

金黄扶正茶对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响

朱丹¹, 张春花², 梁秋云¹, 刘华钢^{1*}

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西中医学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 探讨金黄扶正茶对免疫抑制小鼠脾脏 T、B 淋巴细胞增殖及腹腔巨噬细胞免疫功能的影响。方法: 金黄扶正茶高、中、低剂量组分别连续给昆明种小鼠 ig 10 d, 同时隔日 sc 注射环磷酰胺 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 造成免疫抑制模型。采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法测定刀豆蛋白 A (Con A) 诱导脾脏 T 淋巴细胞增殖和脂多糖 (LPS) 诱导 B 淋巴细胞增殖的影响及自然杀伤细胞 (NK 细胞) 和淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK 细胞) 活性, 酶法检测腹腔巨噬细胞分泌一氧化氮合酶 (NOS) 的活性, 用全自动酶标仪检测巨噬细胞吞噬中性红能力。结果: 金黄扶正茶低、中、高剂量组均能显著提高免疫抑制小鼠的 T、B 淋巴细胞的吸光度 ($A, P < 0.01$); 而中、高剂量组能显著提高免疫抑制小鼠 NK 细胞、LAK 细胞活性、腹腔巨噬细胞吞噬活性及诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 活力 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: 金黄扶正茶能促进免疫抑制小鼠脾淋巴细胞增殖, 增强 NK 细胞、LAK 细胞活性, 提高免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性, 从而增强免疫抑制小鼠的细胞免疫功能。

[关键词] 金黄扶正茶; 免疫抑制; 淋巴细胞增殖; 巨噬细胞; NK 细胞; LAK 细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)08-0242-04

Influences of Jinhuang Fuzheng Tea on Cellular Immune Function in Immunosuppressed Mice

ZHU Dan¹, ZHANG Chun-hua², LIANG Qiu-yun¹, LIU Hua-gang^{1*}

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Jinhuang Fuzheng tea on spleen T, B lymphocyte proliferation and peritoneal macrophage immune function in the Immunosuppressed mice. **Method:** Mice were ig administrated Jinhuang fuzheng tea at high, middle and low dose for 10 days. The immunosuppression mouse model was caused by subcutaneous injection of cyclophosphamide ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) every other day. The determination of concanavalin A (Con A) induced T lymphocyte proliferation and lipopolysaccharide (LPS) induced B lymphocyte proliferation and natural killer cells (NK cells) and lymphokine-activated killer cells (LAK cells) activity was examined by tetrazolium blue (MTT). The inducible nitric oxide synthase (iNOS) secreted by peritoneal macrophages activity was measured by enzymic method. Automatic detection microplate reader was used to determine the capability of phagocytosis neutral red. **Result:** The immunosuppressed mice which were given Jinhuang Fuzheng tea at low, medium and high dose groups showed a increased T and B lymphocyte A value ($P < 0.01$); The medium and high dose groups significantly improved NK cells LAK cell activity, phagocytic activity of peritoneal macrophages and iNOS activity in immunosuppressive mice ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** The Jinhuang Fuzheng tea can promote the immune function in Immunosuppressed mice.

[Key words] Jinhuang Fuzheng tea; immunosuppression; lymphocyte proliferation; macrophages; NK cells; LAK cells

[收稿日期] 20111024(013)

[基金项目] 广西中医药管理局项目 (GZYZ-10-31)

[第一作者] 朱丹, 讲师, 从事中药药理学、生药学研究, Tel: 077-5360143, E-mail: englishzhudan030@sina.com

[通讯作者] * 刘华钢, 教授, 博士研究生导师, 从事药理学及药剂学研究, Tel: 0771-5700208, E-mail: hgliu206@263.net

金黄扶正茶是根据我国传统医学理论,扶正祛邪的精髓,结合现代药理学研究和临床实践经验而组成的方剂,是由黄芪,金银花,大枣,浮小麦等制成袋泡茶剂,有扶正驱邪,益气解毒功效,为民间验方,经临床多年使用,疗效确切。临床上常用于体虚、免疫低下、各种瘟疫,研究发现其可增强免疫抑制小鼠的非特异性免疫^[1],提高非典型性肺炎(SARS)疑似患者的免疫功能^[2],同时具有体外抗病毒^[3-4]的作用。本文通过观察金黄扶正茶对刀豆蛋白A(Con A)和脂多糖(LPS)诱导免疫抑制小鼠淋巴细胞增殖的影响,测定自然杀伤细胞(NK)细胞和淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)细胞的活性以及腹腔巨噬细胞吞噬活性,探讨金黄扶正茶对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响。

1 材料

1.1 药品及试剂 金黄扶正茶由本实验室提供(每1g成药相当于生药材4.01g),该处方由金银花、黄芪、浮小麦、大枣,甜茶组成,取金银花、甜茶粉碎成细粉,备用。其余黄芪、浮小麦、大枣加水煎煮2次,合并煎煮液,滤液浓缩成浸膏,加入金银花、甜茶细粉,混匀,烘干即得。采用HPLC法进行有效成份绿原酸的含量测定,本品每g含金银花以绿原酸($C_{16}H_{18}O_9$)计,不得少于5mg。注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号10042121);盐酸左旋咪唑片(广东南国药业有限公司,批号100703);RPMI-1640[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司,NWD0398];无酚红RPMI-1640培养基(Sigma公司产品);标准胎牛血清,四甲基偶氮唑蓝(MTT),二甲基亚砷(DMSO)(均为Solarbio公司产品);重组白介素-2(IL-2)注射液(北京四环生物制药有限公司,20110503);ConA,LPS(为Scientific Research Special公司产品);一氧化氮合酶(NOS,南京建成生物工程研究所,批号20110509)。

1.2 动物 SPF级昆明种小白鼠60只,雌雄各半,体重13~15g,广西医科大学动物实验中心提供,许可证号SCXK(桂)2009-2002。

1.3 仪器 ELX808全自动酶标仪(Biotek Instruments, Inc),台式低速离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司),311CO₂培养箱(Thermo Forma),立式压力蒸气灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),101AS-2数显电热恒温干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司),XD-101倒置生物显微镜(武汉欧卡科技有限公司),DW-86L628海尔超级低温保存箱(青岛海尔冷冻总公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 取小鼠60只,随机分成6组,每组10只,分别为:正常对照组(生理盐水ig 20 mL·kg⁻¹,连续10d);环磷酰胺组(生理盐水ig 20 mL·kg⁻¹,连续10d,同时隔天sc环磷酰胺30 mg·kg⁻¹);阳性对照组(每天ig左旋咪唑剂25 mg·kg⁻¹,连续10d,给药后隔天sc环磷酰胺30 mg·kg⁻¹);金黄扶正茶高、中、低剂量组(每天分别ig金黄扶正茶5.08,2.54,1.27 g·kg⁻¹(分别相当于临床剂量的24,12,6倍),连续10d,给药后隔天sc环磷酰胺30 mg·kg⁻¹)。

2.2 小鼠脾细胞悬液的制备^[5] 末次用药后1h处死动物,置75%乙醇浸泡5min,无菌取出脾脏,匀浆过200目尼龙布,收集脾细胞悬液。脾细胞悬液1000 r·min⁻¹,离心5min后弃上清得细胞沉淀,沉淀中加4mL红细胞裂解液,轻轻吹打均匀,室温静置5min,1000 r·min⁻¹离心5min,取细胞沉淀用4mL PBS洗3遍后,重悬于含10%胎牛血清的1640培养基中,将细胞液置于培养板中,置于37℃5%二氧化碳培养箱2h,取悬浮的脾淋巴细胞备用。用台盼蓝染料排斥法计数脾淋巴细胞数目并判断活力。然后用完全培养液配成5×10⁶个/mL。

2.3 金黄扶正茶对淋巴细胞增殖的影响^[5]

2.3.1 ConA诱导的小鼠脾脏T淋巴细胞增殖反应

取100 μL脾细胞液加入96孔细胞培养板并加入终浓度为5 mg·L⁻¹的ConA 20 μL,再加80 μL RPMI-1640完全培养液,每只动物设3个复孔,置37℃5%CO₂培养箱中培养68h后,每孔加入20 μL MTT溶液(5 g·L⁻¹),继续培养4h后,细胞培养板3000 r·min⁻¹离心10min,吸弃上清,然后加入DMSO 150 μL,充分震荡后,用全自动酶标仪于570 nm波长下测量吸光度(A)。

2.3.2 LPS诱导小鼠脾脏B淋巴细胞增殖反应^[5]

LPS诱导脾脏B淋巴细胞终浓度为10 mg·L⁻¹,其他检测方法同2.3.1。

2.4 对NK细胞和LAK细胞活性的影响^[6]

2.4.1 效应细胞和靶细胞的制备 常规方法制备脾细胞悬液作为效应细胞,用含10%胎牛血清的1640培养液调到细胞密度5×10⁶/mL。YAC-I细胞(小鼠淋巴瘤细胞)作为靶细胞,培养24~48h,用台盼蓝染料排斥法测定活力95%以上,调细胞密度为1×10⁵个/mL。

2.4.2 NK细胞活性测定 96孔培养板中,试验孔加效应细胞、靶细胞各100 μL;靶细胞对照孔加靶

细胞和培养液各 100 μL ; 效应细胞对照孔加效应细胞、培养液各 100 μL , 每个标本作 3 个复孔。效靶细胞孵育 24 h 后, 各孔均直接加入 20 μL MTT (5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中共同孵育 4 h。孵育结束后, 细胞培养板 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸弃上清, 各孔加 DMSO 150 μL , 用全自动酶标仪于 570 nm 波长下测量 A 值。

$$\text{NK 细胞活性} = 1 - (\text{实验组 A} - \text{效应细胞组 A}) / \text{靶细胞组 A} \times 100\%$$

2.4.3 LAK 细胞活性测定 常规方法制备脾细胞悬液, 用含 1 000 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 重组 IL-2 的 10% 胎牛血清的 1640 培养液培养 72 h, 调到 5×10^6 个/mL 细胞, HL-60 (白血病细胞株) 作为靶细胞, 培养 24 ~ 48 h, 用台盼蓝法测定活力 95% 以上, 调细胞数为 1×10^5 个/mL, 细胞活性测定方法与 NK 细胞相同。

2.5 腹腔巨噬细胞的制备^[7] 脱颈椎处死小鼠, 用 75% 乙醇浸泡消毒小鼠。无菌条件下在腹股沟区做一横切口, 撕裂皮肤以完全暴露腹壁。70% 乙醇冲洗腹壁, 注射器先抽 1 mL 空气和 4 mL 预冷至 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 缓冲液, 镊子提起腹壁法从腹部左侧向腹腔中注射。轻揉腹壁 5 min, 使培养液散布于整个腹腔, 并促使巨噬细胞从腹腔的浆膜表面释放, 形成细胞悬液。取另一支注射器从腹部右侧进针抽出悬液, 移入预冷的容器中。细胞悬液 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取细胞沉淀用 4 mL PBS 洗 2 遍, 重悬于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中, 台盼蓝法计数巨噬细胞数目并判断活力用完全培养液配成 1×10^6 个/mL。

2.5.1 巨噬细胞吞噬功能测定 取 96 孔细胞培养板, 每孔加入 1×10^6 个/mL 的腹腔巨噬细胞培养液 100 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养 2 h 后倾去培养液, 再每孔加入 100 μL 含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养 24 h, 加入 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 中性红溶液 100 μL /孔, 继续培养 4 h, 弃上清后用 PBS 洗弃细胞外中性红溶液, 加入 DMSO 150 μL /孔使巨噬细胞完全溶解, 用全自动酶标仪测定 492 nm 处 A。

2.5.2 巨噬细胞 NOS 活力的测定 NOS 活力按 1×10^6 个细胞/mL 培养上清液每 1 min 生成 1 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NO 为一个活力单位。NOS 催化 L-精氨酸和分子氧反应生成 NO, NO 与亲核性物质生成有色化合物, 在 530 nm 测定 A (间接反映 NOS 活力)。用无酚红 RPMI-1640 培养细胞, 收集细胞培养上清液, 按 NOS 试剂盒说明书操作。

2.6 数据统计 数据统计应用 SPSS 16.0 软件计算, 组间均数比较采用 *t* 检验, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对免疫抑制小鼠脾脏 T, B 淋巴细胞增殖反应与正常对照组比较, 环磷酰胺组 A 明显低于正常对照组 ($P < 0.01$); 给药后, 金黄扶正茶低、中、高剂量组 A 显著高于环磷酰胺组 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 金黄扶正茶对免疫抑制小鼠淋巴细胞增殖反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	T 淋巴细胞增殖 反应/A	B 淋巴细胞增殖 反应/A
正常对照	-	0.430 \pm 0.012 6	0.358 \pm 0.017 5
环磷酰胺	0.03	0.278 \pm 0.013 0 ²⁾	0.229 \pm 0.005 ²⁾
左旋咪唑	0.025	0.345 \pm 0.009 4 ⁴⁾	0.349 \pm 0.013 2 ⁴⁾
金黄扶正茶	1.27	0.314 \pm 0.011 1 ⁴⁾	0.321 \pm 0.006 5 ⁴⁾
	2.54	0.363 \pm 0.009 7 ⁴⁾	0.328 \pm 0.004 4 ⁴⁾
	5.08	0.405 \pm 0.013 9 ⁴⁾	0.341 \pm 0.013 3 ⁴⁾

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与环磷酰胺组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

3.2 对免疫抑制小鼠脾脏 NK 细胞、LAK 细胞活性的影响 与正常对照组比较, 环磷酰胺组 NK, LAK 细胞活性明显低于正常对照组 ($P < 0.05$); 给药后, 金黄扶正茶中、高剂量组 NK, LAK 细胞活性高于环磷酰胺组 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 2。

表 2 金黄扶正茶对免疫抑制小鼠 NK 细胞活性和 LAK 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	NK 细胞活性 /%	LAK 细胞活性 /%
正常对照	-	63.28 \pm 4.35	43.58 \pm 5.03
环磷酰胺	0.03	55.08 \pm 2.51 ¹⁾	35.37 \pm 4.56 ¹⁾
左旋咪唑	0.025	60.96 \pm 4.65 ⁴⁾	40.88 \pm 3.55 ³⁾
金黄扶正茶	1.27	57.90 \pm 5.79	39.84 \pm 4.08
	2.54	60.20 \pm 3.38 ⁴⁾	41.78 \pm 5.04 ³⁾
	5.08	61.07 \pm 4.70 ⁴⁾	41.98 \pm 4.48 ³⁾

3.3 对免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的影响 与正常对照组比较, 环磷酰胺组腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力明显低于正常对照组 ($P < 0.01$); 给药后, 金黄扶正茶中、高剂量组腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力高于环磷酰胺组 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 对免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 活力的影响 与正常对照组比较, 环磷酰胺组腹腔巨噬细胞

iNOS 活力明显低于正常对照组 ($P < 0.01$); 给药后, 金黄扶正茶低、中、高剂量组腹腔巨噬细胞 iNOS 活力明显高于环磷酰胺组 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 金黄扶正茶对免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红和 iNOS 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量 /g·kg ⁻¹	吞噬中性红 /A	iNOS /U·mL ⁻¹
正常对照	-	0.139 ± 0.008	5.94 ± 0.69
环磷酰胺	0.03	0.123 ± 0.008 ²⁾	2.92 ± 0.54 ²⁾
左旋咪唑	0.025	0.136 ± 0.011 ³⁾	5.70 ± 0.30 ⁴⁾
金黄扶正茶	1.27	0.129 ± 0.011	3.98 ± 0.21 ⁴⁾
	2.54	0.134 ± 0.008 ³⁾	4.33 ± 0.41 ⁴⁾
	5.08	0.137 ± 0.012 ³⁾	4.34 ± 0.72 ⁴⁾

4 讨论

淋巴细胞是体内免疫活性细胞, 淋巴细胞的增殖是机体免疫应答过程中的一个重要阶段。因此, 检测淋巴细胞增殖水平是细胞免疫研究的一种常用方法^[8]。NK 细胞是一类重要的免疫效应细胞, 它在机体的抗肿瘤非特异性免疫中发挥着重要作用。LAK 细胞是一类具有广谱抗瘤活性的杀伤细胞。脾脏是人体最大的周围淋巴样器官, 是淋巴细胞迁移和接受抗原刺激后发生免疫应答、产生免疫效应分子的重要场所^[9]。因此本研究通过检测脾脏中 T、B 淋巴细胞的增殖和 NK、LAK 细胞的活性来研究金黄扶正茶对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响。本研究结果显示, 有丝分裂原 ConA、LPS 刺激下, 金黄扶正茶可促进环磷酰胺所致免疫抑制小鼠的 T、B 淋巴细胞增殖反应。同时提高环磷酰胺所致免疫抑制小鼠 NK 细胞、LAK 细胞活性。这表明金黄扶正茶对免疫低下小鼠的细胞免疫功能有一定的促进作用。

巨噬细胞来是重要的免疫调节和效应细胞。具有吞噬消化、抗原递呈、介导炎症等功能, 活化的巨噬细胞有宿主防御功能^[10], 是参与特异性与非特异性免疫的重要细胞。巨噬细胞中的 NOS 系属于诱导型一氧化氮酶 (iNOS), 在免疫或炎症等因素的刺激下能释放出大量 NO。NO 属于巨噬细胞分泌的炎性物质, 体内的 NO 是由 NOS 合酶催化 L-精氨酸

氧化生成的, 属于信息分子又是细胞毒性分子, 参与免疫系统激活、诱导或调节基因活化等生物学过程^[11]。本研究分析了腹腔巨噬细胞的吞噬活性和巨噬细胞培养上清液 NOS 活力, 结果显示, 金黄扶正茶能显著增强免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活性, 提高 iNOS 的活力, 提示金黄扶正茶可以通过改变巨噬细胞的代谢过程提高其吞噬活性, 发挥非特异性细胞免疫功能。

[参考文献]

- [1] 刘华钢, 朱丹. 金黄 1 号对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(11): 1116.
- [2] 刘华钢, 韦斌斌, 王金科, 等. 金黄 1 号对 SARS 疑似患者免疫功能的影响[J]. 广西医科大学学报, 2005, 22(4): 516.
- [3] 刘华钢, 冷静, 朱丹. 金黄 1 号体外抗流感病毒作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(9): 44.
- [4] 朱丹, 刘华钢, 黄慧学. 金黄 I 号及组方药味体外抗流感病毒作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 181.
- [5] 王惠国. 安络小皮伞多糖的提取及其免疫调节作用研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学博士学位论文, 2008: 16.
- [6] 白吉庆, 贺新怀, 席孝贤. 姬松茸菌胞多糖对小鼠 NK、LAK 细胞活性影响的实验研究[J]. 陕西中医, 2007, 9(28): 1253.
- [7] 张志敏, 王建华, 赵兴华, 等. 苦马豆素对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(10): 3423.
- [8] 黄凯, 杨新波, 黄正明, 等. 金丝桃苷对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 解放军药学报, 2009, 25(2): 133.
- [9] 陈慰峰. 医学免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 8.
- [10] 雷萍, 陈文娜, 陈殿学, 等. 灰树花提取物对脾虚小鼠腹腔巨噬细胞和脾细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 207.
- [11] 潘会君, 唐宁, 华晓东, 等. 中药调控一氧化氮合酶-一氧化氮系统的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 202.

[责任编辑 聂淑琴]