

# 补益类复方中药调控流感病毒样颗粒免疫小鼠外周血白细胞介素 17A 的表达水平

林巧 邱勇龙 侯杏芳 郑军 张国良 曾进 刘映霞 聂广

**【摘要】 目的** 探讨补益类复方中药对流感病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)免疫小鼠外周血白细胞介素 17A(interleukin 17A, IL-17A)表达的影响。**方法** 将 42 只 BALB/C 小鼠随机分为 VLPs 组、VLPs+益气方组、VLPs+补血方组、VLPs+滋阴方组、VLPs+壮阳方组、VLPs+霍乱毒素组和 PBS 组共 7 组,每组 6 只,分别于 0 和 14 天通过鼻腔使用 VLPs(10  $\mu$ g/次)进行免疫,联合中药组在第 1 至第 13 天连续灌服中药。中药佐剂按生药量 200 mg/kg 剂量接种。在免疫第 0 天、13 天及 28 天采集外周血并分离血浆和单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),利用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测各组外周血浆 IL-17A 浓度,利用酶联免疫斑点法(enzyme-linked immunospot assay, Elispot)检测 PBMC 中分泌 IL-17A 的细胞数,即斑点形成集落数(spot forming cells, SFCs)。**结果** (1)无论是在免疫应答早期还是后期, VLPs 能有效诱导外周血浆中 IL-17A 的分泌,而联合益气方组血浆中 IL-17A 水平进一步提高( $P<0.05$ );(2) Elispot 技术能有效检测 PBMCs 中分泌 IL-17A 的阳性细胞。与单纯 VLPs 免疫组相比,益气方和滋阴方均能显著增加分泌 IL-17A 的细胞数( $P<0.01$ ),在免疫后 28 天尤为明显。**结论** 益气方、滋阴方可以显著增强流感 VLPs 诱导的 IL-17A 表达水平,益气联合滋阴方有望成为新型流感疫苗佐剂。

**【关键词】** 补益类复方中药; 流感; 病毒样颗粒; 白细胞介素-17A

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.05.008

**Regulating effect of tonic herbal compound in IL-17A expression induced by influenza virus-like particles in peripheral blood of immune mice** LIN Qiao, QIU Yong-long, HOU Xing-fang, et al. Department of outpatient, Shenzhen Bao'an Chronic Diseases Prevent and Cure Hospital, Shenzhen 518126, China

Corresponding author: LIN Qiao, E-mail: qlin021@aliyun.com

**【Abstract】 Objective** To explore the regulating effects of tonic herbal compound on the IL-17A expression induced by influenza virus-like particles in peripheral blood. **Methods** 42 BALB/C mice were divided into 7 groups ( $n=6$  for each group), involving single VLPs group, VLPs combined Yiqi recipe, VLPs combined Buxue recipe, VLPs combined Ziyin recipe, and VLPs combined Zhuangyang recipe group, VLPs combined cholera toxin group was considered as positive control, and PBS only group was considered as blank control. The mice were immunized with 10  $\mu$ g VLPs each time through intranasal administration in day 0 and 14, and herbs were intragastric administration with 200 mg/Kg from first day to day 13. The blood was collected to make serum and PBMCs at pre-immunization and day 13 and day 28 after immunization. The IL-17A level in serum was determined by ELISA, and spot forming cells(SFCs) of IL-17A were determined using Elispot assay. **Results** (1) No matter in the early stage or late stage, influenza VLPs could induce IL-17A expression in serum, especially, Yiqi recipe could increase IL-17A level compared to single VLPs group ( $P<0.01$ ). (2) Elispot technology can effectively detect the secretion of

基金项目:深圳市科技计划(JCYJ20140411141712839)

作者单位:518126 深圳市宝安区慢性病防治院综合门诊(林巧、邱勇龙、郑军、曾进);深圳市第三人民医院肝病研究所(侯杏芳、张国良、刘映霞、聂广)

作者简介:林巧(1978-),硕士,副主任中医师。研究方向:感染病中西医结合诊治研究。E-mail:qlin021@aliyun.com

IL-17A positive cells in PBMCs. The SFCs of IL-17A was much higher in the *Yiqi* recipe and *Ziyin* recipe ( $P < 0.01$ ), especially at day 28 after immunization. **Conclusion** *Yiqi* recipe and *Ziyin* recipe can effectively increase IL-17A expression induced by influenza VLPs, which could be considered as new type adjuvants for influenza vaccine.

**【Key words】** Tonic herbal compound; Influenza; Virus-like Particles; IL-17A

由于流感病毒通过抗原漂移和抗原转变的形式产生免疫逃逸<sup>[1]</sup>,目前临床上应用的流感疫苗并不能满足多种亚型流感病毒,因此增强疫苗免疫原性、寻找安全高效的疫苗佐剂成为当今研究热点。白细胞介素 17A(interleukin 17A, IL-17A)是主要由辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)细胞分泌的具有多种生物学效应的细胞因子,可以诱导机体产生多种细胞因子、趋化因子、炎症效应物质和抗微生物蛋白,在天然免疫和宿主防御中发挥重要作用。研究证实 IL-17 信号通路缺失的小鼠对利什曼原虫感染更为易感<sup>[2]</sup>,同时 A 型流感病毒可以抑制 Th17 细胞介导的宿主抗细菌免疫应答<sup>[3]</sup>。

既往研究表明多种中草药具有多方面的免疫活性,能影响和调节机体的免疫功能,尤其是补益类中药<sup>[4]</sup>。前期实验中课题组也发现补益类复方中药能够增强流感病毒样颗粒(virus like particles, VLPs)疫苗免疫原性,但其对免疫小鼠 IL-17A 应答水平的影响尚不清楚。为此本研究检测不同中药联合 VLPs 免疫方案诱导小鼠产生特异性 IL-17A 分泌水平的差异,进一步明确补益类中药作为佐剂发挥免疫调节作用的分子机制,为临床应用补益类复方中药佐剂奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

BALB/C 小鼠购自广东省医学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(粤)2014-0035,共 42 只,雌性,6~8 周龄,体质量( $20.5 \pm 2.3$ )g,饲养于深圳市第三人民医院 SPF 级动物实验室。

### 1.2 试验药物

本研究分别以益气、养血、滋阴、壮阳为组方原则,制备不同种类补益类复方中药,其中益气方由党参 20 g、黄芪 10 g、茯苓 10 g 组成;养血方由当归 15 g、白芍 15 g、制首乌 10 g 组成;滋阴方由麦冬 15 g、枸杞 15 g、石斛 10 g 组成;壮阳方由淫羊藿 15 g、补骨脂 10 g、怀牛膝 10 g 组成(以上中药量均为生药量)。中药免煎颗粒剂购自广东一方制药有限公司,生产批号:140813,1 g/袋,分别相当于生药量

为:党参 10 g、黄芪 10 g、茯苓 10 g、当归 10 g、白芍 10 g、制首乌 5 g、麦冬 10 g、枸杞 10 g、石斛 10 g、淫羊藿 5 g、补骨脂 5 g、怀牛膝 10 g。以霍乱毒素(cholera toxin, CT)作为黏膜佐剂阳性对照, PBS 作为空白对照组灌服试剂。

### 1.3 试剂与仪器

小鼠淋巴细胞分离液(DKW33-R0100)购自深圳达科为生物公司;DMEM(12491-015)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 10437-028)均购自美国 Gibco 公司;IL-17A 酶联免疫检测试剂盒(M1700)购自美国 R&D 公司;IL-17A 单克隆包被抗体(sc-374218)、生物素标记二抗(sc-7927)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(sc-2004)均购自美国 Santa Cruz 公司;流感 VLPs 疫苗由课题组前期自行制备<sup>[5]</sup>,多功能酶标仪和 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱为美国 Thermo Fisher 公司产品;Elispot 读数系统购自德国 AID 公司。

### 1.4 模型制备和观察指标

1.4.1 免疫方案制定及血浆、外周血单核细胞的制备 应用随机数字表法将 42 只小鼠分为 VLPs 组、VLPs+益气方组、VLPs+养血方组、VLPs+滋阴方组、VLPs+壮阳方组、VLPs+霍乱毒素组和 PBS 组 7 组,每组 6 只。于第 0 和 14 天通过鼻腔以 10  $\mu$ g/次剂量进行流感 VLPs 免疫。在第 1 天至第 13 天, VLPs+益气方组、VLPs+养血方组、VLPs+滋阴方组、VLPs+壮阳方组每天通过灌胃的方式分别灌入益气方、补血方、滋阴方及壮阳方,中药按生药量 200 mg/kg 剂量接种,灌胃体积按 0.2 mL/10g 体重计算,霍乱毒素按 1  $\mu$ g/次接种。分别于 0 天(免疫前)、13 天(最后一次服用中药)及 28 天采集各组小鼠外周肝素锂抗凝血<sup>[6]</sup>,离心获得血浆, -80℃ 保存, 剩余细胞采用密度梯度离心法分离外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 冻存于液氮中备用。

1.4.2 利用 ELISA 检测血浆中 IL-17A 水平 根据 IL-17A ELISA 试剂盒说明书,首先向酶标板中加入 100  $\mu$ L Assay Diluent 活化抗体,之后加入 100  $\mu$ L 血清室温孵育 3 小时, PBST 洗涤 3 次后,加入 200  $\mu$ L

酶标二抗室温孵育 1 小时, PBST 洗涤 3 次后加入 200  $\mu$ L 底物进行显色, 然后使用多功能酶标仪测定 450 nm 吸光度。最后根据标准曲线将样品 OD 值换算为蛋白浓度。

1.4.3 利用 Elispot 检测 PBMCs 中分泌 IL-17A 的细胞数 使用包被缓冲液将抗鼠 IL-17A 特异性单克隆抗体稀释为 3  $\mu$ g/mL, 向 96 孔板中加入 100  $\mu$ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜。将各组免疫小鼠 PBMCs 按  $1.0 \times 10^5$ /孔铺板, 同时加入终浓度为 2  $\mu$ g/mL 的 VLPs 进行刺激, 37 $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 36 小时, PBST 洗涤 3 次, 随后加入生物素标记的二抗和辣根过氧化物酶标记的亲合素, 底物显色后根据形成的斑点数判断细胞因子表达水平的高低。待显色洗板后, 在 Elispot 读数系统自动读数, 并记录斑点形成集落数。

## 1.5 统计学处理

数据统计和图表制作均由 GraphPad 5.0 软件完成。计量资料使用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组计量资料数据首先进行正态分布和齐性检验, 若符合要求则采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行两两比较。若不满足上述条件则采用非参数检验(秩和检验)方法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 补益类复方中药对 VLPs 免疫小鼠血浆中 IL-17A 表达水平的影响

免疫后第 13 天, VLPs 及 VLPs 联合中药均能诱导小鼠外周血浆中 IL-17A 表达, 其中益气方组 IL-17A 浓度为  $(59.8 \pm 9.0)$  ng/mL, 表达水平最高, 与单纯 VLPs 组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。免疫后第 28 天, VLPs 及 VLPs 联合中药组 IL-17A 表达水平进一步提高, 仍以益气方组升高最为明显, 高达  $(75.3 \pm 8.4)$  ng/mL, 显著高于单纯 VLPs 组( $P < 0.01$ )。无论是在免疫早期还是免疫后期, 其他联合中药组与单纯 VLPs 组差异无统计学意义, 结果见表 1。

### 2.2 补益类复方中药对 VLPs 免疫小鼠 PBMCs 中分泌 IL-17A 细胞数的影响

由于外周血浆中 IL-17A 水平较低, 而 Elispot 技术是检测 PBMCs 中分泌 IL-17A 的细胞数, 其斑点代表 IL-17A 阳性细胞数, 与 ELISA 技术相比, 敏感性、特异性更佳。如图 1 所示, 不同免疫方案的 PBMCs 中 IL-17A 斑点形成集落数存在显著差异。

通过统计分析, 发现在免疫后第 13 天和第 28

天, 益气方组和滋阴方组均能显著提高 IL-17A 斑点形成集落数, 与单纯 VLPs 组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。而养血方和壮阳方对 IL-17A 斑点形成集落数影响不显著, 差异无统计学意义, 结果见表 2。

表 1 不同免疫方式的 BALB/C 小鼠在不同时间点外周血浆中 IL-17A 浓度( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL,  $n=6$ )

组别	n	采血时间		
		第 0 天(免疫前)	第 13 天	第 28 天
VLPs	6	12.6 $\pm$ 3.3	46.5 $\pm$ 5.6	60.7 $\pm$ 3.2
VLPs+益气方	6	11.1 $\pm$ 3.8	59.8 $\pm$ 9.0 <sup>a</sup>	75.3 $\pm$ 8.4 <sup>b</sup>
VLPs+补血方	6	12.7 $\pm$ 4.2	50.7 $\pm$ 6.2	63.5 $\pm$ 6.9
VLPs+滋阴方	6	12.7 $\pm$ 3.4	46.8 $\pm$ 6.6	64.4 $\pm$ 6.5
VLPs+壮阳方	6	12.2 $\pm$ 3.3	49.2 $\pm$ 5.9	61.9 $\pm$ 6.3
VLPs+霍乱毒素	6	12.4 $\pm$ 4.4	51.2 $\pm$ 6.4	59.0 $\pm$ 8.0
PBS	6	11.1 $\pm$ 2.6	13.0 $\pm$ 3.4	13.0 $\pm$ 3.2

注: 与 VLPs 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

表 2 不同免疫方式的 BALB/C 小鼠在不同时间点 PBMCs 中 IL-17A 斑点形成集落数( $\bar{x} \pm s$ , 斑点数/ $10^5$  细胞)

组别	n	采血时间		
		第 0 天(免疫前)	第 13 天	第 28 天
VLPs	6	9.5 $\pm$ 4.0	48.8 $\pm$ 5.3	70.5 $\pm$ 3.3
VLPs+益气方	6	9.5 $\pm$ 3.2	64.1 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>	93.8 $\pm$ 9.0 <sup>a</sup>
VLPs+补血方	6	10.5 $\pm$ 5.0	54.6 $\pm$ 3.9	71.5 $\pm$ 11.1
VLPs+滋阴方	6	9.8 $\pm$ 3.5	61.5 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup>	95.5 $\pm$ 10.0 <sup>a</sup>
VLPs+壮阳方	6	10.1 $\pm$ 1.9	52.1 $\pm$ 4.9	72.3 $\pm$ 4.0
VLPs+霍乱毒素	6	10.5 $\pm$ 4.0	61.3 $\pm$ 5.9	100.0 $\pm$ 6.5
PBS	6	9.6 $\pm$ 4.2	11.1 $\pm$ 2.8	16.7 $\pm$ 11.8

注: 与 VLPs 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

IL-17 主要是由 Th17 细胞分泌的细胞因子, 该家族包括 6 个成员的配体(IL-17A ~ IL-17F)和 5 个受体(IL-17RA ~ IL-17RD 和 SEF), 是最新发现的具有强大的促炎症作用的细胞因子家族, 能诱导各种免疫反应来对抗病原体, 因此它具有抗感染和促炎症双重功能<sup>[7]</sup>。如 Yamazaki 等<sup>[8]</sup>研究显示 IL-17A 与皮肤黏膜的白色念珠菌感染有关, 白色念珠菌病疾病患者体内 IL-17A 表达水平减少。IL-17A 也与细菌感染有关, Montgomery 等<sup>[9]</sup>研究发现 IL-17A 在金黄色葡萄球菌皮肤感染中具有保护作用。

另外也有研究发现, 在支气管腺病毒感染的老鼠模型中, IL-17A 能募集中性粒细胞, 但是缺乏抑制病毒复制的作用<sup>[10]</sup>。以上研究表明 IL-17A 在各类感染性疾病的发生、发展和转归中扮演重要角色。

中药能促进造血细胞生成, 促进 IL-1、IL-2、IL-12、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、干扰素



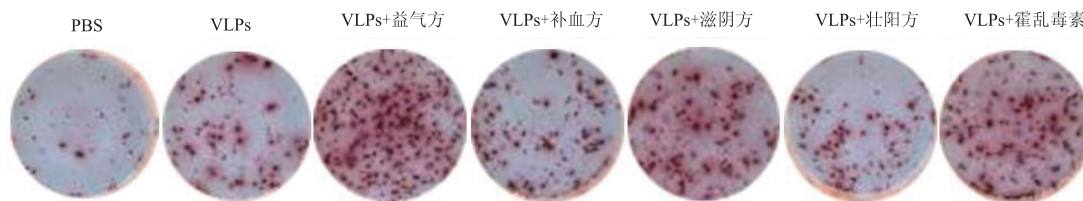


图1 Elispot 技术检测各组免疫小鼠外周血 PBMCs 中 IL-17A 斑点形成集落数

(interferon, IFN) 等细胞因子的分泌, 刺激、加强细胞因子的作用, 增强机体的细胞免疫和体液免疫, 活化补体, 提高机体的免疫功能, 产生免疫调节作用。另外中药还能有效激活 T 细胞, 如枸杞多糖、女贞子多糖、黄芪多糖可以增强辅助性 T 细胞功能, 具有类似胸腺素样的免疫调节作用<sup>[11]</sup>。既往研究报道复方中药能够调节 IL-17A 的产生, 如李学良等<sup>[12]</sup>研究发现宣肺固本中药能够降低哮喘模型大鼠外周血 IL-17A 的表达, Wang 等<sup>[13]</sup>的研究表明补肾益气类中药能显著降低慢性阻塞性肺病患者体内的 IL-17A 表达, 从而缓解肺脏局部炎症反应, 但是中药能否有效调控流感 VLPs 诱导的免疫应答尚不清楚。

在本研究中, 课题组以中医益气、养血、滋阴、壮阳为组方原则, 每种处方选取 3 种代表性药物, 然后协同流感 VLPs 疫苗免疫 BALB/C 小鼠, 通过 ELISA 和 Elispot 两种实验技术检测免疫小鼠外周血浆和 PBMCs 中 IL-17A 的表达情况, 发现益气方可以显著提升小鼠外周血浆中的 IL-17A 水平 ( $P < 0.05$ ), 而对于胞内的 IL-17A 表达, 益气方和滋阴方均能显著提升 ( $P < 0.01$ )。以上结果提示, 滋阴方可以在细胞水平增加 IL-17A 表达, 而益气方则不仅可以增加细胞内 IL-17A 表达, 更能有效促进 IL-17A 的分泌, 从而介导更广泛的免疫应答。因此益气联合滋阴有望成为作为新型的免疫佐剂, 从而提高流感 VLPs 疫苗的免疫保护效果。

然而本研究仍需要通过其他实验进一步完善, 首先是益气方和滋阴方究竟通过什么调控机制影响 IL-17A 表达? 是促进 IL-17A 转录因子 ROR $\gamma$ t 表达, 还是抑制调节性 T 细胞功能? 其次究竟是哪一类单体成分发挥有效作用, 进而促进 IL-17A 表达? 最后是 IL-17A 具有抗微生物和促炎双重作用, 过度产生 IL-17A 是否对机体产生病理损害? 究竟在什么浓度范围之间才能到达最佳免疫效果? 以上研究内容将是本课题组下一步的工作重点。

## 参 考 文 献

[1] Su S, Bi Y, Wong G, et al. Epidemiology, evolution, and recent outbreaks of avian influenza virus in China [J]. J Virol, 2015,

89(17):8671-8676.

- [2] Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Junior DS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon  $\gamma$  to promote protection against Leishmania infantum infection [J]. J Infect Dis, 2015, 211(6):1015-1026.
- [3] Kudva A, Scheller EV, Robinson KM, et al. Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice [J]. J Immunol, 2011, 186(3):1666-1674.
- [4] 祝崢, 胡云章, 钱子刚. 补益类中药有效成分作为新型人用疫苗佐剂的应用前景[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(1):92-94.
- [5] 林巧, 邹容容, 张国良, 等. 基于果蝇 S2 系统的流感病毒样颗粒的制备及鉴定[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2015, 29(4):357-360.
- [6] Bright RA, Carter DM, Daniluk S, et al. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin [J]. Vaccine, 2007, 25(19):3871-3878.
- [7] Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, et al. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase Trypanosoma cruzi infection [J]. J Immunol, 2010, 185(2):1150-1157.
- [8] Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, et al. Two novel gain-of-function mutations of STAT1 responsible for chronic mucocutaneous candidiasis disease; impaired production of IL-17A and IL-22, and the presence of anti-IL-17F autoantibody [J]. J Immunol, 2014, 193(10):4880-4887.
- [9] Montgomery CP, Daniels M, Zhao F, et al. Protective immunity against recurrent Staphylococcus aureus skin infection requires antibody and interleukin-17A [J]. Infect Immun, 2014, 82(5):2125-2134.
- [10] McCarthy MK, Zhu L, Procario MC, et al. IL-17 contributes to neutrophil recruitment but not to control of viral replication during acute mouse adenovirus type 1 respiratory infection [J]. Virology, 2014, 5:259-267.
- [11] 王学宏, 李明春. 中药多糖的免疫及抗肿瘤作用研究进展[J]. 齐鲁医学杂志, 2000, 15(3):230-231.
- [12] 李学良, 许朝霞, 钱鹏, 等. 宣肺固本中药对哮喘大鼠血清 IL-17、IL-22 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2):598-601.
- [13] Wang G, Liu B, Cao Y, et al. Effects of two Chinese herbal formulae for the treatment of moderate to severe stable chronic obstructive pulmonary disease: a multicenter, double-blind, randomized controlled trial [J]. PLoS One, 2014, 9(8):e103168.

(收稿日期: 2016-02-02)

(本文编辑: 韩虹娟)