

【摘要】目的探讨银杏内酯对老年哮喘患者外周血 T 淋巴细胞 Th1/Th2 型细胞因子的作用及其治疗哮喘的可能机制。方法采用流式细胞术检测 25 例健康体检者正常对照组和 25 例老年支气管哮喘急性发作期患者单个核细胞(PBMC) 经银杏内酯干预后 Th1 型细胞因子(IFN $\gamma$ )和 Th2 型细胞因子(IL2)水平及 Th1/Th2 比值变化。结果与正常组比较,哮喘组 Th2 型细胞因子(IL2)水平显著增高( $P<0.01$ ),哮喘组 Th1/Th2 比值显著减低( $P<0.01$ )。哮喘组银杏内酯体外干预后 Th2 型细胞因子(IL2)水平较干预前显著减低( $P<0.01$ ),Th1/Th2 比值较干预前显著增高( $P<0.01$ )。结论银杏内酯具有抑制哮喘 Th2 细胞亚群优势反应和调节免疫平衡的作用。

江城医学论文网:专业提供医学论文的写作、修改、翻译、发表 QQ: 36683531

官方网站: www.jclunwen.com 电话: 13986027713 邮箱: 36683531@qq.com

【关键词】银杏内酯;支气管哮喘;Th1/Th2;流式细胞术

近年研究表明 Th1/Th2 免疫反应失衡, Th2 型优势反应是哮喘发生的重要机制 [1, 2], 调节 Th1/Th2 反应失衡对支气管哮喘具有积极治疗作用。银杏内酯为银杏叶提取物中的重要有效成分之一, 具有抗自由基、抑制炎症反应及调节机体免疫等功能 [3]。本文采用流式细胞术(FCM)以正常老年人为对照, 观察了 25 例老年支气管哮喘急性发作期以及体外银杏内酯干预前后外周血单个核细胞(PBMC)的 Th1 型细胞因子(IFN $\gamma$ )和 Th2 型细胞因子(IL2)水平变化, 从细胞因子水平探讨银杏内酯治疗哮喘的可能机制, 并为其临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 病例选择选择本院 2005 年 10 月至 2007 年 10 月住院的老年支气管哮喘急性发作期患者 25 例, 男 14 例, 女 11 例, 年龄 60-83 岁, 平均 68.23 岁, 诊断标准均符合中华医学会 2003 年哮喘诊断与分级指南 [4], 采血前 8 w 未用过糖皮质激素。正常体检的健康老年人 25 例作为对照, 男 13 例, 女 12 例, 年龄 62-72 岁, 平均 65.12 岁。

1.2 仪器与试剂 EPICS XL 型流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品。CD32 PE2 Cy5、CD82 FITC、IFN $\gamma$  PE、IL2 PE 以及破膜剂(Permeabilisation)、固定剂(Fixation)均购自 Immunotech 公司。佛波酯(PMA)、离子霉素(Ionomycin)、莫能霉素(Monensin)和银杏内酯(BN52021)购自 Sigma 公司。RPMI 1640 购自 Hyclone 公司。

1.3 PBMC 的分离取 EDTA2 K2 抗凝全血 2 ml, 加入等量 PBS 稀释, 将稀释好的全血用滴管沿管壁缓慢加在适量淋巴细胞分离液(Ficoll)液面上, 2 000 r/min 离心 30 min。收集 PBMC, 加入 PBS 3 ml, 1 200 r/min 离心洗涤 10 min, 弃上清。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基重悬, 将哮喘组和正常对照组的 PBMC 分别接种至 24 孔板内, 细胞密度为  $1 \times 10^7$ /ml。每组设空白对照孔和银杏内酯(以 DMSO 溶解, 终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$ )干预孔各 3 复孔,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h。

1.4 膜表面标记及胞内细胞因子染色取上述各组每孔培养的 PBMC 加 PMA(25 ng/ml)、Ionomycin ( $1 \mu\text{g/ml}$ )和 Monensin( $2 \mu\text{g/ml}$ ),  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中刺激培养 4-6 h, 离心洗涤。取刺激培养的 PBMC  $100 \mu\text{l}$ , 加入  $20 \mu\text{l}$  CD32 PE2 Cy5 和  $20 \mu\text{l}$  CD82 FITC 作为待测样品管, 漩涡混匀, 室温避光孵育 15 min, 进行细胞膜表面标记。将样品管离心洗涤, 重悬制成单细胞悬液, 加入  $100 \mu\text{l}$  固定剂轻轻混匀, 室温避光孵育 15 min; 离心洗涤, 弃上清, 加入  $100 \mu\text{l}$  破膜剂, 室温避光孵育 5 min, 离心洗涤。将样品管细胞平分成两管, 分别加入  $10 \mu\text{l}$  IL2 PE 和  $10 \mu\text{l}$  IFN $\gamma$  PE, 漩涡混匀, 室温避光孵育 15 min, 进行胞内细胞因子染色。离心洗涤, 弃上清, 加  $300 \mu\text{l}$  PBS 混匀, 上机检测。

1.5 FCM 检测分析以前向角(FS)和侧向角(SS)散点图设门区分 PBMC, 根据文献 [5] 对门内 CD3 $^+$ 的 T 淋巴细胞进行分析, 每管收集  $1 \times 10^4$  个细胞。用 EXPO32 ADC Analysis

网站: [中国银杏网](http://www.yxw.gov.cn) 网址: <http://www.yxw.gov.cn> 电话: 0539-6886628 手机: 13969968680

企业: 山东恒森银杏苗木基地 13953955982 网址: <http://www.139539.com> 专供银杏树银杏苗木银杏实生嫁接树

软件分析 Th1(CD3+/CD8-/IFN2 ?+)和 Th1 (CD3+/CD8-/ IL2 4+)的含量并计算 Th1/Th2 比值。

1.6 统计学分析 所有数据用 SPSS 10.0 统计软件进行统计,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间方差相等采用 t 检验,方差不等采用秩和检验。

## 2 结果

见表 1。与正常对照组相比,哮喘组患者 Th1 型细胞因子(IFN2 ?)的水平无显著差异 ( $P>0.05$ ),哮喘组 Th2 型细胞因子(IL2 4)水平显著增高( $P<0.01$ ),哮喘组 Th1/Th2 比值显著减低 ( $P<0.01$ )。哮喘组银杏内酯体外干预后 Th1 型细胞因子(IFN2 ?)水平与干预前比较无差异( $P>0.05$ ), Th2 型细胞因子(IL2 4)水平较干预前显著减低( $P<0.01$ ), Th1/Th2 比值较干预前显著增高( $P<0.01$ ),而与正常对照组无显著差异( $P>0.05$ )。正常对照组银杏内酯干预前后 Th1 型细胞因子(IFN2 ?)水平、Th2 型细胞因子(IL2 4)水平及 Th1/Th2 比值无显著差异 ( $P>0.05$ )。

表 1 老年支气管哮喘患者银杏内酯干预前后 PBMC 的 Th1,Th2 表达水平及 Th1/Th2 比值(略)

与对照组比较:1) $P<0.01$ ;与空白组比较:2) $P<0.01$

## 3 讨论

人类 CD4+辅助性 T 细胞(CD4+Th)根据其分泌的细胞因子不同分为 Th0、Th1、Th2 和 Th3 4 个亚群。其中, Th1 细胞主要分泌 IL2 2、 IFN2 ? 等细胞因子,与 TDTH 细胞和 Tc 细胞的增殖、分化及成熟有关,能促进细胞介导的免疫应答, Th2 细胞主要分泌 IL2 4、 IL2 5、 IL2 6、 IL2 10 等细胞因子,与 B 细胞增殖、分化、成熟和促进抗体生成有关,可增强抗体介导的体液免疫应答 [6]。正常情况下 Th1 和 Th2 两种细胞亚群借助其分泌的细胞因子形成负反馈,相互制约,维持平衡。某些因素作用下一旦失去平衡,则出现 Th1 型或 Th2 型优势反应,引发异常免疫应答,造成病理状态。本研究以 IFN2 ? 和 IL2 4 为 Th1 和 Th2 的特征性细胞因子,通过检测这两种细胞因子了解支气管哮喘患者 Th1 和 Th2 的功能状态。结果表明,哮喘组 Th2 型细胞因子(IL2 4)水平显著增高,与 Tavakkol 等 [1] 结论一致,证实支气管患者体内存在 Th1/Th2 失衡,反应向 Th2 型漂移,这为下一步应用银杏内酯进行干预作用提供了依据。

银杏内酯为银杏叶提取物中重要的有效成分, Mahmoud 等 [7] 在 BN52021 与环孢素 A 对哮喘患者外周血激活的淋巴细胞体外影响的研究中发现, BN52021 可以明显减少外周血单核细胞 IL2 4、 IL2 5 等细胞因子的释放,提示银杏内酯通过抑制 IL2 4 等 Th2 型细胞因子的释放,进而抑制了 IgE 介导的速发型变态反应和呼吸道炎症反应。本试验结果显示银杏内酯干预后, Th2 型细胞因子(IL2 4)水平较干预前显著减低( $P<0.01$ ), Th1/Th2 比值较干预前显著增高( $P<0.01$ ),推断其具有抑制 Th2 细胞亚群优势反应和调节免疫失衡的作用。

支气管哮喘目前以应用糖皮质激素抑制气道非特异性炎症反应治疗为主,老年人多合并有糖尿病、消化性溃疡等基础性疾病,应用激素治疗往往受限。本研究结果表明银杏内酯对体外培养的哮喘患者 PBMC 细胞 Th2 型特征性细胞因子(IL2 4)的分泌具有抑制作用,但在临床哮喘治疗中是否能够部分或完全代替糖皮质激素还有待于进一步研究。

## 【参考文献】

- 1 Tavakkol AJ, Farid HR, Hosseini FS, et al. Association of the expression of IL2 4 and IL2 13 genes, IL2 4 and IgE serum levels with allergic asthma [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2007;6(2):672-72.

网站: [中国银杏网](http://www.yxw.gov.cn) 网址: <http://www.yxw.gov.cn> 电话: 0539-6886628 手机: 13969968680

企业: 山东恒森银杏苗木基地 13953955982 网址: <http://www.139539.com> 专供银杏树银杏苗木银杏实生嫁接树

# 中国银杏网

中国最大的银杏资讯网、网络展会

[中国银杏网](http://www.yxw.gov.cn)-13969968680 !

2 Truyen E , Coteur L ,  
Dilissen E,et al.Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients [ J ] .Thorax,2006;61(3):2022 8.

3 Liu KX , Wu WK ,  
He W,et al.Ginkgo biloba extract (EGb 761) attenuates lung injury induced by intestinal ischemia /reperfusion in rats : roles of oxidative stress and nitric oxide [ J ] .World J Gastroenterol , 2007;13(2):2992 305.

4 中华医学会.支气管哮喘防治指南 [ J ] .中华内科杂志,2003;42(11):8172 22.

5 曹云新,金伯泉,韩卫宁.CD3/CD8 设门在 FCM 检测 Th1/Th2 亚型中的应用 [ J ] .细胞与分子免疫学杂志,2002;18(6):6382 9.

6 陈慰峰.医学免疫学 [ M ] .北京,人民卫生出版社 , 2002 : 922 4.

7 Mahmoud F,Abul H,Onadeko B,et al.In vitro effects of ginkgolide B on lymphocyte activation in atopic asthma : comparision with cyclosporine A [ J ] .Jpn J Pharmacol,2000;83(3):2412 5.