

知柏地黄丸对肾上腺皮质激素致肾阴虚幼龄大鼠免疫功能的影响

史正刚*, 于霞, 张士卿
(甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的: 探讨知柏地黄丸对肾阴虚幼龄大鼠免疫功能的影响。方法: 采用氢化可的松每日腹腔注射法造成幼龄大鼠肾阴虚模型, 以幼龄大鼠血清白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)、免疫球蛋白 G(IgG) 含量、脾指数及脾组织学检查为指标进行测定分析。结果: 显示模型组 cAMP 含量无变化($P > 0.05$), (cGMP) 含量明显降低($P < 0.05$), cAMP/cGMP 含量明显升高($P < 0.05$), 说明造模成功。知柏地黄丸可明显提高血清 IL-2、IL-6、IgG 及脾指数水平, 与模型组相比差异显著($P < 0.01$); 增加脾脏淋巴小结、淋巴细胞和巨噬细胞的数量。且其高剂量组效果优于六味地黄丸。结论: 知柏地黄丸能增强肾上腺皮质激素所致肾阴虚幼龄大鼠的免疫功能。

[关键词] 知柏地黄丸; IL-2; IL-6; IgG; 脾指数; 组织学结构; 免疫功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)01-0064-03

1 实验材料

1.1 实验动物 选用断乳后 2 周的 Wistar 幼龄大鼠 75 只(甘肃省医科院动物中心提供), 体重(70 ± 10)g, 雌雄各半。合格证书: 医动字第 14-008 号。

1.2 实验药品及试剂 氢化可的松: 江苏泗阳制药厂, 批号 981013; 知柏地黄丸(浓缩丸), 兰州佛慈制药股份有限公司, 批号 020716; 六味地黄丸(浓缩丸), 兰州佛慈制药股份有限公司, 批号 020813 EDTA 抗凝剂; 醋酸缓冲液; 生理盐水; 蒸馏水; 4% 甲醛。试剂盒: IL-2 放免试剂盒, 批号: 0309; IL-6 放免试剂盒, 批号: 0310; IgG 放免试剂盒, 批号: 2003-10(均由北京北方生物研究所提供)。cAMP 试剂盒、cGMP 试剂盒(由上海中医药大学同位素室提供)。

1.3 实验仪器 实验仪器: 可控低温水箱、AO 病理切片仪、可控水浴箱、高速离心机(3000rpm)、OLYMPUS JAPAN 820 显微照相系统、全自动 γ-免疫计数仪。

2 实验方法

2.1 分组与造模 将 75 只幼龄大鼠依体重顺序查随机数字表分为空白对照组 22 只、空白模型组 13 只、知柏地黄丸高剂量组(高剂量组) 13 只、知柏地黄丸低剂量组(低剂量组) 13 只、六味地黄丸组(对

照组) 14 只。除正常对照组每日腹腔注射相同量的生理盐水外, 其余各组分别每日腹腔注射氢化可的松 50mg/kg, 连续注射 7d 后^[1], 依体重顺序查随机数字表随机抓取正常对照组大鼠 12 只作为正常对照组, 抓取模型组 3 只、高剂量组 3 只、低剂量组 3 只、对照组 4 只作为模型组。将该两组大鼠摘眼球取血。加入 EDTA 抗凝剂制成血浆。取 0.1mL 血浆加入 2.00mL 无水酒精振摇 1min, 静置 5min, 3000r/min 离心 10min。将上清液倒入指形管, 残渣再加入 75% 酒精 1mL 摇匀, 离心 3000r/min 10min。合并上清液, 于 60℃ 烘箱中吹干, 待残渣干后放入 4℃ 保存。测量时用 1.0mL 醋酸缓冲液将残渣溶解, 取 0.1mL 用放免法测其 cAMP、cGMP 含量。若模型组 cGMP 含量降低和/或 cAMP/cGMP 比值升高, 则提示肾上腺皮质激素致肾阴虚大鼠造模成功。

2.2 给药与饲养 所有动物在同一条件下(室温 20 ~ 24℃, 相对湿度 40%), 用普通饲料喂养, 自由饮水。将知柏地黄丸、六味地黄丸分别用蒸馏水制成水溶剂(含 1g 生药/mL)。造模成功 1d 后, 除正常对照组和模型对照组每日灌服等量的生理盐水外, 其余各组开始灌胃给药, 剂量按人与大鼠体表面积比, 折算成大鼠等效剂量(知柏地黄丸、六味地黄丸成人量: 9g/日; 算得大鼠所需剂量为: $9 \times 0.018 \times 5 = 0.81\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 即高剂量组(知柏地黄丸水溶剂 $3.24\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、低剂量组(知柏地黄丸水溶剂

[收稿日期] 2004-11-05

[通讯作者] 史正刚, Tel: (0931) 8765555

0.81g·kg⁻¹·d⁻¹)、对照组(六味地黄丸水溶剂 0.81g·kg⁻¹·d⁻¹)。各组大鼠均每日灌胃 1 次,连续灌胃 20d。

2.3 标本采集与处理 将各组动物在给药结束后摘眼球处死,并收集全血 1mL,3000r/min 离心 20min,取其血清置-2℃低温冰箱保存待测。处死大鼠后立即取出脾脏,剔除周围结缔组织及脂肪,用滤纸吸干其表面的血液及体液后待测。

2.4 检测指标和方法

2.4.1 IL-2、IL-6 及 IgG 的测定 将血清标本送由兰大一院核医学科,采用放免法进行检测(具体方法按试剂盒说明书操作)。

2.4.2 脾指数及其组织结构的观察 脾脏用滤纸吸干后称其湿重,除以其相应体重即得脾指数(g/100g)。脾称重后迅速用 4% 甲醛固定,常规脱水、透明、包埋,石蜡切片,HE 染色,光学显微镜下观察。

2.5 统计学处理 所有数据均输入计算机,采用 SPSS 11.0 统计软件处理,所有数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,cGMP、cAMP 和 cAMP/cGMP 根据方差齐性采用两组间独立样本 *t* 检验(Independent Samples Test)。其余各指标组间根据方差齐性采用单因素方差分析(One-Way-ANOVA)。

3 实验结果

3.1 两组大鼠血浆总 cAMP、cGMP、cAMP/cGMP 含量的结果比较见表 1。由表 1 中可以看出,模型组与空白组比较,cAMP 含量无明显变化($P > 0.05$),而 cGMP 含量明显降低($P < 0.05$),cAMP/cGMP 明显升高($P < 0.05$),有显著性差异,说明造模成功^[1]。

表 1 两组大鼠血浆总 cAMP、cGMP、cAMP/cGMP 含量的结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cAMP (PM/mL)	cGMP (PM/mL)	cAMP/cGMP
正常组	12	79.74 ± 14.05	104.75 ± 5.19	0.53 ± 0.07
模型组	13	60.71 ± 4.75	35.87 ± 1.08 ¹⁾	2.04 ± 0.26 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 各组大鼠血清总 IL-2、IL-6 含量结果的比较见表 2。从表 2 中可以看出,模型组 IL-2 和 IL-6 水平较空白对照组显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白模型组比较,高、低剂量组及对照组均可提高 IL-2、IL-6 的水平,高剂量组和对照组可提高 IL-2 水平,但高剂量组的疗效明显优于低剂量组及对照组,有非常显著性差异($P < 0.01$)。表明知柏地黄丸尤其是高剂量有使幼龄大鼠 IL-2、IL-6 恢复正常的作

且高剂量效果优于六味地黄丸。

3.3 各组大鼠血清总 IgG 含量、脾指数结果的比较见表 3。由表 3 看出,对于 IgG 水平,模型组较空白对照组显著下降($P < 0.01$),高、低剂量组及对照组均可提高 IgG 的水平,且高剂量组明显优于对照组($P < 0.01$)。高、低剂量组均可提高幼龄大鼠的脾指数,高剂量组疗效亦优于对照组($P < 0.05$)。结果表明,知柏地黄丸可提高血清 IgG 和脾脏指数,且高剂量疗效优于六味地黄丸。

表 2 各组大鼠血清总 IL-2、IL-6 含量的结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-2 (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)
正常对照组	8	12.72 ± 0.14	99.28 ± 0.89
模型组	10	6.64 ± 0.92 ¹⁾	57.31 ± 3.45 ²⁾
知柏高剂量组	10	13.32 ± 0.91 ^{4,5)}	122.24 ± 1.96 ^{4,6)}
知柏低剂量组	9	6.58 ± 0.79 ¹⁾	83.36 ± 5.96 ^{1,4)}
六味组	10	11.69 ± 0.31 ³⁾	75.20 ± 4.76 ^{1,3)}

注:1. 实验过程中因灌胃刺穿食道大鼠死亡 3n,故各组间例数不等。2. 与空白对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与空白模型组比较,³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与对照组比较,⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 各组大鼠血清总 IgG、脾指数含量的结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IgG (μg/mL)	脾指数 (g/100g)
正常对照组	8	21.02 ± 1.98 ⁴⁾	2.58 ± 0.78
模型组	10	1.74 ± 0.23 ¹⁾	1.30 ± 0.26 ¹⁾
知柏高剂量组	10	21.95 ± 0.36 ^{4,5)}	4.42 ± 0.38 ^{1,4,5)}
知柏低剂量组	9	10.80 ± 0.23 ⁴⁾	2.79 ± 0.89 ³⁾
六味组	10	11.87 ± 0.24 ⁴⁾	2.09 ± 0.67

3.4 光镜下各组大鼠脾组织结构的变化

1) 正常对照组 光镜下可见红髓、白髓中淋巴细胞排列整齐,形状、大小正常,淋巴小结可见。巨噬细胞数量较少。

2) 模型组 光镜下可见红髓染色较浅,白髓、红髓中淋巴小结、淋巴细胞数量明显减少,细胞排列紊乱。巨噬细胞数量减少,出现较多的吞噬颗粒。动脉周围淋巴鞘变薄。

3) 知柏地黄丸高剂量组 光镜下观察到白髓、红髓中淋巴细胞、淋巴小结数量较空白模型组明显增多,排列整齐。吞噬细胞数量明显增多,内有大量的吞噬颗粒,动脉周围淋巴鞘明显增厚。

4) 知柏地黄丸低剂量组 光镜下见到白髓、红髓中淋巴细胞数量较多,淋巴小结偶见。吞噬细胞较多,内有大量吞噬颗粒。动脉周围淋巴鞘变化不明显。

5) 六味地黄丸组 光镜下见到白髓、红髓中淋巴小结数量增多, 淋巴细胞排列整齐。吞噬细胞增多, 有大量的吞噬颗粒。动脉周围淋巴鞘明显增厚。

4 讨论

六味地黄丸中熟地黄、山萸肉、山药相配, 滋养肝脾肾, 称为“三补”。但熟地的量是山萸肉与山药两味之和, 故以补肾阴为主。泽泻、牡丹皮、茯苓, 淡渗脾湿, 清泄相火, 称为“三泻”。再加上知母清热泻火, 滋阴润燥; 黄柏清相火, 退虚热。八味药合用, 共奏滋阴降火之功, 为治疗阴虚火旺证的代表方。

现代药理学研究表明熟地、山萸肉、山药、茯苓、牡丹皮对机体的细胞免疫与体液免疫都有促进作用^[2]。知母可显著地提高氢化可的松致阴虚状态下小鼠的体重, 并能使受地塞米松抑制的血浆皮质醇浓度升高, 并有防止肾上腺萎缩的作用^[3]。

本研究结果表明, 氢化可的松可降低幼龄大鼠血清 IL-2、IL-6、JgG 的水平, 并降低其脾指数, 还可引起脾脏组织结构的改变, 光镜下可见红髓染色较浅, 白髓、红髓中淋巴小结、淋巴细胞数量明显减少, 细胞排列紊乱。巨噬细胞数量减少, 出现较多的吞噬

颗粒。动脉周围淋巴鞘变薄。知柏地黄丸可不同程度地提高其体内的 IL-2、IL-6、JgG 水平和脾指数; 减轻氢化可的松引起的脾脏组织结构的改变。结果提示, 知柏地黄丸可从多个环节拮抗氢化可的松的免疫抑制作用, 可以作为临床上使用糖皮质激素患者的辅助用药, 以降低糖皮质激素的副作用。

本实验对知柏地黄丸的免疫调节作用做了初步研究, 今后还有待于从免疫细胞、基因水平及其发挥免疫调节作用的物质基础做进一步的探讨; 神经内分泌系统对机体的免疫功能也有重要的调节作用, 知柏地黄丸对该系统的影响有待做进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 刘旭光, 宋开源, 余曙光, 等. 阴虚阳虚大鼠促肾上腺皮质激素及皮质酮昼夜节律的差异研究[J]. 四川中医, 2002, 20(1): 68.
- [2] 杨胜, 张永祥, 吕晓东, 等. 六味地黄汤活性部位 3A 免疫调节作用机理研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(2): 119-122.
- [3] 王君, 仝小林, 王道坤. 中药防治肾上腺皮质激素副作用的实验概况[J]. 甘肃中医学院学报, 1999, 16(3): 36-39.