

达肝清对小鼠免疫功能影响的实验研究

邓家刚,吴光,运晨霞,余晓玲,韦海宏,肖健,陈超树,肖艳芬,黄燕,王坤* (广西中医学院,南宁 530001)

摘要:目的 探讨达肝清对正常小鼠和免疫抑制小鼠免疫功能的影响。方法 用达肝清给正常小鼠和环磷酰胺免疫抑制小鼠灌胃,然后用称重法检测小鼠肝脾重量,溶血试验检测血清溶血素含量、QHS法检测抗体形成细胞数、RIA法检测 IL-2 含量、MTT法检测 NK细胞活性和 T淋巴细胞增殖功能。结果 达肝清对正常小鼠免疫功能无显著影响,对 CXT免疫抑制小鼠有显著的抵抗作用,能增加免疫抑制小鼠肝脾的重量,促进抗体生成和 IL-2分泌,增加 NK细胞活性和 T淋巴细胞增殖功能。结论 达肝清对正常小鼠的免疫功能无显著影响,但能抵抗 CTX对小鼠免疫功能的抑制作用。

关键词:达肝清;抗体;IL-2;T淋巴细胞;NK细胞

中图分类号:R285.5;R975.5 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)04-0278-05

Influence of Daganqing on the Immunity in the Mice

DENG Jia-gang, WU Guang, YUN Chen-xia, YU Xiao-ling, WEI Hai-hong, XIAO Jian, CHEN Chao-shu, XIAO Yan-fen, HUANG Yan, WANG Kun* (Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of Daganqing on the immunity in the normal or immunosuppressive mice. **METHODS** Daganqing was oral in normal or immunosuppressive mice and then the weight of immune organs, the numbers of hemolysin, antibody forming cells, IL-2, the phagocytic activity of macrophage and the activities of T lymphocyte and NK cell were detected by the methods of weighting method, haematolysis experiment, QHS, RIA, MTT, respectively. **RESULTS** Daganqing could promote the weight of immune organs and the numbers of hemolysin and antibody forming cells, and promote the IL-2 level in the serum, promote phagocytic activity of macrophage, T lymphocyte proliferation and NK cell activity in the immunosuppressive mice but did not have significant effect in the normal mice. **CONCLUSION** The results suggest that Daganqing has up-regulation on humeral immunity and cells-mediated immunity in the immunosuppressive mice but hasn't significant effects in the normal mice.

KEY WORDS: Daganqing; antibody; Interlukin-2; T lymphocyte; NK cell

达肝清是根据中医基本理论及方剂组方原则提出的,以治疗乙型肝炎病毒感染为主的自拟方,由三姐妹(*Rabdosia temifolia*)、叶下珠(*Phyllanthus urinaria* L.)、绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino.)、黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge)等中草药制成,有解毒、利湿化痰、益气健脾、扶正护肝之功。体外研究表明,达肝清对 2215 细胞分泌 HBsAg 和 HbeAg 均具有一定的抑制作用^[1]。为探索其对正常或免疫抑制小鼠免疫功能有无调节作用,研究了达肝清对小鼠免疫功能的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种小鼠 120 只,雌雄兼用,体重(20±2)g,广西中医学院实验动物中心提供,合格证号:桂医动第 11004 号。

1.2 药物与主要试剂

达肝清水煎剂,由广西中医学院中药教研室制备(低压浓缩至每毫升含 3.3 g 生药),4℃冰箱保存,用时用蒸馏水配成所需浓度。MTT 试剂盒(R&D SYSTEMS,批号:7808E4);刀豆蛋白 A(ConA,美国 Sigma 公司,批号:c-

基金项目:广西科技厅科技攻关项目(桂科攻:0235023-1)

作者简介:邓家刚,男,教授 *通讯作者:王坤,男,教授

Tel: 13978815716

E-mail: wangkk@gxtcmu.edu.cn

2010); RPMI 1640(美国 GIBCO公司,批号:1165062);小牛血清(NCS,杭州四季青生物工程材料有限公司,批号:050903); IL-2 试剂盒(北京北方生物技术研究所,批号:200510);环磷酰胺(CTX,上海华联制药有限公司产品,批号:041013); YAC-1 细胞株(本院药理教研室保存);补体(1:10新鲜豚鼠混合血清);山羊红细胞悬液(GRBC,新鲜山羊外周血细胞,用生理盐水配制所需浓度,都氏试剂(本室配制))。

1.3 主要实验仪器

Multiskan MK3型酶标仪(美国 Thermo公司); Foma 311型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo公司); FJ-2008P型 γ 放射免疫计数器(西安国营二六二厂); 722型分光光度计(上海第三分析仪器厂); AE260型电子天平(瑞士 Mettler); B4i型离心机(美国 Thermo公司)。

1.4 实验动物分组及给药方法^[2,3]

实验动物随机分为 2 × 6 组,每组 10 只。1 组为正常对照, NS 0.4 mL · d⁻¹ · 鼠⁻¹, po, 共 10 d; 2 组为达肝清对照, 达肝清 10 g · kg⁻¹ · d⁻¹, po, 共 10 d; 3 ~ 6 组用 CTX 造模, CTX 60 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 腹腔注射(ip), 于实验的 3, 5, 7 d 给 3 次; 4 ~ 6 组分别加用不同剂量达肝清, 分别为(5, 10, 20 g) · kg⁻¹ · d⁻¹, po。末次给药后 24 h 内检测指标。实验分两批进行。

1.5 免疫器官重量测定^[4]

末次给药后 5 h 脱颈椎处死小鼠, 取完腹腔液后解剖小鼠取出胸腺和脾脏, 于电子天平上称重。免疫器官系数 = 免疫器官重量(mg) / 30 g 体重。

1.6 血清溶血素测定^[5,6]

于给药第 3 天和第 8 天各组小鼠分别 ip 10% GRBC 每 10 g 体重 0.1 mL 致敏, 末次给药后 2 h 摘眼球取血, 室温下放置 1 h, 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 分离血清, 经 56 °C 30 min 水浴灭活补体后用溶血试验测定血清溶血素含量, 用 722 分光光度计于 540 nm 处读取 A 值, 以实验管 A 值与 50% 溶血管 A 值之比作为溶血素值。每个标本均行双管测定, 取平均 OD 值作为实验结果。

1.7 巨噬细胞活性测定^[7]

末次给药后 5 h 脱颈椎处死小鼠, ip 注入 5 mL 冷 Hank 液, 轻揉腹部数分钟后剖腹, 无菌吸取腹腔液, 装入含肝素的离心管中, 2 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 吸弃上清液, 再用 10% NCS-RPMI 1640 液 5 mL 重悬, 共 2 次, 调整细胞数为每毫升 5 × 10⁶ 个, 加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μ L, 每个样品做 3 个复孔, 37 °C 5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h 使巨噬细胞贴壁。然后用 10% NCS-RPMI 1640 液洗 3 次, 每孔加 0.072% 中性红 100 μ L, 37 °C 5% CO₂ 继续培养 4 h。用 PBS (pH 7.4) 洗 3 次。每孔加脱色剂(v/v: 无水乙醇 冰醋酸 1:1) 100 μ L, 室温放置 1 h 后振荡混匀, 用酶标仪于 A530 nm 处测 A 值。结果以 3 个复孔的 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.8 血清 IL-2 含量测定

按上述方法制备血清, 用¹²⁵I-IL-2 RIA 放射免疫法测定

血清 IL-2 含量。操作方法按试剂盒说明书进行。

1.9 抗体形成细胞(AFC)测定

用定量溶血分光光度法测定抗体形成细胞^[8-9]。末次给药后 5 h 脱颈椎处死小鼠, 无菌操作取出脾脏, 制成脾细胞备用。用时配成每毫升 2 × 10⁶ 脾细胞悬液, 台盼蓝染色检测细胞存活率 > 95%。取脾细胞悬液, 补体和 0.2% GRBC 各 1 mL 混匀, 37 °C 水浴 1 h, 离心取上清, 用 722 分光光度计于 540 nm 处读取 A 值, 以实验管 A 值与 50% 溶血管 A 值之比作为 AFC 值。每个标本均行双管测定, 取均值作为实验结果。

1.10 T 淋巴细胞增殖反应测定(MTT法)^[3,10-11]

取上述制备的脾细胞制成每毫升 5 × 10⁶ 脾细胞悬液, 台盼蓝染色检测细胞存活率 > 95%。取脾细胞悬液 100 μ L 加入 96 孔细胞培养板内, 每个样品做 3 个复孔, 加入终浓度为 5 μ g · mL 的 ConA 液 10 μ L (同时设不加 ConA 的对照孔), 置 37 °C, 5% CO₂, 相对湿度为 100% 的 CO₂ 培养箱中培养 44 h, 加 10 μ L MTT 溶液(5 mg · mL⁻¹), 继续培养 4 h, 离心, 弃上清, 用 PBS 洗 1 次, 加入 30% DMSO 100 μ L, 振荡后静置 20 min, 用酶标仪于波长 A570 nm 处测 A 值, 结果以 3 个复孔的 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.11 NK 细胞活性测定(MTT法)^[3,12-13]

取上述制备好的脾细胞配成每毫升 1 × 10⁶ 细胞悬液作为效应细胞, 取对数生长期的 YAC-1 细胞配成每毫升 1 × 10⁵ 悬液作为靶细胞, 效靶细胞各取 100 μ L (效靶细胞的比例为 10:1) 至 96 孔培养板中, 每个样品做 3 个复孔, 同时设不加靶细胞的效应细胞对照孔和不加效应细胞的靶细胞对照孔各 2 孔, 置 37 °C, 5% CO₂, 相对湿度为 100% 培养箱中培养 4 h, 每孔加入 10 μ L MTT 溶液(5 mg · mL⁻¹), 再培养 4 h, 离心, 弃上清, 用 PBS 洗 1 次, 加入 30% DMSO 100 μ L, 振荡后静置 20 min, 用酶标仪于波长 A570 nm 处测 A 值, 结果以 3 个复孔的 $\bar{x} \pm s$ 表示 NK 细胞活性。NK 细胞活性(%) = [1 - 实验孔 A 值 - 效应细胞孔 A 值] / 靶细胞孔 OD 值 × 100。

1.12 统计分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用华西医科大学的 PEMS 3.1 for Windows 统计软件进行 t 检验, P 值表示差异有无显著性。

2 结果

2.1 达肝清对小鼠免疫器官重量的影响

达肝清对小鼠免疫器官(胸腺、脾脏)重量的影响结果见表 1。

从表 1 可见, 正常对照组与达肝清组比较, 胸腺指数和脾指数差异均无显著性(P > 0.05); 达肝清 3 个剂量组均能显著提高 CTX 免疫抑制小鼠的胸腺指数和脾指数, 与 CTX 组比较差异有显著性或高度显著性(P < 0.05 或 P < 0.01), 表明达肝清对正常小鼠的免疫功能无明显影响, 而能对抗 CTX 对小鼠免疫器官负影响。从表 1 还可看到, 虽然胸腺指数和脾指数都随剂量的加大而有所提高, 但 3 个剂量间比较差异均无显著性(P > 0.05), 表明在一定的剂量范围内, 达肝清对小鼠免疫功能的影响随剂量的加大而有所提高, 但无统计学意义。

表 1 达肝清对小鼠免疫器官(胸腺、脾脏)重量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Daganqing's effect on the weight of the immune organs in the mice

组别	n	胸腺重 /mg	脾重 /mg	胸腺指数 /mg·10g ⁻¹	脾指数 /mg·10g ⁻¹
第 1 组	10	58.52 ± 11.61 ¹⁾	139.82 ± 21.12 ¹⁾	21.56 ± 3.34 ¹⁾	52.66 ± 8.71 ¹⁾
第 2 组	10	59.92 ± 10.32	138.77 ± 20.93	21.48 ± 3.70	51.76 ± 9.14
第 3 组	9	39.74 ± 8.21 ²⁾	89.94 ± 15.15 ²⁾	13.08 ± 2.66 ⁴⁾	29.93 ± 6.76 ⁵⁾
第 4 组	10	47.92 ± 7.17 ³⁾	108.54 ± 16.71 ³⁾	16.67 ± 2.67 ³⁾	40.09 ± 8.15 ³⁾
第 5 组	10	52.55 ± 7.74	121.85 ± 20.24	18.58 ± 2.67	44.00 ± 9.19
第 6 组	9	53.41 ± 8.92	125.29 ± 21.32	19.66 ± 3.99	43.98 ± 9.06

注: ¹⁾第 1 组与第 2, 5, 6 组比较 $P > 0.05$; 与第 4 组比较 $P < 0.05$; 与第 3 组比较 $P < 0.01$; ²⁾第 3 组与第 4 组比较 $P < 0.05$, 与其他组比较 $P < 0.01$; ³⁾第 4 ~ 6 组间比较 $P > 0.05$; ⁴⁾第 3 组与第 4 组比较 $P > 0.05$, 与其他组比较 $P < 0.01$; ⁵⁾第 3 组与其他组比较 $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P > 0.05$ vs groups 2, 5, 6, $P < 0.05$ vs group 4, $P < 0.01$ vs group 3; ²⁾ $P < 0.05$ vs groups 4, $P < 0.01$ vs groups 1, 2, 5, 6; ³⁾ $P > 0.05$ among groups 4 - 6; ⁴⁾ $P > 0.05$ vs group 4, $P < 0.01$ vs groups 1, 2, 5, 6; ⁵⁾ $P < 0.01$ vs groups 1, 2, 4, 5, 6

2.2 达肝清对小鼠溶血素产生、抗体形成细胞和血清 IL-2 含量的影响

达肝清对小鼠溶血素产生、抗体形成细胞和血清 IL-2 含量的影响结果见表 2。

表 2 达肝清对小鼠抗体产生和血清 IL-2 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Daganqing's effect on the antibody and AFCs and IL-2 level in serum in the mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	溶血素值 (A 值)	AFC 值 (A 值)	IL-2 含量 / pg·mL ⁻¹
第 1 组	10	46.71 ± 8.93 ¹⁾	0.41 ± 0.06 ¹⁾	3.04 ± 0.72 ¹⁾
第 2 组	10	48.14 ± 8.32	0.42 ± 0.08	3.10 ± 0.55
第 3 组	9	22.19 ± 6.40 ²⁾	0.20 ± 0.05 ⁴⁾	1.63 ± 0.34 ⁶⁾
第 4 组	10	34.21 ± 8.02 ³⁾	0.27 ± 0.07 ⁵⁾	2.01 ± 0.44 ⁷⁾
第 5 组	10	38.94 ± 8.11	0.38 ± 0.06	2.72 ± 0.73
第 6 组	9	39.29 ± 8.17	0.39 ± 0.08	2.82 ± 0.59

注: ¹⁾第 1 组与第 2, 5, 6 组比较 $P > 0.05$; 与第 3, 4 组比较 $P < 0.01$; ²⁾第 3 组与其他各组比较 $P < 0.01$; ³⁾第 4 ~ 6 组间比较 $P > 0.05$; ⁴⁾第 3 组与第 4 组比较 $P < 0.05$, 与其他组比较 $P < 0.01$; ⁵⁾第 4 组与第 5, 6 组比较 $P < 0.01$, 第 5, 6 组比较 $P > 0.05$; ⁶⁾第 3 组与第 4 组比较 $P > 0.05$, 与其他组比较 $P < 0.01$; ⁷⁾第 4 组与第 6 组比较 $P < 0.05$, 与第 5 组比较 $P < 0.01$, 第 5, 6 组比较 $P > 0.05$

Note: ¹⁾ $P > 0.05$ vs groups 2, 5, 6, $P < 0.01$ vs groups 3, 4; ²⁾ $P < 0.01$ vs groups 1, 2, 4, 5, 6; ³⁾ $P > 0.05$ among groups 4 - 6; ⁴⁾ $P < 0.05$ vs group 4, $P < 0.01$ vs groups 1, 2, 5, 6; ⁵⁾ $P < 0.01$ vs groups 5, 6; ⁶⁾ $P > 0.05$ vs group 4, $P < 0.01$ vs groups 1, 2, 5, 6; ⁷⁾ $P < 0.05$ vs group 6, $P < 0.01$ vs group 5

从表 2 可见, 正常对照组与达肝清组比较, 溶血素、抗体形成细胞和血清 IL-2 含量差异均无显著性 ($P > 0.05$); 达肝清 3 个剂量组均能显著提高 CTX 免疫抑制小鼠的溶血素、抗体形成细胞和血清 IL-2 含量, 与 CTX 组比较差异有显著性或高度显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明达肝清对正常小鼠的溶血素产生、抗体形成细胞数和血清 IL-2 含量无明显影响, 而对免疫抑制小鼠的溶血素、抗体形成细胞和血清 IL-2 含量有显著的提升作用。3 个剂量的达肝清均基本能将免疫抑制小鼠的免疫功能提升到正常水平, 除小剂量达肝清组与正常对照组比较差异有高度显著性外 ($P < 0.01$), 大、中剂量达肝清组与正常对照组比较均差异无显著性 ($P > 0.05$)。从表 2 还可看到, 虽然溶血素产生随剂量的增加而有所提

高, 但大、中、小 3 个剂量间比较差异均无显著性 ($P > 0.05$), 和血清 IL-2 含量随剂量的增加而提高比较明显, 小剂量达肝清组与中、大剂量达肝清组对抗体形成细胞数比较差异均有显著性或高度显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但中、大剂量达肝清组间比较差异均无显著性 ($P > 0.05$), 表明在一定的剂量范围内, 达肝清对小鼠免疫功能的影响随剂量的增加而有增高, 但增到一定的剂量后, 这种增加减缓。

2.3 达肝清对小鼠淋巴细胞增殖反应、NK 细胞活性和巨噬细胞活性的影响

达肝清对小鼠淋巴细胞增殖反应、NK 细胞活性和巨噬细胞活性的影响结果见表 3。

表 3 达肝清对小鼠 T 淋巴细胞增殖反应、NK 细胞活性和巨噬细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Daganqing's effect on the T cell proliferation, NK cell activated and Macrophage function in the mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NK 细胞活性 (A 值)	T 细胞增殖反应 (A 值)	巨噬细胞活性 (A 值)
第 1 组	10	45.298 ± 9.327 ¹⁾	0.506 ± 0.111 ⁴⁾	1.017 ± 0.262 ⁷⁾
第 2 组	10	44.240 ± 9.887	0.495 ± 0.095	1.015 ± 0.338
第 3 组	9	24.618 ± 4.165 ²⁾	0.246 ± 0.061 ⁵⁾	0.468 ± 0.220 ⁸⁾
第 4 组	10	33.143 ± 6.885 ³⁾	0.348 ± 0.092 ⁶⁾	0.724 ± 0.244 ⁷⁾
第 5 组	10	39.682 ± 7.470	0.444 ± 0.091	0.825 ± 0.278
第 6 组	9	43.770 ± 8.637	0.458 ± 0.088	0.918 ± 0.303

注: ¹⁾第 1 组与第 2, 5, 6 组比较 $P > 0.05$; 与第 4 组比较 $P < 0.05$; 与第 3 组比较 $P < 0.01$; ²⁾第 3 组与第 4 组比较 $P < 0.05$, 与其他组比较 $P < 0.01$; ³⁾第 4 组与第 6 组比较 $P < 0.05$, 与第 5 组比较 $P > 0.05$, 第 5, 6 组比较 $P > 0.05$; ⁴⁾第 1 组与第 2, 5, 6 组比较 $P > 0.05$; 与第 3, 4 组比较 $P < 0.01$; ⁵⁾第 3 组与第 4 组比较 $P < 0.05$, 与其他组比较 $P < 0.01$; ⁶⁾第 4 组与第 5, 6 组比较 $P < 0.01$, 第 5, 6 组比较 $P > 0.05$; ⁷⁾第 1 组与第 2, 4, 5, 6 组比较 $P > 0.05$, 与第 3 组比较 $P < 0.01$; ⁸⁾第 3 组与第 4 组比较 $P > 0.05$, 与其他组比较 $P < 0.01$; ⁹⁾第 4 ~ 6 组间比较 $P > 0.05$

Note: ¹⁾ $P > 0.05$ vs groups 2, 5, 6, $P < 0.05$ vs group 4, $P < 0.01$ vs group 3; ²⁾ $P < 0.05$ vs group 4, $P < 0.01$ vs groups 1, 2, 5, 6; ³⁾ $P > 0.05$ vs group 5, $P < 0.05$ vs group 6; ⁴⁾ $P > 0.05$ vs groups 2, 5, 6, $P < 0.01$ vs groups 3, 4; ⁵⁾ $P < 0.05$ vs group 4, $P < 0.01$ vs groups 1, 2, 5, 6; ⁶⁾ $P < 0.01$ vs groups 5, 6; ⁷⁾ $P > 0.05$ vs groups 2, 4, 5, 6, $P < 0.01$ vs group 3; ⁸⁾ $P > 0.05$ vs group 4, $P < 0.01$ vs groups 1, 2, 5, 6; ⁹⁾ $P > 0.05$ among groups 4 - 6

从表 3 可见,正常对照组与达肝清组比较,淋巴细胞增殖反应、NK 细胞活性和巨噬细胞活性差异均无显著性 ($P > 0.05$);达肝清小 3 个剂量组均能显著提高 CTX 免疫抑制小鼠的淋巴细胞增殖反应、NK 细胞活性和巨噬细胞活性,与 CTX 组比较差异有显著性或高度显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明达肝清对正常小鼠的淋巴细胞增殖反应、NK 细胞活性和巨噬细胞活性无明显影响,而对免疫抑制小鼠的 T 淋巴细胞增殖反应、NK 细胞活性和巨噬细胞活性有显著的提升作用。3 个剂量的达肝清基本上都能将 CTX 免疫抑制小鼠的免疫功能提升至正常水平,除小剂量达肝清组的 T 淋巴细胞增殖反应和 NK 细胞活性与正常对照组比较差异有显著性或高度显著性外 ($P < 0.01$ 或 < 0.05),小剂量达肝清组的巨噬细胞活性及大、中剂量达肝清组的和 NK 细胞活性与正常对照组比较均差异无显著性 ($P > 0.05$)。从表 3 还可看到,淋巴细胞增殖反应、NK 细胞活性和巨噬细胞活性随达肝清剂量的增加而逐步提升,其中小剂量达肝清组(第 4 组)的 T 淋巴细胞增殖反应与中、大剂量组(第 5、6 组)比较差异有高度显著性 ($P < 0.01$),而小剂量达肝清组(第 4 组)的 NK 细胞活性与中、大剂量组(第 5、6 组)比较差异有显著性 ($P < 0.05$),但大、中剂量(第 5、6 组)间比较差异均无显著性 ($P > 0.05$),3 个剂量达肝清组(第 4、5、6 组)对巨噬细胞活性比较差异均无显著性 ($P > 0.05$),表明在一定的剂量范围内,达肝清对小鼠免疫功能的影响具有正的剂量关系。

3 讨论

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染本身对肝细胞的直接破坏作用是有限的,肝细胞的损伤是与宿主的免疫反应有关,机体抗病毒的免疫应答既可清除 HBV,又可使肝细胞受损而发生肝炎。HBV 诱发的免疫应答既有体液免疫应答又有细胞免疫应答,体液免疫应答主要产生抗 HBs 抗体、抗前 S 抗体、抗 HBe 抗体和抗 HBc 抗体等,前 2 种是保护性抗体,后 2 个为非保护性抗体。保护性抗体可以起到中和及清除病毒作用,尤其在清除血液中的病毒起主要作用,对 HBV 感染具有保护性免疫作用。但病毒进入细胞后,主要靠细胞免疫杀伤靶细胞以清除受感染细胞内的病毒,同时也会造成肝细胞损伤而发生肝炎。一般认为 HBV 感染后出现的肝组织慢性炎症重要原因之一是由于机体细胞免疫功能低下^[14]。NK 细胞作为非常重要的固有免疫细胞,在抗病毒感染中起关键作用,并可通过释放细胞因子起到免疫调节的作用。有研究显示,外周血 NK 细胞数减少与乙型肝炎慢性化有关^[15]。机体 T 淋巴细胞分为两个亚群,即 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞,它们数量、比值和功能的改变都可能影响着机体的免疫状态。CD4⁺ / CD8⁺ 细胞的比值是监视机体免疫功能,反映机体免疫状态的重要指标,比值失衡可以导致免疫系统紊乱及一系列免疫病理改变^[16]。资料表明^[17],慢性乙型肝炎患者体内 CD4⁺ T 细胞数减少,而 CD8⁺ T 细胞数升高,故 CD4⁺ / CD8⁺ 比值降低。IL-2 既可直接抑制病毒基因的表达和复制,又可激活 CTL、NK 细胞和 B 细胞,对体液免疫和细胞免疫均有促进作用^[18-19]。

本实验使用 CTX 制造免疫功能低下小鼠作为动物模

型,研究达肝清对小鼠免疫功能的影响,结果显示达肝清对正常小鼠免疫功能无显著影响,对 CXT 免疫抑制小鼠的胸腺和脾指数、抗体量、IL-2 量、单核巨噬细胞吞噬功能、NK 细胞活性和 T 细胞增殖功能均有正向调节作用,使之在较短时间内基本恢复到正常水平,提示其对免疫受抑小鼠有较强的正免疫调节作用,推断通过增强免疫功能受抑制机体的免疫功能可能是达肝清治疗乙型肝炎的作用机制之一。在一定的剂量范围内,达肝清的作用有明显的剂量依赖关系。

达肝清主要由三姐妹、叶下珠、绞股蓝和黄芪等中草药精制而成,这些药物及其组方对免疫功能都具有一定的正调节作用。叶琦莉^[20]的研究显示,以三姐妹为君药的复方三姐妹片能显著提高 CTX 免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬率、T 淋巴细胞转化率和抗体形成细胞数。徐培平等^[21]的研究显示,以叶下珠为主药的叶下珠复方虽然对小鼠抗体的产生有抑制作用,但能增强小鼠单核巨噬细胞的吞噬功能。绞股蓝能提高免疫抑制小鼠的胸腺和脾指数,提高吞噬功能、促进 IgG 抗体的产生,促进 T 细胞增殖和 NK 细胞活性^[22]。黄芪则是经典的扶正中药,黄芪对正常小鼠体液免疫无显著影响,对正常小鼠非特异免疫功能及细胞免疫均有增强作用,对免疫抑制小鼠的特异性免疫、非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫功能均有增强作用^[23-25]。达肝清的主要组方都有正免疫调节作用,故全方也具有较显著的正免疫调节作用。虽然我们的研究显示达肝清对免疫受抑小鼠有较强的正免疫调节作用,但其具体的作用机制仍有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] DENG J G, ZHENG Z W, WANG Q, *et al.* Effect on HbsAg and HbeAg in 2215 cell of 8 Chinese compound recipe [J]. Guangxi J Tradit Chin Med (广西中医药), 2004, 27(4): 43-47.
- [2] Pharmaceutical Administration Bureau of Ministry of Health of the People's Republic of China [S]. The files of governing principle about new drugs (Western medicine) preclinical study (Pharmacy, Pharmacology and toxicology) [新药 (西药) 临床前研究指导原则汇编 (药学、药理学、毒理学)], 1993, 103-104.
- [3] WANG K, WEI P Y, FU R Q, *et al.* The influence of Lusu Tincture on the activities of T lymphocyte and NK cell in the mice [J]. Shanghai J Immunol (上海免疫学杂志), 2002, 22(5): 342-343.
- [4] WANG K, WEI P Y, FU R Q, *et al.* Experiment on the immunological effect of Lusu Tincture in the mice [J]. Acta Guangxi Med Univ (广西医科大学学报), 2001, 18: 833-834.
- [5] CHENG Q. The Method of Pharmacological Study (药理研究方法) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000, 779-780.
- [6] XU X Y, LI Y, XU J. A modified humoral immune assay method: a method of hemolysin determination [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1979, 14(7): 444-445.
- [7] ZHANG H H, CHENG W F. Modulation of substance P on mouse peritoneal macrophages function [J]. Chin J Immunol (中国免疫学杂志), 1989, 5(2): 75-76.

- [8] XU S Y, BIAN R L, CHENG X. Experimental Methodology of Pharmacology(药理实验方法学) [M], Edit 3, Beijing: People' s Medical Publishing House, 2002, 948.
- [9] ZHOU L Y, WANG K, HUANG LQ, *et al.* The effect on immunological function of Gelsium Elegans Benth in the mice [J]. Chin J Exp Clin Immunol(中国实验临床免疫学杂志), 1992, 4(4): 14.
- [10] DONG D P, XU W R, ZHAO J H, *et al.* Detection the lymphocyte proliferation with MTT approach[J]. J Zhenjiang Med Coll(镇江医学院学报), 1994, 4(4): 329-331.
- [11] LIN Z N, DONG S Z, DONG S Y, *et al.* Study and apply of the lymphocyte proliferation function with MTT approach[J]. Chin J Health Lab Technol(中国卫生检验杂志), 2000, 10(1): 8-10.
- [12] HE J S, LI R Z, ZONG T Y. Investigation of NK cell activity measurement[J]. Chin J Immunol(中国免疫学杂志), 1996, 12(6): 356-358.
- [13] WANG Q, WANG B, BAI H Q. Examination of the killing activity of NK cells with modified MTT approach [J]. J Ningxia Med Coll (宁夏医学院学报), 1999, 21(4): 86-88.
- [14] MATSUBARA K, TOKINA T. Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis[J]. Mol Biol Med, 1990, 7(3): 243-260.
- [15] ZHU P F, ZHOU Y L, WANG B C. The number of NK cell in peripheral blood of patients with HBsAb and HBcAg positive chronic hepatitis B [J]. Jiangxi J Med Lab Sci(江西医学检验), 2001, 19(2): 68-70.
- [16] LIVINGSTON BD, ALEXANDER J, CRIMI C, *et al.* Altered helper T lymphocyte function associated with chronic hepatitis B virus infection and its role in response to therapeutic vaccination in humans[J]. J Immunol, 1999, 162(5): 3088-3095.
- [17] LIU Y, HAN Y P, LI J. *et al.* Detection the lymphocyte subsets of the peripheral blood from the patients with chronic hepatitis B [J]. Acta Acad Med Nantong(南通医学院学报), 2004, 24(2): 140-141.
- [18] XING S X. The number and activity of IL-2 in chronic hepatitis B [J]. Foreign Med Sci (Immunol) (国外医学免疫学分册), 1996, 19(1): 49.
- [19] CHOW Y H, HUANG W L, CHI W K, *et al.* Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids co-expressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2[J]. J Virol, 1997, 71(1): 169-178.
- [20] YE Q L. Effect on immunity, influenza virus and bacteria of Astragalus Membranaceus Mixture[J]. Guangxi J Tradit Chin Med (广西中医药), 1992, 15(4): 39-41.
- [21] XU P P, FU L S, WANG X H. The immunological effects of Phyllanthus amarus Compound in chronic hepatitis B [D], Guangzhou, Guangzhou Univ of TCM, 2001. 31-32.
- [22] JI G, ZHENG L. Progress of gynostemma on pharmacology[J]. Acta Acad Med CPAPF(武警医学院学报) 2003, 12(3): 239-241.
- [23] LIN A H, LI Y R. Effects of Radix Astragali on immunologic function in mice [J]. J Fourth Mil Med Univ(第四军医大学学报), 2003, 24(7): cover2.
- [24] CHEN D Y, LAN W. The enhancements of Radix Astragali on immunologic function in mice [J]. J Cell Mol Immunol(细胞与分子免疫学杂志), 2002, 18(1): 52-53.
- [25] XU D J, CHEN M Z. Effect of astragalus polysaccharide on immunologic function in mice [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2003, 7(6): 418-419.