



世界中医药学会联合会

World Federation of Chinese Medicine Societies

附件一： 世界中联首届中葡中医药发展论坛
暨第七届中医儿科国际学术交流大会
征稿要求

1. 论文收集截稿日期：2015 年 6 月 30 日前，如逾期将无法录入大会论文集。
2. 论文投稿方式：电子版以附件形式发送至电子邮箱（szlek@126.com）。投稿邮件中请详细注明：姓名、职称、所属单位或团体、通讯方式(电话、电邮、传真)，并注明参加“世界中联首届中葡中医药发展论坛、世界中联第七届中医儿科国际学术交流大会”论文。
3. 格式：论文及摘要一律采用 Microsoft Word 文档格式。不接受手写和图片格式的稿件。
4. 内容：应征论文必须数据可靠，内容充实，文责自负。
5. 题目和摘要：题目、摘要须中文和英文。摘要字数 300 字左右，中文关键词置于中文摘要下方；英文关键词应与中文相对应，置于英文摘要下方。作者姓名要全部依次列出，作者单位需写全称，地址要详细。文中表格一律采用“三线表”，凡能用文字说明者，尽量不用表格。
6. 正文（含参考文献）：字数在 4000 字以内，中英文均可。
7. 参考文献：作者人数 3 名者全部列出，3 名以上者只列前 3 名，后加“，等。”。参考文献应以近 5 年国内外发表的文献为主，每条参考文献要写明起止页码。
8. 论文书写字体、字号、行距等请严格按照样稿。
9. 论文审核：“大会学术委员会”有权删改和取舍论文，大会收录的论文将编辑成大会论文集；不参加大会者欲将论文刊登于大会论文集者请交纳论文编辑付梓费每篇 200 元（请经银行电汇到：中国工商银行南京汉中门支行，卡号 6212264301006188831 戴启刚（收），附言请注明：XXX葡萄牙会论文）
10. 大会演讲：一经选入作为大会发言者，须在 2015 年 8 月 10 日前向大会提供演讲时的演示文稿(PPT)，幻灯片不得超过 30 张，每张幻灯片需要中英文对照。每位发言时间限定在 15 分钟之内（含 3 分钟提问）。不符合以上要求者将视为自动放弃大会发言。

地址：北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 505# 邮编：100101

Add: Room 505, Building A, Wealth Garden, NO.19 Xiao Ying Street, Chaoyang District, Beijing, P.R. China 100101

Tel: 86-10-58650042/ 0043

Fax: 86-10-58650043

http:// www.wfcms.org

E-mail: wfcmsxshb@vip.163.com



世界中医药学会联合会

World Federation of Chinese Medicine Societies

样稿:

固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠肺组织 IL-4、IL-12 的影响

赵霞, 高莉娟, 黄争光, 陈文君

(南京中医药大学, 江苏, 南京210029)

摘要目的: 研究固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠肺组织 IL-4、IL-12 的干预作用, 探讨其治疗哮喘的免疫学机制。方法: 75 只小鼠随机分为正常组、模型组、预防组、固本防哮饮组和孟鲁司特钠组, 以卵蛋白(OVA)致敏和 RSV 致敏激发制备哮喘缓解期小鼠模型。观察各组小鼠的一般行为活动和病理学变化特点, 用 RT-PCR 法测定哮喘小鼠肺组织 IL-4、IL-12 的 mRNA 表达。结果: 1. 模型组小鼠肺组织可见支气管壁水肿、增厚, 周围有嗜酸性粒细胞和中性粒细胞浸润。预防组、固本防哮饮组及孟鲁司特钠组, 小鼠肺脏病理改变显著改善, 支气管壁充血水肿现象减轻, 管壁和平滑肌厚度减小, 且嗜酸性粒细胞和中性粒细胞浸润也显著减少。2. 模型组小鼠肺组织 IL-4mRNA 显著高表达 ($P<0.01$), IL-12mRNA 低表达, 预防组、固本防哮饮组、孟鲁司特钠组 IL-4mRNA 表达下降, IL-12mRNA 表达升高。结论: 固本防哮饮防治哮喘的可能机制是其降低哮喘小鼠肺组织中 IL-4mRNA 的表达, 升高 IL-12mRNA 表达, 纠正 Th1/Th2 失衡, 从而减轻气道炎症, 缓解气道重塑。

关键词: 支气管哮喘; IL-4; IL-12; 固本防哮饮

基金资助: 国家自然科学基金 (81173299); 重点学科开放课题 (EZK2012005)

The Effect of Gubenfangxiao Decoction on the Expression of Remission of Asthma Mice Lung Tissue IL - 4、IL-12

Zhao Xia Gao LiJuan Huang ZhengGuangChenWenJun

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029)

AbstractObjective: Study Gubenfangxiao Decoction for remission of asthma mice lung tissue IL - 4, IL - 12 intervention effect, its immunological mechanisms for the treatment of asthma. **Methods:** 75 mice were randomly divided into normal group, model group, preventive group, Gubenfangxiao Decoction group and Menglusitena group, with egg protein (OVA) sensitization and RSV sensitization excitation preparation remission of asthma mice model. Observe each group general characteristics, activities and pathological changes of mice, By RT-PCR method determination of asthma mice lung tissue mRNA expression of IL - 4, IL - 12. **Results:** 1. Model group mice lung edema, bronchial wall thickening, eosinophils and neutrophils infiltrating around

地址: 北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 505# 邮编: 100101

Add: Room 505, Building A, Wealth Garden, NO.19 Xiao Ying Street, Chaoyang District, Beijing, P.R. China 100101

Tel: 86-10-58650042/ 0043 Fax: 86-10-58650043 http:// www.wfcms.org E-mail: wfcmsxshb@vip.163.com



世界中医药学会联合会

World Federation of Chinese Medicine Societies

it. Prevention group, Gubenfangxiao Decoction, and Menglusitena group, Lung pathological changes in mice significantly improve, bronchial wall reduce hyperemia edema phenomenon, pipe wall thickness decreases, and smooth muscle and eosinophils and neutrophils infiltration was also significantly reduced. 2. IL-4mRNA in lung tissue in model mice significantly higher expression ($P<0.05$), IL-12mRNA lower expression, prevention group, Gubenfangxiao Decoction group and Menglusitena group IL-4mRNA expression decreased, IL-12mRNA expression increased. **Conclusion:** Gubenfangxiao Decoction group possible mechanisms of prevention and treatment of asthma prevention is to reduce the asthma IL-4mRNA expression in lung tissue in mice, increased IL-12mRNA expression, correct the Th1 / Th2 imbalance, thus reduce airway inflammation, relieve airway remodeling.

Keywords bronchial asthma, IL-4, IL-12, Gubenfangxiao Decoction

Fund assistance National Natural Science Foundation of China (NO.81173299), Key discipline and open issue (EZK2012005)

支气管哮喘是由多种细胞包括呼吸道的炎性细胞和结构细胞(如嗜酸粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞、中性粒细胞、平滑肌细胞、呼吸道上皮细胞等)和细胞组分参与的呼吸道慢性炎症性疾病^[1]。近年来哮喘患者低龄化趋势明显,儿童哮喘患病率显著上升。以Th2过度活化为主的Th1/Th2失衡是哮喘重要的免疫学发病机制,其中,白介素12(IL-12),白介素4(IL-4)分别作为Th1和Th2特征性细胞因子,在调节Th1/Th2平衡及哮喘的发生、发展中发挥着重要作用。固本防哮饮处方为我国著名儿科专家江育仁教授的经验方,具有补肺固表,健脾化痰的功效,药理研究表明该复方具有明显的抗炎、调节免疫功能等作用^[2]。本研究旨在通过复制哮喘缓解期小鼠模型检测其肺组织IL-4、IL-12 mRNA表达,从免疫学角度探讨固本防哮饮防治哮喘的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雌性BALB/c小鼠,4~6周龄,体重16-20g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(沪)2012-0002。

1.2 药物

固本防哮饮由炙黄芪、党参、炒白术、茯苓、煅牡蛎、蝉蜕、陈皮、防风、辛夷、五味子和生甘草组成,药材经江苏省中医院药剂科鉴定为正品。将炙黄芪、党参、炒白术、茯苓、煅牡蛎、蝉蜕、陈皮、防风、辛夷、五味子和生甘草按5:3.33:3.33:3.33:5:2:2:1:

地址:北京市朝阳区小营路19号财富嘉园A座505# 邮编:100101

Add: Room 505, Building A, Wealth Garden, NO.19 Xiao Ying Street, Chaoyang District, Beijing, P.R. China 100101

Tel: 86-10-58650042/0043 Fax: 86-10-58650043 http://www.wfcms.org E-mail: wfcmsxshb@vip.163.com



世界中医药学会联合会

World Federation of Chinese Medicine Societies

2:2:1的比例配伍,取10倍量冷水浸药30min,煎90 min(沸后),滤过;第2煎加8倍量水煎30min,将两次煎液过滤合并浓缩,调至含生药1.725g/mL的溶液,密封于无菌量瓶。4℃储存备用。

1.3 试剂及仪器

卵蛋白(OVA,批号:1030D053),美国Sigma公司;Triol试剂盒(批号:A8003-1);Prime Script™ RT reagent kit(批号:AK4302),SYBR Premix EX Taq™ II(批号:AK3820),宝生物工程(大连)有限公司;孟鲁司特钠片,杭州默沙东制药有限公司,批号:J20070058;7500实时定量PCR仪(AB Applied Biosystems),雾化仪器(江苏鱼跃器械有限公司)。

1.4 分组、造模和给药

参考文献[3]方法,并略加改进制备小鼠哮喘缓解期模型。适应性饲养BALB/c小鼠2-3天,第4天予以小鼠腹腔注射OVA致敏液0.2 ml(其中包含OVA100μg,硫酸钾铝1mg,生理盐水溶解)致敏,正常组除外,至第11天再次以同剂量腹腔注射致敏,第18天将小鼠放入有机玻璃盒,以2.5%OVA溶解于生理盐水中雾化吸入30min致敏,每天一次,连续两周,33天时用0.3%戊巴比妥钠0.3ml麻醉,用滴度为 $1.0 \times 10^{6.5}$ TCID₅₀/ml RSV 50ul/只滴鼻,之后用同样方法雾化吸入OVA激发,每2天一次,连续4周,分别于第47、61天用RSV滴鼻,后将小鼠随机分为3组,每组15只,即模型组(蒸馏水20ml/kg)、孟鲁司特钠组(2.6 mg/kg)和固本防哮饮组(34.5g/kg,为生药量),每日灌胃给药1次,共28天。正常组以同体积生理盐水代替OVA溶液致敏和激发,以等体积蒸馏水灌胃。预防组于第二天予以固本防哮饮灌胃。末次给药后24h,收集标本,测定相关指标。

1.5 肺组织标本处理及病理切片的制备

模型组及预防组末次激发24h后,取出小鼠双肺,取各组小鼠左肺立即放入液氮罐中保存备检;在右肺迅速置入4%的中性甲醛中固定24h后进行脱水、石蜡包埋、切片、苏木素伊红(H.E)染色,光镜下观察支气管病变和炎性细胞浸润等病理变化,由专业病理人员进行阅片,评价。

1.6 肺组织 IL-4、IL-12 mRNA 表达的测定

按照说明书抽提总 RNA,生物分光光度计对 RNA 定性及定量分析,按照 RT-PCR 试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA,SYBR Green Real time PCR 法检测肺组织 IL-4、IL-12mRNA 表达。引物设计如下: GAPDH(104bp):5'-CGTGTTCCTACCCCAATGT-3',5'-TGTCATACTTGGCAGGTTTCT-3';IL-4(110bp):5'-TCTCGAATGTACCAGGAGCCATAT-3',5'-AAGCA CCTTGGAAGCCCTACAGA-3';IL-12(106bp):5'-ACAGCACCAGCTTCTTCATCAG-3',5'-TCTTCAAAGGCTT CATCTGCAA-3'。两步法扩增程序为:预变性 95℃×30s→变性 95℃×5s→退火 60℃×34s→延伸 60℃×1min,共 40 个循环,同时做熔解曲线,重复 3 次。Real-Time PCR 结果采用相对定量法计算—— $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,即 $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ 样本} - Ct \text{ 内参}) \text{ 受试组} - (Ct \text{ 样本} - Ct \text{ 内参}) \text{ 对照组}$ 。

地址:北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 505# 邮编:100101

Add: Room 505, Building A, Wealth Garden, NO.19 Xiao Ying Street, Chaoyang District, Beijing, P.R. China 100101

Tel: 86-10-58650042/0043 Fax: 86-10-58650043 http://www.wfcms.org E-mail: wfcmsxshb@vip.163.com



世界中医药学会联合会

World Federation of Chinese Medicine Societies

根据目的片段的长短及引物的 T_m 值设置退火温度和延伸时间。

1.7 统计学处理

数据采用SPSS 17.0统计软件进行统计处理,统计方法采用单因素方差分析,所有计量资料均用 $\bar{x} \pm s$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般行为特点

模型组大鼠经抗原激发后,表现为烦躁不安、呼吸急促和腹肌抽搐等症状,重者呼吸减慢或节律不规则,可闻及哮鸣音,四肢瘫软,行动迟滞或俯伏不动,甚至瘫痪,毛色失去光泽。预防组、固本防哮饮组及孟鲁司特钠组表现较模型组明显减轻。

2.2 对哮喘缓解期小鼠肺脏组织病理学的影响

正常组小鼠肺脏偶见炎性细胞浸润,支气管壁完整,黏膜未见充血水肿,管壁和平滑肌厚度正常;模型组小鼠肺可见支气管壁水肿、增厚,周围有嗜酸性粒细胞和中性粒细胞浸润。预防组、固本防哮饮组及孟鲁司特钠组,小鼠肺脏病理改变显著改善,支气管壁充血水肿现象减轻,管壁和平滑肌厚度减小,且嗜酸性粒细胞和中性粒细胞浸润也显著减少。表明固本防哮饮可以减轻哮喘小鼠的肺脏病理改变。见图1。

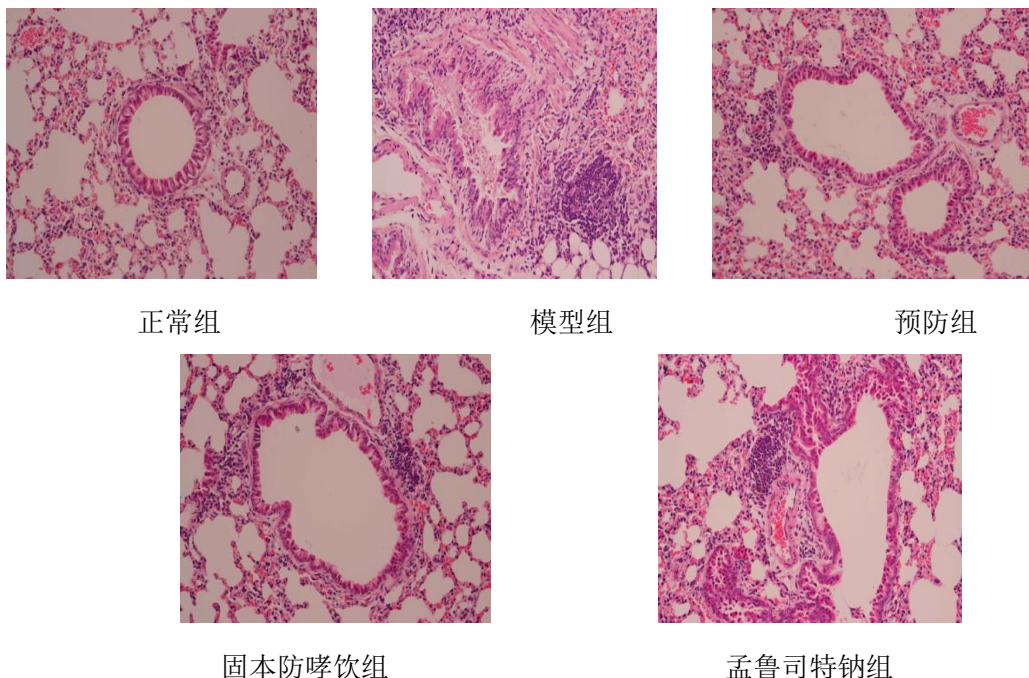


图1 各组小鼠肺组织病理学改变 (HE×100倍)

2.3 各组哮喘小鼠肺组织中IL-4、IL-12 mRNA的表达

与正常组相比,模型组IL-4mRNA显著高表达 ($P < 0.01$), IL-12mRNA低表达;与模型组相比,预防组、固本防哮饮组、孟鲁司特钠组IL-4mRNA表达下降, IL-12mRNA表达升高;

地址: 北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 505# 邮编: 100101

Add: Room 505, Building A, Wealth Garden, NO.19 Xiao Ying Street, Chaoyang District, Beijing, P.R. China 100101

Tel: 86-10-58650042/ 0043 Fax: 86-10-58650043 http:// www.wfcms.org E-mail: wfcmsxshb@vip.163.com



世界中医药学会联合会

World Federation of Chinese Medicine Societies

孟鲁司特钠组升高IL-12mRNA更明显。表明固本防哮饮能降低哮喘小鼠肺组织中IL-4mRNA的表达，升高IL-12mRNA表达，从而减轻气道炎症，纠正Th1/Th2失衡，且能预防哮喘的发生。见表1。

表1 小鼠肺组织中IL-4、IL-12 mRNA的表达 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	IL-4 mRNA	IL-12 mRNA
模型组	3.25±0.51*	0.17±0.12*
预防组	0.58±0.14 [▲]	4.95±0.27 [▲]
固本防哮饮组	1.03±0.27 [▲]	4.66±0.28 [▲]
孟鲁司特钠组	0.73±0.18 [▲]	9.68±0.70 [▲]
F	82.079	320.099

(*与正常组相比, $P<0.05$, [▲]与模型组相比, $P<0.05$)

3 讨论

支气管哮喘的发病机制相当复杂，迄今尚未完全明了。研究表明[4]，辅助性T淋巴细胞TH1/TH2细胞失衡即TH2型反应模式是哮喘气道炎症的重要特征，也是哮喘病理生理过程形成的始动和维持因素。影响TH细胞分化的胞外信号分子包括细胞因子、抗原提呈细胞（APC）的类型、抗原的性质及剂量，其中最关键的是细胞因子。细胞因子IL-12促进TH0向TH1分化；IL-4促进TH0向TH2分化。缺乏IL-12或IL-12Rβ1链小鼠不能形成TH1细胞[5]，而缺乏IL-4或IL-4Rα链的小鼠不能形成TH2反应[6]。因此导致Th1和Th2分化的最终有力因子分别是IL-12和IL-4。IL-4可通过加强IL-4受体的表达及抑制IL-12受体β2链的表达，来促进Th2的分化和抑制Th1的分化；IL-12可抑制嗜酸粒细胞向气道内浸润，又可抑制IL-4的产生，从而抑制了Th2型免疫反应。纠正Th1细胞向Th2细胞漂移状况，使免疫反应由Th2型向Th1型逆转，是目前治疗哮喘的有效途径之一。

我们制备了哮喘缓解期小鼠模型，与正常组相比，模型组小鼠肺组织IL-4mRNA显著高表达，IL-12mRNA低表达，提示哮喘小鼠体内发生Th1/Th2偏移，Th2优势应答是哮喘发病的始动因素和维持因素。固本防哮饮通过降低哮喘小鼠肺组织中IL-4mRNA的表达，减少黏液分泌和减轻气道高反应性；通过升高IL-12mRNA表达，抑制嗜酸粒细胞在气道聚集，从而达到改善失衡的Th1/Th2细胞亚群功能，减轻气道炎症，有利于防止哮喘复发。

综上所述，本研究从免疫学角度探讨固本防哮饮防治哮喘的作用机制，发现固本防哮饮能下调哮喘小鼠体内IL-4mRNA表达，上调IL-12mRNA的表达，从而拮抗气道炎症，防治哮喘，这可能是其防治哮喘的作用机制之一。

参考文献



世界中医药学会联合会

World Federation of Chinese Medicine Societies

- [1] 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]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(3): 177-185.
- [2] 卢海燕.哮喘患儿的中医体质类型及中医药干预方案的研究[D].南京: 南京中医药大学, 2010.
- [3] 袁雪晶,夏晨,汪受传.固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠的治疗作用[J].中药新药药理与临床, 2010,5 (21) : 257-260.
- [4] O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets[J]. Immunity, 1998, 8(3) : 275- 283.
- [5] Seki N, Miyazaki M, Suzuki W, et al . IL- 4- induced GATA- 3 expression is a time- restricted instruction switch for Th2 cell differentiation[J]. J Immunol, 2004, 172(10) : 6158- 6166.
- [6] 王楸,陈超,刘登礼, 等.胰岛素样生长因子-1(IGF-1) 对缺血缺氧性脑损伤新生鼠内源性 IGF-1 和 IGF-1 受体基因表达的影响[J].中国当代儿科杂志, 2004, 6(6): 470- 473.

作者简介: 赵霞 (1972-) 女, 教授, 博士生导师, 南京中医药大学儿科教研室。

研究方向: 中医儿科肺脾系疾病。

地址: 南京市汉中路282号, 210029, Tel:86-025-86798182,E-mail:zhaoxiahy@126.com。