

敏咳清颗粒对人胚肺成纤维细胞表达纤维连接蛋白、干细胞因子的影响

翟文生¹, 殷二航², 冯斌^{1*}, 郑宏¹, 杨濛¹, 任献青¹, 丁樱¹

(1. 河南中医学院第一附属医院儿科医院, 郑州 450000;

2. 贵阳中医学院第一附属医院儿科, 贵阳 550001)

[摘要] 目的: 研究敏咳清颗粒含药血清对经肝素刺激增殖的人胚肺成纤维细胞(lung fibroblast, LFB)表达纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)的影响, 探讨敏咳清颗粒治疗咳嗽变异性哮喘的作用机制。方法: 将常规培养 LFB 细胞分为空白组、模型组、对照组、敏咳清高剂量组、敏咳清低剂量组、养阴清肺糖浆高剂量组、养阴清肺糖浆低剂量组、地塞米松组, 加入肝素刺激后分别加入对应的含药血清, 采用 ELISA 法检测各组细胞培养上清液中 FN, SCF 的水平。结果: ①各组含药血清均可不同程度的抑制 SCF 的产生, 敏咳清颗粒作用最强, 并呈剂量依赖性; ②敏咳清颗粒能明显抑制 FN 的表达, 高、低剂量组之间相比无显著意义。结论: 敏咳清颗粒能显著降低经肝素刺激增殖的 LFB 对 FN, SCF 的表达, 提示抑制 SCF, FN 的表达, 可能是其治疗咳嗽变异性哮喘(CVA)的作用机制之一。

[关键词] 敏咳清颗粒; 人胚肺成纤维细胞; 纤维连接蛋白; 干细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0128-03

咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma, CVA)是哮喘的一种特殊类型, 其病理生理改变与哮喘一样, 存在持续气道炎症与气道高反应性。近年来研究发现, CVA 也存在着气道重建(airway remodeling, AR)。LFB 作为气道炎症细胞及气道黏膜下主要结构细胞之一, 在维持气道慢性炎症及气道重构中起着重要作用^[1]。SCF 是近年来倍受关注的具有多种生物活性的细胞因子, 在哮喘气道慢性炎症及纤维化中发挥作用^[2]。FN 在哮喘气道重构过程中, 不仅在间质中被动的沉积, 而且是上皮纤维化, 包括细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积和气管壁弹性减弱的主动参与者, 在哮喘气道炎症损伤修复和应激反应中起重要作用^[3]。敏咳清颗粒是经过临床验证及实验研究的治疗 CVA 有效、安全的中成药制剂^[4-5]。前期实验研究表明, 敏咳清颗粒对抑制气道炎症、改善气道高反应性, 抑制气道重构有显著作

用^[6]。在此基础上, 笔者通过体外实验观察敏咳清颗粒对增殖的人胚肺成纤维细胞相关细胞因子 SCF, FN 表达的影响, 进一步探讨敏咳清颗粒治疗 CVA 的作用机制。

1 材料

1.1 动物与细胞株 Wistar 大鼠由郑州大学动物实验中心提供, 动物合格证 SCXK(豫)2005-0001, 人胚肺成纤维细胞(HFL-1)购自中科院上海细胞库。

1.2 药品与试剂 敏咳清颗粒剂(紫菀 15 g, 白芍 15 g, 地龙 10 g, 桔梗 10 g, 桑白皮 15 g, 北沙参 15 g, 甘草 6 g, 江阴天江药业有限公司生产, 批号 0604221)。养阴清肺糖浆(10 mL/支, 株洲千金药业有限公司, 批号 20051105)。地塞米松片(5 mg/片, 海南省海联制药厂, 批号 20060524)。胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所), MEM α 培养基、胰蛋白酶(Gibco 公司), EDTA(Sigma 公司), 肝素(Biosharp 公司), SCF, FN 定量 EIA 试剂盒(上海森雄科技实业有限公司提供)。

1.3 仪器 离心机(北京医用离心机厂, 型号 LD5-24), 干燥箱(上海精宏实验设备有限公司, 型号 DHG-907A 型), 双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂, 型号 52-93), 压力蒸气灭菌器(上海佳胜实验设备有限公司, 型号 YXO-SG46-280SA), 电子天平(北京赛多利斯公司, 型号 BS210), 电热恒温水浴锅

[收稿日期] 20100326(002)

[基金项目] 2006年河南中医学院博士基金项目

[第一作者] 翟文生, 医学博士, 教授、主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为中医药治疗小儿呼吸、肾脏系统疾病

[通讯作者] * 冯斌, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为中医药治疗小儿呼吸系统疾病, Tel: 13949025587, E-mail: 465553701@qq.com

(上海精宏实验设备有限公司, 型号 DK-S22), 低速台式大容量离心机(上海安亭科学仪器厂, 型号 TDL-50B), 生物洁净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司, 型号 BCM-1300), 二氧化碳培养箱(美国 REVCO 公司, 型号 RCO-3000TVBB), 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司, 型号 CK40)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 实验大鼠随机分为 6 组, 每组 3 只, 分别为敏咳清颗粒高、低剂量组, 养阴清肺糖浆高、低剂量组, 地塞米松组及空白组。以临床成人用药剂量的大鼠等效剂量的 1 倍、2 倍分别为低、高剂量, 将敏咳清颗粒剂用蒸馏水溶解, 制成高剂量含生药 $0.844 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 低剂量含生药 $0.422 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig 给药; 养阴清肺糖浆的等效剂量的 2 倍, 1 倍作为高、低剂量, 含药体积分数分别为 $0.834 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.417 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig 给药; 地塞米松组, 按 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的临床用药量, 计算大鼠的等效剂量, 制成 $0.094 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 液体, 按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重给药; 对照组予生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig。每天 2 次, 连续 5 d。在 ig 最后 1 次后 2 h, 经眼球取血, 静置 2 h, 离心取上清液, $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活补体 30 min 后 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 无菌滤器过滤, 分装, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 细胞分组及细胞培养 共分空白组、模型组、对照组、敏咳清高剂量组、敏咳清低剂量组、养阴清肺糖浆高剂量组、养阴清肺糖浆低剂量组、地塞米松组 8 组, 每组设 6 个复孔。常规培养细胞, 将处于对数生长期的人胚肺成纤维细胞 HFL-1 消化, 吹打均匀制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 $0.5 \times 10^5/\text{mL}$, 以 $200 \text{ }\mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔板, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中培养 24 h, 使细胞贴壁生长。去掉培养液, 加入不含胎牛血清的 MEM α 培养液 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 继续培养 24 h, 使细胞同步化。

2.3 细胞处理及细胞培养上清液的收集 按实验分组各用药组分别加入相对应的含药血清 $20 \text{ }\mu\text{L}$, 肝素 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $10 \text{ }\mu\text{L}$; 空白组加无胎牛血清 (FCS) 的 MEM α 培养液 $10 \text{ }\mu\text{L}$; 模型组加肝素 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $10 \text{ }\mu\text{L}$; 对照组加肝素 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $10 \text{ }\mu\text{L}$, 正常鼠血清 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 。然后每组加含 $10\% \text{ FCS}$ 的 MEM α 培养液至每孔 $200 \text{ }\mu\text{L}$, 置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中培养 24 h。将经过含药血清处理过的细胞同步化后, 吸取上清 $190 \text{ }\mu\text{L}$ /孔, 装入 0.5 mL 离心管中置

超低温冰箱保存待测。

2.4 检测 均采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法来检测 SCF, FN。严格按照说明方法进行的操作, 在 492 nm 处测 A 值, 通过在半对数坐标纸上绘制标准曲线求出标本中的 SCF, FN 浓度。

2.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计分析软件对实验数据进行统计学处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 one-way ANOVA 分析进行组间均数比较, $P < 0.05$ 表示差异有显著意义。

3 结果

3.1 不同含药血清对体外培养的经肝素刺激增殖的 HFL-1 表达 SCF 的影响 由表 1 可以看出, 正常培养的 HFL-1 上清液中只产生少量的 SCF, 加入肝素刺激后 SCF 的含量明显升高, 与阴性组相比有极显著性差异 ($P < 0.01$), 各组含药血清均能明显降低经肝素刺激后增殖的 HFL-1 产生 SCF 的含量, 与对照组相比均有显著性差异 ($P < 0.05$)。其中敏咳清颗粒对其抑制作用最明显, 且高、低剂量组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明敏咳清颗粒可以剂量依赖地抑制 HFL-1 产生 SCF。敏咳清高剂量组与地塞米松组作用相当, 提示敏咳清颗粒在抑制体外培养的 HFL-1 产生 SCF 的作用方面与地塞米松可能有着相同的作用。

表 1 不同组含药血清对 HFL-1 上清液中 SCF 的含量影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	给药剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	SCF/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
阴性	-	0.3823 ± 0.0211
模型	-	$0.6715 \pm 0.0472^{1)}$
对照	-	0.5892 ± 0.0391
敏咳清	8.44	$0.4325 \pm 0.0500^{3)}$
	4.22	$0.4903 \pm 0.0372^{3)}$
养阴清肺	8.34	$0.5158 \pm 0.0449^{2)}$
	4.17	$0.5385 \pm 0.0366^{2)}$
地塞米松	9.4×10^{-4}	$0.4410 \pm 0.0518^{2)}$

注: 每 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 培养液中含血清 $20 \text{ }\mu\text{L}$; 养阴清肺糖浆的给药剂量为 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; 与阴性组相比¹⁾ $P < 0.01$, 与模型组相比²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 不同含药血清对体外培养的经肝素刺激增殖的 HFL-1 表达 FN 的影响 由表 2 可以看出, 各组含药血清均能明显降低经肝素刺激后增殖的人胚肺成纤维细胞 HFL-1 产生 FN 的含量, 与对照组相比均有显著性差异 ($P < 0.05$)。其中敏咳清颗粒对其抑制作用明显, 与地塞米松组作用相当, 但敏咳清颗

粒高剂量组与低剂量组作用相似,无统计学差异。

表 2 不同组合药血清对 HFL-1 上清液 FN 的含量影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	给药剂量 /g·kg ⁻¹	FN/ng·L ⁻¹
空白	-	0.2853 ± 0.0406
模型	-	0.4792 ± 0.0722 ¹⁾
对照	-	0.4085 ± 0.0353
敏咳清	8.44	0.3175 ± 0.0360 ²⁾
	4.22	0.3310 ± 0.0303 ²⁾
养阴清肺	8.34	0.3883 ± 0.0490
	4.17	0.3915 ± 0.0493
地塞米松	9.4 × 10 ⁻⁴	0.3270 ± 0.0270 ²⁾

4 讨论

LFB 是气道黏膜下主要结构细胞之一,在 CVA 发病机制中起着非常重要的作用。LFB 既是各种介质的靶细胞还是重要的免疫效应细胞,能产生胶原纤维、弹性纤维和网状纤维参与气道重构,也通过产生多种细胞因子和炎性介质增强和维持组织炎症反应^[7]。LFB 的增殖调控机制是由多种细胞因子共同参与的,SCF, TGF-β, 血小板衍生生长因子, 肿瘤坏死因子-α 等能直接或通过内分泌机制诱导 LFB 的增殖, LFB 亦可表达 SCF, FN, TGF-β, 胶原(如 Col-I, III, IV, V) 等细胞因子并发挥相应作用。SCF 是哮喘发病中得一个重要细胞因子,在体内或体外,活化的 LFB, MC, EOS 都能产生 SCF。SCF 通过与 MC, EOC 的相互作用参与气道炎症,维持气道高反应性,并且在 AR 方面起作用^[8-9]。有研究显示抗 SCF 干预可以减少 EOS, MC 的浸润,调节巨噬细胞功能,有助于抑制炎症反应^[10]。肺组织中, LFB 是合成、分泌 FN 的最主要细胞之一,而 FN 又是 LFB 的趋化因子, FN 可通过趋化作用吸引间质细胞,刺激 LFB 分裂、增殖,间质细胞自分泌 FN 循环的形成,在哮喘 AR 中起重要作用。FN 亦参与哮喘气道炎症损伤修复和应激反应,通过相关信号传导途径,促进相关基因转录,抑制炎症细胞凋亡和趋化运动,调节细胞生长、迁移、分化和 ECM 沉积。FN 主要参与早期病变,打破 FN 与 LFB 的内循环,可减少 I, III 型前胶原蛋白及 ECM 的合成,可以减轻气道炎症,延缓气道重建的进程。

敏咳清颗粒是临床治疗 CVA 有效方,由北沙参、紫菀、桑白皮、桔梗、甘草、白芍、地龙组成。方中北沙参养阴清肺,专补肺阴,清肺火,《本草从新》云其“专补肺阴,清肺火,治久咳肺痿”;紫菀润肺下气、化痰止咳,《药品化义》云“紫菀味甘而带苦,性

凉而体润,恰合肺部血分”;二药共用养肺阴,清肺热。桑白皮泻肺火,祛痰止咳平喘;桔梗宣肺祛痰,可开肺气之结;二药升降同施,符合肺脏之生理特点。白芍、地龙合用有疏肝理气、止咳解痉、活血化瘀之效。甘草可以祛痰止咳,调和诸药。纵观全方,诸药共用有养阴清肺、疏肝活瘀、化痰止咳之功。

本实验结果可以看出,正常人胚肺成纤维细胞表达一定量的 SCF, FN, 经肝素刺激后, SCF, FN 表达上升,予敏咳清颗粒含药血清作用后, SCF, FN 的表达明显下降,表明敏咳清颗粒可以抑制经肝素刺激增殖的人胚肺成纤维细胞表达 SCF, FN, 这可能是敏咳清颗粒治疗 CVA 的作用机制之一。

[参考文献]

[1] 苏斌斌,倪殿涛.哮喘气道重构中嗜酸粒细胞与成纤维细胞的相互作用[J].国外医学·呼吸系统分册,2005,25(9):687.

[2] Berlin A A, Hogaboam C M, Lukacs N W, et al. Inhibition of SCF attenuates peribronchial remodeling in chronic cockroach allergen-induced asthma [J]. Lab Invest, 2006, 86: 557.

[3] 苏苗赏,李昌崇.纤维连接蛋白(fibronectin, FN)与支气管哮喘气道重构[J].国外医学·呼吸系统分册,2005,25(9):682.

[4] 朱珊,翟文生,李向云,等.敏咳清口服液治疗过敏性咳嗽的临床研究[J].北京中医药大学学报,2004,27(4):78.

[5] 朱珊,翟文生,李向云.敏咳清口服液治疗过敏性咳嗽的实验研究[J].中华中医药杂志,2006,20(7):439.

[6] 朱珊,翟文生,李向云.敏咳清口服液对卵蛋白造模大鼠血液、支气管-肺灌洗液中 IL-6, IL-8, ET-1, TXB₂ 的影响[J].中国中医药杂志,2005,30(14):1099.

[7] 刘璇,黄茂.干细胞因子的炎症介导机制及其与支气管哮喘的关系[J].国际呼吸杂志,2007,24(14):1069.

[8] 张玉华,张迪,刘斌.轻度哮喘患者 BALF 中活化肌成纤维细胞与气道重塑实验研究[J].武警医学院学报,2009,18(4):336.

[9] Da Silva C A, Frossard N. Potential role of stem cell factor in the asthma control by glucocorticoids[J]. Chem Immunol Allergy, 2005, 87: 154.

[10] 林小亮,张建华.卡介苗干预对哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液干细胞因子、巨噬细胞集落刺激因子表达的影响[J].实用儿科临床杂志,2008,23(4):262.

[责任编辑 聂淑琴]