

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.03.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 01-0021-07

中药川贝对哮喘模型小鼠气道炎症的影响 及可能机制研究*

李厚忠¹, 高照渝², 王慧³, 任公平², 徐红纳¹, 刘艺¹, 巩丽虹¹, 张羽飞¹

(1. 牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157011; 2. 牡丹江医学院附属红旗医院, 黑龙江 牡丹江 157011; 3. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 目的 观察中药川贝对哮喘模型小鼠气道炎症及白细胞介素 8 (IL-8)、白细胞介素 13 (IL-13), 趋化因子受体 CXCR-2 和趋化因子配体 [肿瘤生长相关因子- α (GRO- α)、上皮细胞嗜中性粒细胞活性蛋白-78 (ENA-78) 及嗜中性活性肽-2 (NAP-2)] 的影响。**方法** BALB/c 小鼠, 随机分为正常组、模型组、高剂量组、低剂量组。采用卵蛋白 (OVA) 致敏激发复制小鼠哮喘模型。造模成功后高剂量组和低剂量组分别按 18.0 和 9.0 mg/kg 剂量给予中药川贝灌胃; 正常组和模型组等量生理盐水灌胃, 每天 1 次, 连续 28 d。观察各组小鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中白细胞分类计数的变化; 光镜下观察病理学变化并进行炎症评分; ELISA 检测血清中 IL-8 和 IL-13 浓度; 免疫组织化学法检测 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 阳性细胞; 实时 PCR (real-time PCR) 检测 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 mRNA 的表达。**结果** 模型组小鼠 BALF 中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞计数及炎症评分较正常组增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高剂量组和低剂量组则较模型组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 模型组小鼠 IL-8 和 IL-13 浓度较正常组增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高剂量组和低剂量组则较模型组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 模型组小鼠 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 阳性细胞和 mRNA 表达水平较正常组增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而高剂量组和低剂量组则较模型组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 中药川贝可能通过抑制 IL-8、IL-13, CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 发挥对哮喘模型小鼠的抗炎作用。

关键词: 中药川贝; 哮喘; 气道炎症; 趋化因子

中图分类号: R562

文献标识码: A

Effect of Bulbus Fritillariae Cirrhosae on airway inflammation in mouse model of asthma*

Hou-zhong Li¹, Zhao-yu Gao², Hui Wang³, Gong-ping Ren², Hong-na Xu¹,
Yi Liu¹, Li-hong Gong¹, Yu-fei Zhang¹

(1. Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China; 2. Hongqi Hospital
Affiliated Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China;
3. Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Bulbus Fritillariae Cirrhosae (BFC) on airway inflammation in mouse model of asthma and potential mechanism. **Methods** BALB/C mice were randomly divided into normal group, model group, high dose group and low dose group. Mice were challenged with ovalbumin (OVA) to establish

收稿日期: 2017-04-14

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金 (No: H201490)

[通信作者] 张羽飞, E-mail: yufeizhang@foxmail.com; Tel: 0453-6984647

asthma model. BFC was orally administered at the dose of 18.0 mg/kg (high dose) and 9.0 mg/kg (low dose) while animals in normal group and model group were orally administered with normal saline. All drugs were administered for consecutive 28 days on a daily basis. Leukocyte counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were identified. Morphological abnormality and grading of tissue inflammation were determined. Concentration of IL-8 and IL-13 in serum was measured by Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Expressions of CXCR-2, GRO- α , ENA-78 and NAP-2 positive cells were detected by Immunohistochemistry. Levels of CXCR-2, GRO- α , ENA-78 and NAP-2 mRNA were quantified by Real-time PCR. **Results** Neutrophils, macrophage, monocyte and eosinophils in BALF and inflammation score in model group increased significantly when compared with normal group ($P < 0.05$), which were attenuated by BFC treatment (high dose and low dose) ($P < 0.05$). Levels of IL-8 and IL-13 enhanced significantly in model group when compared with normal group ($P < 0.05$), which was ameliorated by BFC ($P < 0.05$). Expressions of CXCR-2, GRO- α , ENA-78, and NAP-2 were increased significantly in model group ($P < 0.05$) when compared with normal group, which was decreased by BFC ($P < 0.05$). **Conclusion** BFC exerts anti-inflammatory effect in asthmatic mice through deduction of IL-8, IL-13, CXCR-2 and GRO- α , ENA-78 and NAP-2.

Keywords: bulbus fritillariae cirrhosae; asthma; airway inflammation; chemokine

支气管哮喘 (bronchial asthma, BA) 简称哮喘, 是一种高发病率的慢性炎症性疾病, 炎症反应在哮喘发生和进展中发挥着重要作用, 被认为可能是哮喘的可能发病机制之一^[1-2]。目前临床上常用的抗炎药, 如糖皮质激素、白三烯受体拮抗药等, 能迅速控住气道炎症, 效果良好, 但是仍然存在一些弊端, 如停药后的复发, 长期用药导致全身或局部的不良反应等^[3-4]。因此寻找一种安全有效而不良反应小的治疗哮喘的药物显得尤为重要。中药大多为天然植物, 不良反应相对较小, 可作为很好的选择。

川贝 (Bulbus fritillariae cirrhosae) 是具有代表性的川产道地名贵药材, 为临床常用中药, 其性苦、甘, 微寒, 有化痰止咳、清热散结、润肺之功效, 多用于热痰、燥痰、肺虚劳嗽、久嗽、痰少咽燥及痰中带血等最为对证, 还常用于心胸郁结、肺痿、肺癰之证^[5]。本研究前期实验表明, 川贝可有效降低哮喘模型小鼠一氧化氮 (nitric oxide, NO)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、白细胞介素 1 (interleukin, IL-1) 及白细胞介素 6 (interleukin, IL-6) 含量, 升高超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活力等^[6-7], 同时也降低哮喘模型小鼠血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和缺氧诱导因子 1 α (hypoxi-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 的表达^[8]。本研究旨在前期研究基础上, 继续观察川贝对哮喘模型小鼠气道炎症及白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8)、白细胞介素 13 (interleukin-13, IL-13), CXC 趋化因子受体 (CXC chemokine receptor 2, CXCR-2) 和趋化因子配体

[肿瘤生长相关因子 α (growth-related oncogene- α , GRO- α)、上皮细胞嗜中性粒细胞活性蛋白 78 (epithelial cell-derived neutrophil-activating protein-78, ENA-78) 及嗜中性活性肽 2 (neutral active peptides-2, NAP-2)] 的影响, 探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试药 中药川贝粉的制备: 选取整齐、粉性足者。用洁净的纱布擦拭药材表面以去除药材表面的灰尘。净选后的川贝通过灭菌消毒窗消毒 15 min 后直接转至粉碎车间, 用 Fz-400 型粉碎机组加工成 100 目细粉, 收得的细粉装入洁净的容器中, 封口。全部加工完后的细粉用洁净的塑料袋分装成 1 kg/袋备用。临用时参照唐德才等主编的《中药学》所载成人所用剂量为 3 ~ 6 g/d, 根据动物体表面积等效剂量计算方法, 计算小鼠给药剂量 18.0 mg/kg 为高剂量组, 9.0 mg/kg 为低剂量组。分别称取川贝粉 18 mg, 9 mg 各溶于生理盐水 5 ml, 现用现配。

1.1.2 实验动物 雌性 BALB/c 小鼠 50 只, 6 ~ 8 周龄, 由哈尔滨医科大学动物实验中心提供, 实验动物合格证号为: P00102008, 实验动物使用许可证号: SYXK (黑) 2008-033。空调恒温室内 22 $^{\circ}$ C, 相对湿度 50%, 自由饮水饮食, 通风换气 8 次/h。

1.1.3 试剂和仪器 卵蛋白 (OVA) (Sigma 公司), 兔抗人 CXCR-2 多克隆抗体、兔抗人 GRO- α 多克隆抗体、兔抗人 ENA-78 多克隆抗体及羊抗人 NAP-2 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), IL-8 和 IL-13 检测

试剂盒(美国ADL公司),其他试剂均为国产或进口分析纯。恒温水浴箱(HH-W210420L)(天津泰斯鹏仪器有限公司),微量加样器(3112)(德国Eppendorf),自动平衡离心机(LDZ5-2)(北京京立离心机有限公司),电子天平(UW820S)(日本岛津电子天平),超声雾化器(402A)(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司),光学显微镜(BH-2)(日本Olympus公司),粉碎机组(Fz-400)(天津市茂源制药机械有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型复制 健康清洁级BALB/c小鼠40只,腹腔内注射10%OVA+10%氢氧化铝混合液1ml作为首次致敏,第15天将小鼠依次置于超声雾化器中,用1%OVA生理盐水喷雾激发小鼠哮喘发作,隔日1次,1次20min,共激发10d。以小鼠出现口唇发绀、腹肌痉挛、呼吸加快、点头呼吸或站立不稳等表现为成功激发。共复制成功30只。

1.2.2 分组及给药 将成功复制的哮喘模型小鼠随机分模型组、高剂量组及低剂量组,每组10只;另设正常组(10只以生理盐水代替OVA进行腹腔注射及雾化吸入)。分组后每天灌胃给药,正常组和模型组给予等量生理盐水,高剂量组,低剂量组分别按照18.0及9.0mg/kg剂量给予川贝粉,每天1次,连续28d。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)白细胞分类计数 最后1次给药2h后,各组小鼠用1%巴比妥钠麻醉,剪掉颈部毛发后剪开皮肤,分离气管周围的组织,气管作一横行切口,插入气管插管;心脏采血0.8~1.0ml,EDTA抗凝,用于ELISA检测。结扎右主支气管,经气管插管10ml生理盐水分3次灌洗左肺,回收BALF经2000r/min离心15min,弃上清液,取沉渣经生理盐水重悬。Diff-Quik染色液染色BALF细胞涂片后,作细胞分类计数。切取右支气管平滑肌固定于10%的中性甲醛中,用于病理学观察。切取右肺门部位组织用于免疫组织化学和real-time PCR分析。

1.2.4 支气管平滑肌病理学观察 将右支气管平滑肌组织10%中性甲醛固定后,常规酒精脱水,石蜡包埋,切片,HE染色,光镜下观察各组小鼠支气管平滑肌病理学变化。评判标准:没有炎症细胞(0分);有少量炎症细胞(1分);较多分布炎症细胞,且分布不均(2分);大量炎症细胞,少许聚集成团,且分布较均匀(3分);可见大量炎症细胞并且聚集成团(4分)。

1.2.5 血清IL-8和IL-13浓度测定 采用ELISA测

定IL-8和IL-13的浓度,严格按照ELISA试剂盒的操作说明书进行操作。每份样品检测3次。

1.2.6 免疫组织化学分析检测CXCR-2和GRO- α 、ENA-78、NAP-2阳性细胞 右肺门组织石蜡切片、脱蜡、脱水、浸泡于3% H_2O_2 中15min灭活内源性过氧化物酶。置于煮沸柠檬酸钠中修复抗原,暴露抗原表位并且用3%小牛血清蛋白阻断。滴加一抗、二抗及链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物,DAB显色、镜下观察至出现棕黄色阳性信号后蒸馏水冲洗终止反应,苏木素复染、封片,拍照。随机选定3个HPF($\times 200$ 倍,用Image Pro Plus 6.0图像分析软件测出光密度(OD)值,并计算平均OD值。

1.2.7 Real-time PCR分析CXCR-2和GRO- α 、ENA-78、NAP-2 mRNA转录水平 Trizol试剂提取肺组织总RNA,检测RNA纯度,按照Real-time PCR试剂盒进行逆转录反应,合成单链的cDNA。cDNA产物置入 $-20^{\circ}C$ 冰箱冷冻保存。利用Pubmed查找相关基因序列,并利用引物合成软件Primer Premier 5.0设计引物。Real-time PCR反应体系:体积为25 μl ;反应程序为:94 $^{\circ}C$ 变性45s,60 $^{\circ}C$ 复性45s,72 $^{\circ}C$ 延伸50s,共28个循环,72 $^{\circ}C$ 再延伸7min。每个样本以内参基因 β -actin调整。每个样本以内参基因 β -actin调整。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量分析。每份样品检测3次。引物序列见表1。

表1 Real-time PCR引物序列

基因	引物	扩增片段/bp
CXCR-2	正向: 5'-CAGCGACCCAGTCAGGATTTA-3'	251
	反向: 5'-ACCAGCATCACGAGGGAGTTT-3'	
GRO- α	正向: 5'-GAACATCCAAAGTGTGAACGTGAAG-3'	200
	反向: 5'-TTCAGGAACAGCCACCACTGAG-3'	
ENA-78	正向: 5'-CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT-3'	596
	反向: 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	
NAP-2	正向: 5'-GTGACTTGTATGCTGAACTCC-3'	218
	反向: 5'-TGGCAGAAACAGAAACAAAT-3'	
β -actin	正向: 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3'	275
	反向: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'	

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据符合正态分布,方差齐时,采用one-way-ANOVA分析,组间两两比

较采用 LDS-*t* 检验；方差不齐时采用 Games-Howell 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALF 白细胞分类计数结果

各组小鼠 BALF 中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞计数比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞计数与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；高剂量组和低剂量组中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞计数与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 支气管平滑肌病理学观察及半定量分析结果

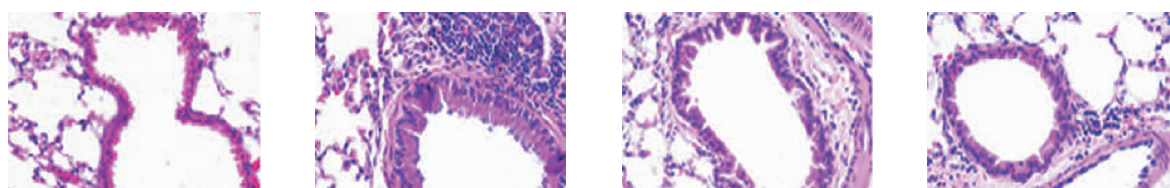
HE 染色结果显示, 正常组小鼠支气管壁完整, 平

滑肌呈正常厚度, 支气管黏膜平整, 细胞排列整齐, 管腔内无上皮细胞脱落, 支气管平滑肌内及其周围无明显炎症细胞浸润；模型组小鼠基层细胞增生, 排列紊乱, 平滑肌增厚, 支气管壁和周围肺组织中有大量炎症细胞浸润, 主要是嗜酸性粒细胞和淋巴细胞, 支气管黏膜上皮脱落, 水肿, 管腔内有分泌物, 以上改变也证明哮喘模型复制成功；高剂量组和低剂量组小鼠支气管平滑肌和气管壁厚度减少, 支气管腔内少量黏液和脱落细胞, 支气管嗜酸性粒细胞和其他炎症细胞浸润有所减少, 支气管嗜酸性粒细胞及其他炎症细胞浸润减少, 几乎消失, 平滑肌和管壁厚度几乎接近正常组, 支气管黏膜平整规则, 管腔内偶尔可见脱落上皮细胞和少量黏液。见图 1。各组小鼠炎症评分比较, 差异有统计学意义 ($F = 12.451, P = 0.001$)。模型组炎症评分

表 2 各组小鼠 BALF 分类细胞计数 ($n = 10, \times 10^4/\text{ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	中性粒细胞	巨噬细胞	淋巴细胞	嗜酸性粒细胞
正常组	3.12 ± 0.57	10.70 ± 1.76	4.10 ± 0.51	0.06 ± 0.01
模型组	$12.71 \pm 2.43^{1)}$	$25.01 \pm 4.38^{1)}$	$15.74 \pm 2.93^{1)}$	$3.50 \pm 0.53^{1)}$
高剂量组	$5.78 \pm 0.57^{2)}$	$13.38 \pm 1.25^{2)}$	$8.45 \pm 0.77^{2)}$	$1.63 \pm 0.21^{2)}$
低剂量组	$8.09 \pm 0.44^{2)}$	$14.85 \pm 0.91^{2)}$	$9.12 \pm 0.96^{2)}$	$2.22 \pm 0.26^{2)}$
<i>F</i> 值	11.731	6.794	8.741	17.683
<i>P</i> 值	0.000	0.003	0.001	0.000

注: 1) 与正常组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$



A 正常组

B 模型组

C 高剂量组

D 低剂量组

图 1 各组小鼠支气管平滑肌病理学观察 (HE 染色 $\times 200$)

与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；高剂量组和低剂量组炎症评分与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 ELISA 结果

各组小鼠血清 IL-8 和 IL-13 浓度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组血清 IL-8 和 IL-13 浓度与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；高剂量组和低剂量组血清 IL-8 和 IL-13 浓度与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 各组小鼠炎症评分结果 ($n = 10, \text{分}, \bar{x} \pm s$)

组别	炎症评分
正常组	1.13 ± 0.18
模型组	$3.37 \pm 0.47^{1)}$
高剂量组	$1.93 \pm 0.17^{2)}$
低剂量组	$1.98 \pm 0.13^{2)}$
<i>F</i> 值	12.451
<i>P</i> 值	0.001

注: 1) 与正常组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

表 4 各组小鼠血清 IL-8 和 IL-13 浓度

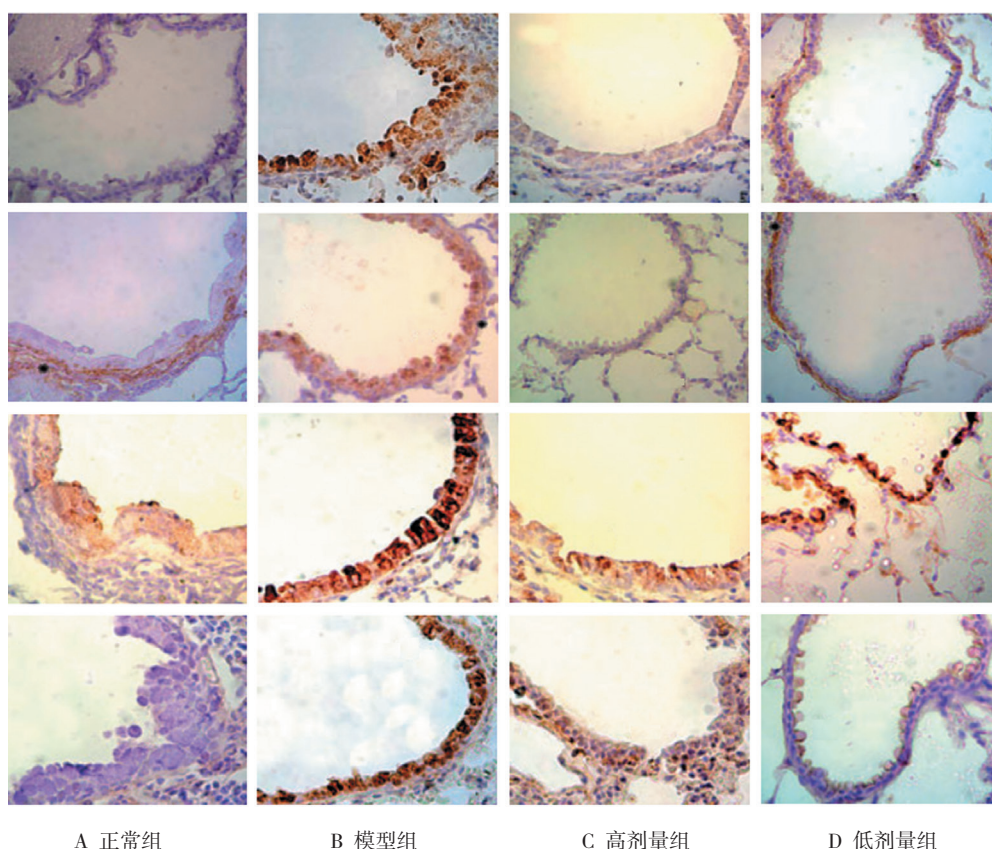
($n=10$, pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-8	IL-13
正常组	327.00 ± 57.01	382.80 ± 56.82
模型组	765.50 ± 82.24 ¹⁾	834.24 ± 86.24 ¹⁾
高剂量组	421.69 ± 47.67 ²⁾	469.30 ± 19.98 ²⁾
低剂量组	587.56 ± 30.76 ²⁾	682.60 ± 24.80 ²⁾
F 值	12.176	14.763
P 值	0.001	0.000

注: 1) 与正常组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

2.4 免疫组织化学结果

免疫组织化学分析结果显示, CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 阳性细胞的胞浆呈棕黄色表达, 主要为支气管上皮细胞和平滑肌细胞。正常组小鼠阳性细胞表达较低, 而模型组小鼠表达较高, 高剂量组和低剂量组小鼠表达降低。见图 2。各组小鼠 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 OD 值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组鼠 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 OD 值与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 高剂量组和低剂量组鼠



A 正常组 B 模型组 C 高剂量组 D 低剂量组

图 2 各组小鼠免疫组织化学结果 (免疫组织化学 × 200)

表 5 各组小鼠 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 表达 ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值			
	CXCR-2	GRO- α	ENA-78	NAP-2
正常组	152.80 ± 25.14	173.20 ± 27.07	233.40 ± 38.72	115.19 ± 21.11
模型组	916.63 ± 154.20 ¹⁾	820.64 ± 124.50 ¹⁾	1231.00 ± 206.30 ¹⁾	1024.82 ± 208.48 ¹⁾
高剂量组	304.17 ± 27.86 ²⁾	415.50 ± 57.39 ²⁾	549.50 ± 80.93 ²⁾	363.76 ± 58.64 ²⁾
低剂量组	401.51 ± 31.59 ²⁾	497.41 ± 45.62 ²⁾	833.79 ± 48.01 ²⁾	575.92 ± 47.07 ²⁾
F 值	16.746	13.534	16.263	13.639
P 值	0.001	0.001	0.000	0.001

注: 1) 与正常组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 OD 值与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

2.5 Real-time PCR 结果

各组小鼠 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 mRNA 表达比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型

组鼠 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 mRNA 表达与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 高剂量组和低剂量组鼠 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 mRNA 表达与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 各组小鼠 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 mRNA 表达 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	mRNA 表达			
	CXCR-2	GRO- α	ENA-78	NAP-2
正常组	0.173 \pm 0.026	0.041 \pm 0.007	0.327 \pm 0.027	0.247 \pm 0.047
模型组	0.414 \pm 0.059 ¹⁾	0.743 \pm 0.101 ¹⁾	1.228 \pm 0.198 ¹⁾	1.189 \pm 0.175 ¹⁾
高剂量组	0.240 \pm 0.026 ²⁾	0.347 \pm 0.064 ²⁾	0.404 \pm 0.061 ²⁾	0.499 \pm 0.065 ²⁾
低剂量组	0.301 \pm 0.012 ²⁾	0.531 \pm 0.034 ²⁾	0.729 \pm 0.081 ²⁾	0.675 \pm 0.044 ²⁾
F 值	10.481	24.935	7.642	17.423
P 值	0.001	0.000	0.008	0.000

注: 1) 与正常组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

3 讨论

气道的炎症是哮喘的特征性病理改变, 包括多种炎症细胞参与, 如中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞等^[9]。动物实验研究表明, BALF 中存在大量的中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞是哮喘的典型特征^[10-11]。当哮喘发作时, 诱发机体的免疫反应, 引起中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞活化、向炎症部位趋化、聚集, 从而释放炎症介质 (如内皮素、血小板活化因子及白三烯等) 间接或者直接损伤气道上皮细胞, 引发气道炎症^[12]。故此, 中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞也称为哮喘的主要炎症效应细胞, 与哮喘的严重程度呈正相关, 是哮喘临床诊断最为重要的指标。本研究显示, 模型组小鼠 BALF 中存在大量的中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞, 与以往研究相一致, 而正常组小鼠 BALF 中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞较少; 给予川贝, 高剂量组和低剂量组小鼠 BALF 中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞均较模型组降低。同时, 本研究病理学观察也证实川贝可降低哮喘小鼠炎症评分。以上结果提示, 川贝可有效抑制哮喘模型小鼠气道炎症反应, 改善哮喘症状。研究证实, IL-8 和 IL-13 在哮喘的发病中起重要作用, 且在哮喘的气道炎症形成中发挥更重要的作用^[13]。IL-8 是趋化因子超家族中的一员 (CXCL

亚家族), 也是中性粒细胞主要的趋化剂和激活剂, 又名中性粒细胞趋化因子, 同时还是哮喘气道炎症的上调因子, 对多种炎症细胞具有趋化作用, 并与哮喘的严重程度密切相关^[14]。IL-13 是一种具有多效性的免疫调节功能的细胞因子, 对哮喘的气道炎症具有激发和促进作用, 是哮喘病理改变发生和发展的主要因素, 可导致哮喘气道慢性持续性炎症, 增加气道阻力, 促进哮喘发病^[15]。本研究显示, 模型组小鼠血清 IL-8 和 IL-13 浓度较高, 而正常组小鼠血清浓度较低; 给予川贝, 高剂量组和低剂量组小鼠血清 IL-8 和 IL-13 浓度降低。以上结果提示, 川贝对哮喘模型小鼠抑制炎症反应的机制可能与其抑制 IL-8 和 IL-13 浓度有关。

趋化因子是一大类功能结构基本相似, 具有和相应的受体结合, 诱导中性粒细胞、淋巴细胞及单核细胞等细胞趋化游走的作用, 从而介导炎症部位的细胞聚集活化, 并参与组织损伤的小分子蛋白质^[16]。CXCR-2 属于趋化因子受体超家族中的重要成员之一, 是趋化因子主要受体。趋化因子受体是表达在中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞表面上介导相应趋化因子发挥生物学功能的关键的 G 蛋白偶联受体超家族。常见的趋化因子配体有 GRO- α 、ENA-78 及 NAP-2 等。CXCR-2 可与 GRO- α 、ENA-78 及 NAP-2 等特异结合, 趋化表达 CXCR2 的中性粒细胞、淋巴细胞等细胞的游走及脱颗粒等一系列生物学效应, 在机体的防御和炎症

反应等方面起重要作用,为哮喘治疗的新靶点^[17]。目前,以趋化因子受体 CXCR-2 为靶点的药物已有所开发^[18]。研究发现,在 IL-13 的刺激下,支气管平滑肌的 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 均升高,且与中性粒细胞的移行和活化有关^[19]。本研究显示,模型组小鼠 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 阳性细胞和基因表达均较高,与以往研究相一致^[20],而在正常组小鼠 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 阳性细胞和基因表达均较低;给予川贝,高剂量组和低剂量组小鼠 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 阳性细胞和基因表达降低。以上结果提示,川贝对哮喘模型小鼠抑制炎症反应的机制可能与其抑制 CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 有关。

综上所述,中药川贝可通过降低中性粒细胞、巨噬细胞,淋巴细胞和嗜酸性粒细胞计数,进而缓解小鼠哮喘的发作,减轻哮喘模型小鼠支气管平滑肌的炎症反应,其机制可能与其抑制 IL-8、IL-13, CXCR-2 和 GRO- α 、ENA-78、NAP-2 有关。

参 考 文 献:

- [1] LICCARDI G, SALZILLO A, PICCOLO A, et al. Dysfunction of small airways and prevalence, airway responsiveness and inflammation in asthma: much more than small particle size of pet animal allergens[J]. *Ups J Med Sci*, 2016, 121(3): 196-197.
- [2] FARAH C S, KEULERS L A, HARDAKER K M, et al. Association between peripheral airway function and neutrophilic inflammation in asthma[J]. *Respirology*, 2015, 20(6): 975-981.
- [3] PARK C S. Size of inhaled corticosteroid and small airway inflammation in asthma[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2017, 9(2): 99-100.
- [4] LEAKER B R, O'CONNOR B, SINGH D, et al. The novel inhaled glucocorticoid receptor agonist GW870086X protects against adenosine-induced bronchoconstriction in asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(2): 501-502.
- [5] 邱彦,刘静,段靖,等.川贝水煎物对大鼠肺气肿治疗作用研究[J].*解放军药学报*, 2014, 30(4): 317-320.
- [6] 李厚忠,齐敏,张羽飞.中药川贝对哮喘大鼠 NO、TNF- α 、MDA 浓度和 SOD 活力及支气管平滑肌炎症反应的影响[J].*中医药学报*, 2013, 41(4): 64-67.
- [7] 李厚忠,任公平,张羽飞.中药川贝对哮喘模型小鼠肺水肿和支气管炎症的影响[J].*中医药信息*, 2014, 31(6): 19-22.
- [8] 李厚忠,任公平,张羽飞.中药川贝对哮喘模型小鼠 VEGF 和 HIF-1 α 表达的影响[J].*中医药信息*, 2014, 31(4): 23-26.
- [9] BARNIG C, LEVY B D. Innate immunity is a key factor for the resolution of inflammation in asthma[J]. *Eur Respir Rev*, 2015, 24(135): 141-143.
- [10] CHOI J, CHOI B K, KIM J S, et al. Picoside II attenuates airway inflammation by downregulating the transcription factor GATA3 and Th2-Related cytokines in a mouse model of HDM-induced allergic asthma[J]. *PLoS One*, 2016, 21(11): e0167098.
- [11] VERHEIJEN K A, WILLEMSSEN L E, BRABER S, et al. The development of allergic inflammation in a murine house dust mite asthma model is suppressed by synbiotic mixtures of non-digestible oligosaccharides and *Bifidobacterium breve* M-16V[J]. *Eur J Nutr*, 2016, 55(3): 1141-1151.
- [12] KURAI J, WATANABE M, TOMITA K, et al. Influence of Asian dust particles on immune adjuvant effects and airway inflammation in asthma model mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e114879.
- [13] HINKS T S, BROWN T, LAU L C, et al. Multidimensional endotyping in patients with severe asthma reveals inflammatory heterogeneity in matrix metalloproteinases and chitinase 3-like protein 1[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(1): 61-75.
- [14] 张霞,徐艳,王玲,等.吸入激素对哮喘和慢性阻塞性肺病患者血清白介素-8、白介素-13 变化的影响[J].*中国老年学杂志*, 2008, 28(20): 2020-2022.
- [15] AL-DAGHRI N M, ALOKAIL M S, DRAZ H M, et al. Th1/Th2 cytokine pattern in Arab children with severe asthma[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(8): 2286-2291.
- [16] 郭宇,李燕,陈庄.趋化因子在哮喘中的作用及研究进展[J].*现代预防医学*, 2012, 39(7): 1764-1767.
- [17] 毕惠娟,王健. CXCR1、CXCR2 及其配体的结构和功能[J].*免疫学杂志*, 2010, 26(12): 1091-1095.
- [18] 吉海杰,胡金凤,陈乃宏.以趋化因子受体为靶点的抗哮喘小分子药物研究进展[J].*药学报*, 2011, 46(11): 1286-1290.
- [19] 金小红,陈存国,李凤仙,等.中重度哮喘急性发作患儿血中 EAN-78 的表达及甲基强的松龙对其表达的影响[J].*中国临床药理学与治疗学*, 2009, 14(5): 564-567.
- [20] 周兴辉,叶辉,罗冬娇,等.内皮中性粒细胞激活肽-78 在哮喘大鼠中性粒细胞中的表达及意义[J].*中华医院感染学杂志*, 2011, 21(18): 3791-3794.

(王荣兵 编辑)