

黄连解毒汤对荷瘤小鼠免疫调节作用的实验研究

周阿高^{1*}, 张勇², 孔德云³, 王颖², 张惠珍², 王树军²,
黄纲¹, 洪声¹, 葛海良², 任秋华², 毛旭明¹, 董佳容¹

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011;
2. 上海交通大学医学院, 上海 200025; 3. 上海医药工业研究院, 上海 200040)

[摘要] 目的: 探讨黄连解毒汤对荷瘤小鼠免疫调节作用。方法: 选择H₂₂肝癌小鼠模型, 通过检测免疫指标, 研究黄连解毒汤对正常小鼠和模型小鼠免疫反应的影响。结果: 实验组小鼠的自然杀伤细胞(NK)杀伤活性及T细胞分泌白细胞介素-4(IL-4)的能力均有显著增高($P < 0.01$, $P < 0.001$)。结论: 黄连解毒汤能增强荷瘤小鼠体内NK细胞的杀伤功能及体液免疫功能。

[关键词] 黄连解毒汤; 肝癌; 免疫调节

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)03-0056-03

Experimental Study of Effect of Huanglian Jiedu Decoction on Immunifaction in Tumor-bearing Mice

ZHOU A-gao^{1*}, ZHANG Yong², KONG De-yun³, WANG Yin², ZHANG Hui-zhen², WANG Shu-jun²,
KUI Gang¹, HONG Sheng¹, GE Hai-liang², REN Qiu-hua², MAO Xu-ming¹, DONG Jia-rong¹

(1. Department of Internal Medicine, People Hospital of No. 9,
Medical College of Shanghai Jiaoda University, Shanghai 200011, China;
2. Medical College of Shanghai Jiaoda University, Shanghai 200025, China;
3. Shanghai Academy of Medical Industry, Shanghai 200040, China)

[Abstract] **Objective:** Approach on the immunifaction in tumor-bearing mice by Huanglian Jiedu Decoction (HLJD). **Methods:** To choose the model of transplanted tumor of hepatocarcinoma cell line H₂₂ in mice, the effects of HLJD on the immunifaction were observed in the normal mice and model ones by detecting the immune indexes. **Results:** The cytotoxic function of NK cell and the function of T cell producte IL-4 are obviously higher in HLJD treated mice than that in the control group ($P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion:** HLJD could reinforce the cytotoxic function of NK cell and the function of humoral immunity in tumor-bearing mice.

[Key words] Huanglian Jiedu Decoction; hepatocarcinoma; immunifaction

热毒内蕴是恶性肿瘤的病机之一, 清热解毒法是治疗恶性肿瘤的主要方法之一。黄连解毒汤是清

热解毒法的代表方剂, 出自隋唐时期, 由黄连、黄柏、黄芩、栀子四味药组成, 其中黄连清心火、泻中焦之火, 黄芩清肺热, 泻上焦火, 黄柏泻下焦火, 栀子清泻三焦之火, 故诸药相须为用具有清热、泻火、解毒之功效, 主治实热火毒、三焦热盛之证。近年来, 药理研究还发现该方除具有抗菌消炎、抗内毒素等功能之外, 尚具有降压、降糖、降脂、改善慢性脑缺血等作

[收稿日期] 2006-08-22

[基金项目] 上海第二医科大学校基金项目(No. 03XJ21027)

[通讯作者] * 周阿高, Tel: (021) 63138341-5394; E-mail: zagssmu@sina.com

用,其临床应用范围亦愈为广泛^[1]。本研究以肝癌(H₂₂)小鼠为模型,对黄连解毒汤进行荷瘤小鼠调节免疫的研究,结果如下。

1 材料与仪器

1.1 药物制备 取黄连解毒汤(由黄连、黄芩、黄柏、栀子组成,各药味比例为3:2:2:3)各饮片置煎煮容器内,加适量的冷水浸泡1~2 h,煮沸30 min,过滤。药渣加3~5倍量水继续煎煮,煮沸20 min,过滤。合并两次滤液,于水浴上浓缩成相当于原生药材1 g/mL的药液,冷却装入灭菌药瓶,置4℃冰箱备用。

1.2 动物 C57BL/6小鼠,雄性,10周龄,清洁级,购自上海中科院动物中心,合格证号:SCXK(沪20030003)。

1.3 瘤株 肝癌H₂₂瘤株,由上海市免疫学研究所提供。

1.4 试剂 ConA(Sigma公司),CD₃、CD₄、CD₈单抗(eBioScience公司),自然杀伤细胞(NK)细胞杀伤试剂(上海市免疫研究所自配),³H-TdR(上海原子能研究所),IFN- γ 和IL-4检测试剂盒(晶美公司)。

1.5 主要仪器 流式细胞仪FACS calibur(Becton Dickinson, San Jose CA)。 β 记数仪(1450 MicroBeta Trilux, PerkinElmer Life Sciences)。酶标测试仪(Biorad Model 550 microplate reader, USA)。

2 实验方法

2.1 造模方法 无菌条件下取生长7~9 d传代接种的H₂₂细胞株,将细胞 5×10^6 接种于每只小鼠右侧腋窝皮下。

2.2 动物分组及给药方法 小鼠30只,正常组10只,其余均按上法造模。造模5 d后,随机分成生理盐水组和实验组,每组10只,实验组给予黄连解毒汤水煎液1 g/mL,均灌胃0.2 mL/只,连续给药15 d。

2.3 标本采集 停药次日,断颈处死小鼠,剥离肿瘤组织并无菌取脾。

2.4 检测指标

2.4.1 T淋巴细胞增殖功能 采用³H-TdR掺入法^[2]。在96孔平底培养板中,每孔加入小鼠脾细胞悬液100 μ L,浓度为 5×10^6 /mL,3复孔培养。同时,分别加ConA 10 μ L。于37℃,5%CO₂条件下培养72 h。终止培养前16 h,每孔加入³H-TdR 1 μ Ci/孔。用细胞收集仪将细胞收集于玻璃纤维滤纸上, β 液闪仪测定cpm值,并计算刺激指数。

2.4.2 NK细胞杀伤功能 用1640培养液分别调整小鼠脾细胞(效应细胞)和体外培养的K562细胞(靶细胞)浓度分别为 5×10^6 /mL和 1×10^5 /mL^[2]。按效:靶=50:1比例,各取100 μ L加入96孔平底培养板,37℃,5%CO₂条件下共同培养4 h。并设自然释放和最大释放组作为实验阴性与阳性对照。然后1000 r/min离心5 min。吸取上清100 μ L,加入底物液100 μ L,静置3 min显色。再加入1N HCl终止反应,490 nm波长读取OD值。计算NK细胞的杀伤百分率。

2.4.3 T淋巴细胞亚群 采用直接免疫荧光及流式细胞仪分析^[2]。取小鼠脾细胞 1×10^6 ,加入适量PE-Cy5-CD₃、FITC-CD₄和PE-CD₈混合单抗,室温避光孵育20 min。1000 r/min离心5 min,洗涤2次后,加入300 μ L固定液,上机检测。

2.4.4 细胞因子 采用ELISA法^[2]。收集小鼠脾细胞经ConA刺激24 h后的培养上清,按照细胞因子检测试剂盒操作说明分别测定IFN- γ 和IL-4的含量。

2.5 统计学处理 采用Statpal团体T检验统计分析各组数据的差异显著性。

3 结果

3.1 黄连解毒汤对荷瘤小鼠T淋巴细胞增殖的影响 如表1所示,两组荷瘤小鼠T淋巴细胞转化功能较正常小鼠有显著降低,且T淋巴细胞转化刺激指数(SI)低于3,故认为荷瘤小鼠免疫功能处于低下水平。实验组小鼠T淋巴细胞转化功能与荷瘤组相比稍有增加,但无统计学差异,说明黄连解毒汤对小鼠的T淋巴细胞增殖功能无明显影响。

表1 黄连解毒汤对荷瘤小鼠T淋巴细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 The influence of Huanglian Jiedu Decoction on proliferation of T cell in tumor-bearing mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量(g/kg)	T淋巴细胞转化刺激指数(SI)
正常组	—	42.01 \pm 5.78
荷瘤组	同体积生理盐水	1.43 \pm 0.71
荷瘤黄连解毒汤组	10	1.69 \pm 0.26

3.2 黄连解毒汤对荷瘤小鼠NK T细胞亚群变化的影响 如表2所示,荷瘤组小鼠NK细胞杀伤活性与正常组比较无显著性差异,而黄连解毒汤组小鼠NK细胞杀伤活性有显著增高,为荷瘤组的4倍($P < 0.05$),说明黄连解毒汤能明显增强荷瘤小鼠NK细胞的杀伤功能。此外,两组肿瘤小鼠T细胞亚群数

量与正常组比较有明显下降 ($P < 0.05$), 说明其免疫功能低下; 而与荷瘤组比较, 黄连解毒汤组 CD_4^+ 明

显升高, CD_8^+ 明显降低 ($P < 0.01$), CD_4^+/CD_8^+ 比例增高。

表 2 黄连解毒汤对荷瘤小鼠 NK、T 细胞亚群变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 The influcon of Huanglian Jiedu Decoction on Changing of NK cell and T Cell subsets ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	NK	CD_3^+	CD_4^+	CD_8^+	CD_4^+/CD_8^+
正常组	—	0.102 ± 0.020	28.67 ± 3.11	15.75 ± 1.56	14.53 ± 1.99	1.08
荷瘤组	同体积生理盐水	0.115 ± 0.066	20.43 ± 3.482 ²⁾	9.33 ± 1.95 ²⁾	11.66 ± 1.94 ²⁾	0.80
荷瘤黄连解毒汤组	10 g/kg	0.581 ± 0.187 ¹⁾	19.51 ± 0.95 ²⁾	11.88 ± 0.50 ^{1), 2)}	8.95 ± 1.09 ^{1), 2)}	1.33

注: VS. N. S¹⁾ $P < 0.01$; VS. normal, ²⁾ $P < 0.05$

3.3 黄连解毒汤对荷瘤小鼠分泌细胞因子能力的影响 由表 3 可见, 3 组小鼠 T 细胞分泌 IFN- γ 能力无明显差异, 而黄连解毒汤组小鼠 T 细胞分泌 IL-4 的能力有显著升高 ($P < 0.001$), 说明黄连解毒汤能显著上调 CD_4^+ Th₂ 细胞的分泌能力, 并进而上调小鼠体液免疫功能。

表 3 黄连解毒汤对荷瘤小鼠分泌 IFN- γ 和 IL-4 能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 The influcon of Huanglian Jiedu Decoction on Ability of Excretion IFN- γ and IL-4 in Tumor-bearing Mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)
正常组	—	47.61 ± 20.50	109.11 ± 18.8
荷瘤组	同体积生理盐水	43.91 ± 20.83	125.83 ± 10.66
荷瘤黄连解毒汤组	10 g/kg	31.94 ± 6.51	297.93 ± 21.93 ¹⁾

注: VS. N. S¹⁾ $P < 0.001$ 。

4 讨论

现代医学认为, 机体的免疫功能与肿瘤的发生发展有密切关系。当宿主免疫功能低下或受抑制时, 肿瘤发生率增高, 而在肿瘤进行性生长时肿瘤患者的免疫功能受抑制, 二者也互为因果^[3]。因此, 如何增强机体免疫功能, 更好地发挥机体的抗肿瘤免疫机制, 是历来肿瘤免疫学研究的重要课题。

本研究着重研究黄连解毒汤对机体抗肿瘤免疫反应的影响。很多研究发现荷瘤机体 NK 细胞活性明显降低^[4~6]。本实验也取得了同样结果, 即荷瘤 (H₂₂肝癌) 模型组小鼠的 NK 细胞活性显著低于正常组, 说明荷瘤机体 NK 细胞活性处于严重低下状态, 而给药组的 NK 细胞活性明显高于荷瘤组 ($P < 0.005$), 表明黄连解毒汤可以增强荷瘤小鼠 NK 细胞活性, 提高其免疫力。IL-4 能促进 Th₀ 细胞分化为 Th₂ 细胞, 而 Th₂ 细胞是 B 细胞最有效的辅助者, 故机体分泌大量 IL-4 能促进体液免疫应答^[7]。本实验检测到给药组小鼠 T 细胞分泌 IL-4 的能力有显著升

高 ($P < 0.001$), 说明黄连解毒汤能显著上调 CD_4^+ Th₂ 细胞的分泌能力, 并发挥体液免疫功能, 但对 CD_8^+ T 细胞介导的细胞免疫应答无明显作用。本实验通过³H-TdR 掺入法及流式细胞术检测还发现黄连解毒汤能极明显促进 T 淋巴细胞亚群增殖, 并改变 T 淋巴细胞亚群比例, 说明其具有增强细胞免疫作用。

综上所述, 本实验证实了黄连解毒汤能增强荷瘤小鼠体内 NK 细胞的杀伤活性并刺激 T 细胞大量分泌 IL-4 发挥体液免疫作用, 对机体细胞免疫功能有明显增强作用。

[参考文献]

- [1] 张海丰, 滕坤, 关颖丽. 黄连解毒汤药理研究进展[J]. 中国医药研究, 2005, 3(3): 234-236.
- [2] 巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [3] Tsai JP, Chen HW, Cheng ML, et al. Analysis of host versus tumor interaction in cancer patients: opposing role of transforming growth factor-beta and interleukin-6 in the development of in situ tumor immunity[J]. Immunobiology, 2005, 210(9): 661-71.
- [4] 田永立, 李家邦, 杨冬花, 等. 抗癌增效汤对荷瘤大鼠免疫功能保护作用[J]. 中国医师杂志, 2003, 5(8): 1024-1026.
- [5] 王晓杰, 胡大为, 张秀芹, 等. 脉冲强磁场对小鼠 H₂₂ 肝癌杀伤作用的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26(10): 600-602.
- [6] 曾冬香, 姜藻, 毕延智, 等. 供者淋巴细胞输注治疗小鼠 H₂₂ 肝癌的实验研究[J]. 东南大学学报(医学版). 2005, 24(3): 194-197.
- [7] Ovsannikova IG, Rvan JE, Vierkant RA, et al. Immunologic significance of HLA class I genes in measles virus-specific IFN-gamma and IL-4 cytokine immune responses [J]. Immunogenetics, 2005, 57(11): 828-836.