

百合知母汤对支气管哮喘大鼠气道炎症的影响

司晓丽, 王燕, 党文呈, 李双燕, 赵敦, 朱向东*

(甘肃中医药大学, 甘肃省兰州市城关区定西东路 35 号, 730000)

摘要 目的 探讨百合知母汤对支气管哮喘大鼠气道炎症的干预作用。方法 40 只 Wistar 大鼠随机分为空白对照组、哮喘模型组、百合知母汤组、地塞米松组, 每组 10 只。除空白对照组外其余各组大鼠采用 10% 卵白蛋白 (OVA) 腹腔注射以及 2% OVA 超声雾化吸入建立支气管哮喘大鼠模型。每次雾化之前 30 min, 百合知母汤组给予百合知母汤 3.68 g/(kg·d) 灌胃, 地塞米松组给予地塞米松注射液 1.2 mg/(kg·d) 灌胃, 空白对照组和哮喘模型组则给予同体积生理盐水灌胃, 连续干预 14 天。HE 染色观察大鼠肺组织病理情况, 检测血浆白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 4 (IL-4) 含量, 分离外周血中淋巴细胞观察细胞周期情况及钙调神经磷酸酶 (CaN) 活性。结果 哮喘模型组大鼠光镜下支气管管壁内可见大量炎性细胞浸润, 血浆 IL-4 含量较空白对照组增加, IL-2 含量降低, G_0/G_1 期淋巴细胞所占比例降低, S 期与 G_2/M 比例增加, 淋巴细胞 CaN 活性显著升高 ($P < 0.05$)。百合知母汤组大鼠肺组织光镜下仅见少量炎性细胞浸润, 较哮喘模型组血浆中 IL-4 含量降低, IL-2 含量升高, G_0/G_1 期淋巴细胞所占比例增加, S 期与 G_2/M 比例显著减少, 淋巴细胞 CaN 活性显著降低 ($P < 0.05$)。结论 百合知母汤可能通过降低支气管哮喘大鼠外周血淋巴细胞 CaN 活性, 从而抑制淋巴细胞增殖, 降低 IL-4 含量, 减轻气道炎症。

关键词 支气管哮喘; 百合知母汤; 气道炎症; 淋巴细胞; 白细胞介素; 钙调神经磷酸酶

支气管哮喘 (简称哮喘) 是常见的气道慢性炎症性疾病, 近年来中药经方越来越多的用于哮喘的治疗。有研究^[1-2]显示, 中医药具有根据患者的整体状况施治、副作用少等特点, 优于抗炎药物或糖皮质激素。我们认为, 阴虚肺热是哮喘的重要病机, 而百合知母汤具有润燥清肺、养阴化痰之功效, 切中病机。前期研究已证实, 百合知母汤对哮喘大鼠的咳嗽喘息具有显著地抑制作用, 能够降低支气管肺泡灌洗液中白细胞介素 4 (IL-4) 含量, 控制气道炎症, 阻止哮喘发作^[3]。本研究基于百合知母汤对 T 细胞的增殖转化的影响, 进一步探寻百合知母汤对哮喘大鼠气道炎症的干预机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 40 只, 70 日龄, 体重 (200 ± 20) g, 购自于甘肃中医药大学实验中心, 实验动物许可证号: SCXK (甘) 2015-002。

1.2 药物与试剂

百合知母汤由百合、知母 (比例 10 : 7) 两味中药组成, 购自于甘肃中医药大学附属医院, 采用水煎法制成浓度 7.5 mol/L 的混悬液。卵白蛋白 (OVA, Sigma 公司, 批号: 326A0514); 氢氧化铝 (北京北化精细化学品有限公司, 批号: 2008-0315); 地塞米松注射液 (国药集团容声制药有限公司, 批号: 20150215); 白细胞介素 2 (IL-2)、IL-4 ELISA 试剂盒 (欣博盛生物技术有限公司, 批号: R150626-001a、R150626-002a); 大鼠淋巴细胞分离液 [Rapidbio (RB) 公司, 批号: 20150807]; 钙调神经磷酸酶 (CaN)、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒 (南京建成科技有限公司, 批号: A068、A045); 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20151023); PBS 磷酸盐缓冲液干粉 (Solarbio 公司, 批号: 1131017)。

1.3 主要仪器

戴维斯压缩雾化器 (美国日升医疗公司, 型号: 3655); Benchmark Plus 连续波长酶仪 (美国 Bio-Rad 公司); 低速自动平衡离心机 (长沙平凡

基金项目: 甘肃省自然科学基金 (1310RJZA098)

* 通讯作者: 1317365093@qq.com, 15339312501

仪器仪表有限公司, 型号: TD4-II); 倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司, 型号: IX71); 数显恒温水浴锅 (江苏正基仪器有限公司, 型号: HH-S2); 电子精密天平 (上海越平科学仪器有限公司, 型号: 20002); 实验室 II 级纯水系统 (ELGA Lab-Water 公司, 型号: ELGA PURELAB Option); 流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特公司, 型号: XL 型)。

1.4 分组及干预方法

取 30 只 Wistar 大鼠适应性饲养 3 天后, 参考文献 [4] 分别于第 1 天、第 8 天腹腔注射 1ml 抗原液 (含 OVA 1 mg, 氢氧化铝 100 mg) 致敏, 第 15 天采用超声雾化器雾化吸入 2% OVA 诱发大鼠哮喘发作, 每次雾化时间 30 min, 每日 1 次, 连续雾化 14 天。密切观察大鼠行为, 若出现焦躁、气短、口唇发紫、呛咳、反抗力降低、呼吸频率加深加快等行为改变提示制作哮喘模型成功。30 只大鼠均造模成功, 将造模成功的大鼠按随机数字表法分为哮喘模型组、百合知母汤组、地塞米松组, 每组 10 只。另取 10 只大鼠作为空白对照组, 同时间腹腔注射 1ml 生理盐水代替 OVA 致敏, 并用等体积生理盐水超声雾化吸入。每次雾化之前 30min, 百合知母汤组根据前期实验结果 [5] 给予百合知母汤 3.68 g/(kg·d) 灌胃, 地塞米松组给予地塞米松注射液 1.2 mg/(kg·d) 灌胃 (给药剂量依据人与动物间按体表面积折算的等效剂量比例表 [6] 折算), 空白对照组和哮喘模型组则给予同体积生理盐水灌胃, 各组连续干预 14 天。

1.5 观察指标及方法

最后一次超声雾化吸入后 2 h, 7% 水合氯醛 400 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 腹正中切口开腹, 腹腔静脉抗凝采血 7~8 ml, 取 3 ml 静脉抗凝血分离提取淋巴细胞, 流式细胞术检测细胞周期改变, CaN 测定试剂盒检测 CaN 活性; 另取 4~5 ml 静脉抗凝血离心制备血浆, ELISA 法测定 IL-2、IL-4 含量; 向上延伸切口开胸取右肺中叶蒸馏水冲洗, 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋并切片, 常规 HE 染色。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件包进行数据统计, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺组织病理学比较

图 1 示, 光镜下空白对照组肺组织中上皮结构以及肺泡隔如常, 未见到明显异常改变; 当 OVA 致敏并雾化吸入后, 哮喘模型组支气管管壁出现大量炎性细胞浸润, 上皮结构破坏: 上皮细胞缺失, 黏膜皱褶增多, 杯状细胞增生, 黏膜下层以及平滑肌显著增厚, 还可见到黏膜下血管扩张。百合知母汤组和地塞米松组较哮喘模型组可见少量炎性细胞, 上皮未见明显病理学改变。

2.2 各组大鼠血浆 IL-2、IL-4 含量比较

表 1 示, 与空白对照组比较, 哮喘模型组血浆 IL-4 含量升高, IL-2 含量降低 (P < 0.05); 与哮喘模型组比较, 百合知母汤组、地塞米松组血浆 IL-4 含量降低, IL-2 含量增加 (P < 0.05), 其中地塞米松组 IL-4 含量降低较百合知母汤组更为显著 (P < 0.05), IL-2 含量地塞米松组与百合知母汤组比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。

表 1 各组大鼠血浆 IL-2、IL-4 含量比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-2	IL-4
空白对照组	10	132.0925 $\pm$ 3.1674	94.0975 $\pm$ 1.2074
哮喘模型组	10	119.7754 $\pm$ 1.3332*	147.7208 $\pm$ 2.4626*
百合知母汤组	10	127.4725 $\pm$ 2.0508 Δ	115.6343 $\pm$ 3.5190 Δ
地塞米松组	10	128.2600 $\pm$ 2.7883 Δ	106.3350 $\pm$ 2.9669 $\Delta\blacktriangle$

注: IL-2, 白细胞介素 2; IL-4, 白细胞介素 4; 与空白对照组比较, * P < 0.05; 与哮喘模型组比较, Δ P < 0.05; 与百合知母汤组比较, $\blacktriangle$ P < 0.05

2.3 各组大鼠外周血淋巴细胞细胞周期比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 哮喘模型组大鼠外周血中 G₀/G₁ 期淋巴细胞比例显著下降, 而 S 期与 G₂/M 期比例增加 (P < 0.05); 与哮喘模型组比

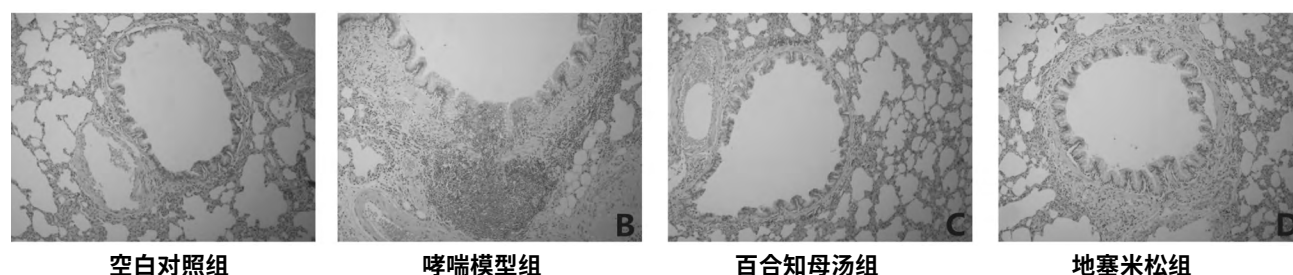


图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色病理图 ($\times 100$)

表 2 各组大鼠外周血淋巴细胞细胞周期比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白对照组	10	95.4460 ± 0.6383	1.9350 ± 0.6847	2.6187 ± 1.0410
哮喘模型组	10	77.6260 ± 1.0379*	6.0930 ± 1.0587*	16.2808 ± 2.0545*
百合知母汤组	10	87.3890 ± 2.0772 [△]	3.9623 ± 1.0030 [△]	8.6483 ± 1.5923 [△]
地塞米松组	10	88.7653 ± 1.9128 [△]	3.3546 ± 1.3740 [△]	7.8801 ± 2.1162 [△]

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与哮喘模型组比较, $\Delta P < 0.05$

较, 百合知母汤组和地塞米松组外周血 G₀/G₁ 期淋巴细胞比例增高, 而 S 期与 G₂/M 期所占比例下降 ($P < 0.05$)。百合知母汤组与地塞米松组组间比较各期淋巴细胞比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠淋巴细胞 CaN 活性比较

表 3 示, 哮喘模型组大鼠外周血淋巴细胞 CaN 活性显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); 百合知母汤组和地塞米松组 CaN 活性较哮喘模型组显著下降 ($P < 0.05$), 而百合知母汤组与地塞米松组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠淋巴细胞 CaN 活性比较 (U/mg · prot, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CaN
空白对照组	10	0.0559 ± 0.0103
哮喘模型组	10	0.0728 ± 0.0122*
百合知母汤组	10	0.0634 ± 0.0143 [△]
地塞米松组	10	0.0597 ± 0.0217 [△]

注: CaN, 钙调神经磷酸酶; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与哮喘模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

百合知母汤见于《金匱要略·百合狐惑阴阳毒病脉证并治》, 用于热病后余热未尽, 或情志不遂, 日久郁结化火而致的心肺阴虚内热。该方清心安神, 养阴润燥, 临床上常被用于治疗失眠、精神抑郁、口腔溃疡等疾病^[1]。支气管哮喘, 中医学称之为“哮喘”。《症因脉治·哮喘》中有言: “哮喘之因, 痰饮留伏, 结成巢臼, 潜伏于内, 偶有七情之犯, 饮食之伤, 或外有时令之风寒束其肌表, 则哮喘之症作矣。可见哮喘主要在肺, 迁延久发, 则肺虚而不能主气, 气不化津, 痰热雍肺, 阴津耗损, 肺热而阴虚。百合性味甘寒, 归肺、心经, 宣肺祛痰, 养阴润肺而善于补; 知母性味苦寒, 归肺、肾经, 生津润燥, 滋阴降火而偏于泻。针对肺热阴虚, 二者相配, 补泻兼施, 滋阴润燥, 清肺化痰, 能够缓解哮喘发作。

Holgate ST 等^[2] 研究认为哮喘的发病过程是一个典型 IgE 介导的 T 型变态反应, 多与体内活化的

CD4⁺T 细胞、炎性细胞以及炎性细胞分泌的各类炎症介质和细胞因子密切相关。气道炎症被认为是支气管哮喘发作的本质, 外来入侵的过敏原通过巨噬细胞等抗原提呈细胞激活体内的 CD4⁺T 细胞, 活化产生辅助性 T 细胞^[3]。活化的 Th2 细胞产生并分泌多种白细胞介素, 过表达的促炎因子促使大量炎性细胞聚集在气道内, 活化的肥大细胞、嗜酸性粒细胞等炎性细胞进一步释放炎症介质 (组胺、前列腺素、白三烯、嗜酸性粒细胞趋化因子、中性粒细胞趋化因子等), 导致气道发生炎症反应, 气道平滑肌收缩、杯状细胞增多、腺体增生, 黏液分泌增加^[4]。本研究结果显示, 哮喘模型组 G₀/G₁ 期 (DNA 静止期和合成前期) 淋巴细胞比例显著低于空白对照组, 而 S 期 (DNA 合成期) 以及 G₂/M 期 (分裂期) 淋巴细胞比例均显著上升, 增殖活跃。血浆中 IL-4 含量显著高于空白对照组, 而 IL-2 含量有所下降, 进一步证实哮喘发作过程中存在活化、增殖的 T 细胞向 Th2 细胞过度活化, 进而释放出大量 IL-4 促炎因子, 导致支气管管壁内黏膜固有层以及黏膜下层出现大量炎性细胞浸润。而百合知母汤干预后, 外周血中处于 S 期以及 G₂/M 期的淋巴细胞比例均显著低于哮喘模型组, 可见百合知母汤能够抑制 T 细胞活化、增殖; IL-4 含量较哮喘模型组减少, 提示百合知母汤能够抑制 T 细胞增殖以及向 Th2 细胞的转化, 减少促炎因子 IL-4 的含量, 从而有助于减轻气道炎症反应。

CaN 是真核生物体内唯一的 Ca²⁺/钙调蛋白依赖丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶^[5], 已有研究报道, CaN 介导的信号通路涉及 T 细胞增殖分化^[6]、瓣膜病患者心房纤颤^[7]等多种病理生理过程。陈亚红等^[8]在哮喘豚鼠模型中加入 CaN 抑制剂, 能够显著抑制 T 细胞活化以及炎性细胞浸润。本研究结果显示, 哮喘模型组 CaN 活性较空白对照组显著增加, 给予百合知母汤组作用后 CaN 活性降低, 提示百合知母汤抑制 T 细胞增殖转化作用可能与降低淋巴细胞内 CaN 活性有关。

参考文献

- [1] 王诗华,金伟华,谭永红,等. 麻杏细紫汤对支气管哮喘豚鼠的治疗作用及其机制 [J]. 华西药学杂志, 2015, 30(6): 678-679.
- [2] 吴奎,王彦,毕玉田,等. 小青龙汤对哮喘小鼠气道变应性炎症作用的研究 [J]. 重庆医学, 2014, 43(17): 2145-2148.
- [3] 孙婧,安耀荣,邱桐. 百合知母汤对哮喘模型大鼠 IL-4、IFN- γ 含量和 EOS 计数的影响 [J]. 甘肃中医学报, 2011, 28(2): 12-15.
- [4] 任旭斌,刘春涛,朱涛. 荷包牡丹碱对哮喘小鼠肺组织 α -SMA 及气道重构的影响 [J]. 四川大学学报(医学版), 2010, 41(4): 626-629.
- [5] 马秀丽,安耀荣,邱桐. 百合知母汤对哮喘大鼠血清、肺泡灌洗液中 SP-A 及脏器系数变化的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(8): 1423-1429.
- [6] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 附录 3.
- [7] 申秀丽,闻永举. 百合知母汤临床应用概述 [J]. 宜春学院学报, 2008, 30(2): 111-113.
- [8] HOLGATE ST, ARSHAD HS, ROBERTS GC, et al. A new look at the pathogenesis of asthma [J]. Clin Sci (lond), 2009, 118(7): 439-450.
- [9] COUTO ALVES A, BRUHN S, RAMASAMY A, et al. Dysregulation of complement system and CD4⁺ T cell activation pathways implicated in allergic response [J]. PloS One, 2013, 8(10): e74821.
- [10] COHN L, ELIAS JA, CHUPP GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression [J]. Annu Rev Immunol, 2004, 22: 789-815. doi: 10. 1146/annurev. immunol. 22. 012703. 104716.
- [11] ZHAO Y, CUI GM, ZHOU NN, et al. Calpain-Calcineurin-Nuclear factor signaling and the development of atrial fibrillation in patients with valvular heart disease and diabetes [J]. J Diabetes Res, 2016: 4639654. doi: 10. 1155/2016/4639654.
- [12] TAKEUCHI K, ROEHRL MH, SUN ZY, et al. Structure of the calcineurin-NFAT complex: defining a T cell activation switch using solution NMR and crystal coordinates [J]. Structure, 2007, 15(5): 587-597.
- [13] 李丛,王建春,赵勇,等. 瓣膜病患者钙调神经磷酸酶-活化 T 细胞核因子通路 with 心房纤颤的关系 [J]. 山东大学学报(医学版), 2014, 52(8): 47-51.
- [14] 陈亚红,赵鸣武,符民桂,等. 钙调神经磷酸酶在哮喘豚鼠气道重塑中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(2): 157-160.

Effect of *Baihe Zhimu Tang* (百合知母汤) on Airway Inflammation in Bronchial Asthma Rats

SI Xiaoli, WANG Yan, DANG Wencheng, LI Shuangyan, ZHAO Dun, ZHU Xiangdong

(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730000)

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Baihe Zhimu Tang* (百合知母汤, BZT) on the airway inflammation in bronchial asthma rats. **Methods** Forty Wistar rats were randomized into control group, asthma model group, BZT group and dexamethasone (DX) group with 10 rats in each group. The bronchial asthma rat model was built by intraperitoneal injection of 10% ovalbumin (OVA) and ultrasonic atomizing inhalation of 2% OVA except for the control group. Thirty minutes before every ultrasonic atomizing inhalation, the BZT group was given BZT 3.68 g/(kg·d) by gastric perfusion; the DX group was administered DX injection 1.2 mg/(kg·d) by gastric perfusion; as for the control group and asthma model group, they were given normal saline of the same volume; all groups were intervened for 14 days. After that, HE staining was used to observe the pathological changes of lung tissue, the levels of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-4 (IL-4) were measured, and the cell cycle and calcineurin (CaN) activity were observed in separated peripheral blood lymphocytes. **Results** For the asthma model group, there was a lot of inflammatory cell infiltration in the bronchial wall under light microscope, the content of IL-4 in the plasma was higher than that in the control group, while the content of IL-2 decreased, the proportion of G₀/G₁ phase lymphocytes decreased, the proportion of S phase and G₂/M increased, and the CaN activity of lymphocytes increased significantly ($P < 0.05$). For the BZT group, there was only a small amount of inflammatory cell infiltration in the lung tissue under light microscope, the IL-4 level in the plasma was lower than that in the asthma model group, while the IL-2 content increased, the proportion of G₀/G₁ phase lymphocytes increased, the proportion of S phase and G₂/M decreased significantly, and the CaN activity of lymphocytes decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** BZT could reduce lymphocyte proliferation, decrease IL-4 level and reduce airway inflammation by reducing CaN activity in peripheral blood lymphocytes of bronchial asthma rats.

Keywords bronchial asthma; *Baihe Zhimu Tang* (百合知母汤); airway inflammation; lymphocytes; interleukin; calcineurin (CaN)

(收稿日期: 2017-03-22; 修回日期: 2017-05-22)

编辑: 邓 媛