

复方二神丸中的药物炮制后对 T 淋巴细胞亚群 及 cAMP/cGMP 的调节作用

潘新, 胡昌江*, 耿媛媛, 赵玲, 熊瑞, 陈志敏
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] **目的:**比较二神丸方剂中的两味中药炮制前、后对脾肾阳虚泄泻模型大鼠全血 T 淋巴细胞亚群和环磷酸腺苷(cAMP)与环磷酸鸟苷(cGMP)比值(cAMP/cGMP)失衡的调节作用,为阐明二神丸中药物炮制增效机制提供实验依据。**方法:**将 50 只 SD 雄性大鼠随机分为正常、模型、阳性对照参苓白术丸 $2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组,二神丸生品(生补骨脂+生肉豆蔻) $3.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组、二神丸炮制品(盐补骨脂+煨肉豆蔻) $3.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组共 5 组,通过复合因素造脾肾阳虚泄泻模型 4 周,并按组给药 2 周,分别从股动脉和眼眶后静脉丛取全血和血清,用流式细胞仪检测全血各组样本 T 淋巴细胞亚群 CD3^+ , $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ 的百分比;用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清样本中环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)的水平。**结果:**3 个给药组均能显著提高模型动物血清中 cAMP/cGMP 和全血 CD3^+ , $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ 百分比,而 $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ 百分比则显著降低,且炮制品二神丸组对 CD3^+ , $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ 百分比和 cAMP/cGMP 的调节作用明显强于生品二神丸组。**结论:**复方二神丸中药物经过炮制后能显著恢复脾肾阳虚泄泻模型大鼠全血 $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ ($P<0.01$) 和血清 cAMP/cGMP ($P<0.01$) 的水平,提示二神丸中的两味中药炮制后增强疗效可能与其增强脾肾阳虚泄泻模型大鼠对 T 细胞网络平衡(CD3^+ , $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$) 和 cAMP/cGMP 平衡的调节作用有关。

[关键词] 二神丸; 炮制; T 淋巴细胞亚群; 环磷酸腺苷/环磷酸鸟苷

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0138-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130138

T Lymphocyte Sub-population and cAMP/cGMP Regulating Effect by Processed Ershen Pill Formula

PAN Xin, HU Chang-jiang*, GENG Yuan-yuan, ZHAO Ling, XIONG Rui, CHEN Zhi-min
(Medicine Institute, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the T-lymphocyte sub-population and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) /cyclic guanosine monophosphates (cGMP) regulating effect of Ershen pill formula and its processed product on in spleen-kidney YANG deficiency rats, and provide experimental basis for mechanism of Ershen pill processing. **Method:** Fifty SD male rats were divided into normal group, model group, positive control group, the processed formula Ershen pill group (the crude fructus psoraleae combined with the crude fructus myristica). The composite factors were used to made the rat spleen-kidney YANG deficiency diarrhea model for 4 weeks, after 2 weeks of administration the whole blood and separate serum were collected, flow cytometry and ELISA were used to detect the percentage of CD3^+ , $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ and the content of cAMP and cGMP. **Result:** Compared with the model group, the three dose groups all could significantly improve cAMP/cGMP and the percentage of CD3^+ , $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, reduce the percentage of $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$, the impact on CD3^+ , $\text{CD3}^+/\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ percentage and cAMP/cGMP was more significant in Ershen pill processed group. **Conclusion:** The

[收稿日期] 20131224013

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81274085)

[第一作者] 潘新,在读博士,从事中药学研究, Tel:18607196428, E-mail:px520520@126.com

[通讯作者] * 胡昌江,教授,博士生导师,从事中药炮制学的教学和科研, Tel:13980980796, E-mail:hhecjj@hotmail.com

components in Ershen pill after processing can recover the lever of $CD3^+ CD4^+$, $CD3^+ CD8^+$ ($P < 0.01$) and cAMP/cGMP ($P < 0.01$) in spleen-kidney YANG deficiency diarrhea rats. This result indicates that the formula Ershen pill after processing can enhance the curative effect, which may be associate with adjusting the balance of T cell network ($CD3^+ CD4^+$, $CD3^+ CD8^+$) and cAMP/cGMP in spleen-kidney YANG deficiency diarrhea rats.

[Key words] Ershen pill; processed products; T-lymphocyte sub-population; cAMP/cGMP

二神丸出自宋·许叔微的《普济本事方》,由肉豆蔻和补骨脂两味药组成,主治“脾肾虚弱,五更泄泻”。五更泄,又称肾泄、鸡鸣泻,多由命门火衰,火不暖土,脾失健运所致,其病机主要为脾肾阳虚。从标本兼治的角度分析,治疗五更泻本在温肾暖脾,标在止泻。方中补骨脂辛苦性温,补命门之火以温养脾土,臣以肉豆蔻温中涩肠以止泻^[1]。在前期研究中已经证明复方中补骨脂、肉豆蔻分别经盐炙和煨炙后能增强固涩止泻的作用,但对于五更泄的病机——脾肾阳虚证的作用还未进行相关研究。

许多研究者认为脾肾阳虚证典型的指征为免疫功能低下和代谢功能紊乱,常用 T 淋巴细胞亚群功能和细胞内参与调节物质代谢和生物学功能环磷酸腺苷(cAMP)/环磷酸鸟苷(cGMP)的异常改变作为评价脾肾阳虚证的确证指标^[2-3]。故本实验以脾肾阳虚泄泻模型大鼠为主体,选择表征细胞免疫功能的 T 淋巴细胞亚群 $CD3^+ CD4^+$, $CD3^+ CD8^+$ 百分比、调节物质代谢功能的 cAMP, cGMP 含量两个方面为切入点,运用流式细胞术和酶联免疫吸附法观察补骨脂、肉豆蔻炮制前后组成的复方二神丸,对脾肾阳虚泄泻模型大鼠全血中 $CD3^+ CD4^+$, $CD3^+ CD8^+$ 百分比含量,血清中 cAMP, cGMP 水平的影响,比较两者在免疫功能和代谢功能调节上的差异,为复方二神丸中药物炮制增强对脾肾阳虚所致五更泄治疗作用的机制提供实验依据。

1 材料

1.1 动物及场地 清洁级 SD 大鼠,雄性,体质量 200 ~ 220 g,由四川达硕动物实验中心提供。实验动物生产许可证号 SCXK(川)2012-24。国家中医药管理局中药药理三级科研实验室(TCM-03-043)。

1.2 仪器 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),TGL-16B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),Thermo 可调式移液器(上海雷勃分析仪器有限公司),52 型酶标仪(芬兰 Labsystems Multiskan MS),AC8 型洗板机(芬兰, Thermo Labsystems),TG16W 型微量高速离心机(国产),GNP-9080 型隔水式恒温培养箱(国产)。

1.3 试剂 FITC 标记抗体 CD3(批号 B171781);

PE 标记抗体 CD4(批号 B137258);Cy5 标记抗体 CD8(批号 130929,均由 Bioass 公司,成都光海科技有限公司提供);大鼠 cGMP ELISA 试剂盒,批号 201310-X02),大鼠 cAMP ELISA 试剂盒(批号 201310-X08)均由成都光海科技有限公司提供;肝素钠真空采血管(武汉致远医疗科技有限公司,批号 20101103)。腺嘌呤(成都贝斯特试剂有限公司,批号 D110160),临用前用蒸馏水配成 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 混悬液。

1.4 药物 番泻叶(成都市药材市场,经成都中医药大学药学院生药教研室卢先明教授鉴定为豆科植物狭叶番泻 *Cassia acutifolia* Delile 的干燥小叶),加水煮沸约 10 min 后用 2 层纱布过滤,滤液减压浓缩成 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液。参苓白术丸^[4](山东方健制药有限公司,批号 20120515),用前粉碎过 100 目筛,用蒸馏水配置成 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液。

补骨脂和肉豆蔻(购于成都市药材市场,经成都中医药大学药学院生药教研室卢先明教授鉴定,分别为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实和肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 的干燥种仁)。

补骨脂盐炙品:取补骨脂药材,加入药材量一半的食盐水($0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),室温闷润 24 h,于 $150 \text{ }^\circ\text{C}$ 炒制 10 min 后置托盘中于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 鼓风烘箱中烘干。

肉豆蔻煨炙品:取肉豆蔻生品与麦麸(100 g:40 g)同置锅内,文火加热,温度控制在 $130 \sim 150 \text{ }^\circ\text{C}$,翻炒 20 min,至麦麸呈焦黄色,肉豆蔻呈棕褐色。

生品二神丸和炮制品二神丸药液:二神丸中补骨脂和肉豆蔻的量按《中药大辞典(方剂分册)》中的 2:1 比例配比,即:补骨脂 + 肉豆蔻(100 g:50 g)、盐补骨脂 + 麸煨肉豆蔻(100 g:50 g),粉碎成粗粉,醇水双提后浓缩配制成 $0.35 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液。

2 方法

2.1 分组与造模方法^[5-7] 将 50 只 SD 雄性大鼠随机分为正常、模型、阳性对照、二神丸生品(补骨脂 + 肉豆蔻)、二神丸炮制品(盐补骨脂 + 煨肉豆蔻)等 5 组。除正常组外,其余各组大鼠按以下方法造模(①,②同时进行复合造模):①腺嘌呤 200

mg·kg⁻¹ 剂量灌胃 4 周致肾阳虚;②单日、双日交替喂饲甘蓝(10 g/只)和精炼猪油(2 mL/只)致饮食失节,附以每日下午游泳致劳倦过度达到伤脾气目的;第 3 周开始,在之前造模基础上再通过给予灌服冰番泻叶(10 g·kg⁻¹)2 周达到伤脾阳的目的。

经过以上方法造模后,实验动物出现活动减少、反应迟钝、弓背蜷缩、体毛枯疏、体重减轻、肢尾冷,肛温低等一系列类似中医“阳虚”证状^[8],且在造模第 2 周相继出现软稀便,第 3 周出现溏泄,且部分大鼠有不同程度的脱肛、腹部肿胀的情况,故认为脾肾阳虚泄泻大鼠模型造模成功。

从造模第 4 周开始,阳性组按参苓白术丸 2.0 g·kg⁻¹ 剂量,二神丸生品、二神丸炮制品组均按 3.5 g·kg⁻¹ 剂量,连续灌胃给药 2 周。

2.2 CD3/CD4/CD8 检测前样品处理 实验 6 周后,于大鼠股动脉丛取血 2 mL,置于含有肝素钠的采血管内,缓慢摇匀。取加有 FITC anti-rat CD3, PE anti-rat CD4, Cy5 anti-rat CD8 3 种抗体各 2 μL 的流式上样管,加入 40 μL 全血,充分混匀,室温避光孵育 30 min 后加入 600 μL 溶血素,避光孵育约 10 min,1 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,移除上清液后,加入 PBS 清洗 2 次,每次 2 mL,在流式细胞仪中上

样检测。

2.3 cAMP/cGMP 检测前样品处理 实验 6 周后,于大鼠眼眶后静脉丛取血 1.5 mL,静置 30 min 后,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上层血清,4 ℃ 保存待测。按酶联免疫检测试剂盒使用说明书操作,即在 96 孔板中加入准备好的样品和对照品,生物素标记二抗和酶标试剂,37 ℃ 反应 60 min;洗板 5 次,加入显色液 A,B,37 ℃ 显色 10 min,加入终止液。在酶标仪 450 nm 波长下读测量各孔的吸光度(A)并计算。

2.4 数据处理 数据统计使用 SPSS 17.0 软件进行统计,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间分析用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 T 淋巴细胞亚群的影响 与正常组相比脾肾阳虚泄泻模型大鼠 T 淋巴细胞 CD3⁺ 和辅助/诱导 T 淋巴细胞 CD3⁺ CD4⁺ 百分比明显减少,抑制/细胞毒 T 淋巴细胞 CD3⁺ CD8⁺ 百分比增多,具有极显著差异($P < 0.01$)。同模型组相比,参苓白术丸组、二神丸生品组和二神丸炮制品组均能明显提高 CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺ 百分比,降低 CD3⁺ CD8⁺ 百分比。见表 1。

表 1 二神丸生品及炮制品对脾肾阳虚泄泻模型大鼠全血样品 CD3⁺, CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺ CD8⁺ 比例的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺
正常	-	58.15 ± 3.14	39.27 ± 5.12	24.34 ± 3.47
模型	-	37.12 ± 3.26 ²⁾	32.97 ± 5.29 ²⁾	30.05 ± 4.23 ²⁾
参苓白术丸	2.0	49.26 ± 6.46 ⁴⁾	37.34 ± 6.24 ⁴⁾	28.90 ± 4.13 ³⁾
生品二神丸	3.5	42.34 ± 4.96 ⁴⁾	35.18 ± 4.39 ³⁾	28.16 ± 3.92 ³⁾
炮制品二神丸	3.5	48.28 ± 6.31 ^{4,5)}	37.92 ± 7.36 ^{4,5)}	25.98 ± 5.89 ^{4,5)}

注:与正常组比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与生品二神丸组比⁵⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对血清中 cAMP, cGMP 及二者比值的影响 大鼠经过造模后,血清中 cAMP 含量显著下降,而 cGMP 含量则升高,导致 cAMP/cGMP 明显下降($P < 0.05, P < 0.01$),这一结果与文献报道的阳虚指征相符。通过给药治疗后,阳性药物组、生品二神丸组和炮制品二神丸组均能使大鼠血清中 cAMP 水平显著升高, cGMP 水平显著降低,进而 cAMP/cGMP 也明显有所增大。二神丸中药物炮制前后的血清 cAMP 含量无显著差异,而血清中 cGMP 含量有明显差异,所以炮制品二神丸组的血清 cAMP/cGMP 这一水平与生品二神丸组相比显著增大($P < 0.05$)。见表 2。

4 讨论

一般认为辅助性 T 淋巴细胞(CD3⁺ CD4⁺)和抑制性/细胞毒性 T 淋巴细胞(CD3⁺ CD8⁺)被认为是评价细胞免疫功能的有效指标^[9-10],这两种调节性细胞亚群的比值表示 T 细胞亚群间量的关系,两者比值的动态平衡是决定机体免疫状态和免疫水平的中心环节,当这一平衡破坏时,就可导致机体免疫能紊乱并发生一系列病理改变。环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)是由受体、环化酶以及偶联于两者间的 G 蛋白组成的,是继被称为“第一信使”的激素之后,传递生命信息的“第二信使”,是细胞内参与调节物质代谢和生物学功能的重要物

表 2 二神丸生品及炮制品对脾肾阳虚泄泻模型大鼠血清 cAMP, cGMP 及其比值的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	cAMP /pmol·L ⁻¹	cGMP /pmol·L ⁻¹	cAMP /cGMP
正常	-	45.22 ± 5.53	10.06 ± 3.52	4.18 ± 0.68
模型	-	31.24 ± 2.61 ²⁾	16.30 ± 4.51 ¹⁾	1.85 ± 0.32 ²⁾
参苓白术丸	2.0	39.04 ± 6.36	12.05 ± 2.18	3.03 ± 0.78
生品二神丸	3.5	35.87 ± 3.90 ³⁾	14.81 ± 3.65 ³⁾	2.24 ± 0.37 ³⁾
炮制品二神丸	3.5	36.90 ± 5.26 ³⁾	12.20 ± 1.51 ^{4,5)}	3.12 ± 0.52 ^{4,5)}

质。在机体内 cAMP/cGMP 适当是调节机体平衡的关键性物质,当其中一方含量发生变化或两者比例改变时,细胞功能也随之发生变化^[11]。

通过实验,笔者发现脾肾阳虚泄泻模型大鼠中 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ 这两种细胞的比值和 cAMP/cGMP 相对正常组有明显的差异,说明模型组动物的免疫调节细胞功能下降,代谢功能紊乱,这一结果与文献报道的阳虚指征相符,故认为脾肾阳虚模型造模成功。3 个给药组都能使模型大鼠的 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ 的百分含量和 cAMP, cGMP 含量, cAMP/cGMP 均趋向正常水平恢复,且二神丸炮制组大鼠比二神丸生品组大鼠的恢复效果更好,说明二神丸中的药物补骨脂和肉豆蔻在炮制后对模型大鼠的 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, cAMP/cGMP 调节作用增强。提示复方中的药物经过炮制后增强脾肾阳虚泄泻大鼠的止泻作用可能与调节模型大鼠的 T 细胞亚群和 cAMP/cGMP 水平的平衡有关。

[参考文献]

[1] 张性成. 四神丸治疗五更泻 28 例临床体会[J]. 中国社区医师, 2008, 24(9): 49.

- [2] 李庆阳, 郑家铿. 老年肾虚与 T 细胞亚群关系[J]. 福建中医学院学报, 2001, 11(2): 5.
- [3] 苏文, 胡爱霞, 杜恒. 遗尿方对肾阳虚多尿大鼠抗利尿激素含量和环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷比例的影响[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(2): 168.
- [4] 陈杰, 胡昌江, 余凌英, 等. 补骨脂盐炙前后对二神丸止泻作用的研究[J]. 成都中医药大学学报, 2009, (1): 93.
- [5] 苟小军, 韩宝侠, 王朝廷, 等. 肾阳虚证造模方法考察[J]. 吉林中医药, 2009, 29(9): 814.
- [6] 王晓英, 苗得雨, 裴妙荣. 复合式造大鼠脾肾阳虚模型[J]. 山西中医, 2012, 28(7): 43.
- [7] 郭煜晖, 周安方, 陈涛, 等. 复合因素法建立肾脾阳虚大鼠模型的实验观察[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8): 2042.
- [8] 王琦, 姚实林, 董静, 等. 阳虚体质者内分泌及免疫功能变化[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(12): 1226.
- [9] 柳永青. 肾阳虚证的分子机制进展和展望[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(10): 68.
- [10] 齐天杰, 阎锡新, 张鲁涛. 血液 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ T 细胞水平对肺部真菌感染的影响[J]. 河北医药, 2011, 33(20): 3045.
- [11] 彭艳, 易受乡, 常小荣, 等. “脾虚证”与能量代谢关系的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(11): 2278.

[责任编辑 聂淑琴]