

· 方药研究 ·

银翘散在不同煎煮时间下对免疫抑制小鼠的免疫调节作用

刘亚娴 霍炳杰 张 莉 刘 羽 李 晶

(河北医科大学第四医院中医科, 河北省石家庄市健康路 12 号, 050011)

[摘要] **目的** 通过观察银翘散在不同煎煮时间下对免疫抑制小鼠免疫功能的影响探讨银翘散的最佳煎煮时间。 **方法** 将 88 只小鼠随机分为 11 组: 空白对照组, 模型对照组, 3 分钟高、中、低浓度组, 6 分钟高、中、低浓度组, 12 分钟高、中、低浓度组。除空白组外均用环磷酰胺造成免疫抑制模型, 银翘散灌胃给药 7 天后测定各组小鼠网状内皮系统对血流中惰性炭粒的吞噬廓清能力、游泳耐力时间、外周血中 T 细胞亚群、脾脏和胸腺器官重量。 **结果** 3 分钟高浓度组、3 分钟中浓度组、6 分钟高浓度组可显著提高免疫抑制小鼠的游泳耐力时间 ($P < 0.05$), 3 组比较差异无统计学意义; 除 6 分钟低浓度组、12 分钟中、低浓度组外, 其余各组均能显著增强免疫抑制小鼠网状内皮系统的吞噬功能、K 值和 α 值均明显增高 ($P < 0.05$), 其中以 3 分钟高浓度和 6 分钟高浓度的效果为优; 银翘散可显著提高各组小鼠外周血 CD_4^+ T 细胞的数量 ($P < 0.05$), 银翘散各组有升高小鼠外周血 CD_8^+ T 细胞数量的趋势, 但作用不显著; 3 分钟高浓度组能显著性增加各组小鼠胸腺重量和脾脏重量 ($P < 0.05$)。 **结论** 银翘散对免疫抑制小鼠具有免疫增强作用, 其效果以煮沸后 3 分钟效果为佳。

[关键词] 银翘散; 煎煮时间; 免疫调节

Immune-Regulating Effect of Yinqiao Powder in Different Decocted Time on Rats with Immune Suppression

LIU Ya-xian, HUO Bing-jie, Zhang Li, et al.

(The Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011)

ABSTRACT **Objective** To explore the best decocted time by observing the effect of Yinqiao Powder (Lonicerae and Forsythiae Powder) in different decocted time on immunity of rats with immune suppression. **Methods** The 88 qualified male rats were randomly divided into 11 groups with 8 in each: normal control group, model group, groups of Yinqiao Powder decocted for 3 minutes in high, medium and low concentrations, groups of Yinqiao Powder decocted for 6 minutes in high, medium and low concentrations, and groups of Yinqiao Powder decocted for 12 minutes in high, medium and low concentrations. Except for the normal control group, the rats in all other groups were made immune suppression models by using cyclophosphamide. Yinqiao Powder decoction was given by intragastric administration for 7 days. Then, the carbon clearance ability of reticuloendothelial system, the swimming endurance, the quantity of T cell subpopulation in peripheral blood, and the weights of spleen and thymus of all groups were determined. **Results** Yinqiao Powder decocted for 3 minutes in high and medium concentrations and decocted for 6 minutes in high concentration could improve remarkably the swimming endurance ($P < 0.05$), without significant difference among these 3 groups. Except for those decocted for 6 minutes in low concentration and decocted for 12 minutes in medium and low concentrations, the other groups of Yinqiao Powder could improve remarkably the phagocytosis of reticuloendothelial system, and the K and α values were increased remarkably ($P < 0.05$), of which, the effect of those decocted for 3 minutes in high concentration and decocted for 6 minutes in high concentration was the best. Yinqiao Powder could increase remarkably the quantity of CD_4^+ T cell of peripheral blood ($P < 0.05$). There was a tendency in Yinqiao Powder groups in increasing CD_8^+ T cell of peripheral blood, but not remarkably. Yinqiao Powder decocted for 3 minutes in high concentration could increase remarkably the weight of thymus and spleen ($P < 0.05$). **Conclusion** Yinqiao Powder is effective in improving immunity in rats with immune suppression and the effect of that decocted for 3 minutes was the best.

Key Words Yinqiao Powder (Lonicerae and Forsythiae Powder); Decocted time; Regulating immunity

银翘散是我国清代著名温病学家吴瑭创制的方剂, 处方由金银花、连翘、桔梗、薄荷、竹叶、生甘草、荆芥、淡豆豉、牛蒡子九味药组成。《温病条辨》称本方为“辛凉平剂”, 以治疗温病以及某些杂病邪在卫分、上焦

而闻名, 并一直沿用至今。吴瑭对本方的煎煮时间及服用方法等作了详细的说明, 方后载“香气大出, 即取服, 勿过煮。”此方法是取得疗效的关键。目前临床上有的忽视此煎法, 有的虽注意到此煎法, 但对“过煮”、“香气大出”的时间控制至今仍未定论, 也尚无系统实验研究证实。本研究目的在于探讨银翘散“香气大出, 即取服”

的最佳煎煮时间及其免疫调节作用,为更加准确合理地应用该方提供客观而科学的依据,并进一步扩大其临床应用。

1 材料

1.1 实验动物

雄性清洁级昆明种小鼠 88 只,体重 18~20g,购自河北医科大学实验动物中心,许可证号 SCXK(冀)2003-1-003。

1.2 药物与试剂

中药:银翘散(金银花、连翘、桔梗、淡豆豉、生甘草、竹叶、荆芥、薄荷、牛蒡子、芦根组成)由石家庄市乐仁堂大药房提供;环磷酰胺(Cy)由山西普德药业有限公司生产,批号 20070103,以生理盐水稀释至 1.25mg/ml 备用;一得阁墨汁由北京一得阁工贸有限公司生产。

1.3 仪器

721 分光光度计,上海欣茂仪器有限公司生产;JA 5003 电子分析天平,上海精科天平厂生产;抗凝管、玻璃缸、秒表等。

2 方法

2.1 动物模型的建立

除空白对照组外,各组于第 1、3、5、7 日腹腔注射 Cy(25mg/kg 体重^[1])。

2.2 中药煎剂的制备

全方中各药比例参照上海科学技术出版社第 6 版《方剂学》文献标准^[2],将各药研成细末后混匀。使用 500ml 的烧杯煎药,在烧杯中加入 200ml 水,低、中、高浓度分别加入 50g、100g、200g 药末。用电磁炉 160℃ 加热,当药液温度达到 100℃ 时开始计时,分别煎煮至 3、6、12 分钟。

2.3 动物分组与给药方法

将 88 只小鼠随机分为 11 组:空白对照组、模型对照组、3 分钟高、中、低浓度组(简称 3 分钟高、中、低浓度组),6 分钟高、中、低浓度组(简称 6 分钟高、中、低浓度组),12 分钟高、中、低浓度组(简称 12 分钟高、中、低浓度组),每组 8 只。各组自造模后开始给药,连续 7 天。空白对照组和模型对照组均以每天蒸馏水 0.4ml 灌胃;3 分钟高浓度组以每天 1g/ml、0.4ml/只灌胃;3 分钟中浓度组以每天 0.5g/ml、0.4ml/只灌胃;3 分钟低浓度组以每天 0.25g/ml、0.4ml/只灌胃;6 分钟高浓度组以每天 1g/ml、0.4ml/只灌胃;6 分钟中浓度组以每天 0.5g/ml、0.4ml/只灌胃;6 分钟低浓度组以每天 0.25g/ml、0.4ml/只灌胃;12 分钟高浓度组以每天 1g/ml、0.4ml/只灌胃;12 分钟中浓度组以每天 0.5g/ml、

0.4ml/只灌胃;12 分钟低浓度组以每天 0.25g/ml、0.4ml/只灌胃(中药剂量按动物与人体表面积比换算为相应剂量)。

2.4 检测指标及方法

2.4.1 对各组小鼠游泳耐力时间的影响 用秒表记录各组小鼠的游泳耐力时间,方法参见文献[3]。

2.4.2 对各组小鼠网状内皮系统对血流中惰性炭粒的吞噬廓清能力的影响 取一得阁墨汁,反复振摇至均匀,用 1% 明胶液稀释 4 倍供用。末次给药后 24 小时,于鼠尾静脉注入稀释的墨汁 0.1ml/10g。注入墨汁后 30 秒及 6 分钟用取血吸管从小鼠眶后静脉丛取血 0.025ml,立刻吹入 0.1% Na₂CO₃ 液 2ml 中,吸管于该液中吸入、吹出数次,以充分洗出吸管壁附着之血液,取血完毕,以 0.025ml 正常小鼠血溶于 2ml 0.1% Na₂CO₃ 液校零,于分光光度计上 675nm 处比色,按下式计算吞噬指数 K 及吞噬系数(校正吞噬指数) αK = (lgC₁ - lgC₂) / (T₂ - T₁) α = W(K)^{1/3} / WLS 式中 C 为血中炭粒浓度, T 为时间, W 为体重, WLS 为肝脾合重^[4]。

2.4.3 对各组小鼠外周血中 T 细胞亚群的影响 在进行上述实验后,以摘眼球取血法每只采血 0.2ml,采用流式细胞仪测定 CD₄⁺T、CD₈⁺T 细胞在外周血中的表达。

2.4.4 对各组小鼠脾脏、胸腺器官重量的影响 小鼠称重后处死,无菌条件下取脾脏、胸腺,称重后计算脾、胸腺指数。公式:脾、胸腺指数 = 脾、胸腺重量(mg) / 体重(g) × 100%^[5]。

2.5 统计学方法

所有数据采用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。采用完全随机设计的方差分析进行比较,并进行组间两两比较。

3 结果

3.1 对各组小鼠游泳耐力时间的影响

表 1 示,3 分钟高浓度组、3 分钟中浓度组、6 分钟高浓度组可显著提高免疫抑制小鼠的游泳耐力时间($P < 0.05$),3 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。其他各组游泳耐力时间虽长于模型对照组,但作用无统计学意义。

3.2 各组小鼠网状内皮系统对血流中惰性炭粒的吞噬廓清能力的影响

表 1 示,除 6 分钟低浓度、12 分钟中、低浓度外,其余各组均能显著增强免疫抑制小鼠网状内皮系统的吞噬功能, K 值和 α 值均见明显增高($P < 0.05$)。其中以 3 分钟高浓度组和 6 分钟高浓度组的效果为优,两者

表 1 各组小鼠游泳耐力时间及网状内皮系统对血流中惰性炭粒的吞噬廓清能力比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	吞噬指数(K)	吞噬系数(α)	耐力时间(秒)
空白组	8	0.044 $\pm$ 0.016*	6.45 $\pm$ 1.26*	186.08 $\pm$ 73.03*
模型对照组	8	0.023 $\pm$ 0.022 Δ #	4.13 $\pm$ 0.76 Δ #	25.86 $\pm$ 10.70 Δ #
3 分钟高浓度组	8	0.043 $\pm$ 0.021*	5.94 $\pm$ 1.55*	155.10 $\pm$ 51.46*
6 分钟高浓度组	8	0.043 $\pm$ 0.040*	5.91 $\pm$ 1.73*	154.95 $\pm$ 29.54*
12 分钟高浓度组	8	0.031 $\pm$ 0.074* Δ #	5.15 $\pm$ 1.34* Δ #	55.12 $\pm$ 14.07 Δ #
3 分钟中浓度组	8	0.033 $\pm$ 0.081* Δ #	5.16 $\pm$ 1.41* Δ #	154.33 $\pm$ 41.13*
6 分钟中浓度组	8	0.032 $\pm$ 0.062* Δ #	5.11 $\pm$ 1.02* Δ #	78.65 $\pm$ 22.43
12 分钟中浓度组	8	0.026 $\pm$ 0.052 Δ #	4.84 $\pm$ 1.08 Δ #	54.88 $\pm$ 35.64 Δ #
3 分钟低浓度组	8	0.031 $\pm$ 0.036* Δ #	5.06 $\pm$ 1.27* Δ #	94.25 $\pm$ 61.86
6 分钟低浓度组	8	0.027 $\pm$ 0.038 Δ #	4.78 $\pm$ 0.95 Δ #	61.94 $\pm$ 26.10
12 分钟低浓度组	8	0.025 $\pm$ 0.066 Δ #	4.78 $\pm$ 1.23 Δ #	45.65 $\pm$ 17.75 Δ #

与模型对照组比较, * $P < 0.05$; 与 3 分钟高浓度组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 6 分钟高浓度组比较, # $P < 0.05$

表 2 各组小鼠外周血 T 细胞亚群比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CD4 ⁺ T(%)	CD8 ⁺ T(%)	CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T
空白对照组	8	104.718 $\pm$ 8.750*	20.480 $\pm$ 8.560	5.530 $\pm$ 1.332*
模型对照组	8	19.448 $\pm$ 5.035 Δ	10.570 $\pm$ 1.900	1.825 $\pm$ 0.184 Δ
3 分钟高浓度组	8	86.143 $\pm$ 4.837*	16.183 $\pm$ 4.769	5.845 $\pm$ 2.453*
6 分钟高浓度组	8	57.985 $\pm$ 10.687* Δ	17.693 $\pm$ 1.024	4.299 $\pm$ 2.112
12 分钟高浓度组	8	56.508 $\pm$ 8.148* Δ	15.418 $\pm$ 5.017	3.859 $\pm$ 0.931
3 分钟中浓度组	8	70.600 $\pm$ 1.700* Δ	14.378 $\pm$ 4.375	5.165 $\pm$ 1.114*
6 分钟中浓度组	8	57.678 $\pm$ 10.672* Δ	13.253 $\pm$ 2.227	4.389 $\pm$ 0.691
12 分钟中浓度组	8	65.600 $\pm$ 9.560* Δ	18.790 $\pm$ 5.880	3.424 $\pm$ 2.102
3 分钟低浓度组	8	59.763 $\pm$ 6.245* Δ	11.500 $\pm$ 5.195	5.669 $\pm$ 1.390*
6 分钟低浓度组	8	57.353 $\pm$ 12.395* Δ	13.175 $\pm$ 0.190	4.364 $\pm$ 0.990
12 分钟低浓度组	8	56.983 $\pm$ 2.605* Δ	18.010 $\pm$ 1.340	2.508 $\pm$ 0.354 Δ

与模型对照组比较, * $P < 0.05$; 与 3 分钟高浓度组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 各组小鼠脾脏、胸腺器官重量比较(mg/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脾指数	胸腺指数
空白对照组	8	5.024 $\pm$ 0.928*	4.738 $\pm$ 0.956*
模型对照组	8	2.631 $\pm$ 0.859 Δ	2.155 $\pm$ 0.688 Δ
3 分钟高浓度组	8	4.608 $\pm$ 0.923*	3.984 $\pm$ 0.802*
6 分钟高浓度组	8	3.238 $\pm$ 1.204 Δ	2.346 $\pm$ 0.609 Δ
12 分钟高浓度组	8	3.194 $\pm$ 0.842 Δ	2.438 $\pm$ 0.708 Δ
3 分钟中浓度组	8	3.225 $\pm$ 1.109 Δ	2.215 $\pm$ 0.703 Δ
6 分钟中浓度组	8	3.213 $\pm$ 0.937 Δ	2.462 $\pm$ 0.606 Δ
12 分钟中浓度组	8	3.001 $\pm$ 0.783 Δ	2.307 $\pm$ 0.743 Δ
3 分钟低浓度组	8	3.085 $\pm$ 0.801 Δ	2.356 $\pm$ 0.604 Δ
6 分钟低浓度组	8	3.042 $\pm$ 0.804 Δ	2.310 $\pm$ 0.801 Δ
12 分钟低浓度组	8	2.989 $\pm$ 0.867 Δ	2.292 $\pm$ 0.791 Δ

与模型对照组比较, * $P < 0.05$; 与银翘散 3 分钟高浓度组比较, $\Delta P < 0.05$

比较差异无统计学意义, 与其他组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3.3 对 各组小鼠外周血中 T 细胞亚群的影响

表 2 示, 银翘散可显著提高各组小鼠外周血中 CD4⁺T 细胞的数量($P < 0.05$), 3 分钟高浓度组效果优于其他各组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$)。银翘散各组有升高小鼠外周血中 CD8⁺T 细胞数量的趋势,

但作用不显著。另外, 3 分钟高、中、低浓度可显著提高小鼠外周血中 CD4⁺/CD8⁺ 的比值($P < 0.05$)。

3.4 对 各组小鼠脾脏、胸腺器官重量的影响

表 3 示, 3 分钟高浓度组能显著增加各组小鼠胸腺重量和脾脏重量($P < 0.05$), 其余各组小鼠胸腺和脾脏重量均有升高趋势, 但作用不显著。

4 讨 论

银翘散原方记载“香气大出, 即取服, 勿过煮。”究竟香气大出是多长时间至今仍未定论, 未见系统实验研究的报道。我们曾于 1994 年以银翘散为主方总结了对 125 例小儿外感高热的治疗效果, 病种以急性上呼吸道感染最多(95/125 例), 其次为流行性腮腺炎初期、病毒性脑炎、急性扁桃体炎等。该组病例均系西药治疗无效转中医者, 服药期间停用西药, 嘱其煎煮时间为煮沸后 3 分钟即可, 一般 1~2 日热退^[5]。银翘散加减广泛用于临床, 推行煮沸后 3 分钟, 其效屡试不爽。故本实验在时间选择上定为煮沸后 3、6、12 分钟。

根据文献[7]采用环磷酰胺 100mg/kg 于第 1、3、5 日腹腔注射复制免疫抑制模型, 结果截至第 6 日早上模型对照组小鼠全部死亡, 而银翘散各组虽注射相同

剂量的环磷酰胺, 却无小鼠死亡, 但各组在进行游泳耐力实验后全部死亡, 可能与本批小鼠年龄较幼, 体重较轻有关。此结果提示银翘散可能有免疫增强作用。

通过对小鼠的游泳耐力时间的影响推测药物的免疫调整作用方法简单易行, 指标明确可靠。3 分钟高浓度组、3 分钟中浓度组、6 分钟高浓度组可显著提高免疫抑制小鼠的游泳耐力时间, 提示银翘散具有免疫增强作用, 且以煮沸后 3 分钟、6 分钟为佳, 并有一定的量效作用趋势。

网状内皮系统(RES, 单核巨噬细胞系统) 是机体最重要的防御系统具有强大而迅速地吞噬廓清异物颗粒或某些可溶性异物的能力, 并能迅速清除体内自身产生的某些有害物质。因此, 可以借助测定血流中炭粒的消失速度来反映RES 吞噬异物的能力。炭粒廓清指数表示在一定范围内小鼠清除进入机体炭粒的速率, 它是非特异性免疫功能的一个指标。实验表明, 除 6 分钟低浓度组、12 分钟中、低浓度组外, 其余各组均能显著增强免疫抑制小鼠RES 的吞噬功能, 其中以 3 分钟高浓度组和 6 分钟高浓度组的效果为优。提示银翘散具有增强小鼠非特异性免疫的功能, 且以煮沸后 3 分钟、6 分钟为佳, 并有一定的量效作用趋势。

CD_4^+ 细胞为感应细胞, 具有辅助、诱导的功能; CD_8^+ 细胞为细胞毒细胞, 具有攻击病毒感染的功能, T 细胞亚群的功能和活性是体内细胞免疫功能的直接反映。细胞免疫功能改变往往敏感地表现在 CD_4^+/CD_8^+ 比值的改变上。实验结果表明, 银翘散可显著提高各组小鼠外周血中 CD_4^+ T 细胞的数量, 且以煮沸后 3 分钟高浓度组效果为优; 银翘散各组虽有升高小鼠外周血中 CD_8^+ T 细胞数量的趋势, 但作用不显著; 3 分钟高、

中、低浓度组可显著提高各组小鼠外周血中 CD_4^+/CD_8^+ 的比值, 提示银翘散具有增强小鼠细胞免疫的功能, 并以煮沸后 3 分钟效果为优。对于其对 CD_8^+ T 细胞数量的不显著作用, 可能是由于动物数量较少和(或) 银翘散增强小鼠细胞免疫的功能可能主要是通过上调 CD_4^+ T 细胞亚群而使 CD_4^+/CD_8^+ 比值恢复正常, 有待进一步研究。

胸腺与脾脏为体内主要的免疫器官, 免疫抑制剂可使胸腺、脾脏明显萎缩, 免疫增强剂则使胸腺和脾脏增重。3 分钟高浓度组能显著性增加各组小鼠胸腺重量和脾脏重量, 提示银翘散具有增强小鼠非特异性免疫功能, 且以煮沸后 3 分钟为佳, 并有一定的量效作用趋势。

参考文献

[1] 黄瑞松, 叶琦莉, 陈超树, 等. 壮药土垠大白蚁菌圃水提醇溶物对小鼠免疫功能的影响. 中国中医药科技, 2005, 12(6): 382~383.

[2] 段富津. 方剂学. 6 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 28~29.

[3] 王克芳. 冬虫夏草抗小鼠运动性疲劳的作用及机制研究. 哈尔滨医科大学学报, 2003, 37(4): 311~314.

[4] 陈奇. 中药药理研究方法学. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 759.

[5] 凌学静, 张海石, 黄岩. 西红花对小鼠免疫增强作用的研究. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4(12): 28~29.

[6] 刘亚娟. 125 例小儿外感高热治疗心得. 中国中医急症, 1994, 3(2): 82.

[7] 王献坤, 郑晓鹤, 邢建峰, 等. 肠安康胶囊对小鼠炎症和免疫功能的影响. 中成药, 2004, 26(12): 1043~1045.

(收稿日期: 2007-10-22; 修回日期: 2008-02-15)

[编辑: 李长今 叶 晨]

第七次全国特色医疗学术会暨特效疗法培训班通知

由《科普文摘》杂志社主办, 北京聚医杰医药科学研究院承办的“第七次全国特色医疗学术会暨特效疗法培训班”, 拟于 2009 年 5 月中旬在山东省烟台市举办。特邀请各级中医、西医、中西医结合医、民间医生、社区医生、乡村医生投稿或参加会议。

一、征文要求: 运用中西医各法治疗常见病多发病、疑难病等方面的特色疗法经验总结及民间疗法等, 特别是各种非药物疗法。论文要求打印, 每文 2000 字左右, 另附 200 字以内作者简介。论文评审后, 入选者除参加会议交流外, 安排在杂志上发表。优秀者发“中国特色医疗名医证书”和“中国特色医疗优秀学术成果证书”。

二、培训内容: 由专家教授作实用特效疗法的讲座, 使学员能掌握几门特色疗法。1. 由著名痛症治疗专家崔振芳教授传授: (1) 三叉神经痛、肩周炎、腰椎间盘突出、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎等的中西医特效疗法; (2) 激能电摩疗法的临床应用; 2. 由微创穴位埋线发明人、著名针灸专家任晓艳主任医师传授微创穴位埋线疗法; 3. 著名民间中医蒋可定传授治疗哮喘、支气管炎等病的点穴疗法; 4. 中医治疗白癜风专家宋明柱传授中医治白癜风的特效疗法。培训班还提供实习机会, 颁发继续教育学分证书。

参会论文及参会报名申请(无论文者也可参会) 请在 2009 年 3 月 30 日前寄北京 100073 信箱 77 分箱, 中华医学论坛杂志编辑部李莹莹或叶续宗主任收, 邮编 100073, 注明“七次特色医疗会投稿”或“报名”。联系电话: 010-51344508、87013859, E-mail: 100036-98@163.com