

养阳益肾汤补肾生髓作用机理的研究

高依卿(福州市传染病医院 福州 350004)

陈玉春 王碧英(福建省中医药研究院 福州 350003)

摘要 养阳益肾汤能显著促进次亚适量 ConA 刺激的小鼠脾淋巴细胞³H-TdR 的掺入($P < 0.001$),显著促进小鼠脾条件培养液(SCM)中集落刺激因子(CSFs)的产生($P < 0.05$),明显促进小鼠肺条件培养液(LCM)中 CSFs 的生成。结果提示养阳益肾汤有增强细胞免疫和刺激骨髓造血功能的作用。

关键词 养阳益肾汤 ³H-TdR 脾条件培养液 肺条件培养液 集落刺激因子

Research on the Mechanism of Tonifying the Kidney and Producing Bone Marrow by a Yang-enriching and Kidney-Reinforcing Decoction

Gao Yiqing(Fuzhou Hospital of Infectious Diseases, Fuzhou, 350004)

*Chen Yuchun, Wang Biying(Fujian Provincial Institute of Traditional
Chinese Medicine, Fuzhou, 350003)*

Abstract: An enriching Yang and reinforcing Kidney decoction was observed sig-

nificantly to enhance the uptake of $^3\text{H-TdR}$ into ConA-stimulated murine splenic lymphocytes ($P < 0.001$). The decoction was also able to markedly promote production of colony stimulating factors (CSFs) both in murine spleen-conditioned medium (SCM) ($P < 0.05$), and in lung conditioned medium (LCM). The results indicated that the decoction for enriching Yang and reinforcing Kidney appeared to have effects on cellular immunity and proliferation of bone marrow in mice.

Key words: Yang-enriching and Kidney-reinforcing decoction, $^3\text{H-TdR}$, Spleen-conditioned medium (SCM), Lung-conditioned medium (LCM), Colony Stimulating Factors (CSFs)

根据中医“肾生髓”、“血之源头在于肾”的理论,现代医学认为中医肾与机体免疫功能和骨髓造血功能有关。“肾生髓”不仅包括骨髓造血功能,而且也包括免疫细胞的产生,“肾精”对血液生化有重要作用。故本文观察养阳益肾汤对次亚适量 ConA 刺激的小鼠脾淋巴细胞 $^3\text{H-TdR}$ 掺入,及对小鼠脾条件培养液 (SCM) 和肺条件培养液 (LCM) 中集落刺激因子 (CSFs) 产生的影响,以探讨中医养阳补肾与机体细胞免疫和骨髓造血功能间的关系。

1 材料与方

1.1 动物 ICR 小鼠,体重 20~25g,雌雄兼用。由上海计划生育科学研究所提供,清洁级。随机分为对照组与实验组,每组 6 只。

1.2 药物与给药

1.2.1 药物 养阳益肾汤系根据临床实践而自拟的处方,由何首乌、淫羊藿、枸杞、菟丝子、巴戟天和续断按 9:9:9:6:6:6g 比例组成。上述方药先后加蒸馏水 1000 和 500ml 煮沸 2 和 1.5h,合并两次药液,过滤,水浴蒸发至 100ml,终浓度为每 ml 含何首乌、淫羊藿、枸杞各 0.09g,菟丝子、巴戟天、续断各 0.06g。

1.2.2 给药 实验组小鼠灌胃给药,对照组给水,每次均 0.6ml/只,剂量为何首乌、淫羊藿、枸杞各 2.7g/kg,菟丝子、巴戟天、续断各 1.8g/kg。每日二次,连续 7 天。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠脾淋巴细胞 $^3\text{H-TdR}$ 掺入测定 按唐波等^[1]方法,略有改进。细胞浓度为 1×10^5 /孔,次亚适量 ConA 浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.3.2 CSFs 测定

1.3.2.1 SCM 制备^[2] 对照组和实验组小鼠分别颈椎脱臼处死,无菌取脾,剪碎、轻磨制成混合脾细胞悬液,120 目尼龙网过滤,0.83% Tris-NH₄Cl 破坏红细胞,洗涤,经台盼兰染色测定细胞活率大于 95%,再以 RPMI-1640 (补充 10% 人 AB 混合血清、5mM Hepar's、50 μM 2-ME、300mg 谷氨酰胺、青霉素、庆大霉素各 100U/ml、链霉素 100 $\mu\text{g/ml}$, pH7.2) 制成浓度为 1×10^7 /ml 的混合脾淋巴细胞悬液,加 ConA 5 $\mu\text{g/ml}$,分装于 25ml 方型螺口培养瓶,置含 5%CO₂ 的潮湿大气中 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 天。离心收获上清液即为 SCM。小瓶分装 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2.2 LCM 制备^[2] 对照组和实验组小鼠分别颈椎脱臼处死,无菌取双侧肺,用 Hank's 液洗去血液,每组 6 只小鼠的肺混合剪碎,按每只小鼠肺加 2ml 培养液计算,加入含 10% 马血清的 RPMI-1640 培养液,制成肺组织悬液,分装于 25ml 方型螺口培养瓶中,置含 5%CO₂ 潮湿大气中 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 7 天。离心收获即为 LCM。小瓶分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2.3 骨髓细胞悬液制备 取正常小鼠 6 只,无菌取双侧髌骨,用 6 号针头吸培养液冲洗骨髓腔,混合骨髓细胞悬液过 4 号针头,以上述 RPMI-1640 培养液制成 5×10^6 /ml

有骨髓细胞悬液,作为测定 CSFs 活性的反应细胞。

1.3.2.4 测定 CSFs 活性 取-20℃保存的 SCM 或 LCM 作倍比稀释,用骨髓细胞测定其 CSFs 活性。即在 96 孔平底培养板(Falcon 3072)中,每孔加骨髓细胞悬液 5×10⁵/0.1ml 和 0.1ml 不同稀释度的 SCM 或 LCM,对照孔加等量的培养液。置含 5%CO₂ 的潮湿大气中 37℃温育 5 天。终止培养前 16h 加入 ³H-TdR(上海原子核研究所,放射比活性 28Ci/mM)0.5μCi/孔,用 ZT(Ⅰ)型多头细胞样品收集器收获于 49 型玻璃纤维滤纸上,以 LS-7800 型 Beckman 液体闪烁计数器测 cpm。结果以 1 份 3 孔的 cpm 均值表示。

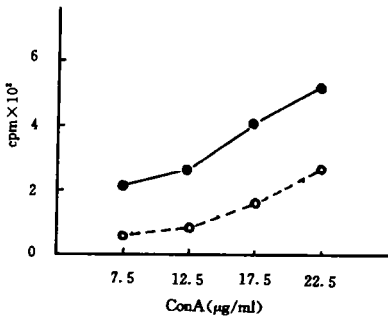


图 1 养阳益肾汤对不同浓度 ConA 刺激的小鼠脾淋巴细胞³H-TdR 掺入的影响
○对照组 ●实验组

2 结果

2.1 养阳益肾汤对次亚适量 ConA 刺激的小鼠脾淋巴细胞³H-TdR 掺入的影响

实验组 3375±937cpm 明显高于对照组 1359±307cpm,二者相比有显著差异(P<0.001)。提示养阳益肾汤有显著促进 ConA 刺激的小鼠脾淋巴细胞³H-TdR 掺入的作用。

2.2 养阳益肾汤对不同浓度 ConA 刺激的小鼠脾淋巴细胞³H-TdR 掺入的影响

图 1 显示不同浓度(7.5~22.5μg/ml) ConA 刺激的小鼠脾淋巴细胞³H-TdR 掺入

的水平,实验组 cpm 明显高于对照组,二者相比有显著差异(P<0.005),结果提示养阳益肾汤对不同浓度 ConA 刺激的小鼠脾淋巴细胞³H-TdR 掺入有显著促进作用,结果与 2.1 项相符。

2.3 养阳益肾汤对小鼠 SCM 中 CSFs 产生的影响

表 1 养阳益肾汤对小鼠 SCM 中 CSFs 产生的影响

SCM 稀释度	对照组 cpm (X̄±SD)	实验组 cpm (X̄±SD)
1/1	1565±427	658±225
1/2	1625±99	1333±235
1/4	1895±486	2625±16
1/8	1460±317	4742±186
1/16	1245±155	4087±73
1/32	623±110	3965±81

实验组和对照组均用 6 只小鼠的脾脏混合制备 SCM,以骨髓细胞测定不同稀释度 SCM 中 CSFs 水平。结果(表 1)表明 SCM 原液或 1/2 稀释时,实验组 cpm 低于对照组;1/4~1/32 稀释时,实验组 cpm 明显高于对照组。从 1/1~1/32 比较,二组有显著差异(P<0.05)。图 2 显示 SCM1/8 稀释时,cpm 最高。提示养阳益肾汤对小鼠 SCM 中 CSFs 产生有显著促进作用,而且 1/8 稀释时,CSFs 活性最强。

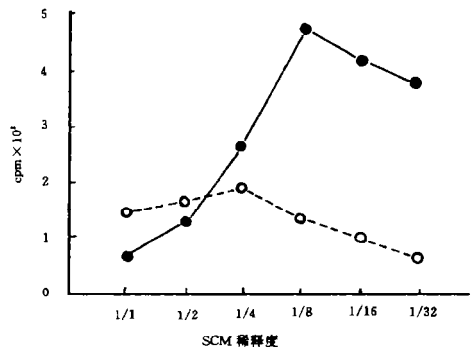


图 2 养阳益肾汤对小鼠 SCM 中 CSFs 产生的影响
○对照组 ●实验组

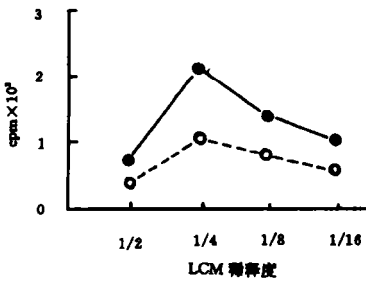


图3 养阳益肾汤对小鼠 LCM 中 CSFs 产生的影响

○对照组 ●实验组

2.4 养阳益肾汤对小鼠 LCM 中 CSFs 产生的影响

实验组和对照组均以 6 只小鼠的肺制备混合 LCM,以骨髓细胞测定不同稀释度(1/2~1/16)LCM 中的 CSFs 水平。结果(图 3)显示实验组 cpm 高于对照组,但二组相比未达显著差异($0.4 > P > 0.05$)。提示养阳益肾汤有促进小鼠 LCM 中 CSFs 生成的趋势。

3 讨论

中医“肾”本质与机体免疫功能密切相关,肾虚时,细胞免疫功能低下。³H-TdR 掺入水平是衡量机体细胞免疫功能的有效指标之一。淋巴细胞活化时,DNA 合成增加。DNA 是细胞分裂增殖的物质基础,RNA 是在 DNA 模板上合成,又决定蛋白质的合成。故养阳益肾汤可能通过促进 DNA、RNA 和蛋白质的合成,增强机体细胞免疫功能而滋补肾虚。

激活的淋巴细胞会分泌包括 CSFs 在内的多种细胞因子。目前,已知机体造血细胞分化与增殖至少受多集落刺激因子(multi-CSF,又称 IL-3)、粒/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)等 4 种 CSFs 相互作用的调节。在小鼠 SCM 中已分

离出 IL-3、GM-CSF,及从 LCM 中已提纯出 GM-CSF、G-CSF 和 M-CSF^[3,4]。CSFs 是强烈的造血刺激因子。养阳益肾汤显著促进 SCM 和明显增加 LCM 中 CSFs 分泌,导致循环中 CSFs 水平升高或活性增强,进而影响骨髓造血功能,促进血细胞的生成、成熟和释放,而起补血活血作用。

中医认为肾充养骨髓,骨依赖髓营养,髓的生成又为“肾主骨”提供物质基础。养阳益肾汤刺激 CSFs 分泌、促进骨髓造血功能,其补肾生髓的药理作用与中医“肾生髓”的理论吻合。温阳补肾是中医重要治则之一。养阳益肾汤以淫羊藿、菟丝子、巴戟天、续断补阳为主,兼以枸杞补阴、何首乌补血,其结果能发挥补肾生髓的药效,亦验证了明·张景岳“善补阳者,必阴中求阳,阳得阴助,生化无穷”的观点。

灌服养阳益肾汤小鼠制备的 SCM 中,CSFs 水平与 SCM 的稀释度呈明显量效反应。证明 SCM 中存在能触发骨髓造血的细胞因子。SCM 原液或作 1/2 稀释时,实验组 CSFs 水平反低于对照组,提示高浓度 SCM 中,同时存在能抑制骨髓细胞增殖的物质,其抑制作用随 SCM 稀释度的增大而减弱,1/4 稀释时则消失,并开始显示刺激骨髓细胞增殖的活性。抑制物质能否通过透析清除之,尚待深入研究。

参 考 文 献

- [1]唐波等. 中国免疫学杂志,1985;1(5):46
- [2]江飞子等. 实验生物学报,1986;19(2):203
- [3]Nicola N A et al. Immunol Today, 1984;5(3):76
- [4]Burgess A W et al. j Bio chem, 1985;260(29):16004