

舒康平喘胶囊对哮喘大鼠支气管肺泡 灌洗液中细胞因子的影响

韩 涛^{1*}, 兰咏梅², 安冬青³

(1. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 西北民族大学医学院, 甘肃 兰州 730030;
3. 甘肃省肃南县人民医院, 甘肃 肃南 734400)

[摘要] 目的: 探讨舒康平喘胶囊对哮喘大鼠 Th1/Th2 细胞亚群反应及 Th1/Th2 失衡的影响及防治哮喘的作用机制。方法: 将大鼠分为正常对照组、哮喘模型组、舒康平喘胶囊高、中、低剂量组、激素对照组, 以卵蛋白腹腔注射致敏加雾化激发建立大鼠哮喘模型。用 ELISA 检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中 IFN- γ 、IL-4、IL-5 水平及 IFN- γ /IL-4 值的变化。结果: 与哮喘模型组比较, 舒康平喘胶囊高、中剂量组和地塞米松组 IFN- γ 水平均明显升高($P < 0.05$), IL-4 水平显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), IL-5 水平明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), IFN- γ /IL-4 值显著升高($P < 0.01$)。结论: 舒康平喘胶囊具有增强 Th1 细胞亚群优势反应, 抑制 Th2 细胞亚群优势反应和调节免疫失衡的作用, 减轻气道炎症, 降低气道高反应性, 可能是舒康平喘胶囊治疗哮喘的机制之一。

[关键词] 舒康平喘胶囊; 支气管哮喘; γ 干扰素; 白介素-4; 白介素-5

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)01-0052-04

Effect of Shukang Pingchuan Capsule on IFN- γ , IL-4, IL-5 and IFN- γ /IL-4 in Asthmatic Rats

HAN Tao^{1*}, LAN Yong-mei², AN Dong-qing³

(1. Gansu College of TCM, Gansu Lanzhou 730000, China;

2. Medical College of Northwest University for Nationalities, Gansu Lanzhou 730030, China;

3. The People's Hospital of Sunan City, Gansu Sunan 734400, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Shukang Pingchuan Capsule (SKPCC) on IFN- γ , IL-4, IL-5 and IFN- γ /IL-4 in Asthmatic Rats. **Methods:** Rats are divided into 6 groups: normal control group, asthmatic model group, SKPCC with large, medium, and small dose group, and hormone (dexamethasone) group. Asthmatic model was established by sensitizing and challenging rats with OVA. The level of IFN- γ , IL-4 and IL-5 and the IFN- γ /IL-4 ratio in BALF was measured by ELISA. **Results:** The IFN- γ level was higher ($P < 0.05$), the IL-4 and IL-5 level significantly lower ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) in large and medium SKPCC treatment group compared with asthmatic model group. The IFN- γ /IL-4 ratio in SKPCC treatment group was significantly higher than that in asthmatic model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** SKPCC can adjust Th1/Th2 in asthmatic rats, inhibit the inflammation in trachea and lower its high reaction, which may be one of the mechanisms of SKPCC in treating asthma.

[Key words] Shukang Pingchuan Capsule; Asthma; IFN- γ ; IL-4; IL-5

[收稿日期] 2006-03-28

[基金项目] 甘肃省中医药科技研究计划项目(2002-GZK-1-08)

[通讯作者] * 韩涛, Tel: (0931) 8765346; E-mail: zggsh@126.com

T细胞及其分泌的各种因子在哮喘气道慢性炎症中发挥了重要作用,活化的CD4⁺辅助细胞两个功能性亚群Th1、Th2细胞因子网络失衡是哮喘发病的分子生物学基础之一。IFN- γ 、IL-4分别是Th1、Th2细胞的特征性细胞因子。本研究通过观察舒康平喘胶囊对哮喘大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中IFN- γ 、IL-4、IL-5水平的干预,探讨其对Th1/Th2细胞亚群反应的影响及防治哮喘的作用机制。

1 材料

1.1 动物 72只雄性SD大鼠,体重150 \pm 20g,由兰州大学医学院医学实验中心提供,合格证号:医动字第14-006号。

1.2 药物与试剂 卵蛋白购自上海伯奥生物科技公司,批号20028909。百日咳疫苗,北京生物制品研究所生产,批号20021102。舒康平喘胶囊由葶苈子、威灵仙、地龙、僵蚕、土鳖虫5味中药组成,用药比例为7:7:3:3:1,由武警甘肃总队医院药剂科制备。醋酸地塞米松片,天津药业集团有限公司生产,批号0206183。大鼠IFN- γ 、ELISA试剂盒、IL-4 ELISA试剂盒和IL-5 ELISA试剂盒,均购自深圳晶美生物工程有限公司。

1.3 仪器 超声雾化器402型,上海合力医疗器材厂出品。高速冷冻离心机,德国Kendro公司产品。自动酶标仪,美国Bio-Rad公司产品。

2 方法

2.1 分组 将实验大鼠随机分为6组,每组12只:正常对照组、哮喘模型组、舒康平喘胶囊高、中、低剂量组和地塞米松片对照组。

2.2 造模 哮喘模型以卵蛋白致敏和攻击按文献方法^[1,2]复制。在实验第1d,每只大鼠(除正常动物组外)腹腔注射内含卵蛋白100mg、灭活百日咳杆菌疫苗 6×10^9 个、氢氧化铝100mg的2mL混合液致敏,第15d将上述各组大鼠置于65cm \times 45cm \times 45cm大小的玻璃罩内,用超声雾化器将1%的卵蛋白生理盐水雾化吸入20min,激发诱喘,每d1次,连续激发1周。正常对照组在实验第1d以2mL生理盐水腹腔注射,第15d给予超声雾化生理盐水20min,每d1次,连续1周。

2.3 治疗方法 实验第16~23d,舒康平喘胶囊高、中、低剂量组,分别以生药7.56、3.78、1.89g \cdot kg⁻¹灌胃(相当于临床等效剂量的4、2、1倍),地塞米松组以0.27mg \cdot kg⁻¹灌胃,每d1次,直至处死,治

疗用药共8d。正常对照组、哮喘模型组均用等容量生理盐水灌胃。

2.4 BALF的采集 麻醉大鼠颈部分离出气管,用一次性输液管插入气管固定后,用5mL注射器抽取Hank's液进行灌洗,灌洗液于肺泡内停留2min,反复来回抽4次,回收BALF注入冷冻管中,4 $\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3000r/min,离心10min,取上清液分装,-70 $\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保存待测。

2.5 BALF中IFN- γ 、IL-4、IL-5含量测定

2.5.1 IL-4的检测 按试剂盒说明进行,在抗IL-4单克隆抗体包被的酶标板上,分别加入标本及不同浓度的标准品(100 μL /孔),室温(20~25 $\text{ }^{\circ}\text{C}$)孵育120min,洗板4次,加入辣根过氧化物酶标记的抗IL-4单克隆抗体(100 μL /孔),室温孵育60min,洗板4次,加显色剂,避光室温10~30min,加终止液,混匀,5min内用酶标仪测光密度值,绘制标准曲线,查出标本浓度。

2.5.2 IL-5的检测 检测方法按试剂盒说明进行,步骤同IL-4。

2.5.3 IFN- γ 的检测 检测方法按试剂盒说明进行,步骤同IL-4。

2.6 统计学处理 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 t 检验,采用SPSS10.0统计软件处理。

3 结果

3.1 各组大鼠BALF中IFN- γ 含量检测结果 与正常对照组比较,哮喘模型组BALF中IFN- γ 水平显著降低($P < 0.01$);与哮喘模型组比较,舒康平喘胶囊高、中剂量组和地塞米松片对照组IFN- γ 水平均明显升高($P < 0.05$),但舒康平喘胶囊高、中剂量组与地塞米松片对照组之间无统计学差异。见表1。

3.2 各组大鼠BALF中IL-4、IL-5含量检测结果 哮喘模型组BALF中IL-4、IL-5水平显著高于正常对照组($P < 0.01$);与哮喘模型组比较,舒康平喘胶囊高、中剂量组IL-4含量显著下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),IL-5含量明显下降($P < 0.05$);地塞米松片对照组IL-4、IL-5含量与哮喘模型组比较均显著下降($P < 0.01$)。但舒康平喘胶囊高、中剂量组与地塞米松片对照组之间IL-4、IL-5含量变化无统计学差异。见表1。

3.3 各组大鼠BALF中IFN- γ /IL-4值的比较 与正常对照组比较,哮喘模型组BALF中IFN- γ /IL-4值显

著降低 ($P < 0.01$); 与哮喘模型组比较, 舒康平喘胶囊高、中、低剂量组、地塞米松片对照组 IFN- γ /IL-4 值均显著升高 ($P < 0.01$), 但舒康平喘胶囊高、中、低

剂量组与地塞米松片对照组之间无统计学差异。见表 1。

表 1 各组大鼠 BALF 中 IFN- γ 、IL-4、IL-5 的含量及 IFN- γ /IL-4 值 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量	IFN- γ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-4 ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-5 ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IFN- γ /IL-4
正常对照组	—	79.68 \pm 21.57 ²⁾	9.45 \pm 2.98 ²⁾	24.10 \pm 5.76 ²⁾	8.41 \pm 2.23 ²⁾
哮喘模型组	—	38.15 \pm 10.30	21.58 \pm 4.03	46.96 \pm 11.87	1.89 \pm 0.47
舒康平喘胶囊组	7.56 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	48.93 \pm 12.82 ¹⁾	15.84 \pm 3.61 ²⁾	36.71 \pm 9.25 ¹⁾	3.19 \pm 0.84 ²⁾
	3.78 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	48.54 \pm 12.41 ¹⁾	16.79 \pm 3.66 ¹⁾	36.97 \pm 9.30 ¹⁾	3.02 \pm 0.75 ²⁾
	1.89 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	47.20 \pm 11.96	17.17 \pm 3.85 ¹⁾	38.23 \pm 10.12	2.70 \pm 0.69 ²⁾
地塞米松片组	0.27 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	50.73 \pm 13.01 ¹⁾	16.09 \pm 3.74 ²⁾	34.45 \pm 8.16 ²⁾	3.16 \pm 0.77 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

支气管哮喘是一种多细胞、多因子介导的具有复杂免疫机制的气道慢性炎症, T 细胞及其分泌的各种因子在免疫过程中起关键的调控作用, 自 1986 年以来 Th1/Th2 (IFN- γ /IL-4) 平衡理论作为支气管哮喘发病机制的核心已被大多数学者所接受。

活化的 CD4⁺ T 细胞按其功能和分泌的细胞因子不同分为 Th1 和 Th2 两个亚群。Th1 和 Th2 的前体细胞为 Th0, 在正常机体中, Th0 按一定比例向 Th1 和 Th2 分化, 两者可促进本亚群和抑制另一亚群的生长分化。Th1 主要分泌 IFN- γ 、IL-2、IL-12, 诱发巨噬细胞活化和迟发性超敏反应; Th2 主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10, 诱发肥大细胞和嗜酸性细胞生长、分化及 IgE 免疫球蛋白生成, 这是 Th2 与变应性疾病有关的基础。其中 IFN- γ 、IL-4 分别是 Th1 和 Th2 细胞的特征性细胞因子。

IFN- γ 可促进 Th0 细胞分化为 Th1 细胞, 并抑制 Th2 细胞增殖; 也具有促进 B 细胞分化, 产生抗体及 Ig 类型转换等作用。在 IgE 合成方面, IFN- γ 可降低致敏小鼠血浆 IgE 水平, 降低气道高反应性和 BALF 中的浸润细胞数量^[3]。同时, IFN- γ 是 IL-4 的拮抗因子, 可通过抑制 IL-4 mRNA 转录水平, 并抑制 IL-4 诱导的 B 细胞表达低亲和 IgE 受体与可溶性的低亲和 IgE 受体, 从而抑制体内 IgE 生成^[4,5]。此外, IFN- γ 对气道嗜酸性粒细胞浸润具有抑制作用。高占成等^[6] 在小鼠哮喘模型气道内给予带有 IFN- γ 的复制缺陷腺病毒感染气道上皮, IFN- γ 在气道上皮表达后可抑制由过敏原引起的嗜酸性粒细胞 (EOS) 在肺内的聚集。

IL-4 能使 Th0 成熟为 Th2 细胞, 并阻断 IL-12 促 Th1 的转化信号, IL-4 被认为是 Th2 转化的必需因子。当机体处于过敏状态时, 免疫应答的平衡被破坏, IL-4 导致 Th0 向 Th2 分化, 并使 Th2 功能亢进。研究表明, IL-4 可特异地阻断 IL-2 对 Th1 的定型作用^[7]。Th2 细胞增加可能与 IL-4 抑制其凋亡有关。IL-4 与 IL-4 受体结合启动一系列的信号反应, 信号转移到细胞核, 激活 DNAT6 启动 IgE 前体 mRNA, 导致 IgE 产生。IL-4 可直接诱导 IgM 向 IgE 转换, 也可抑制 B 细胞凋亡^[4]。IL-4 可增强 IL-5 对 EOS 的募集和激活作用。IL-4 通过 IgE 受体的激活可释放多种炎症介质, 导致气道高反应的发生。Corry 在急性气道高反应性鼠模型的研究中发现, IL-4 是气道高反应性所必需的因子。

IL-5 和 IL-4 一样, 也是 Th2 细胞产生的一种细胞因子。IL-5 可以增强 EOS 对血管内皮细胞的黏附能力, 并对 EOS 具有强烈的趋化作用; IL-5 还可以促使 EOS 的最终分化, 延长其存活时间; 此外 IL-5 对 EOS 毒性蛋白的释放及其本身细胞毒作用都具有明显的强化作用。吴银根等^[8] 采用 ELISA 法测定哮喘豚鼠外周血 IL-5 含量, 结果发现中药哮喘落通过抑制免疫细胞产生 IL-5, 抑制 IL-5 对 EOS 的聚集和活化, 从而发挥治疗哮喘慢性气道炎症的免疫学调控作用。

IFN- γ 和 IL-4 两者以相互拮抗和自身促进的方式形成复杂有序的细胞因子网络, 分别行使各自不同的生理功能, 调节正常的免疫应答。在 IgE 生成, CD23 表达及促进炎性细胞向炎症部位聚集等哮喘

(下转第 57 页)

(上接第 54 页)

发作因素中均起着相反的作用,二者相制约,达到一种平衡状态。IFN- γ /IL-4 失衡介导了哮喘 IgE 依赖的速发变态反应以及 EOS 浸润为主的慢性气道炎症。

本研究结果显示,与正常对照组相比,哮喘模型组 BALF 中 IFN- γ 水平显著降低,IL-4 IL-5 水平显著升高,IFN- γ /IL-4 值显著降低,提示 IFN- γ 、IL-4、IL-5 及 Th1/Th2 失衡在哮喘发病中起着重要作用。经治疗后证实,舒康平喘胶囊能有效升高哮喘大鼠 BALF 中 IFN- γ 水平,降低 IL-4 IL-5 水平,纠正 Th 失衡,提示该药具有增强 Th1 细胞亚群优势反应,抑制 Th2 细胞亚群优势反应和调节免疫失衡的作用,减轻气道炎症,降低气道高反应性,可能是舒康平喘胶囊治疗哮喘的机制之一。

[参考文献]

- [1] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社,2000:447-449.
- [2] 薛建敏,徐永健,张珍祥,等. 一氧化氮对致敏大鼠气

道炎症及淋巴细胞功能的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志,1998,21:208-211.

- [3] Hofstra CL, Van Ark J, Hofiman G, *et al.* Different effects of endogenous and exogenous interferon gamma on immunoglobulin E, cellular infiltration, and airway responsiveness in a murine model of allergy asthma[J]. *Am J Respir Cell Mol*, 1998, 19(5): 82-83.
- [4] 胡素贤,黄瑾. 实验性哮喘小鼠 T 淋巴细胞对 B 细胞分泌特异性 IgE 的调节作用[J]. 吉林大学学报(医学版),2004,30(4):515-517.
- [5] Dickensheets HL, Donnelly. Inhibition of IL-4 inducible gene expression in human monocytes by type I and type II interferon[J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 65: 307-312.
- [6] 高占成,康禹,尚颖,等. γ 干扰素转基因对过敏原导致的小鼠肺嗜酸性粒细胞浸润的抑制作用[J]. 北京医科大学学报,2000,32(5):395-398.
- [7] Castro A, Sengupta TK, Ruiz DC, *et al.* IL-4 selectively inhibits IL-2 triggered Stat5 activation, but not proliferation, in human T cell[J]. *J Immunol*, 1999, 162(3): 1261-1269.
- [8] 吴银根,徐重明,李培成,等. 哮喘落对哮喘模型豚鼠外周血 IL-5 含量影响的实验研究[J]. 中医研究,1998,11(1):15.