

二陈汤加味对慢阻肺大鼠 Th1/2/9 细胞相关淋巴因子及 IL-4R1/IL-13RA1 的调节作用

毛梦迪¹, 尚立芝^{1*}, 徐莉莉¹, 季书¹, 石龙涛², 李耀洋², 张光远², 王国强², 谢文英^{1*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450006)

[摘要] 目的:探究二陈汤加味对慢性阻塞性肺病(COPD)大鼠血浆、支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素-12(IL-12), γ -干扰素(IFN- γ), IL-9, IL-4和IL-13水平以及对细支气管组织中IL-4受体1(IL-4R1), IL-13受体A1(IL-13RA1)定位表达的影响。方法:将大鼠随机分为正常组,模型组,二陈汤加味低、中、高剂量组,共5组,每组10只。采用香烟烟雾联合脂多糖(LPS)方法制备COPD大鼠模型,二陈汤加味低、中、高剂量组分别以5, 10, 20 g·kg⁻¹灌胃(ig),正常组与模型组ig等量生理盐水,连续干预14 d。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血浆, BALF中IL-12, IFN- γ , IL-9, IL-4和IL-13水平,免疫组化(IHC)检测大鼠细支气管组织中IL-4R1, IL-13RA1的定位表达。结果:与正常组比较,模型组血浆BALF中IL-12, IFN- γ 水平均显著降低($P < 0.01$),而IL-9, IL-4和IL-13的水平均显著升高($P < 0.01$), IL-4R1, IL-13RA1在模型组细支气管组织中的表达均显著增强($P < 0.01$);与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量血浆和BALF中的IL-12, IFN- γ 水平均显著升高($P < 0.01$),而IL-9, IL-4和IL-13的水平均显著降低($P < 0.01$), IL-4R1, IL-13RA1在细支气管组织中的表达均显著减弱($P < 0.01$)。结论:二陈汤加味可能通过增加IL-12, IFN- γ 的释放,减少IL-9, IL-4和IL-13分泌,并抑制IL-4R1和IL-13RA1的表达,起到抗炎和保护细支气管结构的作用。

[关键词] 二陈汤;慢性阻塞性肺病;T淋巴细胞;白细胞介素-12;白细胞介素-9;白细胞介素-13

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0016-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201905

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200722.1530.005.html>

[网络出版日期] 2020-7-22 15:33

Regulatory Effect of Modified Erchentang on Levels of Lymphokines Relating to Th1, Th2 and Th9 Cells and Expressions of IL-4R1/IL-13RA1 in Bronchioles of Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

MAO Meng-di¹, SHANG Li-zhi^{1*}, XU Li-li¹, JI Shu¹, SHI Long-tao², LI Yao-yang²,
ZHANG Guang-yuan², WANG Guo-qiang², XIE Wen-ying^{1*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. The First Clinical School of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of modified Erchentang on levels of interleukin-12 (IL-12), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-9 (IL-9), interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) in plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of all rats, as well as expressions of interleukin-4 (IL-4) receptor (IL-4R1) and interleukin-13 (IL-13) receptor (IL-13RA1) in bronchioles tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into 5 groups, namely normal

[收稿日期] 20200111(013)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573881);河南省教育科学“十三五”规划一般课题([2019]-JKGHYB-0101, [2019]-JKGHYB-0114);国家级大学生创新创业训练计划项目(S201810471013, S201910471010)

[第一作者] 毛梦迪,在读硕士,从事中医药作用机制研究, E-mail: 1731532135@qq.com

[通信作者] *尚立芝,教授,从事中医药作用机制研究, E-mail: lzshang2014@163.com;

*谢文英,教授,从事中医药治疗肺系疾病研究, E-mail: xiewenying1963@163.com

group, model group, and low, middle and high-dose modified Erchentang groups (5, 10, 20 g·kg⁻¹), with 10 rats in each group. COPD in rat was prepared by using cigarette smoke combined with dripping lipopolysaccharide (LPS) in trachea. After the modeling, normal and model groups were given normal saline solution through intragastric (ig) administration, while other groups were given corresponding herbal drugs (5, 10, 20 g·kg⁻¹) intragastrically (ig) for 14 days. The levels of IL-12, IFN- γ , IL-9, IL-4 and IL-13 in plasma and BALF were detected by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, and immunohistochemistry (IHC) method was used to detect the expressions of IL-4R1 and IL-13RA1 in bronchioles tissue of all of the groups. **Result:** Compared with the normal group, the levels of IL-12 and IFN- γ were decreased significantly ($P<0.01$), but the levels of IL-9, IL-4 and IL-13 in plasma and BALF were significantly increased ($P<0.01$), and the expressions of IL-4R1 and IL-13RA1 in bronchioles tissue were increased significantly ($P<0.01$) in model group. Compared with the model group, the levels of IL-12 and IFN- γ were increased significantly, while the levels of IL-9, IL-4 and IL-13 in plasma and BALF were decreased significantly ($P<0.01$), and the expressions of IL-4R1 and IL-13RA1 in bronchioles tissue were decreased significantly ($P<0.01$) in modified Erchentang groups (10, 20 g·kg⁻¹). **Conclusion:** Modified Erchentang has effects in resisting inflammatory and protecting tissue structure of bronchioles. Its mechanism may be correlated with increasing the levels of IL-12, IFN- γ and reducing the levels of IL-9, IL-4 and IL-13 in plasma and BALF, and inhibiting the expressions of IL-4R1 and IL-13RA1 in bronchioles tissue.

[Key words] Erchentang; chronic obstructive pulmonary disease (COPD); T lymphoid cell; interleukin-12(IL-12); interleukin-9(IL-9); interleukin-13(IL-13)

慢性阻塞性肺病(COPD)简称慢阻肺,是以呼吸气流受限不完全可逆,并呈进行性进展为特征的常见呼吸系统疾病^[1],临床主要表现为咳嗽、咯痰或伴喘息等症状^[2]。COPD的病因与感染、过敏、遗传、老龄化、吸烟和大气污染等因素密切相关,COPD的高发病率、高复发率、高致残率及高病死率,已逐渐成为影响人体健康乃至寿命的主要慢性疾病^[3]。研究表明,COPD的发病机制主要是多种炎症细胞及其释放的细胞组分参与的气道和肺组织的慢性炎症,淋巴细胞及其分泌的各种淋巴因子在气道慢性炎症中发挥重要作用^[4-5]。初始CD4⁺辅助性T淋巴细胞(Th0)经外来抗原刺激后,可分化为Th1型和Th2型细胞。两者相对平衡,维持正常的免疫功能。激活的Th1型细胞释放白细胞介素-12(IL-12), γ -干扰素(IFN- γ)发挥抗炎作用^[6];而Th2型细胞释放淋巴因子IL-4,IL-13具有促炎作用^[7-8]。Th1/Th2细胞比例失常导致的淋巴因子IL-12,IFN- γ 及IL-4,IL-13水平的变化,影响着炎症的进程及结局^[9]。IL-4和转化生长因子- β (TGF- β)联合作用下诱导Th0细胞分化为Th9细胞,Th9细胞分泌的IL-9参与多种免疫及炎症反应^[10-11]。COPD炎症过程中存在免疫功能紊乱,但有关中医药对COPD中Th1,Th2,Th9淋巴细胞及其相关淋巴因子调节的研究较少。本课题组以宋《太平惠民和剂局方》中的二陈汤为

基础方进行加减,拟定二陈汤加味方。前期研究发现二陈汤加味方通过抑制中性粒细胞、单核细胞释放的细胞因子而发挥抗炎作用^[12-13]。但未涉及二陈汤加味调节辅助T淋巴细胞亚型Th1,Th2,Th9及其释放的淋巴因子的研究。本文采用香烟烟雾联合气管滴注脂多糖(LPS)制备COPD大鼠模型,以二陈汤加味进行干预,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血浆、支气管肺泡灌洗液(BALF)中的淋巴因子IL-12,IFN- γ ,IL-9,IL-4,IL-13水平,免疫组化(IHC)检测细支气管组织中IL-4和(或)IL-13受体IL-4R1,IL-13RA1的表达,旨在探究T淋巴细胞亚型Th1,Th2,Th9细胞释放的淋巴因子在COPD中的作用,以及二陈汤加味对COPD中T细胞免疫调节的分子机制,为二陈汤加味通过调节免疫平衡而治疗COPD,提供新的实验依据。

1 材料

1.1 动物 SD雄性大鼠50只,SPF级,6月龄,体重(230±10)g,由河南省动物实验中心提供,合格证号SCXK(豫)2012-0001。伦理审批号DWLL20150018,动物使用许可证号SYXK(豫)2015-0005。

1.2 药物与试剂 二陈汤加味方的药物组成为姜半夏10g(1601001S),陈皮10g(1609002S),葶苈子10g(1610001S),茯苓15g(1609006W),炙麻黄6g

(1609001S), 地龙 10 g (1610002S), 干姜 5 g (1612002S), 苦杏仁 10 g (1612002S), 党参 10 g (1611003W), 山药 10 g (1609003W), 以上均为华润三九医药股份有限公司生产的中药颗粒。IL-12p (P70), IL-13 大鼠 ELISA 试剂盒(美国 R&B 公司, 批号分别为 18270701, 18270602); IFN- γ 大鼠 ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号 180205); IL-9 大鼠 ELISA 试剂盒(苏州卡尔文生物科技有限公司, 批号 E20180303A); IL-4 大鼠 ELISA 试剂盒(Liuhe Biotech 公司, 批号 LH-E10102RA); 多克隆抗体 IL-4R1 兔抗大鼠一抗(美国 Proteintech 公司, 北京百诺威生物科技有限公司, 批号 66142-1-IG-150); 多克隆抗体 IL-13RA1 兔抗大鼠一抗, ABC 免疫组化试剂盒, DAB 显色试剂盒(博士德生物工程有限公司, 批号分别为 BA3296-2, SA1022, AR1022); LPS(北京索莱宝科技有限公司, 批号 813Q035); 苏木素染液(美国 Sigma 公司, 批号 H9627); 伊红 Y(水溶性, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 71014544); 其他试剂由河南中医药大学中医药科学院的医学共享平台提供。

1.3 仪器 MAX II 型非束缚小动物肺功能测量仪(美国 Buxco 公司); Powerwave XS 型波长扫描酶标仪(美国 BioTek 公司); RM 型 2016 轮转式切片机(德国 Leica 公司); JK-6 生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司); ST5020 型全自动染色机(徕卡显微系统上海有限公司); BX53 奥林巴斯型生物显微镜, BX51 病理图像分析系统(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、模型制备与给药 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为正常组, 二陈汤加味低、中、高剂量组, 模型组。参考相关文献[14-15], LPS 联合香烟烟熏制备 COPD 大鼠模型。造模的第 1 日和第 14 日, 除正常组以外的 4 组造模, 麻醉后, 经气管注入 LPS 每只大鼠 200 μL ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 稀释剂是生理盐水); 正常组大鼠麻醉后, 经气管注入生理盐水 200 μL 。造模的第 2~13 日和 15~28 日, 正常组不做烟熏, 将其他各组的放入熏箱内进行香烟烟熏, 每次 8 支烟, 每天 2 次, 每次 30 min。根据肺功能、组织病理学的结果, 判断 COPD 大鼠造模是否成功^[16]。参考文献[17]进行为期 14 d 的灌胃(*ig*)给药, 二陈汤加味低、中、高剂量组剂量分别 *ig*(5, 10, 20) $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别把中药颗粒冲剂以生理盐水稀释为 4 mL, 各给药组均每次 2 mL, 2 次/d, 模型组、正常

组 *ig* 等量的生理盐水。

2.2 指标检测

2.2.1 肺功能测定 用小动物肺功能测量仪测各组大鼠用力肺活量(FVC), 1 s 用力呼吸容积(FEV_1)和 FEV_1/FVC 的值。

2.2.2 取材与标本制备 腹腔注射异戊巴比妥钠麻醉大鼠, 打开腹腔, 腹主动脉取血 3 mL 入含二乙胺四乙酸钠(EDTA)离心管中, 用于测血常规; 继续取血 5 mL, 入肝素抗凝管中 800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 用于 ELISA 测定血浆中 IL-12, IFN- γ , IL-9, IL-4 和 IL-13 水平。取血后, 断头处死大鼠, 打开胸部, 暴露肺及气管, 结扎右主支气管, 用注射器将 2 mL 生理盐水缓慢注入左侧主支气管, 轻轻按摩左肺, 并回抽, 反复灌洗三次, 共回收 BALF 约 4.5 mL。800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱, 用于 BALF 中的 ELISA 检测; 取 BALF 的沉淀, 用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞, 取细胞悬液涂片, 固定, 瑞氏染色, 光镜下细胞计数板上进行细胞计数, 计算中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞比率。迅速冠状切面取新鲜右肺组织, 多聚甲醛固定, 包埋, 切片厚 5 μm , 常规苏木素-伊红(HE)染色法染色。

2.2.3 ELISA 测定血浆, BALF 中 IL-12, IFN- γ , IL-9, IL-4 和 IL-13 的水平 操作过程严格按照说明书进行, 将标准液、样品液分别加入酶标板中的标准孔、样品孔, 加抗体工作液, 封板并孵育, 反复洗板加底物, 封板, 水浴锅中孵育, 加终止液, 用酶标仪检测 450 nm 波长时的吸光度 *A*, 绘制标准曲线并计算各样品浓度。

2.2.4 免疫组化检测细支气管中 IL-4R1, IL-13RA1 的定位表达 严格按照说明书进行操作: 切片脱蜡至水; 微波修复抗原, 加一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜; 加二抗工作液, DAB 显色, 冲洗, 复染, 脱水, 晾干, 封片。以 PBS 代替一抗工作液作为阴性对照, 以 IL-4R1, IL-13RA1 的阳性片作为阳性对照, IL-4R1, IL-13RA1 的阳性表达为棕黄色颗粒。高倍镜下拍照, 随机选取直径小于 1 mm 细支气管横截面的 10 个不重叠高倍镜视野, 计算每张切片阳性着色积分吸光度 *IA* 的平均值。

2.3 统计学处理 数据处理在 SPSS 24.0 中进行, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 组间均数比较用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状况 正常组大鼠无死亡, 呼吸平

稳、皮毛呈正常光泽,体质量增加。造模过程中,除正常组外,其余各组大鼠均有不同程度的毛色萎黄、逐渐出现呼吸系统症状(咳、喘、鼻中分泌物由稀薄变黏稠)、体质量下降、活动度差。灌胃治疗后,二陈汤加味中、高剂量组大鼠的毛色光泽度有所改善,咳、喘等呼吸系统症状均减轻,鼻腔分泌物逐渐减少至消失。二陈汤加味中、高剂量组

各死亡1只,二陈汤加味低剂量组、模型组各死2只。

3.2 对 COPD 大鼠肺功能的影响 与正常组比较,模型组的 FEV₁, FVC, FEV₁/FVC 的值均显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,二陈汤加味高、中、低剂量组的 FEV₁, FVC, FEV₁/FVC 的值均显著升高 ($P<0.01$)。见表 1。

表 1 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺功能的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of modified Erchentang on lung function of rats with chronic obstructive pulmonary disease($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 /g·kg ⁻¹	FEV ₁ /mL·s ⁻¹	FVC /mL·s ⁻¹	FEV ₁ /FVC /%
正常	10	-	6.63±0.21	7.88±0.13	84.14±1.61
模型	8	-	2.41±0.16 ²⁾	4.72±0.09 ²⁾	51.11±1.78 ²⁾
二陈汤加味	8	5	3.31±0.11 ⁴⁾	5.29±0.14 ⁴⁾	62.57±0.79 ⁴⁾
	9	10	4.79±0.15 ⁴⁾	6.46±0.08 ⁴⁾	74.15±1.22 ⁴⁾
	9	20	4.68±0.18 ⁴⁾	6.15±0.16 ⁴⁾	73.10±2.24 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2-5同)。

3.3 对 COPD 大鼠 BALF 中炎细胞的影响 与正常组大鼠比较,模型组大鼠 BALF 中白细胞计数、巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞比率均显著升高 ($P<$

0.01);与模型组大鼠比较,二陈汤加味低、中、高剂量组大鼠 BALF 中白细胞计数、巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞比率均显著降低 ($P<0.01$)。见表 2。

表 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠 BALF 中白细胞计数的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of modified Erchentang on white blood cell count in BALF of rats with chronic obstructive pulmonary disease($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 /g·kg ⁻¹	白细胞计数 /×10 ⁸ 个/L	白细胞分类/%		
				巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
正常	10	-	4.23±0.21	4.89±0.78	62.24±1.45	22.79±1.22
模型	8	-	13.57±0.24 ²⁾	16.87±1.13 ²⁾	83.42±1.25 ²⁾	54.74±1.71 ²⁾
二陈汤加味	8	5	10.86±0.35 ⁴⁾	9.03±0.34 ⁴⁾	78.32±1.34 ⁴⁾	47.51±1.37 ⁴⁾
	9	10	6.67±0.34 ⁴⁾	8.75±0.27 ⁴⁾	70.14±1.21 ⁴⁾	37.21±1.36 ⁴⁾
	9	20	7.64±0.46 ⁴⁾	8.23±0.23 ⁴⁾	76.25±1.13 ⁴⁾	36.23±1.12 ⁴⁾

3.4 对 COPD 大鼠血浆, BALF 中 IL-12, IFN- γ , IL-9, IL-4 和 IL-13 水平的影响 在血浆和 BALF 中,与正常组比较,模型组 IL-12, IFN- γ 水平均显著降低 ($P<0.01$),而模型组 IL-4, IL-9 和 IL-13 水平均显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量组 IL-12, IFN- γ 水平均显著升高 ($P<0.01$),而二陈汤加味高、中、低剂量组 IL-4, IL-9 和 IL-13 水平均显著降低 ($P<0.01$)。见表 3, 4。

3.5 对 COPD 大鼠细支气管的组织结构的影响

正常组大鼠细支气管腔内无渗出物,细支气管黏膜被覆单层柱状上皮,上皮细胞排列整齐、无坏死,无杯状细胞,黏膜以外各层无腺体和软骨组织,平滑肌呈环状,各层均未见炎细胞浸润。模型组大鼠

细支气管腔内有由脱落的上皮、渗出的炎细胞、渗出液混合而凝集成的痰栓,细支气管黏膜上皮细胞排列不整齐,部分上皮细胞坏死、脱落,管壁各层及其周围均有炎性细胞浸润;与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量组细支气管腔内有微量渗出物,管壁各层炎细胞浸润明显减少,结构趋于正常。二陈汤加味低剂量组细支气管腔内渗出物减少,黏膜上皮细胞脱落减轻,管壁及其周围仍有炎细胞浸润。图 1。

3.6 对 COPD 大鼠细支气管中 IL-4R1, IL-13RA1 表达的影响 IL-4R1 和 IL-13RA1 阳性信号呈棕黄色,表达于细支气管黏膜上皮细胞、淋巴细胞、巨噬细胞及成纤维细胞,均定位在细胞胞膜和胞浆。与

表 3 二陈汤加味对 COPD 大鼠血浆中 IL-12, IFN- γ , IL-9, IL-4 和 IL-13 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

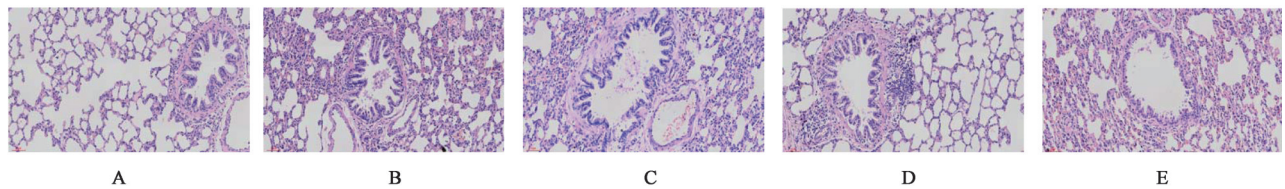
Table 3 Effect of modified Erchentang on levels of IL-12, IFN- γ , IL-9, IL-4 and IL-13 in plasma of rats with chronic obstructive pulmonary disease($\bar{x}\pm s$) ng·L⁻¹

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-12	IFN- γ	IL-9	IL-4	IL-13
正常	10	-	12.41±1.10	21.78±3.25	6.84±1.17	10.27±1.67	5.21±0.48
模型	8	-	5.33±0.12 ²⁾	7.43±1.33 ²⁾	31.26±2.54 ²⁾	38.71±1.37 ²⁾	20.56±2.13 ²⁾
二陈汤加味	8	5	3.11±1.21 ⁴⁾	9.18±1.16 ³⁾	14.17±1.26 ⁴⁾	20.15±0.89 ⁴⁾	10.15±0.94 ⁴⁾
	9	10	8.92±1.23 ⁴⁾	15.77±1.35 ⁴⁾	9.75±1.34 ⁴⁾	15.07±1.71 ⁴⁾	8.07±1.52 ⁴⁾
	9	20	9.66±1.24 ⁴⁾	14.42±2.47 ⁴⁾	10.23±1.63 ⁴⁾	19.34±1.53 ⁴⁾	9.34±1.34 ⁴⁾

表 4 二陈汤加味对 COPD 大鼠 BALF 中 IL-12, IFN- γ , IL-9, IL-4 和 IL-13 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of modified Erchentang on levels of IL-12, IFN- γ , IL-9, IL-4 and IL-13 in BALF of rats with chronic obstructive pulmonary disease($\bar{x}\pm s$) ng·L⁻¹

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-12	IFN- γ	IL-9	IL-4	IL-13
正常	10	-	8.73±1.36	15.78±1.25	12.24±0.46	18.23±1.52	8.46±1.78
模型	8	-	3.21±0.42 ²⁾	6.21±0.31 ²⁾	37.14±2.13 ²⁾	40.41±2.43 ²⁾	28.05±1.26 ²⁾
二陈汤加味	8	5	2.14±1.34 ³⁾	7.02±1.11	18.38±1.23 ⁴⁾	30.18±1.56 ⁴⁾	15.24±0.78 ⁴⁾
	9	10	6.32±1.56 ⁴⁾	12.76±1.43 ⁴⁾	14.62±1.18 ⁴⁾	22.51±1.15 ⁴⁾	12.67±1.32 ⁴⁾
	9	20	5.96±1.37 ⁴⁾	10.74±1.32 ⁴⁾	16.12±1.39 ⁴⁾	23.37±1.33 ⁴⁾	13.85±1.26 ⁴⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 二陈汤加味 5 g·kg⁻¹ 剂量组; D. 二陈汤加味 10 g·kg⁻¹ 剂量组; E. 二陈汤加味 20 g·kg⁻¹ 剂量组(图 2, 3 同)

图 1 二陈汤加味对 COPD 大鼠细支气管组织结构的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of modified Erchentang on bronchioles tissue structure morphology of rats with chronic obstructive pulmonary disease (HE, ×200)

正常组比较, 模型组中 IL-4R1 和 IL-13RA1 表达均显著增强 ($P<0.01$); 与模型组比较, 二陈汤加味高、中、低剂量组 IL-4R1 和 IL-13RA1 表达均显著减弱 ($P<0.01$)。见表 5, 图 2, 3。

表 5 二陈汤加味对 COPD 大鼠细支气管中 IL-4R1, IL-13RA1 定位表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effect of modified Erchentang on expression of IL-4R1 and IL-13RA1 protein in bronchioles of rats with chronic obstructive pulmonary disease($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-4R1	IL-13RA1
正常	10	-	10.34±1.22	21.52±1.35
模型	8	-	54.25±1.46 ²⁾	85.41±2.41 ²⁾
二陈汤加味	8	5	30.12±0.35 ⁴⁾	65.36±3.22 ⁴⁾
	9	10	20.23±1.42 ⁴⁾	36.52±3.35 ⁴⁾
	9	20	26.48±1.23 ⁴⁾	41.37±3.41 ⁴⁾

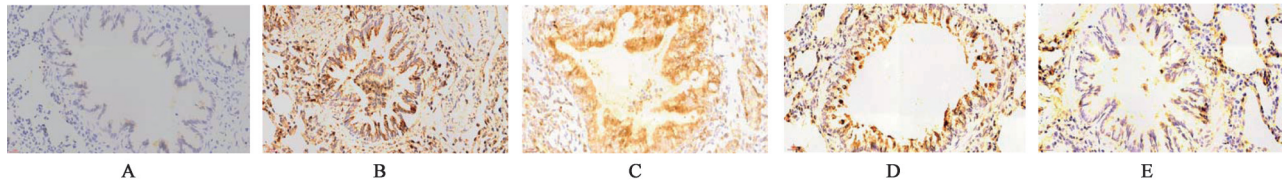


图2 二陈汤加味对COPD大鼠支气管中IL-4R1表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 2 Effect of modified Erchengtang on expression of IL-4R1 in bronchioles of rats with chronic obstructive pulmonary disease (IHC,×400)

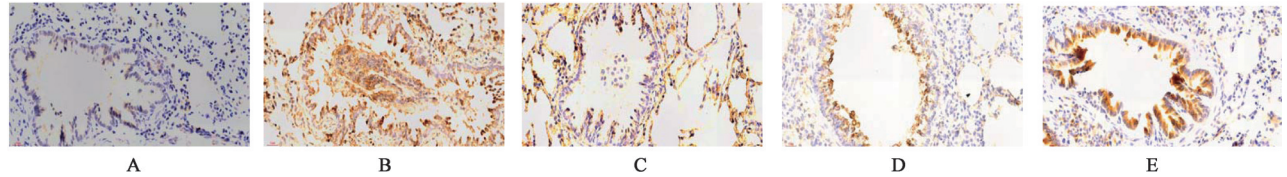


图3 二陈汤加味对COPD大鼠支气管中IL-13RA1表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 3 Effect of modified Erchengtang on expression of IL-13RA1 in bronchioles of rats with chronic obstructive pulmonary disease (IHC,×400)

4 讨论

中医认为COPD的主要病位在肺,与脾、肾密切相关。“脾为生痰之源”,脾失健运,升降失司,水液停聚,上行犯肺,肺失宣降,则咳嗽、咳痰;肾为一身阴阳之根本,肾不纳气则发为喘,故治则应扶正祛邪,标本兼顾。宋《太平惠民和剂局方》卷四中首次记载二陈汤(由茯苓、半夏、甘草、陈皮组成):“治痰饮为患,或呕吐恶心,或头眩心悸,或中脘不快,或发为寒热,或因食生冷,脾胃不和”。二陈汤加味方是在二陈汤的基础上加补脾益肺、健脾除湿、温中和胃之党参、白术、干姜,止咳平喘之麻黄、杏仁,通络平喘之地龙,清肺止咳之葶苈子,健脾益气、益肺止咳、补肾填精之山药,既加强原方燥湿健脾、化痰止咳之功,又兼补益脾肺肾、活血化瘀,使其补而不滞,攻而不伐。本课题组前期研究发现二陈汤加味治疗COPD疗效显著^[18-19]。但尚未涉及对T细胞免疫调节机制的研究。

COPD的病理基础是炎症,其炎症机制主要与机体的免疫功能紊乱有关^[20-22]。静止期辅助T细胞(Th0)受细菌、病毒等外来抗原及其他炎性介质的刺激后,Th0可分化为Th1型、Th2型细胞。Th1/Th2细胞分泌多种抗炎或促炎淋巴因子,影响炎症的结局。Th2型细胞受刺激释放淋巴因子IL-4、IL-13等^[20-24]。IL-4和IL-13共享IL-4RA1与IL-13RA1结合形成的复合受体^[25]。IL-4和(或)IL-13与巨噬细胞膜上的共享复合受体IL-4RA1/IL-13RA1结合,通过激活多种细胞信号转导通路,包括NF- κ B, c-MYC/STAT/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

(PPAR γ), c-Maf/信号转导和转录激活因子(STAT)^[26-27], JAK/STAT信号途径^[28-29]、干扰素调节因子(IRF)/STAT^[30]等通路。使巨噬细胞活化,并释放IL-4、IL-13等多种淋巴因子,维持Th2细胞增殖,诱导炎症反应的启动,增强趋化类、黏附类蛋白的表达,诱导呼吸道内炎症细胞的渗出、趋化、聚集与活化,加重气道的慢性持续性炎症,刺激成纤维细胞增殖,参与气道重建,从而增加气道阻力,通气受限,降低肺的通气功能^[31-33]。激活的Th1型细胞释放IL-12、IFN- γ 等发挥抗炎作用。IL-12可促进Th1细胞因子产生IFN- γ , IFN- γ 结合并活化其受体,激活下游JAK/STAT通路,促进Th1细胞分化。IFN- γ 抑制B淋巴细胞合成与释放免疫球蛋白E(IgE),阻止气道炎症反应;而IFN- γ 又可反过来加强IL-12的作用,从而形成正反馈调节^[6]。IL-12和IFN- γ 又可抑制Th2细胞免疫应答反应,减少IL-13、IL-4释放,并抑制Th2型细胞增生,使Th1/Th2比值恢复正常,减轻气道炎症反应,降低气道阻力,改善肺功能^[6]。IL-12与IL-13的不平衡在COPD炎症过程中具有重要意义。IL-13主要由Th2细胞、单核细胞和肥大细胞等分泌,IL-13不仅下调Th1细胞分泌IL-12、IFN- γ ,而且IL-13刺激Th2细胞增殖,使Th1/Th2平衡向Th2倾斜;还能促进IgE的合成,促进免疫应答引起气道炎症高反应,从而参与炎症的发生与发展^[7-34],导致小气道管壁及周围炎症加重,肺气肿形成^[35-36],肺功能急剧下降^[37]。IL-9是新发现的一种淋巴因子,主要来源于CD4⁺Th9细胞^[38]。IL-9还可来源于Th17细胞、肥大细胞、调节性T细胞(Treg),自然杀

伤细胞(NK)等^[39]。IL-4刺激Th0细胞分化为Th9细胞分泌IL-9,IL-9可作用于多种炎细胞和组织细胞,IL-9可促进肥大细胞的增殖并释放IL-13,在慢阻肺中,IL-9为重要的促炎因子^[40-42]。

COPD疾病模型是研究COPD发病机制及其药效、药理研究的良好平台^[14-16]。判断COPD模型是否成功的金标准是依据肺功能和组织病理学^[14-16]。本研究参考文献制备COPD大鼠模型^[14-15],肺功能检测结果发现,与正常组比较,模型组的FEV₁,FVC,FEV₁/FVC的值均显著降低。组织病理学发现,模型组大鼠细支气管腔内有由脱落的上皮、渗出的炎细胞、渗出液混合而凝集成的痰栓,细支气管黏膜上皮细胞排列不整齐,部分上皮细胞坏死、脱落,管壁各层及其周围均有炎性细胞浸润。肺功能和组织病理学结果均提示本实验造模成功。

COPD炎症机制中存在免疫细胞分化及其功能的紊乱^[7-11]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组血浆,BALF中的中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞计数显著升高,提示中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞参与COPD炎症过程。与正常组比较,模型组血浆和BALF中IL-4,IL-13和IL-9的水平显著升高,与文献报道一致^[43-45],提示淋巴因子IL-4,IL-13和IL-9可能在COPD过程中起促炎作用。与正常组比较,模型组细支气管中IL-4R1和IL-13RA1表达均显著增强,与文献报道一致^[46-47],说明COPD过程中增生的Th2细胞分泌高水平的淋巴因子IL-4,IL-13,刺激上皮细胞、淋巴细胞、巨噬细胞及成纤维细胞等靶细胞膜上的IL-4和(或)IL-13的受体IL-4RA1,IL-13RA1表达增强,提示该配体-受体信号通路参与COPD的炎症过程。

二陈汤加味可能通过调节T淋巴细胞及其淋巴因子,上调IL-12和IFN- γ ,下调IL-4,IL-13,IL-9对COPD发挥抗炎、保护肺功能的作用。本研究发现,与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量组BALF中的中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞计数显著减少(趋于正常),血浆和BALF中IL-12,IFN- γ 水平显著增高,而IL-9,IL-4和IL-13的水平反而显著降低,提示二陈汤加味可能通过调节辅助T细胞免疫,促进IL-12,IFN- γ 抗炎因子的释放,同时抑制IL-4,IL-13,IL-9促炎因子的分泌,进而减轻COPD的炎症反应。经免疫组化对蛋白定位及半定量研究发现,与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量组细支气管中IL-4R1和IL-13RA1表达均显著减弱,二陈汤加味可能抑制靶细胞(上皮细胞、淋巴细胞、巨噬细

胞及成纤维细胞)膜上的IL-4和(或)IL-13的受体IL-4RA1,IL-13RA1表达,提示二陈汤加味通过抑制IL-4和(或)IL-13的共享复合受体IL-4RA1/IL-13RA1系统,对COPD发挥抗炎作用。二陈汤加味中、高剂量组细支气管腔内仅有微量渗出物,管壁各层炎细胞浸润明显减少,结构趋于正常;二陈汤加味高、中、低剂量组的FEV₁,FVC,FEV₁/FVC的值均显著升高,佐证了二陈汤加味保护气道的结构及肺功能。

总之,二陈汤加味通过调节辅助T淋巴细胞分型及其淋巴因子,对COPD有抗炎及保护肺功能的作用。其机制可能与促进Th1细胞释放抗炎因子IL-12,IFN- γ ,下调Th2,Th9细胞分泌促炎因子IL-9,IL-4,IL-13,并抑制IL-4和(或)IL-13的共享复合受体IL-4RA1/IL-13RA1的表达有关。

[参考文献]

- [1] VLAHOS R, BOZINOVSKI S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD [J]. Clin Sci, 2014, 126(4): 253-256.
- [2] ALVARADO-GONZALEZ A, ARCE I. Tiotropium bromide in chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma [J]. J Clin Med Res, 2015, 7(11): 831-839.
- [3] 程艳慧,何东初. COPD发病机制分子生物学的最新研究进展 [J]. 临床肺科杂志 [J], 2010, 15(2): 232-233.
- [4] 刘佳玉,石克华. 中医药治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期研究进展 [J]. 河北中医, 2018, 40(1): 146-151.
- [5] 肖钦文,李海梅,曾珠,等. Th17、Treg细胞失衡与哮喘-慢阻肺重叠综合征的相关性及金匱肾气丸干预后的影响研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(2): 5-9.
- [6] YE Y L, HUANG W C, LEE Y L, et al. Interleukin-12 inhibits eotaxin secretion of cultured primary lung cells and alleviates airway inflammation *in vivo* [J]. Cytokine, 2002, 19(2): 76-84.
- [7] OESER K, MAXEINER J, SYMOWSKI C, et al. T cells are the critical source of IL-4/IL-13 in a mouse model of allergic asthma [J]. Allergy, 2015, 70(11): 1440-1449.
- [8] DONG J, MA Q. Type 2 immune mechanisms in carbon nanotube -induced lung fibrosis [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1120.
- [9] 杜娟,邓冰,桂坤,等. 肺结核患者血清白细胞介素-12、13水平的临床研究 [J]. 临床内科杂志, 2005, 22(6): 409-410.

- [10] SIRACUSA M C, WOJNO E D, ARTIS D. Functional heterogeneity in the basophil cell lineage [J]. *Adv Immunol*, 2012, 11(5):141-159.
- [11] SCHMITT E, KLEIN M, BOPP T. Th9 cells, new players in adaptive immunity [J]. *Trends Immunol*, 2014, 35(2):61-68.
- [12] 谢文英, 尚立芝, 张良芝, 等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠 TNF- α , IL-8, IL-18 及炎细胞的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(4):448-451.
- [13] 陈四清, 季书, 尚立芝. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠转化生长因子- β_1 及组蛋白去乙酰化酶 2 基因表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10):147-154.
- [14] MAHADEVA R, SHAPIRO S D. Chronic obstructive pulmonary disease. 3: experimental animal models of pulmonary emphysema [J]. *Thorax*, 2002, 57(10):908-914.
- [15] 宋小莲, 王昌惠, 白冲. 脂多糖结合熏烟法和单纯熏烟法建立慢性阻塞性肺病大鼠模型的比较 [J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(3):246-249.
- [16] 宋一平, 崔德建, 毛培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响 [J]. *中华内科杂志*, 2000, 39(8):556-558.
- [17] 朱艳琴. 医学实验基本操作技能 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015:106-107.
- [18] 尚立芝, 季书, 李耀洋, 等. 二陈汤加味对急性加重期 COPD 患者 CXCL8 及 CXCR1/2 蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(24):1-8.
- [19] 尚立芝, 季书, 王国强, 等. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(23):65-72.
- [20] MARTINEZ F O, GORDON S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment [J]. *F1000Prime Rep*, 2014, doi: 10.12703/P6-13.
- [21] 王东, 刘江. 益肺健脾颗粒改善老年慢阻肺患者肺功能及免疫功能 [J]. *世界中医药*, 2016, 11(12):2634-2640.
- [22] 徐兴才, 徐永波, 赵平, 等. 沙美特罗替卡松粉吸入剂对稳定期慢性阻塞性肺病患者气道炎症及咳嗽和咳痰症状的影响 [J]. *中国医药*, 2020, 15(8):1233-1236.
- [23] GROVES A M, JOHNSTON C J, MISRA R S, et al. Effects of IL-4 on pulmonary fibrosis and the accumulation and phenotype of macrophage subpopulations following thoracic irradiation [J]. *Int J Radiat Biol*, 2016, 92(12):754-765.
- [24] 王成阳, 刘向国, 彭青和, 等. 调节性 T 细胞、辅助 T 细胞在慢性阻塞性肺疾病患者肺功能降低中的作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 16(22):6247-6249.
- [25] MOJIRI-FORUSHANI H, HEMMATI A A, KHODADADI A, et al. Valsartan attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibition of NF- κ B expression and regulation of Th1/Th2 cytokines [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2018, 40(3):225-231.
- [26] PELLO O M, DE PIZZOL M, MIROLO M, et al. Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology [J]. *Blood*, 2012, 119(2):411-421.
- [27] 沈青. 丹红注射液治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者的临床疗效及其对免疫功能的影响 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2017, 25(12):91-94.
- [28] SICA A, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3):787-795.
- [29] 鞠俊强, 朱正太, 李华, 等. 维生素 D 对老年慢性阻塞性肺疾病稳定期患者细胞免疫功能的影响 [J]. *中国处方药*, 2017, 15(12):87-88.
- [30] CHISTIYAKOV D A, MYASOEDOVA V A, REVIN V V, et al. The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2 [J]. *Immuno Biology*, 2018, 223(1):101-111.
- [31] DE WAAL MALEFYT R, FIGDOR C C, HUIJBENS R, et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN- γ or IL-10 [J]. *J Immunol*, 1993, 151(11):6370-6381.
- [32] 方荣, 王倩, 冯丽伟, 等. IL-13、TNF- α 在慢性阻塞性肺疾病和哮喘患者中的检测意义 [J]. *临床肺科杂志*, 2016, 21(8):1410-1412.
- [33] 王黎风, 鞠建宝. IL13 与 IL13 R α 2 在慢性鼻-鼻窦炎鼻息肉组织中的表达 [J]. *临床医药文献杂志*, 2017, 4(11):2033-2034.
- [34] 胡应龙, 周凤娟, 雷震山, 等. 白细胞介素-12、13 水平对儿童哮喘影响的研究 [J]. *中华医学杂志*, 2005, 29(1):29-30.
- [35] 田慧芸, 顾玉海. 细胞因子 IL-10、IL-13 与 COPD [J]. *临床肺科杂志*, 2013, 18(6):1103-1104.
- [36] 贾琳, 武蕾, 李博林, 等. 加味消风散治疗支气管哮喘风哮证的疗效观察及对炎症因子的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(4):70-74.
- [37] 陈庆芸, 谢灿茂, 黄白丽, 等. IL-18、IL-13 和 TNF- α 在慢性阻塞性肺疾病中的变化及意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(22):2796-2799.

- [38] DARDALHON V, AWASTHI A, KWON H, et al. IL-4 Inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T Cells And, Together With TGF-beta, Generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻ Effector T Cells [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(12):1347-1355.
- [39] CHANG H C, SEHRA S, GOSWAMI R, et al. The transcription factor PU 1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(6):527-534.
- [40] STAUDT V, BOTLHUR E, KLEIN M, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells [J]. *Immunity*, 2010, 33(2):192-202.
- [41] JONES C P, GREGORY L G, CAUSTON B, et al. Activin A and TGF-beta promote TH9 cell-mediated pulmonary allergic pathology [J]. *Allerg Clin Immunol*, 2012, 129(4):1000-1003.
- [42] 李艳霞, 柴燕玲. γ 干扰素和白介素-4的特点及其在慢性阻塞性肺疾病发病过程中的作用[J]. *临床肺科杂志*, 2019, 24(6):1139-1143.
- [43] 杨晓东, 胡大鹏, 鲍文华, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者血清白细胞介素-9、-10的水平及意义[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(16):3998-3999.
- [44] 杨晓敏, 刘娟, 赵娜妹, 等. 健脾益肺化痰方通过抑制IL-13信号通路改善COPD大鼠气道黏液高分泌[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(8):1904-1907.
- [45] 肖莉, 王煜, 李振华, 等. 白细胞介素13可能通过转化生长因子 β_1 途径致肺纤维化[J]. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(12):1778-1782.
- [46] 王黎风, 鞠建宝. IL13与IL13RA2在慢性鼻-鼻窦炎鼻息肉组织中的表达[J]. *临床医药文献杂志*, 2017, 4(11):2033-2034.
- [47] 贺蓓, 赵鸣武, 宁蓝丁, 等. 白细胞介素13基因启动子-1055位点基因型与慢性阻塞性肺疾病的相关性研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2004, 27(8):529-532.

[责任编辑 周冰冰]