

# 溃结灵胶囊对溃疡性结肠炎豚鼠模型 IL-2-IFN- $\gamma$ -NKC 免疫调节网络的影响\*

高亚菲, 鲍德虎, 陈松盛, 张健, 董晓慧(西安医科大学, 西安 710061)

关键词: 溃结灵胶囊; 溃疡性结肠炎; IL-2-IFN- $\gamma$ -NKC

中图分类号: R285.5 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(1999)06-0041-03

溃结灵是我科研组临床治疗溃疡性结肠炎 20 多年的经验方, 主要由朱砂七、白芨等 8 味中草药组成。我们曾从整体角度较系统地观察了 220 例患者的临床效果<sup>[1]</sup>, 每 1 个疗程 1 个月, 2 个疗程的有效率 94%, 治愈率 68.4%, 复发率 30.2%, 远期疗效优于西药柳氮磺胺吡啶。也从细胞学角度研究观察了 40 例患者<sup>[2,3]</sup> 治疗前后的外周血 NK 细胞, 红细胞粘附功能, 血清补体 C<sub>3</sub>, T 细胞亚群 CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub> 及 CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 比值等免疫指标。结果表明溃疡性结肠炎患者以上免疫指标均有不同程度降低, CIC 明显升高。溃结灵胶囊治疗后各项免疫指标有所恢复。在以往研究的基础上, 为了更深入地揭示溃结灵胶囊的治疗机理, 我们又进行了分子水平的研究, 旨在进一步阐明溃结灵和溃疡性结肠炎与 IL-2-IFN- $\gamma$ -NKC 免疫调节网络间的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 检测用细胞与病毒** Wish 细胞株, 按常规方法传代; L<sub>929</sub> 细胞株, 常规传代; 滤泡性口腔炎病毒(VSV), 常规方法传代, 滴定 TCID<sub>50</sub> 为  $1 \times 10^{-5}$ , 实验用 100TCID<sub>50</sub> 攻击。

**1.2 主要试剂** DMEM 完全培养液 (GiBC), 用前加 10% 小牛血清; ConA (serva) 实验用终浓度为 15 $\mu$ g/ml; MTT (Serva) 用 pH7.2 PBS 配成 5mg/ml 应用液, 4 $^{\circ}$ C 避光备用; SDS (Sigma), 四蒸水配制成 10% SDS 裂解液。

**1.3 动物与分组处理** 采用 3~4 月龄的短毛杂色健康豚鼠进行实验, 体重 260~370g (购自西安医科大学动物实验中心), 雌雄各半, 随机分成空白对照组、阳性对照组、治疗药物高、低剂量组、豚鼠溃疡性结肠炎模型组 (造模组)。除空白对照组外, 其余各组造模。治疗药物溃结灵胶囊由西医大药厂提供, 阳性对照药补脾益肠丸深圳南方制药厂生产, 均予动物灌胃服药。

**1.4 溃疡性结肠炎豚鼠模型的建立** 取 3~4 月龄的健康豚鼠 50 只, 禁食不禁水 36h, 腹腔注射戊巴比妥钠溶液进行全身麻醉, 量 25mg/kg, 用 5% 肥皂水经肛门插管洗肠再清水冲洗, 10min 后, 结肠内注入 7% 冰乙酸 2.5ml (距肛门约 12cm 左右), 等动物苏醒后正常饲养。实验组动物造模后第 2d 开始给药, 第 2~3d 开始出现粪便中带血和粘液, 精神不振, 被毛粗乱。冰乙酸对照组以上症状更加明显。造模组第 8d 处死动物, 取出近肛门端 12cm 左右的结肠段, 纵行切开, 肉眼观察, 可见肠粘膜大面积水肿, 不同大小的溃疡灶。病理切片可见粘膜及粘膜下层水肿, 充血, 大量炎性细胞浸润。粘膜上皮细胞脱落, 溃疡形成, 造模成功。空白对照组无上述症状和病理改变。

**1.5 溃结灵胶囊对豚鼠溃疡性结肠炎的治疗作用**<sup>[4]</sup> 正常对照组, 不作任何处理。造模组自造模第 2d 开始灌服 1.2ml/100g 体重

\* 基金项目: 陕西省中医药管理局资助项目(9604)

的蒸馏水; 阳性对照组给补脾益肠丸混悬液 3.0g/kg 体重, 高、低剂量组给溃结灵混悬液 0.8、0.4g/kg 体重, 每天 1 次, 连续口服给药 7d。实验期内每天观察动物的一般情况和临床症状的变化。末次给药后次日, 禁食不禁水 17h, 称体重后处死动物, 截取近肛门端 12cm 的结肠段, 进行肉眼和组织切片观察。

**1.6 IL-2 活性测定** 依匡彦德方法<sup>[5]</sup>有改进。无菌取正常 BALB/c 小鼠脾脏, 常规制备单个核细胞, 以 10% FCS DMEA 完全培养液调细胞浓度为  $2 \times 10^6$ /ml, 加入 ConA (浓度为 15 $\mu$ g/ml), 细胞置 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养 72h, 以 DMEM 洗涤 3 次, 调细胞浓度为  $3 \times 10^5$ /ml, 细胞种入 96 孔板, 每孔 100 $\mu$ l, 各孔加 DMEM 75 $\mu$ l 及待测血清样本 25 $\mu$ l, 细胞培养 64h 后, MTT 法测定样本 IL-2, 以各样本 OD 均值直接表示待测样本中 IL-2 含量。

**1.7 NK 细胞活性测定** 依俞永平方法<sup>[6]</sup>, L<sub>929</sub> 细胞为靶细胞, 效/靶为 50: 1, 细胞培养 4h 后, 用 0.05M 50% 醋酸乙醇 4 $^{\circ}$ C 溶解过夜, 各孔取上清 100 $\mu$ l 于 550nm 波长测 OD 值, NK 细胞活性以靶细胞溶解% 表示:

$$\text{溶解}\% = \frac{\text{对照孔 OD 值} - \text{实验孔 OD 值}}{\text{对照孔 OD 值}} \times 100\%$$

**1.8 干扰素活性测定**<sup>[7]</sup> 各组血清作倍比稀释, 加入 96 孔板, 每孔 100 $\mu$ l, 各孔加入  $2 \times 10^5$ /ml wish 细胞 100 $\mu$ l, 5% CO<sub>2</sub> 37 $^{\circ}$ C 培养 24h, 弃上清, 各孔加 100TCID<sub>50</sub> VSV 100 $\mu$ l, 继续培养, 待病毒对照孔出现 50% 病变时, 各孔加 MTT (5mg/ml) 15 $\mu$ l, 570nm 测各孔 OD 值, 按 Reed-muench 法计算 IFN 效价 (U/ml)。

**1.9 统计学处理** 全部数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”, 并经 SAS 系统处理, 采用多个均数间两两比较的 *q* 检验法。

## 2 结果

**2.1 NK 细胞活性** 见表 1。高剂量治疗组 NK 细胞活性较阳性药物组明显升高, 其增强 NK 细胞活性作用优于阳性药物组。低剂

量组 NK 细胞活性与造模组无差异。

表 1 溃结灵对 NK 活性, 血清 IL-2, IFN 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	NK 活性%	IL-2 水平	IFN 水平
正常组	12 $\pm$ 0.03*	0.68 $\pm$ 0.05*	2.58 $\pm$ 0.30
造模组	25 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.04	2.72 $\pm$ 0.36
阳性组	29 $\pm$ 0.06	1.17 $\pm$ 0.10*	88.14 $\pm$ 4.80*
高剂量	37 $\pm$ 0.04* <sup>Δ</sup>	1.26 $\pm$ 0.07*	101.92 $\pm$ 6.70* <sup>Δ</sup>
低剂量	24 $\pm$ 0.06	0.87 $\pm$ 0.06*	67.97 $\pm$ 4.11*

与造模组比 \* *P* < 0.01; 与阳性组比 <sup>Δ</sup>*P* < 0.01; *n* = 8

**2.2 IL-2 水平测定** 见表 1。造模组血清 IL-2 水平明显降低, 随着药物剂量增多, IL-2 水平随之升高。

**2.3 干扰素水平检测** 见表 1。高剂量治疗组 IFN 水平大幅度上升, 优于阳性组, 阳性药物组优于低剂量对照组, 以上 3 组 IFN 水平明显高于正常对照和造模组。由于化学药物快速造模, 短时间内不能改变 IFN 的水平, 所以造模组与正常对照组无明显差异。溃结灵胶囊有诱生干扰素的作用, 经过一段时间治疗, 药物组有显著差异。尽管造模组血清 IFN 水平也轻度上升, 但无统计学意义。

## 3 讨论

该实验结果提示: 增强或调节免疫功能的药物不局限于祖国医学中的补气血阴阳药物, 很多清热解毒、活血化瘀等药也能直接影响机体体液免疫和细胞免疫, 减轻诱发自身免疫性疾病。此外, 也进一步反证了祖国医学在运用所谓清热解毒药物治疗“实证”之时, 实质上正是用“泻实”的治法进行“补虚”之际, 该实验结果为此提供了重要客观依据。

### 参考文献:

[1] 郭琪, 万素清, 陈金典, 等. 秦巴山区中草药治疗非特异性溃疡性结肠炎的实验研究及临床观察[J]. 西安医科大学学报, 1993, 14(2): 131 ~ 133

[2] 高亚菲, 朱昭明, 李旭, 等. 相关免疫生化指标在慢性溃疡性结肠炎“证”中的临床意义[J].

- 西安医科大学学报, 1996, 17(3): 356~ 358
- [3] 高亚菲, 朱昭明, 李旭, 等. 中草药灌肠III号对溃疡性结肠炎病人免疫调节功能的影响[J]. 中国肛肠病杂志, 1998, 18(7): 9~ 11
- [4] 王玉良, 谢杰, 李显华, 等. 固本益肠片治疗实验性豚鼠脾虚型溃疡性结肠炎的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(2): 98~ 100
- [5] 匡颜德, 关惠真, 钱琴芳, 等. 白细胞介素2的检测及其诱生条件的分析[J]. 上海医科大学学报, 1987, 14(1): 10~ 12
- [6] 俞永平, 叶玲仙, 李修兰, 等. 用比色法测定POLY 1: C和CP菌苗对小鼠NK活性的增强作用[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1988, 8(3): 193~ 195
- [7] 伊纯德, 金伯泉, 黄传书. 应用MTT法测定IFN的生物活性效价[J]. 上海免疫学杂志, 1990, 10(4): 247~ 248

(收稿日期: 1998-08-21)