

月华胶囊对耐多药结核鼠T淋巴细胞亚群及细胞因子的影响

欧阳建军^{1*}, 伍参荣¹, 陈北阳¹, 白宇乾², 曾姣飞¹

(1. 湖南中医学院, 湖南长沙 410007; 2. 江西中医学院, 江西南昌 330006)

[摘要] 目的: 观察月华胶囊对耐多药结核鼠T淋巴细胞亚群TH1/TH2细胞因子的影响及其机理。方法: 将耐多药结核鼠随机分成模型组、月华胶囊组、抗结核药(OEZD)组、月华胶囊+抗结核药组, 另设正常组。测各组中的CD4、CD8、CD4/CD8、IFN- γ 、IL-2、IL-10、TNF- α 。结果: ①与模型组比较, 月华胶囊组、抗结核药组、月华胶囊+抗结核药组均明显减少CD4、CD4/CD8、IFN- γ 、IL-2降低($P < 0.01$), 明显改善IL-10、TNF- α 升高($P < 0.05$); ②与抗结核药组比较, 月华胶囊+抗结核药组各指标差异均有显著性($P < 0.05$)。结论: 月华胶囊对耐多药结核鼠有治疗作用, 其机理是通过调控T淋巴细胞亚群CD4、CD4/CD8及其TH1型细胞因子IFN- γ 、IL-2, TH2型细胞因子IL-10和TNF- α 的水平而实现的。

[关键词] 月华胶囊; 耐多药结核病; T细胞亚群; TH1/TH2细胞因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)09-0028-04

The Influence of YUEHUA Capsule(YHC) on T Lymphocyte Subgroups and Cytokines in Rats with Multi-drug Resistant Tuberculosis(MDR-TB)

OUYANG Jian-jun^{1*}, WU Can-rong¹, CHEN Bei-yang¹, BAI Yu-qian², ZENG Jiaofei¹

(1. TCM of Hunan, Hunan, Changsha 410007, China; 2. TCM of Jiangxi, Jiangxi, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the possible influence of YUEHUA capsule(YHC) on T Lymphocyte subgroup and TH1/TH2 cytokines in rats with Multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) and its mechanism for this effect. **Methods:** The experimental rats, as the studying model, were Divided into the modeling group, YHC group, the drug of antituberculosis (OEZD) group and YHC & OEZD group in random process. And there was normal group. Then CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, IFN- γ , IL-2, IL-10, and TNF- α were observed in the all group. **Result:** Compared with the modeling group, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, IFN- γ and IL-2 were significantly controlled to go down($P < 0.01$), and IL-10, TNF- α were significantly controlled to go up ($P < 0.05$) in YHC group, OEZD group and YHC & OEZD group. Compared with OEZD group, in YHC & OEZD group the findings were significantly different($P < 0.05$). **Conclusion:** YHC holds therapeutic effects on rats with MDR-TB. These effects may be associated with the controlled Level of CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ and TH1/TH2 cytokines, including IFN- γ , IL-2 and IL-10, and TNF- α .

[Key words] YUEHUA capsule; Multi-drug resistant tuberculosis; T Lymphocyte subgroup; TH1/TH2 cytokine

耐多药结核病(Multi-drug resistant tuberculosis,

MDR-TB)是指患者至少对抗结核药物中异烟肼和利福平产生耐药的结核病, 对结核病控制构成严重威胁, 是死亡的主要原因之一。月华胶囊为清代医家程钟龄的月华丸的改革剂型, 由熟地、生地、麦门冬、阿胶、百部等药物组成, 具有滋阴降火, 消痰祛瘀, 止咳定喘, 保肺平肝, 消风热, 杀尸虫之功效, 主治肺肾

[收稿日期] 2005-11-29

[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目(03JJY3041)

[通讯作者] * 欧阳建军, Tel: (0731) 5600635; E-mail:

ouyangjianjun2@163.com

阴虚, 癆瘵久嗽之证。体外药效研究表明在改良罗氏培养基上, 采用试管稀释法, 月华胶囊对浓度为 10^2 mg/mL 耐多药结核菌的最低抑菌浓度为 250mg/mL^[1]。本实验采用小鼠尾静脉注射耐多药结核杆菌建立感染模型的方法, 观察月华胶囊对耐多药结核鼠血液中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 细胞及 $CD4^+/CD8^+$ 、 $IFN-\gamma$ 、 $IL-2$ 、 $IL-10$ 及 $TNF-\alpha$ 的变化, 以探讨月华胶囊对耐多药结核鼠免疫过程中对 T 淋巴细胞亚群及其 TH1/TH2 型细胞因子可能产生的作用及机理。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠 75 只, 雌雄各半, 体重 20g \pm 2g, 由湖南中医学院实验动物中心提供, 清洁级。

1.2 药物 月华胶囊由熟地、生地、麦门冬、天门冬、山药、贝母、阿胶、百部、沙参、茯苓、田三七等药组成(方中各药比例按 1: 1: 1; 1: 1: 1: 1: 1: 1, 2: 1: 1)。由湖南中医附属第一医院制剂科生产。主要制备工艺: 将除阿胶外所有药物洗净, 浸泡 2h, 加水煎煮 2 次, 第一次 3h, 第二次 2h, 合并煎液, 滤过, 滤液在 80℃ 以下减压浓缩稠膏, 同时将阿胶化入, 并在 80℃ 以下干燥, 粉碎, 过筛, 得月华浸膏粉(每 g 浸膏粉含生药 9g), 装入胶囊, 0.5g/粒(不含辅料的浸膏粉)。抗结核化学药物, 氧氟沙星(O), 0.2g/片; 乙氨丁醇(E), 0.75g/片; 吡嗪酰胺(Z), 1.5g/片; 对氨基水杨酸异烟肼(D), 1.0g/片。

1.3 致病菌 ①来源及耐药性测定 从临床肺结核病患者痰液中分离出结核分枝杆菌菌株, 经湖南省结核病防治所菌型鉴定为人型, 编号 478, 对异烟肼、利福平、链霉素、乙氨丁醇、利福喷丁多种化疗药产生耐药。②菌液制备 采取试管几何级稀释法制备耐多药结核分枝杆菌菌液, 挑取在改良罗氏培养基上生长良好的耐多药结核杆菌菌落 20mg(湿重)加入玻璃珠管中, 轻轻摇动 15min, 使试管壁呈毛玻璃状, 加含有 0.05% 吐温-80 的灭菌生理盐水, 摇动 1min, 与预先制备好的细菌浓度标准比浊管比浊, 制成 5mg/mL 的菌湿重量菌悬液。实验前配制, 菌液配成后于 2h 内用完。

1.4 试剂 ①T 细胞亚群试剂盒 CD4-BA0429; CD8-BA0430。②ELISA 试剂盒兔抗鼠 $IFN-\gamma$ 抗体 WZ1022, 兔抗鼠 $IL-2$ 抗体 EK0046, 兔抗鼠 $IL-10$ 抗体 EK0066, 兔抗鼠 $TNF-\alpha$ 抗体 EK0046。所有试剂均购自武汉市博士德试剂有限公司。

1.5 实验仪器 TGL16 台式高速冷冻离心机(湖南

仪器仪表总厂离心机厂); LTP-A 离心涂片机(军事科学医学院仪器厂); 恒温水浴箱(上海教学仪器厂); 江南双目光学显微镜(江南光学仪器厂); MDF381/AT - 78℃ 低温冰箱(日本); 紫外分光光度仪(DU530PERKIN ELHER 公司)。

2 方法

2.1 动物造模 参照文献[2] 将小鼠固定, 尾部用 75% 酒精消毒, 找到尾静脉, 4 号针头穿刺成功后, 每只小鼠尾静脉注射 5mg/mL 的耐多药菌悬液 0.2mL(正常对照组尾静脉注射生盐水 0.2mL), 穿刺部位压迫止血 3min。动物造模后观察 1d, 将小鼠尾部有苍白肿胀或坏死脱落者弃之。

2.2 动物分组和给药 ①分组 将 75 只小鼠先分别按性别、体重分层, 随机分成正常组 15 只, 造模组 60 只; 将造模注射成功的 48 只造模小鼠再分别按性别、体重分层, 随机分为 4 组, 每组 12 只, 分别为: 模型组、月华胶囊组、抗结核药物氧氟沙星(O) + 乙氨丁醇(E) + 吡嗪酰胺(Z) + 对氨基水杨酸异烟肼(D)组(简称 O E Z D 组)、月华胶囊 + O E Z D 组。正常组采用尾静脉注射生理盐水 0.2mL, 注射成功 12 只, 隔离喂养。②给药剂量 造模同时给药, 月华胶囊组、OEZD 组、月华胶囊组 + OEZD 组分别灌胃相应药液, 给药剂量为以 70kg 成人, 20g 小鼠按体表面积比等效剂量进行换算, OEZD 的总量为 $0.5g/kg \cdot d$ (O: $80mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$; E: $220mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$; Z: $100mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$; D: $100mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$); 月华胶囊剂量为等效剂量的 3 倍, $2.4g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ (浸膏粉)。③给药容积均为 $25mL \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$; 正常对照组与模型组灌胃等体积蒸馏水。④给药途径及时间 各组每日 1 次, 连续灌胃 28d。

2.3 观察指标及方法 (1) 免疫组化检测 T 细胞亚群 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ ①免疫组化标本制备: 各组小鼠均于末次给药后, 在清醒状态下心脏采血 1mL, 装入肝素抗凝的 EP 管中, 500r/min 离心 10min, 标本分成血细胞沉淀及血清, 将血细胞层移入一次性塑料管, 加入 2mL 淋巴细胞分离液, 2000r/min 离心 15min 后取出, 吸管吸取中上层(即淋巴细胞层)并置入另一管中, Hank's 液洗涤二次(每洗一次, 离心一次再去上清), 将洗涤后的标本分别置入离心涂片机中离心涂片于玻片上, 分组做好标记, 丙酮固定, -20℃ 备用冻存作 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞亚群测定; ②免疫组织化学染色: 按说明书提供的方法操作; ③显微镜观察及计

量: 细胞着色呈棕黄色的为阳性表达细胞。采用每组随机取 8 个视野, 在高倍镜下计数 200 个细胞, 计算 CD4 抗原、CD8 抗原阳性表达细胞百分率(%), 以平均值表示其表达强度。(2) ELISA 方法检测 Th1/Th2 型细胞因子 取上述血清, -20℃保存, 作 IFN- γ 、IL-2、IL-10 细胞因子及 TNF- α 的测定, 每项具体操作按说明进行。在 492nm 处测吸光值(OD)值, 将 OD 值换算成含量值(ng/L)。

2.4 统计方法 计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各組间比较, 先进行方差齐性检验, 方差齐则采用多样本两两比较的 q 检验, 方差不齐则作完全随机设计的多组样本秩和 H 检验, 全部数据用 SPSS 软件处理。

3 结果

3.1 对动物一般状况的影响 造模后 2d, 尾静脉注射有渗漏的小鼠发生局部肿胀、坏死, 甚至尾巴脱落。7d 后模型组小鼠活动减弱, 12d 时死亡 1 只, 解剖发现肺脏有明显的出血点, 其余模型组小鼠出现进食减少, 体毛干枯少光泽, 口鼻有明显分泌物, 体重减轻, 精神萎靡等改变并呈进行性加重。各给药组小鼠均无明显异常发生, 特别是月华胶囊+OEZD 组小鼠进食、体重、体毛等与正常组基本一致。另实验中模型组、月华胶囊组各因早期灌胃不当死亡小鼠 1 只。

3.2 对 T 细胞亚群 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 的影响 与正常组比较, 模型组 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 明显降低, 其差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。与模型

表 2 月华胶囊给药 28d 对耐多药结核鼠血清 TH1/TH2 型细胞因子的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	n	IFN- γ (ng/L)	IL-2(ng/L)	IL-10(ng/L)	TNF- α (ng/L)
正常组	—	12	103.84 \pm 8.94	63.09 \pm 6.74	32.07 \pm 7.21	10.30 \pm 1.34
模型组	—	10	60.79 \pm 11.47 ¹⁾	34.44 \pm 6.32 ¹⁾	82.53 \pm 12.19 ¹⁾	23.66 \pm 2.69 ¹⁾
月华胶囊组	2.4	11	88.54 \pm 13.19 ²⁾	53.32 \pm 5.54 ²⁾	49.37 \pm 8.56 ²⁾	14.92 \pm 1.65 ²⁾
OEZD 组	0.5	12	82.59 \pm 16.42 ³⁾	52.53 \pm 4.95 ³⁾	43.31 \pm 9.00 ³⁾	5.57 \pm 1.49 ³⁾
月华 CEZD	2.4 0.5	12	96.54 \pm 7.17 ²⁾⁴⁾	60.05 \pm 6.26 ²⁾⁴⁾	33.71 \pm 12.58 ²⁾⁴⁾	2.56 \pm 1.25 ²⁾⁴⁾

4 讨论

耐多药结核病的化学药物治疗遭遇严重挑战, 至今仍无统一的化疗方案。中药复方抗结核的作用重新引起人们的关注。月华丸为传统抗痨名方, 因其效用兼全, 力量大, 独具有杀痨虫之功, 为治结核的特效方^[3]。

结核的发病和转归与机体的免疫功能有关已广为共识。提高机体抗结核免疫主要体现在特异性 CD4⁺ T 细胞^[2]。本实验结果表明, 耐多药结核鼠

组比较, 月华胶囊组、OEZD 组、月华胶囊+OEZD 组 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 均明显升高, 其差异有显著性意义($P < 0.01, P < 0.05$), 而 CD8⁺ 均无明显改变, 其差异无显著性($P > 0.5$)。与 OEZD 组比较, 月华胶囊+OEZD 组 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 明显升高, 其差异有显著性($P < 0.05$)。

表 1 月华胶囊给药 28d 对耐多药结核鼠血液中 T 细胞亚群的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	n	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常组	—	12	37.00 \pm 6.24	18.42 \pm 1.83	2.04 \pm 0.48
病理模型组	—	10	18.90 \pm 4.36 ¹⁾	20.70 \pm 2.00	0.93 \pm 0.25 ¹⁾
月华胶囊组	2.4	11	33.90 \pm 8.02 ²⁾	18.55 \pm 2.25	1.66 \pm 0.48 ²⁾
OEZD 组	0.5	12	29.50 \pm 4.21 ³⁾	18.70 \pm 1.57	1.64 \pm 0.39 ³⁾
月华+OEZD 组	2.4+0.5	12	35.73 \pm 2.00 ²⁾⁴⁾	18.50 \pm 2.65	1.95 \pm 0.21 ²⁾⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$; 与 OEZD 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。OEZD 代表: 氧氟沙星(O), 乙氨丁醇(E), 吡嗪酰胺(Z), 对氨基水杨酸异烟肼(D)。(下同)

3.3 对 TH1 型细胞因子 IFN- γ 、IL-2; TH2 型细胞因子 IL-10 及 TNF- α 的影响 与正常对照组比较, 模型组 IFN- γ 、IL-2 显著降低; IL-10 及 TNF- α 显著升高, 其差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。与模型组比较, OEZD 组、月华胶囊组、月华胶囊+OEZD 组 IFN- γ 、IL-2 均明显升高($P < 0.01, P < 0.05$); IL-10 及 TNF- α 显著降低, 其差异有显著性意义($P < 0.01, P < 0.05$)。与 OEZD 组比较, 月华胶囊+OEZD 组差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 明显降低, 而月华胶囊有提高耐多药结核鼠 CD4⁺ T 细胞数量的作用, 通过 CD4⁺ T 细胞毒性作用直接杀灭结核杆菌, 且通过其介导的免疫提高了巨噬细胞的杀菌效应, 以达到治疗结核病的目的, 并与西药化疗药物有协同增效的优势。至于实验中 CD8⁺ T 细胞无显著性差异, 可能与实验观察的时间有关, 因为结核病有慢性化、病程长的特点。

目前认为, Th1/Th2 型细胞因子在抗结核免疫中

占有重要地位,以特异性杀伤性淋巴细胞产生为特征的Th1型免疫反应在抗结核免疫过程中起着重要的作用^[4]。本实验结果表明,耐多药结核鼠IFN- γ 、IL-2明显降低,而月华胶囊具有通过提高耐多药结核鼠的IFN- γ 、IL-2的水平,增强其杀灭耐多药结核菌的效应,与西药化疗药物联合能加强疗效;IL-10是Th2型细胞因子,在活动型结核病体内,Th1免疫应答水平降低,细胞免疫应答倾向Th2水平,IL-10升高,则疾病不利于好转^[5]。本实验模型组IL-10明显升高,月华胶囊能抑制Th2型细胞因子IL-10的分泌,通过降低IL-10的含量,促进IFN- γ 、IL-2等Th1型细胞因子分泌,因Th2型细胞因子具有拮抗Th1型细胞因子的作用,同时还可能在降低IL-10的过程中,促进Th2型细胞向Th1型细胞漂移,以达到消灭结核杆菌,治疗肺结核的目的。TNF- α 能促进巨噬细胞活化,增强其吞噬作用,参与结核肉芽肿形成,从而在结核菌感染中起保护作用,然而TNF- α 分泌过多也可导致组织坏死^[4,5]。实验结果表明,模型组小鼠TNF- α 的含量明显增高,其余各组升高不明显,这与病理切片观察中各治疗组没有发现空洞形成相一致。

中医药治疗结核病有其独有的特色,如不易产

生耐药性、少毒副作用等,故该确立其应有的临床地位。月华丸治疗耐多药结核病迄今尚无人进行系统地研究,本实验将其改革成现代常用剂型胶囊,从动物实验模型体内第一次探讨其治疗耐多药结核病的疗效,特别是从分子免疫水平探讨其机理,为临床运用月华胶囊治疗耐多药结核病提供了实验依据。而月华胶囊显示的与化疗药结合治疗耐多药结核病的协同增效作用,看到了中西药物结合综合治疗结核病的优势和特点,为临床提示了良好的运用前景。

[参考文献]

- [1] 欧阳建军,伍参荣,白宇乾.月华胶囊对耐多药结核分支杆菌抑菌效应的体外研究[J].湖南中医学院学报,2003,23(5):14-15,22.
- [2] 谢惠安,阳国太,林善梓,等.现代结核病学[M].北京:人民卫生出版社,2000.93-98.
- [3] 许济群,王绵之.方剂学[M].北京:人民卫生出版社,1995.284.
- [4] Zhang M, Lin Y, Iyer DV, et al. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Infect Immunol*, 1995, 63: 3231-3234
- [5] Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 93-129.