

咳喘宁对 RSV 诱发哮喘大鼠 ICAM-1 表达的影响

唐力琼¹, 李英^{2*}, 罗银河^{2*}, 王孟清², 舒兰², 谭维¹, 龚细妹¹, 陶洪², 彭昕欣²

(1.湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2.湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007)

[摘要] 目的 研究咳喘宁对 RSV 诱发哮喘大鼠气道重塑形态学及 ICAM-1 表达的影响, 阐明其防治哮喘的作用机制。**方法** 将 60 只幼年 SD 雄性大鼠随机分为 6 组, 即正常组, 模型组, 泼尼松与沙丁胺醇治疗组(简称泼+沙治疗组), 咳喘宁大、中、小剂量组, 每组 10 只。用卵清蛋白复制大鼠哮喘模型, 并予呼吸道合胞病毒(RSV)激发哮喘。大鼠死后肺组织行 HE 染色观察炎症反应; 图像分析软件测定支气管壁厚度及气道壁面积; 免疫组化 pv-9000 二步法检测 ICAM-1 表达水平。**结果** 与模型组相比, 各治疗组炎症反应较轻。各治疗组支气管壁厚度及气道壁面积改变较小, 与模型组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 咳喘宁中剂量组较泼+沙治疗组作用略差, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 咳喘宁大、小剂量组与泼+沙治疗组相比, 其作用明显较差, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。各治疗组与模型组比较, 其肺组织中 ICAM-1 表达均降低, 有显著性差异 ($P < 0.01$); 泼+沙治疗组 ICAM-1 表达稍低于咳喘宁中剂量组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 咳喘宁可有效抑制气道重塑, 其机制可能与降低肺组织中 ICAM-1 表达有关。

[关键词] 哮喘; 咳喘宁; 气道重塑; RSV; ICAM-1; 五虎汤; 大青叶; 黄芪; 桃仁

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.10.007

Effect of KeChuanNing on Expression of ICAM-1 in Asthma Rats Induced by RSV

TANG Liqiong¹, LI Ying^{2*}, LUO Yinhe^{2*}, WANG Mengqing², SHU Lan², TAN Wei¹, GONG Ximei¹,
TAO Hong², PENG Xinxin²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410218, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of KeChuanNing on airway remodeling morphology and the expression of ICAM-1 in asthma rats induced by RSV, and clarify the mechanism of prevention and treatment. **Methods** The 60 SD male rats were randomly divided into 6 groups: normal group, model group, prednisone and salbutamol treatment group (PS treatment group) and KeChuanNing high, medium and low dose groups, with 10 rats in each group. The asthma rats models were copied by ovalbumin and the asthma was stimulated by respiratory syncytial virus. The lung tissue pathological changes were observed by HE staining. The bronchial wall thickness and airway wall area were determined by image analysis software. The expression of ICAM-1 was detected by using immunohistochemistry pv-9000 method. **Results** Compared with the model group, the inflammatory reaction in treatment groups was less; the bronchial wall thickness and airway wall area were smaller, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The function of KeChuanNing medium dose group was slightly weak than the PS treatment group, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with PS treatment group, the effect of the KeChuanNing high, low dose group was poor and had statistical significance ($P < 0.05$). Compared with the model group, the lung tissue ICAM-1 expression in the treatment groups was decreased, the difference was significant ($P < 0.01$). The expression of ICAM-1 in PS treatment group was slightly lower than KeChuanNing medium dose group, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** KeChuanNing could effectively inhibit airway remodeling, the mechanism may be related with inhibiting the expression of ICAM-1 in lung tissue.

[Keywords] asthma; KechuanNing; airway remodeling; respiratory syncytial virus; intercellular adhesion molecule-1; Wuhu Decoction; folium isatidis; *Astragalus membranaceus*; peach seed

[收稿日期] 2016-04-03

[基金项目] 国家自然科学基金(81674025); 湖南省自然科学基金资助项目(14JJ3120)。

[作者简介] 唐力琼, 女, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 小儿呼吸系统疾病。

[通讯作者] * 李英, 女, 主治医师, E-mail: 120812828@qq.com; 罗银河, 女, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: 1286313109@qq.com。

支气管哮喘(简称哮喘)是小儿常见的呼吸道疾病,在全球范围内其发病率与死亡率呈逐年上升趋势。其中85%的儿童哮喘急性发作与病毒感染有关^[1],且呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染所致者可高达78.49%^[2]。研究发现,细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)是多种病毒的受体^[3], ICAM-1上调能增加炎症的易感性,促进炎症细胞如嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞通过血液进入炎症部位,通过促进炎症因子的黏附和迁移作用介导过敏部位的炎症反应^[4],从而促进气道炎症与气道高反应性。气道炎症和气道重塑是哮喘的两个主要病理学特征。为此,本实验研究了哮喘宁对哮喘大鼠气道重塑形态学及ICAM-1表达的影响,观察哮喘宁对哮喘气道重塑的直观效果,阐明其防治哮喘的可能机制。

1 材料

1.1 动物

幼年SD雄性大鼠,体质量120~150 g,由湖南中医药大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:4300470011386。

1.2 主要试剂与药物

哮喘宁口服液(湖南中医药大学第一附属医院制剂室提供,生药含量0.5 g/mL);卵清蛋白(OVA,上海丽珠东风公司(sigma分装),RSV病毒(武汉市武昌区华东试验试剂公司),ICAM-1血清试剂盒、DAB显色剂(武汉博士德生物公司)。

1.3 主要仪器

402AI超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司);NYD 1000型图文分析仪(同济医科大学千屏影像科技公司)。

2 方法

2.1 分组及造模

60只大鼠随机分为6组,即PBS对照组(又称正常组),模型组,泼尼松与沙丁胺醇治疗组(简称泼+沙治疗组),哮喘宁治疗组又分为哮喘宁大、中、小剂量组,每组10只。参照文献^[5],除正常组外,余五组大鼠分别于第1天和第8天分3处注射共1 mL含10 mg卵清白蛋白和100 mg氢氧化铝凝胶的无菌抗原液(两下肢内侧皮下各注射0.25 mL,腹腔注射0.5 mL)致敏;第9天至第21天为激发阶段,将大鼠放入容积为10 L的雾化箱内,罩的顶面及两侧面分别开一直径约2.5 cm的圆孔,以1%卵清白蛋白生理盐水溶液20 mL雾化,每次20 min,

隔天雾化1次,连续2周;如发现大鼠精神变差、饮食减少、活动减少、呼吸频率加快的现象,提示激发成功,停止激发;第21、35、49天以10%水合氯醛腹腔注射麻醉后再以滴度为 1.0×10^6 空斑形成单位的RSV 50 μ L经鼻腔滴入使大鼠感染RSV诱发哮喘,经RSV滴鼻的大鼠出现喷嚏、鼻腔有少量卡他样无色透明分泌物、弓肩耸背、点头样呼吸、腹肌抽搐,甚至站立不稳时即为哮喘急性发作,提示造模成功。正常组以PBS缓冲液代替卵清白蛋白进行腹腔注射、雾化及RSV滴鼻。

2.2 治疗方法

各治疗组在造模完成当天(即第49天)开始灌胃给药,每日1次,连续7 d,直至处死。用药剂量按体表面积-剂量换算法将人临床用药剂量折算为大鼠用药剂量,泼尼松、沙丁胺醇治疗组予混悬液醋酸泼尼7.0 mg/(kg·d)、沙丁胺醇片剂1.1 mg/(kg·d),哮喘宁大剂量组5.0 g/(kg·d),哮喘宁中剂量组2.5 g/(kg·d),小剂量组1.25 g/(kg·d),正常组及模型组予蒸馏水灌胃,每日灌胃1次。各治疗组药物均以蒸馏水稀释,各组灌胃容量均为10 mL/(kg·d)。

2.3 标本制备

治疗7 d后所有大鼠予10%水合氯醛3 mL/kg腹腔内注射麻醉,麻醉完立即开腹,行腹主动脉取血后,迅速分离气管,并做气管切开插管固定,结扎右主支气管,予左支气管肺组织内灌入PBS缓冲液,反复抽吸,收集肺泡灌洗液后,取右肺。将右肺下叶予4%甲醛固定保存,脱水,透明,包埋,切片厚约4~5 μ m,每个标本制备两份切片。

2.4 观测指标

2.4.1 病理观察 取一份切片行苏木精-伊红(HE)染色,干后光学显微镜下观察各组大鼠肺组织的病理形态学变化。采用NYD 1 000型图像分析软件测定完整小气道支气管内周长(Pi)、管壁厚度(d)、外腔面积(Ao)、内腔面积(Ai)、气道壁面积(WA)。其中 $WA = Ao - Ai$ 。测量结果用内周长(Pi)进行标准化,支气管壁厚度表示为 $d/Pi(\%)$,气道壁面积表示为 $WA/Pi^2(\%)$ 。

2.4.2 ICAM-1的测定 取另一份切片用免疫组化pv-9 000 二步法检测ICAM-1含量;脱蜡、水化组织切片;3%双氧水室温孵15 min以阻断内源性过氧化物酶;PBS修复液置微波炉修复抗原及漂洗;滴加一抗兔抗大鼠ICAM-1多克隆抗体1:100稀释;加二抗Envision兔鼠通用型检测系统,稀释浓度亦为1:100。二氨基联苯胺(DAB)显色,镜下控制,苏木精复染,脱水、透明、封片。高倍镜下观察,棕黄色为阳性显色。运用图文分析仪测定ICAM-1阳性表达

所占面积百分比即平均光密度值(OD)。

2.5 统计学方法

实验数据运用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,各分组所得计量数据采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,对样本数据进行正态性及方差齐性检验,方差齐时用单因素方差分析及组间的多重比较进行统计分析;方差不齐时,用非参数秩和检验, $P<0.05$ 为有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 病理观察

模型组可见支气管壁及其周围有大量炎症细胞浸润,支气管黏膜水肿、增厚,上皮细胞坏死脱落,细胞排列紊乱,管腔变窄,管腔内分泌物增多。正常组、泼+沙治疗组及咳喘宁治疗组炎症反应较模型组明显减轻。正常组、泼+沙治疗组及咳喘宁治疗组小气道支气管壁厚度及气道壁面积较模型组相比均降低,差异有统计学意义($P<0.01$);咳喘宁中剂量组较泼+沙治疗组作用略差,但差异无统计学意义($P>0.05$);咳喘宁大、小剂量组与泼+沙治疗组相比,其作用明显较差,有统计学意义($P<0.05$)。见表 1、图 1。

3.2 肺组织中 ICAM-1 水平的比较

正常组及各治疗组与模型组比较,其肺组织中 ICAM-1 表达均降低,差异有显著统计学意义($P<0.01$);从肺组织免疫组化 DAB 染色切片中可看出 ICAM-1 主要表达于内皮细胞、上皮细胞及成纤维细胞,其中以内皮细胞表达增加最为明显。泼+沙治疗组与咳喘宁中剂量组优于咳喘宁大、小剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$);泼+沙治疗组与咳喘宁中剂量相比,ICAM-1 表达稍低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1、图 2。

表 1 各组大鼠小气道支气管壁厚度、气道壁面积及肺组织中 ICAM-1 平均光密度均值的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	厚度(d/Pi,%)	面积(WA/Pi ² ,%)	ICAM-1
正常组	10	4.77±0.82	3.83±0.89	0.14±0.05
模型组	10	11.59±1.72 [●]	9.32±1.29 [●]	0.44±0.08 [●]
泼+沙治疗组	10	6.61±0.97*	5.69±0.94*	0.21±0.06*
咳喘宁大组	9	8.16±0.86***▲	6.94±1.17**▲	0.29±0.09**▲
咳喘宁中组	9	6.98±0.81*	5.89±1.15*	0.22±0.08*
咳喘宁小组	10	8.71±0.93***▲▲	7.17±0.99***▲	0.30±0.08***▲
F 值		45.73	28.70	21.03
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常组比较,● $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.01$;与泼+沙治疗组比较,** $P<0.05$,*** $P<0.01$;与咳喘宁中剂量组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

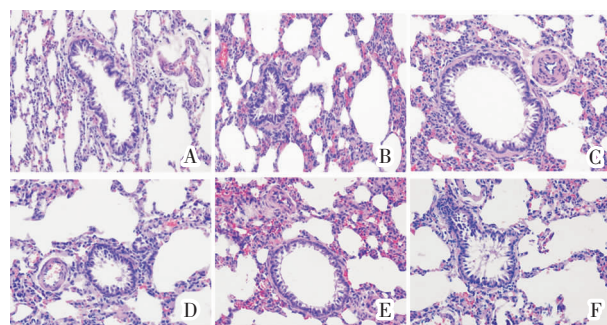


图 1 各组肺组织 HE 染色光镜图(×400)
A.正常组;B.模型组;C.泼+沙治疗组;D.咳喘宁大组;E.咳喘宁中组;F.咳喘宁小组

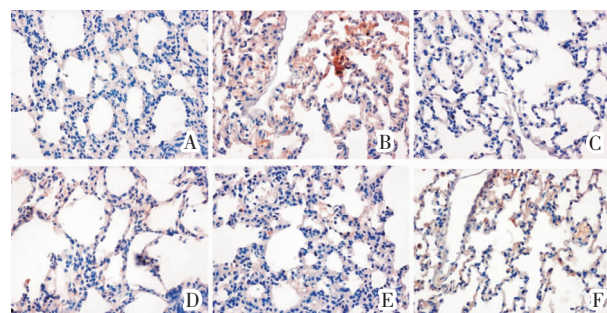


图 2 各组肺组织 ICAM-1 免疫组化 DAB 显色光镜图(×400)
A.正常组;B.模型组;C.泼+沙治疗组;D.咳喘宁大组;E.咳喘宁中组;F.咳喘宁小组

4 讨论

支气管哮喘是由多种细胞包括气道的炎性细胞和结构细胞(如嗜酸粒细胞(EOS)、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、平滑肌细胞、气道上皮细胞等)和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病。气道重塑是哮喘发病的病理性改变,是不可逆性气流阻塞、气道高反应(AHR)及肺功能持续性、进行性损伤的主要原因,并可形成顽固性哮喘。研究表明,哮喘患者气道壁面积及厚度均较正常组明显升高,且其气道壁厚度与哮喘严重程度呈正相关^[6]。ICAM-1 属于免疫球蛋白超家族成员,广泛表达于白细胞、内皮细胞、上皮细胞及成纤维细胞。静息状态下 ICAM-1 呈低水平表达或不表达,炎症发生时分泌释放的多种炎症介质、细胞因子都会不同程度地刺激上皮细胞、内皮细胞活化,使 ICAM-1 表达增加,其主要作用是维持机体器官的结构稳定和参与机体的免疫反应^[7]。ICAM-1 在肺组织有表达。在 OVA 致敏的哮喘大鼠实验中,ICAM-1 基因缺陷的大鼠与野生型大鼠相比较,气道以及肺组织的炎症明显减轻,气道高反应性显著降低^[8]。降低肺组织中 ICAM-1 表达,可抑制哮喘气道炎症细胞浸润及气道高反应性。既往的研

究认为 ICAM-1 作为“痰证”变化的指标,“血瘀证”与血液流变学密切相关。喻氏等^[9]测定大鼠哮喘模型血浆 ICAM-1、血液流变学全血黏度等西医学指标,直观地展现出来其与气道重塑指标的相关性,表明中西医对哮喘发病机制的认识是吻合的,提示“痰瘀伏肺”与哮喘气道重塑的相关性,赋予哮喘“痰瘀伏肺”宿根理论科学内涵。袁雪晶认为哮喘治疗中,及早察觉到血瘀之征,灵活运用活血化瘀药物,痰瘀并治,使痰祛瘀化,气道畅通,哮喘乃平^[10]。实验证明痰瘀同治具有减轻和控制咳嗽变异性哮喘气道重塑的作用,且对大鼠血清中 IL-1, TGF- β 1 及 NF- κ B 表达的抑制,痰瘀同治组优于模型组、辅舒酮组、健脾化痰组、行气化痰组,差异均有统计学意义($P<0.05$)^[11]。

咳喘宁是以清热化痰平喘的传统古方五虎汤为基本方,加大青叶、黄芪、桃仁组成。方中炙麻黄乃“喘家圣药”,入肺、膀胱经,可外开皮毛之郁闭,以使肺气宣畅,内降上逆之气,以复肺司肃降之常,善平咳喘;苦杏仁味苦性微温,能降肺气平喘止咳,《药性论》谓之:“主咳逆上气喘促”,且杏仁助麻黄止咳平喘,疏肺利气。二药有宣有降,可祛除外邪,畅通气道,从而降低气道反应性,共为本方君药。生石膏味辛甘性大寒,归肺、胃经,功在清泻肺热以生津,辛散解肌以透邪;大青叶味苦性寒,能清泄内热;黄芪味甘性微温,归肺、脾经,功在补气健脾、扶正祛邪,三药合用可清热健脾益气,共为本方臣药。桃仁功在活血化瘀,且可止咳平喘;细茶叶功在醒神化痰;甘草镇咳平喘,并可调和诸药,共为本方佐使。诸药合用,共奏发表清热,化痰平喘,活血化瘀等功效。前期研究表明,咳喘宁治疗病毒诱发儿童哮喘具有较好疗效,无论是总有效率还是临床控制率,均明显优于对照组^[12]。本实验结果显示:咳喘宁可有效抑制哮喘大鼠支气管内及其周围肺组织的炎症细胞浸润,减少支气管黏膜水肿及其管腔内分泌物,并可抑制哮喘大鼠的支气管壁增厚及气道壁面积增大,从而抑制气道重塑。另一方面咳喘宁可通过抑制肺组织中 ICAM-1 表达,抑制炎症因子的黏附和迁移,从而改善 RSV 诱发哮喘的气道炎症及气道重塑。无论是从支气管形态学角度还是从抑制气道重塑机制方面而言,咳喘宁中剂量组明显优于咳喘宁大、小剂量组($P<0.05$);咳喘宁大剂量组稍优于咳喘宁小剂量组,但两者差异无统计学意义。

综上所述,咳喘宁可抑制肺组织中 ICAM-1 在细胞上的表达,使之与病毒的结合减少,从而降低气道高反应性;同时由于上皮细胞和内皮细胞中 ICAM-1 表达降低,减少了炎症细胞如嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞通过血液进入炎症部位,抑制了炎症因子的黏附和迁移作用,阻碍了黏附因子直接参与变态反应的炎症反应中,从而缓解气道慢性炎症、抑制气道重塑。同时本实验为哮喘“痰瘀伏肺”宿根理论提供依据及为痰瘀并治法在病毒诱发哮喘中的作用提供可行性证据。

参考文献:

- [1] Openshaw Peter JM, Yamaguchi Yuko, Tregoning John S. Childhood infections, the developing immune system, and the origins of asthma [J]. The Journal of allergy and clinical immunology, 2004, 114(6): 1275-1277.
- [2] 郑吉善,朱春,苏苗贵,等.5岁以下儿童哮喘急性发作时呼吸道病毒病原学检测分析[J].温州医学院学报,2005,35(6):483-484.
- [3] Shcheglovitova ON, Skliankina NN, Babaiaants AA, et al. Adhesion molecules expressed in vascular endothelial cells in natural immunity against viral infections[J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2011(10): 54-60.
- [4] Kikkawa Y, Sugiyama K, Obara K, et al. Interferon- α inhibits airway eosinophilia and Hyperresponsiveness in an animal asthma model[J]. Asia Pac Allergy, 2012, 2(4): 256-263.
- [5] 刘丽娜,杨季国,程东庆.呼吸道合胞病毒诱发的哮喘小鼠模型的建立[J].浙江中医药大学学报,2007,31(2):154-155,157.
- [6] Kasallara K, Shiba K, Ozawa T, et al. Correlation between the bronchial subepithelial layer and Whole airway wall thickness inpatients with asthma[J]. Thorax, 2002, 57: 242-246.
- [7] Marguet C, Dean TP, Warner JO. Soluble intercellular adhesionmolecul-1 (sICAM-1) and Inter-feron- γ in bronchoalveolarlavage fluid from children with aIrway Diseases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(3Pt1): 1016-1022.
- [8] Tang ML, Fiscus LC. Important roles for L-selectin and ICAM-1 in the development of allergic airway inflammation in asthma[J]. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, 2001, 14(3): 203-210.
- [9] 喻强强,薛汉荣,洪广祥.支气管哮喘气道重塑与“痰瘀伏肺”的相关性研究[J].中华中医药杂志,2014,29(7):2148-2152.
- [10] 袁雪晶.从风、痰、瘀论治儿童支气管哮喘[J].中国中医急症, 2010,19(3):438-439.
- [11] 李冬梅,施雷,王文丽,等.痰瘀同治对 CVA 模型大鼠气道重塑作用的实验观察研究[J].中医药学报,2015,43(3):61-64.
- [12] 王孟清,罗银河,陈锡军,等.咳喘宁治疗病毒诱发的小儿哮喘的临床研究[J].新中医,2007,39(4):16-17.

(本文编辑 杨 瑛)