

• 基础实验研究 •

甘露聚糖肽对 COPD 患者淋巴细胞免疫活性的影响

李继红¹, 王利², 吴丽娟¹, 陈莉¹

(1. 成都军区总医院检验科, 成都 610083; 2. 四川省乐山市人民医院老年科 614000)

摘要:目的 为甘露聚糖肽治疗慢性阻塞性肺病(COPD)的合理用药提供依据。方法 对经流式细胞术确认淋巴细胞免疫功能低下的 COPD 患者,用不同浓度的甘露聚糖肽体外诱导淋巴细胞,采用 3H-TdR 与 14C-UR 参入双标记法测定淋巴细胞参入计数值。结果 在不同剂量的甘露聚糖肽的作用下,淋巴细胞参入计数和百万细胞参入计数值不同,在 1 mg/L 时,3H-TdR 和 14C-UR 计数与对照瓶比较差异有统计学意义($P < 0.05$);当甘露聚糖肽浓度达到 10 mg/L 时,3H-TdR 和 14C-UR 的参入计数值达到高点,与对照瓶比较差异有统计学意义($P < 0.01$);继续增加甘露聚糖肽至浓度 50 mg/L 和 100 mg/L 时,两项计数水平开始回落,所测数值与对照瓶比较差异无统计学意义($P > 0.05$),淋巴细胞参入率与上述两项计数的结果一致。结论 甘露聚糖肽对淋巴细胞免疫功能有明显的调节作用,在较低剂量(1、10 mg/L)时,有明显促进淋巴细胞 DNA 及 RNA 合成的效果,但具有双相性,表现出较强的剂量依赖性。

关键词:肺疾病,慢性阻塞性; 甘露聚糖肽; 淋巴细胞参入计数; 淋巴细胞免疫活性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)20-2321-02

The effect of Polyactin A on the lymphocyte immune-competence in patients with COPD

Li Jihong¹, Wang Li², Wu Lijuan¹, Chen Li¹

(1. Department of Medical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China;

2. Department of Gerontology, Leshan people's hospital, Sichuan 614000, China)

Abstract: Objective To provide basis for reasonable medication and achieving desired effect in treating the COPD with Polyactin A. **Methods** Lymphocytes which selected by low immunologic function confirmed by flow cytometry were inducted by different density of Polyactin A. Then the double labeling way of 3H-TdR and 14C-UR were used to the lymphocyte counting value. **Results** Under function of different density Polyactin A, the interpolates counting values were different in the lymphocyte, the 3H-TdR and 14C-UR counting value also had statistics significance($P < 0.05$) comparing the control bottle in 1 mg/L. Both of their value arrived at high point while Polyactin A was in 10 mg/L, and they had the extremely significance difference comparing the control bottle respectively($P < 0.01$). But continues increasing the density to 50 and 100 mg/L, the counting values started to descend, the values were not significant comparing the control bottle. The result of lymphocyte interpolation rate was as same as above. **Conclusion** Polyactin A has obvious control action to the immunologic function, and has obvious promote synthesis effect to lymphocyte DNA and RNA, but it has the double-phase and displayed strong dosage dependence.

Key words: pulmonary disease, chronic obstructive; polyactin A; lymphocyte interpolates counting; lymphocyte immunologic function

慢性阻塞性肺病(COPD)是一组多因性、反复发作、死亡率高的慢性呼吸系统疾病的统称,主要指具有不完全可逆的气流受限的慢性支气管炎和肺气肿两种疾病,疾病的发生、发展及预后均与机体免疫功能的低下密切相关^[1]。甘露聚糖肽是从健康人咽喉部分离的 α -溶血性链球菌经深层培养提取、精制所获得的具有多种生理活性的 α -甘露聚糖肽链物质,是一种新的免疫调节剂,具有增强巨噬细胞的吞噬,增强体液免疫功能和应激功能,提高白细胞数量等功效,还可抑制肿瘤的生长和代谢,临床在应用于各种癌症及白细胞缺乏症的治疗等方面已有大量报道^[2-4]。本研究则采用甘露聚糖肽体外诱导淋巴细胞,通过对参入淋巴细胞的计数,观察不同浓度甘露聚糖肽对 COPD 患者淋巴细胞免疫活性的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 住院 COPD 病患者 30 例,其中男 22 例,女 8 例。年龄分布: $\geq 30 < 40$ 岁 4 例, $\geq 40 < 50$ 岁 10 例, ≥ 50 岁以上 16 例。患者均系住院患者,诊断根据病史、危险因素接触史、体征及实验室检查资料、肺功能仪测定有气流受阻,以及胸部影像学检查等综合分析确定。对照组为同期体检人群中证实的健康者 194 例,其中男 96 例,女 98 例,年龄 19~62 岁,平均 37.4 岁。

1.2 仪器与试剂 采用流式三色分析技术测定 COPD 患者 T 淋巴细胞亚群($CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$)的水平,确认受试者淋巴细胞免疫功能均有不同程度的降低。荧光标记单抗 $CD3^-PC5/CD4-FITC/CD8-PE$ 及同型对照抗体 $IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5$ 等试剂均为美国 Beckman-Coulter 产品,使用 Beckman-Coulter XL4 流式细胞仪进行测定。观察药物参入淋巴细胞双标记法实验的试剂与仪器,甘露聚糖肽(成都利华制药厂生产),3H-TdR(上海原子核研究所生产,比活度 8.14×10^5 MBq/mmol),14C-UR(中国医学科学院放射所生产,比活度 1.96×10^5 MBq/mmol),Tc-199(Sigma 公司产品),LS-9000 型双道液闪测量仪(Beckman)。

1.3 方法 淋巴细胞免疫功能测定清晨采集静脉血 2 mL, EDTA-K₂ 抗凝(紫色真空采血管),流式具体方法见参考文献[5]。淋巴细胞参入双标记实验按常规无菌采取患者静脉血 2 mL,肝素抗凝。取抗凝血 0.2 mL 加入装有 2 mL Tc-199(11 g/L, pH7.4)的培养瓶中,每个培养瓶中加入 PHA 100 μ g,诱导淋巴细胞。每份血样设对照瓶及实验瓶,对照瓶不加甘露聚糖肽,实验瓶加入不同浓度的甘露聚糖肽 100 μ L。轻摇混匀,放入 37 $^{\circ}$ C 孵箱静置培养 72 h,在终止培养前 6 h,每个培养瓶加入 3H-TdR 18.5 KPq 及 14C-UR 7.4 KBq,在培养结束后每瓶

加冷生理盐水 2 mL, 将培养的细胞全部移入离心管中, 以 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用冷生理盐水洗细胞沉淀 3 次, 每次以 2 000 r/min 离心 10 min, 收集细胞沉淀后, 用 1 mol/L NaOH 0.5 mL 加入细胞沉淀管内, 水浴消化 H₂O₂ 脱色后, 取 100 μL 于测量瓶内, 加二氧六环闪烁液(每升中含 PPO 5 g, POPOP 0.5 g, 乙二醇乙醚 167 mL, 萘 50 g)5 mL, 用 LS-9000 型液闪仪进行 3H 及 14C 双标记样品测量, 得到样品 dpm 值。

1.4 统计学处理 淋巴细胞参入率计算公式为: 参入率=(每瓶淋巴细胞总数一本底)/(每瓶加入标记物总数一本底)×100%。全部数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间资料用中国统计学会 POMS 软件做 FLSD 检验及 P 检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 T 淋巴细胞亚群检测结果 流式细胞术检测 COPD 患者外周血 T 淋巴细胞亚群, 除 CD8⁺ 无明显改变外, 其余 CD3⁺、CD4⁺ 以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显低于参考文献[6]报道的正常参考值, 两者间差异有统计学意义(P<0.05, P<0.01), 确认受试对象均为淋巴细胞免疫功能低下者, 见表 1。

表 1 T 淋巴细胞亚群检测结果($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	n	CD3 ⁺ LC	CD3 ⁺ CD4 ⁺ LC	CD8 ⁺ CD8 ⁺ LC	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD8 ⁺ CD8 ⁺
对照组	194	69.98±5.79	35.25±5.16	25.08±4.34	1.89±0.28
COPD 组	30	48.04±3.10 [△]	29.16±3.01 [△]	25.92±4.05	1.15±0.56*

*: P<0.05, △: P<0.01, 与对照组比较。

2.2 淋巴细胞和百万细胞参入计数结果 淋巴细胞参入计数(dpm×10⁴)是每瓶 0.2 mL 全血培养淋巴细胞的总计数, 对照瓶 3H 和 14C 计数分别为(3.082±0.720)和(2.068±0.540), 实验瓶在不同剂量的甘露聚糖肽作用下, 3H-TdR 和 14C-UR 的参入计数见表 2。百万细胞参入计数根据每瓶培养的淋巴细胞数量计算得到以便定量比较, 对照瓶的 3H 和 14C 百万细胞参入计数分别为(17.782±3.720)和(15.068±3.540), 实验瓶计数见表 2。

表 2 COPD 患者淋巴细胞和百万细胞参入计数($\bar{x} \pm s, \text{dpm} \times 10^4$)

甘露聚糖肽用量(mg/L)	淋巴细胞参入计数		百万细胞参入计数	
	3H 计数	14C 计数	3H 计数	14C 计数
0	3.048±0.620	1.826±0.440	15.346±3.120	14.026±2.280
0.1	3.212±0.560	2.162±0.580	17.892±3.260	15.114±3.060
1	3.626±0.620*	2.622±0.660*	19.125±3.060*	17.286±3.840*
10	3.864±0.720 [△]	2.882±0.740 [△]	22.058±4.860 [△]	18.492±4.360 [△]
50	2.966±0.520	2.628±0.640	18.012±4.120	14.856±3.120
100	2.514±0.420	1.422±0.420	15.024±2.260	12.688±2.220

*: P<0.05, △: P<0.01, 与对照瓶比较。

表 3 淋巴细胞参入率($\bar{x} \pm s, \%$)

甘露聚糖肽用量(mg/L)	3H 参入率	14C 参入率
0	5.98±1.3	5.84±1.5
0.1	7.08±1.4	7.02±1.7
1	8.10±1.6*	8.26±1.2*
10	9.12±1.8 [△]	9.35±2.1 [△]
50	7.11±1.4	7.28±1.6
100	5.83±1.2	6.02±1.4

*: P<0.05, △: P<0.01, 与对照瓶比较。

2.3 淋巴细胞参入率 对照瓶 3H 和 14C 计数分别为(6.28

±1.7)和(6.22±1.5), 不同剂量甘露聚糖肽作用下的 3H-TdR 和 14C-UR 的参入率见表 3。

3 讨 论

3H-TdR 与 14CUR 参入双标记法是目前采用较多的了解淋巴细胞免疫功能与状态的方法。3H-TdR 与 14CUR 分别是细胞合成 DNA 和 RNA 的物质基础, 仅有处于增值期的细胞才能摄取标记的原料, 因此, 测定淋巴细胞参入 3H-TdR 及 14CUR 计数的水平, 即可间接获得淋巴细胞 DNA 及 RNA 的合成能力。本实验结果显示, 在不同剂量的甘露聚糖肽的作用下, 淋巴细胞参入计数和百万细胞参入计数中, 3H-TdR 和 14CUR 的参入计数值随甘露聚糖肽加入剂量的不同而发生变化, 在 1 mg/L 时, 两者开始逐渐增加, 此时的 3H-TdR 和 14CUR 计数与对照瓶计数值比较差异有统计学意义(P<0.05)。当甘露聚糖肽浓度达到 10 mg/L 时, 3H-TdR 和 14CUR 的参入计数值达到高点, 与对照瓶比较差异有统计学意义(P<0.01)。但继续增加甘露聚糖肽的浓度至 50 mg/L 和 100 mg/L 时, 2 项计数值便开始回落, 所测数值与对照瓶比较差异无统计学意义, 淋巴细胞参入率的结果与上述 2 项计数的结果一致, 表明甘露聚糖肽对淋巴细胞免疫功能的调节具有双相性, 在较低剂量(1、10 mg/L)时, 有明显促进淋巴细胞 DNA 及 RNA 的合成, 提高淋巴细胞免疫功能的作用, 但当甘露聚糖肽的浓度增至 50 mg/L 或以上, 反而失去了对淋巴细胞免疫功能的促进作用。成月英等[7]也曾报道, 甘露聚糖肽具有激活 T、B 淋巴细胞, 诱导胸腺淋巴细胞产生活性物质, 促进 T 淋巴细胞增殖与转化, 改善和增强机体免疫功能和应激能力, 但甘露聚糖肽对淋巴细胞免疫功能的影响与剂量有关, 在达到一定浓度后, 有随浓度的增加而出现抑制性的影响, 表现出很强的剂量依赖性。

淋巴细胞的活化与增值是免疫反应系统中最基础和最关键的因素之一, 在免疫防御、免疫调节、炎性疾病和自身免疫疾病当中起到相当重要的作用[8]。本研究发现, 尽管甘露聚糖肽能有效地刺激淋巴细胞活化与增值, 但由于具有对剂量的依赖性, 测定不同浓度的甘露聚糖肽体外诱导 COPD 患者淋巴细胞增殖的水平便显得尤为重要, 亦是合理用药, 为达到最佳治疗状态的重要依据。

参考文献

[1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007 年修订版)[J]. 中华内科杂志, 2007, 46(3): 254-261.
[2] 王钊, 吴荣聪, 林琳. 多抗甲素的药理研究进展[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(4): 374-378.
[3] 刘小康, 周黎明, 强文安, 等. 多抗甲素诱导小鼠巨噬细胞产生一氧化氮及其抗肿瘤作用[J]. 中国抗生素杂志, 2000, 25(1): 62-63.
[4] 徐远义, 黄允宁, 常越, 等. 多抗甲素增强大鼠腹腔巨噬细胞抗癌免疫功能的研究[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(4): 396-398.
[5] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 79-82.
[6] 陈瑾, 王浩彦, 刘羽翔, 等. 老年慢性肺阻塞性疾病患者急性加重期 T 细胞免疫状况与免疫干预[J]. 中华老年医学杂志, 2006, 25(6): 534-437.
[7] 成月英, 郭彦珍, 张敬国. 甘露聚糖肽调节免疫功能的研究近况[J]. 中国医药导刊, 2008, 10(5): 706-707.
[8] 吕梦捷, 曾耀英, 宋兵. 人参皂苷 Rb1 对小鼠 T 淋巴细胞体外活化、增殖及凋亡的影响[J]. 中草药, 2011, 42(4): 743-748.