

麻黄加术汤对呼吸道合胞病毒感染小鼠血清 IL-2, IFN- γ 的影响

李俊莲¹, 李艳彦¹, 高鹏², 郭彩云², 郭晓峰¹, 马彦平¹, 陶功定^{1*}
(1. 山西中医学院, 太原 030024; 2. 长春中医药大学, 吉林 130117)

[摘要] 目的:探讨麻黄加术汤对寒湿环境因素下的呼吸道合胞病毒(RSV)感染小鼠血清白介素-2(IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ)含量的影响以及在生态医学思想下寒湿环境、中西药物与机体免疫状态之间的相关性研究。方法:借助人造气候箱,模拟寒湿外邪环境,采用呼吸道合胞病毒 0.1 mL 滴鼻感染,麻黄加术汤 0.472 5 g·mL⁻¹、利巴韦林 5.625 g·L⁻¹灌胃,通过 ELISA 法检测血清 IL-2, IFN- γ 的含量。结果:与正常组相比,病毒模型组和寒湿组均使小鼠 IL-2, IFN- γ 含量显著下降(均 $P < 0.001$),寒湿外邪与病毒感染对小鼠 IL-2, IFN- γ 含量的影响有交互作用($P < 0.001$ 和 $P < 0.05$)。与病毒模型组和寒湿+病毒模型组分别相比,麻黄加术汤和利巴韦林均使小鼠 IL-2, IFN- γ 含量显著升高($P < 0.001$),而 IL-2 含量在中、西药组间无显著性差异,但 IFN- γ 含量的提高,在病毒+麻黄加术汤组显著低于病毒+利巴韦林组($P < 0.001$);与病毒+麻黄加术汤组比较,寒湿+病毒+麻黄加术汤组 IFN- γ 含量显著降低($P < 0.01$)。结论:寒湿外邪与病毒感染均可以使小鼠免疫力下降,西药抗病毒、中药散寒祛湿的麻黄加术汤均可以改善寒湿环境下病毒感染小鼠免疫状态。

[关键词] 人工气候箱; 上呼吸道感染; 寒湿邪气; 白介素-2; 干扰素- γ ; 生态病因

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0196-04

[doi] 10.11653/syfy2013130196

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130425.1502.004.html>

[网络出版时间] 2013-04-25 15:02

Effect of Mahuang Jiazhu Decoction on Serum IL-2, IFN- γ Content in Mice Infected by RSV in the Damp and Cold Environment

LI Jun-lian¹, LI Yan-yan¹, GAQ Peng², GUO Cai-yun², GUO Xiao-feng¹, MA Yan-ping¹, TAO Gong-ding^{1*}
(1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;
2. Changchun University of Chinese Medicine, Jilin 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Mahuang Jiazhu decoction on the serum interleukin-2 (IL-2) and interferon- γ (IFN- γ) content of mice infected by RSV in the damp and cold environment, and the correlation of immune state of mice with damp and cold environment and chinese and western drugs under ecological medicine. **Method:** The serum IL-2 and IFN- γ contents were examined with ELISA in mice which were placed artificial climate box to mimic the environment of simulating cold-wet exopathogen, to analyze the effects of Mahuang Jiazhu decoction and cold-wet exopathogen on immune state of mice infected by RSV. **Result:** The IL-2 and IFN- γ contents in virus model group and cold-wet group were lower significantly (all $P < 0.001$) (all $P < 0.001$) than that in normal group. There was difference in IL-2, IFN- γ contents between virus model group and cold-wet groups ($P < 0.001$, $P < 0.05$). The IL-2 and IFN- γ contents in the Mahuang Jiazhu decoction group and

[收稿日期] 20120304(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873211);山西省国际合作项目(2011081065);山西省自然科学基金(200911049-5)

[第一作者] 李俊莲,医学博士,教授、主任医师,硕士生导师,从事中医经典方证临床与实验研究, Tel:0351-2272294. E-mail: shanxidali@126.com

[通讯作者] *陶功定,医学博士,教授,博士生导师,从事《内经》多学科研究, E-mail: setytd@163.com

Ribavirin group were higher significantly than that in virus model group and cold-wet plus virus model groups, respectively ($P < 0.001$). But there was no difference in the IL-2 content between Mahuang Jiazhu decoction group and Ribavirin group. The IFN- γ contents in virus plus Mahuang Jiazhu decoction group was lower than that in virus plus Ribavirin group ($P < 0.001$). The IFN- γ contents in cold-wet plus virus plus Mahuang Jiazhu decoction group was lower than that in virus plus Mahuang Jiazhu decoction group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The decreased immunity of mice can be caused cold-wet exopathogen and virus infection. Mahuang Jiazhu decoction and Ribavirin can improve the immune state of mice infected by RSV in the damp and cold environment.

[Key words] artificial climate box; upper respiratory tract infection; cold-wet exopathogen; IL-2; IFN- γ ; ecological etiology

疾病的产生常随不同的气候条件发生、变化,或由非时之邪乖戾而致,尤其是疫病^[1]。人与自然相关,自然界正常六气在异常时即可转化为六淫之气。寒湿属于六淫邪气,侵袭人体后机体会做出相应抵抗,即所谓的正邪斗争,而这一过程现代医学的免疫应答相似。免疫应答是在机体的免疫系统内进行的,而免疫系统又是由免疫器官、免疫细胞及免疫分子组成的。白介素-2(IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ)作为细胞因子,主要是由免疫细胞经刺激而合成和分泌的,具有广泛的生物学活性,并在免疫应答中发挥着重要的作用^[2]。因此检测血清中 IL-2, IFN- γ 的含量可以反映免疫细胞的变化,间接反映机体的免疫状况。本实验选择上呼吸道感染小鼠作为研究对象,通过寒湿环境、呼吸道合胞病毒感染对小鼠免疫状态的影响,探讨上呼吸道疾病病因的生态性及药物的干预作用。

1 材料

1.1 动物 选取雌性昆明种小鼠 96 只,体重(30 ± 2)g。由山西省中医药研究院动物中心提供,动物许可证号 SCXK(晋)2010-0002。标准饲料饲养,饲养环境通风良好,饲养温度(21 ± 2)℃;湿度(50 ± 4)%。

1.2 病毒与细胞系 呼吸道合胞病毒(RSV) 10⁶PFU, HeLa 细胞(武汉大学研究所分子遗传研究室)常规培养于 10% FBS DMEM 中。人呼吸道合胞病毒 A2 株(购于武汉大学病毒研究所)接种于 2% FBS DMEM 培养液中的 HeLa 细胞上,至细胞病变达 80% 以上时吸取上清液,1 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,收获 RSV 上清,分装于 EP 管中, -80℃ 冰箱保存^[3]。

1.3 药物 利巴韦林,批号 100724,人体日用剂量依据药品说明书按 0.5 g 计算,通过小鼠与人体的体表面积比例进行剂量换算,用生理盐水配制成 5.625 g·L⁻¹;麻黄加术汤(麻黄 6 g,桂枝 9 g,杏仁 9

g,甘草 6 g,白术 12 g),购于北京同仁堂山西连锁药店有限责任公司,按常规煎煮方法,制成含生药 0.472 5 g·mL⁻¹的水煎剂。将中西药物装瓶后置于 4℃ 冰箱密闭保存备用^[4]。

1.4 试剂 小鼠 IL-2 ELISA 试剂盒(批号 EK0398),小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒(批号 EK0375),均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.5 仪器 LRH-800-GSI 型人工气候箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司),YC-D201 型超声波加湿器(北京亚都人工环境科技公司),Spectramax190 全波长酶标仪(美国,宝特),3K30 型高速冷冻离心机(德国, Sigma)。

2 方法

2.1 造模方法

2.1.1 病毒模型 小鼠给予呼吸道合胞病毒 0.1 mL/只滴鼻给药^[5-6]。

2.1.2 寒湿模型 用人工气候箱制备寒湿环境气候^[7-9]。将小鼠置于寒湿环境的人工气候箱,相对湿度(90 ± 4)%,温度(6 ± 2)℃,每天刺激 8 h(其余时间为正常组温、湿度);非寒湿模型组小鼠全天在正常环境相对湿度(50 ± 4)%,(21 ± 2)℃ 饲养^[10-14]。

2.1.3 寒湿 + 病毒模型 在病毒模型的基础上叠加寒湿模型。

2.2 分组处理 将 96 只小鼠随机分为 8 组:正常对照组、病毒模型组、病毒 + 麻黄加术汤组、病毒 + 利巴韦林组、寒湿模型组、寒湿 + 病毒模型组、寒湿 + 病毒 + 麻黄加术汤组、寒湿 + 病毒 + 利巴韦林组,每组 12 只。给药组按麻黄加术汤 6.3 g·kg⁻¹ 利巴韦林 0.075 g·kg⁻¹ 灌胃,其他组给予等量生理盐水,每日 1 次,连续 7 d。

2.3 标本采集和测定 于造模及给药第 7 天,摘取眼球取血,室温放置,2 500 r·min⁻¹ 15 min 离心,取血清,测定 IL-2 和 IFN- γ 。采用 ELISA 法,按照试剂

盒的说明进行操作。

2.4 统计学处理 各组所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.5 软件统计处理。单因素方差分析后, 行多组间比较, 采用 Student-Newman-Keuls 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 麻黄加术汤对病毒小鼠和寒湿 + 病毒小鼠血清 IL-2 和 IFN- γ 含量的影响 与正常组相比, 各模型组小鼠 IL-2, IFN- γ 含量均显著降低 ($P < 0.001$); 与病毒模型组相比, 病毒 + 利巴韦林组和病毒 + 麻

黄加术汤组小鼠 IFN- γ 含量显著升高 ($P < 0.001$), 但仍显著低于正常组 ($P < 0.001$), 病毒 + 麻黄加术汤组 IFN- γ 含量显著低于病毒 + 利巴韦林组 ($P < 0.001$); 与寒湿 + 病毒组相比, 寒湿 + 病毒 + 利巴韦林组和寒湿 + 病毒 + 麻黄加术汤组小鼠 IL-2 和 IFN- γ 含量显著升高 ($P < 0.001$), 但仍显著低于正常组 ($P < 0.001$), 而且在 2 个给药组间均无显著性差异; 与病毒 + 麻黄加术汤组比较, 寒湿 + 病毒 + 麻黄加术汤组 IFN- γ 含量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 麻黄加术汤对病毒小鼠和寒湿 + 病毒小鼠 IL-2、IFN- γ 含量影响的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

ng · L⁻¹

组别	剂量/g · kg ⁻¹	IL-2	IFN- γ
正常	-	176.44 ± 13.19 ^{1,2,3,4)}	478.67 ± 12.50 ^{1,2,3,4)}
病毒模型	-	78.84 ± 9.94	273.73 ± 9.56
病毒 + 利巴韦林	0.075	116.67 ± 6.06 ¹⁾	396.38 ± 7.23 ¹⁾
病毒 + 麻黄加术汤	6.3	115.39 ± 16.35 ¹⁾	351.77 ± 20.92 ^{1,3)}
寒湿 + 病毒模型	-	34.24 ± 3.68	190.36 ± 11.26
寒湿 + 病毒 + 利巴韦林	0.075	107.98 ± 6.11 ²⁾	330.38 ± 18.29 ²⁾
寒湿 + 病毒 + 麻黄加术汤	6.3	104.77 ± 8.19 ²⁾	322.47 ± 11.65 ^{2,4)}

注: 与病毒模型组比较¹⁾ $P < 0.001$; 与寒湿 + 病毒模型组比较²⁾ $P < 0.001$; 与病毒 + 利巴韦林组比较³⁾ $P < 0.001$; 与病毒 + 麻黄加术汤组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 寒湿因素对病毒感染小鼠 IL-2 和 IFN- γ 含量的影响 病毒组和寒湿组均使小鼠 IL-2, IFN- γ 含量显著下降 ($P < 0.001$), 2 种因素对小鼠 IL-2, IFN- γ 含量的影响有交互作用 ($P < 0.001, P < 0.05$)。见表 2 ~ 3。

表 2 寒湿因素对病毒小鼠 IL-2 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

病毒	寒湿		F	P <
	A/No	C/Yes		
B/No	176.44 ± 4.39	78.84 ± 4.39	262.30 ^a	0.001 ^a
D/Yes	78.84 ± 4.39	34.24 ± 4.39		
F	262.30 ^a		36.44 ^b	
P <	0.001 ^a		0.001 ^b	

注: a. 主效应的 F 和 P 值; b. 交互效应的 F 和 P 值; 寒湿因素和病毒 No 表示无, Yes 表示有 (表 3 同)。

表 3 寒湿因素对病毒小鼠 IFN- γ 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

病毒	寒湿		F	P <
	A/No	C/Yes		
B/No	478.67 ± 5.79	366.47 ± 5.79	1084.64 ^a	0.001 ^a
D/Yes	273.73 ± 5.79	190.36 ± 5.79		
F	160.79 ^a		6.21 ^b	
P	0.001 ^a		0.05 ^b	

4 讨论

从《内经》生态医学思想看六淫、戾气的致病特点主要是大生态的失衡, 是人与自然, 天、地之间平衡状态的破坏, 是人与自然相互关系的一种不和谐表现。前期研究认为疾病不仅是宿主正气强弱与致病因子侵袭力力量的对比, 更是与环境之间多种因素的相关性失衡所致, 是“生态病因所为”^[15]。这种认识与中医外感发热病因探讨中对发热的产生, 指出中医现已认识到六淫、邪毒不仅包含气候变化的物理因素, 还应包括具有致热作用的病毒、细菌等生物学因素具有一致性^[16], 也是一种在思维上的复杂性表现^[17]。

本实验研究即是在天人合一的整体思想下, 对寒湿环境、病毒感染、机体免疫状态之间的相关性探讨。

上呼吸道感染可由多种病毒感染引起, 呼吸道合胞病毒是引起呼吸道感染的重要病原。选择呼吸道合胞病毒滴鼻小鼠, 可引起小鼠上呼吸道感染。采用病毒感染致病是在短时间内大量病毒的入侵, 在中医学中类似感受戾气, 通过选择 IL-2, IFN- γ 这种正向免疫指标探讨小鼠正气的变化, 使用麻黄加术汤经典方剂对因治疗, 了解寒湿邪气、病毒感染、

中西药干预对小鼠免疫状态的影响,从而理解疾病在形成过程中诸多因素的作用。

实验结果也显示,与正常组相比各模型组小鼠血清中 IL-2 和 IFN- γ 的含量显著降低,且寒湿环境下的各组下降程度显著,说明寒湿外邪能够使正常及上呼吸道感染小鼠免疫功能进一步降低,与前期风寒、寒湿、湿热可以使正常小鼠免疫功能降低研究结果一致^[18],并与张氏、赵氏^[19-20]等研究认为寒邪、湿邪会改变病毒生存及存活时间,影响机体的免疫功能的结果具有一致性;麻黄加术汤有发汗解表、散寒除湿之功。从理论上分析,应对寒湿+病毒所致的小鼠 IL-2, IFN- γ 含量降低的改善作用更佳,而本研究发现寒湿+病毒+麻黄加术汤组和病毒+麻黄加术汤组 IL-2 含量无显著差别,寒湿+病毒+麻黄加术汤组小鼠 IFN- γ 含量却显著低于病毒+麻黄加术汤组,可能是由于寒湿+病毒较单纯病毒感染使小鼠免疫功能降低更显著,从而使麻黄加术汤对其的改善受到一定影响所致。麻黄加术汤可以提高小鼠由于病毒和寒湿环境所致血清中 IL-2 和 IFN- γ 含量的降低,从而改善小鼠体内免疫状态,说明 RSV 和药物作用以及持续的寒湿刺激均能影响小鼠体内免疫状态,说明环境因素、病原微生物、药物作用以及机体正气之间存在相关性,疾病病因存在多态因素,其各因素间的协同对疾病的发生作用机制尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 杨威. 五运六气治疫遣方用药规律探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 188.
- [2] 龚非力. 医学免疫学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2004: 72.
- [3] 徐莉. 上呼吸道感染的病因与病理学[J]. 社区医学杂志, 2011, 9(1): 68.
- [4] 杜建雄. 运动与上呼吸道感染的关系[J]. 中国校医, 2010, 24(1): 72.
- [5] 廉国利, 俞海国, 赵晓东, 等. 小鼠呼吸道合胞病毒感染模型的建立[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2003, 24(4): 329.
- [6] 孙喜稳, 吕翠霞, 张淼, 等. 清营解表合剂防治流感免

疫调节机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 161.

- [7] 尚清秀. 上呼吸道感染的临床表现与诊断[J]. 社区医学杂志, 2011, 9(1): 69.
- [8] 陈小可, 刘慧, 刘念, 等. 不同咽痛症状对急性细菌性上呼吸道感染的诊断意义[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(7): 1018.
- [9] 范世珍, 刘牧军, 罗光亮, 等. 多重 PCR 检测急性反复上呼吸道感染儿童病毒和非典型细菌[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(6): 890.
- [10] 田玮, 丁宁峰. 急性上呼吸道感染患者外周血 C 反应蛋白测定的临床诊断价值[J]. 山西医科大学学报, 2010, 41(6): 532.
- [11] 何明菊. 上呼吸道感染的治疗与预防[J]. 社区医学杂志, 2011, 9(1): 71.
- [12] 廉国利, 俞海国, 赵晓东, 等. 小鼠呼吸道合胞病毒感染模型的建立[J]. 西安交通大学学报, 2003, 24(4): 329.
- [13] 许筱颖, 郭霞珍, 刘晓燕. 人工模拟与自然冬夏对血清褪黑素及其合成限速酶活性的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(10): 2051.
- [14] 章敏, 陈刚, 张六通, 等. 六淫湿邪动物模型研究[J]. 湖北中医杂志, 2007, 29(9): 5.
- [15] 陶功定, 冯前进, 李俊莲, 等. 从《黄帝内经》生态医学思想浅论生态病因学[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(8): 649.
- [16] 马仁强, 刘俊田, 陈健文. 试论治疗外感热症中药的药理学研究方法与评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(8): 56.
- [17] 许滔, 吴光炯. 《内经》的复杂性思维探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 232.
- [18] 李俊莲, 李艳彦, 马彦平, 等. 人工模拟不同外邪对正常及免疫低下实验小鼠免疫指标的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(6): 1242.
- [19] 赵鹏, 袁嘉丽, 陈文慧. 冬季感冒患者及健康人上呼吸道微生态状况研究[J]. 中医研究, 2008, 21(2): 26.
- [20] 张伟, 刘海瑜. 寒邪与寒湿之邪对大鼠肺脏 fractalkine mRNA 表达影响的差异性[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(2): 171.

[责任编辑 聂淑琴]