

# 中药疣毒净胶囊对小鼠T淋巴细胞亚群和白介素 II 影响的实验研究

范瑞强 李 静 禩国维

(广州中医药大学第二附属医院皮肤科·广州 510120)

疣毒净胶囊是本院自制的中药制剂,临床用于治疗尖锐湿疣取得了较好疗效<sup>[1]</sup>。为了探讨该药对免疫功能的影响,本研究以环磷酰胺诱导小鼠免疫抑制状态为实验模型,观察其对小鼠免疫抑制状态的调节作用。

## 1 材料和方法

1.1 药物 疣毒净胶囊由广东省中医院制剂室生产。注射用环磷酰胺由上海华联制药公司生产。

1.2 试剂 小鼠 CD<sub>3</sub>(总 T)、CD<sub>4</sub>(T<sub>H</sub>)、CD<sub>8</sub>(T<sub>S</sub>)三种单克隆抗体(其中 CD<sub>3</sub>、CD<sub>8</sub> 用 FITC 荧光标记,CD<sub>4</sub> 用 PE 标记)及小鼠白介素 2(IL-2)ELISA 试剂盒均购自深圳晶美生物工程有限公司。

## 1.3 动物及其分组

NIH 小鼠,18~22g,雌雄各半,购自广东省卫生厅医学实验动物场。实验分成 4 组,每组 8 只。A 组:于实验的第 1d 和第 5d 给小鼠腹腔注射环磷酰胺,每次每公斤体重 50mg,造成小鼠免疫抑制模型。B 组:小鼠免疫抑制造模方法同 A 组,同时从实验第 1d 起给小鼠胃饲疣毒净胶囊水溶液,每 d1 次,每次每公斤体重用药 0.97g,即临床等效量,连续 10d。C 组:小鼠免疫抑制造模方法同前,同时从实验第 1d 起给小鼠胃饲疣毒净胶囊水溶液,每 d1 次,每次每公斤体重用药 2.43g,约为临床等效量的 2.5 倍,连续 10d。D 组:正常对照组;每天用生理盐水胃饲,连续 10d。

## 1.4 检测方法

### 1.4.1 T 细胞及其亚群的检测

于实验第 10d 小鼠摘眼球放血,抗凝血后,每管分别加入 CD<sub>3</sub>、CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub> 3 种单抗。室温避光孵育 20~30min,用 PBS 液洗细胞,加入红细胞溶解液,待红细胞溶解后离心去上清。再用 PBS 液洗细胞 1 次,调整每支标本细胞浓度至 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>/ml,用流式细胞仪测定阳性细胞数。

1.4.2 IL-2 的检测 采用双抗体夹心 ELISA 法。主要步骤:将小鼠脾细胞悬液(5×10<sup>6</sup>/ml)培养 36h,取其上清稀释后滴入酶标板的细胞孔中,每孔先后加入生物素标记二抗、酶联物、底物及终止液后,置自动酶标仪读取波长 450nm 的 OD 值。通过直线回归方程,由

OD 值求出相应的 IL-2 浓度。

## 2 结果

### 2.1 疣毒净胶囊对小鼠 T 细胞及其亚群的影响 见表 1

表 1 对小鼠 T 淋巴细胞及其亚群的影响( $\bar{X} \pm S$ )%

组别	n	CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>	CD <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>	CD <sub>4</sub> /CD <sub>8</sub>
A	8	50.439±8.225	31.709±4.875	19.076±4.925	1.730±0.411
B	8	71.513±14.891*	51.679±9.554*	18.996±6.627	2.939±0.830*
C	8	69.018±10.193*	43.796±7.243*	18.985±2.766	2.685±0.432*
D	8	65.954±11.391*	47.768±10.764	18.058±3.868	2.750±0.766*

\*表示与 A 组相比(t 检验)P<0.05

### 2.2 疣毒净胶囊对小鼠 IL-2 的影响 见表 2。

表 2 疣毒净胶囊对小鼠白介素 2 的影响(Pg/ml)

组别	n	IL-2( $\bar{X} \pm S$ )
A	8	863.475±36.958
B	8	1018.338±57.769*
C	8	979.713±70.281*
D	8	983.213±36.958*

与 A 组比较 \*P<0.05(t 检验)

## 3 讨论

尖锐湿疣,目前临床治疗存在的最大问题是易复发、难根治。易复发的原因目前以为除与局部 HPV 不能得以清除有关外,与患者存在细胞免疫功能障碍也有很大关系<sup>[2,3]</sup>。国外文献报道,反复复发及病程长的尖锐湿疣患者细胞免疫功能显著异常,表现为 CD<sub>8</sub> 细胞百分比升高,CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 比值下降,NK 细胞活性和 IL-2 水平下降<sup>[4]</sup>。

疣毒净胶囊是纯中药制剂,主要由龙胆草、板蓝根、紫草、北芪、白术、苡仁、甘草等中药制成,具有清热解毒燥湿、益气扶正祛邪的作用。临床用于治疗尖锐湿疣取得了较好疗效。

本文观察了疣毒净胶囊对小鼠细胞免疫功能的影响,结果表明:疣毒净胶囊可以提高由环磷酰胺引起的免疫抑制小鼠外周血中的总 T 淋巴细胞、辅助性 T 淋巴细胞和白介素 2 水平。揭示疣毒净胶囊有调节和提高小鼠细胞免疫功能的作用。

(本研究为卫生部科学研究基金资助项目 94-1-15)

## 参考文献

- 1 范瑞强,等.新中医 1997;29(9):41

2 王群. 国外医学·皮肤性病学分册 1997;23(4):219

4 黎志中. 国外医学·皮肤性病学分册 1998;24(3):155

3 钱起丰. 中华皮肤科杂志 1996;29(3):172

(1998年8月27日收稿)

## 愈风汤含药血清对5-HT、L-Glu所致新生大鼠 脑细胞内游离钙升高的影响

许沛虎 指导 涂晋文 (湖北中医学院96级博士生·武汉430061)

### 1 材料与方法

1.1 药物及试剂 愈风汤由防风、秦艽、白芷、桂枝等为主组成,由湖北中医附院提供,其生药含量为 $2g \cdot ml^{-1}$ ;5-HT、L-Glu、DMSO、Hepes、胰蛋白酶为Sigma产品;DMEM为Gibco产品;Fura-2/AM由中国医学科学院药物研究所合成室提供,测试前用重蒸DMSO溶解,分装后于 $-20^{\circ}C$ 避光保存;其它试剂均为国产AR级。

1.2 含药血清的制备 选择纯种新西兰家兔2只,体重为 $2.0 \pm 0.05kg$ ,1只按 $9g \cdot k^{-1} \cdot d^{-1}$ 给予愈风汤灌胃,另1只给予等体积的生理盐水灌胃作对照。给药7d后,于最后1次灌胃后1h(灌胃前禁食不禁水24h),无菌颈总动脉采血,分离血清,经 $56^{\circ}C$ ,30min处理后,于 $-40^{\circ}C$ 保存。

1.3 脑细胞悬液的制备 参照文献<sup>[1]</sup>略加修改进行。

1.4 Fura-2/AM负载及荧光测定 上述细胞悬液于 $37^{\circ}C$ 预温5min后(若观察含药血清则先加入含药血清预温10min,血清为总体积的10%),加入Fura-2/AM使其终浓度为 $5\mu mol \cdot L^{-1}$ ,于 $37^{\circ}C$ 振荡温育40min,再用含0.2%牛血清白蛋白的人工脑脊液(ASCF,  $mmol \cdot L^{-1}$ : NaCl132, KCl3.0,  $NaH_2PO_4$ 1.2,  $CaCl_2$ 1.0, Glucose10.0, Hepes10.0,  $MgCl_2$ 1.0, PH7.4, 当加入L-Glu时无 $MgCl_2$ )洗涤离心( $150 \times g$ , 5min)2次,最后将细胞悬浮于ASCF中。于加血清、负载及测定前均用吸管轻轻吹吸数次,使细胞分布均匀,且在测定前于 $37^{\circ}C$ 复温5min,采用RF-5000双波长荧光分光光度计(Shimadzu产品)进行荧光测定。以公式 $[Ca^{2+}]_i = kd(Fo/Fs)[(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]^{[2]}$ 计算。其中 $kd = 224nmol \cdot L^{-1}$ , Fo、Fs分别代表 $Ca^{2+}$ 为零和饱和状态下,在激发光为380nm波长时的荧光强度,  $R_{max}$ 、 $R_{min}$ 分别为加入Triton X-100(终浓度为0.1%)和EGTA(终浓度为5mmol/L)后测得的荧光比值。在计算前,应减去未负载Fura-2/AM的细胞所测得的自发荧光。

1.5 统计分析 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以不配对的t检验进行统计分析。

### 2 结果

2.1 愈风汤含药血清对静息 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 在含 $Ca^{2+}$ 人工脑脊液中,脑细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 为 $130.26 \pm 7.09nmol \cdot L^{-1}$ ( $n = 6$ );用含药血清处理后,其 $[Ca^{2+}]_i$ 为 $61.77 \pm 6.6nmol \cdot L^{-1}$ ( $n = 6$ ,  $P < 0.01$ ),而生理盐水组对此无影响。

2.2 愈风汤含药血清对L-Glu所致 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的影响 当在含 $Ca^{2+}$ 、无 $Mg^{2+}$ ASCF细胞悬液中加入L-Glu,使其终浓度

分别为 $150, 300, 450\mu mol \cdot L^{-1}$ 时,其 $[Ca^{2+}]_i$ 从 $76.13 \pm 2.95nmol \cdot L^{-1}$ 分别升高至 $309.03 \pm 18.96, 1179.32 \pm 32.15, 2855.98 \pm 30.62nmol \cdot L^{-1}$ ( $n = 6$ ,  $P < 0.01$ );用含药血清预处理后,其 $[Ca^{2+}]_i$ 分别为 $159.51 \pm 10.59, 388.43 \pm 14.06, 700.45 \pm 25.68nmol \cdot L^{-1}$ ( $n = 6$ ,  $P < 0.01$ ),而生理盐水组无影响。

2.3 愈风汤含药血清对5-HT所致 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的影响 在含 $Ca^{2+}$ ASCF细胞悬液中,加入5-HT使其终浓度分别为100、200、300 $\mu mol \cdot L^{-1}$ ,其 $[Ca^{2+}]_i$ 分别从 $130.26 \pm 7.09nmol \cdot L^{-1}$ 升高至 $259.66 \pm 14.63, 485.95 \pm 17.55, 772.96 \pm 19.51nmol \cdot L^{-1}$ ;用愈风汤含药血清预处理后,其 $[Ca^{2+}]_i$ 分别为 $130.21 \pm 6.81, 219.01 \pm 11.31, 351.99 \pm 17.08nmol \cdot L^{-1}$ ( $n = 6$ ,  $P < 0.01$ ),而生理盐水组对此无影响。

3 讨论  $Ca^{2+}$ 在细胞信息的传递中发挥着重要作用。神经细胞内 $Ca^{2+}$ 超载被认为是神经细胞死亡的最后共同通路,通过测定细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的含量及药物治疗后的改变,可阐明药物作用的机制与环节。

实验结果显示,经愈风汤含药血清处理的脑细胞,在静息时及加入5-HT、L-Glu后,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 均较对照组低,说明愈风汤可能具有钙通道阻滞作用。5-HT可加重缺血后脑组织的损伤<sup>[3,4]</sup>,有研究显示,5-HT所导致的神经细胞内 $Ca^{2+}$ 超载是其加重脑损伤的机制之一<sup>[5]</sup>。愈风汤含药血清能抑制5-HT所导致的细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 超载,这可能是其治疗缺血性中风机理之一。L-Glu是一种重要的兴奋性神经递质,在脑缺血后,其胞外含量明显增高,通过刺激NMDA受体,使胞外 $Ca^{2+}$ 大量内流,引起细胞内 $Ca^{2+}$ 超载而加重脑损伤<sup>[6,7]</sup>,愈风汤含药血清可抑制L-Glu所以导致的细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,这可能是其治疗缺血性中风机理之一。(本研究为湖北省科委科研基金资助项目NO.951之P1812)

### 参考文献

- 1 Dildy JE, Leslie SW. Brain Res 1989;499:383
- 2 Gryniewicz G, et al. J Biol Chem 1985;260(6):3440
- 3 孟强. 国外医学·脑血管疾病分册 1998;6(2):71
- 4 陈修,等. 心血管药理学. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 1997:205
- 5 Chung D. Ann Rew Pharmacol Toxicol 1989;29:71-110
- 6 岳少杰. 国外医学·神经病学神经外科学分册 1994;21(4):206
- 7 Rothman S. J Neurosci 1984;4(7):1884

(1998年7月16日收稿)