

## 黄芪注射液治疗鼠单纯疱疹病毒性脑炎的实验研究

杨世炳<sup>1</sup>, 唐久来<sup>2</sup>

(1. 浙江省中西医结合医院, 杭州市红十字会医院, 浙江 杭州 310003; 2. 安徽医科大学第一附属医院)

**【摘要】** 目的 探讨黄芪注射液对 I 型单纯疱疹病毒(HSV- I)感染致病病毒性脑炎的疗效及机制。方法 将 60 只小鼠随机分为对照组、模型组和黄芪治疗组, 每组 20 只。建立 HSV- I 感染致病病毒性脑炎模型。观察各组小鼠的死亡率, 检测小鼠血中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )、一氧化氮(NO)水平, 电镜下观察小鼠神经细胞形态结构的变化。结果 电镜下 HSV- I 感染后小鼠脑细胞胞质水肿明显, 核仁固缩, 核内结构破坏, 多数线粒体呈空泡样改变, 脊突破坏, 髓鞘严重松解, 核仁内可见病毒颗粒; IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、NO 水平及小鼠的死亡率均较对照组明显上升( $P$  均 $<0.01$ )。黄芪注射液治疗后小鼠脑组织病理学改变减轻, 死亡率及 IL-1 $\beta$ 、NO 水平较模型组明显下降, 而 IFN- $\gamma$  继续上升( $P$  均 $<0.01$ )。结论 早期应用黄芪注射液对单纯疱疹病毒性脑炎有一定的治疗效果, 其作用机制可能是通过调节免疫应答, 影响 IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  和 NO 等细胞因子的水平, 从而减轻炎症反应。

**【关键词】** I 型单纯疱疹病毒; 脑炎; 黄芪注射液

中图分类号: R285.5 文献标识码: B DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.020

黄芪注射液是临床常用制剂, 对心脏、肾脏有保护作用。但目前关于黄芪对病毒感染等所致脑炎的保护作用及其机制研究很少。本研究拟观察黄芪注射液对 I 型单纯疱疹病毒(HSV- I)感染的神经细胞是否有保护作用及其可能机制, 以期为临床上黄芪注射液治疗中枢神经系统病毒性感染提供理论依据。

### 1 材料与方

**1.1 实验动物及试剂:** 6 周龄雄性健康昆明小鼠 60 只, 体重(18 $\pm$ 2)g, 由安徽医科大学实验动物中心提供。HSV- I、非洲绿猴肾传代细胞均由安徽省医学科学研究所微生物室提供。聚合酶链反应(PCR)检测试剂盒购自华美生物工程公司, 白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )放射免疫法检测试剂盒购自北京北免东雅生物技术研究所, 一氧化氮(NO)检测试剂盒购于南京建成生物有限公司,  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒购自美国 TPI 公司。

**1.2 病毒滴定:** 使用前将 HSV- I 病毒在 Vero 细胞上传代 2 次, 以增加病毒毒性。以 24~48 h 病毒致细胞病变作用达 +++~++++ 的病毒悬液滴定半数组织培养感染量, 收集病毒并测定其滴度。选择 100TCID<sub>50</sub> 病毒浓度接种小鼠。

### 1.3 动物分组及 HSV- I 脑炎模型建

作者简介: 杨世炳(1971-), 男(汉族), 浙江省人, 医学硕士, 主治医师, Email: yang.shb@163.com.

立<sup>[1]</sup>, 将 60 只小鼠按随机数字表法分为对照组、模型组和黄芪组 3 组, 每组 20 只。对照组向右侧脑室内注射 0.03 ml 生理盐水, 模型组和黄芪组分别向右侧脑室内注射 0.03 ml HSV- I 病毒液, 制备小鼠 HSV- I 脑炎模型。次日起黄芪组左侧腹腔注射黄芪注射液 0.01 ml/g, 每日 1 次, 连用 6 d。对照组、模型组则分别经左侧腹腔内注射等量生理盐水。

**1.4 检测指标及方法:** 分别于 2、4 和 7 d 观察各组小鼠生存状况。在小鼠发病后的症状高峰期(即持续抽搐濒死期)处死小鼠, 未发病的小鼠于 7 d 后处死取血清, 于 -70 °C 保存。用 ELISA 法检测小鼠血中 NO 和 IFN- $\gamma$  浓度, 用放射免疫法检测小鼠血中 IL-1 $\beta$  浓度。另取脑组织, 一部分用体积分数为 10% 的戊二醛固定, 切片, 电镜下观察脑组织神经细胞形态学变化; 另一部分脑组织制成组织匀浆, PCR 检测 HSV- I DNA。

**1.5 统计学处理:** 应用 SPSS 10.0 统计软件, 结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用  $q$  检验, 两组率比较用  $\chi^2$  检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 小鼠生存状况(表 1):** 模型组 7 d 后总死亡率较对照组显著升高, 黄芪组则较模型组显著降低, 差异有统计学意义( $P$  均 $<0.05$ )。

**2.2 NO、IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  含量(表 2):**

模型组 NO、IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  含量均较对照组明显升高, 黄芪组 NO、IL-1 $\beta$  较模型组明显降低, 而 IFN- $\gamma$  则继续升高( $P$  均 $<0.01$ )。

表 1 各组小鼠不同时间点死亡率比较

组别	动物数	死亡率[% (只)]			总死亡率 [% (只)]
		2 d	4 d	7 d	
对照组	20	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
模型组	20	5(1)	35(7)	60(12)	100(20) <sup>a</sup>
黄芪组	20	0(0)	20(4)	45(9)	65(13) <sup>c</sup>

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与模型组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$

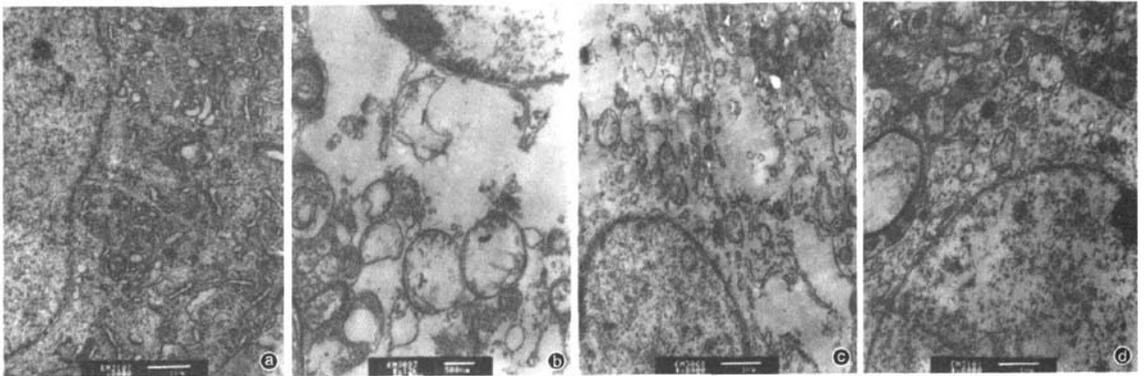
表 2 各组小鼠血 NO、IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数	NO	IL-1 $\beta$	IFN- $\gamma$
		( $\mu$ mol/L)	(ng/L)	(ng/L)
对照组	20	49.7 $\pm$ 5.6	178 $\pm$ 12	45.3 $\pm$ 5.2
模型组	20	122.0 $\pm$ 13.8 <sup>b</sup>	317 $\pm$ 14 <sup>b</sup>	116.7 $\pm$ 13.1 <sup>b</sup>
黄芪组	20	70.6 $\pm$ 10.3 <sup>bd</sup>	251 $\pm$ 15 <sup>bd</sup>	151.2 $\pm$ 8.7 <sup>bd</sup>

注: 与对照组比较, <sup>b</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>d</sup> $P<0.01$

**2.3 HSV- I DNA:** 除对照组外, 模型组和黄芪组脑组织匀浆中 HSV- I DNA 均呈阳性反应。

**2.4 脑组织形态学观察(图 1):** 对照组神经细胞结构正常; 模型组胞质水肿, 多数线粒体肿胀, 棘突破坏, 髓鞘严重松解、破坏; 黄芪组神经细胞轻度受损, 髓鞘病变较轻。



①:对照组(×8 000); ②:模型组(×12 000); ③:模型组(×8 000); ④:黄芪组(×8 000)

图 1 电镜下观察各组小鼠神经细胞形态学变化(轴-铅双染)

3 讨论

HSV- I 感染人体后可侵犯中枢神经系统,引起单纯疱疹病毒性脑炎、脑膜炎,导致病毒性脑炎,危及生命<sup>[2-3]</sup>。

黄芪注射液是从黄芪中提取的多糖、黄酮类有效成分,其性甘、微温,益气行血,能通调血脉,畅通经络,清除自由基,提高机体抗氧化能力,改善微循环和血液流变性,激活和恢复红细胞变形能力,抑制血栓形成,降低血小板黏附率,保护脑细胞。黄芪是临床常用的具有免疫调节作用的药物,研究证实其对机体的免疫功能有促进作用,能增强网状内皮系统的吞噬功能,对体液免疫、细胞免疫均有促进作用<sup>[4]</sup>。黄芪可以提高自然杀伤细胞(NK 细胞)的活性<sup>[5]</sup>,有促进病毒诱生和自身诱生 IFN 的能力。本研究结果显示,黄芪注射液可降低病毒性脑炎小鼠的死亡率。电镜结果亦表明,黄芪注射液治疗后,小鼠脑神经元结构得到明显改善;黄芪组 IFN-γ 水平最高,说明神经细胞对 IFN 非常敏感,IFN 可以在病毒的不同生命周期以不同方式抗击病毒,同时对非特异性免疫、细胞免疫均有明显的调节作用,可促进正常人和肿瘤患者的淋巴细胞转化,增强 NK 细胞

的细胞毒作用,对 IFN 系统有明显的刺激和诱生作用。

在急性脑炎和(或)脑炎病理条件下,抗自由基酶活性降低,抗氧化物减少,自由基产生急剧增多。自由基引起神经细胞生物膜及亚细胞器过氧化,造成结构与功能破坏,脑炎时自由基防御体系受损,超氧化物歧化酶(SOD)等自由基清除剂活性降低,也加剧了自由基引起的损害。近年来黄芪作为氧自由基清除剂已逐渐引起关注,可降低脂质过氧化含量,稳定生物膜,并能提高 SOD 及谷胱甘肽过氧化酶的活性,具有抗氧自由基的作用。黄芪通过清除脑炎时产生的羟自由基( $\cdot\text{OH}$ ),从而抑制脂质过氧化反应带来的神经元损伤;同时能改善脑血流自动调节机制,减少因局部血管痉挛及血管炎症所致继发性脑缺血,从而减轻脑炎。

通过观察病毒性脑炎小鼠体内细胞因子的变化显示,病毒性脑炎时体内细胞因子 IL-1β、NO 水平增高,促进炎症反应,加重脑组织的损伤。黄芪注射液治疗后 IL-1β、NO 水平较模型组低,说明黄芪能改善脑组织结构,降低小鼠死亡率,其机制可能是通过调节免疫应答,影

响 IL-1β、IFN-γ 等细胞因子水平和 NO 的水平,减轻炎症反应,从而减轻脑炎及改善脑组织结构来实现的。

参考文献

[1] Dennett C, Klapper PE, Cleator GM. Polymerase chain reaction in the investigation of "relapse" following herpes simplex encephalitis [J]. J Med Virol, 1996, 48(2):129-132.

[2] 孙景辉, 乔红梅, 傅文水, 等. 病毒性脑炎、脑膜炎多病原的探讨 [J]. 临床儿科杂志, 2000, 18(2): 99-101.

[3] 方方, 吴沪生, 吕俊兰, 等. 儿童单纯疱疹病毒性脑炎 22 例临床特征和随访研究 [J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(7): 432-434.

[4] 蔡琰, 黄青青. 黄芪对机体免疫系统影响的研究进展 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(6): 379-380.

[5] 苏群, 方强. 黄芪注射液联用西药治疗急性病毒性心肌炎对血自然杀伤细胞活性及可溶性白介素-2 受体水平的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(2): 75-77.

(收稿日期: 2009-05-16)

(本文编辑: 李银平)

欢迎订阅《中国危重病急救医学》杂志

中华医学会主办, 中文核心期刊, 中国科技核心期刊

全国各地邮局订阅, 邮发代号: 6-58 定价: 每期 14 元, 全年 168 元

2009 年以前的刊物可在本刊杂志社邮购部购买, 电话: 022-23042150

刊社地址: 天津市和平区睦南道 122 号 邮编: 300050 电话: 022-23306917