

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.04.015

润燥灵方对干燥综合征模型小鼠血清 Th1/Th2 的影响

马武开, 和秀丽, 曾萃, 宁乔怡, 姚血明, 周静, 侯雷*

(贵阳中医学院第二附属医院, 贵州省贵阳市飞山街 32 号, 550003)

摘要 目的 探讨润燥灵方治疗干燥综合征的可能作用机制。方法 将 90 只 C57bl/6j 小鼠随机分为空白组、模型组、强的松组及润燥灵低、中、高剂量组, 每组 15 只。除空白组外, 其余各组采用免疫诱导法建立干燥综合征小鼠模型。造模成功后润燥灵高、中、低剂量组分别给予润燥灵方水煎剂 36、18、9 g/(kg·d), 强的松组给予强的松 0.2 g/(kg·d), 空白组和模型组灌服 0.2 ml 生理盐水, 每日 1 次。连续给药 4 周后, ELISA 法检测血清干扰素 γ (IFN- γ) 和白细胞介素 4 (IL-4) 水平, PCR 法检测颌下腺 T-bet 和 GATA-3 转录因子的表达量, 流式细胞仪检测血清 Th1 和 Th2 细胞的数量。结果 模型组 IFN- γ 、IL-4、T-bet 表达及 T-bet/GATA-3、CD3⁺CD8⁻/IFN- γ 、CD3⁺CD8⁻/IL-4 及 IFN- γ /IL-4 明显高于空白组, 润燥灵高、中剂量均能够降低 IFN- γ 、T-bet 表达及 CD3⁺CD8⁻/IFN- γ 、CD3⁺CD8⁻/IL-4, 以润燥灵高剂量组作用最明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 润燥灵方能够下调干燥综合征模型小鼠血清 Th1/Th2, 可能是其治疗干燥综合征的作用机制之一。

关键词 干燥综合征; 润燥灵方; Th1 细胞; Th2 细胞

干燥综合征 (sjogren's syndrome, SS) 是慢性自身免疫性疾病中的常见病, 临床表现为多器官、多系统损害, 血清中有多种自身抗体和高免疫球蛋白血症。该病中年女性多发, 其发病率在风湿免疫病中高居第二位, 仅次于类风湿关节炎^[1]。SS 确切的发病机制尚不清楚, 目前较为一致的观点认为是遗传、免疫、内分泌、病毒感染等因素相互作用下, 免疫平衡系统被打破是导致 SS 发病的主要原因^[2]。免疫系统是整体平衡的系统, 免疫调节是一种整体调节, 免疫系统可以认为是阴阳平衡的调节系统^[3]。Th1 和 Th2 细胞平衡对整个免疫系统的调节起着关键性作用, 一旦平衡被破坏, 会引起许多疾病的发生和发展^[4]。由此认为, Th1 和 Th2 免疫平衡失调及其导致的细胞因子复杂网络变化可能对 SS 的发生发展具有重要作用。目前 SS 尚无特效药物, 大多采用对症治疗, 毒副作用大。我们认为, SS 的发病以津枯血瘀、燥热成毒为特点^[5], 治疗采用生津养血、润燥解毒、化瘀通络法, 组成

润燥灵方, 经前期临床和实验研究证明对 SS 治疗效果良好^[6-7]。本研究基于前期研究基础, 进一步探索润燥灵方治疗 SS 的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

C57bl/6j 小鼠 90 只, SPF 级, 雌性, 8 周龄, 体质量 (18 ± 2) g, 购自重庆腾鑫生物科技有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(京) 2012-0011。Lewis 大鼠 10 只, SPF 级, 雌性, 8 周龄, 体质量 (150 ± 30) g, 购自北京维通利华试验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(京) 2012-0001。

1.2 药物

润燥灵方组成: 生地黄 15 g, 玄参 15 g, 紫草 10 g, 穿心莲 10 g, 白花蛇舌草 15 g, 肿节风 10 g, 五味子 10 g, 三七 3 g 等, 中药饮片购自贵阳中医学院第二附属医院中药房。药材浸泡 60 min 后加 6 倍水煎煮 30 min, 过滤煎液, 二煎加 4 倍水, 煎煮 30 min, 过滤煎液, 两次滤液合并, 按试验要求将水煎液浓缩至含生药 1 g/ml, 4℃ 冰箱保存备用。强的松片 (天津力生制药股份有限公司, 规格: 5 mg, 批号: B1420202851)。

基金项目: 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项 [黔科合人字 (2013) 50 号]; 贵州省科技创新人才团队建设 [黔科合人才团队 (2013) 4033]

* 通讯作者: 503862439@qq.com

1.3 主要试剂和仪器

弗氏完全佐剂 (美国 Sigma 公司, 批号: F5881-40), 考马斯亮蓝 G-250 (北京中生瑞泰科技有限公司, 批号: C8420), 吸附无细胞百白破联合疫苗 (武汉生物制品股份有限公司, 批号: 20140104-2), TRNzol-A + 总 RNA 提取试剂 (批号: DP421-01)、astQuant cDNA 第一链合成试剂盒 (批号: KR106) 均购于天根生化科技北京有限公司, $2 \times$ 含染料 Taq 预混 PCR 反应体系 (北京康润诚业生物科技有限公司, 批号: A112-40), 胎牛血清 (BSA, 上海奥陆生物科技有限公司, 批号: 16000-044) 鼠干扰素 γ (IFN- γ) Sunny ELISA 试剂盒 (批号: EK280-20141128)、鼠白细胞介素 4 (IL-4) Sunny ELISA 试剂盒 (批号: EK280-20151013) 均购于杭州联科生物技术有限公司, 鼠抗 CD3e FITC (批号: 85-11-0031-81)、鼠抗 CD8a APC (批号: 85-17-0081-81)、鼠抗 IL-4 PE (批号: 85-12-7041-81)、鼠抗 IFN- γ gamma PE (批号: 85-12-7311-81)、佛波脂 (PMA) 刺激剂 (批号: LK-CS1001), 布雷菲德菌素 A (BFA) 阻断剂 (批号: LK-CS1002) 均购于广州伯鑫生物科技有限公司。低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司, 型号: 5810R), 低速离心机 (上海安亭科学仪器厂, 型号: TDL-80-2B), 流式细胞仪 (美国 BD 公司, 型号: FACSCalibur), CO₂ 细胞培养箱 (德国 Memmer 公司, 型号: INC108), 电泳仪 (北京六一生物科技有限公司, 型号: DYY-6C), 凝胶成像系统 (美国基因有限公司, 型号: SyngeneG Box), PCR 仪 (美国 ABI 公司, 型号: 2720), 震荡器 (上海跃进医疗器械厂, 型号: BKYY14-200), 核酸蛋白分析仪 (美国贝克库曼尔特公司, 型号: Du640), ELISA 酶标仪 (美国宝特公司, 型号: Bio-TekELx800V), 光镜 (上海中恒仪器有限公司, 型号: XSP-2C)。

2 方法

2.1 动物分组及造模

将 90 只 C57bl/6j 小鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、强的松组及润燥灵低、中、高剂量组, 每组 15 只。参照文献 [8], 采用免疫诱导法建立 SS 小鼠模型: 取 10 只 Lewis 大鼠颌下腺, 分离颌下腺组织, 用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 冲洗后, 置于无菌滤纸上吸干称重, 用无菌剪刀剪碎, 加入 PBS 液, 用匀浆器将其制备成匀浆, 在 44℃

低温 9000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 继续 6000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 继续以 3000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液。并将 BSA 5 mg 溶于 50 ml 蒸馏水中, 配制成 100 μ g/ml 的标准蛋白质溶液, 考马斯亮蓝 G-250 染色后, 与同体积完全弗氏佐剂 (CFA) 混匀乳化, 最终浓度为 1 mg/ml。除空白组外, 分别于每只小鼠背部、腹部注射大鼠颌下腺与弗氏佐剂混合抗原, 总量为 0.2 ml/只, 第 2 天于背部、腹部注射百白破疫苗 0.5 ml, 并于第 14 天加强免疫 1 次。

免疫 4 周后, 每组按随机数字表抽取 2 只, 共 10 只观察造模情况。SS 小鼠模型的鉴定: 取下小鼠颌下腺, 用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察。颌下腺参照文献 [9] 的方法进行评价: 0 分, 偶见淋巴细胞浸润; 1 分, 少量散在淋巴细胞浸润; 2 分, 淋巴细胞中度浸润 (未成灶), 伴有轻度实质损伤; 3 分, 偶见 0~1 个淋巴细胞浸润灶/5 个低倍视野, 伴有中度实质损伤; 4 分, 2~3 个淋巴细胞浸润灶/5 个低倍视野, 伴有重度实质损伤。2 分以上为发病, 结果造模成功率为 90%。

2.2 给药

从造模第 5 周开始给药。给药量按成人与小鼠体重换算^[10], 润燥灵高、中、低剂量组给药量分别为 36、18、9 g/(kg·d), 强的松组灌服强的松片 0.2 g/(kg·d), 正常组和模型组分别灌服 0.2 ml 生理盐水, 各组每日灌胃 1 次, 连续用药 4 周。

2.3 观察指标及方法

每组按随机数字表法抽取 10 只小鼠, 于第 28 天末次灌胃给药 2 h 后眼球取血采集血液, 断颈处死小鼠。

2.3.1 ELISA 法检测小鼠血清 IFN- γ 和 IL-4 含量

按 ELISA 试剂盒说明书进行操作。按标准品的浓度稀释、洗板、加样、温育、洗板、加酶、温育、显色、终止、测定等步骤进行, 以标准浓度为横坐标 (X 轴), OD 值为纵坐标 (Y 轴), 绘制标准曲线, 由标准曲线计算出 IFN- γ 和 IL-4 值。

2.3.2 PCR 法检测小鼠颌下腺转录因子 T-bet 和转录因子 GATA-3 的表达 无菌操作台每组取出 10 只小鼠颌下腺, 除去包膜及结缔组织, 用无菌剪刀剪碎, 加入 1 ml 总 RNA 提取试剂 (TRNzol-A), 匀浆, 按 TRNzol-A + 操作步骤, 提取总 RNA, 再合成逆转录 cDNA。PCR 引物由上海欧易生物合成医学科技有限公司合成: T-bet (384bp), 正向引

物: 5'-ATGTTTGTGGATGTGGTCTTGCTG-3', 反向引物: 5'-CTGAGTGATCTCTGCGTTCTGGTAG-3'。GATA-3 (465bp): 正向引物: 5'-CAGAAG-GCAGGGAGTGTGTGAA-3', 反向引物: 5'-TG-GAGTGGCTGAAGGGAGAG-3'。β-action (97bp): 正向引物: 5'-GCCTTCCTTCTTGGGTAT-3', 反向引物: 5'-OGCAGAGCAGTAATCTCCTT-3'。PCR 扩增产物的检测, 取 5 μl PCR 扩增产物与含 5 mg/L 溴化已啶 (EB) 1 ml, 于 2% 琼脂糖凝胶电泳 (200 mV 1 h), 用凝胶成像系统观察图片并采图分析, 用 quantity one V4.62 软件测电泳条带的灰度值, 目的基因表达的相对含量 = 扩增基因的灰度值/内参的灰度值 × 100%。

2.3.3 检测血 Th1 细胞 CD3⁺CD8⁻/IFN-γ 及 Th2 细胞 CD3⁺CD8⁻/IL-4 表达 取新鲜抗凝血 500 μl, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加 10 倍细胞体积的红细胞裂解液, 轻轻吹打混匀, 裂解 2 min。1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗涤。取裂解红细胞后的标本 500 μl, 加入 250 × PMA/离子霉素 2 μl 和 250 × 英能菌素/BFA 2 μl, 混匀, 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 6 h, 加入 3 ml 缓冲液, 3000 r/min 离心 5 min, 弃上清收集细胞, 用 0.5 ml PBS 重悬后用流式细胞仪检测, 计算出 CD3⁺CD8⁻/IFN-γ 及 CD3⁺CD8⁻/IL-4 的百分数。

2.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 方差齐时, 各组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐时, 则采用 Tamhane's T2 检验。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠血清 IFN-γ 和 IL-4 表达比较

表 1 示, 模型组 IFN-γ、IL-4 表达明显高于空白组 (P < 0.01)。润燥灵中、高剂量组和强的松

组 IFN-γ 表达均明显低于模型组 (P < 0.05 或 P < 0.01), 且润燥灵高剂量组明显低于强的松组和润燥灵中剂量组 (P < 0.01)。润燥灵高剂量组和强的松组 IL-4 表达均明显低于模型组和润燥灵中剂量组 (P < 0.05 或 P < 0.01), 且两组间比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。

表 1 各组小鼠血清 IFN-γ、IL-4 表达比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IFN-γ	IL-4
空白组	10	208.52 ± 43.91	121.70 ± 18.25
模型组	10	356.65 ± 30.95*	195.55 ± 40.43*
润燥灵低剂量组	10	349.70 ± 33.19 [#]	189.62 ± 37.37 [#]
润燥灵中剂量组	10	302.27 ± 38.20 ^Δ	186.40 ± 29.46
润燥灵高剂量组	10	218.58 ± 26.90 ^{ΔΔ▲▲}	154.81 ± 21.28 ^{ΔΔ▲}
强的松组	10	296.46 ± 37.04 ^Δ	148.46 ± 23.63 ^{ΔΔ▲}

注: IFN-γ, 干扰素 γ; IL-4, 白细胞介素 4; 与空白组比较, * P < 0.01; 与模型组比较, Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01; 与润燥灵中剂量组比较, ▲ P < 0.05, ▲▲ P < 0.01; 与强的松组比较, # P < 0.05, ## P < 0.01

3.2 各组小鼠颌下腺转录因子 T-bet 和 GATA-3 表达及 T-bet/GATA-3 比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组 T-bet、T-bet/GATA-3 升高 (P < 0.01)。与模型组比较, 润燥灵各剂量组及强的松组 T-bet 表达均明显降低, 且润燥灵高剂量组 T-bet 表达最低 (P < 0.05 或 P < 0.01); 润燥灵高剂量组和强的松组 GATA-3 表达明显高于模型组, T-bet/GATA-3 明显低于模型组 (P < 0.05 或 P < 0.01), 两组比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。

3.3 各组小鼠血 Th1 细胞 CD3⁺CD8⁻/IFN-γ、Th2 细胞 CD3⁺CD8⁻/IL-4 及 IFN-γ/IL-4 比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组 CD3⁺CD8⁻/IFN-γ、CD3⁺CD8⁻/IL-4 及 IFN-γ/IL-4 均明显升高 (P < 0.05 或 P < 0.01)。与模型组比较, 润燥灵各剂量组和强的松组 CD3⁺CD8⁻/IFN-γ、润燥灵高剂量组和强的松组 CD3⁺CD8⁻/IL-4 及润燥灵高剂量组和强的松组 IFN-γ/IL-4 均明显降低 (P <

表 2 各组小鼠颌下腺 T-bet、GATA-3 及 T-bet/GATA-3 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	T-bet	GATA-3	T-bet/GATA-3
空白组	10	0.23 ± 0.01	0.28 ± 0.01	1.04 ± 0.07
模型组	10	1.21 ± 0.92*	0.25 ± 0.02	3.03 ± 2.30*
润燥灵低剂量组	10	0.81 ± 0.09 ^Δ	0.27 ± 0.03	2.87 ± 0.33
润燥灵中剂量组	10	0.76 ± 0.08 ^Δ	0.26 ± 0.03	2.79 ± 0.32
润燥灵高剂量组	10	0.43 ± 0.01 ^{ΔΔ▲▼}	0.35 ± 0.01 ^Δ	1.23 ± 0.01 ^{ΔΔ▲▼}
强的松组	10	0.78 ± 0.03 ^Δ	0.40 ± 0.01 ^{Δ▲▼}	0.98 ± 0.03 ^{ΔΔ▲▲▼▼}

注: 与空白组比较, * P < 0.01; 与模型组比较, Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01; 与润燥灵低剂量组比较, ▲ P < 0.05, ▲▲ P < 0.01; 与润燥灵中剂量组比较, ▼ P < 0.05, ▼▼ P < 0.05; 与强的松组比较, # P < 0.01

表 3 各组小鼠血 Th1 细胞 CD3⁺CD8⁻/IFN- γ 、Th2 细胞 CD3⁺CD8⁻/IL-4 及 IFN- γ /IL-4 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CD3 ⁺ CD8 ⁻ /IFN- γ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁻ /IL-4 (%)	IFN- γ /IL-4
空白组	10	13.51 $\pm$ 0.90	15.96 $\pm$ 1.06	0.88 $\pm$ 0.05
模型组	10	22.34 $\pm$ 3.93*	20.62 $\pm$ 3.28*	1.32 $\pm$ 0.23**
润燥灵低剂量组	10	18.81 $\pm$ 10.21* Δ	18.04 $\pm$ 8.58	1.25 $\pm$ 0.80**
润燥灵中剂量组	10	15.78 $\pm$ 10.25 Δ	13.82 $\pm$ 8.71 Δ $\blacktriangle$	1.22 $\pm$ 0.79**
润燥灵高剂量组	10	11.59 $\pm$ 1.33 Δ $\blacktriangle$ $\blacktriangledown$	12.58 $\pm$ 8.35 Δ $\blacktriangle$	0.76 $\pm$ 0.08 Δ Δ
强的松组	10	11.23 $\pm$ 0.39 Δ Δ	14.69 $\pm$ 7.72 Δ	0.56 $\pm$ 0.02 Δ Δ $\blacktriangle$ $\blacktriangledown$

注: IFN- γ , 干扰素 γ ; IL-4, 白细胞介素 4; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与润燥灵低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle \blacktriangle P < 0.01$; 与润燥灵中剂量组比较, $\blacktriangledown P < 0.05$, $\blacktriangledown \blacktriangledown P < 0.05$

0.05 或 $P < 0.01$), 润燥灵高剂量组 CD3⁺CD8⁻/IFN- γ 低于润燥灵中、低剂量组, 润燥灵高、中剂量组 CD3⁺CD8⁻/IL-4 低于润燥灵低剂量组 ($P < 0.05$)。润燥灵高剂量组与强的松组 IFN- γ /IL-4 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。润燥灵各剂量组 CD3⁺CD8⁻/IL-4、CD3⁺CD8⁻/IFN- γ 与强的松组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 讨论

干燥综合征属中医学“燥证”“燥痹”“燥毒”等范畴, 传统中医学认为, 燥邪是 SS 发病的主要原因, 阴虚内热是其关键病机。但长期在临床实践中我们发现, 应用单纯的滋阴润燥治疗效果并不理想。为此, 我们根据 SS 患者久病多瘀、久病伤津、久病燥热成毒等特点, 认为“毒蕴血瘀”是其发病的重要因素^[4], 在临床实践不断总结经验, 采用清热、活血、解毒等治疗方法能够明显提高 SS 患者的临床疗效^[5-7], 并在此中医理论指导下组成润燥灵方。方中生地黄清热生津、润燥凉血, 为君药; 玄参、紫草清热凉血、滋阴解毒, 穿心莲、白花蛇舌草、肿节风清热解毒, 共为臣药; 三七活血化瘀, 五味子生津止渴, 为佐使药。全方从清热、解毒、养阴、生津、活血、通络等多角度组方, 共奏清热解毒、活血生津的功效。

干燥综合征靶器官浸润的细胞主要是 T 淋巴细胞和浆细胞, 以 CD4⁺T 淋巴细胞为主。目前研究认为, CD4⁺T 细胞分为 Th1、Th2、Th17 等细胞亚群^[8]。抗原刺激机体后, CD4⁺T 淋巴细胞活化增值, 分化成效应细胞, 促进多种细胞因子如 IFN- γ 、IL-4、白细胞介素 10 (IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等的产生, 介导靶器官的自身免疫反应, 从而促进炎症的发生, 导致 SS 的发生发展^[9]。Th1 和 Th2 细胞在机体中处于相互制约、动态平衡的状态, 对人体整个免疫系统调节起着决定性的作用, 一旦平衡被打破, 导致许多疾病的发

生和发展^[12]。

Th1 细胞主要分泌白细胞介素 2 (IL-2)、IFN- γ 和肿瘤坏死因子 β (TNF- β) 等细胞因子, 介导细胞内免疫。研究发现, IFN- γ 的异常表达与 SS 的发病有明确关联^[13]。IFN- γ 可增强唾液上皮细胞 Fas 和 CD40 表达, 加速唾液腺上皮细胞的凋亡^[13]。Th2 细胞主要分泌 IL-4、白细胞介素 5 (IL-5) 和 IL-10 等, 介导细胞外免疫。正常情况下, T 细胞各个亚群之间维持着动态平衡, 当机体受到抗原攻击时, Th1、Th2 比值发生变化, 该现象称为免疫失衡^[14]。Th1、Th2 平衡被破坏, 进而导致分泌的细胞因子变化, 免疫细胞的凋亡受到抑制, 刺激自身反应性 B 细胞产生自身抗体, 加重自身免疫反应, 机体受到损伤, 导致 SS 的发病^[13]。有学者推测, Th1、Th2 免疫失衡扮演着促进或加剧 SS 疾病发病的角色^[14]。T-bet、GATA-3 对 Th1、Th2 分化起着重要作用。T-bet 为 Th1 细胞特异的转录因子, 能诱导 IFN- γ 的产生^[17]。GATA-3 是 GATA 家族中成员, 是 Th2 细胞特异性转录因子, GATA-3 能选择性地诱导幼稚型 CD4⁺淋巴细胞朝着 Th2 方向分化, 也能抑制 IFN- γ 的表达, 导致 Th1 的抑制和 Th2 亚群的发展^[18]。

本研究结果显示, 润燥灵能降低 T-bet 含量, 提高 GATA-3 含量, 而促进 Th1/Th2 免疫平衡, 达到改善干燥综合征的作用; 润燥灵能够降低 IFN- γ 、IL-4 表达, 以中高剂量组明显, 与强的松组疗效相当, 低剂量组作用较弱。模型组 IFN- γ /IL-4 比值高于空白组, 说明造模是成功的, 通过润燥灵干预治疗后, 润燥灵高剂量组和强的松组 IFN- γ /IL-4 比值下降, 接近空白组, 提示 Th1/Th2 失衡在一定程度上导致了 SS 的发生, 而中药润燥灵汤可能通过调节 Th1/Th2 而起到治疗 SS 的作用。

参考文献

[1] 蒋明, 张奉春. 风湿病诊断与诊断评析 [M]. 上海科学

技术出版社, 2004: 143-154.

- [2] 林华鹏, 庄俊汉. 干燥综合征发病机制研究进展 [J]. 中国老年保健医学, 2007, 5(2): 36-37.
- [3] 闻玉梅. 天然免疫与中西医结合 [J]. 中西医结合学报, 2004, 2(1): 1-2.
- [4] 袁颖, 金素安, 何世民. 中药对 Th1/Th2 细胞因子平衡调节作用的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(5): 90-93.
- [5] 曾萃, 和秀丽, 马武开, 等. 马武开教授从“毒蕴血瘀”论治干燥综合征. 贵阳中医学院学报, 2016, 36(2): 15-16.
- [6] 马武开, 唐芳. 润燥灵对干燥综合征患者唾液流量及电解质影响的研究 [J]. 环球中医药, 2010, 3(6): 464-465.
- [7] 马武开, 贾二涛. 干燥综合征模型小鼠涎腺 AQP1、AQP5 表达的研究 [J]. 山东医药, 2011, 51(24): 46-48.
- [8] CUTLER LS, GREINER DL, ROZENSKI D. Experimental autoimmune sialadenitis in the LEW rat. II. Target antigens are associated with cell surface and intracellular particulate fractions derived from the submandibular gland [J]. Cell Immunol, 1991, 135(2): 346-353.
- [9] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 150-155.
- [10] KAECH SM, WHERRY EJ, AHMED R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(4): 251-262.

- [1] 印厚才, 邓剑兰. T 细胞相关细胞因子在干燥综合征发病机制的研究进展 [J]. 临床医药文献杂志, 2015, 2(32): 6747-6750.
- [2] NATALIA O TYMOSHOK, LIUDMYLA M LAZARENKO, ROSTYSLAV V BUBNOV, et al. New aspects the regulation of immune response through balance Th1/Th2 cytokines [J]. EPMA J, 2014, 5(suppl 1): A134.
- [3] 李成荫, 汪悦, 孙丽霞. IFN- γ 与 SS 发病机制相关性研究进展 [J]. 现代免疫学, 2012, 3(5): 428-440.
- [4] 许满秀, 钱先. 干燥综合征相关性细胞因子 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(2): 206-208.
- [5] 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.
- [6] 董萍云, 王娟, 李立红. T-bet/Gata-3 调控 Th1/Th2 分化失衡疾病的研究进展 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2008(22): 53-54.
- [7] 王美红, 陈同辛. 转录因子 T-bet 在 Th1/Th2 分化中的作用及意义 [J]. 上海免疫学杂志, 2003, 23(5): 359-361.
- [8] 董萍云, 王娟, 李立红. T-bet/Gata-3 调控 Th1/Th2 分化失衡疾病的研究进展 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2008, 22(1): 53-54.

Impact of Runzaoling Decoction (润燥灵方) on Serum Th1/Th2 in Model Mice with Sjogren's Syndrome

MA Wukai, HE Xiuli, ZENG Ping, NING Qiaoyi, YAO Xueming, ZHOU Jing, HOU Lei

(Second Affiliated Hospital to Guiyang College of Chinese Medicine, Guiyang, 550003)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of Runzaoling Decoction (润燥灵方) in treating Sjogren's syndrome (SS). **Methods** Ninety C57 mice were randomized into a blank group, a model group, a prednisone group, and low, medium and high dose Runzaoling Decoction groups, with 15 mice in each group. Each group was established SS mice models by immune induction method except the blank group. After the models were successfully established, the high, medium and low dose Runzaoling Decoction groups were given Runzaoling Decoction water decoction 36, 18, or 9 g/(kg · d), respectively; the prednisone group was given prednisone 0.2 g/(kg · d), the blank group and the model group given 0.2 ml of normal saline, once every day. After 4 weeks of successive administration, the levels of serum interferon γ (IFN- γ) and interleukin 4 (IL-4) were detected with Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) method. The expressions of salivary gland T-bet and GATA-3 transcription factor were detected with polymerase chain reaction (PCR) method. The number of serum Th1 and Th2 cells were calculated with flow cytometry. **Results** Levels of IFN- γ and IL-4, expression of T-bet, as well as T-bet/GATA-3, CD3⁺CD8⁻/IFN- γ , CD3⁺CD8⁻/IL-4 and IFN- γ /IL-4 in the model group were much higher than those in the blank group. Level of IFN- γ , T-bet expression, as well as CD3⁺CD8⁻/IFN- γ and CD3⁺CD8⁻/IL-4 were lower in the High and medium dose Runzaoling Decoction groups, especially in the high dose Runzaoling Decoction group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Runzaoling Decoction might down-regulate serum levels of Th1/Th2 in SS model mice, which might be one of the mechanisms of treating SS.

Keywords Sjogren's syndrome; Runzaoling Decoction; helper T cell 1; helper T cell 2

(收稿日期: 2016-06-21; 修回日期: 2016-11-28)

编辑: 王利芬