

六味地黄汤活性部位 3A 的免疫调节作用机理研究^{*}

杨 胜 张永祥 吕晓东 乔善义 董剑英 赵毅民

内容提要 目的 对六味地黄汤活性部位 3A 的免疫调节作用机理进行初步研究。方法 观察 3A 对环磷酰胺(Cy)处理小鼠,荷瘤小鼠和快速老化小鼠的 T 细胞亚群, B 细胞产生 IgG 水平, γ 干扰素(IFN- γ) mRNA 的表达水平的影响及体外活性研究。结果 口服给予 3A 对 3 种模型小鼠脾脏 T 细胞亚群的变化均具有不同程度的恢复作用, 并促进快速老化小鼠脾细胞分泌 IgG, 提高 Cy 处理小鼠脾细胞 IFN- γ mRNA 的表达水平。结论 3A 对免疫功能的改善作用与调节 T、B 细胞的比例或改善其功能具有一定的关系。

关键词 六味地黄汤 活性部位 免疫调节 T 细胞亚群 IgG γ 干扰素 RT-PCR

Study on Immunomodulating Mechanism of the Active Fraction of Liuwei Dihuang Decoction YANG Sheng, ZHANG Yong-xiang, LU Xiao-dong, et al *Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medicine, Beijing (100850)*

Objective : To investigate the immunomodulating mechanism of 3A, an active fraction extracted from the ethanol-soluble portion of Liuwei Dihuang Decoction (LWDHD). **Methods** : Influence of 3A on T-lymphocyte subsets, IgG production of B cells, interferon- γ (IFN- γ) mRNA expression in cyclophosphamide (Cy)-treated mice, tumor bearing mice and senescence accelerated mouse-prone/8 (SAMP8) were assessed in vivo and in vitro. **Results** : Oral administration of 3A could elevate the decreased T-lymphocyte subsets in all model mice, it also could promote the IgG secretion of splenic cells in SAMP8 and increase IFN- γ mRNA expression in Cy-treated mice. **Conclusion** : The immunomodulating effect of 3A is related with its effects in regulating ratio of T and B cells or in improving their functions.

Key words Liuwei Dihuang Decoction, active fraction, immuno-modulating, T-lymphocyte subsets, immunoglobulin G, interferon- γ , RT-polymerase chain reaction

六味地黄方是中医‘滋补肾阴’的经典代表名方,临床被广泛用于治疗免疫系统或与免疫系统功能失调有关的疾病。现代实验药理学研究表明,六味地黄丸(方)对机体的免疫功能具有明显的调节作用^(1~3)。我们应用药理学与化学密切合作的研究方法,在药理评价导向下,对六味地黄方中发挥免疫调节的活性成分进行了定向追踪分离,逐步分离获得了多个活性部位⁽⁴⁾。研究表明主要活性部位之一 3A 对环磷酰胺处理小鼠,荷瘤小鼠和快速老化小鼠(senescence accelerated mouse, SAM)的免疫功能低下具有调节作用。本研究初步探讨了 3A 的免疫调节作用机理。

材料与方法

1 3A 的制备 六味地黄汤剂经乙醇溶解,正丁醇萃取,多步硅胶柱层析分离,冻干得活性部位 3A。

2 主要试剂 RPMI-1640 培养液,美国 Gibco 公司产品;环磷酰胺(Cyclophosphamide, Cy),上海华联制药厂产品;氚标胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR),中国原子能科学研究院同位素研究所;刀豆蛋白 A (Con A),美洲商陆(PWM),脂多糖(LPS),Sigma 公司;荧光标记的 CD₄⁺ 或 CD₈⁺ 抗体,北京大学医学部免疫研究室;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 抗体,邦定公司产品;总 RNA 提取试剂盒,逆转录试剂盒, Taq DNA 聚合酶, Promega 产品。

3 动物及处理

3.1 SAM 抗快速老化亚系(SAM-resistance/1, SAMR1),快速老化亚系(SAM-prone/8, SAMP8),从日本京都大学引进,在本院动物室繁殖饲养。饲养室温(20±2)℃,饮水不限,每日光照、黑暗各 12h。本研究选 9 月龄的 SAMR1 及 SAMP8,雌性,用于实验。给药组每日给予 1 次口服,连续 7 或 14 天,剂量除注明外均为 0.3g/kg,体积 0.1ml/10g;对照组给予等体积蒸馏水。

^{*} 国家重点基础研究发展规划项目(No. G1999054401)及‘九五’国家攀登计划预选项目资助课题

3.2 Cy 处理小鼠 NIH 纯系小鼠, 二级, 雌性, 6~8 周龄, (20 ± 2) g, 中国人民解放军总医院动物中心提供。将小鼠随机分为 3 组(对照、Cy 对照及 Cy 加 3A), Cy 于给药后 3 天给予 1 次, 50mg/kg, 腹腔注射 3A 给药剂量及方法同 SAM。

3.3 S_{180} 荷瘤小鼠 NIH 纯系小鼠, 雌性, 6~8 周龄, (20 ± 2) g; 将小鼠随机分为 3 组(对照、 S_{180} 及 S_{180} 加 3A), S_{180} 瘤细胞小鼠体内传代, 取富含 S_{180} 瘤细胞的小鼠腹水, 调整细胞浓度为 1×10^6 /ml, 注射于小鼠右腋下, 0.2ml/只。小鼠自移植瘤细胞后 24h 开始口服给予 3A, 0.3g/kg, 每天 1 次, 于第 9 天处死动物进行实验。

4 方法

4.1 T 细胞亚群检测 按文献方法⁽⁵⁾, 取小鼠脾脏, 制备 2×10^6 /ml 的脾细胞悬液, 0.1ml/管分装, 离心, 在细胞沉淀中分别加入荧光标记的 CD_4^+ 或 CD_8^+ 抗体, 4℃ 放置 30min, 用细胞洗涤液洗涤 3 次后, 加入荧光细胞保存液, 流式细胞仪计数 CD_4^+ 和 CD_8^+ 细胞的比例。

4.2 淋巴细胞增殖实验 方法参考文献⁽⁵⁾。小鼠断头处死后无菌取脾, 制备脾细胞悬液 5×10^6 /ml, 取 100 μ l 悬液加入 96 孔培养板, 同时加入 50 μ l 等体积的 RPMI-1640 液或 Con A (终浓度 1 μ g/ml) 或 LPS (终浓度 2.5 μ g/ml), 加入 50 μ l 不同浓度药物。5% CO_2 , 37℃ 温箱孵育 56h, 每孔加入 20 μ l 3H -TdR (7.4KBq/孔), 继续培养至 72h, 用多头细胞收集仪将细胞收集到玻璃纤维滤膜上, 80℃ 烘干后于液体闪烁计数仪测 cpm 值。

4.3 脾细胞培养上清中 IgG 水平的检测 方法参考文献⁽⁵⁾。小鼠无菌取脾, 制备脾细胞悬液 2.5×10^6 /ml, 另配制 80 μ g/ml 美洲商陆(PWM), 各取 0.5ml 加入 24 孔板内, 5% CO_2 , 37℃ 培养 7 天, 离心收集上清, -20℃ 保存。实验时用羊抗小鼠 IgG 单抗包被聚苯乙烯板, 依次加入 0.05ml 脾细胞培养上清, 酶标抗体, 反应后加入底物, 在酶联免疫检测仪上测 OD 值。

4.4 定量 PCR 实验

4.4.1 引物设计 本实验采用 β -actin 为内标, 根据 Genbank 的序列, 用 Goldkey 软件分别设计 β -actin, γ 干扰素 (IFN- γ) 序列的上下游引物, 如下: β -actin 5' ctatcggaatgagcggctc3', 5' cttaggagttgggggtg-gct3'; IFN- γ 5' cccctctggctgttactgc3'; 5' ctcttttccgcttcttag3'。由上海 Sangon 公司合成。

4.4.2 总 RNA 提取 按文献方法⁽⁶⁾, 取 5×10^7 的细胞, 加预冷的异硫氰酸胍变性溶液 1ml, 匀浆, 加 NaAc (2mol/L, pH4.0) 0.2ml, 酚-氯仿-异丙醇混合液

1ml, 震荡, 4℃, 10 000r/min 离心 20min, 吸取上清, 加等容积的异丙醇, -20℃ 放置 2h 以上。0℃, 10 000r/min 离心 15min, 向沉淀中加入 1ml 变性溶液, 搅拌至 RNA 溶解, 加 NaAc (2mol/L, pH4.0) 0.1ml, 酚-氯仿-异丙醇混合液 1ml, 震荡, 4℃, 10 000r/min 离心 20min, 上层水相转移到 5ml 离心管中, 再加等容积异丙醇沉淀, 离心后, 用预冷的 75% 乙醇洗涤沉淀, 并按前法离心, 吸去乙醇, 在真空中干燥沉淀 15min。用无 RNA 酶的水溶解沉淀, -20℃ 保存备用, 同时紫外定量。

4.4.3 逆转录反应 按文献方法^(6,7), 在 0.5ml Eppendorf 管中加入 rRNasin (4×10^7 u/L) 0.5 μ l, Oligo (dt) 15 引物 (0.5g/L) 1 μ l, 总 RNA 2 μ g, MgCl₂ (25mmol/L) 4 μ l, 5 $\times$ 逆转录缓冲液 4 μ l, AMV 逆转录酶 (2.5×10^7 u/L) 0.6 μ l, 补加无 RNA 酶的水至总反应容积为 20 μ l, 混匀, 42℃ 反应 1h, 96℃ 5min 终止反应, 冰浴冷却 5min, -70℃ 保存。

4.4.4 PCR 反应 按文献方法^(6,8) 在 0.5ml Eppendorf 管中依次加入灭菌水 35 μ l, 10 $\times$ 缓冲液 5 μ l, MgCl₂ (25mmol/L) 5 μ l, dNTP (10mmol/L) 1 μ l, 细胞因子与 β -actin 的 3' 和 5' 端引物 (2.5u/L) 各 2 μ l, 逆转录产物 2 μ l, Tap DNA 聚合酶 (5000u/L) 0.25 μ l, 混匀, 覆盖石蜡油 40 μ l, 稍加离心, 放入 PCR 仪。95℃ 变性 3min, 设置反应程序 94℃ 变性 1min, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min 30s, 周期为 34 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。-20℃ 保存。

4.4.5 PCR 产物定量 吸取 12 μ l PCR 产物, 加入 3 μ l 凝胶载样缓冲液, 在 2% 的琼脂糖凝胶, 1 $\times$ TBE 缓冲液条件下电泳。电泳结果经扫描后进行图像数据分析, 以 IFN- γ / β -actin 的比值反应细胞因子的 mRNA 的表达水平。

5 统计学处理 两组间均数的比较采用 t 检验进行。

结 果

1 3A 对 Cy 处理小鼠 T 细胞亚群的影响 见表 1。Cy 处理小鼠脾脏 T 细胞亚群发生了明显变化, CD_8^+ 细胞数显著下降。口服给予 3A (0.3g/kg, 7 天) 对 Cy 处理小鼠脾脏 T 细胞 CD_8^+ 亚群的降低具有明显恢复作用。

2 3A 对 S_{180} 荷瘤小鼠 T 细胞亚群的影响 见表 2。小鼠于接种 S_{180} 细胞后第 9 天检测脾脏 T 细胞亚群。结果表明, 荷瘤组小鼠脾脏 CD_4^+ 及 CD_8^+ 细胞数

表 1 3A 对 Cy 处理小鼠 T 细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T 细胞亚群 (%)	
		CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺
对照	3	26.0 ± 1.4	19.0 ± 2.5
Cy 对照	3	23.6 ± 2.1	14.9 ± 0.5 *
Cy 加 3A	3	23.3 ± 0.5	19.6 ± 0.4 [△]

注 与对照组比较, * $P < 0.05$ 与 Cy 对照组比较, $\Delta P < 0.01$
均明显下降。3A 给药组(0.3g/kg, 7 天)小鼠 T 细胞 CD₄⁺ 亚群比例有显著性提高, CD₈⁺ 亚群比例也有所升高, 但与 S₁₈₀ 对照组比较差异无显著性。

表 2 3A 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠 T 细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T 细胞亚群 (%)	
		CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺
对照	3	22.1 ± 0.9	15.4 ± 1.7
S ₁₈₀ 对照	3	17.3 ± 0.4 **	12.4 ± 0.4 *
S ₁₈₀ 加 3A	3	21.7 ± 1.0 [△]	14.9 ± 1.6

注 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 S₁₈₀ 对照组比较, $\Delta P < 0.01$

3 3A 对 SAM 脾脏 T 细胞亚群的影响 见表 3。SAMP8 脾脏 CD₄⁺ 细胞数较同月龄 SAMR1 明显下降, CD₈⁺ 细胞数也有下降趋势。口服给予 3A (0.3g/kg, 14 天)对 SAMP8 CD₄⁺ 及 CD₈⁺ 细胞数均有一定的提高作用, 但与 SAMP8 对照组比较差异无显著性。

表 3 3A 对 SAM 脾脏 T 细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T 细胞亚群 (%)	
		CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺
SAMR1 对照	4	26.1 ± 0.4	21.5 ± 3.2
SAMP8 对照	4	21.8 ± 1.5 *	17.7 ± 1.2
SAMP8 加 3A	4	23.4 ± 0.2	19.9 ± 2.7

注 与 SAMR1 对照组比较, * $P < 0.05$

4 3A 对 SAMP8 脾细胞分泌 IgG 能力的影响 见表 4。9 月龄 SAMP8 口服给予 3A (0.03、0.1、0.3g/kg, 14 天)后, 取脾细胞体外培养, 应用 ELISA 检测在 PWM 诱导下 IgG 的产生及分泌水平。结果表明, SAMP8 脾细胞产生 IgG 的能力较同月龄 SAMR1 明显降低。3A 给药组脾细胞产生并释放于培养上清中的 IgG 水平明显升高, 提示 3A 对 SAMP8 脾细胞分泌 IgG 的能力有明显的促进作用。

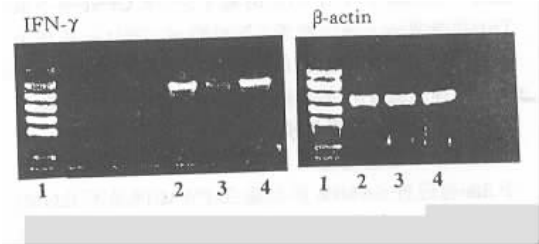
表 4 3A 对 PWM 诱导 SAMP8 脾细胞分泌 IgG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3A 剂量 (g/kg)	IgG (OD 值)
SAMR1 对照	5	—	0.073 ± 0.037
SAMP8 对照	5	—	0.034 ± 0.013 *
SAMP8 加 3A	5	0.03	0.119 ± 0.037 [△]
	5	0.1	0.170 ± 0.031 [△]
	5	0.3	0.180 ± 0.027 [△]

注 与 SAMR1 对照组比较, * $P < 0.05$ 与 SAMP8 对照组比较, $\Delta P < 0.01$

5 3A 对 Cy 处理小鼠脾细胞 IFN- γ mRNA 水平的影响 小鼠经 Cy 处理后 5 天提取脾细胞总 RNA,

经反转录后, 以 β -actin 为内标, 应用定量 PCR 检测 IFN- γ mRNA 水平。IFN- γ 和 β -actin 的 RT-PCR 产物电泳图谱, 见图 1。对凝胶电泳图进行图像分析结果表明, 对照组脾细胞 IFN- γ mRNA 表达水平为 1.102 ± 0.221 , Cy 处理小鼠则明显降低, 为 0.691 ± 0.061 。口服给予 3A (0.3g/kg, 7 天), Cy 处理小鼠脾细胞 IFN- γ mRNA 的表达水平提高到 0.990 ± 0.096 。



1 为 DNA-markers, 2 为对照组, 3 为 Cy 对照组, 4 为 Cy 加 3A

图 1 IFN- γ 、 β -actin 的 PCR 产物凝胶电泳结果

6 3A 体外应用对正常小鼠脾细胞免疫功能的作用 见表 5。3A 在 $10\mu\text{g/ml}$ 时, 对 Con A 诱导的脾细胞增殖反应具有明显的促进作用。对 LPS 诱导的脾细胞增殖反应有增高的趋势, 但与对照组比较差异无显著性。随浓度的增加, 对自发或 Con A 及 LPS 诱导的脾细胞增殖反应则表现为抑制作用, 表现出明显的量效关系。

表 5 3A 体外对 Con A 及 LPS 诱导的小鼠脾细胞增殖反应的影响 (cpm, $\bar{x} \pm s$)

	脾细胞增殖		
	—	ConA	LPS
对 照	881 ± 80	66165 ± 1820	9949 ± 1413
3A 10 $\mu\text{g/ml}$	918 ± 59	70788 ± 2736 *	11276 ± 92
50 $\mu\text{g/ml}$	743 ± 194	67165 ± 2206	8354 ± 1130
100 $\mu\text{g/ml}$	607 ± 70 *	54207 ± 5911 *	6449 ± 417 **
200 $\mu\text{g/ml}$	505 ± 88 **	43411 ± 3227 **	4241 ± 251 **
500 $\mu\text{g/ml}$	168 ± 14 **	4435 ± 366 **	330 ± 33 **

注 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

在免疫活性评价导向下, 对六味地黄汤中发挥免疫调节作用的活性成分进行定向追踪分离, 逐步分离获得了多个活性部位。3A 为其中之一, 初步化学分析表明其主要含有多种皂甙组分。我们以往药理学研究表明, 3A 与六味地黄汤具有相似的免疫药理作用, 提示 3A 是六味地黄汤发挥免疫调节作用的主要活性部位之一(待发表)。

本研究表明, Cy 处理小鼠、荷瘤小鼠及 SAM 的脾脏 T 细胞亚群发生了明显变化, CD₄⁺ 及 CD₈⁺ 细胞数明显降低或比例失调, 表明 T 细胞功能障碍是上述三种免疫低下模型动物所表现出的共同特征之一。

口服给予 3A 对模型小鼠脾脏 T 细胞亚群的变化均具有不同程度的恢复作用,提示 3A 对免疫功能的改善作用与调节或恢复 T 细胞亚群的比例或改善其功能具有一定的关系。进而观察了 C_y 对小鼠脾细胞 IFN- γ mRNA 表达水平的影响,结果表明 C_y 使之明显降低。已知 IFN- γ 是 Th1 分泌的主要细胞因子之一,其分泌量的下降反映了 Th1 功能的低下,提示 C_y 处理小鼠 Th1 功能明显下降。给予 3A 可明显提高 C_y 处理小鼠脾细胞 IFN- γ mRNA 的表达水平,提示 3A 对 C_y 处理小鼠脾细胞 Th1 的功能失调具有恢复作用,因此,T 细胞可能是 3A 发挥免疫调节作用的靶细胞之一,调节或改善 T 细胞功能是 3A 的主要作用之一。口服给予 3A 可促进 SAMP8 脾细胞在 PWM 诱导下 IgG 的产生,体外应用 3A 对 LPS 诱导的脾细胞增殖具有低浓度促进和高浓度抑制的作用,均提示 3A 对 B 细胞功能具有调节作用。以上结果提示,3A 对模型小鼠 T、B 细胞功能的低下均有明显的改善作用,提示其作用的靶细胞包括 T、B 细胞。此外,调节 Th 的功能是 3A 发挥免疫调节作用的重要途径之一。

参 考 文 献

1. 李 萍,石晓敏,崔凤连. 六味地黄丸和地黄的免疫药理研究. 中国免疫学杂志 1987 3(5):296—298.
2. 贾泰元. 六味地黄丸的免疫调节作用. 中成药 1994 16(9):34—35.
3. 聂 伟,张永祥. 六味地黄方的现代药理学研究进展. 中药药理与临床 1998 14(5):41—44.
4. 聂 伟,张永祥,茹祥斌,等. 六味地黄方汤免疫调节活性成分化学分离的药理学导向评价. 中国中西医结合杂志 1998 18(5):287—289.
5. 钱玉昆主编. 实用免疫学新技术. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1994:23—27.
6. 魏小龙,张永祥,魏婉丽,等. 用 RT-PCR 方法定量检测中枢学习记忆功能有关基因的表达. 中国药理学通报 2000 16(1):115—118.
7. Dukas K, Sarfati P, Vaysse N, et al. Quantitation of changes in the expression of multiple genes by simultaneous polymerase chain reaction. Anal Biochem 1993 215(1):66—72.
8. Babu JS, Kanangat S, Rouse BT. Limitations and modifications of quantitative polymerase chain reaction. Application to measurement of multiple mRNAs present in small amounts of sample RNA. J Immunol Methods 1993 165(2):207—216.

(收稿 2000-08-23 修回 2000-11-15)