

龙脷平喘膏抗哮喘大鼠气道炎症作用及机制

乔贇, 易蔚*

(广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**探讨龙脷平喘膏对发作期小儿哮喘气道炎症的影响。**方法:**48只大鼠按体重均衡随机分为空白对照组、模型组、地塞米松组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、龙脷平喘膏高、中、低剂量组($74.8, 37.4, 18.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组8只。采用卵清蛋白(OVA)复制哮喘大鼠模型, 连续给药1周, 记录大鼠过敏性鼻炎症状, 取鼻黏膜和肺组织, 观察鼻黏膜及肺组织病理形态变化, 并检测肺组织炎症细胞凋亡率和原癌基因 Fas(Fas mRNA), B细胞淋巴瘤/白血病2基因(Bcl-2 mRNA)的表达。**结果:**除空白组外, 其他各组在引发过敏性哮喘的同时均诱发了不同程度的过敏性鼻炎症状, 且模型组鼻黏膜和肺组织均见嗜酸粒细胞浸润及相似的病理形态学改变; 与空白组比较, 模型组大鼠搔鼻和喷嚏的次数显著增多($P < 0.01$); 与模型组比较, 龙脷平喘膏能明显减少哮喘大鼠搔鼻和喷嚏的次数($P < 0.01$)。与空白组比较, 模型组大鼠肺组织中炎症细胞凋亡率显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 龙脷平喘膏高、中剂量组大鼠肺组织中炎症细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$), 且肺组织中促炎症细胞凋亡的调控基因 Fas mRNA 阳性表达率显著升高($P < 0.01$), 抑制炎症细胞凋亡的调控基因 Bcl-2 mRNA 阳性表达率则显著下降($P < 0.01$)。**结论:**龙脷平喘膏能明显抑制哮喘大鼠气道炎症, 机制可能与其逆转 Fas/Bcl-2 失衡, 促进炎症细胞凋亡有关。

[关键词] 龙脷平喘膏; 小儿哮喘; 气道炎症

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0150-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170150

Effect and Mechanism of Longli Pingchuan Paste on Airway Inflammation in Asthma Rat

QIAO Yun, YI Wei*

(Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Longli Pingchuan paste to episodes of pediatric asthma induced airway inflammation. **Method:** Forty-eight rats were randomly divided into blank group, model group, dexamethasone group ($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Longli Pingchuan paste high, middle and low dose group ($74.8, 37.4, 18.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 8 rats each group. Ovalbumin (OVA) was used to copy the rat model of asthma, administration lasted 1 week. The allergic symptoms rhinitis mucosa and lung tissue, pathologic morphological changes between the nasal mucosa and lung tissue of asthmatic rats were observed, and lung tissue inflammation cell apoptosis rate, the expression of proto oncogene Fas mRNA and B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) mRNA were detected. **Result:** In addition to the blank group, other groups showed allergic rhinitis symptoms allergic asthma, and eosinophil infiltration and similar pathologic morphological changer were seen in the nasal mucosa and lung tissue in model group; compared with blank group, the numbers of asthma rats in the model group increased significantly ($P < 0.01$); compared with model group, Longli Pingchuan paste significantly reduced the number of asthma rats ($P < 0.01$); compared with blank group, inflammation cell apoptosis rate was significantly lower in the model group ($P < 0.01$); inflammation cell apoptosis rate was significantly higher than the model group ($P < 0.05$), positive expression rate of control gene Fas mRNA of proinflammatory cell apoptosis increased significantly

[收稿日期] 20131212(013)

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(GZYZ1202)

[第一作者] 乔贇, 博士, 副教授, 从事中医药防治哮喘的研究, Tel:0771-3137370, E-mail:yunqiao65@126.com

[通讯作者] * 易蔚, 博士, 教授, 从事中医药防治小儿哮喘的研究, Tel:0771-4733785, E-mail:doctoryewei@126.com

($P < 0.01$), positive expression rate of control gene Bcl-2 mRNA of inhibiting inflammation cell apoptosis decreased significantly ($P < 0.01$) in lung tissue in Longli Pingchuan paste high and middle dose group.

Conclusion: Longli Pingchuan paste can obviously inhibit airway inflammation in asthma rat, the mechanism may be related to promoting inflammation cell apoptosis and reversing Fas/Bcl-2 ratio imbalance.

[**Key words**] Longli Pingchuan paste; infantile asthma; airway inflammation

小儿支气管哮喘(children's bronchial asthma)是一种慢性气道炎症性疾病。临床上表现为反复发作的喘息、气急、胸闷、咳嗽等症状^[1]。气道炎症是小儿哮喘发作期的关键病机。现代医学研究表明^[2],过敏性鼻炎与小儿哮喘实为同一疾病,哮喘发病率与变应性鼻炎的严重程度呈正相关。中医学认为,鼻病多因肺,肺病每源鼻,肺鼻常同病。外邪侵袭,肺鼻同病为小儿哮喘发作期的重要病理机制。因此,“肺鼻同治”及抗炎为发作期小儿哮喘临床治疗的关键环节。龙俐平喘膏正是基于上述中西医理论和研究成果,结合笔者20余年的小儿哮喘临床诊治经验创立的,具有宣肺平喘、祛风解痉、涤痰化瘀、肺鼻同治等功效。本实验从鼻黏膜与肺组织病理变化及肺组织炎症细胞凋亡等方面探讨龙俐平喘膏对发作期小儿哮喘气道炎症的影响。

1 材料

1.1 药物 龙俐平喘膏由龙俐叶,炙麻黄,杏仁,地龙,桃仁,重楼,射干,黄芩,苍耳子,辛夷,甘草组成。各药比例为3:1:2:2:2:1:2:2:1:1:1。上述中药饮片均由广西南宁市宏康膏方科技有限公司提供,龙俐平喘膏由该公司按下列制备工艺制作:将桃仁、杏仁、辛夷、重楼扎碎,与其余药材混合一起,根据星点试验所确定的最佳提取工艺,加18倍量水浸泡60 min,微压循环煎煮70 min,提取液300目滤过,滤液减压低温(压力为 -0.085 Pa,温度为 60 °C)浓缩至相对密度为 $1.24 \sim 1.26$ (30 °C测)的稠膏,加入辅料单糖浆适量浓缩膏,龙俐平喘膏的质控指标参照《中国药典》2010年版中的规定。用时加蒸馏水调至1 mL相当于5.64 g生药量,置 4 °C冰箱中备用。地塞米松磷酸钠注射液(天津药业集团新郑股份有限公司,批号1006071)。

1.2 动物 健康Wistar大鼠48只,SPF级,体重 $120 \sim 150$ g,雄性,由广西医科大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(桂)2009-0002。

1.3 试剂 卵清蛋白(OVA,美国Sigma公司,批号A-41235),氢氧化铝 $[Al(OH)_3]$ 粉末(成都市科龙化工试剂厂,批号20090207),Tunel法细胞凋亡检测试剂盒(批号20090426),大鼠Fas原位杂交检测试剂

盒,大鼠Bcl-2原位杂交检测试剂盒(均购自武汉博士德生物工程有限公司,批号20090336)。

1.4 仪器 980型超声雾化器(上海天缘医用生物有限公司生产),T200型电子天平(常熟双杰测试仪器厂生产)。

2 方法

2.1 分组、给药与造模 48只大鼠按体重均衡随机分成6组,分别为空白对照组(A组),模型组(B组),地塞米松组(C组),龙俐平喘膏高剂量组(D组)、中剂量组(E组)、低剂量组(F组),每组8只。于实验第1,4,7天分别给B,C,D,E,F组每只大鼠ip抗原液1 mL[含OVA 100 mg, $Al(OH)_3$ 100 mg]致敏,A组用生理盐水代替。从第14天开始,将B,C,D,E,F组大鼠分别置于 40 cm \times 25 cm \times 25 cm密闭玻璃容器内,给予3% OVA引喘液恒压超声雾化吸入激发。A组以等量生理盐水进行雾化激发。每日1次,每次20 min,连续7 d。以实验动物的等效剂量^[3]作为龙俐平喘膏中剂量,2倍等效剂量作为龙俐平喘膏高剂量,0.5倍等效剂量作为龙俐平喘膏低剂量。从第14天起,每次雾化激发前30 min给药,D,E,F组分别予龙俐平喘膏高、中、低(剂量分别为 $74.8, 37.4, 18.7$ g \cdot kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$) ig给药;C组ig给予 1 mg \cdot kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 的地塞米松;A,B组ig给予等量生理盐水,上述各药分2次ig给予,2次间隔6 h。每次给药容量均为 15 mL \cdot kg $^{-1}$,连续7 d。

2.2 观察指标

2.2.1 大鼠过敏性鼻炎症状的观察与记录 实验第17,19天,于雾化激发时,分别观察记录每只大鼠喷嚏和搔鼻次数,观察记录20 min,共记录2次。

2.2.2 大鼠鼻黏膜和肺组织病理形态学观察 末次雾化激发24 h后,10%的水合氯醛按 300 mg \cdot kg $^{-1}$ 行ip麻醉,沿大鼠鼻中线切开,暴露鼻中隔及双侧鼻腔,将鼻中隔剪下,提取鼻黏膜;沿颈正中线剪开皮肤暴露气管,开胸,分离气管及肺,提取肺组织。分别固定于4%多聚甲醛液中,石蜡包埋,切片,HE染色。光镜下每张切片取随机视野,分别观察分析各视野的鼻黏膜和肺组织病理学改变。

2.2.3 Tunel法检测肺组织炎症细胞凋亡率 高倍

光镜(400×)下观察肺组织炎症细胞凋亡,记录连续 5 个高倍视野下的炎症细胞数和凋亡炎症细胞数,凋亡细胞所占相应细胞的百分比即为炎症细胞凋亡率。具体操作程序参考细胞凋亡检测试剂盒说明书进行。

2.2.4 原位杂交法检测大鼠肺组织 Fas mRNA, Bcl-2 mRNA 的表达 高倍光镜(400×)随机选择 10 个视野,阳性细胞的胞浆呈棕黄色,每张片子至少计数 200 个嗜酸粒细胞(EOS),求其中阳性细胞所占百分率。具体操作程序按大鼠 Fas mRNA 和 Bcl-2 mRNA 原位杂交检测试剂盒说明书进行。

2.3 统计方法 应用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较若满足正态性且方差齐时采用单因素方差分析,两两比较时,采用 LSD 法。满足正态性但方差不齐时采用近似 *F* 检验,选择 Tamhane's T2 法进行两两比较。不满足正态性时,采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠过敏性鼻炎症状比较 与空白组比较,模型组大鼠过敏性鼻炎症状搔鼻和喷嚏的次数显著增多,差异具有显著性意义($P < 0.01$)。与模型组比较,地塞米松组和龙脷平喘膏各剂量组大鼠搔鼻、喷嚏次数均显著减少,差异有显著性意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与地塞米松组比较,龙脷平喘膏各剂量组大鼠过敏性鼻炎症状搔鼻和喷嚏的次数明显减少,两者比较差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 龙脷平喘膏对大鼠过敏性鼻炎症状的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	搔鼻 /次	喷嚏 /次
空白	-	4.94 ± 0.82	0.44 ± 0.82
模型	-	15.81 ± 8.12 ¹⁾	8.69 ± 3.18 ¹⁾
地塞米松	1 × 10 ⁻³	9.94 ± 1.52 ²⁾	3.75 ± 1.44 ³⁾
龙脷平喘膏	74.8	3.94 ± 1.86 ^{2,4)}	0.94 ± 0.42 ^{2,5)}
	37.4	6.06 ± 1.32 ^{2,4)}	1.44 ± 0.98 ^{2,5)}
	18.7	7.88 ± 2.34 ^{2,5)}	1.38 ± 0.95 ^{2,5)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.05$;与地塞米松组比较⁴⁾ $P < 0.01$,⁵⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 各组大鼠鼻黏膜和肺组织病理形态学观察

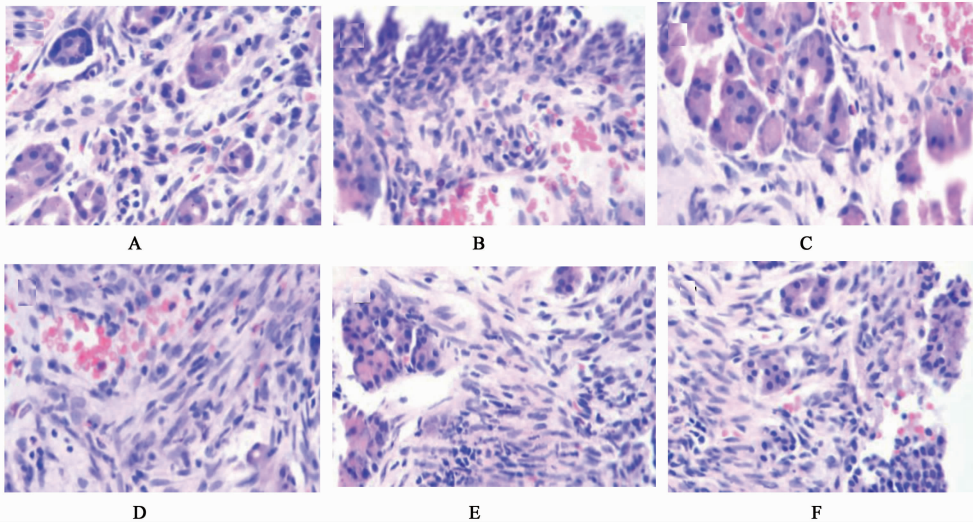
3.2.1 各组大鼠鼻黏膜组织形态学观察 空白组见鼻黏膜层次结构清晰,纤毛完整,排列整齐,黏膜下血管不扩张,腺体无肥大,周围偶见极少量炎症细

胞浸润。模型组鼻黏膜上皮欠完整,表面纤毛受损,可见到部分纤毛脱落,黏膜下血管扩张充血,周围见嗜酸粒细胞等炎性细胞浸润。地塞米松组鼻黏膜上皮结构欠完整,表面纤毛受损不明显,黏膜下血管轻度扩张,周围见少量炎症细胞浸润。龙脷平喘膏高、中剂量组鼻黏膜上皮结构完整,未见纤毛受损及剥脱,偶见极少量炎症细胞浸润。龙脷平喘膏低剂量组鼻黏膜上皮结构欠完整,纤毛欠完整,但未脱落,见少量炎症细胞浸润。见图 1。

3.2.2 各组大鼠肺组织形态学观察 空白组见肺组织结构完整,支气管黏膜完整、无破损,纤毛无倒伏,管壁血管无充血,支气管腔内无分泌物和炎性渗出物,平滑肌无增厚,管腔无狭窄,支气管及血管周围偶见极少量嗜酸粒细胞和中性粒细胞浸润;肺泡无扩大,肺泡壁正常,内无出血及炎性细胞浸润,肺细小动脉无增厚,管壁均匀一致。模型组支气管管壁结构破坏,黏膜不完整,可见纤毛倒伏,上皮脱落,肺组织肺泡间隔弥漫增厚,见明显的肺实变,肺泡壁毛细血管扩张、充血,肺组织中见大量嗜酸粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞浸润,肺泡腔及支气管腔内见炎性分泌物渗出。地塞米松组支气管管壁轻度损伤,黏膜上皮轻、中度受损,肺组织肺泡间隔轻度增厚,未见肺实变,肺泡壁毛细血管轻中度扩张、充血,肺组织中见少量嗜酸粒细胞和淋巴细胞浸润。龙脷平喘膏高、中剂量组支气管管壁未见明显受损,黏膜上皮及纤毛无损伤及倒伏,肺组织肺泡间隔增厚不明显,肺泡壁毛细血管无扩张、充血,肺组织中偶见少量嗜酸粒细胞和淋巴细胞浸润。龙脷平喘膏低剂量组支气管壁轻中度损伤,黏膜上皮中度受损,肺组织肺泡间隔可见增厚,肺泡壁毛细血管轻度扩张、充血,肺组织中见嗜酸粒细胞和淋巴细胞浸润。见图 2。

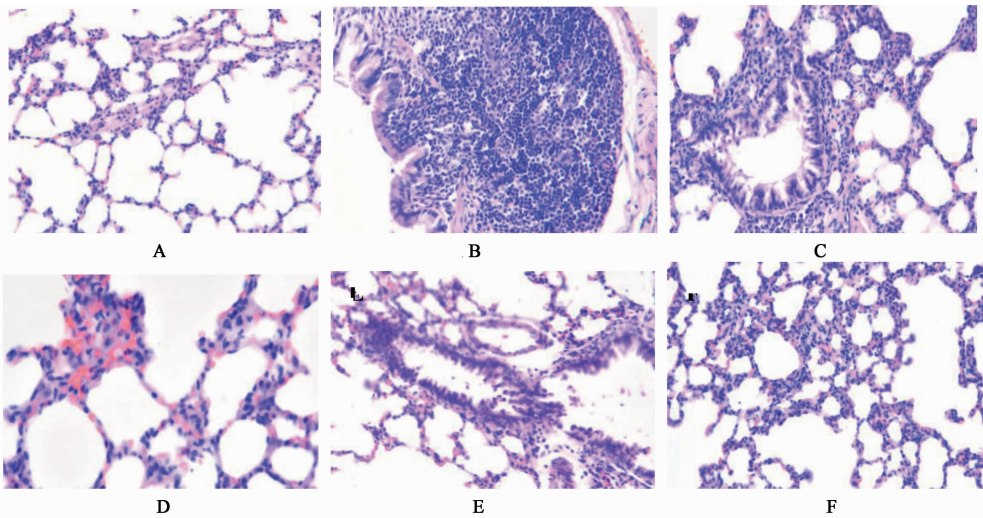
3.3 各组大鼠肺组织炎症细胞凋亡率的比较 模型组大鼠肺组织炎症细胞凋亡率显著降低,与空白组比较有显著性差异($P < 0.01$)。地塞米松组和龙脷平喘膏高、中剂量组大鼠肺组织炎症细胞凋亡率均明显升高,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 各组大鼠肺组织 Fas, Bcl-2 mRNA 表达的比较 模型组 Fas mRNA 的阳性表达率显著不足,与空白组比较有显著性差异($P < 0.01$);地塞米松组和龙脷平喘膏高、中剂量组 Fas mRNA 的阳性表达率显著上升,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);龙脷平喘膏低剂量组 Fas mRNA 的阳性表达



A. 空白组;B. 模型组;C. 地塞米松 $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组;D. 龙脷平喘膏 $74.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组;
E. 龙脷平喘膏 $37.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组;F. 龙脷平喘膏 $18.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组(图2同)

图1 龙脷平喘膏对哮喘大鼠鼻黏膜组织形态学的影响(HE染色, $\times 200$)



A. 空白组;B. 模型组;C. 地塞米松 $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组;D. 龙脷平喘膏 $74.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组;
E. 龙脷平喘膏 $37.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组;F. 龙脷平喘膏 $18.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组

图2 龙脷平喘膏对哮喘大鼠肺组织形态学的影响(HE染色, $\times 200$)

表2 大鼠肺组织炎症细胞凋亡率及 Fas, Bcl-2mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	炎症细胞凋亡率/%	Fas mRNA 表达/%	Bcl-2 mRNA 表达/%
空白	-	15.02 ± 6.68	53.96 ± 18.26	34.41 ± 8.61
模型	-	$2.18 \pm 1.48^{1)}$	$28.14 \pm 9.56^{1)}$	$62.30 \pm 7.00^{1)}$
地塞米松	1×10^{-3}	$8.56 \pm 5.82^{2)}$	$51.30 \pm 19.12^{3)}$	$41.91 \pm 11.08^{3)}$
龙脷平喘膏	74.8	$7.86 \pm 5.58^{2)}$	$50.79 \pm 12.07^{3)}$	$39.29 \pm 8.75^{3)}$
	37.4	$7.83 \pm 3.57^{2)}$	$46.47 \pm 9.59^{3)}$	$42.42 \pm 6.82^{3)}$
	18.7	6.08 ± 4.05	40.90 ± 5.29	52.81 ± 13.08

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

率虽有较多上扬,但与模型组比较差异无统计学意义;龙脷平喘膏3个剂量组 Fas mRNA 的阳性表达率与地塞米松组比较差异无统计学意义。模型组 Bcl-2 mRNA 阳性表达率显著升高,与空白组比较有显著性差异($P < 0.01$);地塞米松组和龙脷平喘膏高、中剂量组 Bcl-2 mRNA 的阳性表达率显著降低,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表2。

4 讨论

小儿哮喘的慢性变态反应性气道炎症与过敏性鼻炎所致上呼吸道慢性炎症在病理本质上是一致的,上下呼吸道的这种炎症在小儿哮喘的发生、发展过程中相互联系,彼此促进,成为诱发小儿哮喘和维持小儿哮喘气道炎症的重要危险因素。流行病学调查显示^[4-5],在变应性鼻炎患者中有21%~58%伴发哮喘,而在哮喘患者中伴有变应性鼻炎则占28%~92%。笔者在研究中发现,当致敏大鼠受到变应原卵清蛋白攻击而引发过敏性哮喘发作的同时,除空白组外,其余各组均诱发了不同程度的过敏性鼻炎症状,且模型组鼻黏膜和肺组织中均见嗜酸粒细胞浸润及相似的病理形态学改变,表明过敏性鼻炎与过敏性哮喘两者在发病机制上具有高度相关性,相同的诱发因素和炎症反应机制,即肺鼻同病。因此,在治疗小儿哮喘时,应将解除过敏性鼻炎症状置于一个重要位置,即“肺鼻同治”。本研究结果显示,龙脷平喘膏各剂量组哮喘大鼠的搔鼻和喷嚏次数明显减少,表明龙脷平喘膏能有效促进受损鼻黏膜上皮和血管内皮的修复,恢复其屏障功能,降低鼻黏膜对变应原的敏感性,有效抑制过敏性鼻炎症状,且龙脷平喘膏控制哮喘大鼠过敏性鼻炎症状的疗效优于地塞米松。

嗜酸粒细胞在气道黏膜下和肺组织中聚集、浸润、活化是气道炎症发生和持续的中心环节,淋巴细胞是小儿哮喘发病的始发效应细胞之一,在EOS分化、成熟、趋化和激活的过程中起中枢性调节作用。淋巴细胞和EOS等炎症细胞的凋亡及被清除是气道炎症走向消退的重要基础,因此,炎症细胞的凋亡和清除是哮喘治疗效果的关键^[6]。本研究显示,龙

脷平喘膏高、中剂量组大鼠肺组织中炎症细胞凋亡率明显高于模型组,且与地塞米松组相当,表明龙脷平喘膏具有促进气道和肺组织中炎症细胞凋亡,抑制气道炎症,缓解甚至控制哮喘发作的功效。提示其抗气道炎症的作用机制与其促进肺组织炎症细胞的凋亡密切相关。与此同时,研究还发现,经龙脷平喘膏高、中剂量治疗后,哮喘大鼠肺组织中促炎症细胞凋亡的调控基因 Fas mRNA 阳性表达率显著升高,抑制炎症细胞凋亡的调控基因 Bcl-2 mRNA 阳性表达率则明显下降。而 Fas/Bcl-2 功能失调,可延迟甚至阻止炎症细胞凋亡,从而加重小儿哮喘。这提示龙脷平喘膏能通过上调 Fas mRNA 表达,下调 Bcl-2 mRNA 表达,从而逆转哮喘大鼠体内促炎症细胞凋亡机制的失调,促进炎症细胞的凋亡和清除,达到消除气道炎症,控制哮喘发作的目的。

气道炎症、肺鼻同病为发作期小儿哮喘的关键病理机制,因此,抗气道炎症和“肺鼻同治”是发作期小儿哮喘临床治疗的二个关键作用靶点。本文从抗气道炎症和“肺鼻同治”(抗敏)二个层面揭示了龙脷平喘膏抗发作期小儿哮喘气道炎症的作用机制。

[参考文献]

- [1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 中国支气管哮喘防治指南(基层版)[J]. 中国实用内科杂志, 2013, 33(8):615.
- [2] 闭旭. 变应性鼻炎的研究进展[J]. 中外医学研究, 2013, 11(34):154.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2002:202.
- [4] 余亚斌. 变应性鼻炎发病相关因素的研究[J]. 中国中医药咨询, 2012, 4(1):385.
- [5] 王向东, 韩德民, 周兵, 等. 上下呼吸道炎症反应相关性研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2003, 38(4):247.
- [6] Xu J, Jiang F, Nayeri F, et al. Apoptotic eosinophils in sputum from asthmatic patients correlate negatively with levels of IL-5 and eotaxin [J]. Respir Med, 2007, 101(7):1447.

[责任编辑 聂淑琴]