槐杞黄对哮喘气道及血清 IL -13水平的影响

杨　晋[1,2],刘　峰[1],周　瑶[1],徐　红[1],张佳敏[1],邓　欢[1],雷其洪[1*],赵德育[1]

([1]南京医科大学附属南京儿童医院呼吸科,江苏　南京　210008;[2]淮安市妇幼保健院,江苏　淮安　223002)

[摘　要]　目的:探讨 IL-13 在哮喘患儿血清中的表达及槐杞黄对于哮喘大鼠 IL-13 表达的可能影响及与布地奈德的共同作用。方法:选择 10 例哮喘缓解期儿童(哮喘组)及 10 例健康儿童(健康对照组)为研究对象。两组年龄、性别、体质指数比较差异均无统计学意义。测试两组儿童初诊时肺功能,并利用酶联免疫吸附试验(enzymelinkedimmunosorbentassay,ELISA)检测两组儿童血清 IL-13 的水平。取 50 只 4~6 周龄的健康雄性 SD 大鼠,适应性喂养 1 周后,随机分为 5 组,即对照组、哮喘模型组、布地奈德组、槐杞黄组、布地奈德联合槐杞黄组。用卵清白蛋白(ovalbumin,OVA)致敏及激发共持续 6 周,建立哮喘模型。通过 HE 染色观察肺部炎症细胞浸润情况。应用 ELISA 检测及比较各组大鼠之间肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)及血清中 IL-13 浓度的差异。结果:与健康对照组儿童比较,哮喘组儿童初诊时第 1 秒用力呼气量占预测值百分比及呼气峰流速占预测值百分比均升高,血清 IL-13 水平升高($P < 0.05$)。大鼠肺组织病理学改变:模型组气道周围大量炎症细胞浸润、柱状细胞增生、气管壁增厚;对照组则无上述表现;相比模型组,布地奈德组、槐杞黄组、布地奈德联合槐杞黄组大鼠不同程度减轻($P < 0.05$)。模型组 BALF 及血清中 IL-13 的浓度增加($P < 0.05$)。相较于模型组,布地奈德组、槐杞黄组、布地奈德联合槐杞黄组大鼠 BALF 及血清 IL-13 浓度有不同程度降低($P < 0.05$),且布地奈德联合槐杞黄组变化比布地奈德组更明显($P < 0.05$)。结论:在 OVA 诱导的大鼠哮喘模型中,使用布地奈德、槐杞黄或是布地奈德联合槐杞黄治疗可以不同程度改善气道 IL-13 分泌,因而可能改善气道炎症。布地奈德联合槐杞黄治疗可能存在协同效应。

[关键词]　哮喘;槐杞黄;布地奈德;IL-13

[中图分类号]　R392　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2014)09-1248-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140920

Huaiqihuang on IL-13 expression in airway and blood in asthma

Yang Jin[1,2],Liu Feng[1],Zhou Yao[1],Xu Hong[1],Zhang Jiamin[1],Deng Huan[1],Lei Qihong[1*],Zhao Deyu[1]

([1]*Department of Respiratory Diseases,Nanjing children's Hospital Affiliated to NJMU,Nanjing 210008*;[2]*Huaian Maternal and Child Health Care Hospital,Huaian 223002,China*)

[**Abstract**]　**Objective**:To evaluate IL-13 concentration changes in serum of children with asthma and the effect of Huaiqihuang on asthmatic rats for expression of inflammatory factors and the effect with budesonide. **Methods**:Ten asthmatic children(the asthma group) and 10 healthy children(the control group) were selected. There was no significant difference in age,gender and body mass index between the asthma group and the control group. Serum IL-13 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Fifty healthy male SD rats(aged 4-6 weeks),after adaptive feeding for one week,were randomly divided into 5 groups:the normal control group,the asthma model group,the budesonide group(the BUD group),the Huaiqihuang group(the H group) and the budesonide + Huaiqihuang group (the BUD+H group). Asthma model was induced ovalbumin (OVA) sensitization and challenge for 6 weeks. Rats were analyzed for tissue biopsy. In addition,ELISA was used to detect the IL-13 in blood and BALF in both asthmatic and control subjects. **Results**:Serum IL-13 concentration in the asthma group was higher than in that in the control group. Pulmonary histopathological changes:inflammatory cell infiltration,columnar cell hyperplasia,trachea wall thickening were observed in the model group around the airway;the normal group had no such differences;the BUD group,the H group,the BUD+H group showed less inflammation cells infiltration than in the model,the BUD+H group reduced more than in the H group ($P < 0.05$). Compared to the normal group,in the model group, IL-13 concentrations in BALF and plasma increased($P < 0.05$). Compared with the model group, in the BUD group,the H group and the BUD+H group,IL-13 concentration in BALF and plasma reduced to varying degrees ($P < 0.05$),and the BUD+H group changed more obvious than in the BUD group($P < 0.05$). **Conclusion**:In the OVA-induced

[基金项目]　南京医科大学附属南京儿童医院科技发展基金(ETYY2013029)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:fantreelife@163.com

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

asthma model, the use of Budesonide, Huaiqihuang or Budesonide + Huaiqihuang combination therapy can improve airway inflammation in different degrees. Budesonide + Huaiqihuang combination therapy may have a synergistic effect.

[**Key words**]　asthma; Huaiqihuang; budesonide; IL-13

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(09): 1248-1252]

支气管哮喘是由多种细胞(包括炎性细胞、气道结构细胞)参与的气道慢性炎症性疾病[1],是儿童时期最常见的慢性呼吸道疾病,患病率亦呈上升趋势,国际儿童和变态反应性疾病调查研究结果显示哮喘发病率高居不下,在部分地区有增加趋势[2]。

气道炎症与气道重塑是哮喘的两个主要病理学特征[3]。IL-13 由肥大细胞、Th2 细胞、单核细胞及自然杀伤细胞分泌,在增加气道高反应性、肺部炎症形成、杯状细胞化生、肺纤维化方面起到了关键作用[4]。有研究表明 IL-13 在人类哮喘患者肺中持续高表达[5],而哮喘患者诱导痰中 IL-13 浓度与气道反应性呈显著负相关[6]。槐杞黄颗粒由槐耳菌质、枸杞子、黄精制成,研究表明其能够调节呼吸道反复感染患儿及原发性肾病综合征患儿的免疫力[7-8]。本研究目的在于探寻哮喘患儿血清中 IL-13 的变化,同时建立慢性哮喘大鼠模型,以槐杞黄辅佐吸入性糖皮质激素治疗,观察其对哮喘大鼠肺部病理及 IL-13 表达的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　病例选择

随机选择在南京医科大学附属南京儿童医院儿科门诊或住院的初诊哮喘患儿 10 例作为哮喘组,均符合 2008 年中华医学会儿科学分会呼吸学组制定的哮喘诊断标准[9],处于非急性发作期,为特应性体质,不伴感染性及免疫性疾病。其中男 5 例,女 5 例;年龄 6~10 (6.13 ± 1.22)岁;身高 (100.90 ± 15.83) cm;体质指数(body mass index, BMI)在正常范围内。另选择健康儿童 10 例作为健康对照组,男 5 例,女 5 例;年龄 5~10 (7.03 ± 1.05)岁;身高 (105.08 ± 11.54) cm;BMI 在正常范围内。无个人及家族过敏性疾病史,近半年无糖皮质激素用药史。两组儿童年龄、性别、身高及 BMI 均无统计学差异 ($P > 0.05$)。所有入组儿童均经家长同意进行肺功能检测:测量第 1 秒用力呼气量占预测值百分比(FEV 1%)和呼气峰流速占预测值百分比(PEF %),并进行抽血检查。所有受试对象均签署知情同意书。

1.1.2　动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 50 只,4~6 周龄,体重 150~170g,购自南京医科大学实验动物中心。在清洁级的条件下饲养,室温 24℃~27℃,通风换气良好,自然昼夜节律光照,每笼 4~5 只。采用全价营养颗粒饲料喂养,饮用清洁自来水,自由采食饮水。

1.1.3　试剂

人、大鼠白介素(interleukin, IL)-13 酶联免疫分析试剂盒均购自美国 R&D 公司,槐杞黄颗粒购自启东盖天力药业有限公司 (国药准字 B20020074),卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)购自美国 Sigma 公司,布地奈德雾化液购自美国阿斯利康公司,TRIzol 试剂购自美国罗氏公司。

1.2　方法

1.2.1　人 IL-13 检测

临床哮喘缓解期及健康对照组儿童分别留取清晨空腹静脉血 2 ml,注入试管凝固后,2 000 r/min,离心 15 min,分离血清注入 EP 管。暂时保存于-70℃冰箱用于 IL-13 检测。

1.2.2　动物分组

随机数字表法将大鼠随机分为对照组、哮喘模型组、布地奈德组、槐杞黄组、布地奈德联合槐杞黄组,每组 10 只。采用 OVA 制备慢性哮喘模型[10]。哮喘模型组:实验第 1 天和第 8 天腹腔注射 1 ml 含 1 mg OVA 和 100 mg 氢氧化铝凝胶的抗原致敏液;第 15 天开始雾化吸入 1% OVA 激发,每次 8 ml,隔日 1 次,连续激发 4 周。布地奈德组:致敏和激发方法同哮喘组,第 15 天开始,每次 OVA 激发前30 min 给予布地奈德 2 mg 雾化。槐杞黄组:致敏和激发方法同哮喘组,第 15 天开始,每天给予槐杞黄(0.4 g /100 g 体重) 灌胃。布地奈德联合槐杞黄组:致敏和激发方法同哮喘组,第 15 天开始,每次 OVA 激发前 30 min 给予布地奈德 2 mg 雾化以及每天给予槐杞黄(0.4 g /100 g 体重) 灌胃。正常对照组:腹腔注射、雾化、灌胃均用生理盐水。

1.2.3　大鼠肺组织标本采集

各组大鼠均在末次雾化激发 24 h 后,给予称重,10%水合氯醛 3.5 ml/kg 腹腔注射麻醉。心脏取血,收集血液于 EDTA 抗凝管中,2 000 r /min,离心 15 min,取血清于-70℃ 冰箱保存用于细胞因子检

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

测。结扎右支气管,取右下肺中上段置于液氮备用,取右下叶放入 4%多聚甲醛固定。大鼠肺组织经过标本固定、脱水、透明、浸蜡和包埋、切片以及脱蜡后,将制备好的 HE 染色切片先在光镜下观察,然后进行图像采集,每张切片随机选择 6 个视野。

1.2.4 大鼠肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid,BALF)及血清 IL-13 检测

用 3 ml PBS 行大鼠支气管肺泡灌洗,共灌洗 3 次。记录每次灌洗的回收量,计算回收率,回收率均大于 80%。收集灌洗液,离心后取上清于-70℃ 冰箱保存用于 IL-13 检测。同时采集大鼠血清,检测血清 IL-13 水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较先行方差齐性检验(F 检验),方差齐用 t 检验,方差不齐用 t' 检验,$P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组儿童肺功能及血清 IL-13 水平比较

两组儿童经过肺功能检测和 ELISA 分析,哮喘组与健康对照组肺功能及血清中 IL-13 含量比较结果如表 1 所示,结果显示:相比于健康对照组,哮喘组初诊时 FEV1%、PEF%值降低,血清中 IL-13 含量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 两组儿童肺功能和血清 IL-13 浓度

Table 1 Lung function and serum IL-13 concentration of children in two groups

(n=10,$\bar{x} \pm s$)

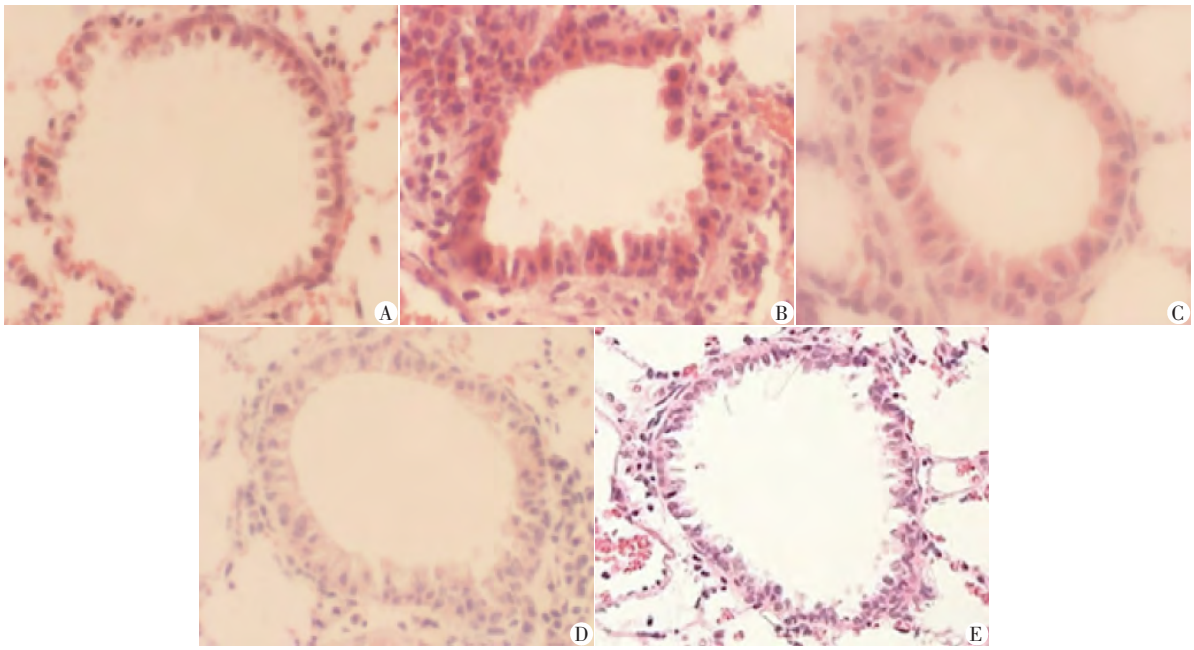
组别	肺功能		IL-13
	FEV1%	PEF%	(pg/ml)
哮喘组(n=10)	62.5 ± 13.2	68.1 ± 10.1	31.33 ± 4.36
健康对照组(n=10)	98.4 ± 19. 5	101.5 ± 12.2	15.16 ± 3.77
t 值	-5.451	-6.568	8.930
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 大鼠肺组织病理改变

HE 染色后,可观察到对照组大鼠肺组织光镜下未见明显炎症细胞,支气管管壁没有增厚,肺泡壁薄。模型组光镜下可见大量炎症细胞、支气管上皮杯状细胞明显增多,支气管管壁增厚,可见平滑肌增生,管腔相对窄,血管管壁亦可见增厚,其周围可见大量炎症细胞浸润。布地奈德组及槐杞黄组病理改变较模型组明显减轻,表现为支气管及血管周围有炎症细胞浸润,但较模型组减轻,气管壁增厚及管腔缩窄均较模型组减轻。但槐杞黄组的病理改变较布地奈德组仍稍重,炎症细胞浸润减轻不及布地奈德组明显。布地奈德联合槐杞黄组中气道炎症细胞浸润较布地奈德组及槐杞黄组进一步减轻,支气管杯状细胞稍增多但不明显,气道基底膜稍增厚(图 1)。

2.3 各组大鼠 BALF 中 IL-13 的表达水平

与对照组相比,哮喘模型组 IL-13 含量明显增加



A:对照组;B:哮喘模型组;C:布地奈德组;D:槐杞黄组;E:布地奈德联合槐杞黄组

图 1 各组大鼠肺组织病理观察结果(HE 染色,× 400)

Figure 1 Histopathology changes in rats in each group (HE stain,× 400)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

($P < 0.05$);布地奈德组、槐杞黄组 IL-13 含量均有不同程度增加($P < 0.05$);布地奈德联合槐杞黄组 IL-13 含量无变化($P > 0.05$)。与哮喘模型组比较,布地奈德组、槐杞黄组、布地奈德联合槐杞黄组 IL-13 含量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与布地奈德组比较,槐杞黄组 IL-13 含量增加,布地奈德联合槐杞黄组 IL-13 含量降低($P < 0.05$,表 2)。

2.4　各组大鼠血清中 IL-13 的表达水平

与对照组相比,哮喘模型组 IL-13 含量明显增加($P < 0.05$);布地奈德组、槐杞黄组 IL-13 含量不同程度增加($P < 0.05$);布地奈德联合槐杞黄组 IL-13 含量无变化($P > 0.05$)。与哮喘模型组比较,布地奈德组、布地奈德联合槐杞黄组 IL-13 含量明显降低($P < 0.05$)。与布地奈德组比较,槐杞黄组 IL-13 含量增加,布地奈德联合槐杞黄组 IL-13 含量减少($P < 0.05$,表 2)。

表 2　各组大鼠 BALF 和血清中 IL-13 浓度

Table 2　The concentration of IL-13 in BALF and plasma of rats in each group　($\bar{x} \pm s$,pg/ml)

组别	IL-13	
	BALF	血清
对照组(n=10)	16.33 ± 1.28	11.11 ± 1.93
哮喘模型组(n=10)	42.57 ± 7.56*	28.99 ± 5.2*
布地奈德组(n=10)	22.91 ± 3.28*#	15.70 ± 3.03*#
槐杞黄组(n=10)	27.88 ± 2.57*#△	23.53 ± 1.94*△
布地奈德联合槐杞黄组(n=10)	18.32 ± 1.98#△▲	11.65 ± 1.33#△▲

与正常组比较,*$P < 0.05$;与哮喘模型组比较,#$P < 0.05$;与布地奈德组比较,△$P < 0.05$;与槐杞黄组比较,▲$P < 0.05$。

3　讨　论

肺功能是诊断儿童哮喘较为客观的指标[11],本研究所选取的哮喘儿童肺功能值较健康儿童均有降低,符合哮喘诊断。而通过采用两次 OVA 腹腔注射致敏,及连续 6 周、隔日 1 次 OVA 气泵雾化吸入激发的方法构造大鼠支气管哮喘模型,病理组织学观察显示哮喘模型组大鼠支气管、血管周围有大量炎性细胞浸润,气道平滑肌增厚、杯状细胞增生。正常组则无上述表现,提示造膜成功。

病理学认为,气道炎症和气道重塑分别是支气管哮喘的两个主要特征[3]。本研究发现,在哮喘组儿童的血清中,IL-13 含量高于正常组儿童,这与既往研究结果一致[12]。而哮喘模型组大鼠 BALF 及血清中 IL-13 相对对照组亦有升高,具有一致性。IL-13 是和哮喘发病有关的细胞因子之一[13],由肥大细胞、Th2 细胞等分泌,在哮喘的气道炎症及气道重建上均有一定影响。小鼠吸入 IL-13 可以导致气道中炎症细胞如嗜酸性粒细胞、单核/巨噬细胞和淋巴细胞浸润[14],而后者又通过表达 IL-13 受体从而促进和放大 IL-13 的作用。有报道证实 IL-13 可通过 β 型转化生长因子和一系列基质金属蛋白酶来增强气道成纤维细胞的浸润[15]。而在哮喘患者中给予抗 IL-13 治疗,则能有效改善肺功能[16]。

槐杞黄颗粒由槐耳菌质、枸杞子、黄精制成,其主要成分为槐耳菌质多糖(PS-T)。相关药理研究证实槐耳菌质主要生物活性物质——槐耳多糖蛋白具有激活巨噬细胞、诱生细胞因子、调节机体细胞免疫与体液免疫、抑制肿瘤细胞增殖的作用[17]。本研究发现布地奈德组、槐杞黄组、布地奈德联合槐杞黄组大鼠肺组织病理中的炎症表现比模型组有不同程度减轻,布地奈德联合槐杞黄组较槐杞黄组减轻明显。此外,相较于模型组,给予布地奈德治疗后 BALF 及血清中 IL-13 均有不同程度降低,联合槐杞黄治疗则降低程度更明显($P < 0.05$)。以上结果提示槐杞黄与布地奈德联合治疗可以降低哮喘大鼠模型体内 IL-13 浓度,并能减轻哮喘大鼠肺部病理改变,且减轻程度优于单用布地奈德治疗。

本研究发现哮喘大鼠予以槐杞黄干预后,其支气管周围炎性细胞浸润程度,气管、血管肌层厚度均高于布地奈德组,BALF 及血清中 IL-13 表达量均高于布地奈德组,说明槐杞黄干预后抗炎效果不及布地奈德,但两者联合用药相较于单用布地奈德,以上指标均可明显改善,提示联合用药可以改善哮喘大鼠肺部炎症及病理变化。

[参考文献]

[1]　Galli SJ,Tsai M,Piliponsky AM. The development of allergic inflammation[J]. Nature,2008,454(7203):445–54

[2]　Wong GW,Leung TF,Ko FW. Changing prevalence of allergic diseases in the Asia-pacific region[J]. Allergy Asthma Immunol Res,2013,5(5):251–7

[3]　张　艳,邵　洁. 高分辨 CT 在评价儿童哮喘气道重塑中的应用[J]. 中国实用儿科杂志,2010,25(4):312–314

[4]　Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Clin Invest,2008,118(11):3546–56

[5]　Homer RJ,Zheng T,Chupp G,et al. Pulmonary type II cell hypertrophy and pulmonary lipoproteinosis are features of chronic IL-13 exposure[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2002,283(1):L52–9

[6]　王　虹,杨淑玲,张少卿,等. 支气管哮喘患者诱导痰细

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

胞因子与哮喘严重程度及气道反应性的关系[J]. 广东医学,2012,33(24):3728-3730

[7] 张爱启,付姝丽,纪玲玲. 槐杞黄颗粒对反复呼吸道感染儿童免疫功能的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报,2011,45(3):269-271

[8] 赵成广,杨永昌,吴玉斌,等. 槐杞黄颗粒辅助治疗儿童原发性肾病综合征前后 T 调节细胞及白细胞介素-10 的变化[J]. 实用儿科临床杂志,2011,26 (11):859-861,867

[9] 中华医学会儿科学会呼吸学组, 编辑委员会中华儿科杂志. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南[J]. 中华儿科杂志,2008,46(10):745-753

[10] Locke NR,Royce SG,Wainewright JS,et al. Comparison of airway remodeling in acute,subacute,and chronic models of allergic airways disease[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2007,36(5):625-32

[11] 刘 娜,赵德育,吴美思,等. 呼出气一氧化氮测定对儿童支气管哮喘的诊断价值[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(4):553-556

[12] 孙海平,郭锡熔,陈吉庆,等. 儿童支气管哮喘 96 例血清 IL-13 的研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版,2003,23(4):382-383

[13] Wang X,Ma C,Zhang Y,et al. Clinical significance of the dynamic changes in serum eotaxin,interleukin 13 and total IgE in children with bronchial asthma[J]. Iran J Pediatr,2013,23(5):525-30

[14] Walter DM,McIntire JJ,Berry G,et al. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity[J]. J Immunol,2001,167(8):4668-75

[15] Ingram JL,Huggins MJ,Church TD,et al. Airway fibroblasts in asthma manifest an invasive phenotype[J]. Am J Respir Crit Care Med,2011,183(12):1625-32

[16] Gauvreau GM,Boulet LP,Cockcroft DW,et al. Effects of interleukin-13 blockade on allergen-induced airway responses in mild atopic asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med,2011,183(8):1007-14

[17] 薛 茹. IL-17 介导原发性肾病综合征肾脏损害及槐杞黄肾脏保护作用的实验研究[D]. 重庆医科大学,2012

[收稿日期] 2014-05-07

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每 3 位分成 1 组,组间留空隙(约为一个汉字的 1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万,但不能写成 4 亿 5 千 3 百万;三千元写成 3 000 元或 0.3 万元,但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如 10%~20%,$(2\sim6)\times10^3$ 或 $2\times10^3\sim6\times10^3$,30~40 km。

(本刊编辑:接雅俐)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net