

维药神香草对 COPD 小鼠 Th1/Th2 和 Th17/Treg 平衡的影响*

□姜 敏 田 戈 王 晶 张洪平 比拉里·艾山 李风森**
(新疆医科大学附属中医医院国家中医临床研究基地 乌鲁木齐 830000)

摘 要 :目的 :研究维药神香草对 COPD 小鼠 Th1/Th2 和 Th17/Treg 平衡的影响 ,探讨神香草治疗 COPD 的免疫作用机制。方法 :复制前期熏烟法建立 COPD 小鼠模型 ,将小鼠随机分为正常组、生理盐水组、神香草高、中、低剂量组。采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-17 及 IL-10 的水平。结果 :与正常组比较 ,COPD 模型组小鼠血清 IL-4、IL-17 水平明显升高($P<0.05$) ,IFN- γ 、IL-10 的水平明显降低($P<0.05$) ;神香草治疗后 ,与模型组比较 ,小鼠血清 IL-4、IL-17 水平明显降低 ,IFN- γ 和 IL-10 水平明显升高。相关性分析表明 IFN- γ 与 IL-4 ,IL-17 与 IL-10 都呈负相关。结论 :神香草在纠正 Th1/Th2 和 Th17/Treg 失衡方面发挥了一定的作用。

关键词 :慢性阻塞性肺病 酶联免疫吸附法 神香草

doi: 10.11842/wst.2013.03.045

中图分类号 :R291.5

文献标识码 :A

慢性阻塞性肺疾病 (Chronic obstructive pulmonary disease ,COPD) 以气道不完全可逆气流受限为特征 ,呈进行性发展 ,与有害气体或有毒颗粒引起的肺部异常炎症反应有关^[1]。COPD 主要累及肺 ,也可引起全身性的疾病 ,肺部主要病理改变包括不可逆的肺组织损伤、气道重塑、气道黏液高分泌和炎症因子浸润^[2]。有关研究表明 ,在 COPD 患者的气道、肺实质和肺血管中均存在着慢性炎症 ,中性粒细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞等均参与了 COPD 的慢性炎症过程^[3]。IFN- γ 、IL-4、IL-17 及 IL-10 分别是 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞的特征细胞因子 ,在 COPD 的发病过程中日益

受到重视。维吾尔医在防治呼吸道疾病方面有许多良药 ,且疗效显著 ,神香草就是其典型的代表之一。

神香草为唇形科植物硬尖神香草 *Hyssopus officinalis* L.(维吾尔语发音 :祖帕奇尼)的干燥地上部分 ,主要产于新疆北部(阿尔泰山地区)山区 ,是维吾尔医常用药材。研究发现神香草在减轻气道炎症反应和改善细胞因子的平衡方面起到了重要的作用^[4,5]。本研究通过检测 COPD 小鼠血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-17 及 IL-10 的水平 ,分析 Th1/Th2 细胞、Th17/Treg 细胞失衡与 COPD 发病的关系 ,检测神香草治疗后各组小鼠血清中 4 种细胞因子的变化情况 ,并分析他们之间的相关性 ,探讨神香草治疗或干预治疗 COPD 的作用机制。

收稿日期 :2013-05-03

修回日期 :2013-06-19

* 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2009211A21)祛风止痉方治疗过敏性哮喘实验研究 负责人 李风森。

** 通讯作者 :李风森 ,教授 ,博士生导师 ,主要研究方向 :中西医结合治疗肺胀、哮喘的临床研究。

一、材料与方法

1. 药物、试剂及仪器

神香草全草由新疆维吾尔自治区维吾尔医院药房提供,新疆医科大学附属中医医院药理实验室制备水提液。水提物的制备:经水蒸气蒸馏提取挥发油后,水液减压浓缩至小体积,喷雾干燥,得到褐色粉末,使用时溶解于灭菌后的生理盐水中。Elisa试剂盒及其它试剂均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司,Mouse IL-10 ELISA Kit 2 Plate(DGE30073); Mouse IL-17 ELISA Kit 2 Plate(DGE30092); Mouse IL-4 ELISA Kit 2 Plate (DGE30064); Mouse IFN- γ ELISA Kit 2 Plate(DGE30038)红雪莲牌过滤嘴香烟(新疆卷烟厂,焦油含量 10 mg,尼古丁含量 1.2 mg);香烟烟雾暴露装置(自制 160 cm \times 50 cm \times 65 cm 密闭箱,顶部有一直径为 2.0 cm 的排气孔,箱内中部悬挂一台 CPU 风扇,可使烟雾均匀分布)。

2. 小鼠 COPD 模型建立及药物干预

清洁级雄性昆明小鼠 100 只,6~8 周龄,质量 18~20 g,由新疆维吾尔自治区疾病控制中心提供,普通饲料饲养,小鼠自由饮水和摄食。应用数字表法将动物随机分为正常组、生理盐水组、COPD 模型组、神香草高、中、低剂量组 6 组,每组 20 只。模型建立:除正常组外,其余各组实验小鼠同时放入自制熏烟箱内,将点燃的 12 支香烟插入置烟孔中,封闭熏烟箱进行熏烟,1 日 1 次,每次 1 h,持续 6 个月。熏烟前 15 天小鼠未出现死亡,灌胃前期死亡率高,实验小鼠死亡率 35%。药物干预:于熏烟第 15 天开始灌胃干预治疗,正常组无药物干预;生理盐水组给予生理盐水灌胃;COPD 模型组无药物干预;神香草高剂量组给予神香草灌胃 0.2 g \cdot mL⁻¹;神香草中剂量组给予灌胃神香草 0.1 g \cdot mL⁻¹;神香草低剂量组给予灌胃神香草 0.05 g \cdot mL⁻¹(神香草水提物高、中、低剂量根据前期药物毒理实验并参照《药理学实验指导》中人和动物的体表面积算法确定)。每天上午灌胃 1 次,平均灌胃量 0.6 mL,持续灌胃至造模结束。

3. 标本采集和处理

各组小鼠腹腔注射 10%的水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉,将小鼠仰面固定于

手术台,75%酒精消毒皮肤后,打开腹腔,腹主动脉采血,37 $^{\circ}$ C 静置 30 min,3 000 rpm 离心 10 min,收集血清,分装标记,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

4. HE 染色

无菌摘取左侧肺组织,4%多聚甲醛固定,酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋切片,常规 HE 染色。

5. 肺泡灌洗液和血清中细胞因子的检测

采用双抗体夹心酶联免疫吸附(ELISA)法检测小鼠血清和肺泡灌洗液中 IFN- γ 、IL-4、IL-17 和 IL-10 的含量,按试剂盒说明书操作检测,通过标准品吸光度值绘制标准曲线,计算各样本的值。

6. 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析和多重比较对各组进行比较分析,以 $P<0.05$ 为差异有显著性,相关性检验采用 Pearson 直线相关分析。

二、结果

1. 肺组织病理学观察

HE 染色显示,正常组支气管形态较为规则,管腔内极少见到炎症细胞及其分泌物,肺泡形态大小均匀,未见炎症细胞浸润;COPD 模型组有少量中性粒细胞及巨噬细胞浸润,肺泡腔形态不规则,壁薄、扩张,部分破裂融合形成肺大泡;治疗组与 COPD 组相比,炎症现象有所减轻,可见不可逆肺泡的破裂融合,神香草高、中、低剂量干预治疗组均有不同程度的肺泡融合,见图 1。

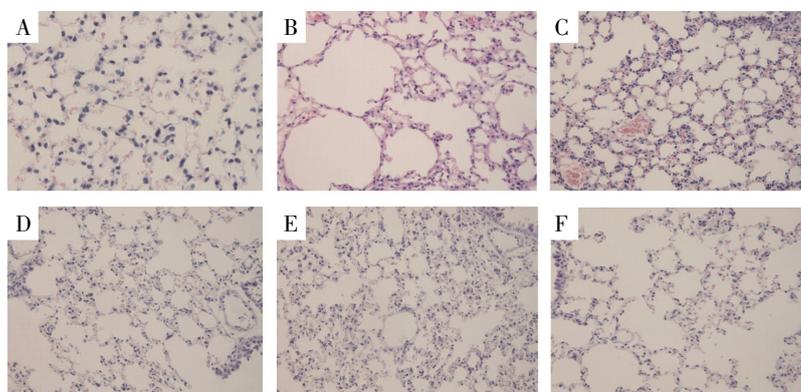


图 1 小鼠肺组织 HE 染色($\times 400$)

注:A:正常组 B:COPD 模型组 C:生理盐水组 D:神香草高剂量组 E:神香草中剂量组 F:神香草低剂量组。

2. 各组小鼠血清 IFN- γ 和 IL-4 水平

与正常组相比, COPD 模型组血清 IL-4 明显升高($P<0.05$), 而 COPD 模型组血清 IFN- γ 的水平明显低于正常对照组($P<0.05$)。与 COPD 模型组比较, 治疗组小鼠血清 IL-4 水平有所降低, IFN- γ 水平明显升高, 其差异有显著性($P<0.05$), 神香草中剂量治疗组 IL-4 的水平与 COPD 模型组的差异有显著性($P<0.05$)。对于 IFN- γ 而言, 神香草高剂量治疗组、中剂量治疗组与低剂量治疗组的差异有显著性($P<0.05$), 见表 1。

3. 各组小鼠血清 IL-17 和 IL-10 水平

与正常组比较, COPD 模型组血清 IL-17 水平明显升高($P<0.05$), COPD 模型组血清 IL-10 的水平明显降低($P<0.05$)。神香草高剂量组与 COPD 模型组比较, IL-17 水平明显降低, 而 IL-10 水平明显升高, 其差异有显著性($P<0.05$), 神香草中剂量组和低剂量组 IL-17 水平虽有降低, 但与其余各组相比差异不显著($P>0.05$)。对于 IL-10 而言, 神香

表 1 各组血清 IFN- γ 和 IL-4 水平的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	IFN- γ (pg·mL ⁻¹)	IL-4(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ /IL-4
正常组	88.4±4.02	12.9±1.79	6.85
生理盐水组	85.8±1.00	16.9±7.81	5.08
COPD 模型组	51.6±1.22 ^{▲▲}	23.7±10.5 [▲]	2.18
神香草高剂量组	88.0±1.08 [*]	13.7±2.32	6.42
神香草中剂量组	88.0±3.35 [*]	12.9±2.15 [*]	6.82
神香草低剂量组	55.9±5.33 ^{▲▲*♦}	22.7±3.50	2.46

注:与正常组相比, [▲] $P<0.05$;与生理盐水组相比, ^{▲▲} $P<0.05$;与 COPD 模型组相比, ^{*} $P<0.05$;与神香草高剂量组相比, ^{*} $P<0.05$;与神香草中剂量组相比, [♦] $P<0.05$ 。

表 2 各组血清 IL-17 和 IL-10 水平的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	IL-17(pg·mL ⁻¹)	IL-10(pg·mL ⁻¹)	IL-17/IL-10
正常组	145.7±16.3	106.5±10.46	1.37
生理盐水组	167.9±13.9	87.0±25.60	1.92
COPD 模型组	189.5±18.4 ^{▲*}	35.9±12.01 ^{▲▲}	5.28
神香草高剂量组	152.1±31.4 [*]	106.5±13.46 [*]	1.43
神香草中剂量组	178.5±19.5	106.3±4.25 [*]	1.68
神香草低剂量组	162.1±31.2	119.0±3.17 ^{▲*}	1.36

注:与正常组相比, [▲] $P<0.05$;与生理盐水组相比, ^{▲▲} $P<0.05$;与 COPD 模型组相比, ^{*} $P<0.05$;与神香草高剂量组相比, ^{*} $P<0.05$ 。

草高剂量治疗组与低剂量治疗组的差异有显著性($P<0.05$), 见表 2。

4. 相关性分析

各组小鼠血清 IL-4 与 IFN- γ 水平呈密切负相关($r=-0.617$), IL-17 水平与 IL-10 水平呈负相关关系($r=-0.441$), 均 $P<0.05$, IL-17 水平与 IL-4 和 IFN- γ 呈负相关关系($r=-2.56, r=-2.56$)。

三、讨论

COPD 是慢性气道炎症性疾病, 发病机制尚未完全清楚, 目前研究认为慢性气道炎症性疾病的发病机制可能与 Th1/Th2 功能失衡有关^[6]。本实验发现在 COPD 小鼠病程发展中 Th1/Th2 失衡表现为 Th2 细胞分泌的细胞因子高表达, 特别是 IL-4 分泌增多, 而 Th1 分泌的细胞因子如 IFN- γ 水平相对较低。IL-4 能调节 Th 细胞亚群的分化, 使 Th0 细胞向 Th2 细胞分化, 并通过影响 IL-10 表达抑制 Th1 细胞的功能^[7]。IFN- γ 可促进 Th1 细胞分化, 抑制 Th0 细胞向 Th2 细胞分化^[8]。COPD 进程中 Th1/Th2 失衡, Th0 细胞向 Th2 细胞分化, 随着维药神香草的干预治疗, Th1/Th2 比值逐步升高, 证实神香草可改善 Th1/Th2 失衡, 且可能具有一定的剂量依赖性。

Th17 和 Treg 细胞来源于共同的初始 T 细胞, 在不同的细胞因子环境下由 T 细胞分化而成, 具有不同的生物学功能^[9], Th17 和 Treg 细胞分别分泌特征性细胞因子 IL-17 和 IL-10。Th17 细胞为促炎细胞, 可能在 COPD 炎症进程中起着重要作用^[10], Treg 细胞则具有抑制炎症反应作用^[11], Th17 和 Treg 细胞的平衡对维持机体内免疫环境的稳定起重要作用^[12]。

本实验发现 COPD 小鼠中 Th17 细胞分泌的细胞因子 IL-17 水平显著升高, 表明 Th17 细胞明显增多; 而 Treg 细胞相关细胞因子 IL-10 水平明显降低, 表明 Treg 细胞显著减少, 从 IL-17/IL-10 显著升高可以推测 Th17/Treg 比值显著升高, Th17 细胞分化增多, 提示 COPD 发生机制可能与 Th17/Treg 失衡导致的免疫紊乱有关。Treg 细胞数量减少, 其抑制炎症反应的功能降低; 而 Th17 细胞过度表达, Th17 细胞通过分泌 IL-17 诱导

细胞因子和趋化因子的释放,从而介导气道炎症。维药神香草干预治疗后,IL-17 表达水平显著降低,IL-10 表达增强,IL-17/IL-10 的比值趋于正常,表明神香草可以改善 Th17/Treg 失衡。

本研究探讨维药神香草治疗 COPD 可能的作用机制,以及 Th1/Th2 和 Th17/Treg 平衡对 COPD 的调节机制。可见,维药神香草可抑制相关促炎症细胞因子细胞表达及分化,并增强机体自身抑制炎症反应作用,为中药治疗 COPD 提供了一定的理论依据。

参考文献

- Weiss S T. What genes tell us about the pathogenesis of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(11):1170~1173.
- Yang G, Zhong N. Effect on health from smoking and use of solid fuel in China. *The Lancet*, 2008, 372(9648):1445~1446.
- Freeman C M, Martinez F J, Han M K, et al. Lung CD8+ T cells in COPD have increased expression of bacterial TLRs. *Respir Res*, 2013, 14:13.
- 侯敏,马秀敏,丁剑冰,等.维吾尔药神香草对哮喘大鼠血清嗜酸性粒细胞趋化因子和可溶性 P 选择素的影响. *科技导报*, 2009, 27(19):90~93.
- 薛志琴,马雪萍,徐琦,等.维吾尔药神香草调节哮喘大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴功能紊乱的实验研究. *现代生物医学进展*, 2011, 11(22):4222~4224.
- Deng Y, Chen W, Zang N, et al. The antiasthma effect of neonatal BCG vaccination does not depend on the Th17/Th1 but IL-17/IFN- γ balance in a BALB/c mouse asthma model. *J Clin Immunol*, 2011, 31(3):419~429.
- Dang B, Wiehler S, Patel K D, et al. Increased PSGL-1 expression on granulocytes from allergic-asthmatic subjects results in enhanced leukocyte recruitment under flow conditions. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(4):702~710.
- Gabriele G, Gerald J, Dale T, et al. Roles of interleukin-13 and interferon- γ in lung inflammation. *Chest*, 2002, 121(3):88~95.
- Betelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006, 441(7090):235~238.
- 姜敏,高振,田戈,等.Th17 细胞/IL-17 在慢性阻塞性肺疾病发病中的作用研究进展. *新疆医科大学学报*, 2012, 35(10):1313~1316.
- 施宇衡,时国朝,万欢英,等.支气管哮喘患者外周血 Th17、CD4+CD25+Treg 细胞表达特征. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(8):740~743.
- Chatila T A. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116(5):949~959.

Effects of Uygur Medicine *Hyssopus officinalis* L. on Balance of Th1/Th2 and Th17/Treg of COPD Mice

Jiang Min, Tian Ge, Wang Jing, Zhang Hongping, Bilal Aishan, Li Fengsen

(Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University & National Clinical Research Base of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, China)

Abstract: This article was aimed to study the Uygur medicine *Hyssopus officinalis* L. on the balance of Th1/Th2 and Th17/Treg of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) mice in order to explore the mechanism of its treatment of COPD. The pre-fumigation method was copied to establish a mouse model of COPD. Mice were randomly divided into the normal control group, saline group and water extract of *H. officinalis* L. high, middle and low dose group. The level of serum IFN- γ , IL-4, IL-17 and IL-10 were detected with ELISA. The results showed that compared with the normal control group, the serum IL-4 and IL-17 level of the COPD model group were significantly higher ($P < 0.05$), and the serum IFN- γ and IL-10 level were significantly lower ($P < 0.05$). After drug intervention, the IL-4 and IL-17 level were significantly lower, and the IFN- γ and IL-10 level were significantly increased compared with the model group. The correlation analysis showed that the IFN- γ , IL-4, IL-17 and IL-10 were negatively related. It was concluded that *H. officinalis* L. played a certain role on correcting imbalances of Th1/Th2 and Th17/Treg.

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease, ELISA, *Hyssopus officinalis* L.

(责任编辑 张丰丰 张志华, 责任译审 汪 晶)