

姜辛夏颗粒对哮喘大鼠气道重建中胶原蛋白及支气管壁厚度的影响

张玉英, 杨 军, 王礼凤, 何云义, 惠朋利, 应小平 (陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 研究姜辛夏颗粒对卵蛋白(OVA)致敏哮喘大鼠模型肺组织中 I、III、V 型胶原蛋白表达及对支气管壁厚度的影响。**方法** 采用 OVA 致敏建立哮喘大鼠模型, 观察姜辛夏颗粒对哮喘大鼠的疗效; 免疫组化技术检测肺组织中 I、III、V 型胶原蛋白的表达; 支气管组织 HE 染色, 计算机图像分析测定气道壁厚度。**结果** 与模型组比较, 姜辛夏颗粒能明显减轻哮喘大鼠的哮喘症状和支气管黏膜的炎症反应; 明显缩小哮喘大鼠支气管总管壁面积(WAt)、内壁面积(WAi)及平滑肌面积(WAm)($P < 0.01$); 明显降低肺组织中 I、III、V 型胶原蛋白的表达($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 姜辛夏颗粒可明显降低哮喘大鼠支气管上皮 I、III、V 型胶原蛋白的合成和沉积, 减小支气管壁的厚度, 改善支气管的通气功能, 从而抑制哮喘气道重建的发生发展。

关键词: 支气管哮喘; 姜辛夏颗粒; 胶原蛋白; 支气管壁厚度

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)01-0063-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.017

Effect of Jiang Xin Xia Granules on Collagen Expression and Bronchial Wall Thickness in Asthmatic Rats with Airway Remodeling

ZHANG Yuying, YANG Jun, WANG Lifeng, HE Yunyi, HUI Pengli, YING Xiaoping (Shaanxi College of Chinese Medicine, Xianyang 712046 Shaanxi, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of Chinese herbal medicine *Jiang Xin Xia* granules on the expression of collagen type I, III and V in the lung tissue and bronchial wall thickness of ovalbumin (OVA)-induced asthmatic rat model. **Methods** OVA-induced asthmatic rat model was replicated and the medication groups were given intragastric administration of the corresponding drugs respectively. After treatment, therapeutic effect was evaluated in all of the groups. The expression of collagen type I, III and V in the pulmonary tissues was detected by using immunohistochemistry technique, and the bronchial wall thickness was measured after HE staining through computer imaging analysis. **Results** Compared with the asthmatic model group, *Jiang Xin Xia* granules had an obvious effect on relieving asthma and bronchial mucosal inflammatory reaction in asthmatic rats, reducing the bronchial total wall area, inner wall area and smooth muscle area ($P < 0.01$), and decreasing the expression of collagen type I, III and V in the pulmonary tissues ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** *Jiang Xin Xia* granules can obviously decrease the synthesis and deposition of collagen I, III and V under bronchial epithelia, reduce airway wall thickness, and improve bronchial ventilation function, thus to prevent the occurrence and development of asthmatic airway remodeling.

Keywords: Bronchial asthma; *Jiang Xin Xia* granules; Collagen; Bronchial wall thickness

气道炎症及气道重建是哮喘的两个主要病理学特征。气道重建的病理学特征包括气道壁增厚、基底膜变性和增厚, 平滑肌增生、肥厚, 上皮下的纤维化, 黏液分泌增多等。气道上皮下纤维化表现为支气管上皮网状层密度和厚度的增加, I、III、V 型胶原、

纤维连接蛋白及细胞黏合素沉积增加, 气道杯状细胞肥大, 上皮黏液腺增生或肥大, 导致黏蛋白量增加, 黏液过度分泌, 形成“黏液栓”, 导致气道狭窄, 气流阻力增加及气道高反应性^[1-2]。前期研究表明, 姜辛夏颗粒能减轻气道炎症、降低气道高反应性、改

收稿日期: 2012-07-18

作者简介: 张玉英, 女, 医学硕士, 教授。研究方向: 经方治疗呼吸病的临床与实验研究。Email: Sxzyxyzyy@163.com。

基金项目: 陕西省教育厅专项计划项目(08JK0275); 陕西省教育厅重点学科(伤寒论)资助项目。

善微循环及通气功能障碍,并能抑制其病理变化^[3-4],从而纠正 Th1/Th2 失衡,下调 TGF- β 以及 MMP-9 和 TIMP-1 的表达,阻止和逆转气道重建的发生^[3-4]。本实验在此基础上,通过复制哮喘大鼠模型,采用免疫组化技术检测肺组织中 I、III、V 型胶原蛋白表达,光学显微镜观察哮喘大鼠气道重建的结构变化,以观察姜辛夏颗粒对哮喘气道重建的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,SPF 级,体质量(160 $\pm$ 20) g,西安交通大学实验动物中心,动物合格号:SCXK(陕)2007-001。实验前在实验室内喂养观察 1 周。

1.2 药物、试剂及仪器 姜辛夏颗粒由麻黄、干姜、细辛、半夏、葶苈子、丹参、淫羊藿组成,由陕西中医学院附属医院中药制剂中心制备。醋酸地塞米松片,浙江仙琚制药有限公司,批号:20100421。卵蛋白(OVA),美国 Sigma 公司,批号:A-5253;灭活百日咳杆菌疫苗,上海生物制品研究所,批号:20090504;氢氧化铝,天津市博迪化工有限公司,批号:20091030;I、III、V 型胶原蛋白多克隆抗体(兔抗鼠)免疫组化试剂盒,北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 20100325;20100715;20100324;JWC-2 医用超声雾化器,鞍山市同信医用仪器厂。

1.3 分组 按体质量随机分正常对照组(12 只)、模型组(14 只),地塞米松组(14 只),姜辛夏颗粒组(12 只)。

1.4 动物模型复制 参照文献方法^[5-6]并稍加改进。抗原液是由 OVA 100 mg、灭活百日咳杆菌疫苗原液约 5×10^9 个/mL 和氢氧化铝干粉 100 mg 制成的混悬液。模型组及各治疗组于第 1 天、第 8 天,每鼠分别在两腹股沟、腹侧、前足跖共 4 点皮下注射 0.2 mL 抗原液,同时腹腔注射 0.2 mL 抗原液以致敏;正常对照组以等量生理盐水代替抗原液进行皮下、腹腔注射。第 15 天开始,将造模大鼠置于密闭容器内(50 cm $\times$ 30 cm $\times$ 20 cm 透明带盖塑料盒内),给予 2% OVA 溶液进行雾化吸入,雾化流量为 3 mL $\cdot$ min⁻¹,每次持续 20 min 激发哮喘,正常对照组用等量生理盐水雾化吸入。观察造模大鼠反应,在大鼠出现烦躁、抖毛、咳嗽或打喷嚏、抓鼻、腹式呼吸、呼吸急促,甚至出现口唇、双眼、双耳紫绀、抽搐、跌倒等症状后,随机从正常对照组、模型组各取 2 只大鼠作病理切片。

结果显示,与正常对照组比较,模型组支气管黏膜及黏膜下层组织有大量的嗜酸性粒细胞浸润、支气管壁增厚、平滑肌增生、管腔狭窄、组织黏膜轻度充血水肿等典型的气道炎症表现,标志大鼠哮喘激发成功。

1.5 给药方法 造模成功后,于第 15 天开始每天早晨 8~9 时将造模大鼠置于密闭容器内雾化,以 2% OVA 溶液激发哮喘,然后灌胃给药,持续 14 d。正常对照组、模型组给予等量的生理盐水,地塞米松组给予地塞米松混悬液 0.75 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹,姜辛夏颗粒组给予姜辛夏颗粒混悬液 23 g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹,为生药量,给药容积为 10 mL $\cdot$ kg⁻¹。

1.6 标本制备 实验第 28 天,末次激发结束后 6 h 内,以 10%水合氯醛 3.5 mL $\cdot$ kg⁻¹腹腔注射麻醉大鼠,固定于操作台上,从颈前纵向剪开皮肤,钝性分离并暴露气管,继续向下分离,暴露肺门。剪开胸腔,常规留取右肺中叶组织,保留右肺门动脉及气管,于 10%甲醛溶液中固定,石蜡包埋、切片,HE 染色,进行病理形态学观察。

1.7 指标检测

1.7.1 一般情况 观察大鼠的症状、体征。

1.7.2 支气管组织进行组织病理学检查 支气管组织 HE 染色,采用图像分析系统测定,每组至少观察 6 只大鼠,每只动物随机观察 3 张切片,在显微镜下放大 200 倍,选择管径完整的小支气管,测量支气管基底膜周径(Pbm)、总管壁面积(WAt)、内壁面积(WAi)及平滑肌面积(WAm),并用 Pbm 将测量值标准化,以表示相应支气管壁的厚度。

1.7.3 免疫组织化学方法检测肺组织 I、III、V 型胶原蛋白的表达 按照说明书严格操作。

1.8 统计学处理方法 所测数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 for windows 统计软件进行单因素方差分析法,组间比较用 q 检验。

2 结果

2.1 一般情况 模型组大鼠激发后,表现为躁动不安、咳嗽、抓鼻、打喷嚏、腹式呼吸、呼吸急促、饮水增多、激发期间活动明显减少或俯卧不动、精神萎靡、反应迟钝、毛色发黄枯槁、无光泽等;各治疗组大鼠的上述症状则明显减轻;正常对照组大鼠行动敏捷,呼吸平稳,精神状态良好,皮毛有光泽。

2.2 对哮喘大鼠支气管组织病理学观察 模型组支气管黏膜下可见大量炎细胞浸润,包括嗜酸性粒细胞、

表 1 对哮喘模型大鼠支气管 Pbm、WAt、WAI、WAm 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of rat bronchial Pbm, WAt, WAI, WAm in various groups

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Pbm/μm	(WAt/Pbm)/μm ² ·μm ⁻¹	(WAI/Pbm)/μm ² ·μm ⁻¹	(WAm/Pbm)/μm ² ·μm ⁻¹
正常对照组	9	—	627.02 ± 51.61	20.75 ± 1.63	17.29 ± 1.35	2.91 ± 0.83
模型组	11	—	636.16 ± 74.31	27.95 ± 1.89 ^Δ	25.00 ± 10.85 ^Δ	5.87 ± 1.86 ^Δ
地塞米松组	14	7.5 × 10 ⁻⁴	631.78 ± 57.55	22.19 ± 1.88**	18.87 ± 1.58**	3.60 ± 1.27**
姜辛夏颗粒组	11	23	633.78 ± 54.31	23.06 ± 1.51**	19.08 ± 1.50**	3.77 ± 0.96**

注：与正常对照组比较，^Δ*P* < 0.01；与姜辛夏颗粒组比较，***P* < 0.01。

淋巴细胞、中性粒细胞、浆细胞等，同时气道壁明显增厚，管壁周围及小血管周围亦有炎细胞浸润，上皮脱落，黏膜上皮增生活跃，管腔狭窄，网状基底膜层及气道平滑肌层增厚明显，亦有部分肺泡壁变薄或断裂，融合成肺大泡；地塞米松组、姜辛夏颗粒组形态接近正常组，支气管及肺泡炎性浸润不明显，黏膜结构完整，肺泡间隔仅有部分断裂，见图 1。

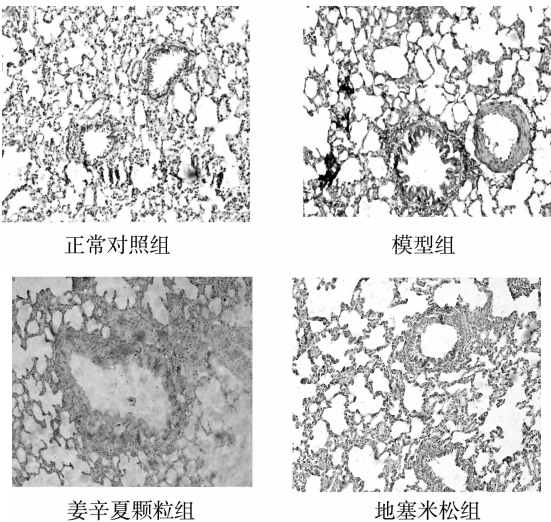


图1 对哮喘大鼠支气管组织病理学的影响(HE, ×200)
Figure 1 Comparison of histopathology of bronchial tissue of rats in varous groups(HE, ×200)

2.3 对哮喘大鼠支气管壁厚度的影响 与正常对照组比较，模型组支气管 WAt、WAI、WAm 明显增厚(*P* < 0.01)；与模型组比较，地塞米松组、姜辛夏颗粒组 WAt、WAI、WAm 明显减小 (*P* < 0.01)；地塞米松组与姜辛夏颗粒组比较无统计学意义 (*P* > 0.05)，见表 1。

2.4 对哮喘大鼠肺组织 I、Ⅲ、V 型胶原蛋白表达的影响 与正常对照组比较，模型组 I 型、Ⅲ型、V 型胶原平均光密度(MOD)值明显升高(*P* < 0.01)；姜辛夏颗粒组和地塞松组 I 型、Ⅲ型、V 型胶原 MOD 值明显低于模型组(*P* < 0.01, *P* < 0.05)，见表 2。

表 2 对哮喘大鼠肺组织胶原蛋白 MOD 值的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of average optical density of collagen expression in lung tissue of rats in various groups

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	MOD 值		
			I 型胶原	Ⅲ型胶原	V 型胶原
正常对照组	9	—	32.31 ± 8.71	18.01 ± 6.22	11.5 ± 3.03
模型组	11	—	57.34 ± 12.68 ^Δ	53.43 ± 10.2 ^Δ	30.02 ± 9.28 ^Δ
地塞米松组	14	7.5 × 10 ⁻⁴	38.71 ± 11.19**	22.28 ± 8.39**	14.61 ± 4.84**
姜辛夏颗粒组	11	23	43.21 ± 10.69*	24.21 ± 7.23**	15.58 ± 5.67**

注：与正常对照组比较，^Δ*P* < 0.01；与模型组比较，***P* < 0.01, **P* < 0.05。

3 讨论

气道重建是气道反复损伤与修复的结果，是造成不可逆转的气道阻塞的重要原因。传统观点认为，哮喘的特点是可逆性气道阻塞，而现在研究表明，气道重建可导致气流不可逆阻塞和持续性的气道高反应性，并成为顽固性哮喘的病理学基础。气道重建的发生不仅出现在哮喘的晚期，而且可出现在哮喘的早期。哮喘发作后通过适当的治疗能暂时控制症状，而气道重建却呈持续性、进行性发展并逐渐加重，故治疗哮喘的重点在于防治气道重建。气道重建是哮喘慢性炎症改变以外又一特征性病理改变，主要包括气道壁上皮的损害、平滑肌增生肥厚、细胞外基质的改变。气道重建还与黏液化生，血管生成、扩张，微血管漏的形成及气道神经的重建等有关^[7]。由于气道炎症的作用，气道壁组分发生改变，如黏膜上皮脱落、平滑肌收缩、黏膜折叠、平滑肌细胞肥大增生、黏膜下胶原沉积、黏液腺体肥大及黏液分泌细胞增生等，都会使气道壁面积明显增大，气道内径缩小^[8]。气道平滑肌增厚是支气管阻塞和气道高反应性的主要决定因子，其主要病理学改变是气道壁的增厚^[9]。上皮纤维化主要是网状层的增厚，表现为以 I、Ⅲ、V 型胶原为主的细胞外基质(ECM)沉积，而 ECM 沉积是基质蛋白合成增加和基质降解受抑制的综合结果。亦即二者比例失衡导致 ECM 异常积聚。(下转第 107 页)

2011, 9: 587-597.

- [13] 郑凌云. 利用人源性血管紧张素 II 构建大鼠心肌肥大模型的方法[J]. 卫生职业教育, 2005, 23(14): 117-118.
- [14] House SL, House BE, Glascock B, et al. Fibroblast growth factor 2 mediates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through activation of the extracellular regulated kinase[J]. Mol Cell Pharmacol, 2010, 2(4): 143-154.
- [15] Shahbaz AU, Sun Y, Bhattacharya SK, et al. Fibrosis in hypertensive heart disease: molecular pathways and cardioprotective strategies[J]. J Hypertens, 2010, 28(1): S25-S32.
- [16] Wu CC, Chen JS, Chen SJ, et al. Kinetics of adaptive immunity to cationic bovine serum albumin-induced membranous nephropathy[J]. Kidney Int, 2007, 72(7):831-840
- [17] 周玖瑶, 廖雪珍, 李锐. 肾复康对大鼠 C-BSA 肾炎的药理作用[J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(4): 342-347.
- [18] Wu SH, Wu XH, Liao PY, et al. Signal transduction involved in protective effects of 15(R/S)-methyl-1-lipoxygenase A4 on mesangiolipid-errative nephritis in rats[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty acids, 2007, 76(3): 173-180.
- [19] 丑安, 周玖瑶, 周园, 等. 真武汤对 C-BSA 渗透泵肾小球肾炎大鼠的治疗作用[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 626-630.
- [20] 刘秀梅, 王玉伟, 初清. 纹状体内微量灌注 Tourette 综合征患者血清对大鼠刻板行为的影响[J]. 中国心理卫生杂志, 2010, 24(1): 69-72.
- [21] 姬媛媛, 刘俊田, 王志东, 等. 非诺贝特对血管紧张素 II 诱导的大鼠炎性反应的干预研究[D]. 西安: 西安交通大学医学院药理学系, 2008: 55-56.

(编辑: 梁进权)

(上接第 65 页)

本研究结果显示, 模型组大鼠肺内支气管平滑肌层及气道壁明显增厚, 上皮下胶原蛋白大量沉积; 姜辛夏颗粒能明显减轻哮喘大鼠的哮喘症状和支气管黏膜的炎症反应, 抑制 I、III、V 型胶原的合成, 缩小哮喘大鼠支气管总管壁面积、内壁面积及平滑肌面积, 其作用强度与地塞米松组相近, 说明姜辛夏颗粒可能通过抑制 I 型、III 型、V 型胶原蛋白的表达, 减小支气管壁的厚度, 减轻气道壁结构的病理变化, 从而达到预防和治疗哮喘气道重建的目的。

参考文献:

- [1] 林耀广. 现代哮喘病学[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 160.
- [2] 余巍巍, 蔡双启. 哮喘大鼠肺内神经生长因子表达与气道炎症的相关性[J]. 武汉大学学报(医学版), 2011, 32(4): 469-472.

(上接第 96 页)

暴露的矿物质种类和数量不同是造成同一批样品测得 PSL 计数值有差异的最主要因素。本方法要求对待测样品进行粉碎处理正是为了让其中的矿物质充分暴露; 取混匀后的粉末约 2.0 g 是保证质地不同的绝大多数样品均能平铺于培养皿的底部, 且测定的面积大小固定, 更利于数据的一致性。

强光照射会造成 PSL 计数值的下降, 故同一份样品连续测定则计数值明显下降, 在强光下放置后的样品计数值明显下降。所以, 未测样品应在暗处保存, 尽量在暗处取样, 并以第一次测定的结果为准。

综上, 所建方法在灵敏度、准确度、稳定性方面均能满足鉴别要求, 与欧盟方法比较, 更适合中药产品, 判定规则更加简洁明确, 判定结果的准确度与欧盟方法一致, 甚至优于欧盟方法。

- [3] 张玉英, 李玲, 唐俊峰, 等. 姜辛夏冲剂对哮喘大鼠气道炎症的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(1): 122-123.
- [4] 张玉英, 何云义, 惠朋利, 等. 姜辛夏颗粒对支气管哮喘大鼠肺组织基质金属蛋白酶及其抑制剂含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(2): 30-32.
- [5] 迟磊, 符州, 戴继宏, 等. 过敏性哮喘大鼠模型的建立[J]. 重庆医学, 2003, 32(4): 429-431.
- [6] 闻玉梅. 天然免疫与中西医结合[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(1): 1-2.
- [7] 张元元, 陆党芝. 支气管哮喘气道重塑的研究进展[J]. 大理学院学报, 2006, 5(8): 59-62.
- [8] 李明才, 何韶衡. 转化生长因子 β 在哮喘气道炎症与重塑中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(8): 1527-1530.
- [9] Lambert RKBR, Wiggs K, Kuwano JC, et al. Functional Significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD[J]. J Appl Physiol, 1993, 74: 2771-2781.

(编辑: 梁进权)

参考文献:

- [1] 赵永富, 汪昌保, 王超. 辐射灭菌技术在制药业上的最新应用进展[J]. 核农学报, 2006, 20(2): 143-147.
- [2] 张立雯, 江英桥, 林彤, 等. 中药辐照检测研究现状概述[J]. 中药材, 2011, 34(3): 482-487.
- [3] EN 13751(2002). Foodstuffs Detection of irradiated food using photo-stimulated luminescence[S]. Brussels: European Committee of Standardization.
- [4] Göktu Bayram, Henry Delincée. Identification of irradiated Turkish foodstuffs combining various physical detection methods[J]. Food Control, 2004, 15: 81-91.
- [5] Alberti A, Corda U, Fuochi P, et al. Light-induced fading of the PSL signal from irradiated herbs and spices[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2007, 76: 1455-1458.
- [6] 毕福钧, 张立雯, 林彤, 等. 脉冲光激发系统法检测辐照中药材方法的建立[J]. 中草药, 2012, 43(11): 2279-2283.

(编辑: 宋威)