

黄芪-当归配伍对气道变应性炎症大鼠 IFN- γ , IL-4, STAT6, STAT4 的影响

袁颖*, 郭忻, 金素安, 何世民, 符胜光
(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] **目的:**通过研究黄芪-当归配伍对气道变应性炎症模型大鼠血清干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)含量及肺组织信号转导因子和转录活化因子 4(STAT4)、信号转导因子和转录活化因子 6(STAT6)表达的影响,探讨黄芪-当归配伍治疗气道变应性炎症的作用机制。**方法:**采用卵清蛋白(OVA)致敏及喷雾激发的方法造成大鼠气道变应性炎症模型,分别用黄芪、当归、黄芪-当归配伍灌胃给药治疗。应用 ELISA 方法测定血清中 IFN- γ 、IL-4 含量。应用 Western blot 方法检测肺组织 STAT4、STAT6 表达。**结果:**模型组血清 IFN- γ 含量降低,IL-4 含量升高。黄芪组血清中 IFN- γ 含量增加,当归组血清中 IL-4 含量降低,芪归配伍组可增加血清中 IFN- γ 含量,降低 IL-4 含量。模型组肺组织 STAT6、磷酸化信号转导因子和转录活化因子 6(p-STAT6)表达增加,STAT4、磷酸化信号转导因子和转录活化因子 4(p-STAT4)表达减少。黄芪组可降低 STAT6、p-STAT6 表达,增加 p-STAT4 表达。当归组可降低 p-STAT6 表达。芪归组可降低 STAT6、p-STAT6,增加 STAT4、p-STAT4 表达。**结论:**黄芪-当归配伍可能通过抑制 STAT6、促进 STAT4,调节气道变应性炎症中 Th1/Th2 细胞因子平衡,从而对气道变应性炎症有抑制作用。

[关键词] 黄芪; 当归; 气道变应性炎症; 干扰素- γ ; 白细胞介素-4; 信号转导因子和转录活化因子 4; 信号转导因子和转录活化因子 6

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0223-04

Effect of Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix on Contents of IFN- γ , IL-4, STAT6 and STAT4 of Airway Allergic Inflammation in Rats

YUAN Ying*, GUO Xin, JIN Su-an, HE Shi-min, FU Sheng-guang
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix on level of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) in serum and expression of signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6), signal transducers and activators of transcription 4 (STAT4) of airway allergic inflammation in rats, in order to partly show the mechanism of Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix in treating airway allergic inflammation. **Method:** The model of airway allergic inflammation in rats were caused by OVA. Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix were used to control the model rats. The contents of IFN- γ and IL-4 in the serum were detected by ELISA. The expression of STAT6, STAT4 in lung tissue were detected by Western blot. **Result:** The level of IL-4 in serum of model group were significantly higher than those in the control group. The level of IFN- γ in serum of model group were significantly lower than those in the control group. Astragali Radix can depress the level of IL-4 in serum, and increase the level of IFN- γ in serum. Angelica can depress the level of IL-4 in serum. Compatibility of *Astragali Radix* and *Angelicae Sinensis Radix* can depress the level of IL-4 in serum, and increase the level of IFN- γ in serum. Astragali Radix can depress the expression of STAT6, p-STAT6 in lung tissue, and increase the expression of p-STAT4. Angelicae Sinensis Radix can depress the expression

[收稿日期] 20111206(011)

[基金项目] 上海市教育委员会 2009 年度科研创新项目(09YZ120);教育部科技发展中心博士专项基金(20093107120013)

[通讯作者] *袁颖,博士,副教授,从事中药及其复方的药效及作用机制研究, Tel:021-513222195, E-mail:yyin921@163.com

of p-STAT6. Compatibility of *Astragali Radix* and *Angelicae Sinensis Radix* can depress the expression of STAT6, p-STAT6 in lung tissue, and increase the expression of STAT4, p-STAT4. **Conclusion:** Compatibility of *Astragali Radix* and *Angelicae Sinensis Radix* may adjust the balance of Th1 and Th2 by restraining STAT6 and promoting STAT4 to control the airway allergic inflammation.

[**Key words**] *Astragali Radix*; *Angelicae Sinensis Radix*; airway allergic inflammation; IFN- γ ; IL-4; STAT6; STAT4

气道变应性炎症反应属于 I 型变态反应,在临床上主要表现为变应性鼻炎(AR)及支气管哮喘(BA)。1 型辅助性 T 细胞和 2 型辅助性 T 细胞(Th1/Th2)细胞因子平衡失调, Th2 类细胞因子增多,功能增强是气道变应性炎症发生发展的重要因素。现代研究表明,信号转导系统在呼吸道变应性疾病的发生发展过程中起着重要的作用。酪氨酸激酶-信号和转录激活因子(JAK/STAT)信号转导途径在哮喘气道炎症和气道重塑中发挥着关键作用^[1]。本研究在建立气道变应性炎症的基础上,探讨了黄芪-当归配伍(芪归)对气道变应性炎症大鼠血中干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4、(IL-4)含量及肺组织信号转导因子和转录活化因子 6(STAT6),信号转导因子和转录活化因子 4(STAT4)表达的影响。

1 材料

1.1 动物及分组 健康 SD 大鼠,清洁级,雄性,48 只,体重(120 \pm 10) g。分笼饲养于上海中医药大学动物实验中心 SPF 级动物实验室内。动物许可证号 SCXP(沪)2008-0005。随机分为 6 组,每组 8 只。分别为正常对照组、模型对照组、黄芪组、当归组、芪归配伍组、曲尼斯特胶囊阳性对照组。

1.2 试剂 卵清蛋白(OVA, V 级, Sigma), 氢氧化铝凝胶(Sigma), STAT4, STAT6, p-STAT4, p-STAT 6 单克隆抗体(Cell Signaling Technology), 大鼠 IL-4 ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 大鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒(Invitrogen)。

1.3 药物 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. 的干燥根,产地甘肃,批号 091211。当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,产地甘肃,批号 091128。由上海市药品检定所吴赵云研究员鉴定。曲尼斯特胶囊,中国药大制药,批号 20070915。

1.4 仪器 402A 超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备有限公司),酶标仪(BIO-TEK ELX800),复日 FR-200 生物电泳图像分析系统。

2 方法

2.1 造模方法

2.1.1 致敏阶段 于实验第 1,8 天,除正常对照组给予氢氧化铝凝胶,各组动物均以新鲜配制的 1 g \cdot L⁻¹ OVA 氢氧化铝凝胶致敏液作皮下注射,每鼠在两侧后足跖、腹股沟、腰、背、颈部共取 10 点,每点注射 0.05 mL,同时 ip 0.5 mL,共计 1 mL。

2.1.2 激发阶段 于实验第 15~36 天,将大鼠置于自制雾化箱内,用超声雾化器以校定的雾化量 0.8 mL \cdot min⁻¹,雾化 1% OVA 激发液 15 min,每日 1 次,以激发气道变应性炎症。正常对照组雾化以生理盐水。观察激发后动物鼻部症状及呼吸变化。

2.2 给药方法 黄芪水煎液、当归水煎液、黄芪-当归(1:1)水煎液,分别于实验第 15 日开始 ig 给药,根据人与大鼠体表面积比计算给药量(按生药量计),10 g \cdot kg⁻¹,每日 1 次,共 21 d。正常对照组和模型对照组 ig 给予等体积的生理盐水。阳性药组 ig 曲尼斯特水溶液 34 mg \cdot kg⁻¹。

2.3 取材处理 最后 1 次激发 24 h 后,用 25% 乌拉坦(4 mL \cdot kg⁻¹) ip 麻醉。迅速打开腹腔,,腹主动脉取血 10 mL,2 500 r \cdot min⁻¹离心 10 min,取血清,置 -20 $^{\circ}$ C 保存直至测定。迅速开胸,取出肺组织,置于液氮中冷冻后,保存于超低温冰箱中直至测定。

2.4 IFN- γ , IL-4 检测 血清 IFN- γ , IL-4 含量采用 ELISA 检测。根据 ELISA 试剂盒说明书操作,酶标仪 450 nm 检测。

2.5 组织总蛋白提取 取 100 mg 肺组织置于 1 mL RIPA 裂解液中,于冰浴中 10 000 r \cdot min⁻¹匀浆 10 s \times 3 次裂解蛋白。将组织匀浆液移至预先加入 10% 的 100 μ L PMSF 的 1.5 mL 离心管中,混匀。加入 40 μ L Complete mini 液混匀,低温高速离心机 12 000 r \cdot min⁻¹离心 10 min,取其上清液,至低温冰箱,2 d 后再按上述方法离心。

2.6 Western blot 检测 取 16 μ L 蛋白提取物,与 4 μ L 的 5 \times LB (Loading Buffer),混匀,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min。上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳条件 80 V,时间约 2.5 h。电泳结束后取下凝胶,上覆与

凝胶同样大小硝酸纤维素膜,进行半干法转膜。转膜条件:电压 12~20 V,时间 70 min。转膜后用 5% 脱脂奶粉 TTBS 室温震荡封闭 1 h。封闭结束后,加入第一抗体工作液(根据各抗体说明书配置),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,孵育结束后 TTBS 洗 5 min \times 3 次,加入 HRP 偶联的第二抗体,室温孵育 1 h,TTBS 洗 10 min \times 3 次,除去未结合的第二抗体。取等量 ECL(1,2 各 0.8 mL)发光剂,混匀,浸膜 3 min,摇匀,取出后以保鲜膜包好,置于曝光匣中,暗室内根据荧光强度决定 X 射线片曝光时间,显影 2 min,水洗,定影 1 min,水洗,放置烘箱快速烘干,置于曝光匣内,根据抗体说明书找出目的分子条带所在的位置。扫描曝光片后,应用复日 FR-200 生物电泳图像分析系统分析底片中的目的条带,计算机自动读取并记录每条带的灰度值。同一张硝酸纤维素膜曝光后以 TTBS 洗涤,5% 脱脂奶粉 TTBS 重新封闭,加入抗 GAPDH 单克隆抗体孵育,作为内参照。以相应蛋白条带的平均灰度值表示所测蛋白的相对强度,将其与内参照对比值作为蛋白相对含量。

2.7 统计学处理 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差齐性检验及单因素方差分析。统计分析采用 SPSS 11.0 软件包完成。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对血清 IFN- γ 、IL-4 含量的影响 血清 IFN- γ 含量,模型组与空白对照组相比 IFN- γ 含量降低($P < 0.05$)。黄芪组和芪归配伍组 IFN- γ 含量与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。血清 IL-4 含量:模型组 IL-4 含量升高($P < 0.01$),各给药组表达与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。血清 IFN- γ /IL-4,模型组与空白对照组相比 IFN- γ /IL-4 降低($P < 0.01$),黄芪组、芪归配伍组及曲尼斯特组与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 黄芪-当归配伍对血清 IFN- γ 、IL-4 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IFN- γ / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-4 / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	IFN- γ /IL-4
空白对照	-	81.75 \pm 15.86	122.17 \pm 46.55	0.76 \pm 0.34
模型对照	-	64.46 \pm 6.27 ¹⁾	284.45 \pm 54.73 ²⁾	0.24 \pm 0.06 ²⁾
黄芪	10	87.08 \pm 22.26 ⁴⁾	159.51 \pm 48.31 ³⁾	0.60 \pm 0.29 ³⁾
当归	10	72.38 \pm 12.43	229.54 \pm 26.28 ⁴⁾	0.32 \pm 0.05
芪归配伍	10	86.48 \pm 17.44 ⁴⁾	144.31 \pm 75.66 ⁴⁾	0.73 \pm 0.31 ⁴⁾
曲尼斯特	0.034	72.41 \pm 16.47	146.62 \pm 86.90 ⁴⁾	0.67 \pm 0.38 ⁴⁾

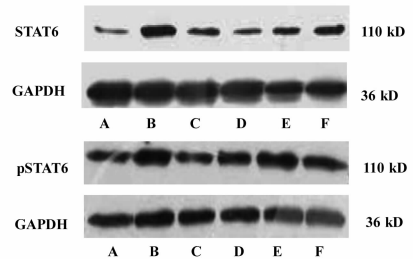
注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对肺组织 STAT6、p-STAT6 表达的影响 模型组肺组织 STAT6 及 p-STAT6 表达均升高($P <$

0.01),黄芪组、芪归组、曲尼斯特组可降低 STAT6 的表达($P < 0.01$),各给药组均降低 p-STAT6 表达($P < 0.01$)。见表 2,图 1。

表 2 黄芪-当归配伍对肺组织 STAT6、p-STAT6 相对含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	STAT6	p-STAT6
空白对照	-	0.97 \pm 0.03	0.78 \pm 0.03
模型对照	0	1.25 \pm 0.04 ²⁾	1.33 \pm 0.02 ²⁾
黄芪	10	0.92 \pm 0.03 ⁴⁾	0.81 \pm 0.09 ⁴⁾
当归	10	1.24 \pm 0.02	0.86 \pm 0.06 ⁴⁾
芪归配伍	10	0.88 \pm 0.01 ⁴⁾	0.91 \pm 0.04 ⁴⁾
曲尼斯特	0.034	1.05 \pm 0.01 ⁴⁾	0.94 \pm 0.04 ⁴⁾



A. 空白对照组;B. 模型组;C. 芪归配伍 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;
D. 黄芪 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E. 当归 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;
F. 曲尼斯特 34 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (图 2 同)

图 1 黄芪-当归配伍对气道变应性炎症模型大鼠肺组织 STAT6、p-STAT6 表达的影响

3.3 黄芪-当归配伍对肺组织 STAT4、p-STAT4 表达的影响 模型组肺组织 STAT4、p-STAT4 表达均降低($P < 0.01$),芪归组可升高 STAT4 的表达($P < 0.01$),黄芪组、芪归组能升高 p-STAT4 表达($P < 0.01$)。见表 3,图 2。

表 3 黄芪-当归配伍对肺组织 STAT4、p-STAT4 相对含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	STAT4	p-STAT4
空白对照	-	1.21 \pm 0.02	1.85 \pm 0.01
模型对照	-	0.85 \pm 0.06 ²⁾	0.81 \pm 0.02 ²⁾
黄芪	10	0.84 \pm 0.04	1.01 \pm 0.01 ⁴⁾
当归	10	0.78 \pm 0.04	0.84 \pm 0.01
芪归配伍	10	1.07 \pm 0.08 ⁴⁾	1.76 \pm 0.02 ⁴⁾
曲尼斯特	0.034	0.83 \pm 0.02	0.56 \pm 0.01

4 讨论

研究表明,细胞因子网络在气道变应性炎症发病中起着重要作用,多数细胞因子通过细胞内 JAK/STAT 途径传递信息,引起靶细胞反应,故 JAK/STAT 信号通路在气道变应性炎症发生发展中发挥着枢纽作用^[2]。JAK (Janus protein tyrosin kinases) 是胞浆中的一种非受体性的蛋白酪氨酸激酶

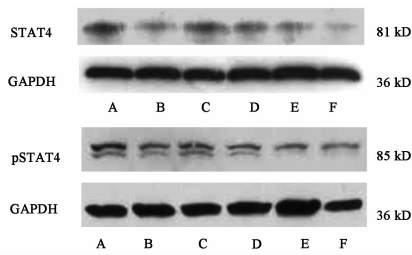


图 2 黄芪-当归配伍对气道变应性炎症模型大鼠肺组织 STAT4, p-STAT4 表达的影响

(TPK)。主要包括 JAK1, JAK2, JAK3, Jyk2^[3]。胞内的信号转导因子和转录活化因子(STAT)是有信号传递和转录因子双重功效的 DNA 结合蛋白,被 TPK 活化后发挥作用。主要包括 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6^[4]。Th1/Th2 细胞亚群功能失衡, Th2 活化亢进是哮喘发病的重要基础。JAK/STAT 途径参与许多细胞因子信号转导而影响 Th 细胞分化,其中 IL4, IL-12 作用最突出。IL-12 诱导 Th1 分化需要活化 STAT4, IL4 和 IL-13 诱导 Th2 分化需要活化 STAT6。有学者认为 STAT4, STAT6 控制了 Th 分化^[5]。在哮喘发病中起重要作用的介质组胺通过 JAK/STAT 途径调节 Th2 类细胞因子 IL-5, IL-10, IL-13 和 Th1 类细胞因子 IFN- γ 的分泌,从而影响 Th 平衡^[6]。STAT6 还参与了气道局部 Th2 细胞募集和趋化因子的表达^[7]。实验证实哮喘大鼠模型 STAT6 在气道上皮细胞表达增强,并与 EOS 的生成密切相关^[8],哮喘大鼠气道平滑肌细胞、血管平滑肌细胞及内皮细胞 STAT4 蛋白及其 mRNA 的表达被抑制^[9]。

血为气之母,气为血之帅。黄芪当归药对的配伍原则为气血同治,为临床所常用,以《内外伤辨惑论》当归补血汤为代表。芪归药对既能自成一方,又可作为基础药对配伍组方,因而备受历代医家重视。而黄芪和当归也常用于气道变应性疾病的治疗。如已有的药理研究证实,黄芪能活化 T 细胞,诱生 IFN- γ , CSFs 及增强淋巴因子激活的杀伤细胞活性等,表现出增强机体免疫有关的补气作用。黄芪可以增强下丘脑-垂体-肾上腺皮质功能,调节 Th1 和 Th2 型细胞因子的平衡^[10-11],能改善哮喘患者的通气功能,降低气道高反应性^[12]。

本研究结果显示血中 IFN- γ 含量降低、IL-4 含量升高。单味黄芪可升高血中 IFN- γ 含量,降低血中 IL-4 含量;单味当归可降低血中 IL-4 含量;黄芪-当归配伍可升高血中 IFN- γ 含量,降低血中 IL-4 含量。提示黄芪-当归配伍可调节 Th1/Th2 细胞因子平衡,抑制 Th2 类细胞因子、促进 Th1 类细胞因子,

使平衡向 Th1 方向逆转,从而对气道变应性炎症有抑制作用。本研究中模型组肺组织 STAT6, p-STAT6 表达增加, STAT4, p-STAT4 表达减少。说明其存在 STAT4 表达抑制,而 STAT6 过度表达,从而 Th1 分化信号转导不充分, Th2 过度活化,使 Th1/Th2 比例失衡。黄芪组可降低 STAT6, p-STAT6 表达,增加 p-STAT4 表达,当归组可降低 p-STAT6 表达;芪归组可降低 STAT6, p-STAT6, 增加 STAT4, p-STAT4 表达。结果提示黄芪-当归配伍对 JAK/STAT 信号转导有一定的调节作用,可能通过抑制 STAT6、促进 STAT4 而改善气道变应性炎症 Th1/Th2 细胞因子平衡状态。本研究结果可为黄芪-当归配伍在气道变应性炎症治疗中的应用提供一定理论依据。

[参考文献]

- [1] Hirasawa M, Ito Y, Shibata M A, et al. Mechanism of inflammation in murine eosinophilic myocarditis produced by adoptive transfer with ovalbumin challenge [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007, 142 (1): 28.
- [2] Bergeron C, Boulet L P. Structural changes in airway diseases; characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation [J]. *Chest*, 2006, 129: 1068.
- [3] 周娟,符州. 支气管哮喘与 JAK/STAT 信号转导途径 [J]. *国外医学:生理、病理分册,科学与临床分册*, 2004(2): 197.
- [5] Pernis A B, Rothman P B. JAK-STAT signaling in asthma [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(10): 1279.
- [6] Packard K A, Khan M M. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance [J]. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3(7): 909.
- [7] Pernis A B, Rothman P B. JAK-STAT signaling in asthma [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(10): 1279.
- [8] 叶乐平,李昌崇,李绍波,等. 哮喘大鼠模型信号转导子和转录激活子 6 在气道上皮细胞表达增强 [J]. *基础医学与临床*, 2006, 26(2): 167.
- [9] 叶乐平,李昌崇,张维溪,等. 大鼠哮喘模型肺组织信号转导子和转录激活子 4 及 mRNA 的表达及其意义 [J]. *浙江医学*, 2006, 28(3): 189.
- [10] 赵福东,董竞成,谢瑾玉,等. 补肾、益气中药对哮喘模型大鼠神经内分泌免疫网络若干指标的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2007, 27(8): 715.
- [11] 张薇,赵菲. 黄芪对儿童变应性鼻炎血清 Th1/Th2 的影响 [J]. *中国药物与临床*, 2006, 6(9): 680.
- [12] 张洁,孙秀珍,田蓉,等. 黄芪对哮喘患者气道反应性的影响 [J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(8): 701.

[责任编辑 聂淑琴]