

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)11-1049-03

养阴抗毒胶囊对阴虚大鼠外周血 T 细胞亚群及 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  的影响侯颖<sup>1</sup>, 史恒军<sup>1</sup>, 陈儒<sup>1</sup>, 睢岩<sup>1</sup>, 曹云新<sup>2</sup>(第四军医大学<sup>1</sup> 唐都医院中医科, 陕西西安 710038, <sup>2</sup>基础部免疫学教研室, 陕西西安 710033)**Effect of Nourishing Yin Antitoxic Capsule on T lymphocyte subsets, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of peripheral blood in Yin deficiency rats induced by hydrocortisone**HOU Ying<sup>1</sup>, SHI Heng-Jun<sup>1</sup>, CHEN Ru<sup>1</sup>, JU Yan<sup>1</sup>, CAO Yun-Xin<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Traditional Chinese Medicine, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China,<sup>2</sup>Department of Immunology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】** AIM: To explore the effect of Nourishing Yin Antitoxic Capsule (YC) on T lymphocyte subsets and IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  of peripheral blood in Yin deficiency rats induced by hydrocortisone. **METHODS:** Thirty-two SD rats were randomly allocated to 4 groups: normal control group, Yin deficiency model control (YD) group, YC group and Liuwei Dihuang Balls (LD) group (with the action of nourishing Yin and replenishing kidney). Radio-immunity method was used to observe the contents of corticosteroid (CORT), IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in blood serum at 9th day after medicine pretreatment and Yin deficiency model establishment. T lymphocyte subsets of peripheral blood in rats were detected by flow cytometer. **RESULTS:** Compared with the normal group, the contents of CORT were higher in YD group ( $P < 0.05$ ); and that could be reduced by YC and LD ( $P < 0.05$ ). Meanwhile the contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were increased significantly in YD group ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ); and they could be reduced by YC and LD ( $P < 0.05$ ) but ones of YC group approached more to normal control group. The percentages of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> in YD group were increased ( $P < 0.05$ ), the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> was not different significantly between all groups. **CONCLUSION:** T lymphocyte subsets of peripheral blood are not significantly decreased in Yin deficiency syndrome induced by hydrocortisone. There are correlations

between the increased contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and Yin deficiency syndrome induced by hydrocortisone. YC can decrease the contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , which might be one of the mechanisms of treating the adverse reaction of glucocorticoids.

**【Keywords】** Nourishing Yin antitoxic capsule; glucocorticoids; Yin deficiency syndrome; T lymphocyte subset; cytokine; rat

**【摘要】**目的 探讨养阴抗毒胶囊(YC)对氢化可的松(HC)所致阴虚大鼠外周血 T 细胞亚群及 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的影响。方法 SD 大鼠 32 只, 随机分为正常对照组、阴虚模型组、YC 组、六味地黄丸(LD)组各 8 只。最后一次给药后 1 d 取血, 用放射免疫方法检测各组血清皮质醇(CORT) 细胞因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的水平; 用流式细胞仪检测外周血 T 细胞亚群的变化。结果 阴虚模型组 CORT 升高, 而 YC 和 LD 组可使其下降( $P < 0.05$ ); YC 和 LD 组可使阴虚模型组升高的 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  下降( $P < 0.05$ ) 其中 YC 更接近于正常对照组。阴虚模型组外周血 T 细胞亚群比例 CD4<sup>+</sup> (与空白组比较  $P < 0.05$ )、CD8<sup>+</sup> 升高, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 各组变化不明显。结论: HC 所致“阴虚”证外周血 T 细胞亚群无明显下降; IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  升高与 HC 所致“阴虚”证有关, YC 可明显降低 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  水平, 可能是其预防和治疗糖皮质激素副作用的机理之一。

**【关键词】** 养阴抗毒胶囊; 糖皮质激素; 阴虚证; T 细胞亚群; 细胞因子; 大鼠

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A

**0 引言**

养阴抗毒胶囊(YC)为我院院内制剂, 已临床应用多年, 其作用为滋阴解毒, 对糖皮质激素(GC)所致的类库欣氏综合征的临床症状有明显的改善作用。前期实验已证实 YC 能有效地保护模型动物肾上腺皮质网状带不受大剂量外源性 GC 的破坏, 对 GC 所致的各种阴虚症状有很好的疗效<sup>[1]</sup>。我们结合临床和前期研究的基础, 继续观察该方对 GC 所致阴虚大鼠外周血 T 细胞亚群及细胞因子的影响, 从而进一步揭示 YC 防治糖皮质激素副作用的效用机理。

**1 材料和方法**

**1.1 材料** ①清洁级 SD 大鼠 32 只, 雄性, 体质量 (220  $\pm$  20) g, 购于第四军医大学实验动物中心。随机

收稿日期 2006-01-11; 接受日期 2006-03-06

通讯作者: 史恒军. Tel (029) 84777441 Email zmsleep@fmmu.edu.cn

作者简介: 侯颖. 硕士生(导师史恒军). Tel (029) 83531390

Email HY69@163.com

分为4组:正常对照组,阴虚模型组(YD),养阴抗毒胶囊(YC)组,六味地黄丸(LD)组,每组8只。②养阴抗毒胶囊由我院药剂科生产(批号20050406),药物组成:羚羊角、西洋参、石斛、生地黄、茜草、连翘、仙鹤草、大蓟、小蓟等。将胶囊内药物再次粉碎,过100目筛,临用前一日加入蒸馏水配制成浓度为200 g/L的混悬液,4℃保存备用。六味地黄丸成药选购北京同仁堂制药厂生产的水蜜丸剂型(批号:5033383),药物成分为:泽泻、山茱萸、牡丹皮、茯苓、熟地黄、山药。将药丸加蒸馏水化解,制成含200 g/L药物的混悬液,4℃保存备用。氢化可的松原药来自山东新华制药有限公司,批号0504041。临用前加入蒸馏水配制成浓度为5 g/L的混悬液。麻醉药速眠新II注射液由军事医学科学院军事兽医研究所研制(批号:005013,2004)。③仪器及试剂:美国BECKMAN-COULTER公司ELITE ESP型流式细胞仪;西安262厂生产的HC-6010型全自动测量r计数仪;皮质醇(CORT)放射免疫分析药盒购自北京北方生物技术研究所(批号:051020);白细胞介素1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子放免药盒购自解放军总医院科技开发中心放免所(批号:051027);试剂小鼠抗大鼠CD4-FITC和CD8-PE均为美国IMMUNOTECH公司产品。

## 1.2 方法

1.2.1 模型复制 养阴抗毒胶囊组、六味地黄丸组均在早晨给予相应浓度的药液2.5 mL/d灌胃,正常对照组及阴虚模型组给予饮用水2.5 mL/d灌胃3 d。第4日起除正常对照组外,其余各组均按阴虚大鼠模型复制方法<sup>[2-3]</sup>每日17:00按50 mg/kg剂量灌胃给予氢化可的松,连续4 d,正常对照组给予相应量饮用水。各组均在造模结束1 d后取血处死。

1.2.2 血清CORT,细胞因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的检测 大鼠于第9日上午,以1 mL/kg剂量速眠新II麻醉后心脏取血5 mL,其中4 mL血放入干燥试管,4℃3000 r/min离心10 min,分离血清放置-20℃冰箱保存,用RIA法测定CORT,IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 。

1.2.3 外周血T细胞亚群CD4<sup>+</sup>,CD8<sup>+</sup>的检测 另外1 mL血肝素(5 $\times$ 10<sup>4</sup> u/L)抗凝,取抗凝血100  $\mu$ L,置5 mL专用试管中,同时加入10  $\mu$ L CD4-FITC和10  $\mu$ L CD8-PE单克隆抗体,阴性对照管加入MsIgG1-FITC和MsIgG1-PE无关抗体,室温下避光染色20 min,上Q-PREP型免疫学样品制备仪,快速溶解红细胞,并稳定和固定靶细胞(所用试剂为ImmunoPrep,购自BECKMAN-COULTER公司)然后上流式细胞仪检测分析。

统计学处理:多组间均数比较采用SPSS 10.0统计软件包进行方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。

## 2 结果

各组大鼠血清CORT,IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 有一定变化,而外周血T细胞亚群比例无明显变化(表1)。阴虚模型组血清CORT含量高于正常对照组( $P < 0.01$ )。动物模型复制成功<sup>[3]</sup>。YC组及LD组CORT含量均低于阴虚模型组( $P < 0.05$ )且与正常对照组无明显差别( $P > 0.05$ )。阴虚模型组IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量均高于正常对照组( $P < 0.05$ ),YC组及LD组均可使之下降( $P < 0.05$ ),但YC组数值更接近于正常对照组。阴虚模型组外周血T细胞亚群CD4<sup>+</sup>( $P < 0.05$ ),CD8<sup>+</sup>高于正常对照组,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>各组数值无统计学意义。

表1 养阴抗毒胶囊对糖皮质激素致阴虚大鼠血清CORT,IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 和T细胞亚群的影响 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	CORT( $\mu$ g/L)	IL-1 $\beta$ ( $\mu$ g/L)	TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
对照	5.75 $\pm$ 1.87	0.29 $\pm$ 0.11	1.82 $\pm$ 0.61	35.71 $\pm$ 6.11	16.29 $\pm$ 3.97	2.30 $\pm$ 0.57
YD	9.10 $\pm$ 1.77 <sup>b</sup>	0.43 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	2.34 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	42.08 $\pm$ 4.33 <sup>a</sup>	17.86 $\pm$ 2.52	2.40 $\pm$ 0.44
YC	6.01 $\pm$ 2.11 <sup>c</sup>	0.31 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	1.87 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>	40.02 $\pm$ 6.88	15.73 $\pm$ 1.53	2.57 $\pm$ 0.51
LD	5.69 $\pm$ 2.33 <sup>c</sup>	0.31 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	1.89 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>	37.36 $\pm$ 5.59	16.53 $\pm$ 2.53	2.28 $\pm$ 0.32

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs YD。YD 阴虚模型, YC 养阴抗毒胶囊, LD 六味地黄丸。

## 3 讨论

糖皮质激素(glucocorticoid, GC)作为临床广泛应用的药物,具有抗炎、抗过敏、抗休克和免疫抑制作用,但同时又有许多副作用。临床观察表明,随着激素服用方法的改进,在足量激素应用阶段,患者更多地出现面色潮红、心悸、烦躁、脉细数等,中医辨证属阴

虚内热,主因药毒伤阴,唯用滋阴润燥、养阴益气之药,既能保证激素的疗效,又可减少其毒副作用。本实验通过在短时间内给予大鼠大剂量GC,复制出外源性GC应用期类柯兴氏综合征的病理动物模型,能在较大程度上反映肾阴虚证患者体内的病理变化。可见模型组大鼠好动易怒,被毛不光泽,血中皮质醇

明显高于正常组,说明动物模型复制成功<sup>[3]</sup>。我们研究表明,GC应用的早期外周血T细胞亚群无明显下降,YC可以有效地降低糖皮质激素所致阴虚大鼠血清皮质醇和IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 的含量,达到滋阴清热的功效,改善阴虚状态。

针对激素使用出现的阴虚证,史恒军教授组方的YC可明显改善患者盗汗、潮热、精神亢奋等临床症状。本方以滋阴解毒为组方原则,方中西洋参、石斛养阴益气,清热生津,解气阴两伤、烦躁口渴;生地、连翘清热凉血,消痈散结,主阴虚内热,热毒痈疡;方中用羚羊角,意在定心神,止盗汗,止渴除烦之用,而大蓟、小蓟、茜草均有凉血之功,大、小蓟又助连翘解热消痈之力,茜草亦有活血之功,仙鹤草止血尤佳,谨防阴虚血热妄行所致各种出血症状。全方滋阴益气,清热解毒,凉血消痈,安神除烦。对照药物六味地黄丸是临床常用、经典的滋阴补肾中药复方及抗衰老药物,用于治疗以肾阴虚证为主证的各种疾病有肯定的临床疗效,且具有的免疫调节作用已被多方研究所证实<sup>[4]</sup>。

GC是常用的免疫抑制剂,而外周血T细胞亚群在GC应用的早期无明显下降,反而有所上升,其机制可能是GC过多可使胸腺发生以皮质为主的急性萎缩<sup>[5]</sup>,出现以淋巴细胞凋亡为主的改变<sup>[6]</sup>。对T细胞而言,受影响的主要是CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>双阳性未成熟胸腺细胞,也是GC作用的重要靶细胞,成熟T细胞对糖皮质激素则相对不敏感<sup>[7]</sup>。胸腺中淋巴细胞增殖非常快,其中只有5%发育成为长寿的T细胞进入外周循环,其余95%在胸腺内破坏。当青春期到来时,淋巴细胞循环池中已储备了一定量的、能够完成细胞免疫功能的长寿T细胞<sup>[5]</sup>。故对GC致阴虚大鼠外周血T细胞亚群的影响不明显。今后进一步可对YC对胸腺组织T淋巴细胞亚群总数及分类的影响进行深入研究。

人和大鼠IL-1的氨基酸序列有约60%~70%的同源性<sup>[6]</sup>。马文涛等<sup>[7]</sup>实验也证明了可用本法检测包括TNF- $\alpha$ 在内的相关细胞因子。本实验提示GC致阴虚大鼠血清IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 含量增加,其机制可能是GC在多种细胞系可增强细胞因子的表达,包括IL-1,IL-2,IL-4,IL-6,IFN- $\gamma$ ,GM-CSF,CSF-1和TNF,其结果可使细胞因子的生物效应增强<sup>[8]</sup>。细胞因子与HPA轴之间,存在着精细的神经内分泌调节反馈环路,有研究表明,IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 刺激下丘脑合成

和释放CRH,或直接作用于垂体或肾上腺,从而激活HPA轴,导致CORT分泌增加<sup>[9]</sup>。本实验结果表明GC致大鼠阴虚模型组CORT,IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 含量较正常对照组升高,说明大剂量GC所致的“阴虚”证与皮质醇增多相关。细胞因子IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 是内源性致热源,可作用于体温调节中枢,引起机体发热<sup>[10]</sup>。阴虚模型组这两种细胞因子升高与阴虚时的内热证相符,与申维玺<sup>[11]</sup>的观点一致。根据阴阳学说,肾阴虚证机制为阴不制阳,阳气相对亢进,此时正气处于一种虚性的亢奋状态,反映了阴虚阳亢的中医思想理论。YC的作用可能是通过多靶点、多层次的调节方式,降低IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 等细胞因子的生物学活性,使细胞因子网络的异常功能状态恢复正常,从而起到治疗阴虚证和相关疾病的效果。具体是哪一种或几种成分的作用还有待进一步研究。

致 谢 本文承蒙童光焕教授、张盈华教授指导并审阅。

#### 【参考文献】

- [1] 张立勇,史恒军,赵宁侠.养阴抗毒胶囊对强的松所致大鼠肾上腺皮质网状带细胞超微结构损伤的影响[J].第四军医大学学报,2005,26(12):1146-1148.
- [2] 施新猷.比较医学(上册)[M].西安:陕西科学技术出版社,2002:233.
- [3] 刘旭光,宋开源,余曙光,等.阴虚阳虚大鼠促肾上腺皮质激素及皮质酮昼夜节律的差异研究[J].四川中医,2002,20(1):6-8.
- [4] 傅桂云,王庆贵,吴忠忱.六味地黄丸的药理研究[J].中成药研究,1986,4:26-28.
- [5] 姜世勃.胸腺萎缩及其对免疫系统的影响[J].国外医学免疫学分册,1984,1:18-22.
- [6] 孙卫民,王慧琴.细胞因子研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1999:368-398.
- [7] 马文涛,杨来启,王晓峰,等.急性应激对大鼠血清细胞因子及皮质醇水平的影响[J].中华精神科杂志,2002,35(2):110.
- [8] 卞如濂.糖皮质激素对有些细胞因子与细胞因子受体表达的增强作用极其重要意义[J].中国药理学学会通讯,2000,17(4):2-3.
- [9] 刘学辉.细胞因子与下丘脑-垂体-肾上腺轴的相互调节及意义[J].国外医学生理病理科学与临床分册,1995,15(3):212-214.
- [10] 龚非力.医学免疫学[M].2版.北京:科学出版社,2004:71.
- [11] 申维玺,孙燕.用分子生物学理论阐释阴虚证的本质[J].医学研究通讯,1998,27(8):1-4.

编辑 黄良田