

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 左歸丸對實驗性氣喘小鼠核轉錄因子與免疫調節之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-039-035-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中國醫藥大學中國醫學研究所

計畫主持人：高尚德

共同主持人：王志堯，李妙蓉

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 12 月 22 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

左歸丸對實驗性小鼠核轉錄因子與免疫調節之探討

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2320-B-039-35-

執行期間：92年08月1日至93年07月31日

計畫主持人：高尚德

共同主持人：王志堯、李妙蓉

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學

中 華 民 國 9 3 年 1 2 月 2 2 日

## 一、中文摘要

中醫古典醫籍中，對於氣喘之病機、症狀早已有詳細記載，並累積豐富的臨床經驗，左歸丸是明·張景岳《景岳全書》著名調理氣喘的方劑。在天竺鼠氣喘動物模式中，我們發現在緩解期餵食左歸丸可降低立即性及遲發性反應，本研究擬利用純化塵璊萃取液誘發BALB/c小鼠氣喘動物模式，研究BALB/c小鼠氣喘模型在緩解期以左歸丸治療後其呼吸道發炎細胞、T細胞與化學趨化因子(chemokine)、細胞激素、血清IgE、血清抗原特異性抗體(IgG1、IgG2a/2b)、轉錄因子NF $\kappa$ B、GATA-3及TLR2、TLR4之變化，以了解左歸丸對致敏氣喘小鼠氣喘再激發時之影響。

研究結果顯示左歸丸：(1)能明顯降低肺泡沖洗液發炎細胞總數。(2)能顯著減少肺泡沖洗液中嗜酸性白血球比例，(3)對肺泡沖洗液中CD4<sup>+</sup>-T細胞無影響。(4)對血清total IgE、抗原特異性IgG1及IgG2a/2b無影響。(5)對肺組織中TLR2、TLR4、eotaxin、RANTES、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10無影響。(6)可輕微抑制肺組織中NF $\kappa$ B之活性及明顯抑制GATA-3之活性。

綜合以上結果我們認為在氣喘緩解期餵食左歸丸可降低氣喘再激發作時呼吸道嗜酸性白血球之浸潤，輕微抑制NF $\kappa$ B之活性，並明顯抑制GATA-3之活性，其降低呼吸道阻力之機轉仍待進一步探討。

關鍵詞：左歸丸, 氣喘, 發炎細胞, 細胞激素, 轉錄因子。

## 二、英文摘要

### Abstract

In this research, we used *Dermatophagoides pteronyssinus* as a allergen to sensitized BALB/c to establish asthmatic animal model, and we evaluate the change of inflammatory cell infiltration, CD4<sup>+</sup> Tcell and the expression of TLR2、TLR4、eotaxin、RANTES、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10、NF $\kappa$ B、GATA-3 of the airway, and the change of the serum total IgE , Der P specific IgG1, Der P specific IgG2a/2b of sensitized BALB/c after Zo-Qui-Wan(ZQW) treatment to understand the effect of ZQW in murine asthma model.

The result show:

1. ZQW significantly reduced the total number of inflammatory cell in bronchoalveolar fluid (BALF) in BALB/c mice asthma model.
2. ZQW significantly decreased the eosinophil infiltration in BALF.
3. ZQW had no effect in serum total IgE, Der P specific IgG1 and Der P specific IgG2a/2b.
4. ZQW didn't change the expression of TLR2、TLR4、eotaxin、RANTES、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$  and IL-10 in lung of BALB/c mice asthma model.
5. ZQW slightly decreased the expression of NF $\kappa$ B in lung of BALB/c mice asthma model:
6. ZQW obviously decreased the expression of GATA-3 in lung of BALB/c mice asthma model.

These data suggested ZQW could decreased the eosinophil infiltration and the GATA-3 activation in lung of BALB/c mice asthma model. However, the precise mechanism of action of ZQW in asthma remains to be elucidated.

Keywords: Zo-Qui-Wan, Asthma, Transcription factor, inflammatory cell.

## 一. 前言

氣喘是全球性的重大公共衛生問題(1,2)，引發氣喘最重要的因子是過敏反應。台灣處於亞熱帶地區，因氣候潮濕，罹患過敏性疾疾病甚多，其中以過敏性鼻炎與氣喘最為常見，近年來，社會進步，工業發達，環境污染日益嚴重，過敏性疾疾病如支氣管氣喘、過敏性鼻炎，不但沒有減少，反而有增加的趨勢(3,4)。

氣喘致病機轉中，T-淋巴球對氣喘之形成、調控及氣喘呼吸道慢性發炎反應均扮演重要角色。Th2 分泌 IL-4、IL-13 能抑制 Th1 之活性，相對的，Th1 產生的 IFN- $\gamma$ 、IL-10 對 Th2 細胞亦具有負迴饋反應。研究顯示氣喘患者呈現 Th2 細胞增多的趨勢(5)，Th2 細胞可經由 IL-4、IL-5 協助 IgE 的形成及活肥大細胞與嗜酸性白血球。因此，在暴露於過敏原後，過敏性氣喘之呼吸道中 Th2 細胞在調節慢性發炎反應、維持呼吸道過度反應性和控制特异性 IgE 生成上扮演關鍵角色。

最近幾年，影響特异性免疫反應來調控 Th1 或 Th2 路徑的因子已廣泛被發現，Th1 及 Th2 細胞是由 T 輔助性前驅細胞(Th0)於抗原呈現時受其環境與遺傳雙重因素影響下發展而來。研究證據顯示 Th1 和 Th2 反應在體內是互相調節的，調節 Th1/Th2 平衡並使之趨向 Th1 優勢化，對以因 Th2 細胞為主的氣喘之治療是合理的策略(6,7)，亦提供了免疫調節劑發展之方向，尋找能調節 Th1/Th2 平衡的口服藥物是現今之研究重點。

NF $\kappa$ B 是一蛋白質轉錄因子，它是很多前發炎分子轉錄所必需，這些發炎分子在產生發炎中很重要，如黏附分子(ICAM-1)，特殊酶(iNOS、COX2)，細胞激素(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6)和 chemokines(IL-8)(8-10)，而很多證據顯示 NF $\kappa$ B 在氣喘之病理形成中扮演重要角色，類固醇在氣喘治療主要的抗發炎機轉即是抑制 NF $\kappa$ B 之活化。

左歸丸是明 張景岳《景岳全書》氣喘緩解期調整體質的名方，我們發現左歸丸能夠降低塵蟎(*Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p)誘發氣喘天竺鼠立即性與遲發性氣喘反應，本研究以 50 $\mu$ l Der P 尾部皮下注射在 day0 及 day7 致敏 ALB/c 小鼠，day14 氣管內滴入 50 $\mu$ l DerP 激發小鼠，休息 7 天再餵食左歸丸 1g/kg 連續 7 天，於 day29 天以 50 $\mu$ l DerP 氣管滴入再次激發，在 24 小時後犧牲小鼠。

利用上述 BALB/c 小鼠氣喘模式繼續深入探討 (1)左歸丸對肺組織 NF $\kappa$ B、GATA-3 活性之影響，(2)左歸丸對肺泡沖洗液中 T 細胞族群之消長，(3)左歸丸對肺組織化學趨化因子之變化與肺泡沖洗液內細胞激素之變化，(4)左歸丸對血清 total IgE、抗原特异性抗體(IgG1、IgG2a)之影響，及(5)對肺組織 TLR2、TLR4 之影響，藉以探討左歸丸其治療氣喘之分子機轉。

## 二. 研究目的

1. 左歸丸對塵蟎致敏小鼠支氣管上皮細胞 NF $\kappa$ B 與 GATA-3 活性之影響。
2. 左歸丸對塵蟎致敏小鼠細胞激素與化學趨化因子變化之影響。
3. 左歸丸對塵蟎致敏小鼠 Th1/Th2 之影響。
4. 左歸丸對塵蟎致敏小鼠血清 total IgE、Der P-specific IgG1 及 IgG2a/2b 之影響。
5. 左歸丸對塵蟎致敏小鼠肺組織 TLR2、TLR4 之影響。
6. 探討左歸丸在氣喘緩解期之免疫調節作用。

## 三. 研究方法

### (一). 左歸丸之組成與比例

熟地 10 山菜庚 3 山藥 5 懷牛膝 4  
枸杞 5 菟絲子 5 鹿角膠 3 龜板膠 3

### (二). 動物模式之建立

BALB/c 小鼠(6-8 週)購自國科會動物中心，在 day0 及 day7 以 50 $\mu$ l 溶液，內含 50 $\mu$ g Der P(佐劑: IFA)尾部皮下注射致敏，在 day14 以 50 $\mu$ l Der P(1mg/ml in PBS)氣管內滴注激發。

### (三). 實驗分組

實驗組在上述 BALB/c 小鼠動物模式中，day15 至 day21 休息七天，於 day22 至 day28 連續餵食 7 天左歸丸 1 克/公斤；對照組則於 day22 至 day28 餵食生理食鹽水，二組於 day29 以 50 $\mu$ l Der P 再次激發，day30 小鼠犧牲，作各項檢測。

### (四). T-細胞之分析

以流式細胞儀檢測帶免疫螢光之單株抗體來分析 CD3/CD4 及 CD3/CD8。

### (五). 血清中之免疫球蛋白之分型與定量

以 ELISA 檢測血清中之 total IgE、DerP-specific IgG1 及 IgG2a/2b。

### (六). semiquantitation RT-PCR

利用 RT-PCR 檢測肺組織中 TLR2、TLR4、eotaxin、RANTES、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10 RNA 之表達。

### (七). Nuclear extracts and EMSA

檢測肺組織中 NF $\kappa$ B 之表達。

### (八). Western Blot 分析

檢測肺組織中 GATA-3 之表達。

### (九). 統計分析

以 one-way ANOVA 分析各組間之差異。

## 四. 結果與討論

### (一) 支氣管肺泡沖洗液之分析

1. 左歸丸降低 Der P 再次激發後，BALB/c 小鼠肺泡沖洗液發炎細胞總數。(圖一)
2. 左歸丸降低 Der P 再次激發後，BALB/c 小鼠肺泡沖洗液中之嗜酸性白血球浸潤。  
(表一)
3. 左歸丸對 Der P 再次激發後，BALB/c 小鼠肺泡沖洗液 CD4<sup>+</sup>Tcell 無影響。

### (二) 左歸丸對 Der P 再次激發後，BALB/c 小鼠血清 Der p 特異性 IgG1 及 IgG2a/2b 無影響。 (圖二、圖三)

### (三) 左歸丸對 Der P 再次激發後，BALB/c 小鼠血清 total IgE 無影響。(圖四)

### (四) 左歸丸對 Der P 再次激發後肺組織中之 TLR2、TLR4、eotaxin、RANTES、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10 無影響。(圖五)

(五) 左歸丸輕微抑制 Der P 再次激發後 BALB/c 小鼠肺組織中 NFκB 活性(圖六)、及能明顯抑制 GATA-3 之活性(圖七)。

我們在 Der P 誘發天竺鼠氣喘動物模式中發現左歸丸能降低 Der P 再次激發時之立即性與遲發性氣喘反應，本研究利用 BALB/c 小鼠氣喘動物模式探討其降低呼吸道阻力之可能機轉，研究顯示左歸丸能較輕微抑制 NFκB 之活性，NFκB 在氣喘病理形成中佔有一重要角色，氣喘患者呼吸道中具有活化的 NFκB，與氣喘惡化有密切相關的過敏原及病毒感染皆能刺激 NFκB 之活化，氣喘中特殊之指標 RANTES 及 eotaxin 是 NFκB 依賴性的化學趨化因子(11)，臨床治療氣喘最有效的藥物-類固醇即是一很強的 NFκB 之活化抑制劑(12)，本研究中左歸丸呈現些較輕微抑制 NFκB 之表現變化，但肺組織中 RANTES 與 eotaxin 之表現並未受影響。GATA-3 選擇性表現在 Th2 而非 Th1 細胞，在 T 細胞中細胞激素基因表達上佔一非常重要角色(13-16)，尤其是 GATA-3 在 T 細胞上 IL-5 表達(15-16)，臨床上亦發現氣喘患者呼吸道 GATA-3 mRNA 表達增加(17)，動物氣喘模式中，呼吸道 GATA-3 明顯增加，若局部以 GATA-3； antisense oligonucleotides 治療，發現可成功的調降 Th2 所誘發之肺部發炎及呼吸道過度反應(18)。研究顯示左歸丸在 GATA-3 方面有較明顯之抑制作用，關於其治療氣喘之作用機轉有待更進一步的探討。

## 五. 參考文獻

1. US Centers for Disease Control and Prevention. Forecasted state-specific estimates of self-reported asthma prevalence, United States-1998. MMWR Morbid Mortal Wkly rep 1998; 1022-1025.
2. Beasley R. Crane J. Lai CK. Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. Journal of Allergy & Clinical Immunology. 105(2 Pt 2): S466-72, 2000.
3. 呂克恒，謝貴雄。台北市兒童過敏病 11 年間之變化。中兒醫誌。1988；29；104.
4. 呂克恒，謝貴雄。過去 20 年臺灣過敏罹病率之增加。中兒醫誌。1995；36；151。
5. Del Prete GF. De Carli M. D'Elis MM. Maestrelli P. Ricci M. Fabbri L. Romagnani S. Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. European Journal of Immunology. 23(7): 1445-9, 1993.
6. Wynn TA. Eltoun I. Oswald IP. Cheever AW. Sher A. Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. Journal of Experimental Medicine. 179(5): 1551-61, 1994.
7. Gavett SH. O'Hearn DJ. Li X. Huang SK. Finkelman FD. Wills-Karp M. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. Journal of Experimental Medicine. 182(5): 1527-36, 1995
8. Blackwell TS, Christmann JW. The role of nuclear factor kappa B in cytokine gene regulation. Am J Respir Cell Mol Biol 1997; 17:3-9.
9. Blackwell TS, Lancaster LH, Christman JW. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic response syndrome and new target for therapy. Intensive Care Med 1998; 24:1131-1138.
10. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kB. Ann Rev Cell Biol 1994; 10:405-455.
11. Stacy MA. Sun G. Vassalli G et al. The allergen Der P1 induced NFκB activation through interference with IκB alpha. Function in asthmatic bronchial epithelial cell. Biochem Biophys Res Commun 1997;236:522-526
12. Hancox RJ. Stevens DA. Adcock IM et al. Effects of inhaled beta agonist and corticosteroid treatment on nuclear transcription factor in bronchial mucosa in asthma. Thorax 1999;54:488-492

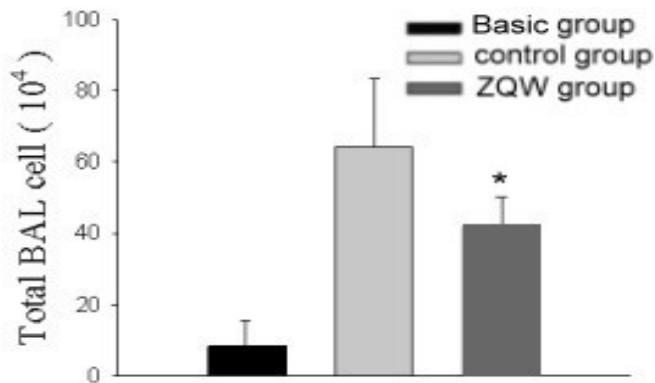
13. Zheng W., and R.A. Flavell.1997.The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4<sup>+</sup>Tcell. *Cell*: 89:587-596.
14. Ouyang. W., S.H. Ranganath, k. Weindel, D. Bhattacharya, T.L. Murphy, W. C. Sha, and K. M. Murphy, 1998. Inhibition of Th1 developmet mediated by GATA-3 through an IL-4 independent mechanism. *Immunity*. 9:745-755.
15. Lee, H. J. A.O'Garra, K. Arai, and N. Arai. 1998. Characterization of cis-regulatory elements and nuclear factors conferring Th2-specific expression of the IL-5 gene: a role for a GATA-binding protein. *J. Immunol*. 160:2343-2352.
16. Zhang, D. H., L. Cohn, P. Ray, K. Bottomly, and A. Ray.1997. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J. Biol. Chem*. 272:21597-21603.
17. Nakamura, Y., O. Chaffar, R. Olivenstein, R.A. Taha, A. Soussi-Gounni, D. H. Zhang, A. Ray, and Q. Hamid. 1999. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin. Immunol*. 103:215-222.
18. Susetta F, George T. DS, Hans AL et al. Treatment of allergic airway inflammation and Hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med*. 2001.193:1247-1261.



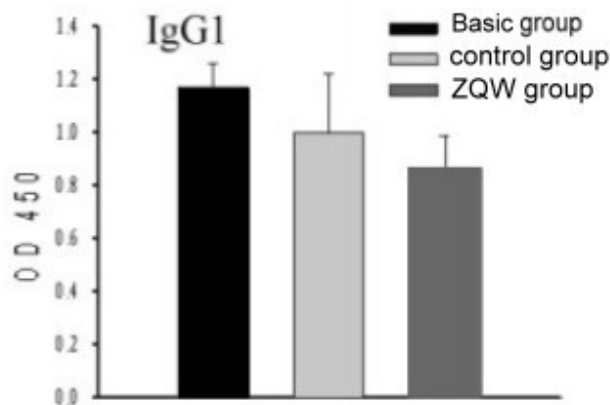
表一:各組肺泡沖洗液發炎細胞浸潤情形

發炎細胞 組別	Total cell counts ( $\times 10^4$ /ml)	Macrophages(%)	Lymphocytes(%)	Neutrophils(%)	Eosinophils(%)
Basic group	8.38 $\pm$ 7.18	5.90 $\pm$ 3.45	0.24 $\pm$ 0.22	0.05 $\pm$ 0.06	0.00 $\pm$ 0.00
Control group	64.29 $\pm$ 19.21	18.71 $\pm$ 6.56	4.70 $\pm$ 2.15	40.50 $\pm$ 12.51	4.59 $\pm$ 1.47
ZQW group	42.00 $\pm$ 8.23*	17.14 $\pm$ 1.59	5.33 $\pm$ 1.22	18.42 $\pm$ 7.90*	1.11 $\pm$ 0.60*

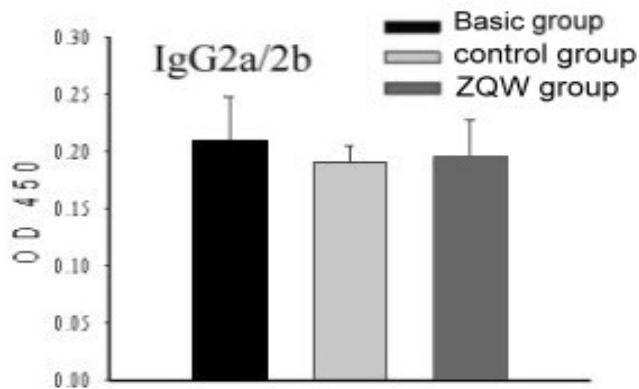
ZQW group 與 Control group 比較。\*: P < 0.05



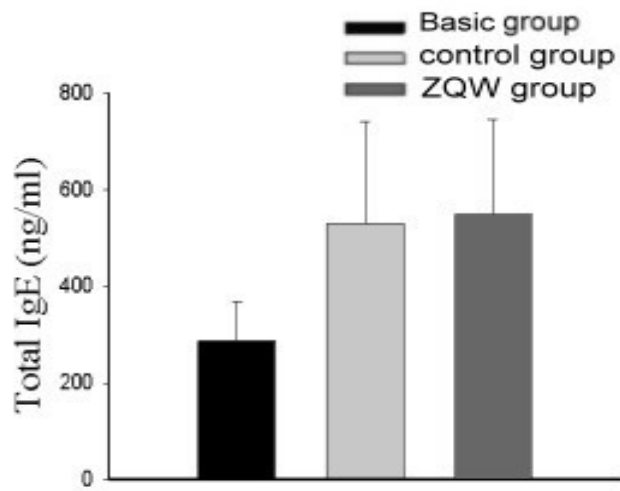
圖一:各組肺泡沖洗液發炎細胞總數  
ZQW 組與對照組比較, \*:P < 0.05



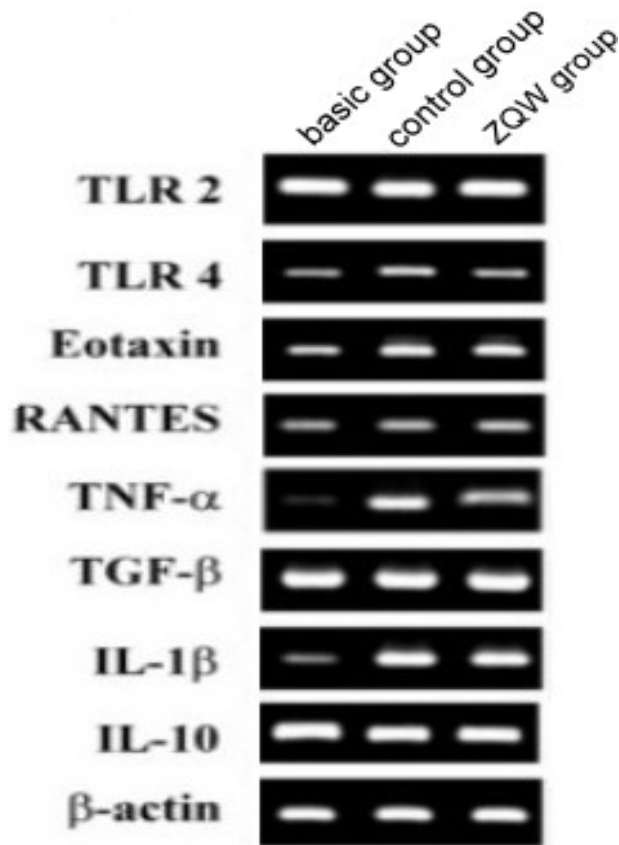
圖二:各組血清抗原特异性 IgG1



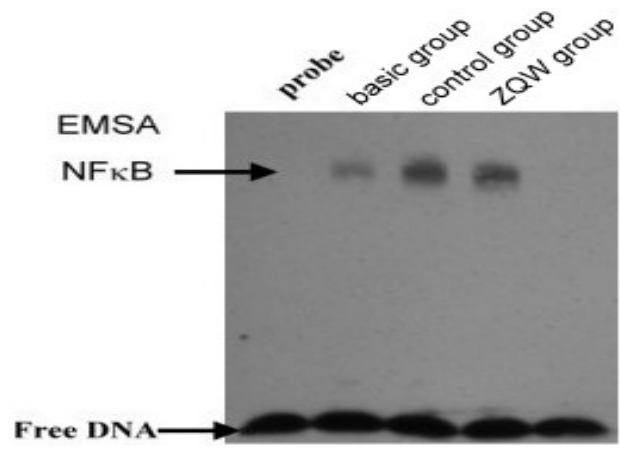
圖三:各組血清抗原特异性 IgG2a/2b



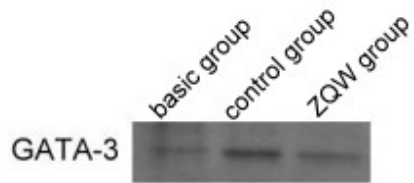
圖四:各組血清 IgE



圖五:各組肺組織各標記 mRNA 之表達



圖六:各組肺組織 NF $\kappa$ B 之表達



圖七:各組肺組織 GATA-3 之表達