

补肾与健脾复方调节皮质酮鼠 T 细胞凋亡的对比研究*

陈 瑜[△] 沈自尹^{△△} 陈伟华 应 健

内容提要 目的:补肾复方与健脾复方调节皮质酮鼠 T 细胞凋亡的对比研究。方法:采用透射电镜、TUNEL 标记的流式细胞仪分析技术对激活诱导的 T 淋巴细胞凋亡进行定性及定量分析。结果:模型组 T 细胞凋亡(%)为 45.87 ± 7.22 , 正常对照组 34.25 ± 6.47 , 两组比较差异有显著性($P < 0.01$);右归饮组 T 细胞凋亡(%)为 35.90 ± 7.39 , 与模型组比较,差异有显著性($P < 0.01$);补肾益寿胶囊组为 36.20 ± 9.14 , 与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$);四君子汤组 T 细胞凋亡(%)为 36.92 ± 11.82 , 与皮质酮模型组比较差异无显著性($P > 0.05$)。结论:皮质酮鼠激活诱导的 T 细胞凋亡敏感性显著增高,两个补肾复方均可显著降低皮质酮鼠激活诱导的 T 细胞凋亡,而四君子汤对皮质酮鼠激活诱导的 T 细胞凋亡无显著的下调作用,提示下调激活诱导的 T 细胞凋亡可能是补肾法改善皮质酮鼠 T 淋巴细胞功能的重要机制之一。

关键词 皮质酮模型鼠 补肾复方 细胞凋亡

Comparative Study of Modulating Effect of Kidney Tonifying Recipe and Spleen Invigorating Recipe on T-Lymphocyte Apoptosis in Corticosterone Treated Rats CHEN Yu, SHEN Zi-yin, CHEN Wei-hua et al *Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040)*

Objective: To compare the modulating effect of Kidney tonifying recipe (KTR) and Spleen invigorating recipe (SIR) on T-lymphocyte apoptosis (TLA) in corticosterone treated rats (CTR). **Methods:** Qualitative and quantitative analysis on activation-induced TLA was conducted by transmission electron microscope and TUNEL labelled flow cytometry detection. **Results:** TLA percentage of CTR was $45.87 \pm 7.22\%$, while that of normal control rats was $34.25 \pm 6.47\%$, the difference between them was significant ($P < 0.01$). TLA percentage of Youguiyin treated rats was $35.90 \pm 7.39\%$, and that of Bushen Yishou capsule treated rats was $36.20 \pm 9.14\%$, compared with that of CTR, $P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively. TLA percentage of the SIR treated group was $36.92 \pm 11.82\%$, which was different insignificantly as compared with that of CTR. **Conclusion:** TLA susceptibility was significantly enhanced in CTR. Both KTRs (Youguiyin and Bushen Yishou capsule) had down-regulating effect on TLA, while the effect of SIR was insignificant, suggesting that down-regulating activation-induced TLA may be one of the important mechanisms of KTR in improving T-lymphocyte function in CTR.

Key words corticosterone treated rat, Kidney tonifying recipe, cell apoptosis

细胞凋亡在 T 细胞克隆性增殖、活化及清除过程中起着重要的作用, T 细胞过早、过度凋亡是 T 细胞数量减少及功能低下的重要机制。在肾本质研究中, 我们已证明皮质酮鼠(下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴, HPAT 轴受抑模型)存在 T 淋巴细胞数量减少及

功能低下, 补肾复方右归饮可提高皮质酮鼠 T 淋巴细胞功能⁽¹⁾, 因此本研究对皮质酮鼠 T 细胞凋亡情况进行了观察, 旨在进一步探讨皮质酮鼠 T 淋巴细胞数量减少及功能低下的分子机理, 并阐明补肾复方改善皮质酮鼠 T 淋巴细胞功能的分子作用机制。

* 本课题受国家自然科学基金资助(No. 30070907)

复旦大学华山医院中西医结合研究所(上海 200040)

[△] 博士, ^{△△} 导师

材料与方法

1 药物制备 补肾复方选用右归饮(附子、肉桂、熟地、山茱萸、山药、枸杞子、仙灵脾(代杜仲)、炙甘草, 用量比例为 2:1:3:2:3:3:3:1, 水煎醇提, 调药物浓度

为 200%) 及补肾益寿胶囊(制首乌、黄精、人参、枸杞子、仙灵脾、灵芝等组成,制成浓度为 1.2g/100ml),右归饮药物组成、剂量比例及制备根据参考文献^[2],补肾益寿胶囊组成及制备见参考文献^[3]。四君子汤由党参、白术、茯苓、炙甘草按 1:1:1:0.3 比例组成,水煎醇提,药物浓度为 200%。

2 动物分组、造模及 T 细胞制备激活 雄性 SD 大鼠 50 只,月龄 4 个月,体重 230~250g,由复旦大学动物实验部提供。造模药物为皮质酮(Corticosterone, CORT, Sigma, USA),使用时溶于灭菌橄榄油中,浓度为 20mg/ml。大鼠随机分为 5 组,每组各 10 只,分别为正常对照组、模型组、四君子汤治疗组、右归饮治疗组、补肾益寿胶囊治疗组(补肾益寿组)。模型组及各治疗组均根据 10mg/kg 皮下注射 CORT,正常对照组以等体积灭菌橄榄油代替 CORT,每天 1 次,连续 14 天。四君子汤、右归饮按 10g/kg 体重剂量灌胃,补肾益寿组按 0.36g/kg 体重灌胃,正常对照组及模型组用蒸馏水代替药物灌胃,每天 1 次,连续 14 天。实验第 15 天,所有动物乙醚麻醉,无菌取脾,参照文献^[4]分离纯化 T 细胞,在预先包被了抗 CD₃ 单抗的 6 孔培养板中,37℃、5%CO₂ 条件下常规培养 14h。

3 细胞形态检测 常规离心收集细胞,2.5%戊二醛固定后,常规制备电镜标本,于透射电镜(DEX-100b, Japan)下观察细胞形态并拍照。

4 TUNEL 标记的流式细胞术检测 常规离心收集细胞,4%多聚甲醛固定后,参照细胞凋亡检测试剂盒(Boehringer Mannheim, Germany)说明书,用 TUNEL 反应混合液标记样品,另设阴性对照,用不含末端转移酶的单纯标记液进行标记,每只动物的细胞样品标记 5×10^5 细胞,采用流式细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickinson, USA)检测 TUNEL 标记的阳性细胞,参考对照采用面积积分法计算出凋亡细胞百分率。分析采样软件为 Cellquest。

5 统计学处理 组间比较采用 *t* 检验。

结 果

1 细胞形态学改变 各组大鼠 T 细胞激活培养 14h,透射电镜下可见正常形态的 T 细胞(图 1)及典型的凋亡细胞(图 2、3)。图 1 显示,正常的细胞染色质分布均匀,图 2、3 显示,凋亡细胞呈现出典型的细胞核变化,核染色质向核膜下或中央部异染色质区聚集形成浓缩的染色质块,电镜下呈高电子密度。边聚的染色质块使细胞核呈环状,中聚的染色质块使细胞核呈眼球状。提示抗 CD₃ 单抗对各组 T 细胞均具有诱导

凋亡的作用。

2 T 细胞凋亡 经抗 CD₃ 单抗诱导 14h,各组 T 细胞均可经流式细胞仪检出 TUNEL 标记的绿色荧光,与电镜结果相符。模型组地形图与正常对照组及各治疗组相比可见明显增强的绿色荧光,面积积分结果经统计学处理表明(见表 1):模型组鼠 T 细胞凋亡与正常对照组比较,差异有显著性($P < 0.01$),提示模型组 T 细胞对抗 CD₃ 单抗激活诱导凋亡的敏感性显著增高;右归饮及补肾益寿组 T 细胞凋亡均低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$);四君子汤治疗组 T 细胞凋亡低于模型组,但差异无显著性($P > 0.05$),提示两个补肾复方均具有下调激活诱导 T 细胞凋亡的作用。

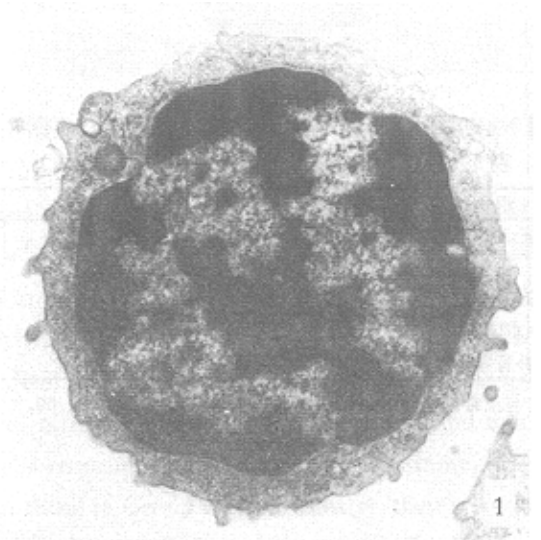


图 1 电镜下正常细胞核形态 ($\times 10000$)

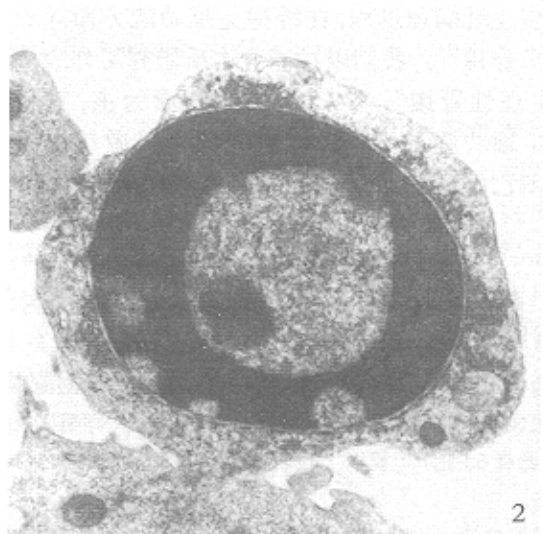
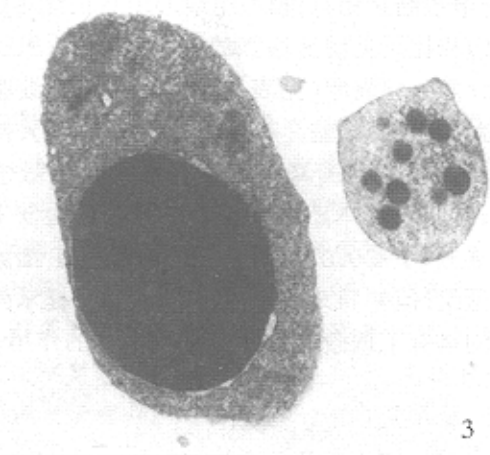


图 2 电镜下凋亡细胞核(核边聚)形态 ($\times 10000$)



3

图 3 电镜下凋亡细胞核(核中聚)形态 ($\times 10000$)表 1 各组大鼠 T 细胞凋亡比较 ($\% \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	T 细胞凋亡
正常对照	10	34.25 ± 6.47
模型	10	$45.87 \pm 7.22^*$
四君子汤	10	36.92 ± 11.82
右归饮	10	$35.90 \pm 7.39^{\triangle\triangle}$
补肾益寿	10	$36.20 \pm 9.14^{\triangle}$

注:与正常组比较, $^*P < 0.01$;与模型组比较, $^{\triangle}P < 0.05$, $^{\triangle\triangle}P < 0.01$

讨 论

细胞凋亡(apoptosis)是多细胞有机体为调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞主动死亡过程。细胞凋亡与免疫系统存在着极为密切的关系,参与了免疫系统中免疫细胞的发育、免疫调节、免疫效应等许多生理病理过程,在维持免疫功能方面起着重要的调节作用⁽⁵⁾。我们以往的肾本质研究工作表明衰老即“生理性肾虚”,临床以阳虚、气虚为主,实验显示 HPAT 轴功能低下。我们对老年大鼠激活诱导的 T 细胞凋亡的研究结果表明衰老过程中存在 T 淋巴细

胞的过度凋亡,两个补肾复方都可改善 T 细胞的过度凋亡^(2,3)。肾虚证患者亦伴有 HPAT 轴功能低下,因此这是衰老和肾虚证共同的生物学标志⁽⁶⁾。基于上述研究背景,我们对 HPAT 轴受抑模型—皮质酮鼠的 T 淋巴细胞凋亡情况进行了研究,并对比观察了补肾、健脾复方对 T 细胞凋亡的干预作用。

我们采用敏感性高的 TUNEL 标记的流式细胞术及透射电镜观察细胞的凋亡情况。研究结果表明,皮质酮鼠模型组激活诱导 T 细胞凋亡高于正常对照组,这一结果提示,皮质酮鼠和老年大鼠一样, T 淋巴细胞亦存在过度凋亡的情况。同时我们的实验结果也表明两个补肾复方都可以显著下调皮质酮鼠 T 淋巴细胞的过度凋亡,而对照的健脾组则不能。因此,进一步阐明了补肾药物改善皮质酮鼠 T 淋巴细胞功能的作用机制,亦说明老年大鼠模型与皮质酮鼠模型在 T 细胞凋亡方面具有一定的共性。

参 考 文 献

1. 蔡定芳,沈自尹,张玲娟,等.右归饮对皮质酮大鼠细胞免疫和细胞因子的影响.中国免疫学杂志 1995;71(4):248—251.
2. 郑振,沈自尹,黄辉.补肾与活血复方调节老年鼠 T 细胞凋亡的对比研究.中国中西医结合杂志 1999;19(10):610—612.
3. 郑振,沈自尹,黄辉.补肾复方下调老年大鼠激活诱导的 T 细胞凋亡.上海医科大学学报 2000;27(1):35—38.
4. Severson CD, Burg DL, Lafrenz DE, et al. An alternative method of panning for rat B lymphocyte. Immunology Letter 1987;15:291—295.
5. Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. Adv Immunol 1999;71:163—210.
6. 沈自尹.肾虚证定位研究.中国中西医结合杂志 1997;17(1):51—54.
7. Ingo Schmitz, Sabine Kirchhoff, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. Internat Biochem Cell Biol 2000;32:1123—1136.

(收稿 2001-11-05 修回 2002-02-01)

关于发展中华中医药学会会员的通知

为了加强学会与会员的联系,促进中医药学术交流和整体学术水平的提高,我会现在全国范围内发展会员,凡自愿填写入会申请表,提供职称证书或执业医师证书复印件即可入会。入会者需交一张 2 寸照片(彩色、黑白均可),费用 350 元(5 年会费 300 元,注册费 50 元),1 篇以上代表性学术文章,寄到:北京市樱花东路甲 4 号中华中医药学会学术部 高扬、王淑英(收),邮政编码:100029。

咨询电话 010—64212828 传真 010—64297983。

万方数据

(中华中医药学会学术部)