

加味金匱腎氣丸对哮喘大鼠气道炎症的缓解作用及其机制研究

蒋朱秀¹, 郑小伟^{2*}, 江劲¹, 李敏静¹, 蔡宛如¹ (1.浙江中医药大学附属第二医院, 杭州 310005; 2.浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 研究加味金匱腎氣丸对支气管哮喘大鼠气道炎症的缓解作用及其机制。方法 60只健康大鼠随机分成正常对照组、模型组、地塞米松组、加味金匱腎氣丸低、中、高剂量组,以卵白蛋白(OVA)致敏激发制备哮喘模型,观察各组大鼠肺组织病理学的改变,测定肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)计数和肺组织中胸腺活化调节趋化因子(thymus activation regulated chemokine, TARC)含量。结果 加味金匱腎氣丸能减轻哮喘大鼠模型的喘息症状、降低支气管肺泡灌洗液中EOS计数和肺组织中TARC的含量,结果均有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。病理组织学检查结果显示,模型组大鼠肺组织支气管黏膜上皮细胞以及杯状细胞增生,肺泡内有分泌物和炎性细胞浸润,官腔狭窄;各药物组病理改变均显著减轻。结论 加味金匱腎氣丸治疗支气管哮喘的机制可能是通过抑制TARC和减少EOS浸润而实现的。

关键词: 哮喘; 胸腺活化调节趋化因子; 嗜酸性粒细胞; 加味金匱腎氣丸

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)08-0932-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.007

Research of Modified Jinkui Shenqi Pills on Eosinophils and Chemokine of Asthmatic Rats

JIANG Zhuxiu¹, ZHENG Xiaowei^{2*}, JIANG Jin¹, LI Minjing¹, CAI Wanru¹ (1. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310005, China; 2. Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of modified Jinkui Shenqi pills, on the thymus and activation regulated chemokine(TARC) and eosinophile(EOS) count in rats with asthmatic. **METHODS** Sixty rats were randomly divided into 6 groups: the normal group, the model group, the dexamethasone group, the modified low, medium and high dose groups. The chronic asthmatic model was established by repeated inhalation of ovalbumin. The morphological change of bronchial and lung tissues, the number of EOS in bronchoalveolar lavage fluid and the content of lung tissue TARC were observed. **RESULTS** Jinkui Shenqi pills obviously improved the asthma degree, decreased the content of TARC and EOS($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Pathological results revealed that the bronchial mucosa epithelial cells and goblet cells hyperplasia, alveolar contains secretions and inflammatory cells infiltration, luminal stenosis in the model group. And these changes were released obviously in the modified Jinkui Shenqi pills groups. **CONCLUSION** Modified Jinkui Shenqi pills can treat asthma possibly by inhibiting TARC and EOS.

KEY WORDS: asthma; thymus activation regulated chemokine; eosinophile; modified Jinkui Shenqi pills

哮喘以气道高反应性及可逆性气道阻塞为临床特征,病理上是以嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)为主,多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病^[1]。EOS、淋巴细胞、中性粒细胞和肥大细胞在气道局部的聚集并释放多种炎症细胞因子引起支气管气道水肿、平滑肌痉挛等,是哮喘发病的中心环节。炎症细胞的活化募集和相互作用及气道高反应性的发生又依赖于各种细胞因子的复杂网络来调控。目前,吸入型糖皮质激素是用于治疗哮喘的主要药物,但其有效性和安全性尚存在一些问题。有研究表明糖皮质激素的治疗可能增加哮喘患者的肺炎发生率,因此中药治疗

哮喘更多被人接受。本研究通过动物实验,建立哮喘大鼠模型,采用加味金匱腎氣丸对哮喘进行干预治疗,通过观察哮喘大鼠肺组织中胸腺活化调节趋化因子(thymus and activation regulated chemokine, TARC)、肺泡灌洗液中EOS百分比、肺组织病理变化及炎症程度的变化来探讨加味金匱腎氣丸对哮喘大鼠气道炎症的影响,为进一步临床使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

清洁级SD大鼠60只,♂,体质量为200~250g,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002,动

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2007CB158);浙江省名老中医专家传承工作室建设经费资助项目(GZS2012012)

作者简介:蒋朱秀,女,博士,主治医师 Tel: (0571)85288239
Tel: (0571)86613661 E-mail: zhwx2103@163.com

E-mail: 5792673@qq.com

*通信作者:郑小伟,男,主任中医师

物合格证号: 0120002, 购于上海医学科学院实验动物中心, 饲养于浙江中医药大学实验动物中心清洁级动物房。动物随机分为正常对照组、模型组、地塞米松组、加味金匱肾气丸低、中、高剂量组, 每组 10 只。

1.2 试剂

鸡卵清白蛋白(OVA, 美国 Sigma 公司, 批号: SLBD2312V); 氢氧化铝凝胶(上海美兴化工股份有限公司, 批号: 20130818); 灭活百日咳杆菌疫苗(上海生物制品研究所, 批号: 20130410); 醋酸地塞米松(浙江仙琚制药股份有限公司, 批号: 110204)。大鼠 TARC 的 ELISA 试剂盒(英国 R&D 公司, 批号: BD2312V)。

1.3 药物

加味金匱肾气丸组方为熟附子 6 g、肉桂 6 g、熟地黄、山萸肉、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓各 12 g、射干 12 g、麻黄 5 g、杏仁 12 g、苏子 12 g、制半夏 2 g、五味子 5 g。药物均购自浙江中医药大学中医门诊部中药房, 经浙江省中医药大学附属第二医院药房主任医师陈锋鉴定药材合格, 符合中国药典 2010 年版。由“浙江中医药大学中医门诊部”自动煎药机煎出药液, 再分别浓缩为含生药 5 g·mL⁻¹(低剂量组)、含生药 10 g·mL⁻¹(中剂量组)、含生药 15 g·mL⁻¹(高剂量组)。

1.4 动物模型制备

哮喘造模^[2]: 除正常对照组外, 各组大鼠采用 OVA 致敏法进行哮喘造模: 实验第 1 天, 用含有 OVA 1 mg、氢氧化铝凝胶 10 mg 及灭活百日咳杆菌疫苗 5×10⁸ 个的混合液 1 mL 注入腹腔内, 令其致敏。正常组以生理盐水腹腔内注射, 第 8 天相同方法重复致敏 1 次。第 15 天开始, 将上述造模大鼠置于 65 cm×45 cm×45 cm 大小的玻璃罩内, 以 1% 的 OVA 超声雾化吸入 30 min, 激发哮喘, 每天 1 次, 连续激发直至处死, 正常对照组用生理盐水进行雾化吸入。

1.5 给药及处理

各组大鼠均于实验第 15 天开始给药。每日给药剂量为: 加味金匱肾气丸低、中、高剂量组给相应中药 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃; 正常对照组、模型组给生理盐水 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃。地塞米松组予地塞米松 0.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 各组大鼠于实验第 30 天处死, 称体质量, 眼球取血, 离心后留取上清, 保存于-80 °C 备用。

1.6 标本采集与相关检测

1.6.1 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中 EOS 检测^[3] 大鼠眼球取血后, 切开气管插管, 结扎一侧支气管, 另一侧用一次性注射器取生理盐水 8 mL 作肺泡灌洗, 重复 3 次, 回收全部的 BALF, 离心后取上清液 1~2 mL, 采用瑞氏姬姆沙染色, 镜下计数 100 个白细胞中的嗜酸粒细胞, 求出百分率, 进行统计分析。

1.6.2 肺组织 TARC 含量测定 取未行肺泡灌洗的一侧部分肺组织, 准确称取大鼠肺组织重量, 匀浆, 离心 15 min 后, 取上清再用生理盐水按 1:9 稀释成 1% 组织匀浆, 按试剂盒说明书方法测定大鼠肺组织 TARC 的含量。

1.6.3 病理学观察 取未行肺泡灌洗的一侧部分肺组织, 用 4% 甲醛固定, 石蜡包埋, 行苏木精伊红(HE)染色, 镜下观察肺组织病理学改变。

1.7 统计方法

应用 SPSS 11.5 统计软件包对数据进行处理, 数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异非常显著。症状积分和病理半定量评分采用非参数秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对哮喘模型大鼠哮喘程度的影响^[4]:

根据大鼠喘息的程度进行积分评定, 分为 0 分: 无任何喘息表现; 1 分: 颤动或点头; 2 分: 咳嗽或呼吸加深; 3 分: 节律性收腹样喘促; 6 分: 跌倒。结果可见各药物均在不同程度上减轻大鼠的哮喘程度, 其中加味金匱肾气丸的平喘作用随着药物剂量浓度的增加而增强。与模型组比较, 地塞米松组和加味金匱肾气丸低、中、高剂量组均能明显改善哮喘的喘息症状, 但地塞米松组和加味金匱肾气丸高剂量组疗效最佳。经非参数秩和检验, 模型组与正常组比较差异非常显著 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地塞米松组和高剂量组的差异均非常显著 ($P < 0.01$), 中剂量和低剂量组差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

2.2 加味金匱肾气丸对哮喘模型大鼠肺组织中 TARC 含量和 BALF 中 EOS 计数的影响

与正常对照组比较, 模型组大鼠肺组织中 TARC 含量及 BALF 中 EOS 计数均明显增加 ($P < 0.01$)。经药物处理后, 与模型组比较, 各药物组均能明显降低肺组织中 TARC 含量以及 BALF

中 EOS 计数($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 随着加味金匱肾气丸药物浓度的升高, 作用不断增强, 地塞米松组和加味金匱肾气丸高剂量组疗效相当, 对抑制 TARC 和 EOS 的效果最佳($P<0.01$), 结果见表 2。

表 1 对哮喘大鼠喘息程度积分的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of the points on rate of breathing asthma rats ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	喘息程度/分				
	0	1	2	3	$\bar{x} \pm s$
正常对照组	10	0	0	0	0 ²⁾
模型组	0	0	0	4	4.80±1.55
地塞米松组	0	7	3	0	1.30±0.48 ²⁾
加味金匱肾气丸低剂量组	0	0	6	4	2.40±0.52 ¹⁾
加味金匱肾气丸中剂量组	0	0	7	3	2.30±0.48 ¹⁾
加味金匱肾气丸高剂量组	0	6	4	0	1.40±0.52 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

表 2 对哮喘大鼠 TARC 和 EOS 含量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Effects of on the content of TARC and EOS in asthma rats($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	TARC/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	EOS/ $\times 10^7 \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照组	14.13±0.64 ²⁾	3.77±0.36 ²⁾
模型组	16.09±1.09	15.45±0.96
地塞米松组	14.71±0.81 ²⁾	5.82±0.43 ²⁾
加味金匱肾气丸低剂量组	14.97±0.57 ¹⁾	7.34±0.46 ¹⁾
加味金匱肾气丸中剂量组	14.63±1.06 ²⁾	7.14±0.54 ²⁾
加味金匱肾气丸高剂量组	14.33±1.14 ²⁾	5.91±0.38 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

2.3 加味金匱肾气丸对哮喘模型大鼠支气管和肺组织形态学的影响

光镜下观察大鼠组织病变和气道炎症细胞浸润、气道黏膜充血水肿情况。参照文献[5]的方法确定支气管周围炎症细胞浸润程度和黏液分泌情况, 进行病理半定量分析。评分如下: 气道周围无炎症细胞(0分); 少许炎症细胞(1分); 较多分布不均的炎症细胞(2分); 大量分布较均匀的炎症细胞, 少见聚集成团(3分); 大量炎症细胞聚集成团(4分)。气道炎症浸润半定量积分见表 3。

正常对照组大鼠的支气管及肺泡结构正常, 各级支气管上皮完整, 管腔内无粘液渗出, 炎症细胞浸润少见; 模型组大鼠支气管黏膜上皮细胞及杯状细胞增生, 肺泡内有分泌物以及炎症细胞浸润, 管腔狭窄, 部分上皮脱落; 地塞米松组大鼠上皮细胞以及杯状细胞增生减少, 管腔以及肺

泡内分泌物减少。加味金匱肾气丸干预后, 炎症细胞数量明显减少, EOS 明显减少, 气道炎症病变减轻, 支气管平滑肌水肿增生不明显, 随着药物浓度增加而明显减轻。结果见图 1。

表 3 对哮喘大鼠炎症浸润半定量评分的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of on inflammation of the invasion semi-quantitative score in asthma rats($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	炎症浸润(分)				
	0	1	2	3	$\bar{x} \pm s$
对照组	10	0	0	0	0 ²⁾
模型组	0	0	0	4	3.60±0.52
地塞米松组	0	7	3	0	1.30±0.48 ²⁾
加味金匱肾气丸低剂量组	0	0	6	4	2.40±0.52 ¹⁾
加味金匱肾气丸中剂量组	0	0	7	3	2.30±0.48 ¹⁾
加味金匱肾气丸高剂量组	0	6	4	0	1.40±0.52 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

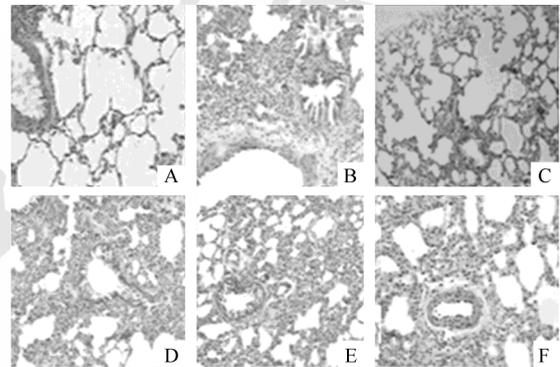


图 1 对哮喘大鼠支气管和肺组织形态学的影响
A-正常对照组; B-模型组; C-地塞米松组; D-加味金匱肾气丸低剂量组; E-加味金匱肾气丸中剂量组; F-加味金匱肾气丸高剂量组。

Fig. 1 Effects of bronchus and lung tissue morphology in asthma rats

A-control group; B-model group; C-dexamethasone group; D-modified Jinkui Shenqi pills low dose group; E-modified Jinkui Shenqi pills medium dose group; F-modified Jinkui Shenqi pills high dose group.

3 讨论

支气管哮喘属中医“哮证”范畴。病理因素以痰为主, 肺肾两虚痰阻气道是发病的主要病机, 治当以温补脾肾, 益肺纳气为原则, 同时辅以降气化痰、祛除顽痰。而加味金匱肾气丸就具有温肾纳气, 降气化痰的功效。

本研究选用的加味金匱肾气丸是在《金匱要略》金匱肾气丸基础上加减而成, 在补肾纳气的基础上, 加以宣肺降逆平喘的射干、麻黄、杏仁、苏子、制半夏、五味子, 全方具有温肾降逆化痰平喘功效, 是临床治疗哮喘行之有效的经验方。

哮喘病理上是以 EOS 为主, 多种细胞和细胞

组分参与的气道慢性炎症。其中以 EOS 为主。在这些炎症细胞从血液转移到气道的过程中,趋化因子发挥着重要作用。

本研究表明 TARC 升高与 EOS 计数升高呈正相关,说明二者可能存在关系,TARC 可以诱导 EOS 的募集、活化和迁移,在哮喘变应性炎症中发挥重要作用^[6]。本结果显示,TARC 及 EOS 升高亦是哮喘的特征。而 TRAC 是一种新的 CC(β 类趋化因子)趋化因子,主要表达于胸腺,也表达于其他组织,如肺、结肠、小肠等^[7],具有聚集嗜酸细胞,尤其是将 Th2 细胞从外周募集到炎症部位,参与多种过敏性疾病的发生和发展^[8-9]。有研究认为 TARC 可以促进呼吸道 EOS 浸润,其主要是通过促进 Th2 细胞的募集及其相关细胞因子的分泌起作用^[10]。王优等^[11]研究证实,在哮喘大鼠中 TARC 含量明显增加,下调 TARC 可能是激素治疗哮喘的一个重要机制。本实验研究结果显示,经 OVA 致敏及激发后可引起 SD 大鼠支气管哮喘;哮喘大鼠肺组织中 TARC 水平增高,嗜酸细胞也升高,说明 TARC 参与哮喘气道炎症反应。而加味金匱肾气丸能在一定程度上降低 BALF 中 EOS 数量,降低肺组织中 TARC 的含量,能够减轻哮喘大鼠气道炎症表现,显示加味金匱肾气丸在改善哮喘症状效果显著,其药效与剂量呈正相关,高剂量组疗效最佳。由此可以推测加味金匱肾气丸是可以降低 TARC 在哮喘大鼠肺组织内的含量来抑制 Th2 细胞募集到炎症部位,从而达到治疗哮喘的作用,其具体的分子生物学通路有待进一步的探讨和研究。

REFERENCES

- [1] HAN S X, HAN X M, WU X M, et al. Investigation of eosinophil apoptosis in asthma patient [J]. *China J Mod Med*(中国现代医学杂志), 2004, 14(7): 15-22.
- [2] WANG Y, GUAN W, LI S N. Action mechanism research of decoction of paeonia and licorice in prevention and treatment of bronchial asthma [J]. *Shangxi J Tradit Chin Med*(山西中医), 2011, 27(9): 43-45.
- [3] SUN J, WANG Y S, XU Z, et al. Changes of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid of cough variant asthma children and modulation effect of Montelukast [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(4): 434-436.
- [4] SAKAGUCHI S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic selftolerance [J]. *Cell*, 2000, 101(5): 455-458.
- [5] ASANO T, KUME H, TAKI F, et al. Thalidomide attenuates airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(6): 1028-1032.
- [6] LIU L, JARJOUR N N, BUSSE W W, et al. Enhanced generation of helper T type 1 and 2 chemokines in allergen induced asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 169(10): 1118-1124.
- [7] ASOJO O A, BOULEGUE C, HOOVER D M, et al. Structures of thymus and activation regulated chemokine (TARC) [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, 59(7): 1165-1173.
- [8] FRIERI M. Airway epithelial cell release of cytokines: modulation byvariou therapeutic agents [J]. *Allergy Asthma Proc*, 2004, 25(6): 387-393.
- [9] HAN C, QI C L, PAN J Q, et al. Effects of Qiaoqingfei Ji on Th1/Th2 imbalance in rat asthma model [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(11): 1178-1182.
- [10] LEE J S, KIM I S, KIM J H, et al. Suppressive effects of *Houttuynia cordata* Thunb (saururaceae) extract on Th2 immuneresponse [J]. *J Ethnophar-macol*, 2008, 117(1): 34-40.
- [11] WANG Y, HUANG X L, SU Z C, et al. Roles of thymus and activation regulated chemokine in asthatic rats and interference of budesonide [J]. *Chin J Child Health Care*(中国儿童保健杂志), 2014, 22(3): 268-270, 274.

收稿日期: 2014-11-28

半枝莲粗多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠红细胞膜脂类成分的影响

张晶, 赵伟杰, 李晓芳, 刘昱(台州职业技术学院生化制药研发中心, 浙江 台州 318000)

摘要:目的 探讨半枝莲粗多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠红细胞膜脂类含量的影响。方法 48 只小鼠, ♂, 随机分为正常对照组、模型对照组、阳性对照(黄芪多糖)组、半枝莲粗多糖低、中、高剂量(50, 100, 200 mg·kg⁻¹)组, 除正常对照组外其他组小鼠右前腋下接种肿瘤。采用紫外分光光度计检测红细胞膜胆固醇、磷脂含量, 采用 GC-MS 检测红细胞膜磷脂脂肪酸的百分含量。结果 与模型对照组比较, 半枝莲粗多糖显著提高 S₁₈₀ 荷瘤小鼠红细胞膜磷脂含量、降低胆固醇含量及二者比值, 棕榈一烯酸(C_{16:1})、油酸(C_{18:1})、亚油酸(C_{18:2})、不饱和脂肪酸/总脂肪酸的比例均有不同程度的升高。结论 半

基金项目: 台州职业技术学院校级项目(2014YB11); 台州职业技术学院大学生科技创新项目(2013DKC15)

作者简介: 张晶, 女, 硕士, 助教 Tel: 15712693630 E-mail: zwjz2000@126.com