

◆实验研究论著◆

七味白术散对轮状病毒感染乳鼠 sIgA、血清 IFN- γ 及小肠黏膜病理的影响

江漪, 谢雯芳, 代婉娟, 刘妮, 赵昉, 张奉学

广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 通过轮状病毒 SA11 株感染乳鼠为实验模型, 研究七味白术散对肠道 sIgA、血清 IFN- γ 及小肠黏膜病理改变的影响, 探讨其对小肠黏膜的保护作用。方法: 给予灌胃病毒液的模型乳鼠连续灌胃七味白术散、病毒唑及生理盐水。采集血清及小肠标本, 采用酶联免疫法 (ELISA) 检测乳鼠肠道 sIgA、血清 IFN- γ 的含量, 对乳鼠空肠段做石蜡切片 HE 染色观察病理改变。结果: 七味白术散组和病毒唑组乳鼠腹泻天数较少, 与模型组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。七味白术散组和病毒唑组病毒清除率均为 100%, 与模型组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。七味白术散组和病毒唑组小肠黏液 sIgA 较高, 与模型组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。七味白术散组和病毒唑组 IFN- γ 升高, 与模型组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。正常组小肠黏膜未见病理改变。模型组黏膜下层可见明显的炎性细胞浸润, 黏膜上皮细胞有少量坏死脱落, 肌层可见明显的肿胀。病毒唑组可见黏膜下层结构疏松, 稍许水肿, 黏膜层上皮细胞未发现明显病理改变; 肌层间些许肿胀, 可见空染的区域和炎性细胞浸润。七味白术散组小肠黏膜结构正常, 未见明显病理改变。结论: 七味白术散能加快对病毒的清除, 改善腹泻症状, 减轻对小肠黏膜的损害。

[关键词] 轮状病毒; 腹泻; 七味白术散; sIgA; IFN- γ

[中图分类号] R512.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2015) 09-0203-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.09.095

Effect of Qiwei Baizhu San on sIgA, Serum IFN- γ and Small Intestinal Mucosal Pathology of Rotavirus Infection on Suckling Mice

JIANG Yi, XIE Wenfang, DAI Wanjuan, LIU Ni, ZHAO Fang, ZHANG Fengxue

Abstract: Objective: To study the effect of Qiwei Baizhu san on sIgA, serum interferon gamma (IFN- γ) and small intestinal mucosal pathology of suckling mice infected by SA11 rotavirus, and to explore the protective effect for the small intestinal mucosa. Methods: Suckling mice infected by Virus solution orally, were intragastric administered Qiwei Baizhu san, ribavirin and saline respectively. Serum and intestinal samples were collected to detect intestinal sIgA, and serum IFN- γ by ELISA, jejunum pathological changes by HE staining. Results: The diarrhea days of Qiwei Baizhu san group and ribavirin group were fewer than those in the model group ($P < 0.05$). The virus clearance rate was 100% in Qiwei Baizhu san group and ribavirin group, and was higher than that in the model group ($P < 0.05$). The intestinal mucous sIgA and serum IFN- γ in the Qiwei Baizhu san group and ribavirin group were higher than those in the model group, the differences being significant ($P < 0.05$). There was no pathological changes in the intestinal mucosa in normal group. There was obvious inflammatory infiltration, and small necrosis and loss of the mucous epithelium, muscle swelling in the model group. Ribavirin group showed loose structure and slight edema in submucosal, mucosa epithelial cells without obvious pathological changes. There were some swelling between the muscles, visible air stained area and inflammatory cell infiltration in the ribavirin group. Qiwei Baizhu san group showed normal intestinal mucosa, no obvious pathological changes. Conclusion: Qiwei Baizhu san can accelerate the removal of virus, improve the

[收稿日期] 2015-01-20

[作者简介] 江漪 (1988-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药物抗病毒。

[通讯作者] 张奉学, Email: doczhang@tom.com。

symptoms of diarrhea, reduce the damage of the small intestinal mucosa.

Keywords: Rotavirus; Diarrhea; Qiwei Baizhu san

中医药治疗小儿泄泻有悠久的历史,病因病机和治法均已完善。宋代钱乙的《小儿药证直诀》所载七味白术散是治疗小儿泄泻的传统名方,临床研究也表明其对婴幼儿腹泻有很好的疗效。笔者针对七味白术散进行轮状病毒感染乳鼠小肠黏膜保护作用的研究,结果报道如下。

1 材料与方

1.1 动物分组及处理 Balb/c 乳鼠由广东省医学实验动物中心提供, SPF 级, 实验动物质量合格证号 SCXK(粤)2013-0002。雌雄各半, 体重 2~6 g。与母鼠一同购回, 实验中正常哺乳。母鼠粪便检测 RV 抗原阴性。饲养环境: 室温(23±2)℃, 相对湿度为(75±10)%。Balb/c 乳鼠按窝分为正常组、模型组、病毒唑组、七味白术散组, 每组 6 只。将除正常组外的 Balb/c 乳鼠第 5 天经口灌胃病毒液 50 μL, 正常组同时给予生理盐水 50 μL。1 h 后七味白术散组经口灌胃 1 g/mL 中药 100 μL, 病毒唑组给予病毒唑 100 μL, 正常组和模型组生理盐水 100 μL。给药 5 天, 每天 1 次。

1.2 病毒 轮状病毒 SA11 株, 由重庆第三军医大学免疫研究所赠送。经 MA104 细胞上多次传代提高毒力后, 测定病毒滴度为 4.5×10^7 FFU/mL, -70℃冻存。

1.3 药物与试剂 七味白术散的制备: 七味白术散由人参、白术、茯苓、葛根、藿香、木香、甘草组成。按原处方比例称取药材(购自广州中医药大学第一附属医院门诊部中药房), 用自来水→单蒸水→双蒸水分别洗 3 次, 放入锥形瓶中, 加 4 倍体积的三蒸水浸泡 2 h(人参另泡另煎), 煎 2 次, 第 1 次煎 30 min, 第 2 次煎 15 min。去渣, 将两次所煎药液混合, 真空泵下滤器抽滤, 于旋转蒸发器中浓缩成 1 g/mL 的药液, 密封, 隔水煮沸消毒备用。病毒唑制剂(100 mg/mL, 辰欣药业股份有限公司), 用生理盐水稀释成 1.5 mg/mL。

1.4 腹泻的动态观察 乳鼠从第 5 天经口灌胃病毒液后每天观察腹泻情况, 并记录每只乳鼠体重。第 6 天和第 9 天, 收集各组每只乳鼠大便分别置于 1.5 mL 无菌 EP 管, 加 200 μL PBS 缓冲液, 震荡 2 min 充分混匀, 4℃ 1500 rpm、半径 10 cm、离心 15 min, 吸取上清做 RV 抗原 ELISA 检测。

1.5 血清 sIgA、IFN-γ 测定 第 9 天给药 6 h 后将乳鼠断头取血, 2500 rpm、半径 10 cm、离心 10 min, 分离血清, 用 ELISA 试剂盒检测。

1.6 小肠黏液 sIgA 测定 解剖乳鼠, 打开腹腔, 分离小肠, 取下从幽门下 10 cm 至回盲部前的这部分小肠, 生理盐水清洗 2 次, 用眼科剪纵向剪开, 滤纸吸干, 用玻片刮下小肠黏液, 置于 1.5 mL 无菌 EP 管, 按照试剂盒操作说明, 采用

ELISA 法检测 sIgA 水平。

1.7 小肠黏膜病理改变 取幽门至幽门下 10 cm 部分的空肠段, 10% 甲醛固定后制成石蜡切片, 每只乳鼠 2 张, 苏木精-伊红(H.E)染色观察。

1.8 统计学方法 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 使用 Graphpad prism 5 进行作图和统计分析, 统计各组间的差异用 F 检验, 两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 各组乳鼠腹泻天数比较 见表 1。七味白术散组和病毒唑组乳鼠腹泻天数较少, 与模型组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

组别	样本数	腹泻天数
七味白术散组	6	1.67 ± 0.44
病毒唑组	6	2.17 ± 0.28
模型组	6	2.83 ± 0.83
正常组	6	0

与模型组比较, ① $P < 0.05$

2.2 各组粪便 RV 病毒清除率比较 见表 2。七味白术散组和病毒唑组病毒清除率均为 100%, 与模型组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

组别	样本数	实验开始 RV 阳性数	实验结束 RV 阳性数	病毒清除率(%)
七味白术散组	6	6	0	100
病毒唑组	6	6	0	100
模型组	6	6	4	33.33
正常组	6	0	0	-

与模型组比较, ① $P < 0.05$

2.3 各组血清和小肠黏液 sIgA 结果比较 见表 3。七味白术散组和病毒唑组小肠黏液 sIgA 较高, 与模型组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

组别	样本数	血清 sIgA	小肠黏液 sIgA
七味白术散组	6	16.50 ± 1.50	53.00 ± 3.33
病毒唑组	6	13.17 ± 2.17	48.17 ± 2.50
模型组	6	10.67 ± 1.67	41.33 ± 2.89
正常组	6	10.83 ± 1.56	20.00 ± 2.33

与模型组比较, ① $P < 0.05$

2.4 各组血清 IFN- γ 测定结果比较 见表 4。七味白术散组和病毒唑组 IFN- γ 升高,与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

组别	样本数	IFN- γ
七味白术散组	6	56.67 \pm 3.78
病毒唑组	6	52.50 \pm 3.17
模型组	6	48.33 \pm 4.00
正常组	6	58.83 \pm 4.44

与模型组比较, $\textcircled{1}P < 0.05$

2.5 各组小肠黏膜病理改变比较 见图 1、图 2、图 3、图 4。正常组小肠黏膜未见病理改变。模型组黏膜下层可见明显的炎性细胞浸润,黏膜上皮细胞有少量坏死脱落,肌层可见明显的肿胀。病毒唑组可见黏膜下层结构疏松,稍许水肿,黏膜层上皮细胞未发现明显病理改变;肌层间些许肿胀,可见空染的区域和炎性细胞浸润。七味白术散组小肠黏膜结构正常,未见明显病理改变。

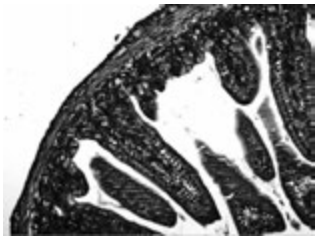


图1 正常组小肠黏膜病理改变 ($\times 100$)

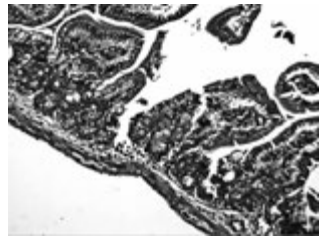


图2 模型组小肠黏膜病理改变 ($\times 100$)

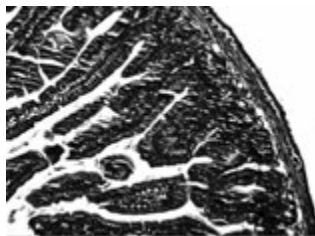


图3 病毒唑组小肠黏膜病理改变 ($\times 100$)

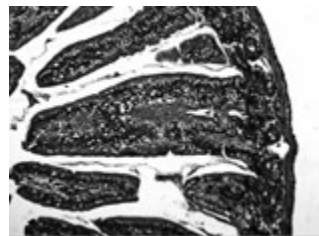


图4 七味白术散组小肠黏膜病理改变 ($\times 100$)

3 讨论

钱乙《小儿药证直诀》：“人参切去头二钱五分，白茯苓五钱，白术(炒)五钱，藿香叶五钱，木香二钱，甘草一钱，葛根五钱(渴者加至一两)。上口父咀，每服三钱，水煎，热盛发渴，去本香。”原方“治脾胃久虚，呕吐泄泻，频作不止，津液枯竭，烦躁渴，但欲饮水，乳食不进，羸弱困劣，因而失治，变成惊痛，不论阴阳虚实，并宜服”。自创制以来，一直被推崇为治疗小儿泄泻的经典方剂。该方组方严谨，配伍精当，为四君子汤加木香、藿香和葛根所成。四君子汤为益气健脾的基础方，有调理中焦，补中益气的功效。木香、藿香芳香

化湿、行气止痛，加上葛根，升阳生津。全方药性平和，温而不燥，补中有泻，寓泻于补，使补益的同时不致气机壅塞，泻实时不致损伤正气。同时也升提阳气，生津止渴，兼顾泄泻耗伤阴液的特点。

肠道是人体重要的器官，它吸收营养物质维持人体正常的生命活动，另外，它有完整的肠道屏障能保证机体不受病原体的入侵和定植，是人体的第一屏障，它包括生物屏障、机械屏障、免疫屏障和化学屏障。sIgA 是重要的生物屏障，它由浆细胞分泌，能有效的清除病毒，将其聚集便于随着纤毛运动排出，抑制病原体在肠道的黏附和定植；也可以加强没有炎症反应的免疫进程，与 T 细胞结合，起到局部免疫调节作用，维持肠道免疫屏障的完整。sIgA 的生成量直接影响腹泻次数和腹泻持续时间。因此，近来有研究表明，口服抗轮状病毒鸡卵黄免疫球蛋白能提高 sIgA 水平，缓解患儿腹泻症状，减少腹泻频次，显著缩短轮状病毒肠炎病程^[1-2]。本研究结果显示，七味白术散能促进小肠黏膜 sIgA 的分泌，增加细胞因子 IFN- γ 的产生，加快病毒的清除。IFN- γ 是 TH1 分泌的促炎性因子，具有抗病毒、免疫调节等重要生理功能。IFN- γ 能增强巨噬细胞吞噬病原体的能力，促进 T 细胞增殖。IFN- γ 的升高能在轮状病毒感染早期起重要的免疫保护作用。轮状病毒感染后，IFN- γ 水平降低，本实验在给予七味白术散或病毒唑后，IFN- γ 水平均升高，提高了机体抗病毒能力。也有研究表明，肠道外感染的 BALB/C 乳鼠皮下注射不同剂量的 IFN- γ ，中等剂量能对机体起良好的抗感染作用，大剂量则会造成肝脏损害^[3]。

小肠黏膜上皮细胞间的紧密连接构成了一道机械屏障。轮状病毒感染后，乳鼠小肠黏膜上皮细胞空泡样改变，出现坏死脱落，黏膜下层有炎性细胞浸润，导致小肠营养物质吸收障碍，同时水电解质转运吸收障碍，出现腹泻。七味白术散及病毒唑治疗后，上皮细胞未见明显病理改变，且七味白术散小肠组织病变较病毒唑组轻，证明其能促进小肠机械屏障功能的恢复。

本实验研究提示，七味白术散能促进小肠黏膜 sIgA 的分泌，增加 IFN- γ 的产生，加快病毒的清除，减轻对小肠黏膜的损伤，维护黏膜屏障的完整性；从而有效地控制腹泻，防止脱水，恢复肠道吸收功能。

[参考文献]

- [1] 张桂华. 益生菌与口服免疫球蛋白辅助治疗儿童轮状病毒肠炎的疗效比较[J]. 中国医药指南, 2015, 13(7): 77.
- [2] 谢咏梅, 王丽媛, 高珊, 等. 口服免疫球蛋白对轮状病毒肠炎患儿肠道 sIgA 分泌的影响[J]. 四川大学学报, 2015, 46(1): 71-74.
- [3] 杨梅. IFN- γ 干预轮状病毒肠道外感染的乳鼠与 NF- κ B 表达相关性的研究[D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2011.

(责任编辑: 骆欢欢)