

止喘胶囊对实验性哮喘动物模型气道重建的影响^{*}

林 琳 要全保 于素霞 吴银根

内容提要 目的:阐明止喘胶囊(补肾健脾法)治疗哮喘对气道重建的影响及其可能的机制。方法:将50只SD大鼠随机分为正常对照组、模型组、止喘胶囊大剂量组、止喘胶囊小剂量组、必可酮组,每组10只。通过长期吸入卵白蛋白建立慢性哮喘模型,肺组织切片分别进行胶原染色、纤维连接蛋白(Fn)免疫组织化学染色,借助计算机图像辅助分析系统分析气道壁胶原、Fn含量、气道腔面积变化,显微测量气道腔内径变化。结果:模型组气道壁胶原、Fn含量明显高于正常对照组($P<0.05$, $P<0.01$),气道内/外径比值、气道内腔面积/总横截面积比值明显低于正常对照组(均 $P<0.01$)。止喘胶囊大剂量组气道壁胶原、Fn含量明显低于模型组($P<0.05$, $P<0.01$),气道内/外径比值、气道内腔面积/总横截面积比值明显高于模型组($P<0.05$);且与正常对照组相似($P>0.05$)。止喘胶囊小剂量组的气道壁胶原含量、气道内/外径比值和气道内腔面积/总横截面积比值虽与模型组无差异($P>0.05$),但其Fn含量明显低于模型组($P<0.01$)。结论:止喘胶囊(补肾健脾法)可能通过减少气道壁胶原和Fn沉积,抑制慢性哮喘的气道重建,有利于对慢性哮喘的治疗和预防。

关键词 止喘胶囊 补肾健脾法 慢性哮喘模型 气道重建

Study on Effect of Zhichuan Capsule on Airway Remodeling in Experimental Animal Model of Asthma LIN Lin, YAO Quan-bao, YU Su-xia, et al *Longhua Hospital of Shanghai University of TCM, Shanghai (200032)*

Objective: To elucidate the effect and possible mechanism of Zhichuan Capsule (ZCC), a Chinese herbal preparation for reinforcing Kidney and invigorating Spleen, on airway remodeling when it was used in treating asthma. **Methods:** Fifty SD rats were randomly divided into five groups: the normal control group, the model group, the high-dosage ZCC group, the low-dosage ZCC group and the Becotide (Beclomethasone Dipropionate) group, 10 rats in each group. The chronic asthma model was established by repeated inhalation of ovalbumin. The changes of collagen and fibronectin (Fn) content in airway wall, inner and outer diameter as well as area of respiratory tract cavity in lung slices were measured by computerized image analysis system. **Results:** The wall contents of collagen and Fn in airway were higher ($P<0.05$ and $P<0.01$), while the ratio of inner diameter/outer diameter (ID/OD) and ratio of area of airway cavity/total area of airway (CA/TA) were significantly lower ($P<0.01$) in the model animals than those in the normal controls. As compared with the model group, collagen and Fn contents were lower, ID/OD and CA/TA ratio were significantly higher in high-dosage ZCC group, close to normal range. In the low-dosage ZCC group, although collagen content, ID/OD and CA/TA were not different to those in the model group, but the content of Fn was significantly lower ($P<0.01$). **Conclusion:** ZCC could inhibit the remodeling of airway in chronic asthma by way of reducing the precipitation of collagen and Fn, thus help the prevention and treatment of chronic bronchial asthma.

Key words Zhichuan Capsule, reinforcing Kidney and invigorating Spleen, chronic asthma model, airway remodeling

补肾健脾方剂止喘胶囊是我院吴银根教授根据传统中医学理论结合多年临床实践经验制定的防治哮喘

的经验方,它具有补肾纳气、健脾化痰、固本平喘的作用,应用于临床已取得了初步疗效。为了进一步探讨止喘胶囊对慢性哮喘气道重建的影响,我们设计建立了大鼠慢性哮喘动物模型,并对其气道组织形态进行观察分析。

^{*} 国家中医药管理局资助课题项目(No. 972100)

上海中医药大学附属龙华医院呼吸内科(上海 200032)

材料和方法

1 动物及分组 选用雄性 SD 大鼠 50 只,体重(200±20)g,由上海中医药大学实验动物中心提供。随机分为 5 组,正常对照组,模型组,止喘胶囊大剂量组,止喘胶囊小剂量组,必可酮组。每组 10 只。

2 药物 止喘胶囊由仙灵脾、巴戟天等 3 味药物按比例提炼浓缩为流浸膏,制成胶囊,每粒含生药 5g,由上海龙华医院提供。必可酮气雾剂每揿含丙酸倍氯米松 50 μ g,重庆葛兰素威康制药有限公司产品。

3 试剂与仪器 试剂:卵白蛋白(Albumin chicken-egg)由上海伯奥生物科技有限公司提供,批号:990817;灭活百日咳杆菌(6×10^9 个/ml)由上海生物制品研究所提供;兔抗人纤维连接蛋白(Fn)即用型单抗,DAKO 公司提供,批号:9901202;免疫组化 DAKO En Vision TM 试剂盒,DAKO 公司提供,批号:9901204;氢氧化铝凝胶,100%无水酒精,丽春红,二甲苯,生理盐水,10%甲醛等若干。仪器:医用超声雾化器 A02 型,上海合力医疗器械厂生产;托盘式扭力天平,TN-100B 型,上海第二天平仪器厂生产;图像分析仪,上海医科大学神经生理和神经生物研究所;烘箱、切片机、普通光学显微镜(OLYMPAS)等均由上海中医药大学病理教研室提供。

4 实验方法

4.1 造模及给药方法 参照文献^[1-4]的方法建立大鼠慢性哮喘模型。除正常对照组外,第 1 天各组大鼠每只腹腔分左右各注射卵白蛋白生理盐水溶液 1ml(每 1ml 含 1.0mg 卵白蛋白,200mg 氢氧化铝)和加热灭活的百日咳杆菌 1ml(6×10^9 个/ml)致敏。第 15~21 天分批用 1% 卵白蛋白气溶胶超声雾化吸入 20min,雾化流量为 3ml/min,连续 7 天,以激发哮喘。第 22~35 天除正常对照组外,各组大鼠每天分别胃饲止喘胶囊 16g/kg 体重,止喘胶囊 4g/kg 体重,吸入必可酮 250 μ g/kg 体重(相当于每天 1 揿/只);模型组大鼠胃饲生理盐水 2ml/只。第 29~35 天除正常对照组外,在给药同时以 1% 卵白蛋白气溶胶超声雾化吸入 20min,激发哮喘。第 35 天晚开始禁食不禁水,第 36 天处死大鼠,收集标本。

4.2 观察项目及检测方法 大鼠肺组织用 10% 甲醛固定 24h,酒精梯度脱水,石蜡包埋,切片约 6 μ m 厚。然后对大鼠肺组织切片进行(1)胶原染色,染色步骤参照文献中胶原纤维的染色新方法^[5]改进。图像分析气道壁胶原含量(积分吸光度 A 值,阳性染色面积/气道总面积)(2)Fn 免疫组化,染色步骤采用 En-

vision System 二步法,根据基因公司 DAKO 1999 年试剂目录提供的方法操作,图像分析气道壁 Fn 含量(吸光度 A 值 \times 染色面积/气道总面积)(3)HE 染色,染色步骤参照龚志锦等^[5]的方法,用测微尺测量并分析气道内径与外径比值,图像分析气道内腔面积与气道总横截面积比值。

4.3 统计学方法 采用单因素方差分析法。

结 果

1 各组大鼠肺组织胶原染色图像分析结果及 Fn 免疫组化图像分析结果 见表 1。正常对照组气道壁薄,Fn 很少,粘膜完整,胶原染色着色浅,染色面积小;模型组气道壁明显增厚,Fn 含量明显增多,粘膜明显肿胀,胶原染色着色重,染色面积大;止喘胶囊大剂量组气道壁薄,Fn 无明显增加,粘膜完整,胶原染色着色及染色面积均与正常对照组相似;止喘胶囊小剂量组气道壁有增厚,Fn 增加较明显,粘膜有一定的肿胀,气道壁胶原染色着色面积增大;必可酮组与正常对照组相近。

2 各组大鼠气道内/外直径比值及气道内腔面积/总横截面积比值比较 见表 2。模型组明显小于正常对照组($P < 0.01$),止喘胶囊大剂量组和必可酮组均明显大于模型组($P < 0.05$),止喘胶囊大剂量组和必可酮组的结果相近($P > 0.05$),且与正常对照组接近($P > 0.05$),止喘胶囊小剂量组则与模型组差异无显著性($P > 0.05$);止喘胶囊大剂量组与止喘胶囊小剂量组之间比较差异有显著性($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠气道壁胶原染色积分 A 值及 Fn 染色相对面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胶原 A 值/气道总面积	Fn 染色面积/气道总面积
正常对照	10	1391.37 \pm 677.31*	0.0991 \pm 0.0542**
模型	10	3026.12 \pm 1220.08 Δ	0.2765 \pm 0.0799 $\Delta\Delta$
必可酮	10	1410.26 \pm 561.12*	0.1023 \pm 0.0440**
止喘胶囊大剂量	10	1430.21 \pm 380.33*	0.0941 \pm 0.0499**
止喘胶囊小剂量	10	1893.43 \pm 848.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.1375 \pm 0.0376** $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与正常对照组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$;与必可酮组比较, Δ $P < 0.05$;与止喘胶囊大剂量组比较, $\Delta\Delta$ $P < 0.05$;下表同

表 2 各组大鼠气道内/外直径比值及气道内腔面积/总横截面积比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	气道内/外径	气道内腔面积/总横截面积
正常对照	10	0.733 \pm 0.062**	0.540 \pm 0.092*
模型	10	0.612 \pm 0.090 $\Delta\Delta$	0.381 \pm 0.116 $\Delta\Delta$
必可酮	10	0.718 \pm 0.102*	0.525 \pm 0.146*
止喘胶囊大剂量	10	0.717 \pm 0.080*	0.520 \pm 0.113*
止喘胶囊小剂量	10	0.683 \pm 0.109 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.476 \pm 0.147 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

讨 论

支气管哮喘是一世界范围内的常见病,多发病,近十多年来,其发病率和病死率都有增高的趋势。支气管哮喘是气道高反应性炎症性疾病,气道重建是慢性哮喘气道病理改变的特征之一,气道重建包括了气道壁基底膜增厚及其玻璃样变,平滑肌增厚和气道壁的血管容量增加,气道粘膜的折叠等⁽⁶⁾,同时还与支气管的损伤修复过程有关,其特有的改变是间质广泛的蛋白质沉积,包括胶原(Ⅲ型、Ⅴ型)和Fn在上皮下的沉积⁽⁷⁾。气道重建能加重哮喘气道高反应性和气流阻塞。

支气管哮喘,中医学称为“哮”、“哮喘”、“哮喘”。在古籍中属于“喘鸣”、“上气”、“痰饮”等范畴。是一种发作性的疾病,其特点是反复发作,一般能自行缓解或经治疗后缓解。哮喘有“夙根”,虽有发作期、缓解期之分,但多表现为肺、脾、肾三脏虚损,治疗重在扶正补虚。

补肾健脾法(止喘胶囊)是吴银根教授根据传统中医学理论结合多年临床实践经验制定的治疗哮喘的根本大法,吴教授认为哮喘以脾肾虚寒为本,寒痰瘀热为标,主张不仅在缓解期以此法防治哮喘,而且在发作期也要兼顾脾肾。止喘胶囊全方具有补肾纳气、健脾化痰、固本平喘的功效。由仙灵脾、巴戟天等中药组成。仙灵脾性微温,味甘,归肝、肾、胃经,功能补肾纳气壮阳,化痰止咳平喘,为君药。本药通常较少用于治疗哮喘,吴教授在临床过程中发现该药不仅有补肾壮阳等的作用,而且有补肾纳气和化痰止咳平喘的功用,同时现代药理研究也表明它具有抗炎、抗过敏、增强巨噬细胞功能、祛痰、中枢性镇咳和免疫调节作用。巴戟天,性微温,味辛甘,归脾、肾两经,补肾健中,化痰平喘,以助君药之功,为臣药。有报道其有抗炎、促进胸腺

萎缩及诱生IFN- γ 的作用。

本研究通过较长时间反复吸入卵白蛋白建立了大鼠慢性哮喘模型,实验结果显示哮喘模型组大鼠气道腔明显变小,气道壁明显增厚,气道壁胶原和Fn明显增加,证明大鼠哮喘模型存在气道重建,与人哮喘病理研究结果相似。而止喘胶囊大、小剂量组尤其是大剂量组的组织学观察显示其气道腔明显大于模型组,与正常组接近,气道壁无明显增厚,胶原和Fn明显少于模型组,提示补肾健脾法(止喘胶囊)可能抑制了大鼠哮喘模型的气道重建过程,防治由于气道重建而引起的不可逆气流阻塞。由于本研究是从造模后期开始给药,故对气道重建的抑制作用可能包含了预防和治疗两方面的作用。

参 考 文 献

1. Martin JG, Xu LJ, Toh MY, et al. Leukotrienes in bile during the early and the late airway responses after allergen challenge of sensitized rats. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:104—110.
2. 苗会,薛全福,庄逢源,等.哮喘大鼠动物模型的制备. *基础医学与临床* 1998;18(1):72—77.
3. 吕国平,崔德健,郭英江,等.介绍一种建立大鼠哮喘模型的实验方法. *中华结核和呼吸杂志* 1995;18(6):377—378.
4. Eidelman DH, Bellofiore S, Martin JG. Late airway responses to antigen challenge in sensitized inbred rats. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1033—1039.
5. 龚志锦,詹茸洲.病理组织制片和染色技术.上海:上海科学技术出版社,1994:51—70.
6. Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(1):229—233.
7. Roche WR, Beasley R, Williams J, et al. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989;1:520—524.

(收稿 2000-07-24 修回 2001-05-17)

《北京中医》2002 年征订启事

《北京中医》是中医、中西医结合综合性学术期刊,双月刊,为国际连续出版物,中国自然科学核心期刊,北京市'95优秀期刊,由北京中医药学会、北京中西医结合学会主办。统一刊号 ISSN1000—4599/CN11—2258/R。本刊面向基层,注重临床实践,突出中医特色和北京地区特色,选登全国各地文章,栏目多样,编排规范,内容充实新颖,设有京都名医、老中医经验、临床报道、中药方剂、针灸经络、学术探讨、文献综述、专题笔谈、京华中医医院、疑难病研治、科研动态、短篇报道、成药研究等栏目。本刊附有英文目录,适宜各级中医、中西医结合工作者和中医爱好者阅读,欢迎广大读者订阅,国内定价每册 5.50 元,全年 33.00 元。国内代号 2-587。各地邮局订购,国外代号 BM668,中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)订购。广告证号:京东工商广字 0173 号,当地订阅不方便者,本编辑部代办邮购。编辑部地址:北京东单三条甲七号,邮政编码:100005,电话:(010)65251589,传真:(010)65223477,电子信箱:bjTcm@pubLic3.bta.net.CN。