

杏龙平喘方对哮喘小鼠模型白细胞介素-5及 氧自由基代谢产物的影响

冯俊涛, 罗百灵*, 胡成平, 潘频华
(中南大学湘雅医院呼吸内科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:观察杏龙平喘方对哮喘小鼠白细胞介素-5(L-5)和氧自由基物质的影响,探讨其作用机制。方法:采用卵白蛋白(OVA)腹腔注射致敏和雾化激发的方法建立小鼠哮喘模型,然后用杏龙平喘方对哮喘小鼠进行干预。干预完成后,对外周血白细胞和嗜酸性粒细胞进行计数,采用ELISA法检测小鼠血清及肺组织中L-5水平,分光光度法检测小鼠肺组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)及丙二醛(MDA)含量。结果:杏龙平喘方干预组小鼠与哮喘模型组小鼠相比,前者外周血中嗜酸性粒细胞数目下降($P < 0.01$);前者肺组织及血清中L-5浓度明显低于后者(均 $P < 0.01$);前者肺组织中SOD和GPx活性增高,SOD活力在2组间差异有统计学意义($P < 0.01$);且前者MDA含量明显下降($P < 0.05$)。结论:降低哮喘小鼠肺组织和血清中L-5浓度,提高肺组织抗氧化能力,可能是杏龙平喘方治疗哮喘的作用机制之一。

[关键词] 哮喘; 杏龙平喘方; 白细胞介素-5; 氧自由基

[中图分类号] R562.25

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-7347(2005)04-0437-04

Effect of Xinglong Pingchuan recipe on interleukin-5 and the inflammagen related to oxygen free radical in asthmatic mice

FENG Jun-tao, LUO Bai-ling*, HU Cheng-ping, PAN Pin-hua

(Department of Respiratory Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Xinglong Pingchuan recipe (XLPCR) on interleukin-5 (L-5), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and malondialdehyde (MDA) in mouse asthma models, and to explore its mechanism in treating asthma. **Methods** The mouse asthma models were established by sensitization and challenge with ovalbumin (OVA). The asthma model was treated with XLPCR. At last, the number of white blood cells and eosinophil was counted, and the concentrations of inflammation factors such as L-5, SOD, GPx, and MDA in the serum or the lung tissue of each mouse were detected. **Results** Compared with the asthmatic group, the number of eosinophil in the XLPCR group decreased significantly ($P < 0.01$); the concentration of L-5 in the XLPCR group significantly decreased in the serum or the lung tissue (all $P < 0.01$); and the concentrations of SOD and GPx in the XLPCR group increased ($P < 0.01$ and $P > 0.05$, respectively). On the other hand, the concentration of MDA in the XLPCR group was significantly lower than that of the asthmatic group ($P < 0.05$). **Conclusion** XLPCR might inhibit the airway inflammation by decreasing the L-5 level and adjusting the balance of oxidants/antioxidants.

Key words: asthma; xinglong pingchuan recipe; interleukin-5; oxygen free radicals

[J Cent South Univ(Med Sci), 2005, 30(4): 0437-04]

收稿日期: 2004-11-16 作者简介: 冯俊涛 (1976-), 男, 河南洛阳人, 博士研究生, 主要从事哮喘发病机制及其防治研究。

*通讯作者, E-mail: bluo181@yahoo.com.cn

基金项目: 湖南省卫生厅中医药科研基金资助 (200061)

Th1/Th2比例失衡是哮喘发病的主要免疫学机制,表现为Th2源性细胞因子L-4和L-5等前炎症因子水平升高,而Th1源性细胞因子IFN- γ 等水平的相对降低^[1,2]。L-5在诱导气道嗜酸性粒细胞(eosinophil, EOS)浸润、气道炎症发生的过程中起关键作用,因而,针对L-5的干预成为哮喘防治研究中的重要方向^[3~5]。

近年来发现氧自由基与哮喘的发病机制密切相关,纠正氧自由基失衡已成为哮喘治疗中值得探讨的途径。正常情况下,氧自由基的产生和清除处于动态平衡,当机体罹患哮喘时氧自由基产生增多,过量消耗超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)等抗氧化物质,引发脂质过氧化反应,而反应终产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)则可反馈激活脂质过氧化,使得气道上皮受损、气道血管通透性增加、 β 肾上腺能受体数目降低和功能减退以及白三烯等炎症介质合成与释放增加,导致气道炎症发生^[6]。

包括糖皮质激素吸入疗法在内,现代医学对哮喘的治疗仍局限在对气道局部炎症的控制,对全身免疫功能紊乱则一筹莫展。而中医药在治疗哮喘方面,讲究标本兼治,不啻为一种有益的补充疗法。杏龙平喘方系治疗哮喘的验方,对预防重症过敏性哮喘发作(寒哮)和治疗轻症过敏性哮喘发作具有较好疗效。从合理开发中药方剂,研究其作用机制出发,探讨杏龙平喘方在治疗哮喘过程中对L-5及氧自由基物质的影响,具有一定的医学价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 健康 balb/c小鼠 32只,雄性,无特定病原体级(SPF),18~22 g,由中南大学实验动物学部提供。杏龙平喘方每剂由杏仁 10 g,地龙 10 g,炙麻黄 10 g,昆明山海棠 15 g,虎耳草 15 g,双花 10 g,椒目 10 g,桔梗 10 g,苦参 15 g,蝉蜕 6 g等 10味共 111 g(70 kg成人每日常规剂量)生药组成,加蒸馏水 900 mL,水煎 2次,浓缩为混悬液 150 mL(每毫升含生药 0.74 g)。地塞米松片系浙江仙居制药股份有限公司生产,0.75 mg/片,以蒸馏水配成 0.12 mg/mL药液。卵白蛋白(ovalbumin, OVA)由北京华美生物工程公司提供,氢氧化铝系广西佳兆药业有限责任公司生产,小鼠 L-5 ELISA试剂盒由上海森雄科技实业有限公司提供, SOD试剂盒、MDA试剂盒、GPx试剂盒及考马斯亮蓝蛋白试剂盒等均由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 实验的分组和处理 32只 balb/c小鼠随机均分为4组:哮喘模型组(哮喘组),杏龙平喘方干预组(杏龙平喘组),正常对照组,地塞米松干预组(地塞米松组)。哮喘组、杏龙平喘组及地塞米松组小鼠均于第1, 7, 14天腹腔注射致敏药液 0.5 mL(OVA 10 μ g, 氢氧化铝 2 mg, 加生理盐水至 0.5 mL),于第21天开始令小鼠雾化吸入 1% OVA,每天1次,每次30 min,共10 d。哮喘组小鼠每次雾化前灌胃注入蒸馏水 0.5 mL/只,杏龙平喘组小鼠每次雾化前灌胃注入杏龙平喘方汤剂 0.5 mL/只(给药按体表剂量系数换算),地塞米松组小鼠每次雾化前灌胃注入地塞米松药液 0.5 mL/只。正常对照组小鼠于第1, 7, 14天腹腔注射生理盐水 0.5 mL,并于第21天开始令小鼠雾化吸入生理盐水,每天1次,每次30 min,共10 d,每次雾化前灌胃注入蒸馏水 0.5 mL/只。

在实验第31天对各组小鼠行眼动脉放血处死,计数白细胞总数和EOS,并取血清备用。右肺用4%甲醛固定后以石蜡包埋,切片,HE染色观察病理变化。左肺称重后匀浆制成10%悬液、离心取上清。

1.2.2 L-5和氧自由基物质检测 按照小鼠 L-5 ELISA试剂盒使用说明,用酶联免疫检测仪在492 nm处检测各待测小鼠血清及肺组织匀浆液上清吸光值,根据标准曲线求出相应L-5含量。取肺组织匀浆上清,按照肺组织蛋白含量, SOD,MDA和GPx测定试剂盒说明进行操作,用721分光光度计在595 nm处测量各样品吸光度,计算出每只实验小鼠所测指标的实际数值。

1.3 统计学处理 实验数据应用SPSS11.0进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 视为有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠白细胞总数、EOS计数及肺组织学变化

各组小鼠外周血白细胞总数、EOS计数的比较结果见表1。光镜下可见哮喘组小鼠气道周围大量炎性细胞(淋巴细胞、EOS等)浸润,肺泡间隔及支气管壁明显增厚;杏龙平喘组小鼠与哮喘组小鼠相比,气道周围炎性细胞浸润程度明显减轻,肺泡间隔病变明显改善;地塞米松组小鼠与哮喘组小鼠相比,气道周围仅有少量炎性细胞浸润,肺泡间隔增厚不明显(图1~4)。

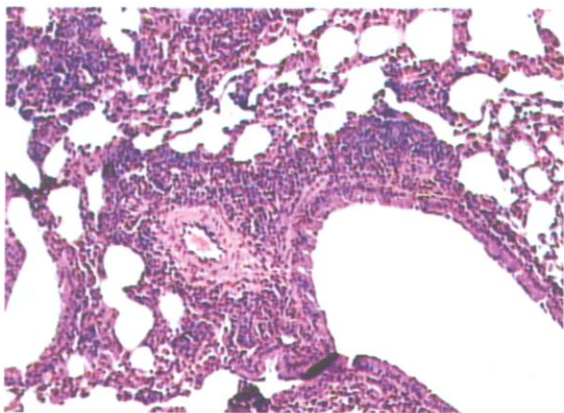


图 1 哮喘组小鼠支气管肺组织(HE×100)
Fig. 1 Bronchial-lung tissue of asthmatic group (HE×100)

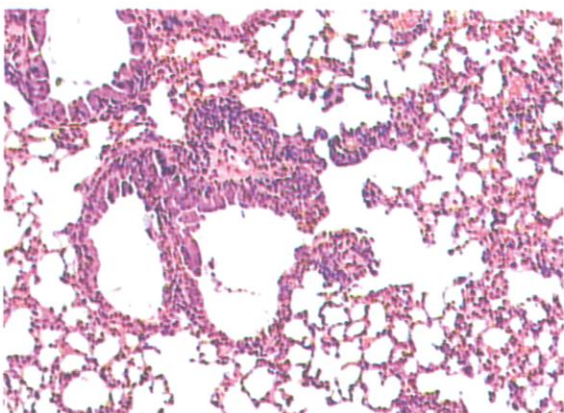


图 2 杏龙平喘方治疗组小鼠支气管肺组织(HE×100)
Fig. 2 Bronchial-lung tissue of Xinglong Pingchuan recipe group (HE×100)

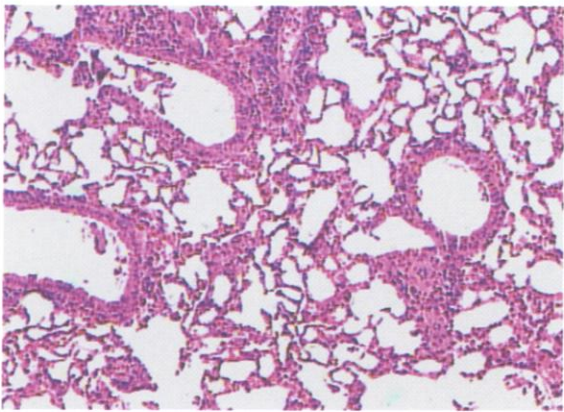


图 3 地塞米松治疗组小鼠支气管肺组织(HE×100)
Fig. 3 Bronchial-lung tissue of treated group with dexamethasone (HE×100)

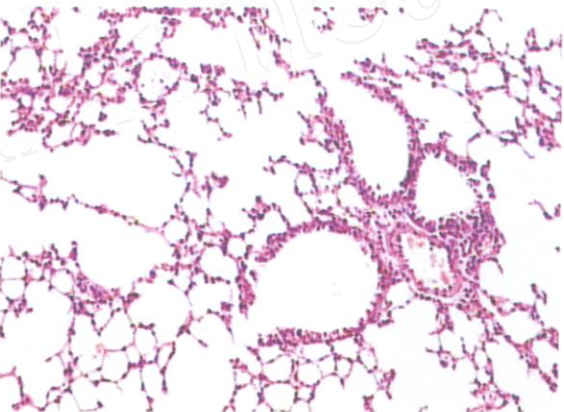


图 4 对照组小鼠支气管肺组织(HE×100)
Fig. 4 Bronchial-lung tissue of matched control group (HE×100)

表 1 杏龙平喘方对哮喘小鼠外周血白细胞总数和 EOS 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	白细胞总数 ($\times 10^7$ /L)	EOS($\times 10^7$ /L)
哮喘组	8	474.38 $\pm$ 81.19	12.75 $\pm$ 5.80 $\Delta\Delta$
杏龙平喘组	8	439.63 $\pm$ 58.37	4.88 $\pm$ 0.03 $^{##}$
地塞米松组	8	411.13 $\pm$ 64.24	3.63 $\pm$ 0.06 $^{##}$
正常对照组	8	416.25 $\pm$ 62.06	2.13 $\pm$ 0.25

与哮喘组相比, $^{##} P < 0.01$; 与正常对照组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 小鼠血清及肺组织中 L-5 的检测 杏龙平喘组与地塞米松组小鼠血清及肺组织中 L-5 水平均明显低于哮喘组 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 而高于正常对照组 (均 $P < 0.05$); 杏龙平喘组与地塞米松组相比, 2 组间血清及肺组织中 L-5 水平差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 2)。

2.3 小鼠肺组织中氧自由基物质的检测 杏龙平喘组与地塞米松组小鼠 SOD 活力水平均明显高于哮喘组 (均 $P < 0.01$); 杏龙平喘组与地塞米松组

小鼠 GPx 活力水平均高于哮喘组 (分别为 $P > 0.05$ 和 $P < 0.01$); 杏龙平喘组与地塞米松组小鼠 MDA 水平均明显低于哮喘组 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。杏龙平喘组与地塞米松组相比, 后者 GPx 活力水平明显高于前者 ($P < 0.01$), 2 组间 SOD 和 MDA 活力水平差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 3)。

表 2 杏龙平喘方对哮喘小鼠血清和肺组织中 L-5 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	L-5 水平 (pg/mL)	
		肺组织匀浆液	血清
哮喘组	8	39.84 $\pm$ 6.57 $\Delta\Delta$	28.12 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta$
杏龙平喘组	8	29.84 $\pm$ 7.48 $^{##\Delta}$	16.17 $\pm$ 5.66 $^{##}$
地塞米松组	8	26.88 $\pm$ 6.86 $^{##\Delta}$	18.67 $\pm$ 6.22 $^{#}$
正常对照组	8	17.93 $\pm$ 5.02	14.37 $\pm$ 5.10

与哮喘组相比, $^{#} P < 0.05$, $^{##} P < 0.01$; 与正常对照组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 3 杏龙平喘方对哮喘小鼠肺组织中 SOD, GPx和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	SOD (U/mg·prot)	GPx (U/mg·prot)	MDA (nmol/mg·prot)
哮喘组	8	7.83 ±3.12	14.05 ±5.57 ^{△△}	2.35 ±0.26 ^{△△}
杏龙平喘组	8	14.51 ±2.99 ^{##}	22.26 ±7.55 [*]	1.95 ±0.39 [#]
地塞米松组	8	13.50 ±4.16 ^{##}	35.72 ±12.23 ^{##}	1.69 ±0.34 ^{##}
正常对照组	8	6.23 ±2.86	27.15 ±9.50	1.70 ±0.29

与哮喘组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与正常对照组相比, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$;与地塞米松组相比, * $P < 0.01$

3 讨 论

大量研究证实,与正常人及正常动物相比,哮喘患者及哮喘动物模型体内 EOS和 L-5水平显著升高,在一定程度上能够反映哮喘时气道炎症的程度,因此常被作为评价平喘药物对哮喘病情改善程度的一项重要指标^[7]。本实验结果显示杏龙平喘方用于治疗小鼠过敏性哮喘,能够降低哮喘小鼠外周血 EOS数目、减轻气道炎症,还能够降低哮喘小鼠肺组织和血清中 L-5浓度,提示降低体内 Th2 源性细胞因子 L-5水平、纠正体内免疫失衡状态,可能是杏龙平喘方治疗哮喘的具体作用机制之一。

哮喘发作过程中,由于各种免疫细胞被激活,释放各种炎症介质时出现呼吸爆发,产生大量氧自由基。同时,一些炎症介质相互作用,形成链式反应。L-5,血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF),白三烯 B₄ (leukotriene B₄, LT_{B4})等介质大量产生, L-5能够增强 PAF和 LT_{B4}对 EOS的趋化作用,还可刺激 EOS脱颗粒和产生氧自由基。氧自由基引发的脂质过氧化作用所造成的线粒体、细胞、组织损伤又可启动自由基发生连锁反应,产生新的自由基。氧自由基的过量产生,使得 SOD等拮抗物质大量消耗,使细胞膜受损,引发强烈的脂质过氧化反应,其反应终产物 MDA则可反馈激活脂质过氧化反应从而形成恶性循环。基于上述机制,如何清除过多的氧自由基和氧化反应产物、提高 SOD和 GPx等保护性抗氧化酶类物质成为治疗哮喘的思路之一。Kinnula等^[8]则在动物实验中证实, SOD及其类似酶类能够清除体内氧自由基,减轻哮喘发作过程中肺脏损伤。Davis等^[9]用 Cu-ZnSOD对 302例早产儿呼吸窘迫综合征进行治疗,发现其可明显改善患者临床症状,减轻肺部损伤。

本研究发现,给哮喘小鼠服用杏龙平喘方一个疗程后,与哮喘组小鼠相比,杏龙平喘方组小鼠 SOD和 GPx活性水平升高,肺组织中 SOD活力水平在 2

组之间差异具有显著性 ($P < 0.01$),而 MDA含量则较哮喘模型组小鼠明显下降 ($P < 0.05$)。由此可见,杏龙平喘方可以提高小鼠肺组织抗氧化能力,维持氧自由基生成与清除的动态平衡,亦可能是其具有治疗哮喘功效的具体作用机制之一。

本研究显示,与现代医学经典的平喘药物肾上腺糖皮质激素(地塞米松)相比,除 GPx以外,杏龙平喘方在降低哮喘 L-5水平、纠正氧自由基物质失衡方面的作用效果和前者接近,提示该方剂不仅遵循传统的理法方药应用规律,而且其作用机制也与现代医学观点相吻合,为其临床开发提供了科学依据。

致谢:衷心感谢张炜宁博士、邢之华教授、陈琼教授、苏晓丽副教授等在实验中给予的指导。

参考文献:

[1] Mattes J, Foster PS Regulation of eosinophil migration and Th2 cell function by L-5 and eotaxin[J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2003, 2(2): 169-174.

[2] Akdis CA, Kussebi F, Pulendran B, et al Inhibition of T helper 2-type responses, IgE production and eosinophilia by synthetic lipopeptides[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(10): 2717-2726.

[3] Blumchen K, Kallinich T, Hamelmann E Interleukin-5: a novel target for asthma therapy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1(3): 433-453.

[4] Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, et al Anti-L-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(7): 1029-1036.

[5] Park SW, Kim do J, Chang HS, et al Association of interleukin-5 and eotaxin with acute exacerbation of asthma[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003, 131(4): 283-290.

[6] Pawliczak R. The role of radical oxygen species in airway inflammation[J]. *Pol Merkuriusz Lek*, 2003, 14(84): 493-496.

[7] 罗百灵,吴鄂生,丘万服,等.哮喘中 L-5和 L-10基因表达及其相关性研究[J]. *湖南医科大学学报*, 2000, 25(2): 99-102.

[8] Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(12): 1600-1619.

[9] Davis JM, Parad RB, Michele T, et al Pulmonary outcome at 1 year corrected age in premature infants treated at birth with recombinant human CuZn superoxide dismutase[J]. *Pediatrics*, 2003, 111(3): 469-476.

(本文编辑 陈丽文)