

白鲜皮的免疫药理学研究

I. 对细胞免疫和体液免疫的影响

王 蓉 徐 强 徐丽华 杭秉茜

(中药药理教研室)

摘要 对白鲜皮水提取物的免疫药理学特性进行了探讨,结果发现:对半抗原 picryl chloride 所致的接触性皮炎(PC-DTH)及颗粒抗原羊红细胞(SRBC)所致的足跖反应(SRBC-DTH),白鲜皮在各抗原攻击后给药有明显的抑制作用,但攻击前给药则未能抑制两 DTH。白鲜皮还明显地抑制二甲苯所致的小鼠耳壳及鸡蛋清所致的小鼠足趾炎症反应。此外,白鲜皮对于小鼠抗 SRBC 抗体的产生,包括对抗体产生细胞(PFC)数和血清溶血素水平均有明显的抑制作用。这些结果表明,白鲜皮对细胞免疫和体液免疫均有抑制作用,对 DTH 反应的作用表现为对 DTH 反应的效应相,其中包括炎症过程的抑制作用。

关键词 白鲜皮;接触性皮炎;足趾反应;细胞免疫;体液免疫;炎症反应

白鲜皮为芸香科白鲜属植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* Turcz. 的根皮^[1]。古籍记载用于治疗风热疮毒、疥癣、皮肤痒疹、口腔溃疡、女子阴中肿痛等症^[2],具有祛风燥湿、清热解毒的功效。白鲜皮的这些适应症与现代医学中的贝切特综合征有类似之处,后者系眼、口、生殖器三联综合征,主要表现为眼色素层炎、口疮和生殖器溃疡等。目前认为,贝切特综合征的发病机制多与细胞免疫反应有关^[3,4],免疫抑制剂是其主要的治疗药物^[5]。鉴于目前中医临床治疗各种皮肤病及溃疡病时常使用白鲜皮,而有关的药理研究则较少,为了探讨白鲜皮对免疫系统的影响及作用机制,我们首先以迟发型接触性皮炎为指标,观察了白鲜皮的影响,并进一步探讨了对其他免疫反应的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

白鲜皮(Cortex Dictamni, CD)(购自南京市药材公司),取药材用 10 倍量的蒸馏水煮

沸 1 h,过滤,滤渣用 10 倍量水继续煮沸 1 h,过滤,合并滤液并在水浴上浓缩至干,得浸膏粉末,称重,收率为 24%,实验中所用的白鲜皮剂量均按该粉末计算。氢化泼尼松注射液(Injectio Prednisoloni, Pred)(上海第九制药厂);环磷酰胺(Cyclophosphamidum, Cy)(上海第十二制药厂);2,4,6-三硝基氯苯(Picryl chloride, PC)(东京化成工业株式会社)。绵羊红细胞(SRBC)购自江宁县卫生防疫站,无菌保存在 Alsever 溶液中(4℃)。RPMI-1640 培养液(含 100 U/ml 青霉素和 0.1 mg/ml 链霉素)(Gibco)。

1.2 动 物

4~6 周龄(体重 18~22 g)的昆明种雌性小鼠,由本校动物室及江苏省实验动物中心提供。

1.3 PC 所致的接触性皮炎(PC-DTH)^[6]

取昆明种小鼠,剃去腹毛,涂 1%PC 的乙醇溶液 100 μl 致敏,6 d 后用 1%PC 的橄榄油溶液 30 μl 涂于右耳两面进行攻击,22 h 后用千分尺测量左右两耳厚度,将两耳厚度的

差作为 DTH 反应的强度。

1.4 缅羊红细胞所致的足跖反应(SRBC-DTH)

取适量含 SRBC 的 Alsever 保存液,用 0.01 M EDTA-gelatin veronal buffer (EDTA-GVB) 洗 2 次,再用含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 GVB²⁺ 洗 3 次,灭菌生理盐水洗 2 次,并用生理盐水调制成血球数为 $2.5 \times 10^8/\text{ml}$ 的细胞悬液,在小鼠左后足跖皮下注射该悬液 40 μl 致敏,5 天后,于右后足跖皮下注射血球数为 $2.5 \times 10^9/\text{ml}$ 的 SRBC 悬液进行攻击,24 h 后,用千分尺测量左、右足跖的厚度,将其厚度差作为 DTH 反应的强度。

1.5 二甲苯所致炎症反应

在小鼠右耳涂 30 μl 的二甲苯致炎,2 h 后测量两耳的厚度,将其厚度差作为反应的强度。

1.6 鸡蛋清所致的炎症反应

小鼠连续给药 5 d 后,于右后足跖皮下注射 10% 蛋清生理盐水溶液 50 μl ,左后足跖注射同样量的生理盐水作对照,4 h 后测量两足跖的厚度,以其厚度差作为反应强度。

1.7 小鼠脾脏空斑形成细胞(PFC)数及血中溶血素(hemolysin)水平的测定

取上述经 EDTA-GVB、GVB²⁺ 和生理盐水清洗后的 SRBC,用灭菌生理盐水或 RPMI-1640 溶液调配成 $10^9/\text{ml}$ 悬浮液,分别供免疫及 PFC 测定用。每只鼠腹腔注射该 SRBC 的生理盐水悬浮液 0.2 ml 免疫。7 d 和 10 d 后放血致死,分离血清,用于 hemolysin 的测定。取出脾脏称重后即置于盛有 5 ml Hanks 液(含 5% 小牛血清、5 U/ml heparin)的培养皿中,用筛网(200 mesh)挤压成脾细胞悬液,用于 PFC 测定。直接 PFC 数和间接 PFC 数按 Cunningham and Szenberg 法^[7]测定。间接 PFC (IgM-PFC) 数测定时加入最终稀释倍数为 200 倍的兔抗鼠 IgG(上海实生细胞生物技术公司),直接 PFC 数与间接 PFC 数之差即得 IgG-PFC 数。血清中溶血素抗体测定时,将

血清用生理盐水稀释(1:32),取该稀释血清 1 ml,加 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 的 SRBC 0.5 ml,再加入 1:10 生理盐水稀释的豚鼠血清 0.5 ml,37°C 温育 30 min,然后置 4°C 冰箱中 5 min 终止反应,取出,1500 rpm 离心 3 min,取上清液 1 ml,加都氏液 3 ml,混匀,放置 10 min,540 nm 处测光密度。同时,另取 0.25 ml $2 \times 10^8/\text{ml}$ SRBC,加都氏液 3.75 ml,同法测光密度,作为 SRBC 半数溶血吸收值。小鼠血清溶血素抗体含量以样品半数溶血值(HC_{50})表示。

样品 $\text{HC}_{50}=$

$$\frac{\text{样品的吸收值}}{\text{SRBC 半数溶血吸收值}} \times \text{稀释倍数}$$

1.8 统计

所有数据均经 t-检验表示两组间的差异。

2 结果

2.1 对 PC-DTH 及 SRBC-DTH 诱导相的影响

从 PC 敏感的前 1 d 起连续 6 d 及 SRBC 敏感的当天起连续 5 d 经口给予白鲜皮 100 和 200 mg/kg,肌内注射氢化泼尼松 10 mg/kg,结果如表 1 所示,白鲜皮的两个剂量组对 PC-DTH 及 SRBC-DTH 均无抑制作用,100 mg/kg 时还有轻微的增强趋势。而氢化泼尼松则显著地抑制了两 DTH。

2.2 对 PC-DTH 及 SRBC-DTH 效应相的影响

在 PC 及 SRBC 攻击后 0、5、10 及 15 h 连续 4 次经口给予白鲜皮 100 及 200 mg/kg,肌注氢化泼尼松 10 mg/kg。结果,白鲜皮 100 及 200 mg/kg 组均显著地抑制了两 DTH。氢化泼尼松显示了更强的抑制作用(表 2)。

2.3 对二甲苯所致小鼠耳壳及蛋清所致小鼠足跖炎症反应的影响

在涂二甲苯致炎前 6 h、3 h 及致炎同时连续 3 次经口给予白鲜皮 100 和 200 mg/kg,肌注氢化泼尼松 10 mg/kg。结果发现,白鲜

Tab 1. Effects of CD and Pred on the induction phase of PC-DTH and SRBC-DTH in mice

Group	Dose, mg/kg	PC-DTH		SRBC-DTH	
		Ear swelling ($\times 10^{-3}$ mm)	Inhibition (%)	Footpad swelling ($\times 10^{-3}$ mm)	Inhibition (%)
Control		71.6 ± 30.5 ¹⁾	(16)	142.0 ± 23.9	(8)
CD 100	59.7 ± 30.4	(15)	16.6	166.9 ± 79.6	(8) - 17.5
CD 200	59.7 ± 40.2	(15)	16.6	144.4 ± 81.0	(8) - 1.7
Pred 10	31.6 ± 9.6 ^{**}	(16)	55.8	92.7 ± 47.8 [*]	(7) 34.7

Figures in parentheses indicate the number of animals. ¹⁾; $\bar{x} \pm s$, *; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$

皮 200 mg/kg 明显抑制了二甲苯所致的小鼠耳壳炎症反应, 而氯化泼尼松显示了更强的抑制作用。对于蛋清所致的炎症反应, 白鲜皮

自足跖注射蛋清前 5 d 起连续 6 d 经口给药, 100 mg/kg 和 Pred 组显著抑制了蛋清所致炎症。但 200 mg/kg 时则无抑制作用(表 3)。

Tab 2. Effects of CD and Pred on the effector phase of PC-DTH and SRBC-DTH in mice

Group	Dose, mg/kg	PC-DTH		SRBC-DTH	
		Ear swelling ($\times 10^{-3}$ mm)	Inhibition (%)	Footpad swelling ($\times 10^{-3}$ mm)	Inhibition (%)
Control		103.0 ± 30.8 ¹⁾	(8)	154.5 ± 72.5	(10)
CD 100	60.0 ± 32.4 [*]	(8)	41.7	75.0 ± 59.9 [*]	(7) 51.5
CD 200	48.3 ± 19.4 ^{**}	(8)	53.1	74.0 ± 59.4 [*]	(6) 52.1
Pred 10	9.4 ± 10.5 ^{**}	(8)	90.8	51.5 ± 43.1 ^{**}	(10) 66.7

Figures in parentheses indicate the number of animals. ¹⁾; $\bar{x} \pm s$, *; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$

Tab 3. Effects of CD and Pred on inflammations induced by xylene in ear, and by egg white in footpad of mice

Group	Dose, mg/kg	Xylene-induced		Egg white-induced	
		Ear swelling ($\times 10^{-3}$ mm)	Inhibition (%)	Footpad swelling ($\times 10^{-3}$ mm)	Inhibition (%)
Control		168.8 ± 39.8 ¹⁾	(8)	87.5 ± 41.0	(8)
CD 100	150.0 ± 45.6	(8)	11.1	45.0 ± 22.0 [*]	(8) 48.6
CD 200	128.1 ± 33.4 [*]	(8)	24.1	86.3 ± 73.3	(8) 1.4
Pred 10	78.8 ± 46.2 ^{**}	(8)	53.3	29.4 ± 31.0 ^{**}	(10) 66.4

Figures in parentheses indicate the number of animals. ¹⁾; $\bar{x} \pm s$, *; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$

2.4 对脾脏中 PFC 数及血中溶血素水平的影响

从 SRBC 免疫小鼠前 4 天起连续 9 天经口给予白鲜皮 100 和 200 mg/kg, Cy 从致敏的当天起连续 7 天经口给予 10 mg/kg。表 4 显示白鲜皮两剂量对 SRBC 免疫后第 7 天和第 10 天的脾重量及脾指数均无明显影响, Cy 对脾重及脾指数则有抑制趋势。表 5 和 6 分

别表示每脾脏中的 PFC 数和血清对 SRBC 的半数溶血值。白鲜皮 100 mg/kg 显著地减少了第 7 d 的 IgG-PFC、第 10 d 的 IgM- 和 IgG-PFC 数, 对第 7 d 的 IgM-PFC 数也有减少趋势。白鲜皮 200 mg/kg 对第 7 d 和第 10 d 的 IgM- 和 IgG-PFC 均有显著的减少作用, 其强度与 Cy 10 mg/kg 相当。

Tab 4. Effects of CD and Cy on spleen weight ad spleen index in mice immunized with SRBC

Group	Dose mg/kg	Day 7 ¹⁾		Day 10	
		spleen weight (mg)	spleen index	spleen weight (mg)	spleen index
Control		127.4 ± 16.9	4.8 ± 0.3	155.3 ± 31.6	5.2 ± 1.1
CD 100	128.1 ± 7.1	4.6 ± 0.2	159.8 ± 27.5	5.3 ± 1.0	
CD 200	151.7 ± 9.7	5.3 ± 0.3	150.2 ± 32.2	5.3 ± 1.3	
Cy 10	121.1 ± 9.3	4.2 ± 0.6 [*]	135.9 ± 32.7	4.8 ± 1.1	

¹⁾; after the SRBC immunization. Each datum indicates $\bar{x} \pm s$ of 6-8 mice. * $P < 0.05$

Tab 5. Effect of CD and Cy on the hemolytic PFC formation in the spleen of mice immunized with SRBC.

Group	Dose mg/kg	Day 7 ¹⁾			Day 10		
		No. of mice	IgM-PFC ($\times 10^3$ /spleen)	IgG-PFC	No. of mice	IgM-PFC ($\times 10^3$ /spleen)	IgG-PFC
Control	7	34.9±25.5 ²⁾	38.6±23.8		7	5.1±2.4	44.7±17.7
CD	100	18.0±11.5	9.4±8.2*		8	2.8±1.3*	38.3±9.6
CD	200	7	11.6±5.5*	12.5±6.6*	6	2.4±1.4*	19.9±7.1**
Cy	10	7	12.8±4.9*	12.7±11.8*	7	1.4±0.6**	19.5±7.8**

¹⁾: after the SRBC immunization; ²⁾: $\bar{x} \pm s$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Tab 6. Effect of CD and Cy on serum hemolysin in mice immunized with SRBC

Group	Dose mg/kg	Day 7 ¹⁾		Day 10	
		No. of mice	HC ₅₀	No. of mice	HC ₅₀
Control	7	167.8±31.4 ²⁾		7	152.2±28.9
CD	100	7	143.7±19.6	7	140.1±41.1
CD	200	7	128.9±25.3*	6	102.5±38.4*
Cy	10	7	92.1±20.5**	8	86.0±25.9*

¹⁾: after the SRBC immunization; ²⁾: $\bar{x} \pm s$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

血清中溶血素水平的测定也得到了类似的结果,白鲜皮 200 mg/kg 和 Cy 对第 7 d 及第 10 d 的血中溶血素抗体含量均有显著抑制作用,而白鲜皮 100 mg/kg 则有抑制趋势。

3 讨 论

贝切特综合征是一类难治性疾病,其治疗需要长时期的免疫抑制疗法,包括糖皮质激素、环磷酰胺等在内的免疫抑制剂是其常用的主要药物。但是,这些药物的长期使用常引起严重的毒副作用。另一方面,自古以来,中医临诊上有应用白鲜皮治疗某些类似贝切特综合征病证的记载^[2],如疮毒、溃疡等。但现代药理研究中除抗炎、抗皮肤真菌作用等个别报道外^[8],其作用几乎未以现代科学得以证明。为此,本研究首先以 PC 所致的接触性皮炎为指标观察了白鲜皮的影响。结果显示,白鲜皮在 PC 攻击后给药显著地抑制了 PC-DTH,200 mg/kg 时抑制率达到 53.1%,但攻击前给药则未能抑制 PC-DTH。PC-DTH 是一种由 T 细胞介导的免疫反应,为了进一步验证其对细胞免疫的作用,我们观察了对另一种迟发型变态反应模型 SRBC-DTH 的影响。结果证明,白鲜皮攻击后给药对 SRBC-

DTH 的抑制率达 50% 以上,同样,攻击前给药未能影响 SRBC-DTH。这些结果表明,白鲜皮对半抗原和粒子抗原等不同性质抗原所致的 DTH 反应均有抑制作用,提示其应用于临床治疗多种原因引起的迟发型变态反应性疾病的可能性。但其对 DTH 反应的诱导相,即效应细胞 T_{DTH} 的形成没有影响,其作用主要是抑制 DTH 反应的效应相即致敏 T 淋巴细胞释放淋巴因子以后的炎症过程。有报道^[9]指出,白鲜皮对多粘菌素及角叉菜胶引起的大鼠足水肿有抑制作用,我们通过二甲苯及鸡蛋清两种炎症模型作了探讨,结果也证明,白鲜皮对两种炎症均有明显的抑制作用,但其作用较之对 DTH 反应效应相的抑制作用为弱。由于 DTH 反应的效应相包括 T 淋巴细胞释放各种淋巴因子、淋巴因子对以巨噬细胞为中心的炎症性细胞的作用及炎症性细胞对组织的作用等多个阶段,故白鲜皮对 DTH 的抑制作用很可能是对上述各个阶段作用的综合结果,因此有必要对其作用机制作进一步的研究。

体液免疫试验结果表明,白鲜皮对小鼠抗 SRBC 抗体的产生有明显的抑制作用,其作用表现在对抗体产生细胞数和血清溶血素

的抑制上,即白鲜皮对抗体产生细胞的增殖和功能以及循环抗体的量均有抑制作用。必须强调指出的是,与作为阳性对照的环磷酰胺不同,白鲜皮对脾重量和脾指数均无影响。

上述结果表明,白鲜皮对细胞免疫和体液免疫均有抑制作用,对迟发型变态反应的抑制主要作用在效应相,抗炎作用是其机制之一。我们的前文^[6]已报道另一中药蒺藜,对DTH反应有显著的抑制作用,它对T_{DTH}细胞形成的抑制作用与白鲜皮对效应相的作用正好呈互补形式。由于许多研究已揭示了细胞性免疫机制在贝切特综合征发病过程中的重要意义,可以设想,这些药物的综合使用将为包括贝切特综合征在内的难治性疾患的治疗开辟新的途径。

参 考 文 献

- 1 中华人民共和国药典(一部). 1990年版,北京:人民卫生出版社,化学工业出版社,1990;91
- 2 江苏新医学院主编. 中药大辞典(上册). 上海:上海人民出版社,1977;737
- 3 Rogers RS, Mitchell WS and Shorter RG. Lymphocytotoxicity in recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol*, 1974; **109**: 361
- 4 Victorino RMN, Ryan P, Hughes GRV and Hodgson HJF. Cell-mediated immune functions and immunoregulatory cells in Behcet's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 1982; **48**: 121
- 5 Hashimoto T. Behcet's disease and inflammation. *Japanese J Inflammation*, 1981; **1**: 354
- 6 徐强,赵红,杭秉茜. 蒺藜对迟发型变态反应的抑制作用. 中国药科大学学报,1991; **22**(1): 12
- 7 Cunningham AJ and Szenberg A. Further improvement in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunology*, 1968; **14**: 559
- 8 曹仁烈,孙在原,王仲德等. 中药水浸剂在试管内抗皮肤真菌的观察. 中华皮肤科杂志,1957; **4**: 286
- 9 台湾中药大型研究计划取得进展. 中药药理与临床, 1991; **7**(3): 48

Immunopharmacological Studies of Cortex Dictamni

I. Effects on Cellular and Humoral Immune Responses

Wang Rong, Xu Qiang, Xu Lihua, Hang Bingqian

Department of Pharmacology of Chinese Materia Medica

The immunopharmacological activities of aqueous extract from Cortex Dictamni (CD) were examined by using 2 kinds of delayed type hypersensitivity (DTH) models and others in mice. Thereby, the administration of CD to the effector phase of DTH markedly inhibited both picryl chloride (PC)-induced contact dermatitis and sheep red blood cells (SRBC)-induced footpad reaction. However, no influence was observed in the mice administered with the drug to the induction phase of both the DTHs. CD also showed a remarkable anti-inflammatory activity against xylene-induced ear and egg white-induced footpad edema and a significant suppression of the antibody production, including PFC formation in spleen and hemolysin level in serum of mice against SRBC. These results suggest that CD could lower both cellular and humoral immune responses, and the anti-DTH activity is presented through inhibiting the effector phase of DTH, including the inflammatory process.

Key words Cortex dictamni (CD); Contact dermatitis; Footpad reaction; Cellular immunity; Humoral immunity; Inflammatory reaction