

五种中药提取物对正常小鼠细胞免疫的影响

沈敬华*, 杨丽敏, 吕炳申, 郭明飞

(内蒙古医学院, 内蒙古 呼和浩特 010059)

[摘要] 目的: 探讨五种中药(黄芪、枸杞、蒲公英、苦参、肉苁蓉)提取物对小鼠细胞免疫功能的调节作用。方法: 以小鼠 T 淋巴细胞转化反应、小鼠腹腔巨噬细胞 IL-1 的分泌、小鼠脾淋巴细胞 IL-2 生成、NK 细胞活化、T 细胞亚群变化等指标评价五种中药单味提取物对小鼠细胞免疫功能的影响。结果: 本实验使用的五种中药均可增强 T 淋巴细胞增殖反应、巨噬细胞产生 IL-1, 淋巴细胞释放 IL-2, 活化 NK 细胞, T 细胞表面标志 CD3、CD4、CD8 表达增加。结论: 五种中药对小鼠的细胞免疫功能具有显著的调节作用。

[关键词] T 淋巴细胞; 白介素-1; 白介素-2; 细胞免疫; NK 细胞; T 细胞亚群

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)02-0057-03

二十世纪 80 年代以来, 科学家们对植物多糖, 特别是对中草药中的多糖研究产生了浓厚的兴趣^[1], 本文对五种中药单味提取物进行研究, 表明五种中药均具有显著的免疫增强作用, 其有效成分为多糖或糖缀合物(glycoconjugates), 包括糖肽、蛋白多糖等^[5-6]。中药可通过影响机体的免疫功能来达到防治疾病的目的。

1 材料

1.1 动物 昆明健康小鼠, ♀ ♂各半 144 只, 体重 18~23g(由北京肿瘤防治研究所提供)。

1.2 药物 黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongolicus* (Bge.) 产于内蒙古, 枸杞 *Lycium barbarum* L. 产于宁夏, 蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. 产于内蒙古, 苦参 *Sophora flavescens* Ait. 产于内蒙古, 肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 产于内蒙古。水煎醇提取, 提取物得率分别为: 苦参 175g/1000g、蒲公英 215g/1000g、黄芪 310g/1000g、枸杞 275g/1000g、肉苁蓉 235g/1000g(由内蒙古医学院微免教研室提供)。五种药物提取物分别制成 400 μ g \cdot mL⁻¹的初始浓度, 巴氏消毒后备用。为控制制剂的质量, 对黄芪、枸杞、蒲公英、苦参、肉苁蓉进行了薄层色谱鉴别, 用薄层扫描法进行了含量测定。

1.3 仪器与材料 CS-9301 薄层扫描仪(日本岛津公司); 939 型薄层制版器(重庆南安贝尔德仪器技术

厂); 分析天平(德国赛多利斯 BP211D); 硅胶 G(青岛海洋化工厂), 化学试剂均为分析纯; 单克隆抗体试剂盒为美国 PHARHINGEN 公司产品; 刀豆蛋白 A 和 MTT 分别购自 Sigma 公司和 Fluka 公司。

2 实验方法

2.1 T 淋巴细胞转化反应 参照唐波等^[1]介绍的方法, 取 6~8 周龄健康 ♀ ♂各半昆明小鼠, 按体重随机分为 6 组(每组 6 只, 自由取食, 饮水), 分别给黄芪、枸杞、蒲公英、苦参、肉苁蓉五种中药 125 μ g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 灌胃给药。正常对照组给与药物等体积的 PBS, 连续 7d, 第 8d 取小鼠脾细胞以 0.83% Tris-NH₄Cl 破坏 RBC, 脾细胞浓度调整为 5 \times 10⁶ \cdot mL⁻¹培养细胞后, 采用适量 ConA(浓度 12.5 μ g/mL) 为刺激剂, 用甲基³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR) 掺入法测定对小鼠 ConA 诱导的淋巴细胞增殖反应的影响。结果以刺激指数(SI)表示, SI= 实验孔 cpm 均值/对照孔 cpm 均值。

2.2 对小鼠腹腔巨噬细胞生成 IL-1 的影响 取 36 只小鼠, 分成 6 组, 每组 6 只, 于实验前 3d ip 6% 巯基乙醇酸钠 2mL/只, 实验时脱颈处死, ip 8mL Hank's 液, 按文献[2]在 24 孔板中无菌制备和培养单层巨噬细胞。五种中药单味提取物以无血清的 RPMI-1640 液配制成 125 μ g \cdot mL⁻¹, 分别加入单层巨噬细胞 1mL/孔, 对照组为无血清 RPMI-1640 液, 按文献[2]制备巨噬细胞培养上清, 储存于-20 $^{\circ}$ C 备用。另取小鼠 6 只, 脱颈处死后, 无菌制备小鼠胸腺细胞并加入 96 孔板中, 0.1mL/孔, 含胸腺细胞 1 \times 10⁶ 个。将

[收稿日期] 2005-01-04

[通讯作者] 沈敬华, Tel: 013500694660

含有 IL-1 的经不同药物作用的培养上清液用培养液作 1:4 稀释, 分别加入上述培养孔中, 每孔 50 μ L, 然后每孔加入 ConA 使其终浓度为 1 μ g \cdot mL⁻¹, 另设 ConA 对照孔, 按文献[2]所述的方法测定每孔的放射量。本方法可进行超微量分析, 敏感性高。根据 IL-1 的含量对放射量的标准曲线测定 IL-1 的含量, 结果以 pg \cdot mL⁻¹ 表示。

2.3 对小鼠脾淋巴细胞生成 IL-2 的影响 取 6~8 周龄健康昆明小鼠 108 只, 分为 6 组(每组 18 只, 雌雄各半, 自由取食, 饮水), 2~6 组分别给黄芪、枸杞、蒲公英、苦参、肉苁蓉五种中药 125 μ g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 1 组为对照组, 每天给与药物等体积的 PBS; 给药后的第 5、10、15d, 分别取上述 6 组中的每组 6 只小鼠摘眼球放血, 脱颈处死。无菌制备、培养脾细胞, 收集上清、离心、除菌后, 分别作 1:2 稀释, 按文献[2]测定稀释液中小鼠胸腺细胞的放射量。根据 IL-2 含量对放射量的标准曲线测定 IL-2 的含量, 结果以 pg \cdot mL⁻¹ 表示。

2.4 对小鼠脾脏 NK 细胞活性, T 淋巴细胞亚群的影响 取 36 只昆明小鼠, 上述水煎醇提取的中药按 400 μ g \cdot mL⁻¹ \cdot kg⁻¹ 灌胃, 每日 1 次, 疗程 10d。取脾研磨经 200 目过滤后平铺于淋巴分离液上, 4000r/min 离心 20min, 吸取中间云雾状细胞即可。T 淋巴细胞亚群采用 ABC 法, 用生物素-亲合素-过氧化物酶复合物作为指示剂, 组成一新的生物放大系统进一步提高检测的灵敏度。它是通过生物素标记抗体连接免疫反应系统, 同时借助生物素化酶或酶标亲合素引入酶与底物反应系统。NK 细胞活性测定采用 MTT 法, MTT 是细胞线粒体脱氢酶的底物, 活细胞特别是增殖细胞通过线粒体水解, 将 MTT 分解为兰紫色的甲臞(formazan) 结晶而显色, 其光密度值能够反应细胞的增殖活性。具体操作均参照试剂盒说明。

2.5 统计学方法 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用组间 *t* 检验进行统计比较。

3 结果

3.1 对小鼠 T 淋巴细胞转化反应的影响 见表 1。

3.2 对小鼠巨噬细胞生成 IL-1 的影响 见表 2。

3.3 对小鼠脾淋巴细胞生成 IL-2 的影响 见表 3。

3.4 对小鼠脾脏 NK 细胞活性, T 淋巴细胞亚群的影响 见表 4。

表 1 五种中药单味提取物对小鼠脾脏 T 淋巴细胞转化反应的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	提取物剂量 (μ g \cdot kg ⁻¹)	闪烁计数 min ⁻¹	
		未加 ConA	加 ConA
对照组	—	1	12.40 \pm 4.98
黄芪组	125	5.66 \pm 1.12 ¹⁾	16.78 \pm 4.90 ¹⁾
枸杞组	125	5.78 \pm 1.23 ¹⁾	23.67 \pm 20.23 ²⁾
蒲公英组	125	5.66 \pm 2.12 ¹⁾	22.56 \pm 10.57 ²⁾
苦参组	125	5.87 \pm 1.39 ¹⁾	24.89 \pm 11.24 ²⁾
肉苁蓉组	125	5.93 \pm 2.10 ¹⁾	26.77 \pm 25.45 ²⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(下同)。

表 2 五种中药单味提取物对小鼠巨噬细胞生成 IL-1 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	提取物剂量(μ g \cdot mL ⁻¹)	IL-1(pg \cdot mL ⁻¹)
对照组	—	20.23 \pm 1.23
黄芪组	125	28.56 \pm 2.22 ¹⁾
枸杞组	125	36.78 \pm 3.12 ¹⁾
蒲公英组	125	37.65 \pm 3.20 ¹⁾
苦参组	125	35.21 \pm 2.89 ¹⁾
肉苁蓉组	125	34.67 \pm 2.45 ¹⁾

表 3 五种中药单味提取物对小鼠脾淋巴细胞生成 IL-2 的影响((IL-2 pg \cdot mL⁻¹) $\bar{x} \pm s, n=6$)

药物	提取物剂量 (μ g \cdot mL ⁻¹)	IL-2(pg \cdot mL ⁻¹)		
		5d	10d	15d
对照组	—	20.34 \pm 5.12	22.56 \pm 3.60	26.56 \pm 6.78
黄芪组	125	36.23 \pm 6.22 ¹⁾	39.88 \pm 6.78 ¹⁾	47.67 \pm 9.11 ¹⁾
枸杞组	125	37.68 \pm 6.61 ¹⁾	40.45 \pm 7.43 ¹⁾	49.78 \pm 9.34 ¹⁾
蒲公英组	125	38.56 \pm 5.43 ¹⁾	42.67 \pm 8.12 ¹⁾	52.12 \pm 9.89 ¹⁾
苦参组	125	35.22 \pm 4.40 ¹⁾	38.12 \pm 5.23 ¹⁾	46.45 \pm 8.90 ¹⁾
肉苁蓉组	125	37.55 \pm 6.78 ¹⁾	41.10 \pm 7.35 ¹⁾	50.23 \pm 9.78 ¹⁾

表 4 五种中药单味提取物对小鼠脾 NK 细胞活性、T 淋巴细胞亚群的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

药物	提取物剂量 (μ g \cdot mL ⁻¹)	NK 细胞活性 (%)	T 淋巴细胞亚群		
			CD3(%)	CD4(%)	CD8(%)
对照组	—	20.23 \pm 1.11	23.78 \pm 5.8	18.4 \pm 6.10	15.45 \pm 4.90
黄芪组	400	55.23 \pm 6.22 ¹⁾	53.88 \pm 6.78 ¹⁾	34.67 \pm 9.11 ¹⁾	28.34 \pm 7.80 ¹⁾
枸杞组	400	67.68 \pm 5.61 ¹⁾	67.45 \pm 7.43 ¹⁾	49.78 \pm 9.34 ¹⁾	30.11 \pm 4.70 ¹⁾
蒲公英组	400	69.56 \pm 5.43 ¹⁾	60.67 \pm 8.12 ¹⁾	50.12 \pm 9.89 ¹⁾	29.80 \pm 5.10 ¹⁾
苦参组	400	58.22 \pm 4.40 ¹⁾	49.12 \pm 5.23 ¹⁾	49.45 \pm 8.90 ¹⁾	27.68 \pm 4.23 ¹⁾
肉苁蓉组	400	47.55 \pm 6.78 ¹⁾	41.10 \pm 7.35 ¹⁾	35.23 \pm 9.78 ¹⁾	20.34 \pm 6.89 ¹⁾

4 讨论

T 淋巴细胞是机体细胞免疫应答的核心。T 细

胞受抗原或丝裂原刺激后,从成熟的终末细胞转化为具有分化、增殖能力的免疫活性细胞。表现为T细胞数目增多、活性增强。分泌多种细胞因子,特别是IL-2表达,通过自分泌作用自身T淋巴细胞使其克隆扩增和旁分泌作用作用其他的T、B淋巴细胞及NK细胞,提高机体的免疫作用。T细胞表面标志CD3、CD4、CD8表达有利于淋巴细胞识别抗原启动免疫应答。IL-1是由巨噬细胞活化后产生是T淋巴细胞活化的重要细胞因子。NK细胞是体内重要的自然杀伤细胞,特别对肿瘤的杀伤更为重要。本试验证明上述五种中药可激活巨噬细胞产生IL-1,激活T淋巴细胞产生IL-2、活化NK细胞、使T淋巴细胞增殖及CD3、CD4、CD8表达增高,表明可提高机体的细胞免疫功能。为今后临床应用进一步提供参考依据。

[参考文献]

- [1] 唐波,杨贵贞. 蚕蛹多肽(AP)免疫药理作用的初步研究[J]. 中国免疫学杂志, 1985, 1(5): 46.
- [2] 郑维发,石枫,王莉,等. 金铁锁总甙对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 武警医学, 2003, 14(10): 598.
- [3] Theze J, Alzari P M, Bertoglio J. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions [J]. Immunology Today, 1996, 17: 481-485.
- [4] 巴得年. 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. 49.
- [5] 吴征镒,周太炎,肖培根,等. 新华本草纲要[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990. 96, 403, 181.
- [6] 李玲玲,张永龙. 黄芪中有效成分环黄芪醇皂苷和黄芪甲苷的含量测定[J]. 中国现代应用药学杂志, 1998, 15(3): 13-15.