

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.04.002

## 黄芪对哮喘小鼠 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞及 IL-4 IFN-γ IL-10 的影响 \*

刘瑞文<sup>1,2</sup> 李春霞<sup>2</sup> 李志华<sup>2</sup> 王郡甫<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup> 山东省医学科学院基础医学研究所, 山东 济南 250062; <sup>2</sup> 济宁医学院基础医学与法医学院, 山东 济宁 272067)

**摘要 目的** 探讨黄芪对哮喘小鼠 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞及 IL-4、IFN-γ、IL-10 的影响。方法 将 BALB/c 小鼠 30 只随机分为对照组、哮喘组和黄芪组。以卵蛋白(OVA)致敏激发法制备小鼠哮喘模型。酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中 IL-4、IFN-γ、IL-10 及血清中 IL-10 的含量;流式细胞术(FCM)、反转录聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测小鼠脾脏中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞数量及 FoxP3 mRNA 表达情况。结果 哮喘组小鼠 BALF 中 IL-4 含量明显高于对照组( $P<0.01$ )而低于黄芪组( $P<0.01$ )。与对照组相比, 哮喘组小鼠 BALF 中 IFN-γ、IL-10、血清中 IL-10 含量及脾脏中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞数量、FoxP3 mRNA 表达水平明显降低( $P<0.01$ );而黄芪组的上述改变较哮喘组显著增加( $P<0.05$ )。结论 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞参与了支气管哮喘的发病过程, 黄芪可通过上调 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞、FoxP3 mRNA 的表达及增加 IL-10 含量减轻哮喘炎症。

**关键词** 黄芪; 哮喘; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞; IL-10; 小鼠

**中图分类号:** R392; R562   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1000-9760(2011)08-232-04

### Effect of Astragalus on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells and cytokines in the mice model of asthma

LIU Rui-wen, LI Chun-xia, LI Zhi-hua, et al

(Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of medical Sciences, Jinan 250062, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of Astragalus (AST) on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and IL-4, IFN-γ, IL-10 in the mice model of asthma. **Methods** 30 BALB/c mice were divided into 3 groups: control group, asthma group and AST group. Asthmatic mice models were established by ovalbumin intraperitoneal injection. The levels of IL-4, IFN-γ and IL-10 were measured by ELISA. Numbers of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells were examined by flow cytometry; the mRNA expression of FoxP3 was tested by RT-PCR. **Results** The BALF level of IL-4 in asthma group was higher than Control group( $P<0.01$ ), and lower than AST group( $P<0.01$ ). Compared with control group, the BALF levels of IFN-γ, IL-10 and the serum level of IL-10 in asthma group, numbers of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and the mRNA expression of FoxP3 were decreased obviously( $P<0.01$ ). However, the changes of above-mentioned of AST group were increased significantly compared with asthma group( $P<0.05$ ). **Conclusion** Numbers of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in spleen and the level of IL-10 in BALF and serum decreased in asthmatic mice which might contribute to the pathogenesis of asthma. AST can increase the numbers of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells, the mRNA expression of FoxP3 and the level of IL-10, and thus provides protective effects against asthma.

**Key words:** Astragalus; asthma; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells; IL-10; mouse

哮喘是一种常见病、多发病, 其发病机制复杂。目前临幊上治疗多以脱敏、抗炎等对症措施为主,

但毒副作用较大。新近研究表明 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞与哮喘变态反应性炎症和在外周维持机体自身免疫耐受有着密切的关系<sup>[1]</sup>。黄芪作为传统中药, 可通过降低患者气道高反应性, 调节患

\* 济宁医学院 2008 年青年科学基金资助项目

△ [通信作者]王郡甫, E-mail: wjf1030@yahoo.com.cn

者免疫功能而对支气管哮喘有一定的治疗作用<sup>[2]</sup>,但其机制尚未完全明确。本研究通过观察黄芪对哮喘小鼠 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞及相关细胞因子的影响,为黄芪的治疗机理及临床应用提供理论和实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

BALB/c 小鼠 30 只,6 周龄,质量 16~20 g,均雌性,由山东大学实验动物中心提供。黄芪注射液系成都地奥九泓制药厂产,20g/10mL,批号:0311066;鸡卵清蛋白(OVA)粉剂购自美国 Sigma 公司;小鼠 IL-4、IFN-γ 及 IL-10 ELISA 试剂盒均购自上海西唐生物科技有限公司;藻红蛋白(PE)标记的抗小鼠 CD25 单克隆抗体(mAb)和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗 CD4 mAb 系 eBioscience 公司产;TRIzol Reagent 系 GIBCO 公司产;RT-PCR 试剂盒系 TaKaRa 公司产;FoxP3 引物及 β-actin 引物系上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 小鼠哮喘模型的建立及分组** BALB/c 小鼠随机分为 3 组;对照组:实验第 1 天和第 8 天分别腹腔注射生理盐水 0.2ml,实验第 15 天后将小鼠置于密闭容器内,生理盐水雾化攻击,每日 1 次,每次 30min,连续 7d。哮喘组:实验第 1 天和第 8 天分别腹腔注射 OVA 抗原液 0.2ml(含鸡卵清蛋白 100 μg 和氢氧化铝 1mg)致敏 2 次;15d 后将小鼠置于密闭容器内,以 60g/L 的 OVA 溶液雾化攻击,每日 1 次,每次 30min,连续 7d。黄芪组:致敏方式同哮喘组,但从第 15 天起每次雾化攻击前 1h 给予黄芪注射液(10ml/kg)腹腔注射,连续 7d。当致敏小鼠出现点头呼吸、用力呼吸等症状时,表示哮喘激发成功。3 组小鼠在同一条件下喂养。

**1.2.2 支气管肺泡灌洗液的制备** 各组小鼠最后一次激发 24h 后,腹腔注射戊巴比妥钠(50 μg/g 质量)行麻醉术,摘眼球法从眶动、静脉采血,离心后去血清,-20℃冻存备用。处死小鼠后打开其胸腔,结扎左主支气管。以眼科剪在气管上剪一斜口,插管,以 0.1mol/L PBS 冲洗,反复回抽 3 次,每次 0.6ml,灌洗 2 次,洗液回收率 > 80%。1000r/min 离心 10min,收集上清液即 BALF,-20℃保存。采用 ELISA 法检测小鼠 BALF 中 IL-4、IFN-γ、IL-10 及血清中 IL-10 水平,检测步骤严

格按试剂盒要求进行。

**1.2.3 FCM 检测 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞** 制备各组小鼠脾细胞悬液,将细胞密度调至 5 × 10<sup>6</sup>/ml,然后取 1 ml 细胞悬液加入 FITC-抗 CD4 mAb(0.25 μg/10<sup>6</sup> 细胞)和 PE-抗 CD25 mAb(0.125 μg/10<sup>6</sup> 细胞),4℃避光孵育 30 min 后,用冷 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH7.4)洗 3 次,最后悬浮在 0.01 mol/L PBS 缓冲液中,调整细胞密度为 1 × 10<sup>6</sup>/ml,取 400 μl 上流式细胞仪进行分析。

**1.2.4 FoxP3 mRNA 的表达** FoxP3 上游引物 F1: 5'-ACCCAAGGGCTCAGAACT-3'; 下游引物 R1: 5'-GATCATGGCTGGGTTGTC -3'。β-actin 上游引物 F2: 5'-GTGGGCCGCTCTAG-GCACCA-3', 下游引物 R2: 5'-TGGCCT-TAGGGTTCAGGGGG-3'。取各组小鼠脾组织, TRIzol 一步法提取组织总 RNA, 建立 RT-PCR 反应体系。将 PCR 扩增产物 10 μl 与 2 μl 上样缓冲液混合后点样于 15 g/L 的琼脂糖凝胶中, 50V 恒压电泳 50 min, 260 nm 波长紫外光下观察结果。用 FR-200UV/WHITE ANALYSIS 及 Photo Impact SE 系统分析电泳结果。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理。

## 2 结 果

### 2.1 小鼠 BALF 及血清中细胞因子的检测结果

哮喘组小鼠 BALF 中 IL-4 含量与对照组相比明显增高( $P < 0.01$ ),BALF 中 IFN-γ、IL-10 及血清中 IL-10 含量较对照组明显降低( $P < 0.01$ );与哮喘组相比,黄芪组 BALF 中 IL-4 含量明显降低( $P < 0.01$ ),而 BALF 中 IFN-γ、IL-10 及血清中 IL-10 含量显著增高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 小鼠 BALF 中 IL-4、IFN-γ、IL-10 及血清中 IL-10 的水平变化( $\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/ml}$ )

组别	BALF			血清
	IL-4	IFN-γ	IL-10	
对照组	20.85 ± 4.29	55.78 ± 11.78	33.54 ± 5.24	65.68 ± 4.31
哮喘组	58.62 ± 5.16*	26.25 ± 6.33*	17.28 ± 2.36*	17.82 ± 1.44*
黄芪组	35.02 ± 3.18△	43.56 ± 4.7△	25.26 ± 1.53△	35.32 ± 2.77△

\* 与对照组比较;#  $P < 0.01$ ;与哮喘组比较;△  $P < 0.01$

### 2.2 黄芪对 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞数量及 FoxP3 mRNA 表达水平的影响

由表2可见,哮喘组小鼠脾脏中 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞数量及FoxP3 mRNA表达水平较对照组明显降低( $P<0.01$ );与哮喘组相比,黄芪组小鼠脾脏中 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞数量及FoxP3 mRNA表达水平显著增高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。图1为各组小鼠脾脏中 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞的FCM分析结果。图2为各组小鼠脾脏中FoxP3 mRNA的表达水平。

表2 各组小鼠脾脏中 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞数量及FoxP3 mRNA的表达水平( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	$CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞(%)	FoxP3 mRNA
对照组	$6.18 \pm 0.80$	$0.68 \pm 0.19$
哮喘组	$2.01 \pm 0.72^\#$	$0.27 \pm 0.03^\#$
黄芪组	$3.77 \pm 2.19^\triangle$	$0.46 \pm 0.24^\triangle$

与对照组比较: $\# P<0.01$ ;与哮喘组比较: $\triangle P<0.05$

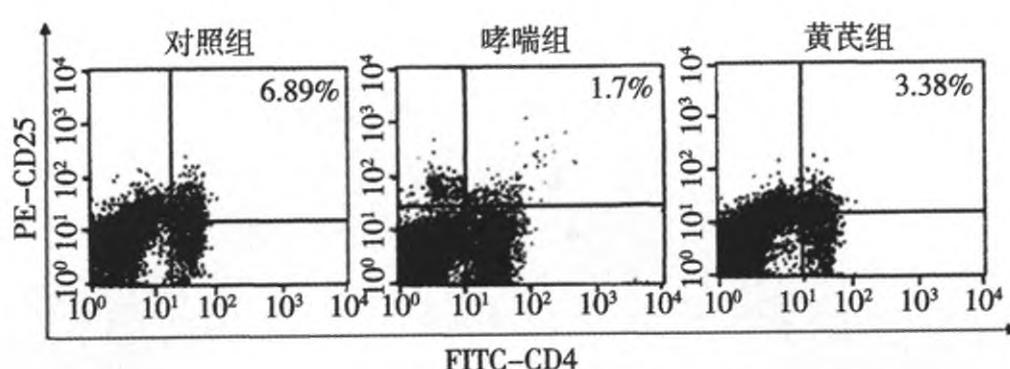


图1 各组小鼠脾脏中 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞FCM分析结果

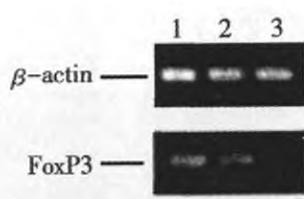


图2 各组小鼠脾脏中FoxP3 mRNA的表达水平

### 3 讨论

以往研究证实,免疫失调是支气管哮喘发病的重要因素,急性发作时,辅助性T(Th1/Th2)细胞比例失衡,Th1细胞分泌细胞因子IFN- $\gamma$ 减少,Th2细胞分泌细胞因子IL-4等增多<sup>[3]</sup>,本实验也证实了此结果。尽管Th1/Th2失衡在哮喘发病中扮演着重要的角色,但不能解释所有的发病机制。 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞是近年被认识的有负调节功能的T细胞亚群,转录因子FoxP3(forkhead/winged helix transcription factor)是该细胞的特征性标志,限制性地表达于 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞。大量研究提示, $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞在哮喘炎症中也发挥着重要作用,它可抑制Th2细胞反应、嗜酸性粒细胞的增多及气道炎症反应<sup>[4]</sup>。Stock等<sup>[5]</sup>发现过继性转移 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞可抑制哮喘炎症。 $CD4^+ CD25^+$ 调

节性T细胞可通过分泌IL-10减少中性粒细胞聚集<sup>[6]</sup>。IL-10局部滴入治疗可抑制哮喘小鼠肺部变应性炎症反应,改善其呼吸道症状<sup>[7]</sup>。本实验结果发现哮喘小鼠脾脏中 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞数量下降,FoxP3 mRNA表达水平下调,BALF及血清中IL-10含量减少,进一步证实了 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞数目的减少不能有效发挥其免疫抑制功能是哮喘发病的机制之一。

黄芪作为益气养血的扶正药物,具有补气固表、利尿排毒、敛疮生肌的功能。黄芪注射液含有活性较强的三萜皂甙、黄酮类、多糖类、氨基酸和微量元素,能抗菌、抗病毒、提高机体免疫功能<sup>[8]</sup>。本研究探讨了黄芪注射液对哮喘小鼠 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞及细胞因子的影响。结果发现,黄芪注射液可减少气道炎症细胞因子IL-4的分泌,增加IFN- $\gamma$ 、IL-10的含量,上调 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞数量及FoxP3 mRNA的表达。推测其机制可能为:一方面黄芪注射液可部分扭转Th1/Th2细胞之间的免疫平衡,减少Th2型细胞因子IL-4而增加Th1型细胞因子IFN- $\gamma$ 、IL-10的分泌;另一方面,黄芪注射液可直接上调 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞及FoxP3 mRNA的表达水平,而 $CD4^+ CD25^+$ 调节性T细胞可抑制Th2细胞反应、嗜酸性粒细胞的增多及气道炎症反应,同

时也可分泌 IL-10 减少中性粒细胞聚集,减轻气道炎症。但黄芪注射液上调 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的具体机理有待进一步阐明。

#### 参考文献:

- [1] 王耀丽,钱桂生,程晓明.调节性 T 细胞在支气管哮喘中的作用[J].中华结核和呼吸杂志,2005,28(12):856-858.
- [2] 刘启,熊南山,程斌.黄芪免疫药理学研究进展[J].中国中医药杂志,2004,2(6):321-322.
- [3] 董宗祈.小儿过敏性哮喘的发病机制及其治疗[J].实用儿科临床杂志,2000,15(3):174-176.
- [4] Ziegler SF. Regulatory T cells and inflammation: better late than never[J]. Immunity,2008,29(1):5-7.

(上接第 231 页)为 40 KD(p40) 和 35 KD(p30) 的两条肽链经二硫键共价连接而成的异二聚体糖蛋白。IL-12 具有多种生物学特性,能显著增强 NK 细胞和特异性细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL) 的细胞毒性<sup>[6]</sup>;诱导辅助性 T 细胞(help T cell, Th) 向 Th1 方向的分化;刺激 T 细胞及 NK 细胞分泌多种细胞因子,特别是干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ),能激活巨噬细胞的溶细胞膜的作用,能诱导干扰素诱导蛋白 10(interferon inducible protein 10, IP-10) 而发挥抑制肿瘤血管形成的作用,显示出其在肿瘤的免疫治疗中将起重要作用<sup>[7]</sup>。

晚期肿瘤患者常用吗啡等阿片药物镇痛,我们的实验显示,吗啡能够刺激 DC 成熟<sup>[8]</sup>,成熟的 DC 通过增强 CTL 细胞毒性及增加 IFN- $\gamma$  等细胞因子的分泌来发挥抗肿瘤免疫作用。提示吗啡在发挥镇痛作用的同时,是否也存在延缓或阻止肿瘤进展的可能性。

吗啡影响 DC 的作用途径尚无定论,文献报道,在小鼠的 DC 中存在  $\mu$ 、 $\alpha$  和  $\delta$  3 种阿片受体<sup>[9]</sup>。本实验通过阿片受体阻断剂纳洛酮阻断阿片受体后,吗啡对 IL-12 分泌的影响变弱乃至消失,提示吗啡可能通过阿片受体来发挥对 DC 的影响。当然,关于吗啡与免疫系统之间的研究仍在进行中,其作用机制在不远的未来将被揭开。

#### 参考文献:

- [1] Vojdani Z, Dehghani F, Seyed F, et al. Quantitative study of

- [5] Stock P, Akbari O, Berry G, et al. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express FoxP3 and protect against airway hyper-reactivity. Nat Immunol, 2004, 5(11): 1149-1156.
- [6] Venet F, Chung CS, Huang X, et al. Lymphocytes in the development of lung in? ammation:a role for regulatory CD4<sup>+</sup> T Cells in indirect pulmonary lung injury[J]. J Immunol, 2009, 183(5):3472-3480.
- [7] 张磊,曲书强,张凤莲.白细胞介素-10 对支气管哮喘小鼠肺部炎症的影响[J].实用儿科临床杂志,2010,25(9):634-636.
- [8] 刘莎,符州.黄芪免疫调节作用及其临床应用[J].国际中医中药杂志,2006,28(4):203-205.

(收稿日期 2011-06-03)

- the effects of morphine on the mouse spleen and inguinal lymph node[J]. Arch Iran Med, 2010, 13(4):294-300.
- [2] Olin MR, Roy S, Molitor T. In vivo morphine treatment synergistically increases LPS-induced caspase activity in immune organs[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2010, 5(4):546-52.
- [3] Segura E, Amigorena S, Théry C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses[J]. Blood Cells Mol Dis, 2005, 35(2):89-93.
- [4] Véron P, Segura E, Sugano G, et al. Accumulation of MFG-E8 /lactadherin on exosomes from immature dendritic cells [J]. Blood Cells Mol Dis, 2005, 35(2):81-88.
- [5] Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 311:17-58.
- [6] Bai B, Song W, Ji Y, et al. Microglia and microglia-like cell differentiated from DC inhibit CD4 T cell proliferation[J]. J PLoS One, 2009, 4(11):e7869.
- [7] Monti P, Leone BE, Zerbi A, et al. Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentingmonocytes and induce IL-10 high IL-12 low regulatory dendritic cells[J]. J Immunol, 2004, 172(12):7341-7349.
- [8] 路海,胡景霞,白波.吗啡持续刺激对小鼠树突状细胞成熟的影响[J].现代免疫学,2011,31(2):126-129.
- [9] Kirst A, Wack C, Lutz WK, et al. Expression of functional kappa-opioid receptors on murine dendritic cells[J]. Immunol Lett, 2002, 84(1):41-48.

(收稿日期 2011-06-21)