

# 解表方通过调节黏膜免疫保护上呼吸道感染模型小鼠的研究

雷娜, 李艳, 何芳雁, 韩春妮, 林青\*  
(云南中医学院, 昆明 650500)

**[摘要]** 目的:观察解表方对上呼吸道黏膜免疫的作用。方法:复制寒冷刺激致上呼吸道黏膜免疫功能低下小鼠模型,观察解表方对模型小鼠唾液中分泌型免疫球蛋白 A(S-IgA)含量和溶菌酶活性的影响;对模型小鼠进行滴鼻、腹腔注射感染肺炎链球菌,观察解表方对其死亡率和生存时间的影响;采用琼脂打孔法进行解表方体外抑菌实验,探讨解表方防治上呼吸道感染的作用。结果:麻黄汤、银翘散均能提高模型小鼠唾液中 SIgA 含量和溶菌酶活性,而玉屏风散仅能升高小鼠唾液中溶菌酶活性;麻黄汤和银翘散能降低滴鼻感染肺炎链球菌小鼠死亡率并延长生存时间;但 3 方对腹腔注射肺炎链球菌小鼠的死亡率没有抑制作用;体外实验证实,3 方均无抑菌作用。结论:提高呼吸道黏膜免疫功能可能是解表方防治上呼吸道感染的作用机制。

**[关键词]** 解表方; 黏膜免疫; 分泌型免疫球蛋白 A; 溶菌酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0174-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013180174

## Effect of Prescription with Function of Relieving the Exterior Syndrome on Upper Respiratory Tract Infection in Mice Model through Regulating Mucosal Immunity

LEI Na, LI Yan, HE Fang-yan, HAN Chun-ni, LIN Qing\*  
(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of prescription with function of relieving the exterior syndrome on upper respiratory tract infection in mice model through regulating mucosal immunity. **Method:** The mouse model of upper respiratory tract mucosal immunity dysfunction was induced by cold stimulation. Then the effects of prescription were evaluated by secretory immunoglobulin A (S-IgA) and lysozyme activity in saliva of the mice. Furthermore, the modeling mice received separately intranasal infection and intraperitoneal injection of streptococcus pneumoniae. The effects of prescription were evaluated by mortality and survival time. The antibacterial activities by *in vitro* experiment were observed. **Result:** Mahuang decoction and Yinqiao Powder could significantly improve the lysozyme activity in the saliva of the mice. In addition, Mahuang decoction also could enhance the S-IgA in the saliva of the animal. In the mice infected by streptococcus pneumoniae via nasal, Mahuang decoction could reduce the mortality rate and prolong survive time. But Mahuang decoction and Yinqiao powder had no protective effect on the upper respiratory tract mucosal immune dysfunction induced by streptococcus pneumoniae intraperitoneal injection. Moreover, no antibacterial ability on streptococcus pneumoniae *in vitro* was found. **Conclusion:** The prescription with function of relieving the exterior syndrome may prevent the upper respiratory infection through improving the function of upper respiratory mucosal immune system.

**[Key words]** Exterior-despelling decoction; mucosal immunity; secretory immunoglobulin A; lysozyme

**[收稿日期]** 20130415(024)

**[基金项目]** 国家中医药管理局“十二五”中医药重点建设学科(培育学科)“中医药微生态学”项目;云南省教育厅科学研究基金资助项目(2010J074);云南中医学院培育学科“食品科学与工程学科”项目

**[第一作者]** 雷娜, 硕士, 助理实验员, 从事中药药理学研究, E-mail: kmlaina3328@126.com

**[通讯作者]** \*林青, 硕士研究生导师, 教授, 从事中药药理学研究, E-mail: 1609627617@qq.com

急性上呼吸道感染 (acute upper respiratory infections, AURI), 是常见的呼吸道传染性疾病。AURI 临床症状与中医表证的证候表现颇为相似, 归属于中医学“表证”的范畴。中医学认为, 外感病初起之时邪在卫表, 治疗多采用解表法, 发汗祛邪, 宣通肺气, 令邪从汗解。在疏风发汗的基础上, 根据病情采用辛温解表、辛凉解表或扶正祛邪法, 方药多用麻黄汤、银翘散、玉屏风散等。中医临床常以这些解表方防治 AURI 并能收到较好的疗效<sup>[1-2]</sup>。但对于解表方防治 AURI 的机制, 已有的研究主要集中在发汗、解热、抗炎、抗病毒、免疫调节等方面, 与化学药物相比, 解表方在这些方面的作用并未表现出显著优势。因此, 现有的研究结果难以解释解表方对 AURI 良好的临床疗效。结合上呼吸道黏膜免疫功能低下是 AURI 发生与发展的重要原因之一<sup>[3]</sup>, 以及呼吸道黏膜中低浓度的分泌型免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, S-IgA) 会增加机体对 AURI 易感性的事实<sup>[4]</sup>, 推测解表方的作用靶点可能与调节呼吸道黏膜免疫功能相关。本研究从调节上呼吸道黏膜免疫功能的角度阐明解表方在防治 AURI 中的作用, 以探讨中医解表法的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 昆明种健康小鼠, 雌雄各半, 清洁级, 体重 18~22 g, 由四川省医学科学院实验动物研究所提供, 合格证号 SCXK(川)2008-24, 批号 0000548。

**1.2 药品与试剂** 根据《方剂学》<sup>[5]</sup>, 受试方剂的药物组成和剂量如下: 麻黄汤 (麻黄 9 g, 桂枝 6 g, 杏仁 6 g, 甘草 3 g); 银翘散 (连翘 30 g, 金银花 30 g, 苦桔梗 18 g, 薄荷 18 g, 竹叶 12 g, 生甘草 15 g, 芥穗 12 g, 淡豆豉 15 g, 牛蒡子 18 g); 玉屏风散 (防风 30 g, 炙黄芪 60 g, 白术 60 g), 以上药材均购自一心堂大药房。按人和动物的体表面积计算法<sup>[6]</sup>, 根据临床药效剂量换算出小鼠用麻黄汤、银翘散、玉屏风散剂量分别为 3.12, 10.92, 9.75 g·kg<sup>-1</sup>, 4℃保存备用。阿莫西林 (昆明贝克诺顿制药有限公司, 批号 091107), 硝酸毛果芸香碱注射液 (天津金耀氨基酸有限公司, 批号 20110926), 小鼠分泌型免疫球蛋白 A (S-IgA) ELISA 试剂盒 (武汉华美生物有限公司, 批号 28071963), 溶菌酶测试盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20110926)。

**1.3 菌株** 临床分离肺炎链球菌菌株由云南省第一人民医院微生物检验室鉴定及提供。

**1.4 仪器** T6 紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司), Infinite M200 PRO 酶标分析仪 (瑞士

Tecan 公司), DL-ZD1 光电浊度计 (珠海迪尔生物工程有限公司), LRH-250 生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 对模型小鼠唾液中溶菌酶活性和 S-IgA 含量的影响** 将实验用小鼠随机分为 5 组, 即正常组、模型组、麻黄汤组、银翘散组和玉屏风散组, 剂量分别为 3.12, 10.92, 9.75 g·kg<sup>-1</sup>, 连续 ig 给药 3 d, 正常组和模型组给蒸馏水。第 3 天除正常组外, 将其余各组实验动物放入 -20℃寒冷环境中刺激 15 min, 复制寒冷刺激至上呼吸道黏膜免疫低下模型<sup>[7-8]</sup> (以下黏膜免疫低下模型小鼠均简称模型小鼠), 造模后再立即给 1 次药, 于 60 min 后小鼠 ip 0.1% 毛果芸香碱注射液 0.3 mL/只, 2 min 后用移液枪取小鼠唾液于 Eppendorf 管中, -40℃保存。分别测定小鼠唾液中溶菌酶活性和 S-IgA 含量。

**2.2 对肺炎链球菌滴鼻模型小鼠的生存保护作用** 将实验用小鼠随机分为 6 组, 即正常组、模型组、阿莫西林 1.04 g·kg<sup>-1</sup>组、麻黄汤组、银翘散组和玉屏风散组, 给药方法、复制黏膜免疫低下模型的方法同 2.1, 于造模 60 min 后, 用滴鼻预实验中能使小鼠死亡率为 90% 左右的肺炎链球菌悬液滴鼻 0.05 mL/只, 菌液浓度为 5 × 10<sup>9</sup> CFU/mL, 并于滴鼻后 60 min 再给药 1 次。观察感染后 7 d 动物的死亡情况, 比较各组动物的死亡率和存活时间。

**2.3 对腹腔注射肺炎球菌模型小鼠的生存保护作用** 实验动物的分组、给药、复制黏膜免疫低下模型的方法同 2.2, 小鼠在室温下适应 60 min 后, 分别 ip 预实验中使小鼠死亡率为 90% 左右的肺炎链球菌悬液 0.5 mL/只, 菌液浓度为 5 × 10<sup>6</sup> CFU/mL, ip 后 60 min 再给药 1 次, 观察感染后 7 d 动物的死亡情况, 比较各组动物的死亡率和存活时间。

**2.4 体外抑菌实验** 麻黄汤 (24 g)、银翘散 (168 g)、玉屏风散 (150 g) 3 个汤剂煎煮后, 各煎液依次浓缩至 24, 168, 150 mL, 制成 1 g·mL<sup>-1</sup> 供试品, 灭菌备用。阳性药组: 阿莫西林浓度为 1 g·mL<sup>-1</sup>, 用生理盐水配制, 灭菌备用。

采用琼脂打孔法<sup>[9]</sup>, 用 6 mm 孔径无菌打孔器在培养基上均匀打 5 个孔, 用无菌棉签蘸取细菌浓度为 5 × 10<sup>8</sup> CFU/mL 的菌液, 在培养基平面上作均匀划线, 然后将上述药液分别加入各孔中, 每孔 50 μL, 每个培养皿设一个阳性药对照孔 (阿莫西林) 和一个正常对照孔 (生理盐水), 将加药的培养基置于 37℃恒温箱中培养 24 h, 观察抑菌圈, 用卡

尺测量其直径,每次实验重复操作 2 次,最后取其平均值<sup>[10]</sup>。结果判定:抑菌圈大于 15 mm 的属于高度敏感(++) ,10 ~ 15 mm 为敏感(+),小于 10 mm 的属于耐药(-)。

**2.5 数据统计和处理** 试验结果均以 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计量资料数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料采用卡方检验。 $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对模型小鼠唾液中溶菌酶活性和 S-IgA 含量的影响** 研究结果显示,模型组小鼠与正常组比较,唾液中溶菌酶活性及 S-IgA 含量明显低于正常组( $P < 0.01$ ),有统计学意义;玉屏风散仅提高模型小鼠唾液中溶菌酶活性;银翘散能升高模型小鼠唾液中 S-IgA 含量,对溶菌酶活性有升高趋势。而麻黄汤既能提高模型小鼠唾液中溶菌酶活性,也能提高 S-IgA 含量( $P < 0.05$ )。结果见表 1。

表 1 解表方对模型小鼠唾液中溶菌酶活性和 S-IgA 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 13$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	溶菌酶/U·mL <sup>-1</sup>	S-IgA/μg·L <sup>-1</sup>
正常	-	89.07 ± 38.90 <sup>2)</sup>	37.31 ± 6.39 <sup>2)</sup>
模型	-	42.52 ± 24.05	30.44 ± 5.60
麻黄汤	3.12	80.05 ± 37.60 <sup>1)</sup>	35.93 ± 5.47 <sup>1)</sup>
银翘散	10.92	69.69 ± 27.00	35.17 ± 6.83 <sup>1)</sup>
玉屏风散	9.75	81.47 ± 35.80 <sup>1)</sup>	31.30 ± 4.15

注:与模型对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 同)。

**3.2 解表方对肺炎链球菌滴鼻模型小鼠的生存保护作用** 实验结果表明,与模型组小鼠比较,麻黄汤、银翘散能降低模型小鼠的死亡率并延长其生存时间( $P < 0.01$ )。而玉屏风散对模型小鼠的死亡无保护作用(表 2)。提示解表方降低黏膜免疫低下合并鼻腔感染肺炎链球菌模型小鼠的死亡率,可能与其能够提高呼吸道局部黏膜免疫水平有关。

表 2 解表方对肺炎链球菌滴鼻模型小鼠生存保护作用( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	死亡数/只	死亡率/%	存活时间/d
正常	-	0	0 <sup>2)</sup>	7 <sup>2)</sup>
模型	-	20	100	1.80 ± 0.79
阿莫西林	1.04	10	50 <sup>2)</sup>	5.40 ± 2.07 <sup>2)</sup>
麻黄汤	3.12	10	50 <sup>2)</sup>	4.60 ± 2.63 <sup>2)</sup>
银翘散	10.92	12	60 <sup>2)</sup>	4.50 ± 2.42 <sup>2)</sup>
玉屏风散	9.75	18	90	2.90 ± 1.85

**3.3 对 ip 肺炎链球菌模型小鼠的生存保护作用** 结

果显示,麻黄汤、银翘散以及玉屏风散不能降低 ip 肺炎链球菌模型小鼠的死亡率,但阿莫西林对模型小鼠有保护作用( $P < 0.01$ ),见表 3。进一步说明解表方防治上呼吸道感染的作用可能是通过增强呼吸道的局部免疫实现,且与杀菌或抑菌作用无关。

表 3 解表方对腹腔注射肺炎链球菌的模型小鼠生存保护作用( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	死亡数/只	死亡率/%	存活时间/d
正常	-	0	0 <sup>2)</sup>	7 <sup>2)</sup>
模型	-	19	95	0.58 ± 1.62
阿莫西林	1.04	1	5 <sup>2)</sup>	6.65 ± 1.57 <sup>2)</sup>
麻黄汤	3.12	18	90	0.84 ± 2.11
银翘散	10.92	17	85	1.30 ± 2.56
玉屏风散	9.75	18	90	0.79 ± 2.12

**3.4 解表方的体外抗菌实验** 结果显示,阿莫西林组呈高度敏感,3 个汤剂 1 g·mL 质量浓度均无体外抑菌作用。

### 4 讨论

黏膜表面面积很大,成年人约有 400 m<sup>2</sup>,广泛分布于人体的呼吸道、消化道、泌尿生殖道等处。S-IgA 是黏膜免疫系统的主要效应分子,它通过空间构象凝集、捕获黏膜表层的病原体,阻止其对黏膜表面的入侵。同时,也可与溶菌酶、补体共同作用,引起细菌溶解,实现免疫排除<sup>[11]</sup>。因此,测定 S-IgA 和溶菌酶在唾液中的含量可作为了解上呼吸道黏膜免疫功能的重要指标。课题组的前期研究已经证实寒冷刺激能使小鼠呼吸道黏膜免疫功能下降<sup>[7]</sup>。在此模型基础上,本实验进一步考察解表方对黏膜免疫的影响。研究结果显示,麻黄汤、银翘散能升高模型小鼠唾液中 S-IgA 含量和溶菌酶活性;同时,麻黄汤、银翘散能够降低黏膜免疫低下合并鼻腔接种肺炎链球菌小鼠的死亡率并延长其生存时间。推测麻黄汤、银翘散两个解表方对滴鼻感染肺炎链球菌小鼠的生存保护作用,可能与提高小鼠唾液中 S-IgA 含量和溶菌酶活性有关。与此同时,在对腹腔感染肺炎链球菌的模型中,麻黄汤、银翘散则没有观察到对小鼠死亡的保护作用,体外实验也无抗菌作用。综上结果提示,解表方不是通过直接抑菌或杀菌发挥作用,而是通过增强上呼吸道局部黏膜免疫功能,提高 S-IgA 含量,达到防治 AURI 的作用。S-IgA 可能是防治 AURI 的靶点,这为防治 AURI 的药物研究提供新的思路和靶点。

# 从细胞凋亡和周期研究旋覆归连方抑制食管癌 Eca9706 细胞增殖作用

吴耀松, 马俊华, 陈玉龙\*, 尹素改  
(河南中医学院, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的: 从细胞增殖、周期和凋亡研究旋覆归连方治疗食管癌作用机制。方法: 体外培养食管癌细胞株 Eca9706, MTT 法检测旋覆归连方抑制细胞增殖作用, 观察其时效和量效;  $1 \times 10^5$ /孔细胞接种于 6 孔板, 加入 15, 25, 60  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的药物作用 48 h, 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡。结果: 旋覆归连方具有很强的抑制 Eca9706 增殖作用, 具有剂量依赖性,  $\text{IC}_{50}$  58.11  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 质量浓度 15, 25, 60  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  在 96 h 内抑制率依时增加; 早、晚期凋亡率用药组与阴性对照组相比明显增高 ( $P < 0.05$ ); 细胞  $G_1/G_0$  期比率也明显增加 ( $P < 0.05$ ), 60  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组出现了明显的凋亡峰。结论: 旋覆归连方能抑制食管癌细胞的增殖, 具有浓度和时间依赖性, 可能与其阻滞了细胞  $G_1/G_0$  期和诱导细胞凋亡有关。

**[关键词]** 旋覆归连方; 食管癌; 增殖; 周期; 凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0177-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013180177

## Researching the Inhibitory Effect of Xuanfu Guilian Prescription on Eca9706 Esophagus Carcinoma Cell Proliferation from the Cell Cycle and Apoptosis

WU Yao-song, MA Jun-hua, CHEN Yu-long\*, YIN Su-gai  
(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** From the cell proliferation, cycle and apoptosis researching the mechanism which

**[收稿日期]** 20130212(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173177)

**[第一作者]** 吴耀松, 硕士, 从事中医肿瘤方证的研究, Tel:0371-65680049, E-mail:linawys@163.com

**[通讯作者]** \* 陈玉龙, 博士, 副教授, 硕导, 从事肿瘤病机与防治的研究。Tel:0371-65680049, E-mail:cyl72621@163.com

### [参考文献]

- [1] 卜繁慧. 小儿解表颗粒治疗小儿急性上呼吸道感染疗效观察[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(17): 2217.
- [2] 王春茹. 中西医结合治疗急性呼吸道感染 118 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 295.
- [3] 曾常茜. 分泌型 IgA 在黏膜抗感染中的作用[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2005, 6(1): 33.
- [4] 王孝钦. 培土生金方治疗小儿反复呼吸道感染[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 216.
- [5] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003, 30.
- [6] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203.

- [7] 李娟, 雷娜, 段小花, 等. 寒冷刺激致小鼠上呼吸道黏膜免疫功能低下模型的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(8): 1662.
- [8] Makinen T M, Juvonen R, Jokelainen J, et al. Cold temperature and low humidity are associated with increased occurrence of respiratory tract infections[J]. Respiratory Medicine, 2009, 103(3): 456.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 278.
- [10] 史跃杰. 黄芩黄连水煎剂对厌氧菌的体外抑菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 226.
- [11] 陈艳, 江明锋, 叶煜辉, 等. 溶菌酶的研究进展[J]. 生物学杂志, 2009, 26(2): 64.

[责任编辑 聂淑琴]