

咳尔康口服液对哮喘模型大鼠NO、iNOS及支气管平滑肌炎症反应的影响^Δ

李厚忠^{1*}, 张羽飞², 齐敏³, 李孟全^{2#} (1.牡丹江医学院药学院, 黑龙江牡丹江 157011; 2.牡丹江医学院医药研究中心, 黑龙江牡丹江 157011; 3.牡丹江医学院附属第二医院, 黑龙江牡丹江 157011)

中图分类号 R285;R99 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3660-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.04

摘要 目的:研究咳尔康口服液对哮喘模型大鼠一氧化氮(NO)含量和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性与支气管平滑肌炎症细胞浸润程度的影响。方法:通过卵蛋白法复制大鼠哮喘模型。40只大鼠均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、醋酸泼尼松(10 mg/kg)组、咳尔康(8.3 ml/kg)组。采用硝酸还原酶法测定大鼠血清与肺组织中NO含量,酶联免疫法测定iNOS活力,HE染色切片半定量评定支气管周围炎症细胞浸润程度。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠血清、肺组织中NO含量显著增加,iNOS活性显著增强,大鼠支气管平滑肌炎症细胞浸润程度加重($P<0.05$);与模型组比较,咳尔康组大鼠血清、肺组织中NO含量显著降低,iNOS活性显著减弱($P<0.05$),大鼠支气管平滑肌炎症细胞浸润程度明显减轻($P<0.01$)。结论:咳尔康口服液可降低哮喘模型大鼠NO含量和iNOS活性,同时可以减轻支气管平滑肌的炎症反应,可能对哮喘有一定的防治作用。

关键词 咳尔康口服液;哮喘;一氧化氮;诱导型一氧化氮合酶

Effects of Keerkang Oral Liquid on NO, iNOS and Bronchial Smooth Muscle Inflammation in Asthmatic Model Rats

LI Hou-zhong¹, ZHANG Yu-fei², QI Min³, LI Meng-quan² (1.School of Pharmacy, Mudanjiang Medical College, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China; 2.Medical Research Center, Mudanjiang Medical College, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China; 3.The Second Affiliated Hospital of Mudanjiang Medical College, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of Keerkang oral liquid on the activities of NO and iNOS and the inflammatory cell infiltration of bronchial smooth muscle in asthmatic model rats. **METHODS:** The asthmatic models were established by injecting ovalbumin (OVA). 40 rats were divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), prednisone acetate group (10 mg/kg) and Keerkang group (8.3 ml/kg). The level of NO and the activity of iNOS were detected in rat serum by nitrate reductase method and enzyme linked immune method respectively, and the inflammatory cell infiltration of bronchial smooth muscle was evaluated by HE staining. **RESULTS:** Compared with normal control group, the levels of NO and the activity of iNOS in serum and lung tissue were increased significantly. The inflammatory cell infiltration of bronchial smooth muscle in rats was aggravated ($P<0.05$); Compared with model group, the levels of NO and the activity of iNOS in serum and lung tissue were decreased significantly ($P<0.05$). The inflammatory cell infiltration of bronchial smooth muscle in rats was relieved significantly ($P<0.01$). **CONCLUSIONS:** Keerkang oral liquid could decrease the level of NO and the activity of iNOS and relieve inflammation response of bronchial smooth muscle in asthmatic model rats. So it might have certain preventive and therapeutic effect on asthma.

KEY WORDS Keerkang oral liquid; Asthma; NO; iNOS

咳尔康口服液是在经典名方六君子汤基础之上经过临床多年实践反复潜心研究衍化而成的中药复方制剂,主要成分包括茯苓、陈皮、甘草、紫菀、白术等,具有理气健脾燥湿、化痰止咳之功效。本课题组前期研究结果表明,该产品具有止咳、祛痰、平喘作用^[1];长期毒性实验也未见明显毒性反应^[2]。

支气管哮喘(Bronchial asthma,简称哮喘),是严重威胁公众健康的一种慢性疾病,原因尚不清楚,已经成为全球关注的

公共卫生问题,因此从哮喘发病机制上寻找特异性防治和根治哮喘的方法一直是人们努力的方向。内源性一氧化氮(NO)具有广泛的生物学作用,既是细胞信使分子,又是毒性分子。研究表明,哮喘发作时,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)被激活,介导产生了大量的NO,使支气管毛细血管扩张并增加其渗出,导致气道水肿,加重气道阻塞和哮喘发作。

本研究通过复制大鼠哮喘模型,观察咳尔康口服液对哮喘模型大鼠血清中NO含量和iNOS活性的影响,同时病理学观察哮喘模型大鼠支气管平滑肌的炎症细胞浸润程度,进一步探讨咳尔康口服液在哮喘炎症形成中的干预作用,以为临床应用提供参考。

1 材料

^Δ 基金项目:黑龙江省卫生厅科研课题(No.2010-233);黑龙江省中医药科研项目(No.ZHY10-W73)

* 讲师,硕士。研究方向:药理学、毒理学。电话:0453-6984647。E-mail:376270417@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:心血管药理学。E-mail:lmq6204@126.com

1.1 仪器

HH-W210420L型恒温水箱(天津泰斯特仪器有限公司);3112型微量加样器(德国Eppendorf公司);LDZ5-2型自动平衡离心机(北京京立离心机有限公司);UW820S型电子天平(日本岛津公司);402A型超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司);BH-2型光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

咳尔康口服液(黑龙江仁和堂药业有限公司代加工,批号:120216);醋酸泼尼松(浙江仙琚制药有限公司,批号:11125);NO、iNOS测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 动物

清洁级SD大鼠40只,♀♂兼半,体质量(200±10)g,由哈尔滨医科大学动物实验中心提供(动物生产合格证号:动字第P00102008)。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

大鼠ip 10%卵蛋白和10%氢氧化铝混合液1 ml,致敏后第15天用1%卵蛋白喷雾激发大鼠哮喘发作,隔日1次,每次20 min,共激发4周。以大鼠出现呼吸加快、口唇发绀、腹肌痉挛、点头呼吸与站立不稳表明哮喘模型复制成功。实验分为4组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、醋酸泼尼松(10 mg/kg)组、咳尔康(8.3 ml/kg)组,ig给药,每天1次,连续4周。

2.2 大鼠血浆与肺组织中NO含量、iNOS活性的测定

末次给药2 h后,大鼠颈静脉采血2 ml,以离心半径为8 cm、3 000 r/min离心10 min后取上清液,-20℃保存待检。取肺组织匀浆,-20℃保存待检。采用硝酸还原酶法测定NO含量,采用酶联免疫法测定iNOS活性。

2.3 大鼠支气管平滑肌病理学观察

将大鼠左支气管平滑肌组织以10%中性福尔马林固定后,常规脱水,石蜡包埋,切片厚度为5 μm,HE染色,光镜下观察大鼠支气管病理学变化。评判标准:无炎症细胞(0分);少许炎症细胞(1分);较多分布不均的炎症细胞(2分);大量炎症细胞,分布较均匀,少见聚集成团(3分);大量炎症细胞聚集成团(4分)。

2.4 统计学方法

采用SPSS 11.5统计软件分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据间进行*t*检验,等级资料差异性分析采用Ridit法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 咳尔康口服液对模型大鼠血清和肺组织中iNOS活性的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清、肺组织中iNOS活性显著增强($P < 0.05$);与模型组比较,咳尔康组大鼠血清、肺组织中iNOS活性显著减弱($P < 0.05$)。咳尔康口服液对模型大鼠血清和肺组织中iNOS活性的影响见表1。

3.2 咳尔康口服液对模型大鼠血清和肺组织中NO含量的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清、肺组织中NO含量显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,咳尔康组大鼠血清、肺组织中NO含量显著减少($P < 0.05$)。咳尔康口服液对模型大鼠血清和肺组织中NO含量的影响见表2。

表1 咳尔康对模型大鼠血清和肺组织中iNOS活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Keerkang oral liquid on the activity of iNOS in lung tissues and serum in model rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	iNOS, U/ml	
	血清	肺组织
正常对照组	2.47 ± 0.83	0.584 ± 0.11
模型组	5.76 ± 0.13*	0.689 ± 0.25*
醋酸泼尼松组	4.03 ± 0.58**	0.521 ± 0.09**
咳尔康组	3.34 ± 0.66*	0.475 ± 0.076*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

表2 咳尔康对模型大鼠血清和肺组织中NO含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Keerkang oral liquid on the content of NO in lung tissues and serum in model rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	NO, μmol/L	
	血清	肺组织
正常对照组	102.74 ± 16.16	8.11 ± 1.12
模型组	118.87 ± 13.15*	11.63 ± 2.65*
醋酸泼尼松组	76.43 ± 15.82**	7.83 ± 1.32**
咳尔康组	87.57 ± 7.66*	6.75 ± 2.76*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.3 咳尔康口服液对模型大鼠支气管平滑肌病理学的影响

正常对照组大鼠支气管内及其周围组织无明显炎症细胞浸润,支气管壁完整,平滑肌厚度正常,细胞排列规整,支气管黏膜规整,管腔内无脱落上皮细胞;模型组大鼠支气管壁及其周围肺组织中有大量嗜酸性粒细胞及淋巴细胞为主的炎症细胞浸润,基层细胞增生,平滑肌增厚,排列紊乱,支气管黏膜水肿、增厚,上皮脱落,管腔内分泌物明显增多,这一改变也说明哮喘模型复制成功。醋酸泼尼松组大鼠支气管周围嗜酸性粒细胞及其他炎症细胞浸润略微减少,气管壁和平滑肌厚度减少,支气管腔内有少量脱落细胞和黏液;咳尔康组大鼠支气管周围嗜酸性粒细胞及其他炎症细胞浸润明显减少,几乎消失,管壁和平滑肌厚度接近正常对照组,支气管黏膜规整,管腔内偶见脱落上皮细胞及黏液。经Ridit分析方法,与正常对照组比较,模型组大鼠支气管炎症细胞浸润程度显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,咳尔康组大鼠支气管炎症细胞浸润程度显著降低($P < 0.01$)。各组大鼠支气管平滑肌病理学观察结果见图1;各组大鼠支气管周围炎症细胞浸润程度见表3。

4 讨论

哮喘是一种气道慢性炎症,以气道高反应性和可逆性气道阻塞为特征,在哮喘的发病过程中有多种炎症介质的参与。近年来的研究表明,NO是一种具有自由基质质的生物信息分子和效应分子,它可参与体内多种生理和病理反应过程^[9]。Al Ali MK等^[14-5]认为,NO可能直接参与了哮喘炎症过程的调控,哮喘患者呼出气体中NO含量较正常人高2~3倍,且炎症越明显NO呼出浓度就越高,因此NO含量的高低可帮助判断气道炎症程度。本课题组前期研究结果表明,咳尔康口服液确有良好的早期和长效抗炎作用^[6-7]。病理学结果表明,与正常对照

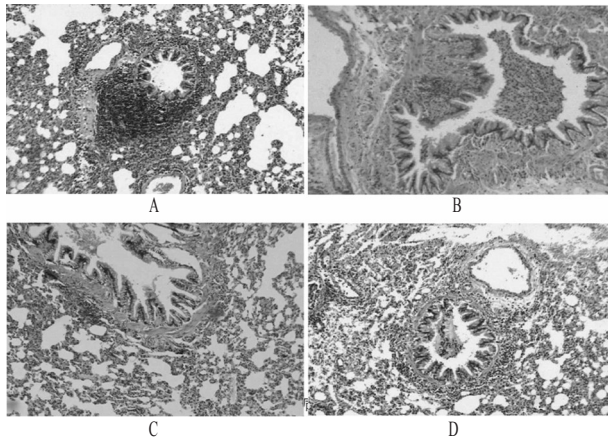


图1 各组大鼠支气管平滑肌病理学观察结果(HE染色, 200×)

A.正常对照组;B.模型组;C.泼尼松组;D.咳尔康组

Fig 1 Pathological observation of bronchial smooth muscle in different groups(HE staining, 200×)

A. normal control group; B. model group; C. prednisone acetate group; D. Keerkang group

表3 各组大鼠支气管周围炎症细胞浸润程度(n=10)

Tab 3 The inflammatory cell infiltration of bronchial smooth muscle(n=10)

组别	0分	1分	2分	3分	4分
正常对照组	10	0	0	0	0
模型组*	0	1	2	4	3
醋酸泼尼松组*	2	6	1	1	0
咳尔康组*	2	3	4	1	0

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.01$

vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: * $P < 0.01$

组比较,模型组大鼠肺组织病理切片有明显的炎症表现;与模型组比较,咳尔康组大鼠肺组织的炎症反应有所改善。本研究发现,哮喘模型组大鼠肺组织中NO含量显著升高,提示过敏性哮喘呼吸道局部组织中NO释放增加,咳尔康口服液可明显降低模型大鼠血清与肺组织中NO含量。研究结果表明,哮喘模型大鼠的肺部炎症可能与NO的过度产生有关。

对哮喘中一氧化氮合酶(NOS)的研究主要集中在iNOS上^[8],主要因为iNOS是体内生成NO的主要催化酶之一,在正常情况下并不表达,但受刺激后会被诱导产生,其催化生成的NO量很大,一旦iNOS诱导生成,将持续产生NO直至底物耗尽为止。总之,NO及其合成酶在哮喘发病机制中起重要作用,内源性NO增高可能加重哮喘气道炎症,在一定程度上可

以反映哮喘气道炎症程度。本研究中,咳尔康口服液能够明显降低模型大鼠血清和肺组织中的iNOS活性($P < 0.05$),从而表现出抗炎活性。因此,选择性抑制iNOS活性是治疗哮喘的一个方向。提示iNOS/NO体系参与了哮喘病理过程,且iNOS与NO两者之间可能存在相互促进的作用,导致气道炎症及哮喘程度加重。

本研究采用醋酸泼尼松作为与咳尔康口服液的疗效对比药,探讨二者对变应性哮喘大鼠防治作用的异同。研究结果发现,咳尔康组和醋酸泼尼松组肺部炎症较轻,肺组织iNOS活性与NO含量均较模型组显著降低。结果提示,与醋酸泼尼松一样,咳尔康口服液对哮喘有明显的防治作用。但是,由于本研究观测指标较少,观察时间较短,其作用机制和过程还需进一步研究。

综上所述,咳尔康口服液可通过降低iNOS的活性,从而降低哮喘模型大鼠血清和肺组织中NO的含量,进而缓解大鼠哮喘的发作,减轻大鼠支气管平滑肌的炎症反应,这可能是咳尔康口服液治疗哮喘的一个重要机制,可为哮喘的治疗开辟一条新的途径。

参考文献

- [1] 孙展鹏,李孟全,王元奕,等.咳尔康口服液止咳、祛痰、平喘的实验研究[J].医药导报,2009,28(3):29.
- [2] 李厚忠,孙展鹏,王元奕,等.咳尔康口服液长期毒性实验[J].毒理学杂志,2009,23(6):508.
- [3] Kharitonov SA, Barnes PJ. Nitric oxide, nitrotyrosine, and nitric oxide modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2003,3(2):121.
- [4] Al Ali MK, Eames C, Howarth PH. Exhaled nitric oxide: relationship to clinicophysiological markers of asthma severity[J]. *Respir Med*, 1998,92(7):908.
- [5] Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, et al. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium *in vivo*[J]. *PNAS*, 1995,92(17):7809.
- [6] 郭强,李孟全,董凯,等.咳尔康口服液对棉球所致肉芽肿的影响[J].牡丹江医学院学报,2009,30(6):5.
- [7] 郭强,李孟全,张小轩,等.咳尔康口服液对蛋清所致大鼠足趾肿胀的影响[J].牡丹江医学院学报,2009,30(5):15.
- [8] Ricciardolo FL, Nijkamp FP, Folkerts G. Nitric oxide synthase (NOS) as therapeutic target for asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Curr Drug Targets*, 2006,7(6):721.

(收稿日期:2012-12-03 修回日期:2013-02-04)

国家卫生和计划生育委员会主任李斌会见荷兰卫生、福利和体育部部长席佩斯

本刊讯 2013年9月9日,国家卫生和计划生育委员会主任李斌在京会见了荷兰卫生、福利和体育部部长席佩斯女士一行,就中荷卫生合作交换意见,并签署中荷卫生合作协议。

李斌简要回顾了中荷卫生合作发展历程,介绍了中国医药卫生体制改革、疾病预防控制和抗生素耐药等方面的工作情况。席佩斯对中国医药卫生体制改革和新发传染病防控方面取得的成果表示赞赏,并分享了荷兰在卫生体制改革、医疗保障体系建设和抗生素耐药防控方面的政策措施。双方一致同意继续加强在卫生信息化、慢病防控和抗生素合理使用等

方面的合作。

会后,双方签署了《中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会与荷兰王国卫生、福利和体育部在医疗保健和公共卫生领域的合作协议》。

席佩斯是应国家卫生和计划生育委员会邀请来华访问的。在华期间,席佩斯出席了中荷卫生研讨会并致辞,访问了国家食品药品监督管理局和北京协和医院,并赴上海和四川考察医疗机构。