

土茯苓对环孢素 A 诱导的免疫抑制小鼠免疫功能的影响

夏琦¹, 邓时贵¹, 卢传坚², 赵瑞芝^{1*} (1.广州中医药大学第二附属医院, 广州 510006; 2.广东省中医证候临床研究重点实验室, 广州 510006)

摘要: 目的 探讨土茯苓水提液对环孢素 A 诱导的免疫抑制小鼠免疫功能的影响。方法 小鼠腹腔注射环孢素 A 5 d 致免疫抑制模型, 造模成功后随机分为模型组、左旋咪唑组(3.79 g·kg⁻¹, 阳性药)和土茯苓低、中、高剂量组(4.55, 9.1, 13.65 g·kg⁻¹)(n=16), 连续给药治疗 5 d 后, 处死小鼠, 取脾、胸腺, 称重计算脾指数和胸腺指数, 流式细胞术检测 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺; 酶联免疫吸附法检测 IL-2, IL-6, IFN- γ 。结果 造模后小鼠脾指数显著高于正常对照组(P<0.05), 胸腺指数明显降低, 脾 T 细胞 CD3⁺CD4⁺显著降低(P<0.05); 与模型组比较, 各治疗组小鼠脾指数均有不同程度降低, 土茯苓水提液中剂量组差异显著(P<0.05), 但胸腺指数无显著变化; 左旋咪唑组、土茯苓中、高剂量组脾 T 细胞 CD3⁺CD4⁺数目显著增加(P<0.01), 各治疗组脾脏 IFN- γ 均显著下降(P<0.05)。结论 土茯苓水提液能通过降低脾指数、增加脾 T 细胞 CD3⁺CD4⁺ 的数目, 增强机体免疫功能, 并下调脾脏内较高的 IFN- γ , 其调节机制可能与左旋咪唑类似。

关键词: 土茯苓; 免疫; T 细胞; 环孢素 A

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)21-2638-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.21.003

引用本文: 夏琦, 邓时贵, 卢传坚, 等. 土茯苓对环孢素 A 诱导的免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(21): 2638-2642.

Effect of Smilacis Glabrae Rhizoma on the Immune Function of Immunosuppressive Mice Induced by Cyclosporin A

XIA Qi¹, DENG Shigui¹, LU Chuanjian², ZHAO Ruizhi^{1*} (1.Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2.Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of Smilacis Glabrae Rhizoma on immune cells in immunosuppressive mice model. **METHODS** The model was induced by intraperitoneal injection of cyclosporin A. After 5 d of modeling, the model was successful, modeled mice was randomly divided into model control group, levamisole treatment group(3.79 g·kg⁻¹, positive control group) and Smilacis Glabrae Rhizoma low, medium, high dose(4.55, 9.1, 13.65 g·kg⁻¹) treatment group (n=16). After 5 d treatment, mice were sacrificed and tissues were collected, spleen and thymus were weighted, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ amount were detected by flow cytometry, IL-2, IL-6, IFN- γ were detected by Elisa. **RESULTS** Compared with normal control group, spleen index increased significantly(P<0.05), thymus index and CD3⁺CD4⁺ amount in spleen(P<0.05) were decreased in model group. Compared with the model control group, the spleen index of mice in each treatment group was decreased to varying degrees, and the difference in the Smilacis Glabrae Rhizoma medium treatment group was significant, the CD3⁺CD4⁺ amount in spleen T cells was significantly increased in levamisole group, Smilacis Glabrae Rhizoma medium and high treatment group (P<0.01), then IFN- γ in spleen was significantly decreased in each treatment groups(P<0.05), while the thymus index did not change significantly. **CONCLUSION** Smilacis Glabrae Rhizoma could enhance the immune function by increasing the number of CD3⁺CD4⁺, decreasing IFN- γ in spleen and the regulate mechanism may be similar way of levamisole.

KEYWORDS: Smilacis Glabrae Rhizoma; immune; T cell; cyclosporin A

土茯苓为百合科光叶菝葜属植物光叶菝葜(*Smilax glabra* Roxb.)的根茎, 具有解毒, 除湿, 通利关节的功效, 常用于治疗银屑病、湿疹、痛风、慢性肾炎等疾病^[1]。广东地区常利用其祛湿功

能调节体质。有文献报道湿证体质患者免疫功能降低^[2], 笔者猜测土茯苓可能具有免疫促进活性, 因此本研究利用环孢素 A 制备免疫抑制模型, 探讨土茯苓对模型动物免疫功能的影响, 以期土茯苓

基金项目: 国家中医药管理局国家中医临床基地项目(JDZX2015206); 广东省自然科学基金项目(S2013030011515); 广东省中医院中医药科学技术研究项目(YN2016MJ08)

作者简介: 夏琦, 女, 硕士生 Tel: (020)39318571 E-mail: 13726752708@163.com *通信作者: 赵瑞芝, 女, 博士, 研究员 Tel: (020)39318571 E-mail: 13610241754@163.com

苓的进一步开发提供支持。

1 材料

1.1 动物

SPF 级昆明小鼠, 体质量 18~22 g, ♀。动物均来自南方医科大学实验动物中心, 生产许可证号: SYXK(粤)2011-0015; 动物批号: 44002100 012023。

1.2 药品与试剂

土茯苓饮片(康美药业股份有限公司, 产地为广西, 批号: 150310211); 环孢素 A 软胶囊(杭州中美华东制药有限公司, 批号: 170823); 左旋咪唑(纯度>98%, 美伦生物有限公司, 批号: A0320A); 红细胞裂解液 10×(BD Biosciences, 批号: 6253805); PBS 磷酸缓冲盐(pH 7.2~7.6, 博士德生物工程有限公司, 批号: 11C16B30); 蛋白酶抑制剂(美国 Calbiochem, 批号: 2740141); RIPA 裂解液(Cell Signaling, 批号: 13); 小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(RayBio, 批号: 1117170413); 小鼠 IL-2 ELISA 试剂盒(RayBio, 批号: 1229170409); 小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒(RayBio, 批号: 0602171106); PE 偶联小鼠 CD3e 抗体(BD Biosciences, 批号: 7090848); FITC 偶联抗小鼠 CD4 抗体(BD Biosciences, 批号: 6110899); PE 偶联抗小鼠 CD8a 抗体(BD Biosciences, 批号: 7132789)。

1.3 仪器

Elix5 型超纯水机(美国 Millipak); FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD); 5418R 型高速冷冻离心机(Eppendorf); BX41 型正置显微成像仪(Olympus); VICTOR X5 型酶标仪(Perkin Elmer 公司)。

2 方法

2.1 试药和试剂的配制

取土茯苓饮片, 破碎至 2 cm² 大小, 加 10 倍量水回流提取 3 次, 每次 1 h。合并提取液, 浓缩并分别配制为 1.365, 0.91, 0.455 g·mL⁻¹ 药液, -20 °C 冰箱保存备用。用医用酒精及生理盐水配成 9% 酒精剂溶解环孢素 A 微乳, 浓度为 2 mg·mL⁻¹ 作为造模剂, 用前配制; 取左旋咪唑粉末于避光容器, 双蒸水溶解, 配成 0.379 mg·mL⁻¹ 阳性药溶液, 避光保存于 4 °C 冰箱, 待用。将 PBS 加 1% 灭活小牛血清和 0.1% 叠代化钠, 配制后过 0.45 μ m 滤膜, 得 Staining buffer 溶液, 预冷待用。

2.2 模型制备与给药

96 只小鼠随机分为正常对照组、模型组、左旋咪唑组(阳性对照组, 3.79 mg·kg⁻¹ 隔日 1 次)和土茯苓水提液高、中、低剂量组(13.65, 9.1, 4.55 g·kg⁻¹, 每日 1 次), 每组 16 只。小鼠腹腔注射孢素 A 溶液 0.01 mL·g⁻¹ 造模, 连续注射 5 d。第 6 日开始灌胃给药, 给药容积为 0.01 mL·g⁻¹。正常对照组和模型组给予 0.9% 生理盐水。给药治疗 5 d, 末次给药前, 称取各小鼠体质量。末次给药 2 h 后, 给小鼠注射 10% 水合氯醛, 剂量为 0.003 5 mL·g⁻¹, 使小鼠麻醉, 取血后脱颈椎处死小鼠, 依次取脾脏、胸腺, 称重, 脾指数=脾脏质量(g)/[小鼠体质量(g)/10], 胸腺指数=胸腺质量(g)/[小鼠体质量(g)/10]。称重后脾脏分成 3 部分, 每组中 8 只小鼠的脾脏用流式细胞术测定 T 淋巴细胞数, 每组中 6 只小鼠的脾脏用以检测炎症因子, 每组中 2 只小鼠的脾脏进行病理检测。

2.3 脾脏 HE 染色切片的制备

取脾脏放入 4% 多聚甲醛中过夜固定, 24 h 后取出, 将待观察面切平, 放入包埋盒, 铅笔标识, 脱水 14 h, 石蜡包埋, 切片, 染色, 封片, 晾干, 拍照。

2.4 流式细胞术测定 T 细胞数量

200 目尼龙网置于 50 mL 离心管上, 于尼龙网上剪碎脾脏, 以注射器推杆钝端轻研, 用 Staining buffer 溶液吹散脾细胞并过滤, 过滤后的脾细胞混悬液在 4 °C, 400×g 离心 5 min, 得积压细胞, 加入红细胞裂解液 5 mL, 37 °C 恒温裂解 3 min, Staining buffer 溶液清洗 2 次, 以 300 μ L PBS 重悬, 避光加抗体。不含抗体样本作为阴性管, 阳性对照管分别加入 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 抗体。待测样本管分别加入 CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, 于 4 °C 避光孵育 30 min。PBS 清洗 2 次, 500 μ L 2% 甲醛溶液固定重悬, 于流式细胞仪检测。

2.5 细胞因子测定

分别取各组中小鼠脾脏, 用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液(酶抑制剂占 1/200)匀浆, 制备成 1× 脾脏原液, 根据酶联免疫吸附法 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-6、IL-2、IFN- γ 。

2.6 数据统计与处理

用 SPSS 19.0 统计软件处理数据, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有显著性, P<0.01 表明差异极显著。

3 结果

3.1 土茯苓水提液对环孢素 A 所致小鼠脾指数、胸腺指数的影响

环孢素 A 造模后, 小鼠毛发枯槁、行动迟缓, 体质量增长缓慢, 脾指数明显增加, 胸腺指数明显降低。左旋咪唑组、土茯苓水提液中剂量组可不同程度地降低脾指数($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。而土茯苓各治疗组对胸腺指数无显著影响。结果见表 1。

表 1 土茯苓水提液对环孢素致免疫抑制小鼠脏器重量及脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n=16$)

Tab. 1 Effect of Smilacis Glabrae Rhizoma water extract on immune organs in immunosuppressive mice($\bar{x} \pm s, n=16$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体质量/g	脾重/g	脾指数	胸腺质量/g	胸腺指数
正常对照组	-	31.819±2.115	0.098±0.016	0.031±0.005	0.138±0.027	0.043±0.008
模型组	-	31.412±2.892	0.144±0.031	0.046±0.009 ¹⁾	0.111±0.033	0.035±0.010 ¹⁾
左旋咪唑组	3.79	29.413±2.381	0.101±0.030	0.034±0.009 ³⁾	0.099±0.019	0.034±0.006
土茯苓水提液低剂量组	4.55	29.589±2.240	0.113±0.014	0.038±0.005	0.103±0.016	0.035±0.007
土茯苓水提液中剂量组	9.1	29.974±2.248	0.110±0.017	0.037±0.005 ²⁾	0.099±0.016	0.034±0.006
土茯苓水提液高剂量组	13.65	29.801±2.064	0.123±0.028	0.041±0.009	0.100±0.020	0.033±0.007

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

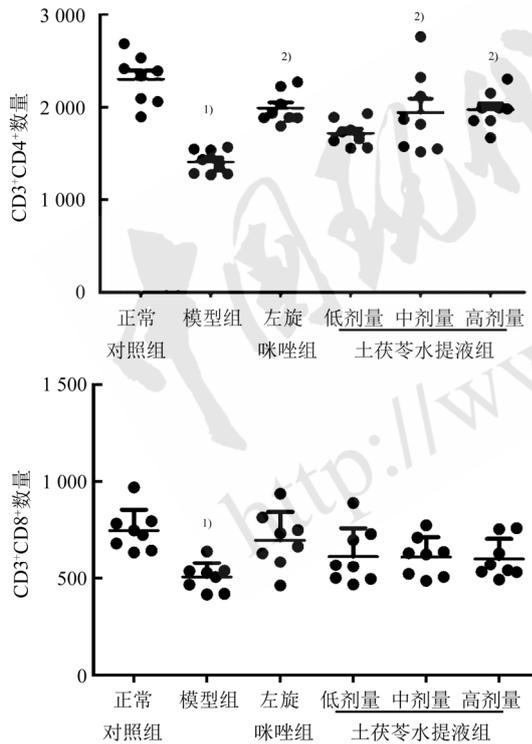


图 1 土茯苓水提液对免疫抑制小鼠 T 淋巴细胞 CD3⁺CD4⁺ 和 CD3⁺CD8⁺ 数量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 Effect of Smilacis Glabrae Rhizoma water extract in T-lymphocyte subsets CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ of immunosuppressive mice($\bar{x} \pm s, n=8$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

3.2 土茯苓水提液对免疫抑制小鼠淋巴细胞数量的影响

环孢素 A 造模后, 小鼠脾脏中 T 淋巴细胞比例失调, 模型小鼠 CD3⁺CD4⁺ 及 CD3⁺CD8⁺ 细胞数量显著低于正常对照组($P<0.05$)。与模型组比较, 左旋咪唑组和土茯苓水提液中、高剂量组小鼠脾脏 CD3⁺CD4⁺ 细胞数量显著升高($P<0.01$); 左旋咪唑组和土茯苓水提液各剂量组均有升高 CD3⁺CD8⁺ 细胞数量的趋势, 但差异无统计学意义。结果见图 1。

3.3 土茯苓水提液对免疫抑制小鼠脾脏炎症因子的影响

与正常对照组比较, 模型组 IFN- γ 显著升高, 对 IL-2 和 IL-6 的含量无显著影响; 与模型组比较, 左旋咪唑组和土茯苓水提液各剂量组均显著降低 IFN- γ 的含量, 对 IL-2 和 IL-6 无显著影响。结果见表 2。

表 2 土茯苓水提液对免疫抑制小鼠脾脏淋巴细胞 IL-2、IFN- γ 、IL-6 的影响($\bar{x} \pm s, n=16$)

Tab. 2 Effect of Smilacis Glabrae Rhizoma water extract on IL-2, IFN- γ , IL-6 of immunosuppressive mice spleen($\bar{x} \pm s, n=16$)

组别	IL-2/pg·g ⁻¹	IFN- γ /pg·g ⁻¹	IL-6/pg·g ⁻¹
正常对照组	11.73±0.73	29.25±2.35	8.78±1.39
模型组	12.01±1.05	32.35±3.58 ¹⁾	9.04±1.22
左旋咪唑组	12.48±1.36	26.32±2.64 ²⁾	9.63±1.32
土茯苓水提液			
低剂量组	12.12±1.56	25.35±2.65 ²⁾	8.86±0.98
中剂量组	12.58±1.11	26.24±4.13 ²⁾	9.05±1.86
高剂量组	11.23±0.63	22.80±3.63 ²⁾	8.07±0.65

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

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

3.4 土茯苓水提液对免疫抑制小鼠脾脏的影响

与正常对照组相比, 模型组脾被膜的网状纤维松散, 内含较多小核细胞, 而正常脾脏被膜只

含有少数梭状间质细胞；模型组白髓萎缩，致脾脏白髓与红髓的比例明显增加，界限模糊。与模型组比较，土茯苓水提液及左旋咪唑给药小鼠，脾脏红、白髓的分布和脾被膜厚度均有所改变，说明土茯苓对脾肿大有一定的调节作用。结果见图 2。

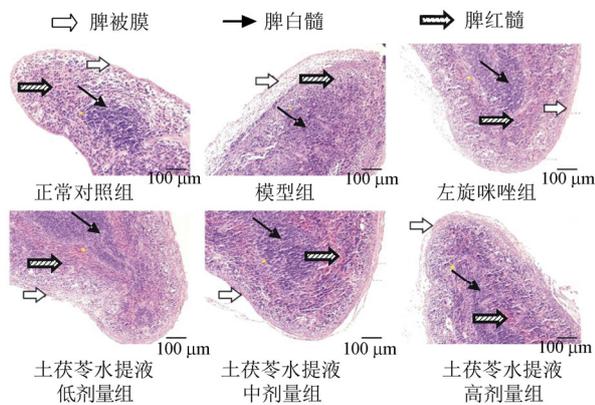


图 2 土茯苓水提液对小鼠脾脏病理组织的影响(HE)
Fig. 2 Effect of Smilacis Glabrae Rhizoma water extract in pathological features of immunosuppressive mice spleen(HE)

4 讨论

土茯苓作为两广地区常用煲汤药材，可祛湿、解毒，调理体质，历史悠久，可能具有免疫促进作用。免疫系统分为细胞免疫和体液免疫，徐强等研究证实，土茯苓主要影响细胞免疫^[3]，环孢素 A 为常用免疫抑制剂，特异性的作用于 T 细胞^[4]，因此选择该模型探讨土茯苓的免疫调节作用。

由于土茯苓在免疫促进作用方面的研究和应用较少，试验对药物剂量的把控是根据临床安全剂量范围和土茯苓在湿阻相关病症治疗的应用决定的^[2,5]。中国药典中土茯苓一般用量为 15~60 g，临床用 30 g 较为普遍，而 60~120 g 已被用于临床难治疾病^[6]。故本研究以临床人用量 30 g·(60 kg)⁻¹ 为最低剂量，用人与小鼠剂量转换方法计算，则小鼠剂量按 1:2:3 的比例，即土茯苓高、中、低剂量组分别给予土茯苓 13.65, 9.1, 4.55 g·kg⁻¹。

脾脏和胸腺是体内免疫细胞的主要聚居地，因此首先考察了造模以及药物对脏器系数的影响。结果显示模型组脾指数显著增加，胸腺指数显著降低，土茯苓中剂量组给药后脾指数变化明显，但各剂量土茯苓对胸腺影响较小。CD4⁺ T 细胞可诱导淋巴细胞分化，产生抗体，发挥免疫功

能；CD8⁺为免疫抑制细胞，常表现细胞毒活性，抑制机体产生抗体，表现为免疫抑制活性，二者在体内共同发挥免疫协同作用。一般认为脾指数升高与脾脏免疫细胞增殖有关，而脾指数降低则与免疫抑制相关，为考察具体的影响，笔者采用流式细胞仪测定了脾脏 CD4⁺和 CD8⁺的数量，结果显示土茯苓可升高由环孢素 A 引起的 T 细胞数量减少，且对 CD4⁺的作用远高于 CD8⁺。脾脏水肿和脾细胞增殖都有可能导导致脾指数增加，由于脾指数结果与 CD4⁺结果不一致，笔者将模型小鼠典型表现的脾组织进行了切片，观察切片发现，与正常对照组相比，模型组白髓萎缩，与 CD4⁺细胞数降低的结果一致；脾被膜显著增厚，红髓区细胞增生，与脾指数增加结果一致，提示脾指数增加可能并不一定是免疫细胞的增加。

Th1/Th2 的失衡是造成多种自身免疫疾病发生的原因，其分别分泌不同的炎症因子，检测不同的细胞因子可探知其平衡状态。其中 Th1 细胞分泌 IL-2、IFN- γ ^[7]，Th2 细胞分泌 IL-6^[8-9]。基于流式细胞仪的研究结果，为进一步探讨土茯苓对机体免疫平衡轴的影响，又检测了脾脏中上述 3 种因子的活性，结果显示土茯苓不影响 IL-2、IL-6 的活性，但却显著影响 IFN- γ 的活性，说明土茯苓的作用具有较强的选择性。

IFN- γ 由 CD4⁺、自然杀伤细胞、树突样细胞产生，为免疫调节型干扰素，可诱导 Th1 细胞分化及促进巨噬细胞活化，可上调主要组织相容性复合体 I 类和 II 类分子的表达；可刺激 IL-2、肿瘤坏死因子、干扰素- α 的产生，发挥免疫调节作用。在过敏反应、春季结膜炎、慢性移植物抗宿主病中，IFN- γ 含量显著降低^[8]，环孢素 A 可升高 IFN- γ 数值，可改善免疫失衡状态，治疗上述疾病；在类风湿关节炎、多发性硬化症、I 型糖尿病、痛风等多种疾病中，患者体内 IFN- γ 含量升高^[8-11]，土茯苓治疗上述疾病具有良好疗效，可能也与土茯苓降低 IFN- γ 的含量有关^[1,12]。

本研究结果提示土茯苓的免疫促进作用与上调 CD4⁺细胞数量及抑制过高的 IFN- γ 有关，是其治疗类风湿关节炎、痛风等作用的基础，艾滋病患者常有 CD4⁺细胞降低及 IFN- γ 升高的现象^[13]，土茯苓特异性的上调 CD4⁺细胞及抑制 IFN- γ 活性或可用于艾滋病的治疗。

REFERENCES

- [1] 于广莹, 刘维. 土茯苓临床应用概况[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(3): 61-63.
- [2] 严灿, 高敏, 吴丽丽, 等. 湿阻证患者免疫调节功能的临床观察及其机理探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4(6): 38-40.
- [3] XU Q, WANG R, XU L H, et al. Effects of Rhizoma Smilacis Glabrae, on cellular and humoral immune responses [J]. Chin J Immunol(中国免疫学杂志), 1993, 9(1): 39-42.
- [4] ZHANG Y J, LI L, YANG S H, et al. Study on different doses of cyclosporin A for preparing immunodeficiency mice models [J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan(湖南中医药大学学报), 2014, 34(11): 14-17, 65.
- [5] JIANG Y G, CHEN X, XU S H, et al. Large dose of Tufuling in treating gout [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med(实用中医内科杂志), 2016, 30(12): 92, 98.
- [6] 唐丽. 痛风的中医临床及实验研究近况[J]. 中国中医急症, 2005, 14(1): 75-77.
- [7] CHEN X Y, ZHANG Z P. Advances in research on drugs targeting different members of interleukin family [J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2017, 41(12): 896-901.
- [8] 魏海明, 刘杰, 田志刚. 检测 Th1/Th2 亚群的临床意义[J]. 中华医学检验杂志, 1998(1): 55-58.
- [9] ZHANG R, ZHENG L, SHI B M. The change of IL-6 and IFN- γ in patients with type 2 diabetes [J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2017, 9(15): 58-59.
- [10] SHI X P, YANG R M, SU C X, et al. The clinical significance and serum concentrations of IFN- γ , IL-17 and IL-6 in cases with rheumatoid arthritis [J]. J Ningxia Med Univ(宁夏医科大学学报), 2016, 38(11): 1286-1289.
- [11] XIA X Q, CHEN J, LU W L, et al. Association between peripheral blood levels of IFN- γ , IL-4 and IL-17A and the clinical type of eczema in the elderly [J]. J Trop Med(热带医学杂志), 2018, 18(2): 203-205, 239.
- [12] FAN J M, MA Z. Research progress of *Smilax glabra* Roxb. in pharmacy [J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2018, 46(8): 36-37, 57.
- [13] 兰太进, 莫明月, 林江, 等. 环孢素 A 造成免疫功能低下小鼠模型的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(5): 764-765.

收稿日期: 2018-12-21

(本文责编: 蔡珊珊)