

哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠的治疗作用 及抗氧化作用机制

侯丹^{1,2}, 黄帅阳^{1,2}, 吕明圣^{1,2}, 弓雪峰^{1,2}, 崔红生^{1*}

(1. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029;

2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**观察哮喘宁颗粒对心理应激性哮喘大鼠的治疗作用及抗氧化机制。**方法:**6周龄雄性SD大鼠随机分为正常组、哮喘组、应激组、应激哮喘组、中药组(哮喘宁颗粒2.48 g·g⁻¹灌胃)、西药组(布地奈德混悬液雾化);第1,8天腹腔注射10%卵蛋白(OVA),氢氧化铝混合液+第15天开始1%OVA溶液雾化激发建立哮喘模型;其中应激组、应激哮喘组、中药组、西药组从第1天起给予束缚刺激,连续刺激28 d,最终建立心理应激性哮喘模型;第15天开始各组连续干预2周。第15,28天进行糖水偏好实验,旷场实验检测;实验结束,检测体质量,血清白细胞介素(IL)-4,IL-5,IL-13含量;肺组织丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽(GSH)水平;肺苏木素-伊红(HE)染色;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织核因子E₂相关因子2(Nrf2),血红素氧合酶-1(HO-1)蛋白表达。**结果:**与应激哮喘组比较,中药组大鼠体质量、糖水消耗率、旷场路程明显升高($P<0.05$);血清IL-4,IL-5,IL-13含量明显降低($P<0.05$);肺组织SOD,GSH水平明显升高($P<0.05$),MDA水平明显降低($P<0.05$);HE染色显示中药组支气管黏膜损伤较轻,炎细胞浸润、腺体增生、上皮变性坏死等明显减轻;与应激哮喘组比较,中药组肺组织Nrf2,HO-1蛋白表达明显升高($P<0.05$)。**结论:**哮喘宁颗粒具有调节心理应激性哮喘大鼠心理应激状态作用,同时缓解气道炎症反应、抗氧化,与其上调Nrf2/HO-1蛋白表达相关。

[关键词] 哮喘宁颗粒;心理应激哮喘大鼠;心理应激;氧化应激;核因子E₂相关因子2/血红素氧合酶1

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0055-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212224

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210928.0855.003.html>

[网络出版日期] 2021-09-28 17:50

Therapeutic Effect and Antioxidant Mechanism of Xiaochuanning Granule on Psychological Stress Related Asthma in Rats

HOU Dan^{1,2}, HUANG Shuai-yang^{1,2}, LYU Ming-sheng^{1,2}, GONG Xue-feng^{1,2}, CUI Hong-sheng^{1*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the therapeutic effect and antioxidant mechanism of Xiaochuanning granule on psychological stress-related asthma in rats. **Method:** The 6-week-old male SD rats were randomly divided into the normal group, asthma group, stress group, stress-related asthma group, western medicine group (atomization of budesonide suspension) and traditional Chinese medicine (TCM) group (Xiaochuanning granule 2.48 g·kg⁻¹). The asthma model was established during 28 days by intraperitoneal injection of 10% ovalbumin(OVA) on the 1st and 8th days and inhaling of vapourized 1% OVA started at the 15th day. Stress group, stress-related asthma group, western medicine group and TCM group were given restraint stimulation during the

[收稿日期] 20210726(011)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82074390)

[第一作者] 侯丹,博士,主治医师,从事中医药防治肺系疾病的研究,E-mail:859669724@qq.com

[通信作者] * 崔红生,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事中医药防治肺系疾病的研究,E-mail:hshcui@sina.com

28 days to establish the psychological stress-related asthma model. Rats in each group were administered with corresponding drug for 14 days from the 15th day. The sucrose preference test and open field test were performed at the 15th and 28th days. At the end of experiment, the body weight, serum interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5) and interleukin-13 (IL-13) levels, as well as the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in lung tissues were detected by assay kits. Hematoxylin-eosin (HE) staining was conducted to observe the pathological changes in lung tissues. Meanwhile, Western blot was used to detect the protein expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and hemeoxygenase-1 (HO-1) in lung tissues. **Result:** Compared with the stress-related asthma group, the body weight, sugar water consumption rate and open field distance in the TCM group were significantly increased ($P<0.05$), and the serum IL-4, IL-5, IL-13 levels were significantly decreased ($P<0.05$), the levels of SOD and GSH in lung tissues increased significantly ($P<0.05$), while the level of MDA decreased significantly ($P<0.05$). HE staining showed that the bronchial mucosal injury, inflammatory cell infiltration, gland hyperplasia, epithelial degeneration and necrosis were significantly ameliorated in the TCM group than in the stress-related asthma group. The expression of Nrf2 and HO-1 protein in lung tissues also increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion:** Xiaochuanning Granule can regulate the psychological stress state of stress-related asthmatic rats, alleviate airway inflammatory reaction, and suppress oxidation, which is related to its up-regulation of the Nrf2/HO-1 protein expression.

[Keywords] Xiaochuanning granule; psychological stress-related asthmatic rats; psychological stress; oxidative stress; nuclear factor erythroid 2-related factor 2/hemeoxygenase-1

近年由于生活方式和工作方式的转变,工作压力、焦虑、抑郁状态等心理因素在哮喘的发病中越来越受到研究者重视。报道显示,焦虑、抑郁等心理因素长期慢性刺激导致哮喘的发病率升高,同样也影响哮喘的预后^[1];另有调查显示过敏性哮喘患者抑郁发生率为45%,焦虑发生率为52%,均高于正常人群^[2]。因此,心理应激哮喘作为支气管哮喘的一个重要表型被提出,被认为与“神经-内分泌-免疫”网络失衡密切相关^[3]。目前临床治疗以 β_2 受体激动剂、糖皮质激素控制、缓解为主,虽然这些治疗能够缓解哮喘患者气道炎症反应,但对心理应激状态无治疗作用,使得疾病反复发作;而抗焦虑、抑郁药物的呼吸道抑制作用也成为治疗禁忌^[4]。因此,发现心理应激哮喘有效药物符合临床迫切需求。

“肝失疏泄”是心理应激发生的关键;肝肺两脏生理相关、病理相因,因此,调肝理肺法是治疗心理应激哮喘基本治法^[5-6],哮喘宁颗粒(柴胡、白芍、枳壳、炙甘草、黄芩、清半夏、炙麻黄、葶苈子、前胡、地龙、丹参)基于此法组方而成,以《伤寒论》四逆散、小柴胡汤疏解少阳郁结,配以炙麻黄、葶苈子、前胡、地龙等理肺平气,共奏调肝理肺之功。课题组前期研究发现,哮喘宁颗粒具有抑制气道免疫炎症反应,调节机体免疫平衡作用^[7-9],但具体作用机制尚缺乏深入研究。

炎症反应和氧化应激是哮喘发生的关键因素,二者互相影响,而核因子 E_2 相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)是调节氧化应激的重要信号通路,具有抗炎作用,同时,Nrf2/HO-1受免疫炎症反应介质激活^[10-11]。因此,Nrf2/HO-1是研究哮喘治疗的重要分子靶点。本研究通过慢性束缚刺激建立大鼠心理应激哮喘模型,通过观察哮喘宁颗粒对大鼠心理应激及炎症反应、氧化应激的作用,进一步探讨其机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠,体质量120~140 g,4~5周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SYXK(京)2020-0033。大鼠饲养于北京中医药大学SPF级动物实验室,温度(23±2)℃,湿度(55±10)%,12 h/12 h光照黑暗循环,自由摄食饮水。所有大鼠喂养普通全价营养颗粒鼠饲料。本研究经北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会审核通过,批号BUCM-4-2020122303-4150。

1.2 药物与试剂 哮喘宁颗粒由柴胡10 g,白芍10 g,枳壳10 g,炙甘草6 g,黄芩10 g,清半夏9 g,炙麻黄6 g,葶苈子10 g,前胡10 g,地龙10 g,丹参15 g组成,由北京康仁堂药业有限公司所生产制备的浓缩配方颗粒剂,批号分别为21010771,21014001,

21004161, 21003471, 21012201, 21011221, 20040921, 21011071, 20041691, 21007351, 21003421, 每剂中药颗粒剂配方为9 g/袋,由北京中医药大学第三附属医院中药房统一采购。

布地奈德混悬液(瑞典Astrazeneca AB公司,批号MAN2020-02);苏木素、伊红染液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20200235,20200926);卵清蛋白(OVA),氢氧化铝佐剂,血清白细胞介素(IL)-4, IL-5试剂盒(美国Sigma公司,批号分别为SLCH2414, VE301887, 202012087, 202012037); IL-13试剂盒(上海信裕生物科技有限公司,批号bsk00370);丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20200406, 20200507, 202012013);兔抗鼠Nrf2多克隆抗体,兔抗鼠HO-1多克隆抗体,兔抗鼠 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体,羊抗兔二抗(美国CST公司,批号分别为12721, 86806, 4970, 14708);ECL发光液(美国Bio-Rad公司,批号170-5060)。

1.3 仪器 7160型全自动生化仪(日本日立公司);E9032型酶标仪(美国Promega公司);BX53型光学显微镜(日本Olympus公司);Mini-PROTEAN Tera System垂直电泳仪,转移槽,ChemiDoc™ XRS+with Image Lab™ Software型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 造模与给药 大鼠适应性喂养1周,随机数字表法按体质量分为正常组、哮喘组、应激组、应激哮喘组、中药组、西药组,每组6只。参照文献建立心理应激哮喘大鼠模型^[12-13],哮喘组、应激哮喘组、中药组、西药组分别于实验第1,8天大鼠腹腔注射致敏液1 mL(含OVA 100 mg,氢氧化铝0.25 mL,生理盐水0.75 mL);第15天开始每天雾化吸入1%OVA溶液激发20 min(流量2 mL·min⁻¹),连续14 d。从致敏之日(实验第1天)起将应激组、应激哮喘组、中药组、西药组大鼠每天束缚制动1次,第1天为2 h,以后每天增加10 min,束缚期间禁食水,每日束缚制动开始时间及持续时间均不相同,连续28 d。

实验第15天开始,各组大鼠每天激发前2 h予以灌胃及雾化吸入给药。结合课题组前期研究,按体表面积法换算给药剂量,中药组予以哮喘宁颗粒(2.48 g·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃^[14],其余各组均予等量生理盐水灌胃;西药组予吸入用布地奈德混悬液雾化(0.5 g·L⁻¹,持续30 min),其余各组均予等量生理盐

水雾化吸入,连续14 d。

2.2 行为学检测 实验第15天进行糖水偏好实验、旷场实验评价心理应激模型,同时实验28 d行以上2个行为学检测评价治疗效果。

2.2.1 糖水偏好实验 实验15,28 d进行大鼠糖水偏好度实验^[15-16]。糖水实验开始前对大鼠进行适应含糖饮水训练,即每笼放置2个装有1%蔗糖水的饮水瓶,24 h后将其中1瓶置换为纯净水,再饲养24 h,对换2瓶水位置。糖水实验开始前24 h禁水,每只大鼠单笼放置,每笼分别给予1瓶1%蔗糖水和1瓶纯净水,记录2 h每笼大鼠的糖水和纯净水消耗量,计算糖水消耗率=每只大鼠糖水消耗量/(糖水消耗量+纯水消耗量)×100%。

2.2.2 旷场实验 实验15,28 d进行大鼠旷场行为学实验,参考相关文献^[17-18]进行,准备敞箱大小为1 m×1 m×0.4 m,将箱底平分为25个大小相等的正方形小格;将正中9个小格划分为中央区,正中中部小格为正中格,于正中格正上方悬挂摄像头。采用上海新软信息科技有限公司Version 2.0分析软件记录大鼠活动轨迹,实验开始后,单只大鼠放置于中央区,记录5 min内大鼠在不同区域活动长度;每只实验结束后75%乙醇擦拭敞箱底部进行消毒。

2.3 标本采集 实验结束后,禁食不禁水过夜,按40 mg·kg⁻¹标准腹腔注射1%戊巴比妥钠溶液麻醉,腹主动脉采血,取血清待用;结扎左侧肺主支气管,行右侧肺泡灌洗,低温剖取右肺冻存待用;左侧肺剖取置于4%多聚甲醛待用。

2.4 一般情况观察 观察各组大鼠一般状态(精神状态、活动情况、毛色等),记录体质量变化。

2.5 血清炎症因子检测 取大鼠血清酶联免疫吸附测定法检测血清IL-4, IL-5, IL-13含量;操作步骤按试剂盒步骤进行。

2.6 肺组织氧化应激指标检测 取大鼠冻存肺组织,预冷匀浆,抽取上清液,按试剂盒步骤检测肺组织MDA, SOD, GSH水平。

2.7 苏木素-伊红(HE)染色观察病理学改变 左肺于4%多聚甲醛定48 h,石蜡包埋,连续切片机切片(4 μ m厚度),烤片等制作石蜡切片。二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水,苏木素染色5 s,返蓝1 min,1% HCl-乙醇分色30 s,伊红染色5 s,梯度乙醇、二甲苯脱水,中性树脂胶封片。选取同一层级支气管采集图像,进行光镜下观察病理结构变化。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达 取大鼠冻存肺组织, RIPA裂解液提取总蛋白,

BCA法蛋白定量;10%SDS-PAGE凝胶,100 V,2 h电泳分离蛋白,半干转法转膜(100 A,2 h),5%脱脂奶粉室温封闭45 min,一抗(1:1 000)4 °C孵育过夜;洗膜后二抗(1:1万)室温孵育1 h;洗膜后ECL发光液反应,凝胶成像系统成像,Image J 7.0分析蛋白条带灰度值,蛋白表达水平用目的蛋白与内参蛋白灰度比值来表示。

2.9 统计学方法 利用SPSS 20.0软件处理数据, $\bar{x} \pm s$ 进行表示,多组间比较采用单因素方差分析方法;两组间比较,满足方差齐性时用最小显著性差异法(LSD)检验,不满足方差齐性时用非参数检验; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠一般情况影响 喂养4周后,正常组大鼠精神良好,反应灵敏,动作灵活,皮毛光泽。应激组、应激哮喘组、西药组大鼠精神紧张、反应激烈,毛发散乱;中药组大鼠精神平稳,灵活度可,皮毛光泽。干预前1 d各组大鼠体质量差异无统计学意义。造模第15天,与正常组比较,各造模组大鼠体质量明显降低($P < 0.05$)。实验第28天,与应激哮喘组和西药组比较,中药组体质量明显升高($P < 0.05$)。见表1。

3.2 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠糖水实验的影响 造模第15天,与正常组比较,应激组、应激哮喘组、中药组、西药组大鼠糖水消耗率明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明大鼠存在心理应激状态。实验第28天,与应激哮喘组和西药组比较,中药组大鼠糖水消耗率明显升高($P < 0.05$)。见表2。

表3 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠旷场实验影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Xiaochuanning granule on open-field test of psychological stress asthmatic rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量	15 d		28 d	
		中央区路程	总路程	中央区路程	总路程
正常		6.74±1.02	23.45±3.26	7.06±2.43	24.35±3.48
应激		3.25±1.47 ¹⁾	16.14±2.63 ¹⁾	2.14±1.33 ¹⁾	15.53±4.26 ¹⁾
哮喘		6.57±1.22	22.46±3.72	6.79±3.84	21.68±3.65
应激哮喘		3.16±0.84 ¹⁾	15.68±3.87 ¹⁾	2.07±1.03 ¹⁾	14.74±4.51 ¹⁾
中药	2.48 g·kg ⁻¹	3.31±1.18 ¹⁾	14.27±3.46 ¹⁾	5.39±1.21 ^{2,3)}	19.56±2.36 ^{2,3)}
西药	0.5 g·L ⁻¹	3.27±1.02 ¹⁾	15.69±2.15 ¹⁾	2.85±1.07	14.17±3.28

3.4 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠血清炎症因子的影响 与正常组比较,哮喘组、应激哮喘组、中药组、西药组大鼠血清IL-4,IL-5,IL-13水平明显升高($P < 0.05$);与应激哮喘组比较,中药组、西药组大鼠血清IL-4,IL-5,IL-13含量明显降低($P < 0.05$)。

表1 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Xiaochuanning granule on body weight of psychological stress asthmatic rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量	1 d	15 d	28 d
正常		158.08±7.67	274.10±19.53	348.63±17.80
应激		158.58±10.25	249.43±13.90 ¹⁾	292.59±14.54
哮喘		159.87±10.51	234.70±15.37 ¹⁾	318.87±20.06
应激哮喘		157.45±12.89	211.96±17.49 ¹⁾	258.35±17.27
中药	2.48 g·kg ⁻¹	157.55±8.39	206.49±16.09 ¹⁾	276.95±9.41 ^{2,3)}
西药	0.5 g·L ⁻¹	159.52±10.22	216.82±13.53 ¹⁾	240.55±20.62

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与应激哮喘组比较²⁾ $P < 0.05$;与西药组比较³⁾ $P < 0.05$ (表2~6同)。

表2 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠糖水实验的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Xiaochuanning granule on sugar water experiment of psychological stress asthmatic rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量	糖水消耗率/%	
		15 d	28 d
正常		78.46±2.39	80.13±2.68
应激		66.72±3.66 ¹⁾	53.86±3.83 ¹⁾
哮喘		77.62±3.16	79.26±3.74
应激哮喘		65.48±2.07 ¹⁾	52.57±3.27 ¹⁾
中药	2.48 g·kg ⁻¹	64.82±3.57 ¹⁾	75.27±2.93 ^{2,3)}
西药	0.5 g·L ⁻¹	66.07±2.45 ¹⁾	54.43±3.15

3.3 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠旷场实验影响 造模第15天,与正常组比较,应激组、应激哮喘组、中药组、西药组大鼠中央区及总路程降低($P < 0.05$)。第28天,与应激哮喘组和西药组比较,中药组大鼠中央区及总路程升高($P < 0.05$)。见表3。

见表4。

3.5 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠肺组织氧化应激指标的影响 与正常组比较,哮喘组、应激哮喘组、中药组大鼠肺组织MDA水平明显升高($P < 0.05$),SOD,GSH水平明显降低($P < 0.05$);与应激哮喘

表4 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠血清炎症因子的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of Xiaochuanning granule on Serum factor of psychological stress asthmatic rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	剂量	IL-4	IL-5	IL-13
正常		15.35±1.46	17.16±1.23	23.41±1.07
应激		16.22±2.03	19.03±1.14	36.35±3.53
哮喘		56.27±2.26 ¹⁾	36.12±1.63 ¹⁾	103.94±4.34 ¹⁾
应激哮喘		78.64±3.85 ¹⁾	42.43±2.46 ¹⁾	142.26±6.28 ¹⁾
中药	2.48 g·kg ⁻¹	34.57±3.56 ^{1,2)}	25.16±1.73 ^{1,2)}	57.36±3.25 ^{1,2)}
西药	0.5 g·L ⁻¹	26.14±2.78 ^{1,2)}	19.47±1.74 ^{1,2)}	41.35±2.53 ^{1,2)}

喘组比较,中药组、西药组大鼠肺组织MDA水平明显降低($P<0.05$),SOD,GSH水平明显升高($P<0.05$);与西药组比较,中药组大鼠肺组织MDA水平明显升高($P<0.05$),SOD水平明显降低($P<0.05$)。见表5。

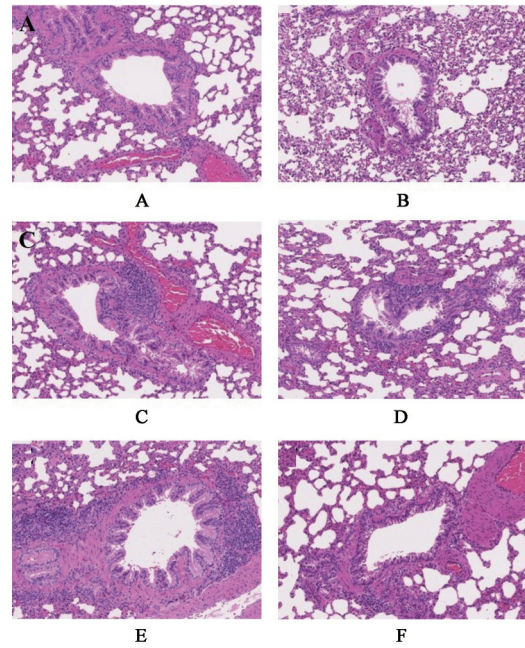
表5 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠肺组织氧化应激指标的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 5 Effect of Xiaochuanning granule on oxidative stress index of psychological stress asthmatic rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量	MDA / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	SOD / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	GSH / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
正常		0.65±0.11	67.39±4.64	10.57±1.53
应激		0.72±0.03	66.68±4.73	9.37±0.64
哮喘		1.53±0.08 ¹⁾	16.75±3.68 ¹⁾	3.14±0.46 ¹⁾
应激哮喘		1.74±0.10 ¹⁾	15.57±2.14 ¹⁾	3.62±0.23 ¹⁾
中药	2.48 g·kg ⁻¹	0.92±0.07 ^{1,2,3)}	25.16±1.73 ^{1,2,3)}	7.84±0.13 ^{1,2)}
西药	0.5 g·L ⁻¹	0.70±0.13 ²⁾	61.36±4.35 ²⁾	9.45±0.32 ²⁾

3.6 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠肺组织形态学的影响 大鼠肺组织HE染色,正常组、应激组大鼠肺组织、支气管结构完整,各层结构清晰可见,细胞排列整齐,无异常增生及细胞浸润;哮喘组、应激哮喘组肺组织及支气管可见上皮细胞脱落,气道狭窄,黏液腺增生扩张,各层结构紊乱,细胞排列混乱,大量炎细胞浸润;西药组气管壁炎细胞浸润减轻,但仍见上皮细胞脱落,腺体细胞增生,排列扭曲;中药组支气管黏膜损伤较轻,炎细胞浸润、腺体增生、上皮变性坏死等较应激哮喘组、哮喘组明显减轻。见图1。

3.7 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠肺组织Nrf2,HO-1蛋白表达的影响 与正常组比较,哮喘组、应激哮喘组大鼠肺组织Nrf2,HO-1蛋白表达明显降低($P<0.05$);与应激哮喘组比较,中药组、西药组大鼠



A. 正常组;B. 应激组;C. 哮喘组;D. 应激哮喘组;E. 中药组;F. 西药组(图2同)

图1 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠肺组织形态学的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Xiaochuanning granule on lung tissue morphology of CVA rats (HE,×200)

肺组织Nrf2,HO-1蛋白表达明显升高($P<0.05$)。说明中药哮喘宁颗粒有明显改善大鼠肺部氧化应激作用。见表6,图2。

表6 哮喘宁颗粒对心理应激哮喘大鼠肺组织Nrf2,HO-1蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 6 Effect of Xiaochuanning granule on Nrf2,HO-1 protein expression of psychological stress asthmatic rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量	Nrf2/ β -actin	HO-1/ β -actin
正常		1.13±0.07	1.04±0.05
应激		1.01±0.06	1.00±0.11
哮喘		0.36±0.08 ¹⁾	0.32±0.04 ¹⁾
应激哮喘		0.22±0.03 ¹⁾	0.24±0.05 ¹⁾
中药	2.48 g·kg ⁻¹	0.86±0.02 ²⁾	0.79±0.03 ²⁾
西药	0.5 g·L ⁻¹	0.93±0.01 ²⁾	0.95±0.07 ²⁾

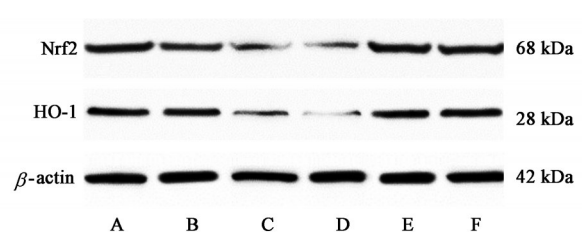


图2 各组大鼠肺组织Nrf2,HO-1蛋白表达电泳

Fig 2 Electrophoresis of Nrf2,HO-1 protein expression of each group

4 讨论

近年心理应激作为哮喘发作及加重的关键因素,得到国内外学者普遍认同。临床研究发现,哮喘患者存在不同程度的焦虑、抑郁,发生率明显高于正常人群;改善患者心理应激状态,大大提高哮喘的控制率和疗效^[19]。机制方面则认为,心理应激引起机体神经-内分泌-免疫网络的异常活动,刺激中枢神经系统释放神经递质或通过激活下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴、自主神经系统,释放糖皮质激素、肾上腺素、去甲肾上腺素等应激激素及乙酰胆碱(ACh),诱发或加重肺部T细胞介导的免疫炎症反应^[20]。因此,有效控制心理应激、改善炎症反应是心理应激哮喘治疗的关键。本研究结果发现,哮喘宁颗粒明显改善心理应激哮喘大鼠糖消耗量和旷场实验不同区域路程,表明能有效治疗大鼠的心理应激;同时,降低大鼠血清炎症因子IL-4, IL-5, IL-13水平,说明其抗炎疗效确切。

中医认为“肝主疏泄、肝主情志”,情志失和,导致肝气不疏,气机郁滞,产生各种情志疾病,这与心理应激反应相切合。“肝生于左,肺藏于右”,肝肺两脏生理相关、病理相因,是人体气机运转之枢机;情志不遂,肝气亢害,反侮肺金,肺失肃降,气逆于上而发咳喘^[21-22]。因此,肝失疏泄、肝肺失和是心理应激哮喘的主要病机特点。基于肝主疏泄、肝肺相关理论,首都国医名师武维屏教授力倡调肝理肺法治支气管哮喘,创制哮喘宁颗粒,课题组在此基础上将调肝理肺功效的哮喘宁颗粒用于心理应激哮喘的治疗和研究^[14],方中以四逆散方义疏解肝阳之郁逆,以小柴胡汤方义和调少阳之枢机,合炙麻黄、葶苈子、前胡、地龙等理肺平气,共奏调肝理肺之功。

哮喘发生过程中气道炎症反应导致氧化/抗氧化失衡;而过氧化物的堆积,一方面激活炎症相关基因转录因子,推动炎症介质分泌,另一方面直接作用于气道平滑肌、肺泡上皮细胞加重气道高反应和氧化损伤^[23-24]。因此,抗氧化物质在哮喘发生过程中至关重要。SOD, GSH是机体有效的抗氧化酶;MDA则是氧化活性物质,研究表明哮喘小鼠肺泡灌洗中SOD, GSH降低,而MDA升高^[25]。本研究中,哮喘宁颗粒治疗后大鼠肺组织SOD, GSH水平升高,MDA水平降低,与既往研究一致。Nrf2/HO-1是调节氧化应激的转录因子。过氧化物堆积或炎症因子刺激,使得细胞质中Nrf2向核内转移,调节转录,启动下游HO-1的表达发挥抗炎抗氧化作用,

降低了过敏原诱导的气道高反应、气道上皮细胞的分泌黏液和Th2细胞因子(IL-13, IL-5, IL-4)的释放^[26]。本研究发现哮喘宁颗粒能够明显上调大鼠肺组织Nrf2, HO-1蛋白表达,从而抑制氧化应激和炎症因子释放。

综上所述,哮喘宁颗粒能够改善心理应激哮喘大鼠的应激状态,通过调节Nrf2/HO-1发挥抗氧化,抑制肺部炎症反应的作用,为哮喘宁颗粒药理作用机制研究提供一定基础。但哮喘宁颗粒作为中药复方具有多靶点、多途径的特点,其是否通过其他途径发挥作用是下一步研究的关注点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] MARSHALL J R. Psychological stress, immune dysfunction, and allergy: opportunities for improved patient health [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2020, 125(4):365-366.
- [2] 范淑红,郝玉娥. 过敏性哮喘患者心理应激与希望水平的相关性研究及其目标干预[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2020, 42(S1):36-39.
- [3] OHNO I. The interrelationship between asthma and brain activities: psychological stress-related asthma as a new asthma phenotype [J]. *Arerugi*, 2017, 66(3): 153-160.
- [4] XU Z X, MENG L L, XIE Y J, et al. lncRNA pcgem1 strengthens anti-inflammatory and lung protective effects of montelukast sodium in children with cough-variant asthma [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2020, 53(7):e9271-e9281.
- [5] 崔红生,靳锐锋,田彦. 情志因素与支气管哮喘证治探析[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(3):771-773.
- [6] 武维屏,崔红生. 试论支气管哮喘从肝论治的生理病理学基础[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2002, 8(10): 7-8.
- [7] 弓雪峰,任培中,崔红生,等. 基于网络药理学探讨哮喘宁颗粒防治心理应激哮喘的作用网络与潜在机制[J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41(4):576-589.
- [8] 单敏敏,李长安,崔红生. 哮喘宁颗粒对哮喘大鼠Th1/Th2平衡和STAT1通路调节作用的研究[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(10):11-15.
- [9] 单敏敏,李长安,崔红生. 哮喘宁颗粒对哮喘大鼠白三烯B4、白三烯C4、C-反应蛋白表达的调节作用[J]. *世界中西医结合杂志*, 2019, 14(1):1-3, 12.
- [10] CHEN Y Q, KONG Y, WANG Q L, et al. Schisandrin B attenuates airway inflammation by regulating the NF- κ B/Nrf2 signaling pathway in mouse

- models of asthma [J]. *J Immunol Res*, 2021, 7(28): 8029963-8029972.
- [11] XIAN Z M, CHOI Y H, ZHENG M Y, et al. Imperatorin alleviates ROS-mediated airway remodeling by targeting the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(5):898-910.
- [12] KAWANO T, OUCHI R, ISHIGAKI T, et al. Increased susceptibility to allergic asthma with the impairment of respiratory tolerance caused by psychological stress [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2018, 177(1):1-15.
- [13] 李长安,胡晓玲,崔红生,等. 心理应激哮喘大鼠模型的建立与评价[J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39(12): 1033-1040.
- [14] 李长安. 心理应激哮喘大鼠模型的建立及调肝理肺法作用机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [15] MIYASAKA T, DO K, TAKAHASHI T, et al. The interplay between neuroendocrine activity and psychological stress-induced exacerbation of allergic asthma [J]. *Allergology International*, 2018, 67(1): 32-42.
- [16] 王一旭,李媛媛,张碧涛,等. 逍遥散对慢性不可预知温和应激大鼠下丘脑弓状核 JAK/STAT 通路变化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(21):21-27.
- [17] HU C, LUO Y, WANG H, et al. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9):e0185129-e0185138.
- [18] JIN S, ZHAO Y, JIANG Y, et al. Anxiety-like behaviour assessments of adolescent rats after repeated maternal separation during early life [J]. *Neuroreport*, 2018, 29(8):643-649.
- [19] HARTMANN B, LEUCHT V, LOERBROKS A. Work stress, asthma control and asthma-specific quality of life: initial evidence from a cross-sectional study [J]. *J Asthma*, 2017, 54(2):210-216.
- [20] HUANG Y, HAO C, SU X. Neuroimmune regulation of lung infection and inflammation [J]. *QJM*, 2019, 112(7):483-487.
- [21] 崔红生,武维屏. 武维屏辨治肺系疾病思路[J]. *中医杂志*, 2013, 54(2):107-109.
- [22] 崔红生. 《内经》“和”思想在支气管哮喘防治中的意义[J]. *北京中医药大学学报*, 2013, 36(12):802-804.
- [23] 楚荷莹,王峰,白勇,张国俊. 金雀异黄酮对幼龄哮喘大鼠 TGF- β /Nrf2/HO-1 信号通路及气道重塑的影响 [J]. *热带医学杂志*, 2021, 21(5):580-585, 673.
- [24] YANG C C, YANG C M. Chinese herbs and repurposing old drugs as therapeutic agents in the regulation of oxidative stress and inflammation in pulmonary diseases [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 4(14): 657-687.
- [25] 徐畅,宋艺兰,姜京植,等. 川芎嗪通过 AMPK/NF- κ B 和 Nrf-2/HO-1 途径减轻过敏性气道炎症和氧化应激的实验研究 [J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(2):100-106.
- [26] CHO H Y, KLEEBERGER S R. Nrf2 protects against airway disorders [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 244(1):43-56.

[责任编辑 张丰丰]