

启膈方对小鼠免疫功能的影响

刘亚娴, 李际君, 付小梅, 单保恩, 刘羽
(河北医科大学第四医院, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的: 发掘研究古方, 探讨启膈 I 号方和启膈 II 号方免疫调节机理, 为扩大临床应用围范提供实验依据。方法: 本实验运用 MTT 法、硝酸银染色法、生物法等观察启膈 I 号方和启膈 II 号方对小鼠免疫功能的影响, 及逆转 BGC823 肿瘤细胞培养上清对小鼠免疫抑制作用。结果: 启膈 I 号方、启膈 II 号方能促进小鼠单核细胞 TNF 的分泌、促进小鼠 T 淋巴细胞的增殖、促进小鼠 B 淋巴细胞 IgG 的分泌, 逆转 BGC823 肿瘤细胞培养上清对小鼠脾细胞增殖的抑制作用。结论: 启膈 I 号方和启膈 II 号方能调节免疫功能和逆转肿瘤对免疫功能的抑制作用。

关键词: 启膈方; 肿瘤 MTT 法; AgNORs; 免疫

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2003)04-0042-03

研究表明, 多种单味中药和复方的应用具有良好的免疫增强作用^[1-3], 但对它们的免疫作用机理研究的报道较少。本实验所用复方启膈 I 号方和启膈 II 号方是在《医学心悟》之启膈散的基础上, 根据多年临床应用体会, 按照中医理法方药和君臣佐使配伍原则适当化裁而成的。经临床应用观察, 启膈方不仅能改善临床症状, 提高患者生活水平还能改善预后, 延长带瘤生存期。实验研究表明启膈 I 号方和启膈 II 号方对肿瘤细胞有较强的抑制作用, 对小鼠脾细胞增殖有很强的刺激作用^[4]。本实验运用 MTT 法、硝酸银染色法等方法, 分析了启膈 I 号方和启膈 II 号方对免疫功能调节作用机理。

1 材料与方法

1.1 中药 启膈 I 号方(郁金、丹参、清夏等)、启膈 II 号方(郁金、丹参、全蝎、僵蚕等)由河北医科大学第四医院中药房提供, 水煎成每毫升含 0.5g 生药的药汁, 过滤除菌, 4℃冰箱保存备用, 临用前培养液稀释至所需浓度。

1.2 试剂 MTT 华美生物工程公司提供, 批号: BS0887。RPMI1640 为 GIBCO 公司产品, 批号: P1504。PBS 磷酸盐缓冲液参照《组织培养》配制^[5]。新生牛血清由杭州四季青生物工程材料有限公司生产, 批号: 020706.1。羊抗小鼠 IgG 血清, (单扩效价 1◇64)北京军事医学科学院提供, 批号 H023。放线菌素 D, 上海新亚药业有限公司, 批号: 030903。

1.3 肿瘤细胞株与培养 人胃癌细胞株 BGC823、

小鼠纤维母细胞瘤 L929(由河北医科大学第四附属医院科研中心提供), 培养在 RPMI1640 培养液(含 100mL/L 小牛血清, 青霉素 100μg/ml, 链霉素 100μg/ml)中, 置于 37℃, 50mL/LCO₂ 的培养箱中, 隔日换液, 待细胞进入对数生长期后, 收集细胞进行药物处理。

1.4 实验动物 BALB/C 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 体重 18~22g, 河北医科大学动物中心提供。

1.5 实验仪器 CO₂ 恒温培养箱为美国 SHELDON 生产, 型号: TC2323 型。酶标仪为郑州博塞生物工程有限责任公司生产, 型号: 2010 型。低温高速离心机为日本 HITACHI 生产, 型号: SCR20B 型。倒置相差显微镜为日本 OLYMPUS 生产, 型号: LH50A 型。培养板为 Costar96 24 孔培养板。KL 肿瘤免疫分析系统, 北京健尔康公司。

1.6 实验方法

1.6.1 小鼠 B 细胞分泌 IgG 的测定 取小鼠脾脏, 制备单个小鼠脾细胞悬液, 羊红细胞 E-花环沉降实验分离 T_H 细胞, 含药 RPMI-1640 培养基(分别为终浓度为 5μg/ml LPS, 50mg/ml 的两种中药, 空白组用正常培养基)调整单个小鼠 B 细胞悬液 1×10⁶/ml, 接种于 24 孔无菌培养板中, 每孔 1ml, 置 5% CO₂ 培养箱中, 37℃培养, 第 3d、第 5d 更换培养基, 第 7d 收集细胞, 离心吸取上清备用。凝胶单扩散法检测 IgG。

1.6.2 小鼠 T 细胞增殖活性的测定 制备单个小鼠脾细胞悬液, 羊红细胞 E-花环沉降实验分离 T 细胞, 镜下检测 E-花环比例大于 80%, 用加药 RPMI-1640 培养基(分别为终浓度为 5μg/ml Con A, 50mg/ml

的两种中药,空白组用正常培养基)调整单个小鼠T细胞悬液 1×10^6 /ml,接种于24孔无菌培养板中,每孔1ml,置于5% CO₂培养箱中,37℃培养72h,PBS洗两遍,按北京键尔康公司Ag-NORs检测说明处理细胞,涂片,染色,KL肿瘤免疫分析系统读片检测T细胞核仁形成区嗜银蛋白含量(I.S,核仁银染面积/核面积)。

1.6.3 小鼠单核细胞TNF-α的诱导与活性测定:参考文献⁽⁶⁾

1.6.3.1 小鼠单核细胞TNF-α的诱导

制备小鼠脾细胞悬液, 1×10^5 /ml接种于直径6cm培养皿中,培养2h,收获贴壁细胞,PBS洗2次,RPMI-1640培养基调整细胞浓度为 5×10^6 个/毫升,将细胞悬液接种于96孔无菌培养板中,每孔100μl,各组分别加入对照剂(阳性对照ConA、LPS,阴性对照Hank's)及中药提取液10μl,每组设5个复孔。37℃孵育24h,收获上清液,-80℃保存备用。

1.6.3.2 小鼠单核细胞TNF-α活性测定

收获L929细胞,调整细胞浓度为 2×10^5 /ml,接种于96孔培养板,每孔100ul,37℃孵育24h,倾去上清,每孔加放线菌素D(2ug/ml)50ul,上述方法收获之上清50ul,37℃孵育24h,每孔加0.2%结晶紫100ul,37℃孵育15min,将培养板浸入水中,甩干,如此洗5次,最后拍干,加入1%SDS100ul,振荡15min,酶联免疫检测仪检测各孔吸光度值(波长λ=492nm),查重组人TNF(recombinant human TNF)标准曲线,得TNF含量。

1.6.4 逆转BGC823肿瘤细胞培养上清免疫抑制作用

收获BGC823细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 /ml,正常培养72h,取上清备用。制备小鼠脾细胞悬液,调整单个小鼠脾细胞悬液 1×10^6 /ml,接种于96孔无菌培养板中,每孔100μl,分别加入BGC823肿瘤细胞培养上清(空白II组加PBS)10μl,37℃孵育24h,倾去上清。每孔加入合药RPMI-1640培养基(分别为终浓度为5μg/mlConA、LPS,50mg/ml的两种中药,空白I组、空白II组正常培养基)100μl,每组均设5个复孔,置于CO₂培养箱中,37℃培养48h,于培养结束前4h,各培养孔加入MTT(5mg/ml)10μl,培养结束后,弃去培养上清,每孔加入10% DMSO100ul,震荡15min,酶标仪测OD值。波长λ=492nm。并计算增殖率。计算公式:增殖率(%) = (实验组吸光度值-空白II组吸光度值) / 空白II组吸光度值 × 100%。

1.7 数据资料用均数±标准差表示,2组间数据用t检验,多组间数据用方差(F检验)。应用The SAS

system 6.12统计软件计算。所有实验结果均重复3次。

2 结果

2.1 对小鼠B细胞分泌IgG的影响

实验表明启隔I号方、启隔II号方对促进小鼠B细胞分泌IgG作用明显优于空白组($P < 0.01$),LPS优于空白组($P < 0.01$),启隔II号方作用略优于启隔I号方,但无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表1。

表1 对IgG分泌的影响 (n=8)

	I号方	II号方	LPS	空白组
环直径(mm)	12.56 ± 0.16	12.59 ± 0.21	12.38 ± 0.17	11.35 ± 0.11

2.2 对小鼠T细胞增殖作用

实验表明启隔I号方、启隔II号方对小鼠T细胞增殖作用明显优于ConA、空白组($P < 0.01$),ConA优于空白组($P < 0.01$),启隔I号方作用略优于启隔II号方,但无统计学意义($P < 0.05$)。结果见表2。

表2 T细胞增殖的影响 (n=10)

	I号方	II号方	ConA	空白组
I.S(%)	12.44 ± 0.56	13.24 ± 0.42	9.15 ± 0.57	7.05 ± 0.51

2.3 对小鼠单核细胞分泌TNF-α的影响

启隔II号方促进小鼠单核细胞分泌TNF-α的作用显著优于其它实验组($P < 0.01$)。启隔I号方作用与ConA、LPS比较无差异($P > 0.05$)。空白组与各组比较有显著差异($P < 0.01$)。

表3 药物对单核细胞分泌TNF的影响 (n=5)

药物	OD值	TNF浓度(u/ml)
启隔I号方	0.126 ± 0.008	0.052708
启隔II号方	0.094 ± 0.011	0.221448
ConA	0.121 ± 0.009	0.078668
LPS	0.136 ± 0.01	0.000788
空白	0.154 ± 0.013	-0.0096

2.4 逆转BGC823肿瘤细胞培养上清免疫抑制作用

药物与小鼠脾细胞共同孵育48h后,空白I组对小鼠脾细胞增殖作用逊于空白II组($P < 0.05$),其增殖率为-15%。启隔I号方、启隔II号方对小鼠脾细胞增殖作用均优于空白I组($P < 0.01$)、空白II组($P < 0.01$)、ConA组($P < 0.01$)、LPS组($P < 0.01$)。

ConA 组 LPS 组对小鼠脾细胞增殖作用均优于空白 I 组 ($P < 0.01$)、空白 II 组 ($P < 0.05$)。启膈 II 号方优于启膈 I 号方 ($P < 0.05$)。

3 讨论

在肿瘤免疫中, B 细胞介导的体液免疫反应不起主要作用, 但可通过抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 激活效应细胞, 包括巨嗜细胞、NK 细胞等, 最终裂解破坏肿瘤细胞, 也可通过补体介导的细胞溶解作用激活补体而溶解肿瘤细胞。在机体抗肿瘤免疫反应中, 由 T 细胞介导的免疫效应起着重要的作用, T 细胞的激活是发挥细胞免疫应答的重要条件。激活的 T 细胞主要通过下列细胞毒效应机制杀伤肿瘤细胞 ①渗透性细胞溶解作用。②细胞凋亡作用。③通过分泌 TNF 进一步破坏肿瘤细胞。肿瘤坏死因子主要是单核巨噬细胞, 还有 T、NK 细胞及肥大细胞等细胞分泌, 在肿瘤免疫中发挥以下作用 ①对肿瘤细胞的直接抑制作用。②对毛细血管内皮细胞的细胞毒作用。③增强 NK 细胞细胞的细胞毒作用。恶性肿瘤在其生长过程中, 能产生一系列生物学和免疫学效应, 造成宿主的免疫抑制, 以保护其本身不受机体的攻击而继续生长, 这就是肿瘤免疫中的“免疫逃逸”。目前已知有多种因素参与, 其中肿瘤细胞自分泌或旁分泌一些细胞因子来促进自身细胞增殖, 和/或抑制机体对其的免疫杀伤构成免疫逃逸的重要因素之一。

本研究运用凝胶单扩散法、T 细胞 Ag-NORs 检测法、TNF 活性测定法(生物法)、MTT 法, 用小鼠 T 细胞、B 细胞、单核细胞等免疫细胞检测启膈方的免疫调节活性。结果表明启膈 I 号方、启膈 II 号方对小鼠 B 细胞分泌 IgG 有较强的促进作用, 提示启膈方对 B 细胞功能有一定的调节作用。小鼠 T 细胞对启膈方的刺激有着很强的反应性, 提示启膈方对 T 细胞增殖也有一定的调节作用。虽然未检测启膈方对小鼠单核细胞增殖的促进作用, 但发现其对促进单核细胞分泌 TNF 有较强的作用。因此, 就体外实验研究而言, 启膈方对 T 细胞、B 细胞、单核细胞都有免疫增强作用, 充分体现了中医药整体治疗优势。本研究还发现肿瘤培养上清对小鼠脾细胞增殖有抑

制作用, 且启膈方可以逆转肿瘤细胞的这种免疫抑制作用。启膈方甘寒濡润, 是在古方的基础上, 根据多年临床应用体会, 按照中医理法方药和君臣佐使配伍, 是一个扶正、祛邪、活血化淤、化痰解郁灵活变通的治疗肿瘤方剂, 临床应用取得了一定的成效。启膈 I 号方主要应用于早期肿瘤患者或放化中的患者, 启膈 II 号方主要应用于中晚期肿瘤患者。启膈 II 号方是在启膈 I 号方基础上增强其化痰、息风、解毒的作用, 而对免疫功能的调节作用得到了加强, 特别是在肿瘤有关的 TNF 分泌和肿瘤免疫耐受中, 说明化痰、息风、解毒中药在复方中一样具在肿瘤免疫中发挥着重要的作用, 从而克服了调整免疫功能局限于扶正的片面性, 这对抗肿瘤中药的临床应用有着非常重要的意义。且启膈方非单纯补气养阴方剂, 从而突破了调整免疫功能局限于扶正中药的片面性, 为改善肿瘤患者免疫功能提供了新的手段。

另外, 由于启膈方是在古方基础上研制而成, 它从一个侧面提示了发掘研究古方在治疗恶性肿瘤与治疗其它疾病一样具有同等重要的意义。关于启膈 I 号方、启膈 II 号方的组方配伍原则及临床应用情况, 将另文阐述。

参考文献:

- [1] 程晓东, 郭峰, 刘嘉湘, 等. 中药扶正方对 Lewis 肺癌的疗效及其免疫学机理的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(2): 88-90.
- [2] 许玲, 刘嘉湘. 益肺抗癌饮对肺癌转移及免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(7): 401-403.
- [3] 张洁, 刘景田, 党小军. 黄芪多糖对荷瘤小鼠红细胞免疫功能的影响[J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(增刊): 315-317.
- [4] 李际君, 刘亚娟, 付小梅, 等. 启膈方抗肿瘤机理的实验研究[J]. 河北中医, 2003, 24(5): 398-400.
- [5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1994. 41-42
- [6] 单保恩, 张金艳, 李巧霞, 等. 白附子对人 T 细胞和单核细胞的调节活性[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(10): 768-772.