

Effect of Qufeng Xuanbi Formula on experimental asthma guinea pigs' airway inflammation and Th1/Th2 cytokines

SHI Suo-fang¹, ZHOU Kui-long²

¹Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing Jiangsu, China

²Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing Jiangsu, China

Received: Apr 24, 2014

Accepted: May 22, 2014

Published: Jul 22, 2014

DOI: 10.14725/gjicmwm.v2n2a387

URL: <http://dx.doi.org/10.14725/gjicmwm.v2n2a387>

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Objective: To explore the therapeutic effect and mechanism of Qufeng Xuanbi Formula on experimental asthma guinea pigs' airway inflammation and regulation Th1/Th2 imbalance in treatment of bronchia asthma. **Methods:** Animal models were established in guinea pigs by a combination of intraperitoneal injection and repeated intranasal challenges. Immune adjustment influence of medicine on Th1/Th2 imbalance was observed. Eos in BALF were counted and tissue slice dyed with HE were observed; Content of IFN- γ and IL-4 were detected by ELISA. **Results:** Compared with normal group, the alveolar lavage fluid (BALF) in the marked increase in the number of Eos, histomorphology lesions, obviously abnormal Eos of the airway inflammatory cells express; the level of IFN- γ was dramatically decreased, neutrophil and level of IL-4 were all significantly increased in the BALF. DXM group, high and low dose group are significant different compared with model group ($P < 0.01$). However, the percentages of EOS and level of IFN- γ was dramatically increased, the level of IL-4 was dramatically decreased ($P < 0.01$), high dose group's effect is better than the low dose group. **Conclusion:** Qufeng Xuanbi Formula can reduce the EOS infiltration, inhibit airway inflammation, regulate Th1/Th2 imbalance, it could be one of the blocking mechanism of occurrence and development of asthma.

Key words

Qufeng Xuanbi Formula; Asthma; Airway inflammation; Th1/Th2 imbalance

祛风宣痹方对实验性哮喘豚鼠气道炎症和 Th1/Th2 细胞因子的影响*

史锁芳¹, 周奎龙²

¹南京中医药大学附属医院, 江苏南京, 中国

²南京中医药大学, 江苏南京, 中国

通讯作者: 史锁芳 Email: jsssf2006@126.com

*基金项目: 江苏省“六大人才高峰”第六批高层次人才资助项目(No.苏人社(R)通[2009]182号-15); 江苏省中医药领军人才项目(No.LJ200909)

【摘要】目的 观察祛风宣痹方对哮喘豚鼠气道炎症和 Th1/Th2 细胞因子的影响, 探讨其作用机制。方法 用卵蛋白和雾化吸入致敏法, 复制豚鼠哮喘模型; 取肺泡灌洗液进行嗜酸性粒细胞(Eos)计数; 肺组织切片 HE 染色形态学观察; ELISA 方法检测 BALF 中 IFN- γ 和 IL-4 的含量。结果 模型组较正常组肺泡灌洗液(BALF)中气道 Eos 炎症细胞表达异常, 组织形态学病变明显, IFN- γ 含量显著下降, IL-4 的含量明显升高; 地塞米松米组、中药高剂量组、中药低剂量组较模型组均有显著性差异, BALF 中 Eos 的数量明显降低, 组织形态学改善明显, IFN- γ 含量显著升高, IL-4 的含量明显下降, 中药高剂量组效果强于低剂量组。结论 祛风宣痹方能减少 EOS 浸润, 抑制气道炎症, 调节 Th1/Th2 失衡, 这可能是其阻断哮喘发生发展的机制之一。

【关键词】祛风宣痹方；哮喘；气道炎症；Th1/Th2 失衡

哮喘是一种气道炎症性疾病已经得到公认。气道炎症是哮喘的基本病理改变，是哮喘气道高反应性和症状反复发生的重要原因之一，即使是轻度的无症状哮喘也有气道炎症存在^[1]。研究发现，Th1/Th2 失衡成为哮喘防治研究的重要环节^[2]。祛风宣痹方是南京中医药大学附属医院治疗支气管哮喘（风痰阻肺证）的有效院内制剂^[3]。本研究通过建立豚鼠哮喘模型，并用祛风宣痹方饲喂，观察该方抗哮喘慢性气道炎症的作用机制及其对 Th1/Th2 细胞因子的影响。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 清洁级健康豚鼠 50 只，由南通大学实验动物中心提供[实验动物生产许可证号：SCXK（苏）2008-0010]。将 50 只豚鼠随机分为 5 组：正常组、哮喘模型组、中药复方高剂量组、中药复方低剂量组、地塞米松组，每组 10 只。

1.2 药物 祛风宣痹方包括射干、麻黄、桃仁、杏仁、全瓜蒌、薤白、僵蚕、地龙、芍药、甘草等，由南京中医药大学附属医院提供，经本院制剂科鉴定均系正品，制成 200ml 灭菌浓煎密封制剂共 600ml，生药含量为 2.9g/ml，低温（4℃）放置备用。醋酸地塞米松片（0.75mg，100 片）由上海信谊药厂有限公司提供，生产批号：100502。

1.3 试剂与仪器

1.3.1 试剂 卵白蛋白：由上海伯奥生物科技有限公司提供，生产批号（101008）；3%戊巴比妥钠溶液：3g 戊巴比妥钠溶于 100g 生理盐水中；HE 染色液由上海舜田生物科技有限公司提供，生产批号 SBT10001；瑞氏染液由上海佳伦生物科技有限公司提供，生产批号 68988-92-1。

1.3.2 主要仪器 莱卡切片机（德国 Leica 公司，型号：RM2128）；荧光显微镜（日本制造，OLYMPUS 型号：BX51）；照相机（日本制造，型号：OLYMPUS C-35AD-2）；超声雾化器（德国百瑞公司）；自制透明带盖塑料盒（50cm×30cm×20cm）等。

2 方法

2.1 造模 运用卵蛋白致敏和雾化吸入法造模^[4]：卵白蛋白腹腔注射 14 天，从第 15 天开始将模型组豚鼠置于密闭器皿内（自制的 50cm×30cm×20cm 透明带盖塑料盒），给予 2%OVA 溶液进行雾化吸入；对照组以生理盐水代替。设定雾化流量为 3ml/min，每次持续雾化 20min 激发哮喘，观察豚鼠反应，以出现抖毛、毛发竖立、抓鼻、咳嗽、打喷嚏、腹式呼吸、呼吸急促甚则出现口唇及双耳紫绀、伸颈、缩胸、点头运动、抽搐、跌倒、大小便失禁等。待出现症状后，随机从正常组和模型组各取 2 只做病理切片，模型组较正常组支气管黏膜及黏膜下层组织有大量的嗜酸性粒细胞浸润、支气管壁增厚、平滑肌增生、管腔狭窄、组织黏膜轻度充血水肿等典型的气道炎症及重建表现，视为造模成功。

2.2 给药方法 各组均从激发阶段第 1 天（即造模第 15 天）诱喘成功后 30min，灌胃给药。中药煎剂浓度为 2.9g/ml，中药复方高剂量组按 18.13g/kg 灌胃，中药复方低剂量组按 9.065g/kg，临用前用蒸馏水将 2.9g/ml 的中药水煎剂稀释 1 倍后按该浓度灌胃；地塞米松组按 1mg/kg，临用前用蒸馏水配成 0.2mg/ml 浓度；正常组与哮喘组予 6.25ml/kg 蒸馏水灌胃），持续 10 天，于第 10 天（即造模第 24 天）最后一次给药后 1h，再次诱发，诱发后 24h 内处死豚鼠，留取标本。

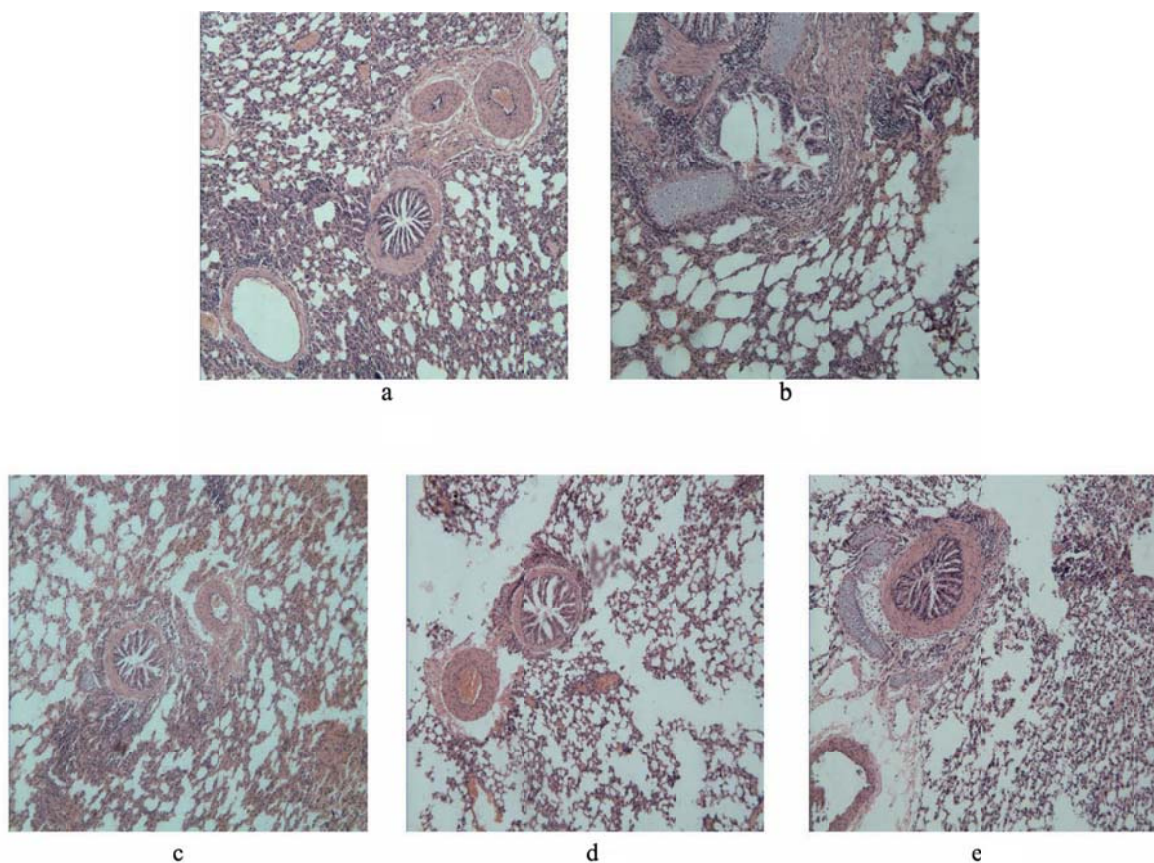
2.3 标本采集与测定 使用预先配制的 PBS 缓冲液 2ml 行肺泡灌洗，缓慢回抽，使回收率>80%，获取支气管肺泡灌洗液（BALF）约 1.6ml 用于细胞分类及计数；用酶联免疫吸附测定（ELISA）法检测 BALF 中 IL-5、 γ 干扰素（IFN- γ ）浓度；肺组织用 4%多聚甲醛石蜡包埋、切片、苏木精-伊红（HE）染色，奥林巴斯显微镜观察，JD801 图像分析系统拍照。以 2%戊巴比妥 1.5ml 腹腔注射麻醉动物，无菌操作分别从每

只豚鼠颈部分离出颈动脉, 放血 5ml 入试管, 3000r/min 离心 10min, 分离上清液, 放于 -20℃ 保存, 用 ELISA 方法, 按照试剂盒所附的说明操作, 测定 IFN- γ 和 IL-4。

2.4 统计学处理 数据用 SPSS17.0 统计软件进行处理, 数据先行正态性检验及方差齐性检验。方差齐者, 组间比较实用 LSD 法, 方差不齐者实用 Tamahane's T2 检验, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较做 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 豚鼠肺组织病理学观察 (1) 正常组: 细支气管及肺泡等肺组织及血管均呈正常形态 (图 1-a)。(2) 模型组: 细支气管黏膜上皮排列紊乱、增生, 支气管黏膜及黏膜下层组织有大量的 EOS、中性粒细胞浸润呈簇状浸润, 支气管官腔狭窄, 腔内有大量的上皮细胞脱落, 组织黏膜充血水肿, 呈现典型的气道炎症 (图 1-b)。(3) 地塞米松组: 细支气管黏膜仍充血水肿, EOS 等炎性细胞浸润较模型组减轻, 仍可见中性粒细胞, 腔内有少量脱落上皮细胞和炎性细胞, 部分区域肺组织基本正常 (图 1-c)。(4) 祛风宣痹方高剂量组: 与地塞米松组相似, 但较为严重, 支气管黏膜充血水肿程度较高, 可见 EOS 的炎性细胞浸润 (图 1-d)。(5) 祛风宣痹方低剂量组: 与地塞米松组及祛风宣痹方高剂量组相比, 细支气管黏膜排列紊乱, 支气管黏膜及黏膜下层组织出现炎性细胞浸润, 腔内细胞脱落明显 (图 1-e)。



a 正常组; b 哮喘模型组; c 地塞米松组; d 祛风宣痹方高剂量组; e 祛风宣痹方低剂量组

图 1 豚鼠肺组织病理变化 (100 \times)

3.2 豚鼠血清 IFN- γ 、IL-4 浓度比较 见表 1。表 1 豚鼠血清 IFN- γ 、IL-4 浓度比较 ($\bar{X} \pm S$, n=8)

组别	n	IFN- γ 浓度 (ng/L)	IL-4 浓度 (ng/L)
正常对照组	8	23.24±6.46 ^{△*}	10.10±1.23 [△]
哮喘模型组	8	14.83±1.07 ^{▽*}	12.20±2.96 ^{▽*}
地塞米松组	8	16.86±2.01 ^{▽△}	11.97±2.01 ^{▽△}
祛风宣痹方高剂量组	8	18.28±2.37 ^{▽△}	11.62±1.83 ^{▽△}
祛风宣痹方低剂量组	8	18.10±4.58 ^{▽△}	10.46±2.83 ^{△*}

注: [▽]表示与正常对照组比较 $P < 0.05$; [△]表示与哮喘模型组比较 $P < 0.05$; *表示与地塞米松组比较 $P < 0.05$

3.3 肺泡灌洗液 (BALF) 细胞计数 见表 2。

表 2 肺泡灌洗液 (BALF) 细胞计数 ($\bar{X} \pm S$, n=8)

组别	n	细胞总数 ($10^9/L$)	EOS (%)
正常对照组	8	0.48±0.47 ^{△*}	3.50±3.89 ^{△*}
哮喘模型组	8	1.10±0.35 ^{▽*}	46.75±21.13 [▽]
地塞米松组	8	0.59±0.29 ^{▽△}	19.75±16.99 ^{▽△}
祛风宣痹方高剂量组	8	0.59±0.38 ^{▽△}	16.00±14.18 ^{▽△}
祛风宣痹方低剂量组	8	0.69±0.36 ^{▽△*}	23.13±26.97 ^{▽△*}

注: [▽]表示与正常对照组比较 $P < 0.05$; [△]表示与哮喘模型组比较 $P < 0.05$; *表示与地塞米松组比较 $P < 0.05$

4 讨论

笔者既往的研究表明,祛风宣痹方具有促使哮喘豚鼠淋巴细胞凋亡指数显著升高^[5]、降低气道高反应性的作用^[6]。本研究采用当前哮喘动物模型实验中常用的药物干预方式——雾化激发前给药^[7],揭示了祛风宣痹方还具有如下作用。

4.1 祛风宣痹方对豚鼠 Th1/Th2 失衡的影响 气道炎症和气道重建是支气管哮喘的两个主要病理学特征,特别是 Th2 细胞在炎症发生发展过程中起关键作用,纠正 Th1/Th2 失衡是治疗支气管哮喘的有效途径^[8]。本研究发现通过祛风宣痹方的干预,IFN- γ 水平升高,IL-4 浓度降低,逆转了 Th1/Th2 的失衡,从而有效减轻豚鼠气道炎症和气道重建,祛风宣痹方高剂量组与地塞米松组相比无统计学差异。

4.2 祛风宣痹方对豚鼠气道炎症的影响 实验发现,各药物治疗组细支气管肺组织炎性病变均较模型组有不同程度减轻,以中药高剂量组和地塞米松组病变最轻,中药低剂量组次之。病理变化结果显示祛风宣痹方能够改善组织病理反应。实验豚鼠哮喘模型组与正常对照组比较后发现,哮喘模型组 BALF 中细胞总数、EOS%显著高于正常组 ($P < 0.01$),说明肺泡灌洗液中炎性细胞浸润明显。经药物干预的其他三组豚鼠 BALF 中细胞总数、EOS%均显著低于哮喘模型组,其中以地塞米松组和祛风宣痹方高剂量组最为明显,两者比较 $P > 0.05$,表明两者在降低细胞总数、EOS%方面疗效相当,而中药低剂量组与中药高剂量组比较 $P < 0.05$,说明祛风宣痹方高剂量组疗效优于低剂量组。中药高剂量组效果强于低剂量组,也进一步说明本方的抗豚鼠气道炎症作用存在剂量依赖性。中药对于哮喘的治疗主要是通过系统的免疫调节而发挥作用,其发挥效用需要一定时间,本研究 10 天的灌胃时间可能较少。因此,给予更长时间和更大剂量的中药复方制剂可能会有更好效果。

4.3 祛风宣痹方平喘作用阐述 目前祛风宣痹方已成为南京中医药大学附属医院治疗风痰阻肺型哮喘的院内制剂 (“祛风宣痹方”批号:苏药制字 Z04000538),已在本院广泛运用。其中祛风药既选擅驱外风的

麻黄宣肺平喘、祛风抗敏，又有擅熄内风的僵蚕、地龙止痉平喘，更用能祛风湿、通经络的海风藤宣痹通络；宣痹药物除了选用瓜蒌、薤白、半夏开肺通阳、泄浊化痰以去痰浊之痹外，同时配合《圣济总录》之“双仁丸”（杏仁、桃仁），活血通腑降气，以去气血之痹，还用射干、枳壳，既能利咽散结，又能理气除满，还能去咽膈之痹。诸药合用，共奏祛风宣痹、开肺泄浊、解痉平喘之功。因此可以认为祛风宣痹方能减少 EOS 浸润,抑制气道炎症,调节 Th1/Th2 失衡,这可能是其阻断哮喘发生发展的机制之一。

【参考文献】

- [1] Stephen T. Holgate, MD, FMedSci. Pathophysiology of asthma: What has our current understanding taught us about new approaches?[J].J Allergy Clin Immunol, 2011,128(3):495-505.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.06.052>
- [2] 董亮,张琦,陈明,等.转录因子 T-bet/GATA-3 比率评价哮喘患者 Th1/Th2 失衡及 CpG-ODNs 干预机制的研究[J].中国病理生理杂志, 2007,23(9):1776-1781.
- [3] 史锁芳,刘丽,黄辉,等.祛风宣痹方对哮喘豚鼠 p38 MAPK 信号通路的影响[J].中华中医药杂志, 2012,27(9):2441-2443.
- [4] 李祥华,张德新,许甲凤,等.地龙汤对实验性哮喘豚鼠气道炎症的影响[J].中国中药杂志, 2007,32(14):1445-1448.
<http://dx.doi:10.3321/j.issn:1001-5302.2007.14.018>
- [5] 郝月琴,史锁芳,曹世宏.平哮合剂对哮喘豚鼠气道 T 淋巴细胞凋亡的影响[J].辽宁中医学院学报, 2002,4(3):177-178.
<http://dx.doi:10.3969/j.issn.1673-842X.2002.03.002>
- [6] 史锁芳,吴寒,朱萱萱,等.祛风宣痹方对实验性哮喘豚鼠肺泡 II 型细胞凋亡的影响[J].江苏中医药, 2009,41(10):68-69.
- [7] 刘仁慧,王秀娟,许利平,等.培本方对哮喘模型大鼠的药效学研究[J].中成药, 2010,32(5):741-746.
- [8] 闫丽丽,康小龙,何承辉,等.香青兰总黄酮对支气管哮喘大鼠 Th1/Th2 免疫失衡的调节作用[J].中国医科大学学报, 2013,42(1):8-13.
<http://dx.doi:10.3969/j.issn.0258-4646.2013.01.003>