

阿胶对哮喘大鼠气道炎症及外周血 I 型 / II 型 T 辅助细胞因子的影响

赵福东, 董竞成, 崔 焱, 谢瑾玉, 巫善美

(复旦大学附属华山医院中西医结合肺、炎症和肿瘤研究室, 上海 200040)

[摘要] 目的 探讨阿胶对哮喘大鼠 Th1/Th2 细胞因子的影响及其防治哮喘的作用机制。方法 60 只 Wistar 大鼠随机分为生理盐水(NS)对照组(A), 低剂量阿胶组(B), 中剂量阿胶组(C), 高剂量阿胶组(D), 斯奇康组(E), 哮喘对照组(F)。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血液中白介素-4(IL-4)、 γ 干扰素(IFN- γ)水平的变化。HE染色观察肺组织病理学变化。结果 与NS对照组比较, 哮喘模型组血液中IFN- γ 水平显著降低($P < 0.01$)。与哮喘模型组比较, 阿胶低、中剂量组和斯奇康组IL-4水平显著降低($P < 0.01$), NS对照组、阿胶低、中剂量组和斯奇康组大鼠肺组织嗜酸性细胞浸润程度也明显减轻。结论 哮喘大鼠存在Th2型细胞优势反应, 而阿胶可能具有抑制哮喘Th2细胞优势反应的作用, 从而调节Th1/Th2型细胞因子平衡, 同时, 可减轻哮喘大鼠肺组织嗜酸性细胞炎症反应。

[关键词] 阿胶; 支气管哮喘; 嗜酸性粒细胞; I型/II型T辅助细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)06-0059-03

The Effect of Ejiao on Airway Inflammation and Th1/Th2 Cytokines in Serum Of Asthmatic Rats

ZHAO Fu-dong, DONG Jing-cheng, CUI Yan, Xie Jin-yu, WU Shan-mei

(The Research Room of Integrated TCM and Western Medicine about Diseases of Lung, Inflammation and Tumor, Huashan Hospital Affiliated Fudan University, Shanghai 200040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Ejiao on Th1/Th2 cytokines and the mechanism of which preventing and curing bronchial asthma. **Methods:** 60 wistar rats were randomly divided into 6 groups. Group A was normal group which were administered with NS. Group B, C and D were administered with low, moderate and high dose Ejiao. Group E were administered with Polysaccharide. Group F were asthma group. IL-4 and IFN- γ in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results:** Compared with normal group, the concentration of IFN- γ in group F was decreased significantly. compared with asthma group, the concentration of IL-4 of low and moderate dose Ejiao groups and Polysaccharide group were decreased significantly($P < 0.05$), and there was less eosinophils in the lungs of group A, B, C, E than that in group F. **Conclusion:** Ejiao could regulate the ratio of Th1/Th2 by decreasing Th2 subset instead of increasing Th1 subset. On the other hand, it could inhibit eosinophils to move from peripheral blood to the lungs of asthma rats.

[Key words] Ejiao; bronchial asthma; eosinophils; Th1/Th2

越来越多的研究表明, 支气管哮喘是一种以嗜酸性粒细胞(EOS)浸润为主的、多种炎症细胞参与的气道慢性炎症, 免疫系统功能紊乱是导致这种病理变化的主要机制。Th1和Th2型细胞之间的平衡

[收稿日期] 2006-01-19

[通讯作者] 董竞成, Tel: (021) 62489999 转 6452 或 6317; Email:

jdong2004@126.com

关系起着调节 EOS 生长、迁移等的重要作用。在哮喘患者,大多以 Th2 型细胞占优势, Th1 型细胞相对处于弱势。以往研究发现,一些中药,如黄芪^[1]等,可抑制 Th2 型细胞因子的生成,促进 Th1 型细胞因子的产生,从而调节 Th1/Th2 细胞的平衡。阿胶自古以来就被用于咳嗽、喘息等疾病,但其对 Th1/Th2 型细胞平衡的影响还少有研究。本研究即是观察其是否具有调节 Th1/Th2 型细胞平衡的作用,从而对支气管哮喘起到一定的治疗作用。

1 材料

健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重 220~250g,由复旦大学上海医学院实验动物部提供。药物及试剂:阿胶,浓度为 0.15g/mL,由东阿阿胶股份有限公司提供(批号:国药准字 Z10880026);斯奇康,0.5mg/mL,湖南九芝堂股份有限公司生产(批准文号:国药准字 SF19990021);卵蛋白,上海丽珠东风生物技术有限公司提供(批号:051010);大鼠 IL-4 ELISA 试剂盒(灵敏度 10 pg/mL)和 IFN- γ ELISA 试剂盒(灵敏度 18 pg/mL),美国 biosource 公司,进口分装。主要仪器:雾化吸入器,上海亿胜科技有限公司出品;台式离心机,上海手术器械厂出品;550 型酶标阅读仪,美国 BIO-RAD 公司产品。

2 方法

2.1 哮喘模型的制备及分组 模型制备^[2]加以改进,60 只 Wistar 大鼠,体重在 220~250g 之间,随机分为 6 组,每组 10 只。A 组: NS 对照组, B 组: 低剂量阿胶组(浓度为 0.017g/mL), C 组: 中剂量阿胶组(浓度为 0.05g/mL), D 组: 高剂量阿胶组(浓度为 0.15g/mL), E 组给药体积 ml/kg: 斯奇康组(肌肉注射 0.05mL,每 mL 含卡介菌多糖 0.35mg,隔日一次,其余 5 组用 0.05mL 生理盐水代替), F 组: 哮喘对照组。B、C、D、E、F 组第 0d 以 1mg 卵蛋白和 1mL AI(OH)₃ 凝胶的混合液在胸部前肢内侧分四个部位皮下注射(每个部位 0.1mL)和腹腔注射(0.6mL),第 7d 重复致敏一次,第 15~28d 每天采用 5% 卵蛋白生理盐水溶液雾化吸入进行激发,每天 20min,连续 1 周,缓解 1 周,再激发 1 周。A 组用生理盐水分别代替卵蛋白与卵蛋白生理盐水溶液进行致敏和激发。从激发第 1d 起以 2mL 阿胶液每只灌胃, A、E、F 组均以 2mL 生理盐水代替阿胶进行灌胃,连续 3 周。

2.2 标本的采集 最后一次激发后,戊巴比妥钠麻醉人鼠,开胸心脏采血,采血完毕立即剪取右肺中

叶, HE 染色,观察嗜酸性粒细胞浸润情况。血液在 4℃ 2000 r/min,离心 20 min,取上清液分装, -80℃ 低温冰箱保存待测。

2.3 细胞因子的检测 IL-4 水平的检测:按试剂盒说明进行,在抗 IL-4 单克隆抗体包被的酶标板上,加 50 μ L 稀释液(RD1W)到每个孔,加 50 μ L 标准品、对照品、样本到每个孔(保证在 15min 之内完成),轻摇板 1min,封膜,室温孵育 2h。洗板 5 次,加入 100 μ L IL-4conjugate(二抗)到每孔,封膜,室温孵育 2h。重复洗板 5 次。加 100 μ L 颜色反应液到每孔,室温孵育 30min,避光。加 100 μ L 中止液到每孔。轻摇板 1min。在 30min 内检测。IFN- γ 检测步骤基本上,按说明书操作进行。

2.4 肺组织嗜酸性细胞计数 HE 染色,采用与图像分析相结合的方法,每个标本随机选取 5 个视野,显微镜下观察(放大 400 倍),计数嗜酸性粒细胞,取其平均数。

2.5 统计方法 采用 SPSS 11.5 软件,数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差不齐时用秩和检验, $P < 0.05$,差异有显著性。

3 结果

血清中 IFN- γ 和 IL-4 的水平与 NS 对照组相比,哮喘组外周血中 IFN- γ 水平显著降低,而 IL-4 水平虽有升高趋势,但并未显示出统计学意义。与哮喘组相比,各剂量阿胶组和斯奇康组大鼠外周血 IFN- γ 水平虽有升高态势,但均未显示出统计学差异。低、中剂量阿胶组和斯奇康组外周血中 IL-4 水平均显著降低。高剂量阿胶组虽有降低趋势,但并无统计学意义(见表 1)。与 NS 对照组比较,哮喘组大鼠肺组织 EOS 浸润程度明显加重:与哮喘对照组相比,低、中剂量阿胶组与斯奇康组大鼠肺组织 EOS 浸润明显减轻($P < 0.01$),而高剂量阿胶组未见显著变化。

模型评价:

(1) 症状改变:

所有模型大鼠均出现喷嚏、咳嗽、呼吸急促、弓背滞伏的症状,大部分大鼠可听见明显的哮鸣音。而生理盐水对照组无明显异常行为,提示造模成功。

(2) 病理变化:见表 2 及图片 1~6。

4 讨论

随着免疫学、分子生物学的发展,越来越多的研究证明以 Th1/Th2 的失衡为特征的免疫功能紊乱在

表 1 给药 3 周后, 各组大鼠血清中 IFN- γ 与 IL-4 水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/kg	IFN- γ (pg/mL)	IL-4(pg/mL)
NS 组	(A) 2mL	70.27 \pm 14.57 ²⁾	57.32 \pm 6.91
低剂量阿胶组	(B) 0.034g	59.09 \pm 11.85	47.61 \pm 10.15 ¹⁾
中剂量阿胶组	(C) 0.1g	55.73 \pm 8.24	39.05 \pm 17.30 ²⁾
高剂量阿胶组	(D) 0.3g	55.05 \pm 7.18	54.26 \pm 9.01
斯奇康组	(E) 0.7mg	58.53 \pm 8.24	42.26 \pm 16.07 ²⁾
哮喘组(给 NS)	(F) 2mL	52.87 \pm 7.46 ³⁾	62.82 \pm 21.02

注:与哮喘组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。与 NS 对照组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 给药 3w 后, 各组大鼠肺组织嗜酸性粒细胞浸润比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Group	剂量/kg	Eos(个)
NS 组	(A) 2mL	1.26 \pm 0.48 ²⁾
低剂量阿胶组	(B) 0.034g	5.60 \pm 1.32 ²⁾
中剂量阿胶组	(C) 0.1g	3.48 \pm 0.98 ²⁾
高剂量阿胶组	(D) 0.3g	6.92 \pm 0.99
斯奇康组	(E) 0.7mg	4.22 \pm 1.27 ²⁾
哮喘组(给 NS)	(F) 2mL	7.26 \pm 1.23 ³⁾

注:(放大 400X, 每个标本随机选取 5 个视野, 取其平均数)与哮喘组比较²⁾ $P < 0.01$ 。与 NS 对照组比较³⁾ $P < 0.01$

哮喘发病机制中起着重要作用^[3-5]。哮喘患者存在着 Th1/Th2 失衡, 即 Th2 的数目增多或功能亢进, Th1 亚群数目减少或功能低下, 因此, 通过纠正 Th 亚群的失衡来实现对哮喘的治疗, 将为治愈哮喘开辟一条新的道路^[6]。免疫学上一般以 IFN- γ 和 IL-4 分别作为 Th1 和 Th2 细胞的特征性细胞因子, 通过检测这两种细胞因子可以了解 Th1 和 Th2 功能状态。我们检测哮喘大鼠血液中这两种细胞因子的水平, 以反映 Th1/Th2 的平衡状态, 并观察阿胶和斯奇康对其功能状态的影响。阿胶是补益类中药, 具有补血滋阴的作用, 同时具有“止嗽下气”的作用。本研究结果显示, 与正常对照组相比, 哮喘模型组血清中 IFN- γ 水平明显降低, IL-4 水平有升高趋势。提示 Th1/Th2 失衡可能在哮喘发病中起着重要作用^[4]。我们也同样观察到阿胶和斯奇康治疗可以使血清中 IL-4 水平明显降低, IFN- γ 水平也有升高趋势, 说明阿胶可能主要通过抑制 Th2 型细胞因子从而影响 Th 细胞因子的平衡。同时, 肺组织嗜酸性粒细胞浸润程度也得到不同程度的降低。由实验结果可知, 阿胶和斯奇康能有效降低哮喘大鼠血清中 IL-4 水平, 该两种药物可能具有抑制 Th2 细胞亚群、从而调节 Th1/Th2 型细胞平衡的作用, 并能够减轻肺和支气管嗜酸性细胞炎性浸润。然而, 在此研究中, 阿胶和

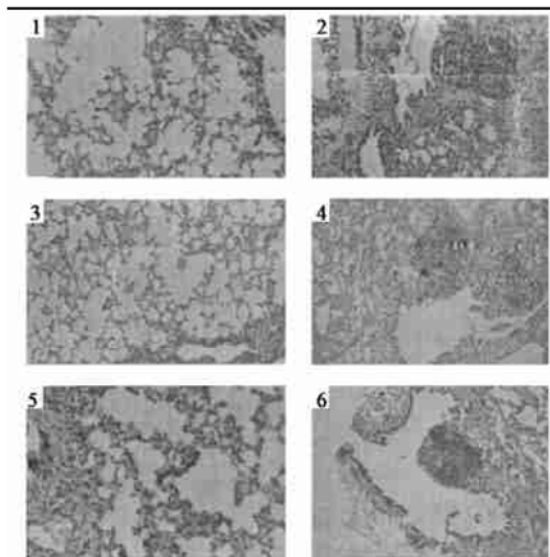


图 各组肺组织病理照片, 如上图(HE 染色, $\times 40$)

- 1: 正常大鼠肺组织: 支气管粘膜无炎症, 未见嗜酸性粒细胞, 支气管壁平滑肌无增生, 管腔内无炎性渗出, 支气管粘膜无水肿。
- 2: 哮喘组大鼠肺组织: 小支气管平滑肌增生, 大量嗜酸性细胞等炎细胞浸润, 粘膜下水肿。
- 3: 斯奇康治疗组: 轻度炎症, 少量嗜酸性粒细胞浸润, 无平滑肌增生和炎性渗出及水肿。
- 4: 低剂量阿胶组: 支气管粘膜下淋巴小结形成, 但无嗜酸性细胞, 管腔内也无炎性渗出, 支气管平滑肌无增生。
- 5: 中剂量阿胶治疗组: 炎症+ -, 见淋巴小结, 少量嗜酸性细胞浸润, 无炎性渗出及水肿, 可见平滑肌增生。
- 6: 高剂量阿胶组: 炎症+ +, 少量嗜酸性粒细胞浸润, 炎性渗出及水肿-, 平滑肌增生+。

斯奇康均未显示出明显增强 Th1 型细胞因子的作用, 阿胶在高剂量时也未显示出抑制 Th2 型细胞因子的作用, 这与祖国医学理论中补益药物有碍脾胃运化, 不宜过量服用是不谋而合的。本实验只是初步观察了 Th1/Th2 型细胞因子中比较有代表性的两个, 并未涉及其它的细胞因子, 今后有必要进一步扩大研究范围。

[参考文献]

- [1] 董竞成, 董晓辉. 黄芪注射液与白细胞介素 2 增强树突细胞抗肿瘤转移作用的比较研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(3): 236-239.
- [2] 宫兆华, 董竞成, 倪健. 豚鼠支气管哮喘模型建立[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(4): 204-206.
- [3] Gem JE, Lemanske RF Jr, Busse WW. Early life origins of asthma[J]. J Clin Invest, 1999, 104: 837-843.
- [4] Friedlander SL, Jackson DJ, Gangnon RE, et al. Viral Infections, Cytokine Dysregulation and the Origins of Childhood Asthma and Allergic Diseases[J]. The Pediatric Infectious Disease.