

三类中药复方对侧脑室内注射 IL-1 大鼠下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴反应状态的影响

张新民* 段元丽* 沈自尹* 王文健* 陈伟华*

摘要 目的:探索补肾、健脾、活血三类中药复方对免疫因子引起下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴反应状态的不同影响。方法:采用侧脑室注射白细胞介素-1 β (IL-1 β),观察大鼠下丘脑单胺类神经递质、血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)的含量,建立下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴对免疫因子的反应状态,以此来观察三类中药对这一反应状态是否有不同的影响。结果:侧脑室内注射 IL-1 β 能使下丘脑去甲肾上腺素(NE)含量明显下降;血浆 ACTH、CORT 浓度明显升高,与国外文献报道相似。补肾的右归饮能使因侧脑室注射 IL-1 β 而降低的下丘脑 NE 含量进一步降低、能使升高的血浆 ACTH、CORT 含量进一步明显升高;健脾的四君子汤也有这一作用趋势;活血的桃红四物汤则无明显差异。结论:补肾中药能提高机体下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴对免疫因子的反应性或反应能力,活血中药则无这一作用。

主题词 复方/药理学 下丘脑—垂体系统/药物作用

随着分子生物学技术的发展和运用,越来越多的细胞因子被发现、复制、合成。在对这些细胞因子生理、病理作用的研究中,人们更多地了解了以形态与功能划分的人体各系统间的密切联系。于是“网络”概念被引入到生物学中,如免疫网络、细胞因子网络、甚至基因网络等等。自神经内分泌—免疫网络学说提出以来,人们已更多地了解了神经内分泌系统和免疫系统之间相互联系、相互作用、相互调节的关系,使人们对生命现象的认识从局部逐渐推向整体、动态。

同样,神经内分泌—免疫网络学说被应用到中医医学研究中,使人们对中医药的研究和中药疗效的研究更加深入。许多研究已表明,IL-1 是免疫应答反应的启动因子,同时它又能诱导神经内分泌的肾上腺皮质功能。本课题应用脑室内注射 IL-1 的方法,造成一个免疫因子引起机体下丘脑—肾上腺皮质机能反应的状态,以此来研究补肾的右归饮、健脾的四君子汤和活血的桃红四物汤三类中药复方对这一反应状态的作用,并对其作用机制进行探讨。

1 材料

1.1 动物:3 月龄 SD 雄性大鼠,体重 200g 左右,由上

海医科大学实验动物部提供,SD 大鼠动物合格证书:医动字第 02-22-2 号。

1.2 中药制剂:右归饮由熟地黄 10g,山药 10g,淫羊藿 10g,枸杞子 10g,山茱萸 6g,附子 6g,肉桂 3g,炙甘草 3g 组成。四君子由党参 10g,白术 10g,茯苓 10g,炙甘草 6g 组成。桃红四物汤由桃仁 10g,当归 10g,熟地黄 10g,白芍 10g,红花 10g,川芎 10g 组成。三方分别以 1:10 加水浸泡过夜、文火水煎 2 小时;分别浓缩至每毫升含生药 1.9g、1.2g、2.0g,4℃ 冰箱保存备用。

1.3 主要试剂:人重组白细胞介素-1 β (IL-1 β):Sigma 公司产品,批号 1-4356。去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)、多巴胺(Dopamine, DA)、3,4-二羟基苯乙酸(3,4-Dihydroxyphenylamine, DOPAC)、5-羟色胺(Serotonin, 5-HT)、5-羟基吲哚乙酸(5-Hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA)均为 Fluka 产品。促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)放免试剂盒为 DPC 公司产品。

1.4 主要仪器:高效液相色谱仪, Waters 公司产品。 γ -计数仪, BECKMAN 公司产品(Gammon 5500)。高速离心机,日立公司产品(20PR-52D)。立体定位仪,第二军医大学研制(江湾 2 型)。

2 实验方法

2.1 动物分组和用药:取 54 只 SD 雄性大鼠,随机分成活血化瘀组、健脾益气组、补肾益精组、IL-1 对照组和生理盐水对照组,以上 3 个用药组大鼠每组 10 只,分别灌服桃红四物汤、四君子汤和右归饮浓缩煎剂 2ml,用药剂量为成年人 60kg 体重剂量的 20 倍。两个对照组灌服生理盐水 2ml,前后灌胃 14 天。

2.2 侧脑室插管术:大鼠称重后,腹腔注射 0.35% (ml/g)戊巴比妥(100ml/100g),麻醉后置立体定位仪固定。碘酒、酒精常规消毒后,切开头皮、暴露颅骨,前后囟门定位,前囟旁开 1mm,向后 2mm,用 2mm 牙钻钻洞,插入用 8 号针管做成的长 12mm 针管(内有针芯),深 4mm,用塑料片和 502 胶水固定,然后用牙托粉再次固定插管。手术以见到脑脊液为成功。术后单独分笼喂养。

2.3 侧脑室内注射及采集标本:实验大鼠灌服中药复方第 7 天后行侧脑室插管术;术后单笼饲养,继续喂药 7 天后,在安静条件下,将大鼠以最小的刺激固定于木

基金项目:国家自然科学基金重点项目(3923370)

* 复旦大学医学院中西医结合研究所,上海市乌鲁木齐中路

12 号(200040)

收稿日期:2000-06-19;修回日期:2000-11-28

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

架上,移去插管内芯,用塑料管连接微量注射器,以 $1\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度缓慢注入 IL-1 β $10\mu\text{l}$ ($5\text{ng}/\mu\text{l}$)。对照组大鼠以同样的方式注入生理盐水 $10\mu\text{l}$ 。30min 后迅速断头,1min 内取出全脑置于干冰中。在大鼠全脑腹侧视交叉后,用 4mm 套管刀打孔取材,组织柱 2~3mm,称重后置于内有 1ml $0.05\text{mol}/\text{L}$ HClO_4 的离心管中,用内切式组织匀浆器以 20000 转/min 匀浆 30s,然后以 25000g 离心 30min,取上清液置于 -70°C 冰箱中待测单胺类神经递质以及代谢产物的含量。断头后取血,收集于 0.4% EDTA 抗凝塑料试管中摇匀、离心,血浆保存于 -20°C 冰箱中,待测定 ACTH、皮质酮浓度(所有实验在 11:00 至 14:00 之间完成)。

2.4 下丘脑单胺类神经递质的测定:高效液相色谱法(HPLC)测定单胺类神经递质的含量。高效液相色谱仪由 Waters M6000A 泵、660 梯度控制器、U6K 进样阀、LC-4B/17 型电化学检测器等组成。色谱柱为 $\mu\text{BondapakC18}$, $30\times 0.5\text{cmID}$, 填料 BP-18, $10\mu\text{m}$ 。洗脱液为 $0.15\text{mol}/\text{L}$ 氯乙酸-氢氧化钠缓冲液(含 EDTA $0.83\text{mmol}/\text{L}$ 和 CSAD-樟脑-B-磺酸 $9\text{mmol}/\text{L}$, pH4.2)与甲醇的混合液(95:5),使用前以 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤,超声波脱气。电化学检测工作电压 750mV ,检测灵敏度为 5nA 。数据处理仪信号衰减比 128。室温 $18\sim 20^\circ\text{C}$ 。标准 NE、DA 分别溶于 0.1N HCl ; 5-HT、5-HIAA、DOPAC 分别溶于超纯水,终浓度进样含量为 5ng ,样品进样量为 $20\mu\text{l}$ 。外标法定量,峰面积计算含量。标准曲线各成分峰分离完全,未见重叠现象。

2.5 放射免疫测定:促肾上腺皮质激素(ACTH)放免试剂盒、皮质酮放免试剂盒均为 DPC 公司产品。按说明书常规操作,用 BECKMAN 公司 Gammon5500 型 γ -计数器测定放射性强度,计算出 ACTH、皮质酮浓度。

2.6 统计学处理:各组数据间的比较均用 t 检验。

3 结果

3.1 三类中药复方对脑室内注射 IL-1 后大鼠血中 ACTH、CORT 的作用:从表 1 可见,IL-1 对照组大鼠血浆 ACTH、CORT 浓度与正常对照组相比明显升

高, $P<0.01$ 。活血化瘀组大鼠血浆 ACTH、CORT 浓度与 IL-1 对照组相比均未见明显变化。健脾益气组大鼠血浆 ACTH 浓度与 IL-1 对照组相比有明显升高($P<0.05$); CORT 浓度有较明显上升趋势,但没有明显差异。补肾益精组大鼠血浆 ACTH、CORT 浓度与 IL-1 对照组相比均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 1 三类中药复方对脑室内注射 IL-1 大鼠血中 ACTH、CORT 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ACTH(pg/ml)	CORT(ng/ml)
正常对照组	12	78.7 ± 40.0	142.77 ± 86.16
IL-1 对照组	12	$177.6\pm 115.2^{\#}$	$356.42\pm 39.28^{\#\#}$
活血化瘀组	10	260.0 ± 159.9	384.84 ± 52.58
健脾益气组	10	$282.7\pm 162.0^*$	404.15 ± 74.77
补肾益精组	10	$376.1\pm 140.3^{**}$	$429.58\pm 59.79^{**}$

与正常对照组比较, $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$; 与 IL-1 对照组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$

3.2 三类中药复方对脑室注射 IL-1 后大鼠下丘脑儿茶酚胺类神经递质含量的影响:由表 2 可见,IL-1 对照组大鼠下丘脑儿茶酚胺类神经递质中 NE 含量与正常对照组相比明显下降($P<0.05$); DA 及其代谢产物 DOPAC 含量变化不明显。活血化瘀组大鼠下丘脑 NE、DOPAC 含量与 IL-1 对照组相比,无明显变化; DA 含量略有上升,但无明显差异。健脾益气组大鼠 NE 含量与 IL-1 对照组相比无明显变化; DA、DOPAC 含量有下降趋势,但无统计学意义。补肾益精组大鼠 NE 含量与 IL-1 对照组相比明显下降($P<0.05$); DA 含量有下降趋势,但无统计学意义; DOPAC 含量没有变化。

3.3 三类中药复方对脑室注射 IL-1 后大鼠下丘脑吲哚类神经递质含量的影响:由表 2 可见,IL-1 对照组大鼠下丘脑吲哚类神经递质中 5-HT 含量与正常对照组相比略有下降,其代谢产物 5-HIAA 含量略有上升,但均无明显差异。活血化瘀组、健脾益气组大鼠下丘脑 5-HT 含量与 IL-1 对照组相比略有上升,但无明显差异; 5-HIAA 含量无明显变化。补肾益精组大鼠 5-HT 含量与 IL-1 对照组相比无明显变化, 5-HIAA 含量略有下降,但无明显差异。

表 2 三类中药复方对脑室注射 IL-1 大鼠下丘脑单胺类神经递质的影响(ng/mg , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NE	DA	DOPAC	5-HT	5-HIAA
正常对照组	12	5.560 ± 1.990	0.424 ± 0.288	0.458 ± 0.147	0.479 ± 0.209	0.393 ± 0.230
IL-1 对照组	12	$3.927\pm 1.594^*$	0.451 ± 0.231	0.388 ± 0.090	0.358 ± 0.188	0.516 ± 0.123
活血化瘀组	10	4.613 ± 3.325	0.584 ± 0.523	0.388 ± 0.121	0.542 ± 0.251	0.496 ± 0.029
健脾益气组	10	3.983 ± 1.583	0.346 ± 0.268	0.337 ± 0.054	0.478 ± 0.283	0.516 ± 0.158
补肾益精组	10	$2.583\pm 0.950^{\Delta}$	0.264 ± 0.227	0.391 ± 0.135	0.361 ± 0.096	$0.414\pm 0.030^{\Delta}$

与对照组比较, $*P<0.05$; 与 IL-1 对照组比较, $\Delta P<0.05$

4 讨论

三类中药复方对脑室内注射 IL-1 引起肾上腺皮质轴反应状态的影响:自 Besedovsky 等用绵羊红细胞免疫小鼠,在检测到抗体形成细胞的同时,偶然观察到血中皮质激素水平上升,甲状腺素水平下降以后^[1],许多研究已逐步证明感染、损伤等刺激均可激活巨噬细胞,合成、分泌 IL-1。IL-1 不仅能启动机体的免疫应答反应,而且对神经内分泌系统产生广泛的影响,从而引起了研究人员的关注和兴趣。Sapolsky 等的研究发现,静脉、脑室注射 IL-1 后,皆能引起大鼠 ACTH 和 CORT 浓度的升高,10 分钟可达到高峰,其峰值与注射 IL-1 剂量成正相关。提前注射促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)抗血清,中和 CRF 的作用,IL-1 就不能诱导血浆 ACTH 和 CORT 浓度的升高^[2]。提示 IL-1 诱导 ACTH 的作用是通过下丘脑或更高中枢系统。Katsuura 等进一步比较了静脉、脑室内注射 IL-1 β 和 IL-1 α 对 ACTH 的影响,结果显示,IL-1 β 是引起血浆 ACTH 浓度升高的主要细胞因子^[3]。我们在预初实验中,用 Sigma 公司生产的人重组 IL-1 β (rhIL-1 β ,其中内毒素含量 $\leq 0.1\text{ng}/\mu\text{g}$ IL-1 β)溶于无菌生理盐水,缓慢注射入大鼠侧脑室,30 分钟后血中 ACTH 浓度随注射剂量的增加而不断上升,其中 25ng 组、50ng 组、100ng 组与对照组比较明显升高,这一结果与国外文献报道基本一致^[3],也为 IL-1 通过中枢激活肾上腺皮质轴提供了又一例证,同时我们也选定了脑室内注射 IL-1 诱导肾上腺皮质机能反应的实验用量。

在预初实验的基础上,我们观察了三种不同的中药复方对因 IL-1 引起的肾上腺皮质机能改变的作用。预先 14 天用三种不同的中药复方煎剂给大鼠灌胃,在脑室内注射 IL-1 后 30 分钟测定 ACTH、CORT 浓度,并与用生理盐水灌胃的正常对照组比较。结果发现,补肾的右归饮能使已升高了的 ACTH、CORT 进一步升高、且有明显差异;健脾的四君子汤在这一反应状态中也能使 ACTH、CORT 进一步升高,但 CORT 的升高没有明显差异;而活血的桃红四物汤在这一反应状态中没有显示出明显变化的结果。提示补肾中药能提高机体内肾上腺皮质机能对 IL-1 的反应性或反应能力,而健脾中药和活血化瘀类中药似乎没有这一作用。

三类中药复方对脑室内注射 IL-1 引起肾上腺皮质反应状态作用机理的探讨:众所周知,下丘脑存在大量源于脑干的儿茶酚胺类递质的纤维,与肾上腺皮质轴形成密切的联系。研究表明,室旁核(PVN)区的

CRH 小细胞神经元区域存在稠密的去甲肾上腺素能神经末梢和肾上腺素能神经末梢^[4]。Dunn 将 IL-1 注入小鼠腹腔,观测 30、60、120、240、480 分钟后血浆 CORT 浓度的变化,并用高效液相色谱仪(HPLC)测量下丘脑匀浆中 NE 及其代谢产物的含量。结果发现,血浆 CORT 浓度升高的同时,下丘脑中 NE 含量下降,其代谢产物 3-甲基氧,4-羟苯乙二醇(MHPG)含量升高,NE 代谢率 MHPG/NE 比值升高,而且 MHPG/NE 比值-时间曲线与 CORT 浓度-时间曲线呈现出一致性。表明 IL-1 激活肾上腺皮质机能与下丘脑内去甲肾上腺素能神经元的活动的增强密切相关,并认为下丘脑 NE 浓度的下降是其代谢增加所致^[5]。Parsadaniantz 等利用 6-羟基多巴胺(6-OHDA)阻断腹侧去甲肾上腺能上升束(VNAB),然后腹腔注射 IL-1,发现下丘脑中 NE 含量下降了 85%,同时血浆 ACTH 浓度也明显降低^[6,7]。提示中枢儿茶酚胺类神经元介导了 IL-1 对 HPA 轴的激活过程。还有利用微透析技术和推挽灌流技术,观察到 IL-1 引起下丘脑中 NE、DA、DOPAC 含量升高的报道^[8-10]。再一次表明 IL-1 能够引起下丘脑内儿茶酚胺类神经元活动增强。

本实验观察到,侧脑室内注射 IL-1 30 分钟后,在血浆 ACTH、CORT 浓度升高的同时,下丘脑匀浆上清液中 NE 含量明显降低,DA 及代谢产物 DOPAC、5-HT 及其代谢产物 5-HIAA 未见明显变化。表明下丘脑儿茶酚胺类神经元介导了 IL-1 对 HPA 轴的激活过程。在此基础上我们研究了三类中药复方对 IL-1 引起下丘脑的儿茶酚胺类神经递质改变的作用。结果显示,补肾益精组大鼠下丘脑 NE 含量与 IL-1 对照组相比明显下降($P < 0.05$);DA 含量有下降趋势,但无明显差异;DOPAC 无明显变化。表明补肾的右归饮能进一步增强下丘脑儿茶酚胺类神经元的活动。健脾益气组大鼠下丘脑中 DA 含量也有降低趋势,但无统计学意义;NE、DOPAC 无明显变化。活血化瘀组大鼠下丘脑儿茶酚胺类递质含量均无明显变化。表明健脾的四君子汤和活血的桃红四物汤没有进一步增强下丘脑儿茶酚胺类神经元活动的作用。在观察三类中药对 IL-1 引起下丘脑的吲哚类神经递质变化的影响过程中,未发现三类中药各组大鼠下丘脑 5-HT、5-HIAA 含量有明显的变化。

我们以前的工作表明,补肾中药(寿而康)能明显延缓 24 月龄大鼠下丘脑 NE、DA 的下降,增加 5-HT 的合成与代谢。健脾中药(四君子汤)也有一定程度延缓下丘脑 NE 的下降和增加 5-HT 的代谢,从而首次

证明,补益中药能对自然衰老大鼠下丘脑单胺类神经递质的老年性改变具有延缓作用^[11]。以后我们的工作多次证明,补益中药能使下丘脑神经细胞、神经分泌细胞发生功能性变化^[12]。本实验结果再次表明,补益中药能使下丘脑单胺类神经递质含量发生变化,增加下丘脑单胺类神经元的活动,并影响神经内分泌机能和免疫机能。但是不同的补益中药处方对不同的机体状态可能有不同的作用和不同的作用机理,进一步深入研究将是有益的。

参考文献

- Besedovsky H, Sorkin E, Felix D, et al. Hypothalamic changes during the immune response. *Eur J Immunol*, 1977, 7(5): 323-325.
- Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, et al. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*, 1987, 238(4826): 522-524.
- Katsuura G, Gottschall PE, Dahl RR, et al. Adrenocorticotropin release induced by intracerebroventricular injection of recombinant human interleukin-1 in rats: possible involvement of prostaglandin. *Endocrinology*, 1988, 122(5): 1773-1779.
- Alonso G, Szafarczyk A, Balmefrezol M, et al. Immunocytochemical evidence for stimulatory control by the ventral noradrenergic bundle of parvocellular neurons of the paraventricular nucleus secreting corticotropin releasing hormone and vasopressin in rats. *Brain Res*, 1986, 397(2): 297-307.
- Dunn AJ. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. *Life Sci*, 1988, 43(5): 429-435.
- Weidenfeld J, Abramsky O, Ovadia H. Evidence for the involvement of central adrenergic system in the interleukin-1-induced adrenocortical response. *Neuropharmacology*, 1989, 28(12): 1411-1414.
- Parsadaniantz SM, Gaillet S, Malaval F, et al. Lesions of the afferent catecholaminergic pathways inhibit the temporal activation of the CRH and POMC gene expression and ACTH release induced by human interleukin-1 β in the male rat. *Neuroendocrinology*, 1995, 62(6): 586-595.
- Mohankumar PS, Thyagarajan S, Quadri SK, et al. Interleukin-1 stimulates the release of dopamine and dihydroxyphenylacetic acid from the hypothalamus in vivo. *Life Sci*, 1991, 48(9): 925-930.
- Palazzolo DL, Quadri SK. Interleukin-1 stimulates catecholamine release from the hypothalamus. *Life Sci*, 1990, 47(23): 2105-2109.
- Dunn AJ. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992, 261(3): 964-969.
- 张新民, 沈自尹, 王文健, 等. 补益中药对老年雄性大鼠下丘脑单胺类神经递质作用的研究. *上海医科大学学报*, 1989, 16(3): 209-211.
- 沈自尹. 肾阳虚证的定位研究. *中国中西医结合杂志*, 1997, 17(1): 50-52.

21世纪换代名品——神农牌陶瓷自动煎药机、包装机



陶瓷自动煎药机

诚征各地区代理商及经销商

—主要特点—

- ★科技含量高, 自动化程度高, 维修简便
- ★陶瓷内胆, 不贴锅内胆, 自动抽出装置
- ★随意调节文火、武火, 随时先煎后下
- ★自动控制浸泡煎药时间, 精确无误
- ★故障自测自检, 报警显示功能

可与卷片式液体自动包装机及直立袋式液体自动包装机配套作用。



神奇可视自动煎药机

卷片式包装机

制造商: 韩国日光机械株式会社

中国总代理: 北京市农人贸易有限责任公司

电话: 010-64290461/64290465/64290466 手机: 13901387686/13901371994

传真: 010-64292440

Homepage: www.nongren.com.cn

地址: 北京朝阳区北三环东路甲11号维特写字楼505/507室

我们的目标是为用户提供一流的产品和服务

(广告编号: 200201-17)