

• 实验研究 •

灰树花多糖对脾虚小鼠 T 细胞亚群和 Th1/Th2 亚群的影响

雷萍, 韩晓伟, 侯殿东, 陈殿学, 关洪全

辽宁中医药大学基础医学院, 辽宁 沈阳 110032

摘要: 目的 观察灰树花多糖对脾虚小鼠 T 细胞亚群和 Th1/Th2 亚群的影响, 探讨其免疫调节机制。方法 健康雄性清洁级昆明小鼠 48 只随机分为空白组、脾虚组、阳性组(香菇多糖)及灰树花多糖低、中、高剂量组, 每组 8 只, 各给药组给予相应药物, 滤菌后腹腔注射 10 d, 第 11 日处死动物。流式细胞术检测各组小鼠外周血 CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺T 细胞百分率, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测小鼠血清干扰素- γ (IFN- γ) 和白细胞介素-4 (IL-4) 的含量。结果 高剂量灰树花多糖能明显升高脾虚小鼠外周血 CD4⁺T 淋巴细胞百分率 ($P < 0.05$); 中、高剂量灰树花多糖可以明显升高脾虚小鼠的 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值 ($P < 0.01$)。中、高剂量灰树花多糖可以明显升高脾虚小鼠 CD3⁺T 淋巴细胞百分率 ($P < 0.01$)。灰树花多糖中、高剂量组可以明显升高脾虚小鼠血清 IFN- γ 含量 ($P < 0.01$), 灰树花多糖高剂量组可以明显降低脾虚小鼠血清 IL-4 含量 ($P < 0.01$)。结论 灰树花多糖可改善脾虚所致 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值降低, 使 Th2 细胞向 Th1 细胞转化, 从而达到治疗脾虚证的目的。

关键词: 灰树花多糖; 脾虚; T 细胞亚群; 干扰素- γ ; 白细胞介素-4; 小鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2013.07.011

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-5304(2013)07-0027-03

Effects of Grifola frondosa Polysaccharide on T cell Subsets and Th1/Th2 Subsets of Spleen Deficiency Mice LEI Ping, HAN Xiao-wei, HOU Dian-dong, CHEN Dian-xue, GUAN Hong-quan (School of Basic Medical Sciences, Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of Grifola frondosa polysaccharide on T cell subsets and Th1/Th2 subsets of spleen deficiency mice, and investigate its immunoregulation mechanism. **Methods** Forty-eight KM mice were divided into 6 groups: normal group, spleen deficiency group, positive group (lentinan), three dosage groups of Grifola frondosa polysaccharide, 8 mice in each group. The mice were injected corresponding drug intraperitoneally for 10 days. Then mice in each group were detected CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺T cell by flow cytometry. IFN- γ and IL-4 levels were detected by ELISA. **Results** The high dose of Grifola frondosa polysaccharide could significantly increase the CD4⁺T lymphocytes percentage in peripheral blood ($P < 0.05$). Medium and high dose of Grifola frondosa polysaccharide could significantly increase CD4⁺/CD8⁺T cell ratio ($P < 0.01$) and CD3⁺T lymphocyte percentage ($P < 0.01$) of spleen deficiency mice. Medium and high dose of grifola frondosa polysaccharide could significantly increase IFN- γ level in serum of spleen deficiency mice ($P < 0.01$), and high dose of Grifola frondosa polysaccharide could decrease IL-4 level in serum of spleen deficiency mice ($P < 0.01$). **Conclusion** Grifola frondosa polysaccharide can improve the decreased CD4⁺/CD8⁺T cell ratio which caused by spleen deficiency, and promote the transformation of Th1 to Th2, thus treating spleen deficiency syndrome.

Key words: Grifola frondosa polysaccharide; spleen deficiency; T cell subsets; IFN- γ ; IL-4; mice

研究表明,脾虚证不仅在临床上有便溏、腹泻、消瘦和气血生化不足等消化功能改变,其免疫功能也多受到影响,脾虚的本质与免疫功能低下有密切关系^[1]。灰树花又名栗蘑、贝叶多孔菌,是一种药食两用的珍稀食用菌。灰树花多糖是从灰树花的子实体中分离得到,主要成分为真菌多糖,近年研究表明,

其具有增强免疫、抑制肿瘤、抗人类免疫缺陷病毒、稳定血压等作用^[2]。目前,关于灰树花多糖对脾虚证引起免疫低下的调节尚未见报道。为此,本研究以灰树花多糖作为一种天然的免疫调节剂,探讨其对脾虚小鼠免疫功能的调节机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性清洁级昆明小鼠 48 只,辽宁中医药大学实验动

通讯作者: 关洪全, E-mail: hongquanguan@sina.com

物中心提供,体质量(20±2)g,动物许可证号: SCXK(辽)2008-0005。

1.2 药物

灰树花多糖,浙江方格药业有限公司提供,多糖纯度为45%,上海化工研究院检测中心吕正平鉴定;香菇菌多糖片,福建闽东力捷迅药业有限公司,批号091201。

1.3 仪器与试剂

全自动酶标仪(奥地利 Anthos 公司,17550 型);生物安全柜(美国热电公司,1169REL#1 型);高压蒸汽灭菌器(日本三洋公司,MLS-3780 型);电热恒温培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂,HXP-9052MBE 型);多孔离心机(法国 Jouan 公司,C4-12 型);流式检测管(BD 公司)。CD4-FITC, CD8-PE, CD3-FITC(eBioscience,批号 E025737);干扰素-γ (IFN-γ)检测试剂盒、白细胞介素-4(IL-4)检测试剂盒(R&D 分装,批号 201004)。

2 实验方法

2.1 分组与造模

将健康雄性清洁级昆明小鼠 48 只随机分为空白组、脾虚组、阳性组(香菇多糖,2 mg/kg)及灰树花多糖低剂量组(灰低组,5 mg/kg)、灰树花多糖中剂量组(灰中组,10 mg/kg)、灰树花多糖高剂量组(灰高组,20 mg/kg),每组 8 只。

参照文献[3]番泻叶-劳倦过度复合因素造模法,每只小鼠每日灌胃 100%番泻叶水煎剂 0.5 mL,并游泳,以身体下沉为度。14 d 后,造模小鼠出现体质量下降、粪便不正常(时软,时溏,时干)、食少纳呆、毛色枯槁、蜷缩聚堆、反应迟钝甚至胆怯状态等表现,说明脾虚造模成功。阳性组给予香菇多糖,灰树花多糖各组按不同剂量予灰树花多糖,滤菌后腹腔注射 10 d,第 11 日处死动物。

2.2 脾虚小鼠外周血 T 细胞亚群检测

采用流式细胞术检测方法。取小鼠肝素抗凝全血 1 mL,加入红细胞裂解液 2 mL 作用 2 min 后,1000 r/min 离心 5 min。弃上清,加入 PBS 液 5 mL,洗 2 次。调整外周血单个核细胞浓度为 1×10⁷/mL。取 100 μL 各实验组外周血单个核细胞悬液于流式管中,加入流式抗体 5 μL,室温避光反应 30 min。1000 r/min 离心 5 min,小心吸弃上清,每孔加入 500 μL PBS 液混匀细胞。1000 r/min 离心 5 min,小心吸弃上清,每孔加入 300 μL PBS 液混匀细胞,上机检测。以未加流式抗体细胞为阴性对照,分别检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞所占比例。

2.3 脾虚小鼠外周血干扰素-γ 和白细胞介素-4 含量测定

各组小鼠取血后静置,离心分离血清,按试剂盒说明书操作。

3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,组间采用两两比较 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

4 结果

4.1 灰树花多糖对脾虚小鼠外周血 T 细胞亚群的影响

脾虚组 CD4⁺T 淋巴细胞百分率与空白组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);灰高组与脾虚组比较,差异有统计学意义

($P < 0.05$)。脾虚组 CD8⁺T 淋巴细胞百分率比空白组明显升高($P < 0.05$),灰树花多糖后各组差异无统计学意义($P > 0.05$)。脾虚组 CD4⁺/CD8⁺比值比空白组明显降低($P < 0.01$),中、高剂量组灰树花多糖可以明显提高脾虚小鼠的 CD4⁺/CD8⁺ 比值($P < 0.01$);造模后,脾虚组的 CD3⁺T 淋巴细胞百分率比空白组明显降低($P < 0.01$),中、高剂量灰树花多糖可以明显提高脾虚小鼠的 CD3⁺T 淋巴细胞百分率($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组小鼠外周血 T 细胞亚群检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ (%)
空白组	5	15.92±0.15	7.17±0.24	2.22±0.95	31.04±5.30
脾虚组	5	17.10±4.86	13.68±4.50 [†]	1.26±0.58 ^{##}	18.73±0.79 [†]
阳性组	5	19.15±0.46	12.60±0.46	1.52±0.19 ^{**}	31.22±5.38 [*]
灰低组	5	23.60±5.22	16.07±0.67 [†]	1.46±0.26 ^{##}	22.99±2.16
灰中组	5	22.80±3.20	15.10±3.73 [†]	1.51±0.28 ^{**}	36.61±1.79 ^{**}
灰高组	5	27.46±3.88 [*]	14.96±2.29 [†]	1.84±0.22 ^{**}	33.93±6.13 ^{**}

注:与脾虚组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与空白组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ (下同)

4.2 灰树花多糖对脾虚小鼠外周血干扰素-γ 和白细胞介素-4 含量的影响

脾虚组小鼠血清 IFN-γ 含量比空白组明显降低($P < 0.01$),中、高剂量组灰树花多糖可以明显提高脾虚小鼠血清 IFN-γ 含量($P < 0.01$)。脾虚组小鼠血清 IL-4 含量明显比空白组增高($P < 0.05$),给予低、中、高剂量灰树花多糖后 IL-4 含量下降,其中高剂量灰树花多糖可以明显降低脾虚小鼠血清 IL-4 含量,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组小鼠血清 IFN-γ 和 IL-4 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IFN-γ (ng/L)	IL-4 (pg/mL)
空白组	8	2525.84±305.01 [*]	173.84±14.83 [*]
脾虚组	8	2007.03±490.30 ^{##}	201.61±24.30 [†]
阳性组	8	2965.96±336.72 ^{###}	185.55±25.59 ^{**}
灰低组	8	2351.02±434.87	195.37±38.52
灰中组	8	2915.17±474.85 ^{**}	177.80±22.65
灰高组	8	2599.10±478.34 ^{**}	156.10±12.70 ^{###}

5 讨论

T 细胞亚群维持着机体正常的免疫功能,其中 CD3⁺T 细胞包括外周所有成熟 T 细胞,在一定程度上反映细胞免疫的总体水平。本研究结果表明,脾虚时,CD3⁺T 淋巴细胞百分率明显降低($P < 0.01$),说明脾虚小鼠外周血的 T 淋巴细胞总数下降,细胞免疫水平明显下降。而中、高剂量灰树花多糖可以明显提高脾虚小鼠的 CD3⁺T 淋巴细胞百分率($P < 0.01$)。

T 细胞在周围组织和外周血中的数目是相对稳定的,CD4⁺和 CD8⁺T 细胞在体内也维持一定的比例,共同参与机体免疫应答过程,其数目和免疫功能的变化也是发病的重要因素,CD4⁺/CD8⁺比值的降低被认为是疾病严重程度和预后不良的重要标志之一^[4]。

造模后,虽然脾虚组 CD4⁺T 淋巴细胞百分率与空白组比较差异无统计学意义,但 CD8⁺T 淋巴细胞百分率比空白组明显升高($P < 0.05$),说明脾虚时发生了 T 细胞亚群向 CD8⁺T 淋巴细胞

方向偏移。与此同时,脾虚组的 CD4⁺/CD8⁺比值比空白组明显降低($P<0.01$),说明脾虚时小鼠免疫功能低下。给予灰树花多糖后各组小鼠外周血 CD4⁺T 淋巴细胞百分率有升高趋势,但只有灰高组与脾虚组比较差异有统计学意义($P<0.05$);灰树花多糖对 CD8⁺T 细胞影响不大,差异无统计学意义,考虑灰树花多糖可能主要是通过作用于 CD4⁺T 淋巴细胞来提高脾虚小鼠的细胞免疫功能。中、高剂量灰树花多糖可以明显升高脾虚小鼠的 CD4⁺/CD8⁺比值($P<0.01$),说明灰树花多糖可以改善脾虚时造成的小鼠 CD4⁺/CD8⁺细胞比值降低。

CD4⁺T 细胞按其功能不同可分为辅助性 T 细胞(Th 细胞)和迟发型超敏反应性 T 细胞(TDTH)。根据分泌的细胞因子和介导的免疫功能不同,CD4⁺T 淋巴细胞又被分成两个亚群:Th1 亚群和 Th2 亚群。Th1 亚群主要分泌 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子,而 Th2 亚群主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 等细胞因子,Th1 亚群主要参与细胞免疫,而 Th2 亚群则主要参与体液免疫。Th1/Th2 亚群比例失调将会导致许多免疫疾病^[4-5]。

本实验选取了 Th0 细胞向 Th1 和 Th2 细胞分化时的关键因子 IFN- γ 和 IL-4。造模后,脾虚小鼠血清中 Th1 型细胞因子 IFN- γ 较空白组显著降低,而 Th2 型细胞因子 IL-4 含量较空白组显著升高,这表明脾虚小鼠出现了 Th1/Th2 亚群比例失衡。

灰树花多糖可以促进 Th1 细胞产生 IFN- γ 。IFN- γ 主要由活化的 NK 细胞和 T 细胞产生,能诱导细胞表达 IL-2 受体,从而促进 T 细胞增殖,进一步扩大免疫应答;还可以增强细胞

毒性 T 细胞(CTL)和 NK 细胞杀伤靶细胞的能力,具有巨噬细胞激活因子(MAF)的作用^[6]。IL-4 主要由活化的 T 细胞、肥大细胞及嗜碱性粒细胞产生,它是最具代表性的 Th2 型细胞因子。IFN- γ 和 IL-4 作为免疫系统中一对重要的调节因子,对维持 CD4⁺T 细胞亚群中 Th1/Th2 的平衡起重要作用。由本研究结果可知,脾虚小鼠体内存在 Th1/Th2 细胞因子网络失衡的状态,机体防御作用减弱,抗感染、抗肿瘤的作用随之降低。灰树花多糖可以有效地升高脾虚小鼠血清中 IFN- γ 含量,下调 IL-4 的含量,从而平衡 Th1/Th2 亚群,使 Th2 细胞向 Th1 细胞转化,从而达到治疗脾虚证的目的。

参考文献:

- [1] 杨舒,钱会南. 中医脾虚证的免疫机制研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(9): 1433.
- [2] 李海花. 灰树花活性多糖的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(2): 365.
- [3] 曲长江,刘劲,林庶如,等. 不同造模方法脾虚小鼠免疫学改变的比较研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(4): 46.
- [4] 岳丽. 大蒜多糖 B 对免疫抑制小鼠免疫活性的调节[J]. 暨南大学学报: 医学版, 2009, 30(6): 601-605.
- [5] 杨贵贞. 医学免疫学[M]. 5 版. 北京: 高等教育出版社, 2004: 126.
- [6] Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, et al. Caspase-1 processes IFN- γ inducing factor and regulates LPS-induced IFN- γ production[J]. Nature, 1997, 386: 619-623.

(收稿日期: 2013-01-03, 编辑: 华强)

(上接第 14 页) 本研究采用斑蝥酸钠维生素 B₆ 注射液联合 GP 方案治疗晚期非小细胞肺癌,两药联合治疗患者的近期疗效达 72.50%,单纯 GP 方案化疗患者为 48.72%,充分显示两药联合可达到协同抗癌作用。治疗后观察组的 T 细胞亚群及 NK 细胞均高于对照组,说明斑蝥酸钠维生素 B₆ 注射液具有较好的提高免疫功能的作用。同时,其止痛作用在本研究中得到了验证。由于患者治疗后肿瘤负荷减小,免疫力提高及疼痛减轻,因此,患者的生存质量得到改善。

参考文献:

- [1] Athanasios P, Sophia A, Athina A, et al. A randomized phase III study of the docetaxel/carboplatin combination versus docetaxel/single-agent as second line treatment for patients with advanced/metastatic non-small cell lung cancer[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 633-640.
- [2] 常永芳,葛明东,唐爱明,等. 艾易舒注射液治疗老年非小细胞肺癌的临床观察[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(16): 1279.
- [3] 陈智伟,廖美琳. RECIST 标准在肿瘤治疗疗效评价中的应用[J]. 中国肿瘤, 2004, 13(10): 617.
- [4] 李同度. 癌症疼痛的处理[M]//张天泽,徐光炜. 肿瘤学: 下册. 天津: 天津科学技术出版社, 1996: 2725-2737.
- [5] 董义亭. NP 方案治疗晚期肺癌的近远期疗效观察[J]. 临床研究, 2009,

- 16(15): 67-68.
- [6] 武振明,刘琪,齐秀恒. 斑蝥素联合介入栓塞治疗原发性肝癌疗效观察[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(12): 2775.
- [7] Zhang W, Zhao H, Yan Y, et al. Apoptosis induced by cantharidin in human pulmonary carcinoma cells A549 and its molecular mechanisms[J]. Chinese Journal of Oncology, 2005, 27(6): 330-334.
- [8] 魏素菊,苑素云. 斑蝥酸钠维生素 B₆ 注射液体外调节细胞因子的实验研究[J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(9): 1226-1228.
- [9] 刘思海,冯雯,朱瑞霞,等. 斑蝥酸钠维生素 B₆ 注射液联合草酸铂与替加氟持续泵入治疗晚期胃癌的比较研究[J]. 实用中西医结合临床, 2008, 8(4): 3.
- [10] 田秀玲,杨朴. 斑蝥酸钠维生素 B₆ 注射液联合 TACE 治疗中晚期肝癌疗效观察[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2006, 13(4): 351-353.
- [11] 温省初,王一飞,成志勇,等. 斑蝥酸钠胸腔灌注治疗恶性胸腔积液临床研究[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(2): 355-356.
- [12] 付彤,李嗣杰,宋东,等. 艾易舒注射液在乳腺癌术后辅助治疗中的应用及效果评价[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2007, 33(4): 746.
- [13] 刘镇锋,吴悦义,张述耀. 斑蝥酸钠与 NP 化疗方案及单用 NP 方案治疗晚期非小细胞肺癌疗效及生存质量比较[J]. 国际医药卫生导报, 2006, 12(23): 40.

(收稿日期: 2013-01-27, 编辑: 陈静)