

Study on the Effects of Couplet Medicine Baibu-Ziwan with Different Proportions on Cytokines Level of Type Th1/Th2 and Th17/Treg in Cough Variant Asthma Rats

Dengzhao Jiang¹, Huimin Li², Keyue Liu¹

¹Key Laboratory of Jiangxi University for the Systems Biology Clinical Application, School of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi

²School of Basic Medical Science, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi

Email: jiangdengzhao@126.com

Received: Jan. 20th, 2017; accepted: Feb. 2nd, 2016; published: Feb. 7th, 2017

Abstract

Objective: To study the antiasthma mechanism of couplet medicine Baibu-Ziwan and investigate the pharmacodynamic effects on the proportion compatibility. **Method:** Cough variant asthma (CVA) rats were established and orally administrated by the extractions of Baibu-Ziwan with different compatibility. The IL-4, INF- γ , IL-17 and IL-10 levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined by Elisa method and the numbers of inflammatory cells in BALF changes in lung were measured, respectively. The differences were tested among the groups by SPSS 19.0 software. **Results:** The levels of Th1/Th2 and Th17/Treg were both corrected after administration of the extractions of Baibu-Ziwan with inflammatory cells (eosinophil, lymphocytes and neutrophil) decreased in CVA group ($p < 0.05$). **Conclusion:** The antiasthma mechanism of couplet medicine Baibu-Ziwan on CVA rats may be related to the regulating imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg and the decreased infiltration of inflammatory cells, and the proportion compatibility had some influences on its pharmacodynamic effects.

Keywords

Couplet Medicine, Baibu-Ziwan, Cough Variant Asthma, Compatibility, Cytokines

不同配比组方的百部 - 紫菀药对咳嗽变异性哮喘大鼠Th1/Th2及Th17/Treg细胞因子平衡影响

姜登钊¹, 李辉敏², 刘可越¹

¹九江学院药学与生命科学学院, 江西省系统生物医学重点实验室, 江西 九江

²九江学院基础医学院, 江西 九江

Email: jiangdengzhao@126.com

收稿日期: 2017年1月20日; 录用日期: 2017年2月2日; 发布日期: 2017年2月7日

摘要

目的: 探讨药对百部-紫菀平喘作用机制并探索配伍比例对药效的作用影响。**方法:** 建立SD大鼠咳嗽变异性哮喘(CVA)模型, 灌胃百部-紫菀不同配伍比例提取物, 采用Elisa方法检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中IL-4, INF- γ , IL-17及IL-10含量, 并测定BALF中的炎性细胞变化, 比较组间差异。**结果:** 药对百部-紫菀给药后, CVA大鼠Th1/Th2及Th17/Treg水平失衡均得到部分纠正, 同时嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞等炎性细胞水平明显降低, 统计学显示具有显著性差异。配伍比例对药对的药效作用具有一定程度的影响, 配伍1:1时的药效作用最强。**结论:** 药对百部-紫菀对CVA大鼠的平喘机制与纠正Th1/Th2与Th17/Treg细胞平衡, 减轻炎性细胞浸润有关, 配伍比例对药对的药效作用具有一定程度的影响。

关键词

药对, 百部-紫菀, 变异性哮喘, 配伍, 细胞因子

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma, CVA)是支气管哮喘的一种特殊类型, 以慢性持续性干咳为主要临床表现。目前的研究表明 CVA 是典型哮喘的前体阶段, 大约 1/3-1/2CVA 患者最终会发展为典型哮喘, 严重危害人们的健康[1] [2] [3]。CVA 的发病机制及病理生理表现与典型哮喘相似, 均为多种炎性细胞和炎性介质参与的慢性呼吸道炎症性疾病[4]。百部-紫菀药对源自《医学心语》中方剂止嗽散, 临床常用其加减方治疗咳嗽变异性哮喘, 具有非常良好的疗效[5] [6]。止嗽散原方由百部、紫菀、陈皮等七味药物组成, 其中百部-紫菀为其核心药对, 属相须相使的协同配伍, 体现着该方药效的核心作用。现代研究表明除了 Th1/Th2 细胞因子比例和功能失衡在哮喘发病机制中具有重要意义, Th17/Treg 细胞因子的免疫失衡也是哮喘发病的重要机制之一[7]。本研究通过观察不同配伍比例百部-紫菀对 CVA 大鼠 Th1/Th2 及 Th17/Treg 细胞因子平衡的影响, 探讨药对的平喘作用机理并探索配伍比例对药对的药效作用影响。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只, 体重 200~260 g, 购自湖北省实验动物研究中心(SCXK(鄂)2008-0005)。

2.2. 试剂与药物

百部, 紫菀均购自于九江市开心人大药房, 经九江学院高春华教授分别鉴定为对叶百部 *Stemona*

tuberosa Lour., 紫菀 *Aster tataricus* L.f.。两味药材粉碎后分别按比例(1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 2:1)经过蒸馏水浸泡 0.5 h 后, 煮沸提取, 第一次提取 1 h, 第二次提取 0.5 h, 合并两次的提取液, 提取液水浴浓缩至原生药量含量为 3.6 g/ml。氢氧化铝为天津市科密欧化学试剂有限公司产品, 以去离子水制成 10% 佐剂; 卵蛋白(OVA)为美国 Sigma 公司产品, 用去离子水配成 1% 浓度的使用液, 溶入 10% 佐剂, 制成浓度为 1 mg/mL 的溶液。细胞因子 IL-4, INF- γ , IL-17, IL-10 检测试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。

2.3. CVA 大鼠模型制备

健康 SD 大鼠经过 3 天适应后, 以新配制的卵蛋白皮下注射, 分别在两后足跖、腹股沟、腰、背、颈部共取 10 处, 每处皮下注射 0.05 mL, 同时腹腔注射 0.5 mL, 合计 1 mL, 1 周后重复 1 次, 加强致敏效果。造模大鼠第 15 天置于 4 L 的玻璃罩内, 以 400 mmHg 的超声雾化恒压喷入 1% 的卵蛋白溶液 20 min 激发大鼠哮喘, 以大鼠腹肌出现明显收缩, 并出现呼吸加深、加快等呼吸道痉挛症状, 提示造模成功[8]。

2.4. 实验分组及动物干预方法

随机分为 7 组, 分别为正常对照组, 模型组, 百部组, 紫菀组, 百部 - 紫菀(1:1)组, 百部 - 紫菀(1:2)组, 百部 - 紫菀(2:1)组, 每组 10 只。百部组, 紫菀组给药浓度为 18 g 生药/kg(相当于成人临床用量 20 倍), 百部 - 紫菀药对各组给药浓度为 36 g 生药/kg(相当于成人临床用量 20 倍), 每天一次; 正常对照组、模型对照组以蒸馏水灌胃, 每天一次。

2.5. 实验样本获取与处理

大鼠造模成功后, 各实验组大鼠按实验剂量给药, 实验第 14 天处死大鼠, 剪开颈部皮肤, 于气管正中处剪开小口, 插入气管套管, 以磷酸盐缓冲溶液行支气管肺泡灌洗, 来回冲洗 3 次, 收集支气管肺泡灌洗液(BALF)。涡旋混合混匀 BALF, 取 50 μ l 加入等量的白细胞计数液, 以细胞计数板计数炎性细胞。剩余灌洗液冷冻离心, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, -80°C 冰箱低温保存。

2.6. 动物状况观察

观察实验期间各组大鼠的呼吸频率、精神、饮食、活动、毛发、大小便等一般情况。

2.7. 细胞因子 IL-4, INF- γ , IL-17, IL-10 水平的检测

采用酶联免疫吸附法进行测定相关细胞因子水平, 具体操作按照试剂盒说明书进行。

2.8. 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 数据以均数 \pm 标准偏差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示, 组间比较方差齐性者用 LSD 检验、方差不齐性者用 Dunnett's 检验, 以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 大鼠一般情况

正常组大鼠反应正常, 体重均有所增长(平均增重约 15%), 其他未见异常情况, 模型组大鼠经抗原激发后出现躁动不安, 打喷嚏, 呼吸急促, 饮水量增多, 食量减少, 反应迟钝, 活动明显减少, 毛色发黄并且掉毛, 体重减轻(平均减重约 10%)。百部组大鼠症状较模型组较好, 活动、反应、饮食与正常组相仿, 体重有所增长; 而紫菀组大鼠仍具有部分模型组大鼠症状, 活动较少, 呼吸急促, 体重减轻。百部 - 紫菀药对各组大鼠的上述症状明显好于模型组及紫菀组, 活动、反应、饮食与正常组几乎无差异,

体重有所增长(平均增重约 10%)。

3.2. BALF 中炎性细胞计数

各实验组大鼠炎性细胞总数和中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞计数见表 1。模型对照组大鼠 BALF 中炎性细胞总数和中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞计数较正常对照组明显升高, 相比较差异均具有统计学意义($p < 0.05$); 百部组, 紫菀组, 百部-紫菀(1:1)、百部-紫菀(1:2), 百部-紫菀(2:1)组大鼠 BALF 中炎性细胞总数和中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞计数均较模型对照组明显降低, 相比较差异均具有统计学意义($p < 0.05$); 百部-紫菀药对各给药组间差异并不具有统计学意义($p > 0.05$), 但各药组与单味药组相比炎性细胞总数和中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞计数均显著降低, 差异均具有统计学意义($p < 0.05$)。

3.3. BALF 中细胞因子 INF- γ , IL-4, IL-17, IL-10 水平

各实验组大鼠 BALF 中细胞因子 INF- γ , IL-4, IL-17, IL-10 水平见表 2。与空白对照组相比, 模型对照组大鼠 BALF 中 INF- γ , IL-10 水平明显降低, IL-4, IL-17 水平明显升高, INF- γ /IL-4 比值明显降低,

Table 1. The number of inflammatory cells, eosinophil, lymphocytes and neutrophil ($\times 10^6/L$, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

表 1. 各实验组大鼠炎性细胞总数和嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞计数($\times 10^6/L$, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	炎性细胞总数	嗜酸性粒细胞	淋巴细胞	中性粒细胞
空白对照组	10.12 \pm 3.52	1.34 \pm 0.62	1.28 \pm 0.34	0.24 \pm 0.13
模型组	38.43 \pm 6.06 ^a	5.94 \pm 0.78 ^a	3.45 \pm 0.53 ^a	1.42 \pm 0.33 ^a
百部组	25.63 \pm 5.24 ^{ab}	3.47 \pm 0.81 ^{ab}	2.65 \pm 0.56 ^{ab}	1.01 \pm 0.37 ^{ab}
紫菀组	26.32 \pm 5.39 ^{ab}	3.94 \pm 0.68 ^{ab}	2.68 \pm 0.61 ^{ab}	1.12 \pm 0.43 ^{ab}
百部-紫菀药对组(1:1)	16.75 \pm 4.81 ^{abcd}	2.34 \pm 0.58 ^{abcd}	2.25 \pm 0.57 ^{abcd}	0.48 \pm 0.18 ^{abcd}
百部-紫菀药对组(1:2)	18.85 \pm 3.23 ^{abcd}	2.84 \pm 0.89 ^{abcd}	2.32 \pm 0.84 ^{abcd}	0.54 \pm 0.24 ^{abcd}
百部-紫菀药对组(2:1)	17.15 \pm 4.54 ^{abcd}	2.32 \pm 0.75 ^{abcd}	2.16 \pm 0.27 ^{abcd}	0.67 \pm 0.25 ^{abcd}

注: 与空白对照组比较 a $p < 0.05$; 与模型组比较 b $p < 0.05$; 与百部组比较 c $p < 0.05$; 与紫菀组比较 d $p < 0.05$ 。

Table 2. The level of INF- γ , IL-4, IL-17, IL-10 and INF- γ /IL-4, IL-17/IL-10 in the rats BALF of experimental groups (pg/ml, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

表 2. 各实验组大鼠 BALF 中 INF- γ , IL-4, IL-17, IL-10 及 INF- γ /IL-4, IL-17/IL-10 水平($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	INF- γ	IL-4	IL-17	IL-10	INF- γ /IL-4	IL-17/IL-10
空白对照组	24.76 \pm 0.50	12.01 \pm 0.61	20.16 \pm 1.25	25.35 \pm 1.56	2.06 \pm 0.094	0.79 \pm 0.11
模型组	14.40 \pm 0.85 ^a	27.60 \pm 0.80 ^a	32.57 \pm 3.45 ^a	12.60 \pm 0.97 ^a	0.52 \pm 0.041 ^a	2.58 \pm 0.23 ^a
百部组	17.25 \pm 1.12 ^b	23.03 \pm 0.76 ^b	27.32 \pm 1.18 ^b	14.07 \pm 1.13 ^b	0.75 \pm 0.036 ^b	1.94 \pm 0.17 ^b
紫菀组	17.28 \pm 1.18 ^b	24.13 \pm 0.82 ^b	26.21 \pm 1.35 ^b	13.69 \pm 1.83 ^b	0.72 \pm 0.026 ^b	1.91 \pm 0.14 ^b
百部-紫菀药对组(1:1)	21.42 \pm 1.06 ^{bcd}	16.08 \pm 0.73 ^{bcd}	23.48 \pm 1.46 ^{bcd}	21.07 \pm 2.13 ^{bcd}	1.33 \pm 0.047 ^{bcd}	1.11 \pm 0.12 ^{bcd}
百部-紫菀药对组(1:2)	18.85 \pm 1.23 ^b	16.84 \pm 0.89 ^{bcd}	26.34 \pm 1.53 ^b	19.84 \pm 1.79 ^{bcd}	1.12 \pm 0.084 ^{bcd}	1.32 \pm 0.13 ^{bcd}
百部-紫菀药对组(2:1)	20.15 \pm 1.54 ^{bcd}	16.32 \pm 0.75 ^{bcd}	27.14 \pm 1.84 ^b	17.38 \pm 1.65 ^{bcd}	1.23 \pm 0.057 ^{bcd}	1.56 \pm 0.13 ^{bcd}

注: 与空白对照组比较 a $p < 0.05$; 与模型组比较 b $p < 0.05$; 与百部组比较 c $p < 0.05$; 与紫菀组比较 d $p < 0.05$; 百部-紫菀药对组间比较 (1:1 与 1:2) e $p < 0.05$, (1:1 与 2:1) f $p < 0.05$ 。

IL-17/IL-10 比值明显升高, 相比较差异均具有统计学意义($p < 0.05$); 与模型组比较, 各组大鼠 BALF 中 INF- γ , IL-10 水平明显升高, IL-4, IL-17 水平明显降低, INF- γ /IL-4 比值明显升高, IL-17/IL-10 比值明显降低, 相比较差异均具有统计学意义($p < 0.05$); 各药对组与单味药组相比, INF- γ /IL-4 比值明显升高, IL-17/IL-10 比值明显降低, 相比较差异均具有统计学意义($p < 0.05$), 说明配伍增强了药效作用; 百部-紫菀药对各给药组间 INF- γ /IL-4 差异并不具有统计学意义($p > 0.05$), 配伍 1:1 组药效作用最强, 但给药组间 IL-17/IL-10 差异具有统计学意义($p < 0.05$), 配伍 1:1 组药效作用最强, 说明配伍比例对于 Th17/Treg 细胞因子平衡具有一定的影响。

4. 讨论

哮喘是由多种炎性细胞、细胞因子和炎性介质共同参与的气道慢性非特异性炎症性疾病, 其关键的效应细胞是嗜酸性粒细胞和 Th 细胞[9]。目前的研究表明, Th1/Th2 细胞因子的失衡是哮喘发病的重要机制[10][11], 纠正 Th1/Th2 免疫失衡是治疗哮喘的重要途径; 但目前也有较多研究发现哮喘的发病机制已不能单纯用 Th1/Th2 平衡理论来解释, Th17/Treg 细胞因子的失衡在哮喘的发病过程中同样存在重要作用[12][13]。IL-4 是 Th2 型特征性细胞因子, 可诱导 Th2 细胞分化, 产生 IgE, 参与哮喘变态反应炎症的发生发展; IFN- γ 为 Th1 型细胞的特征性细胞因子, 可抑制 Th2 型细胞因子的产生, 诱导 Th1 细胞分化, 阻断 IgE 的合成, 并且可有效地活化单核巨噬细胞, 促进其杀伤力[14]; IL-17 是 Th17 型特征性细胞因子, 可诱导上皮细胞、内皮细胞等分泌 IL-6、IL-8, 增强 IL-1 及肿瘤坏死因子的功能, 在炎症的发生发展过程中起促进作用[15], 且与气道高反应程度呈正相关关系; IL-10 是 Treg 型特征细胞因子, 可通过抑制活化中性粒细胞和嗜酸性粒细胞产生促炎因子和趋化因子如 IL-1、IL-6、IL-8 等表达, 改善气道炎症反应[16]。

百部-紫菀药对是止嗽散复方的核心配伍, 而复方配伍比例对于复方药效作用具有重要的影响[17][18]。为了阐明药对百部-紫菀的平喘机制, 本研究通过观察百部、紫菀单味药及不同配伍比例百部-紫菀对 CVA 大鼠 Th1/Th2 及 Th17/Treg 细胞因子平衡的影响, 探讨药对的平喘作用机理并探索配伍及配比药对的药效作用影响, 并为止嗽散复方的平喘机理研究奠定基础。研究表明模型组大鼠可见明显的 Th1/Th2 及 Th17/Treg 平衡失调, 同时嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞等炎性细胞水平明显升高, 统计学显示具有显著性差异; 药对百部-紫菀给药后, 大鼠 Th1/Th2 及 Th17/Treg 水平平衡均得到部分纠正, 同时嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞等炎性细胞水平明显降低, 统计学显示具有显著性差异。实验结果同时显示药对的药效作用明显强于单味药物, 表明配伍确实增强了药物的药效作用, 而配伍比例差异对药对的药效作用同样具有一定程度的影响, 配伍 1:1 的药效作用是相对较强的, 虽然对 Th1/Th2 水平的影响不具有显著性差异, 但对 Th17/Treg 水平具有显著性差异, 提示其平喘机制与纠正 Th1/Th2 与 Th17/Treg 细胞平衡, 减轻炎性细胞浸润有关, 而对 Th17/Treg 细胞平衡的影响值得进一步探讨。

基金项目

国家自然科学基金项目(81560642); 江西省自然科学基金项目(20142BAB205081)。

参考文献 (References)

- [1] 许东风. 变异性哮喘临床分析[J]. 现代预防医学, 2007, 34(1): 199.
- [2] Niimi, A. (2008) Cough Variant Asthma: A Major Cause of Chronic Cough. *Clinical Pulmonary Medicine*, **15**, 189-196. <https://doi.org/10.1097/CPM.0b013e31817e3059>
- [3] Niimi, A., Ohbayashi, H., Sagara, H., et al. (2013) Cough Variant and Cough-Predominant Asthma Are Major Causes of Persistent Cough: A Multicenter Study in Japan. *Journal of Asthma*, **50**, 932-937.

<https://doi.org/10.3109/02770903.2013.823444>

- [4] 赵一菊, 肖正伦. 咳嗽变异性哮喘的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(13): 2067-2069.
- [5] 胡军旗, 郎雅丽, 张副兴, 等. 止嗽散治疗咳嗽变异性哮喘疗效评价[J]. 中医学报, 2015, 30(3): 333-336.
- [6] 洗峰. 止嗽散加味治疗咳嗽变异性哮喘 43 例临床观察[J]. 中医药导报, 2014, 20(3): 95-96.
- [7] Shi, Y.H., Shi, G.C., Wan, H.Y., *et al.* (2011) Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg Imbalances in Patients with Allergic Asthma. *Chinese Medical Journal*, **124**, 1951-1956.
- [8] 梁建卫, 张玉振, 梁敏. 疏肝化痰养阴清肺方对 CVA 大鼠 IL-6、IL-8 的实验研究[J]. 生物医学工程研究, 2009, 28(2): 148-150.
- [9] 徐姗, 苏梦琪, 吕伟红, 等. 异丁斯特对支气管哮喘豚鼠 Th2 型细胞因子白介素 4、白介素 13 及嗜酸粒细胞趋化因子的影响[J]. 中华哮喘杂志, 2009, 3(5): 346-350.
- [10] 胡鑫, 沈唯薇. 难治性哮喘中 Th1/Th2 失衡机制[J]. 华西医学, 2011, 26(9): 1428-1431.
- [11] Dechene, L. (2002) Th1/Th2 Immune Response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **110**, 539-540. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.127436>
- [12] Estelle, B., Yijun, C., Wenda, G., *et al.* (2006) Reciprocal Developmental Pathways for the Generation of Pathogenic Effector TH17 and Regulatory T Cells. *Nature*, **441**, 235-238. <https://doi.org/10.1038/nature04753>
- [13] 黄东晖, 吴少丽, 王慧贤, 等. 喘可治注射液通过调节 Th17/Treg 平衡抑制哮喘模型小鼠气道炎症的实验研究[J]. 中药材, 2014, 37(3): 478-481.
- [14] Choi, I.S., Cui, Y., Koh, Y.A., *et al.* (2008) Effects of Dehydroepiandrosterone on Th2 Cytokine Production In peripheral Blood Mononuclear Cells from Asthmatics. *The Korean Journal of Internal Medicine*, **23**, 176-181. <https://doi.org/10.3904/kjim.2008.23.4.176>
- [15] Aggarwal, S. and Gurney, A.L. (2002) IL-17: Prototype Member of an Emerging Cytokine Family. *Journal of Leukocyte Biology*, **71**, 1-8.
- [16] 上官文姬. 支气管哮喘免疫学发病机制的研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2009, 29(3): 602-606.
- [17] 谭晓梅, 郭阳, 余林中, 等. 麻黄-杏仁药对配伍及不同配比对急性毒性及平喘作用的影响[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 82-84.
- [18] 襄萍, 徐朝晖, 战光绪, 等. 药对麻黄地龙配比及平喘作用机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 236-239.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: pi@hanspub.org