

防感片对小鼠脾细胞分泌 IL-2 影响的实验研究

徐晓玉¹, 熊天琴², 魏大鹏³ (1 重庆医科大学, 重庆 400016;
2 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 3 华西医科大学, 四川 成都 610041)

摘要: 观察防感片对免疫抑制小鼠脾脏细胞分泌 IL-2, 以及协同 CONA 刺激器正常小鼠脾细胞分泌 IL-2 的影响, 研究防感片的细胞免疫增强作用。体内实验用 BALB/c 小鼠。防感 1 组, 防感 3 组给予防感片含生药 16g/kg/d; 防感 2 组给予 8g/kg/d; 连续灌胃 35d。第 29d 起, 各组小鼠腹腔注射环磷酰胺 10mg/kg/d; 连续 7d。第 35d 处死小鼠取脾细胞。用依赖细胞株法测定 IL-2 的活性。防感片能增强小鼠脾细胞分泌 IL-2, 显示其有增强小鼠细胞免疫功能。

关键词: 防感片; 感冒; 补益药; 免疫增强剂

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)04-0034-03

Effect of Fanggan tablest on Splenocyte Secreting IL-2

XU Xiao-yu¹, XIONG Tian-qin², WEI Da-peng³

(1 Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; 2 Chendu University of TCM, Chendu, 610075; 3 Huaxi Medical University, Chendu, 610041)

Abstract: To investigate the cellular immunity of Fanggan Tablets(FGT), we studied FCT acting on spleen of immunodepression mice and normal mice, IL-2. The experiments with Balb/c mice, F1G and F3G were treated with FCT(16g/kg/d), F2G treated with FGT(8g/kg/d). Each group was orally administrated successively for 35 days. From the 29th day, in F1G, F2G and the positive control group, CTX was injected (10mg/kg/d) in the abdominal cavity of the mice. On the 35th day, all mice were killed and their spleens were taken out. In vivo and vitro experiments, FGT could promote the secretion of IL-2 of the splenocyte of the mice. It suggested FGT increase the cellular immunity of the mice.

Key words: Fanggan tablet; cold; supplementing medicine; immunopotentiator

感冒是临床最为常见的病种, 是多种疾病的常见诱因, 反复感冒对于多种慢性病症的发生、发展和恶化起着重要的促进作用, 其预防具有重要的临床价值。目前感冒的治疗用药种类繁多, 但感冒预防用药, 特别是针对慢性病患者的反复感冒的预防用药不多。已被用于防治感冒的化学药物金刚胺、金刚乙胺、病毒唑、潘生丁及生物制品干扰素、白细胞介素 2 及疫苗等均因副作用显著, 价格昂贵^[1,2], 应用受限。鉴此, 我们研制了预防性治疗药防感片以防治气虚患者反复感冒。本文观察了防感片对小鼠脾脏细胞分泌 IL-2 的影响, 旨在探讨其免疫学机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 18±2g BALB/c 健康小鼠 60 只雌雄各半。购自成都市生物制品研究所。

1.1.2 药物 防感片(含生药 8g/g, 课题组提供黄芪、枸杞子、制首乌、刺五加等组成); 环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy)(上海联华制药有限公司, 沪卫药准字[1995]第 012034 号); 多抗甲素(polyaction, PA)(成都利华制药厂, 川卫药准字[1990]第 005323 号)。

1.1.3 试剂及细胞株 RPMI-1640 培养液购自 GIBCO; 四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Sigma; 二甲基亚砜(DMSO)购自 MERCL; Hank's 缓冲液、台盼蓝染液购自华美生物制品工程公司; 刀豆蛋白 A(ConA)购自 Sigma; CTLL-2 细胞株由华西医大免疫教研室提供。

1.1.4 仪器 超净工作台、自控式二氧化碳孵箱、曲颈培养瓶、96 孔培养板、双目倒置显微镜、离心沉淀机、酶联免疫检测仪等。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂配制 防感片水溶液的制备: 取防感片粉碎后加适量蒸馏水溶解, 参照徐小玉^[3]等方法, 沉淀 24h, 经 10000rpm 离心 5min, 吸取上清, 滤菌器(孔径 0.1~0.5μm)过滤, 加双蒸馏水稀释, 使每 ml 含生

药 1mg, 4℃密封保存, 备用于体外实验。

防感片灌胃液的制备: 取防感片粉碎后每克药加蒸馏水 10ml 溶解, 配制成含生药 0.8g/ml 溶液, 灭菌, 4℃密封保存, 备用于小鼠体内实验。

多抗甲素水溶液: 培养液配制成 5mg/ml 溶液, 灭菌, 4℃密封保存, 备用。

1.2.2 防感片体内试验对免疫抑制小鼠 IL-2 水平的影响 (1) 分组及预防性给药 用 BALB/c 小鼠 60 只, 随机分为 6 组, 分别为正常对照组、病理模型组、阳性对照组、防感 1 组、2 组、3 组。正常对照组、病理模型组以生理盐水 0.5ml/只·d 灌胃; 阳性对照组给予多抗甲素 0.06mg/只·d 灌胃(相当于临床成人日用量的 12 倍); 防感 1 组给予防感片含生药 0.32g/只·d 灌胃(相当于临床成人日用量的 12 倍); 防感 2 组给予防感片含生药 0.16g/只·d(相当于临床成人日用量的 6 倍); 防感 3 组给药方法用防感 1 组。各组灌胃均连续 35d。第 29d 起, 正常对照组、防感 3 组小鼠腹腔注射生理盐水 0.5ml/只·d; 病理模型组、阳性对照组、防感 1 组、防感 2 组小鼠腹腔注射环磷酰胺 10kg/kg·d, 各组给药均连续 7d。上述各组均予末次给药 24h 后将小鼠脱颈椎处死, 灭菌取脾。(2) 脾细胞悬液制备 参照于俊阁^[4]等方法。上述各组均予末次给药 24h 后将小鼠脱颈椎处死, 灭菌取脾, 剔除结缔组织和脂肪并剪碎脾脏。将脾组织置于平皿中的不锈钢丝网(100 目, 孔径 0.150mm)上, 轻轻挤压脾组织, 使单个核细胞经网入平皿内的 Hank's 液中。细胞悬液离心、洗涤, 重悬细胞, 备用。(3) 对 IL-2 活性的诱导与检测 小鼠脾细胞悬液用培养液调整细胞浓度为 2×10^6 /ml, 加入康氏管, 每管 100 μ l, 加入 ConA, 使其终浓度为 3 μ g/ml, 补足培养液到 1ml, 37℃, 5% CO₂ 诱导 48h, 取上清液待测。检测方法参考孙惠华^[5]报道。

1.2.3 防感片对正常小鼠脾细胞体外诱生 IL-2 的影响 (1) 正常小鼠处死后, 按上述方法取脾制备脾细胞悬液。(2) 小鼠脾细胞悬液用培养液调整细胞浓度为 2×10^6 /ml, 加入 24 孔培养板中, 每孔 100 μ l, 加入 ConA, 使其终浓度为 3 μ g/ml。(3) 各实验组中分别加入终浓度为 400 μ g/ml、200 μ g/ml、100 μ g/ml、50 μ g/ml 的防感水溶液及多抗甲素水溶液 500 μ g/ml, 对照组加入培养液, 设 4 复孔, 各组加入培养液补足 1ml, 37℃, 5% CO₂, 培养 48h, 取上清液。(4) IL-2 的水平检测参考孙惠华^[5]方法, 以 OD 值代表样品中 IL-2 分泌的水平。

1.3 实验资料处理 所有实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间显著性检验采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 防感片体内试验对免疫抑制小鼠 IL-2 水平的影响(见表 1)

表 1 防感片体内试验对免疫抑制小鼠 IL-2 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	用药及浓度	n	IL-2 的水平
生理盐水		8	0.5570 \pm 0.0329
环磷酰胺	10mg/kg	8	0.5121 \pm 0.0313 [△]
环磷酰胺+多抗甲素	3mg/kg	9	0.5577 \pm 0.0459
环磷酰胺+防感片	16g/kg	8	0.5765 \pm 0.0473*
环磷酰胺+防感片	8g/kg	5	0.5833 \pm 0.0530*
生理盐水+防感片	16g/kg	6	0.6216 \pm 0.0519

注: 与病理模型组比较, * $P < 0.05$; 与正常对照组比较, $\Delta P < 0.05$

结果表明: 与正常对照组比较, 病理模型组小鼠 IL-2 水平降低, 差异显著($P < 0.05$); 防感 3 组 IL-2 水平升高, 但无统计学意义。与病理模型组比较, 防感 1 组、2 组 IL-2 水平均显著升高(均为 $P < 0.05$)。阳性对照组 IL-2 水平升高, 无统计学意义。结果显示环磷酰胺能致小鼠 IL-2 水平降低, 造模成功。防感片能阻止环磷酰胺小鼠 IL-2 水平降低, 多抗甲素未明显表现出阻止环磷酰胺小鼠 IL-2 水平降低的作用。防感片对正常小鼠的 IL-2 水平有增强倾向。

2.2 防感片体外试验对正常小鼠脾细胞诱生 IL-2 的影响(见表 2)

表 2 防感片体外试验对正常小鼠脾细胞诱生 IL-2 的影响($n = 4$)

组别	用药及浓度	IL-2 的水平($\bar{x} \pm s$)
生理盐水		0.3815 \pm 0.0351
多抗甲素	500 μ g/ml	0.3949 \pm 0.0466
防感片	50 μ g/ml	0.4641 \pm 0.0488*
防感片	100 μ g/ml	0.4949 \pm 0.0292**
防感片	200 μ g/ml	0.4364 \pm 0.0491
防感片	400 μ g/ml	0.4092 \pm 0.0379

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P > 0.01$ 。

实验结果: 与对照组比较, 防感 1、2、3、4 组及阳性对照组均能增强 ConA 对 IL-2 的诱导作用, 其中以防感片水溶液 100 μ g/ml ($P < 0.05$)、50 μ g/ml ($P < 0.01$) 浓度作用显著, 其余各浓度及多抗甲素也有增强趋势但无统计学意义($P > 0.05$)。结果显示防感

片 100 μ g/ml 50 μ g/ml 体外能协同 ConA 诱导 IL-2 的产生,而多抗甲素 500 μ g/ml 未明显显示出此作用。

3 讨论

反复感冒属于中医“虚劳”、“感冒”等范畴。反复感冒的预防古今通常从益卫固表论治,以玉屏风散^[6,7]为代表。现代亦有从健脾补肺、益气养阴、调和营卫或清热解毒等治法着手,用香砂六君子汤^[8]、参麦饮^[9]、黄芪桂枝五物汤^[10]、牛黄解毒片^[11]等方。防感片处方在益卫固表基础上,着重双补双调肾阴肾阳,以生肾气,壮卫气之根。另佐以健脾养血之品,助气血生化之源。诸药配合肾阴得滋、肾阳得壮、阴阳平秘,则肾中元气强盛;中焦气血生化有源而卫气得充。

引起感冒的病原生物主要有病毒、细菌、支原体等,其中病毒占 75~80%。有报道^[12]反复呼吸道感染儿童 T 细胞免疫功能低下。反复感冒的主要矛盾是机体免疫功能尤其是细胞免疫功能低下,抗感染能力减弱,致使病原微生物反复侵袭机体。因此,增强患者的免疫力,提高抗病能力,是预防感冒发生的关键环节,其中尤其值得重视的是细胞免疫作用的增强。鉴此,我们主要观察了防感片对 IL-2 的影响。

IL-2 是由 T 细胞、NK 细胞产生的 15.5KD 糖蛋白,在机体的免疫应答中起着重要作用,是机体内最主要最强有力的 T 细胞生长因子。IL-2 含量与机体免疫功能,尤其是与细胞免疫功能密切相关,可间接反映机体抗感染免疫能力。

实验显示,防感片水溶液有协同 ConA 体外诱生 IL-2 作用,在 50~100 μ g/ml 作用显著($P < 0.05$; $P < 0.01$)。浓度继续增大,则对 IL-2 的诱生作用减弱,说明防感片水溶液 IL-2 的作用与剂量有关。防感片 16g/kg 8g/kg 体内用药,均能增强免疫抑制小鼠脾细胞分泌 IL-2 的作用($P < 0.05$),对正常小鼠则无明显作用($P > 0.05$)。多抗甲素体内、体外实验均未见

明显诱生 IL-2 的作用($P > 0.05$)。

综上所述,防感片体内、外均能增强小鼠脾细胞分泌 IL-2,表明其能增强小鼠细胞免疫功能及抗感染免疫能力,可用于感冒的预防。

参考文献:

- [1] 岑衍华. 金刚烷胺和金刚乙胺作为抗甲型流感药物的现状[J]. 预防医学情报, 1992, 2(3): 17-19.
- [2] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A(H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. Science, 1998, 279(5349): 393-396.
- [3] 徐小玉、刘佳佳、薛永新,等. 益气免疫片水提物免疫调节作用实验研究[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1997, 9(1): 52-54.
- [4] 方福德、周吕、丁濂,等. 现代医学实验技巧丛书[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 282, 302.
- [5] 尹钦富. 免疫学及免疫学检验实验技术[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1995. 85-86.
- [6] 段富津. 普通高等教育中医类规划教材·方剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1995. 118-119.
- [7] 刘耀武. 加味玉屏风散预防矽肺病人罹患感冒 106 例观察[J]. 内蒙古中医药, 1993, (1): 8-9.
- [8] 袁红霞. 健脾防病的临床与实验研究[J]. 天津中医, 1989, (5): 17-19.
- [9] 张梓荆、高丽梅、韩秀兰,等. 小儿病毒性肺炎中西医结合治疗 400 例报告[J]. 中国中西医结合杂志, 1992, 2(2): 82-84.
- [10] 林辉、方素钦、林求诚. 百宝胶囊预防感冒临床观察[J]. 福建中医学院学报, 1994, 4(1): 15-17.
- [11] 李丽霞. 牛黄解毒片预防儿童感冒的探讨[J]. 中华预防医学杂志, 1997, 3(1): 63.
- [12] 刘利军、李美珠、钱瑞琴. 反复呼吸道感染儿童 T 细胞免疫状态及中西医结合治疗进展[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(9): 573-575.