

泻白散对小鼠过敏性哮喘气道炎症的作用及机制

张天柱*, 张景龙, 樊湘泽, 程潜
(长春中医药大学, 长春 130117)

【摘要】 **目的:**评价泻白散对哮喘小鼠变应性气道炎症的影响。**方法:**BALB/c 小鼠 60 只,随机分为正常组、模型组、泻白散高剂量组(12 g·kg⁻¹)、中剂量组(6 g·kg⁻¹)、低剂量组(3 g·kg⁻¹)、地塞米松阳性对照组(2 mg·kg⁻¹),共 6 组。各组小鼠(除正常组外)于第 1,8 天腹腔、皮下分别给予 0.1 mL 的致敏液(0.2 mL 致敏液含卵蛋白(OVA)0.1 mg,氢氧化铝 0.02 mg),第 15~28 天各组(除正常组)给予 5% 的 OVA 雾化激发,每次雾化激发 20 min,每次雾化前 30 min 各组小鼠按体重给予相应的药物;空白组以等体积生理盐水代替致敏液,并用生理盐水雾化激发相同的时间。相应的药物治疗 2 周后,取血做嗜酸性粒细胞(EOS)计数,取肺泡灌洗液(BALF)做细胞分类计数。采用酶联免疫法(ELISA)法测定 BALF 中的白介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量。采用 Western blot 法检测肺组织 GATA 结合蛋白 3(GATA3)与 Th1 细胞特异性转录因子(T-bet)蛋白表达。**结果:**泻白散高、中、低剂量组使哮喘小鼠血中 EOS 的含量明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),对淋巴细胞及中性粒细胞没有明显的影响;使肺泡灌洗液中的 EOS 明显下降($P < 0.01$, $P < 0.05$),对肺泡灌洗液的单核细胞及中性粒细胞没有明显的影响;病理显示,各给药组小鼠肺部病变减轻。泻白散高、中、低剂量组能显著降低哮喘小鼠 BALF 中 IL-6 及 TNF- α 的含量,能显著降低哮喘小鼠肺部 GATA3 蛋白表达,并能提高哮喘小鼠肺部 T-bet 蛋白表达。**结论:**泻白散能有效的抗哮喘,其作用机制可能是通过调节 GATA3 与 T-bet 蛋白的表达。

【关键词】 泻白散; 过敏性哮喘; GATA3 结合蛋白 3; Th1 细胞特异性转录因子

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2014)20-0173-04

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200173

Effects and Its Mechanism of Xiebai San on Allergic Airway Inflammation in Asthma Mouse

ZHANG Tian-zhu*, ZHANG Jing-long, FAN Xiang-zhe, CHENG Qian
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

【Abstract】 **Objective:** To investigate the effects and its mechanism of Xiebai San on allergic asthma. **Method:** Sixty BALB/c were divide into six groups: normal group, model groups, Xiebai San high dose (12 g·kg⁻¹), middle dose (6 g·kg⁻¹), low dose (3 g·kg⁻¹), dexamethasone positive group [(2 mg·kg⁻¹), groups mice (except those in the normal group) were sensitized with 0.2 mL sensitized solution (0.2 mL sensitized solution contains 0.1 mg OVA and 0.02 mg Al (OH)₃]. Fifteen day after modeling, and corresponding drugs were given, 30 min later, mice were stimulated with 5% OVA. Blood simples were collectesd for counting numbers of eosinophilic granulocyte (EOS), and bronchoalveolar laverage fluid (BALF) was used for counting inflammatory cells. ELISA was used to assay interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels, Western blotting was Use to detect GATA3 and T-bet. **Result:** The middle dose of Xiebai San could obviously reduce numbers of EOS in the blood ($P < 0.01$), high dose and low dose of Xiebai San could also reduce numbers of EOS ($P < 0.05$), high and middle dose of Xiebai San could obviously reduce numbers of EOS in the BALF ($P < 0.01$), low dose Xiebai San could also reduce numbers of EOS ($P < 0.05$), and Xiebai San

【收稿日期】 20140304(019)

【基金项目】 吉林省中医药科技项目(2012-083)

【通讯作者】 *张天柱, 硕士, 讲师, 从事中药资源与药理学研究, Tel:0431-86172690, E-mail: zhangtz452@126.com

obviously reduced IL-6 and TNF- α , and GATA3, and increased T-bet. **Conclusion:** Xiebai San can inhibit allergic asthma.

[**Key words**] Xiebai San; allergic asthma; GATA-binding protein-3; T-box expressed in T cell

支气管哮喘是一种常见的呼吸道疾病,是由多种细胞包括气道的炎性细胞和结构细胞和细胞组分 (cellular elements) 参与的气道慢性炎症性疾病^[1]。这种炎症使易感者对各种激发因子具有气道高反应性,并引起气道缩窄,其中嗜酸粒细胞 (EOS) 浸润气道导致气道炎症、气道病理改变是哮喘疾病临床改变重要的标志^[2-3]。大量实验研究表明,哮喘鼠在吸入变应原后的迟发反应相时,支气管灌洗液 (BALF) 中 EOS 数量明显增多,活化的 EOS 可释放多种碱性蛋白和脂质体造成气道上皮损伤、气道反应性增高、黏液分泌增多,以及间歇性气道阻塞; EOS 尚能释放多种细胞因子,影响其他细胞功能^[4-9]。泻白散来源于小儿药证直诀,由桑白皮、地骨皮和甘草组成,是治疗咳嗽的经典名方。方中桑白皮主入肺经,泻肺平喘、利水消肿^[10],为方中君药,主要含有黄酮类、二苯乙烯类、芳香苯胺类衍生物、香豆素类、N 糖类、甾体等多种成分^[11]。地骨皮凉血除蒸,清肺降火,可助君药泻肺中伏火,且有养阴之功,君臣相合,清泻肺火。地骨皮主要含有有机酸类化合物、二酰胺类、八肽、生物碱类以及酚类等化合物。将泻白散用于抗过敏性哮喘的研究,在国内外尚属首次,希望能够引起广大药学研究者对该药的关注,也为复方中药治疗哮喘提供理论基础。本实验重在探讨泻白散抗过敏性哮喘及作用机制。

1 材料

1.1 仪器 S-888F 型超声波雾化器 (中外合资南京道芬电子有限公司), FAH04N 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), LDZS-2 自动平衡离心机: (北京医用离心机厂), Hercules 电泳仪 (Bio-Rad)。

1.2 药物与试剂 地骨皮 (Cortex Lycii)、甘草 (Radix Glycyrrhiza)、桑白皮 (Cortex Mori) 由亳州永刚中药有限公司提供,以上药材均经长春中医药大学王德友教授鉴定。泻白散 (地骨皮 30 g, 桑白皮 30 g, 甘草 3 g) 水煎液高、中、低剂量,中剂量由人临床等效量换算,高、中、低剂量分别为 12, 6, 3 g·kg⁻¹; 地塞米松 (天津天药药业股份有限公司, 批号 100605); 卵白蛋白 (OVA, 上海伯奥生物科技有限公司, 批号 110209); 氢氧化铝凝胶 (扬州市星斗药业有限公司, 批号 090803); EOS 计数液 (南京建成生物工程

研究所, 批号 20111014); 快速瑞姬氏染液 (南京建成科技有限公司, 批号 20120106); 0.9% 氯化钠注射液 (山东华鲁制药有限公司, 批号 B08110807)。

1.3 动物 SPF 级 BALB/c 小鼠 60 只, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 雌雄各半, 雌者无孕。购自南京青龙山动物繁殖公司, 合格证号 SCXK (苏) 2007-0001。

2 方法

2.1 小鼠过敏性哮喘模型的建立及给药 将小鼠随机分为 6 组: 模型组、泻白散高、中、低剂量组 (12, 6, 3 g·kg⁻¹)、正常对照组、阳性对照地塞米松组 (2 mg·kg⁻¹)。每组 10 只, 雌雄各半。除正常组外, 各组动物于第 1, 8 天, 每只 sc 0.1 mL 致敏液, 并 ip 0.1 mL 致敏液 (0.2 mL 致敏液含 OVA 0.1 mg, 氢氧化铝 0.02 mg), 第 15~28 天 5% OVA 溶液雾化激发, 每次雾化 20 min。正常组以等体积生理盐水代替致敏液, 并用生理盐水雾化。15~28 d 雾化, 每次雾化前 30 min 灌胃给药。

2.2 血液细胞学检查 末次激发 24 h 后, 小鼠眼眶取血 1 mL 左右, 脱颈椎处死。取 20 μ L 血混匀于 0.38 mL EOS 计数液中, 在光学显微镜进行 EOS 计数。另取血液适量涂片固定, 瑞姬氏染液染色, 显微镜下读取 200 个白细胞, 统计各类白细胞个数, 计算各类白细胞所占百分比。

2.3 BALF 细胞学检查 取已处死动物, 打开胸腔, 结扎左支气管肺门部; 分离气管, 于气管环状软骨下方剪一 V 型切口, 插入前端磨平的 2.5 mL 注射器针头, 结扎固定, 以 1.5 mL 生理盐水分 3 次灌洗, 每次 0.5 mL。取一滴灌洗液至血细胞计数池中, 静置后显微镜下读白细胞总数。1 000 r·min⁻¹ 室温下离心 10 min, 吸出上清液, 取沉淀涂片固定, 瑞姬氏染液染色, 显微镜下读取 200 个白细胞, 统计各类白细胞个数, 计算各类白细胞所占百分比。结合白细胞总数与各类白细胞百分比最终换算得 BALF 中各类白细胞数。

2.4 肺组织病理学检查 取小鼠肺组织, 4% 中性甲醛溶液固定, 常规制备病理切片, HE 染色进行病理检测。

2.5 细胞因子检测 取小鼠 BALF, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6 及 TNF- α 。

2.6 对哮喘小鼠肺组织 GATA3 与 T-bet 的影

响 取小鼠肺组织,制备蛋白样,蛋白(上样量为 75 μg)经 10% SDS-PAGE 电泳,分离后,将蛋白转移到 PVDF 膜上(孔径为 0.45 μm, Pall, USA),然后在 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h,在不同的一抗中 4 ℃ 孵育过夜。PVDF 膜经 0.5% TBS-T 溶液洗膜 3 次,每次 5 min。再与 HRP 标记的二抗进行反应,再用 0.5% TBS-T 溶液洗膜 3 次,每次 5 min。最终膜用 lumiGLO 试剂(Cell Signaling, Beverly, MA)孵育,然后用 X 射线片显出条带(Kodak, New Haven, CT),采用分析软件(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)进行灰度值分析,计算目的蛋白 β-actin 的灰度比值。

2.7 统计方法 实验数据利用 SPASS 11.5 进行统计,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 对哮喘小鼠血液 EOS 数目的影响 模型组血

中 EOS 显著增高,与正常组相比有显著差异($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照地塞米松组、泻白散高、中、低剂量组 EOS 含量降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 1。

3.2 对血液中各炎细胞百分比的影响 血液中淋巴细胞百分比,模型组与正常对照组比较显著降低($P < 0.01$);阳性药组与模型组比较有所升高($P < 0.05$)。中性粒细胞百分比,模型组显著升高,各给药组显著降低。EOS 百分比,模型组较正常组显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组、泻白散各剂量组均显著降低($P < 0.01$),见表 1。

3.3 对哮喘小鼠 BALF 炎细胞计数的影响 与正常组比较,模型组白细胞总数、淋巴细胞数、中性细胞及 EOS 数有显著性差异($P < 0.01$);与模型组比较,阳性药及泻白散各给药组均能显著调节各细胞数($P < 0.05$),见表 2。

表 1 不同剂量泻白散对血液中 EOS 数目、血液中炎细胞百分比的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/g·kg ⁻¹	EOS 数/×10 ⁶ ·L ⁻¹	淋巴细胞/%	中性粒细胞/%	EOS/%
正常	-	0.00 ± 0.00	63.35 ± 6.34	27.19 ± 2.25	0.22 ± 0.056
模型	-	9.77 ± 1.07 ¹⁾	47.36 ± 5.63 ¹⁾	38.00 ± 2.26 ¹⁾	23.77 ± 2.30 ¹⁾
地塞米松	2 × 10 ⁻³	2.42 ± 0.56 ³⁾	59.38 ± 6.36 ³⁾	34.46 ± 3.11 ³⁾	5.26 ± 1.23 ³⁾
泻白散	12	3.07 ± 1.03 ³⁾	56.57 ± 6.01 ³⁾	30.75 ± 3.19 ³⁾	10.61 ± 2.97 ³⁾
	6	4.25 ± 0.76 ²⁾	52.74 ± 5.85 ²⁾	29.65 ± 3.46 ²⁾	12.45 ± 2.33 ³⁾
	3	5.12 ± 0.58 ²⁾	50.31 ± 5.44 ²⁾	28.63 ± 4.13 ²⁾	14.25 ± 2.06 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 泻白散对 BALF 中白细胞总数以及各炎症细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

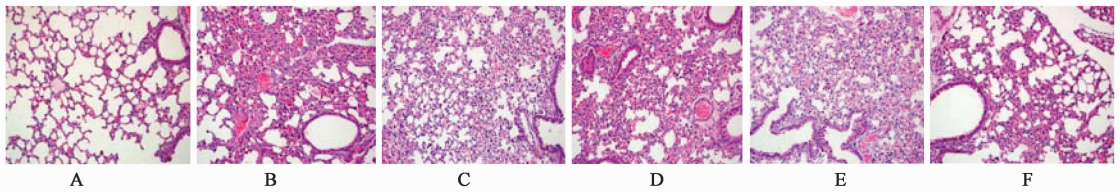
分组	剂量/g·kg ⁻¹	白细胞总数 / × 10 ⁶ /L	淋巴细胞 / × 10 ⁶ /L	中性粒细胞 / × 10 ⁶ /L	单核细胞 / × 10 ⁶ /L	EOS / × 10 ⁶ /L
正常	-	18.43 ± 3.32	2.89 ± 1.21	1.59 ± 0.81	5.53 ± 2.18	0.09 ± 0.02
模型	-	27.88 ± 3.43 ¹⁾	8.87 ± 1.23 ¹⁾	5.21 ± 1.08 ¹⁾	14.45 ± 1.83 ¹⁾	4.86 ± 1.97
地塞米松	2 × 10 ⁻³	12.43 ± 3.34 ³⁾	3.15 ± 1.09 ³⁾	2.22 ± 1.03 ³⁾	6.89 ± 1.11 ³⁾	1.43 ± 0.88 ³⁾
泻白散	12	15.54 ± 2.76 ³⁾	4.06 ± 1.32 ³⁾	3.73 ± 1.23 ³⁾	8.93 ± 1.66 ³⁾	1.96 ± 1.02 ³⁾
	6	17.32 ± 2.62 ³⁾	4.69 ± 1.21 ³⁾	3.99 ± 1.21 ³⁾	9.22 ± 1.55 ³⁾	2.12 ± 0.78 ²⁾
	3	19.32 ± 2.47 ³⁾	5.32 ± 2.05 ²⁾	4.04 ± 1.52 ²⁾	10.32 ± 1.26 ³⁾	2.69 ± 1.23 ²⁾

3.4 肺部病理学检测 正常组肺部未见明显坏死、脱落,固有层及黏膜下层中未见充血、水肿及炎细胞浸润,外膜可见完好的透明软骨支架。模型组可见肺部中度炎细胞浸润,主要包括嗜酸性细胞,淋巴细胞、巨噬细胞及少量浆细胞。与模型组比较,各给药组病变都有减轻趋势,见图 1。

3.5 对哮喘小鼠 BLAF 细胞因子的影响 与正常

组比较,模型组 BLAF 中 IL-6 及 TNF-α 显著性升高($P < 0.01$);与模型组比较,阳性药及泻白散各给药组 BLAF 中 IL-6 及 TNF-α 显著性下降($P < 0.05$),见表 3。

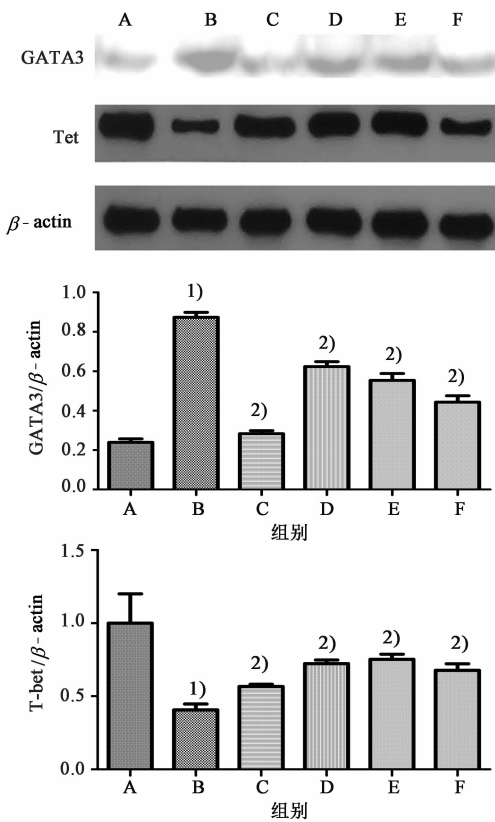
3.6 对哮喘小鼠肺组织 GATA3 与 T-bet 的影响 与正常组比较,模型组肺组织 GATA3 显著性升高($P < 0.01$),T-bet 显著下降($P < 0.01$);与模型组比



A. 正常对照组; B. 模型组; C. 地塞米松 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 泻白散 $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 泻白散 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 泻白散 $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 泻白散对哮喘小鼠肺部组织病理形态学改变的影响 (HE 染色, $\times 200$)

较, 阳性药及泻白散各给药组肺组织 GATA3 显著下降, T-bet 显著升高 ($P < 0.05$), 见图 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 地塞米松 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);
D. 泻白散 ($3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); E. 泻白散 ($6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$);
F. 泻白散 ($12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;
与模型组比较²⁾ $P < 0.01$

图 2 泻白散对哮喘小鼠肺组织 GATA3 与 T-bet 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

表 3 泻白散对哮喘小鼠 BALF 中细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-6 $/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α $/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	23.56 ± 2.12	47.22 ± 3.25
模型	-	$87.22 \pm 1.63^{1)}$	$128.22 \pm 5.26^{1)}$
地塞米松	2×10^{-3}	$39.22 \pm 1.86^{3)}$	$76.37 \pm 6.16^{3)}$
泻白散	12	$46.28 \pm 2.01^{3)}$	$83.48 \pm 5.43^{3)}$
	6	$53.21 \pm 1.85^{2)}$	$99.46 \pm 6.26^{2)}$
	3	$59.27 \pm 2.16^{2)}$	$108.43 \pm 5.66^{2)}$

4 讨论

支气管哮喘是由多种炎症细胞特别是肥大细胞、EOS 和 T 淋巴细胞等共同参与的慢性气道炎症性疾病。炎症细胞(尤其是 EOS)在气道的局部聚集、炎症介质和细胞因子的释放等是形成和维持气道炎症并进而引起组织损伤和气道功能障碍的主要原因, 以抑制气道炎症为主的适当治疗, 通常可以使病情得到控制。所以气道炎症及病理学改变是哮喘重要的临床特点之一。

本文通过探讨泻白散过敏性哮喘的影响, 发现泻白散能显著的改善过敏性哮喘, 明显降低哮喘小鼠血及肺泡灌洗液中 EOS 的含量, 对血的淋巴细胞及中性粒细胞没有明显的影响, 对肺泡灌洗液的单核细胞及中性粒细胞没有明显的影响, 可显著降低哮喘小鼠 BALF 中 IL-6 及 TNF- α 的含量, 各给药组小鼠肺部病变减轻。减轻哮喘症状, 改善肺功能。其机制可能与调节 GATA3, Tbet 蛋白表达相关, 为临床使用泻白散提供理论基础。

[参考文献]

[1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案) [J]. 柳州医学, 2012, 25(3): 171.

[2] Kay A B. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma [J]. Trends Mol Med, 2005, 11(4): 148.

[3] Kulkarani N S, Hollins F, Sutcliffe A, et al. Eosinophil protein in airway macrophages: A novel biomarker of eosinophilic inflammation in patients with asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(1): 61.

[4] Wilson M S, Taylor M D, Balic A, et al. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells [J]. J Exp Med, 2005, 202(9): 1199.

[5] Koya T, Matsuda H, Takeda K, et al. IL-10-treated dendritic cells decrease airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice [J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 119(5): 1241.