

• 药理 •

龟芪散及其拆方对免疫抑制小鼠 IL-2 产生及其基因转录的影响*

朱晓新(中国中医研究院西苑医院 北京 100091)

吴敦序(上海中医药大学 上海 200032)

王 露(山东临沂医专 临沂 276002)

摘要 龟芪散及其拆方可明显增强 Cy 所致免疫受损小鼠 T 淋巴细胞的增殖;提高 $L_3T_4^+$ 细胞数量及 $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ 细胞比率;促进脾细胞 IL-2mRNA 转录和 IL-2 产生。以全方效果最佳,亦好于 PSP。但对正常小鼠无明显影响。

关键词 龟芪散 拆方 淋巴细胞 白细胞介素-2

Effects of Guiqi Powder and Its Simplified Formula on IL-2 mRNA and Protein Expression Level of Immunosuppressed Mice

Zhu Xiaoxin(Xiyuan Hospital,China Academy of TCM,Beijing,100091)

Wu Dunxu(Shanghai University of TCM,Shanghai,200032)

Wang Lu(Linyi Medical College,Linyi,276002)

Abstract: Guiqi powder as a whole and its simplified formulae could promote significantly the proliferation of T lymphocytes, increase $L_3T_4^+$ cells counts raise ratio of $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ cells and enhance spleen cells IL-2 mRNA and protein expression level in immunosuppressed mice caused by cyclophosphamide. The original Guiqi powder as a whole was more potent than its simplified formula as well as PSP. However it showed no effects in normal mice.

Key words: Guiqi Powder, simplified formula, lymphocytes, interleukin-2

龟芪散是吴敦序教授创制的方剂。全方由补肾填精和健脾益气两组药物组成。多年的临床应用表明,该方对反复呼吸道感染,老人或儿童体虚易感,支气管哮喘缓解期及放、化疗后的肿瘤患者具有明显的免疫调节作用,并能改善病人的全身状况。IL-2 主要由 T_H 细胞产生,是在免疫系统激活和功能表现中起重要作用的中介分子。本文报道龟芪散及其拆方在淋巴细胞,IL-2 及其基因转录方面对免疫功能的影响。

1 材料和方法

1.1 动物 清洁级 BALB/c 纯系小鼠,雌

雄各半,4~5 周龄,体重(20±2)g。由上海市计划生育研究所动物房提供。

1.2 药物 龟芪散全方由龟板、熟地、鹿角片、黄芪、生晒参、炒白术等组成。补肾填精拆方由龟板、鹿角片、熟地、山萸肉、紫河车等组成。健脾益气拆方由黄芪、生晒参、炒白术、茯苓等组成。所有中药均采用上海童涵春国药号精制饮片,并经国药号专职人员鉴定。云芝多糖(PSP)为上海新冈制药厂产品(批号 950901)。

1.3 主要试剂 3H -TdR:上海原子能研究所产品。 $[\alpha-^{32}P]$ -dCTP(3000ci/mmol)、硝酸纤维素膜:英国 Amersham 公司产品。刀豆

* 上海市教委资助项目

蛋白 A (ConA)、随机引物 DNA 标记试剂盒:美国 Sigma 公司产品。标准重组白细胞介素-2(rIL-2):美国 Cetus Corporation 公司产品。抗小鼠 $L_3T_4^+$ 和 Lyt_2^+ 单抗及 FITC 二抗及 CTLL-2 细胞株:北京医科大学免疫系提供。PMIL-229 质粒:北京医科大学免疫系分子免疫研究室马大龙教授惠赠。Pst I、Xba I 限制性内切酶:美国 Promega 公司产品。环磷酸胺(Cy):上海第十二制药厂产品(批号:931014)。RPMI-1640 干粉:美国 GIBCO 公司产品。CTLL-2 细胞株:北京医科大学免疫系提供。

1.4 方法

1.4.1 药物制备及用法 药物烘干、粉碎后过 120 目筛,常规煎煮,浓缩至 0.4g/ml。4℃ 保存。PSP 溶于蒸馏水中,浓度为 0.44g/ml,4℃ 保存。以上药物均灌胃给药,剂量为成人公斤体重的 20 倍(成人用量 30g/60kg,口服)。

1.4.2 动物的分组处理 小鼠随机分为 7 组,每组 28 只(雌雄各半),其中 8 只做提取 RNA 用,20 只检测其他指标。正常对照组与模型对照组每天灌服生理盐水,其他各组分别灌服不同药物,均为 0.5ml/次(相当于龟芪散或其拆方生药 10g/kg, PSP1.1g/kg)。除正常组及龟芪散 I 组外,其他各组于实验开始后第 10d 1 次性腹腔注射 Cy120mg/kg 体重,造成免疫抑制模型。第 14d 处死。

1.4.3 血清的采集 采用眶动静脉取血法收集血液,4℃ 静置 4h,2000rpm 离心 10min,吸取血清,-20℃ 保存备用。

1.4.4 脾细胞悬液的制备 无菌条件下将脾脏取出,称重,按文献[1]的方法制备脾细胞,计数,并用完全 RPMI-1640 培养液将脾细胞配成 5×10^6 /ml 浓度悬液备用。

1.4.5 淋巴细胞增殖实验 3H -TdR 掺入法。

1.4.6 IL-2 的诱生及活性检测 采用文献[2]的方法进行。

1.4.7 脾细胞亚群分析^[3] 将新制备的脾细胞 2×10^6 分成二管,2000rpm 离心,去上清,压积细胞中加入抗 $L_3T_4^+$ 和 Lyt_2^+ 单抗 100 μ l,4℃,30min,PBS 洗 2 遍,各加 FITC 二抗 100 μ l,4℃,30min,PBS 洗 2 遍,重悬于 PBS 中,进行 FACS 分析。

1.4.8 IL-2cDNA 探针的制备 参照文献[4]的方法。

1.4.9 小鼠脾脏总 RNA 的提取 AGPC 法,详见文献[5]。

1.4.10 Northern Blot 杂交 按文献[4]方法。点样量为 30 μ g。真空核酸转移仪将变性 RNA 吸印到硝酸纤维素膜上。用随机引物法标记 cDNA 探针。杂交结果用激光扫描仪扫描进行灰度值分析。

1.4.11 统计方法均采用双侧 *t* 检验。

2 结果

2.1 龟芪散及其拆方对免疫抑制小鼠脾指数、脾细胞总数的影响(表 1) 凡注射 Cy 小鼠脾指数及脾细胞总数均较正常组明显降低,各用药组均可使脾指数有不同程度的升高,但无统计学意义;各组药物均有不同程度地回升免疫抑制剂造成的小鼠脾细胞总数的减少,其中龟芪散全方效果好于 2 拆方和 PSP 组。但对正常小鼠无显著影响。

表 1 龟芪散及其拆方对免疫抑制小鼠脾重、脾指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	n	脾指数 (mg/g · w)	脾细胞数 (10^6)
正常组		20	3.97 ± 0.52**	77.44 ± 16.56**
模型组		20	2.20 ± 0.18	16.80 ± 3.90
龟芪散 I 组	10	20	4.05 ± 1.08	76.40 ± 16.28**
龟芪散 II 组	10	20	2.50 ± 0.36	34.94 ± 5.31**
补肾组	10	19	2.84 ± 0.82	28.58 ± 6.34** $\Delta\Delta$
健脾组	10	19	2.34 ± 0.39	26.36 ± 8.84** $\Delta\Delta$
PSP 组	1.1	20	2.40 ± 0.40	22.94 ± 7.59* $\Delta\Delta$

与模型组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 PSP 组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与龟芪散 II 组比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ (下同)

2.2 龟芪散及其拆方对 ConA 诱导的小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响 用药各组均可明显提高 T 细胞的增殖能力和 S.I.。龟芪散全方

和补肾拆方与正常组比较无明显差异,健脾拆方和PSP组未达到正常水平。龟芪散I组与正常组相比无显著变化(表2)。

表2 龟芪散及其拆方对免疫抑制小鼠T淋巴细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	增殖值(cpm)	刺激指数(S.I.)
正常组	20	49519.4 ± 11063.4**	79.63 ± 29.30**
模型组	20	23674.8 ± 7243.0	42.86 ± 10.11
龟芪散I组	20	39515.5 ± 16891.0*	64.25 ± 32.76*
龟芪散II组	20	46490.1 ± 23389.5**	140.07 ± 80.87**
补肾组	19	41473.5 ± 18337.8*	63.10 ± 19.45** ^{ΔΔ###}
健脾组	19	37332.3 ± 9723.3**	53.72 ± 11.55* ^{ΔΔ}
PSP组	20	42212.9 ± 17566.6**	50.42 ± 1.11 ^{ΔΔ}

2.3 龟芪散及其拆方对免疫抑制小鼠脾细胞亚群的影响 由表3可见,模型组小鼠L₃T₄⁺细胞数和L₃T₄⁺/Lyt₂⁺比率均低于正常小鼠。给予龟芪散后其数值明显升高,其他用药组对小鼠脾细胞亚群无明显影响。

表3 龟芪散及其拆方对免疫抑制小鼠脾细胞亚群的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	L ₃ T ₄ ⁺ (%)	Lyt ₂ ⁺ (%)	L ₃ T ₄ ⁺ /Lyt ₂ ⁺
正常组	9	55.91 ± 7.11**	39.15 ± 3.84	1.94 ± 0.17**
模型组	10	48.41 ± 3.78	40.14 ± 4.39	1.21 ± 0.10
龟芪散I组	9	51.67 ± 4.39	35.00 ± 5.17*	1.50 ± 0.21**
龟芪散II组	10	54.00 ± 7.20*	38.50 ± 3.57	1.42 ± 0.29*
补肾组	9	50.40 ± 5.31	41.25 ± 5.24	1.23 ± 0.14
健脾组	9	49.74 ± 3.92	38.97 ± 4.93	1.29 ± 0.17
PSP组	9	48.95 ± 3.91	39.44 ± 3.70	1.24 ± 0.10

2.4 龟芪散及其拆方对免疫抑制小鼠IL-2活性的影响 表4显示,龟芪散及其拆方能显著提高Cy所致免疫受损小鼠脾细胞培养上清中IL-2(5μg/mlConA诱导)活性,尚未达到正常组水平。全方组作用明显好于健脾组和PSP组,但对正常小鼠无明显影响。

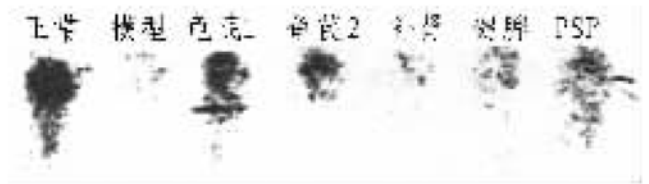
表4 龟芪散及其拆方对免疫抑制小鼠IL-2活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-2水平(U/ml)
正常组	20	24.83 ± 3.64**
模型组	20	10.54 ± 1.79
龟芪散I组	20	27.66 ± 5.08****
龟芪散II组	20	20.06 ± 3.49**
补肾组	19	18.41 ± 3.00**
健脾组	19	16.10 ± 2.22** ^{ΔΔ}
PSP组	20	17.13 ± 1.72** ^Δ

2.5 龟芪散及其拆方对免疫抑制小鼠脾细胞IL-2mRNA表达的影响 模型组小鼠脾细胞IL-2mRNA表达明显降低,为正常组的34.5%。龟芪散及其拆方和PSP均可使Cy所致的免疫受损小鼠IL-2mRNA表达明显升高,且全方组效果好于拆方组和PSP组。龟芪散I组小鼠IL-2mRNA表达基本维持在正常水平(见表5,照片1)。

表5 龟芪散及其拆方对IL-2mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-2mRNA表达(正常组的%)
正常组	5	1.00
模型组	5	0.345 ± 0.114
龟芪散I组	5	1.045 ± 0.076
龟芪散II组	5	0.989 ± 0.114**
补肾组	5	0.708 ± 0.103** ^{ΔΔ#}
健脾组	5	0.504 ± 0.092* ^{ΔΔ}
PSP组	5	0.495 ± 0.136* ^{ΔΔ}



照片1 龟芪散及其拆方对小鼠脾细胞IL-2mRNA表达的影响

3 讨论

IL-2是在机体复杂的免疫网络中起调节作用的细胞因子。主要由CD₄⁺的T_H细胞合成和分泌。可促进多种T细胞亚类的增殖和分化,促进NK细胞的杀伤功能,促进B细胞的增殖与分化,促进多种细胞因子或其受体的表达^[6]。所以我们以IL-2为中心从免疫细胞,细胞因子及其基因转录水平研究了龟芪散的免疫调节效应及其可能的作用机制。结果表明,龟芪散可明显对抗Cy引起的小鼠脾脏的退化,提高其所含的细胞数量;促进免疫受损小鼠T淋巴细胞增殖,并特异地作用于L₃T₄⁺细胞亚类而提高L₃T₄⁺/Lyt₂⁺细胞的比率;促进脾细胞IL-2mRNA的转录,同时使脾细胞培养上清中IL-2合成和分泌增加。这可能是该方免疫调节作用的主要机制。

我们还发现, 龟芪散全方免疫调节效应优于 2 拆方组和 PSP 组, 补肾方优于健脾方, 说明了龟芪散组方的合理性, 和配伍的重要性。窦骏等观察到的当归补血汤唯有原剂量(黄芪: 当归=5: 1)组合免疫作用最为明显也佐证了这一点^[7]。据报道, 中医辨证属于肾虚或脾虚的病人, 均可出现免疫功能的低下或紊乱, 尤其是 IL-2 的活性明显低于健康人^[8]。龟芪散就是吴敦序教授根据临床上免疫功能低下或紊乱的病人多见肾精不足, 脾气虚弱而创制的方剂。先后天之本的肾脾两脏及其精气互相滋生, 互相促进, 激发人体生命活动的动力, 发挥其免疫调节效应。由于肾精所化生的原气是人体生命活动的原动力, 故方中补肾填精药可能是其作用的主要成分。有报道, 在慢支病人中, 肾虚者免疫功能最低, 且病情重, 预后差, 脾虚次之^[9]。说明肾脾在机体免疫功能中都有重要作用, 但作用强度有所不同。龟芪散对正常小鼠的免疫功能无明显影响。

综合以上结果, 我们认为龟芪散具有显著的免疫调节作用, 其作用的途径可能是通过促进 T 细胞的活化、增殖与分化, 并特异地使 T_H 细胞比率增加, 同时导致已活化的 T 细胞中 IL-2mRNA 的转录量或效率增高, 通过 IL-2 的产生进一步影响靶细胞的功能

和相互作用, 导致机体免疫功能增强。

参考文献

- 1 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学(第二版). 北京: 人民卫生出版社, 1994. 1215
- 2 Tada H, Shiho O, Kuroshima K, et al. An improved colorimetric assay for interleukin-2. J Immunol Meth, 1986, 93(2): 157~165
- 3 杨景山主编. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1990. 382
- 4 J. Sambrook, E. K. Fritsch, T. Maniatis. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1993. 19~21
- 5 Chomczynski P, & Sacchi N. Single-step Method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-choloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162: 156~159
- 6 曹雪涛主编. 白细胞介素-2 的基础与临床. 北京科学技术出版社, 1990. 80
- 7 窦骏, 董群, 曲卫敏, 等. 不同剂量黄芪配伍的当归补血汤对小鼠脾 NK 和 IL-2 活性的影响. 中国免疫学杂志, 1993, 9(4): 245
- 8 仰锦虹, 王培训, 李道中. 正常人及肾虚、脾虚病人 IL-2 活性和敏感性的测定. 中国免疫学杂志, 1986, 2(1): 封三
- 9 章育正主编. 祖国医学与免疫. 内部资料, 1983. 18

(收稿: 1997-09-15)