

四君子汤对慢性疲劳综合征模型大鼠 NK 细胞活性及血清细胞因子水平的影响

雷波*, 刘长征

(宜春学院美容医学院, 江西 宜春 336000)

[摘要] **目的:**探讨四君子汤对慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)模型大鼠自然杀伤(NK)细胞活性及血清转化生长因子- β (TGF- β), γ 干扰素(IFN- γ)水平的影响。**方法:**选用 SD 大鼠为实验动物,共分为 5 组:模型组、空白组、治疗组(分低、中、高 3 个剂量组),采取力竭游泳 + 剥夺睡眠 20 h 的复合造模方法造模,造模成功后给药组采用四君子汤 ig,低、中、高剂量按生药量计分别为 3.37, 6.75, 13.5 g·kg⁻¹,空白组与模型组以蒸馏水 ig,均每天 1 次,连续 2 周,2 周后检测各组大鼠 NK 细胞活性及血清 IFN- γ , TGF- β 含量。**结果:**模型组大鼠 NK 细胞活性及血清 IFN- γ , TGF- β 水平与正常大鼠比较,差异均具有高度统计学意义($P < 0.01$);而四君子汤组与模型组相比,低、中、高 3 个剂量组 NK 细胞活性及 IFN- γ 含量均升高($P < 0.05$),中、高剂量组 TGF- β 含量降低($P < 0.05$)。**结论:**四君子汤能提高 CFS 模型大鼠 NK 细胞活性,升高血清 IFN- γ 含量,降低 TGF- β 含量,具有改善 CFS 大鼠免疫功能的作用。

[关键词] 四君子汤;慢性疲劳综合征大鼠;自然杀伤细胞;转化生长因子- β ; γ 干扰素 β

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0195-03

Influence of Sijunzi Decoction on Natural Killer Cell Activity and Serum TGF- β and IFN- γ in Rats with Chronic Fatigue Syndrome

LEI Bo*, LIU Chang-zheng

(College of Aesthetic Medicine, Yichun University, Yichun 336000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the Influence of Sijunzi decoction on natural killer cell (NK) activity and serum interferon- γ (IFN- γ) and transforming growth factor- β (TGF- β) in rats with chronic fatigue syndrome (CFS). **Method:** Animal model was prepared by exhaustion swimming and 20 hours' sleep deprivation. The SD rats were divided into 5 groups, model group, blank group and treatment group at low, mid and high dosage group (3.37, 6.75, 13.5 g·kg⁻¹). After two weeks of treatment, NK activity and serum IFN- γ and TGF- β content were determined. **Result:** The NK activity and serum IFN- γ content was decreased, and TGF- β content was increased in model group, compared with blank group ($P < 0.01$). The NK activity and serum IFN- γ content in treatment groups were higher and the TGF- β content was lower compared with model group ($P < 0.05$); **Conclusion:** Sijunzi decoction could obviously enhance the NK activity and serum TGF- β content and reduce serum IFN- γ content, which could strengthen the immunity in rats with CFS.

[Key words] Sijunzi decoction; rats with CFS; natural killer cell; transforming growth factor- β ; interferon- γ

慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)是 1988 年由美国疾病防治中心命名的一种新

[收稿日期] 20110829(010)

[基金项目] 宜春市科技局社会发展类科技计划项目(JXYC2010KSB005)

[通讯作者] *雷波,硕士研究生,讲师,从事中药抗衰老与中药美容研究, E-mail: kxc0120@yahoo.com.cn

型疾病^[1]。其临床特点是持续存在或反复发作的慢性严重疲劳,近年来,CFS的发病率呈日益增高趋势,给社会和人类造成巨大的经济损失,关于CFS的研究已成为目前医学界研究的热点。

本文选用经典补益方四君子汤作为治疗药物,研究其对CFS大鼠自然杀伤(NK)细胞活性及血清 γ 干扰素(IFN- γ)、转化生长因子- β (TGF- β)含量的影响,从免疫学角度探讨四君子汤治疗CFS的药理机制,为CFS的治疗提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠100只(由南昌大学动物实验研究中心提供,赣医动字第02196-02),SPF级,180~200g,雌雄各半。

1.2 药物与试剂 四君子汤由本实验室提取,取人参、茯苓、白术、甘草4种中药,按3:3:3:2的比例称取,加10倍水,煎煮3次,每次1h,过滤,合并滤液,浓缩定容,冷藏备用。IFN- γ (批号20100711)及TGF- β (批号20100809)试验试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 T6紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司提供),DL-4000B冷冻离心机(青岛紫泉仪器有限公司提供),SHZ-III型循环水真空泵(郑州佳创仪器设备有限公司提供)。

2 方法

2.1 动物分组 SD大鼠100只,雌雄各半,随机分为5组:正常组、CFS模型组、给药组(包括四君子汤低、中、高剂量3个组),每组20只。

2.2 造模^[2] 采取力竭游泳+剥夺睡眠20h的复合造模方法。具体方法为:每日上午9:00,大鼠在水深50cm、水温(25±1)℃的游泳池中,负重5%体质量行一次力竭游泳,记录力竭游泳时间,后按时间放入水深1.5cm塑料盒中,塑料盒用铁丝网盖住,大鼠不能逃脱但可以自由进食饮水,剥夺大鼠睡眠20h,持续2周。

2.3 给药方法 给药组于造模成功后采用四君子汤ig,低、中、高剂量按生药量计分别为3.37,6.75,13.5g·kg⁻¹,每天1次,连续2周;空白组与模型组以蒸馏水ig,连续2周。

2.4 一般表现观察 实验期间,每天观察并记录大鼠的饮水量、进食量、体重、大鼠粪便及皮毛色泽和眯眼等情况。

2.5 NK细胞活性测定

2.5.1 脾细胞悬液的制备 动物停药后,眼球后静脉丛毛细血管取血,拉颈处死,取出脾脏,用注射器栓

轻轻挤压过200目不锈钢筛网,制成细胞悬液,收集滤液于试管中,离心,弃上清。每管加3mL pH 7.2的Tris-NH₄Cl溶液溶解红细胞,离心,Hanks液洗2次,用RPMI 1640完全营养液调整细胞密度至1×10¹¹/L细胞悬液,备用。

2.5.2 NK细胞活性的测定 取各组备用细胞悬液,分别加入96孔培养板中,每孔100μL,每组设3复孔,取培养的L₉₂₉作为靶细胞,加入对照孔。各孔均加入10μL MTT,然后在37℃、5%CO₂培养箱中孵育4h,离心,弃上清。各孔加有机溶剂(DMSO 150μL/孔及甘氨酸缓冲液pH 10.5,20μL/孔)溶解MTT还原产物,在酶标仪上570nm处测吸光度(A)值。

2.5.3 NK细胞活性计算方法 取3个复孔A的均值,按下述方法计算NK细胞的活性,以杀伤力(%)表示。

$$\text{NK细胞活性} = [1 - (\text{实验组} A - \text{效应细胞组} A) / \text{靶细胞组} A] \times 100\%$$

2.6 血清TGF- β 和IFN- γ 含量检测 取2.5.1项下所取血样,静置后离心取血清,按照试剂盒说明书,采用ELISA法测定TGF- β 和IFN- γ 的含量。

2.7 数理统计 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用SPSS 15.0软件进行数据分析,组间比较采用F检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 造模开始后,正常对照组大鼠无异常表现,其他各组随着造模时间的推移,饮水量、进食量逐渐减少,精神倦怠,活动减少,反应迟钝,眯眼明显,皮毛失去光泽、稀疏,眼神黯淡无光,粪便稀。给药后,各给药组大鼠以上情况出现好转,以中、高剂量组较为明显。

3.2 NK细胞活性 与正常组比较,模型组NK细胞活性降低,差异具有高度统计学意义($P < 0.01$);3个治疗组与模型组相比NK细胞活性升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表1。

3.3 血清IFN- γ 和TGF- β 含量 与正常组比较,模型组血清IFN- γ 含量降低,TGF- β 含量升高,差异均具有高度统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,3个给药组血清IFN- γ 含量升高,差异具有高度统计学意义($P < 0.01$),中、高剂量给药组TGF- β 含量降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

4 讨论

CFS病因病机复杂,其具体机制尚不明确,研

表 1 四君子汤对 CFS 大鼠 NK 细胞活性、血清 IFN- γ 和 TGF- β 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NK 细胞活性/%	IFN- γ /ng·L ⁻¹	TGF- β /ng·L ⁻¹
正常	-	38.24 ± 5.52 ²⁾	101.75 ± 12.12 ²⁾	10.67 ± 2.69 ²⁾
模型	-	32.77 ± 3.87	61.83 ± 14.56	18.10 ± 2.89
四君子汤	3.37	35.70 ± 4.02 ¹⁾	82.96 ± 11.03 ²⁾	17.29 ± 2.22
	6.75	36.92 ± 3.41 ²⁾	89.34 ± 12.72 ²⁾	16.35 ± 2.12 ¹⁾
	13.5	37.75 ± 4.57 ²⁾	91.24 ± 12.19 ²⁾	16.35 ± 1.91 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

究认为其多伴有免疫机能的异常^[4],目前 CFS 的治疗药物多为传统补益方^[5-7],四君子汤作为补益方剂的代表,治疗 CFS 疗效确切但机制研究报道甚少。

NK 细胞是原始杀伤 T 细胞,起非特异性杀伤作用,其活性能够直接反映机体细胞免疫的状态^[8-10]。本实验结果显示,CFS 模型大鼠 NK 细胞活性与正常对照组比较差异有显著性意义($P < 0.01$),模型组大鼠 NK 细胞活性较正常对照组明显降低,给药后,CFS 大鼠 NK 细胞活性明显升高,说明四君子汤能增强 CFS 大鼠 NK 细胞的活性。TGF- β 是一种具有多种功能的蛋白多肽,广泛存在于动物正常组织细胞以及转化细胞中,在机体的免疫调节、细胞生长和分化等方面都发挥重要作用^[8-10]。本实验结果显示:CFS 模型大鼠 TGF- β 水平比正常大鼠高($P < 0.01$),说明 TGF- β 与 CFS 间存在内在关联性,TGF- β 水平的升高可能是 CFS 发病机制之一。而四君子汤可降低 CFS 大鼠血清 TGF- β 的含量,提示可能具有减轻免疫抑制的作用。干扰素是一类多功能高效的诱生蛋白,其中,IFN- γ 是细胞介导免疫反应的一个主要标志,能促进抗原特异性 T 细胞分化成 Th1,促进 Th1 细胞增殖,从而增强细胞免疫活性^[8-10]。本实验结果显示:CFS 模型大鼠水平比正常大鼠明显降低($P < 0.01$),给药后,IFN- γ 活性明显升高($P < 0.05$),说明四君子汤具有增强细胞免疫的作用。

综上所述,四君子汤具有改善 CFS 模型大鼠免疫功能的作用,可能是其治疗 CFS 的作用机制

之一。

[参考文献]

- [1] Holmes G P. Chronic fatigue syndrome: a working case definition [J]. Ann Int Med, 1988, 108: 387.
- [2] 靳文, 李晓勇, 赵晓山, 等. 慢性疲劳大鼠模型创建研究[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 32(2): 107.
- [3] 吴松元. 应用 MTT 单波长比色法检测 NK 细胞活性[J]. 中华医学检验杂志, 1992, 15(2): 105.
- [4] 周安方, 曹继刚, 周艳艳, 等. 抗疲方对慢性疲劳综合征大鼠血清 IgA、IgG、IgM 含量影响的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3): 73.
- [5] 张彩, 曹海涛. 四君子汤抗小鼠运动性疲劳拆方研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 187.
- [6] 刘秀峰, 梁茂新, 张宏. 补气消疲饮对实验性慢性疲劳综合征的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 219.
- [7] 李乐军, 肖辉, 陈隐漪, 等. 参精煎方治疗慢性疲劳综合征 62 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 234.
- [8] 赵晓华, 刘显峰, 朱成新, 等. 疲劳安胶囊对实验动物免疫功能及疼痛的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(2): 44.
- [9] 石世德, 周民伟, 李建军, 等. 安可梦口服液对慢性疲劳小鼠免疫调节功能的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(33): 7462.
- [10] 唐纯志, 杨丽霞, 杨君军, 等. 针刺对慢性疲劳大鼠血清 γ -干扰素和转化生长因子- β 的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(8): 612.

[责任编辑 聂淑琴]