

艾可康胶囊对白血病小鼠免疫功能的影响

刘方洲*, 梁瑞峰, 王晓丽, 郭建中

(河南省中医药研究院, 郑州 450004)

[摘要] **目的:**观察艾可康胶囊对 Friend 型白血病鼠的治疗作用。**方法:**BALB/c 小鼠 70 只,分为正常对照组、模型对照组、齐多夫定对照组($0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、唐草片对照组($3.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、艾可康高、中、低剂量组($5, 2.5, 1.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$);除正常组外,每只小鼠 ip 0.5 mL FLV 病毒稀释液,正常组给予 0.5 mL 生理盐水。24 h 后开始给药,正常对照组和模型对照组给予生理盐水,连续给药 21 d。末次给药后取血,摘取脾脏。称取脾脏质量,计算脾指数,流式细胞仪测定 CD4^+ , CD8^+ 及 CD4^+ , CD8^+ T 淋巴细胞的幼稚细胞和记忆细胞。**结果:**与模型组相比较,艾可康高、中剂量组的脾指数、 CD4^+ T 淋巴细胞的记忆细胞均显著降低, CD4^+ , $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$, CD4^+ T 淋巴细胞的幼稚细胞百分率, CD8^+ T 淋巴细胞的幼稚细胞百分率均显著升高 ($P < 0.05$),艾可康高剂量组 CD8^+ 均显著升高, CD8^+ T 淋巴细胞的记忆细胞百分率均显著降低 ($P < 0.05$)。**结论:**艾可康胶囊可提高 Friend 型白血病鼠的免疫功能。

[关键词] 艾可康胶囊; Friend 白血病病毒; 艾滋病

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0198-04

Effect of the Aikekang Capsule on Immunity in the Mice with Infection of Friend Leukemia Virus

LIU Fang-zhou*, LIANG Rui-feng, WANG Xiao-li, GUO Jian-zhong
(Henan Research Institute of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the therapeutic effect of the Aikekang capsule on the infection of Friend leukemia virus in mice. **Method:** Seventy BALB/c mice were randomly divided into seven groups: normal group, model group, Zidovudine group ($0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Tangcaopian group ($3.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Aikekang groups ($5, 2.5, 1.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Except for the normal group, the mice in other groups were inoculated intraperitoneally with Friend leukemia virus (FLV) to acquired immuno deficiency syndrom (AIDS) model. Twenty-four hours after inoculation, the mice were given corresponding drugs according to the experimental design for 21 days. After treatment, the mice were executed and the effects of the Aikekang capsule on the spleen index, CD4^+ cells and CD8^+ cells, CD4^+ and CD8^+ T cells were determined. **Result:** High-dose and middle-dose Aikekang had reduced the spleen index and the percentage of CD4^+ memory T cell and rised the percentage of CD4^+ , the ratio of $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$, the percentage of CD4^+ immature T cell and the percentage of CD8^+ immature T cell; High-dose Aikekang increased the percentage of CD8^+ and reduced the percentage of CD8^+ memory T cell. **Conclusion:** The Aikekang capsule can enhance the immunity on the infection of Friend leukemia virus in mice.

[Key words] Aikekang capsula; Friend leukemia virus; AIDS

艾滋病又称获得性免疫缺陷综合征(AIDS),是由人免疫缺陷病毒(HIV)感染引起的疾病,因其可

破坏人的免疫功能而引起各种机会性感染及肿瘤,并且具有传染性还在不断蔓延。目前用于临床的核苷类逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂等药物不能完全杀灭病毒,而且不良反应多,价格昂贵。中医药学因其独特的理论体系及丰富的实践经验为 AIDS 的防治开辟了新途径^[1-2]。通过临床观察认为积损致

[收稿日期] 20111213(008)

[通讯作者] *刘方洲,副研究员,从事中药药理研究, Tel: 0371-66361118, E-mail: hnliu569@163.com

虚是艾滋病的核心病机,正气亏虚、气虚是患者的主要证型,组方原则可考虑以健脾益肾扶正为主。Friend 鼠白血病病毒(FLV)属于逆转录病毒科,将它接种于敏感鼠可导致脾和淋巴结增大,免疫抑制和机会性感染,其症状与人的艾滋病相似,被广泛应用于评价药物抗艾滋病的作用。我们通过 Friend 鼠白血病病毒模型观察了艾可康胶囊对免疫功能的影响,以期艾可康胶囊治疗艾滋病提供依据。

1 材料

1.1 动物 BALB/c 小鼠,雌性, (16 ± 2) g,购自河南省实验动物中心,许可证号 SCXK(豫)2005-0001。

1.2 药物和试剂 艾可康胶囊(处方组成:黄芪 30 g,人参 15 g,茯苓 15 g,苍术 12 g,炒白术 12 g,扁豆 15 g,薏苡仁 12 g,当归 10 g,川芎 10 g,山药 15 g,莲子 10 g,炙甘草 6 g,以上各味按比例配伍,加水提取 2 次,每次 2 h,合并滤液,浓缩,加入乙醇沉淀,使含醇量达 60%,静置 48 h,回收乙醇,继续浓缩,加入适量辅料,制成颗粒,干燥,装入胶囊,即得,每粒胶囊相当于生药 10.3 g,胶囊以人参皂苷 Rb, Rg, Rt 的含量为质控标准,每粒不得低于 0.5 mg。艾可康胶囊(河南省中医药研究院中药研究所中试实验室提供,批号 20090305),齐多夫定(东北制药总厂,批号 20071201),唐草片(上海百岁行药业有限公司,批号 080804),Friend 型鼠白血病(FLV)病毒(美国标准菌种收藏所提供),抗小鼠 T 细胞表面标志单克隆荧光抗体 Mouse-CD3-Percp, Mouse-CD4-APC, Mouse-CD8-APC, Mouse-CD44-PE, Mouse-CD62L-FITC(均购自 Bioscience 公司)。

1.3 仪器 FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司产品)。

2 方法

2.1 病毒半数感染量(ID_{50})测定 BALB/c 小鼠 ip FLV 病毒悬液,21 d 后取出脾脏制成 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脾悬液,收集脾悬液,按文献方法计算 ID_{50} ,实验时以 80 倍 ID_{50} 为鼠逆转录病毒小鼠模型的实验浓度。

2.2 动物分组及给药 将 70 只小鼠随机分为 7 组:正常对照组、模型对照组、齐多夫定对照组($0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、唐草片对照组($3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、艾可康高、中、低剂量组($5, 2.5, 1.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。除正常组外,每只小鼠 ip 0.5 mL 病毒稀释液,正常组给予 0.5 mL 生理盐水。第 2 天开始 ig 给药,每组分别给予相应的药物,每天给药 1 次,给药体积为 20 mL·

kg^{-1} ,模型对照组和正常对照组给予同等体积的生理盐水,连续给药 21 d。末次给药后禁食 12 h,摘除眼球取血,处死后摘取脾脏。

2.3 指标测定

2.3.1 脾脏指数测定^[4] 精密称取脾脏质量,按照以下公式计算出脾指数以及脾指数抑制率:

$$\text{脾指数} = \text{小鼠脾质量}(\text{mg}) / \text{小鼠体重}(\text{g})$$

$$\text{脾指数抑制率} = (\text{对照组平均脾指数} - \text{实验组平均脾指数}) / \text{对照组平均脾指数} \times 100\%$$

2.3.2 T 细胞亚群的流式细胞仪分析^[5] 小鼠血液用 K3-EDTA 抗凝采血管血液。取流式细胞仪专用盖试管编号,每例血液样本准备 2 支试管,先各加入抗凝血 100 μL ,然后两管中分别加入荧光抗体 Mouse-CD3-Percp, Mouse-CD4-APC, Mouse-CD44-PE, Mouse-CD62L-FITC 各 10 μL ,震荡混匀,避光反应 15 min。然后加入红细胞裂解液 1 500 μL ,震荡混匀,避光反应 15 min。PBS 洗涤 2 次,最后用 1 000 μL PBS 悬浮细胞,上机检测,结果用 Cell Quest Pro 软件进行分析。

2.4 统计方法 实验结果用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行统计, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 对脾指数和 $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+/CD8^+$ 的影响 模型组与正常组相比脾指数显著增大;与模型组相比较,齐多夫定组、艾可康高剂量组、艾可康中剂量组的脾指数均显著降低($P < 0.05$),唐草片组、艾可康低剂量组脾指数与模型组相比无显著差异;与模型组相比,唐草片组、齐多夫定组、艾可康高、中、低剂量组 $CD4^+$ 百分率和 $CD4^+/CD8^+$ 值均显著升高($P < 0.05$),唐草片组、齐多夫定组、艾可康高、低剂量组 $CD8^+$ 百分率均显著升高($P < 0.05$),见表 1。

3.2 对 $CD4^+$ T 淋巴细胞的幼稚细胞和记忆细胞的影响 与模型组相比,齐多夫定组、艾可康高、中剂量组 $CD4^+$ T 淋巴细胞的幼稚细胞百分率均显著升高($P < 0.05$), $CD4^+$ T 淋巴细胞的记忆细胞百分率均显著降低($P < 0.05$),见表 2。

3.3 对 $CD8^+$ T 淋巴细胞的幼稚细胞和成熟细胞的影响 与模型组相比,齐多夫定组、艾可康大、中剂量组 $CD8^+$ T 淋巴细胞的幼稚细胞百分率均显著升高($P < 0.05$),唐草片组、齐多夫定组、艾可康大剂量组 $CD8^+$ T 淋巴细胞的记忆细胞百分率均显著降低($P < 0.05$),见表 3。

表 1 艾可康胶囊对 FLV 所致免疫力低下小鼠脾指数, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 脾指数/mg·g ⁻¹ | CD3 ⁺ CD4 ⁺ /% | CD3 ⁺ CD8 ⁺ /% | CD4 ⁺ /CD8 ⁺ |
|------|-----------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| 正常对照 | - | 0.45 ± 0.04 ¹⁾ | 67.67 ± 3.39 ¹⁾ | 16.46 ± 2.04 ¹⁾ | 4.15 ± 0.41 ¹⁾ |
| 模型对照 | - | 6.9 ± 3.12 | 45.47 ± 7.85 | 14.62 ± 4.12 | 3.11 ± 0.62 |
| 唐草片 | 3.2 | 6.02 ± 1.92 | 59.67 ± 7.94 ¹⁾ | 18.73 ± 3.70 ¹⁾ | 3.30 ± 0.76 |
| 齐多夫定 | 0.1 | 0.62 ± 0.10 ¹⁾ | 69.39 ± 3.66 ¹⁾ | 16.36 ± 3.73 ¹⁾ | 4.44 ± 1.00 ¹⁾ |
| 艾可康 | 5.0 | 4.93 ± 2.42 ¹⁾ | 55.01 ± 8.28 ¹⁾ | 15.18 ± 2.59 ¹⁾ | 3.71 ± 0.77 ¹⁾ |
| | 2.5 | 5.22 ± 2.91 ¹⁾ | 52.75 ± 8.40 ¹⁾ | 14.41 ± 2.12 | 3.72 ± 0.72 ¹⁾ |
| | 1.25 | 6.38 ± 3.25 | 54.18 ± 8.73 ¹⁾ | 14.40 ± 4.45 | 3.76 ± 1.17 ¹⁾ |

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05(表 2~3 同)。

表 2 艾可康胶囊对 CD4⁺T 淋巴细胞的幼稚细胞和记忆细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 幼稚 T 细胞/% | 记忆 T 细胞/% |
|------|-----------------------|---|---|
| | | CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD44 ^{low} CD62 ^{high} | CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD44 ^{high} CD62 ^{low} |
| 正常对照 | - | 15.44 ± 3.84 ¹⁾ | 22.07 ± 5.75 ¹⁾ |
| 模型对照 | - | 11.04 ± 4.38 | 29.59 ± 7.67 |
| 唐草片 | 3.2 | 11.51 ± 3.94 | 28.84 ± 6.84 |
| 齐多夫定 | 0.1 | 14.74 ± 3.58 ¹⁾ | 22.76 ± 4.7 ¹⁾ |
| 艾可康 | 5.0 | 13.75 ± 4.01 ¹⁾ | 23.45 ± 6.12 ¹⁾ |
| | 2.5 | 12.64 ± 3.42 ¹⁾ | 24.65 ± 5.96 ¹⁾ |
| | 1.25 | 11.46 ± 3.69 | 27.1 ± 7.41 |

表 3 艾可康胶囊对 CD8⁺T 淋巴细胞的幼稚细胞和记忆细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 幼稚 T 细胞/% | 记忆 T 细胞/% |
|------|-----------------------|--|--|
| | | (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ^{low} CD62 ^{high}) | (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ^{high} CD62 ^{low}) |
| 正常对照 | - | 13.63 ± 4.77 | 18.91 ± 6.83 |
| 模型对照 | - | 9.77 ± 4.01 | 27.16 ± 7.03 |
| 唐草片 | 3.2 | 10.52 ± 4.12 | 23.24 ± 5.12 ¹⁾ |
| 齐多夫定 | 0.1 | 13.98 ± 2.15 ¹⁾ | 22.78 ± 5.84 ¹⁾ |
| 艾可康 | 5.0 | 13.34 ± 2.53 ¹⁾ | 21.96 ± 5.45 ¹⁾ |
| | 2.5 | 11.56 ± 3.16 ¹⁾ | 24.57 ± 6.94 |
| | 1.25 | 10.31 ± 3.48 | 26.97 ± 7.12 |

4 讨论

Friend 型鼠白血病病毒(FLV)与 HIV 同属逆转录病毒,感染小鼠后会发生严重的免疫缺陷疾病,表现为小鼠脾脏明显增大、免疫抑制等类似于 HIV-1 感染人的症状,该模型能较好地模拟人类艾滋病的症状特点^[6],被称为鼠艾滋病(murine acquired immunodeficiency syndrom, MAIDS)。本实验用此模型研究艾可康胶囊对 Friend 型鼠艾滋病的免疫力的影响。

T 淋巴细胞是机体主要的免疫细胞,根据 T 细胞表面分化抗原的不同,T 细胞分为 CD3⁺,CD4⁺和

CD8⁺T 淋巴细胞。机体的免疫平衡状态主要依赖于各 T 细胞亚群的相互调节作用。CD4⁺T 细胞主要为辅助性 T 细胞,通过激活其他 T, B 细胞亚群,协调免疫细胞间的相互作用,发挥正常的免疫功能。CD8⁺T 细胞主要为抑制性 T 细胞(Ts)和杀伤性 T 细胞(Tc),Ts 抑制淋巴细胞增殖反应和抗体的产生。CD4⁺,CD8⁺T 细胞亚群的百分率或 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值是初步评估机体免疫状态的指标^[7-8]。一些中药或中医治疗方法能调节 T 淋巴细胞亚群的百分率,提高机体免疫功能^[8]。

艾可康胶囊主要由人参、炒白术、当归、川芎、黄芪等组成,其中人参、炒白术、茯苓益气健脾,当归、川芎养血活血,黄芩清热解毒。诸药合用共奏扶正解毒之功。本实验结果显示,艾可康胶囊可抑制 FLV 引起的脾肿大,脾脏为病毒的主要靶器官,FLV 感染鼠的脾增重一定程度可反映病毒量,因此药物能否抑制病毒,脾指数为一个直观的指标。艾可康胶囊还可显著升高 CD4⁺百分率,CD4⁺/CD8⁺,CD4⁺T 淋巴细胞的幼稚细胞百分率,降低 CD4⁺T 淋巴细胞的记忆细胞百分率和 CD8⁺T 淋巴细胞的记忆细胞百分率,提示艾可康胶囊可以提高 Friend 型鼠免疫功能。

[参考文献]

- [1] 危剑安,刘婧,王福生,等.艾灵颗粒对 HIV 感染者外周血树突状细胞亚群的影响[J].中国艾滋病性病,2008,14(3):235.
- [2] 蒋士卿,孙宏新,徐英敏,等.精元康胶囊对不同治疗方案的 116 例 HIV/AIDS 患者白细胞水平影响的随机对照研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(14):201.
- [3] 蒋岩,王红霞,鲍作义,等.用鼠艾滋病模型评价虎杖水提液的抗病毒作用[J].中国病毒学,1998,13(4):306.

茶氨酸提高运动能力的中枢机制

白宝丰*

(南京体育学院运动健康科学系, 南京 210014)

[摘要] **目的:**建立大鼠一次性力竭游泳模型,研究茶氨酸对大鼠纹状体递质氨基酸及谷氨酸受体蛋白含量与酪氨酸磷酸化水平的影响,从而探讨其对提高运动能力的中枢机制。**方法:**雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、茶氨酸高、中、低剂量(400,200,100 mg·kg⁻¹)组,每组 10 只。各组大鼠适应性饲养 1 周后 ig 给药,正常对照组 ig 给予等体积生理盐水,共 30 d。第 31 天,比较各组大鼠游泳至力竭时间;断头取纹状体,高效液相色谱测定纹状体匀浆中谷氨酸(glutamic acid, Glu)、甘氨酸(glycine, Gly)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)与天冬氨酸(aspartic acid, ASP)含量,通过免疫印迹法与免疫沉淀法测定 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体亚基(*N*-methyl-*D*-aspartate receptor subunits 2A, NR2A)蛋白含量与酪氨酸磷酸化水平。**结果:**茶氨酸有效延长大鼠游泳时间(149.4 ± 4.0), (164.7 ± 4.1) min, ($P < 0.01$),高剂量茶氨酸显著提高纹状体中 Glu 含量(10 063.2 ± 359.5) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;与对照组比较,高剂量茶氨酸提高 NR2A 蛋白相对含量(134.1 ± 3.6)与酪氨酸磷酸化水平(123.2 ± 4.4, 对照组为 100, 显著降低 GABA 含量(1 881.3 ± 336.1) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,与正常对照组(2 237.1 ± 198.4) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 比较, $P < 0.05$ 。**结论:**茶氨酸能缓解急性运动导致的中枢神经系统兴奋性抑制,从而提高运动能力,机制可能与其提高兴奋性神经递质含量降低抑制性神经递质含量及提高谷氨酸受体活性有关。

[关键词] 茶氨酸; 运动能力; 神经中枢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0201-04

Effect and Mechanism of *L*-theanine on Improving Exercise Capacity in Rats

BAI Bao-feng*

(Sport and Health Science Department in Nanjing Sport Institute, Nanjing 210014, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of *L*-theanine on amino acids neurotransmitter and GluRs in rats by acute exhaustion swimming and mechanism of *L*-theanine improves exercise capacity. **Method:** SD male rats were randomly divided into high, middle and low dose (400, 200, 100 mg·kg⁻¹, ig) groups and normal control group, ig, ($n = 10$, in each group). After one week, each group was started to give *L*-theanine for 30 days. The normal control group was given normal saline. On the day 31, rat exhaustive swimming time was

[收稿日期] 20120405(011)

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程资助项目;南京体育学院院级课题项目(YJ201104)

[通讯作者] *白宝丰, 硕士, 讲师, 从事运动营养与功能性食品开发, Tel: 13770538024, E-mail: baibaof@163.com

[4] 何家靖, 杨兆丽, 林燕芳, 等. Friend 鼠白血病病毒对 BALB/c 小鼠和 KM 小鼠的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2011, 21(9): 605.

[5] 雷萍, 关洪全, 王昊, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 218.

[6] 杨子峰, 洪志哲, 唐明增, 等. 白藜芦醇对小鼠艾滋病治疗作用的实验研究[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(2): 148.

[7] 雷萍, 关洪全, 王昊, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 218.

[8] 陆春伟, 佟海侠, 陆美言. 急性白血病患者外周血淋巴细胞亚群和调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(11): 2230.

[9] 展昭民, 邓来军, 韩冰虹, 等. 滋肾生血胶囊治疗急性髓系白血病的疗效机制研究[J]. 中成药, 2010, 32(10): 1665.

[责任编辑] 聂淑琴]