

利金方对肺气虚证 COPD 大鼠 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化的影响

李瑞祥¹, 陈斯宁^{1*}, 黎展华¹, 周继红¹, 黄文锋², 何婷婷¹, 冯玉青¹, 廖丽君³, 王浩舟¹

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530011;

2. 清远市中医院, 广东清远 511500; 3. 柳州市中医院, 广西柳州 545001)

摘要:目的 观察利金方对肺气虚证 COPD 大鼠 CD4⁺ 细胞向 Th17 细胞分化的影响。方法 通过烟熏法复制 COPD 大鼠模型, 以不同浓度利金方进行干预, 给药 7d 后检测大鼠肺组织中 CD4⁺ T、Th17 细胞数量以及大鼠血清、BALF 中 IL-6、IL-21 的含量。结果 不同剂量的利金方均能提高大鼠肺组织中 CD4⁺ T 细胞数量并降低 Th17 细胞数量, 同时降低大鼠血清及 BALF 中 IL-6、IL-21 的含量, 其中以高剂量利金方效果最佳。结论 利金方可抑制 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化, 减少炎症因子的分泌而减轻免疫炎症反应, 达到治疗 COPD 的目的。

关键词: COPD; 利金方; CD4⁺ T 细胞; Th17 细胞; IL-6; IL-21

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.05.03

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2021)05-1032-03

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种常见的、可以预防和治疗的疾病,以持续的呼吸道症状和气流受限为特征,通常是由于明显暴露于有毒颗粒或气体引起的气道和/或肺泡异常所致^[1]。COPD 的本质是多种免疫、炎症细胞参与的慢性炎症性疾病。研究表明, T 细胞介导的获得性免疫应答与 COPD 发病有关, Th17 细胞是近年来发现的 CD4⁺ T 细胞亚群, 是目前公认的重要炎症细胞, 其分泌的 IL-6、IL-17 等多种炎症细胞因子在多种炎症和自身免疫病中发挥重要作用^[2,3]。因此通过干预 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化, 抑制炎症细胞因子分泌, 对 COPD 的免疫调节及抗炎治疗有重要意义。近年来, 中医药在干预肺部慢性疾病方面的优势日益凸显。利金方为广西名中医陈斯宁教授通过总结前人经验, 以四君子汤、二陈汤等为基础加减而成, 是治疗 COPD 肺气虚证患者的有效经验方。前期研究证实利金方能提高 COPD 患者的免疫功能, 但利金方调控 COPD 免疫炎症反应的机制尚不明确。本研究通过探讨利金方对 COPD 大鼠免疫炎症机制的影响, 为利金方在临床治疗 COPD 提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 140 只, 体重(200 ± 20) g, 长沙市天勤生物技术有限公司提供 [SCXK(湘) 2014-0010]; 实验前 1 周将 140 只大鼠置于实验环境中饲养。室温 24 ~ 28℃, 空气流通好, 颗粒麦麸喂养。饲养笼具、饲料、饮水均按 SPF 级实验动物的要求进行制备和消毒。

1.2 实验药物 利金方(由党参 10g, 黄芪 15g, 麦冬 10g, 五味子 6g, 紫菀 10g, 川贝 6g, 蛤蚧 10g, 白术 10g, 防风 10g, 茯苓 10g, 陈皮 6g, 甘草 6g 组成, 由广西中医药大学附属瑞康医院药剂科提供), 水煎浓缩为每毫升含生药 1.5g 的浓缩液。JAK2 抑制剂: AG490(上海雅吉生物科技有限公司, 批号: S1509)。STAT3 抑制剂: WP1193(上海熹垣生物提供, 批号: XY-420151-10MG)。

收稿日期: 2020-11-22; 修订日期: 2021-05-10

基金项目: 国家自然科学基金(81760853)

作者简介: 李瑞祥(1986-) 男(汉族), 广西容县人, 广西中医药大学附属瑞康医院主治医师, 硕士学位, 主要从事中医药治疗呼吸危急重症临床研究工作。

* 通讯作者简介: 陈斯宁(1963-) 女(汉族), 广西容县人, 广西中医药大学附属瑞康医院主任医师, 学士学位, 主要从事中医药治疗肺系疾病临床研究工作。

1.3 实验试剂 脂多糖(LPS), 美国 Sigma 公司提供, 生产批号: L8274; 真龙牌香烟: 广西中烟工业有限责任公司, 烟气烟碱量 1.2mg, 焦油含量 11mg; IL-6 ELISA 检测: 杭州联科生物技术股份有限公司提供, 批号: 70-EK3062/2; IL-21 ELISA 检测: 上海江莱生物科技有限公司提供, 批号: JL018002; 大鼠 T 细胞亚群试剂盒: 上海晶抗生物工程有限公司, 批号: JKSK-4246; Th17 试剂盒: 上海江莱生物科技有限公司提供, 批号: 0-020953。

1.4 主要实验仪器 自制 0.6m × 0.8m × 1.2m 透明亚克力材质烟熏箱, 箱顶部设置一直径 8cm 小孔; 高速台式冷冻离心机德国 Sigma 公司 Sigma 3-18KS; 台式低速离心机中国安亭科学仪器厂飞鸽 KA1000C; 研究级显微镜日本 OLYMPUS 公司 BX53; 微孔板恒温振荡器杭州奥盛公司 AS-03030-00; 酶标仪美国热电公司(THERMO) 51119000; 微量点动匀浆器美国 SCIOLOGEX 公司 MX-F; 逐级微量移液枪美国 Eppendorf 公司 2.5、10、100、1000μl; 立式压力蒸汽灭菌器上海博迅公司 BXM-30R; 雪花形制冰机上海汗诺仪器设备厂 FM20; 4℃ 冰箱中国美的公司 BCD-226WTM(E); 万分之一精度电子天平德国 sartorius 公司 BSA224S; 全自动石蜡切片机意大利 Diapath 公司 SDSGA9000; 石蜡包埋热台德国 LEICA EG1150H; 漩涡混匀振荡器美国热电公司(THERMO) 88880018。

2 方法

2.1 动物分组及造模 140 只大鼠随机分为 7 组: 空白组(A 组)、模型组(B 组)、利金方低剂量组(C 组)、利金方中剂量组(D 组)、利金方高剂量组(E 组)、JAK2 抑制剂组(F 组)、STAT3 抑制剂(G 组), 每组 20 只。采用烟熏复合因素造模方法建立 COPD 大鼠模型, 具体方法如下: 除 A 组外, 其余各组在第 1 天、14 天麻醉后气管内注射脂多糖 200μg/200μl(1mg/ml)。分别于第 2~13 天、15~28 天置大鼠于烟熏箱内被动吸烟 0.5h, 烟熏后再次置大鼠于低于环境温度(20℃) 5℃冷空气刺激 1h, 造模期 28 天。28 天后各组各随机处死大鼠两只, 以确认造模成功(参考文献^[4]大鼠肺气虚证模型成功具体表现: 造模过程逐渐出现蜷伏少动, 拱背蜷卧, 撮毛, 食量减少, 毛失光泽、发黄、易脱落, 体质量较正常组减轻, 呼吸急促; 造模 28 d 后, 模型组呼吸频率明显增高, 呼吸道有分泌物从口鼻流出, 偶可闻及咳嗽及气道痰鸣音, 随着造模时间的延长, 上述症状逐渐加重, 表明肺功能低下, 运动耐力下降, 伴随体质量的降低和毛发的枯萎, 符合中医肺气虚证

的特点。并进行肺组织病理学检测及进行大鼠肺功能测定 (PEF) 第 0.3 秒用力呼气量 (FEV_{0.3}) 第 0.3 秒用力呼气量与用力肺活量比值 (FEV_{0.3}/FVC%) 等指标确认建立大鼠慢性阻塞性肺疾病模型成功^[5]。

2.2 给药方法 造模结束后第 2 天 (即第 29 天) 起各组开始灌胃给药。A、B 两组给予生理盐水 10ml/kg 灌胃, 1 次/d; C、D、E 组分别给予利金方药液 10.5ml/(kg·d)、21ml/(kg·d)、42ml/(kg·d) 灌胃, 每组 1 次/d 灌胃, 连续灌胃 7d; F 组: AG490 试剂 8mg/(kg·d) 腹腔注射, 连续 7 天; G 组: WP1193 试剂 8mg/(kg·d) 腹腔注射, 连续 7d。

2.3 标本采集及制作 药物干预结束后, 各组大鼠用 10% 的水合氯醛 (3ml/kg) 麻醉, 肺动脉采血 4ml, -20℃ 保存; 切开胸部, 暴露气管及肺部。结扎右主支气管, 在隆突上用套管针刺穿至左主支气管, 以 2 ml 生理盐水灌洗左肺, 每次回收约 1.5 ml (回收率 75%), 反复灌洗 2 次, 总回收量约为 3 ml。将收集到的 BALF 离心 (3000 r/min 5min), 吸取上清液保存于 -20℃ 的冰箱中待检。取右肺下叶用 10% 甲醛固定, 取距离肺门 3mm 处的肺组织做连续切片及超薄切片机常规切片, 并分别进行苏木精-伊红 (HE) 染色、醋酸铅及枸橼酸铅双重染色。另外: 处死大鼠后最短时间内打开胸腔使心肺充分暴露, 用针挑破左心耳, 从右心室输液针缓慢灌注生理盐水, 待准备灌注完毕时小心剪下心脏防止体循环血液回流回肺脏。然后用胰酶、胶原酶经气管灌注到肺组织内 37℃ 消化 30min, 然后剪碎过滤, 细胞离心, 制备成肺组织细胞悬液。

2.4 检测方法 光镜下观察肺组织炎症反应及组织改变等; 流式细胞技术检测肺组织 CD4⁺T 细胞、Th17 细胞数量; ELISA 检测大鼠血清及 BALF 中 IL-6、IL-21 的含量。

2.5 统计学方法 应用 SPSS22.0 统计处理各项指标的结果, 多组间均数比较采用 One-Way ANOVA 法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 实验结束时, 除确认造模时各组大鼠各处死两只外, A、C、E 组各死亡 1 只; B、D、F、G 组大鼠各死亡 2 只。

3.2 各组大鼠肺组织病理改变比较 A 组大鼠肺结构完整, 未见炎症细胞浸润。B 组大鼠肺泡扩大, 肺泡间隔破裂合成肺大泡, 大量炎症细胞浸润, 气道内可见大量炎性分泌物。C、D 组大鼠肺泡腔扩大、破裂, 慢性炎症细胞浸润, 气道内可见炎性分泌物, 其镜下改变较 B 组减轻。E、F、G 组见大鼠肺泡腔扩大、破裂, 气道内见少量分泌物, 镜下病理改变较 C、D 组减轻。结果见图 1。

3.3 各组大鼠肺组织 CD4⁺T、Th17 细胞含量比较 B 组大鼠肺组织中 CD4⁺T 细胞数量与 A 组比较明显降低 ($P < 0.05$); C、D、E、F、G 组大鼠肺组织中 CD4⁺T 细胞与 B 组比较均有明显上升 ($P < 0.05$), 但与 A 组相比较明显降低 ($P < 0.05$); E、F、G 组与 C、D 组相比较, 大鼠肺组织中 CD4⁺T 细胞数量升高更明显 ($P < 0.05$); C、D 两组比较, E、F、G 三组比较, 大鼠肺组织中 CD4⁺T 细胞数量无明显差异 ($P > 0.05$)。B 组大鼠肺组织中 Th17 细胞与 A 组比较明显升高; C、D、E、F、G 组大鼠肺组织中 Th17 细胞与 B 组比较均有明显下降 ($P < 0.05$), 但与 A 组相比较明显升高 ($P < 0.05$); C、D 两组比较, E、F、G 三组比较, 大鼠肺组织中 Th17 细胞无明显差异 ($P > 0.05$); E、F、G 组与 C、D 组相比较, 大鼠肺组织中 Th17 细胞含量更低 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.4 各组大鼠血清及 BALF 中 IL-6、IL-21 的水平相比较 与 A 组相比较, B、C、D、E、F、G 组中大鼠血清及 BALF 的 IL-6、IL-21 含量明显升高 ($P < 0.05$); C、D、E、F、G 组中大鼠血清及 BALF 的 IL-6、IL-21 含量低于 B 组 ($P < 0.05$); E、F、G 组中大

鼠血清及 BALF 的 IL-6、IL-21 含量低于 C、D 组 ($P < 0.05$); C、D 两组中大鼠血清及 BALF 的 IL-6、IL-21 含量进行两两比较 ($P > 0.05$); E、F、G 三组中大鼠血清及 BALF 的 IL-6、IL-21 含量相比较 ($P > 0.05$)。结果见表 2。

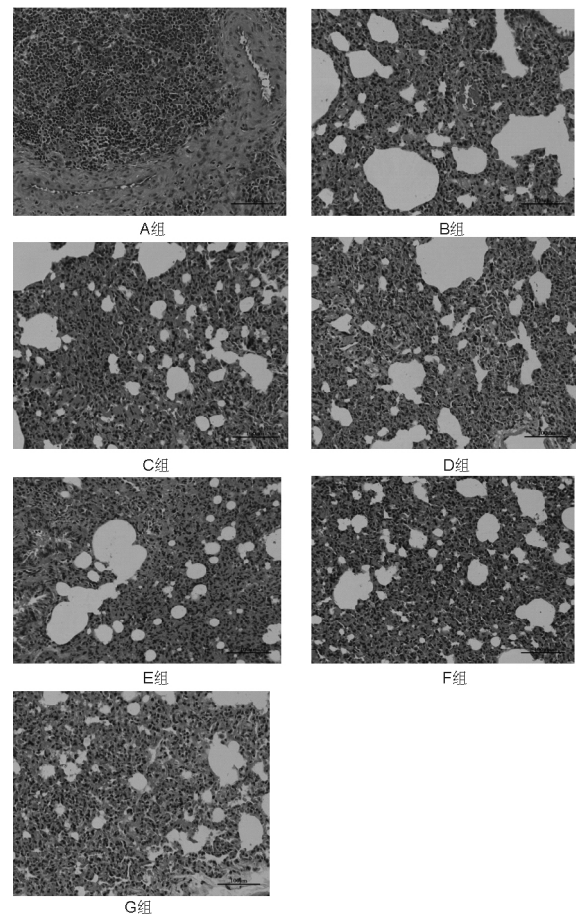


图 1 各组大鼠肺组织病理改变情况 (HE 200 ×)

表 1 各组大鼠肺组织 CD4⁺T 细胞、Th17 细胞的数量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ T 细胞	Th17 细胞
A 组	17	6.11 ± 0.15	4.13 ± 0.24
B 组	16	2.32 ± 0.16 ^a	9.02 ± 0.21 ^a
C 组	17	3.55 ± 0.23 ^{ab}	7.51 ± 0.17 ^{ab}
D 组	16	3.47 ± 0.21 ^{abd}	7.44 ± 0.19 ^{abd}
E 组	17	4.49 ± 0.22 ^{abc}	5.39 ± 0.22 ^{abc}
F 组	16	4.62 ± 0.19 ^{abce}	5.35 ± 0.14 ^{abce}
G 组	16	4.51 ± 0.17 ^{abce}	5.33 ± 0.22 ^{abce}

与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 C、D 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^d $P > 0.05$; 与 E 比较, ^e $P > 0.05$

4 讨论

COPD 是一种气道和肺部慢性持续炎症性疾病, 其发生发展与 T 淋巴细胞介导的炎症免疫反应密切相关^[6], 以往研究发现, 在发生肺气肿的肺实质中存在大量 CD4⁺T 及 CD8⁺T 淋巴细胞的浸润^[7]。CD4⁺T 细胞通过分泌等方式辅助其它淋巴细胞发挥免疫调节作用, Th17 为近年来发现的 CD4⁺T 细胞活化亚群, 在炎症免疫调节中有重要作用^[2]。吸烟是导致 COPD 发病的主要原因, 烟草烟雾刺激所产生的炎症因子如 IL-6、TNF-β 可刺激 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化并分泌大量的炎症介质如 IL-17、IL-21 等, 产生持续的免疫炎症反应。研究发现, CD8⁺T 细胞依赖 CD4⁺T 细胞的帮助发挥长效的免疫反应, IL-21 能刺激 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞的分化, Th17 细胞分泌的 IL-21 通过 IL-21/IL-21R 系统来调节 CD8⁺T 细胞, CD8⁺T 又可导致肺的

损伤,其细胞数量与气流受限及肺气肿的严重程度呈正相关^[8]。金松等^[9]抽取 COPD 急性加重期患者 COPD 稳定期患者、健康吸烟者、健康不吸烟者,流式细胞术检测外周血中 Th17 细胞、Treg

细胞的比例,结果显示: COPD 患者外周血中 Th17 细胞比例和细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-17A 水平明显高。因此,从炎症免疫角度对 COPD 的治疗具有重要意义。

表 2 各组大鼠血清及 BALF 中 IL-6、IL-21 的水平($\bar{x} \pm s$)

ng · L⁻¹

组别	n	血清 IL-6	BALF IL-6	血清 IL-21	BALF IL-21
A 组	17	131.76 ± 65.23	70.68 ± 31.22	113.38 ± 12.32	189.42 ± 21.34
B 组	16	320.32 ± 48.11 ^a	284.84 ± 45.31 ^a	189.26 ± 24.56 ^a	380.67 ± 26.66 ^a
C 组	17	275.87 ± 57.34 ^{ab}	213.59 ± 29.44 ^{ab}	160.59 ± 11.38 ^{ab}	267.35 ± 31.83 ^{ab}
D 组	16	262.65 ± 40.28 ^{abd}	209.18 ± 25.09 ^{abd}	158.38 ± 19.91 ^{abd}	250.14 ± 18.46 ^{abd}
E 组	17	238.21 ± 35.57 ^{abc}	169.35 ± 45.56 ^{abc}	143.47 ± 18.54 ^{abc}	232.34 ± 13.12 ^{abc}
F 组	16	224.37 ± 36.46 ^{abce}	170.17 ± 50.36 ^{abce}	140.72 ± 13.21 ^{abce}	234.57 ± 19.18 ^{abce}
G 组	16	227.90 ± 38.37 ^{abce}	163.39 ± 45.16 ^{abce}	137.75 ± 16.10 ^{abce}	233.44 ± 20.21 ^{abce}

与 A 组比较 $\mu P < 0.05$; 与 B 组比较 $\mu P < 0.05$; 与 C、D 组比较 $\mu P < 0.05$; 与 C 组比较 $\mu P > 0.05$, 与 E 比较 $\mu P > 0.05$

根据 COPD 的慢性咳嗽、咳痰、气喘的临床表现,可将其归属于中医“咳嗽”“肺胀”等病范畴,《金匱要略》:“咳而上气,此为肺胀,其人喘,目如脱状”。其病机特点是本虚标实,本虚以肺脾肾虚损为主,标实以痰瘀为主,根据 COPD 症候特点,可分多个证型,其中肺气虚证是 COPD 早期最常见的证型^[10]。《素问·四气调神大论》中说“圣人不治已病治未病;不治已乱治未乱。……夫病已成而后药之,乱已成而后治之,譬如渴而穿井,斗而铸锥,不亦晚乎”。因此,在 COPD 早期进行积极干预,对其疾病的进展及预后具有重要意义。利金方由党参、黄芪、麦冬、五味子、紫菀、川贝、蛤蚧、白术、防风、茯苓、陈皮、甘草组成,方中党参、黄芪、蛤蚧补益脾肺、纳气平喘;麦冬养阴润肺,善于补肺阴;五味子益气生津、收敛肺气;白术、茯苓、陈皮健脾化痰;川贝、紫菀润肺化痰止咳;防风祛风解表;甘草补脾益气,调和诸药。全方既兼二陈汤的燥湿化痰,又兼四君子汤的补气健脾及玉屏风散的益气固表,共奏补肺固卫、健脾化痰之功。前期临床及实验研究均显示利金方疗效显著^[11,12]

本实验结果显示,采用复合造模方法建立 COPD 模型大鼠,B 组大鼠精神差,活动性下降,被毛灰黄,脱落稀疏,饮食减少,呼吸急促,咳嗽,符合 COPD 肺气虚证的表现;其肺组织病理改变可见肺泡扩张,肺泡间隔变窄并断裂,部分相邻肺泡融合成较大囊腔等改变,符合 COPD 形态学诊断指标,因此,COPD 造模是成功的。在各组大鼠分析中,B 组大鼠肺组织中 CD4⁺T 细胞明显降低,Th17 细胞明显升高,结合 CD4⁺T 细胞与 Th17 关系特点,说明烟雾刺激后大鼠肺组织中的 CD4⁺T 细胞可向 Th17 转化。经药物治疗后,各组大鼠肺组织中 CD4⁺T 细胞均升高,Th17 细胞均下降,其中 E、F、G 组基本一致,但较 C、D 组大鼠更明显,已有证实 JAK2 抑制剂 AG490 可以通过抑制 JAK2-STAT3 途径从而抑制 IL-6 介导的 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化的过程^[13],说明利金方与 JAK2 抑制剂具有同样作用,其中以高剂量的利金方效果更优。另外从大鼠血清与 BALF 中 IL-6、IL-21 含量的表达同样发现,使用利金方干预后均能降低 IL-6、IL-21 的含量,效果仍以高剂量利金方组明显,与使用 AG490 及 WP1193 试剂干预效果保持一致。

综上所述,利金方可抑制 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化,减

少炎症细胞因子的分泌,进而减轻免疫炎症反应,从而达到治疗 COPD 的目的,为中医药多靶点治疗 COPD 患者提供新思路。且中草药来源广泛、药费用相对廉价、副作用少,更易于临床推广。

参考文献:

[1] 王晓娟,方向阳.慢性阻塞性肺疾病全球倡议 2019:慢性阻塞性肺疾病诊断、治疗与预防全球策略解读[J].中国全科医学,2019,22(18):2141.

[2] Tahmasebinia F,Pourgholaminejad A. The role of Th17 cells in auto-inflammatory neurological disorders [J]. Prog Neuro psychopharmacol Biol Psychiatry, 2017,79(PtB):408.

[3] 张兰英,陈杰,张奕,等.慢性阻塞性肺病患者肺组织中树突状细胞、辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞的表达及其意义[J].中华内科杂志,2019,58(2):125.

[4] 王成阳,李泽庚,刘向国,等.六味补气胶囊对 COPD 肺气虚证模型 STAT4,STAT6 蛋白表达影响[J].中国实验方剂学,2013,19(21):194.

[5] 王玮,王琦,张永生,等.香烟联合脂多糖建立慢性阻塞性肺疾病大鼠模型[J].中华中医药杂志,2018,33(9):3866.

[6] 孙印,何士杰,景卫革,等.慢性阻塞性肺疾病免疫发病机制研究进展[J].医学综述,2019,25(13):2574.

[7] Maeno T,Houghton AM,Quintero PA,et al. CD8⁺T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice[J].J Immunol,2007,178(12):8090.

[8] 张超凡,杜春华,李娜,等.IL-21 与 COPD 发病机制的研究进展[J].国际呼吸杂志,2017,37(19):1503.

[9] 金松,吴小军.慢性阻塞性肺病患者外周血 Th17 和 Treg 细胞的表达及意义[J].武汉大学学报(医学版),2018,39(6):961.

[10] 黄牧华,董克成,魏颖,等.慢性阻塞性肺病中医证候及证素分布规律与特征的文獻分析研究[J].中国中医基础医学杂志,2019,25(10):1373.

[11] 陈斯宁,谭玉萍,王朝晖,等.利金方对慢性阻塞性肺病稳定期患者的综合评价研究[J].时珍国医国药,2016,27(10):2448.

[12] 陈斯宁,韦思尊,杨红梅,等.利金方对慢性阻塞性肺病大鼠抗氧化应激的影响[J].世界中西医结合杂志,2016,11(8):1103.

[13] Park JS, Lee J, Lim MA, et al. JAK2-STAT3 blockade by AG490 suppresses autoimmune arthritis in mice via reciprocal regulation of regulatory T Cells and Th17 cells[J].J Immunol,2014,192(9):4417.