

表 4 金复康口服液对小鼠体内脾淋巴细胞增殖的影响

剂 量 (g/kg)	给 药 方 案	动物数	cpm 值 ($\bar{x} \pm s$)	
生理盐水	-	ig × 7	10	2 930 ± 131
香菇多糖	0.02	iv × 7	10	6 516 ± 187
金复康	5.0	ig × 7	10	3 218 ± 101*
	10.0	ig × 7	10	6 307 ± 176**
	20.0	ig × 7	10	4 003 ± 199**

与生理盐水组比较: ** $P < 0.01$

孔加 2 mL 细胞及 ConA 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养 24 h 收集上清液, 应用小鼠胸腺细胞增殖法测定 IL-2 活性, 即无菌条件下取胸腺, 制备细胞悬液, 调整细胞浓度为 2×10^6 个/毫升, ConA 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及收集的上清液分别加在 96 孔细胞培养板上, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养 48 h, 培养结束前 6 h 加入 $^3\text{H-TdR}$ 18.5 kBq/孔, 细胞收集仪上收集细胞, 液闪仪上测定 cpm 值, 并以对照组及给药组比较之。

实验结果表明, 金复康对 IL-2 的活性激活仅在 10 g 生药/kg 体重时才出现, 其余二组均无明显影响, 见表 5。

表 5 金复康口服液对小鼠产生 IL-2 的影响

组 别	剂 量 (g/kg)	给 药 途 径	动物数	cpm 值 ($\bar{x} \pm s$)
生理盐水	-	ig × 7	10	3 155 ± 156
香菇多糖	0.02	iv × 7	10	4 733 ± 352**
ConA				250 ± 178
金复康	5	ig × 7	10	3 220 ± 199
	10	ig × 7	10	4 760 ± 252**
	20	ig × 7	10	3 231 ± 167

与生理盐水组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

金复康口服液为治疗气阴二虚型肺癌患者的中医验方, 本实验表明金复康口服液对人及小鼠的肝癌也有一定的抑瘤效果, 验证了中医异病同治的原则, 免疫学研究也表明金复康口服液有明显的促进免疫功能的作用。

中医治疗历来崇尚“治病必求其本”, 更何况正气虚损不仅是肺癌发生的内在原因, 也是其他各种癌症发生的内在原因, 而且也是癌症发展的一种必然趋势。癌症到了晚期往往由于邪毒内蓄而化热, 耗气伤阴, 正气虚损尤为显著。金复康口服液组方中, 生黄芪性甘, 微温, 有益气、固表、托毒生肌、利水消肿之功; 女贞子和麦冬等入肝肾经, 可补肾阳; 石上柏和七叶一枝花等有清热解毒、消肿止痛、散瘀等功效。因而对人体肝癌及小鼠肝癌均有一定的作用, 临床上根据中医异病同治原则而采用金复康口服液治疗肝癌也取得了一定的效果。

金复康口服液有明显的促进免疫功能的作用, 但在 10 g 生药/kg 体重时作用最强。金复康口服液在较低和较高剂量时对免疫功能的作用不明显, 试验结果提示, 金复康口服液虽然无明显毒性, 但掌握适当的剂量才能在临床上取得一定的疗效。

参 考 文 献

- 1 刘嘉湘, 施志明, 徐振晔, 等. 亚洲医药, 1996, (11): 32
- 2 Mosmann T. J Immunol Methods, 1983, 65: 55
- 3 章崇杰, 吴慧君. 华西医科大学学报, 1987, 18(2): 126
- 4 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 1226

(1999-10-13 收稿)

龟叶草免疫作用的初步实验研究

天津市长征医院(300021)

赵振宇* 刘增琪

沈阳第 202 医院

张 阳

摘 要 目的: 对龟叶草水煎液的免疫作用进行初步研究。方法: 采用碳粒廓清速率实验, 体外淋巴细胞转化实验, 迟发超敏反应以及对血清溶血素和免疫器官重量影响等 6 项实验。结果: 龟叶草水煎液 ip 2, 0.5 g/kg 或 ig 20 g/kg 能抑制小鼠碳粒廓清速率; ip 各剂量对迟发超敏反应均有较强抑制作用, 但采用 ig 未呈现抑制作用, ig 对小鼠脾脏重量略有抑制作用, 对胸腺重量无影响, 对体外淋巴细胞转化有明显抑制作用; ip 对溶血素的形成略有增高作用, 但统计学处理无差异。结论: 龟叶草水煎液对网状内皮系统以及细胞免疫具有明显抑制作用, 对体液免疫稍有增强, 但不明显。

关键词 龟叶草 尾叶香茶菜 碳粒廓清 迟发超敏反应 溶血素 淋巴细胞转化

Address: Zhao Zhenyu, Tianjin Changzheng Hospital, Tianjin

赵振宇 男, 主管药师。1992 年毕业于天津医科大学药学院, 现正在攻读临床药理学硕士学位。天津市长征医院主要从事外用制剂的开发及研制工作。其中药用香波及新型药用辅料黄原胶两项科研成果发表于《中国药学杂志》。酮康唑凝胶的制备被审定为 1999 年填补天津市医药卫生空白的高新技术项目。

龟叶草系唇形科香茶菜属植物尾叶香茶菜 *Rabdosia excisus*(Maxim.) Kudo。研究表明, 龟叶草确有一定的抗肿瘤和很好的抗炎作用^[1]。但对其免疫作用的研究很少, 对其水溶性成分的研究几乎空白。由于药物的抗炎作用和免疫作用之间有着密切的联系, 而龟叶草水煎液的抗炎作用强于其醇提液, 说明香茶菜属植物的主要活性成分二萜类不是其发挥抗炎作用的主要因素, 因此我们对龟叶草水煎液进行了免疫学实验研究。

1 材料与仪器

1.1 试药: 龟叶草采自辽宁中部山区, 植物经第二军医大学药学院郑汉臣教授鉴定为唇形科尾叶香茶菜 *Rabdosia excisus*(Maxim) Kudo。取龟叶草粗粉(全草) 100 g, 加水煎煮 3 次, 浓缩成 100 mL (1/1)。用时以生理盐水(NS) 稀释成不同浓度。环磷酰胺: 上海第十二制药厂出品, 批号: 900103, 临用前以 NS 稀释。植物血凝素 PHA: 上海医学化验所出品, 批号: 900306。氢化可的松注射液: 沈阳第一制药厂出品, 批号 901002。NS 沈阳康利制药厂出品, 批号, 920323。豚鼠血清: 取 3 只豚鼠血分别放入刻度离心管中, 静置 1 h 后离心(2 000 r/min) 30 min, 吸取血清混合, 按每毫升血清加入 0.2 mL 5% 羊红细胞悬液进行吸附, 放置 0.5 h, 离心(2 000 r/min) 20 min, 取其上清液, 放入 -20℃ 冰柜中备用。绵羊红细胞悬液: 沈阳第二二医院检验科提供的绵羊血, 经反复洗涤离心后, 用 NS 配成 5% 和 20% 的浓度。都氏试剂: 碳酸氢钠 1.0 g, 氰化钾 0.05 g, 高铁氰化钾 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL。二硝基氟苯(DNFB): Merck 公司出品, 用时溶于丙酮麻油溶液(丙酮-麻油= 1/1) 配成 1% DNFB 溶液, 密封。印度墨汁: 上海长江日用粘合材料厂产品, 批号: 881120, 用时 1/5 稀释。碳酸钠: 沈阳试剂厂出品, 批号: 861101, 用时配成 0.1% 浓度。³H-TdR: 放射性浓度 37 MBq/mL, 测量日期: 1991 年 10 月 3 日, 中国原子能科学研究院出品。RPMI-1640 培养液: 沈阳第二二医院检验科提供。淋巴细胞分离液: 沈阳第二二医院生化车间提供。肝素: 上海生物化学制药厂出品, 批号: 900725。兔血: 沈阳第二二医院生化车间动物室提供。

1.2 动物: 昆明种小鼠, 雄性, 体重 18 ~ 22 g; 豚鼠, 雄性, 沈阳第一制药厂实验动物室提供。

1.3 仪器: JKDP-3 型电热培养恒温箱(中国、厦门); LZT-4 台式电动离心机(中国、上海); UV-2201 紫外分光光度仪, AEL-160-21 电子分析天平, UV-

120-02 紫外可见分光光度仪(日本、岛津); LS5000TA 液体闪烁计数器(美国、Beckman 公司); DYQ-2 微量多头细胞样品收集器(绍兴、坡坎医疗器械厂); 二氧化碳培养箱(美国、QUEUE 公司)。

2 方法与结果

2.1 对免疫器官重量的影响: 雄性小鼠 40 只随机分成 4 组, 对照组 ig NS 0.2 mL/10 g; 阳性对照组 ip 环磷酰胺 10 mg/kg, 同时 ig 生理盐水等容量; 实验组分别 ig 龟叶草水煎液 20, 10 g/kg, 每天 1 次, 共 8 d。末次给药后 24 h, 摘取小鼠胸腺、脾脏, 称其湿重, 计算各脏器指数(mg/10 g 体重), 结果见表 1。

表 1 龟叶草对免疫器官重量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	脾重 (mg/10 g)	胸腺重 (mg/10 g)
龟叶草水煎液	20	10	42.42 ± 8.98*	33.76 ± 10.86*
	10	9	46.24 ± 10.40*	34.98 ± 6.36*
环磷酰胺+ NS	0.01	10	40.31 ± 5.68*	18.50 ± 5.59**
	-	9	50.09 ± 13.84	34.53 ± 6.91

与 NS 组比较: * P > 0.05 ** P < 0.01

结果表明, 对照组环磷酰胺对胸腺重量呈明显的抑制, 对脾脏抑制作用统计学不显著; 而龟叶草对小鼠胸腺重量无影响, 对脾脏有抑制作用, 但不明显。

2.2 对碳粒廓清速率的影响: 按文献^[1]的方法略有改进。取雄性小鼠 40 只, 分组及给药方式和剂量同 2.1。于末次给药后 24 h, 每鼠经尾 iv 印度墨汁 0.1 mL/20 g。注射后 2(t₁) 及 20(t₂) min 从眼眶静脉取血 40 μL, 溶于 4 mL 0.1% 碳酸钠中, 摇匀, 用 UV-120-02 型紫外可见分光光度仪于 680 nm 处测定吸光度(A), 根据公式计算廓清指数 K 值。结果见表 2。

$$K = (\log A_1 - \log A_2) / (t_2 - t_1)$$

表 2 ig 给药对碳粒廓清速率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	K 值
龟叶草水煎液	20	10	0.034 6 ± 0.003 5**
	10	9	0.037 3 ± 0.005 5*
环磷酰胺+ NS	0.01	10	0.024 0 ± 0.006 4**
	-	9	0.039 9 ± 0.004 2

与 NS 组比较: ** P > 0.05 ** P < 0.01

由表 2 可见龟叶草 ig 给药 20 g/kg 组使小鼠廓清指数 K 明显低于 NS 组, 而 10 g/kg 的 K 值降低不明显。

另取小鼠 28 只, 随机分成 4 组, 对照组 ip NS 0.2 mL/10 g; 阳性对照组 ip 氢化可地松 20 mg/

kg; 实验组 ip 龟叶草水煎液 2, 0.5 g/kg; 每天 1 次, 共 5 d, 于末次给药后 24 h 重复上述碳粒廓清实验, 结果见表 3。

表 3 ip 给药对小鼠碳粒廓清速率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	K 值
龟叶草水煎液	2	7	0.034 2 ± 0.008 3**
	0.5	7	0.032 9 ± 0.010 1**
环磷酰胺	0.02	7	0.039 4 ± 0.005 9*
NS	-	7	0.047 2 ± 0.004 1

与 NS 组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

由表 3 可见, 龟叶草水煎液 ip 给药两个剂量组均使小鼠廓清指数 K 值明显低于 NS 组。

2.3 对体外淋巴细胞转化的影响: 淋巴细胞悬液的制备: 取兔血按 30 ~ 50 μ L/mL 血液加入用 NS 稀释的肝素, 立刻缓慢沿壁距液面约 1 cm 处加入到有淋巴细胞分离液的试管中, 离心 30 min (2 500 r/min), 吸取淋巴细胞层于另一试管中, 用 NS 洗涤后再离心 10 min (2 000 r/min), 反复 2 次, 镜检淋巴细胞数后用 RPMI-1640 液稀释成 1×10^6 /mL 浓度。

参照文献^[2]方法略有改进, 在 96 孔细胞培养板中依次加入不同浓度的龟叶草水煎液各 0.1 mL, 使其最终浓度为 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 5 mg/mL, 每种浓度做 4 孔, 同时各孔分别加入用 RPMI-1640 培养液稀释的 PHA 0.1 mL, 使 PHA 最终浓度为 100 μ g/mL, 然后加入浓度为 1×10^6 /mL 的淋巴细胞悬液 0.1 mL, 同时以 PHA 及空白的淋巴细胞转化实验做对照。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h, 细胞终止培养前 24 h 时, 每孔加入 ³H-TdR 37 kBq 50 μ L (阴性空白管终止培养后加入), 用微量多头细胞样品收集器将细胞收集于国产 49 型玻璃纤维滤纸上, 蒸馏水淋洗 3 次, 抽滤, 于 50 °C 烘干 12 h, LS5000TA 液体闪烁计数器计数, 结果以每分钟计数 cpm 表示。以下式计算抑制率, 结果见表 4。

表 4 对 PHA 诱导兔体外淋巴细胞转化的影响(n = 4)

组别	浓度 (mg/mL)	PHA (mg/mL)	cpm ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
对照组	-	-	239.4 ± 151.2	
PHA	-	0.1	7 676.1 ± 927.3	
龟叶草水煎液	0.5	0.1	277.3 ± 219.8**	96.39
	0.25	0.1	1 258.6 ± 83.49**	83.60
	0.125	0.1	2 063.6 ± 780.9**	73.12
	0.0625	0.1	5 948.8 ± 841.8*	22.50

与 PHA 组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

抑制率 (%) = (1 - 药物组 cpm / 阳性对照组 cpm) × 100%

结果表明龟叶草水煎液各剂量对体外淋巴细胞

转化有显著的抑制作用, 且各剂量组与抑制率之间呈一定的量效关系。

2.4 对小鼠血清溶血素的影响: 参照文献^[3]方法略有改进。取 40 只小鼠, 按每只 0.2 mL, ip 20% 绵羊红细胞悬液, 24 h 后将小鼠随机分成 4 组, ip 给药 5 d, 分组及剂量见表 5。给药后 24 h 摘除小鼠眼球取血, 室温放置 1 h, 离心 (2 000 r/min) 20 min, 取上层血清, 同组 10 只混合, 用生理盐水做 800 倍稀释, 然后分别取出 1 mL 依次放入试管中, 每管加入 0.5 mL 5% 绵羊红细胞悬液及 1 mL 1 : 10 稀释的豚鼠血清, 将反应管摇匀后移至 37 °C 电热培养恒箱中保温 1 h, 中间轻轻振摇 1 次, 反应毕, 立即移入冰浴中, 终止反应。将反应管以 2 000 r/min 离心 20 min 后取上清液 1 mL 加入 3 mL 都氏试剂, 摇匀, 放置 10 min, 在 UV-2201 紫外可见分光光度仪上以 540 nm 比色。另设不加补体而以 NS 代替的空白对照管, 其它操作均相同。取 0.25 mL 5% 绵羊红细胞悬液, 用都氏试剂稀释至 4 mL, 摇匀; 放置 10 min 后 540 nm 比色。以下式计算样品半数溶血值 (HC₅₀), 结果见表 5。

样品 HC₅₀ = $\frac{\text{样品吸光度}}{\text{羊红细胞半数溶血时的吸光度}} \times \text{稀释倍数}$

表 5 对小鼠血清溶血素形成的影响

药物	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	HC ₅₀ ($\bar{x} \pm s$)
龟叶草水煎液	2	10	815.44 ± 54.53*
	1	10	738.84 ± 19.11*
环磷酰胺	0.025	10	524.68 ± 26.87**
NS	-	10	710.19 ± 31.08

与 NS 组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

实验结果表明, 龟叶草水煎液对小鼠血清溶血素的形成略有增高作用, 但统计学处理无差异。

2.5 对小鼠迟发型超敏反应的影响: 按文献^[4]方法, 将小鼠 50 只, 分组及剂量见表 6, 每鼠腹部去毛, 范围约 3 cm × 3 cm, 将 1% DNFB 溶液 50 μ L 均匀涂抹致敏, 24 h 后 ip 给药 5 d。将 1% DNFB 溶液用脱脂棉球蘸取约 10 μ L 均匀涂抹于小鼠右耳两面进行攻击, 24 h 后颈椎脱臼处死小鼠, 煎下左右耳壳, 用打孔器取下直径 8 mm 的耳片称重, 以左右耳片重量之差为肿胀度, 结果见表 6。

由表中看出, 龟叶草水煎液各剂量组均能显著抑制小鼠耳肿胀, 且呈明显的剂量依赖关系。

3 讨论

龟叶草水煎液对小鼠特异性免疫及非特异性免疫的影响初步研究表明: 龟叶草水煎液 ip 及 ig 给药均可减慢小鼠网状内皮系统对碳粒的廓清速率,

表 6 对小鼠迟发型超敏反应的影响

药 物	剂 量 (g/kg)	动物数 (只)	HC ₅₀ ($\bar{x} \pm s$)
龟叶草水煎液	2	10	6.389 ± 2.769* *
	1	10	7.843 ± 2.864*
	0.5	10	8.578 ± 1.425*
	0.25	10	8.656 ± 1.309*
NS	-	10	10.489 ± 1.832

与 NS 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

说明其对网状内皮系统有明显的抑制作用。体外淋巴细胞转化实验和迟发超敏反应的结果均表明其对细胞免疫具有明显的抑制作用。对于免疫器官重量略有降低,但不明显。对于血清溶血素的形成略有升高作用,说明其对体液免疫稍有增强作用,但统计学处理无差异。

在碳粒廓清 ig 给药实验中,我们还对各鼠肝脾称重,按公式 $a = K^{1/3} \times \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重})^{[3]}$ 计算

吞噬指数 a , 结果各组间均无显著性差异。在迟发型超敏反应中我们还采用过 ig 方式于致敏前 3 d 给药,共 8 d。结果表明给药组 20 和 10 g/kg 与 NS 组比均略有升高,但不明显。由于机体的免疫系统是一个复杂的网络系统,给药的剂量、方式,致敏时间不同均会产生不同的结果,各种免疫功能之间也存在着复杂的内在联系,该药是否对免疫功能的调节有一定的作用,有待于进一步研究证实。

参 考 文 献

- 林志彬,秦泽莲,夏鸿林. 中国药理学报, 1085, 6(3): 201
- 冯作化,范秀容. 中国免疫学杂志, 1986, 2(2): 88
- 徐叔云,卞如濂,陈修主编. 药理实验方法学. 北京:人民卫生出版社, 1982: 945, 934
- 徐叔云,卞如濂,陈修,等主编. 药理实验方法学(第二版). 北京:人民卫生出版社, 1991: 1226

(2000-01-14 收稿)

夏塔热片合用夏塔热软膏的抗真菌消炎作用研究

新疆维吾尔自治区维吾尔医研究所(乌鲁木齐 830001) 斯拉甫* 哈木拉提 努尔买买提

摘 要 应用急、慢性炎症实验动物模型及体内、外抗真菌试验,观察夏塔热片合用夏塔热软膏的抗真菌、消炎作用。结果表明,该药内外合用对急、慢性炎症及常见皮肤真菌有明显的抑制作用。

关键词 夏塔热片 夏塔热软膏 抗真菌 消炎

夏塔热片及夏塔热软膏是维吾尔医复方制剂,具有泻毒消炎、清理血液、消肿止痒等功效。用于治疗手癣、体癣、足癣、花斑癣、银屑病、过敏性皮炎、带状疱疹、痤疮等^[1,2]。为了对夏塔热片及其软膏的深入开发利用提供依据,我们对其进行了抗真菌及消炎作用研究。

1 材料

1.1 药品及试剂:夏塔热片、夏塔热软膏由新疆维吾尔药厂生产,批号 980317 及 980320,由地锦草、诃子肉、毛诃子肉、西青果、芦荟及司卡摩尼亚脂等六味药材组成。地锦草为处方君药,主要含槲皮素、没食子酸等,其中槲皮素含量作为该药质量标准中定量指标的依据。本研究按下限将夏塔热片及夏塔热软膏中的槲皮素的含量确定为不得少于 0.3%。地塞米松由连云港正大天晴制药有限公司生产,批

号 971023;二甲苯为中国曹扬二中化工厂生产,批号 950910;角叉菜胶由北京医科大学基础医学院药理系提供。

1.2 菌种:红色毛癣菌、石膏样小孢子菌、粉小孢子菌均由新疆地方病研究所提供。

1.3 动物:昆明种小鼠和 Wistar 大鼠购自自治区医学实验动物中心。

2 方法与结果

2.1 抗真菌作用

2.1.1 体外抗真菌作用^[3]:无菌操作条件下,将 50 片夏塔热片去包衣后,浸泡于 25 mL 无菌生理盐水中 24 h,使其溶解为相当于 0.74 g/mL。取上述药液的上清 1 mL 加 9 mL 液体沙包弱培养基中,以后各管作倍比稀释,并设细菌对照(不加药)和阴性对照(不加细菌)。取实验菌 1 周后的培养液 0.1

* Address: Si Lapu, Xinjiang Weiwu'er Medical Institute, Wulumuqi

斯拉甫 1983 年毕业于石河子医学院,学士学位,现为新疆维吾尔自治区维吾尔医研究所副研究员。主要从事维吾尔医抗炎、免疫药理研究工作。主持及参加国家新药基金、国家中医药管理局及自治区科委等多项课题研究工作,发表论文 23 篇,获 1999 年国家中医药科技进步三等奖 1 项及伊犁州科技进步二、三等奖。

自治区科委科学研究与技术开发计划项目