

金欣浓缩液保留灌肠对呼吸道合胞病毒感染模型大鼠 TNF- α SIgA 的影响

陈超¹ 夏晨² 徐建亚³ 汪受传^{*}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院 2008级博士研究生, 江苏省南京市仙林大学城 138号, 210046)

2. 南京中医药大学 2005级七年制硕士研究生; 3. 南京中医药大学)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772822); 江苏省教育厅研究生科技创新计划资助项目 (CX09B-273Z)

* 通讯作者: wscnj@126.com, (025)86798182

[摘要] 目的 探讨中药复方金欣浓缩液保留灌肠治疗呼吸道合胞病毒 (RSV) 肺炎的作用机制。方法 将 56 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、金欣高、中、低剂量组及预先给药组、利巴韦林组, 每组 8 只。金欣高、中、低剂量组在大鼠 RSV 滴鼻 3 天后分别以 0.50g/ml、0.99g/ml、1.98g/ml 保留灌肠给药 30min, 利巴韦林组予以利巴韦林颗粒剂 (1g/ml) 灌胃。预先给药组在大鼠 RSV 滴鼻第 1 天的同时保留灌肠, 剂量及操作方法均同金欣中剂量组。各组均每天给药 2 次, 每次 1ml/100g, 预先给药组连续给药 10 天, 其余各组连续给药 7 天。测定各组大鼠血清中肿瘤坏死因子 (TNF- α) 及支气管肺泡灌洗液中分泌型免疫球蛋白 A (SIgA) 的含量。结果 与模型组及金欣低剂量组相比, 预先给药组、金欣中剂量组 TNF- α 水平显著增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 金欣各用药组和利巴韦林组 TNF- α 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组及利巴韦林组相比, 预先给药组及金欣高、中剂量组的 SIgA 含量均显著增高 ($P < 0.01$); 金欣高剂量组 SIgA 含量亦明显高于预先给药组及金欣中、低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 金欣浓缩液保留灌肠后可能通过增加 RSV 感染幼年 SD 模型大鼠的 TNF- α 、SIgA 的分泌量, 发挥抗病毒作用, 且存在一定的量效关系。

[关键词] 金欣浓缩液; 呼吸道合胞病毒; 肿瘤坏死因子- α ; 分泌型免疫球蛋白 A

Effect of Jinxin Concentrated Solution Enema on the TNF- α and SIgA in the Rats with Pneumonia Induced by Respiratory Syncytial Viruses

CHEN Chao¹, XIA Chen², XU Jianya³, WANG Shouchuan³

(1. Doctorate Student, The First College of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046; 2. Postgraduate of Nanjing University of Chinese Medicine; 3. Nanjing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To investigate the effect and mechanism of Jinxin Concentrated Solution (Herbal decoction for pneumonia) enema on model rats with pneumonia induced by respiratory syncytial viruses (RSV). **Methods** Fifty-six SD rats were randomized into seven groups, i. e. the normal control group, model control group, Jinxin high-dosage group, medium group, and low-dosage groups, pretreated group, and Ribavirin group, with 8 in each. The Jinxin high-dosage, medium-dosage, and low-dosage groups were given 0.50g/ml, 0.99g/ml, and 1.98g/ml Jinxin Concentrated Solution enema respectively for 30min three days after using RSV nasal drop. The Ribavirin group was given Ribavirin Granule 1g/ml through intragastric administration. The pretreated group was given Jinxin Concentrated Solution enema at the same time of the first day of using RSV nasal drop with the same dosage and manipulation as that of the Jinxin medium-dosage group. All medicated groups were treated twice a day, 1ml/100g each time. The pretreated group was treated for 10 days in succession and other groups for 7 days. The level of tumor necrosis factor α (TNF- α) in serum and secretory immuno-globulin A (SIgA) in bronchia alveolus lavage fluid were measured. **Results** Compared with the model control group and Jinxin low-dosage group, the level of TNF- α in the pretreated group and Jinxin medium-dosage group was significantly higher ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The level of TNF- α in all Jinxin groups and Ribavirin group was without statistical difference ($P > 0.05$). Compared with the model control group and Ribavirin group, the level of SIgA in the pretreated group and Jinxin high-dosage and medium-dosage groups was significantly higher ($P < 0.01$). The level of SIgA in the Jinxin high-dosage group was significantly higher than that of the pretreated group and Jinxin medium-dosage and low-dosage groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The anti-virus effect of Jinxin Concentrated Solution enema is realized through increasing the secretion of TNF- α and SIgA of rats with pneumonia induced by RSV and there exists a dosage-effect relation.

Key Words Jinxin Concentrated Solution; respiratory syncytial virus; tumor necrosis factor α (TNF- α); secretory immunoglobulin A (SIgA)

人类呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial viruses, RSV)是造成婴幼儿下呼吸道感染的主要病毒性病原体之一,有较强的传染性,流行与年龄、发病季节有密切相关性。大量临床实践和实验研究证实中医药治疗病毒感染存在一定优势^[1-3]。前期研究表明,金欣口服液治疗婴幼儿病毒性肺炎有明显疗效^[4-5],但具体作用机制未明。本研究以金欣浓缩液灌肠给药,并检测 RSV 肺炎模型幼年大鼠血清中肿瘤坏死因子(TNF- α)及分泌型免疫球蛋白(SIgA)变化,初步探讨金欣浓缩液经肠给药治疗小儿 RSV 肺炎的作用机制,现报告如下。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级 SD 幼年大鼠(4~6 周龄)56 只,雌雄各半,体重 80~110g,购自上海斯莱特生物有限公司,动物许可证号:SCX2007000503481

1.2 药物与试剂

金欣浓缩液[江苏省植物药深加工工程中心制备,主要由(炙)麻黄 50g 苦杏仁 167g 石膏 333g 虎杖 200g 前胡 167g 等组成,浓缩液终浓度生药量为 5g/ml],利巴韦林颗粒(四川百利药业有限责任公司,批号:090532);人喉癌上皮细胞(Hep-2,南京基天生物有限公司);RSV 病毒保存液(广州博特生物工程有限责任公司);TNF- α 试剂盒、SIgA 试剂盒(上海西塘生物有限公司)

2 方法

2.1 RSV 的扩增及冻存

Hep-2 传代细胞株,采用 DMEM+10% 新生小牛血清,25% 胰酶按常规方法消化传代,置 37℃、5% CO₂ 培养箱,饱和湿度下培养。

在 25cm² 细胞培养瓶中加入 $\times 10^6$ /ml Hep-2 细胞混悬液 3ml,培养 24~48h,吸去液体,加入 1ml DMEM 培育 0.5h 后,加入 0.5ml 首次扩增的 RSV 病毒保存液,小心混匀,37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 90min,每隔 15min 十字形慢慢晃动 3~4 次,病毒吸附 1h 后,移去病毒混合液,加入适量维持液,再培养 3~5 天,待细胞 80% 以上产生病变,封口,−80℃、37℃ 反复冻融 3 次,吹打移入 15ml 无菌离心管中,2500r/min,离心 10min,收集上清,并测定组织培养半数感染量(TCID₅₀)。分装后冻存于−80℃ 备用。

2.2 RSV 肺炎模型的制备

吸取 RSV 感染液 0.1ml(TCID₅₀= $\log^{-4.401}$),顺其吸气时交替滴入 SD 大鼠两侧鼻腔,滴毕保持鼠

头部后仰垂直姿势 2~3min,由重力作用使 RSV 感染液流入支气管和肺泡内。每日 1 次,连续 3 天。

2.3 动物分组与处理方法

将 56 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为金欣高、中、低剂量组,预先给药组,利巴韦林组,模型组,正常对照组,每组 8 只。金欣高、中、低剂量组在大鼠滴鼻感染后第 3 天,采用 1% 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,保留灌肠给药 30min(低、中、高剂量生药浓度分别为 0.50g/ml、0.99g/ml、1.98g/ml),每次 1ml/100g;预先给药组在大鼠滴鼻感染第 1 天的同时保留灌肠,剂量及操作方法均同金欣中剂量组;利巴韦林组在大鼠滴鼻感染后第 3 天灌胃予以利巴韦林颗粒剂每次 1ml/100g(利巴韦林药物浓度为 0.1g/ml),正常对照组和模型组灌胃生理盐水每次 1ml/100g。以上各组均每天给药 2 次,预先给药组连续给药 10 天,其余各组连续给药 7 天。

2.4 指标检测及方法

造模后第 10 天动物禁食 12h(不禁水),1% 戊巴比妥钠 0.3ml/100g 腹腔麻醉后取眶周血制备血清检测 TNF- α ;同时开胸,气管插管,于右侧主支气管取 2ml 生理盐水进行气管、支气管和肺部冲洗,反复冲洗 3 次后,吸出待测 SIgA,并取左肺用 10% 甲醛固定做病理检测。TNF- α 、SIgA 均采用 ELISA 法测定,严格按照试剂盒说明书操作。

2.5 统计学方法

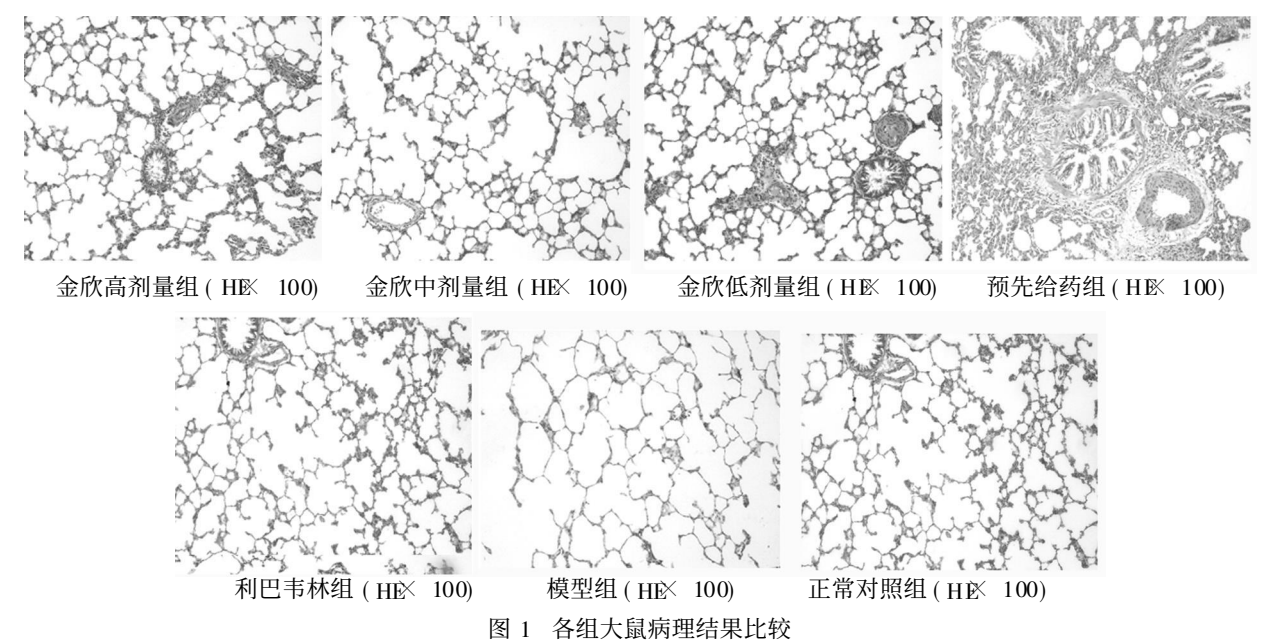
采用 SPSS 10.0 统计分析软件处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析,方差齐者作 *t* 检验,方差不齐者做秩和检验。

3 结果

实验过程中金欣中、低剂量组各有 1 只大鼠因灌肠致肠穿孔而死亡。

3.1 各组大鼠病理结果比较

图 1 示,正常对照组大鼠的肺泡上皮完整,肺间隔及支气管完好无损,肺泡间隔较薄,支气管上皮被覆着正常的纤毛柱状上皮。模型组大鼠肺泡壁血管扩张充血,分布于支气管周围、小叶间和肺泡间隔的结缔组织血管周围有单核细胞、淋巴细胞及少量中性粒细胞浸润,肺泡壁明显增厚。各用药组的肺组织学表现基本同模型组,但肺淤血和间质炎的程度减轻。尤以金欣中剂量组、预先给药组效果较为明显。其中金欣高剂量组肺组织炎细胞浸润程度为:2 例无,3 例极轻,2 例轻度,1 例重度;金欣中剂量组肺组织炎细胞浸润程度为:3 例无,3 例极轻,1 例轻



度;金欣低剂量组肺组织炎细胞浸润程度为: 1例无, 4例极轻, 1例轻度, 1例中度。预先给药组肺组织炎细胞浸润程度为: 2例无, 2例极轻, 3例轻度, 1例中度;利巴韦林组肺组织炎细胞浸润程度为: 2例无, 4例极轻, 2例轻度。

3.2 各组大鼠血清 TNF-α 支气管肺泡灌洗液 SIgA 表达水平比较

表 1 示, 各组大鼠血清 TNF-α 水平均高于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组相比, 预先给药组、金欣中剂量组 TNF-α 水平显著增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 金欣各用药组和利巴韦林组 TNF-α 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 金欣各用药组间比较, 低剂量组 TNF-α 表达水平明显低于金欣中剂量组及预先给药组 ($P < 0.05$), 金欣高、中剂量组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 示, 各组大鼠支气管肺泡灌洗液中 SIgA 水平均高于正常对照组 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 预先给药组及金欣高、中剂量组的 SIgA 含量均显著增高 ($P < 0.01$), 而利巴韦林组和金欣低剂量组无明显增高 ($P > 0.05$); 与利巴韦林组相比, 预先给药组及金欣高、中剂量组 SIgA 含量均显著增高 ($P < 0.01$); 与预先给药组相比, 金欣高剂量组 SIgA 含量显著升高 ($P < 0.05$), 而金欣低剂量组及利巴韦林组则明显降低 ($P < 0.01$); 金欣高、中、低剂量组相比, 金欣高剂量组 SIgA 含量明显高于其他两组 ($P < 0.01$), 而金欣中剂量组亦明显高于金欣低剂量组 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血清 TNF-α 支气管肺泡灌洗液 SIgA 表达水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF-α	SIgA
模型组	8	49.43±4.19 ^a	61.92±6.36 [*]
预先给药组	8	68.4±7.82 [*] △△	81.9±3.66 [*] △△▲
金欣高剂量组	8	57.42±5.85 [*]	87.58±7.58 [*] △△▲#
金欣中剂量组	7	64.63±8.45 [*] △	76.8±6.97 [*] △△●
金欣低剂量组	7	50.44±6.08 [#] ☆	60.36±3.56 [*] ##●☆☆
利巴韦林组	8	55.34±6.27 [*]	65.03±2.46 [*] ##
正常对照组	8	37.76±4.18	46.02±5.05

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与利巴韦林组比较, ▲ $P < 0.01$; 与预先给药组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与金欣高剂量组比较, ● $P < 0.01$; 与金欣中剂量组比较, ☆ $P < 0.05$, ☆☆ $P < 0.01$

4 讨论

RSV 感染是小儿下呼吸道感染的主要病原体, 有研究显示, RSV 感染易并发心、脑、胃肠道损伤^[7-8]。目前发病机制尚未完全阐明, 但免疫系统在其发病中可能占重要地位, 有学者认为, Th1/Th2 平衡紊乱, Th2 优势免疫应答及其诱导产生的一系列炎症介质和细胞因子可能是婴儿 RSV 毛细支气管炎的发生、发展及预后, 尤其是早期喘息和哮喘发生的重要决定因素^[9]。

TNF-α 是一类由单核-巨噬细胞分泌的 Th2 炎症因子, 具有调节免疫应答、抗病毒的作用。正常情况下, TNF-α 在机体内浓度较低, 在病毒感染时, 病毒抗原可刺激单核巨噬系统产生 TNF-α, 增强细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 对病毒感染细胞的杀伤作用。本实验显示 RSV 感染后 TNF-α 升高, 这可能与

RSV 感染后 Th1/Th2 细胞功能失衡相关,与既往文献报道一致^[10]。中药金欣保留灌肠和利巴韦林灌胃后均可上调血清 TNF- α 的表达,尤以预先给药组、金欣高及中剂量组升高最明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示其抗病毒作用。SIgA 是黏膜免疫系统的主要效应分子,主要存在于呼吸道、消化道及泌尿生殖道等黏膜表面分泌液及泪液、唾液、乳汁等中,可有效地防治呼吸道、消化道等疾病。甘子维等^[11]研究发现,SIgA 超声雾化吸入能有效治疗婴幼儿呼吸道合胞病毒感染。

金欣浓缩液即金欣口服液(原名清肺口服液)的浓缩液,是汪受传教授在治疗小儿肺炎经方麻杏石甘汤的基础上结合现代药理,并经长期临床实践加减而成,目前已有研究表明金欣口服液不仅有直接抗病毒的作用,还能通过提高机体自身免疫能力来达到治疗效果^[4,6,12]。此次研究发现,中西药干预后各组的肺部病变程度较模型组减轻,尤其以金欣中剂量组和预先给药组效果较为明显;同时本研究发现,金欣浓缩液保留灌肠后可上调呼吸道黏膜 SIgA 的表达,效果优于利巴韦林组,尤其以预先给药、金欣高及中剂量组为明显 ($P < 0.01$),表明金欣浓缩液在提高呼吸道黏膜 SIgA 方面,具有一定的时间和浓度依赖。

儿童口服汤剂困难,依从性差,是临床亟待解决的问题。直肠给药法是将药物注入直肠或将药栓塞入肛门的方法,适用于胃肠反应重或口服有困难者,且药物吸收后不进入门静脉,可减少破坏。金欣浓缩液保留灌肠后可通过上调炎症因子 TNF- α 的分泌和增加呼吸道黏膜分泌型 IgA 的含量,来调节机体免疫平衡,发挥其抗 RSV 作用。同时通过保留灌肠的给药方式,亦不失为治疗小儿 RSV 感染有效途径之一,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] 李莹. 中药抗呼吸道病毒感染作用研究进展 [J]. 山西中医, 2007, 23(4): 71-72.
- [2] 彭镇耀, 李真真. 消炎宣肺汤治疗小儿病毒性肺炎疗效观察 [J]. 广东药学, 2003, 13(3): 40-42.
- [3] 李杰, 广凌, 王雪峰. 中药内外合治小儿病毒性肺炎的临床研究 [J]. 辽宁中医杂志, 1999, 26(6): 261.
- [4] 袁斌, 任现志, 孙铁秋, 等. 清肺口服液治疗小儿呼吸道合胞病毒肺炎 166 例多中心单盲对照临床观察 [J]. 中医杂志, 2009, 50(3): 221-223.
- [5] 吴琴琴, 汪受传, 陈超, 等. 清肺口服液对呼吸道合胞病毒抑制作用的血清药理学实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(5): 850-851.
- [6] 任现志, 汪受传, 李江全, 等. 清肺口服液治疗病毒性肺炎药效学实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(10): 22-25.
- [7] 张艳敏, 冯玉珍, 罗树舫, 等. 小儿下呼吸道感染病毒病原学动态变化的研究 [J]. 陕西医学杂志, 2002, 31(3): 195-197.
- [8] 王珏, 梅爱农, 闵秀全. 呼吸道合胞病毒毛细支气管炎的并发症及危险因素 [J]. 实用儿科临床杂志, 2003, 18(10): 790-791.
- [9] 陈志敏. Th1/Th2 免疫应答与婴儿 RSV 感染 [J]. 国外医学儿科学分册, 2001, 28(4): 184-187.
- [10] 董琳, 黄达枢. 呼吸道合胞病毒肺炎血清肿瘤坏死因子检测及其临床意义 [J]. 临床儿科杂志, 1996, 14(6): 405-406.
- [11] 甘子维, 周惠敏, 鱼绥和, 等. 粗制分泌型 IgA 超声雾化吸入治疗婴幼儿呼吸道合胞病毒感染 [J]. 第四军医大学学报, 1995, 16(2): 150-151.
- [12] 汪受传, 王霖, 陈超, 等. 清肺口服液含药血清对呼吸道合胞病毒抑制作用的实验研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(1): 25-27.

(收稿日期: 2010-10-11; 修回日期: 2011-02-18)

[编辑: 崔京艳]

(上接第 851 页)

- [8] McCulloch M, See C, Shu X J, et al. Astragalus-based Chinese herbs and platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: meta-analysis of randomized trials [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(3): 419-430.
- [9] 严桂英, 徐振晔, 王中奇, 等. 中药抗瘤增效方对非小细胞肺癌化疗增效减毒作用的临床研究 [J]. 中华实用中西医结合杂志, 2005, 18(6): 873-876.
- [10] 周卫东, 徐振晔, 王中奇, 等. 抗瘤增效方对 NSCLC 化疗患者免疫功能及血清 VEGF、CYFRA21-1 的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(3): 6-8.

- [11] 刘嘉湘. 中医药维护癌症患者生存质量的作用 [J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(3): 309-310.
- [12] 王惠军. 胃癌患者肿瘤浸润淋巴细胞 CD28 表达的检测及临床意义 [J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(1): 58-60.
- [13] 姚反修, 郑红, 李宏云, 等. 化疗对肺癌患者细胞免疫功能的影响 [J]. 中国肿瘤临床和康复, 2001, 8(2): 53-54.
- [14] 任彦, 林求诚. 恶性肿瘤中医虚证与免疫功能状态关系临床研究 [J]. 实用中西医结合杂志, 1997, 10(21): 2060-2061.

(收稿日期: 2010-09-07; 修回日期: 2010-12-20)

[编辑: 叶晨]