

蠲毒片对小鼠免疫系统的影响

耿东升 张文斌 周 军 赵汝海(乌鲁木齐 830063 新疆军区联勤部药品仪器检验所)

摘要 目的: 观察蠲毒片(Juandupian, JDP)对小鼠免疫系统的作用。方法: 用乙肝宁颗粒做对照, 监测 JDP 对小鼠体外巨噬细胞吞噬作用和淋巴细胞转化作用及在一周内对小鼠免疫器官重量、碳粒廓清和 HC_{50} 试验的影响。结果: JDP 抑制小鼠体外巨噬细胞吞噬和淋巴细胞转化作用, 减轻小鼠胸腺重量, 碳粒廓清作用未见明显增加, 可增强 HC_{50} 反应。结论: JDP 对正常小鼠免疫系统有双相调节作用。

关键词 蠲毒片; 免疫; 小鼠

作者简介: 耿东升(1959-), 男, 河北邢台人, 医学硕士, 主任药师。中国药学会及药理学会会员。

Effects of Juandupian on immune system in rats

Geng Dongsheng, Zhang Wenbin, Zhou Jun, Zhao Ruhai(Institute for Drugs and Instrument Control of Xinjiang Command, Urumqi; 830063)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To observe the effects of Juandupian JDP on immune system in rats. **METHOD:** Comparing with YiganNing granulation, the effects of (JDP) on peritoneal macrophages phagocytosing, lymphocyte transformation *in vitro*, the weight of immune organs, the clearance rate of iv charcoal particles and HC₅₀ in rats had been determined. **RESULTS:** The effects of peritoneal macrophages phagocytosing and lymphocyte transformation were inhibited. The weight of the immune organs of rats were decreased. The clearance rate of charcoal particles was generally not enhanced. Reactions of HC₅₀ were significantly increased. **CONCLUSION:** There are bidirectional adjusting effects of JDP on immune system in rats.

KEY WORDS Juandupian, immune, rats

JDP 是由西洋参、羚羊角、车前草、赤芍、蒲公英等组成的纯中药制剂, 临床用于治疗乙型肝炎, 为了进一步阐明其药理作用, 根据乙型肝炎具有免疫反应特征, 故研究其对免疫系统的影响。

1 试验材料

1.1 药物与试剂

JDP 由乌鲁木齐齐珍中西医结合门诊部提供, 灌胃前用水配成 10% 的混悬液, 相当于原药材 0.3g/ml。体外试验用 0.5% CMC-Na 助悬配成 1:100 储备液备用, 临用前稀释成 1:1000, 1:10000 和 1:100000。乙肝宁颗粒(湖南九芝堂股份有限公司, 批号 000913), 灌胃前配成 50% 的浓度, 体外试验配成 1:10000 浓度备用。RPMI-1640 培养基, 美国 Life Technologies Inc. 产品。HEPES, 德国 E. Merck 产品。刀豆素 A (Concanavalin A, ConA), 美国 Sigma Chemical Co. 产品。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)美国 Sigma Chemical Co. 出品。新生牛血清(new born calf serum, NCS), 新疆种牛场出品, 用前 56℃ 灭活 30min。³H-TdR 740 GBq·mmol⁻¹(中国原子能科学研究所出品)。碳素墨汁, 上海墨水厂出品。白葡萄球菌, 新疆卫生防疫站提供, 用生理盐水(NS)洗下备用。G-49 型玻璃纤维滤膜, 上海红光造纸厂出品, 绵羊红细胞(SRBC)和豚鼠血清均购于新疆维吾尔自治区医学实验动物中心。

1.2 仪器

96 孔细胞培养板(COSTAR, corporation, USA)。二氧化碳孵箱, 日本产。液体闪烁仪 LKB-121 型, Finland 产。天平 JA5003, 上海天平仪器厂产, UV-240 紫外可见分光光度计, 日本岛津产。

1.3 动物

昆明种小鼠, 新疆维吾尔自治区医学实验动物中心提供, 雌雄兼用, (21±2)g。

2 方法与结果

2.1 对小鼠腹腔巨噬细胞(peritoneal Macrophages, PMΦ)吞噬功能的影响

取小鼠 5 只, 每鼠 ip 0.2% 的无菌肝糖原 1.0, 2d 后, 脱颈处死, 每鼠 ip RPMI-1640 营养液(内含 15% NCS,

HEPES 20mmol·L⁻¹, NaHCO₃ 24mmol·L⁻¹, 丙酮酸钠 100mmol·L⁻¹) 2ml, 轻揉其腹部, 将腹部剪一小口, 吸取腹腔液(内含腹腔巨噬细胞(PMΦ)) 1ml, 用 RPMI-1640 营养液调整 PMΦ 浓度至 3×10⁶·L⁻¹, 取 PMΦ 0.001, 白葡萄球菌液(在 λ=620nm 处用 NS 调 A 至 0.5, 再稀释 32 倍) 100μl 及药液 100μl 混匀加入 96 孔培养板内, 分为无巨噬细胞组(NO PMΦ)(菌液+药液)和生理盐水(NS PMΦ+菌液+NS)空白对照组、乙肝宁阳性对照组(PMΦ+菌液+乙肝宁)以及不同浓度的 JDP 组(PMΦ+菌液+JDP)。在 37℃ 二氧化碳孵箱温育 1h, 各孔加 ³H-TdR 37kBq, 继续温育 1h, 滤膜法测定 dpm, 并按下式计算吞噬指数(Phagocytosis index, PI) PI(%)=[1-(实验孔 dpm/空白孔 dpm)]×100^[1]。结果见表 1。

表 1 解毒片对小鼠巨噬细胞体外吞噬作用的影响

组别	n	浓度(g·L ⁻¹)	dpm	PI(%)
NO PMΦ	6		2977.4±265.9	
NS	6		908.4±242.5	68.70±11.89
乙肝宁	6	0.1	1731.2±560.7 ¹⁾	40.06±25.91
JDP	6	0.01	2113.0±713.8 ²⁾	27.16±32.17
JDP	6	0.1	1612.4±223.1 ²⁾	45.43±9.68
JDP	6	1	1601±211.0 ²⁾	45.60±10.66

¹⁾P<0.05 ²⁾P<0.01 与 NS 组比较

2.2 对小鼠脾脏 T、B 淋巴细胞转化的影响

取小鼠 5 只, 脱颈处死, 取出脾脏, 用 Hank's 液将其制成组织匀浆并洗涤离心 3 次, 用 RPMI-1640 营养液调整细胞悬液浓度至 5×10⁶·L⁻¹。将此细胞悬液分别加入 2 块 96 孔板中, 每孔加细胞悬液 100μl 及不同的处理因素使总体积为 300μl。每块板均分无脾细胞即 NO Spleen 和脾细胞、处理因素为 NS 的 NS 空白对照组以及脾细胞+乙肝宁的阳性对照和脾细胞+JDP 组。除 NO Spleen 组外, 两块板分别以终浓度为 5mg·L⁻¹ Con A 和 20mg·L⁻¹ 的 LPS 作为对照组和 JDP 组有丝分裂原, 在 37℃ 二氧化碳孵箱温育 66h, 各孔加 ³H-TdR 37KBq, 继续温育至 72h, 滤膜法测定 dpm, 并计算 JDP 对淋巴细胞转化的抑制率(depressive rate, DR), DR(%)=[1-(实验孔 dpm/NS 对照孔 dpm)]×100^[1]。结果见表 2。

表 2 罂毒片对小鼠脾淋巴细胞体外转化的影响

药物浓度 (g·L ⁻¹)	n	dpm	DR (%)
NO Spleen	6	195±52.8	
NS	6	38217.4±6248.2	
乙肝宁(0.1)	6	5483.8±452.1 ¹⁾	85.7±1.2
JDP(0.01)	6	11290.4±4708.1 ¹⁾	70.5±12.3
JDP(0.1)	6	8303.6±2186.9 ¹⁾	78.3±5.7
JDP(1)	6	2552.0±946.2 ¹⁾²⁾	93.3±2.5
NO Spleen	6	195.8±52.8	
NS	6	6328.4±1321.7	
乙肝宁(0.1)	6	2451.8±971.3 ¹⁾	61.3±15.3
JDP(0.01)	6	5922.4±1260.3 ¹⁾	6.4±19.9
JDP(0.1)	6	5001.0±1066.7 ¹⁾	21.0±16.9
JDP(1)	6	4392.8±1015.2 ¹⁾²⁾	306±19.2

¹⁾P<0.01 与 control 组比较 ²⁾P<0.05JDP0.01 与 1 组比较

2.3 对小鼠免疫器官重量的影响

取小鼠 40 只,依体重均衡随机分为 NS 组、乙肝宁组和不同剂量的 JDP 组,ig 给药后 24h 称胸腺和脾脏重量,并根据体重计算胸腺和脾指数,即胸腺(或脾脏)重量/体重,结果见表 3。

表 3 罂毒片对小鼠免疫器官重量的影响

组别	n	给剂量为 (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	脾指数	胸腺指数
NS	8		6.52±1.29	3.54±0.88
乙肝宁	8	2.8	6.78±0.81	2.86±0.74
JDP	8	0.6	6.69±2.02	2.02±1.03 ¹⁾
JDP	8	1.2	6.26±1.06	3.09±1.00
JDP	8	2.4	6.89±3.24	2.36±0.85 ¹⁾

注:为了共同提高数值,表中脾指数及胸腺指数均做×1000 处理;¹⁾P<0.05 与 NS 组比较

2.4 对小鼠碳粒廓清作用的影响

取小鼠 50 只,依体重均衡随机分为 NS 组、乙肝宁组和不同剂量的 JDP 组,ig 给药 7d,末次给药后 24h,每鼠尾 iv 碳素墨汁 0.2ml,2 和 15min 后,分别由眼后静脉丛取血 20μl,溶于 2ml 0.1%Na₂CO₃ 溶液中,静置 24h,650nm 处测吸收度(A),计算廓清指数 K=(logA₁-logA₂)/(t₂-t₁)及校正廓清指数 α=³ K×体重/(肝重+脾重)^[2],结果见表 4。

表 4 罂毒片对小鼠碳粒廓清的影响

组别	n	剂量 (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	K 值	α
NS	10		17.36±4.46	4.21±0.50
乙肝宁	10	2.8	20.95±3.56	4.76±0.78
罂毒片	10	0.6	22.66±5.96	4.81±0.35 ¹⁾
罂毒片	10	1.2	20.59±7.50	4.42±0.94
罂毒片	10	2.4	23.23±4.99	4.01±0.41

注:为了共同提高数值和消除实验仪器出现的负值结果,表中 K 值做 K×1000+20 处理;¹⁾P<0.05 与 NS 组 α 值比较

2.5 对小鼠血清溶血素(serum hemolysis concentration 50%,HC₅₀)的影响

取小鼠 50 只,分组同上,ig 给药 7d。给药第三天用 SRBC 致敏,末次给药后 24h,取小鼠血清按 1:100,1:200,1:400 三个浓度稀释,每个稀释度重复 5 份,以稀释鼠血清 1ml,加 5%SRBC0.5ml 及 1:10 稀释的豚鼠血清 1ml,37℃ 温育 20min,孵毕,放入冰浴终止反应,2000r/min 离心 10min,取上清液 1ml,加都氏试剂 3ml,放置 10min 后,在 540nm 处测定吸收度。另取空白和 SRBC 半数溶血对照管,并计算 HC₅₀,HC₅₀=(样品的吸收度值/SRBC 半数溶血时的吸收度值)×稀释倍数^[2],结果见表 5。

表 5 罂毒片对小鼠血清溶血素(HC₅₀)影响

组别	剂量 (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	n	HC ₅₀		
			1:100	1:200	1:400
NS		5	44.25±3.49	81.31±5.35	123.77±1.32
乙肝宁	2.8	5	47.36±0.98	79.69±1.70	121.69±8.24
罂毒片	0.6	5	47.29±0.99	95.00±1.69 ²⁾	150.38±8.74 ²⁾
罂毒片	1.2	5	49.12±1.51 ¹⁾	93.15±6.09 ¹⁾	180.69±13.49 ²⁾
罂毒片	2.4	5	49.40±1.69 ¹⁾	91.58±2.34 ²⁾	113.31±13.40

¹⁾P<0.05 ²⁾P<0.01 与 NS 组比较

细胞培养实验表明,罂毒片明显抑制小鼠 PMΦ 对白葡萄球菌的吞噬功能和 T、B 淋巴细胞的转化作用,而且后者还显示一定的浓度依赖性。整体试验发现对小鼠胸腺的重量有一定的抑制作用;对小鼠碳粒廓清试验,K 值增加不明显,罂毒片在 HC₅₀ 试验表现出明显的增强作用,且作用优于乙肝宁组。

3 讨论

乙型肝炎属于免疫性肝炎的一种类型,当发生肝细胞损伤时往往是免疫反应所致。因此抑制免疫尤其是过激的免疫反应,进而减轻炎症,是乙型肝炎发作的治疗对策。罂毒片抑制吞噬细胞的吞噬和淋巴细胞转化功能,可能抑制了早期炎症对肝细胞的损伤作用。同时在炎症后期,促进损害的肝细胞修复,增强机体的抵抗力和免疫力又是治疗的另一对策。整体研究(给药 7d 后),小鼠 HC₅₀ 反应明显增强,反映机体抗体水平有明显增高,这可能是机体特异免疫力恢复和提高的信号。

本试验对急性反应的观察还不够全面,尚缺乏“肝炎鼠”治疗后免疫反应对照和给药周期长短的比较,需在进一步的试验中加以补充。

参考文献

1 耿东升,刘发,刘学彬等.硫酸黄连毒对免疫系统的影响.中国药理学通报,1996,12(6):536.
2 徐叔云,卞如濂,陈修主编.药理试验方法学二版.北京:人民卫生出版社,1991,1231.

收稿日期:2001-08-07