

复方川贝颗粒对 OVA 介导的豚鼠过敏性哮喘模型的平喘作用机制研究

陈贺, 张慧颖, 刘禾, 丁春晓, 郭振武, 李国信, 张会宗, 张宏*

(辽宁省中医药研究院, 沈阳 110034)

[摘要] **目的:**探讨复方川贝颗粒对豚鼠哮喘模型的平喘作用机制。**方法:**70 只豚鼠,随机分为 7 组,每组 10 只,雌雄各半,即模型组,复方川贝颗粒(0.67, 1.34, 2.68) g·kg⁻¹组,二陈丸组(2.325 g·kg⁻¹),地塞米松组(9.30 × 10⁻⁴ g·kg⁻¹),正常对照组;试验开始第 1 天,豚鼠 ip10% 卵白蛋白(OVA)生理盐水溶液致敏,致敏后第 13 天灌胃给药,每日 1 次,给药 7 d,各组均按体重 ig,模型组和正常对照组给予等容积蒸馏水,15 d 后用 1% 卵白蛋白生理盐水溶液激发 5 次,每日 1 次,建立豚鼠过敏性哮喘模型,观察复方川贝颗粒对哮喘豚鼠血清中血栓素 B₂(TXB₂)、白三烯 B₄(LTB₄)的含量、哮喘潜伏期及肺部病理切片嗜酸性粒细胞(EOS)计数。**结果:**与正常对照组比较,模型组豚鼠血清中的 TXB₂, LTB₄ 含量明显升高($P < 0.01$),EOS 明显增多($P < 0.01$)。与模型组比较,复方川贝颗粒(1.34, 2.68 g·kg⁻¹)均能降低哮喘豚鼠血清中的 TXB₂, LTB₄ 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$);复方川贝颗粒(0.67, 1.34, 2.68 g·kg⁻¹)剂量均能减少哮喘豚鼠小气道周围 EOS 总数($P < 0.01$),延长豚鼠哮喘潜伏期($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**复方川贝颗粒对 OVA 介导的豚鼠过敏性哮喘模型的平喘作用机制与调节血清炎性介质和减少 EOS 浸润有关。

[关键词] 复方川贝颗粒; 过敏性哮喘; 豚鼠; 血栓素 B₂; 白三烯 B₄; 嗜酸性粒细胞; 卵白蛋白; 豚鼠哮喘潜伏期

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0228-04

[doi] 10.11653/syfy2013180228

Mechanism of Anti-asthmatic Function by Compound Chuanbei Granule in Ovalbumin-mediated Allergic Asthma Model of Guinea Pig

CHEN He, ZHANG Hui-ying, LIU He, DING Chun-xiao, GUO Zhen-wu,

LI Guo-xin, ZHANG Hui-zong, ZHANG Hong*

(Liaoning Institute of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-asthmatic mechanism of compound Chuanbei granules (CCB) in ovalbumin-mediated allergic asthma model of guinea pig. **Method:** Seventy guinea pigs were randomly divided into normal control, model, erchen pill (2.325 g·kg⁻¹), dexamethasone 9.30 × 10⁻⁴ g·kg⁻¹ and CCB granule 0.67, 1.34, 2.68 g·kg⁻¹ groups ($n = 10$). Each group of male and female ratio was 1:1. On the first day of the test, the guinea pigs were sensitized by intra-peritoneal injection of 10% ovalbumin (OVA) saline solution. 13 days after sensitization, corresponding drugs were given for 7 days, the model group and normal control group given distilled water, 15 days later excitation with 1% ovalbumin was carried out. After treating with the CCB granules, latent period of asthma was recorded, the amount of eosinophils (EOS) was detected, the content of thromboxane B₂ (TXB₂) and leukotriene B₄ (LTB₄) were examined. **Result:** Compared with normal control group, in model group guinea pig serum TXB₂, LTB₄ level was significantly increased ($P < 0.01$), the increased eosinophils were seen ($P < 0.01$). Compared with model group, the CCB granules 1.34, 2.68 g·kg⁻¹ could

[收稿日期] 20130329(010)

[第一作者] 陈贺, 硕士研究生, 助理研究员, 从事中药复方药理及毒理学研究, Tel:024-86803067, E-mail:chenhe19342656@163.com

[通讯作者] * 张宏, 研究员, 硕士生导师, 从事中药复方药理及毒理学研究, Tel:024-86803170, E-mail:zhanghong8163@126.com

reduce serum TXB₂, LTB₄ content ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The CCB granule 0.67, 1.34, 2.68 g·kg⁻¹ dose reduced the total number of eosinophils around the small airways of asthma guinea pig ($P < 0.01$); and prolong the incubation period of asthma guinea pig ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The CCB granules could play anti-asthmatic effects. The results suggest that its functional mechanism may be related to the serum inflammatory mediators.

[**Key words**] compound Chuanbei granules; allergic asthma; guinea pig; thromboxane B₂; leukotriene B₄; eosinophils; ovalbumin; incubation period of guinea pig asthma

研究表明过敏性哮喘是由多种炎症细胞和炎症介质参与的气道慢性炎症,其炎症细胞包括肥大细胞、嗜酸粒细胞(EOS)、T淋巴细胞、巨噬细胞等,而其中EOS是关键的效应细胞^[1]。白三烯是支气管哮喘发作中重要的炎症介质之一^[2]。白三烯 B₄(LTB₄)在哮喘发生发展过程中的多个环节起作用,血清 LTB₄ 测定为哮喘的诊断及疾病严重程度判断,提供了较好的实验室依据^[2]。血栓素 B₂(TXB₂)是血栓素 A₂(TXA₂)的降解产物。TXA₂ 的释放能促使支气管平滑肌细胞收缩,黏膜水肿而引起哮喘^[3]。因此,调控 TXA₂ 和减少 EOS 浸润是治疗过敏性哮喘的一个有效途径。本实验拟通过建立卵白蛋白为诱因的豚鼠过敏性哮喘模型,观察复方川贝颗粒对 EOS, LTB₄, TXA₂ 的干预作用,探讨复方川贝颗粒治疗过敏性哮喘的内在机制。

1 材料

1.1 动物 70 只健康 SPF 级 Hartley 豚鼠(雌雄各半),体重(185 ± 15)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物 复方川贝颗粒由川贝母、陈皮等药味组成,经水提醇沉工艺提取制成颗粒剂(每 1 g 颗粒含生药 5.10 g,批号 20120418);二陈丸(北京同仁堂制药有限公司,批号 2083038);醋酸地塞米松片(天津天药药业股份有限公司,批号 110444);生理盐水(青岛华仁药业股份有限公司,批号 H1108004)。

1.3 试剂 卵白蛋白(Albumin, Sigma 公司,批号 031M7008V);血栓素 B₂ 试剂盒(批号 201206);白三烯 B₄ 试剂盒(批号 201206),均由美国 RD 公司生产。

1.4 仪器 Spectra Max190 型光吸收酶标仪(美国 MD);TD5A-WS 型低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);YP5102 型电子天平(上海光正医疗仪器有限公司);YLS-8A 型多功能诱咳引喘仪(山东省科学院设备站);BH-2 型光学显微镜(Olympus),TK-C1381EG(A)型病理图像分析系统(中科恒业)。

2 方法

2.1 动物模型复制^[4-16] 参照文献方法并加以改进,实验第 1 天,正常对照组豚鼠腹腔注射生理盐水 1 mL,模型组和各给药组 ip 10% OVA 生理盐水溶液 1 mL 致敏。注射后第 15 天除正常对照组外将其余各组豚鼠逐个置于引喘仪中,雾化吸入 1% OVA 生理盐水溶液 5 ~ 15 s(激发至豚鼠出现烦躁不安、呼吸急促、点头、身体颤抖及伏地现象,提示造模成功,立即取出豚鼠),每天 1 次激发,共 5 次,正常对照组以生理盐水雾化代替。第 19 天各组称豚鼠体重,称重后给药,给药 30 min 后进行激发。

2.2 动物分组及给药 豚鼠按体重均衡随机分为 7 组,每组 10 只,雌雄各半,即哮喘模型组,复方川贝颗粒 0.67 g·kg⁻¹组,复方川贝颗粒 1.34 g·kg⁻¹组,复方川贝颗粒 2.68 g·kg⁻¹组,二陈丸 2.325 g·kg⁻¹组,地塞米松 9.30 × 10⁻⁴ g·kg⁻¹组,正常对照组。注射后第 13 天开始给药,各组 ig 给药 7 d;每日 1 次,自由饮食。

2.3 指标检测

2.3.1 豚鼠哮喘潜伏期及 TXB₂, LTB₄ 的含量测定 末次激发时记录豚鼠哮喘潜伏期,30 min 后,20% 乌拉坦 ip 6 mL·kg⁻¹麻醉,腹主动脉采血 4 mL,室温凝固 30 min,1 000 r·min⁻¹离心 15 min,收集血清,采用 ELISA 法检测血清中 TXB₂, LTB₄ 含量。

2.3.2 嗜酸粒细胞计数 取肺用 10% 甲醛溶液固定,HE 染色,使用病理图像分析系统进行嗜酸粒细胞计数(×400)。

2.4 统计学处理 实验数据使用 SPSS 11.5 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 豚鼠哮喘潜伏期, TXB₂, LTB₄ 含量 由表 1 可见哮喘模型组与正常对照组比较, TXB₂, LTB₄ 均显著升高($P < 0.01$),说明造模成功;与模型组比较,复方川贝颗粒(1.34, 2.68) g·kg⁻¹能降低哮喘豚鼠血清中 TXB₂, LTB₄ 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$),复方

川贝颗粒(0.67, 1.34, 2.68) g·kg⁻¹能够明显延长哮喘潜伏期($P < 0.01$)。

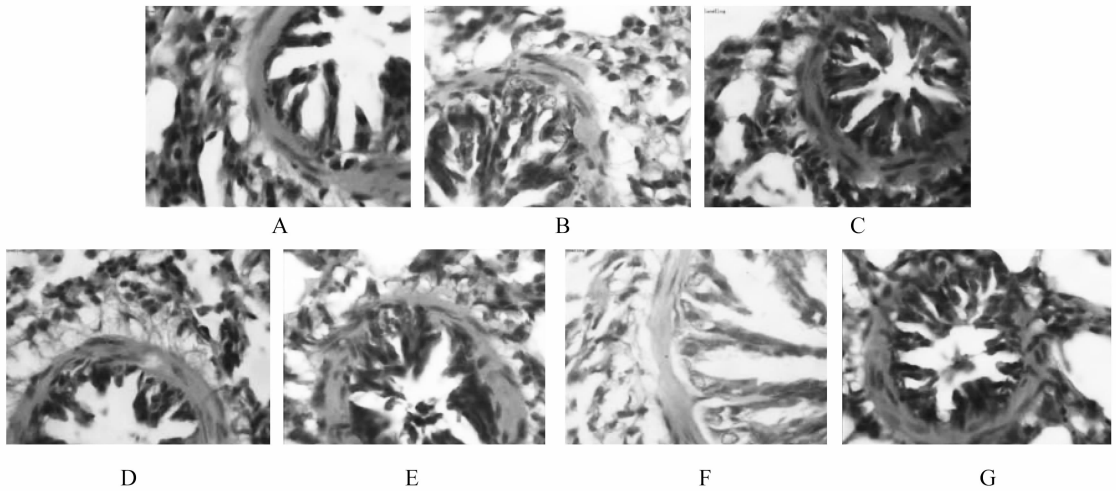
3.2 豚鼠肺组织病理形态学改变 由表 1 可见各组病理切片嗜酸粒细胞计数结果,哮喘模型组与正

常对照组比较($P < 0.01$),说明造模成功,与模型组比较,复方川贝颗粒低、中、高剂量组能降低嗜酸粒细胞数量($P < 0.01$)。模型组可见嗜酸性粒细胞明显增多,正常对照组偶见,其余各组均较少,见图 1。

表 1 复方川贝颗粒对 OVA 介导的豚鼠过敏性哮喘血清中 TXB₂, LTB₄ 含量及引喘潜伏期肺细胞,嗜酸性粒细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TXB ₂ /ng·L ⁻¹	LTB ₄ /ng·L ⁻¹	引喘潜伏期/s	嗜酸粒细胞/个
空白对照	-	58.12 ± 0.57	1 153.88 ± 11.74	-	2.26 ± 1.85
哮喘模型	-	59.51 ± 0.58 ²⁾	1 190.47 ± 14.62 ²⁾	10.4 ± 3.7	24.32 ± 8.82 ²⁾
复方川贝颗粒	0.67	59.22 ± 0.70	1 179.90 ± 15.83	15.4 ± 5.1 ³⁾	7.96 ± 4.00 ⁴⁾
	1.34	58.76 ± 0.76 ³⁾	1 171.21 ± 9.50 ⁴⁾	15.7 ± 4.6 ³⁾	6.20 ± 2.32 ⁴⁾
	2.68	58.86 ± 0.60 ³⁾	1 169.19 ± 10.28 ⁴⁾	16.5 ± 4.4 ⁴⁾	7.90 ± 3.18 ⁴⁾
二陈丸	2.325	58.59 ± 0.86 ³⁾	1 165.95 ± 11.63 ⁴⁾	14.5 ± 3.7 ³⁾	5.70 ± 2.50 ⁴⁾
醋酸地塞米松	9.30 × 10 ⁻⁴	58.08 ± 0.46 ⁴⁾	1161.35 ± 11.89 ⁴⁾	21.2 ± 6.7 ⁴⁾	6.10 ± 4.20 ⁴⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与哮喘模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。



A. 模型组; B. 复方川贝颗粒 0.67 g·kg⁻¹组; C. 复方川贝颗粒 1.34 g·kg⁻¹组; D. 复方川贝颗粒 2.68 g·kg⁻¹组;
E. 二陈丸 2.325 × g·kg⁻¹组; F. 地塞米松组 9.30 × 10⁻⁴ g·kg⁻¹组; G. 正常对照组

图 1 各组豚鼠肺组织病理形态学改变(HE, ×400)

4 讨论

豚鼠较容易致敏,能产生 I 型超敏反应,致敏后可诱发速发相及迟发相哮喘反应,适合制作过敏性哮喘动物模型,故豚鼠仍是目前应用较多的过敏性哮喘模型^[17]。而且豚鼠是最早采用的实验动物模型。优点:易致敏、能产生 I 型超敏反应,可诱发速发相哮喘反应及迟发相哮喘反应,是最早采用的哮喘动物模型,有逐步被大鼠和小鼠取代的趋势,但仍有其利用价值,更适于做人类气道药理学模型^[18]。OVA 是最为常用变应原,分为单纯和复合两种形式的致敏和诱导。常用氢氧化铝、百日咳杆菌、内毒素等作为佐剂乳化 OVA,多次经腹腔或皮下致敏后,再滴鼻或雾化吸入诱导^[18]。肺为娇脏,风邪上受,

首先犯肺,或协寒协热,以致肺失清宣,或化火、或生痰、或累及他脏则发为咳嗽。在现代医学中,引起咳嗽症状的疾病有上呼吸道感染、急性慢性支气管炎、变异性哮喘、各种肺炎等;其中过敏性哮喘日益成为一种多发疾病,过敏性哮喘是一种由 EOS、肥大细胞(MC)、T 细胞等多种炎症细胞参与的慢性气管炎症,是以气管变态性炎症(AAI)和气管高反应性(BHR)为特征性疾病。气道炎症细胞释放的各种活性物质导致患者气道损伤^[11]。白三烯是支气管哮喘发作中重要的炎症介质之一,LTB₄ 作为白三烯家族的成员之一,是目前已知最强的中性粒细胞趋化因子和活化因子之一,LTB₄ 在哮喘发生发展过程中的多个环节起作用,血清 LTB₄ 测定为哮喘的诊

断及疾病严重程度判断,提供了较好的实验室依据^[12];TXB₂是血栓素A₂(TXA₂)的降解产物。TXA₂能使气道平滑肌收缩,其代谢产物TXB₂还能使呼吸道对组胺等炎性介质的敏感性增高。TXA₂是目前所知的最强的小板聚集剂和气道平滑肌收缩剂之一。TXA₂的释放能促使支气管平滑肌细胞收缩,黏膜水肿而引起哮喘^[13]。复方川贝颗粒有确定的临床疗效,但治疗哮喘的作用机制尚不清楚,由试验结果可知:复方川贝颗粒对豚鼠哮喘模型发挥治疗作用的机制与减少嗜酸粒细胞浸润、降低血清中LTB₄和TXA₂含量有关。

[参考文献]

- [1] 罗世杰,郭亚雄,张玲,等.热喘平口服液对豚鼠哮喘模型血清炎性介质影响的实验研究[J].中医儿科杂志,2011,7(5):9.
- [2] 李怡文,杜帅,张艳军.慢性支气管炎及支气管哮喘动物模型复制的研究进展[J].临床肺科杂志,2008,13(11):1456.
- [3] 罗世杰,郭亚雄,张玲,等.热喘平口服液对豚鼠哮喘模型血清炎性介质影响的实验研究[J].中医儿科杂志,2011,7(5):9.
- [4] 郭亚雄,罗世杰,张玲,等.热喘平口服液对哮喘豚鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子影响的实验研究[J].中医儿科杂志,2011,7(4):21.
- [5] 罗世杰,唐志书,张玲,等.热喘平口服液对支气管哮喘豚鼠一氧化氮、肿瘤坏死因子- α 、超氧化物歧化酶及丙二醛的影响[J].河北中医,2011,33(4):589.
- [6] 徐巧萍,王砚,唐法娣,等.1,8-桉油精对卵白蛋白致哮喘豚鼠的气道高反应性和炎症的抑制作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2010,24(1):35.
- [7] 张於,戴爱国.柴朴汤对支气管哮喘豚鼠支气管肺组织中Bel-2表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):275.
- [8] 冯里,徐立,范欣生,等.三拗汤及类方挥发油对卵蛋白致敏哮喘豚鼠模型的效应评价[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(5):35.
- [9] 刘莉,李慧,孙学刚,等.“冬病夏治”方药穴位贴敷治疗哮喘豚鼠的尿液代谢组学研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):180.
- [10] 刚宏林,何志一,李鸿钟,等.玻璃苣醇提取物对实验性哮喘豚鼠平喘作用机制的研究[J].中医药信息,2011,28(6):32.
- [11] 文丹丹,王敏.麻杏石甘汤治疗咳嗽变异性哮喘的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(8):285.
- [12] 文丹丹,王敏.蝉蜕及其配伍治疗哮喘的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):242.
- [13] 黄臣虎,陆茵,高晓君,等.中药血清药理学研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):266.
- [14] 李颖华,李超乾.支气管哮喘动物模型的研究现状[J].中华哮喘杂志:电子版,2009,3(3):60.
- [15] 马萍,邢杰,闫玉文.过敏性支气管哮喘动物模型研究现状[J].武警医学院学报,2010,19(8):677.
- [16] 于鸿,计忠宇,赵辉,等.定喘汤对支气管哮喘大鼠气道重塑及嗜酸粒细胞的影响[J].中国中医急症,2011,20(9):1438.
- [17] 刘颖,顾秋枫,林月钰.儿童哮喘血清白三烯B₄浓度测定的临床研究[J].当代医学,2011,17(17):4.
- [18] 黄树红,陈淑敏,王桂英.支气管哮喘患者外周血ET-1、TXB₂水平变化及临床意义[J].临床肺科杂志,2012,17(4):622.

[责任编辑 聂淑琴]