

四君子汤对小鼠巨噬细胞细胞毒功能的影响

皖南医学院微生物学教研室(安徽 241001) 奚 骏 吴敏毓

内容提要 采用 ^{51}Cr 、 ^{125}I -UdR 释放法, 检测四君子汤对正常和免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞介导的肿瘤细胞溶解作用和抗体依赖细胞介导的细胞毒作用的影响。结果发现: 四君子汤0.4ml/20mg每天1次连续灌胃7天, 对正常小鼠腹腔巨噬细胞介导的细胞毒活性并无明显提高。给小鼠腹腔单独注射环磷酰胺(Cy, 100mg/kg)后, 腹腔巨噬细胞介导的细胞毒活性均显著降低。当加用四君子汤处理小鼠后, 上述两种细胞毒活性比单用Cy组明显提高, 增强率分别为74.40%和121.03%。表明四君子汤能拮抗Cy对小鼠腹腔巨噬细胞介导的细胞毒活性的抑制作用, 而对正常小鼠影响不明显。提示四君子汤对小鼠的免疫调理作用与机体的免疫状态有关。

关键词 四君子汤 环磷酰胺 巨噬细胞介导 肿瘤细胞溶解 细胞毒性, 免疫

四君子汤(SJZT)是补气健脾的代表方, 广泛应用于各种气虚证, 取得满意效果^①。近年来国内学者在对其药理作用研究的同时, 也注重该方对机体免疫功能的影响。已有报道四君子汤能提高机体的免疫功能, 促进巨噬细胞吞噬和淋巴细胞的转化^②, 且能抗突变和抗肿瘤生长等作用^③。但对机体的免疫细胞细胞毒功能有何影响, 报道不多。本实验以小鼠腹腔巨噬细胞介导的肿瘤细胞溶解作用(MTC)和抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)为指标, 观察四君子汤及环磷酰胺(Cy)对巨噬细胞毒活性的影响, 以便进一步研究该方药的免疫药理作用, 探讨四君子汤抗肿瘤作用的可能机理。

材料和方法

一、材料

1. 动物: 健康昆明种小鼠, 6~12周龄, 雌雄兼用。由本院动物科提供。

2. 药品试剂: (1)完全营养液(CM): 含10%灭活的新生小牛血清RPM1640营养液, 加入HEPES和谷氨酰胺各2mmol/L和青链霉素各100u/ml。(2)四君子汤: 党参、白术、茯苓、炙甘草(比例为2:2:2:1)均购于芜湖张恒春药店。按常规煎制, 水浴浓缩为100%(g/ml), 置冰箱备用。(3)Cy: 上海第十二制药厂生产。(4)5- ^{125}I -2'-脱氧尿嘧啶核苷(^{125}I -UdR)、铬酸钠- ^{51}Cr ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$): 放射性浓度分别为268~334 $\mu\text{Ci/ml}$ 和10.6~13.6 $\mu\text{Ci/ml}$ 。均购于北京原子能研究院同位素研究所。(5)5-氟脱氧尿嘧啶核苷(5-FUdR): 生理盐水(NS)配成 10^{-3}mol/L 。

(6)巯基乙醇酸盐(TG): 卫生部北京生物制品研究所。(7)免抗鸡红细胞血清, 本实验室自制。凝集效价1:1024, ADCC效价1:2400。

3. 靶细胞: (1)YAC-1细胞株, 引自第二军医大学。在CM中悬浮生长。(2)鸡红细胞(CRBC), 取自来亨鸡翅静脉血, 生理盐水洗两次, PBS悬浮, 即刻标记。

二、方法

1. 实验分组: 生理盐水(NS)对照组, 每天每只小鼠0.4ml生理盐水连续灌胃7天; Cy组, 生理盐水用法同上, 且第4天腹腔1次性注射Cy(100mg/kg); 四君子汤组, 四君子汤每只0.4ml/天(相当于生药1g/ml), 连续灌胃7天; Cy加四君子汤组, Cy和四君子汤用法同上^④。

2. 腹腔巨噬细胞的制备: 参见文献^⑤。

3. 靶细胞标记: YAC-1细胞标记, 参见文献^⑥; CRBC标记, 参见文献^⑦。

4. 小鼠腹腔巨噬细胞介导的MTC活性测定: 参见文献^⑧。效靶比例为20:1。

5. 小鼠腹腔巨噬细胞介导的ADCC活性测定: 参见文献^⑨加以改进。把标记的 ^{51}Cr ·CRBC与抗血清在室温下共育30min, 加入贴有巨噬细胞的孔中。自然释放组和最大释放组直接加入 ^{51}Cr ·CRBC, 不加抗血清和巨噬细胞。效靶比例为1:1, 余同MTC活性测定。

6. 每个实验重复5~6次, 结果再按下式计算, 用t检验处理。

细胞毒活性(cpm%) =

$$\frac{\text{实验释放cpm} - \text{自然释放cpm}}{\text{最大释放cpm} - \text{自然释放cpm}} \times 100\%$$

$$\text{增强率(En\%)} = \frac{\text{实验组Cyt\%} - \text{对照组Cyt\%}}{\text{对照组Cyt\%}} \times 100\%$$

结 果

一、四君子汤对小鼠腹腔巨噬细胞介导的 MTC 活性的影响, 见附表。

附表 四君子汤对小鼠腹腔巨噬细胞介导的 MTC、ADCC 活性的影响

组 别	n	MTC 活性 (%, $\bar{x} \pm S\bar{x}$)	增强率 (%)	n	ADCC 活性 (%, $\bar{x} \pm S\bar{x}$)	增强率 (%)
NS	15	12.86 ± 1.27	—	12	22.11 ± 3.44	—
Cy	14	5.82 ± 0.93	-54.74	12	7.56 ± 1.32	-65.81
SJZT	17	16.83 ± 1.89	12.86	14	27.53 ± 2.88	22.51
SJZT+Cy	14	10.15 ± 1.53	74.40	12	16.71 ± 2.29	121.03

注: n为动物数, 与Cy比* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$

四君子汤组活性虽然高于生理盐水组, 但两者无明显差异, $P > 0.05$ 。而Cy组的活性明显低于NS对照组, $P < 0.002$; 当加用四君子汤后, 活性显著升高, 与单用Cy组相比, 差异有显著性意义, $P < 0.05$, 增强率达74.40%。结果表明, 四君子汤能拮抗Cy对小鼠腹腔巨噬细胞介导的MTC活性的抑制作用, 而对免疫功能正常的小鼠影响不大。

二、四君子汤对小鼠腹腔巨噬细胞介导的 ADCC 活性的影响, 见附表。

四君子汤组的 ADCC 活性最高, 但与生理盐水组相比差异无显著性意义。而Cy组 ADCC 活性最低, 与NS组相比差异有非常显著性意义, $P < 0.002$; 加用四君子汤后与Cy组相比, ADCC 活性升高非常显著, $P < 0.005$, 已趋于正常, 而增强率已达121.03%。从本实验结果来看, 四君子汤对小鼠腹腔巨噬细胞介导的MTC和ADCC活性的影响有类似效应, 所不同的是在免疫抑制状态下ADCC的敏感性要高于MTC。

讨 论

四君子汤对小鼠腹腔巨噬细胞介导的 ADCC 和 MTC 细胞毒活性有提高趋势, 特别是对使用Cy后, 使

免疫功能受抑制小鼠的细胞毒活性显著增强, 从附表增强率一栏便可证明。笔者认为, 四君子汤作为扶正祛邪的主要辅助治疗剂来调整肿瘤患者的免疫功能, 以利机体主动杀伤其手术后残留的瘤细胞, 起到“祛邪不伤正”之效。本实验结果为此提供了实验佐证。但患肿瘤机体的细胞免疫功能降低, 与Cy对正常机体造成免疫抑制状态下的巨噬细胞毒活性下降, 情况不完全一样。为密切配合临床现象, 我们将继续研究四君子汤对荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞毒活性的影响。

本实验结果还表明, 以“虚则补之, 损则益之”为原则所组成的四君子汤, 对正常小鼠腹腔巨噬细胞毒功能影响不明显, 虽有增强作用, 但差异无统计学意义。按中医观点, 正常机体处于阴阳平衡状态, 既不虚也不衰, 故无需补益之。

Cy是抗肿瘤药物, 也可经多种途径抑制免疫细胞功能。在一次性大剂量注射后, 小鼠腹腔巨噬细胞毒活性显著低于正常生理盐水对照组。这种状况类似中医理论中的“邪之所凑, 其气必虚”的征象, 此时用四君子汤加以纠正, 符合“辨证施治”观点。实验结果也说明, Cy加四君子汤组比Cy组细胞毒活性显著提高, 增强率分别为74.40%(MTC)和121.03%(ADCC)。可见四君子汤具有免疫调节作用, 即对免疫抑制小鼠的细胞毒功能有积极增强作用。至于该方剂通过何种途径影响小鼠腹腔巨噬细胞细胞毒功能及有关影响因素尚待进一步探讨。

参 考 文 献

1. 杨秀伟, 免疫调节作用方药的研究. 中成药研究 1985; 10:33.
2. 姜廷良, 等. 我国抗癌中草药研究现状和展望. 中西医结合杂志 1986; 6(11):698.
3. 季宇彬. 补中益气汤和四君子汤抗突变及抗肿瘤作用的实验研究. 中成药研究 1985; 12:27.
4. 李炳如, 等. 补肾补脾中药对大鼠甲状腺肾上腺切除后卵巢功能减退的补偿治疗作用. 中西医结合杂志 1984; 4(4):227.
5. 董钟云, 等. 巨噬细胞细胞毒功能的调变. 中国免疫学杂志 1985; 2(6):321.
6. 于永利, 等. 人参花总皂甙在体外对小鼠NK活性的影响. 中国免疫学杂志 1985; 1(2):28.
7. 翁惠如. K细胞的检测. 临床免疫学检验, 上册. 上海: 上海科学技术出版社, 1983:107.

pulses based on TCM, the CP-A curve may be taken as an objective index for differentiating these four types of pulse. Besides, after the study of CP-A curve in Floating, Sunken and normal (neither floating nor sunken) pulses, a preliminary criterion of CP was proposed as follows: shallow (floating) at 5~10 kPa, deep (sunken) at 20~25 kPa, and medium at about 15 kPa.

(Original article on page 603)

Observation of Tongue Tip Microcirculation on Patients by Syndrome-Differentiation

Qin Ji-hua(秦吉华), Liu Bin(刘斌), et al

Shandong College of TCM, Jinan (250014)

Observations of tongue tip microcirculation were made on 104 patients with different symptom-complex [5 groups: Yin(阴)deficiency, Yang(阳)deficiency, Qi(气)-blood deficiency, Qi stagnation-blood stasis, damp-heat] in view of TCM, and on 100 healthy persons. 10 indicators including the transverse diameter of the fungiform papillae, morphology of microvascular clumps in the tongue papillae, congestion of the top of microvascular loop, loop dilation, blood color, hemodynamics in microvascular loop, exudation, hemorrhage and loop morphology were observed. The results were: patients of each group were found to have to different degree microcirculation dysfunction; every group differed with Qi stagnation-blood stasis group of being most different. The numbers of abnormal indicators: Qi stagnation-blood stasis group had all 10; Yang deficiency group 9; Yin deficiency and Qi-blood deficiency group 8, 8 respectively; damp-heat group 7. This study discussed the relationship between tongue tip microcirculation of each group and the changes of tongue picture and typing of differentiation of symptoms and signs in view of TCM.

(Original article on page 606)

Protective Action of *Salvia miltiorrhiza* Aqueous Extract on Chemically Induced Acute Myocardial Ischemia in Rats

Cheng Yeuk-yuen(郑若玄), Fong Sam-man(方三曼), Chang Hson-mou(张雄谋), et al

Chinese Medicinal Material Research Centre, The Chinese University of Hong Kong

Aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* (SM-H) can protect the acute myocardial ischemia and arrhythmia of Sprague-Dawley rats induced by isoproterenol (ISO) or BaCl₂ with the following results: (1) intraperitoneal injection (i.p.) of SM-H for 3 to 5 days or intravenously (i.v.) just once significantly reduced the death rate of the animals, (2) i.v. SM-H pretreatment significantly increased the lethal dose of BaCl₂ infusion, (3) i.p. SM-H significantly decreased premature ventricular contraction, ventricular fibrillation, bradycardia and mortality rate induced by bolus i.v. of BaCl₂, and (4) i.p. SM-H also significantly reduced ECG J-point displacement of rats induced by ISO.

(Original article on page 609)

The Effect of Si Jun Zi Tang(四君子汤) on the Macrophage Cytotoxic Activity in Mice

Dou Jun(窦俊), Wu Min-yu(吴敏毓)

Dept. of Microbiology, Wannan Medical College, Wuhu (241001)

The effect of Si Jun Zi Tang (SJZT) on the activities of peritoneal macrophage (M ϕ) mediated MTC and ADCC in normal and immunosuppressed mice were examined by isotope releasing assay (⁵¹Cr, ¹²⁵I-UdR). The results showed the SJZT no significantly increased peritoneal M ϕ -mediated cytotoxic activity (MTC, ADCC) in normal mice. After the injection of immuno-depressive cyclophosphamide (Cy) alone (ip), the cytotoxic activities were decreased, but by treatment with Cy and SJZT, the cytotoxic activities were significantly increased compared with Cy group, the enhancing rates amounted to 74.40% (M ϕ -MTC) and 121.03% (M ϕ -ADCC) respectively. It was demonstrated that the SJZT could protest against the effect that the Cy inhibited the activities of MTC and ADCC of peritoneal M ϕ in mice, but there was no significant effect on normal mice. It indicated that the function of SJZT's immunoregulation was related to the state of immune in body.

(Original article on page 612)