

加减茵陈蒿汤联合布地奈德对哮喘大鼠气道反应性及肺组织中炎性细胞因子表达的影响

张鹏 杨冬妹 聂波 桑勉

(北京中医药大学东直门医院,北京,100700)

摘要 目的:研究加减茵陈蒿汤联合布地奈德对哮喘大鼠气道反应性及肺组织中炎性反应细胞因子表达的影响。方法:选择雄性SD大鼠作为实验动物,分为对照组、模型组、观察组,制作哮喘模型后给予加减茵陈蒿汤联合布地奈德治疗。测定气道阻力、肺泡灌洗液(BALF)中炎性细胞的数目以及肺组织中炎性细胞因子的表达水平。结果:模型组大鼠注射乙酰甲胆碱(MCh)后的气道阻力及BALF中中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞的数目及肺组织中白细胞介素(IL)-2、IL-6、干扰素- γ (IFN- γ)、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)、CCL19、CCL21的mRNA表达水平均明显高于对照组($P < 0.05$);观察组大鼠注射MCh后的气道阻力及BALF中中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞的数目及肺组织中IL-2、IL-6、IFN- γ 、eotaxin、CCL19、CCL21的mRNA表达水平均明显低于模型组($P < 0.05$)。结论:加减茵陈蒿汤联合布地奈德治疗哮喘大鼠能够降低气道反应性、抑制肺组织中的炎症反应,在哮喘治疗中展现出积极价值。

关键词 支气管哮喘;茵陈蒿汤;气道反应性;炎症反应;哮喘;大鼠;实验

Effects of Modified Yinchenhao Decoction Combined with Budesonide on Airway Responsiveness and Expression of Inflammatory Cytokines in Lung Tissue of Asthmatic Mice

Zhang Peng, Yang Dongmei, Nie Bo, Sang Mian

(Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To study the effects of modified Yinchenhao Decoction combined with budesonide on airway responsiveness and expression of inflammatory cytokines in lung tissue of asthmatic mice. **Methods:** Male SD rats were divided into a control group, a model group and a treatment group. After making asthma model, the mice were treated with modified Yinchenhao Decoction combined with budesonide. The airway resistance, the number of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the expression of inflammatory cytokines in lung tissue were measured. **Results:** The airway resistance, the number of neutrophils, eosinophils and lymphocytes in BALF and the expression of interleukin-2 (IL-2), IL-6, interferon- γ (IFN- γ), eotaxin, CCL19 and CCL21 in lung tissue of model group mice were significantly higher than those of control group ($P < 0.05$). The airway resistance after MCh injection and the number of neutrophils, eosinophils and lymphocytes in BALF and the expression of IL-2, IL-6, IFN- γ , eotaxin, CCL19 and CCL21 in lung tissue of treatment group were significantly lower than those of the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Modified Yinchenhao Decoction combined with budesonide can reduce airway reactivity and inhibit inflammation in lung tissue of asthmatic mice, which shows positive value in the treatment of asthma.

Key Words Bronchial asthma; Yinchenhao decoction; Airway reactivity; Inflammation reaction; Asthma; Rats; Experiment

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.06.010

支气管哮喘是临床上常见的呼吸系统疾病,以气道慢性炎性反应、气道高反应性为基本病理特征,临床上表现为反复发作的喘息、气促等。布地奈德是糖皮质激素类药物,被广泛用于哮喘治疗,通过抑制气道炎性反应、舒张气道平滑肌来发挥治疗作用,但仍有部分患者的哮喘反复发作,给患者及家庭带来较大负担^[1-2]。近年来,中药物在呼吸道疾病治疗中的价值受到了越来越多的关注,根据中医理论,

哮喘属于“咳嗽”“哮病”“喘证”的范畴,其主要病机在“脾肾气虚、痰浊内生、伏于肺脏”^[3-4]。茵陈蒿汤是具有清热、利气、祛痰作用的中药汤剂,根据哮喘的中医病机进行加减,加用苦参、浙贝母、石苇、车前草、瓜蒌能够增强该方剂清热利湿、化痰平喘的作用。为了明确加减茵陈蒿汤用于哮喘治疗的价值,本研究具体分析了加减茵陈蒿汤联合布地奈德对哮喘大鼠气道反应性及肺组织中炎性反应细胞因子表

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81704120)——基于CTCR1基因探讨加味芎蝎散对咳嗽变异性哮喘气道平滑肌干预作用及研究机制

作者简介:张鹏(1974.01—),男,本科,副主任医师,研究方向:小儿脑瘫及运动障碍,E-mail:zhangpen7@sohu.com

通信作者:桑勉(1980.07—),女,硕士,副主任医师,研究方向:小儿喘息性疾病,E-mail:happysang518@sina.com

达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选择健康的雄性 SD 大鼠作为实验动物,体质量 150 ~ 180 g。由本医院实验动物中心提供,许可证号:SYXK(京)2015-0001。实验室常规条件饲养、20 ~ 25 ℃、自由摄食饮水。

1.1.2 药物 布地奈德混悬液(阿斯利康公司,批号:H20140475);加减茵陈蒿汤由医院药剂科制备,包括茵陈 12 g、栀子 6 g、苦参 9 g、浙贝母 9 g、甘草 9 g、瓜蒌 9 g、秦艽 9 g、石苇 9 g、车前草 9 g,浓缩得到含有 1 g/mL 生药的药液。

1.1.3 仪器与试剂 卵清蛋白(OVA)(批号:9006-59-1)、乙酰甲胆碱(MCh)(批号:62-51-1)及氢氧化铝(批号:1330-44-5)购自 Sigma 公司;细胞因子表达检测试剂盒购自北京康为世纪公司,具体为 Ultra-SYBR Mixture 试剂(批号 CW2601S)、超纯 RNA 提取试剂盒(批号 CW0597)、SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒(批号 CW0741)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 实验大鼠分为对照组、模型组和观察组。模型组和观察组按照下列方法建立哮喘模型:第 1 天、第 14 天时给予含有 0.1 g OVA 和 1 mg 氢氧化铝的 0.2 mL 混悬液;第 21 天开始,将大鼠放置在密闭容器中并给予 5 mL 2% OVA 溶液雾化吸入以激发哮喘,1 次/d、30 min/次,共激活 14 次。

1.2.2 给药方法 首次激发哮喘的当天,观察组开始给予 10 mL/kg 的药液灌胃,1 次/d,同时在 OVA 雾化激发哮喘前给予 1 mg 布地奈德溶于 5 mL 生理盐水、雾化吸入;对照组和模型组给予 10 mL/kg 的生理盐水灌胃 1 次/d。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 气道反应性测定 末次激发哮喘后 24 h,给予 50 mg/kg 的 1.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,仰卧固定在实验台并安装小动物呼吸机,按照间隔 4 min 的频率依次腹腔注射 3.125 mg/kg、6.25 mg/kg、9.375 mg/kg、12.5 mg/kg 的 MCh,注射 MCh 后

记录气道阻力。

1.2.3.2 肺泡灌洗液(BALF)中细胞的测定 完成气道反应性测定后,打开胸腔、解剖右侧肺,将 0.9 mL 生理盐水注入支气管并反复抽吸,得到 BALF 后以 12 000 r/min 的速度离心 15 min,取细胞沉淀并用 1 mL 磷酸盐缓冲液重悬,用瑞氏染色法染色后在油镜下观察中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞并细胞数目。

1.2.3.3 肺组织中细胞因子的测定 完成 BALF 的取材后,解剖灌洗后的右侧肺组织,采用试剂盒提取组织中的 RNA,将 RNA 反转录合成为 cDNA 并进行 PCR 反应,所用引物分别为白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)、CCL19、CCL21 的特异性引物,根据 PCR 反应曲线计算基因的 mRNA 表达水平。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,3 组间计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用方差分析、两两比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠气道阻力水平比较 注射不同剂量的 MCh 后,与对照组比较,模型组大鼠的气道阻力水平明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,观察组大鼠的气道阻力水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 BALF 中炎症反应细胞的数目 与对照组比较,模型组大鼠 BALF 中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞的数目明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,观察组大鼠 BALF 中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞的数目明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 肺组织中促炎细胞因子的表达量 与对照组比较,模型组大鼠肺组织中 IL-2、IL-6、IFN- γ 的 mRNA 表达量水平明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,观察组大鼠肺组织中 IL-2、IL-6、IFN- γ 的 mRNA 表达量水平明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 3 组大鼠气道阻力的比较($\bar{x} \pm s$, cmHO/L/S, $n = 10$)

组别	MCh 3.125 mg/kg	MCh 6.25 mg/kg	MCh 9.375 mg/kg	MCh 12.5 mg/kg
对照组	25.48 \pm 5.51	33.46 \pm 5.84	39.71 \pm 6.74	42.49 \pm 7.81
模型组	34.76 \pm 6.14*	47.31 \pm 7.76*	53.57 \pm 7.35*	59.23 \pm 8.13*
观察组	29.11 \pm 4.58 Δ	37.84 \pm 6.12 Δ	44.85 \pm 6.43 Δ	49.13 \pm 6.72 Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表2 3组大鼠BALF中炎症反应细胞数目的比较

 $(\bar{x} \pm s, \times 10^5/L, n=10)$

组别	中性粒细胞	嗜酸性粒细胞	淋巴细胞
对照组	4.18 ± 0.63	0.79 ± 0.11	4.27 ± 0.74
模型组	17.62 ± 2.66*	23.22 ± 5.41*	16.65 ± 2.62*
观察组	8.93 ± 1.21 [△]	9.59 ± 1.25 [△]	9.12 ± 1.21 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

表3 3组大鼠肺组织中促炎细胞因子表达量的比较

 $(\bar{x} \pm s, n=10)$

组别	IL-2	IL-6	IFN- γ
对照组	1.05 ± 0.18	1.01 ± 0.14	1.03 ± 0.17
模型组	1.88 ± 0.27*	1.74 ± 0.29*	2.03 ± 0.35*
观察组	1.41 ± 0.18 [△]	1.33 ± 0.17 [△]	1.45 ± 0.24 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

2.4 肺组织中趋化细胞因子的表达量 与对照组比较,模型组大鼠肺组织中 eotaxin、CCL19、CCL21 的 mRNA 表达量水平明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,观察组大鼠肺组织中 eotaxin、CCL19、CCL21 的 mRNA 表达量水平明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表4。

表4 3组大鼠肺组织中促炎细胞因子表达量的比较

 $(\bar{x} \pm s, n=10)$

组别	Eotaxin	CCL19	CCL21
对照组	1.02 ± 0.17	1.01 ± 0.15	0.97 ± 0.14
模型组	1.92 ± 0.26*	1.74 ± 0.24*	2.21 ± 0.37*
观察组	1.38 ± 0.20 [△]	1.29 ± 0.31 [△]	1.47 ± 0.22 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

3 讨论

哮喘属于中医“咳嗽”“哮病”“喘证”的范畴,西医则认为哮喘的特征为慢性气道炎性反应所介导的气道高反应性。根据《证治汇补》中记载,“哮即痰喘之久而常发者,因内有壅塞之气、外有非时之感、膈有胶固之痰,三者相合,闭拒气道、搏击有声,发为哮病”^[5-6]。“痰”在“哮病”的发生中起到关键作用,痰的产生与体内脾肾功能失常、水液代谢紊乱有关,脾肾气虚、痰浊内生、伏于肺脏是“哮病”“喘证”发病的主要病机^[7-8]。西医治疗哮喘的主要手段是抑制气道炎性反应、促进气道平滑肌舒张,布地奈德是临床上广泛应用的哮喘治疗药物,属于糖皮质激素,具有强大的抗炎活性,对抑制哮喘发作具有良好的效果^[9-10]。中医治疗哮喘的重要手段是针对脾肾气虚、痰浊内生、伏于肺脏的病机选用化痰理气的药物,近年来也有越来越多的中药汤剂被用于哮喘的治疗^[11-12]。

本研究所采用的加减茵陈蒿汤作为治疗哮喘的

中药汤剂,方中茵陈清热利湿为主药,栀子清利三焦之火为臣,加用苦参、秦艽以增清热祛湿之功,石菖蒲、郁金化湿浊、醒脾,石韦、车前草清热利小便,湿性重浊趋下,虞抟在《医学正传》中指出:“治湿不利小便,非其治也”。另加浙贝母、瓜蒌清热化痰,通腑泄热,肺气得降。甘草调和诸药,缓和药性。诸药共奏清热利湿宣痹、祛除发病之源、延缓病情进展之功效。原方中茵陈蒿、栀子、大黄三味中药材具有清热、利气、祛痰的作用。在原方的基础上加用苦参、浙贝母、甘草,苦参起到泄肠腑之热的作用,浙贝母起到清热降气化痰的作用,甘草则起到调和诸味药物、缓解苦药苦寒之性的作用。全方组合共奏祛痰、利气、清热之功。为了明确加减茵陈蒿汤用于哮喘治疗的价值,本研究首先通过腹腔注射 OVA 的方式进行致敏、雾化吸入 OVA 激发哮喘,在注射 MAh 激活气道平滑肌胆碱能受体、促进平滑肌收缩后观察气道阻力:模型组 S 的气道阻力水平明显高于对照组,提示哮喘动物模型出现了气道阻力升高的气道高反应性症状。在建立哮喘模型后采用加减茵陈蒿汤进行灌胃治疗,观察结果显示:观察组大鼠的气道阻力水平明显低于对照组,表明加减茵陈蒿汤治疗能够降低哮喘大鼠的气道阻力、在哮喘治疗中展现出积极价值。

气道的慢性炎性反应是造成哮喘病程中气道反应性升高的基本病理环节,气道平滑肌内大量炎性反应细胞浸润^[13-14]。本研究通过分析 BALF 中中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎性反应细胞的数目来反应气道平滑肌内炎性反应细胞的浸润,结果显示:模型组大鼠 BALF 中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞的数目明显高于对照组,加减茵陈蒿汤联合布地奈德治疗后 BALF 中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞的数目明显低于模型组,提示加减茵陈蒿汤联合布地奈德治疗能够抑制哮喘大鼠气道平滑肌内多种炎性反应细胞的浸润,进而有利于减轻气道炎性反应。炎性反应细胞在气道内的进入与多种炎性反应细胞因子的促炎活性及趋化活性有关,IL-2、IL-6、IFN- γ 是与哮喘发生密切相关的促炎因子^[15-17],eotaxin、CCL19、CCL21 是与哮喘发生密切相关的趋化因子^[18-20],本研究对肺组织中细胞因子的分析显示:模型组大鼠肺组织中 IL-2、IL-6、IFN- γ 、eotaxin、CCL19、CCL21 的表达水平明显高于对照组,加减茵陈蒿汤联合布地奈德治疗后肺组织中 IL-2、IL-6、IFN- γ 、eotaxin、CCL19、CCL21 的表达水平明显低于模型组。这一结果表明加减茵

陈蒿汤联合布地奈德治疗能够减少哮喘大鼠肺组织中多种炎症反应细胞因子的表达,由此更进一步证实加减茵陈蒿汤联合布地奈德治疗能够抑制哮喘的炎症反应。

综上所述,加减茵陈蒿汤联合布地奈德治疗哮喘大鼠能够降低气道反应性、抑制肺组织中的炎症反应,今后可进一步在临床中使用加减茵陈蒿汤来治疗哮喘并进一步验证加减茵陈蒿汤在哮喘治疗中的积极价值。

参考文献

[1] Voorham J, Roche N, Benhaddi H, et al. Real-world effectiveness evaluation of budesonide/formoterol Spiromax for the management of asthma and chronic obstructive pulmonary disease in the UK[J]. *BMJ Open*, 2018, 8(10): e022051.

[2] Tamási L, Szilasi M, Gálffy G. Clinical Effectiveness of Budesonide/Formoterol Fumarate Easyhaler® for Patients with Poorly Controlled Obstructive Airway Disease: a Real-World Study of Patient-Reported Outcomes[J]. *Adv Ther*, 2018, 35(8): 1140-1152.

[3] 熊艳娟, 何金凌. 哮喘的中医病机及呼吸内科危重症哮喘患者 30 例临床疗效分析[J]. *中医临床研究*, 2018, 10(15): 17-19.

[4] 刘温丽, 史艳平, 张金虎. 支气管哮喘的中医研究进展[J]. *陕西中医*, 2018, 39(6): 812-814.

[5] 李宣霖, 马锦地, 李建生, 等. 现代名老中医诊治支气管哮喘的病因病机分析[J]. *中医研究*, 2016, 29(11): 62-67.

[6] 李荣才. 哮喘“宿痰伏肺”中医病机与西医气道炎性反应学说的关系[J]. *按摩与康复医学*, 2015, 6(1): 9-10.

[7] 景菲, 王英, 张伟. 从小儿五脏“二有余三不足”论治小儿哮喘[J]. *长春中医药大学学报*, 2018, 34(1): 75-78.

[8] 黄建山, 黄文钦. 肺脾肾三脏同调治疗小儿哮喘缓解期的临床研究[J]. *中医药通报*, 2018, 17(4): 57-60.

[9] Miller SD, Nyberg J, Siddiqui S, et al. Randomized dose-ranging study of a budesonide metered-dose inhaler by using co-suspension delivery technology in asthma[J]. *Allergy Asthma Proc*, 2018, 39(5): 350-358.

[10] Nakwan N, Perkleang T, Tamsawai T, et al. A 12-week, Random-

ized, Parallel-group, Phase III Study Comparing the Efficacy of Once-daily Budesonide/formoterol Turbuhaler (160/4.5 µg/d) with Twice-daily Budesonide(400 µg/d) During the Step-down Period in Well-controlled Asthma[J]. *Turk Thorac J*, 2018, 19(2): 66-72.

[11] 赵恒洁, 徐红日. 宣肺化痰活血法对慢性支气管哮喘患者肺功能的影响[J]. *河南中医*, 2018, 38(6): 930-933.

[12] 成青, 张云凤, 周奇兴. 中西医结合治疗对支气管哮喘患者疗效、免疫功能及肺功能水平的影响[J]. *吉林中医药*, 2018, 38(7): 782-785.

[13] 史晓凤, 陈卫强, 万滢, 等. 嗜酸粒细胞性支气管炎现状及病理生理研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2018, 38(20): 1592-1596.

[14] 张星慧, 常晓悦. 中性粒细胞性哮喘与其相关细胞因子[J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37(23): 1815-1818.

[15] Hondowicz BD, An D, Schenkel JM, et al. Interleukin-2-Dependent Allergen-Specific Tissue-Resident Memory Cells Drive Asthma[J]. *Immunity*, 2016, 44(1): 155-166.

[16] Pyle CJ, Uwadiae FI, Swieboda DP, et al. Early IL-6 signalling promotes IL-27 dependent maturation of regulatory T cells in the lungs and resolution of viral immunopathology[J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(9): e1006640.

[17] Nguyen TH, Maltby S, Tay HL, et al. Identification of IFN-γ and IL-27 as Critical Regulators of Respiratory Syncytial Virus-Induced Exacerbation of Allergic Airways Disease in a Mouse Model[J]. *J Immunol*, 2018, 200(1): 237-247.

[18] Shi T, He Y, Sun W, et al. Respiratory Syncytial virus infection compromises asthma tolerance by recruiting interleukin-17A-producing cells via CCR6-CCL20 signaling[J]. *Mol Immunol*, 2017, 88: 45-57.

[19] Liu J, Wei Y, Luo Q, et al. Baicalin attenuates inflammation in mice with OVA-induced asthma by inhibiting NF-κB and suppressing CCR7/CCL19/CCL21[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(5): 1541-1548.

[20] Teixeira AL, Gama CS, Rocha NP, et al. Revisiting the Role of Eotaxin-1/CCL11 in Psychiatric Disorders[J]. *Front Psychiatry*, 2018, 14(9): 241.

(2019-01-23 收稿 责任编辑:王明)

(上接第 1392 页)

[14] Jung EB, Trinh TA, Lee TK, et al. Curcuzedoalide contributes to the cytotoxicity of Curcuma zedoaria rhizomes against human gastric cancer AGS cells through induction of apoptosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 213: 48-55.

[15] 杨长福, 李亚东, 牛建昭, 等. 莪术油对肺癌 A549 细胞周期及组织蛋白酶 K 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(8): 113-116.

[16] 范丽娜, 张鹏鹏. 运用联合方组治疗肺癌体会[J]. *山西职工医学院学报*, 2017, 27(6): 55-56.

[17] 熊婵, 何成诗, 王俭, 等. 百合固金汤治疗肺癌临床特色[J]. *亚太传统医药*, 2016, 12(17): 59-60.

[18] 王红兵, 蒲志忠, 邓彬, 等. 青蒿鳖甲汤对肺癌骨转移患者细胞因子的影响[J]. *世界中医药*, 2018, 13(3): 665-668.

[19] Liu J, Lin HS, Hou W, et al. Comprehensive treatment with Chinese medicine in patients with advanced non-small cell lung cancer: A multicenter, prospective, cohort study[J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(10): 733-739.

[20] Tseng CY, Lin CH, Wu LY, et al. Potential Combinational Anti-Cancer Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer with Traditional Chinese Medicine Sun-Bai-Pi Extract and Cisplatin[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155469.

(2018-11-12 收稿 责任编辑:王明)