

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.23.002

文章编号: 1005-8982(2016)23-0006-04

论著

白射干素对感染后咳嗽豚鼠细胞因子的影响

邹桂欣, 尤献民, 赵金明, 王光函, 李国信
(辽宁省中医药研究院, 辽宁 沈阳 110034)

摘要:目的 观察白射干素对感染后咳嗽(PIC)豚鼠肺泡灌洗液中细胞因子的影响。**方法** 复制 PIC 豚鼠模型并收集支气管肺泡灌洗液(BALF),测定 BALF 中白细胞总数和分类计数,酶联免疫吸附试验测定细胞因子白介素-4(IL-4)和干扰素- γ (IFN- γ)水平。**结果** 模型组豚鼠肺泡灌洗液中白细胞总数、中性粒细胞、淋巴细胞数及 IL-4 水平较空白组升高($P < 0.05$);IFN- γ 水平较空白组降低($P < 0.05$)。白射干素干预组可明显降低 PIC 豚鼠 BALF 中白细胞总数、中性粒细胞、淋巴细胞及 IL-4 水平,同时升高 IFN- γ 水平,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 提示白射干素可能通过调控细胞因子而减少模型豚鼠气道炎症细胞的浸润,发挥其抗炎、止咳作用。

关键词: 感染后咳嗽;射干;白射干素;白介素-4;干扰素- γ

中图分类号: R259

文献标识码: A

Influences of dichotomitin on cytokines in guinea pig with post infectious cough

Gui-xin Zou, Xian-min You, Jin-ming Zhao, Guang-han Wang, Guo-xin Li
(Liaoning Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Shenyang,
Liaoning 110034, China)

Abstract: Objective To study the effect of dichotomitin on cytokines in post infectious cough (PIC) model of guinea pig. **Methods** PIC guinea pig model was established, dichotomitin was given at the same time. Total WBC number, lymphocytes and neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected. The levels of IFN- γ and IL-4 in BALF were detected by ELISA. **Results** In the mode group, the number of total WBC count, lymphocytes and neutrophils was increased, IL-4 level increased, IFN- γ level decreased ($P < 0.05$) in the BALF compared to the blank group. In the dichotomitin group, total WBC count, neutrophils, lymphocytes and the IL-4 level were obviously reduced, but IFN- γ level was increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Dichotomitin might reduce infiltration of airway inflammatory cells of PIC model of guinea pig, and enhance the immunologic function.

Keywords: post infectious cough; *Rhizoma Belamcandae*; dichotomitin; interleukin-4; interferon- γ

感染后咳嗽(post-infectious cough, PIC)又称感冒后咳嗽^[1]。目前认为呼吸道病毒及其他病原体,如细菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、百日咳杆菌等均可能引起感染后咳嗽,当同时存在 ≥ 2 种病原体感染时,更易使咳嗽延迟不愈^[2]。感冒后咳嗽的致病机制可能与气道炎症及上皮细胞的损伤有关。细菌感染是引发气道炎症的重要因素,革兰阴性菌是呼吸道感

染中主要的致病菌之一,而脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)是决定革兰阴性菌致病力的关键毒素^[3]。目前,国内外学者多采用气道内注射 LPS 法,复制动物气道炎症模型^[4-6]。细胞因子在气道炎症发挥重要作用,其中白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)为 Th2 型细胞因子,是一种重要的炎症表达因子,干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ)为 Th1 型细胞因子,

收稿日期:2015-12-21

是一种调节细胞功能的小分子多肽,能调节机体的细胞免疫功能^[4],IL-4、IFN- γ 以相互拮抗的方式,调节免疫球蛋白 E(immunoglobulins E,IgE)的生成和分泌^[5]。调整 Th1/Th2 平衡(增强 Th1 或抑制 Th2 活性),可能有助于气道炎症的治疗。

射干(rhizoma belamcandae)作为治疗喉痹咽痛的重要药物,始载于《神农本草经》,具有清热解毒、消痰、利咽的功效。前期研究结果提示,射干含有异黄酮成分,有抗炎、止咳等药理活性作用^[9-12]。射干药材中所含白射干素是其抗炎、止咳的药效物质基础成分,因此本实验采用 LPS 滴鼻法,复制动物慢性支气管炎豚鼠模型,观察白射干素对模型豚鼠支气管肺泡灌洗液(bronchio-loalveolar lavage fluids,BALF)中细胞因子的影响,以进一步探讨其抗炎、止咳的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物 豚鼠,雌性,体重 300~450 g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(辽)2010-0001。

1.1.2 主要试剂与仪器 白射干素(成都普瑞法科技有限公司,高效液相色谱法测定纯度 >98.5%);肺宁片(批号:140202,吉林吉春制药股份有限公司),枸橼酸(批号:20140415,国药集团化学试剂有限公司)。IL-4、IFN- γ 酶联免疫吸附试验(enzymelinked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司)。喷雾仪(EM99-002 医用空压机,斯莱达医疗用品有限公司),日本 Sysmex 公司全自动模块式血液体液分析(XN-1000),熏烟箱(自制),黄山牌香烟(焦油含量:11 mg,烟碱含量:1.2 mg,安徽中烟工业有限责任公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与模型复制 豚鼠的饲养环境为温度(20 \pm 2) $^{\circ}$ C,自由饮水,适应性饲养 1 周后,随机分成 6 组,即空白组、模型组、白射干素低、中、高剂量组和阳性对照组(肺宁片),每组 10 只。首先迫使豚鼠慢性吸入香烟烟雾造成气道高反应,用小剂量 LPS 滴鼻诱导豚鼠气道炎症,用枸橼酸刺激法复制豚鼠咳嗽模型。具体操作如下:将豚鼠置熏烟箱中,以锯末 20 g+10 支香烟点燃烟熏,30 min/次,1 次/d,连续 10 d,自由进食吸水,于 11、14 和 17 d 用乙醚浅麻醉,鼻腔滴入 LPS 溶液,滴入量以 1 μ l/g 计算。于第 12、

15 和 18 天,将各组豚鼠置于透明密闭容器中,喷雾仪以 4.5 mol/L 枸橼酸雾化溶液激发咳嗽,40 s/次,1 次/d。

1.2.2 给药方法 于第 19 天开始灌胃,空白组、模型组生理盐水溶液灌胃 20 ml/kg,白射干素高剂量组给药量为 100 mg/(kg \cdot d)[5.00 mg/(ml \cdot d)],白射干素中剂量组给药量为 50 mg/(kg \cdot d)[2.50 mg/(ml \cdot d)],白射干素低剂量组给药量为 25 mg/(kg \cdot d)[1.25 mg/(ml \cdot d)],肺宁片组每天给药量为 580 mg/(kg \cdot d)[29.0 mg/(ml \cdot d)],灌胃 1 次/d,连续给药 5 d,给药结束后测定豚鼠各观察指标。

1.2.3 BALF 收集分析 将实验豚鼠用 2%戊巴比妥(25 mg/kg)麻醉后仰卧固定于操作台,打开胸腔,暴露气管和双肺,结扎右主支气管,在隆突上用套管针刺至左肺,缓慢注入无菌生理盐水 2 ml,停留 30 s,回吸液体,重复 3 次,灌洗液回收率为 70%~85%,用 2 层无菌纱布过滤,取灌洗液在 1 200 r/min 低温离心 10 min,弃上清液,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)溶解细胞沉淀,在全自动模块式血液体液分析仪上测定白细胞总数、淋巴细胞计数及中性粒细胞计数,上清液置入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存,应用 IL-4、IFN- γ 检测试剂盒,按试剂盒说明书用 ELISA 分别测定各检测指标的浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用格拉布斯准则剔除逸出值后,多组间比较用方差分析,两两比较用 LSD- t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALF 中白细胞总数和分类计数测定

2.1.1 白细胞总数的变化 空白组、模型组、白射干素中、高剂量组及阳性对照组的白细胞总数比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=15.231$, $P=0.000$)。两两比较结果,模型组与空白组的白细胞总数比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义($t=8.074$, $P=0.000$),模型组的白细胞总数升高;白射干素中、高剂量组与模型组的白细胞总数比较,经 LSD- t 检验,差异有统计意义($t=2.675$ 和 2.713 , $P=0.010$ 和 0.009),白射干素中、高剂量组的白细胞总数降低。

2.1.2 淋巴细胞计数的变化 空白组、模型组、中高剂量白射干素组及阳性对照组的淋巴细胞计数比

较,经方差分析,差异有统计学意义($F=6.846, P=0.000$)。两两比较结果,模型组与空白组的淋巴细胞计数比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义($t=5.445, P=0.000$),模型组的淋巴细胞计数升高;白射干素中、高剂量组与模型组的淋巴细胞计数比较,经 LSD- t 检验,差异有统计意义($t=2.674$ 和 $3.178, P=0.01$ 和 0.002),白射干素中、高剂量组的淋巴细胞计数降低。

2.1.3 中性粒细胞计数的变化 空白组、模型组、中高剂量白射干素组及阳性对照组的中性粒细胞计数比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=14.990, P=0.000$)。两两比较结果,模型组与空白组的中性粒细胞计数比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义($t=8.024, P=0.000$),模型组的中性粒细胞计数升高;白射干素中、高剂量组与模型组的中性粒细胞计数比较,经 LSD- t 检验,差异有统计意义($t=2.438$ 和 $2.464, P=0.018$ 和 0.017),白射干素中、高剂量组的中性粒细胞计数降低,提示白射干素组有减少感染后咳嗽模型豚鼠 BALF 中白细胞总数、淋巴细胞及中性粒细胞的作用。见表 1。

2.2 BALF 中 IL-4、IFN- γ 水平

2.2.1 IL-4 表达的变化 空白组、模型组、中高剂量白射干素组及阳性对照组的 IL-4 含量比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=3.804, P=0.005$)。两两比较结果,模型组与空白组的 IL-4 含量比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义($t=2.731, P=0.009$),模型组的 IL-4 含量升高;白射干素高剂量组、阳性对照组与模型组的 IL-4 含量比较,经 LSD- t 检验,差异有统计意义($t=2.300$ 和 $3.702, P=0.026$ 和 0.001),

白射干素高剂量组、阳性对照组的 IL-4 含量降低。

2.2.2 IFN- γ 表达的变化 空白组、模型组、中高剂量白射干素组及阳性对照组的 IFN- γ 含量比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=2.738, P=0.028$)。两两比较结果,模型组与空白组的 IFN- γ 含量比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义($t=-3.151, P=0.003$),模型组的 IFN- γ 含量降低;白射干素中剂量组、阳性对照组与模型组的 IFN- γ 含量比较,经 LSD- t 检验,差异有统计意义($t=-2.405$ 和 $-3.166, P=0.020$ 和 0.003),白射干素中剂量组、阳性对照组的 IFN- γ 含量升高。提示白射干组有明显降低感染后咳嗽模型豚鼠 BALF 中 IL-4 浓度,升高 IFN- γ 水

表 2 各组 BALF 中 IL-4、IFN- γ 水平比较
($n=10, \text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-4	IFN- γ
空白组	77.12 \pm 9.65	87.91 \pm 13.73
模型组	89.47 \pm 12.85 ¹⁾	70.87 \pm 7.12 ¹⁾
白射干素低剂量组	83.11 \pm 10.07	81.31 \pm 12.05
白射干素中剂量组	78.08 \pm 9.40	84.28 \pm 10.26 ²⁾
白射干素高剂量组	80.34 \pm 9.05 ²⁾	79.40 \pm 12.83
阳性对照组	73.97 \pm 9.21 ³⁾	84.14 \pm 13.63 ³⁾
F 值	3.804	2.738
P 值	0.005	0.028

注:1)与空白组比较, $P<0.05$;2)与模型组比较, $P<0.05$;3)与模型组比较, $P<0.01$

平的作用。见表 2。

3 讨论

感染后咳嗽是一种较常见的呼吸道疾病之一,当病毒、细菌、支原体、衣原体或其他病原体感染后,呼吸道急性期症状消失,而咳嗽仍然迁延不愈,通常持续 3~8 周,胸片表现正常,常常能够自愈,临床上称之为感冒后咳嗽。美国胸内科医师学会公布《美国肺科医师协会以循证为依据的感染后咳嗽的临床实践指南》,其中指出感染后咳嗽的致病机制可能与呼吸道广泛的炎症及上皮细胞的损伤有关。国内大多认为,气道炎症是气道高反应引起咳嗽的决定性因素之一。病原体感染机体后,可使机体的免疫功能紊乱,细胞因子、炎性介质及炎症细胞分泌或功能失调,引起炎症网络级联反应,从而导致气道阻塞性改变、反应性增高病理过程的发生。参与形成气道炎症反应的免疫因素涉及细胞因子、炎性介质、炎症细

表 1 各组 BALF 中白细胞总数和分类计数比较
($n=10, \times 10^6/L, \bar{x} \pm s$)

组别	白细胞总数	淋巴细胞	中性粒细胞
空白组	0.74 \pm 0.07	0.22 \pm 0.11	0.28 \pm 0.08
模型组	5.45 \pm 0.92 ¹⁾	0.50 \pm 0.08 ¹⁾	4.40 \pm 0.23 ¹⁾
白射干素低剂量组	4.50 \pm 1.24	0.44 \pm 0.09	3.52 \pm 0.82
白射干素中剂量组	4.21 \pm 1.65 ²⁾	0.38 \pm 0.15 ²⁾	3.35 \pm 1.33 ³⁾
白射干素高剂量组	3.85 \pm 1.70 ²⁾	0.36 \pm 0.08 ²⁾	3.09 \pm 1.75 ³⁾
阳性对照组	3.98 \pm 1.71	0.35 \pm 0.17	3.12 \pm 1.63
F 值	15.231	6.846	14.990
P 值	0.000	0.000	0.000

注:1)与空白组比较, $P=0.000$;2)与模型组比较, $P<0.01$;3)与模型组比较, $P<0.05$

胞 3 类物质,细胞因子如白介素,肿瘤坏死因子,转化生长因子等;炎性介质主要有白三烯、组胺等;炎症细胞包括肥大细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、T 淋巴细胞等^[13]。T 细胞活化后释放生物活性物质,可引起不同程度的气道上皮损伤和脱落,激发气道炎症,提高气道反应性,刺激咳嗽发生,其主要分为 Th1 和 Th2 两类,经典的 Th1 型细胞主要分泌 IFN- γ 、肿瘤坏死因子 α 和白介素 -2, Th2 细胞主要分泌的 IL-4、白介素 -5、白介素 -13 等细胞,可辅助 B 细胞促进 IgE 生成、嗜酸性粒细胞 (Eosinophil, EOS) 等炎症细胞分化、募集、活化和黏液的高分泌,可介导包括支气管哮喘在内的过敏性疾病的发生、发展。CD4⁺ T 细胞分泌的 Th2 细胞因子与哮喘气道高反应性 (airway hyper-reponsiveness, AHR)、气道 EOS 浸润和活化,以及血清 IgE 增高显著相关^[14]。Th1 对 Th2 效应有拮抗作用。Th1/Th2 功能失衡在气道炎症中的作用近年来备受关注, Th1/Th2 失衡是气道炎症和气道高反应性发生、发展的关键。正常情况下, Th1 和 Th2 细胞处于相对平衡,维持机体正常免疫功能。当机体受到抗原刺激时,上述平衡被打破, Th1 反应降低, Th2 反应相应增加,即趋向于 Th2 优势,使 Th1/Th2 失衡导致免疫反应性疾病的发生。而由 Th1 和 Th2 细胞分泌的两种细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 被认为在该病理过程中起关键作用^[15]。Th1 活性增强或 Th2 活性被抑制,均有可能改善气道炎症症状。

白射干素是射干止咳的药效物质成分之一,对由枸橼酸引咳的雌性豚鼠有一定的止咳作用。本实验结果表明,白射干素有降低感染后咳嗽豚鼠肺泡灌洗液中白细胞总数和淋巴细胞的作用,能降低模型动物 BALF 中 IL-4 的含量,升高 IFN- γ 的表达水

平,提示白射干素可能通过调节豚鼠 BALF 中 Th1/Th2 平衡而发挥其抗炎、止咳药理效应。

参 考 文 献:

- [1] 张旺生. 止咳散加减治疗感染后咳嗽的疗效及对神经源性气道炎症介质的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2013.
- [2] 季坤. 祛风宣肺方治疗感染后咳嗽的疗效观察及对气道神经源性炎症的作用研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [3] 沈良贤, 李敏, 孙龄云, 等. 脂多糖激活补体诱导内皮细胞释放粘附分子和凋亡[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(9): 1245-1249.
- [4] 陈英华, 吕嘉文, 翟启良, 等. LPS 直接及间接作用致小鼠急性肺损伤模型的建立[J]. 中国临床解剖学杂志, 2015, 33(4): 439-443.
- [5] 顾鹏程, 许惠琴, 范欣生, 等. 内毒素诱导致敏小鼠建立支气管哮喘动物模型的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 1(33): 56-59.
- [6] 吴海青, 李涛平, 徐健, 等. 间充质干细胞对内毒素诱导急性肺损伤大鼠 NF- κ B 的影响[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(11): 1952-1955.
- [7] 王传博, 李泽庚, 彭波, 等. 芪白平肺胶囊对慢阻肺痰瘀阻肺证模型大鼠支气管肺泡灌洗液细胞因子的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11): 2807-2809.
- [8] 刘春涛, 王曾礼. 气道炎症疾病[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 289.
- [9] 赵金明, 齐越, 秦文艳, 等. 射干提取物止咳药效动力学研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(4): 46-50.
- [10] 徐飞, 崔文强, 董竟成. 射干麻黄汤治疗支气管哮喘随机对照试验系统评价[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(45): 77-80.
- [11] 张杰, 曾毓, 常义生, 等. 射干化学成分研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 4(24): 57-59.
- [12] 管仲莹, 李国信, 孟莉, 等. 射干有效成分体外抗病毒实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(8): 1814-1816.
- [13] 温丽娜. CLKCL 治疗小儿上呼吸道感染后咳嗽药效学研究及机理探讨[D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.
- [14] 房祥峰. 气管内注射 TSLP 中和抗体抑制哮喘小鼠气道炎症和气道高反应性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [15] 许芳芳. 辛伐他汀对哮喘大鼠 Th1/Th2 平衡及 MMP-9 及 TIMP-1 表达的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.

(童颖丹 编辑)