

参芪五味子片抗焦虑效应并不再伴随剂量的增加而增强,而呈现一定的镇静作用。

参考文献

- [1] 荣春蕾,代永霞,崔瑛.酸枣仁对阴虚小鼠焦虑行为的影响[J].中药材,2008,11(31):1703-1705.
- [2] 王欣,王守勇.酸枣仁汤临床与实验研究评述[J].中成药,2003,25(5):414.
- [3] 张丽明,李芝晃,陈文浩.当归黄芪结合心理干预治疗女性

更年期焦虑患者临床研究[J].实用全科医学,2008,6(2):165-166.

- [4] Pellow S, Chopin P, File SE, et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat[J]. J Neurosci Methods, 1985, 14(3):149-167.
 - [5] Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mice[J]. Psychopharmacology(Berl), 1987, 92(2):180-185.
- * 四川省安岳县中医院 (622650)

益气止血宁药物血清对离体子宫收缩影响的研究

赵宏利¹ 张英蕾² 马宝璋³

功能失调性子宫出血(DUB)简称功血,是妇产科常见病、多发病,益气止血宁是名老中医马宝璋教授在长期临床实践中总结提炼出来的治疗妇科出血性疾病,尤其是功血属于脾肾不足、气虚失摄型的有效方剂。本实验通过观察益气止血宁水溶液及药物血清对小鼠、大鼠离体子宫收缩作用,来验证其疗效,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 雌性成年大鼠,体重为(200±20)g,鼠龄4月;昆明种雌性小鼠,体重为(20±2)g,鼠龄8周,均购自黑龙江中医药大学实验动物中心。

1.2 主要仪器

成都仪器厂 LMS-2B 型二道生理记录仪,重庆仪器设备厂 CS501 型超级恒温器,高碑店新航机电设备有限公司肌张力换能器 JZ100 型。

1.3 实验药物

宫血宁胶囊:0.13g/粒,批号:ZZ-5418-滇卫药准字(1995)第 000392,云南白药集团股份有限公司;宫血停颗粒:10g/袋,批号:ZZ-5250-黑卫药准字(1985)第 200384,哈药集团股份有限公司;益气止血宁颗粒:黑龙江中医药大学药厂,批号:200203,规格:10g/袋(每克颗粒相当于生药 2g),中益气止血宁用量皆以成品颗粒重量计算。

1.4 实验方法

1.4.1 药物水溶液对小鼠离体子宫收缩的作用 取昆明种雌性小鼠 10 只,体重(20±2)g,腹腔注射己烯雌酚 0.1mg/kg,以提高子宫对药物的敏感性,24h 后将小鼠颈椎脱臼处死。开腹取出子宫置于盛有预先配制的台式液的培养皿中,剥离子宫上附着的脂肪等结缔组织,将双侧子宫并拢,四号手术丝线结扎远近两端,间隔约 2cm。一端以丝线固定于挂钩上,置于盛有 20ml 的台式液的麦氏浴槽中,另一端连接到肌张力换能器上,加负荷 1g,并将换能器连接于 LMS-2B 型二道生理记录仪。麦氏浴槽的温度由超级恒温器控制在(37±0.5)℃。以每秒 3~4 个小气泡的速度向台式液中通入氧气(含 95%O₂+5%CO₂)。稳定 20min 左右子宫收缩平稳,记录一段正常收缩曲线,然后分别滴加宫血宁(6.5×10⁻³g/ml)、宫血停(1g/ml)、益气止血宁(0.5g/ml)各 0.1ml,使台式液中药物浓度分别达到宫血宁(3.23×10⁻⁵g/ml)、宫血停(4.98×10⁻³g/ml)、益气止血宁(2.49×10⁻³g/ml)并依次记录该药的子宫收缩曲线。各药物滴加量(或药物浓度)的比例与各药物成人每日口服量(或实验动

物等效灌胃量)的比例相同,以保证实验对照的可比性,同时各药液 PH 值均调至 7.0~7.2。换药前均用台式液冲洗 3 次,每次 5min 以上,以使子宫收缩基本恢复到未加药前水平,以免影响实验结果。二道生理记录仪的参数:灵敏度取 0.1 或 0.2(按 0.1 标准两倍折算),时间常数为 2,走纸速度 10mm/min,滤波 10Hz。

1.4.2 药物血清对大鼠离体子宫收缩的作用 取 Wistar 雌性成年大鼠 16 只,随机分 4 组,每组 4 只,分别以成人等效剂量的 10 倍量灌胃,宫血宁每日灌服 0.35g/kg,宫血停 54g/kg,益气止血宁 27g/kg,空白组以等容积的生理盐水灌胃。第 7 天给药后 2h,摘眼球取血,静置 30min 后,以 3000r/min 离心 20min,取血清,-20℃保存备用。另取 Wistar 成年雌性大鼠 10 只,颈椎脱臼处死。开腹剪取一侧子宫,按 1.4.1 中方法,记录一段子宫正常收缩曲线后,分别滴加灌服生理盐水的空白组大鼠血清、宫血宁大鼠血清、宫血停大鼠血清、益气止血宁大鼠血清各 0.1ml,分别记录子宫收缩曲线。二道生理记录仪的参数:灵敏度取 0.2 或 0.5(按 0.2 标准 5/2 折算),时间常数为 2,走纸速度 10mm/min,滤波 10Hz。

2 结果

2.1 药物水溶液对小鼠离体子宫收缩的作用

与台式液比较,益气止血宁对小鼠离体子宫收缩频率无影响($P>0.05$),对收缩振幅有加强作用($P<0.01$);宫血停水溶液对离体小鼠子宫收缩振幅无影响($P>0.05$),对收缩频率反而有抑制作用($P<0.01$)。

2.2 药物血清对大鼠离体子宫收缩的作用

与台式液比较,空白血清可加强离体大鼠子宫的收缩幅度($P<0.01$),却不改变收缩频率;空白血清及各药物血清组均能显著提高离体子宫的收缩幅度($P<0.01$);益气止血宁药物血清对子宫收缩幅度提升作用强于空白血清的作用($P<0.05$),说明其兴奋子宫作用已排除了血清故有活性成分的干扰;而宫血停血清与空白血清作用无差异;益气止血宁药物血清对离体子宫收缩频率有促进作用,与台式液、空白血清、宫血停药物血清相比差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3 讨论

益气止血宁由党参、黄芪、炒蒲黄、茜草根、煅牡蛎、墨旱莲等药组成。方中党参、黄芪相协益气健脾生血止血;复以墨旱莲、牡蛎肾阳敛固冲止止血,党参、黄芪得墨旱莲、牡蛎,则补益阳气而不致化火,墨旱莲、牡蛎得党参、黄芪,则养阴敛阳而勿忧凉凝;更仿《内经》四乌贼骨一蘼茹丸之意,加茜

草、蒲黄等化瘀止血之品。全方益气为先，阴阳俱补，脾肾同调，标本兼顾，涩行有致，塞澄并施，温益阳气而不伤阴血，固摄冲任而不止血留瘀，肾固、脾健、瘀祛而崩漏自止。此方实为临床治疗功能失调性子宫出血，乃至其他妇科血证的有效方剂，然毕竟此方偏补阳气，故总以辨证属于脾肾气虚之月经过多、经间期出血、经期延长和崩漏等病的出血期使用更为适宜。

本实验结果显示，益气止血宁水溶成分对小鼠离体子宫收缩振幅有加强作用 ($P < 0.01$)，优于宫血停 ($P < 0.01$)，对收缩频率无显著影响 ($P > 0.05$)，而宫血停对离体子宫收缩频率有抑

制作用；益气止血宁药物血清能显著提高离体大鼠子宫的收缩幅度和收缩频率 ($P < 0.05$)，作用强于空白血清和宫血停药物血清 ($P < 0.05$)；实验说明益气止血宁兴奋子宫作用已排除了血清故有活性成分的干扰，证明了益气止血宁在经胃肠道消化吸收，在体内生物转化后，确能产生提高子宫收缩能力、提高子宫平滑肌张力的有效药理成分。

- 1 浙江省杭州市中医院 (310007)；
- 2 黑龙江省哈尔滨医科大学临床医学博士后流动站；
- 3 黑龙江中医药大学附属第一医院

芍药甘草汤对 MRL/Lpr 小鼠 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 细胞的影响

王璞¹ 张雯¹ 周红娟¹ 朱社敏² 马纪林¹ 王丹² 谭富媛³ 于健宁¹ 陶筱娟¹

系统性红斑狼疮 (Systemic Lupus Erythematosus, SLE) 是临床常见的自身免疫性疾病，表现为 T、B 淋巴细胞异常活化产生各种针对自身的抗体，不仅临床诊治困难，并发症多而复杂，而且治疗手段有限。

免疫学研究发现， $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞 (Regulatory T Cells, Treg) 在活化时能以抑制的方式调节其他 $CD4^+CD25^-$ 效应细胞的活化或功能，帮助维持免疫自稳^[1]，最近发现的转录因子 Foxp3 在 $CD4^+CD25^+$ 细胞中特异表达，如将 Foxp3 通过反转录病毒导入 $CD4^+CD25^-$ 细胞，则可转化为 $CD25^+$ 细胞；或通过特殊刺激素如 TGF- β 使小鼠 $CD4^+CD25^-$ 细胞表达 Foxp3，能获得具有抑制调节功能的 Treg^[2]；Foxp3 基因突变又会导致广泛的自身免疫及炎症发生^[3]，因此， $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞更能代表 Treg。对于这群细胞的研究方兴未艾。

我们在接近 30 年的临床工作中，运用经典方剂芍药甘草汤滋阴扶正治疗活动性 SLE 临床疗效显著，但是该方剂能否影响 Treg 尚无研究报道。本实验中，我们利用成熟的系统性红斑狼疮转基因动物模型 MRL/Lpr 小鼠，同步对照正常 C57BL/6 小鼠，在灌服不同浓度芍药甘草汤前后，观察动物 SLE 症状出现时间、生存率；对其脾细胞 Treg 比例的影响等，初步从现代细胞免疫学角度探索该方剂的作用机理，现总结如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

10 周龄清洁级 MRL/Lpr 模型小鼠 40 只和正常 C57BL/6 小鼠 60 只 (购自上海斯莱克实验动物中心，委托浙江省食品药品检验所动物中心，SPF 级饲养)，正常小鼠 20 只用于急性毒性实验，其余两组小鼠分别于 12 周龄后，密切观察关节肿胀情况、体温变化、每周监测尿白蛋白，总观察期直至模型鼠半数死亡。

1.2 药物制备

一定比例杭白芍、生甘草由本院中药制剂室，用 BZY150K-1 型自动煎药包装机 (中韩合资天津三延精密机械有限公司) 煎煮并浓缩 120min^[4]，浓度为 2kg/L，包装成所需药剂；自小鼠 12 周龄始随机分组，开始按不同比例 (0.6、0.3、0.15g/ml/d)、对照组以等量生理盐水灌胃，早晚各 1 次，每隔 2 周分别分离各组小鼠脾细胞检测相关指标。

1.3 实验方法

① 药物急性毒性实验：经预实验后，取雌雄各半，体重 18~22g 正常 C57BL/6 小鼠 20 只，随机分为给药组和空白组，给药前禁食不禁水 16h，前者以芍药甘草汤 24g 生药/kg/次，按 0.4ml/10g 体重 24h 内灌胃给药 2 次，后者灌服等量生理盐水，中间间隔 6h，连续观察两组小鼠行为、状态、饮食、大小便、毛色、分泌物及死亡等情况。② 脾脏淋巴细胞分离：所需试剂购自杭州联科生物 (Immunotech, France)，分别无菌分离灌药前及灌药后各组不同周龄 MRL/Lpr 和正常 C57BL/6 小鼠脾脏，研磨后裂解红细胞，并进一步制成单个核细胞，制备悬液。细胞计数并定容为 40×10^9 /ml。③ T 淋巴细胞分离：生理盐水温热尼龙毛柱，加脾淋巴细胞悬液 1.5ml 和 10% FCS RPMI 1640 0.5ml，37℃、5% CO₂ 细胞培养箱孵育 1.5~2.0h，5ml 预温热的 PBS 淋洗，去除 B 细胞等，得 T 淋巴细胞，FACS 检测细胞纯度 >85%；④ $CD4^+CD25^+$ 细胞的制备：免疫磁珠法分离 $CD4^+CD25^+$ 及 $CD4^+CD25^-$ 细胞 (MACS 免疫磁性分离仪及相关试剂购自德国 Miltenyi Biotec 公司)；⑤ 小鼠 $CD4^+CD25^+ToxP3^+$ 检测：(试剂盒购自美国 eBioScience 公司)，按 Foxp3 试剂盒说明操作，表面染色 FITC-CD4，APC-CD25 后，细胞固定、破膜，染色 PE-Foxp3，4℃ 孵育 30min，PBS 洗涤 2 次，将细胞悬浮于 PBS 中，通过 FACS 检测 (Beckman Coulter 公司 FC500) Treg 比例。

1.4 统计学方法

生存率分析采用 Kaplan-Meier 生存率曲线和 log rank 检验；实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，百分率对比采用 t 检验，组间均数差异采用方差分析。运用 GraphPad Prism 4.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 药物急性毒性实验示

给药组小鼠活动自如，进食、饮水正常，大便呈湿润颗粒状，小鼠观察期内无死亡，也无明显中毒反应。最大给药量试验提示，给药 7 天内，小鼠无明显不良反应发生，体重有所增加，见表 1。求得小鼠日最大给药量 48g 生药/kg，按公斤体重计算，约为临床人用量的 80 倍。表 1 示，空白组和给药组两组体重进行比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠生存率

在观察的 260 天内，与发病后药物不干预组比较，治疗组