

中药止哮平喘方抗哮喘豚鼠模型 气道炎症的实验研究

胡作为¹, 周燕萍², 王 鹏²

(1. 复旦大学中西医结合研究所, 上海 200040; 2. 湖北中医学院, 武汉 430061)

摘要:目的: 探讨中药止哮平喘方对哮喘豚鼠模型气道炎症的影响。方法: 复制卵蛋白致敏哮喘模型。实验动物分正常对照组、哮喘模型组、西药对照组、中药小剂量组、中药大剂量组, 共5组。第一次诱喘24h后开始给药, 共治疗8d。采用光镜、电镜观察支气管及肺脏的组织形态学改变; 测量全血及肺泡灌洗液(BALF)中血细胞计数, 以反映哮喘的炎症情况。结果: 病理研究显示, 哮喘模型组豚鼠气道周围大量炎性细胞浸润, 以嗜酸细胞和淋巴细胞为主。而正常对照组气道基本上无炎症反应。哮喘模型组全血及BALF中炎性细胞数显著高于正常对照组($P < 0.01$); 中药大剂量组和西药对照组炎性细胞数均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 中药止哮平喘方能够降低气道及外周血炎性细胞的数量, 具有抗气道炎症的作用。

关键词: 哮喘; T淋巴细胞; 病理学; 支气管肺泡灌洗; @止哮平喘方

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2003)06-0033-03

支气管哮喘是以嗜酸细胞、淋巴细胞等浸润为主的气道慢性变态反应性炎症, 其中淋巴细胞尤其是T淋巴细胞活化起关键作用。对哮喘仍然首选糖皮质激素全身或局部用药, 长期应用副作用明显。中药止哮平喘方是王鹏教授多年诊治支气管哮喘的经验方, 整体调节, 具宽胸理气、通阳散结、化痰解痉等作用, 临床效果显著。为进一步探讨支气管哮喘气道炎症的病理学特征和止哮平喘方抗气道炎症的作用机制, 本实验采用全血及肺泡灌洗液(BALF)中细胞学分析的方法, 评价中药止哮平喘方对哮喘气道炎症的影响。

1 材料与方

1.1 主要试剂 卵蛋白 Sigma 公司出品(进口分装); 4%戊巴比妥钠; 肝素溶液 用生理盐水将肝素配制成1250U/ml的溶液。

1.2 实验动物及分组 清洁级健康豚鼠, 体重200±20g, 由同济医科大学医学动物中心提供。检疫1周。豚鼠随机分为①正常对照组、②哮喘模型组、③西药对照组、④中药小剂量组、⑤中药大剂量组, 共5组, 每组10只(雌雄分笼饲养)。

1.3 造模方法 以卵蛋白致敏和攻击加以复制。在实验第1d, 配制10%卵蛋白生理盐水, 豚鼠腹腔注射1毫升以致敏; 第15d将致敏的豚鼠置于14升

透明玻璃钟罩内, 给予1%卵蛋白生理盐水进行超声雾化吸入, 出现呼吸频率加快、点头呼吸、咳嗽、鼻煽、抽搐等症状时为引喘成功。此后, 每隔1d以1%卵蛋白生理盐水诱喘。共4次。(每次诱喘之前, 每只豚鼠均腹腔注射苯海拉明5mg/kg)。正常对照组以等量生理盐水进行腹腔注射和雾化, 方法同上。

1.4 药物制备及给药方法 止哮平喘方(由法夏10g、瓜蒌皮10g、薤白10g、白芍30g、柴胡10g、黄芩10g、麻黄10g、枳壳10g、甘草10g和射干10g组成)由湖北中医学院中药室制备(水煮醇沉法)。每毫升含生药2g。地塞米松片, 0.75毫克/片。在第一次诱喘24h后, 即从第16d开始分别胃饲给药。西药对照组地塞米松1mg/kg/只; 中药小剂量组止哮平喘方6g/kg/只; 中药大剂量组止哮平喘方24g/kg/只; 哮喘模型组及正常对照组均饲以等量生理盐水。共治疗8d。

1.5 标本采集 称体重, 4%戊巴比妥钠1ml/kg腹腔内注射。麻醉成功后, 常规消毒, 心脏采血, 肝素抗凝, 用于血细胞计数、分类; 摘取豚鼠肺脏, 然后用无尖针头注射器置于气管分叉处, 缓慢注入生理盐水(37℃)2ml, 保留30s后抽出, 重复4次。每例收集肺泡灌洗液6~7ml(回收率>85%), 置10ml离心管中, 计量, 于-4℃储存, 并在1h内作细胞分离。另每组选取右肺中叶以10%甲醛固定, 常规石蜡包埋行HE染色。

2 观察项目

2.1 一般情况 观察实验过程中各组豚鼠的精神、活动、饮食、排便、皮毛及死亡情况。

2.2 全血白细胞计数与分类 参照文献^[1]血细胞计数台测定细胞总数,同时涂片、染色,作细胞分类。

2.3 BALF中细胞分类与计数 参照文献^[1] BALF于1500r/min离心10min,沉淀细胞用1ml Hanks液重悬。取0.1ml于血细胞计数台测定细胞总数;取0.2ml涂片,Wright-Giemsa染色,至少计数200个细胞作细胞分类计数。

2.4 支气管肺组织病理学观察

3 统计分析

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用t检验比较。

4 结果

4.1 一般情况 豚鼠致敏后普遍精神较差,活动减少,进食及饮水量明显下降。1~2d后逐渐恢复正常。第3周哮喘模型组3只豚鼠出现皮毛蓬松:西药对照组1只豚鼠;中药小剂量组2只豚鼠亦出现明显皮毛蓬松现象。最后一次诱喘时,哮喘模型组1只豚鼠哮喘发作严重,经给氧抢救后无效死亡。正常对照组豚鼠情况良好,无死亡。各用药组豚鼠情况均较哮喘模型组明显改善,但不能恢复到正常对照组的水平。

4.2 各组豚鼠全血细胞计数与分类 见表1。

表1 各组豚鼠全血的细胞计数与分类($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	细胞总数($10^6/ml$)	EOS(%)	淋巴细胞(%)
正常对照组	10	8.57±3.38	0.64±0.28	4.48±0.21
哮喘模型组	9	25.62±2.27 ^{***}	4.43±0.36 ^{***}	15.23±0.42 ^{***}
西药对照组	10	16.25±3.21 [△]	0.85±0.47 [△]	8.21±0.38 [△]
中药小剂量组	10	24.38±2.36	4.03±0.21	14.48±0.32
中药大剂量组	10	15.47±4.28 [△]	0.90±0.23 [△]	7.56±0.47 [△]

注:与正常组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与模型组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

结果表明:哮喘模型组全血中总细胞浓度显著高于正常对照组($P < 0.01$);中药大剂量组和西药组总细胞浓度显著降低($P < 0.05$);哮喘模型组EOS、淋巴细胞均高于正常对照组($P < 0.01$);中药大剂量组及西药组EOS、淋巴细胞均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。3 各组豚鼠BALF中细胞计数与分类见表2。

结果表明:哮喘模型组BALF中总细胞浓度显著高于正常对照组($P < 0.01$);中药大剂量组和西药组总细胞浓度显著降低($P < 0.01$);哮喘模型组EOS、淋巴细胞均高于正常对照组($P < 0.01$);中药

大剂量组及西药组EOS、淋巴细胞均显著降低($P < 0.01$)。

表2 各组豚鼠BALF中细胞计数与分类($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	细胞总数($10^6/ml$)	EOS(%)	淋巴细胞(%)
正常对照组	10	7.42±4.38	0.56±0.48	2.54±0.08
哮喘模型组	9	24.54±5.5 ^{***}	6.63±1.68 ^{***}	14.35±3.35 ^{***}
西药对照组	10	18.38±4.21 ^{△△}	0.76±1.28 ^{△△}	8.60±2.30 ^{△△}
中药小剂量组	10	23.45±4.36	5.48±1.70	10.36±4.36
中药大剂量组	10	17.95±3.27 ^{△△}	0.81±0.28 ^{△△}	2.40±2.14 ^{△△}

4.4 各组豚鼠形态学观察 光镜下正常对照组:支气管、肺组织结构正常,各级支气管上皮完整,炎性细胞浸润少见。哮喘模型组:气道炎症明显,在细、小支气管管壁和伴行动脉周围有大量的炎性细胞浸润,包括淋巴细胞、嗜酸细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等,其中以嗜酸细胞为主,严重者可见脱落的上皮细胞。支气管管腔狭窄,杯状细胞增生明显,平滑肌增厚;部分肺泡壁变薄或断裂,融合成肺气肿。西药对照组:改变基本接近于正常组。支气管及肺组织结构基本正常。与模型组相比,支气管及肺泡区炎性细胞浸润明显减少。中药小剂量组:病变与哮喘模型组比较,炎性细胞浸润略有减少。中药大剂量组:支气管及肺组织结构基本正常。与模型组相比,气道炎性细胞浸润显著减少,与西药对照组相当。

5 讨论

在哮喘气道慢性炎症中,大量的炎性细胞(如嗜酸细胞、淋巴细胞等)和多种炎性介质参与其病理过程。其中嗜酸细胞(EOS)和淋巴细胞与之尤为密切^[1]。目前认为EOS是气道变应性炎症反应的主要效应细胞。因此,有人称哮喘为“慢性嗜酸细胞性哮喘”^[2,3]。

在气道粘膜的炎性损伤过程中,EOS的趋化和激活是不可缺少的步骤,在整个趋化和激活过程中EOS受到了诸多细胞因子的调控。EOS细胞作跨血管内皮运动进入组织内,然后在淋巴细胞和肥大细胞等释放的趋化因子作用下向气道的炎区趋化和浸润。

淋巴细胞活化是哮喘病人免疫功能紊乱的主要特征。研究发现,①哮喘患者支气管活组织检查及外周血和BALF中CD4⁺淋巴细胞增多;②激活的T淋巴细胞通过特殊的淋巴因子参与哮喘的慢性炎症反应。如促使嗜酸细胞趋化、增殖、分化及功能激活,从而加强气道组织中嗜酸细胞的致炎作用^[4]。

本实验表明,哮喘模型组血液循环及气道局部

BALF 中均存在大量炎性细胞浸润, 炎性细胞主要以嗜酸性细胞和淋巴细胞为主。病理学亦证实哮喘模型组: 气道炎症明显, 在细、小支气管管壁和伴行动脉周围有大量的炎性细胞浸润, 包括淋巴细胞、嗜酸性细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等, 其中以嗜酸细胞为主。

我们认为哮喘发作时的主要病理环节是痰阻气闭、痰气互结、胸阳不足、气道挛急, 故拟宽胸理气、通阳散结、化痰解痉等多法联用、整体调节, 创制哮喘平喘方。全方由瓜蒌薤白半夏汤、小柴胡汤、芍药甘草汤等三首方剂化裁, 由瓜蒌、法夏、柴胡、黄芩、射干等 10 味中药组成。现代药理学研究表明: 瓜蒌皮所含的氨基酸有良好的祛痰作用; 薤白有良好的平喘作用, 可能与其改善肺通气功能、尤其是小气道功能, 提高前列腺素类(PGI₂) 的含量、抑制 TXA₂ 的生成以抗自由基效应有关^[5]。研究证实以射干、麻黄为主组成的药物的作用机理与调节环核苷酸水平有关, 主要使 CAMP 含量及 CAMP/CGMP 比值上升, CGMP 含量下降, 从而使支气管平滑肌松弛, 并抑制介质释放而具平喘作用^[6]。麻黄碱为 β₂ 受体激动剂, 具有显著的平喘作用。对支气管平滑肌痉挛有较持久的解痉作用, 尤其对支气管平滑肌处于痉挛状态时作用更显著。柴胡具有抗炎、抗过敏作用。黄芩有平喘、抗炎、抗变态反应功能。

中药哮喘平喘方治疗后, 小剂量中药组炎性细胞改变不明显; 中药大剂量组和西药对照组炎性细

胞显著降低。哮喘平喘方能够降低外周血炎性细胞如 EOS、淋巴细胞等的数量, 从而减少了炎性细胞向气道内募集的可能性。更重要的是, 中药哮喘平喘方能直接地抑制炎性细胞在气道内的浸润, 即降低 BALF 中炎性细胞的数量, 减轻了其毒性产物的损伤及气道高反应(AHR) 的形成^[7]。因此具有抗气道炎症的作用。而关于哮喘平喘方抗气道炎症的作用机理, 我们将作进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 刘春涛, 王曾礼, 冯玉麟, 等. 哮喘动物模型气道中白细胞介素-5 和 10 的动态变化及其意义[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 4: 239-242.
- [2] Busse WW, Calhoun WF, Sedgwick JD, et al. Mechanism of airway inflammation in asthma[J]. Am Rev Respir Dis, 1993, 147: 20-24.
- [3] Barnes PJ. A new approach to the treatment of asthma. N Engl J Med, 1989, 321: 1517-1527.
- [4] 李明华, 殷凯生, 朱栓立. 哮喘病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 83-100.
- [5] 奚肇庆. 薤白平喘作用的应用与展望[J]. 中西医结合杂志, 1989, 9(11): 698.
- [6] 陈芝喜, 周名璐, 梁直英, 等. 加味射麻汤对哮喘豚鼠血浆 CAMP 及 CGMP 水平的影响[J]. 中医研究, 2000, 13(1): 30-32.
- [7] 崔红生, 黄启福, 武维屏, 等. 哮喘宁煎剂对哮喘豚鼠模型气道嗜酸细胞浸润的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 8: 495-496.