

维药神香草对哮喘大鼠血清嗜酸性粒细胞趋化因子和可溶性 P 选择素的影响

侯敏^{1,2}, 马秀敏^{1,2}, 丁剑冰^{1,2}, 朱明², 马骏³, 马雪萍¹, 王亚男², 田树革¹

1. 新疆医科大学; 新疆名医方与特色方剂学重点实验室, 乌鲁木齐 830011

2. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830054

3. 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000

摘要 通过检测维吾尔药神香草对哮喘大鼠血清嗜酸性粒细胞趋化因子-2 (Eotaxin-2)、嗜酸性粒细胞趋化因子-3 (Eotaxin-3) 和可溶性 P 选择素 (sP-selectin) 的影响, 探讨神香草治疗哮喘的作用机制。采用的方法是, 将大鼠随机分为正常对照组、哮喘模型组、地塞米松治疗组、神香草高剂量治疗组和低剂量治疗组。采用卵清白蛋白 (OVA)、氢氧化铝及百白破疫苗联合致敏和 OVA 生理盐水雾化激发的方法制备哮喘模型。计数各组大鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中嗜酸性粒细胞 (EOS) 的个数; 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测大鼠血清 Eotaxin-2、Eotaxin-3 和 sP-selectin 的水平。结果显示, 与模型组相比, 各治疗组大鼠 BALF 中 EOS 的个数明显减少, 血清 Eotaxin-2 的水平明显下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与神香草低剂量治疗组相比, 高剂量治疗组大鼠 BALF 中 EOS 的个数明显减少, 血清 Eotaxin-2 的水平明显下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。各组大鼠 BALF 中 EOS 的数量与血清 Eotaxin-2 水平密切相关 ($r=0.829$), 与血清 Eotaxin-3 和 sP-selectin 水平均呈正相关 ($r=0.635, 0.348$), $P<0.05$ 。各组大鼠血清 Eotaxin-2 与 Eotaxin-3 和 sP-selectin 水平呈正相关 ($r=0.447, 0.362$), $P<0.05$ 。由此推测, Eotaxin-2、Eotaxin-3 和 sP-selectin 可相互协同, 加剧哮喘的炎症反应, 神香草可能通过抑制 Eotaxin-2 的分泌, 减轻哮喘的炎症反应。

关键词 神香草; 哮喘; 嗜酸性粒细胞趋化因子; 可溶性 P 选择素

中图分类号 R285.5, R562.2*5

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)19-0090-04

Effect of Uygur Medicine *Hyssopus officinalis* L. on Serum Eotaxin-2, Eotaxin-3 and sP-selectin Level of Asthma Rats

HOU Min^{1,2}, MA Xiumin^{1,2}, DING Jianbing^{1,2},
ZHU Ming¹, MA Jun³, MA Xueping¹, WANG Yanan²,
TIAN Shuge¹

1. Xinjiang VIP Laboratory of Great Physicians and
Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae,
Urumqi 830011, China

2. Basic Medical College, Xinjiang Medical University,
Urumqi 830054, China

3. Traditional Chinese Medical Hospital, Xinjiang Medical
University, Urumqi 830000, China

Abstract The Uygur medicine *Hyssopus officinalis* L. on serum Eotaxin-2, Eotaxin-3 and sP-selectin levels of asthma rats is studied for the mechanism of its treatment of asthma. The test rats were randomly divided into normal control group, asthma model group and dexamethasone group and *Hyssopus officinalis* L. high and low dose group. They were sensitized with OVA, Al(OH)₃ and DPT vaccine, and then were challenged with inhalation of aerosolized OVA solution for preparation of asthma model. The levels of serum Eotaxin-2, Eotaxin-3 and sP-selectin were determined with ELISA. The results show that as compared with model group, the number of EOS in BALF of the treatment groups is significantly reduced, and serum levels of Eotaxin-2 are decreased significantly ($P<0.05$). Compared with *Hyssopus officinalis* L. low-dose treatment group, the number of EOS in BALF is significantly reduced for the high dose group, and the serum levels of Eotaxin-2 are decreased significantly ($P<0.05$). The number of EOS in BALF and the serum levels of Eotaxin-2 are closely related ($r=0.829$). The EOS has a positive relationship with the serum Eotaxin-3 and sP-selectin levels ($r=0.635, 0.348$), $P<0.05$. The serum Eotaxin-2 level

收稿日期: 2009-08-10

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (200821129); 新疆维吾尔自治区教育厅重点项目 (XJEDU2008117); 新疆高技术研发项目 (PT0708)

作者简介: 侯敏, 研究方向为维吾尔药的免疫功能, 电子信箱: dahoumin@163.com; 丁剑冰 (通信作者), 教授, 研究方向为中药及维吾尔药的免疫功能, 电子信箱: djbing002@163.com

has a positive relationship with the Eotaxin-3 sP-selectin levels ($r=0.447, 0.362, P<0.05$). It is concluded that Eotaxin-2, Eotaxin-3 and sP-selectin may be in a mutual coordination, to aggravate the inflammatory response of asthma. *Hyssopus officinalis* L. may inhibit the secretion of Eotaxin-2, reducing the inflammatory response of asthma.

Keywords *Hyssopus officinalis* L.; asthma; Eotaxin; sP-selectin

支气管哮喘 (bronchial asthma, 简称哮喘) 是由多种细胞 (如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 细胞、中性粒细胞、气道上皮细胞等) 和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病^[1]。哮喘发病过程中的病理生理学改变与嗜酸性粒细胞 (eosinophils, EOS) 的聚集、活化和脱颗粒密切相关, EOS 的活性直接决定了哮喘发作和气道高反应性的严重程度。越来越多的证据揭示了气道上皮细胞通过一系列炎症介质参与哮喘的慢性气道炎症^[2]。嗜酸性粒细胞趋化因子 (Eotaxin) 在选择性地诱导 EOS 在气道黏膜的粘附、募集和脱颗粒的过程中起着重要的作用^[3]。P 选择素 (P-selectin) 是黏附分子的一种, 通过介导嗜酸性粒细胞的募集、中性粒细胞在活化内皮细胞上的滚动, 以及增加气道高反应性等方面参与哮喘的发生发展。

维药神香草 (*Hyssopus officinalis* L.) 为唇形科 (*Labiatae*) 多年生草本植物, 最早生长于地中海和黑海附近地区, 在新疆维吾尔自治区北部有野生分布。《维吾尔药志》中记载道: 药用全草, 全株主要含挥发油, 常用于镇咳平喘、清热利湿。维吾尔医用于治疗气管炎的咳嗽、气喘、感冒发烧和风湿等病证^[4]。近年在新疆维吾尔自治区人工种植神香草获得成功, 为开发和利用神香草的食用价值和药用价值提供了充足的物质资源。本研究通过检测神香草治疗后的哮喘大鼠 BALF 中 EOS 的个数, 以及血清 Eotaxin-2、Eotaxin-3 和 sP-selectin 的水平, 以探讨维药神香草治疗哮喘的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂

神香草全草由新疆维吾尔自治区维吾尔医院药房提供, 新疆医科大学中医学院中药化学教研室制备提取液。卵清白蛋白 OVA (美国 Sigma 公司, 批号: A8040); 氢氧化铝干粉 (西安化学试剂厂, 批号: 050912); 吸附百白破联合疫苗 (成都生物制品研究所, 批号: 2007126008-3); Rat Eotaxin-2 ELISA Kit (美国 ADL 公司, 批号: 31192)。Rat Eotaxin-3 ELISA Kit (美国 ADL 公司, 批号: 31192); Rat sP-selectin ELISA Kit (美国 ADL 公司, 批号: 31192)。

1.2 动物分组和实验模型制备

雄性健康 Wistar 大鼠 40 只, 4~6 周龄, 体重 150~170 g, 由新疆医科大学实验动物中心提供。随机分为 5 组, 每组 8 只, 分别为正常对照组, 哮喘模型组, 地塞米松治疗组和神香草水提液高、低剂量治疗组。除正常组外, 各组大鼠于实验第

1 天腹腔注射 1 mL 抗原液 (含 10 mg OVA, 100 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$, 5×10^9 个百白破疫苗) 以初次致敏, 实验第 8 天重复一次以加强致敏。正常对照组以等量灭菌生理盐水代替。从实验第 15 天开始, 每天一次将大鼠置于密闭玻璃钟罩, 以 10% OVA 生理盐水雾化吸入 20 min 以激发引喘 (正常对照组以生理盐水代替), 待出现皮肤瘙痒、烦躁不安、点头呼吸、张口呼吸、呼吸急促、腹式呼吸明显等症状, 最后反应迟钝时, 表明引喘成功。

1.3 药物治疗

各组大鼠于每次雾化吸入前 30 min 给予灌胃, 各组药物分别为: 正常对照组: 生理盐水 1 mL; 模型组: 生理盐水 1 mL; 地塞米松组: 地塞米松 0.5 mg/kg; 神香草高剂量组: 神香草提取液 4 g/kg; 神香草低剂量组: 神香草 1 g/kg。

1.4 标本采集

实验第 22 天, 最后一次雾化吸入后 24 h 内, 各组大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛 0.3 mL/100 g 以麻醉。麻醉后将大鼠仰面固定于手术台, 75% 酒精消毒皮肤后, 打开大鼠腹腔, 使用一次性真空采血针行腹主动脉采血, 采血针另一端连接非抗凝负压采血管。采血完毕, 将采血管静置 1 h 后, 4℃、2 000 r/min 离心 10 min, 分离得到血清, 分装后标记, 立即冻存于 -80℃ 冰箱。剥离气管, 从甲状软骨处上方剪开一 V 形缺口, 插入磨平的针头, 用备好的丝线结扎固定。再用注射器吸取冷藏 5% 生理盐水 3 mL, 立即回抽, 收集灌洗液 (BALF), 灌洗 3 次。回收的 BALF 于 4℃、2 000 r/min 离心 10 min, 用 100 μL 10% 小牛血清-PBS 重悬细胞, 涂片, 染色计数 EOS。

1.5 血清 Eotaxin-2、Eotaxin-3 和 sP-selectin 水平检测

严格按照 ELISA 试剂盒说明, 分别检测各组大鼠血清 Eotaxin-2、Eotaxin-3 和 sP-selectin 的水平。酶标仪 450 nm 处读吸光度值, 根据标准曲线计算各组大鼠血清 Eotaxin-2、Eotaxin-3 和 sP-selectin 的浓度。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 形式表示, 采用单因素方差分析和多重比较对各组进行比较分析, 以 $P<0.05$ 为显著性差异; 相关性检验采用 Pearson 直线相关分析。

2 结果

2.1 大鼠的一般表现

激发引喘后, 大鼠出现烦躁不安、皮肤瘙痒、点头呼吸、张口呼吸、腹式呼吸明显、反应迟钝等症状。连续激发后, 大鼠体重减轻, 毛色光泽度下降。

2.2 肺组织病理变化

2.2.1 大体观察

与正常对照组大鼠相比, 哮喘模型组大鼠的肺脏体积明显增大, 表面肿胀, 有多处形状不规则的暗红色与红色充血区, 切面有白色泡沫状渗出物。

2.2.2 肺组织学观察

正常对照组: 支气管管腔规则, 无支气管收缩征像, 未见

(Eotaxin-3), 其中 Eotaxin-1 和 Eotaxin-2 对 EOS 显示出强大的趋化作用, Eotaxin-3 的作用较前两者明显减弱^[6]。刘中娟等^[7]发现, 在成人哮喘急性发作期患者血清中, Eotaxin 升高显著, 血清 Eotaxin 水平与外周血 EOS 计数呈正相关。本研究结果显示, 与正常对照组比较, 哮喘模型组大鼠 BALF 中的 EOS 计数和血清中 Eotaxin-2 和 Eotaxin-3 水平均有明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。各组大鼠 BALF 中 EOS 的个数与血清 Eotaxin-2 水平密切相关 ($r=0.829$), 与血清 Eotaxin-3 水平呈正相关 ($r=0.635$), P 值均 <0.05 , 证实了 Eotaxin 在哮喘发病过程中具有重要作用。

细胞黏附分子在增强过敏性气道炎症中的作用已经得到了肯定^[8-9], P-selectin 作为黏附分子选择素家族的重要组成部分, 由于在过敏性哮喘的支气管炎症和气道高反应性的进程中发挥重要作用而受到广泛关注, 是调控嗜酸性粒细胞浸润至肺并引起炎症的关键因素^[10]。P-selectin 可与配体 PSGL-1 结合介导炎症细胞在活化内皮细胞上的滚动和迁移, 并且参与血小板和某些 T 细胞亚群的沿血管壁的滚动过程。因此, P-selectin 作为一种重要的前炎症因子在炎症早期的炎症细胞募集并向受损部位趋化过程中起重要作用。血清 P-selectin 水平升高可导致气道高反应性, 而且会脱落入血液后成为可溶性成分 sP-selectin, 是评价哮喘炎症反应的重要指标之一^[11]。John 等^[12]实验表明, 封闭大鼠的 P-selectin 基因序列, 可以显著减轻哮喘大鼠气管周围嗜酸性粒细胞的炎症聚集, 抑制嗜酸粒细胞从外周血渗入呼吸道, 以及嗜酸粒细胞和淋巴细胞向肺部炎症组织趋化浸润和气道高反应性。本研究结果显示, 与正常对照组比较, 哮喘模型组大鼠血清 sP-selectin 水平有明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 表明 sP-selectin 在哮喘的发病过程中发挥作用。

本研究结果显示, 各组大鼠血清 Eotaxin-2 与 Eotaxin-3 和 sP-selectin 水平呈正相关 ($r=0.447, 0.362$), 说明在哮喘的炎症反应过程中, Eotaxin-2、Eotaxin-3 和 SP-selectin 可能协同作用, 使炎症反应加剧。与哮喘模型组比较, 各治疗组大鼠 BALF 中的 EOS 计数主血清中的 Eotaxin-2 水平均有明显下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 表明神香草有可能通过抑制 Eotaxin-2 分泌, 减轻哮喘的气道炎症反应; 而血清 Eotaxin-3 和 sP-selectin 水平的下降不明显 ($P>0.05$), 推测神香草可能不是通过抑制 Eotaxin-3 和 sP-selectin 分泌发挥其抗炎作用。

本研究揭示了神香草治疗哮喘的部分作用机制, 为中药治疗哮喘提供了一定的理论依据, 维药神香草的有效成分有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] 叶任高. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004, 1: 64-73.
Ye Rengao. Internal Medicine [M]. 6 ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004, 1: 64-73.
- [2] Garcia G, Godot V, Humbert M, et al. New chemokine targets for asthma

therapy [J]. *Current Allergy Asllergy and Asthma Reports*, 2005, 5(2): 155-160.

- [3] Heiman A S, Abonyo B O, Darling-Reed S F, et al. Cytokine-stimulated human lung alveolar epithelial cells release Eotaxin-2 (CCL24) and Eotaxin-3 (CCL26)[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2005, 25(2): 82-91.
- [4] 刘勇民, 沙吾提·伊克木. 维吾尔药志(上册)[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1986: 290.
Liu Yongmin, Yikemu Shawuti. Uighur drug-chi (I)[M]. Urumqi: People's Publishing House of Xinjiang, 1986: 290.
- [5] 谢华, 何韶横, 魏继福, 等. 哮喘患者痰中 IL-18、IL-16、IL-8、嗜酸性粒细胞趋化因子水平和类糜蛋白酶活性的测定 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(11): 2201-2204.
Xie Hua, He Shaoheng, Wei Jifu, et al. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2005, 21(11): 2201-2204.
- [6] Kitaura M, Suzuki N, Imai T, et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine (Eotaxin-3) that is a functional ligand of CC chemokine receptor 3 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (39): 27975-27980.
- [7] 刘中娟, 任艳丽, 林嘉友, 等. 哮喘患者血清嗜酸性粒细胞趋化蛋白测定及其临床诊断价值[J]. *中国医学科学院学报*, 2004, 26(3): 298-301.
Liu Zhongjuan, Ren Yanli, Lin Jiayou, et al. *Acta Academiae Medicinae Sinica*, 2004, 26(3): 298-301.
- [8] Broide D H, Sullivan S, Gifford T, et al. Inhibition of pulmonary eosinophilia in P-selectin and ICAM-1-deficient mice [J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1998, 18: 218-225.
- [9] Lukacs N W, John A, Belin A, et al. E- and P-selectins are essential for the development of cockroach allergen-induced airway responses[J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 2120-2125.
- [10] Sjosward K N, Uppugundur I S, Schmekel B. Decreased serum levels of P-selectin and eosinophil cationic protein in patients with mild asthma after inhaled salbutamol[J]. *Respiration*, 2004, 71(3): 241-245.
- [11] 于化鹏, 任锦云, 王富强, 等. P 选择素在速激肽类致气道高反应性中的作用[J]. *中华内科杂志*, 1999, 38(4): 228-230.
Yu Huapeng, Ren Jinyun, Wang Fuqiang, et al. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 1999, 38(4): 228-230.
- [12] John A E, Lukacs N W, Berlin A A, et al. Discovery of a potent nanoparticle P-selectin antagonist with anti-inflammatory effects in allergic air way disease[J]. *FASEB*, 2003, 17(15): 2296-2298.

(责任编辑 朱宇)

《科技导报》“走向职场”栏目征稿

“走向职场”栏目由北京航空航天大学毕业生就业指导研究专家程基伟博士主持, 期望通过业内专家撰文, 或有关人士讲述自己求职、就业的经历和成功事例, 帮助博士生和博士后学会如何应聘、如何创业和发展, 给即将走上职场的读者朋友启迪和帮助。本栏目欢迎投稿, 择优录用, 每篇文章约 2 200 字。栏目责任编辑: 朱宇; 投稿信箱: zhuyu@cast.org.cn。