

## 小檗胺对流感病毒感染小鼠免疫功能的影响

金 俐、隋文作 (辽宁中医学院病毒研究室, 沈阳 110033)

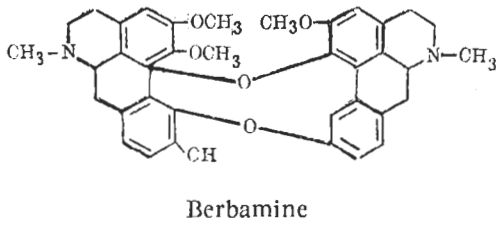
**提要** 小檗胺能改善因流感病毒感染导致的小鼠肺巨噬细胞吞噬, 杀菌和胞内吞噬体-溶酶体融合功能损伤, 具有增强肺巨噬细胞功能的作用。但对感染小鼠支气管内病毒血凝滴度的消长, 抗流感抗体生成及肺病变程度无明显影响。结果表明, 小檗胺是一种细胞免疫促进剂。

**关键词** 小檗胺; 正粘病毒 A 型; 巨噬细胞; 抗体

1985年2月1日收稿 1985年8月31日修回

小檗胺(berbamine)系细叶小檗(*Berberis poiretii* Schneid)根中的生物硷<sup>(1)</sup>。具有升高白细胞<sup>(2)</sup>, 抗矽肺, 抗肿瘤<sup>(3)</sup>, 降血压<sup>(1)</sup>等作用。在升白及抗矽肺临床观察中, 发现多数患者用药后感冒减少, 体质增强, 提示小檗胺可能提高抗病能力。本文用亚致死量流感病毒感染小鼠的实验模型<sup>(4)</sup>观察小檗胺对肺巨噬细胞(M $\phi$ )功能抑制的调节作用及对小鼠肺洗液血

凝滴度消长, 血凝抑制抗体生成和肺病变的影响。



## 材料与方 法

**材料** 盐酸小檗胺由中国科学院林业土壤研究所植化组提供。无色片状结晶, 用无菌生理盐水配成 0.05, 0.1, 0.2%, 4℃保存。流感病毒 A/FM/1/47(H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) 鼠肺适应株 (FM<sub>1</sub>) 由中国医学科学院抗菌素研究所赠送。用 3 周龄小鼠传代, 按文献(5)制备病毒, 感染滴度为 10<sup>4.3</sup> LD<sub>50</sub>/0.05 ml, -75℃保存。昆明种小鼠由中国医科大学动物室提供, 体重 20±SD 2g, ♀♂不拘。

**方法** 肺游离细胞收集小鼠从眼眶动脉放血致死, 通过气管将 5ml 灭菌盐水分 4 次灌洗肺组织, 将收集的肺洗细胞 400×g 离心 10 min 沉淀细胞重悬在 0.4 ml 洗液中。

**Mφ 功能测定** 小鼠每组 60 只。用乙醚轻度麻醉, 第 1-4 组滴鼻接种(in)亚致死量 (0.1 LD<sub>50</sub>) 病毒 (0.05 ml/鼠), 然后第 1 组 ip 生理盐水 0.2 ml/鼠, 第 2-4 组每鼠分别 ip 小檗胺 5, 10 及 20 mg/kg, 首次给药在 in 病毒后 2 h, qd×7 d, 为排除 in 和 ip 的应激作用, 设立第 5 组即 in 正常肺组织悬液并 ip 小檗胺 20 mg/kg 的非感染对照组(control)。in 病毒后 d 3, 5, 7, 10, 14, 每组杀死 12 只小鼠, 收集肺游离细胞。按文献法检测吞噬, 杀菌功能及胞内吞噬体-溶酶体融合功能<sup>(6,7)</sup>。

**肺洗液病毒测定** 取小鼠肺灌洗液上清, 采用常规微量血凝法检测。抗体测定, in 亚致死量 FM<sub>1</sub> 后, 实验组小鼠每日 ip 小檗胺 10 mg/kg, qd×7 d, 对照组 ip 盐水。1 和

2 周自小鼠眼眶动脉取血, 采用常规微量血凝抑制法测定。按常规进行肺病变组织学检查。

## 结 果

**对 FM<sub>1</sub> 感染小鼠肺 Mφ 功能的影响** 表 1 所示, in FM<sub>1</sub> 后, 0 mg/kg 组小鼠肺 Mφ 功能均随天数而趋于下降, 表现为吞噬率, 吞噬指数和杀菌率降低, 胞内吞噬体-溶酶体融合抑制率升高, 用药组小鼠肺 Mφ 功能明显增强。ip 小檗胺 5 mg/kg 即能提高由于病毒感染损伤的肺 Mφ 各功能, 剂量增加 1 倍, 药效也相应提高, 用药 7 d 时, 吞噬率, 吞噬指数和杀菌率三参数已近于非感染对照组水平。镜下尚可见用药组中某些 Mφ 内同时出现吞噬体与溶酶体融合和抑制融合的现象(图 1)。

**对小鼠肺洗液上清血凝滴度消长的影响** in 亚致死量 FM<sub>1</sub> 的小鼠在感染后 d 4-5 出现体毛疏竖, 蜷缩少动等症状。d 5 小鼠肺洗液上清血凝滴度达高峰, d 7 大部分消失。小檗胺对血凝滴度的消长无明显影响(表 2)。

**对小鼠抗 FM<sub>1</sub> 抗体生成的影响** in FM<sub>1</sub> 后 1 周小鼠血凝抑制抗体出现, 2 周增高 4 倍以上, 用药组和对照组无明显差异。

**对小鼠肺病变的影响** 剖检所见, 感染 d 5 的小鼠肺部两侧出现呈灶状分布的炎症病变, 感染后 d 7, 10, 14 的小鼠肺泡及小支气管扩张充血, 炎性细胞渗出, 肺泡壁明显增宽, 但就病变程度而言, 最大剂量 (20 mg/kg) 组与盐水组比较无明显差异, 这表明小檗胺在一定剂量内无抗病毒性肺炎的作用。

## 讨 论

小檗胺抗流感作用及对机体免疫反应的影响尚未见报道。本实验发现小檗胺对非感染的对照组小鼠肺 Mφ 功能无任何影响, 但在 FM<sub>1</sub> 感染后 5-10 d 肺 Mφ 功能低下时, 小檗胺具有增强 Mφ 吞噬, 杀菌及吞噬体-溶酶体融合功能的作用, 其效果与用药剂量有关, 说明小檗胺对 Mφ 功能有增强作用, 很可能是一种有意义

Tab 1. Influence of berbamine on function of alveolar M $\phi$  in FM<sub>1</sub>-infected mice. n=12,  $\bar{x}\pm SD$ . \* p>0.05, \*\*p<0.05, \*\*\*p<0.01. compared to saline Normal group was uninfected FM<sub>1</sub> and ip berbamine (20 mg/kg)

	Berbamine (mg/kg)	Time after FM <sub>1</sub> infection				
		3 d	5 d	7 d	10 d	14 d
Phagocytosis(%)	saline	76.7 $\pm$ 3.2	56.3 $\pm$ 3.6	48.0 $\pm$ 1.5	60.6 $\pm$ 2.1	71.1 $\pm$ 4.0
	5	77.4 $\pm$ 3.0*	59.3 $\pm$ 4.7*	55.8 $\pm$ 4.5***	63.2 $\pm$ 3.2*	70.6 $\pm$ 2.7*
	10	79.8 $\pm$ 3.0*	65.1 $\pm$ 4.2**	72.8 $\pm$ 1.6***	73.0 $\pm$ 2.2***	72.3 $\pm$ 1.7*
	20	78.2 $\pm$ 3.8*	65.8 $\pm$ 4.8**	72.9 $\pm$ 2.8***	70.9 $\pm$ 3.1***	73.0 $\pm$ 1.6*
	Control	71.8 $\pm$ 4.5	72.6 $\pm$ 3.7	72.7 $\pm$ 3.4	73.4 $\pm$ 3.6	72.9 $\pm$ 2.1
	Phagocytic index	saline	2.17 $\pm$ 0.21	1.65 $\pm$ 0.14	1.50 $\pm$ 0.14	1.80 $\pm$ 0.15
5		2.20 $\pm$ 0.31*	1.68 $\pm$ 0.21*	1.71 $\pm$ 0.23*	1.84 $\pm$ 0.23*	2.14 $\pm$ 0.28*
10		2.41 $\pm$ 0.20*	1.77 $\pm$ 0.18*	2.09 $\pm$ 0.21***	2.09 $\pm$ 0.16**	2.17 $\pm$ 0.21*
20		2.28 $\pm$ 0.15*	1.83 $\pm$ 0.27*	2.02 $\pm$ 0.24***	2.06 $\pm$ 0.25**	2.15 $\pm$ 0.30*
Control		2.33 $\pm$ 0.39	2.52 $\pm$ 0.19	2.56 $\pm$ 0.33	2.45 $\pm$ 0.24	2.54 $\pm$ 0.30
Cytocidal rate (%)		saline	5.6 $\pm$ 1.5	5.3 $\pm$ 0.8	2.9 $\pm$ 1.0	3.2 $\pm$ 0.8
	5	6.3 $\pm$ 1.4*	5.6 $\pm$ 1.6*	4.4 $\pm$ 1.6*	3.7 $\pm$ 1.6*	4.4 $\pm$ 1.1*
	10	6.7 $\pm$ 1.8*	7.3 $\pm$ 0.9***	5.9 $\pm$ 1.2***	4.7 $\pm$ 1.1**	5.3 $\pm$ 1.2*
	20	6.4 $\pm$ 1.1*	7.7 $\pm$ 1.7***	5.3 $\pm$ 1.1***	5.0 $\pm$ 0.9**	5.6 $\pm$ 1.6*
	Control	4.6 $\pm$ 1.3	4.9 $\pm$ 0.9	4.3 $\pm$ 1.6	5.0 $\pm$ 1.1	4.6 $\pm$ 1.1
	Inhibition of phagosome-lysosome fusion(%)	saline	30.5 $\pm$ 5.1	49.6 $\pm$ 4.9	65.3 $\pm$ 3.2	47.6 $\pm$ 4.4
5		28.3 $\pm$ 5.2*	40.9 $\pm$ 5.9***	44.3 $\pm$ 4.7***	42.6 $\pm$ 3.9***	28.6 $\pm$ 6.2*
10		26.5 $\pm$ 4.7*	26.6 $\pm$ 7.5***	24.7 $\pm$ 3.4***	23.2 $\pm$ 2.4***	23.1 $\pm$ 1.5*
20		32.3 $\pm$ 5.5*	25.2 $\pm$ 5.4***	26.6 $\pm$ 4.9***	27.3 $\pm$ 4.2***	23.3 $\pm$ 3.5*
Control		5.2 $\pm$ 1.7	2.9 $\pm$ 1.8	4.6 $\pm$ 2.9	5.8 $\pm$ 2.5	5.8 $\pm$ 2.6

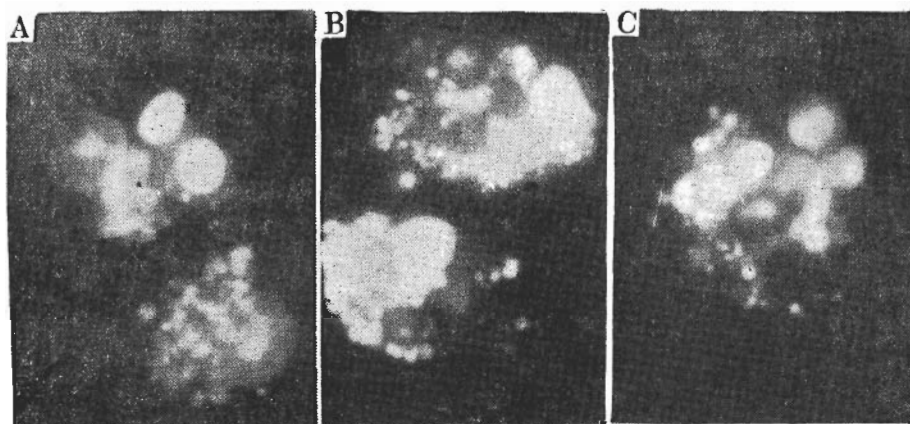


Fig 1. Phagosome-lysosome fusion of alveolar M $\phi$  from a mouse infected 7 d with a sublethal dose of influenza FM<sub>1</sub> and ip berbamine 10 mg/kg, [qd $\times$ 7 d. A) Normal phagosome-lysosome fusion, note the lightly stained yeast particles. B) Inhibition of phagosome-lysosome fusion, note the unstained yeasts. C) Normal and inhibition in the same M $\phi$ .  $\times$ 4000

Tab 2. Influence of berbamine on hemagglutinating activity in lavage fluid supernatants of FM<sub>1</sub>-infected mice.  $\bar{x} \pm SD/mice$ , \* $p > 0.05$

Time after infection FM <sub>1</sub>	Berbamine (mg/kg)			
	0	5	10	20
3 d	17.8 ± 9.2/25	5.8 ± 3.8*/15	10.7 ± 6.1*/19	15.3 ± 12.5*/15
5 d	33.8 ± 10.8/25	30.5 ± 4.3*/14	34.9 ± 7.1*/16	51.7 ± 4.5*/13
7 d	1.4 ± 1.7/25	1.3 ± 1.7*/12	1.2 ± 1.6*/20	1.2 ± 1.7*/15
10 d	0/20	0/12	0/12	0/12

的细胞免疫促进剂。

本实验报告小檗胺未能改变 FM<sub>1</sub> 感染的小鼠肺病变程度及气管内病毒血凝滴度, 对小鼠抗流感病毒抗体生成无明显影响, 提示小檗胺对流感病毒在体内的复制及体液免疫反应无直接作用。

流感病毒感染导致肺 M $\phi$  功能出现一定程度障碍是流感继发细菌性肺炎的主要原因<sup>(8,9)</sup>。研究小檗胺对流感感染的机体肺 M $\phi$  功能影响, 对揭示小檗胺防治流感及其继发细菌性肺炎的机制较有意义。小檗胺在国内的植物资源十分丰富, 是提取黄连素的副产物, 成本低廉, 毒性小, 值得临床探讨。

本实验尚证明 M $\phi$  吞噬体-溶酶体融合检测方法可以作为从激活 M $\phi$  方面筛选免疫药物的一项指标。

**致谢** 傅百川研究员指导, 张永志老师及附院病理室同志协助病理工作, 冯继伟同志协助摄影工作, 省计划生育科研所提供部份实验条件。

## 参 考 文 献

- 1 周仲达、韩传环、王萍. 盐酸小檗胺降压作用机制的研究. 药学学报 1980; 15: 248
- 2 刘国声、陈碧珠、宋万志、肖培根. 细叶小檗的综合利用——小檗胺的药用价值及其在 22 种小檗属植物中的含量. 植物学报 1978; 20: 255
- 3 刘昌孝、李广粹、籍秀娟. 升白药小檗胺的实验研究. 中草药通讯 1979; 9: 36
- 4 金俐、隋文作. 流感病毒(FM<sub>1</sub>)对小鼠肺巨噬细胞功能的影响. 中华微生物学和免疫学杂志 1986; 1: 51
- 5 Wyde PR, Wilson MR, Cate TR. Interferon production by leukocytes infiltrating the lungs of mice during primary influenza virus infection. *Infect Immun* 1982; 38: 1249
- 6 王秀梅、贾柄权. 吞噬细胞的吞噬和杀菌功能测定方法的改进. 中华微生物学和免疫学杂志 1982; 2: 350
- 7 Jakab GJ, Warr GA, Sannes PL. Alveolar macrophage ingestion and phagosome-lysosome fusion defect associated with virus pneumonia. *Infect Immun* 1980; 27: 960
- 8 Rodgers B, Mims CA. Interaction of influenza virus with mouse macrophages. *Ibid* 1981; 31: 751
- 9 Jakab GJ, Warr GA. Pulmonary and systemic defenses against challenge with *Staphylococcus aureus* in mice with pneumonia due to influenza A virus. *J Infect Dis* 1979; 140: 105

## Influence of berbamine on immune function in mice infected with influenza virus

JIN Li, SUI Wen-zuo (Liaoning College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110033)

**ABSTRACT** The dysfunction of the alveolar  $M\phi$  from mice associated with sublethal infection ( $10^{5.3}$  LD<sub>50</sub>/0.05 ml) of influenza A/FM<sub>1</sub>. The results showed that ip berbamine 10 mg/kg qd  $\times$  7 d enhanced the phagocytic function, intracellular bactericidal activity and phagosome-lysosome fusion after the mice were intranasally inoculated with FM<sub>1</sub>, as revealed by staining with methylene blue and fluorescein-labelling. On d 7 the phagocytosis rats was  $48.0 \pm 1.5\%$  in the control group, whereas  $72.8 \pm 1.6\%$  in berbamine group; the cytotoxic rates

were  $2.9 \pm 1.0\%$  and  $5.9 \pm 1.2\%$ , and the inhibitions of phagosome-lysosome fusion were  $65 \pm 3\%$  and  $25 \pm 3\%$ , respectively. All the differences were statistically significant. But berbamine did not influence the hemagglutinating titer in bronchoalveolar spaces, production of anti-influenza antibodies and the viral pneumonia. The results suggest that berbamine is an immunostimulating agent.

**KEY WORDS** berbamine; orthomyxovirus type A; macrophages; antibodies