

麝香及其成药犀黄丸的免疫药理研究

北京市中药科学研究所药理室 顾德辛 王 瑛 田 方 李存来 刘广川

摘要:近年来,对麝香及其成药犀黄丸在防治肿瘤方面有无作用,引起了注意。本文实验结果说明,直接应用麝香,对动物实验性肿瘤 W₂₅₆ 腹水瘤、W₂₅₆ 实体瘤、S₁₈₀ 肉瘤以及 L₆₁₅ 小鼠白血病均无抑制作用。麝香中的蛋白成分有明显抗炎作用,并可能增加 IgM 抗体。另外在抗原 SRBC 存在下,麝香能使实验小鼠的脾脏明显增大。用正交法设计不同组分的犀黄丸,发现天然麝香和天然牛黄合用,能增强对单核吞噬细胞系统的激活作用。

近年来,麝香及其成药犀黄丸在防治肿瘤方面的作用受到注意。为此,我们对麝香和麝香酮作了常规的动物瘤谱筛选*。并和用牛黄与以胆汁酸、胆红素为主的人工牛黄分别配成 3 种不同组分的犀黄丸,观察它们对单核吞噬细胞的激活作用。另外又把麝香制成混悬注射剂,进行非特异性免疫实验。

为 20.68%,合成麝香酮组为 21.22%,均 <30%,无显著差异。

由上可见,虽然采用了不同的给药途径,并选用不同敏感度的瘤株,天然麝香和合成麝香酮对 W₂₅₆ 腹水瘤、W₂₅₆ 实体瘤、S₁₈₀ 肉瘤以及 L₆₁₅ 小鼠白血病等瘤谱均无显著的抑制作用。

一、天然麝香和合成麝香酮(d1-3-甲基-十五环酮)的抗癌实验

(一) W₂₅₆ 雌性大鼠实体瘤:采用外涂麝香(右前肢腋下)、麝香包埋(每只大鼠腋下埋入麝香 20mg)以及口服相当于合成麝香酮 3mg/kg,对大鼠 W₂₅₆ 实体瘤进行疗效观察。结果实验组与对照组在处死时的平均体重和瘤重无显著差异。

(二) W₂₅₆ 雌性大鼠腹水瘤:采用腹腔注射天然麝香和合成麝香酮,剂量均为 300mg/kg,每日一次。结果对照组大鼠的存活天数和实验组无显著差异。

(三) L₆₁₅ 小鼠白血病:采用口服天然麝香(1g/kg)和麝香酮(2g/kg),连续给药 5 天。第 6 天起计算死亡时间。结果全部实验动物均在 8 天内死亡,说明无作用。

(四) S₁₈₀ 雌性小鼠肉瘤:

药物剂量及给药途径同(三),连续给药 8 天,第 9 天处死。天然麝香组的抑制率

二、麝香对免疫系统的作用

把麝香加酸水解后,用日产 KLA-5 型氨基酸自动分析仪进行分析,并计算 17 种氨基酸的含氮量后,求得氨基酸总氮量为 4.125%,乘以 6.25 后,测得天然麝香中含蛋白质为 25.78%,也就是说麝香中有 1/4 为蛋白质成分。

利用麝香本身的抑菌作用,参照海洋软体生物采用匀浆法提取蛋白的方法,将麝香在无菌条件下,加入乳化剂月桂酸聚乙二醇酯(为全部容量的 1%),加防腐剂(苯甲醇 2ml 和尼泊金 0.02g),灭菌注射用水加至 100ml,研成混悬液后,用灭菌的确凉布抽滤,滤液再经 8000 转/分离心,最后灌封于灭菌的 2ml 安瓿中。1ml 相当于含麝香 50mg,供下列实验用。

把上法制得的麝香混悬剂先作以下分析:(1)游离氨基酸;(2)水解后的氨基酸;(3)先用滤纸过滤后再作水解的氨基酸分析。

* 由中国医学科学院药物研究所协助进行。

结果发现：1. 用研磨匀浆离心法制得的麝香混悬注射剂中，提得的蛋白质量约为原麝香蛋白质的1/4左右。

2. 麝香的游离氨基酸含量甚微，仅占水解氨基酸的4.45%，说明混悬剂的主要成分为蛋白或肽类。

3. 制得的混悬剂，几乎都可以通过滤纸，说明可用于注射给药。

4. 制得的麝香注射剂在室温下贮存两年后，未见霉变以及发生沉淀。

(一) 麝香注射剂的消炎作用

以巴豆油引起的小鼠耳部炎症为指标，与氢化可的松作比较，给药途径均为腹腔注射。结果当氢化可的松的剂量为27.5mg/kg时，肿胀抑制率为68.55%。麝香注射剂每20g小鼠注射0.2ml(相当于麝香500mg/kg)，抑制率为73.38%。已知麝香中的蛋白含量为1/4，而制成的混悬剂实际仅提取23%的蛋白，所以小鼠注射0.2ml，折算后给药组的蛋白量约为28mg/kg。说明麝香注射剂中蛋白部分的消炎作用大于氢化可的松。

(二) 麝香注射剂的溶血空斑(改良法)实验

根据北京市肿瘤研究所的溶血空斑改良法，作了以下两方面实验。

1. 以环磷酰胺作阳性对照组

实验动物为雄性小鼠，体重18~20g，每组8只。共分5组：(1)对照组；(2)麝香组。隔天皮下注射麝香混悬注射剂0.2ml(相当于麝香500mg/kg)；(3)环磷酰胺组，剂量0.75mg/只；(4)环磷酰胺组，剂量1mg/只；(3)、(4)两组也隔天皮下注射一次；(5)环磷酰胺+麝香组，环磷酰胺0.75mg/只，麝香500mg/kg，均为隔天皮下注射一次。

以上各组在分别给药3次后的第二天，腹腔注射绵羊红细胞(SRBC)0.2ml。SRBC比积为10%，计数为200万/mm³。给抗原后再给药两次。在给抗原后的第5天，进行抗体IgM的检测。

检测时，SRBC用Hank's液洗涤至无

溶血现象。取小鼠脾块，同组合并研磨，纱布滤过，脾细胞计数为200/mm³。补体采用1:20冰冻干燥豚鼠血清。孵育时，取SRBC 2ml+脾细胞2ml+血清补体1ml，于37℃温孵2.5~3小时，然后在530nm下比色。实验共作两次，结果见表1。

表1 麝香注射剂和环磷酰胺对IgM的影响

组 别	IgM 增加率	
	第一次实验	第二次实验
对 照 组		
麝 香 组	+9%	+11%
环磷酰胺+麝香组	-57%	
环磷酰胺组(0.75mg/只)	-59%	-31%
环磷酰胺组(1mg/只)	-54%	

实验显示，麝香对抗体IgM并无抑制作用，相反似有增加作用。环磷酰胺为免疫抑制剂，实验显示对IgM有明显的抑制作用。同时在取脾时，可见麝香组的脾脏明显增大，颜色加深。而环磷酰胺组的脾脏明显萎缩，颜色较浅。环磷酰胺+麝香组的脾脏仍呈萎缩。

2. 以卡介苗作阳性对照组

为研究麝香是否具有类似佐剂的性质，经参考有关资料^{[1][2]}，在不完全佐剂中采用液体石蜡，乳化剂为月桂酸聚乙二醇酯。在不完全佐剂中分别加入麝香或卡介苗。配制方法如下：

(1) 麝香+不完全佐剂

天然麝香(过100目)	1g
月桂酸聚乙二醇酯	4ml
液体石蜡	16ml
蒸馏水	加至 50ml
以上配制乳剂，每0.5ml含麝香	10mg

(2) 卡介苗+不完全佐剂

卡介苗	25mg
月桂酸聚乙二醇酯	2ml
液体石蜡	8ml
蒸馏水	加至 25ml

以上配制乳剂,每0.5ml含卡介苗0.5mg(北京生物制品研究所生产的划痕用卡介苗,每支1ml含75mg)。

实验动物为雄性小鼠,体重18~22g,共分4组,每组8只:(1)对照组,颈部皮下注射蒸馏水;(2)卡介苗组,颈部皮下注射卡介苗+不完全佐剂;(3)麝香组,颈部皮下注射麝香+不完全佐剂;(4)口服麝香组(以麝香加水配成,每0.2ml含麝香10mg),每天灌胃一次,每次0.2ml。

卡介苗组及麝香组分别在第1,3,5天颈部皮下注射药物。口服组每天灌胃。在给药后第5天腹腔注射SRBC 0.2ml。SRBC浓度为10%,红细胞计数为235万/mm³。给抗原后不再注射给药,口服组仍每天灌胃一次。给抗原后第4天,动物拉颈椎处死,取脾,剪取1/3,每4只小鼠作为一组,制成匀浆,用Hank's液稀释计数,浓度为5×10⁶/ml。孵育时用SRBC 2ml(48000万),脾细胞稀释液0.4ml(200万),Hank's液1.6ml,1:20干燥豚鼠血清稀释液(1ml+Hank's液20ml)1ml。在37℃孵育2.5小时,然后在530nm下比色。实验显示卡介苗有免疫诱导作用,而麝香不明显,但无抑制作用。在分取脾脏时,同样见到麝香组的脾脏比对照组明显增大。因此进一步作脾指数的观察。

(三) 脾指数的观察:

实验分3组,每组5~6只小鼠,体重17.5~23g。(1)对照组,不给任何药剂,也不给SRBC;(2)麝香+抗原组,颈部皮下隔天注射一次麝香不完全佐剂,方法及剂量同前,在给药后第5天腹腔注射SRBC,浓度及剂量同前;(3)麝香组,给药条件同(2)组,但在第5天不给SRBC抗原。以上各组于给药后第8天处死。取脾称重。

$$\text{脾指数} = \frac{\text{脾重(mg)}}{\text{鼠重(g)}}$$

结果见表2

实验结果说明,麝香加不完全佐剂再给以抗原,动物脾脏的增大有非常显著差异。这和作溶血空斑时观察到的现象相一致。

表2 麝香对小鼠脾脏的影响

组别	N	平均鼠重g	平均脾重mg	平均脾指数	$\sum(x-\bar{x})^2$	t值	P
对照组	6	25.9	127.416	4.909	1.41058		
麝香+不完全佐剂+抗原	5	19.8	221.5	11.112	40.3798	4.75	<0.01
麝香+不完全佐剂	5	18.8	141.4	7.402	32.7549	2.11	>0.05

(四) 麝香混悬注射剂临床免疫反应的初步观察:对麝香混悬注射剂作了以下安全性检查:(1)急性毒性试验:取20g左右小鼠10只,尾静脉注射0.08ml(相当麝香4mg),无任何反应;(2)热原试验:家兔注射剂量为1ml/kg,合乎热原规定;(3)健康人过敏试验:健康人一名,皮内注射0.1ml,20分钟内无反应,18小时后注射部位出现红肿现象,过一天后消退,提示有迟发性过敏的可能。在此基础上,临床上对3个肿瘤患者作有关机体免疫作用的初步观察。

给药途径为肌肉注射,隔2~3天注射2ml,共给药一个月。在给药期间均未发生任何不良反应。观察指标为淋巴细胞转化率和玫瑰花斑试验。

淋巴细胞转化试验是测定机体细胞免疫功能的方法之一,正常人的转化率一般约为70%^[3],而肿瘤病人的细胞免疫功能往往低下。正常人的E-玫瑰花形成细胞(ERFC)的数值约为65±15%^[4]。ERFC数目的变化与淋巴细胞转化率相平行。实验表明(1)在上述给药条件下,并没有出现抑制细胞免疫的作用;(2)从数值来讲,似乎有提高,但因例数少,给药剂量及方法还待摸索,故尚不能肯定。

三、犀黄丸方剂的初步分析

参考正交法,设犀黄丸全方为三个因素,两个水平。三个因素即麝香、牛黄、乳香和没药,为避免复杂化,先把乳香和没药视为一个因素。把麝香和合成麝香酮,牛黄和人工牛黄视作两个水平。

由于受灌胃量的限制,故把犀黄丸的体积及比例略作改变。取牛黄3分,麝香1钱,

比例为 1:3.3 (原方为 1:5), 乳香和没药各 1.5 钱, 加黄米配成散剂, 总量为 5 钱, 简称犀黄散。

实验用雄性小鼠, 体重 14~16g, 每只动物灌犀黄散 0.051g (取犀黄散 1.2g, 加蒸馏水配成 14ml, 每只动物灌 0.6ml, 相当于麝香剂量 500mg/kg), 连续给药 15 天。

采用炭末廓清法以检测单核吞噬细胞的功能。印度墨汁的浓度为两份墨汁加一份蒸馏水稀释。按 20g 体重注射 0.1ml, 超过 20g 按比例增加。室温控制在 $15 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

用吞噬指数 K 进行计算^[5]:

$$K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{t_2 - t_1}$$

t_1 : 第一次眼眶取血时间

t_2 : 第二次眼眶取血时间

$\log C_1$: 第一次 O.D 的对数值

$\log C_2$: 第二次 O.D 的对数值

实验结果见表 3。

表3 不同的麝香、牛黄对单核吞噬细胞系统的影响

组别	动物数	平均体重 (g)	吞噬指数 $K \times (10^{-2})$	P
空白组	11	24.8	$K = 3.5836$	
天然麝香+天然牛黄+乳、没	9	21.167	$K = 4.6589$	< 0.05
人工麝香+天然牛黄+乳、没	11	19.90	$K = 3.4895$	无效
天然麝香+人工牛黄+乳、没	10	20.80	$K = 3.8282$	无效

结果表明:

1. 麝香或牛黄采用人工配制品, 则均无激活单核吞噬细胞系统的作用。这和目前认为的麝香和牛黄均含有肽类成分可能有关^[6]。

2. 天然麝香配以人工牛黄亦无激活作用, 但改为用天然牛黄后, 即有显著差异, 说明两者合用有增强作用。这和文献报道的六神丸中麝香和牛黄的抗炎作用不是相加而是增强有类似之处。

3. 乳香、没药对 REC 系统似无明显作用, 但由于犀黄散中的乳香、没药量仅为原犀黄丸中的 1/10 左右, 故尚难作最后定论。

讨 论

麝香的消炎作用愈来愈得到证实和重视, 文献报道麝香的抗炎作用对炎症前期的效力为芦丁的 3 倍, 水相酸钠的 40 倍; 对渗出期为水相酸的 10 倍, 氢化可的松的 20 倍, 对后期的作用不十分显著, 仅为氢化可的松的 1/10。这种作用已确证为某种肽类所致。目前国内外对麝香中含有肽类开展了不少研究工作。据我们的分析, 麝香含蛋白约 1/4 以上, 为此我们作了一些免疫反应方面的初步试验, 观察到麝香的水溶性蛋白不会导致免疫机能的抑制, 并似乎见到对体液免疫和细胞免疫方面有增强现象, 应引起重视。另外一些中成药中常常是采用麝香和牛黄合用, 从我们的实验结果看, 麝香和牛黄合用能增强对吞噬细胞的激活作用, 这和某些实验结果是一致的。同时麝香在抗原存在下, 能使实验动物的脾脏明显增大。因此有深入研究的必要。有的文献提到, 麝香对离体肿瘤细胞的呼吸抑制作用高于正常组织, 同时动物瘤苗用麝香悬液处理后, 防止了腹水的发生, 这些是否和麝香的蛋白成分有关, 也是值得研究的。临床反映, 应用犀黄丸后可见炎症包块吸收、瘢痕组织软化以及纤维组织包裹的松解, 这可能是犀黄丸诸药合用的结果, 因此弄清麝香蛋白的作用机制以及犀黄丸中诸药的相互关系, 有利于整理和提高祖国医学理论。

参 考 文 献

- [1] “肿瘤免疫治疗”《天津医药》, 3:150, 1977 同誌, (2):89, 1977
- [2] 《实用免疫学讲义》, 医科院首都医院基础医学组编 科学出版社, 1976
- [3] 广州市医药工业研究所: “PHA 对外周淋巴细胞转化试验方法”, 《PHA 用于肿瘤治疗的临床报告及有关研究的资料选编》, 第一集, 1977
- [4] 《细胞免疫及检测法》, P2~35, 北京市肿瘤防治研究所编
- [5] DM Weir: Handbook of Experimental Immunology, vol. 2. «Cellular Immunology», 2nd.edition.
- [6] 木村正康: 《代谢》, 10(5), 临时增刊号, 和汉药, 283~286, 1973