

蒺藜对迟发型变态反应的抑制作用

徐强 赵红¹ 杭秉茜

(中药药理学教研室)

摘要 蒺藜水提取物对迟发型变态反应影响的研究表明,结果发现,蒺藜明显抑制2,4,6-三硝基氯苯(PC)及2,4-二硝基氯苯(DNCB)所致的接触性皮炎和绵羊红细胞(SRBC)所致的足跖反应。对PC所致迟发型变态反应(PC-DTH)的效应期无影响;对用环磷酰胺(Cy)前处理而增强的PC-DTH,蒺藜致敏后给药有明显的抑制作用,而致敏前给药则无作用;但对未用Cy处理的小鼠,致敏前给予蒺藜则抑制了PC-DTH。此外,蒺藜对二甲苯以及巴豆油引起的小鼠耳壳炎症反应均无影响。以上结果表明,蒺藜水提取物对迟发型变态反应的抑制作用主要是通过对抑制诱导期中的效应细胞(T_{DTH})的分化与形成。

关键词 蒺藜;迟发型变态反应;接触性皮炎

蒺藜为蒺藜科植物蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 的干燥成熟果实,具有平肝解郁、祛风止痒的功效,临床上主要用于头目眩晕、风疹瘙痒等症^[1]。现代药理研究表明,蒺藜全草经石油醚、乙醇提取所得浸膏有抗胆碱酯酶作用,能兴奋大鼠的中枢神经,降低麻醉狗的血压,但对大鼠甲醛性后足肿胀无抗炎作用^[2]。本研究从免疫药理学角度观察了蒺藜水提取物对迟发型变态反应的影响,发现其对三种迟发型变态反应的模型均有明显的抑制作用,并对其作用机制进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

蒺藜 (*Fructus Tribuli*, FT) (南京市药材公司),取药材用10倍量的水煮沸1h,共2次,然后用纱布(16层)过滤并在水浴上浓缩至干,得浸膏粉末,称重,收率为10.88%,实验中蒺藜的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);2,4-二硝基氯苯 (2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB) (上海市化学试剂公司工厂)。

1.2 动物

4~6周龄(体重18~22g)的昆明种雌性小鼠,由中国药科大学动物室及南京药物研究所动物室提供。

1.3 方法

1.3.1 PC所致的接触性皮炎(PC-DTH)^[3]

取昆明种小鼠,刮去腹部之毛,涂1%PC的乙醇溶液0.1ml致敏,6d后用1%PC的橄榄油溶液30 μ l涂于右耳两面进行攻击,20h后用千分尺测量两耳厚度,将两耳的厚度差作为第一次DTH反应的强度。攻击后第4天在腹部涂1%PC的乙醇溶液进行再次致敏,6d后同样用1%PC的橄榄油溶液在右耳攻击,20h后再测两耳厚度,将其厚度差作为第二次DTH反应的强度。在某些实验中不进行第二次致敏。

1.3.2 DNCB所致的接触性皮炎(DNCB-DTH)

收稿日期 1990-07-17 本校1990届毕业生

在小鼠颈背部 sc 7% DNCB 的丙酮溶液 20 μ l 致敏, 10 d 后用同一溶液 30 μ l 涂于右耳两面进行攻击, 16 h 后用千分尺测量两耳厚度, 将其厚度差作为 DTH 的强度。

1.3.3 绵羊红细胞所致的足跖反应 (SRBC-DTH)

SRBC 取自本校动物室绵羊。在无菌条件下用生理盐水洗涤三次, 洗涤完毕后配成 20% 的生理盐水溶液, 在小鼠右后足跖 sc 该溶液 50 μ l 致敏, 5 d 后在左后足跖 sc 同样量的 SRBC 进行攻击, 24 h 后, 用千分尺测量左、右足跖的厚度, 将其厚度差作为反应的强度。

1.3.4 二甲苯所致的炎症反应

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

1.3.5 巴豆油混和致炎液所致的炎症反应

用 2% 巴豆油, 20% 无水乙醇, 5% 蒸馏水及 73% 乙醚混和均匀配成巴豆油混和致

炎液。将该混和致炎液 100 μ l 涂于小鼠右耳两面, 4 h 后测量两耳厚度, 以其厚度差表示炎症反应的强度。

1.3.6 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 的影响

从 PC 致敏当天起经口给予蒺藜 50、100 和 200 mg/kg, 对照组经口给予蒸馏水, 阳性对照组 im 氢化泼尼松 20 mg/kg, 连续 6 d。结果见表 1。对于第一次 DTH 反应, 蒺藜 50 mg/kg 组呈现了抑制的趋势, 100 和 200 mg/kg 组则有显著的抑制作用, 其中以 100 mg/kg 组的作用最强, 可与 20 mg/kg 的氢化泼尼松相匹敌。第二次致敏日起按同样方法继续给药 6 d, 蒺藜 100 mg/kg 组对第二次 DTH 反应也有一定的抑制作用, 但无显著性差异, 而氢化泼尼松仍有强烈的抑制作用。

Tab 1. Effect of FT and Pred on PC-DTH in mice (FT and Pred were given po and im for each 6 days from each sensitization, respectively)

Group	Dose, mg/kg	No. of mice	Primary immune response		Secondary immune response	
			Ear swelling, $\times 10^{-3}$ cm, $\bar{x} \pm s$	Inhibition, %	Ear swelling, $\times 10^{-3}$ cm, $\bar{x} \pm s$	Inhibition, %
Control		8	8.2 \pm 2.6		18.3 \pm 4.5	
FT	50	8	5.3 \pm 4.2	35.4	16.4 \pm 5.4	10.4
	100	8	3.9 \pm 2.6***	52.4	13.7 \pm 8.2	25.1
	200	7	5.5 \pm 2.2**	32.9	17.5 \pm 6.3	4.4
Pred	20	7	4.8 \pm 2.6**	41.5	6.3*	65.6

*mean of 2 mice (others died). ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

在 PC 致敏前 3 d 起经口给予蒺藜, sc 氢化泼尼松, 连续 4 d, 末次给药为致敏前 4 h。结果见表 2。蒺藜各个剂量组对 PC-DTH 均有抑制的趋势, 氢化泼尼松显著地抑制了 PC-DTH。

2.2 对 DNCB-DTH 的影响

自 DNCB 致敏当天起经口给予 250 及 500 mg/kg 的蒺藜, 连续 10 d。结果表明两剂量组均有抑制 DNCB-DTH 的趋势 (表 3)。

Tab 2. Effect of FT and Pred on PC-DTH in mice (FT and Pred were given po and im for 4 days from 3 days before the sensitization, respectively)

Group	Dose, mg/kg	No. of mice	Ear swelling, $\times 10^{-3}$ cm, $\bar{x} \pm s$	Inhibition, %
Control		8	9.4 \pm 7.6	
FT	50	8	6.2 \pm 4.0	34.0
	100	8	5.2 \pm 2.5	44.7
	200	8	6.3 \pm 3.7	33.0
Pred	15	8	2.0 \pm 1.7**	78.7

** $P < 0.05$

2.3 对 SRBC-DTH 的影响

自 SRBC 致敏当天起经口给予蒺藜 250 和 500 mg/kg, 连续 6 d。结果见表 4, 250 mg/kg 组显著地抑制了 DTH, 其强度与 10 mg/kg 的氢化泼尼松相当。

Tab 3. Effect of FT on DNCB-DTH in mice (FT was given po for 10 days from the sensitization)

Group	Dose, mg/kg	No. of mice	Ear swelling, $\times 10^{-3}$ cm, $\bar{x} \pm s$	Inhibition, %
Control		7	15.6 \pm 8.5	
FT	250	8	9.9 \pm 6.8	36.5
FT	500	8	9.8 \pm 4.2	37.2

Tab 4. Effect of FT and Pred on SRBC-DTH in mice (FT and Pred were given po and im for 6 days from the sensitization, respectively)

Group	Dose, mg/kg	No. of mice	Footpad swelling, $\times 10^{-3}$ cm, $\bar{x} \pm s$	Inhibition, %
Control		8	48.0 \pm 12.7	
FT	250	8	34.6 \pm 7.9**	27.9
FT	500	8	43.6 \pm 13.0	9.2
Pred	10	8	34.1 \pm 12.4**	29.0

** $P < 0.05$

2.4 对 PC-DTH 的效应期的影响

用 PC 致敏, 6 d 后再用 PC 攻击, 0、5、10 及 15 h 后连续 4 次经口给予蒺藜 50、100 及 200 mg/kg, sc 氢化泼尼松。结果见表 5, 氢化泼尼松显著地抑制了 PC-DTH, 而蒺藜的各个剂量组对其均无影响。

Tab 6. Effect of FT and Pred on PC-DTH augmented by Cy in mice

Group	Dose, mg/kg	Administration schedule	No. of mice	Ear swelling, $\times 10^{-3}$ cm, $\bar{x} \pm s$	Inhibition, %
Control			8	5.9 \pm 2.5	
Cy-control			8	10.0 \pm 5.1	
FT	50	d-3~-1	7	8.3 \pm 6.9	17.0
	100	d-3~-1	7	11.0 \pm 4.8	-10.0
	200	d-3~-1	7	9.6 \pm 7.7	4.0
FT	50	d0~5	7	4.9 \pm 3.2**	51.0
	100	d0~5	6	4.9 \pm 1.5**	51.0
	200	d0~5	6	7.0 \pm 2.1	30.0
Pred	15	d0~5	8	2.9 \pm 1.1***	71.0

** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs Cy-control

2.6 对小鼠免疫器官的影响

连续 6 d 分别经口给予小鼠 50、100 和 200 mg/kg 的蒺藜, 氢化泼尼松 im 10 mg/kg, 末次给药的第二天, 处死动物, 摘出胸腺和脾脏称

Tab 5. Effect of FT and Pred on the effector phase of PC-DTH in mice (FT and Pred were given po and im for 4 times in an interval of 5 hours from the challenge, respectively)

Group	Dose, mg/kg	No. of mice	Ear swelling ^a , $\times 10^{-3}$ cm, $\bar{x} \pm s$	Inhibition, %
Control		17	5.4 \pm 2.5	
FT	50	16	4.7 \pm 3.6	13.0
	100	16	5.9 \pm 4.4	-9.3
	200	16	5.0 \pm 2.8	7.4
Pred	20	15	1.3 \pm 1.9***	75.9

^aMean of 2 experiments. *** $P < 0.01$.

2.5 Cy 处理小鼠上诱发的 PC-DTH 的影响

在 PC 致敏的 3 d 前给小鼠一次性 ip 150 mg/kg 的 Cy, 然后将给予蒺藜的动物分成两部分, 每部分又分成三个组, 分别给予 50、100 及 200 mg/kg 的蒺藜, 一部分为致敏前给药, 即从 Cy 注射日起连续 ig 3 d, 另一部分为致敏后给药, 即从致敏日起连续 ig 6 d。结果见表 6, Cy 的致敏前处理明显地增强了 PC-DTH (Cy-control)。蒺藜致敏前给药, 各个剂量组对因 Cy 增强的 PC-DTH 均无明显的影响。而致敏后给药, 蒺藜 50 和 100 mg/kg 组显著地抑制了该 DTH, 其耳壳肿胀低于未用 Cy 的对照组, 200 mg/kg 组呈现了抑制的趋势。im 氢化泼尼松对该增强的 DTH 显示了强烈的抑制作用。

重, 并按体重分别计算其脏器指数。结果见表 7。50 mg/kg 的蒺藜明显地增加了胸腺和脾脏的重量及脾指数, 100 mg/kg 组增加了脾脏重量和脾指数, 200 mg/kg 组对胸腺和脾脏无明

显影响。氢化泼尼松则显著地抑制了胸腺和脾脏的重量及其指数。

Tab 7. Effects of FT and Pred on immune organs in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Group	Dose, mg/kg	Weight, mg		Indexe	
		Thymus	Spleen	Thymus	Spleen
Control		90.3±19.3	86.4±21.2	3.4±0.9	3.3±0.9
FT	50	113.0±20.6**	131.2±29.7***	3.9±1.3	4.9±1.3***
	100	97.1±16.8	112.6±27.5**	3.9±0.6	4.5±0.9**
	200	94.0±18.0	94.9±21.8	3.5±0.6	3.5±0.9
Pred	10	5.5±1.6***	27.3±7.0***	0.26±0.16***	1.3±0.3***

** $P<0.05$, *** $P<0.01$

2.7 对二甲苯及巴豆油所致的小鼠耳壳炎症反应的影响

在涂二甲苯致炎前 4 h、2 h 及致炎同时连续 3 次经口给予蒺藜 50、100 及 200 mg/kg, im

氢化泼尼松。结果发现,蒺藜对二甲苯所致小鼠耳壳炎症反应无明显影响,而氢化泼尼松则强烈地抑制了其肿胀(见表 8)。

Tab 8. Effects of FT and Pred on inflammations induced by xylene and croton oil in the ears of mice

Group	Dose, mg/kg	Xylene		Croton oil	
		Ear swelling, $\times 10^{-3}$ cm, $\bar{x} \pm s$	Inhibition, %	Ear swelling, $\times 10^{-3}$ cm, $\bar{x} \pm s$	Inhibition, %
Control		8.8±0.6		20.0±4.8	
FT	50	12.7±7.5	-44.3	17.8±6.8	11.0
	100	6.4±5.4	27.3	18.5±4.2	7.5
	200	9.7±6.0	-10.2	18.6±6.8	7.0
Pred	10	2.2±3.3**	75.0		
	15			4.9±2.3***	75.5

** $P<0.05$, *** $P<0.01$

另一方面,在用巴豆油混和致炎液致炎前 4 h、2 h、致炎同时及致炎后 2 h 连续 4 次经口给予蒺藜的 50、100 及 200 mg/kg, im 氢化泼尼松 15 mg/kg。结果表明,蒺藜对巴豆油所致炎症反应无明显影响,而氢化泼尼松则显示了强烈的抗炎作用(见表 8)。

3 讨论

本研究在观察蒺藜对迟发型变态反应的抑制作用时,以临床上常用的糖皮质激素类药物氢化泼尼松为阳性对照。结果发现,无论致敏前,攻击前及攻击后给药,氢化泼尼松均能显著地抑制 DTH 反应。即对诱导期和效应期均有非特异性、非选择性的抑制作用,氢化泼尼松还强烈地抑制了胸腺和脾脏。与此相对,蒺藜在攻击后给药未能抑制 PC-DTH,推断其

对 DTH 反应的效应期,也就是致敏 T 淋巴细胞释放淋巴因子以后的炎症过程没有影响。本研究中蒺藜不能抑制二甲苯及巴豆油所致的小鼠耳壳炎症反应的结果,以及蒺藜对大鼠甲醛性后足肿胀无抗炎作用的报道^[2]也支持了上述推断,提示蒺藜对 DTH 的抑制作用主要是影响 DTH 的诱导期,很可能是抑制了其效应细胞 T_{DTH} 的形成。

Cy 具有免疫抑制作用,但有报道^[4,5]指出,在免疫前一次大剂量使用 Cy 可增强免疫反应,其机理是抑制了抑制性 T 细胞的前驱细胞。本研究用 150 mg/kg 的 Cy 给小鼠在 PC 致敏的 3 d 前 ip 一次,显著地增强了 PC-DTH,蒺藜致敏前给药对这种 DTH 几乎没有影响,但致敏后给药则抑制了该 DTH。这个结果提示,蒺藜很可能作用于前 T 细胞,抑制其向成

熟的 T 效应细胞分化。由于经 Cy 处理后,前 T 细胞,包括前 T_H/T_{DTH} 和前 T_S 均受到了抑制,故蒺藜致敏前给药不影响该 DTH;此后,前 T_H/T_{DTH} 逐步恢复,故致敏后给予蒺藜有效很可能是因为抑制其恢复或分化增殖。给未用 Cy 处理的正常小鼠服用蒺藜后再致敏、诱发的 DTH 受到了抑制的结果证实了其作用于前 T 细胞的可能性。另一方面,蒺藜对 PC-DTH 的一次免疫应答效果显著,而对二次免疫应答则效果不明显,可能是因为二次免疫前已有 T_{DTH} 细胞作为记忆细胞存在,而蒺藜对已分化形成的 T_{DTH} 细胞影响较少的缘故。

此外,蒺藜对小鼠免疫器官不但没有抑制作用,而且小剂量时明显地增加了胸腺和脾脏的重量,表明其作用方式不同于皮质激素类药物,不会产生作为副作用的免疫抑制作用。

上述结果提示,蒺藜对 DTH 反应的抑制作用主要是通过抑制前 T_{DTH} 细胞向成熟的 T_{DTH} 细胞的分化。蒺藜对 DTH 反应的诱导期

的这种特异性抑制作用可望用于临床防治变态反应性疾病。对其详细的作用机制正在进一步研究。

致谢 日本岐阜药科大学北村二郎助教授惠赠 picryl chloride,本校余伯阳博士鉴定蒺藜品种。

参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典. 1985年版,一部. 北京:人民卫生出版社、化学工业出版社,1985:314
- 2 Chakraborty B, Neogi NC. Pharmacological properties of *Tribulus terrestris* Linn. *Indian J Pharm* 1978;40 (2): 50
- 3 Mori H, Xu Q, Sakamoto O, et al. Immunological mechanisms of antitumor activity of some kinds of Chinese herbs; Meth A-induced delayed type hypersensitivity. *Japan J Pharmacol* 1988;48: 37
- 4 Mitsuoaka A, Morikawa S, Baba M, et al. Cyclophosphamide eliminates suppressor T cells in age-associated central regulation of delayed hypersensitivity in mice. *J Exp Med* 1979;149:1018
- 5 North RJ. Down-regulation of the antitumor immune response. *Adv Cancer Res* 1985;45:1

Inhibition of Delayed Type Hypersensitivity Reactions by *Fructus Tribuli*

Xu Qiang, Zhao Hong, Hang Bingqian

Department of Pharmacology of Chinese Materia Medica

The effect of aqueous extract of *Fructus Tribuli* (FT) on delayed type hypersensitivity (DTH) and its mechanisms were studied. FT markedly inhibited 2 kinds of contact dermatitis induced by picryl chloride (PC) and dinitrochlorobenzene (DNCB), and also showed a significant inhibition of footpad reaction induced by sheep red blood cells (SRBC). To the induction phase of PC-induced DTH (PC-DTH), FT significantly suppressed the primary immune response, and slightly showed a tendency to inhibit the secondary immune response. However, the drug showed no effect on the effector phase of PC-DTH. The pretreatment with cyclophosphamide (Cy) before PC sensitization remarkably augmented PC-DTH. An administration of FT after PC sensitization significantly lowered the augmented PC-DTH, while no influence was observed when given before sensitization. But the administration of FT before sensitization to the Cy-non-treated mice depressed PC-DTH clearly. On the other hand, FT did not show any anti-inflammatory activity against xylene- and croton oil-induced ear edema. These results suggest that FT possesses the anti-DTH activity mainly through inhibiting the differentiation and formation of effector cell (T_{DTH}) in induction phase of DTH.

Key words *Fructus Tribuli*; *Tribulus terrestris* L.; Delayed type hypersensitivity; Contact dermatitis