

养阴益气活血方对干燥综合征 NOD 小鼠血清及颌下腺 Th1/Th2 免疫平衡的影响

吴国琳¹ 普兴宏² 李天一³ 余国友¹ 卢雯雯¹ 范永升³

摘要 **目的** 观察养阴益气活血方对干燥综合征(Sjogren's Syndrome, SS)非肥胖型糖尿病(non-obese diabetic, NOD)小鼠血清及颌下腺干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、IL-2、IL-4、IL-10 的表达及 Th1/Th2 免疫平衡的影响,探讨其作用机制。**方法** 32 只 NOD 小鼠随机分为模型组、中药组[养阴益气活血方煎剂, 0.4 mL (100 g/kg)]、西药组[羟氯喹 0.4 mL (60 mg/kg)]、联合组[养阴益气活血方煎剂 (50 g/kg) + 羟氯喹 (60 mg/kg) 0.4 mL], 每组 8 只, 8 只 Balb/C 小鼠作为正常对照(正常组)。实验进行 8 周后取血,摘取小鼠颌下腺组织,采用 ELISA 法检测小鼠血清 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 水平,SP 法检测颌下腺组织 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 蛋白的表达。**结果** 模型组小鼠血清和颌下腺组织 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 水平明显高于正常组($P < 0.05$)。中药组和联合组血清 IFN- γ 、IL-10 水平均低于西药组($P < 0.05$)。联合组颌下腺 IFN- γ 、IL-2 表达低于西药组($P < 0.05$)。模型组血清和颌下腺 IFN- γ /IL-4 比值均高于其他各组($P < 0.05$),且中药组和联合组 IFN- γ /IL-4 比值最接近正常组。**结论** 养阴益气活血方能降低 SS NOD 小鼠血清和颌下腺 Th1、Th2 相关细胞因子的水平,下调血清和颌下腺 IFN- γ /IL-4 比值。养阴益气活血方可能通过调节 SS 小鼠 Th1/Th2 免疫平衡达到治疗作用。

关键词 干燥综合征;非肥胖型糖尿病小鼠;养阴益气活血方;Th1/Th2 免疫平衡

Effect of Yangyin Yiqi Huoxue Recipe on Immune Balance of Th1/Th2 in Serum and Submaxillary Glands of NOD Mice with Sjogren's Syndrome WU Guo-lin¹, PU Xing-hong², LI Tian-yi³, YU Guo-you¹, LU Wen-wen¹, and FAN Yong-sheng³ 1 Department of Chinese Medicine, First Affiliated Hospital, Medical College, Zhejiang University, Hangzhou (310003), China; 2 Department of Internal Medicine, Qujing City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qujing (655000), China; 3 College of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Yangyin Yiqi Huoxue Recipe (YYHR) on expression of interferon- γ (IFN- γ), IL-2, IL-4, IL-10, and immune balance of Th1/Th2 in serum and submaxillary glands of non-obese diabetic (NOD) mice with Sjogren's syndrome (SS), and to explore its mechanisms. **Methods** Totally 32 NOD mice were randomly into 4 groups, i.e., the model group, the Chinese medicine group [CM, administered with YYHR at the dose of 0.4 mL by gavage (100 g/kg)], the Western medicine group [WM group, administered with hydroxychloroquine 0.4 mL by gavage (60 mg/kg)], and the combined group [administered with YYHR (50 g/kg) and hydroxychloroquine (60 mg/kg) 0.4 mL by gavage], 8 mice in each group. Eight Balb/C mice were recruited as the normal control group. Mice were sacrificed to withdraw blood after 8 weeks. The submaxillary gland was excised. Serum levels of IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-10 were detected by ELISA. Protein expression of IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-10 in submaxillary glands was detected by SP method. **Results** Compared with the normal group, levels of IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-10 in serum and submaxillary glands all increased in the model group ($P < 0.05$). Levels of IFN- γ and IL-10 in serum in the CM group and the combined group were lower than those of the WM group

基金项目:浙江省中医药管理局资助项目(No. 2012ZB090)

作者单位:1. 浙江大学医学院附属第一医院中医科(杭州 310003); 2. 云南省曲靖市中医医院内科(云南曲靖 655000); 3. 浙江中医药大学基础医学院(杭州 310053)

通讯作者:李天一, Tel: 0571-87236341, E-mail: litianyi00000@aliyun.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.12.1653

($P < 0.05$). Serum levels of IFN- γ and IL-2 in submaxillary glands in combined group were lower than those of the WM group ($P < 0.05$). The ratio of IFN- γ /IL-4 in serum and submaxillary glands in the model group were higher than that of the rest groups ($P < 0.05$). Besides, it was the nearest to that of the normal group. Conclusions YYHR could decrease the levels of Th1 and Th2 related cytokines and the ratio of IFN- γ /IL-4 in serum and submaxillary glands of NOD mice with SS. It could achieve therapeutic effects through adjusting immune balance of Th1/Th2 in SS mice.

KEYWORDS Sjogren's syndrome; non-obese diabetic mouse; Yangyin Yiqi Huoxue Recipe; immune balance of Th1/Th2

干燥综合征 (Sjogren's syndrome, SS) 是一种侵犯唾液腺、泪腺等外分泌腺的自身免疫性疾病。目前 SS 病因和发病机制尚不清楚,有研究发现在 SS 患者发病的过程中 Th1、Th2 型细胞因子是处于一种动态平衡, Th2 型细胞因子在 SS 患者的外分泌腺被低水平淋巴细胞浸润的初期占优势,而随着浸润情况的加重,到 SS 的后期 Th1 型细胞因子的作用则逐渐占主导,说明 SS 患者在疾病变化过程中 Th1/Th2 的免疫平衡被打乱^[1]。前期实验发现养阴益气活血煎剂能减少 SS NOD 小鼠饮水量,增加小鼠唾液分泌量,调节颌下腺和脾脏指数,减轻颌下腺组织病理损害,对 SS 实验小鼠有治疗作用^[2],同时能调节小鼠血清细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达^[3]。本实验通过观察中药养阴益气活血煎剂对 SS NOD 小鼠血清及颌下腺组织 Th1 和 Th2 细胞分泌的细胞因子表达的影响,研究养阴益气活血方对 SS Th1/Th2 免疫平衡的调节作用,进一步探讨其治疗 SS 的可能机制。

材料与方

1 动物 SPF 级 NOD 小鼠 32 只及 Balb/C 小鼠 8 只, 8 周龄, 雌性, 由上海斯莱克动物实验中心提供。动物合格证号: 2007000512526。于无特殊病菌的恒定温度和湿度条件下饲养。

2 药物及试剂 养阴益气活血方煎剂 (由太子参 24 g、白芍 15 g、玉竹 12 g、五味子 10 g、黄精 15 g、乌梅 10 g、红景天 15 g、肿节风 12 g、青蒿 15 g、桑椹 12 g 等 12 味中药组成), 所有中药饮片均购于浙江大学医学院附属第一医院中药房, 由浙江中医药大学中药实验室煎制浓缩成含生药量为 6 g/mL。硫酸羟氯喹片: 0.1 g/片, 上海中西制药有限公司生产, 批号: 091008, 用蒸馏水稀释成含生药量 3 mg/mL。小鼠干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、IL-2、IL-4 及 IL-10 ELISA 检测试剂盒 (购自上海朗顿生物科技有限公司); 兔抗鼠 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 多克

隆抗体一抗 (河北博海生物工程开发有限公司分装美国 Santa Cruz 公司产品); 二抗: Sp-9001、Pv-9003 购自北京中杉金桥公司。

3 动物分组 将 32 只 NOD 小鼠随机分为 4 组: 模型组、中药组、羟氯喹组 (西药组)、中西药联合组 (联合组), 每组 8 只。Balb/C 小鼠 8 只做为正常对照组 (正常组)。

4 干预方法 正常组和模型组每天正常饲养。其他组在正常饲养基础上, 于实验开始后每天定时给药 1 次。中药组每天灌胃养阴益气活血方煎剂 0.4 mL (100 g/kg, 相当于临床人用药剂量 9 倍)。西药组每天灌胃羟氯喹片稀释液 0.4 mL (60 mg/kg, 相当于临床人用药剂量 9 倍); 联合组每天分别灌胃益气养阴活血煎剂 (50 g/kg) 加羟氯喹 (60 mg/kg) 0.4 mL。连续干预 8 周。

5 检测指标及方法 干预结束后股动脉抽血, 断颈处死小鼠, 解剖摘取颌下腺进行指标检测。

5.1 血清 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 水平检测 将血清放入血清分离管中, 室温放置 30 min, 3 000 r/min 离心 15 min, 吸取血清 1.5 mL 放入离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 ELISA 法测定血清 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 水平。具体操作步骤严格按照试剂盒说明书操作。

5.2 颌下腺组织 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 蛋白含量检测 采用免疫组化 SP 法检测 NOD 小鼠颌下腺组织 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 蛋白含量。具体步骤严格按照说明书操作。采用多功能真彩色细胞图象分析管理系统进行图像分析, 选取 400 倍图像, 细胞质或胞膜着棕黄色为阳性表达细胞。选择有意义的组织相, 经登录、编号、采集、分析、读取数据。随机选取 5 个视野进行平均光密度测定, 取其平均值作为该切片的代表值进行统计分析。

6 统计学方法 采用 SPSS 15.0 软件统计分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-Way ANOVA 检验方法, 组间两两比较采用 Dunnett T3 方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般情况比较 干预2周后,中药组1只小鼠死亡,经解剖发现是由于灌胃不当造成食管损伤引起。实验过程中各组小鼠一般情况,包括皮毛色泽、进食量、活动量等无显著变化及差异。模型组小鼠饮水量明显多于正常组,中药组和联合组饮水量稍多于正常组。

2 各组小鼠血清细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10水平比较(表1) 模型组小鼠血清 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10水平均高于其他各组($P < 0.05$)。中药组和联合组小鼠血清 IFN- γ 、IL-10水平均低于西药组($P < 0.05$)。

表1 各组小鼠血清 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th1 相关细胞因子		Th2 相关细胞因子	
		IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10
正常	8	187.3 $\pm$ 11.8 *	256.7 $\pm$ 6.4 *	40.9 $\pm$ 4.4 *	111.8 $\pm$ 12.9 *
模型	8	393.6 $\pm$ 9.2	409.3 $\pm$ 10.2	66.9 $\pm$ 4.1	204.2 $\pm$ 11.3
中药	7	205.9 $\pm$ 18.7 *	310.2 $\pm$ 12.8 *	44.5 $\pm$ 4.5 *	114.2 $\pm$ 10.0 * Δ
西药	8	290.8 $\pm$ 50.6 *	353.6 $\pm$ 22.4 *	53.5 $\pm$ 6.2 *	164.7 $\pm$ 17.2 *
联合	8	195.9 $\pm$ 17.2 *	308.7 $\pm$ 13.9 *	44.4 $\pm$ 4.5 *	123.8 $\pm$ 18.3 * Δ

注:与模型组比较, * $P < 0.05$;与西药组比较, $\Delta P < 0.05$

3 各组小鼠颌下腺组织 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10蛋白表达比较(表2,图1) 正常组小鼠颌下腺的腺泡、闰管、分泌管、导管等处染色较弱或消失,颌下腺组织偶见棕黄色颗粒表达(IL-4、IL-10表达)。模型组NOD小鼠基底膜、导管基底膜等处可见较强IL-4、IL-10表达,颌下腺组织大部分腺泡的顶膜、闰管、纹状管、导管上皮内均有较强染色的棕黄色颗粒(IFN- γ 、IL-2表达)。西药组部分闰管、导管及腺泡内棕黄色颗粒较少,但比中药组和联合组染色程度强。联合组、中药组 IFN- γ 、IL-2有散在表达,且表达较弱。模型组小鼠颌下腺 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10平均光密度高于

表2 各组小鼠颌下腺组织 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 平均光密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th1 相关细胞因子		Th2 相关细胞因子	
		IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10
正常	8	0.06 $\pm$ 0.04 *	0.21 $\pm$ 0.05 *	0.11 $\pm$ 0.06 *	0.094 $\pm$ 0.009 *
模型	8	0.50 $\pm$ 0.12	0.63 $\pm$ 0.10	0.33 $\pm$ 0.13	0.557 $\pm$ 0.535
中药	7	0.14 $\pm$ 0.08 *	0.25 $\pm$ 0.06 *	0.13 $\pm$ 0.05 *	0.200 $\pm$ 0.082 *
西药	8	0.18 $\pm$ 0.12 *	0.43 $\pm$ 0.14 *	0.21 $\pm$ 0.08 *	0.275 $\pm$ 0.104 *
联合	8	0.11 $\pm$ 0.06 * Δ	0.22 $\pm$ 0.09 * Δ	0.14 $\pm$ 0.05 *	0.200 $\pm$ 0.076 *

注:与模型组比较, * $P < 0.05$;与西药组比较, $\Delta P < 0.05$

其他各组($P < 0.05$)。联合组 IFN- γ 、IL-2表达低于西药组($P < 0.05$)。

4 各组小鼠血清和颌下腺组织 IFN- γ /IL-4 比值比较(表3) 模型组小鼠血清及颌下腺 IFN- γ /IL-4 比值均高于其他各组($P < 0.05$)。

表3 各组小鼠血清及颌下腺 IFN- γ /IL-4 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

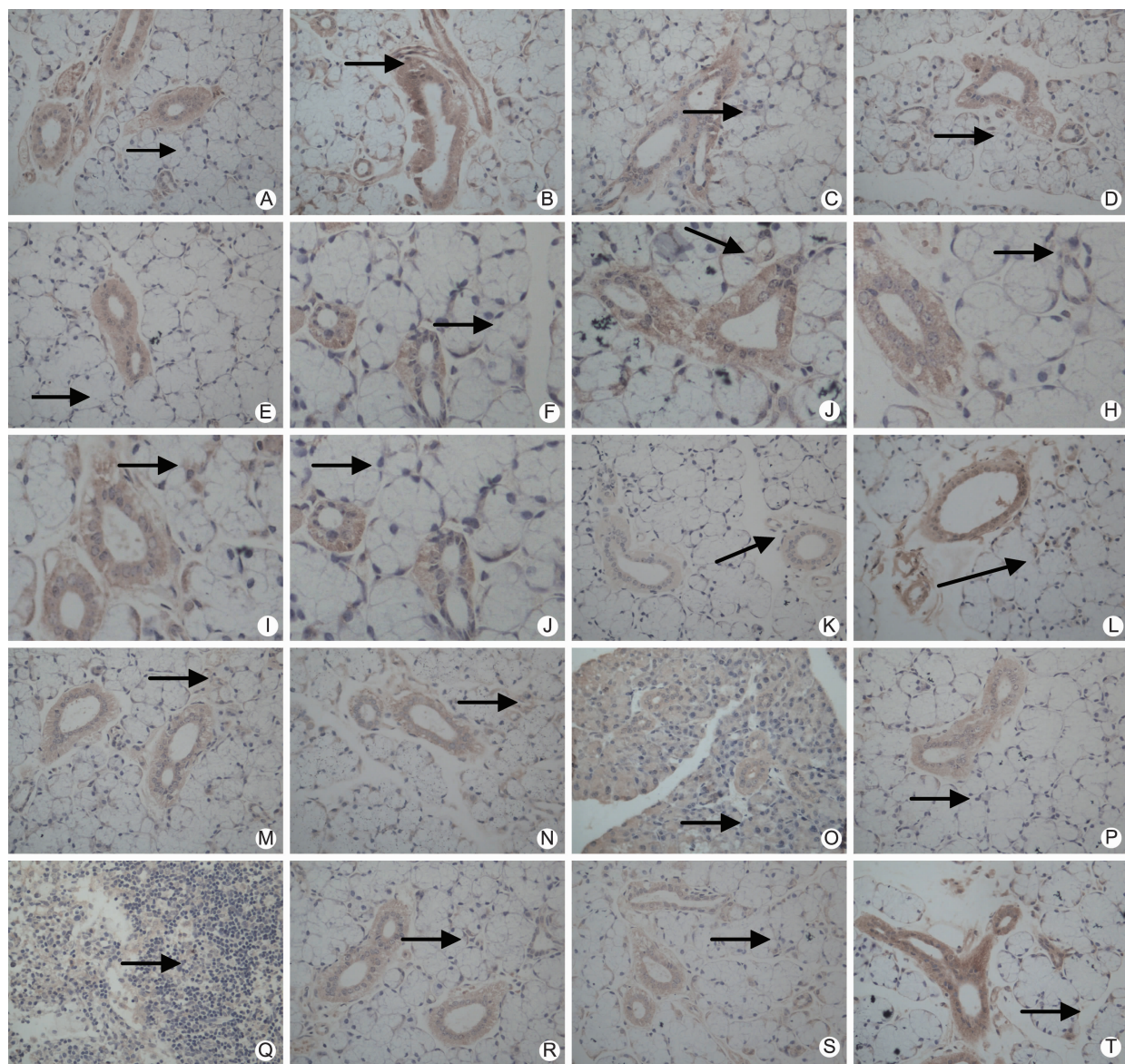
组别	n	血清 IFN- γ /IL-4	颌下腺 IFN- γ /IL-4
正常	8	4.6 $\pm$ 0.4 *	0.6 $\pm$ 0.5 *
模型	8	5.9 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.8
中药	7	4.6 $\pm$ 0.4 *	1.0 $\pm$ 0.5 *
西药	8	5.2 $\pm$ 1.1	1.0 $\pm$ 0.5 *
联合	8	4.5 $\pm$ 0.5 *	0.9 $\pm$ 0.5 *

注:与模型组比较, * $P < 0.05$

讨 论

SS 确切的病因和发病机制尚不明确。一般认为是在遗传、病毒感染的因素等多种因素共同作用下,导致机体细胞免疫和体液免疫的异常改变,使唾液腺和泪腺等组织发生炎症改变及损伤,临床常表现为口干、眼干、关节痛等症状。

T 辅助细胞(Th)主要分为2类:Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2 等细胞因子,参与细胞免疫;而 Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 和 IL-10 等细胞因子,参与体液免疫,Th1 细胞与 Th2 细胞之间存在动态平衡^[4]。研究发现 SS 患者唇腺组织中 Th1 型细胞因子 IL-2 及 IFN- γ 有高表达,IFN- γ 还具有减缓涎腺细胞生长发育的作用,从而在 SS 发病的早期发挥重要作用^[5]。IFN- γ 另外一个重要作用是诱导腺体黏附分子的分泌,可能参与调控淋巴细胞对腺体的浸润过程。IL-4 作为 Th2 细胞产生的细胞因子,在 SS 发病临床期阶段的适应性免疫反应中起关键作用,敲除 IL-4 基因可以恢复 SS 实验动物模型的腺体分泌功能,但是却不能减少淋巴细胞对腺体的浸润^[6]。目前 IFN- γ 、IL-2 和 IL-4、IL-10 被认为是最能反应 Th1 及 Th2 淋巴细胞活性的细胞因子,且 IFN- γ /IL-4 比值也能反应 Th1/Th2 的免疫平衡状态^[7]。SS 患者唇腺组织 IFN- γ /IL-4 比值高于健康人,并且 IFN- γ /IL-4 比值和唇腺组织淋巴细胞浸润程度呈显著正相关^[8]。本实验结果显示,NOD 小鼠血清和颌下腺组织 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 水平均明显高于正常组,表明 SS 存在高水平的 Th1、Th2 型细胞因子。同时比较血清和颌下腺组织 IFN- γ /IL-4 比值发现,模型组小鼠比值要高于正常组,提示 SS 以 Th1 型细胞因子的作用占优势。这些细胞因子发挥正反馈的作用,进一步刺激 Th1



注:A、F、K、P 为正常组;B、G、L、Q 为模型组;C、H、M、R 为中药组;D、I、N、S 为西药组;E、J、O、T 为联合组;A-E 为 IFN- γ 表达;F-J 为 IL-2 表达;K-O 为 IL-4 表达;P-T 为 IL-10 表达;箭头所指为相应指标表达

图 1 各组小鼠颌下腺组织 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 表达 (DAB, $\times 400$)

细胞增殖并向 Th2 细胞分化,导致模型小鼠颌下腺中浸润淋巴细胞增多,病变逐渐加重。

养阴益气活血方主要由太子参、白芍、玉竹、五味子、黄精、乌梅、红景天、肿节风、青蒿、桑椹等中药组成,是笔者长期临床治疗 SS 有效的经验方。方中重用太子参以补肺脾之气,与白芍、乌梅、五味子、桑椹、青蒿、玉竹同用增加益气养阴生津之功,肿节风、红景天活血化瘀止痛,诸药合用,具有滋肾养阴、益气生津、活血化瘀之功,有效针对阴虚气虚兼血瘀病机。通过前期临床研究观察,运用养阴益气活血方配合西药治疗 SS 取得一定的疗效,不仅能缓解患者的临床症状,还能改善患者免疫功能及 Th1/Th2 免疫平衡,提高生活质量和

整体状况^[9-11]。本研究发现,各用药组小鼠血清和颌下腺组织 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 水平低于模型组。中药组和联合组血清 IFN- γ 、IL-10 水平均低于西药组;中药组和联合组 IL-4 水平与正常组接近。联合组颌下腺 IFN- γ 、IL-2 表达低于西药组。中药组、联合组血清和颌下腺 IL-4 水平低于模型组。同时还发现,模型组小鼠血清及颌下腺 IFN- γ /IL-4 比值均高于其他各组,而中药组和联合组 IFN- γ /IL-4 比值最接近正常组。提示中药养阴益气活血方能降低 SS 血清及颌下腺 Th1 型细胞因子以及 Th2 型细胞因子的表达水平,改善 SS 血清和颌下腺 IFN- γ /IL-4 比值,表明其可能通过调节 Th1/Th2 免疫平衡而达到治疗 SS 的目的,中西药合用效果更

好,为临床中西医结合治疗 SS 的有效性提供一定的理论依据。本研究是养阴益气活血方治疗 SS 的基础实验研究,今后将从其对 SS 细胞凋亡、颌下腺分泌功能相关因子等方面进行深入研究。

参 考 文 献

[1] Mitsiasdi C,Tzioufas AG,Veiopoulou C,et al. The Th1,Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjogren's syndrome[J]. Clin Exp Immunol, 2002, 128(2): 562-568.

[2] 吴国琳,普兴宏,李天一,等. 养阴益气活血法对干燥综合征 NOD 小鼠颌下腺的干预作用研究[J]. 西部中医药, 2012, 25(6): 29-34.

[3] 吴国琳,李天一,普兴宏,等. 养阴益气活血方药对干燥综合征 NOD 小鼠血清及颌下腺 TNF- α 、IL-1 β 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 413-416.

[4] Skapenko A, Schulze-Koops H. Analysis of Th1/Th2 T-cell subsets[J]. Methods Mol Med, 2007, 136(1): 87-96.

[5] Nikolov NP, Illei GG. Pathogenesis of Sjogren's syndrome[J]. Curr Opin Rheumatol, 2009, 21(5): 465-470.

[6] Nguyen CQ, Gao JH, Kim H, et al. IL-4-STAR6 signal transduction-dependent induction of the clinical

phase of Sjogren's syndrome-like disease of the non-obese diabetic mouse[J]. J Immunol, 2007, 179(1): 382-390.

[7] 庄俊汉,林华鹏,徐胜美,等. γ -干扰素及白细胞介素-4 在干燥综合征患者唇腺组织中的表达与唇腺组织中淋巴细胞浸润的关系[J]. 赣南医学院学报, 2007, 27(2): 165-168.

[8] 周强,柏涛,吴鸿雁. 干燥综合征患者唇腺黏膜淋巴细胞 Th1/Th2 和 Fas/FasL 表达的相关性研究[J]. 徐州医学院学报, 2008, 28(1): 28-30.

[9] 吴国琳,韩咏梅,李天一,等. 益气养阴祛瘀中药治疗干燥综合征的临床疗效及其对免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(4): 322-324.

[10] Wu GL, Li TY, Fan YS, et al. Therapeutic effect of Chinese herbal medicine for Yiqi Yangyin Quyu on the level of osteopontin in peripheral blood and quality of life in patients with primary Sjogren's syndrome[J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(9): 710-714.

[11] Wu GL, Li TY, Fan YS, et al. Effect of Chinese herbal medicine for nourishing yin, supplementing qi, and activating blood on the Th1/Th2 immune balance in peripheral blood in patients with primary Sjogren's syndrome[J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(9): 696-700.

(收稿:2013-06-01 修回:2013-09-16)

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅