

雷公藤多甙对哮喘患者 Th_1 、 Th_2 细胞因子产生的影响*

林科雄 王长征 钱桂生

内容提要 目的:了解雷公藤多甙对哮喘患者 Th_1 、 Th_2 细胞因子的影响,进一步探讨雷公藤多甙治疗哮喘的机制。方法:选 12 例中、重度哮喘患者,口服雷公藤多甙每日 40 mg 或 60 mg 治疗 4 周,治疗前后取外周血制备血清,并取治疗前外周血分离单个核细胞(PBMC),在体外用刀豆蛋白(ConA)刺激 6h 后再加入雷公藤甲素处理 24h,收集培养上清,用酶联免疫吸附试验(ELISA)对患者血清及 PBMC 培养上清 IL-2、IL-4、IL-5、 γ 干扰素($IFN-\gamma$)水平进行检测。结果:(1)雷公藤多甙治疗后哮喘患者血清中 IL-2、IL-4、IL-5 水平较治疗前降低($P < 0.01$),而 $IFN-\gamma$ 治疗前后均在检测灵敏度(25 pg/ml)以下。(2)雷公藤甲素处理后哮喘患者 PBMC 分泌 IL-2、IL-4、IL-5 减少($P < 0.01$, $P < 0.05$),而 $IFN-\gamma$ 也在检测灵敏度以下。结论:雷公藤多甙对哮喘患者 Th_2 细胞因子的产生具有明显的抑制作用,是治疗哮喘的重要机制。但雷公藤多甙对 Th_1 细胞因子的产生也有抑制作用,说明雷公藤抑制 Th_2 、 Th_1 细胞因子产生的作用无特异性。

关键词 雷公藤多甙 哮喘 细胞因子

Effect of Tripterygium Wilfordii on Th_1 , Th_2 Cytokines Production in Asthma Patients LIN Ke-xiong, WANG Chang-zheng, QIAN Gui-sheng *Institute of Internal medicine of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, The Third Medical University of PLA, Chongqing (400037)*

Objective: To observe the effect of Tripterygium wilfordii on Th_1 , Th_2 cytokines in asthma patients for further study on the therapeutic mechanism. **Methods:** Twelve patients of middle or severe asthma were treated by Tripterygium polyglucoside 40 mg or 60 mg daily for 4 weeks. Blood of patients was collected before and after treatment for serum and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) preparation. The prepared PBMCs were stimulated in vitro with Concanavalin A (ConA) for 6 hrs and followed by culturing with Triptolide for 24 hrs and then the supernatant was collected. The concentration of interleukin-2 (IL-2), -4 (IL-4), -5 (IL-5) and interferon- γ ($IFN-\gamma$) in serum and in the supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Serum levels of IL-2, IL-4 and IL-5 of patients decreased significantly after treatment of Tripterygium polyglucoside ($P < 0.01$), but $IFN-\gamma$ level was under the detection sensitivity both before and after treatment. Triptolide could inhibit PBMC to secrete IL-2, IL-4 and IL-5 in vitro ($P < 0.01$), but $IFN-\gamma$ was also under the detection sensitivity. **Conclusion:** The marked inhibition of Th_2 cytokine expression by Tripterygium was the important mechanism of it in treating asthma. But the fact that Tripterygium also showed inhibition on Th_1 cytokine indicated that the inhibition of Tripterygium on Th_2 and Th_1 cytokines was non-specific.

Key words Tripterygium wilfordii, asthma, cytokine

支气管哮喘是由嗜酸性粒细胞(EOS)、肥大细胞和 T 细胞等多种炎症细胞参与的气道慢性炎症。EOS 和肥大细胞是哮喘气道炎症产生的关键效应细胞, T 细胞则是调控 EOS 和肥大细胞作用的关键细胞。CD $_4^+$ T 细胞根据其产生的细胞因子不同分为

Th_1 、 Th_2 细胞。 Th_2 细胞因子 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 与 EOS、肥大细胞的活化和 IgE 产生有关。 Th_1 细胞因子 γ 干扰素($IFN-\gamma$)、淋巴毒素(LT)和 IL-2 等参与迟发型超敏反应以及细胞内寄生虫和病毒的清除。 Th_1 、 Th_2 细胞均能产生 IL-3、粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),它们与 IL-5 一起对 EOS 生成、活化、成熟、存活延长有重要作用。因此针对细胞因子的治疗是哮喘治疗的关键之一。雷公藤多甙具有抗炎和免疫抑制作用,能抑制哮喘豚鼠淋巴细胞表达 IL-

* 国家自然科学基金资助项目(No.39870946)

第三军医大学新桥医院呼吸内科研究所(重庆 400037)

5、GM-CSF 和 IL-3 mRNA⁽¹⁾, 但对哮喘患者 Th₁、Th₂ 细胞因子产生的影响尚不清楚。本研究观察雷公藤多甙治疗前后哮喘患者血清中 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5 水平变化以及雷公藤甲素(TP)对患者外周血单个核细胞(PBMC)分泌上述细胞因子的影响。

资料与方法

1 主要试剂 人 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均为深圳晶美公司产品。雷公藤多甙和雷公藤甲素分别为湖南株洲市制药三厂和福建省中药研究所产品。淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品。RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品。

2 哮喘患者血清的留取 12 例中、重度哮喘患者, 诊断标准均符合中华医学会呼吸专业委员会 1997 年发表的哮喘诊断标准⁽²⁾。其中男 4 例, 女 8 例, 年龄 22~45 岁, 平均(29.4±5.6)岁。雷公藤多甙治疗开始前 4 周内和治疗期间均未用过糖皮质激素治疗, 治疗期间可以使用氨茶碱和 β_2 受体激动剂。中度、重度患者每日分别服用雷公藤多甙 40 mg 和 60 mg, 治疗 4 周。治疗前后取外周血制备血清, -70℃ 保存备用。

3 哮喘患者外周血 PBMC 分离、培养 在雷公藤多甙治疗前取哮喘患者外周血, 用淋巴细胞分离液通过密度梯度离心分离 PBMC, 用含 10% FCS RPMI 1640 液重悬细胞, 以每孔 2×10^5 细胞培养于 96 孔平底培养板, 总体积 200 μ l, 每孔加 Con A 至 25 μ g/ml 刺激 6 h 后, 相应孔中加雷公藤甲素至 10^{-5} mol/L, 再培养 24 h 后吸取上清, 不加雷公藤甲素处理为对照组, -70℃ 保存备用。

4 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5 的 ELISA 检测 按说明书进行, 采用双抗夹心法。IL-2 检测灵敏度 31 pg/ml, 检测范围 2000~31 pg/ml。IFN- γ 检测灵敏度 25 pg/ml, 检测范围 1000~25 pg/ml。IL-4 检测灵敏度 15 pg/ml, 检测范围 1000~15 pg/ml。IL-5 检测灵敏度 10 pg/ml, 检测范围 500~10 pg/ml。主要步骤为: 取出板条平衡至室温, 加入标准品稀释液至空白孔和零孔, 加入标本和已稀释的不同浓度的标准品各 100 μ l 至相应孔中, 用封板胶纸封住板孔, 37℃, 90 min。按洗板方法自动洗板。除零孔外, 每孔加入稀释好的二抗 100 μ l, 封住板孔, 37℃, 60 min。按洗板方法自动洗板。除零孔外, 每孔加入稀释好的酶联物 100 μ l, 封住板孔, 37℃, 30 min。按洗板方法自动洗板。每孔加底物 A、B 各 50 μ l, 避光 37℃, 15 min, 每孔加终止液 50 μ l, 在酶标仪 450 nm 处读数, 绘制标准曲线并求出相应标本中上述细胞因子浓度。

5 统计学方法 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对资料 t 检验进行统计分析。

结 果

1 疗效及副作用 中、重度哮喘患者经治疗后每日发作次数均减少, β_2 受体激动剂用量减少, 肺功能检测第一秒呼气容积(FEV₁)增加(14.7±4.2)%。1 例女患者出现月经周期紊乱, 其余患者无明显副作用。

2 哮喘患者雷公藤多甙治疗前后血清 IL-2、IL-4、IL-5 及 IFN- γ 水平的变化 见图 1。雷公藤多甙治疗后, 患者 IL-2、IL-4、IL-5 水平显著降低($P < 0.01$), 而治疗前后 IFN- γ 均在检测灵敏度 25 pg/ml 以下。

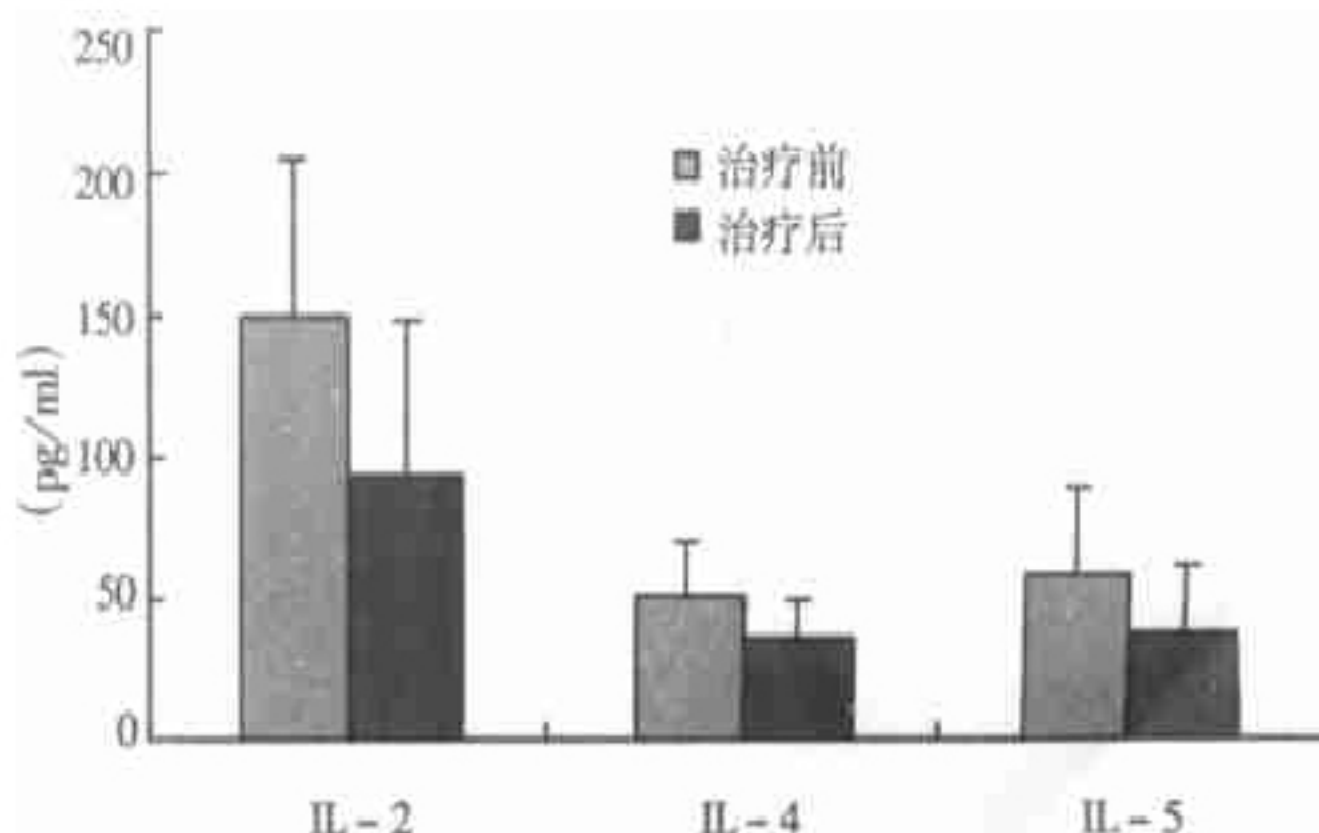


图 1 雷公藤多甙对哮喘患者血清细胞因子的影响

注: 与治疗前比较, * $P < 0.01$

3 雷公藤甲素对哮喘患者 PBMC 产生 Th₁、Th₂ 细胞因子的影响 见图 2。 10^{-5} mol/L 雷公藤甲素处理哮喘患者 PBMC 后其 IL-2、IL-4、IL-5 蛋白合成降低($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而 IFN- γ 则均在检测水平 25 pg/ml 以下。

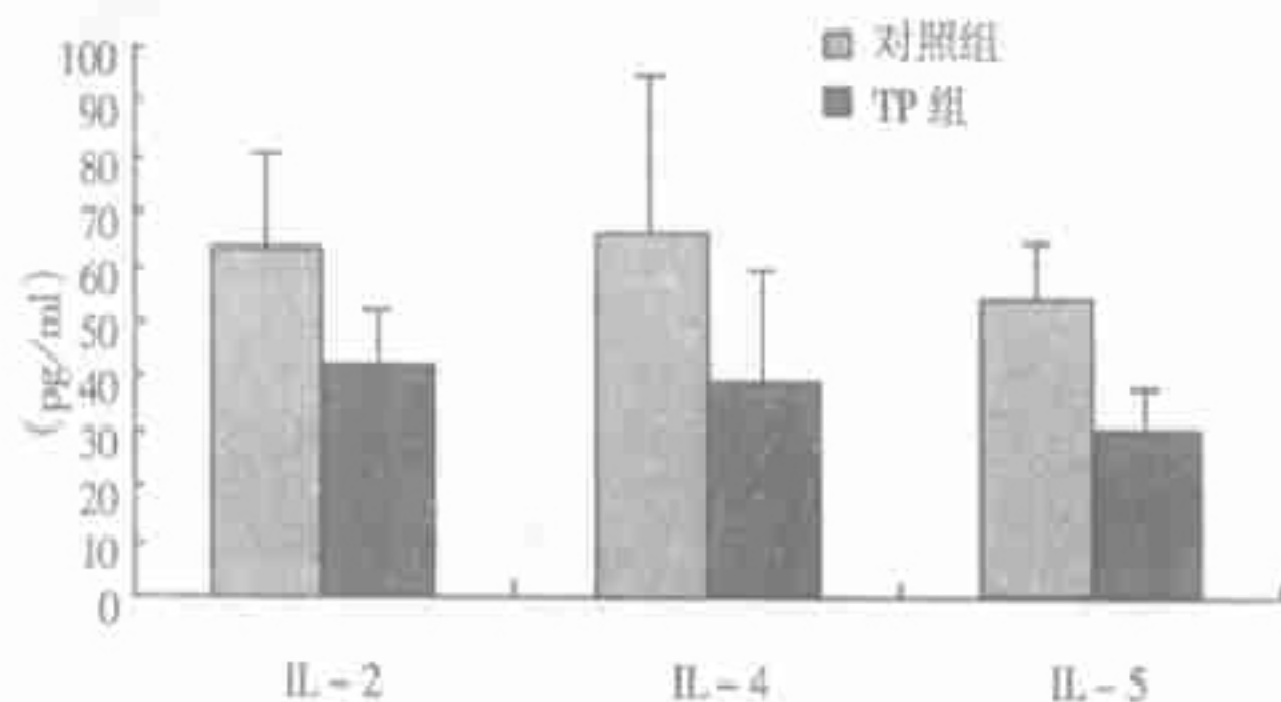


图 2 雷公藤甲素对哮喘患者 PBMC 细胞因子分泌的影响

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

Th₁ 细胞因子 IL-2 能促进 T 细胞的活化、增

殖⁽³⁾。IL-5 是哮喘 EOS 增多和活化的关键调节因素。IL-4 不仅能促进 B 细胞合成 IgE, 还促进 Th₀ 细胞分化为 Th₂ 细胞。与此作用相反, Th₁ 细胞因子 IFN- γ 则抑制 B 细胞合成 IgE 和 Th₀ 细胞分化为 Th₂ 型⁽⁴⁾。因此, Th₁ 与 Th₂ 细胞因子具有相互制约的作用。

过去的研究证实,哮喘患者 Th₁ 细胞因子正常表达或减少,而 Th₂ 细胞因子表达明显增加⁽⁵⁾。Kay 等发现⁽⁶⁾,变应原引起的迟发相反应的皮肤中有 IL-5 mRNA 表达,而无 IL-2 和 IFN- γ mRNA 表达。与此类似,特应性哮喘患者 BALF 细胞中表达 IL-5 和 IL-4 mRNA 的细胞数增多,其阳性细胞百分率与哮喘严重程度和气道高反应性(BHR)密切相关;而表达 IL-2、IFN- γ mRNA 的细胞数无明显增加⁽⁷⁾。另外,哮喘加重期患者外周血中表达 IL-3、IL-4、IL-5、GM-CSF mRNA 的 CD₄⁺ T 细胞(而不是 CD₈⁺ T 细胞)百分率较对照组增加,而表达 IL-2、IFN- γ mRNA 的 CD₄⁺ T 细胞数与对照组差异无显著性⁽⁸⁾。说明哮喘患者具有明显的 Th₁/Th₂ 细胞因子偏移, Th₂ 细胞因子产生增多在哮喘的发病中有重要作用。我们发现,中、重度哮喘患者经雷公藤多甙治疗后 IL-2、IL-4、IL-5 水平显著降低,而且体外试验也证明雷公藤甲素能抑制 ConA 刺激的哮喘患者 PBMC 分泌 IL-2、IL-4、IL-5。IFN- γ 无论是在体内还是在体外条件下均不能检测出,说明哮喘患者 IFN- γ 表达水平低下,也说明雷公藤对哮喘 Th₁ 和 Th₂ 细胞因子的产生均有抑制作用。但是由于哮喘患者存在 Th₁、Th₂ 细胞因子产生的偏移,体内以 Th₂ 细胞因子的产生为主,所以,雷公藤的作用实际上也是以抑制 Th₂ 细胞因子产生为主,这可能是雷公藤多甙治疗哮喘有效的关键机制。

参 考 文 献

1. 王长征,王春霞,金远林,等.哮喘豚鼠 IL-5、IL-3、GM-CSF m-

RNA 表达及雷公藤酯醇的影响.中华微生物和免疫学杂志 1998;18(2):145—148.

2. 支气管哮喘的防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗、疗效判断标准及教育和管理方案).中华结核和呼吸杂志 1997;20:261—267.

3. Van Parijs L, Biuckians A, Ibragimov A, et al. Functional responses and apoptosis of CD₂₅(IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. J Immunol 1997;158(8):3738—3745.

4. Mosmann FR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th₁, Th₂ and more. Immunol Today 1996;17:138—146.

5. Robinson DS, Hamid Q, Sun Y, et al. Predominant Th₂-type bronchoalveolar lavage T lymphocyte population in atopic asthma. N Engl J Med 1992;326:298—304.

6. Kay A, Ying S, Varney V, et al. Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster IL-2, IL-4, IL-5 and GM-CSF in allergen induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. J Exp Med 1991;173:775—778.

7. Robinson DS, Ying S, Bentley AM, et al. Relationship among numbers of bronchoalveolar lavage cells expression messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. J Allergy Clin Immunol 1993;92:397—403.

8. Contigan CJ, Hamid Q, North J, et al. Peripheral CD₄⁺ but not CD₈⁺ T lymphocytes in patients with exacerbation of asthma transcribe and translate mRNA encoding cytokines which prolong eosinophil survival in the context of a Th₂ type pattern: effect of glucocorticoid therapy. Am J Respir Cell Mol Biol 1995;12:567—578.

(收稿:1999-12-24 修回:2000-09-10)

· 书 讯 ·

《实用临床老年病学》出版

《实用临床老年病学》由同济医科大学附属梨园医院刘沛生教授等主编。由中国医药科技出版社于 2000 年 10 月正式出版发行。本书 183 万字。内容包括老年病学概论;老年内科疾病;老年外科疾病、妇科疾病和皮肤科疾病;老年眼科疾病、口腔疾病和耳鼻喉科疾病;老年预防保健、老年病康复、老年病护理、老年病食疗和高龄老人问题等。本书主要取材于 20 世纪 90 年代以来国内外老年病学的最新研究成果,资料丰富,内容翔实,具有较好的理论价值和实用价值。本书可供老年病临床医师、老年保健工作者和其他各科医师使用,也可作为高等医学院校学生和研究生教学参考书。本书为 16 开精装本,定价每册 155 元,邮购另加邮资 5 元,款到发书。欲购者请与下列地址联系:

1 湖北省武汉市(邮编 430077) 同济医科大学附属梨园医院 刘沛生

2 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号(邮编 100088) 中国医药科技出版社三编室 张君则