

· 药理 ·

甘露消毒丹对小鼠 IFN、NK 及 IL-2 影响的研究*

贺又舜 赵国荣 胡建中 伍参荣 黄开颜(湖南中医学院 长沙 410007)

摘要 采用组织培养与放射免疫法,研究了甘露消毒丹全方、残方及加味方,对小鼠 IFN、NK、IL-2 的影响。结果表明:甘露消毒丹全方、加味方与苦残方,对小鼠 IFN 效价的影响,明显高于造模组;甘露消毒丹全方、加味方与苦残方,均能显著增强 NK 活性;甘露消毒丹全方对 IL-2 刺激指数的影响,优于加味方与芳残方、苦残方。

关键词 甘露消毒丹 IFN NK IL-2

Immune Opsonization of Ganlu Xiaodu Capsule on IFN, NK and IL-2

He Youshun, Zhao Guorong, Hu Jianzhong, Wu Shenrong, Huang Kaiyan
(Hunan College of TCM, Changsha, 410007)

Abstract: Tree kinds of Ganlu Xiaodu Capsules, Full, incomplete and supplementary formulae were studied by artificial culture and radioimmunity techniques. The results shows that IFN were increased significantly by all of the 3 kinds capsules, which is much more higher than those of in the model group. IL-2 in the full formula group is much more promoted than in the other two groups. It means that the signal conduction of cytokines were opsonized by the medicine, perhaps this is one of the mechanism of antivirus of the drug.

Key words: ganlu xiaodu capsule, IFN, NK, IL-2

甘露消毒丹载于清·王孟英之《温热经纬》^[1],是一首清热解毒、祛湿化浊名方。在临床上,我们曾用该方治疗多种病毒感染性疾病,诸如急性病毒性肝炎、流行性腮腺炎、病毒性脑炎、流行性乙型脑炎、柯萨奇病毒感染所致的手足口病等,均取得了满意的疗效。为探讨其作用机理,我们在研究其抗柯萨奇病毒作用的基础上^[2],观测了该方对小鼠脾细胞产生白细胞介素-2(IL-2)、诱生干扰素(IFN)及对天然效应细胞NK活性的影响,现报告如下。

1 材料与方

1.1 药物及制备 甘露消毒丹全方(简称“甘全方”):飞滑石(矽酸盐类矿物)、淡黄芩(唇形科 *Scutellaria baicalensis* Georgi)、绵

茵陈(菊科 *Artemisia scoparia* Waldst et kit.)、石菖蒲(天南星科 *Acorus gramineus* Soland)、川贝母(百合科 *Fritillaria cirrhosa* D. Don)、木通(马兜铃科 *Aristolochia manshuriensis* kom)、藿香(唇形科 *Pogonemon cablin* (Blanco) Benth.)、连翘(木樨科 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl.)、白蔻仁(姜科 *Amonum kravanh* Pirre ex Gagnep)、薄荷(唇形科 *Mentha haplocalyx* Briq)、射干(鸢尾科 *Belamcanda chinensis* (L.) DC.);甘露消毒丹加味方(简称“甘加方”):甘全方加板蓝根 10g(十字花科菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 根)、大青叶 10g(十字花科菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 叶);甘露消毒丹芳残方(简称芳残方):藿香、白蔻仁、石菖蒲、薄荷;甘露消毒丹苦残方(简称苦残方):黄芩、连翘、射干、川贝母、茵陈、滑石、木通。上述药

* 国家自然科学基金资助项目 No. 3927084

物(经湖南中医学院药学分院陈祥瑞副教授鉴定)及剂量均遵高等中医药学教材《方剂学》(1995年,上海科技出版社)所载,并从湖南中医学院一附属医院药房1次性购回,用量按动物体表面积与成人用量折合加大3倍配成。上述4方均研成细末,分别加蒸馏水煮沸15min,配成各含生药2、2.8、1.5、1.6g/ml的药液,-4℃保存备用。

1.2 诱生病毒 诱生病毒为新城鸡瘟病毒(NDV-F系),效价1280血凝单位(HAU)/ml,由湖南生物药厂提供。

1.3 动物及分组处理 ICR纯种小白鼠60只,雌雄各半,6~8周龄,体重(20±2)g,由湖南中医学院实验动物室提供。60只小鼠随机分为6组,每组10只。甘全方组、甘加方组、苦残方组、芳残方组分别灌胃给相应药物,每次0.5ml/20g/只,每日1次;造模组与正常组灌胃给等量蒸馏水。上述各组,连续灌胃给药、水6d。第6d灌胃给药/给水后1h,除正常组外,每鼠腹腔注射1280HAU/ml的NDV0.5ml,6h后颈椎脱臼法处死小鼠,随即无菌取其脾脏。

1.4 脾细胞悬液制备 无菌取出小鼠脾脏后,用100目钢网研磨脾脏制备细胞悬液,吸入离心管后静置10min,弃去沉淀的团块,Hanks液洗2遍,用完全RPMI-1640培养基调至所需浓度作为小鼠NK活性的效应细胞及小鼠IL-2和IFN的产生细胞。

1.5 IL-2及IFN的产生 小鼠脾细胞 5×10^6 /ml加ConA $10 \mu\text{g}/\text{ml}$,在24孔细胞培养板中培养48h,1500rpm离心10min,取上清,作为IL-2及IFN粗制品,-20℃保存,待测。

1.6 IL-2、IFN、NK活性测定

1.6.1 IL-2活性检测 (1)CTU细胞传代培养,生长良好的细胞活率 $>95\%$;(2)IL-2鉴定:①稀释标本,在96孔板中稀释标本,稀释度1:2、1:4、1:8、1:16;②洗涤细胞:将CTU细胞从24孔板中吸入离心管中,加

RPMI-1640 200g洗涤,重复3次,洗涤后用含10%小牛血清RPMI-1640调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$,③检测标本:将调好浓度的CTU细胞加入到已稀释标本的96孔板中,每孔0.1ml,轻轻混匀,放5%CO₂,37℃培养16~18h,加入³H-TdR $0.5 \mu\text{Ci}/\text{孔}$,继续培养6h,多头细胞收集器收获细胞于玻璃纤维滤纸上;将纸片放入液闪瓶中,加入闪烁液,于Beckman液闪烁仪上测cpm。(3)计算刺激指数(sl) $sl = \text{实验组 cpm} / \text{细胞对照组 cpm}$ 。

1.6.2 IFN活性检测 用细胞病变抑制法,在96孔平底细胞培养板中,每孔加入 $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ 的L₉₂₉细胞100μl,24h后形成单层,弃去培养基,将待测IFN标本用维持培养基在细胞培养板中作对倍连续稀释,每个稀释度3个复孔,同时设细胞对照及病毒对照组。置37℃5%CO₂孵育箱培养24h后倾去标本,以50TCID₅₀的EMC病毒攻击,培养18h后,每隔2h观察1次病变,待病毒对照孔病变达++++时记录结果。根据50%细胞病变抑制率(Reed-Muench法)计算出IFN的效价。(以湖南医科大学免疫室工作单位表示,参考:杜平《医用干扰素学》)。

1.6.3 ³H测定NK细胞活性 (1)制备小鼠NK活性的效应细胞(见前),(2)每孔100μl标记靶细胞 1×10^5 (YAC-1)与标记同位素 $1 \mu\text{Ci}$ 混匀,放37℃CO₂孵育箱培养2h,加小鼠NK活性的效应细胞100μl(0.1ml),37℃培养20~24h,吸出上清150μl,加入DNA酶100μl(含10μgDNA),充分混匀,于加入胰酶(DIF CO. USA 9606023)0.1ml(含0.6mg),置放1h后收获。(3)对照管以FCS-1640代替效应细胞。(4)计算公式:

$$\frac{\text{对照管 cpm} - \text{实验组}}{\text{对照管}} \times 100\%$$

1.7 统计学处理 用 χ^2 检验及t检验。

2 结果

2.1 对IFN效价的影响 从表1中可以看出,甘全方组、甘加方组、苦残方组IFN效价

表1 甘露消毒丹及其配伍对小鼠 IFN、NK 及 IL-2 的影响
($\bar{x} \pm s$)

	IFN(U/ml)	NK(%)	IL-2(sl)
空白组	305.46±199.25**	61.07±14.16	16.53±6.40
造模组	109.14±71.51	69.11±12.79	21.31±14.26
甘全方	169.74±72.36*	81.73±6.68**	29.04±18.67
甘加方	200.25±90.00*	82.04±9.13**	16.11±8.60 [△]
苦残方	184.67±103.69*	83.72±13.43**	21.60±10.77
芳残方	82.22±36.85 ^{△△} ▲▲ ##	64.29±15.23 ^{△△} ▲▲ ##	16.90±5.37 [△]

注:与造模组比* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与甘全方组比[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与甘加方组比[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$;与苦残方组比[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;n=10

明显高于造模组,差异有显著性;芳残方组 IFN 效价则明显低于 3 个治疗组,差异有非常显著性,亦低于造模组,但无显著性差异。

2.2 对 NK 活性的影响(见表 1) 除芳残方组外,甘全方、甘加方、苦残方组均能提高 NK 活性,与造模组相比,差异有显著性;芳残方组与造模组相比无显著性差异。

2.3 对 IL-2 刺激指数的影响(见表 1) 只有甘全方组对 IL-2 影响最佳,但与造模组比差异无显著性。

3 讨论

3.1 本方《温热经纬》之用法为:“各药晒燥,生研细末,每服三钱,开水调服,日 2 次。或以神曲糊丸如弹子大,开水化服亦可。”^[1] 本实验考虑甘露消毒丹当前临床普遍采用汤剂形式的实际情况,故将该方各药研成细末,加蒸馏水煮沸 15min,滤液备用。

3.2 甘露消毒丹主要由清热解毒与芳香化浊两组药物组成。 实验中发现以苦寒清热解毒残方与加入清热解毒药后的甘加方能显著提高 IFN 的效价。IFN 作为一种细胞因子,其抗病毒的作用是肯定的^[2]。这说明,清热解毒药在该方中地位是不容忽视的。

3.3 IL-2 主要是受抗原与 T 细胞受体结合的刺激之后由辅助 T 细胞分泌的 T 细胞生长因子。 IL-2 同淋巴细胞上的 IL-2 受体结合导致这些细胞增生,增强淋巴因子分泌,提高

其他生长因子膜受体的表达。IL-2 对 T 细胞的这些生物效应扩展到巨噬细胞、激活的 B 细胞、天然杀伤细胞(NK)、LAK 细胞等,从而发挥抗病毒等一系列的治疗作用^[3]。甘露消毒丹全方对 IL-2 刺激指数的影响,优于苦残方、芳残方,也优于甘加方,这不仅说明了该方配伍的合理性,同时也表明,该方的抗病毒作用与刺激细胞分泌 IL-2 有关。

3.4 本实验表明,甘全方、甘加方和苦残方,均能增强 NK 活性,以发挥抗病毒效应。 NK 对靶细胞的杀伤活性虽无特异性,但对病毒感染细胞有一定的识别作用。一般在病毒感染早期,病毒诱导产生的 IFN 可激活和诱导 NK 细胞活性,阻止病毒的扩散和增殖^[4]。甘露消毒丹的抗病毒作用,既可能诱导产生 IFN 以激活 NK 细胞活性,也可能直接激活 NK 细胞活性。其确切机制,尚需进一步阐明。

3.5 从甘露消毒丹及其配伍对 IFN、IL-2 及 NK 的影响来分析,甘露消毒丹通过免疫调节机制以抗病毒的作用,不是单一的而是复合的。 其提高 IFN 效价,则可能使外周血单核细胞(PBMC)增加分泌 IL-2,还可增加细胞表面 IL-2 数目。反过来,IL-2 也可促进 PBMC、NK 细胞诱生 IFN-r。或许这就是该方抗病毒的部分作用机理。

参考文献

- 1 王孟英. 温热经纬·五·方论. 北京:人民卫生出版社,1959. 160
- 2 贺又舜,伍参荣,赵国荣,等. 甘露消毒丹对柯萨奇病毒体外抑制作用的实验研究. 中国中西医结合杂志,1998,18(12):737~740
- 3 程违,李春德. 免疫生理学. 上海:上海科学技术出版社,1993. 184~185
- 4 Chan SH. Mechanisms of IFN-r induction by natural Killer cell stimulatory factor(NK SF/IL-12). J Immunol,1992,148:92~8

(收稿:1998-09-25)