

脾虚大鼠脑内 IL-1 β 、IL-2 表达的变化及益气扶正中药的干预研究 *

钱泽南 钱会南[△] 熊 斌 许 红 吴海霞

(北京中医药大学 北京 100029)

摘要 目的: 研究脾虚模型大鼠脑内白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 2(IL-2) 的活性表达, 以及扶正益气中药的干预作用。方法: 40 只大鼠随机分成 4 组, 正常组、模型组、治疗 1 组(四君子汤组)、治疗 2 组(玉屏风散组), 每组各 10 只。采用苦降泻下、饮食失节加劳倦过度法建立大鼠脾虚模型, 采用免疫组化法检测下丘脑腹侧核、海马 CA1 区的 IL-1 β 和 IL-2 表达变化与四君子汤玉屏风散的治疗作用。结果: IL-1 β 在海马 CA1 区和下丘脑腹侧核表达明显降低, IL-2 在海马 CA1 区和下丘脑腹侧核表达明显降低; 四君子汤治疗组 IL-1 β 和 IL-2 在上述脑区表达明显上升; 玉屏风散治疗组 IL-1 β 和 IL-2 在上述脑区表达呈紊乱变化现象。结论: 益气扶正中药四君子汤、玉屏风散可能通过影响免疫器官、调控细胞因子 IL-1 β 和 IL-2 活性表达而调节机体免疫功能。

关键词 脾虚大鼠; 细胞因子; IL-1 β ; IL-2; 益气扶正中药

中图分类号 Q95-33 R256.3 R285.5 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)27-5218-03

Expression of Interleukin-1 β , Interleukin-2 and Interventional Mechanism of Chinese Medicinal with Actions of Replenishing Qi and Reinforce the Healthy Qi in Rat Spleen-Deficiency Model*

QIAN Ze-nan, QIAN Hui-nan[△], XIONG Bin, XU Hong, WU Hai-xia

(School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

ABSTRACT Objective: To study the changes of expressions of interleukin-1 β , interleukin-2 in spleen-deficiency rat model and the interventional effects of Chinese medicinal with actions of replenishing qi and reinforce the healthy qi. **Methods:** All rats (n = 40) were randomly divided into the normal group, model group, treatment group 1 (T group 1, treated with Sijunzi Decoction) and treatment group 2 (T group 2, treated with Yupingfeng Powder, each n = 10). The spleen-deficiency model was established in rats by using the methods of purgation, improper diet and over strain. The expressions of IL-1 β , IL-2 in the ventral nucleus of hypothalamus and CA1 zone of hippocampus and therapeutic effects of Sijunzi Decoction and Yupingfeng Powder were detected by applying immunohistochemical assay and in situ hybridization. **Results:** In the model group the IL-1 β , IL-2 expression decreased significantly. In T group 1 the IL-1 β , IL-2 expressions increased significantly; In T group 2 changed disorderly in the ventral nucleus of hypothalamus and CA1 zone of hippocampus. **Conclusion:** Sijunzi Decoction and Yupingfeng Powder, with the actions of replenishing qi and reinforce the healthy qi, can regulate the immunologic function of the body through influencing immune organs and controlling the expressions of brain IL-1 β and IL-2.

Key words: Spleen-deficiency rats; Cytokines; Interleukin-1 β ; Interleukin-2; Chinese medicinal with actions of replenishing qi and reinforce the healthy qi

Chinese Library Classification: Q95-33, R256.3, R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)27-5218-03

中医认为脾胃是后天之本, 气血生化之源。脾的功能正常与否与人体的防御能力密切相关。近年来的研究表明, 脾虚证时机体免疫系统功能紊乱, 体内细胞因子表达失常, 可能于脾虚证的发生密切相关^[1]。本文通过研究脾虚大鼠脑内 IL-1 β 、IL-2 的水平表达变化以及益气扶正类中药四君子汤和玉屏风散的影响, 探讨脾虚大鼠中枢功能变化及扶正益气药物对机体免疫功能的调节。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体重(160 $\pm$ 10) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。动物许可证号 SCXK(京)2007-0091。适应性饲养 1 周后, 40 只大鼠被随机分成正常组、模型组、治疗 1 组、治疗 2 组, 每组各 10 只。

1.2 实验药物

造模药由大黄、厚朴、枳实按 2:1:1 组成, 治疗 1 组使用四君子汤原方, 治疗 2 组使用玉屏风散原方。所有药材均由北京金象大药房提供。以上方药分别常规煎煮, 过滤, 浓缩为 1 g/mL 药液, 4 $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。

1.3 主要仪器

* 基金项目 国家自然科学基金项目(30772685)

作者简介: 钱泽南(1977-), 男, 博士研究生, 研究方向: 中医基础理论藏象理论研究,

电话: 010-64286312, 18810621004, E-mail: qhnan20042001@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2012-02-25 接受日期: 2012-03-20)

Nikon 显微镜、数码摄像及图像采集分析系统：日本；DH3600AB 电热恒温培养箱：中国天津；BDS1 电热三用水浴箱：中国北京；DHG9075A 电热恒温鼓风干燥箱：中国上海；Leitz 切片机 德国。

1.4 主要试剂

IL-1 β 、IL-2 免疫组化试剂盒(1 抗)、即用型链霉亲和素 - 生物素酶复合物免疫组化试剂盒均由湖北省武汉博士德生物工程有限公司提供；蛋白酶 K、二乙基焦磷酸胺 Sigma 公司产品；枸橼酸钠、甲醇 均为北京化工厂产品；磷酸盐缓冲液、多聚甲醛、二甲苯、乙醇 均由北京鼎国生物技术有限责任公司提供；中性树胶 上海化学有限公司产品。

1.5 动物处理

采用苦降泻下、饮食失节加劳倦过度法造模^[1]，每日上午灌胃造模药 7.5g/(kg·d)，隔日禁食，自由饮水，每日于 25℃水中游泳至力竭。治疗 1 组在造模的同时，每日下午灌胃四君子汤 7.5g/(kg·d)；治疗 2 组在造模的同时，每日下午灌胃玉屏风散 7.5g/(kg·d)，正常组给予等量生理盐水。观察大鼠活动状态、排便、进食量、体重等。连续 6 周。

1.6 标本的采集与制备

大鼠经 10% 水合氯醛麻醉，打开胸腔，暴露心脏，经左心室插管至升主动脉，先灌注生理盐水，然后灌注预冷的 4%多聚甲醛溶液；取脑，置 4%多聚甲醛溶液中后固定，常规石蜡包埋。石蜡切片机冠状连续切片，片厚 6 μ m，常温保存备用。

1.7 测定方法

严格按照 IL-1 β 、IL-2 免疫组化试剂盒使用说明操作。

1.8 切片观察及图像采集处理

数码摄像及分析系统进行图象采集和数据处理。检测海马 CA1 区、下丘脑腹侧核中的 IL-1 β 、IL-2 免疫阳性反应物的平均光密度(MOD)，每组随机测试 3 张切片，每一部位随机测试 5 个视野，取平均值。

1.9 统计方法

实验结果采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析处理，连续型变量采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，多组间均数比较采用单因素方差分析，两组间均数比较用 LSD 法。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的状态和体征变化

正常组大鼠，体肌丰满，皮毛色白光泽，摄食及日常活动正常，体重呈直线上升。模型组大鼠从造模第 2、3 天起，出现稀软便，之后逐渐大便时干时溏，食量减少，行动缓慢，成群蜷缩，眯眼嗜睡，身体消瘦。治疗 1 组与治疗 2 组在造模处理的第 1 周表现同模型组，经治疗后上述症状和体征逐渐消失，体重逐渐回复增长。

2.2 各组大鼠脑内 IL-1 β 检测结果

模型组 IL-1 β 免疫阳性反应物在海马 CA1 区和下丘脑腹侧核平均光密度(MOD) 较低，与正常组比较差异显著(P < 0.05)；治疗 1 组在海马 CA1 区和下丘脑腹侧核平均光密度较高，与模型组比较差异显著(P < 0.05)；治疗 2 组在海马 CA1 区平均光密度较高，与模型组比较差异显著(P < 0.05)，在下丘脑腹侧核平均光密度较低，与模型组比较无显著差异。结果见表 1。

2.3 各组大鼠脑内 IL-2 检测结果

模型组 IL-2 免疫阳性反应物在海马 CA1 区和下丘脑腹侧核平均光密度(MOD) 较低，与正常组比较差异显著(P < 0.05)；治疗 1 组在海马 CA1 区和下丘脑腹侧核平均光密度较高，与模型组比较差异显著(P < 0.05)；治疗 2 组在海马 CA1 区平均光密度较低，与模型组比较无显著差异，在下丘脑腹侧核平均光密度较高，与模型组比较差异显著(P < 0.05)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠脑内 IL-1 β 及 IL-2 的 MOD 值比较($\bar{x} \pm s$ ，n=10)

Table 1 Comparison of brain IL-1 β protein and IL-2 protein MOD values in rats of all groups($\bar{x} \pm s$ ，n = 10)

组别 Groups	n	IL-1 β MOD 值		IL-2MOD 值	
		海马 CA1 区 CA1 zone of Hippocampus	下丘脑腹侧核 Ventral nucleus of hypothalamus	海马 CA1 区 CA1 zone of Hippocampus	下丘脑腹侧核 Ventral nucleus of hypothalamus
模型 Model group	10	0.321 $\pm$ 0.022**	0.402 $\pm$ 0.014**	0.393 $\pm$ 0.020**	0.371 $\pm$ 0.014**
正常 Normal group	10	0.409 $\pm$ 0.010	0.442 $\pm$ 0.010	0.442 $\pm$ 0.016	0.442 $\pm$ 0.006
治疗 1 T group 1	10	0.428 $\pm$ 0.013 $\square\square$	0.423 $\pm$ 0.006 $\square\square$	0.446 $\pm$ 0.020 $\square\square$	0.472 $\pm$ 0.010 $\square\square$
治疗 2 T group 2	10	0.365 $\pm$ 0.015 $\square\square$	0.405 $\pm$ 0.007	0.413 $\pm$ 0.015	0.414 $\pm$ 0.012 $\square\square$

注：** 与正常组比 P < 0.05， $\square\square$ 与模型组比 P < 0.05。

Note: ** P < 0.05 comparing with normal group; $\square\square$ P < 0.05 comparing with model group.

3 讨论

中医因病机理论认为疾病形成原因复杂，是在多因素的综合作用下而最终导致机体出现一系列的病理变化。本实验采用苦降泻下、饮食失节加劳倦过度造模法，为目前通行的复合因素造模法。造模大鼠出现一系列脾虚表现，符合诊断标准^[2-3]。

IL-1 β 可促使其他促炎因子的产生，并可于其他促炎因子

协同作用，导致“炎症级联反应”的产生^[4]。杨毅等^[5]认为脾虚模型组大鼠脑组织 IL-1 含量明显升高。而 IL-1 有抑制摄食行为、抑制胃排空和胃酸及胃蛋白的分泌的功能，使用加味枳术丸可以降低中枢 IL-1 水平，使得脾虚大鼠的临床症状得到改善。王洪海等^[6]报道经复合因素造模致脾虚大鼠血清 IL-1 水平在造模期间无显著变化。

IL-2 是参与免疫应答的重要免疫因子，可促进和刺激 T 细

胞增殖以及 NK 细胞的生长,还可增强杀伤细胞活性^[7]。杜薇薇等^[8]报道脾虚泄泻大鼠 IL-2 水平显著降低,经补脾益肾药物治疗有效。

本研究表明脾虚大鼠脑内 IL-1 β 和 IL-2 水平明显降低。脾虚时机体内 IL-1 β 水平的下降可能使得其他与之相关的促炎因子的水平随之下降,并使得炎症级联反应水平下降。IL-2 水平的下降使得与之相关的免疫细胞水平和能力下降。脾虚大鼠 IL-1 β 与 IL-2 水平的下降可能反映了机体免疫水平下降,这与中医认为“脾为之卫”的观点相符合。四君子汤的主要功效以益气健脾为主,而玉屏风散的功效以益气健脾、实卫固表为主。钱会南等^[9-10]研究表明复合因素致脾虚大鼠经补气扶正方剂治疗后有好转趋势,认为可能是上述补气益脾的中药可以有效调节 IFN- γ 、IL-4、IL-6R α 等细胞因子水平,使之回复正常。本研究表明玉屏风散组未能呈现很好的统计学差异。这可能与四君子汤补气效果更强,而玉屏风散更侧重于运脾有关,具体机制有待于更深一步的研究与讨论。目前的有关研究^[11-13]表明,脑内的细胞因子主要是由激活的胶质细胞产生,而部分脑内细胞因子是否由体内穿越血脑屏障而来,目前也存在着四条通路的假说。脑内细胞因子的水平的紊乱可能是于脑缺血缺氧导致脑损伤,受损失的胶质细胞被激活有关。而脑内细胞因子水平的紊乱可能影响人体免疫水平。脾虚证时人体免疫机能下降,涉及到神经、内分泌、免疫等方面。脾虚证时与之相关的递质、激素、细胞因子等信息物质及它们的受体均产生了一定程度的紊乱^[14,15]。因此本研究通过检测脑内细胞因子水平的改变符合中医的整体观念,有助于揭示脾虚证与机体神经内分泌免疫网络的变化之间的联系。

参考文献(References)

- [1] 杨舒,钱会南.中医脾虚证的免疫机制研究进展[J].辽宁中医杂志,2008,35(9):1433-1435
Yang Shu, Qian Hui-nan. Research Progress of Immune Mechanism of Spleen Deficiency Syndrome [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine,2008,35(9):1433-1435
- [2] 陈小野.脾气虚证动物模型初步规范化的造模方法和思路[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(1):3-5
Chen Xiao-ye. Method and Thought on Establishing Primarily Standardized Animal Model of the Spleen Qi Deficiency Syndrome [J]. China Journal of Basic Medicine In Traditional Chinese Medicine,2003,9(1):3-5
- [3] 陈小野,邹世洁,张智.大鼠长期脾虚造模的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,1995,1(1):37-41
Chen Xiao-ye, Zou Shi-jie, Zhang Zhi. Study on the Model of Insufficiency of the Spleen for a Long Time in Rats [J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine,1995,1(1):37-41
- [4] Wang C X, Shuai BA. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury [J]. Prog. Neurobiol,2002,67(2):161-172
- [5] 杨毅,陈继婷.加味枳术汤对脾气虚证大鼠脑组织 IL-1 和 D-木糖影响的实验研究[J].贵阳中医学院学报,2008,30(5):17-18
Yang Yi, Chen Ji-ting. Express of IL-1, D-xylose and interventional mechanism of Chinese medicinal with flavored zhizhu decoction in brain tissue of rat spleen-deficiency model [J]. Journal of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine,2008,30(5):17-18

- [6] 王洪海,谢鸣.复合病因造模法致脾虚证大鼠模型在免疫系统方面的变化[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(12):41-45
Wang Hong-hai, Xie Ming. Immunologic effect on the model rat of spleen-qideficiency induced by complex factors[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae,2006,12(12):41-45
- [7] Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications[J]. Cytokine,2004,8(3):109-123
- [8] 杜薇薇,李冀,王玉来,等.五味子散与四神丸对脾虚泄泻大鼠分泌型 IgA 白介素-2 含量影响的配伍比较研究 [J]. 中华中医药学刊,2009,10(27):2189-2191
Du Ya-wei, Li Ji, Wang Yu-lai, et al. Study of different effect of fructus schisandrae chinensis powder and sishen pill on wistar rats of diarrhea of the Contents of S IgA and IL-2 [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine,2009,10(27):2189-2219
- [9] 钱会南,杨舒.脾虚模型大鼠脑内细胞因子 IFN- γ 活性表达与益气扶正中药干预机制[J].北京中医药大学学报,2011,3(34):174-188
Qian Hui-nan, Yang Shu. Expression of cerebral cytokine-IFN- γ and interventional mechanism of Chinese medicinal with actions of replenishing qi and reinforce the healthy qi in rat spleen-deficiency model [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine,2011,3(34):174-188
- [10] 杨舒,钱会南.扶正益气中药对脾虚大鼠脑内 IL-6R α 水平及其基因表达的影响[J].安徽中医学院学报,2010,4(29):49-51
Yang Shu, Qian Hui-nan. Regulation of Interleukin-6 Receptor α Level and Its mRNA Expression in Cerebral Tissues of Spleen Deficiency Rats by Traditional Chinese Medicine for Invigorating Qi and Strengthening Body Resistance [J]. Journal of Anhui Traditional Chinese Medical College,2010,4(29):49-51
- [11] 乔金玲,肖保国,李威.星形胶质细胞释放细胞因子功能初探[J].中国临床神经科学,2009,17(6):613-617
Qiao Jin-ling, Xiao Bao-guo, Li Wei. Effects of the Incubation with Oxygen-Glucose Deprivation on the Cytokines Releases from Astrocytes[J]. Chinese Journal of Clinical Neurosciences,2009,17(6):613-617
- [12] 曹霞飞,让蔚清.炎症反应与阿尔茨海默病[J].中国老年学杂志,2009,10(29):2544-2546
Cao Xia-fei, Rang Wei-qing. Inflammation and Alzheimer's disease [J]. Chinese Journal of Gerontology,2009,10(29):2544-2546
- [13] 姜忠良,朱玲.细胞因子与大脑间的联系 [J]. 四川生理科学杂志,2011,33(2):79-86
Jiang Zhong-liang, Zhu Ling. Connecting cytokines and brain: a review of current issues [J]. Sichuan Journal of Physiological Sciences, 2011,33(2):79-86
- [14] 卓勤,金敬善,邓新荣.中医脾与神经内分泌免疫网络调节的关系 [J].中国中医基础医学杂志,2002,8(9):80
Zhuo Qin, Jin Jing-shan, Deng Xin-rong. Spleen and neuroendocrine immune network regulatory relationships [J]. China Journal of Basic Medicine In Traditional Chinese Medicine,2002,8(9):80
- [15] 温庆祥,张蕾,何俊仁,等.四君子汤对脾虚大鼠神经内分泌免疫网络功能的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2005,1(2):124-126
Wen Qing-xiang, Zhang Lei, He Jun-ren, et al. Sijunzi Decoction on spleen deficiency rat neuroendocrine immune function of network[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine On Gastro-spleen,2005,1(2):124-126