

• 药理 •

四逆汤类方提取物对离体小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响

葛迎春¹, 马天舒¹, 刘平^{1*}, 任慧君¹, 徐亚娟², 赵宏峰², 徐东铭²

(1. 大连市中医研究所, 辽宁 大连 116013; 2. 吉林省中医中药研究院, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 探讨四逆汤类方提取物对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响。方法: 小鼠腹腔巨噬细胞经不同浓度的四逆汤类方提取物作用后, 中性红法检测吞噬能力。以巨噬细胞培养液上清对 L929 细胞和胸腺淋巴细胞增殖的影响为指标, MTT 比色法检测肿瘤坏死因子(TNF)和白细胞介素-1(IL-1)的生成量。结果: 附子、干姜配葱白提取物(EAGO), 附子、干姜配甘草提取物(EAGL), 附子、干姜、葱白配胆汁提取物(EAGB), 附子、干姜、甘草配人参提取物(EAGG)可以提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 但与附子配干姜提取物(EAG)组比较无显著差异。与模型对照组比较, EAGO、EAGL 显著减少 TNF 生成量, EAGL 和 EAGG 可以显著降低 IL-1 生成量。结论: 四逆汤类方均可以提高腹腔巨噬细胞吞噬功能, EAGL 和 EAGO 可以降低 TNF 生成量, EAGL 和 EAGG 可以降低 IL-1 的生成量。对 LPS 诱导炎症反应的实验模型, EAGL 的药理活性较全面。类方之间对腹腔巨噬细胞免疫功能的影响不尽相同。

[关键词] 四逆汤类方; 巨噬细胞; 吞噬功能; 肿瘤坏死因子; 白细胞介素-1

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)02-0028-04

Effect of the Extracts from Sini Tang Serial Decoctions on the Immune Function of Mouse Peritoneal Macrophages *in vitro*

GE Ying-chun¹, MA Tian-shu¹, LIU Ping¹, REN Hui-jun¹,
XU Ya-juan², ZHAO Hong-feng², XU Dong-ming²

(1. Department of Pharmacology, Institute of Traditional Chinese Medicine of Dalian, Dalian 116013, China;

2. Department of Phytochemistry, Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Jilin province, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effect of the extracts from Sini Tang Serial Decoctions(ESTSD) on the immune function of mouse peritoneal macrophages. **Methods:** After the cultured mouse peritoneal macrophages treated with different concentrations(25, 5, 1 μ g/mL) of ESTSD, the phagocytotic activity was determined by neutral red method, the productions of interleukin-1(IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) from the supernatant were determined by MTT colorimetry based on the proliferation of L929 and thymic lymphocyte respectively. **Results:** Compared with the model control group, our results indicated that ESTSD including extracts of Aconite root, Dried ginger and Fistular onion stalk(EAGO) and extracts of Aconite root, Dried ginger and Licorice root(EAGL), extracts of Aconite root, Dried ginger, Fistular onion stalk and pig's bile(EAGB), extracts of Aconite root, Dried ginger, Licorice root and ginseng(EAGG) increased significantly the phagocytotic activity. The supernatant of peritoneal macrophages treated with EAGL and EAGO decreased significantly the

[收稿日期] 2005-03-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 39930210)

[通讯作者] 刘平, Tel: (0411) 82671824; E-mail: ddbc@mail.dlptt.ln.cn

production of TNF compared with model group. The supernatant of peritoneal macrophages treated with EAGL and EAGG decreased significantly the production of IL-1 compared with model group. **Conclusion:** The results suggested that ESTSD stimulated the phagocytotic activity and EAGL, EAGG decreased the production of IL-1 as well as EAGL, EAGO decreased the production of TNF. EAGL had all pharmacologic effect on mouse peritoneal macrophages in this model. Obviously, the effect of ESTSD on these parameters of mouse peritoneal macrophages were different in character.

[**Key words**] Sini Tang Serial Decoctions; macrophage; phagocytosis; tumor necrosis factor; interleukin 1

“四逆汤类方”是以医圣张仲景制定的“四逆汤”为核心,构成的治少阴病、阳气虚阴寒盛、真阴也伤的一类方剂,用于亡阳厥逆之回阳救逆。其组方精良,配伍严谨,蕴涵丰富的配伍规律和以辨证为核心指导遣药组方的配伍原则。包括四逆汤、通脉四逆汤、人参四逆汤、茯苓四逆汤、白通汤等。现代医学有关配伍研究主要集中于“四逆汤”,目前尚未见“四逆汤类方”配伍规律研究的报道。本研究以“四逆汤”为核心,探讨附子、干姜分别与葱白、甘草、胆汁、人参配伍后的提取物对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能影响的共性和个性,分析配伍使用的内在规律。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂 原料药的鉴定及四逆汤类方提取物样品由吉林省中医中药研究院徐东铭研究员完成。附子配干姜(干姜₃、生附子₁₀, EAG),白通汤(生附子₉、干姜₃、葱白₄, EAGO),白通加猪胆汁汤(生附子₉、干姜₃、葱白₄、猪胆汁₃, EAGB),人参四逆汤(生附子₁₀、干姜_{4.5}、甘草₆、人参₃, EAGG),四逆汤(生附子₁₀、干姜₅、甘草₆, EAGL)。以上配方经水煎浓缩至浸膏,经乙醚提取得提取物。得率为 EAG(413g 生药/g) EAGO(7275g 生药/g) EAGB(961g 生药/g) EAGL(337g 生药/g) EAGG(792g 生药/g)。

RPMI 1640 培养基(Gibco, USA);胰蛋白酶(Gibco, USA);96 孔培养板(Costar, USA);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma, USA);大肠杆菌内毒素(LPS, E. Coli O₁₁₁: B₄, Sigma, USA);刀豆蛋白 A(ConA, Sigma, USA);胎牛血清(FCS, 中国医学科学院血液研究所, 批号 200204);其余试剂均为国产 AR。

1.2 动物和细胞 昆明种小鼠,7~8 周龄,体重 20~25g,由大连医科大学实验动物中心提供(动物生产许可证号:SCXK[辽]2002-0002,附动物质量合格证)。L929 细胞购于武汉大学中国典型培养物保存中心。

1.3 仪器 倒置显微镜(OLYMPUS-CK40, Japan);自动酶标光度计(CliniBio 128C, EC);CO₂ 培养箱

(SANYO MCO-175M, Japan)。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠腹腔巨噬细胞的制备^[1] 取数只小鼠,腹腔内注射无血清培养液 1.5mL,10min 后颈椎脱臼处死小鼠,75% 酒精浸泡消毒,无菌收集腹腔液。1000r/min 离心 10min 收集细胞,用含 10% FCS 的培养液调整细胞浓度至 3×10^6 /mL。以每孔 100 μ L 细胞悬液接种于 96 孔培养板,置培养箱中,经 5% CO₂、37℃ 培养 2h。弃上清液,用培养液洗去未贴壁细胞,培养孔内为腹腔巨噬细胞。每孔加培养液 100 μ L,继续培养。

1.4.2 小鼠胸腺淋巴细胞的制备 取数只小鼠,颈椎脱臼处死,75% 酒精浸泡消毒,无菌取材。胸腺组织置培养皿中,加少量 Hank's 液,用无菌注射器芯挤压后,制备成细胞悬液,过 200 目尼龙筛网。悬液经 1000r/min 离心 10min,弃上清。用含 10% FBS 的培养液调整细胞浓度至 3×10^6 /mL,以每孔 100 μ L 的细胞悬液接种于 96 孔培养板,置含 5% CO₂ 的培养箱中 37℃ 孵育。

1.4.3 实验分组 实验分 7 组,对照组加等体积培养液,模型组加入 LPS 10 μ g/mL。依据文献[2],加药组分别加入终浓度为 25.0、5.0、1.0 μ g/mL 的 EAGO、EAGL、EAGB、EAGG 和 EAG,同时加入 LPS 10 μ g/mL,4 个孔为一个平行样本。5% CO₂、37℃ 孵育 24h,取培养液作为备用实验样品上清。依次做以下实验。

1.4.4 巨噬细胞代谢活性的 MTT 测定 分组加药的巨噬细胞经 37℃ 孵育 24h 后,在细胞培养结束前 4h,每孔加入 10 μ L MTT 继续培养。4h 后中止反应,弃培养液,加入 100 μ L 二甲基亚砷。经微量震荡器处理后,用自动酶标光度计测定 570nm 处各孔的 A 值。以 A 值表示腹腔巨噬细胞代谢活性的强弱。

1.4.5 巨噬细胞吞噬中性红试验^[3] 分组加药的巨噬细胞经 37℃ 孵育 24h 后,取培养液上清备用。每孔加入中性红生理盐水液,终浓度为 1g/L,继续培养 20min。细胞经 PBS 洗涤 3 遍,每孔加入细胞溶解

液(乙酸:无水乙醇=50:50)100 μ L,室温放置2h。待细胞溶解后,用自动酶标光度计测各孔吸光度A值,测量波长540nm。以A值表示巨噬细胞吞噬功能的强弱。

1.4.6 巨噬细胞上清液 TNF 检测^[4] 将 L929 细胞悬液调整至 2×10^5 /mL,以 100 μ L/孔接种于 96 孔培养板中,37 $^{\circ}$ C 培养 2h。取备用的各组巨噬细胞培养液上清,以 100 μ L/孔加入 L929 细胞培养板中,4 个孔为一个平行样本。饱和湿度条件下,37 $^{\circ}$ C .5% CO₂ 孵育 48h。在细胞培养结束前 4h,每孔加入 10 μ L MTT 继续培养。终止反应,弃培养液,加入 100 μ L 二甲基亚砷。经微量震荡器混合后,用自动酶标光度计测定 570nm 处各孔的 A 值。

1.4.7 巨噬细胞产生 IL-1 的检测^[4] 取培养的胸腺淋巴细胞,每孔加入终浓度为 2 μ g/mL 的 ConA,对照组不加 ConA。按实验分组分别加入备用巨噬细

胞培养液上清 100 μ L,4 个孔为一个平行样本。饱和湿度,37 $^{\circ}$ C .5% CO₂ 孵育 48h。在细胞培养结束前 4h,每孔加入 10 μ L MTT 继续培养。终止反应,培养板离心后弃培养液,加入 100 μ L 二甲基亚砷。经微量震荡器混合后,用自动酶标光度计测定 570nm 处各孔的 A 值。

1.5 统计分析 采用 SPSSV10.0 统计软件进行“t”显著性检验及方差分析。

2 实验结果

2.1 对腹腔巨噬细胞吞噬中性红的影响 腹腔巨噬细胞在 LPS 作用后,吞噬中性红的功能下降,模型组与对照组比较差异显著。与模型组比较,EAG、EAGO、EAGL、EAGB、EAGG 组对腹腔巨噬细胞的吞噬功能均有显著的促进作用。除 EAGG 低剂量组外,各组与 EAG 组比较均无显著差异(结果见表 1)。

表 1 四逆汤类方提取物组对离体小鼠腹腔巨噬细胞活性、吞噬功能及细胞因子释放的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

分组	剂量 μ g/mL	吞噬中性红(A)	L929 增殖(A)	胸腺细胞增殖(A)	巨噬细胞活性(A)
对照组	—	0.036 \pm 0.006 ¹⁾	0.274 \pm 0.020 ¹⁾	0.169 \pm 0.008 ¹⁾	0.034 \pm 0.004 ¹⁾
模型组	—	0.028 \pm 0.004	0.217 \pm 0.028	0.191 \pm 0.006	0.043 \pm 0.006
EAG	25.0	0.091 \pm 0.021 ²⁾	0.269 \pm 0.026	0.277 \pm 0.021 ³⁾	0.055 \pm 0.002 ¹⁾
	5.0	0.050 \pm 0.019 ¹⁾	0.221 \pm 0.015	0.218 \pm 0.043	0.055 \pm 0.006 ¹⁾
	1.0	0.034 \pm 0.004	0.239 \pm 0.031	0.203 \pm 0.011	0.055 \pm 0.001 ¹⁾
EAGO	25.0	0.056 \pm 0.006 ²⁾	0.311 \pm 0.026 ¹⁾	0.266 \pm 0.024 ²⁾	0.047 \pm 0.008
	5.0	0.039 \pm 0.009 ¹⁾	0.307 \pm 0.017 ^{1,4)}	0.187 \pm 0.049	0.059 \pm 0.005 ¹⁾
	1.0	0.041 \pm 0.012	0.223 \pm 0.015	0.180 \pm 0.054	0.052 \pm 0.009
EAGL	25.0	0.036 \pm 0.002 ¹⁾	0.295 \pm 0.009 ¹⁾	0.217 \pm 0.057	0.048 \pm 0.004
	5.0	0.083 \pm 0.010 ³⁾	0.241 \pm 0.014	0.165 \pm 0.003 ³⁾	0.057 \pm 0.007 ¹⁾
	1.0	0.046 \pm 0.018 ¹⁾	0.230 \pm 0.006	0.137 \pm 0.029 ^{1,4)}	0.046 \pm 0.006
EAGB	25.0	0.093 \pm 0.012 ³⁾	0.229 \pm 0.029	0.292 \pm 0.016 ²⁾	0.063 \pm 0.019
	5.0	0.061 \pm 0.018 ²⁾	0.238 \pm 0.010	0.203 \pm 0.041	0.068 \pm 0.014 ¹⁾
	1.0	0.058 \pm 0.021 ²⁾	0.213 \pm 0.023	0.193 \pm 0.010	0.067 \pm 0.013 ¹⁾
EAGG	25.0	0.050 \pm 0.017 ¹⁾	0.229 \pm 0.014	0.207 \pm 0.020 ⁴⁾	0.066 \pm 0.014 ¹⁾
	5.0	0.059 \pm 0.014 ²⁾	0.221 \pm 0.013	0.158 \pm 0.018 ¹⁾	0.076 \pm 0.008 ^{3,4)}
	1.0	0.050 \pm 0.009 ^{2,4)}	0.223 \pm 0.026	0.157 \pm 0.013 ^{2,4)}	0.074 \pm 0.011 ^{2,4)}

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$;各加药组与 EAG 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 对巨噬细胞分泌 TNF 的影响 在 LPS 作用后,巨噬细胞上清液对 L929 细胞增殖有显著的抑制作用,模型组与对照组比较差异显著。与模型组比较,EAGO、EAGL 组上清液对 L929 细胞的增殖抑制作用显著降低,其他组作用不显著。EAGO 的中剂量组上清液对抑制 L929 细胞增殖的作用显著高于 EAG

组(结果见表 1)。

2.3 对巨噬细胞产生 IL-1 的影响 LPS 作用后,巨噬细胞上清液对小鼠胸腺淋巴细胞增殖有显著刺激作用,模型组与对照组比较差异显著。与模型组比较,EAG、EAGO 及 EAGB 高剂量组刺激胸腺淋巴细胞的增殖。而 EAGL、EAGG 则显著抑制其增殖,且

强于 EAG 组。(结果见表 1)。

2.4 对巨噬细胞代谢活性的影响 LPS 作用后,小鼠腹腔巨噬细胞的代谢活性增强,模型组与对照组比较差异显著。各加药组对腹腔巨噬细胞的代谢活性均有显著的增强作用,其中 EAGG 组的作用显著强于 EAG 组(结果见表 1)。

3 讨论

四逆汤类方均可视为四逆汤之加减方,可用于各种慢性病恶化加重发展到衰竭阶段,亦可用于多种急性病病情发展迅速,正不敌邪的危重状态^[5]。迄今,尚未见四逆汤类方现代医学比较研究的报道。从以往中医临床研究资料来看,类方之间的用药依据病症有所侧重,似乎多用于和心血管系统及免疫系统调节有关的疾病,这些疾病与血管活性物质和细胞因子的调节密切相关。从药理作用的角度分析,类方之间的免疫调节作用显然既有共性也各有特点。

内毒素是先天性免疫最强的刺激剂,参与单核-巨噬细胞的激活、细胞毒作用的发挥及炎性介质的释放。炎性介质的过度释放可能导致广泛的损伤等^[6]。内毒素可刺激巨噬细胞分泌大量 TNF- α ,成为激活细胞因子的主要介质。在本实验中,经内毒素作用后巨噬细胞 TNF 的生成量增加,上清液抑制了 L929 细胞的增殖。与模型组比较,附子、干姜分别与葱白或甘草配伍组的培养液上清对 L929 细胞增殖的抑制作用下降,且附子、干姜配葱白组的作用强于附子配干姜组。实验结果表明,在内毒素作用下,附子、干姜分别与葱白或甘草配伍抑制巨噬细胞分泌炎症介质 TNF 释放的作用较强,而其它配伍则作用不显著,这与整体实验的结果相似^[7]。

巨噬细胞是机体免疫系统具有多种功能的免疫细胞,参与机体非特异性免疫反应,具有很强的吞噬功能。本实验中,加入内毒素后腹腔巨噬细胞吞噬中性红的功能下降。而 MTT 测定的结果则表明,此时细胞内线粒体脱氢酶活性增强,提示细胞的代谢活性增强。与模型组比较,各加药组对腹腔巨噬细胞吞噬功能和代谢活性均有显著的促进作用。而且,附子、干姜与人参配伍其作用强于附子加干姜。IL-1 是由内毒素刺激单核-巨噬细胞产生的体内作用最强的致炎介质之一,可以诱导细胞黏附分子表

达,诱导致炎细胞因子的释放,引起血管扩张等作用^[6]。在本实验中,经内毒素作用后巨噬细胞释放 IL-1 增加,上清液刺激了胸腺淋巴细胞的增殖。与模型组比较,附子、干姜分别与甘草或人参配伍的上清液显著抑制胸腺淋巴细胞的增殖,而其他加药组的高剂量则刺激胸腺淋巴细胞的增殖。实验结果表明,在内毒素作用下,附子、干姜分别与甘草或人参配伍可以抑制巨噬细胞分泌炎症介质 IL-1 的释放量,而与葱白或胆汁配伍则对 IL-1 的释放量没有抑制作用。

本实验结果提示,对于离体条件下内毒素诱导腹腔巨噬细胞免疫反应的实验模型,附子、干姜加甘草(四逆汤)可以提高巨噬细胞的吞噬功能和代谢活性,降低炎症介质 TNF 和 IL-1 的释放。附子、干姜加葱白(白通汤)可以提高巨噬细胞的吞噬功能和代谢活性,降低 TNF 的释放,但却增加了 IL-1 的生成。白通加猪胆汁汤对 TNF 的释放无显著影响,但增加了 IL-1 的生成。人参四逆汤对巨噬细胞的吞噬功能和代谢活性的影响强于其它类方,但对炎症介质释放的抑制作用不如四逆汤。四逆汤类方药理活性差异的研究尚待深入。

[参考文献]

- [1] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1995. 120-130.
- [2] 刘平, 葛迎春, 马天舒, 等. BrdU-ELISA 法测定四逆汤及组方药提取物对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中草药, 2004, 35(1): 54-56.
- [3] 王小京, 丁桂凤, 范少光. 几种阿片肽及 ACTH 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的作用. 中国免疫学杂志[J]. 1987, 3(3): 211-213.
- [4] 孙卫民, 王惠琴. 细胞因子研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 379-603.
- [5] 顾勤, 汪红, 顾武军. 探析《伤寒论》以“四逆”命名的治厥方证治特点及现代药理基础[J]. 中医药学报, 2001, 29(1): 29-32.
- [6] 赵克森, 金丽娟. 休克的细胞和分子基础[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 152-154.
- [7] 葛迎春, 刘平, 马天舒, 等. 四逆汤类方提取物对内毒素血症大鼠血浆中 PGI₂、Ag II、IL-2 和 TNF 含量的影响[J]. 中华现代中西医杂志, 2004, 2(5): 385-387.