

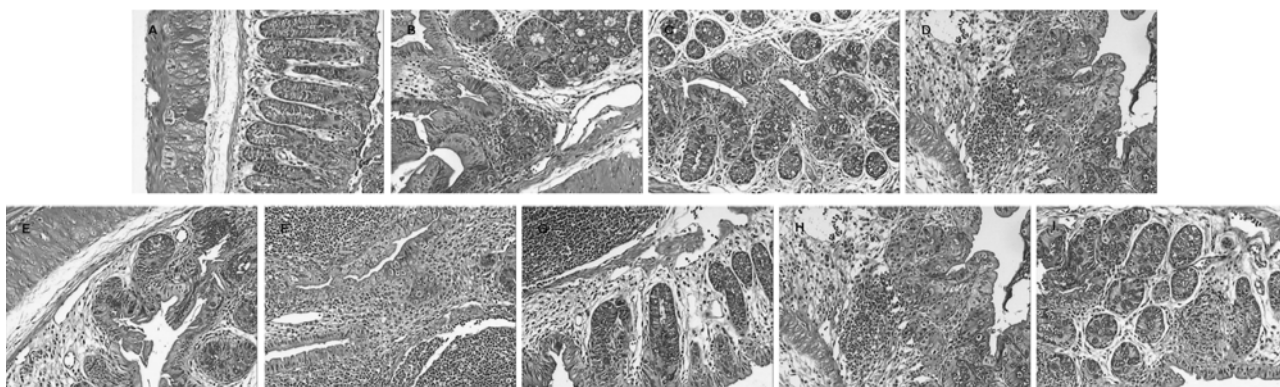


图2 病理切片显微图(10×)

A-正常对照组; B-模型组; C-SASP 组; D-赋形剂组; E-高剂量组 1; F-高剂量组 2; G-中剂量组; H-低剂量组 1; I-低剂量组 2

Fig 2 Pathological section microscopic diagram(10×)

A-control group; B-model group; C-SASP; D-excipient group; E-high dose group one; F-high dose group two; G-middle dose group; H-low dose group one; I-low dose group two

局灶区黏膜固有层腺体数目减少, 腺上皮轻-中度异型增生, 杯状细胞明显减少, 间质伴淋巴细胞, 浆细胞, 单核细胞等炎症细胞浸润, 淋巴组织增生, 淋巴滤泡形成。显示中度炎症。

4 讨论

本实验研究提示, 芪连白术颗粒对 DSS 诱导的小鼠慢性溃疡性结肠炎有明显的疗效。本研究为临床更有针对性的应用提供了实验依据。

中医药对溃疡性结肠炎的影响具有多系统、多层面、多功效、多靶点的特点, 本实验从生理

及病理的角度进行了初步的研究, 分子角度的研究和相关指标的定量检测有待进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] ZHANG Y L, WANG C D. Colitis model induced by dextran sulfate sodium production methods, characteristics and influential factors [J]. J Gastroenterol(胃肠病学), 2006, 11(1): 56-58.
- [2] HU R W, OUYANG Q, CHEN D Y. The dextran sodium sulfate-induced mice ulcerative colitis animal model [J]. J Gastroenterol(胃肠病学), 2002, 7(6): 331-334.

收稿日期: 2012-10-30

香青兰总黄酮对哮喘大鼠白细胞介素-6、13、17 和肿瘤坏死因子- α 的影响

康小龙¹, 何承辉^{2*}, 邢建国², 闫丽丽² (1.新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000; 2.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004)

摘要: 目的 观察香青兰总黄酮对哮喘大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、13、17 等细胞因子水平的影响。方法 采用卵白蛋白致敏和激发建立大鼠哮喘模型, 给予香青兰总黄酮进行干预后, ELISA 法检测大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-6、IL-13 和 IL-17 的含量。结果 香青兰总黄酮 180 和 360 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 可降低哮喘大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-6、IL-13 和 IL-17 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 香青兰总黄酮对哮喘 TNF- α 、IL-6、IL-13 和 IL-17 等炎症因子的释放具有一定抑制作用。

关键词: 香青兰总黄酮; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-6; 白介素-13; 白介素-17

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)08-0839-04

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2011211A098)

作者简介: 康小龙, 男, 博士, 主管药师 Tel: (0991)5853365
助理研究员 Tel: (0991)2318172 E-mail: 408705201@qq.com

E-mail: kangxiaolong_163@163.com *通信作者: 何承辉, 女, 硕士,

Effects of Moldavica Total Flavone on Interleukin-6, 13, 17 and Tumor Necrosis Factor- α Levels in Asthma Rats

KANG Xiaolong¹, HE Chenghui^{2*}, XING Jianguo², YAN Lili²(1.Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2.Xinjiang Medicine Research Institute, Urumqi 830004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of moldavica total flavone on interleukin-6, 13, 17 and tumor necrosis factor- α levels in ovalbumin-induced asthmatic rats. **METHODS** Rats asthma model was established by ovalbumin challenge methods. After therapy by moldavica total flavone, TNF- α , IL-6, IL-13 and IL-17 in BALF were detected respectively by ELISA. **RESULTS** The levels of TNF- α , IL-6, IL-13 and IL-17 in BALF were markedly decreased($P<0.05$ or $P<0.01$) after administration of 180 and 360 mg·kg⁻¹·d⁻¹ moldavica total flavone in ovalbumin-induced asthmatic rats. **CONCLUSION** Moldavica total flavone can inhibit the release of inflammatory cytokines of TNF- α , IL-6, IL-13 and IL-17 on asthma.

KEY WORDS: moldavica total flavone; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6; interleukin-13; interleukin-17

支气管哮喘(哮喘)是由多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病。研究表明^[1]:白细胞介素(IL)和肿瘤坏死因子(TNF)在炎症反应过程中对增强、维持和减轻炎症反应起重要的调节作用,在哮喘的发病机制中起重要的作用。据《维吾尔药志(上)》记载^[2],唇形科植物香青兰(*Dracocephalum moldavica* L.)具有镇咳、祛痰、平喘作用,在维吾尔医和民间用于治疗气管炎已有几百年的历史。本课题组从香青兰中提取的有效部位香青兰总黄酮,拟用于治疗哮喘。本研究观察了香青兰总黄酮对哮喘大鼠 TNF- α 、IL-6、IL-13 和 IL-17 等细胞因子水平的影响,以探讨香青兰总黄酮防治哮喘的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级SD大鼠,♀♂各半,体质量180~220 g,由新疆实验动物研究中心提供,实验动物合格证号:SCXK(新)2003-0002。

1.2 药材与试剂

香青兰药材购自安徽省亳州市德昌药业有限公司,经新疆维吾尔自治区药物研究所何江研究员鉴定为正品。卵白蛋白(OVA)(sigma公司,批号:1001115808);氢氧化铝(西安化学试剂厂,批号:080912);大鼠TNF- α ELISA试剂盒(美国ADL公司,批号42853);大鼠IL-6 ELISA试剂盒(美国ADL公司,批号:51612);大鼠IL-13 ELISA试剂盒(北京晶美生物工程公司,批号:201107);大鼠IL-17 ELISA试剂盒(美国ADL公司,批号:31192);二辛可宁酸蛋白定量试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所,批号:20110511)。

1.3 仪器

402A 型超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备公司);680 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.4 方法

1.4.1 香青兰总黄酮制备方法 香青兰药材经40%乙醇回流提取1次,3 h,提取液用HPD100型大孔吸附树脂纯化,70%乙醇洗脱,浓缩干燥,得香青兰总黄酮,经UV测定,总黄酮含量为60%以上。

1.4.2 动物分组及哮喘模型的复制 清洁级SD大鼠60只,♀♂各半,体质量(200.3±19.4)g,随机分为6组:空白对照组,哮喘模型组,地塞米松组,香青兰总黄酮低、中、高剂量组,每组10只。采用OVA致敏法制备动物模型。除空白对照组外,其他5组动物第1,2,3天用含OVA 10 mg、Al(OH)₃干粉100 mg的生理盐水混悬液1 mL腹腔注射致敏,第8天重复致敏1次,第15天开始除空白对照组外各组动物超声雾化1% OVA进行激发,约30 min·次⁻¹,于每天早上8~9时进行。直至大鼠出现哮喘样发作,共4周。雾化时见大鼠出现烦躁不安、打喷嚏、大小便失禁、抓耳朵、紫绀等症状,说明哮喘模型复制成功。第5周起各给药组分别灌胃给予香青兰总黄酮90,180,360 mg·kg⁻¹·d⁻¹,地塞米松1 mg·kg⁻¹·d⁻¹,空白对照组及哮喘模型组灌胃给予生理盐水,1次·d⁻¹,共30 d。

1.4.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)的收取 末次给药后1 h,用2%戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,然后消毒无菌分离气管,夹闭右主支气管,剪开气管用相应导管插入左主气管内,从导管注入4 mL生理盐水灌洗左肺,反复3次,回收率为60%~70%,回收灌洗液即为BALF,将BALF在

4℃ 3 000 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min, 上清液保存于-80℃, 用于细胞因子的测定。

1.4.4 BALF 中 TNF- α 、IL-6、IL-13 和 IL-17 含量测定 首先用二辛可宁酸蛋白定量试剂盒测定 BALF 中蛋白浓度, TNF- α 、IL-6、IL-13 和 IL-17 采用 ELISA 法测定, 操作均按试剂盒说明书进行, 测定结果以每毫升 BALF 中蛋白含量(pg·mgprot⁻¹) 进行校正。

1.5 统计方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间显著性差异比较用方差分析, 采用 SPSS 11.0 for Windows 统计软件进行统计。

2 结果

2.1 香青兰总黄酮对哮喘大鼠 BALF 中 TNF- α 含量的影响。

与空白对照组比较, 模型组大鼠 BALF 中 TNF- α 含量明显升高($P<0.01$); 与模型组比较, 香青兰总黄酮及地塞米松均可降低大鼠 BALF 中 TNF- α 含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 但香青兰总黄酮对 TNF- α 的抑制作用明显低于地塞米松($P<0.005$)。结果见表 1。

表 2 香青兰总黄酮对哮喘大鼠 BALF 中 IL-6、IL-13 和 IL-17 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 2 Effects of moldavica total flavone on the levels of IL-6, IL-13 and IL-17 in BALF of asthmatic rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	IL-6/pg·mgprot ⁻¹	IL-13/pg·mgprot ⁻¹	IL-17/pg·mgprot ⁻¹
空白对照组	3.52±0.62	7.17±1.02	18.77±1.90
模型组	6.86±1.13 ¹⁾	14.17±2.09 ¹⁾	30.28±3.25 ¹⁾
香青兰总黄酮 90 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 组	6.44±0.90	13.50±1.95	28.04±2.02
香青兰总黄酮 180 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 组	6.48±0.87	11.58±1.77 ³⁾	27.23±1.45 ²⁾
香青兰总黄酮 360 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 组	5.25±1.08 ³⁾	10.42±2.04 ³⁾	24.38±1.87 ³⁾
地塞米松组	5.37±0.62 ³⁾	8.95±1.27 ³⁾	22.15±2.15 ³⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

3 讨论

支气管哮喘是一种以气道炎症为特征的疾病, 多种免疫细胞和细胞因子参与其发病过程。在支气管哮喘的免疫损伤反应中, IL 和 TNF 起重要作用^[1]。

本课题组前期研究表明: 香青兰总黄酮具有明显镇咳、平喘作用; 能抑制哮喘嗜酸性粒细胞浸润, 降低哮喘大鼠 IgE 水平, 抑制哮喘 I 型变态反应, 通过离体气管螺旋条张力实验发现: 香青兰总黄酮可减小哮喘大鼠气管螺旋条张力变化值, 改善哮喘大鼠气道高反应性^[3]; 并且能够调节

表 1 香青兰总黄酮对哮喘大鼠 BALF 中 TNF- α 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 1 Effects of moldavica total flavone on the levels of TNF- α in BALF of asthmatic rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	TNF- α /pg·mgprot ⁻¹
空白对照组	6.24±1.01
模型组	20.42±2.92 ¹⁾
香青兰总黄酮 90 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 组	17.64±2.36 ²⁾
香青兰总黄酮 180 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 组	14.60±1.79 ³⁾
香青兰总黄酮 360 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 组	14.10±1.44 ³⁾
地塞米松组	9.73±1.56 ³⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

2.2 香青兰总黄酮对哮喘大鼠 BALF 中 IL-6、IL-13 和 IL-17 含量的影响。

与空白对照组比较, 模型组大鼠 BALF 中 IL-6、IL-13、IL-17 含量明显升高($P<0.01$); 与模型组比较, 香青兰总黄酮中、高剂量及地塞米松可降低大鼠 BALF 中 IL-6、IL-13、IL-17 含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 香青兰总黄酮高剂量组 BALF 中 IL-6、IL-13 含量与地塞米松组比较差异没有显著性意义($P>0.05$), 但对 IL-17 的抑制作用明显低于地塞米松($P<0.05$)。结果见表 2。

TH1/TH2 类细胞因子的平衡, 改善支气管哮喘慢性炎症^[4], 提示香青兰总黄酮对哮喘有一定治疗作用。

TNF- α 由单核巨噬细胞激活产生, 能引起呼吸道不可逆阻塞以及组织损伤, 促进哮喘发作和气道炎症的加重^[5]。Puthothu 等^[6]研究表明, 吸入或静脉注射 TNF- α 可引起气道阻力延迟性增高, 且随着 TNF- α 水平升高, 嗜酸粒细胞逐渐浸润支气管, 提示 TNF- α 可能与哮喘炎症发生的启动有关。本实验表明: 香青兰总黄酮可降低哮喘大鼠肺部 TNF- α 水平, 提示香青兰总黄酮可能通过减

少 TNF- α 释放而抑制哮喘气道炎症。

Th1/Th2 细胞失衡是变应性哮喘发生过程中重要的免疫学改变。Th1/Th2 失衡表现为哮喘患者体内 T 细胞趋向于产生高水平的 Th2 型细胞因子,特别是 IL-4、IL-6、IL-13 等^[7]。IL-6 在哮喘炎症反应中扮演了重要的角色,在 IL-6 的作用下,IL-4 可诱导产生大量 IgE,并且可以诱导内皮细胞表达黏附分子和促进单核细胞趋化因子的产生,促进单核细胞等炎症因子在炎症及感染部位的聚集^[8]。IL-13 是一种重要的由活化的 Th2 细胞分泌的多效能细胞因子,主要由 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞产生,肥大细胞和中性粒细胞在一定条件下也能产生,具有多种生物学功能。通过激活嗜酸性粒细胞减少其凋亡,促进 IgE 分泌等机制,参与哮喘炎症的维持,诱导气道高反应性和小气道结构重建^[9]。本研究表明,香青兰总黄酮中、高剂量可降低哮喘大鼠肺部 IL-6、IL-13 水平,提示香青兰总黄酮可抑制 Th2 细胞因子的产生,纠正 Th1/Th2 细胞失衡而干预哮喘的发生。

最新研究表明 Th17 细胞及其产物 IL-17 等在炎性反应性疾病中发挥着重要的作用^[10-11]。IL-17 是 T 细胞诱导的炎性反应的早期启动因素,通过调节不同炎性介质的表达,使中性粒细胞向呼吸道聚集。活化 IL-17 还激活上皮细胞、成纤维细胞和巨噬细胞,释放 TNF- α 、IL-6 等,参与呼吸道的重构,促进呼吸道炎症的进一步加剧^[12]。本研究表明,香青兰总黄酮中、高剂量可降低哮喘大鼠肺部 IL-17 产生,提示香青兰总黄酮可能通过抑制哮喘 Th17 细胞及 IL-17 的生成而缓解哮喘气道炎症。

目前控制和治疗哮喘最有效的药物是糖皮质激素^[13],它不仅对炎症细胞迁移和活化、细胞因子的生成以及炎症介质的释放有抑制作用,同时使平滑肌细胞受体的反应性增高,从而抑制炎症反应。但长期口服糖皮质激素会产生很多不良反应,如向心性肥胖,股骨头坏死,骨质疏松,消化性溃疡等,使其应用受到很大限制^[14]。本研究发现,香青兰总黄酮高剂量对哮喘大鼠 IL-6、IL-13 的抑制作用与地塞米松组比较差异没有显著性意义,对 TNF- α 和 IL-17 的抑制作用明显低于地塞米松,提示香青兰总黄酮对哮喘炎症因子的释放

有一定抑制作用,但效果可能还与地塞米松有一定差距,但香青兰总黄酮作为中药提取物,可能在不良反应方面优于地塞米松,这还需要进一步研究加以证实。

REFERENCES

- [1] YU C L, LIU S, CHEN Z Q, et al. The influence of smoking upon level of serum interleukin and TNF- α in patients with bronchial asthma [J]. Chin J Pract Int Med(中国实用内科杂志), 2007, 27(13): 1037-1039.
- [2] LIU Y M. Collection of Uygur Medicine(维吾尔药志) [M]. Xinjiang Urumqi: Science and Technology Health Publishing House of Xinjiang, 1999: 405-407.
- [3] KANG X L, HE C H, XING J G, et al. Inhibitory effects of moldavica total flavone on airway inflammation and hyperresponsiveness in ovalbumin-induced asthmatic rat [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(3): 234-238.
- [4] YAN L L, KANG X L, HE C H, et al. Effects of moldavica total flavone on immunologic imbalance of Th1/Th2 in ovalbumin-induced asthmatic rats [J]. J China Med Univ(中国医科大学学报), 2013, 24(1): 8-9.
- [5] FU W C. Influence of budesonide and salbutamol inhalation on serum TNF- α and hs-CRP of acute exacerbation of bronchial asthma patients [J]. Pract J Clin Med(实用医院临床杂志), 2012, 9(5): 109-111.
- [6] PUTHOTHU B, BIERBAUM S, KOPP M V, et al. Association of TNF-alpha with severe respiratory syncytial virus infection and bronchial asthma [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2009, 20(2): 157-163.
- [7] HOU M, ZHU M, MA X M, et al. Effects of Uygur medicine *Hyssopus officinalis* L. on serum IL-17 level and balance of Th1/Th2 of asthma rats[J]. China J Mod Med (中国现代医学杂志), 2010, 20(3): 365-368.
- [8] MIAO P, LU M S, ZHANG D Q. Recent progresses of the association research on IL-6/IL-6R and rheumatoid arthritis [J]. Immunol J(免疫学杂志), 2011, 27(4): 355-358.
- [9] WANG L, ZHENG S T, CHEN M. The effect of the changes of interleukin-13, interleukin-18 and TNF- α levels on potential implication in patients with asthma [J]. Heilongjiang Med J(黑龙江医学), 2006, 30(11): 812-814.
- [10] WANG Q, WU J L, NI B. Progress in the regulation of Th17 cell differentiation [J]. Immunol J(免疫学杂志), 2009, 25(6): 732-736.
- [11] YANG L J, SHAN B E. Progress in relationship between Th17 and Th1/Treg cell [J]. Immunol J(免疫学杂志), 2010, 26(4): 353-355.
- [12] ZHAO Y X, XU H X. IL-17 cytokine family and bronchial asthma [J]. Int J Respir(国际呼吸杂志), 2010, 30(15): 918-921.
- [13] BRUNI F M, DE L G, VENTUROLI V, et al. Intranasalcorticosteroids and adrenal suppression [J]. Neuroimmunomodulation, 2009, 16(5): 353-362.
- [14] MOGHADAM S K, WERTH V P. Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects [J]. Int J Dermatol, 2010, 49(3): 239-248.

收稿日期: 2012-12-07