

# 乌梅丸对胃肠感染模型小鼠血浆 Th1、Th2 淋巴细胞因子和胃肠传输功能的影响

陈志彪 葛俊辰

(解放军第211医院消化内科,哈尔滨,150080)

**摘要** 目的:观察乌梅丸对胃肠感染模型小鼠的疗效,同时探讨其对小鼠血浆辅助性 T 细胞 1(Th1)、辅助性 T 细胞 2(Th2)淋巴细胞因子和胃肠传输功能的影响。方法:选取昆明小鼠 30 只并随机分为空白组、模型组及实验组,各 10 只。其中模型组及实验组小鼠接受致病性大肠杆菌(EPEC)灌胃制作感染性腹泻模型,空白组用同等剂量生理盐水灌胃。模型制备成功后实验组每日用乌梅丸水溶性生物碱灌胃,剂量按照按人/鼠公斤体重的等效剂量换算,空白组及模型组用同等剂量的生理盐水灌胃,连续干预 10 d。比较 3 组胃排空率、小肠推进率、外周血 Th1、Th2 淋巴细胞因子表达的变化。结果:模型组及实验组小鼠外周血白细胞计数、中性粒细胞百分比较空白组升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中实验组较模型组降低( $P < 0.05$ )。3 组淋巴细胞百分比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。模型组及实验组小鼠的胃排空率及小肠推进率明显增强,与空白组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中实验组小鼠的胃排空率及小肠推进率明显较模型组快慢,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与空白组比较,模型组及实验组小鼠外周血 Th2 比例、白细胞介素(IL-4)、IL-6、IL-10 明显增高,但实验组水平低于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),模型组及实验组 Th1 比例、IL-2、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )表达较空白组明显升高,但模型组及实验组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:乌梅丸可有效改善胃肠感染模型小鼠的胃肠传输功能,其作用机制可能与介导机体的体液免疫为主。

**关键词** 胃肠感染模型;胃肠传输功能;乌梅丸;辅助性 T 细胞 1;辅助性 T 细胞 2

## Experimental Study of Wumei Pills on Plasma Th1, Th2 Lymphocyte Factor and Gastrointestinal Transport Function in Mice with Gastrointestinal Infection

Chen Zhibiao, Ge Junchen

(Gastroenterology Department of the People's Liberation Army 211 Hospital, Harbin 150080, China)

**Abstract Objective:** To observe the therapeutic effect of Wumei Pills on gastrointestinal infection model mice, and to explore the effects of Wumei Pills on plasma Th1, Th2 lymphocyte factors and gastrointestinal transport function in mice. **Methods:** A total of 30 Kunming mice were randomly divided into blank group, model group and control group, with 10 rats in each group. The mice in the model group and the control group were given pathogenic Escherichia coli (EPEC) to simulate infectious diarrhea. The blank group was given the same dose of normal saline. After the model was successfully prepared, the control group was given the water-soluble alkaloids of Wumei Pills daily, and the dosage was converted according to the equivalent dose of human/mouse weight. The blank group and the model group were given the same dosage of saline, and the intervention lasted for 10 days. The gastric emptying rate, intestinal propulsion rate and the expression of Th1 and Th2 lymphocyte factors in peripheral blood were compared among the three groups. **Results:** 1) The WBC and the percentage of neutrophils in peripheral blood of model group and control group were significantly higher than those of blank group ( $P < 0.05$ ), and the WBC and the percentage of neutrophils in control group were lower than those of model group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in lymphocyte percentage between 3 groups ( $P > 0.05$ ). 2) The gastric emptying rate and small intestinal propulsion rate of the model group and the control group were significantly higher than those of the blank group ( $P < 0.05$ ). The gastric emptying rate and the small intestinal propulsion rate of the control group were significantly higher than those of the model group ( $P < 0.05$ ). 3) The ratio of Th2 cells, IL-6, IL-10 and IL-4 in peripheral blood of model group and control group were significantly higher than that of blank group, but the level of experimental group was significantly lower than that of model group ( $P < 0.05$ ). The ratio of Th1 cells, the expression of IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in model group and control group were significantly higher than those of blank group, but the level of model group was lower than that of model group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between group and experimental group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Wumei Pills can effectively improve the gastrointestinal transport function in mice with gastrointestinal infection, and its mechanism may be mainly mediated by humoral immunity.

**Key Words** Gastrointestinal infection model; Gastrointestinal transmission function; Wumei Pills; Th1; Th2; Immunity

中图分类号: R289.4 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.01.018

感染性疾病在胃肠道疾病占首要位置,其中大肠杆菌发病率较高。辅助性 T 细胞 1 (Th1)、辅助性 T 细胞 2 (Th2) 是淋巴细胞 CD4<sup>+</sup> T 的主要亚群,有研究显示发生胃肠感染时机体的免疫系统功能受到明显破坏<sup>[1-2]</sup>,其中 Th1 及 Th2 的水平变化贯穿疾病的发生发展过程。乌梅丸是《伤寒论》中治疗蛔厥的经典方,其君药乌梅性平味酸涩,入肺肠两经,有显著的收敛效应,并可涩肠道生津,临床不乏其有效治疗胃肠道疾病的记载<sup>[3-6]</sup>,但其作用机制目前尚无统一论。基于此,我们利用胃肠感染模型小鼠,探析乌梅丸的部分药用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 选取昆明小鼠 30 只,雌雄各半,购买自济南金丰实验动物有限公司(许可证号:SCXX(沪)2011-00241),本研究方案经过本院伦理委员会批准进行,所有动物饲养于本院动物实验中心,饲养条件:温度(23.5±0.5)℃湿度(52±1.5)%,以 12/12 h 为光暗周期。

1.1.2 药物 乌梅丸粉由本院中药研究院提供,组成:乌梅 300 枚,细辛 84 g、干姜 140 g、黄连 224 g、当归 56 g、附子 84 g(去皮,炮)、蜀椒 56 g(出汗)、桂枝 84 g(去皮)、人参 84 g、黄柏 84 g,以上 10 味,各捣筛,混合和匀;以苦酒渍乌梅 12 h,去核,蒸熟捣成泥,与蜜组成丸。

1.1.3 试剂与仪器 致病性大肠杆菌(EPEC-E2348/69)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心,乌梅丸粉由本院中药研究院提供,小鼠 T 淋巴细胞因子 CBA 试剂盒购自北京西美杰科技有限公司, CytoFLEX LX 流式细胞仪购自贝克曼库尔特商贸有限公司,血细胞分析仪购自北京宝灵曼阳光科技有限公司。白细胞介素-2(IL-2)、IL-6、IL-10、IL-4、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均购自美国 CST 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 选取昆明小鼠 30 只,随机分为空白组、模型组及实验组,各 10 只。3 组小鼠在体重、鼠龄比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。参考文献<sup>[7]</sup>中 EPEC 致胃肠感染模型制备方法,使用 0.3 mL 的 3% 碳酸氢钠溶液对模型组及实验组小鼠进行灌胃,30 min 后将事先配制好的浓度为  $5 \times 10^8$  cfu/mL 的致病性 EPEC 混悬液再次灌胃,每只小鼠灌胃 0.5 mL 致病性 EPEC 混

悬液,随后回笼饲养,观察小鼠的大便变化情况。空白组小鼠接受等剂量的生理盐水灌胃后回笼饲养。灌胃 6 h 后小鼠出现精神疲乏、活动减少、大便性状改变提示造模成功。

1.2.2 干预方法 实验组小鼠造模成功后每日灌胃乌梅丸水溶液,剂量按人/鼠公斤体重的等效剂量计算,1 次/d,连续干预 10 d。模型组及空白与等体积蒸馏水灌胃。

1.2.3 检测指标 1)胃排空率、小肠推进率:将 3 组小鼠禁食 12 h,按照 0.1 mL/10 mg 的比例计算活性炭剂量,将计算好的活性炭进行灌胃,随后处死小鼠取胃称重。将胃置于冰上后从胃大弯处剪开胃体,用生理盐水冲洗胃内容物后再次称重,计算胃排空率。再剪取肠管测量小肠总长度,从幽门至活性炭前沿的距离视为肠管内推进距离,计算小肠推进率。

2)Th1 及 Th2 淋巴细胞因子的表达:干预结束后取 3 组小鼠眼眶静脉血,分离出单核细胞,将分离出的单核细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养 4~6 h,培养过程中加入佛波醇乙酯(PMA)及离子霉素、莫能霉素混合而成的工作液体进行刺激,随后将细胞收集后加入 5  $\mu$ L 异硫氰酸荧光素标记的 CD4 (CD4-FITC),操作按试剂盒说明书进行,采用流式细胞仪检测 Th1 及 Th2 细胞。

3)IL-4、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  检测:在 4  $^{\circ}$ C 条件下进行 3 000  $\times$  g 离心 5 min 后用高压枪头吸取离心后的上清液,使用酶联免疫吸附试验(ELISA)进行检测,利用抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合原理进行相关因子浓度的检测,具体步骤如下:用 0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液将抗体稀释至蛋白质含量为 1~10  $\mu$ g/mL。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1 mL 缓冲液,4  $^{\circ}$ C 过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,3 min/次。将一定稀释的待检样品 0.1 mL 加入反应孔中,置 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。然后洗涤。同时做空白孔,阴性对照孔及阳性对照孔。随后在各反应孔中加入新鲜稀释的酶标抗体(经滴定后的稀释度)0.1 mL。37  $^{\circ}$ C 孵育 0.5~1 h,洗涤。再于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.1 mL,37  $^{\circ}$ C 10~30 min。于各反应孔中加入 2 mol/L 硫酸 0.05 mL。试剂盒由广州达安基因股份有限公司提供,显色后采用 492 nm 波长,TMB 反应产物检测需要 450 nm 波长。检测时一定要首先进行空白孔系统调零,用测定标本孔的吸收值与一组阴性标本测

定孔平均值的比值(P/N)表示。以空白对照孔调零后测各孔A值,若大于规定的阴性对照A值的2.1倍,即为阳性。操作过程全部按照试剂盒说明书进行检测。

1.3 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件进行研究数据分析。所得数据都用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用秩和检验;组内比较采用配对秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 3组血细胞比较 模型组及实验组小鼠外周血白细胞计数、中性粒细胞百分比较空白组升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中实验组较模型组降低( $P < 0.05$ )。3组淋巴细胞百分比比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1。

表1 3组血细胞比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	白细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	中性粒细胞 百分比(%)	淋巴细胞 百分比(%)
空白组( $n=3$ )	6.19±0.37	6.49±0.52	68.28±1.09
模型组( $n=3$ )	7.61±0.76*	25.38±10.01*	59.31±1.78
实验组( $n=3$ )	6.98±0.55* $\Delta$	25.22±9.76*	58.94±2.12

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 3组胃排空率及小肠推进率比较 模型组及实验组小鼠的胃排空率及小肠推进率明显增强,与空白组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中实验组小鼠的胃排空率及小肠推进率明显较模型组慢,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 3组胃排空率及小肠推进率比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	胃排空	小肠推进
空白组( $n=3$ )	57.28±11.28	58.32±6.12
模型组( $n=3$ )	85.14±12.87*	73.25±8.63*
实验组( $n=3$ )	73.28±11.74* $\Delta$	64.35±7.78* $\Delta$

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 3组Th1及Th2比例比较 模型组及实验组小鼠外周血Th2比例、IL-6、IL-10、IL-4与空白组比较明显增高,但实验组水平低于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),模型组及实验组Th1比例、IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 表达较空白组明显升高,但模型组及实验组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表3~4。

表4 3组Th1、Th2细胞因子比较( $\bar{x} \pm s, \mu g/mL$ )

组别	IL-2	IL-6	IL-10	IL-4	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
空白组( $n=3$ )	67.28±12.23	66.39±9.28	58.39±8.19	79.76±6.28	48.38±8.29	55.39±5.39
模型组( $n=3$ )	165.12±14.84*	135.25±15.63*	112.49±14.39*	187.72±15.38*	149.19±7.02	56.02±4.98
实验组( $n=3$ )	164.28±12.73* $\Delta$	94.95±14.78* $\Delta$	79.38±10.29* $\Delta$	101.28±9.19* $\Delta$	148.29±9.01	55.28±5.76

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表3 3组Th1、Th2比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	Th1	Th2
空白组( $n=3$ )	66.28±6.82	36.28±6.22
模型组( $n=3$ )	66.27±7.29	86.27±7.29*
实验组( $n=3$ )	64.23±6.72	54.23±6.72* $\Delta$

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

## 3 讨论

目前关于胃肠感染动物模型制备方法的报道不多,主要以大肠杆菌诱导为主,主要以腹腔注射诱导动物腹泻,但此类模型与人类感染大肠杆菌实际情况不符,故本研究采用经口灌胃途径建立胃肠道感染动物模型,与人类经口感染方式更为贴近。在本研究中我们对20只昆明小鼠进行模型制备,结果显示在造模6h后小鼠均出现精神疲乏、活动减少、大便秘性状等表现,这提示本研究的造模是成功。我们认为小鼠在感染大肠杆菌后肠道黏膜组织受破坏,肠道黏膜组织上皮细胞完整性受损,随着细菌的侵入局部组织渗出增多,从而导致小鼠大便秘性状改变(主要以出现黏液稀便为主)、精神萎靡等炎症反应表现。

我们参考文献<sup>[7]</sup>方法进行造模,首先灌胃碳酸氢钠溶液,旨在尽可能减少小鼠肠道活动能力,保持肠内容物、营养物质的存留,抑制胃酸分泌,降低胃肠道的屏障功能,促进大肠杆菌定植,并进一步粘附于胃肠道内,导致胃肠道组织的损伤,诱发其免疫反应的发生,从而出现腹泻的症状。白细胞是机体抵御外界细菌感染的重要防线,本研究发现,接受大肠杆菌定植的模型组及实验组小鼠血浆中白细胞及中性粒细胞百分比均较空白组升高,这进一步证实了小鼠成功受到细菌的感染,而在研究中我们发现3组小鼠淋巴细胞百分比数值相似,差异无统计学意义,这亦佐证小鼠并未受到病毒感染。

小鼠受到大肠杆菌侵袭后肠道黏膜及全身免疫系统快速启动应答,募集大量的细胞因子参与反应,其中包括Th1淋巴细胞及其代表细胞因子IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ ,以及Th2淋巴细胞及其代表细胞因子IL-6、IL-10、IL-4。Th1淋巴细胞及Th2淋巴细胞在机体免疫应答过程中占据重要位置,有研究指出,机

体发生胃肠感染后(细菌感染及病毒感染)炎性反应递质产生明显变化,其中 IL-6 尤为突出<sup>[8-10]</sup>。在本研究中我们发现模型组及实验组小鼠血浆 IL-6 的确较空白组升高,IL-6 有多种功能,其水平升高可抑制 B 淋巴细胞增殖及分泌相应抗体,从而减弱抗体-抗原结合反应,阻碍病原体的清除。IL-4 亦可激活 B 淋巴细胞,从而促进 IgE 及 IgG 进一步分泌,同时还可促进 IgG 向 IgE 转换,从而破坏肠道微生物的生态平衡,进而影响肠道免疫耐受功能,加重腹泻症状<sup>[11-12]</sup>。有数据证实 IL-2 可通过促进了各亚型 T 细胞活化而广泛参与机体各种炎性反应的发生发展过程。有研究通过动物模型研究发现,葡萄球菌肠毒素感染后动物体内 IL-10 水平上调,这与本研究结果基本一致,IL-10 单抗可明显提升葡萄球菌肠毒素注射小鼠的死亡率,IL-10 是肠道黏膜重要的免疫应答因子,其水平的不断提升可导致炎性反应的不断扩大及延展。本研究结果发现大肠杆菌制备的胃肠感染模型小鼠体内 Th1 及 Th2 细胞及其代表性因子均产生了变化,这提示通过大肠杆菌制备的胃肠感染模型小鼠体内并非单纯促炎/抗炎表现,亦并非单纯的 Th1 类细胞或 Th2 类细胞活化,而是产生了混合型的免疫应答效应,且以 Th2 为代表的体液免疫表现为主,这与国内研究结果相似<sup>[7]</sup>。

中医并无胃肠感染病名记载,其属于“腹泻、泄泻”等范畴,外邪导致脏腑阴阳失调,痰瘀互结侵袭肠腑而成此病,以腹痛、大便稀溏、疲乏等为主要临床表现,“脾虚邪恋、湿热下注、肠道失固”是其主要病机,因此攻补兼顾、寒温并行是治疗本病的关键。乌梅丸是《伤寒论》中治疗蛔厥的经典方,由乌梅、干姜、细辛、当归、桂枝、人参、黄柏、黄连、附子、花椒等 10 味中药组合而成<sup>[13-14]</sup>。其中君药乌梅性平味酸涩,入肺肠两经,有显著的收敛效应,并可涩肠道生津;花椒、细辛、桂枝、附子、干姜散寒温中,黄连、黄柏清热除烦、滋肾止渴,人参、当归益气补血活血,调节脾胃之气而生血和血。现代药理研究显示,乌梅丸有抗菌、消炎、抗变态反应的作用<sup>[15-20]</sup>,同时还有修复肠道黏膜以抑制有毒物质破坏肠道组织的作用。整方寒热并用、补泻兼施、邪正兼顾。本研究结果显示,加用乌梅丸的实验组小鼠在改善血细胞分布、免疫应答、抑制炎性反应方面均有显著提升,这提示乌梅丸确可效改善胃肠感染模型小鼠的胃肠传输功能,其作用机制可能与介导机体的体液免疫为主。

## 参考文献

- [1] Chandra BK, Singh G, Taneja N, et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* as a predominant cause of paediatric nosocomial diarrhoea in India [J]. *J Med Microbiol*, 2012, 61 (Pt 6): 830-836.
- [2] Alikhani MY, Sedighi I, Zamani A, et al. Incidence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from young children with diarrhoea in the west of Iran [J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2012, 59 (3): 367-374.
- [3] 李娜. 新加乌梅丸治疗腹泻型肠易激综合征 29 例临床观察 [J]. *河北中医*, 2014, 36 (1): 52-53.
- [4] 梅刚, 漆冬梅. 乌梅丸治疗糖尿病性腹泻 50 例临床观察 [J]. *云南中医中药杂志*, 2010, 31 (1): 43-44.
- [5] 袁方. 乌梅丸加减治疗腹泻型肠易激综合征 46 例 [J]. *光明中医*, 2010, 25 (8): 1384-1385.
- [6] 倪树文, 孙金蝉. 乌梅丸治疗寒热错杂腹泻型肠易激综合征的临床研究 [J]. *中医药通报*, 2014, 13 (2): 53-55, 58.
- [7] 陈超, 郑成中. 致病性大肠杆菌胃肠感染小鼠模型血浆 Th1、Th2、Th17 淋巴细胞因子变化及意义 [J]. *中国医药导报*, 2013, 10 (19): 37-39.
- [8] 杨立华, 傅晓凤, 潘传四, 等. 细胞炎前因子测定对感染性腹泻诊断的价值 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22 (1): 15-15, 44.
- [9] 熊文虹, 杜华, 李柳青. 急性感染性腹泻患儿血清细胞因子测定的临床意义 [J]. *临床儿科杂志*, 2002, 20 (7): 439.
- [10] Ko G, Jiang ZD, Okhuysen PC, et al. Fecal cytokines and markers of intestinal inflammation in international travelers with diarrhea due to Noroviruses [J]. *J Med Virol*, 2006, 78 (6): 825-828.
- [11] Florquin S, Amraoui Z, Goldman M. Persistent production of TH2-type cytokines and polyclonal B cell activation after chronic administration of staphylococcal enterotoxin B in mice [J]. *J Autoimmun*, 1996, 9 (5): 609-615.
- [12] Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10<sup>-/-</sup>) mice and intestinal inflammation [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 278 (6): G829-833.
- [13] 陈烨文, 连建伟, 龚一萍. 论叶天士及《温病条辨》对乌梅丸方的发挥 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30 (5): 1607-1609.
- [14] 王璐, 张红宇, 王莉. 乌梅及其不同炮制品的药理作用比较 [J]. *中药材*, 2010, 33 (3): 353-356.
- [15] 杨莹菲, 胡汉昆, 刘萍, 等. 乌梅化学成分、临床应用及现代药理研究进展 [J]. *中国药师*, 2012, 15 (3): 415-418.
- [16] 赵凯英. 细辛不同用量配伍应用举隅 [J]. *长春中医药大学学报*, 2009, 25 (6): 966-966.
- [17] 费可, 胡瑕瑜, 邹璐, 等. 细辛临床应用与药理作用研究进展 [J]. *上海中医药大学学报*, 2010, 24 (6): 87-90.
- [18] 刘芳, 谢鸣, 朱丽瑶. 乌梅丸现代主治病证的研究 [J]. *北京中医药大学学报: 中医临床版*, 2011, 18 (4): 37-40.
- [19] 杨梅, 柳华, 代二庆. 乌梅丸治疗消化系统疾病应用概述 [J]. *天津中医药大学学报*, 2015, 34 (2): 125-128.
- [20] 陈洁生. 四君子汤联合肠内营养支持促进胃癌术后恢复临床研究 [J]. *吉林中医药*, 2013, 33 (4): 383-385.