

· 经典名方 ·

加味芎蝎散对咳嗽变异性哮喘大鼠气道平滑肌增殖及 MMP-9, TIMP1 表达的影响

孙洮玉¹, 方顺顺¹, 张子薇¹, 陈爽¹, 徐荣谦¹, 徐春英², 杨斌²

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700;

2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

[摘要] 目的:探讨加味芎蝎散对咳嗽变异性哮喘大鼠气道平滑肌组织增殖以及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶抑制剂1(TIMP1)表达水平的影响。方法:雄性SD大鼠48只,随机选取其中8只作为正常组,剩余大鼠随机分成CVA模型组,孟鲁司特钠组(0.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹),加味芎蝎散组(6 g·kg⁻¹·d⁻¹),趋化因子受体1/2(CXCR1/2)抑制剂组(G31P,隔日颈部注射0.5 mg·kg⁻¹),CXCR1/2抑制剂+加味芎蝎散组,每组8只。腹腔注射卵蛋白(OVA)2 mg及氢氧化铝[Al(OH)₃]200 mg,15 d后1%OVA雾化激发建立咳嗽变异性哮喘(CVA)模型,模型建立后各组给予相应的给药处理,正常组及模型组给予10 mL·kg⁻¹·d⁻¹蒸馏水灌胃。苏木素-伊红(HE)染色后镜下观察肺组织病理形态学变化,测量气道平滑肌层厚度、细胞个数及管壁厚度;免疫组化和蛋白免疫印迹法检测肺支气管平滑肌组织中细胞增殖核抗原(PCNA),MMP-9和TIMP1蛋白表达水平。结果:与正常组比较,CVA模型组大鼠支气管表现为平滑肌层增生、肥厚,管壁上及周围多量炎性细胞浸润等为主要表现的病理变化,平滑肌层厚度、细胞个数及管壁厚度均增加;与模型组比较,其他药物干预组均有不同程度地减轻。与正常组比较,CVA模型组支气管平滑肌组织中PCNA,MMP-9,TIMP1蛋白明显升高($P<0.05$),MMP-9/TIMP1蛋白明显升高($P<0.05$);与CVA模型组比较,各药物干预组明显降低PCNA,MMP-9,TIMP1蛋白表达及MMP-9/TIMP1蛋白($P<0.05$)。结论:加味芎蝎散可以减轻CVA模型大鼠气道平滑肌组织的厚度,可能与抑制CXCR1/2通路,从而降低平滑肌组织的增殖活性以及抑制相关基质金属蛋白酶的表达有关。

[关键词] 咳嗽变异性哮喘;加味芎蝎散;气道平滑肌组织;增殖;基质金属蛋白酶(MMP)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201408

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200507.1015.006.html>

[网络出版日期] 2020-5-7 14:56

Effect of Modified Xiongxiesan on Proliferation of Airway Smooth Muscle Tissues and Expressions of MMP-9 and TIMP1 in CVA Model Rats

SUN Tao-yu¹, FANG Shun-shun¹, ZHANG Zi-wei¹, CHEN Shuang¹, XU Rong-qian¹,
XU Chun-ying², YANG Bin²

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of modified Xiongxiesan on the proliferation of airway smooth muscle tissues and the expressions of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in cough variant asthma (CVA) model rats. **Method:** A total 48 male SD rats were randomly divided into the normal control group (8 rats) and model group (40 rats). CVA model of rats were established through the intraperitoneal administration with 2 mg ovalbumin (OVA) and 100 mg Al(OH)₃,

[收稿日期] 20191118(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81704120);北京中医药大学东直门医院青苗人才培养计划项目(2018)

[第一作者] 孙洮玉,副主任医师,从事中西医结合防治小儿呼吸系统疾病研究,Tel:010-84013158,E-mail:suntaoyu@163.com

[通信作者] * 杨斌,副研究员,从事实验病理学与分子病理学研究,Tel:010-62835096,E-mail:yangbin555@126.com

and then aerosol inhalation of 1% OVA 15 days later. The same volume of sterile saline was given to the normal group through the intraperitoneal injection. Then 40 rats in the modeling group were randomly divided into model group, modified Xiongxiesan group (TCM group, $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), montelukast group ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), chemokine receptor1/2 (CXCR1/2) inhibitor group (G31P group injected subcutaneously via the neck with a dose of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ every other day), and CXCR1/2 inhibitor and modified Xiongxiesan group (G31P+TCM group), with 8 rats in each group. The control group and the model group were orally given distilled water $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Then the rats were sacrificed, and lung samples were collected. Histological changes were examined by hematoxylin-eosin (HE). Basement membrane perimeter (PBM), wall area of bronchial tube (WAt), wall area of bronchial smooth muscle (WAm) and the number of smooth muscle cells (N) were measured using image pro-plus software and standardized based on PBM. The expressions of PCNA, MMP9 and TIMP1 were detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the control group, there were a large number of inflammatory cells infiltration and moderate hyperplasia of smooth muscle area in the model group, which however were alleviated in other groups. The expressions of PCNA and MMP-9, TIMP1 were higher in the model group, which were reduced in other groups significantly. **Conclusion:** Modified Xiongxiesan can reduce the thickness of airway smooth muscle tissue in the CVA model rats, which may be correlated with the inhibition of the CXCR1/2 pathway, thereby reducing the proliferative activity of smooth muscle tissue and inhibiting the expression of related matrix metalloproteinases.

[Key words] cough variant asthma; modified Xiongxiesan; airway smooth muscle tissues; proliferation; matrix metalloproteinase

咳嗽变异性哮喘(CVA)是儿童慢性咳嗽最常见原因之一,其实质是以咳嗽为唯一或主要表现的一种特殊类型哮喘^[1]。流行病学调查显示,CVA位居中国儿童慢性咳嗽病因构成比的首位,占咳嗽病例总数的41.95%^[2]。CVA易被误诊为“上感”“支气管炎”等,因此不仅患儿的咳嗽症状迁延不愈,错误诊断还可延误治疗,加重病情^[3]。更有研究指出,如不进行有效干预措施,近1/3的患儿将会发展为典型哮喘^[4]。因此CVA患儿的明确诊断和早期干预治疗,对防止其恶化具有重要意义。CVA主要病理变化为气道炎症和气道重塑。气道重塑指在炎症的持续作用下,气道壁的组织结构发生改变。其中最具代表性的是气管壁平滑肌组织的增生、肥大,造成支气管管腔狭窄,导致哮喘反复发作。哮喘气道平滑肌组织的改变包括量变和质变,前者包括平滑肌层厚度的增加,胶原纤维沉积等,后者则包括平滑肌细胞表型的转化,可以分泌大量的促炎细胞因子、趋化因子以及细胞外基质蛋白等。加味芎蝎散是徐荣谦教授由传统古方芎蝎散加减而来的经验方,取得了较好的临床疗效^[5-6],在前期动物实验中发现,加味芎蝎散可以针对CVA气道平滑肌细胞诱导凋亡以及加强自噬,逆转气道重塑^[7-8]。同时在前期的实验中,还发现CVA模型大鼠气道平滑肌组织高表达TH2型细胞因子趋化因子受体1/2(CXCR1/2)及

白细胞介素-8(IL-8),而加味芎蝎散可以抑制气道重塑,并对此两指标有明显的减低作用。由此,假设加味芎蝎散可以阻断CVA大鼠气道中CXCR1/2通路蛋白的表达,抑制气道平滑肌细胞增生及表型转化,从而逆转气道重塑。

1 材料

1.1 动物 48只SPF雄性SD大鼠,体质量(200 ± 20)g,4~6周龄,北京维通利华实验动物技术有限公司提供。合格证号SCXK(京)2016-0001。自由摄食、饮水,室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(50 ± 10)%,并通过北京中医药大学东直门医院动物实验伦理研究会同意。

1.2 药物 加味芎蝎散由川芎5g,全蝎3g,芦根20g,葶苈1g,清半夏5g,细辛1g,五味子10g,白前10g组成,所有药材经北京中医药大学东直门医院孙洮玉副教授鉴定为正品。中药煎药机煎制,全蝎炮制入药,制成含生药量 $3.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓缩液。按大鼠体表面积换算,大鼠剂量为 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;孟鲁司特钠片(杭州默沙东,批号J20070058),取药片溶于蒸馏水中,按 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量灌胃。

1.3 试剂 卵清蛋白(OVA),氢氧化铝凝胶(美国Sigma公司,批号分别为A5253-1009,A8222-250);细胞增殖核抗原(PCNA)兔多克隆抗体,基质金属蛋白酶-9(MMP-9)兔多克隆抗体,基质金属蛋白酶

抑制剂1(TIMP1)兔多克隆抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为GR325514-3,GR210587-6,GR248756-4,GR235032-4);辣根过氧化物酶标山羊抗小鼠/兔免疫球蛋白(IgG)聚合物二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号1919D0516);SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术研究,批号173820);迈耶氏苏木素染色液,伊红染色液(北京益利精细化学品有限公司,批号分别为20191023,20191125)。

1.4 仪器 WH-2000型超声雾化器(广东粤华医疗器械厂有限公司);TP1020型全自动脱水机, RM2235型组织切片机(德国Leica公司);BX51型光学显微镜(日本Olympus公司);1658001型垂直电泳及转印系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 CVA模型的制备、动物分组及干预方法 参照杨斌等^[8]实验进行造模。除正常组外,其余40只SD大鼠制备CVA动物模型。第1日至第8日为致敏阶段,腹腔注射卵蛋白混悬液[内含2 mg和Al(OH)₃ 100 mg] 1 mL;观察1周,第15日为激发阶段,雾化吸入2% OVA溶液1 mL,连续雾化1周,1次/d,正常组给予等量生理盐水。CVA模型建立约3~4周,以大鼠出现咳嗽、腹肌收缩、呼吸加快加深等气道痉挛症状,同时肺泡灌洗液中嗜酸粒细胞百分比显著增高,证明模型成功。CVA模型大鼠随机分成5组,分别为CVA模型组(模型组)、加味芎蝎散组、孟鲁司特钠组, CXCR1/2拮抗剂组(G31P组), CXCR1/2拮抗剂+加味芎蝎散组(G31P+加味芎蝎散组)。其中后4组统称为药物干预组。从第8天开始, G31P组和G31P+加味芎蝎散组大鼠颈后皮下注射G31P,剂量为0.5 mg·kg⁻¹,隔日1次。从模型制备成功开始灌胃,按照体表面积法换算,加味芎蝎散组和G31P+加味芎蝎散组给予剂量为6 g·kg⁻¹·d⁻¹,孟鲁司特钠组给予孟鲁司特钠0.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹,正常组及模型组给予等量生理盐水灌胃。根据本课题组既往研究经验,干预30 d后,处死大鼠,取左肺组织多聚甲醛固定,剥离右肺支气管平滑肌组织冻存。

2.2 HE染色观察肺组织变化 各组大鼠左肺组织经10%中性甲醛固定后,常规脱水、包埋、切片, HE染色后于显微镜下观察各组大鼠气道壁病理改变及管壁周围炎细胞的浸润情况。

2.3 图像采集分析气道平滑肌增生肥大变化 运用图像采集系统,在光学显微镜200倍下,每切片选取3个高倍视野,要求是包含完整的小支气管横切

面图像。医学图像分析软件(Image Pro-plus6.0)测定支气管管腔周长(PBM),支气管管壁面积(WAt),支气管管壁平滑肌面积(WAm)和平滑肌细胞计数(N),为了消除选取的支气管直径不统一所造成的误差,各指标用PBM标准化,分别以WAt/PBM, WAm/PBM, N/PBM表示。

2.4 免疫组化检测肺支气管平滑肌组织中PCNA, MMP-9以及TIMP1蛋白的表达 石蜡切片脱蜡至水后,柠檬酸缓冲液高压修复抗原3 min, 10% H₂O₂室温封闭10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后加入一抗(分别稀释为1:250, 1:200, 1:100),用PBS代替一抗做阴性组,4℃孵育过夜,次日二抗PV6000室温孵育30 min,镜下DAB显色、苏木素复染、梯度乙醇脱水、封片。在光学显微镜200倍下,每切片选取3个高倍视野,拍摄肺组织支气管图像。医学图像分析软件(Image Pro-plus6.0)分析测定每张切片的积分吸光度IA。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织平滑肌组织中PCNA, MMP-9以及TIMP1蛋白的表达 取右肺气管平滑肌组织约100 mg,冰上剪碎后裂解并匀浆,提取总蛋白,测定并调整各组大鼠的蛋白含量。配制10%分离胶和5%浓缩胶进行蛋白凝胶电泳,蛋白转膜到PVDF膜上,5%脱脂牛奶封闭,PCNA, MMP-9以及TIMP1蛋白均按照1:800稀释,内参GAPDH抗体1:3 000孵育,4℃过夜。辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗1:5 000常温孵育1 h, ECL试剂盒显影。结果用Quantity one 4.1.1软件分析测定条带的灰度值。

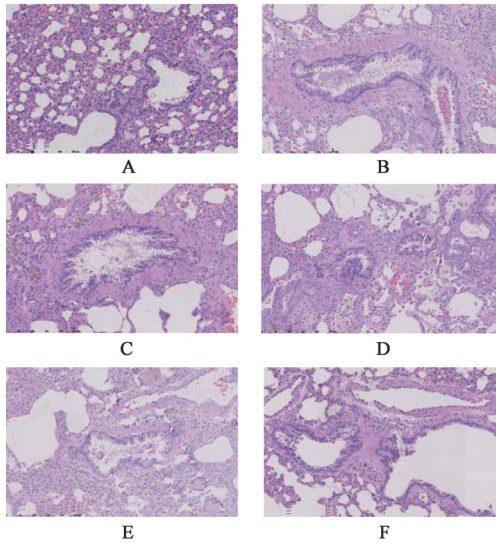
2.6 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件包进行数据分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对CVA大鼠肺组织病理变化的影响

正常组大鼠支气管黏膜光滑完整,上皮细胞排列整齐有序,平滑肌层及管壁未见增厚。CVA模型组气管管腔扩张,黏膜皱襞增生或平坦,黏膜上皮变性、脱落,黏膜下充血、水肿,平滑肌层增生、肥厚,管壁上及周围多量炎性细胞浸润。与模型组比较,其他药物干预组均有不同程度地减轻。其中,孟鲁司特钠组炎症减退较为明显, G31P组平滑肌增生较模型组大为减轻,而加味芎蝎散组及G31P+加味芎蝎散组表现为黏膜上皮轻度变性,平滑肌增生不明显,至少至中等量炎细胞浸润。见图1。

3.2 对CVA大鼠肺组织WAt/PBM, WAm/PBM,



A. 正常组; B. 模型组; C. 孟鲁司特钠组; D. 加味芎蝎散组; E. G31P组; F. G31P+加味芎蝎散组(图2~5同)

图1 加味芎蝎散对CVA大鼠肺组织形态的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of modified Xiongxiesan on lung tissue morphology of CVA rats(HE, ×200)

N/PBM的影响 与正常组比较,模型组大鼠WAt/PBM, WAm/PBM, N/PBM均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组均明显降低WAt/PBM, WAm/PBM, N/PBM($P < 0.05$)。见表1。

3.3 对CVA大鼠支气管平滑肌组织中PCNA, MMP-9以及TIMP1蛋白表达的影响 大鼠气道黏

膜上皮细胞、支气管平滑肌及部分肺泡上皮、血管平滑肌组织均有大量棕黄色阳性蛋白颗粒表达,以前二者为主要表达部位。与正常组比较,模型组大鼠支气管平滑肌组织中PCNA, MMP-9以及TIMP1蛋白表达均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组除TIMP1指标外,均明显降低PCNA, MMP-9蛋白表达($P < 0.05$)。见图2~4,表2。

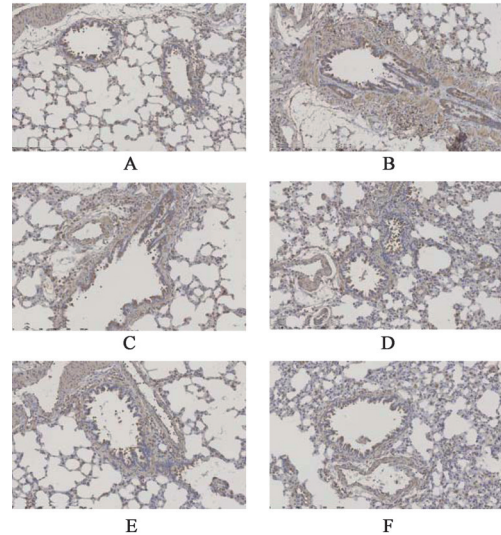


图2 加味芎蝎散对CVA大鼠肺组织PCNA表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of modified Xiongxiesan on PCNA expression in lung tissue of CVA rats(IHC, ×200)

表1 加味芎蝎散对CVA大鼠肺组织WAt/PBM, WAm/PBM, N/PBM的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of modified Xiongxiesan on WAt/PBM, WAm/PBM, N/PBM expression in lung tissue of CVA rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	WAt/PBM	WAm/PBM	N/PBM
正常	-	10.55±2.12	4.23±0.65	0.05±0.02
模型	-	19.77±2.98 ¹⁾	8.76±1.34 ¹⁾	0.15±0.04 ¹⁾
孟鲁司特钠	4×10 ⁻⁴	15.02±3.24 ²⁾	7.69±0.98	0.12±0.06
加味芎蝎散	6	15.17±2.78 ²⁾	6.88±0.76 ²⁾	0.10±0.04 ²⁾
G31P	5×10 ⁻⁴	15.38±2.66 ²⁾	7.15±0.82 ²⁾	0.11±0.03 ²⁾
G31P+加味芎蝎散	5×10 ⁻⁴ +6	14.36±2.78 ²⁾	6.49±0.83 ²⁾	0.08±0.04 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表2,3同)。

表2 加味芎蝎散对CVA大鼠肺组织PCNA, MMP-9以及TIMP1表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of modified Xiongxiesan on PCNA, MMP-9, TIMP1 expression in lung tissue of CVA rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PCNA	MMP-9	TIMP1	MMP-9/TIMP1
正常	-	44.34±5.56	55.33±6.84	46.37±3.21	1.78±0.24
模型	-	83.88±10.19 ¹⁾	87.44±9.58 ¹⁾	54.94±6.23 ¹⁾	6.84±1.26 ¹⁾
孟鲁司特钠	4×10 ⁻⁴	73.45±8.66 ²⁾	79.70±8.41 ²⁾	52.45±8.40	4.48±0.96 ²⁾
加味芎蝎散	6	69.45±7.70 ²⁾	78.95±7.08 ²⁾	51.91±8.22	3.67±1.28 ²⁾
G31P	5×10 ⁻⁴	74.23±6.59 ²⁾	76.43±8.55 ²⁾	49.78±7.29	3.78±0.66 ²⁾
G31P+加味芎蝎散	5×10 ⁻⁴ +6	66.57±7.03 ²⁾	69.49±7.60 ²⁾	50.45±7.26	3.42±0.84 ²⁾

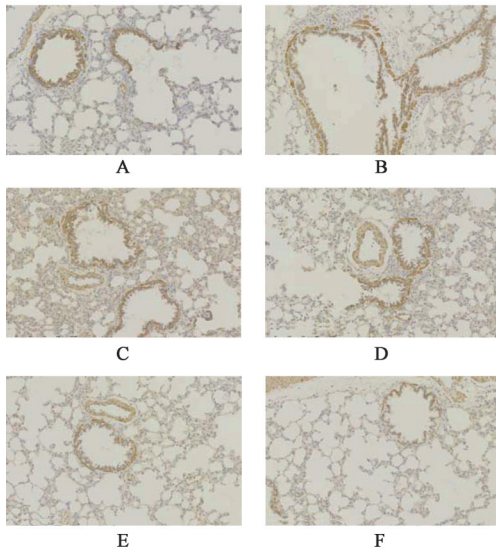


图3 加味芎蝎散对CVA大鼠肺组织MMP-9表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 3 Effect of modified Xiongxiesan on MMP-9 expression in lung tissue of CVA rats(IHC, ×200)

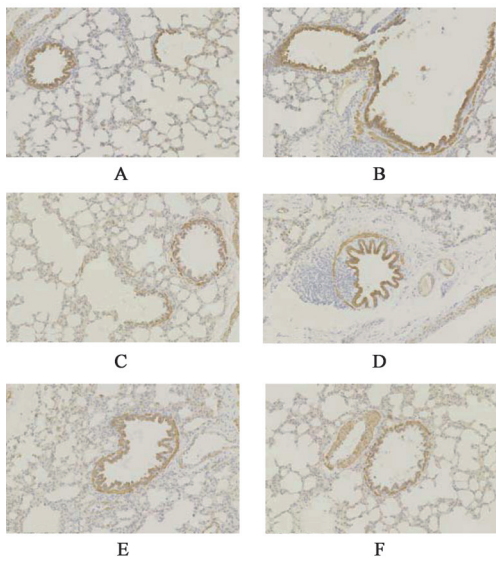


图4 加味芎蝎散对CVA大鼠肺组织TIMP1蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 4 Effect of modified Xiongxiesan on TIMP1 expression in lung tissue of CVA rats(IHC, ×200)

3.4 对CVA大鼠支气管平滑肌组织PCNA, MMP-9以及TIMP1蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠支气管平滑肌组织中PCNA, MMP-9以及TIMP1蛋白表达均明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组均明显降低PCNA, MMP-9以及TIMP1蛋白表达($P < 0.05$)。见图5, 表3。

4 讨论

CVA属于特殊类型哮喘, 中华医学会儿科学分会呼吸学组在《儿童支气管哮喘诊断与防治指南-

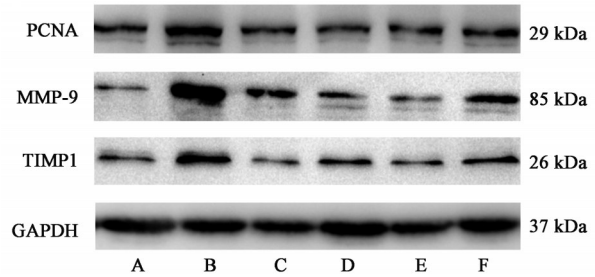


图5 各组大鼠肺组织PCNA, MMP-9, TIMP1蛋白表达

Fig. 5 Electrophoresis of PCNA, MMP-9, TIMP1 protein expression of each groups

表3 加味芎蝎散对CVA大鼠支气管平滑肌组织PCNA, MMP-9以及TIMP1蛋白含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of modified Xiongxiesan on PCNA, MMP-9, TIMP1 protein expression in lung tissue of CVA rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	PCNA /GAPDH	MMP-9 /GAPDH	TIMP1 /GAPDH
正常	-	0.35±0.04	0.55±0.13	0.62±0.09
模型	-	0.74±0.19 ¹⁾	0.85±0.20 ¹⁾	0.75±0.15 ¹⁾
孟鲁司特钠	4×10 ⁻⁴	0.63±0.08 ²⁾	0.74±0.14 ²⁾	0.73±0.09
加味芎蝎散	6	0.59±0.11 ²⁾	0.67±0.13 ²⁾	0.70±0.15
G31P	5×10 ⁻⁴	0.62±0.10 ²⁾	0.73±0.11 ²⁾	0.70±0.11
G31P+加味芎蝎散	5×10 ⁻⁴ +6	0.58±0.12 ²⁾	0.66±0.09 ²⁾	0.69±0.15

2016版》中指出, 当咳嗽持续>4周, 常在运动、夜间和或凌晨发作或加重, 以干咳为主, 不伴有喘息; 临床上无感染征象, 或经较长时间抗生素治疗无效而抗哮喘药物诊断性治疗有效; 即可作为CVA的确诊依据^[1]。气道炎症和气道重塑是哮喘的两个主要病理学改变, 气道重塑为气道壁结构细胞的形态功能变化, 包括气道上皮杯状细胞化生和增生, 基底膜增厚, 细胞外基质(ECM)增加, 气道平滑肌细胞增生和肥大以及黏膜下层血管增生等, 一般被认为是反复炎症损伤与修复的结果, 发生于持续炎症下的疾病后期。尽管气道重塑被认为仅是伴随现象, 作为炎症这个原因之下的导致的结果, 但已有研究发现, 部分儿童哮喘个体在疾病早期存在气道重塑^[9], 另外, 在炎症控制后疾病缓解期内, 气道重塑可继续加重^[10], 这些研究都表明气道重塑是哮喘发生的重要机制, 是潜在的治疗靶标。气道平滑肌是气道壁主要结构细胞, 占管壁面积的60%以上, 在病理状态下, 不仅在气道结构和功能方面发挥功能(即气道重塑), 还能分泌释放细胞因子、趋化分子及炎症介质参与调控气道炎症。

PCNA是真核细胞的DNA合成所必须的辅助蛋白, 表达在细胞核内, 是研究细胞的增殖活跃状

态可靠指标。无论是在哮喘患者或者实验动物体内实验均已表明^[11-12],哮喘病例平滑肌细胞均为高增殖状态,同时在结构上细胞数更多、相对面积更大。中医药的研究同样证实了这一点,GE等^[13]发现防哮方可以减轻哮喘大鼠平滑肌组织SMA的含量,降低PCNA的表达,同时调节Th1/Th2平衡来抑制哮喘大鼠的气道重塑。这些发现均与实验结果是吻合的,同时笔者发现,尽管4个干预组都有不同程度的减轻平滑肌细胞增殖、肥大的作用,但加味芎蝎散组以及G31P+加味芎蝎散组的效果更佳。ECM的降解和沉积失衡是气道重塑的原因之一,而MMPs是ECM代谢的重要限速酶。MMPs属于蛋白酶超家族,可降解构成肺泡壁和基底膜的蛋白成分,而大量研究证实MMP-9在哮喘患者或动物模型中高表达,一般认为MMP-9尽管可以降解ECM,但是MMP-9同时激活平滑肌增殖,并促进上皮细胞分泌转化生长因子- β (TGF- β)。TIMPs家族是MMPs内源性抑制因子,其中活性最强的是TIMP-1,可以特异性抑制MMP-9的活性,既往研究多使用MMP-9/TIMP-1的表达及比例失衡来衡量气道重塑过程中ECM的沉积。MA等^[14]发现MMP-9升高见于哮喘的持续炎症过程,而TIMP-1升高则与哮喘的气道重塑相关^[15]。本课题组前期发现,CVA大鼠模型肺组织中MMP-9及TIMP-1的mRNA升高,而加味芎蝎散可以减低表达^[16]。此次实验发现,MMP-9和TIMP-1在CVA大鼠模型平滑肌组织均显著增高,基本与既往研究相符。不同之处是既往研究发现MMP-9/TIMP-1比值在哮喘大鼠肺组织中呈减低趋势,而本次实验发现呈升高状态。笔者认为可能是模型不同(哮喘与CVA),病因病机存在差异;另外,所检测的组织类型不同(全肺组织检测与支气管平滑肌组织检测)。

G31P是IL-8的特异性小分子抑制剂,其可以竞争性的结合CXC趋化因子家族(主要为IL-8),从而阻断IL-8-CXCR1/2轴介导的炎症反应。研究发现,某些炎细胞和肿瘤细胞中高表达IL-8,因此G31P作用的靶点比较广泛,近年来,G31P在一些炎症及肿瘤性疾病应用中效果显著,针对平滑肌组织中研究中,QIN等^[17]发现动脉粥样硬化小鼠皮下注射G31P可以降低血管平滑肌组织中增殖和迁移,从而抑制AS的斑块形成。实验也证实,G31P组亦有不同程度地减轻CVA气道重塑的效果,但总体效果略差于加味芎蝎散组及G31P+加味芎蝎散组,这可能与中药的多靶点治疗机制相关。

“芎蝎散”是宋代陈文中《小儿病源方论》的家传累世之名方,原方由川芎、芫荽各1两,蝎稍去毒尖1钱,细辛、清半夏各2钱。具有去寒痰冷涎之效。万全在《幼科发挥》中用“芎蝎散”治疗“气喘息急,呕吐痰涎”者。

徐荣谦教授认为CVA属中医“肺风咳嗽”,在本病的发病机制中十分注重风邪。他指出,本病为外感风邪,内犯于肺,风盛生痰,风痰内伏,黏阻气道,闭郁肺气,导致肺失宣肃,形成肺风咳嗽。此外,他认为,在CVA的发展过程中瘀阻肺络也有重要的致病作用。所谓“久病入络”“久病必瘀”。故徐荣谦吸收中医儿科医家使用“芎蝎散”的宝贵经验,再经过自己多年临床实践经验,在“芎蝎散”的基础上,加白前、五味子、芦根3味药,组成“加味芎蝎散”,治疗时间一般为1~2周^[5-6]。方中川芎活血行气,祛风止咳;全蝎搜风通络,以散肺风,共为君药;配合细辛、芫荽、清半夏温肺化痰止咳;白前降气止咳;五味子敛肺止咳;芦根清肺止咳。目前大量样本证实,该方临床疗效确切,不良反应发生率低。如史文丽^[18]对纳入的31例患儿进行加味芎蝎散治疗前后中医症状统计,具有主证咳嗽的患儿例数,经治疗后低于治疗前,差异具有显著性;具有次证咯痰、气急、胸闷、咽痒、睡眠异常、大便异常的患儿例数,经治疗后均低于治疗前,差异具有极显著性。在治疗过程中,1例患儿出现轻微腹痛,未经治疗用药自行缓解。余患儿无不良事件发生。

平滑肌是气道组织的主要结构细胞,亦是气道重塑的重要组成部分,平滑肌增殖活性增加以及分泌功能提高均可加速CVA气道重塑,PCNA是检测组织、细胞增殖能力最常用的指标,MMP-9/TIMP1则是细胞外基质的主要蛋白,可以侧面反应气道平滑肌的分泌功能。本次实验证明,加味芎蝎散方可以有效的减低CVA大鼠平滑肌组织的增殖和分泌,从而达到抑制气道重塑的作用,其作用机制可能与抑制IL-8/CXCR1/2信号通路有关。针对平滑肌组织这一特异性靶点的治疗,临床应用前景广泛,需要做进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)[J]. 中华儿科杂志, 2016,54(3):167-181.
- [2] 中国儿童慢性咳嗽病因构成比研究协作组. 中国儿童慢性咳嗽病因构成比多中心研究[J]. 中华儿科杂

- 志,2012,50(2):83-92.
- [3] 刘秋海,徐浩岑,邢燕如,等. 咳嗽变异性哮喘在儿童慢性咳嗽中发病率的调查研究[J]. 中国医刊,2014,(6):67-69.
- [4] TODOKORO M, MOCHIZUKI H, TOKUYAMA K, et al. Childhood cough variant asthma and its relationship to classic asthma[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003,90(6):652-659.
- [5] 杨颖,徐荣谦. 加味芎蝎散加减联合吸入用布地奈德混悬液雾化吸入治疗儿童轻度急性发作期哮喘35例[J]. 中医研究,2016,29(7):12-14.
- [6] 伍利芬,徐荣谦.“加味芎蝎散”治疗小儿咳嗽变异性哮喘30例临床观察[J]. 北京中医,2007,26(10):665-667.
- [7] 孙洮玉,王俊宏,徐荣谦. 加味芎蝎散对咳嗽变异性哮喘大鼠气道重塑及气道平滑肌相关凋亡分子表达的影响[J]. 中国中医急症,2015,24(3):406-408.
- [8] 杨斌,徐荣谦,杨冬妹,等. 加味芎蝎散对咳嗽变异性哮喘大鼠气道平滑肌中自噬蛋白表达的干预作用[J]. 中国中医急症,2018,27(9):1505-1507,1513.
- [9] SZEFLER S J. Advances in pediatric asthma in 2014: moving toward a population health perspective [J]. *J Allergy Clin Immunol*,2015,135(3):644-652.
- [10] BOULET L P. Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches [J]. *Curr Opin Pulm Med*,2018,24(1):56-62.
- [11] JAMES A L, NOBLE P B, DREW S A, et al. Airway smooth muscle proliferation and inflammation in asthma[J]. *J Appl Physiol*,2018,125(4):1090-1096.
- [12] HASSAN M, JO T, RISSE P A, et al. Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma [J]. *Allergy Clin Immunol*,2010,125(5):1037-1045.
- [13] GE Y Q, CHENG R B, SUN S Y, et al. Fangxiao formula alleviates airway inflammation and remodeling in rats with asthma via suppression of transforming growth factor- β /Smad3 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109429.
- [14] MA H P, LI W, LIU X M, et al. Matrix metalloproteinase 9 is involved in airway inflammation in cough variant asthma [J]. *Exp Ther Med*,2014,8(4):1197-1200.
- [15] 李美香,杨召川,曲政海,等. 中药二步序贯治疗对哮喘小鼠肺组织基质金属蛋白酶-9及基质金属蛋白酶抑制剂-1表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2016,23(3):278-282.
- [16] 史文丽,徐荣谦,齐春燕. 加味芎蝎散对CVA大鼠肺组织MMP-9和TIMP-1 mRNA表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,27(9):124-28
- [17] QIN Y H, MAO W F, PAN L M, et al. Inhibitory effect of recombinant human CXCL8 (3-72) K11R/G31P on atherosclerotic plaques in a mouse model of atherosclerosis. [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*,2019,41(3):446-454.
- [18] 史文丽.“活血祛风、化痰止咳”法治疗儿童咳嗽变异性哮喘临床及机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2015.

[责任编辑 周冰冰]