

· 实验研究 ·

命门合剂对大鼠神经内分泌网络的影响*

蔡定芳 沈自尹 张玲娟 陈晓红

内容提要 为了研究中医命门或肾与神经内分泌免疫网络的本质联系,用皮质酮(CORT)皮下注射塑造大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴(HPAT)抑制模型,观察命门合剂对大鼠神经内分泌免疫网络的调节作用。结果表明:模型组大鼠下丘脑室旁核小细胞区促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)阳性神经元及正中隆起 CRF 阳性神经纤维,垂体前叶促肾上腺皮质激素(ACTH)阳性细胞等明显减少,免疫组织化学 ABC 法染色变浅;肾上腺萎缩特别是束状带变薄;胸腺萎缩,淋巴细胞与胸腺小体明显减少;血浆 ACTH、CORT 以及淋巴细胞增殖反应、白细胞介素 2(IL-2)、 γ -干扰素(γ -IFN)诱生能力等降低。命门合剂灌胃能有效地改善 CORT 对 HPAT 的抑制, $P < 0.01$ 。提示命门合剂可能是调节 HPAT 轴的有效方剂。

关键词 皮质酮 神经内分泌免疫 命门 下丘脑 垂体 肾上腺 胸腺 细胞因子

Effect of Ming-Men Mixture on Corticosterone-Rats' Neuro-Endocrino-Immunological Network Cai Ding-fang, Shen Zi-yin, Zhang Ling-juan, et al *Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai(200040)*

The hypothalamus-pituitary-adrenal-thymus(HPAT) axis is an important form of the neuro-endocrino-immunological network (NEIN). To study the essential link between Ming-Men, Kidney and the NEIN, the corticosterone (CORT) injected rats was used. The CORT caused HPAT axis inhibiting model was established and then the regulation of Ming-Men mixture (MMM) was observed. The results showed that the number of corticotropin-releasing factor (CRF) positive neurones in hypothalamic paraventricular nucleus, CRF positive neurofibril in median eminence, anterior pituitary ACTH positive secretory cells decreased markedly in the CORT inhibited rats and the immunohistochemical ABC staining became lighter than the control. We also observed that there was atrophy in adrenal, especially fasciculate zone became thinner compared with the control. The thymus atrophied, the number of lymphocytes and thymic corpuscles decreased obviously. The content of ACTH and CORT in plasma decreased, the proliferative reaction of lymphocytes, interleukin-2 and the inductive ability of γ -IFN reduced. After the MMM was instilled into stomach in experimental group, it was found that MMM could improve the inhibition on HPAT axis caused by CORT significantly, $P < 0.01$. It suggested that MMM possibly was an effective and ideal prescription which could regulate the HPAT axis.

Key words corticosterone, neuroendocrine immunity, Ming Men, Hypothalamus-pituitary-adrenal-thymus axis, cytokine

为了从神经-内分泌网络角度阐明中医命门或肾本质,本文应用皮质酮(Corticosterone CORT)塑造大鼠肾阳虚的神经-内分泌-免疫抑制模型,观察命门合剂的调节作用。现报告如下。

实验材料

1 命门合剂的制备 命门合剂是沈自尹教授根据近 40 年来中西医结合临床与实验研究成果而创制的新方,由仙灵脾、附子、地黄、枸杞子组成,依次按 3:1:2:2 比例称量。药物经水煎醇提,用蒸馏

*本课题为国家自然科学基金资助重点课题(No.39230370)
上海医科大学中西医结合研究所(上海 200040)

水调浓度至200%。8磅20 min 高压灭菌, 4℃冰箱保存备用。

2 主要试剂 CORT购自Sigma公司, 使用时溶于灭菌豆油中, 浓度为20 mg/ml; 兔抗鼠促肾上腺皮质激素抗血清(Anti-ACTH)和兔抗羊促肾上腺皮质激素释放激素抗血清(Anti-CRF)为美国UCB公司产品; 免疫组织化学ABC试剂盒购自美国Vector公司; ^3H -TdR购自中国科学院上海原子核研究所, 放射性比强度22 Ci/mmol, 放射性浓度为1 mCi/ml; ^{125}I -ACTH放免药盒购自美国DPC公司; ^3H -CORT放免药盒购自上海市内分泌研究所。Con-A、鼠标准白细胞介素2(IL-2)、鼠标准 γ -干扰素(γ -IFN)购自Sigma公司。

实验方法

1 动物分组 雄性SD大鼠30只, 体重 190 ± 15 g, 由上海中医药大学动物室提供。随机分为命门、模型、对照3组, 每组各10只。命门组以10 mg/kg体重皮下注射CORT, 同时用10 g/kg体重命门合剂灌胃, 每天各1次, 连续14天。模型组以等体积蒸馏水代替命门合剂灌胃, 余同命门组。对照组以等体积灭菌豆油代替CORT, 余同模型组。实验第15天, 所有动物断头处死, 取出下丘脑、垂体、左侧肾上腺、胸腺, 固定于无冰醋酸Bouin液中, 分离包膜, 4℃过夜。

2 下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺的形态学观察 将固定12 h的垂体、肾上腺、胸腺快速用滤纸吸干, LIBROR L-160 D型电子天平称重。然后与下丘脑一起, 室温下50%~100%酒精梯度脱水, 氯仿透明, 石蜡包埋。下丘脑从视交叉起至正中隆起止作冠状连续切片, 全垂体作水平连续切片, 每片均厚5 μm , 依次分置于10张载玻片上, 各组取相同序号片作免疫组织化学染色。CRF抗血清终浓度为1:1000, ACTH抗血清终浓度为1:4000, 第二抗体为羊抗兔IgG, 终浓度为1:200, DAB显色。肾上腺、胸腺常规切片作苏木素-伊红染色。日本Olympus BH-2型显微镜观察结果。

3 血浆CORT及ACTH放射免疫法检测 大鼠断头取血, 测CORT用肝素抗凝, 测ACTH用EDTA抗凝。余按药盒说明操作。

4 淋巴细胞增殖试验 无菌取脾, Ficoll分离脾细胞, 调细胞至 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 加入96孔板, 每孔0.1 ml, 每鼠3个复孔。每实验孔加入Con-A 5 μg , 对照孔加等体积完全培养液。每孔总反应容积为0.2

ml。饱和湿度, 5%CO₂, 37℃培养40 h, 终止培养前16 h每孔加 ^3H -TdR 1 μCi 。多头细胞收集仪收集细胞, 测每分计数(cpm)值。

5 γ -IFN及IL-2的诱生与活性检测 将 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 的脾细胞加入24孔培养板, 每孔2 ml, 再加入终浓度10 μg 的Con-A, 置37℃、CO₂孵育箱培养, 48 h收集上清液测IL-2, 96 h收集上清液检测 γ -IFN。IL-2活性检测见文献^①, γ -IFN活性检测见文献^②。

结 果

1 命门合剂对大鼠垂体、肾上腺、胸腺重量的影响 如表1所示。大鼠皮下注射皮质酮后, 垂体、肾上腺、胸腺重量比对照组明显减轻, $P < 0.01$; 命门合剂组灌胃后重量显著上升, $P < 0.05 \sim 0.01$ 。

表1 命门合剂对大鼠垂体和肾上腺及胸腺重量的影响 (mg, $\bar{x} \pm S$)

组别	n	垂 体	肾 上 腺	胸 腺
对照	10	8.55 ± 1.10	24.02 ± 3.84	393.61 ± 65.01
模型	10	$6.90 \pm 0.98^*$	$11.06 \pm 2.04^*$	$204.52 \pm 38.49^*$
命门	10	$8.06 \pm 0.90 \Delta$	$18.81 \pm 2.35 \Delta\Delta$	$262.22 \pm 37.94 \Delta\Delta$

注: 与对照组比较, $^*P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 下表同

2 命门合剂对大鼠HPAT轴的形态学影响 CORT明显抑制大鼠HPAT轴, 模型组大鼠下丘脑室旁核小细胞区CRF阳性细胞及正中隆起外层CRF阳性纤维明显减少, 染色变淡。垂体缩小, 垂体前叶ACTH阳性细胞数量明显减少, 胞体变小, 染色变淡。肾上腺明显萎缩, 特别是束状带明显变薄。胸腺明显萎缩, 以皮质萎缩最为严重, 皮质淋巴细胞数量显著减少, 因此整个胸腺的苏木素染色变浅, 髓质内胸腺小体数量减少。命门组的上述病理变化程度远较模型组轻。提示命门合剂能有效保护CORT对HPAT轴的抑制。

3 命门合剂对大鼠血浆CORT、ACTH、淋巴细胞增殖反应、IL-2及 γ -IFN水平的影响 见表2。模型组大鼠注射皮质酮后血浆CORT、ACTH明显降低, $P < 0.01$, 命门合剂能有效提高模型组大鼠的血浆CORT及ACTH含量, $P < 0.01$; 模型组大鼠淋巴细胞对有丝分裂原Con-A的刺激反应较对照组明显减弱, ^3H -TdR掺入量显著减少, 对Con-A诱导的IL-2、 γ -IFN产生能力显著降低, P 值均 < 0.01 ; 命门合剂能提高模型组大鼠的淋巴细胞增殖反应, 提高诱生IL-2、 γ -IFN水平, $P < 0.01$ 。

4 命门合剂对大鼠脾细胞的促增殖作用 见表

表2 命门合剂对大鼠血浆 CORT、ACTH、淋巴细胞增殖反应、IL-2 及 γ -IFN 水平等影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	CORT	ACTH	脾细胞	淋巴细胞增殖		IL-2	γ -IFN
	($\mu\text{g/dl}$)	(pg/ml)	($\times 10^7/\text{ml}$)	cpm	SI	(u/ml)	(u/ml)
对照	10.70 $\pm$ 4.41 (10)	59.70 $\pm$ 6.94 (10)	16.0 $\pm$ 1.0 (10)	119716 $\pm$ 24856 (10)	8.21 $\pm$ 3.35 (10)	82.5 $\pm$ 20.3 (8)	93.6 $\pm$ 10.4 (8)
模型	1.18 $\pm$ 0.72* (10)	39.64 $\pm$ 4.85* (10)	5.0 $\pm$ 0.9* (10)	65187 $\pm$ 22802* (10)	4.29 $\pm$ 1.50* (10)	40.2 $\pm$ 15.6* (8)	42.6 $\pm$ 6.3* (8)
命门	5.50 $\pm$ 1.19 $\Delta\Delta$ (10)	57.76 $\pm$ 8.85 $\Delta\Delta$ (10)	9.0 $\pm$ 0.8 $\Delta\Delta$ (10)	105190 $\pm$ 25580 $\Delta\Delta$ (10)	6.92 $\pm$ 2.06 $\Delta\Delta$ (10)	60.7 $\pm$ 18.8 $\Delta\Delta$ (8)	76.7 $\pm$ 9.8 $\Delta\Delta$ (8)

注: SI 为刺激指数; 括号内为动物数

2. 与对照组比较, 皮质酮抑制模型组大鼠脾细胞的体内增殖, 使脾细胞的绝对数减少, $P < 0.01$; 命门合剂能有效地促进大鼠脾细胞使其绝对值增加, $P < 0.01$ 。

讨 论

本研究结果表明, 大剂量外源性 CORT 抑制了 HPAT 轴, 血浆 ACTH、CORT 含量以及淋巴细胞增殖反应、IL-2、 γ -IFN 诱生能力等显著降低, 下丘脑室旁核 CRF 阳性神经元及正中隆起 CRF 阳性神经纤维以及垂体前叶 ACTH 阳性细胞等数量减少, 染色变淡; 肾上腺明显萎缩, 束状带变薄, 束状结构排列不齐; 胸腺严重萎缩, 以皮质为著, 胸腺细胞及胸腺小体减少。命门合剂能有效地改善 CORT 对 HPAT 轴形态与功能的抑制。与模型组比较, 命门组的血浆 ACTH、CORT 含量明显上升, 淋巴细胞增殖反应及 IL-2、 γ -IFN 诱生能力提高, 下丘脑室旁核和正中隆起的 CRF 神经元和纤维增多, 染色加深; 垂体 ACTH 阳性细胞增多; 肾上腺皮质特别是束状带增宽, 结构完整; 胸腺皮质萎缩减轻, 胸腺细胞数量增多。推论其作用的可能机理是: (1) 在受体水平拮抗 CORT 对 HPAT 轴的反馈抑制。(2) 改善内环境, 降低 HPAT 轴的受抑程度。(3) 直接促进免疫系统, 通过细胞因子如 IL-2、IFN 等增强 HPAT 轴功能。本实验结果提示命门合剂能有效促进细胞免疫和细胞因子的分泌, 其确切机制有待进一步探讨。

HPAT 轴受抑模型又称为肾阳虚模型。我们认

为肾阳虚是 HPAT 轴功能低下或紊乱的重要原因, 温补肾阳不仅直接提高 HPAT 轴功能, 而且还能间接纠正 HPAT 轴失调导致的全身各系统紊乱。本方意在通过作用于命门, 进而改善或纠正 HPAT 紊乱所导致的机体各系统及内环境的失调。命门为水火之府, 阴阳之宅, 生死之窦, 其火为元气, 其水为元精。“五脏之阳气非此不能发”^[3]。命门学说的实质就是肾阴、肾阳对脏腑各机能的正确调节。命门合剂以仙灵脾温肾补阳为君, 广泛作用于内分泌和免疫系统。近期有报道其促进细胞免疫的机制可能是通过促进胸腺释放成熟细胞^[3]。地黄滋肾补阴为臣, 佐以枸杞填精益髓, 兼以增强细胞免疫功能^[4]; 使以少量附子直入命门, 振奋元阳, 并可增强肾上腺皮质的分泌作用^[5]。命门合剂系循张景岳“善补阳者阴中求阳, 则阳得阴助而生化无穷”之意。

参 考 文 献

1. 匡彦德. 白细胞介素 2 的诱生及检测. 上海医科大学学报 1987; 14(1): 10.
2. 蔡定芳, 王建陵, 申冬珠, 等. 抗炭疽抗病毒及诱生干扰素作用. 中西医结合杂志 1989; 9(4): 210.
3. 丁 雁, 邢善田, 周金黄. 淫羊藿多糖致小鼠胸腺缩小的免疫药理机制. 中国免疫学杂志 1993; 9(4): 185.
4. 曹广文, 杜 平. 枸杞多糖和白细胞介素-2 对 12 月龄小鼠两种 LAK 细胞抗肿瘤活性的调节作用. 中华微生物和免疫学杂志 1992; 12(7): 390.
5. 江苏新医学院. 中药大辞典. 第一版. 上海: 上海人民出版社, 1977: 139.

(收稿: 1994-08-17 修回: 1994-11-16)

电针疗法实用技术体系

电针疗法实用技术体系是在中医经络治病的基础上集针、灸、推拿、按摩之大成与当代科技相结合所形成的医疗保健体系, 凡针灸适用的一切病症均是本体系的适应症。对该体系感兴趣的同志请与北京 9107 信箱李庆元、孔经一同志联系索取 3 万字资料“电针疗法实用技术体系”(免费赠阅)。