

# 复合病因造模法致脾虚证大鼠模型 在免疫系统方面的变化

王洪海, 谢 鸣\*

(北京中医药大学国家重点学科方剂学学科, 北京 100029)

[摘要] 目的: 探讨复合病因造模法致脾虚证大鼠模型的免疫系统变化及其特点。方法: 过度劳倦加饮食失节连续3周, 自然恢复1周。观察各造模时间点大鼠胸腺重量、脾重量及指数和血清细胞因子的变化。结果: 与对照组比较, 模型组大鼠在第1~3周体重未见增长, 显著低于对照组( $P < 0.001$ ), 第4周体重有所回升, 但仍显著低于对照组( $P < 0.001$ ); 模型组大鼠不同时间点的胸腺重量、脾重量均显著低于对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ); 胸腺指数第1周显著低于对照组( $P < 0.01$ ), 第3~4周恢复; 脾指数第3~4周显著高于对照组( $P < 0.05$ )。模型大鼠血清白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )第1周明显升高( $P < 0.05$ ), 第4周显著降低( $P < 0.01$ ); 血清白细胞介素-2(IL-2)3周时显著降低( $P < 0.01$ ), 第4周有回升趋势( $P > 0.05$ ); 血清白细胞介素-6(IL-6)第1~4周呈持续下降趋势; 血清肿瘤坏死因子(TNF  $\alpha$ )第1~3周呈升高趋势, 第4周时有降低趋势。结论: 大鼠造模3周体重、胸腺、脾重量明显降低, 恢复1周后未见明显恢复; 血清细胞因子水平出现了IL-1 $\beta$ 降低、IL-6、IL-2、TNF  $\alpha$ 的紊乱变化现象。脾虚证模型导致了免疫系统方面的变化。

[关键词] 脾虚证; 动物模型; 免疫

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)12-0041-05

## Immunologic Effect on the Model Rat of Spleen-qi Deficiency Induced by Complex Factors

WANG Hong-hai, XIE Ming\*

(Department on Formulaology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the change of immunological system in model rat of spleen-qi deficiency induced by complex factors. **Methods:** Adopting excess fatigue (by swimming) and out of constant diet on rats for constant 3 weeks and stopping doing so in the 4th week. We observed the change of the weight of thymus and spleen, the index of thymus and spleen, and cell factors of serum of the model rat during different modelling time points. **Results:** Compared with the control group, the weight of the model rats has no significant change different from that of weight-increasing control group from the 1~3 week. The weight is lighter still though it brings back a little in the 4th week ( $P < 0.001$ ); The weight of thymus and spleen of the model rats is lighter significantly than that of the control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  or  $P < 0.001$ ). The index of thymus decreased significantly in the 1st week ( $P < 0.01$ ) but came back in the 3rd and 4th week. The index of spleen increased significantly compared with that of the control group in the 3rd and 4th week ( $P < 0.05$ ). The interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) in serum of the model group increased obviously in the 1st week ( $P < 0.05$ ), and decreased significantly in the 4th week ( $P < 0.01$ ). The interleukin-2(IL-2) in serum of the model group decreased in the 3rd week and trended to increase again in the 4th week. The interleukin-6(IL-6) decreased gradually during the 4 weeks. The tumor necrosis factor  $\alpha$ (TNF  $\alpha$ ) trended to increase from 1~3 week, and trended to degrade in the 4th week.

[收稿日期] 2006-07-03

[通讯作者] \* 谢鸣, Tel: (010) 64286992; E-mail: xieming603@263.net

**Conclusion:** After three weeks, the weight of thymus and the weight of spleen are reduced. In the 4 w the weight of thymus and spleen has no recovery. During the course serum IL-1 $\beta$  degraded continuously, and IL-2 IL-6 TNF- $\alpha$  changed disorderly. So it hints the syndrome of spleen qi deficiency brings about the changes in immunological system.

[ **Key words** ] syndrome of spleen qi deficiency; animal model; immunity

依据中医病因发病学原理,在采用过度劳倦<sup>[1,2]</sup>加饮食失节<sup>[3]</sup>复合法复制大鼠脾虚模型的基础上,观察了不同造模时间点大鼠的胸腺、脾和血清免疫因子的变化,以了解该脾虚模型免疫系统的变化及特征,进一步探察该模型的生物学特点,为认识脾虚与免疫功能之间的关系提供部分实验依据。

### 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性 Wistar 大鼠,体重 220  $\pm$  10 g,级别 SPF/VAF,动物许可证号为 SCXK(京)2002-0003,由北京维通利华实验动物中心提供。所有动物提前 1 周购入,5 只/笼。光照节律 12L:12D(6:00 ~ 18:00),室温(22  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C,保持动物室安静。

**1.2 试剂** IL-1 $\beta$ -RIA 试剂盒、IL-2-RIA 试剂盒、IL-6-RIA 试剂盒、TNF- $\alpha$ -RIA 试剂盒,由解放军总医院东亚放射免疫研究所提供。

**1.3 主要仪器和器材** 低温离心机(DDL-5 型),上海安亭科学仪器厂产;SN-695B 型智能放免  $\gamma$  测量仪,上海核所日环光电仪器有限公司产。塑料钢化桶,高 60 cm,桶口径 50 cm,执行标准:Q/WHC02-2002,温岭大溪宏程塑料制品厂生产。

### 2 方法

**2.1 分组与造模** 实验前全部动物进行预游泳,剔除游泳时间少于 10 min 或大于 20 min 的大鼠。合格大鼠随机分为正常对照组(以下简称对照组)和脾虚模型组(以下简称模型组),每组 40 只。模型组动物(5 只/桶)下午 2:00 置于盛有温水[水温(25  $\pm$  1)  $^{\circ}$ C,水深 40 cm]的塑料钢化桶中游泳 10 min。隔日喂食(隔日禁食,隔日足量给食),连续 3 周。自然恢复阶段:于造模第 22 d 开始,停止上述造模因素,自然饲养条件下观察。对照组动物不加任何刺激,自然饲养。

**2.2 观测指标** 于造模的第 1 2 3 4 周的前 1 d 晚上 8:00,分别从两组中随机抽取大鼠各 10 只,禁食,第 2 d 大鼠断头,取血 4 mL 室温放置,2 500 r/min 离心 15 min,取血清,冰箱-20  $^{\circ}$ C 保存,待测 IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、TNF- $\alpha$ ,采用放射免疫法,按试剂盒说明进行操作;打开胸腔、腹腔小心剥离胸腺、脾脏,用滤纸吸

去胸腺、脾脏上附带血液,用电子天平称重,计算脏器指数。

**2.3 数据统计学处理** 各组指标数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS11.0 for windows 统计软件处理,多组之间的比较采用方差分析,组间比较采用 Student-Newman-Keuls 法检验。

### 3 结果

**3.1 脾虚模型大鼠不同时间点体重的变化** 结果见图 1。从图 1 可以看出,对照组大鼠体重第 1~4 周逐渐升高,不同时间点差异显著( $P < 0.01$ );模型组大鼠体重第 1~3 周无明显变化( $P > 0.05$ ),4 周时体重显著升高( $P < 0.001$ )。与对照组相比,模型组大鼠各时间点的体重均显著降低( $P < 0.001$ )。

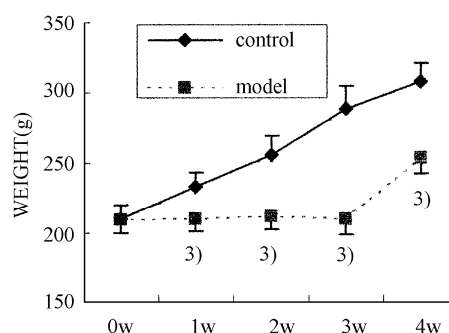


图 1 不同时间点大鼠体重变化

注:与对照组比较: <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.001$ ( $n = 10$ ), (下同)。

**3.2 脾虚模型大鼠不同时间点胸腺、脾重量的变化** 结果见图 2~3。从图 2 可以看出,对照组与模型组大鼠胸腺重量变化趋势相似,变化幅度不大。与对照组相比,模型组大鼠胸腺重量于第 1~3 周均显

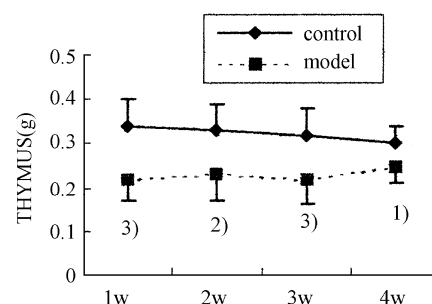


图 2 不同时间点大鼠胸腺重量变化

著降低( $P < 0.001$  或  $P < 0.01$ ), 4 周时虽有回升, 但仍显著降低( $P < 0.05$ )。

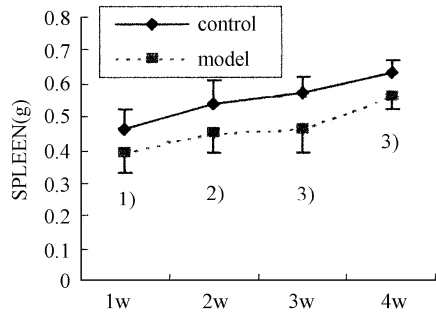


图 3 不同时间点大鼠脾重量变化

从图 3 可以看出, 对照组与模型组大鼠脾重量均呈逐渐升高趋势; 与对照组相比, 模型组大鼠脾重量于第 1~ 4 周均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。

**3.3 脾虚模型大鼠不同时间点胸腺指数、脾指数的变化** 结果见图 4 5。从图 4 可以看出, 对照组大鼠胸腺指数从第 1~ 4 周逐渐降低( $P < 0.01$ ), 第 4 周降至最低; 模型组大鼠胸腺指数变化波动不大。与对照组相比, 模型组大鼠胸腺指数第 1~ 3 周均降低, 其中第 1 周降低具有显著性意义( $P < 0.01$ ), 4 周时升至对照组水平。

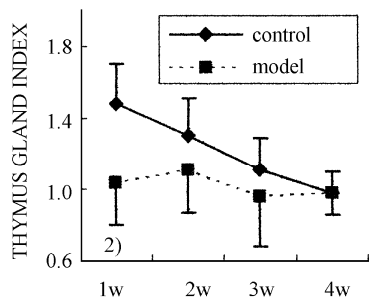


图 4 不同时间点大鼠胸腺指数变化

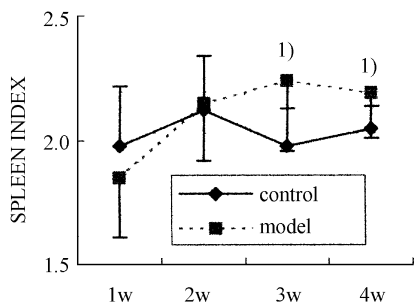


图 5 不同时间点大鼠脾指数变化

从图 5 可以看出, 对照组大鼠脾指数呈波动变化, 但各时间点无明显变化; 模型组自造模 1 周后呈逐渐上升趋势。与对照组相比, 模型组大鼠脾指数于第 3、4 周显著增加( $P < 0.05$ )。

**3.4 脾虚模型大鼠不同时间点血清 IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、TNF- $\alpha$  的变化** 结果见图 6~ 9。从图 6 可以看出, 对照组大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平先升后降, 但 4 周时再次回升, 并与前 3 周相比显著升高( $P < 0.01$ )。与对照组相比, 模型组大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平第 1 周显著升高( $P < 0.05$ ), 4 周时显著降低( $P < 0.01$ )。

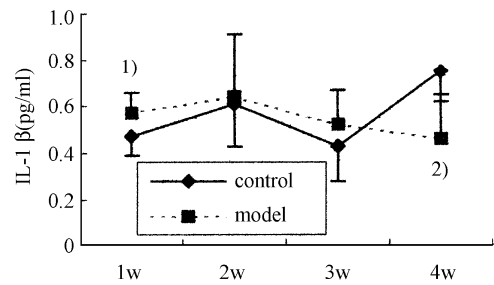


图 6 不同时间点大鼠血清 IL-1 $\beta$  变化

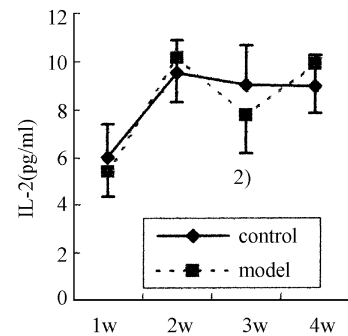


图 7 不同时间点大鼠血清 IL-2 变化

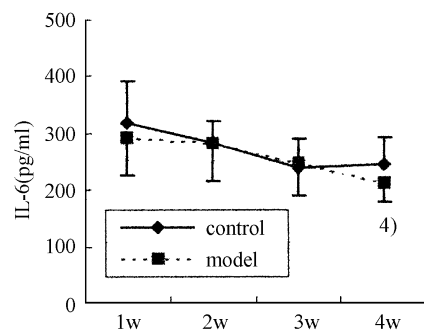


图 8 不同时间点大鼠血清 IL-6 变化

注: 模型组 2、3、4 周与第 1 周比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>5)</sup>  $P < 0.01$  (下同)。

从图 7 可以看出, 对照组大鼠血清 IL-2 水平表现为第 2 周升高和之后缓降的趋势, 第 2~ 4 周均显

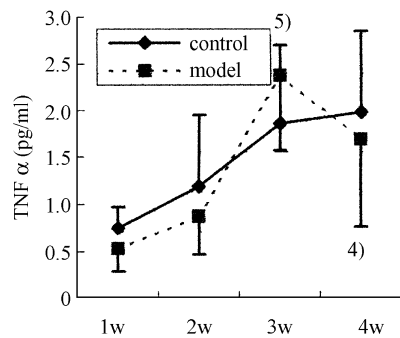


图 9 不同时间点大鼠血清 TNF $\alpha$  变化

著高于第 1 周 ( $P < 0.01$ )；模型组大鼠血清 IL-2 水平表现为第 2 周上升, 3 周时下降, 第 4 周回升的变化。与对照组相比, 模型组大鼠血清 IL-2 水平 3 周时显著降低 ( $P < 0.01$ )。

从图 8 可以看出, 对照组和模型组大鼠血清 IL-6 水平均呈现相近的缓降趋势, 其中对照组各观察点间无显著差异, 模型组第 4 周较第 1 周显著降低 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 模型组大鼠血清 IL-6 水平第 1~4 周均无显著差异。

从图 9 可以看出, 对照组大鼠血清 TNF- $\alpha$  水平第 1~4 周逐渐升高, 其中第 3、4 周较 1 周时显著升高 ( $P < 0.01$ )；模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$  水平第 1~3 周升高, 4 周时降低, 其中第 3 周和第 4 周均较第 1、2 周显著升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 第 4 周较第 3 周显著降低 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 大鼠血清 TNF- $\alpha$  水平第 1~4 周各点均无显著差异。

#### 4 讨论

脾虚证是中医临床常见证型之一。“内伤脾胃, 百病由生”, 可知脾参与体内防御功能, 临床观察到, 脾虚患者常伴有免疫功能的降低<sup>[4]</sup>。本研究采用游泳疲劳加饮食失节法复制脾虚证大鼠模型, 探索不同时间点的大鼠免疫系统的部分变化。

脾、胸腺重量及其指数是观察免疫系统变化的常用指标。实验中对照组大鼠胸腺重量无明显变化, 而脾重量则呈缓慢增长。模型组造模 3 周大鼠胸腺和脾重量均显著降低, 自然恢复 1 周后仍未能恢复正常, 表明模型存在免疫脏器的受损和免疫功能的减退。值得提出的是, 模型组大鼠的胸腺指数前 3 周均显著低于对照组, 但其脾指数除第 1 周较对照组降低外, 其余各点反高于对照组, 这与陈小野等报道的<sup>[5]</sup>采用耗气破气加饥饱失常法造模 26 周复制大鼠脾虚模型的胸腺和脾指数均显著降低的结果不一致。导致脏器重量显著降低但不伴有脏器指

数降低的情况与两组大鼠体重变化的差异有关。当组间体重变幅差异较大时, 胸腺和脾脏重量较其指数更能反映免疫器官的变化。

细胞因子是由免疫细胞分泌的具有调节细胞功能的一类小分子多肽。细胞因子之间可以相互诱导, 如 IL-1 可诱导 IL-2、IL-6, IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  又能促进 IL-2R 的表达<sup>[6]</sup>。本研究观察到, 造模 3 周时模型组大鼠血清 IL-1 $\beta$  和 IL-6 无显著改变, 但 IL-2 显著降低, TNF- $\alpha$  有升高趋势, 此结果与章梅等<sup>[7]</sup>观察的脾虚患者 IL-2、TNF- $\alpha$  水平下降不尽一致; 自然恢复期 IL-1 $\beta$  水平显著降低, IL-6、TNF- $\alpha$  呈降低趋势, IL-2 有回升趋势。4 周时模型大鼠血清 IL-1 $\beta$  显著降低, IL-6、TNF- $\alpha$  降低趋势, 提示脾虚模型自然免疫能力低下。

IL-2 体内非常活跃的免疫促进因子, IL-2 水平的高低是机体细胞免疫的重要标志。大鼠血清 IL-2 在造模 3 周降低, 提示模型组细胞免疫功能降低。自然恢复期 IL-2 明显升高, 与血清 IL-1 $\beta$  显著降低、IL-6、TNF- $\alpha$  水平有降低趋势不一致, 提示模型组细胞免疫功能调节紊乱。T 细胞是体内发挥免疫调节最重要的细胞成分, CD<sup>4+</sup> T 细胞又分为 TH<sub>1</sub>、TH<sub>2</sub> 两个细胞亚群。正常情况下, TH<sub>1</sub>、TH<sub>2</sub> 细胞处于动态平衡状态, 维持机体正常的细胞和体液免疫功能。IL-6 由 TH<sub>2</sub> 分泌, IL-2 由 TH<sub>1</sub> 分泌, 实验结果提示 TH<sub>1</sub> 和 TH<sub>2</sub> 细胞调节功能紊乱, 本模型中二者相互作用机理还需进一步研究。

采用过度疲劳加饮食失节法复制脾虚模型, 连续造模 3 周, 模型大鼠体重及胸腺、脾重量明显降低, 血清 IL-2 明显下降; 停止造模 1 周后大鼠胸腺、脾重量未见明显恢复, 血清 IL-1 $\beta$  显著降低、IL-6、TNF- $\alpha$  有降低趋势, IL-2 水平呈回升趋势。结果提示, 该脾虚模型存在免疫功能的受损及 T 细胞亚群调节功能的紊乱。

#### [参考文献]

- [1] 曲长江, 夏淑杰, 林庶如. 大黄泻下与劳倦过度单复脾虚模型免疫学研究[J]. 辽宁中医杂志, 1999, 26(2): 85-86.
- [2] 曲长江, 刘劲, 夏淑杰, 等. 番泻叶泻下与劳倦过度单、复因素脾虚模型的免疫学研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1999, 7(4): 212-213.
- [3] 黄柄山, 毛翼楷, 范隆昌, 等. 饮食失节所致的脾虚动物模型及中药治疗观察[J]. 中西医结合杂志, 1983, 3(5): 295-296.

- [4] 孙弼纲,田长经,沈鹰. 中医“脾虚”证本质的临床探讨[J]. 安徽中医学院学报, 1983, (3): 3.
- [5] 陈小野,邹世洁,张智,等. 大鼠长期脾虚造模的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1995, 1(1): 37-41.
- [6] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 西安: 世界图书出版公

司, 1998, 97.

- [7] 章梅,夏天,张仲海,等. 四君子汤对脾虚患者血浆细胞因子的影响[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(4): 411-413.