

防感煎剂对 H1N1 病毒感染小鼠 TNF- α 、IL-6 的影响*

徐一凯¹, 杨珺超^{2△}

(1. 浙江中医药大学, 浙江杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江杭州 310006)

摘要: **目的** 探讨防感煎剂对 H1N1 流感病毒感染小鼠 TNF- α 、IL-6 的影响, 进一步了解防感煎剂的疗效机理。**方法** 选用清洁级 ICR 雄性小鼠 96 只, 随机分为 4 组: 正常对照组、模型对照组、防感煎剂组、达菲对照组。实验组予防感煎剂灌胃给药, 达菲对照组予达菲灌胃给药, 正常对照组和模型对照组则用生理盐水灌胃, 在灌胃给药第 3 天开始用 H1N1 流感病毒液滴鼻造模, 造模后的第 1、5、9、13 天每组随机处死 6 只小鼠, 收集肺组织标本, 用于 H1N1 病毒核酸提取, 收集血清, 用 ELISA 法检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6) 含量。**结果** 1、防感煎剂组小鼠一般状况优于模型组。2、防感煎剂组小鼠肺组织 H1N1 病毒含量低于模型组($P<0.05$)。3、防感煎剂组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平低于模型组($P<0.01$)。**结论** 防感煎剂可抑制 H1N1 病毒复制, 抑制细胞因子 TNF- α 、IL-6 的表达, 从而减轻由炎性介质过度释放引起的免疫病理损伤, 由此推断防感煎剂可能通过调节免疫功能来控制感染、改善症状。

关键词: 防感煎剂; 甲 1 型流感病毒; TNF- α ; IL-6

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)01-0012-03

防感煎剂系浙江省中医院国家级名老中医的经验方, 主要由荆芥 10g, 防风 10g, 前胡 10g, 板蓝根 10g, 大青叶 10g, 黄芩 10g, 杏仁 10g, 白芷 10g, 陈皮 6g 组成。方中诸药寒温并用, 功能解表散寒、清热解毒、宣肺利气, 经长期临床使用证实: 该药有较好的防治流感效果。前期的实验结果显示防感煎剂有很好的直接抑制甲 1 型流感病毒作用以及调节 T 细胞免疫功能作用^[1], 可以减轻肺部炎症损害, 有利于病毒感染的控制; 体外抑制试验的研究结果表明防感煎剂可以阻止病毒吸附于易感细胞^[2]。本实验从小鼠 TNF- α 和 IL-6 细胞因子的表达入手, 进一步揭示防感煎剂抗病毒感染的免疫机理。

1 实验材料

1.1 实验动物

清洁级 ICR 小鼠(二级)96 只, 雌雄各半, 体重(20 $\pm$ 2)g, 购于浙江中医药大学实验动物中心。

1.2 实验药品

防感煎剂所需中药购自浙江中医药大学附属

第一医院中药房, 药物品系和质量合格。药材鉴定人: 钱松洋, 主任中药师。按常规方法煎煮 2 次, 将前后两次煮液合并, 过滤, 所得滤液进行浓缩, 最终使用药物剂量为 29.32g/kg(经前期实验验证为最佳药物浓度)^[1]。实验使用药物剂量为 29.32g/kg。磷酸奥司他韦(达菲)胶囊, 75mg/粒, 批号 E1284, 罗氏大药厂香港有限公司。

1.3 病毒

甲 1 型流感病毒鼠肺适应株(FM1), 由浙江省疾病预防控制中心病毒所提供。经测定, 该病毒对小鼠的 LD₅₀ 为 10-4/20 μ l。

1.4 实验试剂

小鼠肿瘤坏死因素(TNF- α)ELISA 试剂盒, 批号 1207283; 小鼠白介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒, 批号 1207281 均由美国 R&D 公司分装, 上海西唐生物科技有限公司提供。

1.5 统计方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析, 数据以

* 基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2010KYB078)

收稿日期: 2013-12-18

作者简介: 徐一凯(1988-), 男, 浙江临安人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 中医临床呼吸病学。

△通信作者: 杨珺超, E-mail: yangjunchaoj@163.com

均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素 ANOVA,组间两两比较,方差齐性时用 LSD-t 检验,方差不齐时用 Tamhane's T2 检验, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 实验方法

2.1 分组及用药情况

小鼠按体重分层随机分为正常对照组、模型对照组、防感煎剂组、达菲对照组,每组 24 只。按照体型系数换算法进行实验动物与人用药量的换算,防感煎剂组给药剂量为 29.32g/kg;达菲对照组给药剂量为 0.02g/kg,正常对照组和模型组以生理盐水灌胃,每天 1 次,每次 0.25mL/10g,分别灌胃给药,先正常给药 2d,第 3-8 天在甲 1 型流感病毒液滴鼻感染造模后 2h 灌胃给药,共给药 8d。

2.2 造模方法

给药第 3 天,小鼠用乙醚轻度麻醉后,正常对照组以生理盐水滴鼻,其余各组以 10LD₅₀ 的甲 1 型流感病毒液滴鼻感染,每只 20 μ L,以滴鼻造模的次日为病毒感染后第 1 天,每组小鼠分别于感染后第 1,5,9,13 天随机取小鼠动态观察毛色,皮肤,反应速度(对一般刺激)等情况。

3 结果

3.1 小鼠一般情况的变化

正常组小鼠毛色光洁,呼吸平稳,活泼好动,反应灵敏,饮食正常,而病毒感染的 72 只小鼠不久即出现不同程度的形体消瘦,毛色干枯,反应迟钝。各药物干预组随着药物的应用,症状明显较模型组减轻。模型组形体消瘦,毛色枯槁,精神萎靡、反应迟钝,饮食减少。达菲组较模型组、防感煎剂组毛色稍润泽,反应稍灵敏。

3.2 RT-PCR 检测感染小鼠流感病毒含量

实时荧光定量 RT-PCR 检测流感病毒含量结果显示:第 1 天,第 5 天,防感煎剂组病毒含量低于模型对照组($P<0.05$);第 9 天防感煎剂的病毒含量低于模型对照组,但没有统计学上的差异($P>0.05$);第 13 天防感煎剂组病毒含量低于模型对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。从表 6 中可以看出,感染后第 5 天病毒含量达到峰值,第 9 天起不再继续增高,而经防感煎剂处理后,病毒高峰仍在第 5 天出现,但无论是病毒感染初期,中期及后期病毒含量都明显下降。见表 1

表 1 病毒含量

(单位:copies/ μ l)

组别	动物总数(n)	第 1 天	第 5 天	第 9 天	第 13 天
正常对照组	6	0	0	0	0
模型对照组	6	66.80 $\pm$ 14.21	186.44 $\pm$ 39.46	132.17 $\pm$ 17.06	55.69 $\pm$ 13.60
达菲对照组	6	32.03 $\pm$ 5.68**	73.56 $\pm$ 33.07**	62.91 $\pm$ 11.05**	16.73 $\pm$ 4.96**
防感煎剂组	6	40.26 $\pm$ 5.94*	111.48 $\pm$ 19.03*	92.41 $\pm$ 28.12	32.31 $\pm$ 7.99*

注:与模型组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,** $P<0.01$

3.3 血清中细胞因子的表达

3.3.1 血清 TNF- α 因子表达

感染后各组小鼠血清 TNF- α 随时间呈升高趋势。但在感染初期(第 1 天)和感染中期(第 5 天)各组之间 TNF- α 表达无明显差异。感染后期(第 9 天、第 13 天)时模型对照组 TNF- α 明显高

于正常对照组($P<0.01$),防感煎剂组和达菲对照组明显低于模型对照组($P<0.05$, $P<0.01$),但两组之间比较无统计学差异($P>0.05$),与正常对照组比较也无统计学差异($P>0.05$)。提示:病毒感染后期 TNF- α 表达增加,防感煎剂能抑制 TNF- α 的表达。见表 2

表 2 血清 TNF- α 表达

(单位:pg/mL)

组别	动物总数(n)	第 1 天	第 5 天	第 9 天	第 13 天
正常对照组	6	22.8234 $\pm$ 0.6013	22.4089 $\pm$ 0.3993	22.9500 $\pm$ 0.8172	22.0133 $\pm$ 1.9260
模型对照组	6	23.7517 $\pm$ 1.7018	23.9250 $\pm$ 1.7151	25.0833 $\pm$ 0.2989#	26.7917 $\pm$ 0.4192#
达菲对照组	6	23.3600 $\pm$ 1.0853	23.4750 $\pm$ 1.1284	24.1383 $\pm$ 0.5345###	24.7167 $\pm$ 0.8824**
防感煎剂组	6	23.4767 $\pm$ 0.8028	23.6750 $\pm$ 0.7952	24.2683 $\pm$ 0.3659###	24.7267 $\pm$ 0.8761**

注:与正常对照组相比,* $P<0.05$;与正常对照组相比,## $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,** $P<0.01$

3.3.2 血清 IL-6 因子表达

感染后各组小鼠血清 IL-6 随时间呈升高趋势。但在感染初期(第 1 天)和感染中期(第 5 天)各组之间 IL-6 表达无明显差异。感染后期(第 9 天、第 13 天)时模型对照组 IL-6 明显高于正常对照组

($P<0.01$), 防感煎剂组和达菲对照组明显低于模型对照组($P<0.05$, $P<0.01$), 但两组之间比较无统计学差异($P>0.05$), 与正常对照组比较也无统计学差异($P>0.05$)。提示:病毒感染后期 IL-6 表达增加,防感煎剂能抑制 IL-6 的表达。见表 3。

表 3 血清 IL-6 表达

(单位:pg/mL)

组别	动物总数(n)	第 1 天	第 5 天	第 9 天	第 13 天
正常对照组	6	122.7933±0.6013	122.4100±0.3993	122.9500±0.8172	122.92±0.43165
模型对照组	6	123.7517±1.7018	123.8367±1.7227	125.0667±0.3085 ^{###}	126.3883±0.1739 ^{###}
达菲对照组	6	123.3100±1.0853	123.3917±1.1335	124.1917±0.5335 [*]	124.2483±1.0272 ^{**}
防感煎剂组	6	123.6767±0.8028	123.6283±0.79763	124.26±0.3667 [*]	124.4332±1.0415 ^{**}

注:与正常对照组相比,^{*} $P<0.05$;与正常对照组相比,^{##} $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与模型组相比,^{**} $P<0.01$

4 讨论

流感是由流行性流感病毒引起的急性呼吸道传染病。流感病毒发病率高、传染性强、致死率高,其中甲型流感病毒的抗原变异性最大,曾 3 次导致世界性大流行的流感^[3]。其中感染人类并能够引起一定范围流行的甲型流感病毒包括甲 1 (H1N1)和甲 3(H3N2)型^[4]。病毒感染机体后,可启动宿主免疫应答,形成炎症反应和炎症免疫病理损伤。在免疫病理损伤过程中,涉及多种免疫细胞和细胞因子,而中医药在调节机体和细胞免疫方面有明显的优势,现代的中药研究显示^[5],有些中药可直接灭活或抑制病毒,有些中药则通过诱导干扰素或调节人体免疫功能而发挥间接抗病毒作用。而复方中药,其有效成分多,能从多环节调节机体的细胞免疫,因而能为病毒感染过程中引起炎症免疫病理损伤的治疗提供新的研究思路。

研究发现激活的巨噬细胞,能增强促炎性细胞因子的分泌,包括 IL-6 和 TNF- α ^[6-7]。而 IL-6, TNF- α 等炎性细胞因子通过趋化、活化淋巴细胞、中性粒细胞等,产生免疫病理损伤;另一方面,这些细胞因子可直接作用于细胞、微血管等,造成组织损伤^[8]。实验结果表明防感煎剂能明显改善小鼠一般状况,降低小鼠肺组织中 H1N1 病毒含量,抑制 TNF- α 、IL-6 等炎性细胞因子的表达,并且与达菲组比较效果相当。说明防感煎剂可抑制 H1N1 病毒复制,在病毒感染引起的免疫病理损伤过程中发挥作用,通过抑制细胞因子 TNF- α 、IL-6 的表达,从而减轻由炎性介质过度释放引起的免疫病理损伤,从而来控制

感染、改善症状。

参考文献:

- [1] 汪玉冠,宋康,骆仙芳,等. 防感煎剂对甲 1 型流感病毒感染小鼠 T 细胞亚群及活化的影响 [J]. 中国中医药科技, 2012, 19(1): 22-24.
- [2] 宋康. 防感煎剂含药血清体外抑制甲 1 型流感病毒作用的实验研究[C]. 第十次全国中西医结合防治呼吸系统疾病学术研讨会, 2009.
- [3] Carolien E. van de Sandt, Joost H. C. M. Kreijtz, Guus F. Rimmelzwaan. Evasion of Influenza A viruses from Innate and Adaptive Immune Responses[J]. Viruses, 2012 September, 4(9): 1438-1476.
- [4] WHO. Influenza (seasonal) fact sheet N°211. [EB/OL]. [2009 April]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>.
- [5] 黄海英,宋辉. 抗流感病毒中药研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(5): 439-440.
- [6] van Riel D., Leijten L. M., van der Eerden M. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF- α induction[J]. PLoS Pathog, 2011, 7: e1002099.
- [7] Becker S., Quay J., Soukup J. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophage [J]. Immunol, 1991, 147: 4307-4312.
- [8] Campbell D. J., Koch M. A. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells [J]. Nat. Rev, 2011(11): 119-130.

(编辑:迟越)

(英文摘要见第 25 页)

- 中医药学刊,2013,31(5):1026-1028.
- [7] 边智伟,吴承玉. “女子以血为本”理论源流探析[J]. 中医药导报,2010,16(12):8.
- [8] 林丽,曹惠芬. 孟如教授治疗干燥综合征经验[J]. 云南中医中药杂志,1999,20(1):10-11.
- [9] 郭晟. 基于古今文献数据分析的云南燥证证治规律研究[D]. 昆明:云南中医学院,2012:49-51.
- [10] 费伯雄. 医醇賸义·卷二 [M]. 上海:上海科技出版社,1959:2-5.
- [11] 陈士铎. 辨证录[M]. 北京:人民卫生出版社,1989:357.
- (编辑:徐建平)

Data-based Medication Analysis on Dryness Syndrome in Central Yunnan Province

GUO Juan, ZHANG Yan, LU Peng, YANG Mei

(Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To discuss the medication rule of Dryness Syndrome treatment in central Yunnan province. **Methods** To explore section medication rule of Dryness Syndrome treatment in central Yunnan province by collecting 432 relevant medical records which included 396 prescriptions before inputting the ingredients to Excel table and conducting cluster analysis and frequency analysis through SPSS19.0 (Statistics Package for the Social Sciences). **Results** Chinese medicine used in Dryness Syndrome treatment in central Yunnan province normally has the functions of regulating and reinforcing Qi and Yin (regulating liver Qi, replenishing lung and spleen Qi, supplementing liver and kidney Yin), and is cold in nature, sweet, bitter or pungent in flavor, and acts on the lung and liver meridians. Commonly applied prescriptions are erzhi pill, liuwei dihuang pill; qingzao jiuwei decoction; yangyin qingfei decoction. The usage of medicine, which is characterized by definite local features, reflects the TCM theory of “treating patients according to the three factors of locality, time and the patients themselves.” and can be applied in clinical practice.

KEY WORDS: Dryness Syndrome in Yunnan province; central Yunnan province; prescription; rule

(原文见第12页)

Influence of Fanggan Decoction on TNF- α and IL-6 in Mice Infected by Influenza A Virus(H1N1)

XU Yi-kai¹, YANG Jun-chao²

(1. Zhe Jiang University of TCM, Hangzhou, 310053, China;

2. The First Affiliated Hospital of Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: **Objective** To Explore the influence of Fanggan decoction on TNF alpha and IL-6 in the mice infected by influenza A virus (H1N1), to learn more about Fanggan decoction curative effect mechanism. **Methods** Choose clean level 96 male ICR mice, were randomly divided into 4 groups: normal control group, model control group, Chinese medicine in Chinese medicine dosage group and positive control group. Sense of Chinese traditional medicine group to prevent decoction medium dose to fill the stomach, positive control group to tamiflu lavage, normal control group and model control group with saline lavage. In for 3 days with the flu virus droplets nasal H1N1 virus infection of animal model is set up. In building 1, 5, 9, 13 days after the random death 6 mice in each group, the serum and lung tissue collection, TNF alpha and IL-6, such as secretion and function. **Results** 1, Fanggan decoction group is better than the model group in general condition of mice. 2, Fanggan Decoction group had lower H1N1 virus content in lung tissue of mice than those in the model group ($P<0.05$). 3, drug intervention group mice blood serum tumor necrosis factor (TNF alpha), IL-6, level significantly decreased, compared with the model group had significant difference ($P<0.01$). **Conclusion** Fanggan decoction can depress the replication of the H1N1 virus, depress expression of cytokines TNF- α , IL-6, thereby reducing the excessive release of inflammatory mediators by immune pathological injury caused by inflammation, thus Fanggan decoction can regulate the immune function and improve symptoms.

KEY WORDS: Fanggan decoction; influenza A virus(H1N1); TNF- α ; IL-6