

脉炎消注射液的免疫学实验研究

初洁秋 韩 莉 (哈尔滨医科大学第二临床医学院 哈尔滨 150086)

孙 华 (中国协和医科大学协和医院中医科 北京 100730)

何 维 胡 愉 (中国医学科学院基础医学研究所 北京 100005)

摘 要 脉炎消注射液可在体外抑制 PHA 诱导的健康人外周血淋巴细胞的增殖反应,对健康人外周血单个核细胞有直接的毒性杀伤作用,其中受作用的细胞主要为 CD19⁺B 细胞和 CD4⁻T 细胞;脉炎消注射液还可抑制 sRBC 免疫小鼠 IgM 型抗体生成细胞的产生及降低 sRBC 免疫小鼠的脾脏重量。

关键词 脉炎消注射液 T 细胞 B 细胞

Immunological Study on Maiyanxiao Injection

Chu Jieqiu, Han Li, Sun Hua, He Wei, Hu Yu

(Dept. of TCM, the Second Hospital, Harbin Medical University, Harbin, 150086)

Abstract: Immunological mechanism of Maiyanxiao (MYX) injection, a traditional chi-

nese medical formula was studied both in vitro and in vivo. Experimental MYX could inhibit PHA-induced proliferation of peripheral blood lymphocytes from healthy donors and show a cytotoxicity towards CD19⁺ and CD4⁺ cells in vitro. MYX could suppress the production of antibody IgM-producing cells and spleen weight in mice immunized with sheep red blood cells. In summary, MYX exert an immunosuppress activity.

Key words: Maiyanxiao injection, T cell, B cell

脉炎消注射液是治疗多发性大动脉炎及免疫性血管炎的新中药复方制剂,由白花蛇舌草、丹参等6味中药组成,具有清热解毒,活血化瘀功效,临床总有效率97.43%^[1,2],为探讨脉炎消注射液的治疗机制,对其进行了免疫学实验研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康 BALB/c 小鼠,♀♂各半,平均体重20±2g,鼠龄8~12周,购自中国医学科学院实验动物繁殖场。

1.1.2 实验细胞 取新鲜的健康人肝素抗凝血,行聚蔗糖-泛影葡胺分层液密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC),以供免疫荧光染色实验和增殖试验用。

1.1.3 主要实验药品及试剂 脉炎消注射液(以下简称脉炎消):含原生药量1g/ml,哈尔滨医科大学附属二院药学部生产,批号92040620,所用白花蛇舌草属茜草科,安徽毫洲产;丹参为四川产。复方丹参注射液:含原生药量1.5g/ml,上海第一制药厂出品,批号930202;注射用环磷酰胺制剂:上海第十二制药厂出品,批号930802;5%葡萄糖注射液:自行配制;RPMI-1640培养基:Biochrom 公司。所有小鼠抗人淋巴细胞单克隆抗体均购于法国 Immuntotech 公司。氚-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR);购于中国原子能研究院,放射比强度25ci/mmol/L。植物血凝素(PHA):Sigma 公司出品。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫荧光双染色分析实验

1.2.1.1 荧光标记抗体及染色组合 藻红

蛋白(Phycoerythrin, PE)标记的小鼠抗 CD19 McAb(抗 CD19-PE)和异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanata, FITC)标记的小鼠抗 CD3 McAb(抗 CD3-FITC)为第一染色组合;抗 CD8-FITC 和抗 CD4-PE 为第二染色组合。

1.2.1.2 实验步骤 取 PBMC 或已培养的 PBMC 与相应组合的荧光抗体在4℃下孵育15min,洗涤2次,洗液为1%牛血清白蛋白(BSA)和0.1%叠氮钠的磷酸盐缓冲液(PBS)。然后将细胞悬垂于1%多聚甲醛 PBS 液中。在 FACSscan 型流式细胞仪(BD 公司)进行分析。细胞计数为10,000个。

1.2.1.3 脉炎消体外对健康人淋巴细胞表面某些 CD 分子表达影响的实验^[3] 将5×10⁴个 PBMC 置入96孔圆底细胞培养板(Nunc,德国),每孔液体量为0.2ml,培养液为 RPMI-1640,内含10%热灭活小牛血清,10mM HEPES,2mM L-谷氨酰胺,100U/ml 青霉素。在37℃,5%CO₂条件下孵育2d,终止培养,进行细胞荧光染色。其脉炎消及 PHA 体外观察剂量见结果部分的图1,图2和表1。

1.2.2 ³H-TdR 掺入法测定细胞增殖反应^[3] 操作如同1.2.1.3,共培养48h,收获前6h 每孔加1μCi³H-TdR,细胞收获在玻璃纤维滤纸上,用β液闪仪(贝克曼公司,美国)测其cpm 值。细胞培养孔设空白对照组(仅有培养液),PHA 组,脉炎消组及 PHA 加脉炎消组,每组设6个孔,取其均值,观察剂量见结果部分。

1.2.3 台盼蓝染色测定培养细胞活力 取2滴细胞悬液加1滴2%台盼蓝水溶液混匀,

5min后,取样湿片镜检,活细胞不着色,死细胞呈蓝色,共计数200个细胞,计算死细胞百分率。以上3项实验的样本均来自7例健康人的PBMC。

1.2.4 溶血空斑试验(琼脂平板法)^[4] 常规制备绵羊红细胞(sRBC)悬液(15×10⁸细胞/ml),取3×10⁸细胞/0.2ml/每只免疫小鼠。4d后杀小鼠取脾,制备底层琼脂平板(1.4%琼脂),而后将0.1ml免疫脾细胞(1×10⁵细胞)和0.1ml sRBC(3×10⁸细胞)加至融化后保温在48~50℃水浴中的2ml 0.7%琼脂内,每份标本铺3个平皿,在37℃ 5% CO₂条件下孵育1h,加豚鼠补体2ml,在同样条件下孵育0.5h,空斑计数,以空斑数/10⁵细胞记录结果,免疫前3d小鼠im给药,共用药7d。试验分组:1、2、3组为脉炎消小、中、大剂量组,即5、10、18ml/kg的用量;4、复方丹参对照组,1.3ml/kg;5、环磷酸胺注射液对照组,10mg/kg;6、5%葡萄糖注射液对照组,5ml/kg。每组7只小鼠。实验同时观察小鼠脾和胸腺重量。

1.2.5 统计学处理 采用t检验及方差分析处理计量资料,采用u检验及卡方检验处理计数资料。结果以平均数±标准差来表示。

2 结果

2.1 脉炎消对健康人PBMC体外增殖反应影响 如图1所示,脉炎消组从1:2~1:2000000稀释浓度范围内皆可抑制健康人

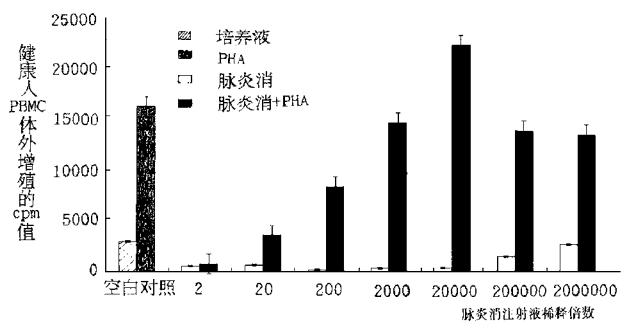


图1 脉炎消对健康人PBMC体外增殖反应影响

注:该图的数据资料经方差分析以³H-TdR的cpm均值(图中直柱)±标准差(直柱上1线)来表示,PHA培养终浓度为0.5μg/ml

PBMC体外增殖反应,与空白培养液组比有显著性差异,PHA可明显诱导PBMC的增殖,而脉炎消+PHA组1:2~1:200倍稀释浓度时可以显著抑制PHA诱导的增殖作用,仅脉炎消+PHA 1:20000倍稀释浓度时可促进PHA诱导的PBMC增殖反应。

2.2 脉炎消对体外培养的健康人PBMC活力的影响 如图2所示,在健康人PBMC体外培养时,其细胞活力可为脉炎消所抑制,脉炎消在1:2至1:2,000倍稀释浓度范围内可明显导致体外培养的PBMC细胞的死亡。

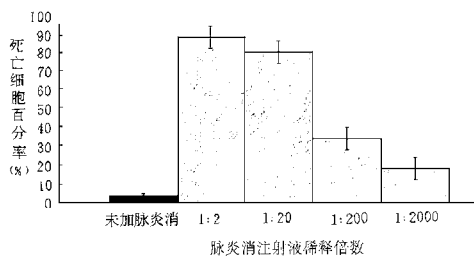


图2 脉炎消注射液对体外培养的健康人PBMC活力的影响

注:数据资料经卡方检验分析P<0.01。实验样本同图1

2.3 脉炎消体外对健康人PBMC表型的影响 由表1可见,在体外细胞培养时,脉炎消可使CD19⁺的B细胞百分率明显降低,而对CD3⁺T细胞百分率无明显影响,但可导致CD4⁺细胞亚群百分率降低和CD8⁺细胞亚群百分率增高。

表1 脉炎消体外对健康人PBMC表型的影响

	免疫荧光细胞表型% (x̄±s)			
	CD3 ⁺ CD19 ⁻	CD3 ⁻ CD19 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺
培养前	61±5	15±3	40±3	20±4
空白对照	65±8	18±3	42±5	24±5
脉炎消	66±8	5±2*Δ	28±10*Δ	37±6*Δ
PHA	81±8*Δ	10±3*Δ	57±6*Δ	17±4*Δ

培养终浓度:脉炎消:2000倍稀释,PHA:0.5μg/ml。空白对照为RPMI-1640培养液。统计学处理采用u检验。与空白对照比*P<0.05~0.01,与培养前比ΔP<0.05~0.01

2.4 脉炎消对小鼠IgM型抗体生成细胞的产生和对sRBC免疫小鼠的脾和胸腺重量的影响 表2所示,脉炎消中、大剂量组的PFC数明显低于葡萄糖,复方丹参和脉炎消小剂量组。

脉炎消大剂量组的脾脏指数明显低于葡萄糖、复方丹参、脉炎消小、中剂量组。脉炎消对 sRBC 免疫小鼠的胸腺重量无明显影响。

表2 脉炎消对小鼠抗体生成
细胞产生及免疫器官重量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PFC/10 ⁵ 脾细胞	脏器指数 mg/g(脏器重/体重)	
			脾	胸腺
葡萄糖	7	323±10	8.25±0.87	5.56±0.98
环磷酰胺	7	81±5**	4.95±0.56*	5.42±0.98
复方丹参	7	265±18	8.15±0.55	6.75±1.21
脉炎消小	7	278±12	7.25±0.57	5.05±0.89
脉炎消中	7	166±11*	6.95±0.80	6.55±0.75
脉炎消大	7	162±15*	6.10±0.72*	5.25±0.52

注:与葡萄糖比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

脉炎消注射液是我们研制的纯中药复方制剂,5年来在临床上治疗多发性大动脉炎炎症期病人与变应性血管炎,脉管炎(I, II期)有良好疗效。而这些疾病均为自身免疫病,表现为体液免疫亢进,为此我们做了该注射液的免疫学实验研究。

研究结果表明:脉炎消具有良好的免疫抑制活性。①脉炎消1:2~1:2000,000倍稀释浓度,在体外直接抑制健康人 PBMC 的存活,台盼蓝染色试验证实80%以上的细胞在脉炎消1:2~1:20倍稀释浓度内已经死亡。提示脉炎消对健康人 PBMC 具有直接的毒性杀伤作用;②脉炎消在1:2~1:200倍稀释浓度内还可抑制 PHA 诱导的 PBMC 增殖反应,PHA 是诱导多克隆 T 细胞活化的有丝分裂原,因此提示脉炎消无论对静息的还是活化的淋巴细胞均有抑制作用。值得注意的是脉炎消在1:2,000倍稀释时对 PHA 诱导的 PBMC 增殖反应有微弱促进作用。③脉炎消杀伤的靶细胞为 B 淋巴细胞和 CD4⁺的 T

辅助细胞,CD4⁺的 T 辅助细胞在抗体产生过程中起到主要辅助作用,而 B 细胞是抗体产生的效应细胞,因此脉炎消主要影响抗体的产生过程。我们最后用体内试验证实了脉炎消的这一作用,脉炎消大、中剂量组对 sR-BC 免疫小鼠的 PFC 数的产生均有抑制作用,但其抑制强度不及环磷酰胺。国内外文献报道,环磷酰胺作为免疫抑制剂可试用于多发性大动脉炎及免疫性血管炎的治疗,但效果无统一认识,因其副作用太大,我们在临床上没有用环磷酰胺治疗前述疾病。同时我们还观察到脉炎消大剂量组可使 sRBC 免疫小鼠的脾脏重量明显减少,但其作用强度仍不及环磷酰胺。

综上所述,脉炎消注射液是一种具有免疫抑制活性的中药复方制剂,这一活性可能是它在临床治疗多发性大动脉炎等自身免疫性血管炎类疾病有效的物质基础。

参考文献

- 1 初洁秋,徐凯健,韩莉,等. 解毒活血法治疗多发性大动脉炎的临床研究. 中医药学报,1992,4:25
- 2 初洁秋,韩莉,李春雯,等. 以解毒活血法为主中西医结合治疗多发性大动脉炎的疗效观察. 中国中西医结合风湿病杂志,1993,2(4):217
- 3 He We, Zhang Y, Deng Y, et al. Induction of TCR- $\gamma \delta$ Expression on Triple-Negative (CD3⁻ 4⁻ 8⁻) Human Thymocytes. J Immunol, 1995, 154:3726
- 4 陶义训. 临床免疫学检验(上册). 第一版. 上海:上海科学出版社,1983. 100

(收稿:1996-06-17)