

布地奈德对哮喘模型大鼠气道炎症的缓解作用及其机制研究

王苑^{1*}, 王优²(1.广东医学院附属医院药学部, 广东湛江 524001; 2.广东医学院附属医院儿科, 广东湛江 524001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3470-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.06

摘要 目的:研究布地奈德对哮喘模型大鼠气道炎症的缓解作用及其机制。方法:取大鼠随机分为正常对照组、模型组和低、中、高剂量布地奈德(0.25、1、2 mg/kg)组,每组10只,除正常对照组外其余各组大鼠以卵白蛋白(OVA)致敏激发法制备哮喘模型;布地奈德组于第14天开始雾化吸入OVA前30 min雾化吸入相应剂量的布地奈德溶液进行干预,每次10 min,每日2次,连续7 d。末次雾化24 h后尾静脉取血和支气管肺泡灌洗液(BALF),检测血清和BALF中嗜酸性粒细胞(Eos)、白细胞介素4(IL-4)、免疫球蛋白E(IgE)及胸腺活化调节趋化因子(TARC)的水平。结果:与正常对照组比较,模型组和低剂量布地奈德组大鼠血清和BALF中Eos数量和IL-4、IgE和TARC的含量均明显增加($P < 0.05$),中、高剂量布地奈德组间比较上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组比较,中、高剂量布地奈德组大鼠血清和BALF中Eos数量和IL-4、IgE、TARC含量均明显降低($P < 0.05$),低剂量布地奈德组上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:布地奈德能缓解哮喘模型大鼠的气道炎症,且与剂量呈正相关;其可能与降低TARC含量有关。

关键词 胸腺活化调节趋化因子;布地奈德;哮喘模型;大鼠;气道炎症;缓解作用;机制

Remission Effects and Mechanism of Budesonide on Airway Inflammation in Asthmatic Rats

WANG Yuan¹, WANG You²(1.Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524001, China; 2.Dept. of Pediatrics, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the remission effect and mechanism of budesonide on airway inflammation in asthmatic rats. METHODS: Rats were randomly divided into normal control group, model group and budesonide low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.25, 1, 2 mg/kg) with 10 rats in each group. The asthmatic model was established in those groups by the ovalbumin (OVA) provocation methods, except for normal control group. Budesonide group was given aerosol inhalation of budesonide solution for 10 min each time, twice a day for consecutive 7 days, 30 min before aerosol inhalation of OVA since the 14th day. Blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected 24 h after the last inhaling budesonide. The levels of eosinophilic granulocyte (Eos), IL-4, IgE and thymus and activation regulated chemokine (TARC) in serum and BALF were measured. RESULTS: Compared with normal control group, the number of Eos, the contents of IL-4, IgE and TARC in serum and BALF were increased significantly in model group and budesonide low-dose group ($P < 0.05$); there was no statistical significance in above index of budesonide medium-dose and high-dose groups ($P > 0.05$). Compared with model group, the number of Eos, the contents of IL-4, IgE and TARC in serum and BALF of budesonide medium-dose and high-dose groups were decreased significantly ($P < 0.05$); there was no statistical significance in above index of budesonide low-dose group ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: Budesonide can relieve airway inflammation in asthmatic rats in dose-dependant manner, which may be associated with the decrease of TARC.

KEY WORDS Thymus and activation regulated chemokine; Budesonide; Asthmatic model; Rats; Airway inflammation; Remission effects; Mechanism

- [1] 田怀平,王美纳.奥硝唑的药理作用及临床应用[J].中国药房,2003,14(1):50.
- [2] 陈吉生,黎行山,叶茂清,等.复方奥硝唑栓的体外抗菌活性研究[J].中国药房,2006,17(24):1 854.
- [3] 夏革清,王泽华.奥硝唑和甲硝唑栓治疗细菌性阴道病临床随机双盲对照研究[J].中国妇幼保健,2005,20(21):2 790.
- [4] 蔡震.奥硝唑血药浓度的高效液相色谱法测定[J].现代医

- 药卫生,2008,24(5):655.
- [5] 魏敏吉,李天云,赵彩云,等.奥硝唑片在健康人体的生物等效性[J].中国临床药理学杂志,2010,26(11):822.
- [6] 李芹,王本杰,郭瑞晨.奥硝唑胶囊人体药代动力学及生物等效性研究[J].中国临床药理学杂志,2002,18(2):119.
- [7] 陈燕,石涛,柳晓泉,等.左旋和右旋奥硝唑在大鼠体内的药代动力学[J].中国药科大学学报,2006,37(1):41.
- [8] 郭威希,刘海涛,罗云,等.奥硝唑注射液兔体内药理学研究[J].广东药学院学报,2005,21(6):665.

(收稿日期:2013-03-14 修回日期:2013-05-03)

* 副主任药师。研究方向:医院制剂及临床药学。电话:0759-2387681。E-mail:88yingzi@163.com

支气管哮喘是儿科常见的气道慢性炎症性疾病。趋化因子在其发病中起重要作用。胸腺活化调节趋化因子(Thymus and activation regulated chemokine, TARC)是近年来发现的一个新的CC趋化因子(Cys-Cys chemokine),在哮喘的发病中起重要作用。而糖皮质激素具有广泛而强烈的抗炎作用,是当前推荐的治疗哮喘的首选药物。布地奈德是一种新合成的不含卤素的糖皮质激素,具有高效局部抗炎作用,是目前唯一可雾化吸入的激素^[1]。本文研究了布地奈德对哮喘模型大鼠气道炎症的缓解作用及其机制,为哮喘的发病机制及激素治疗提供新的理论依据。

1 材料

1.1 仪器

压缩雾化器(德国PARI公司);ELX800光吸收酶标仪(美国Bio-Tek公司);XZ61光学显微镜(日本Olympus公司);Counter JT细胞计数仪(美国贝克曼库尔特公司)。

1.2 药品与试剂

卵白蛋白原料药(OVA,美国Sigma公司,批号:DHO15-4,纯度:99%);氢氧化铝粉末(上海金赛医药化工有限公司,批号:20120226,化学纯);布地奈德混悬液(商品名:普米克令舒,阿斯利康公司,批号:LOT30349,规格:2 ml:1 mg);白细胞介素4(IL-4)、免疫球蛋白E(IgE)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒购自上海晶美生物工程有限公司;TARC的ELISA试剂盒(美国R&D公司)。

1.3 动物

健康SD大鼠50只,♂,体质量(200±20)g,购自广东医学院动物实验中心,使用许可证号:SCXK(粤)2007-0009。

2 方法

2.1 哮喘模型的建立

取大鼠在第0、7天每只腹腔内注射抗原混悬液[OVA 1 mg、氢氧化铝200 μg,溶解于0.9%氯化钠溶液(生理盐水)0.5 ml配成混悬液]致敏,从14 d开始雾化吸入1%OVA,每日1次,每次20 min,连续7 d,建立哮喘模型。

2.2 分组及给药

取大鼠随机分为正常对照组、模型组和低、中、高剂量布地奈德(0.25、1、2 mg/kg)^[2]组,每组10只。除正常对照组外,其余各组按“2.1”项下方法建模,低、中、高剂量布地奈德组大鼠雾化吸入1%OVA激发前30 min雾化吸入相应剂量的布地奈德溶液2 ml,每次10 min,每日2次,连续7 d。正常对照组大鼠第0、7天腹腔注射生理盐水0.5 ml。从14 d开始模型组和正常对照组大鼠雾化吸入蒸馏水,连续7 d。

2.3 标本的制作

各组大鼠末次雾化24 h后,抽取尾静脉血1 ml,1 000×g离心20 min,取上清液于-70℃保存待测。大鼠取血后断颈处死,以止血钳夹闭右支气管,经气管插管以无菌生理盐水1 ml进行支气管肺泡灌洗3次,灌洗液(BALF)1 000×g离心20 min,取BALF的上清液于-70℃保存待测。

2.4 嗜酸粒细胞(Eos)计数

采用Counter JT细胞计数仪计数“2.3”项下各组大鼠血清

和BALF中的Eos。

2.5 IL-4、IgE及TARC的检测

采用ELISA法,按试剂盒说明书操作,检测“2.3”项下各组大鼠血清和BALF中IL-4、IgE及TARC的水平。

2.6 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 10.0软件进行统计学分析,多组间比较采用 F 检验,两组间比较采用 Q 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 血清中Eos数量,IL-4、IgE及TARC含量比较

与正常对照组比较,模型组和低剂量布地奈德组大鼠血清中Eos数量和IL-4、IgE、TARC的含量均明显增加($P < 0.05$),中、高剂量布地奈德组上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组和低剂量布地奈德组比较,中、高剂量布地奈德组大鼠血清中Eos数量和IL-4、IgE、TARC含量均明显降低($P < 0.05$),模型组和低剂量布地奈德组比较上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$),结果详见表1。

表1 各组大鼠血清中Eos数量和IgE、IL-4、TARC含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Comparison of the number of Eos and the contents of IgE, IL-4 and TARC in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Eos, $\times 10^6 L^{-1}$	IgE, u/ml	IL-4, pg/ml	TARC, pg/ml
正常对照组	0.56 ± 0.07	17.97 ± 3.35	113.36 ± 35.61	91.97 ± 15.35
模型组	0.82 ± 0.19*	41.21 ± 6.89*	298.56 ± 36.13*	301.60 ± 14.35*
低剂量布地奈德组	0.71 ± 0.13*	37.33 ± 5.07*	267.72 ± 54.49*	257.65 ± 45.83*
中剂量布地奈德组	0.61 ± 0.09 ^{#a}	20.05 ± 2.75 ^{#a}	143.78 ± 49.05 ^{#a}	108.31 ± 29.31 ^{#a}
高剂量布地奈德组	0.51 ± 0.09 ^{#a}	18.31 ± 4.39 ^{#a}	135.83 ± 28.79 ^{#a}	97.29 ± 19.37 ^{#a}

与正常对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: [#] $P < 0.05$;与低剂量布地奈德组比较: ^a $P < 0.05$

vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: [#] $P < 0.05$; vs. budesonide low-dose group: ^a $P < 0.05$

3.2 BALF中Eos数量,IL-4、IgE及TARC含量比较

与正常对照组比较,模型组和低剂量布地奈德组大鼠BALF中Eos数量和IL-4、IgE、TARC的含量均明显增加($P < 0.05$),中、高剂量布地奈德组间比较上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组和低剂量布地奈德组比较,中、高剂量布地奈德组大鼠BALF中Eos数量和IL-4、IgE、TARC含量均明显降低($P < 0.05$),模型组和低剂量布地奈德组比较上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$),结果详见表2。

4 讨论

哮喘是呼吸系统常见病、多发病。近年来发病率呈增加趋势,特别是儿童哮喘更加明显,因此哮喘的发病机制和治疗一直是人们研究的热点。近年来,对哮喘发病机制进行了广泛的研究,证实哮喘是由T细胞、肥大细胞、Eos、支气管上皮细胞等多种细胞和细胞组分共同参与的一种气道慢性炎症性疾病。其中一个重要特征是存在激活的Th2淋巴细胞、Eos和肥大细胞^[3],IL-4是Th2细胞分泌的细胞因子。在这些炎症细胞和介质从血液转移到气道的过程中,趋化因子发挥着重要作用

表2 各组大鼠BALF中Eos数量和IgE、IL-4、TARC含量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Comparison of the number of Eos and the contents of IgE, IL-4 and TARC in BALF of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Eos, $\times 10^6 L^{-1}$	IgE, u/ml	IL-4, pg/ml	TARC, pg/ml
正常对照组	0.76 \pm 0.13	11.65 \pm 1.02	100.21 \pm 31.28	69.25 \pm 11.06
模型组	2.06 \pm 0.53*	19.70 \pm 3.71*	201.51 \pm 36.05*	261.50 \pm 17.02*
低剂量布地奈德组	1.71 \pm 0.47*	17.80 \pm 1.37*	179.43 \pm 24.23*	248.93 \pm 20.31*
中剂量布地奈德组	0.90 \pm 0.35 [△]	13.05 \pm 2.57 [△]	121.31 \pm 28.67 [△]	81.09 \pm 21.07 [△]
高剂量布地奈德组	0.81 \pm 0.21 [△]	12.30 \pm 1.93 [△]	112.43 \pm 23.29 [△]	75.48 \pm 16.07 [△]

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$; 与低剂量布地奈德组比较: [△] $P < 0.05$

vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: * $P < 0.05$; vs. budesonide low-dose group: [△] $P < 0.05$

用。如何抑制趋化因子的产生从而控制哮喘变态反应发生、发展成为人们普遍关注的热点。

TARC是Imai T等^[4]分离的一个新的CC趋化因子,主要表达于胸腺,也表达于其他组织,如肺、结肠、小肠等。TARC具有趋化Th2细胞从外周血募集至炎症部位的作用,参与了多种过敏性疾病的发生和发展,尤其是近年发现在支气管哮喘的发病中起重要作用^[5]。

近年来Sekiya T等^[6]发现哮喘患者的血清和痰液中的TARC水平明显增加。Leung TF等^[7]研究也发现哮喘患儿中的TARC水平明显增加,且与IgE浓度相关。因此认为血和痰液中TARC水平可作为变应性疾病的一个炎症性指标。

研究^[8]表明,哮喘患儿TARC增加可募集大量Th2细胞至炎症部位,Th2细胞分泌IL-4、IL-13,而IL-4及IL-13又促进气道上皮细胞、平滑肌细胞等分泌TARC,TARC的产生反过来诱导更多Th2细胞在气道的募集,从而起到级联放大作用,促使气道炎症发生、发展及慢性炎症的持续存在。本研究结果发现,模型组大鼠血清和BALF中Eos数量增加,IL-4、IgE及TARC的含量均增加,说明其参与了哮喘的气道炎症,提示TARC与哮喘的发生密切相关。

有研究^[9]证实TARC在哮喘患者的气道上皮细胞中表达较正常组明显增强。糖皮质激素吸入治疗几乎可完全抑制TARC蛋白和mRNA在气道上皮细胞的表达,提示气道上皮细胞是产生TARC的重要来源,糖皮质激素吸入治疗哮喘至少部分是通过抑制上皮细胞产生TARC而发挥作用。本研究结果发现,在给予布地奈德雾化处理后哮喘模型大鼠血清和BALF中的Eos数量和IL-4、IgE、TARC的含量降低,与国外研究结果一致^[10-11];本研究还发现,中、高剂量布地奈德组各项指标降低较明显,低剂量布地奈德组各项指标降低不明显,提示布地奈德确有降低大鼠TARC含量的作用,而且其下降程度与布地奈德的剂量有关。综上所述,布地奈德能缓解哮喘模型大鼠的

气道炎症,其可能与降低TARC含量有关,且呈剂量依赖性。

参考文献

- [1] 陈红波.普米克令舒雾化吸入治疗支气管哮喘疗效观察[J].中国医药导报,2008,5(13):64.
- [2] 中华医学会儿科学分会呼吸学组.儿童支气管哮喘诊断与防治指南[J].中华儿科杂志,2004,42(2):100.
- [3] 金光玉,延光海,金光日,等.抗IgE抗体对哮喘模型小鼠的气道高反应和Th2类细胞因子的影响[J].免疫学杂志,2011,27(1):9.
- [4] Imai T, Yoshida T, Baba M, *et al.* Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(35):21 514.
- [5] Asojo OA, Boulègue C, Hoover DM, *et al.* Structures of thymus and activation-regulated chemokine (TARC) [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, 59 (Pt 7): 1 165.
- [6] Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, *et al.* Increased levels of a Th2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics[J]. *Allergy*, 2002, 57(2):173.
- [7] Leung TF, Wong CK, Chan IH, *et al.* Plasma concentration of thymus and activation-regulated chemokine is elevated in childhood asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110(3):404.
- [8] Zee RY, Fernandez, Ortiz A.ACE D/I polymorphism and incidence of post-PTCA restenosis: a prospective angiography-based evaluation[J]. *Hypertension*, 2001, 37 (3): 851.
- [9] Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, *et al.* Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells[J]. *J Immunol*, 2000, 165(4):2 205.
- [10] Kurokawa M, Kokubu F, Matsukura S, *et al.* Effects of corticosteroid on the expression of thymus and activation-regulated chemokine in a murine model of allergic asthma[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 137(Suppl 1): 60.
- [11] Hoshino M, Nakagawa T, Sano Y, *et al.* Effect of inhaled corticosteroid on an immunoreactive thymus and activation-regulated chemokine expression in the bronchial biopsies from asthmatics[J]. *Allergy*, 2005, 60(3):317.

(收稿日期:2012-10-25 修回日期:2013-07-17)