

DOI:10.13350/j.cjpb.240204

• 论著 •

小柴胡颗粒对呼吸道合胞病毒感染小鼠 免疫系统的影响^{*}

徐翰^{1,2}, 黄蓉¹, 邓爱露¹, 廖庆¹, 王一桦¹, 周春阳^{1*}, 王艺^{2**}

(1. 川北医学院药物研究所, 四川南充 637007; 2. 西南医科大学附属自贡医院, 自贡市精神卫生中心, 自贡市脑科学研究院, 自贡市老年病医院)

【摘要】 目的 探讨小柴胡颗粒对呼吸道感染呼吸道合胞病毒小鼠免疫系统的影响及机制。方法 将小鼠分为正常组、感染组和实验组, 其中将感染组和实验组通过鼻腔滴入呼吸道合胞病毒液建立呼吸道合胞病毒感染模型, 实验组通过小柴胡颗粒(150 mg/kg)进行灌胃治疗, 而正常组和感染组进行生理盐水灌胃治疗。治疗周期结束后通过流式细胞术分析小鼠脾脏中 T 淋巴细胞亚群水平; 通过 ELISA 检测小鼠体内炎症因子水平的表达情况; 通过苏木精伊红染色检测小鼠的肺损伤情况。结果 与感染组相比, 实验组先天性免疫即 NK 细胞的比例显著高于感染组, 为感染组的 3.883 ± 0.777 倍($t=4.600, P=0.010$); 而获得性免疫即 $CD3^+$ T 细胞群的比例也显著高于感染组, 为感染组的 2.844 ± 0.425 倍($t=6.696, P=0.002$); 实验组炎症因子水平也明显低于感染组, 趋向于正常组; 染色结果显示实验组即小柴胡颗粒的治疗明显缓解了由于病毒感染引起的肺损伤。结论 小柴胡颗粒可以激发呼吸道合胞病毒感染小鼠体内的免疫系统, 改善由于病毒感染引起的炎症反应和肺损伤, 为抗病毒治疗提供了新思路。

【关键词】 小柴胡颗粒; 呼吸道合胞病毒; 免疫系统

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)02-0144-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Feb;19(2):144-148.]

Effect of Xiaochaihu granules on the immune system of mice infected with respiratory syncytial virus

XU Han^{1,2}, HUANG Rong¹, DENG Ailu¹, LIAO Qing¹, WANG Yihua¹, ZHOU Chunyang¹, WANG Yi² (1. Institute of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, Sichuan, China; 2. Zigong Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Zigong Psychiatric Research Center, Zigong Institute of Brain Science, Zigong Geriatric Hospital)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect and mechanism of Xiao bupleurum granules on the immune system of respiratory syncytial virus infected mice. **Methods** The mice were divided into normal group, infection group and experimental group. The infection group and experimental group were treated by nasal drip of respiratory syncytial virus (RSV) to establish respiratory syncytial virus infection model. The experimental group was treated by gavage of small bupleurum granules (150 mg/kg), while the normal group and infection group were treated by gavage of normal saline. At the end of the treatment cycle, the levels of T lymphocyte subsets in the spleen of mice were analyzed by flow cytometry. ELISA was used to detect the expression of inflammatory factors in mice. The lung injury of mice was detected by hematoxylin and eosin staining. **Results** Compared with the infected group, the proportion of innate immunity (NK cells) in the experimental group was significantly higher than that in the infected group, which was 3.883 ± 0.777 times ($t=4.600, P=0.010$). The proportion of acquired immunity, that is, T cell population, was also significantly higher than that of the infection group, which was 2.844 ± 0.425 times of the infection group ($t=6.696, P=0.002$). The levels of inflammatory factors in the experimental group were significantly lower than those in the infection group, and tended to be normal. The staining results showed that treatment of the experimental group, i. e., bupleurum granules, significantly alleviated the lung injury caused by viral infection. **Conclusion** Small bupleurum particles can stimulate respiratory syncytial virus infection mice immune system, improve the inflammatory response and lung injury caused by viral infection, for antiviral treatment provides a new way of thinking.

【Key words】 Xiaochaihu particles; respiratory syncytial virus; immune system^{***}

* **【基金项目】** 四川省医学科研课题(No. Q21050); 自贡市精神卫生中心 2022 年第一批医院科研立项课题(No. 2022ZC07)。

** **【通讯作者】** 周春阳, E-mail: zhouchunyang@nsmc.edu.cn; 王艺, E-mail: 791915950@qq.com

【作者简介】 徐翰(1992-), 男, 四川成都人, 硕士研究生, 主管药师, 从事抗感染药学研究。E-mail: 124886532@qq.com

呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)是两岁以下儿童毛细支气管炎的最常见原因^[1-3]。大约1/4因呼吸道合胞病毒入院的人需要重症监护,其中6.6%的住院患者发生死亡^[4]。RSV主要通过唾液或粘液飞沫的近距离接触传播^[5]。感染RSV的患者的免疫反应导致中性粒细胞渗入并使呼吸道变窄,导致毛细支气管炎等呼吸道疾病^[6]。目前针对于RSV的治疗药物较少。以西药治疗感染的药物主要有抗病毒药物^[7]、支气管扩张剂^[8]、免疫调节剂^[9]等,但这些药物都存在较严重的副作用。与西药相比,中药的毒副作用小,药源丰富,对于防治RSV感染具有独特的效果,通过调整机体的免疫状态,来增强机体抵抗病毒的免疫力^[10-12]。因此,在中药库中寻找有效防治RSV感染的药物具有重大意义。

小柴胡颗粒具有广泛的抗病毒功能,能够有效抑制炎症风暴、调节机体免疫功能,被推荐用于防治“非典”“甲型流感”“登革热”和“新型冠状病毒”等病毒性感染引起的疾病^[13-15]。研究表明,小柴胡颗粒可能发挥抑制RSV感染的作用^[16]。NK细胞作为一种免疫细胞,是天然免疫系统的重要组成部分,在防御病毒和抗病毒感染中发挥重要的作用^[17]。本研究通过建立RSV感染小鼠呼吸系统模型并进行小柴胡颗粒灌胃治疗一周,同时正常组和感染组通过灌胃生理盐水作为对照。通过流式细胞术检测不同处理组小鼠脾脏中免疫细胞群的分布,通过ELISA检测炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达,通过苏木精伊红染色观察肺组织的炎症浸润状态,探讨小柴胡颗粒对RSV所致的呼吸系统感染是否具有改善的作用。

材料与方法

1 材料与仪器

BALB/c小鼠,6~8周龄,体重为18~20g,雌雄相当,由湖南省实验动物中心提供;RSV-Long毒株购自中国预防医学科学院病毒学研究所。

FITC anti-mouse CD3 Antibody, PE anti-mouse CD8 α Antibody, PE/Cyanine7 anti-mouse IFN- γ Antibody, Alexa Fluor[®] 488 anti-mouse CD49b Antibody, Alexa Fluor[®] 647 anti-mouse CD69 Antibody 流式抗体、Fixation Buffer、Perm Wash 购自美国BioLegend公司, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA试剂盒购自上海澎湃商城实验室, RPMI-1640培养基购自武汉Servicebio公司, 异戊巴比妥钠购自国药集团化学试剂有限公司。

分析天平(DV215CD)购自美国Ohaus公司,流式细胞计数仪(NovoCyte)购自中国安捷伦科技有限公司,低温超速离心机(5418R)购自德国Eppendorf公

司,酶标仪(H1-Synergy)购自美国Biotek公司。

2 方法

2.1 RSV感染 模型构建首先用10%异戊巴比妥(10 mL/kg)将小鼠麻醉,经小鼠两侧鼻孔滴入50 μ L RSV病毒,连续感染3 d,建立RSV感染模型。3 d后,小鼠出现精神萎靡、毛发凌乱、呼吸急促、咳嗽、打喷嚏等症状,表明RSV感染模型成功。

2.2 流式细胞术检测 免疫细胞群的分布治疗周期结束后,将实验小鼠安乐死,浸入75%酒精,无菌取出脾脏,用RPMI-1640清洗后,再加入1 mL 1640培养基轻轻研磨,加2 mL 1640培养基冲下来后,竖直静放5 min,取上清1 000 r/min离心10 min。弃上清加入2 mL红细胞裂解液,裂解5 min(去除红细胞),1 000 r/min离心10 min。弃上清加入5 mL 1640培养基清洗两遍后进行计数并分成两个部分。

先天性免疫系统NK细胞的检测:根据流式抗体说明书加入抗体(CD49b, CD69),避光冰上孵育30 min。1 000 r/min离心5 min,用1640培养基清洗两遍,过200目筛网后通过流式细胞仪上机检测。

获得性免疫系统T细胞的检测:根据流式抗体说明书加入抗体(CD3, CD8 α),避光冰上孵育30 min。1 000 r/min离心5 min,用1640培养基清洗两遍,用Fixation Buffer固定20 min后,清洗一遍弃去上清,每个样本加入500 μ L Perm Wash,冰上孵育10 min后,离心同样的方法破膜两遍。加入抗体(IFN- γ)同样冰上避光孵育40 min,用破膜剂清洗两遍,过200目筛网上机检测。

2.3 ELISA试剂盒检测 炎症因子的变化在治疗周期结束后,眼球取血于洁净1.5 mL离心管中,室温静置10 min后,以2 500 r/min离心10 min,取出上层血清,检测外周血中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达水平,按ELISA试剂盒说明书进行操作。

2.4 苏木精-伊红染色 在治疗周期结束后,取出实验小鼠的肺组织,通过生理盐水清洗干净肺表面残留物质,接着进行固定、脱水、包埋、切片、脱蜡、梯度浓度乙醇脱水,再分别经苏木素-伊红染色后,脱水、透明、晾干后封片,在显微镜下观察肺组织病理学变化。

2.5 小鼠体重变化记录 在治疗周期内小鼠的体重变化,每天观察小鼠的日常状态,以及对小鼠的体重变化进行统计,绘制体重曲线。

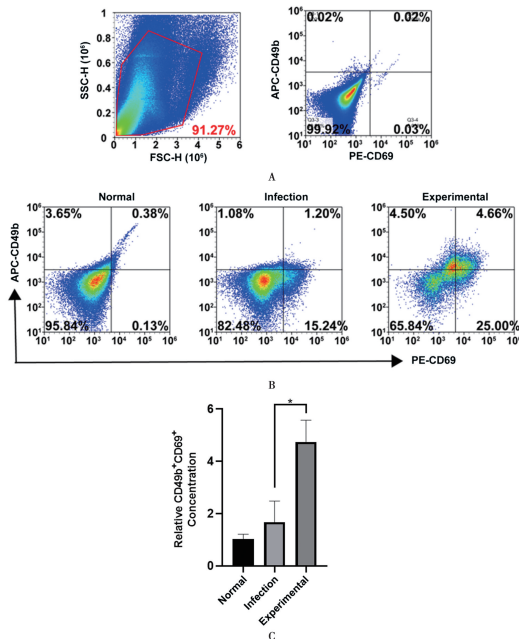
3 统计分析

所有的实验数据均为3次以上的平行实验所得,数据分析使用GraphPad Prism 7.0。数据展示为平均值 $\pm$ 标准差, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 对小鼠先天免疫系统的影响

通过流式细胞术检测小鼠脾脏中 NK 细胞的比例。结果见图 1。经小柴胡颗粒处理后, NK 细胞的比例明显上升(图 1B), 与感染组相比具有显著性差异是感染组的 3.883 ± 0.777 倍, (图 1C) ($t = 4.600, P = 0.010$)。结果表明, 经小柴胡颗粒的治疗, 明显改善了 RSV 感染小鼠的先天免疫系统的状态。



注: 圈门过程(A)、经不同处理后 NK 细胞的总百分比(B)以及(C)相对归一化定量。

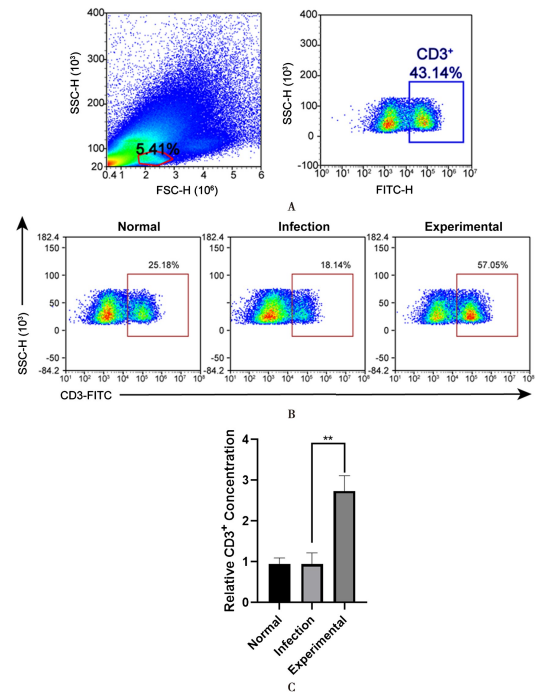
图 1 不同处理组中小鼠的 NK 细胞比例

Note: Flow process of door (A), the percentage of total NK cells after treatment by different preparations (B) and relative normalized quantification (C).

Fig. 1 NK cell proportion of rats in different treatment groups

2 对小鼠获得性免疫系统的影响

通过流式细胞术检测了小鼠经不同处理后脾脏中 CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞以及 CD8⁺IFN- γ ⁺T 细胞的分布与比例, 结果见图 2-4。与正常组相比, 感染组小鼠的免疫细胞群分布相对有所下降, 经小柴胡颗粒灌胃治疗后, 免疫细胞 CD3⁺T 细胞(图 2B)、CD8⁺T 细胞(图 3B)以及 CD8⁺IFN- γ ⁺T 细胞(图 4B)的分布与感染组相比均有所提高。CD3⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞以及 CD8⁺IFN- γ ⁺T 细胞的分布为感染组的 2.844 ± 0.425 倍($t = 6.696, P = 0.002$), (图 2C); 4.204 ± 0.624 倍($t = 8.150, P = 0.001$) (图 3C); 3.135 ± 0.839 倍($t = 4.938, P = 0.008$) (图 4C)。结果表明, 小鼠经 RSV 感染后, 免疫力有所下降, 而小柴胡颗粒灌胃治疗组则显著激活了感染小鼠的免疫应答, 改善了小鼠的免疫系统, 为病毒的清除发挥了作用。

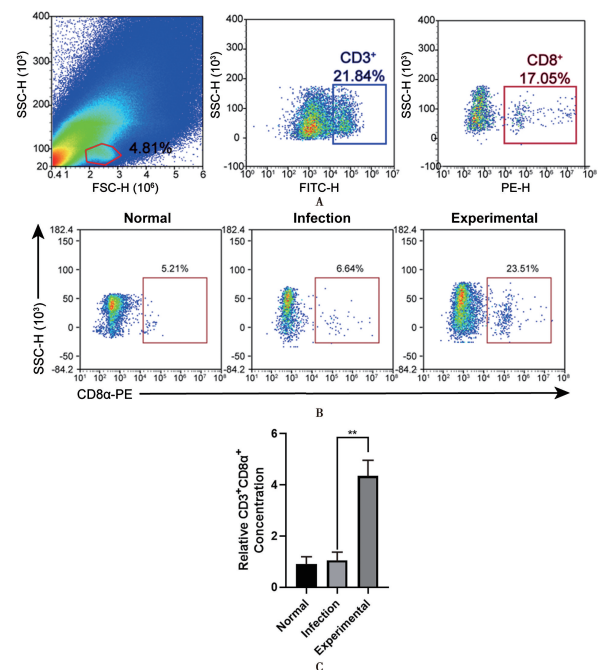


注: 圈门过程(A)、经不同处理后 CD3⁺T 细胞的总百分比(B)以及(C)相对归一化定量。

图 2 不同处理组中小鼠的 CD3⁺T 细胞比例

Note: Flow process of door (A), the percentage of total CD3⁺T cells after treatment by different preparations (B) and relative normalized quantification (C).

Fig. 2 CD3⁺T cell proportion of rats in different treatment groups

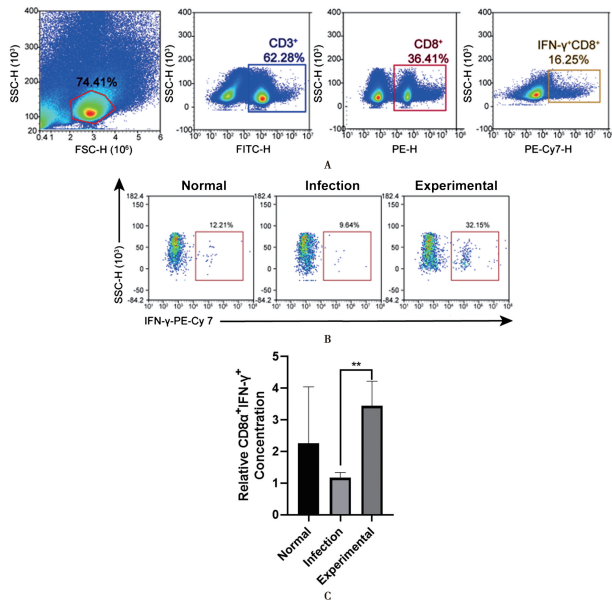


注: 圈门过程(A)、经不同处理后 CD8⁺T 细胞的总百分比(B)以及(C)相对归一化定量。

图 3 不同处理组中小鼠的 CD8⁺T 细胞比例

Note: Flow process of door (A), the percentage of total CD8⁺T cells after treatment by different preparations (B) and relative normalized quantification (C).

Fig. 3 CD8⁺T cell proportion of rats in different treatment groups



注:圈门过程(A)、经不同处理后 $CD8^+ IFN-\gamma^+$ T 细胞的总百分比(B)以及(C)相对归一化定量。

图 4 不同处理组中小鼠的 $CD8^+ IFN-\gamma^+$ T 细胞比例

Note: Flow process of door (A), the percentage of total $CD8^+ IFN-\gamma^+$ T cells after treatment by different preparations (B) and relative normalized quantification (C).

Fig. 4 $CD8^+ IFN-\gamma^+$ T cell proportion of rats in different treatment groups

3 对小鼠分泌炎症因子的影响

采用 ELISA 检测小鼠外周血中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的表达水平,结果见图 5。与正常组相比,感染组小鼠的炎症因子 IL-1 β (A)、TNF- α (B)、IL-6(C)的表达明显升高,而实验组经过处理后,炎症因子的表达水平均明显降低,其中 IL-1 β (A)降低 41.791% ($t = 4.251, P = 0.013$); TNF- α (B)降低了 45.914% ($t = 6.431, P = 0.032$); IL-6 (C)降低 66.769% ($t = 5.549, P = 0.025$)。结果表明,小柴胡颗粒能够减轻病毒感染所引起的炎症反应,改善 RSV 的病情。

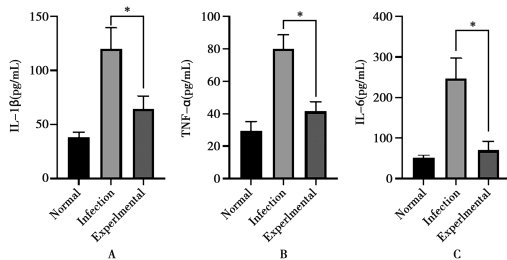


图 5 不同处理对感染小鼠分泌促炎因子 IL-1 β (A)、TNF- α (B)和 IL-6(C)水平的影响($n=3$) (* $P<0.01$)

Fig. 5 Levels of released pro-inflammatory cytokines IL-1 β (A), TNF- α (B), and IL-6 (C) in mouths with different treatments

4 对小鼠肺组织的影响

为了评估小柴胡颗粒对于感染 RSV 小鼠的治疗效果,通过 HE 染色观察不同处理组小鼠的肺部组织

炎症浸润情况,结果见图 6。正常组小鼠肺组织结构正常,未见炎性细胞浸润及毛细血管扩张,肺泡腔无异常物质;感染组小鼠可见肺泡壁明显增厚,厚度不匀,大量炎性细胞浸润,肺泡壁毛细血管扩张明显,部分肺泡明显扩张。实验组可见淋巴细胞浸润减少,肺泡壁变薄,肺组织损伤减轻,结果表明了小柴胡颗粒具有明显缓解感染小鼠肺损伤的效果。

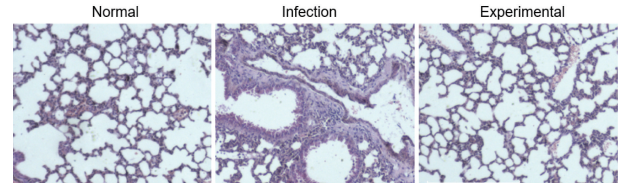


图 6 HE 染色观察大鼠肺组织病理学变化(200 $\times$)

Fig. 6 HE staining to observe the pathological changes of lung tissue in rats (200 $\times$)

5 对小鼠体重的影响

治疗期间各组小鼠的体重变化结果见图 7。实验期间各组小鼠体重都没有出现明显下降的情况,且小鼠的进食量和毛损等也无明显差异,这表明小柴胡颗粒对小鼠的生长状态没有明显影响。

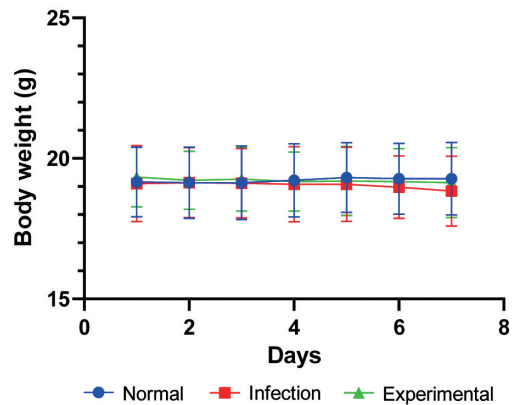


图 7 小鼠在治疗期间的体重变化($n=5$)

Fig. 7 Body weight changes of mice during the treatment period

讨论

研究表明,在病毒感染过程中,先天性免疫系统通过炎症反应分泌抗病毒分子,能够有效地抑制病毒的繁殖和传播^[18]。同时其调节机制则可以避免自身免疫反应的损伤^[19]。NK 细胞是先天免疫细胞,NK 细胞的分布情况反映了固有免疫对于被感染细胞的清除能力^[20]。因此本研究观察到给予小柴胡颗粒处理的小鼠脾脏中 NK 细胞的分布显著高于未处理组,充分说明了小柴胡颗粒治疗对于小鼠先天性免疫的调节能力。

$CD3^+$ T 细胞表示成熟 T 淋巴细胞,反映了机体的细胞免疫功能状态;而 $CD8^+$ T 在 RSV 感染中杀死被感染的细胞,在病毒清除中起着关键作用,另外其分

泌的 IFN- γ 正是杀伤被感染细胞的关键^[21-23]。细胞免疫是 T 细胞介导的机体的另一种重要的免疫反应,可以抵抗细胞内微生物如病毒和宿主细胞内增生的细菌感染^[24]。因为抗体不能进入受感染的细胞,细胞内病毒的消灭主要依靠细胞免疫^[25]。同样,在本研究中检测了经小柴胡颗粒处理后小鼠脾脏中免疫细胞群的分布,结果显示小柴胡颗粒可以激活感染小鼠的获得性免疫系统,发挥抗病毒作用。

炎症因子是具有免疫调节作用的一类重要蛋白质物质,许多中药可以通过激活网状内皮系统,诱生多种细胞因子(如促进干扰素生成,促进白细胞介素生成,诱生肿瘤坏死因子等)来增强动物免疫功能^[26-28]。本研究观察到经小柴胡颗粒处理后,避免了感染小鼠的过度的炎症反应,减轻了感染引起的炎症反应。

本研究证明了小柴胡颗粒能够调节体内免疫平衡,激发获得性免疫系统应答,能通过调动机体特异性和非特异性免疫功能来增强抗病毒感染的能力,从而具有更广泛的适应性和优越性;同时能够抑制炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的过度活化而发挥抗 RSV 感染的效应,改善了由 RSV 感染引起的肺损伤。本研究为小柴胡颗粒的临床应用提供了依据。

【参考文献】

- [1] Gonnin L, Desfosses A, Bacia-Verloop M, et al. Structural landscape of the respiratory syncytial virus nucleocapsids[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 5732.
- [2] 冷晓雪, 李柏新, 陈之光. 天麻素抑制 Notch/NF- κ B 信号通路对呼吸合胞病毒感染大鼠的肺组织损伤及 Th17/Treg 细胞平衡的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(1): 6-11.
- [3] Ghazaly M, Nadel S. Characteristics of children admitted to intensive care with acute bronchiolitis[J]. Eur J Pediatr, 2018, 177(6): 913-920.
- [4] Anderson LJ, Peret TC, Piedra PA. RSV Strains and Disease Severity[J]. J Infect Dis, 2019, 219(4): 514-516.
- [5] Li Y, Chen D, Hu J, et al. The α -tubulin of Laodelphax striatellus mediates the passage of rice stripe virus (RSV) and enhances horizontal transmission[J]. PLoS Pathog, 2020, 16(8): 1-26.
- [6] Smith DK, Seales S, Budzik C. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in children[J]. Am Fam Physician, 2017, 95(2): 94-99.
- [7] Hammitt LL, Dagan R, Yuan Y, et al. Nirsevimab for prevention of RSV in healthy late-preterm and term infants[J]. N Engl J Med, 2022, 386(9): 837-846.
- [8] Piralla A, Chen Z, Zaraket H. An update on respiratory syncytial virus[J]. BMC Infect Dis, 2023, 23(1): 734.
- [9] Kaushal A. Innate immune regulations and various siRNA modalities[J]. Drug Deliv Transl Res, 2023, 13(11): 2704-2718.
- [10] Dai YJ, Wan SY, Gong SS, et al. Recent advances of traditional Chinese medicine on the prevention and treatment of COVID-19 [J]. Chin J Nat Med, 2020, 18(12): 881-889.
- [11] Nai J, Zhang C, Shao H, et al. Extraction, structure, pharmacological activities and drug carrier applications of *Angelica sinensis* polysaccharide [J]. Int J Biol Macromol. 2021;183:2337-2353.
- [12] Zhang Z, Ji Y, Hu N, et al. Ferroptosis-induced anticancer effect of resveratrol with a biomimetic nano-delivery system in colorectal cancer treatment[J]. Asian J Pharm Sci, 2022, 17(5): 751-766.
- [13] Li D, Wang Y, Liu N, et al. Modified Sijunzi granule decreases post-weaning diarrhea in Rex rabbits via promoting intestinal development[J]. Front Vet Sci, 2022, 9: 1-14.
- [14] 刘宏, 黄伟, 陈祥云, 等. 小柴胡颗粒在防治合胞病毒, 腺病毒中的新应用: CN202010403390. 2 [P]. CN111467466A [2023-12-13].
- [15] 毕聪, 郑如文, 江志强, 等. 小柴胡颗粒的药理学研究进展[J]. 药学研究, 2020, 39(10): 4.
- [16] Cheng M, Zhang Y, Yan J, et al. Inhibiting virus replication and excessive inflammatory response: Mechanism of combined prescription of Ma-Xing-Shi-Gan decoction and Xiao-Chai-Hu decoction against influenza virus [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 313: 116481.
- [17] Zhang Y, Zhong X, Xi Z, et al. Antiviral Potential of the Genus *Panax*: An updated review on their effects and underlying mechanism of action [J]. J Ginseng Res, 2023, 47(2): 183-192.
- [18] Hu L, Jiang J, Tang Y, et al. A pseudovirus-based entry assay to evaluate neutralizing activity against respiratory syncytial virus [J]. Viruses, 2023, 15(7): 1548.
- [19] Savoy SKA, Boudreau JE. The Evolutionary arms race between virus and NK cells: Diversity enables population-level virus control [J]. Viruses, 2019, 11(10): 959-969.
- [20] Xu B, Tian L, Chen J, et al. An oncolytic virus expressing a full-length antibody enhances antitumor innate immune response to glioblastoma [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5908-5925.
- [21] Russell CD, Unger SA, Walton M, et al. The human immune response to respiratory syncytial virus infection [J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(2): 481-502.
- [22] Varese A, Nakawesi J, Farias A, et al. Type I interferons and MAVS signaling are necessary for tissue resident memory CD8+ T cell responses to RSV infection [J]. PLoS Pathog, 2022, 18(2): 1-24.
- [23] Schmidt ME, Varga SM. Cytokines and CD8 T cell immunity during respiratory syncytial virus infection [J]. Cytokine, 2020, 133: 1-9.
- [24] Agac A, Kolbe SM, Ludlow M, et al. Host responses to respiratory syncytial virus infection [J]. Viruses, 2023, 15(10): 1999.
- [25] Ma R, Li Z, Chiocci EA, et al. The emerging field of oncolytic virus-based cancer immunotherapy [J]. Trends Cancer, 2023, 9(2): 122-139.
- [26] 王超, 赵君, 白祎名, 等. 小柴胡汤抗人呼吸道合胞病毒感染有效成分与网络机制研究 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(z1): 31-32.
- [27] Tarris G, De Rougemont A, Charkaoui M, et al. Enteric viruses and inflammatory bowel disease [J]. Viruses, 2021, 13(1): 104-117.
- [28] Chen F, Qu F, Jia Y, et al. Xiao-Chai-Hu decoction ameliorates Poly (I: C)-induced viral pneumonia through inhibiting inflammatory response and modulating serum metabolism [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 1240242

【收稿日期】 2023-11-02 【修回日期】 2024-01-10