

苗药香囊对小鼠肺泡灌洗液及肺组织中免疫球蛋白的影响

孟庆志 张权 程明亮 王豫萍

【摘要】 目的 观察苗药香囊对正常小鼠肺泡灌洗液中分泌型免疫球蛋白 A (SIgA)、免疫球蛋白 G1 (IgG1) 及肺组织中免疫球蛋白 A (IgA)、IgG1 的影响。**方法** 雄性昆明小鼠 50 只, 随机分为 5 组 (每组 10 只): 空白对照组、玉屏风颗粒组 (阳性对照组)、苗药香囊持续吸入组、苗药香囊间断吸入组、苗药香囊持续吸入 + 玉屏风颗粒组 (香 + 玉组)。实验小鼠连续用药 4 周后, 采用 ELISA 法检测肺泡灌洗液中 SIgA、IgG1 的含量, Western blot 分析检测肺组织中 IgA、IgG1 蛋白的表达。**结果** 与空白对照组相比, 苗药香囊持续吸入组小鼠肺泡灌洗液中 SIgA 和 IgG1 含量显著升高, 分别为 (255.83 ± 94.96) ng/ml 和 (165.37 ± 54.59) ng/ml, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 苗药香囊持续吸入组小鼠肺组织中 IgA、IgG1 的相对含量分别为 3.90 ± 0.29 和 2.69 ± 0.89 , 显著高于空白对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 苗药香囊能够增加正常小鼠呼吸道中 IgA、SIgA 和 IgG1 的含量, 进而提高其呼吸道黏膜的免疫功能。

【关键词】 苗药香囊; 流感; 免疫球蛋白 A; 免疫球蛋白 A, 分泌; 免疫球蛋白 G1

Effect of Miaoyaoxiangnang on immunoglobulin in fluid of bronchoalveolar lavage and lung tissue of the healthy mice MENG Qing-zhi, ZHANG Quan, CHENG Ming-liang, WANG Yu-ping. Department of Infectious Diseases, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China.

Corresponding author: ZHANG Quan, Email: chengml@21cn.com

【Abstract】 Objective To observe the influences of Miaoyaoxiangnang on secretory immunoglobulin A (SIgA) and immunoglobulin G1 (IgG1) in fluid of bronchoalveolar lavage and immunoglobulin A (IgA) and IgG1 in lung tissue of healthy mice. **Methods** Total of 50 Kunming mice were divided into normal control (NC) group, Yupingfengkeli (YPFKL) group, continuous inhalation of Xiangnang (CIOXN) group, intermittent inhalation of Xiangnang (IOXN) group and CIOXN + YPFKL group ($n = 10$ in each group), randomly. All mice were treated for four weeks. The levels of SIgA and IgG1 in fluid of bronchoalveolar lavage were detected by ELISA; The levels of IgA and IgG1 in the lung tissue of mice were detected by Western blot. **Results** Compared with the NC group, the level of SIgA (255.83 ± 94.96 ng/ml) and IgG1 (165.37 ± 54.59 ng/ml) in fluid of bronchoalveolar lavage and relative levels of IgA (3.90 ± 0.29) and IgG1 (2.69 ± 0.89) in lung tissue in CIOXN group were significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusions** Miaoyaoxiangnang could increase the levels of IgA, SIgA and IgG1 in the respiratory tract and might enhance the respiratory mucosal immune function of healthy mice.

【Key words】 Miaoyaoxiangnang; Influenza; Immunoglobulin A (IgA); Immunoglobulin A, secretory (SIgA); Immunoglobulin G1 (IgG1)

流行性感胃是以流感病毒为病原体的一种常见传染病, 其暴发性流行常造成大范围的传播并给人们的健康带来危害, 造成巨大的社会负担。数千年来, 中医学在流行性感胃防治中积累了丰富的经验和理论。贵州省黔东南州民族医药研究所结合当地

苗族民间医药资源丰富的特点, 针对流行性感胃的传播特点, 研制了“苗药防感香囊”应用于流行性感胃的预防, 取得了良好的效果。为了解苗药防感香囊预防流行性感胃的机制, 本文就其对呼吸道黏膜免疫防御的影响进行研究, 报道如下。

材料与方法

一、材料

小鼠分泌型免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, SIgA) 和小鼠免疫球蛋白 G1

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.03.001

作者单位: 550004 贵阳市, 贵阳医学院 (孟庆志); 贵阳医学院附属医院感染科 (孟庆志、程明亮、张权、王豫萍)

通讯作者: 张权, Email: chengml@21cn.com

(immunoglobulin G1, IgG1) ELISA 试剂盒均购自上海西唐生物有限公司;抗-IgA、抗-IgG1、抗-IgG-AP 均购自美国 Southern Biotech 公司,抗-IgG-AP 购自美国 Santa Cruz 公司,抗- β -Actin 购自美国 Cell Signaling 公司。苗香牌抗感香囊为新华大地民族医药开发有限公司产品;玉屏风颗粒为广东环球制药有限公司产品。主要仪器有酶标仪(Thermo SCIENTIFIC, 美国)、凝胶成像系统(Bio-RAD GelDocXR, 美国)和 pH 仪(METTLER TOLEDO Five Easy, 美国)。

二、方法

1. 实验动物:健康 SPF 级昆明种小鼠 50 只,雄性,体重 18~22 g,由第三军医大学实验动物中心提供,动物许可证号为 SCXK(渝)2007-0003。

2. 实验动物分组:50 只正常小鼠随机分为 5 组,每组各 10 只小鼠,即空白对照组、玉屏风颗粒组(阳性对照组)、苗药香囊持续吸入组、苗药香囊间断吸入组、苗药香囊持续吸入组 + 玉屏风颗粒组(香 + 玉组)。将 5 组小鼠分别置于 3 个房间(湿度、温度和通气条件均一致):空白组与玉屏风颗粒组置于 1 号房间;苗药香囊持续吸入组与香 + 玉组置于 2 号房间;苗药香囊间断吸入组置于 3 号房间。每个笼子外面用罩子(体积为 0.5 m³)罩住,罩子上对称位置开 3 个通气窗(总面积为 150 cm²)。各组均与 AM 8:00 ~ PM 8:00 用罩子罩住,其他时间取下罩子。

3. 实验动物的药物干预:(1)空白对照组(I组):给予生理盐水(体积与上述药物体积相同)灌胃,1 次/d,连续 4 周;(2)阳性对照组(II组):给予玉屏风颗粒灌胃,2 g · kg⁻¹ · d⁻¹[1],1 次/d,连续 4 周;(3)苗药香囊持续吸入组(III组):给予 10 g 苗药香囊 24 h 持续吸入,每 6 d 更换 1 次苗药香囊,并给予生理盐水灌胃(同上),1 次/d,连续 4 周;(4)苗药香囊间断吸入组(IV组):给予 10 g 苗药香囊分别于每天 8~9 时、11~12 时、17~18 时间断性吸入 3 次,每 6 d 更换 1 次苗药香囊,每次 1 h。同时给予生理盐水灌胃(同上),1 次/d,连续 4 周;(5)香 + 玉组(V组),给予 10 g 苗药香囊 24 h 持续吸入,每 6 d 更换 1 次苗药香囊,并给予 2 g · kg⁻¹ · d⁻¹,1 次/d,连续 4 周。各组小鼠经 4 周药物干预后提取标本。

4. 标本的收集:每只小鼠均行双侧肺部灌洗:颈部解剖,暴露气管,1 ml 注射器插入气管上端,以 0.8 ml 生理盐水冲洗 3 遍,每遍冲洗 3~5 次。回收的灌洗液于 4℃,1500 rpm 离心 10 min,上清置于 -20℃ 保存。每只小鼠取 100 mg 肺组织置于 -70℃ 冰箱保存。

5. 实验指标的检测:(1)ELISA 法测定肺泡灌洗液中 SIgA 和 IgG1 的含量,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。(2)Western blot 分析检测肺组织中 IgA 和 IgG1 蛋白表达水平:提取 100 mg 肺组织的总蛋白并测定蛋白质浓度,取等量的蛋白样品 40 μ g 用样品缓冲液处理,蛋白变性、12% SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白、电转移法使蛋白转移至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h,洗膜后分别加入抗-IgA 和抗-IgG1(浓度 1:2500),4℃ 过夜,TBST 洗膜后以碱性磷酸酶标记的抗-IgG(稀释为 1:5000)室温孵育 1 h,再次洗膜后用 ECL 化学发光试剂曝光显影,洗片后用 Gel Doc EQ 凝胶成像仪扫描,采用 Quantity One 软件分析结果。以 β -actin 蛋白表达水平作为内参照。

三、统计学处理

应用 SPSS 11.5 软件包建立数据库并进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。分析前行方差齐性检验,方差齐时用 LSD 法;方差不齐时用 Tamhane's 法(q 检验)。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异具有显著性统计学意义。

结 果

一、各组小鼠肺泡灌洗液中 SIgA 和 IgG1 的含量

与空白对照组相比,苗药香囊持续吸入组、阳性对照组、苗药香囊间断吸入组和香 + 玉组小鼠肺泡灌洗液中 SIgA 水平均显著升高($P < 0.05$),苗药香囊持续吸入组 SIgA 水平平均值较阳性对照组高;苗药香囊持续吸入组、阳性对照组小鼠肺泡灌洗液中 IgG1 显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但苗药香囊持续吸入组 IgG1 含量平均值较玉屏风颗粒组高,但差异无统计学意义(见表 1)。

表 1 各组小鼠肺泡灌洗液中 SIgA 和 IgG1 含量 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	SIgA	IgG1
I	69.35 \pm 24.26	81.09 \pm 45.68
II	203.33 \pm 29.41 ^a	164.52 \pm 67.04 ^a
III	255.83 \pm 94.96 ^a	165.37 \pm 54.59 ^a
IV	150.85 \pm 27.89 ^a	98.92 \pm 16.90
V	185.25 \pm 91.49 ^a	134.34 \pm 44.23

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$

二、各组小鼠肺组织中 IgA 和 IgG1 蛋白的相对含量

与空白对照组相比,苗药香囊持续吸入组、阳性对照组和苗药香囊间断吸入组小鼠肺组织中 IgA 含量均显著升高($P < 0.05$);苗药香囊持续吸入组、阳性对照组、苗药香囊间断吸入组和香+玉组小鼠肺组织中 IgG1 蛋白表达显著升高($P < 0.05$), (表 2, 图 1)。

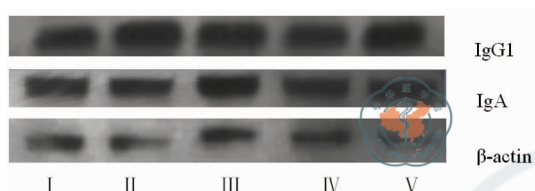


图 1 各组小鼠肺组织中 IgG1 和 IgA 蛋白的表达

表 2 各组小鼠肺组织中 IgA 和 IgG1 蛋白的相对含量($\bar{x} \pm s$)

组别	IgA	IgG1
I	2.42 ± 0.86	1.52 ± 0.38
II	4.25 ± 0.68 ^a	2.88 ± 0.83 ^a
III	3.90 ± 0.29 ^a	2.69 ± 0.89 ^a
IV	4.05 ± 1.52	3.89 ± 1.95 ^a
V	4.11 ± 1.21 ^a	2.95 ± 1.00 ^a

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$

讨 论

目前,呼吸道感染的预防手段有:避免发病诱因、增强体质、使用免疫调节药物和接种疫苗等。预防性疫苗虽然有效,却需要较长的研究周期且无法有效应对病毒的变异^[2]。由于特定性疫苗有生产滞后性、因特异性强而导致的适用范围狭窄、潜在的过敏反应,甚至出现严重的不良反应等缺点^[3],使得流感疫苗的应用受到限制。根据黔东南卫生局提供资料,在该地区预防流感工作中,应用苗药防感香囊取得了良好的效果。玉屏风散的药理作用机制主要为增强免疫功能,作用效果较为肯定,对体液免疫(其能够使 IgA 和 IgG 水平升高,使 IgE 水平下降)、单核巨噬细胞系统、T 淋巴细胞表现出明显的增强作用;另有抑制流感病毒和抗细菌黏附作用^[4-7],故本文以其作为阳性对照。

抗体是机体免疫系统最重要的效应分子,抗体的名称和分类如下: IgA、IgD、IgG、IgE 和 IgM;其中 IgA 是外分泌体液(如唾液、汗液、黏液、胃液及泪液等)中最主要的免疫球蛋白。IgA 分为两型:血清

型为单体,主要存在于血清中;分泌型 IgA (SIgA) 为二聚体,由 J 链连接,含有上皮细胞合成的分泌片,经分泌性上皮细胞至外分泌液中。呼吸道黏膜部位浆细胞分泌的 IgA 经过跨膜运输作用合成 SIgA,而至黏膜表面。SIgA 是黏膜免疫的主要效应因子,具有较强的抗病毒能力,其含量的提高使病毒在呼吸道黏膜上不易存活。SIgA 在黏膜局部与相应的病原微生物结合,阻止病原微生物吸附到黏膜上皮细胞,阻断病原微生物的感染,在防治机体黏膜系统感染和保护机体方面具有重要意义^[8]。另外,SIgA 还具有免疫排斥功能及促天然抗菌因子生长的作用^[9]。IgA 分泌细胞在气管、气管叉和肺组织中均有分布,主要分布于气管、气管叉黏膜固有层,在肺中主要分布于肺泡壁上皮细胞间质。已有研究显示,免疫功能低下人群鼻咽部 SIgA 的含量降低,这是此类人群易发生呼吸道感染的重要因素^[10-11]。本研究中,苗药香囊持续吸入组和阳性对照组呼吸道灌洗液 SIgA 及肺组织 IgA 蛋白表达较空白对照组显著增加($P < 0.05$),且苗药香囊持续吸入组 SIgA 含量均值和肺组织 IgA 蛋白表达与阳性对照组相比差异无统计学意义,提示苗药香囊和阳性对照组药物具有相同功效。说明苗药香囊内药物散发出的挥发性物质可刺激呼吸道黏膜上 SIgA 含量增高,增强呼吸道的局部免疫功能。Hovden 等^[12]报道显示,接种 1 次流感疫苗后,未能检出 IgA,接种 2 次后才可检出低浓度的 IgA,表明流感疫苗对 IgA 的产生作用有限。推测苗药香囊可能达到与疫苗相当或更强的抵御病原微生物效果,二者的比较将在下一步研究中进行。

IgG 分为 4 个亚型,即 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4,其中 IgG1 所占比例最高。IgG1 是参与抗蛋白质和抗病毒的抗体之一,决定抗多糖类抗原的活性。呼吸道中 IgG 可对穿过呼吸道黏膜屏障的外来抗原进行免疫清除。IgG1 与炎性细胞如中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和 NK 细胞上 Fc 受体的相互作用以及与可溶性因子如补体系统的相互作用,可促进其免疫清除功能^[13]。IgG 大量存在于肺泡上皮细胞中,可防止肺炎的发生^[14-15]。在本研究中,苗药香囊持续吸入组和阳性对照组小鼠呼吸道灌洗液 IgG1 含量及肺组织 IgG1 蛋白表达较空白对照组显著增加($P < 0.05$),且苗药香囊持续吸入组 IgG1 含量平均值和肺组织 IgG1 蛋白表达和阳性对照组相比差异无统计学意义,提示苗药香囊和玉屏风散颗粒具有相同的功效。说明苗药香囊内药物散发出的挥发性物质可刺激呼吸道黏膜上 IgG1 的含量增高。

综上所述,小鼠持续吸入苗药香囊后,可增加呼

呼吸道中 IgA、SIgA 和 IgG1 的含量,进而提高小鼠呼吸道黏膜的免疫功能。这是苗药香囊预防流感的可能机制,其作用的具体分子靶点尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 梁春敏,王贤喜,董群. 玉屏风散对小鼠免疫调节作用的血清药理学研究. 上海免疫学杂志,2003,23(6):385-388.
- 2 刘羽华,董静成. 呼吸道病毒感染中西医结合药物治疗进展. 中西医结合学报,2004,2(4):226-227.
- 3 吴文炎,吴红革. 流感疫苗不良反应文献分析. 中国全科医学,2009,12(2):129-130.
- 4 梁月晴,解建平. 玉屏风散治疗呼吸系统疾病研究进展. 中国中医药信息杂志,2001,8(5):24-27.
- 5 陈新,区永欣,陈洁文,等. 玉屏风散对人工风寒气象环境介导小鼠免疫抑制的预防作用. 中国实验临床免疫学杂志,1993,5(5):46-48.
- 6 张红军,张晓莉,宋宝辉,等. 玉屏风散对免疫抑制小鼠免疫功能的调节作用. 细胞与分子免疫学杂志,2001,17(4):398.
- 7 Hong LJ, Xin HT. Progress in immunopharmacologic study of Yupingfeng Powder. Chin J Integ Trad West Med,2000,6(2):157-160.
- 8 王延华,李官成主编. 抗体理论与技术. 2 版. 北京:科学出版社. 2009:39.
- 9 杨永清,陈汉平. SIgA 的基础和临床研究进展:文献综述. 上海免疫学杂志,1991,11(3):176-179.
- 10 王东方,干祖望,王宁皎,等. 慢性鼻炎鼻分泌物 SIgA 含量与气虚相关性研究. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志,1999,7(4):161-162.
- 11 张梓荆. 小儿病毒性呼吸道感染与病毒性肺炎. 北京:中国医药科技出版社. 1990:4-8.
- 12 Hovden AO, Cox RJ, Haaheim LR. Whole influenza virus vaccine is more immunogenic than split influenza virus vaccine and induces primarily an IgG2a response in BALB/c mice. Scand J Immunol, 2005,62(1):36-44.
- 13 施焕中,林江涛主编. 肺脏免疫学及免疫相关性疾病. 北京:人民卫生出版社. 2006:138-142.
- 14 Oran AE, Robinson HL. DNA vaccines, combining form of antigen and method of delivery to raise a spectrum of IFN-gamma and IL-4-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells. J Immunol, 2003,171(4):1999-2005.
- 15 Riberdy JM, Flynn K J, Stech RG, et al. Protection against a lethal avian influenza A virus in a mammalian system. J Virol, 1999,73(2):1453-1459.

(收稿日期:2012-02-09)

(本文编辑:孙荣华)

孟庆志,张权,程明亮,等. 苗药香囊对小鼠肺泡灌洗液及肺组织中免疫球蛋白的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(3):178-181.