

# 中药天花粉对免疫调节 T 细胞作用的研究

白求恩医科大学第三医学院免疫内科(长春 130021)

毕黎琦 刘继文 宋 怡

**内容提要** 本研究用流式细胞仪测定了天花粉蛋白对健康人组及系统性红斑狼疮患者免疫调节 T 细胞( $T_8^+$ 、 $2H4^+$ 、 $4B4^+$ )数量的影响,同时观察了不同浓度的天花粉蛋白对人淋巴细胞 DNA 合成的作用。研究发现天花粉蛋白可使  $T_8^+$  细胞减少,同时增加  $4B4^+$  细胞数,促进淋巴细胞 DNA 合成。提示天花粉蛋白可通过改变不同功能的免疫调节 T 细胞的比例,起到增强体液免疫功能的作用。

**关键词** 天花粉蛋白 免疫调节 T 细胞 DNA 含量 系统性红斑狼疮

天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)对人体免疫系统的作用已在国内外引起广泛重视。有的学者提出 TCS 有很强的诱发免疫抑制的能力<sup>[1]</sup>,而且还发现它在体外能抑制艾滋病病毒(HIV)的增殖<sup>[2,3]</sup>。本研究目的在于通过检测天花粉蛋白对健康人组及系统性红斑狼疮(SLE)患者免疫调节 T 细胞( $T_8^+$ 、 $2H4^+$ 、 $4B4^+$ )的影响,来估测它用于自身免疫病及免疫缺陷病(如肿瘤、艾滋病)的前景。

## 资料和方法

一、病例选择及分组 健康人组为 12 名健康献血员,男 6 名,女 6 名,平均年龄 29.9 岁。系统性红斑狼疮(SLE)患者组为 10 例,符合美国风湿病学会 1982 年修订的 SLE 诊断标准的患者,男 1 例,女 9 例,平均年龄 32.6 岁,平均病程 7.1 个月。

### 二、试剂

1. 单克隆抗体  $T_8$ ( $CD_8$ )为抑制(细胞毒)T 细胞,  $2H4$ ( $CD_{45}RA$ )为抑制诱导 T 细胞,  $4B4$ ( $CD_{29}$ )为辅助诱导 T 细胞。以上抗体及异硫氰酸荧光素标记抗体均为美国 Coulter 公司产品。

2. TCS 水溶性结晶制剂 购自上海金山制药厂, 1.2 mg/ml。

3. RNA 酶 购自上海生化制药厂,所用浓度为 0.02 mg/ml。

4. 碘化丙啶(PI) 购自 Sigma 公司,所

用浓度为 50  $\mu$ g/ml。

### 三、方法

1. 免疫调节 T 细胞的测定 用间接免疫荧光法。取肝素抗凝静脉血,用 Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液分离周围血单个核细胞(PBMC)。取 U 形底细胞培养板,每孔置入  $5 \times 10^5$  个细胞,分别加入单克隆抗体  $T_8$ 、 $2H4$ 、 $4B4$ ,冰浴 30 min,洗涤 3 次,再加入荧光标记抗体,冰浴 30 min,洗涤 3 次。用美国 Becton-Dickinson 公司生产的 FACscan 流式细胞仪测定结果,激发波长为 488 nm,每份样品分析  $10^4$  个细胞,计荧光阳性细胞百分比。同时,还将分离出的 PBMC 和 TCS 分别加入 96 孔 U 形底培养板中,每份样品分别加 3 孔,每孔加入  $5 \times 10^5$  个细胞和浓度为 240  $\mu$ g/ml 的 TCS 溶液 50  $\mu$ l。置 5%  $CO_2$  孵箱培养 3 天。结束时,用前述间接免疫荧光法,以单克隆抗体  $T_8$ 、 $2H4$ 、 $4B4$  标记淋巴细胞,用流式细胞仪测定。

2. 淋巴细胞 DNA 含量的测定 取 96 孔 U 形底培养板,每孔置入  $5 \times 10^5$  个 PBMC,将孔分成 4 列,除 1 列作为对照不加 TCS 外,另 3 列每列分别加入浓度为 2.4  $\mu$ g/ml、24  $\mu$ g/ml 及 240  $\mu$ g/ml 的 TCS 溶液各 50  $\mu$ l,在 5%  $CO_2$  孵箱培养 3 天。结束时,向每孔加入 RNA 酶 1 ml,置 37°C 培养 30 min。再加入 PI 1 ml,在室温下避光染色 30 min,用流式细胞仪分析不同细胞周期的 DNA 含

量, 每孔分析  $2 \times 10^4$  个细胞。

## 结 果

一、健康人及 SLE 患者 PBMC 加入 TCS 培养前后荧光阳性细胞测定结果 见表 1。

表 1 PBMC 加入 TCS 培养前后免疫调节 T 细胞变化 (% ,  $\bar{x}$ )

| 组 别 例数 | T <sub>s</sub> <sup>+</sup> |        | 2 H 4 <sup>+</sup> |       | 4 B 4 <sup>+</sup> |         |
|--------|-----------------------------|--------|--------------------|-------|--------------------|---------|
|        | 培养前                         | 培养后    | 培养前                | 培养后   | 培养前                | 培养后     |
| 健康人 12 | 20.95                       | 14.86* | 43.52              | 43.69 | 1.59               | 21.76** |
| SLE 10 | 26.98                       | 7.99*  | 21.54              | 16.60 | 34.40              | 44.25*  |

注: 与培养前比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

表 2 加入不同量 TCS 培养后 PBMC 的 DNA 含量 (% ,  $\bar{x}$ )

| 组 别 例数 | 空白对照 |                                |                   | TCS 2.4 $\mu\text{g/ml}$ |                                |                   | TCS 24 $\mu\text{g/ml}$ |                                |                   | TCS 240 $\mu\text{g/ml}$ |                                |                   |
|--------|------|--------------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------|
|        | S    | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | G <sub>2</sub> +M | S                        | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | G <sub>2</sub> +M | S                       | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | G <sub>2</sub> +M | S                        | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | G <sub>2</sub> +M |
| 健康人 12 | 4.18 | 95.08                          | 0.77              | 4.93                     | 93.82                          | 1.24              | 5.32                    | 93.88                          | 0.84              | 15.37*                   | 83.36*                         | 1.21              |
| SLE 10 | 6.70 | 92.58                          | 0.72              | 7.92                     | 92.26                          | 0.82              | 6.75                    | 90.94                          | 0.84              | 16.50*                   | 82.58*                         | 0.99              |

注: 与空白对照比较, \* $P < 0.01$

及 SLE 患者的 T<sub>s</sub><sup>+</sup> 细胞均明显减少, 这表明 TCS 对 T<sub>s</sub><sup>+</sup> 细胞有选择性抑制作用。我们前一阶段的动物实验亦发现, 加入 TCS 培养后 T 细胞减少。但 TCS 所减少的 T<sub>s</sub><sup>+</sup> 细胞是其中担负何种功能的亚群, 是一个很令人感兴趣的问题, 有待进一步探讨。另一方面, 本实验结果显示加入 TCS 后, 4 B 4<sup>+</sup> 细胞明显增多, 在健康人表现更为明显, 2 H 4<sup>+</sup> 细胞无明显变化, 可见 T<sub>s</sub><sup>+</sup> 细胞的增加与能影响 T<sub>s</sub><sup>+</sup> 细胞功能的 2 H 4<sup>+</sup> 细胞无关, 其增加可能是 TCS 有直接促进 4 B 4<sup>+</sup> 细胞增殖的作用。无论其机理为何, 实验证明 TCS 可通过增加 4 B 4<sup>+</sup> 细胞, 加强体液免疫功能。万集金等关于天花粉可使小鼠唾液腺内 IgG 增多<sup>(4)</sup>, 并能促进小鼠脾脏免疫细胞的形成和分化, 使 B 淋巴细胞及浆细胞数量明显增多<sup>(5)</sup> 的实验结果, 也支持本实验论点。

现已证明, T<sub>4</sub><sup>+</sup> 细胞是艾滋病病毒杀伤的对象, 受感染者体内的 T<sub>4</sub><sup>+</sup> 细胞常降至正常情况下的 1/3, HIV 通过各种途径, 逐渐地摧毁免疫系统, 使患者对感染失去抵抗能力。已

由表 1 可见, 加入 TCS 后健康人及 SLE 患者的 T<sub>s</sub><sup>+</sup> 细胞均减少, 而 4 B 4<sup>+</sup> 细胞则增多, 在健康人增多更为明显, 2 H 4<sup>+</sup> 细胞无明显变化。

二、加入不同浓度的 TCS 培养后 PBMC 的 DNA 含量 见表 2。随 TCS 剂量的增加, 健康人及 SLE 患者细胞 S 期 DNA 的合成也随之增加, 在大剂量组增加非常明显, 而 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期 DNA 含量则明显减少, G<sub>2</sub>+M 期 DNA 含量无明显变化。

## 讨 论

本研究发现, 加入 TCS 培养后, 健康人

有报道, 艾滋病患者静脉滴注 TCS 后, T<sub>4</sub><sup>+</sup> 细胞有明显回升<sup>(6)</sup>, 与本研究结果一致。而且本研究证实了 TCS 增加的是 T<sub>4</sub><sup>+</sup> 细胞中的 4 B 4<sup>+</sup> 亚群, 此亚群的功能是辅助 B 细胞产生抗体。因此, 推测 TCS 对于艾滋病患者, 不仅可抑制 HIV 的增殖, 而且还可有针对性地刺激人的淋巴细胞增殖, 提高 T<sub>4</sub><sup>+</sup> 细胞数量, 增进体液免疫功能, 有利于艾滋病患者免疫系统的重建。所以天花粉很有希望成为一种抗艾滋病新药。

目前的研究显示, 自身免疫病患者均有免疫调节 T 细胞异常<sup>(7)</sup>, 主要表现为抑制细胞 (T<sub>s</sub><sup>+</sup>) 功能缺陷, 同时, B 细胞多克隆活化, 功能亢进, 产生大量自身抗体而致病。本研究显示, TCS 可使 SLE 患者 T<sub>s</sub><sup>+</sup> 细胞减少, 而 4 B 4<sup>+</sup> 细胞增多, 可使 SLE 患者已有的免疫失衡状态进一步加重, 所以 TCS 不宜用于 SLE 等自身免疫病患者的治疗。

## 参 考 文 献

1. 周光炎. 天花粉蛋白诱发 CD 8 阳性细胞参与的人体免疫抑

- 制. 上海免疫学杂志 1990; 10(1):1.
2. Mc Grath MS, et al. An inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2844.
3. Ferrari P, et al. Toxicity and activity of purified trichosanthin. AIDS 1991; 5:865.
4. 万集金, 等. 天花粉和五味子对小鼠唾液腺内凝集素受体和免疫球蛋白作用的影响. 福建中医药 1989; 20(3): 15.
5. 万集金, 等. 天花粉和五味子对小鼠脾脏抗体形成细胞的影响. 福建中医药 1988; 19(5): 79, 19.
6. Byers VS, et al. A phase I/II study of trichosanthin treatment of HIV disease. AIDS 1990; 4(12): 1189.
7. 毕黎琦, 等. 系统性红斑狼疮病人淋巴细胞表现型及其与临床相关性的研究. 中华内科杂志 1990; 29(12): 720.

## 益气化瘀法治疗心脏早搏的疗效观察

浙江省椒江市中医院(浙江 317700) 李文浩 徐 刚

笔者采用益气化瘀法治疗 34 例心脏早搏患者, 效果较满意。现报告如下。

**临床资料** 68 例早搏患者均符合《疾病临床诊断和疗效标准》的诊断标准(江苏省卫生厅编, 1990 年江苏科技出版社出版)。随机分为益气化瘀组 34 例与丹参组 34 例。益气化瘀组男 20 例, 女 14 例, 年龄 18~60 岁。病程 0.5~5 年。病因为心肌炎 12 例, 冠心病 10 例, 高血压病 6 例, 功能性 6 例。心电图检查: 房性早搏 9 例, 交界性早搏 5 例, 室性早搏 20 例。丹参组男 18 例, 女 16 例, 年龄 20~62 岁, 病程 0.5~5 年。病因为心肌炎 15 例, 冠心病 8 例, 高血压病 6 例, 功能性 5 例。心电图检查: 房性早搏 10 例, 交界性早搏 6 例, 室性早搏 18 例。

**治疗方法** 益气化瘀组以补阳还五汤加减为基本方: 黄芪 30g 党参 30g 川芎 10g 丹参 15g 红花 5g 赤芍 10g 桃仁 5g 苦参 15g 当归 10g 甘草 6g。频繁早搏, 党参易红参或高丽参; 偏阴虚党参易太子参或西洋参, 加麦冬、五味子; 偏阳虚加仙灵脾、菟丝子; 便秘加瓜蒌仁、柏子仁; 失眠加朱砂安神丸。每日 1 剂, 用水煎成汤剂, 分 2 次口服。连续服药 3 周为 1 个疗程。丹参组用宁波第三制药厂生产的丹参注射液(每支 2ml 含生药 3g)16ml, 溶于 5% 葡萄糖液 500ml 中静脉滴注, 每日 1 次, 连续用药 3 周为 1 个疗程。不服任何中药。治疗前后住院观察两组患者的舌质舌苔, 舌下脉络, 脉象等, 同时进行心电图检查。

**结 果** (1)疗效标准: 显效: 症状消失, 早搏基本消失。好转: 早搏次数减少在 50% 以上。无效: 早搏无改善。(2)临床疗效: 益气化瘀组 34 例, 显效

14 例占 41%, 好转 14 例占 41%, 无效 6 例占 18%, 总有效率 82%; 丹参组 34 例, 显效 9 例占 27%, 好转 11 例占 32%, 无效 14 例占 41%, 总有效率 59%。两组的显效率、总有效率经统计学处理( $P < 0.01$ ), 差异有非常显著性意义, 益气化瘀组的临床疗效优于丹参组。(3)心电图疗效: 益气化瘀组: 房性早搏治疗前 9 例, 治疗后 1 例; 交界性早搏治疗前 5 例, 治疗后 1 例; 室性早搏治疗前 20 例, 治疗后 4 例。丹参组: 房性早搏治疗前 10 例, 治疗后 3 例; 交界性早搏治疗前 6 例, 治疗后 1 例; 室性早搏治疗前 18 例, 治疗后 10 例。

**讨 论** 笔者认为, 心脏早搏乃气虚血瘀所致, 故选用益气化瘀法治疗, 寓补气于化瘀之中, 以改善气血运行。方中黄芪、党参意在补益心气, 勃发心气运血之力, 以解血滞经脉留而不行之阻。实验证明在麻醉家兔和大鼠中, 黄芪能预防多种实验性心律失常, 并能提高家兔心室电致颤阈, 延长离体兔心房有效不应期。黄芪尚能直接扩张麻醉犬的多种部位的血管, 包括肢体血管和心、脑、肠等内脏血管, 从而降低全身血压和外周血管阻力, 减低心脏后负荷, 同时能扩张冠状血管。单用活血化瘀法, 虽可达积滞去而正气自伸, 即以通为补。然以通为补其来也渐, 其力也薄, 对于早搏的治疗, 恐难奏效。舍参芪类补气之品不足以当此重任。益气化瘀法, 弥补活血化瘀以通为补之不足, 其着眼点在于此。经临床观察, 益气化瘀法治疗早搏的显效率、总有效率明显优于活血化瘀的丹参组, 表明了益气化瘀法治疗早搏是一种有效的方法。

## Abstract of Articles

### **A Study on Combined Acupuncture and Enflurane Anesthesia for Craniotomy**

Wang Bao-guo (王保国), Wang En-zhen (王思真), Chen Xin-zhong (陈新中), et al

*Beijing Tiantan Hospital, Beijing (100050)*

The reinforcing effect of transcutaneous acupoint electric stimulation (TAES) with enflurane anesthesia during craniotomy was studied. 110 neurosurgical patients were randomly divided into three groups. Anesthesia was maintained with enflurane in group A (n=40); in group B, enflurane anesthesia was supplemented by TAES with Han's acupoint nerve stimulator (HANS) at Hegu, Yuyao and Fengchi points on the operated side (n=40); in group C, enflurane anesthesia was supplemented by TAES and scalp infiltration with 0.5% procaine (n=30). The results showed that the minimum alveolar concentration (MAC) of enflurane in group B and C decreased 37.8–47.0% and 42.1–66.1% respectively than that in group A. The hemodynamics was more stable during operation, and the patients recovered faster after operation in group B and C. It was concluded that TAES with HANS significantly potentiated the anesthetic effect and decreased the side effects of enflurane during operation, and that the triple combination of TAES, enflurane and scalp infiltration with procaine proved to be a better anesthetic method for craniotomy.

**Key words** craniotomy, acupuncture anesthesia, enflurane, hemodynamics

(Original article on page 10)

### **A Study of Classification and Treatment of Combined TCM-WM of 69 Cases of Aplastic Anemia**

Yu Rong-xi (虞荣喜), Luo Xiu-su (罗秀素), et al

*Zhejiang Hospital of TCM, Hangzhou (310006)*

Hemopoietic progenitor cells (BFU-E, CFU-E and CFU-GM) of 69 cases of aplastic anemia were cultured in vitro while the sensitivity of CFU-E and BFU-E to androgen was assayed. The suppressive effect of peripheral blood mononuclear cell (PBMNC) from patients on normal CFU-GM growth was also studied. Hence 69 cases of aplastic anemia were divided into three types: 10 cases of stem cell deficiency type, 30 cases of immuno-mediated type and 29 cases of androgen response type. According to above classification, different treatment programs were practiced using both TCM and western medicine. In the androgen response type, androgen and TCM were used and the effective rate reached 92.3%. In the immuno-mediated type, in addition to TCM. Immunosuppressive agents were cautiously used and the effective rate was 70.6%. As for the stem cell deficiency type, 10 patients' conditions were usually very severe so comprehensive therapeutical means were adopted and 3 cases were improved. The overall response rate of these three was 73.2%. These results showed that the treatment program under the direction of classification have greatly improved the curative effect.

**Key words** aplastic anemia, bone marrow culture, androgen sensitivity

(Original article on page 14)

### **The Effect of Trichosanthin on Immunoregulatory T Lymphocytes**

Bi Li-qi (毕黎琦), Liu Ji-wen (刘继文), Song Yi (宋 怡)

*The Third Medical College, Norman Bethune University of Medical Science,*

*Changchun (130021)*

The effect of trichosanthin (TCS) on immune system has drawn attentions of the investigators both at home and abroad. The purpose of this study is to evaluate the prospects of TCS on autoimmune diseases and immunodeficiency diseases by detecting the immunoregulatory T lymphocytes (T8, 2H4, 4B4) count and cellular DNA content under the influence of TCS with flow cytometer using indirect immunofluorescence technique and lymphocyte culture in normal subjects and systemic lupus erythematosus patients. The results showed that the percentage of T8+ cells