

细柱五加果实提取物对免疫抑制小鼠的免疫调节作用

张正光^{1,2}, 黄厚才², 钱士辉^{1,2*}
(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028)

【摘要】 目的:研究细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠的免疫调节作用。**方法:**将小鼠随机平均分为细柱五加果实的高、中、低 3 个剂量组(2.8, 1.4, 0.7 g·kg⁻¹)、阳性对照组(20 mg·kg⁻¹左旋咪唑)、空白对照组和模型对照组(各组 n = 10)。各组小鼠均 ig 给药(20 mL·kg⁻¹)。连续 10 d。空白对照组和模型对照组均 ig 同等剂量的蒸馏水。从第 7 天开始,除空白对照组外,其余各组小鼠均 ip 环磷酰胺(80 mg·kg⁻¹)以制作免疫抑制小鼠模型。连续 4 d。采用免疫器官质量法和碳粒廓清法,以脾脏指数、胸腺指数、碳粒廓清指数及校正吞噬指数为指标来评价细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠非特异性免疫功能的影响;采用血清溶血素测定法,以血清溶血素含量为指标来评价细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠特异性免疫功能的影响。**结果:**细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠的脾脏指数和胸腺指数无显著性影响,但可以提高其碳粒廓清指数、校正吞噬指数和血清溶血素含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠的非特异性免疫功能和特异性体液免疫功能均有提高作用。

【关键词】 细柱五加; 果实; 乙醇提取物; 环磷酰胺; 免疫功能

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2012)10-0240-04

【收稿日期】 20111114(006)
【基金项目】 江苏省公益研究项目(BM2010610)
【第一作者】 张正光,在读硕士研究生,从事中药资源开发研究, Tel:13815878627, E-mail:zzgwang1221@sina.com
【通讯作者】 * 钱士辉, Tel: 025-85639644, E-mail:njqsh2005@126.com

Caspase-3 进一步切割不同底物,使蛋白酶的效应级联放大,最后导致细胞死亡。故 Caspase-3 是 Fas/FasL 介导的凋亡信号途径下游的关键性效应蛋白,细胞是否发生凋亡关键在于细胞质中活化的 Caspase-3 表达量^[7]。本实验光镜和电镜下观察可见模型组大鼠的心肌纤维明显的损伤坏死,模型组大鼠不仅心肌细胞凋亡率升高, Fas, FasL 和 Caspase-3 的阳性表达也明显上调。而研究结果显示:补中益气汤组较模型组及 L-T4 组的心肌凋亡率明显减少, Fas, FasL 和 Caspase-3 的阳性表达下降。这进一步表明补中益气汤对甲减心肌凋亡相关基因的蛋白表达有明显的调节作用,即显著降低促凋亡基因 Fas, FasL 和 Caspase-3 的蛋白表达,降低心肌细胞凋亡率,从而抑制和阻断细胞凋亡的发生,这可能是补中益气汤保护甲减心肌损害的机制之一。

【参考文献】

[1] Rodondi N, Bauer D C, Cappola A R, et al. Subclinical

thyroid dysfunction, cardiac function, and the risk of heart failure [J]. The Cardiovascular Health study Jam Coll Cardiol, 2008, 52(14):1152.

[2] 周泉, 李志梁, 王素华, 等. 大鼠甲状腺功能状态对心肌细胞凋亡的影响[J]. 第四军医大学学报, 2007, 7(6):639.

[3] Shah A N, Dubrey S W, Thomas D. Hypothyroid cardiomyopathy due to hypopituitarism [J]. Diagnostic dilemma Clin Med. 2007, 7(6):639.

[4] 李文静, 陈如泉. 甲状腺机能减退症的中医临床及实验研究综述[J]. 国医论坛, 1998, 13(6):39.

[5] 王英娜, 高天舒. 从脾虚痰瘀论治桥本甲状腺炎 30 例疗效观察[J]. 新中医, 2008, 20(12):52.

[6] 蒋立峰, 桑峰, 蒋士卿, 等. 精元康胶囊对骨髓抑制小鼠骨髓细胞凋亡相关基因表达水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):121.

[7] 陈月桥, 王丽, 武建华. 细胞凋亡信号传导途径研究进展[J]. 中国实用医药, 2007, 33(2):186.

【责任编辑 古云侠】

The Immunoregulation of Extracts from Fruits of *Acanthopanax gracilistylus* in Immunosuppressive Mice

ZHANG Zheng-guang^{1,2}, HUANG Hou-cai², QIAN Shi-hui^{1,2*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To study the immunoregulation of the ethanol extracts from fruits of *Acanthopanax gracilistylus* in immunosuppressive mice. **Method:** The mice were randomly divided into the fruits of *A. gracilistylus* high dose group, middle dose group, low dose group (2.8, 1.4, 0.7 g·kg⁻¹), positive control group, control group and model control group. Each group was administrated intragastrically at 20 mL·kg⁻¹ for 10 days ($n=10$). The control group and model control group were administrated intragastrically with the same dose of distilled water. From the 7th day, except the control group, other groups were injected cyclophosphamide (80 mg·kg⁻¹) intraperitoneally to produce the immunosuppressive mice model for 4 days. The weight of immune organs and the carbonic particle clearance methods were used to evaluate the effects of the ethanol extracts on non-specific immune function in immunosuppressive mice by spleen index, thymus index, carbonic particle clearance index and corrected phagocytic index; the serum hemolysin examination was used to evaluate the effects of ethanol extracts by serum hemolysin index. **Result:** The ethanol extracts had no significant impacts on spleen index and thymus in immunosuppressive mice, but could improve carbonic particle clearance index, corrected phagocytic index and serum hemolysin index of immunosuppressive mice ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** The ethanol extracts of the fruits of *A. gracilistylus* can enhance non-specific immune function and specific humoral immune function in immunosuppressive mice.

[Key words] *Acanthopanax gracilistylus*; fruits; ethanol extracts; cyclophosphamide; immune fuction

五加科植物细柱五加主产于湖北、河南、安徽、江苏等地,广泛分布于南北各省。五加皮为细柱五加的干燥根皮,是常用传统中药,始载于《神农本草经》,列为上品。此后历代本草均有记载。五加皮为祛风湿和强壮要药,味辛、苦、微甘,性温,具有祛风湿,补肝肾,强筋骨,活血脉等功效^[1]。自1963年版《中国药典》收载细柱五加为五加皮唯一基源植物以来,市场上正品五加皮供应严重短缺。作为五加皮应用的主要是香加皮(已被1985年版以后《中国药典》作为另外品种单独收载)以及五加属多种植物来源的根皮或茎皮的混合品(其中刺五加皮已被2000年版以后《中国药典》作为另外品种单独收载)。这种现象一直延续至今。细柱五加果实作为民间草药入药,味甘、微苦,性温,具有补肝肾,强筋骨等功效,在药性、功效与临床应用上与五加皮具有相似之处^[2]。目前国内对细柱五加的研究主要集中在根皮上^[3-5],而有关于果实的研究却鲜有报道。为了加强对细柱五加资源的综合开发利用,笔者对细柱五加茎、叶与果实的化学成分进行了较为系统

的研究^[6-11]。本文通过研究细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠免疫功能的影响,为进一步开发细柱五加资源提供参考。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠180只,清洁级,雌雄各半,体重18~22 g,由南通大学实验动物中心提供,许可证号SCXK(苏)2008-0010。

1.2 药物与试剂 细柱五加果实(2011年10月28日采自江苏省盱眙县)经江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定为细柱五加 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith 的果实。无水乙醇(南京化学试剂有限公司,批号10060710605)、盐酸左旋咪唑片(重庆青阳药业有限公司,批号110301)、环磷酰胺(江苏瑞恒医药股份有限公司,批号11061421)、中华墨汁(化学纯)、蒸馏水、豚鼠血清、鸡红细胞(江苏省中医药研究院自制)。

1.3 仪器 电子天平[美国双杰兄弟(集团)有限公司],METTLER TOLEDO AT-201 1/10万电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],旋转蒸

发仪(瑞士 Buchi 公司),电热套(江苏省通州市申通电器厂),数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司),离心机(美国 Beckman 公司);紫外-可见分光光度计(上海棱光技术有限公司)。

2 方法^[12-15]

2.1 细柱五加果实乙醇提取物的制备 取细柱五加干燥果实 300 g,以 10 倍量 80% 乙醇回流提取 2 次(每次 2 h),再以 10 倍量 40% 乙醇回流提取 1 次(2 h)。合并提取液并减压回收溶剂得乙醇提取浸膏,待用。将浸膏用新鲜蒸馏水溶解,分别配制成高、中、低 3 个质量浓度的样品(140,70,35 g·L⁻¹)。样品的 ig 体积均为 20 mL·kg⁻¹。

2.2 对免疫抑制小鼠免疫脏器指数的影响 取小鼠 60 只,随机平均分为细柱五加果实高、中、低 3 个剂量组(2.8,1.4,0.7 g·kg⁻¹)、阳性对照组(20 mg·kg⁻¹左旋咪唑)、空白对照组和模型对照组。各组小鼠均 ig 给药(20 mL·kg⁻¹·d⁻¹)。连续 10 d。空白对照组和模型对照组均 ig 同等剂量的蒸馏水。从第 7 天开始,除空白对照组外,其余各组小鼠均 ip 环磷酰胺(80 mg·kg⁻¹·d⁻¹)以制作免疫抑制小鼠模型。连续 4 d。第 10 d 给药 24 h 后将所有小鼠摘眼球放血并脱颈椎处死。称量小鼠体重。取出胸腺及脾脏用 4 ℃生理盐水冲洗,再用滤纸吸干后称重。以胸腺或脾脏的质量与小鼠体重之比作为胸腺或脾指数。

2.3 对免疫抑制小鼠单核吞噬细胞功能的影响 小鼠分组给药、造模同 2.2。于末次给药 30 min 后,在每只小鼠尾部 iv 已用生理盐水稀释 10 倍的中华墨汁 20 mL·kg⁻¹。分别于第 2 min 和第 10 min 用吸管于眼眶后静脉取血各 20 μL,溶于 2 mL 0.1% NaCO₃ 溶液中并摇匀。接着以 0.025 mL 正常小鼠的血溶于 2 mL 0.1% NaCO₃ 溶液中用于校零。用分

光光度计于波长 680 处测定其吸光度(A)。按照下列公式计算碳粒廓清指数 K 及校正吞噬指数 α:

$$K = (\lg A_1 - \lg A_2) / (t_2 - t_1)$$
$$\alpha = \sqrt[3]{K} \times \text{体重} / (\text{肝质量} + \text{脾质量})$$

其中 A₁ 和 A₂ 分别为不同时间 t₁ 和 t₂ 所取血样的吸光度。

2.4 对免疫抑制小鼠血清溶血素抗体生成的影响 小鼠分组给药、造模同 2.2。于给药第 7 d 给所有小鼠腹腔注射 5% 鸡红细胞与生理盐水的混悬液 0.2 mL 进行免疫。免疫后第 3 d,采用眼球取血法取血并离心。取血清用生理盐水稀释 100 倍。取稀释后的血清 1 mL,与 5% 鸡红细胞混悬液 0.5 mL、10% 补体(以 3 只豚鼠血清混合,用生理盐水配成 10% 溶液)0.5 mL 混合,在 37 ℃恒温箱中保温 30 min 后,于 0 ℃冰箱中中止反应。离心。取上清液用分光光度计于 540 nm 处测定其 A。取不加血清的空白对照组的上清液作为比色时调零的基准。以 A 作为判断血清溶血素含量的指标。

2.5 统计学处理 采用 SPASS 11.5 对数据进行统计分析。结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间的比较采用完全随机设计的方差分析;两组间的比较采用 t 检验。以 P<0.05 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 对免疫抑制小鼠胸腺、脾指数和单核巨噬细胞吞噬功能的影响 与空白对照组相比,模型对照组的免疫脏器指数显著降低。与模型对照组相比,各给药组的免疫脏器指数有增加的趋势,但无显著性差异。与空白对照组相比,模型对照组的 K 和 α 显著降低。与模型对照组相比,各给药组的 K 和 α 都有所增加。说明细柱五加果实乙醇提取物可以提高免疫抑制小鼠单核巨噬细胞的吞噬能力。见表 1。

表 1 细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠免疫脏器指数和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	胸腺指数 /mg·g ⁻¹	脾脏指数 /mg·g ⁻¹	K	α
空白对照	—	2.68 ± 0.41	5.94 ± 0.52	0.031 9 ± 0.008 6	6.121 4 ± 0.561 2
模型对照	—	2.01 ± 0.38 ¹⁾	3.83 ± 0.49 ¹⁾	0.017 6 ± 0.003 4 ¹⁾	4.238 1 ± 0.700 9 ¹⁾
左旋咪唑	0.02	2.29 ± 0.57	4.97 ± 0.65	0.029 7 ± 0.004 2 ³⁾	5.901 8 ± 0.478 5 ³⁾
细柱五加果实提取物	2.8	2.06 ± 0.35	3.94 ± 0.48	0.028 0 ± 0.007 1 ³⁾	5.771 0 ± 0.613 8 ³⁾
	1.4	2.10 ± 0.60	3.86 ± 0.60	0.026 2 ± 0.005 9 ³⁾	5.453 0 ± 0.753 0 ³⁾
	0.7	2.07 ± 0.43	3.91 ± 0.46	0.023 9 ± 0.006 2 ²⁾	5.193 5 ± 0.842 2 ²⁾

注:与空白对照组相比¹⁾P<0.01;与模型对照组相比²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表 2 同)。

3.2 对免疫抑制小鼠血清溶血素抗体生成的影响 与空白对照组相比,模型对照组的血清溶血素含

量显著降低(P<0.01),说明造模成功。与模型对照组相比,各给药组的血清溶血素含量均有所增加

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 细柱五加果实乙醇提取物对免疫抑制小鼠血清溶血素抗体生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	血清溶血素含量/ A
空白对照	—	0.489 ± 0.046
模型对照	—	$0.206 \pm 0.025^{1)}$
左旋咪唑	0.02	$0.276 \pm 0.010^{3)}$
细柱五加果实提取物	2.8	$0.255 \pm 0.014^{3)}$
	1.4	$0.228 \pm 0.021^{2)}$
	0.7	0.219 ± 0.018

4 讨论

胸腺和脾脏为机体内重要的免疫器官。胸腺为初级淋巴器官,拥有机体全身 T 淋巴细胞总数的 1/4,直接参与细胞免疫。脾脏为次级淋巴器官,拥有 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和巨噬细胞,与细胞免疫、体液免疫均有着密切的关系。一般来说,免疫抑制剂如环磷酰胺等可使胸腺、脾脏明显萎缩;免疫增强剂如免疫多糖等则可使胸腺、脾脏的质量增加。因此,对于免疫学药理实验,经常以受试药物对动物免疫脏器指数的影响作为初步的观察指标。

网状内皮系统(RES)是机体内最重要的防御系统,具有强大而迅速的吞噬廓清异物颗粒的能力,并且能够快速清除机体内由于自身产生的某些有害物质。当一定大小的惰性炭粒注射入静脉后,便被 RES 细胞迅速吞噬而在血液中被廓清。因此可以通过测定血液中炭粒消失的速度来反映 RES 吞噬异物颗粒的能力。细柱五加果实为补肝肾、强筋骨的要药,能够显著提高 RES 的吞噬能力,具有增强机体非特异性抵抗力的作用。

正常小鼠受到鸡红细胞免疫后,可产生抗鸡红细胞抗体(溶血素)。在机体外,这种抗体与鸡红细胞、补体一起温育,可使鸡红细胞溶解,释放出血红蛋白,使溶液呈红色。颜色深浅的程度反映了红细胞溶出量的多少。而红细胞溶血和小鼠免疫后血清中产生的抗体含量大小有关。因此,测定其上清液的吸光度,则可间接判断血清中抗体形成的数量。吸光度越大,说明产生的抗体量越大。从而反映出药物对体液免疫的影响。本实验研究表明细柱五加果实乙醇提取物具有增强免疫抑制小鼠特异性免疫功能的作用。

细柱五加果实为民间用药。上述实验说明细柱五加果实乙醇提取物虽然对免疫抑制小鼠免疫脏器指数没有显著性影响,但是可以有效地增强免疫抑制小鼠的特异性和非特异性免疫功能。这也为其在临床上的应用奠定了良好的实验基础。细柱五加果实乙醇提取物明确的作用机制还有待于进一步进行研究。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:61.

[2] 袁文学,伍湘瑾,韩玉洁,等.细柱五加的药理作用研究[J].沈阳药学院学报,1988,5(3):192.

[3] 朱彩凤,朱铨,李凤龙,等.细柱五加皮根皮水提液减肥作用的实验研究[J].延边大学医学学报,1997,20(3):152.

[4] 苏佩清,傅俊贞.五加皮的研究现状[J].承德医学院学报,1998,15(3):243.

[5] 高月来,沈烈行.五加皮成分和药理作用研究进展[J].山东中医药大学学报,2000,24(5):392.

[6] 钱士辉,袁丽红,曹鹏,等.细柱五加叶提取物抗肿瘤和抗血管生成活性[J].中药材,2009,32(12):1889.

[7] 安士影,钱士辉,蒋建勤.细柱五加叶化学成分研究[J].中草药,2009,40(10):1528.

[8] 咸丽娜,钱士辉,李振麟.细柱五加茎的化学成分研究[J].中药材,2010,33(4):538.

[9] 咸丽娜,李振麟,钱士辉.细柱五加茎中的一个新的贝壳杉烷型二萜苷[J].中草药,2010,41(11):1761.

[10] 张静岩,濮社班,钱士辉,等.细柱五加中新的脑苷脂类成分[J].中国天然药物,2011,9(2):105.

[11] 张静岩,濮社班,钱士辉,等.细柱五加果实化学成分的研究[J].中药材,2011,34(2):226.

[12] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1346.

[13] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991:458.

[14] 李燕,徐荣谦,王俊宏,等.熄风静宁汤对小鼠免疫功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011:17(7):198.

[15] 贾宁,王汉,郑晶.复方党参提取物对环磷酰胺处理小鼠免疫功能的调节作用[J].中国实验方剂学杂志,2011:17(17):206.

[责任编辑 聂淑琴]