

# 中药槐耳调节哮喘缓解期儿童外周血单个核细胞Th1/Th2平衡的基因及蛋白水平研究\*

孙雯,俞建,时毓民,张皓,王莹,吴冰冰

(复旦大学附属儿科医院,上海 201102)

**摘要:** 目的:从基因及蛋白水平探讨中药槐耳调节T辅助淋巴细胞(Th)平衡的机制,为槐耳在临床上治疗缓解期哮喘提供理论依据。方法:将哮喘缓解期儿童外周血单个核细胞(PBMC)分为3组,即空白组、中剂量组和大剂量组,分别与不同浓度的槐耳菌质配液(6g/L)及培养液作用48h;然后测定细胞培养沉淀中白细胞介素-4(IL-4)及干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) mRNA的表达和细胞培养上清中IL-4及IFN- $\gamma$ 的量。结果:在中剂量组和大剂量组中,IL-4 mRNA表达明显低于空白组( $P < 0.05$ );IFN- $\gamma$ 表达明显高于空白组( $P < 0.05$ );IFN- $\gamma$ /IL-4比值的基因及蛋白水平表达均高于空白组;然而,对于以上4个指标的检测,大剂量组与中剂量组之间无明显差异( $P > 0.05$ )。结论:槐耳菌质能够明显增加IFN- $\gamma$ 及减少IL-4 mRNA的表达,可调节哮喘缓解期IFN- $\gamma$ /IL-4比值的失衡,平衡Th1/Th2比值的漂移。

**关键词:** 槐耳;哮喘;Th1/Th2;IL-4;IFN- $\gamma$

## Research of *Trametes Robinioplila* on balance of Th1/Th2 in gene and protein level in children with asthma in remission stage

SUN Wen<sup>1</sup>, YU Jian<sup>1</sup>, SHI Yu-min<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>2</sup>, WANG Ying<sup>3</sup>, WU Bing-bing<sup>3</sup>

(Department of Traditional Chinese Medicine, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China)

**Abstract:** Objective: To explore the mechanism of *Trametes Robinioplila* on regulating the imbalance of Th1 and Th2 ratio in gene and protein level, and to find the theoretical basis of the fungus for treating asthma in remission stage. Methods: The PBMC from asthmatic children were divided into three groups (blank group, middle-dose group, large-dose group), and then treated respectively with *Trametes Robinioplila* (0g/L, 3g/L, 6g/L) and culture medium for 48 hours respectively. The expression of IL-4 and IFN- $\gamma$  mRNA in cellular precipitation were measured, and the expression of IL-4 and IFN- $\gamma$  in supernatant were measured too. Results: After PBMC cultured with *Trametes Robinioplila* for 48 hours, the expressions of IL-4 mRNA, IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /IL-4 mRNA ratios and IFN- $\gamma$ /IL-4 ratios were significantly different ( $P < 0.05$ ) between drug intervention group and blank group, but there were no markedly differences ( $P > 0.05$ ) between large-dose group and middle-dose group. Conclusion: *Trametes Robinioplila* markedly increased the expression of IFN- $\gamma$  and decreased the expression of IL-4 mRNA, then regulated the imbalance of IFN- $\gamma$ /IL-4 and Th1/Th2 ratios in asthmatic children in remission stage.

**Key words:** *Trametes Robinioplila*; Asthma; Th1/Th2; IL-4; IFN- $\gamma$

哮喘作为一种慢性气道炎症,它的发生由多种细胞和细胞组分介入<sup>[1]</sup>。该疾病易反复发作,并且伴随着发作次数的增加,气道持续存在的变应性炎症和高反应性也将逐步加重,最终导致气道重塑,形成不可逆的病理改变。研究发现<sup>[2]</sup>,在哮喘缓解期亦存在Th1/Th2及其相关转录因子和细胞因子的异常,故而哮喘缓解期的积极治疗就显得尤为必要。

中医学认为,哮喘的发作与肺、脾、肾三脏相关,且哮喘缓

解期患儿体质亦多存在肺、脾、肾三脏的亏虚,故而当以培正固本为主,使正气复而外邪痰浊毋能再犯<sup>[3]</sup>。因此,调节哮喘缓解期患儿的体质,以此减少哮喘的发作次数,是中医药治疗缓解期哮喘的治疗原则之一。槐耳是一种药用真菌,对癌症患者<sup>[4-5]</sup>及反复上呼吸道感染的儿童具有免疫调节作用<sup>[6]</sup>,但是关于槐耳调节缓解期哮喘免疫失衡机制的实验研究,尚未见文献报道。

\*复旦大学附属儿科医院重点科研基金资助(No.0620-06)

通讯作者:俞建,上海市闵行区万源路399号复旦大学附属儿科医院中医科,邮编:201102,电话:021-64931913,传真:021-64931913  
E-mail: yuj20061966@yahoo.com.cn

本研究拟通过用槐耳菌质干预哮喘缓解期儿童外周血单个核细胞(PBMC)的培养,观察槐耳对Th1/Th2相关细胞因子的影响,从基因和蛋白水平研究槐耳治疗缓解期哮喘的部分机制,同时为哮喘缓解期的治疗探求更为有效及完善的方法。

材料和方法

1. 临床资料 15例患儿均选取自复旦大学附属儿科医院2008年5月-6月的门诊患儿,男8例,女7例,年龄3-12.1岁,平均(5.1±2.6)岁。入选标准按照中华医学会儿科呼吸学组2003年修订《儿童支气管哮喘防治常规(试行)》<sup>[7]</sup>诊断为哮喘,其中儿童期哮喘12例,咳嗽变异性哮喘3例,均处于临床缓解期,病程1-7.6年,平均(2.8±1.9)年。所有受试者均排除急性感染,无严重心、肝、肾疾病及肿瘤病史。

2. 试剂 无菌采集患儿外周血3ml;胎牛血清,批号0712013,杭州四季青生物工程公司;槐耳菌质提取物,启东盖天力药业有限公司,批号:20070620,纯度为31.25g菌质提取1g菌质提取物;Trizol液,批号1382739,美国invitrogen公司;Real-Time PCR Master Mix,批号75660M3,日本TOYOBO公司;人IL-4/IFN- 酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,批号20080711,北京晶美生物工程有限公司。

3. 方法

3.1 细胞毒性判断 FicolI法分离PBMC,定容细胞数至5×10<sup>5</sup>个/ml,加入药物浓度上限为10μg/ml,其浓度梯度为:0、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10μg/ml。37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养48h<sup>[8]</sup>,后将细胞悬液与0.4%台盼蓝按4:1混匀,显微镜下计数500个细胞,并记下其中的着色细胞,根据以下公式计算单个核细胞的存活率。细胞存活率(%)=(总细胞数-着色细胞数)÷总细胞数×100%。

3.2 分组 空白组:以培养液代替中药;中剂量组:加入药量3mg/L;大剂量组:加入药量6mg/L。根据细胞毒性检测结果确定浓度。

3.3 IL-4及IFN- mRNA的表达

3.3.1 RNA的抽提及逆转录 离心细胞培养液,得到沉淀。

Trizol法抽提RNA,并将其逆转录为cDNA,-20℃保存。

3.3.2 实时荧光定量 PCR(Real-Time PCR) 用SybrGreen染料法。引物采用primer premier 5.0辅助设计,由上海生工生物工程有限公司合成。检测基因的上下游引物序列及退火温度见表1。所用Real-Time PCR扩增仪为MX3000P,美国Stratagene公司。

表1 各检测基因的引物序列和退火温度

检测基因	上下游引物序列5' 3'	产物长度	退火温度
-actin	CAC CAA CTG GGA CGA CAT ATC TGG GTC ATC TTC TCG C	138 bp	55
IL-4	ACC GAG TTG ACC GTA ACA GAC TGT GGA ACT GCT GTG CAG T	151 bp	57
IFN-	CCA ACG CAA AGC AAT ACA CAG GCA GGA CAA CCA TTA	133 bp	55

3.4 IL-4及IFN- 的表达 收集细胞培养液上清,IL-4及IFN- 采用双抗夹心ELISA试剂盒检测。酶标仪为Wellscan MK3,芬兰Labsystems公司。

4. 统计学方法 应用SPSS15.0统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用配对样本t检验。当P<0.05时,认为差异具有显著统计学意义。

结果

1. 细胞毒性检测结果 药物浓度为0至6mg/L之间时,细胞存活率均>90%;浓度为7至10mg/L之间时,细胞存活率均<90%。故而,最大药物浓度为6mg/L,中等药物浓度为最大药物浓度的一半。

2. IL-4及IFN- mRNA的表达比较 IL-4及IFN- 均以-actin为参照,后取对数进行统计。中、大剂量组分别与空白组比较,IL-4 mRNA和IFN- /IL-4mRNA比值的表达均有显著差异(P<0.05);但是,IFN- mRNA的表达无显著差异(P>0.05)。此外,以上3个指标在中、大剂量组之间无显著差异(P>0.05)。见表2。

3. IL-4及IFN- 的表达比较 大、中剂量组分别与空白组比较,IFN- 和IFN- /IL-4比值的表达显著增加(P<0.05);但是,IL-4无显著差异表达(P>0.05)。此外,以上3个指标在中、大剂量组之间无显著差异(P>0.05)。见表2。

讨论

槐耳作为一种药用真菌,《本草纲目》载其“味苦、辛、平,无毒”;《药性论》记录“能治风,破血,益力”。其主要成分蛋白多糖具有活性很高的生物反应调节剂作用,能激发肌体免疫系统的诸多环节。研究<sup>[9]</sup>发现,槐耳可以诱导正常ICR小鼠分泌干扰素;对于反复呼吸道感染的儿童,治疗前后其免疫球蛋白和CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T细胞明显增加<sup>[6]</sup>;对于化疗患者,NK和CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>细胞的提高率均高于对照组<sup>[4]</sup>;对于癌症术后患者,Th1 相关细胞因

表2 IL-4及IFN- mRNA表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	mRNA(拷贝、数对数)			表达(ng/L)		
		IFN-	IL-4	IFN- /IL-4	IFN-	IL-4	IFN- /IL-4
空白组	15	2.21±0.27	1.28±0.44	1.87±0.48	337.43±59.06	20.45±1.36	20.82±9.52
中剂量组	15	2.10±0.28	0.96±0.28 <sup>*</sup>	2.31±0.56 <sup>*</sup>	425.94±32.00 <sup>*</sup>	15.57±1.28	32.34±8.70 <sup>*</sup>
大剂量组	15	2.07±0.31	0.98±0.38 <sup>*</sup>	2.30±0.63 <sup>*</sup>	453.84±15.62 <sup>*</sup>	18.87±1.58	30.92±7.32 <sup>*</sup>

注:与空白组比较,<sup>\*</sup>P<0.05。

子IFN- $\gamma$ 和IL-2显著增高<sup>[5]</sup>。临床证实,哮喘患儿服用槐杞黄颗粒后,体质增强,哮喘发作减少,但具体机制不清楚,推测可能与槐耳对免疫系统的调节有关。

Th1/Th2之间的失衡使Th2占优势,是哮喘发病的免疫学机制之一。Th1主要分泌IL-2、IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ ;Th2主要分泌IL-4、IL-5、IL-6和IL-13,其中,IFN- $\gamma$ 、IL-4是Th1和Th2的特征性细胞因子,也是一对相互拮抗的细胞因子,可间接反映Th1/Th2免疫应答的情况。IFN- $\gamma$ 可抑制Th2的活性,减少Th2细胞产生IL-4,抑制B细胞CD23的表达和IL-4 mRNA的转录,从而抑制IgE的合成及释放。IL-4在促进B细胞的生长、分化、增生和分泌IgE及Fc RII(IgE高亲和力受体)<sup>[10]</sup>中起关键作用。IL-4和IFN- $\gamma$ 比例失衡,是哮喘患者体内IgE合成过多的主要原因,促进了哮喘患儿气道炎症的发展进程。

本研究结果表明,IFN- $\gamma$  mRNA的表达在药物干预组与空白组间无明显差异,由于mRNA水平12h后,蛋白水平36h即已表达,提示槐耳对IFN- $\gamma$  mRNA的表达无影响,或者是IFN- $\gamma$  mRNA在下一步的蛋白合成中已经消耗;此外,药物干预组IL-4 mRNA的表达明显低于空白组。综上推测,槐耳可能并非直接调节IL-4 mRNA表达,而是在影响IFN- $\gamma$ 的表达之后,由IFN- $\gamma$ 对IL-4产生间接影响,这与IFN- $\gamma$ 可抑制Th2的活性,减少Th2产生IL-4的经典理论相符。

本研究中,IFN- $\gamma$ 的表达在药物干预组明显高于空白组,但是大剂量组与中剂量组之间无明显差异。结果提示,槐耳可能在调节IFN- $\gamma$ 时不需大剂量而只需达到有效剂量即可。同时,细胞培养上清液中IL-4的表达在药物干预组与空白组中无明显差异,提示药物干预后,IL-4可能只是达到了基因水平,蛋白合成尚未进行,与基因表达结果之间的关系是合理的。

通过对IFN- $\gamma$ /IL-4比值的分析,发现IFN- $\gamma$ /IL-4的表达药物干预组明显高于空白组,提示药物可能在调节IFN- $\gamma$ /IL-4的比值失衡方面起到了一定的作用。

本实验说明,槐耳菌质可能对哮喘缓解期的IFN- $\gamma$ 和IL-4均具有调节作用,而对IL-4的调节是通过IFN- $\gamma$ 来间接实现的,因此通过上调IFN- $\gamma$ 及下调IL-4的表达,达到调节IFN- $\gamma$ /IL-4失衡的目的,从而进一步平衡Th1/Th2的漂移;其次,大、中剂量组之间并无明显差异,也提示在服用槐耳药物时不需要大剂量即可实现治疗目的,但是此观点仍然需要进一步的临床佐证。

#### 参 考 文 献

- [1] Executive Committee, GINA Assxmbly. Global Strategy for Asthma Management and Prevention[R/OL].<http://www.ginaasthma.org>,2006-12-12(2)
- [2] 吴彬,俞建,王莹,等.哮喘缓解期患儿Th1/Th2相关上

游转录因子及细胞因子的表达.实用儿科临床杂志,2006,21(21):1461-1462

WU Bin,YU Jian,WANG Ying,et al.Expression of transcription factor and cytokine of Th1/Th2 in children with asthma in remission stage. Journal of Applied Clinical Pediatrics,2006,21(21):1461-1462

- [3] 罗海燕.郑健教授治疗小儿哮喘经验.中医儿科杂志,2006,2(6):5-7

LUO Hai-yan.Experiences about Pro.Zheng Jian treating children with asthma. Journal of Pediatrics of Traditional Chinese Medicine, 2006, 2(6):5-7

- [4] 何斌,蔡明明,吴燕波.槐耳颗粒对化疗患者生活质量及免疫功能影响的临床研究.辽宁中医杂志,2007,34(7):943-944

HE Bin,CAI Ming-ming,WU Yan-bo.Clinical research about the impact of huai'er granule on the quality of life and immune function in patients accepted chemotherapy. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine,2007,34(7):943-944

- [5] 王晓伟,杨丽君,邱法波,等.槐耳颗粒对原发性肝癌术后Th1/Th2漂移的影响.中国现代药物应用,2008,2(9):7-8

WANG Xiao-wei,YANG Li-jun,QIU Fa-bo,et al. The impact of Huai'er granule to Th1/Th2 shift on patients with primary hepatic cancer after surgical resection. Chinese Journal of Modern Drug Application,2008,2(9):7-8

- [6] 韩志英.槐杞黄颗粒治疗小儿反复呼吸道感染50例.中国中西医结合志,2004, 24(6): 563-564

HAN Zhi-ying. Huai-Qi-Huang granule treat children with recurrent respiratory tract infection. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine,2004, 24(6): 563-564

- [7] 中华医学会儿科学分会呼吸学组.儿童支气管哮喘防治常规(试行)(2003年修订).中华儿科杂志,2004,42(2):100-107

Respiratory branch of pediatric society,Chinese Medical Association.Prevention and treatment routine of bronchial asthma in children. Chinese Journal of Pediatrics,2004, 42(2):100-107

- [8] 金鹰,唐玫,李国明.实用淋巴细胞培养技术.激光生物学报,2000,9(1):75-78

JIN Ying, TANG Mei, LI Guo-ming.A practical culture technique in lymphocytes. Acta Laser Biolog Sinica,2000,9(1):75-78

- [9] 陈慎宝,丁如宁.槐耳菌质成分对小鼠免疫功能的影响.食用菌学报,1995,2(1): 21-25

CHEN Shen-bao,DING Ru-ning.The effect of Trametes Robiniophila Murr(TRM) substantial composition on immune function of mice. Acta Edulis Fungi,1995,2(1): 21-25

- [10] Joseph T, Radha K, Holly M,et al. Research Upregulation of CD23 (Fc RII) Expression in Human Airway Smooth Muscle Cells (huASMC) in Response to IL-4, GM-CSF, and IL-4/GM-CSF.Clin Mol Allergy,2005,3(6):1-12

(收稿日期:2008年9月22日)