

川乌配伍防己对动物免疫功能的调节作用

张少华,秦 林,薛 玲,王 平*

(山东中医药大学,山东 济南 250014)

摘要:目的 观察川乌配伍防己对动物免疫功能的影响,探讨寒热配伍的免疫作用。方法 采用免疫变态反应性炎症模型及小鼠迟发性超敏反应(DTH)模型,并检测小鼠单核巨噬细胞(M Φ)吞噬功能和特异性抗体生成等。结果 川乌配伍防己既可明显抑制免疫增高小鼠DTH,明显抑制大鼠佐剂继发性关节炎,又明显提高免疫低下小鼠M Φ 吞噬功能,而各单味药则无明显作用。另外,对特异性体液免疫的影响,单味防己有明显促进作用,而乌防配伍后能明显抑制其作用。结论 川乌配伍防己对细胞免疫有双向调节作用,对体液免疫也有一定的调节作用。

关键词:川乌;防己;配伍;免疫调节;佐剂性关节炎

中图分类号:R286.95 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2003)10-0929-04

Studies on immunoregulating effect in single and compatibility with *Radix Aconiti* and *Radix Stephaniae Tetrandrae*

ZHANG Shao-hua, QIN Lin, XUE Ling, WANG Ping

(Shandong University of TCM, Jinan 250014, China)

Abstract **Object** The immunoregulation function was studied in experimental animals to observe the effect of single and/or combined use with *Radix Aconiti* (RA) and *Radix Stephaniae Tetrandrae* (RST). **Methods** The response of delayed type hypersensitivity (DTH) in mice, the phagocytosis of abdominal macrophages (M Φ) in mice, and the production of special antibodies in mice were observed. **Results** The two Chinese materia medica (CMM) in combination use could induce the increasing of phagocytosis function of M Φ hypoinnunitic model mice, the inhibiting on the responses of DTH in the hyperinnunitic model mice and the non-immunosuppressive treated mice. On the production of special antibodies in mice, the enhance effect was found in RA used in single, and the suppressive effect was found when using the combination of the two CMM. **Conclusion** In accordance with the mechanism of the disorder between the anti-inflammation effect and the induce-inflammation effect to arthritis in the immune system, these data indicate that the bidirectional effect of combination of the two CMM used on the immune responses, may be the involved mechanism on treating arthritis.

Key words *Radix Aconiti* (RA); *Radix Stephaniae Tetrandrae* (RST); compatibility; immunoregulation; adjuvant arthritis

川乌配伍防己(以下简称乌防)是中医治疗风湿痹证的常用传统药对,也是现代治疗风湿性关节炎、类风湿性关节炎等疾病的常用寒热配伍^[1]。笔者曾报道了两药配伍能增强镇痛作用^[2],本研究进一步探讨了乌防配伍前后对免疫功能的影响

1 材料

1.1 药材:川乌为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的块根,防己为防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore的根 购自济南市中药饮片厂,本校中药鉴定教研室石俊英教授鉴定

1.2 药物制备:川乌、防己、乌防 1:1以及乌防

1:2水煎液制备见文献^[2]。4种水煎液中乌头碱和粉防己碱含量均采用薄层扫描法进行测定,结果稳定,见文献^[3]。

1.3 药品与试剂:环磷酰胺(Cyclophosphamide, Cyc),上海华联制药有限公司生产,批号 970501;2,4-二硝基氟苯(DNFB),上海金山县六塔化工厂产品,批号 850601,用时用丙酮-麻油(1:1)混合溶媒配成 10 g/L DNFB溶液;刚果红,北京化工厂产品,批号 700809,用时以生理盐水配成 1% 溶液

1.4 动物:昆明种小鼠,体重 18~22 g,雌雄各半,Wistar大鼠,体重(160 $\pm$ 20)g,雄性,均购自山东

* 收稿日期:2002-10-30
基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670868)
作者简介:张少华(1958-),男,硕士,山东中医药大学副教授,硕士生导师,主要从事中药学教学及理论研究

省医学科学院动物中心。

2 方法

2.1 对 Cyc 诱导小鼠迟发性超敏反应 (DTH) 升高模型的影响: 取小鼠 60 只, 随机分为 6 组: NS 组, Cyc+ NS 组, Cyc+ 川乌组, Cyc+ 防己组, Cyc+ 乌防 1∶1 组, Cyc+ 乌防 1∶2 组。参照文献^[4], 于致敏前 3 d 1 次 ip Cyc 250 mg/kg, 诱导 DTH 升高模型。实验当天, 参照 Corsini 法^[5]稍加改良, 于每鼠腹部去毛处涂抹 10 g/L DNFB 50 μL 致敏, 次日同法强化 1 次。致敏当天各组小鼠分别 ig 0.2 mL/20 g 相应药物, 正常对照组给等量生理盐水, 连续给药 5 d。第 6 天每鼠右耳廓内外两侧面均匀涂抹 10 g/L DNFB 10 μL 攻击, 24 h 后脱颈椎处死, 用直径 8 mm 打孔器打下左右耳廓同部位耳片, 称重以左右耳片质量之差 (mg) 为迟发型超敏反应值。结果以方差分析 *t* 检验法进行统计学处理。

2.2 对大鼠佐剂性关节炎的抑制作用: 方法参照弗氏完全佐剂性关节炎法^[6]。

2.2.1 对大鼠继发性佐剂肿胀的预防作用: 取雄性大鼠 70 只, 每鼠于左后足注射弗氏完全佐剂 0.05 mL 致炎, 一周后随机分为 7 组: NS 组, 消炎痛组, 川乌组, 防己组, 乌防 1∶1 组, 乌防 1∶2 高剂量组, 乌防 1∶2 低剂量组。各组每天等容量 ig 1 次, 体积 2 mL/200 g, 连续给药 7 d。分别于致炎前及致炎后不同时间测量体重及致炎肢和对侧肢的足跖周长, 并根据大鼠注射佐剂前后足跖周长计算足跖肿胀率, 同时观察耳和尾部病变的发生率及严重程度。

2.2.2 对大鼠继发性佐剂肿胀的治疗作用: 取雄性大鼠 70 只, 致炎、分组、给药及测量方法同 2.2.1 项。于致炎 18 d 后开始给药, 连续 7 d, 分别于致炎前及致炎后不同时间进行测量。上述大鼠足跖肿胀率均按下列公式计算, 并以方差分析 *t* 检验法进行统计学处理。

大鼠足跖肿胀率 = (炎后足跖周长值 - 炎前足跖周长值) / 炎前足跖周长值 × 100%

2.3 对免疫低下模型小鼠单核巨噬细胞 (MΦ) 吞噬功能的影响: 参照 Marchal^[7]和刘进学等^[4]方法加以改良, 取小鼠 60 只, 随机分为 6 组: NS 组, Cyc+ NS 组, Cyc+ 川乌组, Cyc+ 防己组, Cyc+ 乌防 1∶1 组, Cyc+ 乌防 1∶2 组。每天等容量 ig, 每次 0.2 mL/20 g, 在小鼠给药连续 5 d 期间, 分别于第 1, 3, 5 天, ip Cyc 70 mg/kg, 造成免疫低下模型。于末次给药 1 h 后, 参照文献^[8,9], 用肝素处理过的定量毛细管, 从小鼠眶后静脉丛取血 40 μL, 立即放

入 4 mL 蒸馏水中, 使血标本完全溶血作为空白对照管, 随即从小鼠尾 iv 刚果红溶液 0.1 mL/10 g, iv 后 30 s, 同上法取血 40 μL, 放入 4 mL 蒸馏水中, 使其完全溶血作为实验管。然后用 721 型分光光度计, 在 510 nm 波长下以空白对照管调零, 测实验管吸光度值, 计算血清刚果红含量 (mg/100 mL), 根据其含量多少说明 MΦ 吞噬功能强弱, 即含量少, 说明吞噬力强; 反之, 吞噬力弱。(刚果红标准曲线, 以回归方程计算得出 $Y = 2.6477X \pm 0.002$, $r = 0.9998$).

2.4 对小鼠血清溶血素 (抗鸡红细胞抗体) 生成的影响: 参照文献方法^[10]。取正常健康小鼠随机分为 6 组: Cyc 模型组, NS 组, 川乌组, 防己组, 乌防 1∶1 组, 乌防 1∶2 组。于免疫刺激当天开始给药, 连续给药 7 d, 于末次给药 1 h 后眶静脉取血, 离心, 取血清用生理盐水稀释 100 倍, 取上述血清 1 mL 与 5% 鸡红细胞混悬液 0.5 mL 混合, 在 0℃ 冰箱中加 10% 补体 0.5 mL, 37℃ 恒温箱中保温 30 min, 在 0℃ 冰箱中终止反应, 离心, 取上清液于 721 分光光度计 540 nm 处比色, 另设不加血清的空白管作对照。

3 结果

3.1 对 Cyc 诱导小鼠 DTH 升高模型的影响: 表 1 结果显示, Cyc 模型组明显高于 NS 组, 说明造模成功。防己组以及各配伍组均可明显抑制升高模型的 DTH, 与 Cyc 模型组有显著差异。川乌组仅有较弱的抑制倾向, 但与防己配伍后, 其抑制作用增强。

表 1 乌防配伍前后对 Cyc 诱导小鼠 DTH 升高模型的影响
Table 1 Influence of enhanced DTH caused by Cyc in mice before and after compatibility of RA and RST

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	动物/只	DTH /mg	肿胀率 /%
NS	—	10	13.1±15.4	107.38
Cyc 模型	—	8	24.9±4.9*	228.86
Cyc+ 川乌	20	9	22.0±6.0*	200.00
Cyc+ 防己	20	8	18.5±3.8△	168.18
Cyc+ 乌防 1∶1	20	10	19.0±4.2△	166.67
Cyc+ 乌防 1∶2	20	10	16.9±5.7△△	143.22

与 NS 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 Cyc 模型组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs NS group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs Cyc model group

3.2 对大鼠佐剂性关节炎的抑制作用

3.2.1 对大鼠继发性佐剂肿胀的预防作用: 表 2 结果显示, 在本实验条件下, 各单味药物组作用较弱, 对致炎肢足肿胀无明显作用, 仅对致炎肢对侧肢的

足肿胀有明显抑制作用;而各配伍组不仅能明显抑制注射局部的 9 d 后的再度肿胀,又可明显抑制对侧肢因迟发性超敏反应引起的足肿胀,并且明显强于各单味药组,有显著和非常显著的统计学意义。表明乌防配伍后对大鼠继发性佐剂关节炎的预防作用明显优于各单味药。从尾部炎性结节等情况来看,各用药组的炎性反应均较 NS 组为轻

3.2.2 对大鼠继发性佐剂肿胀的治疗作用:表 3 结果显示,各单味药对大鼠继发性佐剂关节炎的治疗作用较弱,与 NS 组比较无统计学差异;而各配伍组不仅能使注射佐剂致炎肢的肿胀程度得到迅速的明显降低,而且对另侧迟发型超敏反应性足肿胀,也有显著的抑制作用,与 NS 组比较均有显著和非常显著的统计学意义;与各单味药组比较也有统计学差异。表明在本实验条件下,单味药没有明显的抑制作用,而配伍以后的治疗作用显著增强

表 2 乌防配伍前后对大鼠继发性佐剂关节炎的预防作用 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Prevention on secondary adjuvant arthritis in rats before and after compatibility of RA and RST ($\bar{x} \pm s, n=10$)										
组 别	剂量 $/(g \cdot kg^{-1})$	致炎后不同时间足跖肿胀率 %								
		药 前			药 后					
		1 d	3 d	7 d	9 d		11 d		13 d	
		左足	左足	左足	左足	右足	左足	右足	左足	右足
NS	-	25.3±7.0	23.9±6.5	25.7±9.1	30.5±10.6	13.7±7.5	35.0±9.7	9.3±5.9	38.7±8.7	10.8±3.9
消炎痛	0.1	25.1±8.6	20.6±6.2	22.8±6.4	18.8±9.2*	2.6±1.8*	20.3±10.1	3.6±2.7*	21.4±9.0*	3.1±2.6*
防己	20	23.3±7.9	28.4±8.8	28.6±8.9	30.0±9.4	6.4±4.2*	32.4±9.8	8.5±4.2	31.2±7.4	6.4±4.2*
川乌	20	25.6±3.9	24.1±6.1	26.8±4.8	28.4±7.2	3.6±1.7*	31.0±7.1	5.9±2.7	33.2±11.7	3.4±2.5*
乌防 1:1	20	25.9±6.6	26.2±4.2	23.7±6.6	23.2±4.7*	4.6±2.9*	24.7±6.7	3.5±2.9*△	21.3±8.5*△▲	3.5±2.8*
乌防 1:2	20	26.5±7.4	27.2±5.1	24.4±8.3	20.3±4.1*△▲	3.4±2.8*	21.3±6.1*△▲	3.9±2.9*▲	20.3±5.5*△▲▲	2.1±3.4*▲
	10	25.7±4.6	25.6±9.3	23.5±5.2	17.8±8.8*△▲	2.1±1.6*▲	17.3±8.9*△▲▲▲	2.5±1.8*▲▲	21.3±8.2*▲	1.6±1.7*▲

与 NS 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与川乌组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$; 与防己组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ [乌防 1:2 配伍组,根据药物水煎液中川乌含量的高低分为高、低剂量组 (20, 10 g/kg)]

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs NS group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs RA group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs RST group [Group of combining RA and RST (1:2) were divided into high-dosage group and low-dosage group (20, 10 g/kg)]

表 3 乌防配伍前后对大鼠继发性佐剂关节炎的治疗作用 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Treatment on secondary adjuvant arthritis in rats before and after compatibility of RA and RST ($\bar{x} \pm s, n=10$)										
组 别	剂量 $/(g \cdot kg^{-1})$	致炎后不同时间足跖肿胀率 %								
		药 前			药 后					
		1 d	11 d	18 d	20 d		22 d		25 d	
		左足	左足	左足	左足	右足	左足	右足	左足	右足
NS	-	24.6±7.8	28.8±11.3	31.7±12.2	34.5±9.8	5.5±2.9	31.5±6.8	7.2±2.3	26.3±6.0	5.8±1.8
消炎痛	0.1	26.4±9.8	30.4±8.3	29.9±8.0	22.9±7.7	4.6±3.6	21.1±6.6*	3.3±2.2*	14.9±8.5*	2.6±1.6*
防己	20	23.3±4.6	27.9±6.9	28.9±5.3	27.4±7.3	5.3±3.5	27.4±7.8	5.6±1.8	23.6±7.2	4.6±1.7
川乌	20	24.4±7.7	27.6±10.8	27.0±8.5	27.5±9.8	4.5±3.6	28.3±9.9	5.7±2.6	24.9±5.8	3.8±1.6
乌防 1:1	20	23.1±3.3	29.5±9.3	28.2±10.1	24.6±7.5*	3.3±1.9	21.7±6.0*	4.4±1.3	17.4±6.1*△	4.5±3.7
乌防 1:2	20	25.8±7.4	28.4±8.3	29.8±7.2	20.7±9.1*	1.9±1.7*△▲	18.2±6.9*△▲	4.5±2.1*	16.7±5.7*△	2.3±2.9
	10	26.9±8.4	30.3±9.7	30.3±10.9	21.1±6.9*	3.2±2.8	20.9±4.4*	3.2±2.5*▲	18.5±6.3	3.2±2.4

同表 2 注

Note is same to Table 2

表 4 乌防配伍前后对免疫低下小鼠单核巨噬细胞吞噬功能的影响

Table 4 Influence of phagocytosis function of MΦ in hypoimmune model mice before and after compatibility of RA and RST		
组 别	剂量 /($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	血清刚果红含量 /($\text{mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$)
NS	—	1. 09± 0. 257
Cyc模型	—	1. 507± 0. 254 *
川乌	20	1. 395± 0. 185 *
防己	20	1. 345± 0. 172 *
乌防 1∶ 1	20	1. 146± 0. 188 ^{△△▲▲}
乌防 1∶ 2	20	1. 213± 0. 154 ^{△△▲}

与 NS组比较: ** $P < 0. 01$; 与 Cyc模型组比较: $\triangle\triangle P < 0. 01$;
与川乌组比较: $\blacktriangle P < 0. 05$ $\blacktriangle\blacktriangle P < 0. 01$
** $P < 0. 01$ vs NS group; $\triangle\triangle P < 0. 01$ vs Cyc model group;
 $\blacktriangle P < 0. 05$ $\blacktriangle\blacktriangle P < 0. 01$ vs RA group

表 5 乌防配伍前后对小鼠溶血素生成的影响

Table 5 Influence of production of hemolysin in mice before and after compatibility of RA and RST

组 别	剂量 /($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	A 值
Cyc阳性	0. 01	0. 124± 0. 092
NS	—	0. 264± 0. 143
川乌	20	0. 330± 0. 140
防己	20	0. 646± 0. 296 *
乌防 1∶ 1	20	0. 326± 0. 170 ^{△△}
乌防 1∶ 2	20	0. 405± 0. 182 [△]

与 NS组比较: * $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$; 与防己组比较: $\triangle P < 0. 05$ $\triangle\triangle P < 0. 01$
* $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$ vs NS group $\triangle P < 0. 05$ $\triangle\triangle P < 0. 01$ vs RST group

4 讨论

类风湿性关节炎(风湿痹证)等慢性关节炎炎症的发病机制与机体免疫调节紊乱密切相关。单独应用抗炎药、免疫抑制药或免疫增强药,疗效均欠佳,长期应用还可能加重病情,延长病程^[11]。现代医学逐渐重视抗炎免疫调节药物的研究,但至今未取得突破性进展,因此,寻找抗炎免疫调节药是抗炎药理的重要发展方向之一^[11]。

中药的多重生物活性以及药物配伍,在治疗免疫功能紊乱的慢性炎症疾病方面具有突出的优势

其机制在于调整阴阳寒热,疏通气血经络^[1]。本研究已初步发现寒热配伍对免疫功能有较为明显的调节作用。表现为乌防配伍对细胞免疫有较明显的抑制和促进双向作用,而各单味药未表现明显作用。另外乌防配伍后,能显著抑制单味防己对特异性体液免疫的促进作用,表现出明显的调节单味药的作用。说明乌防配伍能抑制机体对免疫复合物的超敏反应,但无广范围的免疫抑制或影响作用。以上作用可能是乌防配伍在痹证治疗中能够提高抗炎作用、缩短病程、降低毒副作用的重要药理机制之一。上述研究所体现的免疫调节机制值得进一步深入探讨。

References

[1] Qin L, Peng X. The significance for treating arthralgia-syn-drome used in combination with cold natural drugs and heat natural drugs [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(2): 112-114.

[2] Zhang S H, Peng X, Qin L, *et al.* Studies on the analgesic effect of the TCM prescription of a combination of monks-hood root plus peony root and monkshood root plus tetrandra root [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(8): 595-598.

[3] He W, Qin L, Si S Y. Determination of aconitine and tetran-drin in separate and compatible decoction of *Radix Aconiti* and *Radix Stephaniae Tetrandrae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(7): 600-602.

[4] Liu J X, Yuan S R, Zhan Y H, *et al.* Influence of water ex-tract of *Emery Formicisina* on delayed type hypersensitivity in mice [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1996, 31(11): 658-660.

[5] Corsini A C, Bellucci S B, Costa M G, *et al.* A simple method of evaluating delayed type hypersensitivity in mice [J]. *Immunol Methods*, 1979, 30(4): 195-199.

[6] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Pub-lishing House, 1992.

[7] Marcha L G, MiLon G, Hurtrel B, *et al.* Titration and cir-culation of cells mediating delayed type hypersensitivity in normal and cyclophosphamide treated mice during response to sheep red blood cells [J]. *Immunology*, 1978, 35(4): 981-984.

[8] Yan X Z, Zhao L, Yang Y L. Study on experimental method of evaluating phagocytosis of congo-red in mice [J]. *J Bei-jing Coll Tradit Chin Med* (北京中医学院学报), 1982 (1): 40-42.

[9] Huang W Y, Li P. Experimental observation of phagocytosis of congo-red in mice [J]. *J Shandong Coll Tradit Chin Med* (山东中医学院学报), 1986, 10(Special issue): 78.

[10] Li Y K. *Methodology of Chinese Materia Medica in Pharma-cological Experiment* (中药药理实验方法学) [M]. Shang-hai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1991.

[11] Xu S Y, Wei W, Liang J S. Actuality of studies on anti-in-flammatory and immunological pharmacology in China [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1992, 8(3): 161-165.