

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)10-0894-03

荧光定量 PCR 方法探讨黄芪注射液对巨噬细胞吞噬结核杆菌的影响

高 鹏¹, 张润玲¹, 刘燕玲², 石 磊¹(兰州大学: ¹第二医院检验科, 甘肃 兰州 730030, ²微生物学教研室, 甘肃 兰州 730000)

Effect of Astragalus root injection on macrophagal phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis*

GAO Peng¹, ZHANG Run-Ling¹, LIU Yan-Ling², SHI Lei¹¹Department of Clinical Laboratory, Second Hospital, Lanzhou 730030, China, ²Department of Microbiology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

【Abstract】 AIM: To explore the mechanism by which Astragalus root injection affects the macrophagal phagocytosis of mycobacterium tuberculosis. METHODS: Macrophages and mycobacterium tuberculosis were extracted from mice by washing mouse peritoneum with RPMI1640. Astragalus root injection at different concentrations (0, 0.05, 0.2, 0.6, 1.5 and 4 g/L) was coincubated. The capacity of macrophagal phagocytosis of mycobacterium tuberculosis was detected by FQ-PCR method. RESULTS: At the concentration of 0.2, 0.6, 1.5 and 4 g/L, Astragalus root injection enhanced the capacity of macrophagal phagocytosis of mycobacterium tuberculosis. At the concentration of 1.5 g/L, the effect was the most significant. CONCLUSION: Astragalus can enhance the capacity of macrophagal phagocytosis of mycobacterium tuberculosis and this mechanism is bi-directional. Astragalus can inhibit macrophagal phagocytosis of mycobacterium tuberculosis at too high a concentration. This research provides some new insight into the clinical treatment of tuberculosis.

【Keywords】 macrophages; *Mycobacterium tuberculosis*; astragalus root injection; polymerase chain reaction

【摘要】 目的: 探讨黄芪注射液对巨噬细胞吞噬结核杆菌的作用。方法: 以浓度为 0(对照组), 0.05, 0.2, 0.6, 1.5, 4 g/L 的黄芪注射液 100 μL 与 RPMI1640 灌洗小鼠腹腔获得的巨噬细胞及结核杆菌共同孵育, 采用荧光定量 PCR 法检测巨噬细胞对结核杆菌的吞噬能力。结果: 在黄芪注射液浓度

为 0.2, 0.6, 1.5, 4 g/L 时, 黄芪对巨噬细胞吞噬结核杆菌有明显的促进作用, 并且以 1.5 g/L 浓度为最佳。结论: 黄芪可以提高巨噬细胞对结核杆菌的吞噬作用, 并具有双相性, 当其浓度过高时具有抑制巨噬细胞吞噬结核杆菌的作用。本研究为临床治疗结核病提供了理论依据和新的思路。

【关键词】 巨噬细胞 分枝杆菌 结核 黄芪注射液 聚合酶链反应
【中图分类号】 R915 **【文献标识码】** A

0 引言

贫困、流动人口增多、艾滋病流行以及耐药菌种增多等因素使结核病问题日益严峻。在多种治疗方法中, 解决复发和耐药是防治的重点。结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, TB) 在细胞内寄生, 寄生于巨噬细胞(macrophage)的 TB 难以用药物清除, 是引起复发和耐药的原因之一。据国外报道吞噬 TB 的巨噬细胞通过促进巨噬细胞凋亡, 使其胞质 TB 死亡, 达到彻底清除细胞内 TB 的目的。若能寻找到增强巨噬细胞吞噬 TB 的物质, 再辅助以促其凋亡作用, 便能清除细胞内 TB, 将有助于解决 TB 复发和耐药问题。因此, 我们主要探讨黄芪是否能增强巨噬细胞对结核杆菌的吞噬能力, 进而通过凋亡清除。

1 材料和方法

1.1 材料 ① 药物及试剂: 18~20 g 雌性昆明小鼠 30 只购自兰州医学院实验动物中心; 减毒结核杆菌(北京天坛生物技术有限责任公司); 黄芪注射液(山西晋新双鹤药业有限责任公司); TB 核酸扩增(PCR) 荧光检测试剂盒(深圳匹基生物工程股份有限公司); RPMI1640(Invitrogen Corporation); 小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); 瑞氏染剂、非特异性酯酶染剂、台盼蓝染剂均由我科室自行配制。② 主要仪器: 荧光定量 PCR 分析仪(Lightcycler Roch Corporation); 生物安全柜(SPEG AIR TECH); CO₂ 孵箱(SANYO); 倒置显微镜(OLYMPUS)。

1.2 方法

1.2.1 巨噬细胞提取与鉴定 按文献[1]方法选取 18~20 g 雌性昆明小鼠 30 只, 将小鼠脱颈处死, 在无菌条件下向小鼠 ip 5 mL RPMI1640, 充分

收稿日期 2004-12-09; 修回日期 2005-01-23

通讯作者: 张润玲. Tel. (0931)8942670 Email. ZhangRL03@yahoo.com.cn

作者简介: 高 鹏(1979-)男(汉族), 甘肃省兰州市人, 硕士生(导师张润玲). Tel. (0931)8942677 Email. Gp863@163.com.cn

晃动,以冲洗腹腔.用无菌针管回收腹腔内液体,混匀,并置于离心管中,用同法再冲洗腹腔1次,合并2次的腹腔冲洗液.在4℃条件下,将收集的腹腔灌洗液按1200 r/min离心10 min,去除上清,再用含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养基将沉淀于管底的细胞悬浮,并吹打均匀,通过台盼蓝染色判断存活率,瑞氏染色、非特异性酯酶染色计算巨噬细胞纯度.调整巨噬细胞浓度为 $1 \times 10^9/L$.

1.2.2 细胞培养 将上述细胞接种于48孔板中,每孔500 μL ,置入37℃ 50 mL/L的CO₂ 孵箱中温育3 h,弃去上清及未贴壁的细胞,贴壁的即为巨噬细胞.每孔再加入含100 mL/L小牛血清的RPMI1640 500 μL 和密度为 $1 \times 10^{10}/L$ 的结核杆菌500 μL ,使细菌:细胞=10:1.将实验分为6组,每组做6个细胞培养孔,每组分别加入浓度为 α (对照组) β .05 β .2, 0.6 1.5 β g/L的黄芪注射液100 μL .并设立空白组,该组也做6个细胞培养孔,该组只加结核杆菌而不加巨噬细胞,用于观察结核杆菌的洗脱情况.将细胞培养板置于37℃ 50 mL/L的CO₂ 孵箱中温育5 h.

1.2.3 TB-DNA的提取 用RPMI1640反复冲洗细胞培养板,洗去未被巨噬细胞吞噬及粘附的TB.每孔中加入TB-DNA提取液30 μL ,振荡混匀,水浴30 min,使细胞及细菌膜破裂,裂解释放出DNA,用移液器移至Doffle管中,再置于100℃干浴10 min,10 000 g离心10 min,上清液用于DNA扩增.

1.2.4 FQ-PCR检测TB-DNA 设定Roche毛细反应管:检测管、4个标准管和阴阳对照管.从试剂盒中取出TB-PCR反应液,Taq酶及UNG,室温融化并混匀后,向设定的Roche毛细反应管中分别加入TB-PCR反应液17.8 μL ,Taq酶0.2 μL ,UNG 0.03 μL 以及提取的TB-DNA,盖紧管盖,连同Roche专用金属反应管套放入离心机中,于2000 r/min离心10 s.将反应管放入荧光PCR检测仪内,进行扩增和检测.根据标准,仪器自动计算样品中DNA拷贝数.

统计学处理:所有数据均采用SPSS统计软件作处理,计量数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,检验采用多组资料均数比较的方差分析.实验组和对照组比较采用Dunnet *t* 检验.

2 结果

2.1 提取巨噬细胞的鉴定 实验中巨噬细胞的获得数为 $(1.25 \pm 0.34) \times 10^8/L$,纯度为 $(95.32 \pm 3.64)\%$,经台盼蓝染色鉴定其存活率为 $(98.26 \pm 2.21)\%$,并采用瑞氏染色和非特异性酯酶染色加以确定.在瑞氏染色下,分离的巨噬细胞呈圆形或椭圆

形,有伪足状突起,核有凹陷,呈肾形,多偏居一侧,着色深(Fig 1).在非特异性酯酶染色下,巨噬细胞胞质内有灰黑色或棕黑色弥散性颗粒状沉淀(Fig 2).

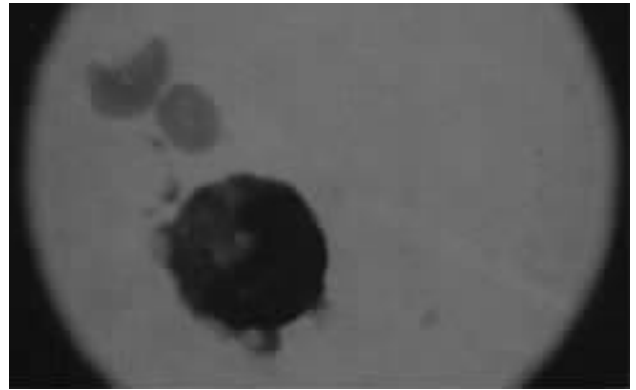


Fig 1 Wright's staining of the macrophages $\times 1000$

图1 巨噬细胞瑞氏染色

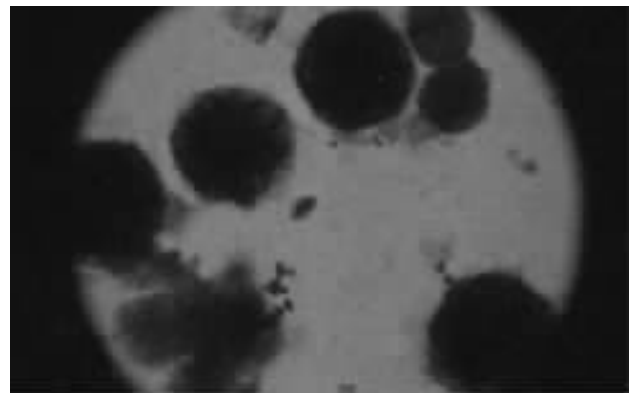


Fig 2 Non-specific lipase staining of the macrophages $\times 1000$

图2 巨噬细胞非特异性酯酶染色

2.2 黄芪对巨噬细胞吞噬TB的影响 空白组的TB-DNA拷贝数为 $(7.67 \pm 3.25) \times 10^2$,黄芪组与对照组的具体数值是减去该背景TB-DNA拷贝数后的值(Tab 1).

表1 不同黄芪浓度对巨噬细胞吞噬TB的影响

Tab 1 Effect of different astragalus levels on the macrophagal phagocytosis of *mycobacterium tuberculosis* ($n=6 \bar{x} \pm s$)

ρ (Astragalus)(g/L)	Copy value/ 10^6
α (Control)	0.08 \pm 0.01
0.05	0.57 \pm 0.12
0.20	1.45 \pm 3.31 ^a
0.60	3.27 \pm 1.02 ^b
1.50	6.03 \pm 1.38 ^b
4.00	4.33 \pm 1.75 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs control.

3 讨论

巨噬细胞是人体重要的免疫调节和效应细胞,参与机体众多的生理和病理反应过程。如巨噬细胞吞噬和消除病原微生物^[2],通过加工处理提呈抗原,启动特异性免疫应答^[3],以及巨噬细胞通过细胞凋亡清除吞噬的致病病原体等^[4]。目前动物体内巨噬细胞的提取主要在腹腔中进行,这是因为腹腔是一个密闭的腔隙,且有丰富的毛细血管,体内的单核细胞易于游出而转变为巨噬细胞。既是在静息的状态下,腹腔中有少量未活化的巨噬细胞。本研究是通过灌洗腹腔而获得这部分巨噬细胞,并且通过增加实验动物的数目,以及提高实验过程中细胞收集和保存技术而得到研究所需的处于静息状态的巨噬细胞的数量。提取巨噬细胞后采用了瑞氏染色和非特异性酯酶染色进行鉴定。这两种方法简单明了,适应性广。并且在该研究中具有相对的特异性,能很好地分辨出巨噬细胞与腹腔中其他细胞,方法简单,易分类计数细胞,便于评估巨噬细胞数量。

该研究中设立空白组,以消除背景干扰。本研究显示空白组 TB-DNA 拷贝数远远低于其他组别,且具有显著统计学差异。实验组及对照组巨噬细胞分离根据其贴壁特性,将其他细胞以及未吞噬及粘附的 TB 弃除。

研究显示黄芪浓度为 0.2、0.6、1.5、4 g/L 时,巨噬细胞吞噬的 TB-DNA 拷贝数与对照组相比有显著的统计学差异,表明黄芪注射液可以提高巨噬细胞对结核杆菌的吞噬作用。这与甘军等^[5]报道黄芪可明显提高小鼠腹腔巨噬细胞对白色念珠菌的吞噬功能和林爱华等^[6]报道的黄芪可明显提高小鼠体内巨噬细胞对碳粒的廓清能力结果相一致。黄芪注射液提高巨噬细胞吞噬结核杆菌的可能原因为:黄芪可以提高小鼠巨噬细胞 C3b 受体和 Fc 受体活性。据黄勇报道对正常小鼠给防己黄芪汤,可增加小鼠腹腔巨噬细胞表面 C3b 受体和 Fc 受体的数量与活性^[7]。C3b 受体和 Fc 受体是巨噬细胞表面的主要受体,其数量和活性直接决定巨噬细胞的吞噬功能。此外黄芪注射液能兴奋巨噬细胞。黄芪有效成分之一黄芪甲苷,体内给予黄芪甲苷后,使细胞内次级溶酶体和残余体增多,初级溶酶体增加,体积增大,酶含量增多,溶酶体酸性磷酸酶活性增高^[8]。电镜下观察到巨噬细胞被活化,细胞直径普遍增大,胞体丰富,伪足宽大,表面有较多凹陷皱折,细胞形态不定^[9]等。值得注意的是,据周义乾等^[10]报道黄芪注射液能显著提高肺结核患者细胞免疫水平。促进 T 淋巴细胞亚群 CD3、CD4 显著升高。这与本研究中证实的黄芪注射液对巨噬细胞的促进作用是否有相互协调作用有待进一步

研究。另外当黄芪浓度为 1.5 g/L 时,巨噬细胞内 TB-DNA 拷贝数显著高于相邻高低两个浓度 0.6 g/L 和 4 g/L 组巨噬细胞吞噬的 TB-DNA 拷贝数(P 均 < 0.05),证明在该研究中黄芪注射液浓度为 1.5 g/L 时黄芪促进巨噬细胞吞噬结核杆菌的作用为最佳,同时表明黄芪免疫调节具有双相性,即一定浓度的黄芪可促进巨噬细胞对 TB 的吞噬能力,当达到一定浓度时却有抑制作用。其机制有待进一步探讨。

【参考文献】

- [1] 高鹏,石磊,张润玲.小鼠腹腔巨噬细胞的提取与鉴别方法探讨[J].中国医学检验杂志,2004,10(5):400-402.
Gao P, Shi L, Zhang RL. Extraction and identification of peritoneal macrophages from mice[J]. *Chin J Med Lab Tech*, 2004, 10(5): 400-402.
- [2] Shimada O, Ishikawa H, Tosaka-Shimada H et al. Rearrangements of actin cytoskeleton during infection with *Escherichia coli* 0157 in macrophages[J]. *Cell Struct Funct*, 1999, 24(5): 237-246.
- [3] Fulton SA, Reba SM, Pai RK et al. Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-kilodalton *Mycobacterium* lipoprotein[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(4): 2101-2110.
- [4] Gil D, Garcia LF, Rojas M. Modulation of macrophage apoptosis by antimycobacterial therapy: Physiological role of apoptosis in the control of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(2): 1886-1894.
- [5] 甘军,张修武.银杏黄芪及其复方对巨噬细胞吞噬功能影响的比较研究[J].湖南中医杂志,1998,14(1):378-379.
Gan J, Zhang XW. Comparison of the effect of Ginkgo, Astragalus and the compound on the phagocytosis function of macrophages[J]. *Hunan J Trad Chin Med*, 1998, 14(1): 378-379.
- [6] 林爱华,李予蓉.黄芪对小鼠免疫功能的影响[J].第四军医大学学报,2003,24(17):66.
Lin AH, Li YR. Effects of Mongolian milkveetch root on immunological function of mice[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003, 24(17): 66.
- [7] 黄勇,吴敏毓.不同剂量黄芪组方的防己黄芪汤对正常小鼠免疫功能的影响[J].中药药理与临床,1997,13(2):302-304.
Huang Y, Wu MY. Effect of Fangji Huangqi Tang with different dose of astragalus mongholicus on the immune function of normal mice[J]. *J Chin Med Pharm Clin*, 1997, 13(2): 302-304.
- [8] 陈永仲.黄芪皂甙甲对小鼠淋巴结内淋巴细胞和巨噬细胞的影响[J].南京医学院学报,1987(7):9-12.
Chen YZ. Effect of astragalus saponin 1 on the lymphocyte in lymph node and macrophages in mice[J]. *J Nanjing Med Coll*, 1987(7): 9-12.
- [9] 陈永仲.黄芪皂甙甲对小鼠腹腔巨噬细胞的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,1988,2(4):305-308.
Chen YZ. Effects of astragalus saponin 1 on peritoneal macrophages in mice[J]. *J Chin Pharm Toxic*, 1988, 2(4): 305-308.
- [10] 周义乾,刘玉林,刘清珍.黄芪注射液对肺结核患者 T 细胞亚群的影响及近期疗效[J].第四军医大学学报,1999,20(10):57-59.
Zhou YQ, Liu YY, Liu QZ. Effect of Astragalus root injection on T cell subsets of pulmonary tuberculosis patients and its short-term curative effect[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 1999, 20(10): 57-59.