

四君子湯活體內調解免疫球蛋白製造的作用機制：第十介白質的角色

The Mechanism That mediates The Regulatory Effect of Si-Jun-Zi-Tang on Immunoglobulin Production *In Vivo*: Role of Interleukin-10

曾哲明

國立臺灣師範大學

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。第十介白質 (IL-10) 為 B 淋巴球分化為抗體製造細胞的促進因子之一，老鼠連續施打三天中藥萃取液之後，顯示其脾臟細胞分泌 IL-10 的能力有顯著的增加，尤其以施打每克體重 10mg 之四君子湯或 0.5mg 之茯苓最明顯。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 淋巴球製造免疫球蛋白的藥效可能來自茯苓，且可能透過對 IL-10 分泌量的調節而達成。

關鍵詞：四君子湯，茯苓，B 淋巴球，第十介白質

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 secret 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 secret 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. Interleukin-10 (IL-10) is one the facts that induces the B-lymphocyte to differentiate into an antibody-producing cells. The mice treated with the drugs for three consecutive days showed a significant increase in the IL-10 secretion by spleen cells. The maximal dose for IL-10 induction was 10 mg per g body weight for Si-Jun-Zi-Tang and 0.5 mg per g body weight for Fu-ling. Therefore, the ability of Shy-Jiun-Tsi-Tang to potentiate Ig secretion by spleen B-lymphocytes *in vivo* may also be partially attributed to the pharmacological activity of Fu-Ling, and IL-10 is involved in this regulatory activity.

Keywords : Shy-Jiun-Tsi-Tang, Fu-Ling, B-lymphocytes, Interleukin-10

壹、前言

四君子湯是補氣的基本處方，在宋代著名方書「太平惠民和劑局方」中即有記載(1)，主治脾胃氣虛，能補氣健脾、利水消腫。四君子湯之組成為人參四錢、茯苓四錢、白朮四錢、炙甘草二錢(2)，故以重量比而言，四種藥方之重量比為2:2:2:1。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。炙甘草甘溫益氣，補中和胃，為本方使藥。合用以奏甘溫益氣、健脾養胃之效(3)。

人參，始載於本經，為五加科多年生植物人參 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的乾燥根。栽培者為“園參”，野生者為“山參”。主產於我國的吉林、遼寧、黑龍江，以及朝鮮半島、蘇聯東西伯利亞等地。現代研究顯示，人參成分含有 13 種以上的皂，總稱為人參皂 R_x ，單體有人參皂 Ro 、 Ra 、 Rb_1 、 Rb_2 、 Rb_3 、 Rc 、 Rd 、 Re 、 Rf 、 Rg_1 、 Rg_2 、 Rg_3 、 Rh_1 、 Rh_2 等。人參莖葉及花亦含有相似成分；此外尚含有多種氨基酸、糖類、人參酸、維生素、黃酮類，以及人參特殊香味的 β -欖香烯與人參醇等揮發性成分等。還含鎂、鋁、磷、鉀及鍍等無機物質。人參有大補肺中元氣、瀉火、益土、生金、明目、開心、益智、添精神、定驚悸、除煩渴、通血脈、破堅積、消痰水的功用，而在現代醫學則用來治療危重症的急救、腫瘤、性機能障礙、糖尿病、阿狄森氏病、脾虛症、高血壓和動脈粥樣硬化症等(4)。

白朮屬菊科植物，學名為 *Atractylodes macrocephala* Koidz，主要產於中國安徽、浙江等區域。白朮根莖含揮發油(4)，有明顯而持久的利尿作用，並增加鈉的排泄量，有降低血糖及抗血凝作用(5)，水浸液對絮狀表皮癬菌及星形奴卡氏菌有抑制作用(6)。白朮能增強網狀內皮系統的吞噬功能，且能明顯促進小腸蛋白質的合成，對消化功能紊亂的脾虛泄瀉或便秘均有治療作用(7)。臨床証明白朮煎劑口服，可使淋巴細胞轉化率及血清 IgG 含量顯著上升，具有免疫刺激作用(6)，白朮有補氣健脾、燥濕利水、止汗、安胎的功效(7)。

茯苓是多孔菌科植物茯苓的乾燥菌核，學名為 *Poria cocos*(Schw.)Wolf，多寄生在松樹根上。茯苓的外皮呈黑褐色，被稱為「茯苓皮」；皮內側呈淡紅色，被稱為「赤茯苓」；內呈白色部份則為「白茯苓」，即一般所用的茯苓；而穿過茯苓塊的松根部份稱為「茯神」，四種部位各有其藥效。茯苓主要產地為中國的雲南、江蘇及湖南等地區。茯苓菌核含 β -茯苓聚糖(β -Pachyman)，約占乾重 93%此外還含樹膠、甲殼質、蛋白質、脂肪、固醇、卵磷脂、葡萄糖、組氨酸、膽鹼， β -茯苓聚糖分解酵素、脂肪酵素、蛋白酵素等(5)。茯苓能利尿，乙醇提取物能使家兔降血糖、增強離體蛙心之收縮與心跳率，對金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、變形桿菌，均有抑制作用，茯苓次聚糖對小鼠肉瘤₁₈₀抑制率可達 96.88%。在臨床應用上，有(1)利尿滲濕：消除蛋白尿，治療因代謝功能紊亂，和各種營養缺乏的下肢浮腫，治腳

氣病。(2)健脾補氣：增加胃腸道的消化吸收，制止泄瀉。補腎安神；茯苓有良好的滋補功效，能鎮定安眠(4)。

甘草屬於豆科植物，學名為 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.，主要產地為中國遼寧、蒙古、甘肅及新疆等地區。根和根狀莖含甘草甜素(Glycyrrhizin)甘草的藥理作用包括：(1)鹽皮質激素及糖皮質激素樣作用；促進鈉、水的滯留，排鉀增加，增強和延長可體松(cortisone)的作用，機制為抑制皮質激素在體內破壞，或減少與蛋白質結合，使血中游離皮質激素濃度升高，從而增強其作用；(2)抗發炎、抗過敏：可能和抑制組織氨對血管的通透性，或降低細胞對刺激的反應性有關；(3)增加干擾素產生；(4)抗消化道潰瘍作用；(5)對腸管、子宮等平滑肌，有明顯解除痙攣的作用；(6)可解毒，解毒機制可能是，甘草水解後可釋出葡萄糖醛酸與毒物結合解毒，其次甘草甜素對毒物有吸附作用，與藥用碳一樣，在胃內吸附毒物減少毒物吸收而解毒；(7)鎮咳祛痰；(8)鎮痛；(9)抗菌；(10)降血脂。在臨床應用上，可治療產後腦垂體前葉機能減退，帕金森氏病、胃及十二指腸潰瘍症、肺結核、肝炎、心率不整、食物中毒、尿崩症、慢性咽炎等(7)。

本實驗室 1993 年開始研究茯苓對免疫系統的調節，發現不論是茯苓生藥或朱拌炮炙品之乙醇萃取物，對老鼠 B 淋巴球皆有胞殺作用，其存活率降低之程度隨茯苓萃取液增加而增加，但是茯苓顯著促進 B 細胞分泌 IgA (8)。1994 年則再針對人類周邊血液 B 淋巴球進行研究，結果顯示茯苓生藥的 50%熱乙醇萃取液，對 IgA 的分泌呈微量但顯著的促進作用。此外，茯苓對 IgM 之分泌呈現促進作用，但對 IgE 之分泌則有顯著之抑制作用，以矽膠色層分析之結果，顯示促進 IgM 分泌之成份(中極性)與抑制 IgE 分泌之成份(低極性)並不相同 (9)。1995 年擴大對四君子湯及其單方作整體的研究，發現四君子湯對人體周邊血液單核細胞有胞殺作用(細胞總數不變，但細胞存活率降低)，不過由於 IgA 分泌量未受影響，故如果以單位存活細胞之 IgA 分泌量而言，四君子湯有促進 IgA 分泌量的功能。四君子湯的四種單方之中，只有茯苓的表現與四君子湯類似，即降低細胞存活率但不降低 IgA 的分泌。故四君子湯對周邊血液單核細胞的影響，應該是來自茯苓 (10)。

免疫球蛋白的製造與細胞激素息息相關。涉及免疫球蛋白製造的細胞激素包括 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TGF- β (11) 及 IL-10 (12) 等。本研究室先前的實驗結果顯示，四君子湯中的茯苓萃取液可顯著促進人類週邊血液單核細胞分泌 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6，但是顯著抑制 TGF- β 的分泌 (13)。TGF- β 早就被發現與老鼠 (11) 及人類 (14) IgA 製造有關，而且 TGF- β 可誘使製造 IgM 的 B 淋巴球轉換成製造 IgA 的 B 淋巴球 (isotype switching)，可見茯苓對 B 淋巴球分泌 IgA 的正面調解作用，來自其他細胞激素。

第十介白質 (IL-10) 是分子量 18KDa 的蛋白，其核苷酸及胺基酸序列與 Epstein-Barr 病毒基因 BCRF1 很相似 (15)，IL-10 是一種多功能的細胞激素，早

期被發現是老鼠 T_H2 淋巴球的產物，可抑制 T_H1 淋巴球分泌細胞激素 (15)，隨後科學家發現在人體免疫系統中，IL-10 可由 T_H1 及 T_H2 細胞製造，且廣泛的抑制 T 細胞及單核球、巨噬細胞分泌細胞激素的功能 (16)。IL-10 也可由單核球/巨噬細胞分泌出來，抑制細胞表現 MHC Class II，抑制細胞製造 IL-6、TNF、GM-CSF、G-CSF 及 IL-8 等與發炎有關的細胞激素 (16, 17)。

然而 IL-10 對某些免疫細胞的功能也有促進的效果。IL-10 延長老鼠 mass cell 細胞株在離體培養狀況下的存活及增生 (18)，最重要的是，IL-10 在 B 淋巴球受到抗 Ig 抗體及 anti-CD40 活化後，顯著促進了活化之 B 細胞製造 IgG、IgM、IgA 及 IgE (12)。也有報導指出，IL-10 與 TGF- β 合作之下，顯著促進 SIgD⁺B 淋巴球轉換成製造 IgA 的細胞 (19)。

本研究延續對四君子湯及茯苓的序列研究，設定兩個待答問題如下：

- 一、由於本實驗室歷年來有關四君子湯及茯苓的研究，皆以分離出來的 B 淋巴球在離體狀態下以藥物處理，如果將藥物直注射到老鼠腹腔，是否也可分泌免疫球蛋白的功能？
- 二、施打四君子湯及茯苓萃取液對老鼠製造 IL-10 的影響如何？是否與藥物對 B 淋巴球的調解作用符合？

參、材料與方法

一. 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及台大實驗動物中心，短期飼養於師大生物系動物房，使用 Laboratory rodent diet (PMI feeds Inc. U.S.A.) 飼養，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。

二. 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 10000 $\times$ g，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，使其最終濃度為 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為罐裝茯苓中藥粉末，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 $10000\times g$ ，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 $0.2\mu\text{m}$ millipore 無菌過濾使用。

三. 老鼠腹腔注射

取四隻 3~10 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。

四. 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 $400\times g$ 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°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。

五. 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 $10\mu\text{g}$ 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。

六. 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) (20) 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 $100\mu\text{l}$ ，放在 4°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°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°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 preoxidase；稀釋成 1/2500) 每格加入 100 μ l，繼續在 37°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% H₂O₂；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 H₂SO₄ 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)。

七、IL-10 濃度測定

以 Cyto Set ELISA kit (R & D Systems, MN, USA) 測之，以單株抗 mIL-10 抗體為第一抗體 Coating 在 ELISA plate 上，每 Well 加入 100 μ l 之 IL-10 標準品或待測樣品，37°C 中作用 20 分後，以沖洗液沖洗五次，每 Well 再加入 100 μ l 之 anti-IL-10 biotinylated conjugate，37°C 中作用 20 分，以沖洗液沖洗五次，每 Well 再加入 100 μ l 之 streptoavidin-HRP conjugate，37°C 中作用 20 分後，以沖洗液沖洗五次，每 Well 再加入 50 μ l 之 substrate solution (含 H₂O₂ 及 tetramethylbenzidine)，室溫下作用 30 分鐘後，以 ELISA Reader 450nm 測 O.D 值，再以標準曲線求得樣品所含之 IL-10 的量。

八、統計方式

以 ANOVA 多變項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 Willcoxon rank sum 作各組劑量間的比較，P 值 ≤ 0.05 視為顯著差異。

肆、結果

一、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）。

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）。

二、茯苓對脾臟淋巴球分泌抗體能力的影響

為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）。

施打過茯苓萃取液的小白鼠，其分泌 IgG 的能力有顯著增強的趨勢（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。

三、四君子湯及茯苓對脾臟細胞分泌 IL-10 的影響

IL-10 為重要的 B 淋巴球分化因子，本研究進一步探討四君子湯及茯苓是否經由對 IL-10 製造量的調節，而影響 B 淋巴球製造免疫球蛋白的能力。結果顯著，由施打過四君子湯萃取液的老鼠分離的脾臟細胞，與控制組相較，在 IL-10 的分泌量上有顯著增加的現象（圖十一），當脾臟細胞培養至第三天時，施打 5mg/g 體重及 10mg/g 體重藥物之老鼠，IL-10 的分泌量約為控制組的 5~6 倍（圖十一）。

如果只施打茯苓萃取液，則老鼠脾臟的 IL-10 分泌量亦顯著增加（圖十二）；不過，在 0.5mg/g 體重的劑量下最高，約為控制組的 5~6 倍，而劑量 1.0mg/g 體重時，雖然仍有顯著差異，但是與 0.5mg/g 體重之劑量相較，有減少的現象（圖十二）。

伍、討論

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 及 IgM 的製造，顯示四君子湯調節免疫反應的藥效可能部份來自茯苓。而由 IL-10 分泌量的增加程度分析，四君子湯及茯苓可能藉由對 IL-10 分泌量的提昇，進而調節免疫球蛋白的分泌。有關 IL-10 的角色，將需要利用抗 IL-10 抗體進一步加以證實。

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 (8)。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 (13)。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 (21)，故 IL-6 的增加可能是茯苓在活體中促進 IgG 及 IgM 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。

四君子湯及茯苓對 B 淋巴球的影響應該是非專一性的，因為四君子湯及茯苓的主要成份為多醣體及植物鹼或有機酸 (4)，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，本研究所測的是 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。

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。

本研究室歷年來的研究發現，四君子湯可促進人類免疫細胞分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF α (13)、GM-CSF (22)，而本研究結果顯示，四君子湯可顯著促進 IL-10 的製造，由於 IL-10 有抑制免疫細胞製造 IL-6、TNF α 、GM-CSF 等細胞激素的能力 (16)，故本研究之結果似乎與先前的研究結果不符。然而，當四君子湯激發細胞激素的製造時，可能有一定的先後順序，如 TNF α 在藥物處理 3 小時後即達到分泌高峰；IL-1 及 IL-6 則在 6 小時之後有顯著增加的現象 (13)；GM-CSF 在藥物作用 3 小時後是受抑制的，但 18 小時後在製造量上有顯著增加 (22)。反觀 IL-10 之分泌形態，其最佳分泌量出現在 48 小時以後，可能此時的 IL-10 之功能在使 IL-1、IL-6、TNF α 及 GM-CSF 的量回歸正常值。有趣的是，以上五種細胞激素對 B 淋巴球分泌抗體的能力，皆有正面調解作用。

陸、結論與建議

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。經由本研究結果，也肯定了四君子湯對細胞激素製造量的調節能力，藉由其對細胞激素的調節，四君子湯應該可廣泛的影響人體的免疫系統。此一推論如何在人體實驗中獲得印證，將是本研究往後的重要課題。此外，四君子湯的四種單方——人參、白朮、茯苓、甘草在四君子湯藥效中扮演何種角色，仍有待深入探討。

柒、參考文獻

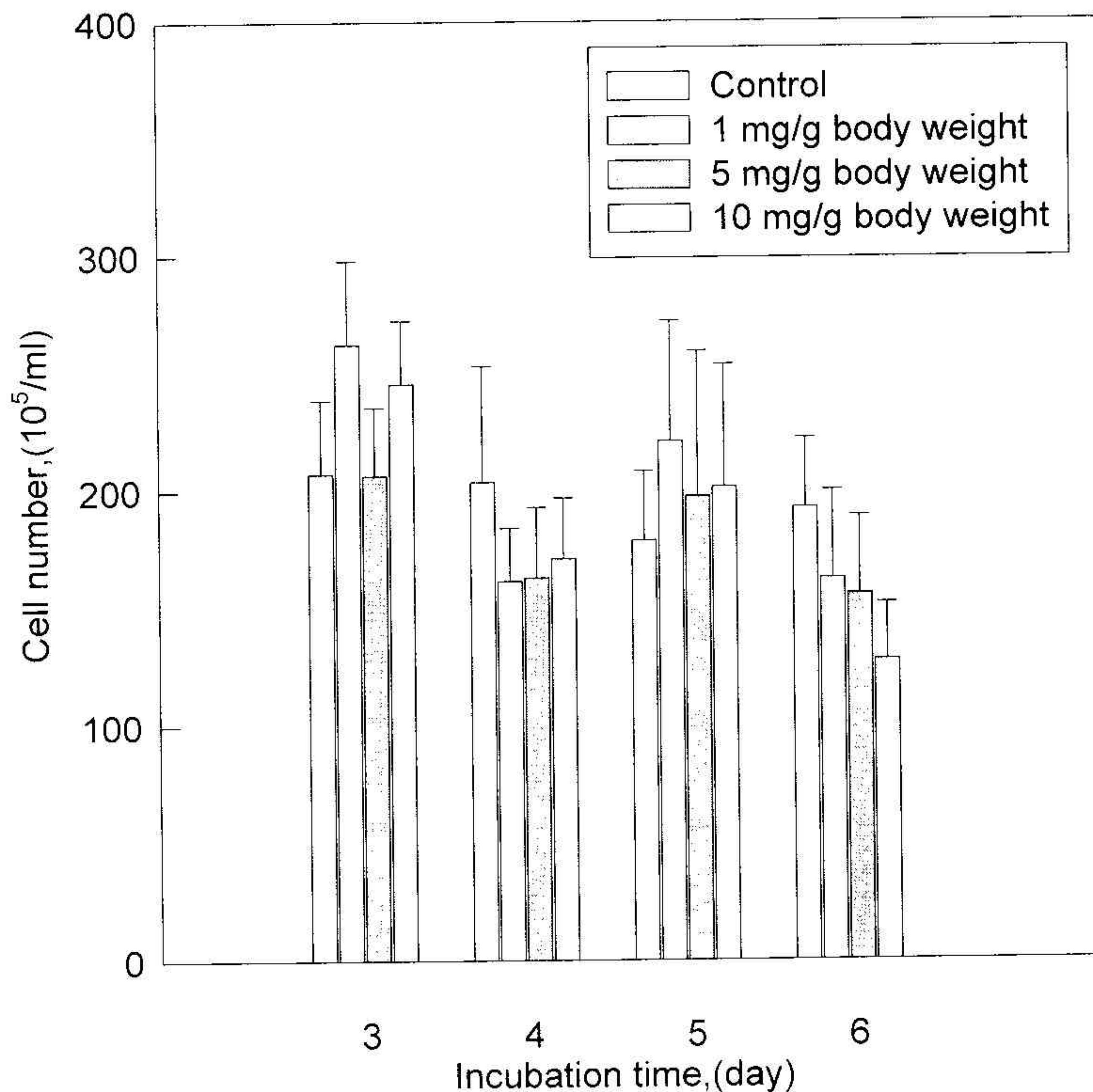
1. 孫孝洪：中醫治療學原理。知音出版社 1992；342-6.
2. 戴新民：中國藥方學。啟業書局 1992；653-4.
3. 中國醫學科學院藥物研究所等編：中藥志。人民衛生出版社 1979，152-5.
4. 顏正華：中藥學。知音出版社 1991；332-4.
5. 王筠默，周金黃：中國藥理學。上海科學技術出版社 1986；116-7，238-41，

246-51.

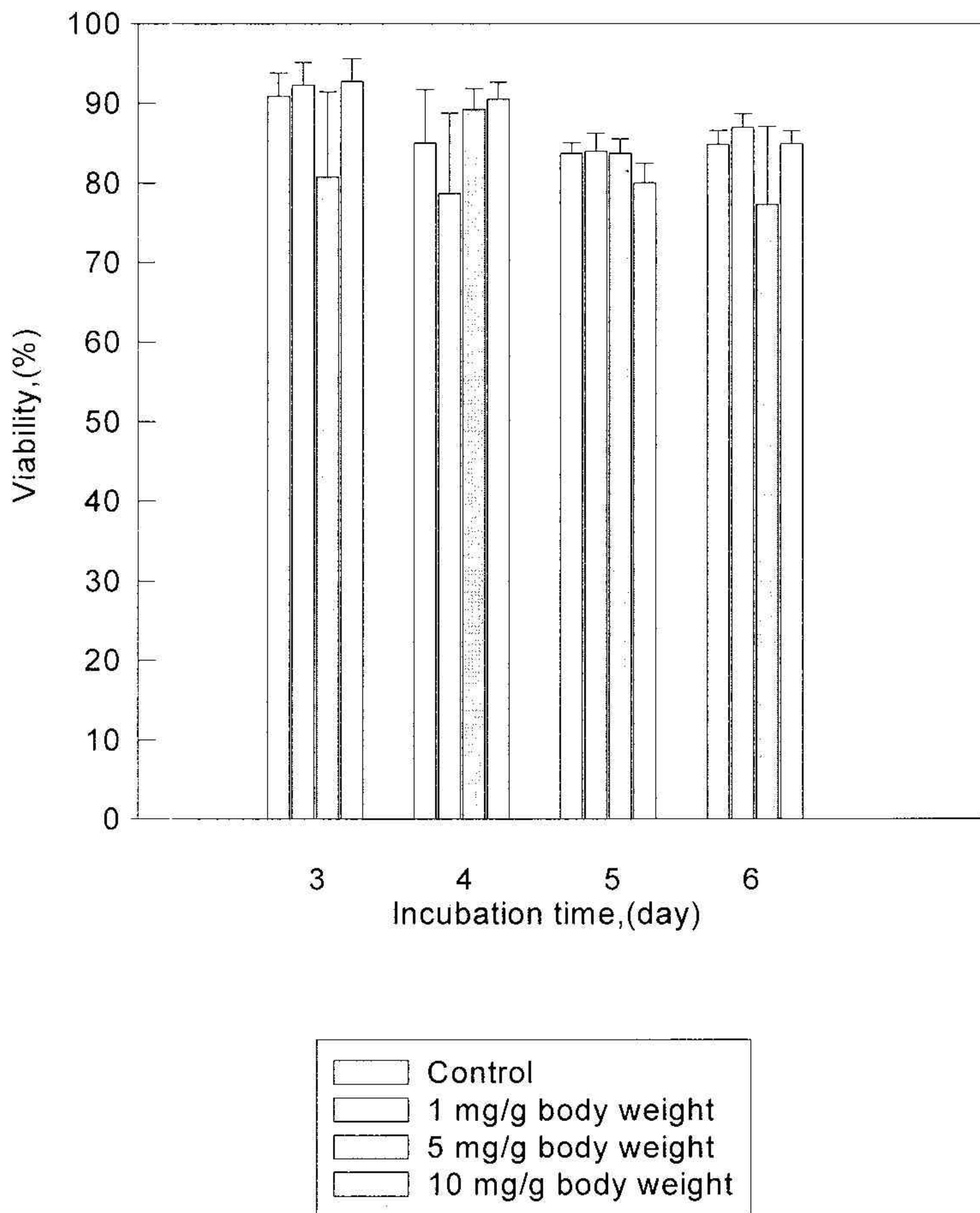
6. 劉接寶：臨床實用彩色科學中藥大典(國際中文版2). 立得出版社1982;66-8.
7. 高正金：新編中藥大字典(中). 新文豐出版社1985.
8. 賴怡琪, 劉倩君, 曾哲明：中藥茯苓對老鼠B淋巴球分泌免疫球蛋白的影響. *師大生物學報* 1993, 28:53-63.
9. 呂丹妮, 余淑絹, 曾哲明：茯苓對人體血液淋巴球分泌免疫球蛋白的影響. *師大生物學報* 1994; 29(1):43-51.
10. 呂丹妮, 陳安德, 張玉冬, 曾哲明：補氣健脾藥四君子湯調節人體 B 淋巴球分泌 A 型免疫球蛋白. *師大生物學報* 1995; 30(2):83-95.
11. Coffman RL, Lebman DA and Shrader B: Transforming growth factor β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170:1039-44.
12. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW and Banchereau J: Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:1890.
13. SJ Yu., Tseng J: Fu-Ling, a Chinese herbal drug, modulates cytokine secretion by human peripheral blood monocytes. *Int J Immunopharmac* 1996; 18:37-44.
14. van Vlasselaer P, Punnonen J and de Vries JE: Transforming growth factor- β directs IgA switching in human B cells. *J Immunol* 1992; 148:2062.
15. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA and Mosmann TR: Homology of cytokines synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990; 248:1230.
16. Moore KW, O'Garra A, Malefyt R de W, Vieira P and Mosmann RT: Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:165-90.
17. Malefyt R de W, Abrams J, Bennett B, Figdor CG and de Vries JE: Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174:1209.
18. Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore WK and Rennick D: Interleukin-10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 1991; 173:507.
19. Defrance T, Vanbervliet B, Briere F and Durand I: Interleukin 10 and

transforming growth factor β cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cell to secrete immunoglobulin. *A J Exp Med* 1992; 175: 671-82.

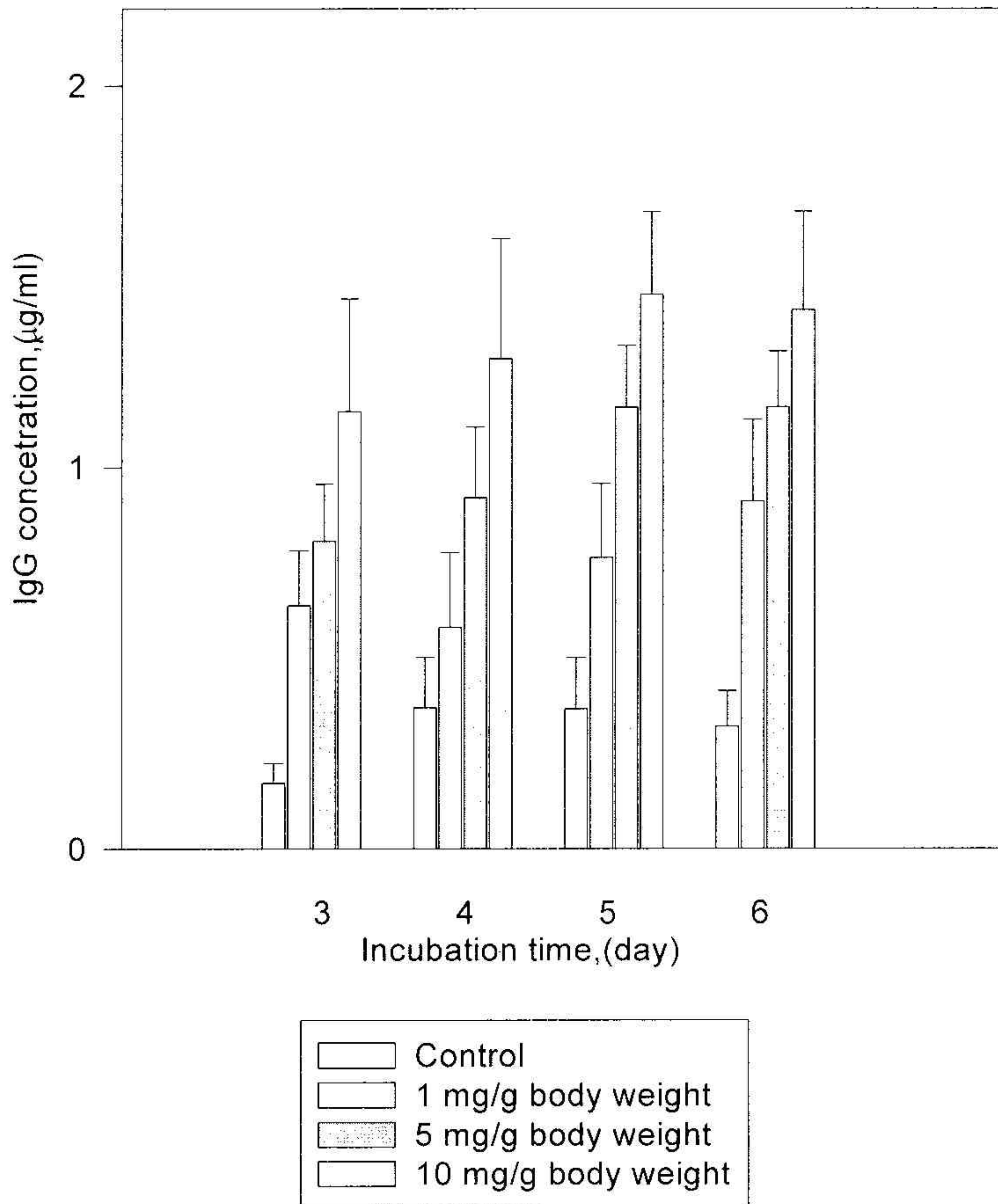
20. Peterman JH and Butler JE: Application of theoretical considerations to the analysis of ELISA data. *Biotech* 1989; 7:608-15.
21. Bertolini JN and Benson EM: The role of human interleukin-6 in B-cell isotype regulation and differentiation. *Cell. Immunol* 1990; 125, 197-209.
22. Tseng J, Li TL: Si-Jun-Zi-Tang regulate granulocyte macrophage colony-stimulating factor secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Chin Med* 1996; 24:45-52.



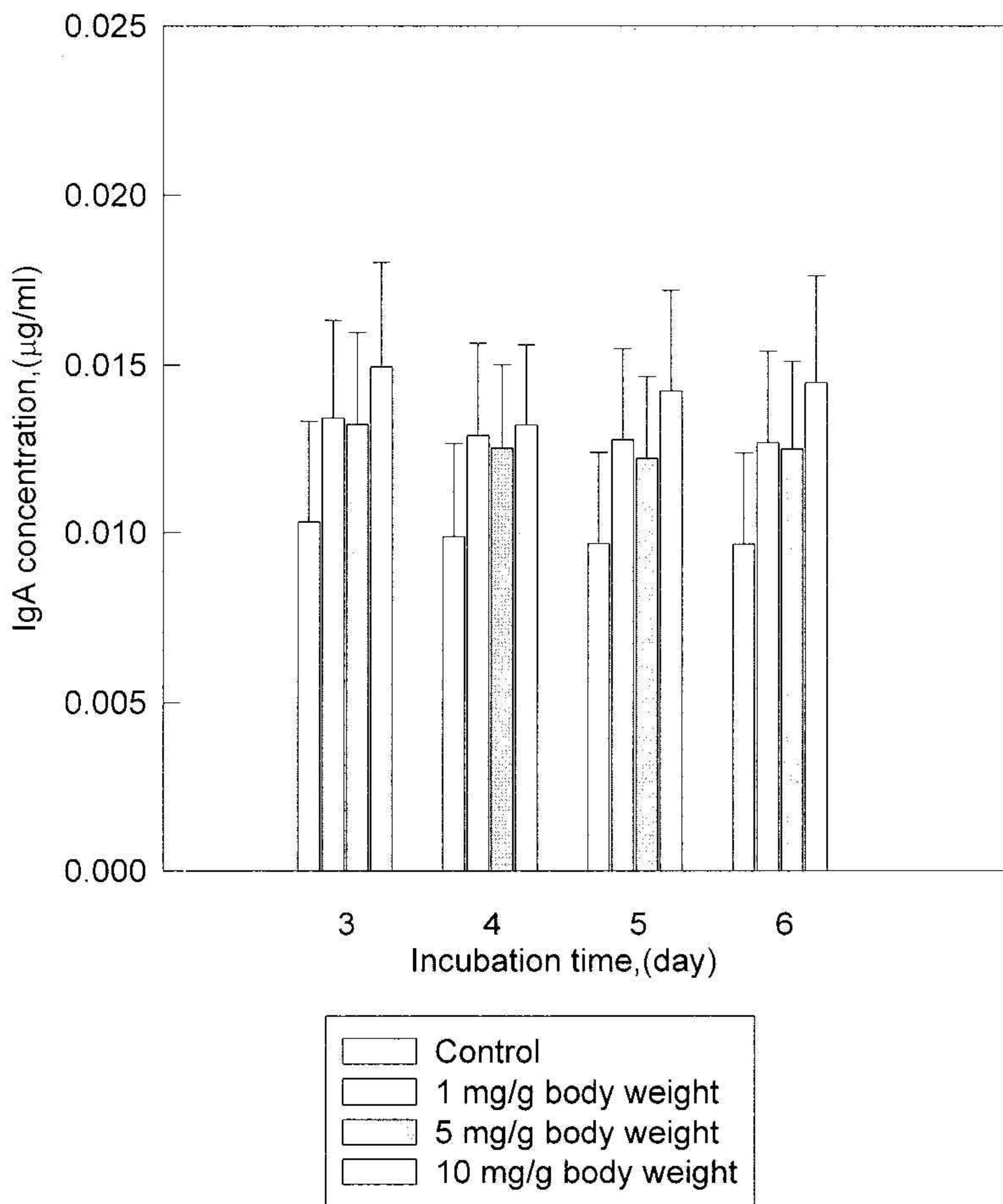
圖一、活體處理四君子湯對老鼠B淋巴球生長之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 1mg、5mg、10mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，計算細胞數目。圖中之數據為四次實驗之平均值± 標準機差，*代表與控制組相較有顯著差異 ($P \leq 0.05$)。



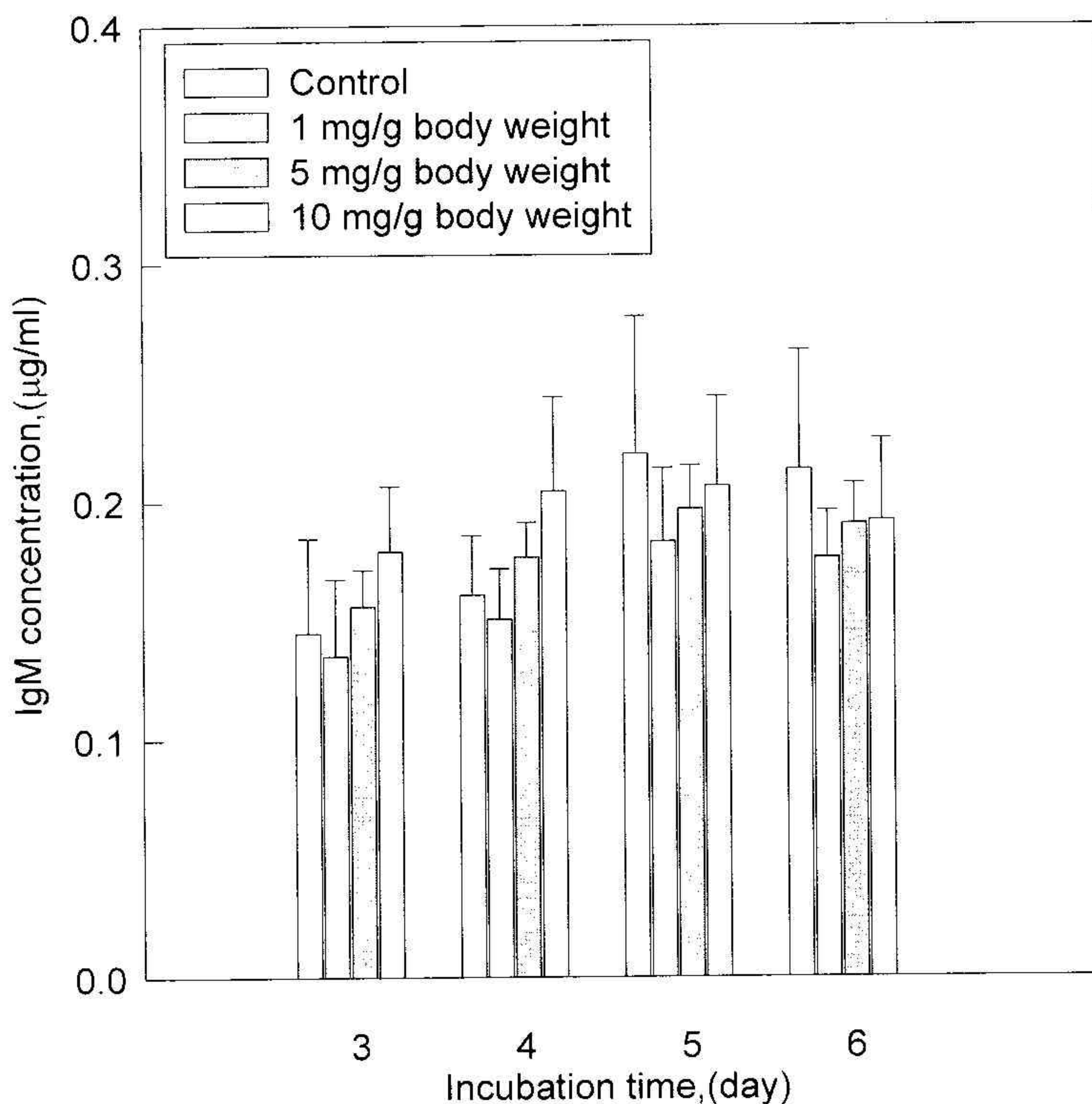
圖二、活體處理四君子湯對老鼠B淋巴球活性濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 1mg、5mg、10mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，計算細胞活性。圖中之數據為四次實驗之平均值±標準



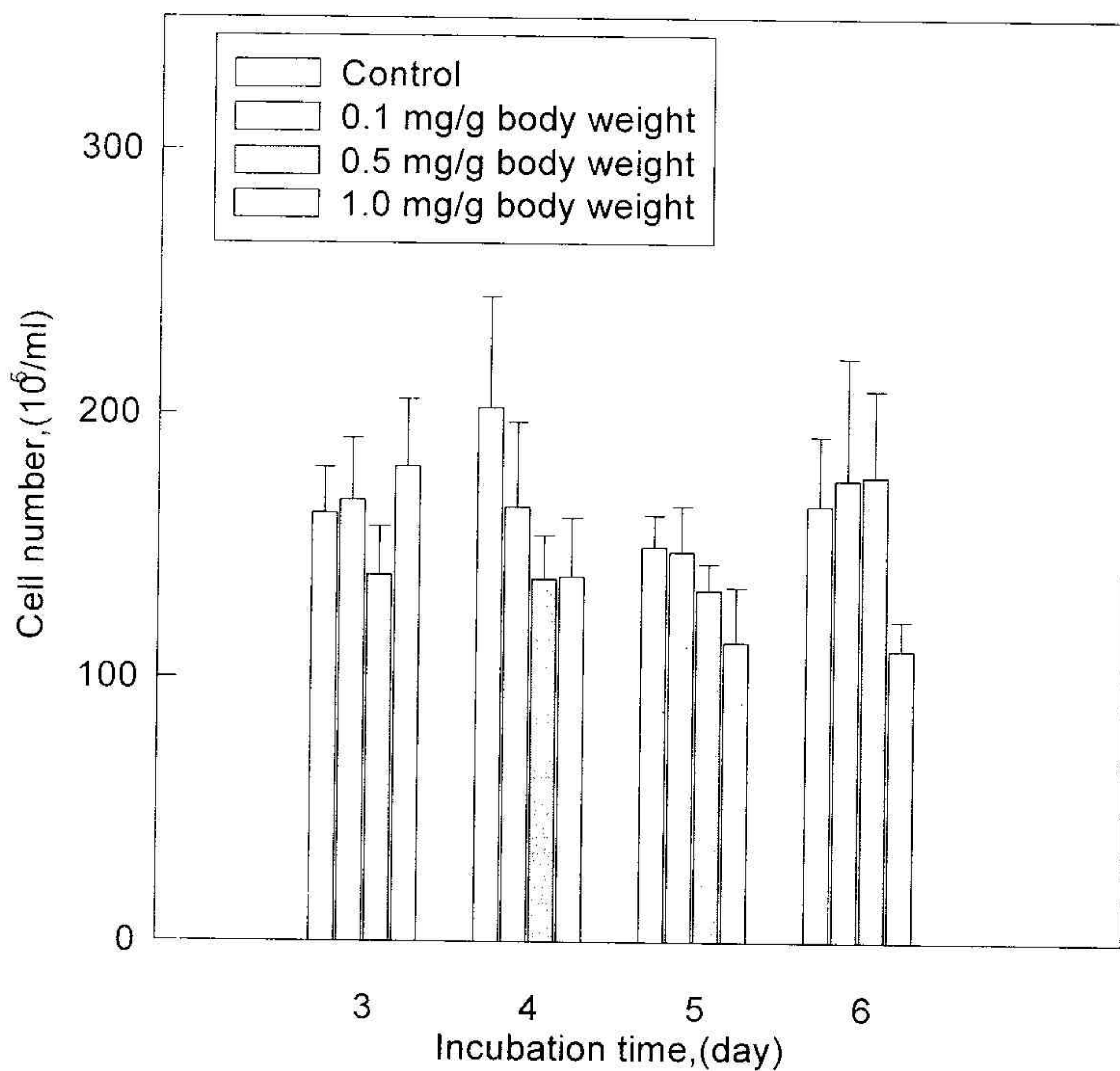
圖三、活體處理四君子湯對老鼠 B 淋巴球分泌 IgG 之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 1mg、5mg、10mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，以 ELISA 測定 IgG 的濃度。圖中之數據為五次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異 ($P \leq 0.05$)。



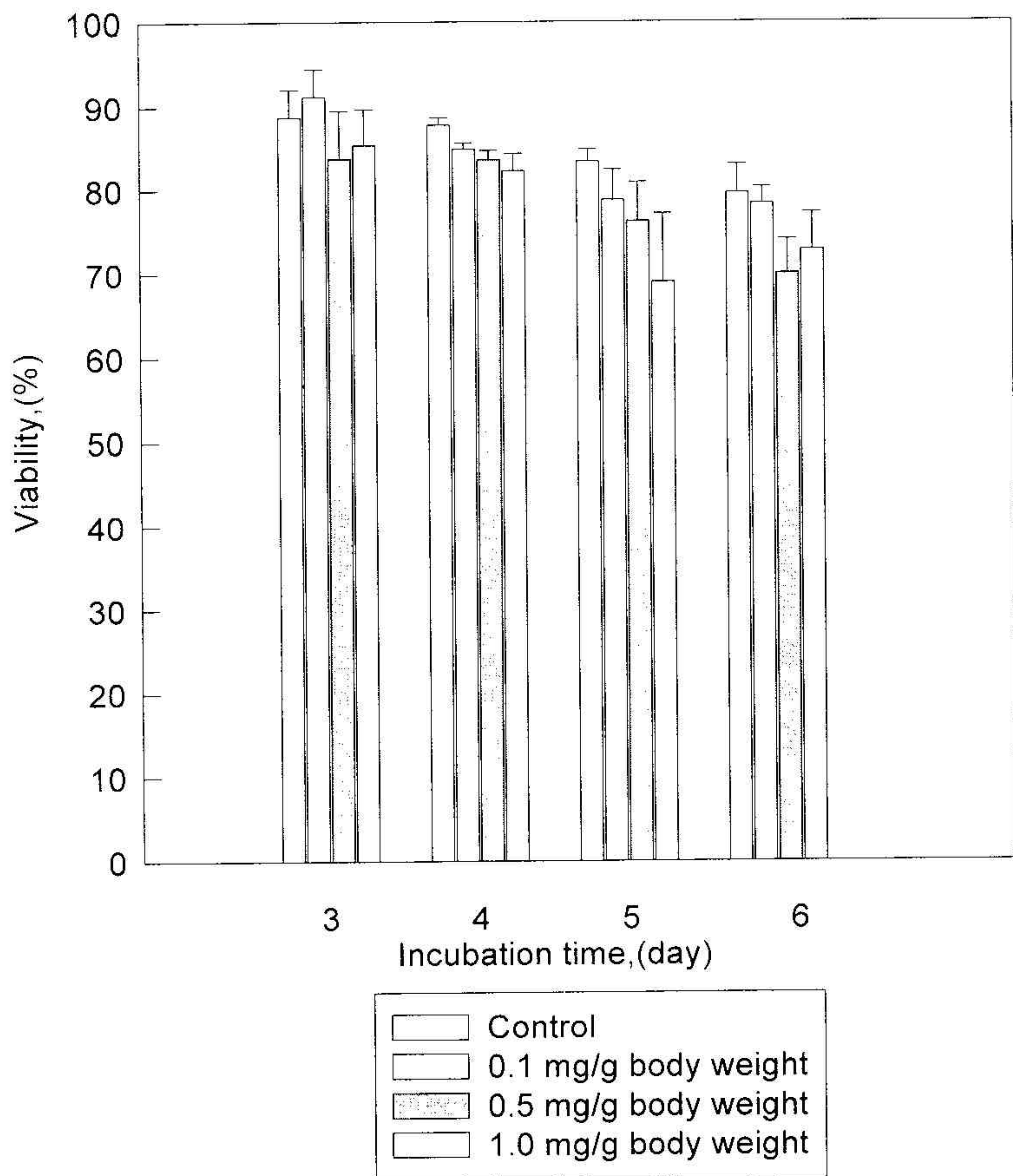
圖四、活體處理四君子湯對老鼠B淋巴球分泌IgA之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入1mg、5mg、10mg的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，以ELISA測定IgA的濃度。圖中之數據為五次實驗之平均值±標準機差，*代表與控制組相較有顯著差異， $P \leq 0.05$ 。



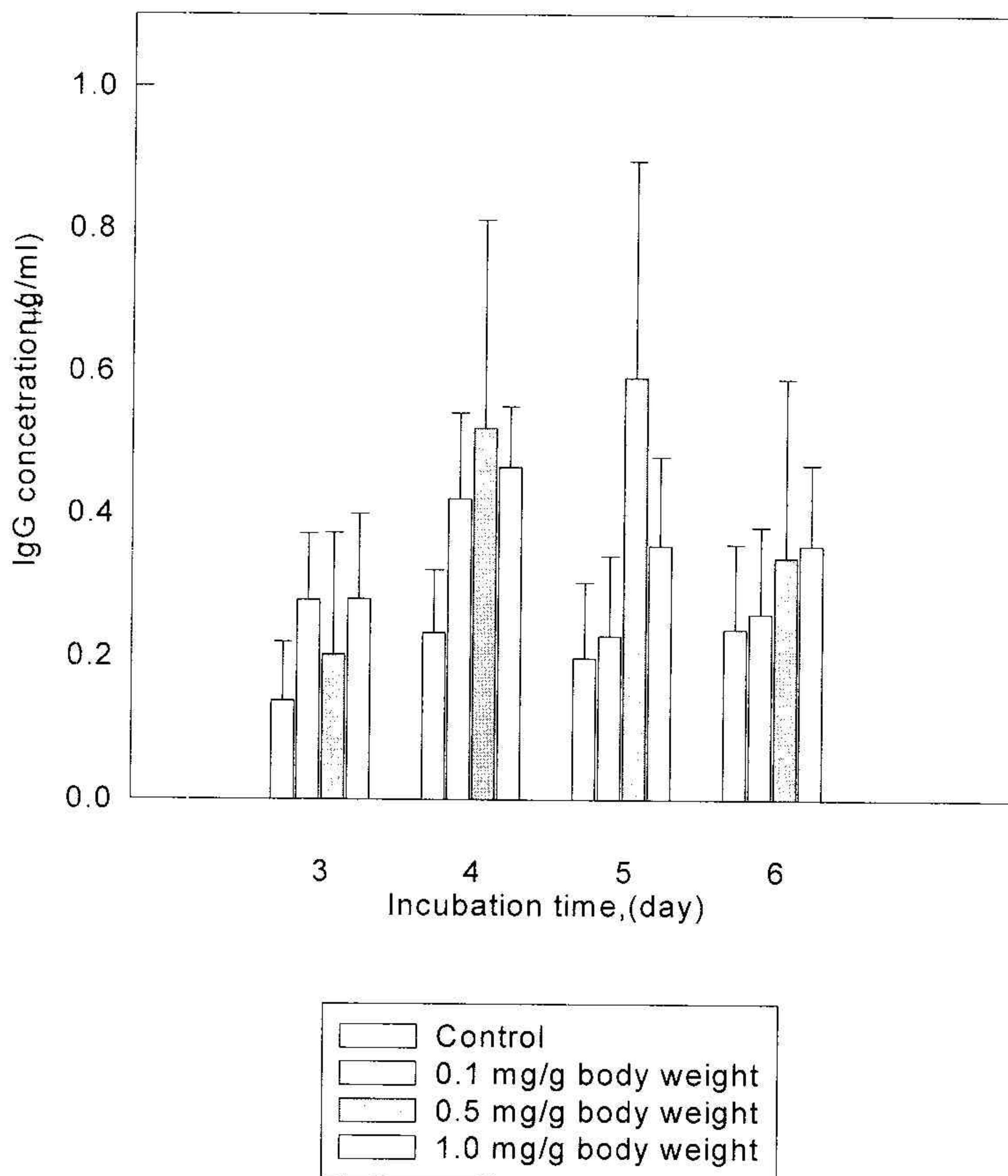
圖五、活體處理四君子湯對老鼠 B 淋巴球分泌 IgM 之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 1mg、5mg、10mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，以 ELISA 測定 IgM 的濃度。圖中之數據為三次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異 ($P \leq 0.05$)。



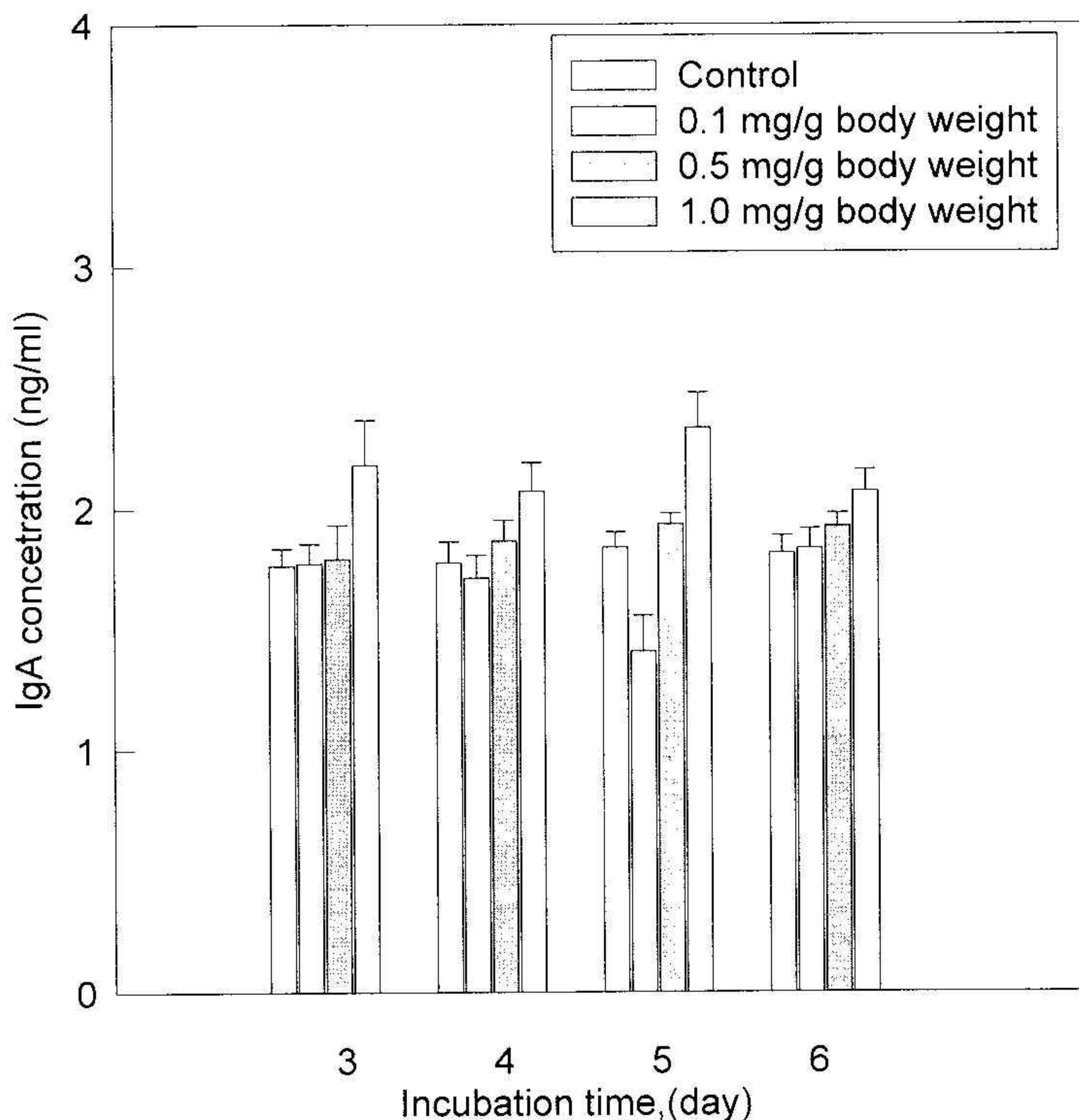
圖六、活體處理茯苓對老鼠 B 淋巴球生長之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 0.1mg、0.5mg、1.0mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，計算細胞數目。圖中之數據為四次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異 ($P \leq 0.05$)。



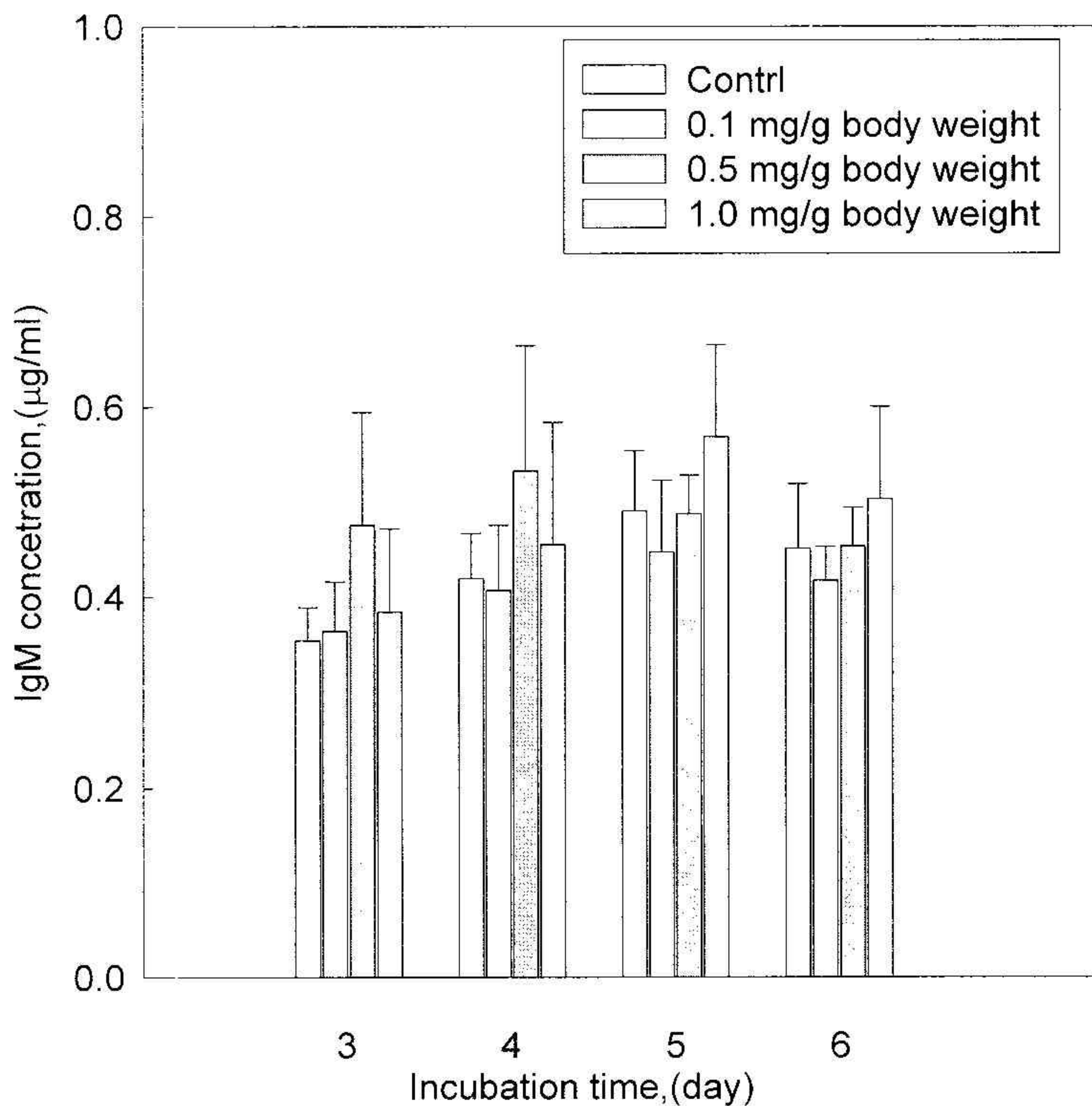
圖七、活體處理茯苓對老鼠 B 淋巴球活性濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 0.1mg、0.5mg、1.0mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，計算細胞活性。圖中之數據為三次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異 ($P \leq 0.05$)。



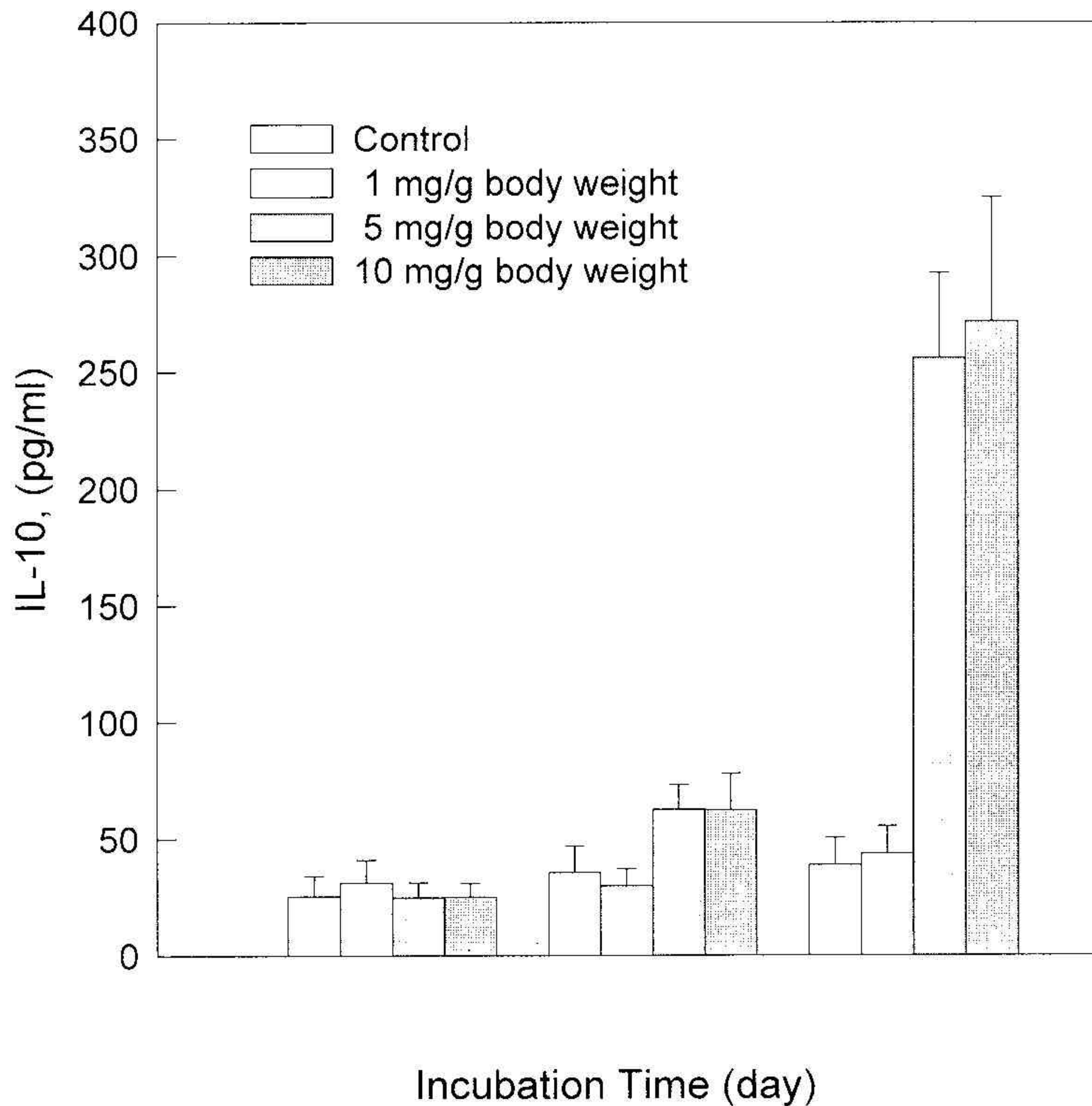
圖八、活體處理茯苓對老鼠 B 淋巴球分泌 IgG 之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 0.1mg、0.5mg、1.0mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，以 ELISA 測定 IgG 的濃度。圖中之數據為三次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異 ($P \leq 0.05$)。



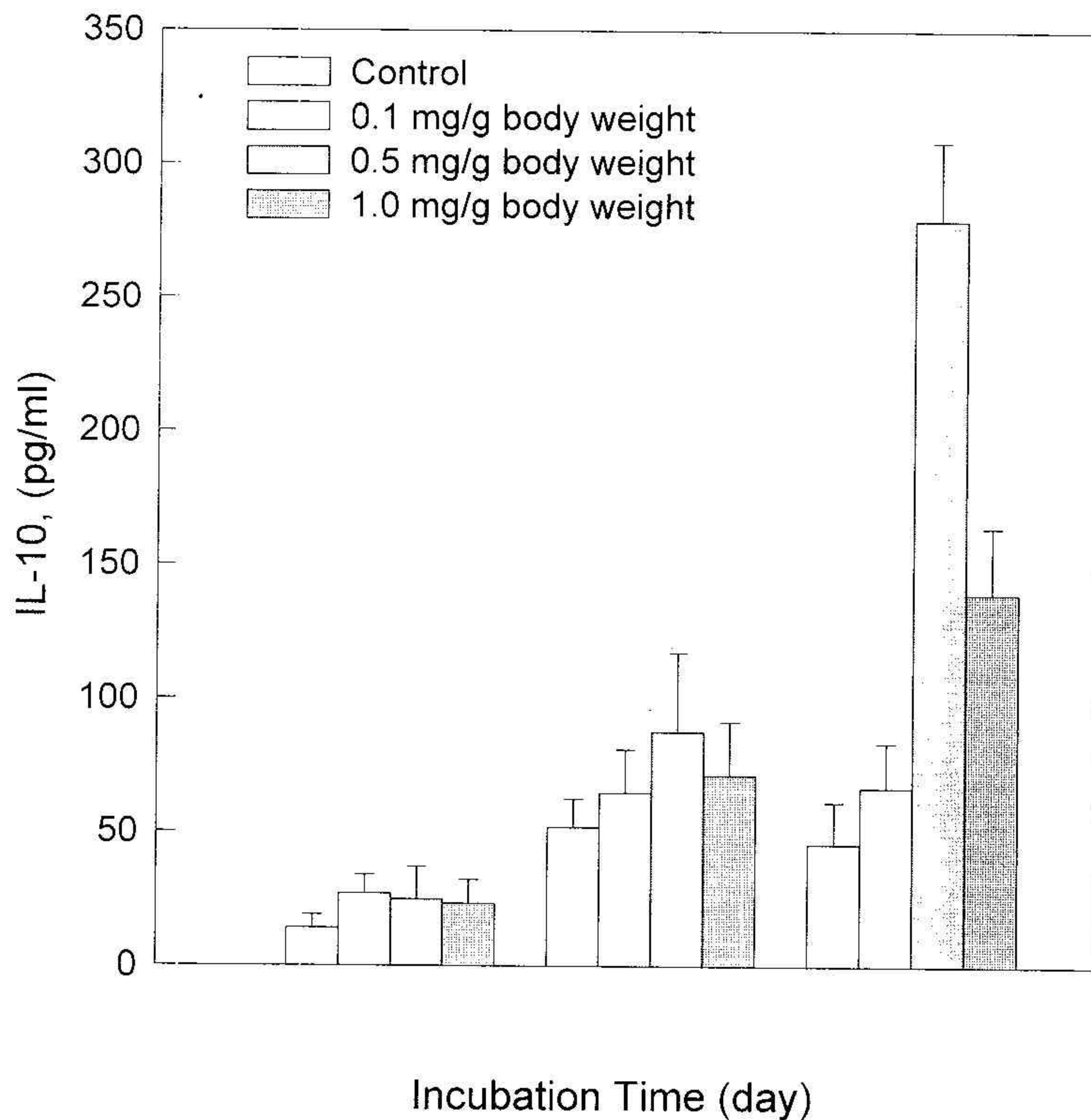
圖九、活體處理茯苓對老鼠 B 淋巴球分泌 IgA 之濃度及時間效應。每隻老鼠分別依每克體重打入 0.1mg、0.5mg、1.0mg 的四君子湯萃取液，三天之後取其脾臟細胞培養之。於培養的第三、四、五、六天收取細胞，以 ELISA 測定 IgA 的濃度。圖中之數據為四次實驗之平均值±標準機差，* 代表與控制組相較有顯著差異 ($P \leq 0.05$)。



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 ($P \leq 0.05$)。



圖十一、活體處理四君子湯對老鼠脾臟細胞分泌 IL-10 之濃度與時間效應。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。於培養的第一、二、三天收取上清液，以 ELISA 測定 IL-10 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 ($P \leq 0.05$)。



圖十二、活體處理茯苓對老鼠脾臟細胞分泌 IL-10 之濃度與時間效應。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。於培養的第一、二、三天收取上清液，以 ELISA 測定 IL-10 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 ($P \leq 0.05$)。