

# 小青龙汤对支气管哮喘小鼠肺泡灌洗液中 炎性细胞及 IL-4, IFN- $\gamma$ 水平的影响

邳琳<sup>1,2</sup>, 胡久略<sup>2\*</sup>

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 南阳理工学院, 河南 南阳 473004)

**[摘要]** 目的: 探讨中药方剂小青龙汤对小鼠哮喘模型气道炎症白介素-4 (IL-4) 及干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 表达的影响。方法: 30 只 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组 (A 组)、哮喘模型组 (B 组)、小青龙汤治疗组 (C 组)。B, C 组采用卵白蛋白 (OVA) ip 致敏与雾化吸入激发制作哮喘模型, 在实验 21 ~ 28 d, A, B 组以生理盐水 15 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> ig, C 组激发前 1 h ig 小青龙汤 15 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>。于 OVA 激发结束后 24 h 收集支气管肺泡灌洗液 (BALF) 计数炎性细胞总数及嗜酸粒细胞 (EOS) 数目, 并测定 BALF 上清液中 IL-4 和 IFN- $\gamma$  水平变化。结果: 小青龙汤的干预治疗能显著降低小鼠 BALF 中炎性细胞总数及嗜酸粒细胞数量; BALF 上清液中 IFN- $\gamma$  水平明显升高, IL-4 水平显著下降。C 组与 A 组、B 组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。结论: 小青龙汤能明显降低哮喘小鼠 BALF 中炎性细胞数量, 影响细胞因子水平变化, 从而改善哮喘气道炎症。

**[关键词]** 小青龙汤; 支气管哮喘; 炎性细胞; 白介素-4; 干扰素- $\gamma$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0265-03

## Effect of Xiaoqinglong Decoction on Airway Inflammation and IL-4, IFN- $\gamma$ in the BALF of Mouse Asthmatic Model

ZHI Lin<sup>1,2</sup>, HU Jiu-lue<sup>2\*</sup>

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Xiaoqinglong decoction on the airway inflammation and the cytokine production in asthmatic mice. **Method:** Thirty BALB/c mice were randomly divided into normal control group (group A), asthmatic model group (group B), Xiaoqinglong decoction treatment group (C group). B, C, ovalbumin was injected intraperitoneally and aerosol inhalation to stimulate the production of the asthma model. From 21 to 28 days, group A, group B were given normal saline 15 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> orally, group C was given Xiaoqinglong decoction 15 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 1 h before stimulating. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected to count the number of total number of inflammatory cells and esinophil and determine BALF supernatant interleukin-4 (IL-4) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) levels. **Result:** Xiaoqinglong decoction intervention could significantly reduce the total number of inflammatory cells and Eosnumber, the supernatant of IFN- $\gamma$  levels were significantly elevated, IL-4 levels were significantly decreased. There was a significant difference among group C and group A, B ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Xiaoqinglong decoction can significantly reduce the number of inflammatory cells in BALF of asthmatic mice and impact the levels of cytokines, thereby improving airway inflammation in asthma.

**[Key words]** Xiaoqinglong decoction; asthmatic model; inflammatory cells; IL-4; IFN- $\gamma$

**[收稿日期]** 20120312(014)

**[基金项目]** 南阳理工院校基金科研项目 (NG2009KYJJ16)

**[第一作者]** 邳琳, 博士, 讲师, 从事中药药理研究, Tel: 0377-62071309, E-mail: xiaoyun0922@sina.com

**[通讯作者]** \* 胡久略, 博士, 副教授, 从事方剂配伍规律、疗效机制及张仲景学术思想研究, Tel: 0377-62071309, E-mail: hujuluegood@126.com

支气管哮喘是一种呼吸系统常见病,多发病,严重危害人类的生命健康,属中医学哮证、喘证的范畴。现代医学认为本病是一种以肥大细胞、嗜酸粒细胞以及淋巴细胞参与的、以气道高反应性为特征的非特异性气道慢性炎症性疾病<sup>[1]</sup>。近年来中医中药在治疗支气管哮喘方面取得了显著疗效,本实验主要观察小青龙汤对卵白蛋白(OVA)诱导的哮喘模型小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎性细胞及白介素-4(IL-4)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )水平的影响。

### 1 材料

**1.1 动物** 实验动物选用 BALB/c 小鼠,SPF 级,6~8 周龄,雌雄各半,体重为 20~22 g 由河南省实验动物中心提供,许可证号 SCXK(豫)2008-0002。

**1.2 试剂和设备** OVA(Sigma 公司分装),小鼠 IL-4 ELISA 试剂盒,小鼠 IFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒(妙通生物计数有限公司提供),402 型超声雾化器(上海鱼跃医疗器械有限公司),全自动酶标仪(济南光机医疗器械有限公司),Olympus 显微镜(日本)。

### 2 方法

**2.1 小青龙汤的制备** 小青龙汤(麻黄、白芍各 9 g,细辛 5 g,干姜、炙甘草、五味子、法半夏各 9 g,桂枝 6 g,药物由南阳理工学院附属医院提供)所有药物经浸泡、煎熬、过滤及浓缩成 100 mL 药汁,质量浓度为 1 g·mL<sup>-1</sup> 的药液。

**2.2 动物分组** 小鼠 30 只,随机分为 3 组,每组 10 只。正常对照组(A 组)、哮喘模型组(B 组)、小青龙汤治疗组(C)。

**2.3 哮喘模型的制备及分组给药** 用 OVA 诱导建立小鼠哮喘模型,第 0,7,14 天 B 组动物分别 ip 抗原液(含 OVA 20  $\mu$ g、氢氧化铝 1 mg、生理盐水 0.2 mL)致敏,第 21~27 天将小鼠置于特制 5 L 透明玻璃容器内,进行雾化吸入 1% OVA 雾化液 4 mL 激发 30 min,连续 7 d。正常对照组(A 组):致敏液和激发均以生理盐水代替;小青龙汤治疗组(C):同模型组,自激发开始第 1 天起,每天 OVA 激发前 1 h ig 小青龙汤 15 g·kg<sup>-1</sup>,按人和动物体表面积折算的等

效剂量比率表计算,用药量相当于临床等效剂量。

**2.4 肺泡灌洗液(BALF)的抽取** 各组小鼠于末次激发 24 h 乙醚麻醉处死小鼠后取 BALF,在 2 000 r·min<sup>-1</sup> 4  $^{\circ}$ C 条件下离心 5 min,取上清液,分装于试管中,封闭,-20  $^{\circ}$ C 保存,待测 IL-4,IFN- $\gamma$ ;移去上清后所留沉渣,加入 1 mL PBS 重悬,吹打均匀,取 10  $\mu$ L 加入血细胞计数板,40  $\times$  10 高倍镜下细胞计数,剩余细胞悬液再次离心(2 000 r·min<sup>-1</sup>,5 min),弃上清,取少许沉渣推片,用瑞氏染液染色,100  $\times$  10 油镜分类计算嗜酸粒细胞(EOS),中性粒细胞,淋巴细胞,巨嗜细胞(选取细胞分布较均匀的高倍视野,数 200 个细胞,计算各种细胞)。

**2.5 细胞因子测定** 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测 IL-4,IFN- $\gamma$  水平变化,具体方法参照试剂盒内说明书操作,两种试剂方法相同。

检测步骤:①取出酶标板,依照次序分别加入 50  $\mu$ L 的对照品于 6 个空白孔中;②分别标记样品编号,加入 50  $\mu$ L 的样品于剩余空白孔中;③在样品孔中加入 10  $\mu$ L 的生物素标记液;④在对照品孔和样品孔中加入 50  $\mu$ L 的酶标记速溶液;⑤37  $^{\circ}$ C 孵育反应 60 min;⑥洗板机清洗 5 次,每次静置 10~20 s;⑦每孔加入呈色液 A,B 液各 50  $\mu$ L;⑧37  $^{\circ}$ C 避光孵育反应 30 min;⑨每孔加入 50  $\mu$ L 终止液,中止反应;⑩将反应完的酶标板置于 450 nm 的酶标仪上读取各孔的吸光度(A);⑪根据样品的 A 查找对应的浓度范围

**2.6 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计处理,本组实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用 *t* 检验,*P* < 0.05 有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 肺泡灌洗液细胞学的改变** 哮喘模型 BALF 中炎性细胞总数、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞明显高于对照组(*P* < 0.05),说明哮喘模型建立成功。小青龙汤组与哮喘组相比 BALF 中炎性细胞总数、EOS、中性粒细胞和淋巴细胞显著降低(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 小青龙汤对支气管哮喘小鼠肺泡灌洗液中细胞学的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

$\times 10^8/L$

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	细胞总数	淋巴细胞	嗜酸粒细胞	中性粒细胞	巨嗜细胞
正常	-	4.44 $\pm$ 2.08	0.24 $\pm$ 0.11	0.006 $\pm$ 0.003	0.91 $\pm$ 0.33	4.11 $\pm$ 0.63
模型	-	32.61 $\pm$ 8.15 <sup>2)</sup>	4.20 $\pm$ 0.86 <sup>1)</sup>	8.23 $\pm$ 1.32 <sup>2)</sup>	4.12 $\pm$ 0.79 <sup>1)</sup>	16.06 $\pm$ 3.02 <sup>1)</sup>
小青龙汤	15	13.22 $\pm$ 2.61 <sup>2,4)</sup>	1.06 $\pm$ 0.34 <sup>1,4)</sup>	0.72 $\pm$ 0.33 <sup>2,4)</sup>	0.69 $\pm$ 0.31 <sup>3)</sup>	10.76 $\pm$ 2.10 <sup>2,4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>*P* < 0.05,<sup>2)</sup>*P* < 0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>*P* < 0.05,<sup>4)</sup>*P* < 0.01(表 2 同)。

表 2 小青龙汤对支气管哮喘小鼠肺泡灌洗液中 IL-4,IFN- $\gamma$  含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-4/ng·L <sup>-1</sup>	IFN- $\gamma$ /ng·L <sup>-1</sup>	IL-4/IFN- $\gamma$
正常	-	74.70 $\pm$ 21.24	494.14 $\pm$ 70.10	0.16 $\pm$ 0.49
模型	-	261.32 $\pm$ 2.16 <sup>2)</sup>	211.10 $\pm$ 46.22 <sup>1)</sup>	1.26 $\pm$ 2.38 <sup>2)</sup>
小青龙汤	15	147.29 $\pm$ 21.80 <sup>3)</sup>	373.10 $\pm$ 24.75 <sup>2)</sup>	0.40 $\pm$ 0.67 <sup>2,3)</sup>

**3.2 BALF 中 IL-4,IFN- $\gamma$  含量及比例的变化** 哮喘组小鼠 BALF 中 IL-4 水平明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 IFN- $\gamma$  水平显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。经过小青龙汤治疗后, 小鼠 BALF 中 IL-4 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而 IFN- $\gamma$  水平显著增高 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

#### 4 讨论

哮喘中医学称之为“哮病”, 其发病的原因较复杂<sup>[1]</sup>, 主要是痰饮内伏导致的肺、脾、肾三脏功能失调, 气机升降失利, 气痰搏结于喉间, 以致气息喘促而发生哮喘<sup>[2-3]</sup>。而小青龙汤出自医圣张仲景的《伤寒杂病论》, 为治疗“外寒内饮证”的代表方, 方中麻黄发汗、平喘、利水, 配桂枝则增强通阳宣散之力, 桂枝配芍药调和营卫, 干姜、细辛为热药则散寒温肺化饮, 五味子敛肺止咳, 半夏燥湿化痰、降逆止呕, 甘草调和诸药, 诸药合用则温肺化饮、止咳平喘。现代药理研究表明<sup>[4]</sup>: 小青龙汤具有止咳平喘、解热、抗炎、抗过敏的药理作用。

支气管哮喘<sup>[5]</sup>是一种由多种细胞如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、嗜中性粒细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病, 其主要的病理改变<sup>[6]</sup>是气道内大量炎性细胞浸润, 这些炎性细胞活化后所释放的多种细胞因子诱导气道的高反应性形成哮喘<sup>[7]</sup>。近年来, 研究发现支气管哮喘患者存在 Th1/Th2 细胞因子间失衡是哮喘发病的关键机制<sup>[8-9]</sup>, 所以一般把 IFN- $\gamma$  和 IL-4 分别作为 Th1 和 Th2 特征性细胞因子<sup>[10-11]</sup>, 其中 IL-4 可加促进气道高反应性的生成<sup>[12]</sup>。本研究结果显示小青龙汤治疗组病变与模型组病变明显减轻, 差异有显著性, 小青龙汤显著减少炎性细胞的数量及嗜酸性粒细胞所占百分比, 抑制炎性细胞气道内的浸润, 说明小青龙汤能有效减轻气道炎症。

喘病[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15):283.

[2] 田金娜, 李建保, 刘小凡. 丹龙定喘汤对哮喘小鼠气道重塑及 MMP-9, TIMP-1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):164.

[3] 吕艳芒. 中西医结合治疗小儿支气管哮喘体会[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11):227.

[4] 姚玉兰, 龚享文, 潘玲, 等. 小青龙汤的药理作用及其治疗支气管哮喘的作用机制研究[J]. 广西中医学院学报, 2008, 11(4):51.

[5] 卓进盛. 补肺汤治疗支气管哮喘慢性持续期的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16):256.

[6] 白敏, 刁晓源, 张湘燕, 等. 支气管哮喘发病机制研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(15):22947.

[7] Kips J C, Brusselle G J, Joos G F, et al. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 153(2):535.

[8] Deehene L. Th1/Th2 Zimmuneresponse [J]. Allergy Clin Immunol, 2002, 110:539.

[9] Duramad P, Harley K, Lipsett M, et al. Early environmental exposures and intracellular Th1/Th2 cytokine profiles in 24-month-old children living in an agricultural area [J]. Environ Health Perspect, 2006, 114(12):1916.

[10] 彭清臻, 钟敏华, 余小明. 加味定喘汤对支气管哮喘模型小鼠的治疗作用研究 [J]. 内科急危重症杂志, 2006, 12(4):172.

[11] Duramad P, Tager I B, Leikauf J, et al. Expression of Th1/Th2 cytokines in human blood after *in vitro* treatment with chlorpyrifos, and its metabolites, in combination with endotoxin LPS and allergen Derp1 [J]. J Appl Toxicol, 2006, 26(5):458.

[12] 温丽娜, 孙建宁, 张硕峰. 小儿止咳颗粒对哮喘大鼠气道高反应性和炎症的抑制作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):195.

[责任编辑 聂淑琴]

#### [参考文献]

[1] 谢晓辉, 霍岩, 高铁峰. 浅谈中医中药治疗老年人哮