

不同产地人参水煎剂对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响

雷萍, 关洪全, 王昊, 韩晓伟, 侯殿东, 陈殿学*
(辽宁中医药大学免疫病原生物教研室, 沈阳 110032)

[摘要] 目的:比较辽宁、吉林、国外朝鲜不同产地人参对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响。方法:皮下注射氢化可的松($70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)制备免疫抑制动物模型,之后分别给予不同产地人参水煎剂($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃,流式细胞术检测脾细胞悬液CD3,CD4,CD8;ELISA法检测血清IFN- γ 含量;SRBC诱导小鼠迟发型超敏反应(DTH)。结果:经不同产地人参水煎剂治疗后,小鼠脾细胞悬液CD3,CD4,CD8均有升高。其中朝鲜人参能使免疫抑制小鼠CD4和CD4/CD8比值明显升高($P < 0.05$),辽宁人参与朝鲜人参和吉林人参相比并没有显著性差异;不同产地人参灌胃后DTH和IFN- γ 也均显著升高($P < 0.05$),辽宁人参与朝鲜人参和吉林人参相比也并没有显著性差异。结论:辽宁人参水煎剂能提高免疫抑制小鼠的细胞免疫功能,与吉林人参和朝鲜人参相比并无明显差异。

[关键词] 人参水煎剂;免疫抑制;T细胞亚群; γ -干扰素;迟发型超敏反应(DTH)

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0218-03

Influences of Decoctions of Different places Ginseng on Cellular Immune Function in Immunosuppressed Mice

LEI Ping, GUAN Hong-quan, WANG Hao, HAN Xiao-wei, HOU Dian-dong, CHEN Dian-xue*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the cellular immune function of Liaoning, Jilin and Korean ginseng in immunosuppressed mice. **Method:** Immunosuppressed model of mouse was induced by subcutaneous injection of hydrocortisone. Three decoctions of ginseng originated from Liaoning, Jilin and Korea were given to explore CD3, CD4, CD8 in spleen cell suspension by flow cytometry. Serum IFN- γ level was determined by ELISA assay; and SRBC was used to induce delayed-type hypersensitivity (DTH). **Result:** The CD3, CD4 and CD8 of spleen cell suspension were increased after each ginseng decoction treatment, Korean ginseng could increase the CD4 and CD4/CD8 ratio for the immunosuppressed mice significantly ($P < 0.05$). Liaoning ginseng had no significant difference compared with that of Jilin ginseng or Korean ginseng. The levels of DTH and IFN- γ were also raised significantly after each decoction treatment ($P < 0.05$), and Liaoning ginseng had no significant difference compared with that of Jilin ginseng or Korean ginseng. **Conclusion:** Liaoning ginseng decoction can improve cellular immune function on immunosuppressed mice, and Liaoning ginseng had no significant difference compared with Jilin and Korean ginseng.

[Key words] ginseng decoction; immunosuppression; T-cell subsets; IFN- γ ; delayed-type hypersensitivity

人参是我国传统的补益类中药,性温,味甘,微苦,归肺、脾、心经,能大补元气,补脾益肺,生津,安

[收稿日期] 20101209(005)

[基金项目] 辽宁省教育厅课题(2008456)

[第一作者] 雷萍,博士在读,讲师,研究方向:天然产物的免疫调节, E-mail: lphare1978@163.com

[通讯作者] *陈殿学,教授,研究方向:中药抗感染免疫, Tel: 024-31207095, E-mail: chendx_58@163.com

神益智^[1]。现代医学表明,人参对免疫系统、神经系统、心血管系统和内分泌系统等都有明显的疗效。人参主产于辽宁、吉林和国外朝鲜等地,其中辽宁的人参主产区(东部山区)属长白山脉,地理位置、土壤、温度等自然条件与吉林和国外朝鲜差别不大^[2]。

辽参是高品质的人参,属辽宁的道地药材,其产值在辽宁的中药材生产中具有重要地位,其品质极好,产量居全国前茅,但始终没能象“高丽参”、“吉林参”那样在国内外受人瞩目。随着国际市场竞争的日益激烈,辽宁人参与吉林参、高丽参的价格差别越来越大,究其原因是在目前为止,尚未有研究将三地人参进行质量、药效等方面系统科学地比较研究。

因此,本文主要通过测定辽宁、吉林、国外朝鲜不同产地人参对免疫抑制小鼠 T 细胞亚群、 γ -干扰素含量以及 DTH 来探讨不同产地人参对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响,通过科学比较弄清产生差距的真正原因,从而指导生产、缩小差距,使辽宁人参具有市场竞争力。

1 材料

1.1 动物 清洁级昆明小鼠 50 只,雌雄各半,分笼饲养,体重 18~22 g,由辽宁中医药大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(辽)2008-0005。

1.2 试剂和仪器 辽宁、吉林、国外朝鲜人参分别购自辽宁新宾、吉林抚松和韩国,均为 6 年生晒参(以上人参均经当地人参研究所鉴定)。氯化可的松注射液(赤峰蒙欣药业有限公司产品,批号 090801),荧光标记 CD3,CD4,CD8 蛋白抗体试剂盒(eBioscience 公司,批号 11-0033-82,12-0043-82,17-0081-81); γ 干扰素 ELISA 试剂盒(美国 RD 公司,批号 DZE20542);超速离心机(美国科峻 D37520);流式细胞仪(美国 BD 公司,FACSCalibur);全自动酶标仪(奥地利 anthos 2010)。

2 方法

2.1 人参水煎剂的制备 分别将不同产地人参切片,加蒸馏水浸泡 1 h,入砂锅煎煮 3 次,合并 3 次煎出液,消毒纱布过滤,浓缩成 100% 水煎剂。

2.2 造模及灌胃方法 50 只小鼠随机分为 5 组,即空白对照组(空白组)、免疫抑制模型对照组(模型组)、免疫抑制辽宁人参治疗组(辽参组)、免疫抑制吉林人参治疗组(吉参组)和免疫抑制朝鲜人参治疗组(朝参组)。免疫抑制模型造模方法为每日皮下注射氯化可的松注射液,70 mg·kg⁻¹,连续 7 d。

造模后,空白组和模型组正常饲养;不同产地人参治疗组分别以不同产地人参水煎剂 0.2 mL 灌胃,5 g·kg⁻¹,1 次/d,连续 14 d。

2.3 流式细胞术检测 T 细胞亚群方法 常规制备脾细胞悬液,加 Hank's 液至 2 mL,置于 1 mL 淋巴细胞分层液上,2 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。取分层液中白细胞放入营养液中(Hank's 液加 20% 小牛血清),调整细胞数为 2×10⁶/mL。取淋巴细胞悬液 100 μ L,加入 20 μ L 3 种不同荧光标记的 CD3,CD4,CD8 单抗,室温反应 20 min,上机检测。

2.4 IFN- γ 含量检测方法 常规制备小鼠血清,采用 ELISA 法进行检测,具体方法参见 ELISA 试剂盒说明书,在 450 nm 波长下测定吸光度(A)。

2.5 SRBC 诱导小鼠迟发型超敏反应(DTH)检测方法 每鼠腹腔注射 2% SRBC 悬液 0.2 mL。致敏后 4 d,用游标卡尺测量左后足跖厚度。在测量部位皮下注射 20% SRBC,每鼠 20 μ L。24 h 后再次测量左后足跖肿胀厚度,连续测 3 次,取平均值。以前后足跖厚度差值表示 DTH 程度。

2.6 统计方法 采用 SPSS 11.0 软件中单因素方差分析进行两两比较,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

从表 1 可见,造模后,小鼠 CD3,CD4,CD8 以及 CD4/CD8 均比空白组明显下降($P < 0.05$),经不同产地人参水煎剂治疗后,上述指标均有升高。其中朝鲜人参能使免疫抑制小鼠 CD4 和 CD4/CD8 比值明显升高($P < 0.05$),辽宁人参升高 CD3,CD4,CD8 以及 CD4/CD8 的效果与朝鲜人参和吉林人参相比并没有显著性差异。

表 1 不同产地人参对免疫抑制小鼠 T 细胞亚群的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /kg·kg ⁻¹	CD3/%	CD4/%	CD8/%	CD4/CD8
空白	-	54.64 ± 9.36	31.07 ± 7.75	17.71 ± 5.17	1.79 ± 0.31
模型	70	42.49 ± 8.58 ²⁾	19.60 ± 4.80 ²⁾	14.12 ± 3.12 ²⁾	1.41 ± 0.27 ²⁾
辽参	5 000	44.63 ± 10.02	23.76 ± 6.33 ³⁾	15.30 ± 3.21	1.58 ± 0.37
吉参	5 000	51.49 ± 10.77	24.20 ± 6.10 ³⁾	14.42 ± 4.14	1.71 ± 0.33
朝参	5 000	50.06 ± 12.67	26.64 ± 9.17 ¹⁾	15.34 ± 3.73	1.72 ± 0.32 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$;与空白组相比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

从表 2 可见,造模后,小鼠 DTH 和 IFN- γ 均比空白组明显下降($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),经不同产

地人参水煎剂治疗后,上述指标均显著升高($P < 0.05$)。辽宁人参水煎剂对 DTH 和 IFN- γ 的升高与朝鲜人参和吉林人参相比也并没有显著性差异。

表 2 不同产地人参对免疫抑制小鼠 DTH 和 IFN- γ 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	DTH/mm	IFN- γ / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	0.77 \pm 0.11	5422.51 \pm 780.19
模型	70	0.55 \pm 0.11 ⁴⁾	4841.63 \pm 472.51 ³⁾
辽参	5 000	0.70 \pm 0.13 ¹⁾	5916.34 \pm 677.28 ²⁾
吉参	5 000	0.76 \pm 0.18 ²⁾	5925.89 \pm 458.64 ²⁾
朝参	5 000	0.72 \pm 0.13 ²⁾	5929.98 \pm 657.13 ²⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与空白组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

通过本研究表明,免疫低下小鼠脾细胞悬液中 CD3, CD4, CD8, CD4/CD8 均显著下降, DTH 和血清 IFN- γ 浓度明显降低,说明免疫低下后机体细胞免疫功能紊乱。

CD3 为成熟 T 细胞表面标志, CD4 是辅助性 T 细胞(Th, 包括 Th1 和 Th2)和迟发型超敏反应 T 细胞表面标志, CD4⁺T 细胞具有辅助 T 细胞转变为效应细胞, B 细胞转化为浆细胞以及活化巨噬细胞等功能。CD8⁺T 细胞主要指细胞毒性 T 细胞, 是细胞免疫应答的主要效应细胞, 可特异性杀伤靶细胞, 在肿瘤免疫、抗病毒感染、同种异体移植排斥反应中发

挥重要作用^[3]。因此, CD4⁺, CD8⁺ 数目的变化尤其是 CD4⁺/CD8⁺ 表示免疫功能状态。

IFN- γ 为 Th1 细胞分泌的细胞因子, 参与细胞介导的免疫反应, 具有调节 Th1 细胞, 参与抗感染、抗肿瘤的作用, 并且能够平衡 Th1 和 Th2, 调节 Th1/Th2 失衡引起的异常免疫应答^[4]。Th1 细胞主要参与细胞免疫, 介导与细胞毒和迟发型超敏性炎症有关的应答, 并被视为 T_{DTH} 细胞。

不同产地人参水煎剂均能不同程度提高免疫低下小鼠脾细胞悬液中 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、CD4⁺/CD8⁺, 及 DTH、血清 IFN- γ 含量。说明人参通过提高成熟 T 细胞数量, 调节 T 细胞亚群比例, 提高 Th1 细胞分泌的 IFN- γ 含量和增强 DTH, 达到纠正免疫低下细胞免疫功能紊乱的作用。

[参考文献]

- [1] 任仁安, 陈瑞华. 中药鉴定学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 125.
- [2] 朱永明. 辽参与高丽参渊源考[J]. 人参研究, 2001, 13: 45.
- [3] 赵琼, 徐世军, 卢陆飞. 蚁附罂痹超细微粉对佐剂性关节炎大鼠外周血 T 细胞亚群的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(4): 60.
- [4] Novlli F, Giovareli M, Reber Liske R, et al. Blockade of physiologically secreted IFN-gamma inhibits human T lymphocyte and natural killer cell activation [J]. Immunol, 1991, 147(4): 1445.

[责任编辑 邹晓翠]