

- [10] 王冠, 曹德晨, 孙宏声, 等. 温阳益气法对重型颅脑损伤患者亚低温治疗期的辅助作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22(5): 449-452.
- [11] 王冠, 郭家奎, 曹德晨, 等. 重型颅脑损伤患者亚低温状态中医证候分析[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(7): 1391-1392.
- [12] O'Phelan KH, Merenda A, Denny KG, et al. Therapeutic temperature modulation is associated with pulmonary complications in patients with severe traumatic brain injury[J]. World J Crit Care Med, 2015, 4(4): 296-301.
- [13] 王冠, 蔡英, 孙宏声, 等. 参附方对颅脑损伤大鼠亚低温期冷诱导 RNA 结合蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23(5): 479-483.
- [14] 蔡英, 郑君毅, 王冠, 等. 冷诱导 RNA 结合蛋白在亚低温下的神经保护作用研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16(7): 754-757.
- [15] Chen J, Qian C, Duan H, et al. Melatonin attenuates neurogenic pulmonary edema via the regulation of inflammation and apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. J Pineal Res, 2015, 59(4): 469-477.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

## 利水通窍汤对急性分泌性中耳炎大鼠 VEGF 表达的影响

李兰芳<sup>1</sup>, 于娟<sup>2</sup>

1. 广东省中医院耳鼻喉科, 广东 广州 510120; 2. 广东省中医院中心实验室, 广东 广州 510120

**[摘要]** 目的: 观察利水通窍汤对急性分泌性中耳炎大鼠血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达及中耳黏膜炎症的影响。方法: 健康雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、头孢克洛组、利水通窍汤低剂量组、利水通窍汤中剂量组、利水通窍汤高剂量组。除正常对照组外, 其他各组大鼠采用听泡内注入内毒素制成大鼠急性分泌性中耳炎动物模型。利水通窍汤高、中、低剂量组灌胃利水通窍汤的浓度分别是 1.5、1、0.5 g/mL, 按每只大鼠 1.05 mL/100 g 灌胃; 头孢克洛组灌胃头孢克洛的浓度是 0.01 g/mL, 按 1 mL/100 g 灌胃, 正常对照组和模型组灌胃等量的生理盐水, 连续给药 7 天。干预后观察各组大鼠中耳黏膜中 VEGF 的表达水平, 同时检查中耳黏膜病变的改变。结果: 与正常对照组比较, 模型组大鼠中耳鼓室黏膜厚度、中耳黏膜中性粒细胞计数、中耳黏膜中 VEGF 的表达显著升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 利水通窍汤低、中、高剂量组和头孢克洛组大鼠中耳鼓室黏膜厚度、中耳黏膜中性粒细胞计数、中耳黏膜中 VEGF 的表达显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。利水通窍汤各剂量组与头孢克洛组比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论: 利水通窍汤可以抑制中耳黏膜中 VEGF 的表达, 减轻由内毒素引起的中耳黏膜水肿, 从而抑制中耳炎症反应。

**[关键词]** 利水通窍汤; 分泌性中耳炎; 血管内皮生长因子 (VEGF); 动物实验; 大鼠

**[中图分类号]** R764.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 06-0017-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.06.005

## Lishui Tongqiao Tang Has Effect on the Expression of VEGF in Rats with Acute Secretory Otitis Media

LI Lanfang, YU Juan

**Abstract:** Objective: To observe the effect of Lishui Tongqiao tang on the expression level of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the inflammation of middle ear mucosa in rats with acute secretory otitis media. **Methods:** Divided healthy male SD rats into six groups randomly, namely the normal control group, model group, cefaclor group, Lishui Tongqiao tang

**[收稿日期]** 2018-01-18

**[基金项目]** 广东省中医药局课题 (20142075)

**[作者简介]** 李兰芳 (1975-), 女, 主治医师, 研究方向: 耳炎性疾病。

of low, middle and high dose groups. In addition to the normal control group, rats in the other groups were given injection of endotoxin in tympanic bullae to establish animal models of rats with acute secretory otitis media. The concentration of Lishui Tongqiao tang in the high, middle and low dose groups was 1.5 g/mL, 1 g/mL and 0.5 g/mL respectively, and each rat in these three groups was given 1.05 mL/100 g by gavage. The concentration of cefaclor was 0.01 g/mL in the cefaclor group, and each rat in it was given 1 mL/100 g by gavage. The normal control group and the model group were given the same amount of normal saline and received continuous medication for seven days. After intervention, the expression level of VEGF in the middle ear mucosa of each group was observed, and the changes in the mucosal lesions of otitis media were examined. **Results:** Compared with the normal control group, the mucosa thickness of the middle ear drum, the neutrophil count in the middle ear mucosa, and the expression of VEGF in the middle ear mucosa in the model group were remarkably increased, differences being significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the mucosa thickness of the middle ear drum, the neutrophil count in the middle ear mucosa, and the expression of VEGF in the middle ear mucosa in Lishui Tongqiao tang of low, middle and high dose groups were remarkably decreased, differences being significant ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference being found in the comparison of the above three items among the Lishui Tongqiao tang groups of each dose and the cefaclor group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Lishui Tongqiao tang can inhibit the expression of VEGF in the middle ear mucosa and reduce the middle ear mucosal edema caused by endotoxin, thus inhibiting the middle ear inflammatory responses.

**Keywords:** Lishui Tongqiao tang; Secretory otitis media; Vascular endothelial growth factor(VEGF); Animal experiment; Rats

急性分泌性中耳炎(Acute secretory otitis media, ASOM)是耳鼻喉科临床上较常见的疾病之一,以起病急、耳内胀闷微痛、耳闭不聪、鼓膜混浊内陷等为特点。急性分泌性中耳炎若治疗不及时、不得当,极易迁延为缠绵难愈的慢性疾病,进而危害听力。现代医学认为急性分泌性中耳炎的病因以及发病机制具有复杂性与多样性,有咽鼓管阻塞、感染、变态反应<sup>[1-3]</sup>、细胞因子<sup>[4-5]</sup>等不同学说的存在。当上呼吸道感染引起咽鼓管炎症或咽鼓管阻塞时,中耳通气引流障碍,鼓室空气吸收,形成负压,血管渗透性增加,血浆外渗,积聚中耳,产生该病。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)早期亦称作血管通透因子,是目前已知的最强的促血管通透剂。目前,在多种肿瘤分子作用机制研究中以 VEGF 为靶点的研究已有大量报道<sup>[6-8]</sup>,但研究影响分泌性中耳炎中耳黏膜中 VEGF 的报道较少。分泌性中耳炎的治疗一般采用抗生素和激素治疗,但副作用较明显。近年来中医药治疗 ASOM 取得了较大进展,且中医药副作用小,具有较大的应用潜力。前期临床观察利水通窍汤治疗急性分泌性中耳炎具有较好的疗效<sup>[9]</sup>。本研究通过建立 ASOM 大鼠模型,研究利水通窍汤干预急性分泌性中耳炎大鼠 VEGF 的表达,进一步探讨利水通窍汤治疗急性分泌性中耳炎的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 选择健康雄性 SD 大鼠 46 只,体质量 180 ~ 220 g,由南方医科大学实验动物中心提供,合格证号:44002100006305。实验在广东省中医院中心实验室进行,实验室是 SPF 级。将实验动物按体质量从小到大编号,随机分为

头孢克洛组、模型组、利水通窍汤低剂量组、利水通窍汤中剂量组、利水通窍汤高剂量组各 8 只,正常对照组 6 只。实验中头孢克洛组死亡 1 只、利水通窍汤低剂量组死亡 2 只、中剂量组死亡 1 只。

**1.2 主要药物与试剂** 利水通窍汤药物组成:茯苓 20 g,路路通 18 g,黄芩、金银花、泽泻、桑白皮各 15 g,柴胡、石菖蒲各 12 g,川芎、地龙、车前子、桔梗各 10 g,甘草 6 g,中药材购自广东省中医院,然后由制剂室制成水煎剂(高剂量组 1.5 g/mL、中剂量组 1 g/mL、低剂量组 0.5 g/mL)。绿脓杆菌内毒素,购自 Sigma 公司,批号:084M4013;头孢克洛缓释片,礼莱苏州制药有限公司,批号 061008;抗 VEGF 抗体,Booster 公司,批号:AR1010。

**1.3 动物模型建立** 全部大鼠在电耳镜下检查排除外耳道及中耳感染。除正常对照组外,其它各组大鼠按参考文献[10]的方法,沿下颌骨边缘分离肌肉,下方可见听泡,听泡内注入内毒素建立急性分泌性中耳炎大鼠模型。48 h 后电耳镜观察鼓膜。

**1.4 动物模型判断标准** 正常对照组大鼠鼓膜透亮,鼓室无积液,锤骨柄和光锥清晰,造模后大鼠的鼓膜充血、浑浊,可有鼓室积液征,光锥消失。

**1.5 干预方法** 48 h 后经电耳镜观察证实造模成功后,头孢克洛组、利水通窍汤各剂量组按每天 1 次灌胃给药。利水通窍汤高、中、低剂量组灌胃利水通窍汤的浓度分别是 1.5、1、0.5 g/mL,按每只大鼠 1.05 mL/100 g 灌胃;头孢克洛组(头孢克洛配置成 0.01 g/mL 的浓度)按 1 mL/100 g 灌胃,正常对照组和

模型组灌胃等量的生理盐水,连续给药7天。

1.6 苏木素-伊红染色(HE)检查听泡 给药结束后全部大鼠立即断头,解剖听泡,10%甲醛固定,5%硝酸水溶液脱钙,脱水后石蜡包埋切片,HE染色,进行光镜检查。

1.7 免疫组化检查 VEGF 表达 取大鼠中耳部位组织,脱水包埋切片后,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,BSA 或者血清封闭,加一抗、加二抗,DAB 显色,复染细胞核,脱水封片,显微镜镜检,图像采集分析。Image pro-plus 6.0 软件分析免疫组化图片:每组内每张切片随机挑选3个视野,200倍进行拍照,图像采集系统型号:Nikon eclipse CI。拍照时尽量让组织充满整个视野,保证每张照片的背景光一致。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件选取相同的棕黄色作为判断所有照片阳性的统一标准,对每张照片进行分析得出每张照片阳性的累积光密度值(IOD),以平均光密度值(OD)进行各组的比较。

1.8 中性粒细胞计数与鼓室黏膜厚度测量 取大鼠中耳黏膜部位,中性粒细胞计数:目镜上配计数格,在低倍镜下于中耳

黏膜下选取5个阳性细胞多的区域,在400倍镜下计数中性粒细胞数,取5个高倍视野下的均值。

鼓室黏膜厚度:用测微计在光镜下测量,每个标本取5个不同位置进行测量并取均值。

1.9 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件进行分析,计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,多组比较采用单因素方差分析,两组比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠鼓室黏膜病理改变比较 见图1。正常对照组:鼓室黏膜为单层上皮细胞,无明显破坏,无明显炎症反应。模型组:黏膜纤毛上皮水肿,伴少量淋巴细胞浸润,黏膜纤毛脱落,黏膜下层轻度水肿伴中等数量的炎性细胞(淋巴细胞,中性粒细胞,嗜酸性粒细胞)浸润。利水通窍汤低、中、高剂量组及头孢克洛组:黏膜纤毛上皮水肿,部分细胞气球样变,伴少量淋巴细胞浸润,黏膜下层轻度水肿伴少量淋巴细胞浸润,4个治疗组鼓室黏膜厚度、黏膜下层水肿程度较模型组轻。

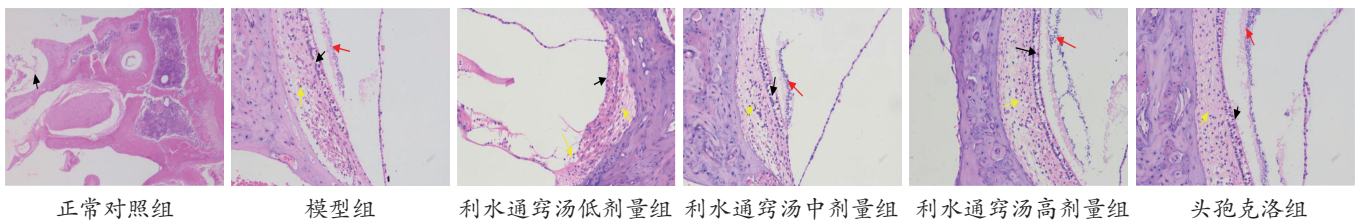


图1 各组大鼠鼓室黏膜 HE 染色结果 (×200)

2.2 各组大鼠中耳鼓室黏膜厚度比较 见表1。与正常对照组比较,模型组大鼠中耳鼓室黏膜厚度显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,利水通窍汤低、中、高剂量组和头孢克洛组大鼠中耳鼓室黏膜厚度显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。利水通窍汤各剂量组与头孢克洛组比较无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表1 各组大鼠中耳鼓室黏膜厚度比较  $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	鼓室黏膜厚度(μm)
正常对照组	6	41.30 ± 8.59
模型组	8	158.18 ± 9.27 <sup>①</sup>
利水通窍汤低剂量组	6	125.53 ± 6.75 <sup>②</sup>
利水通窍汤中剂量组	7	128.52 ± 9.57 <sup>②</sup>
利水通窍汤高剂量组	8	111.22 ± 9.06 <sup>②</sup>
头孢克洛组	7	111.55 ± 9.90 <sup>②</sup>

与正常对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.3 各组大鼠中耳黏膜中性粒细胞计数比较 见表2。与正常对照组比较,模型组大鼠中耳黏膜中性粒细胞计数显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,利水通窍汤

低、中、高剂量组和头孢克洛组大鼠中耳黏膜中性粒细胞计数显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。利水通窍汤各剂量组与头孢克洛组比较无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表2 各组大鼠中耳黏膜中性粒细胞计数比较  $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	中性粒细胞计数(个/μm <sup>2</sup> )
正常对照组	6	2.00 ± 0.63
模型组	8	14.37 ± 1.59 <sup>①</sup>
利水通窍汤低剂量组	6	13.17 ± 1.47 <sup>②</sup>
利水通窍汤中剂量组	7	12.14 ± 1.57 <sup>②</sup>
利水通窍汤高剂量组	8	10.63 ± 1.51 <sup>②</sup>
头孢克洛组	7	10.57 ± 2.37 <sup>②</sup>

与正常对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.4 各组大鼠中耳黏膜中 VEGF 的表达比较 见表3。与正常对照组比较,模型组大鼠中耳黏膜中 VEGF 的表达显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,利水通窍汤低、中、高剂量组和头孢克洛组大鼠中耳黏膜中 VEGF 的表达显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。利水通窍汤各剂量组与头孢克洛组比较无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表3 各组大鼠中耳黏膜中 VEGF 的表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	光密度值
正常对照组	6	0.010 ± 0.002
模型组	8	0.027 ± 0.011 <sup>①</sup>
利水通窍汤低剂量组	6	0.012 ± 0.002 <sup>②</sup>
利水通窍汤中剂量组	7	0.010 ± 0.005 <sup>②</sup>
利水通窍汤高剂量组	8	0.008 ± 0.004 <sup>②</sup>
头孢克洛组	7	0.014 ± 0.001 <sup>②</sup>

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

### 3 讨论

目前研究表明参与 ASOM 发病过程的炎症介质有血管活性肠肽、P 物质、组胺、花生四烯酸代谢产物等, 这些炎症介质都有扩张血管、增加血管通透性的作用, 进而造成中耳渗液的滞留<sup>[4]</sup>。VEGF 可在体内诱导血管新生, 是正常和异常血管新生的重要调节因子, 在生理和病理性血管新生中起重要作用。VEGF 受体特异性地分布于血管内皮细胞, VEGF 通过与其特异性受体的结合, 发挥生理功能: ①促血管内皮细胞分裂从而促进新生血管形成; ②增强血管通透性。李希平等<sup>[11]</sup>发现细菌内毒素能诱导大鼠 ASOM; VEGF 可能参与了 ASOM 急性期的中耳炎症反应。VEGF 在急性中耳炎大鼠的中耳黏膜中表达上调, 甚至在分泌性中耳炎患者的中耳渗液中 VEGF 检出率高达 100%。因此本实验选用 VEGF 为指标, 反应大鼠 ASOM 中耳黏膜的炎症改变。

急性分泌性中耳炎是耳鼻喉科临床上较常见的疾病之一, 属于中医耳胀范畴, 以起病急、耳内胀闷微痛、耳闭不聪、鼓膜混浊内陷等为特点。在治疗 ASOM 上, 中医药因其副作用小有着明显优势。本研究应用临床常用方利水通窍汤, 方中柴胡、石菖蒲、路路通以开耳窍之郁闭; 黄芩、金银花清热解毒以利清窍; 车前子、泽泻、茯苓利水渗湿, 肺朝百脉, 肺气不宣, 多伴气血郁阻, 而血不利则为水, 故方中佐以行气活血之川芎、地龙等。诸药并用, 共奏宣肺行水通窍之功效。本实验结果表明, 正常对照组大鼠中耳黏膜 VEGF 的表达均较低, 而在模型组中明显上调, 符合其病理表现, 即炎症细胞浸润及 VEGF 表达明显改变。利水通窍汤各剂量组的 VEGF 表达比模型组下调, 病理切片上可见炎症细胞浸润较模型组减少, 表明利水通窍汤可以抑制中耳黏膜中 VEGF 的表达, 进而减轻由内毒素引发的中耳炎症。利水通窍汤治疗 ASOM 的机理可能是通过下调 VEGF 表达, 减轻中耳黏膜水肿, 降低炎症细胞在中耳黏膜中的浸润, 来抑制中耳炎症。这一研究对阐明中药对

ASOM 的分子作用机制、创新中药新药研发和丰富现代中医理论具有重要意义。

本研究尚存在许多不足之处, 主要有: ①模型的问题: 在实验过程中发现经鼓膜注射内毒素制作大鼠 ASOM 模型时易破裂, 后改为经颈部正中切口, 经听泡注射内毒素制备模型, 模型可能存在颈部术口感染的可能。②检测指标偏少: 本实验所选取的检测指标偏少, 若能选取多些的检测指标, 会更有说服力。

### [参考文献]

- [1] 付发祥, 宋蕾. 变态反应在分泌性中耳炎中的作用[J]. 实用医院临床杂志, 2011, 8(5): 182-184.
- [2] 周桂英, 邓湖山, 陈世汉, 等. 分泌性中耳炎与变态反应的关系[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(8): 1173-1174.
- [3] 唐安洲, 周永, 李杰恩, 等. 分泌性中耳炎咽鼓管功能障碍的临床观察[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2001, 7(4): 217-219.
- [4] 陈穗俊, 梁象逢, 郑亿庆, 等. 白介素-2 在分泌性中耳炎中的临床意义[J]. 中华耳科学杂志, 2005, 3(2): 93-95.
- [5] 谢明, 周梁, 金晓杰. 白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  在分泌性中耳炎渗出液中的表达及意义[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1998(6): S37-39.
- [6] 段泽星, 谢立群. VEGF 在肿瘤生长和血管生成中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(27): 2894-2900.
- [7] 李京桂, 林相国, 许涛, 等. VEGF 家族及其在肿瘤生长中作用的研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(4): 777-779.
- [8] 王文欢, 伍仁毅, 孙国瑛, 等. VEGF-C 和 VEGF-D 在胃癌组织中的表达与淋巴结转移的关系[J]. 中南大学学报: 医学版, 2010, 35(4): 335-340.
- [9] 李兰芳. 宣肺利水通窍汤治疗急性分泌性中耳炎的疗效观察[J]. 中外健康文摘, 2011, 45(8): 227-228.
- [10] 李希平, 赵守琴, 戴海江, 等. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  在分泌性中耳炎动物模型中的表达[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2005, 12(4): 247-249.
- [11] 李希平, 戴海江, 赵守琴, 等. 血管内皮生长因子在实验性分泌性中耳炎大鼠中耳黏膜的表达[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2013, 21(4): 387-390.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)