

清营解表合剂防治流感免疫调节机制的研究

孙喜稳¹, 吕翠霞^{2*}, 张森¹, 孙喜涛³, 余斌¹, 张歌¹

(1. 暨南大学医学院, 广州 510632; 2. 山东中医药大学, 济南 250355;
3. 喀什师范学院, 新疆 喀什 844007)

[摘要] **目的:**探讨清营解表合剂对流感病毒 A/PR/8/H₁N₁ 感染小鼠免疫保护的作用机制。**方法:**以亚洲甲型鼠肺适应株 A/PR/8/H₁N₁ 流感病毒小鼠滴鼻, 建立感染模型。分别给予病毒唑、清营解表合剂, 计算死亡保护率、延长生命率; 测定小鼠胸腺指数和脾脏指数; 流式细胞术检测小鼠外周血特异性细胞因子 Th₁ (γ-干扰素, IFN-γ)/Th₂ (白介素-10, IL-10) 表达水平。**结果:**清营解表合剂组小鼠死亡保护率和生命延长率分别为 52.94% 和 37.64%, 小鼠脾脏指数和胸腺指数明显提高。感染后小鼠外周血细胞的 Th₁ 型反应弱勢表达, Th₂ 细胞因子优势表达, Th₁ (IFN-γ)/Th₂ (IL-10) 比值明显降低, Th₁/Th₂ 表达向 Th₂ 偏移。清营解表合剂组 Th₁ 细胞因子水平显著升高, 且向空白组正常水平方向漂移。**结论:**清营解表合剂对感染小鼠具有明显的死亡保护作用, 能够逆转流感病毒感染小鼠外周血因子 Th₁ 向 Th₂ 漂移的作用, 通过免疫调节作用防治流行性感。

[关键词] 流行性感; 清营解表合剂; Th 细胞; γ-干扰素; 白介素-10

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0161-04

Immune Protective Mechanism of Qingying Jiebiao Heji on Influenza

SUN Xi-wen¹, LV Cui-xiao^{2*}, ZHANG Miao¹, SUN Xi-tao³, YU Bin¹, ZHANG Ge¹

(1. Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 3. Kashgar Teachers College, Kashgar 844007, China)

[Abstract] **Objective:** To study the immune protective mechanism of Qingying Jiebiao Heji on A/PR/8/H₁N₁ virus infected mice. **Method:** The influenza model in mice was established through dropping A/PR/8/H₁N₁ virus into the nose of Kunming mice. Ribavirin and Qingying Jiebiao Heji were given to the infected mice respectively, then death protection and life prolongation were determined; thymus index and spleen index were observed; Th₁ (IFN-γ)/Th₂ (IL-10) expression in peripheral blood was measured by flow cytometry. **Result:** After being infected, the death protection rate and life prolongation rate of Qingying Jiebiao Heji were 52.94% and 37.64% accordingly, the thymus index and spleen index were improved apparently. Th₁ cytokine IFN-γ attenuated and Th₂ cytokine IL-10 dominantly expressed. The expression of Th₁ (IFN-γ)/Th₂ (IL-10) was remarkably depressed and adjusted, Th₂ expression of Qingying Jiebiao Heji group was markedly strengthened and Th₁/Th₂ drifted towards the normal level. **Conclusion:** Qingying Jiebiao Heji has the effect of death protection on the A/PR/8/H₁N₁ virus infected mice, it also can reverse its peripheral blood cytokine Th₁ drifting to Th₂, and prevent influenza through immune regulation.

[Key words] influenza; Qingying Jiebiao Heji; Th₁/Th₂; IFN-γ; IL-10

[收稿日期] 20100306(006)

[第一作者] 孙喜稳, 博士研究生, 中西医结合专业, Tel: 15013056808, E-mail: wenzisky1999@126.com

[通讯作者] * 吕翠霞, E-mail: sdjnmhx@263.com

流行性感是流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 以急起高热、全身酸痛、乏力, 伴轻度呼吸道症状为临床特征。流感病毒致病力强, 具有突然爆发、迅速蔓延、传播面广、发病率高、人群普遍易感的特点^[1], 给人类造成了极大的危害。1918 年流感在全

球大规模流行,死亡总人数超过 2000 万。2009 年 4 月,墨西哥、美国等国首发甲型 H₁N₁ 型流感疫情,从而引起甲型 H₁N₁ 流感疫情向全球蔓延。截至 2010 年 1 月底,我国 31 个省份累计报告甲流确诊病例 12.6 万例。然而,西医学对于流行性感的治疗仅以“隔离、及早应用抗流感病毒药物、加强支持、对症治疗和预防并发症”为基本治疗原则。中医称流感为时行感冒,长期以来在预防和治疗方面积累了丰富的经验。而且中药具有整体调节、多靶点治疗的特点,能够提高人体免疫机能,在退热抗病毒和缓解上呼吸道症状方面比西药更具优势。中医药防治流感的疗效,已得到国内外学者的高度认可。

清营解表合剂^[2]是姜建国教授根据现代外感病多温热、极易化热、化火、化燥的临床特点,遵循“辛凉解表为主,表里双解”原则确立的治疗外感病的良方,运用于临床,屡获良效。我们将本方作用于亚洲甲型鼠肺适应株流感病毒 A/PR/8/H₁N₁ 感染的小鼠,探讨清营解表合剂防治流行性感的治疗免疫调节机制,为中医药防治流行性感冒提供实验依据。

1 材料

1.1 动物与细胞株 昆明种 SPF 级小鼠,封闭群,雌性,体重 15~18g,208 只,购自山东大学实验动物中心,合格证号 SCXK(鲁)2003004;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 1:256,-70℃ 冻存储备用。

1.2 试剂及用药 佛波酯,离子霉素,莫能霉素,谷氨酰胺,青霉素,链霉素,新霉素,RPMI1640,BFA(Brefeldin A);细胞表面标记抗体:CD3-TC,CD8-FITC,CD69-PE;细胞内因子抗体:IL-10-PE,IFN- γ -PE;同型对照:Rat IgG1-PE,Mouse IgG1-PE,Mouse IgG2a-PE;破膜剂(均购自美国 BD 公司),病毒唑,肝素,溶血剂等。

清营解表合剂:由金银花 30 g,连翘 10 g,白薇 10 g,生地黄 10 g,麦冬 10 g,荆芥 10 g,防风 10 g,炒牛子 10 g,甘草 3 g,等 11 味药,实验时配制混悬液(前期实验最佳浓度^[3]),质量浓度为 0.68 g·mL⁻¹,剂量 15 g·kg⁻¹·d⁻¹,用量 0.4 mL·d⁻¹。

2 方法

2.1 动物模型及分组 实验分为:清营解表合剂对流感病毒感染小鼠死亡保护作用。将小鼠分为空白对照组、感染模型组、病毒唑对照组、清营解表合剂

组,每组 20 只,共 80 只;清营解表合剂对感染小鼠外周血 Th₁/Th₂ 影响实验分组同死亡保护实验,每组 32 只,共 128 只。

以乙醚轻度麻醉小鼠后,空白组以生理盐水滴鼻,每只 25 μ L;其余各组以 25 μ L A/PR/8/H₁N₁ 株病毒液滴鼻,病毒液为血凝滴度 1:512 原液稀释 5 倍。感染 1 h 后给药,空白组、模型组每只小鼠 ig 生理盐水 0.4 mL,病毒唑组每次 ip 0.4 mL 病毒唑 1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹,每日 1 次;清营解表合剂组 ig 清营解表合剂 0.4 mL,剂量为 15 g·kg⁻¹·d⁻¹,感染前 1 d 至感染后 7 d 给药。

2.2 死亡保护作用 逐日记录小鼠死亡数,死亡时间。计算死亡保护率和延长生命率,方法如下:

$$\text{死亡保护率} = \frac{\text{模型组死亡数} - \text{实验组死亡数}}{\text{模型组死亡数}} \times 100\%$$

$$\text{延长生命率} = \frac{\text{实验组平均存活日数} - \text{模型组平均存活日数}}{\text{模型组平均存活日数}} \times 100\%$$

2.3 胸腺和脾指数 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠 Th₁/Th₂ 值的影响实验各组按感染后 3,5,9,12 d 不同时相分批处死动物,每组每次 8 只。于末次给药 6 h 后,颈椎脱臼处死小鼠,称体重,摘除胸腺及脾脏称重,以胸腺或脾脏重量与体重之比作为胸腺或脾脏指数。

2.4 外周血 Th₁/Th₂ 检测 取 1 只试管,加入 200 μ L 外周血和 200 μ L RPMI 1640;再加入 10 μ L 1 mg·L⁻¹ PMA 工作液 + 8 μ L 50 mg·L⁻¹ Ionomycin 工作液 + 6.8 μ L 0.1 g·L⁻¹ Monensin 工作液,37℃,5% CO₂ 孵育箱孵育 4 h。混匀,加入 20 μ L CD3-TC 和 20 μ L CD8-FITC,室温避光孵育 15 min;均匀分于 4 支试管,每支试管加入 100 μ L 已染色的全血,编号为 A₁,A₂,A₃,A₄;每支试管中加入 100 μ L Reagent A,室温避光孵育 15 min;每支试管中再加入 3 mL PBS,1200 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清;然后,每支试管加入 100 μ L Reagent B,同时各试管中按 A₁~A₄ 加入相应的抗体各 10 μ L:mouse IgG1-PE,IFN- γ -PE, rat IgG1-PE, IL-10-PE。室温避光孵育 15 min。每支试管加入 3 mL PBS,1 200 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清;加入 0.5 mL PBS 液重悬细胞,流式细胞仪检测。激发光为氩离子激光 488 nm 谱线,以 T 细胞的特异性表面标志 CD3⁺ 细胞群开窗,各荧光通道均以相应同种 IgG 染色细胞为阴性对照。

2.5 统计方法 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS8.0 统

计分析软件进行多因素方差处理,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠的死亡保护作用 清营解表合剂和病毒唑对流感病毒 A/PR/8/H₁N₁ 感染小鼠死亡保护率分别为: 52.94%, 82.35%; 延长生命率分别为 37.64%, 61.78%。清营解表合剂与模型组比较, $P < 0.05$, 有统计学意义, 说明清营解表合剂能明显提高流感病毒 A/PR/8/H₁N₁ 感染小鼠的存活率, 延长其存活时间。

3.2 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响 由表 1 可见, 模型组小鼠脾脏指数和胸腺指数均降低, 与正常对照组比较, 有显著性差异 ($P < 0.05$); 清营解表合剂组与模型组比较, 小鼠脾脏指数和胸腺指数升高 ($P < 0.05$), 有统计学意义, 表明清营解表合剂具有提高脾脏指数与胸

表 1 清营解表合剂对流感病毒感染 12 d 小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	脾脏指数	胸腺指数
空白	-	2.86 ± 0.42	1.52 ± 0.26
模型	-	2.41 ± 0.58 ³⁾	1.09 ± 0.35 ³⁾
病毒唑	1.2	3.90 ± 0.69 ^{1,3)}	1.97 ± 0.44 ^{1,3)}
清营解表	15	3.74 ± 0.73 ^{1,3)}	1.80 ± 0.36 ^{1,3)}

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与空白组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

腺指数的作用。

3.3 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠 Th₁/Th₂ 值的影响 由表 2 可见, 造模后第 3 天的感染早期, 模型组、病毒唑组和清营解表合剂组 Th₁/Th₂ 均有所降低, 但各组两两比较均无显著性差异, 各组 Th₁/Th₂ 变化尚不明显。

表 2 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠 Th₁/Th₂ 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	第 3 天	第 5 天	第 9 天	第 12 天
空白	-	1.921 ± 0.143	1.825 ± 0.270	1.986 ± 0.141	1.968 ± 0.119
模型	-	1.651 ± 0.181	1.213 ± 0.239 ³⁾	0.800 ± 0.235 ⁴⁾	0.758 ± 0.241
病毒唑	1.2	1.754 ± 0.173	1.485 ± 0.345 ³⁾	1.172 ± 0.476 ^{1,4)}	1.402 ± 0.235 ¹⁾
清营解表	15	1.739 ± 0.203	1.545 ± 0.553 ³⁾	1.262 ± 0.623 ^{1,4)}	1.512 ± 0.251 ¹⁾

造模后第 5 天感染中期, 模型组、病毒唑组和清营解表合剂组 Th₁/Th₂ 值降低, 三者与空白对照组比较, 均有 $P < 0.05$, 有显著性差异; 但清营解表合剂组、病毒唑对照组和清营解表合剂组两两比较, 无统计学意义。

造模后第 9 天感染中后期, 模型组、病毒唑组和清营解表合剂组 Th₁/Th₂ 值继续降低, 并达到最低值, 3 组与空白组比较均有 $P < 0.01$, 有极显著差异; 清营解表合剂组与感染模型组比较, 有显著性差异, 但与病毒唑组比较, 无统计学意义。

造模后第 12 天感染末期, 模型组 Th₁/Th₂ 仍继续降低, 清营解表合剂组、病毒唑组 Th₁/Th₂ 均有所回升; 清营解表合剂组与空白组比较, 无显著性差异。

4 讨论

死亡率和生命延长率分别表示宿主的易感性和药物对病毒感染宿主保护作用的实验指标。实验结果显示, 清营解表合剂能明显提高流感病毒感染小鼠的存活率, 延长其存活时间, 说明清营解表合剂对流感病毒 A/PR/8/H₁N₁ 感染小鼠有明显的死亡保护作用。

胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官, 具有免疫调节作用。因此, 胸腺和脾脏质量指数的改变能够反映机体免疫功能的状况^[4]。T 淋巴细胞简称 T 细胞, Mosmann^[5] 等依据小鼠 CD4⁺ Th 细胞分泌的细胞因子谱不同, 将 Th 细胞分为 Th₁ 和 Th₂ 两个功能不同的独立亚群。Th₁ 细胞主要分泌 IL-2, IL-12, IFN- γ 和 TNF- β/α 等, 介导与细胞毒和局部炎症有关的免疫应答。Th₂ 细胞主要分泌 IL-4, IL-5, IL-6 和 IL-10, 其主要功能为刺激 B 细胞增殖并产生抗体, 与体液免疫相关。许多研究已证实^[6], Th₁/Th₂ 极化是免疫应答调节的关键环节, Th₁/Th₂ 极化异常或缺陷均可导致疾病。疾病的 Th₁/Th₂ 模式是疾病引起的机体优势免疫应答的类型 (Th₁ 型/Th₂ 型), 这种模式可应用于多种疾病, 如感染性疾病、过敏性疾病、自身免疫性疾病、流产、移植免疫及恶性肿瘤等。

实验结果表明, 感染早期, 实验各组 Th₁/Th₂ 降低, 说明流感病毒感染后, 小鼠外周血 Th₁/Th₂ 平衡失调, Th₁ 型反应模式占弱势表达, Th₂ 型反应模式处于优势表达, Th₁/Th₂ 向 Th₂ 方向偏移。感染中

期, 各组 Th_1/Th_2 仍继续降低, 并达到最小值。感染末期, 清营解表合剂组小鼠胸腺和脾脏指数明显提高, Th_1/Th_2 回升, 且逐渐趋于正常水平, 说明清营解表合剂能逆转感染小鼠 Th_1 向 Th_2 漂移。

胸腺和脾脏指数的改变以及外周血细胞因子 Th_1 (IFN- γ)/ Th_2 (IL-10) 的水平, 能反映小鼠感染流感病毒后机体免疫状态的变化, 因此这些指标的改变, 说明清营解表合剂增强了流感病毒感染小鼠的免疫作用。从而表明, 清营解表合剂防治流行性感冒的功能是通过恢复 Th_1/Th_2 异常表达的免疫调节途径实现的。

[参考文献]

[1] 中华医学会呼吸病学分会. 流行性感冒临床诊断和治疗指南(2004年修订稿)[J]. 中华结核和呼吸杂志,

2005, 28(1):5.

- [2] 杨学, 姜建国, 吕翠霞, 等. 清营解表合剂治疗营热体质外感发热临床观察[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(6): 682.
- [3] 吕翠霞, 杨荣阁, 张永萍. 清营解表合剂对流感病毒 A/PR/8/H₁N₁ 感染小鼠肺指数影响的动态观察[J]. 天津中医学院学报, 2005, 24(4): 198
- [4] 寇俊萍. 当归芍药散对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国现代应用药学, 2003, 20(3): 171.
- [5] Mosmann T R, Cherwi H, Bond M W, et al. Two types of murine helper T cell clone I Definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins[J]. Immunol, 1986, 136(7): 2348.
- [6] 余如瑾. 瓜蒌甘草颗粒对流感病毒 FM1 所致肺炎的免疫炎症机制研究[D]. 2004, 北京中医药大学, 99.

[责任编辑 聂淑琴]

(上接第 160 页)

均缺血面积达 27.2%, 脑神经纤维排列紊乱, 有典型梗死灶, 神经元数目减少, 核固缩、胞浆胞核深染; 血管受压变形, 炎性细胞浸润明显, 细胞周围间隙增大, 皮质部血管周围炎性细胞浸润形成“血管套”; 白质间隙增大, 呈疏松状态, 神经组织出现液化性坏死病变, 呈现典型的脑损伤病理改变; 并且脑缺血大鼠全血黏度和血浆黏度增加。

具有活血通脉作用的通脉颗粒能明显减轻脑缺血大鼠神经功能障碍, 使脑组织损伤面积缩小, 脑神经纤维病理改变明显减轻, 同时降低大鼠高切全血黏度、全血还原黏度和血浆黏度; 因此, 认为可用线栓阻塞法建立的脑缺血模型评价抗脑缺血药物。

加味芎归汤能明显减轻脑缺血大鼠神经功能障碍, 使脑组织损伤面积缩小, 脑神经纤维病理改变明显减轻, 具有抗脑缺血损伤的作用。加味芎归汤对脑缺血大鼠血液黏度有一定的改善作用, 使高切全血黏度、全血还原黏度和血浆黏度降低, 可能对脑组织的血液供应具有改善作用; 上述作用支持加味芎

归汤活血行气、醒脑舒络的临床应用。由于加味芎归汤对血液中的有形成分不产生明显影响, 不改变红细胞刚性指数、变形指数与聚集指数, 因此认为其改善血液黏度的作用主要通过降低血浆黏度而实现。

[参考文献]

- [1] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84.
- [2] 陈维洲. 阻断大鼠大脑中动脉引起脑局部缺血法[A]. 见: 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1065.
- [3] 陈槐清. 血液流变学及临床应用[M]. 成都: 四川教育出版社, 1989: 23.
- [4] 廖福龙. 临床血液流变学[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1987: 110.

[责任编辑 聂淑琴]