

实验研究

苏黄止咳胶囊对 PIC 模型大鼠 SP、CGRP 的影响^{*}

李天浩^{**} 王惠琴 高小娟 王冰 胡晨 任加良^{***}

(陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 712000)

摘要:目的 观察苏黄止咳胶囊对感染后咳嗽(PIC)模型大鼠肺泡灌洗液(BALF)及肺组织中P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)表达的影响,探讨苏黄止咳胶囊治疗PIC的作用机制。方法 清洁级SD大鼠45只,随机分为空白组、模型组、和中药组(苏黄止咳胶囊组),每组15只。参照文献方法建立PIC大鼠模型,大鼠给予相应处理10天后,观察3分钟内大鼠咳嗽次数的变化,并检测各组大鼠BALF、血清中SP、CGRP的表达。**结果** ①咳嗽次数比较:模型组大鼠咳嗽次数明显增多,与正常组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);经中药干预后,大鼠咳嗽次数明显减少,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。②各组大鼠BALF中SP、CGRP含量比较:正常组大鼠BALF中SP、CGRP均轻度表达,模型组以上各指标均明显升高,与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);经中药干预后,中药组大鼠BALF中SP、CGRP表达均减低,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。③各组大鼠肺组织SP、CGRP免疫组化检测结果比较:与正常组比较,模型组、中药组大鼠肺组织SP、CGRP蛋白均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,中药组大鼠肺组织SP、CGRP蛋白表达减低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 苏黄止咳胶囊能够减少PIC大鼠BALF和肺组织SP、CGRP的表达,可能是其治疗PIC的作用机制之一。

关键词: 苏黄止咳胶囊;感染后咳嗽;P物质;降钙素基因相关肽

中图分类号: R289.51 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1340(2019)06-0075-04

DOI: 10.13424/j.cnki.jscetm.2019.06.020

感染后咳嗽(Post-infectious cough, PIC)是临床常见病症,是指感冒急性期过后,咳嗽仍不止,以刺激性干咳为主,而胸部影像学多无异常,常持续3~8周,影响生活和学习^[1-4]。有关PIC的发病机制,目前未完全阐明,认为是由于气道上皮损伤、气道炎症及其相互作用导致咳嗽敏感性增高引起^[5-6]。苏黄止咳胶囊治疗PIC疗效显著^[7-8],本研究通过观察苏黄止咳胶囊对PIC模型大鼠BALF及肺组织中SP、CGRP表达的影响,探讨苏黄止咳胶囊治疗PIC的可能作用机制,为其临床应用提供科学依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 SD大鼠,清洁级,雄性,180~240g,购于西安交通大学实验动物中心,动物许可

证号:SCXK(陕)2012-003。实验大鼠分笼饲养,自由饮水进食,适应性喂养3~7天。本研究符合陕西中医药大学实验动物伦理委员会相关要求并审批通过。

1.2 药品与试剂 苏黄止咳胶囊,扬子江药业集团北京海燕药业有限公司,国药准字:Z20103075。辣椒素,购于合肥四峰生物科技有限公司。LPS、SP、CGRP ELISA试剂盒,均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 主要仪器 JIDI-16R台式多用途高速冷冻离心机(广州吉迪仪器有限公司),YLS-8A多功能诱喘仪(北京智鼠多宝生物科技有限公司),Leica DM2500生物显微镜(北京悦昌行科技有限公司),JYT-50药物天平(深圳市白鳍豚生物科技

* 基金项目:陕西中医药大学科研项目(2017SZKY-035)

** 作者简介:李天浩(1974-),男,副主任医师,主要研究方向:慢阻肺的基础与临床研究。E-mail: lth2009113@126.com

*** 通讯作者:任加良,主任医师。Email: huxi_ren@163.com

有限公司),HWP-9162 恒温箱(上海笃特科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 实验分组及模型建立 将大鼠随机分为正常组、模型组、苏黄止咳胶囊组,每组 15 只,参照文献^[9-10]方法将大鼠置于 1m³ 的特制的烟室中,每日用锯末 50g、香烟 10 支,点燃进行烟熏,每日烟熏 40 分钟,每日 1 次。连续 10 日,大鼠每日自由进食、饮水,分别于第 13d、16d、19d,用 10% 水合氯醛经腹腔内注射将大鼠麻醉,然后经鼻腔滴入浓度为 0.4mg/mL 的 LPS 液,分别于第 14d、15d 和第 17d、18d 以及第 20d,将大鼠置于特制的诱喘容器中,用 10⁻⁴mol/L 的辣椒素溶液雾化吸入,每次雾化吸入 3 分钟,每日 1 次。造模成功的判定:在烟熏的过程中,与正常组大鼠比较,模型组大鼠逐渐出现精神不振,毛色干枯,进食减少,体重下降,阵咳等表现,用 LPS 滴鼻诱发和雾化诱喘的过程中,模型组大鼠咳嗽频繁,并且出现腹肌显著收缩,前肢伸展,伸颈及张口等特征性表现,且咳嗽次数明显增加,3 分钟内大于 10 次,表明造模成功^[11]。

2.2 给药方法 各组大鼠于试验第 14 天起开始灌胃给药,连续 10 天。正常组、模型组均给药 0.9% 氯化钠 4mL 灌胃给药,每天 1 次,中药组给予加苏黄止咳胶囊(依据《中药药理研究方法学》^[12],剂量按 0.36g/kg·d,将药粉溶于 0.9% 氯化钠 4ml)灌胃给药,每天 1 次。

2.3 指标检测 结束给药后,观察每组大鼠的咳嗽次数,观察 3 分钟并记录。然后将大鼠麻醉后迅速开胸,并结扎右主支气管,同时经左主支气管向左肺内缓慢注入 0.9% 氯化钠注射液 4mL,保留 10 秒,回抽后再次缓慢注入,重复 3 次。收集 BALF 后经低温 3000r/min 离心 10 分钟后,取上清液置于 -80 度冰箱保存备用。严格按试剂盒说明进行 ELISA 检测。在向左主支气管灌注同时,迅速取下右肺,并用 10% 多聚甲醛液固定后,取材石蜡包埋,然后切片脱蜡、水合,3% 过氧化氢室温孵育 10 分钟,抗原修复,室温封闭 30 分钟,一抗 4℃ 过夜,HRP 标记免疫组化二抗室温孵育 30 分钟,DAB 显色,苏木素、伊红复染。免疫组化图片结果采用 Leica 显微镜进行观察、拍照,比较蛋白表达强度(灰度),行半定量分析。

2.4 统计学方法 统计软件采用 SPSS17.0,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠 3min 咳嗽次数的影响 模型组大鼠咳嗽次数明显增多,与正常组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);经中药干预后,大鼠咳嗽次数明显减少,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 对大鼠 3min 咳嗽次数的影响($\bar{X} \pm S$)

组别	n	咳嗽次数(次)
正常组	15	1.38 ± 1.32
模型组	15	14.28 ± 1.06 *
中药组	15	8.27 ± 1.22 * △

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,与模型组比较,△ $P < 0.05$ 。

3.2 对大鼠 BALF 中 SP、CGRP 的影响 正常组大鼠 BALF 中 SP、CGRP 轻度表达,模型组以上各指标均明显升高,与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);经中药干预后,中药组大鼠 BALF 中 SP、CGRP 表达均减低,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 对大鼠 BALF 中 SP、CGRP 的影响($\bar{X} \pm S$)

组别	n	SP(ng/L)	CGRP(ng/L)
正常组	15	61.38 ± 11.16	13.26 ± 3.19
模型组	15	148.38 ± 11.41 *	59.42 ± 4.46 *
中药组	15	98.62 ± 11.03 * * △	32.64 ± 3.38 * * △

注:与正常组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.05$;与模型组比较,△ $P < 0.05$ 。

3.3 对大鼠肺组织 SP、CGRP 表达的影响 与正常组比较,模型组、中药组大鼠肺组织 SP、CGRP 蛋白均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,中药组大鼠肺组织 SP、CGRP 蛋白表达减低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 对大鼠肺组织 SP、CGRP 表达的影响($\bar{X} \pm S$)

组别	n	SP(ng/L)	CGRP(ng/L)
正常组	15	0.79 ± 0.14	0.62 ± 0.17
模型组	15	5.13 ± 0.15 *	3.82 ± 0.13 *
中药组	15	1.72 ± 0.13 * △	1.37 ± 0.14 * △

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,△ $P < 0.05$ 。

4 讨论

PIC 是由于咳嗽敏感性增高所致。研究发现,引起 PIC 敏感性增高的主要原因是气道神经源性炎症反应,当气道受到病毒、细菌、辣椒素等刺激后,使位于气道的 C 类神经纤维产生冲动,进而刺激 SP、CGRP、PGE₂ 等的释放,作用于其效应细胞,产生神经源性炎症反应^[13]。而这一过程,和一种称之为瞬时受体电位离子通道蛋白(transient receptor potential, TRP)关系密切^[14-17]。TRP 是一种离子通道蛋白,目前研究最为清楚的是瞬时受体电位类香草酸受体亚型 1(transient receptor potential vanilloid-1, TRPV1),它位于哺乳类动物 C 类神经纤维,广泛分布于中枢神经系统、肝、肺、支气管、皮肤等组织器官,是机体一种重要的伤害性感受分子,可对辣椒素、PGE₂ 及 LTB₄ 等多种有害刺激做出反应^[18]。当 TRPV1 被激活后,一方面促使阳离子向细胞内流动,使神经细胞兴奋,引起咳嗽反射。另一方面,激活的 TRPV1 可引起大量 Ca²⁺ 内流,导致神经末梢释放神经肽增多,包括 SP、CGRP 等,产生神经源性炎症反应,其最终结果是,导致气道高反应性,使咳嗽敏感性增高^[19-20]。

PIC 由于病程相对较短,且其发病多为感受风、寒、湿邪所致,故归属于中医“外感咳嗽”范畴。研究发现,PIC 证候以“风邪犯肺”最为多见^[21-22]。苏黄止咳胶囊主要组成为:麻黄、紫苏叶、紫苏子、枇杷叶、地龙、前胡、牛蒡子、蝉蜕、五味子。其中麻黄、苏叶为君药,宣肺平喘、止咳化痰;五味子、牛蒡子、枇杷叶化痰止咳、定喘敛肺,共为臣药;佐以紫苏子、前胡降气止咳,调畅气机,使气机升降适宜,宣降有度;地龙、蝉蜕为血肉之品,以加强解痉、疏风、平喘之功,诸药合用,全方共奏疏风宣肺、止咳定喘之功。临床研究表明,苏黄止咳胶囊能够降低气道高反应性^[23],有效改善咳嗽、咳痰等症状^[24]。

本研究结果表明,苏黄止咳胶囊能够显著减少大鼠咳嗽次数,降低大鼠 BALF 及肺组织中 SP、CGRP 含量,因此,我们推测,苏黄止咳胶囊通过干预 SP、CGRP 来降低咳嗽敏感性,提示这可能是其治疗 PIC 的机制之一。

参考文献

[1] Madison JM Irwin RS. Cough; A Worldwide Problem[J].

Otolaryng Clin N Am.)2010,43(1):1-13.

- [2] McGarvey L. Update: the search for the human cough receptor[J]. Lung. 2014;192(4):459-65.
- [3] McLeod RL, Correll CC, Jia Y, et al. TRPV1 antagonists as potential antitussive agents[J]. Lung. 2008,186(S1):S59-65.
- [4] Braman SS Postinfectious cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines[J]. Chest, 2006, 129(S1):138S-146S.
- [5] 赖克方, 聂怡初. 感染后咳嗽发病机制、诊断与治疗研究进展[J]. 中华肺病杂志(电子版). 2014,7(7):481-5.
- [6] 陆月明. 咳嗽的动物模型研究方法[J]. 临床肺科杂志, 2007,12(5):480-481.
- [7] 韩兰梅. 观察苏黄止咳胶囊治疗感冒后咳嗽的临床有效性及安全性[J]. 中国卫生标准管理, 2015,6(11):109-110.
- [8] 韩佳颖, 王真, 徐凯丽. 苏黄止咳胶囊治疗感冒后咳嗽的 Meta 分析[J]. 中国现代应用药学, 2016,33(10):1328-1333.
- [9] Zhu Jia, Li Feixia. Effects of Qufeng Xuanfei Decoction in Animal Model of Post-Infectious Cough[J]. Cell Biochemistry And Biophysics, 2014,70(2):881-885.
- [10] 陆月明. 咳嗽的动物模型研究方法[J]. 临床肺科杂志, 2007,12(5):480-481.
- [11] 李飞侠, 朱佳, 王文, 等. 一种感染后咳嗽动物模型制作方法的建立及评价[J]. 中华中医药学刊, 2013,31(10):2315-2317.
- [12] 陈奇编. 中药药理研究方法论[M]. 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 2012:110-112.
- [13] 叶新民. 豚鼠病毒感染性咳嗽模型的建立及其神经源性炎症机制探讨[D]. 广州: 广州医学院, 2010.
- [14] Calzetta L, Luongo L, Cazzola M, et al. Contribution of sensory nerves to LPS-Induced hyperresponsiveness of human isolated bronchi[J]. Life sciences. 2015;131:44-50.
- [15] Gatti R, Andre E, Barbara C, et al. Ethanol potentiates TRPV1-mediated cough in the guinea pig[J]. Pulmonary pharmacology & the therapeutics, 2009,22(1):33-6.
- [16] Delescluse I, Mace H, Adcock JJ. Inhibition of airway hyper-responsiveness by TRPV1 antagonists (SB-705498 and PF-04065463) in the unanaesthetized, ovalbumin-Sensitized guinea pig[J]. British journal of pharmacology. 2012;166(6):1822-32.

不同纯度的艾绒燃烧的温度时间变化特点及艾炷燃尽后炷体稳固程度,不同纯度的艾绒有其各自的临床适用领域:纯度为 10:1 的低纯度艾绒临床用于制作艾条进行温和灸疗法;非瘢痕灸疗法用较高纯度艾绒(30:1、20:1 纯度);纯度为 40:1 的精细艾绒临床适用于瘢痕灸疗法,而高纯度艾绒还可以向低一级纯度的应用范围兼用与跨用。现代人对于艾绒纯度的选择正是对吴氏选择陈艾捣绒的进一步发挥。

5 结语

通过对新安医家吴亦鼎的《神灸经纶》的仔细研读,吴亦鼎发扬的“热病用灸”的学术思想可见一斑,作为徽州一带的新安针灸医家流派,他独到的见解发扬了灸法,对后世用灸产生了深远影响。吴亦鼎在灸法治疗热病这一方面,阐发了独特灸理,施灸以迫毒散而立愈;治疗上辨证论治,明证审穴,灵活运用灸法、针法、药法,重用灸法;取材上,精选陈艾,严格取火,控制灸温,对今天的理论研究和临床实践有深远的指导意义。此外,吴亦鼎的“热病用灸”的学术思想有力的反驳了自汉以来的“热病忌灸”思想,发扬了传统灸法,在治疗热病方面取得创新性进展。不过吴亦鼎尚有许多学术思想未得到临床证实,这也是现代灸法发展的空余之地,望后人有所启迪,再创辉煌。

参考文献

[1] 王倩,包永欣. 基于“艾灸可治热证”理论探析湿热型渍

疡性结肠炎的治疗[J]. 河南中医,2018,11(4):1735-1738.

[2] 王大生. 神灸经纶释[M]. 北京:中国中医古籍出版社,2004:381-387.

[2] 胡玲. 新安医学针灸精华[M]. 北京:中国中医药出版社,2009:57-60.

[3] 孙启胜,贾文睿,郭骥影,等.《黄帝内经》外治法拾遗[J]. 世界中医药,2016,11(11):2462-2466.

[4] 马强,王荃,贾学昭,等. 汪机灸法学术思想探析[J]. 中国针灸,2018,38(8):895-898.

[5] 吴子建,吴煥淦,胡玲,等. 周楣声先生之《灸绳》对灸法学的贡献[J]. 中国针灸,2018,38(5):549-552,554.

[6] 胡玲. 新安医学针灸精华[M]. 北京:中国中医药出版社,2009:57-60.

[7] 王鹏,洪靖,王璐.《神灸经纶》灸法学术思想探析[J]. 陕西中医药大学学报,2018,41(1):105-107.

[8] 张田宁,吴生兵,朱咏梅,等. 试析艾灸的质与量[J]. 中华中医药杂志,2018,33(11):5088-5091.

[9] 张会芳,王玲玲,张建斌,等. 艾灸温通调脂临床研究[J]. 世界中医药,2013,8(8):871-874.

[10] 张会芳. 不同灸温调脂通脉效应及 TRPV1 介导灸法“以温促通”效应机制研究[D]. 南京,南京中医药大学,2013.

[11] 张觉予,陈犹得,冼建春,等. 不同纯度艾绒艾炷灸温度时间变化的研究[J]. 中国针灸,2015,35(9):909-912.

(收稿日期:2019-01-18 编辑:巩振东)

(上接第 77 页)

[17] McLeod RL, Fernandez X, Correll CC, et al. TRPV1 antagonists attenuate antigen - Provoked cough in ovalbumin sensitized guinea pigs[J]. Cough. 2006, (2):10.

[18] Chung KF. Chronic 'cough hypersensitivity syndrome': a more precise label for chronic cough[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2011, 24(3): 267-271.

[19] Sadofsky LR, Ramachandran R, Crow C, et al. Inflammatory stimuli up-regulate Transient receptor potential vanilloid - 1 expression in human bronchial fibro - blasts[J]. Experimental lung research,2012,38(2):75-81.

[20] Lv H, Yue J, Chen Z, et al. Effect of transient receptor potential vanilloid - 1 on cough hypersensitivity induced by particulate matter_{2.5} [J]. Life sciences, 2016, (151):

157-66.

[21] 黄敏玲,柯晓霞,吴蕾,等. 感染后咳嗽中医证候规律及病机探讨[J]. 时珍国医国药. 2012,23(10):2570-1.

[22] 阎玥,杨璐,宋芋,等. 风寒方治疗感染后咳嗽[J]. 中华中医药学刊,2014,32(1):217-9.

[23] 杨春发,吴洪波. 苏黄止咳汤治疗气道高反应性咳嗽临床观察[J]. 中国中医药现代远程教育,2019,17(3):49-51.

[24] 阿依古力·托呼提. 苏黄止咳胶囊治疗感冒后咳嗽的效果[J]. 中国实用医药,2018,13(30):143-145.

(收稿日期:2019-03-09 编辑:文颖娟)