

台灣中醫醫學雜誌

苓甘五味薑辛湯對反覆性塵蟎刺激氣喘小鼠之免疫調節探討

王舜德^{a,b}、林志哲^a、李世滄^a、林麗娟^a、高尚德^{b*}

a 中國醫藥大學中醫學系

b 中國醫藥大學學士後中醫學系

中華民國中醫師公會全國聯合會 發行

中華民國九十九年九月 第九卷・第三期 2010. 09.

The National Union of Chinese Medical Associations, R. O. C.

苓甘五味薑辛湯對反覆性塵蟎刺激氣喘小鼠之免疫調節探討

王舜德^{a,b}、林志哲^a、李世滄^a、林麗娟^a、高尚德^b

^a中國醫藥大學中醫學系

^b中國醫藥大學學士後中醫學系

摘要

過敏性氣喘 (allergic asthma) 是一種慢性氣管發炎疾病，肇因於Th2淋巴細胞反應失調，造成嗜酸性白血球浸潤、肥大細胞活化、上皮細胞肥大、腺細胞活化與增生，並增加氣管過度反應及黏液的增加。歐洲塵蟎 (dermatophagoides pteronyssinus, Der p) 是目前台灣造成氣喘最主要的原因之一。我們利用隔週連續5次氣管內給予Der p誘發BALB/c小鼠的慢性氣喘動物模型，來探討苓甘五味薑辛湯在治療氣喘方面的機轉。在此次實驗中我們發現苓甘五味薑辛湯可以明顯抑制Der p激發小鼠肺泡沖洗液的發炎細胞總數、單核球、嗜中性白血球和部份嗜酸性白血球。在肺泡沖洗液中，苓甘五味薑辛湯明顯抑制TGF- β 和TNF- α 濃度，且增高了Th1細胞激素IL-12的濃度。此外，肺部組織EMSA和免疫組織染色顯示，苓甘五味薑辛湯可以抑制呼吸道NF- κ B的表現。Collagen沉著分析和H.E.染色顯示苓甘五味薑辛湯可以減低呼吸道重塑的情形。在RT-PCR的實驗中，苓甘五味薑辛湯可以抑制IL-10、eotaxin、RANTES mRNA的生成。綜合以上結果顯示苓甘五味薑辛湯作用機轉可能主要是選擇性調控單核球和嗜中性白血球，而不是調控嗜酸性白血球以及和呼吸道重塑 (airway remodeling) 有關的細胞激素 (IL-10、TNF- α 、TGF- β) 和化學趨化因子 (chemokine、eotaxin、RANTES)，透過調節Th1/Th2免疫反應和抑制轉錄因子NF- κ B的活化，來減低呼吸道發炎細胞的浸潤和呼吸道重塑。

關鍵詞：過敏性氣喘、塵蟎、傳統中醫藥、苓甘五味薑辛湯

前言

氣喘是全球性的重大公共衛生問題，研究指出引發氣喘最重要的因子是過敏反應，其罹患率與致死率在過去二十年中持續增加中，由此可見氣喘治療與預防的重要性^{1,2}。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。許多研究顯示氣喘患者呈現Th2細胞增多的趨勢，Th2細胞可經由IL-4、IL-5協助IgE的形成及活肥大細胞與嗜伊紅性白血球。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異性IgE生成上扮演關鍵角色³。

近年來影響特異性免疫反應來調控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Th2細胞為主的氣喘之治療是合理的策略方法。許多實驗模型運用重組細胞激素或細胞激素拮抗劑 (如IL-12、IFN- γ 、IL-4 antagonist、IL-5 antagonist)，或者給予小分子如AS-101 (tellurium-based compound) 和OK-432 (streptococcal preparation) 可以調節Th1/Th2平衡^{4,6}，但其缺點在於直接給予此類細胞激素會造成令人憂心的副作用及缺少口服之生物可利用性而限制了療效，因此尋找能調節Th1/Th2平衡的口服藥物是現今之研究重點。

*通訊作者：高尚德

聯絡電話：0912-966584

通訊地址：40402台中市北區學士路91號 中國醫藥大學

E-mail：stkao@mail.cmu.edu.tw

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) 是DNA結合蛋白因子的家族，它是很多前發炎分子 (proinflammatory molecules) 所必須。前發炎在發炎的產生相當重要，其中包括黏附因子 (adhesion molecules)，如 ICAM-1，某些酶如 iNOS、COX2，細胞激素如 IL- β 、TNF- α 、IL-6 和 chemokines 如 IL-8^{7,9}。氣喘之病理形成與廣大的發炎蛋白表達相關，包含細胞激素、酶與黏附分子，這些皆被 NF- κ B 所調節。在臨床上，corticosteroids 重要的抗發炎機轉即是抑制 NF- κ B 活化，吸入性 budesonide 治療能戲劇性的降低支氣管黏膜之 NF- κ B 結合活性¹⁰。雖然有不少研究證據證實 NF- κ B 活化與呼吸道過度反應性之病理形成密切相關，臨床上希望能開發出安全又有效、且具專一性的抑制藥物。然而新藥的發展乃至於應用於臨床上治療疾病的研究過程，往往比既有中醫方劑中尋找其治療療效還要困難。目前文獻中已知有許多中藥對於人體免疫系統有其調節作用，因此研究中醫藥是否能夠有效調整 Th1/Th2 的平衡是近十年來研究重點。先前我們的研究發現中藥方劑可以調節 Th1 與 Th2 細胞平衡，在本研究室所建立的動物模式中不僅提供了一個塵蟎過敏老鼠之 Th 族群不平衡之研究模型，這些 Th 族群不平衡現象可能是歸因於上述之細胞激素，化學趨化因子及黏附分子 (adhesion molecules) 之相互調節所造成。

小青龍湯是東漢·張仲景《傷寒論》治療氣喘的名方，我們先前研究發現小青龍湯在調節 T 淋巴球浸潤過程中扮演重要角色，並有調節 Th1/Th2 平衡之作用¹¹。苓甘五味薑辛湯是東漢·張仲景《金匱要略》治療氣喘之重要方劑，其組成與小青龍湯類似，我們研究發現其在塵蟎致敏氣喘動物模型中有緩解氣喘之作用，但其作用與小青龍湯相比較有其差異性。

材料與方法

一、實驗目的

於本研究中，我們希望進一步了解：(1) 是否苓甘五味薑辛湯對塵蟎誘發氣喘小鼠有其抗過敏反應的作用。(2) 苓甘五味薑辛湯的抗過敏反應是否與呼吸道上皮細胞 NF- κ B 活性的調節有關。

二、研究方法

(一) 藥品製備與購買

1. 中藥製備

苓甘五味薑辛湯 (LGWWJXT, 委託 GMP 柯達製藥廠製備浸膏、桃園) 組成如表 1 所示。淨膏取 1 mL 後冷凍乾燥，計算乾重。之後將淨膏稀釋成 100 mg/mL，儲存於 -30°C 冰箱中備用。

表 1 苓甘五味薑辛湯之組成與比例

	組成	比例
1	茯苓	12
2	甘草	9
3	乾薑	9
4	細辛	9
5	五味子	7.5

2. 藥品之購買與製備

塵蟎粉末 (dermatophagoides pteronyssinus, Der p) 購買於 Allergon (Engelholm, Sweden)。將 1 g 的塵蟎粉末加入 100 mL 的乙醚，攪拌直至乙醚完全蒸發後，再加入 100 mL 生理食鹽水。將家塵蟎粉末溶液倒進鉢中研磨至塵蟎呈大小均一的碎片。在 4°C 下將塵蟎溶液攪拌 2 天，以 12,000 rpm 轉速，於 20°C 下，離心 30 min，之後將淡棕色上清液轉移到 50 mL 離心管，於 4°C 中以 2 L RO 水透析 2 天。透析液於 4°C 下以 3,000 rpm 轉速離心 10 min，取上清液，分裝後置於 -70°C 冰箱，隔天取出以冷凍乾燥機乾燥至水份蒸乾並稱重。實驗前以無菌生理食鹽水回溶，並調節為 1.6 mg/mL 及 1.0 mg/mL 兩種濃度，之後再以 0.22 μ m 的濾器過濾後，儲存於 -20°C 冰箱備用。在每次製備完成之塵蟎溶液皆使用 Limulus ameobocyte lysate test 偵測 LPS 的含量，每次製備完成之塵蟎溶液之 LPS 含量皆低於 0.96 Eu/mg Der p。酵素免疫分析法 (ELISA) 所需抗體購於 PharMingen (San Diego, CA)。

(二) 實驗性氣喘小鼠模式之建立與呼吸道發炎評估

BALB/c 小鼠 (6-8 週)，購自國科會動物中心，本研究採用慢性發炎動物模式來研究氣喘疾病之機轉：在第 0、7、14、21、28 天，共 5 次各以 50 μ L Der P (1 mg/mL in PBS) 鼻腔內滴注並激發建立氣喘慢性發炎動物模式，對照組在 5 次 Der P 滴注時不給予藥，實驗組在 5 次 Der P 滴注時各同時餵食 1 g/kg 苓甘五味薑辛湯，於第 5 次滴注後 72 小時以

腹腔注射xylazine (200 ug/mouse) 和ketamine (2 mg/mouse) 犧牲小鼠以收集血清與肺泡沖洗液 (圖1)。以1 mL 0.5% FBS/1×PBS收集的沖洗液 (約1.8 mL)，離心後收集上清液於-20°C保存。沈澱的細胞再加入1 mL 0.5% FBS/1×PBS回溶計算發炎細胞數目，並以組織染色法 (hematoxylin-eosin stain, Biotech, Taiwan) 計算肺泡中白血球分類計算。以臨床診斷試劑 (unopette test 5877, BD Biosciences, Rutherford, NJ) 計算血液中嗜伊性白血球的數目。

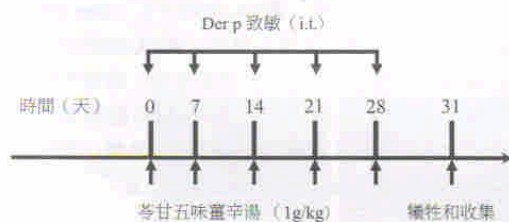


圖1 實驗性氣喘小鼠模式之建立

(三) IgE含量、Der p專一性IgG1和IgG_{2a/2b}分析

使用特定IgE單株抗體配對 (R35-72 and R35-92, BD PharMingen)，經由IgE-specific ELISA測量小鼠血清中總量IgE的含量。為了測量Der p專一性抗體，將待測血清加入以使用Der p (2 µg/mL in 0.1 M NaHCO₃, pH 8.3) 黏附的ELISA測盤，4°C下靜置一晚，經過阻斷和清洗過程後，加入biotinylated rat anti-mouse IgG1 (A85-1) 或IgG_{2a/2b} (R2-40) 單株抗體 (2 µg/mL, BD PharMingen) 1小時，經一連串清洗後再加入streptavidin-HRP conjugate (1:1000 dilution, BD PharMingen)。最後以受質TMB呈色 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) 並以450 nm測量其OD值。

(四) 細胞激素之酵素免疫分析

以酵素免疫分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 分析細胞激素的表現。其抗體配對為 (TNF-α, G281-2626 and MP6-XT3; IL-6, MP5-20F3 and MP5-32C11; IL-12, C15.6 and C17.8; BD PharMingen)。以Mouse IL-4 or IL-5 ELISA Ready-SET-Go (eBioscience, San Diego, CA) 測定IL-4或IL-5的濃度。TGF-β使用ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, Minn) 測定其表現。細胞激素濃度測定的限制分別約2-30 pg/mL。

(五) 半定量RT-PCR

小鼠右肺均質化後，以RNeasy Total RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) 萃取肺部RNA，並以StrataScript H-reverse transcriptase (Stratagene, La Jolla, CA) 反轉錄為cDNA。PCR放大週期及黏合溫度依據各特定primer序列有所不同 (GeneAmp PCR System 2400; PerkinElmer, Branchburg, NJ)。為了比較各組cDNA表現量，進行PCR放大前，皆以β-actin transcripts進行調整。

特定primer序列如下 (sense和antisense)：

- IL-1β, 5'-TCATGGGATGATGATAACCTGCT-3'和5'-CCCATACTTTAGGAAGACACGGATT-3'；
- IL-10, 5'-GGACTT TAAGGG TTACTTGGGTTGCC-3'和5'-CATTTTGATCATCATGTATGCTTCT-3'；
- IL-13, 5'-CTGCAGTCCTGGCTCTCG-3'和5'-CTTTTCCGCTATGGCCACTG-3'；
- RANTES, 5'-GTACATCACCATGGCGTATG-3'和5'-TCTTCTCTGGTTGGCACACA-3'；
- eotaxin, 5'-CCATCTGTCTCCCTCCACCATG-3'和5'-ATCCCATCTCCTTTTCATGCC-3'；
- T-bet, 5'-TGCCTGCAGTGCTTCTAACA-3'和5'-tgccc cgetctctctccaacca-3'；
- β-actin, 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'和5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'。

取10 µL DNA Sample 加入2 µL的6×gel loading buffer，加入電泳膠片凹槽中，100V 1小時，取出電泳膠片放入Ethidium bromide中染色，再放入水中進行脫色，之後用UV光激發並拍照 (Bio-1D; Vilber Lourmat, Marne La Vallee, France)。

(六) 西方墨點法

為了測定GATA-3蛋白的合成，大約20 µg小鼠肺臟核蛋白萃取物，經SDS-PAGE膠體轉印至nitrocellulose膜。經過阻斷和清洗過程後，加入一次抗體anti-GATA-3 (1/1000 dilution, HG3-31, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 反應，清洗後加入連結二次抗體HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1/2000 dilution, ZYMED, San Francisco)，最後以ECL Kit呈色 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)。

(七) 肺部組織學變化和組織免疫染色

將小鼠肺部及氣管取下後，於4% paraformaldehyde固定液保存。經過漸進式酒精脫水及石臘包埋後，切成0.5 µm厚度的薄片，將之固定於玻片上，以蘇木酸和伊紅來染色觀察肺部組

織的變化。以PAS染色 (periodic acid reaction) 觀察 goblet cell 在氣管活化及增生情形。染一次抗體 2 小時，染二次抗體 1 小時，再染 AEC substrate kit 30 min，之後以蒸餾水浸 3 下，玻片標本以 glycerol-gelatin 封片，並於光學顯微鏡下觀察分析。組織免疫染色實驗中，以冰冷 acetone 固定的組織切片，以 1×PBS 沖洗，0.1% Triton X-100 打洞，1×PBS 沖洗 3 次，3% H₂O₂ 10 min，5% 脫脂奶粉 Blocking 30 min 後，染抗體 RelA subunit of NF-κB (SC-372, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 2 小時，染 HRP-conjugated goat anti-rabbit polyclonal IgG (ZYMED, San Francisco) 1 小時，再染 AEC substrate kit (ZYMED, San Francisco) 30 min，之後以蒸餾水浸洗，並以 glycerol-gelatin 封片，於光學顯微鏡下觀察分析。

(八) Collagen 分析

取出小鼠肺臟 100 mg 加入 2 mL HBSS 後均質化，以 800×g 離心 10 min，並收集上清液。以 Sircol Collagen Assay kit 分析 collagen 的含量 (Sircol collagen assay, Biocolor, Belfast, UK)。

(九) 核蛋白萃取與 NF-κB 的表現

小鼠左肺組織以特定試劑均質化後收集核蛋白 (Panomics, Redwood)。以 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA, LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit SET (PIERCE, Rockford)) 方法偵測專一性 NF-κB 的表現。

三、統計分析

實驗結果以 means ± SEM 表示，p 值小於 0.05 視為具統計上的顯著性。利用 student's t-test 作統計分析，比較各組之間的差異。

結果

(一) 苓甘五味薑辛湯對以 Der p 連續致敏激發小鼠氣喘慢性發炎之影響

Naive 組小鼠 BALF 中細胞約有 $18.3 \pm 2.8 \times 10^4$ /mL，Der p 組激發後 72 小時，BALF 中細胞總數增加為 $64.7 \pm 9.6 \times 10^4$ /mL，明顯比 Naive 組上升。苓甘五味薑辛湯組 BALF 中細胞總數約為 $39.7 \pm 6.8 \times 10^4$ /mL，明顯比 Der p 組降低。苓甘五味薑辛湯能明顯降低慢性發炎氣喘小鼠肺泡沖洗液中巨噬細胞、淋巴

球、嗜中性白血球及部份降低嗜伊紅性白血球數目 (表 2)。

(二) 苓甘五味薑辛湯降低 Der p 誘發小鼠肺部組織病理變化

為了分析口服給予苓甘五味薑辛湯，在 Der p 連續致敏激發小鼠氣喘慢性發炎之過敏發炎反應與 collagen 沈著是否有影響。Der p 組肺部發炎細胞浸潤及氣管壁厚度 (圖 2A-左列中)，比 Naive 組均明顯增加 (圖 2A-左列上)。苓甘五味薑辛湯組比 Der p 組，有輕微減少現象 (圖 2A-左列下)。Der p 組氣管中 goblet cell 活化及增生情形 (圖 2A-右列中)，比 naive 組 (圖 2A-右列上) 明顯增加。苓甘五味薑辛湯組 (圖 2A-右列下) 比 Der p 組有輕微壓制現象。同時苓甘五味薑辛湯對慢性發炎氣喘小鼠肺部組織中 collagen 含量亦有降低作用 (圖 2B)。

(三) 血清中抗體 Der-p specific IgG1、Der-p specific IgG_{2a/2b} 和 Total IgE 變化

苓甘五味薑辛湯能部分降低血清 IgG1，但對 total IgE 和 IgG_{2a/2b} 無明顯變化 (圖 3)。

(四) 細胞激素的變化情形和周邊血液嗜伊紅性白血球的變化

苓甘五味薑辛湯對肺泡沖洗液中 TGF-β 和 TNF-α 濃度有降低作用，IL-5 (資料未顯示) 和 IL-6 濃度無降低作用，然而能增加肺泡沖洗液中 IL-12 的濃度。另一方面，苓甘五味薑辛湯並不能有效抑制周邊血液中嗜伊紅性白血球的數目 (圖 4)。

(五) 苓甘五味薑辛湯對慢性發炎氣喘小鼠肺部組織 mRNA 的影響

苓甘五味薑辛湯組對肺部組織 mRNA 表現，與 Der p 組比較在 IL-10、eotaxin、RANTES 有明顯抑制現象，IL-1β、IL-13、transcription factor gata3、c-maf 和 T-bet 則無明顯抑制效果 (圖 5)。

(六) 苓甘五味薑辛湯抑制肺部細胞中 NF-κB 的表現

EMSA 實驗中發現，Der p 組肺部細胞核中 NF-κB 的表現，比 naive 組明顯增加。苓甘五味薑辛湯組肺部細胞中 NF-κB 的表現，較 Der p 組有明顯壓制現象 (圖 6A)。另一方面，Der p 組氣管上皮細胞 NF-κB 在細胞核的表現，比 naive 組明顯增加。苓甘五味薑辛湯組較 Der p 組有抑制現象 (圖 6B)。

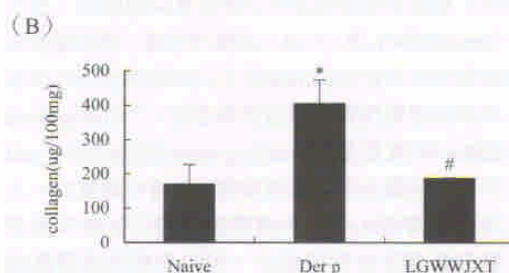
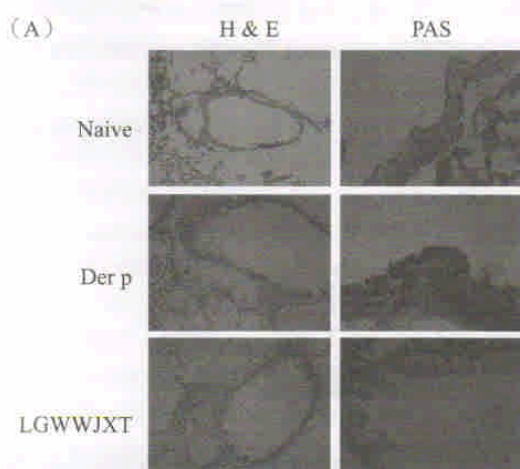
(七) 西方墨點法評估 GATA3 的表現

Der p 組肺部組織中核蛋白 GATA3 表現，比

表2 苓甘五味薑辛湯對連續塵蟎誘發氣喘小鼠肺泡沖洗液中發炎細胞之影響

組別	發炎細胞				
	Total BAL cells	Macrophage	Lymphocyte	Neutrophil	Eosinophil
Naive	18.3±2.8	17.9±2.7	0.06±0.001	0.25±0.11	0
Der P	64.7±9.6 [*]	49.8±1.2 [*]	5.98±0.09 [*]	11.2±0.91 [*]	1.53±0.13 [*]
Der P+LGWWJXT	39.7±6.8 [#]	31.6±5.5 [#]	2.91±0.04 [#]	4.91±0.09 [#]	0.97±0.21

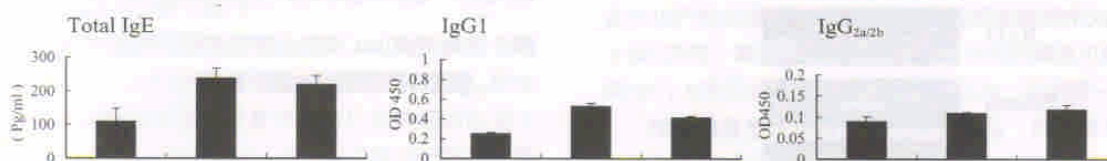
每組小鼠6隻。結果以mean±SEM表示。*p<0.05, Der p組與naive組比較。#p<0.05, 苓甘五味薑辛湯組與Der p組比。



A: 苓甘五味薑辛湯對連續塵蟎激發BALB/c小鼠後72小時, 各組小鼠肺部組織病理切片圖(左列: H&E染色, 100×; 右列: PAS染色, 400×)。

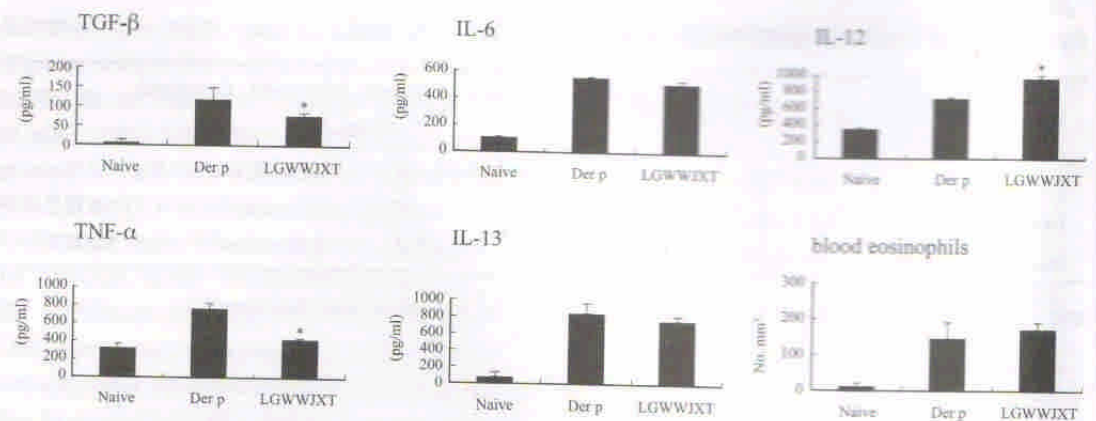
B: 各組小鼠肺部組織collagen沉着分析, 結果以mean±SEM表示。*p<0.05, 和naive組比。#p<0.05, 和Der p組比, 每組小鼠6隻。

圖2 苓甘五味薑辛湯抑制連續塵蟎誘發小鼠呼吸道過敏反應、collagen沉着濃度和杯狀細胞活化。



苓甘五味薑辛湯對連續塵蟎激發BALB/c小鼠72小時後, 小鼠血清中Total IgE和塵蟎專一性抗體的變化, 結果以mean±SEM表示。*p<0.05, 苓甘五味薑辛湯與Der p組比。每組小鼠6隻。

圖3 苓甘五味薑辛湯對連續塵蟎誘發氣喘小鼠血清中專一性抗體和IgE的變化。



用ELISA分析各組小鼠肺泡沖洗液中細胞激素濃度和周邊血液嗜伊紅性白血球的變化，結果以mean ± SEM表示。* $p < 0.05$ ，苓甘五味薑辛湯組與Der p組比。每組小鼠6隻。

圖4 苓甘五味薑辛湯對連續塵蟎誘發氣喘小鼠肺泡沖洗液中細胞激素濃度和周邊血液嗜伊紅性白血球的變化。

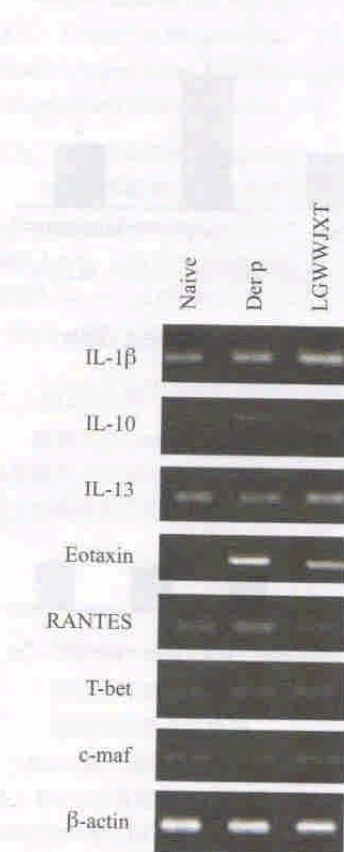
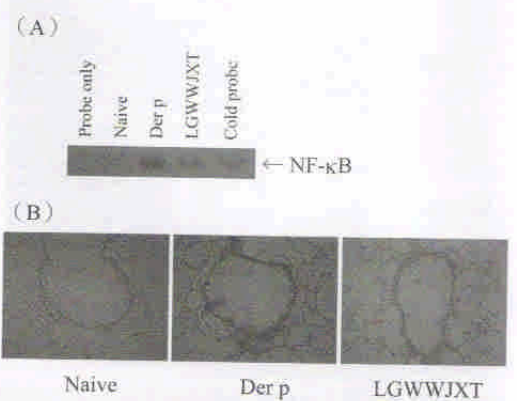
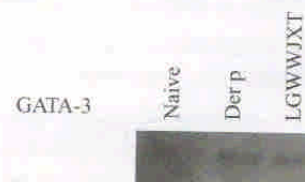


圖5 RT-PCR評估苓甘五味薑辛湯對連續塵蟎誘發氣喘小鼠之影響



EMSA評估小鼠肺部組織核蛋白中NF- κ B表現(A)，並以IHC染色法，觀察NF- κ B在氣管上皮細胞的表現(B，400 \times)。

圖6 EMSA和IHC染色法評估苓甘五味薑辛湯對連續塵蟎誘發氣喘小鼠之影響。



以西方點墨法評估其肺部組織中GATA3，結果代表三次獨立實驗之一。

圖7 西方點墨法評估苓甘五味薑辛湯對連續塵蟎誘發氣喘小鼠轉錄因子之影響。

naive組明顯增加。苓甘五味薑辛湯組肺部組織核蛋白GATA3表現，較Der p組並無明顯抑制作用（圖7）。

討論

實驗中我們利用BABL/c小鼠連續隔週氣管內接種5次Der p，有別於傳統短時間連續激發小鼠的模型和OVA實驗模型。短時間連續激發小鼠的模型看不到呼吸道重塑現象，同時易造成免疫耐受性¹²；另外OVA雖然能有效引起Th2型免疫反應，但並不是臨床上重要過敏原。因此本實驗以Der p經氣管內接種連續隔週5次誘發小鼠過敏的方式，是一種acute-on-chronic model可以比較真實模擬人類過敏原在呼吸道致敏的狀態，同時是屬於慢性氣喘模型，在氣管壁可明顯看到呼吸道重塑現象¹³。IL-5會吸引嗜酸性白血球recruitment到肺部，同時也是嗜酸性白血球活化和生存的重要因子¹⁴。另外，eotaxin、RANTES、MIP-1 α 和MCP-1與嗜酸性白血球recruitment有相當重要的關係¹⁵。氣喘發作反應中，嗜中性白血球的發炎反應亦扮演重要角色¹⁶。在本實驗中我們發現，苓甘五味薑辛湯可以抑制Der p激發小鼠肺泡沖洗液的發炎細胞總數、單核球、嗜中性白血球和部份嗜酸性白血球。以RT-PCR檢測發現，苓甘五味薑辛湯可以抑制eotaxin和RANTES mRNA的表現（圖5），這也間接部份抑制嗜酸性白血球和單核球的浸潤。另外苓甘五味薑辛湯並未能降低血液中嗜酸性白血球的數目（圖4），因此實驗中我們的結果顯示：苓甘五味薑辛湯僅能部份抑制慢性氣喘小鼠肺部中的嗜酸性白血球浸潤（表1）。

在血清中特異性抗體方面，Th2細胞激素有助於IgG1和IgE形成，Th1細胞激素有助於IgG_{2a/2b}形成¹⁷。我們發現苓甘五味薑辛湯可以些微抑制血清中特異性抗體IgG1和total IgE，但並沒有明顯增加特異性抗體IgG_{2a/2b}。IL-4和IL-13會刺激IgE的產生，而且在IgE大量表現的B cell中主要表現的細胞激素是IL-13，而非IL-4¹⁸。在RT-PCR檢測中亦發現口服苓甘五味薑辛湯組小鼠IL-13 mRNA並未明顯降低，並且血液中嗜酸性白血球亦未減少數目。實驗中我們發現，苓甘五味薑辛湯可以抑制Der p激發小鼠肺泡沖洗液中Th2細胞激素 TGF- β 和TNF- α 濃度有降低作用。IL-5（資料未顯示）和IL-6濃度無降低作用，然而能增加肺泡沖洗液中IL-12的濃度。基於先前我

們發表的期刊中顯示，小青龍湯可能增高是double-negative T-cell的比例¹¹。另外，CD4+CD25+T細胞即所謂的調節性T cell，它透過抑制抗原呈現細胞（APC）分泌IL-12，來抑制CD4+CD25-T細胞來終止免疫反應¹⁹。我們發現苓甘五味薑辛湯可以抑制肺泡沖洗液中CD4+CD25+T細胞數目的增加（資料未顯示），這表示降低CD4+CD25+T細胞對APC負回饋作用，提高肺泡沖洗液中IL-12的濃度，如此有助於抑制Th2-bias。Chino等人發表十全大補湯可藉由活化NF- κ B和p38 MAPK來提高小鼠IL-12表現²⁰，但在本實驗中我們發現苓甘五味薑辛湯會抑制NF- κ B的表現，因此是否苓甘五味薑辛湯可藉由p38 MAPK來提高小鼠IL-12表現，值得進一步探討。

NF- κ B訊號傳遞路徑已經被認為是氣喘介入治療的重要目標的，有些研究顯示NF- κ B在Th2 cell分化上，以及前發炎反應細胞激素的製造上扮演重要角色。抑制NF- κ B會強烈減低肺部發炎反應、呼吸道過度反應、黏液的增加、IL-5、IL-13和eotaxin²¹。近年有研究指出NF- κ B subunit p50會造成呼吸道的eosinophilia²²。這也許可以解釋我們實驗結果中，Der p所造成的eosinophilia可能是透過NF- κ B的活化。在實驗中EMSA和免疫組織染色顯示，苓甘五味薑辛湯可以壓抑細胞核中NF- κ B的表現，有助於減低肺部發炎反應，也說明苓甘五味薑辛湯可能有助於抑制前發炎反應細胞激素的分泌。然而在RT-PCR檢測中發現苓甘五味薑辛湯並沒有影響IL-13、轉錄因子gata-3、c-maf和T-bet表現，但明顯抑制eotaxin和RANTES等化學黏附因子的表現。eotaxin、RANTES主要涉及增加嗜酸性白血球肺部浸潤，然而這二者均可受到NF- κ B的調控。在實驗中我們發現苓甘五味薑辛湯可以壓抑細胞核中NF- κ B的表現，顯示eotaxin、RANTES表現的降低可能與NF- κ B的抑制相關，詳細情形仍須進一步研究。

呼吸道重塑是氣喘重要的病理特徵，目前研究發現TGF- β 1會刺激肌纖維母細胞產生ECM蛋白（例如collagen），造成呼吸道重塑²³。在長時間OVA激發小鼠研究中，發現會增高TGF- β 的表現，但在IL-5-deficient OVA激發小鼠中發現會降低TGF- β 的表現²⁴。IL-13可與IL-4、eotaxin和MCP-1協同造成肺部纖維化²⁵。TNF- α 能增加發炎細胞的浸潤，呼吸道黏膜基因的表現而誘發細胞變形²⁶。在實驗中我們發現苓甘五味薑辛湯可以減低TGF- β 和TNF- α 表現，同時Collagen沉著分析和H&E染色法顯示苓甘五味薑辛湯可以減低氣管壁增厚的情形，因此可推測苓甘

五味薑辛湯減緩呼吸道重塑方面有其療效。另外，IL-10主要由Treg cell分泌，具有雙向性的調節，在急性發炎期可以抑制發炎反應，同時IL-10也會造成mucus metaplasia，刺激IL-13分泌，活化Gob-5 gene和呼吸道纖維化。而且IL-10可藉IL-13 dependent pathway誘發TGF- β 增高，造成呼吸道重塑²⁷。本實驗中我們發現，苓甘五味薑辛湯可以抑制IL-10 mRNA表現，PAS染色也顯示苓甘五味薑辛湯可降低PAS-positive goblet cells分泌黏液。因此，基於上述慢性氣喘小鼠模型實驗結果顯示，苓甘五味薑辛湯在in vivo實驗中，可以透過調節Th1/Th2免疫反應和抑制NF- κ B的活化，來明顯減少單核球、嗜中性白血球和部份嗜酸性白血球以減低呼吸道發炎反應和呼吸道重塑。可見苓甘五味薑辛湯可能主要是選擇性調控單核球和嗜中性白血球，而不是調控嗜酸性白血球。

我們實驗中亦發現，小青龍湯對肺部之發炎有改善作用，並能降低血清中total IgE及IgG1濃度，對Th1/Th2平衡有調節作用。同時對於TNF- α 、IL-6濃度有明顯降低作用與增加肺泡沖洗液中IL-12濃度（初步的結果）。口服給予小鼠苓甘五味薑辛湯僅能部份抑制肺部的嗜酸性白血球浸潤、部分降低血清IgG1，但對total IgE、IgG_{2a/2b}無明顯影響。另一方面苓甘五味薑辛湯對肺泡沖洗液中TNF- α 濃度明顯有降低作用，IL-6濃度無降低作用，同時增加肺泡沖洗液中IL-12濃度卻比小青龍湯的效果差。綜合以上實驗結果顯示，小青龍湯中的半夏對於改善肺部細胞發炎反應及對Th1/Th2平衡之調節作用可能扮演著重要的角色。而Takayuki Nagai等人於2004年亦有發現相似結果，然而半夏所扮演的角色仍須進一步相關研究來探討。

結 論

本論文主要目的是在探討苓甘五味薑辛湯對塵蟎致敏小鼠模型之免疫調節作用。實驗中我們發現苓甘五味薑辛湯能主要是選擇性調控單核球和嗜中性白血球（不是調控嗜酸性白血球）以及和呼吸道重塑有關的細胞激素（IL-10、TNF- α 、TGF- β ）和黏附因子（eotaxin、RANTES），這些細胞激素和黏附因子調控可能與苓甘五味薑辛湯能抑制NF- κ B有關。綜合以上實驗結果我們認為，苓甘五味薑辛湯可以降低慢性氣喘小鼠的發炎反應並減緩呼吸道

重塑。

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; 102:2-5.
- 2 Beasley R, Crane J, Lai CK, Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. Journal of Allergy & Clinical Immunology. 2000; 105 (2 Pt 2): S466-72.
- 3 Del Prete GF, De Carli M, D'Elisio 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. 1993; 23 (7): 1445-9.
- 4 Strassmann G, Kumbayashi T, Jacob CO, Sredni D. The immunomodulator AS-101 inhibits IL-10 release and augments TNF alpha and IL-1 alpha release by mouse and human mononuclear phagocytes. Cellular Immunology. 1997; 176 (2): 180-5.
- 5 Sredni B, Tichler T, Shani A, Catane R, Kaufman B, Strassmann G, Albeck M, Kalechman Y. Predominance of TH1 response in tumor-bearing mice and cancer patients treated with AS101. Journal of the National Cancer Institute. 1996; 88 (18): 1276-84.
- 6 Fujimoto T, Duda RB, Szilvasi A, Chen X, Mai M, O'Donnell MA. Streptococcal preparation OK-432 is a potent inducer of IL-12 and a T helper cell 1 dominant state. Journal of Immunology. 1997; 158 (12): 5619-26.
- 7 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.
- 8 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: 1131-8.
- 9 Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. Ann Rev Cell Biol. 1994; 10: 405-55.
- 10 Hancox RJ, Stevens DA, Adcock IM, et al. Effects of inhaled beta agonist and corticosteroid treatment on nuclear transcription factors in bronchial mucosa in asthma. Thorax 1999; 54: 488-92.
- 11 Kao ST, Wang SD, Wang JY, Yu CK, Lei HY. The effect of Chinese herbal medicine, xiao-qing-long tang (XQLT), on allergen-induced bronchial inflammation in mite-sensitized mice. Allergy. 2000; 55 (12): 1127-33.
- 12 Ulrich K, Hincks JS, Walsh R, Wetterstrand EM, Fidock MD, Sreckovic S, Lamb DJ, Douglas GJ, Yeadon M, Perros-Huguet C, Evans SM. Anti-inflammatory modulation of chronic airway inflammation in the murine house dust mite model. Pulm Pharmacol Ther. 2008; 21 (4): 637-47.
- 13 Yu C K and Chen C. L. Activation of mast cells is essential for development of house dust mite dermatophagoides farinae-induced allergic airway inflammation in mice. J Immunol. 2003; 171: 3808-15.

- 14 Greenfeder S, Umlund S P, Cuss F M, Chapman R W, Egan R W. Review Th2 cytokines and asthma the role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir Res.* 2001; 2: 71-9.
- 15 McKay and Sharma. Autocrine regulation of asthmatic airway inflammation: role of airway smooth muscle. *Respir Res.* 2002; 3 (5): 11-23.
- 16 Chang T T, Hang C C, and Hsu C H. Immunopharmacology and immunotoxicology. 2006: 683.
- 17 Coffman R L, Lebrun D A, and Rothman P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv immunol.* 1993; 54: 229-70.
- 18 Hajoui O, Janani R, Tulic M, Joubert P, Ronis T, Hamid Q, Zheng H, Mazer B D. Synthesis of IL-13 by human B lymphocytes: Regulation and role in IgE production. *J. Allergy Clin immunol.* 2004; 114: 657-63.
- 19 Koike S, Tateishi S, Kubo K, Mimura T, Yamamoto K, Kanda H. Downregulation of IL-12 and a novel negative feedback system mediated by CD4+CD25+ T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 330: 226-32.
- 20 Chino A, Sakurai H, Choo M K, Koizumi K, Shimada Y, Terasawa K, Saiki I. Juzentaihoto, a Kampo medicine, enhances IL-12 production by modulating Toll-like receptor 4 signaling pathways in murine peritoneal exudates macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 2005; 5 (5): 871-82.
- 21 Demmet C, Gosset P, Pajak B, Cataldo D, Alj M. B, Lekeux P, Bonna F. Selective blockade of NF- κ B activity in airway immune cells inhibits the effector phase of experimental asthma. *J Immunol.* 2004; 173: 5766-75.
- 22 Raychaudhuri B, Dweik R, Connors M J, Buhrow L, Malur A, Drazba J, Arroliga C, Erzurum S C, Kavuru M S, Thomassen M J. Nitric oxide blocks nuclear factor- κ B activation in alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 21: 311-6.
- 23 Davies D E, Wicks J, Powell R M, Puddicombe S M, Holgate S T. Airway remodeling in asthma: New insights. *J. Allergy Clin immunol.* 2003; 111: 215-25.
- 24 Patrick F P, Andrew M G, Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ludwig M S, Barnes N, Robinson D, Kay A B. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 1029-36.
- 25 McMillan S J, Lloyd C M. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodeling. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34: 479-507.
- 26 Finkelman F D, Yang M, Perkins C, Schleifer K, Sproles A, Santeliz J, Bernstein J A, Rothenberg M E, S C, Marsh M W K. Suppressive effect of IL-4 on IL-13-induced genes in mouse lung. *J Immunol.* 2005; 174: 4630-8.
- 27 Lee C G, Homer R J, Cohn L, Link H, Jung S, Craft J E, Graham B S, Johnson T R, Elias J A. Transgenic overexpression of Interleukin (IL)-10 in the lung causes mucus metaplasia, tissue inflammation, and airway remodeling via IL-13-dependent and independent pathway. *J. Bio. Chem.* 2002; 277: 35466-74.

The Immunomodulatory Effect of Ling-Gang-Wu-Weng-Jiang-Xin-Tang on Repetitive *Dermatogoides Pteronyssinus* Challenged Asthmatic Mice Model

Shulhn-Der Wang^{a,b}, Chin-Che Lin^a, Shin-Chang Lee^a, Li-Jen Lin^a, Shung-Te Kao^{b*}

^a School of Chinese Medical Science, China Medical University

^b School of post-Baccalaureate Chinese Medicine, China Medical University

ABSTRACT

Allergic asthma is a chronic airway inflammatory disease, which is characterized by the Th2-bias immune response, eosinophils infiltration, mast cell activation, epithelial hypertrophy, goblet cell hyperplasia, airway hyperresponsiveness, and excessive mucus secretion in airway. *Dermatogoides pteronyssinus* (Der p) is one of the most prominent and important species of house dust mite in allergic asthma in Taiwan. In this study, we used repetitive challenge of Der p it instillation in BABL/c mice as a chronic asthmatic animal model, which helped us to evaluate the therapeutic mechanisms of Ling-Gang-Wu-Weng-Jiang-Xin-Tang (LGWWJXT). As a result, we found that LGWWJXT attenuated Der p-induced airway inflammation and remodeling via selectively regulating on macrophages and neutrophils but not eosinophils in the lungs. LGWWJXT also could downregulate TGF- β and TNF- α in BALF to inhibit partly eosinophils infiltration and up-regulated IL-12 in BALF to change Th2-bias. In addition, EMSA and immunohistochemistry staining demonstrated LGWWJXT could inhibit NF- κ B expression in the lung. In RT-PCR experiment, we also found that LGWWJXT could inhibit IL-10, eotaxin, and RANTES mRNA expression. These results show that the major mechanism of LGWWJXT could be through the regulation of the Th1/Th2 immune response and the inhibition of transcription factor NF- κ B. Therefore, the mechanism of LGWWJXT on repetitive *Dermatogoides pteronyssinus* challenged asthmatic mice model is selectively regulate on macrophages and neutrophils. Its anti-inflammatory activity may modulate Th1/Th2 imbalance as well as reducing NF- κ B activation in bronchial epithelium, but also by inhibiting the progressing of airway remodeling.

Keywords: Allergic asthma, *Dermatogoides pteronyssinus*, Traditional Chinese medicine, Ling-Gang-Wu-Weng-Jiang-Xin-Tang (LGWWJXT)