

六味地黄颗粒干预下的哮喘大鼠模型肺组织中 TGF- β 1 的变化^①

陈晶, 宋曦, 黄小琪

(广西中医药大学第一附属医院医学分子生物学实验室, 广西 南宁 530023)

E-mail: yueven@sina.com)

摘要: **目的** 观察六味地黄颗粒干预下哮喘大鼠肺组织中 TGF- β 1 的变化, 为研究中医药防治小儿哮喘提供实验依据。**方法** 以卵清白蛋白建立哮喘大鼠模型并分组, 通过 HE 染色观察大鼠肺组织变化; 免疫组织化学法检测各组肺组织 TGF- β 1 蛋白表达量, 并用 ELISA 法检测各组大鼠肺泡灌洗液 TGF- β 1 含量。**结果** HE 染色显示哮喘模型对照组肺组织炎症细胞浸润, 支气管黏膜皱襞增多, 气道平滑肌明显增厚。免疫组化结果显示, 与空白对照组相比, 哮喘模型对照组 TGF- β 1 蛋白表达明显升高。与哮喘模型对照组相比, 六味地黄颗粒组和阳性对照地塞米松组 TGF- β 1 均明显降低, 且六味地黄颗粒组的 TGF- β 1 水平与空白对照组水平相比, 差异无统计学意义。ELISA 检测结果显示, 各组大鼠肺泡灌洗液中 TGF- β 1 含量变化与免疫组化结果一致。**结论** 在六味地黄颗粒干预下, 哮喘大鼠模型肺组织 TGF- β 1 的表达量下调。

关键词: 支气管哮喘; 六味地黄颗粒; TGF- β 1

中图分类号: R256.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2016)02-0139-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.02.004

The changes of transforming growth factor beta1 expression in lung tissues of rat asthmatic models after administration with traditional Chinese medicine Liuwei Dihuang Granule

Chen Jing, Song Xi, Huang Xiaoqi

(Laboratory of Medical Molecular Biology, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi,)

Abstract: **Objective** To study the effects of traditional Chinese medicine Liuwei Dihuang Granule on transforming growth factor beta1 expression in lung tissues of rat asthmatic models and to provide experimental evidence for Chinese medicine in prevention and treatment of child asthma. **Methods** We built rat asthmatic models by using OVA and the rats were grouped. Then an immunohistochemistry was used to detect the protein expression of transforming growth factor beta1 in lung tissues and an ELISA method was used to measure the quantity of transforming growth factor beta1 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). **Results** The results of HE staining presented obviously inflammatory cell infiltration of lung tissues, bronchial mucosal folds increasing and airway smooth muscles thickening in asthmatic model control group. Immunohistochemistry measurements showed that the transforming growth factor beta1 protein expressions of rat asthmatic model group increased significantly by comparing with blank control group. Compared with asthmatic model control group, all the quantity of transforming growth factor beta1 decreased obviously in Liuwei Dihuang Granule group and positive control dexamethasone group. But there was no statistical difference between Liuwei Dihuang Granule group and blank control group in transforming growth factor beta1 expression. The ELISA detection showed that the change of transforming growth factor beta1 content in bronchoalveolar lavage fluid of every group was the same with the expressions of transforming growth factor beta1 detected by immunohistochemistry. **Conclusion** Traditional Chinese medicine Liuwei Dihuang Granule intervention can reduce the transforming growth factor beta1 expression in lung tissues of rat asthmatic models.

① 基金项目: 广西科学基金项目(2013GXNSFBA019136)

Key words: bronchial asthmatic model group asthma; Liuwei Dihuang Granule; transforming growth factor beta1

自哮喘首次被描述到今天,已经有数百年历史。对于这种古老且难治的疾病,人们的认识日渐深入。已有的研究表明,哮喘以反复的气道炎症和气道重塑为特征。其中对哮喘中气道重塑机制研究表明气道的物理性扭曲变形可以促使上皮细胞产生转化生长因子(transforming growth factor, TGF),继而造成支气管上皮-肌纤维母细胞转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),使得基底膜纤维物质沉淀、基底膜增厚^[1-3]。因此研究者提出上皮-间充质营养单位(epithelial-mesenchymal trophic unit, EMTU)假说,认为在气道重塑过程里,EMTU中联系上皮细胞和肌纤维母细胞的最重要细胞因子就是TGF- β 1。在祖国传统医学中,医者认为小儿在体质上有“阴常不足”、“肾常虚”的特点,因此,我们认为六味地黄方适合哮喘患儿缓解期的治疗,并在临床实践中取得了较为满意的疗效。故此,本研究观察六味地黄方干预哮喘大鼠模型肺组织TGF- β 1含量的变化,以探讨其对气道重塑的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 67只SPF级SD雄性大鼠随机分成4组。具体分组情况如下:空白对照组(Z组)、哮喘模型对照组(X组)、地塞米松组(A1组)、六味地黄颗粒治疗组(A2组),各组具体动物数如表1、表2所示。

1.2 实验药物及试剂 六味地黄颗粒:遵钱乙《小儿药证直诀》中六味地黄丸的组方,即熟地黄、山萸肉、干山药、泽泻、牡丹皮、白茯苓,按8:4:4:3:3:3比例制成免煎中药饮片颗粒剂,每包含生药10g,由江阴天江药业有限公司生产,温开水调制每毫升含生药1g。地塞米松磷酸钠注射液(400mg/L),郑州羚锐制药股份有限公司生产。卵清蛋白(OVA)(10克/瓶)由恒因生物有限公司提供。氢氧化铝为天津市博迪化工有限公司产品。TGF- β 1免疫组织化学试剂盒由北京博奥森生物技术有限公司提供。TGF- β 1 ELISA试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 造模 第1d、8d除空白对照组外,其余各组均以卵清蛋白(OVA)辅以氢氧化铝凝胶为佐剂注射致敏,第15~21d每天雾化吸入2%OVA生理盐水混悬液激发哮喘,建立哮喘模型。从实验第8d开始,各给药组地塞米松雾吸给药,六味地黄颗粒灌胃给药,空白对照组不予干预。造模时间共为28d。

1.3.2 取材 造模结束后24h内腹主动脉取血,然后开胸结扎大鼠右支气管,取右肺中叶新鲜肺组织,用

10%甲醛溶液固定以进行后续病理实验。气管插管,用生理盐水5ml注入左侧肺组织内,反复抽吸,使得生理盐水回收率在85%以上。收集肺泡灌洗液,1500r/min离心5min后取上清,-80℃保存待测。

1.4 指标检测

1.4.1 肺组织形态变化 用苏木精伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织形态。

1.4.2 肺泡灌洗液中TGF- β 1含量的检测 采用ELISA法检测,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4.3 免疫组织化学法检测肺组织TGF- β 1蛋白的表达 使用免疫组织化学过氧化物酶标记的链霉卵白素法进行检测。TGF- β 1一抗1:300稀释,4℃过夜,磷酸盐缓冲液冲洗,加生物素标记的二抗,室温10min,磷酸盐缓冲液冲洗。加链霉卵白素标记的三抗,室温10min,磷酸盐缓冲液冲洗,最后二氨基联苯胺显色。每张切片随机选择4个高倍镜下支气管视野,用图文分析系统测定阳性部位的平均吸光度,以代表阳性部位的蛋白表达水平,并计算10个平均吸光度的平均值作为该片的平均吸光度值。

1.5 统计学方法 实验数据通过SPSS 17.0软件进行统计学处理。计量资料经正态性分析后,采用单因素方差分析。如齐性分析显示方差不齐,则采用Dunnett's C法。以 $P < 0.05$ 判定为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠病理检测结果 HE染色及光镜观察Z组组织结构正常,支气管周围、肺间质和肺泡腔内几乎没有炎性细胞浸润,各级支气管上皮基本完整;X组可见支气管周围、肺间质和肺泡腔内大量炎症细胞浸润,同时可见支气管黏膜下水肿,黏膜皱襞增多,黏膜内杯状细胞明显增多,肺泡隔增厚,气道平滑肌明显增厚。A1、A2组亦可见炎症细胞浸润,支气管皱襞增多,气道平滑肌增厚,但相较于X组,这两组均有不同程度的减轻,而相较于Z组均有不同程度的炎性表现,见图1。

2.2 各组大鼠肺泡灌洗液TGF- β 1的含量 各组大鼠肺泡灌洗液TGF- β 1含量ELISA检测结果显示,X组肺泡灌洗液中TGF- β 1含量最高,明显高于Z组。同时,X组肺泡灌洗液中TGF- β 1含量也显著高于A1组和A2组。Z组TGF- β 1含量最低,与A2组比较,并无统计学意义。而Z组与A1组比较,则A1组中TGF- β 1含量明显高于Z组。最后也发现A1组肺泡灌洗液中TGF- β 1含量显著高于A2组,见表1。

表1 各组大鼠肺泡灌洗液 TGF- β 1 含量比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$)

组别	n	TGF- β 1	F	P
X	16	224.21 \pm 6.15 ^a	939.47	<0.001
Z	19	121.59 \pm 4.42 ^b		
A1	15	200.14 \pm 11.75 ^{ab}		
A2	17	125.48 \pm 3.62 ^b		

注:与Z组比较,a: $P < 0.05$;与X组比较,b: $P < 0.05$;
Z:空白对照组;X:哮喘模型对照组;A1:地塞米松组;A2:六味地黄颗粒治疗组

2.3 各组大鼠肺组织 TGF- β 1 蛋白表达 各组大鼠肺组织 TGF- β 1 蛋白表达结果,免疫组织化学染色阳性结果呈棕黄色。TGF- β 1 蛋白均表达定位于细胞质,在分布上主要表达于支气管上皮细胞、平滑肌细胞及黏膜下,见图2。统计结果显示X组 TGF- β 1 蛋白表达明显高于Z组,X组 TGF- β 1 蛋白表达也分别高

于A1组和A2组,且差异都有统计学意义。Z组 TGF- β 1 表达量最低,明显低于A1,但与A2差异无统计学意义。此外,A1组与A2组比较发现A2组 TGF- β 1 蛋白表达显著低于A1组,见表2。

表2 各组大鼠肺组织 TGF- β 1 免疫组织化学平均吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$)

组别	n	TGF- β 1	F	P
X	16	137.84 \pm 3.52 ^a	77.68	<0.001
Z	19	120.47 \pm 2.57 ^b		
A1	15	127.14 \pm 3.90 ^{ab}		
A2	17	120.89 \pm 4.81 ^b		

注:与Z组比较,a: $P < 0.05$;与X组比较,b: $P < 0.05$;
Z:空白对照组;X:哮喘模型对照组;A1:地塞米松组;A2:六味地黄颗粒治疗组

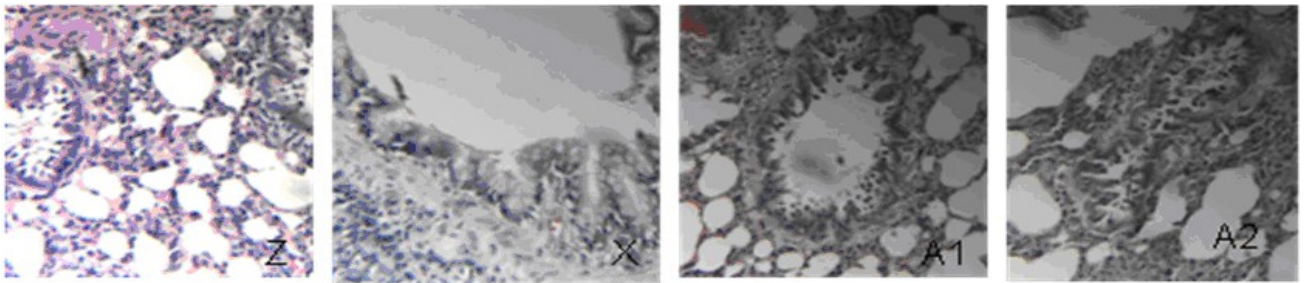


图1 各组大鼠光镜观察结果(HE染色, $\times 400$)

注:Z:空白对照组;X:哮喘模型对照组;A1:地塞米松组;A2:六味地黄颗粒治疗组

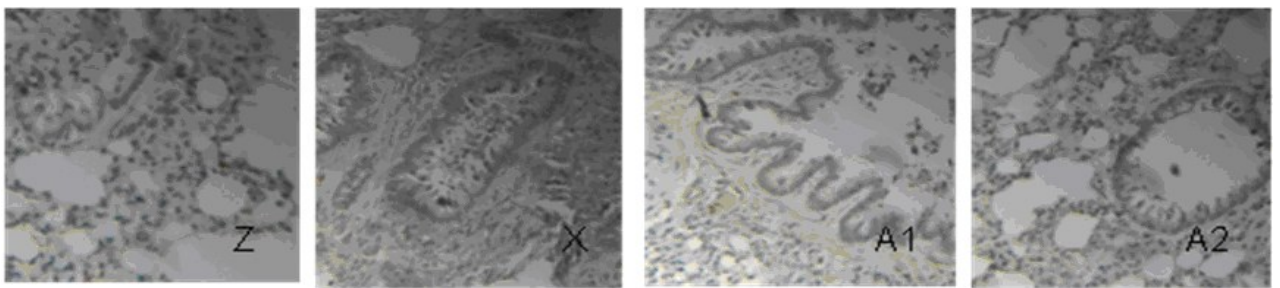


图2 各组大鼠 TGF- β 1 蛋白表达结果(DAB染色, $\times 400$)

注:Z:空白对照组;X:哮喘模型对照组;A1:地塞米松组;A2:六味地黄颗粒治疗组

4 讨论

气道重塑是支气管哮喘难以根治的重要原因,哮喘过程中气道上皮表型改变与网状层胶原沉积密切相关,提示气道上皮细胞不仅仅是炎症损伤的对象,也是哮喘发生发展的积极推动者,由此,研究者由此提出EMTU假说,认为在气道重塑过程中居于核心位置的是EMTU。同时研究者也发现了EMTU中最重要的细胞因子,即 TGF- β 1。在本研究组的前期临床实践

中,我们就哮喘大鼠模型中六味地黄颗粒的抗炎机制,进行了研究,并取得了一定的进展^[4-6]。本实验则以哮喘大鼠模型气道重塑为切入点,进一步探讨六味地黄颗粒对哮喘的作用机制。

本实验研究发现X组 TGF- β 1 的蛋白表达水平、肺泡灌洗液 TGF- β 1 含量明显高于Z组,有明显的气道重塑表现,提示 TGF- β 1 参与了哮喘大鼠模型的气道重塑。A2组,即六味地黄颗粒组肺组织的普通病理

检测与 Z 组较为接近,较少的炎性细胞浸润,气道皱襞、黏膜下平滑肌增厚均不明显。同时,A2 组 TGF- β 1 的蛋白表达量与 Z 组无异,而显著低于 X 组。Z 组、A2 组、X 组三组实验动物的肺泡灌洗液中 TGF- β 1 的含量变化也与免疫组织化学中 TGF- β 1 的表达量变化趋势一致,即 X 组均最高,而 Z 组最低,A2 组居中。此外,两个用药组,即地塞米松组和六味地黄颗粒组相比,六味地黄颗粒能够更显著地降低哮喘大鼠模型肺组织的 TGF- β 1 表达量。这表明,六味地黄颗粒能够促使哮喘大鼠模型的气道上皮细胞进行正常修复,减轻气道黏膜下平滑肌的增厚,进而防止哮喘大鼠模型的气道重塑。

参考文献:

- [1] Robinson DS. Th-2 cytokines in allergic disease[J]. Br Med Bull,2000,56(4):956-968.
- [2] Komai M, Tanaka H, Masuda T, et al. Role of Th2 re-

sponses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma[J]. Br J Pharmacol,2003,138(5):912-920.

- [3] Pohunek P, Warner JO, Turzikova J, et al. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma[J]. Pediatr Allergy Immunol,2005,16(1):43-51.
- [4] 黄小琪,陈晶,梁丽英. 六味地黄颗粒对哮喘大鼠转化生长因子- β 1 影响的研究[J]. 广西医科大学学报,2010,27(5):675-677.
- [5] 陈晶,黄小琪,梁丽英. 生理盐水激发卵白蛋白诱发的哮喘大鼠模型与正常大鼠肺部病理检查的比较与研究[J]. 现代预防医学,2011,38(20):4223-4228.
- [6] 钟李英,王力宁,张程和,等. 中医分期序贯治疗对哮喘大鼠气道重构基质金属蛋白酶-9 及其抑制剂表达影响的研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2014,16(12):2622-2629.

收稿日期:2015-12-04;修回日期:2016-01-20

(上接第 138 页)

调,两者呈显著性正相关,其变化在时间上的特征较为一致。特异性上调脊髓 GLT-1 的表达,增强其摄取谷氨酸的能力可能成为临床治疗和预防神经病理性痛的一个研究靶点。

参考文献:

- [1] Kiya T, Kawamata T, Namiki A, et al. Role of satellite cell-derived L-serine in the dorsal root ganglion in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy[J]. Neuroscience,2011,174:190-199.
- [2] Ren K, Dubner R. Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity[J]. Current opinion in anaesthesiology,2008,21(5):570-579.
- [3] Danbolt NC. Glutamate uptake[J]. Progress in neurobiology,2001,65(1):101-105.
- [4] Maragakis NJ, Rothstein JD. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease[J]. Neurobiology of disease,2004,15(3):461-473.
- [5] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. J Neurosci Methods,1994,53(1):55-63.
- [6] 银联飞,韦婷婷,黄容容,等. 紫杉醇诱导大鼠神经病理性疼痛模型的建立[J]. 右江民族医学院学报,2015,37(3):357-359.
- [7] Maeda S, Kawamoto A, Yatani Y, et al. Gene transfer of

GLT-1, a glial glutamate transporter, into the spinal cord by recombinant adenovirus attenuates inflammatory and neuropathic pain in rats[J]. Mol Pain,2008,4:65-67.

- [8] Sung B, Lim G, Mao J. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats[J]. J Neurosci,2003,23(7):2899-2910.
- [9] Tawfik VL, Regan MR, Haenggeli C, et al. Propentofylline-induced astrocyte modulation leads to alterations in glial glutamate promoter activation following spinal nerve transection[J]. Neuroscience,2008,152(4):1086-1092.
- [10] Tai YH, Wang YH, Tsai RY, et al. Amitriptyline preserves morphine's antinociceptive effect by regulating the glutamate transporter GLAST and GLT-1 trafficking and excitatory amino acids concentration in morphine-tolerant rats[J]. Pain,2007,129(3):343-354.
- [11] Mao J. Glutamate transporter: an unexpected target for some antibiotics[J]. Mol Pain,2005,1:5.
- [12] 周华荣,徐恩. 谷氨酸转运体-1 与脑缺血[J]. 国际脑血管病杂志,2013,21(12):942-946.
- [13] Rothstein JD, Patel S, Regan MR, et al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression[J]. Nature,2005,433(7021):73-77.

收稿日期:2016-03-08;修回日期:2016-03-17