

人工风寒环境对小鼠单核巨噬细胞系统吞噬功能的影响

深圳市红十字会医院中西医结合临床研究所(深圳 518029) 陈 新

广州中医学院(广州 510407) 区永欣 陈洁文

内容提要 我们将小鼠置于人工风寒环境中刺激 10 h 后, 观察到其网状内皮系统 (RES) 廓清功能及 ϕ 腹腔巨噬细胞 ϕ (PM ϕ) 释放 H_2O_2 量均受到明显抑制, 动力学观察结果表明, 免疫抑制高峰发生在风寒刺激后第 3 天, 刺激后第 5 天、第 7 天逐渐恢复正常, 表现出一过性免疫抑制。免疫抑制的原因可能是风寒刺激过程中应激激素大量分泌所致。提示中医六气病因学说中的风寒二气, 其致病的作用机理可能与抑制机体非特异性细胞免疫功能有关, 该结论可与《内经》的“邪之所凑, 其气必虚”发病理论相印证。

关键词 风寒 巨噬细胞 网状内皮系统 吞噬功能

风寒二气是中医六气病因中最为常见的气象性致病因素, 然而其致病作用至今仍不甚明了。为此, 我们动态观察了亚急性人工风寒环境的刺激对小鼠单核巨噬细胞系统免疫功能的影响, 以期探讨风寒二气的致病机理。

材料和方法

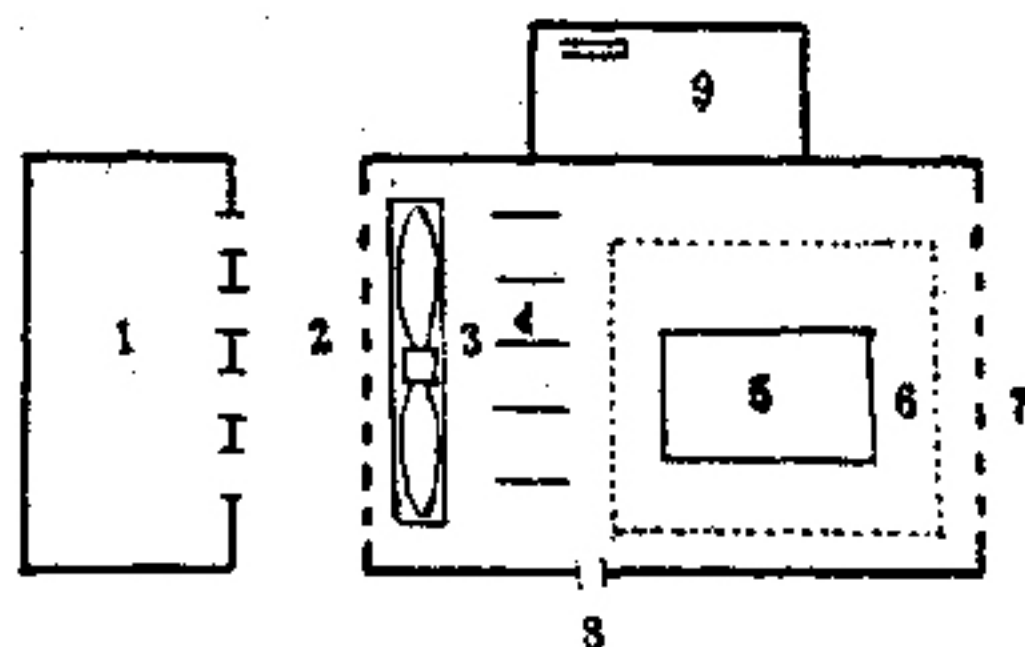
一、实验动物 NIH 小鼠, 雄性, 25~30 g [网状内皮系统 (RES) 廓清实验用] 和 18~22 g [腹腔巨噬细胞 (PM ϕ) 释放过氧化氢 (H_2O_2) 实验用], 均由广东省医用动物场提供, 购回后分笼喂养, 一周后用于实验。喂养环境温度 $25 \pm 3^\circ C$ 。小鼠随机分为 5 组, 其中设正常对照组, 不受风寒刺激, 其余 4 组分别于处死动物前 1 天、3 天、5 天、7 天置于风寒刺激箱内, 每天刺激 1 组, 每组刺激 10 h, 中间停止刺激 1 h, 以便动物摄取水食。

二、主要试剂 Indian Ink (印度墨水) 为德国 Chroma 牌, 用前以生理盐水按 1:4 比例稀释。酵母菌为广东东莞糖厂产品。辣根过氧化物酶 (HRPO) 为日本 Toyobo 公司产品。酚红为英国 BOH 化学公司产品。

三、实验方法

1. 风寒刺激方法 为了获得风寒刺激条件, 我们设计制作了风寒刺激箱, 其结构见图 1。箱内用空调机、冰块控制温度, 电扇控制风力。箱内工作指标: 温度 $10 \pm 3^\circ C$, 风速 2.5 m/s。

2. RES 廓清 Indian Ink 功能测定 参照有关文



附图 风寒刺激箱示意图

1. 空调 2. 进风口 3. 电扇 4. 冰格 5. 观察窗
6. 动物笼 7. 出风口 8. 排水孔 9. 温度指示仪

献^①加以改进。

3. 酵母菌的处理及血清调理 参照朱云凤^②方法。酵母菌终浓度以生理盐水调整为 $7 \times 10^7/\text{ml}$ 。

4. 酚红反应液 (Phenol Red Solution, PRS) 的配制 PRS 内含 140 mmol/L NaCl、10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0)、5.5 mmol/L 葡萄糖、0.28 mmol/L 酚红和 8.5 u/ml HRPO。临用前配制。

5. PM ϕ 释放 H_2O_2 量测定 参照 Pick^③ 方法加以改进。用 Hank's 液将 PM ϕ 洗出后, 洗涤两次, 用 PRS 重悬, 调细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 取 2 ml 至反应管内, 加入 0.5 ml $7 \times 10^7/\text{ml}$ 浓度的经调理的酵母菌悬液, 置 $37^\circ C$ 水浴 1 h, 中间摇匀两次, 反应结束后, 1000 r/min 离心 8 min, 取上清 2 ml 加于比色皿内, 加入 1 mol/L 20 μ l NaOH 终止反应, 在 722 型分光光度计 610 nm 处读取 OD 值, 根据标准曲线回归方程计算 H_2O_2 释放量。

6. H_2O_2 标准曲线回归方程 将 30% 的 H_2O_2 溶液按终浓度为 $0.032 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.048 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.08 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.16 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.32 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.48 \mu\text{mol/L}$ 稀释于 PRS 中, 室温下静置 5 min, 各浓度取 2 ml 于比色皿内, 加入 1 mol/L NaOH $20 \mu\text{l}$ 终止反应, 于 722 型分光光度计 610 nm 处读取 OD 值。以 H_2O_2 浓度为 X 轴, OD 值为 Y 轴, 绘出标准曲线, 得出标准曲线方程为: $Y = 6.18^{-4} + 0.36 X$ 。

四、统计方法 所有数据均由微机作方差分析。医学统计程序(POMS)由上海科技出版社提供。

结 果

一、风寒刺激对小鼠 RES 廓清功能的影响 小鼠在风寒刺激后第 1 天 RES 廓清 Indian Ink 功能即受到抑制, 至第 3 天达到抑制高峰, 第 5 天至第 7 天逐渐恢复和趋向正常。见附表。

附表 风寒刺激对 RES 廓清功能的影响 ($\bar{x} \pm S$)

分 组	吞噬指数 (K 值)	校正吞噬指数 (a 值)
正常对照	0.0358 ± 0.0105	5.54 ± 0.48
风寒刺激 1 天	0.0259 ± 0.011	$4.51 \pm 0.71^{**}$
3 天	$0.0240 \pm 0.007^{*}$	$4.18 \pm 0.51^{**}$
5 天	0.0298 ± 0.007	$4.57 \pm 0.57^{**}$
7 天	0.0317 ± 0.005	$5.04 \pm 0.54^{**}$

注: 每项所用动物均为 10 只, 与正常对照组比,

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

二、风寒刺激对小鼠 $PM\phi$ 释放 H_2O_2 的影响 小鼠受风寒刺激后 1、3、5、7 天 $PM\phi$ H_2O_2 释放量分别为 $0.129 \pm 0.031 (\mu\text{mol}/2 \times 10^6 M\phi \text{ 细胞} \cdot h, \bar{x} \pm S, \text{下同})$ 、 0.103 ± 0.038 、 0.124 ± 0.036 和 0.136 ± 0.028 , 均低于正常对照组的 0.169 ± 0.027 。其中刺激后第 3 天组 H_2O_2 释放量与正常组比, $P < 0.01$, 其余无统计学意义。

讨 论

单核巨噬细胞系统是机体免疫能力的重要组成部分。RES 廓清功能实际上是指肝脾内单核巨噬细胞的吞噬功能。当 $M\phi$ 吞噬或某些生物活性物质接触时, 能引发一系列氧化代谢剧变化, 此时 H_2O_2 产生量增多, 而 H_2O_2 无论在吞噬体内或细胞外环境中都起着氧依赖性杀菌作用⁽⁴⁾。我们的实验结果表明, 风寒环境的亚急性暴露, 可使小鼠 $PM\phi$ 在酵母菌

刺激下 H_2O_2 释放量明显减少, RES 廓清功能亦受到抑制, 提示小鼠单核巨噬细胞系统吞噬和杀菌能力降低。动态观察结果显示, 风寒因素介异的单核巨噬细胞免疫功能的抑制在刺激后第 3 天达到高峰, 且表现为一过性的抑制过程。

寒为阴邪, 易伤阳气; 风为百病之长, 常和寒邪合并为病。环境寒冷固然可以导致辐射、传导散热增强, 风(即气流)在寒冷环境中亦可通过增强对流散热而使体热耗散, 因而, 风寒表现为综合性寒冷效应。中医学病因理论认为, “正气存内”则“邪不可干”, 同时亦认为“邪之所凑, 其气必虚”, 可见外界六淫之气亦可导致正气的虚弱。卫气的功能亦受着六气变化的影响。这种观点与我们的实验结果相印证, 提示风寒外邪的致病机理包括对机体免疫防御功能的抑制。突然、强烈的寒冷刺激对机体无疑构成应激原作用。我们的系列研究结果表明, 小鼠经风寒刺激后, 血浆皮质酮、去甲肾上腺素、肾上腺素含量均大幅度增高, 提示小鼠处于应激状态。神经内分泌免疫调节网络理论认为, 应激过程中大量分泌的糖皮质激素可抑制 $M\phi$ 的吞噬和廓清功能, 还可封闭 RES 对异物的清除⁽⁵⁾。有人观察到在剧烈运动的应激反应中, $M\phi$ 释放 H_2O_2 量受到抑制⁽⁶⁾。可见我们所观察到的风寒刺激所导致的单核巨噬细胞免疫功能的抑制, 是应激激素经由神经内分泌免疫调节网络所介导的, 这一过程可能是风寒外邪损伤卫外正气, 导致外感疾病发生的病理生理基础的一个重要方面。

参 考 文 献

1. 匡彦德, 等. 炭粒廓清试验. 见: 临床免疫学检验. 第一版. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 124.
2. 朱云凤, 等. 小鼠腹腔巨噬细胞表面 C_3b 受体的观察. 上海免疫学杂志 1985; 3(5): 262.
3. Edgar Pick, et al. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. J Immunol Methods 1980; 38: 161.
4. Roos D. The metabolic response to phagocytosis. In Weissinam Ged The cell biology of inflammation. Elsevier North-Holland (Amsterdam New York Oxford) 1980; 337-385.
5. Thomson DMP. Immunotherapy and immunosuppression. In: Freedman so, et al. (ed). Clinical immunology. Harper and Row, 1976: 532.
6. 丁玄宙, 等. 剧烈运动造成的应激对某些免疫细胞的影响. 中国免疫学杂志 1987; 3(6): 341.

Changes of Some Elements, Enzymes and Energy Charge in Skeletal Muscle of Rats with Spleen Qi Deficiency

Sun En-ting (孙恩亭), et al

Basic Theory Institute, China Academy of TCM, Beijing (100700)

In order to investigate the relationship between Spleen and muscle, the changes of trace elements, enzyme activity, adenine nucleotides and energy charge (EC) in the skeletal muscle of rats with Syndrome of Spleen Qi Deficiency (SQD) were studied, the curative effects of Sijunzi Tang (SJZT 四君子汤) for SQD were observed too. Results showed that in comparing with normal rats, the levels of ATP and EC lowered significantly (ATP $P < 0.01$; EC $P < 0.001$), the enzyme activity of the anaerobic glycolysis increased significantly ($P < 0.05$), the zinc and iron concentrations were higher ($P < 0.01$) while the copper, potassium and sodium concentrations were lower than normal significantly ($P < 0.05$). These changes could be corrected after treatment with SJZT for strengthening Spleen and tonifying Qi. Above-mentioned results suggested that the mechanism of Spleen Qi Deficiency is closely related to the abnormal energy metabolism, and the TCM theory of Spleen dominating muscles might have its scientific basis.

Key word Spleen Qi Deficiency, skeletal muscle, energy metabolism, energy charge, enzyme, trace element

(Original article on page 736)

Sequential Observation on the Influence of Artificial Wind-Cold Environment to Immunologic Function of Mononuclear Phagocytic System in Mice

Chen Xin (陈 新), Ou Ying-xin (区永欣)*, Chen Jie-wen (陈洁文)*

*Shenzhen Red Cross Hospital, Clinical institute of integrated TCM and WM,
Shenzhen (518029)*

** Guangzhou TCM College, Guangzhou*

According to TCM theory of Six Evils, the Wind-Cold is one of the pathogen. In order to find the mechanism of Wind-Cold in causing disease, the effect of subacute Wind-Cold stimulation on the phagocyte immunization in mice was observed. Results showed that through exposing in the Wind-Cold environment, the reticuloendothelial system (RES) clearance function and the hydrogenperoxide releasing of peritoneal macrophage were suppressed. Sequential observation showed that the peak of immunosuppression occurred on the 3rd day after stimulation and began to normalize at 5th day. These results suggested that Wind-Cold stimulation could inhibit temporary phagocytosis of macrophage and bacteriocidal effect. Action of immunosuppression was believed to be produced by the increase of stress hormone after stimulation. Results also suggested that the pathogenic action of Wind-Cold on disease is somewhat related with the suppression of nonspecific cellular immunity.

Key word Wind-Cold environment, phagocytosis, reticuloendothelial system, macrophage

(Original article on page 739)