

方药研究

加味玉屏风散对创伤应激小鼠细胞免疫功能的影响

曾广仙¹ 陈 新² 刘俊英¹ 袁学军³ 代丽红¹ 赵 璐¹ 沈关心⁴

摘要 目的:探讨加味玉屏风散对创伤应激小鼠细胞免疫功能的影响。方法:采用小鼠截肢应激模型,检测创伤后小鼠细胞免疫功能变化。结果:创伤后小鼠细胞免疫功能受抑,包括 γ -干扰素(INF- γ)水平、CD₄水平、CD₄/CD₈比值降低;转化生长因子- β (TGF- β)水平升高;核转录因子- κ BmRNA(NF- κ BmRNA)、白细胞介素10-BmRNA(IL-10mRNA)表达增加;高、中、低三种浓度加味玉屏风散对上述指标的变化具有不同程度的纠正作用,其中高剂量组小鼠各项指标均恢复正常。结论:创伤后小鼠细胞免疫功能受抑;加味玉屏风散可有效恢复其细胞免疫功能。

主题词 免疫,细胞/药物作用 玉屏风散/药理学 创伤和损伤/中医药疗法

Effects of Modified Yupingfeng Powder on Cellular Immune Function in Mice of Wound Stress

Zeng Guangxian¹, Chen Xin², Liu Junying¹, et al.

(1. No. 457 Hospital of PLA, Wuhan 430012; 2. National Institute of Health, U. S. A.)

Objective: To observe effects of modified Yupingfeng Powder on cellular immune function in mice of wound stress. **Methods:** Changes of cellular immune function were detected in mice of amputation stress. **Results:** In the mice after wound, cellular immune function including γ -interferon (INF- γ), CD₄ level, CD₄/CD₈ ratio decreased, transforming growth factor- β (TGF- β) level and nuclear transcript factor (NF- κ B) mRNA and interleukin-10 (IL-10) mRNA expression increased; Modified Yupingfeng Powder of high, middle and low dosages could correct the above indexes in varying degrees, and the various indexes in the mice of the high dosage group all restored to normal. **Conclusion:** After wound, cellular immune function of the mice was inhibited, and modified Yupingfeng Powder can effectively restore cellular immune function.

Key Words Immunity, cellular/drug action; Yupingfeng Powder/pharmacology; Wound and injury/TCM therapy

严重的创伤可以抑制机体的免疫功能,而以细胞免疫受抑为主^[1],这为感染发生、肿瘤转移及自身免疫性疾病的发生提供了条件。我们在以往的研究中观察到加味玉屏风散对创伤应激小鼠的细胞免疫功能具有明显的恢复作用^[2,3]。本实验我们进一步观察了截肢应激对小鼠 CD₄、CD₈ 水平,核转录因子- κ BmRNA (NF- κ BmRNA)、白细胞介素10-BmRNA (IL-10mRNA)表达, γ -干扰素(INF- γ)、转化生长因子- β (TGF- β)水平的变化及加味玉屏风散对它们的影响。

1 材料

1.1 动物:4~6周龄BALB/C清洁级小鼠50只,雌雄各半,体重(20±2)g,由武汉生化制品研究所提供,恒温、恒湿条件下自由摄取食水,以尽量减少饲养环境变异造成的情绪应激,1周后开始实验。

1.2 药物:加味玉屏风散由黄芪、党参、白术、防风按

3:2:1:1比例构成。按1:30加水浸泡1小时,第1、2煎文火煮40分钟,第3煎煮20分钟,将3次煎液混合成160%的药液,置4℃冰箱贮存备用。

1.3 主要仪器:SL2300型恒温箱(Seldon公司);CM1850冰冻切片(Leica公司);RM2135-1200EX石蜡切片(Leica公司);HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统(武汉千屏公司);DG-3022型酶标仪(第四军医大学);4K15C型离心机(Sigma公司)。

2 方法

2.1 分组与给药:将小鼠随机分为5组:正常对照组(A)、应激对照组(B)每鼠每天灌服蒸馏水0.5ml;应激+加味玉屏风散高(C)、中(D)、低(E)剂量组每鼠每天分别灌服160%、80%、40%加味玉屏风散水煎液0.5ml(分别含生药0.8g、0.4g、0.2g)。以上5组均连续灌饲7天。

2.2 模型建立^[2]和取材:末次用药1~1.5小时对B~E组小鼠行右后肢截肢术,用4号医用缝合线于小鼠右后肢膝关节上端约0.5cm处结扎,手术剪于膝关节处截去右后肢,酒精棉球消毒断端,不包扎。术后仍按常规摄取食水,术后无感染及死亡。造模后72小时

1 中国人民解放军第四五七医院病理科,湖北省武汉市工农兵路15号(430012)

2 美国国家卫生研究院

3 湖北中医学院研究生

4 华中科技大学同济医学院免疫学系

收稿日期:2004-03-30;修回日期:2004-05-14

引颈处死小鼠,分离胸腺、脾脏,摘取眼球取外周血,8000r/min 离心 1 分钟,吸取上清,置 4℃ 冰箱备用。

2.3 免疫组化标本制备:将新鲜分离的胸腺、脾脏用胶粘剂固定于支架上放入-20℃ 冰冻切片机中,切片厚度 8μm,贴于用多聚赖氨酸处理过的载玻片上,凉风迅速吹干,用含 1/1000DEPC 的 4%多聚甲醛/0.1MPBS(pH7.0)室温固定 30 分钟,蒸馏水洗涤 3 次,迅速吹干,密封置于-20℃ 备用。

2.4 细胞原位杂交标本制备(细胞甩片):将分离后的胸腺、脾脏分别制成单细胞悬液,用 0.83%的 Tris-NH₄Cl 裂解红细胞,Hank's 液离心洗涤 2 次后调胸腺和脾细胞悬液至 1×10⁷/ml,在甩片机上将细胞悬液甩于用多聚赖氨酸处理过的载玻片上,迅速吹干,用含 1/1000DEPC 的 4%多聚甲醛/0.1M PBS(pH7.0)室温固定 30 分钟,蒸馏水洗涤 2~3 次,迅速吹干,密封置于-20℃ 备用。

2.5 观察指标及方法

2.5.1 免疫组化检测 CD₄ 抗原、CD₈ 抗原:免疫组织化学染色按参考文献^[4]的方法进行。显微镜下观察,每组随机选择 10 张切片,每张切片随机选择 10 个视野,计数 200 个细胞中 CD₄ 抗原、CD₈ 抗原阳性表达细胞(呈棕黄色)的百分率(%),以平均值表示其表达强度;运用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统对各组标本 CD₄、CD₈ 抗原阳性细胞进行显微图像分析,每组随机取 10 个视野的吸光度,计算其平均吸光度。

2.5.2 原位杂交检测 NF-κBmRNA、IL-10mRNA 表达:采用 NF-κBmRNA、IL-10mRNA 原位杂交试剂盒,方法按说明书进行。每组随机选 10 张切片,每张切

片随机选 10 个视野,显微镜下计数 200 个细胞中 IL-10mRNA、NF-κBmRNA 阳性表达细胞(呈棕黄色)的百分率(%),以平均值表示其表达强度;HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统对各组标本 IL-10mRNA、NF-κBmRNA 阳性细胞进行显微图像分析,每组随机取 10 个视野的吸光度,计算平均吸光度。

2.5.3 酶联免疫吸附检测 IFN-γ、TGF-β:方法按试剂盒说明书进行,在 492nm 处测吸光度值(OD)值,将 OD 值换算成浓度(pg/ml)。

2.6 统计学方法:采用组间 *t* 检验比较显著性,数据统计以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 胸腺、脾脏组织中 CD₄ 抗原、CD₈ 抗原分布:表 1、表 2 示,创伤后小鼠胸腺、脾脏组织中 CD₄ 抗原分布显著减少、吸光度值降低,CD₄/CD₈ 比值显著减少,与 A 组比较差异有显著性($P < 0.01$),CD₈ 略微下降,但差异无显著性($P > 0.05$);给予加味玉屏风散后,CD₄ 抗原分布明显增多、吸光度值增加,CD₄/CD₈ 比值增加,与 B 组比较差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);其中 C 组与 A 组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

3.2 胸腺、脾脏组织中 NF-κBmRNA、IL-10mRNA 表达:表 3 示,创伤应激小鼠胸腺、脾脏组织中 NF-κBmRNA、IL-10mRNA 表达水平均明显升高、吸光度值增大,与 A 组比较差异有显著性($P < 0.01$);给予加味玉屏风散后其表达水平均明显降低、吸光度值减小,与 B 组比较差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);其中高剂量加味玉屏风散组 NF-κBmRNA、IL-10mRNA

表 1 加味玉屏风散对创伤应激小鼠胸腺组织中 T 细胞亚群细胞计数及吸光度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	T 细胞亚群计数			T 细胞亚群吸光度		
		CD ₄ (%)	CD ₈ (%)	CD ₄ /CD ₈	CD ₄	CD ₈	CD ₄ /CD ₈
A 组	10	8.54±0.77	7.78±0.91	1.09±0.17	0.36±0.06	0.34±0.05	1.08±0.16
B 组	10	6.28±0.98**	7.05±0.84	0.88±0.10**	0.23±0.03**	0.30±0.04	0.77±0.10**
C 组	10	8.11±0.91△△	7.69±1.01	1.07±0.15△△	0.35±0.04△△	0.33±0.05	1.06±0.17△△
D 组	10	7.61±0.94*△△	7.13±0.79	1.05±0.15△△	0.29±0.05*△△	0.31±0.04	0.95±0.12△△
E 组	10	7.05±0.89**	7.19±0.64	0.98±0.11*	0.24±0.03**	0.31±0.04	0.78±0.11**

与 A 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 B 组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

表 2 加味玉屏风散对创伤应激小鼠脾脏组织中 T 细胞亚群细胞计数及吸光度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	T 细胞亚群计数			T 细胞亚群吸光度		
		CD ₄ (%)	CD ₈ (%)	CD ₄ /CD ₈	CD ₄	CD ₈	CD ₄ /CD ₈
A 组	10	8.38±1.16	8.36±1.18	1.01±0.14	0.34±0.04	0.33±0.04	1.02±0.11
B 组	10	5.98±1.01**	7.85±1.05	0.78±0.13**	0.20±0.02**	0.29±0.03*	0.71±0.09**
C 组	10	8.15±1.08△△	8.34±1.08	0.99±0.11△△	0.33±0.05△△	0.33±0.04△	1.00±0.10△△
D 组	10	7.68±1.12△△	8.13±1.11	0.95±0.10△△	0.29±0.04*△△	0.31±0.04	0.94±0.11△△
E 组	10	7.23±1.10*△	7.95±1.09	0.90±0.10△	0.24±0.04*△	0.32±0.03△	0.76±0.10**

与 A 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 B 组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

表3 加味玉屏风散对创伤应激小鼠胸腺、脾脏组织中NF- κ BmRNA、IL-10mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	胸腺组织 NF- κ BmRNA		脾组织 NF- κ BmRNA		胸腺组织 IL-10mRNA		脾组织 IL-10mRNA	
		阳性率(%)	吸光度	阳性率(%)	吸光度	阳性率(%)	吸光度	阳性率(%)	吸光度
A组	10	8.60 $\pm$ 1.10	0.23 $\pm$ 0.04	9.02 $\pm$ 0.99	0.21 $\pm$ 0.03	9.59 $\pm$ 1.14	0.24 $\pm$ 0.04	10.14 $\pm$ 1.22	0.25 $\pm$ 0.04
B组	10	12.65 $\pm$ 1.43**	0.42 $\pm$ 0.05*	12.23 $\pm$ 1.12**	0.38 $\pm$ 0.04**	12.35 $\pm$ 1.41**	0.39 $\pm$ 0.05**	13.86 $\pm$ 1.32**	0.42 $\pm$ 0.05**
C组	10	8.78 $\pm$ 1.07 $\Delta\Delta$	0.24 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$	9.23 $\pm$ 0.89 $\Delta\Delta$	0.23 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$	9.41 $\pm$ 1.08 $\Delta\Delta$	0.21 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$	10.35 $\pm$ 1.19 $\Delta\Delta$	0.26 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$
D组	10	9.81 $\pm$ 1.05* Δ	0.30 $\pm$ 0.04* Δ	10.02 $\pm$ 1.06* Δ	0.27 $\pm$ 0.04** $\Delta\Delta$	10.58 $\pm$ 1.16 $\Delta\Delta$	0.28 $\pm$ 0.03* $\Delta\Delta$	11.24 $\pm$ 1.09** Δ	0.29 $\pm$ 0.04* Δ
E组	10	12.12 $\pm$ 1.31**	0.37 $\pm$ 0.05** Δ	11.83 $\pm$ 1.05**	0.36 $\pm$ 0.04**	11.93 $\pm$ 1.33**	0.35 $\pm$ 0.05**	12.83 $\pm$ 1.22**	0.38 $\pm$ 0.05**

与A组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与B组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

表4 加味玉屏风散对创伤应激小鼠外周血清INF- γ 、TGF- β 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	INF- γ 含量(pg/ml)	TGF- β 含量(pg/ml)
A组	10	60.12 $\pm$ 3.65	28.10 $\pm$ 2.27
B组	10	31.51 $\pm$ 2.16**	66.50 $\pm$ 4.01**
C组	10	58.63 $\pm$ 2.98 $\Delta\Delta$	28.35 $\pm$ 2.20 $\Delta\Delta$
D组	10	42.91 $\pm$ 2.84** Δ	46.19 $\pm$ 3.42** $\Delta\Delta$
E组	10	36.68 $\pm$ 2.78** $\Delta\Delta$	60.39 $\pm$ 5.03** $\Delta\Delta$

与A组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与B组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

表达水平与正常对照组比较差异无显著性($P>0.05$)。

3.3 外周血清中INF- γ 、TGF- β 水平:表4示,与A组比较,B组小鼠血清中INF- γ 水平明显降低($P<0.01$)、TGF- β 水平明显升高($P<0.01$);与B组比较,C、D、E组小鼠INF- γ 水平明显升高($P<0.01$)、TGF- β 水平明显降低($P<0.01$);与A组比较,C组INF- γ 、TGF- β 水平无显著差异($P>0.05$)。

4 讨论

严重创伤后机体的细胞免疫功能受抑,以T细胞的辅助一抑制免疫调节网络失衡、细胞因子分泌紊乱为特征。一般认为,创伤后CD₄和CD₄/CD₈比值降低,CD₈升高^[5]。本实验观察了创伤后小鼠胸腺、脾脏组织中T细胞亚群改变,发现创伤后72小时CD₄明显减少,CD₈略有下降,但差异无显著性,CD₄/CD₈比值与正常组相比差异有显著性;口服加味玉屏风散后CD₄、CD₈、CD₄/CD₈比值与正常组相比差异均无显著性,说明创伤后T细胞亚群改变可能以CD₄和CD₄/CD₈比值降低为主,加味玉屏风散通过对CD₄和CD₄/CD₈比值降低的拮抗作用,来纠正创伤引起的细胞免疫功能的受抑状态。

当机体处于应激状态,组织中的Th2细胞被激活,并得到优势扩增,分泌免疫抑制因子IL-10。本实验采用细胞原位杂交法检测了创伤后72小时及口服加味玉屏风散后小鼠胸腺、脾脏淋巴细胞中IL-10mRNA表达变化,结果表明,创伤后72小时小鼠胸腺、脾脏淋巴细胞中IL-10mRNA表达显著增加,口服

加味玉屏风散后IL-10mRNA表达明显减少,说明加味玉屏风散能通过抑制Th2细胞IL-10mRNA表达,抑制IL-10分泌来纠正创伤应激所致的细胞免疫抑制状态。

NF- κ B活化后能调控一系列基因的表达:如TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-10、TGF- β 、IL-2受体、T细胞受体 α 、 β 链等^[6],根据其功能不同分为两大类:一类为促炎性细胞因子,包括INF- γ 、TNF- α 等;另一类为免疫抑制因子,如IL-4、IL-10、TGF- β 等,这些物质都能直接或间接地调节机体的免疫功能。我们用创伤应激模型观察到小鼠创伤后72小时胸腺、脾脏淋巴细胞中NF- κ BmRNA较正常表达增强,口服加味玉屏风散后小鼠胸腺、脾脏淋巴细胞中NF- κ BmRNA表达明显被抑制,说明加味玉屏风散对创伤所致的NF- κ B过度表达具有良好的拮抗作用。

综上所述,截肢创伤应激可以使免疫功能紊乱,表现为机体的细胞免疫功能抑制,包括胸腺、脾脏淋巴细胞中CD₄水平下降、CD₄/CD₈比值降低;IL-10mRNA、NF- κ BmRNA表达增强;血清中TGF- β 水平升高,INF- γ 水平降低。三种剂量加味玉屏风散可不同程度地纠正创伤应激所致的细胞免疫功能抑制状态。

参考文献

- Zellweger R, Ayala A, DeMaso CM, et al. Trauma-he morrhage causes prolonged depression in cellular immunity. Shock, 1995, 4(2): 149~153.
- 陈新, 杨路, 曾广仙, 等. 加味玉屏风汤对截肢应激小鼠细胞免疫功能的调节作用. 中医杂志, 1998, 39(12): 746~748.
- 曾广仙, 刘俊英. 加味玉屏风散对创伤应激小鼠IL-2与IL-2R基因表达影响的形态计量学研究. 中国体视学与图像分析, 2003, 8(2): 94~96.
- Abrous DN, Rodriguez J, Je Mosl M, et al. Effects of mild traumatic brain injury on immunoreactivity for the inducible transcription factors c-Fos, c-Jun Jun B and, Krox-24 in cerebral regions associated with conditioned fear responding. Brain Res, 1999, 826(2): 181~192.
- O'Mahony JB, Wood JJ, Rodrick ML, et al. Change in T lymphocyte subsets following injury. Assessment by flow cytometry and relationship to sepsis. Ann Surg, 1985, 202(5): 580~586.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. N Engl J Med, 1997, 336(15): 1066~1071.