补益肺肾汤对变应性哮喘大鼠模型 Th1/Th2 的影响

陈 宏[1],张 伟[1],苏玉明[1],宋倩男[1],董国玉[1],秦 琪[1],陈 群[2],隋博文[3]

(1.黑龙江中医药大学附属第一医院儿一科,黑龙江 哈尔滨 150040;
2.黑龙江省哈尔滨市阿城区人民医院检验科,黑龙江 哈尔滨 150300;
3.黑龙江中医药大学附属第一医院呼吸科,黑龙江 哈尔滨 150400)

[摘要]目的 观察补益肺肾汤对变应性哮喘大鼠模型辅助性T淋巴细胞(helper T cell,Th)1/Th2的影响,探讨其治疗变应性哮喘的作用机制。**方法** 选取60只雄性SD大鼠,将其随机分成正常对照组、模型组、生理盐水组、补益肺肾组,每组15只,采用0.5%磷酸组胺溶液超声雾化法复制变应性哮喘大鼠模型,最后一次激发后处死大鼠,收集血清和支气管肺泡灌洗液(broncho alveolar lavage fluid,BALF),采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清免疫球蛋白E(immunoglobin E,IgE)、白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4)和干扰素γ(interferon-gamma, IFN-γ)水平,用流式细胞仪检测脾Th1、Th2细胞比例。**结果** 与正常对照组比较,模型组大鼠血清IgE和IL-4水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,补益肺肾组血清IgE和IL-4水平均显著降低($P<0.05$);补益肺肾组大鼠血清IgE和IL-4水平显著低于生理盐水组($P<0.05$)。与模型组比较,生理盐水组和补益肺肾组大鼠BALF中IL-4水平明显降低($P<0.05$),IFN-γ水平明显上升($P<0.05$);补肾益肺组大鼠BALF中IFN-γ水平显著高于生理盐水组($P<0.05$)。与模型组比较,生理盐水组和补益肺肾组大鼠脾中Th1/Th2明显上升($P<0.05$);补肾益肺组大鼠脾中Th1/Th2显著高于生理盐水组($P<0.05$)。**结论** 补益肺肾汤可能通过下调IL-4水平和提高IFN-γ水平,调节变应性哮喘大鼠体内Th1/Th2失衡。

[关键词]变应性哮喘;补益肺肾汤;辅助性T细胞;免疫功能

[中图分类号]R562.2+5 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2020.01.019

变应性哮喘是过敏原所引起的呼吸道慢性炎症及气道过度反应而导致支气管过度收缩,气流阻塞和呼吸不顺的一种常见疾病[1]。其免疫病理机制为过敏原活化免疫系统中的第2型辅助性T淋巴细胞(helper T cell, Th)[2-3]。白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4)可通过B细胞同型开关介导免疫球蛋白E(immunoglobin E,IgE)合成。变应原与IgE交联使肥大细胞和嗜碱性细胞迅速活化,组胺和白三烯等递质的释放使血管通透性增加,平滑肌收缩和黏液分泌增加[4]。晚期过敏反应的特征是嗜酸性粒

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(H2018052);黑龙江省中医药科研项目(ZHY19-004)

作者简介:陈宏(1977-),男,博士,副主任医师

通信作者:隋博文(1979-),男,博士,主任医师,112211116@qq.com

and low-dose Bushen Antai Granule groups were given Bushen Antai Granule at a dose of 35.1, 11.7, and 3.9 g/(kg·d), respectively, by gavage. After 15 days of consecutive intervention, the mice were sacrificed and the samples were collected. ELISA was used to measure the serum levels of VHL and HIF-1α, and quantitative real-time PCR, immunohistochemistry, and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of VHL and HIF-1α in decidual tissue. **Results** Bushen Antai Granule significantly reduced the embryo loss rate of RSA mice ($P<0.05$), the serum level of VHL, and the mRNA expression of VHL in decidual tissue ($P<0.05$) and significantly increased the serum level of HIF-1α and the mRNA expression of HIF-1α in decidual tissue ($P<0.05$), in a dose-dependent manner ($P<0.05$). **Conclusion** Bushen Antai Granule can reduce the abortion rate of RSA mice, possibly by activating the VHL/HIF-1α signaling pathway.

[**Key words**] Bushen Antai Granule; Recurrent spontaneous abortion; Maternal-fetal interface; VHL/HIF-1α signaling pathway

细胞和Th2通过IL-4在变应原部位补充和激活。补益肺肾法不仅能显著改善哮喘患者的躯体健康，并且对患者的心理和情绪亦有显著的改善作用[5]。本研究主要观察和分析补益肺肾汤对变应性哮喘大鼠模型Th1/Th2的影响，探讨其治疗变应性哮喘的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 雄性SD大鼠60只，7～8周龄，体质量(200±10)g，购自济南朋悦实验动物繁育有限公司[生产许可证号：SCXK(鲁)2014-0007]。

1.2 药物 补益肺肾汤(黄芪20 g，丹参、太子参、麦冬、乌梅各15 g，五味子、陈皮、姜半夏、地龙、瓜蒌仁各10 g，川贝母、炒苏子、磁石、补骨脂、紫河车、桃仁各8 g)为黑龙江中医药大学附属第一医院制剂(批号1812283)。将上述药物在实验室制成煎剂，经蒸馏水常规煎煮，4 ℃保存备用，使用时可稍加热。

1.3 试剂 卵清蛋白(ovalbumin，OVA)、伊文思蓝：美国Sigma公司；吸附无细胞百白破联合疫苗：武汉生物制品研究所；生理盐水、乙醚、丙酮、结晶氯化铝：上海苏燃化学试剂公司；氢氧化钠：天津科密欧化学试剂公司；大鼠OVA特异性IgE试剂盒：美国R&D公司；IgE、IL-4、干扰素-γ(interferon-gamma，IFN-γ)定量夹心酶联免疫吸附检测试剂盒：上海西唐生物有限公司。

1.4 仪器 ELX 800UV型酶标仪：美国Bio-Tek公司；LRH-250A型生化培养箱：广东省医疗器械厂；UV9600型紫外/可见光分光光度计：北京瑞丽分析仪器公司。

2 方法

2.1 动物模型建立与分组

2.1.1 氢氧化铝凝胶的配制 按照氢氧化铝凝胶的规范配制方法[7]，重复此过程，反复洗涤沉淀后收集，即得氢氧化铝凝胶。

2.1.2 动物分组 将SD大鼠放于自制的密闭玻璃箱内，超声雾化0.5%磷酸组胺盐生理盐水溶液刺激大鼠，观察大鼠吸入组胺后的呼吸变化情况，选择吸入组胺后20 s内出现呼吸急促，前肢缩抬，点头或腹式呼吸等哮喘症状的大鼠作为试验用鼠。共筛选出60只大鼠，将其按照随机数字表法分为4组，包括正常对照组、模型组、生理盐水组、补益肺肾组，每组15只。

2.1.3 模型复制 ①致敏阶段。分别于第1天、第14天，将新鲜配制的含1% OVA 1 mg及10%氢氧化铝凝胶1 mg的生理盐水混悬液共1 mL，皮下注射于模型组、生理盐水组和补益肺肾组大鼠四肢内侧，每点各0.2 mL，并腹腔注射0.2 mL，同时腹腔注射1 mL灭活百日咳杆菌5×10^9个，正常对照组按照上述同样途径给予生理盐水代替。②激发阶段。模型组、生理盐水组和补益肺肾组大鼠于第21天以1.0% OVA进行雾化吸入，激发哮喘，每次雾化30 min，连续7 d。

2.2 给药方法 于致敏前、致敏第14天经大鼠腹腔注射OVA，每只100 μg，第21天开始对大鼠进行5% OVA雾化，连续7 d，每次30 min，建立变应性哮喘大鼠模型。①补益肺肾汤组：第21天模型复制成功后，于每次激发前30 min以补益肺肾汤每日10 mL/kg灌胃，给药4 h后观察大鼠症状。②生理盐水组：模型复制成功后，于每次激发前30 min，给予同容积生理盐水灌胃，给药4 h后观察大鼠症状。

2.3 观察指标 末次抗原激发30 min后颈椎脱臼处死大鼠，摘眼球取血，将血液置于抗凝管中，静置30 min后，1 500 r/min离心15 min，取血浆，−20 ℃保存。采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清IgE、IL-4水平，并且检测支气管肺泡灌洗液(broncho alveolar lavage fluid，BALF)中IL-4和IFN-γ的表达水平。分离小鼠脾，加入小鼠淋巴细胞分离液，提取单个核细胞，加入细胞刺激剂，以流式细胞仪检测脾Th1、Th2比例。

2.4 统计学方法 采用SPSS 24.0统计学软件分析。连续型变量以“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”表示。正常对照组与模型组均数比较，采用两个独立样本t检验；除正常对照组之外的其他3组均数比较，采用单因素方差分析。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 4组大鼠血清IgE和IL-4水平比较 与正常对照组比较，模型组大鼠血清IgE和IL-4水平显著升高($P<0.05$)；与模型组比较，补益肺肾组血清IgE和IL-4水平均显著降低($P<0.05$)；补益肺肾组大鼠血清IgE和IL-4水平显著低于生理盐水组($P<0.05$)。见表1。

表1 4组大鼠血清IgE和IL-4水平比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	IgE/(ng/mL)	IL-4/(ng/mL)
正常对照	15	164.58±28.06	12.76±3.25
模 型	15	298.53±61.34*	31.87±3.29*
生理盐水	15	264.85±54.27	27.16±3.46#
补益肺肾	15	208.63±31.25#△	20.56±4.27#△

注：与正常对照组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，# $P<0.05$；与生理盐水组比较，△ $P<0.05$

3.2 4组大鼠BALF中IFN-γ及IL-4水平比较 与正常对照组比较，模型组大鼠BALF中INF-γ水平

显著降低($P<0.05$),IL-4水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,生理盐水组和补益肺肾组大鼠BALF中IL-4水平明显降低($P<0.05$),IFN-γ水平明显上升($P<0.05$);补肾益肺汤组大鼠BALF中IFN-γ水平显著高于生理盐水组($P<0.05$),两组IL-4水平的差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2 4组大鼠BALF中IFN-γ、IL-4水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IFN-γ/(pg/mL)	IL-4/(pg/mL)
正常对照	15	32.46±3.87	1.32±0.97
模型	15	14.31±3.92*	4.75±1.27*
生理盐水	15	19.67±2.65#	2.18±0.85#
补益肺肾	15	27.95±4.16#△	1.83±0.74#

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与生理盐水组比较,△ $P<0.05$

3.3 4组大鼠脾中Th1、Th2比较 与正常对照组比较,模型组大鼠脾中Th1/Th2显著降低($P<0.05$);与模型组比较,生理盐水组和补益肺肾组大鼠脾中Th1/Th2明显上升($P<0.05$);补肾益肺组大鼠脾中Th1/Th2显著高于生理盐水组($P<0.05$)。见表3。

表3 4组大鼠脾中Th1、Th2比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Th1/%	Th2/%	Th1/Th2
正常对照	15	0.43±0.01	0.57±0.02	0.78±0.04
模型	15	0.65±0.03*	0.96±0.04*	0.65±0.04*
生理盐水	15	0.71±0.02#	0.95±0.05	0.72±0.05#
补益肺肾	15	0.86±0.02#△	0.87±0.02#△	0.98±0.06#△

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与生理盐水组比较,△ $P<0.05$

4 讨论

西医多采用糖皮质激素治疗哮喘,但难以避免激素全身给药的不良反应,近年来提倡喷吸给药以局部抗炎,但此法对哮喘急性发作期无效。研究表明,中医药治疗该病具有显著疗效,如小青龙汤具有降低血清IgE的作用,补肾法可抑制哮喘气道反应性增高,维持气道的稳定[5-6]。从多年的临床经验[7]来看,中西医结合治疗,在变应性哮喘加重之时是最佳的选择。但是,在患者的哮喘缓和期,中医补脾益肺、培土生金法具有明显疗效。体内伏痰遇诱因而触发,使气机升降出入失常,乃是本病病机之根本。临床上,在哮喘患者中肺肾气虚证候非常多见。补肾法已不拘于"急则治标,缓则治本"的传统原则,而广泛运用于变应性哮喘各期[8]。中医学认为,本病与体质因素、生活环境、饮食、情志有密切关系,内因在于肺、脾、肾不足,而外因在于感受外邪、饮食失调或情志不畅等。肺、脾、肾不足,脏腑功能失调,津液运化输布障碍,聚而生痰,留宿于肺,闭阻气道,肺气不利,血行不畅而血滞成瘀,痰瘀交结,蕴伏于内,成为哮喘之宿根[9]。

气道炎症是哮喘患者气道可逆性阻塞和非特异性支气管高反应性的重要决定因素。气道炎症产生的途径可根据是否有抗体介导和主体细胞的不同,可分为IgE介导、T淋巴细胞依赖的炎症途径和非IgE介导、T淋巴细胞依赖的炎症途径两大类。哮喘患者体内IgE增多与体内Th2数目增加、功能亢进导致的IL-4、IL-13增加,IFN-γ水平下降有关。变应性哮喘患者体内Th0转化为Th1减少,转化为Th2增多,从而导致Th1/Th2失调,使体内IL-4、IL-13等Th2合成增多,这可能是造成变应性哮喘患者体内B细胞合成过量的IgE的主要原因[10]。研究显示,Th1/Th2在体内是互相调节的,气喘的免疫机制为Th2较为优势,因此,调节Th1/Th2平衡并使之趋向Th1优势化,是气喘治疗的合理策略,亦是免疫调节剂发展的方向[11]。

中医药在预防哮喘发作方面有其独到的优势,根据中医学"春夏养阳,秋冬养阴"的传统理论,治疗上以扶正固本,补益肺肾为立法之本,或佐活血化瘀之品。现代研究表明,补肾法能增强免疫功能,亦可调节丘脑-垂体-肾上腺皮质功能,而获得平喘的远期疗效,并防止季节性复发。本研究采用补益肺肾汤治疗变应性哮喘,方中黄芪补肺固表,五味子敛肺平喘,紫河车纳气补肾,山茱萸益肾,款冬花、姜半夏止咳平喘、温肺化痰,诸药合用,达到化痰温肺的功效。本研究表明,正常对照组和补益肺肾组血清IgE和IL-4水平均低于模型组和生理盐水组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,补益肺肾组大鼠BALF中IL-4水平显著降低($P<0.05$),IFN-γ水平显著上升($P<0.05$)。4组大鼠脾中Th1/Th2差异均有统计学意义($P<0.05$)。结果提示,补益肺肾汤可能通过下调IL-4水平,提高IFN-γ水平,改善变应性哮喘大鼠体内Th1/Th2失衡。

参考文献:

[1] 杜威,杜娟,周俊,等.白细胞介素-25及其受体对过敏性哮喘患者嗜酸性粒细胞的调控作用[J].中国呼吸与危重监护杂志,2019,18(3):247-250.

[2] 袁为远,包凯帆,贾志荣,等.锌指蛋白A20在过敏性哮喘中的研究进展[J].中国药理学通报,2019,35(5):607-608.

[3] PRZYBYSZOWSKI M, PACIOREK K, ZASTRZEZYNSKA W, et al. Influence of omalizumab therapy on airway remodeling assessed with high-resolution computed tomography (HRCT) in severe allergic asthma patients

[J]. Adv Respir Med, 2018,86(6):282-290.
[4] 张小娜,江训烁,杨春平. Th9和其他产生IL-9的细胞在过敏性哮喘中的作用[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2018,32(21):167-168.
[5] 王志英,周学平,李国春,等. 补益肺肾、祛风化痰法治疗慢性持续期哮喘的临床研究[J]. 南京中医药大学学报,2014,30(4):316-317.
[6] 闫伟,刘明,张庆祥. 小青龙汤对支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠1,25二羟基维生素D_3水平的影响[J]. 中华中医药学刊,2017,35(11):286-287.
[7] 刘芷蕊,王永安,钟大玲,等. 大承气汤对过敏性哮喘小鼠肺部炎症及MAPK信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(9):4-5.
[8] 任周新,谢世平,王钊,等. HIV/AIDS脾肺气虚证患者$CD4^+$ T、$CD8^+$ T淋巴细胞亚群数量与$CD4^+$ T淋巴细胞数量关系的探索[J]. 中华中医药杂志,2014,29(4):104-106.
[9] 王新月,杨舒,王健云,等. 肺脾相关理论及其应用:脾胃学说传承与应用专题系列(9)[J]. 中医杂志,2012,53(17):144-145.
[10] FLOKSTRA-DE BLOK BMJ, BARETTA H J, FONSECA J A, et al. Control of allergic rhinitis and asthma test with 1-week recall: validation of paper and electronic version[J]. Allergy, 2018, 73(12):2381-2385.
[11] 鲍梦婕,洪滔,薛汉荣,等. 基于Th1/Th2失衡初探益气温阳护卫法对哮喘炎症白三烯通道干预作用[J]. 时珍国医国药,2019,30(7):167-168.

(收稿日期:2019-07-15;编辑:张倩)

Effect of Buyi Feishen Decoction on T-helper Type 1/T-helper Type 2 Balance in a Rat Model of Allergic Asthma

CHEN Hong[1], *ZHANG Wei*[1], *SU Yu-ming*[1], *SONG Qian-nan*[1], *DONG Guo-yu*[1], *QIN Qi*[1], *CHEN Qun*[2], *SUI Bo-wen*[3]

(1. *First Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Heilongjiang Harbin* 150040, *China*; 2. *Department of Clinical Laboratory, Acheng People's Hospital of Harbin, Heilongjiang Harbin* 150300, *China*; 3. *Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Heilongjiang Harbin* 150400, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of Buyi Feishen Decoction on T-helper type 1 (Th1)/T-helper type 2 (Th2) balance in a rat model of allergic asthma and its mechanism of action in the treatment of allergic asthma. **Methods** A total of 60 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group, model group, normal saline group, and Buyi Feishen Decoction group, with 15 rats in each group. Ultrasonic atomization of 0.5% histamine phosphate solution was used to establish a rat model of allergic asthma. The rats were sacrificed after the last challenge, and serum samples and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the serum levels of immunoglobin E (IgE), interleukin-4 (IL-4), and interferon-gamma (IFN-γ), and flow cytometry was used to measure the percentages of Th1 and Th2 cells in the spleen. **Results** Compared with the model group, the Buyi Feishen Decoction group had significant reductions in the serum levels of IgE and IL-4 ($P<0.05$), and the Buyi Feishen Decoction group had significantly lower serum levels of IgE and IL-4 than the normal saline group ($P<0.05$). Compared with the model group, the normal saline group and the Buyi Feishen Decoction group had a significant reduction in the level of IL-4 and a significant increase in the level of IFN-γ in BALF ($P<0.05$), and the Buyi Feishen Decoction group had a significantly higher level of IFN-γ in BALF than the normal saline group ($P<0.05$). Compared with the model group, the normal saline group and the Buyi Feishen Decoction group had a significant increase in Th1/Th2 ratio in the spleen ($P<0.05$), and the Buyi Feishen Decoction group had a significantly higher Th1/Th2 ratio in the spleen than the normal saline group ($P<0.05$). **Conclusion** Buyi Feishen Decoction can regulate Th1/Th2 imbalance in rats with allergic asthma, possibly by downregulating IL-4 and upregulating IFN-γ.

[**Key words**] Allergic asthma; Buyi Feishen Decoction; T-helper cell; Immune function