

小儿哮喘宁平喘作用的研究

熊静悦, 石莹莹, 谭正怀

四川省中医药科学院 国家中医药管理局中药质量生物评价重点实验室, 四川 成都 610041

摘要: 目的 初步评价小儿哮喘宁的平喘作用, 为临床应用提供科学的实验依据。方法 运用乙酰胆碱及组胺致豚鼠哮喘模型、内毒素 (lipopolysaccharides, LPS) 致小鼠急性肺损伤模型、卵白蛋白 (ovalbumin, OVA) 致豚鼠过敏性哮喘模型及 OVA 加 LPS 致小鼠过敏性哮喘模型, 评价小儿哮喘宁的平喘作用。结果 小儿哮喘宁 20、10、5 g/kg 均能延长乙酰胆碱+组胺所致豚鼠化学刺激性哮喘的引喘潜伏期及 OVA 致豚鼠过敏性哮喘的引喘潜伏期并减少跌倒动物数; 20 g/kg 小儿哮喘宁能降低 LPS 致小鼠急性肺损伤程度; 对嗜酸粒细胞 (eosinophil, EOS) 浸润型过敏性哮喘动物模型的作用优于对中性粒细胞 (neutrophil, NEU) 浸润型过敏性哮喘动物模型的作用。结论 小儿哮喘宁有平喘的作用, 该作用可能与其抑制肺水肿、降低气道 EOS 浸润有关。

关键词: 小儿哮喘宁; 平喘; 哮喘

中图分类号: R985 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)05-0367-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.05.011

Research on antiasthmatic effect of Xiao'er Xiaochuanning

XIONG Jing-yue, SHI Ying-ying, TAN Zheng-huai

Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Key Laboratory of Biological Evaluation of TCM Quality of the State Administration of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610041, China

Abstract: **Objective** To investigate the antiasthmatic effect of Xiao'er Xiaochuanning and to provide the experimental evidence for its clinical application. **Methods** The acetylcholine and histamine-induced asthma model in guinea pigs, lipopolysaccharides (LPS)-induced acute lung injury model in mice, ovalbumin (OVA)-induced guinea pig allergic asthma model, and OVA + LPS-induced mice allergic asthma model were used to evaluate the antiasthmatic effect of Xiao'er Xiaochuanning. **Results** Xiao'er Xiaochuanning (20, 10, and 5 g/kg) prolonged the latent period in acetylcholine- and histamine-induced asthma of guinea pigs and OVA-induced allergic asthma of guinea pig, and could reduce the number of tumbling animals. Xiao'er Xiaochuanning (20 g/kg) could reduce the acute lung injury induced by LPS; However, the protective effect against OVA-induced eosinophilic (EOS) inflammation in guinea pigs was better than that of OVA + LPS-induced noneosinophilic (NEU) inflammation in mice. **Conclusion** The protection of Xiao'er Xiaochuanning against asthma is related to inhibiting the pulmonary edema and decreasing the eosinophilic infiltration in airway.

Key words: Xiao'er Xiaochuanning; antiasthmatic effect; asthma

小儿哮喘宁为中医临床验方, 由麻绒、杏仁、淫羊藿等多味中药组成, 具有祛痰平喘的功效, 主要用于小儿哮喘的治疗, 可减轻或消除小儿哮喘发作时的喘息、咳嗽、咯痰及哮鸣音等症状, 在临床应用中获得良效^[1-2]。因此, 本室对该处方的平喘作用进行了初步的药效学探索, 以期明确其作用的药理学基础, 为临床应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物

小儿哮喘宁, 深棕色浸膏, 由四川省中医药科

学院化学所提供, 1 g 干浸膏约相当于 6.25 g 原生药, 给药时以蒸馏水配制, 给药剂量以原生药 g/kg 表示; 氨茶碱片, 批号 891002, 上海第二十一制药厂; 醋酸泼尼松片, 批号 040266, 浙江仙琚制药股份有限公司; 醋酸地塞米松片, 批号 120999, 浙江仙琚制药股份有限公司。

1.2 动物

豚鼠, 英国种, 普通级, 由四川省实验动物专委会养殖场提供, 合格证号 SCXK (川) 2008-14; 小鼠, KM 种, SFP 级, 由四川省中医药科学院实

收稿日期: 2013-06-03

基金项目: 四川省公益性科研院所基本科研项目 (A-2011N-8)

作者简介: 熊静悦 Tel: (028)85288982 E-mail: 26674389@qq.com

验动物中心提供, 合格证号 SCXK (川) 2008-19。

1.3 试剂

氯化乙酰胆碱, 批号 20060328, 上海三爱思试剂有限公司; 磷酸组织胺, 批号 1702, 中国科学院上海生物化学研究所; 内毒素 (LPS), 批号 091M4031V, 079K4106, Sigma 公司; 卵白蛋白 (OVA), 批号 86R752V, 8613X92J, Sigma 公司; 氯化钠注射液, 批号 C121116C, 昆明南疆制药有限公司。

1.4 仪器

超声波雾化器, WH—2000, 汕头市粤华医疗器械厂; 动物血液分析仪, XT—2000iv, Sysmex 公司。

1.5 方法

1.5.1 小儿哮喘宁对豚鼠引喘实验的影响 取体质量 <200 g 的幼年豚鼠 80 只, 雌雄各半, 进行筛选: 将豚鼠放入玻璃钟罩内, 用超声波雾化器喷入 2% 氯化乙酰胆碱和 0.1% 磷酸组织胺等溶剂混合液 15 s, 观察豚鼠的引喘潜伏期 (即从喷雾开始到哮喘发作、呼吸极其困难直至跌倒的时间), 引喘潜伏期 >120 s 的动物弃用。将筛选合格的豚鼠按体质量随机分为模型组, 小儿哮喘宁高、中、低剂量 (20、10、5 g/kg) 组和阳性药氨茶碱组 (12.5 mg/kg), ig 蒸馏水或相应药物 3 次 (2 次/d, 20 mL/kg), 于末次给药后 1 h 再次引喘, 记录引喘潜伏期, 6 min 未跌倒者按 6 min 计^[3]。

1.5.2 小儿哮喘宁对 LPS 致小鼠急性肺损伤实验的影响 取体质量 18~22 g 雄性 KM 小鼠 59 只, 按体质量随机分为对照组、模型组、小儿哮喘宁高、中、低剂量 (20、10、5 g/kg) 组及阳性药醋酸泼尼松组 (0.01 g/kg), ig 蒸馏水或相应药物 3 次 (2 次/d, 20 mL/kg)。第 2 次给药后, 除对照组外各组尾 iv LPS 生理盐水注射液 10 mg/kg (10 mL/kg), 24 h 后取肺称湿质量, 计算脏器指数^[4]。肺湿重指数 = 肺湿质量/体质量。

1.5.3 小儿哮喘宁对 OVA 致豚鼠哮喘实验的影响 取体质量 200~250 g 雄性豚鼠 54 只, 按照体质量随机分为对照组、模型组、小儿哮喘宁高、中、低剂量 (20、10、5 g/kg) 组和阳性药醋酸地塞米松组 (0.7 mg/kg)。模型组及各药物组每只动物 ip 4% Al(OH)₃ 凝胶 0.2 mL, 并大腿外侧 im 4% OVA 生理盐水溶液 0.2 mL 致敏, 对照组腹腔、肌肉注射等体积生理盐水, 连续 3 d。致敏后第 8 天喂服相应药物

或蒸馏水, 连续 6 d, 并于给药后 30 min, 以 2% OVA 生理盐水溶液超声雾化 1 min。末次给药后 30 min, 以 2% OVA 生理盐水溶液超声雾化 6 min, 记录豚鼠喘息潜伏期及跌倒休克数, 6 min 未跌倒者按 6 min 计, 正常对照组以生理盐水处理^[5]。

1.5.4 小儿哮喘宁对 OVA 加 LPS 致小鼠哮喘实验的影响 取体质量 18~22 g KM 雌性小鼠 61 只, 按体质量随机分为对照组、模型组、小儿哮喘宁高、中、低剂量 (20、10、5 g/kg) 组及阳性药醋酸地塞米松组 (1 mg/kg), 于第 0、7、14 天分别致敏, 即用移液枪取 10 μ g LPS 生理盐水溶液 (25 μ L) 经鼻滴入, 利用小鼠呼吸将致敏液吸入气道, 左右鼻交替进行, 并每只 ip OVA 生理盐水溶液 50 μ g (100 μ L)。对照组滴入并 ip 生理盐水。从第 21 天起, 将造模小鼠置于玻璃钟罩内, 用 5% OVA 生理盐水溶液 5 mL 进行雾化吸入激发, 每天 30 min, 连续 6 d, 对照组雾化给予生理盐水。各组于每次激发前 30 min 给予相应药物或蒸馏水。最后一次雾化后 1 h 股动脉放血处死小鼠, 分离气道, 22 G 留置针气管插管并固定, 3 mL 生理盐水分 3 次灌洗肺部, 收集灌洗液, 1 500 r/min 离心 5 min, 取 0.5 mL 底部液体进行白细胞分类计数^[6]。

1.6 统计方法

除跌倒动物数用 SPSS17.0 软件进行 χ^2 检验外, 其余数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 小儿哮喘宁对豚鼠引喘实验的影响

小儿哮喘宁及阳性药氨茶碱均能延长引喘潜伏期, 与模型组比较有统计学差异。见表 1。

2.2 小儿哮喘宁对 LPS 致小鼠急性肺损伤的影响

对照组、小儿哮喘宁高剂量组及醋酸泼尼松组

表 1 小儿哮喘宁对豚鼠引喘潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 1 Effect of Xiao'er Xiaochuanning on latent period of asthma in guinea pigs ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	给药剂量/(g·kg ⁻¹)	引喘潜伏期/s
模型	—	54.1 ± 12.8
小儿哮喘宁	20	77.7 ± 18.3**
	10	205.9 ± 123.4**
	5	111.3 ± 81.7*
氨茶碱	0.012 5	128.3 ± 79.3**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

肺湿重指数与模型组比较差异有统计学意义, 见表2。

2.3 小儿哮喘宁对 OVA 致豚鼠哮喘实验的影响

小儿哮喘宁3个剂量及醋酸地塞米松均能延长豚鼠的引喘潜伏期, 并显著减少跌倒动物数, 与模型组比较有统计学差异。见表3。

表2 小儿哮喘宁对 LPS 致小鼠急性肺损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Xiao'er Xiaochuaning on acute lung injury induced by LPS in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	肺湿重指数/%
对照	—	9	0.94±0.17
模型	—	10	1.18±0.21 [#]
小儿哮喘宁	20	10	0.96±0.16 [*]
	10	10	1.16±0.28
	5	10	1.26±0.16
醋酸泼尼松	0.01	10	1.02±0.08 [*]

与对照组比较: [#] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$

[#] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group

表4 小儿哮喘宁对 OVA+LPS 致哮喘小鼠白细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Xiao'er Xiaochuaning on leukocyte in asthma of mice induced by OVA and LPS ($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	NEU	NEU / %	EOS	EOS / %	WBC / (×10 ⁹ ·L ⁻¹)
对照	—	10	0	0	0	0	0
模型	—	9	0.18±0.10 ^{###}	47.1±14.7 ^{###}	0.01±0.01 ^{###}	4.58±3.59 ^{###}	0.38±0.19 ^{###}
小儿哮喘宁	20	10	0.14±0.09	46.6±10.1	0.02±0.01	5.74±0.07	0.30±0.15
	10	11	0.11±0.07	35.8±20.6	0.02±0.04	4.69±4.03	0.36±0.33
	5	10	0.10±0.08	35.3±18.2	0.01±0.01	3.85±5.68	0.28±0.16
醋酸地塞米松	1×10 ⁻³	11	0.06±0.04 ^{**}	31.0±17.2 [*]	0.01±0.01	6.25±7.52	0.24±0.11

与对照组比较: ^{###} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

^{###} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

3 讨论

一般认为, 支气管哮喘是由多种炎性细胞及其细胞因子参与的慢性气道炎症, 以气道高反应性(AHR)、可逆性气流受限、气道 EOS 浸润等为主要特点。但近年来的研究发现, 哮喘这一慢性气道炎症尚存在非 EOS 气道浸润为主的 NEU 亚型^[7-10], 进一步丰富了哮喘是异质性疾病的临床理论。本研究首先采用了乙酰胆碱+组胺致豚鼠哮喘模型证实了小儿哮喘宁对化学刺激性哮喘具有明确的平喘作用, 在此实验中, 由于小儿哮喘宁大剂量较黏稠, 喂服幼年豚鼠时其吞咽不如中、小剂量顺畅, 可能影响高剂量组平喘作用的发挥; 其次用 LPS 致小鼠急性肺损伤模型观察了小儿哮喘宁减轻细菌感染所

表3 小儿哮喘宁对 OVA 致豚鼠哮喘的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Xiao'er Xiaochuaning on asthma induced by OVA in guinea pigs ($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	引喘潜伏期/s	跌倒动物数/只
对照	—	9	360.0±0.0 ^{**}	0
模型	—	8	126.0±98.3 ^{###}	8 ^{###}
小儿哮喘宁	20	10	333.3±84.4 [*]	1 ^{**}
	10	9	332.3±78.9 ^{**}	3 ^{**}
	5	9	324.7±71.8 ^{**}	3 ^{**}
醋酸地塞米松	0.7×10 ⁻³	9	309.9±99.5 ^{**}	3 ^{**}

与对照组比较: ^{###} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$

^{###} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

2.4 小儿哮喘宁对 OVA 加 LPS 致小鼠哮喘实验的影响

阳性药地塞米松能降低 NEU 及 NEU%, 对 EOS 作用不明显。小儿哮喘宁各剂量组对 NEU 及 NEU% 表现出降低的趋势, 但无统计学意义。对 EOS 和 WBC 作用不明显。见表4。

致肺部炎症水肿的作用, 最后采用了 OVA 致敏(以气道 EOS 浸润为主)及 OVA 合并 LPS 致敏(以气道 NEU 浸润为主)两种过敏性哮喘动物模型来探索其作用特点, 结果显示小儿哮喘宁对 OVA 致敏模型有平喘的作用, 但不能降低 OVA 合并 LPS 所致气道 NEU 升高, 提示了此后药理作用机制研究可以从减轻肺水肿、抑制气道 EOS 浸润来开展。

参考文献

- [1] 张凡, 李陈. 哮喘灵治疗小儿哮喘发作期315例临床观察 [J]. 四川中医, 2010, 28(4): 102-103.
- [2] 张凡, 李陈, 谢红. 哮喘灵颗粒剂治疗小儿哮喘发作期的临床研究 [J]. 四川中医, 2012, 30(12): 64-66.
- [3] 朱希卓, 甘雨, 张宏, 等. 固本喘嗽康颗粒的镇

- 咳、祛痰、平喘实验研究 [J]. 中南药学, 2008, 6(3): 277-280.
- [4] 谭正怀, 余凌虹, 魏怀玲, 等. 乌司他丁对脂多糖致小鼠急性肺损伤的保护作用以及与诱导型一氧化氮合酶和 *c-Jun* 表达的关系 [J]. 药科学报, 2006: 41(7): 636-640.
- [5] 赵学军, 李卫民, 蔡健聪, 等. 温肾咳喘片的主要药效及作用机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(1): 25-28.
- [6] 敖小冬, 农光民, 刘 静, 等. 中性粒细胞性支气管哮喘小鼠模型建立的探索 [J]. 中华哮喘杂志, 2012, 6(2): 100-105.
- [7] Green R H, Brightling C E, Woltmann G, *et al.* Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids [J]. *Thorax*, 2002, 57: 875-879.
- [8] Tsoumakidou M, Papadopouli E, Tzanakis N, *et al.* Airway inflammation and cellular stress in noneosinophilic atopic asthma [J]. *Chest*, 2006, 129: 1194-1202.
- [9] 季 蓉, 何权瀛. 对中性粒细胞在哮喘发病机制中的新认识 [J]. 国外医学: 呼吸系统分册, 2005, 25(4): 314-316.
- [10] 夏 维, 任振义. 中性粒细胞性哮喘研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2012, 41(1): 173-184.