

咳喘停贴剂穴位贴敷对慢性哮喘大鼠肺组织促炎细胞因子的影响

刘兰英¹ 乔明² 高峰¹ 王和生¹ 孙建华¹

(1.江苏省中医院,江苏南京 210029; 2.连云港市中医院,江苏连云港 222001)

摘要 目的:观察咳喘停贴剂穴位贴敷治疗对慢性哮喘大鼠 Th2 下游促炎细胞因子含量的影响。方法:48 只 Wistar 大鼠随机分成 6 组:正常组、哮喘模型组、地塞米松组、假穴位贴敷组、穴位贴敷组、布地奈德组,每组 8 只。除正常组外,其余各组大鼠用卵蛋白(OVA)致敏和激发来制备慢性过敏性哮喘大鼠模型。正常组和哮喘模型组正常喂养不做其他处理,地塞米松组予地塞米松腹腔注射,布地奈德组予布地奈德雾化吸入,假穴位贴敷组予凡士林贴剂贴敷于双侧背俞穴,穴位贴敷组予咳喘停贴剂贴敷于双侧背俞穴。各组大鼠均予相应治疗 14d 后,观察肺组织细胞学变化及支气管肺泡灌洗液中促炎细胞因子 IL-4、IL-6、IL-13 含量差异。结果:正常组大鼠肺泡形态规则,肺间质少量炎性细胞浸润;模型组和假穴位贴敷组大鼠肺泡腔缩小,其内见炎性细胞浸润及黏液栓,肺间质增厚,可见大量炎性细胞浸润;其余各用药组均较模型组有所改善。与模型组比较,正常组、地塞米松组、布地奈德组大鼠肺泡灌洗液中 IL-4、IL-6、IL-13 含量明显降低;穴位贴敷组支气管肺泡灌洗液中 IL-6、IL-13 含量明显降低,而 IL-4 含量有降低趋势,与地塞米松组、布地奈德组比较无统计学差异。结论:咳喘停穴位贴敷可通过显著降低慢性哮喘大鼠支气管肺泡灌洗液中促炎细胞因子 IL-6、IL-13 含量来减轻慢性气道炎症。

关键词 咳喘停贴剂 慢性哮喘 穴位贴敷 促炎细胞因子 肺 病理学 Wistar 大鼠

中图分类号 R562.250.5 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2015)02-0077-03

慢性气道炎症是支气管哮喘反复发作的主要病理机制之一。辅助性 T 细胞 2(Th2)产生以白介素 4、6、13(IL-4、IL-6、IL-13)等为代表的促炎细胞因子,导致慢性气道炎症加重^[1]。吸入性糖皮质激素是目前主要的抗炎治疗方法之一,但其长期使用会出现激素依赖与抵抗现象,导致疗效不佳,病情易反复发作,患者依从性较差^[2]。我们前期研究表明,咳喘停贴剂以白芥子、生甘遂、延胡索、细辛为主药,在三伏天贴敷于肺、脾、肾三脏背俞穴可有效减轻哮喘复发频率和程度。为探索其作用机制,本研究建立慢性过敏性哮喘大鼠模型,观察咳喘停贴剂穴位贴敷治疗对 IL-4、IL-6、IL-13 等促炎细胞因子含量的影响,从而探讨该疗法对 Th2 相关气道炎症作用的可能调节机制,并与地塞米松和布地奈德作对照。

1 实验材料

1.1 实验动物 选择 SPF 级雄性 wistar 大鼠 48 只,上海西普尔必凯实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK 沪 20080016,6 周龄,体重(160±20)g,

在室温(18~22)℃、湿度 28%环境中饲养 1 周后使用。

1.2 实验仪器 超声雾化器(型号:鱼跃 402AI);自制非完全密闭玻璃箱(30cm×40cm×50cm);Leica 生物组织自动脱水机、石蜡包埋机、全自动轮转石蜡切片机、全自动脱水机、自动染色机等(德国莱卡公司);雅博 200 型摊烘烤片机(常州雅博电子设备有限公司);DHG-9203 型电热恒温干燥鼓风干燥箱(上海精密实验设备厂);Olympus BX-51 型病理图像采集系统(日本奥林巴斯公司);台式恒温振荡器(上海精宏实验设备有限公司,型号:THZ-312);BioTek 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司,型号:240351)等。

1.3 实验试剂 卵蛋白(OVA):美国 sigma 公司生产(规格:Grade V 5503,纯度≥98%);氢氧化铝(分析纯,天津博迪化工股份有限公司);地塞米松磷酸钠注射液(1mL:5mg,山西晋新双鹤药业);布地奈德混悬液(2mL:1mg,阿斯利康制药有限公司);TO 透明剂(广西岑溪市松香厂);伊红 Y 二钠盐、苏木素

基金项目:国家自然科学基金(81102632)

(北京鼎国生物技术有限公司)。以下试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司:IL-4 (批号:KGER030),IL-6(批号:KGERC003),IL-13(批号:KGER037)。

1.4 药物 咳喘停贴剂,由南京中医药大学附属医院制剂部制备,药物组成:白芥子、延胡索、生甘遂、细辛、麻黄、葶苈子、肉桂、丁香、猪牙皂,分别打粉过 200 目筛,按 2:2:1:1:1:1:1:1:1 比例充分混合后加生姜汁、凡士林,做成直径为 1cm 药丸,重约 0.3g。假贴剂:面粉加同上比例的生姜汁、凡士林做成直径为 1cm 的药丸,重约 0.3g。地塞米松磷酸钠注射液:5mg/支。布地奈德雾化混悬液:1mg/支。

2 实验方法

2.1 实验分组 大鼠 48 只,称重后随机分成 6 组,分别为正常组、哮喘模型组、地塞米松组、假穴位贴敷组、穴位贴敷组、布地奈德组,每组 8 只。

2.2 建立慢性哮喘大鼠模型 除正常组外,其余各组大鼠参考 Palmans^[3]方法制备卵蛋白(OVA)致敏慢性哮喘气道炎症大鼠模型。从第 1 天首次接受 OVA 注射至第 14 天为致敏阶段,第 15 天到第 56 天为持续激发阶段(6 周)。致敏阶段:第 1 天予大鼠腹腔注射 OVA 和氢氧化铝混合溶液 1mL(含 OVA10mg、氢氧化铝 100mg);第 8 天再次腹腔注射加强致敏。激发阶段:第 15 天开始,将大鼠放于自备密闭雾化箱内,予 1%OVA 溶液雾化吸入,每次 30min,隔日 1 次,其间观察大鼠喷嚏、呼吸、口唇、腹部及活动度等反应,直到第 56 天雾化结束。

正常组大鼠活动正常,无喘促等表现,其余各组大鼠表现为毛发暗淡、竖毛、倦怠。雾化激发时部分大鼠出现典型哮喘样发作,如呼吸急促、喘息、点头呼吸、腹部翕动、行动减少,并随着激发次数增加症状逐步加重。部分大鼠出现阵发性喷嚏,随着激发次数增加喷嚏次数增加。

2.3 分组治疗 第 57 天起对各组大鼠进行相应处理。正常组、哮喘模型组:正常喂养不做其他处理;地塞米松组:予地塞米松每日 1mg/kg,腹腔注射,每日 1 次;布地奈德组:予布地奈德 10mg (20mL) 雾化吸入 30min,共治疗 14d;假穴位贴敷组:予假贴剂贴敷于双侧肺俞、脾俞、肾俞穴,取穴方法参考李忠仁主编的《实验针灸学》^[4],在穴区脱毛后将药丸压成直径约 1cm 圆形,用胶布固

定到穴位上,6h 后去除,每日 1 次,共治疗 14d^[5];穴位贴敷组:予咳喘停贴剂贴敷于上述穴位,方法同假穴位贴敷组。

2.4 观察指标及检测方法 用 10%水合氯醛(3.5mL/kg)腹腔注射麻醉。大鼠麻醉后,消毒皮肤,打开胸腔,夹闭其右主支气管,从气管缓缓注入生理盐水 4mL 灌洗左肺,反复 3 次,离心,取其上清液并进行分装,ELISA 法检测支气管肺泡灌洗液中 IL-4、IL-6、IL-13 含量,按试剂盒说明进行操作。取右肺中叶,在 4℃ 生理盐水中漂洗干净,立即投入 10%的甲醛溶液中固定 24h,石蜡包埋,切片。HE 染色,观察肺组织形态学表现。

2.5 统计学方法 采用 SPSS20.0 统计软件,检测结果以($\bar{x} \pm s$)表示,应用正态分布,方差齐的组间差异性比较采用单因素方差分析;非正态分布或者方差不齐,采用多个独立样本的非参数检验(Kruskal-Wallis H 检验)。P<0.05 表示有显著性差异。

3 实验结果

3.1 各组大鼠肺组织形态学表现 见图 1。正常组大鼠肺泡形态规则,肺间质少量炎性细胞浸润。模型组大鼠肺泡腔缩小,其内见炎性细胞浸润及黏液栓,肺间质增厚,可见大量炎性细胞浸润。假穴位贴敷组与模型组大鼠相似,肺泡腔缩小,其内见炎性细胞浸润及黏液栓,肺间质增厚,可见大量炎性细胞浸润。与模型组比较,地塞米松组大鼠可见肺大泡,肺泡内黏液栓明显减少,肺间质略增厚;穴位贴敷组大鼠可见部分肺大泡,肺泡腔内少量黏液栓,肺间质略增厚,其内少量炎性细胞浸润;布地奈德组大鼠支气管腔内黏液栓减少,肺间质增厚,可见炎性细胞浸润。

3.2 各组大鼠支气管肺泡灌洗液中 IL-4、IL-6、IL-13 等促炎细胞因子含量比较 见表 1。与正常组比

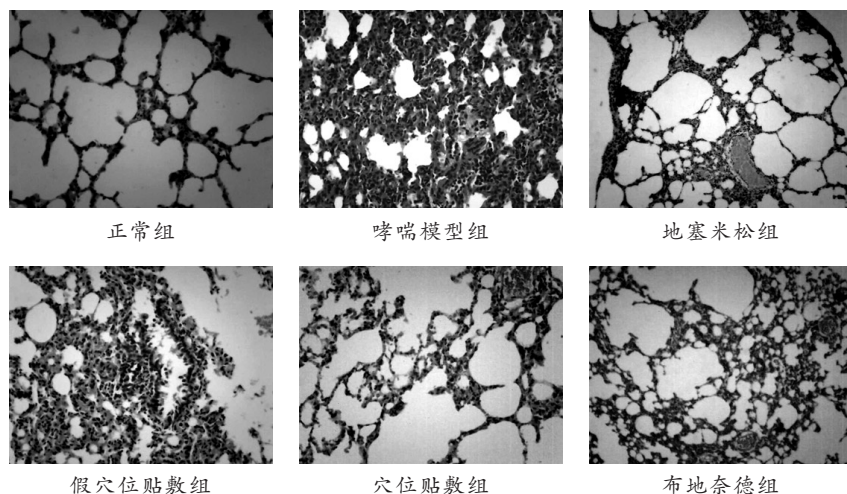


图 1 各组大鼠肺组织病理改变(HE 染色,10×10)

较,哮喘模型组、假穴位贴敷组大鼠支气管肺泡灌洗液中 IL-4、IL-6、IL-13 含量明显升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,地塞米松组、布地奈德组大鼠 IL-4、IL-6、IL-13 含量明显降低 ($P<0.05$);穴位贴敷组 IL-4 含量有降低趋势,IL-6、IL-13 含量明显降低 ($P<0.05$)。穴位贴敷组与地塞米松组、布地奈德组上述促炎细胞因子含量比较无统计学差异 ($P>0.05$)。

表1 治疗后各组大鼠支气管肺泡灌洗液中 IL-4、IL-6、IL-13 含量比较 ($\bar{x}\pm s$) pg/mL

组别	动物数(只)	IL-4	IL-6	IL-13
正常组	8	1.45±0.44 [#]	21.98±1.38 [#]	25.07±3.92 [#]
哮喘模型组	8	4.46±2.93 [*]	24.87±1.38 [*]	34.40±4.13 [*]
假穴位贴敷组	8	3.03±1.03 [*]	23.80±2.14 [*]	37.04±3.68 [*]
地塞米松组	8	1.74±0.50 [#]	22.14±2.01 [#]	27.99±3.30 [#]
布地奈德组	8	1.98±1.11 [#]	22.57±1.61 [#]	28.75±3.55 [#]
穴位贴敷组	8	2.34±1.35	22.94±1.99 [#]	25.60±6.52 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

4 讨论

IL-4 是 Th2 特征性细胞因子,能诱导 B 细胞合成 IgE,促使组胺、前列腺素、白三烯释放,导致支气管平滑肌收缩,血管扩张、通透性增加,气道黏液分泌增加,则患者出现喘息、气急、胸闷或咳嗽。研究表明,哮喘模型小鼠支气管肺泡灌洗液中 IL-4、IL-13 水平及嗜酸性粒细胞计数均较正常小鼠显著升高^[6],本研究亦证实了此结果。IL-6 由气道巨噬细胞及支气管上皮细胞产生,是引起气道炎症的重要细胞因子之一。樊德利等^[7]研究显示,哮喘患者急性发作期 IL-6 含量显著高于缓解期及健康人群。IL-13 促进了哮喘气道上皮杯状细胞化生和黏液的高分泌。嗜酸性粒细胞是支气管黏膜损伤的主要效应细胞,其释放颗粒(内含碱性蛋白、阳性蛋白及白三烯)导致内皮细胞损伤和气道高反应性,进一步加重气道炎症反应。本研究发现,哮喘停穴位贴敷可显著降低哮喘模型大鼠支气管肺泡中 IL-6、IL-13 含量,此效应与地塞米松及布地奈德相当,而对 IL-4 含量影响不大。由此推测,哮喘停贴剂可能通过降低支气管肺泡中 IL-6、IL-13 含量来发挥抗炎作用。

中医学认为,慢性哮喘多为冷哮,与肺、脾、肾关系密切。若三脏之阳气不足,宿痰无以清除,则为喘疾也。其治疗多参照《张氏医通·诸气门下·喘》:“冷哮……夏月三伏中,用白芥子涂法,往往获效。方用白芥子净末一两,延胡索一两,甘遂、细辛各半两,共为细末,入麝香半钱,杵匀,姜汁调涂肺俞、膏肓、百劳等穴……十日后涂一次,如此三次,病根去

矣。”“治脏者治其俞”,本研究选取肺俞、脾俞、肾俞三脏背俞穴,调整肺、脾、肾三脏功能。哮喘停贴剂以《张氏医通》中白芥子、延胡索、甘遂、细辛为基础,加以葶苈子、肉桂、麻黄、丁香等辛温之品,具有温肺化痰、行气利气、消肿散结的功效。研究表明,白芥子主要成分是硫代异氰酸对羟苄酯,小剂量即能引起反射性增加气管分泌,有祛痰的作用,其水解产物白芥油可导致皮肤充血、发泡^[8];甘遂水煎剂提取物可使实验小鼠脾脏增重和胸腺减轻,能抑制实验小鼠抗羊红细胞抗体产生,并可明显抑制由 SRBC 诱导的迟发型超敏反应^[9]。

本研究结果表明,哮喘停贴剂可以明显改善慢性哮喘模型大鼠肺泡组织病理变化,其可能的机制是通过降低支气管肺泡中 IL-6、IL-13 含量。在今后的研究中将进一步关注以 Th1/Th2 为核心的免疫调节失衡在慢性气道炎症中的作用,以及哮喘停贴剂对其的调节作用。

参考文献

- [1] 马小娟,薛黎,丁剑冰.白细胞介素与哮喘.细胞与分子免疫学杂志,2012,28(10):1117
- [2] 张文艳,刘宝欣,孙白云.吸入低剂量布地奈德和口服低剂量茶碱控释片联合应用治疗中度支气管哮喘的临床观察.临床荟萃,2007,22(18):1349
- [3] Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161 (2 Pt1):627
- [4] 李忠仁.实验针灸学.北京:中国中医药出版社,2003:325
- [5] 赵国桢,嵇波.穴位贴敷对哮喘影响的近5年动物实验研究情况分析.针灸临床杂志,2013,29(10):60
- [6] 王桂兰,鲁继荣,刘翔腾.哮喘模型 IL-4、IL-13 与肺组织炎症指标及 STAT6 的相关性研究.临床儿科杂志,2010,28(8):772
- [7] 樊德利,赵翊,李伟.SP-A、TNF- α 、IL-6、IL-8 在支气管哮喘中的检测与分析.中国卫生检验杂志,2011,21(2):450
- [8] 冯宝民,余正江,李帆,等.白芥子化学成分的研究.大连大学学报,2004,25(6):43
- [9] 李嗣英.甘遂对小鼠免疫功能的影响.中国药理通讯,1989,6(2):10

第一作者:刘兰英(1974-),女,研究生学历,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:穴位贴敷治疗支气管哮喘疗效评价及作用机理研究。bluelany@163.com

收稿日期:2014-10-12

编辑:吴宁