

· 实验研究 ·

清燥救肺汤对流感病毒 FM1 感染小鼠肺组织匀浆液中 TNF- α 、MCP-1 和 NO 含量的影响

卢 红 蓉*

(* 中国中医科学院基础理论研究所,北京市东直门内南小街16号,100700)

摘要 目的:观察清燥救肺汤对流感病毒 FM1 感染复制的病毒性肺炎小鼠肺组织匀浆液中 TNF- α 、MCP-1 和 NO 含量的影响,研究清燥救肺汤保护肺组织的作用机制。方法:ICR 小鼠经鼻吸入流感病毒亚洲甲型鼠肺适应株(FM1)复制小鼠病毒性肺炎模型,用清燥救肺汤治疗,设利巴韦林治疗作对照,分别于第3、6、9天处死小鼠,制备肺组织匀浆液,检测感染小鼠肺组织匀浆液中 TNF- α 、MCP-1 和 NO 的含量,动态观察其变化。结果:与模型组比较,清燥救肺汤治疗组肺组织匀浆液中 TNF- α 含量降低,第6、9天差异显著($P < 0.05$);MCP-1 含量亦较模型组降低,第6、9天有显著差异($P < 0.05$);NO 含量较模型组降低,第6、9天差异显著(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:清燥救肺汤对流感病毒 FM1 感染小鼠有保护作用,能减轻肺组织免疫损伤,其保护肺组织的机制可能与减少肺组织中免疫细胞的浸润,减少肺毒性炎症因子 TNF- α 、趋化因子 MCP-1 及炎症介质 NO 的水平有关。

关键词 清燥救肺汤/治疗作用;病毒性肺炎/中医药疗法;TNF- α ;MCP-1;NO

Impact of Qingzao Jiufeitang (Qingzao Jiufei Decoction) on Content of TNF- α , MCP-1 and NO in Lung Cell Homogenate of Mice Contracted with Influenza Virus FM1

Lu Hongrong

(Institute of Basic Theory of TCM, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

Abstract Objective: To observe the impact of Qingzao Jiufeitang (Qingzao Jiufei Decoction) on content of TNF- α , MCP-1 and NO in lung cell homogenate of mice contracted with influenza virus FM1, and investigate the protective mechanism of Qingzao Jiufeitang (Qingzao Jiufei Decoction). **Methods:** Models of viral pneumonia in mice were replicated by inhaling FM1 via mice's noses. The treatment group was treated with Qingzao Jiufeitang (Qingzao Jiufei Decoction), while control group with Ribavirin. We executed mice on 3rd, 6th, 9th day respectively, prepared lung cell homogenate, therein detected content of TNF- α , MCP-1 and NO, and observed their dynamic changes. **Results:** In comparison with the model group, the content of TNF- α , MCP-1, NO of the treatment group were significantly lower on 6th day ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$) and on 9th day ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$) respectively. **Conclusions:** Qingzao Jiufeitang (Qingzao Jiufei Decoction) can protect mice contracted with influenza virus FM1, and lessen immunizing damage in lung tissues, the mechanism of which may relate to reducing infiltration of immunocell in lung tissues, and cutting down the level of toxic inflammatory factors, like TNF- α , chemotactic factor for example, MCP-1 and inflammatory mediator, such as NO.

Key Words Qingzao Jiufei Decoction/ Treatment effect; Viral pneumonia/ Chinese medical therapy; TNF- α ;MCP-1; NO

病毒感染后,机体的抗病毒机制主要是通过细胞分泌细胞因子诱导抗病毒反应,而机体的免疫反应一方面清除病原,另一方面又可导致肺部组织的免疫损伤,免疫病理直接参与了炎症的产生和加重。呼吸道病毒感染的过程中,免疫损害的产生是其特点之一。

本实验采用小鼠流感病毒性肺炎模型,分别于第3、6、9天观察清燥救肺汤(QZJF)对 FM1 感染小鼠肺组织匀浆液中炎症因子 TNF- α 、趋化因子 MCP-1 及炎症介质 NO 表达的影响,探讨其对肺组织的保护作用机制。

1 材料

1.1 实验动物:ICR 小白鼠,封闭群,二级,雄性,体重15~17g,购自北京维通利华实验技术有限公司。许可证号[SCXK(京)2002-0003]。购入后置微生物免疫

动物室(国家二级)动物洁净柜饲养。

1.2 病毒及主要药物:清燥救肺汤在原方的基础上,根据导师宋乃光教授的临床经验,加大了药物的剂量(冬桑叶15g,石膏20g,甘草6g,人参3g,火麻仁10g,阿胶6g(烔化),麦冬10g,杏仁6g,枇杷叶8g),使用时水煎煮2次,取药液混合,滤纸过滤,100℃水浴锅浓缩,制成浓度为1.12g/ml溶液。阳性对照药物利巴韦林颗粒剂:四川百利药业有限责任公司出品(批号:041229),使用时用生理盐水配制成0.006g/ml溶液。流感病毒亚洲甲型鼠肺适应株(FM1)由中国预防医学科学院病毒学研究所提供,9~10日龄SPF鸡胚由北京生物制品研究所提供,流感病毒经鸡胚传代后,测定病毒滴度为1:640,-70℃冻存备用。小鼠 TNF- α 、MCP-1 ELISA 试剂盒均购自美国 santacru 公司。

表 1 QZJF 对流感病毒 FM1 感染小鼠肺组织 TNF- α 含量的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$) (pg/ml)

组别	3 天	6 天	9 天
正常对照组	357.716 $\pm$ 27.901	366.316 $\pm$ 13.192	352.766 $\pm$ 34.226
模型组	531.516 $\pm$ 35.981 **	840.716 $\pm$ 52.816 **	1150.400 $\pm$ 89.837 **
利巴韦林组	454.433 $\pm$ 40.845 #	758.483 $\pm$ 78.434 #	511.716 $\pm$ 70.239 ##
QZJF 组	475.883 $\pm$ 37.849	763.050 $\pm$ 93.717 #	501.633 $\pm$ 34.468 ##

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

1.3 主要实验仪器:酶标仪(BIO-RAD, 2550, 美国)、微量加样器、恒温箱、匀浆机、TBL 型低温高速离心机。

2 方法

2.1 分组及造模、给药方法:把小白鼠按体重随机分组,正常对照组、模型组、利巴韦林组、QZJF 组 4 组,每组 18 只。其中正常对照组小鼠乙醚轻度麻醉后,用 50 μ l 生理盐水滴鼻造模,其他各组均以乙醚轻度麻醉小鼠后,以流感病毒液:生理盐水 = 1:120 稀释后 50 μ l 滴鼻造模。造模后 2h 开始给药,按照人的临床等效剂量折算,利巴韦林组每次灌胃利巴韦林颗粒剂溶解液(0.006g/ml, 0.09g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹); QZJF 组每次灌胃清燥救肺汤药液(1.12g/ml, 16.8g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹); 正常对照组和模型组分别给予生理盐水灌胃,每日 1 次。

2.2 肺组织匀浆液制备:每次取各组小鼠 6 只,分别于造模后第 3、6、9 天眼球放血处死,摘取全肺,按肺重(g):生理盐水(ml) = 1:9 的比例,置匀浆机中匀浆,匀浆后置试管中离心(4 $^{\circ}$ C, 3000rpm/min) 30min,吸取上清液,置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中待用。

2.3 指标检测

2.3.1 小鼠肺组织 TNF- α 、MCP-1 含量的测定:用双抗体夹心 ABC-ELISA 法, TNF- α 、MCP-1 含量测定分别用小鼠 TNF- α ELISA、MCP-1ELISA 试剂盒。检测程序按照试剂盒说明书进行。

2.3.2 小鼠肺组织 NO 含量的测定:NO 硝酸还原酶法检测^[1]。

2.4 统计学方法:用 SPSS10.0 统计软件处理数据,各组数据均值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 QZJF 对流感病毒 FM1 感染小鼠肺组织 TNF- α 含量的影响:模型组肺组织匀浆液中 TNF- α 含量较正常对照组明显升高,第 3、6、9 天均有显著差异($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组肺组织匀浆液中 TNF- α 含量均降低,其中利巴韦林组第 3、6、9 天均有显著差异(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), QZJF 治疗组第 6、9 天差异显著(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 1。

3.2 QZJF 对流感病毒 FM1 感染小鼠肺组织 MCP-1 含量的影响:与正常对照组比较,模型组肺组织匀浆液中 MCP-1 含量明显升高,其中第 6、9 天有显著差异($P < 0.05$);与模型组比较,各治疗组肺组织匀浆液中 MCP-1 含量较模型组降低,其中利巴韦林组,第 6、9 天有显著差异($P < 0.05$); QZJF 治疗组,第 6、9 天有显著差异($P < 0.05$), 结果见表 2。

表 2 QZJF 对流感病毒 FM1 感染小鼠肺组织 MCP-1 含量的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$) (pg/ml)

组别	3 天	6 天	9 天
正常对照组	444.321 $\pm$ 38.074	443.927 $\pm$ 44.765	448.642 $\pm$ 90.813
模型组	529.346 $\pm$ 45.813	719.586 $\pm$ 32.391 *	590.671 $\pm$ 87.176 *
利巴韦林组	443.657 $\pm$ 40.095	485.693 $\pm$ 38.591 #	452.684 $\pm$ 46.436 #
QZJF 组	475.993 $\pm$ 45.813	483.403 $\pm$ 53.779 #	417.654 $\pm$ 87.175 #

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

3.3 QZJF 对流感病毒 FM1 感染小鼠肺组织 NO 含量的影响:模型组小鼠肺组织 NO 含量较正常对照组升高,其中第 3、6、9 天均有显著差异(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$);与模型组比较, QZJF 治疗组肺组织中 NO 含量较模型组降低,第 6、9 天差异显著(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$);利巴韦林组第 9 天 NO 含量差异显著($P < 0.01$), 结果见表 3。

表 3 QZJF 对流感病毒 FM1 感染小鼠肺组织 NO 含量的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$) (μ mol/L)

组别	3 天	6 天	9 天
正常对照组	0.575 $\pm$ 0.009	0.561 $\pm$ 0.147	0.557 $\pm$ 0.124
模型组	0.711 $\pm$ 0.103 *	0.766 $\pm$ 0.0501 **	0.779 $\pm$ 0.024 **
利巴韦林组	0.663 $\pm$ 0.009	0.671 $\pm$ 0.086	0.636 $\pm$ 0.028 ##
QZJF 组	0.587 $\pm$ 0.013	0.631 $\pm$ 0.010 #	0.587 $\pm$ 0.059 ##

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

4 讨论

下呼吸道感染后的免疫炎症反应机制十分复杂,涉及多种炎症细胞及炎症因子,包括促炎因子、黏附分子、趋化分子、炎症抑制因子等多种细胞因子。肺巨噬细胞在肺部免疫系统中,占有重要地位。当严重感染后,巨噬细胞募集到周围损伤组织并被激活,释放

大量的前炎症因子 IL-1、IL-6、TNF- α 、趋化性细胞因子和免疫调节性细胞因子及 NO 等,其中 TNF- α 等细胞因子是最早释放的介质,TNF- α 对肺脏具有强烈的毒性,它能诱导肺内皮细胞活化、白细胞迁移、粒细胞脱颗粒和毛细血管渗漏等,从而诱发并进一步加重炎症反应。本实验中模型组小鼠肺组织 TNF- α 含量较正常组升高,其中第 3、6、9 天均有显著差异,结合肺组织病理,TNF- α 在肺组织中表达的变化趋势与肺病理组织损害程度基本一致,这与文献报道的一致^[1,2]。抗 TNF 治疗可以减少肺部炎症细胞的募集,减轻病情^[3]。在本实验中,利巴韦林组、QZJF 组小鼠肺组织中 TNF- α 含量在第 6、9 天均较模型组显著降低,提示 QZJF 可能通过降低组织中 TNF- α 浓度而达到保护肺组织、减轻炎症损伤的作用。

炎症反应发生时,免疫细胞在肺脏内聚集也是一个多种因子参与的复杂过程,已有研究证实,趋化因子在浸润迁移信号的提供、浸润细胞的活化以及启动其作定向迁移中扮演着至关重要的角色,趋化因子参与了肺部炎症反应^[4]。趋化因子是一类可诱导的分泌型促炎细胞因子,对特定或多种炎症细胞具有定向趋化作用,其中趋化因子 MCP-1 主要参与单核细胞浸润^[5]。MCP-1 是一种特异性作用于单核-巨噬细胞的双功能分子,既能诱导单核-巨噬细胞的趋化,又能激活单核-巨噬细胞,对中性粒细胞则无趋化作用。MCP-1 在单核细胞聚集的过程中可能同时起到启动和放大作用,但近来的研究发现趋化因子在肺炎的发生中作用较复杂,其既参与了炎症的发生,又可能对机体有保护作用,因此认为其具有两面性,是一把“双刃剑”^[6,7,8]。本实验中模型组肺组织匀浆液 MCP-1 含量在第 6、9 天较正常组显著增高;利巴韦林组、QZJF 组肺组织匀浆液中 MCP-1 含量较模型组降低,其中第 6、9 天差异显著。利巴韦林组、QZJF 组 MCP-1 含量升高不明显,说明 QZJF 在激活机体免疫功能的同时,还能通过调节局部细胞因子水平,抑制局部过度炎症反应以减轻肺组织损伤。研究表明,NO 是一种具有双重作用的细胞信使分子和细胞毒性分子,NO 对机体的生理作用取决于刺激因素的性质、强弱、剂量的大小及反应的部位。在生理条件下,由内皮型 NO 合成酶(eNOS)产生的低浓度 NO 有保护支气管过度收缩、调节肺血流和免疫防护的作用^[9],当巨噬细胞受炎症刺激后,由诱导型 NO 合成酶(iNOS)产生的大量 NO 可导致气道炎症反应和组织损伤。NO 对细菌和原虫明确的抗菌作用已得到公认,但在呼吸道病毒感染如流感病毒性肺炎有相反的作用^[10,11,12],抑制 NO 的产生

可明显减轻流感病毒引起的病毒性肺炎病理反应。本实验中模型组小鼠肺组织 NO 含量较正常组升高,其中第 3、6、9 天均有显著差异;QZJF 治疗组肺组织中 NO 含量较模型组降低,第 6、9 天差异显著;利巴韦林组从含量在第 9 天与模型组差异显著。模型组肺组织中 NO 含量与正常组相比,呈上升趋势,这与以往的研究基本一致^[13,14],表明急性肺炎时 NO 水平的升高也是造成肺组织损伤的一种因素。QZJF 降低了肺组织中 NO 的含量,减轻了 NO 代谢产物的毒害作用,对肺组织具有保护作用。

结合以上实验结果,QZJF 对流感病毒 FM1 感染小鼠有保护作用,能减轻肺组织免疫损伤,其保护肺组织的机制可能与减少肺组织中免疫细胞的浸润,减少肺毒性炎症因子 TNF- α 、趋化因子 MCP-1 及炎症介质 NO 的水平有关。

参考文献

- 1 Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M. Bronchoalveolar interferon-alpha, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and inflammation during acute influenza in pigs: a possible model for humans? *J Infect Dis*, 1998, 177(4): 1076 ~ 9.
- 2 Peper RL, Van Campen H. Tumor necrosis factor as a mediator of inflammation in influenza A viral pneumonia. *Microb Pathog*, 1995, 19(3): 175 ~ 83.
- 3 Hussell T, Pennycook A, Openshaw PJ. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology. *Eur J Immunol*, 2001, 31(9): 2566 ~ 73.
- 4 Zlotic A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000, 12: 121.
- 5 沈燕,熊思东. MCP-1 结构与功能的分子基础. *生命的化学*, 2002, 22(1): 58 ~ 60.
- 6 Matsukawa A, Hogaboam CM, et al. Chemokines and innate immunity. *Rev Immunogenet*, 2000, 2(3): 339 ~ 58.
- 7 Nelson S. Novel nonantibiotic therapies for pneumonia: cytokines and host defense. *Chest*, 2001, 119: 419S ~ 425S.
- 8 Brandt E, Ludwig A, Petersen F, et al. Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunol Rev*, 2000, 177: 204 ~ 16.
- 9 Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, et al. The biology of nitrogen oxide in the air ways. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 149: 538 ~ 551.
- 10 Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax*, 1993, 48: 1034 ~ 1043.
- 11 Peterhans E. Reactive oxygen species and nitric oxide in virus disease. *Bio Trace Element Res*, 1997, 56: 107 ~ 116.
- 12 Reiss CS, Komatsu T. Does nitric oxide play a critical role in virus infections. *J Virol*, 1998, 72(6): 4547 ~ 4551.
- 13 李华强,史源. 内源性一氧化氮在感染性肺炎病理过程中的作用. *第三军医大学学报*, 1999, 21(3): 206 ~ 208.
- 14 Tanaka K, Noda S. Role of nitric oxide in murine cytomegalovirus (MC-MV) infection. 2001, 16(3): 937 ~ 44.

(2006-12-04 收稿)