

苏黄止咳胶囊对咳嗽变异性哮喘豚鼠的干预作用研究

高明¹ 张忠德² 李际强² 李洪涛³

(1 广州中医药大学, 广州, 510405; 2 广州中医药大学第二附属医院, 广州, 510120;

3 广州医科大学附属第一医院呼吸疾病国家重点实验室, 广州, 510230)

摘要 目的:观察苏黄止咳胶囊对咳嗽变异性哮喘(Cough Variant Asthma,CVA)豚鼠模型的影响。方法:将55只豚鼠随机分成正常对照组、模型对照组、醋酸泼尼松组及苏黄止咳胶囊高、低剂量组,结合文献方法制作CVA豚鼠模型,检测各组豚鼠咳嗽次数、支气管肺泡灌洗液(Bronchoalveolar Lavage Fluid,BALF)中嗜酸性粒细胞百分率及气道阻力变化。结果:与正常对照组比较,模型对照组豚鼠咳嗽次数、BALF中嗜酸性粒细胞百分率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型对照组比较,苏黄止咳胶囊高、低剂量组豚鼠咳嗽次数明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),苏黄止咳胶囊高剂量组豚鼠的气道阻力在乙酰甲胆碱浓度为0.2 mg/mL、0.4 mg/mL时下降明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),苏黄止咳胶囊高剂量组豚鼠BALF中嗜酸性粒细胞百分率下降明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:苏黄止咳胶囊对CVA豚鼠的咳嗽次数、BALF中嗜酸性粒细胞百分率及气道阻力有改善作用。

关键词 咳嗽变异性哮喘;苏黄止咳胶囊;豚鼠;气道阻力

Effect of Suhuang Zhike Capsule on Model Guinea Pig with Cough Variant Asthma

Gao Ming¹, Zhang Zhongde², Li Jiqiang², Li Hangtao³

(1 Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2 Second Affiliated Hospital to Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; 3 Respiratory System Diseases Key Lab of First Affiliated Hospital to Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510230, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Suhuang Zhike capsule on guinea pig model of cough variant asthma. **Methods:** Fifty-five female guinea pigs were randomly divided into normal control group, model control group, prednisone acetate tablets group and Suhuang Zhike capsule high and low dose group. Based on related literature, set up the guinea pig model of cough variant asthma. Then observe the changes of the cough frequency, the percentage of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and resistance (detection of resistance used the BUXCO RC system). **Results:** Compared with the normal control group, the cough frequency and the percentage of eosinophils in BALF of the model control group was significantly increased ($P < 0.05$); Compared with the model control group, the cough frequency in guinea pig of Suhuang Zhike capsules high and low doses group was reduced obviously ($P < 0.05$), and the resistance in guinea pigs of Suhuang Zhike capsules high dose group was decreased ($P < 0.05$) when methacholine concentration is 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, the percentage of eosinophils in BALF of Suhuang Zhike capsules high dose group was decreased obviously ($P < 0.05$). **Conclusion:** Suhuang Zhike capsules could ameliorate cough frequency, percentage by eosinophils in BALF and resistance in CVA guinea pig.

Key Words Cough variant asthma; Suhuang Zhike capsules; Guinea pig; Resistance

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.02.036

CVA在临床上是一种常见的特殊类型的哮喘。名老中医晁恩祥教授所研制的苏黄止咳胶囊临床应用于CVA患者,对患者咳嗽、咽痒、气急等症状有显著疗效^[1]。本实验从咳嗽敏感性、肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞的百分率及气道阻力的变化,探讨苏黄

止咳胶囊治疗CVA豚鼠模型可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 55只雌性普通级豚鼠,体质量(300±50)g,由南方医科大学实验动物中心提供(合格证

基金项目:广东省自然科学基金项目(编号:S2013010012179;2014A030313412)

作者简介:高明(1989.02—),女,广州中医药大学2014级硕士研究生,研究方向:中医药防治气道疾病、呼吸道感染临床与实验研究,E-mail:861750409@qq.com

通信作者:李际强(1972.10—),男,主任中医师,医学博士,科主任,研究方向:中西医结合呼吸、感染病、老年病的临床与基础研究,E-mail:1728183346@qq.com

号:44002100005781)。

1.1.2 药物 鸡清白蛋白(OVA)溶液(购自 GB-CBIO Technologies 公司):将 1 g 鸡清白蛋白干粉溶于 25 mL 的生理盐水中先配置成 4% OVA 溶液,并用生理盐水稀释 2% OVA 溶液。氢氧化铝干粉(购自天津惠瑞化工科技有限公司,生产编号:20141111)。辣椒素溶液:取辣椒素(购自 SIGMA 公司)30.5 mg,依次加入吐温-80 溶液及无水乙醇各 1 mL 溶解,再加入生理盐水 8.0 mL,配成 10^{-2} $\mu\text{mol/L}$ 的辣椒素原液,取 1 mL 的辣椒素原液,稀释至 100 mL,成 10^{-4} $\mu\text{mol/L}$ 溶液。乙酰甲胆碱溶液(乙酰甲胆碱购自 SIGMA 公司),0.8 mg 乙酰甲胆碱溶于 1 mL 的生理盐水中,对倍稀释成 0.4 mg/mL 和 0.2 mg/mL 的溶液。

1.1.3 试剂 苏黄止咳胶囊由扬子江药业集团有限公司生产,批号为 15051811,成人用量 3 粒/次、1 次/d、0.45 g/粒。

1.2 方法

1.2.1 熏烟箱与用法 熏烟箱为定制的长、宽、高分别为 100 cm $\times$ 60 cm $\times$ 60 cm 的不锈钢箱体。本实验所用香烟为“红梅”过滤嘴香烟(红塔烟草有限责任公司;烤烟型香烟-焦油量 10 mg,烟气烟碱量 0.7 mg,烟气一氧化碳量 12 mg)。每次在熏烟箱中点燃 10 根香烟,将香烟点燃后,通过 300 mL 注射器和三通管的人工操作将烟雾排入熏烟箱,直至香烟燃完。

1.2.2 模型制备与分组 实验动物随机分为正常对照组、模型对照组、苏黄止咳胶囊高、低剂量组、醋酸泼尼松组。除正常对照外的动物在第 1~28 d,熏烟 0.5 h/d;第 15 天每只豚鼠注射 2% OVA 1 mL 和 200 mg 氢氧化铝的混悬液,第 22 天每只豚鼠注射 2% OVA 1 mL 和 200 mg 氢氧化铝的混悬液加强致敏 1 次,第 29 天用 1% OVA 雾化攻击,连续 7 次,1 次/d^[24]。正常对照组给予同样剂量的生理盐水。所有动物饲养在普通环境,12 h/12 h 光照循环,自由饮水和食用颗粒饲料。

1.2.3 给药方法 在第 29 天雾化攻击当天开始给药,苏黄止咳胶囊配置成高剂量组为 6 g/kg,低剂量为 2 g/kg,醋酸泼尼松组为 3 mg/kg。灌胃给予相应的药物,1 次/d,连续 7 d。正常对照组和模型对照组给予同样剂量的生理盐水。

1.2.4 检测指标与方法

1.2.4.1 咳嗽敏感性的测定(CRS) 通过辣椒素咳嗽激发试验判断气道的咳嗽敏感性。采用全身体

积描记法(Buxco Electronics WBP System):1% OVA 最后一次雾化攻击后的第 2 天,将豚鼠放入体描箱内,用 10^{-4} $\mu\text{mol/L}$ 辣椒素溶液雾化 2 min 后观察并记录豚鼠 5 min 的咳嗽次数。

1.2.4.2 气道高反应性测定 CRS 测定 24 h 以后,有创方法通过 RC 系统(Buxco Electronics RC System),观察豚鼠气道阻力(RI)的变化。测定基值后,测定 30 μL 生理盐水及倍增浓度的乙酰甲胆碱(MeCh)激发雾化后 RI 的变化,MeCh 的激发浓度由低到高,依次为 0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.8 mg/mL 每次雾化 1.5 min,观察 5 min,并自动记录下每个浓度级别下的气道阻力值(RI)。

1.2.4.3 支气管肺泡灌洗液的收集和支气管肺泡灌洗液中白细胞计数分类 待激发试验完成后,支气管肺泡灌洗 3 次,2 mL/次 PBS,并回收支气管肺泡灌洗液(BALF)。将收集的 BALF 取 200 μL 并以 3 000 r/min 离心 10 min,转移上清液,加入红细胞裂解液后,3 000 r/min 离心 10 min,转移上清液,加入等量 PBS 涂片,苏木素-伊红染色,在显微镜下进行嗜酸性粒细胞计数,在显微镜下计连续视野中每 200 个细胞中嗜酸性粒细胞的数量,并计算出嗜酸性细胞的百分率。将收集的 BALF 取 100 μL ,以 3 000 r/min 离心 10 min,转移上清液,加入红细胞裂解液后,再以 3 000 r/min 离心 10 min,加入等量 PBS,取 10 μL 进行细胞计数。其余 BALF 离心后取上清,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 统计学方法 上述数据采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行计算,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组豚鼠 CRS 测定^[5-7] 与正常对照组比较,模型对照组咳嗽次数明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗组的咳嗽次数明显低于模型组,苏黄止咳胶囊高、低剂量组的咳嗽次数与模型对照组比较显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);3 个治疗组之间比较,说明苏黄止咳胶囊能抑制动物的咳嗽反应,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组豚鼠的气道高反应测定结果 各组动物在生理盐水激发前的基值和生理盐水激发后的气道阻力(RI, $\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{secs/mL}$)值,差异无统计学意义($P > 0.05$),但苏黄止咳胶囊高剂量组与模型对照组比较在生理盐水激发时差异有统计学意义($P < 0.05$)。乙酰甲胆碱激发后,气道阻力值变化比较明

显,造模的组较正常组气道阻力上升明显,在乙酰甲胆碱浓度为 0.2 mg/mL 时,正常组和苏黄止咳胶囊高、低剂量组与模型对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),苏黄止咳胶囊低剂量组和激素组与高剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);在乙酰甲胆碱浓度为 0.4 mg/mL 时,正常组和苏黄止咳

胶囊高剂量组与模型对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);在乙酰甲胆碱浓度为 0.8 mg/mL 时模型组的阻力值较前一个激发浓度有所下降,苏黄止咳胶囊低剂量组和激素组与苏黄止咳胶囊高剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

表 1 各组豚鼠咳嗽次数测定结果比较 ($n, \bar{x} \pm s$)

组别	正常对照组	模型对照组	激素组	高剂量组	低剂量组
样本数	6	8	7	6	9
咳嗽次数	$3.67 \pm 2.34^{* \Delta}$	$8.63 \pm 3.54^{*}$	5.86 ± 3.08	$4.67 \pm 3.14^{\Delta}$	$5.33 \pm 2.87^{\Delta}$

注:与正常组比较, $^{*}P < 0.05$;与模型对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

表 2 各组豚鼠气道阻力测定结果比较 ($n, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	激发前	生理盐水	0.2 mg/mL	0.4 mg/mL	0.8 mg/mL
正常对照组	6	0.31 ± 0.39	0.36 ± 0.85	$1.30 \pm 1.67^{*}$	$2.43 \pm 2.68^{*}$	4.36 ± 3.37
模型对照组	8	0.41 ± 0.07	0.57 ± 0.14	6.56 ± 2.01	7.94 ± 1.21	4.80 ± 1.62
激素组	7	0.43 ± 0.21	0.56 ± 0.32	$4.20 \pm 4.17^{\Delta}$	6.37 ± 5.85	$8.42 \pm 0.76^{* \Delta}$
低剂量组	7	0.43 ± 0.13	0.55 ± 0.25	$1.85 \pm 2.91^{* \Delta}$	3.64 ± 3.02	$6.14 \pm 3.36^{\Delta}$
高剂量组	3	0.82 ± 0.17	$1.41 \pm 0.27^{*}$	$1.34 \pm 0.23^{*}$	$1.34 \pm 0.38^{*}$	1.46 ± 0.30

注:与模型对照组比较, $^{*}P < 0.05$;与高剂量比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

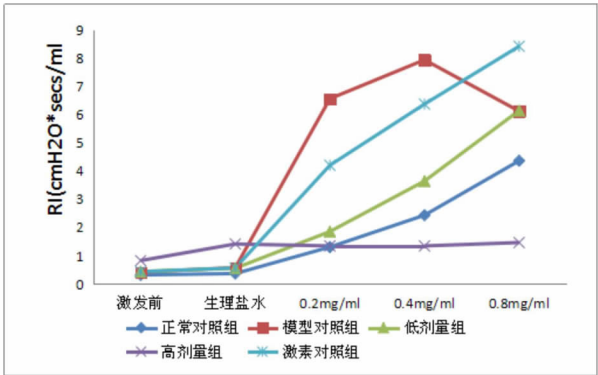


图 1 各组豚鼠气道高反应变化

表 3 各组豚鼠嗜酸性粒细胞百分率与细胞总数比较结果 ($n, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	嗜酸性粒细胞百分率 (%)	细胞总数 (106/mL)
正常对照组	6	$0.19 \pm 0.03^{*}$	$220.17 \pm 212.38^{*}$
模型对照组	8	$0.33 \pm 0.13^{\Delta}$	$515.30 \pm 109.52^{\Delta}$
激素组	7	$0.36 \pm 0.18^{\Delta \Delta}$	$445.01 \pm 243.34^{\Delta \Delta}$
低剂量组	8	0.25 ± 0.09	$483.00 \pm 150.11^{\Delta \Delta}$
高剂量组	6	$0.16 \pm 0.05^{*}$	$223.00 \pm 132.07^{*}$

注:与模型对照组比较, $^{*}P < 0.05$;与正常组比较, $^{\Delta}P < 0.05$;与高剂量组比较, $^{\Delta \Delta}P < 0.05$ 。

2.3 支气管肺泡灌洗液中白细胞计数及嗜酸性粒细胞百分率的测定结果 与正常组比较,模型对照组的嗜酸性粒细胞百分率及细胞总数明显上升 ($P < 0.05$);与模型对照组比较,治疗组的嗜酸性粒细胞百分率及细胞总数有所下降,高剂量组明显减少 ($P < 0.05$);激素组的嗜酸性粒细胞的百分率稍有

上升;3 个治疗组之间比较,苏黄止咳胶囊高剂量组的嗜酸性粒细胞百分率较激素组显著下降明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),细胞总数较激素组和低剂量组显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

CVA 主要临床表现为阵发性、刺激性的干咳,且夜间为重,无明显胸闷气喘等症状,具有气道的高反应性。在感冒、遇冷热刺激、灰尘、异味、等多种因素作用下可诱发咳嗽,临床中使用抗生素治疗的效果不佳。中医对此早有记载,将该病归为“咳嗽”“风咳”等病证范畴,《医门法律》曰:“风、火、热、湿、燥及寒,皆能乘肺,皆足致咳”。《诸病源候论》记载:“有十种咳、一曰风咳,欲语因咳言不得是也”,因此“风咳”居于首位,虽属哮喘,但以咳为主,即名曰“风咳”。晁恩祥教授提出风邪独立致咳的观点,以“风咳”立论^[8],研制了苏黄止咳胶囊,其方以麻黄为君,宣肺止咳平喘;紫菀、五味子等为臣,敛肺止咳化痰,疏缓气道;佐以苏子、前胡等,配合麻黄宣降相协;配蝉蜕等使药加强疏散风邪,并能利咽止痒。

本实验采用有创的方法观察乙酰甲胆碱激发试验检测豚鼠的气道阻力 (RI)^[7]。RC 系统是 Buxco 检测动物气道阻力与动态肺顺应性的系列有创系统中的新产品,检测时需要将动物进行麻醉,并实施气管切开手术,通过测量端口压、跨肺压或胸膜压以及气道中气体流速等参数,得出气道阻力等肺功能指

标参数。与 Hao-yan Jiao 等^[9]采用无创方法所测定 Penh(增强呼吸间歇)不完全相同。实验结果显示,模型对照组的 RI 随着乙酰甲胆碱的浓度升高而逐渐升高,但是在乙酰甲胆碱的浓度为 0.8 mg/mL 时的气道阻力较浓度为 0.4 mg/mL 时的气道阻力有所降低,考虑其一个可能原因是在浓度为 0.8 mg/mL 时相对于前几个浓度样本数量减少,豚鼠个体差异性大,最后获得数据的样本个体气道阻力值偏低;另一个可能原因和熏烟有关,一方面增加了咳嗽反应的敏感性,同时也增加了动物对乙酰甲胆碱激发反应的敏感性,可能导致乙酰甲胆碱浓度在 0.4 mg/mL 达到了最大能承受的激发浓度值,具体原因还需进一步实验证实。经过苏黄止咳胶囊和激素治疗,各组豚鼠的气道阻力在乙酰甲胆碱浓度为 0.2 mg/mL、0.4 mg/mL 时下降明显,且在 3 个浓度的乙酰甲胆碱(0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.8 mg/mL)激发下,苏黄止咳胶囊高、低剂量组的气道阻力值低于激素组,说明苏黄止咳胶囊在降低气道阻力值、减缓气道高反应的效果优于激素治疗。CVA 的高反应性和气道阻力介于哮喘患者和正常人之间,暴露了气道的刺激感受器,对外界的各种理化因素刺激的敏感程度明显提高,故可以引起顽固性持续性咳嗽^[10]。咳嗽是 CVA 唯一或是主要的临床表现,本实验采用辣椒素诱发咳嗽产生,测定豚鼠的咳嗽次数,其原理是通过雾化吸入特异性的刺激物,激活气道感觉神经末梢的咳嗽感受器,诱发咳嗽的产生,以激发物的浓度和咳嗽成都判断 CRS^[11]。造模组的豚鼠的咳嗽次数较正常对照组明显增多,说明模型是成功的,而经过中药和激素治疗,咳嗽次数减少,并且苏黄止咳胶囊高、低剂量组咳嗽次数较激素组少,说明苏黄止咳胶囊可以有效缓解豚鼠的咳嗽症状。气道慢性炎性反应是 CVA 的重要发病机制^[12],是以嗜酸性粒细胞浸润为主的气道炎性反应^[13]。模型对照组的豚鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞的百分比和细胞总数明显升高,经过苏黄止咳胶囊治疗的高、低剂量组嗜酸性粒细胞的百分率明显下降,说明了苏黄止咳胶囊可以减轻嗜酸性粒细胞的

浸润状况,使嗜酸性粒细胞的百分率降低。

综上所述,实验中苏黄止咳胶囊可以改善 CVA 豚鼠模型的咳嗽症状,改善豚鼠模型的气道阻力以及减轻嗜酸性粒细胞的浸润。其作用机制可能通过减轻嗜酸性粒细胞的浸润,从而减轻炎性反应,同时降低气道阻力,减轻高反应性,以达到治疗目的。

参考文献

- [1] 张燕萍,苗青,晁燕,等. 苏黄止咳胶囊治疗咳嗽变异性哮喘的随机对照多中心临床研究[J]. 中医杂志,2008,49(6):504-506.
- [2] Nishitsuji M, Fujimura M, Oribe Y, et al. Effect of montelukast in a guinea pig model of cough variant asthma[J]. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2008, 21(1):142-145.
- [3] 蔡黎,毕小利,王忆勤,等. 咳嗽变异性哮喘豚鼠模型的构建[J]. 山西医科大学学报,2007,38(12):1070-1073.
- [4] 熊宁,彭志群,吴金飞,等. 苏黄止咳胶囊治疗咳嗽变异性哮喘的有效性研究[J]. 中国医药,2013,8(8):1071-1072.
- [5] Liu Q, Fujimura M, Tachibana H, et al. Characterization of increased cough sensitivity after antigen challenge in guinea pigs[J]. Clin Exp Allergy, 2001, 31(3):474-484.
- [6] 吕寒静,邱忠民,杨忠民,等. 气道速激肽在卵蛋白致敏豚鼠模型咳嗽反应中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2005,21(9):1744-1747.
- [7] 高明,张忠德,李际强,等. 豚鼠咳嗽变异性哮喘模型的建立[J]. 广东医学,2016,37(9):1290-1292.
- [8] 李际强,韩云,张忠德,等. 晁恩祥治疗风咳的临床经验探析[J]. 江西中医药,2010,41(7):13-14.
- [9] Jiao HY, Su WW, Li PB, et al. Therapeutic effects of naringin in a guinea pig model of ovalbumin-induced cough-variant asthma[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2015(33):59-65.
- [10] 林少芳,曹鹰,付东红. 咳嗽变异性哮喘 28 例临床分析[J]. 临床肺科杂志,2009,14(5):587.
- [11] 叶新民,钟南山,刘春丽,等. 呼吸道合胞病毒感染对豚鼠咳嗽相关气道功能及其神经递质的影响[J]. 中华哮喘杂志:电子版,2011,5(3):182-187.
- [12] Niimi A, Matsumoto H, Mishima M. Eosinophilic airway disorders associated with chronic cough[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2009, 22(2):114-120.
- [13] 刘映玲,郑艳萍,黄慧芳,等. 小儿止咳颗粒对哮喘大鼠气道炎症的免疫调控作用研究[J]. 广西中医药,2016,39(3):67-70.

(2016-04-18 收稿 责任编辑:张文婷)