

· 基础研究 ·

五拗汤对 PM2.5 诱导加重哮喘小鼠模型的效应及 TRPA1 和 TRPV1 表达的影响

刘洪^{1,2} 范欣生² 朱悦³

摘要 **目的** 观察五拗汤对 PM2.5 复合卵蛋白(OVA)诱导加重哮喘小鼠模型的效应及 TRPA1 和 TRPV1 表达的影响。**方法** 将 90 只小鼠平均分为空白对照组、OVA + PM2.5 组、OVA 组、五拗汤低剂量组(2.1 g/kg)、五拗汤高剂量组(4.2 g/kg)、地塞米松组(0.75 mg/kg), 每组 15 只。给药组自造模第 29 天开始连续灌胃给药 14 天, 空白对照组、OVA + PM2.5 组、OVA 组同期给予生理盐水灌胃, 整个实验周期为 42 天。末次激发哮喘 24 h 后检测外周血中嗜酸性粒细胞(EOS)数量、肺泡灌洗液(BALF)中炎症细胞百分比; 检测气道阻力(RI)、肺动态顺应性(Cdyn)和肺组织损伤得分(TLIS); 测定 BALF 中 IL-13、P 物质(SP)、前列腺素 D₂(PGD₂)、神经生长因子(NGF)含量变化; 实时定量荧光 PCR(q-PCR)法检测肺组织 TRPA1、TRPV1 mRNA 水平; Western Blot 法检测肺组织 TRPA1、TRPV1 蛋白表达。**结果** 与空白对照组比较, OVA 组、OVA + PM2.5 组 EOS 计数及百分比、中性粒细胞(NE)百分比, RI、TLIS 值, IL-13、SP、PGD₂、NGF 水平, TRPA1 和 TRPV1 mRNA 及蛋白表达升高, 巨噬细胞(M ϕ)百分比、Cdyn 值降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 OVA + PM2.5 组比较, OVA 组 EOS 计数和百分比、IL-13、NGF 水平降低, M ϕ 百分比升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 五拗汤低剂量组 EOS 计数和百分比、NE 百分比, RI、TLIS 值, SP、NGF 水平降低, M ϕ 百分比升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 五拗汤高剂量组和地塞米松组 EOS 计数和百分比、NE 百分比, RI、TLIS 值, IL-13、SP、PGD₂、NGF 水平, TRPA1 和 TRPV1 蛋白表达均降低, M ϕ 百分比和 Cdyn 值升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 五拗汤高剂量组 TRPV1 mRNA 降低 ($P < 0.05$)。**结论** 五拗汤有改善 PM2.5 复合 OVA 诱导加重哮喘的作用, 并与调控 TRPA1 和 TRPV1 通道有关。

关键词 五拗汤; PM2.5; 哮喘; TRPA1; TRPV1

Effects of Wu'ao Decoction on the Expressions of TRPA1 and TRPV1 in Lung in PM2.5 and OVA Induced Severe Asthma Mice Model LIU Hong^{1,2}, FAN Xin-sheng², and ZHU Yue³ 1 Library of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023); 2 School of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023); 3 Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing (210023)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects of Wu'ao Decoction on severe asthma, as well as the gene and protein expressions of TRPA1 (transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1) and TRPV1 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1) in PM2.5 (particulate matter ≤ 2.5 micron) and ovalbumin (OVA) induced mice model. **Methods** Totally 90 mice were equally divided into control, OVA plus PM2.5, OVA, the high-dose of Wu'ao Decoction (4.2 g/kg), the low-dose of Wu'ao Decoction (2.1 g/kg) and dexamethasone (0.75 mg/kg) groups, 15 mice in each group. The medication groups were given the drugs by gavage for 14 consecutive days since day 29, while the control, OVA plus PM2.5, and OVA groups were given the same volume of normal saline. The entire experiment lasted for 42 days. 24 hours after the final gavage, eosinophil (EOS) counts in blood

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81473580, No. 81673864)

作者单位: 1. 南京中医药大学图书馆 (南京 210023); 2. 南京中医药大学基础医学院 (南京 210023); 3. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 (南京 210023)

通讯作者: 范欣生, Tel: 025-85811945, E-mail: fanxsh126@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20181218.237

and the ratio of various leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined. The values of airway resistance (RI) and dynamic lung compliance (C_{dyn}) in response to acetylcholine chloride (ACH) were evaluated. Levels of interleukin 13 (IL-13), substance P (SP), prostaglandin D₂ (PGD₂), nerve growth factor (NGF) in BALF were measured by ELISA. Lung tissue samples were taken for the determination of total lung injury score (TLIS), and the determination of gene and protein expressions of TRPA1 and TRPV1 by q-polymerase chain reaction (q-PCR) or Western Blot. Results Compared with the control group, the quantity and ratio of EOS, the ratio of neutrophil (NE), the values of RI and TLIS, the levels of IL-13, SP, PGD₂ and NGF, and the mRNA and protein expressions of TRPA1, TRPV1 were significantly increased, while the ratio of macrophages (M ϕ) and the C_{dyn} value were reduced in OVA and OVA plus PM2.5 groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with OVA plus PM2.5 group, the quantity and ratio of EOS, the levels of IL-13 and NGF were reduced, while the ratio of M ϕ were increased in OVA group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The quantity and ratio of EOS, the ratio of NE, the values of RI and TLIS, and the levels of SP and NGF were decreased, while the ratio of M ϕ were increased in WAD-L group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The quantity and ratio of EOS, the ratio of NE, the values of RI and TLIS, the levels of IL-13, SP, PGD₂ and NGF, and the protein expressions of TRPA1 and TRPV1 were reduced, while the ratio of M ϕ and the C_{dyn} value were increased in WAD-H and DM groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The WAD-H group reduced the mRNA expressions of TRPV1 ($P < 0.05$). Conclusion The effects of Wu'ao Decoction on severe asthma mice model induced by PM2.5 and OVA might be related to TRPA1/TRPV1 regulation and the relevant neurokinins.

KEYWORDS Wu'ao Decoction; PM2.5; asthma; TRPA1; TRPV1

哮喘发病机制复杂,空气污染物 PM2.5 (particulate matter ≤ 2.5 micron) 的增加促进了哮喘发生率持续上升。研究证实 PM2.5 主要通过导致气道炎症、氧化损伤、Th (helper T cell) 1/ Th2 细胞以及 Th17/ Treg (regulatory T cell) 细胞的失衡等几方面来加重气道病变^[1-4]。近年来发现瞬时感受器电位离子通道蛋白 (transient receptor potential ion channel protein, TRPs) 特别是 TRPA1 (transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1) 和 TRPV1 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1) 与哮喘发病关系密切^[5-8]。本研究前期建立了 PM2.5 复合卵蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导的哮喘模型,发现 PM2.5 加重了 OVA 诱导产生的哮喘症状,其炎症细胞浸润、气道反应性增高和肺组织病理损伤较单纯使用 OVA 造模效应严重,且肺组织 TRPA1、TRPV1 蛋白以及相关细胞因子、神经因子表达明显增加,表明 TRPs 通道在哮喘发病过程中发挥了重要的作用^[9]。

三拗汤具有宣肺平喘的功效,在临床上应用广泛,随着主治证候的不断变化,逐渐衍化形成三拗汤的系列方剂。明代闵道扬著《医学集要》记述了五拗汤,该方由三拗汤加味石膏、细茶组成。方中石膏、麻黄辛凉宣肺平喘;杏仁苦降肺气,甘草调和诸药,配以细茶清凉宣肺、解散火邪。诸药共奏宣肺平喘、清热化痰之功

效。为深入探讨五拗汤干预哮喘的作用,本研究在复制 PM2.5 复合 OVA 诱导加重哮喘模型的基础上,观察五拗汤对气道反应性、肺组织病理学、外周血和肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中炎症细胞的数量、比率以及 BALF 中细胞因子和神经因子水平的影响,探讨五拗汤干预哮喘的作用机理。

材料与方

1 动物 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠 90 只,体重 18 ~ 22 g,年龄 8 ~ 12 周。购自扬州大学比较医学中心,动物许可证号 SCXK (苏) 2012 - 0004。小鼠在实验室饲养适应 1 周,自由饮水,温度: (24 \pm 1) $^{\circ}$ C,湿度: 50% ~ 70%。动物实验参考《关于善待实验动物的指导性意见》。

2 药物 根据课题组前期正交试验结果以及参考临床常用剂量^[10],五拗汤中麻黄:杏仁:甘草:石膏:细茶 = 2:3:1:4:2,所有药材购于安徽省亳州市中药材交易市场 (批号分别: 20141030、20150227、20150318、20141211、20150129),由南京中医药大学药学院李伟东教授鉴定品种。经水煎后制成含生药 2 g/mL 药液。地塞米松片 (75 mg/片,上海信谊药厂有限公司生产,批号: 015140402)。

3 主要试剂及仪器 卵蛋白 (上海伯奥生物科技有限公司,批号: 150623); 氯化乙酰胆碱 (国药集团化

学试剂有限公司,批号:20141024);嗜酸性粒细胞(eosinophil, EOS)计数液、瑞吉氏染液(南京建成生物工程研究所,批号分别为:20140521、20150717)。IL-13、P 物质(substance P, SP)、前列腺素 D₂(prostaglandin D₂, PGD₂)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)试剂盒(上海韵涵生物科技有限公司,批号分别为: E20150428A、E20150714A、E20150727A、E20150728A);全蛋白抽提试剂盒(南京凯基生物科技有限公司,批号:20150819);SYBR 荧光实时定量试剂盒(瑞士 Roche 公司,批号:04913850001);TGX 快速制胶试剂盒(美国 Bio-Rad 公司,批号:20150823);逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号:RR047A);Anti-TRPA1 抗体、Anti-TRPV1 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为: AB58844、AB5370); β -Tubulin 抗体(美国 CST 公司,批号:2146);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号: DQ-111-01)、TRIzol RNA 提取试剂盒(上海翊圣生物技术有限公司,批号:15596-026)。XSP-4C 型生物显微镜(日本 Olympus 公司);Buxco 肺阻力检测 RC 系统(美国 Buxco 公司);Spectra MAX190 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);ABI7500 荧光实时定量 PCR 仪(美国 Invitrogen 公司);PowerPac Basic 垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);ChemiDoc XRS + 化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

4 动物分组、造模及干预方法 90 只小鼠采用完全随机分组的方法分为 6 组:空白对照组、OVA + PM2.5 组、OVA 组、五拗汤低剂量(OVA + PM2.5 + 五拗汤低剂量)组、五拗汤高剂量(OVA + PM2.5 + 五拗汤高剂量)组、地塞米松(OVA + PM2.5 + 地塞米松)组,每组 15 只。参照参考文献[9],造模过程分为致敏和激发两个阶段。致敏阶段:除空白对照组外,其余各组小鼠第 1.8 天腹腔和皮下各注射 0.5 mL 致敏液(OVA25 μ g + 氢氧化铝凝胶 2 mg)。激发阶段:将 OVA + PM2.5 组和各给药组小鼠在第 15 ~ 28 天以 5% OVA 雾化液每日雾化吸入激发 20 min,第 30 ~ 42 天以 5% OVA 雾化液隔日雾化吸入激发。第 29、33、37、41 天,OVA + PM2.5 组和各给药组小鼠给予气管滴注^[11]40 μ L PM2.5 溶液(1.6 mg/kg)。OVA 组在第 15 ~ 28 天以 OVA 每天一次雾化激发,第 30 ~ 42 天以 OVA 隔日雾化吸入激发。

各给药组于第 29 ~ 42 天分别给予五拗汤高剂量(4.2 g/kg),五拗汤低剂量(2.1 g/kg),地塞米松(0.75 mg/kg)灌胃,五拗汤高剂量参考人体临床等效量,高、低剂量浓度比为 2:1,OVA 雾化前 30 min 给

药,空白对照组、模型组给予等量的生理盐水,连续 14 天。实验过程中无动物死亡,各组动物体重无明显差异。

5 检测指标及方法 小鼠末次激发 24 h 后,以 0.1 mL/10 g 腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉,其中 5 只用于气道反应性检测,10 只小鼠取血、肺组织及肺泡灌洗液等。

5.1 外周血中 EOS 计数 小鼠眼眶取血 1 mL,取 20 μ L 血混匀于 0.38 mL EOS 计数液中,在 10 \times 10 倍镜下计数 10 个大方格中 EOS 数量并记录,采用公式:EOS/L = 10 个大方格中 EOS 数量 \times 20 \times 10⁶(个/L)^[12],计算外周血中 EOS 数量。

5.2 BALF 中炎症细胞计数 麻醉小鼠后打开胸腔,分离气管,结扎左支气管肺门,于环状软骨下方 1 cm 处剪一 V 型切口,插入无菌塑料管,以 0.5 mL PBS 缓冲液灌洗左肺 3 次,回收 BALF 1.0 ~ 1.2 mL。将回收的 BALF 以 1 000 r/min 室温下离心 10 min,吸出上清液,取沉淀涂片固定,瑞吉氏染液染色,在 10 \times 100 油镜下读取 200 个白细胞,统计各类白细胞:EOS、中性粒细胞(neutrophil, NE)、淋巴细胞(lymphocyte, LYM)、巨噬细胞(macrophages, M ϕ)的个数及比率。

5.3 气道反应性检测 采用 Buxco 肺阻力检测 RC 系统有创肺阻抗法^[13]。麻醉小鼠后,行气管插管,连接小动物呼吸机,呼吸机频率设为 120 r/min,通过测定小鼠气道气流和压力变化,得出小鼠气道阻力(airway resistance, RI)的变化。首先记录小鼠气道阻力的基础值 1 min;随后测定 10 μ L 倍增浓度的氯化乙酰胆碱(acetylcholine chloride, ACH)雾化激发小鼠气道后气道阻力的变化,每次雾化 30 s,记录 3 min。首次用 PBS 液调整基线,ACH 激发浓度由低到高,依次为 6.25、12.5、25、50 mg/mL,直到 RI 值增高较基础约 1 倍时停止激发,计算小鼠肺阻力(RI)和肺动态顺应性(dynamic lung compliance, Cdyn)随 ACH 浓度升高产生的变化数值。

5.4 肺组织病理学检测 小鼠采用颈椎脱臼法处死后,取其肺脏以 10% 福尔马林固定,石蜡包埋切片,厚度 4 μ m,HE 染色,光镜下观察肺组织的病理变化。参照 Underwood S^[14]的方法,使用半定量评分方法对每个动物的肺组织损伤进行评分:包括炎细胞浸润、支气管黏膜层损坏和支气管平滑肌增厚,分值为 0 ~ 4 个等级,0 为正常,4 为严重。将各项损伤分值求和即为总的肺组织损伤得分(total lung injury score, TLIS)。

5.5 BALF 中细胞因子和神经因子测定 采用

ELISA 法。按试剂盒操作要求检测 BALF 中 IL-13、SP、PGD₂ 和 NGF 水平。

5.6 肺组织 TRPA1、TRPV1 mRNA 检测 采用实时定量荧光 PCR(q-PCR)法。RNA 提取:取肺组织约 50 mg,加入 500 μL 的 TRIzol,操作按 TRIzol RNA 提取试剂盒所列步骤进行,提取的 RNA 保存于 -80 ℃。cDNA 的制备:经超微量核酸蛋白检测仪测定纯度和浓度,A_{260 nm}/A_{280 nm} 比值均在 1.8 ~ 2.0 之间。取 1 μg RNA,依据 TaKaRa 逆转录试剂盒的说明,进行逆转录操作,反应体系为获得 cDNA。使用荧光实时定量 PCR 仪测定 TRPA1、TRPV1 mRNA 转录水平表达。扩增共 40 个循环,条件为:维持阶段,50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min;循环阶段,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min。用 2^{-ΔΔCt} 计算基因的表达量,内参基因 GAPDH。以正常组样本为对照样本并设为 100%,计算其余各组基因表达差异。取五拗汤效应较优剂量进行 TRPA1、TRPV1 mRNA 检测。

表 1 各基因引物序列

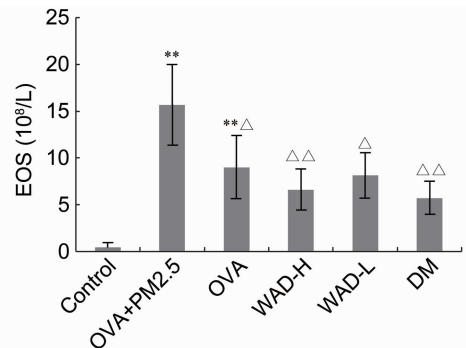
基因名称	引物序列 (5'-3')	退火温度 (℃)	产物大小 (bp)
TRPA1	F:ACGGCTACAGCAGGGAGACT R:ATGTCACTGGCTCCCTGGGT	59	190
TRPV1	F:CATTGCTCTCATGGCGAG R:AGTCATCCTTGCCCTCCGG	59	176
GAPDH	F:GGTGAAGGTCGGTGTGAAC R:TCGCTCCTGGAAGATGGTG	57	232

5.7 肺组织 TRPA1、TRPV1 蛋白表达检测 采用 Western Blot 法。按照全蛋白抽提试剂盒说明书提取各组小鼠肺组织蛋白。提取的蛋白使用 Bradford 方法进行定量,使每个样本蛋白含量为 50 μg,上样前要将样品于沸水中煮 5 min 使蛋白变性。将样本按照 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)凝胶电泳试剂盒说明书,每泳道 20 μL 蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,之后将蛋白转移到 PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜,以 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h,再用 PBST (phosphate buffered saline + tween-20) 洗涤 4 次。加入抗 TRPA1、TRPV1 一抗,以 β-Tubulin 抗体作为内参,4 ℃ 孵育过夜。PBST 洗涤 4 次后,再以辣根过氧化物酶结合的二抗室温孵育 2 h,PBST 洗涤 4 次后,用 ECL 显影液在室温下显色 5 min,然后使用 G:BOX chemiXR5 化学发光成像系统成像,所有结果使用 Gel-Pro32 软件进行分析。取五拗汤效应较优剂量进行 TRPA1、TRPV1 蛋白表达检测。

6 统计学方法 使用 SPSS 22.0 进行实验数据统计,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 One-Way-ANOVA,组间两两比较采用 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠外周血中 EOS 计数比较(图 1) 与空白对照组比较,OVA + PM2.5 组、OVA 组外周血中 EOS 计数升高(P < 0.01);与 OVA + PM2.5 组比较,OVA 组和各药物干预组 EOS 计数降低(P < 0.05, P < 0.01)。



注: control 为空白对照组;WAD-H 为五拗汤高剂量组;WAD-L 为五拗汤低剂量组;DM 为地塞米松组;与空白对照组比较,*P < 0.05,**P < 0.01;与 OVA + PM2.5 组比较,△P < 0.05,△△P < 0.01;下图同;n = 10

图 1 各组小鼠外周血中 EOS 计数比较

2 各组小鼠 BALF 中炎症细胞百分比计数比较(图 2) 与空白对照组比较,OVA + PM2.5 组、OVA 组 BALF 中 EOS、NE 百分比升高(P < 0.05, P < 0.01),Mφ 百分比降低(P < 0.01)。与 OVA + PM2.5 组比较,OVA 组和各药物干预组 EOS 百分比降低,Mφ 百分比升高(P < 0.05, P < 0.01);各药物组 NE 百分比亦降低(P < 0.05);各组 LYM 百分比比较,差异均无统计学意义(P > 0.05)。

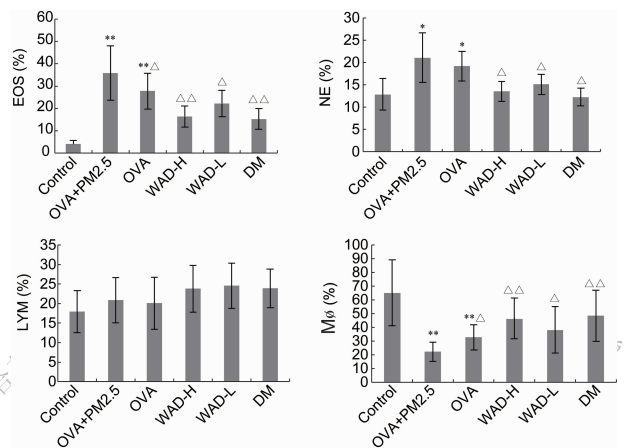
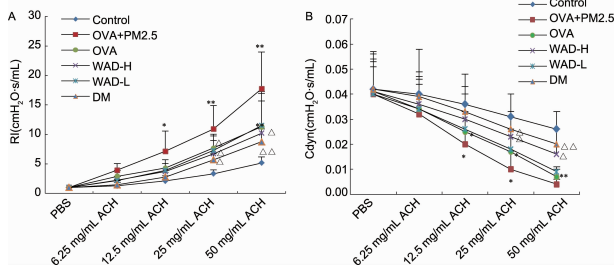


图 2 各组小鼠 BALF 中炎症细胞百分比比较 (n = 10)

3 各组小鼠气道反应性比较(图 3) 与空白对照组比较,OVA + PM2.5 组、OVA 组 RI 值明显升高,Cdyn 值明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 OVA + PM2.5 组比较,各给药组 RI 值降低,五拗汤高剂量组和地塞米松组 Cdyn 值升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

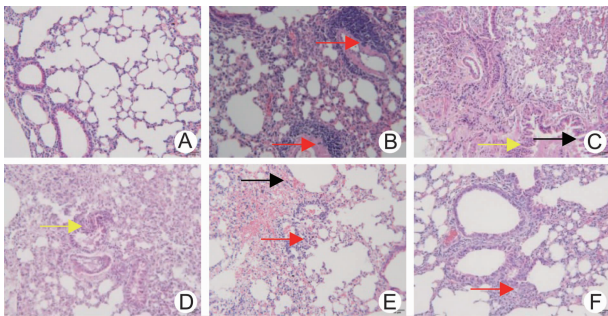


注:A 为各组小鼠 RI 比较图;B 为各组小鼠 Cdyn 比较图;

$n = 5$

图 3 各组小鼠气道反应性比较图

4 各组小鼠肺组织病理学变化比较(图 4、5) OVA + PM2.5 组、OVA 组支气管黏膜下层、肌层以及肺间质可见大量炎细胞浸润,支气管黏膜层损坏,支气管平滑肌厚度明显增加;各药物干预后肺支气管平滑肌增厚减轻,炎细胞浸润减少,支气管黏膜层损坏减轻。与空白对照组比较,OVA + PM2.5 组、OVA 组 TLIS 值升高($P < 0.01$);与 OVA + PM2.5 组比较,五拗汤低、高剂量和地塞米松组 TLIS 值降低($P < 0.05$)。



注:A 为空白对照组;B 为 OVA + PM2.5 组;C 为 OVA 组;D 为五拗汤高剂量组;E 为五拗汤低剂量组;F 为地塞米松组;红色箭头为炎细胞浸润;黄色箭头为支气管黏膜层损坏;黑色箭头为支气管平滑肌增厚; $n = 10$

图 4 各组小鼠肺组织病理学变化比较 (HE, $\times 200$)

5 各组小鼠 BALF 中 IL-13、SP、PGD₂、NGF 水平比较(图 6) 与空白对照组比较,OVA + PM2.5 组、OVA 组 BALF 中 IL-13、SP、PGD₂、NGF 水平升高($P < 0.01$)。与 OVA + PM2.5 组比较,OVA 组 IL-13、NGF 水平降低($P < 0.05$),五拗汤低剂量组 SP、NGF 降低($P < 0.05$),五拗汤高剂量组和地塞米松组

IL-13、SP、NGF、PGD₂ 水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

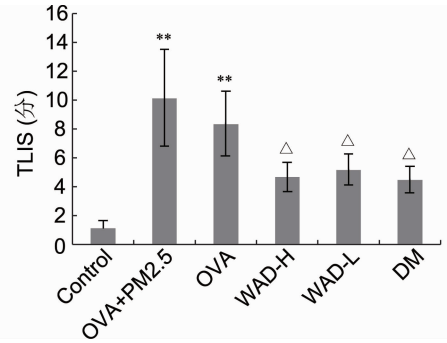
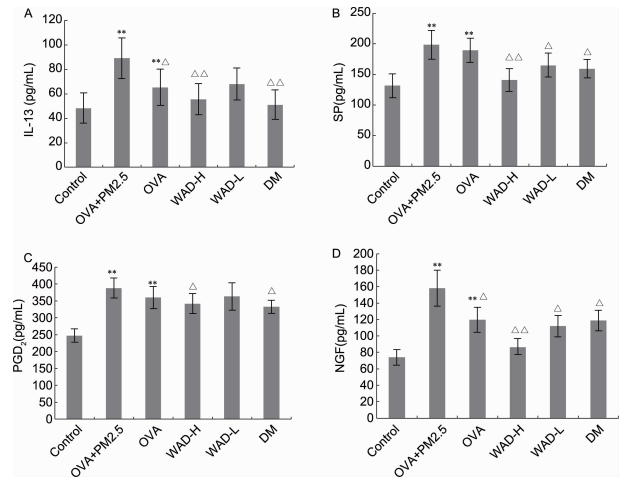


图 5 各组小鼠肺组织病理学改变比较 ($n = 10$)



注:A 为各组 IL-13 水平比较; B 为各组 SP 水平比较; C 为各组 PGD₂ 水平比较;D 为各组 NGF 水平比较; $n = 10$

图 6 各组小鼠 BALF 中 IL-13、SP、PGD₂、NGF 水平比较

6 各组小鼠肺组织 TRPA1、TRPV1 mRNA 比较(图 7) 与空白对照组比较,OVA + PM2.5 组、OVA 组小鼠肺组织 TRPA1、TRPV1 mRNA 表达增高($P < 0.05$)。与 OVA + PM2.5 组比较,药物干预组 TRPA1 mRNA 表达有下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$);五拗汤高剂量组 TRPV1 mRNA 表达降低($P < 0.05$)。

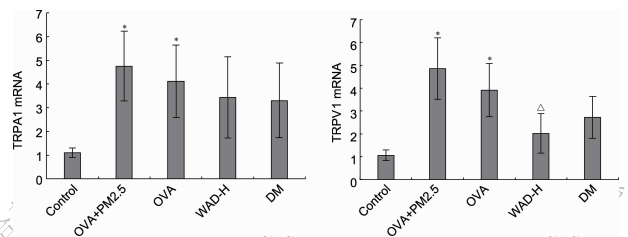


图 7 各组小鼠肺组织 TRPA1、TRPV1 mRNA 比较 ($n = 10$)

7 各组小鼠肺组织 TRPA1 和 TRPV1 蛋白表达比较(图 8、9) 与空白对照组比较,OVA + PM2.5 组和 OVA 组 TRPA1、TRPV1 蛋白表达升高($P < 0.01$)。与 OVA + PM2.5 组比较,五拗汤高剂量组、地塞米松组 TRPA1、TRPV1 蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

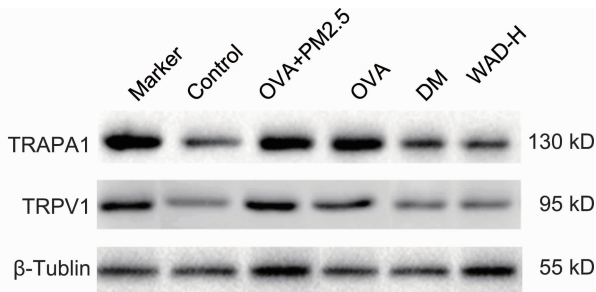


图 8 各组小鼠肺组织 TRPA1 和 TRPV1 蛋白表达

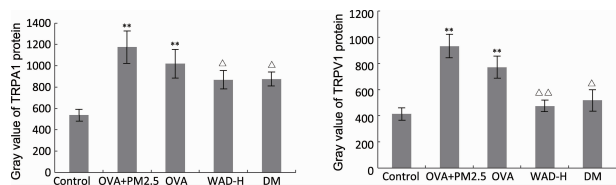


图 9 各组小鼠肺组织 TRPA1 和 TRPV1 蛋白表达比较 ($n = 10$)

讨 论

PM2.5 是空气动力学等效直径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 的颗粒物,含有多种无机和有机成分,无机成分主要包括元素碳、有机碳化合物、硫酸盐、硝酸盐、铵盐、各种金属元素等,有机成分中多环芳烃类化合物毒性较大。中医学认为 PM2.5 属于外邪侵袭^[15],机体大量吸入后,可致邪阻肺络、痰饮伏肺、肺失宣降。研究表明,PM2.5 可以使 OVA 诱导的 EOS 增多,哮喘小鼠肺部炎症加剧,杯状细胞增生及肺超微结构病变;PM2.5 能够显著增加 OVA 诱导的哮喘小鼠气道 Penh 值,明显提高 Th2 相关细胞因子 IL-4 和 IL-13 以及 BALF 中 TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-10 的水平,降低 INF- γ 水平^[16,17]。本研究中 OVA + PM2.5 组小鼠较 OVA 组 EOS 计数和百分比、IL-13、NGF 水平升高, M ϕ 百分比降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),充分证实 PM2.5 可以加重 OVA 诱导的哮喘效应,与笔者前期研究结果一致^[9]。

TRPA1 和 TRPV1 通道都是与温度感受相关的 TRPs 亚家族成员,能够激活气道感觉神经,介导燃烧产生的微粒物质导致的不良反应,每个通道的作用依赖于粒子的成分、剂量和沉积情况^[18]。TRPA1 通道可被 17 $^{\circ}\text{C}$ 以下的低温、机械力、环境刺激物激活,产生疼痛、机械损伤、神经炎症^[19]。TRPV1 通道主要感

受热(超过 43 $^{\circ}\text{C}$)、疼痛、外来刺激物(如辣椒素、柠檬酸、刺激性空气污染物)等伤害性刺激^[20]。文献报道 TRPA1 和 TRPV1 可以介导 Th2 类细胞因子上调造成机体免疫失衡^[20],支气管上皮细胞中 IL-13 因子亦可诱导产生 TRPV1^[21],TRPV1 神经纤维内含有 CGRP、SP 以及神经元型 NOS 等相关因子^[22],TRPV1 进一步损伤支气管上皮引起哮喘反应。气道内 PGD₂ 水平升高可能是哮喘患者气道高反应性的一个原因^[23],其代谢物 15-d PGJ₂ 通过激活 TRPA1 参与引起炎症疼痛和哮喘症状^[24]。NGF 可能通过激活 TRPA1、TRPV1 等受体诱导神经源性炎症参与诱发哮喘^[25]。本研究中 OVA + PM2.5 组与 OVA 组小鼠出现了 TRPA1、TRPV1 mRNA 和蛋白及相关因子 IL-13、SP、PGD₂、NGF 的高表达,其作用机制值得进一步深入探讨。结果提示 TRPs 通道与哮喘发病关系密切,推测 TRPs 通道可能在 PM2.5 诱导加重的哮喘病变中得以激活,介导产生肺组织功能的损害。

五拗汤为三拗汤加味石膏和细茶而来。其中石膏味辛、甘,性大寒,归肺、胃经。《名医别录》云:石膏能“除时气头痛身热,三焦大热,皮肤热,解肌发汗、止渴、消烦逆,暴气喘息,咽热”。石膏的主要成分为含水硫酸钙($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),还含有锌、铜、铁、锰等丰富的微量元素。现代药理研究表明,生石膏可抑制发热时过度兴奋的体温中枢,有强而快的退热作用^[26]。茶叶味甘、苦,性微寒,入心、肺、胃经。明代顾元庆《茶谱》中记载:“饮真茶能止渴、消食、除痰、少睡、利尿道、明目益思、除烦、去腻,人固不可一日无茶”。茶叶具有多种药用成分,如茶多酚、生物碱、茶多糖、维生素类、氨基酸等,其药理作用广泛,能够抑菌、提高免疫力、降血糖、降血压、抗血栓、抗动脉粥样硬化等^[27]。由于配伍了具寒凉药性的石膏和细茶,五拗汤除表现出与三拗汤共同的宣肺平喘功效外,还表现出清热化痰的作用。实验结果显示,OVA + PM2.5 组小鼠灌服五拗汤后,其气道炎症、气道高反应性和肺组织病变得到明显改善,且五拗汤高剂量组显著降低 TRPV1 mRNA、TRPA1 和 TRPV1 蛋白表达及相关因子 IL-13、SP、PGD₂、NGF 水平,且以抑制 TRPV1 蛋白表达更为显著,表明主要感受热刺激的 TRPV1 通道对具有清热功效的五拗汤更为敏感。

当然此研究也存在一些问题值得探讨。首先,TRPA1、TRPV1 阻断剂在 PM2.5 诱导加重哮喘模型中的效应需要与中药方剂进行对照研究。其次,五拗汤能够改善 PM2.5 复合 OVA 诱导加重哮喘小鼠的症状,降低 TRPV1 mRNA、TRPA1 蛋白和 TRPV1 蛋

白及相关因子的表达,而五拗汤调节 TRPs 通道及其递质的作用机制尚不明确,有待今后进一步深入探讨。

利益冲突: 本研究与其他基金项目 and 机构无利益冲突,作者之间、作者署名排序均无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Ogino K, Zhang R, Takahashi H, et al. Allergic airway inflammation by nasal inoculation of particulate matter (PM_{2.5}) in NC/Nga mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92710.
- [2] Shen Y, Zhang ZH, Hu D, et al. The airway inflammation induced by nasal inoculation of PM_{2.5} and the treatment of bacterial lysates in rats [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9816–9823.
- [3] Dobreva ZG, Kostadinova GS, Popov BN, et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in adolescents from Southeast Bulgarian cities with different levels of air pollution [J]. *Toxicol Ind Health*, 2015, 31(12): 1210–1217.
- [4] Thompson LC, Walsh L, Martin BL, et al. Ambient particulate matter and acrolein co-exposure increases myocardial dyssynchrony in mice via TRPA1 [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 1–14.
- [5] Tóth E, Tornóczky T, Kneif J, et al. Upregulation of extraneuronal TRPV1 expression in chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J]. *Rhinology*, 2018, 56(3): 245–254.
- [6] Song J, Kang J, Lin B, et al. Mediating role of TRPV1 ion channels in the Co-exposure to PM_{2.5} and formaldehyde of Balb/c mice asthma model [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11926–11937.
- [7] Baker K, Raemdonck K, Dekkak B, et al. Role of the ion channel, transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1), in allergic asthma [J]. *Respir Res*, 2016, 17(1): 67–86.
- [8] Lv H, Yue J, Chen Z, et al. Effect of transient receptor potential vanilloid-1 on cough hypersensitivity induced by particulate matter 2.5 [J]. *Life Sci*, 2016, 151: 157–166.
- [9] Liu H, Fan X, Wang N, et al. Exacerbating effects of PM_{2.5} in OVA-sensitized and challenged mice and the expression of TRPA1 and TRPV1 proteins in lungs [J]. *J Asthma*, 2017, 54(8): 807–817.
- [10] 汪珊珊, 范欣生, 徐立, 等. 基于正交试验的三拗汤配伍关系研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(20): 184–188
- [11] 宋锐, 王亚红, 邹宝安, 等. PM_{2.5} 对小鼠过敏性哮喘模型炎症反应的影响 [J]. *广东医科大学学报*, 2018, 36(2): 147–151.
- [12] 叶应妩, 王毓三主编, 中华人民共和国卫生部医政司编. 全国临床检验操作规程 [M]. 南京: 东南大学出版社, 1991: 8.
- [13] Galle-Treger L, Suzuki Y, Patel N, et al. Nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates ILC2-dependent airway hyperreactivity [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13202.
- [14] Underwood S, Foster M, Raeburn D, et al. Time-course of antigen-induced airway inflammation in the guinea-pig and its relationship to airway hyperresponsiveness [J]. *Eur Respir J*, 1995, 8(12): 2104–2113.
- [15] 李竹英, 师留杰, 高风丽. PM_{2.5} 与哮喘关系的中西医结合认识 [J]. *中国中医急症*, 2016, 25(12): 2316–2319.
- [16] He M, Ichinose T, Ren Y, et al. PM_{2.5}-rich dust collected from the air in Fukuoka, Kyushu, Japan, can exacerbate murine lung eosinophilia [J]. *Inhal Toxicol*, 2015, 27(6): 287–299.
- [17] Zhang XL, Zhong WQ, Meng QQ, et al. Ambient PM_{2.5} exposure exacerbates severity of allergic asthma in previously sensitized mice [J]. *J Asthma*, 2015, 52(8): 785–794.
- [18] Fariss MW, Gilmour MI, Reilly CA, et al. Emerging mechanistic targets in lung injury induced by combustion-generated particles [J]. *Toxicol Sci*, 2013, 132(2): 253–267.
- [19] 武阳. 瞬时受体电位通道和神经肽表达上调在甲醛诱导型支气管哮喘小鼠模型中的作用 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2013.
- [20] Gao MX, Nie CB, Li JY, et al. Design, synthesis and biological evaluation of N¹-(isoquinolin-5-yl)-N²-phenylpyrrolidine-1, 2-dicarboxamide derivatives as potent TRPV1 antagonists [J]. *Bioorg Chem*, 2018, 82: 100–108.
- [21] Rehman R, Bhat YA, Panda L, et al. TRPV1 inhibition attenuates IL-13 mediated asthma features in mice by reducing airway epithelial injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15(3): 597–605.
- [22] Matsumoto K, Hosoya T, Tashima K, et al. Distribution of transient receptor potential vanilloid 1 channel-expressing nerve fibers in mouse rectal and colonic enteric nervous system: relationship to peptidergic and nitrergic neurons [J]. *Neuroscience*, 2011, 172: 518–534.
- [23] Suto W, Ando Y, Hirabayashi T, et al. Prostaglandin D₂ induces Ca²⁺ sensitization of contraction without affecting cytosolic Ca²⁺ level in bronchial smooth muscle [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 3036–3046
- [24] Weng Y, Batista-Schepman PA, Barabas ME, et al. Prostaglandin metabolite induces inhibition of TRPA1 and channel-dependent nociception [J]. *Mol Pain*, 2012, 8(1): 75–88.
- [25] Chakrabarti S, Pattison LA, Singhal K, et al. Acute inflammation sensitizes knee-innervating sensory neurons and decreases mouse digging behavior in a TRPV1-dependent manner [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 143: 49–62.
- [26] 张晓乐, 吕冠华. 石膏药性功效辨析 [J]. *实用中医内科杂志*, 2018, 32(8): 1–4.
- [27] 李海琳, 成浩, 王丽鸳, 等. 茶叶的药用成分、药理作用及开发应用研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(31): 10833–10835.

(收稿: 2017-12-27 在线: 2019-01-24)

责任编辑: 白霞