

牛磺鹅去氧胆酸对糖皮质激素引起小鼠免疫抑制的影响

王丛丛¹, 石有斐^{1*}, 李金莲², 李培锋³, 夏俊峰¹, 刘海涛¹, 马卫明^{1*} (1. 山东农业大学 动物科技学院, 山东泰安 271018; 2. 泰山学院 生物科学与技术系, 山东泰安 271021; 3. 内蒙古农业大学 兽医学院, 内蒙古呼和浩特 010018)

摘要: 采用 80 mg/kg 剂量的地塞米松对小鼠进行腹腔注射制备免疫抑制小鼠模型; 牛磺鹅去氧胆酸 (Taurochenodeoxycholic acid, TCDCA) 设计了 0.05、0.10、0.20 g/kg 低、中、高 3 个给药剂量对小鼠灌胃给药; 检测免疫器官质量, 碳粒廓清法检测单核-巨噬细胞吞噬功能, 流式细胞术检测外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞亚群百分率及 CD4⁺ 与 CD8⁺ 的比值, ELISA 检测血清中 IgG 的含量。结果显示: 模型小鼠和正常小鼠相比较, 脾指数、单核-巨噬细胞吞噬功能、CD4⁺ 和 CD8⁺ 亚群百分率及血清 IgG 含量均极显著降低 ($P < 0.01$), 说明地塞米松制备的小鼠模型免疫功能极显著低下。给药组与模型组相比较, TCDCA 的 3 个剂量组对小鼠脾指数均无显著影响 ($P > 0.05$); 低剂量组和中剂量组极显著增强单核-巨噬细胞系统吞噬功能 ($P < 0.01$); 3 个剂量组均显著提高外周血中 CD4⁺ 细胞百分率 ($P < 0.05$), 中剂量组显著提高 CD4⁺ 与 CD8⁺ 的比值 ($P < 0.05$); 低剂量组和中剂量组显著提高小鼠血清中 IgG 含量 ($P < 0.05$)。结果表明, TCDCA 对糖皮质激素免疫抑制小鼠的非特异性免疫和特异性细胞免疫、体液免疫功能具有恢复作用, 但对脾脏萎缩无恢复作用。

关键词: 牛磺鹅去氧胆酸 (TCDCA); 糖皮质激素; 免疫抑制

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

文章编号: 1005-4545(2013)01-0089-05

Effect of taurochenodeoxycholic acid on the immunosuppression mice with glucocorticoid

WANG Cong-cong¹, SHI You-fei^{1*}, LI Jin-lian², LI Pei-feng³, XIA Jun-feng¹, LIU Hai-tao¹, MA Wei-ming^{1*} (1. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. Department of Biological Science and Technology, Taishan University, Tai'an, Shandong 271021, China; 3. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: The immunocompromised model mice was prepared with 80 mg/kg dexamethasone using peritoneal injection, three doses of TCDCA were intragastric to the immunosuppression mice, including 0.05 (low-dose group), 0.1 (middle-dose group), 0.2 (high-dose group) g/kg; the weight of the immune organs were measured, the phagocytosis of the mononuclear phagocyte system was determined using carbon particle clearance test, the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ ratio in the blood cell were measured using flow cytometry and the content of IgG in serum was assayed using ELISA. The results showed that spleen index, mononuclear macrophage phagocytic function, CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations percentage and the serum IgG content were significantly decreased ($P < 0.01$) comparing model mice with normal mice; it illustrated that immune function is significantly low in the model mice. Compared with model group, three doses of TCDCA no significant impact to the index spleen ($P > 0.05$); low-dose group and middle-dose group could significantly improve the phagocytic function of the mononuclear phagocyte system ($P < 0.01$); three doses of TCDCA could enhanced the percentage of CD4⁺ lymphocytes ($P < 0.05$).

收稿日期: 2012-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30800837); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2010CQ011)

作者简介: 王丛丛 (1985-), 女, 硕士。

* 通讯作者

and middle-dose group could increase $CD4^+/CD8^+$ ratio in peripheral blood ($P < 0.05$); the content of serum IgG in mice was enhanced in low-dose group and middle-dose group ($P < 0.05$). These results suggested that TCDCA can significantly enhance the nonspecific immunity, cellular and humoral immunity function of the immunosuppression mice with glucocorticoid. But for splenic atrophy without recovery function.

Key words: taurochenodeoxycholic acid (TCDCA); glucocorticoids; immune suppression

* Corresponding author

糖皮质激素类药物具有抗炎、抗过敏、抗休克和抗内毒素等多种药理作用,兽医临床应用非常广泛。而糖皮质激素对机体免疫功能的抑制作用却十分强大,在该类药物治疗结束后,会造成动物机体免疫功能低下,且糖皮质激素无抗菌能力,故动物容易引起细菌、病毒等继发感染或使体内潜在病灶扩散;当畜禽大群使用时还可能会引发传染病流行。因此,预防或恢复糖皮质激素类药物导致的免疫抑制作用具有重要意义。牛磺鹅去氧胆酸 (Taurochenodeoxycholic acid, TCDCA) 是存在于动物胆汁中的一种无臭、白色粉末、味极苦的结合型胆汁酸。目前国内外学者关于 TCDCA 的药理学作用研究发现, TCDCA 具有抗炎^[1-2]、镇咳、平喘^[3]和抗肠上皮细胞凋亡^[4]等作用。2005 年,何秀玲等^[5]发现 TCDCA 对小鼠免疫功能具有调节作用。2007 年,石有斐等^[6]发现 TCDCA 对小鼠免疫功能具有浓度依赖性的双向免疫调节作用,对环磷酰胺和头孢菌素 A 抑制的免疫功能具有恢复作用。2007 年,金少琳等^[7]发现 TCDCA 能够对抗脾脏和血液淋巴细胞以及腹腔巨噬细胞的凋亡。本试验在以往研究工作基础上,开展 TCDCA 对糖皮质激素类药物引起的小鼠免疫抑制作用的影响研究,进一步揭示 TCDCA 的免疫调节作用,并为今后将其作为恢复糖皮质激素免疫抑制作用的药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物 清洁级纯系昆明种小鼠,体质量 23~25 g,雌雄各半,由山东鲁抗动物实验中心提供(许可证号:SCXK(鲁)20080002)。

1.2 主要试剂 TCDCA,纯度 98%,购自绍兴依珂姆化工科技有限公司; FITC anti-mouse CD4、PE anti-mouse CD8a,购自德国 Miltenyi Biotec GmbH 公司; Mouse IgG ELISA Kit,购自美国 GBD 公司; 地塞米松磷酸钠注射液,由山东鲁抗辰欣药业生产。

1.3 仪器设备 FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司); Labsystems Multiskan MS 352 型酶

标仪(美国 GBD 公司)。

1.4 试验模型的制备 糖皮质激素免疫抑制模型参考文献[8]方法进行制备,采用剂量为 80 mg/kg 地塞米松对小鼠进行腹腔注射,每天 1 次,连续 7 d。

1.5 分组及给药 试验设正常组、模型组和低、中、高 3 个剂量的模型给药组,每组 10 只小鼠。给药组在地塞米松造模后,用 TCDCA 灌胃给药,其中低、中、高 3 个给药剂量的质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20 g/kg,每天给药 1 次,连续应用 7 d;正常组和模型组用蒸馏水灌胃。

1.6 TCDCA 对免疫功能低下小鼠免疫器官的影响 末次给药 24 h 后,称量小鼠体质量,断颈处死小鼠,取脾脏,迅速剥离脂肪和其他结缔组织后,滤纸吸净脏器表面血污,称重。按下式计算脾指数。脾指数 = 脾质量(g)/体质量(g) × 100%。

1.7 TCDCA 对免疫功能低下小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响 末次给药 24 h 后,称量小鼠体质量,按 0.01 mL/g 的剂量给各小鼠尾静脉注射 20% 印度墨汁,注射后 2 min 和 20 min 分别从小鼠的左眼眶和右眼眶取血 20 μ L,加入 0.1% 碳酸钠溶液 10 mL 中摇匀,于 600 nm 处测光密度值(D 值);为了校正因各小鼠脾脏、肝脏质量不同产生的差异,取血完毕后,断颈处死小鼠,取肝脏、脾脏,滤纸吸净脏器表面血污,称重。按下式计算廓清指数和吞噬指数:廓清指数: $K = \lg D_1 - \lg D_2 / t_2 - t_1$;吞噬指数 = 体质量/(肝质量 + 脾质量) $\sqrt[3]{K}$ 。式中 D_1 、 D_2 分别为 2、20 min 时,取血测得的光密度值, t_2 、 t_1 为注射印度墨汁后采血的时间。

1.8 TCDCA 对免疫功能低下小鼠外周血中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 含量的影响 采用流式细胞术双抗标记法。末次给药 24 h 后,小鼠眼球采血 0.5 mL,肝素抗凝。取抗凝血 100 μ L,分别加入 FITC- $CD4^+$ /PE- $CD8^+$, 4℃ 避光孵育 30 min。分别加入 1 mL 溶血素, 3 000 r/min 离心,弃上清。PBS(pH 7.2)缓冲液洗涤 2 次,用多聚甲醛固定,然后上流式细胞仪检测。

1.9 TCDCA 对免疫功能低下小鼠血清中 IgG 含量的影响 常规方法制备绵羊红细胞,在造模前 1 d 腹腔注射免疫小鼠,于致敏后 7 d 以同样剂量进行再次免疫,二次免疫后,连续给药 7 d。末次给药 24 h 后,小鼠眼球采血,3 000 r/min 离心取血清,利用试剂盒检测 IgG 含量。

1.10 数据处理 利用 CELLQuest 软件分析流式细胞仪获取的数据;采用 SPSS11.5 统计学软件进行显著性检验,试验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示;2 个样本均数比较用 t 检验,多个样本均数分析用 F 检验。

2 结果

2.1 TCDCA 对免疫功能低下小鼠免疫器官的影响

从表 1 可知,模型组和低、中、高 3 个给药组小鼠脾指数均极显著低于正常组,3 个给药组与模型组小鼠比较无显著性差异,说明 TCDCA 对地塞米松抑制的脾脏萎缩无恢复作用。

表 1 TCDCA 对免疫功能低下小鼠脾指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脾指数
正常组	0.00	0.003 253±0.000 664
模型组	0.00	0.002 109±0.000 530**
低剂量组	0.05	0.002 178±0.000 407**
中剂量组	0.10	0.002 398±0.000 538**
高剂量组	0.20	0.002 400±0.000 697**

注:*表示与正常组比较差异显著($P<0.05$);**表示与正常组比较差异极显著($P<0.01$);△表示与模型组比较差异显著($P<0.05$);△△表示与模型组比较差异极显著($P<0.01$)。下同

2.2 TCDCA 对免疫功能低下小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响 从表 2 可知,模型组与正常组相比较,廓清指数和吞噬指数极显著减小;而低剂量和中剂量组小鼠廓清指数和吞噬指数都极显著高于模型组,但仍极显著低于正常水平。高剂量组与模型组相比较,二者廓清指数和吞噬指数均无显著性差异。这一结果说明,低剂量和中剂量的 TCDCA 可以有效逆转地塞米松对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的抑制作用。

表 2 TCDCA 对免疫功能低下小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

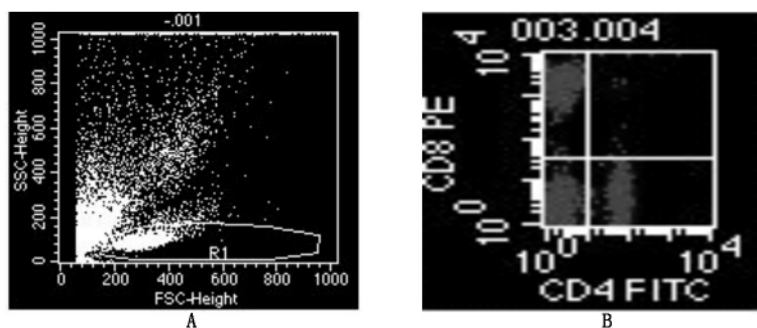
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	廓清指数	吞噬指数
正常组	0.00	0.012 3±0.002 25	4.89±0.74
模型组	0.00	0.003 7±0.000 82**	3.08±0.39**
低剂量组	0.05	0.006 5±0.000 50**△△	3.83±0.39**△△
中剂量组	0.10	0.007 8±0.000 7 3**△△	4.06±0.55**△△
高剂量组	0.20	0.004 7±0.000 49**	3.46±0.28**

2.3 TCDCA 对免疫功能低下小鼠外周血中 CD4⁺、CD8⁺ 含量的影响 由图 1 可知,在小鼠外周血单个核细胞中淋巴细胞圈定区内,可获取分群显著的 CD4⁺、CD8⁺ 细胞亚群及各细胞亚群的百分率。流式细胞仪的检测结果见表 3。模型组与正常组相比较,小鼠外周血中 CD4⁺ 细胞百分率极显著的减小,CD8⁺ 细胞百分率极显著的增大,导致 CD4⁺/CD8⁺ 的比值极显著减小。给药剂量与模型组相比较,3 个给药组小鼠外周血中 CD4⁺ 细胞百分率均显著高于模型组,而 3 个给药组 CD8⁺ 细胞百分率与模型组均无显著性差异;给药组中只有中剂量组 CD4⁺/CD8⁺ 的比值显著高于模型组,但与正常组相比较差异仍极显著。这一结果说明,给药剂量为 0.10 g/kg 的 TCDCA 可以提高地塞米松抑制的小鼠细胞免疫功能。

2.4 TCDCA 对免疫功能低下小鼠血清中 IgG 含量的影响 采用试剂盒检测血清 IgG 时,以不同稀释浓度的标准 IgG 取以 10 为底的对数,与相应 D 值做标准曲线(图 2), $R^2=0.968 1$,标准曲线方程为 $Y=593.01X-172.63$,进而通过血清所测 D 值得出 IgG 含量。由表 4 可知,模型组小鼠血清中 IgG 含量极显著低于正常组;3 个给药剂量组与模型组相比较,低、中 2 个剂量给药组均极显著地提高了小鼠血清中 IgG 含量,且与正常组比较无显著性差异,已恢复到正常水平。而高剂量组与模型组相比较则无显著性差异。这一结果说明,0.05、0.10 g/kg 给药的 TCDCA 可以使地塞米松抑制的小鼠体液免疫功能恢复到正常水平。

3 讨论

糖皮质激素类药物是临床应用较多的一类药物,可用于各种炎症、休克、免疫性疾病(如过敏反应、风湿性关节炎)、严重的皮肤病及血液系统疾病的治疗。在动物上该类药物的主要配合抗微生物药用于细菌、病毒引起严重感染的治疗,使动物度过危险反应期。但糖皮质激素类药物带来的不良反应也较多(如肾上腺功能降低、骨质疏松、胃肠道溃疡等),特别是当该类药物用于非免疫性疾病治疗时,而其引起的免疫功能抑制的不良反应非常严重。大剂量或长期使用可导致免疫器官萎缩、血液淋巴细胞大量凋亡、抗体和细胞因子合成减少等。该免疫抑制作用短时间内难以恢复,对于动物疾病治疗后容易造成继发感染。因此开发免疫增强药,改善和增强糖皮质激素类药物治疗后动物机体的免疫功能是非常必要的。

图 1 外周血淋巴细胞中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞的百分率 A. 阴性对照; B. 试验小鼠表 3 TCDCA 对免疫功能低下小鼠外周血中 CD4⁺、CD8⁺ 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	剂量/(g · kg ⁻¹)	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常组	0.00	50.00 ± 6.25	20.36 ± 4.18	2.60 ± 0.74
模型组	0.00	33.18 ± 6.55**	28.70 ± 4.75**	1.19 ± 0.37**
低剂量组	0.05	40.10 ± 7.13**△	27.10 ± 6.54**	1.69 ± 0.60**
中剂量组	0.10	40.27 ± 7.60**△	25.75 ± 6.51*	1.82 ± 0.59**△
高剂量组	0.20	40.14 ± 4.19**△	31.08 ± 4.40**	1.45 ± 0.46**

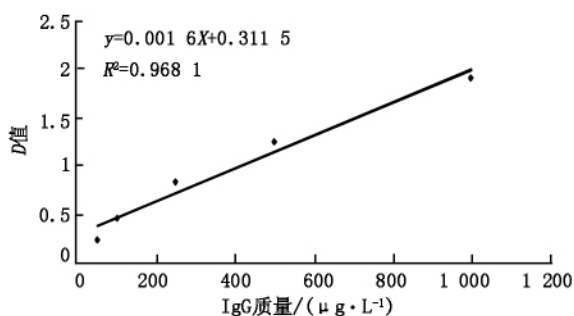


图 2 IgG 标准曲线

表 4 TCDCA 对免疫功能低下小鼠血清 IgG 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	剂量/(g · kg ⁻¹)	IgG 含量/(μg · L ⁻¹)
正常组	0.00	152.79 ± 14.75
模型组	0.00	122.69 ± 20.21**
低剂量组	0.05	146.49 ± 12.06△△
中剂量组	0.10	151.53 ± 25.92△△
高剂量组	0.20	132.55 ± 7.39**

本试验在以往发现 TCDCA 具有免疫调节作用的基础上,进一步开展了针对糖皮质激素类药物导致的免疫功能低下小鼠模型的影响研究,证实了 TCDCA 对地塞米松引起的小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能、细胞免疫和体液免疫功能抑制具有逆转或恢复作用;但对脾脏的萎缩无恢复作用。TCDCA 对机体免疫功能的调节机制目前尚不清楚,但已经证实胆汁酸可以作为信号分子^[9],通过调节其受体 FXR^[10]、TGR5^[11] 和 NF-κB^[4] 等信号途径来发挥生理和药理作用。已发现 FXR 在 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞及巨噬细胞上都有表达^[12-13];对 FXR 受体缺陷型鼠

进行免疫应答实验证明,FXR 受体对于维持机体免疫功能稳定是十分必需的^[14];另有研究发现,TGR5 存在于巨噬细胞表面,胆汁酸可通过 TGR5 影响巨噬细胞释放细胞因子^[15];另外,证实 FXR 和 TGR5 在细胞动能、细胞发育和分化、细胞增殖和凋亡的发生^[16-17]、机体内分泌调节^[18-19]、能量代谢^[20]、促进肝脏再生^[21]等方面发挥着重要作用。TCDCA 是否通过这 2 种受体起到对机体免疫功能的增强和调节作用尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Uchida T, Yamada T, Hayakawa T, et al. Taurochenodeoxycholic acid ameliorates and ursodeoxycholic acid exacerbates small intestinal inflammation[J]. Am J Physiol, 1997, 272(5): 1249-1257.
- [2] Liu M Q, Mao W, Guan H, et al. Effects of taurochenodeoxycholic acid on adjuvant arthritis in rats[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(12): 2150-2158.
- [3] 李培锋, 何秀玲, 关红, 等. 牛磺鹅去氧胆酸的抗炎作用机理[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(11): 1317-1320.
- [4] Douglas J T, Samuel M A, Tongtong Z, et al. Bile salts induce resistance to apoptosis through NF-κB-mediated XIAP Expression[J]. Ann Surg, 2007, 245(3): 415-425.
- [5] 何秀玲, 李培锋, 关红, 等. 牛磺鹅去氧胆酸对小鼠免疫功能的影响[J]. 中药材, 2005, 28(12): 1089-1092.
- [6] 石有斐, 李培锋, 李金莲, 等. 牛磺鹅去氧胆酸对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 中国药理学通报, 2007, 23

- (7):859-65.
- [7] 金少琳,关红,何秀玲,等.牛磺鹅去氧胆酸对小鼠不同免疫细胞凋亡的影响[J].动物医学进展,2008,28(6):27-30.
- [8] 朱正美,刘辉.简明免疫学技术[M].北京:科学出版社,2002:216.
- [9] Hylemon P B,Zhou H,Pandak W M,et al. Bile acids as regulatory molecules[J]. J Lipid Res,2009,50(8):1509-1520.
- [10] Makishima M,Okamoto A Y,Repa J J,et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids[J]. Science,1999,284(5418):1362-1365.
- [11] Kawamata Y,Fujii R,Hosoya M,et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids[J]. J Biol Chem,2003,278(11):9435-9440.
- [12] Schote A B,Turner J D,Schillz J,et al. Nuclear receptors in human immune cells:expression and correlations[J]. Mol Immunol,2007,44:1436-1445.
- [13] Renga B,Migliorati M,Mencarelli A,et al. Reciprocal regulation of the bile acid-activated receptor FXR and the interferon gamma-STAT-1 pathway in macrophages[J]. Biochim Biophys Acta,2009,1792(6):564-573.
- [14] Fiorucci S,Cipriani S,Mencarelli A,et al. Counter-regulatory role of bile acid activated receptors in immunity and inflammation[J]. Curr Mol Med,2010,10(6):579-595.
- [15] Keitel V,Donner M,Winand S,et al. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupper cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2008,372(1):78-84.
- [16] 邹庆伟,蒲燕,蒲敏,等.胆管病发病机制研究进展[J].西南军医,2010,12(5):949-951.
- [17] Zhang Y N,Tadashi I,Du H W,et al. Bile acids enhance proliferation and motility of hepatic stellate cell through regulation of p38/JNK signaling[J]. 临床儿科杂志,2010,28(4):301-306.
- [18] Keitel V,Kubitz R,Häussinger D. Endocrine and paracrine role of bile acids[J]. World J Gastroenterol,2008,14(37):5620-5629.
- [19] Katsuma S,Hirasawa A,Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1[J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,329(1):386-390.
- [20] Watanabe M,Houten S M,Mataki C,et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation[J]. Nature,2006,439(7075):484-489.
- [21] Huang W,Ma K,Zhang J,et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration[J]. Science,2006,312(5771):233-236.

(上接 31 页)

参考文献:

- [1] 薛晓晶,徐福洲,史爱华,等.副猪嗜血杆菌 *aroA* 基因鉴定及遗传进化分析[J].微生物学报,2008,48(8):1100-1103.
- [2] Amano H,Shibata M,Kajio N,et al. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1,4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method[J]. J Vet Med Sci,1994,56:639-644.
- [3] Kielstein P,Rapp-Gabrielson V. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heatstable antigen extracts[J]. J clin Microbiol,1992,30(4):862-865.
- [4] 焦炳华.分子内毒素[M].上海:上海科学技术文献出版社,2002.
- [5] 朱德康,程安春,汪铭书,等.鸭疫里默氏杆菌基因组文库的构建及免疫原性基因初步筛选[J].中国兽医学报,2007,27(6):834-837.
- [6] 李鹏,姜平,李军星,等.副猪嗜血杆菌重组 P2 蛋白的高效表达及间接 ELISA 方法的建立[J].中国兽医学报,2011,31(4):480-484.
- [7] 贾爱卿,李春玲,王贵平,等.副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因的克隆、表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J].中国兽医学报,2011,31(9):1266-1269.
- [8] McVicker J K,Tabatabai L B,Schilfgaarde M. *Haemophilus parasuis*-novel proteins-hopes for vaccine? [A/OL]. [2011-09-11]. http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=185444.
- [9] 贾爱卿,李春玲,王贵平,等.副猪嗜血杆菌 ERIC-PCR 指纹图谱多样性研究[J].中国兽医学报,2010,30(3):337-340.