

养阴益气凉血合剂及方中各组中药对免疫抑制小鼠免疫功能的调节作用

王莒生* 李萍* 刘欣* 梁代英* 盛巡* 王芳*

摘要 目的:观察养阴益气凉血合剂及方中各组药物对外源性糖皮质激素免疫抑制小鼠免疫功能的调节作用。方法:将合剂拆方分为养阴组(玄参、天花粉、黄精)、益气组(黄芪、人参)和凉血组(紫草)。用外源性糖皮质激素肌肉注射造成 CRI 小鼠免疫抑制后,灌服养阴药、益气药、凉血药和全方的水煎液,每组药物水煎液给药浓度均为 5g 生药/kg 体重。测定小鼠淋巴细胞增殖功能、腹腔巨噬细胞吞噬活力和自然杀伤细胞(NK 细胞)活性。结果:与模型组比较,全方组、益气组、养阴组和凉血组对免疫抑制小鼠的 T 淋巴细胞增殖功能均有明显提高作用($P < 0.01$);除凉血组外,其余各组对免疫抑制小鼠的 NK 细胞杀伤活性及巨噬细胞吞噬活力均有显著提高($P < 0.01$);各组对免疫抑制小鼠的脾指数亦有提高作用,但差异无显著性意义。结论:养阴益气凉血合剂及拆方后的益气药、养阴药对免疫抑制小鼠的特异性和非特异性免疫功能都有不同程度的提高作用。其中对益气组的作用在某些方面接近全方组,其次为养阴药组。

关键词 免疫活性 药物作用 @ 养阴益气凉血合剂 巨噬细胞 药物作用

Regulative Effects of Yangyin Yiqi Liangxue Mixture and Its Different Groups of Chinese Herbs on Immunologic Function in Immunosuppression Mice

Wang Jusheng, Li Ping, Liu Xin, et al.

(Department of Pathophysiology, Beijing Municipal Institute of TCM, Beijing 100010)

Objective To observe regulative effects of Yangyin Yiqi Liangxue Mixture and its different groups of Chinese herbs on immunologic function in immunosuppression mice induced by exogenous glucocorticoid hormone. **Methods** The mixture was divided into a nourishing-yin group [Xuanshen (*Radix Scrophulariae*), Huafen (*Radix Trichosanthis*), Huangjing (*Rhizoma Polygonati*)], a supplementing-qi group [Huangqi (*Radix Astragali*), Renshen (*Radix Ginseng*)] and a cooling-blood group [Zicao (*Radix Arnebiae seu Lithospermi*)]. After immunosuppression of CRI mice was induced by intramuscular injection of exogenous glucocorticoid hormone, administered decoctions for nourishing yin, supplementing qi, cooling blood and the whole recipe, respectively. The concentration of decoction for each group was 5g crude drug/kg body weight. Proliferation of lymphocytes, the phagocytosis of macrophage in abdominal cavity and cytotoxicity of NK cells were determined. **Results** Compared with the model group, the nourishing yin group, the supplementing qi group, the cooling blood group and the whole recipe could increase significantly proliferative activities of lymphocytes in immunosuppression mice ($P < 0.01$). Activity of NK cells and phagocytosis of macrophages in administration groups except cooling-blood group were improved significantly ($P < 0.01$). The improvement of spleen index in each group was not significant. **Conclusion** Yangyin Yiqi Liangxue Mixture and the drugs for nourishing yin, supplementing qi in the recipe can increase specific and non-specific immunologic functions in the mouse of immunosuppression in varying degrees, with the drugs for supplementing qi closing the whole recipe in some functions, and the drugs for nourishing yin being the next.

Key Words Immune activity/drug effect; @ Yangyin Yiqi Liangxue Mixture; Macrophage/drug effect

养阴益气凉血合剂为北京中医医院临床长期用于治疗呼吸道病毒感染的有效方药,实验证明本方能抑制腺病毒、呼吸道合胞病毒和脊髓灰质炎病毒等多种病毒^[1]。为了探讨其抑制病毒繁殖和配伍协调作用的机理,本研究根据方中中药的功能,比较观察该方及方中不同作用中药对外源性糖皮质激素免疫抑制小鼠免疫功能的调节作用^[2]。

1 材料

雌性 CRI 小鼠,体重 16~25g,由首都医科大学实

基金项目:北京市中医药科技项目资助[京中科-SARS-14-

(1)]

* 北京市中医研究所病理生理室,北京市东城区美术馆后街 23 号(100010)

收稿日期:2006-01-23;修回日期:2006-03-20

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

验动物中心提供。养阴益气凉血合剂由北京中医医院药剂科提供,浓度为 1:1 的浸膏(1g 生药/ml 药液)。伴刀豆球蛋白(Con A, Sigma 公司)用生理盐水配制(1mg/ml),4℃保存。脂多糖(LPS, Sigma 公司)用生理盐水配制(2mg/ml),4℃保存。噻唑蓝(MTT, Fluka 公司)溶解于生理盐水中(5mg/ml),过滤除菌后 4℃避光保存。氢化可的松(HC),5mg/ml,由天津金耀氨基酸有限公司提供。L929 细胞由北京紫晨医药生物技术研究所提供。

2 方法

2.1 动物分组与处理: CRI 小鼠 54 只,随机分为 6 组,每组 9 只。(1)对照组:肌肉注射生理盐水,0.1ml/只,连续 10 天;于实验第 4 天起同时灌服生理盐水

0.5ml/只,连续 6天 (2)模型组:每日肌肉注射 HC 0.025g/kg体重,0.1ml/只,每日 1次,连续 10天;实验第 4天起灌服生理盐水,0.5ml/只,时间同对照组。

(3)益气组(黄芪、人参)、养阴组(玄参、天花粉、黄精)、凉血组(紫草)和养阴益气凉血合剂全方组:根据全方组中各味药的原有比例制成对应的药液,动物造模同模型组,于实验第 4天灌服各组中药药液,均为 5g生药/kg体重,0.5ml/只,连续 6天。

2.2 脾指数的测定:实验第 11天,脱颈处死各组动物,称体重;然后将动物浸入 75%酒精中消毒,在超净工作台中取完整脾脏,称重。根据公式计算脾指数

$$\text{脾指数} = \frac{\text{脾重量 (mg)}}{\text{体重 (g)}}$$

2.3 脾淋巴细胞增殖功能的检测(MTT法^[3]):在超净工作台中取脾脏,制成脾细胞悬液(2×10^6 /ml),在 96孔板上每孔加 100 μ l细胞悬液,分别加入 ConA (10 μ g/ml)和 LPS(20 μ g/ml)各 100 μ l。每个样品设 3个重复孔。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养 66小时。弃上清,每孔加入 20 μ l MTT, 37 $^{\circ}$ C孵育 4小时,再加入 DMSO振荡。采用酶标仪测 OD值, $\lambda = 570\text{nm}$ 。

2.4 腹腔巨噬细胞吞噬功能的测定^[4]:在无菌条件下每只小鼠腹腔注射灭菌生理盐水 10ml,轻轻按揉腹部 2~3分钟,抽回腹腔液。用 Hanks液洗两次,2000转/分钟离心 15分钟。再用含 10%胎牛血清的 PRMI-1640培养液调细胞浓度至 1×10^6 /ml加入 96孔细胞培养板中,每孔 100 μ l。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养 4小时,甩去未贴壁的细胞,PBS洗涤两次。再加入 0.1%的中性红染料 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养 30分钟,去掉多余的中性红溶液,洗板 3次后加入细胞裂解液 200 μ l,振荡后静置 4 $^{\circ}$ C过夜。次日用酶标仪测 OD值, $\lambda = 570\text{nm}$ 。

2.5 NK细胞活性的测定^[5]:无菌条件下取脾脏,研磨成单个细胞后,1000转/分钟,离心 5分钟,弃上清,加 Tris-NH₄Cl裂解红细胞。PBS洗涤后,用含 10%胎牛血清的 PRMI-1640培养液调细胞浓度至 1×10^7 /ml。传代培养的 L929细胞,将细胞消化,调至浓度为 2×10^5 /ml加入 96孔培养板中,每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养至少 1小时,而后每孔加入 100 μ l的自然杀伤细胞(NK细胞)。每一标本有 4个复孔。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养 20小时。弃去上清,用生理盐水洗 3遍。每孔加 100 μ l 0.1%中性红染料, 37 $^{\circ}$ C孵育 30分钟。弃去染液,生理盐水洗 3遍后每孔再加入 100 μ l细胞裂解液,轻轻摇匀,用酶标仪在 492nm处测 OD值。

2.6 统计学方法:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用

SPSS12.0软件,率的比较采用 χ^2 检验,其他数据采用多组间比较,单因素方差分析(ANOVA)进行处理。

3 结果

3.1 各组中药对免疫抑制小鼠脾指数的影响:模型组的脾指数明显降低,为对照组(3.5)的 28.57%,免疫器官明显缩小。全方组、益气组、养阴组、凉血组虽然比模型组分别提高 130%、130%、40%和 60%,但差异无显著性意义,仍明显低于对照组($P < 0.05$)。

3.2 各组中药对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞增殖功能的影响:表 1示,全方、益气药、养阴药和凉血药均可协同 ConA和 LPS促进免疫抑制小鼠 T B淋巴细胞的增殖。模型组淋巴细胞增殖功能明显降低($P < 0.01$)。全方组、益气组、养阴组、凉血组的 T淋巴细胞增殖率分别比模型组提高 42.2%、42.2%、29.1%和 25.8%,差异均有显著性意义($P < 0.01$)。全方组和益气组接近对照组,均达到对照组的 90%以上;而养阴组、凉血组则远低于对照组($P < 0.01$)。益气组、养阴组与全方组比较差异无显著性意义($P > 0.05$),凉血组则明显低于全方组($P < 0.05$)。

模型组 B淋巴细胞增殖率较对照组明显降低($P < 0.01$);全方组、益气组、养阴组、凉血组的 B淋巴细胞增殖率均比模型组明显提高($P < 0.01$);全方组和益气组接近对照组($P > 0.05$),而养阴组、凉血组则明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组中药对免疫抑制小鼠 T B淋巴细胞增殖的影响(OD值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	T淋巴细胞	B淋巴细胞
对照组	9	0.444 $\pm$ 0.021	0.467 $\pm$ 0.029
模型组	9	0.306 $\pm$ 0.023*	0.314 $\pm$ 0.046*
全方组	9	0.435 $\pm$ 0.017 Δ	0.446 $\pm$ 0.021 Δ
益气组	9	0.435 $\pm$ 0.023 Δ	0.422 $\pm$ 0.018 Δ
养阴组	9	0.395 $\pm$ 0.012** Δ	0.400 $\pm$ 0.007 Δ
凉血组	9	0.385 $\pm$ 0.028** Δ $\blacktriangle$	0.388 $\pm$ 0.036** Δ

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, Δ $P < 0.01$;与全方组比较, $\blacktriangle$ $P < 0.05$ 。

3.3 各组中药对免疫抑制小鼠 NK细胞活性的影响:表 2示,模型组 NK细胞的杀伤活性明显低于对照组($P < 0.01$)。全方组、益气组和养阴组 NK细胞活性均有显著提高,与模型组比较差异有显著性意义($P < 0.01$),凉血组未表现出明显的提高作用。

3.4 各组中药对免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬活力的影响:表 2示,模型组腹腔巨噬细胞吞噬活力比对照组明显下降($P < 0.01$);全方组、益气组、养阴组对免疫抑制小鼠的巨噬细胞吞噬活力比模型组均有显著提高($P < 0.01$)。益气组及养阴组与全方组作用相当,

凉血组则明显低于全方组 ($P < 0.01$)

表 2 各组中药对免疫抑制小鼠 NK 细胞活性、腹腔巨噬细胞吞噬活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NK 细胞杀伤活性 (%)	巨噬细胞吞噬活力 (OD 值)
对照组	9	19.915 $\pm$ 0.967	0.184 $\pm$ 0.014
模型组	9	7.746 $\pm$ 3.879 [*]	0.125 $\pm$ 0.010 [*]
全方组	9	17.725 $\pm$ 3.496 Δ	0.176 $\pm$ 0.016 Δ
益气组	9	19.447 $\pm$ 1.646 Δ	0.174 $\pm$ 0.012 Δ
养阴组	9	17.640 $\pm$ 1.482 Δ	0.166 $\pm$ 0.005 Δ
凉血组	9	10.733 $\pm$ 3.209 [*]	0.142 $\pm$ 0.010 [*] ▲

与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与全方组比较,▲ $P < 0.01$

4 讨论

养阴益气凉血合剂重用生黄芪、党参以益气扶正;以紫草凉血清热解毒;以黄精、沙参、玄参、天花粉滋阴降火。以往研究发现,养阴益气凉血合剂全方不同剂量作用于外源性糖皮质激素免疫抑制小鼠模型上,均能不同程度地提高小鼠的淋巴细胞增殖功能,且大剂量可使受抑制的免疫功能恢复至接近正常,增殖率与给药剂量呈依存关系^[6]。

本实验在以往实验基础上,根据方中药物的性能拆成 3 个部分。实验证实,在外源性糖皮质激素免疫抑制的小鼠模型上,养阴益气凉血合剂全方及方中益气、养阴、凉血药均能不同程度地提高免疫抑制小鼠的淋巴细胞增殖能力,尤其是全方组和益气组,使淋巴细胞的增殖率分别达到对照组的 90% 以上;益气组对 T 淋巴细胞的增殖作用与全方组作用相近,其次为养阴组。各组作用强弱的顺序为全方组 = 益气组 > 养阴组 > 凉血组。对 B 淋巴细胞增殖作用,各组均比模型组有明显的提高 ($P < 0.01$)。全方组、益气组作用接近对照组;养阴组与凉血组均低于对照组 ($P < 0.05$)。各组作用强弱的顺序为全方组 > 益气组 > 养阴组 > 凉血组。由此可见,养阴益气凉血合剂能明显提高特异性免疫功能。通过拆方发现方中益气组中药的作用达到或接近全方组水平,对机体的特异性免疫功能有较强的恢复调节作用,体现了益气类中药在养阴益气凉血合剂中对特异性免疫功能的独特效应;养阴组和凉血组对特异性免疫也有一定的提高作用,但疗效远不及益气组明显,更无法与全方组及对照组相比。提示养阴药和凉血药在本方中起到配伍作用。

同时,全方组、益气组、养阴组、凉血组均可提高小鼠的脾指数,其作用顺序为全方组 = 益气组 > 凉血组 > 养阴组,但均明显低于对照组。表明各中药组虽能改善激素对免疫器官的抑制,却不能使其恢复正常。在对免疫功能低下机体的特异性免疫功能影响方面,益气

组与全方组作用最为突出,体现益气中药在全方中对免疫功能的上调作用。

对非特异性免疫功能的作用观察表明,全方组、益气组与养阴组对免疫抑制小鼠的 NK 细胞活性也有明显增强作用,其中益气组、全方组与养阴组的数值接近对照组,凉血组则无明显提高作用。提示益气组、养阴组中药对 NK 细胞的杀伤活性具有明显的正向调节作用。在对腹腔巨噬细胞吞噬能力影响方面,各组药物的作用强度顺序为全方组 > 益气组 > 养阴组 > 凉血组。全方组治疗后巨噬细胞活性可达到对照组的 96%,而方中益气药和养阴药也有良好的作用(分别达到全方的 99% 和 94%)。

以上结果提示,在免疫抑制小鼠模型非特异性免疫功能调节方面,全方组、益气组、养阴组均能起提高作用,其中益气组与全方组作用非常接近,甚至在一些指标上作用强度超过全方组,进一步显示对免疫功能低下的机体,益气类中药发挥着重要作用,而养阴类中药略低于益气药。同时,以益气、养阴、凉血药组成的全方能在抗病毒、增强免疫力、修复病变、改善症状和体力诸方面共同发挥作用,体现了中药复方独特的优越性。

参考文献

- 朱丽娜,李秋英.扶正抗毒糖浆治疗小儿病毒性肺炎 69 例.北京中医药大学学报,1995,18(3): 50~ 51.
- 王双,张永祥.中药复方拆方研究的现状与分析.中国实验方剂学杂志,2002,8(3): 56~ 59.
- 孙卫民,王惠琴编著.细胞因子研究方法学.北京:人民卫生出版社,1999: 65~ 66.
- 吕建新,金丽琴,陈国荣,等.细脚拟青霉对大鼠腹腔巨噬细胞的激活作用.中国免疫学杂志,1997,13(3): 139~ 141.
- 李淑华,于晓红,于英君,等.蜂胶对免疫功能低下模型鼠细胞免疫的影响.中医药学报,2001,29(3): 38~ 39.
- 王莒生,刘欣,李萍,等.养阴益气凉血合剂及对正常及糖皮质激素免疫抑制小鼠免疫功能的调节.北京中医,2006,24(1): 87~ 89.



想拥有 2000 个古今名医做你的高级助手吗?
一套真正帮助医院、诊所和医生提高临床疗效的高级全科诊治咨询系统!

欢迎免费试用!

“慈方名医”系统通过了由中国中西医结合学会组织的专家论证。该系统“复活”了张仲景、孙思邈、张景岳等古代名医,运用群体智能优化技术实现了历代 2000 多位临床各科数字名医联合会诊,自动给出疑难病优化中药处方,需要重点排查的疾病和相关检查,可显著提高临床疗效,减少漏诊、误诊。使用时,医生通过客户端计算机提交患者的疾病信息,经互联网传至远程服务器,经过系统会诊后返回结果,即可打印出带有医院或诊所名称的咨询报告。该系统具有全科医生的功能,广泛适用于内、外、妇、儿、男、眼、耳鼻喉、口腔、皮肤性病等各科。一位医生说:“有‘慈方名医’在身边,遇到任何疑难病已经不再有束手无策的感觉,它已经成为我的拐杖和智囊。”欲快速提高中医诊疗水平,请进入新浪 UC“慈方医学”交流中心(免费)。试用方法详见慈方中医网 <http://www.cifang.com> 咨询电话:010-89760081