

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.14.002
文章编号: 1005-8982 (2023) 14-0009-07

哮喘·论著

运脾泻肺化痰汤对哮喘大鼠肺组织 相关蛋白表达的影响*

陈娜¹, 陈竹¹, 刘志伟¹, 杜丽¹, 李艳静¹, 阳和平², 骆弟琴³, 王文洲⁴, 曹正连¹

(1. 贵州中医药大学第二附属医院 贵州 贵阳 550003; 2. 广元市昭化区妇幼保健院
四川 广元 628021; 3. 黔西南州中医院 贵州 黔西 562400; 4. 贵州中医药大学
贵州 贵阳 550025)

摘要: 目的 探讨运脾泻肺化痰汤对哮喘模型大鼠肺组织相关蛋白表达的影响。**方法** 采用卵白蛋白诱导复制哮喘大鼠模型, 将大鼠分为正常组、模型组、运脾泻肺化痰汤高剂量组(0.020 mL/g)、运脾泻肺化痰汤中剂量组(0.010 mL/g)、运脾泻肺化痰汤低剂量组(0.005 mL/g)、西药组(0.010 mL/g)、联合组(中药0.010 mL/g+西药0.010 mL/g), 每组各10只, 共7组。分别在第1天和第8天腹腔注射1 mL混悬液[含卵白蛋白100 mg + Al(OH)₃100 mg/mL]致敏。第15天开始, 用1%卵白蛋白激发, 隔日1次, 共激发7次, 第16天开始灌服治疗, 连续4周后采集大鼠肺泡灌洗液及肺组织。行瑞氏-吉姆萨染色观察大鼠肺泡灌洗液中白细胞计数及细胞分类情况; Western blotting检测大鼠肺组织 Iκκ-α、Iκκ-β 蛋白表达; 实时荧光定量酶聚合酶链反应(qRT-PCR)检测大鼠肺组织中 Iκκ-α、Iκκ-β、IκBα、IκBβ mRNA 表达。**结果** 模型组白细胞计数、嗜酸性粒细胞占比、中性粒细胞占比均较正常组高, 单核细胞占比均较正常组低($P < 0.05$); 运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组、联合组的白细胞计数、嗜酸性粒细胞占比、中性粒细胞占比均较模型组低($P < 0.05$), 运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、联合组的单核细胞占比均较模型组高($P < 0.05$)。模型组 Iκκ-α、Iκκ-β mRNA 相对表达量均较正常组高($P < 0.05$), 运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组、联合组 Iκκ-α、Iκκ-β mRNA 相对表达量均较模型组低($P < 0.05$), 联合组 Iκκ-α、Iκκ-β mRNA 相对表达量均较西药组低($P < 0.05$); 模型组 IκBα、IκBβ mRNA 相对表达量均较正常组低($P < 0.05$), 运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组、联合组 IκBα、IκBβ mRNA 相对表达量均较模型组高($P < 0.05$), 联合组 IκBα、IκBβ mRNA 相对表达量均较西药组高($P < 0.05$)。模型组 Iκκ-α、Iκκ-β 蛋白相对表达量均较正常组高($P < 0.05$), 运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组、联合组 Iκκ-α、Iκκ-β 蛋白相对表达量均较模型组低($P < 0.05$), 联合组 Iκκ-α、Iκκ-β 蛋白相对表达量均较西药组低($P < 0.05$)。**结论** 运脾泻肺化痰汤可减轻肺泡灌洗液炎症细胞水平, 通过上调 NF-κB 的抑制因子 IκBα、IκBβ 基因表达, 下调 Iκκ-α、Iκκ-β 蛋白及基因表达量, 有减轻哮喘大鼠气道炎症的作用。

关键词: 哮喘; 运脾泻肺化痰汤; 大鼠; 气道炎症; 核因子 κB

中图分类号: R562.25

文献标识码: A

Effects of Yunpi Xiefei Huatan Decoction on expressions of proteins associated with nuclear factor-κB in lung tissues of asthmatic rats*

Chen Na¹, Chen Zhu¹, Liu Zhi-wei¹, Du Li¹, Li Yan-jing¹, Yang He-ping²,
Luo Di-qin³, Wang Wen-zhou⁴, Cao Zheng-lian¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550003,

收稿日期: 2022-09-06

* 基金项目: 贵州省科技厅基础研究计划(No: 黔科和基础[2020]1Y365); 国家自然科学基金地区科学基金项目(No: 81860868); 贵州省“十四五”中医药、民族医药重点建设学科(No: 黔中医药函[2021]95号-6); 贵州省中医儿科诊疗中心建设项目(No: 黔中医药函[2021]58号)

[通信作者] 陈竹, E-mail: 918236355@qq.com

China; 2. Zhaohua District Maternal and Child Health Hospital of Guangyuan City, Guangyuan, Sichuan 628021, China; 3. Qianxinan Zhou TCM Hospital, Qianxi, Guizhou 562400, China; 4. Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Yunpi Xiefei Huatan Decoction on expressions of proteins associated with nuclear factor-kappa (NF- κ B) in lung tissues of asthmatic rats. **Methods** The rat models of asthma were induced by ovalbumin (OVA) treatment. Specifically, the rats were randomly divided into normal group, model group, high-dose (0.020 mL/g), medium-dose (0.010 mL/g) and low-dose (0.005 mL/g) Yunpi Xiefei Huatan Decoction groups, Western medicine group (0.01 mL/g), and combination group (0.01 mL/g of Chinese medicine + 0.01 mL/g of Western medicine), with 10 rats in each group. The rats were sensitized with intraperitoneal injection of 1 mL of suspension containing 100 mg of ovalbumin and 3100 mg/mL of Al (OH) on day 1 and day 8, followed by stimulation with 1% OVA once every other day since day 15 for a total of 7 sessions. The rats were administrated with according medicines from the 16th day on for a consecutive of 4 weeks, and then the alveolar lavage fluid and lung tissues of rats were collected. The white blood cell (WBC) count and the number of WBC subsets in rat alveolar lavage fluid were determined by Wright-Giemsa staining. Western blotting was used to detect the relative protein expression levels of I κ k- α and I κ k- β in rat lung tissues. The mRNA expression levels of I κ k- α , I κ k- β , I κ B α and I κ B β in rat lung tissues were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** The WBC count and proportions of eosinophils and neutrophils were higher, and the proportion of monocytes was lower in the model group compared with the normal group ($P < 0.05$). The WBC count and proportions of eosinophils and neutrophils were lower, and the proportion of monocytes was higher in the high-dose, medium-dose and low-dose Yunpi Xiefei Huatan Decoction groups, Western medicine group, and combination group compared with the model group ($P < 0.05$). The relative mRNA expression levels of I κ k- α and I κ k- β were higher in the model group than those in the normal group ($P < 0.05$), while those in the high-dose, medium-dose and low-dose Yunpi Xiefei Huatan Decoction groups, Western medicine group, and combination group were lower relative to those in the model group ($P < 0.05$). Besides, the relative mRNA expression levels of I κ k- α and I κ k- β in the combination group were lower than those in the Western medicine group ($P < 0.05$). The relative mRNA expression levels of I κ B α and I κ B β in the model group were lower than those in the normal group ($P < 0.05$), while they were higher in the high-dose, medium-dose and low-dose Yunpi Xiefei Huatan Decoction groups, Western medicine group, and combination group compared with the model group ($P < 0.05$). The relative mRNA expression levels of I κ B α and I κ B β in the combination group were even higher than those in the Western medicine group ($P < 0.05$). The relative protein expression levels of I κ k- α and I κ k- β in the model groups were higher than those in the normal group ($P < 0.05$), whereas they were lower in the high-dose, medium-dose and low-dose Yunpi Xiefei Huatan Decoction groups, Western medicine group, and combination group compared with the model group ($P < 0.05$). In addition, the relative protein expression levels of I κ k- α and I κ k- β in the combination group were even lower than those in the Western medicine group ($P < 0.05$). **Conclusions** Yunpi Xiefei Huatan Decoction may reduce the levels of pro-inflammatory cells in the alveolar lavage fluid, and upregulate the gene expressions of NF- κ B inhibitors I κ B α and I κ B β while downregulating the expressions of I κ k- α and I κ k- β , thereby alleviating the airway inflammation in asthmatic rats.

Keywords: asthma; Yunpi Xiefei Huatan Decoction; rats; airway inflammation; nuclear factor- κ B

支气管哮喘(以下简称哮喘)是儿童最为常见的慢性气道炎症性疾病,根据流行病学调查显示^[1],我国城区 0~14 岁儿童哮喘发病率高达 3.02%,近年来呈不断上升趋势。临床上主要以气道黏液增加、气道壁增厚、气道狭窄及伴有可逆性气流受限为特征,属于一种异质性身心疾病,不仅严重影响人类健康,增加家庭及社会负担,还增加来自个体、家庭等层面的心理压力^[2]。目前

哮喘的治疗主要采用阶梯治疗方案,但部分患儿的疗效并不十分理想,且长期不规范使用全身性糖皮质激素容易对机体免疫功能造成较大损害,并且对年龄小的哮喘患儿靶向治疗的有效性和安全性尚不明确^[3]。中药在治疗哮喘痰液生成增多、痰鸣难消等方面的临床疗效好^[4-5]。运脾泻肺化痰汤是陈竹教授结合贵州中医药大学第二附属医院名老中医黄建业教授学术思想,并结合黄老 50 多

年临床经验,不断总结而成。该方在一定程度上具有抑制哮喘气道炎症的作用^[6]。基于此,本研究拟探讨运脾泻肺化痰汤对哮喘大鼠肺组织核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)及相关蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠70只,长沙市天勤生物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2014-0011,体重(50±5)g,雌雄各半。饲养于贵州医科大学实验动物中心独立通气笼盒,饲料、垫料等均由贵州医科大学提供,自由饮水,足量饲料,光照时间(8:00~20:00),饲养环境温度20℃~24℃,相对湿度40%~70%。

1.2 主要试剂、仪器及药物

卵白蛋白购自美国Sigma公司,氢氧化铝[Al(OH)₃]购自博奥森生物技术有限公司,兔多抗IkB α 、兔多抗IkB β 、兔多抗I κ k- α 、兔多抗I κ k- β 均购自美国Affinity Bioscience公司。DW-HL388-80℃冰箱购自中科美菱公司,载玻片及盖玻片购自江苏世泰实验器材有限公司, BX53型生物显微镜购自日本奥林巴斯公司, Multiskan MK3全自动酶标仪购自美国赛默飞世尔科技公司, ICV-450电热恒温培养箱购自日本ASONE公司, C2500-R-230V微型高速离心机购自美国Labnet公司, DO10快速瑞氏-吉姆萨染液购自南京建成生物工程研究所。运脾泻肺化痰汤由胆南星、瓜蒌子、瓜蒌壳、法半夏、浙贝母、苦杏仁、黄芩、槟榔、焦山楂、茯苓、陈皮、枳实、甘草组成(经贵州中医药大学第二附属医院中药制剂科鉴定,符合用药标准,该方由贵州中医药大学二附院新绿智能药房提供), 羧甲司坦片(北京曙光药业有限责任公司,批号:H11021036)。

1.3 模型复制

参考文献[7]复制哮喘模型,在第1天和第8天腹腔注射1 mL混悬液[含卵白蛋白100 mg/mL + Al(OH)₃100 mg/mL]致敏。第15天开始,用1%卵白蛋白雾化激发,隔日1次,共激发7次,雾化流量5 mL/min,30 min/次。大鼠出现呼吸频率加快、明显腹部收缩、咳嗽、精神萎靡、反应迟缓、活

动度下降、鼠毛脱落、散乱无华、摄食量减少明显等现象时,提示模型复制成功。

1.4 分组与给药

将模型复制成功的SD大鼠随机分为模型组、运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组及联合组,每组10只大鼠;另取10只SD大鼠作为正常组。模型组给予生理盐水灌胃,运脾泻肺化痰低剂量组给予中药0.005 mL/g灌胃,运脾泻肺化痰中剂量组给予中药0.010 mL/g灌胃,运脾泻肺化痰高剂量组给予中药0.020 mL/g灌胃,西药组给予羧甲司坦0.010 mL/g灌胃,联合组给予中药0.010 mL/g灌胃后,再给予羧甲司坦0.010 mL/g灌胃。6组大鼠均连续灌胃4周。

1.5 瑞氏-吉姆萨染色法观察大鼠BALF中炎症细胞

行瑞氏-吉姆萨染色观察大鼠肺泡灌洗液(BALF)中白细胞总数及细胞分类情况。各组大鼠BALF离心后取底下的沉淀细胞,立即加入200 μ L稀释液,在细胞板内按照实验步骤进行涂片、固定,染色,室温放置2 min,进行细胞计数,镜下观察并根据公式(N/4)³10³10⁶/L³20计算白细胞总数,其中N代表计数板内的每一小格的白细胞数目。瑞氏-吉姆萨染色细胞分类结果判断:白细胞的胞膜被染成褐黑色,胞浆呈淡红色,胞核呈紫红色;嗜酸性粒细胞的胞浆一般呈石榴子样分布,一般呈红色;淋巴细胞的胞浆为浅蓝色;中性粒细胞的胞浆为淡紫红色;单核细胞的胞浆为灰蓝色。

1.6 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测大鼠肺组织Ikk- α 、Ikk- β 、IkB α 、IkB β mRNA表达

将肺组织研磨成浆,加入TRIzol试剂,充分裂解后4℃、12 000 r/min离心15 min,提取RNA,并加入400 μ L异丙醇,4℃、12 000 r/min离心10 min,底层见白色沉淀物RNA,弃上清液,加入1 mL无75% RNase free水,4℃、12 000 r/min离心5 min,此过程共重复2次。最后在检测板上滴加2 μ L RNA,用酶标仪检测光密度(OD)值,并根据OD值计算出RNA的最佳浓度。将RNA逆转录成cDNA,反应条件:25℃、5 min,50℃、15 min,85℃、5 min,4℃、10 min。随后6倍稀释cDNA进行PCR,反应条件:50℃预变性2 min,95℃变性10 min,95℃退火30 s,60℃延伸30 s,40个循环。绘制熔解及扩增曲线,GAPDH为内参基因,以2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算Ikk- α 、

I κ κ-β、I κ Bα、I κ Bβ mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物的序列设计

基因	引物序列	长度/bp
I κ κ-α	正向: 5'-GCAGGAAAGAGGCAGAAAG-3'	195
	反向: 5'-GCTAACGCTCTGCCATCTTG-3'	
I κ κ-β	正向: 5'-CCTTCGGAATAACAGCTGCC-3'	152
	反向: 5'-TGTCGATGTGATGCCAAAC-3'	
I κ Bα	正向: 5'-ATGGCTACCTGGGCATCGTG-3'	136
	反向: 5'-TTCAACAGGAGCGAGACCAG-3'	
I κ Bβ	正向: 5'-GATGAATGGTGGCAGCTGG-3'	249
	反向: 5'-TGTTGGCTAGGTCGTTCT-3'	
GAPDH	正向: 5'-ACAGCAACAGGTTGCTGGAC-3'	253
	反向: 5'-TTTGAGGCTGCAGCGAACTT-3'	

1.7 Western blotting 检测大鼠肺组织中 I κ κ-α、I κ κ-β 蛋白表达

研磨剪碎的肺组织, 4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液保存于 -80 ℃ 冰箱中备用。提取总蛋白, 利用 BCA 试剂盒测定浓度, 在沸水中加热 10 min 使蛋白变性, 用 10% 聚丙烯酰胺 (SDS) 凝胶电泳, 恒压 250 mV 至溴酚蓝大约分离到胶底部, 最后终止蛋白电泳。将蛋白转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上并标记, 制备三明治由上到下的顺序: 滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸。最后根据蛋白分子量不同设置不同的转膜条件, 根据目的蛋白分子量剪下条带。将 PVDF 膜浸泡于 5% 的封闭液中, 室温下摇床封闭 2 h。PVDF 膜浸泡于稀释后一抗 (I κ κ-α、I κ κ-β, 均 1:1 000 稀释) 的孵育液中, 使其充分浸

泡, 摇床孵育过夜, 4 ℃ 下洗出多余的一抗。按 1:50 000 比例稀释相应的二抗并标记, 摇床孵育 2 h, 摇床上洗膜 5 次, 5 min/次, 共 25 min。在 PVDF 膜上滴加配置过的显影剂 (A 液:B 液=1:1), 放入显影液曝光显影, 晾干胶片、扫描, 用 Band Scan 软件分析胶片灰度值, 并保存图片。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 26.0 统计软件。计量资料采用以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 运脾泻肺化痰汤对哮喘大鼠 BALF 中炎症细胞的影响

各组大鼠肺组织中白细胞计数、嗜酸性粒细胞占比、中性粒细胞占比、单核细胞占比比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 淋巴细胞占比比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。进一步两两比较, 模型组白细胞计数、嗜酸性粒细胞占比、中性粒细胞占比比较正常组高, 单核细胞占比比较正常组低 ($P < 0.05$); 运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组、联合组的白细胞计数、嗜酸性粒细胞占比、中性粒细胞占比比较模型组低 ($P < 0.05$), 运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、联合组的单核细胞占比比较模型组高 ($P < 0.05$)。见表 2。

白细胞清晰易分, 细胞膜清晰呈紫黑色, 细胞核着色呈深浅不同的紫红色, 胞浆浅红色。胞浆中各种颗粒区分明显, 其中中性粒细胞胞浆中

表 2 各组大鼠 BALF 中炎症细胞比较 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	白细胞/($\times 10^7/L$)	嗜酸性粒细胞/%	中性粒细胞/%	淋巴细胞/%	单核细胞/%
正常组	6.09 ± 0.33	4.41 ± 0.002	66.64 ± 0.028	9.31 ± 0.013	11.16 ± 0.002
模型组	87.28 ± 18.02 ^①	7.96 ± 0.003 ^①	81.26 ± 0.013 ^①	4.29 ± 0.010	3.24 ± 0.007 ^①
运脾泻肺化痰汤高剂量组	32.29 ± 3.92 ^②	5.61 ± 0.002 ^{②③}	74.39 ± 0.010 ^{②③}	7.00 ± 0.021	7.06 ± 0.013 ^{②③}
运脾泻肺化痰汤中剂量组	16.68 ± 3.13 ^{②③}	5.06 ± 0.001 ^{②③}	71.14 ± 0.005 ^{②③}	7.62 ± 0.004	9.64 ± 0.011 ^{②③}
运脾泻肺化痰汤低剂量组	50.52 ± 18.18 ^②	5.48 ± 0.001 ^{②③}	74.22 ± 0.003 ^{②③}	6.23 ± 0.010	7.93 ± 0.017 ^{②③}
西药组	33.39 ± 3.46 ^②	6.09 ± 0.001 ^②	77.39 ± 0.001 ^②	6.40 ± 0.006	3.23 ± 0.021
联合组	11.18 ± 2.53 ^{②③}	4.80 ± 0.001 ^{②③}	69.93 ± 0.001 ^{②③}	9.17 ± 0.039	8.37 ± 0.019 ^{②③}
F 值	23.601	122.175	44.173	2.733	13.420
P 值	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000

注: ①与正常组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$; ③与西药组比较, $P < 0.05$ 。

颗粒呈淡紫红色、嗜酸性粒细胞胞浆中颗粒呈桔红色; 单核细胞的包浆呈灰蓝色, 胞浆中颗粒呈

细小淡紫红色或蓝紫色; 淋巴细胞包浆呈淡蓝色。见图 1。

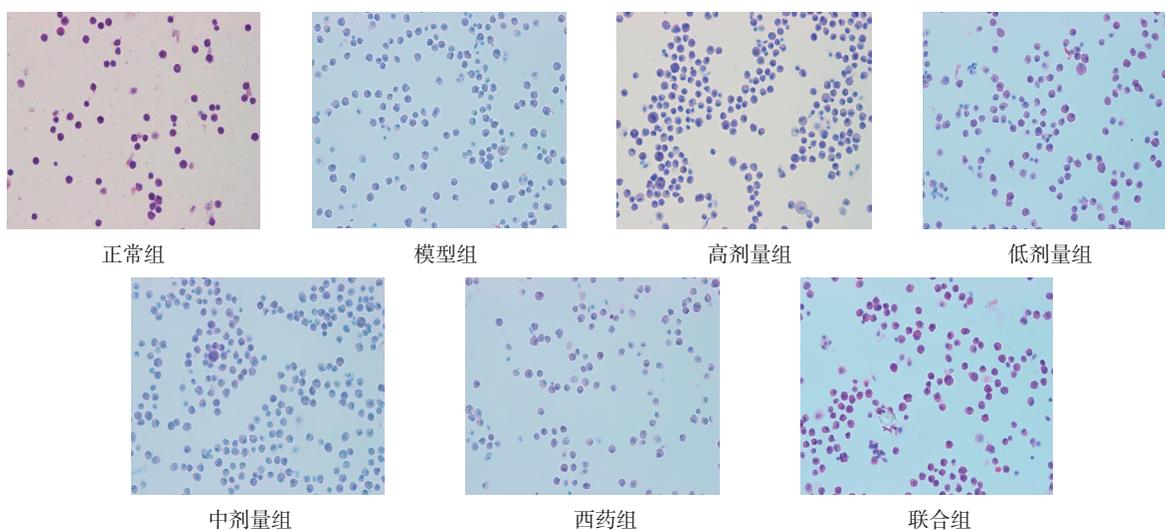


图 1 大鼠 BALF 中炎症细胞病理改变 (吉姆萨染色 × 400)

2.2 各组大鼠肺组织 Iκκ-α、Iκκ-β、IκBα、IκBβ mRNA 相对表达量比较

各组大鼠肺组织 Iκκ-α、Iκκ-β、IκBα、IκBβ mRNA 相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 模型组 Iκκ-α、Iκκ-β mRNA 相对表达量较正常组高 ($P < 0.05$), 运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组、联合组 Iκκ-α、

Iκκ-β mRNA 相对表达量较模型组低 ($P < 0.05$), 联合组 Iκκ-α、Iκκ-β mRNA 相对表达量较西药组低 ($P < 0.05$); 模型组 IκBα、IκBβ mRNA 相对表达量较正常组低 ($P < 0.05$), 运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组、联合组 IκBα、IκBβ mRNA 相对表达量较模型组高 ($P < 0.05$), 联合组 IκBα、IκBβ mRNA 相对表达量较西药组高 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠肺组织 Iκκ-α、Iκκ-β、IκBα、IκBβ mRNA 相对表达量比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Iκκ-α mRNA	Iκκ-β mRNA	IκBα mRNA	IκBβ mRNA
正常组	1.258 ± 0.308	1.237 ± 0.304	1.124 ± 0.135	1.105 ± 0.188
模型组	5.918 ± 0.733 ^①	6.668 ± 0.520 ^①	0.269 ± 0.045 ^①	0.305 ± 0.094 ^①
运脾泻肺化痰汤高剂量组	3.015 ± 0.563 ^{①②}	3.965 ± 0.550 ^{①②}	0.702 ± 0.091 ^{①②③}	0.646 ± 0.082 ^{①②}
运脾泻肺化痰汤中剂量组	3.189 ± 0.795 ^{①②}	4.002 ± 0.901 ^{①②}	0.659 ± 0.111 ^{①②③}	0.620 ± 0.123 ^{①②}
运脾泻肺化痰汤低剂量组	4.303 ± 0.735 ^{①②}	5.108 ± 1.020 ^{①②③}	0.459 ± 0.065 ^{①②}	0.465 ± 0.076 ^{①②}
西药组	3.809 ± 1.059 ^{①②}	3.395 ± 0.602 ^{①②}	0.461 ± 0.105 ^{①②}	0.553 ± 0.077 ^{①②}
联合组	2.409 ± 0.470 ^{①②③}	2.816 ± 0.706 ^{①②③}	0.830 ± 0.089 ^{①②③}	0.809 ± 0.135 ^{①②③}
F 值	26.450	36.554	52.010	28.765
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与正常组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$; ③与西药组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠肺组织 Iκκ-α、Iκκ-β 蛋白相对表达量比较

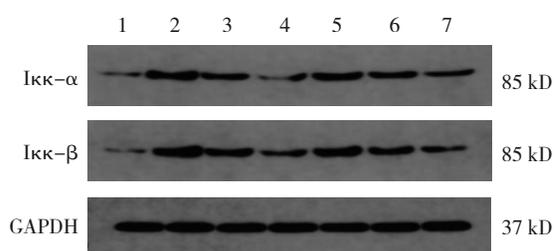
各组大鼠肺组织 Iκκ-α、Iκκ-β 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 模型组 Iκκ-α、Iκκ-β 蛋白相对表达量

较正常组高 ($P < 0.05$), 运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组、联合组 Iκκ-α、Iκκ-β 蛋白相对表达量较模型组低 ($P < 0.05$), 联合组 Iκκ-α、Iκκ-β 蛋白相对表达量较西药组低 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 2。

表 4 各组大鼠肺组织 I κ κ- α 、I κ κ- β 蛋白相对表达量比较
($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	I κ κ- α	I κ κ- β
正常组	0.234 ± 0.048	0.179 ± 0.039
模型组	0.920 ± 0.067 ^①	0.839 ± 0.062 ^①
运脾泻肺化痰汤高剂量组	0.553 ± 0.093 ^{①②③}	0.490 ± 0.054 ^{①②}
运脾泻肺化痰汤中剂量组	0.439 ± 0.064 ^{①②③}	0.373 ± 0.032 ^{①②③}
运脾泻肺化痰汤低剂量组	0.798 ± 0.047 ^{①②③}	0.701 ± 0.056 ^{①②③}
西药组	0.656 ± 0.038 ^{①②}	0.551 ± 0.071 ^{①②}
联合组	0.366 ± 0.030 ^{①②③}	0.298 ± 0.036 ^{①②③}
F 值	85.996	98.869
P 值	0.000	0.000

注：①与正常组比较， $P < 0.05$ ；②与模型组比较， $P < 0.05$ ；③与西药组比较， $P < 0.05$ 。



1: 正常组; 2: 模型组; 3: 高剂量组; 4: 中剂量组; 5: 低剂量组; 6: 西药组; 7: 联合组。

图 2 各组大鼠肺组织 I κ κ- α 、I κ κ- β 蛋白的表达

3 讨论

本研究主要是采用卵白蛋白诱导哮喘模型大鼠来探讨运脾泻肺化痰汤肺组织的影响，采用羧甲司坦作为西药对照参考，将运脾泻肺化痰汤分为高、中、低不同剂量组，比较不同浓度运脾泻肺化痰汤对哮喘模型大鼠的影响，同时也采用中西医结合治疗的手段来对比研究。结果表明，联合组、运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组均能改善哮喘大鼠肺泡灌洗液炎症细胞浸润、抑制了肺组织炎症反应，其中以联合组效果最佳。肺是反映哮喘患儿直接受累的靶器官，肺部的炎症和巨噬细胞介导的反应也将影响哮喘的预后。既往研究表明，哮喘患者的黏液栓会在同一肺段持续多年^[8]。因此肺泡灌洗液及肺组织观察也可以直接反映气道炎症程度。哮喘与 Th1/Th2 平衡失衡有着密切的联系，根据哮喘不同的气道炎症类型，大致分为混合细胞性哮喘、中性粒细胞性哮喘、嗜酸

粒细胞性哮喘等。有研究表明国内外研究最多的是嗜酸性粒细胞性哮喘，同时也是临床最为常见的哮喘表型^[9]。本研究结果显示，联合组、运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组大鼠肺泡灌洗液中白细胞计数、酸性粒细胞占比、中性粒细胞占比模型组低，其中以联合组、中药高剂量组疗效最佳，同时也提示运脾泻肺化痰汤能减少哮喘大鼠肺泡灌洗液的炎症细胞。核因子 κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一种重要的核因转录子，可以形成同源二聚体或异源二聚体，参与调节细胞炎症、凋亡等信号通路，其中以 NF- κ Bp-50、NF- κ Bp-65 所形成的异源二聚体活性为最强，参与炎症的发生、发展^[10]。此外，当诱导激酶激活 NF- κ B 后，可引起 I κ κ α 和 I κ κ β 相应位点的磷酸化，通过级联反应，使 I κ Bs 磷酸化而与 NF- κ B 解离，激活 NF- κ B，被激活后的 NF- κ B 又可参与炎症反应。而 NF- κ B 调节因子 I κ B β 在 IKK 催化反应中表现出与 I κ B α 不同的分子相互作用和磷酸化状态。I κ B β 磷酸化位点位于 C 端区域，而 I κ B α 磷酸化位点位于 N 端区域，I κ B β 磷酸化位点的突变增强了其对稳态蛋白酶体降解的抵抗力^[11]。反之，通过减少炎症因子的释放可抑制 I κ B α 、I κ B β 与 NF- κ B 分离，从而抑制 NF- κ B 信号通路活化，而 NF- κ B 信号通路失活又可减少炎症细胞的基因转录，从而减轻气道炎症反应^[12-13]。本研究结果显示，NF- κ B 的抑制因子 I κ B α 、I κ B β 在运脾泻肺化痰汤干预后明显升高；而 I κ Bs 磷酸化需要 I κ κ α 和 I κ κ β ，本研究结果显示，模型组 I κ κ- α 、I κ κ- β mRNA 相对表达量较正常组高，运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组、联合组较模型组低；而 I κ B α 、I κ B β mRNA 相对表达量正好相反，模型组较正常组低，运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组、联合组较模型组高。本研究结果还显示，模型组 I κ κ- α 、I κ κ- β 蛋白相对表达量较正常组高，运脾泻肺化痰汤高、中、低剂量组、西药组、联合组较模型组低。这表明不同剂量运脾泻肺化痰汤可以降低大鼠肺泡灌洗液炎症细胞水平，以及 I κ κ- α 、I κ κ- β 蛋白和基因表达，且呈剂量依赖性，但对 I κ B α 、I κ B β 分子表达的影响不具有剂量依赖性，说明 I κ κ- α 、I κ κ- β 的表达升高与 I κ B α 、I κ B β 的表达降低均与哮喘发作有密切联系，而 I κ B α 、I κ B β 是 NF- κ B 的抑制因子，也恰好证实了 I κ κ- α 通过介导 I κ B (I κ B α 、

I κ B β)降解,促使NF- κ B活化,进一步释放炎症因子,其机制可能是运脾泻肺化痰汤激活相关信号通路后下调I κ k- α 、I κ k- β ,抑制I κ B α 、I κ B β 的降解,降低NF- κ B信号通路活性,从而进一步抑制哮喘大鼠气道炎症,减少哮喘发生。

运脾泻肺化痰汤来源于《医方考》中清气化痰丸,是本院名老中医黄建业教授经验方。中医认识哮喘是外因引动“伏痰”所致,其病变部位主要在脾肺两脏,小儿脏腑娇嫩,形与气皆属不足,脾运行水谷能力不足,导致水谷精微及水湿停聚,加重痰液生成不断,肺主宣降功能失调,则津液输布不畅,饮停于肺,恰好体现中医“脾为生痰之源,肺为贮痰之器”的理论思想。故治疗要运脾泻肺,一方面通过健运脾胃,培土生金,治病求本,从根本上祛除伏痰,切断生痰之源;另一方面要泻肺化痰,解痉平喘,恢复肺的宣降功能。该方在临床上疗效显著,能有效减少患儿痰液的生成,缓解哮喘治疗中痰多、痰鸣难消的治疗难点。

综上所述,运脾泻肺化痰汤临床疗效显著,具有清泻肺热、运脾化痰的功效。本研究发现运脾泻肺化痰汤可以改善哮喘大鼠肺泡灌洗液中炎症细胞浸润,同时可以通过上调NF- κ B的抑制单位I κ B α 、I κ B β 基因表达,下调肺组织中I κ k- α 、I κ k- β 蛋白及基因表达,减轻哮喘大鼠气道炎症的作用。本研究以运脾泻肺化痰汤作为研究对象具有创新性,同时也为中医药临床运用推广提供一定理论依据。尽管本研究结果显示运脾泻肺化痰汤对大鼠肺组织相关蛋白表达有改善作用,但由于中药组成较多、成分较为复杂,未能阐明是具体哪一成分起关键性作用,需在后续实验中进一步研究。

参 考 文 献 :

- [1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2020年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(12): 1023-1048.
- [2] 朱贝贝, 赵德育. 社会心理压力对儿童哮喘的影响及机制[J]. 国

际儿科学杂志, 2022, 49(5): 338-342.

- [3] 邓云天, 李雪梅. 儿童难治性哮喘生物靶向治疗研究进展[J]. 儿科药学杂志, 2022, 28(2): 56-60.
- [4] 陈竹, 彭玉, 张立文, 等. 清气化痰汤治疗小儿痰热壅肺型哮喘的疗效评价[J]. 贵州医药, 2019, 43(1): 89-91.
- [5] 唐今尧, 张慧娟, 唐光钰. 清肺祛痰汤联合信必可都保治疗对支气管哮喘患者血清IgE、肺功能的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(3): 19-23.
- [6] 张芷瑞, 陈竹, 陈娜, 等. 运脾泻肺化痰汤对幼龄哮喘大鼠气道黏液高分泌的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(18): 2460-2462.
- [7] 杨飞, 惠毅, 闫曙光, 等. 卵蛋白加氢氧化铝致敏建立哮喘大鼠模型研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(15): 1600-1602.
- [8] KIM V, EVANS C M, DICKEY B F. Dawn of a new era in the diagnosis and treatment of airway mucus dysfunction[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 199(2): 133-134.
- [9] 刘昭. 哮喘小鼠肺泡灌洗液及尿液中3-溴酪氨酸水平的研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2020: 001159.
- [10] LIU Y, ZHANG M Q, ZHANG H J, et al. Anthocyanins inhibit airway inflammation by downregulating the NF- κ B pathway via the miR-138-5p/SIRT1 axis in asthmatic mice[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2022, 183(5): 539-551.
- [11] SHOJI S, HANADA K, TAKAHASHI M, et al. The NF- κ B regulator I κ B β exhibits different molecular interactivity and phosphorylation status from I κ B α in an IKK2-catalysed reaction[J]. FEBS Lett, 2020, 594(10): 1532-1549.
- [12] 汤军华, 沈毅弘. 栀子苷对支气管哮喘幼年小鼠气道炎症反应的抑制作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(20): 2581-2583.
- [13] ZHENG S R, WANG C, LIN L, et al. TNF- α impairs pericyte-mediated cerebral microcirculation via the NF- κ B/iNOS axis after experimental traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2022. DOI: 10.1089/neu.2022.0016. Epub ahead of print.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 陈娜, 陈竹, 刘志伟, 等. 运脾泻肺化痰汤对哮喘大鼠肺组织相关蛋白表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(14): 9-15.

Cite this article as: CHEN N, CHEN Z, LIU Z W, et al. Effects of Yunpi Xiefei Huatan Decoction on expressions of proteins associated with nuclear factor- κ B in lung tissues of asthmatic rats[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(14): 9-15.