

· 论 著 ·

表没食子儿茶素没食子酸酯对哮喘小鼠呼吸道变应性炎症作用的研究

吴 奎¹, 陈 章¹, 毕玉田², 肖贞良^{1△}

(1. 中国人民解放军成都军区总医院呼吸内科, 成都 610083; 2. 第三军医大学大坪医院呼吸内科, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对尘螨卵清蛋白(OVA)致敏/激发小鼠呼吸道变应性炎症的作用。方法 C57BL/6 小鼠以 OVA 致敏/激发,在其每日供水时加入 EGCG;在最后一次激发 24 h 后,留取标本,检测支气管肺泡灌液(BALF)中的细胞计数和分类,测定 BALF、血浆中细胞因子水平以及外周血和 BALF 中 Foxp3⁺CD4⁺ T 细胞的比例。结果 哮喘小鼠可见明显炎性细胞浸润,经 EGCG 治疗后肺部炎性细胞浸润显著减少;BALF 中炎性细胞,特别是嗜酸性粒细胞计数较对照组明显升高($P < 0.01$);白细胞介素(IL)-4、IL-5 水平较对照组明显升高($P < 0.01$),Foxp3⁺ T 细胞比例显著下降($P < 0.01$),Th1 细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)无显著变化,治疗组与模型组相比细胞计数、IL-4 和 IL-5 水平、Foxp3⁺ T 细胞比例显著增加,与对照组相比无显著差异;IL-10 水平显著升高。结论 EGCG 可有效抑制哮喘模型小鼠呼吸道变应性炎症,其作用途径可能是通过诱导 Foxp3⁺ T 细胞的产生和 IL-10 的分泌,进而抑制 Th2 型免疫反应,这提示 EGCG 也许可以应用于哮喘的辅助治疗。

关键词:模型,动物; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 变态反应性炎症

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)15-1673-03

Effects of epigallocatechin-3-gallate on the allergic airway inflammations in mice models

Wu Kui¹, Chen Zhang¹, Bi Yutian², Xiao Zhenliang^{1△}

(1. Department of Respiratory Diseases, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610038, China;

2. Department of Respiratory Diseases, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on C57BL/6 mice models with airway allergic inflammation sensitized and challenged with ovalumin (OVA). **Methods** C57BL/6 mice were sensitized and challenged with OVA and treated with EGCG. 24 hours after the last time of sensitization, samples of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected and detected for cell counts and classification. Levels of cytokines in BALF and plasma and the ratio of Foxp3⁺CD4⁺ T cells in peripheral blood and BALF were detected. **Results** There was obvious infiltration of inflammatory cells in model mice group and the infiltration declined after be treated with EGCG. Compared with control group, total cells counts, eosinophil counts and levels of IL-4 and IL-5 in BALF of model group enhanced significantly, levels of IL-10 decreased significantly, while levels of IFN- γ unchanged. In EGCG treated group, the infiltration of inflammatory cells and levels of IL-4 and IL-5 decreased, cytokines of Th1 unchanged and the percentages of Foxp3⁺ T cells increased significantly. **Conclusion** EGCG could efficiently inhibit the allergic airway inflammations in model mice, which might be induced by the inhibition of type Th2 immunereaction through the emerging of Foxp3⁺ T cells and the secretion of IL-10. EGCG might be able to utilized for the adjunctive therapy of asthma.

Key words: models, animal; epigallocatechin-3-gallate; allergic inflammation

支气管哮喘是由 Th2 细胞介导的、对变应原免疫耐受缺陷的疾病^[1]。在其发生、发展过程中,由于调节性 T 细胞作用的缺失,使得患者在接触变应原时,对 Th2 反应的调节作用减弱,Th2 细胞分泌大量白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-9、IL-13 等 Th2 型细胞因子,诱导产生呼吸道炎症反应,使呼吸道黏液分泌增加、平滑肌痉挛,导致呼吸道狭窄,使患者出现喘息、呼吸困难等症状^[2-3]。

哮喘全球防治倡议(GINA)对哮喘的治疗进行了规范,建议长期规律使用吸入性皮质激素/长效 β_2 受体激动剂进行治疗。但该治疗方案存在以下几个问题:其一是费用较高,部分患者无法承受,笔者在临床中经常遇到因为费用较高而无法坚持治疗的患者;其二是患者对长期使用激素存在着一定的顾虑,这多见于有一定文化程度的患者;其三是使用期间出现了不良反应,如声音嘶哑等;其四是使用方法比较复杂,不容易掌握;另外还有一部分患者,虽然经过了正规治疗,仍然无法控制病情。鉴于此,在哮喘的治疗中,仍然需要进一步寻找有效、方

便、廉价的治疗或辅助治疗方法。

茶叶的活性成分主要是茶多酚,而其中起主要作用的是表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)。研究发现,EGCG 具有抗氧化、清除自由基、抑制多种细胞因子的分泌及信号转导、促进细胞凋亡等作用^[4-10]。最近研究发现,EGCG 还具有诱导调节性 T 细胞的作用^[11],因此笔者推测 EGCG 也可以在哮喘的治疗中发挥一定的作用。笔者拟观察 EGCG 对哮喘模型小鼠肺部变应性炎症及外周血辅助性 T 细胞(Th)亚型的影响,为研究 EGCG 在哮喘中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 纯化尘螨卵蛋白(OVA)为美国 Sigma 公司产品,IL-4、IL-5、干扰素 γ (IFN- γ)、IL-10 ELISA 检测试剂盒购自美国 BD 公司,荧光标记的抗 Foxp3、CD4、CD25 抗体及同型对照抗体购自美国 eBioscience 公司,EGCG 为瑞士罗氏公司产品。

△ 通讯作者, E-mail: xiaozhenliang2001@yahoo.com.cn.

1.1.2 哮喘动物模型的复制及分组 6~10 周雄雌性不拘的 C57BL/6 小鼠,平均体质量 202 g,由重庆医科大学动物中心提供。动物分为正常对照组(对照组)、OVA 致敏/激发组(模型组)、EGCG 治疗组(治疗组),每组各 8 只。模型组及治疗组分别于第 1、8 天注射腹腔 1% OVA-生理盐水混悬液各 1 mL,于第 15~21 天每天定时雾化吸入 1% OVA-生理盐水混悬液 30 min,雾化器产雾量为 0.5 mL/min。对照组致敏及激发步骤同模型组,每次注射相同体积的生理盐水,雾化吸入生理盐水。治疗组每日饮水中加入 0.3% EGCG。

1.2 方法

1.2.1 支气管肺泡灌洗和取血 在第 22 天(最后一次雾化吸入激发后 24 h),以 0.3% 戊巴比妥 0.3 mL 腹腔注射麻醉,切开气管,插管,PBS 0.2 mL/次,灌洗 2 次,灌洗液回收率大于 80%。眼窝取血,滴入肝素至抗凝管内,5 000 r/min 离心 5 min,血清移至另一干净 Eppendorf 管,-20 °C 保存待测。

1.2.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞总数和分类计数 取 BALF,1 500 r/min 离心 10 min,收集上清液,-70 °C 保存,以备测定 IL-4、IL-5 和 IFN- γ ,细胞沉淀用 0.1 mL PBS 重悬,取少许用于细胞计数,计算出每毫升的细胞数。其余细胞沉淀再次离心后,弃上清液,用少许 PBS 重悬后,涂片,晾干后瑞氏染色。光学显微镜下计数 500 个非鳞状上皮细胞,并进行嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞分类计数,计算各自所占的百分比。

1.2.3 细胞因子检测 BALF 和血细胞因子 IL-4、IL-5、IL-10 和 IFN- γ 的检测参照浆中 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.2.4 流式细胞检测 取肝素抗凝小鼠眼底血 1.5 mL。在试管内加入淋巴细胞分离液 3 mL。将外周血以等体积 Hanks 液稀释后,轻轻加入淋巴细胞分离液上层。2 000 g 离心 20 min。取出试管后,轻轻吸取液相交的单核细胞,加入 Hanks 液 3 mL,混匀后,1 500 g 离心 5 min。弃去上清液,细胞加入完全培养基调整淋巴细胞浓度为 2×10^8 /mL,根据说明书以流式细胞仪检测 Foxp3⁺ CD25⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例。BALF 中细胞以完全培养基调整细胞浓度为 2×10^8 /mL,根据说明书以流式细胞仪检测 Foxp3⁺ CD25⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALF 细胞学改变 小鼠经 OVA 雾化吸入激发后,小鼠呼吸道和周围肺组织出现包括淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和单核巨噬细胞在内的多种炎性细胞浸润,BALF 中细胞总数及各类炎性细胞数量显著增加,其中尤以嗜酸性粒细胞增加更为明显。BALF 细胞总数和分类计数结果表明,与对照组相比,模型组 BALF 中细胞总数显著增多,嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和中性粒细胞比例显著升高(*P* < 0.01)。在治疗组中,细胞总数、细胞分类计数均较模型组显著下降,与对照组无明显差异。细胞总数和分类计数结果见表 1。

2.3 BALF 和血浆中 IL-4、IL-5、IL-10、IFN- γ 的水平 小鼠变态反应性炎症是由 Th2 反应所介导的,CD4⁺ T 细胞呈现典型的 Th2 型反应,表现为 IL-4、IL-5 等 Th2 型细胞因子增高,而 IFN- γ 等 Th1 型细胞因子降低。为判断 EGCG 对 Th2 型反应的作用,笔者检测了 BALF 和血浆中 IL-4、IL-5 以及 Th1 型细胞因子 IFN- γ 和调节性细胞因子 IL-10 的水平。结果表明:模型组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5 水平较对照组明显升高(*P* < 0.01),IFN- γ 水平和对照组相比无显著差异,而 IL-10 水平较对照组显著降低(*P* < 0.01),经 EGCG 治疗后,IL-4、IL-5 水平显著下降,而 IL-10 水平显著升高,与对照组相比无显著差异;各组 IFN- γ 水平均无显著差异。血浆中各细胞因子出现类似表现。见表 2~3。

表 1 各组小鼠 BALF 中的细胞总数和分类计数的变化

组别	n	细胞总数 ($\times 10^5$ /mL)	细胞分类计数(%)		
			中性粒细胞	淋巴细胞	嗜酸性粒细胞
对照组	8	2.25 \pm 0.84	5.45 \pm 1.42	9.54 \pm 2.38	0.34 \pm 0.21
模型组	8	8.55 \pm 2.42*	11.35 \pm 2.09*	19.55 \pm 5.36*	33.65 \pm 9.3*
治疗组	8	2.37 \pm 1.04#	5.57 \pm 1.44#	8.73 \pm 2.62#	2.04 \pm 0.37#

* :*P* < 0.01,与对照组相比;# :*P* < 0.01,与模型组相比。

表 2 小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5、IL-10、IFN- γ 水平 (pg/mL)

组别	n	IL-4	IL-5	IFN- γ	IL-10
对照组	8	178.04 \pm 36.29	113.54 \pm 47.26	370.90 \pm 35.00	382.49 \pm 94.93
模型组	8	701.55 \pm 84.72*	627.94 \pm 121.39*	331.88 \pm 36.13*	99.35 \pm 22.66*
治疗组	8	151.36 \pm 44.49#	117.90 \pm 22.43#	344.43 \pm 41.58#	393.88 \pm 79.85#

* :*P* < 0.01,与对照组相比;# :*P* < 0.01,与模型组相比。

表 3 小鼠血浆中 IL-4、IL-5、IL-10、IFN- γ 水平 (pg/mL)

组别	n	IL-4	IL-5	IFN- γ	IL-10
对照组	8	97.52 \pm 35.27	84.14 \pm 16.60	245.54 \pm 38.76	332.77 \pm 45.36
模型组	8	354.45 \pm 43.42*	289.30 \pm 36.88*	235.57 \pm 25.65	89.88 \pm 30.05*
联合组	8	94.46 \pm 29.44#	79.33 \pm 19.78#	259.53 \pm 35.57	346.72 \pm 67.42#

* :*P* < 0.01,与对照组相比;# :*P* < 0.01,与模型组相比。

2.4 BALF 中 CD4⁺ T 细胞亚型的变化 结果表明,哮喘组小

鼠外周血 CD4⁺ T 细胞中,Foxp3⁺ T 细胞比例较对照组显著

下降,经 EGCG 治疗后 Foxp3⁺ T 细胞比例显著上升,与对照组水平无显著差异;在对照组 BALF 中, Foxp3⁺ T 细胞比例显著低于外周血,模型组 Foxp3⁺ T 细胞比例较对照组有所下降,而 EGCG 治疗后, BALF 中 Foxp3⁺ T 细胞的比例显著升高,见表 4。

表 4 小鼠外周血 CD4⁺ T 细胞中 Foxp3⁺ T 细胞比例的变化 (%)

组别	n	外周血	肺泡灌洗液
对照组	8	11.63±3.68	7.84±2.06
模型组	8	3.49±1.92*	5.51±2.35*
联合组	8	10.92±4.27#	15.74±4.47*#

*: P<0.01, 与对照组相比; #: P<0.01, 与模型组相比。

3 讨论

在本研究中,笔者发现,EGCG 可以有效抑制 OVA 诱导的肺部变应性炎症,减少炎症细胞在肺部的募集,降低 BALF 中 Th2 型细胞因子水平,升高调节性细胞因子 IL-10 的水平,并且诱导 Foxp3⁺ T 细胞产生。

支气管哮喘是一种 Th2 型 CD4⁺ T 细胞介导的呼吸道慢性炎症性疾病, Th2 细胞通过分泌 IL-4、IL-5 和 IL-13 等细胞因子介导一系列变应性炎症^[1-2]。Th1 型反应也通过加重后期的炎症,使炎症慢性化而参与了哮喘炎症反应,而调节性 T 细胞减少及其功能的降低在哮喘炎症反应中起着重要的作用^[4-5];哮喘的自然缓解也依赖于调节性 T 细胞的产生及 IL-10 的分泌^[12]。

调节性 T 细胞有 2 个主要亚型,即 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞和分泌 IL-10 的 I 型调节性 T 细胞(Tr1),虽然第 1 种调节性 T 细胞在体外实验中主要依靠细胞接触而发挥作用,但体内实验却证明 IL-10 的分泌起着重要的作用;对于第 2 种调节性 T 细胞而言,其功能的发挥主要依靠分泌 IL-10,使用 IL-10 拮抗性抗体阻断后可以完全抑制 Tr1 细胞的调节功能。由此可知,IL-10 是一种重要的调节性细胞因子,在调节性 T 细胞功能中发挥着重要的作用,对哮喘的发病也起着重要的调节作用。

研究发现,EGCG 可以有效抑制哮喘豚鼠肺部去氧自由基(ROS)的产生,并抑制 NO 合成酶的活性^[13]。EGCG 通过抑制基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的产生和 ROS 形成而调节炎症细胞的迁移,进而抑制哮喘的肺部炎症^[14]。EGCG 还可以通过抑制 DNA 甲基转移酶而诱导 Foxp3 和 IL-10 的表达^[11-15]。与以往的研究相符,本研究发现,EGCG 可以有效地抑制哮喘小鼠肺部变应性炎症,降低 Th2 型细胞因子的分泌,并增加调节性细胞因子 IL-10 的分泌,升高 Foxp3⁺ T 细胞的比例。在本研究中,笔者还发现,在正常小鼠 BALF 中,虽然 Foxp3⁺ T 细胞的比例较对照组高,但考虑到对照组小鼠 BALF 中细胞总数显著低于模型组,因此其 Foxp3⁺ T 细胞的总数是显著少于模型组的,这可能反应了对照组小鼠并未对 OVA 致敏,在接触到 OVA 时,反应仍以正常的免疫耐受为主,因此不需要产生较多的调节性 T 细胞来调节过度的 Th2 免疫反应。因此可以推测,EGCG 能通过诱导 IL-10 和 Foxp3 的表达,而诱导分泌 IL-10 的 Tr1 和表达 Foxp3 的调节性 T 细胞产生,进而抑制变应原诱导的 Th2 型免疫反应。本研究结果提示,EGCG

也许可以应用于哮喘的辅助治疗。

参考文献

- [1] Siegle JS, Hansbro N, Dong C, et al. Blocking induction of T helper type 2 responses prevents development of disease in a model of childhood asthma[J]. Clin Exp Immunol, 2011, 165(1): 19-28.
- [2] Assa'ad A. Allergy, asthma, and immunology[J]. Pediatr Ann, 2011, 40(4): 179-180.
- [3] Yamamoto Y, Negoro T, Hoshi A, et al. Impaired Ca regulation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from pediatric Asthma[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2011, 156(2): 148-158.
- [4] Yang WH, Fong YC, Lee CY, et al. Epigallocatechin-3-gallate induces cell apoptosis of human chondrosarcoma cells through apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(6): 1601-1611.
- [5] Shen Q, Tian F, Jiang P, et al. EGCG enhances TRAIL-mediated apoptosis in human melanoma A375 cell line[J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2009, 29(6): 771-775.
- [6] Wu D, Guo Z, Ren Z, et al. Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(5): 636-643.
- [7] Zhong Y, Shahidi F. Lipophilized epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives as novel antioxidants[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(12): 6526-6533.
- [8] Zheng Y, Morris A, Sunkara M, et al. Epigallocatechin-gallate stimulates NF-E2-related factor and heme oxygenase-1 via caveolin-1 displacement[J/OL]. J Nutr Biochem 2011[2011-03-29]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286311000155>.
- [9] Tudoran O, Soritau O, Balacescu O, et al. Early transcriptional pattern of angiogenesis induced by EGCG treatment in cervical tumor cells[J/OL]. J Cell Mol Med, 2011[2011-05-24]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2011.01346.X>.
- [10] Liu X, Zhang DY, Zhang W, et al. The effect of green tea extract and EGCG on the signaling network in squamous cell carcinoma. Nutr Cancer, 2011, 63(3): 466-475.
- [11] Wong CP, Nguyen LP, Noh SK, et al. Induction of regulatory T cells by green tea polyphenol EGCG[J]. Immunol Lett, 2011, 39(1/2): 7-13.
- [12] Leech MD, Benson RA, deVries A, et al. Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory cells[J]. J Immunol, 2007, 179(10): 7050-7058.
- [13] Bani D, Giannini L, Ciampa A, et al. Epigallocatechin-3-gallate reduces allergen-induced asthma-like reaction in sensitized guinea pigs[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 317(3): 1002-1011.
- [14] Kim SH, Park HJ, Lee CM, et al. Epigallocatechin-3-gallate protects toluene diisocyanate-induced airway inflammation in a murine model of asthma[J]. FEBS Lett, 2006, 580(7): 1883-1890.
- [15] Medina-Franco JL, López-Vallejo F, Kuck D, et al. Natural products as DNA methyltransferase inhibitors: a computer-aided discovery approach[J]. Mol Divers, 2011, 15(2): 293-304.