

• 实验研究 •

健脾金丹对正常小鼠及环磷酰胺所致
免疫受抑小鼠免疫功能的增强作用*

樊永平 聂惠民 周 勇 严宣左
北京中医学院(北京 100029) 王庆国 傅延龄 陶君悌 张 庆

内容提要 本实验对治疗小儿疳病良方健脾金丹的免疫调节作用进行初步研究,结果表明:本方对正常小鼠的血清溶菌酶含量,腹腔巨噬细胞吞噬能力,脾 T、B 细胞增殖,腹腔巨噬细胞产生白介素-1(IL-1)和脾 T 细胞产生白介素-2(IL-2)的能力均有显著的增强作用(有统计学意义),并对环磷酰胺(Cy)所致免疫受抑小鼠的上述指标及体重、胸腺指数和脾指数均有显著的恢复作用(有统计学意义)。说明本方有免疫增强作用,在组方上肝脾同调,符合小儿“脾常不足”、“肝常有余”的生理病理特点,因而有广阔的应用前景。

关键词 健脾金丹 胸腺指数 脾指数 淋巴细胞 血清溶菌酶 腹腔巨噬细胞 白介素

健脾金丹亦名四理汤,源于《伤寒论》的四逆散与理中丸,由聂惠民教授拟定。它通过健脾理肝,增进食欲,达到增强体质,减少易感次数的目的,临床上治疗以脾虚为核心的小儿“疳”病类证(以厌食、疳气为主)有良效。本实验借助正常小鼠、环磷酰胺(Cy)所致免疫受抑小鼠,对健脾金丹的免疫调节作用作了初步研究。

实验材料

一、动物 NIH 小鼠,雌性,鼠龄 5~8 周,体重 18~22g,由中国中医研究院动物室提供。

二、药物 健脾金丹主要由党参、白术、柴胡、枳实、白芍、甘草、五味子等 12 味药组成,从我院门诊部购置,经我院药系鉴定室鉴定。

三、试剂 RPMI 1640 培养液(GIBCO,美国),完全培养液内含 L-谷氨酰胺 2mM。青霉素 100u/ml,链霉素 100μg/ml;10%胎牛血清(FBS)。刀豆蛋白(ConA)和脂多糖(LPS)均为美国 Sigma 公司产品。³H-TdR 是北京原子能研究所产品。

实验方法

一、药物制备 药物用自来水浸泡 1h 后,文火煎

20min,倒出药汁,共煎 3 次,将药汁合并,纱布过滤,100℃水浴浓缩至 200%的药液,低温保存。

二、用药剂量 按小鼠日用量为小儿日用量的 15~20 倍换算,小鼠日用量为 0.6~0.8g/20g,即 0.3~0.4ml/20g,在预实验的基础上确立 0.4ml/20g 为合适日用量。

三、分组 小鼠随机分成 4 组,每组 8 只,正常对照组与 Cy 组每天喂饲生理盐水 0.4ml/20g,健脾金丹组与 Cy+健脾金丹组每天喂饲健脾金丹煎液 0.4ml/20g,连续 10 天。其中 Cy 组与 Cy+健脾金丹组在实验第 3、7 天腹腔注射 Cy,每次 75mg/kg。

四、血清溶菌酶样品制备与测定 实验第 11 天小鼠摘除眼球采血,待血凝后离心 2000r/min,共 10min。取血清分装在冻存管中,冰箱保存。按文献^[1]方法,以微球菌为底物制成含菌琼脂板,打孔,孔径为 2.5mm,孔中加入标准溶菌酶或血清样品 25μl,37℃饱和湿度条件下放置 24h,测溶菌圈直径,绘制标准曲线,求出各血清样品溶菌酶的含量。

五、腹腔巨噬细胞制备与吞噬实验

1. 制备 小鼠于取腹腔巨噬细胞前 5 天腹腔注射 10%硫乙醇酸盐培养基 1ml/20g,按常规取腹腔液收集巨噬细胞,用 Hank's 液洗 2 次,用完全 1640 培养液将细胞浓度调成 2×10^6 /ml。

2. 吞噬实验 参照文献^[2]稍加改进,将 2×10^6 /

* 本课题由国家教委博士点基金资助

ml 巨噬细胞加入 96 孔培养板, 100 μ l/孔, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱贴壁 2~4h, 用不加酚红灭菌的 Hank's 液洗 2 次(移去未贴壁细胞), 孔底即为单层巨噬细胞, 加入无菌生理盐水, 200 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 放置 30min, 洗 3 次, 加细胞溶解液, 200 μ l/孔, 置冰箱过夜, 用酶标仪测 OD 值(波长 492nm)。

六、脾 T、B 细胞增殖实验 小鼠眼球放血处死, 按常规制备脾细胞, 用不加胎牛血清 1640 培养液洗涤 1 次, 再用完全 1640 培养液将脾细胞配成 5×10^6 /ml 悬液。作 T 细胞增殖实验加刀豆蛋白 A(ConA), 终浓度 5 μ g/ml; 作 B 细胞增殖实验加 LPS, 终浓度 50 μ g/ml。脾细胞分别加到 96 孔培养板上, 100 μ l/孔, 并补充完全 1640 培养液, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 72h, 在收集细胞前 6~8h 加 ³H-TdR, 0.5 μ Ci/孔, 用液体闪烁计数仪测定 cpm 值。

七、白介素-1(IL-1)的诱生和测定 (1)诱生: 将 5×10^6 /ml 腹腔巨噬细胞悬液加入 24 孔培养板, 1ml/孔, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱贴壁 2h, 用 Hank's 液洗去不贴壁细胞, 补充完全 1640 培养液 1ml/孔、LPS 10 μ g/孔, 培养 24h, 离心 2500r/min, 共 10min, 收集 IL-1 粗制上清。(2)测定: 用体重为 18~20g 的 C₅₇BL/6 雄性小鼠, 制备 1×10^7 /ml 胸腺细胞悬液, 加 ConA, 终浓度 1.5 μ g/ml, 将此细胞悬液与不同稀释度的粗制 IL-1 上清各 100 μ l 加入 96 孔培养板, 每个稀释度 3 个复孔, 同时作完全 1640 培养液对照, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 72h, 收集细胞前 6~8h 加 ³H-TdR

0.5 μ Ci/孔, 用液体闪烁计数仪测定 cpm 值。

八、白介素-2(IL-2)的诱生和测定 (1)诱生: 将 5×10^6 /ml 的脾细胞悬液加入 24 孔培养板, 1ml/孔, 加 ConA 5 μ g/孔, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 48h, 离心 2500r/min, 共 10min, 收集 IL-2 粗制上清。(2)测定: 用体重 18~20g C₅₇BL/6 雄性小鼠, 制备 5×10^6 /ml 胸腺细胞悬液, 加 ConA, 终浓度 5 μ g/ml, 混匀, 加入 96 孔培养板, 100 μ l/孔, 并加入不同稀释度的 IL-2 粗制上清 100 μ l/孔, 每个稀释度 3 个复孔, 同时作完全 1640 培养液对照, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 72h, 收集细胞前 6~8h 加 ³H-TdR, 0.5 μ Ci/孔, 液体闪烁计数仪测定 cpm 值。

结 果

一、体重、胸腺指数和脾指数 健脾金丹对正常小鼠的体重、胸腺指数无显著影响, 对脾指数有明显的提高作用, 对 Cy 所致免疫受抑小鼠的体重、胸腺指数、脾指数均有显著的恢复作用, 见表 1。

二、血清溶菌酶含量 健脾金丹能显著提高正常小鼠、Cy 所致免疫受抑小鼠血清溶菌酶含量, 见表 1。

三、腹腔巨噬细胞吞噬功能 健脾金丹能显著提高正常小鼠、Cy 所致免疫受抑小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力, 见表 1。

四、脾 T、B 细胞增殖 健脾金丹显著促进正常小鼠脾 T、B 细胞增殖, 使 Cy 所致免疫受抑小鼠脾 T、B 细胞增殖能力也有明显恢复, 见表 1。

表 1 健脾金丹对小鼠体重、胸腺指数、脾指数、血清溶菌酶、腹腔巨噬细胞吞噬功能及脾 T、B 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	动物数 (n)	体重 (g)	胸腺指数	脾指数	溶菌酶含量 (μ g/ml)	巨噬细胞 吞噬 OD 值	³ H-TdR 掺入 DNA 的 cpm 值	
			(mg/g)				T 细胞	B 细胞
对照	8	20.60 ± 1.27	3.09 ± 0.44	4.80 ± 0.73	157.86 ± 6.35	0.223 ± 0.031	39008.01 ± 3639.89	8892.58 ± 847.50
健脾金丹	8	19.85 ± 1.29	3.17 ± 0.42	5.46 $\pm 0.27^{\Delta}$	381.10 $\pm 17.41^{\Delta\Delta\Delta}$	0.429 $\pm 0.019^{\Delta\Delta\Delta}$	64154.45 $\pm 2229.31^{\Delta\Delta\Delta}$	12132.51 $\pm 1284.66^{\Delta\Delta\Delta}$
Cy	8	16.69 $\pm 1.87^{\Delta\Delta\Delta}$	1.63 $\pm 0.38^{\Delta\Delta\Delta}$	3.35 $\pm 0.71^{\Delta\Delta}$	137.00 $\pm 8.66^{\Delta\Delta\Delta}$	0.158 $\pm 0.009^{\Delta\Delta\Delta}$	6200.55 $\pm 1114.70^{\Delta\Delta\Delta}$	719.25 $\pm 129.52^{\Delta\Delta\Delta}$
Cy+健脾金丹	8	18.87 $\pm 0.73^*$	2.67 $\pm 0.62^{**}$	4.24 $\pm 0.48^{**}$	364.75 $\pm 26.42^{***}$	0.358 $\pm 0.004^{***}$	19475.70 $\pm 2279.58^{***}$	1433.45 $\pm 118.90^{***}$

注: 与对照组比, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$, $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.001$; 与 Cy 组比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。下表同

五、IL-1 测定 从表 2 看出, 健脾金丹能显著增强正常小鼠、Cy 所致免疫受抑小鼠腹腔巨噬细胞产生 IL-1 的能力, 在各种稀释度下, 增强作用都很显著。

六、IL-2 测定 从表 2 看出, 健脾金丹能增强正常小鼠和 Cy 所致免疫受抑小鼠脾 T 细胞产生 IL-2 的能力, 在 1:4、1:8 稀释度时, 有显著性意义。

表2 健脾金丹对小鼠腹腔巨噬细胞产生 IL-1 及脾 T 细胞产生 IL-2 能力的影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	$^3\text{H-TdR}$ 掺入 DNA 的 cpm 值							
	IL-1				IL-2			
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:4	1:8	1:16	1:32
对照	11649.3 ± 272.7	14612.1 ± 308.5	24271.3 ± 3075.0	16788.3 ± 832.9	5735.2 ± 486.2	2722.1 ± 84.5	2164.7 ± 270.8	2088.3 ± 458.1
健脾金丹	72082.6 ± 2462.1 ▲▲▲	49723.1 ± 3663.4 ▲▲	38250.3 ± 1270.3 ▲▲	31877.5 ± 3828.7 ▲▲	10128.4 ± 341.0 ▲▲▲	6156.3 ± 676.2 ▲▲	2425.3 ± 497.8	1504.3 ± 342.0
Cy	4862.0 ± 439.9 ▲▲▲	8431.3 ± 367.8 ▲▲▲	11859.7 ± 619.4 ▲▲	5913.7 ± 367.6 ▲▲▲	2007.3 ± 59.2 ▲▲▲	1223.7 ± 297.2 ▲▲	1220.3 ± 129.8	1108.3 ± 127.8
Cy+健脾金丹	68407.7 ± 673.4 ***	46050.7 ± 732.1 ***	35323.5 ± 1828.3 ***	27905.0 ± 2452.4 ***	4348.4 ± 788.2 **	2347.3 ± 384.4 *	1366.7 ± 240.2	1258.7 ± 196.7

讨 论

体重一般可反映机体体质的强弱,是“疳”病类证的诊断标准之一^[3];胸腺与脾是体内重要的免疫器官,胸腺指数与脾指数直观地反映了机体免疫功能的强弱,健脾金丹通过拮抗 Cy 的免疫抑制作用,使 Cy 所致免疫受抑小鼠的体重、胸腺指数和脾指数有了显著的恢复。巨噬细胞是一种多功能的免疫细胞,在抗原或多种非特异性因子的刺激下释放 IL-1,据报道,益气助阳药可增强小鼠腹腔巨噬细胞膜受体(Fc-R、C_{3b}-R)的活性^[4],健脾金丹活化巨噬细胞以及促进 IL-1 产生的内在机理可能与此有关;IL-1 促进 T 细胞产生 IL-2,IL-2 又有助于 T、B 细胞的增殖,从而发挥广泛的细胞免疫和体液免疫的作用。

中医学强调正气在人体发病中的决定作用,《素问》云“正气存内,邪不可干”。正气受于先天,更充于后天脾胃,因而脾胃的强弱主宰着正气的盛衰。实践证明,脾虚患者细胞免疫功能低下^[5],而健脾益气方如黄芪建中汤、补中益气汤等均具有显著的免疫促进作用^[6]。健脾金丹在健脾益气的同时,佐四逆散疏肝理气,木土同调,取《血证论》“食气入胃,全赖肝木之气以疏泄之,而水谷乃化”之意,符合小儿“脾常不足”、“肝常有余”的特点,是一特色。临床上“疳”病类证患儿面色萎黄、体瘦羸弱,极易外感,服本方后纳谷渐香,面色转佳,身高增长,体重增加,外感次数明显减少,充分证明本方调肝脾、增纳运、益正气的组方思想是切合实际的。

现代免疫药理的研究证实:柴胡能抑制白细胞移动、促进抗体形成^[7],白芍抗菌作用强、抗菌谱广,可拮

抗 Cy 而恢复处于低下状态的细胞免疫功能^[8],白术增强荷瘤体特异性主动免疫,五味子促进人体全血的体外培养^[9],白芍、党参明显增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活性^[7,8],甘草能增强应激状态小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能^[9]等等。由此可见,健脾金丹的免疫增强作用是组方中诸药协同作用的结果。

(本文承中日友好医院刘干中教授审阅,在实验过程中还得到张丽、王利、葛东宇的帮助,谨谢)

参 考 文 献

1. 王晓京,等.几种阿片肽及 ACTH 对小鼠腹腔巨噬细胞功能的作用.中国免疫学杂志 1987;3(4):211.
2. 张宜霞.关于单核-巨噬细胞系统的吞噬作用和其溶菌酶水平在抗感染中的意义的研究.中华微生物和免疫学杂志 1984;4(2):77.
3. 顾可钦.中药和含锌糖浆治疗疳症的临床观察.中医杂志 1989;30(4):224.
4. 骆保,等.益气助阳药与养血滋阴方药对正常小鼠腹腔巨噬细胞 Fc、C_{3b}受体的作用.中西医结合杂志 1989;9(4):228.
5. 许长照.脾虚证免疫状态的研究——61 例分析.南京中医学院学报 1984;(4):38.
6. 杨承进,等.黄芪建中汤、补中益气汤对脾虚证免疫功能影响的临床观察.上海中医药杂志 1983;(2):28.
7. 马振亚.中药方剂免疫药理研究.第 1 版.西安:陕西科技出版社,1986:155—170.
8. 梁昱若,等.白芍药抗炎免疫药理作用研究.新中医 1989;(3):51.
9. 孙泽先,等.甘草水煎剂对应激状态下小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响.中西医结合杂志 1982;2(4):235.

· 简 讯 ·

湖北省中西医结合学会皮肤性病专业委员会第二届学术会议于 1992 年 11 月 11~13 日在武汉市召开。大会回顾了第一届会议以来所取得的成绩,并对今后的中西医结合工作提出了具体的意见和要求。会议期间共交流学术论文 121 篇,其数量之多、内容之丰富均

超过了上届会议。其中有基础理论研究、实验新成果和临床经验总结,显示省中西医结合皮肤病学成就斐然。大会还选举产生了新一届专业委员会,孙曾拯教授为主任委员,曾昭明教授为副主任委员,高进副主任医师任委员会秘书。
(孙谷彬)

Enhancing Effect of Jian Pi Jin Dan (健脾金丹) on Immune Functions of Normal and Cyclophosphamide Induced Immunosuppressed Mice

Fan Yong-ping (樊永平), et al

Beijing College of TCM, Beijing (100029)

By means of normal and cyclophosphamide (CY) injected NIH mice, the effect of Jian Pi Jin Dan on immuno-modulation was studied which could treat the "Gan (痞)" disease effectively in TCM. Results: Markedly improved the level of serum lysozyme, enhance the phagocytosis of abdominal macrophage. The proliferation of spleen T, B cells, the production of interleukin-1 (IL-1) by macrophage and of interleukin-2 (IL-2) by T cells in normal and CY injected mice were also enhanced. Furthermore, it was able to restore the weight, spleen and thymus index of CY injected mice. This prescription can not only reinforce Spleen, but also regulate Liver, complying to the children's physiological and pathological characteristics.

Key words Jian Pi Jin Dan, spleen index, thymus index, lymphocyte, serum lysozyme, interleukin
(Original article on page 223)

Comparison of Anti-inflammatory, Analgesic Activities, Anaphylactogenicity and Acute Toxicity between Bee Venom and Its Peptides

Chen Chen-yong (陈郴永), Chen Wei-xin (陈维辛), Sun Xin (孙欣)

Nanjing Institute of Biochemical Pharmacy, Nanjing (210015)

Bee venom 1.0-2.0mg/kg and bee venom peptides 1.0-2.0mg/kg inhibited several inflammatory processes, such as ear swelling induced by xylene in mice, edema produced by injecting 1% carrageenin 0.1ml beneath the plantar surface of hind paw in rats and showed a marked analgesic action induced by the hot plate and potassium antimony tartrate. Bee venom peptides had a markedly more effective action as compared with bee venom itself. The anaphylactogenicity of bee venom peptides was apparently milder than that of bee venom. The LD₅₀ of bee venom ip in mice and bee venom peptides was 7.4mg/kg and 7.9mg/kg respectively.

Key words bee venom, bee venom peptides, anti-inflammatory agents, anaphylactogenicity, carrageenin, analgesic

(Original article on page 226)

Effect of Ligustrazine on Isolated Myocardial Ischemic Reperfusion Injury in Rats

Fu Chun-jing (傅春景), Zhao Gen-shang (赵根尚), Zhang Jian-fang (张建芳), et al

Dept. of Pathophysiology, Henan Medical University, Zhengzhou (450052)

In recent years, it is believed by some scholars that the injury of myocardial ischemic reperfusion is correlated to the thromboxane A₂ (TXA₂) released by platelets. In order to explore that whether the myocardial and hemangio-endothelial cells participate in the TXA₂ production during the process of reperfusion, the modified Langendorff method was used to establish the model of reperfusing the isolated rat heart. On the other hand, this experiment was also intended to observe the effect of ligustrazine on the injury of myocardial ischemic reperfusion. The results revealed that the level of thromboxane B₂ (metabolite of TXA₂) and lactic dehydrogenase (LDH) in coronary sinus reflux fluid increased during the process of reperfusion, while the level of 6-keto-PGF₁α in the same fluid relatively decreased ($P < 0.05$). The ratio of TXB₂/6-keto-PGF₁α was raised. The ligustrazine inhibited the release of TXB₂ and LDH, but promoted the production of 6-keto-PGF₁α ($P < 0.05$). The results also proved that the myocardial and hemangio-endothelial cells could synthesize TXA₂, and the amount of TXA₂ released increased during the reperfusion of ischemic myocardium, which was likely to be the major factor of the injury of ischemic myocardial reperfusion. Ligustrazine plays an important role in protecting the myocardium.

Key words ligustrazine, myocardium, reperfusion injury, thromboxane B₂

(Original article on page 228)