

中药单剂炙麻黄、麻黄对哮喘大鼠气道炎症反应的影响

许杰红¹, 曹厚然², 陈玉兴³

1. 广东省第二中医院, 广东 广州 510095
2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405
3. 广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州 510095

[摘要] 目的: 探讨不同剂量中药单剂炙麻黄、麻黄对哮喘大鼠气道炎症反应的影响。方法: SD 大鼠 70 只随机分为正常对照组、模型对照组、甲泼尼龙片组、炙麻黄高剂量组、炙麻黄低剂量组、麻黄高剂量组、麻黄低剂量组, 各 10 只。采用卵蛋白(OVA) 致敏并激发制备哮喘大鼠模型, 在第 20 天根据不同组别按剂量灌胃给药, 连续 7 天。末次激发 24h 后处死大鼠, 行支气管肺泡灌洗并回收支气管肺泡灌洗液(BALF), 计数炎症细胞数量, 采用酶联免疫吸附法(ELISA) 测定各组大鼠支气管肺泡灌洗白细胞介素-4(IL-4)、 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-13(IL-13) 含量。结果: 与模型对照组比较, 炙麻黄高剂量组、炙麻黄低剂量组、麻黄高剂量组、麻黄低剂量组大鼠 BALF 中白细胞数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比均明显降低($P < 0.01$), 提示不同剂量炙麻黄、麻黄均能降低哮喘大鼠 BALF 中炎症细胞表达, 且炙麻黄高剂量组的效果更明显, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。与模型对照组比较, 炙麻黄高剂量组、炙麻黄低剂量组、麻黄高剂量组、麻黄低剂量组大鼠 BALF 中 IL-4、IL-13 含量明显降低, IFN- γ 含量明显升高, 差异有显著性或非常显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示不同剂量炙麻黄、麻黄均能有效改善哮喘大鼠 BALF 中炎症因子表达, 且炙麻黄高剂量组的效果更佳, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。结论: 麻黄、炙麻黄均能有效降低哮喘大鼠 BALF 中炎症细胞数量, 调节炎症因子的表达, 炙麻黄高剂量作用更佳。

[关键词] 麻黄; 炙麻黄; 支气管哮喘; 气道炎症反应; 炎症细胞; 炎症因子

[中图分类号] R562.2*5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 12-0197-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.12.093

Effect of Herba Ephedrae or Honey-fried Herba Ephedrae Alone on Airway Inflammation of Asthmatic Rats

XU Jiehong, CAO Houran, CHEN Yuxing

Abstract: Objective: To investigate the effect of different doses of Herba Ephedrae(HE) or honey-fried Herba Ephedrae (HFHE) on airway inflammation of asthmatic rats. Methods: Seventy SD rats were randomly divided into normal control group, model control group, Methylprednisolone tablets group, high- and low-dose HE groups, and high- and low-dose HE groups, 10 rats in each group. Asthma rat model was sensitized and challenged by ovalbumin(OVA). On the 20th experimental day, the corresponding drugs were administered intragastrically to the rats in different groups for 7 consecutive days. Twenty-four hours after the last challenge, the rats were sacrificed for obtaining bronchoalveolar lavage fluid(BALF). The number of inflammatory cells was calculated, and the contents of interleukin-13(IL-13), interleukin-4(IL-4), and interferon gamma(IFN- γ) in BALF were measured by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Results: The number of white blood cells and neutrophils, and the percentage of eosinophil and lymphocyte were decreased in rat BALF of high- and low-dose HE groups and high- and low-dose HFHE groups($P < 0.01$ compared with the model control group), indicating HE and HFHE in different dose could reduce the count of inflammatory cells. The high-dose HFHE showed better effect, but the difference was insignificant($P > 0.05$). High- and low-dose HE and HFHE also had an effect on decreasing the contents of IL-4 and IL-13 and on increasing IFN- γ content in rat BALF($P < 0.05$ or $P < 0.01$ compared with the model control group), and high-dose HFHE showed better effect, but the difference was insignificant($P > 0.05$). Conclusion: Both HE and honey-fried HE can effectively reduce the number of inflammatory cells in BALF of asthmatic rats, and also can regulate the expression of

[收稿日期] 2014-08-21

[基金项目] 广东省中医药局立项资助课题 (编号: 20121239)

[作者简介] 许杰红 (1966-), 女, 副主任医师, 研究方向: 中医内科疾病的诊治。

inflammatory factors. High-dose honey-fried HE shows a tendency of having better effect.

Keywords: Herba Ephedrae; Honey-fried Herba Ephedrae; Bronchial asthma; Airway inflammation; Inflammatory cells; Inflammatory factors

支气管哮喘(以下简称哮喘)是临床常见的慢性呼吸道疾病之一,属中医学哮喘范畴。近年来,受人们生活、饮食习惯及气候环境等各方面因素影响,哮喘的患病率以惊人的速度上升,估计到 2025 年,全世界哮喘患者数量将由目前的 3 亿上升到 4 亿^[1];在我国,哮喘的发病率亦较高(成人约为 0.7%~1.5%,儿童为 0.11%~2.03%),现有确诊的哮喘患者近 2 千万^[2]。糖皮质激素是治疗哮喘的有效药物,但存在耐药、不良反应等问题。中医治疗哮喘已有上千年历史,积累了诸多行之有效的方药,如:麻黄汤、射干麻黄汤、小青龙汤、麻杏石甘汤、麻黄定喘汤等,且不少方剂均有实验研究证实具有减轻气道炎症反应的作用。那么,麻黄作为这些方剂的主药,其在缓解支气管平滑肌痉挛的同时^[3],是否具有减轻哮喘患者气道炎症反应的作用?不同制法、不同剂量的麻黄所产生的作用是否存在差异?基于此,笔者拟采用卵蛋白(OVA)致敏并激发制备哮喘大鼠模型,探讨不同剂量麻黄与炙麻黄水煎剂对模型大鼠支气管肺泡灌洗液(bronchialalveolar lavage fluid, BALF)中炎症细胞、细胞因子水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 SPF 级 SD 大鼠 70 只,雌雄各半,体重 180~220 g,由广东省医学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2008-0002,实验动物质量合格证号:44007200003685。大鼠平衡喂养 1 周后随机分为正常对照组、模型对照组、甲泼尼龙片组、炙麻黄高剂量组、炙麻黄低剂量组、麻黄高剂量组、麻黄低剂量组,每组均为 10 只。

1.2 实验用药 甲泼尼龙片,由天津天药药业股份有限公司提供(国药准字 H20020224,批号 12120305),按药品说明书成人日用量(每片 4 mg,成人每天 48 mg)为基础换算动物临床等效剂量为 4.32 mg/kg,加蒸馏水按剂量研磨配制后备用;炙麻黄、麻黄根据《中华人民共和国药典》2010 年版说明(麻黄用量 2~10 g),以临床日用量 10 g 为基础换算动物临床等效剂量为 0.90 g 生药/kg,据此设计本研究炙麻黄、麻黄实验低剂量为 0.90 g 生药/kg、高剂量为 3.60 g 生药/kg。由广东省中医研究所制剂研究室制备为 1 g 生药/mL,使用时以蒸馏水配制成所需浓度。

1.3 试剂及实验仪器 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海博谷生物科技有限公司,批号 20130103); γ 干扰素(IFN- γ) ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号 201306251);JJ3000 动物电子秤(G&G 公司);BS224S 电子天平(德国 SARTORIUS);HH-6 数显恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司);3K30 离心机(SIGMA 公司);5424 型小型高

速离心机(德国 Eppendorf 公司);UV-2501PC 型紫外分光光度计(日本 SHIMADZU 公司);Bio-RAD680 酶标仪(美国伯乐公司)。

1.4 卵蛋白(OVA)致敏并激发造模 将 OVA 溶于磷酸盐缓冲液(PBS)配制的 10%氢氧化铝凝胶中,配成 0.2% OVA 溶液,分别于第 1、第 14 天给各组大鼠(正常对照组除外)腹腔注射 0.2 mL 致敏。第 21 天将致敏大鼠置于玻璃钟罩内,以 1% 生理盐水 OVA 溶液雾化吸入激发 30 min,以后每天 1 次,连续 5 天。

1.5 给药方法 各组均于开始 OVA 致敏第 20 天按剂量灌胃给药,给药体积 10 mL/kg,每天 1 次,连续 7 天。正常对照组、模型对照组灌胃给予蒸馏水 10 mg/kg;甲泼尼龙片组按 4.32 mg/kg 加蒸馏水按剂量研磨配制后灌胃;炙麻黄、麻黄不同剂量组按低剂量 0.90 g 生药/kg、高剂量 3.60 g 生药/kg 以蒸馏水配制后灌胃。

1.6 肺泡灌洗液炎症细胞、炎症因子检测 各组均于给药第 7 天,末次激发 24 h 后处死大鼠,剪开颈部皮肤,并于气管正中处剪开一小口,插入气管套管,以磷酸盐缓冲液 5 mL 行支气管肺泡灌洗,来回冲洗 3 次,然后回收 BALF,记录回收收集的灌洗液量,混匀 BALF,计数炎症细胞数量,采用 ELISA 测定各组大鼠 BALF 中细胞因子白细胞介素-4(IL-4)、IFN- γ 、白细胞介素-13(IL-13)含量。

1.7 统计学方法 采用 SPSS15.0 软件建立数据库并进行统计分析。所有计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间均数两两比较,方差齐时采用 SNK 法;方差不齐时采用 Dunnett's T3 法。

2 结果

2.1 各组哮喘大鼠 BALF 中炎症细胞数量比较 见表 1。与正常对照组比较,模型对照组大鼠 BALF 中白细胞数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比均明显升高($P < 0.01$)。与模型对照组比较,炙麻黄高剂量组、炙麻黄低剂量组、麻黄高剂量组、麻黄低剂量组大鼠 BALF 中白细胞数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比均明显降低($P < 0.01$),提示不同剂量炙麻黄、麻黄均能降低哮喘大鼠 BALF 中炎症细胞表达,且炙麻黄高剂量组的效果更明显,但差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.2 各组哮喘大鼠 BALF 中炎症因子表达情况比较 见表 2。与正常对照组比较,模型对照组大鼠 BALF 中 IL-4、IL-13 表达均有升高,IFN- γ 则明显降低($P < 0.01$)。与模型对照组比较,炙麻黄高剂量组、炙麻黄低剂量组、麻黄高剂量组、麻黄

低剂量组大鼠 BALF 中 IL-4、IL-13 含量明显降低, IFN- γ 含量明显升高, 差异有显著性或非常显著性意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示不同剂量炙麻黄、麻黄均能有效改善哮喘大鼠 BALF 中炎症因子表达, 且炙麻黄高剂量组的效果更佳, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

表1 各组哮喘大鼠 BALF 中炎症细胞数量比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	白细胞 ($\times 10^9$)	中性粒细胞 ($\times 10^9$)	嗜酸性粒细胞 (%)	淋巴细胞 (%)
正常对照组	1.185 \pm 0.080	0.867 \pm 0.037	0.007 \pm 0.000	3.474 \pm 0.192
模型对照组	2.856 \pm 0.084	2.381 \pm 0.176	0.079 \pm 0.007	12.970 \pm 1.101
甲泼尼龙片组	1.565 \pm 0.032	1.352 \pm 0.032	0.035 \pm 0.002	5.550 \pm 0.255
炙麻黄高剂量组	1.781 \pm 0.026	1.447 \pm 0.028	0.043 \pm 0.002	6.230 \pm 0.164
炙麻黄低剂量组	2.016 \pm 0.068	1.548 \pm 0.027	0.053 \pm 0.002	7.244 \pm 0.144
麻黄高剂量组	2.195 \pm 0.122	1.702 \pm 0.041	0.061 \pm 0.002	8.345 \pm 0.174
麻黄低剂量组	2.572 \pm 0.112	1.914 \pm 0.07	0.065 \pm 0.003	9.462 \pm 0.280

与正常对照组比较, ① $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ② $P < 0.01$

表2 各组哮喘大鼠 BALF 中炎症因子表达情况比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	IL-4(pg/mL)	IL-13(pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
正常对照组	66.672 \pm 7.813	71.369 \pm 10.316	71.042 \pm 22.007
模型对照组	106.299 \pm 8.951	110.369 \pm 5.798	18.833 \pm 5.416
甲泼尼龙片组	77.040 \pm 10.495	89.511 \pm 7.010	46.208 \pm 13.478
炙麻黄高剂量组	80.387 \pm 9.949	86.117 \pm 8.140	47.292 \pm 16.459
炙麻黄低剂量组	84.191 \pm 9.112	93.849 \pm 17.220	35.500 \pm 17.823
麻黄高剂量组	84.524 \pm 5.909	93.799 \pm 10.144	39.542 \pm 8.262
麻黄低剂量组	94.445 \pm 9.560	98.156 \pm 12.239	32.875 \pm 9.324

与正常对照组比较, ① $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$

3 讨论

哮喘是由多种细胞特别是肥大细胞、嗜酸性粒细胞和 T 淋巴细胞参与的慢性气道炎症。糖皮质激素具有减轻气道炎症反应的作用, 是目前治疗哮喘最有效的药物, 但长期反复的激素使用有可能引起耐药和严重不良反应。针对哮喘急性发作期及慢性缓解期的治疗, 中药药均可通过辨证论治选择合适的处方用药, 其中, 麻黄作为治疗呼吸系统疾病的一味常用中药, 在“哮喘”、“喘证”治疗的诸多方剂中均有应用。

麻黄一药, 始载于《本经》, 具有发汗散寒、宣肺平喘、利水消肿等功效。现代药理研究表明其药理作用广泛, 其中缓解支气管平滑肌痉挛的作用已通过实验研究得到公认^[9]。亦有研究表明, 以麻黄为主药的复方, 如麻黄汤、射干麻黄汤、小青青龙汤、麻杏石甘汤等具有诱导哮喘气道内嗜酸性粒细胞凋

亡, 减少血管渗出, 从而减轻气道炎症, 降低气道高反应性的作用, 其机制与调节 MAPK 信号转导通路及 Th1/Th2 平衡, 抑制 p38 MAPK 蛋白的表达, 抑制炎症介质的释放和聚集等有关^[4-7]。

哮喘发病过程涉及多种炎性细胞及细胞因子。其中, 嗜酸性粒细胞是哮喘气道炎症反应过程的重要炎症效应细胞, 通过释放多种毒性蛋白, 使哮喘气道上皮损伤脱落, 引起气道高反应性; IL-4、IL-13 是重要的 Th2 型细胞因子, 主要参与黏液分泌、嗜酸性粒细胞产生及浸润等过程; IFN- γ 是 Th1 型细胞的特征性细胞因子, 主要作用是抑制 IgE 的合成和 Th2 型细胞因子的分化。本研究结果表明, 不同剂量炙麻黄、麻黄均可抑制哮喘大鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞、白细胞、中性粒细胞的升高, 调节 IL-4、IL-13、IFN- γ 等炎症因子的表达, 且炙麻黄高剂量组的效果更佳。这一结果为麻黄、炙麻黄、含麻黄复方用于哮喘治疗提供了实验依据, 但其作用机制如何, 通过怎样的信号通路对 Th1/Th2 进行调节, 麻黄单剂与含麻黄复方对哮喘的治疗作用及机制是否存在差异, 炙麻黄高剂量应用是否存在毒性等等, 诸多问题尚需深入探讨。

[参考文献]

- [1] Masoli M, Fabian D, Holt S, et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report [J]. Allergy, 2004, 59 (5): 469.
- [2] 陈育智. 儿童支气管哮喘的诊断及治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 1-2.
- [3] 高晔珩, 党力纳. 麻黄研究进展[J]. 陕西中医学院学报, 2003, 26(6): 60-61.
- [4] 黄建明, 田伟, 陈东波, 等. 麻黄汤及其减桂枝对哮喘小鼠影响的比较研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(3): 148-150.
- [5] 杨敏茹, 杨万军, 张伟东, 等. 射干麻黄汤对对支气管哮喘小鼠模型气道炎症及外周血 Th1/Th2 的影响[J]. 中国药师, 2012, 1(3): 309-311.
- [6] 罗丹冬, 丘振文. 小青青龙汤对小鼠支气管哮喘模型气道炎症及细胞因子的影响[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(4): 655-657.
- [7] 黄丰, 童晓云, 张荣华. 麻杏石甘汤调节哮喘模型小鼠 Th1/Th2 反应的机制初探[J]. 中药材, 2008, 31(10): 1519-1522.

(责任编辑: 马力)