

·方药研究·

本文引用:徐佳,夏伯候,邓静,林丽美,何娟娟,吴梦瑶,龚云,雷磊. 妇科千金胶囊对小鼠脾淋巴细胞免疫活性的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(11): 1320-1326.

妇科千金胶囊对小鼠脾淋巴细胞免疫活性的研究

徐佳¹,夏伯候²,邓静²,林丽美²,何娟娟³,吴梦瑶³,龚云^{3*},雷磊^{4*}

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007;2.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;
3.株洲千金药业股份有限公司,湖南株洲412003;4.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南长沙410208)

[摘要] **目的** 研究妇科千金胶囊对小鼠脾淋巴细胞体外增殖及免疫调节的影响。**方法** 分离制备小鼠脾淋巴细胞,将细胞分为空白组(不做任何处理),刀豆蛋白A组(刀豆蛋白A干预,ConA组),LPS组(脂多糖干预,LPS组)及不同浓度的妇科千金胶囊组(FKQ),作用时间分别为24 h、48 h和72 h。CCK8法检测FKQ对小鼠脾淋巴细胞体外增殖的影响;MTT法检测ConA及LPS对脾淋巴细胞增殖的影响;流式细胞术检测各组小鼠脾淋巴细胞中CD4⁺和CD8⁺的比例并计算CD4⁺/CD8⁺的比值;ELISA检测各组细胞上清中IFN- γ 、IL-2、IL-4和IL-10的表达。**结果** FKQ对小鼠脾淋巴细胞有显著的增殖作用,以浓度为30、40、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时其作用越明显($P<0.01$);FKQ能对ConA诱导的T淋巴细胞及LPS诱导的B淋巴细胞增殖有着明显的促进作用,以浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 最显著($P<0.01$);中、高浓度的FKQ协同ConA能升高CD4⁺的比例,降低CD8⁺的比例,显著升高CD4⁺/CD8⁺的比值($P<0.01$)。此外,不同浓度的FKQ均能明显增加IFN- γ 及IL-2的表达($P<0.01$, $P<0.05$),降低IL-4和IL-10的水平,以中、高浓度最为显著($P<0.01$),调节Th1/Th2平衡。**结论** 妇科千金胶囊可有效促进脾淋巴细胞增殖,升高CD4⁺和CD8⁺比例,促进Th1细胞因子的分泌,使Th1/Th2亚群向“Th1漂移”,调节Th1/Th2平衡,提高细胞免疫应答。

[关键词] 妇科千金胶囊;脾淋巴细胞;增殖;免疫调节;Th1/Th2

[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.11.004

Study on Immunological Activity of Fuke Qianjin Capsule to Mice's Splenic Lymphocytes

XU Jia¹, XIA Bohou², DENG Jing², LIN Limei², HE Juanjuan³, WU Mengyao³, GONG Yun^{3*}, LEI Lei^{4*}

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou, Hunan 412000, China; 4. School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of Fuke Qianjin Capsule (FKQ) on the proliferation and immunoregulation of mouse splenic lymphocytes in vitro. **Methods** After isolation and culture of mouse spleen lymphocytes, cells were assigned into a control group (no treatment), a ConA group (intervention with ConA), a LPS group (intervention with LPS) and Fuke Qianjin Capsule

[收稿日期]2020-04-28

[基金项目]国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(2017YFC1701900);2019年度湖南省教育厅优秀青年科学研究项目(19B416);湖南中医药大学研究生创新课题(2019CX20);湖南省中医药管理局一般科研项目(2017123)。

[作者简介]徐佳,女,在读博士研究生,研究方向:中西医结合防治妇科内分泌疾病。

[通讯作者]*龚云,男,高级工程师,E-mail:gongyun2002@126.com;雷磊,男,教授,博士研究生导师,E-mail:leilei1398@sina.com.

of different concentrations (FKQ). They were treated for 24 h, 48 h and 72 h respectively. CCK8 assay was used to test the effects of FKQ on proliferation of spleen lymphocytes in vitro; MTT method was used to detect the effect of ConA and LPS on the proliferation of splenic lymphocytes; Flow cytometry was used to detect the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ and calculate CD4⁺/CD8⁺ ratio. Moreover, IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 were detected by ELISA. **Results** FKQ at the concentrations of 30, 40 and 50 $\mu\text{g/mL}$ significantly promoted the proliferation of splenic lymphocytes ($P<0.01$). FKQ could significantly promote the proliferation of T lymphocytes induced by ConA and B lymphocytes induced by LPS, with the concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ being the most significant ($P<0.01$). The medium and high concentrations of FKQ cooperated with ConA increased the ratio of CD4⁺, decreased the ratio of CD8⁺, and significantly increased the ratio of CD4⁺/CD8⁺ ($P<0.01$). Different concentrations of FKQ could significantly increase the expression of IFN- γ and IL-2 ($P<0.01, P<0.05$), decrease the levels of IL-4 and IL-10 ($P<0.01$), to regulated the balance of Th1/Th2. **Conclusion** FKQ can promote the proliferation of splenic lymphocytes effectively, increase the proportion of CD4⁺ and CD8⁺, and promote the secretion of Th1 cytokines, thus shifting the Th1/Th2 subpopulation to "Th1", thereby regulating the Th1/Th2 balance and improving cellular immune response.

[**Keywords**] Fuke Qianjin Capsule; splenic lymphocytes; proliferation; immunoregulation; Th1/Th2

妇科千金胶囊(FKQ)是中国中药保护品种, 收载于 2015 版《中华人民共和国药典》一部, 由千斤拔、金樱根、穿心莲、单面针、功劳木、鸡血藤、当归、党参 8 味中药材组成, 具有清热除湿、益气化瘀的功效。常用于湿热瘀阻所致的带下病、腹痛, 症见带下量多、色黄质稠、臭秽、小腹疼痛、腰骶酸痛、神疲乏力等, 既标本兼治, 又扶正祛邪, 临床上广泛用于妇科炎症, 疗效甚佳。方中千斤拔祛风利湿解毒, 金樱根清热利湿止带, 二者同为君药; 穿心莲和功劳木清热除湿, 二者同为苦寒之品, 合用使全方清热解毒之力增强; 单面针以其辛温之性, 可防穿心莲、功劳木过于苦寒而伤胃, 使全方药性更趋平和, 无伤正气之虞, 三者共为臣药。当归补血活血、调经止痛, 鸡血藤补血、活血、通络, 二者合用既能补血调经, 又能畅利血行而加强全方清热除湿、活血解毒之功能; 党参补中益气、生津养血, 与当归、鸡血藤合用气血双补、扶正固本, 使全方融扶正、祛邪为一体, 三者共为佐药。诸药合用使机体正气得以充养, 邪气得以祛除, 故诸症消除。

中医学十分重视人体的正气, 强调正气是发病的主导, 认为“正气存内, 邪不可干; 邪之所凑, 其气必虚”。意指当人的正气在内, 气血充足的时候, 即机体免疫力正常, “外邪”即致病菌不容易侵犯机体致病; 而当人体正气受损, 即免疫功能低下时, 致病菌容易乘虚而入发病。FKQ 的治疗理念在清除致病菌

的同时增强机体免疫力, 后期通过强化自身免疫能力而防治疾病反复发作。脾脏作为机体最大的外周免疫器官, 是 T、B 淋巴细胞的主要聚集场所, 而 T、B 淋巴细胞作为机体免疫活性细胞, 其激活、分化、增殖在免疫应答过程中起着重要的作用^[1]。关于 FKQ 能调节由环磷酰胺引起的小鼠免疫功能障碍及 FKQ 组分中药对机体免疫调节研究较多^[2-5], 但尚无 FKQ 对体外培养小鼠脾淋巴细胞的免疫增强活性的报道。因此, 本实验以 FKQ 为研究对象, 研究其对小鼠脾淋巴细胞的增殖及免疫调节的影响, 以期为 FKQ 提高免疫作用机制的研究及开发利用奠定理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

20 只健康 BALB/c 雌性小鼠, 体质量 16~18 g, 6~7 周龄, 由湖南斯莱克景达实验动物公司提供, 许可证号: SCXK(湘)2019-0004。实验动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心, 自由饮食饮水, 实验程序由湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准。

1.2 药品与试剂

妇科千金胶囊(FKQ)(产品批号 20170231, 株洲千金药业股份有限公司); CCK8(CA1210, 北京索莱宝科技有限公司); 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(16000-044, 美国 gibco 公司); 1640 培养基(C11875500BT, 美国 gibco 公司); DMEM 高糖培养

基 (SH3002201, Hyclone 公司); ConA 刀豆蛋白、LPS 脂多糖及 MTT 噻唑兰 (批号分别为 C8110、L8880、M8180, 北京索莱宝科技有限公司); Mouse IFN- γ 、IL-2、IL-4 及 IL-10 ELISA Kit (批号为 PI508、PI575、PI612、PI522, 上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 仪器

47103 离心机 (Eppendorf 中国有限公司); SW-CJ-2FD 苏州净化超净工作台 (上海叶拓科技有限公司)、Blender 快速组织细胞破碎仪 (美国 Next Advance 公司)、Cyto-Flex 流式细胞仪 (美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 小鼠脾脏细胞的分离

将小鼠腹腔麻醉后, 颈椎脱臼处死, 75% 酒精将小鼠浸泡 15 min; 在超净台中取出小鼠脾脏, 去除筋膜后反复用 PBS 冲洗至无血色; 将脾脏置于 200 目细胞筛上, 注射器研磨, 用 PBS 冲洗 6 次后置于培养皿中; 收集细胞悬液, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清; 加入 10% 红细胞裂解液适量, 室温静置 10 min, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清; PBS 清洗 3 遍, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清; 加入 0.85% NaCl 溶液重悬沉淀; 密度梯度离心加样, 1 800~2 000 r/min 离心 40 min; 收集目标分层, PBS 清洗 3 遍; RPMI-1640 完全培养基重悬细胞沉淀, 调节细胞浓度为 1×10^8 , 转入培养瓶中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育 3 h, 去除贴壁细胞, 收集悬浮细胞进行后续实验。

2.2 CCK8 法检测 FKQ 对脾淋巴细胞的增殖作用

将 FKQ 设置成 10、20、30、40、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 不同药物浓度孵育小鼠脾淋巴细胞 24 h、48 h 和 72 h。将处理完成的细胞制备细胞悬液, 将 1×10^4 的细胞数接种到 96 孔板中, 每孔约 100 μL 细胞悬液, 每个浓度设 3 个复孔, 培养 12 h 使其贴壁。每孔加入 10 μL CCK8 继续培养 1 h 后, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度, 吸光度值与细胞的增殖能力成正比。

2.3 MTT 法检测 FKQ 对 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖的影响

细胞分离、接种方法同前, 参考文献[6], 本实验

分为空白组, 模型组 (ConA, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), FKQ 组: 不同浓度的 FKQ (10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别干预 ConA 诱导脾淋巴细胞。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中作用 24 h、48 h 和 72 h, MTT 法检测 FKQ 对 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖功能, 测定方法同 CCK8 法。

2.4 MTT 法检测 FKQ 对 LPS 诱导的脾淋巴细胞增殖的影响

细胞分离、接种方法同前, 参考文献[7], 本实验分为空白组, LPS 组 (LPS, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), FKQ 组: 不同浓度的 FKQ (10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别干预 LPS 诱导的脾淋巴细胞。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中作用 24 h、48 h 和 72 h, MTT 法检测 LPS 诱导脾淋巴细胞增殖功能。

2.5 流式细胞术检测小鼠脾淋巴细胞中 CD4⁺和 CD8⁺亚群的变化

将脾淋巴细胞 (1×10^8) 加入 24 孔板, 设空白组、ConA 组 (ConA, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 FKQ 组: 不同浓度的 FKQ (10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别干预 ConA 诱导脾淋巴细胞。每组均有 3 个复孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中, 孵育 48 h, 离心收集细胞, 磷酸盐缓冲溶液清洗, 然后使用小鼠单克隆抗体 CD4⁺-FITC 或者 CD8⁺-FITC 孵育后磷酸盐缓冲溶液清洗, 流式检测 CD4⁺和 CD8⁺的百分比。

2.6 ELISA 法检测细胞上清中 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 的含量

将脾淋巴细胞 (1×10^8) 加入 96 孔板, 设空白组 (不做任何刺激)、ConA 组 (ConA 刺激)、LPS 组 (LPS 刺激) 和 FKQ 组: 不同浓度的 FKQ (10、30 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别干预 ConA 诱导脾 T 淋巴细胞和 LPS 诱导脾 B 淋巴细胞, 每组均有 3 个复孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中, 孵育 48 h, 收集细胞上清, 2 000 r/min 室温离心 5 min, 取上清, 按说明书操作, 经酶标仪测定 OD 值。

2.7 统计学处理

使用 SPSS 22.0 统计学软件整理数据, 计量资料以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示, 当数据符合正态分布时, 多组间比较使用单因素方差齐性分析 (One-way ANOVA), 当 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

3 结果

3.1 FKQ 对脾淋巴细胞的增殖作用

对小鼠脾淋巴细胞分别孵育 24 h、48 h 和 72 h 后,结果发现,当细胞孵育 24 h,浓度为 10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FKQ 对小鼠脾淋巴细胞增殖无差异 ($P>0.05$);浓度在 30、40、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞增殖有着显著的促进作用 ($P<0.01$)。当孵育细胞 48 h,与浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FKQ 相比,浓度在 20、30、40、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能明显增加脾淋巴细胞增殖 ($P<0.01$),且随着剂量的增加其增殖作用越明显。细胞孵育 72 h 后,30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FKQ 对细胞增殖有促进作用 ($P<0.05$);40、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FKQ 对细胞增殖促进作用更为明显 ($P<0.01$)。其他浓度组的细胞存活率无显著性差异,说明各浓度组药物对细胞无明显毒性。与培养 24 h 相比,FKQ 浓度为 10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,培养 48 h 与 72 h,对小鼠脾淋巴细胞增殖无影响 ($P>0.05$);FKQ 浓度为 20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,培养 48 h 时能明显促进细胞增殖 ($P<0.01$)。见表 1。

表 1 不同浓度的 FKQ 对脾淋巴细胞的增殖作用 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

药物浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	OD 值		
	24 h	48 h	72 h
10	1.028 \pm 0.034	1.059 \pm 0.008	1.038 \pm 0.035
20	1.070 \pm 0.011	1.101 \pm 0.003 ^{**#}	1.074 \pm 0.011
30	1.106 \pm 0.021 ^{**}	1.130 \pm 0.005 ^{**}	1.121 \pm 0.014 [*]
40	1.183 \pm 0.029 ^{**}	1.253 \pm 0.002 ^{**#}	1.182 \pm 0.006 ^{**}
50	1.231 \pm 0.022 ^{**}	1.304 \pm 0.013 ^{**}	1.316 \pm 0.070 ^{**}

注:与浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与培养 24 h 比较, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$

3.2 FKQ 对 ConA 诱导脾 T 淋巴细胞增殖的影响

由表 2 可知,与 ConA 组相比,10~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FKQ 对 T 淋巴细胞的增殖具有显著性差异 ($P<0.01$),有显著的量效关系,但只在 24 h 时剂量依赖性最明显;细胞孵育 48 h 及 72 h 时,FKQ 浓度在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞增殖作用差异较小,而当其浓度达到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其差异变化较大。

3.3 FKQ 对 LPS 诱导脾 B 淋巴细胞增殖的影响

由表 3 可知,LPS 在不同的孵育时间对 B 淋巴

表 2 不同浓度的妇科千金胶囊对 ConA 诱导脾 T 淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	OD 值		
		24 h	48 h	72 h
空白组	-	1.000 \pm 0.010	1.000 \pm 0.005	1.000 \pm 0.023
ConA 组	5	1.073 \pm 0.006	1.206 \pm 0.009	1.309 \pm 0.002
ConA+FKQ 组	10	1.110 \pm 0.005 ^{**}	1.482 \pm 0.015 ^{**}	1.483 \pm 0.015 ^{**}
	30	1.135 \pm 0.005 ^{**}	1.475 \pm 0.086 ^{**}	1.476 \pm 0.086 ^{**}
	50	1.319 \pm 0.012 ^{**}	1.617 \pm 0.005 ^{**}	1.617 \pm 0.005 ^{**}

注:与同培养时间 ConA 组比较, $^{**}P<0.01$

细胞都有明显增殖促进作用;10~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FKQ 对 B 淋巴细胞的增殖存在明显差异 ($P<0.05$, $P<0.01$),在细胞孵育 24 h 及 72 h 时剂量依赖性最明显;当细胞孵育 24 h 及 72 h 时,FKQ 浓度在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞增殖作用差异较小,而当其浓度达到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其差异变化较大。当细胞孵育 48 h 时,FKQ 浓度在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞增殖作用差异最大,浓度在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其差异最小。

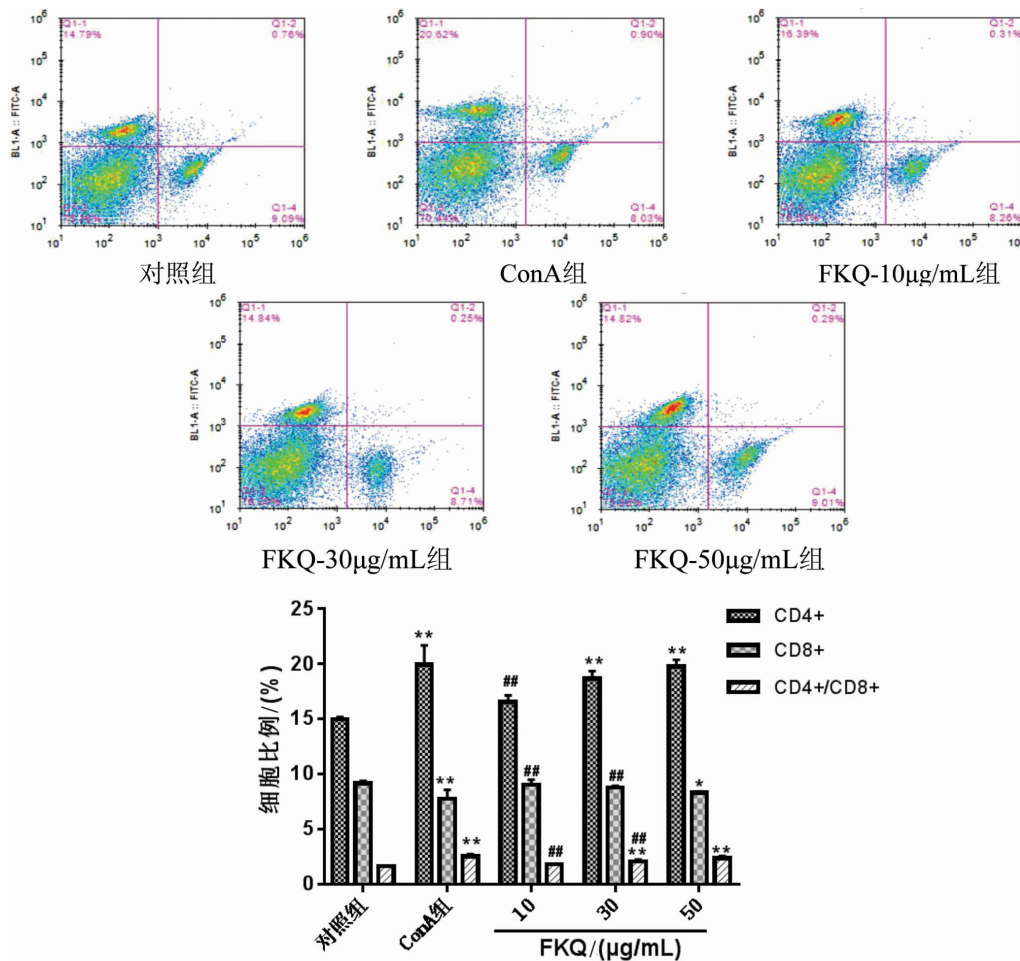
表 3 妇科千金胶囊对 LPS 诱导脾 B 淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	OD 值		
		24 h	48 h	72 h
空白组	-	1.000 \pm 0.006	1.000 \pm 0.012	1.000 \pm 0.004
LPS 组	10	1.075 \pm 0.004	1.199 \pm 0.006	1.328 \pm 0.005
LPS+FKQ 组	10	1.109 \pm 0.003 [*]	1.228 \pm 0.005 ^{**}	1.458 \pm 0.073 [*]
	30	1.146 \pm 0.006 ^{**}	1.267 \pm 0.006 ^{**}	1.501 \pm 0.107 ^{**}
	50	1.303 \pm 0.032 ^{**}	1.348 \pm 0.003 ^{**}	1.638 \pm 0.011 ^{**}

注:与同培养时间 LPS 组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$

3.4 FKQ 对小鼠脾淋巴细胞中 CD4⁺和 CD8⁺亚群的影响

如图 1 所示,与对照组相比,在 ConA 的刺激下,CD4⁺ T 细胞比例显著升高 ($P<0.01$),而随着 FKQ 的浓度升高 CD4⁺ T 细胞的比例出现增加的趋势,但低浓度 FKQ 与 ConA 协同效果不明显,而当 FKQ 达到中、高浓度时开始与 ConA 产生协同作用 ($P<0.01$);经 ConA 刺激后 CD8⁺ T 细胞比例降低;中、高浓度 FKQ 协同 ConA 能显著升高 CD4⁺/CD8⁺ 比值,调节机体免疫功能 ($P<0.01$)。说明中、高浓度的 FKQ 与 ConA 能产生协同作用,调节机体免疫平衡。



注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 ConA 组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$

图 1 FKQ 对小鼠脾淋巴细胞中 CD4⁺和 CD8⁺亚群的影响

3.5 FKQ 对小鼠脾淋巴细胞 INF- γ 、IL-2、IL-4 及 IL-10 表达的影响

表 4 结果显示,与空白组相比,单用 ConA 和 LPS 刺激均能显著增加 INF- γ 、IL-2 的含量,差异具有统计学意义 ($P<0.01$, $P<0.05$);与单用 ConA 及 LPS 刺激相比,ConA 协同 50 $\mu\text{g/mL}$ FKQ 能促进 IL-2 的表达,LPS 协同不同浓度的 FKQ 对 INF- γ 、IL-2 的表达均有显著促进作用 ($P<0.01$),同时结果发现,与空白组相比,ConA 及 LPS 的刺激显著降低了细胞中 IL-4 的表达 ($P<0.01$, $P<0.05$),而增加 IL-10 的表达 ($P<0.01$)。与单用 ConA 及 LPS 刺激相比,FKQ 协同 ConA、LPS 刺激均能降低 IL-4、IL-10 的表达,尤以中、高浓度最为显著 ($P<0.01$)。

4 讨论

ConA 是一种 T 淋巴细胞有丝分裂原,可刺激静止的 T 淋巴细胞增殖活化;LPS 是一种非胸腺依

赖性抗原,可刺激 B 淋巴细胞增殖^[8]。脾淋巴细胞中所含的 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞的增殖是机体细胞免疫最直接的反馈^[9]。在本研究中,我们分离、培养正常小鼠脾淋巴细胞,采用 ConA 及 LPS 诱导刺激后,将不同浓度的 FKQ 进行协同干预,结果发现不同浓度的 FKQ 对小鼠脾淋巴细胞的增殖有着显著的促进作用,而且无毒性。这表明 FKQ 可直接作用于免疫细胞,促进机体免疫细胞的活化、增殖功能,提高机体的免疫力。

外周成熟的 T 细胞只表达 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞,初始 CD4⁺ T 细胞接受抗原刺激后,在不同条件下分化成 Th1 细胞和 Th2 细胞。Th1 主要分泌 INF- γ 、IL-2,INF- γ 具有多种生物活性,能增强 Th1 细胞活性和细胞免疫功能^[10];IL-2 能促进 T 细胞分化、增殖,促进细胞毒 T 细胞的杀伤作用,增强 NK 细胞的活性,其分泌水平的高低代表着机体的免疫能力高低^[11]。Th2 主要分泌 IL-4、IL-10 等细胞因子,

表 4 FKQ 对小鼠脾淋巴细胞分泌的 INF- γ 、IL-2、IL-4 及 IL-10 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	INF- γ /($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-2/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-4/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-10/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白组	-	1.79 \pm 0.12	36.25 \pm 0.19	44.83 \pm 0.34	289.08 \pm 0.84
ConA 组	5	2.57 \pm 0.05**	38.99 \pm 0.33*	35.60 \pm 1.16**	300.63 \pm 9.29**
LPS 组	10	2.23 \pm 0.07**	36.99 \pm 0.36	38.71 \pm 0.76*	299.08 \pm 1.07**
ConA+FKQ 组	10	2.77 \pm 0.05 ^{##}	39.04 \pm 0.71	34.17 \pm 0.54 [#]	297.30 \pm 0.33
	30	3.01 \pm 0.07 ^{##}	39.68 \pm 0.19	29.11 \pm 0.18 ^{##}	281.52 \pm 0.51 ^{##}
	50	3.33 \pm 0.04 ^{##}	43.20 \pm 0.55 ^{##}	25.75 \pm 0.728 ^{##}	272.97 \pm 0.8 ^{##}
LPS+FKQ 组	10	2.78 \pm 0.09 ^{\$\$}	38.15 \pm 0.23 ^{\$\$}	37.48 \pm 1.09	284.97 \pm 2.19 ^{\$\$}
	30	3.14 \pm 0.19 ^{\$\$}	39.13 \pm 0.22 ^{\$\$}	33.64 \pm 0.94 ^{\$\$}	275.74 \pm 1.58 ^{\$\$}
	50	3.38 \pm 0.05 ^{\$\$}	41.20 \pm 0.35 ^{\$\$}	32.76 \pm 0.91 ^{\$\$}	266.52 \pm 0.51 ^{\$\$}

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 ConA 组比较,[#] $P<0.05$;^{##} $P<0.01$;与 LPS 组比较,^{\$\$} $P<0.05$,^{\$\$\$} $P<0.01$

IL-4 可促进活化的 B 细胞和 T 细胞增殖,是体液免疫和获得性免疫的关键调节因子。IL-10 能抑制 Th1 细胞产生 IL-2 和 IFN- γ ,阻碍 Th1 免疫应答^[12]。

由于 Th1 和 Th2 细胞都能分泌细胞因子促进自身的增殖并抑制对方的增殖,因此,正常情况下机体中 Th1 细胞和 Th2 细胞处于平衡状态。而 Th1 和 Th2 的失衡与许多疾病的发生密切相关。如王依静等^[13]研究发现盆腔炎患者血清 IL-2 及 CD4⁺低于健康同龄妇女,而血清 IL-4、IL-10 及 CD8⁺均高于健康者,且急性盆腔炎患者 Th1/Th2 的变化明显大于慢性盆腔炎者,同时越严重的盆腔炎其变化越大。这与王娜研究提示慢性盆腔炎患者血清 Th2 细胞表达(血清 IL-6 的含量)比 Th1 细胞表达(血清 IL-2 含量)具有显著优势,即 Th1/Th2 平衡向 Th2“漂移”,导致免疫功能失调结果一致^[14]。伍丽芳^[15]临床发现 FKQ 可以显著升高子宫内膜炎患者血清 IL-2、IL-10 的表达,而陈小寒发现其能明显降低血清 IL-4 的水平,增加其抗炎活性,提高免疫应答^[16]。而在本研究中发现,FKQ 能明显增加淋巴细胞上清中 IFN- γ 、IL-2 的表达,降低 IL-4 及 IL-10 的表达,与伍丽芳研究结果相反。在炎症后期,可检测到血清 IL-10 的水平升高,高表达 IL-10 可负反馈激活 Th2 细胞,促进炎症后期纤维化的发展^[17]。而在炎症早期,致病菌的感染,使促炎性因子升高,开始介导炎症反应,致炎因子和抗炎因子之间平衡被打破;而在炎症发展过程中,抗炎因子开始逐渐上升,当炎症发

展到后期,促炎性因子表达被抑制,而抗炎因子反应增强,Th2 细胞占主导作用,导致机体免疫抑制。因而,本研究结果提示 FKQ 能降低细胞上清 IL-10 的表达,与临床上 FKQ 应用于炎症后期、慢性后遗症期一致。在炎症后期,FKQ 通过降低 IL-10 的释放使 Th1/Th2 亚群向“Th1 漂移”,抑制 Th2 的优势表达,调节 Th1/Th2 平衡,提高细胞免疫应答。这与王依静研究的盆腔炎发病的免疫机制及 FKQ 对慢性盆腔炎的免疫调节作用一致。

本研究结果表明 FKQ 可有效促进脾淋巴细胞增殖,促进 ConA 诱导的脾 T 淋巴细胞增殖及 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖,增加 CD4⁺比例,降低 CD8⁺比例,升高 CD4⁺/CD8⁺比值,提高机体免疫力。此外,FKQ 能减少淋巴细胞向 Th2 型分化,促使 Th1/Th2 亚群向“Th1 漂移”,抑制 Th2 的优势表达,调节 Th1/Th2 平衡,提高细胞免疫应答。本实验不足之处在于未明确 FKQ 中何种成分发挥主要免疫调节作用,未对 FKQ 调节免疫机能的作用机制进行探究,本课题组将在后续实验中对不足之处进行完善。

参考文献

- [1] YOO J H, LEE Y S, KU S, et al. Phellinus baumii enhances the immune response in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice[J]. Nutrition Research, 2020, 75: 15-31.
- [2] 田 洪,潘善庆,左之文.妇科千金胶囊抗炎免疫作用的实验研究[J]. 湖南中医杂志,2000,16(5):58-60.
- [3] 郝艳艳,聂春霞,武晓伟,等.党参多糖及其结构改性对免疫调节作

- 用影响的研究进展[J].中国医药导报,2018,15(28):25-28.
- [4] 安方玉,刘永琦,骆亚莉,等.当归不同有效部位对高原低氧模型小鼠免疫功能的影响[J].中国中医药信息杂志,2015,22(2):51-54.
- [5] 杨冉冉,刘新,姬蕾,等.鸡血藤质量控制及药理作用研究进展[J].环球中医药,2018,11(11):1833-1838.
- [6] 陈扬扬,刘坤娜,李云姣,等.副干酪乳杆菌 VL8 胞外多糖协同 ConA 对小鼠脾淋巴细胞增殖及细胞因子分泌的影响[J].食品工业科技,2017,38(15):302-305,310.
- [7] 魏晓露,杨健,王宏洁,等.华蟾素蟾毒配基对小鼠脾淋巴细胞免疫功能的影响[J].中药药理与临床,2016,32(6):92-97.
- [8] WANG X F, ZHU Z D, HAO T T, et al. Alopecines A - E, five chloro-containing matrine-type alkaloids with immunosuppressive activities from the seeds of *Sophora alopecuroides* [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 99: 103812.
- [9] FAN P, HAN B, HU H, et al. Proteome of Thymus and spleen reveals that 10-hydroxydec-2-enoic acid could enhance immunity in mice[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2020, 24(3): 267-279.
- [10] 张娜,毛迪,安柏松,等.刺五加多糖对免疫性肝损伤 BALB/c 小鼠 IL-2、IL-4、INF- γ 细胞因子及 mRNA 表达的影响[J].药物评价研究,2018,41(4):557-561.
- [11] MITRA S, LEONARD W J. Biology of IL-2 and its therapeutic modulation: Mechanisms and strategies[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2018, 103(4): 643-655.
- [12] MITCHELL R E, HASSAN M, BURTON B R, et al. IL-4 enhances IL-10 production in Th1 cells: Implications for Th1 and Th2 regulation[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11315.
- [13] 王依静,张碧黎.盆腔炎患者血清 Th1/Th2 及外周血 T 淋巴细胞亚群的变化研究[J].中国妇幼保健,2016,31(23):5008-5009.
- [14] 王娜.盆腔炎对慢性盆腔炎湿热型患者血清 Th1/Th2 的影响[J].山东中医药大学学报,2015,39(6):531-532.
- [15] 伍丽芳.妇科千金胶囊联合抗生素治疗子宫内膜炎对血清 IL-2、IL-10 水平的影响[J].按摩与康复医学,2017,8(24):64-65.
- [16] 陈小寒.抗生素联合妇科千金片治疗子宫内膜炎的临床效果[J].中国民康医学,2017,29(17):82-83.
- [17] ROJAS J M, AVIA M, MARTÍN V, et al. IL-10: A multifunctional cytokine in viral infections[J]. *Journal of Immunology Research*, 2017, 2017: 6104054.

(本文编辑 苏维)