

补脾清肠活血汤对溃疡性结肠炎患者淋巴细胞功能的影响

董文毅, 胡刚正, 郑长青

■背景资料

中药治疗溃疡性结肠炎有效, 临床实验很多, 但从其对T细胞介导的免疫耐受的影响来研究作用机制的文献极少。

董文毅, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)中医科 辽宁省沈阳市 110004

胡刚正, 郑长青, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)消化内科 辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 董文毅, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)中医科. Dong_wen_yi@tom.com

电话: 024-82680280 传真: 024-83956682

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-09

摘要

目的: 探讨补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对溃疡性结肠炎的治疗作用是否通过影响淋巴细胞的增殖或细胞因子表达谱来实现。

方法: 体外培养中用植物凝集素刺激溃疡性结肠炎患者外周血淋巴细胞, 分组加入一定剂量的补脾清肠活血汤、复合灌肠液、环孢素A及空白对照剂, 检测增殖程度及细胞因子表达谱。

结果: 复合灌肠液和环孢素A能显著抑制淋巴细胞的增殖及细胞因子IL-2、IL-4及IFN- γ 的分泌, 同时也抑制了免疫抑制性细胞因子IL-10的分泌, 而补脾清肠活血汤抑制增殖及促炎细胞因子的作用较弱, 但能促进IL-10的分泌。

结论: 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A均可通过影响T细胞来促进免疫耐受的形成, 但其作用的具体途径有差别, 这些途径很可能产生协同作用。

关键词: 溃疡性结肠炎; 中药; 淋巴细胞; 免疫耐受; IL-2; IFN- γ ; IL-10; IL-4

董文毅, 胡刚正, 郑长青. 补脾清肠活血汤对溃疡性结肠炎患者淋巴细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1124-1127

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1124.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)在我国很常见, 且发病率有上升趋势, 而临床治疗常很棘手, 有效控制复发及诱导重度患者临床缓解还很具

挑战性. 氨基水杨酸类及环孢素A等西药有一定的疗效, 但有长期应用副作用较大等不足. UC在我国很早就被认识, 中医药积累了丰富的治疗经验, 近几十年来, 国内也大量地报道了中西药结合治疗UC的临床实验, 疗效一般高于单纯西药, 而且副作用较小^[1-4]. 本科室根据中医理论及大量的临床实验结果, 自拟出补脾清肠活血汤口服剂及复合灌肠液(锡类散加三黄汤), 应用于临床10多年, 疗效比较满意, 尤其是联合西药诱导重度患者缓解和缓解期应用以预防复发。

补脾清肠活血汤及复合灌肠液临床疗效显著, 且副作用很小, 但在现代医学理论中的作用机制尚未深入研究. 近年来, 越来越多的研究者认为溃疡性结肠炎由肠道局部持续、过强的免疫反应所诱发, T淋巴细胞在此免疫反应的激发和维持中起中心作用^[5-8]. T淋巴细胞在正常人体肠道局部免疫耐受的形成中发挥关键作用, 而UC中这种耐受被打破^[9-10]. 已经很明确, T细胞的活化/增殖调控及主动免疫抑制(调节性T细胞的分化及其免疫抑制性细胞因子的产生)是免疫耐受形成的主要机制^[11-13]. 补脾清肠活血汤及复合灌肠液均为中药复方制剂, 药理作用很复杂, 推测其可能主要是通过诱导T细胞介导的免疫耐受的形成来发挥作用. 本研究在体外培养中用多克隆刺激剂活化人外周血淋巴细胞, 分组加入一定剂量的补脾清肠活血汤、复合灌肠液、环孢素A及空白对照剂, 检测增殖程度及细胞因子分泌谱后发现, 补脾清肠活血汤能诱导免疫抑制性细胞因子的产生, 复合灌肠液和环孢素A能抑制淋巴细胞的活化/增殖及促炎细胞因子的分泌。

1 材料和方法

1.1 材料 Lymphocyte-H购于Cedarlane, 胎牛血清及RPMI-1640购于Hyclone, Percoll购于Amersham, 中药均为无菌袋装免煎中药(10 g/袋), 锡类散为北京同仁堂产品(1 g/袋), 环孢素A由Sandoz生产, 植物凝集素购于Sigma, [³H]TdR购于中国原子能研究院, ELISA试剂盒购于

■研发前沿

炎症性肠病被认为是机体对自身的肠道菌群抗原刺激不能有效的形成免疫耐受所致, 调节性T细胞的分化及其免疫抑制性细胞因子的产生是近年来才认识到的免疫耐受形成的主要机制, 因此, 高效的筛选中药组方应该重点地研究其对调节性T细胞分化的影响。

eBioscience.

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞的分离 先后从10名溃疡性结肠炎患者(均为病程3 a以上的慢性复发型患者,符合2000年成都诊断标准)采外周血6 mL,立即注入肝素抗凝管,30 min内与4 mL含1 mmol/L EDTA的PBS混合,加入至15 mL离心管,用接6号加长针头的一次性注射器抽4 mL Lymphocyte-H,缓慢地铺在抗凝血下面,室温、2000 r/min离心20 min,取灰白层,用PBS洗两遍以去除血小板,加10 mL含100 mL/L胎牛血清、100 U/mL青霉素和链霉素、pH7.2的RPMI-1640(含L-Glutamine和HEPES)完全培养基混悬,抽4 mL 460 mL/L Percoll,缓慢地铺在细胞悬液下面,室温、2000 r/min离心20 min,留取下面1 mL内的细胞,洗两次,台盼蓝染色计数活细胞,取约 1×10^5 细胞离心涂片后Giemsa-white染色鉴定淋巴细胞的纯度,结果淋巴细胞的纯度和活性均大于95%.

1.2.2 药液的配制

1.2.2.1 补脾清肠活血汤 取党参、白术、茯苓、黄连、木香、白头翁、秦艽、枳实、当归、丹参、红花、赤芍、山楂各10 g,黄芪20 g,混合于已高温消毒的烧瓶中,加蒸馏/去离子水500 mL,置水浴箱中95℃ 30 min,反复震荡,取10 mL加于15 mL离心管中,15 000 g离心20 min,取上清液5 mL,PBS稀释4倍,一次性针头滤器过滤,作为10倍浓度的储藏液4℃保存备用.

1.2.2.2 复合灌肠液 取黄连、黄柏和黄芩各10 g,锡类散2袋,加蒸馏/去离子水150 mL,如上经加热、离心取上清、稀释和过滤,作为10倍浓度的储藏液4℃保存备用.

1.2.2.3 环孢素A 用PBS稀释环孢素A至5 mg/L,作为10倍浓度的储藏液4℃保存备用.

1.2.3 增殖及细胞因子检测 淋巴细胞以每孔 $1 \times 10^5/180 \mu\text{L}$ 加入96孔培养板,培养基为含100 mL/L胎牛血清、100 kU/L 青霉素和链霉素的RPMI-1640,用终浓度10 mg/L的植物凝集素作为多克隆刺激剂,分组分别加入20 μL 的补脾清肠活血汤、复合灌肠液和环孢素A储藏液及对照液PBS.在37℃,50 mL/L CO₂培养箱中培养48 h后,收集上清液储于-80℃用以检测细胞因子浓度,于增殖检测孔每孔加入0.5 UCi³H]TdR,继续培养24 h后收集细胞于玻璃纤维滤纸上,蒸馏水冲洗,无水乙醇脱水、脱色,60℃烘干后置闪烁液中液闪计数.细胞因子IL-2、IFN- γ 、IL-4及IL-10的检

测用夹心法ELISA试剂盒,完全按照说明操作.

统计学处理 数据用Mean \pm SD表示,组间比较用配对样本的*t*检验,由SPSS 13.0统计软件完成.

2 结果

2.1 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对淋巴细胞增殖的影响 淋巴细胞经PHA刺激后增殖明显,但能被补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A抑制(对照组、补脾清肠活血汤、复合灌肠液和环孢素A组的液闪值分别为 4563 ± 674 、 4170 ± 500 、 2944 ± 361 和 2408 ± 498),补脾清肠活血汤的抑制作用最弱(平均抑制8.6%,与对照组比较 $P < 0.01$),复合灌肠液和环孢素A的抑制作用较强(分别平均抑制35.4%和47.2%,两组与对照组及补脾清肠活血汤组比较均 $P < 0.001$).

2.2 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对IL-2分泌的影响 淋巴细胞经PHA刺激后低分泌IL-2($36.3 \pm 16.2 \text{ ng/L}$),补脾清肠活血汤对其没有显著影响($31.5 \pm 17.8 \text{ ng/L}$, $P > 0.05$),复合灌肠液和环孢素A均能够显著抑制IL-2的分泌(分别为 $18.7 \pm 7.5 \text{ ng/L}$ 和 $18.4 \pm 9.4 \text{ ng/L}$,平均抑制48%和49%,与对照组比较均 $P < 0.01$).

2.3 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对IFN- γ 分泌的影响 淋巴细胞经PHA刺激后高分泌IFN- γ ($5900 \pm 2045 \text{ ng/L}$),补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A均能显著抑制其表达(分别为 $2832 \pm 1043 \text{ ng/L}$ 、 $3499 \pm 1948 \text{ ng/L}$ 和 $1763 \pm 780 \text{ ng/L}$,平均抑制52%、41%和70%,与对照组比较均 $P < 0.001$),补脾清肠活血汤和复合灌肠液的抑制作用无明显差异($P > 0.05$),环孢素A的抑制作用较强(与补脾清肠活血汤和复合灌肠液组比较均 $P < 0.01$).

2.4 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对IL-4分泌的影响 淋巴细胞经PHA刺激后低分泌IL-4($29.3 \pm 12.1 \text{ ng/L}$),补脾清肠活血汤组中略为增加($36.1 \pm 16.4 \text{ ng/L}$),但显著性达不到统计学意义($P > 0.05$),相反,复合灌肠液及环孢素A均能显著抑制IL-4的分泌(分别为 $17.1 \pm 6.9 \text{ ng/L}$ 和 $15.7 \pm 8.0 \text{ ng/L}$,平均抑制42%和46%,与对照组比较均 $P < 0.001$).

2.5 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对IL-10分泌的影响 淋巴细胞经PHA刺激后分泌IL-10($328 \pm 147 \text{ ng/L}$),补脾清肠活血汤能够显著促进其分泌($560 \pm 211 \text{ ng/L}$,平均增加70%,

■创新盘点

本文首次在体外培养中观察中药组方是否影响调节性T细胞的形成.

■应用要点

中药组方补脾清肠活血汤最适用于配合复合灌肠液,或联合西药(氨基水杨酸类或环孢素A)诱导重度溃疡性结肠炎缓解和缓解期应用以预防复发。

与对照组比较 $P<0.001$),相反,复合灌肠液和环孢素A均能显著抑制IL-10的分泌(分别为 253 ± 146 ng/L和 188 ± 96 ng/L,平均抑制23%和42%,与对照组比较分别为 $P<0.01$ 及 $P<0.001$)。

3 讨论

中药补脾清肠活血汤和复合灌肠液缓解期预防复发或联合西药诱导重症溃疡性结肠炎缓解有较好疗效,但其作用机制尚不清楚。环孢素A是强效免疫抑制剂,近年来用于重症UC急性期的治疗,对氨基水杨酸类及类固醇激素无效的患者仍有较高的诱导缓解率,是UC药物治疗上的重要进展之一^[14-15]。T淋巴细胞在UC免疫致病机制中的中心作用越来越受重视,其对抗原刺激的活化增殖程度及细胞因子表达谱能灵敏地反映功能状态,增殖越强提示免疫应答能力越强,细胞因子IL-2、IFN- γ 、IL-4及IL-10均主要由T细胞分泌,IL-2能促进淋巴细胞的增殖,具有较广泛的免疫调节作用,IFN- γ 主要由Th1细胞表达,主要参与细胞免疫,IL-4主要由Th2细胞表达,主要参与体液免疫,IL-10是重要的免疫抑制性细胞因子,Tr1细胞是近年来鉴定的重要调节性T细胞之一,以高表达IL-10为标记^[5,16-18]。

本实验想阐述中药补脾清肠活血汤、复合灌肠液及西药环孢素A治疗溃疡性结肠炎的药理作用是否是干预了淋巴细胞的功能,以及他们干预方式的差别。结果,复合灌肠液和环孢素A能显著抑制淋巴细胞的增殖,抑制IL-2及作为Th1和Th2标志的促炎细胞因子IFN- γ 和IL-4的分泌,同时也能抑制免疫抑制性细胞因子IL-10的分泌,环孢素A对细胞增殖及IFN- γ 的抑制作用较灌肠液强。这提示复合灌肠液和环孢素A的治疗作用是通过全面抑制T细胞对抗原的免疫应答来发挥的,而对T细胞的分化方向并无明显影响。补脾清肠活血汤对淋巴细胞的增殖及作为Th1标志的促炎细胞因子IFN- γ 有较弱的抑制作用,对IL-2及作为Th2标志的IL-4的分泌无显著影响,值得注意的是,其能促进作为Tr1细胞标志的IL-10的分泌。这说明补脾清肠活血汤能够影响T细胞的分化方向,阻止Th1细胞的分化,促进Tr1细胞的分化。近年来,炎症性肠病的发病机制被认为是机体的T细胞对自身肠道内部分菌群抗原的刺激产生过强的免疫反应,而不能形成免疫耐受,这种免疫失耐受很可能与T细胞的分化控制失调有关,其中主要是致病性T细胞/调节性T细胞的平衡失调^[7-10,19]。调节性T细胞的分化

为机体形成免疫耐受的重要机制,是近几年来免疫学领域研究的重大理论成果之一^[11-12,20],最近的研究证实炎症性肠病患者体内确实存在调节性T细胞的生成障碍^[21],这预示着通过促进调节性T细胞分化来治疗炎症性肠病将会成为主流研究方向。补脾清肠活血汤能促进体外培养的淋巴细胞向Tr1细胞分化,提示其对UC的体内治疗作用很可能是通过诱导调节性T细胞的生成来实现。因此,作者认为补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A均可通过影响T细胞来促进免疫耐受的形成,而其作用的具体途径又有些差别,这些途径很可能产生协同作用,这也许是联合中西药疗效更好的理论基础。

4 参考文献

- 1 欧阳钦. 对加强炎症性肠病临床研究的意见. 中华消化杂志 2001; 21: 197-198
- 2 吴凤海. 中医药治疗溃疡性结肠的进展. 中华实用中西医杂志 2002; 2: 67-69
- 3 田海河, 董建华, 田德录, 赵凤志. 中药治疗溃疡性结肠炎的临床及实验研究. 北京中医药大学学报 1995; 18: 47-50
- 4 董宇翔, 李晓春, 张二力. 中药肠炎康口服液治疗溃疡性结肠炎临床疗效观察. 吉林大学学报(医学版) 2004; 30: 785-786
- 5 郑长青, 胡刚正. CD4⁺T淋巴细胞亚群的新认识及对炎症性肠病研究的指导. 世界华人消化杂志 2004; 12: 505-511
- 6 Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 2005; 307: 1920-1925
- 7 Rook GA, Brunet LR. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 2005; 54: 317-320
- 8 Powrie F. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1029: 132-141
- 9 Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 448-455
- 10 Allez M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 666-676
- 11 Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 189-198
- 12 Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2: 816-822
- 13 Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-337
- 14 Feagan BG. Maintenance therapy for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: S6-S17
- 15 Jani N, Regueiro MD. Medical therapy for ulcerative colitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 147-166
- 16 Schimpl A, Berberich I, Kneitz B, Kramer S, Santner-Nanan B, Wagner S, Wolf M, Hunig T. IL-2 and autoimmune disease. *Cytokine Growth Factor Rev*

- 2002; 13: 369-378
- 17 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-573
- 18 Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 271-283
- 19 Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 2005; 204: 184-194
- 20 Lohr J, Knoechel B, Nagabhushanam V, Abbas AK. T-cell tolerance and autoimmunity to systemic and tissue-restricted self-antigens. *Immunol Rev* 2005; 204: 116-127
- 21 Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868-1878

■同行评价

本文研究内容较新, 临床意义较为重要。但是本研究所用的自制中药制剂不是临床所用的标准制剂, 因此需要考虑其差异对实验结论的可能影响。

电编 李琪 编辑 王瑾晖

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十二届全国胆道外科学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会外科学分会胆道外科学组拟定于2006-07在辽宁省沈阳市召开第12届全国胆道外科学术会议。此次会议由全国胆道外科学组委托中国医科大学附属第二医院(盛京医院)承办, 中国实用外科杂志社协办。大会将全面展示我国胆道外科近年来的新进展、新成果。届时将邀请国内外知名肝、胆外科专家作专题演讲。凡参会者均颁发国家级继续教育学分证书。现将征集论文的有关事宜通知如下:

1 征文内容

征文内容包括: (1)胆道外科学基础研究(胆道解剖与胆道疾病、胆石成因、胆道感染、胆道肿瘤、胆胰管结合部异常与胆道先天性疾病); (2)胆道外科的临床研究(胆囊、胆管结石、胆道肿瘤、意外性胆囊癌、胆道损伤、肝移植后胆道狭窄等); (3)胆道外科诊断与治疗的新技术、新方法(腹腔镜技术、内镜技术、介入技术、影像技术等); (4)胆道外科疾病的其他诊疗经验等。

2 征文要求

征文要求包括: (1)请寄论文全文及800字以内的摘要各一份, 4号字打印, 附电子稿件。无摘要者恕不受理。(2)论文要求科学性强、数据可靠、重点突出、文字精炼且未经发表者。论文须由作者所在单位审查盖章同意, 并请在信封正面注明会议征文字样。(3)截稿时间: 2006-05-08(当地邮戳为准)。稿件邮寄地址: 辽宁省沈阳市和平区三好街36号 中国医科大学附属第二医院 第一微创、胆道外科; 邮政编码: 110004。联系人: 吴硕东。投稿E-mail: wushudong@yahoo.com.cn。