

板蓝根多糖在结核小鼠模型中的免疫干预研究^{*}

田 冰¹, 刘 璟^{2△}

(1. 重庆市三峡中心医院感染科 404000; 2. 重庆三峡医药高等专科学校医学基础部免疫教研室, 重庆 404000)

摘要:目的 研究板蓝根多糖(IIP)在结核小鼠模型中对 Th 细胞的免疫干预效果。方法 选取健康 SPF 小鼠 50 只,分为三组,对照组 10 只,其他 40 只经尾静脉注射标准菌株 H37RV 混悬液建立结核小鼠模型,其中模型组 10 只,干预组 30 只。干预组小鼠造模成功后分别予 IIP 100、200、300 mg/(kg·d)腹腔注射,观察三组小鼠的临床表现,造模成功时及成功后 20、30 d 后各抽取 1 次外周血检测干扰素-γ(IFN-γ)、白细胞介素-4(IL-4)、IL-12 水平。结果 干预组小鼠症状较模型组小鼠缓解,外周血检测 IFN-γ、IL-4、IL-12 水平先升高后降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 IIP 可通过对 Th 细胞的干预对结核感染起到积极作用。

关键词: 结核病; 动物模型; 板蓝根多糖; 免疫干预

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.19.010 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)19-2842-03

Study on immune intervention of isatis indigotica polysaccharide in tuberculosis mouse model^{*}

TIAN Bing¹, LIU Jing^{2△}

(1. Department of Infection, Chongqing Sanxia Central Hospital, Chongqing 404000, China; 2. Teaching and Researching Section of Immunology, Department of Basic Medicine, Chongqing Sanxia Medicine High Academy, Chongqing 404000, China)

Abstract: **Objective** To research the immune intervention effect of isatis indigotica polysaccharide (IIP) on Th cells in tuberculosis (TB) mouse model. **Methods** Fifty healthy SPF mice were selected and divided into 3 groups, 10 cases were in the control group and other 40 cases were given standard bacterial strain H37RV mixed suspension solution by tail vein injection for constructing the TB mouse mode, in which 10 cases in the model group and 30 cases in the intervention group. The mice in the intervention group were intraperitoneally injected by IIP 100, 200, 300 mg/(kg·d). Then the clinical manifestations were observed in 3 groups. Peripheral blood was collected at the time of model construction success and on 20, 30 d after model construction success. The levels of interferon-γ (IFN-γ), interleukin-4 (IL-4) and IL-12 were detected by using ELISA. **Results** The symptoms in the intervention group were relieved compared with the model group, the levels of IFN-γ, IL-4 and IL-12 were increased first and then decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** IIP play a positive role to TB infection by intervening Th cells.

Key words: tuberculosis; animal model; isatis indigotica polysaccharide; immune intervention

结核病为常见慢性传染性疾病,具多种传播方式,在近年来患病率有所上升^[1]。结核病在机体是感染、免疫和超敏反应三者并存的复杂免疫状态,结核病的病理损伤最主要为超敏反应及病理性炎症反应造成,但临床治疗对结核病的免疫调节重视较少。板蓝根为抗细菌、抗病毒的传统中药,其有效成分板蓝根多糖(IIP)具有抗感染、抗肿瘤、免疫调节等多种生物活性。本研究拟建立结核小鼠模型,尝试以 IIP 对模型进行免疫干预,观察研究 IIP 在模型中对 Th 细胞的干预效果, IIP 免疫干预的量-效关系,以研究 IIP 用于结核临床治疗的可行性,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料来源 选取健康 SPF 级 8~10 周龄昆明种小鼠 50 只,分为三组,其中对照组 10 只,其他 40 只小鼠经尾静脉接种结核分枝杆菌悬液,根据预设标准判定造模成功,随机选其中 10 只设定为模型组,其余 30 只作为干预组。干预组小鼠确认造模成功后分别予 IIP 100、200、300 mg/(kg·d)腹腔注射,观察小鼠临床表现,于造模成功及成功后 20、30 d 各抽取 1 次小鼠外周血,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中干扰素-γ

(IFN-γ)、白细胞介素-4(IL-4)、IL-12 水平。

1.2 仪器与试剂 显微镜用奥林巴斯显微镜 CX31-LV320,超低温冰箱(海尔, DW-86L286),生物安全柜(苏州安泰, BSC-1000 II A2),酶标仪(芬兰, Multiskan MK3)。结核分枝杆菌 H37RV 菌种由中国疾病预防控制中心重庆结核病预防控制中心提供,-80℃低温保存,常规传代。ELISA 试剂盒购自武汉华美科技有限公司,IFN-γ 试剂盒(CSB-E04579r)、IL-4 试剂盒(CSB-E04634m)、IL-12(CSB-E04579r)严格按说明书低温保存并使用。IIP 由重庆三峡医药高等专科学校天然药物研究中心自行提取,纯度约 85%。

1.3 造模方法 根据董江涛等^[2]报道,将经小鼠体内接种毒力复苏的菌种转种改良罗氏培养基,在 37℃环境中 20 d 后取干菌落加灭菌生理盐水研磨成菌悬液,比浊法测定菌悬液浓度为 3×10^7 /mL,经尾静脉注射 0.1 mL 菌悬液,接种前后常规喂养。

1.4 造模评判及效果评估标准

1.4.1 造模评判 卢振方等^[3]与梁艳等^[4]报道,接种菌株后主要根据两方面情况评判造模结果:(1)小鼠临床表现,体质量

^{*} 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会 2017 中医药科技项目(ZY201703067)。

作者简介:田冰,女,主治医师,主要从事感染疾病方面的研究。△ 通信作者,E-mail:sxzxyd@163.com。

减轻、毛发脱落、精神萎靡、进食减少、活动度降低等；(2)影像学检查小鼠肺部炎性反应浸润阴影、胸膜腔少量积液等。

1.4.2 干预效果评估标准 根据小鼠症状表现及造模评判, IIP 免疫干预后干预效果评估标准设置采取分数叠加制, 10~12 分为显效, 6~<10 分为有效, 3~<6 分为无效。见表 1。

表 1 IIP 干预效果评估标准

项目	3 分	2 分	1 分
进食	进食如常	进食较正常量稍少	少量进食或不进食
精神状态	精神好, 对刺激反应敏捷	精神稍差, 对刺激有反应	精神萎靡, 刺激反应迟钝
毛发情况	茂密无脱落	少量脱落	大量脱落
体质量变化	<5%	5%~<10%	≥10%

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对数据进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 干预组结核小鼠症状表现比较 接种菌株之后, 模型组和干预组小鼠于第 8 天左右出现体质量减轻, 毛发脱落, 进食减少, 活动度降低, 精神状态差, 给予刺激反应较慢等症状, 透视检查可见小鼠肺部炎性反应浸润阴影, 部分小鼠胸膜腔见少量积液, 期间没有小鼠死亡。干预组小鼠经 IIP 干预后, 期间观察进食、毛发、精神状态, 于第 20 天和第 30 天测体质量基本未再减轻, 其症状缓解情况与 IIP 干预用量呈正相关。见表 2。

表 2 干预组结核小鼠模型症状表现比较 (n)

效果	IIP 100[mg/(kg·d)]		IIP 200[mg/(kg·d)]		IIP 300[mg/(kg·d)]	
	20 d	30 d	20 d	30 d	20 d	30 d
显效	1	2	2	4	3	4
有效	8	8	7	6	7	6
无效	1	0	1	0	0	0

2.2 三组小鼠外周血细胞因子检测情况比较 小鼠在造模成功后, 外周血检测显示 IFN- γ 、IL-12 升高, IL-4 轻度升高, 符合结核感染初期表现。应用不同剂量 IIP 之后, 干预组小鼠外周血在造模成功 20 d 后开始出现 IFN- γ 、IL-12 轻微降低, IL-4 未明显降低; 造模成功 30 d 后, 干预组小鼠外周血 IFN- γ 、IL-12 明显降低, IL-4 轻微降低。经原因分析, 干预组小鼠与模型组小鼠数据对比结果差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 同时干预组小鼠在不同剂量 IIP 作用下, 疗效比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 三组小鼠外周血细胞因子检测情况 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	IFN- γ	IL-12	IL-4
对照组	119.57 \pm 5.33	28.96 \pm 4.39	50.16 \pm 4.82
模型组			
造模成功	198.34 \pm 4.79	45.52 \pm 5.65	72.18 \pm 6.32
20 d	200.15 \pm 4.88	44.84 \pm 5.71	75.31 \pm 6.07
30 d	201.37 \pm 4.92	44.97 \pm 5.44	75.42 \pm 6.21

续表 3 三组小鼠外周血细胞因子检测情况 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	IFN- γ	IL-12	IL-4
干预组			
IIP 100 mg/(kg·d)			
造模成功	197.62 \pm 5.14	45.09 \pm 5.63	72.45 \pm 6.29
20 d	172.79 \pm 5.62	40.16 \pm 5.77	69.67 \pm 5.99
30 d	159.73 \pm 5.31	37.85 \pm 4.98	64.72 \pm 6.02
IIP 200 mg/(kg·d)			
造模成功	198.37 \pm 4.78	44.78 \pm 5.46	72.68 \pm 6.35
20 d	168.64 \pm 5.16	39.32 \pm 5.41	67.54 \pm 6.19
30 d	152.13 \pm 5.67	36.56 \pm 4.62	63.49 \pm 6.18
IIP 300 mg/(kg·d)			
造模成功	199.11 \pm 4.86	45.07 \pm 5.59	72.48 \pm 6.21
20 d	166.67 \pm 5.17	38.73 \pm 5.33	66.69 \pm 6.18
30 d	146.73 \pm 4.99	32.79 \pm 4.72	61.74 \pm 5.78
F	634.72	16.93	44.69
P	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨 论

结核病由结核分枝杆菌感染造成, 可通过结核分枝杆菌产生的脂类和蛋白质类物质引起机体超敏反应, 在结核病的病程中, 感染、免疫和超敏反应是一个复杂共同作用而又相互影响的整体效应。结核病的病理损伤也多为超敏反应及炎性反应损伤所致。临床治疗结核为抗痨药物联合足量、足疗程使用, 在感染控制后适量使用糖皮质激素类药物控制炎症反应以减轻病理损伤, 对结核病的免疫调节重视不够; 抗痨药物本身往往具有较强的肝肾毒性, 加之耐药结核分枝杆菌的出现, 更为结核病临床治疗带来新的难题^[5-6]。目前国内有不少相关中药干预结核的研究, 如猫爪草、狼毒大戟等^[7-8], 因中药干预与目前临床用药有不同的作用机制而备受重视, 但多为体外试验, 体内试验开展较少, 也缺乏相关经验可借鉴^[9]。

IIP 是中药板蓝根的有效成分之一。IIP 具有抗病毒、抗细菌、免疫调节等多种效应, 刘磊磊等^[10]发现 IIP 可干预 TLRs 病毒信号通路, 可调节细胞因子的表达, 从而起到抗肿瘤的作用。本研究考虑以 IIP 抗菌和免疫调节作用为切入点, 探讨 IIP 用于结核治疗的可行性。在开展研究时, 根据薛瑞等^[11]应用 IIP 进行免疫调节的经验, 暂设定 IIP 使用量分为 100、200、300 mg/(kg·d)。一方面探讨 IIP 在结核病中免疫干预的量-效关系, 另一方面也因没有前者研究经验可参照, 试探 IIP 在小鼠结核模型中的免疫干预的剂量。

根据卢振方等^[3]与梁艳等^[4]报道, 选择 SPF 级昆明种小鼠, 经尾静脉注射建立小鼠结核模型。小鼠结核模型造模成功的评判目前并无统一标准, 因研究需要又不能处死小鼠做病理检查, 只能暂将造模标准考虑为症状表现和影像学检查。同时建立干预效果评估, 在进行外周血检测后可相互参照, 对 IIP 的效果进行客观评估。在使用 IIP 干预后, 干预组小鼠从症状评估来看, 结核病有所缓解, 病程得到了控制。

结核的免疫过程非常复杂, 大多数研究认为, 结核免疫病程与 Th 细胞活化失衡及 Th 细胞漂移有关^[12-13]。Th 细胞是人体免疫调节细胞的主力, 主要靠分泌细胞因子发挥作用。

IFN- γ 主要由 Th1 细胞分泌,具有活化巨噬细胞功能,可调节炎症反应和免疫效应,是机体抗结核免疫中的关键因子。在既往研究中,证实由于 Th 细胞漂移,肺组织内和外周血 IFN- γ 往往呈相反的表达,即肺内 IFN- γ 低表达而外周血 IFN- γ 高表达。外周血 IFN- γ 在结核不同的病程期有不同的水平,其水平与活动性结核分枝杆菌数量有关:在结核活动期,IFN- γ 可因 Th1/Th2 漂移而降低,而在结核受到控制后,IFN- γ 可再度升高。IL-12 是 Th1 细胞分化的核心因子,可调节 IFN- γ 的表达,在结核抗感染免疫中有重要的正相调节作用。此前有研究通过干预 IL-12 分泌的基因位点来抗结核。在本研究中,外周血 IL-12 和 IFN- γ 在造模成功时呈升高表达,符合前者研究。使用 IIP 干预后,干预组小鼠外周血呈先升高(20 d),后降低(30 d),结合症状评估结果,应当是结核病程得到控制,活动性结核分枝杆菌减少的表现,经统计学检验,其变化幅度与使用量呈正相关。IL-4 主要由 Th2 细胞分泌,可调节 IFN- γ 分泌和效应,避免过度炎症反应造成的病理损伤,在结核病中具有免疫保护作用。过低的 IL-4 被认为是结核严重炎症病理损伤的原因^[14]。在本研究中,IL-4 在造模成功及造模成功后 20 d 随 IL-12 和 IFN- γ 水平而升高,在经干预后 30 d 随 IL-12 和 IFN- γ 水平降低,结合小鼠模型的症状表现,可以看出在此次干预中,Th1/Th2 保持在一个较合适的动态平衡中,既有利于结核的抗感染免疫,同时也可以起到避免病理损伤的作用。

IIP 可调节 Th 细胞的活化和相关细胞因子分泌,在结核病中起到正相的免疫调节作用,其调节作用与 IIP 使用量呈正相关。在后续的研究中,可以进一步测定活动性结核分枝杆菌在小鼠体内的水平和活跃情况;进行 IIP 对结核小鼠模型免疫干预后病变组织病理变化比较;进行 IIP 干预与其他药物干预效果的比较;进行 IIP 与临床用药协同使用的分析。结核的免疫是多细胞、多细胞因子参与的复杂过程,其效应也复杂多变,还需进一步的严谨探讨,才能考虑 IIP 临床使用。

参考文献

[1] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志,2012,34(8):485-508.
 [2] 董江涛,张万江. 结核分枝杆菌感染小鼠模型的建立及研

究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2011,6(8):621-623.
 [3] 卢振方,叶品良,张传涛,等. 耐异烟肼结核分枝杆菌感染小鼠模型的建立与评价[J]. 中医药导报,2016,22(5):69-71.
 [4] 梁艳,吴雪琼,李宁,等. 结核分枝杆菌感染小鼠模型的建立与评价[J]. 中国病原生物学杂志,2014,9(9):775-778.
 [5] Brigden G, Nyang'wa BT, Du Cros P, et al. Principles for designing future regimens for multidrug-resistant tuberculosis[J]. Bull World Organ, 2014, 92(1):68-74.
 [6] 殷春阳,冷东雷,何仲贵. 抗结核药物的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2015,32(1):77-83.
 [7] 陈丹,刘光陵,吴雪琼. 具抗结核作用中药及其成分研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(1):128-131.
 [8] 李思阳,季兴跃,李卓荣. 抗结核中药有效成分研究进展[J]. 中国抗生素杂志,2013,38(10):725-729.
 [9] Ji XY, Li SY, Meng S, et al. Synthesis and antimycobacterial activity of ternatolide[J]. J Chin Pharm Sci, 2012, 21(3):265-268.
 [10] 刘磊磊,陈娟,师彦平. 清热解毒中药抗肿瘤作用研究进展[J]. 中草药,2012,43(6):1203-1212.
 [11] 薛瑞,章激,曹军华,等. 板蓝根多糖对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 中医药导报,2012,18(9):94-96.
 [12] Tan Q, Xie WP, Min R, et al. Characterization of Th1-and Th2-type immune response in human multidrug-resistant tuberculosis[J]. Eur J Clin Microbiol, 2012, 31(6):1233-1242.
 [13] 岳丽敏,秦峻岭,王春芳,等. Th1/Th2 平衡在结核分枝杆菌免疫中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2015,31(10):1426-1429.
 [14] Ashenafi S, Aderaye G, Bekele A, et al. Progression of clinical tuberculosis is associated with a Th2 immune response signature in combination with elevated levels of SOCS3[J]. Clin Immunol, 2014, 151(2):84-99.

(收稿日期:2017-03-15 修回日期:2017-05-24)

(上接第 2841 页)

syndrome[J]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova, 2016, 116(12):44-47.
 [9] 易旭,矫树生,刘承春,等. 介入治疗大脑中动脉急性闭塞后脑缺血再灌注损伤的影像学观察[J]. 重庆医学,2015,44(12):1585-1587.
 [10] Peña ID, Borlongan C, Shen G, et al. Strategies to extend thrombolytic time window for ischemic stroke treatment: an unmet clinical need[J]. J Stroke, 2017, 19(1):50-60.
 [11] Perovic E, Mrdjen A, Harapin M, et al. Short term changes of serum lipids in acute ischemic stroke[J]. Clin Lab, 2016, 62(11):2107-2113.

[12] 黄小平,王蓓,邱咏园,等. 黄芪甲苷和三七的主要有效成分伍伍对小鼠脑缺血再灌注后脑组织能量代谢的影响[J]. 中草药,2014,45(2):220-226.
 [13] 干良敏,魏守蓉,向本旭. 缬苧滴丸对大鼠脑缺血再灌注损伤后血管新生的影响[J]. 药科学报,2016,51(9):1423-1428.
 [14] 许亮,陈春富. 黄芪甲苷防治缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2011,13(7):664-665.
 [15] 刘广辉. 黄芪甲苷对大鼠脑出血灶周围组织线粒体途径细胞凋亡影响的研究[D]. 银川:宁夏医科大学,2014.

(收稿日期:2017-01-22 修回日期:2017-03-28)