



# 补肾平喘膏方对支气管哮喘大鼠肺组织糖皮质激素受体的影响

石克华<sup>1</sup>, 吴银根<sup>2</sup>, 熊必丹<sup>1</sup>, 喻晓<sup>1</sup>

1. 上海中医药大学上海市中医医院呼吸内科, 上海 200071

2. 上海中医药大学龙华医院呼吸内科, 上海 200032

**目的:** 观察支气管哮喘大鼠肺组织中糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的变化情况以及补肾平喘膏方对其的影响,以探讨补肾平喘膏方防治支气管哮喘的作用机制。

**方法:** 60 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、地塞米松组、膏方预防组、膏方治疗组和膏方防治(预防加治疗)组,每组 10 只。除正常对照组外,各组大鼠以卵白蛋白致敏并诱发哮喘模型。采用地塞米松或膏方治疗后,HE 染色法检测大鼠肺组织病理学改变,免疫组织化学法检测肺组织中 GR 的表达情况。

**结果:** 模型组肺组织 GR 表达低于正常对照组( $P < 0.05$ ),膏方预防组、治疗组、防治组肺组织 GR 的表达较模型组明显上调( $P < 0.05$ ),与正常对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。其中膏方预防组 GR 的表达显著上升( $P < 0.01$ ),膏方各组与地塞米松组相比亦明显上升( $P < 0.01$ )。

**结论:** 补肾平喘膏方可能通过上调哮喘大鼠肺组织中 GR 的水平治疗哮喘。

**关键词:** 膏方; 补肾; 平喘; 哮喘; 糖皮质激素受体; 大鼠

Shi KH, Wu YG, Xiong BD, Yu X. *J Chin Integr Med.* 2010; 8(8): 785-789.

Received January 27, 2010; accepted April 4, 2010; published online August 15, 2010.

Indexed/abstracted in and full-text link-out at PubMed. Journal title in PubMed; *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.*

Free full text (HTML and PDF) is available at <http://www.jcimjournal.com>.

Forward linking and reference linking via CrossRef.

DOI: 10.3736/jcim20100810

Open Access

## Effects of medicinal extract for tonifying kidney to relieve asthma on glucocorticoid receptor expression in lung tissues of rats with bronchial asthma

Ke-hua Shi<sup>1</sup>, Yin-gen Wu<sup>2</sup>, Bi-dan Xiong<sup>1</sup>, Xiao Yu<sup>1</sup>

1. Department of Respiratory Diseases, Shanghai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

2. Department of Respiratory Diseases, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

**Objective:** To observe the effects of medicinal extract for tonifying kidney to relieve asthma on glucocorticoid receptor (GR) expression in rats with asthma, and to explore its mechanism in treating asthma.

**Methods:** Sixty SD rats were randomly divided into normal control group, untreated group, dexamethasone group, and medicinal extract-prevented, medicinal extract-treated, and medicinal extract-prevented and -treated groups, with ten rats in each group. Asthma was induced by intraperitoneal injection of ovalbumin (OVA) and forced inhalation of atomized OVA. Expression of GR in lung tissues was detected by immunohistochemical method. Pathological changes of the lung tissues were observed by HE staining.

**Results:** Expression of GR was lower in the untreated group than in the normal control group ( $P < 0.05$ ). Expressions of GR in medicinal extract groups were up-regulated as compared with those in the untreated group and dexamethasone group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and there were no significant differences as compared with the normal control group ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** Medicinal extract for tonifying kidney to relieve asthma can increase the expression of GR in lung tissues of asthmatic rats, which may be one of its mechanisms in preventing and treating asthma.

**Keywords:** medicinal extract; reinvigorating kidney; antiasthma; asthma; glucocorticoid receptor; rats

支气管哮喘是由多种细胞包括气道的炎症细胞和结构细胞参与的气道慢性炎症性疾病。糖皮质激素(glucocorticoid, GC)是目前治疗哮喘的首选药物,通过与糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)结合而发挥作用。近年来膏方广受欢迎,采用膏方防治哮喘亦取得了满意的临床疗效<sup>[1,2]</sup>。补肾平喘膏方是我们防治哮喘的经验方,我们观察了补肾平喘膏方对哮喘大鼠肺组织中糖皮质激素受体的影响,以探讨其防治哮喘的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 60 只雄性 SD 大鼠,体质量(160±10)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司(动物合格证号:0052294)。

1.1.2 实验药物 补肾平喘膏方由淫羊藿 150 g、巴戟天 150 g、何首乌 150 g、黄精 300 g、熟地黄 200 g、山茱萸 100 g、麦冬 300 g、黄芪 300 g、党参 200 g、野荞麦根 300 g、胡颓子叶 150 g、黄荆子 300 g、法半夏 150 g、蒲公英 150 g 组成。将上药先浸泡 24 h,煎煮取汁、过滤共 3 次,将 3 次煎液混合后浓缩至 2 000 mL 左右,加入细研成粉的白参 100 g、蛤蚧 100 g(2 对)、胎盘粉 60 g,冲入预先烱化的阿胶 300 g、龟版胶 150 g,最后加入冰糖 250 g、饴糖 250 g 炼制收膏,每毫升膏剂约含生药 2.145 g,由上海蔡同德堂药号制作。地塞米松片,0.75 mg/片,由上海信谊药厂有限公司生产(生产批号:080102)。

1.1.3 试剂与仪器 卵白蛋白,上海伯奥生物科技有限公司;糖皮质激素受体一抗(兔多抗),SP 二抗试剂盒(山羊抗兔二抗),3′3′-二氨基联苯胺(3′3′-diaminobenzidine, DAB)盐酸盐试剂盒,上海元象医疗器械有限公司;EnVision 试剂,丹麦 Dako 公司;4%多聚甲醛,北京鼎国生物技术有限责任公司;0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 和 0.01 mol/L pH 7.8 的 TBS,上海广实生物科技有限公司。Eurosol Aerosol Apparatus 压缩喷雾治疗仪,意大利 MEFAR 公司;GNP-9050 型隔水式恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;HHV-T4 型电子恒温水浴锅,上海医疗器械五厂;医学图像分析软件 IMS 细胞图像分析系统,上海申腾信息技术有限公司;MV-CP410 型摄像机,日本 Panasonic 公司;BH2 型光学显微镜,日本 Olympus 公司;4500 型数码相机,日本 Nikon 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与造模 将 60 只 SD 大鼠随机分

为正常对照组、模型组、地塞米松组、膏方预防组、膏方治疗组和膏方防治组,共 6 组,每组 10 只。哮喘模型制备参照吕国平等<sup>[3]</sup>介绍的方法进行,分致敏和激发两步。除正常对照组外,其他各组大鼠腹腔注射含卵蛋白 100 mg 和氢氧化铝 100 mg 的生理盐水混悬液(自配)1 mL 致敏,第 8 天再次致敏;第 15 天以 5 L/min 流速雾化吸入 5%卵蛋白生理盐水溶液 40 min 激发哮喘,隔天激发,连续 3 周。正常对照组则以等量生理盐水腹腔注射,雾化吸入。

1.2.2 给药方法 正常对照组、模型组、地塞米松组和膏方治疗组均从造模第 15 天起灌胃给药至末次激发,膏方预防组从造模第 1 天起灌胃至第 14 天,膏方防治组从造模第 1 天起灌胃给药至末次激发,1 次/d。药物用量按陈奇<sup>[4]</sup>提供的常用动物与人的药量换算公式计算。正常对照组和模型组以温生理盐水 10 mL/(kg·d)灌胃;地塞米松组予地塞米松(配制浓度为 0.1 mg/mL)以 1 mg/(kg·d)灌胃;膏方各组予膏方(开水冲溶,冷却至适宜温度,1 mL 温水约溶解 0.5 mL 膏方)以 10.73 g/(kg·d)灌胃。

1.2.3 取材和指标测定 各组大鼠在最后一次激发后 18~24 h 处死取材。以 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后剖胸,取左肺组织置于 4%多聚甲醛中固定,将肺组织脱水、石蜡包埋,切成 4 μm 石蜡切片,58℃下烘烤 24 h 后,采用 EnVision 免疫组织化学法检测肺组织中 GR 的表达。

1.2.3.1 一般情况观察 造模后及治疗过程中观察大鼠皮毛、精神、饮食改变及体质量增长情况。

1.2.3.2 病理形态学观察 采用 HE 染色的方法。将所取肺组织脱水,石蜡包埋,切成 5 μm 石蜡切片,然后进行染色,将载玻片在酒精灯上微热后滴加中性树胶,封片,晾干,然后显微镜下观察。

1.2.3.3 免疫组织化学法检测肺组织 GR 的表达

将石蜡切片常规脱蜡, PBS 洗 3×3 min;用 0.01 mol/L pH 6.0 枸橼酸盐缓冲液热诱导修复(微波 3 档 20 min),室温自然冷却后,用 PBS 洗 3×3 min;后加入 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>抑制内源性过氧化物酶室温下 20 min; PBS 洗 3×3 min;20%正常羊血清室温孵育 30 min,不洗;滴加 GR 一抗后 37℃下孵育 2 h; PBS 洗 3×3 min;再滴加 SP 二抗和 EnVision 试剂(辣根过氧化物酶/抗兔)37℃30 min; PBS 洗 3×3 min; DAB 显色 8~12 min;苏木素衬染,热水蓝化;吹干后,用树脂封片;镜下观察,背景呈紫蓝色, GR 阳性产物呈棕黄色或黄色。最后采用 IMS 细胞图像分析系统检测 GR 表达的阳性面积以及平均光密度值,再计算出免

疫组织化学指数。计算公式:免疫组织化学指数=GR 表达阳性面积×平均光密度值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件作单因素方差分析,各组数据先进行方差齐性检验,采用 LSD-*t* 检验方法进行组间两两比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 一般情况 模型组大鼠经卵白蛋白雾化激发后,出现呼吸急促,张口喘息,腹部翕动,烦躁不安,易激惹等现象,且皮毛干枯、稀疏,饮水增多,活动与饮食减少,精神不振,动作迟缓,身体消瘦。正常对照组大鼠皮毛光泽,活动自如,饮食正常,体质量增加。地塞米松组大鼠激发后亦出现喘息、易激惹、烦躁不安等变化,给药 1 周后皮毛稀疏枯燥,身体消瘦明显。膏方各组大鼠亦出现喘息,但症状较轻,且易激惹、烦躁不安等现象不明显,皮毛润泽,活动自如,饮食正常,体质

量增加。

2.2 肺组织病理形态学观察 正常对照组大鼠气道及肺实质无异常炎症改变,气道黏膜上皮及肺泡结构完整,肺泡间隔窄,气道平滑肌薄,未见炎性细胞浸润,肺泡腔透亮,无炎性物质渗出。模型组大鼠气道和支气管壁周围有大量的炎性细胞浸润,支气管平滑肌层肥大、增生,黏膜充血、水肿,气道腔内上皮脱落、受损,管腔内充满大量的黏性分泌物,肺泡亦出现充血、水肿。地塞米松组大鼠肺泡壁毛细血管扩张充血较模型组减轻,肺泡间隔窄,与正常对照组相似,支气管上皮结构较完整,腔内无明显分泌物,气道平滑肌层增生,厚度与模型组相似,支气管及肺泡炎性细胞浸润亦轻于模型组。膏方各组的肺泡壁毛细血管扩张、充血程度较模型组减轻,支气管上皮结构完整,腔内无明显分泌物,气道平滑肌层稍增生,厚度比地塞米松组稍薄,肺泡间隔窄,肺泡腔内透亮,无明显炎性渗出。见图 1。

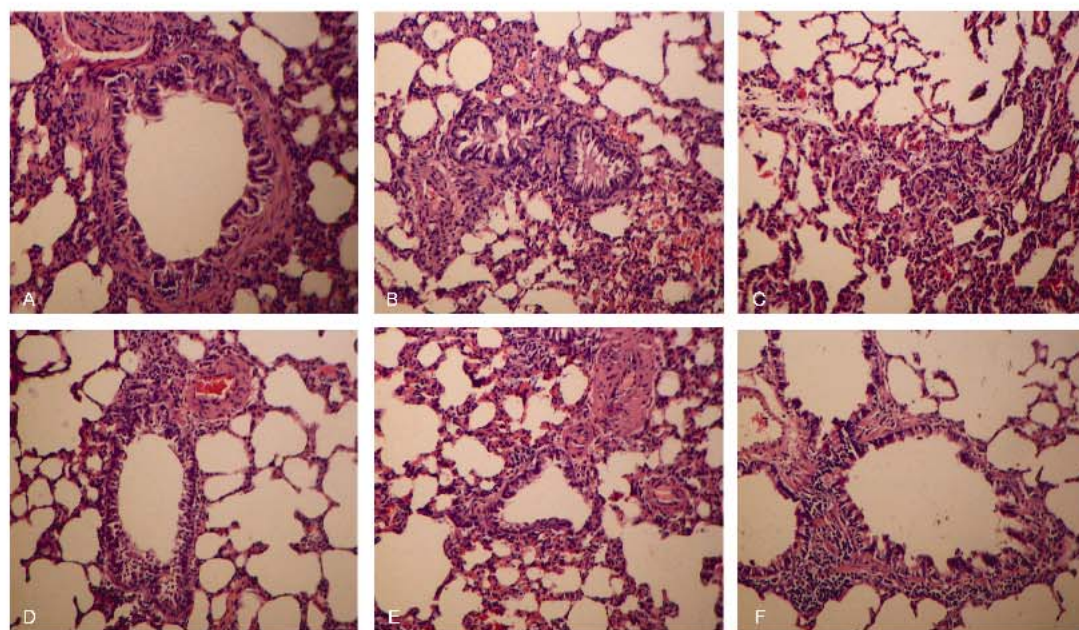


图 1 HE 染色检测哮喘大鼠肺组织病理学变化(光学显微镜,×100)

Figure 1 Pathological change of lung tissues in rats with asthma observed by HE staining (Light microscopy, ×100)

A; Normal control group; B; Untreated group; C; Dexamethasone group; D; Medicinal extract-prevented group; E; Medicinal extract-treated group; F; Medicinal extract-prevented and -treated group.

## 2.3 免疫组织化学法检测 GR 表达

2.3.1 大鼠肺组织 GR 表达的免疫组织化学指数 模型组肺组织 GR 表达的免疫组织化学指数低于正常对照组 ( $P < 0.05$ ),地塞米松组亦明显低于正常对照组 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,地塞米松组轻度下降 ( $P > 0.05$ ),而膏方预防组、治

疗组、防治组肺组织 GR 表达的免疫组织化学指数均明显上升 ( $P < 0.05$ ),与正常对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。其中膏方预防组 GR 的免疫组织化学指数显著上升 ( $P < 0.01$ ),膏方各组较地塞米松组相比亦明显上升 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠肺组织 GR 表达的免疫组织化学指数

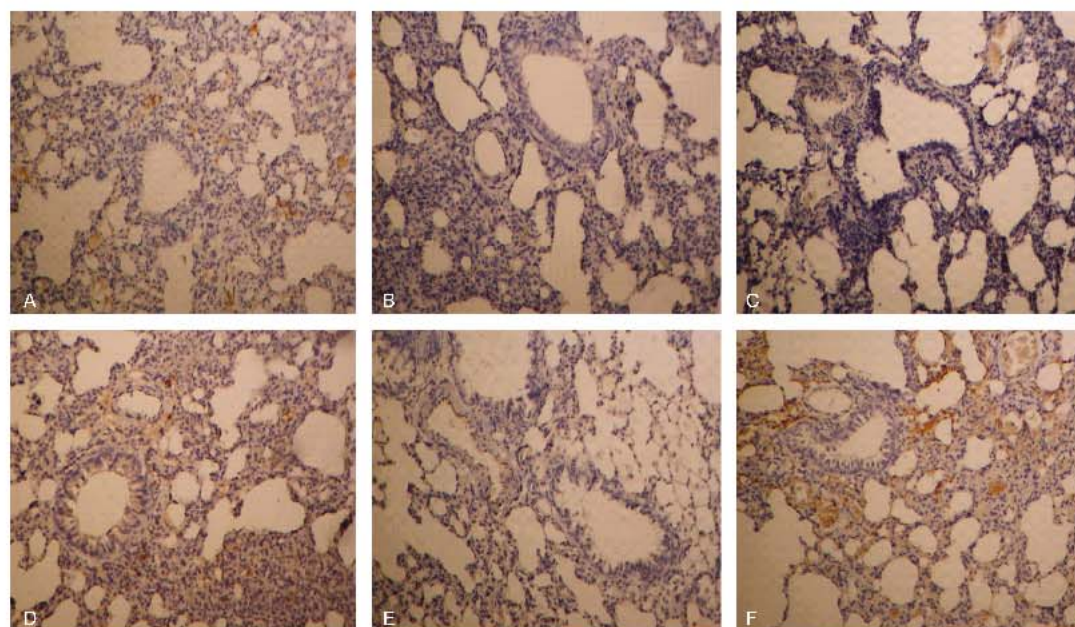
Table 1 Immunohistochemical index of GR expression in lung tissues of rats with asthma in different groups

( $\bar{x} \pm s$ )

| Group                                    | n  | Immunohistochemical index                             |
|------------------------------------------|----|-------------------------------------------------------|
| Normal control                           | 10 | 278 152.13 $\pm$ 14 897.53                            |
| Untreated                                | 10 | 181 370.33 $\pm$ 59 111.60*                           |
| Dexamethasone                            | 10 | 169 976.20 $\pm$ 65 243.27**                          |
| Medicinal extract-treated                | 10 | 272 903.80 $\pm$ 36 962.30 $\Delta\Delta\Delta$       |
| Medicinal extract-prevented and -treated | 10 | 290 496.07 $\pm$ 95 863.23 $\Delta\Delta\Delta$       |
| Medicinal extract-prevented              | 10 | 342 691.83 $\pm$ 54 637.48 $\Delta\Delta\Delta\Delta$ |

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs normal control group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ , vs untreated group;  $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ , vs dexamethasone group.

2.3.2 大鼠肺组织 GR 免疫组织化学图像 正常对照组气道黏膜结构完整, 气道和肺泡腔内无炎性分泌物, 肺泡间质和小血管管腔内可见较多的 GR 阳性产物。模型组气道黏膜结构不完整, 肺泡隔增厚, 支气管壁和肺泡周围有大量炎性细胞浸润, 仅在肺泡间质见少量 GR 阳性产物。地塞米松组气道壁和肺泡壁周围的炎性浸润也较明显, 但较模型组轻, GR 阳性产物也明显减少, 与模型组相似, 仅存在于少量小血管管腔和肺间质周围。膏方各组气道黏膜结构较完整, 支气管壁和肺泡壁周围的炎性细胞浸润较模型组轻, 支气管壁、肺泡间质和小血管管腔内均见大量的 GR 阳性产物, 其中以膏方预防和防治组最为明显。见图 2。

图 2 免疫组织化学法检测哮喘大鼠肺组织 GR 的表达 [光学显微镜,  $\times 100$ ]Figure 2 Expression of GR in lung tissues of rats with asthma observed by immunohistochemical method [Light microscopy,  $\times 100$ ]

A, Normal control group; B, Untreated group; C, Dexamethasone group; D, Medicinal extract-prevented group; E, Medicinal extract-treated group; F, Medicinal extract-prevented and -treated group.

### 3 讨论

GC 之所以成为目前临床治疗哮喘的首选药物, 关键在于其强大的抗炎作用, 而其免疫抑制和抗炎作用则需要与 GR 发生特异性结合才能得到发挥。GC 通过被动扩散进入靶细胞, 与胞浆 GR 结合形成 GC-GR 复合物后进入细胞核, 与 DNA 上的激素应答元件——糖皮质激素应答元件结合, 诱导调节启动子, 提高转录水平, 增加或减少相应蛋白质的合成, 从而发挥其生物效应<sup>[5]</sup>。因此, 研究 GR 的表达水平的变化对于哮喘的临床治疗具有重要的指

导意义。

有实验报道证明, 无论是在体外培养细胞还是在动物体内, GC 对 GR 均具有负反馈调节作用<sup>[6,7]</sup>。哮喘发作时, 机体处于应激状态, 应激反应导致内源性 GC 水平升高, 导致相应的受体疲劳, 而引起 GR 数目下降。亦有研究显示, 哮喘患者外周血白细胞 GR 水平低于正常对照组<sup>[8]</sup>, 且哮喘病情越严重, GR 水平的下降程度也越明显<sup>[9]</sup>, 哮喘机体内源性 GC 水平偏低或其受体 GR 功能缺陷而造成的体内 GC 相对不足是哮喘发作及恶化的重要原因<sup>[10]</sup>。

临床研究结果显示,膏方在控制哮喘的症状及改善肺功能方面有一定的功效,并能增强机体抗病能力,减少或预防哮喘发作<sup>[1,2]</sup>。补肾平喘膏方以淫羊藿、巴戟天、何首乌、黄精、熟地、山茱萸、蛤蚧等温阳补肾、益精填髓为主,黄芪、党参、白参等健脾补肺,野荞麦根、胡颓子叶、黄荆子、法半夏、蒲公英等兼以祛痰下气、止咳平喘。全方标本兼顾,理虚培元。

本实验研究发现,哮喘模型组肺组织 GR 水平明显下降,低于正常对照组,经补肾平喘膏方干预后,膏方各组的 GR 水平均显著上升,提示补肾平喘膏方可能通过上调 GR 水平起到预防和治疗哮喘的作用。

## REFERENCES

- 1 Zhang HY, Liang Z, Tian WY, Wu YG. Treatment of 65 patients with bronchial asthma by medicinal extract with the function of invigorating spleen and warming kidney. *Xin Zhong Yi*. 1996; 28(10): 42-43. Chinese. 张惠勇, 梁知, 田文英, 吴银根. 健脾温肾法膏方治疗支气管哮喘 65 例. *新中医*. 1996; 28(10): 42-43.
- 2 Wu YG, Yao BQ, Yu SX, Ni W, Zhang HY. Analysis of the long-term curative effects of 120 patients with bronchial asthma treated by medicinal extract with the function of invigorating spleen and warming kidney. *Zhejiang Zhong Yi Za Zhi*. 2000; 35(4): 144-145. Chinese. 吴银根, 要全保, 于素霞, 倪伟, 张惠勇. 健脾温肾膏方治疗哮喘 120 例远期疗效分析. *浙江中医杂志*. 2000; 35(4): 144-145.
- 3 Lu GP, Cui DJ, Guo YJ, Tan J. Introduction of an experimental method to establish the model of asthmatic rats. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 1995; 18(6): 377-378. Chinese. 吕国平, 崔德健, 郭英江, 谭剑. 介绍一种建立大鼠哮喘模型的实验方法. *中华结核和呼吸杂志*. 1995; 18(6): 377-378.
- 4 Chen Q. Research method of pharmacology of traditional Chinese medicine. Beijing: People's Medical Publishing House. 1994: 33-34. Chinese. 陈奇. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社. 1994: 33-34.
- 5 Yu XJ, Hou GH. Review of the effects of traditional Chinese medicine on glucocorticoid receptor. *Guo Wai Yi Xue Zhong Yi Zhong Yao Fen Ce*. 2004; 26(4): 216-219. Chinese. 于新娟, 侯桂华. 中药对糖皮质激素受体影响的研究进展. *国外医学中医中药分册*. 2004; 26(4): 216-219.
- 6 Schmidt T, Meyer AS. Autoregulation of corticosteroid receptors. How, when, where, and why. *Receptor*. 1994; 4(4): 229-257.
- 7 Adcock I, Gilbey T, Gelder CM, Chung KF, Barnes PJ. Glucocorticoid receptor localization in normal and asthmatic lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 154(3 Pt 1): 771-782.
- 8 Hu LA, Wu YM, Wang FR. Research of glucocorticoid receptor in peripheral white blood cell of patients with bronchial asthma. *Sichuan Yi Xue*. 1998; 19(6): 470-471. Chinese. 胡良安, 吴亚梅, 王福荣. 支气管哮喘患者外周血白细胞中糖皮质激素受体的研究. *四川医学*. 1998; 19(6): 470-471.
- 9 Zhou YB, Rong ZS. Changes of glucocorticoid receptor in peripheral white blood cells in remission stage of bronchial asthma. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 1997; 20(1): 51. Chinese. 周燕斌, 容中生. 支气管哮喘缓解期外周血白细胞糖皮质激素受体的变化. *中华结核和呼吸杂志*. 1997; 20(1): 51.
- 10 Xiong JP, Kong XY. Effects of hypobaric chamber therapy on the content of serum cortisol and number of eosinophils in treatment of asthma in the remission stage in guinea pigs. *Di San Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 1999; 21(5): 338-340. Chinese with abstract in English. 熊建平, 孔祥英. 模拟高原低压舱治疗哮喘缓解期豚鼠对血清皮质醇及嗜酸性粒细胞的影响. *第三军医大学学报*. 1999; 21(5): 338-340.