

附子理中汤对脾阳虚证大鼠免疫细胞因子的影响

韦祎¹, 唐汉庆^{2*}, 李晓华², 朱晓莹²

(1. 海南医学院, 海口 571199; 2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000)

[摘要] 目的: 观察附子理中汤对免疫细胞因子白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响, 探讨其对脾阳虚证免疫功能影响的可能机制。方法: Wistar 大鼠 100 只随机分为对照组、模型组、附子理中汤低、中、高剂量组 5 组, 每组 20 只。在模型组基础上, 附子理中汤低、中、高剂量组按 5, 10, 20 g·kg⁻¹ ig, 每天 1 次, 连续 4 周。检测胸腺指数、脾脏指数、IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α 含量。结果: 与对照组比较, 模型组胸腺指数, 脾指数, IL-2, IL-6, TNF- α 均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), IL-10 显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 附子理中汤中、高剂量组胸腺指数, 脾指数, IL-2, IL-6, TNF- α 均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), IL-10 降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 附子理中汤对细胞免疫因子产生影响, 通过细胞免疫因子之间的效应可能是其改善脾阳虚大鼠免疫功能的机制之一。

[关键词] 附子理中汤; 脾阳虚证; 免疫; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0179-04

[doi] 10.11653/syjf2013210179

Effects of Fuzi Lizhong Decoction on Immune Cell Factors in Rats with Spleen Yang Deficiency Syndrome

WEI Yi¹, TANG Han-qing^{2*}, LI Xiao-hua², ZHU Xiao-ying²

(1. Hainan Medical University, Haikou 571199, China;

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[收稿日期] 20130604(022)

[基金项目] 广西高等学校优秀人才资助计划(桂教人[2011]40号)

[第一作者] 韦祎, 讲师, 硕士, 中西医结合临床研究, E-mail: sue09cn@163.com

[通讯作者] * 唐汉庆, 副教授, 博士, 中西医结合基础研究, E-mail: iloveyouverymuch0000@yahoo.com.cn

- [8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20:84.
- [9] 黄勇, 王永林, 兰燕宇, 等. 注射用辛芩对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用和对脑微循环血流量的影响[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(2):119.
- [10] 毛伦林, 毛小薇, 顾桢茂, 等. 天舒胶囊对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):144.
- [11] 胡跃强, 唐农, 董少龙, 等. 清热化痰方预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4):194.
- [12] 倪彩霞, 曾南, 许福会, 等. 芳香开窍药对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障影响的实验研究[J]. 中国中药杂志, ():2562.
- [13] 尹艳艳, 曹曦, 李维祖. 喜脑宁对大鼠全脑缺血的保护作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23):3087.
- [14] 孙王杰, 战学秋, 孙树文, 等. 用统计软件 SPSS 对学生成绩分析[J]. 吉林化工学院学报, 2003, 20(3):87.
- [15] 张苏江, 陈庆波. 数据统计分析软件 SPSS 的应用(四)-广义因素方差分析[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(8):24.
- [16] 卢纹岱. SPSS for Windows 统计分析[M]. 2 版. 北京: 电子工业出版社, 2002:162.
- [17] 贺石林. 医学科研方法导论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998:201.

[责任编辑] 聂淑琴

[**Abstract**] **Objective:** To explore the effects and mechanism of Fuzi Lizhong decoction (FZLZ) on immune cell factors in rats with spleen Yang deficiency syndrome. **Method:** One hundred Wistar rats were randomly divided into model group, FZLZ low-dosage group, middle-dosage group, high-dosage group of FZLZ and control group. Each group included 20 rats. Low-dosage group, middle-dosage group and high-dosage group were ig given with FZLZ according to 5, 10, 20 g·kg⁻¹ based on model group, once a day for four weeks. Then thymus index, spleen index, the contents of interleukin (IL) -2, IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were examined. **Result:** Compared with control group, thymus index, spleen index, the contents of IL-2, IL-6 and TNF- α in model group reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), however, the content of IL-10 increased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, thymus index, spleen index, the contents of IL-2, IL-6 and TNF- α in both middle-dosage group and high-dosage group increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) while the content of IL-10 reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Fuzi Lizhong decoction can improve immune function of rats with spleen Yang deficiency syndrome by regulating the contents of IL-2, IL-6, IL-10 and TNF- α , which may be one of the mechanisms.

[**Key words**] Fuzi Lizhong decoction; spleen Yang deficiency syndrome; immune; mechanism

《金匱要略·臟腑經絡先後病脈証治第一》指出：“四季脾旺不受邪。”李東垣在《脾胃論·脾胃虛實傳變論》也指出：“陽氣惡煩勞，病從脾胃生者一也……，諸病從脾胃而生明矣。”提出“內傷脾胃，百病由生”的論斷，說明脾系統在抵禦外邪、護衛機體的重要作用，具有類似於免疫系統的功能，研究表明脾陽虛免疫功能低下是各種疾病發生的重要因素之一^[1-2]。本實驗工作建立脾陽虛大鼠模型，以附子理中湯進行干預，觀察免疫細胞因子白細胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、白細胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白細胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 和腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的變化，討論其對脾陽虛証免疫功能影響的可能機制。

1 材料

1.1 動物 清潔級 Wistar 大鼠 100 只，雌雄各半，體質量 165 ~ 210 g，本院科學實驗中心提供，動物許可證號 SCXK (桂) 2012-0006。

1.2 藥物 附子理中湯由炮附子、黨參、白朮、干姜、炙甘草組成，實驗所用單味藥由本校藥理教研室提供。經本院藥理教研室鑑定：附子為毛茛科植物烏頭 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根；黨參為桔梗科植物黨參 *Codonopsis pilosula* (franch.) Nannf. 的乾燥根；白朮為菊科植物白朮 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的乾燥根；干姜為姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的乾燥根莖；甘草為烏拉爾甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根。

1.3 試劑 IL-2 (批號 20120740)，IL-6 (批號 20120526)，TNF- α (批號 20120800) 放射免疫試劑盒

(北京博奧公司)，IL-10 ELISA 試劑盒 (批號 T2402, Sigma)，考馬斯亮藍蛋白檢測試劑盒 (批號 120436, 南京建成公司)。

1.4 儀器 SN-695B 型智能放免測量儀 (上海核所日環光電儀器有限公司)，MK3 型酶標儀 (Thermo Labsystem 公司)，XT220A 型普利賽斯電子天平 (上海麥聚瑞電子儀器有限公司)，Z360K 型台式高速低溫離心機 (HERMLE, 德國)，DU530 型紫外分光光度儀 (Beckman 公司)，MDF-U72V 型超低溫冰箱 (日本三洋公司)，DY-89 型電動玻璃勻漿機 (寧波新芝公司)。

2 方法

2.1 動物分組和造模 沿用本課題以往研究採用的造模方法製備動物模型^[3-4]。大鼠適應性飼養 1 周後分 5 組，每組 20 只。對照組：普通飼料，自由飲水，常態環境飼養。模型組：施行肩胛骨間棕色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) 切除術，術後第 1 天飼以高脂飼料 (83% 基本飼料，15% 甘油三酯，2% 膽固醇)，19 ℃ 環境飼養；附子理中湯高、中、低劑量組分別在模型組基礎上，按 20, 10, 5 g·kg⁻¹ ig。對照組和模型組按 5 g·kg⁻¹ 生理鹽水 ig，每日 1 次。連續 4 周，灌胃 4 周後第 1 天取材檢測。

大鼠給藥劑量的計算依據參考文獻 [5] 中藥複方藥毒學實驗中人體正常服用量與動物實驗給藥劑量間等效劑量進行折算。

2.2 附子理中湯製備 炮附子、黨參、白朮、干姜、炙甘草按照原方 3: 5: 4: 3: 2 的比例，諸藥分開均先經蒸餾水浸泡 30 min，炮附子先煎 1 h，後納入其餘

诸药,煎煮2次(40 min/次),期间将2次药液纱布过滤,合并,水浴加热浓缩至含生药量为 $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的药液,杀菌,贮存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内备用。

2.3 免疫器官指数检测 取胸腺、脾脏,称重。根据免疫器官指数计算公式:

$$\text{免疫器官指数} = \text{免疫器官质量} / \text{体质量} \times 100\%$$

2.4 脾组织免疫细胞因子检测 取脾称重检测脾指数后,置于碎冰上,经预冷生理盐水洗涤1次,滤纸吸干水分,在表面皿内用眼科剪剪碎后,置于电动玻璃匀浆机中,加PBS 250 μL 稀释,研磨10 s,停10 s,重复2次,再加PBS 250 μL 离心($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min),取上清液, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。考马斯亮蓝法检测脾组织匀浆蛋白含量,按说明书操作,根据下列公式计算:脾组织匀浆蛋白含量 = 测定管吸光度(A) - 空白管A / 标准管A - 空白管A \times 标准管浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。取脾组织匀浆解冻混匀,以放免法检测脾匀浆中IL-2, IL-6, TNF- α 的浓度;以ELISA法检测IL-10的浓度,均按说明书操作。结合考马斯亮蓝蛋白含量检测结果,计算脾组织免疫细胞因子含量($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$),计算公式:脾组织免疫细胞因子浓度($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) / 脾组织匀浆蛋白含量($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.5 统计学处理 数据统计采用SPSS 13.0软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 全部大鼠纳入统计分析,没有脱落。

3.2 免疫器官指数检测 与对照组比较,模型组胸腺指数、脾指数均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,附子理中汤中、高剂量组胸腺指数、脾指数均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表1。

表1 附子理中汤对脾阳虚证大鼠免疫器官指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	胸腺指数	脾指数
对照	-	0.628 ± 0.023	0.386 ± 0.092
模型	-	$0.324 \pm 0.017^{1)}$	$0.188 \pm 0.056^{2)}$
附子理中汤	5	0.356 ± 0.019	0.196 ± 0.052
	10	$0.568 \pm 0.021^{3)}$	$0.232 \pm 0.058^{3)}$
	20	$0.605 \pm 0.022^{3)}$	$0.365 \pm 0.091^{4)}$

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

3.3 脾组织免疫细胞因子检测 与对照组比较,模型组IL-2, IL-6降低($P < 0.05$), TNF- α 显著降低($P < 0.01$), IL-10显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,附子理中汤中剂量组IL-2, IL-6, TNF- α 均升高($P < 0.05$), IL-10降低($P < 0.05$);高剂量组IL-2, IL-6, TNF- α 均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), IL-10降低($P < 0.01$)。见表2。

表2 附子理中汤对脾阳虚证大鼠脾组织细胞因子水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-2	IL-6	IL-10	TNF- α
对照	-	64.22 ± 0.85	4.21 ± 1.12	2.74 ± 0.89	21.96 ± 4.25
模型	-	$33.16 \pm 0.65^{1)}$	$1.82 \pm 0.85^{1)}$	$6.38 \pm 1.24^{2)}$	$9.88 \pm 2.29^{2)}$
附子理中汤	5	38.54 ± 1.96	2.68 ± 0.95	5.24 ± 1.14	11.21 ± 2.69
	10	$51.66 \pm 1.02^{3)}$	$3.23 \pm 0.78^{3)}$	$4.22 \pm 1.22^{3)}$	$15.58 \pm 3.11^{3)}$
	20	$63.95 \pm 1.66^{4)}$	$3.92 \pm 0.84^{3)}$	$2.98 \pm 0.88^{4)}$	$21.94 \pm 4.56^{4)}$

4 讨论

中医认为脾系统具有防御外邪侵袭功能,相当于机体的免疫系统,脾系统发挥免疫功能表现为对免疫系统的调节,脾功能正常发挥的物质基础可能和各种免疫细胞因子及其之间的相互作用有关,脾阳虚免疫功能低下可以从免疫细胞因子的变化体现出来,能提高机体免疫力的中药方药较多,本实验以附子理中汤为干预药物,观察其对免疫细胞因子的影响,探讨其改善脾阳虚大鼠免疫功能的可能机制。

在本实验工作中笔者沿用以往脾阳虚动物造模方法^[3-4],参考有关脾阳虚大鼠造模文献和评价标准^[6-7],采用BAT切除术,由于BAT是成年动物主

要的产热物质^[8-9],切除BAT后,减少大鼠产热物质,大幅衰减其阳气,而后采用高脂饮食并置大鼠于较低温度环境下,模拟“肥甘厚腻”、“寒伤中阳”导致的脾虚,使脾虚和阳虚症状同时具备,从而制备了脾阳虚大鼠模型。由于脾虚的造模方法较多,因此这一造模方法有待同仁的指正和实践的检验。

免疫细胞因子具有调节细胞生长、免疫应答和参与炎症反应等多种生物学功能,IL-2的主要生物学功能是促进T细胞的增殖与分化,研究表明IL-2与自身免疫性胃炎的发生有密切联系,对维持机体的免疫耐受方面起着重要的作用^[10]。IL-6通过激活效应细胞或继发性释放其他细胞因子来直接或间

接地实现免疫效应,对于 IL-2 与 IL-6 在免疫应答中的相互作用仍有不同看法,部分观点认为两者协同提高免疫效应^[11],另外观点认为两者无相加效应^[12],在本实验中观察到脾阳虚模型组大鼠胸腺指数、脾指数均下降,和对照组比较,差异有统计学意义,说明模型组大鼠出现免疫功能降低的状况,同时,模型组 IL-2 和 IL-6 水平下降,和对照组比较,差异也有统计学意义,尽管不能说明 IL-2 与 IL-6 的相互作用是否协同增效,但至少提示两者在免疫功能低下时的趋势是一致的,这一点也可以从应用附子理中汤后得以反证,和模型组比较,中剂量、高剂量组的胸腺指数、脾指数均升高,IL-2 和 IL-6 水平也升高,差异有统计学意义。

TNF- α 是机体免疫功能中非常重要的细胞因子,IL-2 和 TNF- α 在抑制肿瘤细胞生长和免疫调节方面发挥着协同增效作用,在本实验中,作者观察到高剂量组 IL-2 和 TNF- α 水平恢复到趋近对照组水平,说明附子理中汤能改善脾阳虚模型大鼠机体的免疫状态。对于 IL-10,研究认为其对免疫功能具有双向调节作用,在胃肠道等疾病中 IL-10 水平会升高^[13-14],这和本实验的结果一致,作者观察到脾阳虚模型大鼠 IL-10 水平显著升高,和对照组比较,差异有统计学意义,应用附子理中汤后,IL-10 水平下降,以高剂量组明显,表明与剂量高低有关。本实验工作的结果表明,附子理中汤对细胞免疫因子产生影响,通过细胞免疫因子之间的效应可能是其改善脾阳虚大鼠免疫功能的机制之一。

[参考文献]

[1] 修宗昌,余绍源,罗云坚. 浅析“四季脾旺不受邪”及其现代免疫学基础[J]. 江苏中医药, 2003, 24 (1):43.
[2] 陈学习,张英杰,李美霞,等. 脾虚证与免疫系统关系研究概况与思考[J]. 中国当代医药, 2010, 17 (34):6.

[3] 吴云起,唐汉庆,吴翠松,等. 脾阳虚证大鼠棕色脂肪组织和解偶联蛋白 1 关联性的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):206.
[4] 唐汉庆. 附子理中汤对脾阳虚证大鼠血糖、甘油三酯以及总胆固醇的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(15):212.
[5] 黄娟萍,罗裕,江力,等. 中药药动学研究中给药剂量的现状分析[J]. 中国药学杂志,2012,47(21):1685.
[6] 杨雪,杨文思,王勇,等. 脾阳虚证中阳虚症状群的实验评价[J]. 中华中医药杂志,2008,23(3):244.
[7] 杨雪,杨文思,王勇,等. 脾阳虚消化不良症状群客观评价的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2008, 14(4):271.
[8] Smith R E, Horwitz B A. Brown fat tissue and thermogenesis [J]. *Physiol Rev*,1969,49 (2):330
[9] Nicholls D G, Locke R M. Thermogenic mechanisms in brown fat [J]. *Physiol Rev*, 1984, 64 (1):1.
[10] Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, et al. Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(5):723.
[11] Iho S,Shau H,Golub S H. IL-6 enhances the cytotoxic activity of thymocyte-derived CD56⁺ cells [J]. *Cell Immunol*,1992,144(1):1.
[12] Tabibzadeh S S, Poubouridis D, May L T, et al. Interleukin-6 immunoreactivity in human tumors [J]. *Am J Pathol*,1989,135(3):427.
[13] Ordemann J, Jacobi C A. Immunomodulatory changes in patients with colorectal cancer[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2002,17(1):37.
[14] Bermudez-Morales V H, Gutierrez L X, Alcocer-Gonzalez J M, et al. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer; a mechanism for immune response escape [J]. *Cancer Invest*, 2008, 26 (10):1037.

[责任编辑 聂淑琴]