

百合知母汤对哮喘大鼠血清、肺泡灌洗液中 SP-A
及脏器系数变化的影响 *

马秀丽¹ 安耀荣^{1△} 邱 桐¹ 刘伟昌²

(1 甘肃中医学院 甘肃 兰州 730000 2 甘肃省武威市人民医院普外科 甘肃 武威 733000)

摘要 目的 通过百合知母汤对哮喘大鼠的干预,探讨该治疗方法的作用机理。方法 将大鼠随机分成正常组、哮喘模型组、中药大、中、小剂量组、地米组、中西药联用组,除正常组外经卵蛋白免疫建立模型,ELISA 法检测各组血清和 BALF 中 SP-A 的含量;计算肺脏、胸腺和脾脏的脏器系数。结果:与正常组相比,模型组及小剂量组血清、BALF 中 SP-A 明显降低($P<0.05$);与模型组比较,中药各剂量组、地米组及中西药联用组血清和 BALF 中 SP-A 有统计学意义($P<0.05$);中药各剂量组间比较,中剂量组血清和 BALF 中 SP-A 均高于小剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$);模型组肺脏系数明显高于正常对照组($P<0.05$)。结论:百合知母汤可显著升高血清和 BALF 中 SP-A 含量,对肺组织有很大影响。

关键词 百合知母汤;支气管哮喘;肺泡灌洗液;SP-A;脏器重量/体重

中图分类号 R285.5, R562.25 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)08-1423-03

Research of the Effect of Baihe-Zhimu Decoction on Asthmatic Mouse
Serum, IgE in Alveolar Lavage Fluid and Lung Tissue Changes*

MA Xiu-li¹, AN Yao-rong^{1△}, QIU Tong¹, LIU Wei-chang²

(1 Gansu College Of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, 730000, China;

2 General Surgery of Wuwei People's Hospital, Wuwei, 733000, China)

ABSTRACT Objective: Through the Baihe-zhimu decoction intervention, the effect of this treatment method on asthmatic mouse and lung tissue is researched. **Methods:** Devide the mice into the normal group, asthma group, Chinese medicine high dose, middle dose, and low dose groups, dexamethasone group, and combine of western and Chinese medicine group. Except the normal group, establish the model by ovalbumin immunized, detect the SP-A in BALF and serum, the ratio of lung thymus and spleen and body weight were calculated. **Results:** Compared with the normal group, the sera, SP-A in BALF and serum, the asthma group and low dose group reduce significantly ($P<0.05$). Compared with the asthma group, the sera, SP-A in BALF and serum, three Chinese medicine groups, DXM group and combination group have statistical meaning ($P<0.05$). Between the three Chinese medicine groups, the sera, SP-A in BALF and serum, middle dose are less than low dose groups, and their differences have statistical meaning ($P<0.05$). The ratio of lung and body weight in the asthma group rise significantly than the normal group ($P<0.05$). **Conclusions:** Baihe-zhimu decoction can rise the SP-A in BALF and serum significantly lung may be influenced primarily during the airway remodeling of chronic asthma.

Key words: Baihe-zhimu decoction; Bronchial asthma; Alveolar lavage fluid; SP-A; The ratio of organ and body weight

Chinese Library Classification(CLC): R285.5 R562.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)08-1423-03

前言

支气管哮喘(bronchial asthma)简称哮喘,是一种由多种细胞(气道炎性细胞和结构细胞)和细胞组分参与的气道慢性炎症反应性疾病^[1],这种反应贯穿于哮喘的全过程。支气管哮喘若诊治不及时,随病程的延长可产生气道不可逆性狭窄和气道重塑。

百合知母汤系载于张仲景《金匱要略》之古方^[2]。由百合七枚,知母三两组成。百合知母汤主治百合病,发汗后者。百合、知母二者相配为补泻相配,百合长于补,甘寒清润而不膩,知母偏于泻,苦寒降火而不燥,二者相伍,补泻兼施,润肺清肺,化

痰止咳。

本实验通过研究百合知母汤对哮喘大鼠模型血清和 BALF 中 SP-A 以及脏器系数的影响,探讨百合知母汤在支气管哮喘治疗中的作用,为临床应用百合知母汤治疗哮喘提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

SPF 级健康 Wistar 大鼠 70 只,体重 200 g 左右,雌雄各半,由甘肃中医学院实验动物中心提供,卵蛋白(coalbumin, OVA)(上海生工生物生物工程技术服务有限公司),氢氧化铝

* 基金项目 甘肃省教育厅科研项目(044B-02)

作者简介:马秀丽(1983-),女,硕士研究生,研究方向:呼吸系统疾病的病理生理研究,电话:18919000332, E-mail:305336906@qq.com

△通讯作者:安耀荣(1968-),男,副教授,电话:13919155346, E-mail: anyr@gszy.edu.cn

(收稿日期 2011-11-07 接受日期 2011-11-30)

干粉(佐剂)(天津市天河化学试剂厂),卡介苗 5×10^9 个(甘肃省疾控中心提供),地塞米松(天津药业焦作有限公司),SP-A ELISA 试剂盒(上海锐聪生物实验设备有限公司)。

1.2 方法和步骤

1.2.1 动物分组 将健康 wistar 大鼠 70 只,随机分成 7 组即正常组、哮喘模型组、百合知母汤大、中、小剂量组(大、中、小剂量组)、地塞米松组(地米组)和地塞米松加百合知母汤中剂量组(联用组)。

1.2.2 哮喘模型的建立 造模参照文献^[3-5]稍加改变复制大鼠哮喘模型。将大鼠适应性饲养 7 天后,第 1 天和第 8 天给模型组和各治疗组每只大鼠腹腔注射抗原液 1ml(其中含 OVA1 mg,氢氧化铝 100 mg,卡介苗 5×10^9 个,生理盐水 1 ml),正常组以生理盐水 1ml 代替 OVA 致敏。第 15 天起用超声雾化器喷雾 1 %OVA 激发模型组和各治疗组,喷雾 30 min/d,1 次/天,连续激发 14 d,正常组在同一时间给予生理盐水超声雾化吸入。当大鼠出现烦躁、口唇发绀、呛咳、呼吸频率加深加快、点头呼吸、反抗力下降、腹肌抽搐等表现造模成功。

1.2.3 实验动物给药 各组均从激发第一天起开始给药,给药在激发前 0.5 h 进行。其中正常组及哮喘模型组给予生理盐水 1ml 灌胃,地塞米松组按 1.2 mg/kg/d 灌服地塞米松,百合知母汤大、中、小剂量组分别按含生药量 3.68 g/kg/d、1.84 g/kg/d、0.92 g/kg/d 灌服中药煎剂,联用组分别灌服地塞米松 1.2 mg/kg/d 和百合知母汤煎剂 1.84 g/kg/d。大鼠给药剂量参照《中药药理实验方法学》人与动物间按体表面积折算的等效剂量折算^[6]。

1.2.4 SP-A 的蛋白质含量测定 (1)血清 SP-A 的测定 :大鼠最后一次雾化结束后,称重,用 4%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,股动脉取血 1.5 ml,3000 rpm 离心 20 min,保存于 -20 ℃ 冰箱中。严格按试剂盒说明书检测血清中 SP-A 含量。(2)BALF 中 SP-A 的测定 股动脉取血后,打开胸腔,分离气管支气管,行左侧支气管肺泡灌洗,插入气管肺泡灌洗针并固定,将生理盐水 3ml(预热 37 ℃)缓慢注入左肺组织内,用手指轻轻按摩左肺组织^[7],将收集的支气管肺泡灌洗液(BALF)盛入 10 ml 塑料离心管(置于冰浴中),重复上述操作 3 次,收集全部 BALF,将收集的 BALF 液 1500 r/min 离心 15 min,取上清液,-20℃ 保存。严格按试剂说明书检测 BALF 中 SP-A 的含量。

1.2.5 脏器重量 / 体重 肺泡灌洗、采血后,分别取全肺、胸腺、脾计算出各脏器重量 / 体重。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件对资料进行数据方差分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表式,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 血清、BALF 中 SP-A 水平变化

见表 1。模型组、小剂量组血清、BALF 中 SP-A 水平低于正常对照组($P < 0.05$);各治疗组血清、BALF 中 SP-A 水平高于模型组($P < 0.05$);中剂量组血清、BALF 中 SP-A 水平高于小剂量组($P < 0.05$);但中剂量组、大剂量组、地米组、联用组与正常对照组比较无显著性差异($P > 0.05$);中剂量、大剂量组、地米组、中西药组间比较无显著性差异($P > 0.05$)。

表 1 血清、BALF SP-A 含量(IU/ mL) ($\bar{x}\pm s$)
Table1 The content of SP-A in serum and BALF (IU/ mL) ($\bar{x}\pm s$)

Group	Serum	BALF
	SP-A	SP-A
Normal group	23.93±4.61*	24.43±4.37*
Asthma group	14.71±2.89▼	14.06±3.75▼
High dose group	19.59±4.17*	19.77±5.32*
Middle dose group	23.17±3.71*	23.86±5.33*
Low dose group	18.67±4.41▼*☆	19.09±4.82▼*☆
DXM group	22.75±4.26*	23.33±4.26*
Combination group	23.43±4.77*	24.10±4.68*

Note:Compared with normal group,▼ $P < 0.05$;compared with asthma group,* $P < 0.05$ compared with middle dose group,☆ $P < 0.05$

2.2 各组大鼠脏器重量 / 体重

见表 2。哮喘模型组肺重量 / 体重高于正常对照组、中剂量组、地米组、联用组($P < 0.05$),而脾、胸腺重量 / 体重各组间无明显差异($P > 0.05$)。

3 讨论

哮喘是反复接触过敏原后,主要由 IgE 介导的变态反应性疾病。SP-A 可与过敏原结合,通过空间位阻或竞争性抑制的方式抑制变应原特异性 IgE 与变应原结合^[8],调节抗原致敏及变

态反应的发生;通过直接与变应原结合阻止其诱导变态反应,抑制变应原与特异性 IgE 结合,并通过此位阻效应来抑制嗜酸粒细胞等释放组织胺,预防哮喘急性发作^[9]。其中亲水性的 SP-A 与哮喘的关系最为密切^[10]。

肺表面活性物质相关蛋白 A^[11](pulmonary surfactant associated protein A,SP-A)是由肺泡 II 型上皮细胞和气道 Clara 细胞合成并分泌的脂蛋白复合物是呼吸系统防御功能的一部分。SP-A 与 MBL 类似,是非抗体依赖的调理素,并具有增强巨噬细胞依赖的细菌清除功能^[12]。SP-A 作为肺部含量最丰富的表

表 2 脏器重量 / 体重 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Organs/body weight ($\bar{x}\pm s$)

Group	Lung/body weight	Spleen/ body weight	Thymus/body weight
Normal group	0.67±0.08▼	0.22±0.61	0.12±0.41
Asthma group	0.83±0.10	0.26±0.43	0.14±0.37
High dose group	0.85±0.08	0.25±0.43	0.13±0.58
Middle dose group	0.72±0.11▼	0.24±0.23	0.14±0.35
Low dose group	0.71±0.90	0.23±0.42	0.13±0.55
DXM group	0.69±0.12▼	0.22±0.28	0.12±0.29
Combination group	0.76±0.12▼	0.22±0.19	0.12±0.39

Note:Compared with asthma group ,▼P<0.05

面活性蛋白 ,可在各种因素导致的肺泡 - 毛细血管膜屏障损伤后进入血液循环 ,成为具有特异性的血清学标志物^[13] ,也可在肺泡灌洗液、诱导痰及肺组织中获得其含量^[14,15] ,本实验通过收集并测定哮喘大鼠血清、BALF 中 SP-A 含量 ,来研究 SP-A 含量的变化与支气管哮喘的关系。实验结果表明哮喘模型组血清、BALF 中 SP-A 含量较空白对照组明显下降。支气管哮喘患者肺泡灌洗中 SP-A 减少使 PS 活性降低 ,导致末梢细支气管塌陷或腔内粘液栓的形成 ,从而参与哮喘的发病^[16]。在过敏反应的后期 ,SP-A 可抑制淋巴细胞的增生 ,并使许多与过敏反应有关的细胞因子的表达均受到抑制 ,如 SP-A 以剂量依赖方式抑制嗜酸性粒细胞的 IL-8 表达^[17]。SP-A 在抗原结合及抗原递呈、调节过敏效应细胞释放炎症介质等多个环节抑制过敏性炎症。哮喘时引起 SP-A 含量下降^[18] ,主要是因为哮喘时肺泡Ⅱ型细胞受损 ,功能下降 ,导致 SP-A 分泌减少。哮喘时明显增加的炎症介质也可抑制 SP-A 的合成^[19]。研究已证实 SP-A 在肺部的防御功能^[20] ,哮喘时 SP-A 的下降会使呼吸道感染易感性增加 ,这可能是哮喘患者易患呼吸道感染的原因之一。

本实验研究还发现哮喘模型组肺重 / 体重明显高于正常对照组 ,而胸腺、脾无统计学意义 ,提示哮喘时对肺组织的影响最大。其引起肺重 / 体重增加的机制^[21]可能是气道炎症容易波及肺组织 ,支气管壁、管腔内及血管、支气管周围有大量的炎性细胞浸润 ,支气管壁杯状细胞增生 ,支气管粘膜水肿、增厚、管腔内分泌物增多、粘液腺增生及粘液栓形成 ,平滑肌增厚 ,纤维组织增生 ,组织黏膜充血水肿明显引起肺水肿 ,肺大泡等病损。

综上所述 ,百合母汤可减少哮喘大鼠病变区域内炎细胞细胞的浸润 ,并且减轻哮喘对肺组织的破坏作用 ,所以为百合知母汤不失为治疗哮喘的有效中药。

参考文献(References)

[1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(3):177-185
Chinese Medical Association of respiratory disease branch Asthma Study Group. Guidelines for prevention and treatment of bronchial asthma [J].Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases. 2008, 31(3):177-185
[2] 徐光星 ,何若苹 ,何任.百合病方证与临床——《金匱要略》方证与临床系列之四 [J]. 浙江中医杂志, 2009, 44(5):313-315

Xu Guang-xing, He-Ruo-ping,He ren.Lily disease indications and clinical -- "Medical Treasures of the Golden Chamber" the series of four in formula syndrome and clinical [J].Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2009, 44(5):313-315
[3] 施焕中, 林江涛. 肺脏免疫学及免疫相关性疾病 [M]. 北京,人民卫生出版社, 2006:373
Shi Huan-zhong,Lin Jiang-tao. Immunology of lung and immune related diseases [M]. BeiJing, People's Medical Publishing House, 2006:373
[4] 王勇生, 桂淑玉, 李永怀, 等. 过敏性哮喘大鼠模型的建立及地塞米松对其的影响 [J]. 中国医药导报, 2007, 4(22):39-41
Wang Yong-sheng,Gui Shu-yu,Li Yong-huai, et al.Establishment of rat model of allergic asthma and the effect of desamethasone on it [J]. China Medical Herald, 2007, 4(22):39-41
[5] Xu S, Lü WH, Zhang HQ. Effect of ibudilast on apoptosis of airway eosinophil in asthmatic-guinea pigs [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44:737-740
[6] 滕纪媛, 尚莉丽. 哮喘平冲剂对幼龄哮喘大鼠气道重塑及肺功能的影响 [J]. 中国中医急症,2010,19(6):999-1000
Teng Ji-yuan,Shang Li-li. Kechuanping Granules on Airway Remodeling and Lung Function in Rats with Young Asthma [J]. Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine ,2010,19(6): 999-1000
[7] 杨珺超,王真,蔡宛如,等.甘利欣对哮喘大鼠 IL-4 和 IFN-γ 影响的实验研究 [J]. 中国中医药科技,2008,15(5):351-352
Yang Jun-chao, Wang Zhen, Cai Wan-ru, et al. Ganlixin on a research of influence experimental study about IL-4 and IFN-γ in asthma rats [J].Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2008,15(5):351-352
[8] 汪隽瑛,方凤.肺表面活性物质在支气管哮喘发病中的作用研究进展 [J].中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(6): 366-368
Wang Jun-ying, Fang Feng.The Research Advancement of Pulmonary surfactant in the pathogenesis of asthma [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2003, 26(6): 366-368
[9] 孙瑜,卢建.肺表面活性物质在支气管哮喘中的研究进展 [J].临床肺科杂志, 2005, 10(3) 356-358
Sun Yu, Lu Jian. The Research Advancement of Pulmonary surfactant on the bronchial asthma [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2003, 26(6): 366-368
(下转第 1409 页)

- cancer[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2003, 15(1): 63-68
- [3] Gnagy S, Ming EE, Devesa SS, et al. Declining ovarian cancer rates in U.S. women in relation to parity and oral contraceptive use[J]. Epidemiology, 2000, 11(2): 102-105
- [4] Ji Q, Liu PI, Chen PK, et al. Follicle stimulating hormone-induced growth promotion and gene expression profiles on ovarian surface epithelial cells[J]. Int J Cancer, 2004, 112(5): 803-814
- [5] Tai MH, Chang CC, Kiupel M, et al. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(2): 495-502
- [6] Yu H, Fang D, Kumar SM, et al. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles [J]. Am J Pathol, 2006, 168(6): 1879-1888
- [7] Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity[J]. Stem Cells, 2005, 23(8): 1105-1112
- [8] Okuda T, Tagawa K, Qi ML, et al. Oct-3/4 repression accelerates differentiation of neural progenitor cells in vitro and in vivo [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 132(1):18-30
- [9] Zhang J, Li YL, Zhou CY, et al. Expression of Octamer-4 in serous and mucinous ovarian carcinoma[J]. J Clin Pathol, 2010, 63(10): 879-883
- [10] Shushan A, Paltiel O, Iscovich J, et al. Human menopausal gonadotropin and the risk of epithelial ovarian cancer[J]. Fertil Steril, 1996, 65(1): 13-18
- [11] Stewart SL, Querec TD, Gruver BN, et al. Gonadotropin and steroid hormones stimulate proliferation of the rat ovarian surface epithelium [J]. J Cell Physiol, 2004, 198:119-124
- [12] Edmondson RJ, Monaghan JM, Davies BR. Gonadotropins mediate DNA synthesis and protection from spontaneous cell death in human ovarian surface epithelium [J]. Int J Gynecol Cancer, 2006, 16(1): 171-177
- [13] Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, et al. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(11): 5290-5296
- [14] Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues[J]. Cell, 2005, 121(3): 465-477
- [15] Hu T, Liu S, Breiter DR, et al. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis [J]. Cancer Res, 2008, 68(16): 6533-6540
- [16] Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2244-2250

(上接第 1425 页)

- [10] 杨永胜, 关键. 肺表面活性物质相关蛋白与呼吸系统疾病 [J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(3):413-415
Yang Yong-sheng, Guan Jian. Pulmonary surfactant associated protein and the disease of respiratory system [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2011, 16(3):413-415
- [11] 晋大鹏, 胡志帅, 陈书明. 肺表面活性物质相关蛋白 A 与肺部免疫防御研究进展 [J]. 生物学杂志, 2009, 26(2):54-56
Jin Da-peng, Hu Zhi-shuai, Chen Shu-ming. Advance on Protein A Pulmonary Surfactant-associated and Immune Defense in the Lung [J]. Journal of Biology, 2009 26(2):54-56
- [12] 崔纪云, 刘会娟, 龙成凤, 等. 肺表面活性物质相关蛋白 A、D 的研究进展 [J]. 山东医药, 2008, 48(28):112-113
Cui Ji-yun, Liu Hui-juan, Long cheng-feng, et al. The Research Advancement of Pulmonary surfactant associated protein A, D [J]. ShanDong Medical Journal, 2008, 48(28):112-113
- [13] Qian J ian-gang, Ling Wan-li. Determination of Blood ET-1 and Related Cytokines in Pediatric Patient with Bronchial Asthma [J]. J of Radioimmunology, 2005, 18: 89-91
- [14] 骆树新, 许西琳. 肺表面活性物质相关蛋白 A 与慢性阻塞性肺疾病 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(1):5-6
Luo Shu-xin, Xu Xi-lin. Pulmonary surfactant associated protein A in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2011, 25(1):5-6
- [15] Calkovska A, Mokra D, Calkovsky V. Lung surfactant alterations in pulmonary thromboembolism [J]. Eur J Med Res, 2009, 14(7):38-41
- [16] 邱晨, 史菲, 陈彩霞. 哮喘发作期肺表面活性物质对 T 细胞亚群的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(6):806-808
Qiu Chen, Shi Fei, Chen Cai-xia. Effect of pulmonary surfactant on T cell subsets during an asthmatic attack [J]. China Journal of Modern Medicine, 2005, 15(6):806-808
- [17] 郑艳辉, 旷寿金. 支气管哮喘与肺表面活性物质的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2003, 19(2):75
Zheng Yan-hui, Kuang Shou-jin. The Research Advancement of Bronchial asthma and pulmonary surfactant [J]. Hu Nan Journal of Traditional Chinese Medicine 2003, 19(2):75
- [18] Lacaze-Masmonteil T. Expanded Use of Surfactant Therapy in newborns [J]. Clin Perinatol, 2007, 34(1): 179-189
- [19] 汪隽瑛, 方凤, 刘枫, 等. 哮喘大鼠肺表面活性物质结合蛋白 A 的变化及其意义 [J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(11):1255-1257
Wang Jun-ying, Fang Feng, Liu Feng, et al. Changes of pulmonary surfactant-associated proteins A in asthmatic rats [J]. Academic Journal of Second Military, 2004, 25(11):1255-1257
- [20] Floros J, Thomas NJ. Surfactant protein genetics in community-acquired pneumonia: balancing the host inflammatory state [J]. Crit Care, 2011, 15(2):156
- [21] 王向红, 张中乐, 郑海燕, 等. 慢性哮喘豚鼠气道重塑血清电解质及主要脏器 / 体重的变化 [J]. 河南科技大学学报 (医学版), 2006, 24(4): 249-250
Wang Xiang-hong, Zhang Zhong-le, Zheng Hai-yan, et al. Changes of Electrolyte and Ratio of Organ and Body Weight in Airway Remodeling of Chronic Asthmatic Guinea Pig [J]. Journal of Henan University of Science & Technology (Medical Science), 2006, 24(4): 249-250