

- [5] HAN W, ZHONG J, WANG Y F, et al. Development of poly (ADP-ribose)polymerase inhibitors for cancer therapy [J]. Chin J of New Drugs(中国新药杂志), 2011, 20(12): 1086-1091.

- [6] HUANG H, CAO Y, WU Y L, et al. Advances in research of PARP inhibitors in combination with chemotherapeutic agents in the treatment of malignant tumors [J]. Tumor(肿瘤), 2013, 33(4): 372-377.

收稿日期: 2013-11-26

不同剂量百令胶囊对环孢素 A 致肾病大鼠免疫功能的影响

田晓, 冯晓明(河北联合大学附属医院, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 观察百令胶囊对环孢素 A(cyclosporin A, CsA)大鼠免疫功能的调节作用。方法 SD 大鼠, ♂, 随机分为对照组、模型组、百令大、小剂量组, 每组 8 只。第 12 周末用流式细胞仪检测大鼠外周血 T 细胞亚群(CD4⁺、CD8⁺)、B 细胞(CD45RA⁺)及 NK 细胞(CD161a⁺)占淋巴细胞的百分比, 计算 CD4⁺/CD8⁺比例。ELISA 法测定外周血清中 IgG, IgM 含量。结果 模型组及百令大、小剂量组大鼠外周血中 CD4⁺与 CD8⁺百分比均稍高于对照组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。模型组 CD4⁺/CD8⁺比值显著低于对照组 ($P<0.05$), 百令大、小剂量组 CD4⁺/CD8⁺比值显著高于模型组 ($P<0.05$), 百令大剂量组 CD4⁺/CD8⁺比值显著高于百令小剂量组 ($P<0.05$), 其余各组间比较差异无统计学意义。与对照组比较, 模型组外周 B 细胞占淋巴细胞的百分比及血清 IgG、IgM 含量显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 百令大、小剂量组外周 B 细胞占淋巴细胞的百分比及血清 IgG、IgM 含量显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 百令大剂量组 B 细胞(CD3⁻CD45RA⁺) 比值显著高于百令小剂量组 ($P<0.05$)。结论 百令胶囊对 CsA 所致肾病大鼠免疫失调及低下具有调节和促进作用, 大剂量百令胶囊作用更明显。

关键词: 环孢素 A; 百令胶囊; 免疫功能

中图分类号: R692 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)06-0686-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.06.011

Effect of Different Doses of Bailing Capsule on Immune Function of Cyclosporine A Nephropathy Rats

TIAN Xiao, FENG Xiaoming(Hebei Union University Affiliated Hospital, Tangshan 063000, China)

ABSTRACT: **OBJECTIVE** To observe the regulatory effect of Bailing capsule on immune system of cyclosporine A rats, **METHODS** Male SD rats were randomly divided into control group, model group, small and large dosage of Bailing group ($n=8$). After 12 weeks, peripheral blood T cells subsets(CD4⁺, CD8⁺), B cells(CD45RA) and NK cells(CD161a⁺) were tested by flow cytometry, and CD4⁺/CD8⁺ ratio was calculated. Peripheral blood serum level of IgG, content of IgM was determined by ELISA. **RESULTS** The percentage of CD4⁺, CD8⁺ T cells lymphocyte in model group, small and large dosage of Bailing group were higher than control group, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$). The ratio of CD4⁺/CD8⁺ in model group was significantly lower than that in control group ($P<0.05$). The ratio of CD4⁺/CD8⁺ in small and large dosage of Bailing groups were significantly higher than that of model group ($P<0.05$). The ratio of CD4⁺/CD8⁺ in large dosage of Bailing group was significantly higher than that of small dosage of Bailing group. Compared with control group peripheral B cells percentage and serum IgG, IgM content of model group was significantly reduced ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with model group, peripheral B cells percentage and serum IgG and IgM content of large dosage of Bailing, small dosage of Bailing groups was significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). B cells(CD3⁻CD45RA⁺) ratio in large dosage of Bailing group was significantly higher than that in small dosage of Bailing group ($P<0.05$). **CONCLUSION** Bailing capsule has a positive effect on cyclosporine A rats immune system.

KEY WORDS: cyclosporin A; Bailing capsule; immune

环孢素 A(cyclosporin A, CsA)是广泛应用于肾移植后免疫抑制治疗的基础药物, 临床中应用于一些免疫性疾病, 但是该药有多方面的不良反

应, 其中以肾脏毒性最为严重。寻找能够拮抗 CsA 肾毒性的药物具有重要的临床意义。解放军肾病研究所以往的研究表明, 天然虫草和人工虫草对

CsA 引起的肾毒性都有良好的防治作用^[1-3]。此外多项研究表明百令胶囊可对机体的免疫器官、免疫细胞、免疫分子进行广泛调节,可刺激骨髓造血、使胸腺重量增加;增强 T、B、NK 等细胞活性;提升血清抗体滴度,刺激多种细胞因子的表达^[4];进一步辅助治疗患者肾病综合征^[5]。不同剂量的百令胶囊对 CsA 肾病大鼠免疫系统能否发挥其免疫调理作用?本研究从免疫系统出发,对百令胶囊的作用机制进行探讨。

1 材料

1.1 动物

32 只 SD 大鼠(清洁级),♂,10 周龄,体质量(220±7.5)g,河北联合大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(京)2009-0017。

1.2 药物

CsA 大鼠制备方法同文献^[1];CsA 剂型为静脉注射液,含量:50 mg·mL⁻¹;百令胶囊(杭州中美华东制药有限公司,批号:130619,规格:0.5 g·粒⁻¹);戊巴比妥钠(上海阳光生物技术有限公司,批号:20LX32)。

1.3 仪器与试剂

FACSCalibur 型流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)。

荧光标记的小鼠抗大鼠单克隆抗体(克隆号: HIS51): CD3、CD4、CD8a、CD45RA⁺、CD161a; 10 倍红细胞裂解液(批号:40401ES60);以上试剂均购自美国 Becton Dickinson 公司。兔抗大鼠 ELISA 试剂盒(美国 RB 公司,批号:P3030r)。

1.4 外周血血清 IgG、IgM 含量的测定

经大鼠腹主动脉取血,4℃静置 1 h,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离血清,于-30℃冰箱保存待测。测定时按 ELISA 试剂盒说明操作。

2 方法

2.1 分组及给药

大鼠随机分为对照组、模型组、百令小剂量组和百令大剂量组,每组 8 只。对照组:蒸馏水灌胃;模型组:CsA(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹)静脉给药,同时给予无钠及低钠(0.03%~0.05%),直至 4 周末,此后每天蒸馏水灌胃,共 12 周。百令组:在模型组基础上(4 周末),小剂量组和大剂量组每日下午分别灌胃给予百令胶囊 1.5, 4.5 g·kg⁻¹,共 12 周。

2.2 流式细胞仪检测外周血 T 淋巴细胞亚群、B

淋巴细胞及 NK 细胞

各组大鼠于实验第 12 周末,腹腔注射 2%戊巴比妥钠 0.2 mL·(100 g)⁻¹麻醉大鼠,剖腹后经腹主动脉取血,置于加有 K₂EDTA 抗凝的真空管中轻微颠倒 6~7 次,分别向 3 个标有 A、B、C 的流式细胞仪检测,专用试管底部加抗凝全血 50 μL,后 A、B、C 管中各加入 FITC 标记的 CD3 单克隆抗体 1 μg, A 管再加入 PE 标记的 CD4 及 Percp 标记的 CD8a 单克隆抗体各 1 μg, B 管再加 PE 标记的 CD45RA 单克隆抗体 1 μg, C 管再加 PE 标记的 CD161a 单克隆抗体 1 μg,混匀器混匀后避光室温孵育 30 min,每管加 1 倍红细胞裂解液 1 mL(10 倍红细胞裂解液用去离子水稀释,即用即配),混匀后避光室温孵育 10 min 左右至液体透亮,1 000 r·min⁻¹离心 5 min。弃上清液,每管加 PBS 溶液 2 mL,1 000 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清液,每管加 PBS 溶液 300 μL,混匀后即用流式细胞仪检测,对收集的数据进行分析。

2.3 外周血血清 IgG、IgM、IgA 含量的测定

经大鼠腹主动脉取血,4℃静置 1 h,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离血清,于-30℃冰箱保存待测。测定时按 ELISA 试剂盒说明操作。

2.4 统计学方法

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较均采用单因素方差分析(One way ANOVA),各组间两两比较采用 LSD 检验,取 $P=0.05$ 为检验水准。应用 SPSS 15.0 进行统计学处理。

3 结果

3.1 各组大鼠外周血 T 细胞亚群及 CD4⁺/CD8⁺比值

第 12 周末模型组及百令大、小剂量组大鼠外周血中 CD4⁺与 CD8⁺百分比均稍高于对照组,但差异无统计学意义。模型组 CD4⁺/CD8⁺比值显著低于对照组($P<0.05$),百令大、小剂量组 CD4⁺/CD8⁺比值显著高于模型组($P<0.05$),百令大剂量组 CD4⁺/CD8⁺比值显著高于百令小剂量组($P<0.05$),其余各组间比较差异无统计学意义,结果见表 1。

3.2 各组大鼠外周血 B 细胞(CD3⁻CD45RA⁺)及 NK 细胞(CD3⁻CD161a⁺)占淋巴细胞的百分比

第 12 周末大鼠外周血 B 细胞占淋巴细胞的百分比中,模型组显著低于对照组($P<0.05$),百令大、小剂量组显著高于模型组($P<0.05$),百令大剂量组显著高于百令小剂量组($P<0.05$),其余各组间差异

无统计学意义, 结果见表 2。

第 12 周末大鼠外周血 NK 细胞(CD3⁻CD161a⁺) 占淋巴细胞的百分比中, 各组差异无统计学意义, 结果见表 2。

表 1 各组大鼠外周血 T 细胞亚群及 CD4⁺/CD8⁺ 比值比较 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The comparison of peripheral T cells subset and CD4⁺/CD8⁺ ratio among different groups(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺ %	CD8 ⁺ %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
对照组	33.13±2.94	17.06±1.89	1.92±0.26
模型组	35.31±3.37	22.83±4.62	1.54±0.33 ¹⁾
百令小剂量组	37.02±7.47	22.49±3.05	1.64±0.39
百令大剂量组	42.98±6.95	21.03±4.76	2.04±0.27 ²⁾³⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾P<0.05; 与模型组比较, ²⁾P<0.05; 与百令小剂量组比较, ³⁾P<0.05

Note: compared with control group, ¹⁾P<0.05; compared with model group, ²⁾P<0.05; compared with small dosage of Bailing group, ³⁾P<0.05

表 2 各组大鼠外周血 B 细胞和 NK 细胞占淋巴细胞的百分比(n=8, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The comparison of peripheral B cells subset and NK cells among different groups(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	B 细胞占淋巴细胞百分比/%	NK 细胞占淋巴细胞百分比/%
对照组	16.41±3.08	5.36±2.37
模型组	10.46±1.99 ¹⁾	7.61±1.78
百令小剂量组	18.29±4.69 ²⁾	8.46±2.1
百令大剂量组	23.32±7.51 ²⁾³⁾	7.16±1.35

注: 与对照组比较, ¹⁾P<0.05; 与模型组比较, ²⁾P<0.05; 与百令小剂量组比较, ³⁾P<0.05

Note: compared with control group, ¹⁾P<0.05; compared with model group, ²⁾P<0.05; compared with small dosage of Bailing group, ³⁾P<0.05

3.3 各组大鼠血清 IgG、IgM 含量的比较

第 12 周末模型组大鼠血清 IgG、IgM 含量显著低于对照组(P<0.01), 百令大、小剂量组大鼠血清 IgG、IgM 含量显著高于模型组(P<0.05), 二者之间差异无统计学意义, 结果见表 3。

表 3 各组大鼠血清 IgG、IgM 含量的比较(n=8, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The comparison of serum IgG and IgM level among different groups(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	IgG/mg·mL ⁻¹	IgM/mg·mL ⁻¹
对照组	5.14±0.50	0.98±0.11
模型组	2.04±0.38 ¹⁾	0.73±0.07 ¹⁾
百令小剂量组	3.66±0.34 ²⁾	0.85±0.11 ²⁾
百令大剂量组	2.57±0.37 ²⁾	0.68±0.16 ²⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾P<0.01; 与模型组比较, ²⁾P<0.05

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.01; compared with model group, ²⁾P<0.05

4 讨论

CsA 抗免疫以细胞免疫为主, 而 T 细胞及自然杀伤细胞在免疫监视、杀伤靶细胞及免疫调节方面具有极其重要的作用^[6-8]。故本实验应用单克隆抗体和流式细胞术对 CsA 肾病大鼠外周血 T 细胞亚群和 NK 细胞进行检测, 了解其免疫状况。实验发现模型组及百令组大鼠外周血中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞及 NK 细胞百分比与对照组比较有增高趋势, 但组间差异无统计学意义, CD4⁺/CD8⁺ 比值模型组显著低于对照组(P<0.05), 经治疗百令大、小剂量组 CD4⁺/CD8⁺ 比值显著高于模型组(P<0.05), 提示 CsA 大鼠 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞数量无显著影响, 但可致 T 细胞亚群间失衡引起免疫调节功能的紊乱, 百令胶囊对 CsA 大鼠免疫功能有明显调节作用。

CD45RA 是大鼠 B 淋巴细胞的标志, B 淋巴细胞在骨髓中发育成熟, 主要功能是产生抗体介导体液免疫应答。IgG 是血清中含量最高的免疫球蛋白, 是再次免疫应答产生的主要抗体, 在体内分布广泛, 是机体抗感染的“主力军”^[9-11]; 血液中 IgM 以五聚体形式存在, 比 IgG 更易激活补体, 是初次体液免疫应答中最早出现的抗体, 是机体抗感染的“先头部队”。实验发现第 12 周仅模型组大鼠外周血 B 细胞、血清 IgG、IgM 含量显著低于对照组(P<0.05), 提示 CsA 抑制体液免疫功能。既往研究发现 CsA 大鼠同时存在骨髓微血管损伤及骨髓造血干细胞减少, 导致造血微环境破坏, 并且随病情进展骨髓造血组织面积逐渐减小, 从而推测 CsA 对体液免疫功能的抑制与其对骨髓损害有关^[12]。此外实验还发现百令大、小剂量组大鼠外周血 B 细胞、血清 IgG、IgM 含量均显著高于模型组(P<0.05), 提示百令胶囊可增强 CsA 大鼠体液免疫功能, 推测可能通过对造血微环境的调节及造血干细胞的保护而起作用。

上述观察, 初步反映了 CsA 对大鼠免疫功能确有影响, 尤其对体液免疫功能抑制显著, 并且发现百令胶囊不但对 CsA 大鼠肾间质纤维化有保护作用, 而且还可调节 CsA 大鼠免疫功能。但仅从 T 细胞亚群(CD4⁺、CD8⁺)、B 细胞、NK 细胞数量及外周血清 IgG、IgM 含量高低来判断 CsA 大鼠免疫功能及百令胶囊对其影响还很粗略。因为这些细胞群和亚群根据其表型和功能不同又可再分为若干亚群^[13]。如: CD4⁺ T 细胞受抗原刺激后

继续分化为 Th1、Th2、Th3 和 Th17 细胞,其中 Th1 主要介导细胞免疫和炎症反应;Th2 主要是诱导和促进 B 细胞介导的体液免疫应答。又如: B 细胞根据是否表达 CD5 分子,可分为 B-1 细胞和 B-2 细胞 2 个亚群, B-1 细胞属固有免疫细胞,无需 Th 细胞的辅助,可自发分泌低亲和力 IgM,能与多种不同的抗原表位结合,在免疫应答的早期发挥作用; B-2 细胞是分泌抗体参与体液免疫应答的主要细胞,在抗原刺激和 Th 细胞的辅助下,最终分化为浆细胞,产生高亲和力的抗体,行使体液免疫功能。此外,每个亚群的免疫效应功能与其分泌的细胞因子密切相关。如:Th1 分泌的 IFN- γ 可活化巨噬细胞,增强其杀伤已被吞噬的病原体的能力,还可增强 NK 细胞的杀伤能力;Th2 分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子可促进 B 细胞的增殖、分化和抗体的生成^[14]。机体内各细胞亚群及其分泌的细胞因子在免疫应答中相互协作,相互制约,从而维持机体内环境的稳定。因此 CsA 对机体免疫功能的影响及百令胶囊如何发挥免疫调节还要通过免疫器官、免疫细胞、免疫分子乃至基因水平进行不同层次的更进一步的研究。

REFERENCES

- [1] ZHAO X Z, LI L S. Experimental study on the protection of cordyceps sinensis from acute cyclosporine A nephrotoxicity [J]. Chin J Nephrol(中华肾脏病杂志), 1995, 11(1): 23-25, 62-63.
- [2] LIU L J, MA S Y, YUAN B R. The pharmacological action and clinical application of Bailing capsule [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2004, 26(6): 65-68.
- [3] XU H J, LI S Y. Pharmacological action and the research progress in lung diseases of Bailing capsule [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 32(20): 2777-2780.

- [4] ZHANG A H, LIU W H. Damage effects of VEGF on peritoneum [J]. Chin J Blood Purif(中国血液净化), 2006, 5(7): 379-381.
- [5] ZHANG J J, XIE S Y. Meta-analysis of the efficacy of Bailing capsules on primary nephrotic syndrome [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(8): 907-910.
- [6] ZHANG Y J, DAI H F, WANG X S. Clinical observation of Fufanglingni capsule in treating AIDS patients [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族医药杂志), 2011, 17(12): 168-170.
- [7] LUAN F L, ZHANG H, SCHAUBEL D E, et al. Comparative risk of impaired glucose metabolism associated with cyclosporine versus tacrolimus in the late posttransplant period [J]. Am J transplant, 2008, 8(9): 1871-1877.
- [8] CHEN J, LI L, WEN J, et al. Observation of efficacy and safety of convening the calcineurin inhibitor to sirolimus in renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy [J]. Transplant Proc, 2008, 40(5): 1411-1415.
- [9] TOMASZEWSKI J J, LARSON J A, SMALDONE M C, et al. Management of bladder cancer following solid organ transplantation [J]. Adv Urol, 2011, 2011: 256985.
- [10] ZENG L, BLAIR E Y, NATH C E, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in children and young people undergoing blood off marrow and solid organ transplantation [J]. Br J Clin Pharmacol, 2010, 70(4): 567-579.
- [11] WANG F, SHI R, ZHAO L. Expression and significance of TGF- β 1 and VEGF in rabbit corneal neovascularization after corneal stitch [J]. Rec Adv Ophthalmol(眼科新进展), 2008, 28(2): 96-99.
- [12] SHANG M H, YUAN W J, ZHANG S J, et al. Intrarenal activation of renin angiotensin system in the development of cyclosporine A induced chronic nephrotoxicity [J]. Chin Med J(Engl), 2008, 121(11): 983-988.
- [13] ATAKAN A, ARIKAN H, MACUNLUOGLU B, et al. Renal protective effect of leukotriene receptor blockers in an experimental model of cyclosporine nephrotoxicity [J]. Transplant Proc, 2008, 40(1): 279-284.
- [14] LIN S Z, XU X Z, TONG H F, et al. Inhibitory effect of emodin on rejection following orthotopic liver transplantation in rats [J]. Chin J Organ Transplant(中华器官移植杂志), 2008, 28(3): 147-149.

收稿日期: 2013-06-09

鹰嘴豆异黄酮提取物对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆能力及其海马内 TNF- α 、IL-6 表达的影响

韩海红¹, 马剑茵²(1.浙江省舟山医院, 浙江 舟山 316021; 2.浙江海洋学院, 浙江 舟山 316022)

摘要: 目的 探讨鹰嘴豆异黄酮提取物(CIE)对阿尔茨海默病(AD)炎症模型大鼠记忆能力的影响,并探讨其可能的作用机制。方法 采用脂多糖右侧海马注射制备 AD 模型,40 只 Wistar 大鼠随机分为 CIE 高、中、低剂量组(100, 50, 25 mg·kg⁻¹)、模型组和对照组(生理盐水),灌胃给药 28 d 后,采用 Y-迷宫测试大鼠的学习记忆能力,采用免疫组化法检测大鼠海马内肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和细胞白介素-6(IL-6)的表达。结果 与对照组比较,模型组大鼠学习记忆能力明显下降,尝试次