

丹龙定喘汤对哮喘小鼠气道重塑及 MMP-9, TIMP-1 的影响

田金娜, 李建保, 刘小凡*

(成都中医药大学附属医院儿科, 成都 610072)

[摘要] 目的:研究丹龙定喘汤对哮喘小鼠气道重塑和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)的影响。方法:SPF级BALB/c小鼠56只随机分为正常组、模型组、地塞米松组、丹龙定喘汤组。卵蛋白(OVA)致敏激发小鼠制作哮喘气道重塑模型,在实验第41~69天,正常组、模型组以生理盐水灌胃,其余两组分别给予0.02%地塞米松雾化及ig生药丹龙定喘汤 $42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 治疗。实验结束后HE染色观察哮喘小鼠肺组织病理形态变化,采用ELISA法检测血清MMP-9、TIMP-1水平。结果:丹龙定喘汤能改善哮喘小鼠气道炎性细胞的浸润及支气管平滑肌的增厚;与正常组比较模型小鼠MMP-9、TIMP-1均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,西药组和丹龙定喘汤组MMP-9、TIMP-1水平明显降低($P < 0.01$),MMP-9/TIMP-1比值在两组明显增高($P < 0.05$),且两组间未见差异。结论:丹龙定喘汤能够抑制哮喘小鼠血清MMP-9、TIMP-1的分泌,改善哮喘小鼠气道重塑状态。

[关键词] 丹龙定喘汤;哮喘;气道重塑;基质金属蛋白酶-9;基质金属蛋白酶组织抑制剂-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0164-03

Effect of Danlong Dingchuan Decoction on Expressions of MMP-9, TIMP-1 and Airway Remodeling in Asthmatic Mice

TIAN Jin-na, LI Jian-bao, LIU Xiao-fan*

(Department of Pediatrics, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To Study the effect of Danlong Dingchuan decoction (DDD) on expressions of matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), tissue inhibitor-1 of metalloproteinase (TIMP-1) and airway remodeling in asthmatic mice. **Method:** Fifty six SPF BALB/c mice were randomly divided into normal group, model group, western medicine group and DDD group. The three groups except normal group were induced as asthmatic model in allergized mice with ovalbumin (OVA). During the 41-69 days in the experiment, the normal and model group were treated with normal saline. Meanwhile, the western medicine group and DDD group were respectively treated with dexamethasone and DDD. At the end of experiment, we observed the pathomorphological changes in lung tissues and took the sample blood to detect MMP-9 and TIMP-1 using ELISA. **Result:** The pathological changes in lung tissue showed that DDD can significantly reduce the infiltration of inflammatory cells and inhibit bronchial smooth muscle thicken. The level of MMP-9 were significantly increased except the normal group ($P < 0.05$), and TIMP-1 in lung tissue were increased in model group ($P < 0.01$). In western medicine group and DDD group, the content of MMP-9 and TIMP-1 were significantly decreased ($P < 0.01$), but the relative value of MMP-9 and TIMP-1 in the two groups were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** DDD can inhibit the secretion of MMP-9 and TIMP-1 which suppress airway remodeling in asthmatic mice.

[Key words] Danlong Dingchuan decoction; asthma; remodeling; MMP-9; TIMP-1

[收稿日期] 2011-10-24

[基金项目] 成都中医药大学校基金科研项目(ZRYB2007021)

[第一作者] 田金娜,博士,讲师,从事小儿呼吸系统疾病研究,Tel:13679031892,E-mail:zymet@126.com

[通讯作者] *刘小凡,教授,硕士,从事小儿呼吸系统疾病及哮喘病的防治研究,Tel:18908098111,E-mail:liuxf.2008@yahoo.com.cn

现代医学研究认为气道重塑与重症哮喘密切相关,并可出现在哮喘的各个时期^[1-2]。在生理情况下,基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)和其特异性抑制因子金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor-1 of metalloproteinase, TIMP-1)保持平衡状态。在哮喘中这种平衡状态被打破,可导致细胞外基质在气道壁沉积增多引起气道重塑。本研究在于探索丹龙定喘汤对哮喘小鼠气道重塑及 MMP-9, TIMP-1 的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 56 只, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购自四川大学医学动物中心, 动物许可证号 SCXK(川)-09-2009。

1.2 药物制备 丹龙定喘汤由丹参、地龙、当归、射干、法半夏、陈皮、款冬花、白芍、甘草等药物组成。使用前水煎分别浓缩成含生药 $4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液。

1.3 试剂及仪器 卵蛋白(OVA, 批号 038K7012), 美国 Sigma 公司生产; 小鼠 MMP-9, TIMP-1 ELISA 试剂盒, 购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 粤牌超声雾化器, 汕头市粤华医疗器械厂产品。

1.4 动物造模及治疗方法 将 56 只小鼠随机分为正常组、模型组、西药组、丹龙定喘汤组, 每组 14 只, 各组均普通喂养。

造模方法参照文献[3]: 实验第 0, 7, 14 天, 每只小鼠腹腔注射 0.01% OVA 致敏液 0.2 mL。21 d 后, 用 2.5% 的卵蛋白溶液雾化吸入激发哮喘, 1 次/d, 每次 30 min, 连续雾化器 7 d, 从 28 d 起改为隔日雾化, 再连续雾化 6 周, 正常组给予等量的生理盐水于相同部位注射和雾化吸入时间方法均同模型组。

实验第 41~69 天, 正常组和模型组在每天激发前 1 h 给予等容积生理盐水灌胃, 1 次/d; 西药组每天激发前予 0.02% 地塞米松雾化 30 min; 丹龙定喘汤组每日激发前给予生药量为 $42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的药液灌胃。

1.5 取材及检测方法

1.5.1 哮喘小鼠血清 MMP-9, TIMP-1 检测 各组小鼠分别于末次给药 24 h 内称重后麻醉, 采用眼球摘除术取血, 抗凝后以 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, ELISA 法测定血清 MMP-9, TIMP-1 含量。

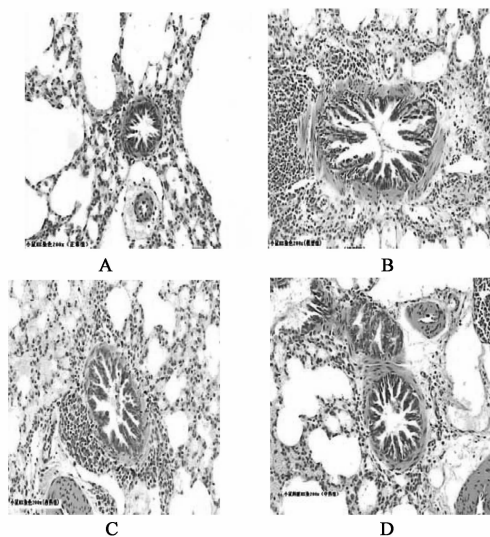
1.5.2 哮喘小鼠肺组织病理检测 各组小鼠眼球摘除取血后, 迅速打开胸腔, 取出小鼠整个肺脏, 用含 1% 肝素的无菌生理盐水快速冲洗肺血管床, 留取右肺肺组织, 置于 10% 甲醛加 95% 乙醇等量混合

液中固定用于病理检测。

1.6 统计方法 采用 SPSS 13.0 统计软件分析。所测数据均表示为 $\bar{x} \pm s$; 计量资料选用单因素方差分析, 方差齐时采用 LSD 法, 方差不齐时采用 Dunnett T3 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹龙定喘汤对哮喘小鼠支气管肺组织病理学的影响 与正常组比较, 其他各组支气管、血管周围结缔组织结构不清, 可见淋巴细胞、嗜酸性细胞等不同程度浸润, 气道平滑肌增厚, 气道上皮细胞坏死、脱落, 黏膜下水肿, 管腔狭窄, 肺泡壁增厚; 与模型组比较, 西药组及丹龙定喘汤组炎性细胞浸润、肺泡壁水肿及支气管平滑肌的增厚均有所改善, 见图 1。



A. 正常组(100×); B. 模型组(200×);

C. 西药组(200×); D. 丹龙定喘汤组(200×)

图1 丹龙定喘汤对哮喘小鼠支气管肺组织病理学的影响(HE染色)

2.2 各组哮喘小鼠血清 MMP-9, TIMP-1 的含量及二者比值变化 与正常组比较, 其他各组哮喘小鼠 MMP-9 均明显升高($P < 0.05$), 模型组 TIMP-1 增高($P < 0.01$); 与模型组比较, 西药组和丹龙定喘汤组 MMP-9, TIMP-1 水平明显降低($P < 0.01$), MMP-9/TIMP-1 明显增高($P < 0.05$), 且两组间未见差异, 见表 1。

3 讨论

祖国医学认为支气管哮喘属于“哮证”的范畴, 其反复发作的根本病理环节是“痰饮内伏”。现代医家根据中医“久病入络”、“久病必瘀”、“津血同源”、“痰瘀同源”等基础理论提出了哮喘痰瘀相关致病学说, 认为“痰瘀互结”是哮喘的主要发病机

表 1 丹龙定喘汤对各组哮喘小鼠血清 MMP-9, TIMP-1 的含量及比值的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-9 /ng·L ⁻¹	TIMP-1 /ng·L ⁻¹	MMP-9/TIMP-1
正常	10	47.79 ± 6.96 ^{4,5)}	44.29 ± 3.79 ⁴⁾	1.08 ± 0.17 ⁵⁾
模型	9	77.14 ± 10.99 ^{2,6)}	77.60 ± 2.28 ^{2,6)}	0.80 ± 1.40 ⁵⁾
地塞米松	9	55.90 ± 9.01 ^{1,4)}	43.50 ± 9.08 ⁴⁾	1.33 ± 0.35 ^{1,3)}
丹龙定喘汤	11	57.38 ± 6.53 ^{1,4)}	42.16 ± 5.37 ⁴⁾	1.39 ± 0.29 ^{1,3)}

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与模型组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01;与西药组比较⁵⁾P < 0.05, ⁶⁾P < 0.01。

制^[4-5]。丹龙定喘汤是刘小凡教授治疗小儿哮喘缓解期的经验方,由张景岳金水六君煎加味而成。本方针对哮喘“痰瘀互结”的病机,以丹参、地龙活血化瘀、通络平喘为君,中药药理研究表明^[6]:丹参对整体豚鼠实验性喘息有显著保护作用,其水提取物和甲醇提取物,均有抑制肺纤维化的作用;地龙则有显著的舒张支气管作用。法半夏、陈皮、茯苓、紫菀等药健脾化痰、降气平喘为臣,该组药物具有不同程度的镇咳祛痰作用。配以当归、熟地黄、白芍等滋阴养血,调和血脉为佐使,白芍与甘草合用则有平喘和抗过敏作用,二者又都有抗炎和免疫调节作用,具有改善毛细血管的通透性,减少炎症渗出,以及增强机体免疫功能的作用。故此,全方共奏活血化瘀、祛痰平喘等功效。

MMPs 是调节细胞外基质代谢的主要限速酶,在多种生理病理过程中发挥重要作用,所有 MMPs 中,MMP-9 和哮喘关系最密切。MMP-9 可降解 IV 型胶原、纤维连接蛋白、层黏连蛋白等,对基质起破坏作用。TIMP-1 是 MMP-9 的特异性抑制剂,可通过抑制 MMP-9 的活性而保护气管基质蛋白不被降解,二者共同维持着正常基质和机体内环境的稳定,而 MMP-9 及 TIMP-1 水平的异常及比例失调在哮喘气道重塑中发挥重要作用,并与气道重塑的严重程度密切相关^[7]。正常情况下 MMP-9, TIMP-1 是以 1:1 的比例一起释放的,支气管哮喘时肺组织 MMP-9 异常升高,可降解生长因子前体的某些肽段而使其成为具有活性的生长因子,促进上皮成纤维细胞的增殖、活化,导致胶原纤维大量增生,促进气道重塑的形成;哮喘时 TIMP-1 也异常升高,可加重细胞外基质在气道内沉积,干扰组织修复,促使上皮纤维化,二者在哮喘气道重塑的病理过程中发挥重要

作用^[7-8]。

本实验研究表明,丹龙定喘汤与地塞米松可以明显降低哮喘小鼠血清 MMP-9 及 TIMP-1 的含量,并且同时打破了 MMP-9/TIMP-1 平衡状态,与现有文献报道有一定的差异^[8-9]。本实验哮喘小鼠肺组织病理检测显示两组药物都可以抑制哮喘小鼠支气管周围嗜酸性粒细胞及其他炎性细胞浸润,抑制气道壁及气道平滑肌层的增厚,从而改善哮喘小鼠气道重塑的病理过程。哮喘气道重塑是一个复杂的病理生理过程,丹龙定喘汤除抑制 MMP-9, TIMP-1 表达参与影响哮喘气道重塑过程外,其他作用机制值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Benayoun L, Druilhe A, Dombret M C, et al. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma[J]. Am J respir Crit Care Med, 2003, 167:1360.
- [2] James A. Airway remodeling in asthma[J]. Curr Opin Pulm Med, 2005, 11: 1.
- [3] Temelkovski J, Hogan S P, Shepherd D P, et al. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolized allergen[J]. Thorax, 1998, 53:849.
- [4] 廖世才. 小儿哮喘活血化瘀法治疗体会[J]. 江西中医药, 1997, 28(6):33.
- [5] 洪霞, 廖宝军. 从痰瘀论治小儿哮喘 116 例分析[J]. 陕西中医函授, 2000, 20(5):41.
- [6] 王琦, 许德金, 许爱兰, 等. 上海丹参片治疗支气管哮喘的临床及实验研究[J]. 实用中西医结合杂志, 1998, 11(2):104.
- [7] 王光辉, 金发光, 楚东岭, 等. 哮喘豚鼠气道重构中基质金属蛋白酶-9 及抑制物 TIMP-1 的表达[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(14):1259.
- [8] Atkinson J J, Senior R M. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 162:1157.
- [9] Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, et al. Sputum matrix metalloproteinase-9:tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in acute asthma[J]. Allergy Clin Immunol, 2000, 105(5):900.

[责任编辑 聂淑琴]