

# 防哮方对慢性哮喘大鼠 IL-6 mRNA、TNF- $\alpha$ mRNA 表达的影响

刘敏<sup>1</sup>, 宣桂琪<sup>2</sup>, 周星星<sup>1</sup>, 宣晓波<sup>2</sup>, 阮晓琳<sup>1</sup>

1. 浙江中医药大学第一临床医学院儿科, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学附属第一医院儿科, 浙江 杭州 310006

**[摘要]** 目的: 探讨临床经验方防哮方对慢性哮喘模型大鼠白细胞介素-6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 表达的影响。方法: 将 48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分成 6 组, 每组 8 只, 分别为正常组、模型组、中药低、中、高剂量组及地塞米松组。除正常组外, 其他各组通过腹腔注射和雾化吸入卵蛋白 (OVA) 制备慢性哮喘大鼠模型, 造模成功后, 分别灌胃相应药物。末次给药 24 h 后取材并观察肺组织中 IL-6 mRNA 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达及肺脏病理学变化。结果: 与正常组比较, 模型组及中药各剂量组、地塞米松组 IL-6 mRNA 的相对表达量都有所升高, 模型组 TNF- $\alpha$  mRNA 的相对表达量明显升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 中药各剂量组、地塞米松组 IL-6 mRNA 的相对表达量均明显下降, 中药各剂量组与地塞米松组 TNF- $\alpha$  mRNA 的相对表达量均明显下降, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与地塞米松组比较, 中药各剂量组 IL-6 mRNA 相对表达量较高, 中药低、中剂量组 TNF- $\alpha$  mRNA 的相对表达量较高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 慢性哮喘模型大鼠 IL-6 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 表达已出现异常, 防哮方能减少 IL-6 mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 的表达, 从而明显改善慢性哮喘大鼠炎症反应。

**[关键词]** 防哮方; 支气管哮喘; 白细胞介素-6 (IL-6); 肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ); 动物实验; 大鼠

**[中图分类号]** R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 01-0015-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.01.005

## Fangxiao Prescription on Expression of IL-6 mRNA and TNF- $\alpha$ mRNA of Rats with Chronic Asthma

LIU Min, XUAN Guiqi, ZHOU Xingxing, XUAN Xiaobo, RUAN Xiaolin

**Abstract:** Objective: To discuss the effect of Fangxiao prescription—a clinical experience prescription on expression of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) of model rats of chronic asthma. Methods: Divided 48 male SD rats in SPF (specific pathogen free) grade into 6 groups randomly, 8 cases in each group. They were normal group, model group, Chinese medicine low dosage group, middle dosage group and high dosage group as well as dexamethasone group. Except for the normal group, the rat models of chronic asthma were established in other groups by ovalbumin intraperitoneal injection and atomization inhalation. After the models were successfully established, rats in other groups were respectively given the medicine by gavage. Twenty-four hours after the last administration, drew materials and observed the expression of IL-6 mRNA and TNF- $\alpha$  mRNA in lung tissue as well as pathological changes. Results: Comparing with normal group, relative expression levels of IL-6 mRNA and TNF- $\alpha$  mRNA in model group, Chinese medicine of different dosage groups and dexamethasone group were increased, and relative expression levels of TNF- $\alpha$  mRNA in model group was raised obviously, differences being significant ( $P < 0.05$ ). Comparing with model group, relative expression levels of IL-6 mRNA in Chinese medicine of different dosage groups and dexamethasone group were decreased significantly, and relative expression levels of TNF- $\alpha$  mRNA in Chinese medicine of different dosage groups and dexamethasone groups were declined evidently, differences being significant ( $P < 0.05$ ). Relative expression levels of IL-6 mRNA was higher in Chinese medicine of different dosage groups, and relative expression levels of TNF- $\alpha$  mRNA in Chinese low dosage and middle dosage group were higher, comparing with those in dexamethasone group ( $P < 0.05$ ). Conclusion: Expression of IL-6 mRNA and TNF- $\alpha$  mRNA of model rats of chronic asthma has been abnormal. Fangxiao prescription can reduce the expression of IL-6 mRNA and TNF- $\alpha$  mRNA, so as to significantly improve inflammatory reaction of rats with chronic asthma.

**[收稿日期]** 2016-07-13

**[基金项目]** 浙江省自然科学基金资助项目 (LY15H270004); 国家自然科学基金面上项目 (81574023)

**[作者简介]** 刘敏 (1991-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 小儿呼吸免疫系统疾病中医药防治研究。

**[通讯作者]** 陈健, E-mail: chenjj670@163.com。

Keywords: Fangxiao prescription; Asthma; Interleukin-6 (IL-6); Tumor necrosis factor(TNF- $\alpha$ ); Animal experiment;

Rats

支气管哮喘(Bronchial Asthma)是一种以慢性气道炎症为特征的异质性疾病,具有喘息、气促、胸闷和咳嗽等呼吸道症状病史,呼吸道症状和强度可随时间变化,伴有可变的呼气气流受限<sup>[1]</sup>。近年来其发病率呈上升趋势,对社会造成的负担不断增加,因此,儿童哮喘的防治在儿科疾病的研究中显得尤为重要。防哮方是全国老中医药专家、浙江省名中医宣桂琪教授治疗儿童哮喘的经验方,本方由生脉散合六君子汤加减而成,具有益气养阴、健脾清肺化痰的功效,临床上治疗缓解期哮喘有着明显的疗效,能明显减少患儿急性发作的次数、减轻急性发作时的病情严重程度。本研究采用慢性哮喘大鼠模型,检测肺组织白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )mRNA的表达,探讨防哮方减轻或预防哮喘发作的可能作用机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 6周龄 SPF 级 SD 大鼠 48 只,雄性,体重(150 $\pm$ 20)g,来源于中科院上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK(沪)2012-0002];饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障环境中[SXYK(浙)2008-0116];正常饲料喂养,自由饮水。动物实验通过了本校动物伦理委员会的审批。环境温度:20~22 $^{\circ}$ C,相对湿度:40%~60%。将48只SPF级雄性SD大鼠用SPSS 19.0软件随机分成6组,每组8只,分别为正常组、模型组、中药低、中、高剂量组及地塞米松组。

1.2 实验药物 防哮方:南沙参、北沙参、姜半夏、生白芍、党参、白术各6g,麦冬9g,地骨皮3g,生石决明、茯苓各10g,陈皮5g(由浙江中医药大学第一附属医院中药房提供)。委托浙江中医药大学制剂室专业人员制剂浓缩至生药浓度2g/mL,置于4 $^{\circ}$ C冰箱备用。醋酸地塞米松片:7.5mg/片,浙江仙琚制药股份有限公司,国药准字:H33020822,批号:1410202。0.9%氯化钠注射液,规格:250mL/瓶,北京费森尤斯卡比医药有限公司,批准文号:国药准字H11021103。

1.3 主要试剂 卵白蛋白(Grade I);氢氧化铝凝胶(美国Sigma);超纯RNA提取试剂(TaKaRa Code D9108B);反转录试剂盒(TaKaRa code DRRO47A);Real-time PCR 试剂盒(TaKaRa code DRR420A);5x RNA Loading Buffer(TaKaRa code DRR420A)。

1.4 主要仪器 泵雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司);包埋机(德国MICROM);半自动石蜡切片机(德国MICROM);自动染色机(德国Leica);Q5型实时荧光定量PCR仪(美国BIO-Rad公司);微量核算测定仪(Thermo)。

1.5 模型的建立 参照文献[2]并加以改进制备慢性哮喘模型,致敏、激发阶段:除正常组外,其余各组大鼠分别于实验的第1、8天在腹腔、前后腿内侧4点各注射0.2mL OVA致敏。第15天开始,用泵雾化器于自制简易的雾化箱中以一定浓度

的OVA生理盐水溶液雾化激发大鼠,每次30min,隔天1次,持续8周。激发的浓度分别为第1、2周1%,第3、4周1.5%,第5、6周2%,第7、8周2.5%。

1.6 动物给药 根据体表面积法<sup>[3]</sup>计算大鼠用药量,大鼠等效给药量(g/Kg)=6.25 $\times$ 成人给药量(g/kg),第9周开始,中药低、中、高剂量组给药剂量以等效给药量的0.5倍、1倍、2倍给药,分别为4g/(kg $\cdot$ d)、8g/(kg $\cdot$ d)、16g/(kg $\cdot$ d),每天1次,连续2周,观察不同剂量中药的干预作用;而正常组、模型组不给中药,予以等量生理盐水代替药物灌胃,每天1次,连续2周;地塞米松组则予以地塞米松0.75mg/(kg $\cdot$ d)灌胃,每天1次,连续2周作为阳性对照。

1.7 肺组织的采集 麻醉处死大鼠后,取大鼠右肺用PBS洗净,润干,存放至冻存管后迅速投入液氮冷冻,再转移至-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用,用于RT-PCR的检测;取左肺大叶存放至10%中性甲醛液中,石蜡包埋,切片,用于HE染色,留取做病理检测。

1.8 检测方法 采用RT-PCR法检测肺组织中IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA的表达。提取总RNA并测定浓度,按TaKaRa逆转录试剂盒操作方法进行反转录。反转录反应条件:37 $^{\circ}$ C 15min,85 $^{\circ}$ C 5s。按TaKaRa荧光定量试剂盒操作方法进行PCR扩增,引物序列分别是IL-6 F:5'-CACTTCACAAGTCGGAGGCT-3',IL-6 R:5'-TCTGACAGTGCATCATCGCT-3',产物大小为114bp;TNF- $\alpha$  F:5'-CATGGATCTCAAA GACAACCAA-3',TNF- $\alpha$  R:5'-CTCCTGGTATGAAATGG CAAAT-3',产物大小为145bp; $\beta$ -actin F:5'-ACTCTGTG TGGATTGGTGTC-3', $\beta$ -actin R:5'-AGAAAGGGTGTA AACGCAGC-3',产物大小为155bp。扩增反应条件:95 $^{\circ}$ C 5min预变性后开始循环,共循环40次(95 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 45s),溶解曲线:从55 $^{\circ}$ C开始,每30s升高0.5 $^{\circ}$ C,直到95 $^{\circ}$ C,循环1次。全部反应信息由BIO-Rad iQ5PCR仪收集,按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量计算公式,计算出各样品目的基因相对定量结果。

1.9 统计学方法 采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,所有计量数据均采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用ANOVA方差分析,方差齐性用LSD方法,方差不齐用Tamhane's T2方法,不符合正态分布采用非参数检验。

## 2 结果

2.1 各组大鼠肺组织中IL-6 mRNA的表达结果比较 见表1。与正常组比较,模型组及中药各剂量组、地塞米松组IL-6 mRNA的相对表达量都有所升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,中药各剂量组、地塞米松组IL-6 mRNA的相对表达量均明显下降,差异均有统计学意义( $P <$

0.05)。与地塞米松组比较,中药各剂量组 IL-6 mRNA 的相对表达量较高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表1 各组大鼠肺组织中 IL-6 mRNA 的表达结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL-6 mRNA( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
正常组	8	1.017 5 $\pm$ 0.020 77
模型组	8	2.395 7 $\pm$ 0.035 51 <sup>①</sup>
中药低剂量组	8	2.145 6 $\pm$ 0.052 23 <sup>①②③</sup>
中药中剂量组	8	1.956 7 $\pm$ 0.013 14 <sup>①②③</sup>
中药高剂量组	8	1.529 4 $\pm$ 0.010 69 <sup>①②③</sup>
地塞米松组	8	1.176 3 $\pm$ 0.021 69 <sup>①②</sup>

与正常组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与地塞米松组比较,③ $P < 0.05$

2.2 各组大鼠肺组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达结果比较 见表2。与正常组比较,模型组 TNF- $\alpha$  mRNA 的相对表达量明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,中药各剂量组与地塞米松组 TNF- $\alpha$  mRNA 的相对表达量均明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与地塞米松组比较,中药低、中

剂量组 TNF- $\alpha$  mRNA 的相对表达量较高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表2 各组大鼠肺组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TNF- $\alpha$ mRNA( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
正常组	8	1.101 1 $\pm$ 0.569 49
模型组	8	38.357 1 $\pm$ 15.012 45 <sup>①</sup>
中药低剂量组	8	4.341 6 $\pm$ 5.087 82 <sup>②③</sup>
中药中剂量组	8	5.428 9 $\pm$ 2.853 58 <sup>②③</sup>
中药高剂量组	8	2.043 7 $\pm$ 1.398 56 <sup>②</sup>
地塞米松组	8	0.677 9 $\pm$ 0.223 49 <sup>②</sup>

与正常组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与地塞米松组比较,③ $P < 0.05$

2.3 各组大鼠肺组织病理学改变情况 见图1。哮喘模型组病理学切片在电镜下观察可见气管壁周围大量炎性细胞浸润(以嗜酸性粒细胞和淋巴细胞为主)。各治疗组可见少量炎性细胞浸润,与模型组相比明显减少。正常组肺组织气道结构清晰,无明显炎症改变。

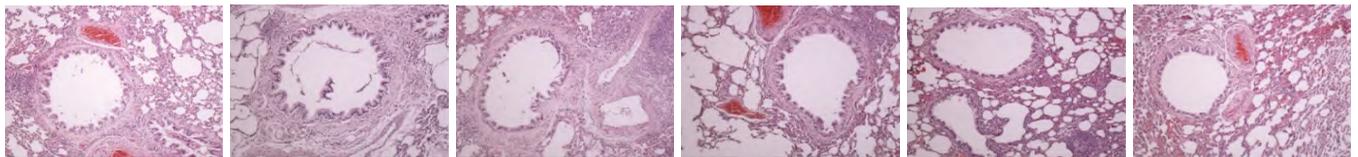


图1 各组大鼠肺组织病理学改变情况 ( $\times 200$ )

### 3 讨论

支气管哮喘是由气道的炎性细胞、结构细胞及细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病<sup>[4]</sup>,病因和发病机制都非常复杂,至今尚未完全阐明。气道高反应性、气道炎症以及气道炎症导致的气道重塑是支气管哮喘的三大主要特征。炎症介质在哮喘的炎症反应和免疫调节过程中发挥着重要作用,常常成为诱发哮喘发作和病情加剧的重要因素,其中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  是前炎症反应因子(PIC),在炎症反应中起重要作用。IL-6 是一种多功能细胞因子,主要是由单核细胞和巨噬细胞产生,其在炎症反应和免疫调节过程中均有重要作用。Siewicz 等研究发现,IL-6 参与支气管哮喘发病的整个过程,其检测有助于病情评估与疗效观察<sup>[5]</sup>。刘艳明等研究表明,用布地奈德早期干预哮喘小鼠可以抑制其呼吸道 IL-6 的表达,这说明 IL-6 有加重气道炎症的作用<sup>[6]</sup>。Th17 细胞是近年来哮喘免疫学发病机制研究中的又一重要发现,它被证实诱导慢性炎症方面发挥重要作用,而 IL-6 是促进 Th17 分化的关键细胞因子,IL-6 水平的升高在哮喘的发病机制中起着重要作用<sup>[7-8]</sup>。TNF- $\alpha$  主要由单核细胞和巨噬细胞产生,在炎症反应过程中是激活细胞内子级联反应的主要介质,具有微量、高效的特点,起到类似内分泌激素的功能。目前大量研究已经证实,IL-6、TNF- $\alpha$  在

支气管哮喘的病程发展、转归中占有重要的地位。杨璐瑜研究急性发作期和慢性持续期支气管哮喘患者 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平,患病组均显著高于健康对照组( $P < 0.05$ );急性发作期哮喘患者 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著高于慢性持续期组( $P < 0.05$ )<sup>[9]</sup>。黄海萍等研究认为支气管哮喘病情的严重程度与 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IgE 含量密切相关,临床可以通过检测 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IgE 的含量作为判断支气管哮喘病情严重程度和治疗效果的重要指标<sup>[10]</sup>。

中医学认为哮喘的病机关键为痰饮内伏,遇外来因素感触而发,反复不已。缓解期哮喘,病机以肺、脾、肾三脏功能不足为主,因虚生痰,哮喘缓解期多采用健脾益气、补益肺肾之药。宣桂琪教授临证主张除肺脾气虚、脾肾阳虚外,还应兼顾“小儿阴常不足,阳常有余”的特点,考虑从“肺阴虚”及“气阴两虚”辨证论治。应用防哮方治疗哮喘缓解期及慢性持续期,方药选用生脉散合六君子汤加减,处方:南沙参、北沙参、生白芍、党参、白术、姜半夏各 6g,麦冬 9g,地骨皮 3g,生石决明、茯苓各 10g,陈皮 5g。方中以沙参麦冬汤养阴清肺;地骨皮清虚热;白芍配石决明养肝平肝热,以防木火刑金而肺热难清;六君子益气扶脾化痰。本研究通过检测肺组织 IL-6、TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达及肺组织病理变化以探

讨防哮方对慢性哮喘大鼠炎症反应的作用。研究发现,防哮方各剂量组均能下调哮喘模型大鼠的 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的水平,抑制大鼠 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达,减少炎症细胞的分泌,提示中药复方防哮方对炎症细胞因子 IL-6 及 TNF- $\alpha$  都有干预作用。

#### [参考文献]

- [1] 尚云晓,冯雍. 2014 版全球哮喘防治倡议(GINA)解读——与儿童哮喘相关内容[J]. 中国实用儿科杂志, 2014, 29(9): 669-672.
- [2] Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, et al. Asthma: From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(5): 1720-1745.
- [3] 魏伟. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J]. 中华哮喘杂志:电子版, 2008, 1(2): 3-13.
- [5] Siwiec J1, Zaborowski T, Jankowska O, et al. Evaluation of Th1/Th2 lymphocyte balance and lipopolysaccharide receptor expression in asthma patients [J]. Pneumonol Alergol Pol, 2010, 77(2): 123-130.
- [6] 刘艳明,农光民,李树全. 布地奈德早期干预对哮喘小鼠呼吸道炎症和白细胞介素-6/信号转导与转录激活因子3信号通路的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(16): 1222-1224.
- [7] Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation [J]. Mol Immunol, 2002, 39(9): 531-536.
- [8] 施宇衡,时国朝,万欢英,等. 支气管哮喘患者外周血 Th17、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞表达特征[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(8): 740-743.
- [9] 杨璐瑜. 哮喘患者血清 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 表达变化与气道炎症的关系探讨[J]. 临床肺科杂志, 2013, 18(8): 1389-1391.
- [10] 黄海萍,吴俊,殷焯军. 支气管哮喘患者血清 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IgE 检测的临床分析[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(1): 65-66.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)