

当归芍药散对小鼠免疫功能的影响

寇俊萍, 华敏, 严永清(中国药科大学中药复方研究室, 江苏 南京 210038)

摘要:目的 研究当归芍药散(DSS)对小鼠免疫功能的作用,为临床用于老年性痴呆的防治提供一定依据。方法 采用亚急性衰老小鼠胸腺指数、2,4,6-三硝基氯苯诱导小鼠迟发性变态反应(PC-DTH)、炭粒廓清、溶血素生成及体外脾淋巴细胞增殖等实验,观察DSS对机体免疫功能的影响。结果 DSS明显升高D-半乳糖所致亚急性衰老小鼠降低的胸腺指数,显著增强醋酸泼尼松龙所致免疫抑制小鼠由2,4,6-三硝基氯苯诱导的迟发型变态反应(PC-DTH)反应能力;体外对小鼠脾淋巴细胞增殖有一定促进作用;而对正常及免疫功能抑制小鼠炭粒廓清及溶血素生成均无明显影响。结论 当归芍药散对免疫系统具有一定选择性作用,主要增强细胞免疫功能。

关键词:当归芍药散(DSS);免疫功能;老年性痴呆

中图分类号:R285.5;R967

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2003)03-0171-03

Effect of DSS on immune function in mice

KOU Jun-ping, HUA Min, YAN Yong-qing(Department of Chinese Complex Prescription, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE The effects of DSS on the immune function in mice were observed so as to provide some evidence for its therapeutic application in senile dementia. **METHOD** A series of experiments were performed to show the effects of DSS on immune function, including thymus index determination in aged mice induced by D-galactose(D-gal), delayed type hypersensitivity induced by picryl chloride(PC-DTH), carbon clearance and hemolysin detection in vivo and lymphocyte proliferation *in vitro*. **RESULTS** DSS significantly increased thymus index suppressed by D-gal, enhanced PC-DTH inhibited by Pred, and stimulated lymphocytes proliferation *in vitro*. Meanwhile DSS had no markable effect on carbon clearance and hemolysin production in normal and immunosuppressed mice. **CONCLUSION** DSS had the selective regulation on immune system, and mainly affected cellular immunity, which is beneficial for its therapeutic application in senile dementia.

KEY WORDS:DSS; immune function; senile dementia

当归芍药散源自《金匱要略》,具有养血疏肝、健脾利湿、通络血脉、和血利水等功效,临床广泛应用于妇科多种疾病^[1,2],因近年来日本学者将该方用于老年性痴呆的治疗而备受瞩目^[3],而国内有关该方这方面的报道较少。本研究室自1996年以来,对该方防治老年性痴呆的药效、毒理、制剂及质量标准进行系统研究,前期试验结果表明,该方可改善多种因素所致动物记忆损伤^[4-6]。鉴于老年性痴呆的发病与机体免疫功能异常有一定关系^[7,8],本实验初步观察了该方对免疫功能的影响,为临床用于防治老年性痴呆提供部分实验依据。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

当归芍药散(DSS)水提物浸膏干粉制备方法,提供单位同前^[5],体内实验用蒸馏水配制所需浓度,体外实验以含10%小牛血清1640培养基配制相应浓度,0.22 μ m微孔滤膜

过滤除菌备用,实验所用剂量以粉末计。

D-半乳糖(D-galactose, D-gal),上海试剂二厂,批号:921212;维生素E胶丸(vitaminE, VitE),浙江新昌制药厂,批号:941025;醋酸泼尼松龙(prednisolone acetate, Pred),上海第九制药厂,批号:960809;环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy),上海华联制药有限公司,批号:960314;2,4,6-三硝基氯苯(picryl chloride, PC),日本东京化成工业株式会社;羊红细胞,江宁县血防站;PRMI1640培养基, GIBCO公司;新生牛血清,南京卫岗血清厂;刀豆球蛋白A(ConA), Sigma公司,批号:11028-71-0;噻唑蓝(MTT),上海伯奥生物科技公司分装,批号:970408。

1.2 动物

昆明种小鼠,18~20g,25~30g,雌性或雄性;雄性ICR小鼠,16~20g;成年豚鼠雌雄兼用350~400g,均由中国药科大学新中新药研究中心动物室提供,合格证号:苏动质

1.3 仪器

LGR-4.2 台式冷冻离心机,北京医用离心机厂;7550 紫外-可见分光光度计,上海分析仪器厂;DG3022A 型酶联免疫检测仪,华东电子管厂。

2 方法与结果

2.1 对 D-半乳糖所致亚急性衰老小鼠胸腺指数的影响^[9]

雄性 ICR 小鼠 50 只,体重(18.2 ± 2.2)g,随机分成 5 组:正常对照组,亚急性衰老小鼠模型组, VitE100 mg/kg 组, DSS250 mg/kg 组及 500 mg/kg 组,分别 ig 给予等容量蒸馏水、VitE100 mg/kg, DSS500, 250 mg/kg,同时除正常对照组 sc 等容量无菌 NS 外,其余各组分别 sc5% D-半乳糖每只每天 0.1 mL/10g,连续 42d。末次给药 1h 后,断头处死摘取胸腺,称重并计算胸腺指数。由表 1 可见:亚急性衰老小鼠模型组胸腺指数显著降低, DSS 250 mg/kg 组和 500 mg/kg 组小鼠胸腺指数明显升高,提示 DSS 可显著增强亚急性衰老小鼠降低的细胞免疫功能。

表 1 DSS 对亚急性衰老小鼠胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effect of DSS on thymus index of subacutely aged mice induced by D-galactose. ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	胸腺指数 (mg/10g)
对照组		19.4 ± 5.0
模型组		13.0 ± 3.7 ¹⁾
VitE 组	100	18.5 ± 4.2
DSS 组	250	21.2 ± 4.7 ²⁾
	500	19.9 ± 3.7 ²⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.05$; Compared with control group, ²⁾ $P < 0.01$

2.2 对 Pred 所致免疫抑制小鼠 PC-DTH 的影响^[10]

雌性昆明种小鼠 40 只,体重(26.7 ± 1.6)g,腹部刮毛涂以 1%PC 无水乙醇溶液 100μL 进行致敏,然后随机分成 4 组:正常对照组,模型组, DSS250 mg/kg 组和 500 mg/kg 组,分别 ig 给予等容量蒸馏水, DSS250, 500 mg/kg,同时正常对照组 im NS,其余各组 im Pred 10 mg/kg, 5d 后以 1%PC 橄榄油溶液 30μL 涂于右耳进行攻击, 24h 后打耳片称重,以左右耳重量差反映 DTH 强度。由表 2 可见: Pred 模型组与对照组比较小鼠耳肿胀显著减轻, DSS250 mg/kg 组与 Pred 模型组比,小鼠耳肿胀显著增加,提示 DSS 具有明显增强免疫抑制小鼠 PC-DTH 作用。

表 2 DSS 对 Pred 所致免疫抑制小鼠 PC-DTH 反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Effect of DSS on PC-DTH of immunosuppressed mice induced by Pred. ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	左右耳重量差 (mg)	抑制率 (%)
对照组		12.14 ± 6.18	
Pred 模型组	10	4.00 ± 2.45 ¹⁾	67.05
DSS + Pred 组	250 + 10	9.00 ± 3.40 ²⁾	25.86
	500 + 10	6.64 ± 2.90 ³⁾	45.30

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; Compared with control group, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$

2.3 对小鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响

取 18g 雌性 ICR 小鼠,断头处死,无菌取脾,按文献[11]制备脾细胞悬液,调整细胞浓度为 4×10^6 /mL,接种于 96 孔平底细胞培养板,每孔 100μL,再分别加入 ConA8μg/mL, DSS25, 50, 100 及 200μg/mL 药液 100μL,每组做三个复孔,于 5%CO₂, 37℃ 培养箱中培养 72h。结束前 4h,每孔吸去 100μL 上清,加入 100μL 1 mg/mL MTT,结束时 1000rpm 离心 10 min,吸去上清,每孔加入 100μL 二甲亚砜,于酶标仪测定 A₅₇₀,并按公式 = 给药组吸光度/空白组吸光度,计算细胞增殖指数。由表 3 可见, DSS50μg/mL 体外能直接促进小鼠脾淋巴细胞增殖,与 4μg/mL ConA 作用相当。

表 3 DSS 对小鼠脾淋巴细胞体外增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 3 Effect of DSS *in vitro* on proliferation of spleen lymphocytes in mice. ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 (μg/mL)	A ₅₇₀	增殖指数
空白对照组		0.14 ± 0.01	
ConA 组	4.0	0.24 ± 0.03 ¹⁾	1.71
DSS 组	12.5	0.19 ± 0.06	1.35
	25.0	0.15 ± 0.02	1.07
	50.0	0.22 ± 0.02 ¹⁾	1.57
	100	0.21 ± 0.08	1.50

注:与正常对照组比较 ¹⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with normal group ¹⁾ $P < 0.01$

2.4 对正常及 Cy 所致免疫抑制小鼠溶血素生成的影响^[12]

雌性 ICR 小鼠 60 只,体重(20.5 ± 1.6)g,随机分为 6 组:正常对照组, Cy 模型组, DSS250 mg/kg 组及 500 mg/kg 组, DSS250 mg/kg 治疗组及 500 mg/kg 治疗组,分别 ig 给予等容量蒸馏水, DSS250, 500 mg/kg,连续 8d。给药 d2 ip 羊红细胞致敏, d2 ~ 4 模型组及 DSS250, 500 mg/kg 治疗组连续 sc Cy 20 mg/(kg·d),正常对照组 sc 等容量 NS,末次给药后 1h 采血作溶血素测定。由表 4 可见, DSS 对正常小鼠及 Cy 所致免疫抑制小鼠溶血素生成无明显影响,提示 DSS 不影响

小鼠体液免疫功能。

表 4 DSS 对正常及 Cy 抑制小鼠溶血素生成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 4 Effect of DSS on hemolysin production in normal and Cy-suppressed mice. ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	HC ₅₀
对照组	-	85.48 ± 6.74
Cy 模型组	20	44.07 ± 12.32 ¹⁾
DSS 组	250	85.03 ± 7.35
	500	83.06 ± 11.37
DSS + Cy 组	250 + 20	38.54 ± 14.00
	500 + 20	40.15 ± 22.89

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$

2.5 对正常及 Pred 所致免疫抑制小鼠炭粒廓清的影响^[12]

雌性昆明种小鼠 30 只,体重(20.3 ± 2.0)g,随机分为 3 组,正常对照组、DSS250 mg/kg 组及 500 mg/kg 组,分别 ig 给予等容量蒸馏水、DSS250,500 mg/kg,连续 8d。末次给药后 1h 于鼠尾静脉注入稀释印度墨汁 0.1 mL/10g 体重,于注入墨汁后 2 min 及 15 min 从小鼠眼眶后静脉丛取血 20 μL,测定 A_{675} ,并摘取肝、脾称重,计算吞噬指数 $K = (lg A_{2min} - lg OD_{15min}) / (15 - 2)$ 及吞噬系数 α (校正吞噬指数) = 体重 × $K^{1/3} / (\text{体重} + \text{肝脾合重})$ 。另取雄性昆明种小鼠 40 只,体重 20.6 ± 1.8g,随机分为 4 组:正常对照组、Pred 模型组、DSS250 mg/kg 治疗组及 500 mg/kg 治疗组,分别 ig 给予等容量蒸馏水,DSS250,500 mg/kg,d5~7 正常对照组给予等容量 NS,其余各组 ip Pred 20 mg/kg,同上法测定并计算 K 及 α 。由表 5 可知,DSS 对正常及免疫抑制小鼠 K 值、 α 值无明显影响,提示 DSS 不影响小鼠单核巨噬系统功能。

表 5 DSS 对正常及 Pred 抑制小鼠炭粒廓清速率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 5 Effect of DSS on carbon clearance in normal and Pred-suppressed mice. ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	K	α
对照组	-	0.040 ± 0.007	5.269 ± 0.457
DSS 组	250	0.039 ± 0.010	5.371 ± 0.754
	500	0.040 ± 0.012	5.674 ± 0.659
对照组	-	0.048 ± 0.014	7.084 ± 1.623
Pred 组	20	0.030 ± 0.008 ¹⁾	5.197 ± 0.762 ¹⁾
DSS + Pred 组	250 + 20	0.033 ± 0.006	5.295 ± 0.554
	500 + 20	0.032 ± 0.006	5.223 ± 0.586

注:与正常对照组比较 ¹⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with normal group ¹⁾ $P < 0.01$

3 讨论

据文献报道,阿尔茨海默病(AD)患者淋巴细胞的某些功能减低,主要表现为 T 细胞对有丝分裂原刺激的反应降低等,有学者认为 AD 与免疫炎症反应具有一定相关性^[7,8]。

另外老年患者也多半伴有免疫功能异常,常出现自身免疫增强。古方当归芍药散有益气健脾之功效,方中茯苓、白术均具有调节免疫功能的作用,而关于全方对免疫功能的影响鲜见报道。本实验采用胸腺指数测定、PC-DTH 反应、炭粒廓清、溶血素生成及体外脾淋巴细胞增殖等一系列实验,初步观察 DSS 对正常及免疫抑制动物模型的单核巨噬系统、细胞免疫及体液免疫功能的影响。结果表明,长期注射 D-半乳糖所致亚急性衰老模型小鼠胸腺指数明显下降,提示细胞免疫功能降低,DSS 可逆转该模型小鼠胸腺指数的降低;并对 Pred 抑制小鼠的 PC-DTH 反应有恢复作用。值得注意的是 DSS 产生的上述作用,剂量关系不甚明显,可能与复方中药成分复杂,调节免疫作用可能存在最适剂量等因素有关。体外试验结果显示,DSS 在 12.5 ~ 100 μg/mL 对小鼠脾淋巴细胞增殖均有一定促进作用,50 μg/mL 作用最佳。但是 DSS 对正常及免疫抑制小鼠炭粒廓清及溶血素生成均无明显影响。上述结果提示,DSS 对免疫系统的影响具有一定选择性,以增强细胞免疫功能为主,这对于临床防治 AD 是有利的。关于其作用机制,尚有待进一步深入探讨。

参考文献

- [1] 李培振. 当归芍药散的应用与研究[J]. 陕西中医, 1988, 9(12): 564.
- [2] 周本宏, 罗顺德, 蔡鸿生. 当归芍药散的药理作用及临床研究进展[J]. 中成药, 1993, 15(5): 38.
- [3] 李杰芬. 日本对中药治疗老年人痴呆的研究[J]. 中药新药与临床药理, 1992, 3(2): 45.
- [4] 寇俊萍, 禹志领, 刘中, 等. 当归芍药散对小鼠学习记忆、脑内 SOD、MDA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1997, 3(4): 24.
- [5] 寇俊萍, 华敏, 朱丹妮, 等. 当归芍药散对脑缺血再灌注所致记忆损伤模型小鼠的影响[J]. 中国现代应用药学, 2001, 18(5): 343.
- [6] 寇俊萍, 金卫峰, 华敏, 等. 当归芍药散对多种记忆损伤动物模型的影响[J]. 中成药, 2002, 24(3): 191.
- [7] 杜泽英, 李晓玉. 阿尔采末病与免疫炎症反应的相关性[J]. 生理科学进展, 1998, 29(3): 253.
- [8] 李金节. 阿茨海默病的非神经系统表现[J]. 国外医学·老年医学分册, 1993, 14(6): 264.
- [9] 常蜀英, 匡培根, 张均田, 等. 绞股蓝及其单体对小鼠学习记忆的促进作用[J]. 中国药理学通报, 1988, (4): 358.
- [10] 王蓉, 徐强, 白藜皮的免疫药理研究[J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(4): 234.
- [11] 毛俊浩, 吕志良, 曾群力, 等. 白术多糖对小鼠淋巴细胞功能调节[J]. 免疫学杂志, 1996, 12(4): 233.
- [12] 戴岳, 黄罗生, 寇俊萍, 等. 养正合剂的免疫调节作用[J]. 中国药科大学学报, 1995, 26(1): 37.

收稿日期: 2002-07-16