

# 虚寒状态大鼠免疫系统功能变化研究

李连珍<sup>1</sup>, 张冰<sup>2\*</sup>, 刘小青<sup>2</sup>

(1. 河南农业大学农学院, 郑州 450002; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**探讨氢化可的松诱导的虚寒大鼠免疫系统功能变化特点,为虚寒证动物模型深入研究奠定基础。**方法:**48 只 SD 雄性大鼠按体重随机分成正常组和虚寒组,每组 24 只。虚寒组 im 氢化可的松琥珀酸钠生理盐水溶液 20 mg·kg<sup>-1</sup>。注射第 7,14,21 天下午,剪尾取 10 μL 全血,显微镜下白细胞计数。第 15,22 天上午,正常组和虚寒组各 12 只,麻醉,腹主动脉取血,分离血清和血浆(EDTA 抗凝),全自动生化分析仪检测免疫球蛋白 G(IgG)和免疫球蛋白 M(IgM),ELISA 法检测白细胞介素 4(IL-4)和干扰素-γ(IFN-γ)。摘取胸腺、脾脏电子分析天平称量后,计算脏器指数。**结果:**与同期正常组比较,虚寒组大鼠胸腺指数和血清 IgM 含量在造模第 14,21 天均明显降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );脾脏指数和血清 IgG 含量在造模第 14 天明显降低( $P < 0.05$ ),造模第 21 天未见统计学差异;外周血白细胞数在造模第 7,14,21 天均明显降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );在造模第 21 天,血浆 IL-4 含量降低( $P < 0.05$ ),IFN-γ 含量升高( $P < 0.05$ ),IFN-γ/IL-4 升高( $P < 0.01$ )。**结论:**氢化可的松塑造的虚寒状态动物模型,免疫系统功能明显低下,并存在 Th1/Th2 细胞因子的漂移现象。

**[关键词]** 虚寒状态; 免疫系统; 氢化可的松

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0199-03

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121030.1143.007.html>

**[网络出版时间]** 2012-10-30 11:43

## Change of Immunologic Function in Deficiency Cold Status

LI Lian-zhen<sup>1</sup>, ZHANG Bing<sup>2\*</sup>, LIU Xiao-qing<sup>2</sup>

(1. Agronomy college of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the change of immunologic function in deficiency cold model induced by hydrocortisone. **Method:** Forty eight male SD rats were divided into two groups. The control group was intramuscularly injected saline 0.25 mL, the experimental group was intramuscularly injected hydrocortisone sodium succinate saline 20 mg·kg<sup>-1</sup>. 10 μL blood sample was collected from tail on 7th day, 14th day and 21th day. WBC count was detected by the microscope. 5 mL blood sample was collected from abdominal main vein on 15th day and 22th day. Serum IgG and IgM levels were detected by automatic biochemical analyzer. Plasma interleukin-4 (IL-4) and interferon-γ (IFN-γ) levels were determined by elisa. Then thymus and spleen were removed and weighed to calculate the organ index. **Result:** Compared with the control group, the thymus index and serum IgG of experimental group were significantly lower on 14th day and 21th day ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), the spleen index and serum IgM were significantly lower on 14th day ( $P < 0.05$ ) and no change on 21th day, the WBC count were significantly lower on 7th day, 14th day and 21th day ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), plasma IL-4 was low ( $P < 0.05$ ), IFN-γ level was high ( $P < 0.05$ ) and IFN-γ/IL-4 was high ( $P < 0.05$ ) on 21th day. **Conclusion:** During the experimental process, the immunologic function was significantly lower, and associated with shift of Th1/Th2 in deficiency cold status.

**[收稿日期]** 20120607(013)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2007CB512605)

**[第一作者]** 李连珍,博士,讲师,从事中药药性及药用植物生长发育特性与药效相关性研究, Tel: 15138665877, E-mail: liilianzhen0813@163.com

**[通讯作者]** \*张冰,教授,博士生导师,从事中药药性及中药防治代谢性疾病研究, Tel: 010-64286335, E-mail: zhangbing6@263.net

[ **Key words** ] deficiency cold status; immune system; hydrocortisone

虚寒状态,临床又称为虚寒证或阳虚证,是由于人体阳气虚衰,温煦、推动和兴奋功能减退所表现的一种病理状态。在药性理论研究过程中,虚寒状态则是研究辛热药药性表达的基础。对于虚寒状态动物模型的建立和界定,科研工作者已经进行了大量的研究<sup>[1-3]</sup>。然虚寒状态下,模型动物的免疫功能变化特点,尚未见系统报道。本研究在课题组前期工作的基础上<sup>[4]</sup>,选择氢化可的松诱导大鼠虚寒状态,观察虚寒状态下大鼠免疫功能变化特点,为虚寒证动物模型的深入研究提供实验依据。

### 1 材料

**1.1 动物** 雄性 SD 大鼠,48 只,体重 240 ~ 250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2007-0001。

**1.2 药物与试剂** 注射用氢化可的松琥珀酸钠(天津生物制药有限公司生产,批号 20100310),免疫球蛋白 G(IgG)、免疫球蛋白 M(IgM)试剂盒(北京利德曼生化技术有限公司),白细胞介素 4(IL-4)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )ELISA 试剂盒(均购自博士德生物技术有限公司)。

**1.3 仪器** CX4 型全自动生化分析仪(贝克曼,美国),XSP-2C 生物显微镜(尼康,日本),BS323S 电子天平(赛多利斯,德国),SpecraMax 190 酶标仪(美国分子仪器公司)。

### 2 方法

**2.1 分组处理** 大鼠按体重随机分为两组,即正常组和虚寒组,每组各 24 只。虚寒组每天上午 8:00

左右,后腿肌肉交替注射氢化可的松琥珀酸钠生理盐水溶液,20 mg·kg<sup>-1</sup>,正常组注射等体积生理盐水。注射第 7,14,21 天下午,剪尾取 10  $\mu$ L 血,白细胞计数。注射第 14,21 天晚上 8 点,正常组和虚寒组各 12 只,禁食不禁水 12 h,次日上午 8 点,戊巴比妥钠 ip 麻醉,腹主动脉取血,分离血清和血浆(EDTA 抗凝),测 IgG, IgM, IL-4 和 IFN- $\gamma$ 。取胸腺、脾脏等称质量,计算脏器指数。

免疫器官指数 = 免疫器官质量 / 最终体重  $\times$  100%

**2.2 指标检测** IgG, IgM 均由贝克曼 CX4 型全自动生化分析仪检测,IL-4, IFN- $\gamma$  含量用 ELISA 法检测。将 10  $\mu$ L 血,加入 3% 醋酸 190  $\mu$ L 中,显微镜下白细胞计数。

**2.3 统计方法** 采用 SAS8.2 统计软件包进行统计学分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较使用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异显著。

### 3 结果

**3.1 胸腺、脾脏指数变化** 与同期正常组比较,虚寒组大鼠胸腺指数在造模第 14, 21 天均明显降低(*P* < 0.01, *P* < 0.05);而脾脏指数在造模第 14 天明显降低(*P* < 0.05),造模第 21 天未见统计学差异。见表 1。

**3.2 外周血白细胞变化** 与同期正常组比较,虚寒组大鼠外周血白细胞数在造模第 7,14, 21 天均明显降低,差异有统计学意义(*P* < 0.01, *P* < 0.05)。见表 2。

表 1 各组动物胸腺、脾脏指数变化( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	氢考剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	胸腺指数		脾脏指数	
		14 d	21 d	14 d	21 d
正常	-	0.184 ± 0.037	0.147 ± 0.040	0.234 ± 0.045	0.197 ± 0.027
虚寒	20	0.123 ± 0.023 <sup>2)</sup>	0.104 ± 0.026 <sup>1)</sup>	0.204 ± 0.014 <sup>1)</sup>	0.194 ± 0.030

注:与正常组比较<sup>1)</sup>*P* < 0.05, <sup>2)</sup>*P* < 0.01(表 2 ~ 4 同)。

表 2 各组动物外周血白细胞数变化( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	氢考剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	白细胞 / $\times 10^9$ / L		
		7 d	14 d	21 d
正常	-	2.55 ± 0.56	3.47 ± 0.45	1.86 ± 0.47
虚寒	20	1.43 ± 0.32 <sup>2)</sup>	1.76 ± 0.39 <sup>2)</sup>	1.47 ± 0.33 <sup>1)</sup>

**3.3 血清 IgM, IgG 变化** 与同期正常组比较,虚寒组大鼠血清 IgM 含量在造模第 14 天和 21 天都明显降低(*P* < 0.01, *P* < 0.05),血清 IgG 含量在造模第

14 天明显降低(*P* < 0.05),但在 21 天变化不明显。见表 3。

表 3 各组动物血清 IgG, IgM 变化( $\bar{x} \pm s, n = 12$ ) mg·L<sup>-1</sup>

时间 / d	组别	氢考 im 剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	IgM	IgG
14	正常	-	47.69 ± 8.71	84.24 ± 17.51
	虚寒	20	39.04 ± 6.80 <sup>2)</sup>	69.45 ± 13.90 <sup>1)</sup>
21	正常	-	42.90 ± 5.77	73.56 ± 15.29
	虚寒	20	38.36 ± 5.64 <sup>1)</sup>	76.83 ± 17.70

**3.4 血浆 IL-4, IFN- $\gamma$  变化** 与正常组比较,虚寒组大鼠血浆 IL-4 含量在造模第 21 天都明显降低 ( $P < 0.05$ ), IFN- $\gamma$  含量升高 ( $P < 0.05$ ), IFN- $\gamma$ /IL-4 比值升高 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 各组动物血浆 IL-4, IFN- $\gamma$  和 IFN- $\gamma$ /IL-4 变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	氢考剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	IFN- $\gamma$ /ng·L <sup>-1</sup>	IL-4/ng·L <sup>-1</sup>	IFN- $\gamma$ /IL-4
正常	-	221.33 ± 43.52	44.60 ± 9.69	4.46 ± 1.52
虚寒	20	289.63 ± 54.70 <sup>1)</sup>	32.50 ± 6.99 <sup>1)</sup>	9.22 ± 2.17 <sup>2)</sup>

## 4 讨论

在药性理论研究的过程中,构建合适的动物模型,已成为中医药研究过程中的瓶颈问题。在辛热药性研究的过程中,虚寒状态模型的研究则更为重要。有关虚寒状态动物模型的研究报道日益增多<sup>[5]</sup>,课题组总结分析了数百篇虚寒状态动物模型相关文献,选择文献占有量约为 80% 的氢化可的松作为造模剂,塑造虚寒状态动物模型,并系统观察氢化可的松不同剂量、不同造模时间对实验动物内分泌激素、物质能量代谢、免疫功能等指标的影响,确定造模剂量及模型成功时间、模型稳定时间<sup>[6]</sup>。本实验选择氢化可的松诱导大鼠虚寒状态,观察虚寒状态下大鼠免疫功能变化特点,为虚寒证的动物模型深入研究提供实验依据。

本研究从免疫器官(胸腺、脾脏)、免疫细胞(外周血白细胞数)和免疫分子(IgG, IgM, IL-4 和 IFN- $\gamma$ )3 个层次,对虚寒状态下免疫功能变化进行探讨。

胸腺和脾脏是体内重要的免疫器官,胸腺、脾脏指数与免疫系统功能变化密切相关。本研究显示,虚寒状态大鼠胸腺、脾脏指数在造模第 14 天和 21 天均降低,与相关报道类似<sup>[7-8]</sup>。白细胞被称为免疫细胞,是机体防御系统的重要组成部分,免疫功能降低与外周血白细胞数下降密切相关<sup>[9]</sup>。实验结果显示,虚寒大鼠在造模第 7, 14, 21 天,外周血白细胞数都明显降低。免疫球蛋白、干扰素、白细胞介素是机体的重要免疫分子。IgG 约占血清免疫球蛋白总量的 75%,是唯一可以通过胎盘的免疫球蛋白。IgM 约占总量的 5% ~ 10%,是个体发育过程中最早合成和分泌的抗体, IgM 也是初次体液免疫应答中最早出现的抗体,是机体抗感染的“先头部队”。Th1/Th2 两类细胞因子平衡状态(Th0 状态)是免疫内环境稳定的先决条件。近年来的研究发现<sup>[10-12]</sup>, Th1/Th2 的漂移是虚寒证动物模型免疫功能变化密

切相关。本研究结果表明,虚寒大鼠血清 IgG, IgM 含量明显降低, IL-4 含量降低, IFN- $\gamma$  含量升高, IFN- $\gamma$ /IL-4 升高, Th1/Th2 发生漂移。

综上,虚寒状态大鼠免疫器官指数、免疫细胞数量和免疫分子含量均明显降低, IFN- $\gamma$ /IL-4 升高。可见,虚寒状态的模型大鼠免疫系统功能低下,并存在 Th1/Th2 细胞因子的漂移现象。因此,在虚寒状态模型研究过程中,应注意免疫系统功能的相关变化。

## [参考文献]

- [1] 陈小野. 实用中医证候动物模型[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993:100.
- [2] 皋聪,王传社,巫冠中,等. 茯苓总苷对氢化可的松致肾虚小鼠学习记忆功能的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(5):330.
- [3] 邝安堃. 某些助阳药对于大剂量皮质激素所致耗竭现象的影响[J]. 中华内科杂志, 1963(2):113.
- [4] 刘欣,张冰,刘小青,等. 氢化可的松诱导大鼠类阳虚状态的动态观察[J]. 中华中医药杂志, 2011(1):128.
- [5] 吴起端,熊带水,梁文能. 肾虚动物模型的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(6):45.
- [6] 赵茜,金锐,张冰,等. 不同剂量氢化可的松诱导大鼠阳虚状态的 Riddit 分析[J]. 中西医结合学报, 2011, 9(9):941.
- [7] 刘振中,曹丹燕,朱光华,等. 红景天口服液对阳虚小鼠的抗应激作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):187.
- [8] 乔丽娜,王承华,陈丽华,等. 壮阳填精口服液对肾虚小鼠模型免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(8):47.
- [9] 江源,刘翠,陈清彬,等. 三七皂苷 R<sub>g1</sub> 对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国现代中药, 2006, 8(3):9.
- [10] 姚成芳,蔡生业,王丽,等. 阴虚与阳虚动物模型中 Th1/Th2 类细胞因子表达的差异性[J]. 山东中医杂志, 2004, 23(3):166.
- [11] 姚成芳,王丽,蔡生业,等. 阴虚阳亢小鼠 Th1/Th2 类细胞因子的漂移现象及中药左归丸的干预研究[J]. 山东大学学报:医学版, 2004, 42(3):350.
- [12] Yao C, Wang L, Zhang J, et al. Immunotoxicity of hydrocortisone on Th1/Th2-related cytokine production is associated with yang-deficient state in traditional Chinese medicine [J]. Cell Mol Immunol, 2007, 4(5):383.

[责任编辑 聂淑琴]