DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.015
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
132 2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0132-03

地塞米松及雷公藤甲素对哮喘CD4、CD8细胞凋亡的影响

林科雄,王长征,钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要 目的:探讨地塞米松(DM)和雷公藤对哮喘CD4、CD8细胞凋亡的作用。方法:采用卵蛋白致敏复制哮喘豚鼠模型。哮喘豚鼠经腹腔内注射DM和雷公藤甲素(TP)后,用淋巴细胞分离液的密度梯度离心分离外周血单个核细胞(PBMCs)。采用免疫细胞化学(ICC)与3′末端转移酶介导的脱氧三磷酸尿苷(dUTP)缺口末端标记(TUNEL)双标染色对CD4、CD8细胞凋亡进行检测。结果:DM和TP均能诱导哮喘外周血CD4、CD8细胞凋亡($P<0.01$);而DM组与TP组CD4、CD8细胞凋亡率无显著差别($P>0.05$)。结论:TP和DM均能诱导哮喘CD4、CD8细胞凋亡,且其作用具有相似性。

关键词 哮喘;地塞米松;雷公藤甲素;细胞凋亡
中图法分类号 R329.25;R562.250.53 文献标识码 A

Effects of desamethasone and triptolide on apoptosis of CD4 and CD8T cells in asthmatic guinea pigs

LIN Ke-xiong, WANG Chang-zheng, QIAN Gui-sheng (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037)

Abstract Objective: To investigate the effects of desamethasone (DM) and triptolide (TP) on apoptosis of CD4 and CD8T cells in asthma. Methods: After asthma was induced by ovalbumin in the guinea pigs, the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated with gradient centrifugation. The apoptotic CD4 or CD8T cells were detected by double staining with immunocytochemistry (ICC) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and end labeling (TUNEL). Results: Administration of TP or DM to allergic guinea pigs significantly increased the apoptotic rates of CD4 and CD8T cells ($P<0.01$). However, there was no marked difference in apoptotic rate between TP-treated and DM-treated animals. Conclusion: TP and DM can exert similar effects on induction of apoptosis of CD4 and CD8T cells in asthma.

Key words asthma; desamethasone; triptolide; apoptosis

糖皮质激素具有广泛的抗炎作用,是目前治疗哮喘的主要药物。雷公藤具有抗炎及免疫抑制作用,可抑制T细胞的增殖活化及IL-3、IL-5和GM-CSF等细胞因子表达,用于治疗哮喘有效[1,2]。但二者能否诱导哮喘CD4、CD8细胞凋亡尚不清楚。本研究采用免疫细胞化学(ICC)S-AP法与3′末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)双标染色,对哮喘豚鼠外周血CD4、CD8细胞凋亡进行检测,了解雷公藤甲素(Triptolide,TP)及地塞米松(Desamethasone,DM)对哮喘T细胞亚群的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品。小鼠抗人CD4、CD8单克隆抗体及淋巴细胞亚群检测试剂盒购自北京中山公司。卵蛋白(OVA)购自上海生化试剂公司。原位细胞凋亡试剂盒、5-溴-3-吲哚-磷酸盐(BCIP)、四唑氮蓝(NBT)为宝灵曼公司产品。地塞米松(DM)为重庆制药六厂产品。雷公藤甲素(TP)为福建省中医研究所产品。

1.2 哮喘豚鼠模型的制备及外周血单个核细胞分离

采用OVA致敏和激发建立豚鼠哮喘模型。体重400~500 g豚鼠18只,雌雄不分。分为:哮喘组、DM处理组、TP处理组,每组6只。第1天腹腔内注射2%OVA氢氧化铝凝胶1 ml致敏豚鼠,第8天重复注射加强致敏,第21天吸入2%OVA生理盐水

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870946)
作者简介:林科雄(1969.5),男,贵州省织金县人,博士研究生,主治医师,主要从事哮喘气道炎症的免疫机制方面的研究,发表论文1篇。电话:(023)68755320
收稿日期:1999-09-15;修回日期:1999-12-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

激发哮喘发作，吸入前腹腔内注射苯海拉明 5 mg/kg 体重。DM、TP 处理组分别在激发 24 h 后腹腔内分别注射 DM 10 mg/ kg 或 TP 40 μg/kg。哮喘组豚鼠激发 48 h 后，DM 处理组、TP 处理组用药 24 h 后，用 3%戊巴比妥钠 1 ml/ kg 体重腹腔内注射麻醉豚鼠，然后从颈动脉插管抽取外周血，用肝素抗凝，以淋巴细胞分离液的密度梯度离心分离单个核细胞（Peripheral blood mononuclear cells，PBMCs）并涂片，4%多聚甲醛固定 30 min。

1.3　CD4、CD8 细胞凋亡检测

采用 CD4 或 CD8 ICC 与 TUNEL 双标染色进行检测。主要步骤如下：PBS（pH 7.2）漂洗。加入小鼠抗人 CD4 或 CD8 单克隆抗体 20 μl/片，37℃，1 h。PBS 漂洗。加入二抗 37℃，1 h。PBS 漂洗。加入三抗 37℃，1 h。PBS 漂洗。0.1%Triton X-100，4℃通透 2 min。PBS 漂洗。0.03%H_2O_2/0.01%NaN_3 封闭 30 min。PBS 漂洗。加入由末端脱氧核苷酸转移酶、脱氧三磷酸核苷和荧光素标记的 dUTP 组成的 TUNEL 反应混合液 20 μl/片，37℃ 反应 1 h。PBS 漂洗。加入过氧化物酶标记的抗荧光素抗体 20 μl/片，37℃ 反应 30 min。PBS 漂洗。0.05%DAB/0.01%H_2O_2 显色，光镜下控制显色深浅。PBS 漂洗。NBT/BCIP 显色。

计数：高倍光镜下计数双染细胞，随意选择视野，至少观察 200 个细胞以上，分别计数 CD4、CD8 细胞凋亡率。

1.4　统计学分析

CD4、CD8 T 细胞凋亡率以（$\bar{x}\pm s$）%表示，采用非配对 t 检验进行组间比较，$P<0.05$ 为相差显著。

2　结果

在光学显微镜下观察，单纯凋亡阳性细胞胞核被染成黄色或棕黄色，ICC 阳性细胞膜被染成紫蓝色。ICC 和 TUNEL 双染阳性细胞可见胞核被染成黄色或棕黄色，胞膜被染成紫蓝色。DM 处理组及 TP 处理组 CD4、CD8 细胞凋亡率显著高于哮喘组（$P<0.01$）。而 DM 组与 TP 组凋亡率无显著差别（$P>0.05$），结果见图 1。

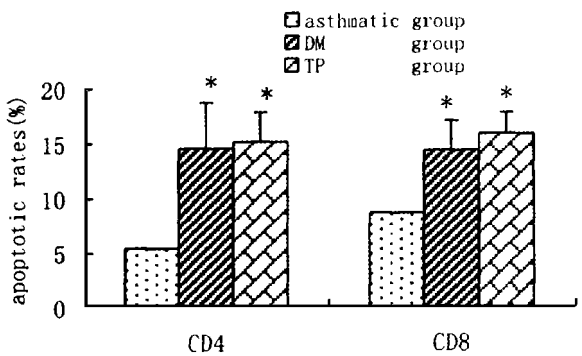


图 1　DM 和 TP 对哮喘豚鼠 CD4、CD8 细胞凋亡的影响

*：$P<0.01$ 与哮喘组比较

Fig 1　The effects of DM and TP on apoptosis of CD4, CD8 cells

*：$P<0.01$ *vs* asthmatic group

3　讨论

支气管哮喘是由嗜酸性粒细胞（Eos）、肥大细胞和 T 细胞等多种炎症细胞参与的气道慢性炎症。CD4 细胞分泌的细胞因子 IL-3、GM-CSF 和 IL-5 促进 Eos 的分化、成熟、活化和存活延长；IL-4 能促进 IgE 的产生[3]。无论是哮喘患者支气管肺泡灌洗液（BALF）还是外周血中 $CD25^+$ CD4 细胞均增多，表达 IL-3、IL-4、GM-CSF 和 IL-5 增加，而且与哮喘严重程度相关[4,5]。所以，CD4 细胞在哮喘发病机制中起重要的调控作用。

CD8 细胞在一定条件下也能分泌 IL-4、IL-5 等 Th2 细胞因子[6]。从特应性患者 BALF 制备的 CD8 细胞系分泌的 IL-5 显著高于非特应性哮喘患者，而且特应性患者 CD8T 细胞产生 IL-4 增加[7]。因此，CD8 细胞也可能参与哮喘的发病。

本文实验结果表明 DM 和 TP 均能诱导哮喘豚鼠外周血 CD4 细胞凋亡，这可能是其减少外周血 $CD25^+$ CD4 细胞数量的机制之一。同时，DM 和 TP 也能诱导 CD8 细胞凋亡，提示 DM 和 TP 对 T 细胞凋亡的作用不具特异性。另一方面，DM 和 TP 诱导哮喘 CD4、CD8 细胞的作用无显著差别，说明二者的作用具有相似性。但糖皮质激素长期应用可抑制下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴，而雷公藤对该轴无抑制作用，同时雷公藤与糖皮质激素的药理作用存在互补性[8]。因此，雷公藤与糖皮质激素交替应用或两者合用能较好地发挥两药的互补性，减少副作用。对激素依赖型、激素抵抗型或其他不宜应用激素治疗的哮喘，雷公藤可能是较好的替代药物之一。

参考文献

[1] 王长征，王春霞，金远林等．哮喘豚鼠 IL-5、IL-3、GM-CSF mRNA 表达及雷公藤内酯醇的影响[J]．中华微生物和免疫学杂志，1998，18(2)：145－148.

[2] 王长征，王金平，周泽云，等．雷公藤多甙治疗慢性重度哮喘的临床观察[J]．实用肺科杂志，1998，5(1)：17－19.

[3] Haczku A. T cells and eosinophils in asthma[J]. Acta Microbiol Immunol Hung，1998，45(1)：19－29.

[4] Robinson D S，Hamid Q，Sun Y，*et al*. Predominant Th2-type bronchoalveolar lavage T-lymphocyte population in atopic asthma[J]. N Engl J Med，1992，326(5)：298－304.

[5] Corrigan C J，Kay A B. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status[J]. Am Rev Respir Dis，1990，141(4)：970－977.

[6] Jerb K，Le Gros G. The role of Th2 type $CD4^+$ T cells and Th2

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

type $CD8^+$ T cells in asthma[J]. Immunology Cell Biology, 1996, 74(2):206—208.

[7] Ying S, Humbert M, Barkas J, *et al*. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein produced by $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics[J]. J Immunol, 1997, 158(7):3 539—3 544.

[8] 胡大伟, 刘沛霖. 雷公藤与强地松的药理作用的互补性[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 170(2):94—96.

(编辑 陈聪连)

(上接131页)

解, 随后改为 5 Gy/次, 未再发生腹痛。

3 讨论

对于不适合手术治疗和复发的直肠癌, 放射治疗是主要的治疗方法, 由于盆腔内其他正常组织器官如膀胱及小肠对放射线耐受性较低, 限制了照射剂量提高, 而且直肠腺癌对放射线相对不敏感, 故常难以达到根治, 晚期肿瘤常规放疗减症效果也不佳, 严重影响患者生存质量。立体定向放射治疗具有定位治疗精确、靶区剂量集中、周围正常组织受照剂量低的特点[1]。采用 SRT 单独或结合全盆腔照射, 则能够给予肿瘤高剂量照射, 同时对周围结构给予最大保护, 而不出现严重并发症。本组采用 SRT 治疗 15 例晚期和复发的直肠癌取得了较好近期疗效。

不适合手术的早期直肠癌患者可采用全盆腔照射+腔内放疗的方法争取根治[2], 对于晚期病例则以外照射减症为主。本组治疗的 4 例均为年老体弱并伴有严重合并症的晚期患者, SRT 治疗后控制血便、肛门坠胀等症状有效率达 100%, 排便困难缓解率达 50%。已随访 3~7 月患者病情均稳定。初步结果提示对于不适合手术治疗的晚期直肠癌患者, SRT能够取得良好近期疗效, 且无明显并发症发生, 其远期疗效有待观察。

尽管手术方法有所改进及与放化疗综合应用, 但直肠癌术后盆腔复发率仍高达 10%~25%[3], 这部分患者再手术治疗难度大且预后差。主要采用放化疗给予姑息治疗, 经选择的少部分患者可行手术挽救治疗[4]。直肠癌术后盆腔复发的突出症状为会阴部坠胀、疼痛, 严重者剧烈疼痛。晚期患者特别是肿块巨大者, 常规放疗效果较差。本组患者多数肿瘤侵犯范围广, CT 显示 5 例患者肿瘤侵犯膀胱等周围结构, 3 例既往曾行术后放射治疗, 1 例伴有远处转移。SRT 治疗取得了较好效果, 止痛有效率达 90.9%。有 1 例根治术后 5 年骶前复发患者, 肿块较大并侵犯膀胱后壁, 先给予全盆腔照射 40 Gy 后行 SRT 治疗, 每次 25 Gy, 共 5 次, 治疗后患者会阴部坠胀疼痛等症状完全消失, 目前已随访 11 月未见复发。3 例死亡的复发患者均为晚期, 1 例已有远处转移, 另 2 例肿块巨大、浸润广泛, 治疗后症状虽有缓解, 其中 1 例治疗后 1 月复查 CT 示盆腔肿块略有缩小, 但未能进一步延长患者生存。从本组病例的结果分析显示直肠癌术后盆腔复发 SRT 治疗后预后较好的因素有: 手术与复发间隔时间较长、肿块较小周围组织浸润较轻、无远处转移、患者一般情况较好者治疗效果好。反之效果相对较差, 生存期短。

本组 2 例直肠癌手术+放疗后骶前复发患者, 分别于治疗后 1 月和 8 月出现会阴部、大腿内侧感觉麻木, 可能是由于累积照射剂量过高导致骶前神经损伤所致。其术后盆腔照射的剂量分别为 60 Gy 和 50 Gy, SRT 的剂量分别为 30 Gy 和 25 Gy, 隔天 1 次, 共 5 次。另有 2 例术后放疗后复发患者 SRT 过程中出现呕吐和腹痛等胃肠道反应。由此看出, 既往曾接受较高剂量盆腔照射的患者, SRT后发生胃肠道反应和神经损伤的概率是较高的, 应特别给予重视。设计治疗计划时应尽量设法避开小肠减少盆腔内小肠受照体积, 减低每次分割剂量, 增加照射次数, 可能会减少并发症发生, 我们正在观察中。

关于直肠癌 SRT的体位固定方法, 本组均采用俯卧位真空固定袋固定, 因为肿瘤距骶部距离近, 俯卧位方便治疗。本组肿瘤体积较大, 长径 4.0~7.5 cm, 平均 5.5 cm, 故较多采用多靶点照射技术 9 例, 单靶点照射 6 例。多靶点照射技术除能使高剂量区充分包括较大肿瘤体积外, 并能使高剂量区分布与不规则之肿瘤相对适应。多靶点治疗中应避免照射区内剂量分布冷点和热点, 否则造成照射量的超量或不足而影响疗效。

综上所述, 从本组结果可以得出以下初步结论, SRT是晚期不适合手术治疗的直肠癌和手术后盆腔复发患者的有效治疗方法, 具有疗效高、疗程短等优点, 能取得较好缓解症状的近期疗效, 对部分患者可能取得根治效果。对于术后高剂量全盆腔常规放疗后复发患者发生胃肠道反应和神经损伤并发症的概率较高。降低每次照射剂量, 可能有助于减少并发症发生。

关键词 立体定向放射治疗; 直肠癌; 近期疗效
中图法分类号 R815; R735.37 文献标识码 B

参考文献

[1] 庞学利. 体部立体定向放射治疗的临床应用[J]. 重庆医学, 1998, 27(2):92—93.

[2] Horiot J C, Gerard J P, Maingon P, *et al*. Conservative and curative management of rectal adenocarcinomas by local radiotherapy alone[J]. Eur J Cancer, 1995, 31A(7~8):1 340—1 342.

[3] Mohiuddin M, Marks G M, Lingareddy V, *et al*. Curative surgical resection following reradiation for recurrent rectal cancer[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997, 39(30):643—649.

[4] Romano G, Rotondano G, D'alessandro V, *et al*. Pelvic recurrence following resection of rectal cancer: a multivarite predictive model[J]. Int Surg, 1997, 82(1):67—71.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net