

基于“情志致病”理论建立慢性咽炎肝郁脾虚大鼠模型的研究*

王 艺¹, 周家璇¹, 黄春江¹, 李在望^{2△}

(1. 云南中医学院第一附属医院, 云南 昆明 650021; 2. 南京医科大学附属无锡人民医院, 江苏 无锡, 214023)

摘要: **目的** 通过建立慢性咽炎肝郁脾虚大鼠模型, 探讨慢性咽炎的发生发展与影响情绪的关键神经递质含量的相关性, 从而研究慢性咽炎与“情志致病”的中医致病理论之间的关系。**方法** 选用 70 只 Wistar 大鼠构建慢性咽炎模型, 随机分 7 组: 空白对照组, 标准慢性咽炎模型组, 标准慢性咽炎模型低剂量组, 标准慢性咽炎模型高剂量组, 慢性咽炎肝郁脾虚模型组, 慢性咽炎肝郁脾虚低剂量组, 慢性咽炎肝郁脾虚高剂量组, 造模完成并评估后分别给予“咽炎消合剂”治疗 10 d, 检测各组大鼠下丘脑组织 5HT-mRNA 表达, 并对各组大鼠行咽黏膜病理切片检测。**结果** 2 种模型大鼠下丘脑组织 5HT-mRNA 表达低于空白组, 肝郁脾虚组的 5-HT_{2C} 含量明显低于标准模型组, 5-HT_{1B} 高于标准模型组。经予“咽炎消合剂”治疗后, 5-HT_{1B}、5-HT_{2C} 受体增加。病理切片显示与 2 种模型对比治疗前, 其咽黏膜慢性炎细胞的数量减少, 咽部血管通透性及炎细胞渗出减轻。**结论** 慢性咽炎肝郁脾虚大鼠模型建立成功, 比标准模型更符合临床病理特征, 证实大鼠体内慢性咽炎的发生发展与影响情绪的关键物质神经递质的异常表达有直接的关联, 证明了慢性咽炎中医致病理论“情志致病”的正确性。

关键词: 慢性咽炎; 动物模型; 情志致病; 咽黏膜

中图分类号: R228

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)01-0011-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.01.003

Study on the Type of Liver-stagnation and Spleen-deficiency Chronic Pharyngitis Rat Model that Based Emotion Pathopoiesis Theory

WANG Yi¹, ZHOU Jiaxuan¹, HUANG Chunjiang¹, LI Zaiwang²

(1. Yunnan University of TCM, Kunming 650021, China;

2. Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214023 China)

ABSTRACT: Objective To confirm the theory of emotion pathopoiesis that basis of TCM, through establishing a rat model of chronic pharyngitis (CP) liver-stagnation and spleen-deficiency CP rat model (GYPM) to explore the correlation between the occurrence and development of CP and the expression of the key neurotransmitter. **Methods** 70 wistar rats were used to establishing the CP standard model and liver-stagnation and spleen-deficiency CP rat model, that divided into 7 groups randomly. After modeling, the hypothalamus tissue 5HT mRNA expression in each group was examined, and pathological sections of rats in each group were observed. **Results** The hypothalamus 5HT mRNA expression in both models was lower than that in the blank group. After 10 days of Yanyanxiao mixture treatment, the 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C} receptor two kind of rat model were increased. **Conclusion** Compared with the standard model, CP rat model of liver-spleen deficiency established successfully, and is more suitable for clinical and pathological features. The incidence of CP is associated with abnormal expression of the key neurotransmitter which affected by mood.

KEY WORDS: chronic pharyngitis; animal model; emotion pathopoiesis; pharyngeal mucosa

慢性咽炎为咽部粘膜, 粘膜下及淋巴组织的慢性弥漫性炎症, 中医称为“慢喉痹”“虚火喉痹”等^[1-2]。该

病病程较长, 患者常伴有焦虑、急躁和紧张等精神症状, 给患者工作、生活、精神及经济上带来了一定的负

* 基金项目: 国家自然科学基金(81760881); 云南省科技厅应用基础研究计划项目(2014FZ094)

收稿日期: 2018-01-15

作者简介: 王艺(1980-), 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 咽喉疾病的中西医结合临床及理论研究。

△通信作者: 李在望, E-mail: lizaiwang123@hotmail.com

担,严重影响了身心健康。目前该病以抗炎、抑制胃酸及抗过敏为主,但无特效药物及统一的治疗方式^[3-7]。此外,心理的疏导对解除本病者带来的心理负担对疾病的改善也有积极的作用。部分学者认为:本病可按抑郁症来治疗^[8-9]。中医认为慢性咽炎的病因病机以虚火灼咽、肝郁气滞、痰湿瘀阻、脾胃虚弱四种为多见^[10],可归结为“情志致病”。“情志致病”是中医病因病机理论中较为重要的内容,包含以上四大病机。目前慢性咽炎大鼠模型不能充分体现中医的发病机制,故本研究通过以中医“情志致病”为理论基础,设计利用慢性应激原理诱导来研究建立肝郁脾虚慢性咽炎大鼠模型,并研究中药通过调节下丘脑组织 5HT mRNA 表达与改善慢性咽炎症状之间的关系;从而探讨慢性咽炎的发生发展与 5-HT 及其受体 1B/2C(5-HT1B/2C)的异常表达是否具有相关性,以及探讨中药对改善慢性咽炎症状的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 Wistar 大鼠 70 只(北京维通利华实验动物技术有限公司,0042625,SCXK(川)2015-030),体质量约为 180~220 g,实验开始前适应性喂养 1 周。

1.2 主要药品、试剂和仪器 药品:院内中药复方制剂(咽炎消合剂,批号 20161025)(组方:柴胡、法夏、厚朴、浙贝、僵蚕、白术、茯苓、桔梗等);试剂:Trizol 动物组织 RNA 提取液(Invitrogen 公司),KAPA SYBR FAST qPCR Kit 荧光定量试剂盒(KAPABio-systems 公司);10%氨水(SIGMA 公司,批号 201610101)250 mL 瓶装;ECL 发光液(Millipore 公司);DNA Marker-DL2000(Takara 公司)。仪器:喉头喷雾器(金喉健喷雾剂 10 mL 药瓶);透射电镜及多用光学显微镜(JEOL 公司 JEM-1200EX),Nanodrop 1000 plus 超微量核酸定量仪(Thermo(德国)公司),自制开口器等^[11]。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组 将 70 只 Wistar 大鼠随机分组:空白对照组;慢性咽炎肝郁脾虚模型组、肝郁脾虚低剂量组、肝郁脾虚高剂量组;慢性咽炎标准模型组、标准模型低剂量组、标准模型高剂量组。共 7 组,每组 10 只(因该实验的动物死亡率较高,每组动物数量保证在 7 只以上)。

1.3.2 造模及实验方法 慢性咽炎标准模型造模方法:用 10%氨水喷大鼠咽部 2 次,每次用喷雾器喷 2 揪,间隔 8 h,连续 21 d。造模第 22 天开始,停止上述造模因素,自然饲养条件下观察^[11]。

慢性咽炎肝郁脾虚型模型造模方法:在慢性咽炎标准模型造模方法的基础上以慢性束缚方法+饥饿法制作肝郁脾虚大鼠模型:将大鼠束缚于束缚筒内(用于限制大鼠的活动),放入饲养箱中,3 h/d,早 8 点到 11 点,连续 21 d。隔日喂食(隔日禁食,隔日足量给食),连续 3 周。造模第 22 天开始,停止上述造模因素,自然饲养条件下观察^[11-13]。

1.3.3 造模后给药组治疗 采用咽炎消合剂临床成人用量与动物体型系数算法换算成大鼠灌胃的等效剂量,常温下灌胃。2 种模型的咽炎消合剂低剂量组(含生药量 2.0 g/mL),灌胃体积 1 mL/100g;2 种模型的咽炎消合剂高剂量组(含生药量 2.5 g/mL)。空白治疗组、健康空白对照组用 0.9%生理盐水等体积灌胃^[13]。

1.3.4 利用行为学、宏观表征进行中医证候表现评估 体温、食量、体质量、大便、舌象、耐力等。评估时间:0 周(给药前),给药后 1 周,给药后 2 周,给药后 3 周。

1.3.5 病理组织结构观察 对大鼠黏膜层、肌层、骨骼肌层作病理形态学和结构观察。重点观察结构:复层扁平上皮层、结缔组织、腺体、肌细胞。

1.3.6 药物干预结束后,行咽部取材予以病理切片。然后于大鼠头颅中线处剪开皮肤、皮下组织和颅骨,暴露并取出脑组织。使用专用大鼠脑组织立体定位器,定位下丘脑并取材。制备下丘脑组织均浆,抽提总 RNA,经紫外分光光度仪测定各总 RNA 的吸光度(A260)值,及 A260/A280。将总 RNA 样本进行 RT,反应条件:37℃;1 h(反应体系略)。将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增。利用 FQ-PCR 仪自带软件(ABI Prism 7000 SDS Software),进行数据采集和分析。下丘脑组织经蛋白裂解液及 PMSF 作用后,以 BSA 为标准,用 Bradford 法对上清进行蛋白定量。

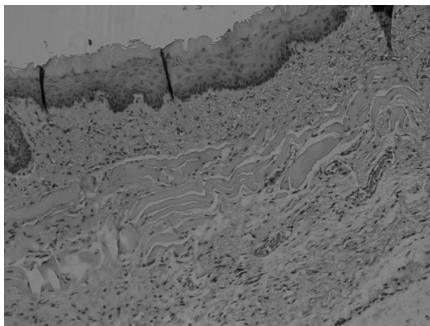
1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据的统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用 F 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察 2 种慢性咽炎大鼠模型的体重都略

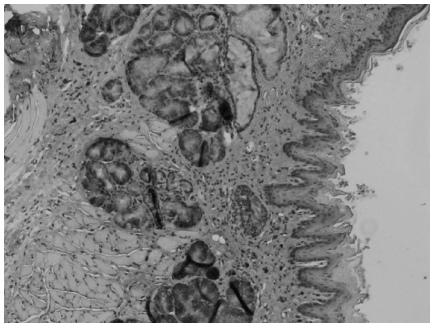
低于正常对照组大鼠。造模开始后慢性咽炎标准大鼠模型、肝郁脾虚大鼠模型的大鼠都存在喉鸣症状,侧头蹭垫料、搔抓口唇动作。标准模型组饮水量明显增加,而肝郁脾虚模型组饮水量接近空白对照组。2种慢性咽炎大鼠模型均存在以下显著的特征:皮毛较疏松、粗糙、无光泽,纳食少、活动少、体重减轻、时有便溏、肛门污秽。肝郁脾虚模型还出现了摄食率降低、嗜睡、时有尾部松弛、拖垂以及时有骚动不安或活动次数下降等行为改变,以造模开始20 d后尤为明显。

2.2 病理组织结构观察 慢性咽炎标准模型组以及慢性咽炎肝郁脾虚型模型大鼠的咽部组织相较于空白对照组,均具有上皮组织增生情况,且乳突状增生、钉状增生明显,具有广泛小血管扩增,普遍出现炎细胞浸润情况。部分区域有粘液腺异常肿大,组织充血,分泌物明显增加;局部区域可见固有层肿胀、纤维组织增生。通过中药复方制剂治疗后,咽黏膜上皮增生出现逆向改变,部分出现上皮层变薄,钉状增生减少,血管扩张现象基本消失。粘液腺增生数量减少、炎症细胞浸润情况改善,肌肉层组织充血情况较模型组减轻,咽部分泌液减少,复层扁平上皮恢复。见图1~图5。



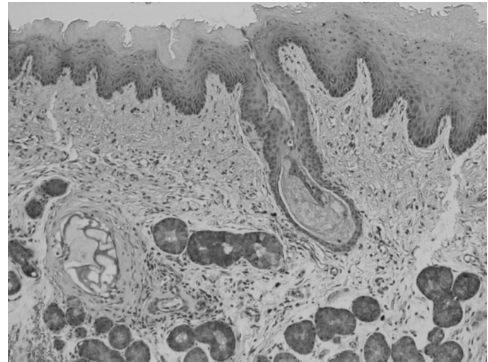
注:黏膜层、肌层、骨骼肌层组织正常,粘液腺无增生

图1 空白组(HE ×100)



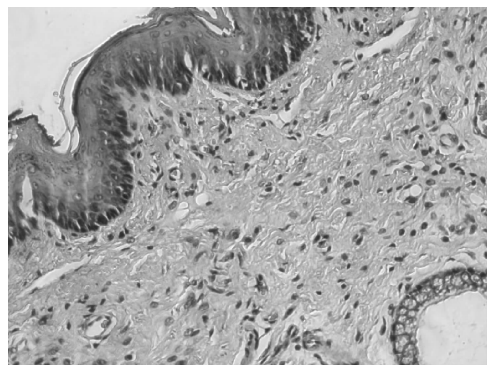
注:钉状突增生明显、复层扁平上皮乳突状增厚、弥漫性炎细胞浸润

图2 标准模型组(HE ×100)



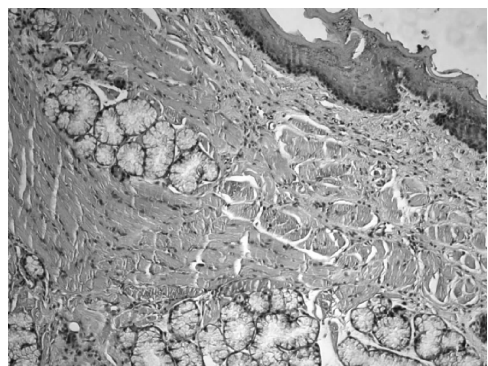
注:粘液腺肿大,分泌物增加,钉状突增生,固有层肿胀

图3 肝郁脾虚型模型组(HE ×100)



注:钉状突消失、粘液腺增生情况消失、血管仍有扩张

图4 咽炎消治疗组(标准模型)(HE ×100)



注:钉状突消失,复层扁平上皮恢复、粘液腺轻度增生

图5 咽炎消治疗组(肝郁脾虚模型)(HE ×100)

2.3 荧光定量检测大鼠下丘脑5-HT含量 结果显示,相对于空白对照组,标准模型组与肝郁脾虚型模型组的大鼠下丘脑5-HT_{1B}、5-HT_{2C}显著性降低,且差异具有统计学意义($P < 0.001$)。标准模型组与肝郁脾虚型模型组之间的5-HT_{1B}水平($t = 16.55, P < 0.001$);5-HT_{2C}水平($t = 3.35, P < 0.01$)均有差异。经过咽炎消合剂的干预治疗后,标准模型组中的低剂量治疗组和高剂量治疗组的5-HT_{1B}、5-HT_{2C}水平都不同程度的提高($P < 0.05$)。见表1~表2,图6。

表 1 大鼠下丘脑 5-HT_{1B} 分析结果(n=7,ng/mL)

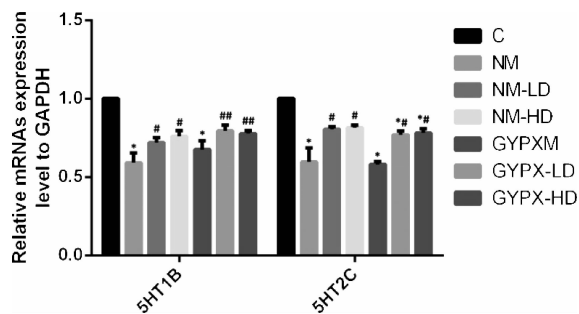
组别	C	NM	NM-LD	NM-HD	GYPXM	GYPX-LD	GYPX-HD
5-HT _{1B}	1	0.591837±0.062617	0.720145±0.031146	0.761057±0.034348	0.675091±0.055714	0.789567±0.04218	0.77059±0.024434
P 值		*P<0.001	#P=0.034	#P=0.025	*P=0.001	△P=0.043	△P=0.041

注：其中 C 为空白对照组,NM 为标准普通模型组;NM-LD 为标准模型低剂量组;NM-HD 为标准模型高剂量组;GYPXM 为肝郁脾虚模型组;GYPX-LD 为肝郁脾虚低剂量组,GYPX-HD 为肝郁脾虚高剂量组;与 C 组比较 *P<0.05,与 NM 组比较 #P<0.05;与 GYPXM 组比较 △P<0.05

表 2 大鼠下丘脑 5-HT_{2C} 分析结果(n=7,ng/mL)

组别	C	NM	NM-LD	NM-HD	GYPXM	GYPX-LD	GYPX-HD
5-HT _{2C}	1	0.597073±0.090215	0.805188±0.015345	0.815849±0.014459	0.48101±0.017095	0.769166±0.024097	0.781998±0.027067
P 值		*P=0.002	#P=0.017	#P=0.012	*P<0.001	△P<0.001	△P<0.001

注：其中 C 为空白对照组,NM 为标准普通模型组;NM-LD 为标准模型低剂量组;NM-HD 为标准模型高剂量组;GYPXM 为肝郁脾虚模型组;GYPX-LD 为肝郁脾虚低剂量组,GYPX-HD 为肝郁脾虚高剂量组;与 C 组比较 *P<0.05,与 NM 组比较 #P<0.05;与 GYPXM 组比较 △P<0.05



注：与空白组相比较,*P<0.01,与标准模型组相比较,#P<0.05,与肝郁脾虚模型组相比较,##P<0.05,与肝郁脾虚模型组相比较,*#P<0.01

图 6 各组大鼠下丘脑组织 5-HTmRNA 表达情况

3 讨论

咽黏膜的慢性炎症是产生咽部不适感的因素之一,然而局部炎症消退后还会存在异物感,长期反复发作后为何会出现焦虑,抑郁等心理及精神症状,二者发病或具有一定相关性。慢性咽炎患者经临床治疗后,局部炎症已完全得到控制,局部粘膜组织已完全恢复,接近于正常,但患者仍旧觉得咽部不适,处于焦虑、紧张的心理状态。前期临床研究表明,基于中医“情志致病”理论,对脾虚肝郁型慢性咽炎患者进行辨证论治,应用咽炎消合剂治疗的慢性咽炎患者总有效率优于单纯使用西药治疗组,并且从患者定期复诊的情况分析,患者除了咽部不适、干燥感、灼热感、痒感、蚁行感等局部症状消失以外,心理上的焦虑、急躁和紧张等精神症状也有很好的缓解,而单纯使用抗炎、抗过敏等方法治疗的对照组患者局部症状消失,局部检查咽部粘膜恢复正常,仍伴有一定的焦虑、忧郁等精神症状,患者感觉疾病还未完全痊愈^[14]。

由此,在前期研究基础上,本课题根据中医“情志

致病”理论,设计利用慢性应激原理诱导建立肝郁脾虚大鼠模型^[15-16]。研究方案中对大鼠的咽部用氨水持续性喷雾,使之产生咽部刺激性不适症状,而慢性束缚方法使大鼠困与狭小的空间内,怒气而无法宣泄,肝气疏泄不及而致气机郁滞;肝气郁滞进而肝木乘土,伤及脾胃,致使脾胃气虚,同时饥饿法除致使脾胃功能失调外反过来也可致肝气不舒,则肝郁脾虚证候形成。以上 3 种刺激作为一组“情志致病”综合应激源,应激源的长期刺激可形成机体的应激反应,即中医的证(证候)。不同证候就是不同个体表现出的不同反应状态,这种状态就是现代医学有关生理及病理(包括功能性和器质性)的综合反应^[17]。因此,应激反应与中医证候在本质上具有高度的相关性。在一定条件下,应激反应同时也可作为一种应激源对机体造成影响。慢性应激反应可使大鼠外周及中枢神经递质合成代谢紊乱,如 5-HT 含量明显改变等。研究表明,本病与 5-HT 等神经递质代谢异常有一定相关性^[18]。

本研究结果显示:慢性咽炎肝郁脾虚模型相对于慢性咽炎标准大鼠模型,在造模后期除有口腔分泌物明显减少,咽部粘膜呈暗红色且干燥、光泽度减退等共同症状外,其咽黏膜病理结构表现也具有慢性炎症表现的共同特征,如咽黏膜上皮组织增生、钉状增生明显、小血管扩增、有炎细胞浸润等;此外,肝郁脾虚模型还出现摄食率降低、体重减轻、嗜睡、时有尾部松弛、拖垂、便溏、肛门污秽以及时有骚动不安或活动次数下降等行为改变,以造模开始 20 d 后尤为明显,符合中医肝郁脾虚证型的特征,并且与临床上慢性咽炎伴随精神症状具有一定的相似性。经过咽炎消合剂治疗 10 d 后,慢性咽炎大鼠局部症状明显好转,相关焦

虑、抑郁等行为学症状也随之消失。

研究同时荧光定量 PCR(FQ-PCR)测定 5-HT1B 和 5-HT2C 2 种受体 mRNA 表达,对比治疗前后,结果证实:相对于空白组,2 种模型的 5-HT1B、5-HT2C 含量总量下降,且差异具有统计学意义($P<0.05$)。肝郁脾虚组的 5-HT2C 含量低于标准模型组,而 5-HT1B 含量高于标准模型组。5-HT1B 自身受体的激活可有效抑制 5-HT 的释放,且可抑制谷氨酸能神经的兴奋性活动,从而在中枢神经活动中起到抑制作用。其中 5-HT2C 受体起着介导神经元兴奋的作用,二者相互制约平衡。2 种慢性咽炎大鼠模型脑组织 5-HT1B、5-HT2C 表达均比空白对照组降低,但经中药治疗后都出现了明显提高。由此可推测,慢性咽炎与 5-HT 的代谢异常具有一定的相关性。值得注意的是,2 种动物模型在经过咽炎消合剂治疗之后,肝郁脾虚模型组的 5-HT2C 受体 mRNA 表达与标准模型组相比具有明显差异性,肝郁脾虚模型组的 5-HT2C 受体明显低于标准模型组,因而出现进食减退,嗜睡,活动能力下降等精神症状,这说明肝郁脾虚的动物模型比标准动物模型更符合中医“情志致病”特征;同时也说明该药不仅能修复咽部黏膜,也通过调节 5-HT 代谢,进而改善慢性咽炎精神症状^[13]。

综上所述,基于“情志致病”理论慢性咽炎肝郁脾虚大鼠模型既具有标准慢性咽炎大鼠模型的咽部病理特征及行为学特征,同时也具备了肝郁脾虚这一中医证候学特征,且符合慢性咽炎临床病因病理特性^[19]。这为进一步探索慢性咽炎发病机制及理论和相关慢性咽炎实验研究选用合适的动物模型提供了参考。

参考文献:

- [1] 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(15):1600-1602.
- [2] 叶京英,韩德民. 慢性咽炎研究进展 [J]. 中国医学文摘,2004,19(5):268-271.
- [3] ROSELL CERVILLA A,GARCIA PURRINOS F J,CALVO MOYA J. Chronic pharyngitis and macrolides[J]. Acta Otorrinolaringol Esp,2002,53(6):441-443.
- [4] ROIG QUERAL M J,ROSELL CERVILLA A. Use of antibiotics for chronic pharyngitis? [J]. Aten Primaria,2003,32(1):64-65.
- [5] MILINEVSKI I V,SHABALDINA E V,SHAMOVA I P,et al. The use of the antidepressant citalopran for the treatment of chronic pharyngitis and pharyngeal neurosis [J]. Vestn Otorinolaringol,2011(2):58-61.
- [6] KAMARGIANNIS N,GOUVERIS H,KATSINELOS P,et al. Chronic pharyngitis is associated with severe acidic laryngopharyngeal reflux in patients with Reinke's edema [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol,2011,120(11):722-726.
- [7] YAZICI Z M,SAYIN,KAYHAN F T,et al. Laryngopharyngeal reflux might play a role on chronic nonspecific pharyngitis [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol,2010,267(4):571-574.
- [8] BOLDYREVA O V,BURENKOV G I,TOROPOVA L A. A new approach to the evaluation of the state of the micro-circulatory system in patients presenting with chronic atrophic pharyngitis and treated with a synthetic neuropeptide[J]. Vestn Otorinolaringol,2011(3):18-19.
- [9] EYIGOR H,ARIHAN G,ERGIN F,et al. Psychiatric disorder profile in patients with chronic pharyngitis[J]. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg,2006,16(4):178-182.
- [10] 周家璇,王艺. 浅论慢性咽炎与上消化道疾病的关系[J]. 云南中医学院学报,2006,29(3):22-24.
- [11] 李艳彦,谢鸣,陈禹,等. 一种运用复合病因造模法复制大鼠肝郁脾虚证模型的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志,2006(6):439-442.
- [12] 周国儿,吴静,黄云娟,等. “肝郁气滞”及“肝郁脾虚”型抑郁症动物模型建立初探[J]. 中华中医药学刊,2014,32(5):1035-1038.
- [13] 李咏梅,张志勇,肖佳尚,等. 慢性咽炎合剂长期毒性试验研究[J]. 中国实用医药,2009,4(25):10-12.
- [14] EYIGOR H,ARIHAN G,ERGIN F,et al. Psychiatric disorder profile in patients with chronic pharyngitis[J]. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg,2006,16(4):178-182.
- [15] 严灿,吴丽丽,徐志伟. 应用心理应激理论和方法开展中医药实验研究的思路[J]. 广州中医药大学学报,2004,21(4):325-328.
- [16] 严灿,徐志伟,吴丽丽,等. 建立中医情志致病动物模型的思考[J]. 中国临床康复,2006,10(3):155-157.
- [17] 李伟,陈家旭,杨建新,等. 疏肝、健脾、补肾复方对慢性束缚应激大鼠行为学和免疫功能的影响[J]. 中国实验动物学报,2003,11(1):5.
- [18] MILINEVSKI I V,SHABALDINA E V,SHAMOVA I P,et al. The use of the antidepressant citalopran for the treatment of chronic pharyngitis and pharyngeal neurosis [J]. Vestn Otorinolaringol,2011(2):58-61.
- [19] 程媛媛,王秋娟. 中医辨证论治慢性咽炎的治疗进展[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2015,23(1):79-80.