DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.013

模拟高原低压舱治疗哮喘缓解期豚鼠对血清皮质醇及嗜酸性粒细胞的影响

熊建平* 孔祥英 (第三军医大学附属西南医院小儿科) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨模拟高原缺氧条件治疗哮喘的机制,为临床应用模拟高原低压舱治疗儿童哮喘提供部分理论依据。方法: 采用 10% 卵白蛋白 (OA)致敏和 5次 1% OA诱发复制哮喘豚鼠动物模型,设立正常对照组、哮喘对照组和低压舱治疗组 3组。利用模拟 4000 m海拔高原条件的低压舱治疗干预,结束后 3组均作外周血和 BALF中 EOS计数以及血清皮质醇检测,并进行统计学分析。结果: 哮喘对照组和低压舱治疗组外周血 EOS BALF中 EOS绝对值均非常显著高于正常对照组,低压舱组非常显著低于哮喘对照组 ($P < 0.01$);哮喘对照组和低压舱治疗组的 BALF中 HEOS百分率均非常显著高于正常对照组,低压舱治疗组非常显著低于哮喘对照组 ($P < 0.01$);正常对照组和低压舱治疗组的血清皮质醇含量均非常显著地高于哮喘对照组,但低压舱治疗组与正常对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。结论: 模拟高原低压舱治疗能使哮喘缓解期豚鼠血清皮质醇升高,进而使其外周血 EOS和 BALF中 EOS减少,有利于预防哮喘复发或减轻哮喘发作症状,可作为临床预防和治疗哮喘的一种新方法。

关键词 低压舱;豚鼠;哮喘;皮质醇;嗜酸性粒细胞

中图法分类号 R562.25; R845.22

哮喘是儿童较为常见的一种阻塞性肺疾病,严重影响身心健康。目前临床上仍以皮质激素作为控制哮喘症状的首选药物,而国内外早有报道应用高原气候条件治疗哮喘,取得良好疗效。本实验利用模拟高原环境的低压舱干预哮喘缓解期豚鼠,通过测定血清皮质醇、外周血和支气管肺泡灌洗液中 EOS计数等,来探讨低压舱治疗哮喘的机制,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物分组和哮喘动物模型的复制

1.1.1 动物分组和饲养 采用第三军医大学实验动物中心提供的 30只豚鼠,雌雄不拘,体重 350~ 450 g,随机分为正常对照组、哮喘对照组和低压舱治疗组 3组,雌雄分笼,予小颗粒饲料和青菜叶混合饲养,并注意每天饮水和保持巢穴清洁、通风、干燥。

1.1.2 动物模型的复制 哮喘对照组和低压舱治疗组豚鼠采用传统方法加以改进[1],并结合王长征[2]的方法复制哮喘动物模型,即第 1天用 10% 卵白蛋白 (OA) 1 ml腹腔注射致敏,第 15天用 1% OA超声雾化吸入 30 min诱发哮喘 (以豚鼠出现烦躁、打喷嚏、咳嗽、腹肌强烈收缩、呼吸急促等典型哮喘样发作为标准),以后隔天 1次,共 5次。第 1次诱发前 45~ 60 min给予苯海拉明 10 mg/kg耳后皮下注射预防豚鼠哮喘发作时突然死亡。正常对照组豚鼠用生理盐水代替 OA处理。

1.2 低压舱治疗

低压舱治疗组豚鼠在 5次哮喘诱发成功后,次日在模拟海拔 4000 m高原条件的动物低压舱治疗 10 d, 2 h/d。

1.3 检测方法

1.3.1 外周血嗜酸性粒细胞 (EOS)计数 治疗结束后, 3组豚鼠均从后足掌采取外周血 20 μl悬于 0.38 ml嗜酸性粒细胞计数液中,用计数板在显微镜下直接作嗜酸性粒细胞计数。

1.3.2 支气管肺泡灌洗液 (BALF)中嗜酸性粒细胞 (EOS)计数 ① 支气管肺泡灌洗液的收集: 所有豚鼠经股动脉放血后,立即分离气管,并做气管切开插管固定,经导管缓慢注入 4℃无菌 Hanks液 10 mL× 3次,保留片刻后反复灌洗,并轻轻回抽,回收率> 50% 者方可进行 EOS分离。将所得支气管肺泡灌洗液按 1000 r/min的速度离心 10 min,弃掉上清液,沉淀细胞用 Hanks液再冲洗、离心 3次,最后收集细胞重悬于比重为 1.070的 1 ml Percoll液中。② BALF中 EOS的分离和低密度 EOS (HEOS)计数: 按文献 [3]方法配制好不同比重的 Percoll液,在 5 ml的离心管中依次缓慢加入比重为 1.100、1.090、1.085、1.080的 Percoll液各 1 ml(注意不能混匀),然后沿管壁轻轻加入上述细胞悬液,用 4℃离心机按 2500~ 3000 r/min速度离心 20 min,将比重≤ 1.085的 EOS定为 HEOS,收集比重高于和低于或等于 1.085的两管液体,分别充分混匀,取 20 μl悬于 0.38 ml嗜酸性粒细胞稀释液中,用计数板在显微镜下直接作嗜酸性粒细胞计数,计算出 BALF中 EOS的绝对数和 HEOS的百分比。

1.3.3 血清皮质醇的测定 豚鼠麻醉后,经股动脉放血,收集 3 ml置于干燥管中,分离得血清 0.5 ml。首先在塑料管上编号,包括非特异管 (Non specific binding sample, NSB)、零结合管 (Binding sample 0, B0)、标准管 (Standard sample, S1~ S6)和待测标本样品管 (Unknown sample, U),按表 1方法加样 (μl)摇匀后, 37℃温育 1 h, 4℃ 30 min后进行测定。

* 熊建平,男, 28岁,住院医师,硕士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　血清皮质醇水平的测定方法

Tab 1　The procedure of determination of serum cortisol

Type of tubes	No. of tubes	Diluent	Standard	Sample	^{125}I-Cortisol	Antibody	ISR
NSB	1~ 2	150	–	–	100	–	1000
B0	3~ 4	50	–	–	100	100	1000
S1~ S6	5~ 16	–	50	–	100	100	1000
U	17~	–	–	50	100	100	1000

ISR: Immunological separating reagent

摇匀,4℃放置 15 min,任取 3管测总放射性计算均值(T),3 500 r/min离心 20 min,弃掉上清液,采用放射免疫分析仪测定标本放射性计数,并经计算机处理,将结果打印出来。

1.4　统计学方法

采用第三军医大学数学教研室提供的医用统计程序包 SPMR中单因素方差分析(PDA-2),实验数据用 $\bar{x}\pm s$表示,应用计算机作统计学处理。

2　结果

外周血 EOS计数(单位:× 10^6/L)、BALF中 EOS绝对值计数(单位:× 10^6)和 HEOS百分比以及血清皮质醇含量(单位:μg/L)比较见表 2

表 2　外周血、BALF中 EOS计数和 HEOS百分比及血清皮质醇水平

Tab 2　EOS count of PB and BALF, percentage of HEOS and content of serum cortisol

	NCG	AG	HCTG
EOS count of PB	28.60± 10.63	288.20± 59.98*	138.60± 27.54*#
EOS count of BALF	2.08± 0.41	6.42± 2.01*	3.1± 0.31*#
Percentage of HEOS	0.28± 0.11	0.68± 0.07*	0.58± 0.07*#
Content of serum cortisol	390.57± 86.39	118.8± 58.81*	383.0± 98.01#

AG: Asthmatic group; HCTG: Hypobaric chamber-treated group; NCG: Normal control group; *: $P<0.01$ *vs* NCG; #: $P<0.01$ *vs* AG

3　讨论

哮喘是一种以气道高反应性为主要特征的阻塞性肺疾病。这种气道高反应性与慢性变态反应性气道炎症有关,且嗜酸性粒细胞(EOS)是重要的效应细胞。现有资料显示,哮喘机体内源性皮质醇水平偏低或其受体功能缺陷而造成体内糖皮质激素相对不足是哮喘发作和恶化的一个原因,也是临床上首选激素类药物来控制哮喘发作的依据。然而长期使用激素治疗哮喘也有其弊端,国外早有人利用高原环境治疗哮喘,取得较好疗效,并证实高原气候条件能提高患者内源性皮质醇水平,降低其外周血及 BALF中 EOS数,并降低气道的高反应性[4],与国内缪琪蕾[5]报道的结果基本一致。而且,中科院上海生理研究所和上海第六人民医院合作利用模拟高原条件的低压舱治疗来预防哮喘复发取得较好疗效,但治疗机制未阐述。

本实验通过 OA致敏和诱发哮喘,成功地复制了豚鼠哮喘模型,其外周血 EOS及 BALF中 EOS显著增多。利用模拟高原条件的低压舱治疗哮喘缓解期豚鼠 10 d,能较为有效地提高血清皮质醇水平,并降低外周血和 BALF中的嗜酸性粒细胞数量,同时亦使 HEOS不同程度下降,取得与国内外高原环境治疗哮喘基本相同的结果。推测其机理可能是通过低氧这一良性应激原,刺激机体下丘脑-垂体-肾上腺轴等兴奋而产生应激反应,从而提高机体内源性血清皮质醇水平,进而通过:① 抑制 T淋巴细胞尤其是 $CD4^+$的 T淋巴细胞活性,进而降低全身和局部的 IL-5、GM-CSF等水平;② 促进淋巴细胞高表达 Fas抗原,通过 Fas/Fas L诱导 EOS等炎症细胞的凋亡[6,7],共同抑制 EOS活化、缩短其生存时间,促进 EOS凋亡。因此,活化的 EOS(HEOS或 EG^{2+})减少,可使其合成和释放白三烯(LTs)、血小板活化因子(PAF)、主要碱性蛋白(MBP)、嗜酸性阳离子蛋白(ECP)、神经毒蛋白(ENP)、过氧化酶(EPO)和氧自由基等毒性颗粒相应减少[8],同时,其表达 IL-5和 VLA-4等亦减少[9,10],进一步减轻了 EOS在炎症局部的粘附、聚集、趋化和活化。此外糖皮质激素可与细胞内其受体结合,诱导一种分子量约(40~ 45)× 10^3u的蛋白质-巨皮质素(又称调脂蛋白)合成,抑制磷脂酶 A_2活性而减少花生四烯酸的合成和释放,从而减少了前列腺素(PGs)、白三烯(LTs)及血栓素(Tx)等炎性介质的生成、释放和激活,能较为有效地抑制变态反应的强度[11]。三者共同减轻哮喘患者气道变态反应性炎症,进而降低气道高反应性,最终使哮喘病人减轻症状、减少复发。

(感谢第三军医大学高原医学教研室提供动物低压舱!)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献

1 刘朝晖,徐 军,钟南山.内皮素、肿瘤坏死因子在哮喘发病中的作用.中华结核和呼吸杂志,1995,18(6):366

2 王长征,郭先健,王顺朝.雷公藤甲素对哮喘动物模型气道反应性的观察.中华医学杂志,1996,76(1):68

3 Day R P. Eosinophil cell separation from human peripheral blood. Immunology, 1970, 18(2): 955

4 De Bie T J, Hessel E M, Van Ark, *et al*. Effect of dexamethasone and endogenous corticosterone on airway hyperresponsiveness and eosinophilia in the mouse. Br J Pharmacology, 1996, 119(7): 1484

5 缪琪蕾.高原气候降低居室尘埃螨过敏性哮喘小儿的周围血T淋巴细胞活性、嗜曙红细胞增多和支气管阻塞.高原医学杂志,1995,5(3):35

6 Adachi T, Motojima S, Hirata A, *et al*. Eosinophil apoptosis caused by theophylline, glucocorticoids, and macrolides after stimulation with IL-5. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98(6 pt2): S207

7 Matsumoto K, Schleimer R P, Saito H, *et al*. Induction of apoptosis in human eosinophils by anti Fas antibody treatment *in vitro*. Blood, 1995, 86(2): 1437

8 Ackerman S J. Distinctive cationic protein of the human eosinophil granule: major basic protein, eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin. J Immunol, 1983, 131(6): 2977

9 Walsh G M, Hartnell A. IL-5 enhances the *in vitro* adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leukocyte integrin-dependent manner. Immunology, 1990, 71(2): 258

10 Laudanna C, Bonizzato C, Piacentini G, *et al*. Crosslinking of members of the 1 and 2 subfamily of integrins triggers eosinophil respiratory burst and spreading. Immunology, 1993, 80(2): 273

11 冯新为 主编.病理生理学.第3版.北京:人民卫生出版社,1993.173~174

(收稿:1998-11-15;修回:1999-03-22)

(编辑 冷怀明)

Effects of hypobaric chamber therapy on the content of serum cortisol and number of eosinophils in treatment of asthma in the remission stage in guinea pigs

Xiong Jianping, Kong Xiangying (Department of Pediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To explore the mechanism of the therapeutic effects of hypobaric chamber on asthma to provide theoretical basis for clinical practice. **Methods**: Guinea pigs were randomized into the normal control group (NCG), asthmatic group (AG) and hypobaric chamber-treated group (HCTG). The model of asthma was established in the animals in the latter two groups through sensitization and induction with 10% ovalbumin (OA) and 1% OA respectively. The guinea pigs in HCTG were treated with hypobaric chamber simulating 4000 m altitude. The content of serum cortisol and the number of eosinophils (EOS) in peripheral blood (PB) and in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined. **Results**: ① The number of EOS in PB and BALF were significantly higher in AG and HCTG than in NCG, but significantly lower in HCTG than in AG ($P < 0.01$). ② The percentage of HEOS in BALF was significantly higher in AG and HCTG than in NCG, but markedly lower in HCTG than in AG ($P < 0.01$). ③ The content of serum cortisol was remarkably higher in NCG and HCTG than in AG. However, no significant difference was found between HCTG and NCG ($P > 0.05$). **Conclusion**: After the treatment of asthma with hypobaric chamber, the content of serum cortisol in asthmatic guinea pigs was significantly increased to result in marked decrease of the number of EOS and the percentage of HEOS in PB and BALF. All these may be beneficial to prevent the relapse of asthma and alleviate asthmatic syndrome. Hypobaric chamber can be used as a new way for prevention and treatment of asthma.

Key words hypobaric chamber; asthma; cortisol; eosinophil; guinea pig

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net