

中图分类号: R932; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)01-0050-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.01.011



强力枇杷露治疗慢性支气管炎模型小鼠作用机制研究*

严家荣, 龙淑娴, 郑玉连, 代路路, 陈桂煌, 王 弋

(广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248)

摘要:目的 探讨强力枇杷露治疗慢性支气管炎模型小鼠的作用机制。方法 将72只NIH小鼠随机分为空白对照组(A组, 12只, 等体积纯净水)和模型组(60只), 采用烟熏联合脂多糖吸入法复制慢性支气管炎模型小鼠建模45 d后, 将模型组小鼠随机分为模型对照组(B组, 等体积纯净水), 盐酸氨溴索组(C组, 10 mL/kg), 强力枇杷露低、中、高剂量组(D₁组、D₂组、D₃组, 7.5、15、30 mL/kg), 各12只, 雌雄各半。各组小鼠按30 mL/kg灌胃给药, 每日1次, 连续14 d。末次给药24 h后, 采集小鼠血清, 测定白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素8(IL-8)水平; 取右肺组织, 测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)含量; 对左肺支气管组织进行病理组织学检查。结果 与B组比较, D₁组小鼠肺组织MDA含量显著降低($P < 0.01$); D₂组小鼠血清IL-8的水平、肺组织MDA含量均显著降低($P < 0.05$); D₃组小鼠血清IL-8水平、肺组织TNF- α 和MDA含量均显著降低($P < 0.05$), SOD含量显著升高($P < 0.05$)。与C组比较, D₁组小鼠血清IL-8水平显著升高($P < 0.05$), 肺组织SOD含量显著降低($P < 0.05$)。病理组织学染色结果显示, 与B组比较, D₁组、D₂组、D₃组小鼠慢性支气管炎病变程度减轻。结论 强力枇杷露治疗慢性支气管炎模型小鼠的作用机制可能与降低IL-8, TNF- α , MDA含量和升高SOD含量相关。

关键词: 强力枇杷露; 慢性支气管炎; 作用机制; 小鼠

Mechanism of Qiangli Pipa Syrup in the Treatment of Chronic Bronchitis in Model Mice

YAN Jiarong, LONG Shuxian, ZHENG Yulian, DAI Lulu, CHEN Guihuang, WANG Yi

(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan, Guangdong, China 528248)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Qiangli Pipa Syrup in the treatment of chronic bronchitis in model mice. **Methods** A total of 72 NIH mice were randomly divided into the blank control group (group A, 12 mice, equal volume of pure water) and the model group (60 mice). The mice in the model group were smoked and inhaled lipopolysaccharide to establish the chronic bronchitis mice models. After 45 d of modeling, the mice in the model group were randomly divided into the model control group (group B, equal volume of pure water), the ambroxol hydrochloride group (group C, 10 mL/kg), and low-, medium-, and high-dose groups of Qiangli Pipa Syrup (groups D₁, D₂, D₃, 7.5, 15, 30 mL/kg), with 12 mice (half male and half female) in each group. Mice in each group were given gastric gavage at a dose of 30 mL/kg once daily for 14 d. At 24 h after the last administration, the serum of mice was collected to measure the levels of interleukin (IL)-6 and IL-8, the right lung tissue was collected to determine the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD), and the histopathology of the bronchial and left lung tissues was tested. **Results** Compared with those in group B, the MDA content in the lung tissue in group D₁ was significantly lower ($P < 0.01$); the serum IL-8 level and the MDA content in lung tissue in group D₂ were significantly lower ($P < 0.05$); the serum IL-8 level and the TNF- α and MDA contents in lung tissue in group D₃ were significantly lower ($P < 0.05$), while the SOD content in lung tissue in group D₃ was significantly higher ($P < 0.05$). Compared with those in group C, the serum IL-8 level in group D₁ was significantly higher ($P < 0.05$), while the SOD content in lung tissue in group D₁ was significantly lower ($P < 0.05$). The histopathological staining result showed a reduction in the degree of chronic bronchitis in groups D₁, D₂, and D₃ compared with that in group B. **Conclusion** The mechanism of Qiangli Pipa Syrup in the treatment of chronic bronchitis in model mice may be related to the reduction of IL-8, TNF, MDA contents, and the increase of SOD content.

Key words: Qiangli Pipa Syrup; chronic bronchitis; mechanism; mice

慢性支气管炎为临床常见病、多发病, 是由感染或非感染因素引起的气管、支气管黏膜炎性变化, 黏液分泌增多, 临床以长期咳嗽、咯痰、气短或伴有喘息为主要特征。其病理特征是气道上皮细胞的纤毛发生粘连、倒伏、脱落, 黏液分泌增多, 同时伴有上皮细胞的空泡

变性、坏死、增生等。我国发病率为3.82%, 50岁以上人群发病率高达13%^[1]。强力枇杷露由枇杷叶、罂粟壳、百部、白前、桑白皮、桔梗、薄荷脑等组方, 具有养阴敛肺、止咳祛痰等功效, 用于治疗支气管炎咳嗽。文献报道, 强力枇杷露联合西药治疗慢性支气管炎的临床效果显

*基金项目: 广东省中医药局科研项目[20211058]。

第一作者: 严家荣, 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为药理学与毒理学, (电子邮箱)83711089@qq.com。

著^[2-4],但单用强力枇杷露治疗的作用机制尚未见报道。本研究中参照杜秀婷等^[5]的研究方法,复制慢性支气管炎模型小鼠,通过测定血清白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素8(IL-8)水平及肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量,检测小鼠支气管及肺组织的病理组织形态,探讨强力枇杷露治疗慢性支气管炎模型小鼠的作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器:Multiskan GO型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);BX43型生物显微镜,CellSens Standard显微图像软件,均购自日本Olympus公司。

试药:强力枇杷露(华润三九<南昌>药业有限公司,批号为2107005J);盐酸氨溴索口服溶液(江苏汉晨药业有限公司,批号为2110202);朝天门香烟(重庆中烟工业有限责任公司,焦油量11 mg,烟气一氧化碳量12 mg,烟气烟碱量1.1 mg);脂多糖(LPS,分析纯,美国Sigma公司,批号为098M4098V);IL-6(批号为Q02011952)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒,TNF- α (批号为U22010940)ELISA试剂盒,均购自武汉华美生物工程有限公司;IL-8 ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号为202204260);MDA(批号为20220311)试剂盒,SOD(批号为20220330)试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所。

动物:无特定病原体(SPF)级NIH小鼠,92只,雌雄各半,体质量18~22 g,购自广东省医学实验动物中心,动物生产许可证号为SCXK(粤)2018-0002,动物生产合格证号分别为44007200099879,44007200099800。动物实验均在广东省医学实验动物中心SPF级动物房进行,饲养条件为每笼5只,自由进食、饮水,采用12 h/12 h昼夜间断照明,饲养室条件稳定。本研究经广东省医学实验动物中心实验动物伦理委员会审核(编号为B202201-4),按实验动物使用的3R原则给予人道关怀。

1.2 方法

造模:将12只小鼠纳入空白对照组(A组),雌雄各半;用60只小鼠进行造模,雌雄各半,模型组小鼠每天用烟熏箱(600 mm×600 mm×1 000 mm)熏烟,1次10支香烟,熏40 min,每日2次,2次熏烟间隔15 min,连续熏烟45 d。第1天、第15天、第29天以LPS(质量浓度为4 mg/mL)滴鼻,每只40 μ L。60只小鼠均造模成功,将其随机分为模型对照组(B组),盐酸氨溴索组(C组,10 mL/kg),强力枇杷露低、中、高剂量组(D₁组、D₂组、D₃组,7.5,15,30 mL/kg),每组12只,雌雄各半,按30 mL/kg灌胃给药。A组和B组小鼠给予等体积纯

净水,C组、D₁组、D₂组、D₃组小鼠给予相应药物每日1次,连续14 d。

一般状态:每天观察动物的外观体征、毛发生长、行为活动、精神状态等一般临床情况1次,至实验结束。

体质量:实验开始、结束时各称体质量1次,试验期间每周称体质量1次。

血清IL-6和IL-8水平测定:末次给药24 h后,麻醉小鼠,采血,离心(转速为3 000 r/min)10 min,取血清,严格按ELISA试剂盒说明操作,采用酶标仪检测血清IL-6和IL-8水平。

右肺组织TNF- α ,MDA,SOD含量测定:小鼠采血结束后,结扎小鼠右侧支气管,取右肺冻存,匀浆,严格按试剂盒说明操作,采用酶标仪检测右肺组织TNF- α ,MDA,SOD含量。

左肺组织病理组织学检查:小鼠采血结束后,取支气管及左肺组织,固定,经脱水、包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色,进行病理组织学分析。参考组织学变化程度参考术语及诊断标准的国际规范(INHAND)四级定级系统^[6]进行组织学变化程度判定,分为极轻度(出现的变化刚超过正常范围),轻度(可观察到病变但尚不严重),中度(病变明显,且很可能加重),重度(病变非常严重或已占据整个组织器官)。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,满足正态分布和方差齐则采用方差分析,则组间比较采用LSD检验;若数据方差不齐或非正态分布,则采用非参数检验,组间比较采用Kruskal-Wallis法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对体质量的影响

与A组比较,B组小鼠治疗前、治疗第7天和第14天的体质量均显著降低($P < 0.01$)。与B组比较,C组、D₁组、D₂组、D₃组小鼠治疗前、治疗第7天和第14天的体质量比较均无显著差异($P > 0.05$)。详见表1。

表1 各组小鼠体质量比较($\bar{X} \pm s, n = 12$)

Tab. 1 Comparison of body mass of mice in each group ($\bar{X} \pm s, n = 12$)

组别	剂量	造模前	治疗前	治疗第7天	治疗第14天
A组		21.4±1.0	37.3±4.5	37.4±5.0	37.9±4.2
B组		20.9±1.0	29.8±4.0*	30.1±3.9*	31.7±4.5*
C组	10 mL/kg	20.7±1.2	30.6±4.4	31.1±4.8	31.8±5.3
D ₁ 组	7.5 mL/kg	21.3±1.0	31.6±3.7	32.3±3.6	33.0±3.7
D ₂ 组	15 mL/kg	21.3±1.0	31.2±4.4	31.7±4.4	32.6±4.6
D ₃ 组	30 mL/kg	20.9±1.2	31.7±4.4	32.0±4.6	33.0±4.9

注:与A组比较,* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with those in the blank control group, * $P < 0.01$.

2.2 对血清 IL - 6 和 IL - 8 水平的影响

各组小鼠血清 IL - 6 水平均无显著差异($P > 0.05$);与 A 组比较, B 组小鼠血清 IL - 8 水平显著升高($P < 0.01$);与 B 组比较, C 组、D₂ 组、D₃ 组小鼠血清 IL - 8 水平均显著降低($P < 0.05$);与 C 组比较, D₁ 组小鼠血清 IL - 8 水平显著升高($P < 0.01$)。详见表 2。

表 2 各组小鼠血清 IL - 6 和 IL - 8 水平比较
($\bar{X} \pm s, \text{pg / mL}, n = 12$)

Tab. 2 Comparison of serum IL - 6 and IL - 8 levels among different groups ($\bar{X} \pm s, \text{pg / mL}, n = 12$)

组别	剂量	IL - 6	IL - 8
A 组		0.635 ± 0.565	12.6 ± 3.0
B 组		0.666 ± 0.494	18.4 ± 1.1 [*]
C 组	10 mL / kg	0.842 ± 0.528	11.7 ± 2.6 ^{##}
D ₁ 组	7.5 mL / kg	0.862 ± 0.589	18.9 ± 1.6 [▲]
D ₂ 组	15 mL / kg	0.660 ± 0.659	14.1 ± 2.2 [#]
D ₃ 组	30 mL / kg	0.424 ± 0.323	11.7 ± 2.2 ^{##}

注:与 A 组比较, ^{*} $P < 0.01$;与 B 组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$;与 C 组比较, [▲] $P < 0.01$ 。表 3 同。

Note: Compared with those in group A, ^{*} $P < 0.01$; Compared with those in group B, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with those in group C, [▲] $P < 0.01$ (for Tab. 2 - 3).

2.3 对肺组织 TNF - α , MDA, SOD 含量的影响

与 A 组比较, B 组小鼠肺组织 TNF - α 含量显著升高($P < 0.01$), SOD 含量显著降低($P < 0.01$)。与 B 组比较, C 组小鼠肺组织 MDA 含量显著降低($P < 0.01$), SOD 含量显著升高($P < 0.01$); D₁ 组、D₂ 组小鼠肺组织 MDA 含量均显著降低($P < 0.05$); D₃ 组小鼠肺组织 TNF - α

和 MDA 含量均显著降低($P < 0.05$), SOD 含量显著升高($P < 0.05$)。与 C 组比较, D₁ 组小鼠肺组织 SOD 含量显著降低($P < 0.01$)。详见表 3。

表 3 各组小鼠肺组织 TNF - α , MDA, SOD 含量比较
($\bar{X} \pm s, n = 12$)

Tab. 3 Comparison of TNF - α , MDA and SOD contents in lung tissue of mice in each group ($\bar{X} \pm s, n = 12$)

组别	剂量	TNF - α (pg / mL)	MDA (nmol / mg)	SOD (U / mg)
A 组		899 ± 591	1.23 ± 0.54	154 ± 11
B 组		1687 ± 751 [*]	1.55 ± 0.50	135 ± 14 [*]
C 组	10 mL / kg	1417 ± 434	0.92 ± 0.49 ^{##}	157 ± 15 ^{##}
D ₁ 组	7.5 mL / kg	1578 ± 756	0.95 ± 0.37 ^{##}	136 ± 14 [▲]
D ₂ 组	15 mL / kg	1497 ± 524	1.11 ± 0.32 [#]	144 ± 13
D ₃ 组	30 mL / kg	1006 ± 338 ^{##}	1.17 ± 0.25 [#]	149 ± 22 [#]

2.4 对小鼠支气管组织的影响

HE 染色结果显示, A 组小鼠肺内支气管结构完整、上皮细胞排列整齐, 肺内未见支气管相关淋巴组织 (BALT), 间质未见炎性细胞浸润。B 组、C 组、D₁ 组、D₂ 组、D₃ 组小鼠均见慢性支气管炎相关病理组织学变化, 主要表现为肺内支气管上皮细胞分泌物增多, 部分管腔内可见炎性分泌物, 细支气管周围可见单核细胞及巨噬细胞浸润或 BALT 增生。与 B 组比较, C 组、D₁ 组、D₂ 组、D₃ 组小鼠病变程度减轻。详见图 2 和表 4。

3 讨论

大气污染、吸烟、感染等因素是引发慢性支气管炎的主要病因^[7]。大气污染及烟雾中的有害物质能直接损害并诱导气道炎症, 引起肺泡内的巨噬细胞、上皮细胞

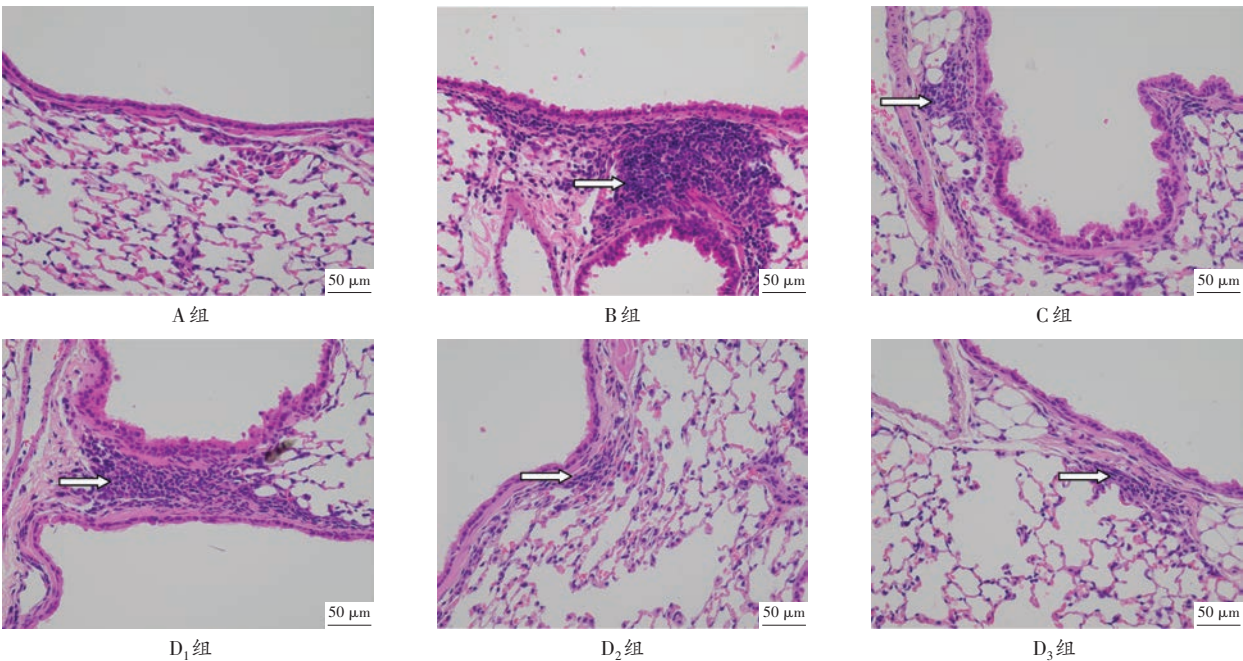


图 2 各组小鼠支气管组织 HE 染色结果 (× 400)

Fig. 2 HE staining results of bronchial tissue of mice in each group (× 400)

表4 各组小鼠支气管组织异常情况比较(例, $n=12$)

Tab. 4 Comparison of abnormal bronchial tissue of mice in each group (case, $n=12$)

组别	剂量	未见异常	极轻度	轻度	中度
A组		12	0	0	0
B组		0	3	8	1
C组	10 mL/kg	1	3	8	0
D ₁ 组	7.5 mL/kg	0	4	7	1
D ₂ 组	15 mL/kg	0	5	5	2
D ₃ 组	30 mL/kg	1	3	7	1

释放一系列炎性介质,激活和吸引中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞向肺部迁徙,从而加剧炎性反应,导致氧化-抗氧化系统和蛋白酶-抗蛋白酶系统失衡,驱动支气管炎的发病过程,甚至形成慢性阻塞性肺疾病^[8-11]。有研究表明,炎性因子IL-6,IL-8,TNF- α 是巨噬细胞和淋巴细胞产生的重要促炎因子,可加剧慢性支气管炎的发展^[12-14];MDA是反映机体氧化损伤程度最经典也是最有效的指标之一,其含量变化间接反映了组织中氧自由基含量及细胞损伤的程度;SOD是广泛存在于需氧代谢细胞中的一种自由基清除剂,在自由基的产生与清除平衡中起重要作用。SOD活力降低和MDA的堆积,氧化-抗氧化的平衡失调,会造成呼吸器官的氧化损伤,产生组织形态学的慢性支气管炎病变^[15-16]。

目前,西医对治疗原则主要为对症治疗、控制感染、祛痰镇咳、解痉平喘,但由于近年来环境污染的加重、抗菌药物的滥用及糖皮质激素的不良反应,导致西医的抗感染和对症治疗措施不能达到预期效果^[17-18]。中医认为,慢性支气管炎属“咳嗽”“痰饮”“喘证”“痰证”病等范畴,病机与肺、肾、脾密切相关,肺、脾、肾功能失调和衰退,脏腑气化功能失调,水液运化受阻,水气经长期聚集、泛滥、凝结成痰,积于体内,导致发病^[19]。在慢性支气管炎缓解期,必须重视补肺益肾、健脾益气,使根本得固,则肺气充足,卫表固护,外邪不得入侵;使脾气旺盛,则痰湿无以停聚;肾气旺盛,纳气归元,则咳、痰、喘等症不复存在^[20]。根据不同的证候辨证施治,分别采用辛温散寒化饮,益气健脾化痰,温肾润肺止咳等不同治法,可发挥中药的特色和优势^[21-23]。

强力枇杷露是由枇杷叶、罂粟壳、百部、白前、桑白皮、桔梗、薄荷脑等中药材组方,广泛应用于治疗支气管炎咳嗽,本研究中采用烟熏联合LPS复制慢性支气管炎模型小鼠,结果显示,与B组比较,强力枇杷露能显著降低血清IL-8水平及肺组织TNF- α 和MDA含量,显著升高SOD含量,有效减轻慢性支气管炎的病变程度,与以往的研究结果^[24-26]一致。

综上所述,强力枇杷露治疗慢性支气管炎的作用机制与降低炎性因子IL-8和TNF- α 水平,升高SOD含量,降低MDA含量,从而减轻机体组织氧化损伤有关。

参考文献

[1] 李婧辰,张梅,李镒冲,等.我国40岁及以上人群慢性呼吸系统疾病症状流行现状及影响因素研究[J].中华流行病学杂志,2018,39(6):786-791.

[2] 范洪涛,黄小平,黄鑫成,等.强力枇杷露联合西药治疗慢性支气管炎急性加重期的效果及对炎性因子、生活质量的影响[J].中国医药导报,2020,17(4):102-105.

[3] 李宏伟.强力枇杷露联合氨溴索治疗慢性支气管炎的临床疗效观察[J].现代诊断与治疗,2019,30(22):3901-3903.

[4] 彭军.雪梨膏及强力枇杷露联合西药治疗慢性支气管炎79例临床分析[J].长江大学学报(自科版),2014,11(36):50-51.

[5] 杜秀婷,林海雄,卓桂锋,等.苏子降气汤对慢性支气管炎模型小鼠TNF- α 、IL-8表达的影响[J].时珍国医国药,2015,26(10):2311-2313.

[6] 杨利峰,周向梅,赵德明.大鼠和小鼠病理变化术语及诊断标准的国际规范:INHAND[M].北京:中国农业出版社,2019:6.

[7] 韦鲜荣.老年慢性支气管炎病因及防治策略分析[J].临床合理用药杂志,2015,8(18):68-69.

[8] STRINGER B, KOBZIK L. Environmental particulate-mediated cytokine production in lung epithelial cells (A549): role of preexisting inflammation and oxidant stress[J]. J Toxicol Environ Health A, 1998, 55(1):31-44.

[9] BECKER S, SOUKUP JM, GALLAGHER JE. Differential particulate air pollution induced oxidant stress in human granulocytes, monocytes and alveolar macrophages[J]. Toxicol in Vitro, 2002, 16(3):209-218.

[10] 李素君,张海欧,徐铁.金振口服液对慢性支气管炎大鼠的疗效观察[J].中国当代医药,2019,26(36):4-7.

[11] 詹琤琤.清气化痰丸对慢性支气管炎小鼠的治疗研究[J].北方药学,2015,12(1):110.

[12] 李东.葶草颗粒对慢性支气管炎模型小鼠的作用[J].医药导报,2015,34(10):1284-1287.

[13] 樊丹,吴炜,罗伟.健脾化痰清肺汤联合常规治疗对老年慢性支气管炎急性发作痰湿蕴肺证患者的临床疗效[J].中成药,2022,44(8):2754-2756.

[14] 咎琼,胡荣,罗先钦.小儿肺咳颗粒对脂多糖致大鼠慢性支气管炎的防治作用及机制研究[J].中国中药杂志,2021,46(8):2112-2118.

[15] 侯颖,曹蔚,李涛,等.蓝玉簪颗粒治疗小鼠慢性支气管炎作用机理的研究[J].第四军医大学学报,2008,29(14):1331-1333.

[16] 王芳,熊培政,冯雪梅.使用竹沥颗粒和鲜竹沥口服液对CB模型大鼠肺组织中SOD活性、MDA水平和HP水平的影响[J].当代医药论丛,2017,15(8):61-63.