

射干麻黄汤对哮喘患者 T 细胞功能的影响

杨硕 罗光伟 胡小萍 万军 夏倩 陈菁 袁文胜 孙洁民

【摘要】 目的 观察射干麻黄汤对寒哮患者外周血 T 细胞亚群及白细胞介素 (interleukin, IL)-5、IL-10 mRNA 水平的影响。**方法** 将 51 例轻中度寒哮患者按随机数字表法分为治疗组 25 例和对照组 26 例。对照组给沙丁胺醇气雾剂,每次吸入 100 μg ,每天 4 次;治疗组在对照组的基础上加用射干麻黄汤中药配方颗粒冲服,每天 1 剂,早晚 2 次冲服。两组均治疗 12 周。分别于治疗前和治疗后 12 周留取血液行流式细胞术检测 T 细胞亚群,RT-PCR 检测 IL-5、IL-10 mRNA 表达。**结果** 治疗后两组比较:CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺ 无显著差异,CD4/CD8 比值($t=2.593, P=0.012$)、IL-5($t=2.492, P=0.016$)明显下降,IL-10($t=2.659, P=0.011$)明显上升。**结论** 射干麻黄汤调节哮喘患者 T 细胞 CD4/CD8 比例及 IL-5、IL-10 表达水平,改变机体细胞免疫功能,控制哮喘症状。

【关键词】 射干麻黄汤; 支气管哮喘; T 细胞亚群

【中图分类号】 R285.6 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.08.005

The Effect of *Shegan Mahuang* decoction on T cell functions of Asthmatics YANG Shuo, LUO Guang-wei, HU Xiao-ping, et al. Department of Respiratory, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China
Corresponding author: LUO Guang-wei, E-mail: whyyy191@sina.com

基金项目:武汉市卫生局中医药中西医结合科研课题(武卫[2007]43号)

作者单位:430022 武汉市第一医院呼吸科

作者简介:杨硕(1979-),博士,主治医师。研究方向:肺部炎症。E-mail: yangshuo2003103@aliyun.com

通讯作者:罗光伟(1968-),硕士,主任医师,硕士研究生导师。研究方向:支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病。

E-mail: whyyy191@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of *Shegan Mahuang* decoction on peripheral blood T cell subsets and IL-5mRNA, IL-10mRNA expression in asthmatics. **Methods** 51 cases of mild to moderate asthmatics were randomly divided into treatment group (25 patients) and control group (26 patients). Control group was given salbutamol aerosol, each inhalation 100 μ g, four times daily; treatment group were given extra dosage of Chinese medicine (*Shegan Mahuang* decoction), twice a day on in the morning and evening. Both groups were treated for 12 weeks. Blood specimens were collected respectively before and after treatment. Then T cell subsets were detected by the line flow cytometry, and IL-5, IL-10mRNA expression tested by RT-PCR. **Results** Compared with control group, T cell subsets CD³⁺, CD⁴⁺, CD⁸⁺ showed no significant difference, but CD4/CD8 ratio ($t = 2.593$, $P = 0.012$), IL-5 ($t = 2.492$, $P = 0.016$) and IL-10 ($t = 2.659$, $P = 0.011$) were changed significantly. **Conclusion** *Shegan Mahuang* decoction can adjust CD4/CD8 ratio and the IL-5, IL-10 expression, regulate immune function, and control asthma symptoms.

【Key words】 *Shegan Mahuang* decoction; Asthma; T cell subsets

对以往未经规范治疗的初诊哮喘患者,推荐按需使用短效 β_2 受体激动剂,并选用低剂量吸入糖皮质激素或白三烯调节剂^[1]。但部分患者尤其是轻症患者,往往因经济收入和顾虑激素副作用,不愿意选用控制药物。中西医结合治疗依从性更好,对这些患者病情控制可能是有益的。目前认为支气管哮喘的发病与辅助性 T 细胞(T helper cells,Th)亚群功能失衡、Th2 活化亢进为特征的免疫学异常相关,如白细胞介素(interleukin,IL)-5、IL-10 等 Th1/Th2 细胞因子表达的调节异常^[2]。射干麻黄汤作为哮喘证治疗的要方,具有较好疗效。麻黄汤是治疗哮喘寒证的经典方剂,在对难治性哮喘也具有有良好的疗效,可有效改善患者肺功能^[3],本研究探讨射干麻黄汤治疗对轻症哮喘患者 T 细胞亚群及 IL-5、IL-10 表达的影响。

1 对象与方法

1.1 对象

51 例研究对象来自 2010 年 9 月至 2013 年 3 月武汉市中西医结合医院呼吸科门诊,根据随机数字表分为治疗组 25 例和对照组 26 例。治疗组中男 12 例,女 13 例;年龄 19~60 岁,平均年龄(44.0 \pm 11.8)岁;对照组中男 13 例,女 13 例;年龄 20~58 岁,平均年龄(44.1 \pm 9.8)岁。两组患者性别、年龄、病情严重程度比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 诊断标准

西医诊断标准参照支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)^[1]制定:符合哮喘防治指南中哮喘的诊断标准;中医辨证标准

参照文献^[4]制定,症见气喘,胸膈满闷如塞,咳不甚,痰少咯吐不爽,色白而多泡沫,形寒怕冷,天冷或受寒所发,舌苔白滑,辨为冷哮者。

1.3 纳入标准

年龄在 18 岁以上,病情为轻度发作,尚未吸入糖皮质激素治疗;中医辨证属于寒哮,能接受并完成治疗、观察和各项检查;所有患者入试前获得知情同意书。

1.4 排除标准

合并支气管扩张、肺结核等基础肺病者;有严重心、脑、肝、肾等疾病者;诱发加重或使哮喘难以控制的因素;有重度哮喘发作史;对本试验药物过敏者;妊娠和哺乳期妇女;不能依从研究方案者。

1.5 治疗方法

对照组:应用沙丁胺醇气雾剂(英国葛兰素史克制药有限公司,生产批号 KR0354)100 μ g,每天 4 次。

治疗组:在对照组的基础上加用射干麻黄汤,予中药配方颗粒(湖北天济中药饮片有限公司生产)口服,组成:射干 12 g(2 袋),麻黄 12 g(2 袋),细辛 3 g(1 袋),生姜 9 g(3 袋),大枣 10 g(1 袋),紫菀 12 g(2 袋),款冬花 10 g(1 袋),五味子 6 g(1 袋),法夏 12 g(2 袋),每天 1 剂,早晚 2 次温服。两组均治疗 12 周。

1.6 观察指标和方法

对每位患者于治疗前后抽取外周静脉血 8 mL,5 mL 采用全血直标法流式细胞术检测 T 细胞亚群,分析 CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺细胞百分率,并计算 CD4/CD8 比值。另 3 mL 肝素抗凝,用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞。将外周血单个

核细胞 (1×10^7 个) 用经焦碳酸二乙酯处理过的 PBS 液洗涤 3 次后移至 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 4°C 离心弃上清, 用 Tripure 1 mL 提取总 RNA, 紫外线分光光度计测定其纯度和含量。引物由中国科学院上海细胞生物研究所合成。应用 OneStep RT-PCR 试剂盒 (美国 QIAGEN 公司), 扩增目的基因, 反应参数为: 50°C 30 分钟; 95°C 15 分钟, 1 个循环; 94°C 1 分钟; 57°C (IL-5)、 62°C (IL-10) 或 65°C (β -actin) 1 分钟; 72°C 1 分钟, 32 个循环; 72°C 延伸 10 分钟。

表 1 RT-PCR 检测用引物

产物	大小	Forward (5' → 3')	Reverse (3' → 5')
IL-5	239bp	ACCTTGGCACTGCTTCTACTCA	ACTCTCCGCTCTTCTCTCCACAC
IL-10	309bp	CTGCTCTGCTGCTGCTCTCTCTG	ATGCCGCTTGATGCTCTGGTCTTG
β -actin	576bp	CCAAGGCCAACCGGAGAGATGAC	AGGCTACATGGTGGTCCGCCAGAC

凝胶扫描扩增合成的 RT-PCR 产物, 在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析系统中扫描打印, 并分析测定电泳带灰度, 以特异的扩增条带灰度与扩增的 β -actin 条带灰度之比表示目的基因相对表达水平。

1.7 疗效判定

参照文献^[1]制定, 分为完全控制、部分控制及未控制。(1) 白天症状 > 2 次/周; (2) 有活动受限; (3) 有夜间症状/憋醒; (4) 需要使用缓解药的增加次数 > 2 次/周; (5) 1 秒用力呼气容积 (Forced expiratory volume in one second, FEV1) < 预计值的 80%。若 5 项均无为完全控制, 1 ~ 2 项为部分控制, 3 项及以上为未控制。未控制者退出试验升级哮喘治疗。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件处理数据。两组患者临床疗效比较采用秩和检验。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据符合正态分布, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 组内治疗前后的比较用配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者疗效比较

共 5 例患者试验期间症状加重并调整治疗方案, 其中治疗组 1 例, 对照组 4 例, 其余患者均完成

试验, 两组患者临床疗效比较采用秩和检验, 治疗组疗效优于对照组 ($P = 0.028$), 详见表 2。

表 2 治疗组与对照组疗效比较

组别	例数	完全控制	部分控制	未控制
治疗组	25	16	8	1
对照组	26	9	13	4

2.2 两组患者治疗前后外周血 T 细胞亚群比较

两组间比较采用独立样本 t 检验, 治疗前两组 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}8^+$ 及 $\text{CD}4/\text{CD}8$ 比值比较差异无统计学意义, 治疗后两组比较: $\text{CD}3^+$ ($t = 0.747$, $P = 0.459$)、 $\text{CD}4^+$ ($t = 1.806$, $P = 0.077$)、 $\text{CD}8^+$ ($t = 1.584$, $P = 0.120$) 差异无统计学意义, $\text{CD}4/\text{CD}8$ 比值明显下降 ($t = 2.593$, $P = 0.012$)。本组治疗前后的比较用配对样本 t 检验, 与治疗前比较, 对照组 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}8^+$ 及 $\text{CD}4/\text{CD}8$ 比值均差异无统计学意义, 治疗组 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}4^+$ 无明显变化, $\text{CD}8^+$ 增加 ($t = 2.752$, $P = 0.008$)、 $\text{CD}4/\text{CD}8$ 比值下降 ($t = 3.539$, $P = 0.001$) 有统计意义, 详见表 3。

表 3 各组治疗前后 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}8^+$ 及 $\text{CD}4/\text{CD}8$ 比值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	$\text{CD}3^+(\%)$	$\text{CD}4^+(\%)$	$\text{CD}8^+(\%)$	$\text{CD}4/\text{CD}8$
治疗组				
治疗前	68.6 \pm 8.0	45.0 \pm 7.9	22.3 \pm 4.1	2.08 \pm 0.49
治疗后	67.7 \pm 7.8	40.9 \pm 7.3	25.6 \pm 4.3 ^a	1.64 \pm 0.38 ^{ab}
对照组				
治疗前	70.9 \pm 7.9	46.2 \pm 7.8	22.8 \pm 4.2	2.10 \pm 0.53
治疗后	69.4 \pm 8.6	44.5 \pm 6.7	23.7 \pm 4.1	1.92 \pm 0.38

注: 与本组治疗前比较, ^a $P < 0.05$; 与对照组同时时间点比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.3 两组患者治疗前后 IL-5、IL-10 表达水平比较

两组间比较采用独立样本 t 检验, 治疗前两组 IL-5、IL-10 mRNA 相对表达水平无明显差异, 治疗后治疗组较对照组 IL-5 ($t = 2.492$, $P = 0.016$) 表达下降, IL-10 ($t = 2.659$, $P = 0.011$) 表达增加。本组治疗后与治疗前比较用配对样本 t 检验, 对照组 IL-5 ($t = 4.874$, $P < 0.01$) 明显下降, IL-10 无明显改变, 治疗组 IL-5 ($t = 6.946$, $P < 0.01$) 明显下降, IL-10 ($t = 5.052$, $P < 0.01$) 明显升高, 详见表 4。

表 4 各组治疗前后 IL-5、IL-10 表达水平比较

组别	IL-5	IL-10
治疗组		
治疗前	0.70±0.16	0.39±0.13
治疗后	0.38±0.16 ^{ab}	0.61±0.18 ^{ab}
对照组		
治疗前	0.69±0.16	0.40±0.15
治疗后	0.48±0.14 ^a	0.48±0.16

注:与本组治疗前比较,^a $P<0.05$;与对照组同时时间点比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨论

哮喘的治疗应以患者的病情严重程度为基础,根据其控制水平级别选择适当的治疗方案,也要考虑患者的实际状况,如经济收入和当地的医疗资源等。对以往未经规范治疗的初诊哮喘患者可选择第 2 级治疗方案,按需使用短效 β_2 受体激动剂,并选用低剂量吸入糖皮质激素或白三烯调节剂。部分患者尤其是轻症患者,往往因经济收入和顾虑激素不良反应,不愿意选用指定的控制药物,而选择第 1 级治疗方案,该方案按需使用短效 β_2 受体激动剂,未指定使用何种控制性药物。对这些患者,密切随访观察病情,及时升级治疗十分必要。同时,给予其他可接受的治疗,如中西医结合治疗,对患者也是有益的^[5]。本研究中,与对照组比较,射干麻黄汤治疗组患者病情控制水平明显提高。

T 细胞在机体细胞免疫应答中起重要作用,T 淋巴细胞亚群紊乱,辅助 T 细胞($CD4^+$)水平升高,抑制 T 细胞($CD8^+$)水平下降, $CD4/CD8$ 比值失调,可导致 IgE 升高和气道高反应性而诱导哮喘发作^[6]。哮喘患者气道阻力与 $CD4^+$ T 细胞及 $CD4/CD8$ 比值呈显著正相关^[7],与 $CD8^+$ T 呈显著负相关,射干麻黄汤治疗后 $CD4/CD8$ 比例的改变,有助于改善患者肺通气。射干麻黄汤治疗后患者与治疗前及对照组比较 $CD4^+$ T 细胞数量均有所下降,但差异无统计学意义。治疗组 $CD8^+$ T 细胞数量较治疗前显著增加,但与对照组比较差异无统计学意义。尽管射干麻黄汤治疗后 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T 细胞数量变化不显著,但 $CD4/CD8$ 比例变化有统计学意义,提示对机体细胞免疫功能情况产生显著的影响。

$CD4^+$ T 细胞可分泌细胞因子对体液免疫产生影响,与支气管哮喘发病密切相关。IL-5、IL-10 均为 Th2 细胞因子,可抑制原始 T 细胞分化为 Th1 细胞及 Th1 细胞功能。IL-5 在接触抗原后,能促进活

化 B 淋巴细胞向产生抗体细胞分化,并诱导骨髓干细胞向嗜酸性细胞(eosinophil, EOS)增殖分化。IL-5 不仅可作用于 EOS 前体促进其增殖分化,维持并延长成熟 EOS 的生存期,引起 EOS 趋化和黏附,还可提高抗体依赖细胞介导细胞毒作用和抗体诱导的 EOS 脱颗粒^[8]。IL-10 是重要的免疫炎症下行调节因子,它能抑制激活的 $CD4^+$ T 细胞的增值,抑制 Th2 细胞合成 IL-5 等多种细胞因子及炎症的发生和发展,促进 Treg 细胞增殖,构成免疫反应的负反馈机制^[9-10]。IL-10 水平的升高,有助于控制哮喘患者气道炎症与症状^[11]。在本研究中射干麻黄汤治疗后虽然 $CD4^+$ 细胞数量影响较小,但 IL-5 水平显著下降,IL-10 水平显著升高,提示射干麻黄汤能够调节细胞因子表达,控制哮喘的发生。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J]. 中华哮喘杂志(电子版),2008,(1):3-13.
- [2] Elias JA, Lee CG, Zheng T, et al. New insights into the Pathogenesis of asthma[J]. J Clin Invest, 2003, 111(30): 291-297.
- [3] 王晶波,彭先祝,隋博文. 射干麻黄汤加味治疗难治性哮喘 33 例临床观察[J]. 中医杂志,2013,54(10):846-8.
- [4] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:61-65.
- [5] 吴祖群,沈华浩. T 细胞在哮喘免疫调节中的作用[J]. 国外医学:呼吸系统分册,2005,25(9):690-695.
- [6] 乔靖,林亮. 中医药治疗支气管哮喘的研究概述[J]. 环球中医药,2013,6(10):769-772.
- [7] 赖映君,邱晨,鄢孟洁. 哮喘患者 T 细胞亚群失衡与气道阻力变化的相关性[J]. 现代预防医学,2006,33(3):284-285.
- [8] Yeon-Joon Park, Eun-Jee Oh, Jong-Won Park, et al. Plasma Eosinophil Cationic Protein, Interleukin-5, and ECP/Eo Count Ratio in Patients with Various Eosinophilic Diseases[J]. Ann Clin Lab Sci,2006,36(3):262-266.
- [9] Ye Z, Huang H, Hao S, et al. IL-10 has a distinct immunoregulatory effect on naive and active T cell subsets[J]. J Interferon Cytokine Res,2007,27(12):1031-1038.
- [10] Rutz S, Janke M, Kassner N, et al. Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008,105(9): 3497-3502.
- [11] Yüksel B, Aydemir C, Ustündag G, et al. The effect of treatment with montelukast on levels of serum interleukin-10, eosinophil cationic protein, blood eosinophil counts, and clinical parameters in children with asthma[J]. Turk J Pediatr, 2009, 51(5): 460-465.

(收稿日期:2014-08-04)

(本文编辑:董历华)