

槐杞黄对哮喘大鼠 BALF 中 IL-5 及 INF- γ 的影响

张琴珍,尚云晓*

[摘要] 目的 观察槐杞黄对大鼠哮喘模型 BALF 中 IL-5 及 INF- γ 的影响。方法 大鼠 40 只,随机分成 4 组:正常对照组(N 组)、哮喘模型组(A 组)、地塞米松组(D 组)、地塞米松+槐杞黄组(H 组),复制哮喘模型。用细胞计数板计算支气管肺泡灌洗(BALF)中细胞总数和嗜酸性粒细胞(EOS)数;酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清卵蛋白特异性 IgE(OVA-IgE)和 BALF 中白介素-5(IL-5)、INF- γ 的水平。结果 A 组血清 OVA-IgE、BALF 中 EOS 数和 IL-5 水平高于 N 组($P < 0.05$);D 组和 H 组各指标较 A 组下降($P < 0.05$);H 组各指标较 D 组下降($P < 0.05$),与 N 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。A 组 BALF 中 INF- γ 的水平低于 N 组,两组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);D 组和 H 组各指标较 A 组回升($P < 0.05$);H 组较 D 组进一步回升($P < 0.05$),与 N 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 槐杞黄辅助治疗可以抑制哮喘大鼠 OVA-IgE 和 IL-5 合成,促进 INF- γ 合成,调节 Th1/Th2 平衡,从而发挥其抗 EOS 性气道炎症的作用。

[关键词] 哮喘;嗜酸性粒细胞;INF- γ ;IL-5;槐杞黄

Effects of Huaiqihuang on IL-5 and INF- γ level of BALF in asthmatic rats ZHANG

Qin-zhen SHANG Yun-xiao* (The Pediatric Respiratory Department, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Huaiqihuang on IL-5 and INF- γ level of BALF in asthmatic rats. **Methods** The rats were sensitized and challenged by ova-albumin to establish the asthmatic model. 40 rats were randomly divided into 4 groups: normal control group(N), asthmatic model group(A), dexamethasone group(D), dexamethasone + Huaiqihuang group(H). The total cell numbers and eosinophils were counted with a hemocytometer. The level of OVA-IgE in serum and IL-5 and INF- γ in BALF were measured by ELISA. **Results** The count of EOS in BALF, level of OVA-IgE in serum, IL-5 in BALF: group A was higher than group N($P < 0.05$); group D and group H were lower than group A($P < 0.05$); and group H was lower than group D($P < 0.05$), but mainly the same as group N($P > 0.05$). The level of INF- γ in BALF: group A was lower than group N($P < 0.05$); group D and group H were higher than group A($P < 0.05$); and group H was even higher than group D($P < 0.05$), but mainly the same as group N($P > 0.05$). **Conclusion** The adjuvant therapy of Huaiqihuang can suppress the high expression of OVA-IgE and IL-5, raise the low expression of INF- γ , regulate Th1/Th2 balance and it plays an important role in developing airway inflammation.

Key words: Asthma; Eosinophil; INF- γ ; Interleukin-5; Huaiqihuang

支气管哮喘是以气道高反应性和嗜酸性粒细胞性气道炎症为特征的免疫紊乱性疾病。众多研究表明, Th1/Th2 功能失衡、Th2 细胞优势分化是导致哮喘发病的重要机制之一^[1]。IL-5 是由 Th2 细胞分泌的细胞因子,它促进嗜酸性粒细胞的产生和在气道的聚集。Th1 细胞分泌 INF- γ 等细胞因子,抑制哮喘反应。目前,支气管哮喘的治疗主要依靠抗炎和解痉,而针对免疫发病机制的治疗较为薄弱。槐杞黄为临床辅助治疗儿童支气管哮喘的免疫调节药物,本实验通过给予哮喘动物模型不同的干预措施,测定 Th1、Th2 细胞因子水平,比较不同干预效果,以期为儿童哮喘的临床治疗提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 卵蛋白(美国 Sigma 公

司),百日咳灭活菌苗(北京生物制品研究所),醋酸地塞米松片(天津药业有限公司),槐杞黄(启东盖天力药业有限公司),ELISA 试剂盒(美国 GBD 公司)。

1.2 实验动物 雌性 Wistar 大鼠 40 只,SPF 级,体质量(140 ± 10) g,由中国医科大学中心实验室动物部提供,饲养条件一致。

1.3 分组和模型制备

1.3.1 动物分组 随机分成 4 组:正常对照组(N)、哮喘模型组(A)、地塞米松组(DXM)、地塞米松组+槐杞黄组(H),每组 10 只。按不同的影响因素分别进行研究。饲养期间给予正常饮食。

1.3.2 大鼠哮喘模型的制作^[2] 除 N 组外,于第 1、7 天,各组大鼠腹腔注射 1% 卵蛋白 1 mL、1% 氢氧化铝凝胶及 6×10^9 /mL 百日咳灭活菌苗致敏液共 1 mL,共致敏 2 次。第 15 天开始雾化吸入 2% 卵蛋白诱喘。每日 30 min,连续 7 d。N 组大鼠以生理盐水代替激发液进行处理。

1.3.3 给药 自第 15 天起连续 7 d,激发前

收稿日期:2010-09-20

作者单位:中国医科大学附属盛京医院小儿呼吸内科,沈阳 110004

基金项目:辽宁省教育厅高校科研基金资助项目(20060953)

* 通讯作者

30 min ,各组灌胃给药(均配成 3 mL) 。N 组: 生理盐水 3 mL; A 组: 生理盐水 3 mL; D 组: 地塞米松 1 mg/kg 3 mL; H 组: 地塞米松 1 mg/kg + 槐杞黄 8 g/kg 3 mL。

1.4 取材 于末次激发后 24 h 内取材。以 10% 水合氯醛 0.4 mL/100 g 麻醉后 ,固定于解剖板 ,75% 酒精消毒 打开胸腔和颈部。心尖取血 ,静置 2 h 3 000 r/min 4 ℃ 离心 10 min ,取上清 - 80 ℃ 保存待测细胞因子。支气管肺泡灌洗液(BALF) 中嗜酸性粒细胞(Eos) 计数: ①止血钳夹闭气管上端和右肺主支气管; ②灌洗支气管和左侧肺: 用密闭式静脉留置针插入气管上端 0.5 mL PBS 反复冲洗 ,共 4 次 ,共回收 1.7 mL 以上灌洗液 ,回收率超过 85%; ③灌洗液 4 ℃、1 500 r/min 离心 10 min; ④回收上清 , - 80 ℃ 保存待检细胞因子; ⑤用 1 mL 含有 1% BSA 的 PBS 重悬细胞沉淀 ,取 10 μL 重悬液进行细胞计数。余液再次 4 ℃ 离心 ,参数同上; ⑥离心后去上清 ,滴入 1 滴血清 ,轻吹散细胞 涂片 3 张; ⑦涂片瑞氏-吉姆萨染色 ,细胞分类计数 ,于光学显微镜下进行细胞分类 ,至少数 300 个细胞每视野 ,至少进行 4 个视野的细胞计数。算出嗜酸细胞的百分比 ,用细胞总数乘以百分比 ,即得出嗜酸细胞的绝对值。

1.5 ELISA 检测各组大鼠血清 OVA 特异性 IgE、BALF 中 IL-5、INF-γ 严格按照试剂盒(美国 GBD 公司) 要求操作 ,试剂盒的检测最低限为 1

ng/mL。IL-5、INF-γ 操作步骤按试剂盒要求进行。拟合标准曲线 ,得到直线方程后 ,根据各样品孔 OD 值推算出样品中 IL-5、INF-γ 含量(pg/mL) 。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,组间比较采用单因素方差分析 ,ANOVE Tukey 检验比较各组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察 经 OVA 激发后 ,模型组小鼠出现烦躁不安、呼吸增快、咳嗽、腹肌收缩、弓背向上、抓挠口鼻、反应迟钝、二便失禁等症状 ,严重者可见呼吸急促 ,呼吸节律不整 ,口唇紫绀; 长期激发可见体质量减轻 ,毛色失去光泽 ,精神状态差。给药组和阳性对照组上述症状可获得不同程度的缓解。

2.2 对血清各项指标的影响 对血清中 OVA-IgE、BALF 中 IL-5 含量和细胞总数($\times 10^6$ /mL) 及 Eos% 的影响: 上述各指标 A 组较 N 组显著增高 ($P < 0.05$) ; D 组和 H 组较哮喘模型组有所改善 ($P < 0.05$) ; H 组较 D 组进一步下降 ($P < 0.05$) ; 与 N 组相比 ,H 组 OVA-IgE、IL-5 含量和 Eos% 基本降至正常水平 ,差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。BALF 中 INF-γ 的水平: A 组低于 N 组 ($P < 0.05$) ; D 组和 H 组各指标较 A 组回升 ($P < 0.05$) ; H 组较 D 组进一步回升 ($P < 0.05$) ,与 N 组比较 ,差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。见表 1。

表 1 不同干预对血清各项指标的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只	OVA-IgE	IL-5	INF-γ	细胞总数	Eos(%)	P
N	10	172.29 ± 2.98	22.87 ± 6.26	80.19 ± 8.82	1.17 ± 0.34	0.89 ± 0.49	<0.05 [#]
A	10	436.40 ± 2.77	54.94 ± 10.32	55.83 ± 10.08	2.91 ± 0.62	20.85 ± 17.49	<0.05 [*]
D	10	268.56 ± 4.83	43.63 ± 7.96	63.10 ± 5.75	2.07 ± 0.63	11.55 ± 7.73	<0.05 ^{* #}
H	10	179.22 ± 3.98	27.61 ± 5.24	74.43 ± 7.60	1.52 ± 0.53	2.52 ± 4.40	<0.05 ^{**}

注: 与正常组比较 ,^{*} $P < 0.05$; 与哮喘组比较 ,[#] $P < 0.05$

3 讨论

大量研究表明 ,支气管哮喘的发病过程中存在 Th2 细胞的过度分化和 Th2 细胞因子的过度分泌 ,是气道炎症启动和维持的关键因素。在哮喘的发病机制中 ,细胞因子不仅在慢性气道炎症中起着重要作用 ,在很大程度上还决定着 Th 细胞的分化趋势。有研究表明 ,Th 类型的主要依据为 Th0 在受到外界抗原刺激后 ,主要分泌哪类细胞因子 ,而调控和决定细胞因子产生的关键取决于哪类转录因子占主导 ,STAT4/STAT6、T-bet/GATA-3 两组转录因子在 Th0 分化中起关键作用^[3]。IL-5 的异常分泌与转录因子 Sp1、E12/E47、Oct-2、c/EBPbeta、GATA-3 和酪氨酸激酶 JAK2、JAK1 等表

达异常有关^[4-5]。Th2 细胞主要分泌包括 IL-5 在内的一系列细胞因子。IL-5 是 Eos 的存活发育因子 ,可刺激骨髓 Eos 增生 ,并促使 Eos 从骨髓到外周血再向气道募集 ,是较强的 Eos 增殖和趋化因子。IL-5 还可促使 Eos 活化 ,并诱导 Eos 释放阳离子蛋白等毒性蛋白颗粒 ,产生过氧化物阴离子等增多。另外 ,IL-5 还可以通过抑制 Eos 凋亡而增强其存活力 ,从而导致哮喘的嗜酸性粒细胞性气道炎症^[6]。Th1 细胞主要分泌包括 INF-γ 在内的一系列细胞因子。INF-γ 在支气管哮喘中起保护作用 ,其分泌减少与哮喘的发生关系密切^[7]。众多研究表明 ,纠正 Th1/Th2 功能失衡 ,可以减轻支气管哮喘的症状^[8]。槐杞黄由中药槐耳、枸杞和黄

精等成分组成。体外研究表明,中药槐耳可通过多种途径对 T 淋巴细胞紊乱进行调节^[9]。笔者通过比较干预前后各种细胞因子水平,证实哮喘大鼠模型存在嗜酸性粒细胞大量聚集的气道炎症、Th2 优势分化和 Th2 细胞因子过度分泌的 Th1/Th2 功能失衡。通过地塞米松的治疗,上述情况可以得到一定程度的缓解,而加用槐杞黄则可使上述情况基本恢复至正常水平。本实验仅初步验证了槐杞黄可调节 Th1/Th2 功能失衡,其具体机制尚待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Wegmann M. Th2 cells as targets for therapeutic intervention in allergic bronchial asthma [J]. *Expert Rev Mol Diagn* 2009 ,9 (1): 85-91.
- [2] Leung SY, Eynott P, Nath P. Effect of ciclesonide and fluticasone propionate on allergen-induced airway inflammation and remodeling features [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2005 ,115 (5): 989-996.
- [3] Ahlfors H, Limaye A, Elo LL. SATB1 dictates expression of multiple genes including IL-5 involved in human T helper cell differentiation [J]. *Blood* 2010 ,116(9): 1443-1453.
- [4] Takatsu K, Kouro T, Nagai Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response [J]. *Adv Immunol* , 2009 ,101: 191-236.
- [5] Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, et al. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol* 1999 ,103(2 Pt 1): 215-222.
- [6] Kim SH, Lee YC. Piperine inhibits eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by suppressing T cell activity and Th2 cytokine production in the ovalbumin-induced asthma model [J]. *J Pharm Pharmacol* 2009 ,61(3): 353-359.
- [7] Kandelaki ET, Nemsadze KP, Chkhaidze IG. INF-gamma during respiratory-syncytial induced obstructive respiratory syndrome in infection in children under one year of age [J]. *Georgian Med News* 2005(129): 69-73.
- [8] Yuan L, Wu L, Chen J. Paclitaxel acts as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice [J]. *Vaccin* 2010 ,28(27): 4402-4410.
- [9] 俞建. 槐耳对哮喘缓解期儿童 T 淋巴细胞调控失衡的影响 [N]. 第八届亚太儿科变态反应、呼吸和免疫学会 (APA-PARI) 年会, 2009.

三氧化二砷抑制重组白细胞介素 13 促成纤维细胞胶原的表达

肖莉^{1*}, 王煜¹, 张凌志¹, 李振华²

[摘要] 目的 观察三氧化二砷 (As_2O_3) 对重组白细胞介素 13 (rIL-13) 促成纤维细胞的增殖及分泌胶原是否有抑制作用。方法 体外培养 3T3 成纤维细胞, 细胞分组为 DMEM 对照组、rIL-13 (80 ng/mL) 组及 rIL-13 加不同浓度 As_2O_3 (2 μ mol/L 和 4 μ mol/L) 组。24 h 和 48 h 后, MTT 法观察细胞生长抑制情况, 用细胞抑制率表示; 各组药物作用细胞 48 h 后, Western blot 法检测 I 型胶原 (Col I) 的表达。结果 As_2O_3 可显著抑制 3T3 成纤维细胞增殖, 且呈剂量-效应关系 ($P < 0.01$)。各组均可检测到 I 型胶原表达。其中 rIL-13 (80 ng/mL) 组 I 型胶原表达显著高于其他各组细胞; rIL-13 加不同浓度 As_2O_3 (2 μ mol/L 和 4 μ mol/L) 组成纤维细胞分泌 I 型胶原的量显著低于 rIL-13 组 ($P < 0.01$)。但 4 μ mol/L As_2O_3 + rIL-13 组与 2 μ mol/L As_2O_3 + rIL-13 组相比, 细胞分泌 I 型胶原的水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 As_2O_3 对白细胞介素 13 促 3T3 成纤维细胞增殖和分泌 I 型胶原有抑制作用。

[关键词] 三氧化二砷; 重组白细胞介素 13; 成纤维细胞; I 型胶原

Inhibitory effect of arsenic trioxide on proliferation and expression of collagen of 3T3 fibroblast induced by recombinant interleukin 13 XIAO Li^{1*}, WANG Yu¹, ZHANG Ling-zhi¹, LI Zhen-hua² (1. Department of Emergency, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China; 2. Institute of Respiratory Disease, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on proliferation and expression of collagen type I of 3T3 fibroblasts induced by recombinant interleukin 13 (rIL-13). **Methods** 3T3 fibroblasts were cultured in vitro, which were divided into four groups: DMEM control group, rIL-13 (80 ng/mL) group and rIL-13 with various concentrations of As_2O_3 (2 μ mol/L and 4 μ mol/L) group. MTT assay was carried out to study cell proliferation; collagen type I (Col I) was determined with Western blot. **Results** As_2O_3 significantly inhibited the proliferation of 3T3 fibroblasts induced by rIL-13 with a dose dependent manner ($P < 0.01$). The expression of collagen type I could be detected in all groups, which in rIL-13 (80 ng/mL) group was the strongest among four groups. But the expression of collagen type I in rIL-13 with different concentrations of As_2O_3 (2 μ mol/L and 4 μ mol/L) groups was significantly lower than that of rIL-13 group ($P < 0.01$), and there was no significant difference between 4 μ mol/L As_2O_3 + rIL-13

收稿日期: 2010-09-13

作者单位: 1. 中国医科大学附属盛京医院急诊医学教研室 沈阳 110004; 2. 中国医科大学呼吸疾病研究所 沈阳 110001

基金项目: 沈阳市科技局科学计划基金 (1063314-4-00); 辽宁省博士启动基金 (20061036)

* 通讯作者