

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.25.006

清气化痰汤对哮喘小鼠肺部炎症的影响*

陈竹,彭玉,庞平,杨见辉,罗贞清

(贵阳中医学院第二临床医学院儿科,贵阳 550001)

[摘要] 目的 观察清气化痰汤对哮喘小鼠气道炎症和肺组织炎性反应的干预作用。方法 将 45 只 BALB/c 小鼠分为正常对照组(CON 组)、哮喘模型组(MOD 组)、地塞米松组(TRE 组)、清气化痰汤组(X1 组)、清气化痰汤联合地塞米松组(X2 组)。通过卵清蛋白和氢氧化铝凝胶进行致敏和雾化建立哮喘小鼠模型。取支气管肺泡灌洗液(BALF)进行细胞计数、嗜酸性粒细胞计数及观察肺组织病理变化。结果 与 CON 组比较,MOD 组 BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数明显增多,TRE 组、X1 组、X2 组 BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数均明显减少,TRE 组和 X2 组治疗后第 15 天与第 5 天比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各治疗组均能减轻小鼠肺组织病理炎症浸润,减少肺大泡产生、气道上皮增厚,X2 组炎症损伤轻。结论 清气化痰汤能减轻气道炎症,改善模型小鼠的肺组织炎性反应。

[关键词] 哮喘;炎症;清气化痰汤

[中图分类号] R272

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)25-3473-04

Effect of Qingqihuatan Decoction on pulmonary inflammation in asthmatic mouse*

Chen Zhu, Peng Yu, Pang Ping, Yang Jianhui, Luo Zhengqing

(Department of Pediatrics, Second Clinical Medical College, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550001, China)

[Abstract] **Objective** To observe the interventional effect of Qingqihuatan Decoction on airway inflammation and inflammatory reaction of lung tissue in asthmatic mouse. **Methods** Forty-five BALB/c mice were randomly divided into the normal control group(CON), asthmatic model group(MOD), dexamethasone group(TRE), Qingqihuatan Decoction group(X1) and Qingqihuatan Decoction combined dexamethasone group(X2). The asthmatic mouse model was established by the sensitization and inhalation of OVA and aluminium hydroxide gel. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was performed the cell counts and eosinophil counts, and the pathological changes of lung tissue were observed. **Results** Compared with CON group, BALF cell count and eosinophil count in the model group were increased obviously, which in the treatment group were significantly decreased. The effect of the X1 group and X2 group had statistical difference between on 5 d and 15 d. ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the treatment groups could reduce the pathogenical infiltration, lung bullae production and airway epithelial thickening of mouse lung tissue, especially the inflammation damage in X2 group was mild. **Conclusion** Qingqihuatan Decoction can relieve the airway inflammation and improves the lung tissue inflammatory response in model mouse.

[Key words] asthma; inflammation; Qingqihuatan Decoction

哮喘是由多种细胞和细胞组分参与的慢性气道炎症性疾病,其以气道炎、气道高反应性、气道重塑为特征^[1]。哮喘是一个全球性的疾病,其发病率呈逐年增高的趋势^[2]。儿童是哮喘的高发人群,我国第 3 次全国儿科哮喘流行病学调查结果显示,全国 0~14 岁儿童哮喘患病率为 0.42%~5.73%,平均为 3.02%,较 10 年前增加了 53.3%^[3]。很多研究证实哮喘的发生及严重程度与嗜酸性粒细胞性气道炎症有关^[4]。清气化痰汤是全国名老中医黄建业教授治疗哮喘痰热壅肺的经验方,临床疗效确切。本研究通过建立哮喘小鼠模型,观察清气化痰汤对哮喘模型小鼠肺部炎症和肺组织病理炎症损伤的影响,探讨其对哮喘的防治作用,为临床推广名老中医经验方及进一步研究其作用机制提供依据。

1 材料与方

1.1 实验动物 BALB/c 小鼠,雌性,4~6 周龄,SPF 级[合格证号 SYXK(黔)2012-001],购自贵州省实验动物工程中心。

1.2 仪器与试剂 2%氢氧化铝凝胶购自 Invivo Gen 公司;卵

清蛋白(OVA)购自 Sigma 公司;注射用地塞米松磷酸钠购自马鞍山丰原制药有限公司,每支 5 mg(批号 150512-1)。苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Masson 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 药物 清气化痰汤由胆南星、全瓜蒌、法夏、浙贝、枳壳、陈皮、茯苓、杏仁等 10 味中药组成。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 第 1、8、15 天腹腔注射 OVA 及氢氧化铝凝胶混合液 0.2 mL(内含 OVA 60 μ g 及 2.25 mg 氢氧化铝凝胶)致敏;第 21 天开始用 5% OVA 溶液 8 mL 行超声雾化,每次 30 min,连续雾化 5 d 进行激发,建立动物模型。CON 组用生理盐水代替 OVA 进行致敏和雾化。每天观察小鼠一般情况,并称取各组小鼠的体质量。

1.4.2 分组及给药 将 45 只小鼠采用随机数字表法分为 5 组,每组 9 只:(1)正常对照组(CON 组),用生理盐水代替 OVA 进行致敏和雾化,不给药;(2)哮喘模型组(MOD 组),按

* 基金项目:贵州省科学技术资金资助项目(黔科合 LH 字[2014]7314 号);贵州省卫生和计划生育委员会科学技术基金资助项目(gzwwkj2014-2-124)。作者简介:陈竹(1976—),硕士,副教授,主要从事儿童呼吸系统疾病的中西医结合防治研究。

1.4.1 方法进行致敏和激发, 不给药; (3) 地塞米松组 (TRE 组), 按 1.4.1 方法进行致敏和激发, 于每次激发前 30 min 腹腔注射地塞米松 (0.5 mg/kg); (4) 清气化痰汤组 (X1 组), 按 1.4.1 方法进行致敏和激发, 于每次激发前 30 min 灌胃给予中药 0.3 mL; (5) 清气化痰汤联合地塞米松组 (X2 组), 按 1.4.1 方法进行致敏和激发, 于每次激发前 30 min 灌胃给予中药 0.3 mL, 腹腔注射地塞米松 (0.25 mg/kg), 每天 1 次, 连续 15 d。1 mL 药液相当于 5.4 g 生药。

1.4.3 BALF 细胞计数 于治疗后第 5、15 天每组各处死小鼠 3 只, 同时从气管注射无菌生理盐水 0.5 mL 入肺, 抽吸 3 次后将抽出液体即支气管肺泡灌洗液 (BALF) 冻存于 -20 °C; 取 150 μ L BALF 细胞悬液与细胞计数液按 1:1 稀释混匀, 显微镜下计数细胞总数, 余下 BALF 4 °C、2 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀物涂片, 瑞氏染色后在显微镜下观察, 每个标本计数 200 个细胞, 共观察 10 个视野计数。

1.4.4 肺组织病理观察 处死小鼠后, 取右肺置于 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, HE 染色, 每张切片随机选取左、右、上、中、下 5 个视野, 观察各组小鼠肺组织病理变化。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行统计处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较用独立样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠一般情况及体质量观察 (1) 在致敏阶段, 各组小鼠

一般情况均较好, 无明显差别; 开始激发后, MOD、TRE、X1 组和 X2 组小鼠均出现烦躁、精神萎靡、进食减少等变化, 各组间无明显差异。 (2) MOD 组小鼠体质量较 CON 组下降, 其他治疗组小鼠体质量介于二者之间 (图 1)。

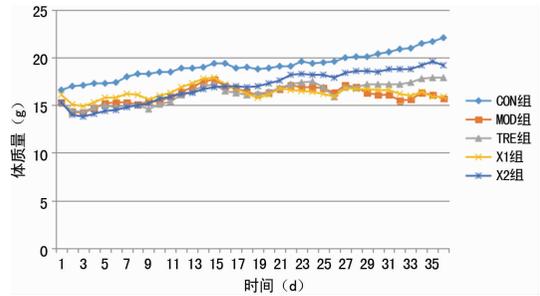


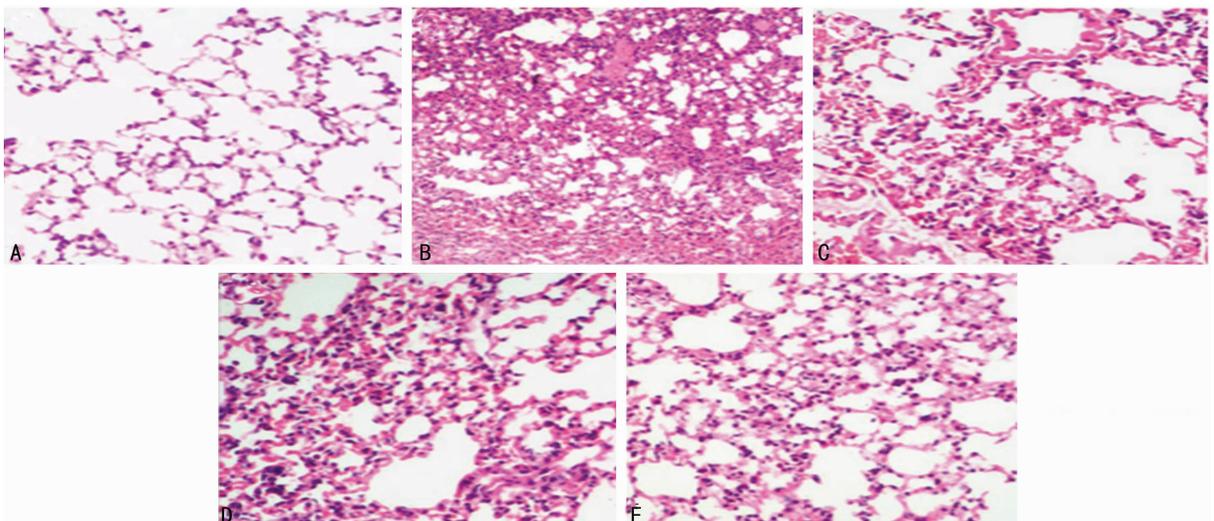
图 1 各组小鼠体质量变化

2.2 各组小鼠 BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数 与 CON 组比较, MOD 组 BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数明显增多 ($P<0.05$); TRE 组治疗后第 5 天与第 15 天 BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数无明显差异 ($P>0.05$); X1 组在治疗 15 d 后 BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数较治疗第 5 天时明显减少, 其治疗效果有明显差异 ($P<0.05$); X2 组治疗后第 5 天与第 15 天 BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数比较也有明显差异 ($P<0.05$); 3 个治疗组中 X2 组治疗 5 d 与 15 d 后 BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数下降最为显著 (表 1)。

表 1 BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数 ($\bar{x} \pm s$)

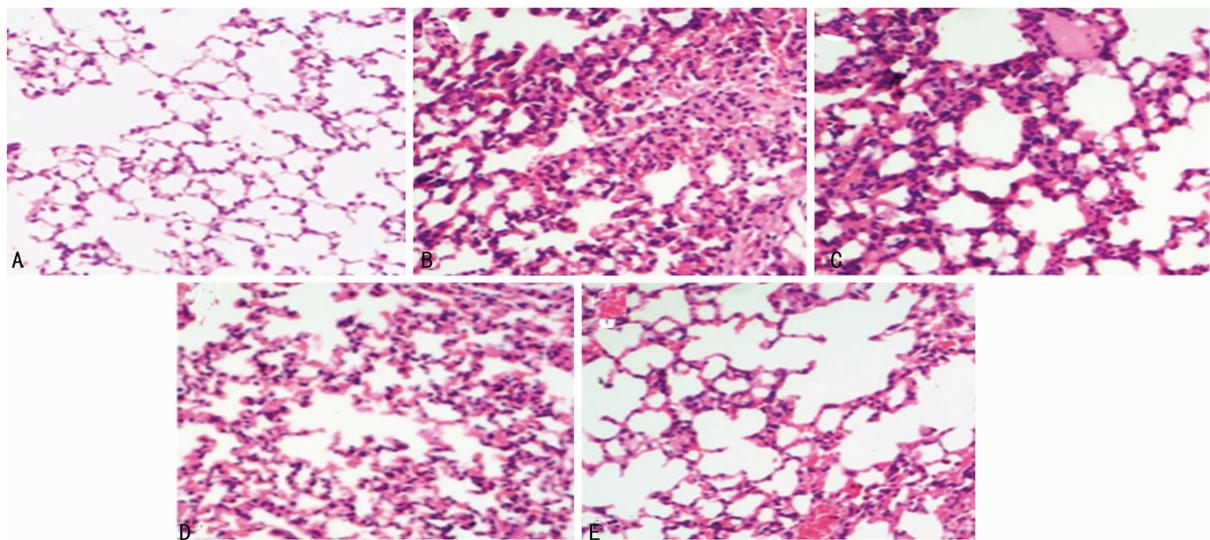
组别	n	BALF 细胞计数 ($\times 10^9/L$)		嗜酸性粒细胞计数 ($\times 10^9/L$)	
		治疗后第 5 天	治疗后第 15 天	治疗后第 5 天	治疗后第 15 天
CON 组	10	6.62 \pm 0.20	—	0.05 \pm 0.01	—
MOD 组	10	12.89 \pm 0.18 [#]	9.08 \pm 0.08 [#]	1.33 \pm 0.07 [#]	0.93 \pm 0.04 [#]
TRE 组	10	8.22 \pm 0.18 ^{**}	7.27 \pm 0.12 ^{**}	0.81 \pm 0.03 ^{**}	0.70 \pm 0.01 [*]
X1 组	10	9.31 \pm 0.17 ^{**}	7.37 \pm 0.18 ^{**}	0.86 \pm 0.03 ^{**}	0.72 \pm 0.02 [*]
X2 组	10	6.89 \pm 0.15 ^{**}	6.59 \pm 0.13 ^{**}	0.66 \pm 0.02 ^{**}	0.57 \pm 0.02 ^{**}

[#]: $P<0.01$, 与 CON 组比较; ^{*}: $P<0.05$, ^{**}: $P<0.01$, 与 MOD 组比较



A: CON 组; B: MOD 组; C: TRE 组; D: X1 组; E: X2 组

图 2 治疗 5 d 后各实验组肺组织病理变化 (HE $\times 200$)



A: CON 组; B: MOD 组; C: TRE 组; D: X1 组; E: X2 组

图 3 治疗 15 d 后各实验组肺组织病理变化 (HE×200)

2.3 肺组织病理观察 (1) 治疗 5 d 后肺组织病理观察: CON 组小鼠肺组织结构正常, 肺泡、小血管、支气管等结构完整, 气管壁和肺泡周围无炎症细胞浸润; MOD 组肺组织中肺大泡形成, 肺充血, 肺泡内出现泡沫样渗出物, 间质水肿, 可见淋巴细胞、单核细胞浸润, 肺组织中气道上皮增厚, 管腔狭窄, 肺间质出现淋巴细胞和嗜酸细胞浸润; TRE 和 X1 组肺泡间质炎症较重, 肺泡间隔增宽, 可见淋巴细胞、单核细胞浸润, 肺泡内可见炎性渗出物; X2 组小鼠肺部炎症减轻, 肺泡结构完整, 肺间质可见少量淋巴细胞和嗜酸细胞浸润(图 2)。(2) 治疗 15 d 后肺组织病理观察: CON 组小鼠肺组织结构正常, 肺泡、小血管、支气管等结构完整, 气管壁和肺泡周围无炎症浸润; MOD 组小鼠肺组织炎症减轻, 部分可见肺充血, 肺泡内出现泡沫样渗出物, 间质水肿, 可见淋巴细胞、单核细胞浸润, 肺组织中气道上皮增厚, 管腔狭窄, 肺间质出现淋巴细胞和嗜酸细胞浸润; TRE 和 X1 组肺泡间质仍有炎症, 肺泡间隔增宽, 可见淋巴细胞、单核细胞浸润, 肺泡内可见炎性渗出物; X2 组小鼠肺部炎症进一步减轻, 肺泡结构完整, 肺间质可见少量淋巴细胞和嗜酸细胞浸润(图 3)。

3 讨论

祖国医学中虽没有支气管哮喘的病名, 但在《素问·逆调论》、《金匱要略·肺痿肺癰咳嗽上气篇》已经有类似哮喘的记载, 《诸病源候论·咳嗽病诸侯》就提出“呶嗽者, 犹是咳嗽也, 其胸膈痰饮多者, 嗽则气动于痰, 上搏咽喉之间, 痰气相击, 随嗽动息, 呀呶有声, 谓之呶嗽”, 所描述症状与支气管哮喘相符。儿童哮喘的发病率高与儿童的生理病理密切相关。小儿肺脏娇嫩, 脾常不足, 肾常虚。人体水液的正常代谢为肺脾肾三脏所司, 若三脏功能失调, 则致水液代谢失常, 痰浊内生。如因外邪犯肺或感触异物, 吸入异气, 肺治节无权, 水津失于输布, 凝液为痰; 儿童脾常不足, 脾虚不能为胃行其津液, 运化失司, 湿聚为痰, 上贮于肺; 肾气虚衰, 不能蒸化水液, 也能使水湿上泛为痰。临床不论何种证型均表现为咳嗽气喘, 喉间痰鸣。中医认为痰易生并伏储于气道是哮喘发作的病理基础, 痰易生难消成为治疗哮喘的一个难点。结合现代医学对哮喘病因病理机制的认识, 推测哮喘“痰饮伏肺”的中医病理特征与现代医学哮

喘气道炎症、气道重塑存在必然的联系^[5]。

清气化痰汤是本院国家级名老中医黄建业教授治疗痰热咳嗽的经验方, 由胆南星、全瓜蒌、法夏、浙贝、枳壳、陈皮、茯苓、杏仁等 10 味中药组成。胆南星、全瓜蒌共为君药, 可疏泄实痰实火之壅闭, 宽胸散结, 达到清化肺内痰热, 理气止咳目的。法夏为辛温之品, 与苦寒之黄芩、浙贝相配共为臣药, 一化痰散结, 一清热降火, 既相辅、相制又相成; 佐以杏仁降利肺气以宣上, 枳壳、陈皮理气化痰以宽胸; 茯苓健脾渗湿以杜生痰之源; 焦楂消积以助脾运。全方具有清热化痰、止咳平喘的作用。

本研究采用药物激发制造小鼠哮喘模型, 在进行激发后除 CON 组小鼠外, 其余各组小鼠均出现烦躁、精神萎靡、进食减少、体质量下降等变化, 尤其是 MOD 组小鼠体质量持续下降明显。提示哮喘作为一个慢性气道炎症, 可对患者的精神及体格生长造成影响, 这对处于生长发育时期的儿童危害更大。大量研究表明, 炎症在哮喘的发病中发挥着至关重要的作用, 肺组织的嗜酸性粒细胞能够介导气道高反应性、气道重塑等病理改变^[6-8]。本研究发现 TRE 组在治疗后 5 d BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数较 X1 组低, 但组内比较, 治疗 5 d 与 15 d 后 BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数无明显差异, 说明激素治疗在疾病早期可较快抑制炎症反应, 但随着治疗时间的延长其治疗效果并未明显增强。X1 组在治疗 5 d 后虽然 BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数都较 TRE 组高, 但在治疗 15 d 后其治疗效果有明显差异, 上述数值均随着药物持续给予逐渐下降, 接近激素治疗效果, 说明清气化痰汤在抑制炎症介质释放方面虽然起效慢, 但随着治疗时间的延长治疗效果逐渐增强。X2 组在治疗 5 d 与 15 d BALF 细胞计数和嗜酸性粒细胞计数均低于 TRE、X1 组, 且组内比较有明显差异, 提示清气化痰汤与激素在减少炎症介质释放、控制炎症反应方面有协同治疗作用。

气道的炎症和气道功能受损, 二者存在密切联系, 支气管气道的炎症主要表现在嗜酸细胞的增多及浸润, 而支气管气道功能受损主要表现为上皮结构和功能改变^[9]。本研究建立的哮喘模型均出现了气道炎症和功能的受损。有研究指出气道结构和功能的改变是支气管哮喘病理改变的核心环节, 气道

皮可以促使 Th2 细胞因子表达增加^[10],这些细胞因子对成熟嗜酸细胞具有趋化和激活作用,直接参与了哮喘的发病和气道炎症的形成^[11-12]。本研究发现 X1 组的病理改变轻,无肺大泡、气道上皮未增厚,说明清气化痰汤的治疗作用不仅是抑制嗜酸细胞等炎症介质的释放还在维护气道上皮完整性、调节免疫方面有积极作用。X2 组小鼠肺组织病理示炎症较 X1、TRE 组轻,肺泡结构完整,肺间质仅见少量淋巴细胞和嗜酸细胞浸润。说明清气化痰汤在减轻小鼠肺组织炎症浸润方面疗效与激素相似,并且在与激素联合使用时能明显修复肺组织的病理损伤。

通过研究证实,清气化痰汤治疗哮喘、减轻咳嗽痰鸣症状的作用机制是抑制炎症介质的释放,减少肺组织中炎性渗出,减轻肺组织损伤。但清气化痰汤与激素联合使用能更好地保护肺组织的机制,需要进一步实验研究。

参考文献

- [1] Hirota JA, Haekett TL, Inlman MD, et al. Modeling asthma in mice: what have we learned about the airway epithelium[J]. *Am J Res Cell*, 2011, 44(4): 431-438.
- [2] Akinbani IJ, Moorman JE, Liu X. Asthma prevalence health care use, and mortality: United States, 2005—2009 [J]. *Natl Health Stat Report*, 2011, 12(32): 1-14.
- [3] 全国儿科哮喘协作组, 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所. 第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查[J]. *中华儿科杂志*, 2013, 51(10): 729-735.
- [4] Weltman K. Cytokines; regulators of eosinophilic inflammation[J]. *Allergy Asthma Proc*, 2000, 21(4): 203.
- [5] 喻强强, 薛汉荣, 余建玮, 等. 疏利气机、涤痰行瘀方(薷哮汤)对哮喘炎症白三烯通道干预作用初探[J]. *中医药通报*, 2016, 15(3): 44-46.
- [6] Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma[J]. *Trends Mol Med*, 2005, 11(4): 148-152.
- [7] Peng T, Hao I, Madri JA, et al. Role of C5 in the development of airway inflammation, airway hyperresponsiveness, and ongoing airway response [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(6): 1590-1600.
- [8] Draper DW, Gowdy KM, Madenspacher JH, et al. ATP binding cassette transporter G₁ deletion induces IL-17-dependent dysregulation of pulmonary adaptive immunity [J]. *J Immunol*, 2012, 188(11): 5327-5336.
- [9] Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. Airway remodeling in asthma [J]. *Current Opinion Pharmacol*, 2010, 10(3): 236-245.
- [10] Bulek K, Swaidani S, Aronica M, et al. Epithelium; the interplay between innate and Th2 immunity [J]. *Immunol Cell Biol*, 2010, 88(3): 257-268.
- [11] Marra F, Marra CA, Richardson K, et al. Antibiotic use in children is associated with increased risk of asthma [J]. *Pediatrics*, 2009, 123(3): 1003-1010.
- [12] Kim HO, Cho SI, Kim JH, et al. Food hypersensitivity in patients with childhood atopic dermatitis in Korea [J]. *Ann Dermatol*, 2013, 25(2): 196-202.
- [13] Liu X, Yu C, He P, et al. Expression of Eag1 channel associated with the aggressive clinicopathological features and subtype of breast cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 15093-15099.
- [14] Chávez-López MG, Zuiga-García V, Pérez-Carreon JI, et al. Eag1 channels as potential early-stage biomarkers of hepatocellular carcinoma [J]. *Biologics*, 2016, 10(1): 139-148.
- [15] 郑轶群, 李志坚, 高新, 等. Eag1 钾通道在前列腺癌组织中的表达及意义 [J]. *中华男科学杂志*, 2013, 19(3): 205-209.
- [16] 刘邦, 刘钧, 蹇顺海, 等. Eag1 钾离子通道, HIF-1 α 以及 VEGF 在子宫颈癌中的表达及其临床意义 [J]. *川北医学院学报*, 2014, 29(1): 57-62.
- [17] Urrego D, Movsisyan N, Ufartes R, et al. Periodic expression of kv10.1 driven by pRb/E2F1 contributes to G₂/M progression of cancer and non-transformed cells [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(6): 799-811.

(收稿日期: 2016-12-18 修回日期: 2017-06-06)

(上接第 3472 页)

regulate human ether- α -go-go-1 potassium channel expression [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 3300-3307.

- [10] Hemmerlein B, Weseloh M, Mello QF, et al. Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours [J]. *Mol Cancer*, 2006, 5(1): 41.
- [11] Occhiodoro T, Bernheim L, Liu H, et al. Cloning of a human ether- α -go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion [J]. *FEBS Lett*, 1998, 434(1/2): 177-182.
- [12] Pardo A, Del Camino D, Sánchez A, et al. Oncogenic potential of Eag K⁺ channels [J]. *EMBO J*, 1999, 18(20): 5540-5547.
- [13] Bijlenga P, Occhiodoro T, Liu H, et al. An ether- α -go-go K⁺ current, Ih-eag, contributes to the hyperpolarization of human fusion-competent myoblasts [J]. *J Physiol*, 1998, 512(Pt 2): 317-323.
- [14] 杨柳, 宋萍萍, 黎春晖, 等. Eag1 在大鼠口腔舌黏膜癌变过程中的表达 [J]. *泸州医学院学报*, 2014, 37(6): 553-556.

(收稿日期: 2016-12-19 修回日期: 2017-06-07)