

- [2] 李大勇,谷峰,陈文娜,等.肢体缺血后代偿性血管新生及相关基因表达的动态变化和意义.中国动脉硬化杂志,2009,17(12):961-965
LI Da-yong, GU Feng, CHEN Wen-na, et al. The Dynamic Changes and Significance of the Compensatory Angiogenesis and Related Gene Expression in Muscle After Limb Ischemia. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2009, 17(12): 961-965
- [3] Tritsaris K, Myren M, Ditlev S B, et al. IL-20 is an arteriogenic cytokine that remodels collateral networks and improves functions of ischemic hind limbs. Proc Natl Acad Sci USA, 2007(104):15364-15369
- [4] Pascotto M, Leong-Poi H, Kaufmann B, et al. Assessment of ischemia-induced microvascular remodeling using contrast-enhanced ultrasound vascular anatomic mapping. J Am Soc Echocardiogr, 2007(20):1100-1108
- [5] 刘小雨,王行宽,杨孝芳.从肝治心组方对急性心肌梗死大鼠心肌毛细血管密度的影响.中国中西医结合急救杂志,2004,11(1):17-20
LIU Xiao-yu, WANG Xing-kuan, YANG Xiao-fang. Effects of Conggan Zhixin prescription(从肝治心组方) on myocardial capillary density of rat with acute myocardial infarction. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine in Intensive and Critical Care, 2004, 11(1): 17-20
- [6] 高秀芳,施海明,山纓,等.红景天对低氧条件下内皮细胞HIF-1 α 、HIF-1 β 和VEGF表达的影响.中华中医药杂志,2010,25(4):582-585
GAO Xiu-fang, SHI Hai-ming, SHAN Ying, et al. Effect of aqueous extract of Radix et Rhizome Rhodiolae on expressions of HIF-1 α , HIF-1 β and VEGF in endothelial cells exposed to hypoxia. China Journal of TCM and Pharmacy, 2010, 25(4): 582-585
- [7] 黄越芳,庄思齐,陈东平.新生大鼠缺氧缺血性脑病模型脑组织新生血管形成及调控因素.中华儿科杂志,2004,42(3):210-215
HUANG Yue-fang, ZHUANG Si-qi, CHEN Dong-ping. Angiogenesis and its regulatory factors in brain tissue of neonatal rat hypoxic-ischemic encephalopathy. Chinese Journal of Pediatrics, 2004, 42(3): 210-215
- [8] 周健,黄岚,晋军,等.低氧诱导因子1 α 抑制大鼠缺血下肢血管生成及内皮祖细胞的动员.中华老年心脑血管病杂志,2006,8(7):474-477
ZHOU Jian, HUANG Lan, JIN Jun, et al. Inhibitory effect of hypoxia-inducible factor-1 α on angiogenesis and endothelial progenitor cell mobilization after rat hind limb ischemia. Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases, 2006, 8(7): 474-477

(收稿日期:2010年7月3日)

· 研究报告 ·

蒿芩清胆汤及其拆方对湿热型流感病毒性肺炎及NF- κ B水平的作用研究

赖鹏华¹, 林培政², 王晓萍³, 刘叶², 徐秋英², 张奉学⁴, 何金洋⁴, 徐沛平⁴

(¹厦门大学医学院中医系, 厦门 361005; ²广州中医药大学温病学教研室, 广州 510405;

³甘肃省中医院神经内科, 兰州 730050; ⁴广州中医药大学热带病研究所, 广州 510405)

摘要: 目的: 通过观察蒿芩清胆汤及其拆方对湿热型流感病毒性肺炎及NF- κ B的干预作用, 以期探讨其治疗机制。方法: 通过气候仓、肥甘饮食加流感病毒滴鼻感染造模成功后, 蒿芩清胆汤及其拆方组以相应中药干预, 比较各组肺指数、光镜下病变程度半定量、肺组织NF- κ B mRNA表达水平。结果: 蒿芩清胆汤及其拆方均能不同程度降低肺指数、肺部病理改变及NF- κ B mRNA表达水平, 其中全方效果最佳。结论: 蒿芩清胆汤具有抗湿热型流感病毒性肺炎的作用, 其机制可能与抑制NF- κ B活化从而减少其下游炎性细胞因子分泌, 截断“炎症瀑布”效应有关。

关键词: 流感; 病毒; 湿热; 核因子 κ B; 蒿芩清胆汤; 拆方

基金资助: 国家自然科学基金-广东省联合基金项目(No.U0632009)

通讯作者: 林培政, 广州市机场路12号广州中医药大学温病学教研室, 邮编: 510405, 电话: 020-39358999, E-mail: linpeizheng@gzhtcm.edu.cn

Effects of Haoqingdingan Decoction and its disassembled recipes on damp-heat syndrome of influenza viral pneumonia and NF- κ B expression

LAI Peng-hua¹, LIN Pei-zheng², WANG Xiao-ping³, LIU Ye², XU Qiu-ying², ZHANG Feng-xue⁴, HE Jin-yang⁴, XU Pei-ping⁴

(¹Chinese Medicine Department, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China; ²Department of Science of Epidemic Febrile Disease, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; ³Department of Neurology, Gansu Province Hospital of Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China; ⁴Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective: To study the therapeutic mechanism by observing and comparing the effects of Haoqingdingan Decoction and its disassembled recipes on damp-heat syndrome of influenza viral pneumonia and NF- κ B expression. Methods: Haoqingdingan Decoction and its disassembled recipes treated their corresponding mice after the model was established by climate incubator, richly fatty and sweet diet and influenza virus infection. We observed lung index, semiquantitative of pathological changes under light microscope and expression of NF- κ B mRNA. Results: Haoqingdingan Decoction and its decomposed recipes decreased lung index, pathological changes and expression of NF- κ B mRNA in various degrees, in which original decoction had the best effect. Conclusion: Haoqingdingan Decoction could resist influenza virus-induced viral pneumonia because it could inhibit the activation of NF- κ B, decrease the excretion of inflammatory cytokines in downstream and then cut off the effects of inflammatory waterfall.

Key words: Influenza; Virus; Damp-heat; NF- κ B; Haoqingdingan Decoction; Disassembled recipes

Fund assistance: National Natural Science Foundation of China: Mutual Fund Project in Guangdong Province (No. U0632009)

岭南地区因气候温暖潮湿、人口稠密成为病毒复制的温床,而其特殊的地理气候及饮食特点,造成呼吸道病毒感染从中医辨证具有易化热夹湿的特点。笔者在以往的临床实践中以蒿芩清胆汤治疗岭南呼吸道病毒性疾病湿热证取得显著疗效。本实验通过观察比较蒿芩清胆汤及其拆方对湿热型流感病毒性肺炎及核因子kappa B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)的干预作用,探讨其治疗机制,现报道如下。

材料与方

1. 动物与饲料 115只BALB/c小鼠,雌雄各半,4周龄,体重13~15g;肥甘饲料(80%基础饲料+8%蜂蜜+12%猪油)。均由广东省医学实验动物中心提供。

2. 病毒 甲1型流感病毒毒种(H₁N₁),由中国药品生物检定所提供,广州中医药大学热带病研究所病毒室增强毒力。

3. 药物 蒿芩清胆汤:青蒿^(原方)10g,黄芩15g,法半夏10g,竹茹10g,滑石30g,茯苓15g,甘草6g,枳壳10g,陈皮6g,大青叶15g,板蓝根15g;拆方1:蒿芩清胆汤减去青蒿、黄芩;拆方2:蒿芩清胆汤减竹茹、法半夏、滑石、茯苓、甘草;拆方3:蒿芩清胆汤减枳壳、陈皮;拆方4:蒿芩清胆汤减去大青叶、板蓝根。中药均购自广州中医药大学第一附属医院中药房。药物水煎浓缩成1g/mL或2g/mL备用。

4. 试剂及仪器 Trizol(美国Invitrogen公司),逆转录试剂盒(Fermentas公司),Realtime PCR Master Mix(SYBR Green)[TOYOBO(东洋纺)公司],引物合成(上海英俊生物技术有限公司),轮转式组织切片机(莱卡2135德国),Olympus光学显微镜(德国),美国ABI7300定量PCR检测系统。

5. 方法 将小鼠随机分为正常对照组、湿热模型组、利

巴韦林组、蒿芩清胆组、拆方1组、拆方2组、拆方3组、拆方4组。正常对照组10只,其余7组均每组15只。正常对照组:常温下(25℃~29℃、湿度50%~80%)普通饲料喂养14d;湿热模型组:全程肥甘饲料喂养,连续10d气候箱[气候箱条件设置:温度(32±0.5)℃,湿度:90%±5%]暴露,6h/d,第11d接种病毒(小鼠在乙醚轻度麻醉下,用浓度为2LD₅₀的病毒液分别滴鼻感染各只小鼠,每只0.05mL),接种病毒后不再置入气候箱,继续常温喂养3d。利巴韦林组、蒿芩清胆组、拆方1组、拆方2组、拆方3组、拆方4组:造模方法如湿热模型组,病毒感染后2h开始灌胃,用药剂量按为36.92mg·kg⁻¹·d⁻¹(按小鼠体表面积换算,根据本课题相关实验结果,取高剂量,即一般剂量的2倍),每日1次,每次0.4mL,连续4d。小鼠禁食不禁水12h,第15天以急性大出血法处死,采集标本。取肺组织约5mm×5mm大小,立即放入液氮冻存管中,再放入-80℃冰箱保存待测。

6. 观察指标及方法

6.1 肺指数

6.2 光镜下病变程度半定量分析 镜下病理改变评价标准为:“-”示肺组织正常;“+”示细支气管周围及肺组织出现少量炎细胞浸润,间质毛细血管扩张充血,小部分细胞内有少量渗出;“++”示细支气管周围及肺间质组织出现中量炎细胞浸润,毛细血管扩张充血明显,肺泡腔渗出物增多;“+++”示肺组织部分或全部实变,间质纤维组织明显增生,肺泡腔大量炎性渗出。

6.3 肺组织NF- κ B mRNA表达水平检测 每组随机选取8个标本采用半定量反转录聚合酶链反应(PCR)法检测。具体步骤如下:小鼠肺组织不断加液氮研磨成粉末状,再按1:10比

例加Trizol,按照试剂盒说明提取RNA。取10 μ L制备好的RNA模板做逆转录反应,逆转录反应体系组成:模板RNA 10 μ L、Oligo (dT)引物1 μ L、DEPC处理水2 μ L、5倍buffer 4 μ L、RiboLock Ribonuclease inhibitor 1 μ L、10mM dNTP mix 2 μ L、M-M μ LV 逆转录酶1 μ L,转录条件为43 $^{\circ}$ C 1h。NF- κ B-P65引物:上游5'-ACG CGG ATT CCT GTA CAC CT-3',下游5'-CAG GAG CTC CAC AGG ACA GA-3',扩增片段长度为113bp; GAPDH(内参照基因)引物:上游5'-AAC AGG GTG GTG GAC CTC AT-3',下游5'-GGG ATA GGG CCT CTC TTG CT-3',扩增片段长度为100bp。定量PCR采用25 μ L体系,引物浓度为250nmol/L,扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 1min,然后95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min,共40循环。最后进行定量分析,以目的基因与内参照基因的比值(P)表示目的基因的表达。

7. 统计学方法 采用统计软件SPSS 13.0进行统计学描述和分析。实验数据计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验。等级资料用Kruskal-Wallis检验。以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

结果

1. 肺指数 如表1所示,湿热模型组与正常对照组比较有显著性差异($P < 0.01$),提示小鼠流感病毒性肺炎模型成功复制。各治疗组与湿热模型组比较肺指数均有所降低。蒿芩清胆汤组及利巴韦林组与湿热模型组比较,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。

2. 肺组织NF- κ B mRNA表达水平 从表1可知,各组整体比较差异有统计学意义($P = 0.000$)。湿热模型组NF- κ B mRNA表达水平较正常对照组升高,且差异显著,有统计学意义($P < 0.01$);各治疗组均能下调NF- κ B mRNA表达水平,与湿热模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。各中药治疗组均值比较,拆方1组最高,蒿芩清胆汤组最低。

表1 各组肺指数及肺组织NF- κ B mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	肺指数	NF- κ B mRNA
正常对照组	0.0149 \pm 0.0030	1.3810 \pm 0.1638
湿热模型组	0.0187 \pm 0.0028 ^{▲▲}	1.8915 \pm 0.1418 ^{▲▲}
利巴韦林组	0.0156 \pm 0.0029 [●]	1.3764 \pm 0.2168 ^{●●}
蒿芩清胆汤组	0.0151 \pm 0.0022 ^{●●}	1.4106 \pm 0.8664 ^{●●}
拆方1组	0.0180 \pm 0.0023 [■]	1.6361 \pm 0.2475 [●]
拆方2组	0.0179 \pm 0.0024 [■]	1.4538 \pm 0.3169 ^{●●}
拆方3组	0.0166 \pm 0.0026	1.5366 \pm 0.2420 ^{●●}
拆方4组	0.0175 \pm 0.0027	1.4395 \pm 0.2377 ^{●●}
F值	2.448	5.513
P值	0.036	0.000

注:与正常对照组比较,▲▲ $P < 0.01$;与湿热模型组比较,● $P < 0.05$,●● $P < 0.01$;与蒿芩清胆汤组比较,■ $P < 0.05$ 。

3. 光镜下病变程度半定量分析结果 从表2可看出:各组整体比较有统计学差异($\chi^2 = 27.908, P = 0.000$)。正常对照组平均秩次最低,湿热模型组最高。病变越严重则平均秩次越高,各

表2 蒿芩清胆汤及拆方对小鼠病毒性肺炎病理形态学影响($n=8$)

组别	病变程度				平均秩
	-	+	++	+++	
正常对照组	8	0	0	0	9.50
湿热模型组	0	1	5	2	48.88
利巴韦林组	2	3	3	0	30.88
蒿芩清胆汤组	2	5	1	0	25.88
拆方1组	1	2	3	2	41.56
拆方2组	1	2	3	2	41.56
拆方3组	2	4	2	0	28.38
拆方4组	2	2	4	0	33.38

注: $\chi^2 = 25.851, P = 0.001$ 。

组从小到大排列顺序为:正常对照组<蒿芩清胆汤组<拆方3组<利巴韦林组<拆方4组<拆方1组、拆方2组<湿热模型组。

讨论

NF- κ B是一种重要的核内转录因子,可高效诱导多种细胞因子如IL-1、IL-2、IFN-8、TNF- α 、GCS-F等、黏附分子、趋化因子等的表达,从而引起“炎症瀑布”效应^[1]。可见,NF- κ B的转移并活化是全身炎症反应或急性肺损伤的关键发病环节之一^[2]。

本实验结果显示湿热证模型组肺指数、光镜下病变程度半定量、NF- κ B mRNA表达水平均明显高于正常对照组,提示流感病毒性肺炎造模成功。蒿芩清胆汤组在改善肺指数及肺部病理改变、降低NF- κ B mRNA表达水平方面均优于拆方组。拆方1,即蒿芩清胆汤去青蒿、黄芩,即减弱清热祛湿力量,对小鼠肺组织保护作用、下调NF- κ B水平效果均为最差,此结果与青蒿、黄芩为湿热证代表方蒿芩清胆汤君药,在蒿芩清胆汤治疗湿热的过程中发挥主要作用相符;拆方2在降低肺指数,改善肺部病理改变方面效果较差,仅次于拆方1;拆方3,即蒿芩清胆汤去枳壳、陈皮,下调NF- κ B水平效果亦较差,仅次于拆方1,也提示在湿热治疗中加以理气,方能达到理想效果;拆方4对肺脏各观察指标亦有改善作用。综观全局,蒿芩清胆汤可通过抑制NF- κ B活化,从而减少其下游炎症因子分泌,截断炎症反应,起到保护肺脏的作用。各拆方干预治疗对各指标的影响程度不同,但效果均差于全方,说明方中各药相协为用,体现了中医方剂组方的科学性及其合理性。

参 考 文 献

[1] Chen F E,Huang D B,Chen Y Q,Ghosh G.Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. Nature,1998,391:410-413
 [2] Lee J Quinton,Matthew R Jones,Benjamin T Simms,et al.Functions and regulation of NF-kappa B Rela during pneumococcal pneumonia.The Journal of Immunology,2007,178: 1896-1903

(收稿日期:2010年10月6日)