

异功散早期干预对支气管哮喘幼年小鼠气道炎症的影响

刘华 欧阳学认 张雪丽 高欣 戴玲颖 范茜茜 陈思韵 胡泽涛

【摘要】 目的 通过动物实验,研究异功散早期干预对支气管哮喘幼年小鼠气道炎症的影响,以探索中医药防治支气管哮喘的机制。**方法** 选取 7 日龄 BALB/c 品系雌性小鼠 24 只,随机分为空白对照组、模型对照组和异功散组共 3 组。以卵蛋白诱导法建立幼年小鼠的哮喘模型,观察幼鼠的一般情况、肺组织病理(HE 染色)及肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF)中白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor-beta1, TGF- β 1)和 IL-17 的变化(ELISA 法)。**结果** 与模型对照组比较,异功散组的肺组织损伤减轻;与空白对照组比较,模型对照组和异功散组 BALF 中 IL-10、TGF- β 1 均显著降低($P < 0.05$),而 IL-17 则显著增高($P < 0.05$);与模型对照组比较,异功散组 IL-10 显著增高($P < 0.05$),IL-17 降低($P < 0.05$),而 TGF- β 1 则无显著差异($P > 0.05$)。**结论** 异功散可减轻哮喘模型幼鼠的气道炎症,提高肺泡灌洗液中 IL-10、减少 IL-17 的含量。

【关键词】 异功散; 支气管哮喘; 气道炎症; 细胞因子; 动物实验

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.10.002

Effect of early intervention with Yi Gong powder on airway inflammation in young mice with bronchial asthma LIU Hua, OUYANG Xueren, ZHANG Xueli, et al. The first affiliated hospital of Guangzhou university of traditional Chinese medicine, Guangdong 510000, China
Corresponding author: LIU Hua, E-mail: liuhua0321@126.com

【Abstract】 Objective To study the effects of early intervention with Yi Gong powder on airway inflammation in bronchial asthma rats, in order to explore the mechanism of traditional Chinese medicine in preventing and treating bronchial asthma. **Methods** 24 female BALB/c mice of 7 days old were selected, and the mice were randomly divided into the blank control group, the model control group and the Yi Gong powder group. Asthma model of young mice was induced by ovalbumin. The general situation, pulmonary pathology(HE stain), and the changes of interleukin 10(IL-10), interleukin 17(IL-17) and transforming growth factor-beta1(TGF- β 1) in bronchial alveolar lavage fluid(BALF) was observed. **Results** (1) Compared with model group, the lung tissue injury was alleviated in the Yi Gong powder group($P < 0.05$). (2) Compared with the blank control group, IL-10 and TGF- β 1 was markedly decreased in the model control group and the Yi Gong powder group($P < 0.05$) while the IL-17 were markedly increased($P < 0.05$). Compared with model control group, IL-10 of the Yi Gong powder group was markedly increased($P < 0.05$) while the IL-17 was markedly decreased($P < 0.05$), and there was no significance in TGF- β ($P > 0.05$). **Conclusion** Yi Gong powder can increase the content of IL-10, and decrease the content of IL-17 in bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic mice.

【Keywords】 Yi Gong powder; Bronchial asthma; Airway inflammation; Cell factor; Animal experiment

基金项目: 广东省自然科学基金(2014A030313410)

作者单位: 510000 广州中医药大学第一附属医院(刘华、欧阳学认、张雪丽);广州中医药大学实验中心(高欣);广州中医药大学第一临床医学院(戴玲颖、范茜茜、陈思韵、胡泽涛)

作者简介:刘华(1975-),女,博士,副主任中医师。研究方向:小儿肺脾相关疾病。E-mail: liuhua0321@126.com

支气管哮喘(以下简称哮喘)是儿童时期常见的慢性变态反应性疾病,在婴幼儿期,临床儿科医师难以做出明确诊断。有资料显示,婴幼儿期的哮喘发病率逐年攀升,其中约 50% 儿童持续哮喘患者的喘息症状发生在 3 岁以前,且较诸年长儿控制情况较差^[1]。吸入糖皮质激素(inhaled corticosteroid, ICS)等治疗可对儿童哮喘的症状和肺功能明显改善,但对于疾病的自然病程,并不能改变^[2]。此外,由于鉴别诊断方面的障碍,对于婴幼儿期的反复喘息,是否及何种程度上使用 ICS,仍存在较大争议^[3]。因此,如何更有效地早期防治哮喘,特别是婴幼儿哮喘,是临床上急待解决的难题。本实验通过研究“培土生金法”的代表方—异功散早期干预对哮喘幼年小鼠气道炎症的影响,探索中医药防治哮喘的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

7 日龄 BALB/c 雌性小鼠,SPF 级,体质量(3.35 ± 0.45)g,由广州中医药大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(粤)2013-0034。采用简单随机分配法,分成 3 组:空白对照组、模型对照组及异功散组,每组 8 只。本实验对动物的处理符合动物伦理学要求。

1.2 药物及试剂

异功散按《小儿药证直诀》的原方(人参、茯苓、白术、陈皮、甘草)1:1:1:1:1 比例配方,各 6 g,由广州中医药大学第一附属医院中药房提供,制成水煎剂,并配成含生药约 1 g/mL 的溶液,充分搅匀,贮于 4℃ 冰箱备用。

白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10)、转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)及 IL-17 的酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒,上海酶研生物科技有限公司,批号:EK-M20156。

1.3 仪器

CMIAS 系列多功能真彩分析系统,由北京麦克奥迪图像技术有限公司提供。

1.4 造模与给药

异功散组和模型对照组于第 1、12 天腹腔注射由 10% 卵蛋白溶液 0.1 mL 与等体积佐剂液态铝混合的致敏液 0.2 mL,第 18~23 天将致敏小鼠置于 20 cm×20 cm×30 cm 的密闭容器,用 3% 的卵蛋白溶液 10 mL 雾化,每天 1 次,吸入 20 分钟。小鼠出

现喷嚏频繁、安静少动、烦躁不安、弓背、抓鼻、前肢缩抬、呼吸急促、喘息等,是哮喘造模成功的标准。

建模同时,异功散组以每只每次 15 g/kg 体重灌服异功散水煎液(稀释为 25 mL/kg 后灌服),每天灌胃给药 1 次,连续 24 天。模型对照组和空白对照组均灌以等量生理盐水。

1.5 标本采集与指标测定

造模结束,第 24 天处死小鼠:暴露胸腔,仰卧位,留置针插入气管,结扎右侧的主支气管,用 0.3 mL 生理盐水,灌洗 5 次,支气管肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF),4℃ 离心后取上清液,−20℃ 保存备用。摘取未灌洗的左肺组织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋并切片后行 HE 染色,在镜下观察肺组织病理学变化。

ELISA 法检测 BALF 中 IL-10、IL-17 和 TGF- $\beta 1$ 水平,具体步骤按说明书进行。

1.6 统计学处理

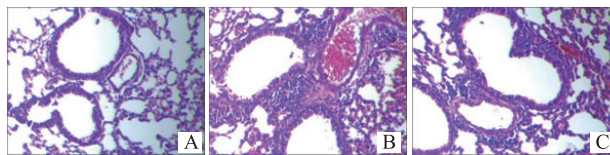
数据采用统计软件 SPSS 19.0 分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,服从正态分布且方差齐用单因素方差分析,不符合正态用 Mann-Whitney 非参数检验进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对小鼠肺组织病理形态学的影响

实验结束后,异功散组死亡 1 只,剩余 7 只,其平均体重为(7.75 ± 0.64)g;模型对照组及空白对照组均无死亡,其平均体重分别为(7.45 ± 0.50)g 及(7.50 ± 0.62)g。

HE 染色后,空白对照组中,小鼠肺组织病理变化不明显,组织结构完整清晰,肺泡的结构完整,无炎性细胞浸润,见图 1A;模型对照组可见明显病理变化,支气管管壁的结构破坏,肺泡壁的毛细血管扩张、充血,炎症细胞如嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等大量浸润,见图 1B;异功散组中,肺组织和支气管管壁,可见轻到中度损伤,肺泡壁毛细血管有轻中度扩张、充血,炎症细胞如嗜酸性粒细胞和淋巴细胞部分浸润,见图 1C。



注:A:空白对照组;B:模型对照组;C:异功散组

图1 对哮喘小鼠肺组织影响的病理 HE 切片图

2.2 BALF 中 IL-10、TGF- β 1 和 IL-17 含量的比较

与空白对照组比较,模型对照组和异功散组 BALF 中 IL-10、TGF- β 1 均显著降低($P<0.05$),而 IL-17 则显著增高($P<0.05$);与模型对照组比较,异功散组 IL-10 显著增高($P<0.05$),IL-17 降低($P<0.05$),而 TGF- β 1 则无显著差异($P>0.05$),见表 1。

表 1 各组 BALF 中细胞因子的浓度($\bar{x}\pm s$,pg/L)

	<i>n</i>	IL-10	TGF- β 1	IL-17
空白对照组	8	32.61 \pm 6.54	150.81 \pm 19.15	24.06 \pm 3.87
模型对照组	8	17.65 \pm 2.55 ^a	43.02 \pm 7.99 ^a	79.67 \pm 5.26 ^a
异功散组	7	25.06 \pm 3.70 ^{ab}	46.53 \pm 11.56 ^a	45.14 \pm 4.80 ^{ab}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

4 讨论

儿童哮喘的发病机制复杂,目前尚未完全明确。机体辅助性 T 淋巴细胞 1 型(Th1)/辅助性 T 淋巴细胞 2 型(Th2)平衡失调的理论并不能完全解释哮喘的发病,而 CD⁴⁺CD²⁵⁺调节性 T 细胞(CD⁴⁺CD²⁵⁺Treg)、辅助性 T 淋巴细胞 17 型(Th17)细胞和哮喘的相关性,越来越得到重视^[4]。CD⁴⁺CD²⁵⁺Treg 细胞通过分泌 IL-10、TGF- β 等,抑制 T 细胞增殖,抑制 Th1、Th2 的相关细胞因子反应,可减轻炎症^[5]。Th17 细胞分泌前炎症细胞因子、哮喘发病相关细胞因子网络的重要成员—IL-17,其表达在哮喘发生上调,可参与哮喘气道重构^[6]。

中医药治疗哮喘历史悠久,尤其是在哮喘防治方面有独特优势。中医藏象学说的重要内容之一——“肺脾相关”理论,在指导肺系相关疾病的诊断及治疗意义重大。大多数学者认为,“痰”为哮喘病之夙根,只是哮喘发作的病理因素,而脾胃虚弱则是贯穿哮喘病发作期与缓解期总病程的核心病机,因此,培土生金法广泛应用于哮喘病的预防治疗。小儿具有“脏腑娇嫩,形气未充”的生理特点,临床所见小儿哮喘单纯肾虚者较少,而其“肺常不足”“脾常虚”的生理、病理特点更显突出。因此,培土生金法也成为防治儿童哮喘的重要治法。运用培土生金法的原则治疗哮喘,在提高哮喘患儿机体免疫力、减少哮喘发作次数、减轻发作程度、提高生存质量方面有其突出优势^[7-9]。在该理论指导下,异

功散—作为调理小儿脾胃功能的经典方剂之一,也被广泛运用于支气管哮喘等肺系疾病的防治。

本研究结果提示,异功散的早期防治,减轻了哮喘模型幼年小鼠的气道炎症反应程度,这可能与其对 CD⁴⁺CD²⁵⁺Treg/Th17 功能的调控相关(例如:增强 IL-10 或降低 IL-17 的表达)。既往有研究表明,健脾益气方药,调节哮喘模型大鼠的 Th1/Th2 失衡,对体内嗜酸性粒细胞趋化因子的水平有降低作用,能减轻肺组织炎症细胞的局部浸润,抑制气道的炎症,减少哮喘发作^[10],本研究结果与此相一致。

参 考 文 献

- [1] Kaiser SV, Huynh T, Bacharier LB. Preventing Exacerbations in Preschoolers With Recurrent Wheeze: A Meta-analysis [J]. Pediatrics, 2016, 137(6):e20154496.
- [2] Guibert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, et al. Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma [J]. N Engl J Med, 2006, 354(19):1985-1997.
- [3] Beigelman A, Bacharier LB. Management of Preschool Children with Recurrent Wheezing: Lessons from the NHLBI's Asthma Research Networks [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2016, 4(1):1-8.
- [4] Shi YH, Shi GC, GC, et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in Patient with allergic asthma [J]. Chin Med (Engl), 2011, 124:1951-1956.
- [5] Hartl D, Koller B, Mehlhon AT, et al. Quantitative and functional impairment of Pulmonary CD4 + CD25hi regulatory T cells in Pediatric asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 119(5):1258-1266.
- [6] Oboki K, Ohno T, Saito H, et al. Th17 and allergy [J]. Allergol Int, 2008, 57(2):121-134.
- [7] 王爱华, 南丽娟, 赵霞. 中医药治疗小儿哮喘缓解期的研究进展 [J]. 中国中医基础杂志, 2015, 21(9):1196.
- [8] 王盛隆, 杨爽, 王强, 等. 支气管哮喘中医药全病程治疗方案研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3):699-701.
- [9] 顾敏勇, 尚莉丽, 孙彦丽. 健脾补肺化痰方对小儿支气管哮喘缓解期肺功能的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(1):8-11.
- [10] 许珂玉, 王艳杰, 赵丹玉, 等. 补脾益气方药对哮喘大鼠嗜酸性粒细胞趋化因子表达的影响 [J]. 山东医药, 2012, 52(24):4-7.

(收稿日期: 2017-04-14)

(本文编辑: 禹佳)