

中药方剂研究

温阳药及其有效成分对阳虚动物模型 某些免疫功能的影响

白求恩医科大学 耿排力 杨贵贞

目前许多研究表明, 虚证与机体免疫功能低下有关, 应用扶正固本、增强免疫功能的中药可使之以调整。因此, 虚证与免疫的关系值得进一步研究。

1963年邱安堃氏等首次用大剂量皮质激素造成动物的耗竭状态来模拟祖国医学中的“阳虚”证候⁽¹⁾, 并证明温补肾阳药能纠正这种证候。近年来先后开展了对此模型内分泌系统、各器官组织化学改变、DNA、RNA合成率及免疫学方面的研究^(2~5), 但迄今未见有关温阳药对阳虚模型小鼠淋巴细胞转化及其有效成分对此模型免疫功能影响的报道。本实验在发现温阳药煎剂对阳虚小鼠低下的体液和细胞免疫有一定增强作用的基础上, 对温阳药的有效成分进行了提取和鉴定, 并从中筛选出了对阳虚模型小鼠免疫功能的恢复起主要作用的药物, 为进一步研究温阳药有效成分对阳虚小鼠免疫功能的影响提供了实验依据。

材料和方法

一、动物

瑞士种雄性小白鼠, 体重18~22克, 由本校动物室饲养及提供。

二、药物

1. 醋酸强的松龙: 上海第九制药厂出品, 批号810607。

2. 温阳药煎剂: 附子、肉桂、淫羊藿、肉苁蓉各20克, 置砂锅中文火煎煮10小时后, 浓缩至200毫升, 纱布过滤备用。

3. 温阳药附子、肉桂、淫羊藿、肉苁蓉总有效成分的提取和鉴定: 参考文献的方法⁽⁶⁾。其中附子总生物碱用无菌双蒸水配成1毫克/毫升注射液; 淫羊藿总黄酮、淫羊藿氨基酸分别配成5毫克/毫升注射液及200%水溶液; 肉桂挥发油为含15%桂皮醛的溶液; 肉苁蓉乙醇提取物配成25%注射液。

(三、主要试剂

1. 植物血凝素-P (PHA-P): 美国DIFCO实验室产品, 批号685048。

2. 刀豆蛋白A (conA) IV型: 美国SIGMA化学公司产品, 批号79C-7602。

3. RPMI-1640: 西德SERVA公司产品, 批号47885。

4. 氚标记胸腺嘧啶核苷(³H-TdR): 比活性24ci/mM, 中国科学院原子能研究所产品。

四、实验方法

1. 动物分组: 根据给予不同药物, 动物随机分成若干组。

(1) 阳虚组: 醋酸强的松龙100微克/20克/日, 用生理盐水稀释成0.1毫升臀部肌肉注射, 实验第2日起口服常水0.2毫升或腹部皮下注射生理盐水0.2毫升。

(2) 阳虚+温阳组: 醋酸强的松龙用量及方法同阳虚组, 实验第2日起灌服温阳药煎剂或腹部皮下注射各温阳药提取物0.2毫升/日, 淫羊藿氨基酸0.2毫升/日口服。

(3) 温阳组: 生理盐水0.1毫升肌肉注射, 实验第2日起口服温阳药煎剂或腹部皮下注射温阳药提取物0.2毫升/日。

(4) 正常对照组: 生理盐水0.1毫升/日肌肉注射, 实验第2日起口服常水0.2毫升或腹部皮下注射生理盐水0.2毫升/日。

2. 方法:

(1) 脾细胞介导红细胞溶血的分光光度计(Quantitative Spleen Cell Mediated SRBC Hemolysis Spectrophotometrically, QHS)⁽⁷⁾测定及血凝抗体滴度(Hemagglutination Test, HT)测定: 实验第3日各组动物腹腔注射5%绵羊红细胞(SRBC)0.2毫升/只。实验第8日先摘眼球采血后脱颈椎处死动物, 取脾置于冷Gey's液中捣碎, 调整细胞数至5×

10^6 个/毫升。每管加脾细胞悬液1毫升, 1:30豚鼠补体1毫升, 0.2%SRBC 1毫升。37℃水箱中孵育1小时。2000转/分离心10分钟, 吸上清液于721分光光度计4B毫微米处读取光密度值。所采血待凝固后分离血清, 56℃水箱灭活30分钟。用生理盐水对倍稀释血清, 滴加1%SRBC 1滴(约0.025毫升), 室温2小时后看结果。判定结果以(++)为阳性反应终点。

(2) $^3\text{H-TdR}$ 掺入淋巴细胞转化试验: 于实验第7日处死动物。取脾置于1640液中, 用挤压法得到淋巴细胞悬液, 调整细胞数至500万/毫升。每培养管加入 2.5×10^6 个/毫升细胞。致有丝分裂原加入浓度分别为PHA 50微克/毫升, conA 10微克/毫升。其它步骤参考我室建立的方法⁽³⁾进行。

本实验全部数据, 均用单因素方差分析法处理。

结果及分析

一、造型动物外观情况

肌注醋酸强的松龙后, 小白鼠因个体上的差异, 出现症状的先后顺序、程度不尽相同。但总的说来有一些规律可循。一般于受试后第4天起出现症状(少数第3天出现), 但较轻微, 以神疲、活动力减弱为主, 此时脾已经缩小。于第5天起出现毛发不荣, 活动迟缓, 腹泻等。从第6天开始出现蜷曲少动, 弓背, 颤抖, 对外界刺激的应答反应降低。7天后除上述症状加重外, 可出现体毛枯疏, 缩成一团, 尾部突出, 四肢冰凉, 形体消瘦, 不采食、水, 眼睛不开甚至眼睛, 逐渐处于濒死状态。这些证候的轻重一般与皮质激素的剂量及室内温度有关。剂量适中, 室温在20℃左右时效果较好。如剂量过大, 室温低时动物死亡率大大增加, 且温阳药不能纠正。故选择一种既可出现“阳虚”症状又不致于动物大量死亡的剂量是必要的。阳虚+温阳组症状出现的先后顺序与阳虚组大致相等, 但其出现症状的程度比阳虚组轻, 主要以神疲, 毛发不荣, 活动迟缓的症状为主, 其体重减轻、脾脏缩小程度也比阳虚组轻(但体重减轻无显著差异)。

选用100微克/20克/日剂量的强的松龙时, 因全身性耗竭状态而死亡的动物较少。有些动物突然死亡可能与使用皮质激素后并发感染有关。

二、温阳药煎剂对阳虚小鼠免疫功能的影响

1. 对体液免疫功能的影响:

(1) 脾细胞介导红细胞溶血的分光光度计(QHS)测定: 表1示, 阳虚组小鼠抗体形成细胞功能较正常小鼠严重低下, 但同时给予温阳药则可使其抗体形成细胞功能趋于恢复正常。温阳药物对正常小鼠QHS也

表1 温阳药煎剂对阳虚小鼠QHS和HT的影响

组别	动物数	QHS (光密度) 均值±标准差	HT (滴度) 均值±标准差
阳虚组	6	0.16±0.08	6.4±1.02
阳虚+温阳组	5	0.41±0.12*	7.8±0.63*
温阳组	6	0.48±0.06*	8.2±0.94*
正常对照组	7	0.44±0.06*	8±0.4*

* 与阳虚组比较 $P < 0.01$

略有增强作用。

(2) 血凝抗体滴度(HT)测定: 表1示, 阳虚组小鼠血凝抗体滴度较正常小鼠显著降低, 但同时给予温阳药物的小鼠血凝抗体滴度已趋于恢复正常。

2. 对细胞免疫功能的影响: 用致T细胞有丝分裂原ConA和PHA刺激后, 观察 $^3\text{H-TdR}$ 掺入淋巴细胞转化试验。表2示, 不论是conA或PHA刺激后, 阳虚组小鼠淋巴细胞刺激指数较正常小鼠均明显降低, 但阳虚动物同时喂服温阳药后淋巴细胞刺激指数均有显著上升, 但较正常小鼠仍明显低下。

表2 温阳药煎剂对阳虚小鼠淋巴细胞转化的影响

组别	动物数	conA(刺激指数) 均值±标准差	PHA(刺激指数) 均值±标准差
阳虚组	6	2.28±0.64	2.27±1.04
阳虚+温阳组	5	8.54±4.36*	4.56±1.10**
正常对照组	5	17.27±5.75**	8.21±1.04**

* 与阳虚组比较 $P < 0.05$

** 与阳虚组比较 $P < 0.01$

三、温阳药有效成分对阳虚小鼠免疫功能的影响

1. 对体液免疫功能的影响: 为了进一步证明四味温阳药之间是否均有相加作用, 是否每味药都具有增强阳虚小鼠免疫功能的作用, 从而筛选出起主要作用的药物, 比较有效成分和煎剂的效能差异, 分别从这四味药中提取其总有效成分, 以QHS和HT为指标, 设单味、二味、三味、四味药组, 分批进行了筛选, 结果见表3。

(1) 脾细胞介导红细胞溶血的分光光度计(QHS)测定: 第一批实验主要观察淫羊藿总黄酮和附子生物碱的作用。结果示, 仅淫羊藿总黄酮可使阳虚动物低下的抗体形成细胞功能趋于恢复; 其它各组分, 包括淫羊藿另一组分淫羊藿氨基酸对阳虚动物QHS均无明显影响。值得注意的是, 淫羊藿总黄酮与附子生物碱合用时其对阳虚动物QHS的促进作用消失, 这有待进一步探讨。第二批实验以肉桂挥发油为主。结果

表3 温阳药有效成分对阳虚小鼠 QHS
和 HT 的影响

编号	组别	动物数	QHS(光密度) 均值±标准差	HT(滴度) 均值±标准差
第一批实验	阳虚组	6	0.26±0.02	3.83±1.17
	淫羊藿组	6	0.40±0.05**	5.83±1.94*
	附子组	5	0.25±0.03	3.8±0.84
	淫羊藿 ^a 组	5	0.32±0.10	3.8±1.30
	淫羊藿+附子组	5	0.25±0.03	4.25±0.5
	淫羊藿+附子组	5	0.27±0.03	3.8±1.30
	正常对照组	5	0.47±0.06**	6±0.71*
第二批实验	阳虚组	5	0.29±0.02	4.2±1.30
	肉桂组	5	0.30±0.05	5.2±0.83
	肉桂+附子组	5	0.31±0.04	5.2±1.30
	肉桂+淫羊藿组	5	0.37±0.03*	5.8±0.45*
	肉桂+附子+淫羊藿组	5	0.37±0.08*	4±0.71
	正常对照组	5	0.47±0.05**	6.2±0.84**
第三批实验	阳虚组	5	0.21±0.02	4.6±0.58
	肉苁蓉组	4	0.26±0.03	5.25±1.50
	肉苁蓉+肉桂组	5	0.25±0.04	5.2±1.30
	肉苁蓉+附子组	4	0.25±0.07	4.75±0.50
	肉苁蓉+淫羊藿组	5	0.30±0.05**	5.8±0.84
	肉苁蓉+附子+淫羊藿+肉桂组	5	0.32±0.06**	5.8±0.84
	正常对照组	5	0.39±0.03**	6±0.71

^a 为淫羊藿氨基酸

* 与阳虚组比较 $P < 0.05$; ** 与阳虚组比较 $P < 0.01$

示, 仅肉桂挥发油+淫羊藿总黄酮, 肉桂挥发油+附子总生物碱+淫羊藿总黄酮对阳虚动物的抗体形成细胞有明显促进作用, 而单用肉桂挥发油或肉桂挥发油+附子总生物碱亦无明显促进作用。第三批实验以肉苁蓉乙醇提取物为主。结果示, 肉苁蓉提取物与淫羊藿总黄酮相加对阳虚动物 QHS 有非常明显的促进作用。

(2) 血凝抗体滴度 (HT) 测定: 从三批实验来看, 仅淫羊藿总黄酮、肉桂挥发油+淫羊藿总黄酮对阳虚动物抗体滴度有明显促进作用。这与 QHS 的结果基本相似。

2. 对细胞免疫功能的影响: 从抗体形成细胞功能及血凝抗体滴度测定结果来看, 单味药提取物或其它药物合用时, 能增强阳虚小鼠体液免疫功能的药物是淫羊藿总黄酮。另外肉苁蓉提取物对阳虚动物抗体形成细胞亦有一定的恢复作用。为探讨这两味药的提取物对阳虚动物细胞免疫功能的影响, 我们又观察了用 conA 和 PHA 作为分裂原的 ³H-TdR 掺入淋巴细胞转化功能。

表4示, 阳虚动物给予淫羊藿总黄酮+肉苁蓉提取物后, 其淋巴细胞刺激指数较阳虚动物有显著增加, 且和正常组动物相比较, 均无显著性差异。与上述四味药煎剂对淋巴细胞转化刺激指数的作用相比较, 这两味药提取物合用时作用更强一些。

表4 淫羊藿总黄酮、肉苁蓉提取物对
阳虚小鼠淋巴细胞转化的影响

组别	动物数	conA(刺激指数) 均值±标准差	PHA(刺激指数) 均值±标准差
阳虚组	10	8.14±2.86	3.56±1.21
阳虚+淫羊藿+肉苁蓉组	10	14.32±3.89*	5.86±0.78*
淫羊藿+肉苁蓉组	10	16.19±4.7*	6.79±2.43*
正常对照组	10	16.57±4.8*	7.60±1.40*

* 与阳虚组比较 $P < 0.01$

讨 论

建立虚证动物模型, 用现代科学的方法探讨其物质基础, 并用扶正固本中药使之恢复正常, 进而试图阐明其可能机制, 是近年来国内研究虚证的一个重要手段和途径。目前对各种虚证模型的评价尚有不同看法。阳虚动物模型建立时间较长, 积累了一些资料并得到较多人的承认。无论称其为阳虚模型或皮质激素模型, 它所出现的一系列症状, 特别是免疫抑制的特征和临床上阳虚病人常表现为免疫功能低下的现象基本一致^(9,10)。将此模型作为研究温阳药免疫药理作用的一个途径是切实可行的。

用皮质激素后小鼠一般于5~7天出现萎靡、蜷曲、毛发不荣、眼睛不开、尾部突出和死亡率增加等。本实验用强的松龙100微克/20克/日, 大约相当于氢化考的松400微克/20克/日, 但其半衰期比氢化考的松长一倍多。注射强的松龙后小鼠出现的症状、死亡率、脾及胸腺重量与文献报道的大致相同⁽¹¹⁾。

本实验结果表明了温阳药煎剂对阳虚动物体液和细胞免疫功能均有增强作用。经过提取有效成分和进一步筛选, 证明这四味药相互之间并非都呈相加作用。淫羊藿总黄酮、肉苁蓉提取物是起主要作用的药物, 而附子总生物碱、肉桂挥发油则相对无效。这与最近张家庆等人⁽¹²⁾观察这四味药的煎剂对阳虚动物模型DNA合成的影响所取得的结果相一致。由于中药的成分及作用机制非常复杂, 因此不能轻易否定附子、肉桂的功效。这两味药也有可能通过改善全身状况或其它某些系统的功能而起有利作用(四味合用时)。但已有报道, 肉桂具有抑制网状内皮系统的吞噬能力和抗体生成的作用⁽¹³⁾, 也有人观察到此药促进免疫球

蛋白的合成⁽¹⁴⁾。

淫羊藿总黄酮、肉苁蓉提取物作为一种温阳强壮药,具有增强阳虚小鼠免疫功能的作用。对体液免疫的增强作用方面,淫羊藿总黄酮强于肉苁蓉提取物。这两味药有效成分对阳虚小鼠淋巴细胞转化具有促进作用。用四味药煎剂时虽使阳虚小鼠淋巴细胞转化功能得到改善,但远不及正常小鼠水平。而用淫羊藿、肉苁蓉总有效成分时,其 conA 刺激的淋巴细胞转化功能接近正常对照组水平。如果再从总有效成分中进一步分离出单体进行比较,效果可能会更好。

温阳药的药理作用十分广泛,据报道具有激素样作用、性激素样作用,还有降血糖、利尿、降压、扩张冠脉、强壮、抗肿瘤、抑菌等作用⁽¹⁵⁾,至于其通过何种机制影响阳虚实验动物模型免疫功能,是否通过神经-内分泌机制或通过“适应原样”的双向调节作用,是值得进一步深入研究的课题。

小 结

一、温阳药(附子、肉桂、淫羊藿、肉苁蓉)煎剂能增强阳虚小鼠低下的体液和细胞免疫功能。

二、淫羊藿总黄酮及肉苁蓉提取物使阳虚小鼠低下的体液免疫功能趋于恢复正常。四味药有效成分恢

复阳虚小鼠体液免疫功能的作用强度依次为淫羊藿总黄酮>肉苁蓉提取物>肉桂挥发油>附子总生物碱。后两味药提取物作用较弱或无效。

三、淫羊藿总黄酮、肉苁蓉提取物可促进致有丝分裂原 conA 和 PHA 刺激的阳虚小鼠淋巴细胞转化。

参 考 文 献

- (1) 邱安堃等:中华内科杂志(2):113, 1963。
- (2) 姜春华等:祖国医学肾的研究, 122 页, 上海科技出版社, 第二版, 1981。
- (3) 施玉华等:上海中医杂志(12):39, 1981。
- (4) 张家庆等:中医杂志(3):64, 1982。
- (5) 章育正:上海免疫通讯(4):80, 1980。
- (6) 中国医学科学院药物研究所编:中草药有效成分研究(第一分册), 人民卫生出版社, 第一版, 1972。
- (7) Simpson. MA, et al: J Immunol Method 21:159, 1978。
- (8) 杨贵贞主编:医学免疫学。380~387 页, 吉林人民出版社, 第一版, 1980。
- (9) 卢君健等:中西医结合杂志(3):142, 1982。
- (10) 陈松涛等:中西医结合杂志(3):140, 1982。
- (11) 上海中医学院正常人体教研组:新医学杂志(9):33, 1977。
- (12) 张家庆:中西医结合杂志(3):138, 1982。
- (13) 袁阿兴:中药通报(2):26, 1982。
- (14) 广州医学院附属医院:新医学杂志(12):12, 1974。
- (15) 施大文:中成药研究(11):1, 1981。

新书出版消息

素问玄机原病式(注释本), (金)刘元素著, 曹公寿、宗全和注释, 估价 1.10 元, 1983 年 5 月出版, 人民卫生出版社。

该书以《素问·至真要大论》提出的病机十九条为基础, 将常见疾病进行比较系统的归类, 并对某些疾病的病因病理作了分析, 对病机十九条加以深入的阐发和补充, 对五运六气学说作了浅近和形象的解释; 以《内经》“亢害承制”理论为依据, 首倡“六气皆从火化”, 提出辛凉解表和泻热养阴为治疗热性病的法则。该书分列“原文”、“注释”、“语译”、“按语”四项, “原文”系以人民卫生出版社 1956 年影印明代古今医统正脉本为底本, 经校勘整理形成。

外科发挥·外科枢要·病疡机要·正体类要·口齿类要(薛氏医案选)上册, (明)薛己著, 估价 1.20 元, 1983 年 5 月出版, 人民卫生出版社。

《外科发挥》列举外科主要病症 81 种, 记述脉、

证后列举临证治验, 论述本病各种治法。《外科枢要》论述疮疡的各种脉证、治法、用药、用针等以及外科常见病的病因、证治。《病疡机要》为麻风病专著。《正体类要》为骨伤科专著。《口齿类要》主要论述口腔疾患 8 种等。

吴医汇讲, (清)唐笠山纂辑、丁光迪点校, 估价 0.48 元, 1983 年 5 月出版, 上海科技出版社。

该书是我国第一部医论性杂著, 其内容丰富, 不分门类, 不限体式, 不拘一科, 搜集诸名医家的文章, 如叶天士、薛生白等。做到既有经典著作的注释阐发、学术理论的争鸣探讨, 又有临床治验的记录、药物方剂的解释、考证等。

中医大辞典(方剂分册), 中医大辞典编委会编, 估价 3.40 元, 1983 年 6 月出版, 人民卫生出版社。

伤寒论诠解, 刘渡舟等主编, 精装估价 3.00 元, 1983 年 4 月出版, 天津科技出版社。

本刊不办理购书业务, 请与有关出版社邮购部联系。上海科技出版社地址: 上海市瑞金二路 450 号。天津科技出版社地址: 天津市和平区赤峰道 124 号。