

# 清解宁对小鼠免疫功能的影响

任钧国, 郝 钰, 邱全瑛, 何秀娟, 娄金丽  
(北京中医药大学微生物与免疫教研室, 北京 100029)

**摘要:**目的: 研究清解宁对小鼠免疫功能的影响。方法: 用绵羊红细胞(SRBC)免疫小鼠, 分别用小鼠脚掌厚度测量法观察迟发性超敏反应(DTH)、溶血分光光度法观察体外抗体形成细胞数(PFC)、微量血凝法观察溶血素、MTT法观察脾T、B淋巴细胞的增殖功能、腹腔M $\Phi$ 吞噬中性红比色法观察腹腔M $\Phi$ 吞噬中性红的能力。结果: 清解宁能明显抑制SRBC免疫小鼠的DTH、PFC、溶血素、脾T、B淋巴细胞的增殖以及腹腔M $\Phi$ 吞噬中性红的能力。结论: 清解宁对SRBC免疫小鼠的免疫功能具有明显的抑制作用。

**关键词:** 清解宁; 迟发性超敏反应; 溶血素; 淋巴细胞增殖; 抗体形成细胞

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)03-0030-03

## Effects of QingJieNing on Immune Function in Mice

REN Jun-guo, HAO Yu, QIU Quan-ying, HE Xiu-juan, LOU Jin-li

(Institute of Microbiology and Immunology, Beijing University of TCM, Beijing 100029)

**Abstract:** Objective: To study the effects of QingJieNing on immune function in mice. Methods: The animal model was made by immunizing mice with sheep red blood cell (SRBC), delayed type hypersensitivity (DTH) by measuring foot thickness, quantity of plaque forming cell (PFC) by hemolytic spectrophotometry, proliferation of T and B lymphocyte by MTT colorimetry, phagocytosis ability of M $\Phi$  in abdominal cavity by neural red colorimetry were observed respectively. Results: QingJieNing can significantly inhibit DTH, PFC, hemolysin, proliferation of T and B lymphocyte, and phagocytosis of M $\Phi$  in mice. Conclusion: QingJieNing has significant inhibition effect on immune function in mice immunized by SRBC.

**Key words:** QingJieNing; DTH; hemolysin; lymphocyte proliferation; PFC

黄连解毒汤是中医临床上常用的清热解毒的代表方, 主要用于一切热毒壅盛之证, 现代多用于急性感染性疾病及某些非感染性疾病; 药理研究证明黄连解毒汤及其主要成分小檗碱、黄芩苷、栀子苷具有一定的抗炎免疫作用<sup>[1,2]</sup>, 特别是能抑制白细胞-血管内皮细胞的粘附<sup>[3,4]</sup>。我们将小檗碱、黄芩苷等成分组合成复方清解宁, 体外实验发现清解宁能抑制白细胞-血管内皮细胞的粘附(另发), 白细胞-血管内皮细胞的粘附在炎症反应与免疫应答中具有重要的作用。因此, 本文仅初步观察了该方对小鼠免疫功能的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 动物** NIH小鼠, 雌雄各半, 体重18-22g, 一级, 由北京生物制品研究所提供(京动许字1999第012号)

**1.2 药物与制备** 盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸

巴马汀、栀子苷及黄芩苷, 均购自中国药品生物制品检定所。将盐酸小檗碱、栀子苷等几种药物成分的生理盐水溶液配伍成清解宁, 4℃保存备用。环磷酰胺(上海华联制药有限公司)。

**1.3 试剂** 绵羊红细胞(SRBC): 新鲜采集加阿氏液置4℃保存, 用前用生理盐水洗涤3次后, 配成应用浓度; RPMI1640培养液(GIBCO美国); ConA、LPS、MTT、中性红(Sigma美国)。

**1.4 仪器** 酶标仪(Bio-Rad 2550美国); CO<sub>2</sub>培养箱(Binder德国); 精密电子天平(Sartorius 1/1000 A2005德国); 96孔培养板(Costar); 游标卡尺(国产)。

## 1.5 检测指标与方法

**1.5.1 动物造模分组与给药** 将小鼠60只随机分为六组: 正常对照组, 模型对照组, 环磷酰胺组(100mg/kg), 清解宁高剂量组(14mg/kg), 清解宁中剂量组

(7mg/kg), 清解宁低剂量组(3.5mg/kg); 除正常对照组, 其余各组每只小鼠第一天腹腔注射5% SRBC悬液0.4ml, 使小鼠致敏, 第5d再用10% SRBC悬液30 $\mu$ l于左足掌作皮内注射, 对侧注射生理盐水作对照, 24h后检测DTH、PFC、溶血素、脾T、B淋巴细胞增殖功能及腹腔M $\Phi$ 吞噬中性红功能。各组小鼠自造模之日起腹腔注射给药, 一日两次, 连续五天, 两对照组注射生理盐水, 环磷酰胺组于第1、4及5d给药, 其余时间注射等量生理盐水。

**1.5.2 DTH指数测定**<sup>[5]</sup> 参照文献, 略有改动。即造模后, 用游标卡尺测量小鼠左右脚掌厚度, 两掌厚度之差为DTH指数。每只脚掌测量4次, 取其平均值。

**1.5.3 体外抗体形成细胞(PFC)数的检测(溶血分光光度法)**<sup>[6]</sup> 将小鼠脾细胞( $1 \times 10^7$ /ml) 0.5ml, 5% SRBC 0.5ml及1 $\diamond$ 20稀释补体0.5ml混匀, 37 $^{\circ}$ C温育1h, 加2ml PBS终止反应, 2000rpm, 离心10min, 吸取上清加于96孔板内, 200 $\mu$ l/孔, 用酶标仪测A值(460nm)。以A值代表抗体形成细胞数。

**1.5.4 溶血素的测定(微量血凝法)** 将待测血清(灭活)用生理盐水倍比稀释(1 $\diamond$ 5开始), 加入96孔血凝板, 每孔100 $\mu$ l, 每一浓度三复孔, 同时加入1% SRBC100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C温育1h, 观察结果, 以最高稀释度仍有凝集现象者作为其凝集效价。以效价的常用对数值代表溶血素的量。

**1.5.5 腹腔M $\Phi$ 吞噬功能的测定(中性红比色法)**<sup>[7]</sup> 无菌取腹腔M $\Phi$ , 用10%小牛血清RPMI 1640调细胞浓度 $1 \times 10^6$ /ml, 96孔平底培养板中每孔加100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育4h, PBS洗后, 每孔加0.072%中性红100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>温育30min, 除去上清, 加入细胞裂解液200 $\mu$ l, 过夜, 用酶标仪测A值(550nm)。以A值代表M $\Phi$ 的吞噬能力。

**1.5.6 脾淋巴细胞增殖功能的检测(MTT比色法)**<sup>[8]</sup> 无菌制备脾细胞悬液, 用10%小牛血清RPMI164调细胞浓度 $2 \times 10^6$ /ml, 细胞悬液内一份加入ConA, 使终浓度为5 $\mu$ g/ml, 另一份加入LPS, 使终浓度为10 $\mu$ g/ml, 在96孔培养板中加200 $\mu$ l, 3个重复孔, 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 孵育66h, 轻轻吸出100 $\mu$ l上清, 每孔加10 $\mu$ l MTT(5mg/ml溶于PBS) 37 $^{\circ}$ C 4h, 后加入100 $\mu$ l 0.1N HCl-10% SDS溶解, 过夜, 用酶标仪测A值(570nm)。以A值代表淋巴细胞的增殖能力。

**1.6 统计学方法** 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS10.0统计软件进行统计分析。

## 2 结果

**2.1 清解宁对小鼠迟发性超敏反应与抗体生成的影响。**(见表1)

**2.1.1 清解宁对小鼠DTH指数的影响** 结果表明, SRBC免疫小鼠的DTH指数高于正常小鼠( $P < 0.01$ ), 环磷酰胺能显著降低小鼠的DTH指数( $P < 0.01$ ); 清解宁三个剂量皆能降低小鼠的DTH指数( $P < 0.05$ )。

**2.1.2 清解宁对小鼠抗体形成细胞数的影响** 与正常小鼠比较, SRBC免疫小鼠的抗体形成细胞数有显著的增高( $P < 0.01$ ), 清解宁高剂量与环磷酰胺作用显著( $P < 0.01$ ); 清解宁中剂量也能抑制小鼠抗体形成细胞数( $P < 0.05$ ), 清解宁低剂量作用不显著( $P > 0.05$ )。

**2.1.3 清解宁对小鼠溶血素的影响** 结果显示, SRBC免疫小鼠溶血素的量比正常小鼠高( $P < 0.01$ ), 环磷酰胺完全抑制了溶血素的生成; 清解宁的高剂量能显著降低小鼠溶血素的量( $P < 0.01$ ); 清解宁的中剂量与低剂量也能降低小鼠溶血素的量( $P < 0.05$ )。

**2.2 清解宁对小鼠淋巴细胞增殖功能和M $\Phi$ 吞噬中性红能力的影响。**(见表2)

**2.2.1 清解宁对小鼠脾T淋巴细胞增殖的影响** ConA诱导的SRBC免疫小鼠脾淋巴细胞增殖能力比正常小鼠高( $P < 0.01$ ), 环磷酰胺能抑制ConA诱导的小鼠淋巴细胞的增殖( $P < 0.01$ ); 清解宁三个剂量皆能抑制小鼠脾淋巴细胞的增殖( $P < 0.01$ )。

**2.2.2 清解宁对小鼠脾B淋巴细胞增殖的影响** LPS诱导的SRBC免疫小鼠脾淋巴细胞的增殖能力比正常小鼠高( $P < 0.01$ ), 环磷酰胺能抑制LPS诱导的小鼠淋巴细胞的增殖( $P < 0.01$ ); 清解宁三个剂量皆能抑制LPS诱导的小鼠脾淋巴细胞的增殖, ( $P < 0.01$ )。

**2.2.3 清解宁对小鼠腹腔M $\Phi$ 吞噬中性红能力的影响** SRBC免疫小鼠腹腔M $\Phi$ 吞噬中性红的能力与正常小鼠比较有非常显著的提高( $P < 0.01$ ), 与模型组比较, 清解宁三个剂量皆能降低小鼠腹腔M $\Phi$ 吞噬中性红的能力( $P < 0.01$ ), 环磷酰胺能抑制巨噬细胞的吞噬能力( $P < 0.01$ ), 但没有清解宁作用强。

## 3 讨论

为研究清解宁对机体免疫功能的影响, 采用SRBC免疫小鼠, 可同时观察清解宁对小鼠体液免

表1 清解宁对小鼠迟发性超敏反应与抗体生成的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg)	DHT 指数	PFC (A 值)	溶血素 (log10)
正常对照组	—	0.182 ± 0.1106	0.073 ± 0.0037	—
模型对照组	—	0.445 ± 0.1166# #	0.081 ± 0.0031# #	2.45 ± 0.1505# #
清解宁低剂量组	3.5	0.330 ± 0.1704*	0.084 ± 0.0022	2.15 ± 0.1505*
清解宁中剂量组	7	0.298 ± 0.1762*	0.077 ± 0.0023*	2.15 ± 0.1505*
清解宁高剂量组	14	0.280 ± 0.1485*	0.072 ± 0.0015**	2.00 ± 0.0000**
环磷酸胺组	100	0.150 ± 0.1328**	0.070 ± 0.0022**	—

注:与正常对照组比较 # #  $P < 0.01$  与模型对照组比较 \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$ 。(下同)

表2 清解宁对小鼠淋巴细胞增殖功能 MΦ 吞噬中性红能力的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg)	T 细胞增殖 (A 值)	B 细胞增殖 (A 值)	MΦ 吞噬中性红 (A 值)
正常对照组	—	0.122 ± 0.0050	0.117 ± 0.0067	0.202 ± 0.0154
模型对照组	—	0.156 ± 0.0055# #	0.203 ± 0.0817# #	0.289 ± 0.0327# #
清解宁低剂量组	3.5	0.126 ± 0.0052**	0.119 ± 0.0066**	0.183 ± 0.0156**
清解宁中剂量组	7	0.112 ± 0.0069**	0.120 ± 0.0030**	0.219 ± 0.0242**
清解宁高剂量组	14	0.113 ± 0.0128**	0.129 ± 0.0059**	0.188 ± 0.0120**
环磷酸胺组	100	0.127 ± 0.0051**	0.134 ± 0.0112**	0.250 ± 0.0239**

疫、细胞免疫与单核吞噬系统等多种免疫功能的影响。

DTH 主要是由 CD4<sup>+</sup> Th1 细胞介导的以单个核细胞浸润和组织细胞损伤为主要特征的炎症反应,是机体细胞免疫功能的体现。研究发现,不同剂量的清解宁能显著抑制 SRBC 免疫小鼠的 DTH,表明清解宁对机体的细胞免疫功能有抑制作用。

机体的体液免疫功能主要通过抗体的作用来体现。本研究表明,清解宁能降低 SRBC 免疫小鼠抗体形成细胞数,进而抑制溶血素的生成,表明清解宁也能抑制机体的体液免疫功能。

细胞免疫与体液免疫同属于机体的特异性免疫应答,T、B 细胞是机体重要的特异性免疫应答淋巴细胞,另外,抗原提呈细胞(如 MΦ)在特异性免疫应答中也具有重要作用。T 细胞主要介导机体的细胞免疫,B 细胞主要介导机体的体液免疫。SRBC 免疫小鼠后,抗原提呈细胞 MΦ 吞噬处理抗原,并将抗原提呈给 T 细胞,刺激 T 细胞的活化增殖,产生对 SRBC 的特异性的细胞免疫应答;活化后的 T 细胞在细胞因子的作用下,分化为效应细胞(如 Th 细胞),在 Th 细胞的参与辅助下,B 细胞才能激活、增殖,产生抗体。本研究结果发现,清解宁能抑制小鼠 T、B 细胞的增殖,以及腹腔 MΦ 吞噬中性红的能力。表明清解宁可能一方面通过抑制 MΦ 的吞噬功能,降低其对 SRBC 的摄取能力,进而抑制了 MΦ 的抗原提呈能力,从而抑制 T、B 细胞的增殖活化;另一方面通

过直接抑制 T、B 细胞的增殖,达到抑制 SRBC 免疫小鼠 DTH 与溶血素生成的目的。

综上所述,清解宁对特异性免疫应答的多个环节具有明显的免疫抑制作用,提示其在免疫功能异常所致的免疫性疾病中有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] 张艺平,韩鹏.黄连解毒汤药理研究最新进展.中国实验方剂学杂志[J].2000,6(6):61-63.
- [2] 耿东升.黄连素的抗炎与免疫调节作用[J].解放军药学学报.2000,16(6):317-320.
- [3] 方素萍,邱全瑛.黄连解毒汤含药血清对 LPS/TNF-α 诱导的人中性粒细胞与血管内皮细胞间粘附的影响.中国实验方剂学杂志[J].2001,7(2):31-33.
- [4] 郝钰,邱全瑛.小檗碱对 IL-1 或 TNF 诱导的多形核白细胞与内皮细胞粘附的影响[J].中国病理生理杂志.2000,16(7):585-587.
- [5] 黄守雄,陈浩,罗斌,等.测定迟发型超敏反应的一种简单有效的方法[J].中国实验临床免疫学杂志,1993,5(3):8-9.
- [6] 钱玉昆.实用免疫学新技术[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1994:15-15
- [7] 王晓京,丁桂凤,范少光,等.几种阿片肽及 ACTH 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的作用[J].中国免疫学杂志.1987,3(4):211-213
- [8] 周道洪,沈元珊,赵曼瑞,等.测定淋巴细胞转化和小鼠白细胞介素-2 活性的新方法-MTT 比色法[J].中国免疫学杂志,1986,2(1):39-44.