

调补肺肾三法对 COPD 大鼠 T 淋巴细胞亚群及 CD4⁺CD25⁺ 的影响及远后效应

姜素丽¹ 李 亚² 田燕歌¹ 李建生^{1,2} 李素云² 王 英¹ 王元元¹ 邓 丽¹

摘要 目的 评价调补肺肾(补肺健脾、补肺益肾、益气滋肾)三法对慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)大鼠 T 淋巴细胞亚群及 CD4⁺CD25⁺ 的影响及远后效应。**方法** 120 只大鼠随机分为对照组、模型组、补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组和氨茶碱组,每组 20 只。除对照组外,其余大鼠均采用香烟熏吸联合细菌感染法制备 COPD 模型,于第 9 周起 3 个中药组及氨茶碱组分别给予补肺健脾方、补肺益肾方、益气滋肾方及氨茶碱灌胃至第 20 周。分别于第 20、32 周观察肺组织病理、外周血和支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)及 CD4⁺CD25⁺ 的变化。**结果** 第 20、32 周时,模型组肺组织损伤明显,外周血和 BALF 中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺ 水平较对照组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),3 个中药组及氨茶碱组上述指标较模型组升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);3 个中药组外周血和 BALF 中 CD3⁺、CD4⁺ 显著高于氨茶碱组($P < 0.05$, $P < 0.01$);补肺健脾组外周血 CD4⁺ 较补肺益肾组、益气滋肾组升高($P < 0.01$)。第 20 周时,补肺健脾组较氨茶碱组升高($P < 0.01$);3 个中药组 CD4⁺ 水平较氨茶碱组明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第 32 周时,3 个中药组和氨茶碱组 CD4⁺/CD8⁺ 水平较模型组升高($P < 0.05$);补肺健脾组和补肺益肾组 CD4⁺ 较氨茶碱组升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与第 20 周比较,补肺健脾组第 32 周 BALF 中 CD4⁺/CD8⁺ 显著升高($P < 0.05$),益气滋肾组外周血和 BALF 中 CD4⁺CD25⁺ 显著降低($P < 0.05$)。**结论** 调补肺肾三法治疗 COPD 的疗效和远后效应机制可能与调节 T 淋巴细胞亚群及 CD4⁺CD25⁺ 水平有关,其中补肺健脾方在调节外周血和 BALF 中 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 方面疗效突出。

关键词 补肺健脾;补肺益肾;益气滋肾;慢性阻塞性肺疾病;T 淋巴细胞亚群;细胞免疫;远后效应

Influence and Long-term Effects of Three Methods for Regulating and Invigorating Fei-Shen on T Lymphocyte Subsets and CD4⁺CD25⁺ in COPD Rats JIANG Su-li¹, LI Ya², TIAN Yan-ge¹, LI Jian-sheng^{1,2}, LI Su-yun², WANG Ying¹, WANG Yuan-yuan¹, and DENG Li¹ 1 Gerontology Institute, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou (450046), China; 2 Center Lab, Institute of Respiratory Disease, First Affiliated Hospital, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou (450000), China

ABSTRACT Objective To evaluate the therapeutic and long-term effects of three methods for regulating and invigorating Fei-Shen [reinforcing Fei and invigorating Pi (RFIP), reinforcing Fei and invigorating Shen (RFIS), benefiting qi and nourishing Shen (BQNS)] on T lymphocyte subsets and CD4⁺CD25⁺ in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Totally 120 rats were randomly divided into the control group, the model group, the RFIP group, the RFIS group, the BQNS group, and the aminophylline group, 20 in each group. Except those in the control group, the rest rats were exposed to cigarette smoking and bacterial infection to prepare the COPD rat model. Rats in the RFIP group, the RFIS group, the BQNS group, and the aminophylline group were administrated with Bufe Jianpi Recipe, Bufe Yishen Recipe, Yiqi Zishen Recipe, and aminophylline from week 9 to 20. After rats were sacrificed at week 20 and 32, lung pathological impairments and the levels of T lymphocyte subsets (CD3⁺,

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(No. 81130062);2010 年度河南省科技创新人才资助项目(No. 104200510004)

作者单位:1. 河南中医学院老年医学研究所(郑州 450046);2 河南中医学院第一附属医院呼吸病研究所中心实验室(郑州 450000)

通讯作者:李建生, Tel: 0371-65676568, E-mail: li_js8@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.11.1538

CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺) and CD4⁺CD25⁺ in the peripheral blood and the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected. Results At week 20 and 32, the impairments in the lungs were obvious in rats of the model group, while the levels of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺CD25⁺ were significantly lower in the peripheral blood and the BALF in the model group than in the controls group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and they were higher in the four groups than in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). However, the levels of CD3⁺ and CD4⁺ in the peripheral blood and the BALF were higher in the three TCM-treated groups than in the aminophylline group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). CD4⁺ in the peripheral blood in the RFIP group was higher than in the RFIS group and the BQNS group ($P < 0.01$). At week 20, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ was higher in the RFIP group than in the aminophylline group ($P < 0.01$). CD4⁺ was higher in the three TCM-treated groups than in the aminophylline group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). At week 32, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in the three TCM- and aminophylline-treated groups was higher than that of the model group ($P < 0.05$). CD4⁺ in the RFIP group and the RFIS group was higher than that of the aminophylline group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with that at week 20, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in the BALF group was significantly higher in the RFIP at week 32 ($P < 0.05$). The CD4⁺CD25⁺ levels in the peripheral blood and BALF of the BQNS group was significantly lower ($P < 0.05$). Conclusions The efficacy and long-term effects of three methods for regulating and invigorating Fei-Shen might be possibly associated with regulating T lymphocyte subsets (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺) and CD4⁺CD25⁺ levels. Of them, RFIP showed significant effects in regulating CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in the peripheral blood and BALF.

KEYWORDS reinforcing Fei and invigorating Pi; reinforcing Fei and invigorating Shen; benefiting qi and nourishing Shen; chronic obstructive pulmonary disease; T lymphocyte subsets; cellular immunity; long-term effect

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种具有气流受限特征的疾病, 气流受限不完全可逆、呈进行性发展, 与肺部对香烟烟雾等有害气体或颗粒的异常炎症反应有关^[1]。COPD 的发生发展与机体免疫功能低下密切相关, 其中以细胞免疫功能减退或紊乱为主^[2]。本课题组既往完成的“十一五”科技支撑计划随机对照临床试验表明, 调补肺肾三法 (补肺健脾、补肺益肾和益气滋肾) 能够改善 COPD 临床症状、减少急性加重次数, 提高运动能力和生活质量等^[3,4]。本文以 COPD 大鼠为研究对象, 以 T 淋巴细胞亚群为主要指标, 评价调补肺肾三法调节机体免疫功能治疗 COPD 的疗效及远后效应, 为临床应用提供依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级 SD 大鼠 120 只, 体重 200 ~ 220 g, 雌雄各半 (由河南省实验动物中心提供, 合格证号: 豫 XK20050001)。

2 细菌 肺炎克雷伯杆菌 (46114) 购自中国医学细菌保藏管理中心, 用前将细菌浓度调整为 6×10^8 CFU/mL (经预实验确定)。

3 香烟 红旗渠牌过滤嘴香烟由河南省中烟工业有限责任公司提供 (郑州, 烤烟型, 焦油量 14 mg,

烟气烟碱量 1.2 mg, 烟气一氧化碳量 15 mg)。

4 药物 院内制剂补肺健脾方 (党参 15 g 黄芪 15 g 白术 12 g 茯苓 12 g 川贝母 9 g 厚朴 9 g 紫苏子 9 g 等)、补肺益肾方 (人参 9 g 黄芪 15 g 枸杞子 12 g 山茱萸 12 g 五味子 9 g 淫羊藿 9 g 等)、益气滋肾方 (人参 9 g 黄芪 15 g 熟地 15 g 枸杞子 12 g 麦冬 15 g 五味子 9 g 肉桂 3 g 等) (科研方, 河南中医学院第一附属医院药理基地中药制剂实验室提供, 按质量标准制成流浸膏备用)。氨茶碱片 (山东新华制药股份有限公司, 生产批号: 081106, 0.1 g/片)。

5 试剂与仪器 大鼠 FITC 标记的 CD3McAb、PE 标记的 CD8McAb、FITC 标记的 CD4McAb、PE 标记的 CD25McAb、FITC 标记的鼠 IgM (CD3McAb 的同型对照)、FITC 标记的鼠 IgG1 (CD4McAb 的同型对照)、PE 标记的鼠 IgG1 (CD8McAb、CD25McAb 的同型对照) (美国 BioLegend 公司); 溶血素 (美国 Becton Dickinson 公司)。EPICL XL 型流式细胞仪 (美国 Beckman 公司); PM-10AD 光学显微镜及照相系统 (日本 Olympus 公司)。

6 分组及模型制备 120 只大鼠随机分为对照组、模型组、补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组和氨茶碱组, 每组 20 只。采用香烟暴露联合细菌感染法制

备 COPD 大鼠模型^[5] (对照组大鼠除外), 于第 8 周随机处死动物观察肺组织病理变化, 参考文献^[6]判断模型成功与否。实验室室温为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度 $(50 \pm 10)\%$, 换气量 $10 \sim 15$ 次/h, 氨浓度 $\leq 14 \text{ mg/m}^3$, 噪声 $\leq 60 \text{ db}$ 。灭菌饲料喂养, 自由饮用灭菌水, 定期检查净化操作系统, 保持环境安静。自第 9 周对照组和模型组均给予 2 mL 生理盐水灌胃, 其余各组分别以氨茶碱 $[2.3 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 、补肺健脾方 $[4.84 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 、补肺益肾方 $[4.44 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 、益气滋肾方 $[4.84 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 灌胃, 每日 2 次, 每周称量大鼠体重以调整灌胃量, 给药至第 20 周, 共 12 周。停药后常规饲养至第 32 周。分别于第 20、32 周取材。氨茶碱、补肺健脾方、补肺益肾方和益气滋肾方剂量采用等效剂量换算公式进行计算: 大鼠用药剂量 = 成人用药剂量 $\times$ (大鼠体型系数/人体型系数) $\times$ (人体重/大鼠体重)^{2/3}^[7]。

7 指标测定

7.1 肺组织病理 分别于第 20、32 周取材。沿右肺下叶最大径切取约 3 mm 厚度的组织块, 4% 多聚甲醛固定 72 h , 石蜡包埋, $4 \mu\text{m}$ 切片, 常规 HE 染色, 通过光学显微镜观察肺组织病理变化。

7.2 外周血 T 淋巴细胞亚群测定 腹主动脉取血, 应用荧光直接标记法及流式细胞仪进行 T 淋巴细胞亚群 (如 CD3^+ 、 CD4^+ 、 CD8^+ 、 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$) 及 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 调节性 T 细胞的测定。取抗凝血 $100 \mu\text{L}$ 加入流式测定管中, 分别加入 $5 \mu\text{L}$ PE 标记的 CD8 McAb 、 $5 \mu\text{L}$ FITC 标记的 CD3 McAb 、 $5 \mu\text{L}$ PE 标记的 CD25 McAb 和 $5 \mu\text{L}$ FITC 标记的 CD4 McAb 混匀, 避光孵育约 20 min , 加 2 mL 溶血素, 避光孵育约 10 min , $1\ 200 \text{ r/min}$ 离心 5 min , 弃上清液, 加 PBS 洗 2 遍, 弃上清液, 加入 PBS 缓冲液, 调整细胞浓度至 1×10^6 个细胞/mL, 于流式细胞仪分析。

7.3 支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中 T 淋巴细胞亚群测定 于第 20、32 周结束后, 对大鼠进行肺泡灌洗, 制备 BALF, 应用荧光直接标记法及流式细胞仪进行 T 淋巴细胞亚群及 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 调节 T 细胞的测定。

8 统计学方法 所有数据采用 SPSS 19.0 统计分析软件处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 的最小显著差法。显著性水准取 $\alpha = 0.05$ 。第 20、32 周比较采用配对样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 模型组大鼠表现出皮毛无光泽, 形

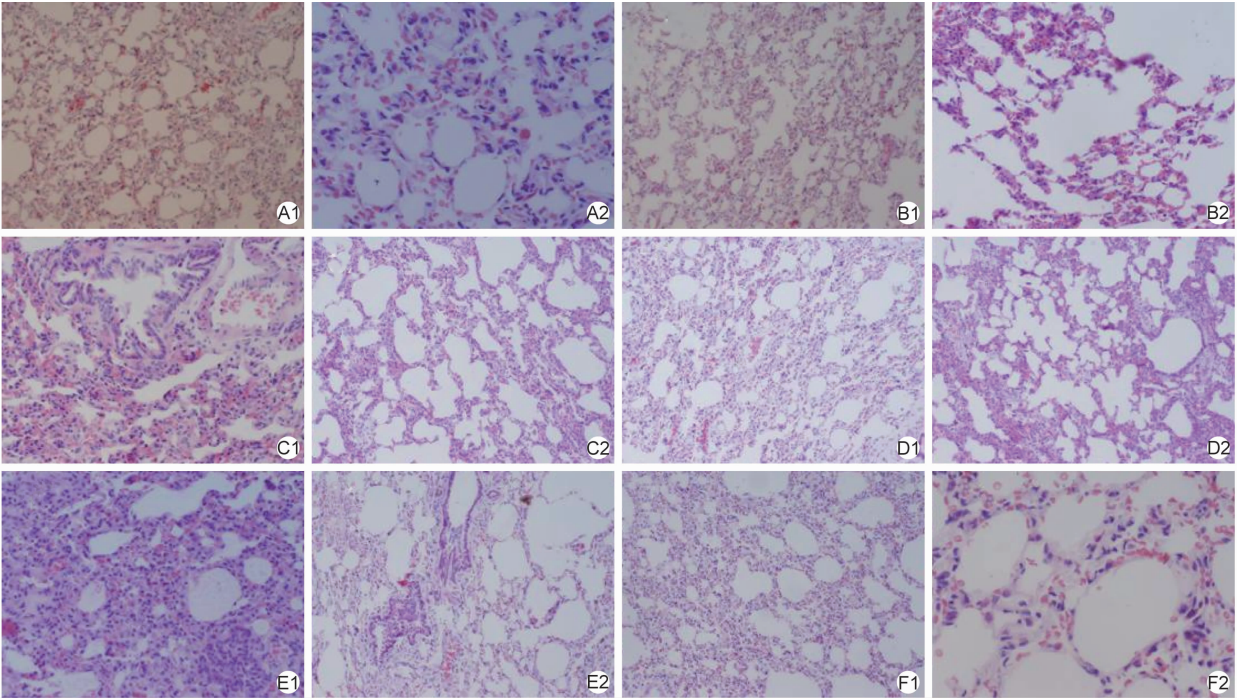
体消瘦, 精神倦怠, 活动减少, 食量、饮水量减退, 大便溏薄, 垫料潮湿等情况, 补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组和氨茶碱组大鼠上述情况均有不同程度的改善, 其中补肺健脾组和补肺益肾组改善明显。对照组大鼠未发现明显异常。在 32 周的观察期间, 对照组大鼠死亡 1 只, 模型组、补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组和氨茶碱组各死亡 2 只, 共 11 只, 尸体解剖证实均有肺气肿、慢性支气管炎等表现。另外, 有几只大鼠在取材时麻醉意外死亡造成抽血失败, 或抽血时和送检流式细胞检测过程中由于部分血液样本未处理好而发生部分凝血, 未进行检测, 因此各组样本含量为 6。

2 各组不同时间大鼠肺脏病理图片比较 (图 1) 第 20 周时, 对照组大鼠肺组织基本正常; 模型组可见肺泡壁断裂, 肺泡融合, 肺泡间质大量炎性细胞浸润, 支气管黏膜上皮细胞部分脱落, 细支气管管壁周围平滑肌和纤维细胞不规则增生, 管腔变窄, 终末细支气管远端气囊腔膨胀, 间隔变薄。3 个中药方及氨茶碱可不同程度改善上述病理表现, 其中 3 个中药方在改善肺泡融合程度及气道、肺泡间质炎症细胞浸润方面略显优势。第 32 周时, 3 个中药组肺组织病理损伤较第 20 周时减轻, 模型组及氨茶碱组改善不明显。

3 各组不同时间外周血 T 淋巴细胞亚群指标变化比较 (表 1) 第 20、32 周时, 模型组外周血中 CD3^+ 、 CD4^+ 、 CD8^+ 、 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 水平较对照组明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 3 个中药组和氨茶碱组较模型组升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 3 个中药组 CD3^+ 水平较氨茶碱组明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 补肺健脾组 CD4^+ 较补肺益肾组和益气滋肾组明显升高 ($P < 0.01$)。第 20 周时, 模型组 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 较对照组有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 补肺健脾组较氨茶碱组升高 ($P < 0.01$); 3 个中药组 CD4^+ 水平较氨茶碱组明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第 32 周时, 模型组 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 水平较对照组明显降低 ($P < 0.01$), 3 个中药组和氨茶碱组较模型组升高 ($P < 0.05$); 补肺健脾组和补肺益肾组 CD4^+ 较氨茶碱组升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

与本组第 20 周比较, 模型组第 32 周 CD3^+ 、 CD4^+ 、 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 3 个中药组均有升高趋势, 但差异无统计意义 ($P > 0.05$), 各组 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 均降低, 以益气滋肾组降低最为明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4 各组不同时间 BALF 中 T 淋巴细胞亚群指标变化比较 (表 2, 图 2、3) 第 20、32 周, 模型组 BALF 中 CD3^+ 、 CD4^+ 、 CD8^+ 、 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 水平较对照组



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为补肺健脾组;D 为补肺益肾组;E 为益气滋肾组;F 为氨茶碱组;1 为第 20 周(×100);2 为第 32 周(×200)

图 1 第 20 和 32 周各组大鼠肺组织病理图片比较(HE 染色)

表 1 各组不同时间外周血 T 淋巴细胞亚群指标变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间(周)	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ (%)
对照	6	20	46.08±4.12	26.85±2.37	18.48±2.24	1.46±0.13	18.18±1.96
		32	46.05±3.46	26.87±2.49	18.85±1.53	1.43±0.12	16.7±3.12
模型	6	20	31.17±2.97**	18.27±2.20**	11.30±2.25**	1.65±0.22	12.97±2.92*
		32	26.48±2.90**●	13.03±2.90**●	11.63±2.88**	1.12±0.09**●●	9.25±3.10**
氨茶碱	6	20	57.40±2.31△△	32.18±1.06△△	22.97±1.71△△	1.41±0.08	18.77±4.42△
		32	56.15±2.01△△	32.83±1.95△△	22.25±2.34△△	1.49±0.20△	14.50±3.55△△
补肺健脾	6	20	62.42±2.30△△▲▲	40.63±1.53△△▲▲	24.40±3.24△△	1.69±0.19▲▲	21.38±5.28△△
		32	64.55±2.35△△▲▲	44.35±3.63△△▲▲	23.47±1.65△△	1.89±0.72▲▲	15.82±2.27△△
补肺益肾	6	20	61.48±2.37△△▲	35.83±1.11△△▲▲○	23.53±2.61△△	1.54±0.14	18.33±3.42△
		32	63.37±3.20△△▲▲	36.33±3.09△△▲○	22.52±3.09△△	1.64±0.28△	14.15±2.04△△
益气滋肾	6	20	61.35±2.30△△▲	34.32±0.81△△▲○	23.27±2.58△△	1.49±0.18	17.67±4.55△
		32	62.22±6.57△△▲▲	35.60±1.49△△○○	23.10±3.53△△	1.57±0.21△	13.68±1.65△△●

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与氨茶碱组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与补肺健脾组比较,○ $P<0.05$,○○ $P<0.01$;与本组 20 周比较,● $P<0.05$,●● $P<0.01$

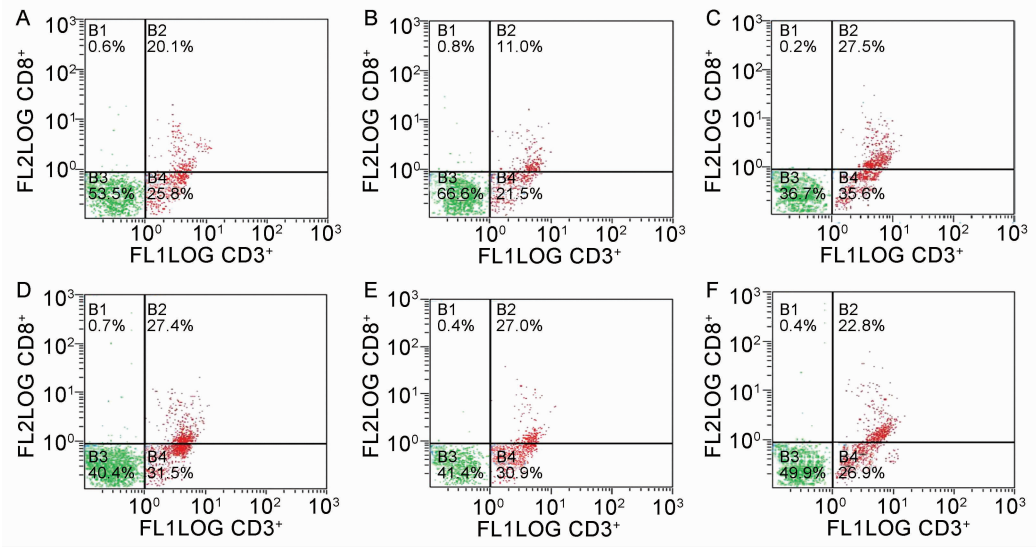
明显降低($P<0.05,P<0.01$),3 个中药组和氨茶碱组较模型组明显升高($P<0.05,P<0.01$);3 个中药组 CD3⁺较氨茶碱组明显升高($P<0.05,P<0.01$);补肺健脾组 CD4⁺较补肺益肾组和益气滋肾组明显升高($P<0.01$)。第 20 周,模型组 CD4⁺/CD8⁺较对照组升高($P<0.05$),补肺健脾组较模型组、益气滋肾组和氨茶碱组升高($P<0.05,P<0.01$);补肺健脾组和补肺益肾组 CD4⁺较氨茶碱组明显升高($P<0.01$)。第 32 周,模型组 CD4⁺/CD8⁺较对照组明显降低($P<0.01$),3 个中药组和氨茶碱组较模型组升高

($P<0.05,P<0.01$),补肺健脾组较益气滋肾组和氨茶碱组升高($P<0.05$);补肺健脾组和补肺益肾组 CD4⁺较氨茶碱组升高($P<0.05,P<0.01$)。与第 20 周比较,模型组第 32 周 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平降低($P<0.05$)3 个中药组均有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$);氨茶碱组 CD4⁺水平有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$);补肺健脾组 CD4⁺/CD8⁺升高明显($P<0.05$);各组 CD4⁺CD25⁺水平均降低,以模型组和益气滋肾组降低尤为明显($P<0.05$)。

表 2 各组不同时间 BALF 中 T 淋巴细胞亚群指标变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

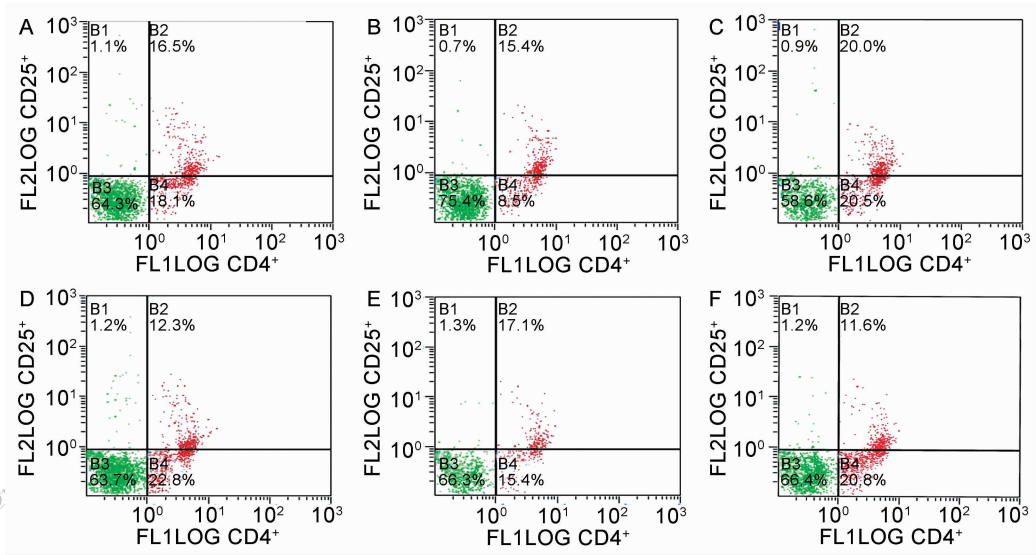
组别	n	时间(周)	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ (%)
对照	6	20	45.98 ± 3.60	26.68 ± 2.26	18.17 ± 1.88	1.45 ± 0.13	18.17 ± 1.97
		32	46.00 ± 3.12	26.85 ± 1.95	18.63 ± 1.61	1.49 ± 0.11	16.90 ± 3.20
模型	6	20	31.18 ± 2.68 **	18.13 ± 2.20 **	11.32 ± 2.16 **	1.63 ± 0.24 *	13.55 ± 2.71 *
		32	26.73 ± 2.53 **●	13.03 ± 2.72 **●	11.80 ± 2.38 **	1.10 ± 0.08 **●●	9.40 ± 2.89 **●
氨茶碱	6	20	57.33 ± 2.47 △△	32.30 ± 1.25 △△	23.02 ± 1.98 △△	1.41 ± 0.10	18.92 ± 4.16 △
		32	56.42 ± 1.58 △△	33.01 ± 1.84 △△	22.52 ± 1.98 △△	1.55 ± 0.16 △	14.58 ± 2.96 △△
补肺健脾	6	20	62.47 ± 2.66 △△△△	40.89 ± 2.20 △△△△	24.27 ± 3.30 △△	1.70 ± 0.18 △△△	21.33 ± 4.81 △△
		32	64.63 ± 2.13 △△△△	44.40 ± 3.55 △△△△	23.40 ± 1.53 △△	1.90 ± 0.08 △△△●	16.20 ± 2.13 △△
补肺益肾	6	20	61.48 ± 2.34 △△△	35.83 ± 0.92 △△△△○○	23.45 ± 2.81 △△	1.54 ± 0.17	18.57 ± 3.43 △
		32	63.30 ± 3.64 △△△△	36.31 ± 2.92 △△△○○	22.60 ± 2.94 △△	1.63 ± 0.25 △	14.32 ± 1.76 △△
益气滋肾	6	20	61.17 ± 2.32 △△△	34.25 ± 0.98 △△○○	23.20 ± 2.47 △△	1.49 ± 0.14 ○	18.03 ± 4.07 △
		32	62.00 ± 2.56 △△△△	35.23 ± 2.10 △△○○	22.98 ± 3.32 △△	1.55 ± 0.16 △△○	13.92 ± 1.73 △△●

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与氨茶碱组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与补肺健脾组比较,○ $P < 0.05$,○○ $P < 0.01$;与本组 20 周比较,● $P < 0.05$,●● $P < 0.01$



注:A 为对照组;B 模型组;C 为补肺健脾组;D 为补肺益肾组;E 为益气滋肾组;F 为氨茶碱组

图 2 流式细胞术检测各组大鼠 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺ CD8⁺ 图片



注:A 为对照组;B 模型组;C 为补肺健脾组;D 为补肺益肾组;E 为益气滋肾组;F 为氨茶碱组

图 3 流式细胞术检测各组大鼠 T 淋巴细胞亚群 CD4⁺ CD25⁺ 图片

讨 论

COPD 稳定期主要是以虚证为主,其中肺脾肾三脏虚损较为常见。肺脏感邪,迁延失治,痰瘀稽留,损伤正气,而致肺脾肾虚损,正虚卫外不固,外邪易反复侵袭,诱使本病发作,其病理变化多为本虚,病机多以气(阳)虚、气阴两虚为主^[8],主要表现为肺脾气虚证、肺肾气虚证、肺肾气阴两虚证等^[9,10],调补肺肾(补肺健脾、补肺益肾、益气滋肾)三法是据此拟定的治疗法则,已通过多中心临床试验证实了其疗效^[4]。

COPD 的病理机制复杂,主要表现为慢性支气管炎、小血管和小气道重塑、肺气肿、肺动脉高压等^[11,12]。研究表明,COPD 模型大鼠肺泡直径明显增大,单位面积肺泡数减少,肺泡结构破坏明显,肺组织结构严重受损^[13]。本组资料表明,第 20 周时,COPD 大鼠出现肺泡破裂、融合,支气管壁增厚、支气管狭窄和明显的炎性细胞浸润等现象,补肺健脾方、补肺益肾方益气滋肾方和氨茶碱可明显改善上述病理变化,其中以 3 个中药方改善尤为显著,且在第 32 周时仍有较好的疗效。

细胞免疫是由 T 淋巴细胞识别特异性抗原开始,并在效应阶段也由 T 细胞参与的免疫应答过程。成熟的 T 淋巴细胞表面表达 CD3⁺ 分子,检测 CD3⁺ 可知在免疫应答过程中 T 淋巴细胞的总数量;CD4⁺ 分子主要通过分泌细胞因子和表达的表面分子调节免疫网络中其他细胞的生物活性,它能辅助 B 细胞产生抗体和诱导抑制 T 细胞功能的细胞,也能产生白介素-2 (Interleukin-2, IL-2),因此对免疫反应启动最终的表现形式和强弱起关键作用,是具有辅助和诱导性的 T 细胞亚群;CD8⁺ 分子是早期抗肿瘤、抗感染的细胞,它的主要功能是杀伤靶抗原,称为细胞毒性 T 淋巴细胞,同时能抑制产生 IL-2,使 IL-2 更少,又称为抑制性 T 细胞。CD4⁺/CD8⁺ 表示诱导性 T 淋巴细胞与抑制性 T 淋巴细胞之间的功能平衡状态,是机体免疫内环境稳定最重要的指标。通过对外周血及肺泡灌洗液中 T 细胞亚群数目或比例的检测,来判断机体的细胞免疫功能,对临床认识疾病,探讨其发病机制,判断预后等方面具有重要意义。CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞是一具有独特免疫调节功能的 T 细胞亚群,约占外周血 CD4⁺ T 细胞 5% ~ 10%。目前认为,天然 CD4⁺CD25⁺ Tr 细胞来源于胸腺,但也可以在持续性抗原刺激及 IL-10 等细胞因子作用条件下在外周诱导产生,在许多疾病中均起重要的免疫调节作用^[14]。

T 淋巴细胞亚群异常在 COPD 的发生、发展过程

中起重要作用^[15]。COPD 患者大多免疫功能低下,其发展和预后与机体免疫功能密切相关,其中 T 淋巴细胞亚群水平与 COPD 严重程度与病程进展关系尤为密切^[16]。研究表明,具有益肺、健脾、补肾等功效的中药可以显著改善 COPD 稳定期患者细胞免疫功能^[17]。课题组前期研究也表明,具有补肺健脾、补肺益肾和益气滋肾功用的补肺健脾方、补肺益肾方和益气滋肾方可以显著增强 COPD 稳定期患者体质,减少急性加重次数和减轻急性加重的程度,提高患者运动能力^[4]。本组资料显示,COPD 大鼠存在免疫功能低下情况,其外周血和 BALF 中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺ 水平显著降低。补肺健脾方、补肺益肾方和益气滋肾方可显著提高上述指标水平,且在提高 CD3⁺ 水平方面优于氨茶碱,补肺健脾方在调节 CD4⁺/CD8⁺ 水平方面优于补肺益肾方和益气滋肾方,补肺健脾方和补肺益肾方可显著提高 CD4⁺ 水平。3 方均能调节 COPD 大鼠 T 淋巴细胞亚群水平,提高机体免疫力,且具有良好的远后效应。

综上所述,补肺健脾方、补肺益肾方和益气滋肾方治疗 COPD 稳定期具有良好的疗效及远后效应,可能与调节 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺ 水平,提高机体细胞免疫有关,其中补肺健脾方在调节外周血和 BALF 中 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 方面疗效突出。

参 考 文 献

- [1] Global initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, revised 2011 [OL]. http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.Pdf (Accessed at Mar 7, 2012).
- [2] Tzanakis N, Chrysafakis G, Tsoumakidou M, et al. Induced sputum CD8⁺ T-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Respir Med*, 2004, 98(1): 57-65.
- [3] 张海龙. 辨证治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期的疗效及对全身炎症反应的影响[D]. 郑州: 河南中医学院, 2010.
- [4] Li SY, Li JS, Wang MH, et al. Effects of comprehensive therapy based on traditional Chinese medicine patterns in stable chronic obstructive pulmonary disease: a four-center, open-label, randomized, controlled study [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12: 197.
- [5] Li Y, Li SY, Li JS, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bac-

- terial infection [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35 (10): 1 752 - 1 760.
- [6] 李素云,李亚,李建生,等.补肺健脾方对慢性阻塞性肺疾病大鼠膈神经放电和膈肌功能的影响[J].中国中西医结合杂志,2012,32(6):812-816.
- [7] 黄继汉,黄晓辉,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
- [8] 李建生.慢性阻塞性肺疾病中医辨证治疗概要[J].河南中医学院学报,2009,7(4):9-11.
- [9] 中华中医药学会内科分会肺系病专业委员会.慢性阻塞性肺疾病中医证候诊断标准(2011版)[J].中医杂志,2012,53(2):177-178.
- [10] 中华中医药学会内科分会肺系病专业委员会.慢性阻塞性肺疾病中医诊疗指南(2011版)[J].中医杂志,2012,53(1):80-84.
- [11] Wright JL, Churg A. Animal models of cigarette smoke-induced COPD [J]. Chest, 2002, 122 (6): S301-S306.
- [12] Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 295 (1): L1-L15.
- [13] 李宇航,黄颖,郭明章,等.清热解毒药物配伍桔梗对 COPD 大鼠模型病理形态的影响[J].北京中医药大学学报,2008,31(12):819-822.
- [14] Ansari NA, Kumar R, Gautam S, et al. IL-27 and IL-21 are associated with T cell IL-10 responses in human visceral leishmaniasis [J]. J Immunol, 2011, 186(7): 3977-3985.
- [15] Cosio MG, Majo J, Cosio MG. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells [J]. Chest, 2002, 121(5): 160-165.
- [16] 李敬会,王磊,夏忠诚.胸腺肽联合清热利肺汤对老年慢性阻塞性肺病患者细胞免疫功能和肺功能的影响[J].中国中医急症,2008,17(3):301-302.
- [17] 张颖,高鹏飞,方忠宏,等.益肺健脾补肾法为主防治慢性阻塞性肺疾病的疗效观察[J].中国中医基础医学杂志,2004,10(6):60-62.

(收稿:2012-07-05 修回:2013-02-20)

《Chinese Journal of Integrative Medicine》

(中国结合医学杂志,英文版)SCI 影响因子提升至 1.059

日前,美国汤森路透公司公布 2012 年 SCI 影响因子。《Chinese Journal of Integrative Medicine》(中国结合医学杂志,英文版)SCI 影响因子提升至 1.059,为我国中医药类杂志影响因子之首,在国际替代医学类期刊中的学科排名由 2012 年的 16 名提升至 12 名。

国际替代医学类期刊目前共 20 本,总体影响因子偏低,最高为 4.857。因此,《Chinese Journal of Integrative Medicine》此次影响因子达到 1.059 显得更为不易。同时,它对中医药发展以及国内学者科研水平的提高也具有重要意义。

近年来,针对国内外同类期刊现状,杂志定位由中医、中西医结合拓展到整个替代医学、结合医学领域,调整了栏目设置,增加了国际约稿比例,利用国际一流的 ScholarOne 在线投审稿系统,优化了审稿流程,提高了在线优先发表比例。网站也进行了全新改版,加大了宣传力度,使国际影响力不断提升。来稿方面,海外稿件比例达 29.7%,期刊的国际关注度明显增加。同时,2012 年对编委进行了改选和增补,其中国外编委比例达 46.39%,编委队伍的国际化为进一步提升杂志的国际影响力奠定了基础。