

· 实验研究 ·

益气养阴活血化癥方法治疗微小残留白血病 免疫机制的实验研究*

于志峰 戴锡孟 戴锡珍
(天津中医学院 300193)

摘要 以可移植性 L7212 白血病小鼠腹腔一次性注射环磷酰胺 250mg/kg, 建立微小残留白血病模型, 观察益气养阴活血化癥方治疗该模型鼠的疗效, 并从细胞免疫学角度进行机制探讨。结果表明: 益气养阴活血化癥方可延长微小残留白血病小鼠的平均生存期, 改善外周血象, 调整紊乱的 T 细胞亚群, 促进白介素 2IL-2、白介素 6IL-6、 γ 干扰素 INF γ 等多种细胞因子的分泌水平, 提高 NK 细胞的杀伤活性, 有较显著的免疫增强和免疫调节作用。

关键词 微小残留白血病 益气养阴活血化癥中药 细胞免疫实验研究

中图分类号: R243 文献标识码: B 文章编号: 1005-7145(2001)01-0022-03

白血病的复发是由于体内残留白血病细胞的存在, 因此寻找有效的清除残留白血病细胞的药物是白血病治疗领域内极为重要的课题。微小残留白血病状态多符合祖国医学“邪少虚多”的病理状态。应用扶正为主, 辅以祛邪的方药有望在本病的治疗中取效。本研究在成功复制微小残留白血病模型的基础上, 观察了益气养阴活血化癥方的疗效, 并从细胞免疫学角度探讨了其疗效机制, 以其为临床治疗提供依据。

1 材料与方

1.1 动物: 615 近交系小鼠 50 只, 体重 20~22g, 雌雄各半, 由中国医学科学院血研所动物室提供。L7212 白血病小鼠由中国医学科学院血研所实验病理室提供。

1.2 微小残留白血病模型的制备: 按褚建新法, L7212 白血病小鼠脱颈处死, 无菌取脾脏, 制成脾细胞悬液备用。615 小鼠右侧腋下接种 L7212 白血病小鼠脾细胞悬液, 0.2ml/只 (含细胞数 1×10^6)。接种白血病细胞后第 3 天 1 次腹腔注射环磷酰胺(Cy) 250mg/kg。

1.3 药物: 益气养阴活血化癥方由党参、黄芪、黄精、女贞子、枸杞子、大黄、桃仁、水蛭、三七等组成。上述药物常规煎制, 并浓缩成 100% 煎剂 (每毫升药液含生药 1g), 备用。

1.4 主要试剂及细胞株:

鼠重组白介素-2(rmIL-2) 1×10^6 U/ml;

鼠重组白介素-6(rmIL-6) 1×10^5 U/ml;

鼠重组干扰素 γ (rmIFN γ) 1×10^4 U/ml;

GK1.5(抗小鼠 CD4 抗原单克隆抗体);

536(抗小鼠 CD8 抗原单克隆抗体);

2C11(抗小鼠 CD3 抗原单克隆抗体);

HT-2 细胞株为白介素-2 依赖细胞株;

KD83 细胞株为白介素-6 依赖细胞株;

Wish 细胞为干扰素 γ 检测细胞株;

Yac-1 细胞为 NK 细胞敏感株。

1.5 动物分组:

将实验动物随机分为 3 组。第 1 组为正常对照组, 10 只, 常规饲养, 不做任何处理; 第 2 组为模型组, 20 只, 造模后即胃饲生理盐水, 每次 0.2ml, 每日 2 次; 第 3 组为中药组, 20 只, 造模后即胃饲益气养阴活血化癥方, 每次 0.2ml, 每日 2 次。

以上各组动物均于造模后第 12 天处死 10 只, 眶静脉取血 2ml, 取材脾脏, 进行相关指标观察。所余动物进行生存期观察。

2 观察项目及方法

2.1 生存期: 观察各组动物的存活时间。

2.2 外周血白细胞和血小板计数: 分别在造模前、造模后第 3 天、造模后第 7 天于小鼠尾静脉取血, 计数外周血白细胞和血小板。细胞亚群测定: 用比重 1.090 的淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC), 洗涤后调整细胞数为 1×10^6 /ml, 分别加入抗 CD3 抗原单克隆抗体, 抗 CD4 抗原单克隆抗体及抗 CD8 抗原单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C, 60min, 离心洗涤, 加入荧光标记抗体, 4 $^{\circ}$ C, 60min, 离心洗涤, 荧光显微镜下计数 200 个细胞, 计算荧光阳性细胞百分率。

2.3 细胞因子的诱生: 小鼠颈脱臼处死后, 无菌取脾脏, 置于含 3% FCS-Hanks 液平皿中, 轻轻磨碎后尼龙滤网过滤, 加入含有淋巴细胞分离液的离心管中, 2000r/min, 离心 30min, 分离有核细胞, 以 10% FCS-1640 培养基调整细胞

* 本课题为天津市卫生局基金课题(97016)

浓度为 1×10^6 /ml, 加入 24 孔细胞培养板中, $2\text{ml}/\text{孔}$, 加入 LPS, 使其浓度 $20\mu\text{g}/\text{ml}$, 用于刺激 T 细胞产生 IL-6, 或加入 PHA, 浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$, 用于刺激 T 细胞产生 IL-2 和 IFN γ , 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养 48h, 收获上清, -40°C 保存, 待测。

2.4 IL-2 活性测定: 取对数生长期的 HT-2 细胞, 洗涤 3 遍后配成 1×10^5 /ml, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 $100\mu\text{l}$, 加入待测上清或 IL-2 标准品 $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养 48h 后将细胞培养板离心, $1700\text{rpm}/\text{min}$, 10min , 弃上清, 用滤纸吸干, 加入 MTT ($1\text{mg}/\text{ml}$) 及无酚红 DMEM 培养基各 $50\mu\text{l}/\text{孔}$, 振荡 $5 \sim 10\text{min}$, 继续培养 4h, 离心弃上清, 加入酸化异丙醇 ($1:300$), $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 充分振荡使形成的甲臜结晶完全溶解, 在 ELISA 仪波长为 570nm 条件下测其 OD 值, 绘制标准曲线, 算出样品中 IL-2 活性单位。

2.5 IL-6 活性测定: 取对数生长期的 KD83 细胞, 洗涤 3 遍后配成 1×10^5 /ml, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 $100\mu\text{l}$, 加入待测上清或 IL-6 标准品 $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养 48h 后将细胞培养板离心, $1700\text{rpm}/\text{min}$, 10min , 弃上清, 用滤纸吸干, 加入 MTT ($1\text{mg}/\text{ml}$) 及无酚红 DMEM 培养基各 $50\mu\text{l}/\text{孔}$, 振荡 $5 \sim 10\text{min}$, 继续培养 4h, 离心弃上清, 加入酸化异丙醇 ($1:300$), $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 充分振荡使形成的甲臜结晶完全溶解, 在 ELISA 仪波长为 570nm 条件下测其 OD 值, 绘制标准曲线, 算出样品中 IL-6 活性单位。

2.6 IFN γ 活性测定: 取对数生长期的 Wish 细胞, 洗涤 3 遍后调整细胞浓度为 3×10^5 /ml, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 $100\mu\text{l}$, 加入待测上清或标准品 $50\mu\text{l}/\text{孔}$, 设细胞对照组和病毒对照组, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养 24h, 弃上清, 加入 $100\mu\text{l}$ 病毒悬液 ($250\text{TICID}_{50}/\text{ml}$), 细胞对照组加入 $100\mu\text{l}$ 培养基。培养 36h, 当病毒对照组细胞几乎全部发生病变时终止培养。将细胞培养板离心, $1700\text{rpm}/\text{min}$, 10min , 弃上清, 用滤纸吸干, 加入 MTT ($1\text{mg}/\text{ml}$) 及无酚红 DMEM 培养基各 $50\mu\text{l}/\text{孔}$, 振荡 $5 \sim 10\text{min}$, 继续培养 4h, 离心弃上清, 加入酸化异丙醇 ($1:300$), $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 充分振荡使形成的甲臜结晶完全溶解, 在 ELISA 仪波长为 570nm 条件下测其 OD 值, 绘制标准曲线, 算出样品中 IFN γ 活性单位。

2.7 NK 细胞杀伤活性测定: 制备小鼠脾细胞悬液, 分离单个核细胞, 并调整至 1×10^7 /ml, 以其为杀伤细胞。取 Yac-1 细胞并调整细胞浓度至 1×10^6 /ml, 加入 H-TdR $10\mu\text{Ci}$, 37°C , 2h , 每半小时振荡 1 次, 洗涤 3 次, 调成 1×10^5 /ml 标记的 Yac-1 细胞。取 96 孔圆底板, 每孔加 1×10^4 靶细胞, 37°C , 18h , 离心, 取上清 0.1ml , 测定被杀伤细胞所释放的同位素, 算出其杀伤活性。

$$\text{NK 细胞杀伤活性}(\%) = \frac{(\text{实验组 cpm} - \text{对照组 cpm})}{(\text{最大释放组 cpm} - \text{对照组 cpm})} \times 100\%$$

2.6 统计学方法: *t* 检验。

3 结果

3.1 生存期: 各组生存期结果见表 1。从表中可见, 中药治疗

组的生存期较造模组延长, 有统计学差异, $P < 0.05$ 。

表 1 各组动物生存期观察结果(天, $X \pm SD$)

| 组别 | 动物数 | 生存期 |
|-----|-----|------------------|
| 造模组 | 10 | 16.8 ± 1.0 |
| 中药组 | 10 | $21.8 \pm 0.6^*$ |

* 与造模组相比, $P < 0.05$

3.2 外周白血细胞和血小板计数: 见表 2。从表 2 中可见, 化疗后第 3 天, 白细胞数降至很低水平, 造模组与中药组之间无明显差别。化疗后第 7 天, 造模组白细胞数均值高于原水平, 中药组接近原水平, 与造模组比较有显著性差异, $P < 0.01$ 。血小板数在化疗后第 3 天、第 7 天两组之间无差别。

表 2 各组动物外周血象和血小板的变化($X \pm SD$)

| 组别 | 白细胞数 ($\times 10^3/\mu\text{l}$) | | 血小板数 ($\times 10^5/\mu\text{l}$) | |
|-----|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|-------------------|
| | 治疗后 3 天 | 治疗后 7 天 | 治疗后 3 天 | 治疗后 7 天 |
| 正常组 | 17.76 ± 6.146 | | 13.57 ± 4.061 | |
| 造模组 | 2.60 ± 0.972 | 28.40 ± 14.147 | 8.37 ± 4.691 | 14.40 ± 1.946 |
| 中药组 | 8.10 ± 3.035 | $15.00 \pm 9.438^*$ | 13.46 ± 1.270 | 13.62 ± 4.001 |

* 与造模组相比, $P < 0.01$

3.3 T 细胞亚群: 结果见表 3。从表中可见, 造模组 CD3 下降, CD4/CD8 比例倒置, 表明机体的免疫功能处于紊乱状态。中药组的 CD3 有所回升, CD4/CD8 的比例有所恢复, 与造模组比较, 有显著性差异, $P < 0.05$ 。

表 3 各组动物 T 细胞亚群测定结果($X \pm SD$)

| 组别 | CD3(%) | CD4(%) | CD8(%) | CD4/CD8 |
|-----|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 正常组 | 72.00 ± 2.1 | 37.00 ± 2.3 | 24.00 ± 2.7 | 1.51 ± 0.11 |
| 造模组 | 53.83 ± 2.79 | 18.83 ± 1.6 | 21.67 ± 1.51 | 0.87 ± 0.07 |
| 中药组 | 65.00 ± 1.26 | 26.87 ± 3.37 | 23.00 ± 1.79 | $1.19 \pm 0.19^*$ |

* 与造模组相比, $P < 0.05$

3.4 IL-2、IL-6、IFN γ 活性测定: 结果见表 4。从表中可见, 造模组各种细胞因子的分泌水平显著低下, 表明机体的免疫功能处于低下状态。中药组各种细胞因子的分泌水平显著回升, 与造模组相比有显著性差异, $P < 0.01$ 。

表 4 各组动物细胞因子水平的变化(U/ml , $X \pm SD$)

| 组别 | IL-2 | IL-6 | IFN γ |
|-----|--------------------|--------------------|--------------------|
| 正常组 | 27.98 ± 2.78 | 38.64 ± 4.17 | 19.12 ± 3.06 |
| 造模组 | 8.17 ± 1.53 | 16.68 ± 2.48 | 3.25 ± 0.67 |
| 中药组 | $19.80 \pm 1.45^*$ | $29.93 \pm 3.04^*$ | $13.47 \pm 2.86^*$ |

* 与造模组相比, $P < 0.01$

3.5 NK 细胞活性测定: 结果见表 5。从表中可见, 造模组 NK 细胞杀伤活性降低, 中药组 NK 细胞杀伤活性有所回升, 与造模组相比有显著性差异, $P < 0.01$ 。

表 5 各组动物 NK 细胞杀伤活性的变化(%, $\bar{X} \pm SD$)

| 组别 | 动物数 | NK |
|-----|-----|---------------|
| 正常组 | 10 | 31.21 ± 4.17 |
| 造模组 | 10 | 8.00 ± 1.43 |
| 中药组 | 10 | 23.40 ± 2.28* |

* 与造模组相比, $P < 0.01$

4 讨论

微小残留白血病(minimal residual leukemia, MRL)是指急性白血病经治疗获完全缓解后体内残留微量白血病细胞的状态。它是白血病复发的根源。目前治疗急性白血病的主要手段仍然是放化疗,由于放化疗既是白血病细胞的杀伤剂,又是机体强烈的免疫抑制剂,随着剂量的不断加大,对机体的毒性损害愈加严重,因此放化疗使用的剂量及效用基本上达到了极限。此外,白血病发生的原因之一是免疫监视功能低下,放化疗加重了免疫功能的损伤,对免疫系统的抑制也阻碍了机体的恢复。

祖国医学将急性白血病归属于“急劳”、“血证”、“症积”等范畴。化疗后多表现头晕、乏力、纳呆、自汗盗汗、腰膝酸软等症候,符合祖国医学“邪少虚多”的病理特点。所谓“邪少”是指化疗药物不能完全杀灭白血病细胞,体内仍残留少量白血病细胞。所谓“虚多”是指白血病细胞的浸润及化疗药物的毒副作用使得机体的正气受损,不能再耐受大剂量的化疗。现代医学研究发现,急性白血病患者免疫功能低下,包括 T

细胞亚群紊乱,自然杀伤细胞, NK 细胞、淋巴因子激活的杀伤细胞、LAK 细胞活性低下等,完全缓解处于 MRL 阶段,免疫功能虽有所恢复,但仍较正常人低下,从而表明 MRL 病人免疫功能有缺陷。

本实验在成功复制微小残留白血病模型的基础上,发现造模组小鼠的 T 细胞亚群紊乱,多种细胞因子如 IL-2、IL-6、IFN γ 以及 NK 细胞杀伤活性均有明显低下,提示此时处于免疫功能抑制状态。一次性大剂量化疗后,虽然生存期有所延长,但外周血白细胞持续低下,代表免疫功能的指标如 T 细胞亚群、IL-2、IL-6、IFN γ 以及 BK 细胞杀伤活性均未见明显回升,说明化疗药物在杀灭残留白血病细胞的同时,对机体的免疫功能强烈抑制,小鼠有可能由于免疫功能低下而产生其它并发症,最终导致死亡。

针对“邪少虚多”的病机特点,我们应用扶正祛邪的治则,以益气养阴为主,佐以活血化痰。结果表明,中药组小鼠的生存期明显延长,外周血白细胞计数升高,紊乱的 T 细胞亚群得以调整,多种细胞因子如 IL-2、IL-6、IFN γ 的活性以及 NK 细胞杀伤活性较造模组明显回升,提示益气养阴活血化痰方有较显著的免疫增强和免疫调节作用,通过恢复自身的免疫功能,提供恢复机体杀伤白血病细胞的可能性,这正是中药不同于化疗的所在,也是中药治疗白血病的优势所在。

(收稿日期: 2000-12-15)

前列安冲剂对试验性前列腺增生作用的影响

王志华 王慧生 刘向红 郝志强

(天津中医学院 300193)

中图分类号: R289.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-7145(2001)01-0024-03

前列安冲剂为我院制剂,由蒲公英、地丁、丹参、穿山甲等中药组成,具有清热解毒、活血化瘀之功。临床用于治疗前列腺增生,可明显改善其临床症状,总有效率达 92.7%。为进一步了解本方的药理作用,我们通过实验性前列腺增生动物模型,进行了前列安冲剂的抗炎、抑制增生作用的实验研究,现报告如下:

1 实验材料

1.1 受试药物: 前列安冲剂浓浸膏,由天津市中医研究所药剂室提供,3.95g 生药/kg,批号 971002,于 4℃ 冰箱保存,用前按要求以蒸馏水配制成所需浓度,供实验动物灌胃给药。阳性对照药,前列康片,市售,批号 980105,包头中药厂产品。

1.2 试剂与仪器: 角叉菜胶, sigma 公司产品; 丙酸睾丸注射

剂, 25mg/ml, 市售, 上海第九制药厂产品, 批号 930403; 紫外分光光度计, 上海光学仪器厂产品, 等。

1.3 实验动物: 昆明种小鼠, 雄性, 体重 20~22g; Wister 大鼠, 雄性, 200~250g, 由天津市药物研究院实验动物室提供, 合格证号 001。

2 方法与结果

2.1 对大鼠实验性前列腺炎的抑制作用: 大鼠 60 只, 按体重随机分为 6 组: 空白组、模型组、阳性对照组(前列康 4.0g 生药/kg), 前列安冲剂 1g 生药/kg、2g 生药/kg、4g 生药/kg 3 个剂量组。每组 10 只, 每日口服灌胃 1 次, 容量为 1ml/100g, 连服 6 天, 于第 6 天给药后 1 小时, 各给药组用 1.5% 戊巴比妥钠水溶液按 0.2ml/100g 体重腹腔注射麻醉大鼠,