

复方内鲁帕尔汤剂免疫抗炎及解热作用的实验研究

孙玉华, 李 涛, 张云珍, 黄 华, 杨丽丽, 顾政一
(新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002)

摘要:目的: 观察复方内鲁帕尔汤剂(CWPN)对免疫功能、发热、炎症的影响。方法: 测定血清溶血素生成, MTT 法测 T、B 淋巴细胞的增殖, $^3\text{H-TdR}$ 法测定小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 用伤寒菌苗造成家兔体温上升研究降温作用, 用小鼠腹腔毛细血管通透性法研究对炎症的影响。结果: CWPN(4.0, 8.0g/kg)能够明显增强小鼠血清溶血素生成($P < 0.05$), CWPN(0.01~10mg/L)能够促进小鼠体外 B 淋巴细胞增殖, 对 T 淋巴细胞无明显影响, 能够增强小鼠腹腔巨噬细胞体外吞噬功能, 能降低伤寒菌苗引起的家兔体温上升, CWPN(4.0, 8.0g/kg)能够抑制小鼠腹腔毛细血管炎性渗出。结论: CWPN 能够增强体液免疫和非特异性免疫功能, 有较好的抗炎、解热功效。

关键词: 复方内鲁帕尔; 血清溶血素; 淋巴细胞; 免疫; 抗炎; 解热

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)05-0042-03

维吾尔医药学是中华医药学的重要组成部分, 积累了许多成功的经验和疗效显著的维吾尔药处方。我们根据古代文献处方和维吾尔医多年临床经验组成了维吾尔医抗病毒处方, 由睡莲花(维吾尔: 内鲁帕尔)、菊苣、欧李、蜀葵花、神香草、一枝蒿、琐琐葡萄组成。我们对它的药理作用进行了研究, 现报道如下。

1 材料

1.1 药品与试剂 CWPN, 棕色液体, 每 mL 相当于 0.28g 生药, 新疆药物研究所研制, 批号: 20030801; 金莲清热颗粒, (94)卫药准字 Z-09 号, 宁夏中药厂生产, 批号 000736; 伤寒菌苗, (96)卫药准字(兰)S-01, 兰州生物制品研究所制; $^3\text{H-TdR}$, 中国原子能科学研究院出品; LPS, Sigma; ConA, 北京医药站进口分装; RPMI-1640, 美国 LIFE TECHNOLOGIES 公司出品; MTT, 德国 MERCK KGaA 公司。

1.2 动物 NIH 小鼠、家兔, 均由新疆医学动物供应中心提供, 合格证号: 新医动字(96)16001 号。

1.3 仪器 222 型紫外分光光度计, 上海第三分析仪器厂制; SW-CT-IF 净化工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; HYS-4 多头细胞收集器, 上海跃进医疗器材厂; 2123TC-CO₂ 培养箱, 美国

SHELDON MANUFACTURING INC; 1217 液闪计数器, 荷兰 LKB 公司; OLYMPUS 生物显微镜, 日本光电工业株式会社出品; 550 型酶标仪, BIORAD 公司。

2 方法与结果

2.1 CWPN 急性毒性试验 CWPN, 每毫升含生药 0.28g, 70℃水浴浓缩成每毫升含生药 2.0g, 用此浓缩液做急性毒性试验, 无法做出 LD₅₀, 只能做最大耐受量试验(MTD), 其 MTD 在 160g 生药/kg 以上。

2.2 CWPN 对小鼠血清溶血素生成的影响^[1] 小鼠 40 只, 依体重、性别随机分为: 生理盐水对照组; 内鲁帕尔小、中、大(2.0g 生药/kg、4.0g 生药/Kg、8.0g 生药/Kg)3 个不同剂量组。ig 给药连续 8d, 第 3d 给药后 2h, 各组均腹腔注射 20% 羊红细胞悬液 0.2mL/只, 免疫后 5d 眼眶取血, 测血清溶血素。各组数据进行 *t* 检验, 结果见表 1。

表 1 CWPN 对血清溶血素的影响($\bar{x} \pm SD, n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	HC ₅₀
生理盐水组	10.0	53.2 ± 20.3
CWPN	2.0	64.8 ± 36.3
	4.0	80.3 ± 35.7 ¹⁾
	8.0	95.5 ± 39.2 ¹⁾

注: 与 NS 组比较¹⁾ $P < 0.05$

表 1 说明 CWPN 中、大剂量能明显增加小鼠血清溶血素的生成, 对体液免疫有增强作用, 随剂量增加作用增强。

2.3 CWPN 对小鼠 T、B 淋巴细胞增殖的影响^[2,3] 取 NIH 小鼠 6 只, 体重 18~22g, 雄性, 摘眼球放血致

收稿日期: 2004-07-19

基金项目: 新疆维吾尔自治区高技术研究与发计划项目(No: 200311123)

通讯作者: 孙玉华, Tel: (0991) 2320296, E-mail: sunyh57818@263.net

死, 0.1% 新洁尔灭消毒, 剖腹取脾脏, 剪碎过 100 目筛, 离心去上清, 加 0.17mol/L NH₄Cl 去红细胞, 用 HBSS 液洗脾细胞 3 次, 加 10% NBS-RPMI-1640 培养液, 调整细胞浓度为 1 × 10⁶ 个/mL。每孔加脾细胞悬液 100μL, 药液 100μL, ConA (5mg/L) 50μL, 或 LPS (10mg/L) 50μL (以上操作均在无菌条件下进行), 37℃ 5% CO₂ 温孵 44h, 加 MTT (1g/L) 50μL, 37℃ 温育 4h, 去上清, 加 DMSO 300μL 摇匀, 酶标仪 570nm 测定。见表 2。

表 2 CWPN 对小鼠 T、B 淋巴细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm SD, n = 3$)

组别	mg/L (生药)	静止期	ConA (5mg/L)	LPS (10mg/L)
对照	0.0	0.45 ± 0.12	0.37 ± 0.14	0.43 ± 0.14
CWPN	0.0001	0.44 ± 0.13	0.36 ± 0.12	0.44 ± 0.13
	0.001	0.46 ± 0.11	0.35 ± 0.12	0.55 ± 0.15
	0.01	0.45 ± 0.12	0.35 ± 0.13	0.58 ± 0.14 ¹⁾
	0.1	0.47 ± 0.11	0.36 ± 0.12	0.58 ± 0.14 ¹⁾
	1.0	0.43 ± 0.12	0.35 ± 0.13	0.67 ± 0.13 ²⁾
	10.0	0.44 ± 0.13	0.34 ± 0.13	0.57 ± 0.14 ¹⁾
	100.0	0.44 ± 0.13	0.35 ± 0.12	0.44 ± 0.14

注: 与对照组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01

实验结果表明, CWPN 浓度在 0.01 mg/L ~ 10 mg/L 对体外 B 淋巴细胞有促增殖作用, 有量效关系, 对 T 淋巴细胞增殖没有影响。

2.4 CWPN 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响⁴⁾

NIH 小鼠 6 只, ip 0.5% 淀粉生理盐水 (煮沸 15min) 0.5mL/只, 3 天后摘眼球放血致死, 腹腔注射 HBSS 2mL, 轻柔腹部, 并于腹部剪一小口, 用滴管吸出腹腔液, 离心 1500r · min⁻¹ 10min, 弃上清液, 加 HBSS 液 5mL, 洗 3 次, 用 15% NBS-1640 营养液 (不含 HEPES) 调整巨噬细胞浓度至 1 × 10⁶ 个/mL, 以上操作均在 0~4℃ 无菌条件下进行。白葡菌液制备: 用无菌生理盐水洗下固体培养基上的白葡菌, 用生理盐水调 A = 0.5 (λ = 620nm) 再用 15% NBS-1640 营养液稀释 32 倍。每孔加 100μL 巨噬细胞悬液, 3 个复孔, 白葡菌液 100μL, CWPN 药液 100μL, 置 37℃ 培养 1h, 再加 10μCi/mL 的 ³H-TdR 12.5μL/孔, 继续培养 1h, 用多头细胞收集器收集细胞于玻璃纤维纸上, 晾干后, 以液闪计数仪测定 cpm 值, 计算吞噬指数 PI = 1 - $\frac{\text{测定}}{\text{空白}} \times 100\%$ 。

CWPN 各剂量组均有增强腹腔巨噬细胞吞噬功能的作用, 10.0、100.0mg/L 剂量组差异有显著性, 作用随剂量增大而增强。

表 3 CWPN 对腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响
($\bar{x} \pm SD, n = 3$)

组别	剂量 mg · L ⁻¹	放射量 min ⁻¹	吞噬指数 (PI) %
NS 组	—	5680.2 ± 1121.0	
NS+ MΦ 组	—	3625.3 ± 1324.0	37.2
CWPN+ MΦ	1.0	2624.0 ± 1031.0	54.3
	10.0	2046.0 ± 894.0 ¹⁾	63.8
	100.0	1623.0 ± 886.0 ²⁾	72.1

注: 与 NS+ MΦ 组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01

2.5 CWPN 对伤寒菌苗致家兔发热的影响¹⁾ 取家兔 40 只, 体重 (2.04 ± 0.14) kg, 雌雄各半, 随机分为 NS 组、金莲清热颗粒组和 CWPN 0.6g/kg、1.2g/kg、2.4g/kg 3 个剂量组, 实验前每兔测 3 次体温, 取其均值作为基础体温。ig 给药, Tid, 连续 3d, 末次给药后立即按每 kg 体重 1.2mL 静脉注射伤寒菌苗, 自进针起每隔 1h 测 1 次体温, 连测 3 次, 记录体温, 并计算其与基础体温差值。各组数据以 t 检验进行统计比较。结果说明, 金莲清热颗粒和 CWPN 3 个剂量均可使致热家兔体温降低。见表 4。

表 4 CWPN 对伤寒菌苗致家兔发热的影响
($\bar{x} \pm SD, n = 8$)

组别	剂量 (g/kg)	致热后体温与基础体温差值		
		1h	2h	3h
发热模型组	2.0mL	1.52 ± 0.43	1.73 ± 0.31	1.67 ± 0.18
金莲清热颗粒组	1.0	0.60 ± 0.28 ²⁾	0.77 ± 0.17 ²⁾	0.37 ± 0.19 ²⁾
CWPN	0.6	1.08 ± 0.32	0.87 ± 0.20 ²⁾	0.77 ± 0.31 ²⁾
	1.2	0.92 ± 0.51	0.73 ± 0.38 ²⁾	0.65 ± 0.36 ²⁾
	2.4	0.60 ± 0.24 ²⁾	0.68 ± 0.21 ²⁾	0.30 ± 0.19 ²⁾

注: 与发热模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01 (下同)

2.6 CWPN 对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响¹⁾ 取昆明种小鼠 40 只, 雌雄兼用, 体重 (19.98 ± 1.39) g, 随机分为 NS 组和 CWPN 2.0g/kg、4.0g/kg、8.0g/kg 3 个剂量的给药组, ig 给药, Tid, 连续 7d, 于末次给药后 1.5h 尾静脉注入 0.5% 的伊文思蓝生理盐水溶液 0.1mL/10g 并立即 ip 0.6% 的乙酸 0.2mL/只, 20min 后处死小鼠, 剪开腹部, 用 6mL NS 分次洗涤腹腔, 吸出冲洗液, 合并后以 NS 稀释至 10mL, 3000r/min 离心 15min, 取上清液于 590nm 处测吸收度值。各组数据以 t 检验进行统计比较。结果说明, 内鲁帕尔 3 个剂量均可降低腹腔毛细血管通透性, 即抑制小鼠腹腔炎性渗出。见表 5。

3 讨论

CWPN 由蜀葵花、菊苣、一枝蒿等中药提取精制

表 5 CWPN 对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响
($\bar{x} \pm SD, n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	吸收值(A)	抑制率(%)
生理盐水组(NS)	20mL	0.364 ± 0.08	
金莲清热颗粒组	4.0	0.27 ± 0.06 ²⁾	25.0
CWPN	2.0	0.30 ± 0.05 ¹⁾	16.8
	4.0	0.27 ± 0.06 ²⁾	25.4
	8.0	0.22 ± 0.05 ²⁾	38.1

而成,MTD 在 160g 生药/kg 以上,口服安全无毒性。药效试验表明,4.0g/kg、8.0g/kg 剂量能明显增加小鼠血清溶血素的生成,在 0.01~10.0mg/L 之间对体外培养 B 淋巴细胞有明显的促进增殖作用,对 T 淋巴细胞无明显影响。体外 10~100mg/L 能明显增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能。说明本制剂能够增强体液免疫和非特异性免疫功能,有助于抗体生成,

增强抵抗力,抑制和杀灭病毒。此外,可明显降低伤寒菌苗致热家兔的体温,降低小鼠腹腔毛细血管的通透性,抑制炎性渗出,有较好的解热及抗炎功效。

参考文献:

- [1] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 750.
- [2] 戴敏, 魏伟, 汪倪萍, 等. 木瓜苷对大鼠佐剂关节炎的治疗作用[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(3): 304-306.
- [3] 钱艳, 关永源, 王冠蕾, 等. 刀豆蛋白 A 促进 T 淋巴细胞增殖与 CIC-3 蛋白的关系[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(10): 1132-1136.
- [4] 王燕平, 李晓玉, 宋纯青, 等. 黄芪皂苷 IV 对小鼠 T、B 淋巴细胞增殖和腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 中国药理学报, 2002, 23(3) 263-266.