

咽立爽口含滴丸对慢性咽炎家兔免疫细胞亚群及 NF- κ B 信号通路的影响

唐 焱¹, 喻国冻², 何星辰³, 王 佳³, 张 田²

[1. 长沙市中医医院(长沙市第八医院)耳鼻咽喉头颈外科, 长沙 410100; 2. 贵州医科大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学, 贵阳 550025]

[摘要] 目的 探究咽立爽口含滴丸对慢性咽炎家兔模型的作用效果及机制。方法 健康新西兰白兔42只, 随机分为7组: 空白组, 模型组, 慢严舒柠清喉利咽颗粒组(9 g/kg), 咽立爽口含滴丸低(0.025 g/kg)、中(0.05 g/kg)、高(0.1 g/kg)剂量组和雾化组(0.025 g/kg)。除空白组外, 其余家兔均采用化学刺激法建立慢性咽炎动物模型。造模成功后第2天起, 5个治疗组每日分别以慢严舒柠清喉利咽颗粒、咽立爽口含滴丸相应剂量进行不同治疗, 而空白组和模型组以蔗糖(0.025 g/kg)置于家兔口腔, 连续给药7 d。从造模第3天开始, 每天观察家兔咽喉壁局部情况, 给药结束后进行采血, 处死家兔后采样待检。HE染色观察咽喉壁黏膜组织病理学变化; 流式细胞术检测血液CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺, 计算CD4⁺/CD8⁺水平; ELISA检测血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、C反应蛋白(CRP)和总抗氧化能力(T-AOC)水平; 蛋白质印迹法检测咽喉壁黏膜组织IL-6、IL-1、TNF- α 、核转录因子 κ B(NF- κ B p65)、核转录因子- κ B抑制因子(I κ B- α)蛋白表达; 实时荧光定量PCR检测咽喉壁黏膜组织NF- κ B p65、I κ B- α mRNA表达。结果 与空白组比较, 慢性咽炎家兔咽喉壁黏膜病理组织损伤; CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺和T-AOC水平显著降低, CD8⁺、IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP、NF- κ B p65和I κ B- α 水平明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 不同治疗组均可不同程度减轻咽喉壁黏膜组织病理损伤; 咽立爽口含滴丸高剂量组及雾化组CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺和T-AOC水平显著升高, CD8⁺、IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP、NF- κ B p65和I κ B- α 水平均降低($P < 0.05$), 效果优于低、中剂量及慢严舒柠清喉利咽颗粒组。结论 咽立爽口含滴丸可显著改善慢性咽炎家兔模型的炎性指标, 减轻组织病理损伤, 调节NF- κ B信号通路相关因子表达, 且雾化用药的效果更明显。

[关键词] 慢性咽炎; 慢严舒柠清喉利咽颗粒; 咽立爽口含滴丸; 家兔

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0426-09

Effects of Pharyngeal Refreshing Pills on Immune Cell Subsets and NF- κ B Signaling Pathway in Chronic Pharyngitis

TANG Yi¹, YU Guodong², HE Xingchen³, WANG Jia³, ZHANG Tian²

[1. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Changsha Hospital of Traditional Chinese Medicine (Changsha Eighth Hospital), Changsha 410100, China; 2. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China]

Correspondence to: YU Guodong, E-mail: ygd.1224@163.com

[Abstract] **Objective** To explore the effect and mechanism of pharyngeal refreshing pills on an animal model of chronic pharyngitis. **Methods** A total of 42 healthy New Zealand white rabbits were randomly

[基金项目] 贵阳市科学技术局资助项目(20173024)

[作者简介] 唐 焱(1990—), 男, 硕士, 住院医师, 从事耳鼻喉研究。E-mail: tangyi67890@126.com

[通信作者] 喻国冻(1965—), 男, 教授, 主任医师, 从事耳鼻咽喉头颈外科研究。E-mail: ygd.1224@163.com

divided into seven groups: control, model, manyanshuning granules (9 g/kg), pharyngeal refreshing pills at low- (0.025 g/kg), medium- (0.05 g/kg), high- (0.1 g/kg) doses, and atomization (0.025 g/kg) groups. Animal models of chronic pharyngitis were established by chemical stimulation in all rabbits except the control group. From the second day after successful modeling, the five treatment groups were administered with manyanshuning granules and different doses of pharyngeal refreshing pills every day, while the control and model groups were fed with white sugar (0.025 g/kg) for 7 days. From the third day after successful modeling, the local condition of the pharyngeal wall of each rabbit was observed every day. Blood samples were collected at the end of drug administration and examined. Histopathological changes in the pharyngeal wall mucosa were examined by hematoxylin-eosin staining, and the levels of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ were detected by flow cytometry. The levels of interleukin-6 (IL-6), IL-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α), C-reactive protein (CRP), and total antioxidant capacity (T-AOC) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting was used to detect the expression of IL-6, IL-1, TNF- α , nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 and NF- κ B inhibitor (I κ B- α) at the protein level in the pharyngeal wall mucosa. qRT-PCR was used to detect NF- κ B p65 and I κ B- α mRNA expression in the pharyngeal wall mucosa. **Results** Compared with the control group, the pathological tissues of the posterior pharyngeal mucosa of rabbits with chronic pharyngitis were significantly damaged; the levels of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, and T-AOC were significantly decreased, while the levels of CD8⁺, IL-6, IL-1, TNF- α , CRP, NF- κ B p65, and I κ B- α were significantly increased (all $P < 0.01$). Compared with the model group, the pathological injury of pharyngitis could be alleviated to different degrees in the treatment group; the levels of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, and T-AOC in the pharyngeal refreshing pills at high dose and atomization groups were significantly increased, while the levels of CD8⁺, IL-6, IL-1, TNF- α , CRP, NF- κ B p65, and I κ B- α were significantly decreased (all $P < 0.05$). The effect of high-dose pharyngeal refreshing pill administration was better than that of low-dose and middle-dose pharyngeal refreshing pills, and manyanshuning granules. **Conclusion** The pharyngeal refreshing pills can significantly improve the inflammatory index of chronic pharyngitis, reduce pathological injury, affect the expression of NF- κ B signaling pathway-related factors, and the effect of atomization dose is more obvious.

[Key words] Chronic pharyngitis; Manyanshuning granules; Pharyngeal refreshing pills; Rabbit

慢性咽炎 (chronic pharyngitis, CP) 是多见于成年人的耳鼻喉科常见疾病, 可由细菌、病毒、酗酒、过度使用声音、吸烟等引起, 主要表现为咽部轻微疼痛、灼热、干痒、吞咽困难、咳嗽、有异物感等症状, 易反复发作^[1]。根据2015年流行病学数据, 全世界至少有20%的成年人患有慢性咽炎, 严重影响着患者的生活及工作^[2]。慢性咽炎是黏膜下、咽黏膜及淋巴组织的慢性炎症。炎症反应能够激活核转录因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)。NF- κ B的持续激活能够增强一些细胞因子及黏附因子的表达, 使炎症反应细胞产生活性氧, 损伤咽黏膜周围上皮细胞, 引起咽黏膜组织的炎症损害^[3]。

在慢性咽炎的各种治疗策略中, 抗炎药物通

常被用来减轻喉部肿胀, 调节病理生理过程, 改善患者的舒适度^[4]。研究表明, 咽立爽口含滴丸 (pharyngeal refreshing pills) 对慢性咽炎有显著的治疗效果^[6]。咽立爽口含滴丸的主要成分为艾纳香草、薄荷素油、天然冰片和薄荷脑, 其中艾纳香草经蒸馏升华提制的艾纳香油具有较强的抗菌、抗炎、消肿、解毒、疏散风热和止痛的作用^[4]。然而, 咽立爽口含滴丸对慢性咽炎的作用机制尚不清楚。本研究拟探究咽立爽口含滴丸对家兔慢性咽炎的影响及其抗炎机制, 以期慢性咽炎的治疗提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康普通级新西兰白兔42只 (雌雄各半),

体质量为2.0~2.5 kg, 购于成都达硕实验动物有限公司 [SCXK (川) 2020-030]。家兔饲养于贵州医科大学动物实验中心 [SYXK (黔) 2021-0007], 环境温度为20~25 °C, 湿度为(50±5) %, 自由饮水。研究方案经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准 (IACUC 2001325), 并按照实验动物使用3R原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

阳性对照药物慢严舒柠清喉利咽颗粒 (批号: Z20053117) 购自山西桂龙医药有限公司; 咽立爽口含滴丸 (批号: Z20025286) 购自贵州黄果树立爽药业有限公司; FACSCalibur流式细胞仪购自美国BD公司; 检测白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) (ZC-52826)、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1) (ZC-52815)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) (ZC-52984)、C反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) (ZC-36085)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) (ZC-37662) 用ELISA试剂盒购自上海茁彩生物科技有限公司; IL-6 (sc-57315)、IL-1 (sc-52012)、TNF- α (sc-52746)、NF- κ B p65 (sc-8008)、核转录因子- κ B抑制因子 (nuclear factor-kappa B inhibitor, I κ B- α) (sc-1643) 相关抗体购自美国Santa Cruz公司; TRIzol试剂和RNA提取试剂盒 (14105) 购自美国Invitrogen公司; PCR扩增试剂盒 (AK9906) 购自日本TaKaRa公司; PCR引物用Primer Premier 5.0软件设计, 由北京擎科科技有限公司合成; 实时定量PCR仪购自美国Bio Rad公司。

1.3 慢性咽炎家兔模型构建

家兔适应性饲养7 d后, 随机分为7组 (每组6只): 空白组 (Con), 模型组 (CP), 慢严舒柠清喉利咽颗粒组 (CP+MYS), 咽立爽口含滴丸低剂量组 (CP+Pha L)、中剂量组 (CP+Pha M)、高剂量组 (CP+Pha H)、雾化组 (CP+Pha A)。除Con组外, 其余各组采用氨水松节油复合因素造模方法刺激咽部, 诱导造慢性咽炎家兔模型^[7]。操作方法: Con组第1~15天用蒸馏水喷雾咽部; 其余各组每天2次 (总共600 μ L) 将2.5%氨水喷入家兔的咽部黏膜, 持续15 d, 在第8天开始将0.5 mL松节油注入家兔的咽黏膜中, 操作

完成后30 min禁止饮水。观察家兔口部抓痕、喷喉后半小时饮水、口咽部分泌物量及每天的食量变化情况, 并于第15天在硬性鼻内镜下观察造模组家兔的咽部黏膜情况。家兔搔抓口部频繁、饮水量及频次明显下降、口腔分泌物黏稠, 咽部黏膜呈暗红色, 光泽度欠佳, 说明造模成功。

1.4 给药方法

造模成功后, 连续给药7 d。CP+MYS组: 每日按2.5 g/kg将慢严舒柠清喉利咽颗粒置于家兔口腔。CP+Pha L组、CP+Pha M组和CP+Pha H组: 将咽立爽口含滴丸研磨成粉末状, 每日分别以相当于成人剂量2.5、5、10倍的咽立爽口含滴丸粉末 (0.025 g/kg、0.05 g/kg、0.1 g/kg) 置于家兔口腔。CP+Pha A组: 每日捻磨咽立爽口含滴丸 (0.025 g/kg) 成粉末状, 与灭菌生理盐水5 mL配制为悬浊液, 置于雾化机内用于雾化治疗。Con组和CP组: 每日以与低剂量用药组等量的蔗糖 (0.025 g/kg) (具有高渗透性, 作为对照) 置于家兔口腔。以上给药量均以人: 兔为1: 5~1: 10计算, 参照苗明三^[8]主编的《实验动物与动物实验技术》。

1.5 样本采集

治疗结束后, 各组家兔均采集耳中央动脉血4 mL。其中3 mL血静置后经3 000 r/min低温离心15 min, 取血清, -80 °C冰箱保存; 另1 mL血加入抗凝管后, 立即进行后续流式细胞检测。采血结束后, 于家兔腹腔注射1%戊巴比妥钠, 采用CO₂吸入法处死家兔, 迅速解剖家兔口咽部, 取出咽喉壁黏膜组织, 用预冷的生理盐水迅速冲净, 分成两份, 一份经质量分数为4%的多聚甲醛溶液固定, 另一份于-80 °C低温保存。

1.6 家兔一般情况观察

从造模第3天开始, 每天观察家兔行为、肛温、状态、摄食、饮水量和大小便等情况, 观察咽喉壁局部情况有无肿胀、色泽、分泌物及搔抓颈部等。

1.7 组织病理观察

将固定的咽喉壁黏膜按常规方法制备石蜡切片, 然后进行苏木精染色, 盐酸乙醇分化, 50 °C温水或弱碱性水溶液返蓝, 85%乙醇溶液脱水, 伊红染色, 梯度乙醇溶液脱水, 二甲苯透

明,中性树胶封固,镜检观察具体病变。按以下标准进行病变程度分级:正常结构为“-”;咽部充血,炎症较轻为“+”;咽部炎症局限,有钉突形成成为“++”;咽部炎症较弥漫,上皮钉突明显为“+++~++++”。

1.8 血液相关因子检测

取抗凝血 100 μ L 加入流式测定管中,分别加入 5 μ L APC 标记的 CD3 McAb、5 μ L FITC 标记的 CD4 McAb、5 μ L PE 标记的 CD8 McAb 后混匀,避光孵育约 20 min;加 2 mL 溶血素,避光孵育约 10 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液;加 PBS 洗 2 遍,弃上清液,用 PBS 缓冲液,调整细胞密度至 1×10^6 个细胞/mL,用 FACSCalibur 流式细胞仪检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞所占百分比,计算 CD4⁺/CD8⁺ 比值。

ELISA 试剂盒测定血清 IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP、T-AOC 水平,具体操作按照试剂盒说明进行。

1.9 蛋白质印迹法检测

提取咽喉壁黏膜组织样本蛋白,进行 10%SDS-PAGE 凝胶电泳。将目的蛋白条带转印至 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉封闭后,分别加入一抗 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α (均按 1:500 稀释)和 β -actin,4 $^{\circ}$ C 振荡孵育过夜,TBST 洗涤 3 次。然后加入二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,膜上加入 ECL 化学发光试剂。取出 PVDF,化学发光法获得胶片后进行图像采集,目标条带的 A 值采用 Quantity One 凝胶图像软件分析,以目标条带与 β -actin 条带的 A 值的比值反映活性 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α 的相对表达水平。

1.10 实时荧光定量 PCR 法检测

依据组织 RNA 提取试剂盒说明提取咽喉壁黏膜组织总 RNA,反转录合成 cDNA。采用 SYBR Green 1 real-time PCR 方法检测 mRNA 的相对表达量, β -actin 作为内参。NF- κ B p65 上游引物序列为 5'-GGCAGCACTCCTTATCAAC-3',下游引物序列为 5'-GGTGTCTGCC-ATCGTAG-3'; I κ B- α 上游引物序列为 5'-CATGAAG-AGAAGACACTGACCATGGAA-3',下游引物序列为 5'-TGGATAGAGGCTAAGTGTAGACA-CG-3'; β -actin 上游引物序列为 5'-ATGGATGAC

GATATCGCTGC-3',下游引物序列为 5'-CTTCTGACCCATACCCACCA-3'。用实时定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 检测,PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 10 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,40 个循环。记录 Ct 值,并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析咽喉壁黏膜组织中 NF- κ B p65、I κ B- α mRNA 相对表达水平。

1.11 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间计量资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组家兔一般情况

造模第 3 天起,大部分家兔逐渐出现精神疲乏、饮水纳食减少、口腔分泌物增多、搔抓颈部、咽部呈现充血及微肿胀等情况;局部注射松节油后,上述症状加重且分泌物较黏稠;造模 15 d 后,上述症状越加明显。Con 组实验动物未见异常。

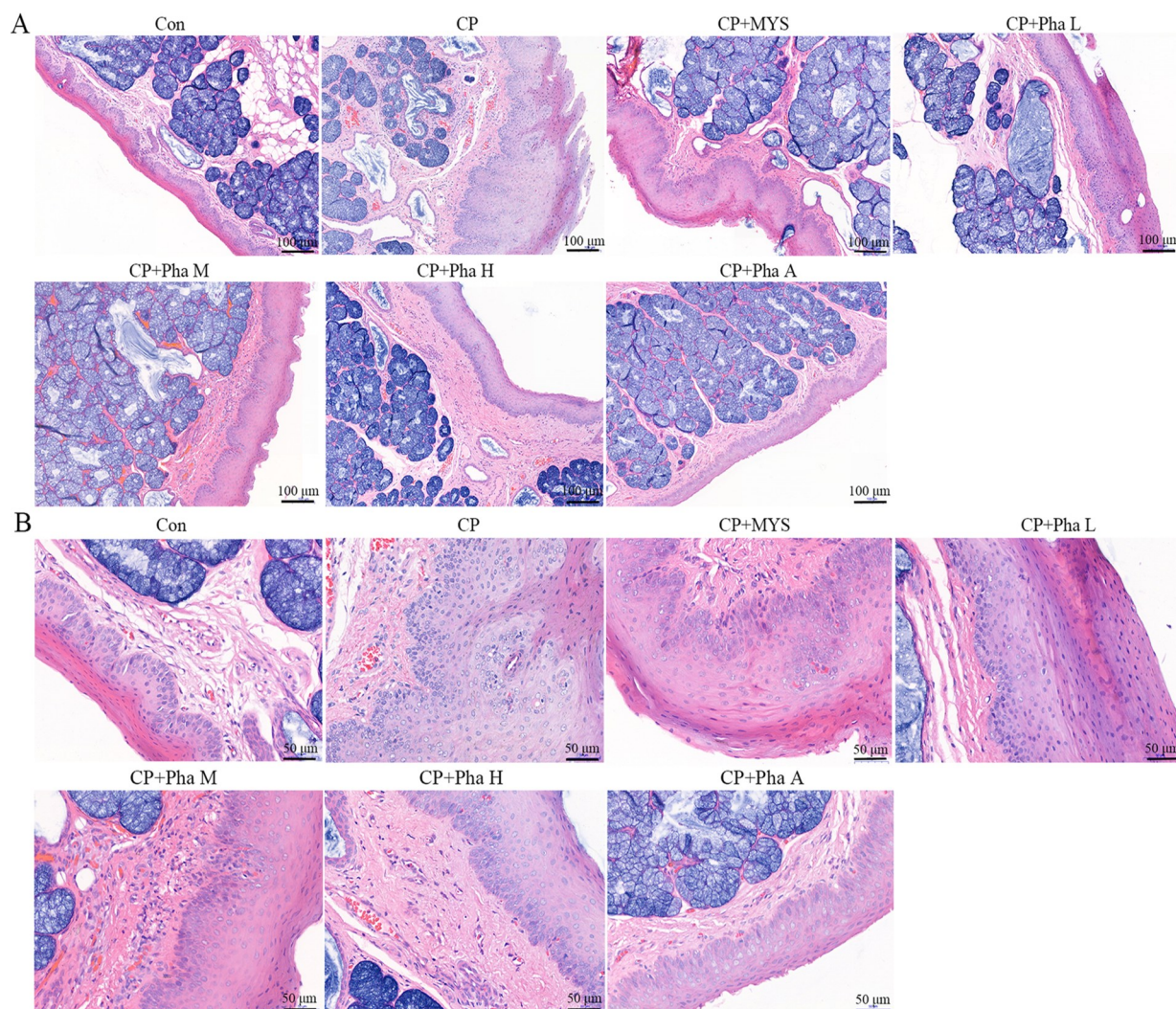
2.2 各组家兔咽喉壁黏膜的病理组织学观察

HE 染色结果(表 1、图 1)显示,Con 组咽

表 1 咽立爽口含滴丸治疗后家兔咽喉黏膜病变程度分级
Table 1 Grading degree of laryngopharyngeal mucosa lesions of rabbits after treatment with pharyngeal refreshing pills

分组	咽喉黏膜病变程度分级				
	-	+	++	+++	++++
Con	6	-	-	-	-
CP	-	1	1	4	-
CP+MYS	-	3	1	2	-
CP+Pha L	-	3	2	1	-
CP+Pha M	1	4	1	-	-
CP+Pha H	2	3	1	-	-
CP+Pha A	4	2	-	-	-

注:Con 为空白组;CP 为模型组;CP+MYS 为慢严舒柠清利咽颗粒组;CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组;CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组;CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组;CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。-为正常结构;+为咽部充血,炎症较轻;++为咽部炎症局限,有钉突形成;+++为咽部炎症较弥漫,上皮钉突明显;++++为咽部炎症弥漫,上皮钉突明显。每组 6 只新西兰白兔。



注: Con 为空白组; CP 为模型组; CP+MYS 为慢严舒柠清喉利咽颗粒组; CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组; CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组; CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组; CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。A 为 HE 染色 (100 $\times$); B 为 HE 染色 (400 $\times$)。

图1 光学显微镜下家兔咽喉壁黏膜组织病理学改变

Figure 1 Pathological examination of the posterior pharyngeal wall mucosa of rabbits under a light microscope

喉壁黏膜组织未见明显病变; CP 组黏膜上皮细胞增生明显, 且增生形成指状突起, 细胞排列较为紊乱, 黏膜固有层见较多腺体分布, 固有层结缔组织内轻度出血, 有炎细胞浸润, 钉突形成, 红细胞溢出血管分布于固有层内; CP+MYS 组黏膜上皮层结构较完整, 排列较规则, 黏膜固有层偶见中性粒细胞浸润、局部轻微出血, 可见红细胞溢出血管; CP+Pha L 组和 CP+Pha M 的病变基本相同, 黏膜上皮层结构较完整, 黏膜上皮细胞点状坏死, 可见胞核固缩、碎裂、轻度炎细胞浸润、局部轻微出血, 比模型组炎性反应明显减轻。

CP+Pha H 和 CP+Pha A 组的病变基本相同, 咽部黏膜表面上皮组织未见明显变性及炎性病变, 固有膜内见轻度慢性炎细胞浸润, 黏膜下层及肌层均未见明显病理变化。另外, CP+Pha H 和 CP+Pha A 组咽喉部病变程度明显好于模型组。

2.3 各组家兔血液 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺水平

流式细胞法检测结果 (表2) 显示: 与 Con 组比较, CP 组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 细胞所占百分比明显降低, CD8⁺ 细胞所占百分比明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, CP+Pha M、CP+

Pha H 和 CP+Pha A 组的 CD3⁺、CD4⁺细胞所占百分比和 CD4⁺/CD8⁺比值均明显升高, CD8⁺细胞所占百分比明显降低 ($P<0.05$)。

2.4 各组家兔血清 IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP、T-AOC 水平

ELISA 法检测结果 (表 3) 显示: 与 Con 组比较, CP 组 IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP 水平明显升高, T-AOC 水平明显降低 ($P<0.01$); 与 CP 组比较, CP+Pha H 组及 CP+Pha A 组 IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP 水平明显降低, T-AOC 水平明显升高 ($P<0.05$)。

2.5 各组家兔咽喉壁黏膜 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α 水平

蛋白质印迹法检测结果 (图 2) 显示: CP 组的 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α 水平较 Con 组明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与 CP 组比较, CP+Pha H 组和 CP+Pha A 组的 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α 水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.6 各组家兔咽喉壁黏膜 NF- κ B p65、I κ B- α mRNA 水平

实时荧光定量 PCR 检测结果 (表 4) 显示:

表 2 各组家兔血液 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺水平比较
Table 2 Levels of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺/CD8⁺ in the blood of rabbits in each group

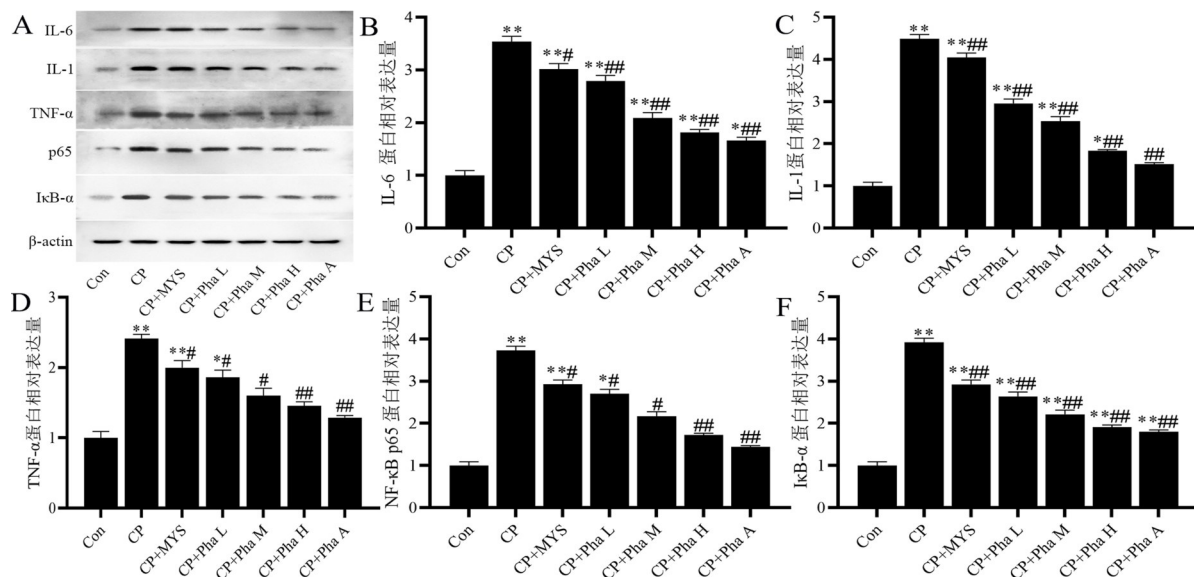
分组	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
Con	73.87±4.15	56.89±1.98	9.71±1.47	5.95±0.91
CP	44.81±3.69**	39.05±2.26**	33.97±3.20**	1.15±0.05**
CP+MYS	52.63±2.20***	51.10±6.25***	32.18±5.82**	1.61±0.20**
CP+Pha L	53.73±2.68***	44.36±3.41**	24.34±3.75***	1.87±0.43**
CP+Pha M	65.90±3.31***	48.87±6.38**	19.09±3.98***	2.65±0.74***
CP+Pha H	71.12±3.89**	55.96±0.94**	13.04±2.10**	4.37±0.75***
CP+Pha A	72.83±4.04**	56.38±4.42**	11.18±1.20**	5.06±0.34**
F value	43.319	8.018	25.350	32.570
P value	<0.001	0.001	<0.001	<0.001

注: Con 为空白组; CP 为模型组; CP+MYS 为慢严舒柠清喉利咽颗粒组; CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组; CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组; CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组; CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。其余组与空白组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 治疗组与模型组比较, *** $P<0.01$, ** $P<0.05$ 。

表 3 各组家兔血清 IL-6、IL-1、TNF- α 、CRP、T-AOC 水平比较
Table 3 Levels of IL-6, IL-1, TNF- α , CRP, and T-AOC in the serum of rabbits in each group

分组	IL-6 $\rho/(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	IL-1 $\rho/(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	TNF- α $\rho/(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	CRP $\rho/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	T-AOC/ ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Con	52.02±0.78	27.02±2.64	66.84±0.44	87.75±0.97	16.74±0.42
CP	59.43±0.83**	34.93±2.17**	73.04±2.65**	95.74±0.71**	13.47±1.37**
CP+MYS	55.50±1.24	30.91±3.71	72.34±1.78**	90.60±4.21#	14.92±0.80*
CP+Pha L	55.36±3.54#	30.57±1.85	72.96±1.23**	90.95±3.15#	14.54±0.44*
CP+Pha M	54.99±3.70#	29.99±3.41#	69.98±2.43	90.71±1.04#	15.31±1.03#
CP+Pha H	53.14±2.36**	28.37±3.49#	68.79±3.34#	89.85±1.06**	15.76±1.32**
CP+Pha A	52.46±1.62**	26.55±0.94**	67.76±1.96**	89.46±1.07**	15.89±0.58**
F value	3.591	3.167	4.224	3.932	3.868
P value	0.023	0.035	0.012	0.016	0.017

注: Con 为空白组; CP 为模型组; CP+MYS 为慢严舒柠清喉利咽颗粒组; CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组; CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组; CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组; CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。其余组与空白组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 治疗组与模型组比较, *** $P<0.01$, ** $P<0.05$ 。



注: Con 为空白组; CP 为模型组; CP+MYS 为慢严舒柠清喉利咽颗粒组; CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组; CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组; CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组; CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。其余组与空白组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 治疗组与模型组比较, ### $P<0.01$, # $P<0.05$ 。

图2 各组家兔咽喉壁黏膜 IL-6、IL-1、TNF- α 、NF- κ B p65、I κ B- α 蛋白表达

Figure 2 Expression of IL-6, IL-1, TNF- α , NF- κ B p65, and I κ B- α at the protein level in the pharyngeal mucosa of rabbits in each group

表4 各组家兔咽喉壁黏膜 NF- κ B p65、I κ B mRNA 水平比较

Table 4 Expression of NF- κ B p65 and I κ B at the mRNA level in the posterior pharyngeal wall mucosa of rabbits in each group

($\bar{x} \pm s$, $n=6$)		
分组	NF- κ B p65	I κ B- α
Con	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.05
CP	1.78 $\pm$ 0.24**	1.93 $\pm$ 0.03**
CP+MYS	1.69 $\pm$ 0.07**	1.65 $\pm$ 0.12**#
CP+Pha L	1.73 $\pm$ 0.05**	1.66 $\pm$ 0.31**#
CP+Pha M	1.48 $\pm$ 0.09**#	1.59 $\pm$ 0.05**##
CP+Pha H	1.40 $\pm$ 0.25**##	1.48 $\pm$ 0.12**##
CP+Pha A	1.21 $\pm$ 0.10##	1.07 $\pm$ 0.03##
F value	11.356	18.071
P value	<0.001	<0.001

注: Con 为空白组; CP 为模型组; CP+MYS 为慢严舒柠清喉利咽颗粒组; CP+Pha L 为咽立爽口含滴丸低剂量组; CP+Pha M 为咽立爽口含滴丸中剂量组; CP+Pha H 为咽立爽口含滴丸高剂量组; CP+Pha A 为咽立爽口含滴丸雾化组。其余组与空白组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 治疗组与模型组比较, ### $P<0.01$, # $P<0.05$ 。

与 Con 组比较, CP 组 NF- κ B p65、I κ B- α mRNA 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与 CP 组比较, CP+Pha H 组和 CP+Pha A 组 NF- κ B p65、I κ B- α mRNA 水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

3 讨论

不良的生活环境及工作压力增大会导致 CP 发病率增加。目前, 医药干预是治疗 CP 的主要方法^[9]。研究表明, 氨水+松节油建立的 CP 模型与临床 CP 相似, 符合 CP 动物模型的生物学特征^[10]。咽立爽口含滴丸的主要成分为艾纳香草蒸馏升华提制的艾纳香油, 以及天然冰片、薄荷素油和薄荷脑, 具有消肿止痛的作用^[11]。郭裕^[6]用咽立爽口含滴丸超声雾化治疗急性单纯性咽炎, 发现超声雾化吸入治疗有效可行。慢严舒柠清喉利咽颗粒可用于急慢性咽炎、扁桃体炎、咽喉发干、声音嘶哑等咽部症状的治疗, 临床疗效明显, 可作为阳性对照药物^[12]。由此, 本实验建立 CP 家兔模型, 并使用咽立爽口含滴

丸干预模型,以期寻找CP的潜在治疗药物。结果显示:与CP模型组比较,咽立爽口含滴丸各干预组家兔咽黏膜上皮结构较完整,排列较规则,偶见中性粒细胞浸润和局部轻微出血。另外,咽立爽口含滴丸高剂量与雾化组家兔咽黏膜上皮组织未见明显变性炎症性病变,黏膜下层及肌层均未见明显病理变化。上述结果表明,咽立爽口含滴丸能减轻慢性咽炎家兔咽部黏膜组织病理损伤,缓解病情进展,可能对CP发挥防治作用。

慢性咽炎患者咽部黏膜炎症反应强烈,多数炎症因子处于高表达状态,如血清TNF- α 、IL-6等。TNF- α 是由T淋巴细胞分泌的细胞因子,生物活性较为广泛,可参与其他生物因子协同作用,在炎症反应中发挥重要作用。IL-6是由成纤维细胞、活化T细胞分泌的细胞因子,属于趋化因子,可在感染引发的炎症反应中诱导炎症反应相关反应蛋白的合成与分泌,进而促进炎症反应^[13]。此外,T淋巴细胞亚群主要包括辅助性T细胞和抑制性T细胞,CD4⁺增多表示机体清除病毒、细菌的能力及机体免疫功能增强,而CD8⁺增多往往表示机体清除病毒、细菌的能力及免疫功能受到抑制^[14-15]。慢性咽炎患者病情进展过程中,CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺的降低可刺激B细胞的分泌,从而增强体液免疫,诱发产生免疫复合物的黏附与沉积,使病情加重^[16-17]。本研究结果显示:与空白组比较,模型组CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平,明显降低;咽立爽口含滴丸高剂量及雾化组CD8⁺水平明显降低,CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平明显升高。这些结果提示咽立爽口含滴丸影响免疫细胞亚群,进而影响咽炎病情进展。

NF- κ B信号通路能调控大量炎症细胞因子的生物学活动,广泛参与炎症反应、细胞增殖及免疫调节等病理生理过程。已有研究证实,未激活的NF- κ B通常与I κ B家族成员结合成无活性细胞质复合物而存在,当强烈的外界信号(如TNF- α 、IL-6、IL-1)诱导刺激细胞时,NF- κ B p65与I κ B相分离致使NF- κ B信号通路激活,诱导大量炎症因子转录,发挥转录调控作用^[18]。研究显示,用卵清蛋白刺激可选择性抑制NF- κ B活化的

I κ B- α 基因突变小鼠,制造变应性气道疾病模型,发现突变小鼠变应性炎症反应较对照组明显减轻,气道嗜酸性粒细胞及黏液分泌减少,血清IgE水平及促炎症反应的细胞因子表达也有所下降,表明NF- κ B在气道变应性炎症反应中起到重要调节作用^[19]。高斐宏等^[20]也通过动物实验发现,鼻炎大鼠鼻黏膜中NF- κ B高表达可使促炎症因子TNF- α 、IL-6表达上升。其中TNF- α 作为多功能炎症细胞因子,能介导黏附分子表达及细胞因子释放,促进炎症细胞的浸润和活化。以上研究结果提示,NF- κ B可激发多种炎症因子表达,同时也受相关炎症因子的反激活,是促使炎症效应进一步放大的关键。

CP是咽黏膜、黏膜下及淋巴组织的慢性炎症反应,炎症反应过程能够激活NF- κ B p65,持续激活的NF- κ B p65能够增强一些细胞因子(如IL-1 β 、TNF- α)和一些黏附因子(如VCAM-1、ICAM-1)的表达,使炎症反应细胞产生活性氧,损伤咽黏膜周围上皮细胞,引起咽黏膜组织的炎症损害^[21]。因此,抗炎作用的一个解释可能是抑制NF- κ B的激活,从而降低炎症标志物的水平。本研究显示,与空白组比较,模型组IL-1、IL-6、TNF- α 、CRP表达及NF- κ B p65、I κ B- α 蛋白和mRNA表达明显升高,T-AOC表达明显降低;而咽立爽口含滴丸雾化组和高剂量组IL-1、IL-6、TNF- α 、CRP表达及NF- κ B p65、I κ B- α 蛋白和mRNA表达明显降低。这些研究结果提示,咽立爽口含滴丸可有效抑制NF- κ B炎症通路活性及促炎因子表达,增强机体的抗氧化能力,从而抑制慢性咽炎的炎症反应。

综上所述,咽立爽口含滴丸具有较好的抗炎及增强免疫作用,可影响NF- κ B信号通路,有效缓解慢性咽炎症状。

参考文献:

- [1] XU C Y, YUE R S, LV X, et al. The efficacy and safety of Banxia-Houpo-Tang for chronic pharyngitis: a protocol for systematic review and meta analysis[J]. *Medicine*, 2020, 99(30): e19922. DOI: 10.1097/MD.00000000000019922.
- [2] LEONE C A, CARUSO A A, ALLOCCA V, et al. Pilot study on the effects of high molecular weight sodium

- hyaluronate in the treatment of chronic pharyngitis[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2015, 28(4): 532-538. DOI:10.1177/0394632015586497.
- [3] RAISH M, AHMAD A, ANSARI M A, et al. *Momordica charantia* polysaccharides ameliorate oxidative stress, inflammation, and apoptosis in ethanol-induced gastritis in mucosa through NF- κ B signaling pathway inhibition[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 193-199. DOI: 10.1016/j.ijbiomac. 2018. 01.008.
- [4] 陈其冰, 王燕, 李芬, 等. 慢性咽炎病因和发病机制研究进展[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2019, 27(2):224-228. DOI:10.3969/j.issn.1006-7299.2019.02.029.
- [5] 吴思恩, 李清明, 曹火太. 咽立爽口含滴丸治疗慢性咽炎的效果观察[J]. *中国当代医药*, 2015, 22(20): 81-83.
- [6] 郭裕. 咽立爽口含滴丸超声雾化治疗急性单纯性咽炎疗效观察[J]. *世界临床药物*, 2006, 27(7):431-432, 442. DOI:10.3969/j.issn.1672-9188.2006.07.012.
- [7] 何强亮, 刘元献, 杨龙, 等. 慢性咽炎动物模型的建立及相关指标观察分析[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2017, 25(1): 17-20. DOI: 10.16542/j. cnki. issn.1007-4856.2017.01.005.
- [8] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997.
- [9] CHEN J J, YIN S K, LIU S X, et al. A multicenter randomized controlled study on the treatment of acute and chronic pharyngitis with Binglianqingye Spray[J]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2018, 32(1): 1-6. DOI: 10.13201/j.issn.1001-1781.2018. 01.001.
- [10] 温雯, 张颖, 邹桂欣, 等. 兔慢性咽炎模型实验研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(6): 1313-1315. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2018.06.060.
- [11] 谢雪艳, 李天珍, 王万林, 等. 不同产源艾纳香油化学成分及其抗炎活性研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(9): 1069-1076. DOI: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2019.09.008.
- [12] 王立英, 刘强, 曹震. 清喉利咽颗粒联合克拉霉素治疗慢性咽炎的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2020, 35 (2): 300-303. DOI: 10.7501/j. issn. 1674-5515. 2020. 02.022.
- [13] 王艺, 张玲, 周家璇. 咽炎消合剂对慢性咽炎大鼠咽黏膜修复作用的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2015, 24(15): 1600-1602. DOI: 10.3969/j. issn. 1008-8849. 2015.15.002.
- [14] 贺敏. 逍遥散联合半夏厚朴汤治疗慢性咽炎的效果及对患者血清炎症标志物及T淋巴细胞亚群的影响[J]. *中医临床研究*, 2020, 12(13):69-71. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7860.2020.13.023.
- [15] 曹敏, 向钦, 刘阳, 等. CBA/CaJ小鼠脏器重量、血液生理生化指标及免疫细胞的比例[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(4): 418-423. DOI: 10.3969/j. issn. 1005-4847.2018.04.002.
- [16] 张礼来, 张志琴, 周凤玲. 益气通窍中药灌洗辅助治疗鼻内镜术后鼻源性慢性咽炎疗效及对炎症细胞因子、T淋巴细胞亚群、SIgA水平的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(9): 959-962. DOI: 10.3969/j. issn.1008-8849. 2018.09.013.
- [17] 雷剑波, 荣堃, 杨丽, 等. 养阴利咽饮联合玉液散吹喉治疗阴虚肺燥型慢性咽炎效果及对血清炎症因子水平的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(27): 3041-3044. DOI: 10.3969/j. issn. 1008-8849. 2016. 27.028.
- [18] ZHOU Z X, MOU S F, CHEN X Q, et al. Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NF κ B in animal models of acute pharyngitis[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1):1269-1274. DOI:10.3892/mmr.2017.7933.
- [19] 徐佳莉, 王莹, 陈鹏. 高剂量PM_{2.5}诱导卵清蛋白致哮喘小鼠肺损伤及其机制[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(10): 1297-1302. DOI: 10.13423/j. cnki. cjcmi.008444.
- [20] 高斐宏, 李林, 卢炆, 等. 蒙药十三味红花密诀丸对过敏性鼻炎大鼠鼻黏膜ICAM-1、VCAM-1、TLR4、NF- κ Bp65表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32 (9):4143-4145.
- [21] ZHU C, ZHANG S, SONG C, et al. Selenium nanoparticles decorated with *Ulva lactuca* polysaccharide potentially attenuate colitis by inhibiting NF- κ B mediated hyper inflammation[J]. *J Nanobiotechnology*, 2017, 15(1): 20. DOI: 10.1186/s12951-017-0252-y.
- (收稿日期: 2021-01-04 修回日期: 2021-03-11)