

槐杞黄对哮喘大鼠 Th1/Th2/Th17 细胞因子 及肺泡巨噬细胞吞噬功能的影响

李红梅 何庆南 李晓燕 帅兰军 周频 易著文

(中南大学湘雅二医院儿科,湖南 长沙 410011)

[摘要] 目的 研究卵清蛋白(OVA)致敏哮喘大鼠 Th1/Th2/Th17 细胞因子及肺泡巨噬细胞吞噬功能的变化以及槐杞黄的治疗效应。方法 40只4~6周龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分成正常对照组、哮喘组、布地奈德组、槐杞黄组和布地奈德+槐杞黄组($n=8$)。OVA致敏和激发建立哮喘模型。酶联免疫吸附试验(ELISA)方法测定血浆和支气管肺泡灌洗液(BALF)IL-4、IFN- γ 、IL-17水平;分离、纯化BALF的肺泡巨噬细胞,测定肺泡巨噬细胞的吞噬功能。结果 与正常对照组比较,哮喘组血浆和BALF中IL-4和IL-17升高,IFN- γ 降低。与哮喘组相比,槐杞黄组IFN- γ 升高。布地奈德+槐杞黄组IFN- γ 升高及IL-17降低较布地奈德组和槐杞黄组更显著。肺泡巨噬细胞的吞噬功能:哮喘组较正常对照组降低,槐杞黄组和布地奈德+槐杞黄组较正常对照组、哮喘组和布地奈德组均升高。血浆和BALF IFN- γ 水平与肺泡巨噬细胞的吞噬功能呈正相关。结论 哮喘大鼠血浆和BALF IL-4和IL-17表达升高、IFN- γ 表达降低,肺泡巨噬细胞吞噬功能下降。槐杞黄能明显提高哮喘大鼠血浆和BALF IFN- γ 表达和肺泡巨噬细胞的吞噬能力,且与吸入性糖皮质激素合用有协同作用。

[中国当代儿科杂志,2011,13(9):747-750]

[关键词] 槐杞黄;布地奈德;细胞因子;肺泡巨噬细胞;哮喘;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)09-0747-04

Effects of huai qi huang on cytokines Th1, Th2 and Th17 and phagocytosis of alveolar macrophages in rats with asthma

LI Hong-Mei, HE Qing-Nan, LI Xiao-Yan, SHUAI Lan-Jun, ZHOU Pin, YI Zhu-Wen. Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (He Q-N, Email:heqn2629@163.com)

Abstract: Objective To study the effects of huai qi huang, a traditional Chinese medicine, on cytokines Th1, Th2 and Th17 levels and alveolar macrophage phagocytosis in asthmatic rats sensitized by ovalbumin (OVA). **Methods** Forty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: normal control, untreated asthma, budesonide-treated, huai qi huang-treated and budesonide + huai qi huang-treated asthma ($n=8$ each). Asthma was induced by OVA sensitization and challenge. The levels of IL-4, IFN- γ and IL-17 in plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured using ELISA. The phagocytosis of alveolar macrophages which were isolated and purified from BALF was evaluated by the colorimetric assay. **Results** The levels of IL-4 and IL-17 increased, in contrast, the IFN- γ level decreased in plasma and BALF in the untreated asthma group compared with those in the normal control group. The IFN- γ level in the huai qi huang-treated asthma group was higher than that in the untreated asthma group. The IFN- γ level increased and the IL-17 level decreased more significantly in the budesonide + huai qi huang-treated asthma group when compared with the budesonide and huai qi huang alone treatment groups. The phagocytosis of alveolar macrophages in the untreated asthma group was lower than that in the normal control group. Huai qi huang alone or combined with budesonide increased the phagocytosis of alveolar macrophages compared with the normal control, untreated asthma and budesonide-treated asthma groups. The levels of IFN- γ in plasma and BALF were positively correlated with the phagocytosis of alveolar macrophages. **Conclusions** The levels of IL-4 and IL-17 increase and the IFN- γ level decreases in plasma and BALF, and the phagocytosis of alveolar macrophages decreases in asthmatic rats. Huai qi huang treatment may increase the IFN- γ expression in plasma and BALF and the phagocytosis of alveolar macrophages in asthmatic rats. There is a synergistic effect between huai qi huang and glucocorticoids. **[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (9):747-750]**

Key words: Huai qi huang; Budesonide; Cytokine; Alveolar macrophage; Asthma; Rats

[收稿日期]2011-01-10; [修回日期]2011-04-23

[作者简介]李红梅,女,硕士,医师。现工作单位:长沙市中心医院儿科,邮编410001。

[通信作者]何庆南,教授。

支气管哮喘是一种常见的呼吸道慢性炎症性疾病。经典的免疫学说认为哮喘发病与 Th1/Th2 细胞功能失衡密切相关,最近研究证实 Th 细胞新亚群 Th17 细胞及其分泌的 IL-17 也参与哮喘发病机制^[1]。肺泡巨噬细胞是气道的主要细胞,参与异物清除和组织损伤恢复^[2],其吞噬功能受损往往是导致或加重呼吸系统疾病的原因之一。槐杞黄能激发机体免疫系统,提高机体非特异性抗感染能力,但槐杞黄对哮喘患儿 Th1/Th2 细胞功能的影响较少见报道。本研究通过观察槐杞黄对哮喘大鼠血浆和支气管肺泡灌洗液(BALF) IL-4、IFN- γ 、IL-17 水平以及肺泡巨噬细胞吞噬功能的影响,探讨其对防治哮喘的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

SPF 级 4~6 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只,体重 110~130 g,购自湖南农业大学(许可证号 N004256)。槐杞黄颗粒(国药准字 B20020074,10 g/袋,启东盖天力药业有限公司),布地奈德雾化液(阿斯利康公司),卵蛋白(OVA,Grade V,美国 Sigma 公司产品),台盼蓝为美国 Sigma 公司产品;大鼠 IL-4、IFN- γ 、IL-17 ELISA 试剂盒为美国 R&D 公司产品,中性红为美国 Amresco 公司产品;RPMI-1640 培养基、特优级胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(trypsin)、EDTA 均为美国 GIBCO 生物工程公司,余试剂为国产市售分析纯。

1.2 动物分组及哮喘模型的建立

随机数字表法将大鼠随机分为正常对照组、哮喘组、布地奈德组、槐杞黄组、布地奈德+槐杞黄组,每组 8 只。参照文献^[3-4]采用 V 级 OVA 制备哮喘模型。哮喘组:实验的第 1 天和第 8 天腹腔注射 1 mL 含 OVA 1 mg 和氢氧化铝凝胶 100 mg 的抗原致敏液;第 15 天开始雾化吸入 1% OVA 激发,每次 8 mL,隔日 1 次,连续激发 4 周。布地奈德组:致敏和激发方法同哮喘组,第 15 天开始,每次 OVA 激发前 30 min 给予布地奈德 2 mg 雾化。槐杞黄组:致敏和激发方法同哮喘组,第 15 天开始,每天给予槐杞黄(0.4 g/100 g 体重)灌胃。布地奈德+槐杞黄组:致敏和激发方法同哮喘组,第 15 天开始,每次 OVA 激发前 30 min 给予布地奈德 2 mg 雾化以及每天给予槐杞黄(0.4 g/100 g 体重)灌胃。正常对照组:腹腔注射、雾化、灌胃均用生理盐水。

1.3 实验方法

1.3.1 标本制备 各组大鼠均在末次雾化激发 24 h 后,10% 水合氯醛 3.5 mL/kg 腹腔注射麻醉。收集血液于 EDTA 抗凝管中,2 000 rpm/min,离心 15 min,取血浆于 -70℃ 冰箱保存用于细胞因子检测。行支气管肺泡灌洗,每次灌洗 6 mL PBS。记录每次灌洗的回收量,计算回收率,回收率均大于 80%。收集灌洗液约 10 mL,离心后取上清于 -70℃ 冰箱保存用于细胞因子检测。收集所有灌洗液的细胞沉淀。采用贴壁法收集、分离、纯化肺泡巨噬细胞。

1.3.2 ELISA 法检测血浆和 BALF IL-4、IFN- γ 、IL-17 水平 测定方法按试剂盒说明书进行。

1.3.3 中性红吞噬实验检测肺泡巨噬细胞吞噬功能 参考 Yang 等^[5]的方法,肺泡巨噬细胞以 2×10^6 /mL 细胞浓度接种到细胞培养板,培养 24 h 后,弃上清液,温 PBS 洗 3 次,吸出未贴壁细胞,获得巨噬细胞单层。于每孔中加入 0.1% 的中性红溶液 200 μ L,置 CO₂ 培养箱培养 2 h,用温 PBS 液冲洗未被吞噬的中性红 3 次。于每孔中加入细胞裂解液 200 μ L,4℃ 静置过夜,空白孔调零,用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度 OD 值。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计分析。计量资料结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较先行方差齐性检验 (F 检验),多方差齐样本均数的比较采用单因素方差分析 LSD 检验,两变量的相关分析采用 Pearson 直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 IL-4、IFN- γ 、IL-17 水平

哮喘组和槐杞黄组的血浆 IL-4 水平较对照组明显升高 ($P < 0.05$);布地奈德组、布地奈德+槐杞黄组较哮喘组及槐杞黄组明显降低 ($P < 0.05$),而与正常对照组的差别无统计学意义。

哮喘组血浆中 IFN- γ 水平较正常对照组降低;布地奈德组、槐杞黄组较哮喘组明显增高 ($P < 0.05$),而与正常对照组比较差别无统计学意义;而布地奈德+槐杞黄组明显高于其余 4 组(均 $P < 0.05$)。

哮喘组和槐杞黄组血浆 IL-17 水平较正常对照组升高 ($P < 0.05$);布地奈德组较哮喘组和槐杞黄组降低 ($P < 0.05$),与正常对照组差别无统计学意义;另外布地奈德+槐杞黄组较哮喘组、布地奈德

组、槐杞黄组均降低(均 $P < 0.05$),与正常对照组差别无统计学意义,见表1。

表1 各组大鼠血浆 IL-4、IFN- γ 、IL-17 水平 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	n	IL-4	IFN- γ	IL-17
正常对照组	8	166 \pm 19	990 \pm 108	322 \pm 24
哮喘组	8	219 \pm 12 ^a	776 \pm 71 ^a	378 \pm 30 ^a
布地奈德组	8	170 \pm 17 ^b	957 \pm 105 ^b	336 \pm 22 ^b
槐杞黄组	8	204 \pm 42 ^a	1011 \pm 161 ^b	373 \pm 32 ^{a,c}
布地奈德 + 槐杞黄组	8	166 \pm 3 ^{b,d}	1284 \pm 52 ^{a,b,c,d}	297 \pm 18 ^{b,c,d}
F 值		4.779	11.830	10.820
P 值		<0.05	<0.001	<0.001

a:与正常对照组比较, $P < 0.05$; b:与哮喘组比较, $P < 0.05$; c:与布地奈德组比较, $P < 0.05$; d:与槐杞黄组比较, $P < 0.05$

2.2 BALF IL-4、IFN- γ 、IL-17 水平

哮喘组和槐杞黄组的 BALF IL-4 水平较正常对照组明显升高($P < 0.05$);布地奈德组、布地奈德 + 槐杞黄组较哮喘组及槐杞黄组明显降低($P < 0.05$),与正常对照组的差别无统计学意义。

哮喘组 BALF IFN- γ 水平较正常对照组降低($P < 0.05$);布地奈德组、槐杞黄组较哮喘组明显增高($P < 0.05$),与正常对照组比较差别无统计学意义;布地奈德 + 槐杞黄组明显高于其余4组(均 $P < 0.05$)。

哮喘组和槐杞黄组 BALF IL-17 水平较正常对照组升高($P < 0.05$);布地奈德组较哮喘组和槐杞黄组降低($P < 0.05$),与正常对照组差别无统计学意义;布地奈德 + 槐杞黄组较其余4组均降低(均 $P < 0.05$),见表2。

表2 各组大鼠 BALF IL-4、IFN- γ 、IL-17 水平 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	n	IL-4	IFN- γ	IL-17
正常对照组	8	182 \pm 7	1197 \pm 41	344 \pm 41
哮喘组	8	238 \pm 20 ^a	998 \pm 73 ^a	392 \pm 21 ^a
布地奈德组	8	203 \pm 16 ^b	1150 \pm 67 ^b	341 \pm 25 ^b
槐杞黄组	8	234 \pm 13 ^{a,c}	1283 \pm 103 ^{b,c}	379 \pm 19 ^{a,c}
布地奈德 + 槐杞黄组	8	188 \pm 9 ^{b,d}	1440 \pm 92 ^{a,b,c,d}	306 \pm 39 ^{a,b,c,d}
F 值		14.203	17.400	10.3480
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

a:与正常对照组比较, $P < 0.05$; b:与哮喘组比较, $P < 0.05$; c:与布地奈德组比较, $P < 0.05$; d:与槐杞黄组比较, $P < 0.05$

2.3 肺泡巨噬细胞吞噬功能

哮喘组肺泡巨噬细胞吞噬功能较正常对照组降低,布地奈德组较正常对照组和哮喘组降低,槐杞黄组、布地奈德 + 槐杞黄组较哮喘组、布地奈德组和正常对照组明显升高(均 $P < 0.05$)。布地奈德 + 槐杞黄组与槐杞黄组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

见表3。

2.4 相关性分析

血浆和 BALF 中 IFN- γ 浓度与肺泡巨噬细胞吞噬功能呈正相关($r = 0.796, 0.793$;均 $P < 0.05$)。

表3 肺泡巨噬细胞中性红吞噬实验结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD (490 nm)
正常对照组	8	0.39 \pm 0.02
哮喘组	8	0.24 \pm 0.02 ^a
布地奈德组	8	0.18 \pm 0.03 ^{a,b}
槐杞黄组	8	0.48 \pm 0.03 ^{a,b,c}
布地奈德 + 槐杞黄组	8	0.47 \pm 0.04 ^{a,b,c}
F 值		344.601
P 值		<0.001

a:与正常对照组比较, $P < 0.05$; b:与哮喘组比较, $P < 0.05$; c:与布地奈德组比较, $P < 0.05$

3 讨论

经典的免疫学说认为 Th1/Th2 免疫失衡是支气管哮喘的重要发病机制。IFN- γ 、IL-4 分别是 Th1、Th2 细胞产生的特征性细胞因子。表达 IL-17 的 Th17 细胞是分化机制和功能特征不同于 Th1/Th2 的 CD4⁺ 细胞细胞群^[6-7]。研究发现哮喘患者的外周血、鼻咽分泌物等 IL-17 表达增加^[8-9]。免疫学上通过检测 IL-4、IFN- γ 和 IL-17 变化间接反映 Th1/Th2/Th17 免疫应答状态。

本研究结果显示:哮喘组与正常对照组相比,血清和 BALF 中 IL-4、IL-17 升高,IFN- γ 降低,布地奈德干预后 IL-4 和 IL-17 明显降低、IFN- γ 明显升高,提示吸入性糖皮质激素能够明显改善哮喘大鼠的 Th1/Th2/Th17 失衡;槐杞黄干预后 IFN- γ 水平显著升高。布地奈德联用槐杞黄干预后 IFN- γ 水平升高及 IL-17 降低,均较单用布地奈德显著。提示槐杞黄具有增强哮喘大鼠 Th1 细胞功能、提高 IFN- γ 表达的作用,与糖皮质激素有协同作用。

研究发现哮喘患者肺泡巨噬细胞吞噬功能障碍^[10]。本研究结果显示哮喘组大鼠肺泡巨噬细胞吞噬能力较正常对照组显著降低。哮喘病人肺泡巨噬细胞吞噬能力降低可能是反复呼吸道感染的重要原因之一。本研究结果提示布地奈德干预并不能提升哮喘大鼠肺泡巨噬细胞的吞噬能力。槐杞黄组以及布地奈德 + 槐杞黄组大鼠的肺泡巨噬细胞吞噬能力显著高于哮喘组、布地奈德组和正常对照组,提示槐杞黄具有显著提高肺泡巨噬细胞吞噬能力的功效。鉴于槐杞黄具有显著提高 IFN- γ 表达的能力,

而 IFN- γ 可以活化巨噬细胞,增强吞噬细胞的吞噬和杀伤能力,本实验进一步分析了血浆和 BALF 的 IFN- γ 水平与肺泡巨噬细胞吞噬能力的相关性,发现血浆和 BALF IFN- γ 水平与肺泡巨噬细胞吞噬能力呈正相关关系。因此推测槐杞黄提高肺泡巨噬细胞吞噬能力可能与其升高 IFN- γ 有直接关系。布地奈德组虽然 IFN- γ 也较哮喘组升高,但是肺泡巨噬细胞的吞噬能力较哮喘组降低,其原因可能是糖皮质激素直接抑制巨噬细胞吞噬功能的作用更明显。长期应用糖皮质激素治疗,无论是吸入、还是静脉注射,其均会在一定程度上降低全身或呼吸道局部抵抗力,导致肺泡巨噬细胞清除异物的能力降低,容易导致呼吸道感染;而呼吸道感染又可以诱发哮喘的发作。而本研究发现,联合应用槐杞黄辅佐吸入性糖皮质激素治疗哮喘,具有显著增强肺泡巨噬细胞吞噬能力的功效。

综上所述,槐杞黄具有明显提高哮喘大鼠 IFN- γ 表达以及明显提高肺泡巨噬细胞的吞噬能力的功效;联合应用槐杞黄辅佐吸入性糖皮质激素治疗哮喘,不仅能够显著提高吸入性糖皮质激素纠正哮喘大鼠 Th1/Th2/Th17 失衡,而且还显著增强肺泡巨噬细胞吞噬能力。

[参 考 文 献]

[1] Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Pagé N, et al.

IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108(3): 430-438.

[2] Sirois J, Bissonnette EY. Alveolar macrophages of allergic resistant and susceptible strains of rats show distinct cytokine profiles [J]. *Clin Exp Immunol*, 2001, 126(1): 9-15.

[3] Palmans E, Kips JC, Pauwels PA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(2): 627-635.

[4] 李惠民,赵顺英,江载芳. 支气管上皮细胞在大鼠哮喘模型气道炎症和重塑中的作用[J]. *中国实用儿科杂志*, 2007, 22(7): 526-530.

[5] Yang Y, Wanshun L, Baogin H, Changhong W, Chenwei F, Bing L, et al. The antioxidative and immunostimulating properties of D-glucosamine[J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(1): 29-35.

[6] Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire; the Th17 lineage[J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(3): 349-356.

[7] Dong C. Th17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(5): 337-348.

[8] Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? [J]. *Respir Res*, 2006, 7: 135.

[9] 王秀芳,杨金玲,乔俊英,张艳丽,5岁以下喘息儿童鼻咽分泌物嗜酸性粒细胞和 IL-17 测定的临床意义[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(2): 113-116.

[10] Alexis NE, Soukup J, Nierkens S, Becker S. Association between airway hyperreactivity and bronchial macrophage dysfunction in individuals with mild asthma[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280(2): L369-L375.

(本文编辑:王庆红)