

· 药理实验与临床观察 ·

六味地黄汤活性部位 3A 的免疫调节作用研究

杨 胜,张永祥,吕晓东,董剑英,乔善义,赵毅民*

(军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

摘 要:目的 初步研究六味地黄汤活性部位 3A 的免疫调节作用。方法 观察 *po* 给予 3A 对环磷酰胺 (Cy) 处理小鼠、肉瘤 S₈₀ 荷瘤小鼠及快速老化模型小鼠 (SAM) 等免疫功能低下模型免疫反应的影响。结果 3A 对以上模型低下的抗体生成反应和脾细胞增殖反应具有明显的改善作用。结论 3A 具有明显的免疫调节作用,是六味地黄汤的重要活性部位之一。

关键词: 六味地黄汤;活性部位;3A;免疫调节

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)04-0326-04

Studies on immunomodulatory activity of fraction 3A from LIUWEIDIHUANG DECOCTION

YANG Sheng, ZHANG Yong-xiang, LU Xiao-dong, DONG Jian-ying, QIAO Shan-yi, ZHAO Yi-min

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Object To carry out a preliminary investigation on the immunomodulatory activity of fraction 3A, a fraction from the ethanol-soluble portion of LIUWEIDIHUANG DECOCTION (LW)*. **Methods** Effects of fraction 3A (*po*) on antibody production response and splenocyte proliferation of models with cyclophosphamid treated, sarcoma S₈₀ bearing and senescence accelerated mouse-prone/8 (SAMP8) mice were evaluated. **Results** Fraction 3A (*po*) significantly improved the immune response in all of the immunodeficient models. **Conclusion** Fraction 3A possesses potent immunomodulating effect and is one of the important effective fraction of LW.

Key words LIUWEIDIHUANG DECOCTION (LW); effective fraction; 3A; immunomodulation

* LIUWEIDIHUANG DECOCTION is a well know prototype of classical TCM recipe to nourish the kidney-yin.

六味地黄汤 (LW) 是中医“滋补肾阴”的经典代表方,临床被广泛用于治疗免疫系统或与免疫系统功能失调有关的疾病。现代实验药理学研究表明,六味地黄方对机体的免疫功能具有明显的调节作用^[1~3]。本室应用药理学与化学密切合作的研究方法,在活性评价导向下,对 LW 发挥免疫调节的活性成分进行定向追踪分离,逐步分离获得了多个活性部位^[4,5]。其中从 LW 醇溶部分中分离获得的活性部位 3A 经初步化学分析表明其主要含有多种皂苷组分。本研究进而观察了 3A 对 3 种不同原因引起的免疫功能低下模型的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 3A 的制备:熟地黄、山茱萸、干山药、泽泻、白茯苓、牡丹皮按 8:4:4:3:3:3 的比例混合煎

煮,获得 LW;经乙醇溶解得到醇溶部分,再经多步硅胶柱层析分离,得活性部位 3A,冻干用于研究。

1.2 动物及处理

1.2.1 快速老化模型小鼠 (Senescence Accelerated Mouse, SAM):抗快速老化亚系 (SAM-resistance/1, SAMR1),快速老化亚系 (SAM-prone/8, SAMP8),从日本京都大学引进,在本院动物室繁殖饲养。饲养室温 (20±2)℃,饮水不限,每日光照/黑暗各 12 h。本研究选不同月龄的 SAMR1 及 SAMP8[♀],用于实验。给药组每日 *po* 给予 1 次,连续 7 d,体积 0.1 mL/10 g;对照组给予等体积蒸馏水。

1.2.2 环磷酰胺 (Cy) 处理小鼠:NIH 纯系小鼠,二级,♀,6~8 周龄, (20±2) g,中国人民解放军总医院动物中心提供。将小鼠随机分为 3 组, Cy 于给

* 收稿日期: 2000-08-07

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目 (No. G1999054401) 及“九·五”国家攀登计划预选项目资助课题

作者简介:杨 胜 (1973-),男,山西省人,现为在读博士研究生,主要从事中药复方研究。

药后 3 d 给予 1 次,50 mg /kg,ip; 3A 给药方法同 SAM

1.2.3 S₁₈₀荷瘤小鼠: NIH 纯系小鼠,♀,6~ 8 周龄,(20± 2) g;将小鼠随机分为 3 组。S₁₈₀瘤细胞小鼠体内传代,取富含 S₁₈₀瘤细胞的小鼠腹水,调整细胞浓度为 1× 10⁶ cfu/mL,注射于每只小鼠右腋皮下 0.2 mL 小鼠自移植瘤细胞后 24 h 开始 po 给予 3A,每日 1 次,分别于第 6,9,12,15 天处死动物进行实验。

1.3 主要试剂: RPMI-1640 培养液为美国 Gibco 公司产品 Cy 为上海华联制药厂产品。氚标胸腺嘧啶脱氧核苷 (³H-TdR),中国原子能科学研究院同位素研究所。刀豆蛋白 A(Con A),Sigma 公司。新生牛血清(NCS),本院放射医学研究所。补体,新鲜补体血清,从本院动物中心提供的豚鼠股动脉取血,4℃ 静置,混合,离心取上清液用做补体,-80℃ 保存。

1.4 溶血空斑 (Plaque Forming Cell, PFC) 实验^[6]:以绵羊红细胞 (SRBC)于实验前 4 d,ip 免疫小鼠,5× 10⁷个/只,实验时断头取脾,制备 2.5× 10⁶ cfu/mL 脾细胞悬液,取上述细胞悬液 400 μL 与 50% SRBC (50 μL)及 50% 补体 (按 1:1 稀释的新鲜豚鼠血清,50 μL)混合,取 100 μL 加入制备好的玻璃小室,石蜡封口,3~ 4 板/组,37℃ 温箱孵育 1 h,计数小室内溶血空斑数,结果以每 10⁶个脾细胞所含空斑数 (PFC/10⁶)表示。

1.5 淋巴细胞增殖实验^[7]:小鼠断头处死,无菌取脾,制备脾细胞悬液 5× 10⁶ cfu/mL,取 100 μL 悬液加入 96 孔培养板,同时加入等体积的 RPMI-1640 液或 Con A (终浓度 1 μg/mL)。37℃ 温箱孵育 56 h 后,每孔加入 20 μL ³H-TdR (7.4 kBq/孔),继续培养至 72 h,用多头细胞收集仪将细胞收集到玻璃纤维滤膜上,80℃ 烘干后于液体闪烁计数器测 cpm 值。

1.6 统计学处理:所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数的比较采用 *t* 检验进行。

2 结果

2.1 3A 对 Cy 处理小鼠免疫反应的作用

2.1.1 对 Cy 处理小鼠脾细胞抗体生成反应的影响:3A 在 0.1~ 0.6 g/kg 剂量范围内对 Cy 处理小鼠脾细胞抗体生成反应能力低下具有明显的改善作用,其中 0.3 g/kg 作用最为显著 (表 1)。

2.1.2 对 Cy 处理小鼠脾细胞增殖反应的影响: Cy 处理小鼠的脾细胞自发和 Con A 诱导的增殖反应

能力均明显降低。3A (0.3 g/kg× 7 d) 对 Cy 处理小鼠脾细胞自发增殖无明显作用,对 Con A 诱导的脾细胞增殖反应具有明显的促进作用 (表 2)。

表 1 3A 对 Cy 处理小鼠脾细胞抗体生成反应的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 (g/kg)	PFC/10 ⁶ 脾细胞
对照	-	3 820± 140
Cy 对照	-	2 533± 117 *
Cy+ LW	10	4 720± 19 #
3A	0.1	3 747± 24 #
	0.3	4 480± 32 #
	0.6	3 007± 13 #

与对照组相比: ** *P* < 0.01

与 Cy 对照组相比: # *P* < 0.05 ## *P* < 0.01

表 2 3A 对 Cy 处理小鼠脾细胞增殖反应的影响
($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	³ H-TdR 掺入值 (cpm)	
	Con A (-)	Con A (+)
对照	3 535± 135	31 609± 2 291
Cy 对照	2 742± 274 *	6 137± 1 244 *
Cy+ 3A	2 564± 64	14 295± 2 24 #

与对照组相比: * *P* < 0.05 ** *P* < 0.01

与 Cy 对照组相比: ## *P* < 0.01

2.2 3A 对 S₁₈₀荷瘤小鼠免疫反应的作用

2.2.1 对 S₁₈₀荷瘤小鼠脾细胞抗体生成反应的影响:结果表明,6 d 时荷瘤对照组小鼠脾细胞抗体生成反应能力较对照组增强,9 d 时明显下降,15 d 时则下降更为明显。给予 3A (0.3 g/kg) 对荷瘤 6 至 12 d 小鼠脾细胞抗体生成能力低下具有明显改善作用 (表 3)。

表 3 3A 对 S₁₈₀荷瘤小鼠脾细胞抗体生成反应的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

天数	PFC/10 ⁶ 脾细胞		
(d)	对照组	S ₁₈₀ 对照组	S ₁₈₀ + 3A
6	2 667± 117	3 003± 19 #	3 827± 204 #
9	3 187± 170	2 710± 92	3 217± 248 #
12	2 953± 142	2 687± 13 #	3 040± 72
15	2 397± 175	1 593± 10 # *	1 633± 67

与对照组相比: * *P* < 0.05 ** *P* < 0.01

与 S₁₈₀对照组相比: # *P* < 0.05 ## *P* < 0.01

2.2.2 对 S₁₈₀荷瘤小鼠细胞增殖反应的影响:小鼠荷瘤 9 d 时其脾细胞增殖反应能力显著降低,特别是 Con A 诱导的增殖反应能力下降十分显著。给予 3A (0.3 g/kg) 对荷瘤 9 d 小鼠脾细胞自发和 Con A 诱导的增殖反应能力低下均具有明显的改善作用 (表 4)。

2.3 3A 对快速老化模型小鼠 (SAM) 免疫反应的作用

表 4 3A对 S₁₈₀荷瘤小鼠脾细胞增殖反应的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	³H-TdR掺入值 (cpm)	
	Con A (-)	Con A (+)
对照	16 158± 140	125 769± 10 630
S ₁₈₀ 对照	3 32± 250 *	1 980± 144 *
S ₁₈₀ + 3A	5 694± 619 #	11 575± 917 #

与对照组相比: ** $P < 0.01$; 与 S₁₈₀对照组相比: ## $P < 0.01$

2.3.1 对 SAM 脾细胞抗体生成反应的影响: 结果表明, SAM R1脾细胞抗体生成反应能力随增龄略有下降,但各月龄组之间无显著性差异。给予 3A (0.3 g/kg× 14 d) 对 SAM R1脾细胞抗体生成反应能力无明显影响。SAMP8脾细胞抗体生成反应能力随增龄明显降低,与同月龄 SAMR1相比,6月龄开始明显降低,9月龄时更为显著。3A (0.3 g/kg× 14 d) 对 3,6月龄 SAMP8脾细胞抗体生成反应能力无明显影响,对 9月龄 SAMP8脾细胞抗体生成反应能力低下则具有明显的改善作用 (表 5)。

表 5 3A对 SAM脾细胞抗体生成反应的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

品系	月龄	PFC/10 ⁶ 脾细胞	
		对照组	3A
SAM R1	3	1 957± 70	2 057± 100
	6	1 700± 66	1 817± 61
	9	1 653± 95	1 613± 55
SAM P8	3	1 893± 60	1 812± 60
	6	1 507± 74	1 543± 64
	9	1 120± 53 *	1 412± 39 #

与同月龄 SAMR1对照组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与 SAM P8对照组相比: ## $P < 0.01$

2.3.2 对 SAM 脾细胞增殖反应的影响: SAMR1脾细胞增殖反应能力随增龄无明显变化,3A (0.3 g/kg× 14 d) 对 3月龄 SAMR1的脾细胞增殖反应具有促进作用。SAMP8脾细胞增殖反应能力随增龄快速降低,与同月龄 SAMR1相比,6月龄开始明显降低,9月龄时更为显著。给予同样剂量 3A 对 6月龄 SAMP8的脾细胞增殖反应能力有改善的趋势,但与对照组相比无统计学差异,对 9月龄 SAM P8脾细胞增殖反应能力低下具有明显的促进作用 (表 6)。

SAM R1脾细胞对 Con A 诱导的增殖反应能力在增龄过程中无明显变化,给予 3A (0.3 g/kg× 14 d) 也无明显影响。Con A 诱导 SAMP8脾细胞增殖反应能力随增龄明显降低,与同月龄 SAMR1相比明显降低。3A (0.3 g/kg× 14 d) 对 9月龄 SAM P8经 Con A 诱导的脾细胞增殖反应能力具有明显促进作用 (表 7)。

表 6 3A对不同年龄 SAM脾细胞增殖反应的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

品系	月龄	³H-TdR掺入值 (cpm)	
		对照组	3A
SAM R1	3	2 200± 140	3 109± 522
	6	2 566± 561	2 173± 477
	9	2 777± 225	3 074± 593
SAM P8	3	1 892± 159	2 134± 76
	6	706± 157 *	942± 162
	9	466± 43 *	2062± 304 #

与同月龄 SAM R1对照组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与 SAM P8对照组相比: ## $P < 0.01$

表 7 3A对 Con A 诱导的不同月龄 SAM脾细胞增殖反应的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

品系	月龄	³H-TdR掺入值 (cpm)	
		对照组	3A
SAM R1	3	48 057± 1 373	45 029± 2 669
	6	29 562± 3 973	42 154± 1 929
	9	45 247± 2 233	43 406± 2 051
SAM P8	3	24 512± 1 348 *	24 805± 1 479
	6	18 525± 1 295 *	20 964± 1 312
	9	8 138± 965 *	29 315± 1 177 #

与同月龄 SAM R1对照组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与 SAM P8对照组相比: ## $P < 0.01$

3 讨论

Cy 是常用的免疫抑制剂,对机体的免疫功能具有多环节的抑制作用,本研究选用被诱导免疫功能低下模型。结果表明,3A 对 Cy 所致小鼠脾细胞抗体生成反应和增殖反应能力低下具有明显的改善作用,提示 3A 能够对抗 Cy 的免疫抑制作用。

小鼠接种 S₁₈₀瘤细胞后第 6天时,脾细胞抗体生成反应明显增强,随后持续下降。该现象反映了荷瘤动物免疫功能的动态变化规律,初期的增强是由于移植肿瘤抗原引起的宿主免疫应答所致,但随着肿瘤的生长,机体免疫功能逐步受到抑制。口服给予 3A 对荷瘤 6至 12 d小鼠脾细胞抗体生成反应能力低下具有明显改善作用,但随着荷瘤时间延长,到 15 d时改善作用消失,表明 3A 对荷瘤引起的免疫功能低下具有改善作用,但当免疫功能受到严重破坏时则难以逆转。

SAM 是日本京都大学竹田教授实验室建立的快速老化模型小鼠,SAMP8为快速老化亚系之一,其特点是在增龄过程中中枢学习记忆功能迅速衰退,免疫功能的进行性明显衰退是 SAMP8的另一重要特征。目前 SAM 在许多国家中被广泛应用于衰老及抗衰老研究^[8]。本研究结果表明,SAMP8免疫功能随增龄快速衰退,9月龄时降低十分显著。口服给予 3A 对 9月龄 SAMP8的脾细胞抗体生成反

应及脾细胞增殖反应能力具有明显的改善作用,提示 3A 对衰老所致免疫功能低下具有明显的改善作用。

以上结果表明,3A 对多种原因造成的免疫功能低下均具有明显的改善作用,提示 3A 是 LW 发挥免疫调节作用的主要活性部位之一。因此,结合对 3A 组分的分离鉴定研究,对其作用机制进行深入研究,不仅有助于进一步说明 LW 的免疫调节作用机制,而且对开发新型中药复方也具有实际意义。

参考文献:

- [1] 李 萍,石晓红,王凤连. 六味地黄丸和地黄的免疫药理研究 [J]. 中国免疫学杂志, 1987, 3(5): 296-298.

- [2] 贾泰元. 六味地黄丸的免疫调节作用 [J]. 中成药, 1994, 16 (9): 34-35.
- [3] 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): 41-44.
- [4] 聂 伟,张永祥,茹祥斌,等. 六味地黄汤免疫调节活性成分化学分离的药理学导向评价 [J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18 (5): 287-289.
- [5] 杨 胜,张永祥,吕晓东,等. 六味地黄汤醇溶部分免疫活性成分化学分离的药理学导向分离评价 [J]. 中药药理与临床, 2000, 16(3): 1-3.
- [6] 刘福君,赵修南,聂 伟,等. 地黄低聚糖增强小鼠免疫功能的作用 [J]. 中国药理学通报, 1998, 14(1): 90-93.
- [7] 钱玉昆. 实用免疫学新技术 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1994.
- [8] 聂 伟,张永祥. 快速老化小鼠 研究衰老及衰老相关疾病的动物模型 [J]. 中国药理学通报, 2000, 16(2): 132-137.

水杉总黄酮抗实验性心肌肥厚及抑制心室 c-Fos 蛋白表达的作用

刘维莞¹,杨晓茹¹,屠治本²,石明健¹,糜留西²,王红英¹,敖 英^{1*}

(1. 武汉大学医学院 药理学教研室,湖北 武汉 430071; 2. 中国科学院武汉植物研究所,湖北 武汉 430074)

摘要: 目的 观察水杉总黄酮 (TFM) 对容量超负荷大鼠心肌肥厚的作用及其对心室 c-Fos 蛋白表达的影响。方法 采用腹腔动-静脉造瘘建立大鼠容量超负荷模型,ig 给予 TFM,免疫组化测定心室 c-Fos 蛋白的相对含量。结果 TFM 剂量依赖性地减轻大鼠心脏重量,抑制心室 RNA 和蛋白质合成,并抑制心室 c-Fos 蛋白表达。结论 TFM 可预防容量超负荷大鼠心肌肥厚的形成,抑制心室 c-Fos 蛋白表达可能是其分子机制之一。

关键词: 水杉总黄酮;容量超负荷;心肌肥厚;c-Fos

中图分类号: R972. 4; R932. 5 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2001) 04- 0329- 04

Inhibitory effects of total flavones of *Metasequoia glyptostroboides* on experimental cardiac hypertrophy and expression of c-Fos protein in ventricle

LIU Wei-wan¹, YANG Xiao-ru¹, TU Zhi-ben², SHI Ming-jian¹, MI Liu-xi², WANG Hong-ying¹, AO Ying¹

(1. Department of Pharmacology, Medical College of Wuhan University, Wuhan Hubei 430071, China; 2. Wuhan Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Wuhan Hubei 430074, China)

Abstract **Object** To observe the effects of total flavones of *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng (TFM) on volume-overload cardiac hypertrophy and the expression of c-Fos protein in rat. **Methods** Volume-overload cardiac hypertrophy of rat was induced by aortocaval shunts. The rats were given ig TFM (400, 40 and 4 mg/kg/d). c-Fos protein in the ventricles were measured by immunocytochemical study. **Results** TFM at the above dosage decreased heart weight and contents of RNA and protein in the myocardium, inhibited the expression of c-Fos protein in the ventricles. **Conclusion** TFM can prevent volume-overload cardiac hypertrophy in rats. The inhibitory effects on the expression of c-Fos protein may be its mechanism in the molecular level.

Key words total flavones of *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng (TFM); volume-overload; cardiac hypertrophy; c-Fos

水杉总黄酮 (Total Flavones of *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng, TFM) 是从古老的杉属植物中提取的活性部位,其药理作用国内外少见

报道。我室初步研究表明,TFM 具有钙拮抗作用,可防治心律失常^[1]。心肌肥厚,作为心血管疾病的独立危险因素已形成共识。近年来,防治心肌肥厚的药

* 收稿日期: 2000-06-18
基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (NO. 39970085)