

傅榕冰,魏义杰,虎春艳,等. 五宝胶囊对哮喘小鼠肺泡灌洗液中 Th1/Th2、Th17/Treg 失衡及趋化因子的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 1-7.

Fu RB, Wei YJ, Hu CY, et al. Effects of Wubao capsule on imbalance of Th1/Th2, Th17/Treg, and chemokines in alveolar lavage fluid of asthmatic mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 1-7.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.03.001

五宝胶囊对哮喘小鼠肺泡灌洗液中 Th1/Th2、Th17/Treg 失衡及趋化因子的影响

傅榕冰¹, 魏义杰², 虎春艳¹, 伍林泽¹, 童晓云³, 张雅琼¹, 黄 丰^{1*}

(1. 云南中医药大学, 昆明 650500; 2. 腾冲市中医医院, 云南 腾冲 679100; 3. 云南中医药大学第一附属医院, 昆明 650021)

【摘要】 目的 观察民族药五宝胶囊对卵清白蛋白 (ovalbumin, OVA) 所致的哮喘小鼠肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluids, BALF) 中 Th1/Th2、Th17/Treg 失衡及趋化因子 Eotaxin、IL-8、MCP-1 的影响。**方法** BALB/c 小鼠随机分为 5 组 (正常组、模型组、地塞米松组、五宝胶囊低、高剂量组), 采用 OVA 致敏和激发的方法复制哮喘模型。HE、PAS 染色观察小鼠肺组织病理学变化, 快速瑞氏-吉姆萨染色法观察 BALF 中各类炎症细胞数目, ELISA 测定小鼠 BALF 中 IFN- γ 、IL-4、IL-17A、IL-10、Eotaxin、IL-8、MCP-1 的含量。**结果** 五宝胶囊能够显著减轻哮喘小鼠肺组织炎症浸润和黏液的分泌, 降低各类炎症细胞数目及 BALF 中 IL-4、IL-17A、Eotaxin、IL-8、MCP-1 的生成 ($P<0.01$, $P<0.05$), 并能明显升高 IFN- γ 、IL-10 的含量 ($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论** 五宝胶囊可能通过调节 BALF 中 Th1/Th2、Th17/Treg 相关细胞因子平衡及抑制趋化因子 Eotaxin、IL-8、MCP-1 的生成来发挥防治哮喘的作用。

【关键词】 哮喘; 五宝胶囊; OVA; Th1/Th2; Th17/Treg; 趋化因子; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 03-0001-07

Effects of Wubao capsule on imbalance of Th1/Th2, Th17/Treg, and chemokines in alveolar lavage fluid of asthmatic mice

FU Rongbing¹, WEI Yijie², HU Chunyan¹, WU Linze¹, TONG Xiaoyun³, ZHANG Yaqiong¹, HUANG Feng^{1*}

(1. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China. 2. Tengchong Hospital of Chinese Medicine, Tengchong, 679100. 3. The First Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650021)

【Abstract】 Objective To observe the effect of the folk medicine Wubao capsule on the imbalance of Th1/Th2, Th17/Treg, and chemokines (Eotaxin, IL-8, MCP-1) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of asthmatic mice induced by ovalbumin (OVA). **Methods** BALB/c mice were randomly divided into five groups (Control group, Model group, Dexamethasone group, Wubao capsule low-dose group, Wubao capsule high-dose group). The asthma model was replicated by OVA sensitization and challenge. The pathological changes of lung tissue were observed by HE and PAS staining. The number of inflammatory cells in BALF was observed by rapid Wright-Giemsa staining. The levels of IFN- γ , IL-4, IL-17A, IL-10, Eotaxin, IL-8, and MCP-1 in BALF were determined by ELISA. **Results** Wubao capsule can significantly alleviate

[基金项目] 国家自然科学基金(81560681;81073129); 云南省科学技术厅-云南中医药应用基础研究联合专项资金面上项目(2019FF002(029)); 云南中医学院中医治未病理论应用研究省创新团队(2017HC011)。

[作者简介] 傅榕冰(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理研究与应用。E-mail: 15087112997@163.com

[通信作者] 黄丰(1971—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药免疫药理研究。E-mail: 14030@ynutcm.edu.cn

inflammatory infiltration and mucus secretion in lung tissue of asthmatic mice, reduce the number of various inflammatory cells and the production of IL-4, IL-17A, Eotaxin, IL-8, and MCP-1 in BALF ($P<0.01$, $P<0.05$), and significantly increase the levels of IFN- γ and IL-10 ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusions** Wubao capsule may play a role in preventing and treating asthma by regulating the balance of Th1/Th2 and Th17/Treg-related cytokines and inhibiting the production of the chemokines Eotaxin, IL-8, and MCP-1 in BALF.

[Keywords] asthma; Wubao capsule; OVA; Th1/Th2; Th17/Treg; chemokine; mouse

支气管哮喘(简称“哮喘”)是一种严重危害人类健康的慢性气道炎症,炎性细胞是其发病机制之一。其中,嗜酸性粒细胞和中性粒细胞在哮喘的发病过程中发挥了重要的作用^[1-2]。以往认为,辅助性 T 淋巴细胞 1 (T helper1, Th1) 和辅助性 T 淋巴细胞 2 (T helper2, Th2) 失衡导致 Th2 细胞优势是介导嗜酸性粒细胞在哮喘发病过程中发挥作用的主要免疫学机制,但随着现代研究深入,发现在嗜酸性粒细胞参与哮喘发病的同时,中性粒细胞在哮喘发病过程中也扮演了重要的角色^[3-5]。辅助性 T 淋巴细胞 17 (T helper17, Th17) 和调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 失衡则是介导中性粒细胞募集至肺中,参与气道炎症的重要机制^[6]。目前糖皮质激素被认为是治疗哮喘最有效的抗炎药物之一,但长期服用糖皮质激素给人体带来较大副作用,一定程度地影响了其在临床上的应用。近年来,民族药在防治哮喘方面取得了一定进展。傣药五宝胶囊(雅叫哈顿),也叫五宝散,为傣医的经典药方,具有清热解毒、除风止痛、咳嗽咳痰的功效,临床上多用于咽喉肿痛、咳嗽咯血等呼吸道疾病,研究表明其具有抗炎等作用^[7-10],我们前期的动物实验发现五宝胶囊有拮抗哮喘的作用,为了更好的阐释其作用机制,本研究采用 OVA 复制哮喘小鼠模型,观察五宝胶囊对哮喘小鼠 BALF 中 Th1/Th2、Th17/Treg 失衡的特异性细胞因子及趋化因子的调节作用,探讨五宝胶囊发挥防治哮喘的可能机制,为五宝胶囊在哮喘的应用中提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,体重为 18~22 g,共 40 只,购于辽宁长生生物技术股份有限公司 [SCXK(辽)2015-0001]。小鼠饲养于云南中医药大学实验动物中心屏障环境中 [SYXK(滇)K2017-005],温度:22℃~24℃,湿度:45%~55%。本实验经云南中医药大学实验动物伦理审查委员会审查,符合国家实验动物福利相关规定,伦理审批编号:R

-06201910。本实验过程严格按照《实验动物管理与使用指南》进行,所有实验严格遵守实验动物使用的“3R 原则”,并给予动物人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

五宝胶囊,云南西双版纳药业有限公司,批号:170703;地塞米松(批号:D1756)与卵清蛋白(批号:SLBH7924 V),美国 Sigma 公司;纳米级 Al(OH)₃ 粉末,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:38701;快速快速瑞氏-吉姆萨染液,南京建成科技有限公司,批号:D010;Eotaxin(批号:2213080441)、MCP-1(批号:A28780431)、IFN- γ (批号:A28081244)、IL-4(批号:A20480141)、IL-17A(批号:A21780741)、IL-10(批号:A21080946) ELISA 检测试剂盒均购于杭州联科生物技术股份有限公司;IL-8(批号:M181106-104a) ELISA 检测试剂盒购于深圳欣博盛生物科技有限公司。

超声雾化仪,德国百瑞公司,型号:INQUA NEB plus;分析天平,上海奥豪斯仪器有限公司,型号:AR224CN;多功能酶标仪,美国美谷分子,型号:spectraMax plus384;离心机,德国海蒂斯公司,型号:1706;超低温冰箱,美国赛默飞世尔科技有限公司,型号:8920。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

40 只健康的雌性 BALB/c 小鼠适应性喂养一周后,随机分为 5 组,分别为:正常组(Control)、模型组(Model)、地塞米松组(Dex)、五宝胶囊低剂量组(WBJN-L)、五宝胶囊高剂量组(WBJN-H),每组 8 只。

1.3.2 动物造模与给药

除正常组外,其余各组于实验第 1、8、15 天腹腔注射 0.2 mL 含 Al(OH)₃ 的 OVA 致敏液(OVA:1 mg/mL;Al(OH)₃:5 mg/mL),正常组则以 0.2 mL 生理盐水代替。于实验第 21 天起,正常组与模型组均给予生理盐水灌胃,剂量为 10 mL/kg;地塞米松组给予地塞米松溶液灌胃给药,剂量为 1 mg/kg;五宝胶囊高、低剂量组分别给予相应浓度的五宝胶囊

溶液灌胃给药,剂量分别为 1 g/kg 和 0.5 g/kg。灌胃 1 h 后,将小鼠置于雾化器内雾化激发,正常组以生理盐水雾化,其余各组以 2% OVA 激发液雾化,每天 1 次,每次 30 min,持续 7 d。

1.3.3 小鼠行为学的观察

将小鼠雾化后出现点头、舔足、呛咳、抓耳挠腮、俯卧少动、腹部节律性收缩等呼吸困难症状作为初步判断模型成功的标准。雾化激发后 3 d,小鼠在前 15 min 首次出现腹肌节律性收缩的时间称为引喘潜伏期,统计时间为“s”,记录每组每只小鼠 3 d 引喘潜伏期的平均值。

1.3.4 ELISA 法检测哮喘小鼠 BALF 中 IFN- γ 、IL-4、IL-17A、IL-10、Eotaxin、IL-8、MCP-1 的含量

实验小鼠最后一次雾化激发 24 h 后,以 0.01 mL/g 腹腔注射 1% 的戊巴比妥钠麻醉小鼠,用 75% 酒精消毒小鼠胸腹腔,暴露胸腔,行气管插管术,用血管夹夹闭右肺,以每次 0.3 mL 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)灌洗左肺 2 次,每次均反复抽吸 3 遍,最后合并 2 次所得的灌洗液。将所得的 BALF 于 1000 r/min, 4℃ 离心 15 min,取上清液严格按照 ELISA 检测试剂盒说明书的操作进行相关细胞因子的检测,绘制标准曲线,联合吸光度求出各个细胞因子的含量。下层细胞沉淀(200 μ L PBS)重悬成细胞悬液用于各类白细胞的计数。

1.3.5 快速瑞氏-吉姆萨染色法检测哮喘小鼠 BALF 中的白细胞数目

用细胞计数板在显微镜下计数 10 μ L BALF 下层细胞悬液的细胞数,计算出细胞悬液中的细胞总数,再取 20 μ L 细胞悬液于玻片上制成细胞涂片,按照快速瑞氏-吉姆萨染色说明书的操作进行单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞数量的计数,所得的比例乘以细胞总数即为各类细胞的数目。

1.3.6 HE 和 PAS 染色检测哮喘小鼠肺组织病理学

取小鼠右肺中叶组织,用 PBS 冲洗,并用滤纸吸干,置于 4% 多聚甲醛固定液中固定 24 h 后,用石蜡包埋,进行 HE 染色观察小鼠肺组织气管增厚和炎性浸润情况;PAS 染色观察小鼠气管周围黏液分泌情况。

1.4 统计学方法

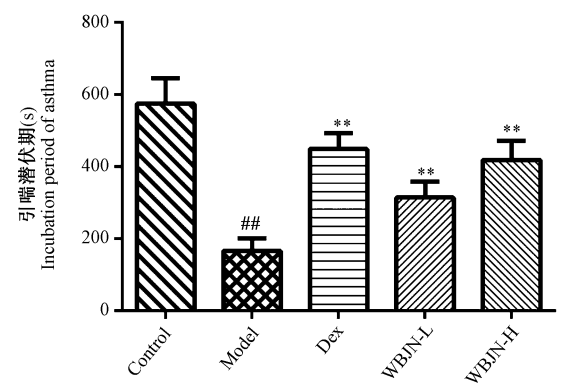
本文数据符合正态分布,采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 软件统计分析处理数

据,多组间的比较采用单因素方差分析,组间的比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组小鼠雾化后行为学观察

各组小鼠雾化激发前,状态均良好。雾化激发后,模型组小鼠出现点头、舔足、抓腮、呼吸急促、毛发杂乱无光泽、活动量减少等现象;正常组小鼠则无上述表现;地塞米松及五宝胶囊药物组上述现象均减轻。小鼠引喘潜伏期结果显示,给予 OVA 雾化激发后,模型组引喘潜伏期明显比正常组短($P < 0.01$),地塞米松及五宝胶囊低、高剂量组均较模型组长($P < 0.01$)(见图 1)。



注: Control: 正常组; Model: 模型组; Dex: 地塞米松组; WBJN-L: 五宝胶囊低剂量组; WBJN-H: 五宝胶囊高剂量组。与正常组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 五宝胶囊对哮喘小鼠引喘潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Note. Control, Control group. Model, Model group. Dex, Dexamethasone group. WBJN-L, Wubao capsule low-dose group. WBJN-H, Wubao capsule high-dose group. Compared with Control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with Model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Effect of Wubao capsule on asthma incubation period in asthmatic mice

2.2 各组小鼠肺组织气管增厚和炎性浸润的比较

小鼠肺组织 HE 染色图显示,正常组小鼠气道上皮较完整,气道与肺泡之间炎性细胞较少;模型组小鼠气道壁增厚严重,气道与肺泡周围受到炎性细胞浸润;经地塞米松及五宝胶囊低、高剂量干预后,小鼠肺组织气道壁增厚情况不同程度减轻,气道与肺泡周围炎性细胞均不同程度地减少(见图 2)。

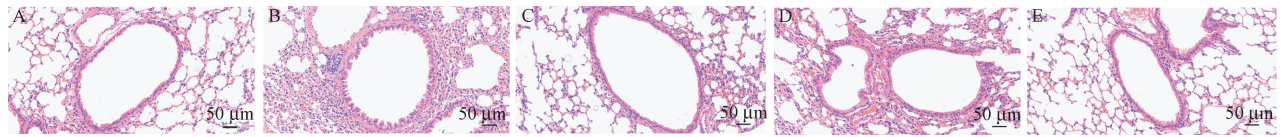
2.3 各组小鼠肺组织黏液增生情况的比较

小鼠肺组织 PAS 染色图片显示,正常组小鼠气管周围无黏液分泌,与正常组相比,模型组小鼠气管周围黏液阳性表达明显(图中紫红色区域),经地塞米松及五宝胶囊高、低剂量干预后,哮喘小鼠的黏液分泌情况明显减轻(见图 3)。

2.4 各组小鼠 BALF 中各类白细胞数目的比较

各组小鼠 BALF 中各类白细胞计数结果显示,模型组与正常组相比,BALF 中白细胞总数、单核细

胞数、淋巴细胞数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞数均显著增多,具有统计学意义($P<0.01$);给予地塞米松及五宝胶囊干预后,地塞米松组及五宝胶囊高剂量组与模型组相比,小鼠 BALF 中白细胞总数、单核细胞数、淋巴细胞数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞数均不同程度降低,其中地塞米松组均明显降低($P<0.01,P<0.05$);五宝胶囊低剂量组与模型组相比,淋巴细胞数、中性粒细胞数、嗜酸性粒细胞数均不同程度降低($P<0.01,P<0.05$)(见图 4)。

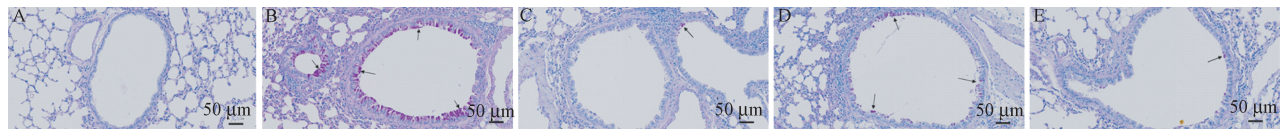


注:A:正常组;B:模型组;C:地塞米松组;D:五宝胶囊低剂量组;E:五宝胶囊高剂量组。

图2 五宝胶囊对哮喘小鼠肺组织气管增厚和炎性浸润的影响(HE染色)

Note. A, Control group. B, Model group. C, Dexamethasone group. D, Wubao capsule low-dose group. E, Wubao capsule high-dose group.

Figure 2 Effect of Wubao capsule on tracheal thickness and inflammatory infiltration in lung tissue of asthmatic mice. HE staining



注:A:正常组;B:模型组;C:地塞米松组;D:五宝胶囊低剂量组;E:五宝胶囊高剂量组。

图3 五宝胶囊对哮喘小鼠肺组织黏液分泌的影响(PAS染色)

Note. A, Control group. B, Model group. C, Dexamethasone group. D, Wubao capsule low-dose group. E, Wubao capsule high-dose group.

Figure 3 Effect of Wubao capsule on mucus secretion in lung tissue of asthmatic mice. PAS staining

2.5 各组小鼠 BALF 中 IFN-γ 与 IL-4 的比较

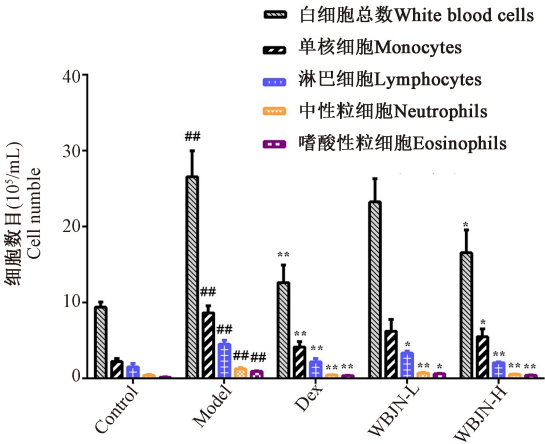
各组小鼠 BALF 中 IFN-γ 与 IL-4 的结果显示,模型组与正常组相比,小鼠 BALF 中 IFN-γ 显著降低($P<0.01$),IL-4 显著升高($P<0.01$);经地塞米松及五宝胶囊干预后,IFN-γ 均明显升高($P<0.01$),IL-4 均明显降低($P<0.01$)(见图 5)。

2.6 各组小鼠 BALF 中 IL-17A 与 IL-10 的比较

各组小鼠 BALF 中 IL-17A 与 IL-10 的结果显示,与正常组相比,模型组小鼠 BALF 中 IL-17A 显著升高($P<0.01$),IL-10 明显降低($P<0.05$);经地塞米松及五宝胶囊干预后,IL-17A 均不同程度降低($P<0.01,P<0.05$),IL-10 均升高($P<0.05$)(见图 6)。

2.7 各组小鼠 BALF 中趋化因子的比较

各组小鼠 BALF 中趋化因子的结果显示,与正常组相比,模型组小鼠 BALF 中 Eotaxin, IL-8, MCP-1 均显著升高,具有统计学意义($P<0.01$);经地塞米松及五宝胶囊高、低剂量干预后,与模型组相比,小鼠 BALF 中各个趋化因子均不同程度降低($P<0.01,P<0.05$)(见图 7)。

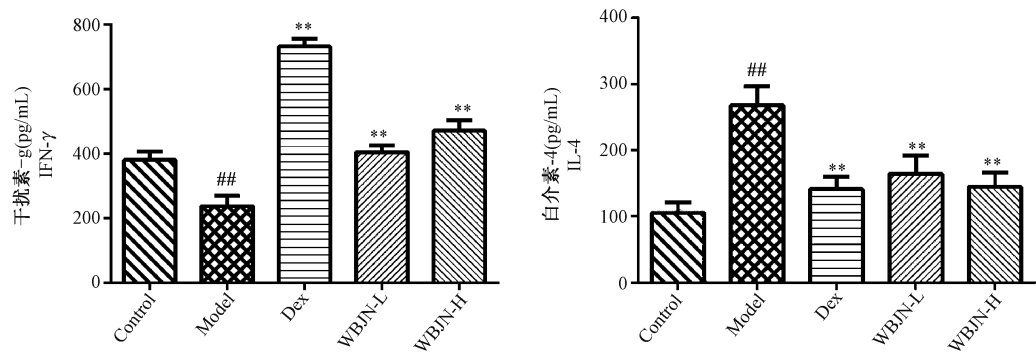


注:Control:正常组;Model:模型组;Dex:地塞米松组;WBJN-L:五宝胶囊低剂量组;WBJN-H:五宝胶囊高剂量组。与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.01$ 。

图4 五宝胶囊对哮喘小鼠 BALF 中白细胞数目的影响($\bar{x}\pm s,n=8$)

Note. Control, Control group. Model, Model group. Dex, Dexamethasone group. WBJN-L, Wubao capsule low-dose group. WBJN-H, Wubao capsule high-dose group. Compared with Control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with Model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 4 Effect of Wubao capsule on the number of white blood cells in BALF of asthmatic mice

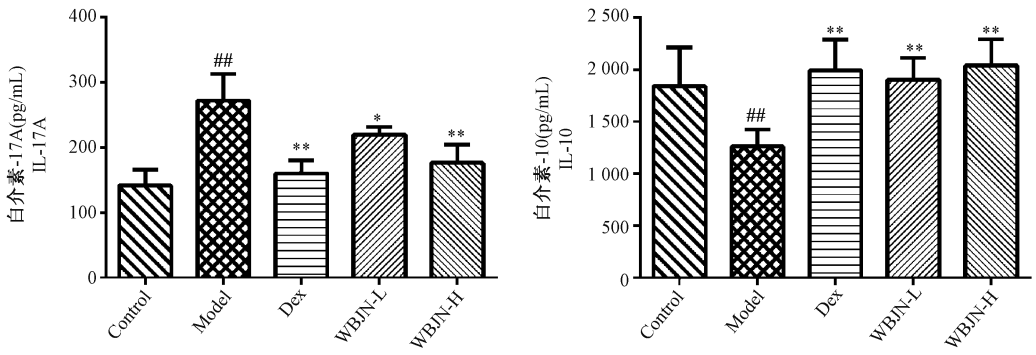


注:Control:正常组;Model:模型组;Dex:地塞米松组;WBJN-L:五宝胶囊低剂量组;WBJN-H:五宝胶囊高剂量组。与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

图 5 五宝胶囊对哮喘小鼠 Th1/Th2 失衡的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Note. Control, Control group. Model, Model group. Dex, Dexamethasone group. WBJN-L, Wubao capsule low-dose group. WBJN-H, Wubao capsule high-dose group. Compared with Control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$. Compared with Model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

Figure 5 Effect of Wubao capsule on Th1/Th2 imbalance in asthmatic mice



注:Control:正常组;Model:模型组;Dex:地塞米松组;WBJN-L:五宝胶囊低剂量组;WBJN-H:五宝胶囊高剂量组,与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

图 6 五宝胶囊对哮喘小鼠 Th17/Treg 失衡的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

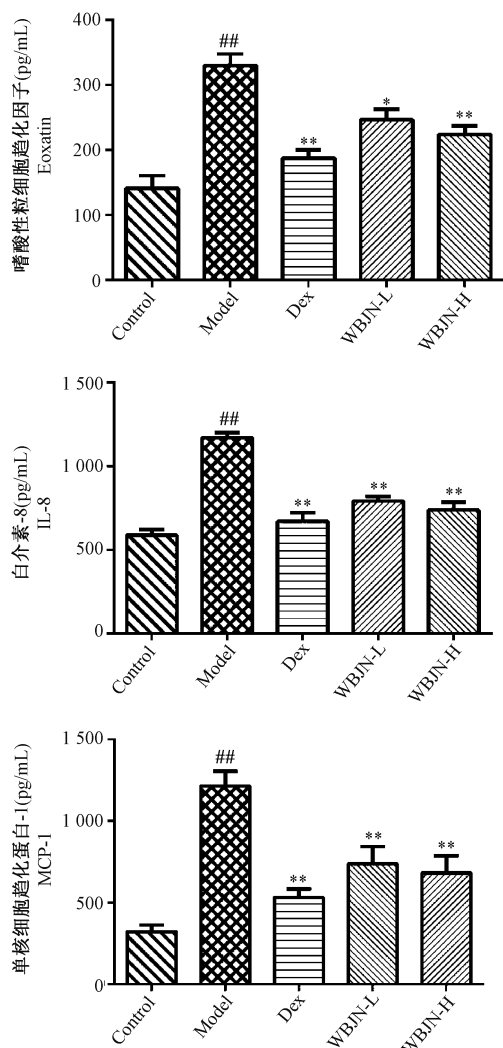
Note. Control, Control group. Model, Model group. Dex, Dexamethasone group. WBJN-L, Wubao capsule low-dose group. WBJN-H, Wubao capsule high-dose group. Compared with Control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$. Compared with Model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

Figure 6 Effect of Wubao Capsule on Th17/Treg imbalance in asthmatic mice

3 讨论

哮喘是由 Th1、Th2、Th17、Treg 等细胞介导的免疫反应。Th1 细胞主要介导细胞免疫,主要通过激活巨噬细胞来清除细胞内细菌及病原微生物来发挥作用^[11],其分泌的细胞因子主要有干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ)、白介素-2 (Interleukin-2, IL-2)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 等,其中 IFN- γ 是其产生的特异性细胞因子,在一定条件下,能够促进 Th1 细胞分化,其对 Th2 具有免疫负向调节的功能,是 Th2 细胞的负生长调节因子,可抑制 Th2 的分化及 IgE 的生成,从而减轻气道炎症^[12]。Th2 细胞是体液免疫应答中的一种重要的免疫细胞,在嗜酸性粒细胞为主的炎症中发挥重要的作用,对细胞外病原体微生物的清除具有一定的

影响,并参与变态反应。白介素-4 (Interleukin-4, IL-4) 是其分泌的特异性细胞因子,其与嗜酸性粒细胞的激活密切相关^[13]。在正常的机体中,IFN- γ 与 IL-4 相互拮抗,主要维持着 Th1 和 Th2 细胞功能的平衡^[14]。当机体受到变应原入侵时,Th2 细胞增多,Th1/Th2 比例失衡,Th2 优势应答,分泌大量 IL-4 等细胞因子,抑制 IFN- γ 的分泌,从而诱导 B 细胞分泌 IgE, IgE 与肥大细胞结合,引起肥大细胞脱颗粒,释放组胺、白三烯等炎症介质,进而使杯状细胞增生,杯状细胞分泌黏蛋白,导致气道粘液高分泌,气管增厚,气道收缩等,进而导致气道狭窄引发哮喘^[15-16]。另一方面 IL-4 的增多可以促进成纤维细胞分泌嗜酸性粒细胞趋化因子 (Eotaxin), Eotaxin 能够与嗜酸性粒细胞的趋化因子受体 3 (CC-chemokine receptor 3, CCR3) 特异性结合,使其向肺



注: Control: 正常组; Model: 模型组; Dex: 地塞米松组; WBJN-L: 五宝胶囊低剂量组; WBJN-H: 五宝胶囊高剂量组。与正常组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

图 7 五宝胶囊对哮喘小鼠 BALF 中对趋化因子 Eotaxin、IL-8、MCP-1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. Control, Control group. Model, Model group. Dex, Dexamethasone group. WBJN-L, Wubao capsule low-dose group. WBJN-H, Wubao capsule high-dose group. Compared with Control group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$. Compared with Model group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Figure 7 Effect of Wubao capsule on Chemokines Eotaxin, IL-8, MCP-1 in BALF of asthmatic mice

中募集、活化,促进其脱颗粒,释放炎性介质,从而导致气道炎症和气道高反应的发生^[17]。此外,在哮喘发病过程中,来源于 C-C 类趋化因子家族的单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 一方面能够诱导单核细胞的呼吸爆发和细胞因子的产生,介导单核细胞的迁移和粘附功能^[18];另一方面 MCP-1 的增多能够抑制 INF- γ 生

成来拮抗 Th1 型反应,通过促进抗原活化 T 细胞、IL-4 的生成来诱导 Th2 型反应,在哮喘过程中扮演了重要的角色^[19]。本研究结果显示,哮喘小鼠 IL-4 升高、INF- γ 明显降低,提示 Th1/Th2 细胞失衡,趋化因子 Eotaxin、MCP-1 升高,通过给予地塞米松和五宝胶囊高、低剂量干预后,IL-4、Eotaxin、MCP-1 比模型组低,而 INF- γ 较高,提示五宝胶囊能够改善哮喘小鼠 Th1/Th2 细胞平衡。

Th17 是一种特异性地高水平分泌白介素-17 A (Interleukin-17A, IL-17A) 并且能够清除细胞外细菌及微生物的免疫细胞^[20], IL-17A 是一种促炎因子,能够诱导气管成纤维细胞分泌白介素-8 (Interleukin-8, IL-8),在炎症过程中发挥重要作用^[21]。Treg 是一种 CD4⁺ 的 TH 细胞亚群,在维护机体的免疫平衡中发挥重要作用^[22],白介素-10 (Interleukin-10, IL-10) 是其分泌的特异性细胞因子,是一种多功能负性调节因子,具有很强的免疫调控作用,在 Treg 发挥免疫调控功能中,IL-10 作为一种重要介质参与其中。在一定程度上 IL-17A 与 IL-10 均能反应 Th17 与 Treg 的功能状态,被认为代表 Th17/Treg 平衡的指标^[23]。在正常机体中, Th17 与 Treg 能够相互制约保持平衡状态。当机体受到外界变应原刺激时, Th17/Treg 平衡被打破, IL-17A 分泌增多,抑制了 IL-10 的生成,同时 IL-8 的大量分泌, IL-8 为公认的中性粒细胞趋化因子,不仅促使中性粒细胞到达气道中,而且激活中性粒细胞脱颗粒,释放炎性介质,增加其与气道内皮细胞的粘附性,进一步加重气道炎症^[24]。在本研究中,哮喘小鼠的 IL-17A 和 IL-8 比正常小鼠的高,而 IL-10 则变低,说明哮喘小鼠 Th17/Treg 细胞失衡,给予地塞米松及五宝胶囊高、低剂量进行干预后, IL-17A、IL-8 下降, IL-10 回升,提示五宝胶囊能够调节 Th17/Treg 的平衡。

综上所述,五宝胶囊可以抑制趋化因子 Eotaxin、MCP-1、IL-8 的生成,调节 Th1/Th2 及 Th17/Treg 的平衡。在小鼠肺组织病理图片和杯状细胞增生图片中可知,五宝胶囊改善小鼠炎性细胞浸润和杯状细胞的增生,通过小鼠各类白细胞的计数发现,五宝胶囊降低嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的数量,提示我们五宝胶囊能够改善气道炎症,可能通过调节 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的平衡发挥防治哮喘的作用。哮喘是由多细胞参与的气道炎症,五宝胶囊在调节 Th1/Th2 及 Th17/Treg 平衡的同时是否对其他细胞具有作用,有待我们进行深入研究。

参考文献:

- [1] Du YM, Zhuansun YX, Chen R, et al. Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 363(1): 114-120.
- [2] Vieira Braga FA, Kar G, Berg M, et al. A cellular census of human lungs identifies novel cell states in health and in asthma [J]. *Nat Med*, 2019, 25(7): 1153-1163.
- [3] Rusznak M, Peebles RS Jr. Eosinophils express LTA4 hydrolase and synthesize LTB4: important for asthma pathogenesis? [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60(4): 375-376.
- [4] Fricker M, Gibson PG, Powell H, et al. A sputum 6-gene signature predicts future exacerbations of poorly controlled asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 144(1): 51-60.
- [5] Habibian R, Delirez N, Farshid AA. The effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on ovalbumin-induced allergic asthma and cytokine responses in mice [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(5): 483-488.
- [6] Ruan G, Tao B, Wang D, et al. Chinese herbal medicine formula Gu-Ben-Fang-Xiao-Tang attenuates airway inflammation by modulating Th17/Treg balance in an ovalbumin-induced murine asthma model [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(3): 1428-1434.
- [7] 罕华珍, 岩罕金, 康朗香. 康朗香老师应用雅叫哈顿(五宝药散)治疗疑难杂症经验介绍 [J]. *中国民族医药杂志*, 2010, 16(2): 9-10.
- [8] 闻杰, 田泽, 刘秀萍, 等. 雅叫哈顿散药效学研究 I [J]. *中成药*, 2007, 29(9): 1272-1274.
- [9] 明全忠, 赵远. 傣医名方雅叫哈顿抗菌抗病毒实验研究 [J]. *中国民族医药杂志*, 2000, 6(1): 36-37.
- [10] 玉罕阶, 苏洁, 黄勇. 傣药雅叫哈顿治疗感冒 45 例疗效观察 [J]. *中国民族医药杂志*, 2008, 14(10): 19-22.
- [11] Sharma N, Akkoyunlu M, Rabin RL. Macrophages-common culprit in obesity and asthma [J]. *Allergy*, 2018, 73(6): 1196-1205.
- [12] Lee SY, Bae CS, Seo JH, et al. Mycoleptodonoides aitichisonii suppresses asthma via Th2 and Th1 cell regulation in an ovalbumin-induced asthma mouse model [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 11-20.
- [13] Rogala B, Bozek A, Gluck J, et al. Prevalence of IgE-mediated allergy and evaluation of Th1/Th2 cytokine profiles in patients with severe bronchial asthma [J]. *Postepy Dermatol Alergol*, 2015, 32(4): 274-280.
- [14] 白晓红, 盛小丹, 刘芳, 等. 伏九贴膏对哮喘小鼠 NGF/TrKA 及相关炎性因子表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(6): 51-56, 111.
- [15] 高琴琴, 丁子桐, 李友林, 等. 不同剂量卵蛋白诱发 BALB/c 小鼠支气管哮喘模型的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4): 52-57.
- [16] Li Y, Wang H, Yang X. Effects of catalpol on bronchial asthma and its relationship with cytokines [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 8992-8998.
- [17] Wu YM, Xue ZW, Zhang LL, et al. Comparable function of γ -tocopherols in asthma remission by affecting Eotaxin and IL-4 [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2016, 25(4): 643-648.
- [18] Akata K, Yatera K, Wang KY, et al. Decreased bronchial eosinophilic inflammation and mucus hypersecretion in asthmatic mice lacking all nitric oxide synthase isoforms [J]. *Lung*, 2016, 194(1): 121-124.
- [19] Cho HY, Choi SJ, Lee SW, et al. Iopromide in combination with IFN- γ induces the activation of HMC-1 cells via IL-4 and MCP-1 expression [J]. *Cell Immunol*, 2015, 293(2): 95-103.
- [20] Liu W, Liu S, Verma M, et al. Mechanism of Th2/Th17-predominant and neutrophilic Th2/Th17-low subtypes of asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(5): 1548-1558.
- [21] Evans MD, Esnault S, Denlinger LC, et al. Sputum cell IL-1 receptor expression level is a marker of airway neutrophilia and airflow obstruction in asthmatic patients [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(2): 415-423.
- [22] Lu Y, Kared H, Tan SW, et al. Dynamics of helper CD4⁺ T cells during acute and stable allergic asthma [J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11(6): 1640-1652.
- [23] Tianzhu Z, Shihai Y, Juan D. The effects of cordycepin on ovalbumin-induced allergic inflammation by strengthening Treg response and suppressing Th17 responses in ovalbumin-sensitized mice [J]. *Inflammation*, 2015, 38(3): 1036-1043.
- [24] Dong M, Wang WQ, Chen J, et al. Acupuncture regulates the balance of CD4⁺ T cell subtypes in experimental asthma mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(8): 617-624.

[收稿日期] 2019-11-19