

喘平方对哮喘豚鼠肺泡灌洗液中 IgE, TGF- β_1 及 TNF- α 的影响

张雄飞, 黄娟萍, 罗裕, 谢吉福, 柴金珍, 江力, 朱盛山*
(广东药学院中药开发研究所, 广州 510006)

[摘要] 目的: 探讨喘平方防治支气管哮喘的作用机制。方法: 取白化豚鼠 60 只, 随机分为正常组、模型组、麻黄组(0.20 g·kg⁻¹)、洋金花组(0.07 g·kg⁻¹)、喘平方组(0.32 g·kg⁻¹)、地塞米松组(7.5 × 10⁻⁴ mg·kg⁻¹), 通过对豚鼠 ip 卵蛋白致敏并雾化吸入激发, 建立实验性哮喘豚鼠模型; 治疗组自注射第 14 天起每天 ig 给药 1 次, 连续 7 d, 正常组及模型组给予生理盐水。观察豚鼠的一般情况, 豚鼠肺泡灌洗液中免疫球蛋白 E(IgE), 转化生长因子 β_1 (TGF- β_1), 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的变化, 肺组织病理情况。结果: 各组豚鼠肺泡灌洗液中 IgE, TGF- β_1 , TNF- α 分别为: 正常组 IgE(68.25 ± 5.92) mg·L⁻¹, TGF- β_1 (78.72 ± 10.92) ng·L⁻¹, TNF- α (388.02 ± 55.61) ng·L⁻¹; 模型组 IgE(137.28 ± 14.38) mg·L⁻¹, TGF- β_1 (172.39 ± 14.04) ng·L⁻¹, TNF- α (752.76 ± 51.25) ng·L⁻¹; 喘平方组 IgE(76.35 ± 6.22) mg·L⁻¹, TGF- β_1 (115.76 ± 9.17) ng·L⁻¹, TNF- α (569.32 ± 39.7) ng·L⁻¹; 哮喘组及喘平方组豚鼠肺泡灌洗液中 IgE, TGF- β_1 , TNF- α 含量均高于正常组($P < 0.05$); 喘平方组豚鼠肺泡灌洗液中 IgE, TGF- β_1 , TNF- α 含量均低于哮喘组($P < 0.05$)。结论: 喘平方能够通过下调豚鼠肺泡灌洗液中 IgE, TGF- β_1 , TNF- α 含量, 可降低气道高反应性、减轻气道炎症症状、控制或延缓气道纤维化进程。

[关键词] 哮喘; 作用机制; IgE; 转化生长因子 β_1 ; 肿瘤坏死因子 α ; 喘平方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0172-04

[doi] 10.11653/syfy2013110172

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130329.1409.009.html>

[网络出版时间] 2013-03-29 14:09

Effect of Chuanping Compound on IgE, Transforming Growth Factor-beta 1 and Tumor Necrosis Factor-alpha in BALF of Guinea Pig with Asthma

ZHANG Xiong-fei, HUANG Juan-ping, LUO Yu, XIE Ji-fu, CHAI Jin-zhen, JIANG Li, ZHU Sheng-shan*
(Research & Development Institute of Chinese Materia Medica of
Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic effect of Chuanping compound on guinea pigs with asthma. **Method:** All guinea pigs were given intraperitoneal injection of ovalbumin (OVA) and forced inhalation of atomized OVA to induce asthma. From the 14th day of modeling, the treatment groups were given the corresponding drugs according to the experimental design, ephedra groups (0.20 g·kg⁻¹), datura flower group (0.07 g·kg⁻¹), Chuanping compound group (0.32 g·kg⁻¹), dexamethasone group (7.5 × 10⁻⁴ mg·kg⁻¹), and the normal group and model group were given normal saline (NS), once a day for 7 days. The general state of the guinea pigs and the changes of immunoglobulin E (IgE); transforming growth factor-beta 1 (TGF- β_1) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were observed. **Result:** The levels of IgE, TGF- β_1 and TNF- α in BALF of guinea pigs: normal group IgE (68.25 ± 5.92) mg·L⁻¹, TGF- β_1 (78.72 ± 10.92) ng·L⁻¹, TNF- α (388.02 ± 55.61) ng·L⁻¹; model group IgE (137.28 ± 14.38) mg·L⁻¹, TGF- β_1 (172.39 ± 14.04) ng·L⁻¹, TNF- α (752.76 ± 51.25) ng·L⁻¹; Chuanping compound group IgE (76.35 ± 6.22)

[收稿日期] 20121223(002)

[基金项目] 国家“十二五”重大新药创制科技重大专项(2011ZX09102-011-01)

[第一作者] 张雄飞, 硕士, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel:020-39352540, E-mail:781290287@qq.com

[通讯作者] * 朱盛山, 教授, 博士生导师, 从事传统中药制剂技术现代化研究, Tel:020-39352539, E-mail:zhush3@126.com

mg·L⁻¹, TGF- β_1 (115.76 ± 9.17) ng·L⁻¹, TNF- α (569.32 ± 39.7) ng·L⁻¹; The levels of IgE, TGF- β_1 and TNF- α in BALF of the model group and Chuanping compound group were higher than those in the normal group. After treatment, IgE, TGF- β_1 and TNF- α levels in BALF of chuanping group were lower than those in the model group. **Conclusion:** Chuanping compound has an effect of reducing airway hyperresponsiveness, alleviating airway inflammation, controlling or delaying the process of airway fibrosis through up-regulation of IgE, TGF- β_1 and TNF- α levels in BALF of guinea pigs.

[**Key words**] asthma; mechanism of action; IgE; transforming growth factor-beta 1; tumor necrosis factor-alpha; Chuanping compound

哮喘是由嗜酸粒细胞(eosinophils, EOS)、肥大细胞、T淋巴细胞等多种细胞及其分泌的细胞因子参与的气道慢性炎症性疾病,同时也是一种外周免疫耐受机制发生缺陷的疾病^[1]。近年的研究越来越清晰地表明哮喘是种非常复杂的疾病,存在着各种发病机制,主要包括传统过敏原诱导的变态反应性哮喘和其他因素如空气污染引起的非变态反应性哮喘^[2]。喘平方为本所研究多年的平喘药物,主要由麻黄组成,药效学研究表明,本方可以明显改善支气管哮喘动物喘息情况。本文建立哮喘豚鼠支气管哮喘模型,观察喘平方对豚鼠肺泡灌洗液中免疫球蛋白 E(IgE)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 及肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的影响,以探讨其对支气管哮喘细胞因子的作用机制。

1 材料

1.1 动物 白化豚鼠,体重 250 ~ 300 g,雌雄各半,由广东省医学实验动物中心提供,动物生产许可证号 SCXK(粤)2008-0002;合格证号 0106269。

1.2 药品与试剂 麻黄与洋金花药材经广东药学院朱盛山教授鉴定麻黄为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎,洋金花为茄科植物白花曼陀罗 *Datura metel* L. 的干燥花;喘平方提取液、洋金花提取液、麻黄提取液由广东药学院中药开发研究所提供,提取方法与质控标准见文献报道^[3-5];转化生长因子 β_1 (TGF- β_1),肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IgE 试剂盒(美国, R&D 公司,批号 201207);地塞米松片(天津药业集团新郑股份有限公司,批号 110503);卵蛋白(美国, Sigma 公司)。

1.3 仪器 LB940 型多功能酶标仪(德国, Berthold); YLS-8A 型多功能诱咳引喘仪(济南益延科技发展有限公司); BC-5380 贝克曼五分类全血细胞分析仪(美国, Beckman-Coulter 公司)。

2 方法

2.1 造模与给药 取豚鼠 60 只,随机分为正常组、模型组、麻黄组(0.20 g·kg⁻¹)、洋金花组(0.07

g·kg⁻¹)、喘平方组(0.32 g·kg⁻¹)、阳性对照组(地塞米松 7.5 × 10⁻⁴ g·kg⁻¹),每组 10 只。采用豚鼠 ip 10% 卵蛋白 1 mL 致敏,自注射第 14 天起,每天上午、下午各 1 次将豚鼠置于雾缸内(正常组除外),用 1% 卵蛋白溶液超声雾化,任动物自行吸入 10 ~ 20 min,激发至哮喘发作,出现呼吸急促、点头、身体颤抖、伏地现象,提示造模成功,连续 7 d^[6-8]。豚鼠 ig 给药与诱喘同步进行,每组于当天 2 次激发间隔时间内 ig 给药 10 mL·kg⁻¹,每日 1 次,连续 7 d,正常组及模型组均 ig 给予等量生理盐水。

2.2 样品采集 各组豚鼠末次激发结束后,3% 戊巴比妥钠 1.0 mL·kg⁻¹ 麻醉,腹主动脉取血 2 mL 置 EDTA-2Na 抗凝试管中,作全血分析血细胞成分(当天检测);取血后开胸,分离出完整的气管、支气管和肺组织,结扎右侧主支气管,于主支气管喉软骨下 0.5 cm 处切一倒“T”型口,插入 18 号灌胃针头(达 1 cm 处),用手术丝线扎紧,接 5 mL 注射器(去针头),每次注入 3 mL 生理盐水,停留 30 s,缓慢吸出,重复 5 次,回收肺泡灌洗液(回收率达 80% 以上),将肺泡灌洗液 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后,取上清液,保存于 -80 °C 冰箱中(肺泡灌洗液于实验第 2 天进行检测)^[9]。常规留取右肺中叶组织,保留右肺门动脉及气管,将其放入已经编号的 10% 中性福尔马林固定液中,固定 48 h 后常规石蜡包埋切片,肺组织 HE 染色,用于镜下观察肺内支气管损失情况。

2.3 检测指标

2.3.1 血细胞成分分析 实验当天将 EDTA-2Na 抗凝血样用血细胞分析仪进行分析,检测嗜酸粒细胞数,淋巴细胞数,白细胞数。

2.3.2 切片病理情况观察 常规石蜡包埋切片,肺组织 HE 染色,用于镜下观察肺内支气管损失情况。

2.3.3 肺泡灌洗液中 IgE, TGF- β_1 , TNF- α 的检测 ELISA 法测量肺泡灌洗液中总 IgE, TGF- β_1 , TNF- α 的含量,检测方法按试剂盒提供的操作说明进行。

2.4 统计学处理 数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计处理,统计方法采用单因素方差分析,所有计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况 动物经 ip 卵蛋白致敏后,出现体重下降食欲不振;经激发后,模型组出现呼吸急促、张口喘息,伴动作迟缓毛皮干枯、稀疏等症状;同期正常组豚鼠饮食正常、毛皮光滑、体重增加;药物治疗组毛色光泽、饮食与正常组无异,喘平方组与地塞

米松组动物无明显不同症状,麻黄组与洋金花组豚鼠毛色较喘平方组稍差,体重增长较少。

3.2 血液中血细胞成分分析 哮喘模型组豚鼠血液中白细胞数、嗜酸粒细胞数、淋巴细胞数均明显高于正常组 ($P < 0.05$),经治疗后,地塞米松组与各中药治疗组豚鼠血液中上述各炎症细胞均明显下降。本实验条件下,喘平方组与地塞米松组各豚鼠各炎症细胞无明显差别,麻黄组、洋金花组各豚鼠较喘平方组有明显差别,说明喘平方治疗哮喘作用优于其单方。见表 1。

表 1 喘平方连续给药 7 d 对哮喘豚鼠血液中血细胞成分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

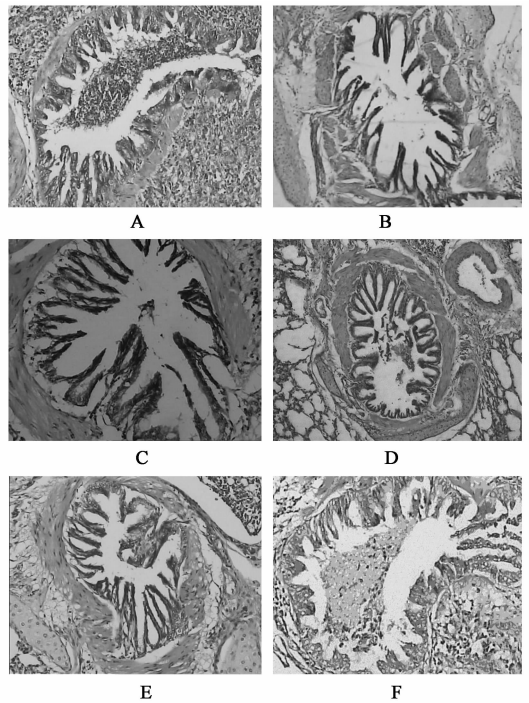
$10^9/L$

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	白细胞	嗜酸粒细胞	淋巴细胞
正常	-	$5.28 \pm 2.23^{1)}$	$0.022 \pm 0.011^{1)}$	$2.30 \pm 0.61^{1)}$
模型	-	9.18 ± 3.03	0.055 ± 0.027	3.74 ± 1.65
地塞米松	7.5×10^{-4}	$6.32 \pm 3.30^{1)}$	$0.028 \pm 0.023^{1)}$	$2.86 \pm 1.01^{1)}$
喘平方	0.32	$6.47 \pm 2.60^{1)}$	$0.030 \pm 0.021^{1)}$	$3.02 \pm 0.90^{1)}$
麻黄	0.20	$7.82 \pm 2.79^{1,2)}$	$0.039 \pm 0.019^{1,2)}$	$3.26 \pm 1.04^{1,2)}$
洋金花	0.07	$7.98 \pm 1.96^{1,2)}$	$0.044 \pm 0.013^{1,2)}$	$3.17 \pm 0.94^{1,2)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,与喘平方组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.3 组织病理检查 HE 染色见:正常组豚鼠肺内支气管上皮完整,肺泡、肺泡间隔形态结构正常,管壁上皮下层、肌层及管周均为正常组织。模型组豚鼠细支气管黏膜上皮损伤脱落,细支气管和小血管管壁及肺泡间隔内可见炎症细胞、中性粒细胞数不等,腔内充满渗出物,肺泡间隙变小,部分区域失变。地塞米松组豚鼠细支气管上皮完好,管周炎细胞数显著降低,腔内无渗出物,上皮脱落、血管充血等明显改善。喘平方组豚鼠肺组织炎症细胞数明显降低,腔内见少量炎症渗出物,细支气管上皮细胞脱落、管壁增厚、肺泡间隙变小等情况较好改善。麻黄组与洋金花组豚鼠细支气管黏膜上皮轻度损伤脱落,管周轻度充血、水肿,有炎症细胞浸润,腔内见炎症渗出物,炎症细胞数不等。见图 1。

3.4 肺泡灌洗液中 IgE, TGF- β_1 , TNF- α 检测 哮喘模型组及各治疗组豚鼠肺泡灌洗液中 IgE, TGF- β_1 , TNF- α 含量均高于正常组;经治疗后,各治疗组豚鼠肺泡灌洗液中 IgE, TGF- β_1 , TNF- α 含量均低于哮喘模型组。麻黄组、洋金花组各豚鼠较喘平方组有明显差别,说明喘平方治疗哮喘作用可能与其能降低哮喘豚鼠 IgE, TGF- β_1 含量有关,喘平方治疗哮喘作用优于其单方的机制可能与喘平方能更好地降低哮喘豚鼠 IgE, TGF- β_1 含量有关。地塞米松组与喘平方组各豚鼠肺泡灌洗液中 TNF- α 含量有较明显差别,而麻黄组、洋金花组各豚鼠较喘平方组无明显差别。见表 2。



A. 模型组; B. 地塞米松 $7.5 \times 10^{-4} g \cdot kg^{-1}$ 组; C. 正常组
D. 喘平方 $0.32 g \cdot kg^{-1}$ 组; E. 麻黄 $0.20 g \cdot kg^{-1}$ 组;
F. 洋金花 $0.07 g \cdot kg^{-1}$ 组

图 1 喘平方连续给药 7 d 后豚鼠肺组织病变的影响 (HE, $\times 200$)

4 讨论

在哮喘发病上,中医重视痰,西医重视慢性气道炎症,而可以理解为痰是慢性气道炎症的结果,控制

表2 喘平方连续给药7 d对豚鼠肺泡灌洗液中 IgE、TGF- β_1 、TNF- α 含量($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IgE/mg·L ⁻¹	TGF- β_1 /ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
正常	-	68.25 ± 5.92	78.72 ± 10.92	388.02 ± 55.61
模型	-	137.28 ± 14.38	172.39 ± 14.04	752.76 ± 51.25
地塞米松	7.5 × 10 ⁻⁴	73.42 ± 8.11 ¹⁾	109.51 ± 8.77 ¹⁾	516.98 ± 59.22 ^{1,2)}
喘平方	0.32	76.35 ± 6.22 ¹⁾	115.76 ± 9.17 ¹⁾	569.32 ± 39.76 ¹⁾
麻黄	0.20	104.82 ± 11.36 ^{1,2)}	133.13 ± 10.11 ^{1,2)}	589.37 ± 45.79 ¹⁾
洋金花	0.07	109.21 ± 12.22 ^{1,2)}	135.21 ± 8.17 ^{1,2)}	598.75 ± 44.84 ¹⁾

气道炎症是治疗哮喘的根本。哮喘与多种炎症细胞介导有关系,嗜酸粒细胞(EOS)在支气管哮喘发生发展中是处于核心地位的效应细胞,哮喘其炎症特征为嗜酸粒细胞(EOS)在支气管组织内聚集和活化导致的可逆性气道阻塞、气道变应性炎症等^[10]。实验数据表明,模型组 EOS 计数明显高于正常组,经治疗后,各中药治疗组豚鼠血液中上述炎症细胞均明显下降,但仍比正常组高,说明中药治疗是一个缓慢恢复的过程。

研究表明,TNF- α 能使局部血管通透性增强,可促进支气管活性物质的释放^[11],从而诱发哮喘的发生。TGF- β_1 在气道重塑中起重要作用,在哮喘患者的肺泡灌洗液中明显增多,无论重症哮喘,还是轻症哮喘患者 EOS 和成纤维细胞产生的 TGF- β_1 均增加,哮喘患者的支气管黏膜内,均可见 TGF- β_1 mRNA 的表达和免疫活性。IgE 水平与哮喘发作程度及气道炎症状况呈正相关,IgE 的含量可评价哮喘发作的轻重^[12]。本实验中,哮喘组豚鼠肺泡灌洗液中 IgE、TGF- β_1 及 TNF- α 含量均高于正常组及治疗组,提示支气管哮喘的发作或严重程度与 IgE、TGF- β_1 及 TNF- α 含量密切相关。

哮喘相当于中医学“喘病”、“哮病”范畴。对于喘证病因病机,张景岳指出“外感之嗽,无论四时皆因于寒邪”以及“病有夙根”。以痰饮内伏为标,肾气不足为本。喘平方中麻黄辛、微苦、温,主入肺、膀胱经,辛温发散风寒以解表,辛苦寒降肺气以平喘止咳,是则寒邪除,腠理开,肺窍利,肺复宣降之功,方中重用,是为君药。洋金花辛温,归肺,入脾经,辛温以祛寒宣肺、以助君药发散风寒,宣肺定喘之功,轻用为臣药。君臣相须为用,效宏力专,则寒邪除,肺复宣降,胸闷、气急、喘息、咳嗽之症皆平。本实验分别以喘平方、麻黄单方、洋金花单方作用于哮喘豚鼠模型,豚鼠肺泡灌洗液中 IgE、TGF- β_1 及 TNF- α 含量均低于哮喘组,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明各治疗组能够降低气道高反应性、减轻气道炎症,控制或延缓气道纤维化的进程,且喘平方组作用最为明显;但 IgE、TGF- β_1 、TNF- α 含量仍高于正常组,说明短期内使用中药,不能很快从根本上逆转支气管

哮喘发生过程中的免疫学改变,这也就是中医学强调支气管哮喘患者需长期固本(补肺健脾益肾)的一个重要原因。

综上所述,喘平方能够通过降低豚鼠肺泡灌洗液中 IgE、TGF- β_1 及 TNF- α 含量,取得降低气道高反应性、减轻气道炎症症状、控制或延缓气道纤维化进程的治疗效果。

【参考文献】

- [1] 陈灏珠.实用内科学(下册)[M].11版.北京:人民卫生出版社,2001:1556.
- [2] 冯高华,顾惠英.“平喘汤”参与治疗急性发作期支气管哮喘 24 例临床观察[J].江苏中医药,2010,42(5):30.
- [3] 朱盛山,刘强,郭丽冰,等.喘平方吸入剂麻黄的提取工艺研究[J].中国中药杂志,2003,28(8):772.
- [4] 朱盛山,刘强,余林中,等.不同的提取方法对喘平方主要药效的影响[J].中药新药与临床药理,2004,15(1):14.
- [5] 李苑新,翟海云,姜红宇,等.喘平方中主要成分含量测定方法的研究[J].中山大学学报,2006,45(3):62.
- [6] 郭鹂.人类疾病的动物模型复制[M].北京:人民卫生出版社,1982:235.
- [7] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1996:1103.
- [8] 刘鑫,张恒平,彭光耀,等.柴朴汤对支气管哮喘大鼠气道重塑及肺组织中- α 平滑肌肌动蛋白表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):220.
- [9] 韩涛,兰咏梅,安冬青.舒康平喘胶囊对哮喘大鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子的影响[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(1):52.
- [10] 李寅超,赵宜红.辛夷挥发油对哮喘豚鼠嗜酸性粒细胞影响的实验研究[J].现代预防医学,2006,33(8):1338.
- [11] Brightling C, Berry M, Amrani Y. Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(1):5.
- [12] 朴仁范,杨春山,朱晓明,等.加味玉屏风散对哮喘大鼠血清总 IgE IL-4 和 IFN- γ 含量的影响[J].中华中医药学刊,2008,26(9):1914.

[责任编辑 聂淑琴]