

玉屏风散对煤烟相关可吸入颗粒物致肺损伤模型 小鼠免疫功能的干预作用

朱雪, 李珂, 陈宪海, 张阳, 韩佳, 卢绪香, 郑建, 张伟*
(山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

[摘要] **目的:**探讨玉屏风散对煤烟相关可吸入颗粒物小鼠肺损伤模型免疫功能的干预作用。**方法:**将实验小鼠置于特制染毒箱中,使煤炭燃烧产生的烟雾通入该箱,箱内 PM_{2.5} 浓度维持在 700~900 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$,建立吸入颗粒小鼠肺损伤模型。以玉屏风散中药水煎剂对染毒模型分别进行预防用药、预防+治疗用药、治疗用药 3 种方式灌胃给药,检测肺泡灌洗液中尘细胞比例,免疫组化法检测肺组织中 CD68⁺ 巨噬细胞数量,流式细胞技术检测血 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞及其比例,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清、肺组织匀浆免疫球蛋白 E(IgE),IgG 浓度。**结果:**模型组小鼠肺泡灌洗液中尘细胞和 CD68⁺ 巨噬细胞数量显著增多,血 CD4⁺,CD8⁺ 均降低,血清 IgE 水平升高,IgG 水平降低,肺组织匀浆中 IgE 无明显变化,IgG 水平显著降低。药物干预后,血液中 CD4⁺,CD8⁺ 细胞数量升高,但二者比例各组间无统计学差异。尘细胞数量和 CD68⁺ 巨噬细胞数量明显降低,以预防+治疗组最为明显。血清中 IgE 含量以预防组最低,血清和肺组织匀浆 IgG 则预防+治疗组最高。**结论:**玉屏风散预防应用可提高小鼠的细胞及体液免疫功能,且在染毒环境中保持,但在已染毒后的治疗作用中效果远不如其提前应用疗效更佳。

[关键词] 可吸入颗粒物;玉屏风散;细胞免疫;体液免疫;巨噬细胞

[中图分类号] R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0103-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180734

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180111.0852.005.html>

[网络出版时间] 2018-01-12 11:18

Effect of Yupingfeng San on Immune Function of Lung Injury Mice Induced by Smoked Soot-related Respirable Particulate

ZHU Xue, LI Ke, CHEN Xian-hai, ZHANG Yang, HAN Jia, LU Xu-xiang, ZHENG Jian, ZHANG Wei*
(Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Yupingfeng San on the immune function of mice models with lung injury induced by smoked soot-related respirable particulate. **Method:** The experimental mice were placed in a special exposure box, and the smoke from the combustion of coal was introduced into the box. The PM_{2.5} concentration in the box was maintained at 700-900 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ to establish the model of lung injury. The Yupingfeng San decoction was given to the models by intragastric administration in 3 different ways: prevention, prevention + treatment, and treatment. Then the proportion of dust cells in the alveolar lavage fluid was detected; the count of CD68⁺ macrophages in the lung tissues was detected by immunocytochemistry; CD4⁺ and CD8⁺ cells counts and their ratio were detected by flow cytometry; IgE and IgG concentrations in serum and lung tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** The dust cells count and CD68⁺ macrophages

[收稿日期] 20171014(003)

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2014HP070);泰山学者建设工程项目(20110819)

[第一作者] 朱雪,博士,主治医师,从事肺系病中医病因学、证候学及临床防治研究,Tel:0531-68617464,E-mail:zhu-99@163.com

[通信作者] *张伟,博士,博士生导师,主任医师,从事呼吸系统疾病的中西医结合临床研究,Tel:0531-68617464,E-mail:huxizhijia@126.com

count in alveolar lavage fluid of model mice were increased significantly; serum CD4⁺, CD8⁺ were decreased; the IgE level in serum was increased and the IgG level in serum was decreased; IgE level in the lung homogenate had no obvious change, while the IgG level in lung homogenate was decreased significantly in model group. After drug intervention, the count of CD4⁺ and CD8⁺ cells in the blood was increased, but there was no statistical difference between the two groups. The count of dust cells and the count of CD68⁺ macrophages were decreased significantly, most obvious in the prevention + treatment group. The IgE level in serum was lowest in the prevention group, and the IgG level in serum and lung homogenate was highest in the prevention + treatment group. **Conclusion:** Yupingfeng San can improve the cellular and humoral immune function of mice, and the effect can be maintained in toxic environment; however the effect in the toxic environment is far less than the earlier application effect.

[**Key words**] respirable particulate; Yupingfeng San; cellular immunity; humoral immunity; macrophages

可吸入颗粒可造成人体多个器官、系统的损害,影响人群多种疾病发病率、死亡率。人为排放是 PM_{2.5} 污染的主要来源,长期暴露于颗粒物可以引起肺部炎性损伤,严重者甚至可以导致呼吸窘迫,影响肺功能,引发哮喘、肺气肿和慢性支气管炎等疾病^[1]。中医学早在《黄帝内经》中提出“治未病”思想,强调疾病预防的重要性。我国首个《国家环境与健康行动计划(2007—2015)》提出,要开展中医药对环境污染健康危害的干预研究,发挥中医药“简、便、验、廉”的特点。目前某些药物或成分已经有实验研究证实对 PM_{2.5} 的损伤有干预作用,可通过改善肺组织炎性反应,调节氧化/抗氧化系统平衡、改善机体免疫功能等方面发挥对肺脏的保护作用。比如方剂有杏苏散、桑杏汤^[2]等,中成药固本止咳颗粒^[3]、清肺化痰丸^[4]、莲花清瘟^[5]等,药物成分参莲(SL)提取物^[6]、番茄红素^[7]、鱼油成分^[8]等,单味中药红景天^[9]等。目前实验研究对已有损伤的干预作用研究较多,对预防作用还没有见到相关的研究成果。

免疫功能失调是呼吸系统疾病发生的重要机制,可吸入颗粒是机体免疫功能失调、免疫功能减退的重要诱因之一^[10-11],使人体呼吸系统感染的机会增加。玉屏风散来源于《丹溪心法》,现主要用来治疗“肺卫气虚证”或“表虚自汗”。全方共由黄芪、白术、防风 3 味中药组成,具有益气、固表、止汗的功效,具有扶正固表、标本兼治的作用,是增强卫气的经典代表方剂。现代医学研究亦认为卫气与免疫功能密切相关,药理学也研究证明玉屏风散具有广泛的免疫调节作用。本研究从免疫调节的角度,探讨玉屏风散在不同时间节点于对 PM_{2.5} 损伤的体液免疫和细胞免疫功能的干预作用是否有不同,预防给药是否有效。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康雄性 ICR 小鼠 100 只,体重(20 ± 2) g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,合格证号 SCXK(鲁)20110019。动物实验符合山东中医药大学实验动物伦理标准。

1.2 药物与试剂 黄芪(*Astragalus membranaceus*) 30 g,白术(*Atractylodes macrocephala*) 30 g,防风(*Saposhnikovia divaricata*) 10 g。中药饮片来自山东中医药大学附属医院中药房,药物批号分别为 150701, 150501, 151001182。小鼠免疫球蛋白 E (IgE) 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒,小鼠 IgG ELISA 试剂盒(欣博盛生物科技有限公司,批号分别为 EMC117, EMC116);免疫组化试剂盒 DAB 显色剂(丹麦 Dako 公司,批号 K5007);CD68⁺ 一抗,HRP 标记的山羊抗兔二抗(武汉谷歌生物科技有限公司,批号分别为 GB13067-2, GB23303);CD4⁺ 抗体(PE/Cy5 anti-mouse CD4⁺), CD8⁺ 抗体(APC anti-mouse CD8a)(美国 BioLegend 公司,批号分别为 100409, 100711)。实验中煤炭采用山西阳泉产的块煤。

1.3 仪器 JJ-12J 型脱水机,JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);Neofuge 15R 型台式高速冷冻离心机(Heal Force 公司);RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);Gallios 型流式细胞仪[贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司];KD-P 型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);ECLIPSE CI 型正置光学显微镜,DS-U3 型成像系统(日本尼康公司);GT1001 型组化笔[基因科技(上海)股份有限公司];12101209H01 型 PM_{2.5} 检测仪[博朗通医疗科技(北京)有限公司]。

2 方法

2.1 中药药液制备 玉屏风散每剂清水浸泡 0.5 h 后,经 2 次水煎浓缩至 200 mL。成人体积用量为

200 mL·(70 kg)⁻¹,按照小鼠用量与成人用量换算公式,小鼠用量为 0.026 mL·g⁻¹(相当于生药量 9.1 g·kg⁻¹)。

2.2 染毒方法 根据张伟等^[12]的方法加以改进进行染毒。实验小鼠置于特制透明有机玻璃染毒箱内,箱体大小 50 cm×80 cm×100 cm,将煤置于专用器具中不充分燃烧,产生的烟雾经收集管路进入烟熏染毒箱,管路经冷水冷却,使通入烟熏箱的烟雾温度不至于过高以防止水气凝结打湿动物皮毛,并在烟熏箱内放入硅胶干燥剂使箱内湿保持干燥。PM 2.5 检测仪放入染毒箱内,实时监测染毒箱内的 PM 2.5 浓度,使 PM 2.5 浓度维持在 700~900 μg·m⁻³,每日染毒 4 h,并不断向染毒箱内通入氧气防止动物窒息,氧流量 1 L·min⁻¹。染毒 15 d 后对小鼠进行支气管肺泡灌洗,并解剖模型小鼠摘取肺组织,灌洗液中见较多尘细胞且肺组织病理切片可见肺泡炎性渗出,淋巴细胞及中性粒细胞浸润,肺组织及肺泡内巨噬细胞增多,胞浆内见大量尘颗粒,为造模成功。

2.3 分组及干预方法 将实验动物按随机数字表法分为 5 组,每组 20 只。空白组,正常环境饲养。模型组,正常饲养 10 d,在实验第 11 天起开始染毒。治疗组,正常饲养 10 d,在实验第 11 天起开始染毒,染毒 15 d,同时以玉屏风散水煎液灌胃。预防+治疗组,先以玉屏风散水煎液灌胃 10 d,在实验第 11 天染毒同时继续以玉屏风散水煎液灌胃,染毒 15 d。预防组,先以玉屏风散水煎液灌胃 10 d,在实验第 11 天染毒,染毒 15 d,染毒时不再以中药灌胃。所有小鼠饲养至第 26 天,麻醉后采集相关样本用于指标检测。

2.4 指标检测

2.4.1 肺泡灌洗液细胞分类计数 小鼠以 4% 水合氯醛按 600 mg·kg⁻¹剂量麻醉后固定于解剖板,分离气管。将 26 号静脉套管针置入气管中,以 1 mL 注射器抽取 0.9 生理盐水 1 mL,连接套管针,反复灌洗 5 次,取得的灌洗液离心制作细胞涂片。瑞氏-姬姆萨染色法染色,显微镜下观察。计数 100 个细胞,观察其中巨噬细胞、尘细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞的数量并记录。肺巨噬细胞体积较大,通常有圆钝形凸起,细胞核较小,深染,呈现肾性,马蹄形,还有不规则形,胞浆略嗜碱性,吞噬尘粒后颗粒在细胞内深染,成为尘细胞。

2.4.2 免疫组化法观察 M1 型巨噬细胞标记物 CD68⁺ 的表达数量情况 小鼠麻醉后摘取右肺下

叶,4% 多聚甲醛固定,制作病理切片。将制作的肺组织石蜡切片经脱蜡、抗原修复、洗涤、孵育等过程,加一抗(CD68,1:1 000),二抗(1:1 000),DAB 显色,Harris 苏木素复染,梯度乙醇脱水晾干,封片。显微镜镜检,苏木素染细胞核为蓝色,DAB 显出的阳性表达为棕黄色。图像采集,每个样本随机选取×200 放大倍数的图像 5 幅,采用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件读取阳性表达细胞数量,算出平均数。每组取 4 只小鼠肺组织观察、计数。

2.4.3 血液 CD4⁺,CD8⁺T 淋巴细胞亚群检测 小鼠采用摘眼球的方法取血,抗凝,4℃ 保存,迅速送检。取血液 50 μL 于 1.5 mL 离心管中。按如下比例配所用抗体于同一管中,CD4⁺ 0.06 g·L⁻¹,CD8⁺ 0.25 g·L⁻¹,溶剂为磷酸盐缓冲液(PBS)。每管血液中加入 50 μL 配好的抗体(CD4⁺,CD8⁺)。混匀后室温闭光孵育 30 min。每管中加入红细胞裂解液 500 μL,剧烈振荡混匀,待溶液透明后,1 000 r·min⁻¹离心 5 min。吸弃上清和红细胞碎片,各管中加入 PBS 500 μL,剧烈振荡混匀细胞。静置约 1~2 min,取层液体 200 μL,用于检测。

2.4.4 ELISA 检测血清中 IgG,IgE 含量 血液采集方法同 2.4.3 项,取 1 mL 全血(不抗凝),以 3 000 r·min⁻¹离心 5 min 得到血清。严格按照试剂盒说明采用 ELISA 法检测血清中 IgG,IgE 的含量(两者检测方法相似)。空白孔加对照品和标本通用稀释液,其余相应孔中加实验标本(100 μL/孔),36℃ 孵育 90 min。洗板 5 次。空白孔加酶标抗体稀释液,其余孔加酶标抗体工作液(100 μL/孔),36℃ 孵育 30 min。洗板 5 次。加入显色底物 100 μL/孔,混合均匀后酶标仪即刻测量吸光度 A_{450 nm}。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析方法进行分析,统计学数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肺损伤模型小鼠肺泡灌洗液中尘细胞比例的影响 与空白组比较,模型组尘细胞比例显著增高($P < 0.01$),各中药干预组尘细胞比例与模型组比较有不同程度下降,其中治疗组和预防+治疗组下降明显($P < 0.01$),预防+治疗组尘细胞比例最低,与空白组无差异,低于治疗组($P < 0.05$),明显低于预防组($P < 0.01$)。见表 1,图 1。

3.2 对肺损伤模型小鼠肺组织免疫组化 CD68⁺ 的表达的影响 与空白组比较,模型组 CD68⁺ 阳性表达巨噬细胞细胞数量明显增多($P < 0.01$),各中药

表 1 玉屏风散对肺损伤模型小鼠肺泡灌洗液中尘细胞比例的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Effect of Yupingfeng San on ratio of dust cells in alveolar lavage fluid of lung injury model mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	尘细胞比例/%
空白	-	1.500 0 ± 1.291 0
模型	-	60.500 0 ± 9.291 6 ¹⁾
治疗	9.1	33.500 0 ± 13.601 5 ^{1,2)}
预防 + 治疗	9.1	10.750 0 ± 6.396 6 ^{2,3,4)}
预防	9.1	56.500 0 ± 7.895 1 ^{1,3)}

注:与空白比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与治疗组比较³⁾ $P < 0.05$;与预防 + 治疗组比较⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

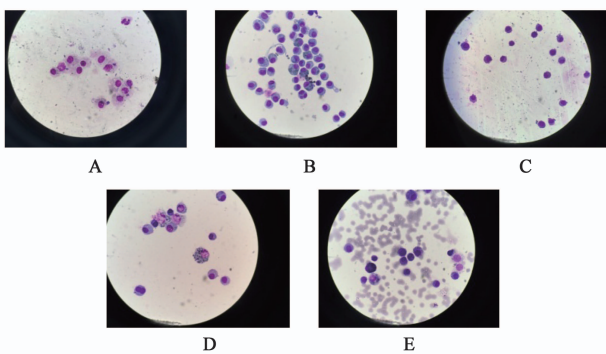


图 1 玉屏风散对肺损伤模型小鼠肺泡灌洗液中尘细胞数量的影响 (瑞氏-姬姆萨染色, 400)

Fig. 1 Effect of Yupingfeng San on number of dust cells in BALF in mice with lung injury (Wright-Giemsa staining, 400)

Fig. 1 Effect of Yupingfeng San on number of dust cells in BALF in mice with lung injury (Wright-Giemsa staining, 400)

干预组数量有不同程度下降,预防 + 治疗组下降最为明显,与模型组比较有显著差异 ($P < 0.01$),且显著低于预防组 ($P < 0.01$),与治疗组比较也有统计学差异 ($P < 0.05$),而治疗组的数量又低于预防组 ($P < 0.05$)。见表 2,图 2。

3.3 对肺损伤模型小鼠血液 CD4⁺, CD8⁺ T 淋巴细胞亚群表达的影响

与空白组比较,模型组 CD4⁺

表 2 玉屏风散对肺损伤模型小鼠肺组织 CD68⁺ 阳性表达巨噬细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effect of Yupingfeng San on number of CD68⁺-positive macrophages in lung tissue of lung injury model mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD68 阳性表达巨噬细胞数/个
空白	-	17.250 ± 1.561
模型	-	69.850 ± 4.878 ¹⁾
治疗	9.1	31.600 ± 4.764 ^{1,2)}
预防 + 治疗	9.1	20.550 ± 4.697 ^{2,3)}
预防	9.1	42.750 ± 4.238 ^{1,2,3,4)}

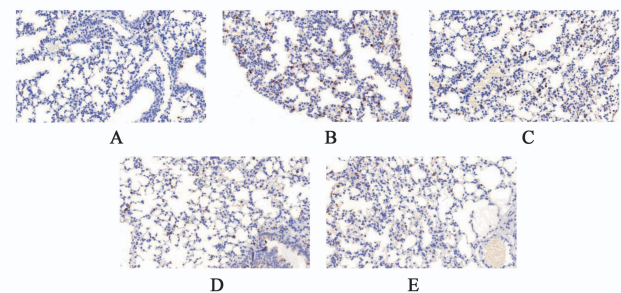


图 2 玉屏风散对肺损伤模型小鼠肺组织免疫组化 CD68 阳性表达巨噬细胞数量的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of Yupingfeng San on number of CD68-positive macrophages in lung tissue of mice with lung injury (IHC, ×200)

细胞明显降低 ($P < 0.01$),经中药干预的各组中与模型组比较以预防 + 治疗组 CD4⁺ 细胞上升最为显著 ($P < 0.01$),与治疗组比较差异显著 ($P < 0.01$),与预防组比较有差异 ($P < 0.05$),而预防组与治疗组之间比较无统计学差异。模型组 CD8⁺ 细胞与空白组比较显著下降 ($P < 0.01$),治疗组和预防组干预后与模型组比较无差异,预防 + 治疗组则有升高 ($P < 0.05$)。CD4⁺/CD8⁺ 上模型组与空白组无统计学差异,治疗组和预防 + 治疗组则高于模型组 ($P < 0.05$),预防组显著高于空白组和模型组 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 玉屏风散对肺损伤模型小鼠血液 CD4⁺, CD8⁺ T 淋巴细胞亚群表达及 CD4⁺/CD8⁺ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Yupingfeng San on expression of CD4⁺, CD8⁺ T lymphocyte subsets and CD4⁺/CD8⁺ ratio in lung injury model mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD4 ⁺ / %	CD8 ⁺ / %	CD4 ⁺ / CD8 ⁺
空白	-	33.887 5 ± 3.996 6	11.430 0 ± 0.804 4	2.985 0 ± 0.472 1
模型	-	6.910 0 ± 1.764 7 ²⁾	2.615 0 ± 0.978 3 ²⁾	2.767 5 ± 0.576 2
治疗	9.1	13.110 0 ± 5.856 6 ¹⁾	2.642 5 ± 0.615 8 ²⁾	4.840 0 ± 1.061 2 ³⁾
预防 + 治疗	9.1	32.652 5 ± 3.595 4 ^{4,6)}	7.030 0 ± 2.081 1 ^{1,3,6)}	4.862 5 ± 1.069 8 ³⁾
预防	9.1	23.340 0 ± 4.240 4 ^{2,3,5,7)}	4.152 5 ± 1.464 6 ^{2,7)}	5.925 0 ± 1.291 6 ^{2,4)}

注:与空白比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与治疗组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.05$;与预防 + 治疗组比较⁷⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 对肺损伤模型小鼠血清 IgG, IgE 含量的影响

除预防组外各实验组小鼠血清 IgE 含量均明显高于空白组 ($P < 0.01$), 经中药干预后, 预防组和预防 + 治疗组小鼠血清 IgE 含量较模型组显著下降 ($P < 0.01$)。而模型组小鼠血清 IgG 含量明显低于空白组 ($P < 0.01$), 经药物干预后, 治疗组仍显著低于空白组 ($P < 0.01$), 预防 + 治疗组和预防组均显著高于模型组 ($P < 0.01$), 二者之间比较预防组血清 IgG 含量较低 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 玉屏风散对肺损伤模型小鼠血清 IgG, IgE 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of Yupingfeng San on serum IgG and IgE levels in lung injury model mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IgE/mg·L ⁻¹	IgG/g·L ⁻¹
空白	-	2.892 1 ± 0.822 8	12.730 3 ± 1.353 3
模型	-	7.823 7 ± 1.049 7 ¹⁾	7.071 1 ± 1.202 7 ¹⁾
治疗	9.1	7.322 8 ± 0.457 0 ¹⁾	8.227 4 ± 0.833 1 ¹⁾
预防 + 治疗	9.1	5.572 4 ± 1.658 3 ^{1,2)}	11.264 9 ± 1.385 4 ²⁾
预防	9.1	4.160 5 ± 1.079 1 ^{2,4)}	9.322 6 ± 1.054 4 ^{2,3,5)}

注:与空白比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与治疗组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与预防 + 治疗组比较⁵⁾ $P < 0.05$ 。

3.5 对肺损伤模型小鼠肺组织 IgG, IgE 含量的影响

各组小鼠肺组织匀浆 IgE 浓度无明显差异。模型组与空白组比较肺组织匀浆 IgG 浓度明显降低 ($P < 0.01$)。治疗组、预防 + 治疗组肺组织匀浆 IgG 浓度较模型组显著升高 ($P < 0.01$), 而预防 + 治疗组明显高于预防组 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 玉屏风散对肺损伤模型小鼠肺组织匀浆 IgG, IgE 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Effect of Yupingfengsan on contents of IgG and IgE in lung homogenate of mice with lung injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IgE	IgG
空白	-	1.247 8 ± 0.123 3	10 663.819 0 ± 1 102.037 3
模型	-	1.216 0 ± 0.071 3	4 714.485 8 ± 1 671.409 8 ¹⁾
治疗	9.1	1.295 6 ± 0.111 4	9 313.185 1 ± 2 414.287 8 ²⁾
预防 + 治疗	9.1	1.287 7 ± 0.050 3	11 298.433 8 ± 1 337.075 7 ²⁾
预防	9.1	1.253 9 ± 0.035 0	6 150.063 6 ± 1 180.459 4 ^{1,3,4)}

注:与空白比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与治疗组比较³⁾ $P < 0.01$;与预防 + 治疗组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

《素问遗篇·刺法论》有云:“正气存内,邪不可

干”,对于毒邪等外邪入侵的预防,除了注意养生和锻炼,还可以应用一些益气固表的药物来增强机体卫气,起到抗御外邪的作用,本实验中选用了益气固表的经典方剂“玉屏风散”正是基于这个思路。另外体虚者在遭受外邪侵袭时,机体往往是处于邪盛正虚的状态,在驱邪的同时同样需要辅助正气,才能帮助机体更有效的去除邪气。而玉屏风散对免疫功能的调节作用是对该方主要的药理研究方向。现代药理研究显示玉屏风散对 Th2 介导的上气道非特异性炎症反应有较好的治疗作用^[13]。玉屏风散水煎液可以显著提高反复呼吸道感染儿童^[14]及慢性支气管炎病人^[15]的血清 IgA 水平。另有研究显示玉屏风散可增加腹腔注射环磷酰胺引起的免疫抑制小鼠的 IgG₁ 水平^[14]。还可以抑制肥大细胞释放 IgE,有效治疗 I 型变态反应性疾病^[14]。玉屏风散中各药物的成分也具有免疫调节作用。黄芪的主要化学成分有黄芪多糖、皂苷类、黄酮类、氨基酸等,黄芪多糖对正常机体的抗体生成功能有明显的促进作用^[16],增强巨噬细胞的吞噬作用,提高自然杀伤细胞(NK)的活性,提高淋巴细胞转化率,可促进机体细胞免疫功能^[17]。白术的有效成分有挥发性成分、内酯类成分、苷类、多糖类成分以及氨基酸等,也具有免疫调节作用,能刺激 Th1 型淋巴细胞增值,产生抗体,调节免疫反应^[18]。防风含有色原酮、香豆素类、多糖、有机酸等成分,多糖有效部位 JBO-6 可以增加脾脏质量,还能提高 NK 细胞的杀伤活性,增强脾淋巴细胞的杀伤活性等免疫调节作用^[19]。

可吸入颗粒物是随着人类现代文明产生的一种新型致病邪气,具有其独特的致病特点。目前对其病因属性没有统一认识,作者认为其可归属于中医学“毒邪”范畴。PM 2.5 致病具有明显的季节性,由于我国冬季北方取暖以煤炭为主要燃料,燃烧过程中形成大量的可吸入颗粒。与大多数关于可吸入颗粒的实验研究中所采用的滴入法不同,本实验采用的是将烟煤燃烧产生的烟雾通入染毒箱中,使动物自然吸入,模拟人体的染毒过程。

免疫系统主要包括细胞免疫与体液免疫。细胞免疫方面本实验观察了小鼠肺巨噬细胞的变化和 T 淋巴细胞中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 的表达。

肺泡巨噬细胞是呼吸系统对抗外来颗粒的第一道防线^[20],吸入空气中的尘粒、细菌等多被巨噬细胞吞噬清除,胞质内含大量尘粒的肺巨噬细胞又称尘细胞(dustcell)。部分尘细胞可随痰液咳出,也有的通过肺泡间隙进入淋巴系统,转移至淋巴结。还

有部分尘细胞在吞噬的颗粒的毒性作用下崩解,颗粒沉积在间质中,刺激成纤维细胞增生,形成间质纤维化等改变。巨噬细胞按照其表型和分泌的细胞因子可以分为经典活化的 M_1 型和选择性活化的 M_2 型巨噬细胞^[21], $CD68$ 常作为 M_1 型巨噬细胞的标记物^[22]。本实验中以预防 + 治疗用药组肺泡灌洗液中尘细胞数量最少,免疫组化显示 $CD68^+$ 巨噬细胞表达最低,预防用药组 $CD68^+$ 明显低于模型组,但较空白组仍差距较大,单纯治疗用药组的效果则比单预防用药组好些, $CD68^+$ 表达均有明显降低,只是尘细胞数量上与持续用药组还有一定差距。说明玉屏风散对增强模型小鼠的巨噬细胞免疫功能有一定作用,能促进尘细胞的排出从而帮助机体排除有害颗粒。

T 淋巴细胞的主要功能是调节蛋白质抗原引起的免疫应答,其中最重要的是 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞,两者比例失调影响机体免疫系统^[23]。正常人的 $CD4^+$ T 细胞与 $CD8^+$ T 细胞的相互平衡,使免疫应答正常发挥作用。当 $CD4^+$ 减少, $CD8^+$ 增高或正常时, $CD4^+/CD8^+$ 则下降^[24], 细胞免疫功能下降, T 淋巴细胞调节就失去平衡而导致机体发病^[25], 是疾病严重程度和预后不良的重要标志之一^[26]。本实验中染毒模型小鼠的 $CD4^+$ 细胞和 $CD8^+$ 细胞比正常小鼠均降低, $CD4^+/CD8^+$ 与正常组小鼠相比较则没有差异。预防应用玉屏风散后,能够显著提高血 $CD4^+$ 细胞,且在之后的染毒过程中 $CD4^+$ 细胞仍然能保持较高, $CD8^+$ 细胞没有明显改变。单纯治疗用药对 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 的影响不大, $CD4^+/CD8^+$ 在 3 个用药组中与正常组和模型组数值有升高趋势,但没有统计学差异。

体液免疫方面, IgG 是最主要的免疫球蛋白,是机体受抗原(如病原体)刺激后产生的,可以阻断病原体对机体的危害,预防相应的感染性疾病。IgE 是含量最少的免疫球蛋白,是过敏反应的主要介导因素。本实验中,各实验组小鼠肺组织 IgE 的变化均不显著,但用药后对血 IgE 水平均有一定影响。单治疗用药不能很好的降低血清 IgE 水平,但预防用药可降低血清 IgE 水平。因此推测可吸入颗粒进入机体后,可刺激血清 IgE 水平升高。而玉屏风散对已升高的血清 IgE 水平作用不明显,但预防应用可在一定程度上抑制由可吸入颗粒引起的 IgE 升高,减轻过敏反应。对血清 IgG 的作用,预防用药组比单治疗用药组血清 IgG 水平高。因此预防玉屏风散可提高机体血清 IgG 水平,与单纯治疗用药有差

异。玉屏风散可提高模型小鼠肺组织匀浆 IgG 的影响,但预防用药对肺组织匀浆 IgG 的影响不大。因此玉屏风散对肺脏局部的免疫功能和全体体液免疫功能的影响不尽相同。

综合分析,玉屏风散预防应用可提高小鼠的细胞及体液免疫功能,且在染毒环境中保持,但在已染毒后的治疗作用中效果远不如其预防应用疗效更佳。提示临床对于 PM 2.5 的预防胜于治疗,这亦与祖国医学“治未病”思想不谋而合。

[参考文献]

- [1] Okeson C D, Riley M R, Fernandez A, et al. Impact of the composition of combustion generated fine particles on epithelial cell toxicity: influences of metals on metabolism [J]. *Chemosphere*, 2003, 51 (10): 1121-1128.
- [2] 姜瑞雪,牛志尊,黄密,等. 杏苏散、桑杏汤对 PM_{2.5} 染毒大鼠肺组织中 HMGB1、TNF- α 、IL-6 表达的影响[J]. *环境卫生学杂志*, 2015, 5(4): 317-320.
- [3] 谷明杰. 固本止咳中药对 PM_{2.5} 致小鼠肺损伤模型肺组织 TNF- α 、IL-8、SIgA 的影响[D]. 北京:北京中医药大学, 2016.
- [4] 杨莹莹,李莉珊,吕鹏,等. 清肺化痰中药对大气 PM_{2.5} 致大鼠肺损伤的干预作用研究[J]. *环境与健康杂志*, 2015, 32(5): 377-380, 471.
- [5] 许宁,平芬,徐鑫,等. 莲花清瘟对细颗粒物致大鼠肺部炎症损伤的拮抗作用研究[J]. *中国全科医学*, 2015, 18(27): 3355-3359.
- [6] 刘栩岑,李玉洁,王娅杰,等. 参莲提取物对 PM_{2.5} 染毒 RAW264.7 细胞损伤的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(10): 1977-1983.
- [7] 陈文生,孙灿兴,戴建威. 番茄红素解除 PM_{2.5} 暴露内皮细胞的氧化损伤[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(15): 4150-4152.
- [8] 李莉珊,马琼锦,杨凌,等. 某鱼油产品对细颗粒物引起的急性肺损伤的影响[J]. *环境与职业医学*, 2015, 32(8): 717-721.
- [9] 刘平安,莫阳,张国民,等. 红景天对细颗粒物 PM_{2.5} 所致急性肺损伤大鼠干预作用的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2015, 35(7): 5-7.
- [10] Kuroda E, Coban C, Ishii K J. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects[J]. *Int Rev Immunol*, 2013, 32 (2): 209-220.
- [11] Chauhan A J, Johnston S L. Air pollution and infection in respiratory illness[J]. *Brit Med Bull*, 2003, 68(1): 95-112.

- [12] 张伟, 张心月, 邵雨萌. 中医药对各型慢性阻塞性肺疾病大鼠核因子- κ B 和 γ -谷氨酰半胱氨酸合酶表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(5): 426-430.
- [13] 顾珺, 沈朝斌, 陆磊, 等. 玉屏风散对过敏性鼻炎动物模型的 Th1/Th2 影响[J]. 中成药, 2006, 28(8): 1163-1166.
- [14] HOU L, XIN H. Progress in immunopharmacologic study of Yupingfeng powder[J]. Chin J Integr Med, 2000, 6(2):157-160.
- [15] ZHU W X, YAO J M. Observation on therapeutic effect of modified Yuping feng granule in treating remission stage of chronic bronchitis[J]. Jiangsu J TCM, 1995, 16(7):45-46.
- [16] 刘玉莲, 杨丛忠. 黄芪药理作用概述[J]. 中国药业, 2004, 13(10):79-79.
- [17] WEI X, ZHANG J, LI J, et al. Astragalus mongholicus and *Polygonum multiflorum*'s protective function against cyclophosphamide inhibitory effect on thymus[J]. Am J Chin Med, 2005, 32(5):669-680.
- [18] Lee J C, Lee K Y, Son Y O, et al. Stimulating effects on mouse splenocytes of glycoproteins from the herbal medicine *Atractylodes macrocephala* Koidz [J]. Phytomedicine, 2007, 14(6):390-395.
- [19] 俞秀廉, 龚传美, 刘喜玉, 等. 防风通圣丸醇提液的抑菌作用及对小白鼠免疫功能的影响[J]. 微生物学杂志, 1991(2):57-59.
- [20] Brannen A L, Chandler D B. Alveolar macrophage subpopulations' responsiveness to chemotactic stimuli [J]. Am J Pathol, 1988, 132(1):161-166.
- [21] Wynn T A, Luke B, Thompson R W, et al. Quantitative assessment of macrophage functions in repair and fibrosis [J]. Curr Port Immunol, 2011, doi: 10.1002/0471142735.im1422593.
- [22] Lau S K, Chu P G, Weiss L M. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples [J]. Am J Clin Pathol, 2004, 122(5): 794-801.
- [23] Ismail A M, Aly S S, Fayed H M, et al. Serum 25⁻ hydroxyvitamin D and CD4⁺ CD25^(+ high) FoxP3⁺ regulatory T cell as predictors of severity of bronchial asthma in children [J]. Egypt J Immunol, 2015, 22(1):9-18.
- [24] Birjandi S, Witte P. Why are the elderly so susceptible to pneumonia? [J]. Expert Rev Respir Med, 2011, 5(5):593-595.
- [25] ZHOU L, MAO Y, WANG L, et al. Comparison of peripheral blood T lymphocyte immune function among venous thromboembolism patients with and without infection and patients with simple infection [J]. Int J Clin Experim Med, 2015, 8(4):6585-6591.
- [26] 叶中绿, 庞伟君, 黄秀兰. EB 病毒感染患儿细胞因子水平与 T 细胞亚群检测的临床意义[J]. 现代预防医学, 2008, 35(12):2306-2308.

[责任编辑 邹晓翠]