

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.25.003

文章编号: 1005-8982(2018)25-0011-05

血必净对哮喘小鼠气道重塑及黏附分子 ICAM-1、VCAM-1的影响

孙玉金¹, 李来传², 史有奎², 高名同², 徐珊珊², 陈京霞²

(1. 潍坊医学院临床医学院, 山东 潍坊 261053; 2. 潍坊医学院附属医院
急诊科, 山东 潍坊 261031)

摘要: **目的** 探讨血必净注射液对哮喘小鼠气道重塑及肺泡灌洗液中黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 的影响。**方法** 40 只 BALB/c 小鼠随机分成健康对照组 (C 组)、慢性哮喘组 (A 组)、血必净干预 1 周组 (1 组)、血必净干预 2 周组 (2 组) 和血必净干预 3 周组 (3 组), 每组 8 只。复制哮喘模型后以血必净注射液分别干预 1、2、3 组小鼠 1、2 和 3 周。麻醉处死后取肺泡灌洗液 (BALF) 及肺组织。BALF 以酶联免疫吸附实验 (ELISA) 法测定细胞间黏附分子 1 (ICAM-1)、血管内皮细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 的含量, 肺组织切片并染色, 镜下观察肺组织病理形态改变及气道形态学改变。**结果** ①血必净干预后可降低哮喘小鼠 BALF 中 ICAM-1、VCAM-1 的水平, 3 组与其他组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 降低最显著。②镜下观察见血必净可改善哮喘小鼠气道及肺组织的病理形态, 3 组效果最明显。③1 组、2 组、3 组支气管壁厚度、平滑肌厚度逐渐变薄, 但均厚于 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 血必净可改善哮喘小鼠气道重塑并可通过下调 ICAM-1、VCAM-1 的水平改善气道炎症。

关键词: 血必净; 哮喘; 气道重塑; 黏附分子

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of Xuebijing on airway remodeling and adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 in asthmatic mice

Yu-jin Sun¹, Lai-chuan Li², You-kui Shi², Ming-tong Gao², Shan-shan Xu², Jing-xia Chen²

(1. Clinical Medical School, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China;

2. Department of Emergency, Affiliated Hospital of Weifang Medical University,
Weifang, Shandong 261031, China)

Abstract: **Objective** To discuss the effect of Xuebijing injection on airway remodeling and the expression of adhesion molecule content of both VCAM-1 and ICAM-1 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice with asthma. **Methods** Forty BALB/c mice were divided into 5 groups, including a control group (group C), an asthma model group (group A), a Xuebijing intervention for 1 week group (group 1), a Xuebijing intervention for 2 weeks group (group 2), a Xuebijing intervention for 3 weeks group (group 3), with eight mice in each group. The asthma model was established, then the groups 1, 2 and 3 accepted Xuebijing intervention respectively for 1, 2 and 3 weeks. The lung tissues and BALF were got after the mice were sacrificed with anesthesia. The content of VCAM-1 and ICAM-1 in BALF was detected by ELISA. Pathological changes of the lung tissues and morphological changes of airway were observed under light microscope after staining in lung slices. **Results** The mice in the groups 1, 2 and 3 had lowered levels of VCAM-1 and ICAM-1, those in the group 3 decreased the most obviously compared to the groups 1 and 2 ($P < 0.05$). Xuebijing injection could improve the pathological changes

收稿日期: 2018-01-22

[通信作者] 陈京霞, E-mail: 13864629272@163.com

of airway and the lung tissues in the mice with asthma, the group 3 had the most obvious effect. The bronchial wall thickness and the smooth muscle wall thickness were gradually declined from the group 1, group 2 to group 3, but all were thicker than those of the group C and thinner than those of the group A ($P < 0.05$). **Conclusions** Xuebijing injection can improve airway remodeling, and improve airway inflammation by influencing the levels of VCAM-1 and ICAM-1.

Keywords: Xuebijing injection; asthma; airway remodeling; ICAM-1; VCAM-1

哮喘是由多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病。哮喘病理以气道炎症、气道高反应性、气道重塑为主要特征^[1]。长期慢性气道炎症的刺激使气道壁发生结构性的改变,称为气道重塑,主要表现为气道上皮黏液化生、平滑肌肥大/增生、上皮下胶原沉积和纤维化、血管增生等^[2-3],从而使哮喘患者对吸入激素的敏感性降低,出现不可逆的气流受限及持续存在的气道高反应性^[4]。细胞间黏附分子 1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 均为细胞表面产生的免疫球蛋白,炎症反应时介导细胞与细胞间、细胞与血管内皮间的黏附,是炎症反应形成的基础^[5],因此 ICAM-1、VCAM-1 的水平可反映哮喘气道炎症水平。血必净注射液是含有多种中药成分的复方制剂,具有抗凝解毒、抗炎等作用,可通过不同机制调控炎症反应^[6-7]。本研究主要通过复制小鼠哮喘模型及血必净注射液的干预,观察血必净哮喘小鼠肺泡灌洗液中 ICAM-1、VCAM-1 水平及气道重塑。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BABL/c 小鼠 40 只,购自北京华阜康生物有限公司,使用许可号 SYXK (鲁) 2013-001,实验动物许可证号: SCXK (京) 2014-0004,6~8 周龄,体重 16~20 g,饲养于潍坊医学院动物房,室温 25℃,湿度 50%,12 h 黑白交替,标准饲料,自由取水。

1.2 药物

血必净,天津红日药业有限公司,10 ml/支。

1.3 主要试剂和仪器

卵清蛋白 (OVA) 干粉 (北京索莱宝科技有限公司),水合氯醛、PBS 缓冲液、4% 多聚甲醛 (国药集团化学试剂有限公司),氢氧化铝 (天津博迪化工股份有限公司),ICAM-1 ELISA 试剂盒、VCAM-1 ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司),雾化器 (boy037G 6000 型,Parl 德国),雾化箱 (自

制,20 cm × 20 cm × 20 cm),20 ml 注射器 (威高集团有限公司),HE 染色试剂盒、Masson 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司)。

1.4 分组与模型复制

将小鼠随机分成 5 组:健康对照组 (C 组)、慢性哮喘组 (A 组)、血必净干预 1 周组 (1 组)、血必净干预 2 周组 (2 组) 和血必净干预 3 周组 (3 组),每组 8 只。除对照组之外,每组小鼠均于第 1、8、15 天分别注射卵清蛋白混悬液 OVA [含 100 μg OVA,1 mg Al(OH)₃] 致敏,对照组用等量生理盐水注射;从第 22 天开始将小鼠放入自制的雾化箱内,除对照组外其余各组小鼠每天雾化吸入 1% 的 OVA 15 min 激发,每天吸入 1 次,时间 20 min,雾化至第 56 天,小鼠出现烦躁不安、呼吸急促、腹肌抽搐、大小便失禁、毛发耸立、活动与饮食减少等症状为模型复制成功,复制模型总时间为 8 周。对照组给予相同剂量生理盐水雾化吸入;1、2、3 组从第 57 天开始腹腔注射血必净注射液 4 ml/(kg · d),治疗时间分别为 1、2、3 周。

1.5 肺泡灌洗液的获取与检测

每只小鼠均于末次治疗结束 24 h 后以 6% 水合氯醛 (6 ml/kg) 麻醉后处死,气管切开,以 20 ml 针头作为留置针,以 BPS 缓冲液行全肺灌洗,回收率为 80% 及以上。回收的肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 立即于 3 000 r/min 离心 7 min,取其上清液,编号后置于 -80℃ 冰箱冷冻保存待用。

1.6 肺组织的获取与染色

收集完 BALF 之后立即取肺组织,左肺叶置于 -80℃ 液氮中保存备用。右叶肺用 4% 的多聚甲醛固定并用石蜡包埋,制成 5 μm 厚切片,分别按照 HE 染色试剂盒、Masson 染色试剂盒操作说明书进行染色。

1.7 肺泡灌洗液 ICAM-1、VCAM-1 的检测

取 BALF 上清液以酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) 法严格按照 ICAM-1 ELISA 试剂盒、VCAM-1 ELISA 试剂盒的说明书操作,用酶联仪在 450 nm 波长处测吸光度值,ICAM-1、

VCAM-1 的浓度与吸光度值成正比, 通过绘制标准曲线求出标本中 ICAM-1、VCAM-1 的浓度。

1.8 肺组织形态学分析

病理形态学: 肺组织 Masson 染色显示小鼠气道上下皮胶原纤维沉积情况, 染色成淡蓝色, HE 染色可观察肺组织炎症细胞浸润程度及支气管腔分泌物、黏膜褶皱水肿、气道平滑肌及基底膜情况。气道形态学: 应用 Image Pro Plus 图像分析软件测定支气管基底膜周径 (Pbm)、支气管管壁面积 (WAt)、支气管平滑肌面积 (WAm), 并用 Pbm 标化, WAt/Pbm 表示支气管管壁厚度, 以 WAm/Pbm 表示支气管平滑肌厚度。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 BALF 中 ICAM-1、VCAM-1 水平比较

各组 BALF 中 ICAM-1、VCAM-1 水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); A 组 ICAM-1、VCAM-1 的水平高于其余 4 组 ($P < 0.05$), 说明该模型复制成功; 1 组、2 组、3 组随着血必净干预时间延长, ICAM-1 和 VCAM-1 的水平逐渐下调, 但均高于 C 组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组肺组织形态比较

与 C 组比较, Masson 染色可见 A 组气道上下皮

胶原纤维沉积增多, 血必净干预的 1 组、2 组、3 组随着干预时间延长, 气道上下皮胶原纤维沉积逐渐减少 (见图 1A); HE 染色可见 C 组气道壁光滑连续、无皱褶水肿, 气道管壁无明显增厚, 炎症细胞浸润少, A 组与 C 组比较, 气道壁不连续, 黏膜皱褶水肿增多, 气道平滑肌及基底膜明显增厚, 气道壁周围炎症细胞浸润, 支气管腔分泌物增多, 1 组、2 组、3 组随着血必净干预时间延长, 上述组织病理变化好转 (见图 1B)。

2.3 各组肺组织支气管管壁厚度及平滑肌厚度比较

各组肺组织支气管管壁厚度及平滑肌厚度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); A 组支气管管壁厚度、平滑肌厚度厚于其余 4 组 ($P < 0.05$); 1 组、2 组、3 组支气管管壁厚度、平滑肌厚度逐渐变薄, 但均厚于 C 组 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

表 1 各组 BALF 中 ICAM-1、VCAM-1 水平比较
($n=8$, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	ICAM-1	VCAM-1
C 组	274.14 ± 39.15 ¹⁾	131.80 ± 50.88 ¹⁾
A 组	681.85 ± 80.51 ²⁾	565.27 ± 89.61 ²⁾
1 组	597.43 ± 94.04 ¹⁾²⁾	456.71 ± 66.80 ¹⁾²⁾
2 组	466.25 ± 82.25 ¹⁾²⁾³⁾	343.00 ± 66.80 ¹⁾²⁾³⁾
3 组	349.29 ± 36.03 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	259.54 ± 75.11 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
F 值	45.742	45.095
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与 A 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 C 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 1 组比较, $P < 0.05$; 4) 与 2 组比较, $P < 0.05$

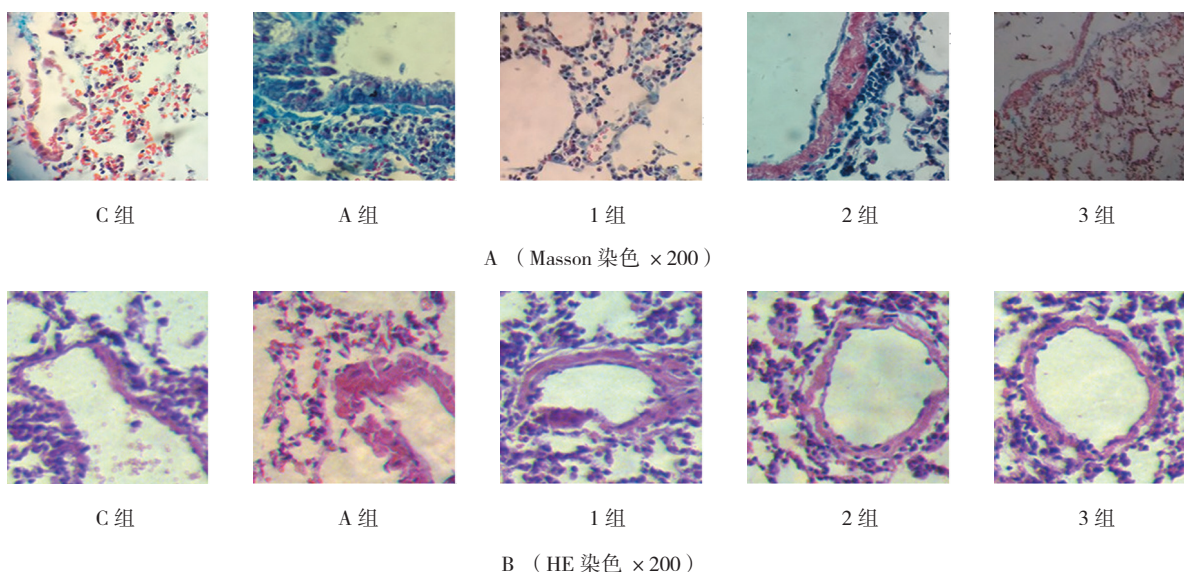


图 1 各组肺组织形态比较

表 2 各组肺组织支气管管壁厚度及平滑肌厚度比较

(n=8, μm , $\bar{x} \pm s$)

组别	支气管管壁厚度	平滑肌厚度
C 组	9.93 ± 0.45 ¹⁾	4.33 ± 0.13 ¹⁾
A 组	18.94 ± 0.40 ²⁾	7.06 ± 0.28 ²⁾
1 组	16.97 ± 0.15 ^{1) 2)}	5.97 ± 0.22 ^{1) 2)}
2 组	14.11 ± 0.28 ^{1) 2) 3)}	5.10 ± 0.13 ^{1) 2) 3)}
3 组	11.91 ± 0.19 ^{1) 2) 3) 4)}	4.89 ± 0.07 ^{1) 2) 3) 4)}
F 值	1067.595	279.109
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与 A 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 C 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 1 组比较, $P < 0.05$; 4) 与 2 组比较, $P < 0.05$

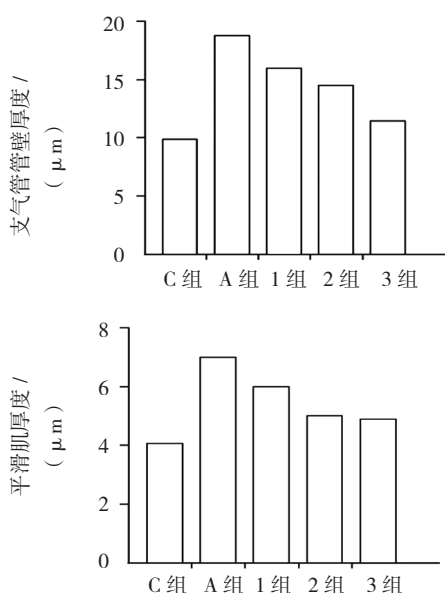


图 2 各组肺组织支气管管壁厚度及平滑肌厚度比较

3 讨论

哮喘在我国的发病率为 0.7% ~ 3.8%^[8], 是最常见的慢性疾病之一, 有研究指出其死亡率占全球总死亡率的 1/250^[9], 且其发病率及死亡率呈逐年增加的趋势^[10]。

哮喘是一种气道慢性炎症性疾病, 气道炎症和气道重塑是哮喘的 2 个重要的病理特征。持续存在的气道炎症是导致气道重塑的主要原因, 而气道重塑又会使患者对吸入激素的敏感性降低, 出现不可逆的气流受限及持续存在的气道高反应性, 也是难治性哮喘死亡率增高的主要原因之一^[4]。ICAM-1、VCAM-1 均为细胞表面产生的免疫球蛋白, 炎症反应时介导细胞与细胞间、细胞与血管内皮间的黏附, 是炎症反应形

成的基础^[5]。VCAM-1 主要在内皮细胞上表达, 可介导内皮细胞与白细胞的黏附。ICAM-1 主要分布于白细胞、内皮细胞、平滑肌细胞上, 主要介导单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞与内皮细胞黏附, 促进淋巴细胞聚集。ICAM-1、VCAM-1 还可促进气道炎症时嗜酸性粒细胞的跨膜转移^[11]。因此, 若能使黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 的水平降低, 减少炎症细胞的黏附和跨内膜迁移^[12], 可有效减轻气道炎症, 从而减轻因长期气道炎症引起的气道重构。从而从根本上提高哮喘患者的生活质量, 甚至治愈哮喘。

现在临床治疗中以糖皮质激素和支气管扩张剂为主, 佐以免疫调节药物, 侧重于缓解支气管哮喘的急性发作, 但是针对气道重塑的药物却很少^[1, 3]。并且糖皮质激素还可以引起高血压、高血糖、高脂血症、骨质疏松症等不良反应^[13-14], 临床中还发现有些哮喘患者对糖皮质激素并不敏感^[15-17], 每每遇到上述情况, 临床治疗就会受到很大限制, 因此寻找一种新型有效的治疗哮喘的药物正日益引起人们的关注。

血必净是一种中药复方制剂, 由中药红花、赤芍、川芎、丹参、当归组成, 具有活血化瘀、疏通脉络、溃散毒邪、消除内毒素的功能, 还具有扩张血管、改善微循环和组织灌注的作用尤其适用于因感染诱发的全身炎症反应性疾病, 现有研究表明血必净可通过抑制炎症介质的释放, 减少炎症反应^[18-19]。有研究提出血必净可有效改善外周血中性粒细胞的趋化^[7], 但未做进一步研究。本研究通过 5 组小鼠的比较发现血必净可使哮喘小鼠 BALF 中黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 水平下降, 且干预时间越长, 下降水平越显著, 从而有效减轻哮喘的炎症反应。通过镜下观察及相关医学图像分析软件测定证实血必净可有效改善哮喘患者的气道重塑。因此大胆推测血必净或许会成为治疗哮喘的新药物, 这为哮喘治疗提供了新思路。

参 考 文 献:

- [1] 黄传君, 张永莲, 丁燕启, 等. 细辛脑联合布地奈德干预哮喘小鼠气道重塑以及炎症因子的表达 [J]. 中华临床医师杂志, 2017, 9(11): 1540-1544.
- [2] 刘成勇, 秦珊, 刘兰英, 等. 穴位贴敷对慢性哮喘小鼠气道重塑及转化生长因子 β_1 /Sma3 表达的影响 [J]. 针刺研究, 2017, 42(2): 153-158.
- [3] 徐增梅, 丁伟伟, 李泽庚. 麻芍平喘汤对哮喘大鼠气道重塑及 TGF- β_1 、PDGF-BB 的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(2): 123-127.
- [4] 刘粉, 吴金香, 赵继萍, 等. 气道上皮 IL-25 促进哮喘气道重塑 [J].

- 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(6): 633-636.
- [5] 窦迎婷, 刘贵颖. 疏风通络方对哮喘大鼠外周血和肺泡灌洗液黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的影响 [J]. 中国中医急症, 2013, 22(5): 693-695.
- [6] 王静, 高燕, 赵雪生, 等. 血必净注射液对重症创伤患者炎症反应的抑制作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18(4): 203-205.
- [7] 丁志欣, 谷丽丽. 血必净注射液治疗全身炎症反应综合征临床疗效分析 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(29): 96-97.
- [8] SONG W J, KANG M G, CHAN Y S, et al. Epidemiology of adult asthma in Asia: toward a better understanding [J]. Asia Pac Allergy, 2014, 4(2): 75-85.
- [9] CAZZOLA M, SEGRETÌ A, CALZETTA L, et al. Comorbidities of asthma: current knowledge and future research needs [J]. Curr Opin Pulm Med, 2013, 19(1): 36-41.
- [10] HOSHINO M, OHTAWA J, AKITSU K. Association of airway wall thickness with serum periostin in steroid-naïve asthma [J]. Allergy Asthma Proc, 2016, 37(3): 225-230.
- [11] KESHAVAN P, DEEM T L, SCHWEMBERGER S J, et al. Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leukocyte migration [J]. J Immunol, 2005, 174: 3709-3718.
- [12] YUSUF-MAKAGIANSAR H, ANDERSON M E, YAKOVLEVA T V, et al. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases [J]. Med Res Rev, 2002, 22(2): 146-147.
- [13] CATES C J, JAESCHKE R, SCHMIDT S, et al. Regular treatment with salmeterol and inhaled steroids for chronic asthma: serious adverse events [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2013(3): CD006922.
- [14] 李航, 刘小虹, 徐卫方. 中药对哮喘 T 细胞亚型免疫调节作用的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(1): 132-136.
- [15] AMMIT A J. Glucocorticoid insensitivity as a source of drug targets for respiratory disease [J]. Curr Opin Pharmacol, 2013, 13(3): 370-376.
- [16] VAZQUEZ-TELLO A, HALWANI R, HAMID Q, et al. Glucocorticoid receptor β -up-regulation and steroid resistance induction by IL-17 and IL-23 cytokine stimulation in peripheral mononuclear cells [J]. J Clin Immunol, 2013, 33(2): 466-478.
- [17] XIONG Y, WANG J, YU H, et al. The effects of nodakenin on airway inflammation, hyper-responsiveness and remodeling in a murine model of allergic asthma [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2014, 36(5): 341-348.
- [18] 刘斌. 血必净联合甲基强的松龙治疗支气管哮喘急性发作期临床研究 [J]. 中国实用医药, 2012, 7(9): 138-139.
- [19] 王光权, 王龙. 血必净注射液对大鼠急性肺损伤的作用 [J]. 现代预防医学, 2011, 38(5): 996-998.

(张蕾 编辑)