

腹腔注射四君子湯及茯苓影響老鼠脾臟 B 淋巴球分泌免疫球蛋白

林瑩芳 莊婉婷 曾哲明*

國立臺灣師範大學生物學系

摘要

四君子湯是補氣健脾的基本處方，主治脾胃氣虛，能利水消腫。茯苓為四君子湯的佐藥，為中醫藥方中使用很廣的藥材，具有利水滲濕、補氣健脾及安神之功效。前人研究指出，老鼠脾臟淋巴球若在離體以含有四君子湯之培養基培養，則其生長受到顯著抑制，抗體分泌降低，只有 IgA 分泌有促進現象，而此免疫調節作用與茯苓有關。本實驗進一步將四君子湯及茯苓萃取液以腹腔注射方式打入老鼠體內，連續施打三天之後，取出脾臟細胞分析其生長及分泌 IgG、IgA 及 IgM 等抗體的能力。實驗結果顯示，老鼠施打四君子湯之後，B 淋巴球生長不受影響，但是 B 淋巴球 IgG 的分泌隨施打藥劑濃度的增加而明顯增加，且施打不同劑量之後，IgA 分泌量也比控制組高。老鼠施打茯苓之後，脾臟 B 淋巴球的活性受到抑制，但茯苓在老鼠體內顯著促進 B 淋巴球 IgG 的分泌能力，對 IgA 及 IgM 則無影響。因為茯苓是四君子湯的主要成分之一，故推測四君子湯促進 B 淋巴球製造 IgG 的藥效可能來自茯苓。

關鍵詞：四君子湯、茯苓、B 淋巴球

緒言

中藥是中國人幾千年來在生活中所累積的寶貴經驗結晶，在許多疾病治療中具有相當之療效。近幾年來中藥對人類免疫系統之影響愈來愈受重視，如靈芝、甘草、人參、黃耆…等對人類免疫系統之影響皆有報導。

四君子湯是補氣的基本處方，主治脾胃氣虛，能補氣健脾、利水消腫。本方以補氣的人參為主藥，佐以白朮與茯苓，再配合有調和諸藥作用的甘草所構成（楊志一，1984）。方中人參甘溫，扶脾養胃，補中益氣，為本方君藥。白朮苦溫，健脾燥濕，扶助運化，為本方臣藥。茯苓甘淡，合白朮以健脾滲濕，為本方佐藥。甘草甘溫益氣，補

中和胃，為本方使藥。合用以奏甘溫益氣，健脾養胃之效（中國醫學科學院，1979）。部份中藥典（如「和劑局方」）則以黨參代替人參，作為四君子湯的配方（戴新民，1992）。

茯苓是四君子湯的主成分之一，在中藥界已使用了兩千多年，多用作利水滲濕藥，亦是補氣健脾方劑中使用很廣的一種藥材，如四君子湯、參苓白朮散等皆含茯苓。根據統計，在中、日、韓三國複方中，茯苓被列為最常用藥中的第四位，僅次於甘草、地黃及人參。茯苓是寄生於松科植物樹根上多孔菌科 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 之乾燥菌核，味乾而淡、藥性平和、利水而不傷氣，具有利水滲濕，健脾胃及寧心安神之功效。臨床

*通信作者(corresponding author)：曾哲明(Jerming Tseng)；FAX: 886-2-29312904；E-mail: t43009Fu-Ling.@cc.ntnu.edu.tw

上廣泛應用於治療小便不利，水腫漲滿，痰飲咳嗽、脾虛少食及失眠心悸等（顏正華，1991）。

茯苓的主要成份為 β -茯苓聚糖（ β -Pachyman），約佔乾重 93%，和少量三萜類化合物、乙酰茯苓酸（Pachymic acid）、茯苓酸（Tumulosic acid）等（高正金，1985）。現代研究方法分析，茯苓除了利尿作用外，還可以降血糖及抗胃潰瘍；煎劑可抑制金色葡萄球菌、大腸桿菌與變形桿菌之生長，且其乙醇萃取物能殺死鉤端螺旋體，水煎劑則無效。而成份中的羧甲基茯苓多糖由 β -1,3 主鏈及 β -1,6 支鏈結合而成，具抗腫瘤的作用，並能顯著提高小鼠腹腔巨噬細胞的吞噬能力。茯苓中的多糖成份能增強免疫功能，抑制腫瘤，卻無損於正常細胞，並可抑制小鼠肉瘤₁₈₀生長，提高巨噬細胞及淋巴細胞攻擊腫瘤細胞的能力，顯著促進脾臟產生抗體，同時使癌細胞 cAMP 量升高 12-39.4%，抑制癌增殖，並可以提高抗癌藥物及化學治療的療效（孫孝宏，1992）。

本實驗室曾經研究茯苓對離體培養下的小鼠脾臟 B 淋巴球（賴怡琪等，1993）及人體周邊血液淋巴球（呂丹妮等，1994）生長與分泌能力的影響，發現不論是茯苓生藥或朱拌炮製品之甲醇萃取物，對 B 淋巴球皆有胞殺作用，但顯著促進單位細胞數 IgA 的分泌量。隨後進一步研究四君子湯及其四種藥材對人體周邊血液 B 淋巴球分泌抗體的影響（呂丹妮等，1995），發現四君子湯有顯著胞殺作用，此作用應該是茯苓和甘草所引起的，黨參及白朮對細胞的生長則無影響，而四君子湯顯著促進人體 B 淋巴球及 B 淋巴細胞株（DAKIKI）分泌 IgA 抗體，此促進作用與茯苓有關。

爲了瞭解離體培養與活體施藥之藥效是

否相同，本研究則進一步將四君子湯及茯苓的萃取液，以腹腔注射的方式打入老鼠體內，連續施打三天之後，取出脾臟，分析其脾臟淋巴細胞分泌抗體的能力，以瞭解茯苓及四君子湯是否在活體內也可影響脾臟淋巴細胞分泌抗體。

材 料 與 方 法

實驗動物

BALB/c 小白鼠：8~10 周大，雄性，購自中研院國家動物中心或台大實驗動物中心，短期飼養於師大生物系動物房，使用 Laboratory rodent diet（PMI feeds Inc. U.S.A.）餵養，內含 crude protein>23.0%，crude fat>4.5%，crude fiber 0%，ash<8.0%，附加 minerals<2.5%，飼養數天後即進行實驗。

四君子湯及茯苓生藥萃取液置備

自迪化街老成記中藥店，購得同一批人參、白朮、茯苓、甘草，依中藥科學製劑（順興堂，台北）各成分之比例，取人參 6g、白朮 5g、茯苓 5g、甘草 2.5g 加 100ml 蒸餾水，隔甘油加熱煎煮至 50ml（即 1/2 體積），再將藥湯以 1400rpm 離心 10 分鐘，取其上清液後再高速離心 10000xg 30 分鐘，以去除固體殘留，收集上清液後，再以 Speed Vac 蒸乾，並估算四君子湯萃取物乾重，再以適量 PBS（phosphate buffered saline）溶出四君子湯萃取液，使其最終濃度爲 100mg/ml，測試前以 0.2 μ m millipore 無菌過濾後使用

茯苓購自迪化街老成記中藥行，爲罐裝茯苓中藥粉末，從中取 5g 茯苓粉末加 100ml 蒸餾水，隔甘油加熱煎煮至 50ml（即 1/2 體

積)，再將藥湯以 1400rpm 離心 10 分鐘，取其上清液後再高速離心 10000xg，30 分鐘以去除固體殘留，收集上清液後，再以 Speed Vac 蒸乾，並估算茯苓萃取物乾重，以適量 PBS 溶出茯苓萃取液，最終濃度為 10mg/ml，測試前以 0.2 μ m millipore 無菌過濾使用。

老鼠腹腔注射

取四隻 8~10 週大的 Balb/c 公鼠，分四組標記、稱重後，作連續三天之腹腔注射。第一組老鼠為每日施打四君子湯萃取液 10mg/g/ml（四君子湯藥量/克體重/注射體積），第二組老鼠每日施打四君子湯萃取液 5mg/g/ml，第三組老鼠每日施打四君子湯萃取液 1mg/g/ml，第四組老鼠為對照組，每日施打 PBS。

取四隻 8~10 週大的 Balb/c 公鼠，分四組標記、稱重後，作連續三天之腹腔注射。第一組老鼠為每日施打茯苓萃取液 1mg/g/ml（茯苓藥量/克體重/注射體積），第二組老鼠每日施打茯苓萃取液 0.5mg/g/ml，第三組老鼠每日施打茯苓萃取液 0.1mg/g/ml，第四組老鼠為對照組，每日施打 PBS。

分離脾臟淋巴球

施打過中藥萃取液的小白鼠，於斷頸及 70% 酒精噴灑消毒後，用剪刀剪開其皮膚及腹膜，取出脾臟，另準備一盛有 10ml RPMI-1640 細胞培養液之培養皿，其中放置細胞研磨器，將脾臟置於細網上，以研磨器磨碎，使細胞分離懸浮於培養液中。如此收集到的脾臟細胞自培養皿吸出，裝入 50ml 離心管中，以 400xg 離心 10 分鐘，去除上清液並拍散細胞後，加 1ml RBC lysing buffer（0.1mM EDTA, 0.15M NH_4Cl ）處理 10 分鐘，以除去紅血球。白血球再清洗三次後，

將細胞移至培養皿中，於二氧化碳培養箱（37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 100%飽和水蒸氣）放置三小時，使附著性細胞附著於培養皿上，隨後收集非附著性細胞，進行下列實驗，此部份之細胞富含 B 淋巴球及 T 淋巴球。

脾臟淋巴球的培養

脾臟淋巴球以 RPMI-1640 細胞培養液調整成濃度為 1×10^6 個細胞/ml，培養在 24 格細胞培養盤（Nunc. Denmark）中，每格為 1×10^6 細胞，每格隨後加入 10 μ g LPS（脂多醣）活化 B 淋巴球，將細胞培養至第三天後，每天收取細胞及培養基上清液，計算細胞數目及其存活率，以酵素免疫分析法測其上清液中 IgG、IgM 及 IgA 的濃度。

酵素免疫分析法測定免疫球蛋白

酵素免疫分析法之操作流程參考 Peterman and Bulter（1989）發表的方法，並加以修改。

IgG

首先將 Goat anti-mouse IgG（以 PBS 稀釋成 1/1000）加入 96 格的 ELISA 測試盤（Nunc. Denmark），每格加入 100 μ l，放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 中隔夜，使其附著於盤上，翌日拿出測試盤用 PBS-0.05% Tween20 清洗三次，再以 1% PBS-gelatin 為 blocking buffer 進行 blocking，即每格加入 100 μ l，放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 中作用 60 分鐘，取出清洗後，再加入 IgG 標準液及測試樣品，IgG 標準液依序稀釋為 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0 μ g/ml 等各濃度。加好之測試盤放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 中作用 120 分鐘，以 PBS-0.05% Tween20 清洗三次，再加入 goat anti-mouse IgG-HRP（Horse radish peroxidase；稀釋成 1/2500）每格加入 100 μ l，繼續在 37 $^{\circ}\text{C}$ 中作用 60 分

鐘，再以 PBS-0.05% Tween20 清洗三次，再加入 100 μ l 的受質溶液 (0.03% H_2O_2 ; 0.1% o-phenylenediamine; 0.1M citrate buffer, pH4.5)，令其於室溫中作用 30 分鐘，隨即加入 2N H_2SO_4 終止反應，然後用 ELISA reader (主波長 490nm, 輔波長為 630nm) 讀 OD 值。最後參考標準曲線之數值，計算出各待測樣品所含 IgG 之濃度。

IgA

測試方法與 IgG 相似，IgA 標準液依序為：0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.0015625、0 μ g/ml 等各濃度。二次抗體則使用 goat anti-mouse IgA-HRP (稀釋 1/2500)。

IgM

測試方法與 IgG 相似，IgM 標準液依序為：1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0 μ g/ml 等各濃度。二次抗體則使用 goat anti-mouse IgM-HRP (稀釋 1/2500)。

統計方式

以 ANOVA 分析四君子湯及茯苓萃取液對 B 淋巴球功能的影響關係，以 Wilcoxon rank sum 作各組劑量間的比較，P 值 ≤ 0.05 視為顯著差異。

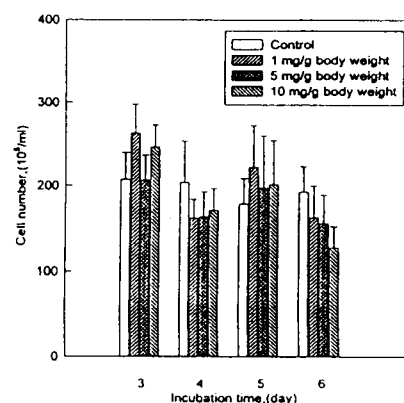
結 果

四君子湯對脾臟 B 淋巴球分泌抗體能力的影響

腹腔施打過四君子湯萃取液的老鼠，脾臟 B 淋巴球在離體培養時，不論實驗組或控制組，其活細胞數 (圖一) 及存活率 (圖二) 皆隨天數而減少，且不受藥物劑量的影響。但其免疫球蛋白的製造能力，則有顯著的變

化。

四君子湯顯著促進 IgG 的分泌，且促進作用隨劑量的增加而增加 (圖三)；組間之分析結果發現，每克體重施打 1mg 劑量的老鼠，脾臟細胞在第三天和第六天 IgG 的分泌有顯著增加；每克體重施打 5mg 劑量的老鼠，脾臟細胞在第三天、第四天和第六天 IgG 的分泌有顯著增加；而每克體重施打 10mg 劑量的老鼠，脾臟細胞在第三、四、五、六天 IgG 的分泌皆有顯著增加的情況，由以上結果推論，四君子湯確可顯著增加老鼠脾臟細胞 B 淋巴球分泌 IgG 的能力 (圖三)。

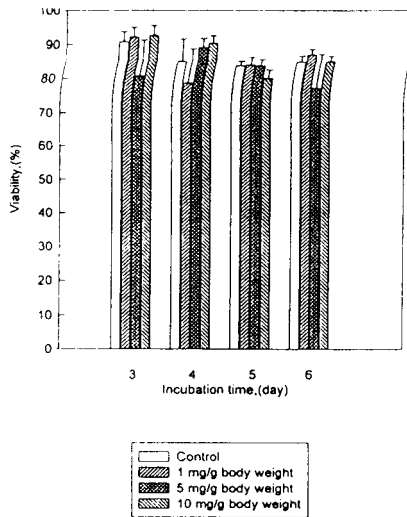


圖一、活體處理四君子湯對老鼠 B 淋巴球生長之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 1mg、5mg、10mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，計算細胞數目。圖中之數據為四次實驗之平均值士標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異 (P<0.05)。

Figure 1. Dose and time-dependent effects of Si-Jiun-Tsi-Tang treatment *in vivo* on the growth of murine B-lymphocytes. Mice were i.p. injected with 1 mg, 5 mg and 10 mg /g body weight/day of Si-Jiun-Tsi-Tang extract, respectively. After three days of consecutive treatment, the spleen cells were isolated and cultured *in vitro*. The cells were harvested from day 3 to day 6. The viable cell number of the spleen cells were counted. Data were mean \pm s.e.m. of four similar experiments. * indicated a significant difference (p<0.05) from the control group.

至於對 IgA 製造能力的部份（圖四），組間之分析結果發現，每克體重施打 1mg 劑量的老鼠，脾臟細胞在第三天和第五天 IgA 的分泌有顯著增加。每克體重施打 5mg 劑量的老鼠，脾臟細胞在第三、四、五、六天 IgA 的分泌有顯著增加。而施打 10mg 劑量的老鼠，脾臟細胞在第三、四、五、六天 IgA 的分泌都有顯著增加的情況，可見四君子湯也可增加老鼠脾臟 B 淋巴球分泌 IgA 的能力。

四君子湯對老鼠脾臟淋巴球分泌 IgM 並沒有顯著影響（圖五）。

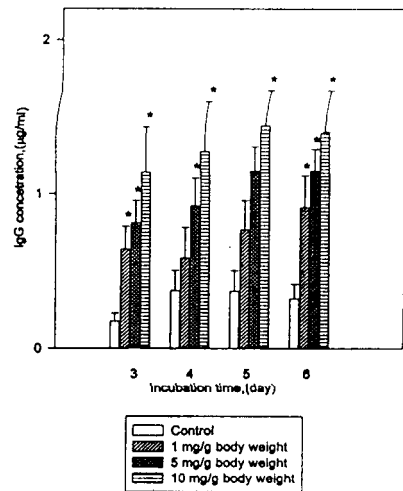


圖二、活體處理四君子湯對老鼠 B 淋巴球活性之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 1mg、5mg、10mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，計算細胞活性。圖中之數據為四次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異（ $P < 0.05$ ）。

Figure 2. Dose and time-dependent effects of Si-Jiun-Tsi-Tang treatment *in vivo* on the viability of murine B-lymphocytes. Mice were i.p. injected with 1 mg, 5 mg and 10 mg /g body weight/day of Si-Jiun-Tsi-Tang extract, respectively. After three days of consecutive treatment, the spleen cells were isolated and cultured *in vitro*. The cells were harvested from day 3 to day 6. The viability of the spleen cells were counted. Data were mean \pm s.e.m. of four similar experiments. * indicated a significant difference ($p < 0.05$) from the control group.

茯苓對脾臟淋巴球分泌抗體能力的影響

爲了探討茯苓在四君子湯調節免疫功能時的角色，本實驗隨後對小白鼠腹腔施打茯苓萃取液，結果顯示其脾臟細胞之活細胞數，不論實驗組或控制組皆不隨天數增加而減少，且不受藥物劑量的影響（圖六）；而存活率除了隨天數而下降外，自培養第五天後即顯著隨藥物劑量的增加而降低，表示施打茯苓會顯著降低小白鼠脾臟細胞的活性（圖七）。

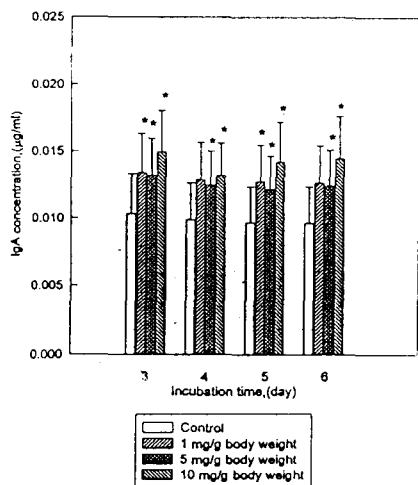


圖三、活體處理四君子湯對老鼠 B 淋巴球分泌 IgG 之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 1mg、5mg、10mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，以 ELISA 測定 IgG 的濃度。圖中之數據為五次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異（ $P < 0.05$ ）。

Figure 3. Dose and time-dependent effects of Si-Jiun-Tsi-Tang treatment *in vivo* on the IgG secretion by murine B-lymphocytes. Mice were i.p. injected with 1 mg, 5 mg and 10 mg /g body weight/day of Si-Jiun-Tsi-Tang extract, respectively. After three days of consecutive treatment, the spleen cells were isolated and cultured *in vitro*. The culture supernatants were harvested from day 3 to day 6, and the IgG concentration in each sample was estimated by an ELISA. Data were mean \pm s.e.m. of five similar experiments. * indicated a significant difference ($p < 0.05$) from the control group.

施打過茯苓萃取液的小白鼠，其分泌 IgG 的能力以 ANOVA 分析，有顯著增強的趨勢（圖八），然而因為個體之間分泌量的差異過大，組間分析結果，實驗組與控制組間並無顯著差異。而 IgA（圖九）及 IgM（圖十）的分泌量則無顯著變化。

討 論

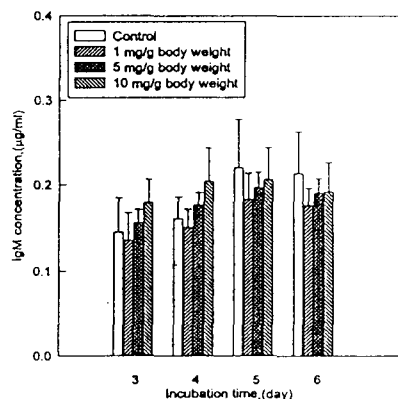


圖四、活體處理四君子湯對老鼠 B 淋巴球分泌 IgA 之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 1mg、5mg、10mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，以 ELISA 測定 IgA 的濃度。圖中之數據為五次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異， $P < 0.05$ 。

Figure 4. Dose and time-dependent effects of Si-Jiun-Tsi-Tang treatment *in vivo* on the IgA secretion by murine B-lymphocytes. Mice were i.p. injected with 1 mg, 5 mg and 10 mg /g body weight/day of Si-Jiun-Tsi-Tang extract, respectively. After three days of consecutive treatment, the spleen cells were isolated and cultured *in vitro*. The culture supernatants were harvested from day 3 to day 6, and the IgA concentration in each sample was estimated by an ELISA. Data were mean \pm s.e.m. of five similar experiments. * indicated a significant difference ($p < 0.05$) from the control group.

本研究證明老鼠施用四君子湯熱水萃取液，可增強其脾臟細胞分泌 IgG 及 IgA 的能力；而老鼠單獨施用茯苓熱水萃取液，也可刺激 IgG 的製造，顯示四君子湯調節免疫反應的藥效，部份來自茯苓。而由抗體分泌量的增加程度分析，四君子湯的其他成份也可能刺激抗體的分泌。

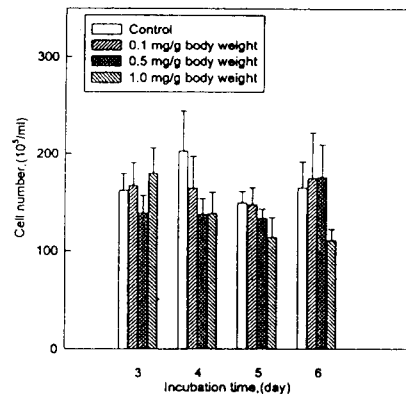
離體與活體施用茯苓及四君子湯，其結果有明顯差別。將離體培養的脾臟 B 淋巴球以四君子湯或茯苓處理，其分泌 IgG 及 IgM 的能力，皆看不出有顯著的影響，主要是由



圖五、活體處理四君子湯對老鼠 B 淋巴球分泌 IgM 之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 1mg、5mg、10mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，以 ELISA 測定 IgM 的濃度。圖中之數據為三次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異（ $P < 0.05$ ）。

Figure 5. Dose and time-dependent effects of Si-Jiun-Tsi-Tang treatment *in vivo* on the IgM secretion by murine B-lymphocytes. Mice were i.p. injected with 1 mg, 5 mg and 10 mg /g body weight/day of Si-Jiun-Tsi-Tang extract, respectively. After three days of consecutive treatment, the spleen cells were isolated and cultured *in vitro*. The culture supernatants were harvested from day 3 to day 6, and the IgM concentration in each sample was estimated by an ELISA. Data were mean \pm s.e.m. of three similar experiments. * indicated a significant difference ($p < 0.05$) from the control group.

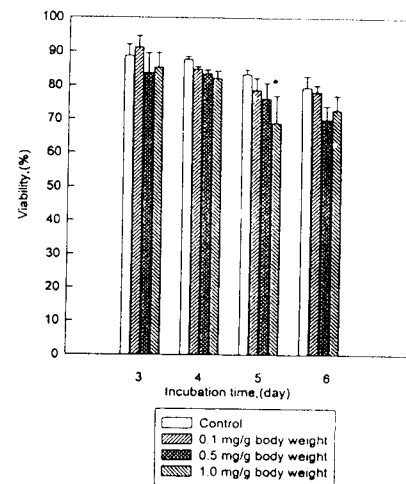
於茯苓及四君子湯直接處理細胞時，對淋巴球有胞殺效應，故淋巴球存活率明顯降低，活細胞數顯著減少，導致分泌抗體的細胞數下降，可是 IgA 在培養基中的濃度卻不受影響，如以單位細胞數而言，細胞分泌 IgA 的能力有顯著增加的趨勢（賴怡琪，1993）。從離體實驗結果也顯示，四君子湯藥效可能來自茯苓。以本研究之結果而言，在活體施打四君子湯的實驗中，三種施打劑量在統計上都對 IgA 的分泌有顯著影響，但只施打茯苓則對 IgA 沒有顯著影響，顯然離體與活體的實驗結果不同，故四君子湯在活體中對 IgA 的促進作用，可能來自茯苓以外的成分。此



圖六、活體處理茯苓對老鼠 B 淋巴球生長之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 0.1mg、0.5mg、1.0mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，計算細胞數目。圖中之數據為四次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異 ($P<0.05$)。

Figure 6. Dose and time-dependent effects of Fu-Ling treatment *in vivo* on the growth of murine B-lymphocytes. Mice were i.p. injected with 0.1 mg, 0.5 mg and 1.0 mg /g body weight/day of Fu-Ling extract, respectively. After three days of consecutive treatment, the spleen cells were isolated and cultured *in vitro*. The cells were harvested from day 3 to day 6. The viable cell number of the spleen cells were counted. Data were mean \pm s.e.m. of four similar experiments. * indicated a significant difference ($p<0.05$) from the control group.

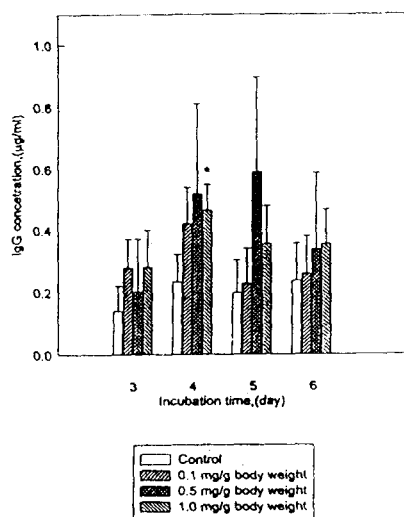
外，施打過四君子湯及茯苓的老鼠，其脾臟淋巴球分泌 IgG 的能力明顯增強，這是離體實驗沒有的結果。造成離體與活體實驗有顯著不同結果的原因，除了在離體實驗對細胞存活率的影響之外，不論是茯苓或四君子湯，當被注射入動物體之後，可能在活體的酵素環境中，改變了有效成分的分子結構，從而對 B 淋巴球造成不同的影響。此外，在活體狀態下，脾臟除了基質細胞及纖維原細胞之外，含有 20-30%T 淋巴球，40-50%B 淋巴球及少量的 NK 細胞，四君子湯及茯苓



圖七、活體處理茯苓對老鼠 B 淋巴球活性之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 0.1mg、0.5mg、1.0mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，計算細胞活性。圖中之數據為三次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異 ($P<0.05$)。

Figure 7. Dose and time-dependent effects of Fu-Ling treatment *in vivo* on the viability of murine B-lymphocytes. Mice were i.p. injected with 0.1 mg, 0.5 mg and 1.0 mg /g body weight/day of Fu-Ling extract, respectively. After three days of consecutive treatment, the spleen cells were isolated and cultured *in vitro*. The cells were harvested from day 3 to day 6. The viability of the spleen cells were counted. Data were mean \pm s.e.m. of three similar experiments. * indicated a significant difference ($p<0.05$) from the control group.

是否會透過其他細胞(如 T 淋巴球)的分泌, 間接影響 B 淋巴球的抗體製造能力, 也未可知。先前的研究顯示, 茯苓在離體實驗下, 可促進第一介白質 (IL-1)、腫瘤壞死因子 (TNF- α) 及第六介白質 (IL-6) 的製造 (Yu and Tseng, 1996)。IL-6 為 IgG、IgA、IgM 抗體製造的主要促進者, 也是 B 淋巴球的主要分化因子之一 (Bertolini and Benson, 1990), 故 IL-6 的增加可能是茯苓在活體

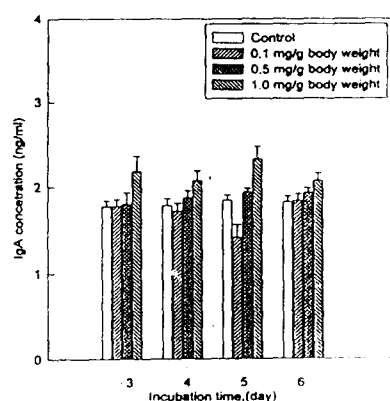


圖八、活體處理茯苓對老鼠 B 淋巴球分泌 IgG 之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 0.1mg、0.5mg、1.0mg 的四君子湯萃取液, 三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞, 以 ELISA 測定 IgG 的濃度。圖中之數據為三次實驗之平均值士標準機差, * 代表與控制組相較有顯著差異 ($P < 0.05$)。

Figure 8. Dose and time-dependent effects of Fu-Ling treatment *in vivo* on the IgG secretion by murine B-lymphocytes. Mice were i.p. injected with 0.1 mg, 0.5 mg and 1.0 mg /g body weight/day of Fu-Ling extract, respectively. After three days of consecutive treatment, the spleen cells were isolated and cultured *in vitro*. The culture supernatants were harvested from day 3 to day 6, and the IgG concentration in each sample was estimated by an ELISA. Data were mean \pm s.e.m. of three similar experiments. * indicated a significant difference ($p < 0.05$) from the control group.

中促進 IgG 分泌的原因。但茯苓可抑制轉型生長素 (TGF- β) 的製造 (Yu and Tseng, 1996), 而 TGF- β 是 B 淋巴球轉換為 IgA 製造者的誘導因子。顯然茯苓在活體中無法顯著促進 IgA 的製造能力, 可能與抑制 TGF- β 分泌有關。目前本研究室正著手探討茯苓及四君子湯對脾臟淋巴球製造第十介白質 (IL-10) 的影響, 試圖進一步解答此問題。

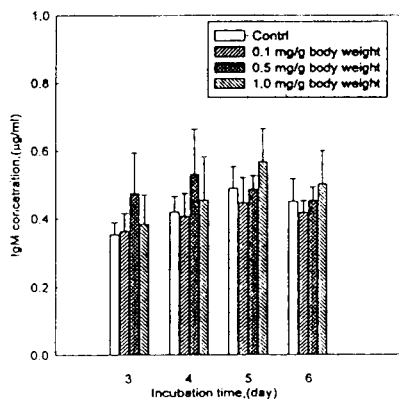
四君子湯及茯苓對 B 淋巴球的影響應該是專一性的, 因為四君子湯及茯苓的主要



圖九、活體處理茯苓對老鼠 B 淋巴球分泌 IgA 之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 0.1mg、0.5mg、1.0mg 的四君子湯萃取液, 三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞, 以 ELISA 測定 IgA 的濃度。圖中之數據為四次實驗之平均值士標準機差, * 代表與控制組相較有顯著差異 ($P < 0.05$)。

Figure 9. Dose and time-dependent effects of Fu-Ling treatment *in vivo* on the IgA secretion by murine B-lymphocytes. Mice were i.p. injected with 0.1 mg, 0.5 mg and 1.0 mg /g body weight/day of Fu-Ling extract, respectively. After three days of consecutive treatment, the spleen cells were isolated and cultured *in vitro*. The culture supernatants were harvested from day 3 to day 6, and the IgA concentration in each sample was estimated by an ELISA. Data were mean \pm s.e.m. of four similar experiments. * indicated a significant difference ($p < 0.05$) from the control group.

成份為多醣體及植物鹼或有機酸（顏正華，1991），這些化合物皆不是很好的免疫原，無法有效的激發專一性免疫反應。此外，本研究測的是 IgG, IgA 及 IgM 總量，並未估計專一性 IgG, IgA 及 IgM 的量，如以圖三的數據而言，以 10mg/g 體重之劑量施打四君子湯，則老鼠脾臟淋巴球分泌抗體的總量，是控制組的五倍左右。總之，四君子湯與茯苓非專一性的促進 B 淋巴球整體免疫球蛋白分泌的增加，而不只是增加抗四君子湯及茯苓的抗體。



圖十、活體處理茯苓對老鼠 B 淋巴球分泌 IgM 之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 0.1mg、0.5mg、1.0mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，以 ELISA 測定 IgM 的濃度。圖中之數據為三次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異（ $P < 0.05$ ）。

Figure 10. Dose and time-dependent effects of Fu-Ling treatment *in vivo* on the IgM secretion by murine B-lymphocytes. Mice were i.p. injected with 0.1 mg, 0.5 mg and 1.0 mg /g body weight/day of Fu-Ling extract, respectively. After three days of consecutive treatment, the spleen cells were isolated and cultured *in vitro*. The culture supernatants were harvested from day 3 to day 6, and the IgM concentration in each sample was estimated by an ELISA. Data were mean \pm s.e.m. of three similar experiments. * indicated a significant difference ($p < 0.05$) from the control group.

實驗過程中每 5g 的茯苓平均可得到 0.04g 的烘乾萃取物，而 18.5g 四君子湯（其中含 5g 茯苓）則平均可得 3.97g 的烘乾萃取物，在比例上茯苓萃取物與四君子湯萃取物的比值是 1:99.25。故施打 10mg 的四君子湯時，其中只含有 0.1mg 的茯苓，而單獨施打 0.1mg 的茯苓，藥效比 10mg 四君子湯低，顯示四君子湯其他成分也有促進抗體分泌的效果，同時增強了茯苓的功效。

透過對中藥及單方的研究，可詳細分析複方中各種藥材的獨特藥效，以及藥材間的交互影響，有利中藥針對某一特定的藥性，做適當的調整，如本研究顯示之四君子湯調節 IgG 分泌的藥效，即可能透過茯苓劑量的調整，而增強或減緩四君子湯這一方面的功能。

參考文獻

- Bertolini, J. N. and E. M. Benson. 1990. The role of human interleukin-6 in B-cell isotype regulation and differentiation. *Cell. Immunol.* 125: 197-209.
- Peterman J. H. and J. E. Butler 1989. Application of theoretical considerations to the analysis of ELISA data. *Biotech.* 7: 608-615.
- Saxon, A. R. H., S. J. Ramer, and P. J. Clements. 1978. Attachment role of gonococcal pili: optimum conditions and quantitation of adherence of isolated pili to human cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 61: 922.
- 顏正華 1991. 中藥學。知音出版社 332-334.

- 高正金 1985. 新編中藥大字典(中)。新文豐出版社 1549.
- 孫孝弘 1992. 中醫治療學原理。知音出版社 276.
- 賴怡琪, 劉倩君和曾哲明 1993. 中藥茯苓對老鼠 B 淋巴球分泌免疫球蛋白的影響。師大生物學報 28: 53-63.
- 呂丹妮, 余淑絹和曾哲明 1994. 茯苓對人體血液淋巴球分泌免疫球蛋白的影響。師大生物學報 29(1): 43-51.
- 中國醫學科學院藥物研究所等編 1979. 中藥志。人民衛生出版社 152-155.
- 呂丹妮, 陳安德, 張玉冬和曾哲明 1995. 補氣健脾藥四君子湯調節人體 B 淋巴球分泌 A 型免疫球蛋白。師大生物學報 30 (2): 83-95.
- 戴新民 1992. 中國藥方學。啓業書局 653-654.
- (接受日期: 1999.6.11)

Peritoneal Administration of Si-Jun-Zi-Tang Affects the Immunoglobulin Secretion by Murine Spleen B Lymphocytes

Ying-Fang Ling, Wan-Ting Chung and Jerming Tseng*

Department of Biology, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan

ABSTRACT

Shy-Jiun-Tsi-Tang is one of the widely used Bu-Chy drug in Chinese herbal medicine. The major pharmacological effects of Shy-Jiun-Tsi-Tang are to improve the functions of gastrointestinal system and to reduce the inflammatory response. Fu-Ling, the scleroderma of *Poria cocos* (Schw.) Wolf, is one of the major ingredients of the Shy-Jiun-Tsi-Tang. Fu-Ling has long been used as a sedative and diuretic. Previous report indicated that Shy-Jiun-Tsi-Tang significantly suppressed the growth of mouse spleen lymphocytes and reduced the IgG and IgM secretion by B-lymphocytes but the IgA secretion was increased after *in vitro* treatment. Based on the data obtained from our experiment, the immunoregulatory activity of Shy-Jiun-Tsi-Tang should be attributed to the presence of Fu-Ling. In this report, the study further extend to *in vivo* condition by peritoneal administration of Shy-Jiun-Tsi-Tang or Fu-Ling. The mice were treated with the drug for three consecutive days, and then the non-adherent spleen cells were isolated and assayed for their ability to grow and secrete immunoglobulin (IgG, IgM and IgA). Result suggested that the growth and viability of spleen cells were unaffected by Shy-Jiun-Tsi-Tang but the abilities of B-lymphocytes to secrete IgG and IgA were enhanced as a dose-dependent manner. In the subsequent experiments, the spleen cells isolated from the mice treated with Fu-Ling were studied. The cells showed a reduction in viability under *in vitro* culture but were unchanged in the cell growth. However, the cells showed an increase in IgG secretion. The amounts of IgA and IgM secretion were unaffected. Therefore, the ability of Shy-Jiun-Tsi-Tang to potentiate IgG secretion by spleen B-lymphocytes *in vivo* might also be partially attributed to the pharmacological activity of Fu-Ling.

Key words: Shy-Jiun-Tsi-Tang, Fu-Ling, B-lymphocytes

* 通信作者(corresponding author): 曾哲明(Jerming Tseng); FAX: 886-2-29312904; E-mail: t43009Fu-Ling.@cc.ntnu.edu.tw