

大青叶水煎剂对小鼠细胞免疫功能的体外研究

张淑杰¹, 赵红¹, 顾定伟², 马立人¹

中草药用来治疗各种感染性疾病的研究由来已久^[1], 大青叶(Folium Statidis, FS)为草本植物蓼蓝的枝和叶, 是常用中药材之一, 味苦性寒, 具有清热解毒、抗菌消炎、凉血消斑等功效^[2], 为了解其在免疫调节中的作用, 本文观察了大青叶水煎剂对小鼠免疫细胞功能的影响。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)大青叶水煎剂的制备: 称取大青叶 300 g, 3次水煎, 每次 30 min。合并水煎剂, 使其浓缩至约 300 ml(1 g/ml)。将浓缩水煎剂离心 10 min, 2 000 r/min。取上清液过滤除菌, 置 4℃保存备用。(2)材料: 细菌脂多糖(LPS)、刀豆蛋白 A(ConA)、MTT(四甲基偶氮唑盐)、3%硫代乙酸钠肉汤均为 Sigma 公司产品。³H-TdR 由上海原子核研究所提供。(3)实验动物: C57 小鼠 6~8 周, 体重 18~22 g, 购自北京医科大学动物中心。

1.2 方法 (1)细胞毒性试验: 以常规方法取小鼠脾脏制备小鼠脾细胞悬液, 调整细胞浓度为 2×10⁶ cfu/ml 加入 96 孔反应板, 每孔 100 μl, 然后加入等量含不同浓度 FS 的 RPMI-1640 培养液, 并设空白对照, 置 37℃5%CO₂ 孵箱中培养 24 h, 参照文献^[3]按常规³H-TdR 掺入法, 用 β-液体闪烁计数器测量每分钟脉冲数(cpm 值)。诱导小鼠腹腔巨噬细胞: 试验前 3 d 给小鼠腹腔注射 3%硫代乙酸钠肉汤 1 ml/只, 3 d 后以无菌程序抽取小鼠腹腔液, 用 RPMI-1640 培养液制备小鼠腹腔巨噬细胞悬液(浓度为 1×10⁶ cfu/ml)。按上述方法进行 FS 的 24 h 毒性实验。(2)脾淋巴细胞增殖反应: 采用 MTT 比色法^[4]。将新分离的浓度为 2×10⁶ cfu/ml 的小鼠脾淋巴细胞悬液加入细胞培养板, 100 μl/每孔, 然后加入含不同浓度 FS 的 RPMI-1640 培养液, 100 μl/孔(分 3 组: A 组仅加 FS, B 组 FS+LPS(20 mg/L); C 组 FS+ConA(10 mg/L), 培养 72 h 后, 用酶标仪读取 A 值(570 nm)。(3)鼠腹腔巨噬细胞功能的测定: 采用吞噬中性红试验方法, 取浓度 1×10⁶ cfu/ml 的小鼠腹腔巨噬细胞悬液加入 96 孔反应板, 100 μl/孔, 37℃5%CO₂ 孵箱中培养 2 h, 弃去上清液后每孔加入 0.075%的中性红 PBS 50 μl, 37℃保温 1 h, 弃去上清液, 然后每孔加细胞裂解液 150 μl, 待细胞完全溶解后, 用酶标仪读取 A 值(570 nm)。

1.3 统计学分析 用 Excel 建立数据库。用 STATA 软件, 对实验的数据进行 t 检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 FS 的细胞毒性分析 分别用 12 个浓度的 FS 水煎液 0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6, 51.2, 102.4(mg/L) 对小鼠脾淋巴细胞和腹腔巨噬细胞进行细胞毒性试验。结果显示, FS 作用于小鼠脾淋巴细胞在 3.2 g/L 浓度以下时各孔 cpm 值与对照孔比无显著性差异, 表明在 3.2

g/L 浓度以下对小鼠脾淋巴细胞无毒性, 同时在 6.4 g/L 以下对小鼠腹腔巨噬细胞无毒性。

2.2 FS 对小鼠脾淋巴细胞增殖活性的影响分析(表 1) 结果表明, FS 在 0.5~3.2 g/L 浓度范围可单独激活小鼠脾淋巴细胞, 同时 FS 与 ConA、LPS 协同对小鼠脾淋巴细胞增殖活性也有促进作用。

表 1 FS 对小鼠脾淋巴细胞的增殖活性反应结果($\bar{x} \pm s$)			
FS 浓度(g/L)	A 值		
	A 组	B 组	C 组
0.0	0.125 0±0.011 2	0.4238 0±0.008 0	0.412 0±0.008 6
0.2	0.155 0±0.011 2	0.443 3±0.016 7	0.453 3±0.023 3
0.4	0.157 5±0.019 2	0.443 3±0.012 0	0.453 3±0.029 6
0.5	0.180 0±0.010 2 **	0.470 0±0.005 8 **	0.496 7±0.008 8 *
0.8	0.010 5±0.019 2 **	0.466 7±0.006 7 **	0.466 7±0.006 7 *
1.0	0.019 0±0.010 0 **	0.493 3±0.003 3 *	0.500 0±0.005 8 *
1.6	0.175 0±0.015 2 *	0.443 3±0.028 5	0.540 0±0.017 3 *
3.2	0.172 5±0.008 3 *	0.570 0±0.000 0 *	0.613 3±0.003 3 *

注: A 组 FS; B 组: FS+LPS; C 组: FS+ConA。经 t 检验, 与空白对照组比, *P<0.05, **P<0.01

2.3 FS 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响分析 采用不同浓度的 FS 对小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能进行测定。结果显示, FS 在高浓度 0.4~6.4(g/L) 各培养孔 A₅₇₀ 值分别为 (0.163 3±0.003 3)、(0.166 7±0.014 5)、(0.166 7±0.014 5)、(0.163 3±0.003 3)、(0.170 0±0.005 8), 与对照孔 A₅₇₀ 值(0.116 7±0.008 8) 比较有增高, 表明 FS 在一定浓度下能够增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能。

3 讨论

现代免疫学认为淋巴细胞和巨噬细胞是机体细胞免疫的重要组成部分, 在对抗胞内寄生菌感染、抗病毒感染、抗寄生虫感染及抗肿瘤免疫中发挥重要作用^[5]。本实验结果表明, 大青叶水煎剂对小鼠脾淋巴细胞的增殖反应具有上调作用, 同时 FS 与 ConA、LPS 协同也对小鼠脾淋巴细胞增殖活性有促进作用, 并且也能促进小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能。由此推断, 临床报道 FS 抗炎、抗病毒等药理作用可能不是直接抑菌、杀菌, 而在于调动机体内的其他抗感染机能, 如上调体内细胞免疫功能治疗感染的作用机制之一。

参考文献:

[1] 张丽英, 赵明宏, 安宁飞, 等. 病毒清的抗炎解毒与免疫增强作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(5): 326—365.

[2] 孙立新, 唐虹, 尹萍, 等. RP-HPLC 法测定板蓝根、大青叶中靛蓝、靛玉红的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 17(3): 191—192.

[3] 巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 262.

[4] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay[J]. J Immunol Meth, 1983, 65: 55.

[5] 林学颜, 张玲. 现代细胞与分子免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 329—343.

作者单位: 1. 华北煤炭医学院生物科学系, 唐山 063000;
2. 华北煤炭医学院附属医院骨外科

作者简介: 张淑杰(1953—), 女, 河北任邱人, 教授, 主要从事医学微生物学与免疫学教学及科研工作。