



· 药物与临床 ·

乐胃饮对脾虚小鼠特异性免疫功能的影响

杨青 潘佩蕾 朱明珠 张钰 钱靖宇 (浙江中医药大学生命科学学院 杭州浙江 310053)

摘要:目的 研究名中医的经验方乐胃饮对脾虚小鼠的治疗作用。方法 采用利血平建立脾虚小鼠模型,将实验动物分高浓度组(24g/kg)、中浓度组(12g/kg)、低浓度组(6g/kg)、对照组。检测乐胃饮对脾虚小鼠脾脏指数、胸腺指数、脾脏产生的IL-2的影响。结果 中浓度组对脾虚小鼠的非特异免疫功能指标脾脏指数、胸腺指数、脾脏产生的IL-2与正常小鼠对应的非特异性免疫指标相比较显著性差异较小,最接近正常,而高浓度组、低浓度组、脾虚对照组与对照组显著性差异明显。结论 乐胃饮能明显恢复脾虚小鼠低下的非特异性免疫功能,在中浓度剂量下(12g/kg)效果最明显。

关键词:乐胃饮 脾虚小鼠

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1009-5187(2017)05-174-01

1 仪器与材料

1.1 实验材料

实验动物:昆明种小鼠,100只,周龄7—12周,体重16—20g

中药试剂:乐胃饮由浙江中医院大学门诊部提供,按2:2:1比例。

分别以水或70%乙醇作用溶剂提取中药试剂,按比例1:10进行调配,水、醇提浓缩成生药浓度为100%,每毫升含生药浓度2g。乐胃饮高剂量组、中剂量组、低剂量组分别按24g/Kg, 12g/Kg, 6g/Kg体重的药量进行脾虚模型组的干预。

1.2 其他材料

绵羊红细胞

2 实验方法

2.1 动物与分组

由浙江中医药大学动物中心供应100只体重在18—20g的清洁级昆明种小鼠。随机把100只小鼠平均分成5组,即:空白正常组,脾虚对照组,低剂量乐胃饮治疗下的脾虚模型组,中剂量乐胃饮治疗下的脾虚模型组,高剂量乐胃饮治疗下的脾虚模型组。每组20只。C57BL/6J雄性小鼠100只,18—19g(用于ConA诱导的IL-2反应细胞制备)。

正常对照组,每天灌服生理盐水0.3ml/20g。另外4组均皮下注射利血平制备脾虚模型0.1ml/10g。脾虚组中3组给药,1组不给药。给药组从造模开始后的第11天进行乐胃饮灌胃。3组每天分别按24g/Kg, 12g/Kg, 6g/Kg体重的药量进行脾虚模型组的干预。造模过程中小鼠逐渐出现身体蜷缩,扎堆,精神萎靡,大便阻塞肛门等一系列脾虚症状。17天造模成功后,停止灌胃24h,给小鼠腹腔注射20%SRBC1ml进行免疫,免疫后第四天,先摘取眼球取血,后拉颈椎脱臼处死小鼠,采集标本进行各种指标检测。

2.2 造模方法

造模采用小鼠利血平法脾虚模型建立^[4],造模开始后的第11天进行乐胃饮灌胃。17天造模成功后,停止灌胃24h,给小鼠腹腔注射20%SRBC1ml进行免疫,免疫后第四天,先摘取眼球取血,后拉颈椎脱臼处死小鼠,采集标本进行各种指标检测。

2.3 免疫组织标本采集与检测

2.3.1 胸腺/脾脏指数:在无菌实验室中对实验小鼠进行摘取小鼠的胸腺与脾脏操作,将小鼠内脏用生理盐水洗去多余残血并用滤纸擦干,称重(mg)并记录,然后分别与小鼠的体重相除,再乘上10,所得值即为脾脏及胸腺指数。

2.3.2 脾T、B淋巴细胞的增殖:MTT比色法检测^[5]。在无菌实验室进行摘取脾脏操作,将摘取的脾脏研磨离心制备成脾细胞混悬液,低温下操作,用IMDM营养液对小鼠脾细胞混悬液进行浓度调节至规定浓度,低温下保鲜。LPS诱导B淋巴细胞增殖实验、ConA诱导T淋巴细胞增殖。37℃,孵育48h,加入MTT10ul,孵育6h。从培养皿中取出后,用滤纸或移液枪将上清液贴壁吸出后弃去,向培养皿中加入溶解甲胍物质的DMSO。水平振荡培养皿均匀后,静置大约20min,然后用酶标仪在570nm波长条件下测定吸光度值A值。记录各组样本的吸光度值用此值来说明B、T淋巴细胞的增殖情况。

2.3.3 脾细胞产生IL-2活性检测:按照丝裂原激活淋巴细胞

方法进行^[6-8]。脾细胞IL-2的诱导:调整脾细胞浓度为 5×10^6 /ml。加入细胞培养板中,再加入ConA1ml,37℃孵育48h,上清液离心沉淀,将上清液装Effendor管,冰箱冻存待测。使用ConA诱导制备实验用IL-2细胞检测:C57BL/6J小鼠以正常脱颈椎处死法杀鼠,无菌操作摘取脾脏,并用IMDM营养液进行磨碎调节细胞的浓度。加ConA,37℃孵育48h,取出后将培养细胞悬液加于Ficoll液上(比重1.088),细胞悬液与分层液比例为2:1,离心取中间白膜层T淋巴细胞。用不完全IMDM营养液离心洗涤2遍后,用含10%小牛血清的IMDM营养液调整反应细胞悬液备用。IL-2活性检测:取冻存小鼠IL-2上清液,IMDM稀释,加入等量反应细胞,设置阴性对照,IMDM营养液取代上清液。阳性对照孔细胞接近全部死亡时,加MTT,培养4h,再加入DMSO。酶标仪570nm处测OD值。

2.4 数据处理方法

数据差异性分析使用SPSS16.0软件进行。组间比较采用方差分析(One-WayANOVA),显著性水平设为 $P < 0.05$,所有数据资料结果以($\bar{x} \pm s$)表示。

3 结果

3.1 小鼠脾脏指数和胸腺指数测量

乐胃饮治疗后,脾虚模型组小鼠的脾脏指数和胸腺指数大致与空白对照组的几乎无显著性差异,都基本恢复至正常的水平,其中中浓度剂量组与空白对照组的显著性差异最低,说明中浓度剂量乐胃饮的疗效最好。而各个不同浓度给药组小鼠与脾虚对照组小鼠相比,显著性差异较明显($P < 0.01$),而与空白对照组小鼠相比,无显著性差异($P > 0.05$),乐胃饮不同浓度剂量组之间进行比较,发现并无显著性差异($P > 0.05$)。

3.2 脾T、B淋巴细胞的增殖

乐胃饮对脾虚小鼠脾T、B淋巴细胞的增殖有促进作用。经ANOVA分析,脾虚对照组与对照组比较差异有及其显著性($P < 0.01$)。不同剂量组之间差异无显著性($P > 0.05$),但从均数看高浓度与对照组更接近对小鼠T、B淋巴细胞增殖促进作用最强,作用最明显。

3.3 脾细胞产生IL-2活性检测

乐胃饮增强脾虚小鼠脾细胞产生IL-2活性,高浓度给药组治愈度最高。方差分析显示,给药组与空白对照组差异无显著性作用($P > 0.05$),但与脾虚组差异极其显著($P < 0.01$);而不同剂量组之间差异有显著性($P < 0.05$)。见表2。

4 讨论

长期临床实践表明乐胃饮对脾虚型的功能性消化不良,慢性浅表,糜烂甚至慢性萎缩性胃炎^[16]等多种消化系统功能与器质性疾病都既能改善临床症状又本逆转病理变化的作用。在本实验中研究发现中剂量的乐胃饮能促进脾T、B淋巴细胞的增殖,提高脾细胞产生IL-2活性。这对乐胃饮中药制剂的药物开发、临床应用起到一定指导作用。

参考文献

- [1] 陈小野,脾气虚证动物模型初步规范化的造模方法与思路[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(01): 3-5.
- [2] 朱飞叶, 吴晋兰, 徐珊. 乐胃饮对慢性萎缩性胃炎大鼠胃粘膜作用的扫描[J]. 电镜观察, 2012, 18(3): 269-270.