

六味地黄汤对大鼠烫伤后免疫功能的影响

徐 瑶, 卞国武, 吴敏毓, 杨解人 (皖南医学院, 芜湖 241001)

摘要: 利用烫伤大鼠实验模型, 采用 MTT 比色法等技术, 分别测定了烫伤大鼠及烫伤大鼠六味地黄汤治疗后免疫功能指标。结果显示: 六味地黄汤能拮抗烫伤抑制大鼠腹腔 $M\phi$ 吞噬活性, 脾脏淋巴细胞转化增殖、IL-2 分泌、NK 细胞活性、RBC-C_{3b}R 花环率、RBC-IC 花环率作用并且拮抗烫伤引起的促进腹腔 $M\phi$ 分泌 TNF、增加血清 IL-6 水平作用。

关键词: 六味地黄汤; 烫伤; 动物模型; 免疫功能

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2000)02-0031-04

The Effect of Liuwei Dihuang Tang on Immunity of Scalded Rats

XU Yao, BIAN Guo-wu, WU Min-yu, YANG Jie-ren

(Wannan Medical College, Wuhu 241001)

Abstract: Immune function of scalded rats with or without treatment of Liuwei Dihuang Tang was assayed by using MTT staining method. The results showed that Liuwei Dihuang Tang could increase the function of phagocytosis of $M\phi$, the transformation and proliferation of spleen lymphocytes, the production of IL-2, the activity of NK cells and the rates of RBC-C_{3b} floral hoop and RBC-IC floral hoop. In addition, Liuwei Dihuang Tang could suppress scald-induced production of TNF α and IL-6 of $M\phi$ in sera.

Key words: Liuwei Dihuang Tang, scald, animal model, immune function

六味地黄汤(LWDHT)是滋补肾阴代表方,为宋·钱乙在《小儿药证直诀》中首创,临床上可用于血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮、糖尿病、肿瘤等治疗。现代医学研究表明该方具有免疫调节作用^[1]。已有研究证明烧伤可引起机体免疫功能紊乱,烧伤感染及一些并发症与烧伤后机体免疫紊乱有关^[2]。本实验利用大鼠烫伤实验模型探讨六味地黄汤对伤后免疫紊乱的纠正作用,以期为临床防治烧伤并发症提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试药物 六味地黄汤方药熟地、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓均购于皖南医学院门诊中药房,由皖南医学院中药免疫研

究室吴敏毓教授鉴定。参照文献^[3]制成六味地黄汤水煎剂(每 ml 含生药 1g),供灌胃用。

1.1.2 试剂、细胞 MTT、conA、LPS 均为 Sigma 公司出品;胰蛋白酶,上海化学试剂分装厂出品;完全营养液(CM)由 RPMI1640 (Gibro 公司)、10% 新生小牛血清(杭州四季青畜配种站)、Hepes 20mol/L (Merck 公司),青、链霉素各 100U/ml 和谷氨酰胺 2mmol/L(上海生化所)组成。CTLL-2、L929 和 YAC-1 细胞(均由浙江医科大学微生物与免疫教研室惠赠)分别用于 IL-2、TNF、NK 细胞活性检测。补体致敏和未致敏酵母菌购自二军大长海医院免疫室。

1.1.3 动物 Wistar 大鼠 30 只,鼠龄 3 个月。体重(200±20)g,♂♀ 兼用,购自上海生

* 基金项目:皖南医学院中青年科研启动基金(99WK024)

物制品研究所实验动物中心。合格证号:沪医动准第 21-1 号。

1.2 方法

1.2.1 分组 将 24 只烫伤大鼠随机分成 4 组,其中实验组又分成六味地黄水煎剂 5、10、20g/kg 共 3 组,分别自烫伤后第 1d 开始 ig 六味地黄水煎剂,另设烫伤对照组和正常对照组 ig 等容积的生理盐水,每日 1 次连续 6d。每组动物均于伤后第 7d 处死,采集血液,腹腔液、脾脏进行有关指标的检测。

1.2.2 大鼠烫伤模型的制备^[4] 用 8% 硫化钡使大鼠背部脱毛。实验当天,在非麻醉状态下,将大鼠背部浸入 100℃ 恒温沸水中 12s,至 25% 体表面积全层烫伤(病理切片证实),伤后立即腹腔注射生理盐水 6ml,以抗休克。然后分笼饲养、自由进食、水。

1.2.3 红细胞免疫功能测定^[5] ①红细胞 C_{3b}受体(RBC-C_{3b}R)花环率测定:取受检血液(肝素抗凝)用 NS 洗 3 次后,用 NS 配成 1.25×10⁷/ml 红细胞悬液,吸取红细胞悬液和 C_{3b}致敏酵母菌悬液(1×10⁸/ml)各 50ml,在试管中充分混匀,37℃ 水浴 30min,取出后涂片,加 0.25% 戊二醛 1 滴固定,冷风吹干,瑞氏染色。在高倍镜下计数 200 个红细胞,求阳性率。以一个红细胞上结合两个或两个以上酵母菌为阳性细胞。②红细胞免疫复合物(RBC-IC)花环率测定:方法与上述基本相同,只是将致敏酵母菌悬液改为未致敏酵母菌悬液(1×10⁸/ml),计算方法同上。

1.2.4 血清 IL-6 水平测定 取受检血清,采用双抗体夹心 ELISA 法,用法国免疫技术公司出品,深圳华法生物工程有限公司进口分装试剂盒检测,按说明书操作。

1.2.5 腹腔巨噬细胞(MΦ)吞噬活性测定 按照文献^[6]制备腹腔液,用完全营养液(CM)调细胞浓度 1×10⁷/ml,在 96 孔细胞培养板上每孔加入 100μl 细胞悬液,37℃ 孵育 2h。每孔加入 10μl 四甲基偶氮唑盐(MTT)(5mg/ml),轻轻振荡后,37℃ 孵育 2h,每孔

再加入 0.1N HCl 异丙醇 50μl,充分混匀。用酶联免疫检测仪 570nm 测定 OD 值。

1.2.6 MΦ释放 TNF 活性的测定 取制备腹腔液,用 CM 调浓度 2×10⁶/ml,铺板于 24 孔培养板。置于 37℃,5% CO₂ 培养箱 2h 后用 Hank's 液洗 3 次,再加入 5μg/ml LPS 1ml/孔,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中,24h 后取上清液,-20℃ 保存待测。以 L₉₂₉细胞为靶细胞的细胞毒 MTT 法测定^[7]TNF 活性,结果以公式表示。

$$\text{细胞毒}\% = \left(1 - \frac{\text{实验组 } A_{570}}{\text{对照组 } A_{570}}\right) \times 100\%$$

1.2.7 经 conA 诱导的脾脏 T 淋巴细胞增殖的测定^[8] 按文献^[9]制备脾脏细胞,用 CM 调细胞浓度 5×10⁶/ml,铺板于 96 孔细胞培养板,每孔 100μl,再加入 10μl conA (100μg/ml)。置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 72h,在细胞培养终止后加入 50μl 0.1N HCL 异丙醇,在酶联免疫检测仪上 570nm 测 OD 值。

1.2.8 脾脏 NK 细胞活性测定 取上述制备的脾脏细胞悬液,CM 调浓度 5×10⁶/ml 以 YAC-1 细胞为靶细胞(效靶比为 10:1),用 MTT 法测 NK 细胞活性^[10],结果表示为 NK 活性% =

$$\frac{\text{靶细胞对照 OD}_{570} - (\text{实验组 OD}_{570} - \text{对照组 OD}_{570})}{\text{靶细胞对照组 OD}_{570}} \times 100\%$$

1.2.9 经 conA 诱导的脾脏 T 细胞分泌 IL-2 活性测定^[9] 取上述制备的脾脏细胞,CM 调浓度 1×10⁷/ml,加入 24 孔培养板中,每孔 1ml 脾细胞悬液和 40μl conA (100μg/ml),37℃,5% CO₂ 孵育 48h,取上清液用 0.45μm 滤器过滤后,-20℃ 保存。取 CTLL 细胞,以 CM 调浓度 2×10⁵/ml,铺板于 96 孔培养板,每孔加 100μl 上清液,37℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 24h,在细胞培养终止前 4h 加入 MTT 10μl(5mg/ml),细胞培养终止后加入 50μl,0.1N HCL 异丙醇,在酶联免疫检测仪 570nm 测 OD 值。

2 统计分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显

著性检验采用 t 检验。

3 结果

3.1 六味地黄汤对烫伤大鼠红细胞免疫功能的影响 由表 1 可知, 烫伤能明显抑制大鼠 RBC-C_{3b}R, RBC-ICR 形成率, 其中 10、20g/kg 组均能使 RBC-C_{3b}R、RBC-ICR 形成率恢复到正常水平。

表 1 六味地黄汤对烫伤大鼠红细胞免疫功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	RBC-C _{3b} R (%)	RBC-ICR (%)
正常对照	—	12.13 ± 2.48**	5.94 ± 1.72**
六味地黄汤	5	8.47 ± 1.74* ^Δ	4.02 ± 0.97
六味地黄汤	10	11.42 ± 2.13**	7.01 ± 1.93**
六味地黄汤	20	13.32 ± 2.94**	6.24 ± 2.04**
烫伤对照	—	6.19 ± 1.33	2.74 ± 0.91

注: 与烫伤对照组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;
与正常对照组比较^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$, $n = 6$ (下同)

3.2 六味地黄汤对烫伤大鼠血清 IL-6 水平、M ϕ 产生 TNF、M ϕ 吞噬活性的影响 由表 2 可知, 烫伤能明显增加大鼠血清 IL-6 水平, 10、20g/kg 组具有拮抗此增加作用, 其中 20g/kg 组能使烫伤大鼠血清 IL-6 水平恢复到正常水平。由表 2 可知, 烫伤能明显增加大鼠 M ϕ 产生 TNF, 不同剂量的六味地黄汤均能拮抗此增强作用, 但均未使之恢复到正常水平。由表 2 可知, 烫伤能抑制大鼠 M ϕ 吞噬活性, 10、20g/kg 组对此抑制有拮抗作用, 均能使之恢复到正常水平。

表 2 六味地黄汤对烫伤大鼠血清 IL-6 水平、M ϕ 产生 TNF、M ϕ 吞噬活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	IL-6 (pg/ml)	TNF 活性 (%)	吞噬活性 OD 值
正常对照	—	14.24 ± 3.77**	9.14 ± 2.31**	0.49 ± 0.11**
六味地黄汤	5	28.43 ± 8.16 ^{ΔΔ}	20.33 ± 3.17** ^{ΔΔ}	0.20 ± 0.08 ^{ΔΔ}
六味地黄汤	10	21.41 ± 5.73* ^Δ	19.74 ± 3.28** ^{ΔΔ}	0.47 ± 0.13**
六味地黄汤	20	17.37 ± 4.68**	17.32 ± 2.87** ^{ΔΔ}	0.41 ± 0.07**
烫伤对照	—	31.67 ± 8.47	42.19 ± 4.46	0.19 ± 0.12

3.3 六味地黄汤对烫伤大鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖转化、NK 细胞活性、淋巴细胞产生

IL-2 的影响 由表 3 可知, 烫伤能明显抑制大鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖转化, 20g/kg 组能拮抗此抑制作用, 但未能使之恢复正常。烫伤能明显抑制大鼠脾脏 NK 细胞活性, 10、20g/kg 组能拮抗此抑制作用, 但均未能使之恢复正常。烫伤能明显抑制大鼠脾脏淋巴细胞产生 IL-2, 不同剂量的六味地黄汤均有不同程度的拮抗抑制作用, 但都未能使之恢复到正常水平。

表 3 六味地黄汤对烫伤大鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖转化、脾脏 NK 细胞活性、脾脏淋巴细胞产生 IL-2 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	T 细胞增殖 OD 值	NK 细胞活性 (%)	IL-2 OD 值
正常对照	—	0.31 ± 0.07**	28.48 ± 3.78**	0.81 ± 0.05**
六味地黄汤	5	0.12 ± 0.03 ^{ΔΔ}	13.94 ± 3.97 ^{ΔΔ}	0.51 ± 0.09** ^{ΔΔ}
六味地黄汤	10	0.11 ± 0.04 ^{ΔΔ}	23.11 ± 0.06** ^Δ	0.56 ± 0.06** ^Δ
六味地黄汤	20	0.15 ± 0.04* ^{ΔΔ}	21.74 ± 2.93** ^{ΔΔ}	0.49 ± 0.08** ^{ΔΔ}
烫伤对照	—	0.09 ± 0.03	15.49 ± 3.71	0.28 ± 0.04

4 讨论

早些年, 有众多临床和实验观察表明烧伤后机体免疫功能受抑制而易发生感染等并发症。目前人们逐渐认识到烧伤后免疫功能一方面表现为以淋巴细胞功能、IL-2 合成水平, 吞噬细胞吞噬功能, NK 细胞活性降低为代表的免疫防御机能下降; 另一方面表现为以 IL-1、IL-6、IL-8, TNF 等合成、分泌增强为代表的过度炎症反应。故烧伤后机体免疫状态应为紊乱而不是单纯下降^[2]。本实验结果支持上述结论。烧伤可抑制机体免疫防御功能, 使机体易于并发感染。另一方面, 烧伤可增加 TNF、IL-6 等细胞因子分泌, 使机体出现过度炎症, 造成机体损害。本实验观察六味地黄汤对烫伤引起的大鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性、脾脏淋巴细胞转化增殖、分泌 IL-2、NK 细胞活性抑制有不同程度的拮抗作用。这对增强机体烫伤后免疫防御能力, 预防伤后感染无疑起积极作用。同时本实验结果也

表明六味地黄汤能抑制烫伤后大鼠腹腔巨噬细胞 TNF 分泌和降低血清 IL-6 水平, 这将有助于预防伤后过度炎症反应, 防止多器官功能不全综合征的发生。

有报道^[11] 烧伤可抑制红细胞 C_{3b} 受体花环形成率和红细胞 IC 花环形成率, 这与本实验结果吻合。六味地黄汤可不同程度地恢复上述两指标, 这种作用有助于伤后机体的免疫防御、防止感染的发生。

由此可见, 纠正伤后免疫功能紊乱是防治烧伤后感染等并发症的一个重要环节, 但目前尚无理想的免疫调节剂可供选用, 本实验结果为临床应用六味地黄汤提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 聂伟, 张永祥. 六味地黄方的现代药理学研究进展[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(5): 41
- [2] 李磊. 创伤后免疫功能的双向性改变及其研究新进展[J]. 国外医学免疫学分册, 1998, 21(3): 157
- [3] 窦昌贵, 刘文中. 复元活血汤活血化瘀作用的实验研究[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(5): 9
- [4] 卓安山. 特异性 iRNA 对烫伤后大鼠免疫功能作用的量效关系的实验研究[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1998, 10(3): 28
- [5] 郭峰. 红细胞免疫及其调节功能的测定方法[J]. 免疫学杂志, 1990, 10(3): 28
- [6] 张庆, 刘涛, 钟华元. 大枣多糖体外对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(3): 21
- [7] 虞冠华. Mtt 法快速测定 TNF 活性[J]. 细胞生物学杂志, 1994, 1: 48
- [8] Denizit F. Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival[J]. J Immunol methods, 1986, 89: 271
- [9] 张群豪. 含黄芪血清对淋巴细胞增殖及 IL-2 产生的影响[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(4): 17
- [10] 何金生. MTT 还原法检测 NK 细胞活性的方法学研究[J]. 中国免疫学杂志, 1996, 12(6): 356
- [11] 赵小华. 烧伤病人红细胞免疫的变化[J]. 中国免疫学杂志, 1992, 7(增刊): 69

(收稿日期: 1999-09-21)