

小青龙汤对哮喘大鼠气道结构重建的影响※

□ 薛汉荣¹ 惠萍² 洪广祥² 程光宇² 付向春² 兰智慧² 丁云东²

(1. 广东省江门市五邑中医院 广东 江门 529000 2. 江西中医学院呼吸病研究所 江西 南昌 330006)

摘要 目的：通过观察小青龙汤对气道结构重建的影响，探讨其治疗哮喘的作用机制。方法：SD 雄性大鼠 40 只，随机分为 4 组：哮喘组（A 组）、小青龙汤组（B 组）、地塞米松组（C 组）、正常组（D 组），每组 10 只。每组动物连续灌胃雾化 1 个月后留取病理组织，采用计算机图像分析系统测定气管和支气管平滑肌、粘膜、基底膜的厚度，并剥取其气管平滑肌匀浆后，用 ELISA 法测定其内皮素（ET-1）的水平。结果：治疗组大鼠气管平滑肌、粘膜、基底膜的厚度明显低于哮喘组大鼠（ $P < 0.05$ ），与对照组、正常组无明显差别（ $P > 0.05$ ）；治疗组大鼠 ET-1 水平明显低于哮喘组（ $P < 0.05$ ）。结论：小青龙汤用于哮喘防治的有效途径之一，可能是通过抑制气道平滑肌 ET-1 的分泌，改善哮喘大鼠气道结构重建。

关键词 小青龙汤 哮喘 气道重建 大鼠

支气管哮喘（bronchial asthma，简称哮喘）是一种以气道炎症和重建为显著特征的慢性疾病。哮喘所致的气道阻塞并非完全可逆。目前认为，此种改变的主要成因在于气道的持续性损伤和结构异常，即气道重建（airway remodeling），气道重建是哮喘的特征性病理变化。气道平滑肌（the airway smooth muscle, ASM）收缩导致支气管狭窄是哮喘时气流受限的主要因素，ASM 增生肥大是气道重建的特征性改变^[1]，而内皮素不仅是支气管平滑肌最强的收缩剂，还是强大

的促进 ASMC 的增殖剂^[2]。小青龙汤为《伤寒论》名方，具有温肺化饮，止咳平喘之功效，临床已广泛用于哮喘的防治^[3,4]，但有关小青龙汤在哮喘气道重建方面的研究，目前还比较少。本实验拟通过建立 SD 大鼠哮喘模型，观察小青龙汤对哮喘大鼠气道重建结构的影响，探讨其防治哮喘的作用机制。

1 对象和方法

1.1 **实验动物** 健康雄性 SD 大鼠 40 只，4~5 周龄，体重 120~170g，江西医学院实验动物中心提供。

1.2 **主要试剂和设备** 卵白蛋白（OVA，Sigma 公司分装）、402 型超声雾化器（上海鱼跃医疗设备有限

※基金项目 本项目为江西省自然科学基金资助课题项目（No: 0340022）。

公司)、计算机图像分析系统(南京长信信息系统公司)、Endothelin-1 EIA Kit (Cayman 公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 小青龙汤的制备 小青龙汤(麻黄、白芍、细辛、生姜、炙甘草、五味子、法半夏、桂枝),药材购自江西中医学院附属医院。用药剂量依据 2000 年版《中国药典》,根据人和动物体表面积折算的等效剂量比率表计算,用药量相当于临床等效剂量,文火浓缩制成浓度为 1g/ml 的水煎液。

1.3.2 动物分组 健康雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只。哮喘组(A 组):吸入卵蛋白(OVA),致敏后激发;小青龙汤组(B 组):吸入 OVA 致敏激发 3 天后,每天 OVA 激发前 1 小时,按 1.2g/100g 灌服小青龙汤;地塞米松组(C 组):吸入 OVA 致敏激发 3 天后,每天 OVA 激发前 1 小时,按 0.02mg/100g 灌服地塞米松;正常组(D 组):致敏与激发均以吸入生理盐水代替 OVA。以上各组雾化吸入每次均 20min,每日 1 次,连续 1 个月。

1.3.3 哮喘大鼠模型的制备 参照文献^[5-7]方法并加以改进,制作大鼠哮喘模型:第 1 天 A、B、C 组动物分别腹腔注射抗原液 1ml(含卵蛋白 OVA100mg 和氢氧化铝 100mg)致敏,第 8d 重复注射 1 次加强,第 15d 将 A、B、C 组大鼠置于特制透明玻璃容器内,以超声雾化器雾化 1% OVA,使之吸入雾化液 20min 激发哮喘,连续三天。

1.3.4 组织标本的制备 以上各组大鼠均于最后一次激发后 24 小时内处死,取气管及肺门段支气管,10% 甲醛固定,酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,石蜡切片 5um 厚,HE 染色,二甲苯透明加树脂封片。镜下观察病理学改变。采用计算机图像分析软件测定气道壁平滑肌、粘膜及网状基底膜厚度。

1.3.5 ELISA 法测定 ASM 的 ET-1 水平 取大鼠气管剥取其气管平滑肌,加生理盐水匀浆,离心后取上清液,密封保存 -20℃ 冰箱备用。按照说明书 ELISA 法测定 ET-1 的水平。

1.4 统计学分析 采用 SAS8.2 统计专业软件进行数据处理,统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 一般情况观察 模型组大鼠经抗原激发后,出现呼吸气促,严重者呼吸减慢或节律不齐,口唇紫绀,易激惹、烦躁不安,或行动迟滞、俯伏不动、反应迟钝,日久则见形体偏瘦。而正常组大鼠行动敏捷,未见异常。

2.2 病理形态学观察 模型组大鼠镜下可见气道壁明显增厚,气道黏膜皱襞增多,且不规则,气道腔内上皮脱落、受损,气道壁不完整,气道平滑肌层和网状基底膜层增厚,气道周围大量的嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎细胞浸润。治疗组和对照组,气道壁增厚不明显,气道黏膜结构较完整,炎症反应轻微。正常组无气道壁增厚,气道黏膜结构完整,无明显炎症反应。

2.3 气道壁厚度的变化 治疗组大鼠气管平滑肌、粘膜、基底膜的厚度明显低于哮喘组大鼠 ($P < 0.05$);治疗组、对照组大鼠气管平滑肌、粘膜、基底膜的厚度虽高于正常组,但三者之间无明显差别 ($P > 0.05$)。

表 1 各组气道壁厚度比较 (μm , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	平滑肌厚度	粘膜厚度	基底膜厚度
A 组	10	10.42 \pm 1.724	10.73 \pm 1.834	6.6 \pm 1.029
B 组	10	6.89 \pm 1.099 *	6.71 \pm 2.194 *	3.91 \pm 0.819 *
C 组	10	6.53 \pm 1.019 *	6.02 \pm 1.334 *	3.7 \pm 0.841 *
D 组	10	5.94 \pm 0.710 *	4.82 \pm 1.133 *	2.85 \pm 0.735 *

注:与 A 组比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 气管平滑肌 ET-1 水平 治疗组大鼠 ET-1 水平明显低于哮喘组 ($P < 0.05$);治疗组、对照组大鼠 ET-1 水平虽高于正常组,但三者之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 2 各组 ET-1 含量 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ET-1
A 组	10	8.685 \pm 1.071
B 组	10	6.739 \pm 0.655 *
C 组	10	6.681 \pm 0.558 *
D 组	10	6.510 \pm 1.037 *

注:与 A 组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

气道重建是慢性炎症反复损伤和修复的结果,气

道重建是哮喘的病理特征之一,可能是顽固性哮喘的最主要原因之一^[8]。其主要表现为气道管壁增厚,气道上皮纤维化,平滑肌细胞增生、肥大,成纤维细胞增生以及腺上皮化生。其中以基底膜 I 型、III 型、V 型胶原纤维、纤维连接素(FN)等细胞外基质(ECM)堆积增加和肌成纤维细胞分化、增殖为突出表现^[9,10]。气道平滑肌的增生和肥大导致气道壁增厚,气道几何形态改变,另外,也可引起平滑肌自身紧张性和收缩性增强,从而使哮喘产生持续性的气道高反应性(AHR),由此引起管腔狭窄并导致气流受阻的不可逆改变。因此,预防和逆转气道重建是预防哮喘,尤其是慢性顽固性哮喘的有效途径^[11]。而气道结构细胞异常过度分泌内皮素是 AHR 发生发展并趋不可逆的重要原因^[12],内皮素不仅是支气管平滑肌最强的收缩剂,而且具有强大的促进气管平滑肌细胞增殖的作用^[2]。

支气管哮喘,中医学称为“哮”、“哮喘”或“哮喘”等。在古籍中属于“喘鸣”、“上气”、“痰饮”等范畴,是一种发作性的疾病。历代医家强调哮喘的病理因素责之于痰,痰伏于肺为发病的宿根。诱发哮喘发作的因素是多方面的,而外感风寒是哮喘发作的主要诱因,“痰瘀伏肺”为哮喘反复发作的宿根,“痰瘀伏肺”是气道炎症和气道高反应性的重要病理基础^[13]。

小青龙汤出自汉张仲景《伤寒论》,有温肺化饮,止咳平喘之功效,正与哮喘之基本病机合拍,且遵循《金匮》“病痰饮者,当以温药和之”之意,临床已广泛用于哮喘防治,且疗效肯定。且从该方的拆方研究看,小青龙汤融温宣、温通、温散及温补于一炉,而达到祛痰行瘀,改善通气的目的^[3]。《日本汉方医学精华》研究表明本方不仅用于哮喘发作期,而且可用于缓解期。本方实验研究多集中于能够缓解支气管平滑肌痉挛^[14,15]及抗过敏作用^[16]等。有关小青龙汤在哮喘气道重建方面的研究,目前还比较少。

本实验显示,与正常组比较,哮喘模型组平滑肌、粘膜、基底膜显著增厚,ET-1 水平高,提示哮喘可通过分泌 ET-1 而导致平滑肌、粘膜、基底膜的增生和肥大。而小青龙汤治疗组与哮喘模型组比较,平滑肌、粘膜、基底膜厚度显著下降,ET-1 水平

低,提示小青龙汤可通过抑制 ET-1 的分泌,从而阻断平滑肌、粘膜、基底膜的增厚,延缓不可逆性气道重建的进程,对哮喘大鼠气道结构重建有很好的治疗作用,可以有效地预防气道重建,对改善哮喘的预后具有积极的作用。

参考文献

- [1] 方玉蓉,朱润庆,张万宏等.布地奈德对哮喘大鼠气道重塑和平滑肌肌动蛋白- α 表达的影响[J].药物流行病学杂志,2004,13(5):227.
- [2] 黄铁群.内皮素在支气管哮喘中的作用研究进展[J].国外医学呼吸系统分册,1998,18(4):207-209.
- [3] 薛汉荣,程红.小青龙汤在哮喘中运用探讨[J].江西中医药,1999,30(6):14-15.
- [4] 高桂根.小青龙汤的临证应用[J].实用中医内科杂志,1995,9(1):19.
- [5] 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[J].中华结核和呼吸杂志,1995,18(6):377-378.
- [6] 王丽新,吴银根.实验性哮喘大鼠气道重塑的形态学变化[J].中西医结合学报,2003,1(1):63.
- [7] 马秀琴,黄茂,卞涛等.地塞米松对哮喘大鼠肺组织 NF- κ B 和 MMP-9 及 TIMP-1 表达的影响[J].南京医科大学学报(自然科学版),2005,25(4):255.
- [8] Larivee P. Airway inflammation and remodelling in asthma: airway epithelial cell[J]. Can Respir J. 1998, 5(1):51.
- [9] Kon. DM, and A B Kay. T cells and chronic asthma Int. Arch [J]. Allergy Immunol, 1999, 118: 133-135.
- [10] Redington AE, Howarth P. Airway wall remodeling in asthma [J]. Thorax. 1997, 52: 310-312.
- [11] 王文建,杨莉,王西华等.川芎嗪对大鼠支气管哮喘模型气道重塑的影响及机制[J].中华结核和呼吸杂志,2004,27(12):835.
- [12] Xu J, Zhong NS. The interaction of tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 in pathogenic models of asthma. Clin Exp Allergy, 1997, 27: 568-573.
- [13] 洪广祥.全程温法治疗哮喘之我见[J].中国医药学报,2003,18(5):306-308.
- [14] 黄坚,金若敏,陈长勋.用血清实验法观察小青龙汤对豚鼠气管平滑肌的作用[J].中药药理与临床,1995,11(6):12-14.
- [15] 李仪奎,胡赵蓉.采用正交设计法对小青龙汤平喘作用的研究[J].中成药研究,1986,(4):23-25.
- [16] 李仪奎,吴健宇,吴晓芬等.小青龙汤药物血清对致敏大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒及组织胺释放的影响[J].中国中西医结合杂志,2000,20(1):40-41.