

· 基础研究 ·

扁咽宁汤对急性咽炎模型大鼠 Th_1/Th_2 平衡漂移的影响文德鉴^{1,2} 袁丽君¹ 李三宇¹ 陈通华¹ 张翠兰¹ 朱敏英¹ 胡泽华¹ 涂 星^{1,2}

摘要 目的 探讨扁咽宁汤对急性咽炎大鼠的干预作用及 Th_1/Th_2 相关细胞因子含量的影响。方法 采用氨水喷洒法造模,选取造模成功后的 40 只 SD 大鼠随机分为扁咽宁汤高、中、低剂量组(简称高、中、低剂量组)和模型组,每组 10 只,另取 10 只健康大鼠作为空白对照组。各给药组分别按照 28.8、14.4、7.2 g/kg 剂量给予扁咽宁汤灌胃,空白对照组及模型组同法灌胃等量蒸馏水,每天 1 次,连续 7 天。观察各组大鼠症状变化情况;采用 ELISA 法检测血清中 IL-1 β 、IL-4、IFN- γ 和 TNF- α 的含量;采用 HE 染色观察其形态特征。**结果** 扁咽宁汤可有效缓解氨水诱导的急性咽炎大鼠的咽部充血、肿胀症状,对肺组织炎性浸润和充血有较好的改善作用;与空白对照组比较,模型组血清中 IL-1 β 、IL-4、TNF- α 含量升高($P < 0.05$), IFN- γ 、IFN- γ /IL-4 降低($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组 TNF- α 、IL-1 β 含量下降($P < 0.05$), IFN- γ 含量均增加($P < 0.05$),中剂量组 IFN- γ /IL-4 增加($P < 0.05$);与低剂量组比较,中、高剂量组 TNF- α 、IL-1 β 含量降低($P < 0.05$),中剂量组 IFN- γ /IL-4 增加($P < 0.05$);与中剂量组比较,高剂量组所有指标差异均无统计学意义($P > 0.05$);对各指标的影响不存在明显的剂量依赖。**结论** 扁咽宁汤对急性咽炎模型大鼠具有较好干预作用,其作用机制可能与调节大鼠血清中 Th_1/Th_2 相关因子的失衡、抑制炎症细胞因子的释放而有效缓解炎症局部的炎性浸润和组织结构破坏有关。

关键词 扁咽宁汤;急性咽炎; Th_1/Th_2 平衡;肺组织;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-1 β

Effect of Bianyaning Decoction on Th_1/Th_2 Balance of Acute Pharyngitis Rats Induced by Ammonium Hydroxide WEN De-jian^{1,2}, YUAN Li-jun¹, LI San-yu¹, CHEN Tong-hua¹, ZHANG Cui-lan¹, ZHU Min-ying¹, HU Ze-hua¹, and TU Xing^{1,2} 1 School of Medicine, Hubei Minzu University, Hubei (445000); 2 Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Hubei (445000)

ABSTRACT Objective To investigate the intervention effect of Bianyaning Decoction on acute pharyngitis rats induced by ammonium hydroxide. Methods Acute pharyngitis rats were established by spraying ammonium hydroxide to their throat. Totally 40 successful model rats were randomly divided into Bianyaning Decoction groups with high, middle, low dosage and model group. Another 10 health rats were recruited as normal group. The corresponding groups were respectively administered by gavage of Bianyaning Decoction as the dosage of 28.8, 14.4, 7.2 g/kg, while the control group and model group were given equal volume distilled water for 7 consecutive days. The syndromes of all groups were observed. ELISA method was used to investigate the content of IL-1 β , IL-4, IFN- γ and TNF- α in serum. HE method was used to observe the morphological characteristics of lung tissues in different groups. Results Bianyaning Decoction could effectively alleviate the symptoms of pharyngeal congestion and swelling in rats with acute pharyngitis induced by ammonia, and improved the inflammatory infiltration and congestion of lung tissue. Compared with the control group, the content of IL-1 β , IL-4, TNF- α increased ($P < 0.05$), IFN- γ and IFN- γ /IL-4 significantly decreased ($P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, the content of TNF- α and IL-1 β decreased ($P < 0.05$), IFN- γ significantly increased ($P < 0.05$) in the high, middle and low dosage groups, meanwhile IFN- γ /IL-4 significantly increased ($P < 0.05$)

基金项目:湖北省教育科学规划课题(No. 2016GA024)

作者单位:1. 湖北民族大学医学部(湖北 445000); 2. 风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室(湖北 445000)

通讯作者:涂 星, Tel: 0718-8437479, E-mail: kuangsheng1234@126.com.

DOI: 10.7661/j.cjim.20191112.228

in the middle dosage group. Compared with the low dosage group, the content of $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ decreased ($P < 0.05$) in the middle and high dosage groups, meanwhile $\text{IFN-}\gamma/\text{IL-4}$ significantly increased ($P < 0.05$) in the middle dosage group. Compared with the middle dosage group, there was no statistical difference in the high dosage group for all the indicators ($P > 0.05$). There was no significantly relationship between the efficacy and the dosage among the groups. Conclusion Bianyanning Decoction has a good intervention effect on acute pharyngitis, which may be related to alleviating local inflammatory infiltration and tissue damage by regulating the imbalance of Th1/Th2 in the serum and restraining the release of inflammatory cytokines.

KEYWORDS Bianyanning Decoction; acute pharyngitis; Th1/Th2 balance; Lung; $\text{TNF-}\alpha$; $\text{IL-1}\beta$

急性咽炎是一种以咽部疼痛或干燥、有灼热感或异物感,吞咽时加重为主要临床表现的一类耳鼻喉科常见疾病,其发病机制主要是病毒、细菌或理化因素刺激咽喉部造成的炎症反应^[1]。该病属于中医学“急喉痹”证范畴,其辨证常分为外感风热证、外感风寒证和肺胃热盛证三类,其治疗上以祛邪、止痛、利咽为原则^[2,3]。扁咽宁方主要由玄参、白芷、射干、金银花、麦冬等 10 味药组成,主要配伍以疏风清热、解毒利咽为主,兼具滋阴润肺、消肿止痛之功,为临床使用多年治疗外感风热及肺胃热盛所致急性咽炎、急性扁桃体炎发作期及缓解期的经验方,疗效确切,且未见明显不良反应^[4]。

Th1 型细胞分泌 IL-2 、 $\text{IFN-}\gamma$ 等,主要介导细胞免疫和自身免疫疾病等; Th2 型细胞分泌 IL-4 、 IL-10 等,主要介导体液免疫。正常情况下,机体中 Th1/Th2 细胞处于相对平衡状态,但机体发生免疫功能异常时,其平衡状态会被打破,向一方偏移,称为 Th1/Th2 漂移^[5-8]。急性咽炎的发生是机体免疫应答的炎症反应,故研究 Th1/Th2 平衡漂移能有效反映急性咽炎与机体免疫的关系。

本研究拟通过氨水喷雾法建立急性咽炎大鼠模型,观察扁咽宁汤治疗急性咽炎模型大鼠的疗效,考察其对肺组织的形态及 Th1/Th2 反应细胞因子 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-4 、 $\text{IFN-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 含量的影响,初步探讨扁咽宁汤治疗急性咽炎的疗效和作用机制及其与 Th1/Th2 平衡漂移的关系。

材料与方法

1 动物 SD 雄性大鼠 70 只,体重(200 ± 20)g,购自湖北省实验动物研究中心,许可证号:SCXK(鄂)2015-0018。适应性喂养 7 天饲养于含 2.5 cm 木屑垫料的塑料笼中($40 \text{ cm} \times 25 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$, $L \times W \times H$),保持昼夜节律各 12 h,饲养环境温度 $18 \sim 24^\circ\text{C}$,相对湿度 50%~70%。研究经湖北民族大学生物医

学科伦理委员会通过(No. 2018-008)。

2 药物 玄参(批号:20180201,江西药都堂中药饮片有限公司)、白芷(批号:180501,江西顺福堂中药饮片有限公司)、射干(批号:180301,湖北强康中药饮片有限公司)、金银花(批号:20180201,江西齐仁堂江西齐仁堂)等,均购自湖北民族大学附属医院药房;扁咽宁汤(实验室自制,按照扁咽宁复方组成称取适量药材,加 8 倍量的水,浸泡 1 h,加热煮沸 1 h,滤过,剩余残渣再加入 6 倍量水煮沸半小时,滤过,合并两次滤过药液,分别浓缩至相当于原药材 0.576、1.152、2.304 g/mL 的水提液,置于 5°C 冰箱内保存备用)。

3 主要试剂及仪器 主要试剂: $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-4 、 $\text{IFN-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 大鼠 ELISA 试剂盒均购于上海酶联生物科技有限公司,批号分别为 ml063132、ml058051、ml025561、ml160639;其他试剂均为分析纯。主要仪器:RE52CS-1 旋转蒸发仪(上海贤德实验仪器有限公司);5810R 低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);DL-1 电子万用炉(北京市永光明医疗器械有限公司);KL 型自动脱水机、生物组织自动包埋机、组织切片机等均购于湖北康龙电子科技有限责任公司;Plus384 连续波长酶标仪(美谷分子仪器上海有限公司)等。

4 急性咽炎动物造模及分组 参照参考文献[2]。随机选取 60 只 SD 雄性大鼠,用咽喉喷雾器每天早、中两次均喷浓度为 12% 的氨水于大鼠咽部(约 6 μL 残留在大鼠咽喉部),连续 3 天,空白对照组同法喷等量蒸馏水。根据咽炎模型标准^[9],若出现饮食减少、饮水增多、咽喉部出现红肿等情况,即视为造模成功,其中 51 只造模成功,成功率为 80.9%。采用随机数字表法将 40 只造模成功的大鼠分为扁咽宁汤高、中、低剂量组(简称高、中、低剂量组)和模型组,每组 10 只,另外 10 只正常大鼠为空白对照组。

5 干预方法 从造模完成后第一天开始,分别按照临床等效剂量设置高、中、低剂量,以高剂量(相当于 2 倍临床等效剂量,28.8 g/kg)、中剂量(临床等效

剂量, 14.4 g/kg)、低剂量(1/2 临床等效剂量, 7.2 g/kg)给予浓度为 0.576、1.152、2.304 g/mL 扁咽宁汤等体积灌胃, 空白对照组及模型组同法灌胃等量蒸馏水, 每天 1 次, 连续 7 天。

6 检测指标及方法

6.1 大鼠一般行为学观察 观察并记录各组大鼠被毛颜色、饮水量、饮水量、精神情志、搔抓咽喉部的活动、体重变化、咽喉部红肿情况。

6.2 肺组织病理样本制备 与形态观察 配制 10% 的水合氯醛, 于末次给药 24 h 后以 3 mL/kg 剂量麻醉大鼠, 固定在手术台上, 迅速剖开大鼠腹部, 取腹主动脉血 1 mL, 置于抗凝 EP 管中, 匀速摇晃, 避免血液凝固, 置于 4 ℃ 冰箱冷藏, 备用。处死动物, 立即摘取左肺下叶组织, 在 10% 甲醛溶液中固定, 置于 4 ℃ 冰箱中放置保存。48 h 后取材, 经常规脱水, 石蜡包埋, 切成厚度为 5 μm 的切片, 每隔三片取一片, HE 染色后, 在光学显微镜下观察。

6.3 血清 IL-1β、IL-4、IFN-γ、IL-4/IFN-γ、TNF-α 含量测定 取腹主动脉血, 经离心处理分离血清后, 按照上海酶联生物科技有限公司 ELISA 试剂盒说明书在 450 nm 波长处检测血清中 IL-1β、IL-4、IFN-γ、IL-4/IFN-γ 和 TNF-α 含量。

6.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行分析, 计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-Way ANOVA 进行分析, 组间比较若方差齐性则采用 LSD 检验, 方差不齐则采用 SNK 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般行为学观察 造模 3 天后, 与空白对照组对比, 模型组大鼠出现挠抓口部、咽部, 出现充血、肿胀, 饮水增多, 饮食量下降, 自发性活动减少等现象。经过给药干预后, 与模型组比较, 高、中剂量组咽喉充血和肿胀基本消失, 饮食饮水基本正常, 未出现抓挠口部等现象; 而低剂量组咽喉充血基本消失, 有轻微红肿, 偶见抓挠口部现象, 饮食饮水基本正常。

2 各组大鼠肺组织形态学观察(图 1) 空白对照组大鼠的肺组织结构完整, 肺间质无明显增生, 肺泡腔清晰, 肺泡间隔均匀一致, 未见炎性细胞浸润(图 1A); 模型组肺泡间隔出现明显增宽, 肺泡壁断裂融合, 部分肺泡腔出现萎缩内陷, 其内充满淡红色水肿液, 肺泡间隔内见大量多形核中性白细胞和肺泡巨噬细胞浸润, 毛细血管充血、扩张、出血, 血管周围可见水

肿液形成水肿套(图 1B); 低剂量组肺泡出现明显增宽或萎缩, 肺泡壁断裂融合, 部分肺泡腔出现萎缩内陷, 肺泡间隔内可见大量中性白细胞和肺泡巨噬细胞浸润, 毛细血管的充血现象较明显, 血管周围可见水肿液形成水肿套(图 1C); 中剂量组肺泡腔结构较为清晰完整, 肺泡间隔内中性白细胞和肺泡巨噬细胞浸润有改善, 未见明显毛细血管充血、扩张和出血, 血管周围水肿液形成水肿套数量明显减少(图 1D); 高剂量组肺泡腔结构较为清晰完整, 偶见中性白细胞和肺泡巨噬细胞浸润, 未见明显毛细血管充血、扩张和出血, 偶见血管周围水肿液形成水肿套(图 1E)。

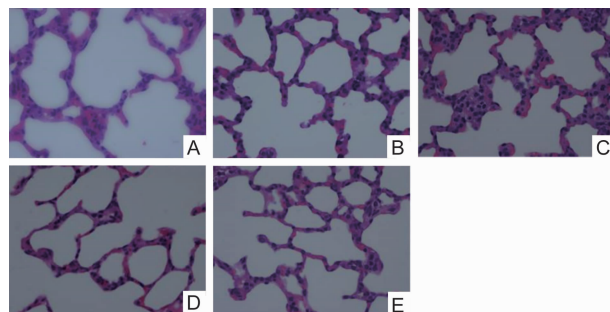


图 1 肺组织形态学观察结果 (HE, ×400)

3 各组大鼠血清 IL-1β、IL-4、IFN-γ、IL-4/IFN-γ、TNF-α 含量比较(表 1) 与空白对照组比较, 模型组血清中 IL-1β、IL-4、TNF-α 含量升高(P < 0.05), IFN-γ、IFN-γ/IL-4 降低(P < 0.05); 与模型组比较, 各给药组 TNF-α、IL-1β 含量下降(P < 0.05), IFN-γ 含量增加(P < 0.05), 中剂量组 IFN-γ/IL-4 增加(P < 0.05); 与低剂量组比较, 中、高剂量组 TNF-α、IL-1β 含量降低(P < 0.05), 中剂量组 IFN-γ/IL-4 增加(P < 0.05); 与中剂量组比较, 高剂量组所有指标差异均无统计学意义(P > 0.05)。

讨 论

急喉痹是外邪客于咽部所致, 以咽痛、咽黏膜肿胀为特征的急性咽病^[10]。刺激性化学气体是急性咽炎致病因素之一, 即为“外邪”。本研究选用经典造模方法氨水造模是以碱性刺激物质, 高浓度局部喷雾刺激大鼠咽部黏膜, 使之充血肿胀, 形成急性炎症^[11]。临床西医对急性咽炎用药大多采用喷雾、涂搽、含漱或含服等方式给予抗生素类药物^[12]。但抗生素容易产生耐药性, 容易导致患者急性咽炎反复发作, 迁延不愈。本研究采用扁咽宁汤干预治疗急性咽炎大鼠, 可有效改善其咽部充血、肿胀症状, 对肺组织炎性浸润和充血有较好改善作用。

表 1 血清 IFN- γ 、IL-4、IL-4/IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IFN- γ /IL-4	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
空白对照	10	64.3471 $\pm$ 11.0517	3.5271 $\pm$ 0.2848	18.2529 $\pm$ 2.8855	28.3429 $\pm$ 2.7545	45.8086 $\pm$ 5.5965
模型	10	41.5133 $\pm$ 5.4368 *	4.0883 $\pm$ 0.4061 *	10.1483 $\pm$ 0.8980 *	56.0467 $\pm$ 5.9373 *	98.8217 $\pm$ 8.9509 *
低剂量	10	44.3133 $\pm$ 3.5391 Δ	4.1100 $\pm$ 0.3386	10.8067 $\pm$ 0.7103	50.2033 $\pm$ 3.0434 Δ	84.9700 $\pm$ 6.1702 Δ
中剂量	10	59.4367 $\pm$ 6.5957 $\Delta\Delta$	3.8583 $\pm$ 0.4238	15.5550 $\pm$ 2.3904 $\Delta\Delta$	41.7817 $\pm$ 3.1716 $\Delta\Delta$	59.7317 $\pm$ 4.3938 $\Delta\Delta$
高剂量	10	54.8117 $\pm$ 5.7950 $\Delta\Delta$	4.2267 $\pm$ 0.2457	13.0400 $\pm$ 1.8853	40.4400 $\pm$ 2.7818 $\Delta\Delta$	63.5817 $\pm$ 6.6979 $\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与低剂量组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

IFN- γ 和 IL-4 分别体现了 Th1 和 Th2 型淋巴细胞的主要生物学效应,两者常作为监测 Th1 和 Th2 型淋巴细胞免疫功能的指标,IFN- γ /IL-4 平衡状态代表着 Th1/Th2 免疫反应是否处于平衡状态^[7,13]。本研究的结果显示,氨水诱导的急性咽炎模型大鼠 IL-4 升高、IFN- γ 降低,IFN- γ /IL-4 比值降低,出现 Th1/Th2 平衡漂移,Th2 型细胞因子处于优势表达,提示发生急性咽炎后大鼠自身发生体液免疫,免疫功能紊乱。给予扁咽宁汤治疗后,中剂量组 IFN- γ /IL-4 比值较模型组增大,出现了 Th1/Th2 漂移的逆转现象。该研究结果证实,扁咽宁汤治疗急性咽炎的作用可能与调节 Th1/Th2 相关因子的失衡有关。

TNF- α 是一种重要的炎性介质趋化因子,能够诱导细胞浸入炎症局部,进而加重炎症浸润导致的组织损伤;IL-1 β 为一级炎症细胞因子,能够促进炎症细胞的活性^[14,15]。本研究结果显示,氨水诱导的急性咽炎模型大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 含量升高,提示这两个指标在急性咽炎发作中起促进作用;给予扁咽宁汤治疗后,其含量均显著下降,提示扁咽宁汤可通过抑制炎症细胞因子的释放而有效缓解炎症局部的炎性浸润和组织结构破坏,为其临床治疗急性咽炎提供了理论依据。

利益冲突:文章全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 李凡成,徐绍勤. 中西医结合耳鼻喉科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:271-274.
- [2] 王文萍,赵克明,高京京,等. 急性咽炎的病因病机理论再探讨[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(7):1086-1088.
- [3] 刘大新. 中医耳鼻喉科常见病诊疗指南-国家中医药管理局中医药标准化项目(全文)[A]. 中华中医药学会耳鼻喉科分会. 中华中医药学会耳鼻喉科分会第十六次全国学术交流会论文摘要[C]. 北京:中华中医药学会耳鼻喉科分会,2010:46.
- [4] 文德鉴,涂星,袁丽君,等. 一种治疗肺热阴虚型扁桃

体炎的中药组合物及其制备方法[P]. 湖北省:CN109260367A,2019-01-25.

- [5] 文德鉴,袁丽君,李三字,等. 复方扁咽宁对急性咽炎大鼠疗效及其机制[J]. 中国应用生理学杂志,2019,35(1):19-22,27.
- [6] 万磊,刘健,黄传兵,等. 新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠肺功能、Th 细胞漂移及调节性 T 细胞的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2017,37(2):225-231.
- [7] Miossec P. The Th1/Th2 cytokine balance in arthritis[J]. Arthritis Rheumatology, 2014, 40(12):2105-2115.
- [8] 张伟,刘海瑜. 湿邪对不同梯度的寒邪犯肺大鼠细胞因子变化影响[J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(1):51-54.
- [9] 苗明三,常兵杰,白明,等. 急性咽炎动物模型制备规范(草案)[J]. 中药药理与临床,2018,34(1):175-178.
- [10] 急喉痹的诊断依据、证候分类、疗效评定-中华人民共和国中医药行业标准《中医内科病证诊断疗效标准》(ZY/T001.1-94)[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(2):59.
- [11] 吴嘉宝,黄栋芳,王烨,等. 喉痹动物模型的研究现状及评价分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(18):189-195.
- [12] 杨霄. 中西医结合治疗急性慢性咽喉炎现状[J]. 河南中医,2014,34(1):172-175.
- [13] Boskabady MH, Mehrjardi SS, Rezaee A, et al. The impact of Zataria multiflora Boiss extract on *in vitro* and *in vivo* Th1/Th2 cytokine (IFN- γ /IL4) balance[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(3):1024-1031.
- [14] Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, et al. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNFagents[J]. Rheumatology, 2010, 49(7):1215-1228.
- [15] 李秋月,许海玉,杨洪军. 促炎因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 在神经病理性疼痛中的研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(19):3709-3712.

(收稿:2018-09-25 在线:2019-12-24)

责任编辑:白霞