

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.13.017

芪丹复感颗粒对呼吸道黏膜免疫低下模型小鼠肠道功能的影响

孙婷¹, 王俊宏^{2*}, 张立石³, 柏冬³, 任昕昕⁴, 郑源⁴

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津市西青区昌凌路 88 号, 300193; 2. 北京中医药大学东直门医院; 3. 中国中医科学院中医基础理论研究所; 4. 北京中医药大学)

摘要 目的 探讨芪丹复感颗粒治疗小儿反复呼吸道感染的可能作用机制。方法 将 60 只昆明种小鼠随机分为模型组、空白对照组、匹多莫德组及芪丹高、中、低剂量组, 每组 10 只。除空白对照组外, 其余各组小鼠采用卵清蛋白致敏及雾化激发制备呼吸道黏膜免疫低下模型。造模后芪丹高、中、低剂量组分别给予芪丹复感颗粒 0.324、0.162、0.081 g/10 g 灌胃; 匹多莫德组给予匹多莫德颗粒 0.024 g/10 g 灌胃; 模型组及空白对照组给予 0.1 ml/10 g 生理盐水灌胃, 每天 1 次。灌胃 2 周后, 计算各组小鼠脾脏指数、胸腺指数、胃肠推进率, 并测定分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 含量。结果 模型组小鼠脾脏指数、胸腺指数、胃肠推进率、sIgA 均低于空白对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 匹多莫德组及芪丹高、中、低剂量组小鼠脾脏指数、胸腺指数、胃肠推进率及 sIgA 均高于模型组 ($P < 0.05$); 芪丹高、中、低剂量组之间各指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 芪丹复感颗粒可以促进呼吸道黏膜免疫低下小鼠的肠蠕动, 升高肠液 sIgA 水平, 可能是其治疗小儿反复呼吸道感染的作用机制之一。

关键词 小儿反复呼吸道感染; 芪丹复感颗粒; 黏膜免疫; 肠道功能; 胃肠推进率

小儿反复呼吸道感染 (recurrent respiratory tract infection, RRTI) 是指小儿频繁发作上、下呼吸道感染, 在单位时间内超过一定次数的临床综合征^[1]。我们在临床中发现, 呼吸道感染的患儿常存在一定程度肠道功能的改变, 与中医学理论“肺与大肠相表里”相吻合。黏膜免疫系统 (mucosal immune system, MIS) 是完成特异性免疫的主要场所, 广泛分布在人体呼吸道、胃肠道、泌尿生殖道等黏膜下及部分外分泌腺体的淋巴组织中^[2]。人体接近 95% 的感染是从黏膜入侵或直接侵袭黏膜, 因此 MIS 是机体抵御外邪的第一道生物屏障^[3]。由 MIS 分泌的分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 是执行黏膜免疫屏障功能的重要物质基础, 能诱导 B 细胞和 T 细胞的免疫反应, 然后激活的 B 细胞和 T 细胞外流, 定居到全身各处需产生免疫效应的效应位点, 如黏膜固有层和一些腺体, 进而

分化为浆细胞分泌 IgA 发挥黏膜免疫保护作用^[4]。肠道是最大的黏膜免疫场所, sIgA 分布最为广泛, 其 sIgA 含量的变化可以提示黏膜免疫功能的水平^[5]。不同种类的淋巴细胞会定位于淋巴器官不同部位, 成熟的淋巴细胞进入外周免疫器官后, 部分淋巴细胞离开外周淋巴器官而进入淋巴液、血液, 在体内循环后携带抗原再返回淋巴器官, 这一转移过程称为淋巴细胞再循环, 即淋巴细胞“归巢”^[6]。此外, 呼吸道和消化道可以通过黏膜淋巴细胞“归巢”及共同免疫系统相联系, 共同黏膜免疫是在黏膜某一处致敏的淋巴细胞可迁移至其他部位的黏膜, 继而产生免疫效应, 使二者出现相关性症状^[7]。芪丹复感颗粒是基于北京中医药大学东直门医院儿科多年临床经验总结出来的治疗 RRTI 的中药复方, 临床疗效较为显著^[8]。本研究以呼吸道黏膜免疫低下小鼠为对象, 采用芪丹复感颗粒进行药物干预, 观察芪丹复感颗粒对小鼠肠蠕动功能及肠液 sIgA 水平的影响, 以探讨芪丹复感颗粒治疗 RRTI 的可能作用机制。

基金项目: 北京市科技计划 (Z14110002214020)

* 通讯作者: jhwang3158@126.com, (010) 84013158

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康昆明种小鼠 60 只, 雄性, 4~6 周龄, 体重 18~20 g, 实验动物许可证号: SCXK(京) 2012-0001, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.2 药物

芪丹复感颗粒, 组成: 黄芪 10 g, 太子参 10 g, 丹参 6 g, 赤芍 6 g, 川芎 4 g, 麸炒白术 6 g, 陈皮 6 g, 鸡内金 6 g, 由北京中医药大学中药学院中药制药科研车间配制, 将上述药物制成免煎颗粒剂(批号: 20150010); 匹多莫德颗粒由浙江仙琚制药股份有限公司生产(批号: 150538A)。

1.3 主要试剂和仪器

卵清蛋白(批号: A5378-4G), Sigma 公司; 氢氧化铝干粉(批号: 1005709), 郑州西德利化工新材料有限公司; sIgA ELISA 试剂盒(批号: ab157717), Abcam 公司; 活性炭(批号: F20080308)、阿拉伯树胶粉(批号: 20121006), 国药集团化学试剂有限公司。

402A1 型超声雾化器, 江苏鱼跃医疗设备股份有限公司; TDZ5-WS 型多管架自动平衡离心机, 长沙湘仪离心仪器有限公司; Multiskan Mk3 型酶标仪, 美国 Thermo 公司; XS-18 型生物显微镜, 南京江南光电股份有限公司; 水平流 HS-840/1300 型超净工作台, 苏州净化设备厂; ME104E 型分析天平, 梅特勒-托利多公司。

1.4 动物分组、造模及给药

60 只小鼠适应性喂养 3 天后, 采用随机数字表法分为芪丹高、中、低剂量组, 匹多莫德组, 模型组及空白对照组, 每组 10 只。除空白对照组外, 其余各组参照文献 [6] 制备变应性鼻炎小鼠模型。将 20 μ g 卵清蛋白及 1.3 mg 氢氧化铝溶于生理盐水成 200 μ l 配制卵清蛋白氢氧化铝混悬液 [14]。造模各组腹腔注射 0.2 ml 卵清蛋白氢氧化铝混悬液, 进行基础致敏, 隔日 1 次; 空白对照组注射等体积生理盐水, 隔日 1 次, 共 14 天。各组 14 天后喂养 1 周, 不做任何操作。于第 21 天开始进入雾化阶段, 将卵清蛋白液放于雾化器内, 将小鼠置于雾化缸内进行雾化, 每组 30 min, 然后再用 10 μ l 卵清蛋白氢氧化铝混悬液进行鼻腔滴入, 连续 7 天, 雾化过程结束后 10 min 内观察小鼠鼻痒、喷嚏、鼻溢液行为。计分如下: 鼻痒: 轻搔鼻 1 或 2

次计为 1 分, 剧烈抓挠鼻面不止计为 3 分, 介于二者之间计为 2 分; 喷嚏: 1~3 个计为 1 分, 4~10 个计为 2 分, 11 个以上计为 3 分; 鼻溢液: 清流涕至前鼻孔计为 1 分, 超出前鼻孔计为 2 分, 涕流满面计为 3 分。总分大于 5 分表示造模成功 [11]。

造模成功后芪丹高、中、低剂量组分别给予芪丹复感颗粒 0.324、0.162、0.081 g/10 g 灌胃, 相当于临床儿童(6 岁)用量的 12、6、3 倍 [12]。匹多莫德组给予匹多莫德颗粒 0.024 g/10 g 灌胃。模型组及空白对照组给予生理盐水灌胃。各组每天灌胃 1 次, 连续灌胃 2 周, 灌胃体积均为 0.1 ml/10 g。

1.5 观察指标及方法

灌胃 2 周后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 各组小鼠灌胃活性炭混悬液 0.15 ml, 称重, 10 min 后将小鼠颈椎脱臼处死。

1.5.1 脾指数、胸腺指数 称取小鼠体重, 摘取脾、胸腺, 用电子天平称质量, 计算脾脏指数、胸腺指数。测量重复进行 3 次, 取均值。脏器指数 = 脏器质量(g)/体质量(g)。

1.5.2 肠蠕动功能 用碳素标记计算胃肠推进率。墨汁的配制: 在容积为 1000 ml 的烧杯中加入 800 ml 蒸馏水, 称取 100 g 阿拉伯树胶粉放入其中, 用玻璃棒边煮边搅匀, 直至煮沸溶液呈透明糊状, 称取 50 g 活性炭粉, 加入到上述煮沸的糊状溶液中用玻璃棒边煮边搅匀, 煮沸 3 次, 呈黑色糊状, 待糊状溶液冷却后, 加入蒸馏水定容至 1000 ml, 4℃ 保存备用 [13]。小鼠脱颈椎处死, 打开腹腔分离小肠, 然后分离肠系膜, 剪取幽门段至回盲肠的小肠, 伸直平铺于桌面。测量自幽门到活性炭混悬液运行最远端的长度(A), 幽门到回盲部的长度(B), 胃肠推进率(%) = $A/B \times 100\%$ 。

1.5.3 肠液 sIgA 选取活性炭混悬液未运行到的小肠, 取约 15 cm, 予 3 ml 生理盐水冲洗肠黏液于安培管, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 测 sIgA 的含量, 操作严格按照试剂盒说明。酶标仪 450 nm 波长测量各孔吸光度(OD 值)。使用 Excel 2013 绘制标准曲线图, 根据曲线图计算样品浓度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件处理数据。实验结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 正态且方差齐者, 采用单因素方差分析; 组间两两比较, 方差齐时用 LSD 法, 方差不齐时用 Dunnett's T3 法。非正态分布数据采用多个独立样本的非参数检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

表 1 示, 模型组小鼠脾脏指数和胸腺指数低于

2.1 各组小鼠脾脏指数、胸腺指数比较

表 1 各组小鼠脾脏指数、胸腺指数、胃肠推进率、sIgA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脾脏指数	胸腺指数	胃肠推进率 (%)	sIgA (ng/ml)
空白对照组	10	0.20 ± 0.27	0.20 ± 0.06	62.82 ± 6.79	60.91 ± 14.81
模型组	10	0.13 ± 0.07**	0.14 ± 0.05*	44.90 ± 8.93**	38.76 ± 16.02*
匹多莫德组	10	0.16 ± 0.04 [△]	0.16 ± 0.03 [△]	46.02 ± 10.01 [△]	45.90 ± 8.39 [△]
芪丹低剂量组	10	0.16 ± 0.04 [△]	0.16 ± 0.03 [△]	51.56 ± 9.89 [△]	46.55 ± 23.28 [△]
芪丹中剂量组	10	0.16 ± 0.03 [△]	0.16 ± 0.04 [△]	54.40 ± 7.37 [△]	44.07 ± 18.41 [△]
芪丹高剂量组	10	0.15 ± 0.05 [△]	0.16 ± 0.03 [△]	49.86 ± 7.36 [△]	42.68 ± 14.37 [△]

注: sIgA, 分泌型免疫球蛋白 A; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

空白对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 匹多莫德组及芪丹高、中、低剂量组小鼠脾脏指数和胸腺指数均高于模型组 ($P < 0.05$); 芪丹高、中、低剂量组之间各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠胃肠推进率、sIgA 水平比较

表 1 示, 模型组胃肠推进率、sIgA 均低于空白对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 匹多莫德组及芪丹高、中、低剂量组小鼠胃肠推进率、sIgA 均高于模型组 ($P < 0.05$); 芪丹高、中、低剂量组之间各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

根据患儿临床症状特点, 可将 RRTI 归属于中医学“体虚感冒”“咳嗽”“哮喘”等肺系疾病, 均因体虚易感受外邪所致^[4]。中医治疗医家以各自的临床经验为主, 有养阴益气、调和营卫、注重补肾等。我们在临床观察中发现, 患儿饮食自伤, 学习压力大, 常易出现两目下青暗、舌质暗、舌下脉络紫暗、指纹紫滞等体征。临床遣方用药中突出“久病入络”的思想, 在补益肺脾、养阴生津的基础上酌加丹参、赤芍等活血通络之品。芪丹复感颗粒方中太子参归脾、肺经, 益气生津、健脾润肺, 用于脾肺气阴两虚证, 既能补脾肺之气, 又能养阴生津, 其性略偏寒凉, 属补气药中的“清补”之品。黄芪味甘温, 归肺、脾经, 为补益肺脾之要药, 主要功能为健脾补中。黄芪与太子参相伍, 共奏补益之效, 达到健脾益肺治本的目的。白术性温, 归脾、胃经, 可补气运脾、燥湿利水, 生津益肺、补肾固本, 为小儿健脾之要药。陈皮性温, 温能行气、辛能发散, 其偏于理肺脾之气, 长于运脾燥湿化痰; 鸡内金性平, 能健脾益胃、消食化积。全方益气活血、运脾导滞, 在扶正的同时贯穿活血通络的原则。

胸腺和脾脏是人体重要的免疫器官。胸腺主要

产生 T 细胞和分泌胸腺素, 主要参与细胞免疫; 脾脏中含有大量的免疫细胞, 与体液免疫密切相关, 科研实验中常用胸腺指数及脾脏指数来评价机体免疫功能的强弱^[5]。本研究中模型组胸腺指数及脾脏指数较空白对照组降低, 证明了此模型造模成功。经过芪丹复感颗粒治疗, 小鼠胸腺指数及脾脏指数有所升高, 表明了芪丹复感颗粒对小鼠免疫功能有一定的提高能力。在对小鼠胃肠推进率的观察中发现, 模型组小鼠较空白对照组明显减低, 而在口服芪丹复感颗粒后小肠活性炭混悬液推进率有明显升高。胃肠推进率可以反映肠蠕动的功能, 表明芪丹复感颗粒可以通过促进肠蠕动改善肠道的机械运动功能。此外, 模型组小鼠肠液 sIgA 含量明显低于空白对照组, 在口服芪丹复感颗粒后肠液 sIgA 含量明显升高, 直接反映了芪丹复感颗粒对肠道免疫功能的促进作用。由此可以看出, 芪丹复感颗粒对于呼吸道黏膜免疫低下型小鼠肠蠕动及肠液 sIgA 水平均有提高, 能改善小鼠的肠道功能。

综上, 芪丹复感颗粒对呼吸道黏膜免疫低下小鼠的肠蠕动功能及肠液 sIgA 水平具有一定的促进作用, 可能是其治疗 RRTI 的作用机制之一, 但这种作用机制的深层次靶点还有待进一步探索。本研究雾化阶段存在很多不确定因素, 如因其躲避雾气的行为而无法确定每只小鼠的吸入量, 这对后期药物的量效关系也会存在一定不良影响; 同时对于模型的选取仍需进一步思考, 结果分析中中药剂量间未体现出差异, 考虑可能与选取模型的敏感性有关。

参考文献

- [1] 陈慧中. 儿童反复呼吸道感染判断条件及反复肺炎诊断思路 [J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(3): 163-165.
- [2] 吴小川, 周杜鹃. 儿童反复呼吸道感染的支气管黏膜免疫和气道高反应性变化 [J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(1): 22-25.

- [6] 张永振,徐建国. 粘膜免疫系统与粘膜免疫应答的诱导 [J]. 细胞生物学杂志, 2001, 23(1): 11-16.
- [7] 张刘扛. “肺与大肠相表里”的黏膜免疫和受体的生物学机制研究 [J]. 北京: 北京中医药大学, 2011: 56-61.
- [8] 左涛,律迎春,曹露,等. 冰岛参对小鼠肠道粘膜 SIgA 分泌的影响 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(1): 373-375.
- [9] WOOF JM, KERR MA. The function of immunoglobulin A in immunity [J]. J Pathol, 2006, 208(2): 270-282.
- [10] WILLSON DF, HORN SD, HENDLEY JO, et al. Effect of practice variation on resource utilization in infants for viral lower respiratory illness [J]. Pediatrics, 2011, 108(4): 851-855.
- [11] 王俊宏,崔丽华. 益气活血运脾方治疗小儿反复呼吸道感染临床研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 16(6): 11-14.
- [12] 杨钦泰,黄雪琨,陈壮桂,等. 变应性鼻炎小鼠模型鼻黏

膜组织重塑和转录因子 T-bet/GATA-3 的表达 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2013, 34(1): 70-74.

- [13] 谢佳星,张清玲,罗炜. 小鼠鼻气道阻力检测方法的建立 [J]. 广西医学, 2014, 36(4): 409-412.
- [14] 郑国玺,刘亮亮,祝康,等. Notch 基因在变应性鼻炎小鼠模型中的表达及其意义 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 28(20): 1585-1589.
- [15] 赵伟,孙国志. 不同种实验动物间用药量换算 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5): 52-53.
- [16] 隋楠. 助阳通便汤治疗慢传输型便秘的实验研究 [J]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2012: 62-63.
- [17] 马融,韩新民. 中医儿科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 70.
- [18] 何嘉,郭建辉,梁栋. 健脾益肺口服液对慢阻肺“肺气虚证”大鼠脾脏指数和胸腺指数的影响 [J]. 河南医学, 2014, 25(10): 1412-1414.

Effect of *Qidan Fugan Granules* (芪丹复感颗粒) on Intestinal Function in Low Respiratory Tract Mucosal Immunosuppressed Model Mice

SUN Ting¹, WANG Junhong², ZHANG Lishi³, BAI Dong³, REN Xinxin⁴, ZHENG Yuan⁴

(1. First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences; 4. Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Qidan Fugan Granules* (芪丹复感颗粒) in treating pediatric recurrent respiratory tract infection. **Methods** Sixty Kunming mice were randomized into blank control group, model group, pidotimod group, *Qidan Fugan Granules* of high, medium and low dose groups, with 10 mice in each. Except for the blank control group, mice in the other groups were sensitized with ovalbumin and aerosolized to prepare a model of respiratory mucosal immunity. After modeling, the high, medium, and low doses of *Qidan Fugan Granules* group were given 0.324, 0.162, and 0.081 g/10 g, respectively, while those in the pidotimod group were given 0.024 g/10 g pidotimod Gandudu. The blank control group was given intragastric administration of 0.1 ml/10 g saline once daily. After 2 weeks of gavage, the spleen index, thymus index, and gastrointestinal propulsive rate of each group of mice were calculated, and the content of secretory immunoglobulin A (sIgA) was determined. **Results** The spleen index, thymus index, gastrointestinal propulsion rate, and sIgA in the model group were lower than those in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the spleens index, thymus index, gastrointestinal propulsion rate, and sIgA of the mice in the high-, middle-, and low-dose groups of Piedemold and *Qidan Fugan Granules* groups were all higher than those in the model group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the indexes among the high, middle, and low doses of *Qidan Fugan Granules* group ($P > 0.05$). **Conclusion** *Qidan Fugan Granules* can promote intestinal peristalsis in mice with low respiratory mucosal immunity and increase the sIgA level in intestinal fluids, which may be one of the mechanisms for the treatment of repeated respiratory infections in children.

Keywords pediatric recurrent respiratory tract infections; *Qidan Fugan Granules* (芪丹复感颗粒); mucosal immune; intestinal function; gastrointestinal propulsive rate

(收稿日期: 2017-10-19; 修回日期: 2018-04-10)

编辑: 王利芬