

· 药理实验与临床观察 ·

当归补血汤中不同组分对正常及血虚小鼠免疫功能的影响

王燕平¹, 李晓玉¹, 宋纯清², 陈长勋², 胡之璧²

(1. 中国科学院上海药物研究所, 上海 200031; 2 上海中医药大学, 上海 200032)

摘要: 目的 比较当归补血汤中的不同组分对正常及血虚小鼠模型的免疫调节作用。方法 采用 MTT法测 T、B淋巴细胞的增殖率;分光光度法检测脾细胞中抗体的生成;用乙酰苯肼和环磷酰胺制备小鼠血虚模型。结果 黄芪中的 4 个不同组分对正常小鼠均具有增强 T、B淋巴细胞增殖率及促进抗体生成作用,而当归中的 3 个不同组分则作用各异,但是对血虚模型小鼠均表现出明显的免疫调节作用。体外实验发现:在 2.5~250 μg/mL 浓度范围内,黄芪黄酮、黄芪皂苷以及黄芪和当归的挥发油部分均表现为良好的双向免疫调节作用,而黄芪和当归的多糖组分则为明显的浓度依赖性作用方式。结论 当归补血汤中的组分具有不同程度的免疫调节作用。

关键词: 当归补血汤; 当归; 黄芪; 免疫调节作用; 血虚模型

中图分类号: R286.95 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)02-0135-04

Effect of different fractions from DANGGUI BUXUE TANG* on immunological function in normal and blood-deficiency mouse

WANG Yan-ping¹, LI Xiao-yu¹, SONG Chun-qing², CHEN Chang-xun², HU Zhi-bi²

(1. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031,

China; 2. Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

Abstract Object To study the immunomodulatory effect of seven fractions from DANGGUI BUXUE TANG in normal and blood-deficiency mouse. **Methods** The proliferation of T, B lymphocyte was measured by MTT assay; the activity of splenocyte antibody was determined by spectroscopic assay; the blood-deficiency model was prepared by injection of acetyl phenylhydrazine and cyclophosphamide. **Results** Four fractions from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge all promoted proliferation of T and B lymphocyte and antibody production. Three fractions from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels had different effects at 200 mg/kg *po in vivo*, but they all showed significant immunomodulatory effects on blood-deficiency mouse. *In vitro*, volatile oil, flavone and saponin from *A. membranaceus* and volatile oil, flavone from *A. sinensis* exhibited fine dual-immunomodulatory effects, polysaccharide from both herbs showed well concentration-dependent immunomodulatory effects at the doses of 2.5~250 μg/mL. **Conclusion** There are different immunomodulatory effects in the different fractions from DANGGUI BUXUE TANG.

Key words DANGGUI BUXUE TANG; *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bunge; *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; immunomodulation; blood-deficiency model

*DANGGUI BUXUE TANG is a typical Chinese compound preparation with *Radix Astragali* and *Radix Angelicae Sinensis* etc. It has the function of invigorating the spleen and replenishing *qi*.

当归补血汤是经典的补中益气复方,由黄芪与当归按 5:1 的比例组成^[1]。近代研究表明当归补血汤具有补血、调节免疫功能等药理作用。临床对许多免疫功能紊乱的疾病如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫疾病均有较好疗效^[2]。黄芪和当归两个单味药均是很好的补益药,究竟是其中哪些

成分在起免疫调节作用呢?为了探索当归补血汤的主要药效物质基础,我们运用现代药理学和现代植物化学分离技术相结合的方法,将当归补血汤拆分成 7 个组分,分别观察各个组分对正常及“血虚模型”小鼠脾淋巴细胞增殖及抗体生成功能的影响,以明确当归补血汤的主要药效物质基础

1 实验材料

1.1 实验动物: ICR 纯系小鼠, 雌性, 18~ 22 g, 由中国科学院上海药物研究所动物中心提供; 昆明种小鼠, 雌雄各半, 18~ 22 g, 由上海中医药大学动物中心提供

1.2 样品与试剂

1.2.1 样品制备: 样品由上海中医药大学提供, 制备方法如下: 黄芪用 90% 乙醇渗滤, 回收乙醇后用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇分配, 依次得黄芪挥发油 (A)、黄酮 (B)、皂苷 (C) 及黄芪经水煎浓缩加醇沉淀后的多糖部位 (D) 当归水煎液浓缩后, 加醇沉淀多糖 (G), 稀醇部分回收乙醇后, 用石油醚和乙酸乙酯分配, 依次得当归挥发油 (E) 和黄酮 (F) 各样品体内实验用 0.1% CMC 配制, 体外实验用少量 DMSO 溶解后, 用 RPMI1640 培养液稀释至所需浓度

1.2.2 试剂: RPMI1640 培养液, Gibco 公司产品; 伴刀豆蛋白 (ConA) 和细菌脂多糖 (LPS) 均为 Sigma 公司产品, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), Fluka 公司产品; 小牛血清, 上海实生细胞生物公司购买。其余试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 脾细胞悬液的制备: 方法同前文^[3]。体内实验小鼠随机分组, 每日 ig 上述不同样品 1 次, 对照组 ig 溶剂。小鼠眼眶放血致死, 无菌取脾脏, 用 100 目不锈钢网研磨, 使细胞分离, 低渗破坏红细胞后取上清液 500×g 离心 3 min, 所得淋巴细胞用含 10% 小牛血清的 1640 培养液配成 5×10⁶/mL 的脾细胞悬液

2.2 淋巴细胞增殖实验: 方法略有改动^[4]。将 5×10⁶/mL 的脾细胞悬液, 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板, ConA (终浓度 5 μ g/mL) 和 LPS (终浓度 10 μ g/mL) 加入不同孔内, 以分别活化 T B 淋巴细胞。将此板置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内培养 48 h, 并于培养结束前 4 h, 每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μ L, 4 h 后弃去上清液, 每孔加溶解液 (50% 二甲基甲酰胺, 10% SDS, HCl 调 pH 至 7.4) 100 μ L, 充分溶解后, 在酶联免疫仪上检测 570 nm 的吸光度 (A_{570 nm})

2.3 抗体生成实验^[5]: 将 5×10⁷/mL 的脾细胞悬液, 绵羊红细胞和豚鼠血清各 1 mL 混匀, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1.5 h, 800×g 离心 15 min, 用紫外分光光度计检测 A_{520nm}, 空白对照组用 PBS

2.4 血虚模型的制备: 昆明种小鼠随机分为 8 组

对照组每天 ig 生理盐水, 治疗组分别 ig 不同组分 (各相当于生药 10 g/kg) 第 1 天 sc 乙酰苯肼 40 mg/kg, 第 4 天减为 20 mg/kg, 同时 ip 环磷酰胺 40 mg/kg, 随后连续 3 d 仅 ip 环磷酰胺 40 mg/kg, 第 14 天时解剖。

2.5 统计学处理: 所有数据均采用 Student-t test 统计处理。

3 实验结果

3.1 体内作用

3.1.1 当归补血汤、当归和黄芪对正常小鼠的免疫调节作用: 水煎剂按相当于生药的配比剂量给 ICR 小鼠 ig 6 d, 第 3 天 ip 绵羊红细胞刺激抗体生成, 第 7 天解剖。结果发现三者对正常小鼠的 T B 淋巴细胞增殖和脾细胞抗体生成均有明显的促进作用, 说明合剂及单味药都有明显的免疫增强作用, 合剂的免疫增强作用似乎略强于单味药, 提示配伍用药可能具有一定的协同作用, 结果见表 1

表 1 当归补血汤、黄芪和当归的免疫调节作用

组别	剂量 (g/kg)	A _{570 nm}		A _{520 nm}
		T 淋巴细胞	B 淋巴细胞	抗体生成
正常	-	0.70±0.01	0.83±0.05	0.84±0.1
当归补 血汤	6	1.06±0.00**	1.05±0.02	0.86±0.6*
	12	0.96±0.01**	1.05±0.02	0.87±0.1**
黄 芪	5	0.92±0.07	0.98±0.02	0.87±0.0**
	10	0.87±0.01**	1.02±0.01	0.86±0.2**
当 归	1	0.93±0.06	0.88±0.01	0.86±0.1**
	2	1.0±0.01**	0.94±0.05	0.87±0.3**

与正常对照组相比: * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001

3.1.2 当归及黄芪中不同组分的免疫调节作用: 将 A~G 7 个不同组分用 200 mg/kg ig ICR 小鼠 6 d 后, 结果黄芪的 4 个不同组分 A~D 都表现出显著的免疫增强作用, 其中又以 C (黄芪皂苷) 的免疫增强作用最为突出, 能够使 T 淋巴细胞增殖率提高近 5 倍 (P < 0.001) 当归的作用较为复杂, 在 3 个不同组分 E~G 中, F 表现为明显的抑制 T B 淋巴细胞增殖的作用, G 则能够促进 T B 淋巴细胞增殖, 而 E 仅促进 T 细胞增殖; 此外, E~G 对正常小鼠的抗体生成均无明显作用, 结果见表 2

3.1.3 当归补血汤中不同组分对血虚模型小鼠的免疫调节作用: 用乙酰苯肼和环磷酰胺制备的血虚模型小鼠, 其免疫功能低下, 主要表现为 T 淋巴细胞增殖能力下降, 即 T 细胞免疫功能降低 (P < 0.05)。当归补血汤中的不同组分分别以相当于生药 10 g/kg 的剂量 ig 14 d 后, 发现除黄芪 D 以外, 均具有明显提高血虚模型小鼠低下的细胞免疫功能的能力, 而且与正常对照组相比, 黄芪 B C 还可以促

进静止淋巴细胞的增殖,黄芪 B对 B淋巴细胞增殖也有明显的促进作用,结果见表 3

表 2 黄芪、当归中的不同组分对抗体生成、T B淋巴细胞增殖率的作用

样 品	抗体生成 (%)	T淋巴细胞增殖率 (%)	B淋巴细胞增殖率 (%)
A	4 [†] **	306	235
B	7	165	192
C	10	490 [†] **	99
D	34 [†] **	35	60
E	4	54	- 6
F	- 1	- 72 [‡]	- 69 [‡]
G	- 1	245	38

注:增殖率(%)=(A样品-A对照)/A对照×100%

与对照组比较:* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001

由于样品为粗品,而且此处为初筛,所以没有用相对于生药的剂量计算,仅以相同剂量的药效比较;此结果在以后的实验中亦得到证实。另外,100 mg/kg体内给药 6 d,F能够分别使增强 T B淋巴细胞的增殖率提高 400%和 37.5%。

表 3 当归补血汤中不同组分对血虚模型小鼠的免疫调节作用

样 品	A570 nm		
	静止细胞	T淋巴细胞	B淋巴细胞
对照组	0.37±0.02	0.58±0.02	0.50±0.03
血虚模型	0.4±0.03	0.39±0.01 [†]	0.50±0.02
E	0.48±0.03	0.43±0.01 [†]	0.5±0.03
F	0.45±0.01	0.57±0.03 [†]	0.63±0.08
G	0.46±0.06	0.48±0.01 [†] #	0.50±0.09
A	0.50±0.05	0.43±0.01 [†]	0.53±0.03
B	0.5±0.02 [†] #	0.5±0.01 [†] #	0.55±0.01 [†]
C	0.54±0.01 [†] * #	0.5±0.01 [†] #	0.53±0.03
D	0.43±0.02	0.39±0.03	0.47±0.04

与对照组相比:* P<0.05 ** P<0.01

与血虚模型组相比:# P<0.05 ## P<0.01

3.2 体外作用

3.2.1 黄芪、当归不同组分的体外免疫调节作用:在 2.5~250 μg/mL 的浓度范围内,黄芪 A B C对静止淋巴细胞均具有明显的双向免疫调节作用,即在 25 μg/mL 时促进静止淋巴细胞的增殖,促进率分别为 20.4%、58.2%和 55.5%;而在 250 μg/mL 时出现明显的抑制作用,抑制率分别为 60.6%、67.8%和 49.9%。黄芪 D在 2.5~250 μg/mL 内能够剂量依赖性促进静止淋巴细胞的增殖,最大促进率为 50.3%;当归 G亦呈现剂量依赖性促进作用,最大促进率为 21.4%,结果见图 1

黄芪 B C对 T淋巴细胞增殖亦呈现明显的双向调节作用,促进率分别为 29.4%和 20.5%;抑制率分别为 77.2%和 66.5%。黄芪 A和当归 E在 250 μg/mL 时为明显的抑制作用,抑制率分别为 72.6%和 68.4%,结果见图 2

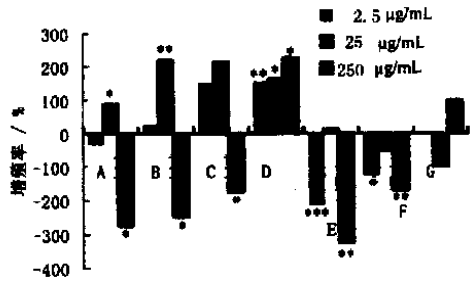


图 1 当归补血汤 7个组分对静止淋巴细胞增殖的体外作用

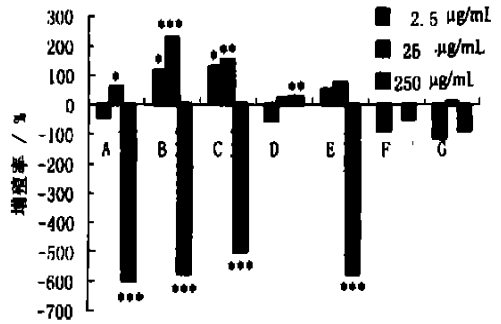


图 2 当归补血汤 7个组分对 T淋巴细胞增殖的体外作用

黄芪 B C对 B淋巴细胞的增殖同样为显著的双向免疫调节作用,25 μg/mL 时促进率分别为 30.8%和 42.0%;250 μg/mL 时抑制率分别为 75.5%和 67.7%。而黄芪 D和当归 G剂量依赖性促进 B淋巴细胞的增殖,在 250 μg/mL 时,分别为 13.0%和 21.2%;黄芪 A和当归 E在 250 μg/mL 时明显抑制 B淋巴细胞的增殖,抑制率分别为 64.4%和 67.2%,结果见图 3

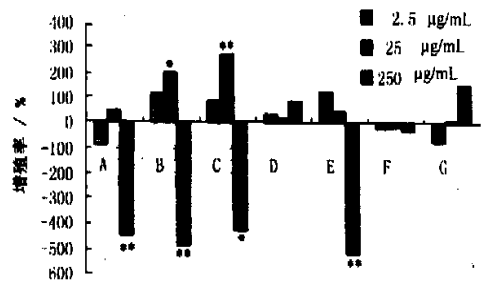


图 3 当归补血汤 7个组分对 B淋巴细胞增殖的体外作用

4 讨论

中药复方的开发中最为重要的一个环节是确定该复方中产生药效的物质基础。基于这一目的,我们选取了只有两味中药组成的当归补血汤这一传统的补益复方,研究该方中的主要药效物质以及产生作用的主要机制。体内实验中发现,黄芪 4个组分对正常小鼠均具有不同程度的免疫增强作用,提示黄

芪的免疫增强作用可能是各个组分之间的协同作用。当归对正常小鼠的免疫作用比较复杂,其整体的免疫增强作用可能与各个组分之间的配伍有关,并非简单的协同作用。而对血虚模型小组中低下的 T 淋巴细胞免疫,当归黄酮和黄芪黄酮、黄芪皂苷的作用突出,说明当归补血汤的补益作用是建立在其单味药中较强活性物质的基础上。同时,当归黄酮在低剂量时有很强的免疫促进作用,但在高剂量时则表现为明显的免疫抑制作用,而对免疫低下的血虚模型小鼠则能将其降低的 T 淋巴细胞增殖率提高至接近正常,反映了当归黄酮极强的免疫调节作用,同时,也可以看出当归不同组分之间剂量配比的重要性。当归黄酮的免疫调节作用有待进一步的研究。

体外实验亦发现当归、黄芪不同组分产生免疫活性强弱不同,在 $2.5 \sim 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内,黄芪挥发油、黄酮、皂苷以及当归挥发油均表现为显著的双向免疫调节作用,其中黄芪黄酮和皂苷的作用明显强于黄芪挥发油和当归挥发油,这与体内结果一致,说明二者是黄芪产生免疫增强作用的主要活性物质。两个多糖成分(黄芪多糖和当归多糖)则

表现为明显的浓度依赖性作用方式,其中二者对静息细胞和 B 淋巴细胞的增殖有明显的促进作用,而对 T 淋巴细胞增殖无明显作用,黄芪多糖的作用要强于当归多糖。

尽管黄芪多糖是目前公认的免疫促进剂,但是,本实验发现其对 T 和 B 淋巴细胞的增殖作用和抗体生成以及对血虚模型小鼠的调节作用均不如黄芪皂苷和黄芪黄酮两个组分。尤其是黄芪皂苷具有较强的免疫调节作用,可以认为是当归补血汤中药效的主要物质基础。

参考文献:

- [1] 郑虎占. 中药现代化研究与应用(第四卷)[M]. 北京:人民卫生出版社,1998.
- [2] 黄幼群. 当归补血汤研究概况[J]. 中成药,1989,11(9):39-40.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学(第二版)[M]. 北京:人民卫生出版社,1994.
- [4] Bian T H, Wang X F, Li X Y, Effects of morphine and naloxone on proliferation of lymphocyte *in vitro* [J]. Acta Pharmacol Sin, 1995, 16(4): 315-318.
- [5] 向道斌. 牛膝多糖对小鼠体液免疫反应的增强作用[J]. 上海免疫学杂志,1994,14(3):134-136.

人参皂苷-Rg₁对中性粒细胞与血小板之间粘附的影响

沈志强¹,吴蓝鸥¹,雷伟亚¹,陈植和¹,刘吉开²

(1. 云南省天然药物药理重点实验室,昆明医学院,云南昆明 650031; 2. 中国科学院昆明植物研究所 开放实验室,云南昆明 650204)

摘要:目的 探讨人参皂苷-Rg₁对大鼠血小板与中性粒细胞之间粘附及颈动脉血栓形成的影响。方法 采用 Charlton 等方法评价人参皂苷-Rg₁对电刺激大鼠颈动脉血栓形成的作用;应用玫瑰花结试验观察对大鼠血小板与中性粒细胞之间粘附的影响。结果 $25 \text{ mg}/\text{kg}$ 人参皂苷-Rg₁使血栓形成时间从对照组的 $(18.7 \pm 1.8) \text{ min}$ 延长到 $(36.4 \pm 2.1) \text{ min}$ ($P < 0.05$);显著降低凝血酶激活的血小板与中性粒细胞间的粘附率,其 IC₅₀为 $81.2 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。结论 人参皂苷-Rg₁具有较强的抗血栓的作用,其机制可能与抑制中性粒细胞与血小板之间的相互作用有关。

关键词: 人参皂苷-Rg₁; 中性粒细胞;血小板;粘附;血栓形成

中图分类号: R286.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)02-0138-03

Effects of ginsenoside-Rg₁ on adhesion of neutrophil to platelet

SHEN Zhi-qiang¹, WU Lan-ou¹, LEI Wei-ya¹, CHEN Zhi-he¹, LIU Ji-kai²

(1. Yunnan Pharmacological Laboratory of Natural Products, Kunming Medical College, Kunming Yunnan 650031, China; 2. Opening Laboratory, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650204, China)

Abstract Object To investigate the effects of ginsenoside-Rg₁ on adhesion of neutrophil to platelet, and on carotid thrombosis in rat. **Methods** Charlton and Rosette test were used to evaluate the effect of ginsenoside-Rg₁ on carotid thrombosis induced by electrical stimulation and to observe its effect on the

收稿日期: 2001-04-25

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目,课题号: 98C066M

作者简介: 沈志强,男,35岁,博士,副教授,研究方向:天然药物与心血管药理学,于国内外发表论文近 30篇 Tel (0871) 5332956
E-mail szq2000@yahoo.com Fax (0871) 5377271