

• 实验研究 •

桂枝汤免疫抑制作用的实验研究

北京医科大学第三医院成形外科研究中心 吕秀凤 谢蜀生* 朱洪荫 龙振洲*

内容提要 本文报告中药桂枝汤对小鼠免疫功能的抑制作用。经口服、肌肉注射和腹腔注射不同剂量的桂枝汤，均能明显抑制小鼠的 PFC、SRFC、BSA 诱导的迟发型超敏反应，以及对 ConA 和 LPS 的增殖反应。进一步的研究表明，桂枝汤有明显抑制小鼠脾细胞产生 IL-2 的作用，这可能是桂枝汤免疫抑制作用的主要机制。

桂枝汤乃是《伤寒论》之名方，具有解肌发表，调和营卫之功能^①，近年来，临床应用桂枝汤治疗过敏反应以及抑制炎症反应获得明显疗效^②。本文比较系统地研究了桂枝汤对小鼠免疫功能的影响。结果表明，桂枝汤能明显抑制小鼠的细胞及体液免疫功能。

材料与方法

一、动物：BALB/C 纯系小鼠及 LACA 系小鼠，8~12 周龄，北京医科大学动物部供应。

二、试剂：刀豆蛋白 A (ConA)，细菌脂多糖 (LPS)，福氏完全佐剂 (CFA)，牛血清白蛋白 (BSA) 均系美国 Sigma 公司产品，³H-胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR) 系中国科学院原子能研究所产品。

三、药物及给药方式：中药桂枝汤系北京医科大学制药厂制备：桂枝 9g 生姜 6g 甘草 9g 白芍 9g 大枣 (去核) 12 个，以水醇法提取其中有效成份，配制注射液备用，浓度为每毫升含生药 0.3g。

在用绵羊红细胞 (SRBC) 免疫前 3 小时给药，不同剂量的桂枝汤经口服、肌肉及腹腔注射等不同途径给药，4 天后进行溶血空斑测定及特异玫瑰花形成细胞检测。检查小鼠脾细胞对 ConA 及 LPS 的增殖反应以及白细胞介素-2 (IL-2)，测定时用每天 200mg/kg 剂量，腹腔给药，连续用药 4 天；检测迟发型超敏反应 (DTH)，测定时每天 200mg/kg 腹腔给药，在 BSA 致敏后连续用药 4 天。对照组均用生理盐水代替。

四、溶血空斑试验 (PFC)：按本室改良的 Kennedy 电荷单分子层法进行^③。

五、特异玫瑰花形成细胞测定 (SRFC)：按本室建立的方法进行^④。

六、BSA 诱导的迟发型超敏反应 (DTH)：按本室改良的 Titus 方法进行^⑤。

七、小鼠脾细胞对 ConA 和 LPS 的增殖反应：无菌

制备小鼠脾细胞悬液，用 20% 小牛血清 RPMI 1640 完全营养液，将细胞配成 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ 浓度，取 0.2ml 加入 96 孔平底板 (Linbro, 美国) 小孔中，每孔含 5×10^5 个脾细胞，并加入 ConA $0.4\mu\text{g}$ (终浓度为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$)；LPS $10\mu\text{g}$ (终浓度为 $50\mu\text{g}/\text{ml}$)， 37°C CO_2 温箱中培养 3 天，收获前 6 小时，每孔中加入 $0.5\mu\text{Ci}$ ³H-TdR 用液闪计数器测定 cpm 值。

八、白细胞介素-2 (IL-2) 活性测定：按本室建立的方法进行^⑥。

结 果

一、桂枝汤对小鼠抗体分泌细胞 (PFC) 和特异玫瑰花形成细胞 (SRFC) 的抑制作用：用四个不同剂量的桂枝汤经腹腔注射，连续 4 天后，检查 PFC 及 SRFC。结果表明：每天 10mg/kg，小鼠 PFC 及 SRFC 均有降低，但 $P > 0.1$ ；每天 50mg/kg 与对照组相比 PFC 和 SRFC 均有明显减少， $P < 0.05$ ；每天 100mg/kg 及 200mg/kg 组与对照组相比， $P < 0.01$ 。表 1 说明桂枝汤对小鼠 PFC 和 SRFC 的抑制作用呈正相关。

表 1 不同剂量的桂枝汤对小鼠 PFC 及 SRFC 的影响 ($M \pm SD$)

组别	鼠数	桂枝汤 (mg/kg·d)	PFC/ 10^6 脾细胞	SRFC/ 10^6 脾细胞
实验	12		1320 ± 821	15260 ± 7693
对照	12	10	1459 ± 568	19410 ± 4687
实验	12		913 ± 286*	11300 ± 5868
对照	12	50	1324 ± 432	18900 ± 3892
实验	12		702 ± 158**	7120 ± 3201**
对照	12	100	1455 ± 596	17800 ± 5461
实验	12		485 ± 248**	6210 ± 2601
对照	12	200	485 ± 328	17650 ± 6328

与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

确定药量为每天 100mg/kg 的条件下，通过口服、肌肉注射及腹腔注射，检查小鼠 PFC 及 SRFC，结果

* 北京医科大学免疫学教研室

△ 本研究受国家自然科学基金资助

表明: 三种途径给药均能明显抑制PFC及SRFC, 与对照组相比, $P < 0.01$, 结果见表2。

表2 不同途径给予桂枝汤对小鼠脾PFC及SRFC的影响 (M±SD)

组别	鼠数	桂枝汤 (mg/kg·d)	途径	PFC/ 10 ⁶ 脾细胞	SRFC/ 10 ⁶ 脾细胞
实验	15	100	口服	803±32*	9416±462*
对照	15			1148±872	19300±1250
实验	18	100	腹腔注射	783±120*	8916±528*
对照	18			1154±662	19400±8421
实验	14	100	肌肉注射	948±98*	9833±632*
对照	14			1213±432	15083±3210

与对照组比较, * $P < 0.01$

二、桂枝汤抑制小鼠脾细胞对BSA诱导的迟发型超敏反应(DTH): 对小鼠用BSA致敏同时腹腔注射给药, 剂量为每天100mg/kg, 连续用药4天后, 用热凝聚的BSA攻击小鼠足垫, 24小时后检测小鼠对BSA的DTH反应。结果表明: 用药组10只小鼠足垫肿胀度为 0.43 ± 0.15 (mm, M±SD, 下同)较对照组(0.82 ± 0.15)明显为弱, $P < 0.01$ 。

三、桂枝汤抑制小鼠脾细胞对ConA和LPS的增殖反应: 小鼠经腹腔给药, 每天100mg/kg, 连续4天后, 发现小鼠脾T细胞有丝分裂原(对ConA)和B细胞有丝分裂原(对LPS)的增殖反应均明显抑制。统计学处理 $P < 0.01$, 结果见表3。

表3 桂枝汤抑制小鼠脾细胞对ConA和LPS的增殖反应 (M±SD)

组别	鼠数	³ H-TdR掺入(cpm)	
		ConA	LPS
对照	20	44374±8861	14695±5781
实验	20	17349±5203*	5520±1250*

与对照组比较, * $P < 0.01$

四、桂枝汤抑制小鼠脾细胞产生IL-2: 小鼠经腹腔给药4天(每天100mg/kg)取脾, 检测脾细胞在ConA刺激下产生IL-2的能力。结果表明, 桂枝汤明显抑制了小鼠脾细胞产生IL-2的能力, 与对照组相比, $P < 0.01$, 结果见表4。

讨 论

桂枝汤出自《伤寒论》, 为辛散解表方剂, 近来有报告桂枝汤在治疗荨麻疹及抗炎症反应方面有明显疗效, 是否与其免疫抑制功能有关, 值得研究。

本实验用多项细胞免疫和体液免疫指标, 观察了

表4 桂枝汤对小鼠脾细胞产生IL-2的抑制作用 (M±SD)

组别	IL-2稀释度	³ H-TdR掺入(cpm)	P值
实验	1:1	9354±1280	<0.01
对照		1157±820	
实验	1:2	5851±893	<0.01
对照		1033±658	
实验	1:4	6237±1456	<0.01
对照		1582±312	
实验	1:8	4449±1120	<0.01
对照		988±155	

桂枝汤对小鼠免疫功能的影响, 肯定了上述的推测。

PFC是检测机体体液免疫功能的可靠指标, 而SRFC可能是抗原特异的早期T细胞和B细胞, 与细胞免疫和体液免疫都有关。通过不同剂量和不同途径给药, 均能抑制小鼠PFC和SRFC数, 提示桂枝汤对抗原特异的体液免疫和细胞免疫都可能有一定程度的抑制作用。ConA可以刺激小鼠T细胞活化与增殖, 而LPS可以刺激小鼠B细胞的活化与增殖, 本研究表明, 桂枝汤能明显抑制ConA和LPS对小鼠脾细胞的增殖反应, 进一步证明了桂枝汤对细胞和体液免疫的抑制作用。近年来的研究表明, 介导DTH反应的T细胞主要是Thy-1⁺、lyt-1⁺、lyt-2⁻的T细胞亚群。这群T细胞除诱发迟发型超敏反应外, 还通过释放IL-2等淋巴因子参与免疫应答的调节^⑥, 本研究发现桂枝汤能明显抑制BSA诱导的DTH反应, 这提示桂枝汤可能会抑制其IL-2的产生。检查桂枝汤对小鼠脾细胞产生IL-2的影响表明, 桂枝汤确实抑制了小鼠脾细胞产生IL-2。IL-2是调节机体细胞免疫和体液免疫的重要因子, 因此抑制IL-2的产生可能是桂枝汤抑制作用的重要机制之一。由于LPS是多克隆的B细胞激活剂, B细胞对LPS的增殖反应不受T细胞影响, 所以桂枝汤对免疫应答的抑制作用, 可能有多种途径, 其机制值得进一步研究和探讨。

参 考 文 献

1. 田长安, 等。桂枝汤药理作用的初步研究。中成药 1983; 1:25。
2. 龙振洲, 等。五仁醇对抗体分泌细胞及特异玫瑰花形成细胞的抑制作用。中华医学杂志 1984; 64(6):369。
3. 冯世纶, 等。桂枝汤加味治疗荨麻疹。健康报 1986; 12.20。
4. 谢蜀生, 等。甲氧咪呱对小鼠免疫功能的影响。药学通报 1984; 19(9):39。

5. 龙振洲, 等. 羟甲基茯苓多糖刺激小鼠免疫功能的实验研究. 中华微生物与免疫学杂志 1985; 5(5):280.

6. Masmann TR, et al. Two types of mouse help T-cell clone. Immunology Today 1987; 8:223.

更年期综合征患者轰热的手指皮温观察及治疗

上海医科大学妇产科医院 归绥琪 俞瑾 毛秋芝 祝秀都

更年期综合征妇女常以面颈部乃至上胸部阵阵轰热、出汗为主要症状。我们以手指皮温作为轰热的客观指标, 用双盲法初步观察我院中药方对36例更年期综合征妇女的疗效。

临床资料

一、对象: 在门诊选择主诉有明显轰热的更年期综合征妇女36例, 三个月内均未用性激素及其它中西药治疗。其中更年期月经紊乱9例; 停经 <1 年4例(其中有3例全子宫及双附件切除术后); 绝经23例(其中4例全子宫及附件切除术后, 1例行双侧卵巢内膜样囊肿剥出术后绝经6年)。年龄最大63岁, 最小35岁(全子宫切除术后)。

二、观察方法: 36例患者均在治疗前作手指皮温测定, 患者在室温 $21\sim 24^{\circ}\text{C}$ 静卧下, 以半导体测温仪, 每15分钟测定右手食指指尖掌侧皮肤温度(简称皮温), 连续观察4小时, 当发现患者手指皮温波动或主诉轰热发生时, 改为每5分钟测皮温一次, 直至皮温基本恢复到基线。

治疗方法 36例患者, 由固定医生诊治, 按双盲法随机分成1组(治疗组)和2组(对照组), 两组分别服上海中药一厂试制的更年宁1号和2号片。用法: 每次服12片, 1日3次, 连服1~3个月。所有患者治疗结束后, 由中药一厂公布, 更年宁1号为本院治疗更年期综合征经验方: 仙茅6g 仙灵脾12g 知母9g 黄柏6g 生地18g 黄精12g 泽泻6g 龟版12g, 每剂制成36片。更年宁2号为淀粉制成同样剂型片剂。

结果

一、轰热与手指皮温的观察: 根据所测皮温波动形态及其伴发症状, 36例患者大致分成3型。

I型: 6例, 在测手指皮温4小时内, 无轰热发作, 其手指皮温连续测定波动极微, 基线均值 $33.3\pm 1.33^{\circ}\text{C}$

($\bar{X}\pm\text{SD}$, 下同), 温差小, 其差值为 $0.37\pm 0.15^{\circ}\text{C}$ 。

II型: 26例, 患者测皮温期间有轰热发作, 继之微微出汗, 见皮温有一定升降幅度。轰热发作前皮温基线均值为 $31.88\pm 1.29^{\circ}\text{C}$ ($28\sim 33.5^{\circ}\text{C}$); 轰热发生, 基温线坡形上升达高峰, 其均值为 $33.67\pm 1.4^{\circ}\text{C}$ ($30\sim 35.5^{\circ}\text{C}$), 温差均值 $1.79\pm 0.71^{\circ}\text{C}$, 当轰热消退时, 皮温线下降回复到基线水平。皮温变化持续时间为 $41.23\pm 19.15\text{min}$ ($20\sim 110\text{min}$)。

III型: 4例, 患者轰热发作前有发冷感觉, 继之明显发热, 出汗。轰热前皮温基线低, 均值 $23.5\pm 2.84^{\circ}\text{C}$ ($20.5\sim 26^{\circ}\text{C}$), 轰热时皮温快速上升达高峰, 均值 $30.63\pm 0.85^{\circ}\text{C}$ ($30.5\sim 31.5^{\circ}\text{C}$)。平均温差 $7.13\pm 1.18^{\circ}\text{C}$, 皮温变化持续时间为 $41.21\pm 12.58\text{min}$ ($30\sim 60\text{min}$)。

二、治疗结果: 1组17例, 2组19例, 各失访1例。服药前后轰热次数的比较, 1组和2组治疗前24小时轰热次数的平均值分别为9.15次和9.56次; 治疗后24小时轰热次数分别为6.19和5.31次。两组治疗前后经t检验, $P<0.005$, 提示两组治疗前后有极显著差异, 但两组间比较 $P>0.2$, 差异无显著性, 说明该中药方对轰热的治疗无特异性。

讨论 本文36例更年期综合征患者, 观察期出现轰热30例, 轰热时手指皮温变化和轰热伴发症状相符。轰热II型患者手指皮温基线及峰值均高于轰热III型患者, 说明半导体测温仪手指皮温测定可作为轰热的客观指标。34例经双盲法进行治疗观察(2例失访), 其结果治疗组和对照组用药后轰热次数均减少, 有极显著性差异, 而两组间疗效比较差异无显著性意义, 说明更年期综合征用中药治疗对改善症状有效, 但无特异性。其疗效判断需进一步作各种客观指标的观察, 以探讨其治疗作用机理。

Experimental Study on the Immunosuppressive Effects of Gui Zhi Tang(桂枝汤)

Lü Xiufeng(吕秀凤), et al

Beijing Medical University, Beijing

In this paper the immunosuppressive effects of Gui Zhi Tang (a famous Chinese medicine) on the murine immune functions are reported. Varying dosages of Gui Zhi Tang administrated orally, i.p. and i.m. were able to inhibit the amounts of PFC, SRFC and the DTH response induced by BSA and the proliferation response of murine spleen cells to Con A and LPS. Further studies showed that Gui Zhi Tang had the inhibitory effect on Interleukin-2 production of murine spleen cells, which might be one of the mechanisms leading to the immunosuppressive effects of Gui Zhi Tang.

(Original article on page 283)

Experimental Study of Qi(气)Deficiency Syndrome and *Codonopsis pillosulae* and *Astragalus* Injection on Immune Response of Mice

Zhou Yong(周 勇), Yan Xuanzuo(严宣佐), et al

Dept. of Immunology, Beijing College of TCM, Beijing

According to TCM theory "hunger impairs one's Qi(气)", the authors had made mouse model of Qi deficiency syndrome (QDS) through controlling amount of food fed. Compared with mice of normal group, the body weight, thymus index and spleen index obviously decreased in mice of QDS group. The similar effects on humoral immunity and cell-mediated immunity were also obtained. It was found that the *Codonopsis pilosulae* and *Astragalus* Injection (CPAI) possessed the promoting action of thymus index, spleen index, humoral immunity and cell mediated immunity on QDS mice and normal mice except spleen index. However, QDS mice were more sensitive to CPAI than the normal mice. 4×10^9 SRBC/mouse was administered to normal donor mice by i. p., the super-optimal immunization could obviously induce generation of Ts cells. The CPAI could also reduce generation of Ts cells. This paper had proved that the inherent relation between Qi and immune response of organism, and that the CPAI could promote immune response by means of reducing Ts cells.

(Original article on page 286)

Effect of Yin Zhi Huang(茵栀黄)on Bilirubin Excretion in Animals with Unconjugated Hyperbilirubinemia

Yin Jie(殷 杰), Richard Wennberg*, et al

Hunan Medical University, Changsha

*California University, Davis, U.S.A

Yin Zhi Huang (YZH) given stomach perfusion daily for three days in rabbits accelerated plasma clearance of infused unconjugated bilirubin. A similar but less dramatic effect could be obtained by using YZH or phenobarbital i. p. daily for three days in rats employing simultaneously with the method of bile duct ligation, plasma indirect bilirubin levels was lower but hepatic bilirubin content and plasma direct bilirubin levels were higher in both YZH and phenobarbital treated rats than those in the control animals. These observations suggested that YZH and phenobarbital shared a common mechanism of acting in lowering the indirect bilirubin levels of serum.

(Original article on page 289)