

注射用炎琥宁对实验性急性咽炎动物模型的疗效与作用机制研究

梁璐¹, 朴晋华^{2*}, 高天红², 泰刚²

1. 山西大学 化学化工学院, 山西 太原 030006

2. 山西省食品药品检验所, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 探讨注射用炎琥宁对大鼠实验性急性咽炎动物模型的疗效及作用机制。**方法** 采用乙型溶血性链球菌直接注射于SD大鼠咽部黏膜建立急性咽炎动物模型,并予以注射用炎琥宁药物进行治疗,观察该药物对模型动物血清IL-1 β 、IL-6 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达以及对病理形态学的影响。**结果** 高、中(53、26.7 mg/kg)剂量组药物对模型动物血清中的IL-1 β 、IL-6 β 有明显的抑制作用,同时能不同程度改善急性咽炎的病理变化;高剂量组药物能有效抑制模型组动物TNF- α 的表达。**结论** 注射用炎琥宁对急性咽炎有较好的治疗作用,其作用机制可能与调节细胞因子的表达和抑制咽部病理改变的发生有关。

关键词: 注射用炎琥宁; 急性咽炎; 动物模型; 疗效; 作用机制

中图分类号: R987 R766.14 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)03-0165-04

Effect of Yanhuning Injection on animal models with acute pharyngitis and its mechanism

LIANG Lu¹, PIAO Jin-hua², GAO Tian-hong², TAI Gang²

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Shanxi Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To explore the effects of Yanhuning Injection in rat models with acute pharyngitis and its mechanisms based on an experimental study. **Methods** The rats were used in this study to establish the model of acute pharyngitis induced by directly applying beta hemolytic streptococcus into pharyngeal mucosa at first. Then, the several groups were treated by Yanhuning Injection for 5 d. The expression of serum IL-1 β , IL-6 β and TNF- α were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the effects on pathologic morphology were observed. **Results** In Yanhuning groups with high- and mid-doses, the expression of serum IL-1 β , IL-6 β could be obviously inhibited and the pathological changes of model group with acute pharyngitis improved in different degrees; In Yanhuning high-dose group, the expression level of TNF- α could be inhibited. **Conclusion** It indicates that Yanhuning Injection has a good curative effect on acute pharyngitis. The therapeutic mechanisms of Yanhuning Injection may be related to the regulation on the expression of cytokines and the inhibition on the pathological changes of pharynx.

Key words: Yanhuning Injection; acute pharyngitis; animal model; effects; mechanism

急性咽炎是临床常见病,多发病,属于上呼吸道感染炎症的一部分。本病临床发病率较高,从临床用药来看,西医大多采用抗生素类药物或辅以西地米松等激素类制剂,但疗效不佳,易反复发作^[1]。中医药作为传统医药,对其治疗效果显著,且不良反应较小。注射用炎琥宁是植物穿心莲提取物——穿心莲内酯经酯化、脱水、成盐精制而成的脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯钾钠盐,为纯天然中药单体化合物。文献报道^[2-5],穿心莲内酯为穿心莲法

热解毒,消炎止痛的主要有效成分。本实验通过对急性咽炎模型大鼠血清中IL-1 β 、IL-6 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的数据检测和病理形态学分析,对注射用炎琥宁治疗急性咽炎的作用机制进行了初步研究,并提出细菌感染SD大鼠急性咽炎动物模型的建立方法。

1 材料

1.1 药物与试剂

注射用炎琥宁,哈尔滨三联药业有限公司,批

收稿日期: 2012-03-22

基金项目: 山西省实验动物专项科研项目(2008K06)

作者简介: 梁璐(1985—),女,硕士生,专业方向为药理及药效学研究。Tel: 13834041274 E-mail: tomorrowlulu@163.com

*通讯作者 朴晋华 Tel: (0351)2025877 E-mail: marypia@126.com

号 YBH13602005。注射用氨苄西林钠, 华北制药集团山西博康药业有限公司, 批号 H14022707。灭菌注射用水, 焦作市康华药业有限公司, 批号 H41024209。碘^[125I]白细胞介素-1 β 放射免疫分析药盒, 碘^[125I]白细胞介素-6 放射免疫分析药盒, 碘^[125I]肿瘤坏死因子- α 放射免疫分析药盒, 均购自北京华埠力特生物技术研究所。

1.2 实验动物

SD 大鼠, 体质量 (200 \pm 20) g, 雌雄各半, 山西省医科大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号 SCXK (晋) 2009-0001。

1.3 仪器

SPX—250—Z 型生化培养箱; MLS—3780 型高压蒸汽灭菌器; 无菌操作台; BX53 双目生物显微镜; KDC—1042 低速离心机; SN—69513 型免疫计数器; KW—86L628 超低温保存箱 (-70 $^{\circ}$ C); 电子台秤; 一次性灭菌手术器械一套; 灭菌注射器; 一次性 EP 管等。

1.4 标准菌株和培养基

乙型溶血性链球菌 CMCC (B) 32210 购自中国食品药品检定研究院。营养肉汤培养基、普通琼脂培养基、血琼脂基础培养基 (营养肉汤、普通琼脂培养基加入 5%~10% 的无菌脱纤维兔血)^[6], 培养基均购自中国食品药品检定研究院。

2 方法

2.1 菌种的活化及菌液制备

从冻干瓶中复苏乙型溶血性链球菌, 置于预先准备的营养肉汤中 (加入 5%~10% 的无菌脱纤维兔血), 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 18 h, 在无菌操作台用一次性接种环挑取菌液划线接种于血琼脂培养基斜面上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后挑取单菌落接种于营养肉汤中 (加入 5%~10% 的无菌脱纤维兔血), 继续培养 12 h, 经比浊判定菌量后, 稀释至含菌量为 10⁸~10⁹ cfu/mL 的菌悬液为目标菌液, 至 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用^[6]。

2.2 急性咽炎动物造模方法

48 只 SD 大鼠, 随机取 8 只 (雌雄各半) 作正常对照组, 其余 40 只 (雌雄各半) 造模。给需造模的 40 只 SD 大鼠咽部注射含菌量为 1 \times 10⁸~1 \times 10⁹ cfu/mL 的乙型溶血性链球菌, 即用灭菌镊子翻开大鼠上颌口颊, 使之暴露部分口腔黏膜, 用带菌注射针头 (经灭菌处理) 以接近与口腔黏膜水平方向, 注入约为 0.02 mL/只的乙型溶血性链球菌^[7], 操作

程度以略有点状出血为度。已感染大鼠按常规饲养, 24 h 后进行二次感染^[8], 方法同上。空白对照组不接种乙型链球菌, 只接种灭菌后的相应肉汤培养基, 接种方式, 剂量, 次数均与模型组一致。经重复两次乙型溶血性链球菌感染后, 大鼠按常规饲养。造模结束后, 随机处死 8 只动物, 根据急性咽炎模型研究^[9]所规定的标准, 分别对动物造模后出现的一般症状、体征以及咽部病理形态学, 血清中 IL-1 β 、IL-6 β 以及 TNF- α 的细胞因子的表达等方面进行考察, 以评价动物造模是否成功。

2.3 动物分组与给药方法

将造模成功的 32 只急性咽炎动物模型 SD 大鼠 (雌雄各半), 随机分成 4 组, 即阳性对照组 (注射用氨苄西林钠)、注射用炎琥宁高、中、低剂量组。同时设空白对照组 8 只。按照李仪奎《中药药理实验方法学》中规定的人与动物用药剂量换算方法^[10], 治疗高、中、低剂量组分别 im 炎琥宁 53、26.7、13 mg/kg (分别相当于成人剂量的 20、10、5 倍), 每天 2 次 (上、下午各 1 次), 连续给药 5 d; 阳性对照组 1.3 g/kg (用与治疗中剂量组等容的灭菌注射用水配制), 每天 2 次 (上、下午各 1 次), 连续给药 5 d。正常对照组每天用与治疗中剂量组等容的蒸馏水 ig 给药。

2.4 病理标本的制备与观察

正常对照组、阳性对照组、治疗药物组均于第 5 天末次给药 45 min 后, 立即从大鼠股动脉取血至一次性 EP 管中, 随即自大鼠环状软骨水平剪断气管食管, 自咽后壁向上分离软组织至腭帆水平切断组织。摘取咽部组织入 10% 中性缓冲福尔马林溶液固定, 次日取材后经常规脱水, 石蜡包埋, 切片, HE 染色后在光学显微镜下用 10 \times 10, 10 \times 40 倍做光镜观察^[11]。

2.5 大鼠血清制备及测定

取大鼠股动脉血 2 mL, 注入 EP 管中待凝固后, 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清。至 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。测定前使样本置于室温中复融 (避免反复冻融), 再次 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 5 min, 取血清, 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清中 IL-1 β 、IL-6 β 以及 TNF- α , 操作依据试剂盒说明进行。

2.6 统计学方法

本实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件分析数据, 两组数据间用 t 检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 SD大鼠造模后一般状态

从造模第2天起,大部分SD大鼠逐渐出现频饮水,纳食少,活动迟缓,体质量下降,精神状态欠佳,被毛失光泽等症状,空白组无上述情况出现。阳性药组和注射炎琥宁高、中剂量组给药5d后,可观察到上述症状有所缓解。

3.2 光镜下大鼠咽部组织形态学变化

模型组大鼠咽部黏膜上皮角化严重,钉突明显,

腺体细胞肥大增生,黏膜的固有层、黏膜下层、肌层的间质可见明显的炎细胞浸润,情况严重者可见肌层结构破坏现象,部分肌细胞溶解,结构消失,但皮下出血和血管扩张现象较不明显。空白对照组大鼠无病理改变。炎琥宁高、中剂量组和阳性对照组能明显改善模型大鼠咽部黏膜及组织的炎细胞浸润、腺体的肥大、上皮增生、脓肿等症状,黏膜下组织基本正常,肌细胞无明显坏死现象,低剂量组有较为明显的病变。病理图片见图1。

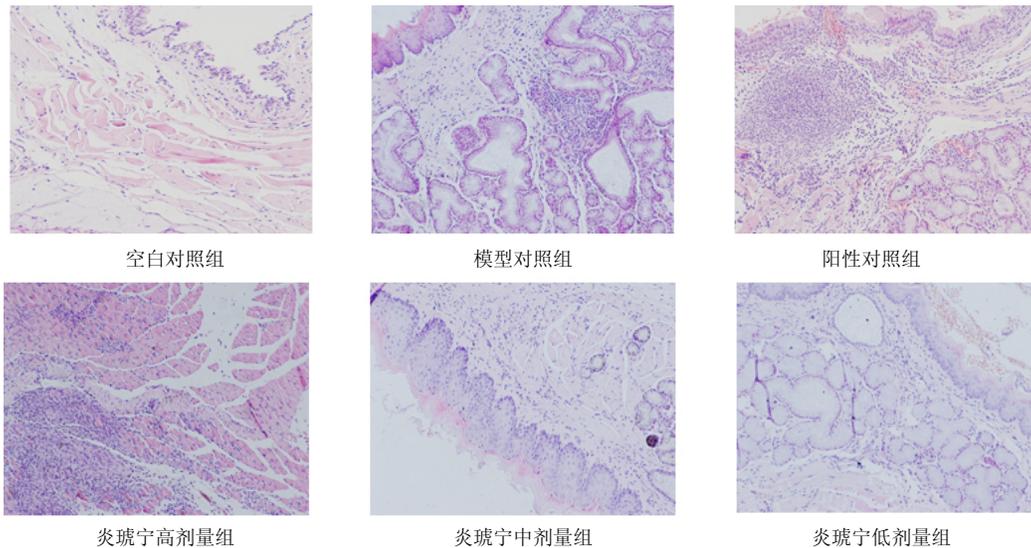


图1 大鼠咽部组织病理图片

Fig. 1 Pathological morphology on pharyngeal mucosa of rats

3.3 IL-1 β 测试结果

表1的结果显示,模型组血清中的IL-1 β 较空白对照组明显升高,具有明显的统计学意义($P < 0.01$),而注射用炎琥宁高、中剂量组和阳性对照组均能明显降低血清中IL-1 β 的产生($P < 0.05$),而低剂量组无统计学意义($P > 0.05$)。

3.4 IL-6 β 测试结果

模型组血清中的IL-6 β 较空白对照组明显升高,具有统计学意义($P < 0.01$),而注射用炎琥宁

高、中剂量组和阳性对照组均能明显降低血清中IL-6 β 的产生($P < 0.05$),而低剂量组无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

3.5 TNF- α 测试结果

模型组血清中TNF- α 表达与空白组相比明显升高,具有统计学意义($P < 0.05$),而注射用炎琥宁高剂量组和阳性对照组能抑制血清中TNF- α 表达,与模型组相比有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 注射用炎琥宁对大鼠血清中IL-1 β 、IL-6 β 、TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Yanhuning Injection on IL-1 β , IL-6 β , and TNF- α in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(ng·mL ⁻¹)	IL-6 β /(pg·mL ⁻¹)	TNF/(ng·mL ⁻¹)
空白对照组	—	0.049 \pm 0.015	379.03 \pm 28.83	1.54 \pm 0.36
模型组	—	0.214 \pm 0.047 ^{▲▲}	445.67 \pm 25.06 ^{▲▲}	2.26 \pm 0.60 [▲]
注射用炎琥宁	53	0.159 \pm 0.024 [*]	387.04 \pm 20.17 [*]	1.57 \pm 0.49 [*]
	26.7	0.167 \pm 0.020 [*]	402.11 \pm 11.60 [*]	1.81 \pm 0.29
	13	0.198 \pm 0.032	438.55 \pm 21.70	2.02 \pm 0.54
注射用氨苄西林钠	1 300	0.161 \pm 0.021 [*]	380.14 \pm 16.44 [*]	1.54 \pm 0.33 [*]

与空白对照组比较: [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

[▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$ vs blank control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

急性咽炎是咽部黏膜、黏膜下组织及其淋巴组织的急性炎症,目前的急性咽炎动物模型多采用氨水咽部喷雾的方法^[9],考虑到细菌感染是引起急性咽炎的主要原因之一,本实验创新采用直接向咽部黏膜注射临床检出率较高的乙型溶血性链球菌,通过对动物血清中细胞因子的数据分析、病理形态学的考察以及急性咽炎的临床诊断标准^[12]的指导,分析结果显示本实验成功建立急性咽炎动物模型,与临床急性咽炎症状相似,符合急性咽炎动物模型的生物特征。

注射用炎琥宁是穿心莲提取物穿心莲内酯的成品,对细菌性上呼吸道感染有特殊疗效,被誉为天然抗生素药物。本实验研究证实,注射用炎琥宁可明显改善模型动物咽部外观症状及各种体征,有效抑制血清中 IL-1 β 、IL-6 β 的释放,修复 TNF- α ,对急性咽炎具有显著疗效。其治疗急性咽炎的主要作用机制与以下因素有关:注射用炎琥宁可有效对抗咽部急性炎细胞浸润,抑制血清中 IL-1 β 、IL-6 β 炎症介质的表达,抑制 TNF- α 的生成,减缓细菌扩散速度,促进炎性渗出物的吸收和组织重建,并有效提高自身免疫力。本实验充分说明注射用炎琥宁对急性咽炎具有很好的治疗作用,为其更有效的应用于临床提供了实验依据。

参考文献

- [1] 宋燕萍. 地塞米松对迅速缓解急性咽炎症状的疗效观察 [J]. 中国新医学论坛, 2007, 7(7): 71.
- [2] 宋沛然. 穿心莲超分子提取物的毒理学、药效学及其抗炎机制的研究 [D]. 河南大学, 2008.
- [3] 廖琼峰, 姚 媛, 谢智勇, 等. 穿心莲内酯在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收机制 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1363-1366.
- [4] 叶 玲, 刘 薇, 唐 斓, 等. 大鼠在体肠吸收穿心莲内酯的特征研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 219-222.
- [5] 靳 鑫, 时圣明, 张东方, 等. 穿心莲化学成分的研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 47-50.
- [6] 袁术妹, 愈洁东, 陈晓阳, 等. 虎射利咽方体外抑菌作用的实验研究 [J]. 中国当代医药, 2010, 4(17): 17-18.
- [7] 谢小军, 王 冲, 何 亮, 等. 小鼠口咽部甲型链球菌的微生态研究 [J]. 中华全科医学, 2010, 8(8): 944-946.
- [8] 贾恩礼, 冯成强, 杨春梅, 等. 咽舒气雾剂抗菌作用的动物实验 [J]. 前卫医药杂志, 2000, 17(4): 221-222.
- [9] 封银曼, 王 停, 高志卿, 等. 急性咽炎动物模型的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, (2): 52.
- [10] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 562.
- [11] 彭顺林, 邓 谦, 田 理, 等. 利咽口服液对实验性慢性咽炎病理形态学的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 12(10): 21-23.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 [S]. 1993. 306.