

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

贾宁, 王汉, 郑晶

(中山大学附属第五医院, 广东 珠海 519000)

[摘要] **目的:**观察复方党参提取物对环磷酰胺所致免疫低下小鼠免疫功能的调节作用。**方法:**小鼠随机分为对照组、模型组和复方党参提取物低、中、高剂量组(0.25, 0.5, 1.0 g·kg⁻¹), 各剂量组、对照组和模型组均 ig 给药, 持续 10 d, 并在第 7 天开始同时 ip 环磷酰胺制作免疫抑制小鼠模型。MTT 法检测免疫细胞的活力, 鸡红细胞吞噬检测巨噬细胞的吞噬功能。绵羊红细胞免疫法检测小鼠体液免疫功能。**结果:**复方党参提取物各组脾淋巴细胞转化率升高、足跖厚度增加; 脾细胞溶血空斑数增加、血清溶血素水平及腹腔巨噬细胞吞噬率增加; 复方党参提取物中、高剂量组与模型组比较有非常显著性差异($P < 0.01$)。**结论:**复方党参提取物对环磷酰胺处理的免疫低下小鼠有免疫保护作用。

[关键词] 复方党参提取物; 免疫功能; 环磷酰胺

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0206-04

Immunomodulative Effect of Compound Codonopsis Radix Extract on Immunosuppressive Mice Induced by Cyclophosphamide

JIA Ning, WANG Han, ZHENG Jing

(The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yet-Sen University, Zhuhai 519000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of compound Codonopsis Radix extract on immunological function in immunosuppressive model mice induced by cyclophosphamide. **Method:** The immunosuppressive model in mice was induced by cyclophosphamide. Mice were administered with (low, medium and high dose, 0.25, 0.5 and 1.0 g·kg⁻¹ accordingly) compound Codonopsis Radix and control groups were administered with distilled water for 10 days. MTT assay was employed to evaluate the metabolic activity of splenocytes. The changes in the phagocytotic activity of macrophage in response to compound Codonopsis Radix extract treatment were tested by phagocytosis percentage of chicken red blood cells (CRBCs). The effect of compound Codonopsis Radix extract on humoral immunity was assessed in mice immunized with sheep red blood cells (SRBCs) by measuring the serum levels of specific antibody against SRBCs. **Result:** Compound Codonopsis Radix extract significantly increased the paw swelling in mice, enhanced the metabolic activity of mouse splenocytes, and also significantly increased serum hemolysin level immunized with SRBCs and capacity of mouse peritoneal macrophages for CRBC phagocytosis in mice induced by cyclophosphamide. **Conclusion:** Compound Codonopsis Radix extract can stimulate the immunologic function in immunosuppressive mice.

[Key words] compound Codonopsis Radix extract; immunological function; cyclophosphamide

随着对肾脏疾病认识的不断深入, 目前认为人类多数肾脏疾病为免疫介导疾病。环磷酰胺是治疗

肾脏病的常用免疫抑制剂, 在狼疮性肾炎和小血管炎的治疗中具有划时代的意义^[1], 但其相关的严重免疫抑制等毒副作用也限制了其应用。近年来临床使用的现代免疫增强剂多为化学合成药物, 存在副作用。而研究发现, 许多天然中草药具有调节免疫的作用, 且毒副作用小^[2]。本文旨在探讨复方党参

[收稿日期] 20110413(019)

[第一作者] 贾宁, 硕士, 主治医师, Tel: 13926930461, E-mail: hellenjia76@126.com

提取物对环磷酰胺处理小鼠免疫功能的影响。

1 材料

1.1 动物及分组 昆明种小鼠,6~8周龄,体重18~22 g,由第一军医大学实验动物中心提供(动物合格证号2002A036)。

1.2 药物 党参、黄芪、枸杞等药材购于珠海市药材公司。按照2:2:1的比例,称取党参、黄芪、枸杞等药材,加入6倍量水加热回流提取,达到微沸状态后保持2 h,再加入4倍量水重复提取1次,混合2次提取液。滤过,用旋转蒸发仪浓缩,温度控制在70℃左右,浓缩成稠膏。置真空干燥箱中,70℃减压干燥,取出,得到复方党参提取物,本品呈棕黄色干膏。临用时用蒸馏水配制成0.012 5,0.025,0.05 g·mL⁻¹。

2 方法

2.1 动物造模及分组 随机将小鼠分为复方党参提取物(低、中、高3个剂量)组及正常对照组和模型组,共5组,每组10只。正常对照组与模型组每日用去离子水(20 mL·kg⁻¹)ig,共10 d;模型组在第7天开始ip环磷酰胺(17.5 mg·kg⁻¹),共4 d;试验组分别用复方党参提取物低剂量0.25 g·kg⁻¹,中剂量0.5 g·kg⁻¹,高剂量1.0 g·kg⁻¹ig,持续10 d,并在第7天开始ip环磷酰胺(17.5 mg·kg⁻¹),共4 d。第11天测定各项免疫指标。

2.2 ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验及胸腺和脾脏脏器系数测定 无菌取脾脏,置于盛有适量无菌Hanks液的小平皿中,经200目筛网过滤,Hanks液洗3次,离心,然后将细胞悬浮于2 mL的完全培养液中,用台盼蓝染色计数活细胞数,调整细胞密度为2×10⁶个/mL。将细胞悬液分2孔加入24孔培养板中,1孔50 μL ConA液(相当于50 mg·L⁻¹),另1孔作为对照,置5% CO₂,37℃培养72 h。培养结束前4 h,每孔吸去上清液0.7 mL,加入0.7 mL无血清RPMI1640培养液,同时加入MTT(5 g·L⁻¹)50 μL/孔,继续培养4 h。培养结束后,每孔加入1 mL酸性异丙醇,吹打混匀,分别加于96培养板中,作2个孔的平行样,以570 nm波长测定吸光度(A)。计算各组加ConA孔与不加ConA孔A的差值。

2.3 小鼠迟发型变态反应试验(足跖厚度增加法)

实验结束前4 d免疫动物:用2%绵羊活细胞ip 0.2 mL致敏动物,5 d后测定左后足跖厚度,接着于

该处皮下注射20%绵羊红细胞(20 μL/只),注射后24 h测定左后足跖厚度3次,得平均值。

2.4 抗体生成细胞检测(Jerne改良玻片法) 将SRBC免疫4~5 d后的小鼠颈椎脱臼处死,取出脾脏,放在盛有Hanks液的小平皿中,轻轻将脾撕碎,制成细胞悬液。经200目筛网过滤,或用4层纱布将脾磨碎,离心10 min,用Hanks液洗2次,最后将细胞悬液在5 mL RPMI1640培养液中,计数细胞,并将细胞密度调整为5×10⁶个/mL,测定脾空斑形成数。将表层培养基(1 g琼脂加双蒸水至100 mL,加热溶解后,放45℃水浴保温,与等量pH 2~7.4、2倍浓度的Hanks液混合,分装小试管,每管0.5 mL,再向管内加50 μL 10% SRBC(用SA配制),20 μL脾细胞悬液(5×10⁶个/mL)脾细胞悬液,迅速混匀,倾倒入已刷琼脂薄层的薄片上,做下玻片,待琼脂凝固后,将玻片水平扣放在片架上,放入二氧化碳培养箱中温育1~1.5 h,然后用SA缓冲液稀释的补体(1:8)加入到玻片架凹槽内,继续温育1~1.5 h后,计数溶血空斑数。

2.5 小鼠血清溶血素滴度测定(血凝法) 实验结束前的第4 d免疫动物,每只ip 2%的绵羊红细胞0.2 mL。第5天摘除眼球采血,分离血清备用。凝集反应:用生理盐水将血清倍比稀释于微量反应板内,各50 μL,加入0.5%绵羊红细胞50 μL,混匀,装入湿润饭盒内盖好,置于37℃温箱3 h后,观察抗体凝集反应程度。

2.6 小鼠腹腔单核吞噬细胞吞噬功能的测定^[3]

小鼠ip 1%鸡红细胞,1 mL/只;30 min后ip生理盐水1 mL/只,断颈处死小鼠,吸取腹腔液涂片,1:1丙酮甲醇固定5 min,染色后油镜观察。每份标本油镜下观察200个巨噬细胞,计算吞噬率。

$$\text{吞噬率} = (\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数} / 200 \text{ 个巨噬细胞}) \times 100\%$$

2.7 统计方法 在SPSS 12.0软件包上自动运行。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料进行单因素方差分析,组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠脾脏和胸腺质量的影响 结果显示模型组,复方党参提取物各剂量组的脏器/体重比值与对照组比较,差异均无显著性意义。

3.2 对ConA诱导的免疫低下小鼠脾淋巴细胞转化反应及足跖厚度的影响 模型组淋巴细胞转化A明

显降低,模型组足跖厚度明显减少,与正常对照组比较差异有显著意义($P < 0.05$),说明免疫低下小鼠模型成立。各剂量复方党参提取物组加 ConA 后 A 值升高,脾淋巴细胞转化率升高,足跖厚度增加,中、高剂量组与模型组比较有非常显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 复方党参提取物对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化反应和迟发型变态反应的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 加 ConA 后 A 增加值 | 足跖厚度 /mm |
|---------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 对照 | - | 0.084 ± 0.038 ¹⁾ | 0.40 ± 0.18 ¹⁾ |
| 模型 | - | 0.059 ± 0.012 | 0.27 ± 0.11 |
| 复方党参提取物 | 0.25 | 0.079 ± 0.063 | 0.51 ± 0.13 ¹⁾ |
| | 0.5 | 0.169 ± 0.057 ²⁾ | 0.60 ± 0.14 ²⁾ |
| | 1.0 | 0.177 ± 0.073 ²⁾ | 0.61 ± 0.17 ²⁾ |

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 对免疫低下小鼠脾细胞抗体生成水平的影响
模型组脾细胞抗体生成水平、血清溶血素抗体体积数及腹腔巨噬细胞吞噬率明显下降,与正常对照组比较差异有显著意义($P < 0.05$),说明免疫低下小鼠模型成立。复方党参提取物各剂量组脾细胞抗体生成水平、血清溶血素抗体体积数、腹腔巨噬细胞吞噬率与模型组比较有非常显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 复方党参提取物对抗体生成细胞、血清溶血素滴度及腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 溶血空斑数 个/10 ⁶ 脾细胞 | 抗体积数 | 吞噬率 /% |
|---------|---------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 对照 | - | 188.4 ± 27.2 ¹⁾ | 57.7 ± 24.3 ¹⁾ | 45.3 ± 4.3 ¹⁾ |
| 模型 | - | 140.2 ± 25.3 | 30.8 ± 22.2 | 31.8 ± 1.2 |
| 复方党参提取物 | 0.25 | 202.1 ± 20.5 ¹⁾ | 76.7 ± 29.0 ¹⁾ | 35.7 ± 2.2 |
| | 0.5 | 254.1 ± 54.5 ²⁾ | 103.7 ± 36.8 ²⁾ | 46.2 ± 6.8 ¹⁾ |
| | 1.0 | 311.5 ± 43.4 ²⁾ | 106.4 ± 40.2 ²⁾ | 62.4 ± 4.2 ¹⁾ |

4 讨论

复方党参提取物由党参、黄芪、枸杞等药材组成,其中党参为扶正补气类中药,具有抗缺氧、抗放射线损伤、抗低温、抗溃疡、抗炎、抗肿瘤、镇痛、抗疲劳及抗衰老等作用^[4-5];枸杞^[6]补肝肾、养隐血;黄芪具有补气升阳、利水消肿、托疮升机之功效^[7]。全方共奏补中益气 and 益卫固表、健脾补血、滋补肝肾等功效。药理试验结果^[4-5]已表明,党参能激发和促进细胞免疫,故被称为“免疫激发型”天然中药。枸杞的

主要成分是枸杞多糖,黄芪的主要成分为黄芪皂苷和黄芪多糖,具有促胸腺体液反应;同时多糖又是细胞膜的组分,有强化正常细胞提高机体抗病能力。

本实验采用环磷酰胺 ip 制作免疫抑制小鼠模型^[3],与对照组比较小鼠免疫器官淋巴细胞转化率和溶血素明显降低,证明免疫抑制小鼠模型造模成功。小鼠的脾细胞主要为免疫细胞,免疫增强剂能诱导其发生增殖反应。MTT^[8]法则通过检测细胞转化而间接反映细胞增殖的程度,是机体重要的细胞免疫指标。本研究观察到,复方党参提取物使 ConA 诱导的免疫低下小鼠脾淋巴细胞转化率升高,使受试动物脾脏抗体生成细胞数增加,且有浓度依赖趋势,提示其对免疫细胞及其功能有直接的调节作用。小鼠血清溶血素是由绵羊红细胞诱导的 B 淋巴细胞产生的抗体,是检测体液免疫功能的常用方法之一^[8]。绵羊红细胞作为半抗原与蛋白结合成完全抗原后,使 T 淋巴细胞致敏,导致迟发型超敏反应。本研究观察到复方党参提取物可显著提高绵羊红细胞诱导的免疫低下小鼠迟发型变态反应能力,增加足跖厚度,增强由 T 细胞介导的迟发型超敏反应。

单核吞噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的标志之一,当抗原进入机体后可被单核吞噬细胞迅速吞噬和清除掉。单核吞噬细胞清除的速率可反应其吞噬功能^[8]。本研究观察到复方党参提取物能显著增加环磷酰胺处理小鼠的廓清指数和吞噬指数,提高小鼠的非特异性免疫功能。

综上所述,复方党参提取物具有增强小鼠细胞免疫、体液免疫及非特异性免疫之功效,为临床进一步用药奠定了良好的实验基础。但是由于实验采用的是复方提取物,其化学组分相对复杂,其确切的作用机制还待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Couser W G, Neilson E G. Overview of renal inflammation immunologic renal diseases 2nd [M]. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001: 47.
- [2] 周洪明, 操继跃. 中草药免疫促进剂的药效研究进展 [J]. 中国兽药导报, 2002, 36(6): 42.
- [3] 陈奇. 中药药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 315.
- [4] 粟群芳, 周紫婧. 党参超微饮片对小鼠抗疲劳和耐缺氧作用的观察 [J]. 中医药导报, 2010, 8(16): 95.

金疮小草醇提物活血化瘀及抗急性肝损伤作用

曾春晖, 杨柯*, 徐明光, 李先梅, 李河, 梁金莎
(广西中医学院药学院, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**研究金疮小草醇提物(ADT)对正常小鼠凝血时间及微循环影响及抗急性肝损伤的作用。**方法:**正常小鼠 50 只,随机分成 5 组,即空白对照组、阿司匹林组、ADT 高、中、低剂量组,ig 给药,1 次/d,连续 7 d,末次给药后 1 h,采用毛细管法及玻片法测定其对凝血时间的影响;测定肠系膜毛细血管网交点数、管径、血液流速以观察其对微循环的影响;正常小鼠 60 只,随机分成 6 组,即空白对照组、模型对照组、联苯双酯组、ADT 高、中、低剂量组,ig 给药,1 天 1 次,连续 7 d,末次给药后禁食不禁水 8 h,除空白组外 ip CCl₄ 或 D-GalN,12~16 h 后取血分离血清,测定小鼠血清中 ALT,AST 水平以评价其对急性肝损伤的影响。**结果:**与空白对照组比较,ADT 能明显延长小鼠血液的凝血时间($P < 0.05$),玻片法测得的凝血时间延长 40% 以上,毛细管法测得的凝血时间延长 20% 以上;显著增加肠系膜的毛细血管网交点数和加快微循环血液速度($P < 0.05$),网交点数增加了约 30%,血液流速加快了约 10%;与模型对照组比较,ADT 能明显降低 CCl₄ 和 D-GalN 引起急性肝损伤动物的血清 ALT,AST 水平($P < 0.05$)。**结论:**金疮小草醇提物活血化瘀作用可能是抗急性肝损伤途径之一。

[关键词] 金疮小草;乙醇提取物;活血化瘀;急性肝损伤;小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0209-04

Effects of Ethanol Extract from *Ajuga decumbens* on Blood-activating and Stasis-dissolving and Anti-liver Acute Injury in Mice

ZENG Chun-hui, YANG Ke*, XU Ming-guang, LI Xian-mei, LI He, LIANG Jin-sha
(Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:**To study the effects of the ethanol extract from *Ajuga decumbens* on blood-activating and stasis-dissolving and anti-liver acute injury in mice. **Method:** Fifty mice were randomly divided into 5 groups: normal control group, aspirin group, ethanol extract from *A. decumbens* groups of low, middle and high doses. Treatments in according groups were given daily for 7 days. Glass capillary method and slide method were used to determinate the effects of the ethanol extraction of *A. decumbens* on blood-activating and stasis-dissolving by the clotting time in mice. Meanwhile we selected the intestinal mucosa to measure its nodal points of capillary network, the diameter of capillary and the blood's flow velocity. Another 60 mice were randomly divided into 6 groups:

[收稿日期] 20110225(001)

[第一作者] 曾春晖, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 从事中药炮制药理研究, Tel:0771-2219854, E-mail: chzheng@163.com

[通讯作者] * 杨柯, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 从事中药药理学研究, Tel:0771-2279423, E-mail: kyang_11@126.com

[5] 王开贞, 徐红, 刘秀花, 等. 党参合剂抗疲劳作用的初步研究. [J] 中成药, 2008, 30(4):944.

[6] 覃筱美, 唐丽. 枸杞提取物对小鼠抗疲劳作用的实验研究[J]. 中医药导报, 2009, 32(2):154.

[7] McKenna D, Hughes K, Adamas A, et al. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron

enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila* [J]. *Aquaculture*, 2008, 275 (1/4):26.

[8] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 2 版. 武汉:湖北科学技术出版社, 2002:396.

[责任编辑] 聂淑琴