

麻杏石甘汤对流感病毒肺部感染模型肺、结肠组织 MCP-1 蛋白表达水平的影响

邹莉¹, 何谷良¹, 卢芳国^{1*}, 李玲¹, 张波¹, 戴冰¹,
魏科¹, 陈山泉², 宁毅¹, 胡珏¹, 吴涛¹

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 香港中文大学(深圳), 广东深圳 518172)

[摘要] 目的:从流感病毒肺部感染模型肺、结肠组织单核细胞趋化因子(MCP)-1蛋白表达水平,探讨流行性感冒“肺病及肠”的分子机制与麻杏石甘汤的干预作用。方法:经鼻腔接种建立流感病毒小鼠肺部感染模型。实验设正常组、模型组、麻杏石甘汤组和奥司他韦组。经灌胃给药或生理盐水3,7 d后,常规法检测小鼠体质量、肺指数、肺组织和结肠组织病理变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)和免疫组化法检测小鼠肺、结肠组织MCP-1蛋白表达水平。结果:①与正常组比较,模型组肺指数显著升高($P < 0.01$),给药3,7 d的麻杏石甘汤组肺指数显著下降($P < 0.01$)。②与正常组比较,模型组肺组织、结肠组织炎症充血严重,给药3,7 d的麻杏石甘汤组肺、结肠组织炎症明显减轻。③与正常组比较,模型组肺组织中MCP-1蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),给药3,7 d的麻杏石甘汤组MCP-1蛋白表达水平显著下降($P < 0.01$),Western blot和免疫组化法检测结果趋势一致。④与正常组比较,免疫组化法检测结果中的模型组结肠组织中MCP-1蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),给药3,7 d的麻杏石甘汤组MCP-1表达水平没有明显差异;⑤麻杏石甘汤对流感病毒肺部感染模型肺指数抑制作用与其对肺、结肠组织MCP-1的蛋白表达水平的调节作用呈正相关。结论:流感病毒肺部感染模型伴有严重的肠组织病理损伤以及肺、肠组织中MCP-1的蛋白表达水平的上升,麻杏石甘汤可能通过调节MCP-1蛋白表达水平而实现抗流感病毒作用。

[关键词] 流感病毒; 流行性感冒; “肺病及肠”; 单核细胞趋化因子(MCP)-1; 麻杏石甘汤

[中图分类号] R285.5;R256.1;R289.3;R242 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)05-0100-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018050100

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171113.1434.006.html>

[网络出版时间] 2017-11-13 14:34

Effect of Maxing Shigan Tang on Protein Expression Level of MCP-1 in Lung Tissue and Colon Tissue Based on Influenza Virus Infection Lung Model

ZOU Li¹, HE Gu-liang¹, LU Fang-guo^{1*}, LI Ling¹, ZHANG Bo¹, DAI Bing¹, WEI Ke¹,
CHEN Shan-quan², NING Yi¹, HU Jue¹, WU Tao¹

(1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The Chinese University of Hong Kong (Shenzhen), Shenzhen 518172, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the molecular mechanism of ‘lung disease transferring to large intestine’ and the intervention effect of Maxing Shigan Tang thought the influenza virus infection lung model and the protein expression level of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in lung tissue and colon tissue. **Method:** Nasal inoculation with influenza virus was performed to establish influenza virus-infected animal models. The

[收稿日期] 20170904(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774126,81473468,81503445,81703919);湖南省自然科学基金项目(2016JJ2095,2017JJ2322);湖南省教育厅创新平台开放基金项目(17K067);湖南省卫生计生委科研课题项目(C2015-16,C2016049);湖南省高校科技创新团队项目(15);湖南省省级精品课程项目(48);湖南中医药大学重点学科项目(1)

[第一作者] 邹莉,硕士,从事中医药防治感染性疾病的研究,Tel:18774063345,E-mail:1209578802@qq.com

[通信作者] *卢芳国,博士,博士生导师,教授,从事中医药防治感染性疾病的研究,Tel:13647310305,E-mail:lufanguo0731@163.com

experiment included the normal control group, the model control group, the Maxing Shigan Tang group and the oseltamivir group. The groups were given the corresponding drugs or saline by gavage for 3 days and 7 days respectively. The mice's body weight, lung index, pathological changes in lung tissue and colon tissue were detected by routine method; MCP-1 protein expressions in lung tissue and colon tissue were detected by Western blot technology and immunohistochemistry. **Result:** ① Compared with the normal control group, the lung index of the model control group increased, with significant differences ($P < 0.01$). ② Compared with the normal control group, the model control group's lung tissue and colon tissue showed serious inflammation; after drug treatment for 3 days and 7 days, Maxing Shigan Tang group showed obvious decrease in pathological damage of lung tissue and colon tissue. ③ Compared with the normal control group, MCP-1 protein expression in lung tissue of the model control group increased, with significant differences ($P < 0.01$); after drug treatment for 3 days and 7 days, Maxing Shigan Tang group showed decrease in MCP-1 protein expression, with significant differences ($P < 0.01$); there was a similar trend in the detection result of Western blot and immunohistochemistry. ④ Compared with the normal control group, MCP-1 protein expression in colon tissue of the model control group increased, with significant differences ($P < 0.05$), after drug treatment for 3 days and 7 days, Maxing Shigan Tang group showed no statistically significant difference in MCP-1 protein expression. ⑤ The lung index inhibiting effect of Maxing Shigan Tang in the influenza virus lung infection model had a positive correlation with the regulating effect in MCP-1 protein expression level of lung tissue and colon tissue. **Conclusion:** The influenza virus lung infection model has a serious colon tissue pathological injury, and the MCP-1 protein expression levels in lung tissue and colon tissue increased. Maxing Shigan Tang can play a role in anti-flu virus by regulating MCP-1 protein expression.

[Key words] influenza virus; flu; 'lung disease transferring to large intestine'; monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1); Maxing Shigan Tang

流行性感 冒 (简称流感) 是由流感病毒 (influenza virus) 经呼吸道进入机体而引起的急性传染病。具有传染强、传播迅速、易于流行等特点, 其发病率很高^[1]。据世界卫生组织统计, 每年因季节性流感在区域内的流行就造成了几百万病例, 而流感在世界范围的流行更是带来了严重的后果^[2]。20 世纪曾爆发过多次世界性的流感大流行^[3-4], 每次流感大流行都给世界各国带来严重经济损失, 并造成巨大的人员伤亡和痛苦, 而且随着耐药株的不断出现, 更是给治疗流感药物的研究带来了挑战。

麻杏石甘汤是张仲景《伤寒论》的经方之一, 具有清热宣肺, 降气平喘的功效^[5]。方中麻黄辛温, 善于宣肺平喘^[6], 李时珍曰: “麻黄乃肺经专药, 故治肺病多用之。”石膏辛寒, 善于清泄肺热; 而石膏用量倍于麻黄, 可遏制麻黄辛温发散之力。麻黄与石膏相制为用, 一寒一热, 一散一清。麻黄得石膏, 则宣肺平喘而不助热, 石膏得麻黄, 则清泄肺热而不遏寒。杏仁苦温, 宣利肺气以平喘咳, 即可助麻黄平喘, 又可防麻黄宣散过度。炙甘草调和诸药。

流感的临床表现多样复杂, 部分流感患者 (特别是胃肠功能紊乱的老人和儿童患者) 除表现发热、头痛、乏力等全身症状和咳嗽、鼻塞、流涕等呼吸

道症状外, 还伴有上腹胀痛、腹泻、恶心、呕吐等胃肠炎症状^[7]。有研究报道, 30.9% 的流感患者伴有胃肠炎症状^[8]。尽管流感合并胃肠炎症状的临床表现已被关注, 但其“肺病及肠”之传变的分子机制并不清楚。在热毒袭肺证和热毒壅肺证“甲型 H1N1 流感”、“季节性流感”、“人感染 H7N9 禽流感”防治中倍受重视的麻杏石甘汤对其传变有无干预作用, 至今未见报道。本文从流感病毒小鼠肺部感染模型肺组织、结肠组织 MCP-1 蛋白表达水平分析流感“肺病及肠”的分子机制与麻杏石甘汤的干预作用。

1 材料

1.1 病毒株 A 型流感病毒小鼠肺适应株 (A/PR/8/34) 由湖南师范大学病毒研究室陈则教授惠赠。经 10 日龄鸡胚尿囊腔接种培养传代, 微量血凝试验滴定病毒效价, 血凝效价 1:640 以上者可供实验用, 体内实验前测定小鼠病毒半数致死量 (LD_{50}), 实验用 50 个单位的 LD_{50} ($50LD_{50}$) 的病毒液。

1.2 动物 6~8 周 KM 雌性小鼠 40 只, 体质量 (18 ± 2) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SYXK (湘) 2013-0005, 喂养于湖南中医药大学实验动物中心。本实验经过湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准, 符合实验动物伦理委

员会指导原则。

1.3 药物 ①麻杏石甘汤组成为麻黄(去节,批号1411200312) 9 g,苦杏仁(去皮尖,批号1505130152)9 g,石膏(碎,棉裹,批号1405220632) 18 g,炙甘草6 g(批号20150901),均由亳州市沪谯药业有限公司生产,均购自湖南中医药大学第一附属医院门诊科。煎煮后,将药液浓缩至药液含生药 $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。②磷酸奥司他韦胶囊(批号B3017,进口注册证号H20090377,瑞士巴塞尔豪夫迈罗氏有限公司生产,上海罗氏制药有限公司分装,分装批准文号J20090076)购自湖南省人民医院门诊西药房。用蒸馏水充分溶解,制成 $32.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混悬液。药液置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存。

1.4 仪器 FA1104型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);F1型移液器(德国Eppendorf公司);H1650型台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);ELx800型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);WD-9405C型电泳仪,DYCZ-24DN型转膜仪,WD-9413C型凝胶成像系统(北京六一仪器厂);CX22型光学扫描显微镜(日本Olympus公司)。

1.5 试剂 4%多聚甲醛,DAB显色试剂盒,BCA蛋白定量试剂盒,Western blot显色试剂盒(武汉博士德生物技术公司,批号分别为AR1068,AR1024,AR0146,AR1024);MCP-1抗体(Santa公司,批号sc-1785);ACTIN抗体(英国Abcam公司,批号ab8226);SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(武汉谷歌生物科技,批号G2003);蛋白Marker[Therm(Fermentas)公司,批号26616];PVDF膜 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore公司,批号ISEQ00010)。

2 方法

2.1 动物模型的建立 KM雌性小鼠40只,经适应性饲养后,根据完全随机原则,分为正常组、模型组、奥司他韦组、麻杏石甘汤组,每组10只。除正常组外,其余各组小鼠鼻腔内接种 50LD_{50} 流感病毒液 0.05 mL ,建立小鼠肺部感染模型^[9]。正常组小鼠鼻腔内接种0.9%氯化钠溶液 0.05 mL 。

2.2 给药方法 各组小鼠感染造模后第2天开始灌胃给药,每天1次,每次 0.4 mL ,持续灌胃给药3,7 d后,处死小鼠,取标本进行指标检测。各药均以蒸馏水作溶剂配置,以 60 kg 成人每日服用药物剂量与 18 g 小鼠体表面积换算比值换算出小鼠1 d用量,计算出各药物组的临床等效剂量^[10]。

2.3 指标检测

2.3.1 肺指数和肺指数抑制率的检测 病毒感染

后治疗的第7天,称小鼠体质量后,取肺脏称重,计算肺指数和肺指数抑制率(%)。肺指数($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)=肺重(mg)/体质量(g),肺指数抑制率=(模型组肺指数-实验组肺指数)/模型组肺指数 $\times 100\%$ 。

2.3.2 肺组织和结肠组织病理变化 用4%多聚甲醛固定肺组织和结肠组织、石蜡包埋、切片($4\sim 5\text{ }\mu\text{m}$),苏木素-伊红(HE)染色后,在光学显微镜下观察病理变化。

2.3.3 肺组织和结肠组织MCP-1蛋白表达水平

①蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺、结肠组织提取蛋白后检测蛋白浓度,依次SDS-PAGE电泳、转膜、免疫反应、化学发光,检测MCP-1的蛋白表达水平,使用Alpha软件处理系统分析目标带的灰度值;②免疫组化,肺组织、结肠组织用4%多聚甲醛溶液固定,按常规脱水、石蜡包埋、切片,检测MCP-1的蛋白表达水平,用光学显微镜观察,测定有细颗粒状或细丝网状棕色颗粒为阳性表达,使用图像分析软件IPWIN60分析结果取积分吸光度IA做统计分析。

2.4 统计学分析 计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用SPSS 17.0统计软件分析,组间显著性比较用 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠肺指数及肺指数抑制率的影响 与正常组比较,模型组小鼠肺组织充血、水肿明显,肺指数显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各药物治疗组小鼠肺指数显著下降($P<0.01$);给药治疗3 d的麻杏石甘汤组肺指数抑制率为28.67%,给药治疗7 d的麻杏石甘汤组肺指数抑制率为29.47%。见表1。

3.2 对小鼠肺组织病理变化的影响 与正常组比较,模型组小鼠肺组织正常结构消失,肺泡大小不一致,肺泡囊、肺泡管、肺泡隔、细支气管等正常结构遭到破坏,肺组织有大量的炎细胞浸润,肺部血管内充血明显。经药物干预后,小鼠肺组织炎症明显减轻。麻杏石甘汤治疗7 d后小鼠肺组织炎症反应比治疗3 d后轻。见图1。

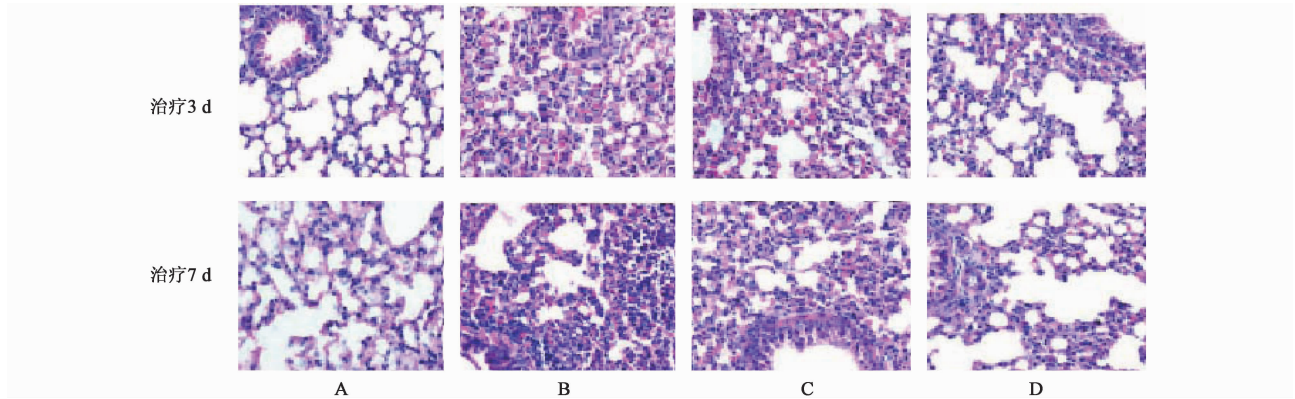
3.3 对小鼠结肠病理变化的影响 与正常组比较,流感病毒感染小鼠后,模型组小鼠结肠组织正常结构消失,结肠黏膜上皮水肿、甚至脱落,管腔内有大量炎性渗出物;部分黏膜腺体破坏、排列不规则,黏膜内充血、水肿,有大量炎细胞浸润。经药物干预后,小鼠结肠炎症明显减轻。麻杏石甘汤治疗7 d后小鼠结肠炎症反应比治疗3 d后轻。见图2。

表 1 麻杏石甘汤对小鼠肺指数及肺指数抑制率的影响

Table 1 Effect of Mxing Shigan Tang on lung index and lung index inhibition rate in each group of mice

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	肺指数($\bar{x}\pm s, n=5$)/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$		抑制率/%	
		给药 3 d	给药 7 d	给药 3 d	给药 7 d
正常	-	8.55 ± 1.51	8.37 ± 0.85	-	-
模型	-	13.46 ± 1.45 ¹⁾	14.74 ± 1.2 ¹⁾	-	-
奥司他韦	0.01	8.08 ± 0.61 ²⁾	8.61 ± 1.45 ²⁾	39.94	41.56
麻杏石甘汤	6.27	9.60 ± 0.58 ²⁾	10.39 ± 1.55 ²⁾	28.67	29.47

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。



A. 正常组;B. 模型组;C. 奥司他韦组;D. 麻杏石甘汤组(图 2~6 同)

图 1 麻杏石甘汤对小鼠肺组织病理变化的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Mxing Shigan Tang on lung tissue pathological changes in each group of mice(HE, ×400)

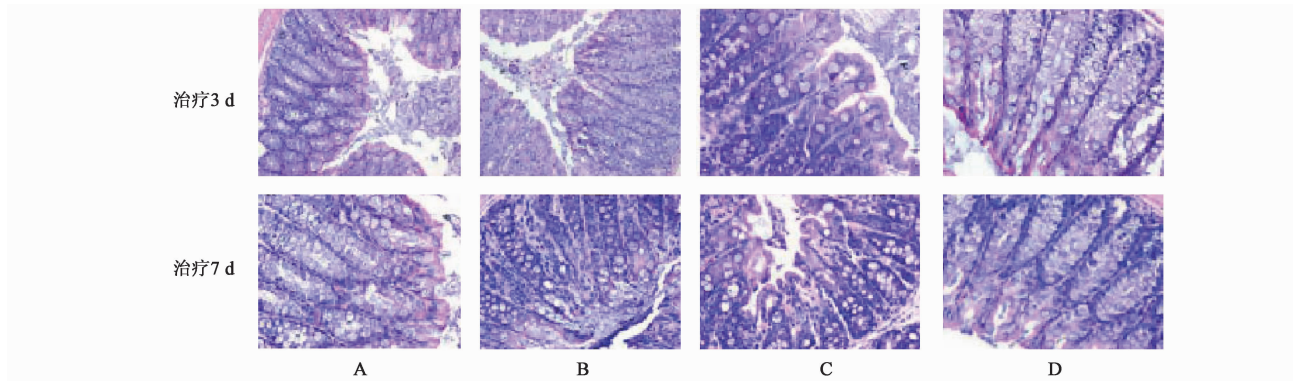


图 2 麻杏石甘汤对小鼠结肠组织病理变化的影响(HE, ×400)

Fig. 2 Effect of Mxing Shigan Tang on colon tissue pathological changes in each group of mice(HE, ×400)

3.4 对小鼠肺组织 MCP-1 蛋白表达水平的影响

①Western blot 检测结果可知,与正常组比较,模型组小鼠肺组织 MCP-1 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,给药治疗 3,7 d 麻杏石甘汤组 MCP-1 蛋白表达水平显著下降($P < 0.01$)。见表 2,图 3。②免疫组化法检测结果可知,与正常组比较,模型组小鼠肺组织中 MCP-1 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,给药治疗 3,7 d 麻杏石甘汤组 MCP-1 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);给药治疗 7 d 麻杏石甘汤组

表 2 麻杏石甘汤对小鼠肺组织 MCP-1 蛋白相对表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Mxing Shigan Tang on integrated optical density value of MCP-1 in lung tissue in each group of mice($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	给药 3 d	给药 7 d
正常	-	0.27 ± 0.024	0.26 ± 0.022
模型	-	0.38 ± 0.029 ¹⁾	0.37 ± 0.026 ¹⁾
奥司他韦	0.01	0.25 ± 0.022 ²⁾	0.22 ± 0.025 ²⁾
麻杏石甘汤	6.27	0.32 ± 0.026 ²⁾	0.30 ± 0.021 ²⁾

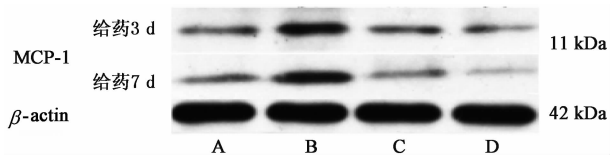


图 3 麻杏石甘汤对小鼠肺组织 MCP-1 蛋白表达电泳
Fig. 3 Effect of Mxing Shigan Tang on MCP-1 protein expression levels in lung tissue in each group of mice

MCP-1 含量下降程度高于给药治疗 3 d 麻杏石甘汤组。见表 3, 图 4。

3.5 对小鼠结肠组织 MCP-1 蛋白表达水平的影响 ①Western blot 法检测结果可知, 与正常组比较, 模型组小鼠结肠组织中 MCP-1 蛋白表达水平没有明显差异, 与模型组比较, 给药治疗 3, 7 d 的麻杏石甘汤组小鼠结肠组织中 MCP-1 蛋白表达水平没有明显差异。见表 4, 图 5。②免疫组化法检测结果可知, 与正常组比较, 模型组小鼠结肠组织 MCP-1

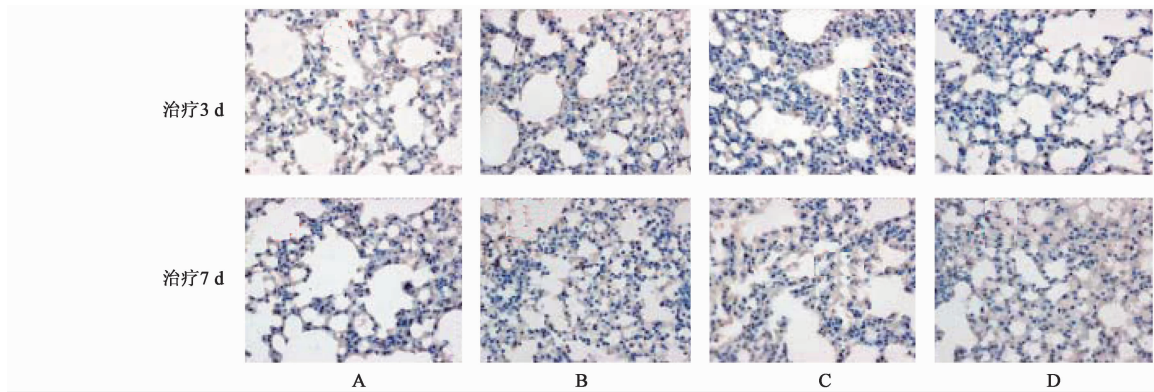


图 4 麻杏石甘汤对小鼠肺组织 MCP-1 的蛋白表达水平的影响(免疫组化, $\times 400$)
Fig. 4 Effect of Mxing Shigan Tang on MCP-1 protein expression levels in the lung tissue in each group of mice (IHC $\times 400$)

表 4 麻杏石甘汤对小鼠结肠组织 MCP-1 蛋白相对表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of Mxing Shigan Tang on integrated optical density value of MCP-1 in colon tissue in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	给药 3 d	给药 7 d
正常	-	0.19 \pm 0.092	0.18 \pm 0.091
模型	-	0.30 \pm 0.101	0.29 \pm 0.080
奥司他韦	0.01	0.21 \pm 0.088	0.15 \pm 0.082 ²⁾
麻杏石甘汤	6.27	0.27 \pm 0.084	0.24 \pm 0.077

3.6 肺指数与 MCP-1 蛋白表达水平相关性 ①肺指数与肺组织 MCP-1 蛋白表达水平相关性可知, 给药治疗 3 d 的肺指数与肺组织 MCP-1 蛋白表达水平之间具有相关性 ($r = 0.655, P < 0.05$); 给药治疗 7 d 的肺指数与肺组织 MCP-1 蛋白表达水平之间具有相关性 ($r = 0.802, P < 0.05$)。②肺指数与结肠

表 3 麻杏石甘汤对小鼠肺组织 MCP-1 蛋白 (IA) 表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of Mxing Shigan Tang on average optical density value of MCP-1 protein expression in lung tissue in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	给药 3 d	给药 7 d
正常	-	0.19 \pm 0.016	0.19 \pm 0.021
模型	-	0.30 \pm 0.027 ¹⁾	0.28 \pm 0.020 ¹⁾
奥司他韦	0.01	0.22 \pm 0.023 ³⁾	0.18 \pm 0.024 ³⁾
麻杏石甘汤	6.27	0.26 \pm 0.028 ²⁾	0.21 \pm 0.019 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

蛋白表达水平不同程度升高, 差异显著 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 给药治疗 3, 7 d 的麻杏石甘汤组小鼠结肠组织中 MCP-1 蛋白表达水平无明显差异。见表 5, 图 6。

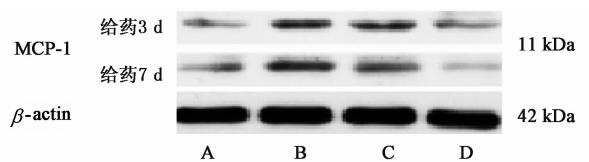


图 5 麻杏石甘汤对小鼠结肠组织 MCP-1 蛋白表达电泳
Fig. 5 Effect of Mxing Shigan Tang on MCP-1 protein expression levels in colon tissue in each group of mice

组织 MCP-1 蛋白表达水平相关性可知, 给药治疗 3 d 的肺指数与结肠组织 MCP-1 蛋白表达水平之间具有相关性 ($r = 0.613, P < 0.05$); 给药治疗 7 d 的肺指数与肺组织 MCP-1 蛋白表达水平之间具有相关性 ($r = 0.511, P < 0.05$)。见表 6。

4 讨论

流行性感冒的发生发展是流感病毒致病作用与机体抗流感病毒免疫效应相互影响、相互制约的

表 5 麻杏石甘汤对小鼠结肠组织 MCP-1 蛋白 (IA) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 Effect of Maxing Shigan Tang on average optical density value of MCP-1 protein expression in colon tissue in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	给药 3 d	给药 7 d
正常	-	0.18 ± 0.022	0.19 ± 0.024
模型	-	0.25 ± 0.025 ²⁾	0.22 ± 0.020 ¹⁾
奥司他韦	0.01	0.21 ± 0.017 ³⁾	0.19 ± 0.018 ³⁾
麻杏石甘汤	6.27	0.22 ± 0.024	0.21 ± 0.016

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

结果。流感病毒进入机体后,不仅可因病毒增殖而直接破坏宿主细胞结构与代谢,导致组织炎症与病变,还可因机体过度免疫应答产生的大量细胞因子、趋化因子等而造成免疫病理损伤。在多次流感的大流行中,患者的肺组织和血清中有高水平的细胞因子[白细胞介素(IL)-1,IL-6等],趋化因子[MCP-1,巨噬细胞炎性蛋白-1(MIP-1)等],表明高水平细胞因子及趋化因子所导致的免疫病理损伤是流感病毒的重要致病机制^[11]。MCP-1是由单核细胞、成纤维细胞、内皮细胞等分泌的小分子蛋白质,具有招募、活化白细胞、启动炎性细胞的迁移,参与炎症反应的

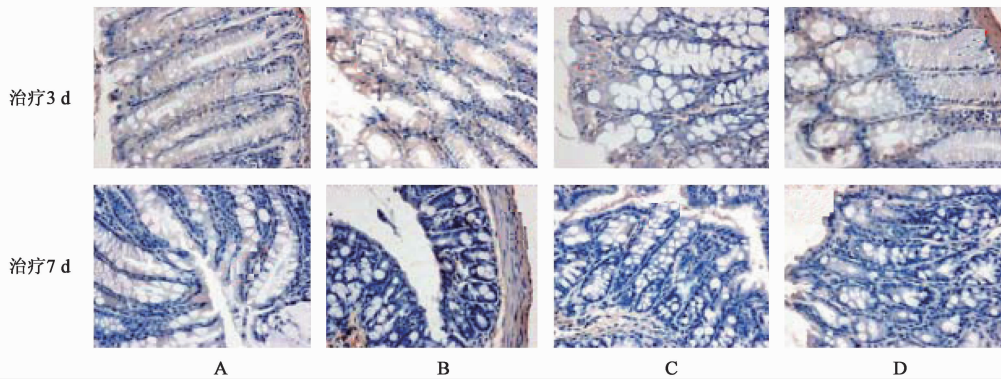


图 6 麻杏石甘汤对小鼠结肠组织 MCP-1 的蛋白表达水平的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 10 Effect of Maxing Shigan Tang on MCP-1 protein expression levels in colon tissue in each group of mice (IHC, ×400)

表 6 肺指数与肺、结肠组织 MCP-1 蛋白表达水平的相关性 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 6 Correlation between lung index and protein expression levels of MCP-1 in lung and colon tissues ($\bar{x} \pm s, n=20$)

指标	肺组织		结肠组织	
	给药 3 d	给药 7 d	给药 3 d	给药 7 d
肺指数	9.87 ± 2.633	10.13 ± 3.265	9.87 ± 2.633	10.13 ± 3.265
MCP-1 蛋白表达水平	0.24 ± 0.046	0.22 ± 0.044	0.22 ± 0.032	0.21 ± 0.023
r	0.655	0.802	0.613	0.511
P	0.006	0.000	0.011	0.043

注:MCP-1 蛋白表达水平以免疫组化法进行检测。

功能^[12]。本研究发现,流感病毒小鼠肺部感染模型不仅肺组织水肿充血、有大量的炎性细胞浸润,而且伴有严重的结肠组织的病理损伤。结肠组织的这种病理损伤可能是病毒感染肺部后,活化的肺源性免疫细胞(巨噬细胞,CD4⁺T 细胞)在趋化因子(MCP-1)作用下特异性向肠道组织迁移,并过度分泌 IL-6,肿瘤坏死因子-β(TNF-β)等细胞因子而导致的免疫病理损伤^[13-14]。分析 MCP-1 蛋白表达水平检测结果还发现,Western blot 技术和免疫组化法检测的结果均显示模型组小鼠肺组织中 MCP-1 蛋白表达水平显著高于正常组;而结肠组织只是在免疫组化法检测结果中模型组 MCP-1 蛋白表达水平显著高于

正常组,在 Western blot 技术检测结果中模型组与正常组小鼠结肠组织中 MCP-1 蛋白表达水平没有明显差异。这一结果是否与流感病毒肺部感染模型原发感染部位(肺)的巨噬细胞等更易受病毒等刺激而分泌高水平的趋化因子等有关有待进一步研究。

流感病毒入侵人体后,其原发感染部位主要在呼吸系统,但人体是有机整体,病毒体及其免疫反应产物均可以通过血循环或淋巴系统或黏膜免疫系统等进行扩散。有研究表明,呼吸系统的“肺、支气管和气管”和消化系统“回肠、结肠”是与中医学“肺”和“大肠”直接相关的组织器官^[15-16]。“肺与大肠相表里”理论是中医藏象学说的基本内容之一。肺与

大肠不仅在经络上互为表里,而且在生理上相互联系,病理上相互影响。肺为脏,主气司呼吸、主行水,肺气以宣发肃降为基本运动形式;大肠为腑,传化糟粕,大肠“以通为用”、“以通为补”。肺与大肠共同调节机体的气机升降与津液输布。肺气宣肃有助于大肠传化功能的正常发挥,大肠“传化物而不满”则使肺气宣肃、通调水道之功能正常发挥。肺失宣肃,则大肠传化不利,导致便秘、泄泻、腹痛等胃肠道症状出现(“肺病及肠”);大肠腑气不通,则肺气不利,导致咳嗽、哮喘等呼吸道症状出现(“肠病及肺”)^[17-18]。由此可见,流感病毒小鼠肺部感染模型出现结肠组织的病理损伤以及肺组织、结肠组织 MCP-1 的蛋白表达水平的升高是“肺与大肠相表里”理论之科学内涵在流感传变中的体现。

麻杏石甘汤是治疗肺热火盛的肺炎和热邪犯肺的哮喘的代表方^[19]。研究表明,该方不仅具有镇咳、祛痰、平喘、解热之功效,还有抗炎、抗病毒等作用,已广泛用于流感、病毒性肺炎、支气管炎、扁桃体炎、结肠炎、肺心病及荨麻疹等多种疾病治疗等^[20-21]。该方的临床疗效与其调节免疫应答等机制密切相关^[22]。本项目组研究发现,麻杏石甘汤能够显著抑制流感病毒肺部感染模型肺指数的增加,下调肺组织 MCP-1 蛋白表达水平,而且该方给药治疗 3, 7 d 的肺指数与肺组织、结肠组织 MCP-1 蛋白表达水平之间具有相关性,表明该方可能通过调节 MCP-1 蛋白表达水平而实现抗流感病毒作用, MCP-1 可能是流行性感“肺病及肠”之传变的物质基础之一。

[参考文献]

[1] 苏文哲,柯昌文. 流行性感病毒耐药的耐药性相关研究进展[J]. 中国病毒病杂志, 2011, 1(3): 171-176.

[2] Moghadami M. A narrative review of influenza: a seasonal and pandemic disease [J]. Iran J Med Sci, 2017, 42(1): 2-13.

[3] 曾祥兴,李康生. 流感百年: 20 世纪流感大流行的回顾与启示[J]. 医学与社会, 2010, 23(11): 4-6.

[4] Benjamin G H, Randy A A, Adolfo G S. Innate immune evasion strategies of influenza viruses [J]. Future Microbiol, 2012, 55(1): 24-32.

[5] 熊曼琪,王庆国,关庆增,等. 伤寒学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006: 92-93.

[6] 杨文. 《伤寒论》麻黄杏仁甘草石膏汤剖析[J]. 江苏中医药, 2011, 43(1): 70-71.

[7] Arena C, Amoros J P, Vaillant V, et al. Simultaneous

investigation of influenza and enteric viruses in the stools of adult patients consulting in general practice for acute diarrhea[J]. Virol J, 2012, 9(1): 1-8.

[8] Laetitia M, Charrel R N, Pierre-Emmanuel C, et al. Prevalence of gastrointestinal symptoms in patients with influenza, clinical significance, and pathophysiology of human influenza viruses in faecal samples: what do we know? [J]. V J, 2015, 12(1): 1-9.

[9] 张波,李玲,卢芳国,等. 麻杏石甘汤对流感病毒感染小鼠肺部炎症与神经氨酸酶活性影响研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(4): 1052-1056.

[10] 贺石林,王键,王净净. 中国科研设计与统计学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2006: 48.

[11] 郭亚丽,刘建,刘燕梅,等. 流感病毒感染后固有免疫病理损伤机制的探讨[J]. 世界中医药, 2015, 10(10): 1476-1479.

[12] 邵敏明,张奉学. 流感病毒介导肺损伤的免疫病理机制的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(2): 236-240.

[13] 张淑静,吴莹,齐晓宇,等. 小鼠流感病毒性肺炎模型中肠道的病变及在中医理论研究中的应用[J]. 世界中医药, 2016, 11(2): 283-287.

[14] WANG J, LI F, WEI H, et al. Respiratory influenza virus infection in duces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation [J]. J Exp Med, 2014, 211(12): 2397-2410.

[15] 于斌,陈孝银. 肺与大肠相表里理论研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2015, 38(6): 389-393.

[16] 莫芳芳,李鸿涛,王柳青,等. 中医“肺与大肠相表里”理论现代研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(2): 512-514.

[17] 张芸,史锁芳. “肺与大肠相表里”学说现代研究进展[J]. 中医研究, 2015, 28(5): 73-75.

[18] 莫芳芳,高思华. 基于中医古籍研究的“肺与大肠相表里”理论应用情况分析[J]. 中医杂志, 2012, 53(20): 1711-1713.

[19] 李冀,连建伟. 《方剂学》[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 36-37.

[20] 李立,赵静,王雪飞,等. 麻杏石甘汤防治甲型 H1N1 流感分子机制的生物信息学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 346-350.

[21] 曾丽娟,丁月文,陈俏妍,等. 麻杏石甘汤和银翘散体外抗流感病毒药理特点的比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(3): 381-385.

[22] 李玲,魏科,卢芳国,等. 基于 TLR4-MyD88-TRAF6 信号通路的麻杏石甘汤抗 A 型流感病毒感染小鼠所致的病毒性肺损伤研究[J]. 中草药, 2017, 48(8): 1591-1596.

[责任编辑 邹晓翠]