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011, 300(3): L479-L485.
- [21] WI SM, MOON G, KIM J, et al. TAK1-ECSIT-TRAF6 complex plays a key role in the TLR4 signal to activate NF- κ B [1]. J Biol Chem, 2014, 289(51): 35205-35214.
- [22] CLARKE D, DAMERA G, SUKKAR MB, et al. Transcriptional regulation of cytokine function in airway smooth muscle cells [1]. Pulm Pharmacol Ther, 2009, 22(5): 436-445.

Effect of Compound Zhongjiefeng Nebulizer (复方肿节风雾化剂) on Inflammatory Factors of Pharyngeal Mucosa in Chronic Pharyngitis Model Rats

CHEN Fangyuan¹, ZHANG Yanping², YANG Ronggang², LI Yunsong², LIU Xiaodong², ZHU Fuchai¹

1. Graduate School, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, 550025; 2. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of Compound Zhongjiefeng Nebulizer (复方肿节风雾化剂, CZN) in the treatment of chronic pharyngitis. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into normal group (n = 10) and model group (n = 50). The rats in the model group were injected with group A beta hemolytic streptococcus into the pharynx to develop the model of chronic pharyngitis. The 42 successfully modeled rats were further randomly divided into model group (n = 10), ampicillin sodium group (n = 8) and CZN low, medium, and high-dose groups (each with 8 rats). The CZN low, medium, and high-dose groups were given ultrasonic atomization of 20 ml solution containing 2.33, 4.66, and 9.32 g/(kg · d) of CZN, respectively; the normal group and the model group received atomization of the same volume of normal saline; the ampicillin sodium group was injected intraperitoneally with 0.93 g/(kg · d) of ampicillin sodium. The hair, mental state, oral secretions, and pharyngeal mucosa of rats in each group were assessed on the 4th and 14th day after modeling. After 14 days, the pathology of the pharyngeal mucosa was observed through HE staining; ELISA method was used to detect the content of the tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6) in the pharyngeal mucosal tissue; RT-qPCR and immunohistochemistry were used to detect tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), nuclear factor κ B p65 (NF- κ B p65) protein and mRNA expression. **Results** Compared to those of the normal group, the pharyngeal mucosal structure of the model group was incomplete and damaged heavily; epithelial shedding, necrosis and massive inflammatory cell infiltrations were seen; the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the pharyngeal mucosa significantly increased, as well as the TRAF-6 and NF- κ B p65 protein and mRNA expression ($P < 0.05$). Compared to the model group, there was no obvious keratinization in the pharyngeal mucosal epithelium in the high-dose and middle-dose CZN group and the ampicillin sodium group; no obvious hyperplasia of the compound squamous epithelium and a small amount of inflammatory cell infiltration were seen, and the muscle fibers were arranged neatly; the compound squamous epithelium in the pharyngeal mucosal tissue of the CZN low-dose group was keratinized, proliferated and shed, with submucosal edema, massive inflammatory cell infiltration and irregularly arranged muscular fibers. Compared to the model group, the high-dose and middle-dose CZN group and the ampicillin sodium group had decreased levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the pharyngeal mucosal tissue, as well as decreased TRAF-6 and NF- κ B p65 protein and mRNA expression ($P < 0.05$). **Conclusion** Compound Zhongjiefeng Nebulizer can effectively improve the inflammatory status of the pharyngeal mucosa in rats model of chronic pharyngitis; and the high and medium doses are more effective. The mechanism of action may be related to the regulation of the TRAF6/NF- κ B p65 pathway in the pharyngeal mucosa tissue.

Keywords chronic pharyngitis; the group A streptococcus; Compound Zhongjiefeng Nebulizer (复方肿节风雾化剂); tumor necrosis factor receptor related factor 6; nuclear factor kappa B p65

(收稿日期: 2021-01-17; 修回日期: 2021-05-19)

编辑: 王利芬