

土茯苓对细胞免疫和体液免疫的影响

徐强 王蓉 徐丽华 蒋洁云

(中国药科大学中药药理教研室, 南京 210009)

〔摘要〕 土茯苓水提取物在抗原致敏后及攻击后给药均明显地抑制了 picryl chloride(PC)所致的小鼠接触性皮炎(PC-DTH)和绵羊红细胞(SRBC)所致的足趾反应(SRBC-DTH),其中攻击后给药时作用较强。土茯苓还明显地抑制了二甲苯所致的耳壳及蛋清所致的小鼠足趾炎症反应。此外,土茯苓对小鼠抗 SRBC 抗体形成的细胞数(IgM-及 IgG-PFC 数)无明显影响,但其溶血空斑明显地较对照组为大,同时,血清溶血素水平未见降低,而呈增加趋势。以上结果表明,土茯苓对体液免疫反应无抑制作用,但可选择性地抑制细胞免疫反应,后者主要系影响致敏 T 淋巴细胞释放淋巴因子以后的炎症过程。

〔关键词〕 土茯苓;迟发型变态反应;接触性皮炎;体液免疫

土茯苓为百合科植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb. 的根茎,具有解毒、除湿、利关节的功效。早年临床上主要用于防治钩端螺旋体病、治疗梅毒及急性细菌性痢疾等症^{〔1〕}。除具有抗肿瘤作用的报道外^{〔2〕},有关现代药理的研究较少,本文从免疫药理学角度观察了土茯苓水提取物对细胞免疫和体液免疫反应的影响。

材料与方 法

1. 药品与试剂 土茯苓 (*Rhizoma smilacis glabrae*, RSG)(购自南京市药材公司,经中国药科大学生药教材研究室余伯阳博士鉴定品种),各用 10 倍量蒸馏水煎煮 2 次,过滤,合并滤液浓缩得浸膏粉末,收率为 24%,实验中所用的土茯苓剂量均按该粉末计算。氢化泼尼松注射液 (Injectio Prednisoloni, pred)(上海第九制药厂);环磷酰胺 (Cyclophosphamidum, Cy)(上海第十二制药厂);2,4,6-三硝基氯苯 (Picryl chloride, PC)(东京化成工业株式会社)。绵羊红细胞 (SRBC)(江宁县卫生防疫站),无菌保存在 Alsever 溶液 (4℃);RPMI-1640 培养基 (Gibco);兔抗鼠 IgG(上海实生细胞生物技术公司)。

2. 动物 4~6 周龄(体重 18~22 克)的昆明种雌性小鼠,由中国药科大学动物室及江苏省实验动物中心提供。

3. PC 所致的接触性皮炎 (PC-DTH)^{〔3〕} 取昆明种小鼠,剃去腹部之毛,涂 1%PC 的乙醇溶液 100 μ l 致敏,6 天后用 1%PC 的橄榄油溶液 30 μ l 涂于右耳两面进行攻击,22 h 后用千分尺测量左右两耳厚度,以其厚度差作为 DTH 反应的强度。

4. 绵羊红细胞所致的足趾反应 (SRBC-DTH)

取 SRBC 的 Alsever 保存液适量,分别用 0.01ME DTA-gelatin eronal buffer(EDTA-GVB)、含 Ca²⁺ 的 Mg²⁺ 和 GVB²⁺ 及灭菌生理盐水洗 2 次、3 次和 2 次后,用生理盐水调制成 2.5 \times 10⁸/ml 的细胞悬液,取 40 μ l 注射于小鼠左后足 皮下致敏,5 天后于右后足趾皮下注射 40 μ l 2.5 \times 10⁸/ml 的 SRBC 进行攻击,24 h 后,用千分尺测量左、右足趾的厚度,将其厚度差作为 DTH 反应的强度。

5. 二甲苯所致的炎症反应 在小鼠右耳涂 30 μ l 的二甲苯致炎,2 h 后测量两耳的厚度,将其差作为炎症反应的强度。

6. 鸡蛋清所致的炎症反应 小鼠连续给药 5 天后,于左后足趾皮下注射 10%蛋清生理盐水溶液 50 μ l,右后足注射同样量的生理盐水作对照,4h 后测量两足趾的厚度,以其厚度差作为炎症反应的强度。

7. 小鼠脾脏空斑形成细胞(PFC)数及血中溶血素(hemolysin)水平的测定 取上述 SRBC 用灭菌生理盐水或 RPMI-1640 溶液(含 100U/ml 青霉素和 0.1mg/ml 链霉素)调配成 10⁹/ml 悬浮液,分别供免疫及 PFC 测定用。每只小鼠腹腔注射该 SRBC 的生理盐水悬液 0.2ml 免疫。7 和 10 天后放血处死,分离血清,用于 hemolysin 的测定。取出脾脏称重后于 Hanks(含 5%的小牛血清、5U/ml 的 heparin)液中制成脾细胞悬液,用于 PFC 测定。直接 PFC 数和间接 PFC 数按 Cunningham and. Szenberg^{〔4〕}法测定。间接 PFC 数测定时加入最终稀释倍数为 200 倍的兔抗鼠 IgG,测得 IgM-PFC 数,而直接 PFC 数测定时不加兔抗鼠 IgG,测得 (IgM +

IgG) - PFC 数, 直接与间接 PFC 数之差为 IgG - PFC 数。血清中溶血素抗体按文献[5]方法测定半数溶血吸收值(HC₅₀)。

8. 统计 所有数据均按 t-检验表示两组间的差异。

结 果

一、对 PC-DTH 诱导相的影响

表 1 土茯苓及氢化泼尼松对小鼠 PC-DTH 诱导相的影响

Tab. 1. Effect of RSG and Pred on the induction phase of PC-DTH in mice.

Group	Dose mg/kg	No. of mice	Ear swelling (×10 ⁻³ mm, $\bar{X} \pm SD$)	Inhibition (%)
Control		16	71.6 ± 30.5	
RSG	100	16	40.9 ± 22.0**	42.9
RSG	200	11	70.5 ± 17.9	1.5
Pred	10	16	31.6 ± 9.6**	55.9

** p < 0.01

自 PC 致敏的前 1 天起连续 6 天经口给予土茯苓, 肌内注射氢化泼尼松。如表 1 所示, 土茯苓 100mg/kg 对 PC-DTH 有抑制作用, 而 200mg/kg 则无。氢化泼尼松显著地抑制了 PC-DTH。

二、对 PC-DTH 及 SRBC-DTH 效应相的影响

在 PC 及 SRBC 攻击后 0.5、10 及 15h 连续 4 次经口给予土茯苓 100 和 200mg/kg, 肌注氢化泼尼松 10mg/kg。结果, 土茯苓两剂量及氢化泼尼松均显著地抑制了 PC-DTH 和 SRBC-DTH(表 2)。

三、对二甲苯所致小鼠耳壳及蛋清所致小鼠足蹠炎症反应的影响

在二甲苯致炎前 6h、3h 及致炎同时连续 3 次经口给予土茯苓 100 和 200mg/kg, 肌注氢化泼尼松 10mg/kg。结果, 土茯苓对该炎症反应有抑制趋势。对于蛋清所致的炎症反应, 土茯苓自注射蛋清前 5 天起连续 6 天经口给药, 两剂量组均显著地抑制了

表 2 土茯苓及氢化泼尼松对小鼠 PC-DTH 和 SRBC-DTH 效应相的影响

Tab. 2. Effects of RSG and Pred on the effector phase of PC-DTH and SRBC-DTH in mice.

Group	Dose mg/kg	PC-DTH		SRBC-DTH	
		Ear swelling (×10 ⁻³ mm)	Inhibition (%)	Footpad swelling (×10 ⁻³ mm)	Inhibition (%)
Control		103.0 ± 30.8 ¹⁾ (8)		154.5 ± 72.5(10)	
RSG	100	41.9 ± 21.5** (8)	59.3	82.5 ± 37.8* (8)	46.6
RSG	200	58.0 ± 25.0** (8)	43.7	60.0 ± 41.3* (8)	61.2
Pred	10	9.4 ± 10.5** (8)	90.8	51.5 ± 43.1** (10)	66.7

Figures in parentheses indicate the number of animals.

1): $\bar{X} \pm SD$, * : p < 0.05, ** : p < 0.01.

表 3 土茯苓及氢化泼尼松对二甲苯及蛋清所致炎症的影响

Tab. 3. Effects of RSG and Pred on inflammations induced by xylene in ear, and by egg white in footpad of mice.

Group	Dose mg/kg	Xylene-induced		egg white-induced	
		Ear swelling (×10 ⁻³ mm)	Inhibition (%)	Footpad swelling (×10 ⁻³ mm)	Inhibition (%)
Control		168.8 ± 39.8 ¹⁾ (8)		87.5 ± 41.0(8)	
RSG	100	124.0 ± 41.5(8)	26.5	40.6 ± 41.4* (8)	53.6
RSG	200	125.1 ± 43.4(8)	25.9	35.6 ± 25.6** (8)	59.3
Pred	10	78.8 ± 46.2** (8)	53.3	29.4 ± 31.0** (10)	66.4

Figures in parentheses indicate the number of animals. 1): $\bar{X} \pm SD$, * : p < 0.05, ** : p < 0.01.

表 4 土茯苓对羊红细胞免疫小鼠的脾脏溶血空斑数的影响

Tab. 4. Effect of RSG and Cy on hemolytic PFC formation in the spleen of mice immunized with SRBC.

Group	Dose mg/kg	mice	Day 7 ⁽¹⁾		Day 10	
			No. of IgM-PFC	IgG-PFC	No. of IgM-PFC	IgG-PFC
			($\times 10^3$ /spleen)		($\times 10^3$ /spleen)	
Control		7	34.9 \pm 25.5 ²⁾	38.6 \pm 23.8	7	5.1 \pm 2.4 44.7 \pm 17.7
RSG	100	8	28.2 \pm 14.1	40.3 \pm 27.8	8	2.9 \pm 1.7 30.5 \pm 11.8
RSG	200	8	22.9 \pm 12.5	39.4 \pm 19.5	8	3.1 \pm 1.5 39.6 \pm 23.1
Cy	10	7	12.8 \pm 4.9*	12.7 \pm 11.8*	8	1.4 \pm 0.6** 19.5 \pm 7.8**

1); after the SRBC immunization. 2); $\bar{X} \pm SD$, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

表 5 土茯苓对羊红细胞免疫小鼠的血清溶血素的影响

Tab. 5. Effect of RSG and Cy on serum hemolysin in mice immunized with SRBC.

Group	Dose mg/kg	mice	Day 7 ⁽¹⁾		Day 10	
			No. of mice	HC ₅₀	No. of mice	HC ₅₀
Control		7		167.8 \pm 31.4 ²⁾	7	152.2 \pm 28.9
RSG	100	8		205.7 \pm 24.6*	8	178.3 \pm 25.1
RSG	200	7		197.6 \pm 53.2	6	188.6 \pm 46.8
Cy	10	7		92.1 \pm 20.5**	8	86.0 \pm 25.9*

1); after the SRBC immunization. 2); $\bar{X} \pm SD$, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

该炎症反应。氢化泼尼松对于两炎症反应均有显著的抑制作用(表 3)。

四、对脾脏中 PFC 数及血中溶血素水平的影响

自 SRBC 免疫前 4 天起连续 9 天经口给予土茯苓 100 和 200mg/kg, cy 自致敏的当天起连续 7 天经口给予 10mg/kg。表 4 和表 5 分别表示每脾脏中的 PFC 数和血清对 SRBC 的半数溶血值。土茯苓两剂量对 IgM-PFC 数有减少趋势, 但对 IgG-PFC 数无影响, 且其溶血空斑较对照组大而明显。两剂量组对第 7 天和第 10 天的血中溶血素抗体含量均有增加趋势。而 cy 则显著地减少了 IgM- 及 IgG-PFC 数并降低了血清溶血素水平。

讨 论

本研究首先观察了土茯苓对 PC 所致接触性皮炎的影响, 结果发现, 土茯苓在 PC 攻击前及攻击后给药均可抑制 PC-DTH, 以攻击后给药时作用为较强, 提示其主要作用于致敏 T 淋巴细胞释放淋巴因子以后的炎症过程。为了进一步探讨土茯苓对 DTH 反应效应相的作用, 我们观察了对另一 DTH 反应模型(SRBC-DTH)以及对炎症反应的影响。结果, 土茯苓攻击后给药对 SRBC-DTH 同样有显著的抑制作用。还明显地抑制了二甲苯及鸡蛋清所致的炎症反应。

临床上迟发型变态反应性疾病多为难治性疾病, 糖皮质激素、烷化剂等是其常用的治疗药物, 这些制剂虽有较好的疗效, 但易引起严重的毒副作用。在本研究中我们以氢化泼尼松为阳性对照, 发现其无论攻击前、后给药均能显著地抑制 PC- 或 SRBC-DTH, 对二甲苯及蛋清所致的炎症反应也有较强的抑制作用。我们的前报^[3]还证实, 致敏前连续给予氢化泼尼松也能显著地抑制 PC-DTH。此外, 有报道指出^[4], 环磷酰胺和 5-氟尿嘧啶等对 DNCB 诱导的 DTH 反应也有显著的抑制作用。但是, 所有这些药物均能明显地减轻动物的体重及胸腺、脾脏等的重量, 说明其作用的非选择性和非特异性。本研究在体液免疫试验中发现, 阳性对照药环磷酰胺在显著抑制脾脏中抗体产生细胞及血清抗体的形成的同时还抑制了小鼠的脾指数。与此相对, 土茯苓对脾重量和脾指数则无影响(数据未列出)。测定溶血空斑数发现仅对 IgM-PFC 数有减少趋势, 对 IgG-PFC 数则无影响。在实验中还发现, 土茯苓各剂量的溶血空斑明显地较对照组为大, 说明其对 IgM-PFC 数虽有减少趋势, 但分泌的抗体量并不为少。血清溶血素的测定证实了这种推断, 与对照组相比, 土茯苓对血清溶血素值有明显的增高(第 7 天)或增高的趋势(第 10 天)。上述结果表明, 土茯苓可

选择性地抑制 T 细胞介导的细胞免疫反应,但不抑制 B 细胞介导的体液免疫。说明其作用方式不同于皮质激素类及化疗药物,有可能避免产生作为副作用的免疫抑制作用。土茯苓的这种特性对于临床治疗细胞免疫性疾患具有重要的意义。

参考文献

[1] 江苏新医学院主编 中药大辞典(上册)91 页上海,上海人民出版社,1977.

[2] 杨德安,等。猪苓、土茯苓和硒对膀胱化学致癌抑制作用的实验研究。中华医学杂志,1987,67(11):622.

[3] 徐强,等。茯苓对迟发型变态反应的抑制作用。中国药

科大学学报,1991;22(1):12.

[4] Cunningham. A. J. and Szenberg. A; Further improvement in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. Immunology 1968;14:559-602.

[5] 戴岳,等。女贞子煎剂对小鼠免疫系统的作用。中国药科大学学报 1987;18(4):301.

[6] 邓文龙,等。昆明山海棠的药理作用研究 I,对免疫功能的影响。中草药,1981;10:26.

[1992 年 9 月收稿 11 月修回]
(编辑 徐 杰)

Effectsof Rhizoma smilacis glabrae, on cellular and humoral immune responses

XU Qiang, WANG Rong, XU Li-Hua and JIANG Jie-Yun Department of Pharmacology of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

A remarkable inhibitory activity was exhibited by the aqueous extract from Rhizoma smilacis glabrae(RSG) against both picryl chloride(PC)-induced contact dermatitis and sheep red blood cells (SRBC) - induced footpad reaction. The effect of RSG was displayed more distinctly wheng given after than before the 2nd antigen challenge. RSG also showed a marked anti-inflammatory activity against xylene-induced ear and egg whiteinduced footpad edema. Additionally, RSG did not show a notable influence on IgM-and IgG-PFC counts against SRBC in mice. An increase but not decrease in serum hemolysin level, however, was observed in both groups of RSG, peralleled with the finding that hemolytic plaques in PFC test were obviously bigger than those in control. These results suggest that RSG has a selective activity to suppress the cellular immune response without inhibiting the humoral immune response. The suppression to cellular immunity by RSG may be presented mainly through affecting the inflammatory process after lymphokine release.

Key word: Rhizoma smilacis glabrae(RSG); contact dermaitis; footpad reaction; cellular immunity; humoral immunity; anti-inflammatory action

[Chinese Journal of Immunology, 1993, 9(1): 39]