

小儿止咳颗粒对哮喘大鼠气道高反应性和炎症的抑制作用

温丽娜, 孙建宁*, 张硕峰
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:探讨小儿止咳颗粒对哮喘大鼠气道高反应性的改善作用及其机制。方法:大鼠第 0,8 天 sc 及 ip 给予 1 mL 含卵蛋白(OVA)100 mg 的氢氧化铝凝胶和 1 mL 含卡介苗 3 mg 的生理盐水致敏,第 15 天开始以 OVA 攻击制备哮喘模型,同时 ig 给予小儿止咳颗粒高、中、低剂量(15.7, 7.85, 3.925 g·kg⁻¹)。第 22 天测定大鼠气道阻力、血清中高迁移率族蛋白 B-1(HMGB-1),肺匀浆中免疫球蛋白 E(IgE),白介素-4(IL-4),白介素-13(IL-13)的含量。结果:小儿止咳颗粒高、中、低剂量均可明显抑制引喘后 20,30,40,60 s 大鼠气道所需正压力的上升(与模型组相比较 $P < 0.01$);小儿止咳颗粒各剂量组可明显抑制血清 HMGB-1 及肺匀浆 IgE 含量的增高($P < 0.05, P < 0.01$);小儿止咳颗粒高、中剂量可以明显抑制肺匀浆 IL-13, IL-4 含量的增高($P < 0.01$)。结论:小儿止咳颗粒可以通过抑制炎症介质、细胞因子含量的增高降低哮喘大鼠的气道高反应性,从而治疗小儿上呼吸道感染后咳嗽。

[关键词] 小儿止咳颗粒;气道高反应性;炎症

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0192-04

Inhibitory Effects of Xiaoer Zhike Granule on Ovalbumin-induced Lung Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Asthmatic Rats

WEN Li-na, SUN Jian-ning*, ZHANG Shuo-feng

(Department of Pharmacology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Xiaoer Zhike Granule on airway hyperresponsiveness and inflammation in asthmatic rats. **Method:** The rat model was performed by intraperitoneal injection of 1 mL Al(OH)₃ gel containing OVA 100 mg and 1 mL NS containing BCG vaccine 3 mg. The rats were constructed by immunization of intraperitoneal injection on the 0 day and the 7th day, and the experiment was performed on the 15th day, while giving Xiaoer Zhike Granule high, medium and low doses (15.7, 7.85, 3.925 g·kg⁻¹ respectively). On the 22th day airway resistance rats was tested. The content of serum HMGB-1 and IgE, IL-4, IL-13 in lung homogenate were determined. **Result:** Xiaoer Zhike Granule at high, medium and low doses could inhibit airway pressure in rats ($P < 0.01$), it could inhibit the increasing in serum HMGB-1 and lung homogenate IgE content ($P < 0.05, 0.01$). The high and medium doses could inhibit the content increasing of lung homogenate IL-13, IL-4 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Xiaoer Zhike Granule can lower airway responsiveness in asthma rats by inhibiting inflammation, cytokine content, so that it can treat pediatric coughing after upper respiratory tract infection.

[Key words] Xiaoer Zhike Granule; airway hyperresponsiveness; inflammation

小儿上呼吸道感染后咳嗽是指患儿感冒好转后遗留咳嗽久而不愈,又称感冒后咳嗽。一般认为其

发病机制与感冒无关,而与气道高反应性(AHR)密切相关^[1]。气道炎症可以诱导气道平滑肌收缩,使

[收稿日期] 20100602(001)

[第一作者] 温丽娜,在读硕士生, E-mail: can858@163.com

[通讯作者] *孙建宁,教授,博士生导师,国家药典委员会委员, Tel: 010-84738627, E-mail: jn_sun@sina.com

气道敏感性增强、反应性增高,是 AHR 发生发展的重要因素,其中 IL-13 是引起 AHR 的决定性因素^[2-3]。此外,气道上皮损伤、神经功能紊乱、气道重建等因素亦可加重 AHR。

小儿止咳颗粒由黄芪、金荞麦等中药组成,具有清肺化痰,止咳利咽的功能。该药是以临床疗效为基础,由中医经验方开发而成的中成药,专门用于小儿上呼吸道感染后咳嗽的治疗。本研究从肺功能的角度验证其对哮喘大鼠气道高反应性的影响,同时考察其对气道炎症相关指标的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂 小儿止咳颗粒 由北京创立科创医药技术开发有限公司提供,0.21 g 膏粉/1 g 生药;醋酸地塞米松片:天津太平洋制药有限公司产品。批号 070404;氢氧化铝(AR):国药集团化学试剂有限公司,批号 080428;鸡卵白蛋白(OVA):美国 Sigma 公司产品,批号 0842;Ach:Sigma 公司产品,批号 0822;组胺:中科院上海化学研究所产品,批号 771158;灭活百日咳杆菌菌苗:中国药品生物制品检定所,批号 20080630;IgE ELISA 试剂盒:上海森雄公司,批号 091128;HMGB-1 ELISA 试剂盒:美国 Ever 公司,批号 091202;考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒:南京建成生物工程研究所,批号 20091110。

1.2 动物 SD 大鼠,雌雄各半,100~120 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2006-0009。

1.3 仪器 A02AI 超声波雾化器:上海鱼跃医疗设备有限公司产品;TOPO 呼吸机:美国 KENT 公司产品;MP150 多导生理记录仪:美国 BIOPAC 公司产品;DENLEY DRAGON WellScan MK 酶标仪,Wellwash 4 MK2 洗板机:均为 Thermo 公司产品(芬兰);PYX-DHS 型数字显示隔水式电热恒温培养箱:上海跃进医疗器械厂产品;TGL-168 型离心机:上海安亭科学仪器厂产品。

2 方法

2.1 分组及给药 将大鼠随机分为 6 组,每组 10 只(雌雄各半),即空白组,小儿止咳颗粒 15.7, 7.85, 3.925 g·kg⁻¹剂量组(按生药计算),醋酸地塞米松组,模型组。于第 2 次致敏后开始 ig 给予相应药物,正常组及模型组大鼠均 ig 以等量饮用水 10 mL·kg⁻¹体重,共 14 d。

2.2 造模方法 除正常组外,各组分别于第 1, 8 d

用新鲜配制的卵蛋白 100 mg + 氢氧化铝 200 mg + 生理盐水 1 mL 混悬液在大鼠两侧腹股沟、前足跖 4 点做 sc 注射,每点 0.2 mL, ip 注射 0.2 mL,同时 ip 注射卡介苗 1 mL(3 g·L⁻¹)。在实验第 15~21 天每天 ig 后分批将致敏的大鼠置于密闭容器内,给予 1% 卵蛋白生理盐水进行超声雾化吸入 30 min·d⁻¹,雾化流量为 3 mL·min⁻¹,连续 7 d,以激发哮喘。正常组以等量生理盐水进行 sc, ip 和雾化,方法同上。各组除施加以上药物因素处理外其日常饲养方法均相同,可以自由进食常规大鼠饲料和水。第 22 天处死大鼠。

2.3 气道阻力的测定 用生理盐水配制成 0.25% Ach + 0.4% 组胺溶液,即为引喘物。用 10% 水合氯醛 350 mg·kg⁻¹ ip 将大鼠麻醉,背位固定,将 Y 形导管插入大鼠气管。在大鼠左右胸腔下角剪开皮肤肌肉,造成气胸。并同时开启呼吸机,采取定容模式(即通过正压将预定的通气量送入呼吸道或肺内,并将压力控制在一定范围内,但当预定的通气量达到后,机械通气机才停止供气,气流中断,呼气阀打开,肺和胸廓萎陷,产生呼气。通过调节通气量,呼吸频率以及吸气比率来控制动物吸气的容量),呼吸频率 80 次/min,吸气比率 40%,调节通气量使最大正压值在 15 cm H₂O 左右。连接 MP150 多导生理记录仪,记录压力变化信号。待动物吸气压力稳定后,将引喘物经大鼠股静脉 iv 2 mL·kg⁻¹体重引喘。记录引喘后大鼠 10 min 内吸气压力变化情况。取引喘前、引喘后 20, 30, 40, 60, 120, 180, 300, 600 s 各组大鼠吸气压力值,计算引喘前后吸气压力变化率的均值及标准差。

2.4 血清 HMGB-1 及肺匀浆 IgE, IL-13, IL-4 含量的测定 第 22 天,测定气道阻力后,腹主动脉取血,室温静置 2 h,于 3 000 r·min⁻¹离心 20 min,取上清液,即为血清。称取左肺,加入 9 倍量生理盐水配制成 10% 的匀浆,于 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液。分别将血清及肺匀浆样品于 -20℃ 条件下冻存,备用。ELISA 法测定血清 HMGB-1 及肺匀浆 IgE, IL-13, IL-4 的含量。按照考马斯亮蓝法蛋白定量试剂盒说明书测定样品中蛋白含量,结果以每毫克蛋白所含细胞因子皮克数表示。

2.5 统计学分析 实验数据用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,各组数据进行单因素方差分析,组间比较方差齐者用 LSD 检验,不齐者用 Dunnett's T3 检

验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 小儿止咳颗粒对气道高反应大鼠模型气道阻力的影响 大鼠使用乙酰胆碱组胺引喘后, 在固定呼吸频率, 吸气比率的情况下, 将定量空气压入大鼠肺内所需压力明显上升, 持续时间超过 120 s, 表明大鼠支气管平滑肌收缩, 肺通气阻力上升。小儿止咳颗粒预防及治疗给药, 高、中、低剂量均可明显抑制引喘后 20, 30, 40, 60 s 大鼠气道所需正压力的上升(与模型组相比较 $P < 0.01$), 表明小儿止咳颗粒可对抗乙酰胆碱组胺所致大鼠支气管平滑肌的收缩, 使肺通气阻力下降, 具有明显的抑制大鼠呼吸阻力增加的作用, 但是作用弱于地塞米松(与模型组相比较 $P < 0.05, P < 0.01$), 结果见图 1。

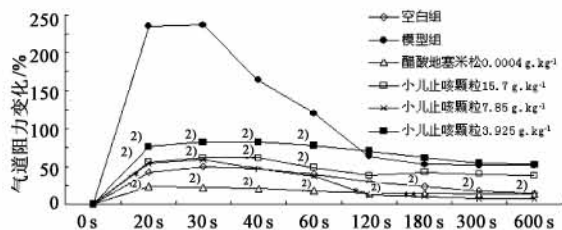


图 1 小儿止咳颗粒对哮喘大鼠气道阻力的影响
与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

3.2 小儿止咳颗粒对气道高反应大鼠模型 HMGB-1 及 IgE, IL-4, IL-13 的影响 卵蛋白致敏引喘后, 同空白组比较, 大鼠血清中 HMGB-1, 肺匀浆中 IgE, IL-13, IL-4 的含量明显增高 ($P < 0.01$); 同模型组比较, 小儿止咳颗粒各剂量组可明显抑制血清 HMGB-1 及肺匀浆 IgE 含量的增高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 小儿止咳颗粒高、中剂量可以明显抑制肺匀浆 IL-13, IL-4 含量的增高 ($P < 0.01$)。见表 1 ~ 2。

表 1 小儿止咳颗粒对哮喘大鼠 HMGB-1, IgE 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	HMGB-1 /pg·mg ⁻¹	IgE /pg·mg ⁻¹
空白	-	1.94 ± 0.39 ²⁾	5.24 ± 2.84 ²⁾
模型	-	3.84 ± 2.46	13.51 ± 1.80
小儿止咳颗粒	15.7	2.20 ± 0.50 ²⁾	4.23 ± 1.05 ²⁾
	7.85	1.91 ± 0.34 ²⁾	5.54 ± 1.05 ²⁾
	3.925	2.56 ± 1.14 ¹⁾	5.77 ± 2.92 ²⁾
醋酸地塞米松	0.000 4	2.04 ± 0.41 ²⁾	7.78 ± 3.40 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 小儿止咳颗粒对哮喘大鼠 IL-4, IL-13

含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-4 /pg·mg ⁻¹	IL-13 /pg·mg ⁻¹
空白	-	8.99 ± 4.46 ²⁾	43.57 ± 3.16 ²⁾
模型	-	30.27 ± 12.13	66.66 ± 6.09
小儿止咳颗粒	15.7	13.75 ± 6.01 ²⁾	54.50 ± 5.93 ²⁾
	7.85	16.72 ± 3.71 ²⁾	57.69 ± 6.75 ²⁾
	3.925	25.52 ± 9.48	60.53 ± 12.75
醋酸地塞米松	0.000 4	20.76 ± 9.24 ¹⁾	53.83 ± 9.72 ²⁾

4 讨论

气道高反应性 (AHR) 是指气道对正常不引起或仅引起轻度应答反应的非抗原性刺激物出现过度的气道收缩反应。AHR 引起气道狭窄和气道阻力增加, 从而引发咳嗽、胸闷和喘息等症状。AHR 常有家族倾向, 受遗传因素影响, 但外因性的作用更为重要。目前普遍认为气道炎症是导致气道高反应性的重要机制之一。

气道炎症包括变应性因素与非变应性因素^[4]。IgE 可以介导变应性炎症; 呼吸道病毒、细菌感染、某些非过敏性抗体 (如 IgG4)、非过敏性介质 (如补体)、渗透压改变等物理因素、药物刺激等化学因素可介导非变应性炎症, 激活肥大细胞, 从而改变气道反应性。气道炎症可导致气道平滑肌呈易激性, 引起气道反应性增高。气道渗出增加、黏膜水肿、腺体分泌亢进、上皮损伤等其他气道炎症的变化可加剧气道高反应性。

IL-13 在 AHR 的发生过程中起决定性作用。研究表明, 引入外源性 IL-13 可直接引起 AHR 的途径, 但是如果 IL-13 缺失, 则 ARH 不能产生^[2-3]。IL-13 可激活趋化因子, 诱导和加重呼吸道炎症。IL-13 直接作用于气道平滑肌细胞, 可以在没有气道炎症的情况下诱发 AHR。IL-13 能引起呼吸道杯状细胞增生及黏液过度分泌^[3], 参与维持气道黏膜 Th2 细胞因子的表达, 促进嗜酸性粒细胞聚集, 诱导 5-脂加氧酶的表达, 从而导致半胱氨酰白三烯的增加, 提高气道反应性^[5]。此外, IL-13 能直接刺激成纤维细胞活化、增殖, 在呼吸道重塑中发挥作用。因此抑制 IL-13 含量的增加或其受体的表达可以降低 AHR。

IL-13 能够促进 B 细胞分化, 减少凋亡并诱导 B 细胞合成过多的 IgE。IgE 结合许多效应细胞表面的受体, 引起炎性介质的释放, 从而增强黏液分泌,

引发 AHR。

IL-4 对 ARH 的产生也具有重要作用^[6-7]。IL-4 可以促进血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)、P-选择素等多种黏附因子的表达,加速嗜酸性粒细胞的黏附和渗出,趋化 EOS 的浸润, EOS 释放的因子能够引起气道黏液分泌增多,微血管通透性增加,黏膜水肿和气道平滑肌收缩,促进 AHR 的生成。因此有效抑制 IL-4 的含量也可抑制 AHR 的形成。

HMGB-1 作为晚期炎症介质参与了多种炎症性疾病的发生发展过程。巨噬细胞、单核细胞、垂体细胞受内毒素, IL-2, TNF- α 刺激后均能释放 HMGB-1, HMGB-1 也可刺激单核细胞释放致炎因子,如 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β 等^[8], 引发气道炎症。

本研究证实小儿止咳颗粒预防及治疗给药可对抗乙酰胆碱组胺所致大鼠支气管平滑肌的收缩,使肺通气阻力下降,明显的抑制大鼠呼吸道阻力的增加,为小儿止咳颗粒治疗小儿上呼吸道感染后咳嗽提供了依据。同时小儿止咳颗粒各剂量组可明显抑制肺匀浆中 IL-13, IL-4, IgE 含量的增加,说明小儿止咳颗粒是通过干预炎症免疫网络来降低 AHR 的,从而有效的治疗小儿上呼吸道感染后咳嗽。实验结果还证实小儿止咳颗粒对晚期炎症介质 HMGB-1 亦有抑制作用,但这是否是其发挥镇咳作用的机制之一,还有待于其他实验进一步研究。

[参考文献]

- [1] 黄秋芳. 小儿感染后咳嗽的发病机理及治疗进展[J]. 中国药业, 2009, 18(15): 84.
- [2] David M. Walter J J, McIntire G B, et al. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity[J]. J Immunol, 2001, 167(8): 4668.
- [3] Morcillo E J, Cortijo J. Mucus and MUC in asthma[J]. Curr Opin Pulm Med, 2006, 12(1): 1.
- [4] 李明华, 殷凯生, 蔡映云. 哮喘病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 128.
- [5] 吴为群, 江宏志, 吴忠道, 等. 血清白细胞介素 IL-13, 17 与气道高反应性的关系[J]. 热带医学杂志, 2004, 4(5): 539.
- [6] To Y, Dohi M, Tanaka R, et al. Early inter Leuk in 4-dependent response can induce airway hyperreactivity before development of airway inflammation in a mouse model of asthma[J]. Lab Invest, 2001, 81(10): 1385.
- [7] Monique S, Jean L B, Boris Vargaftig. Granulocyte depletion and dexamethasone differentially modulate airways hyperre activity, inflammation, mucus accumulation and secretion induced by rm IL-13 or antigen [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 26(1): 74.
- [8] 姚咏明, 盛志勇. 高迁移率族蛋白-1 在脓毒症发病中的作用和意义[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(9): 752.

[责任编辑 聂淑琴]