

乙肝舒对小鼠细胞免疫功能及白细胞介素-2 生成的影响

聂淑琴 王金华 李兰芳 薛宝云

梁爱华 曹秀芳 杨庆 赵良辅

(中国中医研究院中药研究所 北京 100700)

摘要 乙肝舒对正常 BALB/c 小鼠淋巴细胞增殖有明显抑制作用,对泼尼松处理小鼠淋巴细胞增殖有促进作用,但与 ConA 无明显协同或对抗作用;对脾脏 NK 细胞活性有明显增强作用;对淋巴细胞 IL-2 生成有显著促进作用。

关键词 乙肝舒 淋巴细胞增殖 自然杀伤细胞(NK) 白细胞介素-2(IL-2)

Effects of Yiganshu Extract on Functions of Immune Cells and the Production of Interleukin-2 in Mice

Nie Shuqin, Wan Jinhua, Li Lanfang, Xue Baoyun

Liang Aihua, Cao Xiufang, Yang Qing, Zhao Liangfu

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing, 100700)

Abstract: Yiganshu extract depressed lymphocyte proliferation in normal BALB/c mice in vivo, while the extract stimulated lymphocyte proliferation in immunosuppressed mice induced by prednisoloni, but the extract had no significant effects on lymphocyte proliferation induced by ConA. The extract enhanced NK cell activity in vivo. It also significantly increased the production of IL-2 by cultured spleen cells of BALB/c mice treated PO with Yiganshu.

Key words: Yiganshu, lymphocyte proliferation, natural killer (NK) cells, interleukin-2 (IL-2)

乙肝舒依据中医药理论及名老中医临床经验组方,已对 50 余例慢性迁延性乙型肝炎进行疗效观察。服药 3 个月临床症状改善率为 93%,肝功能指标 ALT、AST 复常率分别为 80%和 86%,乙型肝炎表面抗原(HBsAg)转阴率 25%。动物实验乙肝舒明显抑制鸭乙型肝炎病毒(DHBV)复制,对非特异免疫和体液免疫有促进作用。本研究探讨药物对细胞免疫和 IL-2 生成能力的影响。

1 材料

1.1 动物 BALB/c 小鼠,18±1g,购自中国医学科学院实验动物研究所,贰级,合格证号:〈京动字〉第 9209M18 号。

1.2 细胞株 CTLL-2 细胞株,军事医学科

学院基础所赠,L₉₂₉ 细胞株,由中国预防医学科学院病毒所提供。

1.3 药物 乙肝舒浸膏,为中药复方制剂,由拳参、生大黄、茵陈、黄芪等中药组成,经科学提取精制而成。中国中医研究院洮南制药厂提供,批号:930208,4.49g 生药/g 浸膏。乙肝宁,长沙九芝堂药厂生产,批号:930106。左旋咪唑,桂林制药厂生产,批号 861001。氢化泼尼松、氢化可的松注射液,北京第三制药厂生产,批号分别为 920208、890124。³H-TdR 1mci/ml,中国原子能研究所产。ConA (concanvalin A type III)、RPMI-1640,均为 Sigma 公司产。D-MEM 培养基,GIBCO BRL 公司产。胰蛋白酶(trypsin),Serve 公司进

口。基因工程人 IL-2(rHIL-2)10⁴u/ml 军事医学科学院提供。PPO、POPOP 闪烁纯,二甲苯、三氯乙酸、无水乙醇、中性红、乙酸均为分析纯,北京化工厂产。

1.4 仪器 CO₂ 恒温培养箱,日本产;Titerkek 550 细胞收获仪,英国产;LS₉₈₀₀ 液闪仪,Beckman 公司产;BIO-450 酶标仪,美国产;96 孔无菌培养板,日本产;49 型玻璃纤维滤纸,上海红光造纸厂产。

2 方法及结果

2.1 淋巴细胞增殖试验 (³H-TdR 掺入法)^[1]

2.1.1 对正常小鼠淋巴细胞增殖的影响 BALB/c 小鼠,雌性,按体重随机分 6 组,①正常对照组,②、③乙肝舒 6g/kg、12g/kg 组,④、⑤乙肝宁 3g/kg、6g/kg 组,⑥左旋咪唑 0.04g/kg 组。每组 6~8 只动物。ig7d,第 8d 将小鼠放血致死,无菌取脾,制备脾细胞悬液,以含 15%小牛血清的 RPMI1640 将细胞浓度调至 5×10⁶/ml,取 200μl 细胞悬液加入 96 孔培养板中,每鼠加 4 孔,其中 2 孔加入 ConA(10μg/ml)。细胞于 5%CO₂ 37 C 培养 72h,终止培养前 24h 每孔加入 ³H-TdR 0.5μci。培养毕,将细胞收获于玻璃纤维滤膜上,按滤膜法^[2]用液体闪烁记录仪记录各样品的 1min 的放射强度,以 cpm 值表示各样品的淋巴细胞增殖程度,以组间 t 检验比较差异的显著性,结果见表 1。乙肝舒 6g/kg、12g/kg 对正常小鼠 ConA 诱导的脾淋巴细胞增殖有显著的抑制作用;乙肝舒 6g/kg 对不含

表 1 乙肝舒对正常小鼠脾淋巴细胞³H-TdR 掺入量的影响

组 别	剂量 g/kg	放射强度 cpm/1×10 ⁶ 细胞	
		不含 ConA	ConA 10μg/ml
空白对照	—	879±221	16231±1683
乙肝舒	6.00	662±97*	12259±696**
	12.00	749±186	12464±1675**
乙肝宁	3.00	501±86**	11503±3088**
	6.00	789±302	9893±2110**
左旋咪唑	0.04	646±176	9797±832**

注:与对照组相比 *P<0.05, **P<0.01

空白对照组 n=8, 给药各组 n=6

ConA 的脾淋巴细胞增殖也有显著抑制作用,表现为 ³H-TdR 掺入 DNA 的放射强度显著低于空白对照组。

2.1.2 对泼尼松处理小鼠淋巴细胞增殖的影响 BALB/c 小鼠 80 只分为 8 组,每组 10 只动物,给药组连续给药 11d,于第 9d、10d 皮下注射醋酸泼尼松 5mg/kg,正常对照组注射同体积生理盐水。第 12d 按 2.1.1 实验法测定脾淋巴细胞 ³H-TdR 掺入量。本实验 ³H-TdR 加入量为 0.25μci/孔,结果见表 2。乙肝舒 1.5~6.0g/kg 能明显对抗泼尼松对淋巴细胞增殖的抑制作用,对给泼尼松动物 ConA 诱导的淋巴细胞增殖无明显影响。

表 2 乙肝舒对泼尼松处理小鼠淋巴细胞³H-TdR 掺入量的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	剂量 g/kg	放射强度 cpm/1×10 ⁶ 细胞	
		不含 ConA	ConA 10μg/ml
空白对照	—	373±81	5603±1066
泼尼松	5mg/kg	207±41*	6218±1785
乙肝舒+泼尼松	1.5	423±120**	5999±1310
	3.0	345±95**	6649±1815
	6.0	422±209**	5705±1370
乙肝宁+泼尼松	3.0	522±170***	7217±1612#
	6.0	310±109*	5405±858
左旋咪唑+泼尼松	0.04	563±70***#	6295±1640

注:与对照组比较 #P<0.05, ***P<0.01;

与泼尼松组比较 *P<0.05, **P<0.01(n=10)

2.2 对小鼠脾脏自然杀伤(NK)细胞活性的影响

2.2.1 制备 NK 细胞 BALB/c 小鼠,雌性,分为 7 组,每组 7 只动物,分别灌胃受试药物,连续给药 18d,同时设空白对照组。第 19d 将小鼠摘眼球放血致死,按文献^[3]方法制备 NK 细胞,调整细胞浓度至 1×10⁷/ml。

2.2.2 制备靶细胞 传代培养的 L₉₂₉ 细胞,于实验前 1 天换液,实验时用 0.25%胰酶 1~2ml 消化 10s,加完全 D-MEM 培养液轻轻吹打使细胞从壁上脱落,1000rpm 离心 5min,倾去上清液,将沉淀重新悬于 15%小牛血清的 D-MEM 培养基中,调整细胞浓度至 2×10⁵/ml。

2.2.3 药物对NK细胞活性的影响 取事先配好的靶细胞(L₉₂₉细胞 2×10^5 /ml)加入96孔培养板中,0.1ml/孔,放37℃、5%CO₂孵箱中培养1h,使靶细胞贴壁成单层细胞,而后每孔加入0.1ml效应细胞(NK细胞 1×10^7 /ml),使效靶比为50:1,每只动物做4复孔,同时设培养基对照孔、靶细胞对照孔、效应细胞对照孔。将培养板放37℃ 5%CO₂培养箱中20h,倾去上清,用生理盐水轻轻灌满各孔,而后倾去,反复3次,以除去效应细胞及被杀伤而脱落的靶细胞,用滤纸吸干孔内水分。每孔加0.1%中性红0.1ml,37℃孵育30min,弃去染液,用生理盐水洗3次,每孔加入0.1ml细胞溶解色液(50%乙酸与50%乙醇1:1配制),使含有中性红的靶细胞溶解,释放出中性红,轻轻摇匀,用Bio-450酶标仪在540nm测定光密度记录OD值,参考波长630nm。以组间t检验比较差异的显著性。结果见表3,乙肝舒3g/kg、6g/kg、12g/kg给小鼠连续灌胃18d,非常显著提高脾NK细胞的杀伤活性。乙肝宁也显著提高NK细胞杀伤活性。

表3 乙肝舒体内给药对小鼠脾脏NK细胞杀伤能力的影响

组别	剂量 g/kg	动物数	OD值
正常对照	—	7	0.405±0.058
乙肝舒	3	7	0.128±0.030**
	6	7	0.115±0.021**
	12	7	0.219±0.035**
乙肝宁	3	7	0.173±0.048**
	6	7	0.233±0.052**
左旋咪唑	0.04	7	0.413±0.040

注:与正常对照组相比 **P<0.01

2.3 对小鼠脾细胞IL-2生成的影响

2.3.1 IL-2的制备 按本文2.1.1所述方法分组、给药、制备脾细胞悬液,以含15%小牛血清的RPMI 1640将细胞浓度调整至 5×10^6 /ml,取1ml细胞加入ConA至终浓度3μg/ml,37℃、5%CO₂孵育48h,然后离心

2500rpm 20min,收获上清,-20℃保存备用。

2.3.2 CTLL-2细胞培养 CTLL-2细胞培养于含10%小牛血清、1%PS、5000u/L rHIL-2的RPMI 1640培养液中,用前以Hank's液洗3遍。

2.3.3 IL-2活性测定——³H-TdR掺入法^[6] 取对数生长期CTLL-2细胞,Hank's液洗2遍,37℃孵育30min,再洗1遍,以不含IL-2培养液,将细胞浓度调至 1×10^5 /ml。以培养液倍比稀释待测样品和标准品rHIL-2,在96孔板上每个稀释度3复孔,以单纯培养液为阴性对照,每孔加入CTLL-2细胞 10^4 /100μl,37℃ 5%CO₂培养24h。培养结束前6h,每孔加入0.5μCi ³H-TdR,再培养6h后收获细胞,按2.1方法在液闪仪上测cpm值,以组间t检验比较差异的显著性。

2.3.4 结果 乙肝舒对正常小鼠脾细胞IL-2生成的影响结果见表4。乙肝舒3g/kg、6g/kg、12g/kg灌胃给药8d能显著提高小鼠脾细胞IL-2生成,提示乙肝舒对T细胞功能有显著促进作用。乙肝舒对泼尼松抑制的小鼠脾细胞IL-2生成无明显影响(表5)。

表4 乙肝舒对正常小鼠脾细胞IL-2生成的影响

组别	剂量 g/kg	样品稀释倍数	cpm×10 ⁴ 细胞
空白对照	—	—	50±2(8)
rHIL-2	0.625u/ml		110±10(4)
	1.25u/ml		175±15(4)
	2.50u/ml		201±15(4)
	5.00u/ml		246±20(4)
乙肝舒	3	1:4	191±55(9)**
	6	1:4	223±60(9)**
	12	1:4	207±66(9)**
乙肝宁	3	1:4	128±43(9)
	6	1:4	115±22(9)
左旋咪唑	0.040	1:4	133±21(9)
正常对照	—	1:4	117±34(9)
培养基对照	—	1:4	75±5(4)

注:与正常对照组比较 **P<0.01

3 讨论

已经证明乙型肝炎病毒(HBV)不能直接杀伤肝细胞,肝脏损害程度、临床表现和转

表5 乙肝舒对泼尼松处理小鼠脾细胞 IL-2 生成的影响

组别	剂量 g/kg	样品稀释倍数	cpm/10 ⁴ 细胞
空白对照	—	—	50±2(10)
rHIL-2	0.625u/ml		172±30(4)
	1.25u/ml		314±68(4)
	2.50u/ml		589±134(4)
	5.00u/ml		1666±264(4)
乙肝舒+泼尼松	1.5	1:8	335±181(10)
	3.0	1:8	207±96(10)
	6.0	1:8	415±303(10)
乙肝宁+泼尼松	3.0	1:8	286±93(10)
	6.0	1:8	279±71(10)
左旋咪唑+泼尼松	0.080	1:8	561±179(10)*
	泼尼松	0.005	1:8
正常对照		1:8	380±157(10)

注:与泼尼松组比较 *P<0.05

归主要取决于宿主的免疫反应。免疫反应低下者因不能清除 HBV 而导致慢性迁延性肝炎,也有对肝细胞膜抗原起自身免疫反应的慢性活动性肝炎。因此在肝炎的治疗中抗病毒与免疫调节药物有着同样重要的意义^[7]。已证明乙肝舒具有抑制病毒复制、保肝、增强机体非特异免疫和体液免疫功能。本研究证明乙肝舒对正常小鼠淋巴细胞增殖呈抑制作用,但对泼尼松处理小鼠淋巴细胞增殖有促进作用,显示其对细胞免疫功能有调节作用。对 NK 细胞杀伤活性有显著促进作用,对淋巴细胞 IL-2 生成有促进作用,在治疗乙肝中可能具有重要意义。NK 细胞有多种免疫功

能,它参与抗感染免疫,具有重要的分泌功能和免疫调节功能。有学者证明急性乙型肝炎恢复期病人的 NK 细胞活力增高,在慢性乙肝时 NK 活力低于正常,表明 NK 细胞在清除 HBV 时可能有作用^[7]。IL-2 是一种具有广泛生物活性的淋巴因子,除可以在体外维持 T 细胞生长外,尚可使 NK 细胞在体外增殖。IL-2 是一种活化因子,它能激活 NK 细胞,还能刺激 T 细胞产生 r-干扰素(r-IFN)。乙肝舒通过增强 NK 细胞活性及提高 IL-2 水平增强机体免疫功能可能在治疗乙型肝炎中发挥作用。

参考文献

- [1] Xia D. et al. J Beijing Med Univ 1989;21: 533
- [2] 徐叔云,卞如濂,陈修等. 药理实验方法学 人民卫生出版社,第1版 1982: 952
- [3] 俞永平,叶玲仙,李修兰等. 中华微生物和免疫学杂志 1988;8(3): 193
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法. 第1版人民卫生出版社,1993: 753
- [5] 丁桂凤,席宏丽,邓玉兰等. 上海免疫学杂志 1988;8(1): 64
- [6] 田志刚,杨贵贞等. 中华医学检验杂志 1991;14(6): 340
- [7] 周金黄,李晓玉,荣康泰. 免疫药理学进展基础与临床. 中国科学技术出版社,1993: 22,389

(收稿:1996-08-06)