

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.12.018

调补肺肾三法调节慢性阻塞性肺疾病稳定期大鼠 T 淋巴细胞亚群的 R 值综合评价

李建生^{*}, 崔红新², 田燕歌¹, 李 亚¹, 谢 洋¹

(1. 河南中医学院老年医学研究所, 河南省郑州市郑东新区龙子湖高校园区, 450046; 2. 河南中医学院数理学科)

摘要 目的 采用 R 值综合评价法多指标综合评价调补肺肾三法(补肺健脾、补肺益肾、益气滋肾)对慢性阻塞性肺疾病(COPD)稳定期大鼠 T 淋巴细胞亚群的调节作用。方法 采用香烟熏吸联合细菌感染法制备 COPD 模型,于第 9 周分别给予补肺健脾方、补肺益肾方、益气滋肾方及氨茶碱至第 20 周。于第 20、32 周测定外周血和肺泡灌洗液中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺及 CD4⁺CD25⁺表达。采用 R 值综合评价法,对调补肺肾三法调节 COPD 稳定期 T 淋巴细胞亚群进行综合评价。结果 第 20、32 周及综合 20、32 周,调补肺肾三法和氨茶碱对外周血和肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞亚群各指标均具有较显著的综合纠正作用($P < 0.01$)。综合 20、32 周,各治疗方案对外周血 T 淋巴细胞亚群的纠正强度依次为补肺健脾、氨茶碱、补肺益肾、益气滋肾;对肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞亚群纠正强度依次为补肺健脾、氨茶碱、益气滋肾、补肺益肾,其中补肺健脾的纠正强度较补肺益肾显著($P < 0.05$)。结论 调补肺肾三法和氨茶碱对 COPD 稳定期大鼠外周血和肺脏局部 T 淋巴细胞亚群均具有明显的调节作用,并具有良好的远后效应,以补肺健脾方尤为显著。

关键词 慢性阻塞性肺疾病; 补肺健脾; 补肺益肾; 益气滋肾; T 淋巴细胞亚群; R 值综合评价法

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的主要病理特征是不可逆的肺损伤、气道重塑、黏液分泌过多和炎症细胞浸润^[1]。免疫功能低下是造成这些病理损伤的主要因素,其中 T 淋巴细胞介导的细胞免疫在全身和肺局部免疫功能中均起重要作用^[2]。前期研究表明,调补肺肾三法(补肺健脾、补肺益肾、益气滋肾)可明显调节外周血及肺泡灌洗液中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺水平,提高机体免疫功能,且具有较好的远后效应^[3]。但这些结果仅能反映出药物对单个指标的作用,不能确切反映出药物对多个免疫指标的综合作用。

R 值综合评价法的建立是基于已提出的中医药疗效评价“三要素”理论^[4],将机体状态因素和药物因素统一于效应因素中,并结合现代科学分析方法和数理分析模型对药物疗效进行多指标综合评价。其不仅能够反映各治疗方案对多指标的综合作用,

而且能够得出多个治疗方案的优劣趋势^[5]。因此,本文基于前期研究数据,采用 R 值综合评价法从外周血和肺泡灌洗液两个方面来评价调补肺肾三法对 COPD 全身和肺局部 T 淋巴细胞亚群的调节作用。

1 数据来源

将大鼠分为对照组、模型组、补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组、氨茶碱组,除对照组外,其余各组采用香烟熏吸联合细菌感染法制备 COPD 稳定期大鼠模型^[6]。于第 9 周起对照组、模型组给予 2 ml 生理盐水灌胃,其余各组分别给予补肺健脾方 4.84 g/(kg·d)、补肺益肾方 4.44 g/(kg·d)、益气滋肾方 4.84 g/(kg·d)及氨茶碱 2.3 mg/(kg·d)每日 2 次灌胃至第 20 周,停药至第 32 周以观察远后效应,于第 20、32 周采用流式细胞技术测定外周血和肺泡灌洗液中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺及 CD4⁺CD25⁺表达,具体数据见文献[6]。

基金项目:国家自然科学基金(81130062)

* 通讯作者: li_js8@163.com, (0371) 65676568

2 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。采用公式 $D = R - (-3.5)$ 建立 D 值数据集, 对数据集进行正态性、方差齐性检验, 计算 R 综合值符合正态分布且方差齐性者采用单因素方差分析的最小显著差异法 (LSD), 不满足正态性的数据采用 Kruskal-Wallis H 检验。组内比较, 满足正态分布者采用配对样本 t 检验, 不满足者采用 Wilcoxon 符号秩和检验。组间比较采用单因素方差分析。

3 R 值综合评价法的应用

表 1 各治疗组慢性阻塞性肺疾病大鼠外周血 CD3⁺、CD4⁺ 第 20、32 周 R 值

组别	CD3 ⁺		CD4 ⁺	
	第 20 周	第 32 周	第 20 周	第 32 周
氨茶碱组	-2.3622	-1.9638	-2.2726	-1.5899
补肺健脾组	-2.8197	-2.3566	-3.1929	-1.8679
补肺益肾组	-2.6990	-1.9654	-2.8257	-1.5148
益气滋肾组	-2.7231	-1.2265	-2.8401	-2.0022

R 值综合评价法的建立参照文献 [5], 与不同的是本文数据计算出的 R 值数值偏小, 最小值为 -3.1929, 故原公式 7 改为 $D = R - (-3.5)$, 才能完全转化为正值。以氨茶碱组 20 周外周血 CD3⁺ 为例: 对照组 $\bar{x}_1 + s_1 = 46.08 \pm 4.12$, 模型组 $\bar{x}_2 + s_2 = 31.17 \pm 2.97$, 氨茶碱组 $\bar{x}_3 + s_3 = 57.40 \pm 2.31$ [9], 根据公式 1 得: $dM = -4.2059$; 根据公式 2: $dMe_1 = 9.9356$; 根据公式 6: $R_1 = -$

2.3622。如此计算外周血 CD3⁺、CD4⁺ R 值, 见表 1。

$R_{\text{综合}}(D)$ 值的意义也随之改变: 1) $R_{\text{综合}}(D) < 2.5$, 表示药物对此类指标的综合纠正强度太强, 不仅使模型状态的指标值恢复到正常值, 且超过正常值; 2) $R_{\text{综合}}(D) = 2.5$, 表示药物对此类指标的综合纠正强度达到最佳效果, 使模型状态恢复到正常状态; 3) $2.5 < R_{\text{综合}}(D) < 3.5$, 表示药物使机体的模型状态向正常状态发展, 对此类指标有一定的纠正作用, 但尚不足以使其达到正常状态; 4) $R_{\text{综合}}(D) = 3.5$, 表示药物对此类指标基本没有起到纠正作用; 5) $R_{\text{综合}}(D) > 3.5$, 表现出该药物对此类指标有反向的加剧作用, 值越大, 反向加剧作用越强, 治疗效果越差。总之, $R_{\text{综合}}(D) < 2.5$ 表示药物起到纠正作用, 且 $R_{\text{综合}}(D)$ 值越接近于 2.5, 治疗效果越好, 从而得到药物对指标综合评价的优劣顺序。

由于模型组没有药物干涉, 取 $R_{\text{综合}} = 3.5$ 。

4 结果

4.1 各组大鼠外周血和肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞亚群各指标变化的二维散点图

图 1 示, 第 20、32 周氨茶碱组、补肺益肾组和益气滋肾组对外周血和肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞亚群各指标均有积极的纠正作用, 其中第 20 周氨茶碱组、补肺益肾组和益气滋肾组的外周血和肺泡灌洗液中 CD4⁺/CD8⁺ 都在第四象限, 其余指标属于第二象限; 补肺健脾组的外周血和肺泡灌洗液

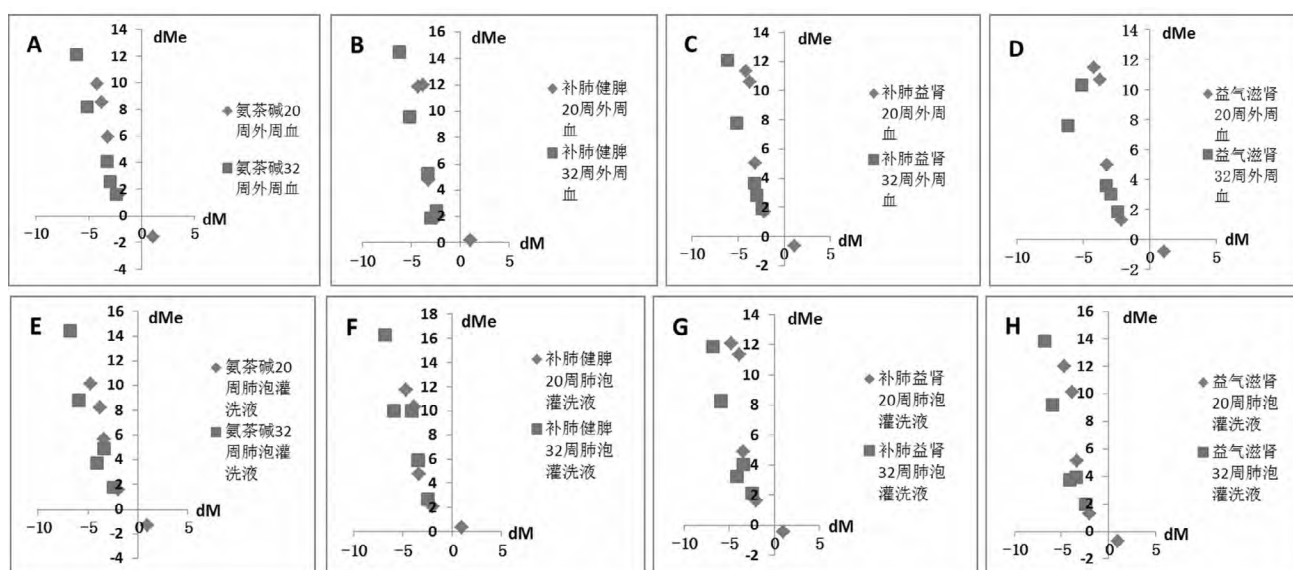


图 1 各治疗组 COPD 大鼠外周血和肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞亚群各指标变化散点图

注: A、B、C、D 分别为各治疗组第 20、32 周外周血中 T 淋巴细胞亚群各指标变化散点图; E、F、G、H 分别为各治疗组第 20、32 周肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞亚群各指标变化散点图

中 $CD4^+/CD8^+$ 属于第一象限, 表示补肺健脾方对 $CD4^+/CD8^+$ 的纠正作用不明显。

4.2 D 值数据集的计算结果

在本研究指标的计算中, 补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组和氨茶碱组外周血和肺泡灌洗液中共 10 个指标, 80 个 D 值。其中 $CD4^+/CD8^+$ 和 $CD4^+CD25^+$ 共 32 个 D 值, 30 个属于 $2.5 < D < 3.5$, 表示药物使机体的疾病状态向正常状态发展; 第 20 周, 补肺健脾组的外周血和肺泡灌洗液中 $CD4^+/CD8^+$ 的 2 个 D 值分别为 3.6797, 3.8426, 表示药物对该指标有反向加剧作用, 加重了模型状态的指标值。其余指标 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 的 D 值 < 2.5 , 反映了这些指标对调补肺肾三法和氨茶碱较敏感。

4.3 各组大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群各指标综合评价比较

表 2 示, 第 20、32 周及综合 20、32 周, 调补肺肾三法各组及氨茶碱组对外周血 T 淋巴细胞亚群各指标均具有显著的纠正作用 ($P < 0.01$)。第 20 周, 纠正强度依次为氨茶碱组、补肺益肾组、益气滋肾组、补肺健脾组。第 32 周, 纠正强度均依次为补肺健脾组、补肺益肾组、氨茶碱组、益气滋肾组。综合 20 和 32 周, 纠正强度依次为补肺健脾组、氨茶碱组、补肺益肾组、益气滋肾组。调补肺肾三法各组第 32 周时均维持第 20 周纠正强度, 氨茶碱组第 32 周纠正强度较第 20 周显著降低 ($P < 0.05$)。

表 2 各组慢性阻塞性肺疾病大鼠外周血中 T 淋巴细胞亚群各指标综合评价比较 ($R_{综合}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	20 周	32 周	综合 20、32 周
模型组	3.5000 $\pm$ 0.0000	3.5000 $\pm$ 0.0000	3.5000 $\pm$ 0.0000
氨茶碱组	1.7617 $\pm$ 0.6619*	2.2360 $\pm$ 0.5296* Δ	1.9988 $\pm$ 0.6180*
补肺健脾组	1.8428 $\pm$ 1.3781*	2.0027 $\pm$ 0.6783*	1.9228 $\pm$ 1.0274*
补肺益肾组	1.8094 $\pm$ 1.0486*	2.2315 $\pm$ 0.4727*	2.0204 $\pm$ 0.7985*
益气滋肾组	1.8121 $\pm$ 1.0642*	2.2767 $\pm$ 0.4649*	2.0444 $\pm$ 0.8120*

注: 与模型组同时时间点比较, * $P < 0.01$; 与本组 20 周比较, $\Delta P < 0.05$

4.4 各组大鼠肺泡灌洗液 T 淋巴细胞亚群各指标综合评价比较

表 3 示, 第 20、32 周及综合 20、32 周, 调补肺肾三法各组及氨茶碱组对肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞亚群各指标均具有显著的纠正作用 ($P < 0.01$)。第 20 周, 综合纠正强度依次为补肺益肾组、益气滋肾组、氨茶碱组、补肺健脾组。第 32

周, 纠正强度依次为补肺健脾组、氨茶碱组、益气滋肾组、补肺益肾组, 其中补肺健脾组的纠正强度较补肺益肾组显著 ($P < 0.05$)。综合 20 和 32 周, 纠正强度依次为补肺健脾组、氨茶碱组、益气滋肾组、补肺益肾组。调补肺肾三法各组及氨茶碱组第 20 周与第 32 周间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组 COPD 大鼠肺泡灌洗液中 T 淋巴细胞亚群各指标综合评价比较 ($R_{综合}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	20 周	32 周	综合 20、32 周
模型组	3.5000 $\pm$ 0.0000	3.5000 $\pm$ 0.0000	3.5000 $\pm$ 0.0000
氨茶碱组	1.8829 $\pm$ 0.5768*	2.1665 $\pm$ 0.5481*	2.0247 $\pm$ 0.5511*
补肺健脾组	2.0422 $\pm$ 1.2257*	1.6312 $\pm$ 0.5543*	1.8367 $\pm$ 0.9226*
补肺益肾组	1.8521 $\pm$ 1.0841*	2.3080 $\pm$ 0.3929* Δ	2.0801 $\pm$ 0.8054*
益气滋肾组	1.8741 $\pm$ 0.9439*	2.2116 $\pm$ 0.5072*	2.0429 $\pm$ 0.7362*

注: 与模型组同时时间点比较, * $P < 0.01$; 与补肺健脾组同时时间点比较, $\Delta P < 0.05$

5 讨论

正虚积损为 COPD 发病的主要病机, 扶正祛邪为治疗 COPD 的主要策略^[1]。COPD 患者正气虚弱, 故免疫功能低下, 适应性免疫细胞增加, 尤其是 $CD4^+$ T 淋巴细胞和 $CD8^+$ T 淋巴细胞活化^[2]。 $CD4^+$ T 淋巴细胞能促进 B 细胞、T 细胞和其他免疫细胞的增殖与分化, 协调免疫细胞间的相互作用, 活化时可引起一系列炎症反应。 $CD8^+$ T 淋巴细胞活化后释放穿孔素、颗粒酶参与 COPD 的发生发展过程, 且 $CD8^+$ 数量的增加与 COPD 严重程度相关^[3]。 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞具有免疫抑制作用, 可负调节 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的活化和增殖^[4]。前期研究表明, 补益肺肾兼顾脾, 佐以祛痰活血的调补肺肾三法可调节 COPD 外周血和肺泡灌洗液中免疫功能相关指标 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 及 $CD4^+CD25^+$ 水平变化, 并具有明显的远后效应^[5]。中医药作用复杂, 受诸多因素的影响, 既往研究多侧重于药物在单个时间点对单个指标表达的影响, 虽能反映药物对单个指标的作用, 但难以反映其综合疗效。本文基于前期研究数据, 采用 R 值综合评价法评价调补肺肾三法对 COPD 大鼠 T 淋巴细胞亚群的综合调节作用, 以客观反映其对免疫功能的影响。

本研究结果表明, 调补肺肾三法和氨茶碱对外周血和肺泡灌洗液 T 淋巴细胞亚群各指标均有显著的纠正作用。第 32 周, 对肺泡灌洗液 T 淋巴细胞亚群各指标的综合纠正强度依次为补肺健脾组、氨茶碱组、益气滋肾组、补肺益肾组, 其中补肺健

脾组的纠正强度较补肺益肾组显著。综合 20 和 32 周, 对外周血 T 淋巴细胞亚群各指标的综合纠正强度依次为补肺健脾组、氨茶碱组、补肺益肾组、益气滋肾组; 对肺泡灌洗液 T 淋巴细胞亚群各指标的综合纠正强度依次为补肺健脾组、氨茶碱组、益气滋肾组、补肺益肾组。调补肺肾三法各组第 32 周仍维持第 20 周纠正强度, 说明调补肺肾三法对调节 COPD 免疫功能具有较好的远后效应。

综上所述, 调补肺肾三法对 COPD 稳定期大鼠外周血和肺脏免疫功能指标均具有显著的调节作用, 并具有良好的远后效应, 其中补肺健脾综合作用尤为显著。本文的 R 值综合评价法能够多层面、多靶点反映各方法的作用特点。

参考文献

- [1] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (updated 2014) [EB/OL]. (2014 - 08 - 04). http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report2014_Feb07.pdf.
- [2] Eppert BL, Wortham BW, Flury JL, et al. Functional characterization of T cell populations in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Immunol,

2013, 190 (3) : 1331-1340.

- [3] 姜素丽, 李亚, 田燕歌, 等. 调补肺肾三法对 COPD 大鼠 T 淋巴细胞亚群及 CD4⁺CD25⁺ 的影响及远后效应 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(11) : 1569-1575.
- [4] 田燕歌, 谢洋, 李建生. 基于疗效评价“三要素”的中医药疗效评价设想 [J]. 中医杂志, 2012, 53(8) : 649-650.
- [5] 李建生, 崔红新, 田燕歌, 等. 调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病稳定期模型大鼠肺胶原和蛋白酶调节作用的 R 值综合评价 [J]. 中医杂志, 2014, 55(11) : 949-954.
- [6] Li Y, Li SY, Li JS, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(10) : 1752-1760.
- [7] 李建生. 正虚积损为慢性阻塞性肺疾病的主要病机 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(4) : 4-6.
- [8] Holloway RA, Donnelly LE. Immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Curr Opin Pulm Med, 2013, 19(2) : 95-102.
- [9] Freeman CM, Martinez FJ, Han MK, et al. Lung CD8⁺ T cells in COPD have increased expression of bacterial TLRs [J]. Respir Res, 2013, 14: 13. doi: 10.1186/1465-9921-14-13.
- [10] Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8⁺ T cell activation by CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory cells [J]. J Immunol, 2001, 167(3) : 1137-1140.

R-Value Comprehensive Evaluation on Three Methods for Lung-Kidney Regulating and Supplementing on T lymphocyte Subsets in Rats with Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease

LI Jiansheng¹, CUI Hongxin², TIAN Yange¹, LI Ya¹, XIE Yang¹

(1. Geriatric Institute of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Henan Province, 450046; 2. Mathematics and Science Section of Henan University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To evaluate the effect of three methods for lung-kidney regulating and supplementing on T lymphocyte subsets in rats with stable chronic obstructive Pulmonary disease (COPD) adopting R-value comprehensive evaluation. **Methods** COPD models were established with cigarette smoking combined with bacterial infection. From the 9th week to 20th week, animals were given *Bufei Jianpi Fang* (补肺健脾方), *Bufei Yishen Fang* (补肺益肾方), *Yiqi Zishen Fang* (益气滋肾方) and aminophylline respectively. Expression of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ and CD4⁺CD25⁺ in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid was detected in the 20th and 32nd weeks. R-value comprehensive evaluation was adopted to evaluate the effect on T lymphocyte subsets. **Results** In the 20th and 32nd week, three methods for lung-kidney regulating and supplementing and aminophylline showed comprehensive corrective effect on T lymphocyte subsets in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid (*P* < 0.01). Based on the results in both the 20th and 32nd week, the order of corrective effect intensity of all therapeutic schemes on T lymphocyte subsets in peripheral blood was *Bufei Jianpi Fang*, aminophylline, *Bufei Yishen Fang*, and *Yiqi Zishen Fang*; and the order of those effect intensity in bronchoalveolar lavage fluid was *Bufei Jianpi Fang*, aminophylline, *Yiqi Zishen Fang*, and *Bufei Yishen Fang*. The corrective effect intensity of *Bufei Jianpi Fang* was superior to that of *Bufei Yishen Fang* (*P* < 0.05). **Conclusion** Three methods for lung-kidney regulating and supplementing and aminophylline all have significant regulating effect on T lymphocyte subsets in peripheral blood and lung as well as good late effect in rats with stable COPD. *Bufei Jianpi Fang* is most effective among the methods.

Keywords chronic obstructive pulmonary disease (COPD); supplement lung and spleen; supplement lung and kidney; supplement Qi and kidney; T lymphocyte subsets; R-value comprehensive evaluation

(收稿日期: 2014 - 08 - 04; 修回日期: 2014 - 11 - 28)

编辑: 王利芬