

实验研究

加味玉屏风汤对截肢应激小鼠细胞
免疫功能的调节作用陈 新¹ 杨 路² 曾广仙² 沈关心³

摘要 为了探讨加味玉屏风汤对应激过程中免疫功能的调节作用,制造了小鼠截肢应激模型,观察到应激后第3天,小鼠细胞免疫功能受到抑制,包括胸腺发生急性病理性萎缩,T、B淋巴细胞对ConA和LPS反应性减弱,IL-2含量及活性下降,NK细胞活性低下。高、中、低三种浓度加味玉屏风汤可不同程度地对上述免疫功能的抑制产生拮抗作用。

主题词 免疫,细胞/药物作用 截肢 玉屏风散/治疗应用

应激反应过程中发生的免疫功能抑制,为细菌感染、癌细胞转移及自身免疫性疾病的发生提供了条件。因而,调节应激过程中的免疫功能,有着重要的意义。古方玉屏风散良好的免疫调节作用已被许多实验所证实,我们在其原方基础上加党参。实验结果表明,加味玉屏风汤对于应激性免疫抑制有着较好的拮抗作用^[1],我们进而观察了该方对应激过程中胸腺器官、淋巴细胞分裂原反应性、IL-2活性和含量、NK细胞活性的影响。

1 材料和方法

药物:加味玉屏风汤由黄芪、党参、白术、防风按3:2:1:1比例,常规方法水提,浓缩成160%的药液,置4℃冰箱备用,实际使用时,配成160% (高剂量)、80% (中剂量)和40% (低剂量)的工作液。生药由深圳市药材公司提供。

截肢应激模型:用医用4号缝合线于小鼠左后膝关节上端约0.5cm处结扎,然后用手术剪于膝关节处剪去左下肢,碘酒棉球消毒断端,不包扎。术后常规摄取食水,术后无感染及死亡。

动物及分组:二级BALB/C小鼠,雄性,体重20±

2g,由第一军医大学动物中心提供。购回喂养于二级动物实验室内,1周后开始实验。小鼠随机分5组:正常对照组、应激对照组、应激+高剂量加味玉屏风组(高剂量组)、应激+中剂量加味玉屏风组(中剂量组)、应激+低剂量加味玉屏风组(低剂量组)。

给药方法:正常对照组和应激对照组以生理盐水灌胃,剂量为0.5ml/20g体重,每日1次,连续7天;三个给药组分别予相应浓度药液(0.5ml/20g体重)灌胃,每日1次,连续7天。最后一次用药后,应激各组施行截肢手术。

T、B淋巴细胞分裂原反应性测定:参照文献^[2],观测应激后72小时脾细胞对ConA及LPS的反应性。

胸腺重量指数的计算及胸腺超微结构的观察:造模后72小时断颈处死小鼠,取出胸腺,称湿重。胸腺重量指数的计算:胸腺重量指数=胸腺称重(g)×100/体重(g)。常规固定,HE染色,显微镜观察和摄影。以2.5%戊二醛前固定,1%四氧化锇后固定,逐级脱水后,EPM812包埋,超薄切片,铀铝双重染色,ZEN-1200EX透射电镜观察和摄影。

IL-2活性及含量的测定:应激后72小时脾脏淋巴细胞IL-2诱生及活性测定参照文献^[3]进行。IL-2含量测定按药盒说明书进行,结果通过标准曲线方程求得实际含量。

NK细胞活性的观测:应激后24小时NK细胞活性的检测参照文献^[4]进行。

2 实验结果

2.1 对脾细胞分裂原反应性的影响:表1示,截肢3天后,小鼠脾细胞对ConA及LPS的反应性分别下降20.3%和16.7%,与正常对照组比较,其差异均有显著性意义(P 均 <0.01)。高剂量加味玉屏风汤有效拮抗了脾细胞对ConA反应性的降低($P<0.01$),各剂量组加味玉屏风汤均有效拮抗了脾细胞对LPS反应性的降低($P<0.01\sim0.05$)。

2.2 对胸腺重量指数及胸腺超微结构的影响:表2示,应激后第3天,小鼠胸腺重量指数与正常对照组相

1 深圳市红十字会医院、深圳市中西医结合临床研究所,深圳市上坊区(518029)

2 湖北中医学院

3 同济医科大学实验中心免疫室

收稿日期:1997-12-23;修回日期:1998-02-20

表 1 加味玉屏风汤对应激小鼠脾细胞
分裂原反应性的影响($\bar{X} \pm S$)

组 别	鼠数	对 ConA 反应性 (增殖指数, %)	对 LPS 反应性 (增殖指数, %)
正常对照组	10	1.53 ± 0.20	1.20 ± 0.14
应激对照组	10	1.22 ± 0.14*	1.00 ± 0.07*
高剂量组	10	1.47 ± 0.19▲▲	1.19 ± 0.13▲▲
中剂量组	10	1.36 ± 0.23	1.16 ± 0.15▲
低剂量组	10	1.21 ± 0.21*	1.12 ± 0.07▲

* 与正常对照组比较 $P < 0.01$

与应激对照组比较 ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

表 2 加味玉屏风汤对应激小鼠胸腺
重量指数的影响($\bar{X} \pm S$)

组 别	鼠数	胸腺重量指数
正常对照组	10	25.65 ± 3.34
应激对照组	10	18.34 ± 2.88*
高剂量组	10	22.29 ± 1.83▲*
中剂量组	10	20.38 ± 1.63*
低剂量组	10	19.24 ± 1.88*

* 与正常对照组比较 $P < 0.01$

▲ 与应激对照组比较 $P < 0.01$

比下降了 28.5% ($P < 0.01$), 与应激组比较, 高剂量组胸腺重量指数上升了 21.5%, 两组差异有非常显著性 ($P < 0.01$), 其余各剂量组与应激对照组比较差异均无显著性 (P 均 > 0.05)。各药物组与正常对照组比较差异仍然有显著性 ($P < 0.01$)。截肢后, 小鼠免疫器官重量下降, 光镜观察结果表明, 正常组小鼠胸腺皮、髓交界清晰, 皮质淋巴细胞丰富。应激后小鼠胸腺皮质变薄, 淋巴细胞稀疏, 皮髓交界模糊, 呈急性病理性萎缩表现, 加味玉屏风组可见胸腺皮质较厚, 皮髓交界清晰, 皮质胸腺细胞较密集。电镜下可见胸腺细胞的超微结构与淋巴细胞相似, 细胞核呈圆形或椭圆形, 数量多, 排列整齐, 形态规则, 胞膜界限清晰, 胞核大, 核心清楚, 异染色质密集, 细胞质少, 线粒体等亚细胞结构数目较少; 应激组胸腺细胞排列不紧密, 形态不规则, 部分核膜界限不甚清晰, 胞核小于正常组, 核欠规则, 线粒体数量增多, 肿胀。加剂量组可见皮质主要由胸腺细胞组成, 细胞数量明显多于应激组, 排列紧密, 形态规则, 细胞膜界限清晰, 有许多母细胞型淋巴细胞, 胞核多呈圆形, 染色质分布均匀, 可见明显核仁, 胞质丰富, 线粒体较多(照片从略)。

2.3 对 IL-2 活性及含量的影响: 表 3 示, 截肢后, 小鼠脾细胞 IL-2 含量及活性分别下降了 13.3% 及

表 3 加味玉屏风汤对应激小鼠脾细胞 IL-2 活性
及含量的影响($\bar{X} \pm S$)

组 别	鼠数	IL-2 活性 (μ /ml)	IL-2 含量 (ng/ml)
正常对照组	10	314.8 ± 57.35	1.28 ± 0.04
应激对照组	10	168.0 ± 55.43**	1.11 ± 0.10**
高剂量组	10	277.0 ± 50.39▲▲	1.23 ± 0.07▲
中剂量组	10	245.1 ± 47.40▲▲*	1.18 ± 0.11*
低剂量组	10	228.8 ± 49.28▲**	1.16 ± 0.08**

与正常对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

与应激对照组比较 ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

表 4 加味玉屏风汤对应激小鼠
NK 细胞活性的影响($\bar{X} \pm S$)

组 别	鼠数	NK 细胞活性(%)
正常对照组	10	34.73 ± 5.31
应激对照组	10	21.27 ± 3.10**
高剂量组	10	33.09 ± 5.06▲▲
中剂量组	10	27.09 ± 6.44*▲
低剂量组	10	26.18 ± 7.28*

与正常对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

与应激对照组比较 ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

46.6%, 与正常对照组比较差异均有非常显著性 (P 均 < 0.01)。高剂量组 IL-2 含量比应激对照组上升了 10.8% ($P < 0.05$), 而与正常对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。其余各药物组与应激对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 且均明显低于正常对照组 ($P < 0.01 \sim 0.05$)。三种剂量组的 IL-2 活性均明显高于应激对照组, 其差异高、中、低三剂量组有非常显著性 ($P < 0.01 \sim 0.05$), 但中、低剂量组仍然显著低于正常对照组 (P 分别 < 0.05 和 0.01)。

2.4 对 NK 细胞活性的影响: 表 4 示, 截肢后小鼠 NK 细胞活性下降 32.3%, 明显低于正常对照组 ($P < 0.01$), 高、中剂量组均明显地拮抗了 NK 细胞活性的抑制 ($P < 0.01, P < 0.05$), 中、低剂量组仍然明显低于正常对照组 (P 均 < 0.05)。

3 讨论

本次实验结果表明, 应激 72 小时后, 小鼠脾细胞对 ConA 及 LPS 的反应性均大幅下降, 三种剂量的加味玉屏风汤均可抑制 B 淋巴细胞反应性的抑制, 高剂量可有效拮抗 T 淋巴细胞反应性的抑制。胸腺是中枢性免疫器官, 以分泌胸腺激素和作为 T 淋巴细胞的生成器官而在免疫系统中发挥关键性作用。应激后 72 小时, 小鼠胸腺重量的指数明显下降, 结合光镜及电镜观

察结果,提示截肢应激小鼠胸腺发生急性病理性萎缩。高剂量加味玉屏风汤较为有效地防止了应激导致的小鼠胸腺指数的降低及保护胸腺组织避免发生萎缩。IL-2是由活化的T淋巴细胞分泌的一种很重要的淋巴因子,应激后72小时,小鼠脾细胞IL-2含量及活性均明显下降,三种剂量加味玉屏风组IL-2活性均显著高于应激对照组,高剂量加味玉屏风组IL-2含量比应激对照组上升了10.8%,说明加味玉屏风汤对应激状态下IL-2的抑制具有良好的拮抗作用。NK细胞在宿主抗恶性肿瘤、某些病毒性疾病中起着重要的作用,应激72小时后,小鼠NK细胞活性下降32.3%,高、中剂量加味玉屏风组均明显地拮抗了NK细胞活性的抑制,提示加味玉屏风汤可防止由于应激导致的肿瘤监视功能的下降。综上所述,截肢创伤应激小鼠细胞免疫功能受到抑制,包括胸腺发生急性病理性萎缩,T、B淋巴细胞分裂原反应性减弱,IL-2含量及活性下降,NK细胞活性低下。高、中、低三种剂量加味玉屏风汤可不同程度地对上述免疫功能的抑制具有拮抗作用。

玉屏风散是一首古典名方,《医方类聚》记载:“玉屏风散,治腠理不密,易于感冒”,明·方广《丹溪心法附余·盗汗门》云:“如古方玉屏风散治自汗者,其间防风、黄芪所以实表气,白术所以燥内湿也”,可见该方原始设计是以固表止汗为宗旨,国家统编教材《方剂学》(1983年版)也将玉屏风散列为固涩剂,但现代临床研究该方主要用于补益卫气以调节免疫功能^[5]。该方补气作用仅赖黄芪一味,显然势单力薄。党参、黄芪常配伍使用,以增强补气作用,如补中益气汤等,且党参、白术合用补脾益气之力甚强,故我们在玉屏风散原方基础上加用党参,以期增加补益卫气、调节免疫功能的作用。

应激是机体遇到伤害或精神紧张时表现出来的一种全身整体性适应性反应。应激首先导致下丘脑—垂

体—肾上腺轴的激活,并由此引发一系列的生理性反应。应激过程中,通过神经内分泌免疫调节网络(neuroendocrine-immune network)的相互作用,导致免疫系统的功能受到抑制。目前,现代医学对应激性免疫功能抑制尚无满意的防治方法。中医药的特色就在于整体调节,因而研究中医药对应激过程中免疫功能的调节作用有着较为重要的意义。本项实验结果提示,加味玉屏风汤对于防治应激性免疫功能抑制方面,具有较为乐观的临床应用前景。同时,通过以方测证,可以推测应激性免疫功能抑制,应具有卫气虚弱的病理属性。《内经》认为,“卫气者,所以温分肉,充皮肤,肥腠理,司开合者也。”“卫气和则腠理致密”(《灵枢·本脏》),可见,中医理论中的卫气是一个多系统的机能整合概念。神经内分泌免疫调节网络也是涉及多系统的功能互动体系,我们的实验结果提示,卫气的实质,应与神经内分泌免疫调节网络有着相当密切的联系。对这两个概念的相关性研究,无疑有着较大的理论及临床意义。

4 参考文献

- 1 陈新,张永峰,朱炎,等. 加味玉屏风汤对应激及激素注射小鼠细胞免疫功能的影响. 中国实验临床免疫学杂志, 1996,8(3):42.
- 2 杨贵贞,麻彤辉. 人参皂甙抗小鼠手术应激的细胞免疫调节效应. 中西医结合杂志, 1988,8(8):479.
- 3 朱慧芬. MTT比色法检测IL-2和杀伤细胞活性的研究. 免疫学杂志, 1994,10(1):48.
- 4 Konjevic G, Jurisic V, Spuzic I. Corrections to the original lactate dehydrogenase (LDH) release assay for the evaluation of NK cell cytotoxicity. J Immunol Methods. 1997,200:199.
- 5 汶医宁. 玉屏风散的药理研究进展. 中成药, 1993,(9):38.

注:本研究系国家中医药管理局资助课题(95B0068)

中国中医研究院培训中心 1999 年招生通知

中国中医研究院是中国中医药研究机构和医疗教学的重要基地,我中心依托中国中医研究院科研医疗教育的优势,集国内中医药界中医专家教授师资力量和他们丰富的理论知识临床技能办学经验,为国内外广大医务工作者提供一个学习交流的机会,现将1999年上半年招生计划安排如下。

1. 任志远中国传统针灸刀(即小刀)疗法,薛立功古长圆针疗法的现代临床应用专题研修班,时间:1999年3月4日~3月10日,1999年5月14日~5月20日;2. 全国高级中医进修班,时间:1999年3月12日~3月23日;3. 全国高级中医急诊临床应用进修班,时间:1999年3月25日~4月3日;4. 全国高级针灸临床应用研修班,时间:1999年4月5日~4月16日;5. 全国高级推拿研修班,时间:1999年4月18日~4月29日;6. 全国高级中西医结合治疗骨折与肢体畸形矫正经验研修班,时间:1999年5月4日~5月13日;7. 全国高级中医肛肠病研修班,时间:1999年5月21日~5月30日。以上各班于开班前一日报名,学费680元,报名费5元,学习结束颁发中英文对照、钢印结业证书,食宿统一安排,费用自理,学员请备2寸免冠照片两张,广告刊出,按时开课。地址:北京东直门内北新仓18号中国中医研究院培训中心,邮政编码:100700,联系人:沙力、狄福金,电话:(010)64062096,64075193。

(广告编号,9812-15)