

含蝉翼藤大鼠血清的免疫调节作用

李勇文¹,李丽¹,梁荣感¹,徐庆¹,张士军²(1.桂林医学院基础医学院,广西 桂林 541001;2.广西医科大学药理教研室,南宁 530021)

摘要:目的 探讨蝉翼藤(CYT)对小鼠细胞免疫功能的调节作用。方法 以昆明小鼠为研究对象,以 Wista 大鼠含药血清为药物,通过体外给药来测定脾淋巴细胞转化率。结果 蝉翼藤可以增强正常小鼠的免疫功能,拮抗环胞素 A 引起的免疫功能低下和免疫正向调节作用。结论 蝉翼藤是一种有效的免疫增强剂,对免疫正向调节维持机体的正常免疫功能起重要作用。

关键词:蝉翼藤;淋巴细胞转化;正向调节

作者简介:李勇文,男,硕士,讲师

Tel:13878169054

E-mail:LiYongWen99@Yahoo.com.cn

Studies on Immune-Regulating Effects of Rat's Serum Containing *Securidaca inappendiculata*

LI Yong-wen¹, LI Li¹, LIANG Rong-gan¹, XU Qing¹, ZHANG Shi-jun² (1. The College of Basic Medical Sciences, Guilin Medical College, Guilin 541001, China; 2. Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the up-regulating effects of *Securidaca inappendiculata* Hassk to cellular immunity in Mice. **METHODS** Determining the spleen lymphocyte transformation rate in mice with the serum containing CYT of Wistar rats inappendiculata Hassk. **RESULTS** *Securidaca inappendiculata* Hassk improved the immune function in healthy mice, inhibited the immune-deficiency caused by Cyclophosphamide and has up-regulated effects on the cell-immunity. **CONCLUSION** *Securidaca inappendiculata* Hassk is a kind of effective immunopotentiator, it plays an important role in up-regulating the cell-immunity and holding the formal immune function.

KEY WORDS: *Securidaca inappendiculata* Hassk; lymphocyte transformation; up-regulation

蝉翼藤 (*Securidaca inappendiculata* Hassk.) 为远志科、远志族蝉翼藤属攀援灌木, 分布于印度、缅甸、越南、印度尼西亚和马来西亚, 我国产于广东、海南、广西和云南^[1]。其药理作用尚未见报道。为了进一步探讨其免疫调节作用的机制, 笔者对蝉翼藤 (CYT) 增强正常小鼠的免疫功能, 拮抗环孢素 A 引起的免疫功能低下和免疫正向调节作用进行了实验研究, 旨在为临床应用提供依据。目前, 在中药血清药理学实验中, 多选用大鼠、家兔、豚鼠等正常动物来制备含药血清, 制备血清的动物应与获取离体器官、组织、细胞的动物相一致, 从而缩小或避免动物血清之间, 以及动物血清和血清之间在理化、生物等特性上的差异, 减少因种属差异而造成的免疫反应, 提高实验结果的可靠性。大鼠能够采集到足够的血清满足本实验需要, 因此我们选用大鼠来制备含药血清。

1 材料和方法

1.1 动物

昆明小鼠体重 19~20 g, 雄性, 购自广西医科大学实验动物中心 (许可证号: 桂动许字 2000 第 001 号)。

1.2 试剂

RBMI 1640 细胞培养液: 美国 Gibco 公司, Cat No 13200-035; 刀豆蛋白 (ConA): 瑞士 Fluka 公司; 环孢素 A (CysA) 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$: 华北制药集团; 无菌 Hanks 液: 圣东生物科技发展有限公司; 四甲基偶氮唑盐: Sigma 公司; 盐酸: 天津化学试剂三厂; 异丙醇: 天津天新精细化工开发中心; 胎牛血清: 美国 Gibco 公司, Cat No 16000-036; 生理盐水: 天津市氨凌药业有限公司; 乙醇: 天津化学试剂有限公司。

1.3 仪器

超净工作台: 上海浦东跃欣科学仪器厂, SZX 型; 倒置显微镜: 南京江南光电集团股份有限公司, XD-101 型; CO_2 孵箱: 美国 Thermo Forma 公司, Mode B11; 细胞计数板: 上海医用光学仪器厂一分厂; 离心机: 上海安亭科学仪器厂, TDL-5; 96 孔培养板: 加拿大 JET 公司; 酶标仪: BIO-RAD 公司, Model 450。

1.4 方法^[2-4]

1.4.1 含药血清的制备 采用血清药理学方法进行实验, 制备含药血清的方法如下: 三月龄 Wistar 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体重 (250 $\pm$ 30) g, 随机分为 4 组, 每组 10 只。①无药空白血清对照组: 等量的生理盐水; ②CYT 大剂量组: 10.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; ③CYT 中剂量组: 5.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; ④CYT 小剂量组: 2.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。各组动物在同样条件下饲养, 均以每日 2 次, 早晚各 1 次空腹灌胃连续给药 7 d。于末次灌胃 (灌胃前禁食不禁水 12 h) 后 2 h, 乙醚吸入麻醉, 腹主动脉抽血, 低速离心分离血清, 并将同组动物的血清混合。经 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 灭活处理, 经 0.45 μm 的微孔滤膜, 再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.4.2 小鼠脾细胞的收集 通过算出细胞总数, 计算所需加入 RPMI 1640 (10% FCS) 体积, 以调整到需要浓度。

1.4.3 ConA 溶液的配制 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.4.4 加 96 孔培养板 向 96 孔培养板中分别加入 ConA (每孔 50 μL)、药物血清 (每孔 50 μL)、环孢素 A (每孔 10 μL)、脾细胞悬液 (每孔 100 μL) 及无酚红的 RP-MI 1640 (10% FCS) (每孔 10~50 μL)。A96 孔板加好样后, 放入到 CO_2 孵箱中, 孵育 68 h。加入 MTT 再孵育 4 h 然后加入 1:300 的盐酸异丙醇溶液 100 μL , 混匀后, 振摇。

1.4.5 测定 将 96 孔培养板放到酶标仪内测定。

1.5 实验分组

①无药血清组: 分为空白组、ConA 组、ConA + CysA 组; ②高剂量含药血清组: 分为 ConA 组、ConA + CysA 组; ③中剂量含药血清组: 分为 ConA 组、ConA + CysA 组; ④低剂量含药血清组: 分为 ConA 组、ConA + CysA。

2 结果

采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。所有实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

通过表 1 结果可以看出, 单加 ConA 组比无药血清空白组的 A 值高, 给药 ConA 组要比空白血清 ConA 组的 A 值高, 高剂量含药血清组最为显著, 说明该药可以增强免疫功能。加入 CysA 组相对比单加 ConA 组的 A 值低, 但比无药血清

表 1 含蝉翼藤大鼠血清对小鼠脾淋巴细胞转化的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 The effect of CYT-containing serum at different dilution on the mice spleen cells proliferation($n=8, \bar{x} \pm s$)

组 别	吸光度 A值	刺激指数	CysA抑制率
无药空白血清组	0.205 2 ±0.047 0		
空白血清 +Con A组	0.303 6 ±0.068 0 ¹⁾	0.479 5 ±0.194 3	
高剂量含药血清 +Con A	0.585 4 ±0.064 0 ¹⁾	1.852 8 ±0.312 5	
中剂量含药血清 +Con A	0.459 7 ±0.052 3 ¹⁾	1.240 3 ±0.371 5	
小剂量含药血清 +Con A	0.416 3 ±0.068 6 ¹⁾	1.028 8 ±0.312 1	
空白血清 +Con A +CysA组	0.226 9 ±0.042 7	0.105 8 ±0.201 1	0.289 7 ±0.101 2
高剂量含药血清 +Con A +CysA	0.397 4 ±0.067 5 ²⁾	0.936 6 ±0.423 6	0.232 6 ±0.101 5
中剂量含药血清 +Con A +CysA	0.299 7 ±0.037 1 ²⁾	0.460 5 ±0.223 8	0.272 1 ±0.131 6
小剂量含药血清 +Con A +CysA	0.225 4 ±0.035 3	0.098 5 ±0.196 3	0.262 5 ±0.152 3

注:在 Con A组中,各组与无药空白血清组比较;在 Con A +CysA组中,各组与空白血清组比较,¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$

Note: In the groupes of Con A, each group compare with the Non-medicine-blood-serum group respectively; and in the groupes of Con A +CysA, each group compare with the Blank-blood-serum group respectively, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$

空白组的 A值高,给药组比空白血清组的 A值高,说明该药可以拮抗环孢素 A引起的免疫功能低下并具有免疫正向调节作用。综上所述表明:①蝉翼藤可以增强正常小鼠的免疫功能,拮抗环孢素 A引起的免疫功能低下和免疫正向调节作用。②蝉翼藤在给药大剂量组血清对淋巴的刺激指数最高,Cys A抑制率最低,CYT高,中、低剂量组之间有一定的量效依赖关系。其机制尚待进一步探究。

3 讨论

实验通过含药大鼠血清作为药物来观察蝉翼藤对小鼠脾淋巴细胞转化率的影响,为进一步研究蝉翼藤对小鼠体内免疫增强的机制,本实验通过采用环孢素 A免疫抑制剂加入脾淋巴细胞中,建立免疫功能低下细胞模型来观察蝉翼藤对免疫抑制淋巴细胞免疫功能的影响。实验证明:蝉翼藤能使免疫功能低下的脾淋巴细胞数明显增加,同时淋巴细胞转化率提高。由此可见,蝉翼藤可能是一种有效的免疫增强剂,对免疫正向调节、维持机体的正常免疫功能起重要作用。

REFERENCES

[1] Kunming Institute of Botany, Chinese Academ y of Sciences. Flora of Yun Nnan(云南植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1983: 261.

[2] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. Immunol Methods, 1983, 65(1-2): 55-63.

[3] ZHENG Y T, BEN K. Use of assay for the detem ination of cell viability and proliferation [J]. Immunology J(免疫学杂志) , 1992, 8(4): 266.

[4] CUI X L, HE Y Z, GAO Y J. The new thought on study of the Chinese traditional medical pharmacology- Chinese Serum Pharmacology [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技) , 1997, 4(4): 239.

收稿日期: 2006-08-01