

DOI: 10.3969/j.issn.1000-7083.2011.02.006

石韦对小鼠免疫功能及异基因皮片移植排斥的抑制作用

贾永芳, 李莉, 张彤, 张顺利*

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要:目的 研究石韦对小鼠免疫功能和同种异基因皮片移植的影响。方法 分别给小鼠灌胃高、中、低 3 个剂量石韦水煎液, 研究其对正常小鼠和由左旋咪唑引起的免疫亢奋模型小鼠脾脏重量指数、巨噬细胞的吞噬活性、淋巴细胞转化、IgM 分泌量的影响; 观察石韦对小鼠同种异基因皮片移植的影响。结果 石韦可抑制正常小鼠巨噬细胞吞噬活性、T 淋巴细胞转化率和 IgM 的分泌量 ($P < 0.05$)。3 个剂量的石韦均可调节免疫亢奋小鼠脾脏重量指数、巨噬细胞吞噬活性、T 淋巴细胞转化率恢复至正常水平, 中剂量组可以显著降低 IgM 的分泌量至正常水平。小鼠移植皮片的存活时间: 石韦低剂量组为 (16.13 ± 1.13) d, 中剂量组为 (15.62 ± 1.01) d, 高剂量组为 (14.89 ± 2.01) d, 显著长于对照组的 (9.75 ± 0.89) d。结论 石韦可抑制正常小鼠的免疫功能, 调节免疫亢奋小鼠免疫功能恢复至正常水平, 减轻机体对同种异基因皮片移植的排斥反应。

关键词: 石韦; 免疫功能; 同种异基因皮片移植; 免疫抑制; 小鼠

中图分类号: Q959.8; Q956 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2011)02-0261-04

Immunosuppressive Effects of *Pyrrosia lingua* (Thunb.) Farwell on Immune Function and Rejection of Allogeneic Skin Transplantation in Mice

JIA Yong-fang, LI Li, ZHANG Tong, ZHANG Shun-li*

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxing, Henan Province 453007, China)

Abstract: Objective To observe the effects of *Pyrrosia lingua* (Thunb.) Farwell on immune function and allogeneic skin transplantation in mice. **Methods** *P. lingua* of low, middle and high doses were given orally to normal mice and immunopotential model mice which were *ip* levamisole. Changes in the weight index of spleen, phagocytic activity of macrophage, lymphocyte transformation, and levels of IgM were observed. Survival of the transplanted allogeneic skin in mice which were treated with *P. lingua* was recorded. **Result** Phagocytic activity of the macrophage, the increase of T-lymphocyte transformation and the levels of IgM in normal mice were restrained by low, middle and high doses of *P. lingua* ($P < 0.05$). *P. lingua* could regulate the weight index of the spleen, phagocytic activity of the macrophage and the increase of T-lymphocyte transformation in immunopotential model mice reached normal levels. Levels of IgM in immunopotential model mice were significantly reduced and reached normal when given with middle doses of *P. lingua*. The growth time of allogeneic skin of the low dose group is $16.13 \text{ d} \pm 1.13 \text{ d}$, middle dose group is $15.62 \text{ d} \pm 1.01 \text{ d}$, and the high dose group is $14.89 \text{ d} \pm 2.01 \text{ d}$, which were all significantly longer than in the control group ($9.75 \text{ d} \pm 0.89 \text{ d}$, $P < 0.01$). **Conclusion** *P. lingua* could restrain immune function of normal mice, regulate the immune function of immunopotential model mice and help ease allograft rejection of the transplanted skin in mice.

Key words: *Pyrrosia lingua* (Thunb.) Farwell; immune function; allogeneic skin transplantation; immunosuppression; mice

中药免疫调节的药理基础已成为目前中药免疫研究领域的核心内容。其中大多数是围绕中药免疫增强剂的药理基础和作用机制进行研究, 针对中药免疫抑制剂的研究很少。石韦 *Pyrrosia lingua*

(Thunb.) Farwell, 为水龙骨科植物, 有清热利尿, 活血化淤的作用。目前对石韦的研究集中在抗炎临床应用(吴金英, 孙建宁, 2000; 占永立, 2007), 其对小鼠免疫功能的影响至今未见报道。本实验旨在通过

收稿日期: 2010-08-12 接受日期: 2010-09-14

基金项目: 河南省科技攻关项目 (No. 092300410193); 河南省动物学省级重点学科基金资助

作者简介: 贾永芳 (1978~), 女, 硕士, 讲师, 主要从事细胞分化、中草药研究, E-mail: jyf324@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, 教授, 研究生导师, E-mail: zsl369@sina.com

观察石韦对小鼠免疫功能及同种异基因皮片移植排斥反应的影响,确定其免疫效应,为开发和利用新的中药免疫抑制剂提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 石韦对小鼠免疫功能的影响试验

1.1.1 实验材料 健康昆明种小鼠 144 只购自郑州大学实验动物中心,生产许可证号为 SCXK(豫)2005-0001,使用许可证号为 SYXK(豫)2005-0012,8 周龄,质量 $22.0 \text{ g} \pm 2.1 \text{ g}$,雌雄各半。绵羊红细胞(SRBC)购自新乡医学院实验动物中心,石韦购自河南新乡市医药公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 BBI 公司,二甲基亚砷(DMSO)购自上海生工,刀豆蛋白 A(ConA)和脂多糖(LPS)均购自 Sigma 公司,RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清和豚鼠血清均购自北京鼎国公司,酶联免疫检测仪购自南京华东公司。

1.1.2 生药制备及分组给药方法 石韦经液氮碾碎后,双蒸水浸泡过夜,次日以中火煎沸后微火熬制 1 h,浓缩至含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,过滤后备用。小鼠分 8 组。对照组(简称 CK 组)每日灌胃小鼠生理盐水 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$;石韦低剂量组(简称 A1 组)每日灌胃小鼠 $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 石韦水煎液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$,石韦中剂量组(简称 A2 组)每日灌胃小鼠 $0.50 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 石韦水煎液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$,石韦高剂量组(简称 A3 组)每日灌胃小鼠 $0.75 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 石韦水煎液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$;模型组(简称 M 组)每日腹腔注射 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的左旋咪唑溶液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$,并灌胃生理盐水 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$,低剂量给药模型组(简称 M1 组)每日腹腔注射左旋咪唑溶液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$,并灌胃 $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 石韦水煎液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$,中剂量给药模型组(简称 M2 组)每日腹腔注射左旋咪唑溶液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$,并灌胃 $0.50 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 石韦水煎液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$,高剂量给药模型组(简称 M3 组)每日腹腔注射左旋咪唑溶液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$,并灌胃 $0.75 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 石韦水煎液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。每组小鼠 18 只,均连续灌胃 14 d。

1.1.3 实验方法 各组取 6 只小鼠于末次灌胃后 1 h 称质量,放血,处死小鼠,取脾脏,称湿重,以脾重/体重表示脾脏重量指数。制备脾细胞悬液,每只小鼠脾细胞又分为正常组、ConA 组和 LPS 组,ConA 组加入终浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ConA,LPS 组加入终浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS,一式三复孔,以无细胞培养孔为空白对照,以 MTT 比色法(林清华,1999)测定淋巴细

胞转化率。末次灌胃后,各组取 6 只小鼠按碳廓清试验方法(张文学,2007)测定巨噬细胞吞噬指数 α 。各组取 6 只,在灌胃的第 10 d 开始给小鼠注射 0.2 mL 20% 的 SRBC 悬液,第 15 d 放血后处死小鼠,取脾脏得脾细胞悬液,按定量溶血分光光度法测定脾细胞的 IgM 生成量(张文学,2007)。

1.2 同种异基因小鼠皮肤移植试验

1.2.1 实验材料 供体小鼠为近交系 C57BL/6(H-2^{b/b}),20 只,8 周龄,质量 $22.3 \text{ g} \pm 1.8 \text{ g}$,由郑州大学实验动物中心提供,生产许可证号为 SCXK(豫)2005-0001,使用许可证号为 SYXK(豫)2005-0012。受体小鼠同 1.1.1,40 只。

1.2.2 生药制备方法 生药制备方法同 1.1.2。

1.2.3 实验方法 每组 10 只昆明种小鼠。对照组每天灌胃生理盐水 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$,第 8 d 做皮肤移植手术(刘德许等,2005),不间断灌胃直至皮片被排斥。低剂量组每日灌胃 $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的石韦水煎液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$;中剂量组每日灌胃 $0.50 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的石韦水煎液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$;高剂量组每日灌胃 $0.75 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的石韦水煎液 $0.02 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$,其余同对照组。皮片移植一周后拆除石膏包扎,若移植皮片与受体小鼠的背底部愈合,色泽一致,炎症和充血不明显,为未发生排斥反应;以皮片结痂、变硬、坏死、正常皮片缩小到初始测量尺寸的 50% 时,定为排斥反应。剪下受体小鼠移植后的皮片进行表皮 ATP 酶细胞化学染色(毕建军等,2005),在表皮随机取 10 个视野计数,计算每 mm^2 面积内朗罕氏细胞数量。

1.3 统计学方法

数据经 SPSS 14.0 进行统计学处理,多组间比较用方差分析,每组两两比较用 q 检验;结果用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 石韦对小鼠免疫功能的影响

2.1.1 石韦对小鼠脾脏重量指数的影响 如表所示,A1、A2、A3 组脾脏重量指数较 CK 组差异不显著,石韦对正常小鼠脾脏的重量指数没有显著影响。M 组小鼠脾脏重量指数极显著高于 CK 组小鼠($P < 0.01$)。M1、M2、M3 组均较 M 组极显著减小($P < 0.01$),与 CK 组相比差异不显著($P > 0.05$),3 组间差异不明显($P > 0.05$)。

2.1.2 石韦对小鼠巨噬细胞吞噬指数的影响 M 组的巨噬细胞吞噬指数 α 极显著高于 CK 组。显示

表 石韦对小鼠脾脏重量指数、巨噬细胞吞噬活性和抗体生成细胞 IgM 分泌量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table Influence of *Pyrrhosia lingua* (Thunb.) Farwell on weight index of spleen, phagocytic activity of macrophagocyte and level of IgM in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	脾脏重量指数 Weight index of spleen (mg·g ⁻¹)	巨噬细胞吞噬指数 Phagocytic index of macrophagocyte	IgM 分泌量(光密度值) Level of IgM (optical density)
CK	4.10 ± 0.41	4.46 ± 0.43	0.291 ± 0.032
A1	3.85 ± 0.54	3.27 ± 0.26 *	0.220 ± 0.014 *
A2	3.9 ± 0.13	3.34 ± 0.31 *	0.183 ± 0.042 **
A3	3.79 ± 0.49	3.54 ± 0.38 *	0.112 ± 0.035 **
M	5.82 ± 0.46 **	5.61 ± 0.69 **	0.328 ± 0.021
M1	4.32 ± 0.15##	4.51 ± 0.49##	0.281 ± 0.048
M2	3.96 ± 0.37##	4.12 ± 0.29##	0.267 ± 0.078#
M3	4.21 ± 0.46##	4.22 ± 0.86##	0.234 ± 0.051**

与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Compare with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compare with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 个石韦剂量组对正常小鼠的吞噬指数 α 均有显著的抑制作用;对模型组小鼠的吞噬指数 α 也有极显著的抑制作用,抑制后水平接近 CK 组小鼠。但在正常组小鼠及模型组小鼠实验中 3 个石韦剂量组之间没有显著性差异($P > 0.05$) (表)。

2.1.3 石韦对小鼠脾淋巴细胞转化率的影响 A1、A2、A3 组均可明显抑制 ConA 或 LPS 活化的正常小鼠脾淋巴细胞的增殖($P < 0.01$)。ConA 实验中, T 细胞转化率 M 组显著高于 CK 组($P < 0.01$); M1、M2、M3 组与 M 组相比显著降低($P < 0.01$), 3 组 T 淋巴细胞转化率与 CK 组相比略高,但无显著差异($P > 0.05$)。左旋咪唑对 LPS 促进的 B 细胞增殖活化的影响不显著, M 组与 CK 组无显著差异($P > 0.05$), 但 M1、M2、M3 组均显著低于 M 组($P < 0.05$) (图)。

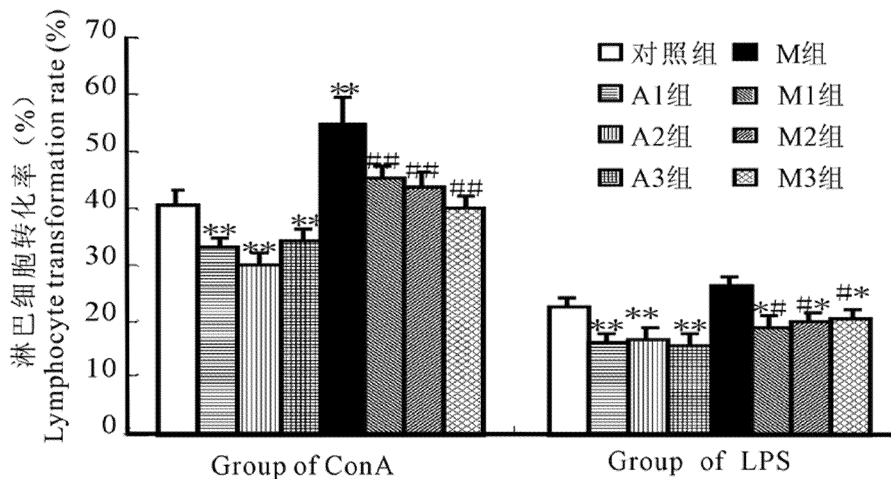


图 石韦对小鼠脾淋巴细胞转化的影响($\bar{x} \pm s$)

Fig. Influence of *Pyrrhosia lingua* (Thunb.) Farwell on the lymphocyte transformation in mice($\bar{x} \pm s$)

与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Compare with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compare with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.1.4 石韦对小鼠抗体生成细胞 IgM 分泌量的影响 在溶血素测定实验中, M 组光密度值与 CK 组之间差异不显著; A1、A2、A3 组可抑制正常小鼠 IgM 的分泌量($P < 0.05$)。中、高石韦剂量组可显著降低抑制模型小鼠 IgM 的分泌量($P < 0.05$), M2 组与 CK 组没有明显差异, M3 组显著低于 CK 组($P < 0.05$)。

2.2 石韦对同种异基因小鼠皮肤移植的影响

小鼠皮肤移植术后石韦低剂量组的皮片存活时间为(16.13 ± 1.13) d, 中剂量组为(15.62 ± 1.01) d, 高剂量组为(14.89 ± 2.01) d, 均较对照组的(9.75 ± 0.89) d 显著延长($P < 0.01$)。移植皮片的

朗罕氏细胞为棕黑色, 胞体形态不规则, 有 4 ~ 8 个突起。小鼠表皮中朗罕氏细胞数目, 低剂量组为(106.45 ± 11.75) 个, 中剂量组为(82.38 ± 9.17) 个, 高剂量组为(158.38 ± 14.89) 个, 3 组均极显著少于对照组的(608.83 ± 5.19) 个($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 石韦对小鼠免疫系统功能的影响

机体正常免疫功能依赖于各种正常功能的免疫细胞及细胞之间的相互作用, 由特异性免疫、非特异性免疫共同构成的防御系统执行。在特异性免疫应答过程中起核心作用的是淋巴细胞, 它们的激活、增

殖和分化是机体免疫应答过程的重要阶段。检测淋巴细胞增殖水平和抗体生成能力是研究特异性免疫的常用方法。而巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的标志之一(Fleshner *et al.*, 1992)。巨噬细胞吞噬指数 α 、T 淋巴细胞转化率和 IgM 的分泌量可作为检测小鼠免疫功能变化的指标。

小鼠通过腹腔注射左旋咪唑,脾脏重量指数、巨噬细胞吞噬活性、T 淋巴细胞转化率显著增加,免疫功能增强,这与 Hu 等(2001)的报道相符,说明免疫亢奋模型建立成功。

石韦对于上呼吸道感染、肾炎、膀胱炎等有一定疗效,炎症反应主要是以 T 细胞、巨噬细胞浸润及细胞坏死为主。实验结果显示石韦 3 个剂量均显著抑制正常小鼠巨噬细胞的吞噬活性,调节免疫亢奋小鼠的巨噬细胞的吞噬活性恢复至正常水平;石韦抑制正常小鼠和免疫亢奋小鼠由于 ConA 刺激所导致的 T 淋巴细胞的母细胞化,使其无法转化为效应细胞分泌细胞因子发挥其效应;3 个剂量组均可以显著降低正常小鼠抗体生成细胞中 IgM 抗体分泌量,中剂量能抑制免疫亢奋小鼠的体液免疫功能并调节其恢复正常水平,这和具有免疫抑制功能的青藤碱、汉防己碱、苦豆子(Ho *et al.*, 1999;刘继红等,2005;李莉等,2008)作用相似,推测石韦显著降低小鼠免疫功能是其治疗肾炎和由过敏反应引起的上呼吸道感染的主要原因。

3.2 石韦对小鼠同种异基因皮片移植的影响

器官移植已成为现代医学拯救末期器官功能衰竭患者生命的有效手段,但移植器官的排斥反应使其成功率受到严重影响,T_C 细胞对移植物的细胞毒作用和 T_D 细胞诱发的迟发型超敏反应是引起移植排斥的主要原因,而抗原呈递细胞的呈递作用是前提和基础。同种异基因皮肤移植试验的结果进一步验证了石韦的免疫抑制功效,结合上述对正常小鼠显著的免疫抑制作用,推测石韦可以延长同种异基因皮片存活时间的机理与其对小鼠各项免疫指标的抑制作用有关。为进一步探索石韦对抗排斥反应的

机理,研究了移植皮片内的朗罕氏细胞的变化。朗罕氏细胞是位于表皮基层层上方的专职抗原递呈细胞,与皮肤抗原性呈正相关(Katz, 1980),因而朗罕氏细胞数目减少会减轻皮肤移植排斥反应,这可能是石韦各剂量组小鼠皮片存活时间极显著长于对照组的原因之一。

综上所述,石韦在非特异性免疫、体液免疫、细胞免疫、器官移植免疫排斥反应等多个环节抑制了免疫应答,作为新型的免疫抑制剂显示了良好的深入开发与应用前景。

4 参考文献

- 毕建军, 伍津津, 唐书谦, 等. 2005. 皮肤组织工程的基础研究: 三磷酸腺苷酶染色法定性及定量观察猪表皮朗格汉斯细胞[J]. 中国临床康复, 9(2): 54 ~ 55.
- 李莉, 李骞, 张顺利. 2008. 苦豆子对小鼠的免疫调节作用研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 36(3): 98 ~ 100.
- 林清华. 1999. 免疫学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社: 188 ~ 192.
- 刘德许, 曾耀英, 狄静芳, 等. 2005. 小鼠同种异基因皮肤移植模型的建立[J]. 暨南大学学报(医学版), 26(2): 222.
- 刘继红, 李卫东, 滕慧玲, 等. 2005. 青藤碱治疗类风湿性关节炎免疫作用和机制[J]. 药学报, 40(2): 127 ~ 131.
- 吴金英, 孙建宁. 2000. 复方石韦片主要药效学实验研究[J]. 中成药, 22(6): 428 ~ 431.
- 占永立, 李秀英, 吴圣贤, 等. 2007. 复方石韦片治疗尿路感染的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 27(3): 63 ~ 65.
- 张文学. 2007. 免疫学实验技术[M]. 北京: 科学出版社: 16 ~ 17, 135 ~ 136.
- Fleshner M, Watkins LR, Lockwood LL, *et al.* 1992. Specific changes in lymphocyte subpopulation: a potential mechanism for stress-induced immunomodulation[J]. J Neuroimmunol, 41: 131 ~ 142.
- Ho LJ, Chang DM, Lee TC, *et al.* 1999. Plant alkaloid tetrandrine downregulates protein kinase C-dependent signaling pathway in T cells[J]. Eur J Pharmacol, 367: 389 ~ 398.
- Hu KF, Lovgren-Bengtsson K, Morein B. 2001. Immunostimulating complexes for nasal vaccination[J]. Adv Drug Deliv Rev, 51(1-3): 149 ~ 159.
- Katz SL. 1980. The role of Langerhans cells in immunity[J]. Arch Dermatol, 116: 1361 ~ 1362.