

姜辛夏方对哮喘大鼠气道重建中 HIF-1 α 及 VEGF 表达的影响

张玉英*, 罗思宁, 杨军, 贺鹏, 王彦峰
(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] **目的:**研究姜辛夏方对 OVA(卵蛋白)致敏哮喘大鼠模型肺泡灌洗液中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)及血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。**方法:**60 只雄性 SD 大鼠分为正常对照组、哮喘模型组、姜辛夏方高、中、低剂量干预组(23, 17.5, 11.5 g·kg⁻¹·d⁻¹),甲泼尼龙干预组(0.76 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。除正常对照组用生理盐水注射及气道雾化外,其余各组动物均以新鲜配制的卵蛋白抗原液做皮下、腹腔联合注射及气道雾化,建立大鼠哮喘模型。注射每天 1 次,连续 5 d,实验第 8 天,各组于引喘前 30 min 灌胃给药干预,正常对照组、模型组用生理盐水,其余各干预组给予相应的药物灌胃进行干预。每隔 1 天用药引喘 1 次,连续 30 d,观察整个实验过程中各组大鼠的一般情况,实验第 39 天采集标本,酶联免疫吸附法检测 HIF-1 α 、VEGF 的表达,并进行统计学分析。说明姜辛夏方对哮喘大鼠的疗效。**结果:**经过用抗原液引喘后,模型组大鼠烦躁不安、打喷嚏、抓鼻、喘息、倚笼而立、腹肌抽搐、大小便失禁,毛色暗淡,用药干预组与模型组比较症状明显减轻,正常组大鼠的表现未见明显异常。与正常组比较模型组肺泡灌洗液中 HIF-1 α 、VEGF 含量明显升高有显著差异($P < 0.01$),与模型组比较,姜辛夏方能明显减轻哮喘大鼠症状;明显降低肺泡灌洗液中 HIF-1 α 及 VEGF 的含量($P < 0.01$),且姜辛夏方大剂量组的效果优于其他剂量组($P < 0.05$)。**结论:**姜辛夏方能抑制哮喘大鼠肺组织中 HIF-1 α 及 VEGF 的生成,改善气道平滑肌与基底膜的增厚,从而抑制哮喘气道重建的发生发展。

[关键词] 支气管哮喘; 姜辛夏方; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0131-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110131

Impact of Jiang Xinxia Formulae on Expression of HIF-1 α and VEGF in Airway Remodeling of Asthmatic Rats

ZHANG Yu-ying*, LUO Si-ning, YANG Jun, HE Peng, WANG Yan-feng
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the impact of Jiang Xinxia formulae on the expression of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) and vascular endothelia growth factor (VEGF) in the alveolar lavage fluid of egg albumin (OVA) induced asthmatic rats. **Method:** OVA was used to establish the of the rat asthmatic model. ELISA was used to measure the level of HIF-1 α and VEGF in the alveolar lavage fluid. **Result:** Compared with model groups, Jiang Xinxia formulae obviously relieved the symptoms of the asthmatic rats; decreased the level of the HIF-1 α and VEGF in the alveolar lavage fluid ($P < 0.05$). **Conclusion:** Jiang Xinxia formulae can inhibit the HIF-1 α and VEGF in the asthmatic rat lungs, improve the thickening of the airway smooth muscle and basement membrane, thereby inhibit occurring and development of the asthmatic airway remodeling.

[Key words] bronchial asthma; Jiang Xinxia formulae; hypoxia inducible factor 1 α ; vascular endothelia growth factor

[收稿日期] 20131101(006)

[基金项目] 陕西省教育厅专项计划项目基金(08JK0275); 省级重点学科(伤寒论)学科项目

[通讯作者] * 张玉英, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事经方辩证呼吸病的临床与实验研究, Tel: 029-33168761, E-mail: Sxzyzyzy@163.com

支气管哮喘是一种常见病和多发病, 据统计, 全球哮喘的患病率为 1% ~ 18%, 估计全世界有 3 亿哮喘病患者^[1], 我国估计有哮喘患者 2 000 万之多, 目前中国仅为 2% ~ 3%, 部分地区超过 4%, 男女比例大致相等。一般认为儿童患病率高于青壮年, 老

年人群的患病率有增高的趋势^[2-3]。随着工业化建设发展,环境的污染,近年来各国及各地区的哮喘发病率和死亡率呈上升趋势,严重危害着人们的身心健康,因此对哮喘防治已成为全球共同关心、研究的热点。

目前对支气管哮喘发病机制已有进一步的认识。大量实验研究证明,支气管哮喘不仅有气道炎症还发生气道结构的改变,即气道重建(又称气道重塑)。气道重建是以气道慢性炎症反复发生、复修导致组织增生的结果,因而气道慢性炎症又是气道重建的基础,气道炎症和气道重建是哮喘的两个主要病理学特征。血管生成重构,气道平滑肌和基底膜的增厚是哮喘气道重建的前提,参与血管新生和血管重构的关键因子血管内皮生长因子(VEGF)可促进内皮细胞迁移,使内皮细胞穿过基底膜进入血管周围基质,促进内皮细胞的有丝分裂和相互连接,从而促进新生血管形成,并导致气道平滑肌增生和基底膜增厚。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)可在缺氧条件由及多种生长因子及癌基因的调控下表达增加促进新生血管的生成,且 HIF-1 α mRNA 的半定量和 VEGF 呈正相关,可在转录水平上调节 VEGF 的表达,参与哮喘的气道重建。因而被认为与哮喘过程中气道平滑肌增生肥厚、气道痉挛及气道上皮纤维化有关。前期研究表明,姜辛夏方能减轻气道炎症,降低气道高反应性,改善微循环和通气功能障碍,并能抑制其病理变化,从而纠正 Th1/Th2 失衡,下调 TGF- β 及 MMP-9 和 TIMP-1 的表达,阻止和逆转气道重建的发生^[4-5]。本实验在此基础上,通过复制哮喘大鼠模型,采用酶联免疫法检测大鼠肺泡灌洗液中 HIF-1 α 及 VEGF 的含量,以观察姜辛夏方对哮喘大鼠气道重建影响。

1 材料

1.1 动物 健康、雄性 6 周龄 SD 大鼠 60 只,体重(200 \pm 20) g,由西安交通大学医学院动物实验中心提供,动物许可证号 SCXK(陕)2007-001。实验前在实验室喂养观察 1 周。

1.2 药物、试剂及仪器 姜辛夏方由麻黄 6 g,干姜、细辛各 3 g,炙半夏 9 g,葶苈子、丹参各 15 g,淫羊藿 12 g,五味子 6 g 组成。由陕西中医学院附属医院中药房提供。将购入的中药置于砂锅中,加适量水浸泡 1 h 后,武火煮沸后文火煎煮 30 min,过滤取汁,药渣同前再次煎煮取汁,将 2 次过滤汁混合放于玻璃瓶中,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用,每次所配置的药物限 1 周内使用。甲泼尼龙片(西安利君制药有

限责任公司,批号 1201079-2),卵蛋白(OVA,美国 Sigma 公司分装,批号 A5253),HIF-1 α ELISA 试剂盒(上海凯博生化试剂有限公司,批号 20110921),VEGF ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 20120907)。

2 方法

2.1 分组 将 60 只大鼠采用随机数字表法分为 6 组:正常对照组(A)、模型对照组(B)、甲泼尼龙干预组(C)、姜辛夏方小剂量干预组(D)、姜辛夏方中剂量干预组(E)、姜辛夏方大剂量干预组(F),每组 10 只。

2.2 动物模型建立 按参考文献[6-7]方法并加以改进。除正常对照组外,其余各组动物均以新鲜配制的 1% OVA 抗原液做皮下及腹腔联合注射,每鼠在两腹股沟、腰、背、颈部共取 5 点,每点皮下注射抗原液 0.1 mL,同时 ip 0.5 mL 抗原液致敏。正常对照组以等量生理盐水对以上部位注射,每天 1 次,连续 5 d。在第 8 天激发大鼠哮喘 30 min 前给正常对照组、模型对照组 ig 生理盐水,各干预组相应剂量 ig 给药,每鼠每天 1 mL。之后除了正常对照组用等量生理盐水雾化,其余各组以 1% 卵蛋白抗原液雾化激发大鼠哮喘 45 min,隔天 1 次,均在早上进行,共 30 d。在此期间,激发大鼠哮喘 3 d 后,根据大鼠行为学改变,如:烦躁不安、打喷嚏、抓鼻、喘息、呼吸急促、倚笼而立、腹肌抽搐、大小便失禁等阳性反应来评价哮喘模型造模是否成功。本实验中哮喘大鼠气道重建模型是在哮喘大鼠模型的基础上延长激发时间而建立的^[8]。实验第 39 天,测定大鼠肺泡灌洗液中炎症细胞含量的变化,采用酶联免疫吸附法检测大鼠肺泡灌洗液中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达。

2.3 给药方法 根据文献记载^[9-10],人和动物用药比例换算,姜辛夏方高、中、低剂量干预组(23, 17.5, 11.5 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹)。甲泼尼龙干预组的给药量为 0.76 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹。

2.4 标本制备 参照文献[11]并加以改进,先用 10% 的水合氯醛 ip 将大鼠麻醉,剂量为 3 mL \cdot kg⁻¹,用手术刀层层划开皮肤、肌肉及筋膜组织,再用手术剪自剑突部向头部方向剪,剪开胸骨,注意剪时避开胸腔中的大血管,完全暴露胸腔。再剪开大鼠颈部皮肤直到暴露气管,向胸部分离气管。然后在胸腔中找到心脏,将心脏向上小心翻开找到位于心脏后方贴于背部的肺脏,剪断和心脏相连的大血管,暴露肺脏,小心分离气管和肺脏相连的组织,最后剥离出气管和两肺。切开气管,用灌胃针行气管插管,丝线

固定,迅速分离肺组织,结扎右主支气管,经气管行左肺灌洗,用 PBS 缓冲液 8 mL 分 3 次于气管插管处注入,缓慢冲洗右肺,并用手指轻轻按摩左肺组织,约 30 s 后回收肺泡灌洗液,回收率约 80%,肺泡灌洗液收集在 EP 管中,3 000 r·min⁻¹ 低温离心 10 min,取上清液分装于 EP 管中,4 °C 冰箱保存。

2.5 指标检测

2.5.1 观察大鼠一般情况。

2.5.2 酶联免疫吸附法检测大鼠肺泡灌洗液中 HIF-1 α 及 VEGF 的含量。

2.6 统计学处理 所测数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析法,组间比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 激发后模型组与各干预组大鼠都不同程度出现喷嚏、咳嗽、抓耳挠鼻、抖毛、呼吸加深加快,腹肌抽搐等症状,正常组未出现以上症状,表明造模成功。

3.2 对哮喘大鼠肺泡灌洗液中 HIF-1 α 及 VEGF 的含量的影响 模型对照组肺泡灌洗液中 HIF-1 α , VEGF 含量明显高于正常对照组 ($P < 0.01$),与模型对照组相比各干预组肺泡灌洗液中 HIF-1 α , VEGF 含量均降低,有显著差异 ($P < 0.01$),姜辛夏方大剂量组与甲泼尼龙组 HIF-1 α 含量的比较无显著性差异,分别与姜辛夏方中、小剂量干预组 HIF-1 α , VEGF 含量比较均有显著差异 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠肺泡灌洗液中 HIF-1 α , VEGF 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)
ng·L⁻¹

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | n | VEGF | HIF-1 α |
|------|---------------------------|----|--------------------------------|--------------------------------|
| 正常对照 | - | 8 | 13.68 ± 5.66 | 13.51 ± 6.97 |
| 模型对照 | - | 9 | 39.10 ± 4.13 ¹⁾ | 38.72 ± 2.61 ¹⁾ |
| 泼尼松 | 0.76 × 10 ⁻³ | 9 | 21.94 ± 6.38 ²⁾ | 18.86 ± 2.45 ²⁾ |
| 姜辛夏 | 11.5 | 10 | 26.84 ± 2.87 ^{2,3,4)} | 22.95 ± 3.93 ^{2,3,4)} |
| | 17.5 | 8 | 25.91 ± 1.46 ^{2,3,4)} | 20.61 ± 7.19 ^{2,3,4)} |
| | 23.0 | 8 | 17.97 ± 2.86 ^{2,3)} | 16.88 ± 3.21 ^{2,3)} |

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型对照组比较²⁾ $P < 0.01$;与泼尼松组比较³⁾ $P < 0.05$;与姜辛夏 23 g·kg⁻¹ 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

气道重建是由 Huber 和 Koessler 首先提出^[12],他们研究观察 21 例因哮喘而致死亡的患者中气管腔严重狭窄、黏膜肥厚、气管壁增厚、炎症细胞浸润,这些病理学特征和正常气道形态比较变化很大,气

道壁的结构发生了重塑,并且呈不可逆的状态。近年来许多病理学和形态学的研究进一步证实了哮喘气道结构的改变,不仅在重型哮喘,而且在轻型哮喘也存在不同程度的气道壁增厚、管腔狭窄、上皮纤维化、黏液腺增生、或成纤维细胞增生和肥大,上皮细胞增生等。可见气道重建多数是在哮喘迁延不愈、反复发作的过程中形成的,但也可在哮喘早期出现。哮喘发作时支气管平滑肌的张力增加,使 HIF-1 α 蛋白表达增加,HIF-1 α 活化后能够促进多种基因的转录,其中 VEGF 和许多炎症因子转录后进一步加重哮喘的发作并能促进气道壁的重塑。此外,HIF-1 α 能够活化许多重要的促血管生成基因,可促进哮喘患者气道壁微血管的重塑。VEGF 的功能复杂,主要有促进血管内皮细胞的增殖,促进内皮细胞的变形、移动,形成新生血管。促进微静脉、小静脉通透性增加,有利于血浆蛋白等大分子外渗,引起细胞外水肿、细胞外基质结构的改变。实则,支气管哮喘过程中形成气道重建的病理特征时,已具有中医学所谓的虚实夹杂证,其主要是痰饮夹瘀的病机。

而姜辛夏方的处方用药是在《伤寒论》治疗咳嗽的小青龙汤的基础上组方,通过临床观察该方对治疗哮喘疗效理想,具有平喘祛痰、活血化瘀和邪正兼顾功效,本次动物实验进一步观察到,姜辛夏方以平喘祛痰、活血化瘀和邪正兼顾的原则组方对哮喘治疗有明显的效果,又证明姜辛夏方能降低 HIF-1 α , VEGF 的表达,阻止和延缓气道重建,特别是姜辛夏方大剂量组的效果明显。这说明祛痰化瘀、邪正兼顾法和 HIF-1 α 及 VEGF 的表达有着内在的联系。由此可见痰、瘀、虚是本病的关键,也是气道重建的关键,姜辛夏方以祛痰化瘀,邪正兼顾来实现对哮喘的防治,起到调节 HIF-1 α 及 VEGF 而干预哮喘气道重塑的效果。

[参考文献]

- [1] Masoli M, Fabian D, Holt S, et al. The global burden of asthma; executive summary of the GINA dissemination committee report [J]. Allergy, 2004, 59 (5): 469.
- [2] 陈欣, 林江涛. 我国支气管哮喘防治现状 [J]. 内科急危重症杂志, 2008, 14(5): 522.
- [3] 叶任高, 陆再英. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 64.
- [4] 张玉英, 李玲, 唐俊峰, 等. 姜辛夏冲剂对哮喘大鼠气道炎症的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(1): 122.
- [5] 张玉英, 惠朋利, 何云义, 等. 姜辛夏颗粒对哮喘大鼠气道重建 TGF- β_1 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 1941.

正交试验法研究补阳还五汤中 保护 OGD 损伤 PC12 细胞的主要药味

张继平¹, 刘俊娥¹, 姚晖^{1*}, 方永奇², 李翎², 文凤妮¹, 朱永坤³

(1. 佛山市第二人民医院, 广东 佛山 528000; 2. 广州中医药大学第一附属医院实验中心, 广州 510405;
3. 东莞市石龙人民医院, 广东 东莞 523326)

[摘要] 目的: 研究补阳还五汤中保护缺氧缺糖(oxygen-glucose deprivation, OGD)损伤 PC12 细胞的主要药味。方法: 将补阳还五汤中 7 种单味药(黄芪、赤芍、当归尾、地龙、川芎、桃仁、红花)作为实验因素, 每个因素选取有或无 2 个水平, 按 $L_8(2^7)$ 正交试验表设计 8 种拆方。普通级新西兰兔分为 9 组, 空白血清组和 8 个拆方含药血清组, 分别 ig 蒸馏水和临床等效剂量 5 倍的拆方药液, 24 h 内连续 ig 3 次后, 提取血清。运用四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)和微量酶标法, 以细胞活力和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放量为指标, 观察 10% 补阳还五汤及其拆方含药血清对 OGD 损伤 18 h 的 PC12 细胞的影响。结果: PC12 细胞 OGD 损伤后, 其 LDH 释放量增加($P < 0.01$), 补阳还五汤能显著抑制 OGD 损伤 PC12 细胞的 LDH 释放量($P < 0.01$)。正交试验结果显示, 含黄芪、当归尾、赤芍的拆方组其细胞活力显著增加($P < 0.01$), LDH 释放量显著降低($P < 0.01$); 而含桃仁的拆方组其细胞活力显著下降($P < 0.01$), 含地龙的拆方组其 LDH 释放量显著升高($P < 0.01$); 红花、川芎对细胞活力及 LDH 释放量的作用不明显。结论: 补阳还五汤对 OGD 损伤 PC12 细胞具有保护作用, 其中黄芪、当归尾、赤芍是保护 OGD 损伤 PC12 细胞的主要药味, 桃仁、地龙可加重 PC12 细胞 OGD 损伤, 红花、川芎对细胞的作用不明显。

[关键词] 正交试验; 补阳还五汤; 缺氧缺糖; PC12 细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0134-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110134

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140324.1604.018.html>

[网络出版时间] 2014-03-24 16:04

Main Ingredients of Buyang Huanwu Decoction in Protecting PC12 Cells During OGD by Orthogonal Test

ZHANG Ji-ping¹, LIU Jun^{2-e}, YAO Hui^{1*}, FANG Yong-qi², LI Ling², WEN Feng-ni¹, ZHU Yong-kun³

[收稿日期] 20131107(007)

[基金项目] 广东省中药局中医药强省项目(2010008, 20111058, 20121088)

[第一作者] 张继平, 医学硕士, 硕士生导师, 研究员, 主任中药师, 从事中药药理研究, Tel: 0757-88032005, E-mail: fszjping@163.com

[通讯作者] * 姚晖, 医学博士, 硕士生导师, 副主任药师, 从事中药药理、临床药学研究, Tel: 0757-88032029, E-mail: fsyaohui@126.com

- [6] 迟磊, 符州, 戴继宏, 等. 过敏性哮喘大鼠模型的建立[J]. 重庆医学, 2003, 32(4): 429.
- [7] 闻玉梅. 天然免疫与中西医结合[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(1): 1.
- [8] 莫万勇. VEGF, HIF-1 α 在大鼠哮喘模型中的表达及柴朴汤的干预研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2010.
- [9] 孙敬方. 实验动物方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 478.
- [10] 陆源. 生理科学实验教程[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2004: 99.
- [11] Petra Seidel, Stephanie Goulet. DMF inhibits PDGF-BB induced airway smooth muscle cell proliferation through induction of heme-oxygenase-1 [J]. Respiratory Research, 2010(11): 145.
- [12] Halwanir, AL-Muhsens, AL-Jahdalih, et al. Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(2): 127.

[责任编辑] 聂淑琴