

加味六安煎对咳嗽变异性哮喘大鼠肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-5 的影响

霍婧伟 魏丽娜 苟旭蕾 张媛 王东升 吴力群

【摘要】 目的 探讨加味六安煎治疗咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma,CVA)的作用机制。**方法** 将60只Wistar大鼠随机分为正常对照组、模型组、孟鲁司特钠组、加味六安煎低、中、高剂量组。以卵蛋白、氢氧化铝致敏并吸入卵蛋白激发法复制咳嗽变异性哮喘大鼠模型,观察各组大鼠咳嗽次数、血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha,TNF- α)、白细胞介素-5(interleukin-5,IL-5)的含量及肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞(eosinophile,EOS)计数。**结果** (1)咳嗽次数:CVA模型组较其余各组咳嗽次数明显增加($P<0.001$);与CVA模型组相比,各治疗组咳嗽次数明显减少($P<0.05$);(2)EOS计数:与正常组比较,其余各组支气管肺泡灌洗液EOS计数明显升高($P<0.05$);(3)TNF- α 值:CVA模型组与正常组比较,血清TNF- α 值明显增高($P<0.05$),高剂量组与孟鲁司特钠组比较,无显著性差异($P>0.05$);(4)IL-5值:CVA模型组血清IL-5值较其余各组明显升高($P<0.05$);其中高剂量组血清IL-5值较其余各治疗组比较降低最明显($P<0.05$)。**结论** 加味六安煎对咳嗽变异性哮喘大鼠有较好的治疗作用,其机制可能是通过降低CVA大鼠血清TNF- α 、IL-5水平,改善CVA大鼠咳嗽症状、降低EOS数量,从而达到治疗CVA的目的。

【关键词】 加味六安煎; 咳嗽变异性哮喘; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-5

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.01.002

基金项目:北京中医药大学自主选题(2013-QNJSZX018)

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院儿科(霍婧伟、吴力群);北京中医药大学第二临床医学院[魏丽娜(硕士研究生)、苟旭蕾(硕士研究生)、张媛(硕士研究生)、王东升(硕士研究生)]

作者简介:霍婧伟(1984-),女,硕士,主治医师。研究方向:中医药治疗小儿呼吸系统疾病。E-mail:huo_jing_wei@126.com

通讯作者:吴力群(1965-),女,博士,主任医师,教授,硕士生导师。研究方向:中医药治疗小儿肺系、肾系疾病。E-mail:wulq1211@163.com

The effect of *Jiawei Liuan* decoction on TNF- α and IL-5 in cough variant asthma rats HUO Jing-wei, WEI Li-na, GOU Xu-lei, et al. Department of pediatrics Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Corresponding author: WU Li-qun, E-mail: wulq1211@163.com

【Abstract】 Objectives To observe the effect of *Jiawei Liuan* decoction on blood serum level of TNF- α and IL-5, and eosinophil (EOS) level in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in cough variant asthma (CVA) rats, thereby determining the mechanism of *Jiawei Liuan* decoction in CVA treatment. **Methods** 60 Wistar rats are randomly allocated into normal control group (NCG), CVA group (CVAG), montelukast sodium group (MSG), *Jiawei Liuan* low dose group (LALG), *Jiawei Liuan* medium dose group (LAMG) and *Jiawei Liuan* high dose group (LAHG). CVA rat models are hypersensitized by albumin and aluminium hydroxide. The rats are made to inhale albumin to activate the replication of CVA rat models. Cough frequencies, blood serum TNF- α and IL-5 levels, as well as BALF EOS levels are observed. **Results** Cough frequency: CVAG experienced increased cough frequency as compared to other groups ($P < 0.001$), cough frequencies of all groups are significantly lower as compared to CVAG ($P < 0.05$). Eosinophil count: BALF EOS of all groups are significantly increased as compared to NCG ($P < 0.05$). TNF- α levels: CVAG blood serum TNF- α is significantly increased ($P < 0.05$), there is no significant difference between LAHG and MSG ($P > 0.05$). IL-5 levels: CVAG blood serum IL-5 are significantly increased as compared to other groups ($P < 0.05$), IL-5 blood serum was significantly decreased in LAHG as compared to other treatment groups ($P < 0.05$). **Conclusions** *Jiawei Liuan* decoction has prominent therapeutic effect for CVA rats. The mechanism involved could be that it is able to decrease the blood serum TNF- α , IL-5 levels, decrease cough symptoms and decrease BALF EOS level in CVA rats in order to achieve therapeutic effect.

【Key words】 *Jiawei Liuan* decoction; Cough variant asthma; Tumor necrosis factor alpha; Interleukin-5

咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma, CVA)是一种特殊类型的哮喘,咳嗽是其惟一或主要临床表现,无明显喘息、气促等症状或体征,以刺激性干咳、日轻夜重、季节性加重为其重要特征^[1]。国内报道小儿 CVA 占儿童慢性咳嗽的 35.4%^[2],且约有 30% 患者可发展为典型哮喘^[3],因此对于 CVA 的早期诊断及治疗以防止其发展为典型哮喘有着重要意义。本病以咳嗽为主要表现,属中医学“咳嗽”范畴。加味六安煎为临床常用治疗痰湿咳嗽方剂,且疗效显著,本研究选用动物实验方法进一步验证其疗效及探讨咳嗽变异性哮喘的发病机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 4 周龄雄性 Wistar 大鼠 60 只,体质量 (100 ± 10) g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.2 药物与试剂

加味六安煎颗粒(药物组成:法半夏 6 g、橘红 6 g、茯苓 6 g、杏仁 6 g、白芥子 6 g、甘草 3 g、海浮石 20 g、葶苈子 6 g、瓜蒌 10 g、胆南星 4 g、炒莱菔子 10 g),低、中、高剂量组分别配制成浓度为

0.74 g/mL、1.48 g/mL、2.22 g/mL 的溶液,由北京中医药大学东方医院提供;孟鲁司特钠(批号:J012036,杭州默沙东制药有限公司,10 mg/片)。

卵蛋白(ovalbumin, OVA)(批号:326A0510, Sigma 公司);氢氧化铝(批号:20131224,北京市化学试剂公司);辣椒素(纯度>95%,批号:K1222058, Sigma 公司);白细胞介素(interleukin, IL)-5 试剂盒(批号:201408,北京赛驰生物技术有限公司);肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 试剂盒(批号:201409,北京福瑞生物工程公司)。

1.3 造膜与分组

将 60 只健康大鼠随机分为 6 组(正常对照组、CVA 模型组、孟鲁司特钠组、加味六安煎低剂量组、加味六安煎中剂量组、加味六安煎高剂量组),每组 10 只。参照参考文献的方法复制^[4],采用 OVA 和氢氧化铝激发致敏并用卵蛋白激发的方法复制 CVA 模型大鼠。除正常对照组外,其余各组大鼠均在第 1、8 天腹腔注射 10% 卵蛋白和 $Al(OH)_3$ 混合溶液 1 mL 致敏。从第 15 天起, CVA 模型组、孟鲁司特钠组、加味六安煎低剂量组、加味六安煎中剂量组、加味六安煎高剂量组大鼠置于密闭有机玻璃罩内,给予含 1% OVA 溶液的生理盐水超声雾化激

发 20 分钟,每天 1 次,共 10 天。

模型评估:激发时观察大鼠反应,如出现咳嗽、竖毛、呼吸困难、喷嚏、干呕、极度烦躁等现象中两种或两种以上者,或抽搐、虚脱现象之一者,判定为造模成功。

1.4 给药

给予含 1% OVA 溶液的生理盐水超声雾化激发前 30 分钟,孟鲁司特钠组、加味六安煎低剂量组、加味六安煎中剂量组、加味六安煎高剂量分别灌胃给药干预,其余 2 组分别给予同等剂量生理盐水。第 26 天,进行咳嗽次数测定,腹主动脉取血分离血清进行 TNF- α 、IL-5 细胞因子水平的测定。

1.5 咳嗽次数测定

造模第 26 天,将大鼠放置在密闭玻璃罩内,雾化吸入 10^{-4} mol/L 辣椒素溶液,然后关掉雾化器,再在玻璃罩内停留 60 秒,揭开盖子,手背触摸感受大鼠腹肌抽搐次数记录 2 分钟内咳嗽次数。

1.6 血清中 TNF- α 、IL-5 水平

治疗结束后,先将大鼠禁食(可自由饮水)24 小时,称量各组大鼠体重,然后打开腹腔,腹主动脉取血 4 mL,标本由无菌干燥管收集,静置 1 小时后,4℃ 2000 rpm 离心 10 分钟,分离血清,-20℃ 以下保存。采用 ELISA 方法测定血清 TNF- α 、IL-5 的含量。

1.7 肺泡灌洗液嗜酸性粒细胞计数

大鼠腹主动脉采血,消毒后打开胸腔,从气管插管处注入 5 mL 生理盐水,每次气道内反复注入、回抽 3 次,获得支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),并以 1000 rpm 离心 10 分钟,转移上清液,将沉淀涂片,进行瑞氏染色,高倍镜下进行嗜酸性粒细胞(eosinophile, EOS)计数。在显微镜下对连续视野中每 200 个细胞中嗜酸细胞计数。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计分析软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,咳嗽频次、TNF- α 、IL-5 及肺

泡灌洗液嗜酸性粒细胞计数均服从正态分布,咳嗽频次方差齐,因此采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;TNF- α 、IL-5 及肺泡灌洗液嗜酸性粒细胞计数方差不齐,因此用 Games-Howell 法进行两两比较,所有的统计检验均采用双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 体征观察

正常组大鼠呼吸平稳,行动灵活,反应灵敏,体重增长稳定,毛色光泽。其余组大鼠在激发前呼吸平稳,个别大鼠体重增长缓慢,毛色失去光泽。激发后出现咳嗽、喷嚏、口鼻分泌物增多、呼吸加快等。实验结束时,各组大鼠死亡数量分别为:CVA 模型组、加味六安煎中、高剂量组各 1 只(CVA 模型组 1 只为互相咬食致死,加味六安煎中、高剂量组各 1 只为取血前注射镇静药致死)。

2.2 咳嗽次数测定结果

经单因素方差分析, $F=4.640, P<0.01$,可以认为 6 组咳嗽频次不全相同,与正常组比较,CVA 模型组咳嗽次数明显增加,有显著统计学差异($P<0.001$);与 CVA 模型组相比,各治疗组咳嗽次数明显减少($P<0.05$);各药物治疗组间咳嗽次数无显著性差异($P>0.05$)。见表 1。

2.3 各组大鼠血清 TNF- α 检测结果

与正常组比较,CVA 模型组血清 TNF- α 值明显增高,具有显著性差异($P<0.05$);与 CVA 模型组比较,各治疗组血清 TNF- α 明显降低,具有显著性差异($P<0.05$);加味六安煎中药各剂量组间比较,加味六安煎高剂量组与低、中剂量组比较有显著性差异($P<0.05$);孟鲁司特钠组、加味六安煎中、低剂量组间无显著差异($P>0.05$)。加味六安煎高剂量组与孟鲁司特钠组比较,无显著性差异($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠咳嗽次数、TNF-a、IL-5 及 EOS 计数比较

组别	n	咳嗽次数	TNF- α (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)	EOS 数($\times 10^5$)
正常组	10	0.8 \pm 0.8	81.8 \pm 4.50	44.2 \pm 2.38	1.20 \pm 0.63
CVA 模型组	9	4.4 \pm 1.87	237.3 \pm 10.79	116.3 \pm 6.54	12.88 \pm 2.44
孟鲁司特钠组	10	1.8 \pm 1.32	167.2 \pm 19.42	89.15 \pm 5.84	4.19 \pm 1.31
加味六安煎低剂量组	10	3.3 \pm 1.41	118.7 \pm 13.50	64.0 \pm 15.83	7.03 \pm 1.49
加味六安煎中剂量组	9	3.2 \pm 2.22	160.2 \pm 15.33	77.0 \pm 10.62	5.32 \pm 1.39
加味六安煎高剂量组	9	2.8 \pm 0.84	183.6 \pm 24.15	91.31 \pm 4.90	4.66 \pm 0.93

2.4 各组大鼠血清 IL-5 检测结果

与正常组比较, CVA 模型组血清 IL-5 值明显升高, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 各治疗组血清 IL-5 明显降低, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); 与孟鲁司特钠组比较, 加味六安煎中、低剂量组无显著性差异 ($P > 0.05$); 加味六安煎高剂量组血清 IL-5 值明显降低, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.5 肺泡灌洗液嗜酸性粒细胞计数

与正常组比较, CVA 模型组肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞数量明显增高, 具有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明 CVA 模型组有嗜酸性粒细胞参与的气道炎症, 孟鲁司特钠组与加味六安煎中、高剂量组间无明显差异 ($P > 0.05$), 但治疗后各组间与正常组仍有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 1。

3 讨论

咳嗽变异性哮喘, 归属于中医学“咳嗽”范畴。小儿具有“肺常不足, 脾常虚”的生理特点, 且咳嗽变异性哮喘病程较长, 病情易反复, 日久肺脾气虚证多见。其病机主要是肺脾气虚导致痰湿内伏, 复感外邪触发致使痰阻气道, 肺失宣肃、肺气上逆而发, 方药选用六安煎加味。六安煎出自《景岳全书·新方八阵》, 由半夏、陈皮、茯苓、甘草、杏仁、白芥子六味药物组成, 半夏燥湿化痰, 净贮痰之器, 茯苓健脾渗湿杜生痰之源, 杏仁降气止咳, 白芥子利气豁痰, 全方达到健脾化痰, 降气止咳功效。正所谓脾为生痰之源, 肺为贮痰之器, 如此肺脾同治则痰消咳止。现代医学认为该病发病机制与典型哮喘相似, 是由多种炎性细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 细胞、中性粒细胞、气道上皮细胞等)共同参与的气道慢性炎症引起的气道高反应。EOS 是诱导支气管黏膜损伤的主要效应细胞, EOS 的主要杀伤机制是释放 4 种颗粒蛋白, 还能产生细胞因子和炎症介质。近年研究发现 IL-5 受体特异的表达于嗜酸和嗜碱性粒细胞上, IL-5 对 EOS 的增殖、分化、存活及活化起着重要作用^[5]。TNF- α 可趋化嗜酸性粒细胞、中性粒细胞释放炎症介质, 诱发或加重哮喘, 最终使气道痉挛, 血管通透性增加, 微血栓形

成, 气道黏膜水肿等, 导致哮喘发作^[6]。目前孟鲁司特钠已被 GINA 方案中推荐用于治疗各种程度的哮喘, 能够有效预防和抑制气道嗜酸粒细胞浸润及支气管痉挛, 减轻气道炎症反应和黏膜水肿, 减少气道分泌物, 改善气道高反应性, 达到预防和治疗哮喘目的^[7]。

本实验结果显示咳嗽变异性哮喘大鼠模型外周血清中 TNF- α 、IL-5 及肺泡灌洗液中 EOS 数量明显高于正常大鼠, 能够反映气道的炎症反应。在应用孟鲁司特钠及加味六安煎治疗后, 各组大鼠咳嗽次数、EOS 数量均较前模型组减少, 且各组间无明显差异。TNF- α 及 IL-5 水平, 经治疗后各组水平均有明显下降, 其中加味六安煎高剂量组与孟鲁司特钠组下降最明显, 无明显差异。本研究结果提示加味六安煎可有效减轻咳嗽变异性哮喘大鼠咳嗽次数, 降低气道反应性, 推测其可能作用机制之一为通过调节体内 TNF- α 及 IL-5 的含量, 降低 EOS 的水平, 从而减轻气道炎性反应, 以达到治疗咳嗽变异性哮喘的目的。

参 考 文 献

- [1] 2009 年中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(6): 407-413.
- [2] 刘秋海, 徐浩岑, 邢燕如, 等. 咳嗽变异性哮喘在儿童慢性咳嗽中发病率的调查研究[J]. 中国医刊, 2014, (6): 67-69.
- [3] Nakajima T, Nishimura Y, Nishiuma T, et al. Characteristics of patients with chronic cough who developed classic asthma during the course of cough variant asthma: a longitudinal study [J]. Respiration, 2005, 72(6): 606-611.
- [4] Nishitsuji M, Fujimura M, Oribe Y, et al. Guinea pig model for cough variant asthma and role of tachykinins [J]. Exp Lung Res JT-Experimental lungResearch, 2004, 30(8): 723-737.
- [5] Lampinen M, Carlson M, Hakansson L D, et al. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease [J]. Allergy, 2004, 59(8): 793-805.
- [6] 李迎利, 尚宁, 周民伟. 透明质酸对支气管哮喘患者嗜酸细胞的影响 [J]. 临床肺科杂志, 2001, 6(1): 15.
- [7] 周卫卫, 凌杰. 孟鲁司特对哮喘患儿血清白三烯 C4 和尿白三烯 E4 水平的影响及疗效观察 [J]. 中国药物与临床, 2013, 13(11): 1459-1460.

(收稿日期: 2015-06-24)

(本文编辑: 董历华)