

消风散颗粒免疫调节作用机理研究

李国忠¹, 郑咏秋²

(1 安徽省铜陵市人民医院, 安徽 铜陵 244000; 2 安徽中医学院, 安徽 合肥 230032)

摘要:目的: 研究消风散颗粒免疫调节作用和机制。方法: 分别观察了消风散颗粒对小鼠迟发型变态反应(DTH)耳肿胀度、胸腺指数、脾指数; 丝裂原诱导的脾 T、B 淋巴细胞增殖和炎症组织细胞因子的影响。结果: 消风散颗粒可降低 DTH 小鼠异常增高的耳肿胀度、脾指数和胸腺指数; 抑制丝裂原诱导的脾 T、B 淋巴细胞增殖; 抑制炎症组织细胞因子白介素 1(IL-1)、白介素 2(IL-2) 和白介素 4(IL-4) 的活性。结论: 消风散颗粒的免疫抑制作用与其调节 T、B 淋巴细胞功能和抑制炎症细胞因子的活性有关。

关键词: 消风散颗粒; 脾淋巴细胞增殖; 白细胞介素 1; 白细胞介素 2; 白细胞介素 4

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)03-0039-04

The Immunoregulatory Effects and Mechanism of Xiao Fengsan Granules

LI Guo-zhong¹, ZHENG Yong-qiu²

(1 Tongling People's Hospital, Tongling, Anhui Province, 244000;

2 Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui Province, 230032)

Abstract: Objective: To investigate the effects and mechanism of Xiao Fengsan Granules (XFG) on delayed type hypersensitivity(DTH). Methods: In mice DTH induced by 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB), the effects of XFG on ear swelling, spleen index and thymus index were observed, and the splenocytes proliferation induced by Concanavalin A (Con A) or lipopolysaccharide(LPS) were determined; Meanwhile, the cytokines including interleukin 1(IL-1), interleukin 2(IL-2) and interleukin 4(IL-4) production by tissue of dermatitis were measured. Results: XFG could inhibit the ear swelling, thymus index, spleen index and the enhanced splenocytes proliferation in DTH mice. XFG could also inhibit the activity of IL-1, IL-2 and IL-4 in tissue of dermatitis. Conclusions: The mechanism by which XFG regulated the immune function might via its regulatory effects on T, B lymphocytes and its inhibitory effects on cytokines production.

Key words: Xiao Fengsan Granules; splenocytes proliferation; interleukin 1; interleukin 2; interleukin 4;

消风散颗粒源于《外科正宗》所载经方消风散, 由当归、防风、苍术等多味中药组成, 具有疏风养血、清热除湿的功效, 临床主治风疹、湿疹。近年研究显示, 消风散颗粒具有抗炎、抗过敏和抑制药物所致全身性瘙痒的药理作用^[1-2], 本文在已有工作基础上, 进一步分析了消风散颗粒对 2, 4-二硝基氟苯(DNFB)诱导的小鼠皮肤迟发型变态反应(DTH)的作用机制。

1 材料

1.1 药物 消风散原处方为每剂当归、生地、防风、蝉蜕、知母、苦参、荆芥、苍术、牛蒡子、胡麻、石膏各一钱(3 克), 甘草、木通各五分(1.5 克)。取以上各味药材按原方配比粉碎成 40 目粉, 以正交设计法确

定其最佳提取工艺^[2]。产物为棕色颗粒状, 气香, 味稍苦, 每克相当于生药 2.625g。临床日服生药量 31.5g, 即颗粒量 12g。实验前, 颗粒以含 0.5% 羧甲基纤维素钠的双蒸水配成所需浓度, 剂量以颗粒量计算。

湿毒清胶囊, 广西云林制药厂出品, 批号 000107, 每粒胶囊含药粉 0.5g, 具有养血润燥、化湿解毒、祛风止痒功能, 用于皮肤瘙痒症属湿蕴皮肤证者。临床服用, 每日 3 次, 每次 1.5~2g。试验剂量以胶囊内含药粉剂量计算。

1.2 试剂 小鼠用白细胞介素-4(IL-4) ELISA 测定试剂盒购自晶美生物技术公司; 二甲亚砜, 上海硫酸厂产品; 2, 4-二硝基氟苯(DNFB), 上海金山县兴塔化工厂产品。RPMI 1640 培养粉, Hepes, MTT, 刀豆蛋白 A(Con A) 和脂多糖(LPs) 均购自 sigma 公司。胎

牛血清, 购自北京邦定生物医学公司, 临用前热灭活。

1.3 动物 ICR 小鼠, 雄性, 体重 24.15 ± 2.25 克, 用于制备 DTH 模型。C57BL/6J 小鼠, 雄性, 体重 18 ± 2 克, 用于 IL-1 和 IL-2 活性测定。以上动物均购自上海西普尔一必凯实验动物有限公司。合格证号: 沪动合证 152 号, 许可证号: 2002-0006。

1.4 仪器 Napco 6100 CO₂ 培养箱, 美国杜邦公司产品; XSZ 倒置显微镜: 重庆光学仪器厂产品。YJ-1450 型医学净化工作台, 苏州净化设备公司产品。EL301 型酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司产品。

2 方法

2.1 剂量设置 给药方法及实验对照 ICR 小鼠 60 只, 随机分为 6 组: 消风散颗粒高剂量组 (4.8g · Kg⁻¹)、中剂量组 (2.4g · Kg⁻¹)、低剂量组 (1.2g · Kg⁻¹)、湿毒清组 (1g · Kg⁻¹)、正常组和 DTH 模型组, 每组 10 只。每日灌胃一次, 模型组和正常组给予等量溶媒。

2.2 小鼠迟发型变态反应模型的制备及评价 灌胃第 5 天, DNFB 以丙酮和中性麻油 (1: 1) 调配成相应浓度溶液备用, 将每鼠 (除正常组外) 腹部去毛, 去毛范围约为 3 × 3cm² 大小, 将 1% DNFB 25μl 均匀涂于去毛部位致敏, 次日同法强化一次。继续给药 4 天后, 再以 0.2% DNFB 溶液 10μl 均匀涂于右耳, 涂耳后 12h 给药一次。DNFB 涂耳 24h 后全部小鼠脱颈椎处死, 以直径 8mm 打孔器摘取左右耳片称重, 以左右耳片重量之差表示 DTH 反应强度, 同时取脾脏及胸腺称重, 以每 10g 体重之脾重和胸腺重表示

脾指数和胸腺指数。

2.3 ConA 和 LPS 分别诱导的脾淋巴细胞增殖反应

常规制备脾脏淋巴细胞悬液 1 × 10⁷ 个细胞/ml, 于 96 孔无菌细胞培养板中每孔加入细胞悬液 100μl, 100μl ConA (终浓度 5 mg · L⁻¹) 或 LPS (终浓度 5mg · L⁻¹), 设 3 个复孔。置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱内培养 72h 后, 每孔加入 5g · L⁻¹ 的 MTT 液 10μl, 于振荡器上振荡 1min, 再放入 37 °C, 5% CO₂ 培养箱继续培养 2h。结束培养后 760G 离心 10min, 吸弃上清后每孔加入二甲亚砜 200μl, 在酶标仪上于 490nm 波长处读每孔吸光度, 结果以 A 值表示。

2.4 炎症组织细胞因子活性检测

2.4.1 标本采集 右耳片称重后, 剪碎放入离心管, 每管加入含 0.1% Tween-20 的 PBS 液 3ml 制备匀浆, 并超声 10S, 760G 离心 10min, 取上清 (每标本 100μl) 用作细胞因子活性测定。

2.4.2 IL-1 活性检测 采用活化的小鼠胸腺细胞 MTT 比色法^[3]。

2.4.3 IL-2 活性检测 采用活化的小鼠脾细胞 MTT 比色法^[4]。

2.4.4 IL-4 活性检测 采用 ELISA 法, 详细操作参照说明书。

3 结果

3.1 消风散颗粒对 DNPB 诱导 DTH 小鼠免疫功能的影响 见表 1。结果表明消风散颗粒三个剂量组均可显著抑制 DTH 小鼠耳肿胀, 同时消风散颗粒高、中剂量组可有效抑制 DTH 小鼠脾指数, 消风散颗粒高剂量组还可有效抑制 DTH 小鼠胸腺指数。

表 1 消风散颗粒对 DNFB 诱导 DTH 小鼠免疫功能的影响 ($\bar{x} \pm s; n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	耳肿胀度 (mg)	脾指数 (0.1mg/g bw)	胸腺指数 (0.1 mg/g bw)
正常组	—	0.90 ± 1.97	39.72 ± 6.11	19.65 ± 4.72
DTH 模型组	—	16.30 ± 2.41 [#]	57.92 ± 10.15 [#]	29.81 ± 6.16 [#]
消风散颗粒	4.8	11.70 ± 2.63 ^{**}	45.20 ± 5.12 ^{**}	23.39 ± 4.56 [*]
消风散颗粒	2.4	11.60 ± 2.88 ^{**}	46.22 ± 3.05 ^{**}	26.29 ± 3.33
消风散颗粒	1.2	13.30 ± 3.65 [*]	51.07 ± 6.96	28.14 ± 5.45
湿毒清	1.0	11.70 ± 2.36 ^{**}	48.00 ± 7.37 ^{**}	26.64 ± 6.07

注: 与正常组比较[#] P < 0.01; 与模型组比较^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01 (下同)。

3.2 消风散颗粒对 ConA 和 LPS 分别诱导的脾淋巴细胞增殖反应的影响 见表 2。结果表明较之正常组, ConA 诱导的 DTH 小鼠脾 T 淋巴细胞增殖反应和

LPS 诱导的 DTH 小鼠脾 B 淋巴细胞增殖反应均显著增加, 消风散颗粒三个剂量均可抑制脾淋巴细胞的过度增殖反应。

表 2 消风散颗粒对 ConA 和 LPS 分别诱导的脾淋巴
细胞增殖反应的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 4$)

组别	剂量(g/kg)	T 细胞增殖反应(A)	B 细胞增殖反应(A)
正常组	—	0.390 ± 0.090	0.205 ± 0.097
DTH 模型组	—	0.524 ± 0.160 [#]	0.419 ± 0.099 [#]
消风散颗粒	4.8	0.382 ± 0.137 [*]	0.312 ± 0.107 [*]
消风散颗粒	2.4	0.412 ± 0.123 [*]	0.261 ± 0.110 [*]
消风散颗粒	1.2	0.408 ± 0.128 [*]	0.294 ± 0.157 [*]
湿毒清	1.0	0.381 ± 0.077 ^{**}	0.256 ± 0.106 ^{**}

3.3 消风散颗粒对炎症组织细胞因子活性的影响
见表 3。结果表明 DTH 小鼠右耳炎症部位 IL-1 和 IL-

表 3 消风散颗粒对炎症组织细胞因子活性的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 4$)

组别	剂量(g/kg)	IL-1 活性(A)	IL-2 活性(A)	IL-4 活性(pg/ml)
正常组	—	0.345 ± 0.071	0.247 ± 0.623	29.75 ± 3.31
DTH 模型组	—	0.553 ± 0.171 [#]	0.283 ± 0.076	42.21 ± 4.98 [#]
消风散颗粒	4.8	0.406 ± 0.131 [*]	0.220 ± 0.027 [*]	31.58 ± 4.01 ^{**}
消风散颗粒	2.4	0.440 ± 0.152	0.217 ± 0.062 [*]	33.81 ± 2.96 ^{**}
消风散颗粒	1.2	0.386 ± 0.112	0.255 ± 0.100	33.55 ± 3.32 ^{**}
湿毒清	1.0	0.369 ± 0.135 ^{**}	0.217 ± 0.053 [*]	31.95 ± 3.12 ^{**}

应均显著增强 ($P < 0.01$), 说明 T、B 淋巴细胞均参
予了 DTH 的病理过程。消风散颗粒对两种脾淋巴
细胞的增殖反应均有显著抑制作用, 显示其可能通
过影响 T、B 淋巴细胞的功能发挥免疫抑制作用。

T 细胞可因分泌不同细胞因子而被分为 Th1
(IFN- γ IL-2) Th2(IL-4 IL-5 IL-6 IL-10) 和 Th3(TGF- β)^[6-7]。以化学致敏原接触皮肤表面引起的 DTH 又
被称为接触超敏反应(Contact Hypersensitivity, CHS),
该反应被认为与 Th1 细胞的渗透作用有关^[8-9]。但
有研究认为, 重复接触致敏原可引起细胞因子释放
失衡并使 CHS 转变为 Th2 反应^[10-11]。IL-4 可由包括
Th2 细胞, NK 细胞在内的多种细胞产生^[12], 近来, B
细胞也通过分泌不同的细胞因子而被划分为 Be1 和
Be2 细胞, 其划分类似于 Th1 和 Th2。研究表明 Be1
也可大量产生 IL-4^[13]。IL-2 由 Th1 细胞产生, 为 Ts
和 Tc(杀伤) 细胞分化增殖所必需的调控因子, 并对
Tc 细胞杀伤效应有增加作用。IL-1 可诱导 T 细胞分
泌 IL-2, 促进 B 细胞增殖以及增强机体的免疫应答
等^[14]。

本实验表明, DNFB 诱导的 DTH 小鼠炎部位 IL-
1 IL-4 活性均显著增高 ($P < 0.01$), 而 IL-2 活性没有
明显改变。消风散颗粒不仅能有效抑制异常增高的
IL-1 IL-4 活性, 还可有效抑制 IL-2 活性。综合以上
结果, 消风散颗粒的免疫抑制作用与其调节 T、B 淋
巴细胞功能和抑制炎症细胞因子的活性有关, 粒治

4 活性显著增加, 而 IL-2 活性则无明显变化, 消风散
颗粒不仅可有效抑制模型组小鼠异常增高的 IL-1 IL-
4 活性, 而且对 IL-2 活性也有明显下调作用。

4 讨论

DTH 在致敏机体接触致敏原后约 24h 以上才出
现病变, 其组织损伤机制是迟发型超敏反应 T 细胞与
抗原结合而活化, 释放出多种淋巴因子, 导致反应局
部组织发生以单核细胞浸润为主的炎症反应^[5]。本
实验结果表明, 在 DNFB 诱导的小鼠 DTH 模型中, 脾
脏 B 淋巴细胞与 T 淋巴细胞对丝裂原敏感的增殖反

应均以 IV 型变态反应为主的湿疹等皮肤疾病的主要机
制之一。

参考文献:

- [1] 郑咏秋, 陈光亮, 戴敏, 等. 消风散颗粒抗炎作用的
实验研究[J]. 基层中药杂志, 2002, 16(5): 6-8.
- [2] 郑咏秋, 戴敏, 陈光亮, 等. 消风散颗粒抗过敏作用
及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(6):
26-28.
- [3] 梁君山, 魏伟, 周爱武, 等. 白细胞介素-1 的检测及
白芍总甙对其的影响[J]. 中国药理学通报, 1989, 5
(6): 354-9.
- [4] 丁桂凤, 席宏丽, 邓玉兰, 等. 用活化小鼠脾细胞测定
IL-2[J]. 上海免疫学杂志, 1988, 8(1): 64-70.
- [5] 沈玉先, 魏伟, 张安平, 等. 富硒酵母对不同状态下
的 DTH 的影响[J]. 微量元素与健康研究, 1998, 15
(4): 7-8.
- [6] Scott P, Kaufmann SHE. The role of T-Cell subsetS and
cytokines in the regulation of infection[J]. Immunol Today,
1991, 12: 346.
- [7] Weiner HL. Oral tolerance; immune mechanisms and
treatment of autoimmune diseases [J]. Immunol Today,
1997, 18: 335-43.
- [8] Grewe M, Walther S, Gyufko K, et al. Analysis of the
cytokine Pattern expressed in situ in inhalant allergen patch
test reactions of atopic dermatitis patients [J]. Invest
Dermatol, 1995, 105: 407-10.

- [9] Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY. Differential in Situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis[J] . J Clin Invest, 1994, 94: 870-6.
- [10] Kitagaki H, Fujisawa S, Watanabe K, et al. T. Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice[J] . Invest Dermatol, 1995, 105: 749-55.
- [11] Kitagaki H, Ono N, Hayakawa K, et al. Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a type 2 Profile [J] . Immunol, 1997, 159: 2484-91.
- [12] Seder RA, Paul WE, Berr-Sasson S Z, et al. Production of interleukin 4 and other cytokines following stimulation of mast cell lines and in vivo mast cells basophils[J] . Int Arch Allergy Appl Immunol, 1991, 94: 137-40.
- [13] Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells[J] . Nat Immunol, 2001, 1: 475-82.
- [14] 尚红生, 邓玉兰, 林志彬, 等 . 小鼠 IL-1 测定方法的探讨及中药香菇菌多糖对 IL-1 产生的作用[J] . 中国免疫学杂志, 1986, 2(2) : 70.