

## 25 味中药对小鼠类风湿性关节炎脾脏 淋巴细胞增殖反应的影响

王连荣<sup>1\*</sup>, 吴伟康<sup>2</sup>

(1. 北京市中西医结合医院, 北京 100039; 2. 中山大学中西医结合研究所, 广州 510080)

**[摘要]** 目的: 观察 25 味中药对小鼠类风湿性关节炎脾脏淋巴细胞增殖反应的影响。方法: 采用 II 型胶原纤维诱导的小鼠类风湿性关节炎动物模型, 在免疫后第 5 周无菌摘除脾脏, 制成脾淋巴细胞悬液, 选择 25 味具有抗炎、免疫调节及改善微循环功能的单味中药, 分别在有或无 II 型胶原纤维存在的条件下, 刺激脾淋巴细胞, 通过 MTT 检测, 测定单味中药的作用效果。结果: 在 II 型胶原纤维存在的条件下, 羌活对淋巴细胞增殖具有明显的抑制作用, 而川芎、全蝎、丹参则具有较强的促进作用; 无 II 型胶原纤维存在的条件下, 麝香、白芍、羌活、牛膝对淋巴细胞增殖反应具有明显的抑制作用, 而川芎、水蛭、地龙则具有较强的促进作用。结论: 25 味中药对小鼠类风湿性关节炎脾脏淋巴细胞增殖反应均存在不同程度的抑制或促进作用, 其中羌活的抑制和川芎的促进作用最为明显, 实验结果为临床治疗类风湿性关节炎用药及组方提供了参考依据。

**[关键词]** 中药; 类风湿性关节炎; MTT 实验

**[中图分类号]** R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0234-03

类风湿性关节炎(RA)是多系统性炎症性的自身免疫病,其发病机理与 T 淋巴细胞及 B 细胞被活化,分泌大量免疫球蛋白,发生免疫反应有关,因此,临床上使用具有抗炎和免疫抑制作用的药物治疗类风湿性关节炎,收到一定的效果。本研究选择 25 味具有抗炎、免疫调节及改善微循环功能的单味中药<sup>[1-9]</sup>,刺激 II 型胶原纤维诱导的小鼠类风湿性关节炎脾脏淋巴细胞,根据淋巴细胞增殖反应的结果,初步分析 25 味中药的作用效果。

### 1 材料

**1.1 动物** 5 周龄 NIH 雄性小鼠 20 只,体重 22 ~ 25 g,适应性饲养 1 周后用于实验。

**1.2 药物** 标准中药对照品:防风、麝香、当归、天麻、丹参、牛膝、白芍、独活、黄芪、人参、川芎、党参、全蝎、羌活、地黄、柴胡、威灵仙、羚羊角、水蛭、蟾蜍、地龙、牛胆粉、紫杉醇、高三尖杉碱、蛇胆汁等,均购自中国药品生物制品鉴定所。制备:取上述中药对照品 0.5 g(麝香 0.01 g),加蒸馏水 40 mL,浸泡 20 min 后加热煮沸,浓缩至 10 mL,反复过滤,去药渣,得 2 mL 澄明溶液,药液终浓度为 250  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (麝香终浓度为 50  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )。放 4℃ 冰箱保存。

**1.3 试剂及仪器** II 型胶原纤维(bovine type II collagen): Sigma 公司产品;福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂, Gibco 公司产品;胎牛血清,杭州四季清公司;MTT,上海生物工程公司分装;Sodium Dodecyl Sulphate(SDS):上海生物工程公司;倒置相差显微镜(德国 Olympus 公司);Model 1550 全自动酶标仪(德国 BIO-RAD)。

### 2 方法

**2.1 动物造模** 小鼠初次免疫为腹部 sc 100  $\mu\text{g}$  II 型胶原纤维和 100  $\mu\text{L}$  福氏完全佐剂,3 周后再次免疫,使用 100  $\mu\text{g}$  II 型胶原纤维和 100  $\mu\text{L}$  福氏不完全佐剂;小鼠初次免疫后第 5 周,脱颈处死,无菌摘除脾脏。

**2.2 脾细胞的体外培养** 无菌摘除的小鼠脾脏在生理盐水中漂洗 2 次,去除表面的残留血液,剪碎,无菌挤压过 200 目网,同时用  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 mL 冲洗,去除红细胞,离心 1 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  10 min,去上清,加 2 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,用 0.5% 的台盼蓝染色计数,制成  $2\times 10^5$  个/mL 的细胞悬液。

### 2.3 MTT 法检测脾淋巴细胞增殖

**2.3.1 II 型胶原纤维存在条件下的脾脏淋巴细胞 MTT 检测** 取 96 孔细胞培养板,每孔加 0.1 mL PBS 含 0.5  $\mu\text{g}$  II 型胶原纤维, -4℃ 保存 12 h。吸去板中液体,每孔用 200  $\mu\text{L}$  含 0.05% Tween-20 的 PBS 洗涤 3 次。每孔加 0.1 mL 脾脏淋巴细胞的培

[收稿日期] 2009-11-30

[通讯作者] \* 王连荣, Tel: 13141391731, E-mail: lianrongw@yahoo.com.cn

养液,6 h 后每孔加入 2  $\mu\text{L}$  的中药提取液进行刺激,在 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 12 h。吸去培养液,每孔加 0.1 mL PBS 和 10  $\mu\text{L}$  MTT 溶液 (5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),培养箱中培养 2 h。每孔加 0.1 mL 10% SDS (含 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸),置酶联检测仪中测定吸光度(A)值,检测波长 570 nm,参考波长 630 nm。设置调零孔(培养液、MTT、SDS),阴性对照孔(细胞、培养液、MTT、SDS),中药刺激孔(中药提取液、细胞、培养液、MTT、SDS),每组设定 6 复孔。

**2.3.2 无 II 型胶原纤维条件下的脾脏淋巴细胞 MTT 检测** 取 96 孔细胞培养板,每孔直接加 0.1 mL 脾脏淋巴细胞的培养液,在 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 12 h。每孔加入 2  $\mu\text{L}$  的中药提取液进行刺激,培养箱中培养 72 h,吸去培养液,每孔加 0.1 mL PBS 和 10  $\mu\text{L}$  MTT 溶液 (5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),培养箱中培养 4 h,余下操作步骤同上。

**2.3.3 统计分析** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 17.0 软件进行分析,中药刺激孔与阴性对照孔的 A 值采用配对样本 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 II 型胶原纤维存在条件下的脾脏淋巴细胞 MTT 检测** 25 味中药提取液刺激脾脏淋巴细胞,酶联检测 A 如表 1。中药刺激孔 A 值与阴性对照孔 A 进行比较,小于阴性对照组的为抑制,大于阴性对照组的为促进。根据 A 的大小将促进程度分为轻微 (0.066 ~ 0.200)、中等 (0.200 ~ 0.400)、较强 (> 0.400),结果表明,羌活对淋巴细胞增殖具有明显的抑制作用,而川芎、全蝎、丹参则具有较强的促进作用,结果详见表 2。

**3.2 无 II 型胶原纤维存在条件下的脾脏淋巴细胞 MTT 检测** 在中药刺激后培养时间明显增长,需要 72 h,而且加入 MTT 溶液后的培养时间也要延长 2 h。酶联检测 A 如表 3。中药刺激孔 A 与阴性对照孔 A 值进行比较,小于阴性对照组的为抑制,大于阴性对照组的为促进,根据 A 的大小将促进分为轻微 (0.016 ~ 0.500)、中等 (0.500 ~ 1.000)、较强 (> 1.000),结果麝香、白芍、羌活、牛膝对淋巴细胞增殖反应具有明显的抑制作用,而川芎、水蛭、地龙则具有较强的促进作用,其余中药作用结果详见表 4。

表 1 25 味中药对小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响 (II 型胶原纤维) ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

中药	A
阴性对照	0.066 $\pm$ 0.004
羌活	0.043 $\pm$ 0.005 <sup>2)</sup>
水蛭	0.069 $\pm$ 0.003 <sup>1)</sup>
羚羊角	0.081 $\pm$ 0.007 <sup>2)</sup>
防风	0.084 $\pm$ 0.005 <sup>2)</sup>
麝香	0.090 $\pm$ 0.008 <sup>2)</sup>
地黄	0.101 $\pm$ 0.010 <sup>2)</sup>
蟾蜍	0.149 $\pm$ 0.011 <sup>2)</sup>
地龙	0.166 $\pm$ 0.011 <sup>2)</sup>
高三尖杉碱	0.190 $\pm$ 0.013 <sup>2)</sup>
白芍	0.191 $\pm$ 0.012 <sup>2)</sup>
威灵仙	0.193 $\pm$ 0.011 <sup>2)</sup>
蛇胆汁	0.194 $\pm$ 0.014 <sup>2)</sup>
黄芪	0.195 $\pm$ 0.013 <sup>2)</sup>
柴胡	0.197 $\pm$ 0.015 <sup>2)</sup>
牛膝	0.199 $\pm$ 0.014 <sup>2)</sup>
天麻	0.227 $\pm$ 0.018 <sup>2)</sup>
紫杉醇	0.228 $\pm$ 0.016 <sup>2)</sup>
牛胆粉	0.236 $\pm$ 0.015 <sup>2)</sup>
独活	0.243 $\pm$ 0.017 <sup>2)</sup>
当归	0.254 $\pm$ 0.020 <sup>2)</sup>
党参	0.282 $\pm$ 0.019 <sup>2)</sup>
人参	0.283 $\pm$ 0.021 <sup>2)</sup>
川芎	0.412 $\pm$ 0.026 <sup>2)</sup>
全蝎	0.476 $\pm$ 0.025 <sup>2)</sup>
丹参	0.662 $\pm$ 0.032 <sup>2)</sup>

注:与阴性对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (下同)。

表 2 25 味中药刺激脾脏淋巴细胞增殖反应 (A) 的影响程度 (II 型胶原纤维)

抑制 ( $< 0.066$ )	阴性对照 (0.066)	促进 (轻微, 0.066 ~ 0.200)	促进, (中等, 0.200 ~ 0.400)	促进 (较强, $> 0.400$ )
	羌活	水蛭、羚羊角、防风、麝香、地黄、蟾蜍、地龙、高三尖杉碱、白芍、威灵仙、蛇胆汁、黄芪、柴胡、牛膝	天麻、紫杉醇、牛胆粉、独活、当归、党参、人参	川芎 全蝎 丹参

表 3 25 味中药对小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响  
(无 II 型胶原纤维) ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

中药	A
阴性对照	0.016 ± 0.003
麝香	0.001 ± 0.001 <sup>2)</sup>
白芍	0.005 ± 0.002 <sup>2)</sup>
羌活	0.008 ± 0.002 <sup>2)</sup>
牛膝	0.013 ± 0.003 <sup>2)</sup>
防风	0.020 ± 0.002 <sup>2)</sup>
全蝎	0.023 ± 0.003 <sup>2)</sup>
地黄	0.030 ± 0.004 <sup>2)</sup>
羚羊角	0.059 ± 0.006 <sup>2)</sup>
丹参	0.079 ± 0.009 <sup>2)</sup>
蛇胆汁	0.085 ± 0.011 <sup>2)</sup>
当归	0.165 ± 0.014 <sup>2)</sup>
柴胡	0.166 ± 0.015 <sup>2)</sup>
独活	0.174 ± 0.012 <sup>2)</sup>
紫杉醇	0.197 ± 0.018 <sup>2)</sup>
蟾蜍	0.245 ± 0.022 <sup>2)</sup>
牛胆粉	0.269 ± 0.025 <sup>2)</sup>
威灵仙	0.316 ± 0.029 <sup>2)</sup>
人参	0.338 ± 0.034 <sup>2)</sup>
高三尖杉碱	0.355 ± 0.033 <sup>2)</sup>
天麻	0.386 ± 0.037 <sup>2)</sup>
黄芪	0.473 ± 0.042 <sup>2)</sup>
党参	0.651 ± 0.059 <sup>2)</sup>
川芎	1.076 ± 0.094 <sup>2)</sup>
水蛭	1.251 ± 0.113 <sup>2)</sup>
地龙	2.144 ± 0.196 <sup>2)</sup>

表 4 25 味中药刺激脾脏淋巴细胞增殖反应(A)的影响程度  
(无 II 型胶原纤维)

抑制 (<0.016)	阴性对照 (0.016)	促进 (轻微, 0.016 ~ 0.500)	促进 (中等, 0.500 ~ 1.000)	促进 (较强, >1.000)
		防风、全蝎、地黄、羚羊角、丹参、蛇胆汁、当归、		
麝香		柴胡、独活、紫杉醇、蟾蜍、牛胆粉、威灵仙、人	党参	川芎
白芍	培养液 + 细胞	参、天麻、高三尖杉碱、黄芪		水蛭
羌活				地龙
牛膝				

#### 4 讨论

类风湿性关节炎是一种需要长期用药治疗的慢性疾病,中药治疗具有一定的疗效,可能与中药的抗炎、免疫调节及改善微循环功能有关,本研究利用 II 型胶原纤维诱导的小鼠关节炎动物模型,选择 25 味中药刺激脾脏淋巴细胞,观察其对淋巴细胞增殖反

应的影响程度。实验结果表明:在 II 型胶原纤维存在条件下,羌活对淋巴细胞增殖具有明显抑制作用,而川芎、全蝎、丹参则有较强促进作用,其余中药具有轻微或者中等程度促进作用;在无 II 型胶原纤维存在条件下,麝香、白芍、羌活、牛膝对淋巴细胞增殖反应具有明显抑制作用,川芎、水蛭、地龙则具有较强促进作用,其余中药表现为轻微或者中等程度促进作用;在这两种条件下大部分单味中药对淋巴细胞增殖反应的影响程度基本相同,说明它们的作用途径可能类似,少部分单味中药在不同条件下对淋巴细胞增殖反应的影响程度有强、弱之分,有待进一步研究。羌活、川芎未受条件影响表现出明显的抑制和促进作用,这与现代药理研究相符合,羌活具有解热镇痛、抗炎、抗过敏及抗心肌缺血等作用,而川芎的作用主要是改善微循环<sup>[10]</sup>,对细胞增殖所需的微环境有利。这些实验结果为临床治疗类风湿性关节炎用药及组方提供了参考依据。

#### [参考文献]

- [1] 李艳冰,许树林. 麝香抗炎的药理实验[J]. 林业科技, 2001,26(1):33.
- [2] 徐叔云,沈玉先,许杜娟,等. 白芍总甙和丹皮总甙对松果腺调节炎症免疫反应的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1994,8(3):161.
- [3] 侯杰,戴令娟,母国华,等. 中药丹参、川芎联合强的松治疗特发性肺纤维化的临床疗效[J]. 医师进修杂志, 2001,24(1):17.
- [4] 贾泰元. 党参对鼠 J774 巨噬细胞吞噬活性的增强效应[J]. 时珍国医国药, 2000,11(9):769.
- [5] 王一涛,杨奎,王家葵,等. 羌活的药理学研究[J]. 中药药理临床, 1996,4:12.
- [6] 龚海洋,王红,许哲,等. 二十一种中药对小鼠免疫药理作用的初步研究[J]. 中药药理与临床, 1995,2:30.
- [7] 吴英良,刘崇铭,陈兰兰,等. 全蝎与蝎身煎剂对小鼠免疫功能的影响[J]. 时珍国药研究, 1995,6(2):13.
- [8] 刘京生,苗智慧,董力,等. 水蛭抗肿瘤作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2001,12(10):884.
- [9] 耿晖. 地龙药理作用研究进展[J]. 山东中医杂志, 2000,19(9):550.
- [10] 孔增科,周海平,付正良. 常用中药药理与临床应用[M]. 呼和浩特:内蒙古科学技术出版社,2005,1:42;257.

[责任编辑 何伟]