

薯蓣丸对 Friend 白血病病毒感染小鼠免疫功能的影响

任周新^{1,2*}, 许前磊², 李青雅², 左刚²

(1. 河南省病毒性疾病中医药防治重点实验室, 郑州 450000;

2. 河南中医学院艾滋病研究所, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**探讨薯蓣丸对 Friend 病毒模型小鼠免疫功能的影响。**方法:**Friend 病毒攻击小鼠,同时施用不同剂量的薯蓣丸进行干预,连续用药 3 周。取血,处死动物,称取脾脏,酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测血浆中白细胞介素-2(IL-2), γ -干扰素(IFN- γ),IL-6 含量;流式细胞术检测 CD4⁺T,CD8⁺T 细胞百分率。另外,复制环磷酰胺小鼠模型,连续用药 5 d。观察薯蓣丸对小鼠血液中红细胞数量、白细胞数量、血红蛋白含量的影响。**结果:**与 Friend 模型组比较,给药后动物的体重、脾脏质量、脾指数及 IL-2,IFN- γ ,IL-6 含量和 CD4⁺T,CD8⁺T 细胞百分率均没有显著性差异。与环磷酰胺模型组比较,薯蓣丸能够增加血液中红细胞数量、白细胞数量、血红蛋白含量($P < 0.05$)。**结论:**薯蓣丸对 Friend 病毒感染小鼠的免疫功能没有明显的影响。薯蓣丸的刺激红细胞、白细胞生成作用对 HIV 感染患者有益但促进 Friend 病毒感染小鼠的病理进程。提示,具有红细胞、白细胞生成作用的中药复方抗 HIV 的研究,不适宜选择 Friend 病毒感染模型。

[关键词] 薯蓣丸; Friend 病毒; 小鼠; 免疫功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0191-04

Effect of Shuyu Wan on Immunity of Murine AIDS Induced by Friend Murine Leukemia Virus in Mice

REN Zhou-xin^{1,2*}, XU Qian-lei², LI Qing-ya², ZUO Gang²

(1. Henan Key Laboratory of Viral Diseases Control with Traditional Chinese Medicine(TCM),

Zhengzhou 450000, China; 2. AIDS Institute of Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shuyu Wan on the immunity of murine AIDS (MAIDS) induced by the Friend murine leukemia virus (FLV). **Method:** Experimental model was established by inoculated intraperitoneally(ip) with FLV in mice. Meanwhile, treatment groups were intragastric administrated with Shuyu Wan. Three weeks later, blood was withdrawn to assay interleukin-2 (IL-2), interferon (IFN)- γ and IL-6 by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Percentage of cluster of differentiation 4⁺ (CD4⁺) T lymphocyte and CD8⁺T lymphocyte were determined by flow cytometry. In addition, some mice were injected cyclophosphamide (CTX) and given Shuyu Wan for 5 days, then, leucocytes, hemoglobins, and erythrocytes were detected. **Result:** FLV model group showed no evident differences to the treatment groups. But compared with CTX group, the amount of leucocytes, hemoglobins, and erythrocytes were higher markedly in Shuyu Wan groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shuyu Wan could not ameliorate immunity of MAIDS induced by the Friend murine leukemia virus. Friend virus infection model might not be appropriate for anti-HIV study by traditional Chinese medicine.

[Key words] Shuyu Wan; Friend murine leukemia virus; mice; immunity

[收稿日期] 20110223(004)

[基金项目] 河南中医学院博士科研启动基金项目(03301061)

[通讯作者] *任周新,博士,讲师,从事病毒性疾病的中医药学研究, Tel:0371-66244621, E-mail: renzhouxin123@126.com

艾滋病是一种虚实夹杂为特点的病毒性疾病^[1],患者免疫机能低下,易于感染“外邪”,正气不足和病毒等毒邪共存。薯蓣丸源自《金匱要略》,临床可用于外感风邪及正气虚损的诸多疾病的治疗,具有攻邪扶正兼顾、邪去而不伤正的特点。药理研究证实,薯蓣丸对小鼠多种免疫功能有促进作用^[2-3]。但是,艾滋病患者的免疫紊乱表现复杂,患者一方面出现 CD4⁺T 细胞进行性减少为代表的细胞免疫功能低下,但另一方面,也出现 CD8⁺T 细胞增多、血液中抗体增多等体液免疫过亢。薯蓣丸是否能够对这种免疫紊乱具有调节作用,值得探讨。Friend 白血病病毒(Friend leukemia virus, FLV)能够诱导敏感小鼠表现出 CD4⁺T 细胞减少、CD8⁺T 细胞增多等类似于艾滋病患者免疫紊乱的表现^[4]。在本次实验中,我们选择 Friend 病毒感染小鼠作为艾滋病模型,用薯蓣丸进行干预,探讨薯蓣丸对模型动物免疫功能的影响。

1 材料

1.1 动物 BALB/c 种小鼠,体重 13~15 g,雌性,SPF 级,由河南省实验动物中心提供,许可证号 SCXK(豫)2005-001。昆明种小鼠,体重 16~18 g,雌雄各半,SPF 级,由河南省实验动物中心提供,许可证号 SCXK(豫)2010-0002。

1.2 病毒株 Friend 型鼠白血病病毒,购自美国经典培养物收藏中心(ADCC)。

1.3 药物 根据《金匱要略》所载薯蓣丸全方组成如下:山药 90 g,当归、神曲、桂枝、干地黄、豆黄卷各 30 g,甘草 84 g,人参 21 g,川芎、芍药、白术、麦门冬、杏仁各 18 g,柴胡、桔梗、茯苓各 15 g,阿胶 21 g,干姜 9 g,白藜 6 g,防风 18 g,大枣 100 枚。药材粉碎,炼蜜为丸,每丸重 10 g,药材购于河南中医学院第三附属医院中药房。齐多夫定(AZT),厦门迈克制药有限公司生产,批号 061102。利血生,江苏吉贝尔药业有限公司生产,批号 070605。环磷酰胺(CTX),上海华联制药有限公司产品,批号 041109。

1.4 仪器 FACS Calibur 型流式细胞仪,美国 BD 公司;680 型酶标仪,美国 BIO-RAD 公司;994 型超低温冰箱,美国热电公司。

1.5 试剂 小鼠白介素-2(IL-2)、小鼠白介素-6(IL-6)、小鼠干扰素- γ (IFN- γ)ELISA 试剂盒,购自博士德科技有限公司,批号依次为 EK0398, EK0411, EK0375。荧光标记多克隆抗小鼠 CD4-PE,

CD8-FITC 抗体,博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-0765R-PE, bsF-0648R。

2 方法

2.1 对 Friend 模型小鼠的影响

2.1.1 10% 脾病毒悬液的制备 取病毒株,流水冲洗融化,用生理盐水 10 倍稀释。ip BALB/c 小鼠,每只 0.5 mL,14 d 后处死小鼠,取脾、选择质量大于 1 g 者,用无菌匀浆器研磨后,加无菌生理盐水混悬,同时加入青霉素,配成 500 U·mL⁻¹的 10% 脾病毒悬液。-80 °C 冰箱保存,备用。

2.1.2 模型的制作及给药 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、薯蓣丸高、低剂量组、AZT 组,每组 10 只。取出 10% 脾病毒悬液,4 °C 冰箱融化,用生理盐水稀释 125 倍作为病毒攻击液,除正常对照组外,其余各组小鼠 ip 病毒攻击液 0.5 mL/只。正常组以 0.5 mL 生理盐水 ip。立即按照组别 ig 药物或生理盐水,连续给药 21 d。正常对照组、模型对照组 ig 生理盐水 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹;薯蓣丸低、中、高剂量组分别给予相当于 70 kg 体重的成人按体表面积比等效剂量换算出生药量的 0.5, 1, 2 倍(2, 4, 8 g·kg⁻¹·d⁻¹)生理盐水混悬液 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹;AZT 组按 100 mg·kg⁻¹ ig 生理盐水混悬液 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹。连续 21 d, 1 次/d。

2.1.3 血浆 IL-2, IL-6, IFN- γ 含量的检测 于实验 21 d 称量动物体重,给药后 3 h,摘眼球取血,置于 EDTA-K3 抗凝试管中,取出 100 μ L,室温条件下放置;其他血液在室温条件下,3 000 r·min⁻¹,离心 5 min,分离动物血浆,4 °C 保存。处死动物,取脾脏,称取质量。根据试剂盒说明书检测血浆中 IL-2, IL-6, IFN- γ 含量。

2.1.4 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞的检测 取抗凝全血 100 μ L,加入 900 μ L 的 1 \times 红细胞裂解液,混匀全血,裂解 15 min。离心,1 500 r·min⁻¹, 5 min。弃上清,加 100 μ L PBS 缓冲液,混匀,加荧光标记的多克隆抗体 CD4-PE 和 CD8-FITC 各 10 μ L,混匀,室温避光放置 30 min。FACS 上机检测,每个标本收集 10 000 个细胞,FSC-SSC 散点图设门圈定淋巴细胞,在 CD4-PE 和 CD8-FITC 双参数散点图中,利用十字象限设门,其中 Q1 和 Q4 象限分别表示 CD4⁺T, CD8⁺T 细胞,检测 CD4⁺T, CD8⁺T 细胞/淋巴细胞的百分率。

2.2 对 CTX 贫血小鼠血象的影响 昆明种小鼠 50

只,随机分为 5 组,即正常对照组、模型组、利血生 ($7.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 组、薯蓣丸低、高剂量组 ($2, 4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 每组 10 只,雌雄各半。正常对照组 ip 生理盐水,其他组均 ip CTX $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。立即 ig 给药,连续给药 5 d 后,断头取血,测定各组小鼠的白细胞、红细胞数和血红蛋白。

2.3 统计学处理 数据分析用 SPSS 11.5 统计软件,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 Friend 小鼠脾脏质量、脾脏指数和体重的影响 见表 1。与正常组比较,模型组体重明显减轻 ($P < 0.05$),脾质量及脾指数明显增加 ($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠脾质量、脾指数的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	体重 /g	脾质量 /mg	脾指数 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
正常	-	$19.2 \pm 1.2^{1)}$	$135 \pm 27^{2)}$	$7.1 \pm 2.0^{2)}$
模型	-	17.2 ± 1.4	2031 ± 317	118.6 ± 21.2
AZT	0.1	18.5 ± 1.0	$264 \pm 80^{2)}$	$14.3 \pm 4.2^{2)}$
薯蓣丸	2	17.9 ± 1.3	2122 ± 367	118.3 ± 15.0
	4	18.2 ± 1.1	1979 ± 165	109.0 ± 9.6
	8	18.1 ± 1.3	2008 ± 257	111.0 ± 12.6

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 各组小鼠血浆细胞因子及血液 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	细胞因子/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$			T 淋巴细胞亚群/%	
		IL-2	IL-6	IFN- γ	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T
正常	-	$116.81 \pm 28.73^{2)}$	$8.12 \pm 6.62^{2)}$	$89.89 \pm 30.79^{2)}$	$42.52 \pm 7.28^{2)}$	$14.77 \pm 3.62^{2)}$
模型	-	19.07 ± 9.09	17.15 ± 9.96	15.13 ± 6.65	13.46 ± 5.76	35.79 ± 12.89
AZT	0.1	$61.29 \pm 24.34^{2)}$	$13.53 \pm 6.50^{2)}$	$36.59 \pm 19.21^{1)}$	$38.98 \pm 6.80^{2)}$	$18.69 \pm 5.35^{2)}$
薯蓣丸	2	21.78 ± 8.33	18.30 ± 9.93	18.59 ± 9.69	13.40 ± 5.12	33.95 ± 17.03
	4	24.23 ± 11.44	21.53 ± 9.95	16.10 ± 5.86	13.68 ± 3.74	36.92 ± 16.99
	8	18.03 ± 5.89	19.22 ± 11.81	16.81 ± 5.58	12.53 ± 4.26	35.51 ± 14.86

表 3 薯蓣丸对 CTX 诱导小鼠造血功能障碍的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	白细胞/ $\times 10^9/\text{L}$	红细胞/ $\times 10^{12}/\text{L}$	血红蛋白/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	$10.68 \pm 2.08^{2)}$	$9.67 \pm 1.30^{2)}$	$14.85 \pm 1.35^{2)}$
模型	-	6.46 ± 2.29	6.29 ± 1.35	9.51 ± 2.08
利血生	0.007 8	$10.72 \pm 3.20^{2)}$	$8.77 \pm 1.72^{1)}$	$12.97 \pm 2.24^{1)}$
薯蓣丸	2	8.44 ± 2.96	7.26 ± 1.53	11.32 ± 2.33
	4	$9.76 \pm 2.75^{1)}$	$8.23 \pm 1.29^{1)}$	$13.40 \pm 2.09^{1)}$

4 讨论

AZT 是临床常用的抗 HIV 病毒药物。对于 Friend 病毒模型小鼠,能够明显地抑制脾肿大和病毒血症,延长鼠的生存期^[5],在一定程度上恢复免疫功能。研究发现,多个中药复方没有明显的体内抗

与模型组比较,AZT 组脾质量及脾指数明显减轻 ($P < 0.01$);与模型组比较,薯蓣丸 3 个组的体重、脾质量及脾指数没有显著性差异。

3.2 对 Friend 小鼠血浆细胞因子及血液 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的影响 见表 2。与正常组比较,模型组血浆 IL-2 和 IFN- γ 含量显著减少 ($P < 0.01$)、IL-6 含量显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,AZT 组血浆 IL-2 和 IFN- γ 含量显著增加 ($P < 0.01$),IL-6 含量显著减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较,薯蓣丸 3 个组的血浆 IL-2、IFN- γ 、IL-6 含量没有显著性差异。与正常组比较,模型组 CD4⁺T 细胞显著减少,CD8⁺T 细胞显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,AZT 组 CD4⁺T 细胞显著增加 ($P < 0.01$)、CD8⁺T 细胞显著减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较,薯蓣丸 3 个组的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞没有显著性差异。

3.3 对 CTX 诱发小鼠造血功能障碍的影响 结果见表 3。与模型组比较,薯蓣丸高剂量组小鼠白细胞数、红细胞数、血红蛋白含量和脾指数均显著升高 ($P < 0.05$)。薯蓣丸低剂量组上述指标有所升高,但没有显著性差异。

HIV 的作用,但能够提高艾滋病患者免疫功能^[6],显示了与抗病毒药物不同的作用途径。

感染 Friend 病毒小鼠血液中 CD4⁺T 细胞的数量随着感染时间的延长而逐渐降低,TH-1 型细胞因子如 IL-2 和 IFN- γ 含量降低而 TH-2 型细胞因子

IL-6 分泌水平升高^[7]。这些结果提示, Friend 病毒感染小鼠模型可在一定程度上模拟 HIV 感染者的细胞因子网络紊乱。“I 型-II 型转换”假说能够解释这种紊乱状态, 该假说认为: “I 型应答”指伴有正常或升高水平“I 型细胞因子”IL-2, IL-12 和 IFN- γ 的强细胞免疫反应; “II 型应答”指伴有 B 细胞活化和“II 型细胞因子”IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 等升高, HIV 感染者体内细胞因子分泌模式处于变化中, 如果免疫系统处于 I 型细胞因子占优势的状态, 则对机体具有保护性, HIV 感染向 AIDS 进展缓慢甚至长期不进展; 若处于 II 型状态则易于或快速向 AIDS 进展。依照该假说, 应用 IL-2 能够改善患者的免疫紊乱的状态, 提高 CD4⁺T 细胞的功能, 增加血液中 CD4⁺T 细胞数量。外源性的给予 IL-2, 确实具有这种作用^[8]。如果给予免疫激活剂, 刺激内源性的 IL-2 的产生, 可能具有相似的作用。

薯蓣丸可促进创伤小鼠淋巴细胞 IL-2 及 IL-2R 的基因转录表达, 逆转 IL-2 及 IL-2R 的抑制状态, 提高外周血和脾脏中 IL-2 浓度^[3]。因此, 作者推测薯蓣丸可能提高 Friend 小鼠血液中的 IL-2 水平, 改善模型鼠的免疫紊乱状态。但在本研究中未能发现薯蓣丸的内源性刺激 IL-2 分泌的作用, 其他各项免疫指标也未见改善。作者认为, 薯蓣丸不能有效干预 Friend 模型小鼠免疫紊乱的原因可能有 2 个: Friend 病毒感染小鼠整体疾病病理状态的特异性; 薯蓣丸作用机制的多样性。与创伤小鼠不同, Friend 病毒感染小鼠存在红白血病, 出现红细胞和白细胞的异常增生, 当感染的成红细胞或白细胞增生的步伐快于宿主免疫系统抑制感染的能力, 疾病恶化^[9]。临床发现薯蓣丸具有一定的升高体内白细胞的作用^[10], 本次实验证实薯蓣丸能够缓解环磷酰胺小鼠的骨髓抑制作用, 提高小鼠外周血中红细胞、白细胞的数量和血红蛋白含量。对于 Friend 小鼠, 上述作用可能在一定程度上促进了小鼠异常的白细胞和红细胞增生, 加重宿主免疫系统清除能力的负担, 加重病理性损伤, 从而抵消了薯蓣丸的诱导 IL-2mRNA 转录的作用, 导致薯蓣丸未能有效改善 Friend 小鼠免疫紊乱。

Friend 病毒小鼠模型是一种较为成功的筛选抗 HIV 药物模型, 但和人类的 HIV 感染有一定的差异。对于人类 HIV 感染, 患者常见外周血异常, 主要表

现为贫血、白细胞数量减少等变化^[11]。显然, 临床患者应用具有升高白细胞或红细胞的药物能够提高患者的生活质量, 缓解某些症状。但是薯蓣丸的上述有益作用却成为加重 Friend 小鼠病理损害的因素, 提示薯蓣丸对艾滋病患者和 Friend 小鼠可能产生不同的甚至是相反的影响。鉴于某些临床常用的提高免疫功能的复方具有升高白细胞或红细胞的作用, 因此, Friend 小鼠模型不适合具有上述作用的复方研究。

[参考文献]

- [1] 邱红, 谢世平, 郭选贤. HIV/AIDS 患者 274 例中医证候流行病学分布[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2007, 42(2): 363.
- [2] 蔡美, 周衡. 《金匱》薯蓣丸对小鼠免疫功能的影响[J]. 湖南中医药导报, 1997, 3(6): 31.
- [3] 李云海, 张雪荣, 叶太生, 等. 薯蓣丸对创伤应激小鼠白细胞介素-2 mRNA、白细胞介素-2R mRNA 基因表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(4): 33.
- [4] Michael A C, Michael A U, Paul L B, et al. Imexon and biological response modifiers in murine models of AIDS [J]. J Immunopharmacol, 1991, 13(suppl. 1): 336.
- [5] 蒋岩. 评价艾滋病治疗药物鼠模型的研究进展[J]. 中国病毒学, 1997, 12(1): 1.
- [6] 任聪颖, 侯建春, 谢世平, 等. 中医药治疗艾滋病的免疫学研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(3): 218.
- [7] 冯鹰, 符林春, 肖凤仪. 毛冬青对小鼠逆转录病毒感染模型脾大症治疗机制的研究[J]. 江苏中医药, 2007, 39(11): 85.
- [8] Pau A K, Tavel J A. Therapeutic use of interleukin-2 in HIV-infected patients[J]. Curr Opin Pharmacol, 2002, 2(4): 433.
- [9] Hasenkrug K, Chesebro B. Immunity to retroviral infection; the Friend virus model[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(15): 7811.
- [10] 高晓红. 薯蓣丸合穴位注射治疗白细胞减少症 30 例[J]. 国医论坛, 2002, 17(5): 8.
- [11] 陈灏珠, 林果为. 实用内科学[M]. 13 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 466.

[责任编辑 聂淑琴]