论著·实验研究

穿心莲内酯对哮喘小鼠嗜酸性粒细胞表达的影响及其作用机制

李艳华[1] 王美怡[1] 金蓉[1] 郭盛[1] 范小勇[2] 马辉[2] 吴良霞[1] 张建华[1]

(1. 上海交通大学附属第六人民医院儿科,上海 200233; 2. 复旦大学附属公共卫生临床中心科学研究部,上海 202508)

[摘 要] **目的** 穿心莲内酯是中药穿心莲的主要有效成分,在体内外均具有较强的抗炎作用。该研究观察穿心莲内酯对哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸性粒细胞、eotaxin 及 IL-5 表达的影响。**方法** 32 只 BALB/c小鼠随机分为对照组、哮喘组、布地奈德组、穿心莲内酯组,每组 8 只。以卵清蛋白(OVA)致敏激发建立哮喘小鼠模型。ELISA 法检测 BALF 及外周血中 eotaxin、IL-5 的水平,实时荧光定量 PCR 法检测肺组织 eotaxin、IL-5 mRNA 的表达。**结果** 穿心莲内酯明显抑制哮喘小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞($P<0.05$)浸润,且作用强于布地奈德($P<0.05$);与哮喘组相比,穿心莲内酯组小鼠 BALF 中 eotaxin、IL-5,肺组织中 eotaxin mRNA 和外周血中 IL-5 的表达明显降低($P<0.05$),但仍高于布地奈德组($P<0.05$);同时穿心莲内酯抑制哮喘小鼠外周血中 eotaxin 和肺组织 IL-5 mRNA 的表达($P<0.05$),作用与布地奈德比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 穿心莲内酯通过降低哮喘小鼠 eotaxin、IL-5 的表达,抑制哮喘气道嗜酸性粒细胞浸润。[**中国当代儿科杂志,2012,14(5):371-374**]

[**关 键 词**] 哮喘;穿心莲内酯;嗜酸性粒细胞;Eotaxin;IL-5;小鼠

[**中图分类号**] R-33 [**文献标识码**] A [**文章编号**] 1008-8830(2012)05-0371-04

Effects of andrographolide on the expression of eosinophil granulocytes and possible mechanisms

LI Yan-Hua, WANG Mei-Yi, JIN Rong, GUO Sheng, FAN Xiao-Yong, MA Hui, WU Liang-Xia, ZHANG Jian-Hua. Department of Pediatrics, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, *China* (*Zhang J-H, Email: zjh*12195@*yahoo.com.cn*)

Abstract: Objective Andrographolide, the active component in andrographis paniculata, has potent anti-inflammatory actions. This study aimed to evaluate the effects of andrographolide on eosinophil granulocytes (EOS) and the expression of eotaxin and IL-5 in mice with asthma. **Methods** BALB/c mice were randomly assigned into normal control, asthma, budesonide treatment and andrographolide treatment groups ($n=8$ each). Mice in the latter three groups were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) to induce asthma. ELISA was used to detect the concentrations of eotaxin and IL-5 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood. The expression of eotaxin mRNA and IL-5 mRNA in lung tissues was detected by real-time quantitative PCR. **Results** Andrographolide treatment significantly decreased EOS count in BALF ($P<0.05$) and the effect of andrographolide was better than the effect of budesonide. Andrographolide treatment significantly down-regulated the expression of eotaxin and IL-5 in BALF, lung eotaxin mRNA expression and blood IL-5 expression ($P<0.05$), but the effects of andrographolide were poorer than the effects of budesonide. Andrographolide treatment resulted in a decrease in blood eotaxin expression and lung IL-5 mRNA expression and the effects of andrographolide were similar to budesonide. **Conclusions** Andrographolide can down-regulate the expression of IL-5 and eotaxin and thus suppress the inflitration of EOS in a mouse model of asthma.

[**Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(5):371-374**]

Key words: Asthma; Andrographolide; Eosinophil granulocyte; Eotaxin; IL-5; Mice

支气管哮喘(简称哮喘)是以嗜酸性粒细胞(eosinophil granulocyte, EOS)浸润为特征的慢性气道炎症,IL-5、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)介导 EOS 的趋化是哮喘气道炎症发生的重要机制[1]。拮抗 EOS 是哮喘药物治疗的重要措施。穿心莲内酯具有解热、抗菌、抗病毒及调节免疫等多种药理作

[收稿日期]2011-11-01;[修回日期]2011-12-17
[作者简介]李艳华,女,硕士研究生。
[通信作者]张建华,主任医师。

用,研究证实,穿心莲内酯可抑制 IL-4 的表达、刺激 IFN-gama 的分泌,调节哮喘 Th1/Th2 失衡[2],但对 EOS 的作用研究甚少,本实验旨在探索穿心莲内酯对哮喘 EOS 表达的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,6 ~ 8 周龄,体重 18 ~ 20 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号:scxk(沪)2007 - 0005,共 32 只,饲养于 SPF 级实验室。

1.2 药品、试剂盒及化学试剂

穿心莲内酯(江西青峰药业有限公司,批号:20101115);布地奈德(阿斯利康制药有限公司,批号:199372);卵清蛋白(OVA, Grade V, Sigma 公司);氢氧化铝分析纯(上海山浦化工有限公司);IL-5 ELISA 试剂盒、TMB 底物为 eBioscience 公司产品;eotaxin ELISA 试剂盒为 PeproTech 公司产品;瑞氏吉姆萨染色试剂购自南京建成科技有限公司。

1.3 酶和引物

实时荧光定量 PCR 检测的引物用 Primer Primier 5.0 软件设计,由英潍捷基公司合成。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测用引物序列

目的基因	Genbank accession no.		引物序列(5′→3′)	产物长度(bp)
IL-5	NM-010558.1	上游	AGGCTTCCTGTCCCTACTCATA	174
		下游	CTCCTCGCCACACTTCTCTTTT	
Eotaxin	NM-011330.3	上游	CTTCTATTCCTGCTGCTCACG	126
		下游	TTGTAGCTCTTCAGTAGTGTGTTGG	
β-actin	BC138614.1	上游	GTCCCTCACCCTCCCAAAAG	266
		下游	GCTGCCTCAACACCTCAACCC	

1.4 实验方法

1.4.1 模型建立 参照以往实验略作变化[3],实验动物随机分 4 组,每组 8 只。哮喘组:将 OVA 10 μg 和氢氧化铝 1.6 mg 溶于 400 μL 磷酸缓冲液(PBS)中,于实验第 1 天、14 天每只小鼠予腹腔注射致敏,第 21 天起予 1% OVA 雾化吸入诱喘,每次 30 min,1 次/d,连续 7 d;对照组接受等量 PBS 处理;在哮喘模型建立基础上,穿心莲内酯干预组(简称穿心莲内酯组)于每次诱喘前 1 h 腹腔注射穿心莲内酯 0.06 mg/g;布地奈德干预组(简称布地奈德组)于每次诱喘前 1 h,予 0.5 mg/mL 布地奈德雾化 30 min。

1.4.2 标本采集与处理 最后一次诱喘后 24 h,处死小鼠,暴露气管,气管切口插管,予生理盐水灌洗,每次 0.4 mL,共 4 次,支气管肺泡灌洗液(BALF)总回收量约 1.2 mL。4000 r/min 低温离心,取上清置 -80℃冻存待测。沉淀重悬涂片于瑞氏吉姆萨染色镜下行 EOS 计数。眼眶采血 1 mL/只,静置,待血细胞凝固后,4000 r/min 低温离心,取上清置 -80℃冻存待测。取右肺中叶置于 1 mL RNAfixer 中冻存,用以抽提总 RNA。左下叶用多聚甲醛固定以行苏木精 - 伊红(HE)染色。

1.4.3 ELISA 双抗夹心法测定 BALF 中的 eotaxin 和 IL-5 按双抗体夹心 ELISA 法操作规程进行,于酶标仪 450 nm 波长测定吸光值,按标准曲线换算各待测指标浓度。

1.4.4 实时荧光定量 PCR Trizol 法抽提总 RNA 后取 200 ng 加入 10 μL 逆转录反应体系中,按逆转录试剂盒说明书操作,进行逆转录以获得 cDNA。以小鼠 eotaxin、IL-5 及 β-actin 对应的 PCR 引物进行荧光定量 PCR 扩增,反应条件为 95℃预变性 10 min→(95℃变性 15 s→55℃退火 15 s→72℃延伸 30 s)×40 循环,后接溶解曲线。结果以 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 作为被测因子初始 mRNA 的相对表达量。

1.5 统计学分析

以 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。数据符合正态分布且方差齐者,多组间比较采用 ANOVA 检验,组间两两比较采用 LSD 法;数据不符合正态分布者,多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验,组间两两比较采用 Mann-Whitney U 检验;$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALF 中 EOS 数量变化

哮喘小鼠 BALF 中 EOS 较对照组明显升高($P < 0.05$),穿心莲内酯组、布地奈德组较哮喘组均显著下降($P < 0.05$),但仍高于对照组($P < 0.05$);穿心莲内酯组 EOS 计数低于布地奈德组($P < 0.05$)。见表 2,图 1。

2.2 BALF 中 eotaxin 和 IL-5 的表达

哮喘小鼠 BALF 中 eotaxin、IL-5 表达较对照组均明显升高($P < 0.05$),穿心莲内酯、布地奈德均可下调其表达($P < 0.05$),但两组 eotaxin 的表达仍高于对照组($P < 0.05$)。穿心莲内酯组 IL-5 的表达高于对照组($P < 0.05$),而布地奈德组 IL-5 的表达略高于对照组但差异无统计学意义($P > 0.05$);穿心莲内酯组 eotaxin、IL-5 的表达均高于布地奈德组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2　BALF 中 EOS 计数及 BALF、外周血中 eotaxin、IL-5 的表达　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	EOS 计数 ($\times 10^4$/mL)	BALF (pg/mL)		外周血 (pg/mL)	
			eotaxin	IL-5	eotaxin	IL-5
对照组	8	0.47 ± 0.03	340 ± 42	72 ± 9	886 ± 174	66.2 ± 0.5
哮喘组	8	163.00 ± 24.55[a]	1118 ± 193[a]	192 ± 28[a]	1096 ± 67[a]	70.1 ± 0.8[a]
布地奈德组	8	90.69 ± 9.60[a,b]	551 ± 58[a,b]	73 ± 13[b]	903 ± 126[b]	66.7 ± 0.7[b]
穿心莲内酯组	8	33.75 ± 4.06[a,b,c]	882 ± 85[a,b,c]	97 ± 22[a,b,c]	916 ± 134[b]	67.8 ± 1.2[a,b,c]
F 值		230.52	77.00	67.13	4.58	35.36
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与哮喘组比较，$P<0.05$；c：与布地奈德组比较，$P<0.05$

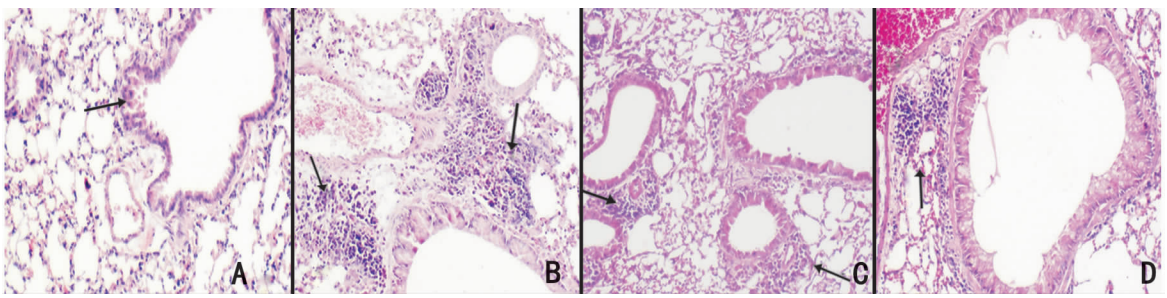

图 1　肺组织苏木精－伊红染色（×400）　与对照组（图 A）比较，哮喘组（图 B）可见气道壁增厚，EOS 浸润明显增加；穿心莲内酯组（图 D）及布地奈德组（图 C）气道周围 EOS 浸润明显减少，但仍多于对照组。箭头所指为 EOS 浸润。

2.3　外周血中 eotaxin 和 IL-5 的表达

哮喘小鼠外周血中 eotaxin、IL-5 表达较对照组均明显升高（$P<0.05$），穿心莲内酯、布地奈德均下调其表达（$P<0.05$），且两组 eotaxin 的表达与对照组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。穿心莲内酯组 IL-5 的表达高于对照组（$P<0.05$），而布地奈德组 IL-5 的表达略高于对照组但差异无统计学意义（$P>0.05$）；穿心莲内酯组 IL-5 的表达高于布地奈德组（$P<0.05$），但 eotaxin 的表达与布地奈德组的差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表 2。

2.4　肺组织 eotaxin 和 IL-5 mRNA 的表达

哮喘小鼠肺组织 eotaxin 和 IL-5 mRNA 表达较对照组均明显增加，差异有统计学意义（$P<0.05$），穿心莲内酯、布地奈德均显著降低其表达（$P<0.05$），但两个干预组 eotaxin mRNA 的表达高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$），而 IL-5 mRNA 表达与对照组的差异均无统计学意义。穿心莲内酯组 eotaxin mRNA 表达高于布地奈德组，差异有统计学意义（$P<0.05$），而 IL-5 mRNA 表达与布地奈德组比较差异无统计学意义。见表 3，图 2。

表 3　肺组织 eotaxin 和 IL-5 mRNA 的表达

［中位数（四分位间距）］

组别	n	eotaxin	IL-5
对照组	8	0.94（0.80～1.37）	0.59（0.46～0.64）
哮喘组	8	9.43（7.99～11.76）[a]	3.28（2.07～4.98）[a]
布地奈德组	8	4.03（3.45～4.65）[a,b]	1.83（1.14～2.57）[b]
穿心莲内酯组	8	5.87（5.17～6.27）[a,b,c]	0.93（0.40～1.36）[b]
χ^2 值		27.97	13.17
P 值		<0.01	0.05

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与哮喘组比较，$P<0.05$；c：与布地奈德组比较，$P<0.05$

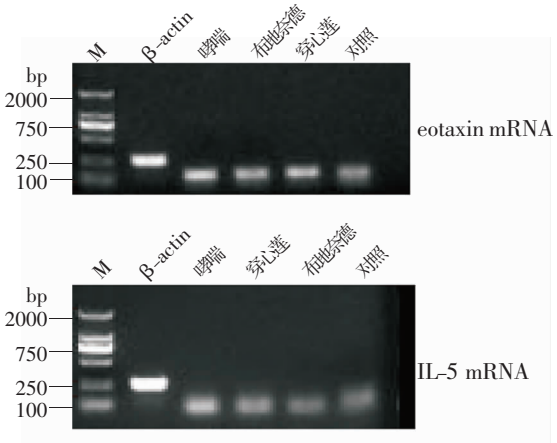

图 2　RT-PCR 检测肺组织中 eotaxin mRNA 和 IL-5 mRNA 的表达

3 讨论

支气管哮喘是以 EOS 浸润为主要特征，气道 EOS 的过量表达与气道炎症呈正相关。EOS 的募集机制尚未完全清楚，但与 eotaxin、IL-5 的表达有密切关系[1]。eotaxin 属于趋化因子 CC 家族，又为 CCL11，研究发现 eotaxin 产生于多种细胞，对 EOS、T 细胞有趋化作用，通过 CCR3 受体使 EOS 由外周血向局部肺组织迁移[4]。IL-5 是具有多种生物活性的细胞因子，主要由 Th2 型细胞合成，可刺激受体 CCR3 的表达[5]，刺激 EOS 的增殖分化，介导 EOS 由骨髓池向外周血及肺组织局部趋化[6]。eotaxin、IL-5 均对 EOS 有明显的趋化作用，而成熟的 EOS 又可分泌 eotaxin、IL-5 等炎症介质，互相刺激诱导增殖、分化、表达，形成循环效应，加重气道炎症反应[7]。因此，抑制 eotaxin、IL-5 的表达，对于降低过敏性哮喘 EOS 浸润，拮抗过敏性气道炎症有十分重要的意义。

近年来，以中药调节免疫反应治疗哮喘的研究颇受关注，黄芪因含黄芪苷类、黄酮类等多种化学成分，具有免疫调节作用；香菇多糖也有增强免疫的功能，二者均可调节 Th1/Th2 平衡[8-9]。穿心莲内酯是中药穿心莲的主要作用成分，在体内外均具有较强的抗炎作用，可抑制肿瘤坏死因子 TNF-α、集落刺激因子 GM-CSF 合成[10]。而且穿心莲内酯可有效抑制炎症细胞合成白三烯 LTB4、前列腺素 PGE2 及血栓素 TXB2 [11]。本研究结果显示穿心莲内酯可显著减少哮喘小鼠 BALF 中 EOS 浸润，降低 BALF 及外周血中 eotaxin、IL-5 水平，同时降低肺组织 eotaxin mRNA、IL-5 mRNA 的表达，且与 EOS 下降一致。表明穿心莲内酯可通过抑制气道中 eotaxin、IL-5 的表达，减少 EOS 的增殖、分化及聚集，达到减轻气道炎性损伤的目的。

糖皮质激素是国际、国内公认的治疗哮喘的一线用药，通过抑制炎症因子、降低抗体合成、减少炎性细胞浸润而发挥作用，布地奈德是具有高效局部抗炎作用的糖皮质激素，雾化吸入对哮喘急性发作及长期控制均有良好疗效[12]。本研究证实布地奈德可减少 EOS 浸润，抑制 eotaxin、IL-5 的表达，与穿心莲内酯结果相似，但布地奈德减少 EOS 浸润作用弱于穿心莲内酯，可能与穿心莲内酯抑制 IL-13、RANTES 表达等机制有关[2]，而减少细胞因子表达作用强于穿心莲内酯，可能与其多环节抑制炎性因子表达有关[12]。穿心莲内酯降低 IL-5 表达在分子水平弱于布地奈德，在基因水平强于布地奈德，这可能与检测时间差异有关，mRNA 翻译后迅速降解，也可能与样本量有关。

本研究显示，穿心莲内酯具有与激素相似的拮抗气道 EOS 浸润及相关因子表达的作用，且其清热解毒、抗病毒作用更有利于缓解病毒诱发的哮喘。因此，穿心莲内酯应用于哮喘临床治疗具有一定的适应症，但临床疗效尚需大量临床试验验证和支持。

[参 考 文 献]

[1] Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma[J]. N Engl J Med, 2009, 360(10): 973-984.
[2] Bao Z, Guan S, Cheng C, Wu S, Wong SH, Kemeny DM, et al. A novel antiinflammatory role for andrographolide in asthma via inhibition of the nuclear factor-kappaB pathway[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(8): 657-665.
[3] Park SJ, Lee KS, Kim SR, Min KH, Choe YH, Moon H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist down-regulates IL-17 expression in a murine model of allergic airway inflammation[J]. J Immunol, 2009, 183(5): 3259-3267.
[4] Huang JJ, Joh JW, Fuentebella J, Patel A, Nguyen T, Seki S, et al. Eotaxin and FGF enhance signaling through an extracellular signal-related kinase (ERK)-dependent pathway in the pathogenesis of eosinophilic esophagitis[J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2010, 6(1): 25.
[5] Barnes PJ. New therapies for asthma: is there any progress?[J]. Trends Pharmacol Sci, 2010, 31(7): 335-343.
[6] Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of asthma[J]. Annu Rev Physiol, 2009, 71: 489-507.
[7] Queto T, Gaspar-Elsas MI, Masid-de-Brito D, Vasconcelos ZF, Ferraris FK, Penido C, et al. Cysteinyl-leukotriene type 1 receptors transduce a critical signal for the up-regulation of eosinophilopoiesis by interleukin-13 and eotaxin in murine bone marrow[J]. J Leukoc Biol, 2010, 87(5): 885-893.
[8] 卞涛，赵薇，钱秀，吴艳，崔小川，王红梅，等. 黄芪和地塞米松对哮喘失衡表达转录因子 T-bet/GATA-3 不同的调节作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(10): 907-913.
[9] 金龙腾，张和，李昌崇，张维溪，林立. 香菇多糖对白介素-1β 诱导人胚肺成纤维细胞表型转化的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(4): 331-335.
[10] Abu-Ghefreh AA, Canatan H, Ezeamuzie CI. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of andrographolide[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(3): 313-318.
[11] Chandrasekaran CV, Gupta A, Agarwal A. Effect of an extract of Andrographis paniculata leaves on inflammatory and allergic mediators in vitro[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 129(2): 203-207.
[12] Dougherty RH, Fahy JV. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biologyand the exacerbation-prone phenotype[J]. Clin Exp Allergy, 2009, 39(2): 193-202.

（本文编辑：王庆红）