

实验研究

雷公藤多苷对小鼠细胞免疫功能的影响

冯先礼¹, 岑国栋²

(1. 都江堰市中医医院, 四川 成都 610075; 2. 成都地奥制药集团药物研究所, 四川 成都 610041)

摘要:目的 研究雷公藤多苷对正常小鼠细胞免疫功能的影响。方法 用流式细胞仪及 T 淋巴细胞增殖试验分别测定雷公藤多苷对正常小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群及 T 淋巴细胞增殖能力的影响。结果 与空白对照组比较, 雷公藤多苷可显著降低成熟淋巴细胞(CD3⁺)、T 辅助性及 T 诱导性淋巴细胞亚群(CD4⁺)百分比以及 T 淋巴细胞增殖能力, 也可显著升高 T 抑制淋巴细胞亚群(CD8⁺)百分比。结论 雷公藤多苷具有一定的细胞免疫抑制作用。

关键词:雷公藤多苷; 淋巴细胞; T-淋巴细胞; 细胞增殖

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2009)05-0289-03

Effects of tripterygium glycosides on cellular immune function of mice

FENG Xian-li¹, CEN Guo-dong²

(1. Dujiangyan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. Institute of Drug Research, Chengdu Diao Pharmaceutical Group, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of tripterygium glycosides on cellular immune function of mice. **Methods** Detection of flow cytometry and the proliferation of T-lymphocyte were employed to evaluate the effects of tripterygium glycosides on the change of T-lymphocyte subpopulation in peripheral blood and the activity of T-lymphocyte. **Results** Compared with normal control group, tripterygium glycosides significantly decreased the percentage of CD3⁺ and CD4⁺ and the proliferation of T-lymphocyte. It also significantly increased the percentage of CD8⁺. **Conclusion** Tripterygium glycosides can inhibit to a certain extent the immunological function of mice.

Key words: tripterygium glycosides; lymphocyte; T-lymphocyte; cellular proliferation

卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 具有清热解毒、祛风通络、舒筋活血、消肿止痛、杀虫止血等功效。目前已从该植物中提取到 150 余种单体成分, 且不断有新的化合物被发现。雷公藤多苷是我国已上市的常用抗风湿中成药之一, 对自身免疫性疾病等难治性疾病, 如红斑狼疮、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、过敏性紫癜、肾病等有独特的临床疗效^[1]。近年来有研究者认为, 雷公藤多苷对体液免疫的作用途径不仅是通过直接作用于 B 淋巴细胞(又称 B 细胞), 而且通过抑制辅助 T 淋巴细胞(又称辅助 T 细胞)功能而间接影响 B 细胞^[2]。以往对雷公藤多苷的动物实验研究主要在于非特异性免疫和体液免疫等方面, 而系统地研究其

对动物细胞免疫抑制的报道则较少。本研究旨在通过先进的流式细胞技术及 T 细胞增殖试验, 探讨雷公藤多苷对正常小鼠细胞免疫的作用, 为临床用药提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

雷公藤多苷, 浙江得恩德制药有限公司提供, 批号 Z33020422, 每片 10 mg; 阳性药地塞米松, 浙江仙琚制药股份有限公司提供, 批号 0203050, 每片 75 mg; 大鼠抗-小鼠 T 细胞表面标记单克隆抗体(抗 CD3、抗 CD4、抗 CD8), 购于 Steroetec 公司; ConA, 购自 Sigma 公司, 批号 02k0711; MTT, 购自 Sigma 公司, 批号 095k1270。

1.2 动物

BALB/c 小鼠, 体质量(18 ± 2)g, 雌雄各半, 由河南医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号豫检字: 4104035。

1.3 仪器

Cell Lab Quanta SC BECKMAN 流式细胞分析仪, 美国贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司产品; MK3 全自动多功能酶标仪, 北京金信诚有限责任公司生产; SV3-2B 移液器等。

2 方法

2.1 雷公藤多苷对正常小鼠 T 细胞亚群的影响

BALB/c 小鼠 100 只, 雌雄各半, 随机分成 5 组, 每组 20 只, 分别为空白对照组, 雷公藤多苷高剂量(16 mg/kg)、中剂量(8 mg/kg, 约为成人的临床等效剂量, 下同)、低剂量(4 mg/kg)组, 地塞米松 400 μ g/kg(约为成人的临床等效剂量, 下同)组。空白对照组每日 ig 生理盐水, 各给药组每日 ig 相应药物 0.1 mL/10 g。给药 21 d 后, 每只小鼠眼眶取血 0.5 mL, 肝素抗凝, 用流式细胞分析仪测定 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺。

2.2 雷公藤多苷对 ConA 诱导的正常小鼠 T 细胞增殖能力的影响^[3]

BALB/c 小鼠 100 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组, 每组 20 只, 分别为空白对照组, 雷公藤多苷高、中、低剂量(分别为 16、8、4 mg/kg)组, 地塞米松 400 μ g/kg 组。空白对照组每日 ig 生理盐水, 各给药组每日均 ig 相应药物 0.1 mL/10 g。给药 21 d 后小鼠断颈处死, 置于 75% 乙醇中浸泡 5 min, 无菌取脾, 脾脏剥膜后撕碎、研磨, 经 200 目不锈钢网滤过, Hank's 液漂洗 2 次, 每次 1 000 r/min 离心 10 min, 再用 RPMI 1640 完全营养液调整细胞数至 5×10^6 /mL。于 96 孔细胞培养板中加入上述细胞悬液 200 μ L(每孔 1×10^6), 每孔加入 ConA 20 μ L(终质量浓度为 5 mg/mL)或 RPMI 1640 液(阴性对照), 每孔设 2 个复孔, 于 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L 二氧化碳培养箱中培养 48 h。培养结束前 4 h, 每孔吸弃上清液 100 μ L, 加入 MTT(5 mg/mL)10 μ L, 振荡 1 min, 继续培养 4 h。培养结束后, 每孔加入 0.15 mL 酸性异丙醇, 振荡 30 s 混匀, 使紫色结晶完全溶解。酶标仪测定, 波长 570 nm, 参考波长 630 nm, A 值为 $A_{570} \sim A_{630}$, 以消除非特异性光吸收效应。

2.3 数据处理

采用 SPSS10.0 软件统计分析, 以($\bar{x} \pm s$)表示

结果, 用单因数方差分析进行组间比较。

3 结果

3.1 雷公藤多苷对正常小鼠 T 细胞亚群的影响

与空白对照组比较, 雷公藤多苷各剂量组小鼠的成熟淋巴细胞(CD3⁺)、T 辅助性及 T 诱导性淋巴细胞亚群(CD4⁺)百分比均显著降低, T 抑制性淋巴细胞亚群(CD8⁺)百分比显著升高, 表明雷公藤多苷对特异性细胞免疫具有一定的抑制作用。结果见表 1。

表 1 雷公藤多苷对正常小鼠 T 细胞亚群的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	CD3 ⁺ / %	CD4 ⁺ / %	CD8 ⁺ / %
空白对照	—	53.0 $\pm$ 5.5	49.3 $\pm$ 5.4	3.7 $\pm$ 1.3
雷公藤多苷	16	46.0 $\pm$ 7.5 $\blacktriangle\blacktriangle$	39.3 $\pm$ 6.6 $\blacktriangle\blacktriangle$	5.4 $\pm$ 1.5 $\blacktriangle\blacktriangle$
	8	48.9 $\pm$ 6.4 $\blacktriangle$	44.1 $\pm$ 6.4 $\blacktriangle\blacktriangle$	4.8 $\pm$ 1.6 $\blacktriangle\blacktriangle$
	4	50.3 $\pm$ 6.8	45.8 $\pm$ 5.8 $\blacktriangle$	4.6 $\pm$ 1.4 $\blacktriangle$
地塞米松	0.4	44.2 $\pm$ 7.9 $\blacktriangle\blacktriangle$	38.9 $\pm$ 5.9 $\blacktriangle\blacktriangle$	5.2 $\pm$ 1.6 $\blacktriangle\blacktriangle$

与空白对照组比较: $\blacktriangle P < 0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

3.2 雷公藤多苷对 ConA 诱导的正常小鼠 T 细胞增殖能力的影响

与空白对照组比较, 雷公藤多苷各剂量组小鼠的 T 细胞增殖能力均显著降低, 表明雷公藤多苷对细胞免疫具有一定的抑制作用。结果见表 2。

表 2 雷公藤多苷对 ConA 诱导的正常小鼠 T 细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	T 细胞增殖能力/A 值
空白对照	—	0.94 $\pm$ 0.10
雷公藤多苷	16	0.78 $\pm$ 0.14 $\blacktriangle\blacktriangle$
	8	0.82 $\pm$ 0.13 $\blacktriangle\blacktriangle$
	4	0.87 $\pm$ 0.12 $\blacktriangle$
地塞米松	0.4	0.80 $\pm$ 0.14 $\blacktriangle\blacktriangle$

与空白对照组比较: $\blacktriangle P < 0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

4 讨论

现代免疫学研究证明, T 细胞亚群按 T 细胞表面存在的分化抗原(CD)的不同, 可分为 CD4⁺ 和 CD8⁺ 两大亚群; CD3⁺ 细胞代表成熟淋巴细胞, CD4⁺ 细胞包括辅助性和诱导性淋巴细胞, 具有增强和扩大免疫细胞的功能, IL-2 的主要来源也是 CD4⁺ 辅助细胞; 而 CD8⁺ 细胞按其功能可包括抑制性 T 细胞(Ts)和杀伤性 T 细胞(Tc), 分别具有免疫抑制和杀伤靶细胞的功能。T 细胞亚群可以反映整个机体免疫功能的状况。在本研究中, 与空白对照组比较, 雷公藤多苷剂量组成熟淋巴细胞、T 辅助性及 T 诱导性细胞亚群百分比值及 T 淋巴细胞增

殖能力均显著降低,T抑制细胞亚群百分比值显著升高,表明雷公藤多苷具有一定的细胞免疫抑制作用,为临床合理用药提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 黄真,毛庆秋.雷公藤多苷的临床应用、不良反应及预防[J].药品评价,2005,2(2):125-127.

- [2] 吴敏毓,刘公植.医学免疫学[M].第4版.合肥:中国科学技术大学出版社,2002.

- [3] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1): 55-63.

(收稿日期 2009-04-22)

克拉霉素片微生物限度检查方法学验证研究

姜凌,傅鹏,张建军

(天津药物研究院 新药评价中心,天津 300193)

摘要:目的 确定克拉霉素片微生物检查方法。方法 采用离心与薄膜过滤联合法对克拉霉素片试验菌回收率的有效性进行评价。结果 离心与薄膜过滤联合法的细菌、真菌回收率均高于70%。结论 采用离心与薄膜过滤联合法测定细菌、真菌数,可有效除去克拉霉素片中的抑菌成分,使检验结果更准确、可靠。

关键词:克拉霉素片;抗菌;微生物限度检查;回收率

中图分类号:R927.1

文献标识码:A

文章编号:1674-5515(2009)05-0291-03

Validation of microbial limit test of Clarithromycin Tablets

JIANG Ling, FU Peng, ZHANG Jian-Jun

(Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the microbial limit test of Clarithromycin Tablets. **Methods** The methods of centrifugation and membrane filtration were combined to evaluate the recovery rate of test bacteria in Clarithromycin Tablets. The antimicrobial effect of Clarithromycin Tablets was determined by recovery rate of the test bacteria. **Results** The recovery rates of bacteria and fungi in Clarithromycin Tablets were both over 70%. **Conclusion** The combination of centrifugation and membrane filtration can be used effectively in the microbial limit test of Clarithromycin Tablets. It is accurate and reliable.

Key words: Clarithromycin Tablets; anti-microbial; microbial limit test; recovery rate

克拉霉素片属大环内酯类抗生素,主要成分为克拉霉素。该制剂对革兰阳性菌、部分革兰阴性菌及支原体有抑制作用,临床上主要用于抗感染治疗。由于克拉霉素片中含有抑菌成分,使其中污染的微生物处于受损或半死亡等状态,故干扰污染微生物的正常检出,使检验结果不能真实反映药品中微生物污染的状况^[1-2]。《中国药典》(2005年版)规定,在建立一种药品微生物限度检查方法时,应对方法进行验证以保证方法的可靠性。为此,笔者按《中国药典》(2005年版二部)规定的方法^[3],人工加入阳

性对照菌,测其回收率,建立了克拉霉素片微生物限度检查方法。

1 材料与仪器

1.1 供试品

克拉霉素片,由天津药物研究院制剂中心提供,批号071101。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、大肠杆菌[CMCC(B)44102]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉菌