

火把花根片对哮喘豚鼠肺泡灌洗液白细胞介素3受体mRNA的表达及嗜酸性粒细胞浸润的影响

哮喘是一种以迟发性气道过敏反应为主的慢性气道炎症性疾病[1]。气道粘膜嗜酸性粒细胞(eosinophil, Eos)等炎症细胞的大量聚集和脱颗粒是哮喘的主要病理改变之一。激素类药物是目前治疗哮喘的首选药,但是此类药物长期服用,毒副作用明显且易复发。中药火把花根片又名六方藤,为卫茅科植物,味苦,辛,凉,功能祛风活络,散淤活血[2]。临床观察表明,火把花根片具有良好的抗炎及免疫调节作用,对银屑病、慢性肾炎、类风湿性关节炎、结节性红斑等[3][4][5][6]多种自身免疫性疾病有显著性疗效,且无激素的副作用,病人的依从性较好。本实验就经火把花根片治疗的哮喘豚鼠肺泡灌洗液(BALF)的白细胞介素-3(IL-3)受体mRNA的表达,及其对哮喘豚鼠气道Eos浸润的影响进行初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性豚鼠32只,体质量250~300 g,由第一军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 卵蛋白(上海化学试剂采购站进口分装),火把花根片(重庆中药研究院制药厂产品),RT-PCR试剂盒(瑞康生物技术有限公司产品),DNA Marker: ϕ ×174 Hinc II digest (TaKaRa公司产品)。

1.1.3 仪器 “402”超声雾化吸入器(上海合力医用器械厂),PCR仪(德国Eppendorf公司产品),UVItec凝胶分析仪(英格兰UVItec公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠哮喘模型的制备及分组

32只健康豚鼠随机分为4组:哮喘组、地塞米松治疗哮喘组、火把花根片治疗哮喘组和正常对照组。每组8只。

豚鼠哮喘模型的制备:在第1天用10%的卵蛋白生理盐水混悬液1 ml腹腔注射。第15天将致敏的豚鼠置于一30 cm×20 cm×20 cm的半密闭有机玻璃罩内,将1%卵蛋白溶液用“402”超声雾化吸入器喷入激发,直至豚鼠出现呼吸急促、点头运动及腹肌明显收缩等哮喘症状时停止。在激发前60 min给予苯海拉明10 mg/kg·b.w.腹腔注射,预防动物因过敏反应而死亡。

哮喘组:第16~30天,隔日以1%卵蛋白生理盐水混悬液激发1次,共7次。

地塞米松治疗哮喘组:第16~30天,按1.6 mg/kg·b.w.予地塞米松片,将其研磨成粉末状溶于2 ml生理盐水,每日通过自制的胃管灌服。同时隔日以1%卵蛋白生理盐水混悬液激发1次,共7次。地塞米松片为每次激发前1 h灌服。

火把花根片治疗哮喘组:第16~30天,按260 mg/kg·b.w.予火把花根片,将其研磨成粉末状溶于2 ml生理盐水,每日通过自制的胃管灌服。同时隔日以1%卵蛋白生理盐水混悬液激发1次,共7次。火把花根片为每次激发前1 h灌服。

正常对照组:用生理盐水代替卵蛋白。在第1天用生理盐水1 ml腹腔注射。第15天将豚鼠置于一30 cm×20 cm×20 cm的半密闭有机玻璃罩内,将生理盐水用“402”超声雾化吸入器喷入。第16~30天,隔日给予生理盐水用“402”超声雾化吸入器喷入。

1.2.2 BALF的收集及细胞计数与分类

第30天,最后1次激发后,10%水合氯醛以3.5 ml/kg·b.w.腹腔注射麻醉豚鼠。切开气管,行气管插管,用3 ml Hanks液灌入支气管肺组织内,抽吸2~3次,轻按摩胸部后回收BALF。回收率为85%以上,共灌洗3~4次。BALF回收后用双层无菌纱布过滤,除去粘液等,记录回收液体量。将BALF放入离心管中,1 000 r/min离心10 min,离心的细胞沉

淀用含5%胎牛血清(FCS)的M-199培养液冲洗3次, 调整培养液为1 ml, 取少量于载玻片上涂片, 进行细胞总数和细胞分类。

1.2.3 肺组织病理切片

在每次肺泡灌洗后, 切取豚鼠右侧肺, 用3%甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE染色。光镜下观察Eos的浸润及上皮细胞脱落等病理学改变。

1.2.4 IL-3R α 引物和 β -actin引物的合成

扩增鼠IL-3R α 引物及 β -actin引物, 参照McClanahan等[7]文献设计, 由中国科学院上海细胞生物研究所合成。其中 β -actin作为内参。IL-3R α : 扩增产物长度227 bp; SENSE 5' GAACAGATTCCACC ATGGCCTCCTTG3'; ANTISENSE 3' GTCTCCACTAC GGACACTTCTGTC5'。 β -actin: 扩增产物长度587 bp; SENSE 5' CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC3'; ANTISENSE 3' AGACCGCCGTGGGTACATGGGA 5'。

1.2.5 RT-PCR及半定量分析

采用半定量逆转录-多聚酶反应技术(SqRT-PCR), 通过设立 β -actin阳性对照作基因转录的mRNA半定量测定。

RNA提取: 用RT-PCR试剂盒提取。从液氮中取出每组样品标本, 提取方法参照试剂盒说明书进行。逆转录及第1次PCR步骤: 置PCR仪中42 °C反应90 min, 95 °C变性5 min。第1次PCR条件: 94 °C变性45 s, 55 °C退火45 s, 72 °C延伸1 min, 扩增30个循环, 最后72 °C延伸10 min。

第2次PCR步骤: 建立50 μ l反应体系, 94 °C变性45 s, 59 °C退火45 s, 72 °C延伸1 min, 扩增30个循环, 最后72 °C延伸10 min。

PCR产物检测: 采用2%琼脂糖凝胶电泳, 以 β -actin为阳性对照, 用UVItec凝胶分析仪将电泳图扫描后进行分析。以积分光密度之比进行半定量分析。1.2.6 统计学处理 用SPSS10.0软件行One-Way ANOVA统计分析, 各组间比较采用SNK法。

2 结果

2.1 BALF中细胞总数及细胞分类(表1)

表1 各组 BALF 中细胞总数和分类的比较($n=8, \bar{x}\pm s$)

Tab.1 Comparison of the total cell number and cell classification in the BALF of the 4 groups ($n=8, Mean\pm SD$)

Group	Total cell number ($\times 10^6/ml$)	Classification of cell(%)				
		Neutrophil	Lymphocyte	Eosinophil	Endothelial cell	Monocyt
Control	0.40 \pm 0.12	16.0 \pm 8.2	31.5 \pm 10.9	3.0 \pm 3.2	35.9 \pm 22.8	13.6 \pm 16.4
Asthma	0.86 \pm 0.06**	22.5 \pm 8.0	16.9 \pm 6.3**	28.3 \pm 7.8**	27.0 \pm 10.3	5.1 \pm 2.5
Dexamethasone	0.68 \pm 0.13*** [#]	33.0 \pm 6.9*** [#]	36.9 \pm 9.5 ^{##}	10.9 \pm 3.4*** ^{##}	12.9 \pm 6.5 [#]	6.4 \pm 4.5
Huobahuagen	0.70 \pm 0.19*** ^{##}	30.1 \pm 8.0**	37.0 \pm 6.5 ^{##}	10.3 \pm 4.2*** ^{##}	14.9 \pm 5.4	7.1 \pm 5.0

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ vs asthma. BALF: Bronchoalveolar lavage fluid

哮喘豚鼠经过火把花根片治疗后, BALF中细胞总数和Eos的百分比均有显著性下降, 与正常组比较有显著差异。地塞米松组与火把花根片组比较, BALF中细胞总数和细胞分类均无明显差异。

2.2 肺组织病理切片

2.2.1 正常组 支气管和肺组织均未见明显病理变化(图1A)。

2.2.2 哮喘组 支气管粘膜及粘膜下层组织有大量Eos浸润, Eos脱颗粒, 支气管壁增厚, 管腔狭窄, 腔内有大量的上皮细胞脱落, 还可发现粘液栓, 有组织粘膜充血水肿等典型的气道炎症表现(图1B)。

2.2.3 地塞米松治疗组 组织粘膜仍有比较明显的充血水肿等, 但Eos浸润较哮喘组豚鼠明显减轻, 可见到淋巴细胞和浆细胞等(图1C)。

2.2.4 火把花根片治疗组

与地塞米松治疗组相似，Eos浸润较哮喘组豚鼠明显减轻，可见淋巴细胞和浆细胞等，组织仍有充血水肿(图1D)。

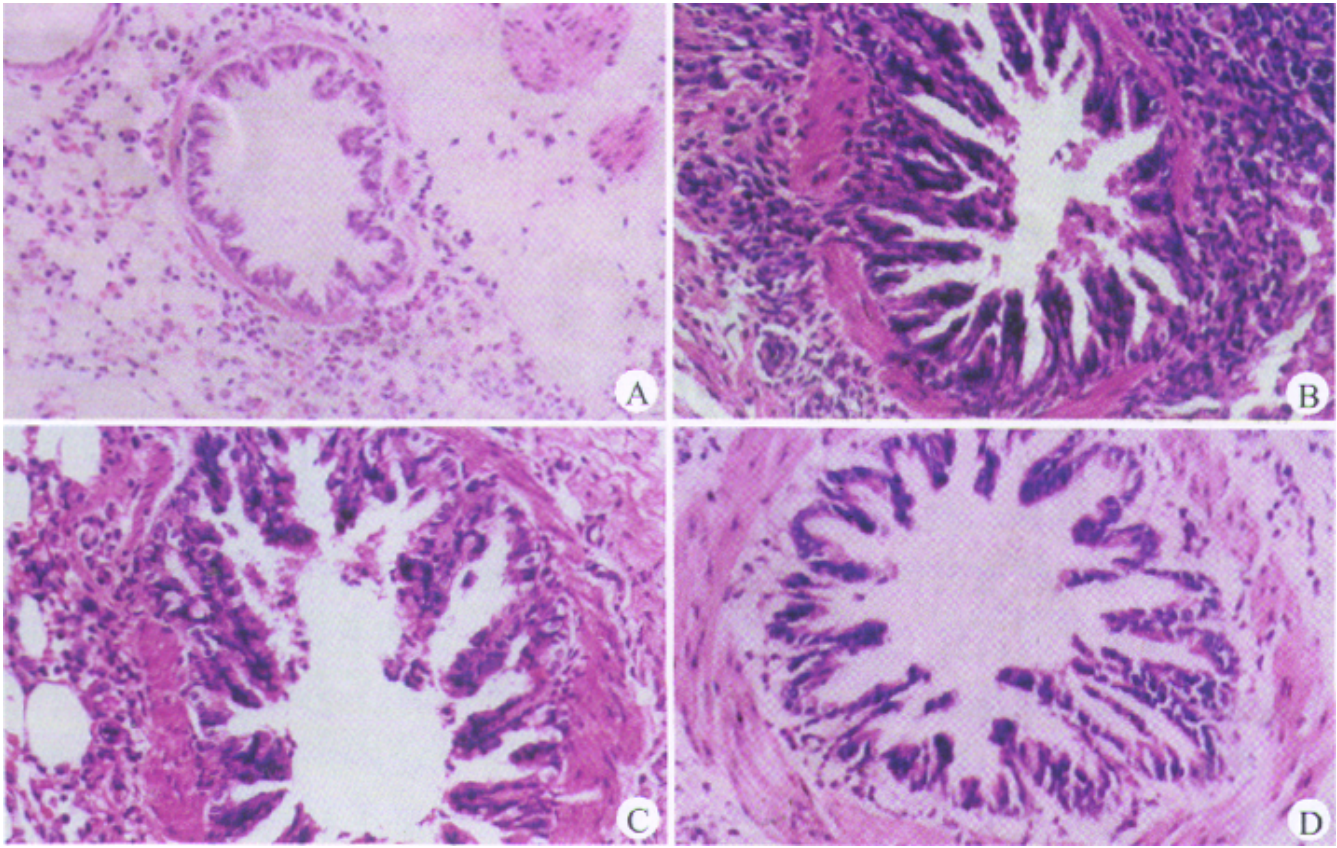


图1 各组肺组织病理切片(HE染色, ×400)

Fig.1 Histopathological examination of the lung tissues in different groups (HE staining, ×400)
 A: Control group; B: Asthmatic group; C: Dexamethasone therapy group; D: Huobahuagen tablet therapy group

2.3 BALF中Eos IL-3R α mRNA表达相对含量(表2)

表2 各组BALF中Eos的IL-3R α mRNA的相对含量($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Relative content of IL-3 receptor mRNA of the Eos in the BALF of the 4 groups ($n=8, Mean \pm SD$)

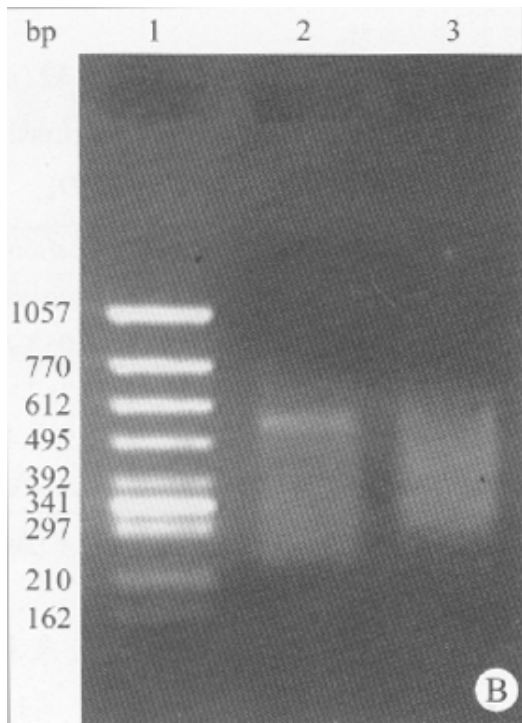
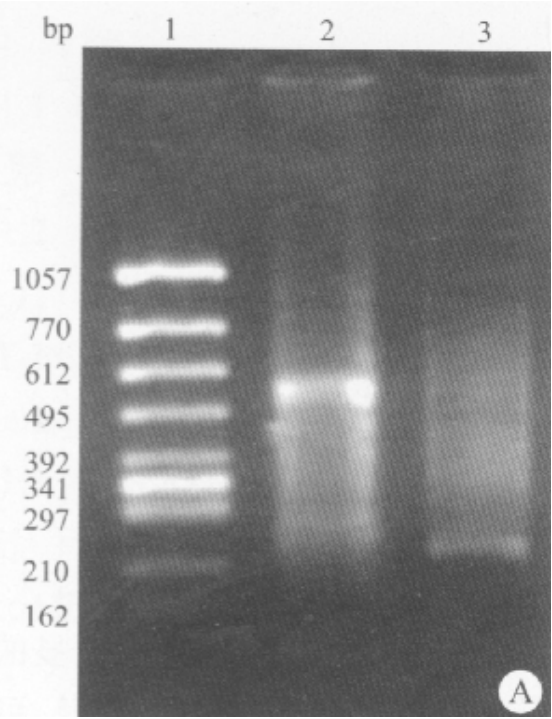
Group	IL-3R α mRNA
Control	0.53 \pm 0.17
Asthma	0.25 \pm 0.16*
Dexamethasone	1.13 \pm 0.13*** ^{ab}
Huobahuagen	1.62 \pm 0.50*** ^{ab}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; ^{ab} $P < 0.01$ vs asthma

RT-PCR检测显示，正常豚鼠BALF中Eos有一定量IL-3R α mRNA的表达，哮喘豚鼠经过火把花根片治疗后，IL-3R α mRNA的表达显著增加。地塞米松治疗组与火把花根片治疗组比较无显著性差异。

2.4 各组RNA电泳结果

各标本总RNA琼脂糖凝胶电泳结果(图2A~D)显示，RNA有部分降解，但IL-3R α 和 β -actin两条带显示清晰，符合RT-PCR要求。



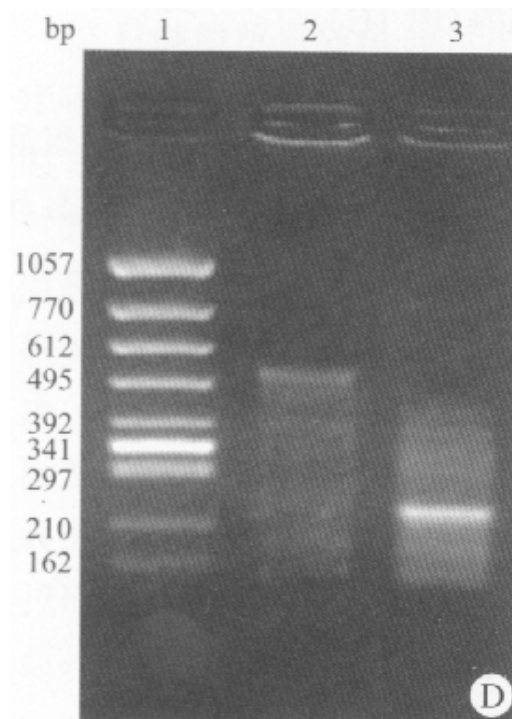
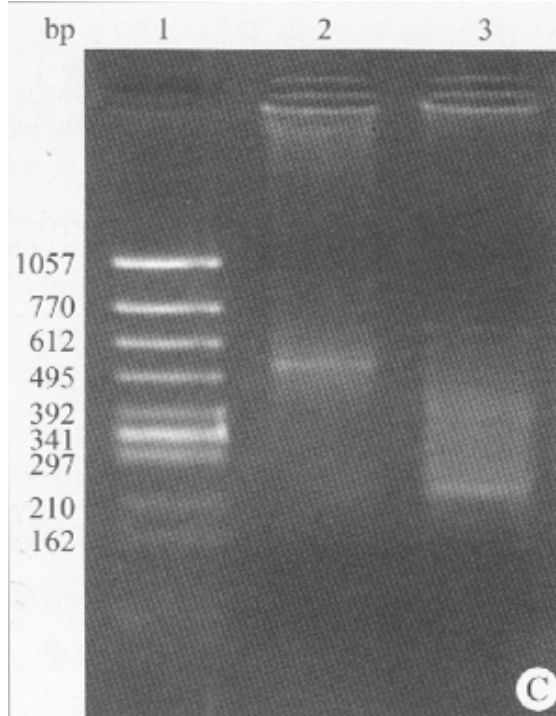


图2 各组的RT-PCR结果

Fig.2 Result of RT-PCR in different groups

A: Control group; B: Asthmatic group; C: Dexamethasone therapy group; D: Huobahuagen tablet therapy group

Lane 1: DNA marker; Lane 2: Induced by β -actin; Lane 3: Induced by IL-3

3 讨论

目前研究表明,哮喘是一种由Eos、肥大细胞及T淋巴细胞等多种炎症细胞参与的气道慢性炎症性疾病,它导致气道上皮损伤、微血管渗透性增高及气道神经功能紊乱,诱发和加重气道高反应性。气道的慢性炎症是哮喘的病理基础[8]。目前公认,在所有这些细胞中,Eos可能是产生气道炎症最重要、作用强度最大的细胞。活化的T细胞通过分泌IL-3、白介素-5(IL-5)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)促进Eos的分化,活化存活延长及气道内的募集

[9]。细胞因子IL-3、IL-5、GM-CSF通过与Eos上的各自受体 α 亚单位结合而起作用。它们具有共同的 β 亚单位， β 亚单位是信号传递的关键部位，因此，这些细胞因子的许多作用相似或者相同[10][11][12]。在哮喘中，它们共同促进Eos分化、成熟、内皮粘附、趋化、激活和脱颗粒。Eos活化浸润释放是引起哮喘特征性病理改变和气道高反应性的主要原因。IL-3可延长Eos的存活，增强Eos对趋化因子的反应，促使Eos跨内皮移行，还能促进肥大细胞分化成熟。有研究表明，哮喘患者BALF表达的IL-3增加与哮喘严重程度相关[13]。

Kurata等[14]发现人的CD34⁺细胞中IL-3R α mRNA可被IL-3、IL-5、GM-CSF下调，反之当这些细胞因子减少时，对受体的抑制减少，IL-3R α mRNA表达就增加。本实验利用火把花根片后，IL-3R α mRNA表达增加，说明IL-3减少。同时利用地塞米松这种临床上最常用的治疗哮喘药与之进行比较，清楚地表明在这两组BALF中Eos及细胞总数差异均无显著性，肺组织病理切片HE染色后通过光镜观察也表明这两组的差异不大，BALF的Eos IL-3R α mRNA表达相对含量差异也无显著性。本实验表明，火把花根片能显著抑制哮喘豚鼠的气道炎症，其机制可能与火把花根片作为一种抗变态反应性的中药，具有抗炎、降低毛细血管通透性、减轻组织水肿等作用有关。本研究为火把花根片临床应用于哮喘治疗提供了初步的实验基础，但还有待于进一步研究其抗哮喘炎症的分子机制。

参考文献：

- [1] 杨玉. 哮喘概念的新进展[J]. 中华结核和呼吸杂志 (Chin J Tuber Respir Dis), 1993, 16(1): 69.
- [2] 谢宗万. 全国中草药汇编(下册)[M]. 第2版, 北京: 人民卫生出版社, 1996. 90.
- [3] 王亚美, 李忠青. 火把花根片治疗银屑病患者50例[J]. 中华皮肤科杂志(Chin J Dermatol), 2000, 33(2): 128.
- [4] 李夏玉, 方维佳. 火把花根片治疗IgA肾病60例临床观察[J]. 中草药, 2001, 32(9): 825-6.
- Li XY, Fang WJ. Clinical observation of Huobahuagen tablet therapy IgA nephrosis 60 cases [J]. Trad Chin Med, 2001, 32(9): 825-6.
- [5] 杨剑辉, 朱广春, 张纪云, 等. 火把花根片和雷公藤多甙片二联治疗肾小球肾炎的临床研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2001, 2(3): 154-5.
- Yang JH, Zhu GC, Zhang JY, et al. Clinical study of Huobahuagen tablet and tripterine therapeutic alliance glomerulonephritis[J]. Chin J Integrat Trad Western Nephrol, 2001, 2(3): 154-5.
- [6] 周雅, 范秀芝, 姚林春. 火把花根片治疗结节性红斑疗效观察[J]. 皮肤病与性病, 2001, 23(1): 11-2.
- Zhou Y, Fan XZ, Yao LC. Effective observation of Huobahuagen tablet therapy erythema nodosum [J]. Dermatosi s Cypridopathy, 2001, 23(1): 11-2.
- [7] McClanahan T, Dairymple S, Barkett M, et al. Hematopoietic growth factor receptor genes as markers of lineage commitment during in vitro development of hematopoietic cells[J]. Blood, 1993, 81(11): 2903-15.
- [8] Vignola AM, Chanez P, Bonsignore G, et al. Structural consequences of airway inflammation in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(2Pt2): s514-7.
- [9] Haczku A. T cells and eosinophils in asthma[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 1998, 45(1): 19-29.
- [10] Wang P, Wu P, Cheewatrakoolpong B, et al. Selective inhibition of IL-5 receptor α -chain gene transcription by IL-5, IL-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human blood eosinophils[J]. J Immunol, 1998, 160(9): 4427-32.
- [11] Zheng J, Kuvelkar R, Cheewatrakoolpong B, et al. Evidence for multiple promoters of the human IL-5 receptor α subunit gene: a novel 6-base pair element determines cell-specific promoter function[J]. J Immunol, 1997, 159(11): 5412-21.
- [12] Yasrueel Z, Humbert M, Kotsimbls TC, et al. Membrane-bound and soluble α IL-5 receptor mRNA in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic asthmatics[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155(4): 413-8.
- [13] Jerb K, Le Gros G. The role of Th2 type CD4⁺ T cells and Th2 type CD8⁺ T cells in asthma[J]. Immunol Cell Biol, 1996, 74(2): 206-8.
- [14] Kurata H, Arai T, Yokota T, et al. Differential expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-3 receptor subunits on human CD34⁺ cells and leukemic cell lines[J]. J Allergy Clin Immunol, 1995, 96(6 Pt 2): 1083-99.

参考文献:

- [1] 杨玉. 哮喘概念的新进展[J]. 中华结核和呼吸杂志 (Chin J Tuber Respir Dis), 1993, 16(1): 69.
- [2] 谢宗万. 全国中草药汇编(下册)[M]. 第2版, 北京: 人民卫生出版社, 1996. 90.
- [3] 王亚美, 李忠青. 火把花根片治疗银屑病患者50例[J]. 中华皮肤科杂志(Chin J Dermatol), 2000, 33(2): 128.
- [4] 李夏玉, 方维佳. 火把花根片治疗IgA肾病60例临床观察[J]. 中草药, 2001, 32(9): 825-6.
Li XY, Fang WJ. Clinical observation of Huobahuagen tablet therapy IgA nephrosis 60 cases [J]. Trad Chin Med, 2001, 32(9): 825-6.
- [5] 杨剑辉, 朱广春, 张纪云, 等. 火把花根片和雷公藤多甙片二联治疗肾小球肾炎的临床研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2001, 2(3): 154-5.
Yang JH, Zhu GC, Zhang JY, et al. Clinical study of Huobahuagen tablet and tripterine therapeutic alliance glomerulonephritis[J]. Chin J Integrat Trad Western Nephrol, 2001, 2(3): 154-5.
- [6] 周雅, 范秀芝, 姚林春. 火把花根片治疗结节性红斑疗效观察[J]. 皮肤病与性病, 2001, 23(1): 11-2.
Zhou Y, Fan XZ, Yao LC. Effective observation of Huobahuagen tablet therapy erythema nodosum [J]. Dermatitis Cypridopathy, 2001, 23(1): 11-2.
- [7] McClanahan T, Dairymple S, Barkett M, et al. Hematopoietic growth factor receptor genes as markers of lineage commitment during in vitro development of hematopoietic cells[J]. Blood, 1993, 81(11): 2903-15.
- [8] Vignola AM, Chanez P, Bonsignore G, et al. Structural consequences of airway inflammation in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(2Pt2): s514-7.
- [9] Haczku A. T cells and eosinophils in asthma[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 1998, 45(1): 19-29.
- [10] Wang P, Wu P, Cheewatrakoolpong B, et al. Selective inhibition of IL-5 receptor α -chain gene transcription by IL-5, IL-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human blood eosinophils[J]. J Immunol, 1998, 160(9): 4427-32.
- [11] Zheng J, Kuvelkar R, Cheewatrakoolpong B, et al. Evidence for multiple promoters of the human IL-5 receptor α subunit gene: a novel 6-base pair element determines cell-specific promoter function[J]. J Immunol, 1997, 159(11): 5412-21.
- [12] Yasruef Z, Humbert M, Kotsimbls TC, et al. Membrane-bound and soluble α IL-5 receptor mRNA in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic asthmatics[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155(4): 413-8.
- [13] Jerb K, Le Gros G. The role of Th2 type CD4+ T cells and Th2 type CD8+ T cells in asthma[J]. Immunol Cell Biol, 1996, 74(2): 206-8.
- [14] Kurata H, Arai T, Yokota T, et al. Differential expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-3 receptor subunits on human CD34+ cells and leukemic cell lines[J]. J Allergy Clin Immunol, 1995, 96(6 Pt 2): 1083-99.