

# 玉屏风散生物转化液对免疫抑制小鼠细胞免疫的干预作用

王月飞, 赵红晔, 王玉阁, 王滨\*, 徐启华\*  
(齐齐哈尔医学院生理教研室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** 目的: 观察玉屏风散生物转化液对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响。方法: 用流式细胞仪对外周血中 CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T 进行测定; 采用 ELISA 法检测外周血中白细胞介素-2 (IL-2) 和  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 的含量。结果: 与环磷酰胺组比较, 玉屏风散生物转化液组 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的百分率提高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T 明显上升 ( $P < 0.01$ ); 小鼠血清 IL-2 和 IFN- $\gamma$  水平显著提高 ( $P < 0.01$ )。结论: 玉屏风散生物转化液可能是通过调节体内 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群比例平衡, 纠正 Th1/Th2 漂移现象, 维持 Th1 的优势, 提高机体的细胞免疫功能。

**[关键词]** 玉屏风散; 生物转化; 细胞免疫

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0176-03

## Effect of Bioconversion Product of Jade Screen Powder on Cellular Immunity in Immunosuppressed Mice

WANG Yue-fei, ZHAO Hong-ye, WANG Yu-ge, WANG Bin\*, XU Qi-hua\*  
(Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of the bioconversion product of jade screen powder on cellular immunity in immunosuppressed mice. **Method:** The levels of CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T were determined by flow cytometry; The content of serum interleukin-2 (IL-2) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) were detected by ELISA. **Result:** Compared with cyclophosphamide group, the levels of CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T improved in experimental group ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ) and the content of serum IL-2 and IFN- $\gamma$  improved obviously in experimental group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The bioconversion product of Jade Screen Powder can promote the cell immunity function, through regulating the balance between CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T cells and correcting Th1/Th2 drift phenomenon to keep the superiority of Th1.

**[Key words]** Jade Screen Powder; biotransformation; cellular immunity

玉屏风散是元代朱丹溪《丹溪心法》中扶正固本的经典方剂, 玉屏风散由黄芪、白术、防风组成, 有益气固表止汗之功, 主治气虚表弱, 易感风寒。玉屏风散能促进淋巴细胞的增殖分化, 对细胞免疫和体液免疫均有增强作用<sup>[1]</sup>。近几年的实验研究提示, 用生物转化技术对玉屏风散煎剂进行生物转化, 其

产物能有效改善小鼠的免疫功能, 且疗效强于玉屏风散煎剂<sup>[2-3]</sup>。为了进一步了解玉屏风散生物转化液提高免疫功能的机制, 本试验以外周血中 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T, IL-2 和 IFN- $\gamma$  作为主要观察指标, 旨在探讨玉屏风散生物转化液对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响。

### 1 材料

**1.1 药物** 黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch) Beg. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao, 白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz., 防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turz) Schischk. 均购自齐齐哈尔市药品站, 由齐齐哈尔医学院郭丽娜教授鉴定。3 味药质量比为 2:2:

**[收稿日期]** 2010-07-12

**[基金项目]** 黑龙江省教育厅资助项目(11511454)

**[通讯作者]** \* 王滨, Tel: 0452-2663183, E-mail: wangbinqqhrmc@ yahoo. com. cn;

\* 徐启华, Tel: 0452-2663183m E-mail: qihuaxu@123. com

1. 玉屏风散煎剂由本室自制;环磷酰胺(上海华联制药有限公司,批号 040608);FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD8 单克隆抗体(美国 EB 公司);PE 标记的大鼠抗小鼠 CD4 单克隆抗体(美国 EB 公司);小鼠 IL-2 试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司);小鼠 IFN- $\gamma$  试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司);啤酒酵母(QSB-XI6 齐齐哈尔大学生物教研室)。

1.2 动物 昆明种小鼠,体重 18 ~ 22 g,雌雄各半,由齐齐哈尔医学院实验动物中心购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2002-0003。

1.3 仪器 FacsCalibur 流式细胞仪(BD 公司);Safire2 酶标仪(瑞士 TECAN 公司);LDZ5-2 水平离心机(北京医用离心机厂);超净工作台(苏州净化设备厂)。

## 2 方法

2.1 玉屏风散生物转化液制备 取黄芪 100 g,白术 100 g,防风 59.150 g,常规煎煮 3 次去渣、混合、浓缩配成相当于含生药 1.25 g · L<sup>-1</sup> 的煎剂。115 °C 高压蒸气灭菌 20 min。在 37.5 mL 浓缩煎剂中加入经过 PAD 培养基培养的啤酒酵母(QSB-XI6)菌液,使混合后生药达 0.47 g · mL<sup>-1</sup>,继续按原条件培养酵母菌 120 h 后取出培养瓶,终止转化。将转化液 2 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,除去酵母菌,置 4 °C 冰箱中备用。

2.2 分组、免疫抑制小鼠模型制备及给药 小鼠 66 只,雌雄各半,随机分成 3 组,每组 22 只,分别为正常对照组、环磷酰胺组和玉屏风组。环磷酰胺组和玉屏风组在给药前 3 d 分别 ip 环磷酰胺 50 mg · kg<sup>-1</sup>(用生理盐水调整至 0.5 mL/只),次日强化 1 次<sup>[4]</sup>,正常对照组 ip 生理盐水 0.5 mL/只。造模后每组各随机处死 2 只小鼠,取其脾脏和胸腺称重,环磷酰胺组和玉屏风组小鼠的脾脏和胸腺均明显萎缩且质量减轻,表明免疫抑制小鼠模型制备成功,开始给药,各组小鼠均 ig 1 次/d,玉屏风组 ig 玉屏风散生物转化液,剂量为 9.375 g · kg<sup>-1</sup>,正常对照组和环磷酰胺组 ig 同量的蒸馏水,连续 10 d。

2.3 血液采集与检测 末次给药 24 h 后,每组各取 10 只小鼠摘眼球收集小鼠血液。将血置于抗凝管中(含肝素),加入抗小鼠 CD4 单克隆抗体(PE)和抗小鼠 CD8 单克隆抗体(FITC)各 10  $\mu$ L,置 4 °C 避光 20 min。加染色洗涤液 1 mL 混匀,离心洗涤 3

次后弃上清。加入 0.5 mL 的固定液固定,置 4 °C 存放 30 min,流式细胞仪测定。

末次给药 24 h 后,每组各取 10 只小鼠摘眼球收集小鼠血液。静置 2 h 后于 3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 8 min,取血清,采用 ELISA 法,按照晶美公司提供的 ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作分别测量 IL-2、IFN- $\gamma$  含量。

2.4 统计学处理 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计分析软件的 One-Way ANOVA 过程进行方差分析,最小显著差法(Least significant difference, LSD)进行两两比较,双侧检验以  $P < 0.05$  表示差别有统计学意义。

## 3 结果

3.1 玉屏风散生物转化液对免疫抑制小鼠外周血 T 细胞亚群的影响 由表 1 可见,环磷酰胺组小鼠外周血 CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞率及其比值明显低于正常对照组( $P < 0.01$ ),进一步说明小鼠的免疫抑制模型成功。玉屏风散生物转化液能有效改善由环磷酰胺所致小鼠外周血 CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞率及其比值的减少( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。

表 1 玉屏风散生物转化液对免疫抑制小鼠外周血 T 细胞亚群的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量		CD4 <sup>+</sup> T/CD8 <sup>+</sup> T	
	/g · kg <sup>-1</sup>	CD4 <sup>+</sup> T/%	CD8 <sup>+</sup> T/%	
正常对照	-	58.34 ± 2.09 <sup>2)</sup>	33.53 ± 1.24 <sup>1)</sup>	1.77 ± 0.08 <sup>2)</sup>
环磷酰胺	0.05	38.40 ± 1.46	30.83 ± 1.13	1.32 ± 0.13
玉屏风散	9.375	56.94 ± 3.14 <sup>2)</sup>	32.12 ± 1.07 <sup>1)</sup>	1.91 ± 0.16 <sup>2)</sup>

注:与环磷酰胺组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2 同)

3.2 玉屏风散生物转化液对免疫抑制小鼠血清 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的影响 由表 2 可见,环磷酰胺组小鼠血清 IL-2 和 IFN- $\gamma$  水平显著低于正常对照组( $P < 0.01$ ),与环磷酰胺组比较,玉屏风组小鼠血清 IL-2、IFN- $\gamma$  水平显著升高( $P < 0.01$ ),表明玉屏风散生物转化液能提高免疫抑制小鼠血清 IL-2 和 IFN- $\gamma$  水平。

表 2 玉屏风散生物转化液对免疫抑制小鼠血清 IL-2, IFN- $\gamma$  的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g · kg <sup>-1</sup>	IL-2/pg · mL <sup>-1</sup>	IFN- $\gamma$ /pg · mL <sup>-1</sup>
正常对照	-	28.53 ± 1.76 <sup>2)</sup>	4.89 ± 0.14 <sup>2)</sup>
环磷酰胺	0.05	16.36 ± 2.28	2.74 ± 0.11
玉屏风散	9.375	27.45 ± 1.17 <sup>2)</sup>	6.36 ± 0.07 <sup>2)</sup>

## 4 讨论

玉屏风散是中医扶正固本的经典方剂,大量的

实验研究表明其对免疫功能低下的动物模型具有明显的增强免疫功能作用<sup>[1]</sup>。另有研究表明微生物发酵法对玉屏风散煎剂进行生物转化,制成玉屏风散生物转化液,能明显改善由环磷酰胺所导致的小鼠脾和胸腺萎缩,以及脾抗体细胞形成数,且疗效要强于玉屏风散煎剂<sup>[2]</sup>。玉屏风散生物转化液与煎剂都可增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能及一氧化氮的生成量,且玉屏风散生物转化液的作用强于煎剂<sup>[3]</sup>。

T 细胞亚群中的 Th(T 辅助细胞)和 Ts(T 抑制细胞)对免疫反应起调控作用,对维持免疫稳定起重要作用。CD4<sup>+</sup>代表辅助性 T 细胞,CD8<sup>+</sup>代表抑制性和细胞毒性 T 细胞,CD4<sup>+</sup>,CD8<sup>+</sup>彼此相互调节,表现出辅助和抑制的作用,是免疫系统的核心。因而机体 CD4<sup>+</sup>T,CD8<sup>+</sup>T 及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>可以作为评价机体细胞免疫状态的指标。IFN- $\gamma$ , IL-2 是调节 Th 细胞分化和 Th1/Th2 平衡的重要因子<sup>[5-7]</sup>,因此,通过二者在外周血中的含量变化,可直接或间接反映 Th1 和 Th2 细胞的功能,了解免疫状态。

本试验结果显示:玉屏风散生物转化液可明显提高 CD4<sup>+</sup>T,CD8<sup>+</sup>T 细胞率( $P < 0.01$ ),尤其是促使 CD4<sup>+</sup>T 细胞率明显提高,玉屏风散生物转化液使 CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T 明显上升( $P < 0.01$ );玉屏风散生物转化液能提高免疫抑制小鼠血清 IL-2 水平( $P < 0.01$ )和血清 IFN- $\gamma$  水平( $P < 0.01$ ),表明玉屏风散生物转化液能够刺激 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的生成。结果显示:玉屏风散生物转化液可能是通过调节外周血中

CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群比例平衡,纠正 Th1/Th2 漂移现象,维持 Th1 的优势,恢复机体细胞免疫功能而发挥免疫调节作用的。

### [参考文献]

- [1] 张红军,张晓莉,宋宝辉,等. 玉屏风散对免疫抑制小鼠的免疫功能的调节作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001,17(4):398.
- [2] 徐启华,赵堃,曹军. 玉屏风散的生物转化液对免疫抑制小鼠免疫功能的调节作用[J]. 齐齐哈尔医学院学报. 2006,27(4):643.
- [3] 王璐,邱培勇,王亚莉,等. 玉屏风散提取液对小鼠腹腔巨噬细胞活化及增殖的影响[J]. 新乡医学院学报, 2010,27(3):244.
- [4] 朱正美,刘辉,燕秋,等. 简明免疫学技术[M]. 北京:科学出版社,2002:216.
- [5] Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. J Immunol, 2005,175(1):5.
- [6] Dlugovitzky D, Fiorenza G, Farroni M, et al. Immunological consequences of three doses of heat-killed Mycobacterium vaccae in the immunotherapy of tuberculosis[J]. Respir Med, 2006,100(6):1079.
- [7] 郑九生,杜二球,周小飞,等. 新生儿 IL-18 对 Th1/Th2 类细胞免疫平衡的作用与 HBV 宫内感染相关性研究[J]. 现代妇产科进展, 2009,18(9):678.

[责任编辑 何伟]