

复方苦芩对细小病毒感染犬血液 T 细胞亚群和细胞因子的影响

刘娟, 吴秋月, 邱洪

(西南大学荣昌校区动物医学系, 荣昌 402460)

摘要: 研究复方苦芩对细小病毒感染犬 T 细胞亚群和细胞因子的影响。建立犬细小病毒感染模型, 把动物随机分为 6 个组, 分别为空白对照组, 模型组, 阳性药物组, 复方苦芩高、中、低剂量组, 每组 20 只。将攻毒后 6 h 设定为试验 0 d, 分别于试验 0、7、14、21、28、35 d 采血, 流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群, 试剂盒检测 IL-2、IL-4、IFN- γ 含量。结果显示: 与模型组相比, 复方苦芩可促进犬机体分泌 IL-2、IL-4 和 IFN- γ , 提高外周血 CD3⁺ T、CD3⁺ CD4⁺ T 细胞百分数, 降低 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞百分数。复方苦芩能够调节细小病毒感染犬的免疫机能, 提高犬抗病毒能力。

关键词: 苦芩; 犬细小病毒; T 细胞亚群; 细胞因子

中图分类号: S853.74

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)02-0369-08

Effect of Compound Kuqin on T Cell Subsets and Cytokines of Blood in Canines with Canine Parvovirus

LIU Juan, WU Qiu-yue, QIU Hong

(Department of Veterinary Medicine, Southwest University, Rongchang 402460, China)

Abstract: In order to study the effect of compound Kuqin on T cell subsets and cytokines of blood in canines with canine parvovirus, we established the canine parvovirus model, and separate 120 canines into 6 groups, like blank control group, model group, positive medicine group, compound Kuqin high dose group, middle dose group, low dose group, with 20 canines in each group. We set the time point that 6 hours after the virus was inoculated as 0 d, and collect the blood sampling from the canine saphenous vein at the day 0, day 7, day 14, day 21, day 28, and day 35. T lymphocyte subsets were detected by flow cytometry, and the cytokines IL-2, IL-4, IFN- γ were detected by kit. The result showed that, compared with the model group, compound Kuqin can promote the secretion of IL-2, IL-4, IFN- γ , and increase the percentage of CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺ T cells in peripheral blood, and decrease the percentage of CD3⁺ CD8⁺ T cells. In conclusion, compound Kuqin can regulate canines' immune function and improve the ability of antiviral after they were infected by canine parvovirus.

Key words: compound Kuqin; canine parvovirus; T cell subsets; cytokines

犬细小病毒病是由犬细小病毒(canine parvovirus, CPV)感染幼犬引起的一种高度接触性急性传染病, 临床上以剧烈呕吐、出血性肠炎、白细胞显著减少以及心肌炎为主要特征, 感染率可高达

100%, 病死率一般为 10% ~ 50%, 有时可达 100%^[1-3], 是犬的第二大传染病^[4]。近年来, 国内外研究人员进行了预防及治疗犬细小病毒病的研究, 开发出了犬细小病毒核酸疫苗(pVCPV-VP2)、

CPV 重组活载体疫苗(CAV2/CPV)、犬细小病毒性肠炎弱毒疫苗(M-CPV)以及犬细小病毒单克隆抗体(CPV McAb)等^[5-8]。但由于犬细小病毒本身易经过抗原漂移产生新的突变株,致使宿主范围不断扩大;体内母源抗体的干扰;继发感染以及环境等因素,均可导致临床使用上效果欠佳^[9-12]。近年来人们研究发现某些中药的活性成分以及研制的中药复方能一定程度上有效地预防或治疗该病症,为预防及治疗犬细小病毒病提供新的研究方向^[13-17]。同时研究表明,T 细胞亚群在不同的病毒病中起不同作用,不同的病毒可诱导产生不同的 T 细胞亚群参与免疫应答,同一种病毒对不同的感染动物以及在感染的不同阶段激发不同的 T 细胞亚群发生免疫应答。不同 T 细胞亚群在抗感染中的作用与某些细胞因子的产生密切相关,而 T 细胞亚群的分化又受到不同细胞因子的调节^[18],在细小病毒感染情况下,犬机体的 T 细胞亚群及细胞因子会产生相应变化,产生免疫应答。本实验室研制出对细小病毒病有一定治疗作用的复方苦苣,前期试验结果表明复方苦苣对犬的细小病毒病具有较好的防治效果^[13,15,19]。为此,本试验拟在建立犬细小病毒感染模型基础上,用复方苦苣提取液进行预防,检测不同时间段的犬 T 淋巴细胞亚群变化和细胞因子含量变化。探索复方苦苣免疫调节途径,进一步阐明犬细小病毒损伤机制和复方苦苣对犬细小病毒病犬损伤保护作用。

1 材料与方 法

1.1 毒株与细胞

犬细小病毒 CPV-2(四川农业大学彭广能惠赠,由西南大学荣昌校区 P2 生物安全实验室保存);猫肾细胞(F81)(中国科学院典型培养物保藏中心昆明细胞库,编号 KCB2006104YJ)。

1.2 动物

11~12 周龄中华田园犬 120 只,公母均有,(1.5 ± 0.2)kg,由西南大学荣昌校区实验动物中心提供,均接种过狂犬病疫苗,经左旋咪唑驱虫,隔离观察 1 周,确认健康无病且营养状态良好后用于试验。

1.3 药物与试剂

复方苦苣提取液(采用水醇提取法,生药含量 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),由西南大学荣昌校区中药教研室研制,中药:黄芩、苦参、金银花、黄芪等,购于重庆荣昌县

石家大药房;新生小牛血清,重庆百瑞有限公司;鼠抗犬 CD3;FITC/CD4;RPE/CD8;AlexaFluor[®] 647 [0213],美国 Bio-Rad 公司;淋巴细胞分离液,上海化精高科技生物产品有限公司,批号:20111208;IL-2 试剂盒,上海生物工程有限公司产品,批号:A702AD0278;IL-4 试剂盒,上海生物工程有限公司产品,批号:A702AD0279;IFN- γ 试剂盒,上海生物工程有限公司产品,批号:A702AD0277。

1.4 仪器

SE-2000 型 Nikon 倒置显微镜,日本 Nikon 公司;3111 型隔水式二氧化碳培养箱,Thermo Electron Corporation USA;SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台,苏州净化设备有限公司;DC-NSG-10 型多功能提取浓缩机组,上海达程实验设备有限公司;Bio-Rad Model 680 Microplate Reader,美国 Bio-Rad Laboratories, Inc;FACSCalibur 流式细胞仪,Bio-Rad 公司等。

1.5 病毒的复苏和感染性测定

取适量 CPV 毒株接种于已形成单层的 F81 细胞上,置 CO_2 培养箱(37°C)90 min 后,用 PBS 冲洗两遍,更换维持液,置 CO_2 培养箱中继续培养,每日在倒置显微镜下观察细胞病变,当 80% 以上细胞发生细胞病变时(约 36 h 左右细胞几乎全部脱落),连同细胞和培养液的细胞瓶冻融 3 次后,离心收集上清液,分装至 2 mL 冻存管后,置于 -80°C 保存备用。取出一部分毒株,使用 Reed-Munch 法测定病毒感染性 TCID_{50} 为 $10^{-4.76} \cdot 0.1 \text{ mL}^{-1}$ 。

1.6 犬细小病毒感染模型建立

参考文献[20],取冻存的病毒株,解冻,用于造模;采用灌服 $5 \text{ mL} \cdot \text{只}^{-1}$ 和皮下注射 $3 \text{ mL} \cdot \text{只}^{-1}$ 病毒液给试验组接种。以犬细小病毒试纸呈阳性的犬作为实验动物。

1.7 试验分组及处理

将若干只犬随机分为 6 个组,每组 20 只,分别为空白对照组(灌服等量的生理盐水,每天 2 次),模型组(只攻毒不给药),阳性药物组(攻毒前 7 d 给药,每天 2 次,每次灌服黄芪多糖),复方苦苣高、中、低剂量组(攻毒前 7 d 给药,每天 2 次,每次分别按生药量灌服 2、1、0.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。攻毒 6 h 后,设定为试验 0 d。分别于试验 0、7、14、21、28、35 d 后肢隐静脉无菌采血,分为两部分:一部分制备成抗凝血,用于 T 淋巴细胞亚群检测;另一部分分离血清,置于 4°C 冰箱保存,用于测定 IL-2、IL-4、IFN- γ 含量。

1.8 检测指标

1.8.1 犬外周血 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺)的检测 参照文献[21],从待检处理组犬后肢隐静脉采血 10 mL 于真空采血管内,混匀后静置 1 h,另取离心管,加淋巴细胞分离液 2.0 mL,吸取富含白细胞的血浆约 1.0 mL,沿管壁徐徐重叠于分离层液上,以 2 000 r·min⁻¹离心 20 min,离心完毕后,吸取血浆与分层液之间乳白色细胞层,即为淋巴细胞;将淋巴细胞移入加有 3~5 mL Hank's 液的小试管中,以 1 500 r·min⁻¹离心 10 min,弃去上清液,重复 3 次;用含 10% 小牛血清的 Hank's 液稀释淋巴细胞,调整细胞密度为 1.0×10⁶·mL⁻¹,每只犬重复 3 次。

每个样品分取 1 mL 细胞悬液加入流式管,2 500 r·min⁻¹,离心 10 min,弃上清。管内加入 100 μL PBS 和 CD3:FITC/CD4:RPE/CD8:Alexa 抗体各 10 μL,混匀避光孵育 30 min。之后加 PBS 2 mL,2 000 r·min⁻¹,离心 5 min,弃上清,重复两次,加 PBS 200 μL 混匀,在第三军医大学流式细胞室检测 T 淋巴细胞亚群(活细胞率在 90% 以上)。

1.8.2 犬血清中细胞因子 IL-2、IL-4 和 IFN-γ 含

量的检测 根据 ELISA 试剂盒说明书,用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中犬血清中 IL-2、IL-4 和 IFN-γ 含量。

1.9 统计学处理

用 SPSS 20.0 统计软件,对所得数据进行显著性检验,并进行分析比较。

2 结果

2.1 各组犬外周血 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺)的检测

与空白组相比较,模型组犬外周血淋巴层中 CD3⁺T 淋巴细胞百分数在试验 7 和 14 d 极显著($P<0.01$)升高,在试验 28 和 35 d,模型组 CD3⁺T 淋巴细胞百分数极显著($P<0.01$)降低。0~28 d,模型组的 CD3⁺T 淋巴细胞百分数呈现先升高后下降的趋势。与模型组相比较,复方苦苓高剂量组犬外周血淋巴中 CD3⁺T 淋巴细胞百分数在试验 14 d,显著($P<0.05$)升高;试验 21、28、35 d,复方苦苓高、中剂量组 CD3⁺T 淋巴细胞百分数极显著或显著($P<0.01$ 或 $P<0.05$)升高。详见表 1。

表 1 各试验组犬淋巴细胞液中 CD3⁺T 淋巴细胞的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	攻毒后时间/d Days post challenge					
	0	7	14	21	28	35
空白组	40.2±2.9 ^{Aa}	37.6±11.1 ^{Bb}	39.4±9.4 ^{Cd}	47.8±12.3 ^{ABCbcde}	55.9±3.8 ^{Bc}	52.5±6.9 ^{Aa}
模型组	39.5±2.5 ^{Aa}	67.5±13.9 ^{Aa}	62.4±10.1 ^{ABbc}	42.0±16.1 ^{BCde}	30.4±8.6 ^{Cd}	36.3±5.6 ^{Bb}
阳性药物组	39.5±1.7 ^{Aa}	71.8±6.9 ^{Aa}	71.6±3.2 ^{Ab}	58.3±7.6 ^{ABCabcd}	63.2±11.0 ^{ABbc}	41.6±4.1 ^{ABb}
复方苦苓高剂量组	41.9±7.2 ^{Aa}	79.0±8.9 ^{Aa}	76.9±5.1 ^{Aa}	72.9±10.9 ^{Aa}	76.5±5.5 ^{Aa}	53.5±4.7 ^{Aa}
复方苦苓中剂量组	43.4±8.4 ^{Aa}	69.3±10.8 ^{Aa}	70.6±6.1 ^{Ab}	68.6±8.9 ^{ABa}	68.7±7.9 ^{ABab}	51.1±4.7 ^{Aa}
复方苦苓低剂量组	44.4±6.2 ^{Aa}	65.6±10.2 ^{Aa}	59.6±3.0 ^{ABbc}	65.1±8.6 ^{ABCab}	36.7±3.2 ^{Cd}	32.5±3.6 ^{Bb}

同列相同字母表示差异不显著($P>0.05$),同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),同列不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下表同

Same letters in the same column means not significant difference between treatments ($P>0.05$), different lowercase letters in the same column means significant difference ($P<0.05$), different capital letters in the same column means very significant difference between treatments ($P<0.01$). The same as below

与空白组相比较,试验 7、14 和 35 d,模型组犬外周血淋巴中 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞百分数极显著($P<0.01$)降低。0~35 d,模型组 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞百分数呈现先下降后回升的趋势。与模型

组相比,试验 7、21、35 d,复方苦苓高、中剂量组、阳性药物组犬外周血淋巴中 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞百分数差异显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)升高。详见表 2。

表2 各试验组犬淋巴细胞液中 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Changes of the CD3⁺CD4⁺T lymphocyte in canines' lymphocyte liquid ($\bar{x} \pm s, n=3$)

%

组别 Group	攻毒后时间/d Days post challenge					
	0	7	14	21	28	35
空白组	43.9±4.0 ^{Aa}	46.9±4.8 ^{Aa}	43.5±6.0 ^{Aa}	41.0±5.7 ^{BCcd}	48.8±9.5 ^{BCb}	50.2±2.0 ^{ABbc}
模型组	43.7±2.0 ^{Aa}	21.3±3.1 ^{Ee}	23.1±3.3 ^{Bbc}	35.4±10.0 ^{Cde}	39.8±2.4 ^{Cbc}	34.1±3.5 ^{Ce}
阳性药物组	43.5±3.6 ^{Aa}	28.4±2.0 ^{BCDEcd}	26.4±7.0 ^{Bbc}	53.9±3.5 ^{ABab}	43.3±7.6 ^{Cbc}	42.4±4.9 ^{BCd}
复方苦苣高剂量组	42.7±5.4 ^{Aa}	37.0±3.1 ^{Bb}	27.2±3.3 ^{Bbc}	59.8±2.7 ^{Aa}	62.0±2.2 ^{Aa}	58.2±1.7 ^{Aa}
复方苦苣中剂量组	39.4±5.5 ^{Aa}	31.1±5.2 ^{BCDbc}	18.2±2.0 ^{Bc}	57.1±3.2 ^{Asb}	58.9±2.4 ^{ABa}	54.2±0.7 ^{Ab}
复方苦苣低剂量组	39.1±1.1 ^{Aa}	36.1±0.6 ^{BCb}	31.7±9.5 ^{ABb}	49.2±7.2 ^{ABbc}	36.5±4.9 ^{Cc}	32.3±5.3 ^{Ce}

模型组犬外周血淋巴中 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞百分数在试验 7 和 21 d,与空白组相比较,极显著或显著($P<0.01$ 或 $P<0.05$) 升高,在试验 14 d,模型组极显著($P<0.01$) 降低。0~14 d,CD3⁺CD8⁺T 淋

巴细胞百分数呈现先升高后下降的趋势,并且 21 d 时最高,21 d 后下降。与模型组相比较,复方苦苣中剂量组在试验 0 d 显著($P<0.05$)升高;试验 21 d,复方苦苣高剂量组极显著($P<0.01$)降低。详见表 3。

表3 各试验组犬淋巴细胞液中 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Changes of the CD3⁺CD8⁺T lymphocyte in canines' lymphocyte liquid ($\bar{x} \pm s, n=3$)

%

组别 Group	攻毒后时间/d Days post challenge					
	0	7	14	21	28	35
空白组	40.5±2.6 ^{BCcde}	35.0±3.1 ^{Cd}	43.5±6.0 ^{Aa}	44.8±11.1 ^{ABb}	32.9±12.0 ^{Aab}	33.5±9.2 ^{Aa}
模型组	41.7±5.7 ^{ABCbcde}	67.4±8.8 ^{Aa}	23.1±3.3 ^{BCbcd}	46.7±13.2 ^{Aa}	33.1±2.6 ^{Aab}	36.3±2.0 ^{Aa}
阳性药物组	43.3±4.5 ^{ABCbcde}	58.6±7.6 ^{ABab}	25.6±1.4 ^{BCbcd}	25.5±1.8 ^{ABb}	26.8±1.6 ^{Aab}	35.4±1.5 ^{Aa}
复方苦苣高剂量组	48.5±1.5 ^{ABab}	53.3±2.5 ^{ABbc}	27.2±3.3 ^{BCbc}	22.5±5.3 ^{Bb}	22.9±4.9 ^{Ab}	30.4±2.6 ^{Aa}
复方苦苣中剂量组	51.0±2.6 ^{Aa}	59.7±2.1 ^{ABab}	18.2±2.0 ^{Ccd}	32.7±8.5 ^{ABab}	24.2±3.2 ^{Ab}	35.5±3.1 ^{Aa}
复方苦苣低剂量组	38.6±2.4 ^{BCcde}	46.2±4.7 ^{BCc}	31.7±9.5 ^{Bb}	36.3±13.2 ^{ABab}	35.4±3.6 ^{Aa}	31.1±7.5 ^{Aa}

2.2 各组犬血清中 IL-2、IL-4 和 IFN-γ 含量的检测

IL-2、IL-4 和 IFN-γ 标准曲线见图 1~3。与空白组相比,试验 0 d,模型组犬血清中 IL-2 含量明显升高,差异极显著($P<0.01$),而在试验 21~35 d,模型组犬血清中IL-2含量不显著($P>0.05$)降低。

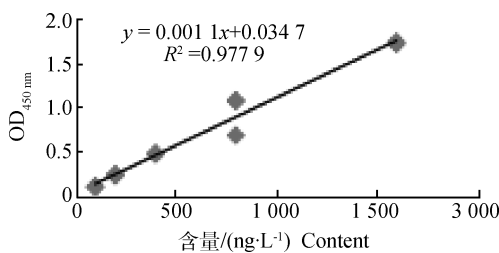


图1 IL-2 标准曲线
Fig.1 The standard curve of IL-2

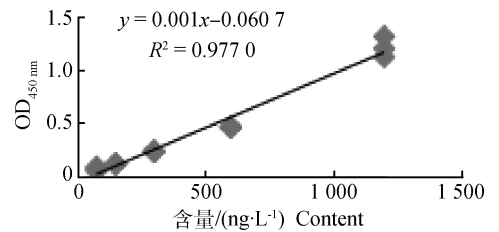


图2 IL-4 标准曲线
Fig.2 The standard curve of IL-4

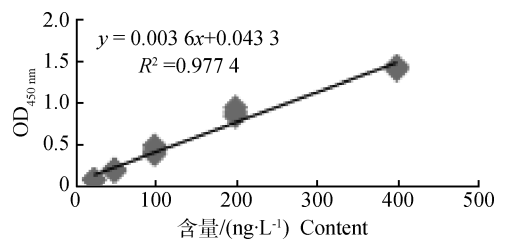


图3 IFN-γ 标准曲线
Fig.3 The standard curve of IFN-γ

与模型组相比较,在试验 0 d,复方苦苓高、中剂量组及阳性药物组极显著($P < 0.01$)降低;试验 7~35 d,复方苦苓高剂量组 IL-2 含量不显著($P > 0.05$)升高。详见表 4。

与空白组相比,试验 14 和 21 d,模型组犬血清中 IL-4 含量极显著($P < 0.01$)降低。与模型组相比,在试验 7~35 d,复方苦苓高、中、低剂量组 IL-4

含量极显著($P < 0.01$)升高。详见表 5。

与空白组相比较,在试验 0 d,模型组犬血清中 IFN- γ 含量显著($P < 0.05$)升高,在试验 7~14 d,模型组犬血清中 IFN- γ 含量差异均显著($P < 0.05$)降低。与模型组相比较,在试验 7~14 d,阳性药物组,复方苦苓高、中剂量组 IFN- γ 含量极显著($P < 0.01$)升高。详见表 6。

表 4 犬血清中细胞因子 IL-2 含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Group	攻毒后时间/d Days post challenge					
	0	7	14	21	28	35
空白组	145.12 ± 5.40 ^{Cd}	236.64 ± 6.26 ^{ABab}	189.82 ± 5.05 ^{BCbc}	153.61 ± 5.39 ^{BCbc}	130.58 ± 5.82 ^{BCc}	187.55 ± 7.21 ^{Bbc}
模型组	404.52 ± 4.13 ^{Aa}	234.21 ± 2.49 ^{ABab}	195.73 ± 5.05 ^{ABCab}	118.76 ± 4.97 ^{BCc}	92.70 ± 4.28 ^{BCc}	108.45 ± 4.17 ^{Bbc}
阳性药物组	219.06 ± 4.62 ^{BCcd}	138.45 ± 3.49 ^{Bc}	86.64 ± 2.02 ^{Cc}	316.64 ± 3.16 ^{Aa}	248.15 ± 2.50 ^{ABb}	250.27 ± 1.79 ^{ABb}
复方苦苓高剂量组	231.18 ± 3.41 ^{BCcd}	261.79 ± 2.41 ^{Aab}	270.88 ± 3.32 ^{ABa}	176.33 ± 3.67 ^{BCbc}	121.18 ± 2.79 ^{BCc}	118.45 ± 6.95 ^{Bbc}
复方苦苓中剂量组	248.15 ± 5.78 ^{BCbc}	299.36 ± 3.34 ^{Aa}	214.52 ± 4.99 ^{ABCab}	103.61 ± 4.28 ^{Cc}	115.73 ± 5.45 ^{BCc}	148.45 ± 4.02 ^{Bbc}
复方苦苓低剂量组	344.82 ± 2.58 ^{ABab}	266.64 ± 2.36 ^{Aab}	132.39 ± 1.61 ^{BCbc}	97.85 ± 4.01 ^{Cc}	88.15 ± 3.88 ^{Cc}	129.36 ± 1.91 ^{Bbc}

表 5 犬血清中细胞因子 IL-4 含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Group	攻毒后时间/d Days post challenge					
	0	7	14	21	28	35
空白组	109.63 ± 2.25 ^{Cd}	109.30 ± 2.48 ^{CDe}	146.80 ± 3.79 ^{Ee}	125.97 ± 1.42 ^{Ef}	60.63 ± 2.64 ^{Cd}	98.30 ± 3.19 ^{Cc}
模型组	123.30 ± 1.21 ^{Cd}	68.97 ± 1.83 ^{De}	49.63 ± 0.92 ^{Ff}	59.30 ± 1.78 ^{Fg}	77.30 ± 2.14 ^{Ccd}	105.63 ± 2.26 ^{Cc}
阳性药物组	119.30 ± 2.01 ^{Cd}	206.30 ± 2.29 ^{ABcd}	226.97 ± 2.20 ^{CDd}	153.80 ± 6.50 ^{Ee}	103.97 ± 10.48 ^{Cc}	73.63 ± 4.29 ^{Cc}
复方苦苓高剂量组	175.30 ± 3.79 ^{Bbc}	286.30 ± 5.25 ^{Aab}	279.97 ± 1.87 ^{Bb}	262.97 ± 1.46 ^{BCbc}	244.30 ± 2.80 ^{ABb}	256.30 ± 4.56 ^{Bb}
复方苦苓中剂量组	169.97 ± 1.94 ^{Bc}	274.30 ± 1.36 ^{ABabc}	262.63 ± 1.40 ^{BCbc}	238.63 ± 1.61 ^{CDcd}	227.97 ± 1.83 ^{Bb}	217.97 ± 1.31 ^{Bb}
复方苦苓低剂量组	110.30 ± 2.45 ^{Cd}	238.97 ± 2.52 ^{ABabcd}	232.30 ± 2.01 ^{CDcd}	230.97 ± 1.73 ^{CDd}	224.30 ± 1.52 ^{Bb}	215.97 ± 2.05 ^{Bb}

表 6 犬血清中细胞因子 IFN- γ 含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Group	攻毒后时间/d Days post challenge					
	0	7	14	21	28	35
空白组	57.88 ± 1.01 ^{De}	78.99 ± 1.66 ^{CDEc}	57.42 ± 0.89 ^{De}	73.06 ± 1.38 ^{Aa}	79.73 ± 2.26 ^{BCbc}	59.08 ± 2.41 ^{BCDd}
模型组	75.29 ± 2.08 ^{CDd}	58.90 ± 1.58 ^{Ed}	46.68 ± 1.51 ^{Df}	61.77 ± 2.24 ^{ABa}	52.88 ± 1.92 ^{De}	56.95 ± 2.08 ^{CDd}
阳性药物组	94.55 ± 0.82 ^{Bbc}	106.86 ± 2.10 ^{ABab}	73.25 ± 1.18 ^{Cd}	33.99 ± 2.94 ^{Bb}	57.51 ± 1.25 ^{CDde}	29.92 ± 2.90 ^{De}
复方苦苓高剂量组	73.62 ± 1.34 ^{CDd}	118.16 ± 0.89 ^{Aa}	101.86 ± 1.53 ^{Aa}	83.90 ± 2.50 ^{Aa}	80.75 ± 2.09 ^{BCbc}	95.47 ± 1.66 ^{ABa}
复方苦苓中剂量组	93.06 ± 1.01 ^{Bbc}	104.92 ± 1.02 ^{ABab}	83.90 ± 1.31 ^{BCc}	81.58 ± 1.52 ^{Aa}	75.29 ± 0.78 ^{BCDbed}	77.79 ± 2.59 ^{ABCab}
复方苦苓低剂量组	73.90 ± 1.53 ^{CDd}	99.82 ± 1.07 ^{ABCb}	73.71 ± 0.99 ^{Cd}	75.19 ± 0.76 ^{Aa}	66.21 ± 0.81 ^{BCDede}	66.68 ± 1.97 ^{ABCb}

3 讨论

犬细小病毒病是由犬细小病毒(CPV)感染犬引起的一种常见的具有高度接触性传染性的疾病,能够引起机体 T 细胞亚群和细胞因子发生变化^[18]。根据中医理论,犬细小病毒病是由疫疔之气侵害,疫疔邪气先犯及肺卫,致使卫气郁闭,肺气不宣,因而出现发热、鼻流清涕等轻度症状,而后卫分郁结而不解,疫邪侵入脾胃,脾的清阳不升则泻,胃的浊阴不降则吐,又脾统血,脾失统血之职,可见呕吐、血痢疾^[22]。同时,体表温度降低,食欲废绝。疫疔邪气一旦继续向内发展,湿热内蕴,熏灼营血,可至病犬鼻镜干燥、龟裂,口内出现溃疡,各脏器元气虚衰乃至亡阳^[23]。复方苦苣方中清热解毒的黄芩,燥湿、利水的苦参,健脾健胃的白术,均为君药;金银花、白头翁、黄芪及藿香等具有清热解毒、止痢,补气升阳、利水消肿,芳香化湿、行气和中等功效,共为臣、佐药。本试验可知,复方苦苣各组均具有保护机体免受病毒侵害,尤其是复方苦苣高剂量组保护率较高。这与报道的结果相似^[19]。

复方苦苣可提高外周血 CD3⁺T、CD3⁺CD4⁺T 细胞百分数,降低 CD3⁺CD8⁺T 细胞百分数。T 淋巴细胞及其亚群是动物机体重要的免疫细胞群,在细胞免疫功能当中发挥重要作用。CD3、CD4 以及 CD8 是 T 细胞表面重要标志。CD3 仅存于 T 淋巴细胞表面,是 TCR 表达和信号传导所必须的,它的主要作用是把 TCR 与外来结合的抗原信息传递到细胞内,启动细胞内的活化过程,在 T 细胞接受抗原刺激被激活后的早期过程起着重要作用^[24]。利用 CD3 分子的单抗做流式细胞术可检测外周血 T 淋巴细胞数。CD4 和 CD8 分别在不同功能亚群的 T 淋巴细胞表面表达,即 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞亚群^[24]。CD4⁺具有辅助性 T 细胞(Th)功能,CD8⁺具有抑制性 T 细胞(Ts)和细胞毒性 T 细胞功能(Tc/CTL)的效应。CD4⁺亚群 T 细胞与 CD8⁺亚群 T 细胞在体内进行免疫应答时相互作用,互相拮抗,共同维持着体内免疫系统的平衡^[24]。本试验中,模型组相对于空白组,在 7~28 d,CD3⁺CD4⁺T 细胞百分数降低,21~35 d,CD3⁺T 细胞百分数降低、CD3⁺CD8⁺T 细胞百分数升高,模型组犬外周血淋巴层中各 T 淋巴细胞亚群发生的变化,提示病毒侵入机体后引起的 T 细胞免疫反应启动^[25-26]。与模型组相比,7~35 d,阳性药物组、复方苦苣高剂量

组 CD3⁺T、CD3⁺CD4⁺T 细胞百分数升高,21~35 d,阳性药物组及复方苦苣高、中剂量组 CD3⁺CD8⁺T 细胞百分数降低,该试验结果提示,复方苦苣高剂量组在病毒入侵机体的时候,能够调节机体的 T 细胞亚群发生变化,控制病毒的破坏作用,从而发挥保护机体的作用。

复方苦苣可促进犬机体分泌 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 。细胞因子在免疫应答过程中,对细胞间相互作用、细胞的生长和分化起着重要调节作用^[27]。内源性 IL-2 主要由病原刺激 T 细胞(CD4⁺中 Th1 和 CD8⁺)而产生的具有广泛生物活性的细胞因子,在病原进入机体初期,诱导毒性 T 粒细胞的增殖和产生,同时可直接杀伤病毒^[28]。初次感染病毒时,原发感染的细胞中产生 IFN- γ ,虽然不能抑制感染细胞中的病毒复制,但可释放至周围细胞中,刺激这些细胞产生抗病毒蛋白质,阻止病毒增殖。IFN- γ 的减少可使上述过程受阻,而 IL-4 增加对 B 细胞、肥大细胞刺激作用,还可诱发 B 细胞产生高水平的 IgE 和 IgG1,IL-4 被认为是巨噬细胞活化因子,可以增强克隆化的巨噬细胞株的抗原递呈能力,这一功能的实现是由于抗原的表达增加而实现的^[29-31]。本试验中,与空白组相比,在 7~21 d,模型组 IL-4、IFN- γ 含量皆降低,21~35 d,IL-2 含量降低,模型组的犬外周血淋巴层中细胞因子发生变化,提示病毒侵入机体后引起免疫反应启动,继而引起 IL-2、IL-4 及 IFN- γ 等细胞因子发生含量变动,继而调动机体相应机能,引起病毒的破坏作用^[32-33]。与模型组相比,7~35 d,高剂量组 IL-2 含量升高,复方苦苣高、中、低剂量组 IL-4、IFN- γ 含量升高,该试验结果提示,复方苦苣组在病毒入侵机体的时候,能够引起机体的细胞因子发生变化,控制病毒的破坏作用,从而发挥保护机体的作用。

综上所述,复方苦苣能够调控犬机体的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞的变化以及相应细胞因子的分泌,发挥保护机体的作用,但其如何调控 T 细胞亚群的变化以及相应细胞因子的分泌,还有待进一步研究。

参考文献(References):

- [1] 颜文卿,吴德峰,戴亚东,等. 犬细小病毒病的病原学研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(1): 48-51.

- pathogeny of canine parvovirus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, 27(1): 48-51. (in Chinese)
- [2] 艾 静, 袁玉国, 彭秋玲, 等. 犬细小病毒病的流行病学调查[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(11): 200-202.
AI J, YUAN Y G, PENG Q L, et al. Epidemiological investigation of canine parvovirus[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(11): 200-202. (in Chinese)
- [3] 顾海军, 汪建亚, 王 军, 等. 犬细小病毒病的防治与体会[J]. 中国动物保健, 2010(4): 100-102.
GU H J, WANG J Y, WANG J, et al. Prevention and treatment of canine parvovirus [J]. *China Animal Health*, 2010(4): 100-102. (in Chinese)
- [4] 李明霞, 王 伟. 犬细小病毒病的诊断与综合防治[J]. 吉林畜牧兽医, 2013(2): 58-59.
LI M X, WANG W. Diagnosis and comprehensive prevention and treatment of canine parvovirus [J]. *Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013(2): 58-59. (in Chinese)
- [5] HOARE C M, DEBOUCK P, WISEMAN A. Immunogenicity of a low-passage, high-titer modified live canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibodies[J]. *Vaccine*, 1997, 15(3): 273-275.
- [6] JIANG W, BAKER H J, SWANGO L J, et al. Nucleic acid immunization protects dogs against challenge with virulent canine parvovirus[J]. *Vaccine*, 1998, 16(6): 601-607.
- [7] MORRISON M D, REID D, ONIONS D, et al. Generation of E3-deleted canine adenoviruses expressing canine parvovirus capsid by homologous recombination in bacteria[J]. *Virology*, 2002, 293(1): 26-30.
- [8] 汪恭富, 杨 沈, 朱 燕, 等. 犬细小病毒单克隆抗体在犬细小病毒病治疗中的应用[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(3): 46.
WANG G F, YANG S, ZHU Y, et al. Application of monoclonal antibodies to canine parvovirus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2007, 43(3): 46. (in Chinese)
- [9] IKEDA Y, MOCHIZUKI M, NAITO R, et al. Prevalence of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats[J]. *Virology*, 2000, 278(1): 13-19.
- [10] STEINEL A, MUNSON L, VAN VUUREN M, et al. Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 2): 345-350.
- [11] POLLOCK R V, CARMICHAEL L E. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection; transfer, decline, and interference with vaccination [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1982, 180(1): 37-42.
- [12] OBRIEN S E, ROTH J A, HILL B L. Response of pups to modified-live canine parvovirus component in a combination vaccine [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1986, 188(7): 699-701.
- [13] 朱兆荣, 刘 娟, 聂晨睿. 复方苦苓注射液对人工感染犬细小病毒病的防治[J]. 中兽医医药杂志, 2010(6): 34-37.
ZHU Z R, LIU J, NIE C R. Curative and preventive effects of compound *Kuqin* injection against canine Parvovirus disease in dogs[J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2010(6): 34-37. (in Chinese)
- [14] 王学林, 刘文森, 王承宇. 抗犬细小病毒复方制剂的研究[J]. 畜牧与兽医, 2004, 36(4): 7-8.
WANG X L, LIU W S, WANG C Y. Study on anti-CPV composite[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2004, 36(4): 7-8. (in Chinese)
- [15] 聂晨睿. 复方苦苓对犬细小病毒病防治作用及药理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
NIE C R. Research on the preventive and therapeutic effect of complex prescription *Kuqin* on CPV and pharmacodynamic action [D]. Chongqing: Southwest University, 2008. (in Chinese)
- [16] 杨光维, 李润楠, 于为力. 利用 3 种中药组方对比治疗犬细小病毒病的效果观察[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(9): 58-59.
YANG G W, LI R N, YU W L. Observation on effect of three kinds of traditional Chinese medicine in treating canine parvovirus disease [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2007, 43(9): 58-59. (in Chinese)
- [17] 尹彦军. 中药“犬康”治疗犬细小病毒性肠炎试验 [J]. 中国动物检疫, 2002, 19(3): 27-28.
YIN Y J. Treatment of canine parvovirus enteritis with traditional Chinese medicine “*Quan Kang*” [J]. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2002, 19(3): 27-28. (in Chinese)
- [18] 刘钟瑛, 王 雅, 胡 杨. T 细胞亚群和细胞因子在抗感染免疫中的作用 [J]. 国外医学免疫学分册, 1992(4): 206-208, 224.
LIU Z B, WANG Y, HU Y. Role of T cell subsets and cytokines in anti-infection immunity [J]. *International Journal of Immunology*, 1992(4): 206-208,

224. (in Chinese)
- [19] 诸葛证,朱兆荣,刘娟. 复方苦苓对细小病毒病犬红细胞及血红蛋白变化的影响[J]. 内江科技, 2009, 30(12): 25.
ZHUGE Z, ZHU Z R, LIU J. Effect of Kuqin compound on canine parvovirus of red blood cell and hemoglobin changes[J]. *Neijiang Science and Technology*, 2009, 30(12): 25. (in Chinese)
- [20] 北京农业大学. 兽医学[M]. 北京: 农业出版社, 1999.
Beijing Agricultural University. *Veterinary medicine* [J]. Beijing: Agriculture Press, 1999. (in Chinese)
- [21] 孔庆波, 陈进军, 陈德坤, 等. 两种转移因子对犬外周血 T 细胞亚群的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(7): 56-59.
KONG Q B, CHEN J J, CHEN D K, et al. Effects of two transfer factors on T-Lymphocytic subgroups in canine peripheral blood[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2007, 34(7): 56-59. (in Chinese)
- [22] 盛鹏飞, 蒋月. 中西药结合治疗藏獒犬细小病毒病[J]. 畜牧兽医科技信息, 2008(5): 105.
SHENG P F, JIANG Y. Treatment of tibetan mastiff parvovirus by combination of traditional Chinese medicines[J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2008(5): 105. (in Chinese)
- [23] 景秀年, 李中利, 杨小华, 等. 犬细小病毒的中医治疗[J]. 四川畜牧兽医, 2002, 29(3): 48.
JING X N, LI Z L, YANG X H, et al. Treatment of canine parvovirus by traditional Chinese medicine[J]. *Sichuan Animal and Veterinary Sciences*, 2002, 29(3): 48. (in Chinese)
- [24] 杨汉春, 姚火春, 王君伟, 等. 动物免疫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
YANG H C, YAO H C, WANG J W, et al. *Immunology* [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2003. (in Chinese)
- [25] NG C T, SNELL L M, BROOKS D G, et al. Networking at the level of host immunity: immune cell interactions during persistent viral infections[J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(6): 652-664.
- [26] WHERRY E J, KURACHI M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(8): 486-499.
- [27] PAUL W E, SEDER R A. Lymphocyte responses and cytokines [J]. *Cell*, 1994, 76(2): 241-251.
- [28] TANIGUCHI T, MINAMI Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview[J]. *Cell*, 1993, 73(1): 5-8.
- [29] 侯健, 王东星, 胥军民, 等. 人类细胞因子手册[M]. 上海: 同济大学出版社, 1996.
HOU J, WANG D X, XU J M, et al. *A handbook of human cytokines* [M]. Shanghai: Tongji University Press, 1996. (in Chinese)
- [30] 刘志超, 岳屹因. 细胞因子与临床疾病[M]. 海口: 海南出版社, 2008.
LIU Z C, YUE Y N. *Cytokines and clinical disease* [M]. Haikou: Hainan Press, 2008. (in Chinese)
- [31] 万遂如, 康丽娟. 细胞因子在畜禽疫病防控中的科学应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
WAN S R, KANG L J. *Application of cytokines in the prevention and control of animal diseases* [M]. Beijing: China Agricultural University, 2010. (in Chinese)
- [32] BROWN M A, HURAL J. Functions of IL-4 and control of its expression [J]. *Crit Rev Immunol*, 1997, 17(1): 1-32.
- [33] LEVY D E, GARCÍA-SASTRE A. The virus battles; IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001, 12(2-3): 143-156.

(编辑 白永平)