

玉屏风散对小鼠胸腺上皮细胞介导的皮肤 T 淋巴细胞功能的影响

马丽¹ 沈佳曼² 黄芬² 郭文琴² 高建莉³

1.浙江中医药大学基础医学院 杭州 310053 2.浙江中医药大学药学院 3.浙江中医药大学中医药科学院

摘要: [目的]研究益气固表经典方玉屏风散(Yupingfeng Powder, YPF)对 BALB/c 小鼠胸腺上皮细胞(thymic epithelial cells, TECs)介导的小鼠皮肤 T 淋巴细胞功能的影响。[方法](1)离体器官培养法研究 YPF 对 BALB/c 小鼠表皮淋巴细胞的影响及 TECs 在该过程中的作用。分离 BALB/c 小鼠皮肤组织和原代 TECs 细胞,设对照组(正常培养皮肤组织),YPF 低、中、高剂量组(皮肤组织予 25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ YPF 处理)、TEC 共培养组(TECs 与皮肤组织共培养)、TEC+YPF 低、中、高剂量组(TECs 与皮肤组织共培养,同时分别加入 25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ YPF 处理),以上各组培养 72h 后以免疫组化法检测皮肤组织中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞的数量。(2)研究 YPF 对 BALB/c 小鼠胸腺细胞、脾细胞的影响及 TECs 在该过程中的作用。分离小鼠脾淋巴细胞和胸腺细胞,以噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)法检测 25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ YPF 对脾淋巴细胞和胸腺细胞增殖的影响。再采用 TECs 分别与脾淋巴细胞或胸腺细胞共培养,以对照培养液或上述浓度 YPF 处理 48h,流式细胞术检测脾淋巴细胞和胸腺细胞中 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺T 细胞数量及 CD4⁺/CD8⁺细胞比值的变化,酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测脾淋巴细胞和胸腺细胞中 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白介素-2(interleukin-2, IL-2)和 IL-4 的表达水平。(3)研究 YPF 对 BALB/c 小鼠 TEC 增殖及功能的影响。25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ YPF 直接干预 TECs 48h,MTT 法检测 YPF 对 TECs 增殖的影响,实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)检测 TECs 中胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)、信号传导及转录激活因子 3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-7、IL-12 和 IL-17 mRNA 水平变化,ELISA 检测 TECs 分泌 IL-7 的水平。[结果](1)与对照组比较,TECs 与皮肤组织共培养后,皮肤中 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺T 细胞数量增加。YPF 处理后增加更明显。(2)不同浓度 YPF 对脾淋巴细胞和胸腺细胞均有促增殖作用($P<0.01$);与脾淋巴细胞、胸腺细胞单独培养组比较,脾淋巴细胞、胸腺细胞与 TECs 共培养,并采用不同剂量 YPF 处理后 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞数均显著升高,其中脾淋巴细胞+TECs+高剂量 YPF 组和胸腺细胞+TECs+各剂量 YPF 组中 CD4⁺/CD8⁺比值显著升高($P<0.05$, $P<0.01$);ELISA 结果显示,TECs 与脾淋巴细胞或胸腺细胞共培养后,采用不同剂量 YPF 处理,IFN- γ 水平均升高,YPF 中、高剂量组 IL-2 水平升高($P<0.05$)。 (3)不同浓度 YPF 处理能显著下调 TECs 中 TSLP、STAT3、TNF- α 、IL-12 和 IL-17mRNA 水平,显著上调 IL-7 mRNA 水平($P<0.01$),增加 TECs 分泌 IL-7 的水平($P<0.05$, $P<0.01$)。[结论]YPF 可增强 TECs 介导的皮肤 T 细胞数量增殖,并刺激 IFN- γ 等细胞因子分泌。YPF 还能够促进脾淋巴细胞和胸腺细胞的增殖,增强其功能,并促进 T 细胞向 Th1 细胞分化,其机制可能与 YPF 能促进 TECs 分泌 IL-7 有关。本研究提示,YPF 具有潜在的促进胸腺介导的皮肤 T 淋巴细胞免疫功能的作用。

关键词: 玉屏风散;胸腺上皮细胞;胸腺细胞;淋巴细胞;皮肤免疫功能;益气固表

中图分类号: R331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-5509(2020)10-0941-08

DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2020.10.003

Effect of Yupingfeng Powder on the Function of Skin T Lymphocyte Mediated by Thymic Epithelial Cells in Mice MA Li¹, SHEN Jiaman², HUANG Fen², et al 1.School of Basic Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou(310053), China; 2.Pharmacy College, Zhejiang Chinese Medical University

Abstract: [Objective] To study the effect of classic prescription of tonifying Qi and consolidating exterior Yupingfeng Powder(YPF) on skin T lymphocyte function mediated by thymic epithelial cells(TECs) in BALB/c mice. [Methods](1) The effect of YPF on epidermal lymphocytes of BALB/c mice and the role of TECs in this process were studied by organ culture in vitro. BALB/c mice skin tissue and primary TECs cells were isolated and divided into control group(normal culture skin tissue), YPF low, medium and high dose groups(YPF-L, M and H, skin tissue treated with 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ YPF), TECs co-culture group(TECs + skin tissue), TECs + YPF groups(TECs+skin tissue, treated with 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ YPF, respectively). The number of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells in skin tissue was detected by immunohistochemistry after 72 hours of culture.(2)To study the effect of YPF on spleen lymphocytes and thymocytes of BALB/c mice and the role of TECs in this process. Spleen lymphocytes and thymocytes were isolated from mice. The effects of YPF(25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on proliferation of spleen lymphocytes and thymocytes were detected by thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT) method. Then, TECs were co-cultured with spleen lymphocytes or thymocytes respectively, and treated with control medium or with YPF at the cocentration above for 48h. The number of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ cells in spleen lymphocytes and thymocytes were detected by flow cytometry. The expression levels of interferon- γ (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2) and IL-4 in spleen lymphocytes and thymocytes were detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). (3) To study the effect of YPF on the proliferation and function of TECs in BALB/c mice. The effects of YPF on the proliferation of TECs were detected by MTT assay. The mRNA levels of thymic stromal lymphopoietin(TSLP), signal transducers and activators of

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81473575);浙江省自然科学基金一般项目(LY17H160061,LY19H280010)

Fund projects: General Program of National Natural Science Foundation Project(81473575); General Program of Zhejiang Natural Science Foundation Project(LY17H160061,LY19H280010)

通讯作者:高建莉,E-mail: jianligao@zcmu.edu.cn

transcription 3 (STAT3), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-7, IL-12 and IL-17 in TECs were detected by quantitative real-time PCR(qPCR). The level of IL-7 secreted by TECs was detected by ELISA. [Results](1) Compared with control group, the number of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells in skin was increased in TECs co-culture group. The increase was more obvious after YPF treatment. (2) The results showed that different doses of YPF could promote the proliferation of spleen lymphocytes and thymocytes ($P<0.01$). Compared with spleen lymphocytes and thymocytes alone, the number of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T cells in the co-culture groups (spleen lymphocytes or thymocytes + TECs + different doses of YPF) significantly increased. Among which, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in spleen lymphocyte + TECs + YPF-H group and thymocyte + TECs + each dose of YPF groups were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). ELISA results showed that IFN- γ levels increased after spleen lymphocytes or thymocytes were co-cultured with TECs, and IL-2 level in YPF-M and YPF-H groups increased ($P<0.05$). (3) The levels of TSLP, STAT3, TNF- α , IL-12 and IL-17 in TECs + different doses of YPF were significantly down-regulated, and the level of IL-7 mRNA was significantly up-regulated ($P<0.01$). The level of IL-7 secreted by TECs also increase ($P<0.05$, $P<0.01$). [Conclusion] YPF can enhance the proliferation of skin T cells mediated by TECs and stimulate the secretion of IFN- γ and other cytokines. YPF can also promote the proliferation and function of spleen lymphocytes and thymocytes, and promote the differentiation of T cells into Th1 cells. The mechanism may be related to YPF promoting TECs to secrete IL-7. This study suggests that YPF has potential to promote thymus mediated immune function of skin T lymphocytes.

Key words: Yupingfeng Powder; thymic epithelial cells; thymocytes; lymphocyte; skin immune function; tonifying Qi and consolidating exterior

玉屏风散(Yupingfeng Powder, YPF)是益气固表的经典名方,药味简单、疗效显著,对腠理不固(相当于以皮肤常驻T淋巴细胞等为关键效应细胞的真皮免疫系统功能低下)疗效确切,临床应用广泛,对过敏性皮炎、慢性湿疹、慢性荨麻疹等免疫失调性皮肤病具有显著的疗效^[1-2]。药理学研究发现,YPF及其组方药物黄芪、防风和白术具有调节免疫、抗炎、抗病毒及抗老化等作用^[3-4]。

皮肤是人体的第一道防御体系,皮肤中包含T淋巴细胞、B淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cells, DCs)等多种免疫细胞^[5],其中主要免疫细胞为T淋巴细胞,简称T细胞,表皮中主要为CD8⁺ T细胞,真皮中主要为CD4⁺ T细胞,数量是血液循环中T细胞数量的2倍^[6]。皮肤中各种T细胞最初源于胸腺,胸腺是中枢免疫器官,是T细胞分化、发育、成熟的场所,而胸腺上皮细胞(thymic epithelial cells, TECs)是维持胸腺功能的关键细胞,其分泌的胸腺素等细胞因子为T细胞的分化成熟提供必需的微环境和条件。关于YPF对胸腺介导的皮肤免疫环境的影响,目前尚未见报道。

课题组前期研究发现,胸腺缺陷的乳腺癌荷瘤小鼠会发生皮下转移,并较早发生肺转移,而胸腺完整的荷瘤小鼠未出现这种现象,提示胸腺功能缺失会导致皮肤相关免疫功能的下降。而TECs分泌的白介素-7(interleukin-7, IL-7)、IL-12和胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)等均能影响免疫细胞功能,由此笔者推测TECs对皮肤免疫功能的正常发挥至关重要,结合YFP益气固表的传统功效,本研究拟探索YPF在TECs影响皮肤免疫功能的过程中所起到的作用,以期为该方的药理研究及临床应

用提供参考。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 健康无特定病原体动物(specific pathogen free, SPF)级雌性BALB/c小鼠9只,4~6周龄,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016]。YPF购自浙江中医药大学滨江门诊部,由黄芪60g、防风20g、白术20g组成。药材加8倍体积蒸馏水,加热提取2次,每次2h,抽滤后合并药液,旋转蒸发后,冷冻干燥制得浸膏,浸膏得率9.23%。小鼠TSLP重组蛋白购于R&D Systems公司(批号:555-TS-010);CD3、CD4、CD8抗体购于Santa Cruz公司(批号:SC-18871、SC-13573、SC-18913);TSLP抗体购于abcam公司(批号:ab188766);CD3、CD4、CD8抗体购于BD Pharmingen公司(批号:563061、553051、553032);噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)试剂购于德国Biofrox公司(批号:EZ2811D347);通用型二步法免疫组化检测试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司(批号:K185910E);小鼠IL-2、IL-4、IL-7、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)酶联免疫检测(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、2 $\times$ SG Fast实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)试剂盒、cDNA逆转录试剂盒均购于生工生物工程(上海)股份有限公司(批号:D720181-0096、D720336-0096、D720369-0096、D720175-0096、B639271-0005、B532435-0100)。

1.2 主要仪器和设备 RM2245切片机购于德国Leica公司;Yabo400组织包埋机为常州市雅博电子设备有限公司产品;Synergy H1全自动酶标仪为美国Bio-Rad公司产品;荧光定量PCR仪为美国ABI公司产品;流式细胞仪购于美国贝克曼公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞分离与培养 按照文献[7-8]所述方法分离培养小鼠原代TECs、脾淋巴细胞和胸腺细胞,细胞分别采用含10%胎牛血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)和洛斯基·帕克纪念研究所培养基(Roswell Park Memorial Institute 1640 medium, RPMI 1640),于37℃、5%CO₂培养箱中常规培养。TECs每1~2d换液传代,传至第2代用于后续实验。脾淋巴细胞和胸腺细胞分离成功即用于后续实验。

1.3.2 免疫组化检测BALB/c小鼠皮肤组织中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T细胞数量 分离小鼠皮肤组织和TECs,将皮肤组织置于6孔板内,分别给予YPF和TSLP培养皮肤组织;将TECs均匀接种于transwell 6孔板下室,待板内TECs贴壁后,将组织块置于transwell 6孔板的上室,25、50、100μg·mL⁻¹YPF作用于TECs与皮肤组织共培养体系72h,实验分为对照组(正常培养的皮肤组织)、YPF不同剂量(25、50、100μg·mL⁻¹)组、TSLP不同剂量(2.5、5、10ng·mL⁻¹)组,并加入TECs与皮肤组织共培养,同上设置不同剂量的给药组。培养72h后,收集并固定皮肤组织,按照文献[9]方法进行检测。

1.3.3 细胞存活率检测 将脾淋巴细胞和胸腺细胞分别均匀接种于96孔板,分别再加入25、50、100μg·mL⁻¹YPF培养48h后,进行MTT检测,按照文献[9]的方法计算细胞存活率。

1.3.4 流式细胞术检测脾淋巴细胞和胸腺细胞中CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺ T细胞数量及CD4⁺/CD8⁺比值的变化 将TECs均匀接种于Transwell 6孔板下室,过夜后加入不同浓度YPF,上室分别均匀接种脾淋巴细胞和胸腺细胞,分别设置脾淋巴细胞或胸腺细胞单独培养对照组、TECs与脾淋巴细胞或胸腺细胞共培养组、TECs与脾淋巴细胞或胸腺细胞共培养加YPF低、中、高剂量(25、50、100μg·mL⁻¹)组,48h后收集上室细胞,以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤,加入多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物(peridinin-chlorophyll-protein complex, PerCP)CD3、别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)CD4和藻红蛋白(phycoerythrin, PE)CD8,避光染色15min后1 000r/min离心3min,每组加入500μL PBS,流式细胞仪检测。

1.3.5 ELISA检测脾淋巴细胞和胸腺细胞分泌IFN-γ、IL-2和IL-4的水平 按照1.3.4所述方法,分别收

集脾淋巴细胞和胸腺细胞上清液,依照IFN-γ、IL-2和IL-4 ELISA检测试剂盒说明书,检测细胞因子的水平。

1.3.6 TECs细胞存活率检测 将TECs均匀接种于96孔板,过夜后加入25、50、100μg·mL⁻¹YPF,培养48h后以MTT检测细胞存活率。

1.3.7 qPCR检测TECs中相关细胞因子mRNA表达水平 将TECs均匀接种于6孔培养板,过夜后给予25、50、100μg·mL⁻¹YPF培养48h后,收集细胞。裂解细胞并提取总RNA,逆转录为cDNA,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde -3 -phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参基因进行扩增。按照说明书配制反应液,反应条件:94℃预变性4min,1个循环;94℃变性30s,59℃退火30s,72℃延伸31s,共41个循环。分别检测TSLP、信号传导及转录激活因子3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、IL-7、IL-12和IL-17的mRNA表达,以2^{-ΔΔCt}法计算目的基因相对表达量。所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表1。

1.3.8 ELISA检测TECs分泌IL-7的水平 按照1.3.7所述方法培养TECs并收集细胞上清液,按照IL-7 ELISA检测试剂盒说明书检测IL-7的水平。

1.4 统计学分析 应用SPSS 20.0统计软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本t检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组皮肤组织CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺ T细胞数量比较 与对照组比较,TECs+YPF-M组皮肤组织内CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺ T细胞数量增加,且CD3⁺和CD4⁺ T细胞数量增加较明显;而未加入TECs共培养的YPF-M组和TSLP-M组皮肤组织内CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺ T细胞数量无明显变化。见图1。说明TECs介导的皮肤组织内T淋巴细胞数量增加与TECs分泌的TSLP无关;在TECs的介导下,YPF能够促进皮肤组织内T淋巴细胞的数量增加。

2.2 YPF对脾淋巴细胞增殖及TECs介导的脾淋巴细胞功能的影响 脾淋巴细胞单独培养时,与脾淋巴细胞单独培养对照组比较,YPF 25、50、100μg·mL⁻¹分别干预48h可促进脾淋巴细胞的增殖,细胞增殖率

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

基因名称	引物序列
GAPDH	上游:5'-GGCTGCCCAGAACATCAT-3'
	下游:5'-CGGACACATTGGGGGTAG-3'
TSLP	上游:5'-AGCCAGCTTGCTCCTGAAA-3'
	下游:5'-GGCAAATGTTTTGTCGGGA-3'
STAT3	上游:5'-TAGTGTGCTCAGTTGTCCCC-3'
	下游:5'-GCCCTTCACGGTAACTCTCA-3'
IL-7	上游:5'-TCTGCTGCCTGTCACATCATC-3'
	下游:5'-GGACATTGAATTCTCACTGATATTCA-3'
IL-12	上游:5'-AGACTCCCTGGACGTTTGTGTC-3'
	下游:5'-ATCGGCCTCTTCACACACAT-3'
IL-17	上游:CCTGCTGTTTAGCTGCTGGA
	下游:GGGTGCACTCGTAAAAACAC
TNF-α	上游:TACAGCGACACTTGACACCC
	下游:TGCGGACCATAGAGACTGGA

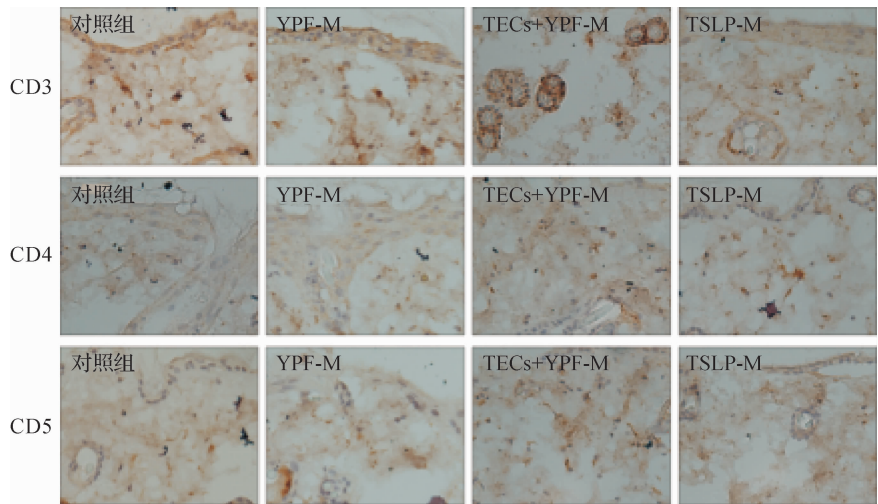


图1 YPF对BALB/c小鼠皮肤组织内CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺T细胞数量的影响(400×)

Fig.1 Effect of YPF on the number of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺T cell in BALB/c mice skin(400×)

分别增加至 $136.17 \pm 15.30 (P < 0.01)$ 、 $155.71 \pm 24.79 (P < 0.01)$ 、 $175.19 \pm 19.83 (P < 0.01)$ 。加入TECs共培养后,YPF各剂量组中CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺T细胞百分比均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中YPF高剂量组CD4⁺/CD8⁺比值显著升高($P < 0.01$)。ELISA结果显示,TECs与脾淋巴细胞共培养时YPF处理各剂量组脾淋巴细胞分泌的IFN- γ 水平升高,中、高剂量组IL-2水平升高($P < 0.05$),IL-4的水平无明显变化($P > 0.05$)。见表2。

2.3 YPF对胸腺细胞增殖及TECs介导的胸腺细胞功能的影响 胸腺细胞单独培养时,与胸腺细胞单独培养对照组比较,YPF 25、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 分别干预48h

可促进胸腺细胞的增殖,细胞增殖率分别增加至 $134.88 \pm 22.04 (P < 0.01)$ 、 $136.86 \pm 21.13 (P < 0.01)$ 、 $144.20 \pm 115.07 (P < 0.01)$ 。加入TECs共培养后,ELISA结果显示TECs与胸腺细胞共培养各剂量组胸腺细胞分泌的IFN- γ 水平升高($P < 0.05$),共培养中、高剂量组IL-2水平升高($P < 0.05$),IL-4的水平无明显变化($P > 0.05$)。TECs与胸腺细胞共培养各剂量组中CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺T细胞数量和CD4⁺/CD8⁺比值显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中CD3⁺和CD4⁺T细胞数量变化较明显($P < 0.01$, $P < 0.01$)。见表3。

2.4 YPF对TECs增殖及功能的影响 与TECs对照组

马丽,等:玉屏风散对小鼠胸腺上皮细胞介导的皮肤T淋巴细胞功能的影响

表2 YPF对TECs介导的脾淋巴细胞增殖及功能的影响($n=3$)

Tab.2 Effects of YPF on the proliferation and function in spleen lymphocyte mediated by TECs($n=3$)					
指标	脾淋巴细胞 单独培养对照组	TECs 共培养组	TECs+YPF-L 共培养组	TECs+YPF-M 共培养组	TECs+YPF-H 共培养组
细胞因子($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
IL-2	2.90±0.11	2.95±0.02	3.06±0.05	3.12±0.06*	3.16±0.11*
IL-4	3.32±0.22	3.45±0.22	3.47±0.19	3.43±0.22	3.42±0.18
IFN- γ	14.31±0.57	15.09±1.06	15.79±0.59*	15.98±0.86*	15.87±0.66*
T 淋巴细胞亚群(%)					
CD3 ⁺	22.96±0.31	22.37±0.99	24.34±0.09**	24.29±0.59*	70.50±0.62**
CD4 ⁺	56.11±1.76	57.14±0.52	62.29±1.09**	60.20±1.48*	65.78±0.55**
CD8 ⁺	22.61±0.77	23.38±0.26	26.41±0.13**	26.27±0.66**	27.79±0.59**
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.73±0.08	1.72±0.15	1.79±0.07	1.62±0.04	2.28±0.15**
注:与脾淋巴细胞单独培养对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$					
Note: Compared with spleen lymphocyte single culture control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$					

表3 YPF对TECs介导的胸腺细胞增殖及功能的影响($n=3$)

Tab.3 Effects of YPF on the proliferation and fuction in thymocyte mediated by TECs($n=3$)					
指标	胸腺细胞 单独培养对照组	TECs 共培养组	TECs+YPF-L 共培养组	TECs+YPF-M 共培养组	TECs+YPF-H 共培养组
细胞因子($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
IL-2	2.95±0.06	2.99±0.14	2.99±0.10	3.12±0.04 [#]	3.12±0.04 [#]
IL-4	3.40±0.08	3.50±0.11	3.50±0.13	3.49±0.05	3.45±0.12
IFN- γ	15.27±0.68	15.90±0.64	16.96±0.77 [#]	16.74±0.41 [#]	16.68±0.36 [#]
T 淋巴细胞亚群(%)					
CD3 ⁺	18.99±0.20	19.22±1.13	47.74±1.88 ^{###}	43.79±1.88 ^{##}	48.76±0.89 ^{##}
CD4 ⁺	13.48±0.24	14.56±0.55	28.22±0.07 ^{###}	25.40±0.90 ^{##}	27.67±0.22 ^{##}
CD8 ⁺	41.55±1.19	43.02±1.97	45.70±1.67 [#]	46.70±1.95 [#]	45.94±0.50 ^{##}
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.73±0.01	0.73±0.03	0.80±0.01 ^{##}	0.77±0.02 [#]	0.79±0.00 ^{##}
注:与胸腺细胞单独培养对照组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$					
Note: Compared with thymocyte single culture control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$					

比较,YPF对TECs增殖无明显影响($P>0.05$)。qPCR结果显示,不同浓度YPF均能够显著下调TECs中TSLP、STAT3、TNF- α 、IL-12和IL-17 mRNA的表达水平,显著上调IL-7 mRNA的表达水平($P<0.01$)。见表4。

ELISA结果显示,TECs对照组IL-7水平(0.15 ± 0.02) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,YPF-L组为(0.18 ± 0.04) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,YPF-M组为(0.21 ± 0.03) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,YPF-H组为(0.23 ± 0.07) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,显著高于TECs对照组($P<0.05$, $P<0.01$),且具有剂量

表4 YPF对TECs功能的影响($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=3$)

Tab.4 Effects of YPF on the function in TECs($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=3$)						
组别	TSLP	STAT3	TNF- α	IL-7	IL-12	IL-17
TECs 对照组	1.00±0.03	1.00±0.07	1.01±0.18	1.00±0.04	1.00±0.10	1.00±0.02
YPF-L 组	0.56±0.05 ^{△△}	0.53±0.07 ^{△△}	0.25±0.04 ^{△△}	1.56±0.06 ^{△△}	0.21±0.05 ^{△△}	0.57±0.06 ^{△△}
YPF-M 组	0.88±0.00 ^{△△}	0.67±0.07 ^{△△}	0.27±0.01 ^{△△}	1.32±0.02 ^{△△}	0.13±0.02 ^{△△}	0.43±0.01 ^{△△}
YPF-H 组	0.65±0.04 ^{△△}	0.70±0.03 ^{△△}	0.19±0.01 ^{△△}	3.00±0.29 ^{△△}	0.14±0.02 ^{△△}	0.40±0.15 ^{△△}
注:与TECs对照组比较, ^{△△} $P<0.01$						
Note: Compared with TECs control group, ^{△△} $P<0.01$						

马丽,等:玉屏风散对小鼠胸腺上皮细胞介导的皮肤T淋巴细胞功能的影响

依赖性。

3 讨论

研究证实, YPF能够提高CD3⁺和CD4⁺ T细胞的数量, 还能够调节辅助性T细胞(helper T cell, Th)的分化^[10]。本研究结果表明, 在TECs介导下YPF可提高小鼠皮肤组织内T细胞的数量和功能, 体外可提高脾淋巴细胞和胸腺细胞的功能, 并促进T细胞向Th1细胞分化。

YPF可参与调节T细胞的数量及其亚群分布, T细胞源于胸腺, 并在胸腺内经过阳性选择后进入皮肤组织内参与免疫应答, 而TECs为CD4及CD8的阳性选择提供了至关重要的信号^[11], TECs分泌的TSLP等细胞因子可促进淋巴细胞的增殖与分化^[12]。本研究显示, 在TECs介导下YPF可提高小鼠皮肤组织中CD3⁺、CD4⁺及CD8⁺ T细胞的数量, 尤其是CD3⁺和CD4⁺T细胞的数量, 但YPF或TSLP直接处理时没有出现这种现象。研究发现CD3仅存在于T细胞的表面, 是成熟T细胞表面的特异性标志物, 故而常用来计数T细胞总数^[13]。CD8⁺ T细胞能够抑制各类免疫细胞, 降低机体的免疫功能, 而CD4⁺ T细胞数量与T细胞免疫功能呈正相关。本研究结果说明在TECs存在的情况下, YPF能够提高皮肤T细胞的数量和功能, 而TECs的这种作用与其分泌的TSLP无关。

细胞水平的结果显示, YPF对脾淋巴细胞和胸腺细胞均具有促增殖作用, 与以往报道的YPF及其方中药物能够抑制淋巴细胞的凋亡^[14], 并能促进淋巴细胞活化与增殖等结果一致^[4]。YPF还能够提高免疫抑制模型小鼠CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺T细胞百分比及血清INF- γ 水平, 维持免疫平衡^[15]。而TECs分泌的IL-2、IL-6、叉头框蛋白外显子(forkhead box exon1, Foxn1)、Let-7等细胞因子均可以促进T细胞的分化和选择, 从而影响T细胞亚群^[16]。本研究发现, 在TECs的介导下, YPF可提高脾淋巴细胞和胸腺细胞中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T细胞数量及CD4/CD8比值, 进一步验证了器官水平的结果。正常情况下, CD4⁺T细胞数量及CD4/CD8比值的高低与机体免疫功能的强弱呈正相关, 而CD8⁺T细胞数量与机体免疫功能呈负相关。研究发现, CD4/CD8失衡时, CD4⁺T细胞可分泌大量细胞因子从而激活体液免疫, 并进一步释放信号激活CD8⁺T细胞以维持机体的正常免疫功能^[17]。本研究结果显示, 在TECs的介导下YPF能够提高脾淋巴细胞和胸腺细胞中CD3⁺、

CD4⁺、CD8⁺ T细胞数量及CD4/CD8比值, 原因可能是CD4⁺ T细胞数量升高, 进一步分泌细胞因子或释放信号激活CD8⁺ T细胞, 使CD8⁺ T细胞的数量也相应升高以维持免疫平衡, 但CD4/CD8比值也升高了, 说明最终T细胞的免疫功能得到了增强。

CD4⁺T细胞根据分泌因子的不同可分为Th1、Th2、Th17和调节性T细胞(regulatory cells, Treg)4个亚群^[18], 其中Th1细胞分泌的INF- γ 为其特征性细胞因子, 可促进Th0细胞分化为Th1细胞, 并能够抑制Th2细胞的产生^[19]。Th2细胞分泌的特征性细胞因子IL-4可调节T、B细胞的分化, 促进Th2细胞产生免疫应答^[20]。IL-2可促进T细胞的活化与增殖^[21]。本研究结果显示, TECs干预后, YPF可提高脾淋巴细胞和胸腺细胞分泌IL-2和INF- γ 的水平, 但对IL-4的水平无明显影响, 说明TECs介导后, YPF促进了脾淋巴细胞和胸腺细胞中的T细胞向Th1细胞分化。

IL-7是T细胞、B细胞和巨噬细胞等多种免疫细胞生长发育及分化所必需的细胞因子, 对未成熟的T细胞具有强烈的刺激作用, 是T细胞生长、发育及成熟所必需的细胞因子。既往研究表明, IL-7可促进T细胞的分化, 维持幼稚T细胞在胸腺中分化, 并参与维持外周CD4⁺、CD8⁺T细胞、Th细胞等免疫细胞的稳态^[22-23]。目前研究认为, 在T细胞和胸腺细胞中, IL-7可通过活化两面神激酶(Janus kinases, JAKs)/STATs、磷酸肌醇-3-激酶(phosphatidylinositolide-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)等信号通路, 进而触发下游信号, 最终调控靶细胞的细胞周期、代谢及存活等生物学过程^[24-25]。TECs分泌的TSLP、STAT3、IL-6、IL-17和TNF- α 等也能影响免疫细胞的功能。本研究结果表明, YPF能够显著下调这些基因的水平, 上调IL-7的基因水平, 这提示IL-7可能是TECs中发挥作用的关键因子。ELISA也证实不同浓度YPF均能够增强TECs中IL-7的分泌, 进一步说明IL-7可能是发挥作用的关键因子, 因此TECs分泌的IL-7的作用机制将是后续研究的方向。

综上所述, YPF能够直接促进体外淋巴细胞的增殖, 在TECs的介导下YPF能够增强皮肤组织中T淋巴细胞的功能, 促进T细胞向Th1细胞分化, 这种作用与TECs分泌的IL-7有关。但本研究未能进一步探索TECs分泌的IL-7的作用机制, 也未能

进一步研究 YPF 中各组分发挥的作用。总之,本研究结果在一定程度上揭示了 TECs 在 YPF 提高皮肤 T 淋巴细胞数量、功能及促进 T 细胞分化上起着至关重要的作用。

参考文献:

References:

- [1] Song J, Li J, Zheng S R, et al. Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of Yupingfeng Powder on chronic bronchitis rats[J].Chin J Integr Med,2013,19(5):353-359.
- [2] Zhong Y, Wang X, Xu G, et al. Modified Yupingfeng formula for the treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review of randomized controlled trials[J].Afr J Tradit Complement Altern Med, 2014,11(1):1-14.
- [3] Bamodu O A, Kuo K T, Wang C H, et al. Astragalus polysaccharides (PG2) enhances the M1 polarization of macrophages, functional maturation of dendritic cells, and T cell-mediated anticancer immune responses in patients with lung cancer[J].Nutrients,2019,11(10):2264.
- [4] Li W, Guo S, Xu D, et al. Polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz (PAMK) relieves immunosuppression in cyclophosphamide-treated geese by maintaining a humoral and cellular immune balance[J].Molecules, 2018,23(4):932-945.
- [5] 郑松,高兴华.皮肤的免疫功能[J].实用医院临床杂志, 2015,12(2):3-8.
ZHENG Song, GAO Xinghua. Skin immune sentinels in health and disease[J].Practical J Clin Med,2015,12(2): 3-8.
- [6] Clark R A, Chong B, Mirchandani N, et al. The vast majority of CLA⁺T cells are resident in normal skin[J].J Immunol,2006,176(7):4431-4439.
- [7] 郑丹丹,欧阳军,何滔,等.小鼠胸腺上皮细胞的培养、鉴定及对淋巴细胞促增殖作用的初步研究[J].医学研究杂志, 2015,44(3):41-44.
ZHENG Dandan, OUYANG Jun, HE Tao, et al. Culture and identification of mouse thymus epithelial cells and preliminary study on promoting lymphocyte proliferation[J].J Med Res,2015,44(3):41-44.
- [8] 李磊强.红芪多糖对小鼠脾淋巴细胞免疫调节作用的实验研究[D].兰州:兰州大学,2015:48.
LI Leiqliang.Experimental study on the regulating effects of *Hedysari Radix* polysaccharide on immune function of lymphocytes in mice [D].Lanzhou: Lanzhou University, 2015:48.
- [9] 石荣珍,沈佳曼,张进宇,等.乳痈方对4T1乳腺癌小鼠胸腺上皮细胞表型变化的作用及机制研究[J].上海中医药大学学报,2020,34(1):45-56.
SHI Rongzhen, SHEN Jiaman, ZHANG Jinyu, et al. Effects and mechanisms of Ruyong Formula on phenotypic changes of thymic epithelial cells in 4T1 breast cancer mice[J].Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2020,34(1):45-56.
- [10] 沈朝斌,顾珺,林千里,等.玉屏风散与T细胞亚型表达的Meta分析[J].上海中医药杂志,2004,38(11):59-61.
SHEN Chaobin, GU Jun, LIN Qianli, et al. Meta analysis between Yupingfeng Powder and T subgroup expression [J].Shanghai J Trad Chin Med,2004,38(11):59-61.
- [11] Anderson G, Owen J J, Moore N C, et al. Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes in vitro[J].J Exp Med,1994,179 (6):2027-2031.
- [12] Zhou B, Comean M R, Smedt T D, et al. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice[J].Nat Immunol,2005,6(10):1047 - 1053.
- [13] Caprara G V, Nisini R, Castellani V, et al. Lymphocyte subsets are influenced by positivity levels in healthy subjects before and after mild acute stress [J].Immunol Lett,2017,188(5):13-20.
- [14] Hamed A, Yousefi G, Farjadian S, et al. Physicochemical and immunomodulatory properties of gum exudates obtained from *Astragalus myriacanthus* and some of its isolated carbohydrate biopolymers[J].Iran J Pharm Res, 2017,16(4):1520-1530.
- [15] 李雪嫣,张李峰,桂曼曼,等.复方玉屏风散对小鼠细胞免疫力的增强作用研究[J].西部中医药,2013,26(8):11-14.
LI Xueyan, ZHANG Lifeng, GUI Manman, et al. Study on compound Yupingfeng San oral liquid improving cellular immunity of mice [J].West J Trad Chin Med,2013,26(8): 11-14.
- [16] Anderson G, Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection[J].Trends Immunol,2012,33(6):256-263.
- [17] 马越腾.外周血中CD4⁺T、CD8⁺T淋巴细胞水平变化与急性冠脉综合征的相关性研究[D].太原:山西医科大学,2019: 22-25.
MA Yueteng.The correlation between the level changes of CD4⁺T and CD8⁺T lymphocytes in peripheral blood and acute coronary syndrome[D].Taiyuan:Shanxi Medical University,2019:22-25.
- [18] Rodriguez R S, Pauli M L, Neuhaus I M, et al. Memory regulatory T cells reside in human skin[J].J Clin Invest,2014,124(3):1027-1036.
- [19] Schoenborn J R, Wilson C B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses[J].Adv Immunol,2007,96(7):41-46.
- [20] 胡洪慧,王凤山,凌沛学.白细胞介素-4的研究进展[J].中国药理学杂志,2005,40(10):721-725.
HU Honghui, WANG Fengshan, LING Peixue. Research progress of interleukin-4[J].Chin Pharmac J,2005,40(10): 721-725.
- [21] 贾艳敏,格根塔娜.IL-2与口腔黏膜相关性疾病的研究进

马丽,等:玉屏风散对小鼠胸腺上皮细胞介导的皮肤T淋巴细胞功能的影响

展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(25):81-82.

JIA Yanmin, Gegentana. Research progress of interleukin-2 and oral mucosa-related diseases[J]. World Lat Med Inform, 2019, 19(25):81-82.

- [22] Watson J D, Morrissey P J, Namen A E, et al. Effect of IL-7 on the growth of fetal thymocytes in culture[J]. J Immunol, 1989, 143(4):1215-1222.

- [23] Jiang Q, Huang J, Li W Q, et al. Role of the intracellular domain of IL-7 receptor in T cell development[J]. J Immunol, 2007, 178(1):228-234.

- [24] Dibirdik I, Langlie M C, Ledbetter J A, et al. Engagement of interleukin-7 receptor stimulates tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, clonal proliferation of human T-lineage acute lymphoblastic leukemia cells[J]. Blood, 1991, 78(3):564-570.

- [25] Seckinger P, Fougereau M. Activation of src family kinases in human pre-B cells by IL-7[J]. J Immunol, 1994, 153(1):97-109.

(收稿日期:2020-04-12)

(上接第934页)

- [16] 国家风湿病数据中心及CSTAR专家共识组. 羟氯喹治疗风湿性疾病专家共识[J]. 中华风湿病学杂志, 2014, 18(3):148-150.

National Rheumatology Data Center and CSTAR Expert Consensus Group. Expert consensus of hydroxychloroquine in the treatment of rheumatic diseases[J]. Chin J Rheumatol, 2014, 18(3):148-150.

- [17] 陈祝锋, 张震宇. 昆明山海棠抑制大鼠同种异体肢体移植排斥反应的研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(10):958-960.

CHEN Zhufeng, ZHANG Zhenyu. Role of *Tripterygium hypoglaucum* hutch in preventing acute rejection in rat limb allograft[J]. J Chin Pract Diag Ther, 2019, 33(10):958-960.

- [18] 邱伟建, 肖鹏, 吴学建. 苍术素抑制白细胞介素-1 β 诱导的人骨关节炎软骨细胞炎症[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(8):1442-1444.

QIU Weijian, XIAO Peng, WU Xuejian. Atractylodesin inhibits interleukin-1 β -induced osteoarthritis of human chondrocytes[J]. Chin J Exp Surg, 2019, 36(8):1442-1444.

- [19] 吉金雨, 郭哲, 黄亚光, 等. 青藤碱抑制类风湿关节炎骨破坏机制的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(14):2338-2341, 2346.

JI Jinyu, GUO Zhe, HUANG Yaguang, et al. The research progress of sinomenine reducing bone reconstruction in rheumatoid arthritis[J]. J Pract Med, 2019, 35(14):2338-2341, 2346.

- [20] 范九梅, 马卓. 土茯苓药理学研究概述[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(8):36-37, 57.

FAN Jiumei, MA Zhuo. Research progress of *Smilax glabra* Roxb in pharmacy[J]. J Anhui Agric Sci, 2018, 46

(8):36-37, 57.

- [21] Van Nies J, Tsonaka R, Gaujoux-viala C, et al. Evaluating relationships between symptom duration and persistence of rheumatoid arthritis: Does a window of opportunity exist? Results on the Leiden early arthritis clinic and espoir cohorts[J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(5):806-812.

- [22] Boers M. Understanding the window of opportunity concept in early rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(7):1771-1774.

- [23] Raza K. Early rheumatoid arthritis is characterised by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin[J]. Arthritis Res Ther, 2019, 21(1):226.

- [24] Raza K, Falciani F, Curnow S J, et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(4):784-795.

- [25] Smith R J, Sly L M. Type II collagen-induced arthritis in the diabetic-resistant biobreeding rat: Inflammatory and histopathological features of joint pathology and effects of antiinflammatory and antirheumatic drugs on this chronic arthritic process[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1996, 277(3):1801-1813.

- [26] Omenetti S, Pizarro T T. The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome[J]. Front Immunol, 2015, 6:1-8.

- [27] 张莹, 周小莉. Th17/Treg平衡在类风湿关节炎发病和治疗中的意义[J]. 中国医药导报, 2015, 12(24):48-52.

ZHANG Ying, ZHOU Xiaoli. Significance of balance of Th17/Treg in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis[J]. Chin Med Herald, 2015, 12(24):48-52.

(收稿日期:2020-05-18)