

发应用虫草提供依据。

参 考 文 献

- [1] 李凤荣. 冬虫夏草的化学成分及药理学研究概况[J]. 内蒙古中医药, 2010, 29(17): 102-105.
- [2] 吴建良, 刘成海. 冬虫夏草对肝纤维化的作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2001, 11(6): 382-384.
- [3] 朱家漩, 王宝恩, 王泰龄. 冬虫夏草对实验性免疫损伤肝纤维化的预防和治疗作用[J]. 中华消化杂志, 1994, 14(6): 333-336.
- [4] 吴建良, 薛惠明, 刘成海, 等. 冬虫夏草对肝纤维化小鼠白细胞介素 4 与 Y. 干扰素表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 6(24): 106-109.
- [5] 陶金华, 狄留庆, 文红梅, 等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(17): 31-34.
- [6] Wei Junkong, Yan Lingzhao, Li Meishan, et al. Investigation on the spectrum-effect relationships of EtOAc extract from Radix Isatidis based on HPLC fingerprints and microcalorimetry[J]. Journal of Chromatography B, 2008, 871(1): 109-144.
- [7] 王瑞华. 人工蛹虫草质量标准及指纹图谱研究[D]. 华中科技大学, 2008.
- [8] 王春云. 冬虫夏草等中药材的指纹图谱研究[D]. 河北大学, 2009.
- [9] 徐宏平, 何航. 水飞蓟宾对人肝星状细胞 LX-2 凋亡及 $\alpha 1(1)$ 胶原 mRNA 表达的影响[J]. 郑州大学学报, 2009, 44(3): 597-599.
- [10] Li J, Liu P, Zhang R, et al. Icaritin induces cell death in activated hepatic stellate cells through mitochondrial activated apoptosis and ameliorates the development of liver fibrosis in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1): 714-723.
- [11] bechmann LP, Zahn D, Gieseler RK, et al. Resveratrol amplifies profibrogenic effects of free fatty acids on human hepatic stellate cells[J]. Hepatol Res, 2009, 39(6): 601-608.

(收稿日期: 2013-08-29)

(本文编辑: 蒲晓田)

RT-PCR 法分析两种解表法中药对 FM₁ 感染小鼠肺中炎性细胞因子的影响

徐红日 王成祥 王兰 王惠芳 张靖 殷人易 姜良铎 周平安

【摘要】 目的 动态观察益气清瘟解毒剂所含辛温解表法和辛凉解表法中药对流感病毒亚洲甲型鼠肺适应株(FM₁)感染小鼠肺中炎性细胞因子表达的影响, 探讨上述两种解表法抗流感免疫炎性损伤及其修复方面的作用机制。**方法** 建立 FM₁ 感染小鼠模型, 将小鼠随机分为 4 组, 分别为正常空白组、病毒感染模型组、辛温解表法组(炙麻黄 6 g、羌活 12 g、紫苏叶 10 g)、辛凉解表法组(柴胡 10 g、金银花 10 g、薄荷 6 g), 各组按病毒感染后第 1、3、5、7 天不同时相各分为 4 个小组, 每小组 8 只小鼠。采用反转录酶-聚合酶链式反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)法, 在流感病毒感染后不同时相, 动态观察辛温、辛凉解表法中药对小鼠肺中 TNF- α 、IL-6、IL-1、IL-10、IFN- γ 5 种炎性细胞因子 RNA 表达的影响。**结果** (1) 辛温解表法中药在 FM₁ 感染小鼠后 1~5 天显著降低肺组织中 TNF- α 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后 3~5 天显著降低肺组织中 IL-1 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后第 1 天及第 7 天显著降低肺组织中 IL-6 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后第 3 天及第 7 天, 显著增加肺组织中抗炎性细胞因子 IL-10 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后 1~3 天显著增加抗病毒因子 IFN- γ 的 RNA 表达。(2) 辛凉解表法中药在 FM₁ 感染小鼠后 3~5 天显著降低肺组织中 TNF- α 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后第 7 天显著降低肺组织中 IL-1 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后

基金项目: 国家自然科学基金(30873254)

作者单位: 100700 北京中医药大学东直门医院急诊科(徐红日、王兰), 内科(王成祥、姜良铎); 中国人民解放军防化研究院(王惠芳、张靖); 武汉市第一医院呼吸科(殷人易); 北京中医药大学东方医院内科(周平安)。

作者简介: 徐红日(1976-), 博士, 副主任医师。中华中医药学会急诊分会、肺系病分会会员, 世界中医药学会联合会内科分会会员。研究方向: 中医药防治呼吸系统感染性疾病的临床与实验研究。E-mail: soohongil@sina.com

通讯作者: 王成祥(1963-), 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。中华中医药学会肺系病分会副主任委员。研究方向: 中医药防治呼吸系统感染性疾病的研究。E-mail: wang601@vip.sina.com

1~7 天显著降低肺组织中 IL-6 的 RNA 表达,在 FM₁ 感染后第 3 天及第 7 天,显著增加肺组织中抗炎细胞因子 IL-10 的 RNA 表达,在 FM₁ 感染后 1~3 天显著增加抗病毒因子 IFN- γ 的 RNA 表达。在 FM₁ 感染后第 3 天辛凉解表法中药可能增加肺组织中 IL-1 的 RNA 表达。**结论** 中药可能通过纠正炎性细胞因子的失衡抑制机体的炎性损伤,并促进损伤的修复,对靶器官具有免疫保护作用。

【关键词】 反转录酶—聚合酶链式反应; 解表法中药; 流感病毒亚洲甲型鼠肺适应株(FM₁); 小鼠; 炎性细胞因子

【中图分类号】 R285.5 【文献标识码】 A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.11.002

Influence of the lung inflammatory cytokines in model rats infected with influenza virus FM1 by treating with two kinds of Chinese medicine compounds for relieving exterior syndromes through RT-PCR method XU Hong-ri, WANG Cheng-xiang, WANG Lan, et al. Department of ,Emergency, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding author: WANG Cheng-xiang, E-mail: wang 601@vip. sina. com

【Abstract】 **Objective** To observe the influence of the lung inflammatory cytokines expression in model rats infected with influenza virus FM1 by treating with two kinds of Chinese medicine compounds for relieving exterior syndromes (Including relieving exterior with warm-pungent herbs and cold-pungent herbs in Chinese medicine theories). To discuss the inflammation damage and repairing mechanism of these two compounds. **Methods** Model rats infected with influenza virus FM₁ were divided into blank group, model control group, warm-pungent herbs group (consists of *Ephedra*, *Notopterygium* and *Purple Perilla*) and cold-pungent herb group (consists of *Radix Bupleuri*, *Honeysuckle* and *Mentha Haplocalyx*) at random. Each group was divided by the different stages of infection in 1, 3, 5 and 7 day (8 for each). Then observe the influence of TNF- α , IL-6, IL-1, IL-10 and IFN- γ in model rats lungs in each group. **Results** The RNA expression in model rat lungs of TNF- α in 1~5 day levels, IL-1 in 3~5 day levels and IL-6 in 1, 7 day levels were significantly reduced in warm-pungent herb group, while the expression of IL-10 in 3, 7 day levels and IFN- γ in 1~3 day levels were significantly increased. In cold-pungent herb group, the expression of TNF- α in 3~5 day levels, IL-1 in 7 day level and IL-6 in 1~7 day levels were significantly reduced, while the expression of IL-10 in 3, 7 day levels and IFN- γ in 1~3 day levels were significantly increased, but the expression of IL-1 in 3 day level was significantly increased. **Conclusion** Diaphoresis Chinese medicine compounds for relieving exterior syndromes based on those two relieving exterior methods might be able to decrease inflammatory damages and enhance the recovery of injured by correcting inflammatory cytokine imbalance.

【Key words】 RT-PCR; Diaphoresis Chinese medicine compound for relieving exterior syndromes; FM₁; Model rats; Inflammatory cytokines

流感病毒可致重症病毒性肺炎,可进而引起呼吸衰竭而导致死亡。2013 年 2 月以来,中国陆续出现人感染禽流感病毒 H7N9 的重症患者,且为世界首次报道。虽然早期使用神经氨酸酶抑制剂可能有效,但尚缺乏对该病毒特性的了解,且目前尚无相对应的疫苗,故其防治非常棘手。在这种情况下,发挥中医药的优势与特色,防治流感病毒所致的病毒性肺炎,提高临床疗效,降低重症病例数,具有重要的意义。

研究表明,流感病毒引起的肺损伤,主要是由免疫细胞分泌的炎性细胞因子所介导的一种免疫炎症损伤。机体发生流感病毒所致的致炎反应的同时亦可产生抗炎反应。细胞因子肿瘤坏死因子- α

(TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)及干扰素- γ (IFN- γ)与调节和介导免疫炎症反应密切相关^[1]。上述细胞因子在流感病毒所致的病毒性肺炎的发生与演变中起着重要的作用,其含量与疾病严重程度相关;IL-1、TNF- α 等促炎性细胞因子的表达越增多,其病情越危重^[2]。

辛温解表、辛凉解表法是中医药辨治外感热病时采用的最重要的两种解表法则。本实验中所采用的辛温解表法与辛凉解表法所选用的药物为北京中医药大学东直门医院治疗流行性感冒的临床效方益气清瘟解毒合剂所含有的两种解表法中药。在前期的临床研究发现该方治疗北方地区流行性感冒表寒里热证退热效果显著,并具有较高的治

愈率,可能与降低流感患者血清中促炎性细胞因子 TNF- α 的过度释放有关^[3]。已完成的实验研究还发现,该方能明显降低 FM₁ 感染小鼠肺中促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-6 的过度表达,而显著增加肺中抗炎性细胞因子 IL-10 的表达,能够抑制肺组织的病理损伤,促进损伤的修复^[1]。为进一步探讨该方中的上述两种解表法中药在治疗流行性感冒时的作用机理以及确定该方的最佳治疗时机,设计了本实验研究,现将实验结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与药物

焦碳酸二乙酯(DEPC), TRIzol, Taq DNA Polymerase、氯仿、异丙醇、乙醇、反转录试剂盒、琼脂糖、溴化乙锭,100 bp DNA Ladder。

两种解表法的中药(辛温解表法由炙麻黄 6 g、羌活 12 g、紫苏叶 10 g 组成;辛凉解表法由柴胡 12 g、金银花 10 g、薄荷 6 g 组成)由江苏天江药业有限公司提供,采用免煎颗粒剂,用去离子水配成混悬液备用。

1.2 病毒

流感病毒亚洲甲型鼠肺适应株 FM₁,由中国疾病预防控制中心病毒研究所流感室提供,鸡胚传代后,血凝滴度为 1:1280, -70℃ 冻存备用。

1.3 动物

BALB/cAnN 小白鼠,清洁级,雄性,体重 18~23 g,共 128 只,购自中国医学科学院动物所。合格证号 SCXK(京)2004-0001。

1.4 仪器与设备

玻璃匀浆器、离心管、振荡器、剪子、镊子等。PCR 仪, Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, 产自 Singapore; 凝胶成像系统, Gel Doc 2000, Bio-Rad 公司; 紫外透射仪, TFX, 法国 Vilber Lourmat 公司; 纯水仪: MilliQ。

1.5 感染方法与给药

将小鼠随机分为 4 组,分别为正常空白组、病毒感染模型组、辛温解表组、辛凉解表组,各组按病毒感染后第 1、3、5、7 天不同时相各分为 4 个小组,每小组 8 只小鼠。

用乙醚轻度麻醉小鼠后,正常空白组以生理盐水滴鼻,每只 25 μ l。其余各组以 25 μ l FM₁ 株病毒液滴鼻,感染量为 1LD₅₀。

小鼠感染 FM₁ 半小时后给药。每次给药前均

称小鼠体重,根据小鼠体重确定用药剂量,用药剂量相当于成人临床用药剂量,辛温、辛凉解表组各为 3.64 g/(kg·d),正常空白组与病毒感染模型组灌等量生理盐水,每日灌胃 1 次。

1.6 肺组织 RNA 提取

以提取 TNF- α 的 RNA 为例。其他细胞因子的 RNA 提取同 TNF- α 。

1.6.1 肺组织提取 分别于感染后第 1、3、5、7 天摘眼球放血处死小鼠,留取各小组小鼠新鲜肺组织 50~100 mg,放入无 RNA 酶的离心管中,用液氮迅速冷冻后,放入 -70℃ 冻存备用。

1.6.2 组织匀浆 (1) 匀浆:取出 -70℃ 冻存的肺组织,按 50 mg 组织加入 1 ml TRIzol 试剂进行匀浆。组织匀浆后,通过 2~8℃ 下 11000 rpm,离心 10 分钟,去除一些不溶性物质,沉淀中包括细胞膜、多聚糖和高分子量的 DNA,上清部分含 RNA。将上清匀浆液移入无 RNA 酶的离心管中。(2) 分离:30℃ 孵育已匀浆的样品 5~15 分钟,使核酸与蛋白质完全分离,每管中加入 0.2 ml 的氯仿。安全地盖好样品管的盖子,用力摇动离心管 15 秒,并在 30℃ 放置 2~3 分钟,2~8℃ 下 11000 转/分,离心 15 分钟。(3) 沉淀:取无色透明的上层水相移入新的离心管中,加入 0.5 ml 的异丙醇 30℃ 孵育 10 分钟,形成 RNA 沉淀,2~8℃ 下 11000 rpm,离心 10 分钟,将沉淀聚集到管底。(4) 清洗:去除上清,用 1 ml 75% 乙醇洗 RNA 沉淀物。(5) 溶解:干燥 RNA 沉淀用无 RNA 酶水溶解(40 μ l/50 mg 组织), -70℃ 冻存备用。

1.7 反转录酶—聚合酶链式反应(RT-PCR)

以 TNF- α 的 RNA 扩增为例。

1.7.1 引物合成 设计长度约 15~20 bp 5 种炎性细胞因子的引物,具体如下。

TNF- α : 上游: 5'-CTC ATG CAC CAC CAT CAA GGA-3'; 下游: 5'-ACC CCG GCC TTC CAA ATA A-3'。IL-6: 上游: 5'-TGC CAA GCC TTA TCG GAA AT-3'; 下游: 5'-TTT TCC AAG GAG TTG TTT CCG TTA-3'。IL-1 β : 上游: 5'-TGG GCT GTC CTG ATG AG-3'; 下游: 5'-AAG GTC CAC GGG GAA AGA CA-3'。IFN- γ : 上游: 5'-CCA TCG GCT GAC CTA GAG AAG A-3'; 下游: 5'-CGT GGC ACT AAC AGC CAG AAA-3'。IL-10: 上游: 5'-CCA GTA CAG CCG GGA AGA CA-3'; 下游: 5'-ATG GCC TTG TAG ACA CCT TGG T-3'。

1.7.2 片断的大小 TNF- α (293 bp); IL-6 (427 bp); IL-1 β (143 bp); IFN- γ (170 bp); IL-10 (558 bp)。

1.7.3 PCR 反应 参见 PCR 实验手册。

其他细胞因子的 RNA 扩增同 TNF- α 。

1.8 琼脂糖凝胶电泳与成像

使用 TAE 缓冲液系统, 1% 的琼脂糖凝胶。取 20 μ l PCR 产物进行电泳。使用凝胶成像仪 Gel Doc 2000 对电泳 DNA 的琼脂糖凝胶图进行拍照, 运用 Quantity One 4.2.1 系统的灰度扫描法定量测定凝胶中的 DNA 含量。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件, 组间及组内差异用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 两种解表法中药对小鼠肺组织中 TNF- α 的 RNA 表达水平的影响

FM₁ 感染小鼠后第 1~5 天, 肺组织中促炎性细胞因子 TNF- α 的 RNA 表达显著增加, 第 3 天达峰值。辛温解表组在 FM₁ 感染后第 1~5 天能够显著降低肺组织中 TNF- α 的 RNA 表达。辛凉解表组在 FM₁ 感染后 3~5 天显著降低肺组织中 TNF- α 的 RNA 表达。辛温解表组的作用强于辛凉解表组。见表 1。

2.2 两种解表法中药对小鼠肺组织中 IL-1 的 RNA 表达水平的影响

FM₁ 感染小鼠后第 3~7 天, 肺组织中促炎性细胞因子 IL-1 的 RNA 表达显著增多, 第 5 天达峰值。辛温解表组在 FM₁ 感染后第 3~5 天显著降低肺组织中 IL-1 的 RNA 表达。辛凉解表组在 FM₁ 感染后第 7 天显著降低肺组织中 IL-1 的 RNA 表达, 但在 FM₁ 感染后第 3 天, 肺组织中 IL-1 的 RNA 表达可能高于病毒感染模型组。辛温解表组的作用强于辛凉解表组。见表 2。

2.3 两种解表法中药对小鼠肺组织中 IL-6 的 RNA 表达水平的影响

FM₁ 感染小鼠后各时相, 肺组织中促炎性细胞因子 IL-6 的 RNA 表达显著增多, 第 5 天达峰值。辛温解表组在 FM₁ 感染后第 1 天及第 7 天显著降低肺组织中 IL-6 的 RNA 表达。辛凉解表组在 FM₁ 感染后各时相, 均显著降低肺组织中 IL-6 的 RNA 表达, 此作用强于辛温解表组。见表 3。

2.4 两种解表法中药对小鼠肺组织中 IL-10 的 RNA 表达水平的影响

FM₁ 感染小鼠后第 5~7 天, 肺组织中抗炎性细胞因子 IL-10 的 RNA 表达显著增加, 且呈现逐渐增加的趋势。辛温、辛凉解表组均在 FM₁ 感染后第 3 天及第 7 天, 显著增加肺组织中 IL-10 的

表 1 两种解表法中药对小鼠肺组织中 TNF- α 的 RNA 表达水平的影响

组别	RT-PCR 反应后 DNA 的量 ($\bar{x} \pm s$, ng/ μ l)			
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
正常组	5.58 \pm 0.62 (8)	5.46 \pm 0.78 (8)	5.53 \pm 0.74 (8)	4.80 \pm 0.79 (8)
病毒组	12.18 \pm 1.37 ^c (8)	33.95 \pm 2.66 ^c (8)	8.92 \pm 0.45 ^e (5)	5.61 \pm 0.79 (5)
辛温解表组	10.07 \pm 1.15 ^{ac} (6)	9.24 \pm 1.80 ^{bc} (5)	7.75 \pm 0.91 ^{ac} (5)	5.54 \pm 1.03 (5)
辛凉解表组	10.74 \pm 2.10 ^c (7)	20.85 \pm 2.28 ^{bcd} (7)	7.40 \pm 0.98 ^{ac} (5)	5.27 \pm 0.93 (5)

注: 与病毒组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与正常组比较, ^c $P < 0.01$; 与辛温解表组比较, ^d $P < 0.01$; 表格中括号内的数字为存活动物数 (n)。

表 2 两种解表法中药对小鼠肺组织中 IL-1 的 RNA 表达水平的影响

组别	RT-PCR 反应后 DNA 的量 ($\bar{x} \pm s$, ng/ μ l)			
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
正常组	7.27 \pm 1.30 (8)	7.48 \pm 1.32 (8)	7.80 \pm 1.76 (8)	7.90 \pm 1.51 (8)
病毒组	7.42 \pm 1.28 (8)	15.70 \pm 2.34 ^d (8)	22.27 \pm 2.88 ^d (8)	18.11 \pm 3.80 ^d (5)
辛温解表组	8.59 \pm 1.32 (7)	9.39 \pm 1.46 ^{bc} (5)	15.00 \pm 2.24 ^{bd} (5)	14.34 \pm 2.51 ^d (5)
辛凉解表组	8.49 \pm 1.07 (6)	32.21 \pm 3.59 ^{bde} (7)	21.92 \pm 3.21 ^{de} (5)	12.67 \pm 1.92 ^{ad} (5)

注: 与病毒组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与正常组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与辛温解表组比较, ^e $P < 0.01$; 表格中括号内的数字为存活动物数 (n)。

RNA 表达,其作用类似。见表 4。

2.5 两种解表法中药对小鼠肺组织中 IFN- γ 的 RNA 表达水平的影响

FM₁ 感染小鼠后,肺组织中 IFN- γ 的 RNA 表达可能没有变化。辛温、辛凉解表组均在 FM₁ 感染后第 1~3 天显著增加肺组织中 IFN- γ 的 RNA 表达水平。辛温解表组在 FM₁ 感染后第 3 天,肺组织中 IFN- γ 的 RNA 表达水平显著高于辛凉解表组。见表 5。

3 讨论

流感病毒感染机体后引起的免疫炎症损伤是导致流感病毒性肺炎及其严重并发症的重要环节。当肺组织损伤时,释放大量的炎性细胞因子

TNF- α 、IL-1、IL-6 等,在肺组织炎性损伤的发生中发挥着重要的作用^[4]。TNF- α 、IL-1、IL-6 等促炎性细胞因子的过度释放,可引起炎症“瀑布”效应,导致肺等靶器官的严重损伤^[5]。而 IL-10 在免疫调控过程中起关键作用,即在病原体介导的免疫以及机体损伤产生的免疫过程中起平衡作用^[6-7]。IL-10 具有很强的抗炎及免疫抑制活性,可以抑制上述促炎性细胞因子的过度表达,从而控制炎症反应,减轻病原体或免疫应答对机体本身的炎性损伤^[8]。传统认为因子 IFN- γ 在机体的抗病毒感染中发挥着非常重要的作用。IFN- γ 由 Th1 细胞分泌,主要参与细胞毒和局部炎症相关的免疫应答,能够抑制流感病毒在机体内的复制及扩散,在机体抗胞内病原体感染中作用显著^[9]。

表 3 两种解表法中药对小鼠肺组织中 IL-6 的 RNA 表达水平的影响

组别	RT-PCR 反应后 DNA 的量 ($\bar{x} \pm s$, ng/ μ l)			
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
正常组	1.71 \pm 0.15 (8)	1.77 \pm 0.13 (8)	1.96 \pm 0.32 (8)	1.93 \pm 0.20 (8)
病毒组	2.36 \pm 0.31 ^d (8)	5.42 \pm 1.06 ^d (8)	6.80 \pm 1.21 ^d (8)	4.03 \pm 0.47 ^d (6)
辛温解表组	1.58 \pm 0.18 ^b (7)	5.51 \pm 0.93 ^d (6)	6.19 \pm 1.18 ^d (5)	2.33 \pm 0.29 ^{bc} (5)
辛凉解表组	1.48 \pm 0.19 ^b (7)	3.00 \pm 0.53 ^{bde} (7)	3.60 \pm 0.69 ^{bde} (5)	2.25 \pm 0.27 ^{bc} (5)

注:与病毒组比较,^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$;与正常组比较,^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$;与辛温解表组比较,^e $P < 0.01$;表格中括号内的数字为存活动物数 (n)。

表 4 两种解表法中药对小鼠肺组织中 IL-10 的 RNA 表达水平的影响

组别	RT-PCR 反应后 DNA 的量 ($\bar{x} \pm s$, ng/ μ l)			
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
正常组	7.81 \pm 1.54 (8)	7.45 \pm 1.31 (8)	6.62 \pm 1.17 (8)	6.67 \pm 1.19 (8)
病毒组	6.38 \pm 1.22 (8)	6.24 \pm 1.28 (8)	21.09 \pm 3.85 ^d (8)	27.91 \pm 5.91 ^b (5)
辛温解表组	7.03 \pm 1.36 (7)	30.68 \pm 3.79 ^{ab} (5)	24.11 \pm 4.66 ^b (5)	50.58 \pm 5.48 ^{ab} (5)
辛凉解表组	6.91 \pm 1.38 (7)	29.33 \pm 3.17 ^{ab} (7)	25.17 \pm 5.05 ^b (5)	47.96 \pm 8.46 ^{ab} (5)

注:与病毒组比较,^a $P < 0.01$;与正常组比较,^b $P < 0.01$;表格中括号内的数字为存活动物数 (n)。

表 5 两种解表法中药对小鼠肺组织中 IFN- γ 的 RNA 表达水平的影响

组别	RT-PCR 反应后 DNA 的量 ($\bar{x} \pm s$, ng/ μ l)			
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
正常组	5.76 \pm 0.64 (7)	5.80 \pm 0.84 (7)	5.56 \pm 0.88 (7)	5.10 \pm 0.43 (6)
病毒组	5.03 \pm 0.87 (8)	5.90 \pm 1.17 (8)	5.00 \pm 0.98 (8)	4.13 \pm 1.03 (5)
辛温解表组	6.47 \pm 1.25 ^a (7)	13.80 \pm 1.92 ^{bc} (5)	5.10 \pm 1.25 (5)	5.04 \pm 1.19 (5)
辛凉解表组	6.60 \pm 1.27 ^a (7)	9.60 \pm 1.45 ^{bcd} (7)	5.13 \pm 1.14 (5)	4.90 \pm 0.94 (5)

注:与病毒组比较,^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$;与正常组比较,^c $P < 0.01$;与辛温解表组比较,^d $P < 0.01$;表格中括号内的数字为存活动物数 (n)。

FM₁ 感染小鼠后, 肺组织中促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 的 RNA 表达水平显著增高, 在 FM₁ 感染后第 3~5 天达峰值。说明在这个时相, 肺组织的炎性损伤最严重。肺组织中抗炎性细胞因子 IL-10 的 RNA 表达在 FM₁ 感染后第 5~7 天显著增高。说明在此时相抗炎性细胞因子的表达增高, 有利于抑制促炎性细胞因子的过度分泌。而抗病毒因子 IFN- γ 的 RNA 表达在 FM₁ 感染后各时相均无变化。辛温、辛凉解表法中药各自在 FM₁ 感染小鼠后不同时相显著降低肺组织中 TNF- α 、IL-1、IL-6 的 RNA 表达, 并显著增加抗炎性细胞因子 IL-10 及抗病毒因子 IFN- γ 的 RNA 表达, 对抗免疫炎症损伤, 同时促进损伤的修复。辛温解表法中药特别是在 FM₁ 感染后 3~5 天, 这种对抗炎性损伤的作用最为突出, 有利于保护靶器官。辛凉解表法中药虽在 FM₁ 感染后第 3 天可能增加肺组织中 IL-1 的 RNA 表达, 但同时显著降低 TNF- α 、IL-6 的 RNA 表达, 并增加 IL-10、IFN- γ 的 RNA 表达, 故仍具有一定的对抗免疫炎症损伤的作用。辛温解表法中药的抗炎性损伤的作用在 FM₁ 感染后第 3 天强于辛凉解表法中药。

北京中医药大学东直门医院治疗流行性感冒的临床效方益气清瘟解毒合剂所含有的辛温解表法中药包括炙麻黄、羌活、紫苏叶, 具有辛温散表寒的功效。其中炙麻黄开通毛窍, 阳气达表, 汗液外泄, 使病邪有外达之路。羌活辛温发汗解表, 祛风止痛。紫苏叶外开皮毛而发散风寒, 又可宣利肺气。麻黄与羌活及苏叶伍用, 辛温发汗解表之功增强, 能外散体表之风寒。辛凉解表法中药包括柴胡、金银花、薄荷, 具有辛凉清里热的功效。其中柴胡舒畅气机, 开发阳气, 解表泄热, 消除发热之源。金银花辛凉透热, 清气透邪外出, 防止热毒入里发生传变。薄荷疏风散热, 发汗解表。柴胡与金银花及薄荷相伍, 辛凉透邪外达之功增强, 能清透郁闭之内热。辛温解表法与辛凉解表法同用, 双解表里之邪气, 既能散表寒, 又能清里热, 使过度分泌的促炎性细胞因子等毒邪随汗液透达于外, 增强抗炎性细胞因子与抗病毒因子的作用, 抑制靶器官的免疫炎症病理

损伤, 同时促进靶器官炎性损伤的修复, 因此有利于防止传变, 减少流感重症的发生。

综上所述, 益气清瘟解毒合剂寒温并用, 特别是在流感免疫炎症损伤最严重的 3~5 天, 即急性外感热病极期, 通过调节失衡的免疫炎症细胞因子, 不仅对抗机体的流感免疫炎症损伤, 同时促进炎性损伤的修复, 使机体恢复“阴平阳秘”的状态, 对肺等靶器官具有较强的免疫保护作用。这可能就是该方治疗流感临床疗效显著的微观化机理所在。

参 考 文 献

- [1] 王成祥, 高桂新, 魏守超, 等. 益气清瘟解毒合剂对流感病毒 FM₁ 感染小鼠肺中 IFN- γ , TNF- α , IL-10 及 IL-6 蛋白动态表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30 (7): 541-544.
- [2] Aldridge JR Jr, Moseley CE, Boltz DA, et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106 (31): 5306-5311.
- [3] 徐红日, 刘清泉, 王兰, 等. 益气清瘟解毒颗粒剂治疗流行性感冒的临床疗效评价 [J]. 中国全科医学, 2012, 15 (5a): 1485-1488.
- [4] 张艳丽, 范新生, 李澎涛, 等. 毒热平注射液抗流感病毒肺损伤机制的研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32 (1): 33-35.
- [5] 徐红日, 王成祥, 沈杏生, 等. 清热解毒中药对流感病毒 FM₁ 株感染所致小鼠肺组织病理损伤的影响 [J]. 环球中医药, 2011, 4 (3): 161-167.
- [6] Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, et al. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo [J]. Nat Med, 2006, 12 (11): 1301-1309.
- [7] Ejrnaes M, Filippi CM, Martinic MM, et al. Resolution of a chronic viral infection after Interleukin-10 receptor blockade [J]. J Exp Med, 2006, 203 (11): 2461-2472.
- [8] 郎需龙, 王兴龙. 白细胞介素-10 在感染性疾病中的作用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22 (1): 102-104.
- [9] 刘琪, 顾立刚, 卢娜娜, 等. 疏风宣肺、解表清里方药对流感病毒性肺炎小鼠辅助性 T 细胞 1/2 平衡调节的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (1): 1-4.

(收稿日期: 2013-07-02)

(本文编辑: 秦楠)