

补肺方对缓解期哮喘豚鼠气道重塑作用机制的研究^{*}

★ 张弦¹ 王强² 孙增涛^{2**} (1. 天津市北辰区中医医院 天津 300400; 2. 天津中医药大学第二附属医院 天津 300193)

摘要:目的:观察中药补肺方对缓解期哮喘豚鼠气道重塑的影响。方法:将 48 只雄性健康豚鼠随机分为 4 组,空白对照组 A、模型组 B、强的松组 C 和中药补肺方组 D,每组 12 只。采用鸡卵蛋白致敏加激发法制作缓解期支气管哮喘豚鼠模型,用中药补肺方灌服,并与空白对照组、模型组、强的松组比较。取各组豚鼠右肺下叶制作石蜡切片,行 MASSON 染色和免疫组化染色,分别观察豚鼠肺组织气道重塑和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)。结果:上皮黏膜层面积(WAmuc)/支气管基底膜周径(Pbm)在强的松组低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TGF- β_1 , B 组与 A 组比较 $P < 0.01$, C、D 组与 A 组比较 $P < 0.05$, C、D 组与 B 组比较 $P < 0.05$, D 组与 C 组比较 $P < 0.05$ 。结论:中药补肺方可改善缓解期支气管哮喘豚鼠气道重塑,降低肺组织中 TGF- β_1 浓度,在缓解期对哮喘进行中药干预对预防气道重塑有实验意义。

关键词:补肺方;哮喘;豚鼠;气道重塑 TGF- β_1

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

1 实验材料

1.1 动物来源及分组

雄性清洁级豚鼠 48 只,月龄 8~10 周,平均体重 250~300 g,购自中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心。按照随机数字表法分为四组,每组 12 只。空白对照组(A 组),哮喘模型组(B 组),强的松组(C 组),中药补肺方组(D 组)。

1.2 试剂、药品

卵清白蛋白(OVA, Grade II, Sigma A5253);强的松(醋酸泼尼松片),天津力生制药,批号:0609044,规格 5mg/片,研碎溶于生理盐水制成悬浊液。

补肺方:处方组成:党参 20 g,熟地 20 g,当归 20 g,山茱萸 20 g,炙麻黄 6 g,桑白皮 20 g,黄芩 10 g,陈皮 10 g,半夏 10 g,紫菀 10 g,甘草 6 g。水煎,浓缩取汁。TGF- β_1 试剂盒:购于北京中杉生物技术有限公司。

2 实验方法

2.1 缓解期哮喘模型建立

各组豚鼠正常饲养一周后, B、C、D 组每只豚鼠腹腔注射 10% OVA 溶液 1ml 致敏,含 OVA100 mg。A 组注射等量生理盐水。从致敏后第 14d 开始, B、C、D 组豚鼠依次放入半封闭玻璃雾化箱,雾化吸入 1% 的 OVA 约 30 s~2 min,以豚鼠出现呼吸加快、咳嗽、口唇发绀、腹肌痉挛、点头呼吸及站立不稳等表现为激发成功。后连续激发,每天 1 次,持续 2 周。末次激发后正常饲养 2 周,造成豚鼠哮喘缓解

期模型。

2.2 给药、取材

末次激发后正常饲养 2 周,各组分别给药干预。

动物给药剂量参照徐淑云公式^[1]。计算后每天每只豚鼠给含生药 3.4 g 的补肺颗粒溶液 4 ml,含强的松 0.48 mg 的生理盐水溶液 4 ml。中药组给予补肺方水煎液 4 ml 灌胃,每日 1 次;强的松组给予强的松生理盐水溶液 4 ml,每日 1 次;空白对照组与模型组给予生理盐水溶液 4 ml,每日 1 次,共 14 d。给药结束后再次进行雾化吸入 OVA 激发。各组豚鼠在最后一次激发 24 h 后取材。以 1% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 体重给予豚鼠腹腔注射麻醉,固定于木制鼠板。剥离颈部组织至气管,统一切取右肺下叶组织,浸泡于中性福尔马林液固定保存。

2.3 检测指标

2.3.1 Masson 染色和测量 石蜡切片行 Masson 染色,随机选取 Masson 染色切片中内周长 $< 1\ 000\ \mu\text{m}$,长径/短径 ≤ 2 ,较规整的小支气管,每组选 ≥ 20 个,采用 IDA2000 数字医学图像分析系统测定支气管基底膜周径(Pbm),上皮黏膜层面积(WAmuc)、平滑肌面积(WAm)、气管内壁面积(WAi),并用 Pbm 将测量值标准化,分别以 WAmuc/Pbm、WAm/Pbm、WAi/Pbm($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)表示,代表相应管壁层的厚度,表示气道重构程度^[2,3]。

2.3.2 免疫组化染色及 TGF- β_1 检测 石蜡切片行免疫组化染色,封片晾干,每片取 10 个视野, $\times 400$ 倍镜下,应用 IDA2000 数字医学图像分析系统,

* 基金项目:天津市科技计划项目重大科技项目(05YFGDSF02200)

** 通讯作者:孙增涛,男,教授,博士生导师,中西医结合呼吸病方向。

测定 TGF- β_1 面积比。

2.4 统计学处理

实验数据采用 SPSS13.0 统计软件分析,所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),多组间两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 气道重构程度 Masson 染色后镜下观察情况:A 组肺内细小支气管周围极少量薄层胶原沉积;B 组肺内细小支气管周围多量胶原沉积,分布不均;C 组肺内细小支气管周围中等量胶原沉积,分布不均;D 组肺内细小支气管周围极少量胶原沉积,分布不均。

测量 Pbm, WAmuc, WAm, WAI, 并用 Pbm 将测量值标准化,统计分析结果显示:除 WAmuc/Pbm 在强的松组低于模型组,差异有统计学意义外($P < 0.05$),其余各组间差异均没有统计学意义。见表 1。

表 1 气道重构情况

组别	视野数	WAmuc/Pbm	WAm/Pbm	WAI/Pbm
空白对照组 A	23	42.95 $\pm$ 12.21	25.10 $\pm$ 8.72	21.84 $\pm$ 17.89
模型组 B	20	46.54 $\pm$ 19.58	22.91 $\pm$ 8.15	23.19 $\pm$ 13.34
强的松组 C	29	37.99 $\pm$ 12.13 [#]	21.27 $\pm$ 7.95	23.01 $\pm$ 11.41
补肺方组 D	22	45.09 $\pm$ 9.64	23.77 $\pm$ 6.05	24.06 $\pm$ 10.48

与模型组比较 [#] $P < 0.05$ 。

3.2 免疫组化测 TGF- β_1 的变化

模型组与空白组比较 TGF- β_1 明显升高($P < 0.01$),强的松组和补肺方组与模型组比较 TGF- β_1 明显降低($P < 0.01$),补肺方组与强的松组比较 TGF- β_1 也明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 TGF- β_1 测量结果

组别	例数 $\times$ 10 个视野数	TGF- β_1 面积比(%)
空白对照组 A	120	12.82 $\pm$ 3.68
模型组 B	110	19.26 $\pm$ 4.46 [#]
强的松组 C	80	17.48 $\pm$ 4.62 [*]
补肺方组 D	120	14.77 $\pm$ 4.87 ^{*Δ}

与空白对照组比[#] $P < 0.01$;与模型组相比^{*} $P < 0.01$;与西药组比 $\Delta P < 0.05$ 。

4 结论

哮喘气道重塑在慢性哮喘的病理生理中非常重要,决定着诸多哮喘的临床表现^[4]。气道重塑的程度与哮喘病情的严重性密切相关,严重气道重塑的哮喘患者常对糖皮质激素不敏感。因此,哮喘气道重塑是未来开发治疗哮喘药物的重要靶标,逆转哮喘气道重塑过程的药物在哮喘治疗中将起关键作用^[5]。本实验经过强的松和中药治疗,上述变化出现了减轻的趋势,这提示哮喘缓解期经过合理的治疗可以有效的减轻其气道平滑肌、气道粘膜的增厚,抑制气道重塑,防止气道不可逆性气流受限的出现。

中医药治疗哮喘历史悠久,疗效肯定而副作用小,对于缓解期的治疗及防止复发,中医药尤其具备优势和特长。缓解期哮喘以本虚为主,应细辨肺、脾、肾的虚实及阴虚阳虚,以扶正固本。

临床辨治经验显示,肺脾肾三脏亏虚、痰瘀内结是哮喘缓解期主要病理变化。健脾益肾补肺,祛瘀化痰平喘为哮喘缓解期中药治疗的基本法则。补肺方是导师孙增涛教授根据传统中医理论,结合多年临床实践经验,制定的防治缓解期哮喘的基本方。是从《备急千金要方》中的补肺汤和《景岳全书·新方八阵》中的金水六君煎化裁而来,具有健脾补肺益肾,祛瘀化痰平喘之功效。方中党参健脾益气、培土生金为君药;熟地、山茱萸滋肾、金水相生为臣;炙麻黄宣肺平喘,桑白皮、黄芩清热,陈皮、半夏、紫菀行气化痰,当归、赤芍活血化瘀共为佐药;甘草调和诸药;共起健脾益肾补肺,祛瘀化痰平喘之用。使气得复,痰浊瘀热得清,脾肺之气升降自如,金水二脏滋生互养,功能恢复正常。

转化生长因子- β 是一种具有同源双链的 25kD 多肽。哺乳动物中存在 3 中亚型,即 TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 。TGF- β 可来源于支气管上皮细胞、ASMC 和炎性细胞如中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等,具有广泛的调节细胞增殖分化、促进结缔组织蛋白合成的作用,在哮喘气道重构中起着重要作用。

TGF- β_1 在哮喘发病过程中的重要调节作用主要表现为:促进平滑肌细胞增生、肥大细胞及细胞外基质沉积,与哮喘患者气道重构有关。Vignola 研究发增多,且与基质膜厚度及成纤维细胞数目显著相关,提示 TGF- β_1 参与气道重构。

模型组与空白组比较豚鼠肺组织中 TGF- β_1 显著升高,中药组与强的松组豚鼠肺组织中 TGF- β_1 较模型组明显降低,同时中药组与强的松组比较也出现下降趋势。提示缓解期合理治疗可以有效的降低 TGF- β_1 表达水平,通过减轻气道平滑肌增生、肥大细胞及细胞外基质沉积,抑制哮喘豚鼠气道重塑。

参考文献

- [1]徐淑云,卞如濂,陈修.药理学实验方法学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1991.
- [2]BAI A, Edelman D H, Hogg J C, et al. Proposed nomenclature for quantifying subdivisions of the bronchial wall [J]. J Appl Physiol, 1994, 77(2):1011-1014.
- [3]杨远,林勇,黄静.地塞米松对哮喘小鼠气道重塑的影响[J].现代医学,2006,34(4):219-222.
- [4]Lazaar AL. irway smooth muscle: new targets for asthma Pharmacotherapy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2002, 6:447-59.
- [5]Kips JC, Pauwels RA. Airway wall remodeling: does it occur and what does it mean[J]. ClinExpAllergy, 1999, 29:1457-66.

(收稿日期:2008-12-20)