从调节性 T 细胞和 Th17 细胞变化探讨抗敏平喘方治疗哮喘机制

严展鹏[1]，张晓震[2, 3]，徐东宁[2, 3]，叶　娟[2, 3]，朱晓静[2, 3]，滕之颖[2, 3]，曹　鹏[2, 3*]

1. 南京师范大学生命科学学院，江苏 南京　210023
2. 江苏省中医药研究院，江苏 南京　210028
3. 中国中医科学院江苏分院，江苏 南京　210028

摘　要：目的　从调节性 T 细胞（Tregs）和 Th17 细胞亚群平衡方面来探讨抗敏平喘方治疗哮喘的机制。**方法**　将 6～8 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为 5 组：对照组、模型组、泼尼松（5.5 mg/kg）组、抗敏平喘方低和高剂量（4.95、9.90 g/kg）组；用卵清蛋白诱导小鼠哮喘模型，每天雾化后 ig 给药，连续 15 d，末次给药后处死小鼠，通过病理切片 HE 染色观察肺组织的损伤情况，用流式细胞术测定血液中 Th17 和 Tregs 细胞亚群的变化比例；ELISA 法检测小鼠血清中白细胞介素-4（IL-4）、转化生长因子-β（TGF-β）和肿瘤坏死因子-α（TNF-α）蛋白的表达水平。**结果**　病理切片 HE 染色显示抗敏平喘方能够改善哮喘小鼠肺组织损伤，降低淋巴细胞对肺组织的浸润水平；抗敏平喘方能够下调血液中 Th17 细胞比例和上调 Tregs 细胞比例，并且存在剂量依赖效应；抗敏平喘方同时能够显著提高血液中 IL-4 和 TGF-β 水平并降低 TNF-α 水平。**结论**　抗敏平喘方能够通过影响 Th17 细胞和 Tregs 在血液中的比例以及相关炎症因子的水平而达到治疗哮喘的作用。

关键词：哮喘；抗敏平喘方；调节性 T 细胞；Th17 细胞，炎症细胞因子

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2014)12 - 1731 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.015

Study on mechanisms of anti-asthma by Kangmin Pingchuan Formula via balance of regulatory T cells and Th17 cells

YAN Zhan-peng[1], ZHANG Xiao-zhen[2, 3], XU Dong-ning[2, 3], YE Juan[2, 3], ZHU Xiao-jing[2, 3], TENG Zhi-ying[2, 3], CAO Peng[2, 3]

1. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China
2. Jiangsu Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China
3. Jiangsu Branch of China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective　To study the possible mechanisms of Chinese materia medica Kangmin Pingchuan Formula via regulating the balance of regulatory T cells (Tregs) and Th17 cells. **Methods**　The female BALB/c mice were divided into five groups: control, model, Prednisone (5.5 mg/kg), Kangmin Pingchuan Formula low- (4.95 g/kg) and high-dose (9.90 g/kg) groups; Ovalbumin was used to make the asthmatic model of mice, the drug was ig administered daily after atomization for consecutive 15 d, then the mice were killed after the last administration. The paraffin-embedded tissue sections of the lungs in mice were stained by HE; Th17 cells and Tregs in blood were detected by flow cytometry; IL-4, TGF-β, and TNF-α in serum of mice were detected by ELISA assay. **Results**　HE staining showed that Kangmin Pingchuan Formula could alleviate the inflammation in the lung tissue of mice, decrease the proportion of Th17 cells, increase the proportion of Tregs in blood, promote TGF-β levels, and inhibit TNF-α levels in blood. **Conclusion**　Kangmin Pingchuan Formula could treat the asthma through impacting the proportion of Th17 cells and Tregs in blood as well as the levels of related inflammatory cytokines in mice.

Key words: asthma; Kangmin Pingchuan Formula; regulatory T cells; Th 17 cells; inflammatory cytokines

哮喘是一种复杂的呼吸道 I 型超敏反应性疾病，其特点是气道间断性阻塞和可逆性气道高反应性，是由多种因素（遗传、免疫和环境等）所导致的慢性气道炎症反应[1]。据报道全世界共有 3 亿人

收稿日期：2014-01-22

基金项目：江苏省中医药领军人才培养基金（RC1006）

作者简介：严展鹏（1988—），男，硕士研究生，研究方向为中药免疫药理。E-mail: yzpsxxazz@126.com

*通信作者　曹　鹏，研究员，研究生导师，主要从事中药药理研究。Tel: (025)85608666　E-mail: cao_lab@126.com

患有哮喘，每年有 25 万人死于该疾病，且儿童比成年人群更易患病[2]。哮喘的发病机制比较复杂，免疫系统中的 IgE 抗体、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突状细胞、白细胞介素-4（IL-4）、IL-5、T 淋巴细胞等多种免疫细胞和细胞因子都参与了该疾病的发生发展过程，近年来研究表明哮喘和 T 淋巴细胞亚群关系密切[3-5]。$CD4^+CD25^+Foxp3^+$调节性 T 细胞（regulatory T cells，Tregs）是一群具有免疫抑制功能的 T 细胞亚群，有研究发现在哮喘患者的体内，特异性转录因子 Foxp3 表达下调以及 $CD25^{hi}$ 调节性 T 细胞的比例和抑制功能均发生下降[6-8]。Th17 细胞分泌的 IL-17 和 IL-22 等炎症因子会诱导气道的炎症和增加平滑肌的收缩，对哮喘也有一定的促进作用[9-10]。

中医认为哮喘的病机是素体禀气不足，宿痰内伏，遇到风寒燥等外邪后，邪郁于肺，肺气失宣，痰阻气闭，气机不利，从而导致了疾病发生[11]。朱秀峰老中医的抗敏平喘方由炙麻黄、射干、乌梅、平地木、陈皮、桔梗、炙黄芪、仙灵脾和生甘草 9 味药组成，具有抗敏平喘、扶正祛痰之功，临床上主要用于体虚易感、反复咳喘的患者。该方结构严谨，君药麻黄、射干与乌梅，辛开苦泄、寒温并用、收敛结合，共起宣肺祛痰、解痉平喘、调畅气机之功；臣药平地木、桔梗、陈皮与黄芪，化痰祛痰、补气调气，协助君药进一步祛痰调气；佐药仙灵脾，辛温散邪、甘温不滞、补肾调养，助君药纳气平喘；使药生甘草味甘性平，既能补脾益气、润肺止咳，还能平喘化痰、调和宣降；诸药共奏抗敏平喘，扶正祛痰之功。现代药理研究显示，麻黄、射干、乌梅、平地木、桔梗、仙灵脾及甘草都有抗过敏的作用，可抑制机体对外来刺激的超敏反应，而黄芪、仙灵脾、平地木、桔梗及甘草有免疫调节的功能。

本实验根据哮喘的西医发病机制和中医的病因病机，分析整理朱秀峰老中医对哮喘的临床经验，结合现代药理学和免疫学的研究进展，从 Tregs 和 Th17 细胞的变化来对抗敏平喘方进行研究。

1 材料

1.1 实验动物

BALB/c 雌性小鼠，6～8 周龄，体质量 18～22 g，购自上海斯莱克实验动物有限公司，合格证号 SCXK（沪）2008-0016，饲养条件为 SPF 级，室温为 22～25 ℃，湿度为 40%～70%，自由取食和饮水，12 h 黑夜，12 h 白天。

1.2 试剂

卵清蛋白（OVA）购自中国鱼跃公司，氢氧化铝购自天津四通化工厂，IL-4、转化生长因子-β（TGF-β）和肿瘤坏死因子-α（TNF-α）ELISA 检测试剂盒及 Tregs 和 Th17 细胞检测试剂均购自美国 eBioscience 公司，RPMI 1640 培养基和胎牛血清（FBS）购自美国 Life Technologies 公司，苏木精和伊红购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器

超声雾化吸入器购自德国 PARI GmbH 公司，倒置显微镜购自美国 Carl Zeiss 公司，石蜡切片机购自德国 Leica 公司，流式细胞仪购自美国 Millipore 公司，全自动酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

2 方法

2.1 动物分组

取 50 只 BALB/c 雌性小鼠，将小鼠随机分为 5 组：对照组、模型组、泼尼松（5.5 mg/kg）组、抗敏平喘方低和高剂量（4.95、9.90 g/kg）组。

2.2 哮喘动物模型制备

参照 McMillan 等[12]小鼠哮喘模型制作方法，第 1 天，每只小鼠 ip OVA 悬液（100 mL 生理盐水中加入 20 mg 的 OVA，同时加入 2.25 g 佐剂氢氧化铝粉末，摇匀过夜）150 μL 进行致敏；第 14 天，重复致敏 1 次；第 28 天，以含 1% OVA 的 PBS 溶液通入雾化吸入箱，5 min 后放入造模小鼠，雾化 60 min（雾粒直径不超过 1 μm），每天 1 次，每次给小鼠雾化 1 h 后，开始 ig 给药，连续 15 d，第 43 天停止给药；对照组小鼠以等量的生理盐水雾化，每天 ig 等体积生理盐水。

2.3 抗敏平喘方制备

抗敏平喘方组方：炙麻黄 6 g、射干 15 g、乌梅 9 g、平地木 30 g、陈皮 9 g、桔梗 9 g、炙黄芪 9 g、仙灵脾 12 g 和生甘草 9 g，各药材均由江苏省中西医结合医院提供，由江苏省中医药研究院王大为博士鉴定，具体鉴定结果及产地见表 1，各药材按常规方法制成 4.05 g/mL 的水煎液，冰箱保存备用。

2.4 肺组织切片和染色

实验结束时处死小鼠，将取好的小鼠肺组织浸入 10%甲醛固定 24 h 后，进行梯度脱水和石蜡包埋，包埋后的蜡块保存在 4 ℃过夜，在石蜡切片机上以 5 μm 的厚度切片，展片机中充分展片后捞片，再放在拷片机上拷片 3 h，即可进行组织学染色检

表 1 抗敏平喘方的药材基原及产地

Table 1 Sources origins and habitats of composition in Kangmin Pingchuan Formula

名称	基原	产地
炙麻黄	麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* 的草质茎	河北
射干	鸢尾科植物射干 *Belamcanda chinensis* 的干燥根茎	湖北
乌梅	蔷薇科植物梅 *Prunus mume* 的近成熟果实，经烟火熏制而成	福建
平地木	紫金牛科植物平地木 *Ardisia japonica* 的全株	江西
陈皮	芸香科植物橘 *Citrus reticulata* 的干燥成熟的果皮	广东
桔梗	桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* 的干燥根	吉林
炙黄芪	豆科植物黄芪 *Astragalus membranaceus* 的炮制加工品	内蒙古
仙灵脾	小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* 的全草	陕西
生甘草	豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensia* 的根及根茎	新疆

测；苏木素伊红（HE）染色观察肺组织的形态，确定肺部的炎症水平及药物治疗的有效性。

2.5 流式细胞术检测

用红细胞裂解液裂解处理小鼠心脏采血获得的新鲜血液，用抗 CD4-FITC 和抗 CD25-APC 孵育血液中白细胞 30 min，固定和破膜后用抗 Foxp3-PE 染色 30 min，流式细胞仪分析 Tregs 细胞比例；用加有刺激剂 PMA 和阻断剂 BFA 的 RPMI 1640 培养基（含 10%胎牛血清）将血液细胞在培养箱中培养 5 h，加入抗 CD4-FITC 孵育 30 min，固定破膜后加入抗 IL-17-PE 染色 30 min，流式细胞仪分析 Th17 细胞比例。

2.6 ELISA 法检测细胞因子

末次雾化 24 h 后，用 10%水合氯醛（2.5 mL/kg）ip 麻醉小鼠，暴露胸腔后右心室穿刺取血，放于离心管中，静置待血液凝固后，4 ℃温度下 3 500 r/min 离心 5 min，血清−80 ℃保存；ELISA 法检测小鼠血清中 IL-4、TGF-β 和 TNF-α 细胞因子水平。

2.7 统计学分析

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行计算，组间差异采用 Students-*t* 检验，结果以 $\bar{x} \pm s$ 来表示。

3 结果

3.1 抗敏平喘方对哮喘小鼠肺组织病理学的影响

对小鼠肺组织进行切片和 HE 染色后，病理学观察和分析发现，对照组小鼠的肺组织没有明显的病理变化，模型组却发现有更多的淋巴细胞浸润和支气管壁增厚，而给予阳性药泼尼松后小鼠的肺组织病变具有一定的改善，抗敏平喘方的高、低剂量小鼠肺组织病变均有所减轻，免疫细胞的浸润大量减少，同时肺的组织形态较模型组损伤有较大程度的恢复，显示抗敏平喘方具有较好的治疗作用，见图 1。

3.2 抗敏平喘方对哮喘小鼠体内 Th17 和 Tregs 细胞的影响

从图 2 中的数据分析可知，与对照组比较，模型组小鼠血液中 Th17 细胞的比例明显升高，阳性药泼尼松和抗敏平喘方低剂量组对哮喘小鼠的 Th17 细胞均没有影响，抗敏平喘方高剂量组却能明显下调小鼠血液中 Th17 细胞的比例；在模型组哮喘小鼠中 Tregs 出现了下调趋势，泼尼松能够提高小鼠血液中 Tregs 细胞的比例，抗敏平喘方对小鼠的 Tregs 细胞也有一定的上调作用；流式细胞仪测

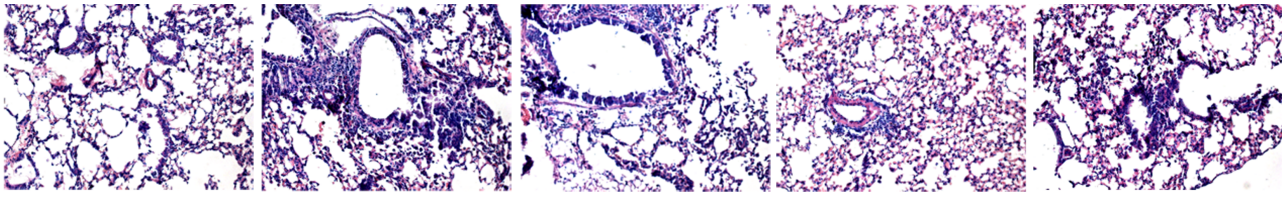

图 1 各组小鼠肺组织病理学观察

Fig. 1 Histopathology of lung in mice of each group

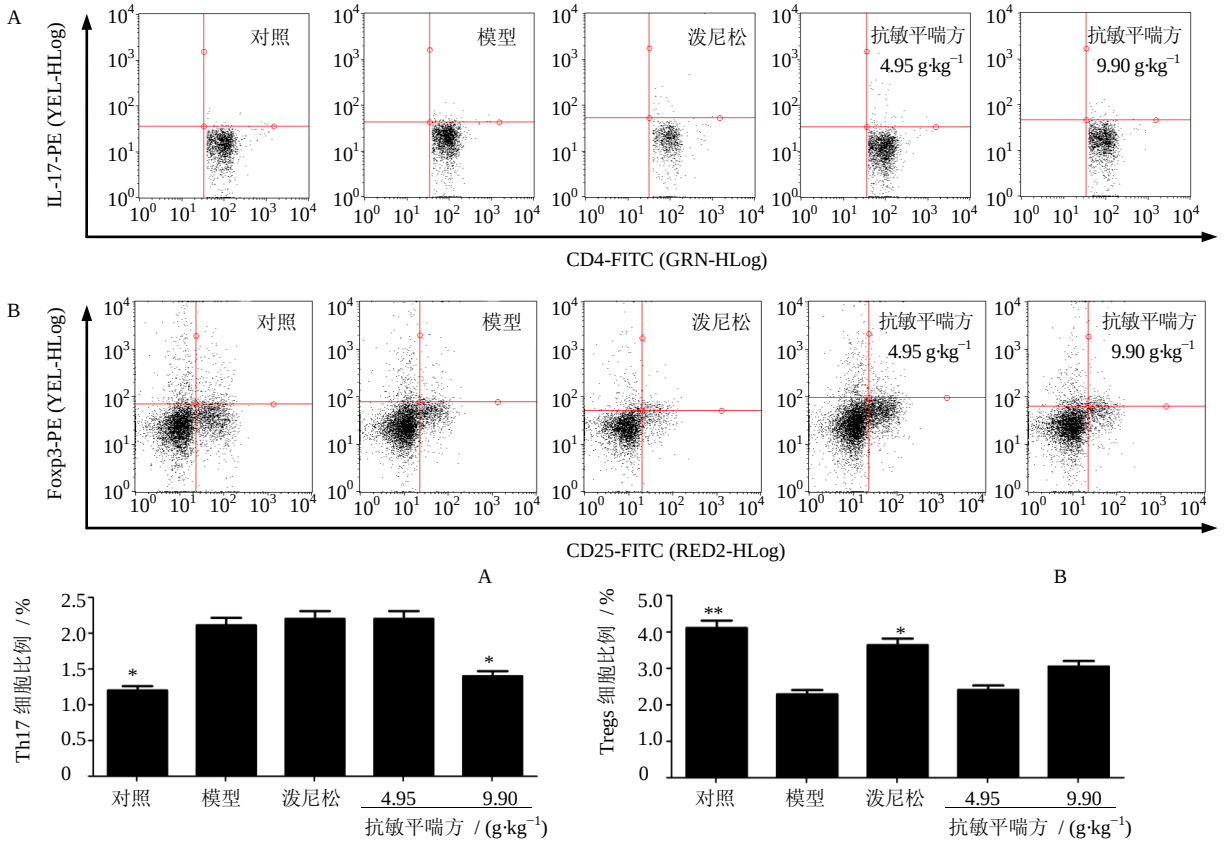

图 2　流式细胞术检测哮喘小鼠血液中 Th17 细胞 (A) 和 Tregs 细胞 (B) 比例 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2　Detection for proportion of Th17 cells (A) and Tregs (B) in blood of mice by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

定结果显示抗敏平喘方能够使小鼠血液中的 Th17 细胞下调和 Tregs 细胞上调。

3.3　抗敏平喘方对哮喘小鼠血清炎症因子的影响

IL-4 在模型组小鼠血清中升高，在泼尼松组和抗敏平喘方组中呈现了下降趋势；TGF-β 在模型组小鼠血清中降低，在泼尼松组和抗敏平喘方组中出现了上升趋势；抗敏平喘方能够同时调节炎症因子 IL-4 和抑炎因子 TGF-β 的水平，见图 3。

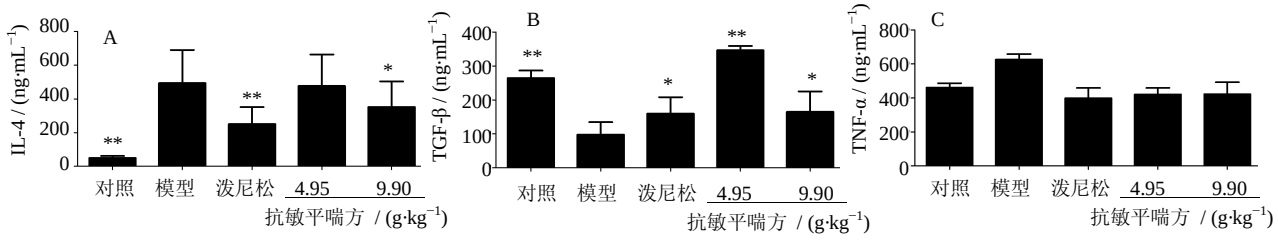

图 3　ELISA 法测定小鼠血清中 IL-4 (A)、TGF-β (B) 和 TNF-α (C) 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3　Detection of levels of IL-4 (A), TGF-β (B), and TNF-α (C) in serum of mice by ELISA ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

4　讨论

支气管哮喘是以嗜酸性粒细胞浸润为主的慢性肺部炎症性疾病，多种免疫细胞和细胞因子也参与其中，近年来科学研究对于 T 淋巴细胞亚群在哮喘中的作用机制研究也是越来越多。Th17 细胞和 Tregs 都属于 T 细胞亚群，Th17 细胞主要分泌 IL-17 和 IL-23 等炎症因子，该类细胞的特异性转录因子是 ROR-γt；Tregs 主要分泌 IL-10 和 TGF-β 等抑炎因子，该类细胞的特异性转录因子是 Fxop3；这 2 类细胞在支气管哮喘的患者体内都具有明显的变

化，Th17 细胞水平的升高导致肺组织中的炎症反应上调，Tregs 水平的下调减少了对炎症细胞和炎症因子的抑制，从而能够促进哮喘疾病的发生[13-15]。

目前西医治疗哮喘多以激素类、白三烯受体拮抗剂、β_2受体激动剂、茶碱类药物等来抑制气道炎症、降低气道高反应性，从而达到控制症状、预防发作为目的，但是疗效仍然不是很满意，并且在安全性方面也存在很多问题，如长期应用激素类药物会引起骨质疏松、高血压、糖尿病、肥胖症、下丘脑-垂体-肾上腺轴的抑制、青光眼、肌无力等不良反应，白三烯受体拮抗剂则会出现肝功能损害，β_2受体激动剂会引起心率加快、心律失常、血钾下降等，茶碱类也有毒副作用[16]。

支气管哮喘在中国传统医学中属于“哮证”、“喘证”、“痰饮”等范畴，是临床常见病多发病之一，中医学家在总结前人经验的基础上，进一步认识到体质与哮喘有密切的关系，认为哮喘复发本质乃禀赋不足，肺脾肾亏虚，即古人所谓哮有“夙根”，采用清热化痰、温阳益气、补肾纳气、止咳平喘等方药治疗哮喘在临床上取得了良好的效果[17]。

基于小鼠哮喘模型，本实验从细胞与分子免疫学方向研究抗敏平喘方对哮喘的治疗机制，从而解释和印证该方在临床上的疗效。小鼠肺组织病理学切片显示抗敏平喘方对小鼠的肺部炎症和形态具有一定的改善作用，流式细胞术检测了 Th17 细胞和 Tregs，抗敏平喘方能够改善 Th17/Tregs 细胞的平衡，抗敏平喘方在一定程度上能够下调炎症因子 IL-4 与 TNF-α，上调抑炎因子 TGF-β，这些实验结果在一定程度上阐释了抗敏平喘方对哮喘的免疫作用机制，这将为以后更加深入地研究抗敏平喘方的药理学机制奠定了一定的基础。

参考文献

[1] Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma [J]. *Front Microbiol*, 2013, 4: 263.

[2] Bousquet J, Clark T J, Hurd S, *et al*. GINA guidelines on asthma and beyond [J]. *Allergy*, 2007, 62(2): 102-112.

[3] 李学良, 许朝霞, 王忆勤. 支气管哮喘发病机制的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(9): 1960-1963.

[4] Gould H J, Sutton B J. IgE in allergy and asthma today [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(3): 205-217.

[5] Renauld J C. New insights into the role of cytokines in asthma [J]. *J Clin Pathol*, 2001, 54(8): 577-589.

[6] Robinson D S. Regulatory T cells and asthma [J]. *Clin Exp Allergy*: *J Brit Soc Allergy Clin Immunol*, 2009, 39(9): 1314-1323.

[7] Ray A, Khare A, Krishnamoorthy N, *et al*. Regulatory T cells in many flavors control asthma [J]. *Mucosal Immunol*, 2010, 3(3): 216-229.

[8] Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells [J]. *Immunity*, 2013, 38(3): 414-423.

[9] Zhao Y, Yang J, Gao Y D, *et al*. Th17 immunity in patients with allergic asthma [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 151(4): 297-307.

[10] Cosmi L, Liotta F, Maggi E, *et al*. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis [J]. *Allergy*, 2011, 66(8): 989-998.

[11] 符 思, 许卫华, 王 微. 哮喘中医辨证论治研究进展 [J]. 中国现代医药杂志, 2006, 8(12): 135-137.

[12] McMillan S J, Lloyd C M. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling [J]. *Clin Exp Allergy*: *J Brit Soc Allergy Clin Immunol*, 2004, 34(3): 497-507.

[13] 龚 臣, 邓静敏. Th17/Treg 在支气管哮喘发病机制中的作用及研究进展 [J]. 中华哮喘杂志, 2013, 33(9): 684-688.

[14] Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells in allergic asthma [J]. *Isr Med Assoc J*: *IMAJ*, 2012, 14(3): 180-183.

[15] Kim H Y, De Kruyff R H, Umetsu D T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(7): 577-584.

[16] 李宏杰, 康淑兰, 李 俐. 支气管哮喘的药物治疗进展 [J]. 药物流行病学杂志, 2005, 14(5): 272-275.

[17] 钱 钢, 蒋荣芳. 抗敏平喘方治疗支气管哮喘的临床观察 [J]. 上海中医药杂志, 2000, 34(7): 17-18.