

丹参协同 地塞米松对哮喘大鼠 T-bet/GATA-3 及 Th 失衡的调控研究

陈棱丽¹, 吕剑², 成霖霞¹, 易璐³, 何少为², 刘晓日²

1 湖南省妇幼保健院儿科(长沙 410008); 2 南华大学附属南华医院儿科; 3 南华大学附属第一医院儿科

摘要:目的 探讨丹参协同 地塞米松对哮喘大鼠 T-bet/GATA-3及Th失衡的调控作用。**方法:** 随机将80只SD大鼠分为哮喘模型组; 正常对照组; 丹参治疗组; 联合用药组(丹参协同 地塞米松治疗), 每组20只。测定气道反应性; 肺组织苏木素伊红(HE)染色观察病理改变; 蛋白质印迹法(western-blots)检测T-bet和GATA-3在肺组织中的表达; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肺组织匀浆白细胞介素4(IL-4)和白细胞介素5(IL-5)水平。**结果:** 丹参组和联合用药组大鼠肺部病理学切片呈现肺部炎症改变较哮喘组减轻, 以联合用药组减轻更明显。大鼠气道阻力示哮喘组>丹参组>联合用药组>对照组(P 均< 0.05), 且各组随着组胺浓度的升高气道阻力增高明显。蛋白质印迹法检测肺组织中T-bet水平对照组>联合用药组>丹参组>哮喘组(P 均< 0.01), 而GATA-3水平则与之相反。肺组织IFN- γ 蛋白水平对照组>联合用药组>丹参组>哮喘组(P 均< 0.01), 而IL-4水平则与之相反。肺T-bet/GATA-3水平与IFN- γ 蛋白水平呈正相关($r=0.787, P < 0.01$), 与IL-4蛋白水平呈负相关($r=-0.816, P < 0.01$), 与IFN- γ /IL-4比值呈正相关($r=0.893, P < 0.01$)。**结论**丹参注射液可上调T-bet/GATA-3水平, 进而纠正Th1/Th2失衡, 与地塞米松有协同发挥抗气道炎症作用。

关键词:哮喘; T-bet; GATA-3; Th1/Th2平衡; 丹参; 地塞米松

Abstract: Objective: To study the regulation of T-bet/GATA-3 and Th imbalance in asthmatic rats with Salvia and Dexamethasone. **Methods:** 80 SD rates were randomly divided into four groups: 1. Asthma model group; 2. Normal control group; 3. Salvia group; 4. Combined group by Salvia and Dexamethasone. Each group has 20 rats. The airway responsiveness were observed; Lung tissue of SD rats were stained with HE, Pathologic examinations of lung tissue- stained were made. GATA-3 and T-bet expressions in lung tissue were detected by western-blots, respectively. Interleukin-4 (IL-4) and Interleukin-5 (IL-5) in lung hemogenous were detected by ELISA.

Results: The inflammation in slices of rat lung pathology in Salvia group and Combined group were mild compared with Asthma group, which most was in combined group. Airway resistance indicated that Asthma group>Salvia group>Combined group>Control group($P < 0.05$), and histamine concentration had been increased with the airway resistance. Western-blots test the level of T-bet, which showed that Control group>Combined group>Salvia group>Asthma group($P < 0.01$), however it contrasted in GATA-3 level. The level of IFN- γ in lungs, which showed that Control group>Combined group>Salvia group>Asthma group($P < 0.01$), however it contrasted in IL-4 level($r=0.893, P < 0.01$). **Conclusion** Salvia injection may up regulate the expression of T-bet/GATA-3, and correcting Th1/Th2 imbalance, which play a synergistic role in anti-inflammation with Dexamethasone.

Key Words: Asthma; T-bet; GATA-3; Th1/Th2 balance; Salvia; Dexamethasone

支气管哮喘是一种常见的慢性炎症性气道阻塞性疾病，许多细胞因子和炎症介质参与了病理过程。研究证实 Th1/Th2 细胞的比例失衡是其发病的核心环节，哮喘的免疫学发生机制是 Th2 反应为优势的免疫功能紊乱，由于 Th1 降低和 Th2 增高，促进大量炎症介质分泌和细胞活化，导致哮喘发生^[1]。T-bet(T-box expressed in T cells)是 T 盒基因家族新成员，是 Th1 特异的转录因子，在 Th1 细胞的发育中起核心作用，且对 Th2 细胞因子的合成有抑制作用^[2]。GATA3(GATA binding protein 3, GATA3)主要表达于 Th2 细胞并上调 Th2 细胞因子的表达，是 Th2 细胞分化所必须的转录因子。地塞米松(Dexamethasone, DXM)是目前临床应用较广且有效的抗哮喘药物，丹参注射液治疗哮喘疗效明显，但其机制还有待进一步研究。本研究通过建立哮喘大鼠模型，给予丹参注射液、DXM 进行干预，观察各组哮喘大鼠气道炎症和 T-bet/GATA-3 变化，探讨丹参注射液联合 DXM 抑制哮喘慢性气道炎症的免疫学机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂和仪器 试验动物清洁级的 SD 大鼠 80 只，购自中南大学实验动物中心，鼠龄 2-3 月，重 180-230 g，其他试剂和仪器如下：卵清蛋白(OVA, 美国 SIGMA 公司)，Al(OH)₃，(天津市大茂化学试剂厂)，兔抗大鼠 T-bet 抗体(SANTA CRUZ 公司，美国)；兔抗大鼠 GATA-3 抗体(SANTA CRUZ 公司，美国)；过氧化物酶标记的链霉卵白素(ABC)免疫组化检测试剂盒(羊抗兔) (北京中杉金桥生物技术有限公司)；大鼠 IL-4、IL-5 的酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(R&D 公司，美国)；丹参注射液(开开援生制药公司 2ml/支，含生药丹参 1.5g/ml)；地塞米松(江苏涟水制药有限公司)；生物信号采集处理系统(北京中杉金桥生物技术有限公司)；酶标仪(AWARENESS 公司，美国)；影像分析系统(BIO-RAD 公司，美国)；电泳仪、电转仪及附件(BIO-RAD 公司，美国)。

1.2 方法

1.2.1 SD大鼠哮喘模型的建立及处置 SD大鼠80只随机分为正常对照组(A组)；哮喘模型组(B组)；丹参治疗组(C组)；联合用药组(D组)，每组20只，不拘雌雄；各组分笼饲养，自由进食去卵白蛋白的特殊饲料和水，动物饲养环境符合 SPF实验动物级环境设施标准(安静，温暖，20℃，避强光)，正常饲养7天后进行实验。哮喘模型制备参照Palmans^[3-4]等方法。具体操作如下：实验第1天在大鼠双上肢内侧、双下肢大腿外侧及腹腔注射1 ml混悬液(含10mg OVA及30mg氢氧化铝凝胶)，其中腹腔注射0.6ml、皮下共注射0.4 ml。第8天重复上述步骤一次。致敏15天将大鼠置于不完全封闭自制容器中(30cm×30cm×40cm)雾化吸入1%OVA。每次雾化30 min，隔日1次，共14天。以大鼠出现烦躁、搔鼻、腹肌痉挛、呼吸加快、口唇发绀、点头呼吸及四肢瘫软等表现为激发成功。药物干预^[5]：丹参组每次激发前30 min腹腔注射20%丹参注射液3 ml，联合用药组20%丹参注射液3 ml+DXM 1mg/kg联合干预。于末次激发24 h后将大鼠进行气道反应性测定，并处死取材。10%水合氯醛(0.5g/kg)腹腔注射麻醉大鼠。气道反应性测定后，75%的乙醇消毒皮肤，取仰卧位固定于手术

台上, 剪开胸腔并用注射器吸净心脏血。无菌取出气管连同肺, 右肺注入2ml空气后结扎支气管, 4%多聚甲醛固定6小时, 20%蔗糖磷酸缓冲液中4℃浸泡过夜, 常规石蜡包埋, 4 μm切片, HE染色观察病理改变。

1.2.2 气道反应性测定 于末次激发 24 h 后, 大鼠腹腔注射 10%水合氯醛 (0.5 g/kg) 麻醉, 仰卧固定, 正中剪开颈部皮肤, 暴露气管, 行气管插管。将胸腔插管与“U”型水检压计和差压换能器 P2 的一端相连, 然后借助胸腔插管的钝针头于前胸 4~5 肋间插入大鼠的胸腔内, 可测得胸内压(如果水检压计水柱随大鼠呼吸而上下波动, 且为负值, 说明插管已插入胸膜腔)。然后将差压换能器 P2 的另一端连接至气道, 可测得胸内压与气道内压之差, 即跨肺压。将气管插管接流速换能器 P1。差压换能器 P2、流速换能器 P1 均连接计算机, 记录计算机上数据。通过计算机处理, 将气道流速、跨肺压换算成气道阻力(Raw), $Raw = \text{跨肺压} / \text{气道流速}$ 。随着大鼠自主呼吸, 待大鼠状态稳定后, 记录吸入盐酸组胺浓度为 0 时(仅吸入磷酸盐缓冲液(PBS))大鼠跨肺压及气道流速作为基础值, 然后依次给大鼠气雾吸入不同浓度的盐酸组胺(0.02, 0.04, 0.06, 0.08 及 0.16 mg/ml) 30 秒, 观察 5 分钟内大鼠的跨肺压及气道流速变化情况。以吸入盐酸组胺浓度为 0(PBS) 时 Raw 值作为基础值 1.00, 再换算成上述不同盐酸组胺浓度下 Raw 值。

1.2.3 肺组织病理检测 HE染色蜡切片常规脱蜡至水, 吹干, 置入苏木素中 7min, 盐酸酒精分色, 反蓝30s入伊红中3min, 常规脱水、透明、中性树胶封片。

1.2.4 应用蛋白质印迹(western-blot)检测 T-bet、GATA-3 在大鼠肺组织的表达 组织裂解提取蛋白, 将获得的蛋白质样品通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对不同分子量的蛋白质进行分离, 并通过转移电泳将凝胶上分离到的蛋白质转印至固相支持物(NC膜)上, 用抗靶蛋白的非标记抗体(一抗 1:100)与转印后膜上的靶蛋白进行特异性结合, 再与经辣根过氧化物酶标记(偶联)的二抗(1:500)结合, 最后用 ECL 超敏发光液试剂检测。转印膜上含有靶蛋白, 经 X 光片曝光、显影后, 则会在 X-光片上出现特异性蛋白条带。GAPDH 为内参, 处理方法同上, 其中一抗(1:5000), 二抗(1:80000)。将显带的 X 线片在图像分析系统上分析, 得到每条带的灰度值。

1.2.5 肺组织匀浆肺 IFN-γ 和 IL-4 蛋白水平的检测 右肺称重后剪碎匀浆制成 10% 悬液, 3000 r/min 离心 10 分钟, 取上清-20℃待测。肺 IFN-γ 和 IL-4 蛋白均采用双抗体夹心(ABC-ELISA)法检测。

1.3 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件处理所有统计数据。计量资料采用均数标准差($\bar{x} \pm S$)表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, 两样本之间的比较采用独立样本 *t* 检验, 两变量之间相关性检验采用直线相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠气道反应性的测定 两组大鼠气道阻力的基础值($\bar{x} \pm S$, cmH₂O/ml/秒): 对照组(0.754±0.218)哮喘组(1.252±0.645)丹参组(0.973±0.116)联合用药组(0.813±0.678), 可见在不同组胺浓度下大鼠气道阻力均示哮喘组>丹参组>联合用药组>对照组(P 均< 0.05), 且各组随着组胺浓度的升高气道阻力增高明显。提示丹参治疗有效, 联合用药疗效提升。见

表 1。

表 1 不同浓度组胺对 8 周两组大鼠气道阻力的影响($\bar{x}\pm S$, 测定值/基础值)

组别	0.02 mg/ml	0.04 mg/ml	0.06 mg/ml	0.08 mg/ml	0.16 mg/ml
A 组	1.01±0.23	1.14±0.34	1.20±0.35	1.31±0.29	1.35±0.31
B 组	1.54±0.35	1.87±0.35	1.97±0.32	2.53±0.29	2.98±0.41
C 组	1.13±0.33	1.32±0.27	1.39±0.31	1.46±0.27	1.67±0.35
D 组	1.08±0.21	1.17±0.37	1.30±0.35	1.46±0.32	1.54±0.40
P 值(B 比 A)	0.037	0.034	0.021	0.043	0.026
P 值(B 比 C)	0.032	0.020	0.042	0.037	0.031
P 值(B 比 D)	0.048	0.038	0.034	0.037	0.039
P 值(C 比 D)	0.046	0.048	0.039	0.041	0.043

2.2 肺组织病理改变: 对照组大鼠肺组织切片可见肺泡间隔细, 管腔圆整, 无炎性细胞浸润, 肺泡、管壁结构完整, 无支气管收缩征象。哮喘组肺泡充血、支气管平滑肌增厚、断裂, 管腔内充满大量粘液, 细支气管血管周围大量炎症细胞浸润, 主要是嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞为主。丹参组和联合用药组炎症和气道重塑表现较哮喘组减轻, 以联合用药组减轻更明显。具体见图 1, 图 2, 图 3, 图 4。

图 1 对照组肺的 HE 染色×100

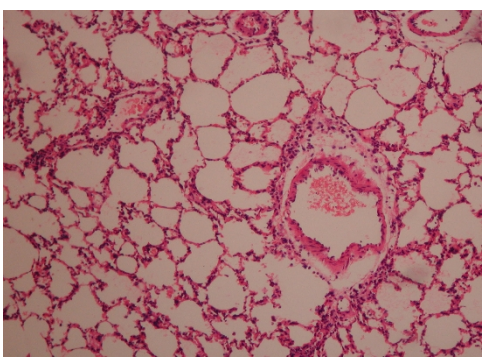


图 2 哮喘组肺的 HE 染色×100

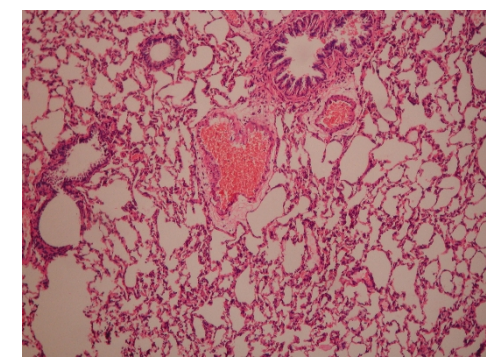


图 3 丹参组肺的 HE 染色×100

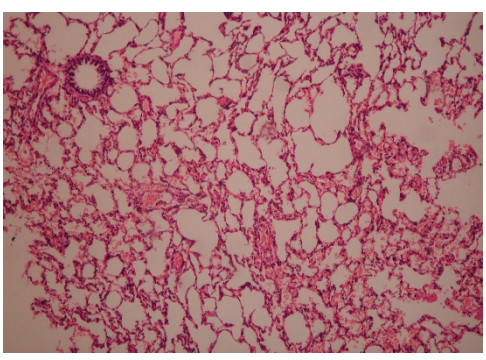
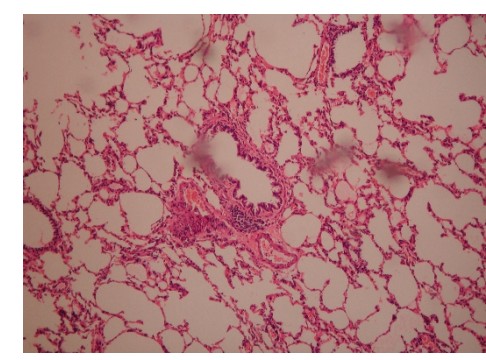


图 4 联合用药组肺的 HE 染色×100



2.3 各组免疫学指标的变化及相关分析

2.3.1 SD 大鼠肺组织 T-bet 及 GATA-3 的表达 应用 Western-blots 检测 SD 大鼠肺组织 T-bet 及 GAPDH 灰度值, T-bet/GAPDH 求得相对灰度值。对照组

(0.976 ± 0.43) > 联合用药组 (0.905 ± 0.41) > 丹参组 (0.845 ± 0.38) > 哮喘组 (0.714 ± 0.39) (P 均 < 0.01)。同样测GATA-3及GAPDH灰度值, GATA-3/GAPDH求得相对灰度值。对照组 (0.732 ± 0.33) < 联合用药组 (0.975 ± 0.31) < 丹参组的 (1.301 ± 0.29) < 哮喘组的 (1.785 ± 0.36) (P 均 < 0.01)。见图5, 图6

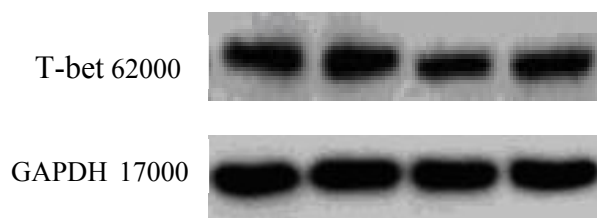


图5 肺T-bet: 从左至右依次为对照组、哮喘组、丹参组、联合用药组。GAPDH为内参

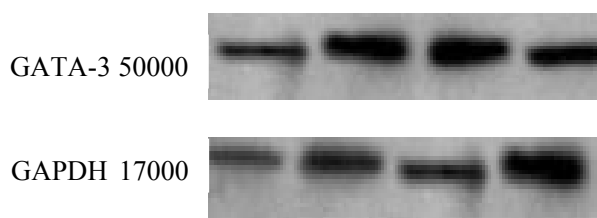


图6 肺GATA-3: 从左至右依次为对照组、哮喘组、丹参组、联合用药组。GAPDH为内参

2.3.2 SD大鼠肺IFN- γ 和IL-4蛋白水平变化 肺组织IFN- γ 蛋白水平对照组 (129.3 ± 12.6) ng/L > 联合用药组 (118.9 ± 10.7) ng/L > 丹参组 (107.4 ± 10.7) ng/L > 哮喘组 (86.2 ± 12.1) ng/L (P 均 < 0.01)。而肺组织IL-4蛋白水平对照组 (86.2 ± 17.3) ng/L < 联合用药组 (102.3 ± 16.4) ng/L < 丹参组的 (118.7 ± 15.2) ng/L < 哮喘组的 (143.7 ± 15.1) ng/L (P 均 < 0.01)。

2.3.3 SD大鼠肺组织T-bet/GATA-3与IFN- γ 、IL-4、IFN- γ /IL-4的相关性: 肺T-bet/GATA-3水平对照组 > 联合用药组 > 丹参组 > 哮喘组 (P 均 < 0.01)。肺T-bet/GATA-3水平与IFN- γ 蛋白水平呈正相关 ($r=0.787, P < 0.01$), 与IL-4蛋白水平呈负相关 ($r=-0.816, P < 0.01$), 与IFN- γ /IL-4比值呈正相关 ($r=0.893, P < 0.01$)。

3讨论

目前普遍认为哮喘是一种气道的慢性炎症, 治疗支气管哮喘最有效、最常用的依然是糖皮质激素, 但是它对机体免疫系统的抑制特别是对IFN- γ 的抑制, 降低了机体防御感染的能力。且有研究表明, 早期应用糖皮质激素能对网状基底膜增厚有一定的作用, 但不能阻止最终的气道重塑^[6]。所以单用糖皮质激素不利于哮喘的最终缓解。现研究认为哮喘是以辅助性T细胞Th2型反应为主要特征的免疫反应, 由于Th2反应增强而Th1反应减弱, 导致Th1/Th2失衡, 从而导致B细胞合成增多, 嗜酸性粒细胞活化浸润气道造成气道高反应性及气道病理炎症改变^[7-8]。因此在糖皮质激素治疗的同时可考虑合用某些免疫调节药物, 使Th1类细胞因子水平适度上调, Th1/Th2免疫反应趋于平衡, 以期减少

激素的不良反应, 并提高临床疗效。本研究选择中药丹参, 它具有降低毛细血管通透性、改善微循环、保护肺功能、抗氧自由基、抗炎等作用^[9]。研究认为丹参具有显著抑制哮喘大鼠气道炎症细胞浸润的作用, 从而减轻气道炎症, 其发生机制则可能与促进 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞 (CD4⁺CD25⁺Treg) 的产生有关^[10]; 而 CD4⁺CD25⁺Treg 可以抑制 T 细胞亚群 2 (Th2) 的活化, 从而抑制哮喘气道炎症的发生和发展^[11-12]。本研究发现, 丹参组和联合用药组炎症和气道重塑表现较哮喘组减轻, 以联合用药组减轻更明显。而且在大鼠肺功能测定中也发现在不同组胺浓度下大鼠气道阻力均示哮喘组>丹参组>联合用药组>对照组 (P 均 < 0.05), 且各组随着组胺浓度的升高气道阻力增高明显。提示丹参能减轻气道阻力, 和地塞米松协同作用明显。

针对 Th1/Th2 失衡, T-bet/ GATA-3 的比率是目前研究热点, T-bet 在 CD4⁺ Th1 型细胞分化中起重要作用, 可促进 Th1 的发育, 抑制 Th2 细胞因子合成, 使已定向分化的 Th2 逆转为 Th1, 其基因的表达低下与支气管哮喘发病密切相关^[13]。GATA-3 在分化的 Th1 细胞中异位表达, 可以使其逆转为 Th2 细胞。Th2 细胞因子受到多种因子的调控, 其中, STAT-6、GATA-3 等转录因子在 Th2 反应的发生、发展中起着重要的正向调控作用, 是导致哮喘病理变化的重要因子^[14]。T-bet/GATA-3 可作为支气管哮喘的一个评价指标, 它的表达状态直接影响 Th1/Th2 细胞的分化, 在哮喘发生中起到重要作用。以 T-bet/GATA-3 为靶向的治疗为哮喘及部分激素难控制的哮喘带来一片曙光, 但如何在临床中有效的应用仍是我们需要克服的重大难题。本研究发现丹参注射液可以通过增强 T-bet 表达, 同时抑制 GATA-3 的表达, 通过双向调节 T-bet 和 GATA-3 平衡逆转 T-bet/ GATA-3 的比率, 逆转 Th1/Th2 失衡, 从而改善哮喘的症状, 有望成为 T-bet/GATA-3 为靶向的治疗哮喘的新途径。

总之, 丹参注射液可有效改善哮喘的炎症反应和肺功能, 该作用可能和调节哮喘 T-bet/GATA-3 的比率, 逆转 Th1/Th2 失衡有关, 但产生的具体机制有待深入研究。

参考文献:

- [1] Byung HK, Hwang S S, Kim J Y, et al. Th2 LCR is essential for Regulation Of Th2 cytokine genes and for pathogenesis of allergic asthma[J]. PNAS, 2010, 107(23): 10614-10619.
- [2] Maier E, Duschl A, Horejs-Hoeck J. STAT6-dependent and independent mechanisms in Th2 polarization[J]. Eur J Immunol, 2012, 42(11): 2827-2833
- [3] Palmans E, Kips J C, Pauwels R A. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(21): 627-635.
- [4] 殷晓峰, 冯玉麟, 刘春涛, 等. 大鼠支气管哮喘模型气道重构的研究[J]. 四川医学, 2002; 5(23): 497-498.
- [5] 金毅, 徐永健, 张珍祥. 哮喘大鼠肺泡巨噬细胞蛋白激酶 C- α 表达及丹参对其影响. 中国组织化学与细胞化学杂志 2000; 9(1): 74-77.
- [6] 陈俊艳, 薄建萍, 巩雪芳. 地塞米松对支气管哮喘大鼠气道重塑及内皮素一

1 的影响[J]. 当代医学, 2009; 15(4): 2-3.

[7] Deo SS, Mistry KJ, Kakade AM, et al. Role played by Th2 type cyto-

kines in IgE. mediated allergy and asthma[J]. Lung India, 2010, 27(2): 66-71.

[8] Yamaguchi T, Soma T, Takaku Y, et al. Salbutamol modulates the balance of Th1 and Th2 cytokines by mononuclear cells from allergic asthmatics[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2010, 152(Suppl 1): 32-40.

[9] 杜冠华, 张均田. 丹参现代研究概况与进展[J]. 医药导报, 2004; 23(7): 435-439.

[10] 薛克营, 熊盛道, 熊维宁, 等. 丹参注射液对哮喘大鼠气道炎症及 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2008; 37(1): 18-21.

[11] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003; 26(3): 132-8.

[12] HZ Shi, XJ Qin. CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in allergy and asthma[J]. Allergy, 2005; 60(8): 986-95.

[13] 黄玲, 向旭东, 王文军, 等. 罗格列酮对支气管哮喘急性发作期患者 T 淋巴细胞转录因子 T-bet/GATA-3 表达的调控. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30: 116-120.

[14] Maneechotesuwan K, Xin Y, Ito K, et al. Regulation of Th2 Cytokine Genes by p38MAPK-Mediated Phosphorylation of GATA-3[J]. J Immunol, 2007, 178(4): 2491-2498.