

# 不同剂量小青龙汤变方对发作期哮喘小鼠体内 NO 含量及 NOS 影响的研究

徐瑞, 张晓

南阳市第一人民医院, 河南 南阳 473000

**[摘要]** 目的: 观察不同剂量小青龙汤变方对发作期哮喘小鼠体内一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 含量及一氧化氮合酶 (Nitric Oxide Synthase, NOS) 的影响, 探讨该方在哮喘急性期可能的作用机制。方法: 将 BALB/c 小鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、小青龙汤变方低剂量组、小青龙汤变方高剂量组、激素组, 每组 10 只。采用注射卵白蛋白和氢氧化铝凝胶混悬液的方法制作哮喘小鼠模型, 用不同剂量小青龙汤变方及地塞米松进行干预治疗后, 测定各组小鼠血清、肺组织匀浆液中 NO、诱导型一氧化氮合酶 (inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)、构成型一氧化氮合酶 (constitutive Nitric Oxide Synthase, cNOS) 活性的变化水平, 探讨所检测指标与急性期哮喘的相关性; 并通过肺组织病理学检查观察各组肺组织炎性细胞的浸润情况。结果: 与空白组比较, 模型组小鼠体内血清及肺组织匀浆中 NO 及 iNOS 含量明显增高 ( $P < 0.05$ ), cNOS 变化不明显, 肺组织病变严重。与模型组比较, 药物干预后, 小青龙汤变方低、高剂量组及激素组小鼠体内 NO 及 iNOS 含量均下降, 以小青龙汤变方高剂量组及激素组降低最明显, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。肺组织病理切片显示激素组、小青龙汤变方低、高剂量组较模型组炎性改变有明显好转, 以激素组和小青龙汤变方高剂量组病变最为轻微。结论: 小青龙汤变方可降低哮喘发作期小鼠体内 iNOS 含量、抑制其活性表达, 降低 NO 含量, 从而改善哮喘症状及肺组织病理变化, 且在一定范围内其药效作用随着药量的增加而增加, 可见中医药复方在治疗疾病中多途径、多靶点的疗效优势。

**[关键词]** 哮喘; 小青龙汤变方; 构成型一氧化氮合酶 (cNOS); 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS); 动物实验; 小鼠

**[中图分类号]** R256.12 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2017-6427 (2018) 05-0031-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.05.007

## Modified Prescription of Xiaoqinglong Tang in Different Doses Has effect on NO Content and NOS in Asthmatic Mice at the Attack Stage

XU Rui, ZHANG Xiao

**Abstract:** **Objective:** To observe the effect of modified prescription of Xiaoqinglong tang in different doses on nitric oxide (NO) content and nitric oxide synthase (NOS) in asthmatic mice at the attack stage, and to discuss the possible functioning mechanism of the prescription at acute attack of asthma. **Methods:** Divided BALB/c mice into the blank group, the model group, the low-dose and high-dose modified prescription of Xiaoqinglong tang group and the hormone group randomly, 10 mice in each group. Injection with suspension of ovalbumin and aluminum hydroxide gel was administered to establish the model of asthmatic mice. After using the modified prescription of Xiaoqinglong tang in different doses and dexamethasone to intervene the treatment, measured the changes of activity of NO, iNOS and cNOS in serum and lung tissue homogenate of mice in each group, discussed the relevance between the indexes detected above and asthma in acute attack; and by means of examining pathological examination of lung tissue, observed the infiltration of inflammatory cells of lung tissue in each group. **Results:** Comparing with the blank group, the content of NO and iNOS in serum and lung tissue homogenate of mice in the model group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), cNOS was not significantly changed, and the lesions of lung tissue were severe. Comparing with the model group, the content of NO and iNOS of mice in the low-dose and high-dose modified prescription of Xiaoqinglong tang group as well as the hormone group was respectively decreased ( $P < 0.05$ ), and the high-dose modified prescription of Xiaoqinglong tang group and the hormone group were decreased the most significantly;

**[收稿日期]** 2017-06-27

**[作者简介]** 徐瑞 (1984-), 女, 主治医师, 研究方向: 儿童呼吸及神经系统疾病研究。

the pathological section of lung tissue showed that the inflammatory lesion of the hormone group and the low-dose and high-dose modified prescription of Xiaoqinglong tang group was significantly improved, and the lesion of the hormone group and the high-dose modified prescription of Xiaoqinglong tang group was the slightest. Comparing with the low-dose Chinese medicine group, the content of NO in serum and lung tissue homogenate, the content of TNOS and iNOS in serum and the content of TNOS and iNOS in lung tissue homogenate of mice in the high-dose group were significantly decreased, differences being significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The modified prescription of Xiaoqinglong tang can reduce iNOS content and inhibit its activity expression in mice at the attack stage of asthma and decrease the excessive production of NO, thus to improve asthmatic symptoms and the pathological changes of lung tissue, and its efficacy enhances as the dosage increases in certain scope, which shows multiple-approach and multi-target as the clinical advantage of Chinese herbal compound in the treatment of disease.

**Keywords:** Asthma; Modified prescription of Xiaoqinglong tang; Constitutive Nitric Oxide Synthase (cNOS); Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS); Animal experiment; Mice

哮喘是儿童时期常见的一种反复发作的哮鸣气喘肺系疾病,随着环境污染的日益严重,哮喘患病率有逐年上升的趋势,2000年全国哮喘防治小组采用整群抽样调查我国城区儿童哮喘的现患病率为0.12%~3.34%,平均1.54%,累计患病率为0.25%~4.63%,平均1.98%<sup>[1]</sup>。而河南省2001年采用分层随机对18个市共43个流调点进行整体抽样调查显示:0~14岁儿童累积哮喘患病率为1.75%,其中78.8%在3岁内发病,7岁前起病的占90.6%<sup>[2]</sup>。哮喘本质的病理变化就是一种气道慢性炎症;缓解期控制气道慢性炎症、降低高反应性、促进黏膜壁的修复等求本治疗将是规范化治疗哮喘的重点。一氧化氮(Nitric Oxide, NO)是一种内源性调控分子,由左旋精氨酸在一氧化氮合酶(Nitric Oxide Synthase, NOS)的作用下氧化而成,在机体内起着重要的信使作用。总的一氧化氮合酶(Total Nitric Oxide Synthase, TNOS)主要包括诱导型一氧化氮合酶(inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)和构成型一氧化氮合酶(constitutive Nitric Oxide Synthase, cNOS),前者主要调节生理功能,后者主要在病理状态下产生。哮喘发作时,机体在多种刺激因素的诱导下使iNOS合成的NO增加,局部NO大量合成,引起气道充血,毛细血管通透性增加,使血浆渗漏,加重哮喘病情。

小青龙汤出自张仲景《伤寒论》麻黄汤证之后,为外解表邪、内蠲水饮、宣肺平喘的著名经方,数千年的临床实践证实其在治疗支气管哮喘方面疗效确切。地龙性咸、寒,具有清热熄风、通络、平喘、利尿的功效,现代实验研究表明其含有的广地龙次黄嘌呤有

显著舒张支气管的作用,并可拮抗组织胺引起的平滑肌痉挛,具有明显抗炎平喘作用<sup>[3]</sup>。小青龙汤变方是由小青龙汤加地龙而成,是宋桂华教授治疗哮喘的经验基础方,临床疗效显著。因此,本研究通过观察不同剂量小青龙汤变方对发作期哮喘小鼠血清及肺组织匀浆液中NO含量、NOS活性和肺组织病理改变的影响,试图阐明该方在哮喘急性期可能的作用机制,同时为探求中药源iNOS抑制剂提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 选用健康、清洁级、雄性BALB/c小鼠50只,鼠龄4~5周,体质量20~25g。由河南省实验动物中心提供。饲养于河南中医学院动物实验中心,实验室自然光线采光,通风良好,控制室温在20~25℃之间,湿度(50±10)%,昼夜周期12h。动物饲料为河南省实验动物中心提供的灭菌、标准干燥鼠粮。

**1.2 实验药物** 卵白蛋白(Ovalbumin, OVA)(美国Sigma公司,规格1g/瓶,批号:20110209),2%OVA雾化液配制:2gOVA溶于含50mg氢氧化铝的100mL生理盐水中,充分混匀,冷藏静置;0.05%卵蛋白抗原混悬液:5mgOVA溶于含5mg氢氧化铝的10mL生理盐水中;地塞米松注射液(河北华威制药有限公司)配置成4.5mg/kg(约相当于人用量0.5mg/kg);小青龙汤变方高剂量组:按100mL温开水含生药100g浓度配制(麻黄、白芍各18g,细辛、五味子、地龙各12g,甘草、干姜各5g,半夏、桂枝各9g);小青龙汤变方低剂量组:按100mL温开水含生药50g浓度配制(麻黄、白芍各9g,细辛、五味子、地龙各

6 g, 半夏、桂枝各 4.5 g, 干姜、甘草各 2.5 g), 所有中药均采用三九颗粒剂, 由河南中医学院第一附属医院中药房提供。

**1.3 实验试剂** 氧化铝干粉(上海美化公司, 100 mL/瓶, 批号: 20110308); NO(酶法)试剂盒、NOS 比色法检测试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所; 无水乙醇、苏木素液、戊巴比妥干粉、伊红、中性树胶等。

**1.4 动物分组** 将 50 只健康、清洁级、雄性 BALB/c 小鼠按随机数字表法分为 5 组: 空白组、模型组、小青龙汤变方低剂量组、小青龙汤变方高剂量组、激素组, 每组 10 只。

**1.5 模型的制备及干预** 参考汪受传主编《中医儿科临床研究》<sup>[4]</sup>中哮喘小鼠模型制作方法: 在实验第 1、7、14 天造模组小鼠腹腔内注射 OVA 和氢氧化铝凝胶混悬液 0.2 mL 致敏(含 100 μg OVA 和 2 mg 氢氧化铝); 而空白组同时注射等量的生理盐水; 在第 15 天将造模组小鼠置于自制激发箱内, 给予 2 mL 2% 的 OVA 生理盐水悬液雾化吸入以激发哮喘(35 min/d, 共 7 天)。空白组小鼠用 2 mL 生理盐水进行雾化吸入。诱喘成功后小鼠表现为前期烦躁不安, 活动频繁; 后期静伏不动, 毛发竖立, 呼吸急促, 萎靡不振, 严重者伸颈, 缩胸, 收腹呈喘息状, 大小便失禁等。

空白组按照造模方法用生理盐水代替 OVA; 造模成功后, 模型组干预药物用生理盐水代替; 小青龙汤变方低、高剂量组: 从 OVA 吸入第 1 天起, 雾化吸入前 0.5 h, 灌胃小青龙汤变方, 低剂量组给药量 0.5 g/(mL·d), 高剂量组给药量 1 g/(mL·d), 连续给药 7 天, 从实验起每 5 天测一次小鼠体质量, 以及时调整给药。激素组: 自吸入 OVA 第 1 天起, 雾化前 0.5 h 腹腔注射地塞米松针剂 4.5 mg/(kg·d)(约相当于人的剂量 0.5 mg/(kg·d), 连续给药 7 天, 具体用药剂量参照苗明三主编《实验动物和动物实验技术》<sup>[5]</sup>提供的常用动物与人的不同体质量的药物换算公式计算:  $D_2 = D_1 \times K_2 / K_1$ ,  $D_2$  为动物用药量,  $D_1$  为人的剂量,  $K_2$  为 1,  $K_1$  为 0.11。

**1.6 标本采集及制备** 各组小鼠末次激发结束后 12 h 内以 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射以麻醉、颈椎脱臼法处死所有小鼠, 按取血、制备肺组织匀浆液、取肺组织的顺序立即采集标本。取血标本用低速离心机以 2 000 r/min 的速度离心 20 min, 用移液管

吸取血清放置一次性试管, 于 -20℃ 冰箱保存, 以备指标检测; 取肺组织后在医用无菌纱布上渗干后放入已编好号的 10% 中性福尔马林固定液中备用, 以备标本的检测。采用比色法测定血清及肺组织中 NO 的含量, 采用硝酸还原酶法测定血清及肺组织中 NOS 的含量。

**1.7 统计学方法** 采用 SPSS18.0 统计软件进行处理, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 先对各组数据进行方差齐性检验, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 若方差齐则用 SNK 法进行多样本间的两两比较, 不齐时用 Dunnett's T3 比较, 取  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠一般情况** 实验第 17 天, 激素组死亡 1 只, 考虑为腹腔注射操作不当所致。与空白组比较, 造模组小鼠在雾化第一天, 约雾化 12 min 左右即出现烦躁不安、抓头挠腮、呼吸深快、腹部痉挛抽动、活动减少、迟滞、大便增多等过敏喘息表现, 但随着干预药物次数的增多及时间的延长, 小青龙汤变方低剂量组、小青龙汤变方高剂量组和激素组小鼠再次给予雾化后上述表现均较模型组明显减轻, 模型组则过敏喘息症状仍然较重, 精神较差, 活动进一步减少, 进食、饮水明显减少。

**2.2 各组小鼠血清、肺组织匀浆液中 NO 含量比较** 见表 1。与空白组比较, 模型组小鼠血清及肺组织 NO 含量明显增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 小青龙汤变方低、高剂量组和激素组小鼠血清及肺组织 NO 含量明显下降( $P < 0.05$ )。与小青龙汤变方低剂量组比较, 小青龙汤变方高剂量组小鼠血清及肺组织 NO 含量降低更加显著, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与小青龙汤变方高剂量组比较, 激素组在降低哮喘小鼠体内血清及肺组织 NO 含量数值变化方面较为接近, 但无统计学意义。

表 1 各组小鼠血清、肺组织匀浆液中 NO 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | n  | 血清(μmol/L)                 | 匀浆液(μmol/g prot)          |
|------------|----|----------------------------|---------------------------|
| 空白组        | 10 | 30.31 ± 10.98              | 0.51 ± 0.12               |
| 模型组        | 10 | 75.85 ± 15.50 <sup>①</sup> | 1.91 ± 0.13 <sup>①</sup>  |
| 小青龙汤变方低剂量组 | 10 | 61.53 ± 9.53 <sup>②</sup>  | 1.50 ± 0.14 <sup>②</sup>  |
| 小青龙汤变方高剂量组 | 10 | 50.10 ± 9.98 <sup>②③</sup> | 1.25 ± 0.10 <sup>②③</sup> |
| 激素组        | 9  | 43.90 ± 13.39 <sup>②</sup> | 1.14 ± 0.18 <sup>②</sup>  |

与空白组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$ ; 与小青龙汤变方低剂量组比较, ③ $P < 0.05$



2.3 各组小鼠血清中 NOS 含量比较 见表 2。与空白组比较,模型组小鼠体内血清 TNOS、iNOS 含量均明显增高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,小青龙汤变方低、高剂量组和激素组小鼠血清 TNOS、iNOS 均明显降低( $P < 0.05$ );与小青龙汤变方低剂量组比较,小青龙汤变方高剂量组在降低小鼠体内血清 TNOS、iNOS 方面作用更加显著( $P < 0.05$ );其中激素组与小青龙汤变方高剂量组疗效接近,二者无统计学差异。

**表 2 各组小鼠血清中 NOS 含量比较( $\bar{x} \pm s$ ) U/mL**

| 组别         | n  | TNOS                    | iNOS                    | cNOS      |
|------------|----|-------------------------|-------------------------|-----------|
| 空白组        | 10 | 1.21±0.31               | 0.69±0.27               | 0.52±0.06 |
| 模型组        | 10 | 2.14±0.25 <sup>①</sup>  | 1.59±0.23 <sup>①</sup>  | 0.54±0.11 |
| 小青龙汤变方低剂量组 | 10 | 1.77±0.27 <sup>②</sup>  | 1.25±0.28 <sup>②</sup>  | 0.53±0.05 |
| 小青龙汤变方高剂量组 | 10 | 1.50±0.12 <sup>②③</sup> | 0.96±0.11 <sup>②③</sup> | 0.52±0.08 |
| 激素组        | 9  | 1.51±0.21 <sup>②</sup>  | 0.95±0.21 <sup>②</sup>  | 0.53±0.10 |

与空白组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与小青龙汤变方低剂量组比较,③ $P < 0.05$

2.4 各组小鼠肺组织匀浆液中 NOS 含量比较 见表 3。与空白组比较,模型组小鼠肺组织匀浆液中 TNOS、iNOS 含量明显增高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,小青龙汤变方低、高剂量组和激素组小鼠肺组织匀浆液中 TNOS、iNOS 含量均明显降低( $P < 0.05$ )。与小青龙汤变方低剂量组比较,小青龙汤变方高剂量组小鼠肺组织匀浆液中 TNOS、iNOS 含量下降显著( $P <$

0.05);小青龙汤变方高剂量组及激素组疗效接近,无统计学差异。

**表 3 各组小鼠肺组织匀浆液中 NOS 含量比较( $\bar{x} \pm s$ ) U/mL**

| 组别         | n  | TNOS                    | iNOS                    | cNOS      |
|------------|----|-------------------------|-------------------------|-----------|
| 空白组        | 10 | 0.65±0.17               | 0.46±0.17               | 0.31±0.07 |
| 模型组        | 10 | 1.46±0.22 <sup>①</sup>  | 1.09±0.20 <sup>①</sup>  | 0.37±0.04 |
| 小青龙汤变方低剂量组 | 10 | 1.14±0.20 <sup>②</sup>  | 0.76±0.18 <sup>②</sup>  | 0.36±0.08 |
| 小青龙汤变方高剂量组 | 10 | 1.05±0.13 <sup>②③</sup> | 0.61±0.11 <sup>②③</sup> | 0.34±0.05 |
| 激素组        | 9  | 0.88±0.11 <sup>②</sup>  | 0.60±0.13 <sup>②</sup>  | 0.33±0.06 |

与空白组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与小青龙汤变方低剂量组比较,③ $P < 0.05$

2.5 各组小鼠肺组织 HE 染色结果 见图 1。空白组小鼠肺组织气管纤毛排列整齐,肺泡壁结构完整,血管无充血,炎性细胞浸润现象不明显。模型组小鼠支气管黏膜下层可见中性粒细胞为主的炎性浸润,伴见纤毛部分脱落、粘连、倒伏、坏死等,气管壁明显增厚,局部血管充血水肿。激素组、小青龙汤变方低、高剂量组较模型组有明显好转,以激素组和小青龙汤变方高剂量组病变最为轻微,仅见少许淋巴细胞浸润,充血轻微,气道壁厚度较模型组明显变薄,但比空白组厚。小青龙汤变方低剂量组小鼠气管壁、肺组织周围依然可见较多淋巴细胞、中性粒细胞等炎性浸润,气管壁较厚,较模型组明显好转,但不如激素组、小青龙汤变方高剂量组改善明显。

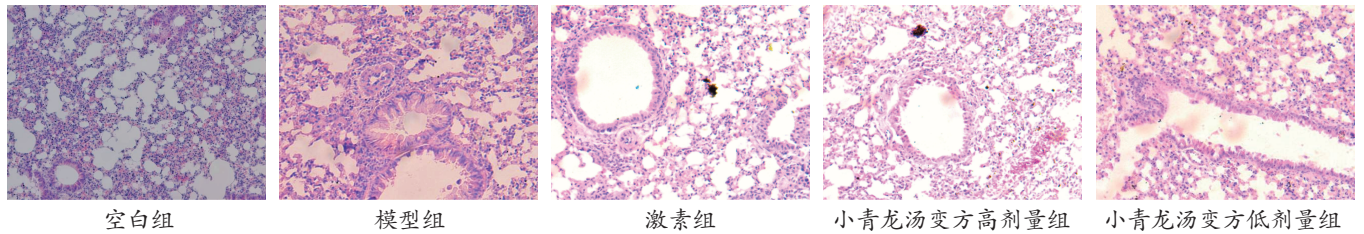


图 1 各组小鼠肺组织 HE 染色结果 (×200)

### 3 讨论

哮喘病人呼出气中 NO 含量较正常人高,其主要是由于哮喘患者气道上分布的多种炎性细胞因子刺激 iNOS 活性增强所致。大量炎性因子可诱导 iNOS 活性表达增强,致使 NO 释放增多并发挥细胞毒性作用,研究证明,NO 参与了哮喘时支气管微循环改变。Bemareggi M 等<sup>[9]</sup>证明 NO 对微循环亦有双重作用,在生理状态下,NO 可以抑制微循环血浆渗出,但在哮喘状态下,NO 可增加微循环通透性,增加血浆渗

出,致气道高反应性和加重哮喘发病。

研究表明,哮喘病人呼出气中 NO 含量较正常人高 2~3 倍<sup>[7]</sup>,iNOS 抑制剂可以降低哮喘患者呼出气 NO 水平。杨利康等<sup>[8]</sup>通过实验发现哮喘豚鼠肺组织中 cNOS 活性水平变化不明显,说明哮喘时神经性一氧化氮的缺乏不明显,是 iNOS 活性水平升高,导致肺组织中 NO 水平随之升高,从而引起气道高反应性增强,加重哮喘发病。哮喘患者呼出气中 NO 含量增加,在哮喘恶化时进一步升高<sup>[9]</sup>,一定程度上反映哮

喘炎症反应的过程和严重程度。吸入外源性 NO 虽然可轻度扩张支气管,但却增加了气道的高反应性,而哮喘的本质是气道慢性炎症改变,气道局部平滑肌痉挛只是哮喘病理过程的一个组成部分而非全部,因此选择性抑制 iNOS 活性将是治疗哮喘的方向之一,也是激素治疗哮喘的机制之一。

本实验也进一步证实了哮喘小鼠体内血清、肺组织匀浆液中 NO 含量明显增高, iNOS 活性增强,而 eNOS 变化不明显, NO、iNOS 在哮喘发病中起着重要的作用。哮喘发作时 iNOS 活性明显增强,可以促进病理状态下 NO 过量产生,加重哮喘发作期症状及肺组织的炎性浸润。

综上,本课题研究结果进一步说明了小青龙汤变方可降低哮喘发作期小鼠体内 iNOS 含量、抑制其活性表达,降低 NO 过量产生,从而改善哮喘症状及肺组织病理变化,且以高剂量组改善更为明显。推测小青龙汤变方治疗急性发作期哮喘的作用机制之一可能和影响机体组织内 NO 和 iNOS 代谢活性有关,且在一定范围内随着药量的增加而发挥更强的作用,这体现了中医药复方在治疗疾病中多途径、多靶点的疗效优势。此外,小青龙变方高剂量组的治疗作用和激素组接近,为临床部分哮喘发作期症状较轻,未达到使用激素指证的患儿提供了另一种治疗选择。但本研究样本量偏小,可重复性偏低,下一步我们将进一步扩大样本量,制定更严谨、科学、准确、具有更高可重

复性的研究方案,进一步揭示中医药多途径、多靶点的疗效优势。

#### [参考文献]

- [1] 全国儿童哮喘防治协作组. 中国城区儿童哮喘患病率调查[J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(2): 123.
- [2] 彭义利, 汤兵祥, 刘俊刚, 等. 河南省 0-14 岁儿童支气管哮喘流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 2001, 22(6): 470-471.
- [3] 张保国, 刘庆芬. 小青龙汤现代研究与新用[J]. 中成药, 2012, 34(2): 340-344.
- [4] 汪受传. 中医儿科临床研究[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 167.
- [5] 苗明三. 实验动物与动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 57.
- [6] Bevelander M. Nitrogen dioxide promotes allergic sensitization to inhaled antigen [J]. J Immunol, 2007, 179(6): 3680-3688.
- [7] 沈华浩. 哮喘手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 17-30.
- [8] 杨利康, 刘翔, 陈宇英, 等. 一氧化氮及一氧化氮合酶在哮喘大鼠气道高反应中的作用[J]. 中国临床康复, 2004, 8(36): 8235.
- [9] 黄铁群. 一氧化氮在哮喘发病和治疗中的双重性[J]. 国外医学: 呼吸系统分册, 1998, 18(1): 51-53.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

欢 迎 阅 读