

头花蓼对淋巴细胞分泌干扰素 γ 和白介素4的影响*

冯海潮^{1**}, 孙朝琴¹, 何芸¹, 吴琼¹, 张然², 莫非¹, 罗昭逊^{1***}

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 山东聊城人民医院, 山东 聊城 252000)

[摘要] 目的: 研究苗药头花蓼对淋巴细胞分泌干扰素 γ (IFN- γ)及白介素4(IL-4)的影响。方法: 制备C57BL/6小鼠脾淋巴细胞悬液, 同刀豆蛋白A(ConA)及不同浓度的头花蓼(终浓度分别为: 1、2、4、8、16、32、64、128、256、512 mg/L)于37℃、5% CO₂培养箱共培养72 h, 细胞活性检测试剂盒(CCK-8)检测头花蓼对体外T淋巴细胞增殖的影响, 酶联免疫吸附实验(ELISA)测定细胞上清中的IFN- γ 和IL-4含量, 分析不同浓度的头花蓼对ConA活化的脾淋巴细胞增殖和分泌IFN- γ 、IL-4的影响。结果: 头花蓼浓度>128 mg/L时, 明显抑制T淋巴细胞的增殖, 抑制其分泌IFN- γ 的水平, 与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 头花蓼浓度为8~128 mg/L时, ConA活化的脾淋巴细胞分泌IFN- γ 和IL-4的水平明显高于空白对照, 而T淋巴细胞的增殖无明显变化; 头花蓼的浓度低于32 mg/L时, ConA活化的淋巴细胞的IFN- γ 分泌水平随头花蓼浓度升高而增加。结论: 一定浓度的头花蓼刺激小鼠脾淋巴细胞增殖、IFN- γ 和IL-4分泌, 参与机体细胞免疫过程。

[关键词] 植物药; 淋巴细胞; 头花蓼; 干扰素 γ ; 白介素4

[中图分类号] R931 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)06-0645-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.06.006

Influence of *Polygonum capitatum* on IFN- γ and IL-4 Secretion in Spleen Lymphocytes

FENG Haichao¹, SUN Chaoqin¹, HE Yun¹, WU Qiong², ZHANG Ran², MO Fei¹, LUO Zhaoxun¹

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Liaocheng People's Hospital,
Liaocheng 252000, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *Polygonum capitatum* on the secretion of IFN- γ and IL-4 in mice spleen lymphocytes. **Methods:** A series of concentrations of *Polygonum capitatum* (final concentrations were 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 mg/L) in splenic lymphocytes of C57BL/6 mice that were activated by ConA for 72 h at the condition of 37℃ and 5% CO₂. Following Counting Kit-8 was used to detected lymphocytes proliferation and double antibody sandwich ELISA was used to detect changes, the effect of *Polygonum capitatum* with different concentration on proliferation and secretion of IFN- γ and IL-4 was analyzed. **Results:** The T-cell proliferation and IFN- γ secretion was restrained when the concentration of *Polygonum capitatum* was higher than 128 mg/L. The level of IFN- γ and IL-4 secreted by mice spleen lymphocytes after ConA activation was higher obviously with *Polygonum capitatum* at the concentration between 8 to 128 mg/L, compared with the blank control group ($P < 0.05$). T-cell proliferation had no obvious change. When the concentration of *Polygonum capitatum* was lower than 32 mg/L, secretion amount of IFN- γ increased as the concentration of *Polygonum capitatum* become higher. **Conclusion:** *Polygonum capitatum* at a certain concentration could participate

*[基金项目] 贵州省科学技术基金[黔科合(2014)2027号]; 贵州省科技合作计划基金[黔科合 LH(2015)7417号]; 贵州省卫生计生委科学技术基金(gzwwkj2015-1-003); 贵阳市科技局计划项目[筑科合同(2014001)]

** 贵州医科大学 2013 级研究生 E-mail: 461698511@qq.com

*** 通信作者 E-mail: 418611578@qq.com

网络出版时间: 2016-06-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160617.1035.002.html>

in cellular immunity that stimulate the mice spleen lymphocytes proliferation, and secretion IFN- γ and IL-4 in vitro.

[Key words] *Polygonum capitatum*; spleen lymphocytes; interferon- γ ; interleukin-4

头花蓼(*polygonum capitatum*)为蓼科蓼属植物头花蓼的全草,为贵州精选苗药。有“清热利湿,活血解毒之功效”^[1],全草入药,民间常用于治疗泌尿系统疾病^[2]。目前关于头花蓼的研究多局限于种植技术及成分分析,其药理活性研究报道少见。已有研究报道,头花蓼对淋病奈瑟菌、幽门螺杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等具有抗菌活性^[3-4],其有效成分黄酮和没食子酸具有确切的免疫调节作用。T 细胞参与免疫调节的重要环节,辅助性 T 淋巴细胞(T helper cell, Th)占 T 细胞总数的 65%,具有识别抗原,分泌多种细胞因子的效应,从多方面引起和增强免疫能力。Th 细胞分为 Th1 细胞和 Th2 细胞两个细胞亚群, Th1 细胞主要分泌干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、TNF- α 等细胞因子,主要介导宿主细胞免疫应答; Th2 细胞主要分泌白细胞介素(interleukin-4, IL-4)、IL-10 等细胞因子,介导宿主体液免疫应答。正常状态下, Th1 和 Th2 细胞因子相互制约、相互调节,处于动态平衡,维持机体正常的细胞和体液免疫功能^[5]。本研究应用头花蓼与脾淋巴细胞在体外进行共培养,观察不同浓度的头花蓼作用于脾淋巴细胞后, Th1 (IFN- γ) 和 Th2 (IL-4) 细胞因子的表达水平,评价头花蓼的免疫调节功能。

1 材料和方法

1.1 材料

头花蓼浸膏由浙江众益公司提供,清洁级 C57BL/6 雄性小鼠体质量(20 ± 5) g[批号 SYXK(渝)2007-0001],胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,改良 RPMI-1640 培养基(hclone 及批号 NAF1417), IFN- γ 和 IL-4 ELISA 试剂盒购自 Ausrtian Bender Medsystems^{MT}公司,刀豆蛋白 A(ConA)购自 Sigma 公司及批号 NO. C8110, CCK-8 细胞活性检测试剂盒购自日本同仁, CO₂ 培养箱(Thermo)及酶标仪(BIO-xMAark)。

1.2 方法

1.2.1 头花蓼工作液 用无菌双蒸水配制头花蓼母液,浓度为 25.6 g/L,进行一系列倍比稀释,得到头花蓼工作液浓度分别为 12.8、6.4、3.2、1.6、

0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 g/L, 4℃ 放置备用。

1.2.2 脾淋巴细胞悬液 颈椎脱臼处死小鼠,无菌取小鼠脾脏。剪碎,置于 2 张无菌载玻片毛玻璃面之间,研磨,200 目无菌筛网过滤,4℃ 离心(1 000 r/min, 10 min)。弃上清,加入红细胞裂解液作用 3 min, 4℃ 离心(1 000 r/min, 5 min),弃上清, Hank's 液洗涤 2 次。Hank's 液重悬细胞,小心重叠于等体积的淋巴细胞分离液上, 4℃ 离心(2 000 r/min, 20 min),吸出淋巴细胞层,加入预冷的 RPMI-1640 培养液, 4℃ 离心(1 000 r/min, 10 min)。弃上清, 10% 的小牛血清 RPMI-1640 培养液重悬细胞。台盼蓝染色确定细胞存活率大于 95%, 37℃、5% CO₂ 培养 2 h 时,去除贴壁细胞,调整细胞浓度约 2×10^9 /L。

1.2.3 头花蓼对脾淋巴细胞的毒性试验 将制备好的脾细胞悬液加入 96 孔细胞培养板, 86 μ L/孔,然后添加 10 μ L ConA(终浓度为 5 mg/L)。头花蓼干扰组再加入上述梯度浓度的头花蓼工作液 4 μ L(使头花蓼的终浓度分别为 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 mg/L),空白对照组加入 4 μ L 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。培养板置 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中,培养 72 h。培养结束前 4 h,加入 CCK-8 液 10 μ L,继续培养 4 h,用酶标仪测定在 450 nm 波长下吸光度值(OD)。每孔 100 μ L,设 3 个复孔,试验重复 3 次,取均值。

1.2.4 IL-4 和 IFN- γ 的水平 将脾淋巴细胞悬液加入 96 孔培养板,加入 ConA,每孔终浓度为 5 mg/L,再加入不同浓度的头花蓼工作液,终浓度分别为(512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 mg/L),空白组加入等体积的 RPMI-1640 培养基,每个药物浓度及对照平行做 3 孔,每孔 100 μ L。培养板置 37℃、5% CO₂ 温箱中培养 72 h。收集上清液, 4℃ 离心(2 000 r/min, 10 min),上清液于 -20℃ 保存,待测。严格按照酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunobent assay, ELISA)试剂盒操作说明,通过绘制标准曲线求出 IL-4 和 IFN- γ 的浓度。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

计量资料数据均由均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,多组间比较

采用 ANOVA 分析,方差齐采用 LSD 检验,方差不齐采用 Dunnett-t 进行方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 头花蓼对 T 淋巴增殖水平的影响

培养 72 h 时,头花蓼 < 128 mg/L 时,对小鼠脾脏体外淋巴细胞增殖没有明显的影响; ≥ 128 mg/L 浓度时,淋巴细胞数量明显降低,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示头花蓼浓度低于 128 mg/L 时,对淋巴细胞没有毒性,不影响其增殖,见表 1。

表 1 不同浓度头花蓼对小鼠脾淋巴细胞增值的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of *Polygonum capitatum* on proliferation of splenic lymphocyte in mice

组别	淋巴细胞 OD _{450nm}
空白对照组	0.67 ± 0.02
头花蓼实验组 (mg/L)	
1	0.66 ± 0.01
2	0.71 ± 0.01
4	0.69 ± 0.02
8	0.60 ± 0.01
16	0.65 ± 0.02
32	0.66 ± 0.02
64	0.54 ± 0.04
128	0.50 ± 0.03 ⁽¹⁾
256	0.32 ± 0.02 ⁽¹⁾
512	0.20 ± 0.02 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与空白对照组比较, $P < 0.05$

2.2 头花蓼对 IFN- γ 和 IL-4 的影响

头花蓼浓度 4 ~ 128 mg/L 时,IFN- γ 的分泌水平明显增高,与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),在 32 mg/L 时,IFN- γ 的分泌量达到顶峰。头花蓼浓度 ≥ 256 mg/L 时,淋巴细胞分泌 IFN- γ 的水平明显降低,与空白组比较,差异有统计学意义, ($P < 0.05$);头花蓼的浓度在 4 ~ 128 mg/L 时,IL-4 分泌量明显增高,与空白对照组比较具有统计学差异;浓度大于 512 mg/L 时,淋巴细胞分泌 IL-4 的水平低于空白对照组,差异无统计学意义,见表 2。提示适宜浓度的头花蓼对体外培养的小鼠分泌 Th1、Th2 细胞因子具有一定的刺激作用,对 Th1 细胞因子的分泌水平呈现出一定的浓度相关性。

表 2 头花蓼对体外培养的小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 及 IL-4 的影响 (ng/L)

Tab. 2 Effects of *polygonum capitatum* on IFN- γ and IL-4 secretion in mice spleen lymphocytes *in vitro*

组别	TFN- γ (ng/L)	IL-4 (ng/L)
空白对照组	94.07 ± 6.34	17.78 ± 2.27
头花蓼实验组 (mg/L)		
1	92.35 ± 4.03	15.93 ± 1.67
2	98.64 ± 6.23	21.32 ± 1.49
4	137.30 ± 8.72 ⁽¹⁾	28.68 ± 2.61 ⁽¹⁾
8	161.72 ± 8.78 ⁽¹⁾	30.34 ± 3.29 ⁽¹⁾
16	189.29 ± 9.82 ⁽¹⁾	22.98 ± 4.75 ⁽¹⁾
32	250.82 ± 16.63 ⁽¹⁾	24.96 ± 2.63 ⁽¹⁾
64	193.45 ± 11.17 ⁽¹⁾	22.98 ± 3.24 ⁽¹⁾
128	129.07 ± 15.24 ⁽¹⁾	25.56 ± 3.24 ⁽¹⁾
256	84.74 ± 7.07 ⁽¹⁾	20.55 ± 5.06
512	87.53 ± 5.33 ⁽¹⁾	13.90 ± 5.47

⁽¹⁾与空白对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

细胞因子是由活化的免疫细胞和某些基质细胞分泌的具有高活性、多功能的小分子物质,它们涉及免疫和炎症的每个环节,可以调节和决定免疫应答的性质^[5-8]。依据 Th 分泌产生细胞因子及功能特征的不同,把 Th 淋巴细胞分为 Th1 细胞和 Th2 细胞两个细胞亚群^[9]。Th1 细胞主要分泌产生 IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子,IFN- γ 作为 Th1 型代表细胞因子,它在初级免疫应答中可提高 MHC II 类分子的表达和细胞抗原递呈能力,导致记忆型 T 细胞水平增高^[10],主要促进细胞免疫;Th2 细胞主要分泌产生 IL-4、IL-10 等细胞因子,对 B 细胞、T 细胞、单核细胞、树突状细胞、内皮细胞、纤维细胞等非特异细胞具有多种调节功能,是体液免疫应答的重要调节因子^[11]。在正常状态下,体内 Th1 和 Th2 细胞因子相互制约、相互调节,处于动态平衡,维持机体正常的细胞和体液免疫功能^[12-13],而 IFN- γ 、IL-4 作为 Th1/Th2 型免疫相关因子,在一定程度上可反映出机体细胞免疫和体液免疫的基本状况^[14]。

有研究报道幽门螺杆菌感染后可介导异常的细胞免疫导致胃黏膜屏障受损,进一步促进溃疡形成^[15]。本实验通过观察不同浓度的头花蓼对体外脾淋巴分泌 Th1/Th2 型典型细胞因子的诱生效果,初步了解头花蓼免疫调节作用,为后续关于头

花蓼治疗幽门螺杆菌相关性胃炎、消化性溃疡的免疫调节机制奠定基础。结果显示 4 ~ 128 mg/L 的头花蓼对 ConA 活化的淋巴细胞分泌 IFN- γ 和 IL-4 均具有明显的促进作用,这可能与其中的多糖、黄酮、槲皮素等有效成分有关。已有报道多种中药的多糖成分通过诱生 IFN- γ 和 IL-4 增强机体的抗病力^[16],维持机体的细胞免疫和体液免疫;Farhadi L^[17]报道类黄酮可促进淋巴细胞增殖,刺激 IFN- γ 分泌,降低 IL-4 含量,发挥其免疫调节效应。但高剂量的头花蓼对 ConA 活化淋巴细胞分泌 IFN- γ 和 IL-4 有不同程度的抑制分泌作用,可能通过抑制淋巴细胞的增殖,进而抑制 Th1 细胞、Th2 细胞分泌相应的细胞因子。此外中药的成分比较复杂,高剂量时,其中的某些活性成分与中药的蛋白质和鞣质等成分结合,致使药液中的一些有效成分凝固变性,一定程度上影响了药效。所以,采用中药进行免疫调节时,需选择合适的剂量。

本研究结果显示头花蓼可刺激 IFN- γ 和 IL-4 的分泌作用,但两者浓度需在一定的范围内,才能使 Th1/Th2 免疫调节处于平衡状态,以维持机体正常的细胞免疫和体液免疫功能。观察系列浓度的头花蓼刺激脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 、IL-4 效果,不仅显示了该药对两者的分泌的促进作用,还显示了两者的不同分泌水平下头花蓼的浓度趋势,为头花蓼关于免疫调节方面的深入研究提供相关浓度依据。而关于头花蓼在机体内是否能够刺激 IFN- γ 和 IL-4 的分泌,调节 Th1/Th2 免疫平衡及其有效的调节途径还需通过体内实验进行观察验证,进一步探索其调节途径及作用机理。

4 参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典(上册)[M]. 2 版. 上海: 上海科技出版社, 2006:850.
- [2] 贾敏如,李星炜. 中国民族药志要[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2005:479.
- [3] 刘瑜新,宋晓勇,康文艺,等. 头花蓼对多重耐药金黄色葡萄球菌抗菌作用研究[J]. 中成药, 2014(9):1817 - 1821.
- [4] 张姝,罗昭逊,莫非,等. 头花蓼对幽门螺杆菌抗菌作用分析[J]. 中国医院药学杂志, 2015(2):113 - 118.
- [5] Haghshenas MR, Khademi B, Ashraf A, et al. Helper and cytotoxic T cell subsets (Th1, Th2, Tc1 and Tc2) in benign and malignant salivary gland tumors [J]. Oral Dis, 2016:12496.
- [6] 罗娜,郭晟,杨承英,等. 人 BCIGL 基因 siRNA 逆转录病毒的制备及其对 T 淋巴细胞增殖的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2009(3):250 - 254.
- [7] Jiong R, Zhi Q, Yang TJ. Immunomodulatory activity in vitro and in vivo of polysaccharide from *Potentilla anserina* [J]. Fitoterapia, 2010(81):1117 - 1124.
- [8] 朱伟,付本懂,王鲁,等. 硫酸化 20(S)-人参皂苷 Rh2 对小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-4 和 IFN- γ 的影响[J]. 实验研究, 2011(17):17 - 19.
- [9] Li LL, Zhang B, Zhu NH, et al. Effects of polysaccharides on immunologic function in early-weaned piglets [J]. Research of Agriculture Modernization, 2009(4):495 - 497.
- [10] Zhou H, Buitenhuis AJ, Weigen S, et al. Candidate gene promoter polymorphisms and antibody response kinetics in chickens: interferon- γ , interleukin-2, and immunoglobulin light chain[J]. Poultry Science, 2001(80):1679 - 1689.
- [11] Wang N, Shen GS, Bai HG. Research progress of interleukin-4 gene[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2005(1):23 - 25.
- [12] 陈全英,陈万般. 活动期溃疡性结肠炎患者 Th1/Th2 平衡的特点与药物调节[J]. 海南医学院学报, 2010(4):429 - 434.
- [13] Mat sumura K, Nakase H, Yamamoto S, et al. Modulation of the Th1/Th2 balance by infliximab improve hyperthyroidism associated with a flare up of ulcerative colitis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2009(7):967 - 968.
- [14] Mosmann TR, Subash S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more [J]. Immunol Today, 1996(1):136 - 139.
- [15] 吴德明,吴治德,刘怡菲. 幽门螺杆菌相关的消化性溃疡患者 Th17/Treg 细胞及其细胞因子的表达水平及意义[J]. 临床荟萃, 2014(7):536.
- [16] 商云霞,朱晓庆,谷新利,等. 中药复方多糖对鸡 IFN- γ 、IL-4 和 IL-12 质量浓度的影响[J]. 西北农业学报, 2015(5):24 - 28.
- [17] Farhadi L, Mohammadi-Motlagh HR, Seyfi P, et al. Low concentration of flavonoid-rich fraction of shallot extract induce delayed-type hypersensitivity and Th1 cytokine IFN- γ expression in BALB/c Mice [J]. Int J Mol Cell Med, 2014(1):16 - 25.

(2016-03-03 收稿,2016-05-24 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅