

实验研究

食积因素对 FM1 流感病毒感染小鼠免疫功能影响的实验研究

施金凤¹ 于 河² 王 上³ 谷晓红²

(1 河南省郑州市第二中医院, 郑州, 450002; 2 北京中医药大学, 北京, 100029; 3 湖北中医药大学, 武汉, 430061)

摘要 目的:通过检测不同时相食积复合流感病毒(FM1)感染小鼠血清免疫球蛋白 M(IgM)、IFN- γ 、IL-4 及 TH1/TH2 水平,探讨食积对流感病毒感染(FM1)小鼠免疫功能的影响。方法:通过喂饲小鼠高蛋白、高热量特制饲料复制食积模型,在此基础上,经鼻感染 FM1 甲型流感病毒,复制病毒性感染模型,于感染后第 1、3、5 天,分别检测各组小鼠血清 IgM、IFN- γ 、IL-4 及 TH1/TH2 水平。结果:小鼠感染 FM1 流感病毒后第 5 天,单纯感染组、食积感染组小鼠血清 IgM 含量均较正常组下降,且食积感染组结果差异有统计学意义($P < 0.05$),食积感染组较单纯感染组正常组血清 IgM 含量明显降低,且结果有统计学意义($P < 0.01$);病毒感染后第 1、3、5 天,单纯感染组、食积感染组小鼠血清 TH1 (IFN- γ)/TH2 (IL-4) 水平均较正常组降低,且在第 3 天差异有统计学意义($P < 0.05$),第 3、5 天食积感染组较正常组降低更为明显,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:食积可能通过影响机体 IgM、IFN- γ 、IL-4 及 TH1/TH2 水平对流感病毒感染(FM1)小鼠的免疫失衡产生影响,从而提示食积因素可能对流感的发生发展产生了影响。

关键词 食积;流感病毒;免疫功能

Experimental Study of the Impact of Dyspepsia on Immune Function on Influenza Virus Infected Mice

Shi Jinfeng¹, Yu He², Wang Shang³, Gu Xiaohong²

(1 The Second Traditional Chinese Medicine Hospital of Zhengzhou City, Zhengzhou 450002, China; 2 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3 Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

Abstract Objective: To investigate the impact of dyspepsia on immune function on influenza virus (FM1) infected mice, through detecting the serum levels of immunoglobulin M (IgM), Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-4 (IL-4) and TH1/TH2. **Methods:** The mice dyspepsia model was built by feeding mice with high protein-calorie food, then nasal infected with FM1 influenza A virus, randomized to normal group, infected group, and infected and dyspepsia group on D3 and D5 after infection, detected the serum level of IgM, IFN- γ , IL-4 and TH1/TH2 levels. **Results:** Mice were infected with FM1 virus at D5, the IgM level of both infected groups were significantly higher than that of the normal group ($P < 0.05$). The dyspepsia group showed significantly decreased IgM level ($P < 0.01$) compared with the virus infected group; at D1, D3, D5, the serum level of TH1 (IFN- γ)/TH2 (IL-4) of the infected groups were lower than that of the normal group, and the reduction was significant on D3 ($P < 0.05$); at D3 and D5 the dyspepsia group was even more lower ($P < 0.05$). **Conclusion:** Dyspepsia can break the balance of immune system by impacting IgM, IFN- γ , IL-4 and TH1/TH2, indicating dyspepsia plays a role in influenza epidemic.

Key Words Dyspepsia; Influenza Virus; Immune function

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.09.029

小儿脏腑娇嫩,形气未充,肺脾常不足,且寒暖不能自调,乳食不知自节易于形成食积,外易受六淫所侵而发病,临床多以呼吸系统为多^[1]。加之小儿体属“纯阳”,呼吸道黏膜防御机制不够完善,故感邪易从热化而成急性外感热病。中医学认为积食积热可促进肺热

证的发生、发展,如叶天士所言:“胃肠为市,故阳明为成温之藪也”。临床发现,食积小儿容易发生急性呼吸系统感染,而具体病理机制尚待进一步发掘探索。有研究发现流感病毒感染与机体免疫功能失调有密切关系^[2],而细胞因子在感染性疾病的发生、发展中起着重

基金项目:科学研究与研究生培养共建项目——科研项目——应用队列研究序贯扎根理论探索中医病因学研究的新模式(编号:521/0101204);北京市教委共建项目资助(编号:0101165);北京中医药大学自主课题(编号:2009JYBZZ-JS008);北京中医药大学青年教师专项课题:食积与肺肠损伤的相关性实验研究

通信作者:谷晓红,女,教授,博士生导师, E-mail:Guxh1003@126.com

要的作用。有学者认为 T 辅助淋巴细胞 TH1/TH2 的功能可以反应机体促炎和抗炎反应的失衡情况^[3]。TH1 细胞主要分泌干扰素 γ , TH2 细胞则主要分泌 IL-4, 本研究试图从 TH1 (IFN- γ) 和 TH2 (IL-4) 平衡的角度来探讨食积因素在病毒感染状态下细胞因子谱的改变, 以明确其对机体免疫功能的影响。尝试揭示食积影响肺系热证的发展变化的作用机制, 为临床肺胃同治提供依据, 对于急性呼吸系统传染病的防治有一定指导意义。

1 材料与方法

1.1 动物分组 昆明小鼠, 雄性, 体重 11~13 g, 180 只, 清洁级, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2006-0009]。购入后置免疫教研室动物房实验动物洁净柜饲养。将小鼠按体重随机分为 3 组: 正常组、单纯感染组、食积感染组, 每组 60 只。

1.2 模型制作 正常组: 正常饲料, 不限食水。从实验第 1 天起, 予生理盐水按 0.2 mL/10 g 灌胃, 2 次/d, 共灌胃 4 d。于第 5 天乙醚麻醉后, 给予生理盐水 50 μ L 滴鼻。单纯感染组: 正常饲料, 不限食水。从实验第 1 天起, 予生理盐水按 0.2 mL/10 g 灌胃, 2 次/d, 共灌胃 4 d。于第 5 天乙醚麻醉后, 予 FM1 流感病毒 50 μ L 滴鼻。食积感染组: 自制高蛋白、高热量饲料(豆粉、面粉、牛奶粉、鱼肉松, 四者按 2:1:1:1 比例配制), 不限食水。从实验第 1 天起, 予 52% 浓度的牛乳按 0.2 mL/10 g 灌胃, 2 次/d, 共灌胃 4 d。于第 5 天乙醚麻醉后, 予流感病毒 50 μ L 滴鼻。

1.3 主要试剂及药物 免疫球蛋白 M 酶联免疫试剂盒 IgM(201103)ELISA; 白介素 4 酶联免疫试剂盒 IL-4(201102)ELISA、干扰素 γ 酶联免疫试剂盒 IFN- γ (201102)ELISA IT; 北京康源瑞得生物技术有限公司提供; 病毒: 流感病毒亚洲甲型鼠肺适应株(FM1)由北京中医药大学免疫学教研室提供, LD50 为 $10^{-3.7}$, 4LD50 的流感病毒液为 1:150; 乙醚、乙醇、生理盐水。

1.4 观察项目 1) 小鼠体征; 2) 体重: 从实验第 1 天开始, 连续记录小鼠体重, 至取材前; 3) 正常组与单纯感染组、单纯感染组分别在感染病毒后第 1、3、5 天, 各组每次取 20 只小鼠, 摘眼球取血, 其中每组中的 10 只, 静置后低温离心(1000 r/min), 离心 15 min, 留取血清, 将血清置于 -80℃ 冰箱中备用, 行酶联免疫分析法(ELISA)测各组小鼠血清 IL-4、IFN- γ 含量; 每组中另外的 10 只, 静置后低温离心(3000 r/min), 离心 10 min, 留取血清, 将血清置于 -80℃ 冰箱中备用, 行酶联免疫分析法(ELISA)测各组小鼠血清特异性抗体 IgM 含量。

1.5 统计学分析 采用 SPSS13.0 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。

2 结果

2.1 小鼠体征 正常组小鼠粪便质粗, 量多, 未见明显异常。单纯感染组小鼠活动减少, 扎堆, 耸毛, 毛无光泽, 蜷缩, 活动减少, 粪便质粗, 量多; 食积感染组小鼠活动减少, 扎堆, 蜷缩, 眼睛分泌物多, 睁眼受限, 毛色发黄结成束状, 较脏, 粪便呈黄棕色、质细, 量较少, 较硬。

2.2 血清 IgM 含量、IFN- γ 、IL-4、TH1/TH2 水平

2.2.1 小鼠血清 IgM 结果显示, 小鼠感染 FM1 病毒后第 1、3 天, 单纯感染组较正常组小鼠血清 IgM 升高, 有统计学意义($P < 0.01$); 食积感染组较正常组 IgM 水平升高, 但结果无统计学意义($P > 0.05$); 食积感染组水平较单纯感染组降低, 但结果无统计学意义($P > 0.05$)。小鼠感染 FM1 病毒后第 5 天, 单纯感染组、食积感染组小鼠均较正常组小鼠血清 IgM 含量下降, 且食积感染组结果差异有统计学意义($P < 0.05$), 食积感染组较单纯感染组、正常组小鼠血清 IgM 含量明显降低, 且结果有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 小鼠血清 IgM (μ g/mL) ($\bar{x} \pm s$)

时间	1 d	3 d	5 d
鼠数	10	10	10
正常组	0.4545 $\pm$ 0.06157	0.4434 $\pm$ 0.06737	0.4886 $\pm$ 0.10431
单纯感染组	0.5417 $\pm$ 0.07047 *	0.5210 $\pm$ 0.05887 *	0.4773 $\pm$ 0.06493
食积感染组	0.4903 $\pm$ 0.07195	0.4851 $\pm$ 0.06272	0.3662 $\pm$ 0.07966 * $\Delta\Delta$

注: 与同天正常组相比, * $P < 0.01$; 与同天单纯感染组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.2.2 细胞因子水平

2.2.2.1 小鼠血清 IL-4 变化 小鼠感染 FM1 病毒后第 1、3、5 天, 单纯感染组、食积感染组小鼠血清 IL-4 水平均较正常组升高, 且食积感染组结果有统计学意义($P < 0.01$), 单纯感染组与正常组比较第 3 天结果差异显著($P > 0.05$), 食积感染组小鼠较单纯感染组升高, 且在第 1、5 天时结果有统计学意义($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 小鼠血清 IL-4 (pg/mL) ($\bar{x} \pm s$)

时间	1 d	3 d	5 d
鼠数	10	10	10
正常组	202.260 $\pm$ 35.6481	203.907 $\pm$ 29.1355	225.121 $\pm$ 39.0966
单纯感染组	203.640 $\pm$ 28.9521	240.159 $\pm$ 36.4371 *	226.438 $\pm$ 54.7801
食积感染组	244.844 $\pm$ 22.3894 * * $\Delta\Delta$	249.052 $\pm$ 49.2737 * *	367.107 $\pm$ 59.7842 * * $\Delta\Delta$

注: 与同天正常组相比, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$; 与同天单纯感染组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.2.2.2 小鼠血清 IFN- γ 变化 小鼠感染 FM1 病毒后第 1 天, 单纯感染组、食积感染组小鼠血清 IFN- γ 均较正常组升高, 但差异无统计学意义($P > 0.05$);

于感染后第 3、5 天,单纯感染组及食积感染组均较正常组下降,且在第 5 天下降明显差异有统计学意义($P < 0.01$),食积感染组较单纯感染组下降更为明显,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 3 小鼠血清 IFN- γ (pg/mL) ($\bar{x} \pm s$)

时间	1 d	3 d	5 d
鼠数	10	10	10
正常组	177.974 $\pm$ 29.36340	192.872 $\pm$ 49.90038	231.020 $\pm$ 26.43760
单纯感染组	189.8659 $\pm$ 26.42562	176.4076 $\pm$ 65.78693	172.3947 $\pm$ 33.80248 **
食积感染组	183.5103 $\pm$ 27.75967	174.9277 $\pm$ 55.17043	153.2093 $\pm$ 16.65930 **

注:与同天正常组相比, ** $P < 0.01$ 。

2.2.2.3 小鼠血清 TH1/TH2 变化 小鼠感染 FM1 病毒后第 1、3、5 天,单纯感染组、食积感染组均较正常组降低,且在第 3 天差异有统计学意义($P < 0.05$),而在第 3、5 天食积感染组较正常组降低更为明显,且差异有统计学意义($P < 0.05$);食积感染组在不同时相虽均较单纯感染组下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

表 4 小鼠血清 TH1/TH2 ($\bar{x} \pm s$)

时间	1 d	3 d	5 d
鼠数	10	10	10
正常组	0.8068 $\pm$ 0.11971	0.8261 $\pm$ 0.10218	0.7961 $\pm$ 0.17441
单纯感染组	0.7654 $\pm$ 0.14963	0.6538 $\pm$ 0.16930 *	0.7027 $\pm$ 0.13837
食积感染组	0.7351 $\pm$ 0.11946	0.6212 $\pm$ 0.08754 **	0.5541 $\pm$ 0.30035 *

注:与同天正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

基于小儿特殊的生理病理特点,使得小儿易发生食积,并表现出病理状态,从而引发各种相关疾病。已有研究证实,食积可导致肠源性内毒素血症及肺损伤等^[4],随着食积实验研究不断深入,食积不仅对血生化、胃肠功能的改变产生了影响,而且对免疫功能也有作用。毕可恩等通过对食积状态下小鼠免疫功能的测定发现,非特异性免疫的巨噬细胞吞噬功能、细胞免疫的迟发性变态反应试验、体液免疫的血清溶血素测定等免疫指标,食积组明显低于正常组,推测免疫功能的改变可能是食积患儿易于反复感染外邪的内在病理基础^[5]。流感病毒经由呼吸道侵入机体后不仅能在呼吸道的细胞内增殖,导致呼吸道各类细胞变性、坏死,病毒颗粒尚可穿过呼吸道黏膜,引起进行性感染,导致淋巴细胞、单核细胞及多核细胞生长特性改变、功能降低甚至溶解、凋亡,从而导致机体免疫功能降低^[6]。病毒可激活小鼠的免疫细胞产生氧自由基、NO 和大量细胞因子,而这些因子作为免疫介质介导的全身病理反应导致小鼠发病^[7],并造成免疫器官损伤和功能下降。免疫球蛋白是具有抗体活性或化学结构上与抗体相似的球蛋白,是一类重要的免疫效应分子,经抗原诱导可

转化为抗体,IgM 就是其中的一种,其主要参与机体的体液免疫调节,主要作用是与抗原发生免疫反应,生成抗原-抗体复合物,从而阻断病原体对机体的危害。机体在病毒、细菌等感染后,抗原刺激诱导体液免疫应答过程中,IgM 产生时间最早,血清中以 IgM 为代表,形成对付外源性微生物或病毒侵入的第一道防线^[8]。本实验中,在小鼠感染 FM1 病毒后第 5 天,血清 IgM 含量食积感染组较正常组及单纯感染组均下降,说明食积小鼠感染 FM1 病毒感染后,机体体液免疫能力明显下降,这与黎文清等^[9]报道的小儿感染的 IgM 指标有所下降是一致的。而单纯感染组小鼠 IgM 水平较正常组降低,这与国内报道也是一致的^[10-11]。小鼠在感染 FM1 病毒后第 1、3 天,单纯感染组及食积感染组小鼠血清 IgM 含量均较正常组升高,可能与淋巴细胞迅速增殖,从而产生较多的 IgM 积极参与机体的体液免疫应答,阻断病毒对机体的危害有关。而食积感染组小鼠血清 IgM 水平较单纯感染组下降明显,可能与阳明积热本身已经对机体的体液免疫能力产生了影响,导致机体的抗感染能力下降,一旦受到病毒的侵袭后,导致机体 IgM 浓度出现明显降低,进一步影响机体免疫能力及抗感染能力,这与报道的感染期间的细胞免疫功能和补体系统功能相对减弱,机体抗感染能力随之下降也是一致的^[12],食积通过调节机体体液免疫影响了机体 IgM 的含量,从而导致机体抗感染能力下降。

干扰素(IFN)是一种广泛的抗病毒物质,是机体抗病毒感染中最重要的细胞因子之一,在病毒性疾病的康复中有重要地位^[13]。有实验研究发现,病毒感染小鼠后,模型组 IFN- γ 水平较正常组明显降低,说明流感病毒感染导致机体的细胞免疫功能减弱,对免疫系统产生了抑制作用。流感病毒经抗原递呈后活化 CD4⁺T 细胞,活化的 CD4⁺Th 细胞分泌多种细胞因子,可分化为 Th1、Th2 两个亚类,正常状态下,TH1/TH2 通过分泌细胞因子彼此调节,相互制约,相对平衡,以维持正常免疫状态。本实验中,病毒感染后,小鼠血清 IFN- γ /IL-4 水平,单纯感染组、食积感染组均较正常组下降,尤其在病毒感染后的第 3、5 天降低较为明显,食积感染组降低更为明显,食积感染组小鼠 TH1/TH2 水平较正常组及单纯感染组降低,说明病毒感染引起了机体抗炎与促炎水平的失衡,从而导致了机体免疫功能的紊乱,且食积感染组对机体免疫失衡的影响更为明显。食积感染组较单纯感染组小鼠血清 IFN- γ /IL-4 水平有下降趋势,但其对机体免疫失衡的影响是否更为严重仍需进一步论证。

(下接第 1090 页)

炎和慢性湿疹的治疗有着大量临床实践和经验积累^[10-11],特别对中药的有效成分的研究显示,其可作用于过敏反应不同环节^[12-16]。皮炎康颗粒作为科内临床协定方长期用于上述疾病的治疗并取得了比较满意的临床疗效。此方由黄芪、黄芩、黄柏、白芍、白术、当归、大黄、青蒿、生地黄、甘草等组成。方中黄芩、黄柏、大黄、青蒿、生地黄、牡丹皮、白鲜皮清热利湿,凉血疏风;而黄芪、白芍、白术、当归健脾利湿,养血益气,固表御邪;甘草调和诸药。目前慢性变应性接触性皮炎、慢性湿疹的现代医学治疗是以抗炎、抗组胺为主要方法,同时可配以免疫调节治疗。本方的治疗原则与现代医学治疗方法有相通之处,既清热利湿、凉血疏风,亦养血益气、固表御邪。本动物实验研究结果表明,皮炎康颗粒可改善 DNCB 引起的慢性变应性接触性皮炎模型小鼠的耳部肿胀,具有一定的抗炎作用,同时可降低小鼠胸腺、脾指数。

参考文献

- [1]李敏.疏风饮对变应性接触性皮炎小鼠脾指数、胸腺指数及 IFN- γ 与 IL-4 分泌的影响[J].实用中医内科杂志,2011,25(1):24-25.
- [2]郝光荣.实验动物学[M].2版,上海,第二军医大学出版社,2002:276.
- [3]Bradley J, McCluskey J. Clinical Immunology[M]. Chapter 16. Oxford: Oxford University Press, 1997:330-348.
- [4]Abbas AK. Cellular and molecular immunology[M]. 3rd ed. Chaper 14 Philadelphia: W. B. Saunders company, 1997:301-308.

- [5]陈妍,郭在培.变应性接触性皮炎的原位免疫学研究[J].华西医学,2006,21(1):217-218.
- [6]SehimuT, AbeR, NishiharaJ, et al. Impaired contact hypersensitivity in macrophage migration inhibitory factor - deficient mice. EurJ Immunol, 2003,33:1478-1487.
- [7]赵辨.中国临床皮肤病学[M].南京:江苏科学出版社,2009:717-718.
- [8]梁秀宇.消风散对变应性接触性皮炎抑制作用及其免疫学机制实验研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2007.
- [9]Walsh GM, Annunziato L, Frossard N, et al. New insights into the second generation antihistaminics[J]. Drugs, 2001,61:207-236.
- [10]杨宝华,陈德宇,肖顺汉.消风胶囊对小鼠迟发型超敏反应的影响及其作用机理研究[J].中国中西医结合皮肤性病学杂志,2003,2(1):13-15.
- [11]杨宝华,陈德宇,肖顺汉.消风胶囊对小鼠迟发型超敏反应的影响及其作用机理研究[J].中国中西医结合皮肤性病学杂志,2003,2(1):13-15.
- [12]黄磷,吴铁,樊翌明.6种中药抑制二硝基氟苯所致小鼠接触性皮炎的实验研究[J].现代中西医结合杂志,2007,16(13):1756-1757.
- [13]韩春雷,陈学荣,马俊江.氧化苦参碱对大鼠变应性接触性皮炎药效学作用[J].北京医科大学学报,1996,28(1):59-61.
- [14]郝飞.甘草酸国外研究进展[J].中国药房,2001,12(8):500-502.
- [15]郑咏秋,魏伟,戴敏,等.木瓜总甙抑制小鼠接触性超敏反应及对胸腺 T 淋巴细胞亚型的调节作用[J].中国药理学通报,2004,20(9):1016-1020.
- [16]陈子珺,李庆生,淤泽博,等.防风与刺蒺藜抗过敏作用的试验研究[J].云南中医中药杂志,2003,24(4):30-32.

(2013-01-09 收稿)

(上接第 1087 页)

因此,食积因素可能通过影响机体 IgM 产生、IFN- γ 、IL-4 细胞因子水平,导致机体免疫系统发生失调,从而对机体免疫功能产生了影响,说明食积可能与对肺热证的发生、发展存在一定相关性。因此,食积因素可能通过影响小儿机体免疫功能,从而使小儿易于发生呼吸系统感染,本研究提示及时消除食积内因,对于呼吸系统感染性疾病易感人群可以起到防护的目的。

参考文献

- [1]陈超,汪受传.“肺与大肠相表里”理论在儿科临证中的应用[J].中医药学报,2006,34(6):43.
- [2]郭海,杨进,龚婕宁,等.连花清瘟胶囊对流感病毒感染小鼠肺组织 γ -IFN 的影响[J].河南中医,2007,27(5):29.
- [3]欧敏,董建华,段蕴轴.清肺饮对流感病毒感染小鼠免疫功能的调节作用[J].北京中医药大学学报,1998,21(6):21.
- [4]王上,于河,等小儿食积的研究进展[J].北京中医药大学学报:中医临床版,2011,18(3):41.
- [5]毕可恩,刘爱华,朱有名,等.食积小鼠模型免疫功能的实验研究[J].山东中医学院学报,1991,15(4):48-50.

- [6]李华玲.流行性感冒病毒诱导细胞凋亡的研究进展综述[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2001,22(2):85-87.
- [7]Moril, KomatsuT, TakeuchiK, et al. In vivo induction of apoptosis by influenza virus[J]. J Gen Virol, 1995,76(11):2869-2873.
- [8]黄隽敏,徐爱晖,王明丽,等.合肥地区成人急性上呼吸道感染患者血清 IgM 测定[J].安徽医科大学学报,2008,43(1):114.
- [9]黎清交,曾素萍,黎昌茂,等.白细胞、C 反应蛋白和免疫球蛋白检测在小儿肺炎中的运用[J].山东医药,2010,50(9):65-66.
- [10]LUJ, YE HP, LOU JT, et al. Application of C-reactive Protein in children Patients[J]. Shanghai Journal of Medical Laboratory Sciences, 1999,14(5):266.
- [11]LU J, YE HP, ZHANG ZJ, et al. Observation of infant Pneumonia secretion type IgA content and full body immune state[J]. Journal of Practical Pediatrics, 1991,6(6):20-21.
- [12]传兵.支气管炎患儿治疗前后血清 SIgA 和 T 淋巴细胞亚群的水平探讨[J].放射免疫学杂志,2005,18(5):401-402.
- [13]靳文学,杨宇.从粘膜免疫系统看“肺与大肠相表里”[J].四川中医,2005,23(12):1-2.

(2012-12-27 收稿)