

同一复方用黄芪与用红芪对小鼠免疫功能影响的比较研究

桂曼曼,张李峰,李雪嫣,程卫东*

(兰州大学基础医学院中西医结合研究所,兰州 730000)

[摘要] **目的:**比较同一复方用黄芪与用红芪对免疫低下小鼠免疫功能的影响。**方法:**取正常昆明种小鼠 60 只,雌雄各半,随机分为 6 组:空白对照组、模型组、含黄芪益气养血汤组($6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、含红芪益气养血汤组($6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、含黄芪补中益气汤组($4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、含红芪补中益气汤组($4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续 ig 14 d,用药第 2 天腹腔注射环磷酰胺制备免疫低下小鼠模型,分别比较补中益气汤和益气养血汤用红芪和用黄芪对免疫低下小鼠 T 淋巴细胞增殖、NK 细胞杀伤活性、血清溶血素和血清 IL-1, IL-4 水平的影响。**结果:**这两个复方无论用红芪还是用黄芪均能使免疫抑制小鼠 T 淋巴细胞增殖、NK 细胞杀伤活性、血清溶血素和血清 IL-1, IL-4 水平提高至正常水平,其中,在 T 淋巴细胞增殖上,两复方用红芪均比用黄芪作用更为显著($P < 0.05$),而在其余指标上两复方无论用红芪还是黄芪均无明显差异。**结论:**益气养血汤和补中益气汤在提高细胞免疫功能方面用红芪均比用黄芪作用显著。

[关键词] 益气养血汤;补中益气汤;红芪;黄芪;免疫功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0203-04

Comparison of Immunologic Function of Same Compound Using Astragalus Radix and Using Hedysari Radix

GUI Man-man, ZHANG Li-feng, LI Xue-yan, CHENG Wei-dong*

(Institute of Chinese Traditional and Western Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effects of the same compound (Yiqi Yangxue decoction and Buzhong Yiqi decoction) prescription containing Astragali Radix (AR) and Hedysari Radix (HR), respectively, on immunologic functions of mice. **Method:** The sixty mice were divided randomly into six groups: the control group, the model group, Yiqi Yangxue decoction containing AR group, Yiqi Yangxue decoction containing HR group, Buzhong Yiqi decoction containing AR group and Buzhong Yiqi decoction containing HR group. The mice were injected peritoneally with cyclophosphamide to establish immunosuppressive model, and spleen lymphocyte Proliferation, IL-1, IL-4 and serum hemolysin level, NK cells activity were observed. **Result:** After administration, the immunologic functions were significantly increased. The compounds containing HR were more significant than compounds containing AR in spleen lymphocyte proliferation, but in other respects, the two compounds whether containing AR or HR had no obvious difference. **Conclusion:** Both Yiqi Yangxue decoction and Buzhong Yiqi decoction containing HR are better than compounds containing AR in improving cellular immune function.

[Key words] Yiqi Yangxue decoction; Buzhong Yiqi decoction; Astragali Radix; Hedysari Radix; immunologic function

[收稿日期] 20110414(011)

[基金项目] 甘肃省中医药科研立项(GZK-2008-7)

[第一作者] 桂曼曼,硕士研究生,从事中西医结合抗肿瘤研究, Tel: 15193106302, E-mail: guimanman1985@126.com

[通讯作者] *程卫东,教授,博士生导师,从事中西医结合治疗常见病研究, Tel: 13909482629, E-mail: chengweidong888@sina.com

红芪与黄芪属于同科异属,它们的性味、功效与主治相同,在古代常红芪、黄芪不分,以西北地区尤甚。近年来对红芪化学成分研究的深入,将其单列为一种药材。有学者对红、黄芪免疫功能进行了对比研究,发现红芪免疫调节作用比黄芪作用显著^[1-2]。因此,我们有必要探讨在复方中能否用红芪来代替黄芪。本实验采用在益气养血口服液和补中益气丸原方水煎剂中用等剂量红芪来代替黄芪,分别比较两方用红芪和用黄芪对小鼠免疫功能的影响。其中,益气养血口服液和补中益气丸均为临床上常用的补气的中成药,二者为 2005 年版《中国药典》一部收录的成方制剂且均以黄芪作为君药。

1 材料

1.1 中药煎剂 益气养血汤组成:黄芪(红芪)83.4 g,党参 75 g,人参 50 g,当归 33.3 g,白术(炒)33.3 g,地黄 33.3 g,制何首乌 30 g,五味子 25 g,陈皮 33.3 g,地骨皮 25 g,鹿茸 1.7 g,淫羊藿 50 g;补中益气汤组成:炙黄芪(红芪)200 g,党参 60 g,炙甘草 100 g,白术(炒)60 g,当归 60 g,升麻 60 g,柴胡 60 g,陈皮 60 g。以上药材均购于兰州市药材市场,已经兰州大学基础医学院程卫东教授鉴定,其中黄芪为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,红芪为多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根。按常规方法煎煮,益气养血汤最后浓缩至每毫升含生药 0.6 g,补中益气汤最后浓缩至每毫升含生药 0.4 g,放置 4℃ 冰箱冷藏保存。其中,益气养血汤浓度计算方法:成人按 60 kg 计算,每日服用益气养血口服液 60 mL,相当于生药 28.9 g,人日服用益气养血口服液生药量为 0.48 g·kg⁻¹,按动物体形系数折算小鼠的等效剂量为 6 g·kg⁻¹(即人临床日用量的 12.33 倍)^[3]。按小鼠常规 ig 量 10 mL·kg⁻¹,则益气养血汤每毫升含生药约为 0.6 g。补中益气汤的浓度计算方法同益气养血汤。

1.2 动物与细胞株 清洁级昆明种小鼠 18~22 g,雌雄各半,由兰州大学医学动物实验中心提供,生产许可证号 SCXK(甘)2009-0004。绵羊红细胞由兰州大学医学实验中心提供。豚鼠由兰州大学医学动物实验中心提供,生产许可证号 SCXK(甘)2004-005。将 3 只豚鼠的新鲜血清中加入 1/10 压积绵羊红细胞,于 4℃ 震荡混匀 20 min 置 -20℃ 保存,做补体用。K562 细胞株由兰州大学中西医结合研究所提供。

1.3 试剂 环磷酰胺粉针剂(上海华联制药有限公司,批号 041109);刀豆蛋白 A(ConA)和四甲基偶氮唑盐(MTT)(均购自美国 Sigma 公司,批号分别为 C2010,M2128);NP40(上海碧云天生物技术有限公司,批号 N8030);DMSO(天津汇英化学试剂有限公司,批号 20030526);IL-1 β 试剂盒、IL-4 ELISA 试剂盒、小鼠淋巴细胞分离液(均购自深圳达科为生物技术有限公司,批号分别为 E2012-1101-1,E2040-1101-2,33R021015)。

1.4 仪器 TGL-16G 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);CO₂ 恒温箱(NAPCO 5410);680 型酶标检测仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药方法 清洁级昆明种小鼠 60 只,随机均分为 6 组:正常对照组、环磷酰胺模型组、含黄芪益气养血汤组、含红芪益气养血汤组、含黄芪补中益气汤组、含红芪补中益气汤组,每组 10 只。空白对照组和环磷酰胺模型组分别 ig 生理盐水 10 mL·kg⁻¹,另外 4 组分别 ig 含黄芪益气养血汤、含红芪益气养血汤、含黄芪补中益气汤、含红芪补中益气汤,ig 量均为 10 mL·kg⁻¹,每只小鼠 ig 1 次/天,连续 14 d。在 ig 第 2 天除正常对照组外,各组小鼠均腹腔注射环磷酰胺 50 mg·kg⁻¹,1 次/天,连续 5 d,制备免疫低下小鼠模型。

2.2 Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖转化实验^[4-5] 各组小鼠连续用药 14 d 后,颈椎脱臼处死,无菌取脾脏,置于盛有适量淋巴细胞分层液的平皿,将脾脏研碎,200 目细胞筛网过滤,用 Hank's 液洗涤两次,调整细胞密度为 1×10⁷ 个/mL。将细胞悬液加入 96 孔培养板,每孔 100 μ L,每个样本设 6 个复孔,其中 3 孔每孔加 100 μ L Con A(终浓度为 5 mg·L⁻¹),另外 3 孔作为对照,置于 CO₂ 培养箱内培养 68 h 后,加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 10 μ L/孔,继续培养 4 h。培养结束后,弃上清,每孔加入 100 μ L DMSO,混匀,静置数分钟,待紫色结晶完全溶解后,在 570 nm 波长处测定每孔的吸光度(A),取 3 个复孔均值,按以下公式计算刺激指数(SI)。

$$\text{刺激指数(SI)} = \text{测定孔 A} / \text{对照孔 A}$$

2.3 用 LDH 释放法测定 NK 细胞活性 取靶细胞(K562 细胞)和效应细胞(脾细胞)各 100 μ L(效靶比为 50:1),加入 96 孔培养板中,靶细胞自然释放孔加

靶细胞和培养液各 100 μL,靶细胞最大释放孔加靶细胞和 1% NP40 各 100 μL,上述均设三个复孔,37 °C 5% CO₂ 孵箱中 22 h 后,每孔吸取上清 100 μL,按乳酸脱氢酶试剂盒说明书操作,检测结果经酶标仪 450 nm 波长测定反应孔、自然释放孔、最大释放孔的 A,然后按以下公式计算 NK 细胞的杀伤活性。

$$\text{NK 细胞杀伤活性} = (\text{反应孔 } A - \text{自然释放孔 } A) / (\text{最大释放孔 } A - \text{自然释放孔 } A) \times 100\%$$

2.4 用 SRBC 免疫法测定血清溶血素水平^[6] 每只小鼠均经腹腔注 0.2 mL 5% 绵羊红细胞,免疫 4 d 后,小鼠摘眼球取血,先放置 3 h,使血清充分析出,然后 1 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集血清。用生理盐水将血清稀释 10 倍,取 1 mL 置于试管内,依次加 10% 补体 0.5 mL,5% 绵羊红细胞悬液 0.5 mL,混匀,置于 37 °C 孵育 30 min,冰浴终止反应,1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清 1 mL,加蒸馏水 3 mL。同时取 5% CRBC 悬液 0.25 mL 加蒸馏水至 4 mL[作为 CRBC 半数溶血值(HC₅₀)]于另一试管中,充分摇匀,放置 10 min,于 570 nm 读取各管吸光度(A),同时设生理盐水空白组,按以下公式计算。

$$\text{HC}_{50} = (\text{样品管 } A / \text{CRBC 半数溶血 } A) \times \text{稀释倍数}$$

2.5 用 ELISA 法测定血清 IL-1,IL-4 含量 按 2.4 方法制备血清,然后用生理盐水将血清稀释 10 倍,

用 ELISA 法检测血清 IL-1,IL-4 含量,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2.6 统计方法 采用 SPSS 17.0 统计软件包,数据先进行方差齐性检验,随后进行方差分析,最后采用 LSD-*t* 检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 对小鼠 T 淋巴细胞增殖能力和 NK 细胞杀伤活性的影响 结果如表 1 所示,与对照组比较,模型组 T 淋巴细胞的刺激指数和 NK 细胞杀伤活性均明显降低($P < 0.01$)。益气养血汤组和补中益气汤组无论用红芪还是用黄芪均能提高免疫抑制小鼠 T 淋巴细胞的刺激指数和 NK 细胞杀伤活性($P < 0.01$),且在 T 淋巴细胞的刺激指数方面,二复方用红芪均比用黄芪作用显著($P < 0.05$),而在 NK 细胞杀伤活性方面,二复方用红芪与用黄芪无明显统计学差异。

3.2 对小鼠血清溶血素,IL-1,IL-4 水平的影响 结果如表 2 所示,与空白对照组比较,模型组血清溶血素,IL-1,IL-4 水平均明显降低($P < 0.01$)。益气养血汤组和补中益气汤组无论用红芪还是用黄芪均可显著增加免疫抑制小鼠的血清溶血素,IL-1,IL-4 水平($P < 0.01$),且这两复方用红芪与用黄芪之间差异无统计学意义。

表 1 同一复方用黄芪和红芪对小鼠 T 淋巴细胞增殖能力和 NK 细胞杀伤活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	加 ConA/A	不加 ConA/A	SI	NK 细胞杀伤活性/%
对照	-	0.413 ± 0.033	0.328 ± 0.038	1.267 ± 0.070	23.023 ± 2.015
模型	-	0.180 ± 0.016 ²⁾	0.168 ± 0.015 ²⁾	1.081 ± 0.117 ²⁾	8.019 ± 1.067 ²⁾
含黄芪益气养血汤	6	0.393 ± 0.024 ⁴⁾	0.319 ± 0.026 ⁴⁾	1.230 ± 0.047 ⁴⁾	21.243 ± 1.344 ⁴⁾
含红芪益气养血汤	6	0.425 ± 0.022 ^{4,5)}	0.326 ± 0.017 ⁴⁾	1.308 ± 0.035 ^{4,5)}	22.171 ± 1.818 ⁴⁾
含黄芪补中益气汤	4	0.405 ± 0.032 ⁴⁾	0.323 ± 0.034 ⁴⁾	1.254 ± 0.057 ⁴⁾	23.181 ± 2.271 ⁴⁾
含红芪补中益气汤	4	0.435 ± 0.025 ^{4,5)}	0.328 ± 0.024 ⁴⁾	1.329 ± 0.069 ^{4,5)}	22.900 ± 2.206 ⁴⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与同一方含黄芪组比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 同一复方用黄芪和红芪对小鼠血清溶血素,IL-1,IL-4 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血清溶血素/A	IL-1 /ng·L ⁻¹	IL-4/ng·L ⁻¹
对照	-	0.340 ± 0.524	129.69 ± 14.50	46.33 ± 5.94
模型	-	0.189 ± 0.029 ²⁾	78.73 ± 7.86 ²⁾	25.33 ± 2.25 ²⁾
含黄芪益气养血汤	6	0.269 ± 0.029 ⁴⁾	119.53 ± 9.46 ⁴⁾	40.88 ± 3.20 ⁴⁾
含红芪益气养血汤	6	0.286 ± 0.037 ⁴⁾	123.34 ± 10.49 ⁴⁾	41.54 ± 3.70 ⁴⁾
含黄芪补中益气汤	4	0.292 ± 0.026 ⁴⁾	125.24 ± 13.20 ⁴⁾	41.35 ± 2.40 ⁴⁾
含红芪补中益气汤	4	0.301 ± 0.036 ⁴⁾	134.88 ± 11.22 ⁴⁾	42.62 ± 2.69 ⁴⁾

4 讨论

T 淋巴细胞产生的免疫应答是细胞免疫,它可以与靶细胞特异性结合,直接杀伤靶细胞,另一方面它可以直接释放淋巴因子,最终使免疫效应扩大和增强,故淋巴细胞的增殖能力的强弱,可以反映机体细胞免疫功能的高低;血清溶血素测定不仅反映抗体形成的数量,也提示合成抗体的能力,是检测体液免疫功能的重要指标;NK 细胞是先天免疫中一类十分重要的淋巴细胞,通过其细胞毒活性和产生淋巴因子,在机体抗感染、抗肿瘤、免疫调节等方面发挥重要的免疫功能,IL-1 由多种细胞合成和分泌,能促进 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增殖分化,增强 NK 细胞的杀伤活性,也可以诱导其他多种细胞因子的分泌;IL-4 主要由 CD4 + T 细胞产生,主要作用于 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞、NK 细胞等 4 种靶细胞,具有重要的免疫调节作用。本实验选用这 5 个指标基本可以反映出整个机体的免疫功能的状况及药物对其的影响。

本实验通过检测以上免疫学指标对含红芪和含黄芪的益气养血汤、含红芪和含黄芪的补中益气汤进行了免疫功能评价,实验结果结果显示,益气养血汤与补中益气汤无论用红芪还是用黄芪以上免疫指标均明显提高,且以上升高的各组值与正常对照组比较无明显统计学差异,说明这两方无论用黄芪还是用红芪均可以使免疫抑制小鼠免疫功能恢复至正常水平。在临床应用时均可以用来提高免疫力。但是考虑到益气养血汤侧重于益气养血,补中益气汤侧重于益气健脾,所以即便两方对免疫抑制小鼠的免疫指标的影响作用相似,无明显差异,我们也不能就此肯定在临床应用中两方可以互用,在具体运用时还是要注意把西医的辨病与中医的辨证相结合。

本研究结果也显示,在益气养血汤和补中益气汤两复方中分别运用红、黄芪对比研究时,在 T 淋巴细胞增殖方面两复方用红芪均比用黄芪作用更为显著($P < 0.05$),而在其余指标上两方无论用红芪还

是用黄芪均无明显统计学差异。对单药红、黄芪对比研究发现二者在 T 淋巴细胞的增殖方面无明显差异性^[7-8],所以对于在同一复方中运用红、黄芪引起的差异,考虑可能为红、黄芪与复方中药物共同作用所引起的,具体机制还在进一步研究之中。总的来说,在补中益气汤和益气养血汤中用红芪来代替黄芪是完全可行的。红芪在复方中的应用不仅使整个复方抗肿瘤免疫作用增强,另一方面也为黄芪增加了药源,为开发利用甘肃红芪资源提供了科学依据。但是对于在其他复方中能否用红芪代替黄芪还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Liu Jing, Hu Xuguang, Yang Quan, et al. Comparison of the immunoregulatory function of different constituents in Radix Astragali and Radix Hedysari [J]. J Biomed Biotechnol, 2010, Article ID 479426.
- [2] Song Qing-hua, Takao kobayashi, Xiu Li-mei, et al. Effects of Astragali root and Hedysari root on the murine B and T cell differentiation[J]. J Ethnopharmacol, 2000, 73:111.
- [3] 黄继汉,黄晓晖. 药理试验中动物间与动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069.
- [4] 徐叔云,卞如濂,孙修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1462.
- [5] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991:157.
- [6] 雷林生,孙莉莎,杨淑琴. 有限稀释微量溶血法测定小鼠血清溶血素的活性[J]. 中国药理学通报,1999,15(3):274.
- [7] 毛小娟,王军志. 红芪多糖和黄芪多糖的免疫调节作用[J]. 中国药理学通报,1989,5(4):307.
- [8] 毛小娟,王军志,王凤连. 黄芪和红芪的免疫药理研究进展[J]. 兰州医学院学报,1988,1(总第 43 期):67.

[责任编辑 聂淑琴]