

三伏天灸调节支气管哮喘患者 Th1/Th2 比值的初步研究*

廖冰洁,汪 杨,李月梅,周迎春,梁淑慧,刘基铎,庞志宇
(广州中医药大学第一附属医院检验科,广东广州 510405)

摘要:目的 探讨三伏天灸治疗支气管哮喘能否有效调节辅助性 T 淋巴细胞(Th)1/Th2 比值。方法 将该院接受三伏天灸治疗的 30 例支气管哮喘患者作为患者组,另外选取 20 例同期健康体检者作为对照组。用实时荧光定量 PCR 检测患者组三伏天灸治疗前、后以及对照组 *T-bet*、*GATA-3*、*Foxp3* 和 *STAT-6* 的 mRNA 表达;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)水平;采用流式细胞术检测 Th1、Th2 细胞百分率。结果 三伏天灸治疗后,患者组 Th1/Th2 比值升高,IFN- γ 分泌水平降低,T-bet 和 *GATA-3* 表达水平明显升高,STAT-6 表达水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 三伏天灸疗法可以通过降低 Th2,调节 Th1/Th2 的比值,对支气管哮喘患者的治疗发挥作用。

关键词:哮喘; 天灸; Th1; Th2

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.03.003

中图法分类号:R562.2

文章编号:1673-4130(2018)03-0264-03

文献标识码:A

The preliminary study of Tian Jiu therapy regulating Th1/Th2 ratio in bronchial asthma patients*

LIAO Bingjie, WANG Yang, LI Yuemei, ZHOU Yingchun, LIANG Shuhui, LIU Jiduo, PANG Zhiyu
(Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese
Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether Tian Jiu therapy can regulate Th1/Th2 ratio effectively for bronchial asthma patients. **Methods** A total of 30 bronchial asthma patients who were treated with Tian Jiu therapy in the hospital were enrolled in the study as patients group and 20 healthy individuals were enrolled as control group. The mRNA of *T-bet*, *GATA3*, *Foxp3* and *STAT-6* were detected by using realtime-PCR, while IFN- γ and IL-4 were detected by using ELISA for control group and patents group before and after treatment. Flow cytometry was used to detect Th1/Th2 ratio. **Results** After Tian Jiu therapy, Th2 proportion decreased and Th1/Th2 ratio increased, secretion of IFN- γ decreased, mRNA of *T-bet* and *GATA3* significantly increased, while *STAT-6* decreased significantly($P < 0.05$). **Conclusion** Tian Jiu therapy has therapeutic effect on bronchial asthma patients through decreasing Th2 proportion and regulating Th1/Th2 ratio.

Key words: asthma; Tian Jiu; Th1; Th2

哮喘是一种以气流阻塞为特征的气道高反应性疾病。患者一般伴随辅助性 T 淋巴细胞(Th)2 水平增高,同时 B 细胞分泌大量 IgE(IgE 会介导超敏反应)。目前,治疗哮喘的方法以吸入短效 β_2 -受体阻断剂为主,但这种方法不能从根本上改善患者的预后^[1],高达 50% 的哮喘患者会使用非传统的治疗方法^[2]。三伏天灸是中国传统医学里运用针灸理论治疗哮喘的方法之一。中医学理论有“冬病夏治”和“春夏滋阳”,而哮喘作为一种经常在冬季发病的慢性疾病,可以在一年最热的“三伏天”对哮喘患者运用天灸治疗,达到“冬病夏治”和“春夏滋阳”的目的,从而减少哮喘患者冬天的发病次数。以往的研究表明,三伏

天灸对哮喘患者的症状改善有效^[3-4],但其确切机制并不清楚。哮喘患者一般伴随 Th2 百分率增高,三伏天灸治疗对哮喘患者的 Th2/Th1 比值是否能有效调节作用未见报道。本研究旨在探讨三伏天灸是否通过调节 Th1/Th2 比值,起到改善哮喘患者症状的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取广州中医药大学第一附属医院接受三伏天灸疗法的支气管哮喘患者共 30 例纳入本研究作为患者组,另外选取同期健康体检者 20 例作为对照组。

1.2 仪器与试剂 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪、BD 公司 C6 型流式细胞仪;TRIzolLS、反转

* 基金项目:广东省省级科技计划项目(2013B021800222)。

作者简介:廖冰洁,女,副主任技师,主要从事临床免疫学研究。

本文引用格式:廖冰洁,汪杨,李月梅,等.三伏天灸调节支气管哮喘患者 Th1/Th2 比值的初步研究[J].国际检验医学杂志,2018,39(3):

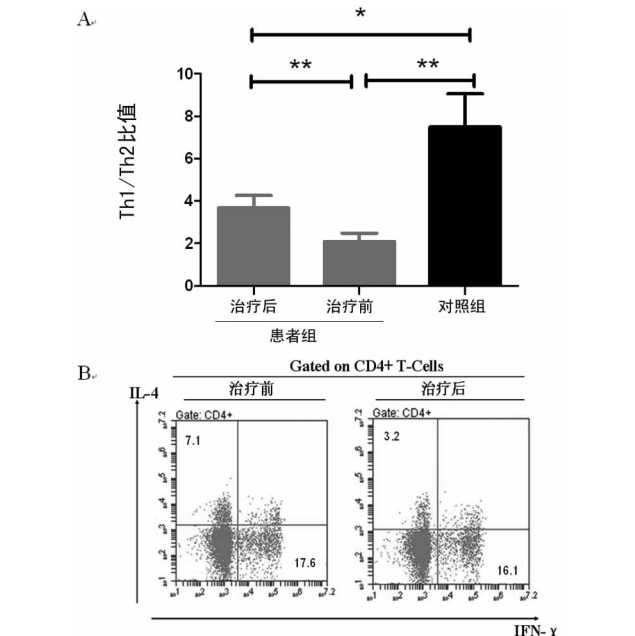
录酶、GPR-6 购自 Generay 公司;RNaseOUT™核糖核酸酶购自 Invitrogen 公司;Faststart Universal SYBR Green Master 购自 Roche 公司;DEPC 水购自碧云天公司;引物均由 Invitrogen 公司合成;560751 Hu Th1/2/17 Phenotyping 检测试剂盒(50 次);Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™ antibody、固定和透化液、裂解缓冲液均购自 BD 公司;RPMI-1640 培养基购自 Corning 公司;胎牛血清购自 Gibco 公司。

1.3 方法 运用实时荧光定量 PCR 的方法检测患者组治疗前和三伏天灸治疗 3 个月以后以及对照组人群的外周血单个核细胞(PBMNC) T-bet、GATA-3、Foxp3 和相关信号通路 STAT-6 表达。采用流式细胞术检测患者组治疗前后以及对照组外周血 Th1/Th2 比值,用 APC 标记的 IL-4 和 FITC 标记的 IFN- γ 分别对血液标本进行 PBMC 染色,然后进行流式检测。以 IFN- γ^+ IL-4 $^-$ 为 Th1 细胞的标记,IFN- γ^- IL-4 $^+$ 为 Th2 细胞的标记。酶联免疫吸附法(ELISA)检测患者组治疗前后以及对照组 PBMNC 培养上清液中 IFN- γ 、IL-4 的水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。治疗前后的比较采用配对 t 检验,和对照组间的比较采用非配对 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者组治疗前后 Th1/Th2 比值的比较 患者组三伏天灸治疗后和治疗前相比,Th2 百分率降低,Th1/Th2 比值升高,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 1。

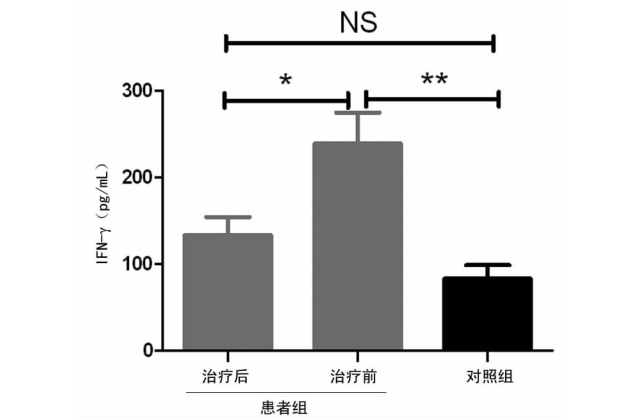


注:A 为患者组三伏天灸治疗前后及对照组 Th1/Th2 比值的比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;B 为流式细胞仪检测 Th2 的散点图

图 1 患者组治疗前后 Th1/Th2 比值的比较

2.2 患者组治疗前后和对照组 PBMC 培养上清液中

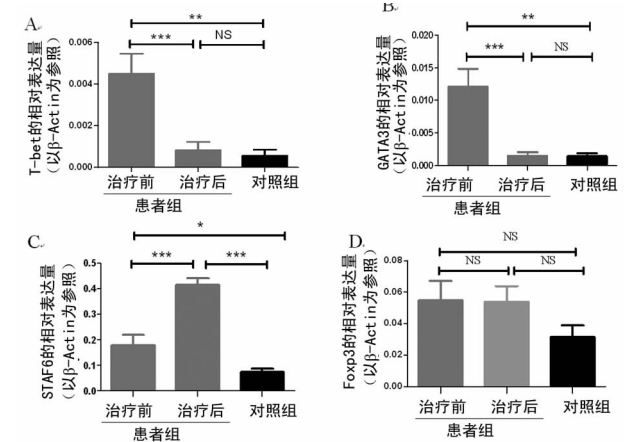
IFN- γ 、IL-4 水平的比较 和对照组比较,患者组治疗前 IFN- γ 分泌水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);三伏天灸治疗后,支气管哮喘患者 IFN- γ 分泌水平降低,与治疗前比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。ELISA 测得的 IL-4 水平均太低,故未展示数据。



注:* 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$;NS 表示 $P>0.05$ 。

图 2 患者组治疗前后及对照组 PBMC 培养上清液中 IFN- γ 水平的比较

2.3 T-bet、GATA-3、Foxp3 和 STAT-6 的表达水平的比较 患者组用三伏天灸治疗后,T-bet 表达水平明显升高,GATA-3 表达水平也明显升高,STAT-6 表达水平明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);Foxp3 表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。



注:* 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$; *** 表示 $P<0.01$;NS 表示 $P>0.05$

图 3 4 个指标相对表达量的比较

3 讨 论

支气管哮喘在全世界范围内有 3 000 万患者,作为一个世界性难题,和绝大多数其他慢性疾病一样,许多哮喘患者还依靠其他非传统治疗方法^[5]。三伏天灸作为我国传统医学里治疗哮喘经典方法之一,近些年来被广泛关注,虽然大量研究证明其对支气管哮喘患者症状和预后的改善有良好的效果,但具体机制仍未阐明。

有研究证明, 针灸在肺癌等肿瘤患者治疗中, 能有效改善患者预后, 机制是通过调节 Th1, Th2, 影响调节性 T 细胞(Treg)比例, 从而调节患者的免疫失衡状态^[6]。之前大量研究证明, 哮喘患者存在 Th1、Th2 比例失衡, Th2 比例选择性升高, 从而促使 B 细胞分泌 IgE, 同时促进肥大细胞的激活, 加重哮喘患者气道炎症反应^[7]。本研究基于如下假设: 三伏天灸通过调节 Th1/Th2 比例改善支气管哮喘患者免疫失衡, 改善哮喘患者症状和预后。

依据上述假设, 本课题组首先检测了哮喘患者治疗前后 Th1 和 Th2 的比例。结果发现和对照组人群相比, 患者组治疗前 Th2 百分率明显升高, Th1/Th2 比值明显降低, 这和之前报道相一致^[8]。当用三伏天灸治疗 3 个月后, 和治疗前相比, Th2 百分率有明显降低, Th1/Th2 比值升高, 证明三伏天灸可以有效调节 Th1/Th2 比例, 从而改善症状和预后。有趣的是, 本研究发现治疗后的患者, Th1 比例也有所降低, 治疗可能可以减轻哮喘患者的气道炎症反应^[9]。

为了解 Th1/Th2 比值变化后对相应细胞因子分泌影响, 本课题组检测了治疗前后 PBMC 分泌 IFN- γ 、IL-4 水平的变化情况。IFN- γ 是 Th1 分泌的细胞因子, 可以促进 Th1 的增殖和分化, Th2 细胞不分泌。IL-4 则可以促进 Th2 的增殖和分化, 而 Th1 细胞中不分泌。和健康人相比, 哮喘患者 IFN- γ 分泌水平明显升高, 而治疗后的患者 IFN- γ 水平有所降低, 这和上述 Th1 比例降低相一致。但是促使 Th2 分泌的 IL-4 则很难检测出来, 有文献报道, IL-4 属于一过性分泌细胞因子^[10], 这可能是其很难检测出来的原因之一; 也有可能是本研究采用的 ELISA 检测的灵敏度不够。

T-bet、GATA-3、Foxp3 分别是促使 Th0 向 Th1、Th2、Th17 分化的重要转录因子^[11], STAT-6 是 IL-4 促使 Th0 向 Th2 分化的重要信号通路分子^[7]。通过对支气管哮喘患者治疗前后和对照组 PBMC T-bet、GATA-3、Foxp3 和 STAT-6 mRNA 表达差异的研究发现: 和治疗前相比, 三伏天灸治疗后, T-bet 表达水平明显升高, 而 T-bet 的升高可以抑制 Th0 向 Th2 分化, 因此 T-bet 的表达增高减少了 Th2 的百分率, 从而调节 Th1/Th2 的比值。另一方面, 治疗后, GATA3 表达水平明显升高, GATA-3 升高可能抑制了 Th0 向 Th1 分化, 从而 Th1 的比例也降低。本研究提示 STAT-6 表达水平降低, 但是 GATA-3 和 STAT-6 在哮喘患者 Th0 向 Th2 分化中, 哪个起到更重要的作用, 之前有研究也没有给出明确的结论^[12], 需要进一步的实验证实。Foxp3 在治疗前和治疗后没有表达差异, 提示三伏天灸可能不是通过调节 Treg 的水平发挥作用。

本研究通过实验揭示三伏天灸对哮喘患者通过

降低 Th2, 调节 Th1/Th2 的比值从而发挥作用, 为三伏天灸治疗支气管哮喘提供了基础理论支持。但是 Th1/Th2 比值变化的深层次机制, 特别是 GATA3 和 STAT-6 对于 Th2 分化的主导性问题需要进一步研究。

参考文献

- [1] National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 3 (EPR-3); Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007 [J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 120(5): 94-138.
- [2] BLANC P D, TRUPIN L, EARNEST G, et al. Alternative therapies among adults with a reported diagnosis of asthma or rhinosinusitis-data from a population-based survey [J]. Chest, 2001, 120(5): 1461-1467.
- [3] 朱丽冰, 罗桂青, 张伟, 等. 三伏天灸治疗哮喘的临床研究概况[J]. 中医学报, 2015, 30(6): 804-807.
- [4] CHAN C W, LEE S C, LO K C, et al. Tian Jiu therapy for the treatment of asthma in adult patients: a Meta-Analysis [J]. J Altern Complement Med, 2015, 21(4): 200-207.
- [5] BATEMAN E D, HURD S S, BARNES P J, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary [J]. Eur Respir J, 2008, 31(1): 143-178.
- [6] WU H, WANG K, LI G, et al. Effects of transcutaneous acupoint electrical stimulation on the imbalance of Th1, Th2, Th17 and Treg cells following thoracotomy of patients with lung cancer [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(2): 495-502.
- [7] HOLGATE S T. Innate and adaptive immune responses in asthma [J]. Nat Med, 2012, 18(5): 673-683.
- [8] 上官文姬, 沈惠风. 支气管哮喘免疫学发病机制的研究进展 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2009, 29(5): 602-606.
- [9] MCWILLIAM A S, NAPOLI S, MARSH A M, et al. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli [J]. J Exp Med, 1996, 184(6): 2429-2432.
- [10] MATHESON M C, REECE J C, KANDANE-RATH-NAYAKE R K, et al. Mould-sensitized adults have lower Th2 cytokines and a higher prevalence of asthma than those sensitized to other aeroallergens [J]. Allergy, 2016, 71(12): 1701-1711.
- [11] BOWEN H, KELLY A, LEE T, et al. Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells [J]. Clin Exp Allergy, 2008, 38(9): 1422-1431.
- [12] 檀卫平, 李静, 夏焱, 等. 哮喘患儿转录因子 T-bet/GATA-3 mRNA 比值及其与 Th1/Th2 平衡间的关系 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2008, 29(1): 95-98.