

补阳还五汤对气虚血瘀型小鼠免疫功能影响的实验研究

朱晓晨¹ 田昕¹ 杨傲然²

(1 北京中医药大学基础医学院,北京市北三环东路11号,100029; 2 北京市中西医结合医院神经内科)

摘要 目的:观察补阳还五汤对细胞免疫影响及清除免疫复合物的作用,验证补阳还五汤可提高免疫功能、修复血管内皮的损伤。方法:将小鼠随机分为正常组、模型组和治疗组,治疗组给予补阳还五汤,Elisa法测CIC循环免疫复合物的含量,镜下观察E花环形成率,吞噬细胞的吞噬率。结果:补阳还五汤治疗组的循环免疫复合物的含量、E花环形成率、吞噬细胞的吞噬率与模型组相比, $P < 0.05$,有统计学意义,与正常组比较, $P > 0.05$,无统计学意义。结论:补阳还五汤可以提高红细胞受体活性,减少循环免疫复合物含量,增强小鼠腹腔的巨噬细胞的吞噬功能。

关键词 免疫功能;补阳还五汤;气虚血瘀

Buyang Huanwu Tang on the Immunological Function of Mice with Qi Deficiency and Blood Stagnancy

(Zhu Xiaochen¹, Tian Xin¹, Yang Aoran²)

(1 College of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Add.: No. 11, East of North 3rd Ring Road, Beijing Post code: 100029; 2 Neurology Department, Beijing Integrative Chinese and Western Medicine Hospital)

Abstract Objective: To observe the impact of Buyang Huanwu Tang on cell immunity and immune complex clearance in order to confirm its effect on immunological functions. **Methods:** The model of qi deficiency and blood stagnancy was established on mice. The treatment group received Buyang Huanwu Tang, and was controlled by a normal group and a model group. We determined the content of circulating immune complex (CIC), calculated E-rosette forming rates, and phagocytic rates. **Results:** Of the abovementioned parameters, the treatment group was significantly different with the model group ($P < 0.05$), and statistically the same with the normal group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Buyang Huanwu Tang can stimulate erythrocyte receptor activity and phagocytic function, and reduce CIC content.

Key Words Immunological function/ Buyang Huanwu Tang; Qi deficiency and blood stagnancy

补阳还五汤是清代王清任的名方,主要由黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、桃仁、红花组成,主治证属气虚血瘀的中风,对于恢复期或是后遗症期的患者效果甚佳。现代研究表明,动脉粥样硬化及高血脂是中风的病理基础,它是由于各种刺激因素导致的血管内皮的功能障碍甚至损伤,是一种发生在内皮上的炎性反应,而炎症与免疫是一个问题的两个侧面,两者不可重叠不可分割^[1]。本实验通过检测T淋巴细胞E花环的形成,血中循环免疫复合物清除率和吞噬细胞功能等指标,来讨论补阳还五汤对于小鼠机体免疫功能的影响。

1 材料与方

1.1 实验动物与分组 小鼠30只,由北京市维通利华实验动物技术有限公司提供,雄性,体重20~24g,随机分为正常组、模型组、治疗组3组,每组各10只。

1.2 主要试剂与仪器 Invitrogen CIC Elisa试剂盒,上海亚培生物科技公司提供。SRBC(绵羊红细胞悬液)由北京大学动物实验室提供。BECKMAN COULTER AD340酶标仪(美国),nikon显微镜(日本)由北京中医药大学科研中心提供。

1.3 造模 正常组不予特殊处理,自由饮水、摄食。按照文献^[2]介绍的方法对模型组和治疗组进行造模,

都进行饥饿性喂食,量为正常组的60%。模型组和治疗组全部小鼠,每天固定时间给予0℃水中游泳5min,持续2个星期。同时,给予治疗组补阳还五汤浓缩煎剂(按照黄芪:当归尾:赤芍:地龙:川芎:红花:桃仁=40:2:2:1:1:1:1的比例,使每1mL含35mg药物剂量),按20g/kg等效剂量,给予0.5mL灌胃,每日1次,连续12天。

1.4 指标检测 CIC循环免疫复合物用Invitrogen CIC Elisa试剂盒进行测定,采用AD430酶标仪检测OD值,进行数据统计。E花环试验(微量全血法)^[3]:摘眼球取血,取0.1mL至1.5mL的Tris-NH₄Cl缓冲液充分混匀,37℃水浴10min混匀,离心2000r/min 5min,弃上清液,加Hank液3mL混匀,离心500r/min 10min,同样洗涤2次,末次弃上清液加Hank液0.2mL。向以上细胞悬液中加入1%SRBC悬液及小牛血清各0.2mL混匀,37℃水浴15min,离心500~1000r/min 5min放4℃冰箱过夜,次日涂片计算。计数200个淋巴细胞中形成花环的百分数,凡结合3个或3个以上SRBC者为阳性花环形成细胞。吞噬细胞检测^[3]:在处死小鼠前72h,每只小鼠腹腔注射5%可溶性淀粉0.6mL,处死前每只小鼠腹腔注射1%SRBC 0.6mL。实验时,处死小鼠,每只腹腔注射1.4mL生理

盐水,轻揉 2min,腹部剪口并撕开,用吸管吸腹腔液 1mL,水平涂片,放在湿盒内与 37℃温箱孵育 30min,生理盐水冲洗玻片,干燥后瑞氏染色镜下计数 200 个细胞,计算吞噬百分率和吞噬指数。按公式计算:吞噬百分率 = 200 个巨噬细胞中吞噬 CRBC 的巨噬细胞数 / 200(巨噬细胞数) × 100%。

2 统计学方法

用 SPSS11.0 软件进行方差齐性检验,两两比较, $P < 0.05$ 有统计学意义。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

表 1 各组小鼠免疫指标的实验结果 ($\bar{x} \pm sd$)

组别	样本	CIC 循环免疫复合物	RBC - C3bRR (%)	巨噬细胞吞噬百分率 (%)
正常组	7	39.753 ± 0.720	20.585 ± 1.056	17.437 ± 0.544
模型组	8	51.741 ± 1.764*	17.592 ± 0.689*	14.819 ± 0.437*
治疗组	7	41.863 ± 0.735 ^Δ	20.237 ± 1.109 ^Δ	17.993 ± 0.910 ^Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,有统计学意义;与模型组比较,^Δ $P < 0.05$,有统计学意义。

3 结果

由表 1 可知,气虚血瘀型的小鼠的模型复制是成功的,在服用补阳还五汤后可以提高 C3b 受体花环形成率,红细胞的黏附作用增强;体内的循环免疫复合物的含量降低,从而减少对血管内皮的损伤;能提高巨噬细胞的吞噬率,增强机体损伤的恢复能力。以上指标均接近于正常组水平。

4 讨论

清代王清任的补阳还五汤,作为气虚血瘀的代表方剂,有明显的补气活血之效。方由黄芪、党参、茯苓、远志、川芎等中药组成。大剂量的黄芪、党参功擅补元气;桂枝温通心脉,升提阳气;茯苓为“治痰主药”活血利水,可行气利水;远志宁心安神化痰通窍;赤芍、川芎不仅活血行气且有升散之性,还可活血而不留瘀,是活血化瘀之要药。全方具有益气活血之效,化瘀通络之功。模型组和补阳还五汤组给予小鼠饥饿、劳累、冰冷

等因素,符合中医理论中,劳则耗气,而气随血行,气不行血则滞。且脾为后天之本,使其饥饿则小鼠水谷精微生化乏源,气不得充,更加上寒冷,主收敛凝滞,成功复制了气虚血瘀的模型。

免疫功能是机体识别和清除抗原性异物以维持内环境稳定的一种生理功能,是机体抵抗外邪的强有力的屏障,由特异性免疫和非特异性免疫组成。T 淋巴细胞表面具有 SRBC 抗体,在一定条件下,SRBC 可与 T 细胞表面 SRBC 抗体相结合形成花环,其敏感性高,特异性好,通过 E 花环生成实验检测了外周血 T 细胞的百分率,是衡量机体免疫功能的一个指标^[3]。而吞噬细胞具有对异物的吞噬和消化功能,是机体遇到外邪侵入的一道天然的有力屏障,属于非特异性免疫系统,同时参与特异性免疫活动^[4],通过吞噬细胞吞噬的 SRBC 数量,可以反映出吞噬细胞的活跃度和细胞的吞噬能力,也能反应机体的免疫状态。

从结果来看,模型组的 E 花环形成率和吞噬指数都相应的减低,而血中循环免疫复合物的含量却明显升高,气虚血瘀模型的免疫能力是下降的,而经补阳还五汤治疗后各组指标与正常组无统计学意义。实验表明,服用补阳还五汤可防止机体免疫功能的降低,维持接近正常的生理和代谢状态,服用补阳还五汤还可以提高机体免疫能力,对于临床中利用补阳还五汤来提高患者的免疫状态有着重要的指导意义。

参考文献

[1]徐叔云. 抗炎免疫药理学研究十年进展. 中国药理学通报,1996,12(1):1-6.
 [2]王键,赵辉,李净,等. 多因素复合作气虚血瘀证脑缺血动物模型的实验研究. 中国实验动物学报,2001,9(4):216-220.
 [3]邱全球,关洪全. 医学免疫学与病原生物学[M]. 科学出版社,2005(1):501,505.
 [4]黄海燕,朱勇. 应用红细胞花环形成试验筛选肿瘤膜抗原单克隆抗体. 第四军医大学学报,2004,25(14):1343.

(2009-11-04 收稿)

2010 年全国中医药工作会议在京召开

2010 年全国中医药工作会议 1 月 14 日在京召开。中共中央政治局常委、国务院副总理李克强对本次会议作重要批示。卫生部副部长、国家中医药管理局局长王国强在会上宣读了李克强的批示。卫生部党组书记张茅就全国中医药工作作了讲话,王国强全面部署了今年的中医药工作。

李克强在批示中说,2009 年,全国中医药系统坚决贯彻中央决策部署,积极参与医药卫生体制改革,各项成绩令人鼓舞。尤其在防治甲型 H1N1 流感疫情中,中医药发挥了独特作用,成效显著。新的一年,医药卫生事业改革发展任务艰巨,是医改关键之年。希望中医药系统深入贯彻落实科学发展观,把满足人民群众对中医药服务的需求作为出发点,推动中医药继承与创新,提升中药产业技术水平,增强对基层的服务能力,在医药卫生体制改革中发挥特有作用,努力开创中医药事业持续健康发展的新局面!

总后卫生部副部长陈新年,国家中医药管理局副局长吴刚、于文明、李大宁、马建中,局党组成员王志勇出席会议。

广西壮族自治区副主席李康,宁夏回族自治区副主席姚爱兴出席下午会议并作大会经验交流。

(洪志强)