

· 方药研究 ·

平喘灵对哮喘大鼠血浆环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷含量及气道炎症细胞 Fas 表达的影响

刘永琦¹ 李金田¹ 李娟¹ 刘玉良¹ 苏菊萍¹ 颜春鲁¹ 陈珏明²

(1. 甘肃中医学院基础课部, 兰州市定西东路 35 号, 730000; 2. 石河子大学第一附属医院)

[摘要] **目的** 探讨平喘灵对哮喘大鼠血浆环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)含量及气道黏膜炎症细胞 Fas 表达的影响。**方法** 用卵蛋白复制大鼠哮喘模型。采用放射免疫法检测各组大鼠血浆 cAMP、cGMP 含量;用免疫组织化学法检测气道黏膜炎症细胞 Fas 的表达。**结果** 模型组大鼠较空白对照组大鼠血浆中 cAMP 含量、cAMP/cGMP 比值明显降低, cGMP 含量明显升高, 气道黏膜炎症细胞 Fas 表达明显升高($P < 0.05$), 组织形态学病变明显;经平喘灵治疗后, 上述指标均得到改善($P < 0.05$)。**结论** 平喘灵治疗支气管哮喘可能与其调节机体 cAMP、cGMP 含量及气道黏膜炎症细胞 Fas 表达, 稳定 cAMP/cGMP 比值有关, 且平喘灵与激素在治疗哮喘中有协同效应。

[关键词] 哮喘;中医药疗法;平喘灵;炎症细胞 Fas 表达

Effect of Pingchuanling on the Content of Serum cAMP and cGMP and Expression of Fas in Tracheal Inflammatory Cells in Asthma Rats

LIU Yong-qi, LI Jin-tian, LI Juan, et al.

(Department of Elementary Courses, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Pingchuanling on the content of serum cAMP and cGMP and expression of Fas in tracheal inflammatory cells in asthma rats. **Methods** Ovalbumin was used to copy asthma model rats. Radio-immunoassay was used to detect the content of serum cAMP and cGMP of rats in each group. The expression of Fas in tracheal inflammatory cells was tested by immunohistochemical method. **Results** In comparison with blank control group, the content of serum cAMP and cAMP/cGMP ratio decreased, while cGMP and the expression of Fas increased significantly in model group ($P < 0.05$), obvious histomorphologic change was observed in model group as well. All indexes mentioned above were improved by Pingchuanling. **Conclusion** The therapeutic effect of Pingchuanling for bronchial asthma may be related to regulating the content of cAMP and cGMP, expression of Fas and cAMP/cGMP ratio. Pingchuanling has cooperativity with hormone for asthma.

Key Words Asthma; TCM therapy; Pingchuanling; Expression of Fas in inflammatory cells

平喘灵为临床经验方, 临床应用及前期研究证实其具有清肺、宣肺、解表、止咳、祛痰、平喘之功效^[1]。本实验进一步探讨了平喘灵冲剂对哮喘大鼠血浆环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)含量及气道黏膜炎症细胞 Fas 表达的影响。

1 材料

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 70 只, 体重(200±20)g, 由甘肃中医学院 SPF 级实验动物中心提供; 普通级 SD 大鼠 60 只, 体重(200±20)g, 由青海省实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂

卵蛋白(OVA)由上海升正生物制品有限公司提供; SABC 免疫组化试剂盒、Fas(200 μg/ml)检测试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供; cAMP 放免

试剂盒、cGMP 放免试剂盒由上海放射免疫分析技术有限公司提供。平喘灵冲剂由麻黄、地龙、紫菀等组成, 由甘肃中医学院科研实验中心及基础医学实验室制备, 每克相当于生药 6g。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备

2.1.1 平喘灵及激素对哮喘大鼠血浆 cAMP、cGMP 含量的影响 清洁级 SD 大鼠 70 只用随机数字表^[2]分为空白对照组(A组)、模型组(B组)、平喘灵大剂量组(C1组, 平喘灵 5.76g/kg)、平喘灵小剂量组(C2组, 平喘灵 2.88g/kg)、地塞米松组(D组, 0.81mg/kg)和小剂量平喘灵加小剂量地塞米松组(E组, 平喘灵 2.88g/kg, 地塞米松 0.405mg/kg)。

造模采用 Underwood 法^[3]加以改进, 第 1 天 B、C1、C2、D、E 组大鼠腹腔注射 OVA 10mg 加氢氧化铝干粉 100mg 与灭活百日咳菌苗 5×10⁶ 个配制混悬液 1ml。于致敏第 15 天, 将 B、C1、C2、D、E 组大鼠置于密闭箱内,

给予1%OVA 超声雾化吸入激发,每天1次,每次30分钟。其中C1、C2、D、E 于每天激发前12小时分别按前述剂量胃饲相应药物。A 组用等量生理盐水代替氢氧化铝凝胶和 OVA 进行致敏和激发。A、B 组均胃饲等体积生理盐水,每天1次,共7天。每次激发时记录其引喘潜伏期及一般情况。哮喘标准为:头、面部瘙痒,呼吸加深、加快,少动,弓背,前肢缩抬,点头呼吸,咳嗽,或闻及哮鸣音,呈哮喘样表现。一般情况包括精神、活动、饮食、体重、排便、皮毛、病情及死亡情况。

2.1.2 平喘灵及激素对哮喘大鼠气道黏膜炎症细胞 Fas 表达及组织形态学的影响 SD 大鼠⁶⁰只用随机数字表分组^[2],模型复制及给药方法与2.1.1相同。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 平喘灵及激素对哮喘大鼠血浆 cAMP、cGMP 含量的影响 参考文献[4,5],末次诱喘1小时后,每只大鼠腹股沟股动脉取血3ml,放入 EDTA 抗凝的试管中,轻摇后立即冰浴,在采样20分钟内以4℃、3 000转/分钟离心20分钟,取血浆分置于两只试管中,冰箱中-20℃冷藏,分别待测 cAMP 和 cGMP 含量。采用放射免疫分析法,参照文献[6],按试剂盒说明书的步骤进行提取和测量。

2.2.2 平喘灵及激素对哮喘大鼠气道黏膜炎症细胞 Fas 表达及组织形态学的影响 参考文献[4,5],末次诱喘1小时后处死动物,大鼠无菌术开胸,取右肺中叶,置于10%中性甲醛溶液中固定24小时,石蜡包埋及切片,分别作常规 HE 染色组织切片及免疫组化染色组织切片。

气道黏膜炎症细胞 Fas 的测定用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶法(ABC 法),即参考SABC 免疫组化试剂盒及 Fas 检测试剂盒说明书进行染色、封片、镜下观察分析。以细胞核着色呈棕黄色的细胞为 Fas 表达阳性细胞^[7],以细胞浆着色呈棕黄色的细胞为 Bcl-2表达阳性细胞^[8]。应用 BI-2000A 型医学图像分析系统(成都泰盟科技有限公司产品)对每张切片随机选取5个视野(×200),测定肺组织嗜酸性粒细胞等炎症细胞 Fas 表达的阳性细胞总面积、积分光密度、阳性细胞面

积占总面积百分比并照相。对免疫组化染色组织切片结果进行统计学分析。

2.3 统计学方法

数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS10.0软件进行方差分析。

3 结果

3.1 一般状态观察

各组大鼠在激发前一般状态良好。激发后,A 组大鼠无明显变化。B 组大鼠则出现呼吸急促,张口呼吸,节律不整,腹式呼吸明显,幅度增强且不齐,喷嚏或呛咳,口鼻、四肢及尾尖轻度紫绀,躁动不安,粪便增多,激发后活动明显减少或俯卧不动。各治疗组大鼠呼吸急促、节律不整、幅度增强等较模型组为轻。各组均无大鼠死亡。

3.2 平喘灵对哮喘大鼠血浆 cAMP、cGMP 含量的影响

表1示,与 A 组相比,B 组血浆 cAMP 含量、cAMP/cGMP 比值明显降低,cGMP 含量明显升高($P < 0.05$);D 组、E 组、C1组较 B 组血浆 cAMP 含量、cAMP/cGMP 比值明显升高,cGMP 含量明显降低($P < 0.05$),而 C2组对3项指标的调节较 B 组无明显差异($P > 0.05$)。E 组、C1组、D 组效应相当($P > 0.05$)。

3.3 平喘灵对哮喘大鼠肺组织形态学及气道黏膜炎症细胞 Fas 表达的影响

光镜下观察,B 组大鼠气管上皮细胞脱落,平滑肌束断裂、缺损,杯状细胞略显增多,管腔、黏膜组织均可见大量炎症细胞浸润。肺泡壁增厚、水肿,肺泡腔变小,肺泡壁内细胞成分增多,局部可见肺组织实变。C2组大鼠肺组织形态学改善不明显;而其他治疗组大鼠支气管、细支气管仅偶见上皮细胞脱落,管腔内无黏液栓,管壁仅有少量炎症细胞浸润。

表2示,与 A 组比较,B 组 Fas 总面积、积分光密度、面积百分比均明显升高($P < 0.05$);与 B 组比较,各治疗组 Fas 总面积、积分光密度、面积百分比均明显升高($P < 0.05$),且 E 组较 C2组作用更为明显($P < 0.05$),并与 D 组效应相当($P > 0.05$)。

表1 平喘灵对哮喘大鼠血浆 cAMP、cGMP 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	给药剂量(g/kg)	cAMP(pM/ml)	cGMP(pM/ml)	cAMP/cGMP
A 组	10	—	30.61±4.86	7.27±1.35	4.358±0.819
B 组	12	—	17.90±6.46△	10.82±2.33△	1.715±0.560△
D 组	12	0.00081	30.34±7.52*▲	7.56±1.24*▲	4.182±1.235*▲
C2组	12	2.88	23.11±4.75△	10.77±2.13△	2.144±0.732△
C1组	12	5.76	31.73±7.12*▲	7.21±1.44*▲	4.318±0.753*▲
E 组	12	0.00142488	29.54±8.18*▲	7.31±1.60*▲	4.372±1.1801*▲

与 A 组比较,△ $P < 0.05$;与 B 组比较,* $P < 0.05$;与 C2组比较,▲ $P < 0.05$

表2 平喘灵对哮喘大鼠肺组织气道黏膜炎症细胞 Fas 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	给药剂量(g/kg)	总面积(μm^2)	积分光密度	面积百分比(%)
A组	10	—	6.671 $\pm$ 2.065	3.519 $\pm$ 1.239	0.100 $\pm$ 0.037
B组	10	—	60.755 $\pm$ 5.229 Δ	56.377 $\pm$ 2.248 Δ	0.550 $\pm$ 0.031 Δ
D组	10	0.00081	96.494 $\pm$ 1.696 Δ^*	93.571 $\pm$ 2.620 Δ^*	0.915 $\pm$ 0.071 Δ^*
C2组	10	2.88	94.153 $\pm$ 3.988 $\Delta^*\#$	87.456 $\pm$ 1.992 $\Delta^*\blacktriangle\#$	0.880 $\pm$ 0.014 $\Delta^*\blacktriangle\#$
C1组	10	5.76	97.759 $\pm$ 2.423 Δ^*	94.214 $\pm$ 1.881 Δ^*	0.933 $\pm$ 0.020 Δ^*
E组	10	0.0004+2.88	100.028 $\pm$ 2.041 $\Delta^*\blacktriangle$	95.781 $\pm$ 2.430 $\Delta^*\blacktriangle$	0.958 $\pm$ 0.010 $\Delta^*\blacktriangle$

与A组比较, $\Delta P < 0.05$; 与B组比较, $* P < 0.05$; 与D组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与E组比较, $\# P < 0.05$

4 讨论

支气管哮喘是由多种细胞和细胞组分参与的以气道慢性炎症和气道高反应性为特征的慢性炎症性疾病。其发生机制主要是由IgE介导肥大细胞等脱颗粒引起的超敏反应。cAMP、cGMP可调节生理或病理状况下的气管平滑肌^[9,10]。cAMP可使支气管平滑肌松弛,支气管扩张。任何减少cAMP含量的原因均可诱发支气管哮喘。肥大细胞内的cAMP激活蛋白激酶后,可改变细胞膜的通透性,抑制肥大细胞脱颗粒,阻止释放生物活性物质,从而避免支气管哮喘的发生;而cGMP可增加肥大细胞脱颗粒过程,加速生物活性物质的释放,诱发哮喘。另外,cAMP与cGMP在细胞内的浓度存在交互抑制现象,即cAMP增高时,cGMP减少;cGMP增高时,cAMP减少^[4,11]。本实验结果表明,模型组大鼠血浆中cAMP含量明显降低,cGMP含量明显升高,cAMP/cGMP明显降低,与文献报道相似^[6],说明模型复制成功。

中医学认为,先天禀赋不足,脏腑功能失调导致宿痰停聚于肺,从而成为哮喘的宿根。纯中药制剂平喘灵冲剂具有化痰豁痰,健脾温肾,宣肺平喘之功效。本研究表明,C1组、D组、E组动物一般状态及组织形态学明显改善,并可通过降低异常升高的血浆cGMP水平,升高血浆cAMP水平及稳定cAMP/cGMP比值而达到阻止炎性递质释放,松弛支气管平滑肌,降低气道高反应性等免疫调节作用,可能是其治疗哮喘的作用机制之一。另外,小剂量平喘灵虽然对血浆中cAMP、cGMP含量影响不明显,但与小剂量地塞米松具有协同作用。

气道黏膜嗜酸性粒细胞等炎症细胞的大量聚集及脱颗粒是哮喘的主要病理改变之一。细胞凋亡是生物体内存在的一种普遍现象,对维持组织细胞的平衡起着重要作用。本研究显示,模型组管腔、黏膜组织可见大量炎症细胞浸润,与文献报道相似^[7,8],提示模型复制成功。已有研究证实,激素等可通过诱导气道黏膜嗜酸性粒细胞等炎症细胞凋亡而实现对哮喘的治疗作用。Fas分子可在多种细胞广泛表达,具有介导细胞凋

亡、调节炎症反应及多种免疫生理病理作用^[12]。各治疗组大鼠肺组织炎症细胞Fas表达均明显升高,提示皮质激素及平喘灵均可诱导哮喘模型肺组织嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞的凋亡,可能是平喘灵治疗支气管哮喘的作用机制之一。另外,小剂量平喘灵与小剂量地塞米松在诱导炎症细胞Fas表达中还具有协同作用。综上可见,临床用药在安全范围内联合应用平喘灵有助于激素的撤减。

参考文献

[1]陈耀明,李金田,刘永琦.平喘灵冲剂治疗支气管哮喘的药效学研究.中医研究,2005,18(7):8~9.
[2]徐勇勇.医学统计学.北京:高等教育出版社,2001:246.
[3]Underwood SL,Raeburn D,Lawrence C,et al.RPR106541,a novel,airways-selective glucocorticoid: effects against antigen-induced CD4⁺ T lymphocyte accumulation and cytokine gene expression in the Brown Norway rat lung. Br J Pharmacol,1997,122(3):439~446.
[4]魏玲,刘春丽,金发光.卵蛋白诱发哮喘发作时豚鼠大脑和肺内Fos蛋白的表达.基础医学与临床.2002,22(1):63~65.
[5]邓杨梅,谢强敏,陈季强,等.哮喘大鼠肺与大脑皮层的白三烯B₄含量和白三烯A₄水解酶的mRNA表达上升.浙江大学学报(医学版),2003,32(4):296~322.
[6]李矗,龙子江,王珍,等.鱼棉平喘方对哮喘豚鼠血浆中cAMP、cGMP及PAF含量影响.中成药,2002,24(5):374~376.
[7]赵云峰,陈虹,罗永艾.母牛分枝杆菌菌苗对哮喘豚鼠肺组织Eos凋亡及Fas蛋白表达的影响.中国误诊学杂志,2004,11(4):1769~1772.
[8]赵云峰,罗永艾.微卡对哮喘豚鼠肺组织Eos凋亡及Bcl-2蛋白表达的影响.中国病理生理杂志,2005,21(3):555~558.
[9]李荣,张珍祥,彭则.腺苷受体激动剂在豚鼠实验性哮喘中的作用.中国病理生理杂志,2000,16(2):135~138.
[10]刘永琦.医学免疫学.北京:人民卫生出版社,2005:177~181.
[11]秧茂盛,肖建初.青蒿琥酯对豚鼠气管平滑肌的影响.中山大学学报,1997,18(4):264~267.
[12]何维.医学免疫学.北京:人民卫生出版社,2005:281.

(收稿日期:2005-11-03;修回日期:2006-02-20)