

• 论著 •

易喘平胶囊对哮喘模型小鼠气道黏液高分泌的抑制作用

宋立强, 马战平, 吴昌归, 李 妍

(第四军医大学西京医院呼吸内科, 陕西 西安 710033)

【摘要】 目的: 观察易喘平胶囊(补肾活血法)对哮喘气道黏液高分泌的抑制作用及机制。方法: 将 32 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组、哮喘组、地塞米松组和易喘平胶囊组($n=8$), 制备卵蛋白致敏的哮喘模型, 高碘酸-希夫(PAS)法检测各组小鼠气道黏膜杯状细胞数量及黏液分泌情况, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肺组织黏液蛋白 MUC5AC mRNA 的水平, 检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸粒细胞数及细胞总数, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测肺组织匀浆液中白细胞介素-4(IL-4)和 γ -干扰素(IFN- γ)的含量。结果: 与哮喘组相比, 易喘平胶囊组和地塞米松组小鼠小支气管上皮杯状细胞数量明显减少, 管腔内黏液量也减少; 同时后两组的 MUC5AC mRNA 水平也显著降低(P 均 <0.01)。易喘平胶囊组和地塞米松组 BALF 中嗜酸粒细胞数和细胞总数, 以及肺组织中 IL-4 含量均低于哮喘组(P 均 <0.01), 而 IFN- γ 含量有所提高(P 均 <0.01)。结论: 易喘平胶囊对哮喘气道黏液高分泌具有一定抑制作用, 调节辅助 T 淋巴细胞 Th1/Th2 的平衡、降低气道炎症程度是其发挥作用的机制之一。

【关键词】 易喘平胶囊; 哮喘; 气道; 黏液分泌; 炎症; 气道

中图分类号: R285.5; R256.12 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)02-0086-03

Inhibitory effect of Yichuanping capsule (易喘平胶囊) on the airway mucus overproduction in asthmatic mice
SONG Li-qiang, MA Zhan-ping, WU Chang-gui, LI Yan. Department of Respiratory Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shanxi, China

【Abstract】 Objective: To evaluate the inhibitory effect of Yichuanping capsule (易喘平胶囊) on the airway mucus overproduction in asthmatic mice and its mechanism. **Methods:** Thirty-two male BALB/c mice were randomly divided into normal control group, asthma group, dexamethasone group and Yichuanping capsule (YC) group ($n=8$ in each group). Asthmatic mouse model was established by intraperitoneal injection of ovalbumin. The number of goblet cells and secretion of mucus were detected with periodic acid-Schiff (PAS) staining, and mucus protein MUC5AC mRNA was detected with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Number of total cells and eosinophil in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were counted with special staining. The contents of interleukin-4 (IL-4) and γ -interferon (IFN- γ) in lung tissue were assessed by enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA). **Results:** Compared with asthma group, the number of goblet cells, MUC5AC mRNA levels and secretion of mucus in airway were reduced in dexamethasone group and YC group (all $P<0.01$). The number of total cells and eosinophil in BALF, and the contents of IL-4 in lung in dexamethasone group and YC group were lower than those in asthma group (all $P<0.01$), but IFN- γ contents increased ($P<0.01$). **Conclusion:** Yichuanping capsule shows the inhibitory effect on the airway mucus overproduction in asthma, and one of the mechanisms is regulating the ratio of Th1/Th2 cell and inhibiting the airway inflammation.

【Key words】 Yichuanping capsule; asthma; airway; mucus overproduction; airway inflammation

气道黏液高分泌是哮喘的主要症状之一, 是气流出现不可逆性阻塞的重要诱因, 并可加速肺功能恶化。但目前临床尚缺乏针对性药物。哮喘气道黏膜杯状细胞增生、肥大及化生, 是黏液分泌量成倍增加的病理学基础。据报道, 哮喘气道黏膜杯状细胞数

量是正常气道的 2.5 倍, 储存的黏液蛋白量提高近 3 倍^[1,2]。近年来, 虽然研究发现杯状细胞胞膜的钙激活 Cl^- 通道、上皮生长因子受体、钠钾氯共转运子等蛋白表达升高, 在黏液高分泌中扮演重要角色, 但目前这些膜蛋白均缺乏特异性的化学拮抗剂^[3,4]。易喘平胶囊是以补肾益肺、活血祛痰为治则的中药复方制剂。本课题拟制备哮喘小鼠模型, 观察易喘平胶囊对气道黏液高分泌的干预效应, 并初步探讨其作用机制。

基金项目: 陕西省中医药科研基金资助项目(0386)

作者简介: 宋立强(1970-), 男(汉族), 山西长治人, 医学博士, 主治医师, 讲师, 主要从事哮喘防治的基础和临床研究, 承担多项国家和省级科研课题(E-mail: songlq@fmmu.edu.cn)。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:易喘平胶囊由黄芪、蛤蚧、白术、川贝、地龙、丹参、莪术、甘草等药物按比例组方并经蒸馏浓缩为粉剂,制成胶囊,每粒含药 0.3 g,由陕西中医药研究院提供。酶联免疫吸附法(ELISA)检测白细胞介素-4(IL-4)、 γ -干扰素(IFN- γ)含量,试剂盒分别购自武汉博士德生物工程有限公司和第四军医大学免疫教研室。

1.2 实验动物:雄性 BALB/c 小鼠 32 只,平均体重 (25 ± 3) g,由第四军医大学实验动物中心提供。按随机数字表法分成正常对照组、哮喘组、地塞米松组、易喘平胶囊组 4 组,每组 8 只。

1.3 哮喘小鼠模型的制备^[5]:第 1 日每只小鼠腹腔注射 20 μ g 鸡卵蛋白(OVA)和 2 mg 氢氧化铝〔混合于 0.5 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)中〕;第 8 日注射剂量为 10 μ g OVA 和 1 mg 氢氧化铝;第 15 日始将小鼠置于封闭容器中,给予质量分数为 5% 的 OVA 和 0.5 $\times$ PBS 雾化吸入激发哮喘发作。每日 1 次,每次 25 min,连续 7 d;24 h 内处死动物。给药方法:地塞米松组小鼠从哮喘模型激发的第 1 日开始,每日喂饲地塞米松粉剂 0.4 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹;易喘平胶囊组则喂饲易喘平胶囊制剂 20 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹;正常对照组小鼠灌服等量生理盐水。

1.4 高碘酸-希夫(periodic acid-Schiff, PAS)染色及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测肺组织中黏液蛋白含量:①取各组部分肺组织,常规石蜡切片,脱蜡后行 PAS 特殊染色和苏木精衬染,显微镜下观察。②取各组另一部分组织,参照说明书要求用 PolyA Trac[®] System 1000 提取细胞 mRNA。采用 RT-PCR 检测各组动物肺组织中的黏液蛋白 MUC5AC mRNA 水平。设计特异引物 P1 为 5'-CCAG CACCACCTCTACAACC-3', P2 为 5'-GGTGACAGAGTCTCTCTCC-3'。磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH) mRNA 作为内参照^[2]。扩增 MUC5AC、GAPDH 的 cDNA 长度分别为 920 bp 和 446 bp。采用 ImageTool 3.0 对 cDNA 电泳条带进行图像分析,计算各组条带灰度比(即 MUC5AC 条带与相应 GAPDH 条带灰度的比值)。

1.5 支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞计数:4 组小鼠经气管插管进行肺灌洗术。0.5 ml PBS 灌洗肺 2 次,灌洗液以 1 500 r/min(离心半径 10 cm)离心 10 min,弃上清并保留细胞沉淀。生理盐水重新混悬细胞后,滴加在载玻片上,风干,丙酮固定,常规吉姆萨染色,显微镜下进行细胞分类计数。

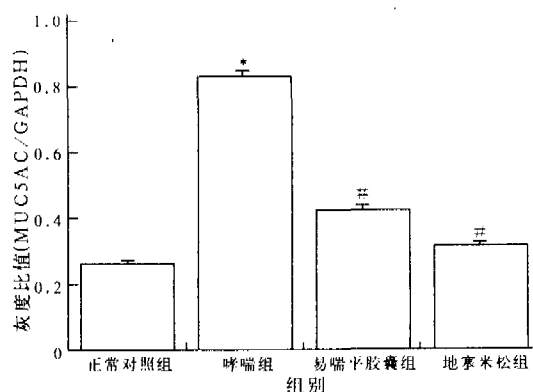
1.6 生物素卵白素过氧化物酶-酶联免疫吸附法(ABC-ELISA)检测肺组织中 IL-4、IFN- γ 含量:取各组小鼠部分肺组织,制成体积分数为 10% 的肺组织匀浆液,3 000 r/min 离心 20 min,取上清。按照试剂盒说明书,用双抗体夹心 ELISA 法检测上清中 IL-4 和 IFN- γ 含量。

1.7 统计学处理:所有实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 软件,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠气道黏液分泌状况的检测:杯状细胞是气道上皮中分泌黏液糖蛋白的主要细胞。PAS 染液能特异性地结合糖蛋白,使胞浆内呈现亮红色颗粒,由此能够鉴定出杯状细胞。观察各组肺组织切片中小支气管的 PAS 染色情况发现,正常对照组气道黏膜只有少量散在分布的杯状细胞,管腔干净。而哮喘组黏膜出现大量簇状、聚集分布的杯状细胞,管腔内可见着色的黏液。与哮喘组相比,地塞米松组、易喘平胶囊组的杯状细胞数量显著减少,管腔较干净。

糖蛋白 MUC5AC 增高被认为是杯状细胞化生的标志蛋白^[6]。采用 RT-PCR 技术检测各组肺组织 MUC5AC mRNA 水平的差异。图像分析半定量结果表明,与正常对照组相比,哮喘组的 MUC5AC mRNA 水平明显增高($P < 0.01$),而地塞米松组、易喘平胶囊组的增幅不显著(P 均 > 0.01 , 图 1)。



注:与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与哮喘组比较: # $P < 0.01$

图 1 各组肺组织 MUC5AC mRNA 水平的图像分析结果

Figure 1 MUC5AC mRNA levels of mice lung tissue in all groups

2.2 各组小鼠 BALF 中细胞计数结果(表 1):哮喘组小鼠 BALF 中细胞总数、嗜酸粒细胞数计及其比值均显著高于正常对照组(P 均 < 0.01)。地塞米松组、易喘平胶囊组 BALF 中细胞总数、嗜酸粒细胞计数及其比值均显著低于哮喘组(P 均 < 0.01)。

表 1 各组小鼠 BALF 中细胞计数结果($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 1 Cell numbers in BALF in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	细胞总数 ($\times 10^9/L$)	嗜酸粒细胞计数 ($\times 10^9/L$)	嗜酸粒 细胞比
正常对照组	5.96 $\pm$ 0.31	0.06 $\pm$ 0	0.010 $\pm$ 0.001
哮喘组	12.21 $\pm$ 0.62*	2.24 $\pm$ 0.19*	0.184 $\pm$ 0.005*
地塞米松组	6.66 $\pm$ 0.36 [#]	0.16 $\pm$ 0.03 [#]	0.024 $\pm$ 0.001 [#]
易喘平胶囊组	7.92 $\pm$ 0.72 [#]	0.18 $\pm$ 0.02 [#]	0.023 $\pm$ 0.004 [#]

注:与正常对照组比较: * $P<0.01$;与哮喘组比较: [#] $P<0.01$

2.3 各组小鼠肺组织中 IL-4、IFN- γ 含量的检测: IL-4、IFN- γ 分别是辅助 T 淋巴细胞 Th2 和 Th1 合成分泌的代表性细胞因子。从表 2 结果可以看出,与正常对照组相比,哮喘组小鼠肺组织中的 IL-4 含量增高,IFN- γ 含量下降,因而两种细胞因子的比值升高($P<0.01$)。与哮喘组相比,地塞米松组、易喘平胶囊组的 IL-4 含量、IL-4/IFN- γ 比值明显下降,IFN- γ 含量升高($P<0.01$)。

表 2 各组小鼠肺组织中 IL-4、IFN- γ 含量检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 2 Contents of IL-4 and IFN- γ of mouse lung tissue in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	IL-4 ($\mu g/L$)	IFN- γ (ng/L)	IL-4/IFN- γ (%)
正常对照组	1.38 $\pm$ 0.39	8.52 $\pm$ 0.97	16.20 $\pm$ 0.67
哮喘组	3.49 $\pm$ 0.53*	4.79 $\pm$ 0.86*	72.86 $\pm$ 0.74*
地塞米松组	1.40 $\pm$ 0.95 [#]	7.61 $\pm$ 0.47 [#]	18.39 $\pm$ 0.36 [#]
易喘平胶囊组	1.61 $\pm$ 0.93 [#]	6.51 $\pm$ 0.92 [#]	24.73 $\pm$ 0.82 [#]

注:与正常对照组比较: * $P<0.01$;与哮喘组比较: [#] $P<0.01$

3 讨论

研究表明,正常恒河猴气道上皮杯状细胞的黏液储备量是黏膜下腺体的 2 倍以上,特别是在哮喘发病过程中,杯状细胞数量增多、合成功能增强,最终导致气道黏液高分泌状态。致敏豚鼠被抗原激发引起黏液的分泌速度快达 1×10^{-5} s,数量可达几百倍^[6]。其中 MUC5AC 被认为是哮喘时气道上皮杯状细胞化生的标志蛋白。临床研究发现,黏液高分泌是致死性哮喘发生的独立危险因素。因此,有效控制气道黏液高分泌的形成在哮喘防治中占重要地位。祖国医学认为,哮喘的发生为宿痰内伏于肺,复加外感、饮食、情志、劳倦等因素,以导致痰阻气道,肺气上逆所致;久病又可导致肺肾两虚,易感外邪,使疾病反复发作^[7]。易喘平胶囊组方就基于补肾益肺、活血祛痰的施治原则。本实验结果表明,易喘平胶囊能显著降低哮喘小鼠气道黏膜杯状细胞的数量及黏液合成量,并与地塞米松表现出相似的效应。

哮喘气道黏膜杯状细胞数量增加及合成黏液蛋

白增多的机制还不完全清楚,目前认为气道炎症是杯状细胞结构与功能出现异常的直接诱因之一。众所周知,哮喘的病理基础就是气道慢性非特异性炎症,以嗜酸粒细胞、T 细胞等为主的炎性细胞及其分泌的细胞因子、炎性介质共同参与了气道炎症。这种炎症形成的关键环节是机体 Th1/Th2 平衡向 Th2 极化方向偏移,导致 Th2 型细胞因子(如 IL-4 等)合成增多,Th1 型细胞因子(如 IFN- γ)减少,最终引发炎性细胞的局部聚集。据报道,IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 等 Th2 型细胞因子及嗜酸粒细胞能直接诱导在体或离体杯状细胞合成 MUC5AC^[8-11]。因此,观察易喘平胶囊能否减轻气道炎症的程度,是本研究探讨该药作用机制的着眼点。本研究结果发现,与地塞米松作用效果相似,易喘平胶囊能够在一定程度上调节 Th1/Th2 平衡,使其向 Th1 极化方向发展,减少 Th2 型细胞因子的合成,从而达到阻止气道局部嗜酸粒细胞聚集、减轻气道炎症程度的效果。

综上所述,易喘平胶囊能在一定程度上缓解哮喘小鼠气道黏液高分泌状态,减轻气道炎症程度是其作用机制之一。

参考文献:

- [1] Fahy J V. Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma [J]. Chest, 2002, 122: 320S-326S.
- [2] Rogers D F. The airway goblet cell [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35: 1-6.
- [3] Zhou Y, Shapiro M, Dong Q, et al. A calcium-activated chloride channel blocker inhibits goblet cell metaplasia and mucus overproduction [J]. Novartis Found Symp, 2002, 248: 150-165.
- [4] Rose M C, Nickola T J, Voynow J A. Airway mucus obstruction; mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25: 533-537.
- [5] 公丕花, 高占成, 胡萍, 等. 过敏原所致小鼠气道高反应性的动态演变和布地奈德干预对其的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 463-467.
- [6] Alimam N Z, Piazza F M, Selby D M, et al. Muc-5/5ac mucin messenger RNA and protein expression is a marker of goblet cell metaplasia in murine airways [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22: 253-260.
- [7] 黄建明, 田伟, 陈东波, 等. 麻黄汤及其减桂枝对哮喘小鼠影响的比较研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11: 148-150.
- [8] Rogers D F. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders [J]. Eur Respir J, 1994, 7: 1690-1706.
- [9] Burgel P R, Lazarus S C, Tam D C, et al. Human eosinophils induce mucin production in airway epithelial cells via epidermal growth factor receptor activation [J]. J Immunol, 2001, 167: 5948-5954.
- [10] Zhou Y, Dong Q, Louahed J, et al. Characterization of a calcium-activated chloride as a shared target of Th2 cytokine pathways and its potential involvement in asthma [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25: 486-491.
- [11] Louahed J, Toda M, Jen J, et al. Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22: 649-656.

(收稿日期: 2005-10-21 修回日期: 2006-02-06)

(本文编辑: 李银平)