

附麻平喘方对哮喘模型大鼠的作用与机制的实验研究

邢亚群¹ 王迪生¹ 龙子江²

(1 蚌埠医学院第二附属医院药剂科,蚌埠,233000; 2 安徽省合肥市安徽中医药大学药理学教研室,合肥,230038)

摘要 目的:实验探讨附麻平喘方对哮喘模型大鼠的影响并探讨其作用机制。方法:选用 SPF 级清洁雄性大鼠 60 只,采用注射卵蛋白(OVA)与氢氧化铝致敏,OVA 雾化吸入激发来复制哮喘动物模型,造模后将其随机分为 5 组:模型组(等容量蒸馏水)、附麻防喘片组(377.5 mg/kg)、附麻平喘方高剂量组(49.68 g/kg)、附麻平喘方中剂量组(24.84 g/kg)、附麻平喘方低剂量组(12.42 g/kg),每组 10 只。并于致敏 2 周后开始灌胃给药 8 周。末次给药后,采用 ELISA 法检测血浆 ACTH,血清 CORT、IL-4、IFN- γ 及 IgE 的含量;取肺脏,一侧做 HE 染色,另一侧采用免疫组化法检测肺组织内 β -AR 的含量。结果:附麻平喘方能有效缓解模型大鼠哮喘的症状,减轻肺组织病变程度,同时显著升高血清 CORT,血浆 ACTH,肺组织 β -AR 的水平。结论:附麻平喘方可改善哮喘模型大鼠的症状,其机制可能与改善 HPA 轴及免疫功能有关。

关键词 附麻平喘方;作用;机制;实验研究

Experimental Study on the Effect and Mechanism of the Fuma Pingchuan Prescription for Asthma in the Model Rats

Xing Yaqun¹, Wang Disheng¹, Long Zijiang²

(1 The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China; 2 Department of Pharmacology, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

Abstract Objective: To examine the effect of the Fuma Pingchuan Prescription for Asthma in Experimental Rats and to study its mechanism. **Methods:** Sixty Clean male rats of SPF. Except the blank control group, all the rats were injected with ovalbumin(OVA) and aluminum hydroxide sensitization, OVA inhalation excited to replicate animal models of asthma. The experimental rats were divided into five groups: the model group(such as volume of distilled water), positive compare group(377.5 mg/kg), Fuma Pingchuan Prescription high dose group(49.68 g/kg), middle dose group(24.84 g/kg) and low dose group(12.42 g/kg). Each group consists of ten rats. The rats started to receive intragastric administration 2 weeks after sensitization, 1 dose each day in 8 weeks. After the last administration detected by ELISA in plasma ACTH, serum CORT, IL-4, IFN- γ and IgE levels. Staining the tissue in one side of the lung with HE and detecting β -AR content. In the other side by immunohistochemistry. **Results:** Fuma Pingchuan Prescription can effectively alleviate asthma, reduce asthma symptoms and improve lung tissue morphology, while significantly elevated serum CORT, plasma ACTH, lung tissue β -AR levels. **Conclusion:** Fuma Pingchuan Prescription can improve asthma symptoms of model rats, which may be related to the improved functions of HPA axis and immune.

Key Words Fuma Pingchuan Prescription; Effect; Mechanism; Experimental Study

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.08.028

哮喘是支气管哮喘的简称,该证是由肥大细胞,嗜酸性粒细胞和淋巴细胞参与的慢性持续性气道炎性反应性疾病,属于 I 型超敏反应,临床上以痰、咳、喘为其主症。目前西医临床采取抗炎解痉为主的治疗原则,使用 β -受体激动剂、糖皮质激素、茶碱等药物治疗取得了一定的疗效,但不良反应大,远期疗效不很理想。中医治疗该证有长期的临床经验,附麻平喘方是临床经验方,本实验通过观察该方对实验大鼠血浆 IL-4、IFN- γ 、IgE,促肾上腺皮质激素(ACTH),血清皮质酮(CORT)等改变,探讨该方对哮喘大鼠的治疗功效与作用机制^[3-7]。

中医学将该病归于“哮”证和“喘”证的范畴,脏腑

功能失调或虚弱等均可引起痰鸣气喘等证。在临床上有众多的证型分类,有的以病性分型,如冷哮(寒哮)、热哮、虚哮;有以病因分型,如风哮、痰哮;有的按发作期、缓解期分类,且以虚实为纲^[8]。尽管分型众多,但它的治疗离不开肺与肾,特别是久咳久喘或肾虚性患者。故重视标本兼治也已成为治疗这类哮喘患者的一条重要治则。附麻平喘方根据这一治则合理组方,用于治疗支气管哮喘。

1 材料与方法

1.1 药物 试验药物为附麻平喘方,该药由下列中药颗粒剂(江阴天江药业生产)组成:附子 10 g(批号:120518)、麻黄 10 g(批号:120606)、桂枝 10 g(批号:

120810)、细辛 3 g(批号:120703)、青皮 10 g(批号:130219)、甘草 5 g(批号:121007)、决明子 10 g(批号:120613)、白芍 15 g(批号:120308)、熟地黄 20 g(批号:130128)、紫菀 10 g(批号:121105)、苏子 10 g(批号:130307)、淫羊藿 15 g(批号:120627)、巴戟天 10 g(批号:120908)等中药组成。上述中药饮片按中药常规方法煎煮 3 次,合并药液,制成浓度为 5 g/mL 的水煎液,所给剂量按人与动物的剂量换算所得,并经预实验调整。阳性对照药为补肾防喘片(太极集团重庆涪陵制药有限公司生产,批号 11120008),临时时配成相应浓度使用。

1.2 动物 未曾交配的 4~5 月龄 SPF 级 SD 大鼠 60 只,均为雄性,体重(200 ± 20) g,由安徽医科大学动物中心提供,动物合格证书号:SCXK(皖)2011-002。室温 22~25℃、相对湿度为 40%~50%,普通饲料喂养,自由饮水。

1.3 主要试剂 氢氧化铝(江苏永华精细化学品有限公司,批号:20120909);卵清蛋白(Sigma 公司分装);甲醛(上海苏懿化学试剂有限公司,批号:20121110);生理盐水(开开援生制药股份有限公司,批号:2092864);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司生产,批号:20110304),磷酸盐缓冲液,(万新试剂,批号:1112130101);ACTH ELISA 试剂盒、CORT ELISA 试剂盒(上海源叶生物技术有限公司,批号分别为:10805R,10332R), β -肾上腺素受体试剂盒(北京博奥森,批号:998825006W)。

1.4 实验仪器与设备 漩涡混合器,其林贝尔仪器制造公司,型号:GL-88B;超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司,批号:1203001);ALC210 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);酶标仪,雷杜,型号:RT-6000;离心机:安徽嘉文,型号:JW3021HR;电热恒温箱:上海三发,型号:DNP-9052BS-III;分析天平:北京赛多利斯仪器系统有限公司;移液器,eppendorf;电炉(上海日用电炉厂);电子天平(上海天平仪器厂)。

1.5 实验方法 动物分组及给药:取雄性 SD 大鼠 60 只,适应性饲养 1 周后,除正常组外,其他大鼠分别于第 1、7 天腹腔注射 10% 卵清白蛋白(OVA)混悬液 1 mL(含 OVA 100 mg+氢氧化铝 100 mg)。正常组注射生理盐水 1 mL,各组完成致敏阶段^[5,9-10]。然后采用随机数字表法分为 5 组。正常对照组(等容量的蒸馏水)、哮喘模型组(等容量的蒸馏水)、阳性药物组(377.5 mg/kg),附麻平喘方高剂量组(49.68 g/kg),附麻平喘方中剂量组(24.84 g/kg)及附麻平喘方低剂

量组(12.42 g/kg),每组各 10 只。第 15 天起模型组与各给药组分别放于 5 L 自制玻璃雾化箱内,第 1、2 周以 1% OVA 进行雾化吸入激发,1 次/d,20 min/次,每 2 周浓度提高 0.5%,共雾化 8 周,正常组则雾化生理盐水替代 OVA。给药容积为 1 mL/100 g 体重。

1.6 检测指标

1.6.1 血清 IL-4, IFN- γ , IgE 的检测 末次给药后,禁食 24 h,不限水,用 3.5% 水合氯醛 10 mL/kg 腹腔注射麻醉,腹主动脉抽血后处死。分离取血清及血浆,血清用于 IL-4, IFN- γ , IgE 的检测。该检测采用生物素双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELASA)。

1.6.2 血清 CORT 和血浆 ACTH 的检测 末次给药后,禁食 24 h,不限水,用 3.5% 水合氯醛 10 mL/kg 腹腔注射麻醉,腹主动脉抽血后处死。分离取血清及血浆,血清用于 CORT 含量检测,血浆用于 ACTH 含量检测。

1.6.3 肺组织病理形态学检测 取肺脏称重,用 10% 甲醛固定后,以备 HE 染色观察肺组织病理变化。

1.6.4 肺组织 β -AR 的检测 取另一侧肺脏,采用免疫组化法检测肺组织 β -AR 的含量。计算公式:免疫组织化学指数 = GR 表达阳性面积 $\times$ 平均光密度值。

1.7 数据分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理。数据结果以($\bar{x} \pm s$)表示,定量资料每组实验前后比较采用配对样本 t 检验,多组间两两比较采用方差分析(方差齐的采用 LSD 检验,方差不齐者采用 Dunnett t 检验)。

2 结果

2.1 哮喘模型大鼠病理形态学的观察 正常组大鼠肺无实质性异常炎性反应改变,气道黏膜上皮及肺泡结构完整,肺泡间隔窄,气道平滑肌薄,未见炎性细胞浸润。模型组大鼠气道和支气管壁周围有大量的炎性细胞浸润,支气管平滑肌层肥大、增生,黏膜充血、水肿,气道腔内上皮脱落、受损,管腔内充满大量的黏性分泌物,肺泡结构亦出现紊乱、融合现象。补肾防喘片组大鼠肺泡结构较好,与正常对照组相似,支气管上皮结构较完整,气道平滑肌层稍增生,腔内无明显分泌物,支气管及肺泡炎性细胞浸润亦轻于模型组。附麻平喘方高,中剂量组的肺泡壁毛细血管扩张、充血程度较模型组减轻,支气管上皮结构完整,腔内无明显分泌物,肺泡结构较完整,肺泡腔内无明显炎性物质渗出。附麻平喘方低剂量组支气管周围有较多的炎性细胞,支气管平滑肌增生强于高,中剂量组,肺泡有融合现象,结果见图 1。

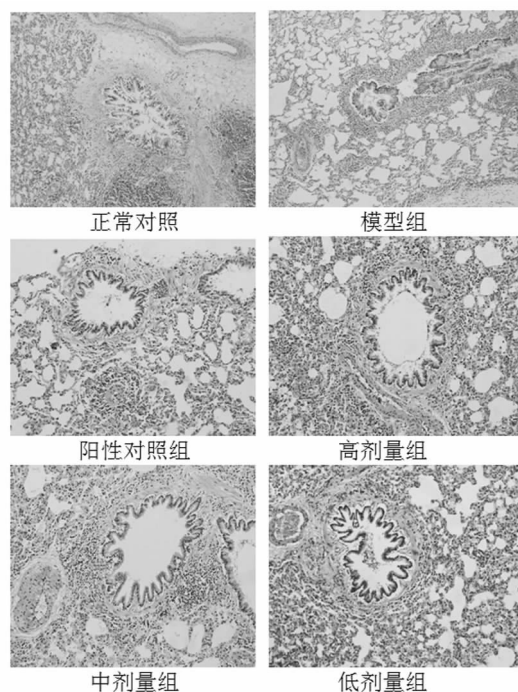


图1 HE染色检测哮喘大鼠肺组织病理学变化×200

2.2 附麻平喘方对哮喘模型大鼠 CORT 和 ACTH 的影响 与正常对照组比较,模型组 ACTH,CORT 值明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,阳性组 CORT($P < 0.01$)和 ACTH($P < 0.05$)升高,高剂量组 CORT,ACTH 值升高($P < 0.05$),中剂量组和低剂量组 CORT 和 ACTH 值升高差异有统计学意义($P < 0.01$),见表1。

表1 附麻平喘方对 CORT,ACTH 水平的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	CORT(ng/mL)	ACTH(pg/mL)
正常组	343.16 ± 48.41 **	129.80 ± 22.90 **
模型组	261.69 ± 34.92	70.47 ± 16.66
补肾防喘片组	342.46 ± 41.25 **	102.69 ± 12.94 *
附麻平喘方高剂量组	304.81 ± 63.65 *	95.79 ± 25.40 *
附麻平喘方中剂量组	342.47 ± 49.84 **	110.03 ± 30.98 **
附麻平喘方低剂量组	353.75 ± 36.21 **	104.46 ± 28.00 **

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.3 附麻平喘方对哮喘模型大鼠肺组织 β -AR 免疫组化指数的影响 与正常对照组比较,模型组 β -AR 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,阳性组 β -AR 升高且差异有统计学意义($P < 0.01$);附麻平喘方高、中剂量组 β -AR 升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);低剂量组 β -AR 升高差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

2.4 附麻平喘方对哮喘模型大鼠 IL-4, IFN- γ , IgE 的影响 与正常对照组比较,模型组 IL-4, IgE 值升高, IFN- γ 值降低($P < 0.01$);与模型组比较,阳性组,

中剂量组和低剂量组 IL-4 值降低差异有统计学意义($P < 0.01$),高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$);阳性组,中剂量和低剂量组 IFN- γ 值升高且差异有统计学意义($P < 0.05$);阳性组 IgE 值降低差异有统计学意义($P < 0.01$),高剂量组和中剂量组降低差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表2 附麻平喘方对 β -AR 免疫组化指数影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	β -AR
正常组	—	205.61 ± 25.45 **
模型组	—	60.30 ± 9.87
补肾防喘片组	0.38	128.82 ± 19.03 **
附麻平喘方高剂量组	49.68	156.48 ± 13.14 **
附麻平喘方中剂量组	24.84	105.56 ± 21.82 **
附麻平喘方低剂量组	12.42	90.74 ± 10.66 *

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表3 附麻平喘方对 IL-4, IFN- γ 水平的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	IL-4(Pg/mL)	IFN- γ (Pg/mL)	IgE(ug/mL)
正常组	89.21 ± 11.24 **	194.95 ± 29.45 **	16.94 ± 3.45 **
模型组	128.02 ± 24.41	136.22 ± 27.33	21.85 ± 3.49
补肾防喘片组	93.21 ± 13.32 **	165.23 ± 27.09 *	17.03 ± 3.39 **
高剂量组	107.29 ± 24.22 *	146.26 ± 28.55	17.48 ± 2.93 *
中剂量组	93.17 ± 26.56 **	182.19 ± 26.91 **	17.88 ± 1.76 *
低剂量组	104.72 ± 20.66 *	168.00 ± 29.65 *	19.11 ± 2.67

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

此外,模型组大鼠与正常对照组相比在“望诊”方面出现了皮毛无泽、竖立,大小便量增多,身体消瘦,动作迟钝,精神不振,蜷卧等症状,同时伴见呼吸急促,喘息,哮鸣音,口鼻四肢发绀,严重者,甚至出现了明显的喘促声或打喷嚏、搔鼻、咳嗽等现象,提示该组大鼠出现了哮喘的症状,各给药组上述症状均不同程度减轻、好转。

3 讨论

现代医学认为哮喘的病理生理变化涉及到免疫系统和神经内分泌系统多个环节,其中下丘脑-垂体前叶-肾上腺皮质与单核-巨噬细胞环路是目前与哮喘等应激有关的研究较多的一个环路,即 HPA(下丘脑-垂体-肾上腺皮质)轴。研究发现,哮喘患者 HPA(下丘脑-垂体-肾上腺皮质)轴功能低下^[9],特别是糖皮质激素水平较低。

哮喘是以肥大细胞反应,嗜酸性粒细胞浸润为主的慢性气道炎性反应性疾病;T 淋巴细胞的 2 种亚型 Th1、Th2 的失衡与哮喘的发作密切相关,Th2 细胞过度表达可导致哮喘发作,因此 Th1、Th2 的比值也成为相关实验研究判定治疗结果的指标之一^[10];IFN- γ 、IL

-4 分别是 Th1 和 Th2 细胞的特征性细胞因子^[11]。哮喘患者 Th1 细胞功能下降, Th2 细胞功能异常增高, 以致 IFN- γ 分泌减少, IL-4 分泌增多, 因此 IFN- γ 在相关研究中作判定治疗结果的指标之一^[12]。它们作为一种重要的趋化因子, 对引起哮喘发作的各种效应细胞如嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、T 细胞及 IgE 均有较强的趋化作用, 可趋化嗜酸性粒细胞向气道聚集后, 嗜酸性粒细胞可释放炎症递质白三烯、血小板活化因子等, 造成气道细胞组织的炎症损伤, 又直接导致气道痉挛, 并最终可导致气道反应性的增高。

本实验研究结果也与上述哮喘机制相吻合: 模型组 ACTH 和 CORT 主要的检测指标明显偏低, 附麻平喘中剂量组的 ACTH 和 CORT 指标高于模型组, 并且差异有统计学意义, 这一结果表明附麻平喘方通过附麻平喘方治疗哮喘的作用机制与提高 ACTH 和 CORT 水平有关。

糖皮质激素对哮喘发病机制的干预是通过抑制炎症反应细胞的迁移和活化, 抑制细胞因子的生成, 抑制炎症反应递质的释放等实现的。本实验的研究结果与这一机制相吻合: 模型组血清 IFN- γ 分泌减少, IgE、IL-4 分泌增多; 附麻平喘中、低剂量组 IL-4、IL-8 水平均低于模型组; 其中、低剂量组 IFN- γ 水平均高于模型组、上述差别均有统计学意义。此外, 哮喘患者气道紧张度增高, β_2 受体功能相对降低, 也是哮喘发病因素之一, 糖皮质激素水平升高可增强平滑肌细胞 β_2 受体的反应性, 有利于哮喘的缓解与减轻, 本实验研究结果也证实了这一作用。

中医学对哮喘症的治疗由来已久, 既是在中西医对照的情况下仍取得良好疗效。中医学认为脏腑功能失调或虚弱, 或因六邪七情、瘀血等致肺气不宣, 气机上逆; 或致湿浊内生聚而生痰; 或痰气相搏, 气道挛急等均可引起痰鸣气喘等证。在临床上有众多的证型分类, 但肺主呼, 肾主吸, 与肺肾有密切关系, 特别是久咳久喘患者精气耗损, 伤及元气, 出现肾虚性症状。故重视补肾虚以治本^[13], 宣降肺气等以治标, 标本兼治成为治疗这类哮喘患者的一条重要治则。附麻平喘方根据这一治则合理组方, 该方由补肾、调肺等中药组成:

附子、淫羊藿、巴戟天温补肾阳为君药; 麻黄、桂枝、苏子、细辛、紫菀、温肺宣肺, 通降肺气, 为臣药; 熟地黄阴中求阳, 决明子泻中求补, 青皮疏肝理气、调畅气机, 同为佐药; 甘草、白芍引经、调和为使药。上述君药不仅能补益正气, 还有一定抗过敏作用^[14]。

参考文献

- [1] 任现志, 刘嘉君. 从肾论治儿童哮喘缓解期的研究概况[J]. 中国中医急症, 2010, 19(12): 2120-2121.
- [2] Christianson C A, Alam R. Mechanisms of sustained signalling in asthma[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2013, 13(1): 100-105.
- [3] Nakamura Y. Developmental current and future therapy for severe asthma[J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2013, 12(1): 54-60.
- [4] 苏奎国. 五紫三黄方对激素依赖性哮喘小鼠模型作用机理的实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [5] CHU Wei-li, CHU Ming, WANG Yue-dan, et al. Effects of epithelial cell injury of the lower respiratory tract in the pathogenesis of allergic responses in a rat model[J]. Chin Med J, 2013, 126(1): 72-77.
- [6] 王培, 许利平, 金喜宏, 等. 糖皮质激素对哮喘模型大鼠肾阴阳虚证候演变的影响[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(1): 80-85.
- [7] 张雪, 潘家华. IL-17 在哮喘发病机制中免疫作用的研究进展[J]. 安徽医药, 2012, 16(12): 1743-1746.
- [8] 李凤森, 哈木拉提, 杨剑, 等. 哮喘中医分型及其淋巴细胞亚群与递质、内源性皮质醇变化的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 10(15): 19-22.
- [9] 刘仁慧, 杨婧, 王培, 等. 淫羊藿女贞子对激素干预撤停阶段大鼠哮喘模型 HPA 轴及骨代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 137-139.
- [10] 张雄飞, 朱盛山, 黄娟萍, 等. 喘平方调节哮喘模型豚鼠 Th1/Th2 平衡的实验研究[J]. 中成药, 2013, 35(9): 2016-2019.
- [11] Gavalá ML, Bashir H, Gern JE. Virus/allergen interactions in asthma[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2013, 13(3): 298-307.
- [12] 陈杰, 袁岳沙, 黄虎翔, 等. 中医治疗哮喘患儿对炎症细胞因子的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 885-886.
- [13] 方向明. 支气管哮喘中医治疗的思路与方法[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 21(3): 1-3.
- [14] 孙彦, 卢薇, 曲天华, 等. 中医药治疗哮喘的临床体会[J]. 中华实用中西医杂志, 2009, 22(3): 132-133.

(2014-03-06 收稿 责任编辑: 王明)