

中药地黄饮子对小鼠抗体激发水平的影响*

邵 扬¹ 陈 晨² 刘 辉^{2△} 张广耘³ 袁 晓³(1 大连医科大学 研究生院 辽宁 大连 116044; 2 大连医科大学 临床免疫学教研室 大连 116044;
3 青岛市立医院 口腔科 山东 青岛 266071)

摘要 目的:探讨地黄饮子对小鼠抗体激发水平的影响。**方法:**将 40 只经卵核蛋白免疫过的小鼠随机分 A、B 两组,分别灌服地黄饮子和葡萄糖,1 次/d,每次 0.5 mL 只,连续 7 d 后,加强免疫,再经 7 d,用 ELISA 法检测血清中相应抗体生成水平。**结果:**与葡萄糖组比较,地黄饮子组小鼠抗体水平升高,差异有显著性意义($P<0.05$)。**结论:**地黄饮子有可能促进小鼠抗体激发水平和免疫水平的提高。

关键词:地黄饮子;免疫;中药药理

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-465-03

The Effects of Dihuang Drink on the Level of Antibody in Mice*

SHAO Yang¹, CHEN Chen², LIU Hu^{2△}, ZHANG Guang-yun³, YUAN Xiao³

(1 Graduate School of DaLian Medical University Dalian 116044, China; 2 Department of Clinical Immunology Dalian Medical University DaLian 116044, China; 3 Department of stomatology QingDao Municipal Hospital QinDao 266071, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of Dihuang drink on Antibody in mice. **Methods:** 40 mice immunized by egg protein were randomly divided into groups A and group B, administered with Dihuang drink and glucose individually, respectively. The dose was 0.5 mL for each mouse one day and lasted for 7 days. To strengthen immunization for another 7 days. The antibody to egg protein was detected and repeated. **Results:** Compared with group B, the antibody of mice of group A were high, and had statistic meaning ($P<0.05$). **Conclusion:** Dihuang drink was possible to stimulate levels of antibody and immunity in mice.

Key words: Dihuang drink; Immunization; Pharmacology of chinese materia medica

Chinese Library Classification(CLC): R285.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)03-465-03

前言

地黄引子出自宋代刘河间的《素问·宣明论方》,主治舌体强硬不能言语,筋骨软弱不能行走,病人口干但不思饮,脉象沉、细、弱,具有滋肾阴,补肾阳,化痰开窍的功能,用于暗痱症并具有抗衰老延年益寿之功效。近年来地黄饮子广泛用于脑血管溢外及老年痴呆等老年神经系统疾病治疗^[1-3]。临床应用除涉及内科的神经系统、内分泌系统、泌尿系统、循环系统的疾病外,已广泛涉及皮肤科、儿科、男科等领域^[4]。其的药理作用已被较多的研究所证实^[5-6],但其是否具有免疫调节的作用和调节途径的机尚未有研究报告,对于主要用于老年病治疗的中药名方其免疫调节作用不能忽视。本实验采用地黄饮子水煎剂灌胃的给药途径,用酶联免疫法检测抗体受抗原刺激时的生成水平,观察地黄饮子对小鼠体液免疫功能可能的影响。

中药的免疫调节作用一直是中药药理作用的研究热点,究其原因可能主要是由于中药的免疫调节作用确实有长于西药之处^[7-10]。此外,中药的免疫调节作用可以用于抗炎、抗肿瘤等作为其辅助效应,因此对中药的免疫条件作用的研究可以作为中西医结合研究的突破口。

1 材料和方法

1.1 中药的选择

中药水煎剂的制备:取 20 g 中药地黄饮子(成药由大连市中医院提供,经大连药检所鉴定为正品),置于 1000 mL 的玻璃烧杯中,加水 500 mL;浸泡 1 h 后。置于火上煎熬。先武火煮沸以后改为文火,再煎熬 30 min 后熄火,用纱布滤出药液。再向烧杯内加水 300 mL,用同样的方法煎熬。将两次滤液混合后置于火上,浓缩成 100 mL,制成含生药 20% 的药液。将该药液密封,置于冰箱冷藏保存,以备。

1.2 实验动物

昆明种小鼠,40 只,雄性,体重 18~22 g(由大连医科大学试验动物中心提供)。

1.3 试剂与仪器

卵核蛋白抗原(由大连医科大学免疫实验室提供);冻干辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 BALB/C IgG 结合物(卫生部北京生物制品研究所制品);底物显示剂 A、B(A:双氧水;B:四甲基联苯胺)(北京科卫出品);终止液(上海科华出品);酶标仪(Reader230s 全自动酶标仪)。

1.4 实验方法

* 基金项目:辽宁省教育厅科技发展基金资助(990221063)

作者简介:邵 扬(1983-),女,硕士研究生;Tel:15166421926;E-mail: shaoyang8306@yahoo.com.cn

△通讯作者:刘 辉,教授;Tel:13074152532;E-mail:liuhui60@sina.com

(收稿日期:2010-11-02 接受日期:2010-11-25)

将 40 只小鼠随机分 2 组,每组 20 只,分别标记地黄饮子组(A 组),5%葡萄糖组(B 组)。第 1 天将所有小鼠腹股沟皮下注射卵核蛋白,0.2 mL / 只。然后每天于固定时间进行灌胃,A 组灌胃地黄饮子,B 组灌胃葡萄糖,连续灌胃 7 d,1 次 /d,每次 0.5 mL / 只。第 7 天将所有小鼠加强免疫 1 次,方法同前,7 d 后小鼠经摘眼球法取血,0.8~1.2 mL / 只,静置 30 min,2500 rpm 离心 3~5min,收集上清备用^[11-12]。

1.5 卵核蛋白抗体效价测定

测定采用酶联免疫吸附试验(ELISA)。以卵核蛋白包被酶标板,测定相应抗体水平,以 A 值表示。步骤如下:①用包被液(pH 9.6 的碳酸盐缓冲液)稀释鸡卵核蛋白,加入酶标板中,每孔 0.1 mL,4℃。24 h 后弃上清,充分洗涤 3 次,甩干;②加入定量参考品(以鸡卵核蛋白免疫的小鼠血清)及待测血清:将参考品稀释 1 倍、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍、64 倍、128 倍、256 倍(用 30%牛乳蛋白液稀释)及阴性对照分别加入酶标板中;再将待测血清稀释 100 倍(用 30%牛乳蛋白液稀释)分别加入酶标板中,每孔 0.1 mL。置 37℃ 恒温箱 30 h,取出后同前法洗涤 3 次甩干。③将辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体,用抗体稀释液

1:1200 稀释后,每孔 0.1 mL 加入酶标板中,置 37℃ 恒温箱 30 h,取出同前法洗涤 3 次,甩干。④显色:各孔内加入 A、B 底物各一滴,混匀,变色后终止反应。⑤用酶标仪,检测 A 值($\lambda =450\text{nm}$)。

1.6 数据处理及统计学方法

以参考品抗体的 A 值为横坐标,以参考品抗体浓度(分别取 lg 值记为 lgU)为纵坐标,做拟合直线方程,用直线方程将检测样品的 A 值转化为抗体单位(lgU),以抗体单位(lgU)为统计量。实验结果用 SPSS 软件协助完成,数据以均数± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据间均值比较采用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

经 2 周喂养,A、B 两组小鼠各死亡 1 只,属随机死亡,其他小鼠的精神状态正常。实验结果见表 1。A 组小鼠血清中卵核蛋白抗体生成水平明显高于 B 组($t=3.074$, $P<0.01$)。标准样品的曲线方程见图 1, $R^2>0.95$ 。

表 1 小鼠血清中产生卵核蛋白抗体的检测结果
Fig. 1 The test result of mice serum antibodies produce egg protein

分组 (group)	n	$\bar{x} \pm s$	P
地黄饮子 (A 组) Dihuang drink (groups A)	19	2.57± 0.88	0.004
葡萄糖 (B 组) Glucose(groups B)	19	2.18± 0.91	

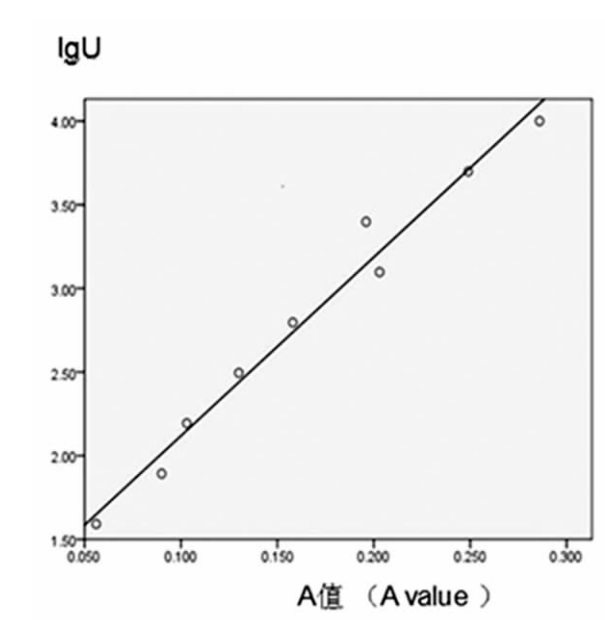


图 1 抗体检测定量效果分析图:X 轴:参考品抗体的 A 值;Y 轴:参考品抗体浓度(分别取 lg 值记为 lgU); $R^2=0.979$
Fig.1 The quantitative effect of antibody test :X-axle : Reference is tasted antibodies A value ;Y-axle: Reference is tasted antibody concentration (lg value recorded as lgU) : $R^2=0.979$

3 讨论

本实验使用免疫激发态(以抗原刺激后的免疫状态)小鼠为研究对象,研究其口服中药后抗体激发水平的变化情况。该

法灵敏度高,不用制备免疫低下动物模型,实验干扰因素小^[13-17],模拟药物作用对免疫的影响更接近真实情况,由于目前尚无公认的促进对抗体生成的药物,而且实验可控性强,类似研究一般不设阳性对照^[18-19]。给机体注射抗原后机体抗原提呈细胞将摄取抗原物质并将信息传递 T 淋巴细胞,T 淋巴细胞通过多种黏附分子和细胞因子等辅助 B 淋巴细胞转变成浆细胞,产生抗体^[20],因此对相应抗体水平能反映抗原激发免疫系统的全过程检查,特别是采用敏感的酶联免疫方法进行检测可以灵敏地反映机体的免疫水平的变化^[21-22]。抗体的产生需要 T 细胞的辅助和细胞因子的参加,因此检测抗体的水平也可以在一定程度上反映细胞免疫的情况,是一种评价机体免疫的有效方法。

我们在实验中采用标参考品 A 值与浓度(lgU)做标准曲线方程,得出 $R^2>0.95$,可以显示出该实验的准确性高、可靠性好。其实验结果显示激发态小鼠灌服地黄饮子组的免疫应答水平明显高于对照组,且差异有显著性意义($P<0.05$)。这说明口服地黄饮子可以增强机体的特异性体液免疫应答。

中药,特别是中药复方成分复杂,其药物的量 - 效关系也极其复杂,中药复方的量 - 效关系主要根据疾病情况对某些成分有目的的加减,这在动物实验很难模拟,本文作为初步研究未对地黄饮子的量 - 效关系作进一步的探讨。实验表明口服中药地黄饮子能使激发态小鼠卵核蛋白抗体有明显的升高,初步证实了地黄饮子对小鼠的免疫的调节作用,但其免疫调节作用的环节和机制尚有待深入研究。

参 考 文 献(References)

[1] 刘威,何晓红.地黄饮子研究进展[J].长春中医学院学报,2003,19(2): 59-60

- Liu Wei, He Xiao-hong. Research progress of Dihuang drink [J]. Academic Periodical of Changchun College of Traditional Chinese Medicine, 2003, 19(2):59-60
- [2] 张福珍. 地黄饮子在防治老年病中的地位与应用 [J]. 中医药学报, 1994,22(2):28-2
- Zhang Fu-zhen. Prevention the elderly patient in the position and applications of Dihuang drink [J]. Acta Chinese Medicine And Pharmacology, 1994,22(2):28-2(In Chinese)
- [3] 封银曼. 地黄饮子对痴呆小鼠脑功能及单胺氧化酶活性的影响[J]. 山东中医杂志,2002,21(11):683-684
- Feng Yin-man. Brain function and single amine oxidase activity effect of dementia mouse on Dihuang drink.[J]. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine, 2002,21(11):683-684 (In Chinese)
- [4] 关慧波,侯舒峰.地黄饮子临床研究进展[J].中医药信息,2008,25(1):43-44
- Guan Hui-bo, Hou Shu-feng. Clinical research progress of Dihuang drink [J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2008, 25(1):43-44 (In Chinese)
- [5] 高志清,封银曼,王亭.地黄饮子近 20 年的研究[J].河南中医,2001 21(5):75-77 (In Chinese)
- Gao Zhi-qing, Feng Yin-man, Wang Ting. Nearly 20 Years of Study on Dihuang drink [J]. HenNan Traditional Chinese Medicine. 2001 21(5):75-77 (In Chinese)
- [6] Ge Zi, Dan LS, Wan C. The Effect of Decoction Remannia on the Cytochemical Components of the Local Cerebrum Hypothalamus and Adrenal Gland of Experimental Cerebral Embolism [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 1994,14(2):123-127
- [7] 刘翠艳,赵宏坤,韩春杨.中药免疫调节剂对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(2) : 178-180(In Chinese)
- Liu Cui-ping, Zhao Hong-kun, Han Cun-yang. Chinese Medicine Immune Modulators for Mice, the Influence of Cellular Immune Function [J].Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology. 2007,23(2) :178-180
- [8] 王晓玉,魏伟.抗炎免疫中药的药动力学研究[J].时珍国医国药,2006,17(10) :2073-2076
- Wang Xiao-yu, Wei Wei. Advances in the Research of Pharmacokinetics of Traditional Chinese Medicine of Antiinflammatory-immunity [J]. LiShiZhen Medicine and Materia Medica Research. 2006,17(10) :2073-2076(In Chinese)
- [9] 杨金霞,王学美.中药抗肝癌免疫调节的研究进展[J].中国中药杂志, 2007,32(4) :281-284
- Yang Jin-xia, Wang Xue-mei. Progress in studies on anti-hepatoma effect of traditional Chinese medicine by adjusting immune function [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007,32 (4) :281-284 (In Chinese)
- [10] 刘辉,林敬连,郭月秋.因中药免疫组学而对中药四君子汤免疫调节作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):125-127
- Liu Hui, Lin Jing-lian, Guo Yue-que.[J]. For Chinese Medicine Vaccinated Group Learning and the Traditional Chinese Medicine Sijunzi Decoction Immunoregulatory Effects of Research[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2010,16(7):125-127 (In Chinese)
- [11] 常波,胡军.灌服中药 " 三仙汤 " 对小鼠免疫应答的影响[J].中国现代内科学杂志,2004,4(17):676-677
- Chang Bo, Hu Jun. Influence of taking San-xian-tang orally on the immunoresponsiveness of mice [J]. Chinese Journal of the Practical Chinese with Modern Medicine, 2004, 4(17):676-677 (In Chinese)
- [12] 江兴林,中药白芍对小鼠体液免疫功能影响的探讨[J].怀化医学专学报,2006,5(2):54-55
- Jiang Xin-lin. Probe into the Influence to Mouse Body Fluid Immunologic Function by TCM Paeonia Lactiflora Pallas [J]. Journal of Huaihua Medical College, 2006,5(2):54-55 (In Chinese)
- [13] 刘学良,王忠裕,陈彦平.牡蛎散对小鼠免疫功能影响的研究[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(1):170-171
- Li Xue-liang, Wang Zhong-yu, Chen Yan-ping. Research on the Influence of Mouse Immunologic Function by TCM [J]. Muli Powder Journal of Liaoning University of TCM, 2009 11(1):170-171 (In Chinese)
- [14] 吕新文,宋建荣,汶昕.中药方剂回阳救急汤对小鼠免疫力的影响[J].临床和实验医学杂志,2009,8(5):50
- Lv Xin-wen, Song Jian-rong, Wen Xin. Influence of huiyangjiuji decoction on murine immune responses. [J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2009, 8(5):50 (In Chinese)
- [15] 孙文平,罗红,杨光.当归多糖激发免疫反应的特征研究 [J].大连医科大学学报,2009,31(3):262-264
- Sun Wen-ping, Luo Hong, Yang Guang. Features of immune response activated by Angelica polysaccharides .Journal of Dalian Medical University, 2009,31(3):262-264(In Chinese)
- [16] 李发胜,杨光,咸丰.漏芦多糖对小鼠激发态免疫功能的影响及其可能机制[J]. 中国中药杂志,2007,32(5): 433-435
- Li Fa-sheng, Yang Guang, Xian Feng. Effects of Rhaponticum uniflorum polysaccharide on immune response of mice after antigen stimulation and their possible mechanisms [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007, 32(5): 433-435(In Chinese)
- [17] 李艳菊,刘辉,郭月秋.石菖蒲对小鼠免疫功能调节作用的研究[J]. 中国中医药科技,2007,14(2): 95
- Li Yan-Gi, Lu Hui, Guo Yue-qiu. Research on the Influence of Mouse Immunologic Function by ShiChangpu. [J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2007,14(2): 95(In Chinese)
- [18] 刘辉,常波,刘薇薇.因中药免疫组学而进行的中药免疫调节作用实验研究[J].中国免疫学杂志,2008,8(24):719-720
- Liu Hui, Chang bo, Liu Wei-wei. For Chinese learning and immune group of traditional Chinese medicine immunoregulatory effects of experiments [J]. Chinese Journal of Immunology, 2008, 8 (24): 719-720 (In Chinese)
- [19] 杨光,李发胜,刘辉.党参多糖对小鼠免疫功能的影响[J].中药药理与临床,2005,21(4):39-39
- Yang Guang, Li Fa-sheng, Liu Hui. Influence of Polygonatum Polysaccharide on apoptosis of primary cultured neonate rat cerebral cortical neurons caused by hypoxia [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2005,21(4):39-39 (In Chinese)
- [20] 吴健民.免疫学检验[M].北京:人民卫生出版社,2003,58-59
- Wu Jian-min. Immunology examination[M].Bei Jin: People's medical publishing house, 2003,58-59
- [21] 李艳菊.基于中药信息学对三种中药免疫调节作用的试验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2007,34(6):834-835
- Li Yan-ju. The Research of Immune Regulation Effects of Three Chinese Medicines Based on Chinese Medicine Informatics [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2007,34(6):834-835(In Chinese)
- [22] 侯殿东,赵宝霞,刘辉.应激致免疫功能降低动物模型的建立[J].中国实验动物学报, 2007, 15(5) :330-332
- Hou Dian-bao, Zhao Bo-xiao, Lui Hui. Establishment of an Animal Model of Stress. [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sincia, 2007, 15(5) :330-332 (In Chinese)