

红参水提物对哮喘气道炎症小鼠的治疗作用及其机制研究

黄 丽 靳庆霞

摘 要 **目的** 探讨红参水提物对哮喘气道炎症小鼠模型的治疗作用及其机制。**方法** 选取 BALB/c 小鼠 75 只,采用随机数字表法分为正常组(等量生理盐水)、模型对照组(等量生理盐水)、低剂量组(红参水提物 100mg/kg)、高剂量组(红参水提物 200mg/kg)、阳性对照组(地塞米松 0.5mg/kg)各 15 只,除正常组外均成功制作哮喘气道炎症小鼠模型,给予对应的处理措施,对比各组小鼠末次激发后 24h 的肺泡灌洗液(BALF)中的各种炎性细胞因子、血清免疫球蛋白 E(IgE)、肺组织中羟脯氨酸含量,并采用 HE 染色观察各组大鼠肺组织病理变化。**结果** 模型对照组 BALF 中白细胞介素-4(IL-4)、IL-5、IL-14、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、血管内皮生长因子(VEGF)、血清免疫球蛋白 E(IgE)、肺组织羟脯氨酸均高于正常组($P < 0.01$);低剂量组、高剂量组及阳性对照组的 BALF 中 IL-4、IL-5、IL-14、TGF- $\beta 1$ 、VEGF 水平、血清 IgE、肺组织羟脯氨酸均低于模型对照组($P < 0.01$);高剂量组 BALF 中 IL-4、IL-5、IL-14、TGF- $\beta 1$ 、VEGF 水平、血清 IgE、肺组织羟脯氨酸均低于低剂量组($P < 0.05$)。**结论** 红参水提物主要通过减轻哮喘小鼠模型的气道炎性反应程度达到治疗作用。

关键词 红参 哮喘 气道炎症 机制

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.039

Experimental Study on the Effect and Mechanism of Water Extract of Red Ginseng on Asthmatic Mice with Airway Inflammation. Huang Li, Jin Qingxia. Department of Pharmacy, Anyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Henan 455000, China

Abstract **Objective** To investigate the effect and mechanism of water extract of red ginseng on asthmatic mice with airway inflammation. **Methods** Totally 75 BALB/c mice were selected, they were divided into normal group (Physiological saline equivalent), model control group (Physiological saline equivalent), low dose group (Water extract of red ginseng, 100mg/kg), high dose group (Water extract of red ginseng, 100mg/kg) and positive control group (Dexamethasone, 0.5mg/kg) by random number table method. There were 15 mice in each group. In addition to the normal group, all the other groups successfully produced the asthmatic airway inflammation model in mice, and the corresponding treatment measures were given. Comparison of mice after the last challenge 24h in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of various inflammatory cytokines and serum immunoglobulin E (IgE), Hydroxyproline content in lung tissue and pathological changes were observed in lung tissue of rats with HE. **Results** The model control group BALF interleukin interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-14 (IL-14), transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), Vascular endothelial growth factor (VEGF), serum immunoglobulin E (IgE), hydroxyproline content in lung tissue were higher than the normal group ($P < 0.01$). The levels of IL-4, IL-5, IL-14, TGF- $\beta 1$, VEGF, IgE and Hydroxyproline content in lung tissue in the low dose group, the high dose group and the positive control group were lower than that in the model control group ($P < 0.01$) in BALF. The levels of IL-4, IL-5, IL-14, TGF- $\beta 1$, VEGF, IgE and hydroxyproline content in lung tissue in the high dose group of BALF were lower than those in the low dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** The water extract of red ginseng can achieve the therapeutic effect by reducing the airway inflammatory reaction of the asthmatic mice model.

Key words Red ginseng; Asthma; Airway inflammation; Mechanism

支气管哮喘简称哮喘,是临床常见的气道慢性炎症性疾病。患者的支气管在嗜酸性粒细胞、肥大细胞、淋巴细胞等多种炎性细胞、炎性介质的作用下发生上皮细胞黏液腺化生、杯状细胞增生、平滑肌细胞

增生、细胞外基质沉积、上皮下纤维化等病理改变,最终导致支气管壁结构和功能的改变。大量基础研究已经证实,炎性细胞因子、血清免疫球蛋白参与气道重塑过程^[1]。

红参是传统医学中补益药的 대표 药物,具有大补元气、复脉固脱之功效。现代药理学研究发现,红参

可兴奋中枢神经、加快冲动转导,并具有增强机体免疫功能和耐受力、增强性功能等药理作用^[2]。中医取红参益气之效治疗咳喘已有较长的历史,但其作用机制尚未完全阐明。本研究以小鼠为动物模型,探讨红参水提物对哮喘气道炎症小鼠模型的治疗作用及其机制,现将结果报道如下。

材料与方法

1. 实验动物:选取 BABL/c 小鼠 75 只,体质量 15~20g,平均体质量 18.3 ± 2.1 g,喂养于光照 12h、室温 22~25℃、相对湿度 45%~60% 的环境中。

2. 实验仪器与药品:欧姆龙 U219 雾化吸入器购自大连医疗器械厂;酶联免疫检测仪购自美国 Thermo 公司;Western blot 转膜仪购自美国 BioRad 公司;SmartSpec Plus 核酸/蛋白质含量测定仪购自美国 Bio-rad;TGL-16G 高速冷冻离心机购自上海金鹏分析仪器有限公司;RF-540 型荧光分光光度计购自日本岛津公司。卵清蛋白(OVA)(批号 RAB0300)购自美国 Sigma 公司;氢氧化铝粉(批号:A1577)购自美国 Thermo 公司;白介素-4(interleukin-4, IL-4)、白介素-5(interleukin-5, IL-5)、白介素-14(interleukin-14, IL-14)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。红参购自同仁堂大药房。

3. 造模方法:采用随机数字表法分为正常组、模型对照组、低剂量组、高剂量组、阳性对照组 5 组,每组各 15 只,除正常组外其他 4 组均制作哮喘气道炎症小鼠模型。于第 1、7、14 天腹腔注射 OVA + 氢氧化铝凝胶混合液 200 微升/只(含 OVA 20 μ g、氢氧化铝凝胶 1mg)。在致敏后的第 21、22、23 天给予雾化吸入 1% OVA 5ml 30min,观察小鼠状态。如出现烦躁不安、大小便失禁、腹肌抽搐、呼吸急促等反应认为造模成功。

4. 干预方法:于致敏后第 14~23 天分别给予相应剂量的药物干预。正常组灌胃等量生理盐水;模型对照组灌胃等量生理盐水;低剂量组灌胃红参水提物 100mg/kg;高剂量组灌胃红参水提物 200mg/kg;阳性

对照组灌胃地塞米松 0.5mg/kg,1 次/天。于末次雾化结束 24h 后处死小鼠。眼眶取血待测 IgE;以磷酸盐缓冲液行支气管肺泡灌洗,收集支气管肺泡灌洗液,取右肺中叶组织。

5. HE 染色:取右肺中叶组织,10% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片(厚约 5 μ m)。切片置于 68℃ 恒温箱烘烤 30min。采用二甲苯脱蜡(二甲苯 I 5min、二甲苯 II 5min),梯度乙醇脱水(100% 乙醇 5min、95% 乙醇 5min、80% 乙醇 5min、75% 乙醇 5min)。自来水冲洗。苏木素染色,自来水冲洗。0.1% 盐酸乙醇分化。伊红染色,自来水冲洗,梯度乙醇脱水(95% 乙醇 I 1min、95% 乙醇 II 1min、100% 乙醇 I 1min、100% 乙醇 II 1min)。干燥后中性树脂封片。光学显微镜下观察支气管周围炎性细胞浸润情况。

6. 观察指标及检测方法:BALF 离心取上清液测细胞因子,IL-4、IL-5、IL-14、TGF- β 1、VEGF 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定,严格按试剂盒说明书操作。血液标本离心取上清液测 IgE,严格按试剂盒说明书操作。取肺组织 200mg 置入裂解液匀浆,离心取上清液测羟脯氨酸含量。严格按照试剂盒说明书操作。

7. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计学软件进行数据统计分析处理,采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述,组间比较采用方差分析法,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 病理学结果分析:HE 染色结果观察,图 1A(正常组)肺组织可见气道上皮完整、未发现纤毛脱落、气道管腔光滑、气道黏膜未见水肿、气道及周围组织中无炎性细胞及炎性分泌物;图 1B(模型对照组),可见气道黏膜破坏严重、气道水肿程度明显、管腔变狭窄、气道黏膜及周围组织中可见大量的炎性细胞及炎性分泌物;图 1C(低剂量组)、图 1D(高剂量组)、图 1E(阳性对照组),可见小鼠肺组织病理学 HE 染色病变程度较图 1B 显著的减轻,并且图 1D 和图 1E 的病变程度较图 1C 轻微。

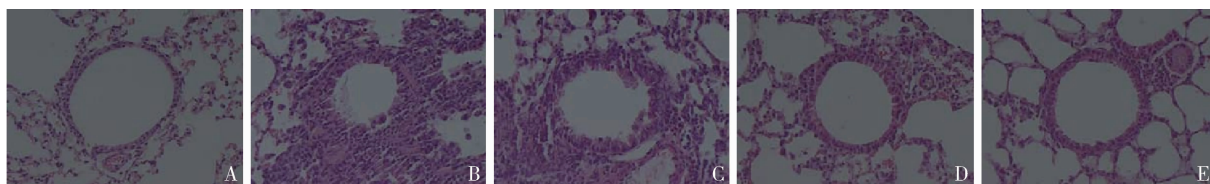


图 1 肺组织病理学观察(HE, $\times 200$)

A. 正常组;B. 模型对照组;C. 低剂量组;D. 高剂量组;E. 阳性对照组

2. 各组大鼠 BALF 中炎性细胞因子水平比较:模型对照组 BALF 中 IL - 4、IL - 5、IL - 14、TGF - β 1、VEGF 水平均高于正常组 ($P < 0.01$);低剂量组、高剂量组及阳性对照组的 BALF 中 IL - 4、IL - 5、IL - 14、

TGF - β 1、VEGF 水平均低于模型对照组 ($P < 0.01$);高剂量组 BALF 中 IL - 4、IL - 5、IL - 14、TGF - β 1、VEGF 水平均低于低剂量组 ($P < 0.05$,表 1)。

表 1 各组大鼠 BALF 中炎性细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL - 4 (μ g/L)	IL - 5 (μ g/L)	IL - 14 (pg/ml)	TGF - β 1 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)
正常组	15	11.20 $\pm$ 3.96	13.84 $\pm$ 5.20	20.80 $\pm$ 10.47	74.41 $\pm$ 18.40	15.40 $\pm$ 5.83
模型对照组	15	43.82 $\pm$ 13.79 *	63.14 $\pm$ 18.57 *	133.61 $\pm$ 31.94 *	196.76 $\pm$ 38.27 *	53.39 $\pm$ 16.29 *
低剂量组	15	28.75 $\pm$ 10.33 *#	40.04 $\pm$ 15.51 *#	78.55 $\pm$ 19.04 *#	138.52 $\pm$ 21.15 *#	38.71 $\pm$ 11.40 *#
高剂量组	15	19.61 $\pm$ 8.40 *# Δ	24.06 $\pm$ 8.85 *# Δ	41.20 $\pm$ 21.15 *# Δ	104.58 $\pm$ 17.63 *# Δ	26.20 $\pm$ 8.91 *# Δ
阳性对照组	15	15.11 $\pm$ 4.82 *# Δ	18.59 $\pm$ 7.23 *# Δ	34.76 $\pm$ 15.03 *# Δ	90.25 $\pm$ 19.52 *# Δ	18.44 $\pm$ 6.94 *# Δ

与正常组比较, * $P < 0.05$,与模型对照组比较;# $P < 0.05$;与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

3. 各组大鼠血清 IgE 水平比较:模型对照组血清 IgE 水平高于正常组 ($P < 0.01$);低剂量组、高剂量组及阳性对照组的血清 IgE 水平低于模型对照组 ($P < 0.01$);高剂量组血清 IgE 低于低剂量组 ($P < 0.05$,表 2)。

气道重塑为病理特征的呼吸系统疾病,是世界范围内公认的顽疾,目前尚无彻底治愈的方法^[3]。近年来随着环境污染的加剧,哮喘的发生率逐年递增,部分患者可进展为慢性阻塞性肺疾病、肺心病等,不仅降低了患者的生存质量,也给社会医疗资源造成沉重的负担^[4]。

表 2 各组大鼠血清 IgE 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	IgE (ng/ml)	<i>F</i>	<i>P</i>
正常组	15	33.05 $\pm$ 9.42	59.084	0.000
模型对照组	15	197.62 $\pm$ 44.81 *		
低剂量组	15	110.56 $\pm$ 25.77 *#		
高剂量组	15	65.94 $\pm$ 21.56 *# Δ		
阳性对照组	15	48.13 $\pm$ 17.24 *# Δ		

与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型对照组比较, # $P < 0.05$;与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

目前临床上首选的哮喘治疗药物为糖皮质激素,可有效减轻哮喘症状、改善肺功能、抑制气道高反应性和炎性反应程度,但长期用药可导致骨质疏松、念珠菌感染、库欣综合征等不良反应。一旦撤停激素,可导致病情复发甚至恶化^[5]。因此寻求疗效确切、不良反应小的药物治疗哮喘已迫在眉睫。中医药理论认为,哮喘属于“喘息”、“哮鸣”之范畴,与肺气虚弱密切相关^[6]。红参可大补元气,于肺气不足之哮喘非常对证,但其具体的药理作用机制尚未完全阐明^[7]。

4. 各组大鼠肺组织中羟脯氨酸含量比较:模型对照组肺组织中羟脯氨酸含量高于正常组 ($P < 0.01$);低剂量组、高剂量组及阳性对照组的肺组织中羟脯氨酸含量低于模型对照组 ($P < 0.01$);高剂量组肺组织中羟脯氨酸含量低于低剂量组 ($P < 0.05$,表 3)。

目前关于哮喘的基础研究和临床研究已成为热点,已有的基础研究结果证实,支气管哮喘的发病过程由多种细胞因子、炎性介质参与,引起气道壁结构发生不可逆性改变^[8]。T 淋巴细胞过度活化是哮喘患者免疫功能紊乱的主要特征,Th1、Th2 细胞两个亚群的失衡与哮喘的发病密切相关^[9]。阻断 Th2 细胞的过度活化是哮喘治疗的重点。IL - 4、IL - 5、IL - 14 等细胞因子可影响 B 淋巴细胞的活化、功能调节等过程,还可增加 B 淋巴细胞表面的抗体表达,加强气道内 IgE 与抗体结合能力,是引起气道重塑的主要介质^[10]。其中 IL - 5 还可促进嗜酸性粒细胞的生长、活化,诱导嗜酸粒细胞向炎症部位转移等^[11]。TGF - β 1 可参与调节机体炎性细胞表达,促进细胞因子分泌、血管生成、胶原合成、细胞外基质沉积,并

表 3 各组大鼠肺组织中羟脯氨酸含量比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	羟脯氨酸 (mg/g 肺组织)	<i>F</i>	<i>P</i>
正常组	15	0.55 $\pm$ 0.05	41.284	0.000
模型对照组	15	0.81 $\pm$ 0.09 *		
低剂量组	15	0.74 $\pm$ 0.06 *#		
高剂量组	15	0.66 $\pm$ 0.05 *# Δ		
阳性对照组	15	0.60 $\pm$ 0.07 *# Δ		

与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型对照组比较, # $P < 0.05$;与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

支气管哮喘是一种以慢性炎症、气道高反应性、

促进上皮纤维化、平滑肌细胞迁移及增生等^[12]。VEGF与气道周围组织纤维化、平滑肌细胞增生、肥大等气道重塑关系密切^[13]。

本研究模型对照组BALF中IL-4、IL-5、IL-14、TGF- β 1、VEGF水平均高于正常组,提示哮喘模型小鼠体内IL-4、IL-5、IL-14等细胞因子处于较高水平。红参低剂量组、高剂量组、阳性对照组的BALF中IL-4、IL-5、IL-14、TGF- β 1、VEGF均低于模型对照组;高剂量组BALF中IL-4、IL-5、IL-14、TGF- β 1、VEGF均低于低剂量组,提示红参水提取物有助于降低哮喘模型小鼠细胞因子水平,并与剂量呈现一定的相关性,但高剂量组IL-4、IL-5、IL-14、TGF- β 1、VEGF等指标仍高于阳性对照组,提示红参水提取物降低哮喘模型小鼠细胞因子水平的效果尚未达到糖皮质激素的治疗效果。

IgE可与肥大细胞、嗜碱性粒细胞结合,介导I型过敏反应,血清IgE升高是过敏性疾病最有力的佐证^[14]。本研究中模型对照组血清中IgE水平均高于正常组,提示哮喘模型小鼠体内血清中IgE处于较高水平。红参低剂量组、高剂量组、阳性对照组的血清中IgE均低于模型对照组;高剂量组血清中IgE低于低剂量组,提示红参水提取物有助于抑制哮喘模型小鼠过敏反应程度,并与剂量呈现一定的相关性,但尚未达到糖皮质激素的抗过敏效果。

羟脯氨酸是胶原蛋白的主要成分,当体内结缔组织大量增生或破坏时羟脯氨酸含量增加^[15]。本研究中模型对照组肺组织羟脯氨酸含量高于正常组也充分印证了这一点。红参低剂量组、高剂量组及阳性对照组的肺组织羟脯氨酸均低于模型对照组;高剂量组肺组织羟脯氨酸均低于低剂量组,说明红参水提取物有助于保护肺组织,减轻哮喘引起的肺组织损害。

本研究对小鼠肺组织进行HE染色后观察发现,哮喘模型小鼠可见气道黏膜破坏严重、气道水肿程度明显、管腔变狭窄、气道黏膜及周围组织中可见大量的炎性细胞及炎性分泌物。而经过红参水提取物治疗者肺组织黏膜下炎性细胞浸润、杯状细胞化生及平滑肌增生明显减轻。说明红参水提取物具有抑制气道重塑的作用。

本研究结果表明,红参水提取物主要通过减轻哮喘小鼠模型的气道炎性反应程度达到治疗作用。但本

研究中红参水提取物浓度设定为100~200mg/kg,更高浓度的红参水提取物是否具有更好的治疗效果尚有待于进一步研究证实。

参考文献

- 姜洪娟,张玄,迟翔宇,等.糖皮质激素吸入治疗对支气管哮喘患者血清蛋白质组的影响[J].中华结核和呼吸杂志,2014,37(4):274-278
- 王哲艳,王翠霞.中药联合特异性免疫治疗小儿过敏性鼻炎118例效果分析[J].解放军医药杂志,2015,11(11):102-105
- 梁钰彬,赵培,岳少乾,等.红参提取物对血管内皮细胞分泌的影响[J].中国临床药理学杂志,2016,32(1):42-44
- Amber HS, Steven M, Dennis T, et al. Childhood asthma acute primary care visits, traffic, and traffic-related pollutants[J]. Journal of the Air & Waste Management Association, 2014, 64(5):561-567
- 李喆,莫琳芳,任成山,等.支气管哮喘药物治疗现状及进展[J].中华肺部疾病杂志:电子版,2014,7(5):78-80
- 李美香,杨召川,曲政海,等.中药二步序贯治疗对哮喘小鼠肺组织基质金属蛋白酶-9及基质金属蛋白酶抑制剂-1表达的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2016,23(3):278-282
- 莫碧文,李洁,韦江红,等.基质细胞衍生因子-1/CXC趋化因子受体4在支气管哮喘大鼠气道炎症及气道重塑中的作用[J].中华结核和呼吸杂志,2015,38(1):39-44
- 崔利萍,田明,吴丽娟,等.炎症因子TSLP、TNF- α 和IL-8对不同气道炎症性疾病的影响及临床意义[J].中国临床研究,2014,27(7):776-777,781
- Sharon DD, Michael J, Bernard B, et al. Presence of other allergic disease modifies the effect of early childhood traffic-related air pollution exposure on asthma prevalence[J]. Environ Int, 2014, 65(4):83-92
- 余小汉,赵茂林.支气管肺泡灌洗液治疗支气管哮喘的疗效及灌洗液中炎症因子水平的检测[J].山西医药杂志,2016,45(10):1214-1215
- 卢惠伦,何海春,游世伦,等.支气管哮喘患者血清炎症因子与肺功能相关性研究[J].临床肺科杂志,2014,19(1):51-53
- 孙天寿,易桂生,郑红,等.疏肝理肺方对慢性应激条件下哮喘大鼠肺组织中TGF- β 1和Smad3表达的影响[J].实用医学杂志,2014,11(22):3548-3551
- 黄涛,赵莉,张玲,等.哮喘患儿血清VEGF、IL-13的表达水平及临床意义[J].大连医科大学学报,2015,3(3):279-281
- 郑莎莎,朱晓萍,李波,等.贵阳地区哮喘患儿IL-4 R α 基因多态性及其与血清总IgE水平的相关性[J].中华医学杂志,2014,12(36):2822-2827
- 张焕英,于连峰,杨俊玲,等.支气管哮喘患者血清肿瘤坏死因子- α 和透明质酸及羟脯氨酸水平表达及意义[J].中华实用诊断与治疗杂志,2016,30(10):1022-1024

(收稿日期:2017-02-17)

(修回日期:2017-03-17)