

“平喘汤”对哮喘大鼠肺组织 EOS 凋亡及 Bax 蛋白表达的影响研究

冯高华^{1,2} 刘美秀¹ 惠晓丹² 刘臻² 朱晓舟² 朱虹²

(1.张家港市中医医院,江苏张家港215600;2.扬州大学医学院,江苏扬州225000)

摘要 目的:观察平喘汤对哮喘大鼠肺组织嗜酸性粒细胞(EOS)凋亡及Bax蛋白表达的影响,探讨平喘汤治疗哮喘的相关机制。方法:SD大鼠随机分为模型组、地塞米松组、正常组和平喘汤低、中、高剂量组。除正常组,其余各组大鼠以卵清蛋白(OVA)致敏、激发制备哮喘大鼠模型。于第1次哮喘激发(造模第21天)开始各组连续灌胃给予相应药物或生理盐水14d。观察各组大鼠一般状况、肺组织病理形态,DNA断裂的原位末端标记法(TUNEL)测定肺组织EOS原位表达;免疫组化法(Western blot)检测Bax蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠肺组织有明显的病理变化,肺组织EOS呈强阳性表达($P<0.01$),Bax蛋白表达量明显减少($P<0.01$)。经药物干预后,各治疗组哮喘症状有所减轻,肺组织病理变化呈不同程度的改善。各治疗组大鼠肺组织EOS表达明显低于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),Bax蛋白表达明显高于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),其中平喘汤高剂量与地塞米松改善效果更为明显,且其改善效果相当。结论:平喘汤能够通过促进Bax蛋白表达,诱导EOS凋亡以减少肺组织炎性细胞浸润,进而缓解哮喘气道炎症。

关键词 平喘汤 哮喘 EOS凋亡 Bax蛋白 肺 大鼠 实验研究

中图分类号 R562.250.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2018)10-0071-04

基金项目 江苏省中医药局科技项目(YB2015106)

支气管哮喘(哮喘)是由多种炎性细胞和炎性介质参与的气道慢性炎症性疾病。调查显示,目前全球哮喘人数已超过5%,且患病率与病死率均有持续上升的趋势,严重影响患者的身心健康^[1]。吸入性皮质类固醇激素和 β -2激动剂常作为哮喘患者的

一线治疗药物^[2],但存在价格较高、治疗周期长、副作用明显或停药后症状加重等问题^[3]。平喘汤为临床经验方,是以三子养亲汤为基础,配合宣肺、平喘等药物加减而成。既往的临床研究表明,本方可以改善支气管哮喘患者急性发作期的肺功能^[4]。本实

综上所述,本实验在小儿退热合剂原质量标准基础上建立了黄柏和钩藤的薄层色谱鉴别方法及大黄中5种蒽醌类成分的HPLC含量测定方法。建立的方法经3批样品验证考察,专属性强,阴性无干扰,灵敏度高,重现性好。今后的研究将进一步建立黄柏、钩藤等饮片成分同时测定的方法,可以更科学、更合理、更全面地进行质量评价。

参考文献

- [1] 崔华,杨祥正.中药退热合剂灌肠治疗小儿急性上呼吸道感染发热82例[J].中国中医药信息杂志,2007,14(3):60.
- [2] 胡晓丹,解玲芳.小儿退热滴肠液治疗小儿外感高热42例[J].山东中医杂志,2011,30(7):478.
- [3] 张丁丁,隋军,郭春梅.医院制剂降糖丸的鉴别研究[J].黑龙江医药,2011,24(3):362.
- [4] 张庆莲,黄娟,皮凤娟,等.硝矾洗剂薄层色谱鉴别及微生物

限度检查法的建立[J].西北药学杂志,2017,32(6):722.

- [5] 凌勇,汪艳艳,陈广通,等.高效液相色谱法测定莲花清瘟胶囊中大黄5种成分的含量[J].中医学报,2012,27(9):1157.
- [6] 许乾丽,茅向军,宋晓宁,等.HPLC法同时测定六味安消胶囊中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J].药物分析杂志,2010,30(10):1841.
- [7] 张子龙,魏刚,刘东辉,等.大黄及其醇提液HPLC特征图谱相关性研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(21):69.

第一作者:王迅(1980—),男,本科学历,副主任中医师,从事中药制剂质量标准研究。

通讯作者:张源,本科学历,主任中医师。
2217764733@qq.com

收稿日期:2018-05-04

编辑:吴宁

验通过研究平喘汤对哮喘大鼠嗜酸性粒细胞(EOS)凋亡及Bax蛋白表达的影响,探索本方防治哮喘的机制。

1 实验材料

1.1 动物 健康SPF级SD大鼠72只,雌雄各半,6~8周龄,体重(196.6±11.2)g,无鸡卵清蛋白饲料喂养,饲养环境为温度21~25℃,湿度52.1%~64.2%,饲养于扬州大学实验动物中心。实验大鼠购买于南通大学实验动物中心,许可证编号:SCXK(苏)2014-0001。

1.2 药品 平喘汤由炙麻黄10g,杏仁10g,葶苈子10g,苏子10g,莱菔子15g,白芥子10g,枳壳10g,桔梗6g,地龙30g,僵蚕10g,五味子6g组成。中药饮片由张家港市中医医院中药房提供,经中药制剂室制成灭菌浓煎密封制剂,置于250mL盐水瓶中,4℃保存备用。地塞米松片(0.75mg/片,辰欣药业股份有限公司,国药准字H37021969)以生理盐水溶解备用。

1.3 试剂与仪器 TUNEL凋亡试剂盒,美国罗氏,POD货号:11684817910;鸡卵清蛋白(OVA),美国Sigma公司;氢氧化铝凝胶,遂成药业股份有限公司;IL-5 ELISA试剂盒,MSK公司,批号:KT30409;Anti-Bax Antibody,武汉博士德生物工程有限公司,货号:BA315;HRP标记的羊抗兔(Bio-world公司);切片石蜡,上海信然生化试剂有限公司;伊红染液,武汉博士德生物工程有限公司;苏木素染液、中性树脂,凯基生物公司。

超净工作台,苏州苏净集团安泰公司;电子天平,上海第二天平仪器厂;显微镜NikonEclipse E200,日本尼康公司;黏附载玻片,江苏恒泰实验器材有限公司;推拉式石蜡切片机,德国莱卡公司;超声雾化器,403C型,YZB/苏0024-2012;光学显微镜,日本,OLYMPUS;全自动酶标仪,680型,美国BIO-RAD。

2 实验方法

2.1 分组与造模 随机将实验动物分为6组,每组12只,分别为模型组、正常组、地塞米松组和平喘汤低、中、高剂量组,每组编号后单笼饲养。除正常组外,其余各组大鼠均采用OVA制备哮喘模型。分别于致敏过程的第0、7、14天腹腔注射含有20μg OVA和20mg氢氧化铝凝胶的0.9%氯化钠混合液共200μL进行致敏^[5],正常组腹腔注射相同体积蒸馏水。哮喘组和治疗组从第21天开始每日给予雾化吸入5% OVA激发液诱发哮喘,持续7d,每日1次,每次持续约0.5h,正常组行雾化吸入0.9%NaCl。

造模大鼠出现抖毛、前肢挠鼻,同时有点头呼吸、呼吸急促及站立不稳、腹肌抽搐等症状,提示哮喘大鼠造模成功。

2.2 干预处理 各治疗组均从第1次哮喘激发开始(造模第21天)每日雾化后予灌胃给药:平喘汤低、中、高剂量组分别给予相当于生药量4.8g/kg、9.6g/kg、19.2g/kg的药液,地塞米松组给予地塞米松0.001g/kg,正常组及模型组给予等体积生理盐水灌胃,1次/d,连续14d。末次给药24h后,颈椎脱位法处死大鼠,打开胸腹腔,于无菌条件下取出肺组织,肉眼观察其外观,沿矢状面切开成两片,用预冷的无菌PBS液冲洗,除去血液,滤纸拭干,取一半肺组织放在10%福尔马林中固定,制备厚度为0.3cm左右的标本,组织固定时间为24h以内,常规脱水、石蜡包埋、切片,以便进行病理组织学分析。

2.3 指标观察

2.3.1 各组大鼠一般情况 造模前后及末次给药结束后,分别观察各组大鼠一般情况,包括精神、食欲、体重、大便及行为改变等情况。

2.3.2 肺组织病理形态学观察 肺组织经切片后,进行HE染色,封片后于光镜下观察病理形态,并以吸光度(OD)值进行定量分析。

2.3.3 肺组织EOS原位表达检测 肺组织经切片后,用DNA断裂的原位末端标记法(TUNEL)检测EOS表达,检测方法按试剂盒中提供的操作说明严格进行。封片后于光镜下观察EOS表达情况,并以OD值进行定量分析。

2.3.4 肺组织Bax蛋白表达检测 肺组织经切片后,用免疫组化法检测Bax蛋白表达,检测方法按试剂盒中提供的操作说明严格进行。封片后于光镜下观察Bax蛋白表达情况,并以OD值进行定量分析。

2.4 统计学分析 利用GraphPad Prism5软件包及SPSS 16.0系统软件分析数据,结果以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 可认为有统计学差异。

3 实验结果

3.1 各组大鼠行为观察 正常组大鼠呼吸正常,体温恒定,毛发光泽、紧贴皮肤,眼睛明亮,鼻、唇部湿润清洁,行动敏捷,大便正常。模型组及各治疗组大鼠经激发后行为改变明显,表现为精神差、烦躁不安、抖毛、前肢挠鼻,同时有点头呼吸、呼吸急促及站立不稳、腹肌抽搐、二便失禁等。经药物干预后,各治疗组大鼠上述症状较模型组均有不同程度减轻。

3.2 各组大鼠肺组织病理形态比较 正常组大鼠肺组织几乎无炎性细胞浸润,气道黏膜上皮完整,肺泡结构未见明显异常。模型组细支气管管腔狭窄,管壁内有嗜酸粒细胞、肥大细胞和淋巴细胞浸润,红细胞和黏液在肺泡腔中均可见。各治疗组大鼠病理程度较模型组均有不同程度改善,其中地塞米松组和平喘汤高、中剂量组大鼠气道结构损伤明显恢复,支气管管壁厚度、肺组织炎性细胞浸润等病理较模型组明显减轻,见图1。

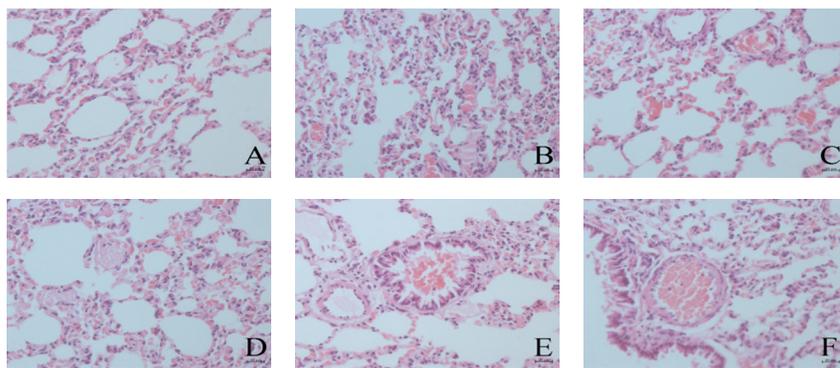


图1 各组大鼠肺组织病理形态(HE,40×)

注:A.正常组;B.模型组;C.地塞米松组;D.平喘汤高剂量组;E.平喘汤中剂量组;F.平喘汤低剂量组

3.3 各组大鼠EOS原位表达、Bax蛋白表达比较 TUNEL法细胞检测结果显示,正常组大鼠肺组织固有细胞胞浆中可见EOS表达的阳性颗粒表达量极少,接近无;模型组EOS表达量明显增多,呈强阳性表达,着色极深(棕黄色颗粒);各治疗组EOS在上述部位表达较模型组均有不同程度下调,但仍高于正常组。见图2。免疫组化显示,正常组大鼠肺组织固有细胞胞浆中可见Bax蛋白表达的阳性颗粒表达量极多,呈强阳性,着色极深(棕黄色颗粒);模型组Bax蛋白表达量明显减少;各治疗组Bax蛋白在上述部位表达较模型组均有不同程度上调,但轻于正常组大鼠。见图3。各组大鼠肺组织EOS原位表达、Bax蛋白表达OD值比较见表1。

表1 各组大鼠肺组织EOS原位表达、Bax蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	剂量(g/kg)	EOS(OD值)	Bax(OD值)
正常组	8	9.6	5837.7±708.2 [#]	40690.1±2520.7 [#]
模型组	8	9.6	30213.4±1203.8 ^{**}	3051.7±250.7 ^{**}
地塞米松组	8	1×10 ⁻³	10253.9±643.0 ^{###}	19669.9±691.3 ^{###}
平喘汤高剂量组	8	19.2	19670.0±1345.6 ^{###}	7013.9±574.5 ^{###}
平喘汤中剂量组	8	9.6	23389.8±1206.8 ^{###△}	5352.8±852.7 ^{###△}
平喘汤低剂量组	8	4.8	24306.0±1016.3 ^{###△}	4944.1±135.4 ^{###△}

注:与正常组比较,*P<0.05,**P<0.01;与哮喘模型组比较,#P<0.05,##P<0.01;与地塞米松组比较,△P<0.05。

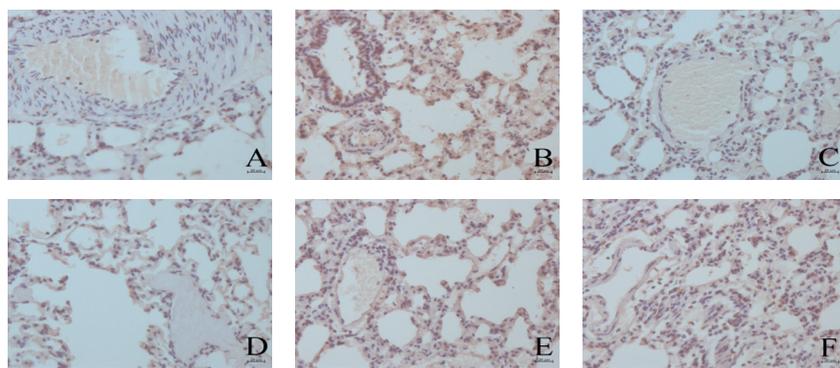


图2 TUNEL法测定各组大鼠肺组织EOS原位表达(40×)

注:A.正常组;B.模型组;C.地塞米松组;D.平喘汤高剂量组;E.平喘汤中剂量组;F.平喘汤低剂量组

4 讨论

哮喘是由多种炎性细胞和炎性介质共同参与并相互作用而导致的气道慢性炎症性疾病。气道炎症是哮喘的本质,是哮喘气道高反应性和反复发作的重要原因之一。为了评估平喘汤的抗炎作用,本课题组用光学显微镜检查了哮喘大鼠肺组织标本。HE染色结果显示,正常组大鼠肺组织无或者极少有炎症,OVA诱导的哮喘模型大鼠肺组织HE染色显示强阳性,即肺组织中存在广泛的炎症以及严重的支气管痉挛、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润,另

外红细胞和黏液在肺泡腔中均可见。经平喘汤干预后,各剂量组大鼠肺组织炎症较模型组均有不同程度的改善,肺泡毛细血管中炎性细胞浸润和红细胞及分泌物均有不同程度的减少,以平喘汤高剂量组尤为明显,其治疗效果与地塞米松相当,而平喘汤中、低剂量疗效逊于高剂量及地塞米松。本实验组织学结果表明,足剂量的平喘汤疗效近似于西药地塞米松,具备一定的抗炎、降低气道高反应的作用。

一般认为, EOS是哮喘患者肺组织中主要参与炎症反应的细胞^[6],且EOS在气道的浸润程度与哮喘病情的严重程度相关,因此,减少肺内嗜酸粒细胞浸润及促进嗜酸粒细胞凋亡是缓解支气管哮喘气道炎症的重要方式^[7]。本实验结果显示,模型组大鼠肺组织中EOS浸润明显高于正常组 ($P<0.01$);各治疗组EOS浸润均明显低于模型组 ($P<0.01$, $P<0.05$),尤以地塞米松及中药高剂量组效果更为明显,提示减少炎症反应中EOS的浸润能缓解炎症反应。哮喘发作时存在EOS凋

亡受抑或EOS凋亡缺陷。细胞凋亡是多方面调控机制的共同结果,若干基因以及细胞因子有着重要的调控作用。其中Bax是Bcl-2家族中促进细胞凋亡的一个重要成员,当Bax大量表达时,细胞出现凋亡增多。EOS的凋亡是由Bax解聚并从胞核或胞质中移至线粒体,线粒体随后释放细胞色素(cytochrome) C,扰乱线粒体膜电位,从而激活半胱天冬酶(caspase),导致EOS凋亡^[8]。本实验结果显示,模型组大鼠肺组织中Bax蛋白表达明显下调,各治疗组Bax蛋白表达明显高于模型组,且以平喘汤高剂量和地塞米松改善作用更为明显。

一般而言,地塞米松所代表的糖皮质激素可直接或间接作用于哮喘发病的多个环节,发挥抗炎抗过敏作用,从而改善哮喘发作的症状^[9]。本实验结果推测,平喘汤可能通过上调Bax蛋白表达,诱导EOS凋亡,从而发挥抗炎平喘的作用,其高剂量的平喘效果近似于地塞米松,而低、中剂量的平喘效果显著低于地塞米松,这可能与中药的剂量过小及(或)量效关系未达到最大效应有关。可见,平喘汤能减轻哮喘模型大鼠气道高反应性,改善肺部病理学,其足剂量的药效可能相当于治疗气道炎症性疾病的抗炎剂,其基于分子水平的作用机制尚需进一步研究。

参考文献

[1] 孔晓梅,韩葆芬,张彩苹,等.支气管哮喘急性发作期的病原学分析[J].中华医院感染学杂志,2014,24(1):58.
 [2] MURAD H A, HASANIN A H. The anti-inflammatory effects of 1,1 dimethyl-4-phenylpiperazinium (DMPP) compared to dexamethasone in a guinea pig model of ovalbumin induced asthma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(15): 2228.

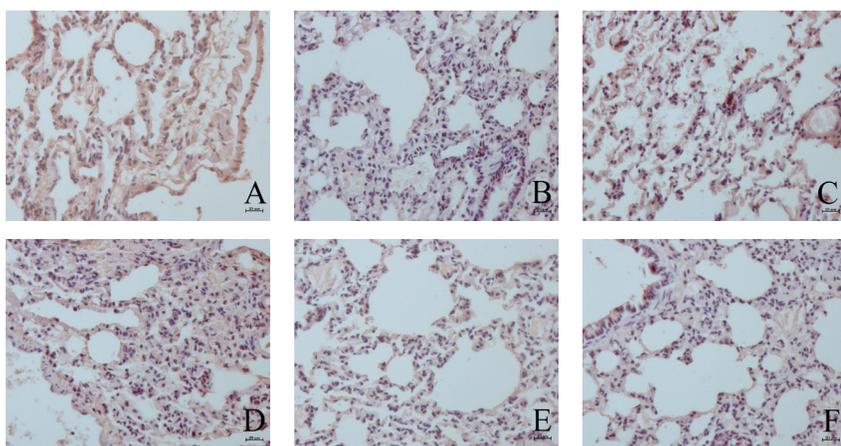


图3 免疫组化法检测大鼠肺组织Bax蛋白表达(40×)

注:A.正常组;B.模型组;C.地塞米松组;D.平喘汤高剂量组;E.平喘汤中剂量组;F.平喘汤低剂量组

[3] KIM D Y, PARK B S, HONG G U, et al. Anti-inflammatory effects of the R2 peptide, an inhibitor of transglutaminase 2, in a mouse model of allergic asthma, induced by ovalbumin[J]. Br J Pharmacol, 2011, 162(1): 210.
 [4] 冯高华,顾惠英.“平喘汤”参与治疗急性发作期支气管哮喘24例临床观察[J].江苏中医药,2010,42(5):30.
 [5] 谭国超,边静,郭亚玲,等.重组鼠IL-5可溶性受体α蛋白对哮喘小鼠肺组织嗜酸性粒细胞凋亡及Bax蛋白表达的影响[J].中华肺部疾病杂志(电子版),2014,7(2):155.
 [6] OH J, MALTER J S. Pin1-FADD interactions regulate Fas-mediated apoptosis in activated eosinophils[J]. J Immunol, 2013, 190(10): 4937.
 [7] 李志伟,马千里,王长征.支气管哮喘的炎症表型及其临床意义[J].中华肺部疾病杂志(电子版),2013,6(4):341.
 [8] DEWSON G, COHEN G M, WARDLAW A J. Interleukin-5 inhibits translocation of Bax to the mitochondria, cytochrome c release, and activation of caspases in human eosinophils[J]. Blood, 2001, 98(7): 2239.
 [9] 黎振兴,何晟,魏立平,等.地塞米松可增强支气管哮喘小鼠肺组织RECK的表达[J].细胞与分子免疫学杂志,2016,32(5):604.

第一作者:冯高华(1970—),男,本科学历,主任中医师,研究方向为中西医结合治疗慢性咳嗽哮喘等气道炎症性疾病、肺部肿瘤及呼吸介入。fgh0600@163.com

修回日期:2018-06-19

编辑:吴宁