

## 黄皮叶提取物对哮喘大鼠血清 及肺组织 Th1/Th2 平衡的调节作用

黄桂红\*, 韦江红, 陈薇, 董晓敏, 廖曾珍, 杨华  
(桂林医学院附属医院, 广西桂林 541001)

**[摘要]** **目的:**探讨黄皮叶提取物对哮喘大鼠炎症反应中 Th1/Th2 细胞因子平衡的调节作用。**方法:**将健康雄性 SD 大鼠 48 只,随机分为 6 组,分别为正常组、哮喘模型组、地塞米松组(1.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、黄皮叶提取物低、中、高剂量组(520, 1 040, 2 080 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。除正常组外,其余各组分别在第 1,7 天采用卵清蛋白致敏法 *ih* 致敏液,并于第 15 天开始,各给药组大鼠每天在灌胃给药后 1 h 进行雾化激发,连续 1 周;正常组及模型组以生理盐水灌胃代替。分别采用 ELISA 法测定大鼠血清中一氧化氮(NO),白三烯 D<sub>4</sub>(LTD<sub>4</sub>),白细胞介素-4(IL-4), $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )的含量、硝酸还原法测肺组织 NO 含量;RT-PCT 法测定肺组织中 IL-4,IFN- $\gamma$  mRNA 表达及观察肺组织病理学改变。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠血清中 NO,IL-4,LTD<sub>4</sub> 的含量明显升高,IFN- $\gamma$  的含量降低,肺组织 NO 含量明显升高,大鼠肺组织中 IL-4 mRNA 表达明显升高,IFN- $\gamma$  mRNA 表达明显降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,黄皮叶提取物低、中、高剂量组均能明显减少血清中 NO,IL-4 的含量,升高 IFN- $\gamma$  的含量( $P < 0.05, P < 0.01$ ),黄皮叶提取物高、中剂量组能减少哮喘大鼠肺组织中 NO 的含量,黄皮叶提取物高剂量组能明显减少哮喘大鼠血清中 LTD<sub>4</sub> 的含量( $P < 0.05, P < 0.01$ ),黄皮叶提取物低、中、高剂量组能明显降低哮喘大鼠肺组织中 IL-4 mRNA 表达,增加 IFN- $\gamma$  mRNA 表达( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**黄皮叶提取物能有效的减少哮喘大鼠的炎症反应,其机制可能是通过调节 Th1/Th2 细胞因子的平衡,从而减轻炎症细胞浸润有关。

**[关键词]** 哮喘大鼠;黄皮叶提取物;炎症因子;Th1/Th2

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0097-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190097

**Regulating Effects of Clausenae Lansii Folium Extracts on Th1/Th2 Balance in Serum and Lung Tissue of Asthmatic Rats** HUANG Gui-hong\*, WEI Jiang-hong, CHEN Wei, DONG Xiao-min, LIAO zeng-zhen, YANG Hua (Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the regulating effects of Clausenae Lansii Folium extracts on cytokines level of type Th1/Th2 in inflammation reaction on asthmatic rats. **Method:** Forty-eight healthy male rats were randomly divided into six groups: normal control group, asthma model group, dexamethasone group (1.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), Clausenae Lansii Folium extracts groups of low, medium and high doses (520, 1 040, 2 080 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). Except normal control group, all the other groups were sensitized with ovalbum by subcutaneous injection on the first and the seventh day. From the fifteenth day, rats in various administering groups received atomization treatment 0.5 hour after gavage 1 hour for 1 week. The normal control group and asthma model group were treated with normal saline instead. The levels of nitric oxide (NO), leukotriene D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>), interleukin (IL-4), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in serum were measured by ELISA, and NO in lung tissue was detected by nitrate reductase method. The expression of IL-4, IFN- $\gamma$  mRNA in lung tissue was measured by RT-PCR. The pathological changes in lung tissue were observed. **Result:** Compared with the normal group, levels of NO, IL-4 and LTD<sub>4</sub> in serum of rats in model group were significantly higher, and IFN- $\gamma$  content was lower. NO content in lung tissues was also significantly higher, IL-4 mRNA expression was significantly higher, and IFN- $\gamma$  mRNA was

**[收稿日期]** 20150120(021)

**[基金项目]** 广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053079);广西中医药科技专项项目(GZKZ10-124);桂林市科学研究与技术开发计划项目(20120121-1-17)

**[通讯作者]** \*黄桂红,硕士,主任药师,硕士生导师,从事中药抗糖尿病及抗哮喘研究, Tel:0773-2810610, E-mail: huangguihong120@126.com

significantly lower ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, all of Clausenae Lansii Folium groups of low, medium and high dose could significantly reduce NO and IL-4 levels in serum, and increase IFN- $\gamma$  level ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Clausenae Lansii Folium groups of high, medium doses could reduce the level of NO in lung tissues of the asthma rats. Clausenae Lansii Folium high dose group could significantly reduce the level of LTD<sub>4</sub> in serum of asthma rats ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). All of Clausenae Lansii Folium groups of low, medium and high dose could significantly reduce IL-4 mRNA expression and increase IFN- $\gamma$  mRNA expression ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** The extracts of Clausenae Lansii Folium are effective in treatment of inflammation reaction in asthmatic rats by adjusting Th1/Th2 balance, and reducing the infiltration of inflammation cells.

[**Key words**] asthmatic rat; Clausenae Lansii Folium extracts; inflammation cytokines; Th1/Th2

哮喘的发病机制通常与免疫失衡、炎性介质释放等多种因素有关。Th1/Th2 细胞亚群在数目和功能的平衡失调,导致 Th2 类细胞因子表达和释放增多,使以  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 为特征因子的 Th1 不能有效的抑制以白细胞介素-4(IL-4)为代表的 Th2 细胞因子,使得 Th2 型细胞因子过度释放,从而加重气道炎症,导致哮喘的反复发作<sup>[1]</sup>。黄皮叶在广西壮族民间主要用于治上感、痰咳哮喘等相关疾病,本课题组前期研究已证实黄皮叶提取物具有镇咳、祛痰及平喘的作用<sup>[2]</sup>,但其作用机制尚未清楚,为更好的研究黄皮叶提取物的平喘作用,本课题组拟从黄皮叶提取物调控以 IFN- $\gamma$ , IL-4 为代表的 Th1/Th2 细胞平衡,探讨其抗炎平喘作用机制,为开发新的民族草药提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重(200 ± 30) g,由桂林医学院动物实验中心提供,合格证号为 SCXK(桂)2007-0001。

**1.2 药物及试剂** 黄皮叶提取物经桂林医学院生药学教研室杜泽香教授鉴定为芸香科植物黄皮属黄皮 *Clausena lansium* 的干燥叶(黄皮叶干燥粗粉用 70% 乙醇提取后浓缩后所得,批号 20130506)。卵清蛋白(OVA,美国 Sigma 公司,批号 9006-59-1),氢氧化铝凝胶(美国 Sigma 公司,批号 A8222),灭活百日咳杆菌(北京生物制品研究所,批号 R201002),地塞米松片(天津药业集团新郑股份有限公司,批号 120307),一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成公司,批号 A102),蛋白定量试剂盒(南京建成公司,批号 A045-2),IL-4,IFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒(武汉博士德公司,批号 EK0406),PCR 引物,内参照  $\beta$ -actin 引物均由上海生物工程有限公司合成,Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026),逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司,批号 k1622),DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2 ×,美国 Fermentas 公司,批

号 k1081)。黄皮叶提取物制备:黄皮叶干燥粗粉 500 g 依次以物液比 1:10,1:8,1:6 加入 70% 乙醇溶液,回流提取 3 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,将滤液于旋转蒸发仪减压浓缩并真空干燥至稠膏状备用(批号 20130506)。

**1.3 仪器** FA2004 型电子天平(上海精密仪器厂),RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),402AI 型超声波雾化器(江苏鱼跃公司),Axioert 40 型倒置显微镜(德国 ZEISS 公司),libra S32PC 型紫外分光光度计(英国 Biochrom 公司),PTC-100 型 PCR 仪(美国 MJ Research 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** 取健康雄性 SD 大鼠 48 只,随机分为 6 组,正常组,哮喘模型组,地塞米松组(1.5 mg·kg<sup>-1</sup>),黄皮叶提取物低、中、高剂量组(520, 1 040, 2 080 mg·kg<sup>-1</sup>),每组 8 只。正常组、哮喘模型组以等量生理盐水 ig。

**2.2 哮喘大鼠模型的建立** 除正常组外,其余各组大鼠进行哮喘模型的建立。致敏阶段:大鼠分别于第 1,7 天给予 ih 致敏液 1 mL(致敏液含 OVA 10 mg + 氢氧化铝凝胶 200 mg + 灭活百日咳杆菌 5 × 10<sup>9</sup>);激发阶段:从第 15 天开始每天将大鼠置于自制密闭有机玻璃箱内,用 402AI 型超声雾化器给予 2% OVA/PBS 溶液 50 mL 雾化吸入,雾化吸入前 1 h 分别给予地塞米松(1.5 mg·kg<sup>-1</sup>),黄皮叶提取物低、中、高(520, 1 040, 2 080 mg·kg<sup>-1</sup>)剂量 ig,每天激发 1 次,激发时间为 30 min,共雾化激发 1 周。在雾化过程中大鼠出现喘息、咳嗽、躁动等典型的哮喘发作症状为诱喘成功。正常组则以生理盐水代替致敏原注射和雾化吸入。

**2.3 标本采集** 大鼠于最后 1 次激发后 24 h 内,ip 10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉,用无菌手术器械开胸后迅速以一次性负压真空采血管行心脏采血,以 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,去上清装于高压过

的 EP 管内,并置于 -80 °C 低温冰箱冻存用于 ELISA 检测;采血后取出右上肺、右中肺及右下肺,剪成大小约 1 cm × 1 cm,用 0.1% DEPC 水漂洗后装入冻存管内,立即放于液氮中保存,之后放于 -80 °C 冻存,用于 RT-PCR 及肺组织内 NO 的测定;左肺则经主支气管内灌注 4% 多聚甲醛 6 mL 固定,置于 4% 多聚甲醛中保存,24 h 后做石蜡包埋,切片(4 μm 左右厚度),常规 HE 染色。

**2.4 黄皮叶提取物对哮喘大鼠血清一氧化氮(NO),白三烯 D<sub>4</sub>(LTD<sub>4</sub>),IFN-γ,IL-4 及肺组织 NO 的影响** 采用 ELISA 检测试剂盒分别检测各组血清中 NO, LTD<sub>4</sub>, IL-4, IFN-γ 的蛋白含量及硝酸还原法测肺组织 NO 含量。

**2.5 RT-PCR 法测定肺组织 IFN-γ, IL-4 mRNA 的表达** 大鼠肺组织制备匀浆后,加入 1.0 mL Trizol 裂解液中(按试剂说明书操作)抽提肺组织总 RNA。逆转录及 cDNA 的扩增严格按照试剂盒操作方法进行。IL-4 RT-PCR 扩增反应 IL-4 上游引物 5'-CGGAATTCAACACCACGGAGAT-3', 下游引物 5'-CCGCTCGAGCAGTGAGTTCAGT-3', 扩增产物长度为 211 bp。IFN-γ 基因引物序列如下,上游引物 5'-CGAATTC CAAGGCACACTCATT-3', 下游引物 5'-

CCGCTCGAGTCAGCACCGACTT-3', 扩增产物长度为 383 bp。内参为 β-actin, 上游引物 5'-ATGGGTTTTAGGCGCAGAGTTT-3', 下游引物 5'-ATGGGTTTTAGGCGCAGAGTTT-3', 扩增产物长度为 424 bp。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 退火(IL-4 59.5 °C, IFN-γ 63 °C, β-actin 50 °C) 30 s, 72 °C 延伸 30 s, (IL-4 37 s, IFN-γ 37 s, β-actin 32 s) 循环;72 °C 总延伸 10 min。取 5 μL PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,并使用凝胶成像系统进行扫描分析。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 分析软件进行统计学分析,实验结果均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间的比较采用方差分析,两两比较采用 *q* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对哮喘大鼠血清 NO, LTD<sub>4</sub>, IFN-γ, IL-4 及肺组织 NO 的影响** 与正常组比较,模型组大鼠血清中 NO, LTD<sub>4</sub>, IL-4 及肺组织 NO 的含量明显升高, IFN-γ 的含量明显降低(*P* < 0.01);与模型组比较,黄皮叶提取物低、中、高剂量组均能明显减少血清中 NO, LTD<sub>4</sub>, IL-4 及肺组织 NO 的含量,明显增加 IFN-γ 的含量(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。见表 1。

表 1 黄皮叶提取物对哮喘大鼠血清 NO, LTD<sub>4</sub>, IFN-γ, IL-4 及肺组织 NO 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effects of Clausenae Lansii Folium extracts on levels of NO, LTD<sub>4</sub>, IFN-γ, IL-4 in serum and NO in lung tissue of asthmatic rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	血清				肺组织 NO /μmol·g <sup>-1</sup>
		NO/μmol·L <sup>-1</sup>	LTD <sub>4</sub> /mg·L <sup>-1</sup>	IFN-γ/ng·L <sup>-1</sup>	IL-4/ng·L <sup>-1</sup>	
正常	-	25.62 ± 3.66 <sup>2)</sup>	3.00 ± 1.01 <sup>2)</sup>	44.17 ± 2.28 <sup>2)</sup>	62.64 ± 2.38 <sup>2)</sup>	6.34 ± 2.91 <sup>2)</sup>
模型	-	49.98 ± 9.37	6.48 ± 2.73	34.24 ± 1.55	111.71 ± 2.39	10.28 ± 2.82
地塞米松	1.5	30.82 ± 4.37 <sup>2)</sup>	4.75 ± 1.86 <sup>1)</sup>	82.92 ± 3.10 <sup>2)</sup>	71.97 ± 1.89 <sup>2)</sup>	6.18 ± 2.21 <sup>2)</sup>
黄皮叶提取物	520	43.32 ± 3.52 <sup>1)</sup>	6.15 ± 2.47	56.36 ± 1.90 <sup>2)</sup>	93.54 ± 1.94 <sup>2)</sup>	10.16 ± 0.87
	1 040	36.32 ± 8.91 <sup>2)</sup>	5.50 ± 2.09	65.30 ± 3.45 <sup>2)</sup>	85.70 ± 2.29 <sup>2)</sup>	7.48 ± 1.98 <sup>1)</sup>
	2 080	36.00 ± 4.02 <sup>2)</sup>	4.30 ± 1.37 <sup>1)</sup>	73.95 ± 2.01 <sup>2)</sup>	77.33 ± 1.71 <sup>2)</sup>	6.96 ± 2.75 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>*P* < 0.05, <sup>2)</sup>*P* < 0.01(表 2 同)。

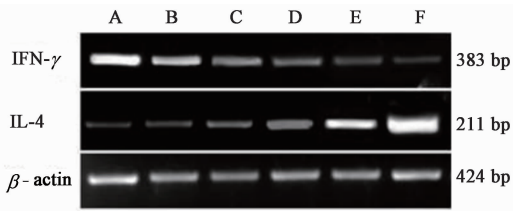
**3.2 对哮喘大鼠肺组织 IFN-γ, IL-4 mRNA 表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠肺组织中 IFN-γ mRNA 表达明显降低, IL-4 mRNA 表达明显升高;与模型组比较,黄皮叶提取物高、中、低剂量组哮喘大鼠肺组织中 IFN-γ mRNA 表达明显增多, IL-4 mRNA 表达明显减少,且呈剂量依赖性。见图 1。

**3.3 对哮喘大鼠肺组织病理学的影响** 哮喘模型组肺泡间质明显增宽、充血,有较多的炎症细胞,肺泡功能萎缩;黄皮叶提取物高、中剂量组显示大鼠肺泡间质较模型组有明显改善,炎症细胞明显减少,肺泡功能有所好转。说明黄皮叶提取物有减少哮喘大鼠肺

组织炎症细胞浸润,改善肺泡功能的作用。见图 2。

### 4 讨论

支气管哮喘是由多种炎症细胞参与的慢性变态反应性疾病,炎症细胞通过合成和释放多种炎症介质及细胞因子而诱发哮喘发作,辅助性 T<sub>H</sub>1 控制哮喘的炎症反应<sup>[3]</sup>。研究认为初始 Th0 激活后,可以分化为 Th1 细胞, Th2 细胞和调节性 T 细胞(Treg)等。Th2 细胞介导体液免疫应答,辅助 B 淋巴细胞合成 IgE,上调 IL-4 和 IL-13 等,加重哮喘炎症反应; Th1 细胞介导细胞免疫应答,通过促进分泌 IFN-γ, IL-12 等细胞因子,而逆转哮喘气道炎症。本实验通



A. 正常组; B. 模型组; C. 地塞米松组; D. 黄皮叶提取物 2 080 mg·kg<sup>-1</sup>组; E. 黄皮叶提取物 1 040 mg·kg<sup>-1</sup>组; F. 黄皮叶提取物 520 mg·kg<sup>-1</sup>组(图 2 同)

图 1 黄皮叶提取物对哮喘大鼠肺组织 IFN- $\gamma$ , IL-4 mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effects of *Clausenae Lansii Folium* extracts on expression of IFN- $\gamma$ , IL-4 mRNA on lung tissues in asthmatic rats

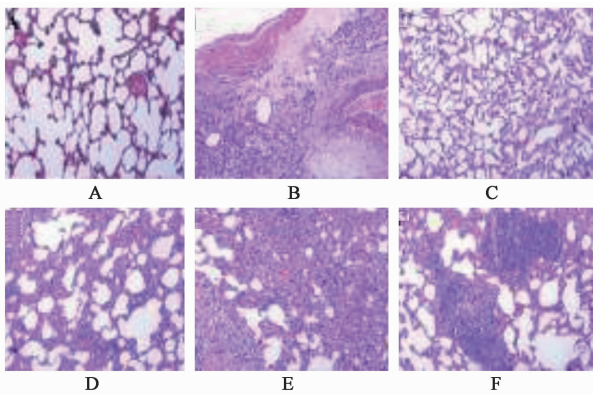


图 2 黄皮叶提取物对哮喘大鼠肺组织病理学的影响(HE,  $\times 100$ )

Fig. 2 Effects of *Clausenae Lansii Folium* extracts on pathological changes of lung tissues in asthmatic rats (HE,  $\times 100$ )

过建立哮喘大鼠模型,分别检测哮喘大鼠血清中 IFN- $\gamma$ , IL-4 含量及肺组织中 IFN- $\gamma$ , IL-4 mRNA 的表达,结果提示:与哮喘模型大鼠组比较,黄皮叶提取物高、中、低剂量组大鼠血清中 IL-4 含量及 IL-4 mRNA 的表达明显降低;而血清中 IFN- $\gamma$  含量及 IFN- $\gamma$  mRNA 表达明显升高。说明黄皮叶提取物可以通过降低 IL-4 的表达和升高 IFN- $\gamma$  的表达来调节 IL-4/IFN- $\gamma$  比例的失衡,从而减少哮喘的炎症反应。

与哮喘相关的炎症介质有 20 多种,主要有组胺、白三烯(LTs)、前列腺素、血小板活化因子、碱性蛋白质和细胞因子<sup>[4]</sup>。而白三烯的合成与释放和肥大细胞,EOS 密切相关,这两种细胞正是与哮喘有关的关键细胞。LTD<sub>4</sub> 可以通过促进炎症细胞尤其是嗜酸性粒细胞聚集及增加其他细胞因子,如 IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  等的生成和增加其活性,引起气道毛细血管血管通透性增加、黏液分泌增多,导致气道炎症发生。而 NO 在哮喘的发病中具有双相作用,

在生理状态下,机体产生低浓度 NO 可以选择性的提高对 Th1 细胞的诱导,而对 Th2 细胞无影响。因此低浓度 NO 可介导支气管平滑肌的松弛和血管的舒张反应,降低哮喘患者的气道高反应;在病理状态下,局部大量高浓度的 NO 可选择性抑制 Th1 细胞增殖和 IL-12, IFN- $\gamma$  的产生,使 Th2 细胞大量增殖,促使释放 IL-4, IL-5 等细胞因子,加重气道嗜酸性粒细胞的浸润,引起气道充血、血浆渗漏,造成肺上皮细胞及组织损伤,诱发和加重气道的炎症反应<sup>[5]</sup>。本实验通过检测哮喘大鼠血清中 LTD<sub>4</sub>, 血清及肺组织中 NO 含量,发现黄皮叶提取物高、中剂量组能明显降低哮喘大鼠血清及肺组织中 NO 的含量,从而减少高浓度的 NO 对气道及肺组织的损伤,缓解气道的炎症反应。而黄皮叶提取物组高剂量组能减少哮喘大鼠血清中 LTD<sub>4</sub> 的含量,说明黄皮叶提取物高剂量组能减少气道炎症介质的释放,从而减少哮喘的炎症反应。

总之,本实验利用黄皮叶提取物对哮喘大鼠模型进行干预,结果显示黄皮叶提取物能减少哮喘大鼠的炎症反应,其作用机制可能为通过减少血清 IL-4 含量及肺组织中 IL-4 mRNA 表达,增加血清中 IFN- $\gamma$  及肺组织中 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达,调节 Th1/Th2 比例的失衡,减少哮喘炎症反应;另黄皮叶提取物还可通过减少血清中 NO 及肺组织中 NO 含量、减少 LTD<sub>4</sub> 中含量,从而减少炎症介质对气道及组织的损伤,从而改善哮喘大鼠的炎症反应。

#### [参考文献]

- [1] 朴红梅,宋秋红,金延燕,等. 白花蛇舌草对哮喘模型小鼠 Th1/Th2 免疫平衡的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(17): 1281-1385.
- [2] 黄桂红,邓航,陈薇,等. 黄皮叶萃取物镇咳、祛痰及平喘作用研究[J]. 天津医药, 2013, 41(3): 234-237.
- [3] 王俊琴,马福成,田卫斌. 椒目油 A2 对不同时相哮喘小鼠肺组织 NF- $\kappa$ B 信号通路及炎症因子表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6): 1120-1126.
- [4] 谭显曙,万莉红,匡文娟. 如意定喘丸对支气管哮喘大鼠慢性气道炎症的干预作用[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(5): 11-13.
- [5] 王力宁,李志峰,陈平兰,等. 六味地黄颗粒对哮喘大鼠血清 NO 及肺组织 NOS 水平影响的研究[J]. 广西中医药, 2011, 34(1): 47-52.

[责任编辑 周冰冰]