

寒喘宁口服液对实验性哮喘豚鼠肺泡灌洗液中细胞因子的影响^{*}

罗世杰 张 玲 陈苏静 张 娜 刘冬琴 王 苗
(陕西中医学院附属医院儿科,陕西 咸阳 712000)

摘 要:**目的** 通过观察寒喘宁口服液对实验性哮喘豚鼠支气管肺泡灌洗液(BLAF)中 γ -干扰素(IFN- γ)、白介素4(IL-4)水平的影响,探讨寒喘宁口服液对实验性哮喘豚鼠的治疗作用。**方法** 选50只体重为250g-300g的雄性幼龄豚鼠,通过随机数字表法分成正常对照组、地塞米松组、哮喘模型组、中药大剂量组、中药小剂量组5组,每组各10只。造模后各组按要求罐药,测定BLAF中IFN- γ 和IL-4的含量。**结果** 哮喘模型组与正常对照组比较IFN- γ 显著降低($P<0.01$),IL-4显著升高($P<0.01$)。与哮喘模型组比较,地塞米松组、中药大剂量组、中药小剂量组IFN- γ 水平显著升高($P<0.01$),IL-4显著降低($P<0.01$)。**结论** 寒喘宁口服液能升高实验性哮喘豚鼠BLAF中IFN- γ 的水平和降低IL-4的水平,寒喘宁口服液可能是治疗儿童支气管哮喘的有效药物。

关键词:寒喘宁口服液;哮喘;IFN- γ ;IL-4

中图分类号: R 285.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-0571(2015)02-0066-003

DOI: 10.13424/j.cnki.mtcm.2015.02.028

Influences of HanChuanNing Oral Liquid over Cytokine in BALF of Experimental Guinea Pig with Asthma

LUO Shijie, ZHANG Ling, CHEN Sujing, ZHANG Na, LIU Dongqin, WANG Miao
(Pediatrics of the Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

Abstract Objective: To investigate the therapeutic function of HanChuanNing oral liquid for experimental guinea pig with asthma by observing its influence over the IFN- γ and IL-4 levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). **Methods:** By the method of random numbers table, the 50 young male guinea pigs from 250g to 300g were divided into normal control group, dexamethasone (DXM) group, asthma model group, heavy and light doses of Chinese medicine groups with 10 cases in each. The IFN- γ and IL-4 levels in BALF were determined after the models established and perfused with medicines according to the demands. **Results:** The IFN- γ levels markedly decreased ($P<0.01$) and IL-4 increased significantly ($P<0.01$) in asthma model group, compared with normal control group. Compared with asthma model group, the IFN- γ levels markedly increased ($P<0.01$) and IL-4 decreased significantly ($P<0.01$) in DXM group, heavy and light dose groups of Chinese medicine. **Conclusion:** HanChuanNing oral liquid can elevate IFN- γ levels and reduce IL-4 levels in BALF of experimental guinea pigs, which indicate that it is a effective medicine for children bronchial asthma.

Keywords HanChuanNing oral liquid; asthma; IFN- γ ; IL-4

* 基金项目:陕西省教育厅专项科研计划项目(12JK1026)

通过对临床治疗小儿寒性哮喘发作期有较好疗效的方剂进行筛选,提炼制成寒喘宁口服液。本研究以实验性哮喘豚鼠为研究对象,观察寒喘宁口服液对哮喘豚鼠肺泡灌洗液中细胞因子的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 取 50 只体重为 250 g - 300 g 幼龄雄性豚鼠,购于西安交通大学实验动物中心。

1.2 药品及试剂 寒喘宁口服液由炙麻黄、桂枝、葶苈子、干姜、桃仁、五味子、甘草按 2: 2: 2: 1: 2: 2: 1 比例组成(中药大剂量组每 100 mL 约含有生药 100 g;中药小剂量组每 100 mL 约含生药 50 g),由陕西中医学院药物研究所提供;卵白蛋白:上海励瑞生物科技有限公司生产; γ -干扰素酶联免疫检测试剂盒,南京建成科技有限公司生产,批号:国药准字 H10770102;白介素 4 酶联免疫检测试剂盒,上海森雄科技实业有限公司生产,批号:国药准字 S1083077。

1.3 实验仪器 微量电子天平(日本岛津 AECT220 型),MPF - 4 型荧光分光光度计(Made in Japan),自动酶标仪(美国 Bio - Rad 公司),电热恒温干燥箱(上海博讯实业有限公司),数显恒温水浴箱(上海博讯实业有限公司),超声雾化器(402B 型,江苏鱼跃医疗设备股份有限公司)。

1.4 实验方法 取 50 只体重 250 g - 300 g 的幼龄雄性豚鼠,适应性喂养 1 周,通过随机数字表法将实验豚鼠分成 5 组,每组各 10 只,即正常对照组、地塞米松组、哮喘模型组、中药大剂量组、中药小剂量组。按文献方法造模^[1-3],以卵白蛋白致敏和攻击复制哮喘模型。在实验第 1 天,以卵白蛋白致敏和攻击复制哮喘模型。在寒冷的气温条件下,将哮喘模型组、地塞米松组、中药大剂量组、中药小剂量组的豚鼠置于室外环境施加“形寒”的刺激,12 小时/天。同时饮用加入冰块的水,食用冷冻的豚鼠饲料和蔬菜。对哮喘模型组、中药大剂量组、中药小剂量组、地塞米松组豚鼠采用腹腔注射 10 % 卵白蛋白 1 mL 致敏,正常对照组腹腔注射生理盐水 1 mL 代替卵白蛋白。自注射第 14 d 将哮喘

模型组、中药大剂量组、中药小剂量组、地塞米松组豚鼠每天上、下午各一次逐个置于雾化箱内,吸入 1 % 卵白蛋白溶液雾化 15 ~ 20 秒,激发至哮喘发作,豚鼠出现烦躁、颤抖、气急、点头、伏地,以及扎堆、流涕、喷嚏、唇周青紫,爪甲紫暗等症状者判定为哮喘寒证造模成功。正常对照组每日 2 次以生理盐水雾化代替卵白蛋白激发。豚鼠灌胃给药与诱发哮喘同步进行,地塞米松组、中药大剂量组、中药小剂量组在当天每次激发后 2 小时内给药,每日 2 次,每次 3 mL,(中药大剂量组 20 g/Kg · d 相当于生药 6 g/d;中药小剂量组 10 g/Kg · d 相当于生药 3 g/d;地塞米松组 3.5 mg/Kg · d,即地塞米松片混悬液 1 mg/d)。正常对照组和哮喘模型组每日 2 次均用生理盐水 3 mL 灌胃。每组共灌胃 2 周。

1.5 标本采集与指标检测 末次给药后 2 小时,豚鼠称重,用 20 % 乌拉坦 6 ml/kg 腹腔内注射,麻醉成功后常规消毒,沿颈正中线剪开皮肤,钝性分离,游离气管,打开胸腔,分离左右支气管,结扎右支气管后在第二、三软骨环间剪一小口,将 5 号头皮针剪去针头插进小口 0.5 ~ 1.0 cm,以 0 号手术线结扎固定,连接注射器,用 37 ℃ 的生理盐水反复灌洗 3 次,每次 10 mL,回吸率在 80 % 左右,将抽取的肺泡灌洗液(BALF)放入离心管中,1000 r/min 离心 10 min 后,取上清液 - 20 ℃ 保存。分别采用酶联免疫检测试剂盒测定 IL - 4 和 IFN - γ ,严格按试剂盒说明操作。

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件处理,均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验数据先做方差齐性检验,方差齐的两组样本比较用 t 检验,方差不齐的将数据转换为方差齐再做上述检验,组间比较用 t 检验。

2 实验结果

寒喘宁口服液对支气管肺灌洗液中 IFN - γ 、IL - 4 含量的影像见表 1。

实验结果表明,哮喘模型组与正常对照组比较 IFN - γ 显著降低($P < 0.01$),IL - 4 显著升高($P < 0.01$)。与哮喘模型组比较,各个治疗组 IFN - γ 显著升高($P < 0.01$),IL - 4 显著降低($P < 0.01$)

说明地塞米松和寒喘宁口服液对豚鼠哮喘均有效。

表 1 实验豚鼠 BALF 中 IFN- γ 、IL-4 的水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IFN- γ (ng/L)	IL-4 (ng/L)
正常对照组	10	70.07 \pm 2.41	9.66 \pm 0.76
哮喘模型组	10	25.27 \pm 2.53 [▲]	33.68 \pm 2.33 [▲]
地塞米松组	10	48.35 \pm 1.87 ^{▲▲}	16.96 \pm 1.36 ^{▲▲}
中药小剂量组	10	33.62 \pm 1.44 ^{▲▲}	24.98 \pm 1.89 ^{▲▲}
中药大剂量组	10	47.37 \pm 2.33 ^{▲▲}	17.87 \pm 1.07 ^{▲▲}

注:与正常对照组比较[▲] $P < 0.01$;与哮喘模型组比较^{▲▲} $P < 0.01$ 。

3 讨论

哮喘的发生是外因作用于内因的结果,其内有壅塞之气,外有非时之感,膈有胶固之痰,三者相合,闭阻气道,搏击有声,则哮喘发作。若是外感风寒,内伤生冷,或素体阳虚、寒痰内伏,则发为寒性哮喘。寒喘宁口服液由麻黄、桂枝、桃仁、干姜、葶苈子、五味子、甘草组成,方中麻黄、桂枝为君药,麻黄辛、微苦、温,止咳平喘,桂枝辛、甘、温,温助阳气,以助麻黄平喘、化痰。干姜辛、温,温肺散寒、化饮化湿。桃仁苦、甘、平,止咳平喘、活血化痰,可以促进气道分泌物排出以畅通气道。葶苈子辛、苦,泻肺平喘,行水消肿,三药合用使气滞血瘀及痰湿消除,肺气畅利,助君药降气化痰平喘,共为臣药。又佐以五味子收敛肺气而止咳,与麻黄、干姜相伍,既敛肺止咳,缓和病势,又防辛热化燥伤阴,耗散肺气。使以甘草,补脾益气,调和诸药,又增强止咳之功。全方温肺化痰,活血祛瘀,降气平喘。现代药理研究表明麻黄平喘的主要有效成分是挥发油和生物碱^[4],伪麻黄碱具有抗炎作用^[5]。桂枝具有抗炎、抗过敏、抗菌、抗病毒、扩张血管、促进发汗、利尿、解热、镇痛、镇静等作用。干姜与非甾体抗炎药物有相似的药理作用^[6]。桃仁水提取物能抑制小鼠血清中的皮肤过敏抗体和脾溶血性细胞的产生,具有抗过敏性炎症的作用^[7]。葶苈子的 B-谷甾醇具有镇咳祛痰、舒张支气管平滑肌、缓解支气管痉挛的作用^[8]。五味子有祛痰、镇咳、抗菌、增强免疫功能等作用。甘草具有抗菌、抗病毒、抗炎、调节免疫的功效。

现代医学认为平衡机制在哮喘发病中起重要

作用,Th1/Th2 失衡程度与哮喘的发病关系密切。T 细胞分泌 Th1 细胞和 Th2 细胞,Th1 细胞分泌以 IFN- γ 为主要代表的细胞因子,Th2 细胞主要分泌以 IL-4 为代表的细胞因子。正常情况下,Th1、Th2 处于相对平衡状态,但当机体受到异常刺激时,Th1/Th2 平衡状态被打破,即可引起异常的免疫应答。IL-4 对气道变异性炎症的发展起主导作用,可导致 Th0 细胞向 Th2 细胞转化,从而促进 IgE 抗体合成及肥大细胞的增殖和分化。IL-4 诱导 EOS 聚集,破坏气管组织,促进气管高反应的形成。IFN- γ 是一种抗支气管哮喘因子,可抑制变态反应,抑制 IL-4mRNA 的转录水平,是 IL-4 合成的生物拮抗剂。IL-4 和 IFN- γ 在哮喘的发病机制中是极其重要的细胞因子。

本研究表明,寒喘宁口服液能升高实验性哮喘豚鼠 BLAF 中 IFN- γ 的水平和降低 IL-4 的水平,说明寒喘宁口服液可能是治疗儿童支气管哮喘的有效药物。

参考文献

[1] 方向明,王军. 平喘宁对哮喘豚鼠肺组织中嗜酸性粒细胞趋化因子 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2007,22(1):56.

[2] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1990:1178.

[3] 郑小伟. 中医动物模型的研制方法与评价[J]. 中国医药学报,1997,(5):57-60.

[4] 钟凌云,祝婧,龚千锋,等. 炮制对麻黄发汗、平喘药效影响研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(6):53-56.

[5] 戴贵东,闫琳,余建强,等. 伪麻黄碱镇痛、抗炎作用的研究[J]. 陕西医学杂志,2003,32(7):642.

[6] Kim E C, Min J K, Kim T Y, etal [6] - Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo [J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,335(2):300-3081.

[7] 赵强,李莹,孔令升,等. 桃仁化学成分及药理作用研究进展[J]. 天水师范学院学报,2008,28(2):56-58.

[8] 李广勋. 中药药理毒理与临床[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,1992:284.

(收稿日期:2014-12-15 编辑:文颖娟)