

淫羊藿对哮喘大鼠神经内分泌 免疫网络若干指标的影响

赵福东, 董竞成*, 崔焱, 谢瑾玉, 吴金峰, 宫兆华, 巫善美
(复旦大学附属华山医院中西医结合肺、炎症和肿瘤研究室, 上海 200040)

[摘要] 目的: 研究支气管哮喘(以下简称哮喘)大鼠神经内分泌免疫网络(NEI)若干指标的变化; 观察补肾药淫羊藿对哮喘大鼠 NEI 网络若干指标的影响。方法: 健康雄性挪威(BN)大鼠 54 只, 分为正常对照组(A组), 哮喘对照组(B组), 低剂量淫羊藿组(C组), 中剂量淫羊藿组(D组), 高剂量淫羊藿组(E组)。用实时定量-PCR(Realtime-PCR)法检测下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)mRNA 的表达; 放射法检测血浆中促肾上腺皮质激素(ACTH)的含量; 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清 IL-4, IL-6, IFN- γ 和皮质酮(CORT)的含量。结果: 哮喘大鼠下丘脑 CRHmRNA 表达和血浆 ACTH 无明显变化, 血清皮质酮水平升高显著, 细胞因子 IFN- γ 无明显变化, IL-6 IL-4 有上升趋势, 低、中剂量淫羊藿能够促进哮喘大鼠 CRHmRNA 的产生, 中剂量淫羊藿能够上调血清 IFN- γ 的浓度。结论: 哮喘大鼠存在 NEI 网络的紊乱; 补肾药淫羊藿可以增强下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴的功能, 提高血清 IFN- γ 的水平。这些可能是其治疗哮喘的机制之一。

[关键词] 支气管哮喘; 炎症; 神经内分泌免疫网络; 淫羊藿

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)09-0044-03

The Effects of Epimedium Herb on Neuro-endocrino-immune Network in Asthma Models

ZHAO Fu-dong, DONG Jing-cheng*, CUI Yan, XIE Jin-yu, WU Jin-feng, Gong Zhao-hua, WU Shan-mei
(Institute of Integrative Medicine for Lung, Inflammation and Cancers,
Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

[Abstract] **Objective:** To study changes of several related subjects of neuro-endocrino-immune network(NEI) in asthma models, to study the effects of Epimedium Herb on NEI. **Methods:** 54 BN rats were randomly divided into 5 groups, Group A, B, C, D and E. Group A was the normal group. Group B was the allergic asthma model. Group C, D and E were administered respectively with low, moderate and high dose Epimedium Herb. CRHmRNA, ACTH, CORT, IL-6, IL-4, IFN- γ were measured in all groups. **Results:** The expression of CRHmRNA in hypothalamic tissue and concentration of interferon gamma in blood both increased in controlled groups in comparison with group B. There were higher expression of CRHmRNA in group C or D than that in group B. There were higher concentration of IFN- γ in group D than that in group B. **Conclusion:** The rats troubled with repeated asthmatic attack for three weeks had disorders of NEI(mainly including HPA axis and several cytokines). Epimedium Herb could improve HPA axis and Th1/Th2 cytokines so as to alleviate the inflammation of asthma.

[Key words] bronchial asthma; inflammation; neuro-endocrino-immune network; epimedium herb

[收稿日期] 2007-02-01

[通讯作者] * 董竞成, Tel: (021) 62489999-6317; E-mail: jcdong2004@126.com

气道变应性炎症只是哮喘病理机制的一部分,其它还涉及遗传、环境、免疫、社会心理等各个领域。进一步的研究表明,免疫系统和神经内分泌系统的相互作用与影响参与哮喘的发病过程,如内源性皮质激素对哮喘有重要的调节作用。哮喘患者在接触变应原,哮喘初发期糖皮质激素分泌增多,但反复发作的哮喘患者下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴功能低下,对应激反应不足,激素分泌功能低下;Th1/Th2下降,NEI网络紊乱。目前,在哮喘治疗中,糖皮质激素是最为有效的药物,但长期全身用药会产生许多副作用,也会对哮喘患者的HPA轴起到明显的抑制作用^[1]。因此,寻找能促进内源性糖皮质激素分泌或具有类皮质激素样作用的药物具有重要意义。糖皮质激素的分泌主要受HPA轴的调节,此外,还受垂体外因素、肾上腺皮质自身因素等的调节,同时,在NEI网络的研究中发现,免疫刺激可产生大量细胞因子,如IL-6等,除了参与致炎以外,也可激活HPA轴,使促肾上腺皮质激素(ACTH),皮质酮(CORT)分泌增加,进而对免疫性炎症产生抑制作用。

祖国医学认为,哮喘反复发作多表现为肾阳虚,现代肾本质的研究表明,肾阳虚的物质基础为HPA轴的功能低下,本实验研究补肾药淫羊藿对哮喘大鼠HPA轴及若干相关的细胞因子的影响,从而进一步探求肾虚与补肾药治疗哮喘的机理。

1 材料

1.1 动物 健康清洁级雄性挪威(Brown Norway)大鼠,体重范围在(200~220)g,购自北京维通利华实验动物技术公司。动物饲养条件:清洁级,光照时间固定,水、食物自由摄取。

1.2 试剂和药物 淫羊藿,由上海中药研究所提供。卵蛋白由上海丽珠东风生物技术有限公司提供,氢氧化铝凝胶(13 mg·mL⁻¹)由Sigma公司提供,灭活百日咳杆菌疫苗由上海生物制品研究所提供,IFN- γ 、IL-4、IL-6试剂盒,均由biosource公司进口分装,皮质酮试剂盒购自R&D公司,ACTH放免试剂盒,由第二军医大学神经生物学研究所提供。

2 方法

2.1 药物制备 取淫羊藿药材700g,加8倍量的水,水煎2次,每次1h,过滤,常压浓缩,至700mL,即浓度为1g生药/mL,此浓度作为高剂量组,中、低剂量组分别用蒸馏水做2倍、4倍稀释。

2.2 造模及样品采集 动物分组:共分5组,正常对照组10只,其余每组11只,A组:正常对照组;B组:哮喘对照组;C组:低剂量淫羊藿组;D组:中剂量淫羊藿组;E组:高剂量淫羊藿组。造模方法参照文献[2,3]进行,B~E组大鼠腹腔注射含卵蛋白(OVA)100 mg·6 \times 10⁹个灭活百日咳杆菌疫苗和氢氧化铝凝胶的生理盐水混悬液1 mL(A组以1 mL生理盐水进行腹腔注射),14 d后以5%的OVA生理盐水溶液5 L·min⁻¹雾化吸入20 min,激发哮喘发作,连续激发7 d,停止激发7 d,再激发7 d。A组以生理盐水代替OVA生理盐水进行雾化吸入。从停止激发第1 d开始,A、B组以生理盐水灌胃,C、D、E组分别以低、中、高剂量(分别为0.25,0.5,1 g生药·kg⁻¹)淫羊藿灌胃,共14 d,每日1次,每次2 mL/只。各组大鼠末次雾化吸入后30 min内,取血、下丘脑,以上取标本时间均在(8:30~10:30)am进行。

2.3 指标检测 实时定量PCR(Realtime-PCR)检测下丘脑CRHmRNA。放免法检测血浆ACTH。用酶联免疫吸附实验(ELISA)方法检测血清IL-6、IFN- γ 、IL-4、CORT。

2.4 统计分析 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS11.5统计软件进行分析。两两比较采用t检验,多组比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

与正常对照组比较,哮喘组大鼠下丘脑CRHmRNA、血浆ACTH、血清IFN- γ 均无明显变化,IL-6、IL-4虽有上升趋势,但并未显示出统计学意义,而血清皮质酮明显升高($P < 0.05$)。与哮喘组比较,低、中剂量淫羊藿能够明显促进下丘脑CRHmRNA的表达,但与高剂量组差别无显著性,中剂量组能提高血清IFN- γ 的浓度,但与低、高剂量组差别无显著性,具体如表1~2。

表1 淫羊藿对下丘脑CRHmRNA的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量(生药 g·kg ⁻¹)	CRHmRNA
正常对照组	—	1.76 ± 0.56
哮喘组	—	2.28 ± 0.54
淫羊藿组	0.25	4.62 ± 1.87 ²⁾
淫羊藿组	0.50	4.44 ± 1.88 ²⁾
淫羊藿组	1.00	3.08 ± 1.25

注:与哮喘组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。(下同)

4 讨论

淫羊藿是常用的补肾阳中药,其主要有效成分

为淫羊藿总黄酮,淫羊藿甙及多糖等。现代医学研究表明,淫羊藿总黄酮能上调老年大鼠神经递质受体的表达并通过 NEI 网络的下行通路激活神经内分泌和免疫系统^[4]。能够降低下丘脑组织钙调蛋白 (CaM)mRNA 的表达水平^[5]。淫羊藿为常用补肾药

物,临床用其治疗哮喘病人,能起到良好的疗效^[5]。特别是在长期反复发作及小儿哮喘中,能够减少哮喘发作次数,减轻症状^[6]。哮喘大鼠存在 HPA 轴受抑制的现象,补肾阳复方可以改善哮喘大鼠 HPA 轴的功能状态^[7,8]。

表 2 淫羊藿对血浆 ACTH、CORT 及几个细胞因子的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (生药 g·kg ⁻¹)	n	ACTH(pg·μL ⁻¹)	CORT(ng·mL ⁻¹)	IL-6(pg·mL ⁻¹)	IFN-γ(pg·mL ⁻¹)	IL-4(pg·mL ⁻¹)
正常对照组	—	10	1.16 ± 0.76	138.46 ± 50.47 ¹⁾	31.30 ± 7.62	19.09 ± 6.55	28.66 ± 18.17
哮喘组	—	11	0.99 ± 0.55	178.76 ± 49.49	43.85 ± 44.32	20.21 ± 5.23	46.08 ± 66.84
淫羊藿组	0.25	11	1.33 ± 0.62	195.81 ± 64.78	35.50 ± 7.36	23.48 ± 5.28	38.61 ± 18.05
淫羊藿组	0.50	11	0.84 ± 0.38	213.53 ± 75.60	37.01 ± 11.09	26.26 ± 9.21 ¹⁾	42.20 ± 27.10
淫羊藿组	1.00	11	1.30 ± 1.17	160.26 ± 55.59	38.31 ± 5.64	20.19 ± 5.44	45.56 ± 13.85

本实验研究发现,哮喘 3 周大鼠下丘脑 CRHmRNA 表达水平无明显下降,甚至有上升趋势,实验中血浆 ACTH 未呈现出统计学意义的变化。血浆 CORT 浓度较正常对照组明显升高,这与 ACTH 的水平并不一致,可能肾上腺 CORT 的分泌除了受 ACTH 的刺激影响外,还受神经和免疫等因素的调节^[9]。另外,模型大鼠 HPA 轴等功能不低弱的原因可能与发作时间与强度有关,即这种发作强度仅引起 HPA 轴多环节、多水平的紊乱,还没有使其功能低弱。低、中剂量的淫羊藿均可以使哮喘大鼠下丘脑 CRHmRNA 表达水平明显升高。本实验提示淫羊藿对血浆 ACTH 及血清 CORT 的浓度无明显影响,原因有待进一步验证。本实验研究结果表明,与正常对照组比较,哮喘大鼠虽然 HPA 轴仍然处于相对兴奋状态,但补肾中药仍然能从下丘脑层面增强 HPA 轴的兴奋性,可能通过此途径对哮喘大鼠起到一定的保护作用,其具体机制仍有待进一步研究。另外,淫羊藿可提高血清 IFN-γ 水平,从而有可能调节 Th1 和 Th2 型细胞因子的平衡。

[参考文献]

[1] Casale TB, Nelson HS, Stricker WE, et al. Suppression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity with inhaled flunisolide and fluticasone propionate in adult asthma patients [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2001, 87(5): 379-385.

[2] Murai A., Abe M., Hayashi Y., et al. Comparison study

between the mechanisms of allergic asthma amelioration by a cysteinyl-leukotriene type 1 receptor antagonist montelukast and methylprednisolone[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 312(2): 432-440.

[3] 宫兆华,董竞成,倪健.豚鼠支气管哮喘模型建立[J].上海实验动物科学,2004,24(4):204-206.

[4] 沈自尹,陈瑜,黄建华,等.EF 处缓 HPAT 轴衰老的基因表达谱研究[J].中国免疫学杂志,2004,20(1):59-62.

[5] 蒋淑君,王桂兰,许兰芝.糖皮质激素对 HPAA 的影响及仙灵脾的调整作用[J].滨州医学院学报,2004,27(2):87-90.

[6] 陈立翠,谭艳.重用淫羊藿治疗小儿支气管哮喘[J].四川中医,2000,18(6):40-41.

[7] Bornstein SR, Chrousos GP. Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs [J]. J Clin Endocrinol Metab, Review. 1999, 84(5): 1729-1736.

[8] 谢瑾玉,董竞成,宫兆华,等.补肾益气中药仙灵脾和黄芪对哮喘大鼠 TNF-α 和 NF-κB 的影响[J].中国中西医结合杂志,2006,26(8):723-727.

[9] Fottner C, Engelhardt D, Weber MM. Regulation of steroidogenesis by insulin-like growth factors (IGFs) in adult human adrenocortical cells: IGF-I and, more potently, IGF-II preferentially enhance androgen biosynthesis through interaction with the IGF-I receptor and IGF-binding proteins [J]. J Endocrinol, 1998, 158(3): 409-417.