

引用:钟伦坤,何娟,朱佳丽,等.清窍胶囊对分泌性中耳炎模型大鼠中耳黏膜 HIF-1 $\alpha$  表达的影响[J].现代中医药,2024,44(4):119-122.

# 清窍胶囊对分泌性中耳炎模型大鼠中耳黏膜 HIF-1 $\alpha$ 表达的影响<sup>\*</sup>

钟伦坤 何娟 朱佳丽 何露 陈龙 骆晓琴 孙永东 胡文健<sup>\*\*</sup>

(西南医科大学附属医院中医医院,四川 泸州 646000)

**摘要:**目的 探讨清窍胶囊对分泌性中耳炎(secretory otitis media,SOM)大鼠中耳黏膜组织中 HIF-1 $\alpha$  表达的影响。方法 建立分泌性中耳炎模型,分别给清窍胶囊低、高剂量治疗组大鼠灌胃给予 0.0036 g·mL<sup>-1</sup> 和 0.0072 g·mL<sup>-1</sup> 的药物;采用苏木精-伊红(HE)染色观察组织的病理学变化;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测中耳灌洗液中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)含量;采用免疫组化检测中耳黏膜组织中缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (Hypoxia-Inducible Factors-1 $\alpha$ ,HIF-1 $\alpha$ )的表达。结果 清窍胶囊低、高剂量组与模型组相比坏死细胞、炎性细胞浸润及纤维组织减少;中耳灌洗液中 VEGF 含量及中耳黏膜组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达均降低。结论 清窍胶囊治疗分泌性中耳炎具有较好的疗效,能够通过缓解中耳组织缺氧情况,抑制 VEGF 的表达,从而对治疗 SOM 取得较好疗效。

**关键词:**HIF-1 $\alpha$ ;清窍胶囊;分泌性中耳炎;VEGF;大鼠

**中图分类号:**R246.81 **文献标识码:**A

**文章编号:**1672-0571(2024)04-0119-04

**DOI:**10.13424/j.cnki.mtcm.2024.04.021

分泌性中耳炎(secretory otitis media,SOM)是耳鼻喉科常见的导致患者出现听力下降及中耳积液等疾病的疾病,给患者健康带来威胁<sup>[1-3]</sup>。近年来众多研究表明,咽鼓管功能障碍、免疫变态反应及感染等因素均可能是导致 SOM 的重要因素<sup>[4-6]</sup>。治疗主要采用药物或手术治疗,但由于手术预后、药物耐药及易复发等问题,给 SOM 的治疗带来困难<sup>[7]</sup>。前期研究表明,清窍胶囊作为科室独创用于治疗 SOM 的经验协定方药,具有改善机体免疫功能及降低血清粘附分子表达,抑制中耳黏膜细胞增生,从而治疗 SOM<sup>[2,8]</sup>。

低氧诱导因子(Hypoxia-Inducible Factors,HIF)由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  组成,其中 HIF-1 $\alpha$  作为主要受缺氧等条件的转录因子,在炎症、缺血、缺氧等多种病理过程中占据重要作用<sup>[9]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)在促进新生血管生成方面起着重要作用<sup>[10-12]</sup>。研究表明,

VEGF 能够在 HIF-1 $\alpha$  的介导下大量表达,进而起到扩血管、增加血管通透性的作用,从而促进中耳积液的产生<sup>[9,13]</sup>。但目前缺少清窍胶囊对 SOM 大鼠中耳黏膜 HIF-1 $\alpha$  表达的影响的相关研究,故本研究探讨清窍胶囊对 SOM 大鼠中耳黏膜 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 表达的影响,为 SOM 的治疗奠定基础。

## 1 仪器与材料

**1.1 仪器** SpectraMAX Plus384 酶标仪(美谷分子仪器有限公司生产);JT-12S 自动脱水机(武汉俊杰电子有限公司);BA210Digital 数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。

**1.2 试药** 清窍胶囊为医院内制剂,批准文号:川药制字 Z20080310,配方为:玄参 9 g,生地 9 g,丹参 12 g,川牛膝 6 g,僵蚕 4 g,当归 9 g,薏苡仁 18 g,豆蔻 6 g,甘草 9 g。HIF-1 $\alpha$ (批号:BS-0737R,北京博奥森生物技术有限公司);生物素标记山羊抗兔 IgG(H+L)(批号:A0277,碧云天生物技术有限公司);

<sup>\*</sup> 基金项目:四川省中医药管理局项目(2021MS227);四川省中医药管理局-青年中医药项目(2014-k-140);西南医科大学-西南医科大学附属中医医院联合课题(2018XYLE-018)

<sup>\*\*</sup> 作者简介:钟伦坤,副主任医师,副教授,研究方向:中西医结合耳鼻喉治疗研究。E-mail:zhonglk@swmu.edu.cn

<sup>\*\*\*</sup> 通讯作者:胡文健,教授。E-mail:huwenjian\_7707@163.com

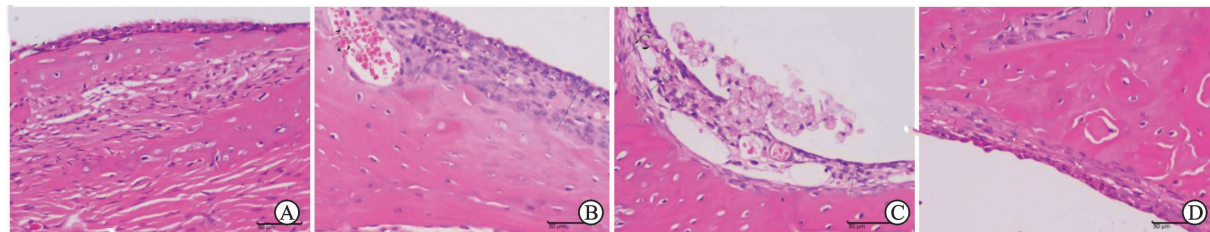
卵清蛋白(批号:A8041, Solarbio 公司); PBS(批号:A211017, 培源生物科技股份有限公司); 氢氧化铝(国药准字 H37024064, 山东聊城阿华制药有限公司); 生理盐水(批号:20011012, 信合援生制药股份有限公司); 苏木素染液(批号:CR22002071, 武汉塞维尔生物科技有限公司); 伊红染液(批号:YE2080, 合肥博美生物科技有限责任公司); 甲醛(批号:2021011401, 成都市科隆化学有限公司); 二甲苯和无水乙醇(批号:220609, 四川西陇科学有限公司); VEGF 试剂盒(批号:ZC-37412, 上海茁彩生物科技有限公司)。

**1.3 实验动物** 选取雌性 SD 大鼠 24 只, 6~8 周龄, (240±20)g, 由西南医科大学实验动物中心提供[SYXK(川)2018-065]。试验严格遵守《试验动物管理条例》, 遵守 3R 准则。将动物置于干燥通风处适应性饲养一周, 给予干净充足的饮水及饲料。

## 2 方法

**2.1 动物模型的建立及给药** 将大鼠分为对照组、模型组、清窍胶囊低剂量组和清窍胶囊高剂量组共 4 组, 每组 6 只, 除对照组外, 其余组均进行 SOM 模型的建立。将卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)用 PBS 稀释后, 用氢氧化铝作为免疫佐剂腹腔注射大鼠, 1 w/次, 14 d 后, 将大鼠麻醉后, 将 15  $\mu$ L OVA/PBS 混合液注入鼓室, 24 h 后观察鼓膜状态, 再次注射 15  $\mu$ L OVA/PBS 混合液; 建模后可见大鼠鼓膜充血, 光锥消失, 鼓室积液等症状, 表明建模成功。给清窍胶囊低、高剂量治疗组大鼠分别经灌胃给予 0.0036 g·mL<sup>-1</sup> 和 0.0072 g·mL<sup>-1</sup> 的药物治疗, 1 d/次, 连续给药 14 d; 对照组和模型组给药同等剂量的生理盐水。

**2.2 苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)染色观**



注: A. 对照组; B. 模型组; C. 清窍胶囊低剂量组; D. 清窍胶囊高剂量组

图 1 HE 染色检测大鼠中耳病理变化

**3.2 清窍胶囊对 SOM 大鼠中耳灌洗液中 VEGF 表达的影响** 根据结果可知, 模型组中耳灌洗液中的 VEGF 含量与对照组相比升高( $P<0.05$ )。清窍胶

囊低、高剂量组与模型组相比中耳灌洗液中 VEGF 的浓度降低, 其中高剂量组降低最为显著( $P<0.05$ )。见表 1。

**2.3 ELISA 分析中耳灌洗液 VEGF 含量** 用 ELISA 法检测大鼠中耳灌洗液 VEGF 含量, 操作严格按照试剂盒说明书进行, 用酶标仪测定各组的 OD450 值。

**2.4 免疫组化观察中耳 HIF-1 $\alpha$  的表达** 将中耳黏膜组织经过甲醛固定, 固定组织经全自动脱水机脱水、石蜡包埋后进行切片; 经过二甲苯脱蜡、无水乙醇水化、用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消除过氧化氢酶活性, 用高温抗原热修复, 血清进行封闭; 弃去封闭液后, 加入 1 抗(HIF-1 $\alpha$  抗兔)孵育 45 min, 加入 2 抗[生物素化山羊抗兔 IgG(H+L)] , 孵育 30 min; 滴加 DAB 显色后洗净, 苏木素复染, 经脱水后封片, 用病理图像分析仪拍照。

**2.5 统计学方法** 实验数据采用 SPSS 21.0 软件分析, 两组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ , 差异有统计学意义。

## 3 结果

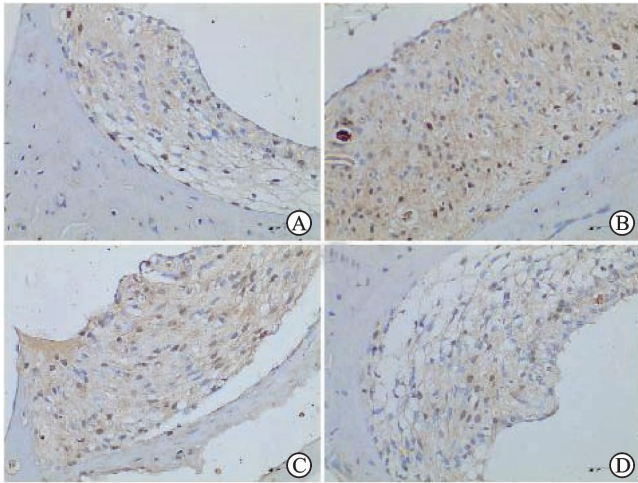
**3.1 清窍胶囊对 SOM 大鼠中耳及咽鼓管的病理变化的影响** 通过结果可知, 模型组与对照组比较, 黏膜增厚, 较多纤维组织增生、坏死细胞及炎性细胞浸润。清窍胶囊组出现少量细胞炎性浸润及轻微纤维组织增生。通过中耳鼓室黏膜厚度测定可知, 与对照组比较, 模型组中耳鼓室黏膜厚度明显增加, 低、高治疗剂量组中耳鼓室黏膜厚度与模型组相比由高到低呈递减趋势( $P<0.01$ )。见图 1、表 1。

囊低、高剂量组与模型组相比中耳灌洗液中 VEGF 的浓度降低, 其中高剂量组降低最为显著( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 各组鼓室黏膜厚度和中耳灌洗液中 VEGF 的表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	黏膜厚度( $\mu\text{m}$ )	VEGF( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
对照组	6	13.78 $\pm$ 4.35	11.63 $\pm$ 0.55
模型组	6	60.48 $\pm$ 15.67**	27.21 $\pm$ 0.68*
清窍胶囊低剂量组	6	54.48 $\pm$ 6.85	24.07 $\pm$ 0.58
清窍胶囊高剂量组	6	35.95 $\pm$ 12.51 <sup>#</sup>	17.92 $\pm$ 0.44 <sup>#</sup>

注:与对照组相比;\* $P<0.05$ ;与对照组相比;\*\* $P<0.01$ ;  
与模型组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$



注:A. 对照组;B. 模型组;C. 清窍胶囊低剂量组;D. 清窍胶囊高剂量组;与对照组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$

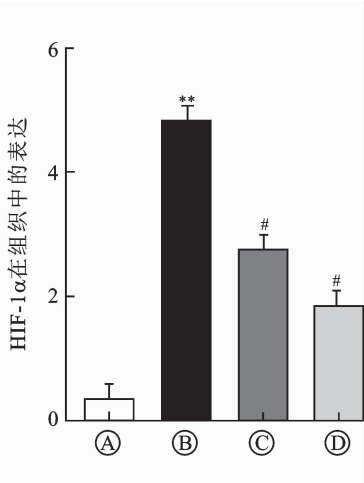
图 2 免疫荧光检测大鼠组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达

4 讨论

SOM 的致病机制尚不明确,目前认为感染、咽鼓管功能障碍及变态反应等都被认为与 SOM 的发病相关<sup>[14-15]</sup>。治疗方法包括手术(鼓膜置管术、咽鼓管置管术等)和药物(激素、抗生素及促排剂等)治疗,但易导致术后预后不良反应及药物耐药,且长期治疗未痊愈患者易形成粘连性中耳炎、胆脂瘤等病变,给患者听力造成不可逆伤害<sup>[16]</sup>。近年来用中药治疗 SOM 得到了大众的关注<sup>[17]</sup>。SOM 在中医上属于“耳胀”范畴,认为其病因病机大致是由于机体中存在肝胆湿热、风邪外袭、脾虚失运等不良诱因导致<sup>[18-20]</sup>。清窍胶囊具有健脾益气,凉血清热,去湿化浊的功效,在前期研究中已取得较好的成果<sup>[8]</sup>。本研究对 SOM 模型大鼠中耳黏膜组织病理学变化检测及测量中耳鼓室黏膜厚度结果显示,与模型组比较,清窍胶囊低、高组的坏死细胞、炎性细胞及纤维组织增生均减少,且中耳黏膜厚度显著降低。表明清窍胶囊能够促进中耳分泌物的排除,能有效改善 SOM 的临床症状。

SOM 不仅会导致中耳黏膜产生积液,还会导致鼓室黏膜中血管生成,而 VEGF 对多种组织中的新

3.3 清窍胶囊对 SOM 大鼠中耳组织中 HIF-1 $\alpha$  表达的影响 根据结果可知,模型组与对照组比较,中耳黏膜组织中 HIF-1 $\alpha$  的含量增高( $P<0.01$ );清窍胶囊低、高治疗剂量组与模型组比较,中耳黏膜组织中 HIF-1 $\alpha$  的含量降低,其中高剂量治疗组降低最为明显( $P<0.05$ )。详见图 2。



血管形成至关重要<sup>[21]</sup>。研究表明,卵清蛋白能够诱导大鼠产生变态反应从而导致变应性炎症产生,还会刺激血管内皮细胞促进 VEGF 的释放<sup>[22-23]</sup>。血管内皮细胞中 VEGF 的大量生成会使血管的通透性增加,从而促进血浆蛋白的渗透率,有助于加速对血管生成及炎症浸润,从而增强变应原的致敏性<sup>[24-25]</sup>。本研究模型组大鼠中耳灌洗液中 VEGF 较对照组增加,且清窍胶囊低、高剂量组的 VEGF 含量较模型组降低,表明清窍胶囊可以抑制中耳黏膜中 VEGF 的表达,减轻由卵清蛋白所引起的变态反应。

HIF-1 $\alpha$  表达随着细胞中氧浓度的降低而增加的低氧依赖性蛋白,是内环境氧平衡调节的关键蛋白<sup>[26]</sup>。在缺氧调节下通过激活 HIF-1 $\alpha$  来与多种靶基因相结合,从而激活相应缺氧反应基因的转录和表达,在促进促进葡萄糖转运、糖酵解及血管生成等方面起着重要作用<sup>[27-29]</sup>。ZHANG 等<sup>[30]</sup>表明抑制 HIF-1 $\alpha$  的表达能有效调节渗出性中耳炎的炎症反应;刘留等<sup>[31]</sup>研究表明降低 HIF-1 $\alpha$  的表达对改善 SOM 患者听力及鼓室声导抗图、咽鼓管功能起着重要作用。本研究结果表明,清窍胶囊低、高剂量组中耳粘黏膜组织中 HIF-1 $\alpha$  表达较模型组降低,表明清

窍胶囊通过抑制中耳黏膜组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达,而对 SOM 起到治疗作用。

综上所述,清窍胶囊能够通过抑制中耳黏膜组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达,从而抑制其下游调节因子 VEGF 的表达,缓解 SOM 的临床症状,以达到较好的治疗效果。

参考文献

[1] PANG KY, DI YZ, LI GD, et al. Can reflux symptom index and reflux finding score be used to guide the treatment of secretory otitis media in adults? [J]. *ORL; Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties*, 2020, 82(3):130-138.

[2] 钟伦坤, 周兴玮, 何炯, 等. 清窍胶囊治疗分泌性中耳炎的临床疗效以及相关机制[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(17):2930-2933, 2945.

[3] HU RY, XIA LF, SHI CC, et al. Otitis media with effusion in pre-school children with adenoid hypertrophy: risk factors and nursing care[J]. *Nursing Open*, 2024, 11(5):e2165.

[4] 张萍, 李莉, 毋桂花. 小儿分泌性中耳炎的临床治疗进展[J]. *云南中医中药杂志*, 2019, 40(4):77-80.

[5] MATHER MW, POWELL S, TALKS B, et al. Dysregulation of immune response in otitis media[J]. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2021, 23:e10.

[6] ADEKANYE AG, ONWUGHALU BC, MGBE RB, et al. Risk factors for otitis media with effusion in preschool and school children in Calabar municipality[J]. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 2024, 27(4):435-441.

[7] 陈文明. 中西医结合治疗分泌性中耳炎的临床疗效及安全性评价[J]. *中医临床研究*, 2018, 10(4):82-84.

[8] 钟伦坤, 胡文健, 周兴玮, 等. 清窍胶囊对分泌性中耳炎大鼠 Th17/Treg 细胞及炎症因子的影响[J]. *医学信息*, 2021, 34(17):75-78.

[9] LI XP, YE MX. The expression of VEGF and VEGFR in endotoxin induced otitis media with effusion in rats[J]. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2021, 144:110669.

[10] LONDON NR, GURGEL RK. The role of vascular endothelial growth factor and vascular stability in diseases of the ear[J]. *The Laryngoscope*, 2014, 124(8):E340-E346.

[11] 王佩, 雷亚玲, 曹瑾, 等. 化痰活络饮联合醒脑静注射液治疗急性缺血性脑卒中(痰瘀阻络型)临床研究[J]. *陕西中医药大学学报*, 2022, 45(1):93-97.

[12] 张莉莉, 董媛. 益气养精法联合化疗治疗非小细胞肺癌疗效[J]. *现代中医药*, 2021, 41(1):95-97.

[13] YE MX, LI XP. Effect of vascular endothelial growth factor and its receptors in adult otitis media with effusion[J]. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2019, 276(7):1889-1895.

[14] 陈沛维, 赵春丽, 王丹妮, 等. Th17/Treg 细胞介导的分泌性中耳

炎发病机制研究[J]. *中华耳科学杂志*, 2020, 18(3):431-437.

[15] MITTAL R, LISI CV, GERRING R, et al. Current concepts in the pathogenesis and treatment of chronic suppurative otitis media[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2015, 64(10):1103-1116.

[16] VANNESTE P, PAGE C. Otitis media with effusion in children: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. A review[J]. *Journal of Otology*, 2019, 14(2):33-39.

[17] 李蓓, 朱祥成, 洪钱江. 朱祥成教授治疗耳鼻喉咽喉疾病经验[J]. *陕西中医学院学报*, 2013, 36(1):31-32.

[18] 何腾. 参苓白术散对变态反应相关 SOM 大鼠模型血清 IL-4、IFN- $\gamma$  及听泡黏膜炎症反应的影响[D]. 成都: 四川医科大学, 2015.

[19] 王青, 吴显文, 黄桂. 中医辨证分型治疗分泌性中耳炎经验[J]. *环球中医药*, 2020, 13(8):1425-1427.

[20] 张雨霖, 张洁, 章涪. 疏风宣肺通窍汤联合西药治疗儿童急性分泌性中耳炎临床研究[J]. *新中医*, 2024, 56(4):87-91.

[21] DU EM, LI X, HE SY, et al. The critical role of the interplays of EphrinB2/EphB4 and VEGF in the induction of angiogenesis[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(6):4681-4690.

[22] 卡迪丽娅·木拉提, 艾力根·阿不都热依木, 张瑾. 地骨皮甲素调节 VEGF 信号通路对分泌性中耳炎大鼠的作用研究[J]. *实用药物与临床*, 2020, 23(12):1069-1073.

[23] 刘华, 赵守琴, 刘泊, 等. 变应原诱发大鼠分泌性中耳炎动物模型的建立[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2008, 16(4):304-307.

[24] 彭小江. 龙蛭汤对老年急性脑梗死患者神经功能及血清炎症因子的影响[J]. *现代中医药*, 2019, 39(5):44-47.

[25] 王莉. 哮喘患儿外周血中 mTOR、HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 水平的检测及意义[D]. 郑州: 郑州大学, 2017.

[26] 韦富贵. HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 在胆脂瘤型中耳炎上皮的表达及意义[D]. 南宁: 广西医科大学, 2006.

[27] 黄秋红, 郑亿庆. 缺氧与缺氧诱导因子-1 在分泌性中耳炎发病机制中的作用[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2008, 8(3):192-193.

[28] HUANG QH, ZHANG ZG, ZHENG YQ, et al. Hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor pathway for the study of hypoxia in a new model of otitis media with effusion[J]. *Audiology & Neuro-Otology*, 2012, 17(6):349-356.

[29] KIERANS SJ, TAYLOR CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology[J]. *The Journal of Physiology*, 2021, 599(1):23-37.

[30] ZHANG JT, HE JG, LUO YM, et al. MiR-210 regulates the inflammation of otitis media with effusion by inhibiting the expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 534:401-407.

[31] 刘留, 江涛, 邹秀云. 针药并用治疗脾虚痰湿型慢性分泌性中耳炎的疗效观察及对患者血清 SIL-2R、HIF-1 $\alpha$  水平的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2022, 41(1):50-54.