

小儿治哮喘灵片对幼年大鼠哮喘的干预作用

律广富¹, 王永宽², 马超¹, 王玉宝², 林喆¹, 钟南方¹, 林贺¹, 黄晓巍^{1*}

1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117

2. 吉林敖东延边药业股份有限公司, 吉林 敦化 133700

摘要: 目的 研究小儿治哮喘灵片对幼年大鼠哮喘模型的干预作用及机制。方法 36只雄性Wistar幼年大鼠随机分为6组: 对照组、模型组、醋酸地塞米松(阳性药, 1 mg/kg)组和小儿治哮喘灵片低、中、高剂量(0.32、0.64、1.28 g/kg)组。除对照组外, 其余各组以卵清蛋白(OVA)致敏、激发制备幼年大鼠哮喘模型。造模第8天开始ig给药, 每天给药1次, 给药至造模3周, 对照组和模型组ig给予蒸馏水。记录各组大鼠引喘潜伏期并进行行为学评分; 检测肺脏器指数; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组幼年大鼠血清中白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-6、免疫球蛋白E(IgE)、 γ -干扰素(IFN- γ)、核转录因子(NF- κ B)的水平以及肺泡灌洗液中IFN- γ 水平。结果 与模型组比较, 小儿治哮喘灵片高、中、低剂量组引喘潜伏期及哮喘行为评分均显著下降($P < 0.05$ 、 0.01); 肺脏器指数显著下降($P < 0.05$); 血清IL-4、IL-5、IL-6、IgE、NF- κ B水平均显著下降($P < 0.01$); 血清与肺泡灌洗液中IFN- γ 水平显著升高($P < 0.01$)。结论 小儿治哮喘灵片抗哮喘作用可能与降低炎症细胞因子分泌有关。

关键词: 小儿治哮喘灵片; 幼年大鼠; 哮喘; 肺泡灌洗液; 炎症因子; 干扰素- γ ; 核转录因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2020)12-2434-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.12.014

Effect of Xiaer Zhixiaoling Tablets on asthmatic model of young rats

LÜ Guangfu¹, WANG Yongkuan², MA Chao¹, WANG Yubao², LIN Zhe¹, ZHONG Nanfang¹, LIN He¹, HUANG Xiaowei¹

1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. Jilin Aodong Pharmaceutical Group Co., Ltd., Dunhua 133700, China

Abstract: Objective To study the interventional effect and mechanism of Xiaer Zhixiaoling Tablets on asthmatic model in juvenile rats. **Methods** Thirty six young male Wistar rats were randomly divided into six groups: control group, model group, dexamethasone acetate (positive drug, 1 mg/kg) group and low, medium and high dose (0.32, 0.64, 1.28 g/kg) groups of Xiaerzhixiaoling Tablets. Except the blank control group, the other groups of young rats were sensitized by egg albumin (OVA) and stimulated to prepare the rat model of asthma in juvenile rats. On the 8th day of modeling, drugs were ig given once a day until 3 weeks for modeling. The control group and model group were given distilled water. The incubation period of asthma was recorded and the behavior score was evaluated. The levels of IL-4, IL-5, IL-6, IgE, IFN- γ , NF- κ B in serum of young rats and the level of IFN- γ in alveolar lavage were detected by enzyme-linked immunosorbent method. **Results** Compared with the model group, the asthma latency and asthma behavior scores in the high, middle and low dose groups of Xiaer Zhixiaoling Tablets were significantly decreased ($P < 0.05$ and 0.01), and the lung organ index was significantly decreased ($P < 0.05$); levels of IL-4, IL-5, IL-6, IgE, NF- κ B decreased in the high-dose group, the medium-dose group and the low-dose group ($P < 0.01$), and levels of IFN- γ in serum and alveolar lavage fluid increased ($P < 0.01$). **Conclusion** The anti-asthma effect of Xiaer Zhixiaoling Tablets; may be related to the decreased secretion of downstream inflammatory cytokines.

Key words: Xiaer Zhixiaoling Tablets; juvenile rat; asthma; alveolar lavage; inflammatory factors; IFN- γ ; NF- κ B

收稿日期: 2020-02-19

基金项目: 校企合作项目“小儿治哮喘灵片安全性评价研究”资助

第一作者: 律广富(1984—),男,助理研究员,主要从事中药药理学研究。E-mail:message219@163.com

*通信作者: 黄晓巍,女,主任药师,主要从事中药药理研究。E-mail:15948000740@163.com

支气管哮喘是世界上最常见的慢性病之一,是以咳嗽、喘息、胸闷和气促反复发作为主要临床表现的慢性气道炎症和气道高反应性特征的异质性疾病,常在夜间和清晨发作或加剧,呼吸道症状的具体表现形式和严重程度随时间变化而改变,并常伴有可逆性呼气气流受限^[1]。

我国哮喘发病人数逐年上升,特别是儿童患者。儿童免疫力低,当外界环境剧烈变化时,易感受外邪从而引发哮喘。小儿哮喘是儿科的常见病、多发病,常反复发作,很难完全治愈。如果儿童期不能得到有效地治疗,很容易发展为成人哮喘,对小儿身体健康及生长发育有很大影响。调查显示,我国儿童哮喘的总患病率已达3%以上,哮喘已成为危害中国儿童健康成长的主要慢性疾病之一^[2]。

小儿治哮喘片具有止咳、平喘、镇咳、化痰、强肺、脱敏等功效,用于小儿哮、咳、喘等症的治疗,多年来临床治疗小儿哮喘具有较好的疗效^[3]。本实验采用幼年大鼠作为研究对象,对小儿治哮喘片作用机制进行探讨,为提高药品质量和保障患者用药安全,提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

健康雄性4周龄幼年大鼠,36只,体质量(85±5)g,购于长春市亿斯实验动物有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(吉)-2018-0003。

1.2 主要试剂

小儿治哮喘片(吉林敖东延边药业股份有限公司,批号1010001,规格0.1 g/片);醋酸地塞米松片(遂成药业股份有限公司,批号H41021038,规格0.75 mg/片);卵清蛋白(OVA, Sigma, 货号SLBS6919);氯化钠注射液(吉林省都邦药业股份有限公司,批号H22023069),白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-6、免疫球蛋白E(IgE)、核转录因子(NF-κB)和γ-干扰素(IFN-γ)酶联免疫试剂盒(江苏酶免实业有限公司)。

1.3 主要仪器

JSC-202超声雾化器(辽宁鞍山电子医疗器械厂);电子分析天平(上海越平科学仪器有限公司);WP-UP-III-40精密型超纯水机(四川沃特科技发展有限公司);4℃低温离心机(Cerrtrifuge 5810R);恒温培养箱(EYEL4 SLI-700,上海爱朗仪器有限公司);MultiskanFC型酶标仪(赛默飞世尔(上海)仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药^[4]

将36只幼年大鼠随机分为6组:对照组、模型组、醋酸地塞米松(1 mg/kg,阳性药)组和小儿治哮喘片低、中、高剂量(0.32、0.64、1.28 g/kg)组,每组6只。自造模第8天开始ig给药,给药体积10 mL/kg,对照组和模型组给予等体积蒸馏水,给药至造模第3周。

2.2 哮喘模型的制备^[5-6]

除对照组外,大鼠适应性饲养1周后开始造模,于第1天ip 1 mL 10% OVA溶液(含100 mg OVA)致敏,在第4、7天再次ip 10% OVA溶液1 mL,以加强致敏;第8天开始将大鼠置于自制的雾化箱给予5% OVA溶液雾化激发,每天1次,每次30 min,共激发3周。对照组致敏时ip相同剂量生理盐水,激发时则采用相同剂量蒸馏水雾化激发。

2.3 行为学评价

将5% OVA溶液放入雾化器内,打开雾化器开关,同时开始计时,记录各组大鼠引喘潜伏期。参照文献建立评分标准^[7-9]:①无明显呼吸急促,0分;呼吸频率加快,未见鼻翼扇动,腹式呼吸,0.5分。②呼吸困难(鼻翼扇动、腹式呼吸),1.0分;呼吸困难伴轻咳,1.5分。③呼吸困难,并出现咳嗽、哮喘(少于3次/min),2.0分;呼吸困难、频繁咳嗽(大于3次/min),2.5分。④张口呼吸,或深长呼吸,呼吸暂停伴眼、耳、唇紫绀,3.0分;站立不稳,3.5分。⑤休克、跌倒不起、猝死,4.0分。

2.4 血清的采集

第28天最后1次雾化后,ip 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉。去除下腹部皮毛,剪开皮肤,用棉花分离暴露血管,左手用镊子夹住近心端血管,右手持5 mL一次性注射器插入腹主动脉取血(如果抽吸过程中,抽动困难,转动注射器使空气进入可继续抽动),放入5 mL离心管中,3 500 r/min离心10 min,取上清液分装冻存于-20℃冰箱,待用^[10]。

2.5 肺泡灌洗液的采集及肺脏指数的检测

去除颈部皮毛,剪开皮肤,钝性分离气管(注意避开颈部血管),于接近头端的气管剪一切口,左手大拇指压住头部,食指压住胸部,剩余3指从下拖住颈部。右手持带有灌胃针的2.5 mL注射器,缓慢注入PBS缓冲液1 mL,静置10 s后,轻轻按压胸部,将缓冲液回抽,置于5 mL离心管中,重复操作6次(回

收率大于80%),肺泡灌洗液以3 500 r/min离心10 min,取上清液分装冻存于-20 °C冰箱,待用^[11]。取大鼠肺脏,称质量,计算肺脏指数。

2.6 酶联免疫吸附法检测

酶联免疫吸附法检测血清中IL-4、IL-5、IL-6、IgE、IFN- γ 、NF- κ B水平以及肺泡灌洗液中IFN- γ 水平。以上检测操作均严格按照酶联免疫试剂盒说明书进行。

2.7 统计学方法

应用SPSS 20.0统计软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 小儿治哮喘片对大鼠哮喘行为的影响

造模后,与对照组比较,模型组大鼠哮喘行为评分均显著升高($P<0.01$);给药后,与模型组比较,阳性药和小儿治哮喘片高、中、低剂量组引喘潜伏期显著延长,哮喘行为评分显著下降($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表1。

表1 小儿治哮喘片对大鼠哮喘行为的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of pediatric treatment of Xiaoe

Zhixiaoling Tablets on asthma behavior in rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	引喘潜伏期/s	行为学评分
对照	—	—	0±0
模型	—	87.23±2.45 ^{##}	3.01±0.31 ^{##}
醋酸地塞米松	0.001	163.22±15.53 ^{**}	1.18±0.62 ^{**}
小儿治哮喘片	1.28	148.91±9.54 ^{**}	1.58±0.43 ^{***}
	0.64	139.07±16.73 ^{**}	2.03±0.27 ^{**}
	0.32	105.38±10.63 ^{**}	2.21±0.81 [*]

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

3.2 小儿治哮喘片对大鼠肺脏指数的影响

与对照组比较,模型组大鼠肺脏指数显著升高($P<0.05$);与模型组比较,阳性药和小儿治哮喘片高、中、低剂量组肺脏器指数显著下降($P<0.05$)。提示小儿治哮喘片能够改善OVA造成的哮喘模型大鼠气道炎症引发的肺部炎症反应,缓解肺损伤的作用。结果见表2。

表2 小儿治哮喘片对大鼠肺脏器指数的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of pediatric treatment of Xiaoe

Zhixiaoling Tablets on lung organ index in rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g	肺脏指数/%
对照	—	298.02±13.42	0.86±0.06
模型	—	274.20±18.45	0.94±0.07 [#]
醋酸地塞米松	0.001	282.42±15.89	0.85±0.06 [*]
小儿治哮喘片	1.28	297.25±11.59	0.83±0.04 [*]
	0.64	289.08±16.45	0.86±0.07 [*]
	0.32	286.00±15.00	0.84±0.06 [*]

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

3.3 小儿治哮喘片对大鼠血清和肺泡灌洗液中炎症因子水平的影响

与对照组比较,模型组血清中IL-4、IL-5、IL-6、IgE、IFN- γ 、NF- κ B的水平均显著升高($P<0.01$),血清和灌洗液中IFN- γ 水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,阳性药和小儿治哮喘片高、中、低剂量组血清中IL-4、IL-5、IL-6、IgE、NF- κ B的水平均显著降低($P<0.01$),血清和灌洗液中IFN- γ 水平均显著升高($P<0.01$)。结果见表3和4。

4 讨论

儿童哮喘已成为儿童三大慢性疾病之一,儿童患者因年龄较小,脾肾不足,难以生成和运化水津;

表3 小儿治哮喘片对大鼠血清中炎症因子的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of pediatric treatment of Xiaoe Zhixiaoling Tablets on inflammatory factors in rat serum($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	IL-4/ (ng·L ⁻¹)	IL-5/(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	IgE/(ng·L ⁻¹)	IFN- γ /(ng·L ⁻¹)	NF- κ B/(ng·L ⁻¹)
对照	—	13.81±1.93	19.26±1.66	15.66±2.82	52.46±5.66	471.07±25.66	565.71±27.90
模型	—	31.81±2.41 ^{##}	40.35±2.89 ^{##}	29.27±3.58 ^{##}	97.88±7.81 ^{##}	291.45±19.36 ^{##}	708.93±39.81 ^{##}
醋酸地塞米松	0.001	17.38±3.08 ^{**}	21.26±3.20 ^{**}	20.32±1.49 ^{**}	61.13±8.49 ^{**}	391.51±16.41 ^{**}	537.14±22.43 ^{**}
小儿治哮喘片	1.28	18.44±2.01 ^{**}	23.49±2.79 ^{**}	19.67±2.12 ^{**}	62.06±9.85 ^{**}	377.85±22.92 ^{**}	576.00±25.49 ^{**}
	0.64	19.65±2.53 ^{**}	24.93±2.40 ^{**}	21.92±1.41 ^{**}	70.85±6.97 ^{**}	367.43±25.89 ^{**}	600.86±90.63 ^{**}
	0.32	22.67±3.02 ^{**}	26.54±3.44 ^{**}	24.25±1.73 ^{**}	79.39±5.02 ^{**}	327.85±29.12 ^{**}	642.19±127.04 ^{**}

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

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

表4 小儿治哮喘片对大鼠肺泡灌洗液中IFN- γ 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of pediatric treatment of Xiaoe Zhixiaoling Tablets on IFN- γ in alveolar lavage fluid of rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IFN- γ /(ng·L ⁻¹)
对照	—	801.43±54.40
模型	—	519.29±26.23 ^{##}
醋酸地塞米松	0.001	809.76±41.64 ^{**}
小儿治哮喘片	1.28	832.80±34.01 ^{**}
	0.64	775.48±38.31 ^{**}
	0.32	697.86±29.31 ^{**}

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

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

肺脏娇弱,肺之宗气不足难以通调水道以散布水津。水津运化失常,于肺中内湿为痰。痰浊反作用影响肺的宣发肃降,宗气难以走息道以司呼吸,气促发为哮喘,哮喘治疗当以祛痰、散寒、温肺3步入手。难根治、易复发的哮喘特点严重影响了儿童的身心健康发展。如果治疗不及时,易成为伴随一生的疾病。小儿治哮喘片具有燥湿以祛内因之痰、解表以散外因之寒、温肺以助肺之宗气的作用,适用于小儿哮、咳、喘等症的治疗^[12-14]。

现代医学认为哮喘的发病机制为辅助性T淋巴细胞1(Th1)功能不足,机体出现以辅助性T淋巴细胞2(Th2)占主导的Th1/Th2失衡,产生大量的IL-4、IL-5、IL-6,并进一步促进IgE的活化和聚集,IgE大量增加后通过与效应细胞相应受体结合后,刺激效应细胞产生能使支气管平滑肌收缩的白三烯等炎症介质,最终诱发以气道炎症和气道高反应性为特征的哮喘。Th1细胞主要分泌IFN- γ 等细胞因子,哮喘患者体内IgE合成过多的主要原因是IFN- γ 分泌减少,其中IFN- γ 具有加强宿主防御和参与免疫调节的作用。IFN- γ 是IgE的负调节因子,能抑制由IgE引起的炎症反应,在机体中作为保护因子。而哮喘患者IFN- γ 分泌减少的主要原因则是由NF- κ B信号通路过度激活引起,外部刺激使无活性状态的NF- κ B从细胞质中进入细胞核活化,促进基因转录,从而增加下游炎症细胞因子水平,加速了哮喘发生与发展^[10,15-18]。本实验采用IL-4、IL-5、IL-6、IgE、IFN- γ 、NF- κ B作为检测指,以探讨小儿治哮喘片对幼年大鼠哮喘模型的干预机制。实验结果表明,哮喘大鼠模型血清中IL-4、IL-5、IL-6、IgE、NF- κ B较对照组显著增高,血清和肺泡灌洗液中IFN- γ 较对照

组显著降低。提示血清中IL-4、IL-5、IL-6、IgE、IFN- γ 、NF- κ B以及肺泡灌洗液中IFN- γ 与OVA诱导的哮喘大鼠密切相关。大鼠哮喘模型的发作机制可能是OVA诱导NF- κ B信号通路激活,导致下游炎症细胞因子过度分泌,IgE合成增加,从而引起炎症级联反应。经过小儿治哮喘片干预后,各给药组的IL-4、IL-5、IL-6、IgE、NF- κ B水平较模型组均显著降低,IFN- γ 较模型组均显著升高。结果表明,小儿治哮喘片干预后能够改善哮喘症状,其作用机制可能为抑制哮喘大鼠肺组织中NF- κ B活化通路,调节下游炎症细胞因子水平的分泌,还原Th1/Th2正常比值,进而降低炎症反应的进程,从而起到治疗哮喘的作用^[19-21]。

小儿治哮喘对幼年大鼠哮喘模型具有较好治疗作用。儿童哮喘作为儿科的主要慢性疾病之一,严重影响了儿童的健康成长。而中医药治疗儿童哮喘具有很好的疗效,本实验为儿童患者用药安全提供了理论依据,同时为防止儿童哮喘提供了新的思路。

参考文献

- [1] 冯晓凯. 我国支气管哮喘患病情况及相关危险因素流行病学调查 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [2] 刘璐, 孙丽平. 近五年中西医儿童哮喘国内外研究回顾 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(1): 76-78.
- [3] 郑方芳, 李颖勤, 寇丽, 等. 小儿治哮喘片辅助治疗咳嗽变异性哮喘患儿的效果及对血清TGF- β 、IgE和TNF- α 水平的影响 [J]. 中外医学研究, 2018, 16(23): 1-3.
- [4] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004(9): 1069-1072.
- [5] 于少泓. 健脾疏肺食疗方对肺脾两虚证支气管哮喘模型大鼠白细胞介素4和干扰素 γ 的影响 [J]. 河北中医, 2018, 40(1): 105-108.
- [6] 张伟, 邓焕华, 涂敏芳. 悬灸对哮喘大鼠Th2、Th17的免疫调节作用 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(10): 2540-2545.
- [7] Masoli M, Fabian D, Holt S, et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report [J]. Allergy, 2004, 59(5): 469-478.
- [8] 黄艳, 刘鑫, 戴爱国, 等. 柴朴汤对卵蛋白诱导豚鼠哮喘的干预作用及对核因子- κ B的影响 [J]. 中医药导报, 2007(6): 1-3.
- [9] 纪蕾蕾. 三拗汤类方提取物对卵蛋白致敏哮喘模型作用的物质基础与作用机理探讨 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.

- [10] 仇志凯, 曲元, 马超, 等. 哈蟆油对哮喘豚鼠炎症因子及肺组织病理变化的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(2): 228-230.
- [11] 董勤, 刘锐锋. 清肺合剂对哮喘模型大鼠作用及其机制的研究 [J]. 今日药学, 2018, 28(8): 514-515, 519.
- [12] 李海霞, 张勇华, 任晓丹, 等. 建立RSV联合OVA诱发幼年大鼠哮喘模型的方法 [J]. 湖南中医药大学学报, 2018(12): 1371-1373.
- [13] 赵颖, 朱慧华. 中医药防治儿童支气管哮喘的临床研究进展 [J]. 中医儿科杂志, 2019, 15(1): 86-89.
- [14] 陈志鑫, 范暖东. 中医药治疗小儿哮喘研究进展 [J]. 中医儿科杂志, 2018, 14(4): 69-72.
- [15] 杨涛, 何开勇, 汪杨, 等. 童乐口服液对哮喘大鼠的干预研究 [J]. 药学研究, 2018, 37(8): 443-445, 452.
- [16] 梁志娟, 耿立梅. 穴位贴敷联合穴位注射乌体林斯对OVA哮喘模型大鼠气道炎症气道高反应的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(9): 1273-1275, 1321.
- [17] 李陆一, 蒋毅. 支气管哮喘代谢组学研究进展 [J]. 系统医学, 2018, 3(14): 196-198.
- [18] 郭洁, 刘洁云, 吴雅俊, 等. 小儿治哮喘灵片对发作期小儿咳嗽变异性哮喘气道反应性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 204-209.
- [19] 郑方芳, 李颖勤, 寇丽, 等. 小儿治哮喘灵片辅助治疗咳嗽变异性哮喘患儿的效果及对血清TGF- β 、IgE和TNF- α 水平的影响 [J]. 中外医学研究, 2018, 16(23): 1-3.
- [20] 臧明月, 韩玉生, 侯志涛, 等. 麦门冬汤对哮喘模型大鼠NF- κ B蛋白表达及炎症细胞因子的影响 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2017, 38(22): 2622-2623.
- [21] 孙洋, 闵冬雨. 补肺平喘汤对支气管哮喘大鼠Th1/Th2失衡及JAK/STAT信号通路影响 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(10): 1039-1041.