

柴朴汤对支气管哮喘豚鼠支气管肺组织中 Bcl-2 表达的影响

张於^{1,2}, 戴爱国^{2*}

(1. 南华大学, 湖南 衡阳 421001;

2. 湖南省老年医院, 湖南省老年医学研究所呼吸疾病研究室, 长沙 410001)

[摘要] **目的:** 观察中药柴朴汤对哮喘豚鼠支气管肺组织中 Bcl-2 表达的影响。**方法:** 40 只健康豚鼠随机分为正常对照组, 哮喘模型组, 地塞米松组 ($0.001 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 柴朴汤组 ($0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只。采用卵蛋白腹腔注射和雾化吸入激发建立哮喘模型, 各组豚鼠均于激发前 30 min 予相应灌胃处理, 隔日 1 次, 共 7 次。末次激发 24 h 后, 处死各组豚鼠。检测各组豚鼠血液中嗜酸性粒细胞数及支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中白细胞 (WBC) 数, 嗜酸粒细胞 (EOS) 数及百分比; HE 染色法观察各组豚鼠支气管肺组织病理改变; 免疫组化法检测支气管肺组织中 Bcl-2 蛋白表达, 原位杂交法检测支气管肺组织中 Bcl-2 mRNA 的表达。**结果:** 柴朴汤组外周血中 EOS 数, BALF 中 WBC 数、EOS 数及百分比均较哮喘模型组明显降低 ($P < 0.05$)。与哮喘模型组比较, 柴朴汤组支气管肺组织中 Bcl-2 mRNA 及蛋白的表达有显著性差异 ($P < 0.05$)。地塞米松组与柴朴汤组比较, 无明显差异。**结论:** 柴朴汤可以明显降低哮喘豚鼠外周血和支气管肺泡灌洗液中 EOS, 减轻支气管肺组织的炎症反应, 下调 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达水平。

[关键词] 哮喘; 豚鼠; 嗜酸粒细胞; Bcl-2; 柴朴汤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0275-05

Effect of Chaipu Decoction on Expression of Bcl-2 in Lung Tissue in Asthma Guinea Pigs

ZHANG Yu^{1,2}, DAI Ai-guo^{2*}

(1. University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Department of Respiratory Disease, Institute of Human Gerontology, Human Geriatric Hospital, Changsha 410001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Chaipu decoction on expression of Bcl-2 in lung tissue in asthma guinea pigs. **Method:** Forty guinea pigs were randomized into normal control, model, dexamethasone ($0.001 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and chaipu decoction ($0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups with 10 guinea pigs each group. Asthma mouse model was prepared by injecting ovalbumin (OVA) into the abdominal cavity and inhalation of aerosol, and normal group, was given saline water. Each group was given relevant medicines by oral administration before 30 mins of suscitation corresponding, once every other day, for 2 weeks. All animals were sacrificed after the last stimulation. The white blood cell (WBC) count, the number of eosinophil (EOS) and the percentage of EOS in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of guinea pigs and the number of EOS in whole blood were examined. Pulmonary pathological changes were observed by HE stain. Bcl-2 protein expression was examined by immunohistochemistry. And Bcl-2 mRNA expression was detected with in situ hybridization. **Result:** Compared with model group, chaipu decoction group could significantly reduce the EOS count in whole blood, the WBC count, the number of EOS and the percentage of EOS in BALF ($P < 0.05$); and the expression level of Bcl-2 mRNA and protein in the lung tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). In Chaipu decoction group,

[收稿日期] 20110919(026)

[第一作者] 张於, 硕士, 从事支气管哮喘机制研究, Tel:0731-84762723, E-mail: zhangyuziqiang@126.com

[通讯作者] *戴爱国, 主任医师, 教授, 博士, 从事呼吸系统疾病研究, Tel:0731-84762723, E-mail: daiaiguo2003@163.com

compared with dexamethasone group, the significant difference was not found. **Conclusion:** Chaipu decoction for asthma was able to reduce the proportion of EOS in BALF, alleviate the inflammation of airway and lung tissue of the asthmatic guinea pigs. Chaipu decoction for asthma could reduce the Bcl-2 mRNA and protein expression level.

[**Key words**] asthma; guinea pigs; eosinophil; Bcl-2; Chaipu decoction

哮喘是由多种细胞包括气道的炎性细胞和结构细胞(如嗜酸粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、平滑肌细胞、气道上皮细胞等)和细胞组分(cellular elements)参与的气道慢性炎症性疾病^[1]。气道慢性炎症被认为是哮喘的本质,嗜酸粒细胞(EOS)的异常增多及活化被认为是炎症反应中的重要环节,而 EOS 凋亡增多则被认为是哮喘气道炎症消退的重要机制^[2]。Bcl-2, 是 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因的缩写,具有抑制细胞凋亡的作用,其表达异常与多种疾病相关。临床观察发现,柴朴汤能有效缓解患者咳、痰、喘等症状,提高患者生活质量^[3]。本实验通过建立豚鼠哮喘模型,观测不同组别豚鼠外周血和支气管肺泡灌洗液中 EOS 数量,病理形态改变,检测支气管肺组织中 Bcl-2 mRNA 与蛋白表达水平,进一步探讨柴朴汤防治支气管哮喘的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性英国短毛种豚鼠 40 只,体重(300 ± 50) g,由湖南省中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(湘)20090012。

1.2 药物 中药柴朴汤由柴胡、法半夏、茯苓、黄芩、厚朴、大枣、白参、甘草、苏叶、生姜,按 7:5:3:3:3:3:3:2:2:1 的比例配制,每克颗粒含生药 18.5 g,由湖南省中医药大学药学院中药药物提取实验室制备提供。醋酸地塞米松片(天津药业焦作有限公司,批号 10030611)。

1.3 试剂 卵蛋白(Sigma 公司), Bcl-2 多克隆抗体(sc-492, Santa Cruz 公司),免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),大鼠 Bcl-2 原位杂交检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.4 仪器 JA1003 型电子天平(上海天平仪器厂),402T 型超声雾化器(上海四菱医疗器械厂),TG1-16G 型台式高速低温离心机(湖南湘仪离心机有限公司),光学显微镜及拍照系统(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 哮喘模型的建立与给药方法 按随机数字表法,将豚鼠随机分为 4 组,每组 10 只:正常对照组,哮喘模型组,地塞米松组,柴朴汤组。实验豚鼠购回

后,进行适应饲养 1 周。采用卵蛋白(OVA)致敏和反复激发复制豚鼠哮喘模型。第 1 天,哮喘模型组、地塞米松组、柴朴汤组,3 组豚鼠,ip 10% 卵蛋白生理盐水溶液 1 mL,2 周后,将致敏豚鼠放入密闭透明的有机玻璃容器内,给予 1% 卵蛋白生理盐水溶液进行超声雾化吸入,隔日诱喘 1 次,共 7 次。正常对照组豚鼠,用等量生理盐水代替,操作同模型组。

自造模之日起,每次超声雾化吸入前 30 min,各组豚鼠 ig 给药。地塞米松组 ig 地塞米松 0.001 g·kg⁻¹;柴朴汤组 ig 柴朴汤 0.35 g·kg⁻¹;正常对照组、哮喘模型组 ig 等量生理盐水(10 mL·kg⁻¹)。

2.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞收集与计数

参照文献[4]略作改动,末次雾化吸入后 24 h,各组豚鼠均 ip 2% 戊巴比妥钠麻醉并固定。常规消毒颈胸部皮毛,层层剪开颈部皮肤,暴露气管,于气管前端作一“T”形切口,结扎右主支气管,插入带有 20 号针头的 5 mL 注射器,缓慢注入无菌生理盐水(37 ℃)5 mL,轻轻按摩胸部 30 s 后,缓慢充分回抽。操作重复 3 次,回收率 > 80%。

充分混匀 BALF,取 200 μL BALF 细胞悬液加入等体积的白细胞稀释液,显微镜下计数白细胞。将 BALF 离心沉淀物涂片,常规瑞氏染色,显微镜下行细胞分类计数。

2.3 外周血中 EOS 计数 颈静脉采血,取抗凝血 20 μL 加入 EOS 稀释液(0.38 mL)中,立即混匀,混匀后将细胞悬液冲入细胞计数池,室温下静置 3 ~ 5 min,显微镜下观察计数。

2.4 支气管肺组织病理学观察 豚鼠右肺下叶组织,以 4% 多聚甲醛溶液(含 1/1 000 DEPC)固定,常规脱水,石蜡包埋,切片,厚度 4 μm,苏木素-伊红染色。光镜下观察支气管肺组织炎性细胞浸润情况,主要观察 EOS 浸润程度,气道管腔大小变化,肺泡形态结构改变等。

2.5 免疫组化法检测支气管肺组织中 Bcl-2 蛋白表达 石蜡切片,脱蜡水化,经抗原修复,滴加封闭液后,滴加一抗(1:100),4 ℃ 过夜,加入聚合 HRP 标记抗兔 IgG, DAB 显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树脂封片。细胞胞浆着色为棕黄色者为阳性结果。高倍视野(400 ×)下,每张切片随机取 5

个观察视野,采用 Image pro plus 6.0 图像分析处理系统,测算阳性产物平均吸光度(A)。

2.6 原位杂交法检测支气管肺组织中 Bcl-2 mRNA 表达 寡核苷酸探针,地高辛标记的多相寡核苷酸探针探针序列, Bcl-2 mRNA: 5'-GATGA AGTAC ATCCA TTATA AGCTG TCGCA-3'; 5'-GCGCT CAGCC CGGTG CCACC TGTGG TCCAC-3'; 5'-GGGAG ATGTC GCCCC TGGTG GACAA CATCG-3'。

石蜡切片,脱蜡水化,灭活内源性过氧化物酶,胃蛋白酶消化,预杂交,地高辛标记的核苷酸探针湿盒杂交过夜,封闭,滴加生物素化鼠抗地高辛,经 SABC 孵育,滴加生物素化过氧化物酶,DAB 显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片。细胞胞浆着色为棕黄色者为阳性结果。图像采集与分析同免疫组化。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据分析。计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对哮喘豚鼠外周血中 EOS 计数的影响 与正

表 2 柴朴汤对哮喘豚鼠支气管肺灌洗液(BALF)中 WBC, EOS 数量及百分比的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	WBC/×10 ⁸ /L	EOS/%	EOS/×10 ⁷ /L
正常对照	-	7.27 ± 0.14	4.81 ± 1.17	2.37 ± 0.19
哮喘模型	-	19.41 ± 2.85 ¹⁾	21.03 ± 2.98 ¹⁾	7.55 ± 1.49 ¹⁾
地塞米松	0.001	12.96 ± 2.18 ^{2,3)}	9.22 ± 1.57 ^{2,3)}	4.82 ± 0.75 ^{2,3)}
柴朴汤	0.35	13.35 ± 1.69 ^{2,3)}	8.38 ± 2.31 ^{2,3)}	5.17 ± 1.36 ^{2,3)}

3.3 支气管肺组织病理改变 正常对照组支气管肺组织结构正常完整,管腔光滑,气道黏膜无水肿,上皮细胞无明显增生,偶见 EOS 浸润,肺泡间隔完整正常。哮喘模型组支气管管腔狭窄变形,可见黏膜明显水肿,上皮细胞大量增生、脱落,黏液分泌明

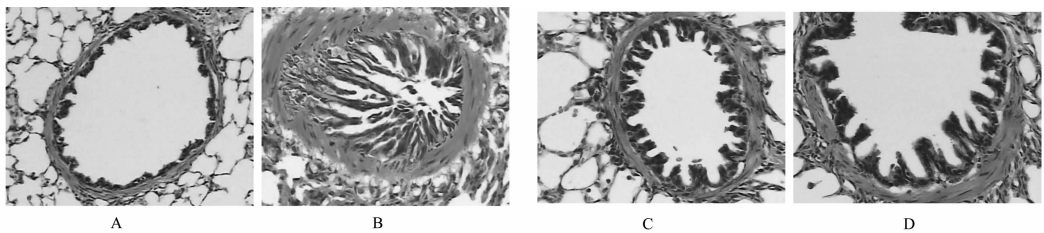
常对照组比较,哮喘模型组外周血中 EOS 计数明显增高,差异显著($P < 0.01$);与哮喘模型组比较,地塞米松组、柴朴汤组外周血中嗜酸性粒细胞计数均明显降低($P < 0.05$);地塞米松组、柴朴汤组两组比较,无显著性差异。见表 1。

表 1 哮喘豚鼠外周血中嗜酸性粒细胞计数($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	EOS/×10 ⁹ /L
正常对照	-	0.41 ± 0.28
哮喘模型	-	1.66 ± 0.15 ¹⁾
地塞米松	0.001	0.96 ± 0.20 ^{2,3)}
柴朴汤	0.35	1.01 ± 0.31 ^{2,3)}

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与哮喘模型组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

3.2 对哮喘豚鼠 BALF 中 WBC 计数、EOS 比例、EOS 计数的影响哮喘模型组 BALF 中白细胞数、EOS 比例、EOS 数均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);地塞米松组、柴朴汤组 BALF 中白细胞数, EOS 比例, EOS 数均低于哮喘模型组($P < 0.05$),但高于正常对照组($P < 0.05$)。见表 2。



A. 正常对照组;B. 哮喘模型组;C. 地塞米松(0.001 g·kg⁻¹)组;D. 柴朴汤 0.35 g·kg⁻¹组(图 2~3 同)

图 1 各组豚鼠支气管肺组织病理形态改变(HE, ×400)

3.4 对哮喘豚鼠支气管肺组织中 Bcl-2 蛋白表达的影响 免疫组化检测显示,与正常对照组比较,哮喘模型组豚鼠支气管肺组织 Bcl-2 蛋白阳性产物平

均 A 显著增加($P < 0.01$);地塞米松组与柴朴汤组,均较哮喘模型组明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但均未达到正常对照组水平;地塞米松

组与柴朴汤组相比较,无明显统计学差异。见表 3,图 2。

表 3 柴朴汤对哮喘豚鼠支气管肺组织 Bcl-2 蛋白及 Bcl-2mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Bcl-2 蛋白	Bcl-2mRNA
正常对照	-	0.45 ± 0.06	0.82 ± 0.35
哮喘模型	-	1.36 ± 0.21 ¹⁾	3.39 ± 0.27 ¹⁾
地塞米松	0.001	0.69 ± 0.08 ^{2,3)}	1.76 ± 0.19 ^{2,3)}
柴朴汤	0.35	0.76 ± 0.19 ^{2,3)}	1.91 ± 0.26 ^{2,3)}

3.5 对哮喘豚鼠支气管肺组织中 Bcl-2mRNA 表达的影响 原位杂交结果显示,哮喘模型组豚鼠支气管肺组织 Bcl-2mRNA 阳性产物 A 较正常对照组显著增加 ($P < 0.01$);地塞米松组与柴朴汤组,均较哮喘模型组明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),但均未达到正常对照组水平;地塞米松组与柴朴汤组相比较,无明显统计学差异。原位杂交结果与支气管肺组织中免疫组化 Bcl-2 蛋白表达水平相符。见表 3,图 3。

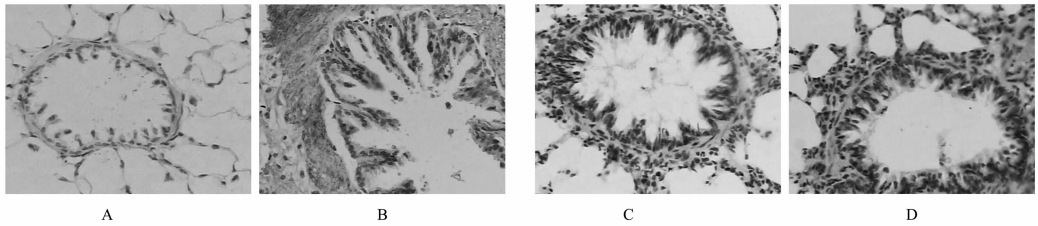


图 2 各组豚鼠支气管肺组织病 Bcl-2 蛋白表达 (DAB, ×400)

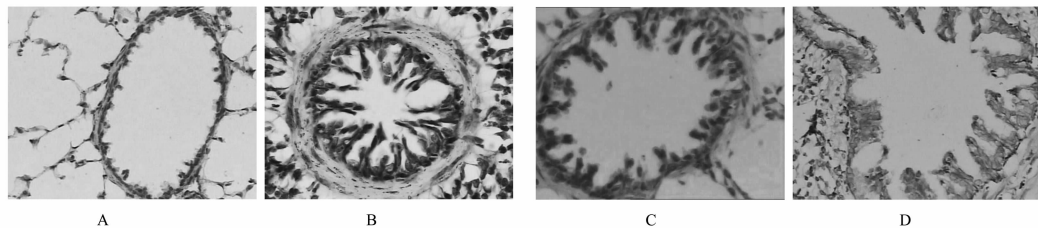


图 3 各组豚鼠支气管肺组织病 Bcl-2mRNA 表达 (DAB, ×400)

4 讨论

本研究采用卵蛋白腹腔注射和反复雾化吸入激发的方法,建立豚鼠哮喘模型。哮喘模型组豚鼠病理组织切片显示,支气管黏膜下大量炎性细胞浸润,以 EOS 为主,黏膜水肿,管腔狭窄变形,上皮细胞增生肥大脱落,黏液分泌增加,气道平滑肌细胞增生肥厚;外周血和 BALF 中 EOS 数量明显增加;此外,反复雾化吸入时,豚鼠出现明显哮喘症状,符合文献描述^[5],说明哮喘模型复制成功。

支气管哮喘的炎性反应是多种炎性细胞、炎性介质和细胞组分共同参与、相互作用的结果。EOS 是哮喘炎性反应的主效应细胞,其与哮喘的严重程度密切相关。本研究中,柴朴汤组哮喘豚鼠外周血和 BALF 中 EOS 数量较模型组显著减少 ($P < 0.05$);同时,HE 染色显示柴朴汤组豚鼠支气管肺组织炎性细胞浸润明显减轻,说明柴朴汤可以有效地抑制 EOS 在气道的聚集与活化,缓解气道的炎症反应。

Bcl-2 家族是研究的最早,也是最受重视的调控

细胞凋亡的家族^[6],Bcl-2 主要通过阻断细胞凋亡的公共凋亡信号通路,抑制细胞凋亡过程^[7]。Mermigkis C M^[8]等人实验发现,与正常对照组患者相比,特发性肺纤维化患者,支气管肺泡灌洗液中,EOS 和中性粒细胞表面 Bcl-2 蛋白阳性表达显著增多。An-SooJang^[9]等人的临床研究发现,哮喘患者痰液中 EOS 生存延长,凋亡受抑,与 Bcl-2 高表达密切相关。El-Gamal Y^[10]在哮喘急性发作期儿童的痰液中,也发现了相似的结果。本研究结果显示,柴朴汤组哮喘豚鼠支气管肺组织中 Bcl-2 mRNA 与蛋白表达水平较哮喘模型组显著降低 ($P < 0.05$),说明柴朴汤可以有效地降低抗凋亡基因 Bcl-2 的表达。

综上所述,柴朴汤可能是通过下调基因 Bcl-2 在支气管肺组织中的表达,促进 EOS 凋亡,从而达到减少 EOS 在气道中活化聚集,减轻气道炎性浸润的作用,为临床应用柴朴汤防治支气管哮喘提供了实验依据。

十全大补汤抑制 Lewis 肺癌原发瘤切除后转移瘤的研究

郭刚, 许建华*, 韩建宏, 梁芳, 张勇, 张强, 孙珏, 范忠泽
(上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科, 上海 200062)

[摘要] 目的: 探讨十全大补汤对小鼠 Lewis 肺癌原发瘤(先前接种肿瘤)切除后转移瘤生长及血管生成的影响, 并探讨可能的机制。方法: 构建 C57/BL6 小鼠 Lewis 肺癌肺转移模型, 随机分为原发瘤切除组(TR)、原发瘤未切除组(TP)、十全大补汤组(Shiquan Dabu Tang group, SDT)。采用切除原发瘤及十全大补汤 $31.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗 10 d, 摘除眼球取血, 剥出肺脏, 应用组织切片苏木素-伊红染色法, 观察肺部转移瘤情况。链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(SP)免疫组织化学法检测转移瘤微血管密度(MVD)及细胞增殖。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测治疗后小鼠血清中血管内皮生长因子(VEGF)、血管抑素(AS)和内皮抑素(ES)的表达水平。结果: 治疗 10 d 后, 小鼠肺转移灶数与原发瘤切除组(47.30 ± 5.57)个比较, 十全大补汤组(8.28 ± 5.28)个及原发瘤未切除组(10.71 ± 3.30)个均明显降低($P < 0.01$); 小鼠肺脏质量与原发瘤切除组(0.57 ± 0.05)g 比较, 十全大补汤组(0.26 ± 0.05)g 及原发瘤未切除组(0.28 ± 0.05)g 均明显降低($P < 0.01$)。原发瘤切除组、原发瘤未切除组和十全大补汤组转移瘤 Ki67 表达分别为(55.10 ± 6.51)%, (34.60 ± 4.95)%, (27.10 ± 4.56)%, CD34 表达分别为(35.40 ± 2.46)%, (30.60 ± 6.54)%, (22.09 ± 5.89)%, 十全大补汤组降低明显, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。ELISA 检测显示, 与原发瘤切除组比较, 十全大补汤能够降低血清中 VEGF 及上调 ES 的表达, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结论: 原发瘤切除可使荷瘤小鼠体内的 VEGF 和 ES 比例失衡, 有利于肿瘤血管生成及促进转移。十全大补汤明显抑制小鼠原发瘤切除后转移瘤生长, 明显抑制转移瘤血管生成以及与之相关的血管生成调节因子的作用。

[关键词] 十全大补汤; 肿瘤; 转移; 血管生成

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0279-06

[收稿日期] 20111031(002)

[第一作者] 郭刚, 2009 级硕士研究生, E-mail: sirius0403@sina.com

[通讯作者] * 许建华, 博士, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合防治肿瘤的临床及基础研究, Tel: 021-62572723-8173, E-mail: xujianhua50@yahoo.com.cn

[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[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(3): 177.

[2] Kankaanranta H, Lindsay M A, Giembyez M A, et al. Delayed eosinophil apoptosis in asthma[J]. Allergy Clin Immunol, 2000, 106(1): 77.

[3] 邹渭洪, 刘鑫. 柴朴平喘干糖浆的制备与疗效观察[J]. 中药材, 2001, 24(5): 390.

[4] 张秀峰, 戴爱国, 胡瑞成. Nrf2 在支气管哮喘豚鼠炎症细胞中调控-谷氨酰半胱氨酸合成酶的表达[J]. 中国病理生理学杂志, 2008, 24(9): 1779.

[5] 曾泽戎, 崔德建, 梁延杰等. 哮喘豚鼠模型细支气管和肺组织的病理学研究[J]. 中华内科杂志, 2001, 40(3): 158.

[6] O'Reilly M A, Staversky R J, Huyck H L, et al. Bcl-2 family gene expression during severe hyperoxia induced

lung injury[J]. Lab Invest, 2000, 80(12): 1845.

[7] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275(5301): 1129.

[8] Mermigkis C M, Tsakanika K, Polychronopoulos V, et al. Expression of bcl-2 protein in bronchoalveolar lavage cell populations from patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Acta Cytol, 2001, 45(6): 914.

[9] An-Soo Jang, Inseon-SChoi, Soong Lee, et al. Bcl-2 expression in sputum eosinophils in patients with acute asthma[J]. Thorax, 2000, 55(5): 370.

[10] El-Gamal Y, Heshmat N, Mahran M, et al. Expression of the apoptosis inhibitor Bcl-2 in sputum eosinophils from children with acute asthma[J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34(11): 1701.

[责任编辑 聂淑琴]