

止哮平喘方对哮喘大鼠肺组织 EOS 凋亡及 Fas, Bcl-2 基因表达的影响

潘丰满^{1*}, 张燕翔¹, 李祥华¹, 杜亚明¹, 王鹏²

(1. 长江大学医学院, 湖北 荆州 434023; 2. 湖北中医药大学临床医学院, 武汉 430061)

[摘要] **目的:**观察止哮平喘方对哮喘大鼠肺组织嗜酸性粒细胞(EOS)凋亡及 Fas, B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2) mRNA 表达的影响,探讨止哮平喘方影响哮喘大鼠肺组织 EOS 凋亡的机制。**方法:**SD 大鼠 60 只,随机分为正常对照组、哮喘模型组、地塞米松治疗组($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、止哮平喘方低、中、高剂量组($11, 22, 44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),每组 10 只。采用卵蛋白(OVA)致敏和激发复制哮喘大鼠模型,共治疗 14 d。取右中肺组织 4% 多聚甲醛固定,石蜡切片,原位末端转移酶标记技术(TUNEL)检测肺组织 EOS 凋亡,原位杂交检测 Fas, Bcl-2 mRNA 的表达。**结果:**与正常组比较,哮喘模型组大鼠肺组织中 EOS 的数量较多, EOS 凋亡减少,同时 Fas mRNA 表达明显降低、Bcl-2 mRNA 的表达明显增加($P < 0.01$)。药物干预后,各治疗组 EOS 凋亡增加, Fas mRNA 表达增加、Bcl-2 mRNA 表达降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。Fas mRNA 表达与 EOS 凋亡呈正相关($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 表达与 EOS 凋亡呈负相关($P < 0.01$)。**结论:**止哮平喘方可促进肺组织 Fas mRNA 表达、抑制 Bcl-2 mRNA 的表达,促进肺组织 EOS 凋亡,减轻气道炎症,从而发挥平喘作用。

[关键词] 止哮平喘方; 哮喘; 嗜酸性粒细胞; 凋亡; TUNEL 法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0219-04

[doi] 10.11653/syjf2013180219

Effects of Zhixiao Pingchuan Prescription on Eosinophil Apoptosis and Expression of Fas/Bcl-2 mRNA in Asthmatic Rats

PAN Feng-man^{1*}, ZHANG Yan-xiang¹, LI Xiang-hua¹, DU Ya-ming¹, WANG Peng²

(1. School of Medicine, Yangtze University, Jingzhou 434023, China;

2. Clinical Medical College, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effects of Zhixiao Pingchuan prescription on eosinophil (EOS) apoptosis and expression of Fas B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) mRNA in asthmatic rats. **Method:** Sixty SD rats were randomly assigned to 6 groups including normal control group, asthma model group, dexamethasone treated group, low dosage group, middle dosage group and high dosage group of Zhixiao Pingchuan prescription. The rat asthma model was established by sensitization and challenge of ovalbumin (OVA). After the rat models were formed successfully, the decoction of Zhixiao Pingchuan prescription was given. Twenty-one days later, their right lungs were removed for investigation. Apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay, the expressions of Fas mRNA and Bcl-2 mRNA in the lung tissue were detected in situ hybridization. **Result:** Compared with normal group, the count of EOS increased and EOS apoptosis rates decreased, the expression of Fas mRNA significantly decreased and the expression of Bcl-2 mRNA significantly increased in model group ($P < 0.01$). Compared with model group, EOS apoptosis rates and the expression of Fas mRNA increased significantly, while the expression of Bcl-2 mRNA decreased significantly in each treatment group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). A positively significant correlation was found between the Fas mRNA expression and EOS apoptosis in each group ($P < 0.01$), and a very significant negative correlation was found

[收稿日期] 20130515(012)

[基金项目] 长江大学博士科研启动基金课题(801250010117)

[通讯作者] * 潘丰满, 博士, 副教授, 主要从事中医呼吸病教学、临床、科研工作, Tel: 0716-8062624, E-mail: pfm2@163.com

between the Bcl-2 mRNA expression and EOS apoptosis ($P < 0.01$). **Conclusion:** By means of promoting EOS apoptosis, Fas mRNA expression and inhibiting Bcl-2 mRNA expression, Zhixiao Pingchuan prescription could reduce airway inflammation in asthmatic rats.

[Key words] Zhixiao Pingchuan prescription; asthma; eosinophil; apoptosis; TUNEL

支气管哮喘是由多种细胞特别是肥大细胞、嗜酸性粒细胞(EOS)和T淋巴细胞参与的气道慢性炎症,可引起气道高反应性(AHR),导致可逆性气道阻塞性疾病^[1]。EOS的浸润被认为是哮喘炎症的特征性标志,是气道炎症的中心环节。其他大多数炎症性细胞最终是通过EOS而产生效应。EOS的凋亡在哮喘气道炎症清除中有重要的意义。止哮平喘方是第五批全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师王鹏教授诊治支气管哮喘的经验方,有宽胸理气、通阳散结、化痰解痉的作用,临床疗效确切^[2]。前期研究表明,本方能降低哮喘大鼠血清免疫球蛋白E(IgE)、白介素(IL-5)、IL-13水平,调节哮喘大鼠免疫功能^[3]。本研究以气道炎症反应的关键细胞EOS为切入点,进一步从肺组织EOS凋亡及其调控基因Fas、B细胞淋巴瘤/白血细胞-2(Bcl-2)mRNA表达等方面探讨止哮平喘方的平喘机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级SD大鼠60只,雄性,体质量200~300g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,实验动物许可证号SYXK(鄂)2004-0007。

1.2 仪器 YBL-III生物组织冷冻包埋机(孝感),TSJ-1真空组织脱水机(天津),徕卡RM2025切片机(德国LEICA),Olympus BX50F双目显微镜(日本Olympus),JSC-OK多功能型超声波雾化器,辽宁鞍山市电子医疗仪器厂。

1.3 药物与试剂 醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号071048);止哮平喘方(瓜蒌、薤白、法半夏、柴胡、黄芩、枳壳、白芍、甘草、麻黄、射干等),以上中药饮片购自荆州市中药材公司,经由荆州市食品药品监督管理局刘以民副主任药师检验鉴定均系正品。水煎煮,恒温水浴浓缩至高、中、低剂量原生药含量为4.4,2.2,1.1g·mL⁻¹;置于4℃冰箱保存备用。卵蛋白(Sigma公司,批号061218);细胞凋亡检测试剂盒(MK1020)、大鼠Fas原位杂交检测试剂盒(MK1113)、大鼠Bcl-2原位杂交检测试剂盒(MK1050,武汉博士德生物工程有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备 参照文献方法[4]采用卵蛋白致敏和激发复制哮喘大鼠模型。除正常组外,于第1天、第

8天用新鲜配制的卵蛋白100mg+氢氧化铝200mg+生理盐水1mL混悬液在大鼠两侧腹股沟、前足跖,共4点做皮下注射,每点0.2mL,同时ip0.2mL。

2.2 分组与给药 大鼠随机分为6组,每组10只。于实验第8天开始,正常组、哮喘模型组大鼠(ig给予生理盐水),地塞米松组(地塞米松,1mg·kg⁻¹·d⁻¹),止哮平喘方低、中、高剂量组(止哮平喘方11,22,44g·kg⁻¹·d⁻¹),大鼠ig1次/d,连续给药14d。动物用药剂量根据人(60kg)与大鼠(200g)体表面积折算。实验第15~21天每天给药后30min,分批将致敏的大鼠置于30cm×20cm×25cm自制密闭玻璃容器内,给予1%卵蛋白生理盐水进行超声雾化吸入25min·d⁻¹,雾化流量为3mL·min⁻¹,连续7d,以激发哮喘。正常组以等量生理盐水进行腹腔注射和雾化。

2.3 标本采集 实验第22天,即末次给药24h后,用20%乌拉坦腹腔注射(5mL·kg⁻¹)麻醉大鼠,常规消毒颈、胸、腹部皮肤,完成肺溢流实验后,开胸迅速摘取右中肺组织,4%多聚甲醛固定。

2.4 大鼠肺组织EOS凋亡检测 采用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的原位缺口末端标记(TUNEL)法检测肺组织EOS凋亡,参考细胞凋亡检测试剂盒说明书操作。高倍光镜(400×)下观察EOS凋亡,经DAB显色细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡细胞,细胞计数方法为分别连续数5个高倍视野下(400×)的EOS数和凋亡EOS数,凋亡细胞所占相应细胞的百分比即为EOS凋亡率。

2.5 大鼠肺组织Fas,Bcl-2 mRNA表达检测 采用原位杂交法检测大鼠肺组织Fas,Bcl-2 mRNA的表达,按大鼠Fas,Bcl-2原位杂交检测试剂盒说明书进行操作。高倍光镜(400×)随机选择视野,经DAB显色阳性细胞的细胞浆呈棕黄色,每张片子至少计数200个EOS以上,求阳性细胞所占百分率。

2.6 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件。各组间均数比较采用单因素方差分析,相关分析用Pearson法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肺组织EOS凋亡的影响 正常组大鼠肺组

织中 EOS 数量较少,但 EOS 凋亡率较高,约为 11%。模型组大鼠肺组织中 EOS 数量较多,EOS 凋亡率仅为 3%,明显低于正常组($P < 0.01$)。应用药物干预后,各治疗组肺组织中 EOS 凋亡率均较模型组增加,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),以地塞米松组和大剂量组 EOS 凋亡增加更明显,与正常组比较差异无统计学意义。见表 1,图 1。

3.2 对肺组织 Fas、Bcl-2 mRNA 表达的影响

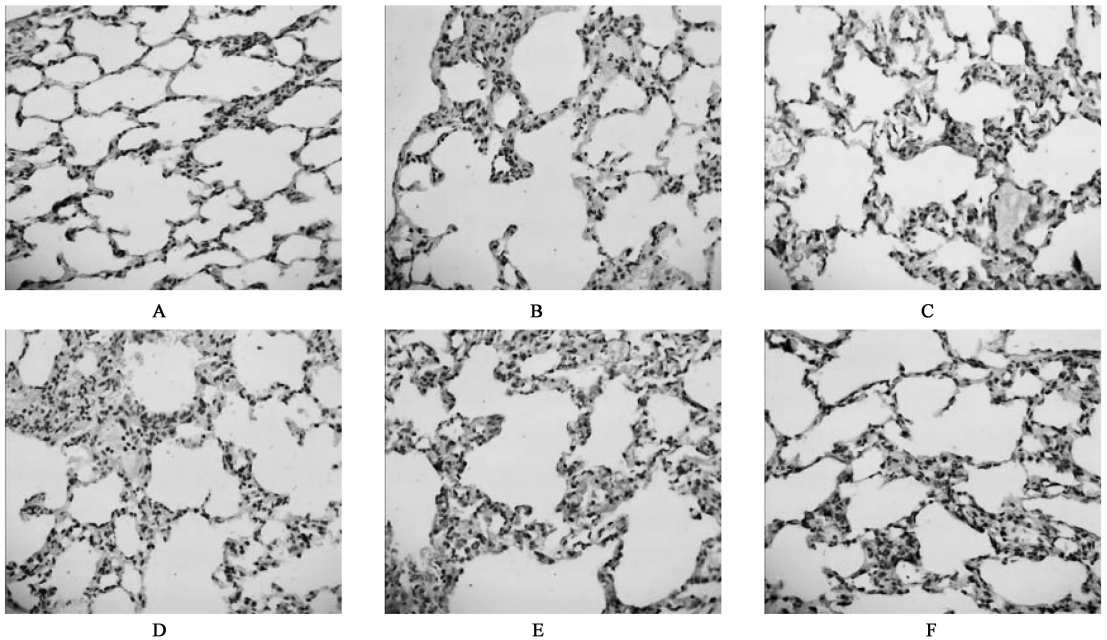
肺组织切片经原位杂交,DAB 显色后,阳性 EOS 呈棕黄

色。正常组大鼠肺组织 Fas mRNA 表达较高、Bcl-2 mRNA 的表达较低。模型组大鼠肺组织 Fas mRNA 表达明显减少、Bcl-2 mRNA 的表达明显增多,与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各治疗组与模型组比较,均表现为 Fas mRNA 阳性表达细胞相对增多,而 Bcl-2 mRNA 阳性表达细胞相对减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。其中尤其以地塞米松组和止哮喘平喘方高、中剂量组变化更明显,与正常组比较无显著性差异。见表 1。

表 1 止哮喘平喘方对各组大鼠肺组织 EOS 凋亡率,Fas,Bcl-2 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	EOS 凋亡率	Fas mRNA 表达	Bcl-2 mRNA 表达
正常	-	11.15 ± 2.57	68.88 ± 9.44	45.15 ± 8.79
模型	-	3.03 ± 0.98 ²⁾	32.92 ± 8.05 ²⁾	81.62 ± 6.56 ²⁾
地塞米松	0.001	8.66 ± 2.40 ⁴⁾	63.64 ± 8.52 ⁴⁾	48.19 ± 8.17 ⁴⁾
止哮喘平喘方	11	6.33 ± 2.60 ^{2,3)}	46.66 ± 11.07 ^{2,3)}	65.75 ± 9.32 ^{2,3)}
	22	7.74 ± 2.68 ^{1,4)}	55.86 ± 10.92 ⁴⁾	54.03 ± 12.00 ⁴⁾
	44	8.10 ± 2.98 ⁴⁾	58.90 ± 12.27 ⁴⁾	50.56 ± 15.08 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。



A. 正常对照组;B. 模型组;C. 地塞米松 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. 止哮喘平喘方 $11 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E. 止哮喘平喘方 $22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;F. 止哮喘平喘方 $44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 止哮喘平喘方对大鼠肺组织 EOS 凋亡的影响(TUNEL 法, $\times 400$)

3.3 大鼠肺组织中 Fas、Bcl-2 mRNA 表达与 EOS 凋亡的关系

经 Pearson 相关分析发现,各组大鼠肺组织中 Fas mRNA 的表达与 EOS 的凋亡间存在明显的正相关($r = 0.513, P < 0.01$),Bcl-2 mRNA 的表达与 EOS 的凋亡间存在着明显的负相关($r = -0.485, P < 0.01$)。

4 讨论

哮喘是多种细胞及介质参与的慢性气道炎症,EOS 在哮喘气道炎症中起关键作用^[5],其他大多数

炎症细胞最终是通过 EOS 而产生效应。哮喘气道中的 EOS 可能有 5 种减少的途径^[6]:进入气道组织的 EOS 数目减少;气道组织内原有的 EOS 大量转移、分布到其他器官;EOS 坏死性死亡;EOS 凋亡;EOS 进入气道腔,排出体外。其中,EOS 的凋亡是 EOS 在气道的清除和哮喘气道炎症缓解的关键机制之一^[7],而 EOS 凋亡受抑或凋亡延迟是导致气道炎症发展和持续的重要因素^[8]。

细胞凋亡是多基因控制的,原癌基因 Fas、Bcl-2

是影响 EOS 凋亡的重要基因。Fas 是一促凋亡基因,哮喘气道内的炎症的消除需要 Fas 及 Fas 的配体介导的细胞凋亡清除无用的炎性细胞来实现^[9]。Bcl-2 是一种抑制细胞凋亡的原癌基因。在严重哮喘患者痰中的 EOS 有明显的 Bcl-2 表达,其表达与嗜酸细胞阳离子蛋白(ECP)及白细胞介素(IL)-5 水平正相关,哮喘时 Bcl-2 可以延长气道中 EOS 存活抑制凋亡^[10]。动物实验证实,哮喘豚鼠 BALF 中 EOS 的凋亡率降低,同时,Fas 表达与 EOS 凋亡呈正相关,而 Bcl-2 的表达与 EOS 凋亡呈负相关($P < 0.05$)。地塞米松则可促进 EOS 上 Fas 表达,抑制其 Bcl-2 表达,促进 EOS 凋亡^[11]。

支气管哮喘属中医“哮病”范畴,笔者通过临床研究认为^[12-13],痰饮伏肺既是哮喘发病潜在的“宿根”,也是哮喘发作的病理关键。胸(肺)阳郁闭、气机郁滞是哮喘发作的主要病理特点。痰为阴邪,易郁闭胸(肺)阳、阻滞气机,致痰气交阻于气道,气道挛急而致哮喘发作。止哮平喘方由瓜蒌薤白半夏汤、小柴胡汤、芍药甘草汤等三方化裁而成,取瓜蒌薤白半夏汤之通阳散结、祛痰宽胸;小柴胡汤之和解枢机、宽胸理气;芍药甘草汤之酸甘化阴、缓急解痉作用;更加射干、麻黄祛痰平喘。诸药合用,可宽胸理气、通阳散结、化痰解痉,以止哮平喘。实验研究证实,黄芩的有效成分黄芩苷可显著减少哮喘豚鼠血及肺泡灌洗液内 EOS 计数及细胞总数,抑制哮喘气道炎症反应而平喘^[14]。

本实验研究发现,与正常组比较,模型组大鼠组肺组织 EOS 凋亡率降低,同时 EOS 上 Fas mRNA 表达显著减少、Bcl-2 mRNA 表达显著增多($P < 0.01$),说明哮喘大鼠气道炎症的存在与 EOS 凋亡减少有关,EOS 凋亡调控基因表达比例失调可能是其主要原因之一。应用药物干预后,各治疗组大鼠肺组织 EOS 凋亡明显增多,同时 Fas mRNA 表达明显增多、Bcl-2 mRNA 表达显著减少,与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。其中,止哮平喘方大剂量组诱导 EOS 凋亡的作用及其大、中剂量组调控 Fas、Bcl-2 mRNA 表达的作用与地塞米松组效果相当。相关分析发现,各组大鼠肺组织中 Fas mRNA 的表达与 EOS 的凋亡间存在明显的正相关($r = 0.513, P < 0.01$),Bcl-2 mRNA 的表达与 EOS 的凋亡间存在着明显的负相关($r = -0.485, P < 0.01$)。实验结果表明,止哮平喘方具有促进哮喘大鼠肺组织 EOS 的凋亡,减轻气道炎症的作用,且有明显的剂量依赖关系。其作用机制可能与促进肺组织 Fas mRNA

的表达、抑制 Bcl-2 mRNA 的表达有关。

[参考文献]

- [1] Szeffler S J, Baker J W, Uryniak T, et al. Comparative study of budesonide inhalation suspension and montelukast in young children with mild persistent asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 120(5):1043.
- [2] 胡作为,周燕萍. 中药止哮平喘方对支气管哮喘发作期患者 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 陕西中医, 2004, 25(4):321.
- [3] 潘丰满,杜亚明. 止哮平喘方对哮喘大鼠血清 IgE、IL-5、IL-13 的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7):1711.
- [4] 刘含,王力宁,黄小琪,等. 六味地黄颗粒协同辅舒酮吸入对哮喘大鼠 IFN- γ 和 IL-4 影响的研究[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(9):539.
- [5] Maa S H, Wang C H, Liu C Y, et al. Endogenous nitric oxide downregulates the Bcl-2 expression of eosinophils through mitogen-activated protein kinase in bronchial asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 112(4):761.
- [6] 蔡彦,陈文裕,陈创荣,等. 纳子法电针治疗对哮喘模型豚鼠嗜酸性粒细胞凋亡的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(2):124.
- [7] Woolley K L, Gibson P G, Carty K, et al. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154(1):237.
- [8] Xu J, Jiang F, Nayeri F, et al. Apoptotic eosinophils in sputum from asthmatic patients correlate negatively with levels of IL-5 and eotaxin [J]. Respir Med, 2007, 101(7):1447.
- [9] Chuang Y H, Fu C L, Lo Y C, et al. Adenovirus expressing Fas ligand gene decreases airway hyper-responsiveness and eosinophilia in a murine model of asthma [J]. Gene Ther, 2004, 11(20):1497.
- [10] Jang A S, Choi I S, Lee S, et al. Bcl-2 expression in sputum eosinophils in patients with acute asthma [J]. Thorax, 2000, 55(5):370.
- [11] 李志奎,刘刚,王长征,等. 地塞米松对哮喘豚鼠嗜酸性粒细胞凋亡及 fas、bcl-2 mRNA 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(3):577.
- [12] 潘丰满,张德新. 王鹏教授从风痰气论治哮喘发作期经验介绍[J]. 新中医, 2009, 41(3):20.
- [13] 张德新,潘丰满. 肺阳理论与临床再认识[J]. 江苏中医药, 2007, 39(11):13.
- [14] 倪健,董竞成. 三种中药药效成分抗支气管哮喘变应性炎症的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4):49.

[责任编辑 聂淑琴]