

# 益气温阳护卫法对哮喘大鼠 IL-12/STAT4 信号途径的影响<sup>※</sup>

● 余建玮<sup>1\*</sup> 薛汉荣<sup>1</sup> 洪广祥<sup>1</sup> 邱小华<sup>2</sup> 邹叶青<sup>2</sup> 程光宇<sup>1</sup> 付向春<sup>1</sup> 杨玉萍<sup>1</sup> 兰智慧<sup>1</sup>

**摘要** 目的:探讨益气温阳护卫法对哮喘大鼠白细胞介素 12/信号传导子及转录激活子 4(IL-12/STAT4)信号途径的调节作用。方法:50 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、哮喘模型组、益气温阳护卫组、地塞米松组和卡介菌多糖核酸组,每组 10 只。采用 TaqMan Real time PCR 测定哮喘大鼠 Th 细胞 IL-12 和 STAT4 的 mRNA 表达变化。结果:哮喘模型组 IL-12 和 STAT4 的 mRNA 表达显著低于正常对照组( $P < 0.01$ ),益气温阳护卫组、地塞米松组和卡介菌多糖核酸组 PBMC 中 IL-12 和 STAT4 的 mRNA 表达显著高于哮喘模型组( $P < 0.01$ )且与正常对照组 IL-12 和 STAT4 的 mRNA 表达相当。结论:益气温阳护卫法调节哮喘大鼠 Th1/Th2 平衡的作用可能是通过上调 IL-12/STAT4 信号途径的基因表达实现。

**关键词** 益气温阳护卫法 哮喘 IL-12 STAT4

哮喘为一种气道的慢性炎症性疾病,许多细胞和细胞组分参与此过程的发生。这种慢性炎症引起气道高反应性,导致喘息、呼吸困难、胸闷和咳嗽反复发作,常发生在夜间和清晨。其发生与广泛多变的可逆性气流受限有关,常可自行缓解或通过治疗缓解。研究指出哮喘的临床表现,包括喘息症状、睡眠受到干扰、日间活动受限、肺功能受损以及急救药物的使用,均可通过正确治疗得以控制,一旦哮喘被控制,复发的情况和重症哮喘将减少<sup>[1]</sup>。近年,随着分子免疫学和分子生物学的发展,越来越多的事实表明,Th1/Th2 在细胞数量、活化及功能方面的比例失衡可能是哮喘气道炎症发病机制中的重要环节。中医学防治哮喘有着较丰富的经验,洪广祥教授认为哮喘发病的内因是“气阳虚弱,卫气不固”<sup>[2]</sup>,由此提出了益气温阳护卫法防治哮喘的观点。

本研究通过采集哮喘大鼠外周血单个核细胞

(peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 抽提 Total RNA, 检测调节 Th1/Th2 细胞发育的 IL-12/STAT4 信号途径的基因表达水平, 设立对照并以益气温阳护卫中药进行干预, 拟从基因转录水平探讨该治法调节 Th1/Th2 平衡的作用, 进而探讨其治疗哮喘的机制, 为科学指导用药提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 4-5 周龄, 体重 120-170g, 购置南方医科大学实验动物中心。按照随机原则分为 5 组, 每组 10 只, 自由进水与饮食, 常规饲养一周后建立哮喘模型。动物合格证号: SCXK(粤)2006-0015。

**1.2 实验用药** (1) 实验用益气温阳护卫汤的制备: 益气温阳护卫汤药材购自江西中医学院附属医院。将生黄芪、白术、防风、桂枝、白芍、生姜、大枣、炙甘草、仙茅、仙灵脾等 10 味药按比例 2:1.5:1.5:1:1:1:1:0.5:1:1.5 配伍, 取上述生药 1200g。然后取 8 倍量冷水浸药 0.5h, 第 1 煎 1h(沸后); 第 2 煎加 6 倍量水煎 40min, 将两次煎液, 过滤合并浓缩, 将提取物混合成合剂(其中白术、防风、桂枝、白芍、生姜提取挥发油), 调至含生药 2g/ml, 浓度溶液 600ml 密封于无菌

**※基金项目** 国家自然科学基金资助项目(No:30560188); 江西省自然科学基金(No:0540112)

**\*作者简介** 余建玮, 男, 江西中医学院 2005 级硕士研究生, 研究方向: 肺系病的临床与实验研究。

**•作者单位** 1. 江西中医学院呼吸病研究所(南昌 330006); 2. 江西省分子医学研究中心(南昌 330006)

量瓶,存放于4℃冰箱。(2)地塞米松片,0.75mg/片,仙居制药股份有限公司。(3)斯奇康(卡介菌多糖核酸)注射液,湖南九芝堂制药有限公司。(4)用药剂量依据2000年版《中国药典》,根据人和动物体表面积折算的等效剂量比率表计算,用药量相当于临床等效剂量。

**1.3 主要仪器和试剂** (1)主要仪器:PCR仪(ABI9700),Mx3000P Real Time PCR仪(Stratagene公司);台式高速低温离心机(BECKMAN公司);-70℃超低温冰箱(8525型,USA);核酸蛋白分析仪(Du 530型,BECKMAN);紫外凝胶扫描仪(UNITED KINGDOM);Agilent2100生物分析仪;(2)主要试剂:卵白蛋白(OVA,Sigma公司)、RNeasy Mini Kit(50)、RNA-later RNA Stabilization Reagent(50ml)、QIAshredder(50)、Rnase-Free Dnase Set、SS III 2-STEP QRT-PCR。

**1.4 哮喘模型** 参照文献[3]方法并加以改进,制作大鼠哮喘模型:第1天将实验大鼠分别腹腔注射抗原液1ml(含卵蛋白(OVA)100mg和氢氧化铝[Al(OH)<sub>3</sub>]100mg)致敏,第8d重复注射1次加强,第15d将大鼠置于特制透明玻璃容器内,以超声雾化器雾化1%OVA,使之吸入雾化液20min激发哮喘。

**1.5 实验动物分组及给药** 根据随机原则,将大鼠分为:(1)正常对照组:用生理盐水代替致敏和诱发的不同浓度卵蛋白。(2)哮喘模型组:同哮喘模型制备。(3)益气温阳护卫汤组:致敏和诱发哮喘组,第9天开始按每12h用温阳益气护卫汤5mL/kg灌服大鼠。(4)地塞米松组:致敏和诱发哮喘组,第9天开始按每12h用地塞米松0.5mg/kg灌服大鼠。(5)卡介菌多糖核酸(BCG-PSN)组:致敏和诱发哮喘组,第9天开始每次给以卡介菌多糖核酸注射液6.25mg/kg腹腔注射,隔日一次。各组连续给药4周,每组大鼠10只,每组标本采集,均于诱发后24h内。

**1.6 RNA抽提及TaqMan Real time PCR检测** 从外周血单个核细胞用RNeasy Mini Kit(QAIGEN公司)试剂盒抽提Total RNA。获得的RNA保存于-70℃超低温冰箱中。在Real time PCR仪(Mx3000P Real

Time PCR仪)上,用Taq Man法进行实时定量PCR。引物及探针序列(invitrogen公司合成):

GAPDH:Forward Primer:5'-TCTACATGTTCCAG-TATGACTCTACC-3',Reverse Primer:5'-ACATACT-CAGCACCAGCATCA-3',TaqMan Probe:5'-CG-GCAAGTTCAACGGCACAGTCAAGGC-3';IL-12:Forward Primer:5'-TGCCAAGTGTCTTAACCAGTCC-3',Reverse Primer:5'-GTTTTGTCCCCTGTGATGTCT-TC-3',Taq Man Probe:5'-AACCTGCTGAAGAC-CACGGACGACAT-3';STAT4:ForwardPrimer:5'-GC-CTCAAGTGGGTGGAGAAATG-3',Reverse Primer:5'-CTCTCTCCGTCCAGGCAGTG-3',Taq Man Probe:5'-CCCTAGTGGCATGGCGTCAGCAGC-3'。反应体系:(invitrogen公司试剂盒)PCR SuperMix-UDG 25μl,Forward Primer(10μM)1μl,Reverse Primer(10μM)1μl,Fluorogenic probe(10μM)0.5μl,ROX Reference Dye 1μl,cDNA5μl,DEPC-treated water to 50μl。PCR反应条件:50℃ 2min(UDG incubation),95℃ 2min,40 cycles of 95℃ 3sec and 60℃ 30sec,72℃ 20sec。在延伸的过程中搜集荧光信号,用软件记录数据并分析,选取管家基因GAPDH为内参照,以GAPDH和目的基因扩增的Ct值(每个反应管内荧光强度达到系统认为有目的DNA合成时的循环数)之差(ΔCt值)表示目的基因mRNA表达的相对丰度。待测样品的相对值越大,表达量越低。

**1.7 数据统计** 所有数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。用SPSS13.0统计软件进行统计处理,组间比较用单因素方差分析,检验以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

哮喘模型组IL-12和STAT4的mRNA表达明显低于正常对照组,差异有显著性( $P < 0.01$ ),益气温阳护卫组、地塞米松组和卡介菌多糖核酸组IL-12和STAT4的mRNA表达明显高于哮喘模型组,差异有显著性( $P < 0.01$ ),且与正常对照组IL-12和STAT4的mRNA的表达相当。结果见表1。

表 1 IL-12\_mRNA、STAT4\_mRNA 各组表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	n	IL-12 $\Delta$ Ct	STAT4 $\Delta$ Ct
正常对照组	10	13.9840 $\pm$ 0.70319 *	7.9180 $\pm$ 1.08010 *
哮喘模型组	10	25.3050 $\pm$ 0.90906	12.5870 $\pm$ 0.70637
益气温阳护卫组	10	13.6620 $\pm$ 0.71633 *	8.0110 $\pm$ 1.00327 *
地塞米松组	10	14.1520 $\pm$ 1.03462 *	8.6550 $\pm$ 1.02488 *
卡介菌多糖核酸组	10	13.2990 $\pm$ 0.92104 *	8.7090 $\pm$ 0.96633 *
Total	50	16.0804 $\pm$ 4.74168	9.1760 $\pm$ 1.98231

注:与哮喘模型组比较,\* $P < 0.01$ 。

3 讨论

以往的研究已证实益气温阳护卫汤具有降低哮喘豚鼠及哮喘患者气道反应及明显延长哮喘发作的潜伏期的作用。降低哮喘豚鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)嗜酸性细胞阳离子蛋白(ECP)的水平及减轻气道炎症,且明显优于玉屏风散组<sup>[4-7]</sup>。至于该法调节 Th1/Th2 平衡的机制尚不明确。

Th1 和 Th2 细胞分泌的细胞因子能够促进自身亚型的生长、分化,相反对另一细胞亚型则起着抑制作用。影响 Th 细胞分化的胞外信号分子中最关键的是细胞因子,细胞因子在抗原刺激的早期产生,并在抗原活化的 T 细胞分化过程中影响其向不同亚型分化。目前研究发现 STATs 家族作为转录因子与启动子区域相结合,启动靶基因从 DNA 向 mRNA 转录,并在细胞内根据 mRNA 所携带的炎症基因编码复制出大量的炎症蛋白,再释放出去来扩增炎症反应。这构成了哮喘炎症基因表达的分子学机制及哮喘发病机制的基础<sup>[8]</sup>。许多的研究证实,在正常细胞,IL-12 发挥生物学作用可通过 STAT4 途径实现,并且 STAT4 只有 IL-12 才能激活<sup>[9]</sup>。IL-12 与受体结合,后者二聚体化,促使 JAK 激酶活化酪氨酸激酶,导致受体发生酪氨酸磷酸化;再通过 JAK 活化 STAT4,使后者与受体解离,转位到核内,结合于特异基因的启动子序列上<sup>[10,11]</sup>,促进基因表达,发挥生物学作用。当 IL-12 通过 STAT4 的信号途径可使 CD<sup>4+</sup> 细胞的分化为 Th1 细胞。在支气管哮喘的发病过程中,诱导 Th1 分化的关键细胞因子是 IL-12,它是通过其家族成员 STAT4 发挥作用的<sup>[12]</sup>,因此,IL-12/STAT4 信号途径是哮喘发病的重要环节。本研究显示:在哮喘大鼠模型上,采用益气温阳护卫法干预能上调 IL-12、STAT4 等 Th1 细胞因子 mRNA 表达的水平,表明其可增强 Th1 亚群功能,纠正 Th1/Th2 细胞因子的比值失衡,这个结果

预示益气温阳护卫法调节 Th1/Th2 平衡的作用不仅在调控胞外信号分子基因的表达,而且对于细胞内信号转导子和转录激活子也发挥作用,这可能对恢复 Th1/Th2 平衡更有意义,推测这可能是其防治哮喘的机制之一。

参考文献

[1] Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention; updated 2007.

[2] 洪广祥. 全程用温法治疗哮喘之我见[J]. 中国医药学报,2003,(5):305-306.

[3] 马秀琴,黄茂,卞涛,等. 地塞米松对哮喘大鼠肺组织 NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 及 TIMP-1 表达的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2005,25(4):255.

[4] 薛汉荣,洪广祥,郭德华,等. 益气温阳护卫汤对哮喘豚鼠气道反应的影响[J]. 江西中医药,2002(1):50-51.

[5] 薛汉荣,洪广祥,郭德华,等. 益气温阳护卫汤对哮喘豚鼠气道嗜酸性粒细胞浸润及活化的影响[J]. 中国中西医结合杂志,基础理论研究特集. 2002(6):101-104.

[6] 薛汉荣,洪广祥,郭德华,等. 益气温阳护卫汤对哮喘豚鼠 BALF TH1、TH2 细胞因子产生及调节的影响[J]. 中国医药学报,2002(3):152-154.

[7] 薛汉荣,洪广祥,程光宇,等. 益气温阳护卫汤对缓解期哮喘患者气道反应性的影响及作用机理研究. [J] 中国医药学报,2004,19(8):477-479.

[8] Barnes PJ, Adcock IM. Transcription factors and asthma [J]. Eur Respir J, Jul 1998, 12:221-234.

[9] Jacobson N G, Szabo S J, Weber Wordt R M et al. Interlukin 12 signaling in T helper type1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription STAT3 and STAT4. J Exp Med ,1995,181 :1755.

[10] James E , Darnell Jr. STATs and gene regulation. Science , 1997, 277 :1630.

[11] Xiang Xu , Ya Lin Sun , Timothy Hoey. Cooperatine DNA binding and sequence selectine recognition conferind by the STAT amino - termal domain. Science , 1996,273 :794.

[12] Gately MK, Renzetti LM, Margram J, et al. The IL-12/IL-12R system: role in nomal and pathologic immune responses [J]. Annu Rev Immunol, 1998, 16:495.