

小儿止咳平喘露的平喘作用及其对外周血可溶性细胞黏附分子-1 的影响

桑果¹, 杜建民² (1. 浙江省立同德医院, 杭州 310012; 2. 杭州市第一人民医院, 杭州 310006)

摘要:目的 在小儿止咳平喘露平喘、镇咳、祛痰的实验基础上, 观察其对哮喘动物模型肺泡灌洗液嗜酸性粒细胞计数及外周血可溶性细胞黏附分子-1 (sICAM-1) 的影响。方法 ①将预选合格的豚鼠 30 只随机分为 3 组, 即正常对照组、细辛脑组、小儿止咳平喘露组, 每组 10 只。采用豚鼠组胺引喘法观察小儿止咳平喘露的平喘作用。②采用豚鼠枸橼酸引咳法观察小儿止咳平喘露的镇咳作用, 给药方式及剂量同平喘试验。③将 ICR 健康小鼠 30 只, 随机分为 3 组, 分组方式同平喘试验, 采用小鼠气道酚红排泄法观察小儿止咳平喘露的祛痰作用。④将 40 只健康豚鼠随机分为 4 组, 即正常对照组、模型组、细辛脑组、小儿止咳平喘露组, 每组 10 只。建立卵蛋白致敏豚鼠哮喘模型, 在肺泡灌洗液中计数白细胞总数和嗜酸性粒细胞数, 并用 ELISA 法检测豚鼠血清 sICAM-1 的表达水平。结果 小儿止咳平喘露能明显延长组胺诱导的豚鼠引喘潜伏期和枸橼酸引起的豚鼠咳嗽潜伏期, 促进小鼠气道酚红排泄, 降低哮喘豚鼠肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞计数和血清 sICAM-1 水平。结论 小儿止咳平喘露具有平喘、止咳、祛痰作用, 其作用机制可能与降低哮喘豚鼠肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞计数和血清 sICAM-1 水平有关。

关键词:哮喘; 可溶性细胞黏附分子-1; 作用机制

中图分类号: R283.6; R974.3

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2008)01-0071-03

Antiasthmatic Effects of Zhikepingchuan Decoction for Children and Its Effect on Blood sICAM-1 Level

SANG Gao¹, DU Jian-min² (1. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China; 2. Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the antiasthmatic effects of Zhikepingchuan Decoction For Children and its effect on blood sICAM-1 level. **METHODS** ①Antiasthmatic effect was investigated with asthma induced by histamine aerosol in guinea pigs. ②Antitussive effect was studied with citric acid-induced cough in guinea pigs. ③Expectorant effect was studied with excretion of phenol red in the airway of mice. ④Forty guinea pigs were randomly divided into four groups: control, model, α -asarone, Zhikepingchuan Decoction For Children, with 10 guinea pigs in each group. Experimental animals were sensitized and challenged by OVA to establish an asthmatic guinea pig model. The numbers of leukocytes and eosinophils (EOS) in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected, and the levels of plasma sICAM-1 in four groups were determined respectively by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS Zhikepingchuan Decoction For Children can obviously prolong the incubation times both for histamine-induced asthma and for citric acid-induced cough; It can also increase the excretion of phenol red and reduce either the number of EOS in BALF or the level of sICAM-1 in plasma. **CONCLUSION** These results indicate that Zhikepingchuan Decoction For Children has some pharmacological effects of antiasthma, antitussive and expectorant. The mechanism of these effects might be associated with reducing the number of EOS in airway and/or declining plasma sICAM-1 level.

KEY WORDS: Asthma; sICAM-1; mechanism

麻杏石甘汤出自东汉张仲景《伤寒论》第 63 条和第 162 条, 有宣肺、平喘、清热之功, 是中医历代医家治疗哮喘的常用有效方剂。小儿止咳平喘露方是在“麻杏石甘汤”基础上, 针对小儿的生理病理特点优化组合创制的经验方, 由炙麻黄、石膏、杏仁、制半夏、葶苈子、苏子、甘草等药组成, 并已制成成药应用于临床。 α -细辛脑为中药石菖蒲的主要有效成分, 现已人工合成细辛脑注射液, 具有止咳、祛痰、平喘、解痉的作用^[1], 临床已经应用于哮喘、慢性阻塞性肺部疾病等的

治疗, 取得较好的疗效^[2-3], 但其制剂为注射液, 使用有诸多不便, 且据文献报道 α -细辛脑有一定程度的基因和细胞毒性^[4-8]。故而开发安全、有效且使用方便的口服中药平喘制剂具有重要的临床意义。

本实验拟以 α -细辛脑为阳性对照, 通过平喘、镇咳、祛痰实验验证小儿止咳平喘露的疗效, 并从嗜酸性粒细胞炎症与黏附分子角度探讨其平喘作用机制, 为从中药经方中研制安全有效的平喘药物提供新的实验依据。

作者简介: 桑果, 女, 硕士, 副主任中医师 Tel: (0571) 89972000

E-mail: sanggao@126.com

1 方法

1.1 组胺诱发豚鼠哮喘试验

参照文献^[9]。取健康豚鼠 40 只预选,将每只豚鼠置于 4 L 密闭的玻璃钟罩内,用超声雾化器以 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的容量向密闭钟罩内喷入 0.4% 的组胺雾化气体,喷雾 20 s,进行预选。喷雾停止后,观察 6 min 内豚鼠引喘的潜伏期。潜伏期超过 120 s 的不敏感豚鼠不予选用。第 2 天,将预选合格的豚鼠 30 只随机分为 3 组,即正常对照组,细辛脑组,小儿止咳平喘露组,每组 10 只。细辛脑组 $1.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射给药,其余各组均 1 mL/只 (生理盐水或小儿止咳平喘露)灌胃给药,每日 1 次,共 2 次。次日给药后 1 h,重复上述引喘方法,记录 6 min 内豚鼠引喘的潜伏期。

1.2 枸橼酸诱发豚鼠咳嗽试验

参照文献^[9]。预选方法同哮喘试验(以 17.5% 枸橼酸溶液的雾化气体替换组胺雾化气体,喷雾 10 s,喷雾后 2 min 内不咳者不用)。第 2 天,将预选合格的豚鼠 30 只随机分为 3 组,每组 10 只,给药方式及剂量同哮喘试验,共 1 次。给药后 1 h,重复上述引咳方法,观察和记录豚鼠咳嗽的潜伏期。

1.3 小鼠气道酚红排泄试验

参照文献^[9]。取 ICR 健康小鼠 30 只,随机分为 3 组,分组方式同哮喘试验,每组 10 只。细辛脑组 $3.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射给药,其余各组均 0.4 mL/只 灌胃给药,每日 1 次,共 5 次。末次给药 30 min 后,腹腔注射 0.25% 苯酚红溶液 0.7 mL/只 ,注射后 30 min,将实验小鼠脱颈处死,分离气管,于喉头下将 7 号针头插入气管内,用 1 mL 注射器吸取 5% 碳酸氢钠溶液 0.5 mL ,通过针头来回灌洗呼吸道 3 次,将灌洗液注入一比色管中,共灌洗 3 次。将 3 次的灌洗液合并置比色管中,与苯酚红标准管在 721 型分光光度计的波长 546 nm 处进行比色,测出吸光度,计算酚红浓度。

1.4 豚鼠哮喘模型的建立及肺泡灌洗液嗜酸性粒细胞计数和血浆 sICAM-1 含量测定

取健康雄性豚鼠 40 只,随机分为 4 组,即正常对照组,哮喘模型组,细辛脑组,小儿止咳平喘露组,每组 10 只。参照 Huston 等的方法^[10]建立豚鼠哮喘模型。4 组动物在激发后 24 h 用戊巴比妥钠麻醉,气管切开插入套管支气管肺泡灌洗, 1.5 mL/次 ,共 3 次,回收支气管肺泡灌洗液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。回收的 BALF 在光镜下用血细胞计数板进行白细胞总数计数,细胞离心涂片, Wright + Giemsa 染色,高倍镜下计数 500 个细胞,按形态学特征计数嗜酸性粒细胞。于最后一次抗原激发后 24 h,处死豚鼠,收集外周血采用双抗体夹心 ELISA 法检测 sICAM-1 (具体步骤按试剂盒说明书进行)。

1.5 统计方法

实验全部数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,用 SPSS 11.5 统计软件进行处理。正态分布数据用 One-way ANOVA 检验,予以方差齐性检验,方差齐的数据组间比较用 LSD 联合 Duncan 法,方差不齐时数据组间比较用 Tamhane's T_2 法。非正态分布数据先用 Kruskal-Wallis 法进行多组秩和检验,组

间多重比较采用 Mann-Whitney 检验。以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 对组胺诱发的豚鼠哮喘的抑制作用

小儿止咳平喘露组豚鼠引喘潜伏期为 $(80.40 \pm 17.53) \text{ s}$ ($n=10$),与正常对照组 [$(53.20 \pm 9.35) \text{ s}$, $n=10$] 及细辛脑组 [$(53.00 \pm 8.01) \text{ s}$, $n=10$] 相比明显延长 ($P < 0.01$),说明小儿止咳平喘露组可明显保护组胺引起的豚鼠哮喘反应。

2.2 对枸橼酸引起的豚鼠咳嗽的影响

小儿止咳平喘露组豚鼠咳嗽潜伏期为 $(45.60 \pm 9.41) \text{ s}$ ($n=10$),细辛脑组豚鼠咳嗽潜伏期为 $(40.40 \pm 6.75) \text{ s}$ ($n=10$),与正常对照组 [$(17.90 \pm 6.17) \text{ s}$, $n=10$] 相比,小儿止咳平喘露组和细辛脑组豚鼠咳嗽潜伏期明显延长 ($P < 0.01$)。说明小儿止咳平喘露组以及细辛脑组均可明显延长枸橼酸引起的豚鼠咳嗽潜伏期。

2.3 对小鼠气道酚红排泄的影响

小儿止咳平喘露组小鼠气道酚红排泄量为 $(152.88 \pm 56.98) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=10$),细辛脑组小鼠气道的酚红排泄量为 $(199.25 \pm 60.17) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=10$),与正常对照组 [$(72.13 \pm 27.19) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=10$] 相比明显增加 ($P < 0.01$)。说明小儿止咳平喘露组以及细辛脑组均可明显促进小鼠气道的酚红排泄。

2.4 小儿止咳平喘露对豚鼠肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞的影响

哮喘模型组豚鼠肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞计数为 $(2.90 \pm 0.88) \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=10$),较正常对照组 $(1.10 \pm 0.74) \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=10$) 显著增加,两者有显著性差异 ($P < 0.01$)。小儿止咳平喘露组豚鼠肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞计数为 $(1.00 \pm 0.82) \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=10$),细辛脑组为 $(1.50 \pm 0.53) \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=10$),均较哮喘模型组明显减少 ($P < 0.01$)。说明小儿止咳平喘露组以及细辛脑组均可明显降低豚鼠肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞计数。

2.5 小儿止咳平喘露对豚鼠血清 sICAM-1 含量的影响

正常对照组豚鼠血浆 sICAM-1 含量很低 [$(23.40 \pm 5.56) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=10$],哮喘模型组豚鼠血浆 sICAM-1 含量为 $(159.90 \pm 40.07) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=10$),较正常对照组显著增加,两者有显著性差异 ($P < 0.01$)。小儿止咳平喘露组 [$(61.80 \pm 7.76) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=10$] 和细辛脑组 [$(76.30 \pm 10.76) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=10$] 豚鼠血浆 sICAM-1 水平较哮喘模型组显著降低 ($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究证明了小儿止咳平喘露对组胺引起的豚鼠哮喘具有保护作用,能明显延长哮喘潜伏期,抑制枸橼酸引起的豚鼠咳嗽反应并促进小鼠气道酚红排泄。其平喘、镇咳、祛痰作用与文献报道一致^[11]。支气管哮喘临床主要表现为慢性反复发作性的咳、痰、喘,小儿止咳平喘露集良好的平喘、镇咳、祛痰作用于一体,从药理学研究再一次佐证了其治疗支气管哮喘的作用。

近年来认为哮喘的本质是气道炎症,有多种炎性细胞、细胞因子和黏附分子等在哮喘气道炎症的形成与发展中发挥了重要作用^[12]。气道炎症的发现与深入研究已成为哮喘发病机制研究领域的重大进展。

目前普遍认为,在引起气道炎症的多种炎性细胞中,嗜酸性粒细胞(EOS)起着尤为关键的作用,其他大多数炎性细胞最终是通过EOS而产生效应,EOS是哮喘气道炎症的主要效应细胞^[13-14]。它通过释放毒性蛋白引起气道上皮损伤、剥脱和气道高反应性,并与气道上皮损害、肺组织水肿及病情严重程度呈平行关系^[15]。EOS还能合成和分泌多种细胞因子增强细胞活力,延长其在肺内存活时间,这可能是慢性哮喘迁延不愈的一个重要原因^[15]。本实验通过对肺泡灌洗液中细胞形态的观察发现哮喘模型组中EOS计数明显高于正常对照组。小儿止咳平喘露及细辛脑干预后肺泡灌洗液中的EOS计数较哮喘模型组明显减少,提示经小儿止咳平喘露或细辛脑处理后哮喘豚鼠的气道EOS显著减少,从而推测小儿止咳平喘露可能通过减少EOS在气道的浸润而起到平喘作用。

ICAM-1参与EOS在变态反应炎症部位的黏附、移行和募集,而且还决定了气道高反应性的发展。sICAM-1构成了细胞外ICAM-1的主要生理功能部分。血液中sICAM-1主要来源于细胞膜黏附分子的脱落及细胞受损后细胞黏附分子的释放,因此,可溶性黏附分子的增多可作为白细胞、内皮细胞激活或损伤的标志物,检测其血液中的水平可反映组织、细胞中ICAM-1的表达状态^[16-17]。哮喘时存在sICAM-1的异常表达。在临床上,Bloemen PG等发现哮喘患者支气管黏膜和痰液中ICAM-1的表达明显增高并与气道反应性密切相关^[18]。研究发现,正常豚鼠血浆sICAM-1含量很低,哮喘豚鼠血浆sICAM-1含量较正常对照组有显著增加,两者有显著性差异。小儿止咳平喘露以及细辛脑能不同程度地降低血浆sICAM-1水平,提示小儿止咳平喘露可能通过抑制ICAM-1表达而发挥平喘作用。

综上所述,小儿止咳平喘露具有平喘、镇咳、祛痰的作用,其平喘作用机制可能与减轻哮喘豚鼠气道的嗜酸性粒细胞浸润和抑制黏附分子的表达有关。

REFERENCES

- [1] WU C. Progress in study of α -asarone [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 1997, 32(3): 129-132.
- [2] YANG Y. Treatment of 148 patients of obstructive lung diseases with α -asarone[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 1986, 5(4): 210.
- [3] LUO J. Analysis of the treatment of obstructive lung diseases with α -asarone[J]. J Guangxi Med Univ(广西医科大学学报), 1987, 4(11): 70.
- [4] YANG Y N, YIN C S, XIAO H, *et al.* Studies on the teratogenicity of α -asarone, the essential component of oleum calamus[J]. Acta Univ Med Nanjing(南京医科大学学报), 1986, 6(1): 11.
- [5] YANG Y N, LI Q T, TANG L F, *et al.* Studies on the mutagenicity of α -asarone, the essential component of oleum calamus[J]. Acta Univ Med Nanjing(南京医科大学学报), 1986, 6(4): 248.
- [6] SALAZAR M, SALAZAR S, ULLOA V, *et al.* Teratogenic action of alpha-asarone in the mouse[J]. Toxicol Clin Exp, 1992, 12(3): 149.
- [7] WISEMAN R W, MILLER E C, MILLER J A, *et al.* Structure-activity studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives related to estragole and safrole on administration to preweanling male C57BL/6J XC3H/HeJ F₁ mice[J]. Cancer Res, 1987, 47(9): 2275.
- [8] MORALES-RAMIREZ P, MUDRIGAL-BUJADAR E, MERCADER-MARTINEZ J, *et al.* Sister-chromatid exchange induction produced by in vivo and in vitro exposure to alpha-asarone[J]. Mutat Res, 1992, 279(4): 269.
- [9] LI Y K. Experimental Methodology of TCM Pharmacology(中药药理学实验方法学)[M]. Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991.
- [10] HUTSON P A, CHURCH M K, CLAY T P, *et al.* Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. I. The association of disordered airway physiology to leukocyte infiltration[J]. Am Rev Respir Dis, 1988, 137(3): 548-557.
- [11] LI M H. Therapeutic effect of Chinese medicinal herbs combined with chemotherapy on advanced non-small cell lung cancer[J]. Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合杂志), 1997, 17(4): 199-200.
- [12] GRZELEWSKA-RZYMOWSKA I, PIETRZKOWICZ M. Role of intra cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and its soluble form (sICAM) in chronic airway inflammation[J]. Pol Merkuriusz Lek, 2004, 16(92): 179-182.
- [13] WANG C Z. Eosinophil and asthma[J]. Chin J Tuberc Respir Dis (中华结核和呼吸系统病杂志), 1998, 21(9): 562-564.
- [14] SIMON H V, YOUSEFI S, SCHRANZ C, *et al.* Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia[J]. Immunol, 1997, 158: 3920-3908.
- [15] LAI K F, WANG C Z, GUO X J, *et al.* Dynamic changes in eosinophil infiltration and apoptosis in asthmatic guinea pigs[J]. Acta Acad Med Mil Tert(第三军医大学学报), 1998, 20(3): 198-201.
- [16] POPPER MM, PALLERS, WURVINGER O, *et al.* Expression of adhesion molecules in allergic lung diseases[J]. Virchows Arch, 2002, 440(2): 172-180.
- [17] GRZELEWSKA-RZYMOWSKA I, PIETRZKOWICZ M. Role of intra cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and its soluble form (sICAM) in chronic airway inflammation[J]. Pol Merkuriusz Lek, 2004, 16(92): 179-182.
- [18] BLOEMEN PG, HENRICKS PA, NI JKAMP FP. Cell adhesion molecules and asthma[J]. Clin Exp Allergy, 1997, 27(2): 128-141.

收稿日期: 2006-04-14