

清解灵诱生的内源性集落刺激因子 对增强宿主防御功能的作用*

薛茵¹ 潘菊芬¹ 马凤蓉¹ 丁洁² 吴威中²

内容提要 目的:为探讨清解灵(QJL)诱生的内源性集落刺激因子(G-CSF)对增强宿主防御功能的作用。方法:给正常小鼠注射清解灵,获取血清,用 ELISA、骨髓细胞增殖及集落生成试验证明该血清含有 G-CSF 活性后,将该血清被动转输给 8 只正常 BALB/C 小鼠(实验组),48h 后用大肠杆菌攻击该鼠,次日杀鼠,测脾悬液中大肠菌数。对照组(8 只)以正常小鼠血清取代实验组用的血清,而后同法处理。结果:经清解灵注射的小鼠血清与抗 G-CSF 单克隆抗体呈阳性反应,该血清可促进同系鼠的骨髓细胞增殖,并使之在固体培养基中形成以中性粒细胞为主的细胞集落。说明该血清确实含有 G-CSF。被动转输此血清的实验组小鼠,在受大肠杆菌攻击之后其脾悬液中的大肠杆菌数量比对照组显著减少($P < 0.01$)。结论:清解灵可增强宿主的抗感染能力,其部分机理可能与诱导机体产生内源性 G-CSF 有关。

关键词 清解灵 内源性集落刺激因子 宿主抗感染能力

Effect of Qingjieling Induced Endogenous Granulocyte-Colony Stimulating Factor in Strengthening Host Defence against Bacteria Xue Yin, Pan Jufen, Ma Fengrong, et al Dept. of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin (300070)

Objective: To explore the effect of Qingjieling (QJL) induced endogenous granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in strengthening host defence against bacteria in mice. **Methods:** Serum containing G-CSF was obtained by injecting 5 mg/g of QJL to mice. The CSF activity was identified by ELISA, bone marrow cell proliferation and colony-forming assays. Forty-eight hours after the serum was infused to 8 normal BALB/C mice, the mice was sacrificed and the number of E. coli in spleen suspension was measured. Eight mice of the control group were treated in the same way but with normal serum of mice instead of the QJL treated serum. **Results:** The QJL treated serum showed a positive reaction with anti-G-CSF McAb, it promoted the proliferation of bone marrow cells and formation of cell colony of neutrophilic granulocyte type in the culture medium, these results indicated that the serum contained G-CSF undoubtedly. The number of E. coli in spleen suspension of test group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$). **Conclusions:** QJL does enhance the defense capability of the host, the mechanism of which partly might be due to the induction of endogenous G-CSF in the host.

Key words Qingjieling, endogenous granulocyte-colony stimulating factor, host defence against bacteria

中药方剂清解灵是一种清热解毒药,经数十年中西医结合治疗急腹症的临床实践,证明其有较好的疗效,免疫分子中的细胞因子在人体神经内分泌免疫调节网络系统中与神经肽及激素共同起到沟通网络各方面以维持机体平衡的作用,因而某些细胞因子就被考虑用于调整机体平衡的生物制剂作为辅助治疗,其中粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony stimulating

factor, G-CSF)已被批准用于化疗后升高白细胞,减少感染并发症等,有明显改善症状,降低病死率的效果,我们近年的工作^[1]说明清解灵有诱生内源性 G-CSF,并有提高防御能力的作用,本研究进一步探讨此防御功能的增强是否与其含有 G-CSF 的血清有关,旨在揭示清解灵治疗急腹症的部分机理。

材料和方法

1 材料:

1.1 清解灵药液 天津市中西医结合治疗急腹

* 本课题为天津市科委资助项目(No. 92009380)

1. 天津医科大学免疫学教研室(天津 300070);2. 天津市中西医结合急腹症研究所免疫室

症研究所中药制剂研究室加工制成,其成分包含蒲公英、败酱草、白头翁、玄参、甘草各 15g,配制为 100g/100ml 原液,无菌 4℃ 保存。

1.2 动物 BALB/C 小鼠购自北京实验动物研究所,7~9 周龄,体重 20g 左右。

1.3 大肠杆菌由天津市中西医结合急腹症研究所细菌研究室提供。

1.4 伊红美蓝琼脂培养粉(日本产)。

1.5 其他试剂 G-CSF ELISA 试剂盒(协和医科大学提供);鲎试验试剂盒(上海医学化学试剂研究所提供),RPMI-1640、胎牛血清、琼脂粉(GIBCO 提供)。

2 方法

2.1 清解灵诱生 CSF 及 CSF 活性鉴定 具体方法同文献^[1],将 10 只 BALB/C 小鼠分别称重,以每克体重 0.5mg 清解灵药量(经筛选找出的最佳剂量)腹腔注射小鼠,3h 后采血分离血清,混合后过滤除菌,冷冻保存。同法用生理盐水取代清解灵注射小鼠,取血清作为阴性对照。又以一般通用的胎肌浸出液作为天然 CSF 的阳性对照。血清中 CSF 活性鉴定采取 3 个指标:(1)抗 CSF 单抗 ELISA 试剂盒测定。(2)将待测血清按 30% 加入 RPMI-1640 培养液中,与同系小鼠骨髓细胞 $1 \times 10^5/L$ 培养于 96 孔板中,72h 后用 MTT 显色测定 OD 值,观察是否有增殖。(3)骨髓细胞集落形成实验:同系小鼠骨髓细胞与适量的胎牛血清、RPMI-1640、待测血清、琼脂等混合,使细胞终浓度为 $1 \times 10^5/L$,琼脂为 0.3%,培养基为 20% FCS RPMI-1640,待测血清 20%,倾入 24 孔板中,37℃ 5% CO_2 培养 7~10 天,观察细胞集落数,进一步对含集落的琼脂洗涤晾干后作 Giemsa 染色,观察细胞形态类别。

2.2 大肠菌毒力的增强及适宜攻击量的确定 将大肠菌冻干品用盐水稀释后注入小鼠腹腔,48h 后取脾制成悬液,再注入另一只小鼠,如是共 3 次通过鼠体,使细菌毒力增强后,于末次过鼠体后将该鼠脾悬液稀释为不同浓度,分别感染注射健康鼠,48h 后取脾制成悬液,取 0.1ml 培养于伊红美蓝平板培养基,次日观察及计数紫黑色菌落数,选出菌落成单个分散生长、计数在 30~50 个之间的感染用细菌数作为下述抗感染实验用。

2.3 含诱生 CSF 血清被动输注对宿主抗感染作用的实验 取 20g 左右小鼠分成两组,每组 8 只,实验组腹腔注入含诱生 CSF 的血清每只 0.5ml,对照组同法注入正常鼠血清,48h 后经腹腔注入经上述方法 2.2 筛选确定数量的大肠杆菌进行攻击,24h 后杀鼠取脾,

以 5ml 盐水制成脾悬液,取 0.1ml 散铺培养于伊红美蓝平板上,次日观察计数平板上生长的菌落数。用 t 检验比较两组菌落数的差异。

2.4 清解灵药液中 LPS(脂多糖, Lipopolysaccharide)含量的测定 用鲎试验法,按说明书程序操作。

结 果

1 清解灵处理鼠血清的 CSF 活性测定 见表 1。说明该血清中含有能刺激骨髓细胞增殖并在软琼脂培养基中形成集落的成分,即 CSF 的存在,又按集落细胞的形态为中性粒细胞,该血清尚能与抗 G-CSF 单抗特异性结合出现 ELISA 阳性反应,进一步可证明该 CSF 属 G-CSF,提示清解灵有诱生机体产生内源性 G-CSF 的作用,经鲎试验证明本工作所用清解灵药液所含 LPS 量极微($<1pg/ml$),远不足以诱导小鼠产生 CSF,进一步表明是清解灵本身具有诱导小鼠产生内源性 CSF 的作用,排除了中药中因污染杂菌而残留 LPS 的作用的可能。

表 1 清解灵处理鼠血清 G-CSF 活性

组 别	骨髓细胞增殖(OD 值)	抗 G-CSF 单抗(OD 值)	骨髓细胞集落形成(集落数/ 1×10^5 个细胞)	活性单位(u/ml)
清解灵处理	1.562	0.36	28.7 ± 2.64	287
生理盐水处理	0.806	0.16	0	0
组织衍生 G-CSF 血清	1.680	ND	140	560

2 大肠杆菌攻击(感染)实验用量 经筛选证明以每只鼠注入 2.5×10^8 个菌为宜,此时脾悬液 0.1ml 培养于一个平板上,可观察到 30~50 个分散的菌落,便于准确计数。

3 含诱生 G-CSF 的血清被动输注对宿主抗感染的作用 被动转输正常鼠血清的小鼠经大肠菌攻击后,脾内含菌量为 245 ± 130 个,而被动转输清解灵处理鼠(含诱生 G-CSF)的血清,受同等量大肠菌攻击后,脾内仅可测到 25.0 ± 18.5 个菌,两组比较有显著的差异($P < 0.001$)。

讨 论

1 近年研究证明清解灵在与西医结合治疗急腹症时可发挥解毒保肝及扶正的作用^[2]。我们以往的工作发现^[1]清解灵具有在体内诱生内源性 G-CSF 的作用,后者可在血清中检出。本研究进一步以此血清被动转输正常小鼠后观察宿主对大肠菌攻击的保护能力,结果显示宿主体内的细菌数显著少于对照组用正常鼠血清被动转输者脾内细菌数($P < 0.001$),说明清

解灵具有增强宿主防御功能的作用,其机理至少与该中药诱生的内源性 G-CSF 有关。

2. G-CSF 是一种能刺激骨髓造血细胞分化成熟为粒细胞并增殖活化的细胞因子,它与 TNF、IL-1 等致炎细胞因子不同,一般来说,对于机体是有益的,因而其重组品目前已被广泛用于临床作为升高白细胞,减少并发症,改善症状,降低病死率等辅助治疗用。但最近国外报道^[3]多次使用 CSF 的患者可出现抗 CSF 抗体,从而减少了疗效,其原因是重组品缺乏天然品所具有的一种糖链结构之故。清解灵在体内可诱生内源性 G-CSF,反映本药治标与治本相结合的特性,用此药还可免去了用外源性 G-CSF 做辅助治疗之需要,同时内源性 G-CSF 为天然品,没有重组品可诱生特异抗体的缺点。

3 鉴于中药的免疫效应往往存在体内外分离的现象(体内外效应恰相反)^[4],我们观察清解灵对细胞因子的诱生作用不是在体外通过某种免疫细胞来进行,而是观察在体内复杂环境中所出现的诱生效应以

及所诱生的细胞因子在体内所发挥的作用,以此来揭示清解灵所发挥的免疫药理作用的整体性,为今后观察对人体的效应提供参考。

参 考 文 献

1. 马凤蓉,潘菊芬,丁洁. 清热解毒药清解灵对内源性集落刺激因子的诱生作用. 中国免疫学杂志 1996;12(3):167—170.
2. 胡家石,吴威中,鲁焕章. 内窥镜鼻胆道引流实践—清解灵治疗急性重症胆管炎的临床观察. 中西医结合杂志 1989;3(9):144—148.
3. Melstedt H. Induction of anti-granulocyte macrophage colony stimulating factor antibodies against exogenous nonglycosylated GM-CSF: Biological implications. J. Interferon Research 1994;14:179—180.
4. 杨贵贞. 谈谈中医免疫学的研究思路和方法. 中国免疫学杂志 1988;4(6):321—324.

(收稿:1997-03-17 修回:1998-04-20)

金纳多治疗冠心病心绞痛 36 例

解跃辉 丁菊华

我们于 1997 年 1 月~8 月用金纳多片治疗冠心病心绞痛 36 例,现报告如下。

资料与方法

1 病例选择 74 例均为心脏科住院患者,符合卫生部《心血管系统药物临床研究指导原则》中“冠心病心绞痛诊断标准”,采用单盲对照法随机分为两组,治疗组 36 例,男 33 例,女 3 例;年龄 58~84 岁,平均 68 ± 7 岁;病程 1~16 年,平均 7 ± 6 年;其中劳力性心绞痛 9 例,混合性心绞痛 27 例。对照组 38 例,男 36 例,女 2 例;年龄 56~87 岁,平均 69 ± 9 岁;病程 6~17 年,平均 13 ± 2 年;其中劳力性心绞痛 11 例,混合性心绞痛 27 例。

2 给药方法 治疗组口服金纳多片(德国威玛舒培博士药厂生产)40mg,每日 3 次,连服 3 个月。对照组口服小剂量阿斯匹林片(福建宝仁德药业)40mg,每日 1 次,连服 3 个月。实验期间,两组原使用消心痛治疗心肌缺血剂量不变。

3 观察方法 每日一次询问记录临床症状及不适,分别于用药前及用药 1 个月、2 个月、3 个月做常规 12 导心电图。

结 果

1 疗效评定标准 根据中华人民共和国卫生部药政局 1993 年制定的《心血管系统药物临床研究指导原则》。

2 结果 (1)症状疗效:治疗组 36 组例中显效 5 例(13.9%),有效 26 例(72.2%),无效 5 例(13.9%),总有效率 86.1%。对照组 38 例中显效 6 例(15.8%),有效 26 例(68.4%),无效 6 例(15.8%),总有效率 84.2%,经 Ridit 检验,两组症状疗效无显著性差异($P > 0.05$)。(2)心电图疗效:治疗组 36 例中显效 3 例(8.3%),有效 12 例(33.3%),无效 21 例(58.3%),总有效率 41.7%。对照组 38 例中,显效 5 例(13.2%),有效 10 例(26.3%),无效 23 例(60.5%),总有效率 39.5%。经 Ridit 检验两组心电图疗效差别不显著($P > 0.05$)。

讨 论 金纳多,是银杏叶提取物,其中的萜类成分对血小板有很强的拮抗作用,临床上适合用于冠心病,闭塞性脑血管病,特别是合并有高粘滞血症的患者。本研究通过单盲治疗对照的方法观察金纳多对冠心病心绞痛的疗效,观察到该药的症状疗效 86.1%,心电图疗效 41.7%,与国产小剂量阿斯匹林组疗效近似。

(收稿:1997-12-08 修回:1998-04-18)