

· 实验研究 ·

六味地黄汤免疫调节活性成分化学分离的
药理学导向评价*聂 伟¹ 张永祥¹ 茹祥斌¹ 乔善义² 姚新生² 周金黄¹

内容提要 目的:为定向追踪分离六味地黄汤发挥免疫调节作用的活性成分进行导向评价。方法:运用化学与药理学密切合作的研究方法,以环磷酰胺(Cy)处理小鼠为模型,抗体生成反应为活性评价指标,对每一步化学分离所得组分进行活性评价,确定活性部位。结果:六味地黄汤及其醇溶、醇沉部分对 Cy 所致抗体生成反应低下具有明显的改善作用;后二者活性均高于其母体水煎剂;其中醇沉部分活性较醇溶部分强。醇沉部分又以活性炭柱层析所得组分 CA4 活性最强。结论:六味地黄汤醇沉部分发挥免疫调节作用的主要活性成分来源于 CA4,其主要由酸性多糖组成。

关键词 六味地黄汤 免疫调节作用 活性成分 化学分离

Guiding-Evaluation of Immunomodulating Activity of the Liuwei Dihuang Decoction During the Stepwise Fractionation Nie Wei, Zhang Yongxiang, Ru Xiangbin, et al *Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing (100850)*

Objective: To conduct the activity evaluation for immunomodulating components from the Liuwei Dihuang Decoction (LWDHD). **Methods:** Cyclophosphamide (Cy)-treated mice were used as the immunodeficient model and the antibody production response in plaque-forming cell (PFC) assay was employed as the activity-evaluating parameter. Stepwise fractionation was guided by activity-evaluation. **Results:** Fr1, the ethanol-soluble fraction, and Fr2, the ethanol insoluble fraction of LWDHD, both significantly improved the antibody production response in Cy-treated mice, in which Fr2 showed stronger activity than that of Fr1. Fr2 was further fractionated. Fr2-CA4, one of the fractions obtained by active carbon chromatography from Fr2, exhibited the strongest activity in comparison with other fractions. **Conclusion:** CA4, which is mainly composed of acidic polysaccharides, is the main immunomodulating active fraction contained in the ethanol-insoluble fraction of LWDHD.

Key words Liuwei Dihuang Decoction, immunomodulating effect, active fraction, chemical fractionation

六味地黄方是中医滋补肾阴的代表名方,在近代临床医疗中仍被广泛地应用于包括与免疫功能失调有关的多种疾病的治疗。近代实验药理学研究发现,六味地黄方对免疫功能具有明显的调节作用⁽¹⁻⁴⁾。但迄今为止,国内外尚未见有关于六味地黄方发挥免疫调节作用活性成分研究的报道。本研究运用现代药物化学与药理学密切合作的方法,将六味地黄方视为一个整体,从汤剂出发,首先对其发挥免疫调节作用的活性成分进行了导向分离。

材料与方法

1 动物及处理 LACA 小鼠,雌性,6~8 周龄,体重 $20 \pm 2\text{g}$,由本院动物中心提供。将小鼠随机分为正常组,对照组〔环磷酰胺(Cy)于实验前 5 天 1 次给予,剂量为 50mg/kg ,皮下注射〕及 Cy 加六味地黄汤组(简称 Cy+六味组),每组动物 4 只。Cy+六味组动物每日灌胃给六味地黄汤 1 次,灌胃体积为 $0.1\text{ml}/10\text{g}$ 体重,连续 7 天。六味地黄汤的剂量设置为 5、10 和 20g/kg ,其化学分离组分的剂量设置依据六味地黄汤和其各自直接来源母体的最佳剂量以及由母体到子体的得率换算确定。正常组及对照组动物均口服给予等体积蒸馏水。

*国家自然科学基金资助项目(No.39570851)

1. 军事医学科学院毒物药物研究所(北京 100850);2. 沈阳药科大学

2 药物 六味地黄汤由熟地黄、山茱萸、干山药、泽泻、牡丹皮和白茯苓按 8:4:4:3:3:3 的比例混合,加入沸水煎煮 2h,过滤,药渣同法再煎煮 1 次,过滤,与第 1 次煎煮滤液混合浓缩而成。

3 试剂 RPMI 1640 培养液为美国 Gibco Laboratories 产品;Cy 为上海华联制药厂产品。

4 溶血空斑(plaque-forming cell, PFC) 实验按文献方法^[5];于实验前 4 天以 10% 的绵羊红细胞(SRBC)腹腔注射免疫小鼠,实验时断头处死动物,取脾脏制备脾细胞悬液,调整细胞浓度为 $2.5 \times 10^6/L$ 。取上述细胞悬液 400 μ l 与 50% SRBC 及 50% 补体(按 1:1 比例稀释的新鲜豚鼠血清)混合,取 100 μ l 混合液加入事先制备好的小室中,石蜡封口,置 37℃ 温箱孵育 1h,计数小室内形成的空斑数目,结果以空斑数/ 10^6 个脾细胞(PFC/ 10^6 脾细胞)表示。统计学处理采用 t 检验。

结 果

1 六味地黄汤对 Cy 处理小鼠脾细胞抗体生成反应的影响 见表 1。对照组小鼠对 SRBC 诱导的抗体生成反应明显下降。六味地黄汤诸剂量组对 Cy 所诱发的抗体生成反应低下具有明显的改善作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其最佳剂量在 10~20g/kg 之间。因此,选择六味地黄汤 10g/kg 的剂量作为推算其化学分离组分剂量的参考标准。

表 1 六味地黄汤对 Cy 处理小鼠脾细胞抗体生成反应的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	PFC/ 10^6 脾细胞
正常	—	1705 $\pm$ 63
对照	—	1112 $\pm$ 67 *
Cy + 六味	5.0	1312 $\pm$ 83 [△]
	10.0	1452 $\pm$ 42 ^{△△}
	20.0	1483 $\pm$ 87 ^{△△}

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与对照组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;样本数均为 4 个;下表同。

2 六味地黄汤醇溶(Fr1)及醇沉(Fr2)部分对 Cy 处理小鼠脾细胞抗体生成反应的影响 见表 2。Fr1 及 Fr2 对 Cy 引起的脾细胞 PFC 形成数目减少均有明显的升高作用,其活性高于水煎剂组,通过比较其大致推算的等效剂量可以看出,Fr2 的活性高于 Fr1。

3 Fr 2 大孔树脂柱层析分离成分(MR)对 Cy 处理小鼠脾细胞抗体生成反应的影响 见表 3。Fr2-MR1、2、4、5 四个来源于 Fr2 的组分均可不同程度地使 Cy 处理小鼠脾细胞 PFC 数目增加,其中以 Fr2-MR5 的活性较强。

4 Fr2 活性炭层析分离成分(CA)对 Cy 处理小鼠脾细胞抗体生成反应的影响 见表 4。来源于 Fr2 活性炭柱层析的组分 Fr2-CA2、3、4 对 Cy 所致小鼠抗体生成反应的下降均有明显的改善作用,使脾细胞 PFC 的形成数目明显增加,其中以 CA3、CA4 的作用较强。

表 2 六味地黄汤 Fr1 及 Fr2 对 Cy 处理小鼠脾细胞抗体生成反应的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	PFC/ 10^6 脾细胞
正常	—	1752 $\pm$ 68
对照	—	1123 $\pm$ 90 *
Cy + 六味	10.0	1305 $\pm$ 70 [△]
Cy + Fr1	2.0	1581 $\pm$ 78 ^{△△}
	4.0	1493 $\pm$ 103 ^{△△}
Cy + Fr2	1.5	1452 $\pm$ 84 ^{△△}
	3.0	1746 $\pm$ 98 ^{△△}

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与对照组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表 3 Fr2-MR 对 Cy 处理小鼠脾细胞抗体生成反应的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	PFC/ 10^6 脾细胞
正常	—	1251 $\pm$ 39
对照	—	475 $\pm$ 68 *
Cy + Fr2	3.0	440 $\pm$ 32
Cy + MR1	0.5	506 $\pm$ 27
	1.0	601 $\pm$ 31 [△]
Cy + MR2	0.07	390 $\pm$ 47
	0.15	720 $\pm$ 43 ^{△△}
Cy + MR3	0.04	613 $\pm$ 79
	0.08	541 $\pm$ 40
Cy + MR4	0.12	471 $\pm$ 31
	0.25	680 $\pm$ 41 [△]
Cy + MR5	0.04	1231 $\pm$ 22 ^{△△}
	0.08	838 $\pm$ 27 ^{△△}

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与对照组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表 4 Fr2-CA 对 Cy 处理小鼠脾细胞抗体生成反应的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	PFC/ 10^6 脾细胞
正常	—	998 $\pm$ 60
对照	—	705 $\pm$ 44 *
Cy + Fr2	3.0	985 $\pm$ 53 [△]
Cy + CA2	0.25	758 $\pm$ 61
	0.5	942 $\pm$ 60 [△]
Cy + CA3	0.125	1138 $\pm$ 55 [△]
	0.25	958 $\pm$ 68 [△]
Cy + CA4	0.125	1293 $\pm$ 45 [△]
	0.25	1292 $\pm$ 63 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与对照组比较,[△] $P < 0.01$

5 Fr2 的 CA3、CA4、MR5 免疫活性比较 见表 5。CA3、CA4 及 MR5 对 Cy 所致小鼠抗体生成反应下降具有明显的改善作用,其中以 CA4 剂量为 0.125g/kg 时作用最为显著。

表 5 Fr2 的 CA3、CA4、NR5 免疫活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	PFC/10 ⁶ 脾细胞
正常	—	1001 ± 57
对照	—	646 ± 76*
Cy + CA3	0.125	963 ± 101 [△]
	0.25	943 ± 85 [△]
Cy + CA4	0.125	1285 ± 102 [△]
	0.25	981 ± 29 [△]
Cy + MR5	0.04	1198 ± 133 [△]
	0.08	1098 ± 86 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与对照组比较,[△] $P < 0.01$

讨 论

以往国内外对中药研究的方法大多是先从单味中药中分离提取某种化学成分,然后再去评价其药理活性。运用这种研究方法曾经发现了一些具有药理活性的成分,但由于化学分离不以活性为导向,因而使化学分离和药理学研究均具有一定的盲目性,使分离获得活性成分的周期延长,机率减小,无效工作量增加。有时虽然能够分离到活性成分,但具有难以客观地比较、分析、判断其活性成分是否是最佳或唯一的活性成分,以及分离过程中有无活性物质的丢失等局限性。因此,本研究首次尝试了运用中药化学与药理学密切合作的方法,以中药复方为对象,以活性评价为导向,从六味地黄汤中定向追踪分离具有调节免疫功能的活性成分,获得了主要活性部位 CA4。

在中药活性成分的定向追踪分离过程中,选择或建立准确、快速的活性评价指标是最为重要的工作之一。虽然评价免疫功能的指标有许多种,但无论哪一种既有其特点,也有其局限性。同时采用多种免疫学指标进行导向评价虽可更为准确地反映分离产物的活性,但工作量大、周期长、花费高、难以实行。Luster 等⁽⁶⁾分别比较了 12 种免疫指标分别对免疫功能的评价,结果与 12 种指标综合评价结果的符合率。结果表明,单项指标中以 T 细胞亚群分布的符合率(81%)最高,PFC 实验居第二位(78%)。T 细胞亚群分布的符合率虽然最高,但毕竟并非直接功能实验,而且实验所需条件较高,作为活性导向评价方法尚有一定的难度。PFC 实验涉及了巨噬细胞提呈抗原、辅助 T 细胞的辅助作用及 B 细胞产生抗体三个主要免疫应答过程,影响其中任何一个过程均可最终影响抗体生成能力。因

此,本研究选用以环磷酰胺处理小鼠为模型,以 PFC 实验为六味地黄汤免疫调节活性成分导向分离的活性评价指标。结果表明,这是一个行之有效的方案。

六味地黄汤醇溶部分(Fr1)以小分子物质为主,醇沉部分(Fr2)则以水溶性大分子成分为主,二者均具有改善 Cy 处理小鼠抗体生成反应的活性,但 Fr2 的活性高于 Fr1。因此,对 Fr2 继续进行追踪分离。应用活性炭柱层析分离 Fr2 获得了四个组分,其中以 CA3 和 CA4 的活性较强。Fr2 用大孔树脂柱层析分离得到五个组分,其中以 MR5 活性较强。三者当中以 CA4 活性较强,而且得率最高,提示六味地黄汤醇沉部分调节免疫功能的活性成分主要存在于 CA4 当中。

初步化学分析结果表明,CA4 主要含有酸性多糖,分子量在 5 000~40 000 之间。目前虽然已有关于组成六味地黄汤单味药免疫活性成分的报道,如地黄多糖、茯苓多糖等,但国内外尚未见这些单味药中含有酸性多糖的报道。1991 年日本报道了从十全大补汤中分离获得具有促进淋巴细胞增殖反应的酸性多糖⁽⁷⁾,1995 年又报道了从小柴胡汤中分离获得了具有增强 NK 细胞活性的酸性多糖⁽⁸⁾。因此,CA4 中所含有的酸性多糖可能是六味地黄汤发挥免疫调节的主要活性成分之一。对 CA4 中酸性多糖的进一步分离纯化及活性鉴定正在进行当中。

参 考 文 献

1. 郑家驹,龚正亮,姜继华,等.四种中药补方对免疫功能的影响.中成药研究 1981;(12):28—30.
2. 李顺成,钱瑞琴,范维崧,等.六味地黄汤及杞菊地黄汤对老年小鼠免疫衰老的调整作用.中成药 1990;12(10):28—30.
3. 李 萍,石晓宏,王凤连.六味地黄丸和地黄的免疫药理研究.中国免疫学杂志 1987;3(5):296—298.
4. 姜廷良,严述常,王素芬,等.六味地黄汤防治肿瘤的研究.中医杂志 1983;24(6):71—74.
5. 钱玉昆.实用免疫学新技术.第 1 版.北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1994:14—15.
6. Luster MI, Portier C, Pait DG, et al. Risk assessment in immunotoxicology 1. Sensitivity and predictability of immune tests. Fundam Appl Toxicol 1992;18(2):200—210.
7. Kiyohara H. Characterization of mitogenic pectic polysaccharides from kampo (Japanese Herbal) medicine "Juzen-Taiho-To". Planta Med 1991;57(3):254—259.
8. Yamaoka Y. A polysaccharide fraction of shosaiko-to active in augmentation of natural killer activity by oral administration. Biol Pharm Bull 1995;18(6):846—849.

(收稿:1997-06-06 修回:1998-01-08)