

清肺渗湿汤对哮喘大鼠血清 IFN- γ 和 IL-4 含量的影响[※]

□ 周兆山^{1*} 宋 曦² 张有花³

(1. 山东省青岛市中医院 山东 青岛 266033

2. 河北省邯郸市邯钢医院 河北 邯郸 056001

3. 山东中医药大学 2004 级硕士研究生 山东 济南 250014)

摘 要 目的：观察清肺渗湿汤对哮喘大鼠血清 IFN- γ 和 IL-4 含量的影响，探讨清肺渗湿汤治疗哮喘气道炎症的作用机制。方法：清洁级雄性 Wistar 大鼠 60 只，随机分为 5 组，每组 12 只，采用卵蛋白制作大鼠哮喘模型。用酶联免疫吸附试验（ELISA）法检测各组大鼠血清中 IFN- γ 和 IL-4 的水平。结果：哮喘模型组血清中 IFN- γ 的含量明显小于正常组（ $P < 0.05$ ），而 IL-4 的含量明显大于前者（ $P < 0.05$ ），存在着严重的 IFN- γ /IL-4 比例的失衡；与模型组相比较，实验所用三种药物均可不同程度的上调 IFN- γ 并下调 IL-4 的水平；这其中尤以清肺渗湿汤和地塞米松的作用更明显。结论：清肺渗湿汤治疗哮喘气道炎症的作用机制与纠正失衡的 IFN- γ /IL-4 比值有关。

关键词 清肺渗湿汤 哮喘 大鼠 细胞因子

我们在前期的临床研究中采用清肺渗湿汤治疗哮喘，结果发现清肺渗湿汤较传统的治法具有见效快、疗效高的优点。为了阐释这种治法的作用机理，我们以 Th1/Th2 失衡在气道炎症的异常免疫反应中的关键作用为切入点，以 IFN- γ 和 IL-4 这一对互相拮抗的细胞因子作为研究对象，观察大鼠哮喘模型血清中 IFN- γ /IL-4 比值的动态变化，进行组间比较，为清肺渗湿汤治疗哮喘提供了现代科学依据。

※基金项目 青岛市卫生局“2000 年科技发展计划”（No: 2000-ZY01）

***作者简介** 周兆山，男，主任医师，教授，硕士研究生导师。主要研究方向为中西医结合治疗呼吸系统疾病。

1 材料与方法

1.1 动物 选择清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 60 只（购自山东鲁抗医药集团有限公司，许可证号为：SCXK 鲁 20050017），体重 $200 \pm 20\text{g}$ ，月龄 2~3 月。在室温 $18 \sim 22^\circ\text{C}$ 、湿度 28% 环境中饲养一周后将其随机分为正常组、哮喘模型组、地塞米松组、清肺渗湿汤组及麻杏石甘加味汤组共 5 组，每组 12 只。每 4 只一笼，分笼饲养，以常规饲料喂食。

1.2 药物 （1）地塞米松片：天津天药药业股份有限公司生产，药品批号为：0504385；（2）清肺渗湿汤：麻黄 10g、杏仁 10g、石膏 30g、炙甘草 10g、薏苡仁 30g、冬瓜仁 30g、车前草 15g、茯苓 20g、石苇

12g、射干 12g、浙贝母 12g、蝉蜕 12g、鱼腥草 30g；
(3) 麻杏石甘加味汤：麻黄 10g、杏仁 10g、石膏 30g、炙甘草 10g、射干 12g、浙贝母 12g、蝉蜕 12g、鱼腥草 30g。

上述 (2)、(3) 两组配方由青岛市中医医院制剂室制成灭菌浓煎密封制剂，生药含量分别为 1.17g/ml、1.125g/ml。

1.3 试剂及仪器 (1) 大鼠 γ -干扰素 ELISA 试剂盒：武汉博士德公司提供，产品编号为：EK0374；(2) 大鼠白介素-4ELISA 试剂盒：武汉博士德公司提供，产品编号为：EK0406；(3) 超声雾化器：江苏鱼跃医疗设备有限公司生产，上海鱼跃医疗设备有限公司经销，产品标准号 Q/3211812YQ007-2000；(4) 微量移液器及相应 tip：20，200，1000ul tip 及 1500uleppendorf 管，GILSON 产品；(5) 隔水式电热恒温培养箱：PYX-DHS-X，上海市跃进医疗器械厂；(6) 电子天平：Bs110 型，Sartorius 公司产品；(7) 雾化箱：海慈医疗集团中医呼吸科自制。

1.4 实验方法

1.4.1 动物模型制备 哮喘模型组和各治疗组并于实验的第 1 天、第 8 天和第 15 天共三次在腹腔分 2 点注射 10% 卵白蛋白生理盐水致敏；第 3 次致敏 1 周后，每日以 1% 卵白蛋白生理盐水对模型组和各治疗组动物进行超声雾化吸入，诱发其哮喘发作，连续激发 7 天。正常对照组予生理盐水代替抗原进行致敏和激发。

1.4.2 给药方法和途径 各组均从激发阶段的第一天起开始给药，正常组、对照组和哮喘模型组给予生理盐水灌胃 30g/kg，连续 7 天；地塞米松组用地塞米松片 1mg/kg 胃饲，连续 7 天；其他两组分别给与清肺渗湿汤和麻杏石甘加味汤灌胃 30g/kg，连续 7 天。

1.4.3 观察指标与检测方法 末次激发 24 小时后以 10% 水合氯醛 (1ml/100g) 麻醉动物，四肢及背部固定，剪开胸腔，心脏采血 2ml，低温下离心，用 ELISA 法测定血清中 IL-4、IFN- γ 的含量。

1.5 统计学处理 主要采用 SPSS11.5 统计软件进行分析。所得结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。取 $P < 0.05$ 作为显著性差异水平。

2 结果

对治疗后大鼠血清 IL-4 和 IFN- γ 的含量进行观察比较：(1) 与正常组相比较，哮喘模型组血清中 IFN- γ 的含量明显小于前者 ($P < 0.05$)，而血清中 IL-4 含量明显大于前者 ($P < 0.05$)，提示哮喘发作期存在着严重的 IFN- γ /IL-4 比例的失衡；(2) 与模型组相比较，各治疗组的 IFN- γ 含量均有明显升高 ($P < 0.05$)，且三种治疗药物之间无显著差异 ($P > 0.05$)，提示实验用三种治疗药物均可上调 IFN- γ 的表达；(3) 与模型组相比较，各治疗组的 IL-4 含量均有明显降低 ($P < 0.05$)，且这种下调 IL-4 的表达的趋势以地塞米松和清肺渗湿汤更为显著。综合上述结果分析，三种治疗药物均可纠正失衡的 IFN- γ /IL-4 比值，这其中尤以地塞米松和清肺渗湿汤的作用更显著。见表 1。

表 1 血清 IFN- γ 和 IL-4 的含量

组别	治疗后只数	IFN- γ (Pg/ml)	IL-4 (Pg/ml)
正常组	12	23.80 \pm 2.77 $\Delta\blacktriangle\blacklozenge$	11.8 \pm 1.69 $\Delta\blacktriangle\blacklozenge$
哮喘模型组	11	10.16 \pm 1.11 $\blacktriangle\blacklozenge$	25.34 \pm 2.68 $\blacktriangle\blacklozenge$
地塞米松组	10	17.01 \pm 1.66 \blacktriangle	15.48 \pm 1.42 \blacktriangle
清肺渗湿汤组	12	17.19 \pm 4.26 \blacktriangle	15.61 \pm 1.69 \blacktriangle
麻杏石甘汤组	11	19.35 \pm 9.87 \blacktriangle	18.56 \pm 2.21 $\blacktriangle\blacklozenge$

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较， Δ $P < 0.05$ ；与地塞米松组比较， \blacktriangle $P < 0.05$ ；与清肺渗湿汤组比较， \blacklozenge $P < 0.05$ ；与麻杏石甘汤组比较， \bullet $P < 0.05$ 。

3 讨论

支气管哮喘是慢性气道炎症性疾病，近年来研究发现，支气管哮喘最重要的免疫异常是辅助 T 淋巴细胞亚群 1 和 2 (Th1/Th2) 比例和功能的失衡，主要表现为 Th2 细胞数量的增多和功能亢进，产生 Th2 类细胞因子增多以及血免疫球蛋白 E (IgE) 过量，导致气道局部嗜酸性粒细胞慢性炎症，气道高反应性而致哮喘^[1]。IFN- γ 和 IL-4 是 Th1 和 Th2 类细胞因子中具有代表性的一对，IFN- γ /IL-4 值的失衡在哮喘发病中起着至关重要的作用，因此越来越多研究者将关

注的目光集中于二者。

IFN- γ 是由 Th1 细胞分泌产生的一种高活性多功能的小分子多肽, 是一种抗哮喘因子。它不仅是 IL-4 合成的生物拮抗剂, 而且还通过抑制 IL-4 诱导的 B 细胞表面 CD23 的表达, 抑制 IL-4 诱导的免疫球蛋白的同型转换及抑制 Th2 细胞的增殖, 从而抑制 IgE 的产生。IL-4 又称 B 细胞刺激因子-1 (BSF-1), 是 CD4 + 细胞产生的细胞因子, 在哮喘有关的细胞因子网络中居中心地位, 可以促进 Th0 类细胞分化为 Th2 类细胞, 调控 TH2 类细胞的定型^[2], 并诱导 TH2 细胞分泌 IL-5、IL-13 等细胞因子, 使它们作用于炎性细胞, 释放炎性介质。此外, 它还通过激活 B 细胞使之转型产生 IgE, 同时也间接使 CD23 表达升高, 对 IgE 合成起上调作用^[3], 并通过增加上皮细胞上血管细胞粘附分子 VCAM-1 的表达, 诱导气道上皮细胞产生内毒素, 最终加重嗜酸性粒细胞对气道的损害^[4]。由此可知 IFN- γ 和 IL-4 是一对相互拮抗的因子, 已有的研究已证明, IFN- γ /IL-4 的失衡状态对 IgE 生成具有重要意义^[5]。正常状态下, 它们共同作用以维持 IgE 在体内一定水平, 当二者的比例失衡时, B 淋巴细胞过度合成, 体内 IgE 的浓度稳态被打破, 则引起异常的免疫反应, 在此基础上引起气道炎症的产生和维持。

本研究即是以 Th1 和 Th2 类细胞因子中最具有代表性的 IFN- γ 和 IL-4 为切入点, 用量化的指标观察清肺渗湿汤及各对照组哮喘大鼠体内 IFN- γ 和 IL-4 细胞因子的状态, 探讨清肺渗湿汤和其他对照组所用药物在细胞因子水平起效的机制, 并通过统计学分析进行药效的优势性比较。从实验结果可以看到哮喘模型组

血清中 IL-4 明显高于正常对照组, 而 IFN- γ 的值恰与前者相反, IFN- γ /IL-4 比值也相应低于正常组对照组。结合病理切片观察, 随着 IFN- γ /IL-4 比值的梯度升高, 炎症反应严重程度逐渐减轻, 证实了哮喘模型大鼠存在着失衡的 IFN- γ /IL-4 比值。在药物干预下, 失衡的 IFN- γ /IL-4 比值得到不同程度纠正, 这其中又以地塞米松和清肺渗湿汤的作用更为显著。由此证实, 清肺渗湿汤抑制气道炎症的直接作用机制就是调整失衡的 Th1/Th2 类细胞因子的比值, 而且这种调整作用与已知抑制气道炎症最有效的药物——糖皮质激素相近似, 优于麻杏石甘加味汤。说明在传统的清热宣肺法基础上加用渗湿法治疗哮喘较前者有着明确的优势, 这种优势在细胞因子水平得到证实。

参考文献

- [1] Agrawal DK, Hopfenspirger MT, Chavez J. Flt3 ligand: a novel cytokine prevents allergic asthma in a mouse model [J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1: 2081-2089.
- [2] Swain SL, Weinberg AD, English M, et al. IL-4 directs the development of TH2-like helper/Peffectors [J]. J Immunol, 1990, 145 (11): 3796-3806.
- [3] Marsh DG, NeelyJD, Breazeale DR, et al. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31. 1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations [J]. Science, 1994, 264 (5 162): 1152-1156.
- [4] Mochizuki M, Bartels J, Mallet AI, et al. IL-4 induces eotaxin; a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth IFNfection and atopy [J]. J Immunol, 1998, 160 (1): 60-68.
- [5] 吕国军, 柳 春, 李 刚, 等. 哮喘豚鼠 IFN- γ /IL-4 失衡与 IgE 水平相关性研究 [J]. 微生物学杂志, 2003, (23) 6: 17-19.

热烈祝贺中华中医药学会系列期刊《中医药通报》杂志 2007 年将正式更名为《中华中医药通报》!