

苏子降气汤对哮喘大鼠核因子- κ B 表达 及嗜酸性粒细胞数量的影响*

旺建伟, 李 翼*, 徐国亭

(黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 研讨苏子降气汤对核因子- κ B(NF- κ B) 表达与嗜酸性粒细胞(EOS) 数量的影响。方法: 以卵白蛋白注射致敏雾化吸入激发法复制哮喘模型, 观察苏子降气汤对哮喘模型肺组织 NF- κ B 蛋白表达、血及 BALF 中 EOS 数量、肺组织形态学的影响。结果: 苏子降气汤对 NF- κ B 蛋白表达有明显抑制作用, 能明显降低血及肺泡灌洗液(BALF) 中 EOS 数量, 改善肺组织形态学。结论: 苏子降气汤降低哮喘模型血及 BALF 中 EOS 数量的作用机制之一可能与调控肺组织 NF- κ B 蛋白表达有关。

[关键词] 苏子降气汤; 哮喘; 核因子- κ B; 嗜酸性粒细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)06-0038-03

[收稿日期] 2005-07-20

[基金项目] 黑龙江省中医管理局资助项目(No. ZH04Z41)

[通讯作者] 李翼, Tel: (0451) 82193631; E-mail: lijw@hljucm.net

核因子- κ B(NF- κ B)是近年来发现的重要基因转录因子,受NF- κ B调控的基因表达产物囊括了大多数参与哮喘气道炎症形成的细胞因子、黏附分子和炎症介质。嗜酸性粒细胞(EOS)在哮喘变应性炎症发生中作为一种效应细胞,对气道变应性炎症的发生起重要作用,而NF- κ B激活与EOS凋亡抑制有关。苏子降气汤是临床治疗哮喘的有效方剂,前期实验^[1]已证明苏子降气汤可通过对哮喘模型肺组织细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、活化正常T细胞表达和分泌的调节物(RANTES)蛋白表达的干预作用,抑制EOS趋化而降低EOS含量。本实验旨在通过对哮喘模型肺组织NF- κ B蛋白表达的影响,以期进一步探讨苏子降气汤对哮喘模型EOS数量影响的作用机制。

1 实验材料

1.1 实验药物 苏子降气汤(苏子 12.5g,半夏 12.5g,当归 7.5g,炙甘草 10g,前胡 5g,姜厚朴 5g,肉桂 7.5g,苏叶 5g,生姜 5g,大枣 10g);拆方 I(苏子 12.5g,半夏 12.5g,姜厚朴 5g,前胡 5g,苏叶 5g,生姜 5g);拆方 II(肉桂 7.5g,当归 7.5g,炙甘草 10g,大枣 10g)。按处方量称取药物,其中当归、大枣用水煎煮两次,第一次加 10 倍量水煎煮 2h,第二次加 8 倍量水煎煮 1h,合并两次煎煮液,浓缩至相对密度 1.16(70℃);其它药物采用挥发油提取装置,第一次加 10 倍量水煎煮 2h,第二次加 8 倍量水煎煮 1h。收集挥发油,水提液用 75% 乙醇沉淀,回收乙醇并浓缩至相对密度 1.16(70℃)。将两次提取浓缩液合并,加入挥发油。制备后,苏子降气汤含生药量为 5.3g/mL,拆方 I 含生药量为 3g/mL,拆方 II 含生药量为 2.3g/mL。醋酸泼尼松片(上海信谊药业有限公司)制成混悬液,浓度为 0.1mg/mL。

1.2 实验动物 雄性 SD 大鼠,体重 170 ± 20g,由哈尔滨医科大学第二医院动物研究所提供。

1.3 试剂与仪器 卵白蛋白(OVA)(邦定泰克生物技术有限公司);百日咳杆菌菌苗(卫生部生物制品研究所菌苗室);氢氧化铝(哈尔滨市化工试剂厂);核因子- κ B(p65)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);BSW-100 超声雾化器(贝尔思医疗器械有限公司);BX60 研究用显微镜(日本 OLYMPUS 公司);2135 轮转式组织切片机(德国莱卡公司)。

2 实验方法

2.1 模型复制与给药 采用 OVA 注射雾化吸入致

敏激发法复制哮喘大鼠。实验第 1d,将大鼠一次性腹腔注射 10% OVA 生理盐水溶液。1mL(OVA100mg,氢氧化铝 100mg,灭活百日咳杆菌菌苗 6×10^9 个)以致敏;第 15d 起,将大鼠分别置于玻璃容器中,以 1% OVA 生理盐水溶液超声雾化,自然吸入 20min,诱发哮喘,每天 1 次,共 7d。以呼吸急促深快,烦躁呛咳及点头运动等症状的出现为激发成功。模型对照组、阳性对照组、全方组、拆方 I 组、拆方 II 组均采用 OVA 注射雾化吸入致敏激发法复制哮喘。正常对照组用等量生理盐水替代进行腹腔注射和雾化吸入。各组分别于实验第 8d 起灌胃给药,根据体表面积比等效剂量换算比率计算,全方组给苏子降气汤 7.20g/kg,拆方 I 组给拆方 I 4.05g/kg,拆方 II 组给拆方 II 3.15g/kg,阳性对照组给醋酸泼尼松混悬液 0.9×10^{-3} g/kg,正常对照组、模型对照组给生理盐水,连续给药 23d。第 15~21d,各组均于雾化吸入前给药。

2.2 组织取材与处理 实验第 30d 收集标本。摘眼球取血 2mL,EDTA- Na_2 抗凝,混匀,静置 15min,用于白细胞计数。取 0.1mL 血液涂片,染色,在显微镜下计数 100 个白细胞中的 EOS,为 EOS 百分含量。取血后脱颈处死,分离气管及肺,经气管插入灌洗器于左支气管处,注入 PBS 液 2mL,灌洗 2~3 次,收集 6~7mL 肺泡灌洗液(BALF),离心 3000r/min 10min,分离上清液与细胞沉淀。细胞沉淀用 1mL PBS 液重悬,用于白细胞计数。取 0.1mL 细胞重悬液涂片,染色,在显微镜下计数 100 个白细胞中的 EOS,为 EOS 百分含量。根据公式计算 EOS 数量。EOS 数量 = 白细胞总数 × EOS 百分含量。切取右肺中叶,固定,脱水,包埋,切片。HE 染色,观察肺组织形态学变化;采用免疫组织化学方法检测 NF- κ B 蛋白表达情况。光镜下观察,细胞核被染成棕褐色为阳性(+),染成紫蓝色为阴性(-)。根据细胞核被染成棕褐色细胞数占细胞总数比例及染色深浅分为 4 级;阴性(-);弱阳性(+);阳性(++);强阳性(+++)。

2.3 数据处理 实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用 *t* 检验法;等级资料数据以 -、+ 表示,组间差异比较采用 Ridit 检验法。

3 实验结果

3.1 对哮喘大鼠血及 BALF 中 EOS 含量的影响 从表 1 可见,与正常对照组相比,模型对照组血及 BALF 中 EOS 数量显著增高($P < 0.01$),苏子降气

汤、二拆方均不同程度地降低 EOS 数量, 全方组疗效最为明显 ($P < 0.01$), 二拆方组疗效相近 ($P < 0.05$)。

表 1 对哮喘大鼠血及 BALF 中 EOS 数量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	EOS (%)		EOS 数 ($\times 10^8/L$)	
		血	BALF	血	BALF
正常对照组	-	4.2 ± 1.2 ²⁾	5.9 ± 2.2 ²⁾	3.98 ± 2.00 ²⁾	5.54 ± 4.11 ²⁾
模型对照组	-	13.1 ± 3.0	21.5 ± 5.2	23.33 ± 9.51	55.30 ± 24.51
醋酸泼尼松	0.9 × 10 ⁻³	7.0 ± 2.2 ²⁾	9.9 ± 3.4 ²⁾	7.89 ± 4.38 ²⁾	13.28 ± 8.17 ²⁾
苏子降气汤	7.20	7.9 ± 1.7 ²⁾	10.9 ± 1.9 ²⁾	9.26 ± 3.17 ²⁾	15.20 ± 7.75 ²⁾
拆方 I 组	4.05	9.4 ± 1.9 ²⁾	15.2 ± 4.2 ²⁾	12.80 ± 4.23 ²⁾	28.05 ± 14.07 ²⁾
拆方 II 组	3.15	10.6 ± 2.2 ²⁾	16.9 ± 3.9 ¹⁾	16.02 ± 4.95 ¹⁾	35.17 ± 13.72 ¹⁾

注: 同模型对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对哮喘大鼠肺组织 NF- κ B 表达的影响 从表 2 可见, 与正常对照组相比, 模型对照组肺组织 NF- κ B 蛋白表达程度明显上升 ($P < 0.01$), 苏子降气汤、二拆方组均不同程度地抑制 NF- κ B 蛋白表达, 全方组疗效最为明显 ($P < 0.01$), 二拆方组疗效相近 ($P < 0.05$)。

表 2 对哮喘大鼠肺组织 NF- κ B 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	n	-	+	++	+++
正常对照组	-	10	6	3	1	- ²⁾
模型对照组	-	8	-	1	2	5
醋酸泼尼松	0.9 × 10 ⁻³	10	3	5	1	1 ²⁾
苏子降气汤	7.20	9	3	4	1	1 ²⁾
拆方 I 组	4.05	8	2	3	2	1 ¹⁾
拆方 II 组	3.15	9	1	3	4	1 ¹⁾

注: 同模型对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对哮喘大鼠肺组织形态学的影响 光学显微镜下观察, 模型对照组大鼠肺组织 HE 染色见支气管壁环肌肥厚, 纤维组织增生, 粘膜上皮细胞高度分化, 腔内充满粘液, 见有大量 EOS 浸润。全方组大鼠肺组织切片支气管纤维组织轻度增生, 肺泡上皮轻度增生, 部分肺泡膨胀, 支气管纤维组织及肺泡间质偶见灶性炎性细胞浸润。

4 讨论

EOS 浸润是哮喘的主要病理学特征, EOS 凋亡抑制可导致 EOS 数量增多, 肺组织 EOS 浸润加重, 与 EOS 趋化募集共同加强 EOS 在肺中浸润, 而加重气道炎症反应。是呼吸道炎症持续存在的一个重要因素。

NF- κ B 是一种位于细胞浆内, 能够激活若干个

控制炎症反应、淋巴细胞分化及生长发育等基因转录过程的多功能异二聚体蛋白质, 在由细胞因子、炎症介质参与的哮喘的发病过程中发挥重要作用^[2]。在前炎症细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β) 等刺激单核细胞、气道上皮细胞作用下, 细胞内 NF- κ B 明显激活。NF- κ B 进入胞核中, 启动多种炎症反应基因转录。受 NF- κ B 调控的基因表达产物囊括了大多数参与哮喘气道炎症形成的细胞因子和炎症介质, 提示 NF- κ B 在哮喘的发病中起重要作用。Van Antwerp 等于 1996 年研究发现 NF- κ B 能够抑制由 TNF- α 诱导的细胞凋亡^[3]。而抑制 NF- κ B 活性则有助于促进细胞凋亡。

本实验采用免疫组化技术检测支气管上皮细胞中 NF- κ B 蛋白表达。结果显示, 正常对照组支气管上皮细胞中 NF- κ B 蛋白表达低, 各造模组 NF- κ B 蛋白表达均有不同程度上升, 其中模型对照组 NF- κ B 蛋白表达程度最高, 苏子降气汤、二拆方能够不同程度地抑制 NF- κ B 蛋白表达, 苏子降气汤疗效最为明显, 二拆方组疗效相近。结合肺组织炎性细胞浸润 (HE 染色) 及血和 BALF 中 EOS 数量变化结果分析, 与模型对照组相比, 全方组肺组织气道壁 EOS 浸润明显降低, 胞核 NF- κ B 蛋白表达降低, NF- κ B 激活细胞数量下调, 说明苏子降气汤可能通过下调 NF- κ B 激活细胞数量, 降低 NF- κ B 蛋白表达, 促进 EOS 凋亡, 从而降低支气管壁 EOS 浸润, 减少炎症反应。

此外, EOS 凋亡尚与 TNF 等细胞因子、神经递质调控有关, 与 NF- κ B 等共同调节 EOS 凋亡, 形成一个复杂的调控网。苏子降气汤可通过对 ICAM-1、RANTES 蛋白表达的干预作用, 抑制 EOS 趋化而降低 EOS 含量, 并降低 TNF 含量, 说明苏子降气汤通过对多种活性物质抑制/促进等作用, 多靶点、多环节、多方位对 EOS 的数量起到调控作用。

[参考文献]

[1] 李翼, 旺建伟, 徐国亭. 苏子降气汤对哮喘模型 EOS 的数量及作用机理的影响[J]. 中医药信息, 2004, 6(22): 56.

[2] May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- κ B[J]. Immunology Today, 1998, 19: 80.

[3] Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, et al. Suppression of TNF- α induced apoptosis by NF- κ B[J]. Science, 1996, 274: 787.