

· 论著 ·

雷公藤对哮喘大鼠气道炎症及重塑影响的研究

曲政海, 谢 宁, 刘小梅, 黄玉强, 林荣军

(青岛大学医学院附属医院儿科, 山东 青岛 266003)

【摘要】 目的:探讨雷公藤对哮喘大鼠气道炎症及重塑的影响。方法:40 只大鼠被随机均分为阴性对照组、阳性对照组、雷公藤常规剂量组(雷 I 组)和雷公藤小剂量组(雷 II 组)4 组。采用卵白蛋白致敏方法制备哮喘模型,采用瑞氏染色,进行支气管肺泡灌洗液(BALF)中的细胞分类及计数,免疫组化方法检测肺组织中核转录因子- κ B(NF- κ B)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)的表达。结果:与阴性对照组相比,阳性对照组 BALF 中的淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及嗜酸粒细胞数均明显升高;肺组织中 NF- κ B、MMP-9 和 TIMP-1 的阳性细胞百分数亦明显升高,差异均有显著性(P 均 <0.01)。与阳性对照组比较,两个雷公藤治疗组 BALF 中淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及嗜酸粒细胞数均明显降低(P 均 <0.01);且肺组织中 NF- κ B、MMP-9 和 TIMP-1 的阳性细胞百分数亦明显降低(P <0.05 或 P <0.01)。雷 I 组与雷 II 组各指标比较,差异均无显著性。结论:雷公藤能够抑制哮喘大鼠的气道炎症和纤维化,且小剂量雷公藤亦能产生上述效果。

【关键词】 雷公藤;哮喘;核转录因子- κ B;基质金属蛋白酶;嗜酸粒细胞

中图分类号:R285.5;R256.12 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2007)01-0026-03

Influence of tripterygium polyglycosid (雷公藤) on airway inflammation and remodeling in rats with allergic asthma QU Zheng-hai, XIE Ning, LIU Xiao-mei, HUANG Yu-qiang, LIN Rong-jun. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong, China

【Abstract】 **Objective:** To observe the effect of tripterygium polyglycosid (TP, 雷公藤) on airway inflammation and remodeling in rats with asthma. **Methods:** Forty rats were randomly divided evenly into negative control group, positive control group, normal dose TP group (TP I group) and small dose TP group (TP II group). The experimental model was induced by ovalbumin sensitization. Number of cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was observed by immunocytochemical staining. The expressions of nuclear factor- κ B (NF- κ B), matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) were detected by immunohistochemistry method. **Results:** Compared with the negative control group, the counts of lymphocyte, neutrophilic leukocyte, macrophage and eosinocyte in BALF were elevated significantly, positive cell percentages of NF- κ B, MMP-9 and TIMP-1 in lung tissues increased greatly in positive control group, the differences being significant (all P <0.01). Compared with the positive control group, the counts of lymphocyte, neutrophilic leukocyte, macrophage and eosinocyte in BALF were lowered significantly (all P <0.01), and positive cell percentages of NF- κ B, MMP-9 and TIMP-1 in lung tissues decreased greatly in TP I group and TP II group (P <0.05 or P <0.01). There were no differences between TP I group and TP II group. **Conclusion:** Even small dose of TP can markedly reduce airway inflammation and fibrosis in rats with allergic asthma.

【Key words】 tripterygium polyglycosid; asthma; nuclear factor- κ B; matrix metalloproteinases; eosinocyte

支气管哮喘是一种由多细胞、细胞因子和炎症介质引起,以呼吸道高反应性为特征的变态反应性疾病,早期病变以小气道炎症为主,长期气道炎症导致气道重塑是支气管哮喘的严重后果。通过抑制气道炎症、延缓气道重塑是治疗哮喘的重要目的。本研

究通过观察雷公藤对哮喘大鼠气道炎症及重塑的影响,旨在探讨中药防治支气管哮喘的作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与药品:卵白蛋白购自美国 Sigma 公司,雷公藤多甙片购自黄石制药厂,淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂。核转录因子- κ B(NF- κ B)和基质金属蛋白酶类(MMPs)检测试剂盒均购自北京

基金项目:青岛市科委基金资助项目(05-1-JC-93)

作者简介:曲政海(1963-),男(汉族),山东省人,副教授,硕士生导师>Email:quzhenghai@163.com。

中山公司。

1.2 哮喘大鼠模型的制备及分组:实验用雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 250~350 g,按随机数字表法均分为阴性对照组、阳性对照组、雷公藤常规剂量组(雷 I 组)和雷公藤小剂量组(雷 II 组)4 组。其中阳性对照组和雷公藤组在实验第 1 日用卵白蛋白 100 mg 与氢氧化铝 200 mg 配制成 2 ml 混合液向大鼠腹腔注射进行致敏,致敏后第 15 日采用质量分数为 1% 的卵白蛋白超声雾化吸入,每日 1 次,每次 20 min,连续 7 d,激发成功后,改为每周 1 次,每次 5 min,连续 4 周;阴性对照组采用生理盐水代替上述抗原进行腹腔注射和雾化吸入,方法同上。雷公藤组大鼠在激发的同时鼻饲雷公藤多甙,雷 I 组剂量为 2 mg/kg,雷 II 组为 1 mg/kg,每日 1 次。各组大鼠于最后 1 d 雾化吸入后,向腹腔内注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉,进行气管切开和气管插管,行支气管肺泡灌洗,每次注入生理盐水 5 ml,然后回收支气管肺泡灌洗液(BALF),共 5 次,总量 25 ml,以备细胞分类和计数;然后处死大鼠,取肺组织,进行免疫组化分析。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 细胞分类和计数:收集 BALF,经 1 500×g 离心 15 min,取适量沉渣制备细胞涂片,采用瑞氏染色法染色,按照形态学标准对细胞进行分类,并计算出嗜酸粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和中性粒细胞的数目。

1.3.2 肺组织 NF-κB 表达:采用免疫组化方法检测^[1]。处死动物后取肺组织做冷冻切片,片厚 5 μm,进行免疫组化染色,一抗为兔抗 NF-κB p65 多克隆抗体,稀释 1:100,按试剂盒说明书要求操作,选择较完整的支气管肺组织,随机选取 5 个高倍视野,计算阳性细胞数占细胞总数的百分比,取平均值作为该切片的代表值。

1.3.3 检测基质金属蛋白酶-9(MMP-9)及其抑制剂-1(TIMP-1):采用免疫组化法检测^[2]。一抗工作液浓度为 1:50,操作时设阴性、阳性对照。细胞质中出现棕褐色颗粒为阳性细胞,其百分数>5% 即为阳性。

1.4 统计学处理:应用 SPSS10.0 统计分析软件。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用方差分析,用 *q* 检验进行均数间两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 BALF 中细胞计数的比较(表 1):与

阳性对照组比较,雷 I 组、雷 II 组大鼠 BALF 中淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸粒细胞的数量均明显降低(P 均 <0.01),但雷 I 组、雷 II 组间比较差异均无显著性。

表 1 BALF 中细胞分类和计数($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Comparison of numbers of cells in BALF in each group($\bar{x}\pm s, n=10$) $\times 10^7/L$

组别	淋巴细胞	中性粒细胞	巨噬细胞	嗜酸粒细胞
阴性对照组	5.1±1.2	1.2±1.0	29.0±5.9	0.1±0.1
阳性对照组	25.3±10.0**	8.3±5.9**	34.9±4.5**	9.8±3.3**
雷 I 组	12.5±7.4**	4.3±2.1**	20.5±5.0**	3.4±2.1**
雷 II 组	15.9±7.3**	3.3±2.2**	22.5±6.3**	4.2±2.3**
F 值	17.8	23.1	6.7	32.3
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与阴性对照组比较:** $P<0.01$;与阳性对照组比较:** $P<0.01$

2.2 NF-κB、MMP-9 和 TIMP-1 阳性细胞百分数的比较(表 2):与阳性对照组比较,雷 I 组、雷 II 组大鼠 NF-κB、MMP-9 和 TIMP-1 的阳性细胞百分数均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但雷 I 组、雷 II 组间比较差异均无显著性。

表 2 各组大鼠 NF-κB、MMP-9 和 TIMP-1 的阳性细胞百分数比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Comparison of positive cell percentages of NF-κB, MMP-9 and TIMP-1 in each group($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	NF-κB($\bar{x}\pm s$)	MMP-9	TIMP-1
阴性对照组	(7.2±4.1)%	30.0%	31.5%
阳性对照组	(27.6±6.2)%**	72.5%**	82.5%**
雷 I 组	(17.4±4.5)%**	41.5%**	65.5%#
雷 II 组	(16.1±6.5)%**	37.5%**	42.5%#
F 值	17.13	16.3	23.1
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

注:与阴性对照组比较:** $P<0.01$;与阳性对照组比较:** $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨论

采用卵白蛋白诱导的大鼠哮喘模型因其结果可靠,重复性好而被广泛应用于实验研究^[2,3]。本实验结果显示,阳性对照组大鼠 BALF 中嗜酸粒细胞的数量明显高于阴性对照组,同时伴有 NF-κB 和 MMP-9 的升高,提示本实验动物哮喘模型制备是成功的。

NF-κB 是一种多功能的核转录因子,由 p50、p65 两个亚单位组成的二聚体,可影响细胞因子、黏附分子、趋化物质和免疫受体等基因表达。静息状态下 NF-κB 与其抑制蛋白(IκB)以复合物形式存在于胞浆中。细胞表面受到激活信号刺激后,NF-κB 被激活并向核内转移,与靶基因的相应结合位点反

应启动基因转录,因此胞核出现阳性着色就能简便直观地反映出 NF- κ B 转位至胞核。由于 NF- κ B 参与调节多种炎性蛋白基因的转录,因此其在哮喘发病机制中的作用日趋受到重视。Hart 等^[4]用免疫组化方法证实哮喘患者呼吸道上皮细胞和黏膜下细胞 NF- κ B 表达增加,并且证实 NF- κ B 的表达与细胞因子基因、炎性酶基因和黏附分子基因异常表达有关。

MMPs 的主要功能是降解除多糖外的全部细胞外基质(ECM)成分,它可在多种酶作用下,形成“瀑布效应”,具有重要的病理生理意义。MMPs 是反映细胞基质代谢活跃程度的重要指标,MMP-9 特异性底物是 IV 型胶原,而后者是肺泡壁基底膜的重要成分。在正常肺组织中 ECM 能维持肺泡结构,ECM 的合成与降解保持动态平衡对于保证正常肺功能非常重要;但在平衡破坏时,将会产生以肺结构改变为特征的肺泡疾病,如慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘等。MMP-9 可能通过以下机制引起呼吸道重塑:①通过刺激或激活与基质生长有关的生长因子释放,诱导细胞增殖、分化而参与呼吸道重塑;②降解血管胶原成分,从而加快平滑肌细胞移行到血管基质,扩大血管的表面积,使血管壁变薄,并参与血管内皮生长因子的释放而促进新生血管形成;③降解上皮下胶原,促进上皮细胞的移行;④促进成纤维细胞的增生并刺激其生成胶原,从而促进呼吸道纤维化。TIMP-1 是 MMPs 天然的拮抗剂,二者在肺泡基底膜的降解及重塑方面发挥重要作用。Ekekezie 等^[5]认为 MMP-2 于急性期时表达呈高峰,其过度表达所致的 MMP-2/TIMP-1 失衡是导致肺纤维化更主要的因素。

雷公藤是具有免疫抑制作用的常用中药,其有效成分为雷公藤多甙、雷公藤内酯醇、生物碱等^[6],对系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、过敏性紫癜、肾病综合征、原发性肾小球肾炎、重症支气管哮喘、肺结核、皮肤血管炎性疾病、疔疮肿毒、风湿痹痛等病有治疗作用^[7]。雷公藤被认为具有糖皮质激素样治疗作用,而无糖皮质激素样不良反应^[8]。邱海波等^[9]观察到雷公藤多甙具有与地塞米松同样的调节免疫反应作用,通过抑制脾淋巴细胞中 γ -干扰素(IFN- γ)和白细胞介素-4(IL-4)的水平,调节 T 辅助细胞 1/2(Th1/Th2),促使 Th1 向 Th2 漂移,从而起到了防治急性肺损伤的作用。孙洪涛等^[10]发现,不论是哮喘模型大鼠还是哮喘患者,其 Th1/Th2 水平均明显降低,说明 Th1/Th2 失

衡在哮喘发病机制中起着很重要的作用,而雷公藤具有抑制 Th 的作用,但其治疗哮喘的机制尚不清楚。来查云等^[11]应用雷公藤治疗哮喘患儿,发现其能改善哮喘症状和气道阻塞。王长征等^[12]报道雷公藤还可以抑制嗜酸粒细胞的活性。本实验选取雷公藤多甙进行研究,发现哮喘大鼠经雷公藤多甙治疗后,BALF 中嗜酸粒细胞数目明显下降,NF- κ B 和 MMP-9 亦明显降低,提示雷公藤多甙具有抑制哮喘大鼠气道炎症和肺纤维化的作用,说明雷公藤多甙可使嗜酸粒细胞降低。所以,雷公藤对哮喘的治疗可能是通过抑制嗜酸粒细胞实现的。本实验中采用雷公藤的剂量是临床用量的 1~2 倍,明显小于孙洪涛等^[3]采用的剂量,应进一步研究小剂量雷公藤对哮喘的作用,以便为临床应用提供更多的依据。

参考文献:

- [1]孔春妍,张岩,王明月,等.吸入性糖皮质激素对哮喘小鼠核因子- κ B及 Th2 类细胞因子的影响[J].实用儿科临床杂志,2005,20(10):974-975.
- [2]Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, et al. Relationship of airway wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in asthma[J]. Thorax, 2005,60(4):277-281.
- [3]孙洪涛,林江涛,何雯雯.雷公藤和糖皮质激素对哮喘大鼠支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞的影响[J].现代中西医结合杂志,2003,12(4):347-348,351.
- [4]Hart L A, Krishnan V L, Adcock I M, et al. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor- κ B, in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998,158(5 pt 1):1585-1592.
- [5]Ekekezie I I, Thibeault D W, Simon S D, et al. Low levels of tissue inhibitors of metalloproteinases with a high matrix metalloproteinases-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio are present in tracheal aspirate fluids of infants who develop chronic lung disease[J]. Pediatrics, 2004,113(6):1709-1714.
- [6]杨春欣,马爱娟,董颖,等.雷公藤水溶性免疫抑制作用部位的筛选研究[J].中国中西医结合急救杂志,2001,8(5):268-270.
- [7]孟庆义,李玉芳,沈洪.关于雷公藤临床应用的讨论[J].中国中西医结合急救杂志,2000,7(4):254-256.
- [8]曲政海.小剂量雷公藤多甙治疗儿童难治性 Still 病的对比研究[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11(3):156-168.
- [9]邱海波,周韶霞,蒋雄斌,等.雷公藤多甙对小鼠急性肺损伤的防治作用[J].中国中西医结合急救杂志,2001,8(2):109-112.
- [10]孙洪涛,林江涛,王群,等.T 辅助淋巴细胞亚群平衡变化与支气管哮喘发病的关系研究[J].中国危重病急救医学,2001,13(2):87-89.
- [11]来查云,杨朝喜,黄彤,等.雷公藤多甙治疗重型、偏重型小儿支气管哮喘的临床疗效观察[J].实用儿科杂志,1987,2(1):28-29.
- [12]王长征,郭先健,王顺朝,等.雷公藤甲素对哮喘动物模型气道反应性的观察[J].中华医学杂志,1996,76(1):68-69.