

## 异烟肼对大鼠免疫功能影响的研究

曹汴川<sup>1</sup>, 黄喆<sup>1</sup>, 黎秋菊<sup>2</sup>, 黄秀芳<sup>3</sup>, 朱义红<sup>4</sup>, 肖科<sup>1</sup>, 黄富礼<sup>1</sup>, 钟利<sup>1\*</sup>

1. 西南医科大学附属医院, 四川 泸州 646000

2. 成都市青白江区人民医院, 四川 成都 610300

3. 成都市新都区人民医院, 四川 成都 610500

4. 广东省阳江市人民医院, 广东 阳江 529500

**摘要:** **目的** 研究异烟肼对大鼠淋巴细胞因子表达和巨噬细胞功能的影响。**方法** 健康雄性SD大鼠, 随机分为喂药1个月组、喂药3个月组、停药1个月(喂药3个月后)组, 每组再随机等分为异烟肼组和对照组。异烟肼组给以120 mg/kg异烟肼, 隔日1次ig给药, 对照组给予生理盐水。于相应时间点, ELISA法检测血清白细胞介素-12(IL-12)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )水平; 琼脂平板法检测大鼠血清溶菌酶含量; 硝酸铅(Comori)法检测腹腔液酸性磷酸酶水平。**结果** 在各时间点, 异烟肼组IL-12、IFN- $\gamma$ 、溶菌酶水平与对照组比较, 差异均不显著; 喂药1个月, 与对照组比较, 异烟肼组酸性磷酸酶水平显著升高( $P < 0.05$ ); 喂药3个月、停药1个月, 两组酸性磷酸酶水平差异不显著。**结论** 120 mg/kg异烟肼对大鼠免疫功能无明显影响, 长期应用不会导致免疫功能的损伤。

**关键词:** 异烟肼; 结核病; 淋巴细胞因子; 白细胞介素-12(IL-12); 干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ); 巨噬细胞; 溶菌酶; 酸性磷酸酶  
**中图分类号:** R994.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)08-1094-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.08.011

## Influence of isoniazid on immune function of rat

CAO Bian-chuan<sup>1</sup>, HUANG Zhe<sup>1</sup>, LI Qiu-ju<sup>2</sup>, HUANG Xiu-fang<sup>3</sup>, ZHU Yi-hong<sup>4</sup>, XIAO Ke<sup>1</sup>, HUANG Fu-li<sup>1</sup>, ZHONG Li<sup>1</sup>

1. Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

2. Qingbaijiang District People's Hospital, Chengdu 610500, China

3. Xindu District People's Hospital, Chengdu 610500, China

4. Yangjiang People's Hospital, Yangjiang 529500, China

**Abstract: Objective** To study the influence of isoniazid on lymphocyte factor expression and macrophage function of rats.

**Methods** Healthy male SD rats were randomly divided into three groups, which was treated for one month, three months and withdrawal for one month after treated for three months, and each group was randomly divided into isoniazid group and control group. The isoniazid groups were ig with isoniazid at dose of 120 mg/kg every other day and control groups were fed on normal saline. At the corresponding time points, the level of interleukin-12 (IL-12) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) was detected with ELISA method, detected serum lysozyme content by agar plate method, and Comori method was used for the detection of acid phosphatase levels in peritoneal fluid. **Results** At all the time points, levels of IL-12, IFN- $\gamma$  and lysozyme in isoniazid group were not significantly different compared with control group. There were statistically significant differences in acid phosphatase between isoniazid group and control group after treated for one month ( $P < 0.05$ ), but the significant differences disappeared at the next two time points. **Conclusion** Isoniazid of 120 mg/kg may have no obvious influence on the immune function of rat. We don't detect the immune injury.

**Key words:** isoniazid; tuberculosis; lymphocyte factor; Interleukin -12 (IL-12); interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ); macrophage; lysozyme; acid phosphatase

收稿日期: 2017-03-20

基金项目: 抗结核药物对免疫功能影响的研究(四川省卫计委, 编号090209)

作者简介: 曹汴川, 硕士, 研究方向为细菌感染性疾病的基础与临床。E-mail: tcchc1986@163.com

\*通信作者 钟利, 博士, 主任医师, 硕士生导师。E-mail: zhongli620@163.com

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的一类多系统、多器官损害,可严重危害机体健康的传染性疾病。目前,由于人类免疫缺陷病毒/获得性免疫缺陷综合症(HIV/AIDS)的增加,免疫抑制剂及细胞毒性药物广泛使用、耐药结核不断增加<sup>[1-3]</sup>,导致结核病不断增多。机体对结核分枝杆菌感染的免疫过程中,T淋巴细胞、巨噬细胞和相关细胞因子都起着重要作用,机体的免疫功能强弱与结核病的发生、发展和治疗有密切联系<sup>[4-5]</sup>。

近年发现,一些抗菌药物在治疗过程中,不仅能够杀灭病原菌,而且对机体免疫功能具有调节作用<sup>[6-8]</sup>。抗结核药物对机体免疫功能是否同样具有调节作用,目前国内外还未见相关的完整系统研究。异烟肼是抗结核治疗中最重要的一线药物,本研究对其对健康大鼠免疫功能的影响,进一步了解抗结核药物是否对机体免疫功能具有调节作用。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

健康雄性SD大鼠60只,2月龄,购于重庆腾鑫生物有限公司,动物合格证号为SCXK(渝)2012-0008。

### 1.2 药品及主要试剂

异烟肼片(0.1g×100片/盒,批号100806,成都锦华药业有限责任公司);生理盐水(500mL/袋,批号12061821,四川美大康佳乐药业有限公司);白细胞介素-12(IL-12)ELISA试剂盒(批号KRC0121,Invitrogen公司);干扰素-γ(IFN-γ)ELISA试剂盒(货号BMS621,eBioscience公司);溶菌酶标准品(货号120310,上海玉博生物科技有限公司);

硝酸铅(批号20110915,成都市科龙化工试剂厂)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组及给药

将实验大鼠按照随机数字表法分为3组,即喂药1月组、喂药3月组、停药1月组(喂药3月后),每组20只,各组再随机等分为异烟肼组和对照组,每组10只。异烟肼组:将异烟肼片研磨成粉末,用生理盐水配制异烟肼药液,浓度为12mg/mL,ig给药,给药体积1mL/100g,即剂量为120mg/kg(根据临床人体常用剂量计算<sup>[9]</sup>),隔日1次ig给药。对照组给予等体积的生理盐水。

### 2.2 标本采集与检测

于相应时间点ip3%戊巴比妥钠溶液(30mg/kg)麻醉大鼠,后行心脏采血2mL,静置、离心后留取血清。ELISA法检测血清IL-12、IFN-γ水平(具体操作按试剂盒说明书);琼脂平板法检测大鼠血清溶菌酶含量<sup>[10-11]</sup>;用硝酸铅(Comori)法检测大鼠腹腔液巨噬细胞酸性磷酸酶活性<sup>[12]</sup>。

### 2.3 统计学方法

数据采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。细胞因子和溶菌酶实验:组间比较采用两独立样本*t*检验,方差不齐者,采用*t'*检验;结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。酸性磷酸酶实验:组间比较采用秩和检验,结果用平均秩次表示。

## 3 结果

### 3.1 异烟肼组与对照组IL-12和IFN-γ含量比较

喂药1个月、3个月、停药1个月,异烟肼组与对照组IL-12和IFN-γ含量比较,差异均不显著。结果见表1。

表1 异烟肼组与对照组大鼠血清IL-12、IFN-γ含量比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Comparison of IL-12 and IFN-γ in isoniazid group with control group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	IL-12/(pg·mL <sup>-1</sup> )			IFN-γ/(pg·mL <sup>-1</sup> )		
		喂药1个月	喂药3个月	停药1个月	喂药1个月	喂药3个月	停药1个月
对照	—	131.75±41.08	96.21±18.84	96.02±20.46	107.61±34.77	127.38±24.00	105.52±19.75
异烟肼	120	134.41±25.13	137.03±65.94	113.24±38.70	121.55±21.85	118.44±8.16	114.28±18.80

### 3.2 异烟肼组与对照组溶菌酶和酸性磷酸酶含量比较

喂药1个月、3个月、停药1个月,异烟肼组与对照组溶菌酶含量比较,差异均不显著。喂药1月,与对照组比较,异烟肼组酸性磷酸酶水平显著升高( $P < 0.05$ );喂药3个月、停药1个月,两组

比较差异不显著。结果见表2。

## 4 讨论

### 4.1 淋巴细胞因子在抗结核病中的意义

结核分枝杆菌经不同途径感染机体后,可诱导机体产生相应免疫反应。淋巴细胞因子,如IL-12、IFN-γ等在对抗结核分枝杆菌感染的免疫反应中起

表2 异烟肼组与对照组溶菌酶和酸性磷酸酶含量比较 (n = 10)

Table 2 Comparison of lysozyme and acid phosphatase in isoniazid group with control group at the same time (n = 10)

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	血清溶菌酶/mm			腹腔液巨噬细胞酸性磷酸酶活性/+		
		喂药1个月	喂药3个月	停药1个月	喂药1个月	喂药3个月	停药1个月
对照	—	12.20±0.79	13.00±0.81	11.85±1.24	7.6	11	9.75
异烟肼	120	13.20±1.49	12.70±0.82	11.45±2.03	13.4*	10	11.25

与对照组比较: \*P&lt;0.05

\*P &lt; 0.05 vs control group

重要作用<sup>[13-14]</sup>。IL-12可促进T淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞的增殖活化<sup>[15]</sup>,并刺激两者产生IFN- $\gamma$ ; IL-12也可激活巨噬细胞,并与IFN- $\gamma$ 一起增强其抗结核分枝杆菌的能力<sup>[16]</sup>。目前研究表明,上述细胞因子平衡失调是造成结核病发生、发展的重要因素,与结核病预后密切相关<sup>[17]</sup>。有研究发现,IL-12缺乏的机体容易遭受结核分枝杆菌感染,这提示IL-12在机体对抗结核分枝杆菌的感染中具有保护作用<sup>[18]</sup>。

本实验研究异烟肼对健康雄性大鼠细胞因子IL-12、IFN- $\gamma$ 含量的影响,结果显示,异烟肼对大鼠血清IL-12、IFN- $\gamma$ 含量无明显影响。

#### 4.2 巨噬细胞在抗结核病中的意义

巨噬细胞在抵抗结核分枝杆菌感染中也发挥着重要作用。巨噬细胞构成机体固有免疫,是抵抗结核分枝杆菌感染的第一道屏障,又因其是结核分枝杆菌寄生的场所,是细胞介导的特异性免疫反应的第一步。活化的巨噬细胞能抑制,甚至杀灭结核分枝杆菌,对机体控制结核分枝杆菌感染起到至关重要的作用<sup>[19]</sup>。巨噬细胞内含有溶菌酶和酸性磷酸酶等多种酶类,这些酶类在保护机体的防御性免疫反应中起重要作用。溶菌酶和酸性磷酸酶的增高程度与巨噬细胞的功能有关。毛泽善等发现<sup>[20]</sup>,异烟肼可使小鼠腹腔液巨噬细胞酸性磷酸酶活性增高,但随着用药时间延长及停药后酸性磷酸酶如何变化,国内外尚未见到相关研究。

本实验研究异烟肼对健康雄性大鼠巨噬细胞功能的影响,结果显示,异烟肼对大鼠血清溶菌酶含量无明显影响;对大鼠腹腔液巨噬细胞酸性磷酸酶活性具有短暂促进作用,其长期作用不明显。

综上,除对腹腔液巨噬细胞酸性磷酸酶活性具有短暂促进作用外,异烟肼对大鼠免疫功能无明显影响,长期应用不会导致免疫功能的损伤。

#### 参考文献

[1] Lima G C, Silva E V, Magalhaes P O, et al. Efficacy and

safety of a four-drug fixed-dose combination regimen versus separate drugs for treatment of pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis [J]. Braz J Microbiol, 48(2): 198-207.

[2] Das D, Satapathy P, Murmu B. First Line Anti-TB Drug Resistance in an Urban Area of Odisha, India [J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(11): DC04-DC06.

[3] Ebonyi A O, Oguiche S, Agbaji O O, et al. Mortality among pulmonary tuberculosis and HIV-1 co-infected Nigerian children being treated for pulmonary tuberculosis and on antiretroviral therapy: a retrospective cohort study [J]. Germs, 2016, 6(4): 139-150.

[4] Mosquera-Restrepo S F, Caro A C, Garcia L F, et al. Fatty acid derivative, chemokine, and cytokine profiles in exhaled breath condensates can differentiate adult and children paucibacillary tuberculosis patients [J]. J Breath Res, 2017, 11(1): 16003.

[5] Grover A, Trout J, Foster C, et al. High mobility group box 1 acts as an adjuvant for tuberculosis subunit vaccines [J]. Immunology, 2014, 142(1): 111-123.

[6] 朱义红, 钟利. 抗菌药物对免疫功能的影响 [J]. 国外医药(抗生素分册), 2012, 33(02): 58-61.

[7] 马晓辉. 抗菌药物免疫调节作用的研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2013, 26(01): 31-32.

[8] 邵维莉, 蔡芸, 王睿, 等. 抗菌药物免疫调节作用研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(07): 493-515.

[9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 人民卫生出版社, 2002.

[10] 王霆, 董卫星, 刘淑鑫, 等. 溶菌酶测定方法的研究进展 [J]. 中南药学, 2012, 10(01): 58-61.

[11] 吴月琴. 溶菌酶测定及其正常值探讨 [J]. 第二军医大学学报, 1985, (03): 164-166.

[12] 章静波, 黄东阳. 细胞生物学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.

[13] Chen D, Li G, Fu X, et al. Wnt5a Deficiency Regulates Inflammatory Cytokine Secretion, Polarization, and Apoptosis in Mycobacterium tuberculosis-Infected Macrophages [J]. Dna Cell Biol, 2017, 36(1): 58-66.

- [14] Mortaz E, Masjedi M R, Abedini A, et al. Common features of tuberculosis and sarcoidosis [J]. *Int J Mycobacteriol*, 2016, 5 Suppl 1: S240-S241.
- [15] Hamilton C A, Mahan S, Entrican G, et al. Interactions between natural killer cells and dendritic cells favour T helper1-type responses to BCG in calves [J]. *Vet Res*, 2016, 47(1): 85.
- [16] Thada S, Ponnana M, Sivangala R, et al. Polymorphisms of IFN-gamma (+874A/T) and IL-12 (+1188A/C) in tuberculosis patients and their household contacts in Hyderabad, India [J]. *Hum Immunol*, 2016, 77(7): 559-565.
- [17] Anuradha R, Munisankar S, Bhootra Y, et al. High body mass index is associated with heightened systemic and mycobacterial antigen-specific pro-inflammatory cytokines in latent tuberculosis [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2016, 101: 56-61.
- [18] Kreins A Y, Ciancanelli M J, Okada S, et al. Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(10): 1641-1662.
- [19] 张万江, 刘云霞. 结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(6): 617-622.
- [20] 杨廷桐, 毛泽善, 范雪辉, 等. 异烟肼对小鼠非特异性免疫功能的影响 [J]. *陕西医学杂志*, 2004, 33(04): 306-307.

(上接第 1089 页)

- [6] 周莉, 王永, 杨春雷, 等. 注射用灯盏花素豚鼠全身主动过敏性试验评价方法的比较 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29(2): 265-270.
- [7] 荆宝琴, 张金晓, 王磊, 等. 大鼠被动皮肤过敏性实验中最佳佐剂的选择研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2014, 30(12): 1114-1116.
- [8] 李逢春. 盐酸氨溴索注射液安全性评价研究 [J]. *中国实用医药*, 2014, 9(19): 258-259.
- [9] 鲁素雅, 黄青, 史清水. 中药注射剂过敏反应非临床评价方法研究进展 [J]. *药学与临床研究*, 2013, 21(5): 547-550.
- [10] 刘丽鹤, 尹利辉, 金少鸿. 中药注射剂过敏反应体外评价方法研究进展 [J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(8): 1439.
- [11] 刘珍, 张改平, 职爱民. 苏丹红IV和柠檬黄人工抗原的制备与鉴定 [J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(5): 538-541.
- [12] 余伟, 王小红, 周有祥. 苏丹红 I 人工抗原的合成 [J]. *卫生研究*, 2008, 37(3): 362-376.
- [13] 吴昊, 戴彩霞, 刘佳. 盐酸西布曲明人工抗原的合成与鉴定 [J]. *食品科学*, 2012, 33(3): 140-145.
- [14] 李亚萍, 张明昊. 中药注射液不良反应现状分析与防治措施探讨 [J]. *光明中医*, 2016, 31(5): 739-741.
- [15] 李福兵. 174 例中药注射液不良反应的临床分析 [J]. *数理医药学杂志*, 2015, 28(11): 1656-1657.
- [16] 高英杰. 中药注射液常用辅料的作用与安全性分析 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2014, 14(7): 640-642.
- [17] 张佩, 吴恩应, 陈玉琴, 等. 特异性抗体效价检测技术概述 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(17): 3377-3381.
- [18] 尉希清, 刘帅, 牛珩, 等. 黄芪甲苷对大鼠平滑肌细胞及颈动脉内膜增生的影响及机制研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(19): 3432-3440.
- [19] 孙豪栋, 庞晓斌, 李继扬. 黄芪甲苷生物活性研究进展 [J]. *中国药房*, 2011, 22(7): 657-660.