

化痰祛瘀疏肝法预防性干预对哮喘小鼠 NGF - TrkA 信号通路的影响

张新光^{1,2} 刘芳³ 薛征^{1,2} 李利清^{1,2} 刘斐⁴ 白莉^{1,2} 虞坚尔^{1,2}

(1 上海中医药大学附属市中医医院儿科, 上海, 200071; 2 上海市中医药研究院中医儿科研究所, 上海, 200071;

3 同济大学附属东方医院儿科, 上海, 200120; 4 上海中医药大学, 上海, 201203)

摘要 目的:探讨化痰祛瘀疏肝法预防性干预对哮喘小鼠 NGF - TrkA 信号通路的影响。方法:以 10% OVA/AL(OH)₃ 致敏、5% OVA 激发复制支气管哮喘小鼠模型,于激发前开始给药,至激发结束取材。用 ELISA 法检测 BALF 中 NGF、TrkA 浓度,Western blot 法检测肺组织匀浆中 NGF、TrkA 蛋白表达。结果:模型组 NGF、TrkA 浓度明显升高(P 均 < 0.01),NGF、TrkA 蛋白表达明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$);各处理组 NGF、TrkA 浓度均较模型明显降低(P 均 < 0.01),两中药组 NGF 蛋白表达均明显低于模型组(P 均 < 0.01),地米组与模型组无统计学意义($P > 0.05$),两中药组 TrkA 蛋白表达均明显低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$);两中药组 NGF、TrkA 浓度下调不及地米组(P 均 < 0.01);PCF 组 NGF、TrkA 蛋白表达与地米组相似(P 均 > 0.05),SG-PCF 组显著优于地米组(P 均 < 0.05);两中药组 NGF、TrkA 浓度及蛋白表达均无统计学意义(P 均 > 0.05)。结论:在发作期干预方式下,化痰祛瘀疏肝法对哮喘小鼠升高的 NGF、TrkA 浓度及上调的 NGF、TrkA 蛋白表达均有降低作用,上述作用总体与化痰祛瘀平喘法相似,优于地塞米松。提示化痰祛瘀疏肝法对哮喘小鼠神经源性炎症 NGF - TrkA 信号通路有较为确切的干预作用。

关键词 哮喘/中医药疗法;化痰祛瘀疏肝法;干预

Effect of Preictal Phase Intervention of Phlegm-Stasis Resolving and Liver Soothing Method on NGF-TrkA Signaling Pathway of Murine Model of Asthma

Zhang Xinguang^{1,2}, Liu Fang³, Xue Zheng^{1,2}, Li Liqing^{1,2}, Liu Fei⁴, Bai Li^{1,2}, Yu Jianer^{1,2}

(1 Pediatric Department of Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China; 2 Pediatric Institute of Shanghai Traditional Chinese Medicine Academy, Shanghai 200071, China; 3 Pediatric Department, East Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China; 4 Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To observe the effects of preictal intervention of phlegm and stasis resolving and liver soothing method on NGF-TrkA signaling pathway of neurogenic inflammation of murine model of asthma. **Methods:** The asthmatic BALB/c mice model were established through being sensitized by intra-peritoneal injection of 10% OVA/AL(OH)₃ solution, and activated by 5% ovalbumin solution. Intervention started before activation, and lung homogenate was obtained after activation. NGF and TrkA concentration in BALF were examined by ELISA, and the protein expression of NGF and TrkA concentration in lung tissue homogenate were detected by western blot. **Results:** In asthmatic model BALB/c mice, NGF and TrkA concentration significantly increased ($P < 0.01$), the protein expression significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The NGF、TrkA concentration of all intervention groups decreased ($P < 0.01$), while DXM showed a better effect than the other two intervention groups ($P < 0.01$). The NGF protein expression in PCF and SGPCF group decreased significantly compared with model group ($P < 0.01$), while that of DXM group was similar to model group ($P > 0.05$). TrkA protein expression of PCF and SGPCF group were lowered ($P < 0.05$, $P < 0.01$), PCF group had a similar effect on NGF and TrkA with DXM, while SGPCF showed a significantly better effect than DXM ($P < 0.05$), but the differences between PCF and SGPCF group had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion:** Preictal intervention of phlegm and stasis resolving and liver soothing method can decrease the increased concentration and protein expression of NGF and TrkA. The effect is generally similar to phlegm and stasis resolving and qi regulating method, and better than dexamethasone, which indicates that preictal intervention of phlegm and stasis resolving and liver soothing method has a definite effect on the NGF-TrkA pathway of neurogenic inflammation of murine model of asthma.

Key Words Asthma/Chinese medical therapy; Phlegm-stasis resolving and liver soothing method; Intervention

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.06.022

基金项目:国家自然科学基金项目:平喘方干预哮喘模型动物阴阳失衡的机理及拆方研究(编号:81173302);国家自然科学基金项目:基于 NGF - TrkA 通路探讨肝肺同治法对哮喘模型小鼠神经源性炎症的影响(编号:81202723);海派中医流派传承研究基地(徐氏儿科)(编号:ZYSNXD-CC-HPGC-JD-005)

通信作者:虞坚尔(1952—),男,医学硕士,教授,主任医师,博士研究生导师,浙江镇海人,主要从事中医儿科医疗、教学、科研工作, Tel:021-56639828, E-mail: jianeryu@hotmail.com

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是一种多功能的细胞生长和调节因子,除对神经系统的作用,尚对免疫、生殖、细胞增殖、造血等具有广泛的作用^[1-4]。NGF 参与免疫炎症调控以及复杂的神经-免疫相互作用机制,可认为是神经可塑性和免疫可塑性的双重调控递质。支气管哮喘免疫失衡及神经源性炎症两大病理环节之间已被证明存在较为密切的关系, Th1/Th2 免疫失衡可能通过调控 NGF 表达间接促进其诱导神经源性炎症。

化痰祛瘀平喘中药在前期研究中经动物实验证明对哮喘小鼠 Th1/Th2 相关细胞因子的表达及信号转导通路有调节作用,对气道重建亦有显著的改善作用^[5-8],并已被证实对哮喘有良好的临床疗效^[9]。本研究从肝失条达、肺失宣肃所致痰、气、瘀互结与神经源性炎症的潜在关系入手,选择 NGF、TrkA 作为观察指标,以地塞米松及化痰祛瘀平喘中药(平喘方)为对照药物,旨在观察化痰祛瘀疏肝法对哮喘小鼠神经源性炎症 NGF、TrkA 信号通路的早期干预作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 卵清白蛋白(上海骏惠化工有限公司,批号:20110209),小鼠 NGF、TrkA ELISA、试剂盒(美国 RayBiotech 进口分装),NGF 抗体(效价 1:50)、TrkA 抗体(效价 1:100)(ABCAM);芬兰雷勃酶标仪(MK3),电泳仪(mini protean 3 cell, BIO-RAD 公司)等。

1.2 实验药物

1.2.1 化痰祛瘀疏肝中药/疏肝平喘方(SGPCF) 由炙麻黄、杏仁、甘草、苏子、莱菔子、地龙干、桃仁、椒目、黄芩、柴胡、白芍、丹参组成。以 1:2:2:2:2:2:1:2:2:2:2:1 量,根据《动物实验方法学》^[10]中公式 $dB = dA \times RB/RA \times (WA/WB)^{1/3}$ (dB: B 种动物的公斤体重剂量, dA: A 种动物的公斤体重剂量, WA、WB: 已知动物体重, RB、RA: 体型系数),计算实验剂量,用药量相当于临床 30 kg 儿童用药量的 10 倍。中药煎煮提取方法参考李仪奎^[11]等的方法,第 1 次加 6 倍水旺火煮沸后,温火煮 1 h,保温 2 h,将药液滤出。第 2 次加入 5 倍水旺火煮沸后,温火煮 1 h,保温 2 h,将药液滤出。煎煮 2 次后滤液合并浓缩,加入 95% 乙醇(按公式 $V \times 60/(95-60)$ 计算乙醇用量),冷藏静置 24 h 后滤出,将滤液浓缩至流浸膏样。具体由上海市中医医院中心实验室制备。终浓度 6.99 g 生药/mL。

1.2.2 化痰祛瘀平喘中药/平喘方(PCF) 由炙麻黄、杏仁、甘草、苏子、莱菔子、地龙干、桃仁、椒目、黄芩组成。以 1:2:2:2:2:2:1:2:2 量,煎煮提取方法如上

述,终浓度 5.33 g 生药/mL。

1.2.3 对照药物/地塞米松(DXM) 醋酸地塞米松片(0.75 mg/片),上海信谊药厂有限公司提供。以蒸馏水将地塞米松片剂配制成 0.075 mg/mL 浓度溶液。

1.3 实验动物分组及模型建立 清洁级雄性 Balb/c 小鼠(18 ± 2 g, 3~5 周龄)50 只。由上海中医药大学医学实验动物室提供(上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK2008-0016)。室温 25℃、湿度 60%~70% 环境中饲养,自由饮水与进食。50 只小鼠根据体重用随机数字表随机分为 5 组,每组 10 只:空白对照组;哮喘模型组;地米组;平喘方(PCF)组;疏肝平喘方(SGPCF)组。

除空白对照组外,其余各组小鼠均以 10% OVA/AL(OH)₃ 混合液 1 mL 于第 1 d、第 15 d 行小鼠腹腔注射致敏 2 次。第 23 d 至 29 d 激发阶段,每天将各组小鼠置于 5 L 密闭容器中,以 5% OVA 蒸馏水溶液超声雾化吸入 40 min, 1 次/d, 共 7 d。空白对照组均以等量生理盐水行腹腔注射及雾化吸入。于首次腹腔注射前、末次激发后分别对各组小鼠呼吸频率、体重、烦躁不安、腹肌抽搐、二便失禁、毛发竖起、活动减少、饮食减少、口鼻发绀等行为学表现进行观察并记录。用光镜观察各组肺组织形态学改变,包括肺内细支气管壁黏膜上皮、管腔内炎性渗出物及脱落的黏膜上皮细胞、管周炎性细胞浸润等情况,确认模型建立。

造模成功标准:呼吸频率增快:与空白组比较,呼吸频率增加幅度在 20% 以上;体重减轻:与空白组比较,体重减轻幅度在 10% 以上;其他症状:出现烦躁不安、腹肌抽搐、二便失禁、毛发竖起、活动减少、饮食减少、口鼻发绀等;后期取材肺泡灌洗液中总 IgE 升高;沉渣嗜酸性粒细胞计数(EOS)增多;所见肺组织病理表现符合哮喘表现。

1.4 干预方法

1.4.1 给药 于第 16 d 至第 29 d 给药。各处理组以对应药物 0.4 mL/20 g 灌胃, 1 次/d。空白对照组、哮喘模型组以等量生理盐水灌胃, 1 次/d。

1.4.2 取材 于第 30 d 取材。留取小鼠右肺肺组织:每只小鼠收集完左肺 BALF 后,取右肺上 2 叶于冻存管置 -80℃ 冰箱冻存,制肺组织匀浆。余下右肺下 2 叶以 10% 甲醛固定,采用 HE 染色制肺组织病理切片,用光镜观察各组肺组织形态学改变;制 1.0 cm × 1.0 cm × 0.2 cm 组织切片。

1.4.3 检测指标 ELISA 法检测哮喘小鼠 BALF 中 NGF、TrkA 浓度, Western blot 法检测哮喘小鼠肺组织 NGF、TrkA 蛋白表达。

2 结果

2.1 NGF 在哮喘小鼠肺组织的表达

2.1.1 NGF 在哮喘小鼠 BALF 中的浓度 (ELISA 法)

与空白组比较:模型组 NGF 浓度明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较:地米组、PCF 组及 SGPCF 组 NGF 浓度均明显降低 (P 均 < 0.01);与地米组比较:2 中药组 NGF 浓度均显著高于地米组 (P 均 < 0.01);2 中药组间比较:2 中药组 NGF 浓度无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠 BALF 中 NGF 浓度 (ng/l)

组别	N	NGF 浓度 (ng/l) ($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
空白	10	42.96 $\pm$ 2.55	219.815	0.000
模型	8	169.26 $\pm$ 6.47 **		
地米 (DXM)	9	90.65 $\pm$ 5.18 ** $\Delta\Delta$		
平喘方 (PCF)	9	116.41 $\pm$ 13.97 ** $\Delta\Delta$		
疏肝平喘方 (SGPCF)	8	115.27 $\pm$ 13.16 ** $\Delta\Delta$		

注:方差不齐,用 Games - Howell 程序两两比较:与空白组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.1.2 NGF 蛋白在哮喘小鼠肺组织中的表达 (Western blot 法) 与空白组比较:模型组 NGF 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较:PCF 组及 SGPCF 组 NGF 蛋白表达均显著降低 (P 均 < 0.05),地米组 NGF 蛋白表达与模型组无统计学意义 ($P > 0.05$);与地米组比较:PCF 组 NGF 蛋白表达与地米组无统计学意义 ($P > 0.05$),SGPCF 组显著低于地米组 ($P < 0.05$);2 中药组间比较:2 中药组间 NGF 蛋白表达无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠肺组织中 NGF 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	NGF (ng/l) ($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
空白	8	0.51 $\pm$ 0.28	6.049	0.001
模型	8	0.94 $\pm$ 0.20 *		
地米 (DXM)	8	0.74 $\pm$ 0.16		
平喘方 (PCF)	8	0.66 $\pm$ 0.11 Δ		
疏肝平喘方 (SGPCF)	8	0.59 $\pm$ 0.15 Δ		

注:方差不齐,用 Games - Howell 程序两两比较:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

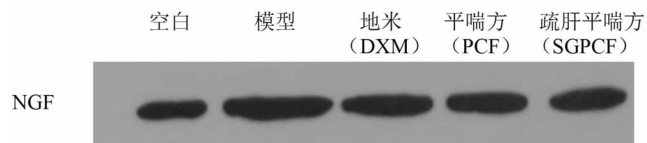


图 1 各组小鼠肺组织中 NGF 蛋白表达

2.2 TrkA 在哮喘小鼠肺组织的表达

2.2.1 TrkA 在哮喘小鼠 BALF 中的浓度 (ELISA 法)

与空白组比较:模型组 TrkA 浓度明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较:地米组、PCF 组及 SGPCF 组 TrkA 浓度均明显降低 (P 均 < 0.01);与地米组比较:2

中药组 TrkA 浓度均显著高于地米组 (P 均 < 0.01);2 中药组间比较:2 中药组间 TrkA 浓度无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠 BALF 中 TrkA 浓度 (ng/L)

组别	N	TrkA (ng/l) ($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
空白	10	8.76 $\pm$ 0.55	234.005	0.000
模型	8	31.10 $\pm$ 1.30 **		
地米 (DXM)	9	14.47 $\pm$ 1.43 ** $\Delta\Delta$		
平喘方 (PCF)	9	21.13 $\pm$ 2.26 ** $\Delta\Delta$		
疏肝平喘方 (SGPCF)	8	20.93 $\pm$ 2.12 ** $\Delta\Delta$		

注:方差不齐,用 Games - Howell 程序两两比较:与空白组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

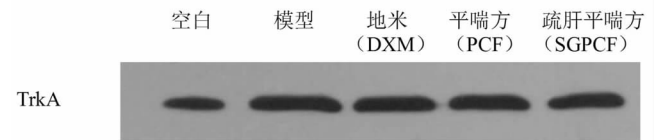


图 2 各组小鼠肺组织中 TrkA 蛋白表达

2.2.2 TrkA 蛋白在哮喘小鼠肺组织中的表达 (Western blot 法) 与空白组比较:模型组 TrkA 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较:地米组、PCF 组及 SGPCF 组 TrkA 蛋白表达均显著低于模型组 (P 均 < 0.01);与地米组比较:PCF 组 TrkA 蛋白表达与地米组无统计学意义 ($P > 0.05$),SGPCF 组显著低于地米组 ($P < 0.05$);2 中药组间比较:2 中药组 TrkA 蛋白表达无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 各组小鼠肺组织中 TrkA 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	TrkA ($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
空白	8	0.61 $\pm$ 0.24	12.653	0.000
模型	8	1.11 $\pm$ 0.13 **		
地米 (DXM)	8	0.80 $\pm$ 0.08 * $\Delta\Delta$		
平喘方 (PCF)	8	0.76 $\pm$ 0.13 $\Delta\Delta$		
疏肝平喘方 (SGPCF)	8	0.66 $\pm$ 0.15 $\Delta\Delta$ *		

注:方差不齐,用 LSD 程序两两比较:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 结论

上述结果表明,在预防性干预方式下,化痰祛瘀疏肝法对哮喘小鼠升高的 NGF、TrkA 浓度及上调的 NGF、TrkA 蛋白表达均有降低作用,上述作用总体与化痰祛瘀平喘法相似,在蛋白表达水平上疏肝平喘方显著优于地塞米松。提示化痰祛瘀疏肝法预防性干预哮喘小鼠神经源性炎症 NGF - TrkA 信号通路有较为确切的作用。

4 讨论

历代医家对儿童哮喘病因病机的共识,五脏之中,以肺、脾、肾三脏与其关系最为密切。通常儿童发病,受内伤七情影响较为少见。肝主疏泄,疏通气机,调畅

情志;助脾胃运化;推动血液及津液代谢。若肝气失于条达,周身气机不畅、重者致血液循行涩滞而不通,此与失于宣降之肺气、伏留气道之痰瘀、外感六淫之邪气相互为因,加重哮喘之顽固、反复发作。自 20 世纪 80 年代以来,随着我国社会发展,“四 - 二 - 一”家庭结构逐步成为社会主流,独生子女受到过多宠爱和关注,其骄恣任性的问题逐步显露,七情致病的重要性日益被儿科医师所关注。从中医理论的角度可以理解为肝失疏泄,气机失常,重者影响血液代谢和循行。

“痰”与气道慢性炎症、“瘀”与气道重构存在相似病理基础,我们认为痰瘀同病、痰瘀交阻是哮喘反复发作之主要病理基础;治疗上,应痰瘀并重,治痰须兼活血,血活则易化痰。临床上哮喘与反复呼吸道感染亦常互为因果,痰瘀互结因而加重^[12]。化痰逐瘀平喘中药(平喘方)以宣肺、化痰、平喘为主要功效,兼顾祛瘀。前期研究中已取得较为确切的效果,在防治哮喘的机理上,与糖皮质激素的作用途径相似,对于哮喘 Th1/Th2 免疫失衡、气道重建、气道慢性炎症、气道高反应性等病理环节均有调节作用,且随用药时间延长,有累加效应,其疗效与地塞米松相近,但作用环节更为广泛。

近年有多项研究发现,神经生长因子通过诱导神经源性炎症反应参与哮喘发病。Th2 类细胞因子 IL - 13 可上调哮喘大鼠淋巴细胞神经生长因子 mRNA 的表达,Th1 类细胞因子 IL - 18 可下调淋巴细胞 NGFmRNA 表达,两者均呈时间和浓度依赖性,Th1/Th2 类细胞因子免疫失衡可能通过调控 NGFmRNA 表达间接促进其诱导神经源性炎症;而同时有证据显示,NGF 通过诱导 Th1 型向 Th2 型免疫应答偏移来参与特应性皮炎 Th1/Th2 类细胞因子免疫失衡效应^[13];而这一过程可能通过对 GATA - 3 表达的上调进行^[14]。

本研究根据前期结论,在平喘方的基础上,增强疏肝理气活血组成,选择柴胡、白芍、丹参等功效显著且性味温和的儿科常用疏肝、活血药加入原方组成疏肝平喘方,以期对痰、气、瘀互结的病理环节有新的干预作用。前期实验已证明本法对哮喘小鼠气道 Th1/Th2 免疫失衡相关因子有较好的调节作用^[15]。研究选取 NGF、TrkA 作为观察指标,目的是发现化痰祛瘀疏肝法对哮喘小鼠 Th1/Th2 免疫失衡相关的神经源性炎症的干预作用,为进一步深入研究中医药对哮喘神经源性

炎症的干预机制提供前期基础。在进一步研究中,我们考虑将 Th1/Th2 类细胞因子 IL - 13、IL - 18 以及 NGF、TrkA 共同作为观察指标,研究化痰祛瘀疏肝法对哮喘小鼠 Th1/Th2 免疫失衡和神经源性炎症干预作用的相关性,以期发现中医药临床治疗哮喘的新机理。

参考文献

- [1] Nockher W A, Renz H. Neurotrophins and asthma: novel insight into neuroimmune interaction[J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(1): 67 - 71.
- [2] El - Banna SM, Mahdi WK, AliBA, et al. Role of nerve growth factor in allergic and inflammatory lung diseases[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2006, 396: 444 - 451.
- [3] Nassenstein C, Kutschker J, Tumes D, et al. Neuro - immune interaction in allergic asthma: role of neurotrophins[J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(4): 591 - 59.
- [4] Feng J T, Hu C P. Dysfunction of releasing adrenaline in asthma by nerve growth factor. Med Hypotheses, 2005, 65(6): 1043 - 1046.
- [5] 虞坚尔, 李利清, 张晓峰, 等. 平喘方干预支气管哮喘模型大鼠 Th1/Th2 平衡的研究[J]. 中医儿科杂志, 2006, 2(1): 23 - 26.
- [6] 赵毅涛, 张新光, 白莉, 等. 平喘方对哮喘模型小鼠肺组织炎症及 IFN - γ /IL - 4 的影响[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(7): 807 - 813.
- [7] 张新光, 赵毅涛, 白莉, 等. 基于 T - bet/GATA - 3 表达研究化痰祛瘀法对哮喘小鼠气道炎症及免疫失衡的影响[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(5): 974 - 977.
- [8] 李利清, 虞坚尔, 王忆勤, 等. 平喘方对支气管哮喘模型大鼠气道顺应性影响研究[J]. 中国现代临床医学, 2006, 5(11): 4 - 6.
- [9] 李利清, 虞坚尔, 张新光, 等. 平喘方治疗儿童支气管哮喘 30 例临床观察[J]. 中医儿科杂志, 2008, 4(1): 14 - 16.
- [10] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 357.
- [11] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 119 - 120.
- [12] 张新光, 虞坚尔, 邓伟, 朱盛国, 夏以琳. 儿童反复呼吸道感染发病影响因素的 Logistic 回归分析[J]. 世界临床药物, 2011, 3(1): 38 - 42, 66.
- [13] 何荣国, 伍绍国, 邹运学, 等. 神经生长因子在特应性皮炎小鼠模型 Th1/Th2 类细胞因子免疫失衡中的作用[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(2): 109 - 111.
- [14] 靳英丽, 李琦, 韩军, 等. 神经生长因子在哮喘小鼠 Th1/Th2 失衡中的作用研究[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(5): 595 - 597.
- [15] 张新光, 虞坚尔, 薛征, 等. 化痰祛瘀疏肝法对哮喘小鼠 IL - 13/IL - 18 失衡的干预作用[J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(4): 344 - 347.

(2013 - 03 - 12 收稿)