

六味地黄汤的免疫药理研究

中国药科大学中药学院中药药理教研室(南京210009)

马世平 杭秉茜

刘越* 洪文华* 杨汉祥** 李佩珍 戴岳

提要 本文观察了六味地黄汤全方、熟地、三补、三泻的煎剂对免疫系统及红细胞免疫功能的影响。结果表明全方、熟地、三补均能减轻CRBC、DNFB、DNCB所引起的小鼠迟发型过敏反应,而对小鼠的免疫器官重量、碳粒廓清速率及血清抗体IgG的含量无明显影响;熟地、三补显著升高红细胞C_{3b}受体花环率,对强的松龙所致的C_{3b}花环率降低,熟地、三补及全方均有对抗作用,而使小鼠红细胞免疫功能回升。

关键词 六味地黄汤 迟发型过敏反应 碳粒廓清 免疫球蛋白G 红细胞免疫 C_{3b}受体

六味地黄丸对人及动物的免疫功能有一定影响^[1,2],本文对六味地黄汤及其组成药物熟地、三补、三泻对免疫功能的影响作了实验研究。

材料

药物及试剂 熟地(RR),三补(熟地+山茱萸+山药,RR+FC+RD),三泻(泽泻+丹皮+茯苓RA+CM+PO),六味地黄汤(LWDT),均按传统方法水煎;2,4-二硝基氟苯(DNFB),金山县塔化工厂产品;2,4-二硝基氯苯(DNCB),上海化学试剂公司工厂产品;地塞米松(DXM),江苏省常州第二制药厂产品;环磷酰胺(Cy),上海第十二制药厂产品;强的松龙(PDL),浙江仙居制药厂产品;冻干羊抗小鼠IgG抗血清,上海生物制品研究所产品;鲜酵母,南京发酵厂产品。

动物 C₅₇BL小鼠,体重17—19g,南京药物研究所提供。ICR小鼠,江苏省实验动物中心提供。

方法与结果

1. 对免疫器官重量的影响

取雌性C₅₇BL小鼠,给药组ig熟地6.4g/kg,三补12.8g/kg或六味地黄汤20.0g/kg,对照组给予等量生理盐水,连续7d。结果表明,熟地、三补及六味地黄汤全方对小鼠胸腺、脾脏重量与对照组比较均无明显影响。(P>0.05)

2. 血清抗体IgG含量测定

按琼脂单向扩散法^[3],羊抗小鼠IgG抗血清稀释度为1:40,待测小鼠血清按1:4稀释,每份样品加两孔,取其均值,以扩散圈的直径表示待测血清中IgG的含量。

结果表明,熟地、三补、全方对小鼠血清抗体IgG与对照组比较(P>0.05)均无明显影响。

3. 碳粒廓清速率测定

每鼠尾静脉注射经1:3稀释的印度墨汁10ml/kg,于注射后2,20min,分别从眼后静脉丛取血20μl,溶于2ml1%Na₂CO₃溶液中,静止30min后,用750-A分光光度计于680nm处测光密度,计算廓清指数K值及校正廓清指数α值。

$$K = (\log OD_1 - \log OD_2) / (t_1 - t_2)$$

$$\alpha = \sqrt[3]{K} \cdot \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重})$$

结果表明,熟地、三补、全方对小鼠血

* 1988届毕业生 ** 1989届毕业生

液碳粒廓清速率与对照组比较无明显影响 ($P>0.05$)。

4. 鸡红细胞 (CRBC) 诱发迟发型足垫肿胀

在小鼠左后足垫 $sc10\%$ CRBC $50\mu l$ 致敏, d 6 于小鼠右后足垫 SC 等量 CRBC 攻击, 24 小时后, 测量左右后足垫的厚度, 以其厚度差作为肿胀度。

给药组于 CRBC 致敏的同天开始给药, 剂量同上, 阳性对照组 im DXM 25 mg/kg , 连续 7 d, 结果, 熟地、三补, 全方组小鼠足垫肿胀度均明显低于对照组。见表 1。

Tab 1. Effect of LWDT on delayed footpad reaction to CRBC in mice ($X\pm SD$)

Drug	Dose g/kg $\times$ d	Mice	Thickness difference (mm)
Saline		7	0.21 ± 0.06
RR	6.4×7	8	$0.13\pm 0.07^{**}$
RR+FC+RD	12.8×7	9	$0.13\pm 0.04^{***}$
LWDT	20.0×7	9	$0.12\pm 0.07^{**}$
DXM	0.025×7	7	$0.10\pm 0.03^{***}$

$^{**}P<0.05$ $^{***}P<0.01$ vs saline

5. DNCB 诱发接触性皮炎

参考文献^[4], 在小鼠颈背部 SC 7% DNCB 丙酮溶液 $20\mu l$ 致敏, d 11 在小鼠右耳涂以 1% DNCB 甘油溶液 $30\mu l$ 攻击, 16h 后处死小鼠, 以直径 8 mm , 打孔器取下小鼠耳片, 以左右耳片重差作为肿胀度。

给药组于 DNCB 致敏的同天开始给药, 阳性对照组 SC Cy 25 mg/kg , 连续 10 天, 结果, 熟地与全方均显著减轻小鼠耳廓肿胀度, 三补也有抑制作用, 但差异不显著。见表 2。

Tab 2. Effect of LWDT on contact dermatitis of pinnae with DNCB in mice ($X\pm SD$)

Drug	Dose g/kg $\times$ d	Mice	Thickness difference (mg)
Saline		11	5.13 ± 1.64
RR	6.4×7	13	$2.22\pm 1.27^{***}$
RR+FC+RD	12.8×7	12	$3.62\pm 3.08^*$
LWDT	20.0×7	13	$2.92\pm 1.28^{***}$
Cy	0.025×7	13	$3.19\pm 2.33^{**}$

$^*P>0.05$ $^{**}P<0.05$ $^{***}P<0.01$
vs saline

6. DNFB 诱发接触性皮炎

参考文献^[5], 在小鼠腹部剪毛, 涂以 1% DNFB 溶液 (丙酮、甘油 $1:1$ 混合为溶剂) $50\mu l$ 致敏, d 2 同法强化一次, d 6 在小鼠右耳涂以 1% DNFB $10\mu l$ 进行攻击, 20 h 后处死小鼠, 测小鼠耳廓肿胀度如上。

给药组于 DNFB 致敏的同天开始给药, 阳性对照组于 d 1, d 3, SC Cy 25 mg/kg , 结果, 熟地与三补均显著减轻小鼠耳廓肿胀度, 全方也有抑制作用, 但差异不显著。见表 3。

Tab 3. Effect of LWDT on contact dermatitis of pinnae with DNFB in mice ($X\pm SD$)

Drug	Dose g/kg $\times$ d	Mice	Weight difference (mg)
Saline		8	22.25 ± 9.35
RR	6.4×7	10	$11.90\pm 8.09^{**}$
RR+FC+RD	12.8×7	8	$9.50\pm 11.50^{**}$
LWDT	20.0×7	10	$12.70\pm 10.47^*$
Cy	0.025×7	10	$9.20\pm 13.03^{**}$

$^*P>0.05$ $^{**}P<0.05$ vs saline

7. 红细胞 C_{3b} 受体花环率检测

参考文献^[6,7], 小鼠眼眶采血 (EDTA 抗凝), 红细胞经生理盐水洗涤三次, 稀释成 $1\times 10^8/\text{ml}$, 将经洗涤的 1% 酵母菌悬液经

定性滤纸过滤,恢复至原体积并煮沸20 min,混匀后洗涤二次,充分分散,加等量小鼠血清,37℃水浴温育15 min致敏,配成 $5 \times 10^9/\text{ml}$ $\text{C}_{3\text{b}}$ 致敏酵母菌使用液。

取上述致敏酵母菌及小鼠红细胞悬液各100 μl 混匀,37℃温育30 min,加2.5%戊二醛1滴固定,涂片,染色,镜检,计数200个红细胞,以结有2个以上酵母菌者为 $\text{C}_{3\text{b}}$ 受体花环,计算其%,即为 $\text{C}_{3\text{b}}$ 受体花环率。

给药组ig剂量及天数见表4,阳性对照强的松龙(PDL)ip给药,于给药组末次给药后24 h,小鼠眼眶采血,测定红细胞 $\text{C}_{3\text{b}}$ 受体花环率,结果,熟地、三补均能提高正常小鼠红细胞受体花环率。强的松龙可降低 $\text{C}_{3\text{b}}$ 受体花环率,熟地、三补、全方可对抗强的松龙的作用,三泻则无论对正常小鼠或强的松龙小鼠的红细胞 $\text{C}_{3\text{b}}$ 受体花环率,均不表现任何作用。见表4。(表中PDL剂量均相同)

Tab 4. Effect of LWDT on RBC $\text{C}_{3\text{b}}$ receptor rosette formation in mice ($\bar{X} \pm \text{SD}$)

Drug	Dose g/kg $\times$ d	Mice	$\text{C}_{3\text{b}}$ receptor rosette (%)
Saline		10	21.34 ± 3.05
RR	6.4×7	8	$29.69 \pm 3.53^{***}$
RR+FC+RD	12.8×7	10	$28.23 \pm 4.73^{***}$
RA+CM+PO	7.2×7	10	$21.48 \pm 7.26^*$
LWDT	20.0×7	10	$23.86 \pm 4.70^*$
PDL	$0.25 \times 1(\text{d1})$ 0.025×2 $(\text{d2}, \text{d3})$	9	$8.26 \pm 0.93^{***}$
PDL+RR	6.4×7	9	$10.51 \pm 1.59\Delta\Delta\Delta$
PDL+RR+ FC+RD	12.8×7	8	$9.87 \pm 1.13\Delta\Delta\Delta$
PDL+RA+ CM+PO	7.2×7	7	$8.03 \pm 1.00\Delta$
PDL+LWDT	20.0×7	7	$9.53 \pm 0.99\Delta\Delta$

* $P > 0.05$ *** $P < 0.01$ vs saline

$\Delta P > 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ vs PDL

讨 论

文献报道六味地黄丸的水煎液及水煎醇提液对体液免疫与细胞免疫均有增强作用^[1],但也有实验证明熟地与六味地黄丸对正常动物的体液免疫和细胞免疫均无明显影响,而能对抗环磷酰胺及地塞米松的免疫抑制作用^[2]。本文的结果表明熟地、三补及全方对正常小鼠胸腺,脾脏重量,碳粒廓清速率和血清抗体IgG水平均无明显影响,这一点与文献^[2]所述是一致的,但发现对CRBC, DNFB, DNFB所致小鼠迟发型超敏反应有显著抑制作用,说明对IV型变态反应有抑制作用。CRBC为颗粒型(或细胞型)抗原, DNFB、DNFB为化学物质,必须与机体蛋白质结合才具有抗原性,熟地、三补与全方对这两种类型抗原所致的IV型变态反应均能抑制,表明其作用无抗原特异性,可能对多种抗原引起的IV型变态反应均可起抑制作用。

熟地、三补能提高正常小鼠红细胞 $\text{C}_{3\text{b}}$ 受体花环率,熟地、三补和全方能对抗强的松龙降低红细胞 $\text{C}_{3\text{b}}$ 花环率的作用,说明能增强红细胞免疫功能。红细胞免疫是Siegel (1981)^[8]提出的新概念,红细胞膜上有补体 $\text{C}_{3\text{b}}$ 受体,循环中的抗原-抗体复合物与 $\text{C}_{3\text{b}}$ 结合后,可粘附于红细胞膜上,有利于免疫复合物的清除。文献报道地黄有治疗某些免疫性疾病的效果^[9,10],六味地黄汤及熟地、三补能提高红细胞免疫功能及抑制IV型变态反应,可能对其治疗免疫性疾病机理作部分解释。

参 考 文 献

- [1] 郑家驹等: 中成药研究, 1981, (12):28—30
- [2] 李萍等: 中国免疫学杂志, 1987, 3(5):296—8
- [3] 戴岳等: 中国药科大学学报, 1987, 18(4):301

- [4] 邓文龙等, 中草药, 1981, 12(10):468
 [5] 魏文树等, 中国药理学通报, 1987, 3(3):148—52
 [6] 郭峰等, 中华医学杂志, 1982, 62(12):715—6
 [7] 叶定江等, 中药通报, 1987, 12(3):149—52
 [8] Siegel I, et al: Lancet, 1981, 2, 556—9
 [9] 卢存寿, 中华医学杂志, 1965, 51(5):290—2
 [10] 卢存寿, 天津医药, 1966, 3(3):209—10

Immunopharmacological Study of Liuwei Dihuang Tang

Ma Shiping Hang Bingqian Liu Yue Hong Wenhua,

Yang Hanxiang Li Peizheng Dai Yue

(China Pharmaceutical University, Nanjing)

Abstract

Liuwei Dihuang Tang (LWDT) 20 g/kg and the decoction of Radix Rehmanniae(RR) 6.4 g/kg, the decoction of the mixture of Radix Rehmanniae, Fructus Corni, Rhizoma Dioscoreae (RR+FC+RD) 12.8 g/kg (These three drugs are called three tonics in LWDT) significantly inhibited the delayed type hypersensitivity reaction induced by CRBC, DNCB, DNFB in mice. But these decoctions had no effect on the weights of thymus and spleen, clearance rate of charcoal particles and serum antibody IgG in normal mice. RR and RR+FC+RD enhanced the RBC C_{3b} receptor rosette formation in mice. RR, RR+FC+RD and LWDT antagonisted the inhibitory effect of prednisolone on this rosette formation. But the decoction of the mixture of Rhizoma Alismatis, Cortex Moutan and Poria (RA+CM+PO) 7.2 g/kg (These three drugs are called three purgatives) had no effect on this rosette formation.

Key words Liuwei Dihuang Tang Delayed type hypersensitivity Charcoal clearance
 IgG Red cell immune function C_{3b} receptor