

## 3 种解表方对甲 1、甲 3 型流感小鼠白介素 2 和 T 淋巴细胞亚群的影响

马力<sup>1</sup>, 黎敬波<sup>1\*</sup>, 盛丹<sup>2</sup>, 刘叶<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 四川泸州医学院, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的: 观察桂枝麻黄各半汤、银翘散、新加香薷饮对甲 1、甲 3 型流感小鼠白细胞介素 2(IL-2)、T 淋巴细胞亚群的影响。方法: 选取 SPF 级 NIH 小鼠, 毒种流水冲浸融化, 小鼠经乙醚吸入麻醉后, 病毒滴鼻每只约 0.05 mL。在病毒攻击前 1 d 开始给药, 以 3 种解表方中药组分别按最适合有效剂量(0.4 mL·d<sup>-1</sup>) ig 给药 5 d。至造模后第 4 d, 球后取血, 测 IL-2 和 T 淋巴细胞亚群 CD<sub>3</sub><sup>+</sup>, CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup>。结果: 感染甲 1、甲 3 型流感病毒后, 外周血 IL-2 的浓度明显降低, 与正常组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。银翘散对甲 3 型流感感染小鼠 IL-2 升高无统计学意义, 病毒唑组及 3 种解表方法均能提高病毒感染小鼠外周血 IL-2 水平, 且在甲 1 型实验中, 中药治疗各组均高于正常对照组水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。感染甲 1 型流感病毒后, 小鼠外周血中 T 淋巴细胞 CD<sub>3</sub><sup>+</sup>, CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 降低, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 尤其 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 降低明显, 致 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 比例下降, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 提示细胞免疫功能下降失调。而 3 种解表方法中药均能提高 CD<sub>3</sub><sup>+</sup>, CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 总数, 与模型对照组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 3 治疗组 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 也较正常组高( $P < 0.05$ ), 但 3 组的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 比值较模型对照组高( $P < 0.05$ ), 已较接近正常水平。结论: 3 种解表方(桂枝麻黄各半汤、银翘散和新加香薷饮) 均能不同程度地提高机体细胞免疫功能, 达到抗流感病毒的效果。

[关键词] 流感; 病毒; 中药组方; 白介素-2; T 淋巴细胞亚群

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0108-04

## Effect of Three Therapies on Interleukin 2 and T lymphocyte Subgroups in Mice Infected With Influenza A Virus of Type 1 or Type 3

MA Li<sup>1</sup>, LI Jing-bo<sup>1\*</sup>, SHENG Dan<sup>2</sup>, LIU Ye<sup>1</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Luzhou Medical College, Luzhou 64600, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Guizhi Mahuang Geban Tang (GMGT, Integrated Decoction of *Ramulus Cinnamomi* Decoction and *Herba Ephedrae* Decoction), Yinqiao San (YS, Powder of *Flos Lonicerae* and *Fructus Forsythiae*), and Xijia Xiangru Yin (XXY, Modified *Herba Moslae* Powder) on interleukin 2 (IL-2) and T lymphocyte subgroups in mice infected with influenza A virus of type 1 or type 3. **Method:** NIH mice with specific pathogen free were given GMGT, YS and XXY (0.4 mL·d<sup>-1</sup>, ig) respectively one day before the mice were attacked by intranasal dripping of 0.05 mL influenza A virus solution. After establishing the model, blood sample was collected on the fourth day, and the amount of IL-2 and CD<sub>3</sub><sup>+</sup>, CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup> in the blood was examined. **Result:** After infection, the peripheral IL-2 level in infected mice was decreased as compared with the normal group ( $P < 0.05$ ). YS had no significant effect on mice infected with type 3 influenza A virus. Both virazole and three exterior-

[收稿日期] 20100115(002)

[基金项目] 国家中医药管理局基金项目(04-05JP46); 国家自然科学基金项目(39700184)

[作者简介] 马力, 编辑, 研究方向: 中医编辑学, Tel: 13533557249, E-mail: xzybjbm@gzhtcm.edu.cn

[通讯作者] \* 黎敬波, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医基础理论, Tel: 13825004480, E-mail: li-jing-bo@vip.sina.com

releasing therapies increased the peripheral IL-2 level in mice infected with influenza A virus, and three exterior-releasing therapies increased the peripheral IL-2 level in mice infected with type 1 influenza A virus ( $P < 0.05$ , compared with the normal group).  $CD_3^+$  and  $CD_4^+$  percentage in the mice infected with type 1 influenza A virus decreased as compared with those in the normal group ( $P < 0.05$ ), and the decrease of  $CD_4^+$  percentage in the infected mice was obvious, resulting in the lower  $CD_4^+ / CD_8^+$  ( $P < 0.05$  compared with the normal group). Three exterior-releasing therapies increased the total amount of  $CD_3^+$  and  $CD_4^+$  ( $P < 0.05$ , compared with the model group), and increased the  $CD_8^+$  ( $P < 0.05$ , compared with the normal group) and  $CD_4^+ / CD_8^+$  ( $P < 0.05$ , compared with the model group), being close to the normal level. **Conclusion:** The anti-virus mechanism of the three exterior-releasing therapies, GMGT, YS and XXY, is probably related with elevation of the cellular immune function.

**[Key words]** influenza; virus; Chinese herbal prescriptions; interleukin 2; T lymphocyte subgroups

流行性感冒(Influenza)是由流感病毒引起的上呼吸道病毒感染性疾病,是人类最常见的上呼吸道感染性疾病之一。它的两个重要特征是流行性爆发和高死亡率<sup>[1]</sup>。同型流感病毒根据 HA 和 NA 抗原性不同又分为若干亚型,甲型流感病毒 HA 可分为 16 个亚型(H1 ~ H16), NA 有 9 个亚型(N1 ~ N9)<sup>[2]</sup>。A 型流感病毒在自然界广泛分布,除了可以感染人类外,还可以感染禽、猪、马及数种海洋哺乳动物,人禽流感病毒 H5N1 也属于 A 型流感病毒。

流感属季节性传染病、多发病。在中医学属外感表证初起范畴,分别散见于温病中的风温,伤寒中的太阳病、少阳病等。中医治疗外感表证有 3 种基本方法:辛温解表、辛凉解表、祛湿解表。这 3 种解表方法在临床广泛用于治疗上呼吸道感染性疾病,效果良好,其代表方桂枝麻黄各半汤、银翘散、新加香薷饮。前期对几种方法抗病毒做了研究<sup>[3-5]</sup>,本研究观察辛温解表、辛凉解表、祛湿解表法对甲 1、甲 3 型流感小鼠白细胞介素 2、T 淋巴细胞亚群的影响,现报道如下。

## 1 材料与方

**1.1 药物** 桂枝麻黄各半汤:《伤寒杂病论》制法:按照伤寒论原文煮取麻黄汤(麻黄 9 g,桂枝 6 g,杏仁 9 g,炙甘草 6 g),桂枝汤(桂枝 9 g,芍药 9 g,甘草 6 g,生姜 9 g)各等份水煎后合并。银翘散:《温病条辨》原方:连翘 15 g,金银花 15 g,桔梗 9 g,薄荷 9 g,竹叶 6 g,生甘草 5 g,荆芥穗 6 g,淡豆豉 6 g,牛蒡子 6 g,芦根 10 g。新加香薷饮:《温病条辨》原方:香薷 6 g,金银花 9 g,扁豆花 9 g,厚朴 6 g,连翘 6 g。阳性对照药物病毒唑由湖北省医工所提供,批号 2000303。按照体表面积公式换算剂量,中药冷水浸

泡 30 min 后,水煎 10 min,控制浓度分别为桂枝麻黄各半汤 0.08 g/mL,银翘散 0.132 g/mL,新加香薷饮 0.072 g/mL,病毒唑 0.001 g/mL。

**1.2 毒种** 甲 1 型流感病毒 FM<sub>1</sub> 株,由中国药品生物制品检定所提供,广州中医药大学热带医学研究所病毒室于 MDCK(狗肾细胞,由广东省儿童医院病毒室赠送)经传代培养,以细胞病变及鸡红细胞血凝法来判断病毒滴度。甲 3 亚型流感病毒 A/昆科/1/71(H3N2)任株经鼠肺适应,再经鸡胚尿囊腔接种传代,广州中医药大学热带医学研究所病毒室长期冻存。

**1.3 动物** SPF 级 NIH 小鼠由广东省医学实验动物中心提供,雌雄各半,体重 13 ~ 15 g。实验动物质量和条件合格证书 SCXK(粤)2003-0002,粤监证字 2006A017。饲养环境:室温为(23 ± 2),相对湿度为(50 ± 5)%。

**1.4 IL-2 血清标本的制备** 将各组实验小鼠摘眼球取血 1 mL 置于 1.5 mL EP 管中,于室温下静置 3 h,红细胞充分沉淀,血液凝固,血清析出,室温下 3 000 r · min<sup>-1</sup>离心约 15 min,吸取上清,标记好后放于 - 20 冻存储备用。

IL-2 试剂盒(广州晶美生物公司提供货号 FMK0001;解放军总医院科技开发中心放免所提供,批号 20061130);高精度加样器(德国 Brand);双蒸水及去离子水;坐标纸;酶标仪 Elx800(美国 Bio-TEK 公司生产);37 °C CO<sub>2</sub> 孵箱(美国 SHELLAB 公司生产)。广州中医药大学核医学研究室完成测试。

**1.5 T 淋巴细胞亚群的制备** 实验用 NIH 小鼠摘眼球取血约 0.5 mL 加入抗凝管中充分混匀。取适量标有不同荧光染色剂的 3 种抗体,并将按照说明书以蒸馏水稀释成 0.012 5 μg · μL<sup>-1</sup>,取 50 μL 抗

凝血加入测试管中,依次加入 3 种抗体各 10  $\mu\text{L}$ ,在室温下避光孵育 20 ~30 min;每管加入 250  $\mu\text{L}$  溶血素(1  $\times$ )轻轻吹打,在室温下避光静置 10 min,裂解红细胞;观察溶液澄清透明后,加入冷 PBS 液 1 mL 终止反应,室温下 2 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心约 5 min,弃上清,加入约 1 mL PBS 液摇匀,滴加 1% 多聚甲醛液约 100  $\mu\text{L}$  以固定,待上机检测;流式细胞仪(型号 BD FACSCalibur,产地美国);由广州中医药大学一附院实验中心完成测试。

**1.6 造模及给药方法** 毒株经鼠肺适应、鸡胚尿囊传代,测定  $\text{LD}_{50}$ ,制备每 0.05 mL 含 15 个  $\text{LD}_{50}$  的病毒混悬液。小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、病毒唑组、桂枝麻黄各半汤组、银翘散组和新加香薷饮组,在乙醚轻度麻醉下滴鼻,病毒感染各组每只滴鼻 4 滴(约 0.05 mL)病毒混悬液,正常对照组每只滴鼻 4 滴生理盐水。于造模前 1 d 开始 ig 给药(正常对照组 ig 等量生理盐水),0.4 mL  $\cdot\text{d}^{-1}$ ,分 2 次给药,0.2 mL/次,至造模后第 4 天,球后取血。

**1.7 统计学方法** 对所得实验数据用 SPSS11.5 软件予以统计学处理,计量资料均数用  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 对感染甲 1 型、甲 3 型流感小鼠血清 IL-2 的影响** 见表 1。感染甲 1、甲 3 型流感病毒后,外周血白细胞介素 2 的浓度明显降低,与正常组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。除银翘散对甲 3 型流感感染小鼠 IL-2 升高无统计学意义外,病毒唑(阳性

对照)及 3 种解表方法均能提高病毒感染小鼠外周血白细胞介素 2 水平,且在甲 1 型实验中,中药治疗各组均高于正常对照组水平,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 3 种治法对感染甲 1 型、甲 3 型流感小鼠血清 IL-2 的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量 /g $\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-2 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$	
		甲 1 型( $n$ )	甲 3 型( $n$ )
正常对照	—	3.73 $\pm$ 0.16 <sup>2)</sup> (6)	3.49 $\pm$ 0.29(7)
模型对照	—	1.90 $\pm$ 0.15 <sup>1)</sup> (5)	2.68 $\pm$ 0.43 <sup>1)</sup> (7)
病毒唑	0.02	4.00 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup> (5)	3.43 $\pm$ 0.37 <sup>2)</sup> (6)
桂枝麻黄各半汤	1.60	4.06 $\pm$ 0.20 <sup>1,2)</sup> (8)	3.83 $\pm$ 0.97 <sup>3)</sup> (6)
银翘散	2.64	4.24 $\pm$ 0.144 <sup>1,2)</sup> (7)	3.24 $\pm$ 0.84(7)
新加香薷饮	1.44	4.12 $\pm$ 0.16 <sup>1,2)</sup> (8)	3.54 $\pm$ 0.49 <sup>2)</sup> (6)

注:与正常对照组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型对照组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (下同)。

**2.2 对感染甲 1 流感小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响** 见表 2。感染甲 1 型流感病毒后,小鼠外周血中 T 淋巴细胞  $\text{CD}_3^+$ ,  $\text{CD}_4^+$  降低,与正常对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),尤其  $\text{CD}_4^+$  降低明显,致  $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$  比例下降,与正常对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示细胞免疫功能失调。而 3 种解表方法中药均能提高  $\text{CD}_3^+$ ,  $\text{CD}_4^+$  细胞总数,与模型对照组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),3 个治疗组  $\text{CD}_8^+$  也较正常组高( $P < 0.05$ ),但 3 组的  $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$  比值较模型对照组高( $P < 0.05$ ),已较接近正常水平。

表 2 3 种治法对感染甲 1 型流感小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量/g $\cdot\text{kg}^{-1}$	$n$	$\text{CD}_3^+/\%$	$\text{CD}_4^+/\%$	$\text{CD}_8^+/\%$	$\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$
正常对照	—	6	62.0 $\pm$ 3.1	46.1 $\pm$ 4.1	14.4 $\pm$ 1.4	3.2 $\pm$ 0.4
模型对照	—	5	37.3 $\pm$ 4.2 <sup>1)</sup>	20.5 $\pm$ 3.9 <sup>1)</sup>	18.5 $\pm$ 2.0	1.6 $\pm$ 0.8 <sup>1)</sup>
病毒唑	0.02	9	51.7 $\pm$ 13.8	31.2 $\pm$ 11.5 <sup>1)</sup>	20.3 $\pm$ 4.9	2.0 $\pm$ 1.8 <sup>1)</sup>
桂枝麻黄各半汤	1.60	10	70.5 $\pm$ 5.7 <sup>2)</sup>	49.9 $\pm$ 6.9 <sup>2)</sup>	21.2 $\pm$ 6.7 <sup>1)</sup>	2.7 $\pm$ 1.2 <sup>2)</sup>
银翘散	2.64	10	67.1 $\pm$ 4.7 <sup>2)</sup>	43.2 $\pm$ 6.5 <sup>2)</sup>	21.4 $\pm$ 5.9 <sup>1)</sup>	2.1 $\pm$ 0.6 <sup>2)</sup>
新加香薷饮	1.44	10	70.9 $\pm$ 6.3 <sup>2)</sup>	50.5 $\pm$ 11.1 <sup>2)</sup>	18.6 $\pm$ 6.2 <sup>1)</sup>	3.1 $\pm$ 1.4 <sup>2)</sup>

**2.3 对感染甲 3 型流感小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响** 见表 3。感染甲 3 型流感病毒后,小鼠外周血中 T 淋巴细胞  $\text{CD}_3^+$ ,  $\text{CD}_4^+$ ,  $\text{CD}_8^+$  细胞总数均降低, $\text{CD}_3^+$ ,  $\text{CD}_4^+$  细胞总数下降与正常对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示细胞免疫功能降低。而 3 种解表方法中药均能提高  $\text{CD}_3^+$ ,  $\text{CD}_4^+$ ,  $\text{CD}_8^+$  细胞总数,而提高  $\text{CD}_3^+$ ,  $\text{CD}_4^+$  细胞总数水平明显,与模

型对照组比较差异有显著性意义,从而使  $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$  比值略高于正常,但差异无统计学意义。

## 3 讨论

流感病毒以其抗原多变性成为医学界预防和治疗流感研究的关键。科学家们最初认为病毒性疾病的出现和流行主要是由于病毒基因的改变引起的。然而越来越多的数据表明,环境因素才是新病毒性

表 3 3 种治法对感染甲 3 型流感小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响 ( 柳±s)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	CD3 <sup>+</sup> / %	CD4 <sup>+</sup> / %	CD8 <sup>+</sup> / %	CD4 <sup>+</sup> / + CD8 <sup>+</sup>
正常对照	—	8	75.01 ±8.64	52.61 ±6.34	18.79 ±2.68	2.82 ±0.21
模型对照	—	6	58.88 ±7.18 <sup>1)</sup>	40.60 ±8.63 <sup>1)</sup>	15.90 ±5.92	3.09 ±1.83
病毒唑	0.02	8	78.79 ±6.60 <sup>2)</sup>	57.87 ±5.53 <sup>2)</sup>	17.67 ±4.36	3.47 ±0.97
桂枝麻黄各半	1.60	8	81.72 ±3.50 <sup>2)</sup>	61.32 ±4.00 <sup>2)</sup>	16.16 ±3.78	4.01 ±1.07
银翘散	2.64	8	78.49 ±8.55 <sup>2)</sup>	58.15 ±6.38 <sup>2)</sup>	18.20 ±3.04	3.26 ±0.56
新加香薷饮	1.44	8	84.80 ±7.62 <sup>2)</sup>	63.56 ±9.00 <sup>2)</sup>	17.46 ±4.31	4.02 ±1.84

疾病出现的主要原因,生态环境的改变至少能加速新病毒性疾病的出现。人类的社会活动和经济活动、环境污染在一定程度上加快了病毒基因转变。流感的传播与流行、流感病毒的毒力增强在一定程度上与季节变换、气温变化密切相关。

辛温解表、辛凉解表、祛湿解表为中医治疗外感表证最基本的 3 种法则,而 3 种治法的特点正好是针对不同环境下,流感疾病的发病而使用,因此,临床辨证治疗外感热病均有很好疗效。本实验从中医外感理论出发,由流感病毒入手,以小鼠流感肺炎模型为基础,观察不同治法对流感肺炎小鼠 IL-2 和 T 淋巴细胞亚群的影响,以探讨 3 种解表方法治疗流感的免疫干预机制。

IL-2 又称 T 细胞生长因子(TCGF),由 T 细胞产生,以自分泌和旁分泌方式发挥效应,主要生物学功能是活化 T 细胞,促进细胞因子产生;刺激 NK 细胞增殖,增强 NK 杀伤活性及产生细胞因子,诱导 LAK 细胞产生;促进 B 细胞增殖和分泌抗体;激活巨噬细胞。因此,在流感病毒感染后,可能参与人体自身抗病毒能力的发挥。IL-2 又与 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T 细胞活化及功能调节有关。

本实验结果表明,辛温解表、辛凉解表、祛湿解表等 3 种治法的代表方(桂枝麻黄各半汤、银翘散、新加香薷饮)在小鼠体内能够有效抗流感病毒,减轻小鼠流感肺炎的发病及病理改变<sup>[3-5]</sup>,而这样的疗效,可能就是通过增强和调节小鼠细胞免疫功能,

减轻后发的炎症反应,发挥了综合效应,达到抗流感病毒感染的效果。

桂枝麻黄各半汤、银翘散和新加香薷饮能够提高流感感染小鼠外周血 IL-2 和 T 淋巴细胞亚群(CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>)水平,说明在改善免疫状态的同时,对炎症反应也有调节作用,提示中药治疗流感的途径不只是消灭病毒,而可能还与免疫调节的多个环节有关,中药治疗流感是综合作用的发挥。实验中还发现,不同治法方药治疗流感的作用存在一些差异,可能与未辨证用药,或给药时机不当有关,还需要进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Turkulov V, Madle-Samardzi ja N. Influenza always present among us[ J]. Med Prel, 2000, 3 (3/4): 154.
- [2] Bernd Sebastian Kamps, Christian Hoffmann, Wolfgang Preiser. Influenza Report, 2006, www. InfluenzaReport.com
- [3] 刘叶,黎敬波. 三种解表法抗流感病毒甲 1 型的实验研究[ J]. 新中医, 2004, 36(1): 78.
- [4] 盛丹,黎敬波,杨子峰,等. 不同治法体内抗甲 3 (H3N2) 亚型流感病毒作用的实验研究[ J]. 河南中医, 2007, 27(2): 25.
- [5] 盛丹,黎敬波,刘进. 辛温解表三方体内抗甲 1(H1N1) 亚型流感病毒作用的实验研究[ J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(1): 25.

[责任编辑 聂淑琴]