

3 张国秀, 陈小文, 张亦楠. 布地奈德混悬液与硫酸特布他林雾化液联合治疗儿童哮喘急性发作 [J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21 (16): 1099

4 Allen DB. Effects of inhaled steroids on growth, bone metabolism, and adrenal function [J]. Adv Pediatr, 2006, 53: 101

5 翁俊良, 郑义珊, 马琼风. 小剂量布地奈德粉吸入剂治疗轻度支气管哮喘患者的远期疗效 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28 (2): 88

6 Szefer SJ, Lgzell E, Fitzpatrick S *et al*. Safety profile of budesonide inhalation suspension in the pediatric population: Worldwide experience [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2004, 93 (1): 83

7 彭东红, 黄英, 陈坤华 *et al*. 雾化吸入布地奈德混悬液治疗婴幼儿轻中度喘息性疾病的疗效 [J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23 (4): 304

8 黄建军, 余嘉璐, 曾强. 联合吸入布地奈德混悬液和特布他林雾化液治疗婴幼儿哮喘的疗效 [J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 2 (4): 301

(2009-05-21 收稿)
编校 徐强]

槐耳颗粒对哮喘模型 TGF-β₁ 表达的干预作用

李德乐 王桂兰 刘翔腾 南方医科大学附属中山市博爱医院儿科 (广东 中山) 528403

中国图书分类号 R725.6 文献标识码 B 文章编号 1001-4411 (2010) 18-2568-03

【摘要】 目的: 观察槐耳颗粒对哮喘模型肺组织转化生长因子-β₁ (transforming growth factor-β₁, TGF-β₁) 表达的干预作用。方法: 将 60 只 BALB/c 哮喘模型鼠随机分为空白对照组、哮喘模型组及槐耳颗粒干预组 (每组 20 只); 除空白对照组外其他各组小鼠在试验第 1 天、第 7 天和第 14 天通过腹腔注射 0.2 ml 混有 40 mg 氢氧化铝和 10 μg OVA 的 pH 7.4 的 PBS 液致敏, 在试验第 15 天用 5% 的 OVA 对小鼠进行雾化激发, 连续一周; 槐耳颗粒干预组在致敏阶段即每日加用槐耳颗粒胃内注入 5 g/d, 时间为 1 个月; 所有小鼠在实验 1 个月后杀死, 分别用 ELISA 以及免疫组化方法检测血中 IgE、L-4 水平以及肺组织 TGF-β₁ 的表达。结果: 槐耳颗粒干预组 1 个月后血中 IgE、L-4 水平及肺组织 TGF-β₁ 的表达明显低于哮喘模型组, 血中的 IFN-γ 水平较哮喘模型组明显增多, 差异均有统计学意义 (P < 0.05)。结论: 槐耳颗粒长期使用可能会逆转过敏性炎症, 并且对哮喘模型肺组织 TGF-β₁ 的表达有明显的抑制作用。

【关键词】 哮喘模型 槐耳颗粒 气道重塑

The intervention effect of Huaier particles on expression of TGF-β₁ in asthma model

LI De-Le, WANG Gui-Lan, LIU Xiang-Teng. Department of Pediatrics, Boai Hospital of Zhongshan City, Southern Medical University, Zhongshan 528403, Guangdong, China

【Abstract】 Objective: To observe the intervention effect of Huaier particles on expression of pulmonary transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁) in asthma model. **Methods:** 60 BALB/c asthma model mice were divided into blank control group, asthma model group and Huaier particles intervention group, 20 mice in each group; the mice in asthma model group and Huaier particles intervention group received intraperitoneal injection of 0.2 ml PBS solution of pH 7.4 mixed with 40 mg aluminum hydroxide and 10 μg OVA to induce sensitization on the first, seventh and fourteenth day; on the fifteenth day, 5% OVA was used for atomization and excitation for one week; in Huaier particles intervention group, at sensitization stage, the mice were treated with Huaier particles, 5 g/d for one month; all the mice were killed after one month, then serum levels of IgE and L-4 and expression of pulmonary TGF-β₁ were detected by ELISA and immunohistochemical method. **Results:** After one month, the serum levels of IgE and L-4 and expression of pulmonary TGF-β₁ in Huaier particles intervention group were significantly lower than those in asthma model group, while the serum IFN-γ level was significantly higher than that in asthma model group (P < 0.05). **Conclusion:** Long-term use of Huaier particles may reverse allergic inflammation and inhibit the expression of pulmonary TGF-β₁ in asthma model significantly.

【Key words】 Asthma model; Huaier particles; Airway remodeling

哮喘是小儿最常见的呼吸系统疾病, 发病率逐年增加。在急性发作期可使用皮质激素和支气管扩张剂雾化吸入, 作

用迅速、直接, 但不能预防喘息的反复发作, 长期应用皮质激素还有一定的不良反应。槐耳颗粒可以通过诱导机体产生 IFN-γ 逆转哮喘患儿体内 TH1 和 TH2 细胞的免疫失衡达到对哮喘的早期干预作用, 根据这个原理该实验拟采用槐

通讯作者

杞黄颗粒对哮喘模型进行干预, 观察其对哮喘模型的免疫调节作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 槐杞黄颗粒 (启东盖天力药业有限公司提供)、鸡卵白蛋白 (OVA, GradeV, Sigma)、氢氧化铝干粉 (北京化工厂)、小鼠血清 OVA 特异性 IgE 检测试剂盒 (购自美国 Biokey 公司)、IFN- γ 、L-4 的 ELISA 试剂盒 (购自深圳晶美公司)、羊抗小鼠 TGF- β 多克隆抗体 (购自深圳晶美公司)、S-P 超敏试剂盒 (迈新生物公司)。

1.2 实验动物 BALB/c 小鼠 (吉林省长春市高新技术开发区医学动物中心提供) 60 只, 清洁级, 6~8 周龄, 雌性, 体重 20~25 g。

1.3 方法

1.3.1 哮喘模型建立 鸡卵白蛋白 (OVA) 10 μ g 加 40 mg 氢氧化铝溶于 pH 7.4 的 PBS 液 0.2 ml 中, 分别于实验第 0 天、7 天、14 天 OVA 抗原液注射于小鼠腹腔致敏。第 15~21 天为激发阶段, 将小鼠放入 20 cm \times 20 cm \times 20 cm 玻璃缸中, 通过空气压缩泵雾化吸入器雾化吸入含 5% OVA 生理盐水液, 每天 1 次, 每次 20 min, 连续激发 7 天, 在激发开始 1 个月后眼球取血, 处死动物, 留取标本。空白对照组用 0.01 M pH 7.4 的 PBS 0.2 ml 连续腹腔注射 3 次, 激发与模型组相同, 在激发开始 1 个月后眼球取血, 处死动物, 留取标本。

1.3.2 动物分组 实验动物共 60 只, 随机分为空白对照组、哮喘模型组以及槐杞黄颗粒干预组, 每组 20 只, 槐杞黄颗粒干预组在哮喘模型激发开始同时给予加用槐杞黄颗粒 5 g/d, 连用 1 个月后眼球放血取血后处死, 留取标本同前。

1.3.3 标本留取 实验小鼠用眼球放血的方法杀死, 血标本静置 1 h 后 4 \times 1 800 rpm 离心 15 min, 获得血清 -20 $^{\circ}$ C 保存, 待测血清 IgE。分离主支气管, 打开胸腔, 结扎左侧支气管, 通过主支气管下管约 1 cm 进行右肺肺泡灌洗, 每次注入 37 $^{\circ}$ C 生理盐水 0.6 ml, 缓慢注入后再缓慢回抽共 3 次, 收集 1.35~1.55 ml 液体为合格, 4 \times 1 500 rpm 离心 10 min, 上清于 -20 $^{\circ}$ C 保存以备相关细胞因子检测。左肺经 10% 的中性福尔马林固定和石蜡包埋后病理分析并进行 TGF- β 免疫组化检测, 在 400 倍的高倍显微镜下计数各组小鼠肺组织 TGF- β 阳性表达的细胞。计数方法为每个视野计数 200 个细胞, 共 20 个视野, 每个视野计数 TGF- β 阳性表达细胞的比率, 取平均值。

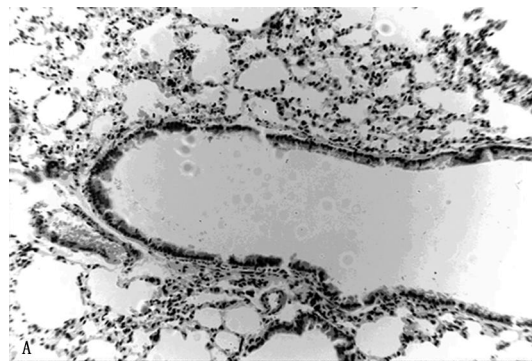
1.4 统计学方法 所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 12.0 统计软件进行分析, 多组比较采用方差分析, 多组间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 哮喘模型肺组织过敏性炎症的鉴定 与空白对照组相比哮喘模型组可见肺组织、细小支气管壁及伴行的动脉周围有明显的炎性细胞浸润, 以 EOS 和浆细胞浸润为主, 支气管黏膜皱襞增厚, 杯状细胞增生。见图 1。

2.2 各组小鼠血 IgE、L-4 以及 IFN- γ 水平分析 结果显

示干预组血 IgE、L-4 水平较哮喘模型组明显降低 ($P < 0.05$), 而 IFN- γ 水平较哮喘模型组明显增高 ($P < 0.05$), 差异均有统计学意义。见表 1。



注: A 为正常对照组, B 为哮喘模型组。

图 1 哮喘模型组和正常对照组的肺组织用甲醛固定、石蜡包埋切片后 HE 染色在高倍镜下观察病理改变 ($\times 100$)

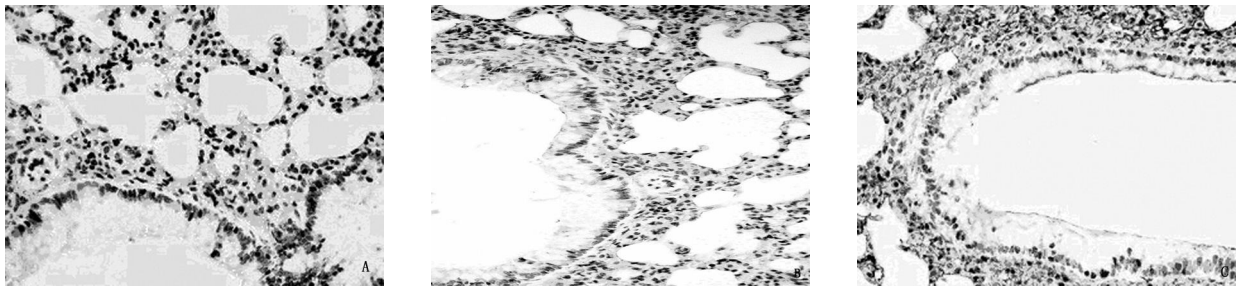
表 1 各组小鼠血清 IgE 含量及 BALF 中 L-4 和 IFN- γ 水平

组别	鼠数	IgE (U/ml)	L-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
空白对照组	20	14.0 \pm 2.73	13.16 \pm 2.44	262.36 \pm 12.99
哮喘模型组	20	136.18 \pm 4.93	62.16 \pm 8.46	149.55 \pm 19.60
干预组	20	58.82 \pm 8.85	32.09 \pm 5.57	442.09 \pm 59.4
F		167.81	72.83	78.32
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

2.3 各组小鼠肺组织 TGF- β 阳性表达细胞的比率 干预组小鼠肺组织 TGF- β 的表达较哮喘模型组明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、图 2。

表 2 各组小鼠肺组织 TGF- β 阳性表达的细胞的比率

组别	鼠数	比率 (%)
空白对照组	20	16.27 \pm 2.66
哮喘模型组	20	82.36 \pm 19.12
干预组	20	46.90 \pm 8.45
F		104.43
P 值		<0.05



注：A为空白对照组，肺组织有可见较少的 TGF-β 表达；B为干预组，肺组织可见一定量 TGF-β 的表达，但较哮喘模型组表达明显减少；C为哮喘模型组，肺组织可见大量 TGF-β 的表达。

图 2 各组小鼠的肺组织用 10%的中性福尔马林固定和石蜡包埋后进行 TGF-β 免疫组化检测，在 400倍的高倍显微镜下观察

3 讨论

最近的研究发现，哮喘患者体内存在异常的 Th1/Th2 型细胞应答反应。Th1 细胞通过分泌 IFN-γ 抑制 Th2 型细胞的分化，而 Th2 细胞又通过分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子抑制 Th1 细胞的发育。当 Th1/Th2 出现失衡时，偏离的 Th2 促进 IgE 的产生和 I 型超敏反应的发生。资料显示哮喘急性发作期患者体内 IgE 水平明显高于正常人，血清 IL-12、IFN-γ 显著降低，两者呈负相关性；而血清 IL-4 较正常对照组高，与 IgE 呈正相关性。鉴于此，在哮喘临床治疗中，尤其对控制不佳、临床频繁发作的患者，应考虑采用纠正机体偏离 Th1/Th2 应答反应的治疗方法，从根本上改善患者机体的免疫病理状态^[1]。Th1 细胞分泌的 IFN-γ 能增强肺泡吞噬细胞的活性，抑制 IL-4 诱导产生 IgE，并且促使 IgE 转换成 IgG1、IgG2，使血清总 IgE 显著降低，从而有效的阻止气道的 I 型变态反应，因此具有很好的预防各种类型的支气管哮喘的作用^[2]。研究还显示 TGF-β 在气道重塑中起重要作用，无论重症哮喘，还是轻症哮喘患者嗜酸性粒细胞和成纤维细胞产生的 TGF-β 均增加，Th2 产生的细胞因子 IL-4、IL-13 调节着转化生长因子（TGF-β）的产生，而来自 Th1 的 IFN-γ 可抵抗 IL-4、IL-13 的作用^[3]。

槐杞黄颗粒其成分包括槐耳菌质、枸杞子、黄精，槐耳属于菌物界，槐耳是我国民间重要的药用真菌（学名：*trametes robinophila murr*），中药名为槐栓菌，真菌门，担子菌亚门，层菌纲，非褶菌目，多孔菌科，栓菌属，经查新证实它是一种未正式报导过的药用真菌。野生槐耳因其寄主日益稀少，以致药源紧缺，必需人工培育。它对细胞吞噬功能有非常显著的促进作用，可以增强溶菌酶活性，同时能够诱导 IFN-γ、IFN-α。IFN-γ 干扰素可以促 NK 细胞活性，提高特异性抗体产生，IFN-α 能够抑制哮喘患儿 Th2 细胞的分

化，逆转哮喘过敏性炎症的免疫进程^[4]。正常机体的 Th1/Th2 型细胞因子处于动态平衡，当这个平衡失调并向 Th1 或 Th2 转化时，称为 Th1/Th2 的偏移。胃内注入槐耳颗粒一个月可促使哮喘模型鼠 Th1 型细胞因子表达，使 Th1/Th2 偏向 Th1 状态。

哮喘患者气道中 TGF-β 水平明显增高，EOS 以及气道上皮细胞是 TGF-β 的主要来源，如果 TGF-β 持续过度表达就可以引起气道纤维化和气道重建^[5]。

该实验通过 1 个月的观察研究结果显示，槐耳颗粒对哮喘模型小鼠有明显的免疫调节作用，这与其诱导、干扰素生成的作用密切相关；同时该实验提示槐耳颗粒还能够抑制 TGF-β，长时间服用可以逆转哮喘模型的气道重塑。

4 参考文献

- 1 黄跃海，付四毛．儿童哮喘急性发作期 IL-4、IL-12、IFN-γ 与 IgE 水平的变化及意义 [J]．医学临床研究，2003，20（6）：418
- 2 杨国玉，燕敬菊．干扰素对哮喘患儿血清 IgE 及其预防作用的影响 [J]．当代医学．2008，142（1）：79
- 3 郑礼林，潘家华．支气管哮喘发病机制研究进展 [J]．中华妇幼临床医学杂志，2008，4（3）：66
- 4 李立新，叶胜龙，王艳红．槐耳浸膏的实验研究及临床应用进展 [J]．中国肿瘤，2007，16（2）：110
- 5 Akbari O，Stöck P，Dekruyff RH *et al*．Role of regulatory T cells in allergy and asthma [J]．Curr Opin Immunol，2003，15（6）：627

（2009-10-23 修回）

编校 徐 强]

敬告作者

本杂志投稿方式以网上投稿为主，邮箱地址为：zgfybj@sina.com；或也可将稿件邮寄至编辑部，并且注明作者联系方式及作者详细通讯地址。

修改稿应按照编辑部的退修意见进行修改，修改后请注明“修改稿”字样后，发送至编辑部邮箱或寄回编辑部。

特殊文种、上下角标符号、需排斜体等应在文稿上予以说明。来稿 1 份便可，一般不退稿，请作者自留底稿，投稿在 3 个月内未接到通知者可写信或通过向编辑部查询，切勿再抄一份寄来，以免造成混乱。