

苓桂术甘汤对免疫功能低下模型小鼠 T 细胞亚群及 IL-2 活性的影响

黄金玲, 龙子江, 吴华强, 王桐生
(安徽中医学院, 安徽 合肥 230038)

摘要:目的: 探讨苓桂术甘汤对免疫功能低下模型小鼠的免疫调节作用机制。方法: 近交系昆明种小鼠以环磷酰胺(Cy, $80\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip, qd \times 1) 诱导免疫功能低下模型, 用苓桂术甘汤($42.90\ 24.45\ 4.29\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 连续灌胃(ig) 给药 10d, 分别采用间接免疫荧光法和小鼠胸腺细胞氚标胸腺嘧啶核苷($^3\text{H-TdR}$) 掺入法检测 T 细胞亚群及 IL-2 活性。结果: 苓桂术甘汤($42.90\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 能明显提高 Cy 所致免疫抑制模型小鼠 T 细胞总数 $\text{L3t } 4^+$ $\text{Lyt } 2^+$ 细胞百分率及 $\text{L3t } 4^+/\text{Lyt } 2^+$ 比值, 纠正 T 细胞亚群紊乱, 明显增加 IL-2 活性, 与 Cy 模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。结论: 苓桂术甘汤对 Cy 模型小鼠免疫功能的改善作用与其促进 T_H 细胞功能、恢复 T 细胞亚群的比例、增强 IL-2 活性有关。

关键词: 苓桂术甘汤; 环磷酰胺; 免疫调节; T 细胞亚群; IL-2 活性

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)06-0038-03

Effects of Lingguizhugan Decoction on T-lymphocyte Subset and the Activity of Interleukin 2 in Immunosuppressed Mice Induced by Cyclophosphamide

HUANG Jin-ling, LONG Zi-jiang, WU Hua-qiang, WANG Tong-sheng

(Anhui college of TCM, Anhui, Hefei 230038)

Abstract: Objective: To study Immunoregulating mechanism of Lingguizhugan Decoction on immunosuppression in mice. Methods: The immunosuppressed mice were induced by cyclophosphamide (Cy), $80\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip, qd \times 1. Lingguizhugan Decoction ($42.90, 21.45, 4.29\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig, qd \times 10) were administrated for immunosuppressed mice. Then the T-lymphocyte subset and activity of interleukin 2 (IL-2) were measured by indirect immunofluorescence and thymus cells intermingled $^3\text{H-TdR}$. Results: Lingguizhugan Decoction could obviously enhance the total number of T⁺ cells, percentage of L_3T_4^+ , $\text{Lyt-}2^+$ and revise the turbulence of T-lymphocyte subset. It could also evidently promote the activity of IL-2. Conclusion: The Immunoregulating mechanism of Lingguizhugan Decoction in immunodepression mice were related with promoting the function of helper T-cell(T_H) and activity of IL-2.

Key words: Lingguizhugan Decoction; cyclophosphamide; immunoregulation; T-lymphocyte subset; Interleukin 2

苓桂术甘汤(LGZG) 出自汉·张仲景《伤寒论》, 由茯苓、桂枝、白术、甘草 4 味药物组成, 是益气温阳、健脾化饮的代表方。以往的研究表明, 该方能明显增加 Cy 所致免疫功能低下模型小鼠碳粒廓清指数、提高吞噬活性、促进血清抗体生成和增加 DTH 反应小鼠的耳肿胀度^[1]。本实验观察该方对 Cy 所致免疫功能低下模型小鼠 T 细胞亚群及 IL-2 活性的影响, 以进一步探讨其免疫调节作用机制。

1 材料

1.1 药品与主要试剂 实验所用中药材均购自安徽中医学院第一附属医院, 经生药学鉴定, 其原植物分别为茯苓 *Poria cocos* (Schw) Wolf., 桂枝 *Cinamun cassia* Presl., 白术 *Atractylodes macrocephala* koidz., 甘草 *Glycyehiza uralensis* Fisch.。药物制备: 苓桂术甘汤按原方比例(茯苓 12g、桂枝 9g、白术 9g、甘草 6g), 常规方法煎煮三次, 将三次滤液混合, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴浓缩, 制成含生药 $2\ \text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 药液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。四君子丸, 河南宛西制药厂产品, 批号: 20010511; 环磷酰胺(Cy), 江苏恒瑞医药股份有限公司出品, 批号: 20010625; 抗小鼠单克隆抗体(McAb) $\text{Tyt-}1^+$ 、 $\text{L3t } 4^+$ 、 $\text{Lyt-}2^+$ 、兔抗鼠 IgG 荧光抗体, 由北京医科大学

免疫学教研室提供; 氚标胸腺嘧啶核苷($^3\text{H-TdR}$), 中国原子能科学研究院同位素研究所提供。

1.2 动物与仪器 近交系昆明种小鼠, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 皖医实动准字第01号; XSZ-D型倒置式显微镜, 重庆光学仪器厂产品; EX50系统生物显微镜, 日本Olympus光学工业株式会社产品; HWO301T-VBA型 CO_2 培养箱, HARRIS公司产品; 96孔PVC培养板, CUCN公司产品; ZF-II型多头细胞收集器, 浙江绍兴坡塘医疗器械厂产品; FJ-2107型液体闪烁计数器, 西安262厂产品。

2 方法

2.1 动物分组与给药方法、剂量 取近交系昆明种小鼠60只(♀♂各半, 体质量 $18 \pm 2\text{g}$), 随机分为6组(每组10只): 空白对照组, Cy模型组, Cy+四君子丸($23.40\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于成人每日常用量的10倍)组, Cy+苓桂术甘汤小、中、大(4.29g 、 21.45 、 $42.90\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组(分别相当于成人每日常用量的1、5、10倍)。灌胃(ig)给药, 灌胃容积为 $25\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续给药10d, 空白对照组、Cy模型组灌以等容积蒸馏水。

2.2 免疫功能低下小鼠模型复制 参考文献^[2]采用Cy诱导法: 于给药第1d, 除空白对照组外, 各组小鼠均以Cy $80\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip, qd $\times 1$ 诱导免疫低下模型。

2.3 统计方法 组间检验采用 t 检验。

2.4 T细胞亚群的测定 参考文献^[3]采用McAb间接免疫荧光法。(1)效应细胞制备: 模型复制、给药方法如前, 末次药后30min, 断头放血处死小鼠, 无菌条件下打开腹腔, 取脾脏, 用100目不锈钢筛网研磨, 用单层尼龙网过滤, 制成单个脾细胞悬液, 低渗去除红细胞, 0.01%台酚蓝活细胞计数, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, 活细胞数 $> 95\%$ 。将脾细胞悬液分别加入96孔U形底PVC软板孔内, 每孔100 μl , 每份标本加4孔后, 1000rpm水平离心1min, 去上清液。(2)在1-3孔内分别加入抗Lyt-1、L3t4⁺、Lyt-2⁺的McAb各20 μl , 第4孔加入RPMI-1640营养液作为阴性对照。(3)将96孔板置振荡器上振荡5min, 使淋巴细胞与McAb充分混匀。放入有盖湿盒内, 置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中作用45min。(4)每孔加入Hank's液200 μl , 振荡5min, 1000rpm离心1min。去上清液, 加Hank's液200 μl , 重复洗涤3次。(5)分别加入兔抗鼠IgG荧光抗体各10 μl , 振荡5min, 放入有盖湿盒内, 置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱作用45min后, 同(4)洗涤3次。(6)去上清液, 加入20%甘油PBS缓冲液100 μl 振荡均匀后, 用微量吸液器分别吸取细胞悬液至载玻片上, 覆以盖玻

片。在荧光显微镜高倍镜下分别记数200个淋巴细胞, 记录荧光阳性细胞数, 然后计算出各淋巴细胞亚群的百分率。

2.5 IL-2活性检测 参考文献^[4,5]采用小鼠胸腺细胞 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法。(1)IL-2诱生: 模型复制、给药方法如前。末次药后30min, 断头放血处死小鼠, 按前述方法常规制备单个脾细胞悬液。用5%小牛血清Hank's液洗两次, 每次1000rpm离心10min, 于第二次离心后, 弃去上清液, 用完全RPMI-1640培养液配制 $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ 的脾细胞悬液(活细胞数 $> 95\%$)。在24孔培养板上, 每孔加入0.5ml细胞悬液和50 μl ConA(终浓度 $3.0\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 将培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中孵育48h后, 2500rpm离心20min, 收集上清。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。(2)小鼠胸腺细胞悬液的制备: 将小鼠断头放血处死, 打开小鼠胸腔取出胸腺, 按前述脾细胞悬液制备法, 制成单个胸腺细胞悬液, 低渗去除红细胞。悬液用5%小牛血清-Hank's液清洗两次, 每次1000rpm离心10min, 活细胞计数(活细胞数 $> 95\%$)。于第二次离心后, 弃去上清液, 用完全RPMI-1640培养液配制 $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ 的胸腺细胞悬液。(3)细胞培养及加样: 将待测样品按系列倍比($1 \cdot 1^{-1}$ 、 $1 \cdot 2^{-1}$ 、 $1 \cdot 4^{-1}$ 、 $1 \cdot 8^{-1}$ 、 $1 \cdot 16^{-1}$ 、 $1 \cdot 32^{-1}$)稀释成6个稀释度, 分别放入96孔U形底PVC软板孔内, 每孔100 μl , 每个稀释度作3个平行复孔, 每孔加入胸腺细胞悬液100 μl 及ConA($3.0\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)20 μl 。另设3个平行对照孔, 只加100 μl 胸腺细胞悬液、20 μl ConA($3.0\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)和100 μl 培养液, 不加待测样品。将培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中孵育66h后, 每孔加入 $^3\text{H-TdR}$ 20 μl (0.5 μCi), 继续培养6h。用多吸头细胞样品收集器收集细胞于玻璃纤维滤纸片上, 干燥后用液体闪烁计数器测定掺入DNA $^3\text{H-TdR}$ cpm数值, 以3个复孔cpm的均值表示结果, 并计算IL-2活性单位。

3 结果

3.1 苓桂术甘汤对Cy模型小鼠T淋巴细胞及其亚群的影响 苓桂术甘汤($42.90\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)能明显拮抗Cy对小鼠T细胞总数、L3t4⁺、Lyt-2⁺细胞百分率及L3t4⁺/Lyt-2⁺比值的抑制, 纠正T细胞亚群紊乱, 与Cy模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。见表1。

3.2 苓桂术甘汤对Cy模型小鼠IL-2活性的影响 苓桂术甘汤(4.29 、 21.45 、 $42.90\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)均能明显增加Cy所致免疫抑制模型小鼠IL-2活性, 与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。见表2。

表1 LGZG对Cy模型小鼠T淋巴细胞及其亚群的影响($\bar{x} \pm s$; n = 10)

组别	给药剂量 (g·kg ⁻¹)	Tyt ⁺ (%)	L3t4 ⁺ (%)	Lyt ⁺ (%)	L3t4 ⁺ / Lyt ⁺
空白对照组	-	41.25 ± 2.53	25.16 ± 1.94	16.61 ± 1.28	1.53 ± 0.92
Cy模型组	-	20.83 ± 2.49 [△]	10.12 ± 1.46 [△]	10.71 ± 1.37	0.95 ± 0.39 [△]
Cy+ 四君子丸组	23.40	33.64 ± 3.02*	20.24 ± 2.34*	13.93 ± 2.09*	1.45 ± 0.37*
Cy+ 苓桂术甘汤组	42.90	32.38 ± 2.39*	19.01 ± 2.21*	12.97 ± 1.86*	1.46 ± 0.61*

注:与空白对照组比较[△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01;与Cy模型组比较* P < 0.05, ** P < 0.01。(下同)

表2 LGZG对Cy模型小鼠IL-2活性的影响($\bar{x} \pm s$; n = 10)

组别	给药剂量 (g·kg ⁻¹)	IL-2 (活性单位)
空白对照组	-	27.92 ± 4.83
Cy模型组	-	13.01 ± 3.49 ^{△△}
Cy+ 四君子丸组	23.40	23.67 ± 5.31**
Cy+ 苓桂术甘汤组	4.29	19.52 ± 4.91*
	21.45	21.93 ± 5.65*
	42.90	22.51 ± 5.43**

4 讨论

现代研究发现中医的“虚证”(无论阴虚、阳虚、气虚、血虚)患者均显示细胞免疫功能低下^[6]。在机体的细胞免疫中T细胞发挥着重要的作用,T细胞不仅是细胞免疫功能的承担者,而且也是免疫应答的调节者,其中以辅助性T细胞(T_H)和抑制性T细胞(T_S)对免疫网络的调节作用至为重要。T_H除了具有辅助B细胞及其它T细胞功能活性,促进免疫应答的作用外,也能诱导其他T细胞亚群的活化。IL-2主要由活化的T_H1细胞或CD4⁺T细胞分泌,它能引起多种淋巴细胞(如T_H、B细胞及NK细胞等)的增殖,增强CTL、NK细胞和LAK细胞的杀伤活性,促进B细胞产生相应抗体,并可诱导IFN分泌等,是参与免疫应答和免疫调节的重要细胞因子,是衡量机体免疫功能,尤其是细胞免疫水平的一个重要标志。IL-2在有丝分裂原存在的条件下,可作用于小鼠胸腺细胞,诱导胸腺细胞的增殖。因此,根据胸腺细胞

增殖过程中³H-TdE掺入量可反应IL-2的活性。有研究表明,大剂量注射Cy对T细胞功能有一定的损伤,且免疫细胞的不同亚类对Cy的敏感性也存在着明显地差异^[7],在DNBF致敏当天给小鼠ip Cy80mg·kg⁻¹,导致DTH反应降低,同时L3t4⁺细胞数量减少,L3t4⁺/Lyt⁺比值降低,推测这可能与Cy选择性杀伤T_H前体细胞有关^[8],明亮等也得出同样研究结论^[2]。本实验模型复制结果与其一致,且与空白对照组比较具有显著性差异(P < 0.05)。结果显示:苓桂术甘汤能明显提高Cy所致免疫功能低下小鼠T细胞总数L3t4⁺、Lyt⁺细胞百分率及L3t4⁺/Lyt⁺比值,纠正T细胞亚群紊乱,增强IL-2的活性,与Cy模型组比较有显著性差异(P < 0.05或P < 0.01)。表明本方对机体细胞免疫功能增强作用与其促进T_H细胞功能,增强IL-2活性有关。这可能是本方益气温阳健脾,用于治疗免疫功能低下性疾病的机制之一。

参考文献:

- [1] 黄金玲,龙子江,吴华强,等.苓桂术甘汤对CY模型小鼠免疫功能的影响.中国中医基础医学杂志[J].20(5):31.
- [2] 明亮,张艳,李卫平,等.银杏提取物对Cy模型小鼠记忆及免疫功能的影响,安徽医科大学学报[J].1999(6):34.
- [3] 陈奇.中药药理研究方法学[M].人民卫生出版社,1993.369.
- [4] 沈关心,周汝麟.现代免疫学实验技术[M].湖北科学技术出版社,1998.264.
- [5] 陈奇.中药药理研究方法学[M].人民卫生出版社,1993.775.
- [6] 余传霖,叶天星,陆德源,等.现代医学免疫学[M].上海医科大学出版社,1998.1301.
- [7] 陆德源.现代免疫学[M].上海科学技术出版社,1995.86.
- [8] 王兴旺.白芍总苷调节免疫功能的机理[J].中国药理学通报,1990,6(6):363.