

清半夏多糖对过敏性哮喘模型大鼠肺组织 MUC5AC mRNA 的影响

黄聪, 彭伟, 魏大能, 钟占琼, 牟茂婷, 魏蜀君, 高永翔*, 吴纯洁*
(成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] **目的:** 通过观察清半夏多糖对过敏性哮喘模型大鼠气道黏液分泌的作用, 研究清半夏多糖为原药材发挥“燥湿化痰”功效“大分子”成分的物质作用基础。**方法:** SPF 级 Wistar 大鼠 60 只, 除正常组外, 鸡卵清蛋白(OVA)与铝镁佐剂腹腔注射诱导致敏, OVA 溶液雾化激发, 建立过敏性哮喘大鼠模型。造模成功后大鼠随机平均分成 5 组, 为过敏性哮喘模型组, 阳性药组(孟鲁司特钠, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 清半夏多糖高、中、低剂量组($400, 200, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清、支气管肺泡灌洗液(BALF)上清液中白细胞介素-4(IL-4), γ -干扰素(IFN- γ)含量, BALF 沉渣进行嗜酸性粒细胞(EOS)的计数检测; 苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理改变, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肺组织黏蛋白 5AC(MUC5AC)mRNA 的表达。**结果:** 与正常组比较, 过敏性哮喘模型组大鼠血清 IL-4 含量显著升高($P < 0.01$), IFN- γ 含量显著降低($P < 0.01$), BALF 中 EOS 计数显著升高($P < 0.01$); 与过敏性哮喘模型组比较, 孟鲁司特钠组、清半夏多糖高、中、低剂量组均能显著降低血清中 IL-4 的含量($P < 0.01$), 清半夏多糖高、中剂量组能显著降低 BALF 中 IL-4 的含量($P < 0.05$, $P < 0.01$), 清半夏多糖中剂量组能显著增高血清中 IFN- γ 的含量($P < 0.05$), 孟鲁司特钠组、清半夏多糖各剂量组均能显著降低 BALF 中的 EOS 计数($P < 0.01$)。HE 染色结果显示, 过敏性哮喘模型组大鼠肺组织出现明显病理改变, 孟鲁司特钠组、清半夏多糖各组具有缓解作用。与正常组比较, 过敏性哮喘模型组大鼠肺组织的 MUC5AC mRNA 表达显著升高($P < 0.01$); 与过敏性哮喘模型组比较, 孟鲁司特钠组、清半夏多糖高、中、低剂量组 MUC5AC mRNA 均显著降低($P < 0.01$)。**结论:** 清半夏的“大分子”成分清半夏多糖, 可能是原药材清半夏发挥“燥湿化痰”功效的物质作用基础。

[关键词] 清半夏多糖; 过敏性哮喘模型大鼠; 黏蛋白 5AC (MUC5AC)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0015-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192103

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190717.1612.010.html>

[网络出版时间] 2019-07-18 13:18

Effect of Pinelliae Rhizoma Praeparatum Cum Alumine Polysaccharides on MUC5AC mRNA in Lung Tissues of Allergic Asthma Model Rats

HUANG Cong, PENG Wei, WEI Da-neng, ZHONG Zhan-qiong, MOU Mao-ting, WEI Shu-jun,
GAO Yong-xiang*, WU Chun-jie*

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Pinelliae Rhizoma Praeparatum Cum Alumine polysaccharides (PRPCAP) on airway mucus secretion in rats with allergic asthma, in order to study the material basis of the "macromolecule" component of the polysaccharides as the original medicinal materials. **Method:** The 60 SPF-grade Wistar rats were induced by intraperitoneal injection of chicken ovalbumin (OVA) and aluminum-magnesium adjuvant, except for the normal control group. The OVA solution was aerosolized to establish a rat

[收稿日期] 20190327(023)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573610)

[第一作者] 黄聪, 在读博士, 从事中西医结合基础研究, E-mail: huangcong@cdutcm.edu.cn

[通信作者] *高永翔, 博士, 教授, 从事中西医结合基础、免疫学、中医内科学研究, E-mail: gaoyongxiang@cdutcm.edu.cn;

*吴纯洁, 博士, 研究员, 从事中药炮制与制剂工作研究, E-mail: wuchunjie@cdutcm.edu.cn

model of allergic asthma. After successful modeling, the rats were randomly divided into 5 groups, namely allergic asthma model group, positive drug group (montalurast sodium, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), high-dose PRPCAP group ($400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), middle-dose PRPCAP group ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and low-dose PRPCAP group ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The contents of interleukin-4 (IL-4) and interferon- γ (IFN- γ) in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) supernatant were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the count of eosinophils (EOS) was detected by BALF sediment. The histopathological changes were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining in lung tissue. The mRNA expression of mucin 5AC (MUC5AC) was detected by Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the normal control group, serum IL-4 level in the allergic asthma model group was significantly increased ($P < 0.01$), IFN- γ level was significantly decreased ($P < 0.01$), and EOS counts in BALF were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the allergic asthma model group, the positive drug group, and high, middle, and low-dose PRPCAP groups could significantly reduce the serum IL-4 content ($P < 0.01$), while high and middle-dose PRPCAP groups could significantly reduce the content of IL-4 in BALF ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the middle-dose PRPCAP group could significantly increase the content of IFN- γ in serum ($P < 0.05$), EOS counts in BALF were significantly lower in the positive drug group and all of PRPCAP groups ($P < 0.01$). HE staining showed the pathological changes in the lung tissue of the allergic asthma model group and a mitigating effect in the positive drug group and all of PRPCAP groups. Compared with the normal control group, the expression of MUC5AC mRNA in the lung tissue of rats with allergic asthma was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group of allergic asthma rats, the positive drug group and all of PRPCAP groups showed significant decrease in MUC5AC mRNA ($P < 0.01$). **Conclusion:** The " macromolecule" component of polysaccharides in the Pinelliae Rhizoma Praeparatum Cum Alumine may be the material basis for the efficacy of eliminating dampness and eliminating phlegm.

[**Key words**] Pinelliae Rhizoma Praeparatum Cum Alumine polysaccharides; allergic asthma model rat; mucin 5AC (MUC5AC)

半夏为川产道地药材,是天南星科植物半夏的干燥块茎,性温,味辛,有小毒,归脾、胃、肺经,为“燥湿化痰”要药,常用于痰多哮喘的治疗。2015 年版《中国药典》中记载,清半夏是生半夏用 8% 白矾溶液浸泡至内无干心,口尝微有麻舌感后,洗净切片干燥制成。清半夏较生半夏而言毒性减低而化湿功效增强,多入煎剂,常用于体弱而痰涎壅盛所致眩晕、痰多咳嗽的配伍入药,在半夏白术天麻汤、二陈汤、温胆汤等方剂中多有运用^[1-2]。在药材水煎液的成分中,以相对分子质量 1 000 为界限,将物质基础分为“小分子”与“大分子”两大类,其中相对分子质量 < 1 000 的,如生物碱、氨基酸、有机酸等,为小分子物质;而相对分子质量 > 1 000 的,如多糖、蛋白质等,则为“大分子”物质^[3]。本课题组前期研究发现,清半夏水煎剂中的多糖类“大分子”成分较“小分子”成分含量更多,且具有缓解哮喘的效果,推测清半夏多糖可能是清半夏发挥“燥湿化痰”的药效作用物质基础。

过敏性哮喘以气道高反应性、气道重构、炎性渗出,组织细胞萎缩、坏死为特征。过敏性哮喘在传统

中医认识中可归于“哮病”,属于“痰饮病”。中医理论中,哮病的病因病机主要为“痰伏于肺”,痰壅气道而致。黏蛋白黏蛋白 5AC (MUC5AC),是气道黏液层中的成分^[4],关键在于 MUC5AC mRNA 的表达与黏液分泌是呈同向关系^[5],与气道痰液的生成密切相关,而已有研究发现白三烯受体抑制剂孟鲁司特钠,对气道黏液高分泌的哮喘大鼠肺组织 MUC5AC mRNA 有下调作用^[6]。故本课题拟通过采用建立过敏感性哮喘大鼠模型,以孟鲁司特钠为阳性对照,基于肺部 MUC5AC mRNA 的表达变化,探讨清半夏多糖对过敏性哮喘痰液生成的影响,为研究清半夏多糖作为清半夏药材水煎液中的“大分子”成分可能是清半夏药材的物质作用基础而提供参考。

1 材料

1.1 动物 60 只雄性 Wistar 大鼠,3~4 周龄,体质量 180~220 g,购买于成都达硕实验动物有限公司,动物合格证号 SCXK (川) 2015-0030。本项目通过成都中医药大学实验动物伦理委员会审查。

1.2 试剂与仪器 鸡卵清蛋白 (OVA, 美国 Sigma 公司,批号 SLBQ9036V); 铝镁佐剂,trizol,反转录试

剂盒(美国 Thermo Scientific 公司,批号分别为 SJ255649,174265,00616421);大鼠白细胞介素-4(IL-4), γ 干扰素(IFN- γ)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,批号均为 A30480435);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(福州飞净生物科技有限公司,批号 180305);嗜酸性粒细胞计数液(北京索莱宝科技有限公司,批号 G3580);RNA 提取液(武汉谷歌生物科技有限公司,批号 181904);HyPure™ 分子生物级水(美国 HyClone 公司,批号 AD18110297);荧光定量试剂盒(上海罗氏制药有限公司,批号 39088900)。

1.3 仪器 402 型超声雾化器(上海鱼跃医疗设备有限公司);AP280-1.2.3 型包埋机, HM335E 型组织切片机(德国 Microm 公司);HI1210 型漂片机, HI1220 型摊片机(德国徕卡仪器公司);V1.0 型明美显微数码测量分析系统(广州市明美光电技术有限公司);UPK-I-10T 型纯水仪(四川优普超纯科技有限公司);KZ-II 型匀浆机(武汉赛维尔生物科技有限公司);Stepone plus 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司);SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);3001 型酶标测试仪, NanoDrop2000 型微量分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.4 清半夏多糖的获取和制备 本研究使用的清半夏饮片购买自新荷花中药饮片股份有限公司,批号 1705002,饮片由成都中医药大学吴纯洁教授鉴定为正品。取清半夏饮片加水煎煮,制备得到水煎液。用 1 000 Da 的半透膜分离成“大分子”和“小分子”两部分溶液。取上述清半夏饮片水煎液的“大分子”部分溶液,减压浓缩至一定程度,加入乙醇提取 3 次,滤过,弃去滤液,残渣加入适量水溶解,加入三氯乙酸于 4 °C 下脱蛋白,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液用稀碱液调 pH 至中性,减压浓缩,加入乙醇使含醇量达到一定浓度,静置,滤过,收集沉淀物,干燥后得到清半夏多糖成分,用于后期对过敏性哮喘模型大鼠的作用机制进行研究。清半夏多糖由成都中医药大学中药炮制学教研室提供,每 1 g 提取物相当于生药 5 g。

2 方法

2.1 过敏性哮喘模型大鼠的制备与评价 前期除正常组外,其余大鼠均于第 1 天和第 7 天,采用 OVA 2 g·L⁻¹ 与铝镁佐剂 10 g·L⁻¹ 制成的混悬液 1 mL 腹腔注射致敏。第 14~35 天采用 5% OVA 雾化吸入激发哮喘。正常组大鼠以生理盐水在相同的

时间进行同样的对照操作^[7-8]。

密切观察大鼠有无持续出现口唇黏膜发绀、腹肌出现痉挛、频繁的喘息、喷嚏、呛咳、抓耳挠腮、烦躁不安等行为学改变^[9]。淘汰不符合要求的大鼠后,从正常组、参与造模过程的大鼠中,各随机选取 3 只进行肺组织病理切片,HE 染色观察,进行模型病理评价。

2.2 分组及给药 本课题组预实验发现,清半夏多糖以 200 mg·kg⁻¹ 剂量灌胃给药过敏性哮喘模型大鼠时,具有缓解哮喘的作用。故本实验以 200 mg·kg⁻¹ 剂量设置为清半夏多糖中剂量组给药剂量;同时以 200 mg·kg⁻¹ 剂量为基础,2 倍剂量即 400 mg·kg⁻¹ 作为清半夏多糖高剂量组的给药剂量,0.5 倍剂量即 100 mg·kg⁻¹ 为清半夏多糖低剂量组的给药剂量。通过设置 2 倍递增的 3 个剂量组,探讨清半夏多糖对过敏性哮喘大鼠的作用及机制研究。

待模型评价成功后,将模型大鼠随机分配至各给药组中,分别为过敏性哮喘模型组、孟鲁司特钠组、清半夏多糖高、中、低剂量组,每组 8 只。每组大鼠灌胃给予相应药物治疗 14 d,其中正常组、过敏性哮喘模型组大鼠以生理盐水在相同的时间进行等体积灌胃操作,孟鲁司特钠组大鼠以孟鲁司特钠 5 mg·kg⁻¹^[10] 进行灌胃给药,清半夏多糖各组给予相应剂量,期间继续保持雾化。

2.3 取材 第 35 天最后 1 次 OVA 雾化、给药,24 h 后,所有大鼠 10% 水合氯醛(0.3 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,腹主动脉采血,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取血清保存于 -80 °C 冰箱中待测。切开颈部皮肤,暴露气管,结扎右肺,左侧支气管固定自制一次性无菌支气管肺泡灌洗采集管,用预冷生理盐水 5 mL 进行左肺支气管肺泡灌洗,注入、回抽 3 次,回收液体量 >80% 为合格,共采集 3 次。

灌洗完立即将支气管肺泡灌洗液(BALF)置于冰上,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液存 -80 °C 冰箱。离心管底部沉渣加磷酸盐缓冲液(PBS)0.1 mL 重悬细胞,取细胞悬液 20 μ L,加入嗜酸性粒细胞(EOS)计数液 0.38 mL 后,在光学显微镜下用细胞计数板读取染色后的 EOS 细胞数量,经计算得到 EOS 计数值。

2.4 HE 染色观察肺组织病理变化 切取右肺第 1 肺叶用 PBS 液冲洗后,4% 多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋,切片 5 μ m,进行 HE 染色,观察肺组织病理变化。

2.5 ELISA 检测 IL-4 和 IFN- γ 含量的表达

ELISA 试剂盒检测血清, BALF 中 IL-4 和 IFN- γ 含量。右肺第 2 肺叶保存于 -80 °C 冰箱备用。

2.6 Real-time PCR 检测肺组织、结肠组织 MUC5AC mRNA 的表达

取匀浆管, 加入 trizol 1 mL, 置冰上预冷。取肺组织 100 mg, 加入到匀浆管中, 匀浆仪充分研磨, 提取总 RNA, 使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度后, 荧光染料标记, cDNA 合成试剂盒进行 DNA 的反转录, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 通过 PCR 仪对 cDNA 进行扩增, 95 °C 预变性 10 min 一个循环, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 延伸 60 s, 40 个循环, 熔解曲线 60 °C 到 95 °C, 每 0.5 °C 一个梯度, 每梯度 15 s, 1 个循环, 获得 Real-time PCR 反应曲线, 采用 PCR 仪自带图像分析软件分析 MUC5AC mRNA 的 C_t 值及其相对表达量。目的基因及内参由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成, 引物信息见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
MUC5AC	上游 AGCAATAACTCCACTTCCCTCTAC	133
	下游 TCTTGGGCACTCTATCTTCAT	

2.7 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行分析, 各组所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均值满足正态性和方差齐性的使用单因素方差分析, 不满足的使用非参数秩和检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 模型评价结果 参与造模过程的大鼠持续出

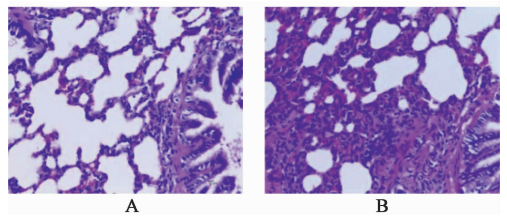
表 2 清半夏多糖对过敏性哮喘模型大鼠血清和 BALF 中 IL-4 和 IFN- γ 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Pinelliae Rhizoma Praeparatum Cum Alumine polysaccharides on expression of IL-4 and IFN- γ in serum and BALF of allergic asthma model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-4		IFN- γ	
		血清	BALF	血清	BALF
正常	-	27.16 \pm 0.82	57.57 \pm 4.03	209.54 \pm 4.96	256.73 \pm 8.19
模型	-	32.74 \pm 3.91 ¹⁾	60.74 \pm 0.80	197.29 \pm 7.44 ²⁾	246.37 \pm 29.34
孟鲁司特钠	5	25.32 \pm 0.97 ³⁾	53.60 \pm 5.32	199.62 \pm 6.75	256.28 \pm 9.77
清半夏多糖	400	24.84 \pm 1.71 ³⁾	55.25 \pm 1.88 ^{3,5)}	195.66 \pm 4.94 ⁵⁾	245.03 \pm 3.46 ⁴⁾
	200	25.22 \pm 1.77 ³⁾	58.17 \pm 10.76 ²⁾	209.12 \pm 10.49 ²⁾	250.35 \pm 8.43
	100	28.37 \pm 1.12 ^{3,5)}	60.43 \pm 3.17	198.91 \pm 4.40 ⁵⁾	241.79 \pm 12.82 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与哮喘模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与孟鲁司特钠组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

现口唇黏膜发绀、腹肌出现痉挛、频繁的喘息、喷嚏、呛咳、抓耳捞腮、烦躁不安等行为习惯改变, 上述大鼠的行为学改变可以表示激发成功^[7]; 随机选取的正常组、参与造模且有行为习惯改变的大鼠, 其肺组织通过 HE 染色发现, 正常组大鼠肺组织中部分肺间质内有少量炎细胞浸润; 与正常组比较, 参与造模过程大鼠肺组织可见支气管分支结构破坏, 细部分支气管上皮坏死、脱落, 管腔内有脱落、散布的上皮细胞, 黏膜层中大量杯状细胞增生、肥大, 肺泡间质明显增宽, 大量炎细胞浸润的病理改变, 见图 1。通过行为学和病理学共同评价, 说明实验造模成功。



A. 正常组; B. 过敏性哮喘模型组

图 1 造模对大鼠肺组织病理变化的影响(HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of modeling methods on pathological changes of lung tissue in rats(HE, $\times 400$)

3.2 对过敏性哮喘模型大鼠血清, BALF 中 IL-4 和 IFN- γ 含量的影响

与正常组比较, 过敏性哮喘模型组大鼠血清 IL-4 含量显著升高($P < 0.01$), IFN- γ 含量显著降低($P < 0.01$); 与过敏性哮喘模型组比较, 孟鲁司特钠组、清半夏多糖高、中、低剂量组均能显著降低血清中 IL-4 的含量($P < 0.01$), 而清半夏多糖高、中剂量组能明显降低 BALF 中 IL-4 的含量($P < 0.01, P < 0.05$), 清半夏多糖中剂量组能明显增高血清中 IFN- γ 的含量($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对过敏性哮喘模型大鼠 BALF 沉渣的 EOS 计数影响 与正常组比较,过敏性哮喘模型组大鼠 BALF 中 EOS 计数显著升高 ($P < 0.01$); 与过敏性哮喘模型组比较,孟鲁司特钠组、清半夏多糖高、中、低剂量组均能显著降低大鼠 BALF 中 EOS 计数 ($P < 0.01$)。见表 3。

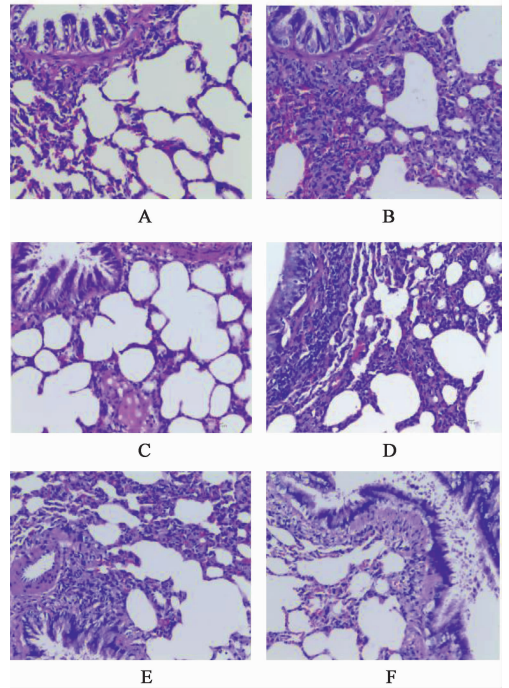
表 3 清半夏多糖对过敏性哮喘模型大鼠 BALF 中 EOS 计数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Pinelliae Rhizoma Praeparatum Cum Alumine polysaccharides on EOS count in BALF of allergic asthma model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	EOS 计数 ($\times 10^9$)/个
正常	-	0.18 ± 0.17
模型	-	$1.48 \pm 0.26^{1)}$
孟鲁司特钠	5	$0.45 \pm 0.21^{3)}$
清半夏多糖	400	$0.55 \pm 0.26^{3)}$
	200	$0.43 \pm 0.23^{3)}$
	100	$0.63 \pm 0.17^{3)}$

3.4 对过敏性哮喘模型大鼠肺组织病理变化的影响 正常组肺组织各级支气管分支、支气管纤毛上皮排列、肺泡结构、肺泡间质均较正常,肺泡上皮细胞未见变性、坏死;部分肺间质内有少量炎细胞浸润。与正常组比较,过敏性哮喘模型组肺组织可见各级支气管分支结构破坏,部分细支气管上皮坏死、脱落,管腔内有脱落、散布的上皮细胞,细支气管黏膜层中大量杯状细胞增生、肥大,肺泡间质明显增宽,血管周围水肿,大量炎细胞浸润,清半夏多糖低剂量组肺组织可见各级支气管分支结构不正常,支气管黏膜层内杯状细胞数量明显增多、细胞肥大,部分可见大量上皮细胞脱落;与过敏性哮喘模型组比较,孟鲁司特钠组、清半夏多糖高、中剂量组对过敏性哮喘模型肺组织的肺泡上皮细胞变性、坏死,减少炎细胞浸润有缓解作用,而清半夏多糖低剂量组在肺泡结构、肺泡上皮细胞形态、肺泡间质宽度、炎细胞浸润程度上与过敏性哮喘模型组比较,程度较轻。见图 2。

3.5 对过敏性哮喘模型大鼠 MUC5AC mRNA 表达的影响 与正常组比较,过敏性哮喘模型组大鼠肺组织的 MUC5AC mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与过敏性哮喘模型组比较,孟鲁司特钠组、清半夏多糖高、中、低剂量组 MUC5AC mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.01$)。见表 4。



A. 正常组; B. 模型组; C. 孟鲁司特钠组; D. 清半夏多糖高剂量组; E. 清半夏多糖中剂量组; F. 清半夏多糖低剂量组

图 2 清半夏多糖对过敏性哮喘模型大鼠肺组织病理变化的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Pinelliae Rhizoma Praeparatum Cum Alumine polysaccharides on pathological changes of lung tissue in allergic asthma model rats (HE, $\times 400$)

表 4 清半夏多糖对过敏性哮喘模型大鼠肺组织中 MUC5AC mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of Pinelliae Rhizoma Praeparatum Cum Alumine polysaccharides on expression of MUC5AC mRNA in lung tissue of allergic asthma model rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	MUC5AC
正常	-	0.37 ± 0.10
模型	-	$3.70 \pm 0.65^{1)}$
孟鲁司特钠	5	$0.83 \pm 0.26^{3)}$
清半夏多糖	400	$1.68 \pm 0.77^{3)}$
	200	$1.36 \pm 0.42^{3)}$
	100	$2.08 \pm 0.71^{3)}$

4 讨论

半夏具有燥湿化痰,降逆止呕,消痞散结等功效,清半夏为生半夏用白矾溶液加工炮制后入药者,其毒性及辛燥之性较生半夏有所降低,而化痰作用增强,临床常用于哮喘等痰多壅盛者的配伍治疗^[11]。以往半夏的药理活性研究中,半夏提取物中的生物碱、糖苷、有机酸、多糖等多种成分可能参与抗炎活性^[12-13],但相关研究并不系统、深入。半夏

在中医临床运用时,多使用炮制品,清半夏为炮制品的一种,往往是配伍使用,汤剂居多,而多糖这类“大分子”成分往往大量存在于药材的水煎液中,此类成分是否为清半夏发挥功效的物质基础,目前的研究较少。故本课题组关注清半夏多糖对肺部“痰液”生成的影响角度,探讨其作为原药材水煎液中的“大分子”物质的活性作用,为研究其作用功效提供依据。

Th1/Th2 细胞的平衡失调, Th2 细胞活化占优势时, IL-4 等细胞因子分泌增多^[14], 而 Th1 细胞分泌的 IFN- γ 等具有抑制 Th2 细胞因子的量减少, 且 IFN- γ 可能通过降低气道局部转化生长因子- β (TGF- β) 的分泌而抑制气道重塑, 这些都是导致哮喘发病的主要机制^[15]。故而 IFN- γ /IL-4 可以反映 Th1/Th2 细胞的平衡^[16-17]。本实验结果显示, 过敏性哮喘模型组血清, BALF 中 IL-4 对比正常组均有升高, 而清半夏多糖各剂量能降低血清, BALF 中 IL-4 的含量; 过敏性哮喘模型组 IFN- γ 在血清和 BALF 中均有降低, 清半夏多糖中剂量组能显著提高 BALF 中 IFN- γ 的含量, 说明清半夏多糖具有稳定 Th1/Th2 细胞的平衡, 发挥抗炎、缓解过敏性哮喘的作用。

过敏性哮喘的病因病机与 EOS 的过量产生密切相关, 大量 EOS 产生导致的肺部炎症, 会引起哮喘病情的加重。故本课题采用过敏性哮喘大鼠模型, 观察清半夏多糖的不同剂量的作用效果, 发现清半夏多糖的高、中、低剂量组与过敏性哮喘模型组比较, 均能显著降低 BALF 中升高的 EOS 计数, 说明清半夏多糖对过敏性哮喘的 EOS 生成有抑制作用, 从而缓解哮喘。

大量痰液生成会加重哮喘的进程。哮喘在中医理论中归于“哮病”。《黄帝内经》中记载有“喘呼”“喘喝”等用来描述哮喘的临床症状的名词;《诸病源候论》中记载“呷嗽者”“胸膈痰饮多”, 并且“疲气相击, 随嗽动息”, 这些描述与哮喘的表现十分相似。《丹溪心法》中首次提出“哮喘”名词, 特别强调“痰”, 在哮喘的病因、病机, 治疗思路中的重要性。综合可见中西医对过敏性哮喘的认识中, 均认为肺部痰液的产生、分泌与哮喘的发生、发展密切相关。MUC5AC 是在呼吸道上皮表达的主要黏蛋白, 该基因分泌表达的黏蛋白所占比例极大, 与呼吸道黏液的分泌密切相关^[18-19], 黏蛋白过度表达, 导致痰液增多和黏稠^[20], 气道高分泌, 产生阻塞作用, 故而加重哮喘病情^[21]。而本实验研究发现与正常组比较,

所有参与造模组的各组大鼠 MUC5AC mRNA 表达均有升高, 说明通过 OVA 诱导、激发制备过敏性哮喘大鼠模型过程中, 均加重黏液的分泌, 与过敏性哮喘模型组比较, 孟鲁司特钠组, 清半夏多糖各剂量组均能显著有降低肺组织的 MUC5AC mRNA 表达, 其中孟鲁司特钠组孟鲁司特钠对 MUC5AC mRNA 作用与之前报道相同, 说明清半夏多糖对过敏性哮喘模型大鼠肺部的 MUC5AC mRNA 的表达有抑制作用, 从而降低黏液分泌, 减少痰液生成, 发挥“燥湿化痰”的功效, 故而推测, 清半夏多糖可能是清半夏原药材发挥作用的“大分子”物质基础, 其他相关作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 崔红梅, 范玉强, 栗锦迁从痰论治眩晕经验[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(1): 24-25.
- [2] 王烈, 苏培迪, 郭磊, 等. 论“哮痰汤”治“哮痰证”[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(10): 29-30.
- [3] 李斌, 程秀民, 周永妍, 等. 半夏的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(1): 47-48.
- [4] 刘娟娟, 张婷, 米苜枚. 呼吸道合胞病毒感染对气道上皮细胞表皮生长因子受体、紧密连接相关蛋白及黏蛋白表达的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21(3): 294-299.
- [5] 王艳杰, 苗兰英, 柳春, 等. 脾虚哮喘模型大鼠肺组织 MUC5AC 蛋白表达变化的研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(10): 2551-2553.
- [6] 张博达. 基于 CysLts 探讨三子养亲汤抑制 OVA 致大鼠哮喘气道黏液高分泌的作用机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [7] 潘杰. 过敏性哮喘小青龙汤证动物模型述评[J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(4): 322-323.
- [8] 刘兴隆, 张珑琼, 付雯, 等. “肺肠合治”法对肠道菌群失调合并过敏性哮喘大鼠呼吸功能、肠菌群及相关免疫因子的影响研究[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(8): 1748-1752.
- [9] 徐凤, 肖韩艳, 周淑芬, 等. 柴朴汤对哮喘模型大鼠气道炎症及 ERK/p38 MAPK 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 104-109.
- [10] 崔佳丽. 孟鲁司特对哮喘大鼠 IL-25、IL-12 及 NF- κ B、MMP-9 表达的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.
- [11] 王世华, 付靖, 刘少琴, 等. 正交试验优选清半夏的炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 25-28.
- [12] 周信, 张小荣, 张秋燕, 等. 生半夏及其炮制品对小鼠主动脉内皮细胞炎症因子分泌的影响[J]. 中国实验

- 方剂学杂志,2013,19(10):261-265.
- [13] 张明发,沈雅琴.半夏提取物抗菌抗炎及其抗肿瘤药理作用研究进展[J].抗感染药学,2017,14(6):1089-1094.
- [14] 黄桂红,韦江红,陈薇,等.黄皮叶提取物对哮喘大鼠血清及肺组织 Th1/Th2 平衡的调节作用[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(19):97-100.
- [15] 孙小钧.肺肠合治、治肺、治肠法对肠道菌群失调并过敏性哮喘大鼠 TGF- β_1 /Smads 信号传导通路影响的比较研究[D].成都:成都中医药大学,2016.
- [16] 秦乐.桂枝加厚朴杏子汤干预肠道菌群失调合并过敏性哮喘大鼠 Th17/Treg 细胞平衡相关调节因子的实验研究[D].成都:成都中医药大学,2015.
- [17] 付雯.基于肠道菌群失调并过敏性哮喘大鼠 TLRs/NF- κ B 信号转导通路及肠道菌群 16SrDNA 的“肺与大肠相表里”免疫机制研究[D].成都:成都中医药大学,2015.
- [18] 董春玲,鲁继荣,王桂芳,等.哮喘小鼠肺组织中水通道蛋白 5 和黏蛋白 5AC 的表达变化及其相关性研究[J].中国现代医学杂志,2007,17(24):2962-2965.
- [19] Inoue D, Kubo H, Sasaki T, et al. Erythromycin attenuates MUC5AC synthesis and secretion in cultured human tracheal cells infected with RV14[J]. Respirol, 2008, 13(2):215-220.
- [20] 邢琼琼,赵霞,杨睿雪,等.固本防哮饮对支气管哮喘缓解期小鼠嗜酸性粒细胞及黏液分泌相关因子的影响[J].中医杂志,2017,58(18):1581-1584.
- [21] 魏然,臧金萍,王金亮,等.IL-12 在哮喘小鼠杯状细胞化生和黏液分泌中的作用[J].中华哮喘杂志:电子版,2013,7(1):14-16.

[责任编辑 周冰冰]