

平喘固本膏方对COPD稳定期大鼠模型树突状细胞及T淋巴细胞的影响[※]

● 彭草云¹ 阮月芳² 叶甫澄¹ 张 峰¹

摘 要 目的:研究平喘固本膏方对COPD稳定期大鼠模型树突状细胞及T淋巴细胞的影响。方法:采用烟熏结合气管内注入脂多糖的方法制作大鼠COPD稳定期模型,并用平喘固本膏方对其进行干预,疗程为1个月,氨茶碱组采用氨茶碱片灌胃,治疗后检测IL-10、IL-12、CD4+T、CD8+T,同时取大鼠肺组织计数大鼠肺实质的DCs数量。结果:高剂量组在降低IL-12及CD8+T方面优于氨茶碱($P<0.05$),而在升高IL-10、降低CD4+T及CD4+T/CD8+T方面高中低各剂量组与氨茶碱组比较无显著差异($P>0.05$)。COPD大鼠模型DC表面分子标记物CD80及CD86明显升高($P<0.05$),膏方各组均能降低CD80及CD86的表达,在降低CD80的表达上,高剂量组与氨茶碱组比较有显著差异($P<0.05$),但中剂量组及低剂量组与氨茶碱比较无显著差异($P>0.05$);在降低CD86的表达上,高剂量组及中剂量组与氨茶碱比较均有显著差异($P<0.05$),而低剂量组与氨茶碱比较无显著差异($P>0.05$)。结论:COPD大鼠模型DC表面分子标记物CD80及CD86呈高表达,平喘固本汤膏方可降低IL-2、CD8+T以及CD80、CD86的表达,值得进一步研究。

关键词 平喘固本膏方;COPD;模型;树突状细胞

近年来树突状细胞(dendritic cells, DCs)在慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的发病中所起的作用逐渐受到重视,认为其在COPD的发病中充当“前哨”的作用,当DCs获取外来抗原后,将其递呈给T淋巴细胞主要是CD8+T细胞,进而发挥免疫效应,促使COPD的发病^[1]。平喘固本汤系治疗肺胀肺肾气虚证的名方,该方具有补肺纳肾、降气化痰之功。笔者前期的研究表明平喘固本膏方对改善COPD稳定期患者的咳嗽气喘症状有一定疗效^[2],并可降低COPD大鼠血清白介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-8和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis

factors, TNF- α)水平^[3]。为进一步研究平喘固本膏治疗COPD的作用机理,笔者又将其对COPD稳定期大鼠模型树突状细胞及T淋巴细胞的影响进行了研究,报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SD大鼠60只,雄性,体重 200 ± 20 g。由嘉兴医学院动物房提供。

1.1.2 实验药物 平喘固本膏方:党参300g,五味子120g,胡桃肉240g,灵磁石360g,苏子300g,款冬花240g,法半夏240g,橘红120g。上药加适量水浸泡24小时,后煎煮取汁、过滤共3次,将3次煎液混合后浓缩至2 000 mL左右,加入细研成粉的坎脐粉、沉香粉各300g,最后加入蜂蜜250g炼制收膏,每毫升膏剂约含生药1.26g。膏方由嘉兴市中医院制剂室制作。氨

※基金项目 浙江省中医药管理局计划项目(No.2015ZB115)

• 作者单位 1. 嘉兴市中医院(浙江 嘉兴 314001); 2. 嘉兴市第一医院(浙江 嘉兴 314000)

茶碱片:天津力生制药股份有限公司(国药准字H12020118)。脂多糖,购自Sigma公司。

1.1.3 主要试剂与仪器 抗大鼠白细胞分化抗原分化群80(cluster of differentiation 80, CD80)单克隆抗体(ab62636)及抗大鼠CD86单克隆抗体(ab119857)由艾博抗(上海)贸易有限公司提供,大鼠IL-10(EK-R30159)及大鼠IL-12(EK-R30163)由上海酶研生物科技有限公司提供,CD4抗体(11-0040-81)、CD8抗体(12-0084-82)由Thermo Fisher Scientific提供。全自动流式细胞分析仪(美国Becton Dickinson公司,BD FACSVerse),酶标仪(DENLEY DRAGON Wellscan MK 3)购自芬兰Thermo公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与造模 随机分为6组:COPD稳定期模型组、高、中、低剂量膏方治疗组、氨茶碱组和空白组。除空白组外,均建立COPD稳定期模型,按宋一平等^[4]的方法建立,即第1、14天气管内注入脂多糖200 μ g/200 μ l,第2~28天在容积为84 L的密闭箱内熏雄狮牌香烟,0.5 h/每日上午。

1.2.2 给药方法 造模成功后每日1次灌胃给药,连续给药30天。给药剂量根据大鼠体重按成人一日剂量折算[按公式大鼠等效剂量(mg/kg)=折算系数 $\times$ 成人剂量(mg/kg)]计算出大鼠等效剂量^[5],以等效剂量为中剂量即1.512g/(200g $\cdot$ d)。高剂量组以6.048g/(200g $\cdot$ d)灌胃,中剂量组以1.512g/(200g $\cdot$ d)灌胃,低剂量组以0.378g/(200g $\cdot$ d)灌胃。氨茶碱组用氨茶碱片以7.2mg/(200g $\cdot$ d)灌胃,模型组灌以生理盐水。

1.2.3 取材和指标测定 实验结束后颈动脉取血制备血清,IL-10和IL-12检测采用双抗体夹心ABC-ELISA法,CD4+T、CD8+T采用流式细胞仪检测。

1.3 计算机图像分析 以胞膜、胞质或胞核染成棕黄色或黄色的细胞为阳性细胞。对比右下肺HE及免疫组化染色图片,确定大鼠肺实质的DCs数量。每张切片随机取5个高倍视野,使用IPP6.0软件计算阳性细胞数以及总细胞数,阳性率=阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$,取平均值作为该切片的阳性细胞率。

1.4 统计学方法 应用SPSS 17.0统计分析软件处理,计量资料采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。本实验各组数据方差齐性检验 P 值均大于0.05,采用单因素方差分析,即One-Way ANOVA,以LSD分析方法进行两两比较。

2 结果

2.1 各组大鼠血清IL-10、IL-12、CD4+T、CD8+T、CD4+T/CD8+T检测 结果显示,高剂量组在降低IL-2及CD8+T方面优于氨茶碱($P < 0.05$),而高中低各剂量组及氨茶碱组在降低IL-10、CD4+T及CD4+T/CD8+T方面无明显差异($P > 0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠IL-10、IL-12、CD4+T、CD8+T、CD4+T/CD8+T结果($\bar{x} \pm s$)

项目	模型组(6例)	高剂量组(5例)	中剂量组(8例)	低剂量组(8例)	氨茶碱组(9例)	空白组(6例)
IL-10(pg/ml) [#]	27.49 $\pm$ 10.60	50.44 $\pm$ 7.46	46.60 $\pm$ 3.51	40.33 $\pm$ 7.21	41.08 $\pm$ 12.99	59.47 $\pm$ 10.32
IL-12(pg/ml) [#]	22.06 $\pm$ 3.50	13.70 $\pm$ 1.44 [△]	19.41 $\pm$ 2.54	17.29 $\pm$ 2.48	19.53 $\pm$ 3.96	12.87 $\pm$ 3.16
CD4(%) [#]	42.45 $\pm$ 5.10	35.43 $\pm$ 3.88	38.12 $\pm$ 3.23	37.81 $\pm$ 5.10	36.74 $\pm$ 8.21	34.49 $\pm$ 3.48
CD8(%) [#]	33.09 $\pm$ 4.21	21.39 $\pm$ 2.58 [△]	24.04 $\pm$ 3.20	25.87 $\pm$ 4.28	28.98 $\pm$ 4.70	22.79 $\pm$ 4.69
CD4/CD8 [#]	1.29 $\pm$ 0.14	1.68 $\pm$ 0.29	1.62 $\pm$ 0.33	1.52 $\pm$ 0.43	1.27 $\pm$ 0.21	1.60 $\pm$ 0.52

注:[#]各组的总体比较:CD4各组比较 $F=1.596$, $P=0.186$,CD4/CD8[#]各组比较 $F=1.829$, $P=0.132$,其余指标各组比较 P 值均为0.000;[△]高剂量组与氨茶碱组比较:IL-12两组比较 $P=0.027$,CD8两组比较 $P=0.0275$,余指标比较 P 值均大于0.05

2.2 大鼠DC表面分子标记物表达检测 结果显示,膏方各组均能降低COPD大鼠DC表面分子标记物CD80及CD86的表达,在降低CD80的表达上,高剂量组与氨茶碱组比较有显著差异($P < 0.05$),但中剂量组及低剂量组与氨茶碱比较无显著差异($P > 0.05$);在降低CD86的表达上,高剂量组及中剂量组与氨茶碱比较均有显著差异($P < 0.05$),而低剂量组与氨茶碱比较无显著差异($P > 0.05$)。见表2。

3 讨论

DCs广泛分布于肺内各级气道、血管、实质、肺泡腔以及脏层胸膜,它是目前已知的唯一可以激活初始T细胞的抗原提呈细胞,其对T细胞免疫应答和免疫耐受均具有调节作用^[6]。DCs可表达多种辅助分子,其中CD80和CD86是初始CD4+T淋巴细胞的激活所需的最重要的共刺激分子,CD80能够诱导辅助性T细胞(helper T cell, Th)细胞分化为Th1细胞,而CD86能够诱导Th细胞分化为Th2细胞^[7-8]。活化的树突状细

表 2 各组大鼠 DC 表面分子标记物表达阳性率($\bar{x} \pm s, \%$)

项目	模型组(6例)	高剂量组(5例)	中剂量组(8例)	低剂量组(8例)	氨茶碱组(9例)	空白组(6例)
CD80 [#]	19.46±4.17	11.27±2.22 [△]	13.78±3.21 [*]	13.64±2.94 [*]	15.97±3.49	9.16±1.81
CD86 [#]	10.92±2.18	7.54±1.71 [△]	8.69±2.31 [*]	9.43±1.90 [*]	10.82±2.46	5.85±1.05

注: [#]各组的总体比较; CD80[#]与 CD86[#]总体比较 P 值均为 0.000; [△]高剂量组与氨茶碱组比较: CD80 两组比较 $P=0.011$, CD86 两组比较 $P=0.007$; ^{*}中剂量组与氨茶碱组比较: CD80 两组比较 $P=0.159$, CD86 两组比较 $P=0.039$; ^{*}低剂量组与氨茶碱组比较: CD80 两组比较 $P=0.134$, CD86 两组比较 $P=0.173$

胞通过释放 IL-12 和表达协同共刺激因子,使局部固有的 CD8+T 细胞活化,从而产生诱发和维持局部免疫炎症反应^[9]。

T 淋巴细胞尤其是 CD8+T 在 COPD 的发生过程中扮演着重要的角色。研究证实,不论在 COPD 急性加重期还是在稳定期,CD4+T 和 CD8+T 均明显升高。CD4+T 细胞中的 Th1 通过分泌 IL-2 和 γ 干扰素(interferon- γ , INF- γ)等细胞因子,诱导产生基质金属蛋白酶-12(matrix metalloproteinase-12, MMP-12)和 MMP-9,从而导致弹性蛋白水解和肺气肿形成,Th17 细胞也可通过分泌 IL-17 等炎性细胞因子导致肺气肿形成^[10]。CD8+T 通过分泌 IFN- γ 和 TNF- α 对感染和改变的宿主细胞起到溶解的作用,从而在 COPD 的发生发展中起重要作用^[11]。本研究显示,模型组 CD4+T 和 CD8+T 均较空白组升高,但 CD8+T 升高更为明显,差异有统计学意义。高剂量膏方在降低 CD8+T 方面优于氨茶碱,但中剂量膏方和低剂量膏方则与氨茶碱比较无明显差异。

然而,T 细胞要发挥作用,需要树突状细胞的辅助。研究证实,长期烟雾暴露后,不仅巨噬细胞、中性粒细胞和 CD8+T 细胞等炎性细胞增多,肺部 DCs 数量及亚群功能也会发生变化,从而导致免疫功能失调^[12]。大多数研究认为,在 COPD 患者和动物模型中 DCs 的数量增多^[13-14],并且在 COPD 患者中 DCs 表面 CD80 和 CD86 的表达水平明显升高,而白藜芦醇等药物可有效地抑制 COPD 中 CD80 和 CD86 等共刺激分子的激活^[15]。

既往的研究表明,平喘固本汤膏方在改善 COPD 稳定期患者的咳嗽气喘症状及降低 COPD 大鼠血清 IL-6、IL-8、TNF- α 水平等方面有一定作用^[2-3]。其对 DCs 的作用如何尚不清楚,而中药是否也能通过调节 DCs 从而达到治疗 COPD 的效果尚未见报道。本研究结果证实,经烟熏及气管内注射脂多糖处理后的大鼠肺组织中 CD80 和 CD86 水平显著升高($P>0.05$)。在降低 CD80 方面,平喘固本膏方高剂量组优于氨茶碱

组,但中剂量组及低剂量组与氨茶碱组比较无显著差异。在降低 CD86 方面,高剂量组及中剂量组优于氨茶碱组,但低剂量组与之比较无显著差异,显示平喘固本膏方在调节 DCs 细胞方面呈剂量依赖性。

IL-10 是一种抑制性细胞因子,能够抑制 IL-1、IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等多种细胞因子的合成及活性。IL-10 降低及其调控分泌的促炎症细胞因子的增加可能是气道持续炎症并导致气道重塑、气流受限、肺组织破坏及肺气肿等病理过程的重要机制^[16]。IL-12 作为巨噬细胞分泌的炎性因子,它不仅可独立作用于 NK 细胞和细胞毒 T 细胞,介导细胞毒性炎性反应,在 COPD 的发生发展中起到重要的作用。本研究表明,模型组 IL-10 明显低于其余各组,而模型组 IL-12 则明显升高。与氨茶碱组比较,高剂量膏方能更好地降低 IL-12,但在升高 IL-10 方面,膏方各剂量组与氨茶碱比较均无明显差异。

因此,笔者初步的研究结果证明,高剂量平喘固本汤膏方在降低 IL-12、CD8+T 及 CD80 和 CD86 等方面有一定作用,推测平喘固本汤膏方除通过调节 IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α 等炎症介质起到治疗 COPD 的作用外,还可能与调节 T 淋巴细胞及 DCs 有关,值得深入研究。COPD 稳定期的药物治疗以吸入剂为基础,但茶碱缓释片口服仍具有改善肺功能、提高生活质量的作用^[17],因此,我国 2013 年 COPD 诊治指南将茶碱作为吸入剂的替代方案之一^[18]。由于实验研究的限制,笔者采用了氨茶碱片而非茶碱缓释片作为对照药物,可能对研究结果存在一定的影响,今后需进一步改进研究方案。

参考文献

- [1] Geert R VP, Ken RB, Guy FJ, et al. The role of dendritic cells in the pathogenesis of COPD: liaison officers in the front line[J]. COPD, 2009, 6(4):284-290.

(下转第 10 页)