



淫羊藿女贞子配伍调节哮喘大鼠 NO/ET 及 HPA 轴作用的研究

刘仁慧¹, 郑君芳², 袁颖³, 郭忻^{3*}

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 2. 首都医科大学 基础医学院, 北京 100069;
3. 上海中医药大学 中药学院, 上海 201203)

[摘要] 目的: 观察淫羊藿女贞子配伍对哮喘大鼠模型 NO/ET 及下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的调节作用。方法: 采用卵蛋白(OVA)致敏、激发复制大鼠慢性哮喘模型, 以阿斯美胶囊为对照药, 检测血清及支气管肺泡灌洗液(BALF)中内皮素(ET), NO, 诱生型一氧化氮合酶(iNOS), 原生型一氧化氮合酶(cNOS)的含量, 血清皮质酮(CORT)、血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)及下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)水平, 肺组织糖皮质激素受体(GCR)蛋白表达。结果: 淫羊藿女贞子能抑制 BALF 中 ET, NO 浓度的升高($P < 0.05$); 能明显下调血及 BALF iNOS 水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 升高血及 BALF 中 cNOS 水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 明显升高血清 CORT 含量($P < 0.01$); 上调肺组织 GCR 的蛋白表达($P < 0.05$)。结论: 淫羊藿女贞子防治哮喘的作用与其对 ET, NO(NOS), HPA 轴调节作用有关。

[关键词] 淫羊藿; 女贞子; 哮喘; ET/NO; HPA 轴

培本方是上海市著名老中医徐辉光教授积 30 余年临床之经验, 根据中医“久病成虚”、“缓则治本”的理论, 独树一帜的创立以平补气血阴阳药物为主组成的复方, 临床上用于哮喘缓解期的治疗, 取得了良好的疗效。通过一系列的基础研究已经证实, 培本方具有抗炎、抗过敏、调节 Th1/Th2 失衡及下丘脑-肾上腺皮质激素等作用^[1-3]。有观点认为哮喘“夙根”论的实质, 主要是指脏腑阴阳失调, 治疗当调理脏腑阴阳^[4]。而肾之阴阳为脏腑阴阳之根本, 肾阴肾阳相互依存, 肾之阴精是化生肾之阳气的物质基础(精化气), 肾之阳气是产生阴精的内在动力(气生精)。故调补阴阳宜遵循补阳不损阴、滋阴不伤阳的原则。本实验以培本方中平补阴阳的代表药物淫羊藿、女贞子药对为研究对象, 遵循原方中二药的配伍比例, 探讨其平补阴阳之作用与调节哮喘发病中的神经-内分泌的关系。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 健康大鼠 50 只, SPF 级, 体重

(130 ± 10) g, 购自中国科学院上海实验动物中心, 合格证号 SCXK(沪)2003-0002。

1.2 药品与试剂 淫羊藿、女贞子等饮片由上海康桥中药饮片有限公司提供。阿斯美胶囊, 每粒含盐酸甲氧苯丙甲胺 12.5 mg, 那可丁 7 mg, 氨茶碱 25 mg, 扑尔敏 2 mg(日本三共株式会社); OVA(Sigma 公司)。NO, NOS(分型)试剂盒(南京建成生物工程研究所); ET 放免药盒(解放军总医院科技开发中心放免所); ACTH 放免分析测定盒(北京北方生物技术研究所); CORT 放免试剂盒(美国 DSL 公司); CRH 测定放免试剂盒(第二军医大学神经生物学教研室); EnVision™ 试剂盒(丹麦 Dako 公司, 即用型)。GCR 抗体(兔抗鼠, 美国 Santa Cruz)。

2 方法

2.1 模型复制 SD 大鼠 50 只, 随即分成 5 组, 即正常对照组、模型组、淫羊藿女贞子组、培本方组、阿斯美组。于实验第 0, 7 天, 除对照组给予 1% 氢氧化铝溶液, 各组动物均以新鲜配制的致敏液($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ OVA, 溶于 1% 氢氧化铝溶液内)作皮下注射, 每鼠在两侧后足跖、腹股沟、腰、背、颈部共取 10 点, 每点注射 0.05 mL, 同时腹腔注射 0.5 mL, 共计 1 mL。于实验第 14 天开始, 将大鼠置于自制雾化箱($40 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$)内, 用超声雾化器以雾化量 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 雾化 1% OVA 生理盐水溶液 15

[稿件编号] 20100127005

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801494); 北京市优秀人才项目(20081D0501800209)

[通信作者] * 郭忻, Tel: (021)51322195, E-mail: guoxin112@citis.net

[作者简介] 刘仁慧, 讲师, 主要从事中药及复方药效学研究, Tel: (010)86074595, E-mail: liurenhui995@163.com



min,每日1次,以激发哮喘。对照组雾化以生理盐水。连续激发3周后,停止激发6d,最后激发1次,24h后处死。

2.2 给药方法 于实验第14天开始ig给药,每日1次。淫羊藿女贞子组给予淫羊藿女贞子(剂量比为4:3)水煎液 $9.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。培本方组给予培本方水煎液 $23.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。阿斯美组给予阿斯美水溶液 $25.11\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。对照组和模型组给予生理盐水。

2.3 观察指标及检测方法 参照相关试剂盒说明书进行检测操作。放免法测定ET,CORT,ACTH,CRH;比色法测定NO,NOS;免疫组化法测定GCR蛋白表达;HE染色法观察肺组织病理变化。

表1 各组大鼠血清及BALF中NO,ET,NO/ET的比较($\bar{x}\pm s,n=10$)

| 组别 | NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | | ET/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ | | NO/ET | |
|--------|---------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------|---------------|
| | 血清 | BALF | 血清 | BALF | 血清 | BALF |
| 对照 | 68.41 ± 16.88 | 75.90 ± 27.84 | 50.62 ± 10.86 | 7.75 ± 1.08 | 0.771 ± 0.234 | 0.122 ± 0.060 |
| 模型 | 121.14 ± 31.40 ¹⁾ | 148.32 ± 31.70 ¹⁾ | 91.31 ± 25.59 ¹⁾ | 12.08 ± 2.82 ¹⁾ | 0.768 ± 0.196 | 0.083 ± 0.015 |
| 淫羊藿女贞子 | 106.37 ± 35.44 | 112.56 ± 46.48 ²⁾ | 82.06 ± 16.49 | 9.40 ± 2.92 ²⁾ | 0.871 ± 0.375 | 0.094 ± 0.040 |
| 培本方 | 86.04 ± 29.36 ³⁾ | 97.28 ± 28.27 ³⁾ | 67.74 ± 16.04 ³⁾ | 8.44 ± 1.97 ³⁾ | 0.863 ± 0.309 | 0.098 ± 0.049 |
| 阿斯美 | 89.31 ± 22.99 ²⁾ | 90.02 ± 23.88 ³⁾ | 64.54 ± 15.96 ³⁾ | 8.60 ± 1.38 ³⁾ | 0.764 ± 0.258 | 0.100 ± 0.024 |

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表2~5同)。

3.2 血清及BALF中NOS浓度的比较 模型组较对照组血及BALF中iNOS含量明显增高($P < 0.01$),cNOS含量明显降低($P < 0.01$);培本方组及

2.4 统计学处理 实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差齐性检验及单因素方差分析;相关分析采用pearson检验和直线回归法。所有资料的统计分析均采用SPSS 13.0软件完成。

3 结果

3.1 血清及BALF中NO/ET的比较 模型组较对照组血及BALF中的ET,NO含量均显著增高($P < 0.01$)。与模型组比较,淫羊藿女贞子配伍组对血中ET,NO含量的影响作用不明显,但对BALF中ET,NO含量有降低作用($P < 0.05$);而培本方全方组对血及BALF中NO,ET的影响作用均较明显。各组动物血清及BALF中NO/ET均无明显差异。见表1。

淫羊藿女贞子配伍组均能明显下调血及BALFiNOS水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),升高血及BALF中cNOS水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠血清及BALF中NOS的比较($\bar{x}\pm s,n=10$)

$\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$

| 组别 | 血清 | | BALF | |
|--------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | iNOS | cNOS | iNOS | cNOS |
| 对照 | 24.57 ± 3.17 | 12.04 ± 3.19 | 5.99 ± 2.22 | 6.26 ± 1.55 |
| 模型 | 35.97 ± 5.09 ¹⁾ | 6.66 ± 3.10 ¹⁾ | 12.31 ± 2.83 ¹⁾ | 2.71 ± 1.46 ¹⁾ |
| 淫羊藿女贞子 | 28.37 ± 4.57 ³⁾ | 10.24 ± 3.47 ²⁾ | 9.41 ± 3.52 ²⁾ | 5.47 ± 3.53 ³⁾ |
| 培本方 | 24.75 ± 4.18 ³⁾ | 9.54 ± 2.60 ²⁾ | 7.02 ± 2.56 ³⁾ | 5.08 ± 1.41 ²⁾ |
| 阿斯美 | 27.74 ± 3.30 ³⁾ | 9.52 ± 2.56 ²⁾ | 8.40 ± 2.36 ³⁾ | 4.22 ± 1.47 |

3.3 血清及BALF中ET/cNOS的比较 与对照组比较,模型组血及BALF中ET/cNOS均明显增高($P < 0.01$)。与模型组比较,培本方及淫羊藿女贞子组均可明显降低BALFET/cNOS($P < 0.05$),但对血ET/cNOS无显著作用。见表3。

3.4 CORT,ACTH,CRH浓度的比较 模型组CORT含量明显降低($P < 0.01$),ACTH及CRH含量虽有降低趋势,但无显著性差异;淫羊藿女贞子配

表3 各组大鼠血清及BALF中ET/cNOS的比较($\bar{x}\pm s,n=10$)

| 组别 | 血清 | BALF |
|--------|----------------------------|---------------------------|
| 对照 | 4.67 ± 2.39 | 1.36 ± 0.47 |
| 模型 | 15.27 ± 6.06 ¹⁾ | 5.49 ± 2.71 ¹⁾ |
| 淫羊藿女贞子 | 9.19 ± 4.40 | 1.81 ± 0.72 ²⁾ |
| 培本方 | 7.78 ± 3.20 | 2.11 ± 0.96 ²⁾ |
| 阿斯美 | 7.40 ± 3.14 ²⁾ | 2.26 ± 0.79 ²⁾ |



伍能明显升高 CORT 含量 ($P < 0.01$), 对 ACTH 及 CRH 含量亦有一定的影响。培本方组明显升高 CORT 含量 ($P < 0.01$), 影响 ACTH 含量。见表 4。

3.5 肺组织 GCR 表达的比较 模型组 GCR 表达

表 4 各组大鼠 CORT, ACTH, CRH 的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 血清 CORT/mg · L ⁻¹ | 血浆 ACTH/ng · L ⁻¹ | 下丘脑 CRH/pg · g ⁻¹ |
|--------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 对照 | 725.93 ± 110.98 | 11.54 ± 6.64 | 376.38 ± 183.65 |
| 模型 | 452.76 ± 176.71 ¹⁾ | 6.84 ± 2.88 | 329.93 ± 154.94 |
| 淫羊藿女贞子 | 719.61 ± 128.18 ³⁾ | 14.73 ± 4.67 ³⁾ | 492.54 ± 156.52 ²⁾ |
| 培本方 | 722.60 ± 129.69 ³⁾ | 14.15 ± 8.19 ³⁾ | 434.07 ± 132.69 |
| 阿斯美 | 596.88 ± 152.27 ²⁾ | 9.93 ± 3.21 | 347.61 ± 137.06 |

的阳性面积 (Area) 和 A 值均明显降低 ($P < 0.01$); 培本方组及淫羊藿女贞子组对 GCR 表达的阳性面积及 A 值均有明显上调作用 ($P < 0.05$)。结果见表 5。

表 5 各组大鼠肺组织 GCR 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 面积/μm ² | A |
|--------|---------------------------------|-----------------------------|
| 对照 | 1 454.15 ± 273.91 | 0.172 ± 0.010 |
| 模型 | 948.47 ± 70.54 ¹⁾ | 0.148 ± 0.012 ¹⁾ |
| 淫羊藿女贞子 | 1 311.02 ± 157.06 ²⁾ | 0.170 ± 0.013 ²⁾ |
| 培本方 | 1 374.86 ± 250.35 ²⁾ | 0.171 ± 0.014 ²⁾ |
| 阿斯美 | 1 251.34 ± 324.62 | 0.158 ± 0.020 |

3.6 支气管肺组织形态学改变 对照组: 支气管肺组织结构正常, 各级支气管上皮细胞完好, 无明显炎症细胞浸润。模型组: 支气管上皮水肿、增厚、脱落、结构紊乱; 杯状细胞增生, 黏膜下层和平滑肌增厚; 管腔变形、狭窄; 气道壁及气道周围有大量炎性细胞浸润, 以嗜酸性粒细胞 (eosinophils, EOS) 为主, 同时可见大量的淋巴细胞和一定量的中性粒细胞; 肺泡壁增厚、水肿, 肺泡壁内细胞成分增多, 肺泡腔变小, 肺泡内有较多的 EOS 浸润。淫羊藿女贞子组: 支气管周围、管壁及肺泡壁可见轻度的 EOS、淋巴细胞等炎性细胞浸润; 支气管上皮水肿较轻, 部分上皮脱落, 肌层略增厚, 杯状细胞轻度增生; 大多数肺泡区接近正常, 肺泡壁内炎性细胞明显减少。培本方组: 道黏膜上皮较完整, 气道周围及管壁炎性细胞浸润明显减轻, 管壁平滑肌厚度基本正常, 少量杯状细胞增生; 肺泡结构基本正常。阿斯美组: 支气管肺组织病变较轻。支气管上皮细胞增生不明显, 部分有脱落; 气道周围及管壁炎性细胞浸润明显减少, 可见少量基层细胞、杯状细胞增生, 平滑肌稍增厚; 肺泡壁明显变薄, 肺泡腔变大, 肺泡壁内细胞成分明显减少。

4 讨论

ET 是目前所知最强的支气管收缩剂, 作用缓慢而持久, ET 不仅是血管内皮细胞 (vascular endothelial cell, VEC) 所产生的一种激素, 而且亦是一种新的

神经递质^[5]。NO 是正常机体气道中的神经因子, 具有舒张支气管和降低气道阻力作用, 但其在哮喘发病中可能因其来源不同而具有双向作用^[6]。哮喘时由于气道上皮损伤使维持气道舒张由 cNOS 产生的神经源性 NO 减少, 因气道炎症刺激可产生大量的 iNOS 而诱生的 NO, 可加重气道充血、渗出、水肿, 诱发或加重气道高反应性 (airway hyperresponsiveness, AHR), 使炎症反应放大。本实验结果显示, 淫羊藿女贞子配伍后主要对 BALF 中的 ET, NO, NOS 有影响作用, 说明二药配伍可能通过阻止局部 ET 的生成和释放, 或抑制其作用, 减轻气道炎症及气道重建, 降低 AHR; 并可通过下调 iNOS 水平, 抑制 iNOS 的致炎作用, 减少内源性 NO 生成, 减轻气道炎症; 并通过上调 cNOS 活性, 从而诱导神经源性 NO 而发挥对气道的舒张作用。

生理状态下 ET/NO 平衡起着维持气道基础张力的重要作用, 但二者在哮喘发病过程中处于失衡状态。由于哮喘发病中 iNOS 活性明显增强, 诱导大量 NO 生成, 使 ET/NO 无法正确反映 ET/NO 失衡对 AHR 的影响。本实验中各组对 ET/NO 的影响作用均无差异; 哮喘模型组 BALF 中 ET/cNOS 升高, 而淫羊藿女贞子却能下调此比值, 亦证实哮喘发病中反应气道基础张力水平的不是 ET/NO, 而是 ET/cNOS, 淫羊藿女贞子配伍能通过调节 ET/cNOS 而缓解 AHR。

此外, 通过相关分析结果显示, 血清与 BALF 中相同指标的相关分析有显著意义的是 NO, iNOS, ET, ET/cNOS (r 分别为 0.354, 0.506, 0.558, 0.337, $P < 0.01$); ET 与 NO (NOS) 水平的相关性分析结果显示, 血 ET 分别与血 NO, iNOS 水平呈显著正相关 (r 分别为 0.412, 0.348, $P < 0.01$), 并与血 cNOS 呈负



相关(r 为 -0.300 , $P < 0.05$); BALF ET 分别与 BALF NO, iNOS 水平呈显著正相关(分别为 r 为 $0.363, 0.365$, $P < 0.01$), 与 BALF cNOS 不相关($r = 0.106$)。ET, NO, iNOS 水平彼此相关, 提示三者同作为哮喘的炎症反应指标, 可能在哮喘的发病过程中彼此影响, 而降低 ET, NO, iNOS 水平及影响各指标之间的相互作用可能是淫羊藿女贞子配伍防治哮喘的机制之一。

大量临床及实验研究表明, 哮喘存在下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴不同程度的抑制现象, 体内糖皮质激素(glucocorticoid, GC)浓度不足, 使哮喘炎症反应加重并增加过敏性哮喘的易感性, 也许这是哮喘长期反复发作的机制之一; 而 GC 在体内发挥作用依赖于和胞内 GCR 的结合, GCR 是决定靶细胞对 GC 反应性的关键因素之一, GCR 缺陷在哮喘发病机制中具有重要意义^[7]。本实验相关分析结果显示, 血清 CORT 水平与肺组织 GCR 表达的面积和 A 值均呈显著正相关(r 分别为 $0.723, 0.686$, $P < 0.01$), 提示哮喘致病与治疗过程中 GC 与 GCR 的协同作用。哮喘模型 CORT 含量明显降低($P < 0.01$), ACTH 及 CRH 含量有降低趋势, 肺组织 GCR 表达的面积和 A 值均

明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较, 淫羊藿女贞子配伍能明显升高 CORT 含量($P < 0.01$), 并有上调 ACTH, CRH 含量的作用($P < 0.05$); 对 GCR 表达的面积和 A 值均有明显的影响($P < 0.05$), 提示二者配伍后有影响 HPA 轴及增强 GCR 在肺组织的蛋白表达的作用, 其治哮喘的作用机制与调节内源性 GC 有关。

[参考文献]

- [1] 郭忻, 冯怡, 符胜光, 等. 培本方抗变态反应的研究[J]. 中成药, 1997, 19(12): 31.
- [2] 刘仁慧, 郭忻. 培本方调节哮喘大鼠 Th1/Th2 失衡作用的实验研究[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 32(5): 423.
- [3] 黄琦, 刘仁慧, 郭忻. 培本方调节哮喘大鼠 HPA 轴紊乱的实验研究[J]. 上海预防医学杂志, 2005, 17(12): 568.
- [4] 王鹏, 陈铁清, 张得新. 中医哮喘学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 154.
- [5] Minami K, Mnnky E, Shongea U, et al. Effect of endothelin[J]. Biochem Pharmacol, 1995, 49(4): 1051.
- [6] Kharitonov S A, Yates D, Robbins R A, et al. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients[J]. Lancet, 1994, 343(8890): 133.
- [7] 胡克. 糖皮质激素受体与支气管哮喘[J]. 国外医学·呼吸系统分册, 1994, 14(2): 61.

Adjustment effects of Herba Epimedii, Fructus Ligustrilucidi on NO/ET, HPA axis in asthmatic rats

LIU Renhui¹, ZHENG Junfang², YUAN Ying³, GUO Xin^{3*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

3. College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the neuro-endocrine adjustment effects of Herba Epimedii and Fructus Ligustrilucidi on the asthmatic rats. **Method:** Rat asthma model was duplicated by OVA (ovalbumin) through sensitizing and challenging. Fifty male rats were randomly divided into normal group, model group, adjustment group of Herba Epimedii and Fructus Ligustrilucidi, Peibenfang group and Asimei capsule group. Investigating levels of ET (Endothelin), NO, iNOS (inducible NOS), and cNOS (constitutive NOS) in blood serum and BALF (bronchoalveolar lavage fluid), CORT (corticotrophin) in serum, ACTH (adrenocorticotropin hormone) in plasma, CHR (corticotropin release hormone) in hypothalamus, protein expression of GCR (glucocorticoid receptor) in lung tissue. **Result:** The adjustment of Herba Epimedii and Fructus Ligustrilucidi could inhibit ET and NO content in BALF (all $P < 0.05$), decrease the level of iNOS in serum and BALF ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and increase the level of cNOS in serum and BALF ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), raise the concentration of serum CORT ($P < 0.01$), enhance the protein expression of GCR in lung tissue ($P < 0.05$). **Conclusion:** The preventive and therapeutic effect of Herba Epimedii and Fructus Ligustrilucidi on asthma relates to their adjustment effect on ET/NO and HPA axis.

[Key words] Herba Epimedii; Fructus Ligustrilucidi; asthma; ET/NO; HPA axis

doi: 10.4268/cjcm20101219

[责任编辑 张宁宁]