

黄芪建中汤和补中益气汤对脾虚模型小鼠 免疫调节作用的实验研究

万 幸 刘倩娴 陈妙欢 梁旻若(广州中医药大学基础医学院 广州 510407)

摘要 采用小鼠大黄脾虚模型,用核素掺入法测定 IL-2 活性、核素标记靶细胞测定 NK 活性、微量细胞病变法测定 IFN- γ 水平。结果:脾虚小鼠的免疫指标明显低于正常组;补中益气汤和黄芪建中汤均能使之提高至正常水平,而对正常小鼠免疫指标无明显影响。

关键词 黄芪建中汤 补中益气汤 白细胞介素 2 自然杀伤细胞 干扰素

Experimental Study on the Immunoregulatory Effect of Huangqi Jianzhong Decoction and Buzhong Yiqi Decoction on Spleen-deficiency Model Mice

Wan Xing, Liu qianxian, Chen Miaohuan, Liang minruo

(College of Basic Medical Science Guangzhou University of TCM, Guangzhou, 510407)

Abstract: Using the model mice with spleen-deficiency syndrome induced by rhubarb, the IL-2 activity was detected by the method of incorporation of tritiated thymidine, NK activity by the method of tritiated thymidine labeled target cells and IFN- γ titer by the method of micro-cytopathic effects. The NK activity, IL-2 and IFN- γ levels decreased significantly in the spleen-deficiency groups, while those parameters could be improved to normal level by Huangqi Jianzhong Decoction (HJD) and Buzhong Yiqi Decoction (BYD), there was no significant change in normal groups treated with HJD or BYD.

Key words: Huangqi Jianzhong Decoction, Buzhong Yiqi Decoction, interleukin 2, natural killer cell, interferon gamma

黄芪建中汤是临床常用的温阳健脾的代表方剂,补中益气汤则是临床常用的益气健脾的代表方剂。临床研究^[1]表明黄芪建中汤和补中益气汤能够改善脾虚病人的免疫功能。本实验采用大黄脾虚小鼠模型,观察其自然杀伤细胞(NKC)活性,白细胞介素-2(IL-2)及免疫干扰素(IFN- γ)水平的变化,以探讨黄芪建中汤和补中益气汤的免疫调节作用,并比较两个补虚方剂所代表的温阳健脾和益气健脾治则特点以及小鼠大黄脾虚模型的证候属性。

1 材料

1.1 中药煎剂 黄芪建中汤^[2]:黄芪 9g,芍药 18g,桂枝 9g,炙甘草 6g,生姜 12g,大枣 5枚。补中益气汤^[2]:黄芪 20g,人参 10g,白术 10g,炙甘草 5g,陈皮 6g,当归 10g,柴胡 3g,升麻 3g。按常规方法煎成 1Kg/L 水煎剂,黄芪建中汤溶入饴糖 33g,浓缩或稀释为所需浓度。大黄水煎剂按文献^[3]方法煎制。以上均 4℃ 保存。其中多基源药材经本校中药学院品种资源室丁平老师鉴定,大黄为 *Rheum officinale* Baill 的干燥根茎,甘草为 *Glycyrrhiza uralensis* Fischer 的干燥根,黄芪为 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,柴胡为 *Bupleurum chinense* DC. 的

干燥根,升麻为 *Serratula chinensis* S. Moore 的根。

1.2 实验动物、细胞系和病毒 NIH 小鼠,雄性,体重(20±2)g,广东省医用实验动物场提供。*C*_{57BL/6} 小鼠,6~8 周龄,第一军医大学实验动物研究所提供。小鼠成纤维细胞(L₉₂₉)、YAC-1 细胞、滤泡性口炎病毒(VSV) Indiana 株分别由广州医学院微生物学教研室、珠江医院血液科、广州市儿童医院病毒室提供,按常规方法传代、培养、保存。

1.3 营养液 RPMI-1640(美国 GIBCO)中加入 10% 小牛血清、2mM 谷氨酰胺、20mM HEPES、1~5×10⁻⁵M 2-巯基乙醇(2-ME)、青霉素 2×10⁵U/L、链霉素 200mg/L, pH7.2。

1.4 其它试剂 刀豆蛋白 A(ConA)、 α -甲基甘露糖苷(α -mm)(美国 sigma)。³H-甲基胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)中国原子能科学研究院。淋巴细胞分离液上海试剂二厂。

2 方法

2.1 动物分组与给药方法 小鼠先随机分为两大组,即大黄脾虚模型组(简称脾虚组)和正常组,脾虚组按文献^[3]方法胃饲 1Kg/L 大黄水煎剂 0.5ml/只/d,连续 8d,正常组胃饲等量蒸馏水。第 9d 将两组动物再分组,分为对照组及不同剂量的给药组(2 方各 3 个

剂量),每组 10 只小鼠,连续灌胃给药 12d。对照组则以等量蒸馏水代替。

2.2 小鼠脾细胞悬液制备 本室常规方法,小鼠摘眼球放血,拉颈处死,无菌取脾,在 100 目铜网上轻轻挤压,制成细胞悬液,用低渗压除去红细胞,以 Hank's 液洗涤,配成 $1 \times 10^{10}/L$ 及 $2 \times 10^{10}/L$ 脾细胞悬液。

2.3 小鼠脾细胞 NK 活性测定用 3H -TdR 标记靶细胞法^[4] NK 活性用 3H -TdR 释放率(%)表示,即

$$^3H\text{-TdR 释放率} = 1 - (\text{实验孔 cpm 均值} \cdot \text{靶细胞对照孔 cpm 均值}^{-1}) \cdot 100\%$$

2.4 小鼠脾细胞 IL-2 的制备及活性测定^[5]

实验第 21d,将各组小鼠脾细胞($1 \times 10^{10}/L$)加入 24 孔培养板,2ml/孔,再加 ConA 5mg/L,37℃ 5%CO₂ 培养 24h,离心,收获上清,为检测样本,-40℃ 保存。用激活的淋巴细胞增殖 3H -TdR 掺入法检测 IL-2 活性。IL-2 活性用刺激指数(SI)表示。

$$SI = IL\text{-2 样本孔 cpm 均值} \cdot \text{ConA 对照孔 cpm 均值}^{-1}$$

2.5 小鼠脾细胞 IFN- γ 的制备及活性测定^[6] 实验第 21d,将各组小鼠脾细胞($1 \times 10^{10}/L$)加入 24 孔培养板,2ml/孔,再加 ConA 10mg/L,37℃,5%CO₂ 培养 48h,离心,收获上清,-40℃ 保存。用微量细胞病变抑制法测定干扰素活性,用 Reed Muench 法计算干扰素活性,以 Log₂ U/ml 表示。

3 结果

3.1 黄芪建中汤和补中益气汤对正常及脾虚模型小鼠 NK 活性、IL-2 及 IFN- γ 的影响,结果如表 1。

3.2 正常对照组与脾虚对照组比较,脾虚对照组除出现食欲减退,体重减轻,腹泻脱肛,动作迟缓,成群倦卧,毛疏散竖立等表现外,其 NK 活性,IL-2 及 IFN- γ 水平均明显低于正常组。

3.3 正常组给予黄芪建中汤或补中益气汤后,各剂量组的免疫指标无明显变化;脾虚组给予黄芪建中汤或补中益气汤,两方中剂量

组 IFN- γ 均有明显升高;高剂量时 3 项指标均升高。以上升高的各组值与正常对照组比较,其差别无显著性。

表 1 黄芪建中汤和补中益气汤对 NK,IL-2,IFN- γ 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	NK 活性(%)	IL-2(SI)	IFN- γ 效价
正常对照	0	38.34±6.23**	18.30±6.08*	7.30±0.41**
	7.5	38.68±7.36	16.22±2.33	7.28±0.25
	22.5	39.29±7.34	13.43±6.75	7.39±0.25
	37.5	38.14±6.50	13.51±6.85	7.30±0.31
	5	39.54±0.05	20.21±9.78	7.24±0.15
	20	39.55±3.24	18.63±8.74	7.55±0.31
脾虚对照	0	25.94±8.54	12.61±5.01	6.32±0.30
	7.5	31.41±2.04	13.48±4.76	6.47±0.39
	22.5	36.17±7.58*	15.71±4.38	7.23±0.25**
	37.5	37.30±2.15**	21.55±8.79*	7.02±0.22**
	5	31.16±8.68	16.72±4.55	6.42±0.28
	20	31.54±9.64	16.39±4.55	6.42±0.28**
补中益气	40	33.37±6.36*	17.71±5.51*	7.06±0.41**

注:与脾虚对照组比较 *P<0.05, **P<0.01, n=10

4 讨论

4.1 NK 细胞,IL-2,IFN- γ 是体内细胞因子网络的重要组成部分^[7],在免疫调节方面起重要作用,检测它们的活性水平,可以反映出整个机体免疫功能的状态。本实验选用这 3 个指标可以基本反映机体免疫功能的状态及药物对其的影响。小鼠大黄脾虚模型是一种被广泛采用的动物模型。实验中,模型动物除表现为食欲减退,腹泻脱肛,动作迟缓,成群倦卧等体征外,免疫学指标也明显低于正常水平,表明免疫功能低下是脾虚证的重要表现之一。

4.2 黄芪建中汤方出自张仲景《金匱要略》,功效温中补气,和里缓急,主治“虚劳里急诸不足”;补中益气汤出自李东垣《脾胃论》,功效补中益气,升阳举陷,主治脾胃气虚及气虚下陷,两方均用于治疗脾虚证。实验表明两方均能使脾虚模型低下的免疫学指标恢复至正常水平,这与“虚则补之”的原则相一致;同时,‘以方测证’也证明了该模型作为‘脾虚证’模型是成立的。

4.3 两方的治则也存在差别,黄芪建中汤长

于温阳健脾,补中益气汤侧重益气健脾。本实验中两方对模型动物的免疫指标的影响作用相似,无显著差别,我们认为不能因此而否定益气健脾和温阳健脾两治则的区别,小鼠大黄脾虚模型证型特点是以脾气虚为主,兼有脾阳虚的表现,因而,用这一两证混杂的模型也就难以看出温阳健脾与益气健脾两治则之间的区别。其次,免疫功能降低仅为脾虚证的一个重要方面,脾虚证的内涵远不局限于此,两方均以黄芪为主药,在改善实验指标方面可能起主要作用。而其它组分如缓急止痛的白芍、升阳举陷的升麻等可能在改变免疫指标方面不起主要作用,而在配合主药治疗虚劳里急和脏器下垂等方面起重要作用,这也正是中药复方的精妙之处。

本实验是用整方进行的体内研究,要弄清其确切的免疫药理机制以及不同组分的功效和联系,尚需进一步的体外实验及拆方研究。

参考文献

- 1 许济群. 方剂学. 上海:上海科学技术出版社, 1985. 80,95
- 2 杨承进,黄月华,洪伟,等. 黄芪建中汤和补中益气汤对虚寒胃痛和脾虚泄泻免疫功能的影响. 中医杂志,1983,24(1):53~54
- 3 北京师范大学生物系消化生理教研组. 中医脾虚证动物模型的造型. 中华医学杂志,1980,60(2):83~86
- 4 冯作化,陈兆聪. 用³H-TdR 标记靶细胞检测细胞介导的细胞毒作用. 中国免疫学杂志,1988,4(2):73~76
- 5 金虹,梁旻若,王建华. 从IL-2水平探讨黄芪及黄芪多糖的免疫调节作用. 中国免疫学杂志,1989,5(5):308~310
- 6 刘倩娴,梁旻若,陈妙欢,等. 绞股蓝皂甙对小鼠产生IFN- γ 的影响. 广州中医药学报,1991,2(3):212~217
- 7 曹雪涛,叶天星,杜平. 细胞因子和细胞因子网络的基础研究进展. 国外医学免疫学分册,1990,13(5):230~233 (收稿:1997-11-11)