

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.06.05

❖ 论著 ❖

芪风固表颗粒在大鼠哮喘模型炎症反应中的作用

白东明¹, 房洁²

(德州市人民医院, 1. 胸外科; 2. 呼吸内科, 山东 德州 253000)

【摘要】目的: 探究芪风固表颗粒在大鼠哮喘模型炎症反应中的作用。**方法:** 100只SPF级雄性SD大鼠随机分为5组(每组 $n=20$), 鸡卵清蛋白雾化方法激发制备大鼠哮喘模型(A、B、C、D组), A、B、C组大鼠在每次激发前2h分别给予0.52g/kg、1.04g/kg和2.08g/kg芪风固表颗粒灌胃溶液, D、E组大鼠给予等量生理盐水灌胃, 最后一次激发完成后24h内采集大鼠血清, 分离肺组织和支气管, 制备肺泡灌洗液(BALF)。比较5组大鼠肺泡灌洗液及血清内各炎症指标水平。**结果:** (1)大鼠BALF及血清中 γ 干扰素(IFN- γ)水平比较, E组均高于其他4组($P<0.05$), D组均低于A、B、C组($P<0.05$); 白细胞介素-4(IL-4)水平E组均低于其他4组($P<0.05$), D组均高于A、B、C组($P<0.05$)。 (2)大鼠BALF细胞涂片中淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞计数比较, E组均低于其他4组($P<0.05$), D组均高于A、B、C组($P<0.05$)。 (3)大鼠血清IL-13、IgE、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平比较, E组均低于其他4组, D组均高于A、B、C组($P<0.05$); IL-18水平E组均高于其他4组($P<0.05$), D组均低于A、B、C组($P<0.05$)。**结论:** 芪风固表颗粒可抑制各炎症因子的表达, 缓解哮喘大鼠气道炎症, 但并未表现出剂量反应。

【关键词】 哮喘; 大鼠; 芪风固表颗粒; 肺泡灌洗液; γ 干扰素; 炎症因子

【中图分类号】 R285.5; R332 **【文献标志码】** A

Effect of Qifenggubiao granules on inflammatory reaction in rat asthma model

BAI Dong-ming¹, FANG Jie²

(1. Department of Thoracic Surgery; 2. Department of Respiratory Medicine, Dezhou People's Hospital, Dezhou 253000, Shandong, China)

【Abstract】 Objective: To explore the effect of Qifenggubiao granules in the inflammatory response of a rat asthma model. **Methods:** 100 SPF healthy male SD rats were randomly divided into five groups ($n=20$), and the chicken ovalbumin atomization method was used to stimulate the preparation of rat asthma models (groups A, B, C, and D). Rats in groups A, B and C were given 0.52g/kg, 1.04g/kg and 2.08g/kg Qifenggubiao granules intragastric solution 2 hours before each challenge, rats in groups D and E were given the same amount of normal saline. The serum of each rat was collected within 24 hours after the last challenge. The complete organs, bronchial tubes, and lung tissue were isolated to prepare lavage fluid. The levels of inflammation indicators in the alveolar lavage fluid and serum of five groups of rats were compared. **Results:** The levels of alveolar lavage fluid and serum IFN- γ in group E was higher than that in groups A, B, C, and D, group D was lower than group A, B and C ($P<0.05$), and the levels of IL-4 in group E was lower than that in groups A, B, C, and D ($P<0.05$), the alveolar lavage fluid and serum IFN- γ levels in group D were higher than those in groups A, B, and C ($P<0.05$). The lymphocyte, neutrophil and eosinophil counts of BALF cell smears in group E were lower than those in groups A, B, C and D ($P<0.05$), group D was higher than groups A, B and C ($P<0.05$). The serum levels of IL-13, IgE and TNF- α in group E were lower than those in groups A, B, C and D, and the levels of IL-18 were higher than those in groups A, B, C and D ($P<0.05$), the serum levels of IL-13, IgE and TNF- α in group D were higher than those in groups A, B and C, and the levels of IL-18 were lower than those in groups A, B and C ($P<0.05$). **Conclusion:** Qifenggubiao granules can inhibit the expression of various inflammatory factors and relieve airway inflammation in asthmatic rats, but it does not show a dose response.

【Key words】 Asthma; Rats; Qi fenggubiao granules; Alveolar lavage fluid; Interferon alpha alpha; Inflammatory cytokines

哮喘是儿童群体最常见的呼吸道慢性疾病之一, 主要特点为胸闷、喘息、咳嗽、气促等呼吸道症状和气道高反应, 近年来发病率逐年升高^[1-2]。中医学认为哮喘属于“哮证”范畴, 肺、脾、肾三脏虚衰,

痰饮留伏, 外因诱发, 触动伏痰, 痰阴气道则发为哮喘, 可分为肺脾两虚和脾肾两虚, 是小儿时期的常见肺系疾病, 具有缠绵难愈、反复发作的特点^[3]。临床中对哮喘患儿的治疗以缓解期的扶正固本为主,

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2015WS0465)

作者简介: 白东明(1972-), 男, 硕士, 副主任医师。E-mail:18606406869@163.com

由于儿童处于不断生长发育的阶段,肾为先天,精气受于父母,因此多以肺脾两虚为主,临床治疗应以补肺健脾^[4]。芪风固表颗粒多用于治疗肺脾肾三虚的慢性咳嗽,疗效显著^[5]。本研究拟通过建立哮喘大鼠模型,探讨芪风固表颗粒在哮喘大鼠炎症反应中的效果,以期能为后期临床治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 试验动物

100 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠均为 6~9 周龄,体重为 180~210 g,平均(192.99±10.78)g,随机分为 5 组(每组 $n=20$),实验前 1 周由该实验室统一提供标准颗粒饲料,自由进食进水,分笼饲养。饲养室光照适度,洁净度及通风良好,温度为(22±2)℃内,湿度为 50%~70%。

1.2 药品与试剂

氢氧化铝凝胶(山东健康药业有限公司,批号 20200204);鸡卵清蛋白(美国 Sigma 公司,批号 20200219);芪风固表颗粒(黑龙江省中医研究院制药厂,批号 20200377);各试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司。

1.3 方法

(1)哮喘大鼠模型造模^[6]:首先致敏,在试验开始的第 1 天、第 8 天、第 15 天均腹腔内注射鸡卵清蛋白(1 mg)与氢氧化铝凝胶(100 mg)混悬液 1 mL 致敏。然后于第 21 天将 1% 鸡卵清蛋白雾化吸入,50 mL/组,隔日 1 次,30 min/次,连续 7 次,最后一次雾化结束后判断是否造模成功。上述造模大鼠为 A、B、C、D 组。(2)E 组:不建造哮喘模型,其余各组大鼠造模时同时腹腔注射或者雾化吸入等量 0.9% 生理盐水。(3)造模成功标准^[7]:参考哮喘模型成功评价标准,评判哮喘模型造模及结局。(4)芪风固表颗粒处理:A、B、C 组大鼠于每次激发前 2 h 分别给予 0.52 g/kg、1.04 g/kg、2.08 g/kg 芪风固表颗粒灌胃溶液,D 组和 E 组大鼠给予等量 0.9% 生理盐水灌胃。A、B、C、D 组中分别造模失败 2 例、1 例、2 例、1 例,6 例中包含 4 例死亡,2 例造模失败,造模成功率为 93.02%。

哮喘模型成功评价标准^[7]:(1)呼吸频率较健康小鼠增加超过 20%;(2)体重减轻较健康小鼠减轻超过 10%;(3)症状:出现饮食/活动减少、口鼻发绀等症状;(4)肺泡灌洗液(BALF)中 IgE 水平、嗜酸性粒细胞计数(沉渣)水平升高;(5)肺组织病理符合哮喘表现。

1.4 观察指标

(1)最后一次激发完成后 24 h 内采集各大鼠血

清,将大鼠塞入固定器内,使其无法转动,辅助人员抓住大鼠尾巴,抓的部位距离进针部位 2 cm 左右,拇指压住静脉,使血管充盈,使用 75% 酒精消毒,以 4.5 号针,30°进针,微微上挑并推进,抽取 2 mL 静脉血。以 2 000 rpm 的速率离心 10 min,取上层血气,使用酶联免疫吸附法(所用试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司)对血清 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素 4(IL-4)、IL-13、IL-18、IgE、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)进行测定。(2)采集完毕后常规处死大鼠,将大鼠固定在手术板上,常规消毒,将颈部皮肤剪开,钝性分离,暴露气管,使用手术线对左肺进行结扎,将气管做一横切口,使用圆头 7 号针头进针,约 1 cm,以“0”号手术线结扎固定,使用 37℃ 的生理盐水对右肺进行支气管肺泡灌洗,每次停留 30 s 后抽出,重复 3 次,回收的 8 mL BALF 离心,取血清使用酶联免疫吸附法对 BALF 中 IFN- γ 和 IL-4 水平进行测定。分离器官:将气管提起,剪断附着的食道与结缔组织后,将肺组织与心脏完整取出。将气管插管与注射器连接,向肺中缓慢压入气体,使肺叶充分膨胀,使用棉线结扎肺叶主支气管,将所需剪下,使用擦镜纸将表面血液吸去,将多余的结缔组织与脂肪剪掉,泡入组织固定液内。(3)取步骤(2)中上清液 0.5 mL 冻干,使用 0.2 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS)复溶,取沉淀,使用 100 μ L PBS 溶解,取 20 μ L 混悬液,加入 0.38 mL 嗜酸性粒细胞计数液,静置 30 min,在细胞计数板上计数嗜酸性粒细胞,并进行瑞氏染色,按照白细胞种类进行计数。

1.5 统计学分析

数据采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理分析,其中对于符合正态分布的计量资料采取 t 检验,其中组间比较采用成组 t 检验且利用($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 BALF 及血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平比较

各组大鼠 BALF 及血清中 γ 干扰素(IFN- γ)水平比较,E 组均高于其他 4 组($P < 0.05$),D 组均低于 A、B、C 组($P < 0.05$);IL-4 水平 E 组均低于其他 4 组($P < 0.05$),D 组均高于 A、B、C 组($P < 0.05$)。A、B、C 组大鼠 BALF 及血清中 IFN- γ 、IL-4 水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠 BALF 细胞涂片中淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞计数比较

大鼠 BALF 细胞涂片中淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞计数比较,E 组均低于其他 4 组($P < 0.05$),D 组均高于 A、B、C 组($P < 0.05$)。A、

B、C 组组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 各组大鼠 BALF 及血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平比较 (ng/L)

分组 例数	BALF		血清	
	IFN- γ	IL-4	IFN- γ	IL-4
A 组 18	12.55 \pm 1.97	12.00 \pm 1.03	139.88 \pm 19.28	13.58 \pm 0.52
B 组 19	12.72 \pm 2.02	12.08 \pm 0.95	144.30 \pm 16.20	13.83 \pm 0.39
C 组 18	12.68 \pm 2.13	12.17 \pm 1.15	145.53 \pm 17.61	13.69 \pm 0.47
D 组 19	11.24 \pm 1.12 * # Δ	14.37 \pm 0.77 * # Δ	130.98 \pm 4.67 * # Δ	14.67 \pm 0.58 * # Δ
E 组 20	14.45 \pm 1.78 * # Δ \blacktriangle	10.58 \pm 0.81 * # Δ \blacktriangle	165.43 \pm 20.09 * # Δ \blacktriangle	12.66 \pm 0.61 * # Δ \blacktriangle

* $P < 0.05$, 与 A 组比较; # $P < 0.05$, 与 B 组比较; Δ $P < 0.05$, 与 C 组比较; \blacktriangle $P < 0.05$, 与 D 组比较。

表 2 各组 BALF 细胞涂片淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞计数比较 ($\times 10^9/L$)

分组 例数	淋巴细胞	中性粒细胞	嗜酸性粒细胞
A 组 18	30.09 \pm 5.51	58.88 \pm 5.10	7.04 \pm 1.20
B 组 19	32.81 \pm 4.29	59.43 \pm 4.20	7.18 \pm 1.13
C 组 18	33.31 \pm 4.77	60.22 \pm 4.87	7.23 \pm 1.88
D 组 19	56.69 \pm 5.18 * # Δ	71.93 \pm 3.29 * # Δ	12.33 \pm 4.45 * # Δ
E 组 20	24.41 \pm 3.37 * # Δ \blacktriangle	49.11 \pm 2.01 * # Δ \blacktriangle	3.32 \pm 0.77 * # Δ \blacktriangle

* $P < 0.05$, 与 A 组比较; # $P < 0.05$, 与 B 组比较; Δ $P < 0.05$, 与 C 组比较; \blacktriangle $P < 0.05$, 与 D 组比较。

2.3 各组大鼠血清炎症因子水平比较

大鼠血清 IL-13、IgE、TNF- α 水平比较, E 组均低于其他 4 组, D 组均高于 A、B、C 组 ($P < 0.05$); IL-18 水平 E 组均高于其他 4 组 ($P < 0.05$), D 组均低于 A、B、C 组 ($P < 0.05$)。A、B、C 组上述指标组间比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组血清炎症因子水平比较 (ng/mL)

分组 例数	IL-13	IL-18	IgE	TNF- α
A 组 20	43.38 \pm 2.78	27.66 \pm 3.68	2.57 \pm 0.49	126.69 \pm 5.73
B 组 20	45.18 \pm 2.66	28.98 \pm 3.32	2.64 \pm 0.52	128.97 \pm 4.38
C 组 20	47.77 \pm 3.31	29.90 \pm 3.11	2.71 \pm 0.55	129.99 \pm 6.10
D 组 20	59.10 \pm 7.84 * # Δ	15.46 \pm 4.10 * # Δ	4.97 \pm 0.45 * # Δ	152.38 \pm 6.54 * # Δ
E 组 20	38.72 \pm 5.21 * # Δ \blacktriangle	49.22 \pm 5.57 * # Δ \blacktriangle	2.09 \pm 0.33 * # Δ \blacktriangle	108.96 \pm 5.10 * # Δ \blacktriangle

* $P < 0.05$, 与 A 组比较; # $P < 0.05$, 与 B 组比较; Δ $P < 0.05$, 与 C 组比较; \blacktriangle $P < 0.05$, 与 D 组比较。

3 讨论

哮喘发病过程中多种炎症细胞均参与其中,目前认为 EOS 是诱发哮喘气道炎症反应的主要效应细胞^[7]。有研究^[8-9]指出,哮喘发病的重要机制之一为辅助性 T 淋巴细胞的两种亚型 Th1 和 Th2 比例失衡,若 Th2 细胞优势表达则会增大哮喘的发生率。

中医认为哮喘的诱因多样,包含情志、外邪、气候、饮食、劳倦等,因此部分学者认为对哮喘的治疗应当以解痉平喘、祛痰利气为主^[10]。本研究建立哮喘大鼠模型,给予芪风固表颗粒治疗,以达到益气固表,补肺健脾益肾的功效,并对 BALF 中 IFN- γ 及各项血清因子进行观察,以评价其对哮喘的治疗效果。

机体遭受外界刺激时, Th1 和 Th2 比例失衡, Th2 细胞增多会促进 B 细胞产生大量的 IgE, 分泌大量炎症性细胞因子, 对内皮细胞、上皮细胞、嗜酸性细胞、肥大细胞等产生刺激, 促使其产生血栓素 A2、白三烯、前列腺素、内皮素等炎症介素, 各炎症介质含量升高能够诱发支气管平滑肌挛缩, 扩张毛细血管, 促进腺体分泌, 诱发 Th1 和 Th2 型变态反应, 促使产生神经源性炎症^[11]。其次, B 细胞可产生大量 IgE, 并与上皮细胞、肥大细胞表面的受体结合, 促进各炎症介质的释放, 使黏液分泌增强, 使静脉通透性增高, 诱发气道黏膜水肿, 导致哮喘^[12]。

芪风固表颗粒方中五味子酸温, 可生津止渴、敛肺止汗; 麦冬甘寒养阴清热, 可润肺生津, 与黄芪相配伍, 具备益气养阴之功效^[13]。六药合用使方中有补有散, 有润有敛, 生津止渴, 益气养阴, 敛阴止汗, 汗止阴存, 气复津生, 因此对于因肺、脾、肾虚弱而致的哮喘具有一定的疗效^[14]。方中黄芪能够增强细胞免疫, 促进植物血凝素、商陆素、刀豆素 A 等引起的淋巴细胞转化^[15]; 白术能够提高免疫抑制动物脾细胞体外培养存活率, 延长淋巴细胞的寿命, 并促进正常大鼠 B 淋巴细胞与 T 淋巴细胞增殖转化^[16]; 刺五加可增强细胞毒 T 淋巴细胞杀伤靶细胞的活性, 刺激大鼠脾细胞分泌白细胞介素-2, 促进机体分泌 IgG、IgM 的抗体分泌细胞, 生成抗体^[17]。

研究^[18]发现, 芪风固表颗粒可在慢性支气管炎的病因上解决问题, 防止或延缓慢性支气管炎的发作, 能改善慢支患者的生存状态, 提高生活质量, 这一结果为芪风固表颗粒用于治疗哮喘提供了研究基础。同时分析 Th1 细胞的主要执行细胞因子为 IFN- γ , 其能够将 Th1 细胞的表达水平显示出来, IFN- γ 可参与到调节细胞免疫过程中, 辅助抗体生成细胞免疫应答, 在迟发型超敏反应中发挥作用。且 IFN- γ 在 IgE 的合成中有重要作用, 可调节气道炎症反应, 因此能够抑制哮喘的炎症反应, 因此在本研究中哮喘大鼠经不同剂量的芪风固表颗粒治疗后其体内炎症反应明显改善, 各炎症因子水平改善^[18]。这一过程均为芪风固表颗粒作用下所产生的, 证实了其哮喘大鼠治疗中的作用途径及效果。哮喘大鼠经芪风固表颗粒治疗后, 药物发挥了扶正固本、润肺化痰、益气固表、健脾补肾益肺等功效。

本研究结果也提示药物通过诱导 T 淋巴细胞的凋亡,改善了大鼠体内的炎症反应,抑制了嗜酸性粒细胞趋化,进而从根本上减缓了哮喘的发生机制。同时本研究中给予哮喘大鼠不同剂量的芪风固表颗粒治疗,但不同剂量的药物并未对大鼠产生明显的疗效差异,说明芪风固表颗粒治疗效果与剂量的联系并无明显相关性,提示可从经济学角度等方面选择更适用于患者的剂量治疗,且今后需要进一步进行探究,以选择最有效的药物剂量。

综上所述,芪风固表颗粒可抑制各炎症因子的表达,缓解哮喘大鼠气道炎症,但并未表现出剂量反应,今后应进一步探究和明确其是否存在剂量反应,以寻找治疗哮喘的最佳药物剂量。

参考文献

[1] Ching-Yen K, Chin-Kan C, Jing-Long H, *et al.* Decline in hospitalization for childhood asthma in different air pollution regions in Taiwan, 2001-2012 [J]. *Int J Environ Health Res*, 2020, 2(19): 1-11.

[2] Zonglin H, Huailiang W, Siyu Z, *et al.* The association between secondhand smoke and childhood asthma: A systematic review and meta-analysis [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2020, 1(15): 1002-1006.

[3] 孙莺. 健脾宣肺防喘汤对缓解期哮喘患儿气道反应性及哮喘控制的影响 [J]. *世界中医药*, 2018, 13(5): 1195-1197.

[4] Bandar A, Maaweya EH, Asif N, *et al.* Assiri, Mushira A. Enani. MERS-CoV infection is associated with downregulation of genes encoding Th1 and Th2 cytokines/chemokines and elevated inflammatory innate immune response in the lower respiratory tract [J]. *Cytokine*, 2020, 126(2): 1548-1559.

[5] 张万祥, 王博超, 李志军, 等. 中药固本辟邪方预防老年院内感染的疗效观察 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(5): 469-472.

[6] 林香花, 冯可青, 郑素歌, 等. 甘草次酸对哮喘大鼠肺泡灌洗液白细胞计数及血清相关炎症因子的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(11): 2613-2614.

[7] 张新光, 虞坚儿, 薛征, 等. 化痰祛瘀疏肝法对哮喘小鼠 IL-

13/IL-18 失衡的干预作用 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2013, 8(4): 344-348.

[8] 陈叶, 胡智立, 贺守第, 等. 冬凌草甲素对急性哮喘小鼠 Th1 细胞/Th2 细胞平衡的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(7): 651-653.

[9] Yan Y, Bao HP, Li CL, *et al.* Wentong decoction cures allergic bronchial asthma by regulating the apoptosis imbalance of EOS [J]. *Chin Med*, 2018, 13(6): 18-21.

[10] 陈聪, 洪静, 刘璐, 等. 支气管哮喘的中医病因、病位、病机探讨 [J]. *河北中医*, 2019, 41(5): 775-778, 800.

[11] 赵兰凤, 马洪举, 林国华, 等. 膻穴热敏灸治疗哮喘慢性持续期的临床观察 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(8): 2137-2140.

[12] Hani MSL, Omar MA, Samar FB, *et al.* Alotaqi, Ahmed A. Bahnasay. Refractory asthma phenotyping based on immunoglobulin E levels and eosinophilic counts: A real life study [J]. *Respir Med*, 2019, 158(10): 55-58.

[13] Zhu YJ, Mao D, Gao W, *et al.* Analysis of lncRNA Expression in Patients With Eosinophilic and Neutrophilic Asthma Focusing on LNC_000127 [J]. *Front Genet*, 2019, 10(3): 101-141.

[14] 郑单单, 魏文峰, 霍金海, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析芪风固表颗粒化学成分 [J]. *中成药*, 2020, 42(6): 1649-1657.

[15] 聂娟, 谢丽华, 马港圆, 等. 中药黄芪的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *湖南中医杂志*, 2018, 34(7): 228-231.

[16] Wang CY, Gao HB, Cai EB, *et al.* Protective effects of Acanthopanax senticosus-Ligustrum lucidum combination on bone marrow suppression induced by chemotherapy in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109(1): 2062-2069.

[17] Elyza AAN, Taichi O, Keisuke K, *et al.* Inhibition of cholesteryl ester synthesis by polyacetylenes from *Atractylodes rhizome* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30(7): 1269-1297.

[18] William JB, Stölting H, Oliver RA, *et al.* A T cell-myeloid IL-10 axis regulates pathogenic IFN- γ -dependent immunity in a mouse model of type 2-low asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 145(2): 666-678.

(收稿日期: 2020-03-15)

学术编辑: 孙丽凤)