

冰香散对甲 I 型流感病毒感染小鼠脾淋巴细胞增殖及细胞因子分泌的影响

谢雯芳¹, 丁伟¹, 代婉娟¹, 江漪¹, 许秀妮¹, 邵敏明¹, 刘妮¹, 赵昉¹, 张奉学¹, 徐培平¹, 王新华²
(1. 广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405; 2. 广州医科大学, 广东 广州 510182)

摘要: **目的** 观察冰香散挥发油对甲 I 型流感病毒(H1N1)感染小鼠脾淋巴细胞增殖及细胞因子分泌的影响, 探讨其影响机体免疫应答的作用机制。**方法** 冰香散挥发油不同途径给药(滴鼻、雾化)对甲 I 型流感病毒感染小鼠干预性给药, 用 CCK-8 法检测冰香散对刀豆蛋白 A(ConA)、革兰氏阴性菌细胞壁脂多糖(LPS)诱导 T、B 淋巴细胞增殖的影响; 酶联免疫法(ELISA)检测冰香散对白介素-4(IL-4)、白介素-2(IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等相关细胞因子的影响。**结果** 与正常对照组比较, 模型组 H1N1 对小鼠脾 B 淋巴细胞增殖有明显的抑制作用($P < 0.05$), 明显提升了 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2 等相关致炎因子的水平($P < 0.05$), 而对 IL-4 等抗炎因子提升并不明显; 利巴韦林对感染小鼠脾 B 淋巴细胞增殖有明显的增强作用($P < 0.01$), 明显提高 IL-4 和 IFN- γ 的水平, 同时降低 TNF- α 水平($P < 0.05$); 冰香散滴鼻能促进感染小鼠脾 B 淋巴细胞的增殖($P < 0.05$), 抑制 IL-2 和 TNF- α 的分泌($P < 0.05$); 冰香散雾化能促进感染小鼠脾 T 淋巴细胞的增殖($P < 0.05$), 促进 IL-4 和 IFN- γ 产生的同时, 抑制 IL-2 的分泌($P < 0.05$)。**结论** 冰香散挥发油对甲 I 型流感病毒感染小鼠脾细胞活性有一定的促进作用, 对 Th1/Th2 免疫平衡有一定的调节作用, 但不同给药途径(滴鼻、雾化)的抗病毒免疫机制有所不同。

关键词: 冰香散; 不同给药途径; 甲 I 型流感病毒; 淋巴细胞增殖; 细胞因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)06-0578-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.013

Effects of *Bingxiang* Powder on Lymphocyte Proliferation and Cytokine Secretion in Mice Infected with Influenza A

XIE Wenfang¹, DING Wei¹, DAI Wanjuan¹, JIANG Yi¹, XU Xiuni¹, SHAO Minming¹, LIU Ni¹, ZHAO Fang¹, ZHANG Fengxue¹, XU Peiping¹, WANG Xinhua² (1. Institute of Tropical Medicine of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of volatile oil of *Bingxiang* Powder on lymphocyte proliferation and cytokine secretion in mice infected with influenza A (H1N1) virus by different administration methods, and to explore its possible mechanism during immune response. **Methods** We administered the essential oil of *Bingxiang* Powder by dripping nose or by atomization, and then used CCK-8 to detect the proliferation of lymphocyte T and B induced by concanavalin(ConA) and lipopolysaccharide(LPS), and used enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) to detect the levels of interleukin 4(IL-4), interleukin 2(IL-2), interferon gamma(IFN- γ) and tumor necrosis factor alpha(TNF- α). **Results** H1N1 showed obvious inhibitory effect on the proliferation of mice splenic lymphocyte B($P < 0.05$ compared with that in the normal control group), increased the levels of inflammatory factors of TNF- α , IFN- γ and IL-2($P < 0.05$), but had no effect on IL-4 level. Ribovirin enhanced the splenic lymphocyte B

收稿日期: 2013-07-08

作者简介: 谢雯芳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药抗病毒。Email: 376292309@qq.com。通讯作者: 徐培平, 医学博士, 副研究员, 研究方向: 病毒性疾病的中医药防治研究, Email: xupeiping@21cn.com。王新华, 医学博士, 博士生导师, 研究方向: 中医药抗病毒。Email: xinhuaaw@gzhmc.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81072948); 广东省自然科学基金研究团队项目(S2012030006598); 广东省建设中医药强省立项资助科研课题(2010397)。

proliferation ($P < 0.01$), increased IL-4 and IFN- γ levels and decreased TNF- α level ($P < 0.05$). *Bingxiang* Powder by dripping nose or by atomization promoted splenic lymphocyte B and T proliferation, and inhibited the secretion of IL-2 in mice infected with H1N1 ($P < 0.05$). The administration of *Bingxiang* Powder by dripping nose could also inhibit the secretion of TNF- α ($P < 0.05$), and *Bingxiang* Powder by atomization promoted production of IL-4 and IFN- γ ($P < 0.05$). **Conclusion** The volatile oil of *Bingxiang* Powder has certain effect on promoting the activates of spenic lymphocytes in mice infected with influenza A, and can regulate the balance of Th1/Th2. The anti-viral immunoregulation mechanism varies in the administration methods of dripping nose or atomization.

Keywords: *Bingxiang* Powder; Different administration methods; Influenza A; Lymphocyte proliferation; Cytokines

中药防治流感主要有三个方向,分别是辛凉解表方药如银翘散,扶正祛邪方药如玉屏风散,芳香辟秽方药如冰香散^[1]。银翘散和玉屏风散在临床上已证实有很好的疗效,而冰香散在前期的研究中也证实对甲 1 型流感病毒(H1N1)有很好的防治疗效^[2-3]。冰香散是一种挥发油制剂,在体内和体外实验中发现滴鼻和雾化两种方式给药均能很好抑制流感病毒的侵入^[4]。本实验通过观察小鼠淋巴细胞的增殖及细胞因子的分泌,以初步了解冰香散对机体免疫应答反应和免疫调节的作用和可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物 BALB/c 小鼠,雌性,体质量 13 ~ 15 g,由广东省医学实验动物中心提供,SPF 级,合格证号: 0110239。

1.2 试剂及仪器 Mouse IL-4 ELISA Kit, 美国 BioLegend 公司,批号: B147522; Mouse IL-2 ELISA Kit, 美国 BioLegend 公司,批号: B145603; Mouse IFN- γ ELISA Kit, 美国 BioLegend 公司,批号: B154876; Mouse TNF- α ELISA Kit, 美国 BioLegend 公司,批号: B135182; 刀豆蛋白 A(ConA), 美国 Sigma 公司,批号: c-8110; RPMI-1640 培养基, 美国 GBICO 公司; 淋巴细胞分离液, 北京索莱宝科技有限公司,批号: 20120609; 细胞增殖检测(CCK-8), 日本同仁化学研究所,批号: c0038; 乙醚, 分析纯, 广州化学试剂厂,批号: 20100601-1; 402AI 医用超声雾化器, 江苏鱼跃医疗设备有限公司; ELx800 酶标仪, 美国 Bio-Teck。

1.3 毒株 流感病毒 A/FM/1/47(H1N1)鼠肺适应株,由中国医学科学院医药生物技术研究所提供,广州中医药大学热带医学研究所病毒室冷冻保存,经小鼠增强毒力后,于鸡胚尿囊腔传代 2 次,在小鼠上测定其半数致死量为(LD₅₀)为 10^{-4.37}。

1.4 药物制备 各配伍组合药物选定符合 2010 年版中国药典规定的饮片,购自广州中医药大学附属第一医院中药房。冰香散制剂,由野菊花、艾草、冰片等组成,购自广州中医药大学附属第一医院。取 15 剂水煮沸蒸馏,浓缩后得到 8.67g 黄色精油,用乙醚将精油反复溶出,加无水 Na₂SO₄ 脱水干燥,用维持液将药物混悬并超声以备用,终浓度为 1.15 %。利巴韦林,湖北医药工业研究所,批号: 120423644。

1.5 方法

1.5.1 给药方案 将 BALB/c 小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,设正常对照组,模型组、利巴韦林组,冰香散滴鼻组,冰香散雾化组。冰香散采用滴鼻与雾化吸入两种给药方式,使用时将冰香散精油混悬于 20 mL 蒸馏水中(含 0.5 %吐温),微孔滤膜过滤。冰香散小鼠滴鼻给药剂量为 0.03 g·kg⁻¹(生药材),每次 4~5 滴,每天 2 次;冰香散雾化给药剂量为 0.6 g·kg⁻¹(生药材),最大雾化率: 4 mL·min⁻¹;利巴韦林组口服给药(100 mg·kg⁻¹);正常对照组和模型组给予同体积的生理盐水。预防给药 7 d,然后用 2LD₅₀ 流感病毒感染小鼠,在乙醚轻度麻醉下,用 2LD₅₀ 的流感病毒滴鼻感染,每鼠 4 滴,约 0.05 mL。正常对照组不感染病毒。再继续给予药物 4 d,于感染后的第 5 天剖杀小鼠。

1.5.2 脾细胞制备 取无菌剪刀,挑取小鼠全脾,剪成 5 mm × 5 mm 大小的组织块。先用预冷 1640 培养基滴几滴置 200 目方形筛网上,用注射芯轻柔挤压脾组织至所有组织通过筛网,用少量 1640 培养基润洗。再将 5 mm × 5 mm 大小的组织块同上操作,直至所有脾脏完全研碎并通过筛网,其中加入的 RPMI-1640 培养基的总量不得超过 5 mL。离心分离,用 RPMI-1640 培养基将脾组织细胞悬液定容至 5 mL,加入等量的淋巴细胞分离液,保持液面分界清

晰,用1800 r·min⁻¹离心15 min。用一次性的巴氏吸管小心收集淋巴细胞层,并用5 mL RPMI-1640 培养基重悬细胞,1600 r·min⁻¹离心10 min,弃上清。重复使用RPMI-1640 培养基洗涤2次,弃上清。先加2 mL RPMI-1640 培养基重悬细胞,取微量细胞悬液,100 倍稀释,再用台盼蓝染色,计算细胞数。

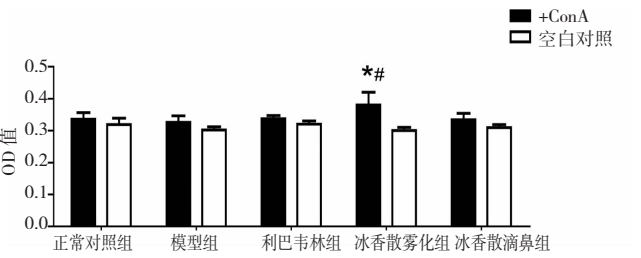
1.5.3 脾淋巴细胞的增殖 计数后,用含10 %小牛血清的RPMI-1640 培养基调整细胞浓度至 5×10^6 cells·mL⁻¹,接种于96 孔板,每只小鼠做3 个复孔,每孔100 μL。4 h 后,其中2 孔分别加入终浓度为10 μg·mL⁻¹的ConA 100 μL 和终浓度为10 μg·mL⁻¹的LPS 100 μL,另1 孔为空白对照加入100 μL RPMI-1640 培养基。置5 %CO₂、37 ℃培养箱培养48 h。终止后,每孔加入10 μL 的CCK-8,培养4 h,酶标仪检测450 nm 处吸光度值。

1.5.4 相关细胞因子的检测 5×10^6 cells·mL⁻¹ 接种24 孔培养板中,每孔加入1 mL 脾细胞悬液,4 h 后,于每孔加入浓度为10 μg·mL⁻¹的ConA 100 μL,置5 %CO₂、37 ℃培养箱培养48 h。取细胞悬液,2000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,经0.45 μm 微孔滤器过滤,按试剂盒要求操作,检测IL-2、IL-4、TNF-α、IFN-γ 浓度。

1.6 统计学处理方法 应用SPSS18.0 软件对数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验进行比较。

2 结果

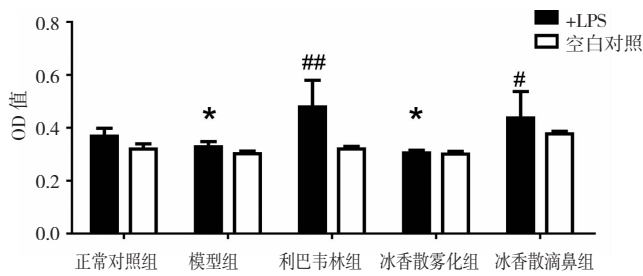
2.1 冰香散挥发油对小鼠脾 T 淋巴细胞增殖的影响 见图1。与正常对照组比较,模型组H1N1 对小鼠脾T 淋巴细胞的增殖影响不大,说明H1N1 感染对ConA 刺激诱导的小鼠脾T 淋巴细胞的增殖作用影响不大。利巴韦林组、冰香散滴鼻组对小鼠脾T 淋巴细胞的



注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$ 。
图1 冰香散挥发油对小鼠脾 T 淋巴细胞增殖的影响
Figure 1 Effects of Bingxiang Powder on spleen T lymphocyte proliferation in mice

增殖作用也无明显影响。冰香散雾化具有促进H1N1 感染小鼠脾T 淋巴细胞的增殖作用,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 冰香散挥发油对小鼠脾 B 淋巴细胞增殖的影响 见图2。与正常对照组比较,模型组H1N1 对LPS 诱导的小鼠脾B 淋巴细胞的增殖有明显的抑制作用($P < 0.05$)。利巴韦林、冰香散滴鼻对LPS 诱导的小鼠脾B 淋巴细胞增殖有明显的增强作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)。相反,冰香散雾化能抑制H1N1 感染小鼠脾B 淋巴细胞的增殖作用,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。
图2 冰香散挥发油对小鼠脾 B 淋巴细胞增殖的影响
Figure 2 Effects of Bingxiang Powder on spleen B lymphocyte proliferation in mice

2.3 冰香散挥发油对相关细胞因子分泌的影响 见表1。与正常对照组比较,模型组H1N1 感染明显提高了TNF-α、IFN-γ 和IL-2 等相关致炎因子的水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),而对IL-4 抗炎因子提高并不明显;与模型组比较,利巴韦林能够明显提高IL-4 和IFN-γ 的水平,同时降低TNF-α 水平,差异有统计学意义($P < 0.05$);冰香散滴鼻能明显抑制IL-2 和TNF-α 的水平($P < 0.05$);冰香散雾化能明显提升IL-4 水平同时抑制IL-2 水平($P < 0.05$)。

表1 冰香散挥发油对小鼠相关细胞因子分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$, pg·mL⁻¹)

组别	IL-4	IL-2	IFN-γ	TNF-α
正常对照组	89.96 ± 39.32	1087.10 ± 237.09	60.63 ± 20.75	203.00 ± 31.54
模型组	108.38 ± 42.93	1485.00 ± 423.17*	136.78 ± 32.41**	351.65 ± 72.9**
利巴韦林组	145.91 ± 18.75*	1039.80 ± 373.45*	103.28 ± 29.17*	213.73 ± 24.22#
冰香散雾化组	155.63 ± 42.16#	963.45 ± 409.82#	133.05 ± 5.02	290.07 ± 68.12
冰香散滴鼻组	62.44 ± 19.46	902.55 ± 191.64#	64.06 ± 17.94###	264.46 ± 46.17*

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

3 讨论

1989 年 Mossman 等^[5]根据 Th 细胞分泌细胞因子的不同将其分为两个功能群 Th1 和 Th2, 它们通过相互诱导、相互调控、受体表达以及生物学效应的相互影响(增强与拮抗), 组成了免疫微环境中的特殊的细胞因子网络(cytokines network), Th1 细胞主要分泌 IL-2、TNF- α 、IFN- γ , 介导细胞免疫应答, 反应炎症的损害程度; Th2 细胞主要分泌 IL-4, 5, 6, 9, 10, 13, 介导体液免疫应答, 与疾病的进展、慢性化有关^[6]。其中, IL-2、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-4 是一组相互拮抗的细胞因子, 是反映 Th1 和 Th2 细胞亚群平衡的重要标志。Th1/Th2 细胞因子失衡时, 会出现免疫偏移(immune deviation), 与流感病毒感染后导致的机体免疫病理损伤密切相关。逆转 Th1/Th2 的异常漂移, 已成为免疫治疗的新热点。本研究的结果表明, 甲 I 型流感病毒感染后, 使 Th1 细胞分泌的 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 显著升高, 而 Th2 细胞分泌的 IL-4 升高不明显, 提示该流感病毒感染小鼠可使其免疫功能紊乱, 且主要表现为 Th1 样反应, 介导细胞免疫应答, 虽然有利于清除感染细胞内的病毒, 但由于炎症扩大反应, Th1 与 Th2 之间失衡, 导致肺组织的免疫病理损伤。而阳性药利巴韦林能够明显提高 IL-4、IFN- γ 水平, 同时降低 TNF- α 水平; 冰香散滴鼻给药能够明显降低 IL-2 和 TNF- α 的水平, 冰香散雾化给药能够明显提升 IL-4、IFN- γ 水平同时降低 IL-2 水平。即大体上都是通过上调 IL-4、IFN- γ 的分泌, 降低 IL-2、TNF- α 的分泌, Th1 样反应朝 Th2 样反应方向逆转, 促使 Th1/Th2 重新趋于平衡。

机体免疫系统中淋巴细胞增殖是机体对非己抗原刺激产生免疫应答过程中的重要事件。淋巴细胞增殖结果表现为产生效应淋巴细胞, 清除非己抗原, 维护机体内环境稳定。T 细胞活化是细胞免疫应答早期的重要变化^[7-8], 淋巴细胞增殖效果决定效应淋巴细胞的数量, 决定了机体免疫应答反应的强度, 反映机体的细胞免疫状态。本实验研究发现, H1N1 感染对 B 淋巴细胞增殖有一定的抑制作用, 阳性药利巴韦林明显增强 LPS 刺激诱导小鼠脾 B 淋巴细胞增殖反应, 这可能就是利巴韦林抗 H1N1 感染的主要原因之一。冰香散滴鼻能一定程度上促进 LPS 刺激诱导小鼠脾 B 淋巴细胞的增殖作用, 而冰香散雾

化对 LPS 刺激诱导小鼠脾 B 淋巴细胞的增殖作用起负调控作用。冰香散雾化能促进 ConA 刺激诱导小鼠脾 T 淋巴细胞的增殖作用, 而利巴韦林和冰香散滴鼻对 ConA 刺激诱导小鼠脾 T 淋巴细胞的增殖作用不明显。

滴鼻剂的制备方法简单, 成本低, 是常用的鼻用制剂之一。但由于鼻纤毛的清除功能, 药液在鼻腔内的滞留时间仅有 15 ~ 30 min, 因此在一定程度上影响了药物的吸收和疗效。而喷雾剂给药后, 药物分散均匀并以微小的液滴与鼻黏膜接触; 药物在鼻腔中的滞留时间延长, 因此, 药物的吸收比较完全。

综上所述, 冰香散抗 H1N1 作用机制可能在于影响 Th1、Th2 细胞分泌的细胞因子来调节 Th1/Th2 之间的平衡, 并能增强 T 淋巴细胞或 B 淋巴细胞的增殖起到增强抗病毒的作用。冰香散雾化与滴鼻给药虽同为冰香散挥发油, 且都可以通过调整 Th1/Th2 的平衡、增强 T 淋巴细胞或 B 淋巴细胞的增殖反应来发挥其抗病毒作用和免疫调节功能, 但可能由于剂型不同造成其对免疫反应上的差异。鉴于冰香散对 H1N1 有很好的防治作用, 有望开发成适用于临床的剂型, 可以利用现代先进工艺, 通过改变剂型, 如开发成微球制剂、凝胶剂等, 以达到延长药物在鼻腔的滞留时间、提高药物的生物利用度的目的, 从而充分发挥其抗病毒及免疫调节功能。

参考文献:

- [1] 徐培平, 丁伟, 赵昉, 等. 中药预防流感作用与黏膜免疫相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2012, (11): 992-998.
- [2] 徐培平, 丁伟, 赵昉, 等. 中药对鼠流感病毒感染的预防效果研究[J]. 中国热带医学, 2012, (11): 1299-1303.
- [3] 徐培平, 赵昉, 刘妮, 等. 中药体外防治甲型 H1N1 流感病毒实验研究[J]. 实用预防医学, 2012, (8): 1121-1124.
- [4] 丁伟, 赵昉, 许秀妮, 等. 冰香散挥发油对甲 I 型流感病毒体外作用研究[J]. 中药材, 2012, (8): 1298-1300.
- [5] Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells [J]. Adv Immunol, 1989, 46: 111-147.
- [6] Chiu BC, Chensue SW. Chemokine responses in schistosomal antigen-elicited granuloma formation [J]. Parasite Immunol, 2002, 24 (6): 285-294.
- [7] 侯会娜, 曾耀英, 黄秀艳, 等. 金银花提取物对小鼠淋巴细胞体外活化与增殖的影响[J]. 免疫学杂志, 2008, (2): 178-180.
- [8] 赵洁, 王曦鸣, 李继祥. MTT 法检测淋巴细胞增殖能力的影响因素[J]. 畜禽业, 2008, (2): 28-30.

(编辑: 邓响潮)