

补肾方剂对子代小鼠非特异性免疫功能的影响

许凯霞^{1,2}, 王永辉², 杨向竹¹, 牛欣¹, 刘亚明², 冯前进^{2*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 山西中医学院, 太原 030024)

[摘要] **目的:** 通过观察受孕小鼠孕期给补肾方剂对其子代胎儿宫内发育迟缓(IUGR)模型抗致病性大肠杆菌能力及网状内皮系统(RES)吞噬功能的影响,探讨中医“肾为先天之本,肾主生殖发育”和“补母益子”理论。**方法:**将同期妊娠小鼠分为正常对照组、IUGR 模型组、左归丸组、右归丸组、五子衍宗丸组、四君子汤组,共 6 组。模型组于孕第 7 天用 40% 乙醇灌胃,12 mL·kg⁻¹,1 日 1 次,共 14 d,各治疗组分别在造模的同时 ig 予补肾方剂(五子衍宗丸、左归丸、右归丸)及补气方剂(四君子汤),30 g·kg⁻¹,30 mL·kg⁻¹,1 日 1 次,共 14 d。每窝子鼠 2~4 只供检测各组子 1 代小鼠抗致病性大肠杆菌能力及网状内皮系统(RES)吞噬功能。**结果:**孕鼠于孕 7~20 d ig 补肾方剂左归丸的子鼠感染致病性大肠杆菌 24 h 存活率(8 只)明显高于 IUGR 模型组($P < 0.05$)及正常对照组($P < 0.05$);IUGR 模型子鼠 RES 碳粒廓清吞噬指数 $K(1.15 \pm 0.14)$ 及校正吞噬指数 $\alpha(5.68 \pm 2.63)$ 均显著低于正常对照组($2.14 \pm 0.14, 9.26 \pm 1.67, P < 0.05$),而补肾方剂左归丸组吞噬指数 K 及校正吞噬指数 α 为($2.54 \pm 0.12, 8.51 \pm 1.94$)、右归丸组为($0.98 \pm 0.07, 8.86 \pm 1.76$)、五子衍宗丸组($2.28 \pm 0.09, 8.70 \pm 1.32$)均明显高于模型组($P < 0.05$)而接近正常组;补气方剂四君子汤对子代的抗细菌感染力及 RES 吞噬功能未见明显作用。**结论:**孕鼠于孕 7~20 d ig 左归丸等补肾方剂,可显著提高 IUGR 小鼠的免疫力,从免疫学角度为中医“肾为先天之本,肾主生殖发育”和“补母益子”理论提供了实验依据。

[关键词] 补肾方剂; 胎儿宫内发育迟缓; 非特异性免疫; 中医理论

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0161-04

[收稿日期] 20110918(001)

[基金项目] 国家科技部国际科技合作项目(2006DFA32490);山西省科技基础条件平台建设项目(2009091010)

[第一作者] 许凯霞,博士研究生,讲师,从事方药的物质基础研究,Tel:0351-2272306,E-mail:xukaixia7903999@sina.com

[通讯作者] *冯前进,博士生导师,教授,从事方药的物质基础研究,Tel:0351-2272278,E-mail:xyqj728119@yahoo.com.cn

- [2] 贺玉琢,富杭育,周爱香,等.以抗炎的药效法再探麻黄汤、桂枝汤、银翘散、桑菊饮的药物动力学[J],中药药理与临床,1993,9(1):1.
- [3] 马悦颖,尚明英,李沧海,等.桂枝汤有效成分苯丙烯酸类化合物干预 IL-1 β 刺激小鼠脑微血管内皮细胞释放 PGE₂ 的构效关系[J].药学学报,2007(7):798
- [4] 郭建友.桂枝汤苯丙烯酸类化合物对 PGE₂ 代谢关键靶点影响及其综合效应[D].北京:中国中医科学院中药研究所,2006.
- [5] Kawabata A. Prostaglandin E₂ and pain-an update[J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(8):1170.
- [6] Pecchi E, Dallaporta M, Jean A, et al. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. Physiol Behav[J]. 2009, 97(3/4):279.
- [7] Davies P, Bailey P J, Goldenberg M M, et al. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation[J]. Annu Rev Immunol, 1984, 2: 335.
- [8] 张畅斌,陆茵,姜廷良.微粒体前列腺素 E₂ 合成酶-1 抑制剂研究进展[J].现代药物与临床,2010,25(1):11.
- [9] Sato T, Nakajima T, Yamano Y. Development of anti-inflammatory drugs targeted against prostaglandin-related molecules[J]. Nihon Rinsho, 2010, 68(10):1835.
- [10] Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson P J. Membrane prostaglandin E synthase-1 a novel therapeutic target [J]. Pharmacol Rev, 2007, 59(3): 207.
- [11] Murakami M, Kudo I. Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer[J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(8): 943.

[责任编辑 聂淑琴]

Effect of Prescription with Function of Tonifying the Kidney on the Nonspecific Immunologic Function in Newborn Mice

XU Kai-xia^{1,2}, WANG Yong-hui², YANG Xiang-zhu¹, NIU Xin¹, LIU Ya-ming², FENG Qian-jin^{2*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of prescription with function of tonifying the kidney on the resistance ability against pathogenic escherichia coli and phagocytic function of reticuloendothelial system (RES) in newborn mice with intrauterine growth retardation (IUGR), and to investigate the theory of TCM: ‘the kidney being the origin of congenial constitution and foundation of reproduction and development of an individual’, ‘invigorating the mother to benefit the children’. **Method:** The pregnant mice were randomly divided into 6 groups. The control group was fed normally. In model group, the pregnant mice were fed with alcohol on the 7th day, ig, 12 mL · kg⁻¹, for 14 days. In other 4 experiment groups, the pregnant mice were fed respectively by Zuogui Wan (ZGW, a prescription for reinforcing kidney Yin) or Yougui Wan (YGW, a prescription for reinforcing kidney Yang) or Wuzi Yanzong Wan (WZYZW, a prescription for reinforcing both of kidney Yang and kidney Yin) or Sijunzi decoction (SJZD, a prescription for supplementing Qi) ig, 30 g · kg⁻¹, 30 mL · kg⁻¹, for 14 days, at the same time. After birth, the newborn mice were infected with pathogenic escherichia coli, the phagocytic functions of reticuloendothelial system (RES) were detected. **Result:** In the treated groups, the survival rate of newborn mice infected by pathogenic escherichia coli (8) for 24 hours was higher than that in model group ($P < 0.05$) and control group ($P < 0.05$). The phagocytic function of reticuloendothelial system (RES) in model group ($K: 1.15 \pm 0.14$, $\alpha: 5.68 \pm 2.63$) was markedly lower than control group (2.14 ± 0.14 , 9.26 ± 1.67 , $P < 0.05$). The phagocytic function in the treated group was markedly higher than that in model group (ZGW: 2.54 ± 0.12 , 8.51 ± 1.94 , $P < 0.05$, YGW: 0.98 ± 0.07 , 8.86 ± 1.76 , $P < 0.05$, WZYZW: 2.28 ± 0.09 , 8.70 ± 1.32 , $P < 0.05$). But same result was not found in for supplementing Qi group. **Conclusion:** Prescriptions with function of tonifying the kidney like ZGW can enhance immunologic functions in newborn mice with IUGR. And this may provide an evidence for the theory- ‘the kidney being the origin of congenial constitution and foundation of reproduction and development of an individual’, ‘invigorating the mother to benefit the children’ in TCM from the aspect of immune theory.

[Key words] prescription for tonifying Kidney; intrauterine growth retardation; nonspecific immunity; theory of TCM

目前,对健康和疾病发育起源 (DoHaD) 的研究正成为全球范围内的重大挑战之一^[1]。大量临床流行病学研究及动物实验证明胎儿在宫内发育时受到遗传因素和宫内环境的影响,不仅会影响胎儿期的生长发育,并可能产生持续的结构功能改变,导致将来一系列成年期疾病的发生^[2-5]。其中,胎儿对多种宫内不良环境的一个常见反应是引起胎儿宫内发育迟缓 (IUGR)。

胎儿宫内发育迟缓 (IUGR),是指胎儿出生体重低于同胎龄平均体重的第 10 个百分位或 2 个标准差,与成年期糖尿病、高血压等多种慢性重大疾病的

发生密切相关^[6-7]。这与中医认为的先天不足会导致后天对某些疾病的易感性增强的理论是一致的。反之,若能在胚胎期有效拮抗 IUGR,即改善先天不足,则能在一定程度上防止成年期多种慢性重大疾病的发生,为人类造福。中医认为,肾为先天之本,有研究显示,补肾方左归丸水提液在一定浓度范围内可以提高 SD 大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 的体外增殖能力,而 BMSCs 来源于发育早期的中胚层,类似中医的“先天之精”,具有“先身而生”的特点^[8]。那么直接在胚胎期予补肾方药,能否通过补益先天之肾精而改善 IUGR 呢?

由于胎儿长期暴露于乙醇环境是导致 IUGR 的重要原因,并且免疫缺陷是其不良后果之一^[9],本研究在小鼠孕期以乙醇制造 IUGR 模型,应用左归丸等补肾方剂并以补气方四君子汤作为对照观察子代小鼠 RES 吞噬功能及抗感染力,以证实补肾方剂通过对胚胎发育的作用可影响子代小鼠先天性非特异性免疫功能。从而从免疫学角度为中医的“肾主先天”、“肾主生殖发育”理论提供实验依据,为优生优育工作提供中医途径及依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,体重(36±2)g,购于中国医学科学院实验动物中心,许可证号 SCXK(京)0089326,2004-0001。

1.2 药物与试剂 左归丸(熟地:山药:山萸肉:枸杞子:菟丝子:鹿角胶:龟板胶:川牛膝8:4:4:4:4:4:4:3),右归丸(熟地黄:山药:山萸肉:枸杞子:菟丝子:鹿角胶:杜仲:当归:肉桂:制附子8:4:3:4:4:4:4:3:2:2),五子衍宗丸(枸杞子:炒菟丝子:覆盆子:盐炒车前子:蒸五味子8:8:4:2:1),四君子汤(党参:炒白术:茯苓:炙甘草2:2:2:1)。原药材均来自山西省中医药研究院中药房,每方质量浓度均为生药量 1 g·mL⁻¹。药物的煎制和浓缩均用陶瓷制品手工操作。分析纯乙醇(广州化学试剂二厂,批号 2007061201)加蒸馏水配制成 40% 的乙醇溶液,临用现配。大肠杆菌 0111B₄ 菌株由北京中医药大学微生物免疫教研室鉴定并提供,印度墨汁(青岛高科园海博生物技术有限公司,批号 001213),Na₂CO₃(分析纯,天津市博迪化工有限公司,批号 20060721)等。

1.3 仪器 岛津 UV-3000 紫外-可见分光光度计,塞普利斯 XS125A 分析天平。

2 方法

2.1 分组 小鼠雌雄比例 2:1 合笼过夜,次日晨检见阴栓或阴道涂片镜检见精子者,确定为受孕,当日记为受孕 0 d,将孕鼠随机分为正常对照组、IUGR 模型组、左归丸组、右归丸组、五子衍宗丸组、四君子汤组,共 6 组,每组孕鼠 7 只。

2.2 模型制备与给药 除正常对照组外,其余各组于受孕第 7 天用 40% 乙醇 ig,12 mL·kg⁻¹,1 日 1 次,连续 14 d 至第 20 天(预产期)。第 7 天起各给药组在造模同时分别 ig 给予左归丸、右归丸、五子衍宗丸、四君子汤 4 组方剂 30 g·kg⁻¹,30 mL·kg⁻¹; IUGR 模型组和正常对照组 ig 予生理盐水,30 mL·kg⁻¹,1 日 1 次。孕鼠单笼饲养,于第 20~21 天孕鼠

分娩子 1 代鼠(简称子鼠)。每窝子鼠 2~4 只供抗感染及碳粒廓清实验用。

2.3 样品制备与指标检测 采用体内抗菌实验法,每组子鼠 15~16 只于 4 周龄,大肠杆菌 0111B₄ 菌株肉汤培养基培养 24 h 菌液,0.5 mL/只,ip。小鼠注射部位剪毛,消毒。观察记录感染后 15,18,24 h 各组死亡率,并继续观察 7 d。采用碳粒廓清法^[10],每组子鼠 6~7 只于 4 周龄称重,尾静脉注射 20% 印度墨汁生理盐水 0.1 mL/10 g,于注射后 2 min 和 22 min 眼球后静脉丛采血 20 μL,放入 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中混匀,用岛津 UV-3000 紫外-可见分光光度计,在 570 nm 处测定其吸光度(A),并称取肝脾质量,计算碳粒廓清吞噬指数(K)及校正吞噬指数(α):

$$K = (\lg A_1 - \lg A_2) / (t_2 - t_1)$$

$$\alpha = K^{1/3} \times \text{体重} / (\text{肝质量} + \text{脾质量})$$

2.4 统计学处理 用 SPSS 16.0 软件统计包对各组数据进行统计分析,计数数据行 χ^2 检验;计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,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 补肾方剂对子鼠抗菌力的影响 孕鼠孕期给予补肾阴方左归丸及补肾阳方右归丸,其子鼠感染致病大肠杆菌 18 h 存活率明显高于模型对照组,左归丸组在感染致病大肠杆菌 15 h,24 h,7 d 存活率亦都明显高于正常对照组和模型对照组。本实验未观察到模型组与正常对照组感染后各期存活率的差别,平补肾精方剂五子衍宗丸组及补气方剂四君子汤组子鼠细菌感染后各期存活率与对照组亦无明显差异,见表 1。

表 1 受孕 7 d 孕鼠 ig 补肾方剂 30 g·kg⁻¹ 14 d 对子鼠感染致病性大肠杆菌存活率的影响($\bar{x} \pm s$) 只

组别	n	不同时间存活数			
		15 h	18 h	24 h	7 d
正常对照	16	5	5	0	0
模型对照	16	3	0	0	0
左归丸	16	14 ^{1,2)}	8 ¹⁾	8 ^{1,2)}	8 ^{1,2)}
右归丸	15	8	8 ¹⁾	5	5
五子衍宗丸	15	9	7	2	2
四君子汤	15	5	5	2	2

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与正常对照组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 补肾方剂对子鼠 RES 功能的影响 模型对照组子鼠的吞噬指数(K)与吞噬系数(α)均明显低于正常对照组,补肾方剂左归丸组、右归丸组、五子衍宗丸组吞噬能力明显高于模型对照组,而补气方四

君子汤组则与模型对照组无差异,见表 2。

表 2 受孕 7 d 孕鼠 ig 补肾方剂 30 g·kg⁻¹ 14 d 对子鼠吞噬指数 *K* 与吞噬系数 α 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	<i>K</i>	α
正常对照	7	2.14 ± 0.14 ¹⁾	9.26 ± 1.67 ¹⁾
模型对照	6	1.15 ± 0.14	5.68 ± 2.63
左归丸	7	2.54 ± 0.12 ²⁾	8.51 ± 1.94 ¹⁾
右归丸	6	0.98 ± 0.07	8.86 ± 1.76 ¹⁾
五子衍宗丸	7	2.28 ± 0.09 ²⁾	8.70 ± 1.32 ¹⁾
四君子汤	6	0.31 ± 0.09	3.47 ± 4.01

注:与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01。

4 讨论

非特异性免疫是机体在长期的种系发育与进化过程中逐渐建立起来的一系列防卫机能,这种免疫机能可在个体出生时就具有,受遗传等因素的影响。RES 吞噬功能是非特异性免疫的重要指标。中医理论认为,肾为先天之本、主生殖发育,先天之本充盈,则“正气存内,邪不可干”,抗病能力强,即免疫力强;若先天不足,则免疫力差。本研究在母鼠孕期应用乙醇制成其子鼠 IUGR 模型,同时予左归丸等补肾方剂并以补气方剂四君子汤作为对照。结果显示:模型组子鼠 RES 吞噬功能显著低于正常对照组,而各补肾方剂组(左归丸组、右归丸组、五子衍宗丸组)子鼠 RES 吞噬功能均较 IUGR 子鼠增强。故可认为,胚胎期应用补肾方剂可对胚胎发育产生有益影响,从而增强子鼠决定于先天的非特异免疫系统抵抗有害因素乙醇的致 IUGR 损伤作用。而单纯补气方剂四君子汤组子鼠 RES 吞噬功能与 IUGR 子鼠降低的 RES 吞噬功能无显著差别,表明胚胎发育期单纯补气在增强子鼠免疫力方面,对胚胎发育的影响不明显。

此外,致病性大肠杆菌感染子鼠后,模型组与正常对照组及五子衍宗丸组 18, 24 h 存活率未见明显差异,补肾方剂左归丸组、右归丸组的 18 h 存活率均明显较对照组高,但 24 h 及 7 d 存活率仅左归丸组高。亦说明补肾方剂胚胎期给药可以提高子鼠的免疫力,犹以补肾阴方更明显。

由于抗感染过程中,首先是非特异性免疫系统发挥作用,之后随着特异性免疫的形成,两者相互配合,扩大作用。其中,非特异性免疫是特异性免疫的基础。从中医理论来看,非特异性免疫可看作是先天之精的作用,特异性免疫可看作是后天之精的作

用。因此,本文所观察子鼠体内抗菌实验同时反映了非特异性及特异性免疫两个方面,既有先天亦有后天因素,而以非特异性免疫为基础的抗菌过程,在一定程度上反映了特异性免疫功能。先天之精充足,则脏腑功能强,容易化生后天之精,则非特异性免疫功能强,随后发生的特异性免疫也强,从而抵抗力强。反之,先天之精不足,则脏腑功能亦不足,化生后天之精少,则不但非特异性免疫功能相对弱,而且随后发生的特异性免疫也弱,从而抵抗力弱。对其先天不足者,例如 IUGR,若能从胚胎期用补肾方剂补充先天之精,则可增强其出生后的免疫力。这正与本研究实验结果一致,可作为中医“肾为先天之本”、“肾主生殖发育”的理论与实验依据。同时,也为优生优育工作提供了中医途径及依据。

[参考文献]

- [1] 杨慧霞,马京梅. 健康与疾病的发育起源对围产医学实践的启迪[J]. 中华围产医学杂志, 2010, 13(6):441.
- [2] 杨慧霞. 健康与疾病的发育起源学说引发的思考[J]. 中华围产医学杂志, 2008, 11(3):157.
- [3] 李世刚,茅彩萍,徐智策. 健康与疾病的发育起源研究进展[J]. 中华围产医学杂志, 2010, 13(6):463.
- [4] 蒋文跃,韩巍,李志新. 成人疾病胎源说的证据及机制[J]. 北京大学学报:医学版, 2007, 39(1):96.
- [5] 曾婵娟,杨慧霞. 健康和疾病的发育起源研究现状[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(1):3.
- [6] Godfrey K M, Barker D J. Fetal nutrition and adult disease[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(5 Suppl):1344S.
- [7] Valsamakis G, Kanaka-Gantenbein C. Causes of intrauterine growth restriction and the postnatal development of the metabolic syndrome[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1092:138.
- [8] 谭峰,樊巧玲,王明艳,等. 左归丸对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):145.
- [9] Mc Gill J, Meyerholz D K, Edsen-Moore M, et al. Fetal exposure to ethanol has long-term effects on the severity of influenza virus infections[J]. J Immunol, 2009, 182(12):7803.
- [10] 傅毓,秦惠龙,罗琦,等. 固本益肾胶囊对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):153.

[责任编辑 聂淑琴]