

## ◆实验研究论著◆

含白花蛇舌草血清对大鼠淋巴细胞和混合培养  
淋巴细胞增殖影响的实验研究金钟大<sup>1</sup>, 陈江华<sup>2</sup>

1. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120

2. 浙江大学医学院附属第一医院肾脏病中心, 浙江 杭州 310003

**[摘要]** 目的: 研究含白花蛇舌草 (Spreading Hedvotis Herb, 简称 SH) 血清对植物血凝素 (PHA) 诱导大鼠脾淋巴细胞增殖、混合淋巴细胞培养 (简称 MLR) 淋巴细胞增殖及对淋巴细胞分泌白细胞介素-2 (IL-2) 和  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 的影响。方法: 大鼠 20 只, 随机分为 5 组, 每组 4 只, 分为 SH 低剂量 (4 g/kg)、中剂量 (16 g/kg)、高剂量 (24 g/kg) 组, 含环孢素 A (CsA) 血清组, 按相应药物灌胃, 空白血清组用等量生理盐水灌胃。MTT 法测定 PHA 诱导的大鼠脾淋巴细胞和 MLR 淋巴细胞增殖, ELISA 法测定 PHA 诱导淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  含量。结果: SH 高剂量组可抑制 PHA 诱导大鼠脾淋巴细胞增殖, SH 高剂量组、含 CsA 血清组与空白血清组比较, 差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。双向 MLR 体系中, 各剂量组含 SH 血清均可抑制淋巴细胞增殖, 其中 SH 高剂量组与空白血清组比较, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ); 在单向 MLR 体系中, 各剂量组含 SH 血清可调节淋巴细胞增殖。SH 中剂量组、SH 高剂量组血清抑制脾淋巴细胞增殖, 与空白血清组比较, 差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。含 CsA 血清组血清可抑制单向、双向 MLR 体系中淋巴细胞增殖, 与空白血清组比较, 差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。SH 中剂量组、SH 高剂量组、含 CsA 血清组血清均可显著抑制大鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  含量, 与空白血清组比较, 差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。结论: SH 能抑制淋巴细胞和混合培养淋巴细胞增殖, 其作用机制可能与抑制淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  有关。

**[关键词]** 白花蛇舌草; 血清药理学; 混合淋巴细胞培养; 白细胞介素-2 (IL-2);  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ )

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 07-0186-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.07.087

Effect of the Serum Containing Herba Hedyotis Diffusae on Proliferation of Rats  
Splenic Lymphocytes and Mixed Lymphocytes

JIN Zhongda, CHEN Jianghua

**Abstract:** Objective: To study the effect of the serum containing Herba Hedyotis Diffusae (HHD) on splenic lymphocytes proliferation induced by phytohemagglutinin (PHA) and in in-vitro mixed lymphocyte reaction (MLR) system as well as the contents of interleukin-2 (IL-2) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). Methods: Twenty rats were randomly divided into five groups, blank group, cyclosporin a (CsA, in the dosage of 15 mg/kg) group, and high (H)-, middle (M)-, low (L)- dose HHD groups (in the dosage of 4, 16 and 24 g/kg, respectively). The blank group was administrated with normal saline. Lymphocyte proliferation induced by PHA and lymphocyte proliferation in MLR system were detected by means of MTT assay. The levels of IL-2 and IFN- $\gamma$  were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Results: The inhibition of lymphocyte proliferation in H group and CsA group was superior to that in the blank group ( $P < 0.05$ ). In two-way MLR system, all HHD groups could inhibit the proliferation of lymphocytes, the difference between H group and the blank group being significant ( $P < 0.05$ ). In one-way MLR system, all HHD groups could regulate the proliferation of lymphocytes. The inhibition of splenic

**[收稿日期]** 2014-02-21

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (编号: 30701074, 81373523)

**[作者简介]** 金钟大 (1972-), 男, 医学博士, 副主任医师, 主要从事中西医结合治疗肾系疾病的研究。

lymphocytes proliferation in H group and M group was superior to that in the blank group ( $P < 0.05$ ). In two-way MLR system, the difference between H group and the blank group was significant ( $P < 0.05$ ). In both one-way and two-way MLR system, the inhibition of lymphocyte proliferation in CsA group was superior to that in the blank group ( $P < 0.05$ ). The inhibition of IL-2, IFN- $\gamma$  secretion in H group, M group and CsA group was superior to that in the blank group ( $P < 0.05$ ). Conclusion: HHB can inhibit the proliferation of lymphocytes and the mixed lymphocytes, and the mechanism is related with the inhibition of IL-2 and IFN- $\gamma$  by rat lymphocytes.

Keywords: Herba Hedyotis Diffusae; Serologic pharmacological; Mixed lymphocyte reaction; Interleukin-2 (IL-2); Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )

白花蛇舌草, 别名蛇舌草、蛇利草、蛇总管、尖刀草, 为茜草科植物白花蛇舌草(Spreading Hedvotis Herb, 简称 SH) 的干燥全草, 具有清热解毒、活血止痛、利尿消肿的作用, 粗提物有抗肿瘤、抗菌消炎、调节免疫功能等作用。有研究发现含有白花蛇舌草的中药复方及清热解毒中药具有一定的抗急性排斥反应作用<sup>[1-2]</sup>, 本研究采用体外研究排斥反应的重要模式—混合淋巴细胞培养(MLR)与中药血清药理学方法, 从体外细胞水平进一步研究 SH 的抗排斥及可能作用机制。

## 1 材料与方法

1.1 试剂与药品 噻唑蓝(MTT)、丝裂霉素 C、植物血凝素(PHA)购自 Sigma 公司, RPMI1640 购自 Gibco 公司, 小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司, 淋巴细胞分离液购自上海恒信化学试剂有限公司(批号: 20011217), 异丙醇购自浙江临平化工试剂厂, 二甲基亚砷购自浙江杭州双林化工试剂厂, 环孢素 A(简称 CsA)购自华东制药有限公司(批号: 000413), SH 购自北京同仁堂药店, 经南京中医药大学中药教研室鉴定为正品 SH。

1.2 实验动物 SD 大鼠体重 200~250 g, 雄性, 由中国科学院上海实验动物中心提供。纯系 F344、DA 大鼠, 体重 180~250 g, 雄性, 购自北京大学医学部实验动物中心。

1.3 SH 含药血清制备 生药浸泡 30 min 后, 水煎 3 次, 浓缩成 2 g/mL 浓度。取 SD 大鼠 20 只, 随机分为 5 组, 每组 4 只大鼠。SH 水煎剂分为低剂量(4 g/kg)、中剂量(16 g/kg)、高剂量(24 g/kg), 含 CsA 血清组, 按相应药物灌胃 2 mL/100g 鼠重, 空白血清组用等量生理盐水灌胃, 以上每天 2 次, 连续灌胃 3 天, 于末次灌胃给药 1 h 后取血, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 经 56℃ 30 min 灭活处理后用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌, 置 -80℃ 保存备用。

1.4 淋巴细胞增殖实验 大鼠脾淋巴细胞分离: 麻醉后无菌条件下取脾, 在玻璃器皿中剪碎, 轻轻研磨, 并经 100 目丝网过滤, PBS 冲洗, 应用淋巴细胞分层液分离淋巴细胞, PBS 洗涤 2 次, 计数, 细胞重悬于预温的 RPMI1640 中, 密度为  $1 \times 10^6$ /L。于 96 孔细胞培养板中每孔加入 100  $\mu$ L 细胞悬液, 再加 100  $\mu$ L 5 mg/L 的 PHA 和含有不同浓度待测药物血清使血清终浓度达 10%。培养板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱

中培养 3 天。检测前每孔加入 10  $\mu$ L MTT, 再培养 4 h 后, 弃去上清, 各孔加 100  $\mu$ L 异丙醇, 轻轻振动后静置 10 min, 用 ELX800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)测定波长 490 nm 各孔的光密度(OD)值表示淋巴细胞增殖程度, 以每组 4 个孔 OD 的平均值作为各组的平均 OD 值。

1.5 MLR 双向 MLR。按上法分别制备 F344、DA 大鼠脾淋巴细胞悬液, 2 种细胞按 1:1 混合, 另加待测含药血清使总体积为 200  $\mu$ L, 待测药物血清终浓度为 10%。培养板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 6 天。检测步骤同淋巴细胞增殖实验所述。单向 MLR。刺激细胞的处理: 将 DA 大鼠脾淋巴细胞加入终浓度为 25 mg/L 的丝裂霉素 C, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 30 min, 用完全培养基洗 3 次去除残余丝裂霉素 C 后, 用体积分数为 10% 的小牛血清 RPMI1640 培养液调 PBMC 至  $1 \times 10^6$ /L。将分离的 F344 大鼠脾脏的 PBMC 分别作为反应细胞( $1 \times 10^6$ /L), 在 96 孔板中进行 MLR。每孔加入 100  $\mu$ L 的反应细胞(细胞数为  $1 \times 10^6$ ), 另加刺激细胞和待测药物含药血清使总体积为 200  $\mu$ L, 待测药物血清终浓度为 10%, 每组设 4 个复孔, 培养板置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 6 天。检测步骤同淋巴细胞增殖实验所述。

1.6 白细胞介素-2 (IL-2) 和  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 测定 血清制备: 按上法制备 F344 大鼠脾淋巴细胞悬液( $1 \times 10^6$ /L), 于 24 孔培养板中每孔加入 1 mL PHA 及不同浓度待测含药血清, 待测药物终血清浓度为 10%, 在培养箱中培养 48 h, 每组设 4 个复孔, 分别收集培养上清, 微孔滤膜除菌, 置 -20℃ 冰箱保存待测。IL-2、IFN- $\gamma$  均采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定, 检测试剂购自美国 TPI Inc 公司, 按使用说明操作。

1.7 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件处理数据, 计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 各组对 PHA 诱导脾淋巴细胞增殖作用的比较 见表 1。SH 高剂量组、含 CsA 血清组与空白血清组比较, 差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。而 SH 低剂量组、SH 中剂量组与空白血清组比较, 差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。

2.2 各组对 MLR 影响的比较 见表 2。双向 MLR 体系中, 各剂量组含 SH 血清均可抑制淋巴细胞增殖, 其中 SH 高剂量

组与空白血清组比较, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。在单向 MLR 体系中, 各剂量组含 SH 血清可调节淋巴细胞增殖。其中 SH 低剂量组与空白血清组比较, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。SH 中剂量组、SH 高剂量组血清抑制脾淋巴细胞增殖, 与空白血清组比较, 差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。含 CsA 血清组单向、双向 MLR 体系中淋巴细胞增殖均受到抑制, 与空白血清组比较, 差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。

表1 各组对 PHA 诱导的脾淋巴细胞增殖作用的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量	PHA (5 mg/L CD <sub>490m</sub> )
空白血清组	-	0.874 ± 0.124
含 CsA 血清组	15 mg/kg	0.659 ± 0.028 <sup>①</sup>
SH 低剂量组	4 g/kg	0.909 ± 0.191
SH 中剂量组	16 g/kg	0.707 ± 0.168
SH 高剂量组	24 g/kg	0.638 ± 0.079 <sup>①</sup>

与空白血清组比较, ① $P < 0.05$

表2 各组对 MLR 影响的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量	双向 MLR CD <sub>490m</sub>	单向 MLR CD <sub>490m</sub>
空白血清组	-	1.332 ± 0.282	1.680 ± 0.130
含 CsA 血清组	15 mg/kg	0.752 ± 0.183 <sup>①</sup>	1.046 ± 0.245 <sup>①</sup>
SH 低剂量组	4 g/kg	1.076 ± 0.127	1.701 ± 0.318
SH 中剂量组	16 g/kg	1.045 ± 0.193	1.149 ± 0.261 <sup>①</sup>
SH 高剂量组	24 g/kg	0.828 ± 0.043 <sup>①</sup>	1.127 ± 0.131 <sup>①</sup>

与空白血清组比较, ① $P < 0.05$

2.3 各组对 PHA 诱导淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  含量的比较见表 3。SH 中剂量组、SH 高剂量组血清均可显著抑制大鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  含量, 与空白血清组比较, 差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。SH 低剂量组与空白血清组比较, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。含 CsA 血清组血清可抑制大鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  含量, 与空白血清组比较, 差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。

表3 各组对 PHA 诱导淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  含量的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量	IL-2	IFN- $\gamma$
空白血清组	-	99.61 ± 4.42	122.11 ± 8.03
含 CsA 血清组	15 mg/kg	74.19 ± 2.71 <sup>①</sup>	41.65 ± 9.51 <sup>①</sup>
SH 低剂量组	4 g/kg	105.22 ± 11.29	133.97 ± 8.54
SH 中剂量组	16 g/kg	88.97 ± 4.03 <sup>①</sup>	87.78 ± 4.39 <sup>①</sup>
SH 高剂量组	24 g/kg	80.10 ± 3.84 <sup>①</sup>	76.93 ± 3.50 <sup>①</sup>

与空白血清组比较, ① $P < 0.05$

### 3 讨论

排斥反应是困扰器官移植学的主要难题之一, 中药抗移植物排斥的问题在国内外已引起注意。近年来, 在抗排斥反应中

药研究中, 清热解毒中药越来越受到重视<sup>②</sup>。肾脏移植排斥的常见证型有热毒亢盛证、血瘀证、湿热证、肝肾阴虚证、脾肾气虚证等<sup>③</sup>, 笔者在临床中发现晚期反复发生移植肾急性排斥及难治性急性排斥时, 在调整免疫抑制剂的同时加用较高剂量的白花蛇舌草可明显改善移植肾功能, 患者尿量明显增加, 移植肾痛症有所缓解, 血肌酐及蛋白尿改善, 与免疫抑制剂有协同作用, 表明含有 SH 的清热解毒复方抗肾移植急性排斥是有确切临床依据的, 这与邹扬华等<sup>④</sup>的研究结果相近。中药多数是通过口服起作用, 中药粗制剂直接加入离体反应体系中, 由于中药本身复杂的理化性质、对细胞生长造成一定的影响, 从而影响实验结果。而中药血清药理学方法将中药经口服吸收后, 进入体循环, 此时采集动物血清也含有该药物, 用含药血清代替中药粗制剂进行体外实验可排除各种干扰影响因素, 从而更接近药物在体内环境中产生药理效应的真实过程, 有利于中药真正有效部位、活性成分地发现。MLR 是将 2 个无关个体的淋巴细胞混合在一起培养, 由于两者的淋巴细胞膜上的组织相容性抗原不同, 可互相刺激, 导致对方的淋巴细胞分裂增殖和转化, 并产生多种细胞因子。MLR 看作体外研究排斥反应的重要模式, 其淋巴细胞的增生及某些细胞因子的释放, 在一定程度上可预示体内排斥反应的发生<sup>⑤</sup>。为此笔者用血清药理学方法与体外研究排斥反应的 MLR 和 PHA 诱导的淋巴细胞增殖反应来探讨中药 SH 对淋巴细胞增殖的影响, 以进一步探索 SH 抗急性排斥的作用机制。

细胞因子在介导机体的免疫反应中起着重要的作用。有研究显示 IL-2、IFN- $\gamma$  在排斥反应中可能发挥重要作用, 急性排斥时明显提高<sup>⑥-⑧</sup>, 是急性排斥反应的信号。本研究发现含高剂量 SH 血清可显著抑制 PHA 诱导的大鼠淋巴细胞增殖及单向、双向 MLR 体系中的淋巴细胞增殖。进一步检测了含 SH 血清对体外 PHA 诱导淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  含量的影响, 结果表明含 SH 血清可抑制大鼠淋巴细胞分泌的 IL-2、IFN- $\gamma$ 。含 CsA 血清显著抑制 PHA 诱导的大鼠淋巴细胞增殖并对单向及双向 MLR 淋巴细胞增殖明显抑制作用, 而且可抑制大鼠淋巴细胞分泌的 IL-2、IFN- $\gamma$ , 表明抗排斥作用的 CsA 在血清药理学及 MLR 反应体系中展现出较好的抑制淋巴细胞增殖作用。

本研究表明, 含高剂量 SH 的血清可抑制淋巴细胞增殖, 其作用机制可能与其含药血清抑制淋巴细胞分泌的 IL-2、IFN- $\gamma$  含量有关。SH 含有萜类、甾类、甾类、有机酸类、多糖类化学成分, SH 的哪些有效成分在起抗排斥作用, 笔者将在下一步研究中继续探索, 并为其在临床自身免疫疾病及移植排斥中的广泛应用提供依据。

### [参考文献]

- [1] 邹扬华, 章敏. 肾移植后的中西医治疗[J]. 上海中医药杂志, 1979(1): 8-10.

- [2] 朱洪荫, 王雪圃, 彭学敏. 中西药结合治疗家兔同种肾移植急性排斥反应的组织学及超微结构观察[J]. 中医杂志, 1983(12): 65- 67.
- [3] 金钟大, 陈江华. 中西医结合防治肾移植排斥反应的研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8): 764- 766.
- [4] 金钟大, 陈江华. 中医药在肾移植临床中的应用及实验研究概况[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(7): 558- 560.
- [5] Danzer SG, Kirchner H, Rink L. Cytokine interactions in human mixed lymphocyte culture [J]. Transplantation, 1994, 57(11): 638- 1642.
- [6] 李素华, 刘健, 桑晓红. 肾移植大鼠外周血中的 IL- 2、IFN-  $\gamma$  的动态观察[J]. 新疆医学, 2006, 36(2): 47- 49.
- [7] 黄萱, 热衣汗, 刘健, 等. 移植肾急性排斥反应中 Th1/Th2 细胞因子的动态变化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(44): 7693- 7697.
- [8] Millón O, Rafael- Valdivia L, Torrademé E. Intracellular IFN-  $\gamma$  and IL- 2 expression monitoring as surrogate markers of the risk of acute rejection and personal drug response in de novo liver transplant recipients [J]. Cytokine, 2013, 61(2): 556- 564.

(责任编辑: 马力)

## 针刺对肥胖大鼠 MSH 及 POMC 影响的实验研究

骆悠<sup>1</sup>, 黄桂宝<sup>1</sup>, 樊莉<sup>1</sup>, 龚娅玲<sup>2</sup>, 邓硕丽<sup>2</sup>

1. 广东省中医院, 广东 广州 510006; 2. 枝江市人民医院, 湖北 枝江 443200

**[摘要]** 目的: 观察针刺对肥胖大鼠促黑皮质素 (MSH) 及前阿片黑素促皮质激素原 (POMC) 的影响。方法: 选用刚断乳健康 SD 雄性大鼠, 分为正常组和造模组, 采用自制高脂饲料制备肥胖大鼠模型, 随机分为模型组及针刺组, 针刺组针刺梁门、天枢、大横、内庭穴, 连续治疗 2 周。观察各组大鼠 MSH 及 POMC 的变化。结果: 针刺后针刺组大鼠体重下降, 与模型组比较, 差异有非常显著性意义 ( $P < 0.01$ )。针刺组 MSH、POMC 水平明显低于模型组 ( $P < 0.05$ ); 针刺后针刺组 MSH、POMC 与正常组比较, 差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。结论: 针刺在改善肥胖大鼠体重的同时可调节肥胖大鼠 MSH 及 POMC 的水平。

**[关键词]** 肥胖; 针刺; 促黑皮质素 (MSH); 前阿片黑素促皮质激素原 (POMC)

**[中图分类号]** R589.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256- 7415 (2014) 07- 0189- 02

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.07.088

肥胖是一种由食欲和能量调节紊乱引起的疾病, 与遗传、环境、膳食结构等多种因素有关, 发病机制涉及神经及内分泌调节功能的紊乱。从能量代谢的角度看, 肥胖是能量的摄入大于消耗, 是一种能量平衡失调的表现。近年来研究表明, 进食是在神经系统严密控制下的一种行为活动, 食欲受到下丘脑的综合调节, 使机体将体重严格控制在在一个很少的波动范围内<sup>[1]</sup>, 前阿片黑素促皮质激素原(POMC)是很多神经肽共同的前体, POMC 基因可以表达多种神经肽, 促黑皮质素(MSH)是由 POMC 基因表达的一组与色素代谢有关的肽类激素, 有研究证明它们与动物进食量的调节密切相关。本研究通过实验

探索针刺对肥胖大鼠 MSH 及 POMC 的影响, 探讨针灸减肥的机制, 希望为临床针刺治疗肥胖病提供理论依据。

### 1 材料与方

1.1 仪器和试剂 电子天平 2004, 由上海天平仪器厂提供; G6805 型针灸治疗仪, 由上海医疗器械厂提供; MSH 及 POMC 测定用 ELISA 法检测, 试剂盒均购于 ADL 公司。

1.2 动物模型制作 选用刚断乳健康 SD 雄性大鼠, 体重 60~90 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供。根据孙志<sup>[2]</sup>方法改进, 将 60 只 SD 大鼠, 随机分为 2 组, 正常组 10 只, 喂普通饲料; 模型组 50 只, 喂高脂饲料。所有动物在造模期

**[收稿日期]** 2014-02-21

**[基金项目]** 广东省科技厅资助课题 (编号: 2010A030100024)

**[作者简介]** 骆悠 (1983-), 女, 主治医师, 研究方向: 针刺治疗内分泌代谢性疾病。