

苍耳子挥发油对支气管哮喘大鼠气道重塑的影响

颜玺¹, 郭亚蕾², 薛中峰^{2*}

(1. 三亚市中医院, 海南 三亚 572000; 2. 广西中医药大学, 南宁 530200)

[摘要] 目的:探讨苍耳子挥发油对支气管哮喘模型大鼠气道重塑的影响,并从对基质金属蛋白酶-9(MMP-9),基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1),血小板衍生生长因子(PDGF),转化生长因子- β_1 (TGF- β_1),Smad2,Smad3和Smad7 mRNA的表达方面探讨了其作用机制。方法:SD大鼠雌雄各半,共48只,随机分为正常组,模型组,苍耳子挥发油7.5,15,30 mg·kg⁻¹组和地塞米松(0.5 mg·kg⁻¹)组,每组各8只。除正常组外,用卵蛋白致敏并雾化吸入法诱发大鼠支气管哮喘模型。苍耳子挥发油给药组从第1次哮喘激发开始(造模后第4周)至处死前每天通过喷雾给予苍耳子挥发油干预,共4周。进行苏木素-伊红(HE)染色分析支气管肺组织病理学改变;进行气道重塑情况观察,记录支气管管腔内周长(Pi),支气管平滑肌面积(S),管壁面积(W),平滑肌细胞核数(N);检测肺泡灌洗液(BALF)中内皮素-1(ET-1)和类胰岛素生长因子-1(IGF-1)水平;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测肺组织MMP-9,TIMP-1,PDGF,TGF- β_1 ,Smad2,Smad3和Smad7 mRNA的表达。结果:模型组支气管壁周围有大量炎性细胞浸润,气道平滑肌厚度明显增加,官腔变窄扁平,基底膜增厚;苍耳子挥发油各剂量组明显改善支气管肺组织病理损伤。与正常组比较,模型组S/Pi,W/Pi,N/Pi均明显升高($P < 0.01$),苍耳子挥发油各剂量组和地塞米松组S/Pi,W/Pi,N/Pi均低于模型组($P < 0.01$)。与正常比较,模型组BALF中ET-1和IGF-1水平明显升高($P < 0.01$),苍耳子挥发油各剂量组和地塞米松组BALF中ET-1和IGF-1水平明显低于模型组($P < 0.01$)。与正常比较,模型组MMP-9 mRNA表达明显升高($P < 0.01$),TIMP-1 mRNA表达明显降低($P < 0.01$),MMP-9/TIMP-1明显升高($P < 0.01$),苍耳子挥发油各剂量组和地塞米松组MMP-9 mRNA表达和MMP-9/TIMP-1低于模型组($P < 0.01$)。与正常组比较,模型组肺组织PDGF mRNA表达明显增强($P < 0.01$),苍耳子挥发油各剂量组和地塞米松组PDGF mRNA表达均低于模型组($P < 0.01$)。与正常组相比较,模型组TGF- β_1 ,Smad2和Smad3 mRNA表达均增强($P < 0.01$),Smad7 mRNA表达减弱($P < 0.01$),与模型组比较,苍耳子挥发油各剂量组和地塞米松组TGF- β_1 ,Smad2和Smad3 mRNA表达减弱($P < 0.01$),Smad7 mRNA表达增强($P < 0.01$)。结论:苍耳子挥发油可调节MMP-9,TIMP-1水平及MMP-9/TIMP-1值,调节TGF- β_1 /Smad信号通路,抑制PDGF,ET-1和IGF-1因子表达,通过多种途径抑制了上皮下纤维化、细胞外基质合成、气道平滑肌细胞增殖、迁移等,起到减轻或抑制气道重塑,从而起到防治哮喘的作用。

[关键词] 苍耳子; 挥发油; 支气管哮喘; 气道重塑

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0106-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191304

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190317.1907.005.html>

[网络出版时间] 2019-03-19 15:50

Effect of Volatile Oil from Xanthii Fructus on Airway Remodeling of Rats with Bronchial Asthma

YAN Xi¹, GUO Ya-lei², XUE Zhong-feng^{2*}

(1. Sanya Traditional Chinese Medicine Hospital, Sanya 572000, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the effect of volatile oil from Xanthii Fructus on airway remodeling of

[收稿日期] 20181221(007)

[基金项目] 海南省自然科学基金面上项目(20168340)

[第一作者] 颜玺,副主任中医师,从事中西医结合临床工作,E-mail:1297106071@qq.com

[通信作者] *薛中峰,博士,主管中药师,从事中药新药研究,Tel:0771-4953513,E-mail:xuezhongfeng@foxmail.com

rats with bronchial asthma, in order to discuss the mechanism of action through matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), Smad2, Smad3 and Smad7 mRNA expressions. **Method:** Forty-eight rats (half males and half females) were randomly divided into six groups ($n = 8$), namely normal saline group, model group, volatile oil from Xanthii Fructus (7.5, 15, 30 mg·kg⁻¹) groups and dexamethasone group (0.5 mg·kg⁻¹). Except for normal saline group, airway remodeling of rats were established through ovalbumin sensitization and atomization inhalation method. At volatile oil group, rats got volatile oil spray since the first time (the 4th week after modeling) of inspiration of asthma to the last day before the end of test. Histopathological changes of bronchus and lung were analyzed by htoxylin eosin (HE) stain. And airway remodeling was observed, and perimeter of bronchial lumen (Pi), smooth muscle area of bronchi (S), tube wall area (W) and nuclei of smooth muscle cells (N) were recorded. And levels of endothelin-1 (ET-1) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in irrigation solution of Alveoli (BALF) were detected. And mRNA expressions of MMP-9, TIMP-1, PDGF, TGF- β_1 , Smad2, Smad3 and Smad7 were detected by real-time quantitative-polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** In the model group, infiltration of a large number of inflammatory cells were found at the peribronchial wall, airway smooth muscle thickness and basement membrane increased, and bureaucratic cavity was narrower and flatter. Volatile oil from Xanthii Fructus can ameliorate pathological damage of bronchopulmonary tissue. Levels of S/Pi, W/Pi and N/Pi, BALF, ET-1, IGF-1 and MMP-9/TIMP-1 and mRNA expressions of MMP-9 and PDGF in volatile oil group and dexamethasone group were lower than those in model group ($P < 0.01$). Compared with model group, mRNA expressions of TGF- β_1 , Smad2 and Smad3 were less than those in model group ($P < 0.01$), while mRNA expression of Smad7 was more than that in model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Volatile oil from Xanthii Fructus can regulate levels of MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1, TGF- β_1 /Smad, inhibit expressions of PDGF, ET-1 and IGF-1, and suppress subepithelial fibrosis, extracellular matrix synthesis, proliferation and migration of airway smooth muscle cells to relieve or inhibit airway remodeling, so as to prevent and treat asthma.

[**Key words**] Xanthii Fructus; volatile oil; bronchial asthma; airway remodeling

支气管哮喘是多种细胞(气道炎性细胞和结构细胞)和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病,以持续性慢性气道炎症、气道高反应性和气道重塑为特点^[1]。气道重塑是哮喘病理变化的重要特征之一,它是指气道炎症、组织损伤及随后不正常修复导致气道壁结构的改变,出现不可逆性气流受限和气道高反应性,使哮喘患者对常规治疗药物反应性降低甚至抵抗,并增加急性发作的频率;其主要病理变化包括上皮细胞变化和黏液腺增生、上皮下纤维化、气道平滑肌细胞增殖与迁移、气道壁血管再生等。气道重塑的机制复杂,多种细胞因子参与,目前主要通过抑制各种炎性及重塑介质以抑制气道重塑,但治疗效果个体差异较大,中药对许多已被证实的与哮喘气道重塑相关的细胞因子和信号通路都有调控作用,是临床研究的热点之一^[1-3]。

苍耳子为菊科植物苍耳的干燥成熟带总苞的果实,辛温,归肺经,具有散风寒、通鼻窍、祛风湿的功效;主要含有挥发油、脂肪油、萜醌、黄酮、生物碱等多成分,其中挥发油(目前已经有 17 个成分)是主

要活性成分,具有抗炎、抗过敏、抗菌、镇痛、抗病毒等多种药理作用^[4]。李景福^[5]的研究显示苍耳子可调节哮喘患者 Th1/Th2 细胞免疫因子、降低外周血嗜酸性粒细胞(EOS),抑制炎症递质释放,从而起到治疗哮喘的作用。朱慧华等^[6]的实验研究显苍耳子治疗哮喘缓解期慢性气道炎症,具有降低外周血 EOS,降低气道阻力、延长哮喘模型小鼠引喘潜伏期的作用。黄钢花等^[7]的实验研究显示以苍耳子为主药的苍耳子散能降低转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 水平,从而抑制平滑肌增殖,减少胶原合成及沉积、形成纤维化,减轻哮喘气道炎症,预防气道重塑的作用。本研究笔者观察了苍耳子挥发油对气道重塑的干预作用,以探讨苍耳子挥发油治疗哮喘的机制。

1 材料

1.1 动物 48 只 SPF 级 SD 大鼠购买于广东省实验动物中心,雌雄各半,体质量(260 ± 16) g,合格证号 SCXK(粤)2013-0002,动物饲养在 IVC 系统。动物实验研究获得三亚市中医院伦理委员会批准(批号 2016SYZY0516D)。

1.2 药物与试剂 苍耳子采摘于海南尖峰岭附近区域,经三亚市中医院制剂中心药检室钟莹主管中药师鉴定为菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* 的干燥成熟带总苞的果实。苍耳子挥发油的制备参考 2015 年版《中国药典》一部附录和文献提取苍耳子挥发油,具体为炒制干燥去刺苍耳子打碎成粉末,取 350 g 加入 3 L 无水乙醇浸泡 24 h。采用回流萃取,水温控制在 80 ℃,回流 6 h,采用真空减压回收乙醇。减重法计算苍耳子挥发油质量。本研究苍耳子挥发油回收率为 19.3%,与报道基本一致^[8]。将苍耳子挥发油与聚山梨酯-80 混匀加水低温超声制备喷雾乳化液。卵蛋白[OA,生工生物工程(上海)股份有限公司,批号 B831BA0500];苏木素-伊红(HE)染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号 382822);大鼠内皮素-1(ET-1)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海双赢生物科技有限公司,批号 20170136);类胰岛素生长因子-1(IGF-1)兔抗大鼠单克隆试剂盒(武汉博士德生物公司,批号 201711025)。

1.3 仪器 RU25S8-2 型 IVC 动物饲养系统(苏州市苏杭科技器材有限公司);CP213 型电子天平(上海天平仪器厂);DM5500B 型显微镜及照相系统, RM2255 型病理切片与染色(德国 Leica 公司);LT-N200 型雾化器(上海四菱医疗器械厂);H1750R 型高速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);M200 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司);K960 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(杭州晶格科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 48 只大鼠雌雄各半,随机分成正常组、模型组、苍耳子挥发油低、中、高剂量组(按预实验结果设置低剂量为 7.5 mg·kg⁻¹,中剂量为 15 mg·kg⁻¹,高剂量为 30 mg·kg⁻¹),地塞米松组,每组 8 只。除正常组外,其余各组制作大鼠哮喘模型。

2.2 支气管哮喘模型的建立 将大鼠分别置于气雾装置内,4% OA 生理盐水溶液进行恒压喷雾引喘,观察大鼠的哮喘潜伏期(即从喷雾开始到哮喘发作的时间),一般不超过 150 s,超过 150 s 者认为不敏感,不予选用。将预选合格的大鼠随机分组,各组大鼠于两侧大腿外侧肌内注射 4% OA 生理盐水 0.2 mL,腹腔注射 0.5 mL,同时腹腔注射 4% 氢氧化铝凝胶 0.5 mL,致敏(正常组给予等量生理盐水)^[9]。

2.3 给药方法 致敏第 4 周开始给药(正常组和模型组给以等体积生理盐水),致敏前 1 h 给予 7.5,

15,30 mg·kg⁻¹苍耳子挥发油喷雾,地塞米松组给予地塞米松 0.5 mg kg⁻¹喷雾给药,连续 4 周。

2.4 取材 末次给药后 0.5 h,各鼠分别放入气雾装置内,按动物筛选时的同样条件喷入 4% OA 生理盐水溶液引喘。各组动物均于最后一次引喘后 24 h 内麻醉,收集组织标本待检。

2.5 HE 染色观察支气管肺组织病理学变化 用 4% 多聚甲醛固定左肺组织 24 h 后,常规乙醇脱水,石蜡包埋切片,厚度 4 μm,HE 染色,400 倍光镜下观察肺组织病理学改变。

2.6 气道重塑情况观察 取 3~4 级支气管,采用图像分析软件测量支气管管腔内周长(Pi),支气管平滑肌面积(S),管壁面积(W),平滑肌细胞核数(N),并进行标化,比较 S/Pi, W/Pi, N/Pi 以评价气道重塑情况。

2.7 ELISA 检测 ET-1 和 IGF-1 含量 30 mg·kg⁻¹戊巴比妥钠腹腔麻醉后,立即经气管注入 4 ℃ D-Hanks 液 5 mL,轻轻按摩胸部 20~30 s 后,回收支气管肺灌洗液(BALF),共 3 次,回收率 >90%,回收后的 BALF 4 ℃ 离心(2 500 r·min⁻¹,10 min),上清液 -20 ℃ 保存,各组老鼠取相同部位的肺组织备用。检测 ET-1 和 IGF-1 的含量按照 ELISA 试剂盒说明操作。

2.8 采用 Real-time PCR 法检测肺组织基质金属蛋白酶-9(MMP-9),基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1),血小板衍生生长因子(PDGF),TGF-β₁和 Smad2,Smad3,Smad7 mRNA 表达 采用 trizol 一步法提取肺组织总 RNA,提取的 RNA 经紫外分光光度计测量吸光度 A_{260 nm} 和 A_{280 nm} 的值,判断其纯度,并由 A_{260 nm} 计算出 RNA 浓度。按照 Promega 公司的逆转录试剂盒进行逆转录为 cDNA 后进行 PCR 扩增。取 PCR 产物置于 20 g·L⁻¹琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,电泳条带经凝胶成像分析系统扫描及分析,并以内参照甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)条带进行标化,引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表 1。2^{-ΔΔC_t}法计算 MMP-9, TIMP-1, PDGF, TGF-β₁, Smad 2, Smad 3, Smad 7 mRNA 的表达。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学处理,采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD 法,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

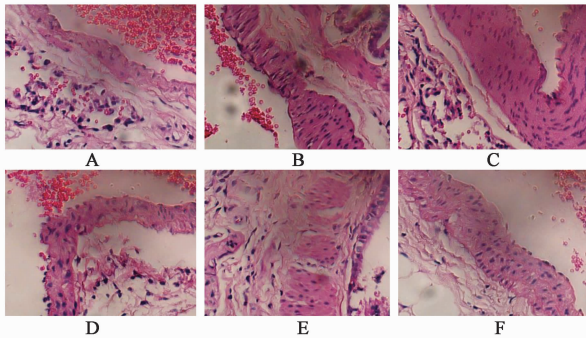
3.1 对支气管哮喘大鼠支气管肺组织病理改变的

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Sequence primers of PCR

引物	上游(5'-3')	下游(5'-3')	长度/bp
MMP-9	CGCTGACAAGAAGTGGGTTT	TACAGATGGTGGATGCCTTTTA	189
TIMP-1	CCTGGTTCCTGGCATAATC	CGCTCTGGTAGCCCTTCTC	182
PDGF	CCTGTGCCCATCCGCAGGAAGAGA	TTGGCCACCTTGACACTGCGGTG	227
TGF-β ₁	CGCAACAACGCAATCTATG	ACCAAGGTAACGCCAGGA	204
Smad 2	ACTATACCCACTCCATTCCA	CACTATCACTTAGGCACTCG	477
Smad 3	CCAGTGCTACCTCCAGTGTT	CTGGTGGTCGCTAGTTTCTC	189
Smad 7	GGCTTTCAGATTCCCAACTTC	CGCCATCCACTTCCCTTGT	255

影响 正常组周围未见明显炎症反应,组织形态正常。模型组支气管壁周围有大量炎性细胞浸润,气道平滑肌厚度明显增加,官腔变窄扁平,基底膜增厚。苍耳子挥发油低、中、高剂量组炎症细胞浸润,气道平滑肌增生,气道壁厚度、支气管狭窄程度均高于正常组,但低于模型组。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 苍耳子低剂量组;D. 苍耳子中剂量组;E. 苍耳子高剂量组;F. 地塞米松组

图 1 苍耳子挥发油对支气管哮喘大鼠支气管肺组织病理改变的影响(HE, ×400)

Fig.1 Effect of volatile oil from Xanthii Fructus on pathological changes of bronchopulmonary tissue in each group(HE, ×400)

3.2 对支气管哮喘大鼠气道重塑的影响 与正常组比较,模型组 S/Pi, W/Pi, N/Pi 均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,苍耳子挥发油各剂量组和地塞米松组 S/Pi, W/Pi, N/Pi 均显著降低($P < 0.01$);苍耳子挥发油低、中剂量组 S/Pi, W/Pi, N/Pi 均高于地塞米松组($P < 0.01$),苍耳子挥发油高剂量组与地塞米松组 S/Pi, W/Pi, N/Pi 相比较,差异无统计学意义。见表 2。

3.3 对支气管哮喘大鼠 BALF 中 ET-1 和 IGF-1 水平的影响 与正常组比较,模型组 BALF 中 ET-1 和 IGF-1 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,苍耳子挥发油各剂量组和地塞米松组 BALF 中 ET-1 和 IGF-1 水平显著降低($P < 0.01$);苍耳子挥发油各剂量组 BALF 中 ET-1 和 IGF-1 水平高于地塞米

表 2 苍耳子挥发油对支气管哮喘大鼠气道重塑的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of volatile oil from Xanthii Fructus on airway remodeling in asthmatic rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	S/Pi /m ² ·m ⁻¹	W/Pi /m ² ·m ⁻¹	N/Pi /个·μm ⁻¹
正常	-	6.16 ± 0.47	2.96 ± 0.35	0.013 ± 0.001
模型	-	12.51 ± 2.34 ¹⁾	7.07 ± 0.86 ¹⁾	0.042 ± 0.009 ¹⁾
苍耳子挥发油	7.5	9.27 ± 0.94 ^{2,3)}	4.84 ± 0.59 ^{2,3)}	0.033 ± 0.006 ^{2,3)}
	15	8.85 ± 0.78 ^{2,3)}	3.48 ± 0.52 ^{2,3)}	0.028 ± 0.005 ^{2,3)}
	30	7.29 ± 0.64 ²⁾	3.11 ± 0.39 ²⁾	0.024 ± 0.007 ²⁾
地塞米松	0.5	7.04 ± 0.68 ²⁾	3.02 ± 0.45 ²⁾	0.020 ± 0.005 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与地塞米松组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

松组($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 苍耳子挥发油对支气管哮喘大鼠 BALF 中 ET-1 和 IGF-1 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of volatile oil from Xanthii Fructus on ET-1 and IGF-1 levels in BALF of asthmatic rat($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ET-1/ng·L ⁻¹	IGF-1/μg·L ⁻¹
正常	-	92.25 ± 13.41	46.84 ± 6.25
模型	-	173.48 ± 19.59 ¹⁾	89.67 ± 10.05 ¹⁾
苍耳子挥发油	7.5	126.05 ± 14.93 ^{2,3)}	48.19 ± 9.11 ^{2,3)}
	15	102.49 ± 11.88 ^{2,3)}	60.03 ± 8.12 ^{2,3)}
	30	98.24 ± 11.75 ^{2,3)}	55.95 ± 7.86 ^{2,3)}
地塞米松	0.5	90.14 ± 8.67 ²⁾	49.04 ± 7.13 ²⁾

3.4 对支气管哮喘大鼠肺组织 MMP-9, TIMP-1, PDGF mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组 MMP-9, PDGF mRNA 表达显著升高($P < 0.01$), TIMP-1 mRNA 显著降低($P < 0.01$), MMP-9/TIMP-1 显著升高($P < 0.01$);与模型在比较,苍耳子挥发油各剂量组和地塞米松组 MMP-9, PDGF mRNA 表达和 MMP-9/TIMP-1 显著降低($P < 0.01$),苍耳子挥发油中、高剂量组和地塞米松组 TIMP-1 mRNA 表达高于模型组($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 苍耳子挥发油对支气管哮喘大鼠肺组织 MMP-9, TIMP-1, PDGF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of volatile oil from Xanthii Fructus on expression of MMP-9, TIMP-1 and PDGF in lung tissue of asthmatic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MMP-9	TIMP-1	MMP-9/TIMP-1	PDGF
正常	-	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.02	0.87 ± 0.13
模型	-	2.88 ± 0.26 ¹⁾	0.66 ± 0.06 ¹⁾	4.43 ± 0.77 ¹⁾	3.90 ± 0.51 ¹⁾
苍耳子挥发油	7.5	0.31 ± 0.12 ^{2,3)}	0.24 ± 0.06 ^{2,3)}	1.47 ± 0.85 ^{2,3)}	2.82 ± 0.46 ^{2,3)}
	15	0.42 ± 0.13 ^{2,3)}	0.84 ± 0.07 ^{2,3)}	0.51 ± 0.16 ²⁾	2.58 ± 0.37 ^{2,3)}
	30	0.35 ± 0.06 ^{2,3)}	1.21 ± 0.25 ^{2,3)}	0.31 ± 0.13 ^{2,3)}	2.03 ± 0.34 ²⁾
地塞米松	0.5	0.99 ± 0.13 ²⁾	2.03 ± 0.36 ²⁾	0.50 ± 0.11 ²⁾	1.82 ± 0.33 ²⁾

3.5 对支气管哮喘大鼠肺组织 TGF-β₁, Smad2, Smad3 和 Smad7 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组 TGF-β₁, Smad2 和 Smad3 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$), Smad7 mRNA 表达显著降低

($P < 0.01$); 与模型组比较,苍耳子挥发油各剂量组和地塞米松组 TGF-β₁, Smad2 和 Smad3 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$), Smad7 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 苍耳子挥发油对支气管哮喘大鼠肺组织 TGF-β₁, Smad2, Smad3 和 Smad7 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effect of volatile oil from Xanthii Fructus on expression of TGF-β₁, Smad2, Smad3 and Smad7 mRNA in lung tissue of asthmatic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TGF-β ₁	Smad2	Smad3	Smad7
正常	-	0.45 ± 0.09	0.21 ± 0.04	0.25 ± 0.06	0.68 ± 0.09
模型	-	0.94 ± 0.15 ¹⁾	0.79 ± 0.10 ¹⁾	0.93 ± 0.17 ¹⁾	0.27 ± 0.05 ¹⁾
苍耳子挥发油	7.5	0.60 ± 0.12 ^{2,3)}	0.35 ± 0.08 ^{2,3)}	0.44 ± 0.09 ^{2,3)}	0.38 ± 0.05 ^{2,3)}
	15	0.55 ± 0.11 ²⁾	0.27 ± 0.07 ^{2,3)}	0.31 ± 0.08 ^{2,3)}	0.57 ± 0.09 ^{2,3)}
	30	0.51 ± 0.09 ²⁾	0.21 ± 0.05 ²⁾	0.27 ± 0.05 ^{2,3)}	0.61 ± 0.08 ²⁾
地塞米松	0.5	0.49 ± 0.08	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.64 ± 0.10

4 讨论

本病属于中医“哮证”范畴,乃痰伏于肺,遇感诱发,痰阻气道、肺失宣降、风盛痰阻、气道挛急是哮喘发病的主要病理机制,中药治疗哮喘的机制包括抑制气道炎症、调节免疫功能、改善气道重塑、降低气道反应、调节神经失衡等,存在多环节、多靶点、多途径等特点^[10]。气道重塑是哮喘引起的器质性改变主要机制,被认为是难治性哮喘的主要病理基础,是引起哮喘反复发作和不完全可逆性的主要病理因素^[11]。

气道上下纤维化是气道重塑的重要病因,可导致气道阻力增加、气道狭窄加重,使肺功能下降^[2]。上下纤维化的主要原因是基质合成与分解的不平衡,其中 TGF-β₁ 是刺激细胞外基质合成的关键细胞因子;气道壁胞外基质 (ECM) 的降解主要由 MMP-9 介导,其作用受其抑制剂 TIMP-1 调节,二者含量高低及其比值失衡是调节 ECM 失调、气道重塑的核心因素^[2,12]。TGF-β₁ 可刺激气道和血管平滑肌细胞增殖及表型转化,能诱导气道成纤维细胞的分裂增殖,促进成纤维细胞向成肌纤维细胞转化,增

加纤维黏蛋白和胶原的合成,从而促进了气道重塑^[11]。Smad 蛋白是目前所知的 TGF-β₁ 受体的胞内激酶底物,其存在于细胞质中,是 TGF-β₁ 信号从细胞表面传导至细胞核的过程的关键点,其中 Smad2, Smad3 是受体活化的 Smad,直接参与信号传导,是正调节作用;Smad7 可通过与 Smad2, Smad3 竞争 TGF-β₁ 型受体来抑制该信号通路的传递,起负性调节作用;TGF-β₁/Smad 信号通路被认为是上皮纤维化主要机制^[11,13]。TGF-β₁ 还可直接自分泌和旁分泌途径激活 Smad2, Smad3 通路,上调血管内皮生长因子,PDGF 等表达,促进气道重塑^[14]。

PDGF 是成纤维细胞增殖的获能因子,能刺激气道平滑肌细胞、成纤维细胞增殖和趋化及 ECM 合成,PDGF 可刺激成纤维细胞产生胶原酶,造成间质胶原断裂,从而导致胶原排列紊乱,是引起气道重塑的重要机制之一^[15]。

ET-1 除作为缩血管物质,发挥平滑肌收缩作用,导致气道收缩外,还对血液凝固以及纤维蛋白溶解系统起到直接的作用,降低其活性,也可收缩支

气管促进平滑肌细胞以及成纤维细胞的不断增殖等作用,起到促进气道重塑的作用^[16]。IGF-1 可促进炎症细胞、肺成纤维细胞、气道平滑肌进行分泌,并且抑制其凋亡,特别是对上皮下的成纤维细胞增殖及肌成纤维细胞有分化作用,参与气道重塑的过程^[17]。

苍耳子作为治疗鼻炎、鼻窦炎及变应性鼻炎的临床常用中药,并且多作为君药或臣药现出,2015 年版《中国药典》一部中收录的含苍耳子制剂达 19 种。苍耳子挥发油是主要活性成分,具有较好的抗过敏、抗炎作用,除用于鼻炎疾病外,现也广泛用于哮喘^[5-7,18]的治疗。苍耳子有“小毒”,一般认为临床中毒多为炮制不当造成,其毒性成分为其所含毒性蛋白,经水浸泡或加热处理,可降低毒性,如炒焦、炒炭后能破坏其毒性^[19]。本研究将去刺苍耳子炒熟,采用回流法提取苍耳子挥发油,去除毒性,最大利用挥发油功效。

本实验结果显示苍耳子挥发油各组炎症细胞浸润,气道平滑肌增生,气道壁厚度、支气管狭窄程度均低于模型组,S/Pi,W/Pi,N/Pi 均低于模型组,可见苍耳子挥发油可起到抑制气道炎症及气道重塑的作用。进一步的观察显示苍耳子挥发油各剂量组 MMP-9 mRNA 表达和 MMP-9/TIMP-1 低于模型组,TIMP-1 mRNA 表达高于模型组;苍耳子挥发油各剂量组 TGF- β_1 , Smad 2 和 Smad3 mRNA 表达减弱于模型组,Smad7 mRNA 表达增强于模型组;苍耳子挥发油各剂量组 PDGF mRNA 表达均减弱于模型组;苍耳子挥发油各剂量组 BALF 中 ET-1 和 IGF-1 水平明显低模型组,以上结果提示了苍耳子挥发油可调节 MMP-9, TIMP-1 水平及其 MMP-9/TIMP-1 值,调节 TGF- β_1 /Smad 信号通路,抑制 PDGF, ET-1 和 IGF-1 因子表达,通过多种途径抑制了上皮纤维化,ECM 合成,气道平滑肌细胞增殖、迁移等,起到减轻或抑制气道重塑作用,从而起到防治哮喘。

[参考文献]

[1] 祝丁,张超,赖天文,等. 中药对支气管哮喘气道重塑干预机制研究进展[J]. 中国实用内科杂志,2016,36(8):694-697.

[2] 潘亦林,朱燕亭,李满祥. 支气管哮喘气道重塑的研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志:电子版,2015,8(6):773-776.

[3] Hirota N, Martin J G. Mechanisms of airway remodeling[J]. Chest,2013,144(3):1026-1032.

[4] 崔秀荣,马海波,张旗,等. 苍耳子的化学成分和临床

应用研究进展[J]. 现代药物与临床,2012,27(6):614-618.

[5] 李景福. 辛夷、苍耳子对支气管哮喘患者 Th1/Th2 比值及炎症递质的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(10):1057-1058.

[6] 朱慧华,虞坚尔,陈燕萍,等. 辛夷苍耳子治疗儿童哮喘缓解期慢性气道炎症机理研究[J]. 辽宁中医杂志,2007,34(8):1025-1028.

[7] 黄钢花,黎凯燕,黎世明,等. 小儿喘咳液合苍耳子散对哮喘大鼠气道重塑影响的研究[J]. 中华中医药学刊,2016,34(7):1682-1685.

[8] 汝绍刚,赵文英,朱庆书,等. 苍耳子油回流提取工艺优化及其动力学研究[J]. 化学工业与工程,2012,29(1):34-38.

[9] 李翎,邹衍衍,石琛,等. β_2 受体激动剂及石菖蒲挥发油对支气管哮喘的药效对比观察[J]. 时珍国医国药,2006,17(11):2137-2138.

[10] 张雄飞,黄娟萍,李碧云,等. 中药治疗哮喘作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):344-347.

[11] 乡世健,盛华芳,吕亚梅,等. 冬病夏治穴位贴敷对哮喘豚鼠气道炎症及肠道菌群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(9):95-102.

[12] 王忠敏,汤卫红,王惠庭,等. 哮喘模型小鼠肺组织 TGF- β_1 、MMP-9、TIMP-1 与气道重塑相关性研究[J]. 浙江中西医结合杂志,2018,28(11):920-923.

[13] 宋洪娟,黄正桥,黄笑,等. 清金化痰汤通过 p38MAPK/NF- κ B 信号通路改善大鼠急性气道炎症的作用和机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(13):104-110.

[14] 邹璐,孙祝美,郭春荣,等. 中医药防治支气管哮喘气道重塑相关信号通路研究进展[J]. 中华中医药杂志,2018,33(11):5057-5060.

[15] 杨季国,马慧娟,徐纓,等. 平喘 I 号对呼吸道合胞病毒哮喘鼠气道重塑 PDGF-B 与 ERK 信号通路的影响[J]. 中华中医药学刊,2014,32(11):2696-2699.

[16] 吕昊泽,杨斌,康振华. 血浆 TNF- α 与 ET-1 与肺炎支原体感染合并支气管哮喘相关性研究[J]. 中国实验诊断学,2016,20(9):1539-1540.

[17] Ciesielska N, Kozakiewicz M, Zukow W. Influence of physical activity on the levels IGF-1 and IGF1Ps at geriatric patients. Review of clinical trials[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,2015,150(2):358-366.

[18] 王相东. 苍耳子浸出液治疗 226 例变异性哮喘疗效观察[J]. 中国疗养医学,2016,25(3):312-313.

[19] 张婷婷,鄢良春,赵军宁,等. 苍耳子“毒性”及现代毒理学研究进展[J]. 药物评价研究,2010,33(5):361-366.

[责任编辑 周冰冰]