

比较地黄不同炮制品组方的四物汤 对小鼠 T 淋巴细胞亚群的作用

李敏兰, 陈智钦, 张振凌*
(河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的: 比较地黄不同炮制品组成的四物汤免疫作用的区别, 说明生地黄和熟地黄功效的异同。方法: 昆明种雌性小鼠, 第 1, 2, 3 天腹腔注射(ip)环磷酰胺(CTX)80 mg·kg⁻¹建立免疫抑制模型, 按体重随机分为模型对照组, 阳性香菇多糖组(0.1 g·kg⁻¹), 鲜地黄-四物汤组(20.3 g·kg⁻¹), 生地黄-四物汤组(15.8 g·kg⁻¹), 熟地黄-四物汤组(15.8 g·kg⁻¹), 去当归-四物汤组(12.0 g·kg⁻¹), 每组 10 只, 连续灌胃(ig)7 d。取脾脏和胸腺, 计算脏器指数; 采集淋巴细胞样品, 用流式细胞仪进行检测, 观察受试药物对模型动物 CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ 淋巴细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 的表达水平。结果: 熟地黄-四物汤组能显著提高免疫抑制小鼠的脾脏指数(7.26 ± 0.85) mg·g⁻¹ 和胸腺指数(0.75 ± 0.12) mg·g⁻¹ (P < 0.05), 同时能够极显著提高 CTX 造成的免疫抑制小鼠 CD3⁺ (40.68 ± 1.24)%, CD4⁺ (48.08 ± 2.14)%, CD8⁺ (29.56 ± 1.43)% 淋巴细胞 (P < 0.01) 及 CD4⁺/CD8⁺ (1.62 ± 0.36), 其他组无显著性差异。结论: 熟地黄-四物汤能显著提高机体 T 细胞及其亚群间的平衡, 鲜地黄-四物汤和生地黄-四物汤作用不显著, 生、熟地黄组方四物汤其对免疫功能的作用差别较大。

[关键词] 地黄不同炮制品; 环磷酰胺; 免疫抑制; 淋巴细胞亚群

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0215-04

[doi] 10.11653/syjf2013140215

Comparison on the Effect of Different Production of Rehmanniae Radix in Siwu Prescription on T Lymphocyte Subsets in Mice

LI Min-lan, CHEN Zhi-qin, ZHANG Zhen-ling*
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[收稿日期] 20121105(005)

[基金项目] 中医药行业专项[20110700701]

[第一作者] 李敏兰, 在读硕士, 从事中药饮片及新药研究, Tel: 13676986417, E-mail: liminlan2010@126.com

[通讯作者] * 张振凌, 教授, 硕士研究生导师, 从事中药饮片及新药研究, Tel: 13803816758, E-mail: zhangzl6758@163.com

- [5] 邹忠杰, 施旭光, 龚梦娟, 等. 利血平所致大鼠脾虚证代谢组学研究[J]. 中国新药与临床药理, 2012, 23(3): 291.
- [6] 施学丽, 张丽萍, 武丽, 等. 生长抑素在抑郁症发病中的作用[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(11): 8.
- [7] 王海燕, 刘亚明, 李海燕, 等. 高良姜油对胃溃疡小鼠模型血清胃动素、生长抑素、P 物质、血管活性肠肽的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 15.
- [8] 潘秀珍, 蔡立勉. 胃肠激素研究的现状[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(6): 464.
- [9] 郑芝田. 消化性溃疡病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 84.
- [10] 高杰, 贾春雨, 贺蓉, 等. 大黄, 苍术对正常大鼠胃肠激素水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 220.
- [11] 贾波, 李晓红, 梁煜, 等. 白术茯苓汤对脾虚大鼠胃肠激素的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24(4): 47.
- [12] Grady J G. Fulminant hepatitis in patients with chronic liver disease [J]. J Viral Hepatitis, 2000, 7 (suppl 1): 9.
- [13] 尹卫东, 温晓艳, 温晓竞, 等. 实验性脾虚证大鼠 10 种血清酶分析[J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2009, 26(3): 41.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To compare the effects of different processed products of *Rehmanniae Radix* in Siwu prescription, and the difference between raw rehmannia and prepared rehmannia. **Method:** Kunming female mice were injected, on day 1, 2, 3 respectively celiac injection (ip) cyclophosphamide (CTX) $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ to establish immunosuppression model. After 7 days of administration, the spleen and thymus, acquisition lymphocyte sample were collected. Flow cytometry instrument was used to test CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ . **Result:** The prepared *Rehmanniae Radix* of Siwu prescription could improve the immune suppression of spleen and thymus index ($P < 0.05$), and at the same time, improve CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ lymphocytes ($P < 0.01$) and $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$. **Conclusion:** The prepared *Rehmanniae Radix* of Siwu prescription can improve the T cell subsets. *Rehmanniae Radix* with different processed methods has an influence on the immune function.

[Key words] different processed product of *Rehmanniae Radix*; cyclophosphamide; immunosuppression; lymphocyte subsets

四物汤始载于《理伤续断方》，主治营血虚滞证。方中以熟地黄为君药，具有补血滋阴、益精填髓功效。地黄由于炮制方法的不同，有鲜地黄、生地黄及熟地黄等不同品种，其化学成分及药理作用也发生变化。药理研究表明四物汤有一定程度的免疫作用^[1-3]，提高正常小鼠的脾脏和胸腺指数^[4]，但生、熟地黄在复方中怎样发挥免疫作用，是否占主要作用，研究尚未见报道。为深入探讨地黄应用的机制，尤其是促进免疫功能的机制，本实验采用环磷酰胺诱导小鼠产生免疫抑制^[5]，观察该药对模型动物免疫器官指数及 T 淋巴细胞亚群的影响。

1 材料

1.1 动物 昆明种雌性小鼠，清洁级，体重为 $(20 \pm 2) \text{ g}$ ，购于郑州大学医学院动物实验中心，动物许可证号 SCXK (豫) 2010-0002，合格证号 0008680。

1.2 仪器 TGL-16gR 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂)，流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.3 药品和试剂 香菇多糖片 (湖北广仁药业有限公司，批号 111107)，环磷酰胺注射液 (通化茂祥制药有限公司，批号 110605)，FITC Hamster Anti-Mouse CD3e Antibody (批号 04051605)，PE Rat Anti-Mouse CD4 Antibody (批号 03052801)，APC Rat Anti-Mouse CD8 Antibody (批号 03051802)，FITC Rat IgG1, k Isotype Antibody (批号 03102501)，PE Rat IgG2b, k Isotype Antibody (批号 03091503)，APC Rat IgG2a, k Isotype Antibody (批号 4042502)，QBLysing solution, $10 \times$ 浓缩液 (批号 03040706) 均购于北京安必奇生物科技有限公司。

1.4 药材 实验所用鲜地黄购自宛西地黄种植基地，生地黄和熟地黄均为本实验室自制。当归 (批号 120413)、白芍 (批号 110508H)、川芎 (批号

120416) 药材均购于河南中原正信药行，经河南中医学药理学学科董诚明教授分别鉴定地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根，当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的根，白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的根，川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 鲜地黄-四物汤 鲜地黄 30 g 直接榨汁，当归 12.5 g，白芍 15 g，川芎 10 g 加水煎煮，鲜地黄榨汁兑入即得。

2.1.2 生地黄-四物汤 生地黄 15 g，当归 12.5 g，白芍 15 g，川芎 10 g 加水煎煮，浓缩成 $1.58 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (剂量为 $15.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，根据临床用药剂量换算) 的灌胃药液。

2.1.3 熟地黄-四物汤 熟地黄 15 g，当归 12.5 g，白芍 15 g，川芎 10 g 加水煎煮，浓缩成 $1.58 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (剂量为 $15.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，根据临床用药剂量换算) 的灌胃药液。

2.1.4 去当归-四物汤 熟地黄 15 g，白芍 15 g，川芎 10 g 加水煎煮，浓缩成 $1.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (剂量为 $12.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，根据临床用药剂量换算) 的灌胃药液。

2.1.5 香菇多糖 香菇多糖片加生理盐水配制成 $0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (剂量为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，根据临床用药剂量换算) 的灌胃药液。

2.2 造模与分组 小鼠 70 只常规饲养 3 d 适应环境后，按体重随机分组：正常对照组、模型组、阳性组 (香菇多糖)、鲜地黄-四物汤组、生地黄-四物汤组、熟地黄-四物汤组及去当归-四物汤组，每组 10 只。除空白组外其他各组分别于第 1, 2, 3 天 ip $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 新配制的 CTX 生理盐水液，药物组同时灌胃相

应的药物,阳性组小鼠每天灌胃香菇多糖片($0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),鲜地黄-四物汤组($20.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),生地黄-四物汤组($15.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),熟地黄-四物汤组($15.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),去当归-四物汤组($12.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),模型组和空白组灌胃同体积的生理盐水。每天给药 1 次,连续 7 d。

2.3 检测指标

2.3.1 脏器指数 采血后小鼠脱颈椎处死,解剖取胸腺、脾脏,弃去表面的组织、血丝,并用滤纸吸去表面的血液,迅速用电子天平称重,计算肝脏和胸腺指数,脏器指数 = 脏器质量(mg)/g 体重。

2.3.2 流式检测 停止给药 2 h 后,称重,各组动物摘眼球取血,EDTA 抗凝,涡旋混匀,室温避光放置 20 min,加入红细胞裂解液溶血素 2 mL,充分混匀,避光放置 10 min,离心 $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,弃去上清液,取沉淀细胞用 PBS(鞘液)洗 2 次后,充分混匀,离心 $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,弃去上清液,加入 1 mL PBS(鞘液),充分混匀,样品上流式细胞仪检测^[5-6]。

2.3.3 数据的统计处理 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况 模型组第 2,3 天各动物均开始出现行动迟缓、竖毛而无光泽、少食、体重下降及尾色苍白、晦暗等现象,熟地黄-四物汤组小鼠行动敏捷、毛色正常,与空白对照组小鼠无明显区别。

3.2 脏器指数 与正常组比较,模型组胸腺、脾指数均明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,熟地黄-四物汤组能显著提高血虚小鼠的胸腺、脾指数($P < 0.05$),鲜地黄-四物汤组和生地黄-四物汤组无显著性差异;与熟地黄-四物汤组比较,鲜地黄-四物汤组和生地黄-四物汤组作用弱于熟地黄-四物汤组,有显著性差异($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 对淋巴细胞亚群的影响 模型组小鼠 CD3^+ ,

表 1 地黄不同炮制品组方的四物汤给药第 7 天对胸腺、脾指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	脾指数 /mg·g ⁻¹	胸腺指数 /mg·g ⁻¹
正常	-	7.19 ± 0.83	0.69 ± 0.11
模型	-	6.04 ± 0.46 ¹⁾	0.54 ± 0.12 ¹⁾
香菇多糖	0.1	7.27 ± 0.53 ⁴⁾	0.73 ± 0.11 ⁴⁾
鲜地黄-四物汤	20.3	6.13 ± 0.14 ⁷⁾	0.55 ± 0.10 ⁷⁾
生地黄-四物汤	15.8	5.99 ± 0.59 ⁷⁾	0.57 ± 0.08 ⁷⁾
熟地黄-四物汤	15.8	7.26 ± 0.85 ⁴⁾	0.75 ± 0.12 ⁴⁾
去当归-四物汤	12.0	6.85 ± 1.12	0.68 ± 0.14

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$;与模型组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$,⁶⁾ $P < 0.001$;与熟地黄-四物汤比较⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$,⁹⁾ $P < 0.001$ (表 2 同)。

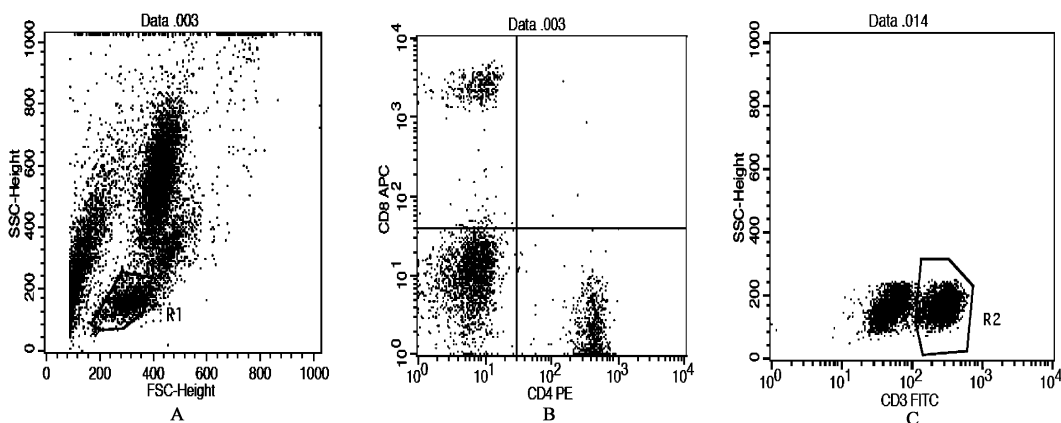
CD4^+ , CD8^+ 淋巴细胞均明显低于正常组($P < 0.001$),模型组小鼠 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 低于正常组($P < 0.05$),说明造模成功。地黄不同炮制品组成的四物汤各组与模型组比较, CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ , $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 明显升高($P < 0.05$),其中熟地黄-四物汤组的恢复程度明显高于生地黄-四物汤组和鲜地黄-四物汤组,说明熟地黄-四物汤有提高和改善免疫功能的作用。见表 2,图 1。

4 讨论

胸腺属于中枢免疫器官,具有重要的免疫调节作用,能够分泌多种细胞因子,是 T 细胞分化、发育的场所,促进 T 细胞成熟,在建立自身免疫耐受和维持免疫自稳方面发挥重要作用。脾脏是最大的免疫器官,是细胞免疫和体液免疫的中心。胸腺和脾脏质量指数改变,反映机体免疫功能的改变,中药可以提高免疫抑制小鼠的胸腺、脾指数^[7-8]。本实验模型组与正常组比较胸腺、脾指数均明显降低,熟地黄-四物汤组能显著提高血虚小鼠的胸腺、脾指数,与文献报道一致。

表 2 地黄不同炮制品组方的四物汤给药第 7 天对 T 淋巴细胞亚群的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	$\text{CD3}^+/\%$	$\text{CD4}^+/\%$	$\text{CD8}^+/\%$	$\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$
正常对照	-	42.48 ± 1.94	52.46 ± 1.55	30.56 ± 2.25	1.72 ± 0.44
模型	-	20.00 ± 2.43 ³⁾	32.79 ± 2.29 ³⁾	23.82 ± 2.10 ³⁾	1.29 ± 0.40 ¹⁾
香菇多糖	0.1	39.00 ± 2.72 ⁶⁾	47.72 ± 1.55 ⁶⁾	32.56 ± 2.26 ⁶⁾	1.47 ± 0.15
鲜地黄-四物汤	20.3	24.15 ± 1.55 ^{6,9)}	40.01 ± 2.36 ^{6,9)}	26.29 ± 1.63 ^{6,8)}	1.49 ± 0.21 ⁷⁾
生地黄-四物汤	15.8	32.87 ± 1.96 ^{6,9)}	42.99 ± 1.94 ^{6,9)}	27.79 ± 0.99 ^{6,8)}	1.55 ± 0.20 ^{4,7)}
熟地黄-四物汤	15.8	40.68 ± 1.24 ⁶⁾	48.08 ± 2.14 ⁶⁾	29.56 ± 1.43 ⁵⁾	1.62 ± 0.36 ⁵⁾
去当归-四物汤	12.0	37.99 ± 2.87 ^{6,8)}	46.19 ± 0.98 ^{6,7)}	28.78 ± 2.67 ^{6,7)}	1.60 ± 0.39 ⁵⁾



A. 淋巴细胞、粒细胞和单核细胞分离图; B. $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ 分布; C. $CD3^+$ 阴性、阳性 分布

图 1 地黄不同炮制品组方的四物汤对小鼠 T 淋巴细胞亚群分布的影响

T 淋巴细胞亚群在机体的免疫反应中处于重要地位。 $CD4^+$ T 淋巴细胞通过分泌细胞因子激活其他细胞亚群参与免疫反应,对介导体液免疫和细胞免疫起着重要调节作用。本次实验数据显示,模型组小鼠 T 淋巴细胞亚群各指标平均值均明显低于正常组和香菇多糖组,有统计学意义($P < 0.01$),说明小鼠免疫抑制模型的实验方法可靠。其他给药组的各指标平均值与模型组比较均见升高且接近正常组水平,并与香菇多糖阳性组各指标平均值无明显差异,表明实验药物与香菇多糖药效一致,即地黄不同炮制品组成的四物汤对增强免疫抑制模型小鼠的免疫功能有恢复作用,其中熟地黄-四物汤的作用更显著。地黄含环烯醚萜苷类、糖类、生物碱、氨基酸及微量元素等,炮制加工糖类成分升高,报道熟地黄的中性多糖^[9]含量为 $65.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。熟地黄多糖有免疫作用^[10],与本研究结果是一致的。

文献报道当归有免疫调节作用^[11],因此本实验特意安排去当归-四物汤作为对照,结果显示去当归-四物汤组 $CD4^+/CD8^+$ 高于鲜地黄-四物汤组和生地黄-四物汤组,弱于熟地黄-四物汤组($P < 0.01$),说明在四物汤中增强免疫方面熟地黄发挥主要作用。生、熟地黄免疫作用差异比较大,在提高机体免疫作用方面应选用熟地黄,不用或少用鲜地黄和生地黄。

【参考文献】

[1] 马增春,高月,刘永学,等. 四物汤对环磷酰胺所

致血虚证小鼠造血细胞作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(5):13.

[2] 梁乾德,王升启,高月. 四物汤基础研究进展[J]. 天津中医药杂志, 2003, 20(5):83.

[3] 路晓钦,马增春,高月. 四物汤药理研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(4):56.

[4] 张玉杰,张建明,宋敏. 四物汤对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国麻风皮肤, 2004, 20(6):546.

[5] 王洪武,贾亮亮,徐媛青,等. 五子衍宗汤对环磷酰胺致免疫低下小鼠的免疫调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):144.

[6] D N Tripathi, G B Jena. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes[J]. Mutation Re-search, 2010, 696(1):69.

[7] 寇俊萍. 当归芍药散对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国现代应用药学, 2003, 20(3):170.

[8] 胡彦武. 东北刺人参茎叶提取物对环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):156.

[9] 李红霞,许闯,孟江,等. 怀地黄多糖的含量测定[J]. 河南科学, 2002, 20(2):144.

[10] 黄霞,刘惠霞,邵静. 熟地多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2004, 31(9):792.

[11] 张晓君,祝晨藜,胡黎,等. 当归多糖的免疫活性和对造血功能影响[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(5):24.

【责任编辑 聂淑琴】