

• 实验研究 •

咽炎消合剂对慢性咽炎大鼠模型咽粘膜 TGF- β 1、Smad3 调节机制研究*

李在望¹, 周家璇², 黄春江², 王 艺^{2Δ}

(1. 暨南大学第二临床医学院/南方科技大学第一附属医院/深圳市人民医院神经内科, 广东 深圳 518020;

2. 云南中医药大学第一临床医学院, 云南 昆明 650021)

摘要: **目的** 通过研究咽炎消合剂对慢性咽炎大鼠模型咽部粘膜组织中 TGF- β 1、Smad3 mRNA 表达的趋势, 阐明咽炎消合剂修复慢性咽炎模型大鼠咽粘膜的作用机制, 进一步研究该病的发病机理。 **方法** 选用 45 只 SD 大鼠, 随机分 3 组造模: 标准慢性咽炎模型组, 慢性咽炎模型治疗组, 空白对照组。成功造模后进行咽炎消合剂治疗 15d, 然后对各实验组大鼠粘膜组织病理切片免疫组化检测, 以及用 Q-PCR 检测不同组别中的 TGF- β 1、Smad3 mRNA 的表达情况, 对 Q-PCR 中 Ct 值进行 t 检验, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行计算。 **结果** 一般观测及病理检查显示, 慢性咽炎模型建立成功。治疗组比较标准慢性咽炎模型组, 咽粘膜组织病理增生情况好转明显, 局部炎性细胞的数量减少, 血管通透性明显降低。Q-PCR 检测显示, 模型组及治疗组的 TGF- β 1、Smad3 mRNA 表达要高于空白组 ($P < 0.05$), 经咽炎消合剂治疗后, 治疗组 TGF- β 1、Smad3 mRNA 表达明显低于模型组。 **结论** 咽炎消合剂对慢性咽炎大鼠模型咽粘膜中有 TGF- β 1/Smad3 信号通路具有调控作用, 干预了咽粘膜的组织纤维增生及炎性改变, 证实了该药物对慢性咽炎治疗的有效性。

关键词: 慢性咽炎; TGF- β 1; Smad3; 动物模型; 咽黏膜; 咽炎消合剂

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2020)06-0001-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2020.06.001

Study on Regulating Mechanism of Yanyanxiao Mixture on Pharyngeal Mucosa TGF- β 1 and Smad3 in Chronic Pharyngitis Rat Model

LI Zaiwang¹, ZHOU Jiaxuan², HUANG Chunjiang², WANG Yi^{2Δ}

(1. The Second Clinical Medical College of Jinan University/The First Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology/Department of Neurology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China;

2. The First Clinical Medical College of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650021, China)

ABSTRACT: **Objective** By studying the trend of Yanyanxiao Mixture on the expression of TGF- β 1 protein in the pharyngeal tissue of chronic pharyngitis (CP) rat models, to clarify and further study the mechanism of Yanyanxiao Mixture repairing the mucosa of CP model rats and the pathogenesis of CP. **Methods** Forty-five SD rats were selected and randomly divided into 3 groups: standard CP model group, treatment group, and blank control group. After successful model established, treatment by Yanyanxiao Mixture for 15 days, immunohistochemical detection of mucosal tissue pathological sections of rats in each group, and Q-PCR detection of TGF- β 1 and Smad3 mRNA expression in different groups. **Results** Pathological examination showed that compared with the standard CP model group and the treatment group, the number of local pharyngeal mucosal inflammatory cells was reduced, and the vascular permeability was significantly reduced. The expression of TGF- β 1 and Smad3 mRNA in the model group and the treatment group was higher than that of the blank group. After treatment with "Yanyanxiao Mixture", The expression of TGF- β 1 and Smad3 mRNA in the treatment group was significantly lower than that in the model group. **Conclusion** Yanyanxiao Mixture has a regulatory effect on the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in the pharyngeal mucosa of rat model of CP, and could interfere the tissue fibrosis and inflammatory changes of the pharyngeal mucosa, confirmed the effectiveness of the Mixture in the treatment of CP.

KEY WORDS: chronic pharyngitis; TGF- β 1; Smad3; animal model; pharyngeal mucosa; Yanyanxiao Mixture

收稿日期: 2020-11-03

* 基金项目: 国家自然科学基金(81760881)

第一作者简介: 李在望(1977-),男,博士,副主任医师,研究方向: 神经系统疾病的中西医结合临床及理论研究。

Δ通信作者: 王艺, E-mail: 52247276@qq.com

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,是上呼吸道慢性炎症的一部分^[1]。中医称为“慢喉痹”“虚火喉痹”等。以咽部不适、干燥、异物感、咽痒、刺激性咳嗽等症状为主要临床特征,症状反复,病程较长,多见于成年人^[2]。病因及发病机制复杂,无统一的治疗方式,中药治疗具有一定优势^[3-4]。前期临床研究表明,应用咽炎消合剂能够减少动物咽粘膜组织慢性炎细胞的数量,减轻咽部血管通透性及炎细胞渗出,抑制纤维组织增生^[2]。本研究通过对慢性咽炎大鼠模型的咽粘膜中转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)和信号传导蛋白 Smad3 mRNA 的表达情况进行分析,探讨中药复方咽炎消合剂对改善慢性咽炎症状和粘膜病理状态的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 45 只(北京维通利华实验动物技术有限公司,0042625,SCXK(川)2019-0004),体质量 180~220g,全价饲料适应喂养 1 周。

1.2 主要药品、试剂和仪器 药品:云南省中医医院院内中药复方制剂咽炎消合剂(又名知石利咽合剂,批号 20190748)(组方:知母、石膏、法夏、厚朴、玄参、桔梗等);试剂:TGF 抗体、Smad3 一抗(Santa Cruz 公司);5%氨水(Wabcan 公司,批号 20190613) 500mL 瓶装;Platinum® SYBR® Green qPCR 试剂盒(Invitrogen 公司)。仪器:喉头喷雾器(金喉健喷雾剂 10mL 药瓶);透射电镜及多用光学显微镜(JEOL 公司 JEM-1200EX),自制开口器,荧光定量 PCR 仪 Light Cycler480(罗氏公司)等。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组 将 45 只 SD 大鼠随机分组:空白对照组、标准慢性咽炎模型组、慢性咽炎标准模型治疗组,共 3 组,每组 15 只。

1.3.2 造模及实验方法 慢性咽炎标准模型造模方法:10%氨水用喷雾器喷大鼠咽腔 2 次,每次喷 2 滴,刺激时间间隔 8 h,连续 21 d。从第 22 天开始,停止上述操作,自然条件下饲养观察^[5-6]。

空白对照组:等量生理盐水咽腔喷雾。

1.3.3 造模后给药组治疗 造模成功进行药物干预。对照临床成人用量计算咽炎消合剂大鼠灌胃的等效剂量,常温下灌胃^[6]。咽炎消合剂治疗组(含生药量

2.0 g/mL),灌胃体积 1 mL/100 g。空白治疗组、慢性咽炎标准模型组用 0.9%生理盐水等体积灌胃^[2]。治疗干预 15 d。

1.3.4 药物治疗干预后,开口器固定,取咽部粘膜组织做病理切片。HE 染色,镜下重点观察粘膜上皮纤维结缔组织、血管、腺体、上皮细胞、肌细胞。

1.3.5 qPCR 检测不同组别粘膜中的 TGF- $\beta 1$ 、Smad3 mRNA 的表达情况。在荧光 PCR 扩增过程中,当扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数设定为 Ct 值; ΔCt 内参基因的 CT 值归一目标基因的 CT 值; $\Delta\Delta Ct$ 校准样本的 ΔCt 值归一试验样本的 ΔCt 值; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表达量的比值。把所有组的样品的 Ct 值进行 *t* 检验后, $P < 0.05$,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算真实性。

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 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用成组 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

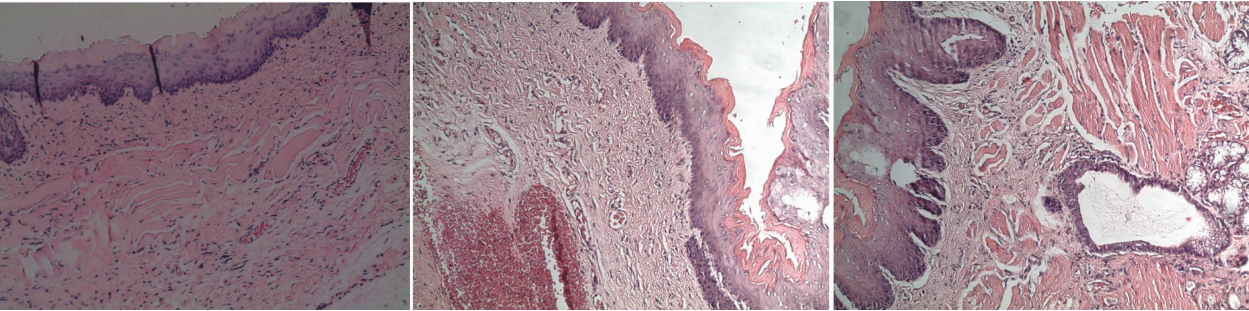
2 结果

2.1 一般观察 对照空白组,模型组和治疗组大鼠都出现间断性喘鸣声,骚动不安,饮水量明显增加,侧头蹭垫料、搔抓口唇动作,少数个体出现了口唇局部溃破情况,皮毛粗糙、疏松、光泽度差。治疗组进行咽炎消合剂给药 15 d 后,大鼠的活动状态趋于正常,饮水量较前减少,进食量明显增加,皮毛光泽度有所改善等。开口器活体观察咽部组织,见治疗组大鼠口腔粘膜水肿情况减轻,点状溃疡面积和数量较模型组有明显减少,咽部分泌物也有减少^[2]。空白对照组体征无明显变化。

2.2 咽粘膜病理切片观察 对照空白组,模型组以及治疗组的咽部组织出现了广泛炎细胞浸润情况,纤维上皮组织增生,局部有乳头状增生、钉突增生,并且出现有增生小血管扩增。治疗组经咽炎消合剂干预治疗后,咽黏膜上皮血管扩张基本消失,钉突增生减少,组织增生等病理表现情况对比治疗前明显改善,粘液腺增生数量减少,炎细胞浸润也明显减少。见图 1。

2.3 大鼠咽部粘膜 TGF- $\beta 1$ 、Smad3 mRNA 表达趋势变化

标准慢性咽炎模型组、慢性咽炎模型治疗组经过模型构建并评估成功后^[2],2 组大鼠模型粘膜中的



A. 空白组 B. 标准模型组 C. 咽炎消合剂治疗组

注:A.各层组织无病理改变; B.粘膜层组织纤维组织增生、小血管扩张、炎性细胞广泛浸润、粘液腺肿大; C.粘液腺无明显肿大,钉状突增生减少,血管轻度扩张

图 1 3 组咽粘膜病理情况

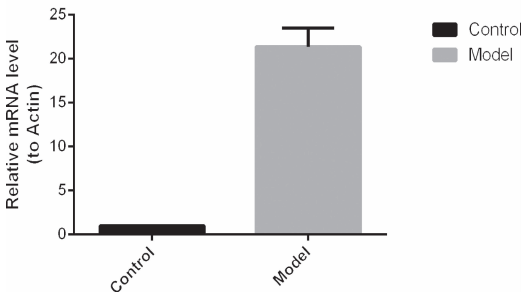
TGF-β1 mRNA 的表达水平对照空白组具有显著性差异(表 1,图 2)。 疗干预后,治疗组大鼠模型粘膜中的 TGF-β1 mRNA 的表达水平明显下降,与模型组对照具有显著性差异(表 2,图 3)。

咽炎消合剂对慢性咽炎模型治疗组经过 15d 治

表 1 模型构建后及药物干预 15d 后大鼠咽部 TGF-β1 表达变化

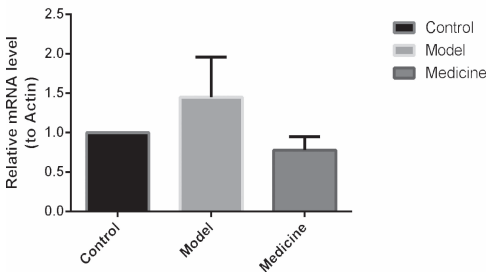
组别	Actin 平均 Ct (建模 21d 后)	TGF 平均 Ct (建模 21d 后)	Actin 平均 Ct (药物干预 15d 后)	TGF 平均 Ct (药物干预 15d 后)
空白组	25.23±0.67	22.64±0.10	23.87±0.55	20.66±0.05
模型组	28.71±0.08	23.26±0.25*	29.31±0.20	25.57±0.03 ^Δ
治疗组	25.40±0.23	20.92±0.04*	26.67±0.29	23.12±0.67 ^{Δ#}

注:与空白组对照,*P<0.05;与空白组对照,^ΔP<0.05;与模型组对照,[#]P<0.05。



注:Control 空白对照组;Model:模型组。

图 2 造膜 3 周后 TGF-β1 表达情况



注:Conrtrol 空白对照组;Model 模型组;Medicine 治疗组。

图 3 药物干预 15 d 后各组大鼠 TGF-β1 表达情况

表 2 模型构建后及药物干预 15d 后各组大鼠咽部 Smad3 mRNA 表达趋势变化

组别	Actin 平均 Ct (建模 21d 后)	Smad3 平均 Ct (建模 21d 后)	Actin 平均 Ct (药物干预后)	Smad3 平均 Ct (药物干预后)
空白组	1.87±0.27	2.02±0.05	1.79±0.31	1.67±0.12
模型组	2.33±0.14	3.19±1.22 ^Δ	2.62±0.79	2.91±1.06
治疗组	2.41±0.29	2.83±1.10 ^Δ	2.15±0.58	1.74±1.35 ^{ΔΔ}

注:与空白组对照,^ΔP<0.05;与模型组对照,^{ΔΔ}P<0.05。

标准慢性咽炎模型组、慢性咽炎模型治疗组成功建模后,2 组大鼠模型粘膜中的 Smad3 mRNA 的表达水平升高,对照空白组具有显著性差异;经过 15d 治疗干预后,治疗组大鼠粘膜中的 Smad3 mRNA 的表达水平对比模型组有了明显下降,具有显著性差异。

3 讨论

慢性咽炎病程较长,缠绵难愈,与慢性炎症刺激、长期烟酒过度,粉尘、有害气体的刺激,胃食管反流性疾病,内分泌紊乱以及免疫功能紊乱等因素有直接的相关性^[7-9]。而这些因素都导致了一个最主要病理改变:咽粘膜肥厚、咽后壁的淋巴滤泡增生,弥漫充血,双侧咽侧索充血肥厚,即中医所谓“痰凝血瘀,结聚咽喉”^[10]。

研究结果显示慢性咽炎模型中的治疗组经咽炎消合剂干预治疗后,大鼠一般摄食、饮水、活动状况接近正常,检查可见口腔粘膜水肿情况明显缓解,点状溃疡面积和数量较模型组有明显减少,咽部分泌物量也有降低。病理检查显示咽黏膜上皮血管扩张基本消失,钉突增生减少,组织增生等病理表现情况对比治疗前明显改善,粘液腺增生数量减少,炎细胞浸润也明显减少。说明咽炎消合剂能够减少咽粘膜组织慢性炎细胞的数量,减轻咽部血管通透性及炎细胞渗出,抑制纤维组织增生,对慢性咽炎的症状和体征有明显的治疗作用^[11-13]。这一治疗作用过程推测与 TGF- β 1/Smads 信号转导通路有密切相关性^[14]。

本实验研究结果显示:TGF- β 1、Smad3 mRNA 水平在大鼠咽部粘膜样本中,治疗组、模型组与空白组对比有明显的统计学差异。说明氨水对大鼠咽部粘膜的刺激形成的炎症反应,激发特异性炎症介质、各种细胞因子的释放,形成了氧化应激反应等,最终导致组织器官细胞的炎性增生和上皮、间充质细胞的纤维化,而组织的纤维化最公认的最重要的通路就是 TGF- β 1/Smads 信号转导通路^[15-16]。TGF- β 1 是属于一组调节细胞生长和分化的 TGF- β 超家族。TGF- β 1 对细胞的生长、分化和免疫功能都有重要的调节作用,可以抑制免疫活性细胞的增殖,促进成纤维细胞,促进伤口愈合和典型肉芽组织形成^[17]。TGF- β 1/Smads 信号转导通路中,TGF- β 1 的表达水平直接决定了下游 Smads 的表达,其相关效应是通过该信号转导通路发挥的,而其中调控 Smad3 蛋白可以阻断 TGF- β 1

信号的继续传导^[18]。

在慢性咽炎中,TGF- β 1、Smad3 的表达可能与咽粘膜的损伤修复可能具有一定关系^[19]。以往研究显示,不同病理触发因素导致的 3 种主要粘膜上皮增生状态:上皮-间质转化,衰老和内质网应激以及未反应的蛋白质反应,每种上皮状态都有其特征性的转录驱动因子,所有这些状态都引起分泌反应,这些反应具有促进胶原蛋白积累的能力^[20]。TGF- β 1 可诱导十几种蛋白的表达,这是胶原蛋白大量表达和组织积累所必需的。这些蛋白质几乎在胶原蛋白加工的每个阶段都起作用^[21]。如上所述,TGF- β 1 是成纤维细胞活化和胶原蛋白分泌的主要驱动力^[15]。本次实验研究结果显示,TGF- β 1、Smad3 mRNA 表达水平在大鼠咽部粘膜样本中,治疗组均低于模型组,并且相对于模型组,咽炎消合剂治疗组粘液腺无明显肿大,钉状突增生减少,血管轻度扩张,说明咽炎消合剂对慢性咽炎大鼠模型的咽部粘膜组织增生等病理表现情况对比治疗前明显改善,炎细胞浸润也明显减少,说明对病理性增生可逆转和修复作用^[22]。同时也可推测该药对 TGF- β 1/Smads 信号转导通路可能具有调控作用,其作用可能与其抑制 TGF- β 1、Smad3 mRNA 的过度表达,从而控制 TGF- β 1/Smads 信号通路的过度激活而缓解咽部粘膜纤维病理性增生的病变进程有关,这为中医药临床应用防治慢性咽炎提供了实验依据^[23-25]。

综上所述,通过对慢性咽炎大鼠模型造模和药物干预不同阶段咽粘膜 TGF- β 1、Smad3 mRNA 表达趋势变化的分析,说明咽炎消合剂对慢性咽炎大鼠模型 TGF- β 1 /Smads 信号通路具有调控作用,通过阻断该信号通路干预了咽粘膜的组织纤维增生及炎性改变,证实了该药物对慢性咽炎治疗的有效性,从而为进一步探索慢性咽炎发病因素和中药治疗机制提供理论依据。

参考文献:

- [1] 孔维佳,周梁.耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2015:391-392.
- [2] 王艺,周家璇,黄春江,等. 基于“情志致病”理论慢性咽炎肝郁脾虚大鼠模型建立研究[J]. 云南中医学院学报, 2018,41(1):11-15.
- [3] 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,2015,23(1):79-80.
- [4] 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.
- [5] 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,2006,12(6):439-442.
- [6] 梁璐,朴晋华,马建丽. 急性和慢性咽炎的发病机制与动物模型建立的研究现状[J]. 临床医药实践,2012,21(7):540-543.
- [7] 王艺,周家璇,施志强,等. 咽炎消合剂对慢性咽炎肝郁脾虚大鼠 5-HT 调控机制研究[J]. 现代中西医结合杂志,2018,27(6):576-578.
- [8] KAMARGIANNIS N, COUVERIS 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.
- [9] YAZICI Z M, SAYIN I, KAYHAN F T, et al. Laryngopharyngeal reflux might play a role on chronic nonspecific pharyngitis[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2010, 267(4):571-574.
- [10] CHUNG J H, TAE K, LEE Y S, et al. The significance of laryngopharyngeal reflux in benign vocal mucosal lesions [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2009, 141(3):369-373.
- [11] KUNDU S, DUTTA M, ADHIKARY B K, et al. Encountering chronic sore throat: how challenging is it for the otolaryngologists? [J]. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 2019, 71(Suppl 1):176-181.
- [12] 买鹏宇,朱闽. 中医药在转化生长因子- β 1介导的自身免疫性炎症疾病中作用的研究进展[J]. 辽宁中医杂志 2020,47(1):198-203.
- [13] KRYUKOV A I, KUNEL'SKAYA V Y, SHADRIN G B, et al. The role of microbiota in chronic pharyngitis [J]. Vestn Otorinolaringol, 2018, 83(3):61-64.
- [14] LOBODA A, SOBCZAK M, JOZKOWICZ A, et al. TGF- β 1/Smads and miR-21 in Renal Fibrosis and Inflammation [J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016:8319283.
- [15] GAO L, WANG L Y, LIU Z Q, et al. TNAP inhibition attenuates cardiac fibrosis induced by myocardial infarction through deactivating TGF- β 1/Smads and activating P53 signaling pathways [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(1):44.
- [16] HUANG Q, ZHANG X, BAI F, et al. Methyl helicertate ameliorates liver fibrosis by regulating miR-21-mediated ERK and TGF- β 1/Smads pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 66:41-51.
- [17] WANG W, XIONG H, HU Z, et al. Experimental study on TGF- β 1-mediated CD147 expression in oral submucous fibrosis [J]. Oral Dis, 2018, 24(6):993-1000.
- [18] MARTELOSSI CEBINELLI G C, PAIVA TRUGILO K, BADARÓ GARCIA S, et al. TGF- β 1 functional polymorphisms: a review [J]. Eur Cytokine Netw, 2016, 27(4):81-89.
- [19] SCHREURS M, SUTTROP C M, MUTSAERS H A M, et al. Tissue engineering strategies combining molecular targets against inflammation and fibrosis, and umbilical cord blood stem cells to improve hampered muscle and skin regeneration following cleft repair [J]. Med Res Rev, 2020, 40(1):9-26.
- [20] MORIKAWA M, DERYNCK R, MIYAZONO K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent roles in cell and tissue physiology [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(5):a021873.
- [21] RUSSO L M, BROWN D, LIN H Y. The soluble transforming growth factor- β receptor: advantages and applications [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(3):472-476.
- [22] LI X, MO N, LI Z. Ginsenosides: potential therapeutic source for fibrosis-associated human diseases [J]. J Ginseng Res, 2020, 44(3):386-398.
- [23] 叶斌,买鹏宇,陆智华,等. 中医药干预 TGF- β 1/Smads 信号通路对组织器官细胞纤维化调控作用的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(3):611-614.
- [24] 于蓉,岑瑛. TGF- β 1/Smads 信号转导通路与创伤后瘢痕形成 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2012, 26(3):330-335.
- [25] LI Z, HUANG J, HU Z. Screening and diagnosis of chronic pharyngitis based on deep learning [J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(10):1688.