

养阴清肺汤对巨细胞病毒性肺炎模型小鼠的保护作用

李灵芝*,常国良(长治市第二人民医院中医科,山西长治 046000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2196-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.12

摘要 目的:研究养阴清肺汤对巨细胞病毒(MCMV)肺炎模型小鼠的保护作用。方法:小鼠ip给予0.8 ml巨细胞病毒性细胞以复制巨细胞病毒肺炎模型。实验分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、更昔洛韦(60 mg/kg)组与养阴清肺汤高、中、低剂量[98.64、49.32、24.66 g(生药)/kg]组,ig给药,每天2次,连续3周。采用HE染色观察小鼠肺组织病理学;采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法测定小鼠肺组织中MCMV-DNA病毒量;采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定小鼠肺组织 γ 干扰素(INF- γ)与白细胞介素6(IL-6)的表达。结果:与正常对照组比较,模型组小鼠肺组织中MCMV-DNA病毒量增加;IL-6表达增强,INF- γ 表达减弱,差异有统计学意义($P<0.05$);光镜下其肺泡壁及细支气管周围肺间质内有大量炎性细胞(单核细胞为主)浸润,肺泡壁有增宽,部分肺泡腔内有蛋白渗出。与模型组比较,养阴清肺汤高、中、低剂量组小鼠肺组织中MCMV-DNA病毒量减少;IL-6表达减弱,INF- γ 表达增强,差异有统计学意义($P<0.05$);肺组织病理学状况有一定改善。结论:养阴清肺汤对MCMV肺炎模型小鼠具有一定保护作用,其机制与抑制肺组织内MCMV增殖、减弱IL-6表达、增强INF- γ 表达有关。

关键词 养阴清肺汤;巨细胞病毒; γ 干扰素;白细胞介素6;小鼠;肺炎

Protective Effects of Yangyin Qingfei Decoction on the Model Mice with Cytomegaloviral Pneumonia

LI Ling-zhi, CHANG Guo-liang (Dept. of Traditional Chinese Medicine, the Second People's Hospital of Changzhi, Shanxi Changzhi 046000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the protective effects of Yangyin qingfei decoction on the model mice with cytomegaloviral pneumonia. METHODS: 0.8 ml cytomegalovirus cells were ip given to mice to establish the model of cytomegaloviral pneumonia. In the test, there were normal control group (equal capacity saline), model group (equal capacity saline), ganciclovir group (60 mg/kg) and Yangyin qingfei decoction high, medium and low doses groups [98.64, 49.32, 24.66 g (medicinal materials)/kg]. The drugs were ig given to the mice, twice a day, for consecutive 3 weeks. HE stain was adopted to observe the pathological shape of the lung tissues of the mice; real-time quantitative fluorescent polymerase chain reaction (RT-PCR) technology was used to determine the amount of cytomegaloviruses in the lung tissues; and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to determine the expression of the interferon- γ (INF- γ) and interleukin-6 (IL-6) in the lung tissues. RESULTS: Compared with normal control group, the amount of the cytomegalovirus DNA in the lung tissues of the mice in model group was increased; the expression of the IL-6 was increased and the expression of the INF- γ was decreased, with significant difference ($P<0.05$). The mice's alveolar wall and pulmonary mesenchyme around bronchioles were found to be infiltrated by a large number of inflammatory cells (predominantly monocytes) under the light microscope, the alveolar wall was thickened, and proteins was oozed from a part of alveolar spaces. Compared with model group, the amount of the cytomegalovirus DNA in the lung tissues of the mice in Yangyin qingfei decoction high, medium and low doses groups was decreased; the expression of the IL-6 was decreased, and the expression of the INF- γ was increased, with significant difference ($P<0.05$); the pathological slices of the lung tissues were improved to some degree. CONCLUSIONS: Yangyin qingfei decoction have protective effects on the mice with cytomegaloviral pneumonia by a mechanism that may be related to inhibiting the proliferation of the cytomegalovirus in lung tissues, reducing the expression of IL-6 and enhancing the expression of IFN- γ .

KEYWORDS Yangyin qingfei decoction; Cytomegalovirus; Interferon- γ ; Interleukin-6; Mice; Pneumonia

巨细胞病毒(MCMV)肺炎是以感染鼠MCMV后出现发热、寒战、咳嗽、头痛、全身酸痛、倦怠等为临床表现的急性上呼吸道病变^[1]。现代医学多采取更昔洛韦等抗病毒疗法,但抗病毒药副作用较大,会严重影响患者生活质量^[2]。研究发现,MCMV具有潜伏-活化的特点,当患者处于低免疫水平时,MCMV活跃,导致患者间质性肺炎的发生,是引起院内感染的重要原因^[3]。因此,提高患者机体免疫水平是治疗本病的根本。更昔洛韦等抗病毒药只具有单独抗病毒的作用,无法提

高机体的免疫水平;中医学治疗从疾病发病的根本出发,采取相应的治疗,整体调节,在治疗疾病病因的同时促进机体的平衡^[4]。养阴清肺汤是由大生地、麦冬、生甘草、玄参、贝母、丹皮、薄荷和炒白芍组成,具有养阴清肺、解毒利咽的功效。方中大生地养肾阴固根本,滋肾阴救肺燥;麦冬养阴润肺;白芍和营泄热;玄参清虚火解毒;贝母润肺化痰;丹皮清热凉血;薄荷散邪利咽;生甘草润肺解毒;全方滋养肺肾,利咽散结,消肿止痛^[5]。笔者通过观察小鼠肺组织中MCMV-DNA病毒量与 γ 干扰素(INF- γ)与白细胞介素6(IL-6)水平,来探究养阴清肺汤对MCMV肺炎模型小鼠的保护效果,现报道如下。

* 副主任中医师。研究方向:老年病。E-mail: lingzhipub@126.com

1 材料

1.1 仪器

DTC-3T型聚合酶链反应(PCR)仪(上海启前电子科技有限公司);X-1型离心机(美国Beckman公司);BX31型光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

更昔洛韦片(山东罗欣药业股份有限公司,批号:140102,规格:0.5 g/片);养阴清肺汤(长治市第二人民医院中药房,批号:20141010,规格:500 ml/瓶);DNA提取试剂盒(美国Sigma公司);IFN- γ 和IL-6酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物与细胞

SPF级6周龄BALB/C小鼠58只,♀,体质量(76 \pm 14)g,购于中国科学院上海动物中心(动物使用合格证号:D20021024)。MCMV、小鼠胚胎成纤维细胞购于中国医学科学院基础研究所。

2 方法

2.1 模型的复制

在无菌操作下,将MCMV注入小鼠胚胎成纤维细胞中,置于适宜环境中培养;根据病毒致细胞病变效应终点稀释的方法,在培养24~48 h内病毒致细胞病变效应终点达到“3+~4+”的病毒悬液滴定达半数组织感染量。ip给予小鼠0.8 ml MCMV细胞以复制小鼠MCMV肺炎模型。

2.2 分组与给药

实验分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、更昔洛韦(60 mg/kg)组与养阴清肺汤高、中、低剂量[98.64、49.32、24.66 g(生药)/kg]组,ig给药,每天2次,连续3周。更昔洛韦成人口服日用量约0.5 g,养阴清肺汤成人口服日用量为5.48 g(生药)/kg,按体表面积计算法和不同给药途径的剂量换算,选择更昔洛韦60 mg/kg,养阴清肺汤98.64、49.32、24.66 g(生药)/kg为小鼠ig剂量。

2.3 各组小鼠肺组织病理学观察

末次给药1 h后处死小鼠,切取小鼠右肺组织,浸泡于10%中性福尔马林溶液中,固定24 h。经常规脱水、包埋、切片、HE染色,光镜下观察,每张切片选取3个视野,观察小鼠肺组织病理学改变。

2.4 各组小鼠肺组织中MCMV-DNA病毒量的测定

取小鼠右肺组织剪碎、研磨,置于0.2%胶原酶中消化,采用D-Hanks液清洗,于4℃水中冰浴30 min,以离心半径为13.5 cm、1 200 r/min离心8 min,制备成单细胞沉淀,根据DNA试剂盒说明提取小鼠右肺组织中MCMV-DNA。目的基因上游引物序列:5'-ACTCGTAAGGTTTCGTCA-3',下游引物序列:5'-CTCGTAAATAAATGGGACTT-3'。内参基因上游引物序列:5'-CCACAGTCCATGCCATCACT-3',下游引物序列:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'。经过PCR反应条件的优化,PCR循环条件为:94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,共35个循环,最后72℃延伸5 min。以表达量来代表MCMV-DNA病毒量。

2.5 各组小鼠肺组织中IFN- γ 和IL-6表达的测定

将小鼠右肺组织剪碎研磨后,置于0.2%胶原酶中消化,采用D-Hanks液清洗,常规离心,取上清液,按照ELISA试剂盒说明书测定小鼠右肺组织中IFN- γ 和IL-6的表达。

2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0软件处理实验数据。各组数据均为计量资料,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验进行分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠肺组织病理形态学观察结果

光镜下,模型组小鼠肺组织呈间质性肺炎的表现,肺泡壁及细支气管周围肺间质内有大量炎性细胞(单核细胞为主)浸润,肺泡壁有增宽,部分肺泡腔内有蛋白渗出。养阴清肺汤高、中、低剂量组小鼠肺间质单核细胞数减少,支气管壁与支气管周围有少量单核细胞出现浸润现象,但程度减轻。各组小鼠肺组织病理形态学观察结果见图1。

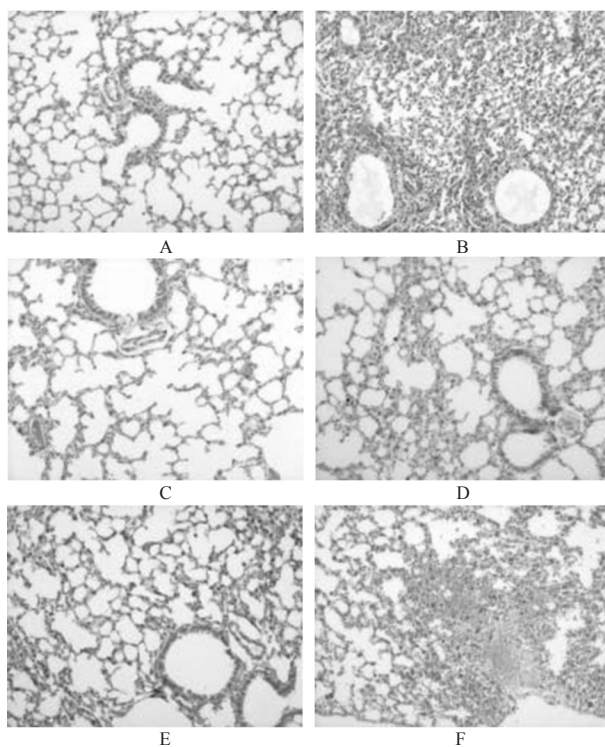


图1 各组小鼠肺组织病理形态学观察结果(HE染色,×200)

A.正常对照组;B.模型组;C.养阴清肺汤低剂量组;D.养阴清肺汤中剂量组;E.养阴清肺汤高剂量组;F.更昔洛韦组

Fig 1 Pathomorphological observations of the lung tissues of all groups(HE stain, ×200)

A. normal control group; B. model group; C. Yangyin qingfei decoction low dose group; D. Yangyin qingfei decoction medium dose group; E. Yangyin qingfei decoction high dose group; F. ganciclovir group

3.2 各组小鼠肺组织中MCMV-DNA病毒量的测定结果

与正常对照组比较,模型组小鼠肺组织中MCMV-DNA病毒量增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,养阴清肺汤高、中剂量组小鼠肺组织中MCMV-DNA病毒量减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。各组小鼠肺组织中MCMV-DNA病毒量的测定结果见表1(表中 Δc 表示目的基因与内参

基因表达差值)。

表1 各组小鼠肺组织中MCMV-DNA病毒量的测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Determination results of the amount of MCMV-DNA virus in the lung tissues of all groups($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MCMV-DNA病毒量(Δc)
正常对照组	10	0.241 ± 0.072
模型组	8	0.330 ± 0.046*
养阴清肺汤低剂量组	8	0.167 ± 0.038 [#]
养阴清肺汤中剂量组	8	0.232 ± 0.038 [#]
养阴清肺汤高剂量组	8	0.242 ± 0.043 [#]
更昔洛韦组	8	0.200 ± 0.029 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

3.3 各组小鼠肺组织中INF- γ 和IL-6表达的测定结果

与正常对照组比较,模型组小鼠肺组织中INF- γ 表达减弱,IL-6表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,养阴清肺汤高、中、低剂量组小鼠肺组织中INF- γ 表达增强,IL-6表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠肺组织中INF- γ 和IL-6表达的测定结果见表2。

表2 各组小鼠肺组织中INF- γ 和IL-6表达的测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Determination results of the expressions of INF- γ and IL-6 in the lung tissues of all groups($\bar{x} \pm s$)

组别	n	INF- γ	IL-6
正常对照组	10	2 265.75 ± 149.65	587.64 ± 158.61
模型组	8	1 258.84 ± 126.41*	1 875.36 ± 269.58*
养阴清肺汤低剂量组	8	1 460.73 ± 99.24 [#]	1 692.83 ± 234.08 [#]
养阴清肺汤中剂量组	8	2 369.64 ± 135.54 [#]	986.37 ± 189.64 [#]
养阴清肺汤高剂量组	8	2 403.16 ± 120.18 [#]	1 002.18 ± 205.37 [#]
更昔洛韦组	8	1 983.78 ± 126.47 [#]	1 269.38 ± 253.44 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

4 讨论

MCMV是免疫力低下患者发生机会性感染的常见病原体,其可使肺组织充血、渗出甚至纤维化,是导致院内感染的重要原因,同时也容易并发真菌感染,增加临床疾病治疗难度和死亡率^[6]。更昔洛韦是治疗病毒性肺炎的标准用药,但其只具有抗病毒的作用,无法发挥增强患者免疫水平的作用。对免疫功能缺失的患者,单独使用抗病毒药物很难有效地控制病毒性肺炎,因此调节机体免疫水平是治疗病毒性肺炎的关键^[7]。

中医中药在治疗MCMV肺炎时,是从根本原因入手,整体调节,促进机体阴阳趋于平衡,使机体自身发挥抗病毒的作用;但中医中药起效迟缓,疗程较长^[8]。本研究中,养阴清肺汤组小鼠肺组织中MCMV-DNA病毒量较模型组明显减少,且中剂量组与高剂量组比较无明显差异,提示使用原方剂量效果较好。研究表明,无论感染MCMV的时间长短,都会诱导炎症反应,导致肺组织间质性炎症的发生,而IL-6是重要的促炎因子,在机体感染MCMV后发生炎症改变的过程中起着重要的作用^[9];另有相关研究证明,INF- γ 具有直接抗MCMV并抑制促

炎因子分泌的双重作用。因此,本研究中模型组小鼠肺组织中IL-6处于高水平,而INF- γ 处于低水平,ig给予养阴清肺汤后二者水平发生逆转^[10]。MCMV感染主要是使机体细胞免疫发生改变,导致Th₁/Th₂发生失衡,使病毒成功逃避机体细胞免疫的作用而侵袭肺组织,在肺组织中繁殖、生长从而促使肺组织发生一系列的病理变化^[11]。

综上所述,养阴清肺汤能够明显提高MCMV肺炎模型小鼠肺组织中INF- γ 水平,降低IL-6水平,并能有效地抑制MCMV在肺内的复制增殖,这可能是养阴清肺汤能够有效地调节细胞免疫恢复机体细胞免疫的平衡、防止复感其他病原体的机制。

参考文献

- [1] 左丽娜,陈玉玲,张文辉,等.热毒宁注射液抑制肺内鼠巨细胞病毒的复制增殖并下调INF- γ 及IL-6的表达[J].细胞与分子免疫学杂志,2013,29(12):1 242.
- [2] 孙亚娇,许家玲,夏荣耀,等.成人病毒性社区获得性肺炎患者外周血TLR2/3/9的表达及临床意义[J].哈尔滨医科大学学报,2014,48(6):493.
- [3] 王成祥,曹鸿云,程森,等.黄芩、板蓝根等清热解毒药对流感病毒所致肺炎小鼠炎性因子蛋白表达的影响[J].中华实验和临床病毒学杂志,2012,26(6):415.
- [4] 邹映雪,杨瑄,马翠安,等.IL-18及Th1细胞因子与儿童肺炎支原体肺炎的关系[J].天津医药,2007,35(12):906.
- [5] 李积军.养阴清肺汤配合西药防治呼吸机相关肺炎疗效观察[J].陕西中医,2012,33(4):402.
- [6] 穆亚平,李娜,刘立旻,等.儿童肺炎支原体肺炎血清细胞因子变化及临床意义[J].中国小儿急救医学,2011,18(6):504.
- [7] 孙晓凤,多力坤·木扎帕尔.肺炎合剂对细菌性肺炎患儿血清PCT、hs-CRP、WBC变化的影响[J].中国药房,2014,25(15):1 416.
- [8] Trilling M, Le VT, Rashidi-Alavijeh J, et al. "Activated" STAT proteins: a paradoxical consequence of inhibited JAK-STAT signaling in cytomegalovirus-infected cells[J]. *J Immunol*, 2014, 192(1):447.
- [9] Tang Feldman YJ, Lochhead GR, Lochhead SR, et al. Interleukin-10 repletion suppresses pro-inflammatory cytokines and decreases liver pathology without altering viral replication in murine cytomegalovirus (MCMV)-infected IL-10 knockout mice[J]. *Inflamm Res*, 2011, 60(3):233.
- [10] Miyake T, Satoh T, Kato H, et al. I κ B ζ is essential for natural killer cell activation in response to IL-12 and IL-18[J]. *Pro Nati Acad Sci USA*, 2010, 107(41):17 680.
- [11] Cheeran MC, Hu S, Palmquist JM, et al. Dysregulated interferon-gamma responses during lethal cytomegalovirus brain infection of IL-10-deficient mice[J]. *Virus Res*, 2007, 130(1/2):96.

(收稿日期:2015-02-12 修回日期:2015-03-19)

(编辑:张 静)