

清营解表合剂对流感病毒感染小鼠外周血 Th1, Th2 型细胞因子动态表达的影响

任亮, 宋素花, 姜璐, 姜政驰, 宋荣强, 刘永, 吕翠霞*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 探讨清营解表合剂对流感病毒感染小鼠免疫功能的影响。方法: 以流感病毒亚洲甲型鼠肺适应株(A/PR/8/H1N1)感染小鼠为模型, 灌服清营解表合剂 $16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.4 mL/只), 1 次/d, 连续 ig 给药 12 d, 应用流式细胞仪分析药后 3, 6, 9, 12 d 特异性细胞因子 γ -干扰素, 肿瘤坏死因子- α , 白细胞介素 3, 4, 6, 10 的动态表达水平及 Th1 (IFN- γ)/Th2 (IL-4) 值。结果: 流感病毒感染小鼠后 3 d, 细胞因子 IFN- γ 升高显著 ($P < 0.05$), 6, 9, 12 d 无显著改变, 6, 9 d 较 3 d 均降低显著 ($P < 0.05$); 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 TNF- α 均升高显著 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 IL-3 均升高, 3, 6 d 差异显著 ($P < 0.05$); 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 IL-4, IL-6, IL-10 均显著升高 ($P < 0.01$), 在早期 3 d 达到峰值; 3, 6, 9, 12 d 外周血 Th1 (IFN- γ)/Th2 (IL-4) 明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且 6 d 降到最低点, 12 d 较 6 d 升高显著 ($P < 0.05$)。经清营解表合剂治疗后, 3 d 细胞因子 IFN- γ 水平升高, 较模型组无显著差异, 6, 9, 12 d 较模型组升高显著 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 TNF- α 水平表达较模型组均明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 IL-3 较模型组均有所下降, 但差异无统计学意义; 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 IL-4, IL-6, IL-10 水平较模型组均显著降低; 3, 6, 9, 12 d 外周血 Th1 (IFN- γ)/Th2 (IL-4) 均升高, 差异显著 ($P < 0.01$), 12 d 清营解表组较 3 d 升高显著 ($P < 0.01$)。结论: 清营解表合剂通过调节流感病毒感染小鼠外周血 Th 型细胞因子的表达水平, 恢复机体的抗感染免疫平衡, 提高机体免疫功能, 以防治流感病毒感染。

[关键词] 清营解表合剂; 流感病毒; 细胞因子; 流式细胞术

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0255-06

[doi] 10.11653/syfy2013110255

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130329.1403.005.html>

[网络出版时间] 2013-03-29 14:03

[收稿日期] 20120525(376)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672589)

[第一作者] 任亮, 硕士, 从事教学工作, Tel: 13375319611, E-mail: rlyj2005@163.com

[通讯作者] * 吕翠霞, 教授, 硕士生导师, 从事仲景杂病证治规律研究及中医体质规律的基础与临床研究, Tel: 13153033759, E-mail: 13153033759@126.com

- [13] Meng Zhiqiang, Yang Peiyong, Shen Yehua, et al. Pilot study of huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, nonsmall-cell lung cancer, or pancreatic cancer[J]. *Cancer*, 2009, 115(22): 5309.
- [14] 程文宁, 肖家全. 华蟾素抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. *医学综述*, 2009, 15(8): 1193.
- [15] Liu L F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs [J]. *Annu Rev Biochem*, 1989, 11(58): 351.
- [16] Wang J C. DNA topoisomerases [J]. *Annu Rev Biochem*, 1985, 54(1): 665.
- [17] Giovanella B C, Stehlin J S, Wall M E, et al. DNA topoisomerase I -targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts [J]. *Science*, 1989, 246(4933): 1046.
- [18] Potmesil M, Hsiang Y H, Liu L F, et al. Resistance of human leukemic and normal lymphocytes to drug-induced DNA cleavage and low levels of DNA topoisomerase II [J]. *Cancer Res*, 1988, 15(48): 3537.
- [19] Rho Y H, Lee B W, Park K H, et al. Cudraflavanone A purified from *Cudrania tricuspidata* induces apoptotic cell death of human leukemia U937 cells, at least in part, through the inhibition of DNA topoisomerase I and protein kinase C activity [J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2007, 18(9): 1023.
- [20] 潘亚奇, 袁公, 杨艳维. DNA 拓扑异构酶 II α 与肿瘤 [J]. *医学信息*, 2011, 2(3): 415.

[责任编辑 李玉洁]

Influence of Qingying Jiebiao Mixture on Dynamic Expression of Peripheral Blood Cytokines Th1, Th2 in Mice Infected by Influenza Virus

REN Liang, SONG Su-hua, JIANG Lu, LOU Zheng-chi, SONG Rong-qiang, LIU Yong, LV Cui-xia*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Qingying Jiebiao mixture (QJM) on immune function in mice infected by flu virus. **Method:** The model of influenza virus in mice was established by lung infection with Asia line (A/PR/8/H1N1). QJM suspension ($0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.4 mL was orally given to each mouse ($16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) daily for 12 days. After administration of 3, 6, 9 d and 12 d, the expression level of specific cytokine interferon-gamma, tumor necrosis factor- α , interleukin 3, 4, 6, 10, the ratio of Th1 (interferin- γ , IFN- γ) and Th2 (interleukin-4, IL-4) were determined by flowcytometry. **Result:** After the mice was infected with influenza virus, cytokines IFN- γ at 3 d was increased significantly ($P < 0.05$), those at 6, 9 d and 12 d showed no significant changes. IFN- γ at 6, 9 d was decreased significantly compared with that at 3 d ($P < 0.05$); and cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α) at 3, 6, 9, 12 d were increased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$); cytokines IL-3 at 3, 6, 9, 12 d was increased, those at 3, 6 d showed significant difference ($P < 0.05$). Cytokines IL-4, IL-6 and IL-10 at 3, 6, 9, 12 d were significantly increased ($P < 0.01$), and reached the peak in the early 3 d. Peripheral blood Th1 (IFN- γ) /Th2 (IL-4) at 3, 6, 9, 12 d were decreased obviously ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and dropped to the lowest point at 6 d, and then increased significantly at 12 d compared with that at 6 d ($P < 0.05$). After treatment of QJM, cytokines IFN- γ at 3 d was slightly increased, without significance to the model, however those at 6, 9, 12 d were increased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$) compared to the model. Cytokines level of TNF- α expression at 3, 6, 9, 12 d were significantly decreased compared to those in the model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Cytokine IL-3 at 3, 6, 9, 12 d was slightly decreased, without significance to the model. Cytokines IL-4, IL-6, IL-10 at 3, 6, 9, 12 d were significantly lower than those in the model group. Peripheral blood Th1 (IFN- γ) /Th2 (IL-4) at 3, 6, 9, 12 d were significantly increased ($P < 0.01$), and that at 12 d was increased significantly compared with that at 3 d ($P < 0.01$). **Conclusion:** QJM can control the infection of influenza virus through regulating Th type cytokine expression in infected mice, improving immune function and restoring the resistance to infection.

[Key words] Qingying Jiebiao mixture; influenza virus; cytokines; flowcytometry

流感病毒作为一种高发病率、高传染性、高致死率的急性呼吸道病毒^[1],感染机体后,可启动宿主免疫应答,形成炎症反应和炎症免疫病理损伤。在免疫病理性损伤过程中,涉及多种免疫细胞和细胞因子,基于细胞因子的多效性和相互作用,单一调节某一细胞或细胞因子策略很难奏效,而中医药在调节细胞免疫的过程中具有明显的优势^[2]。因此,充分发挥中医复方的多成分,多环节作用特点,从而为病毒感染过程中炎症免疫病理损伤的治疗提供新的思路^[3]。临床验方清营解表合剂由金银花、连翘、白薇、生地黄、麦冬、荆芥等中药组成,具有辛凉疏表、清营透邪等功效,用于偏内热体质的感冒患者出现发热、头痛、咽痛等症,效果显著。本实验通过流

感病毒感染小鼠,选择流感病毒感染免疫病理损伤相关的一些主要细胞因子进行动态观察,探讨清营解表合剂的免疫作用机制。

1 材料

1.1 动物 BALB/c 小鼠,SPF 级,18 ~ 20 g,雌雄各半,山东大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK (鲁)20090001。

1.2 试剂与流感病毒株 FITC/Control (BD Pharmingen™ Cat. 400605), PE/Cy5/Control (BD Pharmingen™ Cat. 400509), CD4-FITC (BD Pharmingen™ Cat. 100405), CD8-PE/Cy5 (BD Pharmingen™ Cat. 100709), 溶血素 (BD FACS™ Lysing solution Cat. 349202), 1% 多聚甲醛, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

PBS 缓冲液(购于 BD 公司)。

流感病毒亚洲甲型鼠肺适应株(A/PR/8/H1N1),由国家流感中心病毒所提供,鸡胚传代后,血凝滴度为 1:64, -70 °C 冻存备用。

1.3 药物 清营解表合剂(由金银花、连翘、白薇、生地黄、麦冬、荆芥等中药组成,由山东中医药大学门诊部药剂科提供,实验时配制成 $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),利巴韦林注射液(辰欣药业股份有限公司生产,生产批号 0210022)。

1.4 器材 FACSCalibur CellSorting System(流式细胞仪),BD Bioscience(USA),YYQ-20P 型普瑞牌移液器(北京明力普瑞科技有限公司),LGR16-w 高速冷冻离心机(北京医用离心机厂)。本流式细胞仪所用的塑料制品均使用进口原装一次性制品。

2 方法

2.1 造模与给药 将小鼠随机分为正常空白组、感染模型组、病毒唑对照组、清营解表组 4 个大组,每个大组 48 只。每个大组小鼠又随机分为 4 个时点小组(第 3, 6, 9, 12 天),每个小组 12 只。

乙醚轻度麻醉小鼠后,以流感病毒液(病毒原液 1:64 稀释)滴鼻感染小鼠,0.025 mL/只,正常组以等量 0.9% 生理盐水滴鼻。造模后 2 h 给药,清营解表组 ig 清营解表合剂混悬液($0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)0.4 mL/只,1 次/d;正常对照组、模型组、小鼠 ig 0.9% 生理盐水 0.4 mL/只,1 次/d。病毒唑组 ip 病毒唑 0.5 mL/只,其余各组每只小鼠 ip 等量 0.9% 生理盐水,1 次/d,连续给药 12 d。

2.2 对外周血细胞因子表达的影响

2.2.1 PBMC(外周血单个核细胞)的分离 取肝素钠抗凝全血,用等量 RPMI 1640 稀释,在离心管中加入适量的淋巴细胞分离液,然后将稀释好的全血用滴管沿管壁缓慢加入分离液液面,水平离心 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min。收集白色云雾状层的单个核细胞,用洗液洗 2 遍,再用含 $100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 胎牛血清(FCS)的 RPMI 1640 调整细胞密度为 2×10^6 个/mL。取 500 μL 细胞悬液接种于 6 孔培养板中,加入丙二醇甲醚醋酸酯(PMA)($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、Ionomycin($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、monensin($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),在 37 °C, 5% CO_2 培养箱中培养 4 h 后,每孔加入 DNA 酶 I $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (减少细胞凝集),用橡皮刮刮下各孔细胞,置 5 mL 专用试管中于 37 °C 作用 5 min,使细胞分散。然后用 PBS 缓冲液洗涤 2 遍。

2.2.2 细胞膜表面标记的染色 取同一份刺激培

养的细胞样品分成 2 管,一管用于阴性对照的染色,每份加入 100 μL ($100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) 含 FCS 的 RPMI 1640 制成单细胞悬液,同时加入 5 μL IgG 2b-FITC/IgG2a-PE/Cy5/IgG1-PE;另一管用于待测样品的染色,每份加入 100 μL ($100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) 含 FCS 的 RPMI 1640 制成单细胞悬液,同时加入 5 μL CD3-FITC 和 5 μL CD8-PE/Cy5,室温下避光染色 30 min,用 PBS 缓冲液洗 2 遍,加入 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛避光固定 10 min 后,用 PBS 缓冲液再洗 1 遍。

2.2.3 细胞膜通透 加入 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS/5% FCS/0.1% spanoin 200 μL ,室温下避光孵育 20 min,用 PBS 缓冲液洗涤 1 遍,再加入 100 μL PBS 缓冲液重悬成单细胞悬液。

2.2.4 胞内细胞因子染色 在 CD3/CD8 反应管中,分别加 5 μL IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-3-PE 直标 mAb,室温下避光染色 30 min。用 PBS 缓冲液洗涤 1 遍,加入终质量浓度 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定,置 4 °C 冰箱冷藏,24 h 以内进行 FCM 检测。

2.2.5 观察指标 FCM 法检测小鼠外周血 CD4^+ T 细胞分泌的细胞因子(IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-3)及 Th1(IFN- γ)/Th2(IL-4)。

2.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 对模型小鼠外周血 IFN- γ 表达的影响 流感病毒感染小鼠后 3 d,外周血 IFN- γ 水平较正常对照组升高显著($P < 0.05$);6, 9 d 与 3 d 比较均显著降低($P < 0.05$)。经清营解表合剂治疗后,IFN- γ 水平有上升趋势,但与模型组比较,差异无显著性;6, 9, 12 d 较模型组显著升高($P < 0.01, P < 0.05$)。结果见表 1。

3.2 对模型小鼠外周血 TNF- α 表达的影响 流感病毒感染小鼠后,外周血 TNF- α 水平表达各时间点均明显高于正常对照组($P < 0.01, P < 0.05$),且早期即达峰值。清营解表合剂治疗后在各时间点均较模型组均明显下降($P < 0.01, P < 0.05$),且呈逐渐降低趋势。见表 2。

3.3 对模型小鼠外周血 IL-3 表达的影响 流感病毒感染小鼠后,外周血 IL-3 表达各时间点均高于正常对照组,3, 6 d 差异显著($P < 0.05$)。清营解表合剂、病毒唑治疗各时间点较模型组均有所下降,但差异无统计学意义。见表 3。

表 1 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠外周血 IFN- γ 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

%

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 d	6 d	9 d	12 d
正常对照	-	3.36 ± 0.29 ¹⁾	3.24 ± 0.29	3.40 ± 0.30	3.21 ± 0.48
模型	-	3.81 ± 0.22	3.02 ± 0.30 ³⁾	3.19 ± 0.35 ³⁾	3.46 ± 0.60
病毒唑	2.5	4.07 ± 0.47	3.71 ± 0.42 ¹⁾	3.90 ± 0.47 ¹⁾	4.16 ± 0.55 ¹⁾
清营解表	16.0	3.95 ± 0.43	3.98 ± 0.42 ²⁾	4.15 ± 0.66 ²⁾	4.18 ± 0.44 ¹⁾

注:与同时点模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与同组 3 d 比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2, 4, 6 同)。

表 2 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠外周血 TNF- α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

%

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 d	6 d	9 d	12 d
正常对照	-	3.59 ± 0.70 ²⁾	3.76 ± 0.77 ²⁾	3.59 ± 0.69 ²⁾	3.58 ± 0.85 ¹⁾
模型	-	4.99 ± 0.62	4.72 ± 0.67	4.49 ± 0.59	4.24 ± 0.51 ³⁾
病毒唑	2.5	4.36 ± 0.71 ¹⁾	4.21 ± 0.51 ¹⁾	3.74 ± 0.52 ²⁾	3.67 ± 0.60 ¹⁾
清营解表	16.0	4.26 ± 0.56 ²⁾	4.17 ± 0.60 ¹⁾	3.85 ± 0.51 ¹⁾	3.65 ± 0.62 ¹⁾

表 3 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠外周血 IL-3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

%

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 d	6 d	9 d	12 d
正常对照	-	0.84 ± 0.31 ¹⁾	0.81 ± 0.31 ¹⁾	0.80 ± 0.28	0.86 ± 0.28
模型	-	1.17 ± 0.53	1.18 ± 0.57	1.00 ± 0.26	0.99 ± 0.22
病毒唑	2.5	1.10 ± 0.39	0.97 ± 0.36	0.96 ± 0.43	0.96 ± 0.27
清营解表	16.0	1.07 ± 0.46	0.96 ± 0.24	0.96 ± 0.28	0.93 ± 0.26

注:与同时点模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 对模型小鼠外周血 IL-4 表达的影响 流感病毒感染小鼠后,外周血 IL-4 水平各时间点均高于正常对照组 ($P < 0.01, P < 0.05$),且早期即达峰值。经清营解表合剂治疗后各时间点较模型组均有所下降,3,6 d 下降均显著 ($P < 0.01, P < 0.05$),12 d 清营解表组较模型组下降显著 ($P < 0.05$)。12 d 清营解表组较 3 d 下降显著 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.5 对模型小鼠外周血 IL-6 表达的影响 流感病毒感染小鼠后,外周血 IL-6 水平表达各时间点均高于正常对照组 ($P < 0.01, P < 0.05$),且早期即达峰值。清营解表合剂治疗后外周血 IL-6 水平表达在各时间点较模型组降低但无显著性差异,呈逐渐降低趋势。见表 5。

3.6 对模型小鼠外周血 IL-10 表达的影响 流感病毒感染小鼠后,外周血 IL-10 表达各时间点较正常对照组升高明显 ($P < 0.01$),12 d 较 3 d 下降显著 ($P < 0.05$)。清营解表合剂治疗后较模型组各时间点均明显降低 ($P < 0.05$);12 d 清营解表组较 3 d 下降显著 ($P < 0.01$)。见表 6。

3.7 对小鼠外周血 Th1 (IFN- γ)/Th2 (IL-4) 的影响 流感病毒感染小鼠后,外周血 Th1/Th2 3,6,9,12 d 较正常对照组明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$),12 d 较 6 d 升高显著 ($P < 0.05$)。清营解表合剂治疗后较模型组各时间点均升高,差异显著 ($P < 0.01$);12 d 清营解表组较 3 d 升高显著 ($P < 0.01$)。见表 7。

表 4 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠外周血 IL-4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

%

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 d	6 d	9 d	12 d
正常对照	-	1.38 ± 0.40 ²⁾	1.29 ± 0.51 ²⁾	1.28 ± 0.48 ²⁾	1.34 ± 0.46 ¹⁾
模型	-	2.32 ± 0.48	2.15 ± 0.59	1.99 ± 0.73	1.82 ± 0.62 ³⁾
病毒唑	2.5	1.86 ± 0.39 ¹⁾	1.71 ± 0.29 ¹⁾	1.72 ± 0.54	1.45 ± 0.44 ³⁾
清营解表	16.0	1.78 ± 0.45 ²⁾	1.69 ± 0.42 ¹⁾	1.63 ± 0.49	1.37 ± 0.43 ^{1,3)}

表5 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠外周血 IL-6 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

%

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	3 d	6 d	9 d	12 d
正常对照	-	2.31 ± 0.53 ²⁾	2.36 ± 0.36 ²⁾	2.30 ± 0.67 ²⁾	2.37 ± 0.67 ¹⁾
模型	-	3.57 ± 0.79	3.43 ± 0.67	3.02 ± 0.64	2.93 ± 0.63
病毒唑	2.5	2.97 ± 0.51 ¹⁾	2.87 ± 0.52	2.82 ± 0.70	2.43 ± 0.44
清营解表	16.0	3.19 ± 0.61	2.93 ± 0.50	2.74 ± 0.57	2.67 ± 0.55

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。表6 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠外周血 IL-10 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

%

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	3 d	6 d	9 d	12 d
正常对照	-	2.18 ± 0.60 ²⁾	2.15 ± 0.47 ²⁾	2.29 ± 0.51 ²⁾	2.22 ± 0.71 ²⁾
模型	-	3.33 ± 0.74	3.29 ± 0.49	3.12 ± 0.41	2.83 ± 0.49 ³⁾
病毒唑	2.5	3.18 ± 0.51	2.81 ± 0.67 ¹⁾	2.76 ± 0.71	2.62 ± 0.43 ³⁾
清营解表	16.0	2.85 ± 0.47 ¹⁾	2.76 ± 0.47 ¹⁾	2.63 ± 0.69 ¹⁾	2.37 ± 0.47 ^{1,3)}

表7 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠外周血 Th1 (IFN- γ)/Th2 (IL-4) 的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

%

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	3 d	6 d	9 d	12 d
正常对照	-	2.48 ± 0.23 ²⁾	2.67 ± 0.56 ²⁾	2.70 ± 0.28 ²⁾	2.55 ± 0.48 ¹⁾
模型	-	1.65 ± 0.12	1.43 ± 0.16	1.65 ± 0.22	2.07 ± 0.63 ⁵⁾
病毒唑	2.5	2.06 ± 0.06 ¹⁾	2.18 ± 0.12 ²⁾	2.46 ± 0.83 ^{2,3)}	3.02 ± 0.58 ^{2,4)}
清营解表	16.0	2.24 ± 0.16 ²⁾	2.38 ± 0.24 ²⁾	2.75 ± 0.81 ^{2,4)}	3.21 ± 0.68 ^{2,4)}

注:与同时点模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与同组 3 d 比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与同组 6 d 比较⁵⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

根据 Th 细胞所分泌的细胞因子不同,将其分为 Th0, Th1 和 Th2 3 种亚型^[4]。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ , TNF- α , IL-3 等细胞因子,其中以 IFN- γ 为典型代表,IFN- γ 可干扰病毒复制,可特异性杀伤病毒感染细胞,表现为急性一过性炎性反应^[5]。TNF- α 作为重要的致炎细胞因子,其在流感病毒感染过程中对肺脏具有强烈的毒性^[5-7]。IL-3 可诱导机体体液免疫应答,产生抗体以中和病毒,还可促进嗜酸粒细胞的细胞毒作用,起到清除病毒的作用。本实验结果显示,流感病毒感染小鼠后,外周血 Th1 型细胞因子 IFN- γ , TNF- α , IL-3 在 3 d 较正常对照组升高显著,且达到峰值,说明病毒感染早期机体很快发生免疫应答反应,能够产生抗病毒作用,但亦有研究表明^[8] IFN- γ , TNF- α 作为炎症因子参与流感病毒感染早期炎症病理损伤。随着疾病进一步发展,IFN- γ 表达从 3 d 开始下降,6 d 达到最低点,且较 3 d 下降明显,提示流感病毒感染后机体在 6 d 抗病毒能力相对较弱;随着机体的保护性免疫反应,IFN- γ 表达从 6 d 开始升高,9,12 d 细胞因子 IFN- γ 表达均高于 6 d,但较正常对照组无显著改变,提示随着机体

抗病毒免疫反应的发生,病毒被大量抑制或清除,到病毒感染中后期,IFN- γ 表达向正常水平恢复。细胞因子 TNF- α 水平表达从 3 d 峰值开始下降,6,9,12 d 较 3 d 下降,且 12 d 较 3 d 下降显著,但各时间点仍明显高于正常对照组,正如有关研究表明, TNF- α 的高水平表达可引起多种病理生理变化损伤机体,是流感病毒病理损伤重要原因之一^[9];6 d 时细胞因子 IL-3 仍较正常对照组升高显著,9,12 d 细胞因子 IL-3 表达较正常对照组无明显改变,表明 IL-3 可能在早期参与炎症反应,也可能作为协同细胞因子参与免疫反应。经清营解表合剂治疗后,3 d 外周血 IFN- γ 较模型组升高不明显,这可能与药物能够防治早期炎症反应有关,6,9,12 d 较模型组显著升高,说明清营解表合剂能促进 IFN- γ 高表达,使 Th1 细胞反应占优势,从而提高机体抗病毒感染能力及防止病毒反复感染。外周血 TNF- α 水平表达 3,6,9,12 d 较模型组明显下降,且在早期 3 d 开始到 12 d 整个发病过程呈现递减趋势,说明清营解表合剂能通过免疫调节使 TNF- α 水平表达下调,减轻炎症反应,减轻免疫病理损伤,且调节 TNF- α 水平表达下调的作用是稳定的。3,6,9,12 d 细胞因子

IL-3 较模型组均降低但无显著性差异,说明清营解表合剂对 IL-3 调节作用不显著,更进一步说明 IL-3 有可能只是作为某种细胞因子的协同因子起作用。

Th2 细胞主要分泌 IL-4, IL-6, IL-10 等细胞因子,其中以 IL-4 为典型代表,可增强中性粒细胞介导的吞噬、杀伤活性和 ADCC 作用;能够抑制 Th1 细胞活化,并促进 Th0 细胞向 Th2 细胞分化^[10]。IL-6 的生物学活性具有明显双重性,不仅作用于免疫活性细胞,还参与炎症反应,是主要促炎细胞因子之一^[11]。IL-10 是具有多向性生物学活性的强免疫抑制因子,能改变机体的免疫应答。机体病毒感染时,IL-10 高水平表达,既削弱机体的防御功能,又限制机体过度异常的免疫反应^[12]。本实验结果显示,外周血 Th2 型细胞因子 IL-4, IL-6, IL-10 水平表达均极度升高,在早期 3 d 达到峰值,从 3 d 开始呈现下降趋势,6, 9, 12 d 较 3 d 均下降,但 6, 9, 12 d 仍较正常对照组升高显著,说明病毒感染机体后,早期就发生免疫病理损伤,中后期仍然存在病理损伤, Th 细胞以 Th2 细胞反应占优势表达,免疫平衡向 Th2 细胞反应漂移。经清营解表合剂治疗后, 3, 6, 9, 12 d 细胞因子 IL-4, IL-6, IL-10 水平较模型组均显著降低,且 12 d 细胞因子 IL-4, IL-10 较 3 d 下降显著,说明清营解表合剂早期就能明显降低 Th2 细胞因子表达,早期免疫平衡失衡严重阶段能抗病毒,防止病情恶化发生严重并发症,中后期持续降低,提示清营解表合剂可防止病毒再次或反复感染。

正常情况下, Th1/Th2 细胞处于平衡状态, 流感病毒侵入和抗病毒药物干预下, Th1 细胞和 Th2 细胞的变化可在一定程度上反映机体的免疫状态。流感病毒感染小鼠后 3 d, Th1/Th2 与正常对照组对比明显降低,随着疾病的发展, Th1/Th2 继续下降, 6 d 时降到最低点,说明流感病毒感染后,机体的免疫平衡早期就被打破, Th1/Th2 细胞平衡向 Th2 细胞方向漂移,机体在 6 d 时抗病毒能力相对较弱;而后从 6 d 开始逐渐升高, 12 d 较 6 d 升高显著,且 9, 12 d 仍较正常对照组降低显著,说明随着机体的免疫反应的进行,机体免疫平衡在逐渐恢复,但 Th2 细胞反应仍占优势表达,免疫病理损伤仍然存在。经清营解表合剂治疗后, 3, 6, 9, 12 d 较模型组均显著升高,且 12 d 较 3 d 升高显著,说明清营解表合剂在整个发病阶段都在发挥作用,使得 IFN- γ 始终高表达, Th1 细胞反应占优势,增强了细胞免疫反应及抗病毒作用,在各个时间点明显下调 Th2 型细胞因子表达,机体免疫状态由 Th2 细胞反应优势表达向 Th1

细胞反应漂移,使得机体形成一个新的动态平衡,有利于缓解炎症损伤,起到抵抗和清除病毒的作用和提高机体免疫力的作用。

[参考文献]

- [1] Hsieh Y C, Wu T Z, Liu D P, et al. Influenza pandemics: past, present and future [J]. J Formos Med Assoc, 2006, 105 (1): 1.
- [2] 沈敬华, 杨丽敏, 吕炳申, 等. 五种中药提取物对正常小鼠细胞免疫的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12 (2): 57.
- [3] 郭姗姗, 刘颖, 高英杰, 等. 小儿肺热咳喘口服液对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (2): 152.
- [4] 赵武述. 免疫平衡研究及其临床意义 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 90.
- [5] Van Reeth K, Van Gucht S, Pensaert M. Correlations between lung proinflammatory cytokine levels, virus replication, and disease after swine influenza virus challenge of vaccination-immune pigs [J]. Viral Immunol, 2002, 15 (4): 583.
- [6] 许淑云, 刘晓晴. 细胞因子和急性肺损伤 [J]. 国外医学: 呼吸系统分册, 2001, 21 (4): 197.
- [7] Van Reeth K, Van Gucht S, Pensaert M. Correlations between lung proinflammatory cytokine levels, virus replication, and disease after swine influenza virus challenge of vaccination-immune pigs [J]. Viral Immunol, 2002, 15 (4): 583.
- [8] H ussell T, Pennycook A, Openshaw P J. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology [J]. Eur J Immunol, 2001, 31 (9): 2566.
- [9] Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, et al. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus [J]. Am J Gastroenterology, 2002, 97 (8): 2086.
- [10] 潘钰, 瞿介明, 何礼贤, 等. 免疫受损大鼠铜绿假单胞菌肺部感染 IFN- γ 和 IL-4 的变化 [J]. 复旦学报, 2002, 29 (4): 259.
- [11] 徐泊文, 郝钰, 吴琨, 等. 加味宣肺透解剂对流感病毒感染小鼠细胞因子的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22 (4): 320.
- [12] Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, et al. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus [J]. Am J Gastroenterology, 2002, 97 (8): 2086.

[责任编辑 何伟]