

复方辛夷口服液对实验性哮喘豚鼠气道炎症的影响

范欣生¹, 方泰惠², 徐立², 余晶华³, 项晓人⁴, 朱海青⁵

(1 南京中医药大学基础医学院, 江苏 南京 210029; 2 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029

3 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029;

4 南京中医药大学江苏省针药结合重点实验室, 江苏 南京 210029;

5 南京脑科医院, 江苏 南京)

摘要: 目的: 观察中药疏风宣肺、利气平喘的复方辛夷口服液对实验性支气管哮喘豚鼠气道炎症的作用, 并探讨其作用机理。方法: 采用卵蛋白(OA)致敏豚鼠哮喘模型, 60 只豚鼠随机分为 6 组, 空白组、模型组、阳性对照组、中药 3 个剂量组, 分别观察引喘时间、肺组织病理学、支气管肺灌洗液(BALF)中嗜酸细胞(EOS)数目和凋亡情况。结果: 复方辛夷口服液 3 个剂量组均能延长豚鼠引喘潜伏期, 与模型组比较差异非常显著($P < 0.01$); 模型组 BALF 细胞计数 EOS 量显著增高, 中药组各剂量组 BALF 中 EOS 数均少于哮喘组($P < 0.05 \sim 0.01$)。模型组支气管黏膜轻度水肿, 部分支气管内皱褶减少伴部分上皮脱落, 支气管壁、管周及肺泡区见炎细胞浸润, 其中较多嗜酸细胞浸润, 支气管壁增厚; 电镜见模型组细支气管破坏, 肺泡 II 型细胞变性, 肺泡内 EOS 浸润。中药各剂量组以上改变显著较轻, 见 BALF 中 EOS 凋亡。结论: 疏风宣肺、利气平喘可以减轻哮喘的气道炎症, 其作用与抑制嗜酸细胞浸润、促进嗜酸细胞凋亡有关。

关键词: 疏风宣肺; 利气平喘; 哮喘; 豚鼠; 气道炎症; 复方辛夷

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2005)06-0058-03

疏风宣肺、利气平喘是临床治疗支气管哮喘的重要治法之一, 本课题组前期已经报道了疏风宣肺、利气平喘中药具有平喘作用和调控对血清及痰液中相关细胞因子的效应^[1,2], 本实验观察了该法组方的复方辛夷口服液对小气道炎症病变的影响, 试图对其临床效应途径作一定的阐明。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品及试剂 复方辛夷口服液: 南京中医药大学海洋药物研究中心制剂研究室提供, 浸膏 14g 生药/1.2g/mL, 药物组成为辛夷、炙麻黄、杏仁、甘草等, 该制剂制备工艺见参考文献[3]。阳性对照药: 博利康尼: 阿斯特拉(无锡)制药有限公司, 批号: 200101005。致敏剂: 卵蛋白(OA), 上海伯奥生物科技有限公司, 批号: 20010402。

1.1.2 动物 豚鼠(250±30)g, ♂♀各半, 南京中医药大学实验动物中心提供。苏动(质): 97003。

1.1.3 仪器 CMIAS98A 图像分析仪, 北京航空航天大学生产。电镜 JEM1200 EM 型, OLYMPUS。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 取筛选合格的模型豚鼠随机分为 6 组, ①空白组; ②模型组; ③博利康尼组: 0.43mg·kg⁻¹; ④复方辛夷大剂量组: 生药 20g·kg⁻¹; ⑤复方辛夷中剂量组: 生药 10g·kg⁻¹; ⑥复方辛夷小剂量组: 生药 5g·kg⁻¹。用 10% 卵蛋白(OA) 1.0mL 豚鼠腹腔注射, 于 d(15、16、17) 分别以 1% 卵蛋白(OA) 给豚鼠雾化吸入引喘, 喷雾 20s, 测定引喘潜伏期(喷雾开始至豚鼠出现抽搐跌倒的时间)。于第 17d 引喘后分组给药, 每天 1 次, 共 5d。于第 22d 最后一次给药 30min 后, 同上法进行引喘, 再次测定各豚鼠的引喘潜伏期, (若豚鼠在 5min 内无抽搐跌倒反应, 以 300s 计), 并作各项指标观察^[4]。

1.2.2 组织标本留取 第 22d 激发后, 用 2% 戊巴比妥腹腔注射(40mg/kg) 麻醉后, 取右肺灌洗, 每次 3mL 生理盐水(37℃) 留置 2min, 轻轻按摩动物的胸部 20~30s 后抽出, 回收 BALF, 重复 3 次, 回收率大于 90%。将 BALF 以 1500r/min 离心 10min, 固定、染色后进行细胞分类计数。激发实验后结束处死动

收稿日期: 2004-11-22

基金项目: 江苏省科技厅应用基础项目(No: BJ99074); 江苏省教育厅自然科学基金(No: 01KJB360007)

通讯作者: 范欣生, Tel: (025) 51998306, E-mail: famxsh@njutcm.edu.cn

物,分离肺及其支气管,10%福尔马林固定、取材、脱水、石蜡包埋。切片经 HE 染色,光学显微镜观察。每组动物中随机选取 2 只,取右肺中叶置 2%戊二醛中固定,行电镜观察。收集 BALF 沉淀细胞,固定于戊二醛中,行电镜观察。

1.2.3 图像分析系统观察 分别观察每个标本管径为 100~200 μ m 的细支气管及周围肺泡区 5 个视野($\times 400$)的改变,经图像分析系统计算浸润的 EOS 数。

1.2.4 统计学处理 各组结果以($\bar{x} \pm s$)表示,数据以 SPSS 统计分析。组间比较 *t* 检验。

2 结果

2.1 致敏豚鼠模型的引喘潜伏期变化 复方辛夷 3 个剂量组及西药组均能延长豚鼠引喘潜伏期,与模型组比较差异非常显著 $P < 0.01 \sim 0.05$,提示中药各剂量组对致敏豚鼠哮喘具有平喘作用。结果见表 1。

表 1 复方辛夷口服液对卵蛋白致敏豚鼠哮喘潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量($g \cdot kg^{-1}$)	引喘潜伏期/s
空白组	—	297.588 \pm 33.42 ²⁾
模型组	—	143.33 \pm 88.02
阳性药组	0.43	284.50 \pm 75.27 ²⁾
复方辛夷口服液大剂量	20	267.50 \pm 60.18 ¹⁾
复方辛夷口服液中剂量	10	269.11 \pm 57.94 ¹⁾
复方辛夷口服液小剂量	5	232.00 \pm 85.16 ¹⁾

与模型比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。(下同)。

2.2 哮喘豚鼠 BALF 中 EOS 水平的变化 各组肺泡灌洗液 EOS 细胞计数显示,空白对照组 BALF 中 EOS 中细胞很少,模型组肺泡灌洗液中 EOS 计数显著增高,与空白对照组比($P < 0.01$)。治疗各组肺灌洗液中 EOS 数比空白组增多,但均较模型组降低($P < 0.05$)。提示中药可以减少 EOS 浸润。结果见表 2。

表 2 复方辛夷口服液对气管洗出液中 EOS 水平影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量($g \cdot kg^{-1}$)	EOS/ $10^5 mL^{-1}$	EOS%
空白组	—	8.47 \pm 4.46 ²⁾	6.25 \pm 2.62 ²⁾
模型组	—	41.57 \pm 12.97	34.54 \pm 5.82
阳性药组	0.43	12.62 \pm 6.12 ²⁾	20.17 \pm 5.56 ¹⁾
复方辛夷口服液大剂量	20	28.28 \pm 7.67 ¹⁾	23.16 \pm 6.30 ¹⁾
复方辛夷口服液中剂量	10	21.11 \pm 5.75 ²⁾	24.60 \pm 3.10 ¹⁾
复方辛夷口服液小剂量	5	22.77 \pm 7.90 ¹⁾	23.16 \pm 3.30 ¹⁾

2.3 病理组织学观察

2.3.1 HE 染色观察 模型组肺泡内见有炎细胞;支气管黏膜水肿,部分支气管内皱褶减少伴部分上皮脱落,支气管壁及管周见炎细胞浸润,其中较多 EOS 浸润;支气管壁增厚。阳性对照组可见肺泡内见有少量炎细胞,部分支气管黏膜轻度水肿,部分支气管内皱褶减少伴部分上皮脱落,支气管周围 EOS 浸润不明显。中药各剂量组肺泡内见有少量炎细胞,部分支气管黏膜轻度水肿,部分支气管内皱褶减少伴部分上皮脱落,支气管周围嗜酸细胞浸润不明显。

2.3.2 电镜观察 电镜显示,哮喘模型组动物细支气管病变符合哮喘气道炎症病理学改变。哮喘模型组豚鼠细支气管管腔狭窄,EOS 浸润,可见 EOS 脱颗粒,颗粒中有特异性结晶核。肺泡隔增厚,细胞成分增多(包括成纤维细胞、肺泡巨噬细胞和炎性细胞),基底膜增厚、水肿,肺泡 II 型上皮肿胀,板层体排空,部分肺泡 II 型上皮细胞脱落于肺泡腔内。治疗各组病变较模型组减轻,嗜酸粒细胞浸润较模型组减少;BALF 中见嗜酸性细胞凋亡的形态改变,凋亡细胞核发生固缩,染色质边集,凋亡小体形成。

2.3.3 嗜酸细胞浸润图像分析 哮喘模型组细支气管 EOS 浸润显著增多,与空白组比较有显著性差异($P < 0.01$),阳性药组和各中药组 EOS 的浸润量与空白组比较明显升高,但较模型组有明显降低,组间比较有显著性差异($P < 0.01 \sim 0.05$),说明中药各剂量组均具有抑制嗜酸细胞浸润的作用。结果见表 3。

表 3 复方辛夷口服液对细支气管嗜酸细胞浸润的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量($g \cdot kg^{-1}$)	Eos/5 个视野
空白组	—	1.00 \pm 1.03 ²⁾
模型组	—	20.11 \pm 7.38
阳性药组	0.43	5.80 \pm 3.22 ^{2,3)}
复方辛夷口服液大剂量	20	8.88 \pm 3.65 ^{1,3)}
复方辛夷口服液中剂量	10	4.49 \pm 2.06 ^{2,3)}
复方辛夷口服液小剂量	5	5.64 \pm 2.47 ^{2,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与正常组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

疏风宣肺、祛痰利气是哮喘发时治标的重要治

法,宣肺平喘方药是目前临床常用有效方的配伍核心部分之一。本课题组以疏风宣肺、祛痰利气立法,由三拗汤加味,其中麻黄宣肺平喘,杏仁降气化痰,甘草和药,协同麻、杏利气祛痰;方中辛夷,味辛温,入肺胃经,本方取其性浮而散之功,《玉揪药解》称其“泻肺降逆,利气破壅”,诸药相配,共奏疏风宣肺,利气平喘之功。我们观察了复方辛夷口服液对哮喘支气管炎症的影响,试图为其作用途径给予探讨和一定的阐释。

目前认为支气管哮喘(简称哮喘)是由多种细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、气道上皮细胞等)和细胞组份参与的气道慢性炎症性疾病^[4]。以肺部可逆性气流阻塞、气道黏膜炎症和气道高反应性为特征。本课题采用豚鼠卵蛋白(OA)激发模型,观察复方辛夷口服液对该模型干预效应,实验结果表明,复方辛夷口服液 3 个剂量组均能延长致敏豚鼠引喘潜伏期,与模型组比较差异非常显著($P < 0.01$),与阳性对照组比无显著性差异($P > 0.05$),提示复方辛夷具有良好的抑制哮喘的作用。

光镜观察哮喘豚鼠肺泡内见有炎细胞,支气管黏膜水肿,部分支气管内皱褶减少伴部分上皮脱落,支气管壁及管周大量炎细胞浸润,其中较多 EOS 浸润;电镜观察显示模型组肺泡隔明显增厚,细胞成分增多,基底膜增厚、水肿,肺泡 II 型上皮肿胀,板层体排空,部分肺泡 II 型上皮细胞脱落于肺泡腔内;细支气管管腔狭窄,EOS 浸润,可见 EOS 脱颗粒,颗粒中有特异性结晶核。中药各剂量组以上气道炎症均显著减轻。从而从光镜、电镜水平证实复方辛夷口服液具有抑制气道、肺组织炎症作用。

嗜酸性粒细胞等是哮喘炎症的关键细胞之一^[5-7],通过释放已经生成并储存于细胞内的炎症介质和新生炎症介质起作用,损伤气道上皮。本实验观察到豚鼠实验性哮喘模型 BALF 中嗜酸性细胞数量显著增加,肺及支气管周围有显著的嗜酸性细胞浸

润;中药各剂量明显减少嗜酸性细胞的浸润量,与模型组相比有显著性差异($P < 0.01$),提示中药复方辛夷口服液可以抑制抗原诱导的嗜酸性细胞向气道内的流入;同时对中药组 BLAF 沉淀细胞电镜观察发现嗜酸性细胞凋亡的形态改变,说明中药复方辛夷促进哮喘豚鼠的嗜酸性细胞凋亡。相关实验结果也证实该组方对多种炎症介质具有^[1,2]显著的调控作用。

综上提示疏风宣肺、利气平喘中药具有对哮喘豚鼠减少嗜酸性细胞的浸润、抑制气道嗜酸性粒细胞炎症、促进凋亡等调控作用,认为这很可能是其阻断哮喘的发生发展的机制之一。

参考文献:

- [1] 范欣生,周志祥,姜静,等. 中药吸入对中轻度支气管哮喘的临床疗效及血清、深部痰液 IL-8 水平的影响[J]. 中国医药学报, 2000, 16(2): 38.
- [2] Fan XSH, Yu JH, Jiang J, et al. Effects of Composite Xin'yi Aerosol on Asthma Related Cytokines in Serum and Sputum of Patients with Bronchial Asthma [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2002, 8(4): 275-278.
- [3] 狄留庆,范欣生,赵小莉. 复方辛夷口服液的制备工艺研究[J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(4): 222-224.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修,等. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1990. 1178.
- [5] Lacy P, Moqbel R. Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2001 Feb; 1(1): 79-84.
- [6] Clark K, Simson L, Newcombe N, Koskinen AM, Mattes J, et al. Eosinophil degranulation in the allergic lung of mice primarily occurs in the airway lumen [J]. J Leukoc Biol. 2004, 75(6): 1001-1009.
- [7] Shen HH, Ochkur SI, McGarry MP, et al. A causative relationship exists between eosinophils and the development of allergic pulmonary pathologies in the mouse [J]. J Immunol. 2003, 170(6): 3296-3305.