

# 紫华荣及其主要成分对丝裂霉素 C 所致小鼠免疫功能低下的预防作用

金 锐<sup>1</sup> 万玲玲<sup>2</sup> 三石俊美<sup>2</sup> 児玉一惠<sup>2</sup> 仓茂达德<sup>1</sup>

**内容提要** 用抗癌药丝裂霉素 C 给小鼠腹腔内注射, 同时口服中成药紫华荣及其主要成分紫草根、黄芪、川芎, 以探讨中药对小鼠巨噬细胞和淋巴细胞的影响。结果丝裂霉素 C 能使小鼠腹腔内巨噬细胞数量减少, 向异物的游走能力减慢, 脾脏重量减轻, T 淋巴细胞的母细胞化能力下降以及 NK 细胞的细胞毒作用减弱, 并对巨噬细胞、T 淋巴细胞的损害有防御作用。提示: 紫华荣不但能刺激网状内皮系统使抑制状态的巨噬细胞恢复活性, 也能使抑制的淋巴细胞活跃, 对丝裂霉素 C 所造成的免疫不全现象起到积极的防御作用。

**关键词** 丝裂霉素 C 巨噬细胞 T 淋巴细胞 自然杀伤细胞

**Effects of Shi-ka-ron and Chinese Herbs in Mice Treated with Anti-Tumor Agent Mitomycin C**  
Jin Rui, Wan Ling-ling\*, Toshimi Mitsuishi\*, et al Dept. of Medical Technology, College of Medical Care and Technology, \*Dept. of Internal Medicine, School of Medicine, Cuihua University, Maebashi 371 Japan

The Shi-ka-ron, and its constituent Chinese herbs *Lithospermum erythrorhizon*, *Astragalus membranaceus* and *Ligusticum Wallichii* were administered with antitumor agent, mitomycin C (MMC) to ICR mice, and their effects on murine macrophages and lymphocytes were studied. Peritoneal macrophages were significantly inhibited both in their number and chemotactic activity by MMC treatment. Splenic weight and blastogenic responsiveness to Concanavalin A of spleen lymphocytes also decreased significantly in MMC-treated mice. NK cell activity was also suppressed by MMC treatment. When these mice were orally treated with extracts of Shi-ka-ron or each Chinese herbs mentioned above, it showed protective effects to immunosuppressive mice on all 5 items studied. The number of macrophages, and the functions of macrophages and lymphocytes maintained the same or more than normal levels in MMC plus each group of these extracts treated mice. These results suggest that the Shi-Ka-Ron and Chinese herbs could resist immunosuppression induced by antitumor agent MMC, and its mechanisms might be correlated with stimulation of the RES (reticuloendothelial system), activation of T cell blastogenesis and NK cell cytotoxicity.

**Key words** mitomycin C, Shi-ka-ron, macrophage, T-lymphocyte, natural killer cell

紫华荣具有补气活血, 凉血解毒的作用。为了证明紫华荣及其主要成分对宿主本身免疫系统的影响, 分别与抗癌药丝裂霉素 C 同时治疗小鼠, 探讨丝裂霉素 C 所致小鼠腹腔巨噬细胞和 T 淋巴细胞功能抑制产生的防御作用机理。

## 材料与方 法

### 1 材料

#### 1.1 动物 ICR 小白鼠, 6 周龄, 购自 Charles

1. 日本国立群马大学医疗技术短期大学部卫生技术学科免疫学(前桥 371); 2. 日本国立群马大学医学部第三内科学

River, Japan Inc., Atsuki, Kanakawa 公司。

1.2 药物 丝裂霉素 C(mitomycin C)用蒸馏水溶解后, 于实验开始第 1、3、5 天分别给小鼠腹腔内注射 2 mg/kg。紫华荣合剂(含紫草根 3.7 g、黄芪 1.1 g、川芎 1.1 g、人参 13.3 g、当归 2.7 g、鱼腥草 1.9 g、薏米仁 40 g、甘草 1 g、乳糖 35.2 g)及其主要成分紫草根、黄芪、川芎。

1.3 动物分组 将动物分为 6 组, 每组 3 只, 即: 对照组, 不作任何处理; 丝裂霉素组, 单用丝裂霉素 C 治疗; 紫华荣组, 用丝裂霉素 C 加紫华荣 75 mg/kg; 紫草根组, 用丝裂霉素 C 加紫草根 35 mg/

kg; 黄芪组, 用丝裂霉素 C 加黄芪 10 mg/kg; 川芎组, 用丝裂霉素 C 加川芎 4 mg/kg; 均每日 1 次给小鼠灌胃, 连续 7 天。

1.4 肿瘤细胞及培养液 YAC-1 细胞作为 NK 细胞的靶细胞。在 RPMI 1640 培养液加 10% 胎牛血清 (FCS; Irvine Scientific, Santa Ana, CA), 50 u/ml 青霉素 G 钾盐 (明治制药, 东京) 和 50  $\mu$ g/ml 硫酸链霉素 (大日本制药, 东京) 作为细胞培养液。

## 2 方法

2.1 腹腔内巨噬细胞数及游走能力测定 将各组小鼠脱颈椎处死, 腹腔内注入 5 ml 培养液, 然后轻揉小鼠腹部约 5 min, 回收腹腔内巨噬细胞。各实验小鼠巨噬细胞用血球计数板计数, 然后用 Boyden Chamber 法<sup>(1)</sup>进行巨噬细胞游走功能测定。

2.2 脾脏重量及淋巴母细胞化反应测定 取小鼠脾脏无菌称重, 然后将脾脏捣碎, 离心后取淋巴细胞, 用细胞培养液调整为  $2 \times 10^6$ /ml, 将 100  $\mu$ l 的淋巴细胞悬浮液分别注入 96 孔平皿中, 在 Con A ( $20 \mu$ g/ml, E-Y Laboratories, San Mateo, CA) 刺激下, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 培养 72 h, 培养终末 4 h 前, 用 <sup>3</sup>H-Thymidine 0.5  $\mu$ Ci/ml 标记淋巴细胞, 使用 scintillation counter 测定淋巴细胞 <sup>3</sup>H-Thymidine 摄入量<sup>(2)</sup>。

## 2.3 NK 细胞的细胞毒作用的测定

用 Europium release 法进行测定<sup>(3)</sup>。将 YAC-1 细胞用硝酸 Europium (Aldrich, Milwaukee) 标记后, 用细胞培养液调至  $5 \times 10^4$ /ml, 调整的各种浓度 ( $1.25 \times 10^6$ /ml,  $2.5 \times 10^6$ /ml,  $5 \times 10^6$ /ml) 的效应, 淋巴细胞悬浮液及 YAC-1 细胞悬浮以 100  $\mu$ l 与 100  $\mu$ l 的比率混合后离心 (500 g/min, 5 min), 5% CO<sub>2</sub> 37°C 培养 4 h 后取上清 20  $\mu$ l, 加入增强试剂 (Wallac Oy, Tur Ku, Finland) 100  $\mu$ l, 在室温下反应 5 min 后, 用时间分解荧光光度计测定荧光 (europium, Eu) 强度。最大放出量为在细胞中添加 0.1% Triton-X 100 100  $\mu$ l, 细胞被完全溶解后计算 NK 细胞的细胞毒作用。计算公式如下:

NK 细胞活性 (%) = ((实验组 Eu 放出量 - 自然放出量) / (最大放出量 - 自然放出量))  $\times$  100

## 3 统计学处理采用 t 检验。

## 结 果

### 1 药物对小鼠腹腔巨噬细胞的影响

实验第 7 天小鼠 (每组 3 只), 腹腔巨噬细胞对照组为  $(19.87 \pm 0.18) \times 10^5$ /只, 丝裂霉素组为  $(7.13 \pm$

$2.29) \times 10^5$ /只, 紫草根组为  $(17.50 \pm 6.01) \times 10^5$ /只, 川芎组为  $(15.50 \pm 3.53) \times 10^5$ /只, 与丝裂霉素组比均有所增高 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 紫华荣组为  $(10.25 \pm 6.01) \times 10^5$ /只, 与丝裂霉素组比有所增加, 但无统计学意义, 提示紫草根和川芎可使丝裂霉素 C 造成的小鼠腹腔内巨噬细胞伤害有恢复作用。

### 2 对小鼠腹腔巨噬细胞游走的影响

各组小鼠用药 7 天后腹腔巨噬细胞游走数 (取 10 个视野算出平均数): 对照组为  $14.33 \pm 6.95$  个, 丝裂霉素组为  $5.23 \pm 3.30$  个, 两组比较差异显著 ( $P < 0.05$ ); 紫华荣、紫草根、黄芪、川芎组分别为  $13.03 \pm 1.76$  个、 $14.96 \pm 4.08$  个、 $23.46 \pm 5.24$  个、 $18.53 \pm 4.36$  个, 与丝裂霉素组比, 差异非常显著 ( $P$  均  $< 0.01$ )。提示紫华荣与其成分均对丝裂霉素所造成的细胞损害有防御作用。

### 3 对小鼠脾脏重量的影响

对照组小鼠脾脏重量为  $0.122 \pm 0.008$  g ( $\bar{x} \pm S$ ), 丝裂霉素组为  $0.081 \pm 0.006$  g, 两组比较, 差异非常显著 ( $P < 0.01$ ); 紫华荣、紫草根组脾脏重量达正常水平, 黄芪和川芎组较丝裂霉素组脾脏有所增重, 但无统计学意义。

### 4 对淋巴母细胞的影响

<sup>3</sup>H-Thymidine 摄入量 (cpm,  $\bar{x} \pm S$ ): 对照组为  $11875.5 \pm 545.2$ , 丝裂霉素组为  $7297.5 \pm 582.1$ , 紫华荣组为  $10483.7 \pm 666.1$ , 黄芪组为  $11881.3 \pm 508.2$ , 紫草根组为  $11825.9 \pm 566.9$ , 川芎组为  $13021.6 \pm 610.9$ , 各组与丝裂霉素组比, 差异非常显著 ( $P < 0.01$ )。

### 5 对 NK 细胞细胞毒活性的影响

NK 细胞活性 (%),  $\bar{x} \pm S$  丝裂霉素组为  $7.26 \pm 2.0$ , 对照组为  $19.3 \pm 1.4$ , 紫华荣组为  $28.9 \pm 4.6$ , 紫草根组为  $19.0 \pm 0.4$ , 黄芪组为  $21.4 \pm 0.8$ , 川芎组为  $21.8 \pm 2.9$ , 中药各组与丝裂霉素组比有非常显著差异 ( $P < 0.01$ )。提示中药能提高 NK 细胞活性。

## 讨 论

紫华荣以补气药人参, 黄芪为主, 补血药当归, 活血药川芎为辅, 凉血药紫草根, 清热药鱼腥草, 理气药薏米仁为佐药, 甘草为使药。黄芪有效成分为 2', 4'-dihydroxy-5, 6-dimethoxyisoflavone, 1-canavannine, phenol glycoside, saponin and isoflavone<sup>(4)</sup>。药理学研究表明黄芪水溶性提取物能使巨噬细胞的吞噬作用增强, 多糖类能使巨噬细胞数

量增加<sup>(5)</sup>。本实验结果表明黄芪还能使巨噬细胞向异物游走能力增加,淋巴细胞数量增加,T淋巴母细胞化能力加强,NK细胞活性增强,使丝裂霉素造成的巨噬细胞及淋巴细胞抑制得到完全缓解。

川芎的主要成份为3-butylidene-7-hydroxyphthalide, cis-, trans-6, 7-dihydroxyligustilide, butylphthalide, butylidenephthalide, ligustilide, senkyunolide, neocnidilide and tetramethylpyrazine<sup>(4)</sup>。本实验表明川芎不仅能增加小鼠腹腔巨噬细胞、淋巴细胞数量,增强巨噬细胞的游走能力,还能增强T细胞母细胞化能力和NK细胞细胞毒作用,有力地抵抗了丝裂霉素的免疫抑制作用。

紫草根(lithospermum erythrorhizon)的主要成份为Shikonin and acetylshikonin<sup>(4)</sup>。在临床应用中抑制局部炎症能力相当于0.1%地塞米松软膏<sup>(6)</sup>,其甲醇提取物有抑制EB病毒和抗癌作用<sup>(7)</sup>,本实验提示紫草根能使丝裂霉素C引起巨噬细胞和淋巴细胞功能抑制得到缓和。

紫华荣对丝裂霉素C所造成的免疫抑制均有不同程度的防御作用,解除NK细胞的抑制作用,还使NK细胞活性增加。

紫华荣问世还不长,还存在着适合浓度、混合比率的问题,我们期待着今后能有一个更佳的紫华荣问世。

### 参 考 文 献

1. Kurashige S, Mitsuhashi S. Macrophage activities in

sacoma 180-bearing mice and EL4-bearing mice. Gann 1982; 73: 85.

2. Kurashige S, Akuzawa Y, Mitsuhashi S. Purine metabolic enzymes in lymphocytes IV. effects of enzyme inhibitors and enzyme substrates on the blastogenic responses of human lymphocytes. Scand.J.Immunol 1985;22:1.

3. Blomberg K, Granberg C, Hemmila I, et al. Europium-Labelled target cell in an assay of natural killer cell activity. I & II, A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. J Immunol Meth 1986 a & b;86:225 & 117.

4. 秋山和幸, 川村次良, 立沢政义, et al. 日本药局方解说书. 第1版. 东京: 广川书店, 1991; 111-114, 535-537 及 418-421.

5. Lau BHS, Ong P, Tosk J. Macrophage chemiluminescence modulated by Chinese medicinal herbs astragalus membranaces and Ligustrum lucidum. Phytother Res 1989;3:148.

6. Cyong J. A pharmacological study of the anti-inflammatory activity of Chinese herbs, a review. Acupuncture & Electro-Therapeutics Res Int J 1982;7: 173.

7. 木岛孝夫, 小塚睦夫, 德田春邦, 等. 生药制剂, 紫云膏的 Epstein-Barr Virus 活性化抑制作用和抗发癌 Promotor 作用. 药理学杂志 1989; 109(11): 843.

(收稿: 1994-02-21 修回: 1994-10-10)

## 欢迎订阅本刊 1995 年基础理论研究特集

为了扩大学术交流, 提高基础理论水平, 推广应用中西医结合基础研究成果, 应广大读者的要求, 并经上级有关部门批准, 本社将编辑出版 1995 年基础理论研究特集。本特集共收入论文 160 篇左右, 附有英文摘要, 共 80 万字左右。本特集选题广泛, 内容丰富, 学术水平高, 科学性较强, 集中反应了我国中西医结合基础理论研究领域近 1~2 年的最新进展。

本特集预计 1995 年第 2 季度末出版发行, 每册定价 36.00 元(另加邮费 10%)。订阅办法: 可直接向本社汇款订购。本社地址: 北京西苑操场 1 号中国中西医结合杂志社(邮编: 100091)。开户银行: 北京工商银行海淀区办事处, 中国中西医结合杂志社。帐号: 046098-24。务请写清收刊者详细地址、姓名及所在地邮政编码, 注明“购 1995 年特集”。

中国中西医结合杂志社