

桑椹对阴虚小鼠免疫功能的影响

顾洪安¹, 胡滢月²

(1 上海市徐汇区中心医院, 上海 200031;

2 北京中医药大学附属东直门医院, 北京 100700)

摘要: 通过检测小鼠刀豆素 A(ConA) 诱导的脾淋巴细胞增殖反应、IL-2 诱生活性、NK 细胞活性, 从细胞免疫功能方面探讨桑椹滋阴作用的机理。结果发现阴虚小鼠淋巴细胞增殖程度降低、IL-2 诱生活性降低以及 NK 细胞杀伤率降低; 桑椹混悬液能够提高阴虚小鼠的淋巴细胞增殖能力、IL-2 诱生活性和 NK 细胞杀伤率, 从而增强其免疫功能。

关键词: 桑椹; 阴虚; 免疫功能

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** D **文章编号:** 1005-9903(2001)04-0040-02

桑椹为桑科植物 *Morus alba* L. 的干燥果穗, 味甘酸, 性寒, 具有补肝益肾, 养血生津, 滋阴熄风, 润肠通便的作用, 主治肝肾阴虚证。而阴虚证的现代研究表明: 与正常人相比, 阴虚者的细胞免疫功能相对低下, 但体液免疫功能变化不大。本实验拟从细胞免疫功能方面探讨桑椹的滋阴作用。

1 实验材料

1.1 动物 NIH 小鼠, 雄性, 体重 20 ± 2 g, 由上海医科大学动物中心提供。动物合格证号为上海医科大学医动学 D02-22-8。

1.2 药物 桑椹(*Fructus Mori*) 产地广西容县, 购自上海市药材公司, 由上海市药检所鉴定。桑椹混悬液由本院制剂室制备。

1.3 试剂 甲状腺素, 浙江金华生物化学制药厂生产, 批号 970730; 利血平片, 上海医科大学红旗制药厂生产, 批号 971001。IL-2 放射免疫分析试剂盒, 东亚免疫技术研究所。

1640 培养基干粉、小牛血清购自 GIBCO 公司; 胰蛋白酶, Difco 产品进口分装; 刀豆蛋白 A(ConA) 购自 Sigma 公司; ³H-TDR 购自中国原子能科学研究院。

1.4 仪器 LS1801 液体闪烁计数器、DP5500 型 γ 计数器 BECKMAN 公司产品; 低温离心机; 二氧化碳孵箱, HARRIS MANUFACTURING 公司产品; BIO-RAD2550 型酶标仪。

1.5 实验方法

1.5.1 分组及给药 将实验动物随机分为 4 组, 每

组 10 只, 分别为正常组、阴虚模型组、桑椹高剂量组和桑椹低剂量组。阴虚模型组, 桑椹高、低剂量组小鼠每天用甲状腺素 3mg, 利血平 0.02mg 研末灌胃, 桑椹高、低剂量组在灌胃同时灌服桑椹混悬液, 正常对照组灌服等量生理盐水, 连续 10d。

1.5.2 ³H-TdR 掺入淋巴细胞转化实验 按参考文献^[1] 方法制得脾细胞悬液, 调细胞浓度至 1×10^7 /ml, 备用。在 96 孔培养板上, 每孔中分别加入脾细胞悬液 100 μ l, ConA 100 μ l(终浓度为 5 μ g/ml), 对照组则加用 200 μ l RPMI-1640 培养液, 每只小鼠均作实验及对照各 3 孔。将培养板放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱内, 培养 66~72h。取出培养板, 每孔加入 5.55×10^5 Bq/ml(15 μ Ci/ml) ³H-TdR 20 μ l, 继续培养 6h。培养结束后, 用抽滤器将各孔细胞分别吸于 49 型玻璃纤维滤膜上, 用蒸馏水洗滤 10 次后, 置于 80 $^{\circ}$ C 烤箱中干燥 30min 后, 用打孔器将每个样品的滤片取下, 放入含有 7ml 闪烁瓶中, 避光过夜。次日, 用液体闪烁计数器测样品的每分钟脉冲数(cpm)。以 cpm 来反映细胞内 ³H-TdR 掺入 DNA 的量, 用以表示细胞增殖的程度。观察桑椹对 ³H-TdR 掺入 T 淋巴细胞的放射性强度的影响。刺激指数 SI = 实验组 cpm/对照组 cpm。

1.5.3 桑椹对小鼠脾脏自然杀伤细胞(NKC)活性的影响^[1] 小鼠 NK 细胞的获得同脾细胞。传代培养的 L929 细胞在实验前一天换液, 实验时用 0.25% 胰蛋白酶 1~2ml 消化 1~2min, 加 1640 培养液 10ml, 轻轻吹打细胞使其完全从壁上脱落, 1000rpm 离心 5min, 倾去上清液, 将沉积细胞重悬于含 10% 小牛血清 1640 培养液中, 调细胞浓度至 2×10^5 /ml, 即为备

用的靶细胞。

向96孔平底塑料培养板每孔中分别加入事先配好的靶细胞悬液,100μl/孔,然后放入37℃、5%CO₂孵箱内,培养4h,使靶细胞贴壁成一单层细胞,然后向每孔加入100μl效应细胞(使效靶细胞比例为50:1),每样品做三个复孔,靶细胞对照孔加完全1640培养液100μl,再放置于37℃5%CO₂孵箱培养至20h,倾去上清液,用生理盐水轻轻灌满各孔,反复3次,以除去效应细胞及被杀伤而脱落下来的靶细胞,在滤纸上吸干孔内水分,每孔加入100μl细胞0.1%中性红染液,37℃培养30min,弃去染液,再用生理盐水洗三遍后,每孔加入100μl细胞溶解色液(50%醋酸和50%乙醇配制),使吞有中性红的靶细胞溶解,释放出中性红,轻轻摇匀。用酶标仪在492nm处测定光密度,参考波长为450nm,记录OD值。

结果计算:

$$\text{杀伤率} = \frac{\text{靶细胞 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{靶细胞 OD 值}} \times 100\%$$

1.5.4 IL-2 的诱生和测定^[2] 将制得的脾细胞用含10%小牛血清的1640培养液将细胞浓度调至5×10⁶/ml,将脾细胞悬液0.5ml加入24孔培养板,加入ConA(使终浓度为5μg/ml),将培养板放入37℃5%CO₂孵箱内,培养24h,2000rpm离心10min,取上清,即为含IL-2的样本。用IL-2放射免疫分析试剂盒测定其含量。

1.6 统计学方法 均采用SPSS统计软件包。

2 结果

2.1 桑椹对阴虚小鼠淋巴细胞增殖的影响 阴虚组小鼠与正常组相比,淋巴细胞增殖明显减少,刺激指数明显下降(P<0.01),桑椹组比阴虚组有明显改善,结果见表1。

表1 桑椹对阴虚小鼠淋巴细胞转化的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	量(g/kg)	³ H-TdR 掺入 cpm	刺激指数(SI)
正常组	-	8856.66±241.12	2.98±0.52
阴虚组	-	4289.28±121.26 ^{***}	1.62±0.45 ^{***}
高剂组	25	7578.90±156.22 ^{**}	2.31±0.56 ^{**}
低剂组	12.5	6579.71±274.50 [*]	2.27±0.64

注:与正常组相比^{***}P<0.01;^{**}与阴虚组相比P<0.01,P<0.05;n=10,以下同。

2.2 桑椹对阴虚小鼠NK细胞活性的影响 阴虚组小鼠与正常组相比,NKC杀伤率明显下降(P<0.01),桑椹组比阴虚组杀伤率有明显提高,结果见表2。

表2 桑椹对阴虚小鼠NK细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)
正常组	-	0.323±0.047
阴虚组	-	0.098±0.039 ^{***}
高剂组	25	0.187±0.044 ^{**}
低剂组	12.5	0.156±0.089

2.3 桑椹对脾细胞诱生IL-2的能力的影响 桑椹高剂量组能提高诱生IL-2能力,结果见表3。

表3 桑椹对阴虚小鼠IL-2水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	IL-2(ng/ml)
正常组	-	0.754±0.115
阴虚组	-	0.359±0.158 ^{***}
高剂组	25	0.726±0.126 ^{**}
低剂组	12.5	0.465±0.139

3 讨论

阴虚证的现代研究表明,阴虚者的细胞免疫功能相对低下。卢氏通过测定总补体、补体C3、免疫球蛋白(IgA,IgG,IgM)、玫瑰花结试验、淋巴细胞转化试验、植物血凝素(PHA)皮试等试验,发现阴虚患者的细胞免疫功能低下,而对体液免疫方面影响不大^[3]。陈氏发现肾阴虚患者外周血NK细胞活性显著降低^[4]。在我们的实验中,阴虚动物模型的淋巴细胞转化试验NK细胞活性变化的结果与文献报道相一致;而经高剂量的桑椹混悬液治疗的小鼠,其淋巴细胞增殖和NK细胞活性均有明显地提高。

IL-2是T细胞自分泌或旁分泌的生长因子,具有重要的免疫调节作用:(1)活化巨噬细胞;(2)刺激NKC生长,并增强其溶细胞活性,IL-2还可诱导CTL(细胞毒性淋巴细胞)杀伤细胞的分化和效应及诱导杀伤细胞产生TNF-γ、TNF-α等细胞因子^[5]。我们的实验结果表明,阴虚组的小鼠脾细胞诱生IL-2水平明显降低,高剂量桑椹混悬液可以提高阴虚小鼠IL-2诱生活性。我们认为,桑椹对细胞免疫的作用可能是通过诱导和刺激IL-2及其他的相关细胞因子的分泌,从而增强CTL、NK细胞的细胞免疫功能。

参考文献:

[1] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社.1993.745,753.
 [2] 崔金莺,林志彬.银耳多糖对小鼠IL-2、IL-6、TNF-α活性及其mRNA表达的影响[J].北京医科大学学报.1996,28(4):244-248.
 [3] 卢君健,宋改铭,王毓明.100例虚证分型与免疫关系的探讨[J].中西医结合杂志.1982,(3):142-144.
 [4] 陈小峰,王培训,李道中,等.肾虚患者的自然杀伤细胞活性研究[J].中西医结合杂志.1989;9(7):409-410.
 [5] 毕爱华.医学免疫学[M].北京:人民军医出版社.1995.68