

牛膝饮片及牛膝多糖对小鼠免疫抑制调节作用的研究

崔维^{1,2}, 吴国学^{1,3}, 张振凌^{1*}

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 河南中医学院第三附属医院, 郑州 450008;
3. 郑州人民医院, 郑州 450003)

[摘要] 目的: 研究牛膝饮片及其有效成分牛膝多糖对免疫功能的影响, 探讨二者作用的一致性。方法: 将昆明种小鼠分为空白对照组、模型组、牛膝饮片组、牛膝多糖组及香菇菌多糖阳性对照组, ip 环磷酰胺 3 d 造成小鼠免疫抑制模型, 同时分别 ig 生理盐水及相应药物 7 d 后测定牛膝饮片、牛膝多糖对小鼠胸腺、脾脏质量、吞噬百分率、吞噬指数、溶血素、溶血斑以及淋巴细胞转化率的影响。结果: 牛膝饮片、牛膝多糖均能提高环磷酰胺造成免疫抑制模型小鼠胸腺、脾脏质量、吞噬百分率、吞噬指数, 促进溶血素、溶血斑形成, 提高淋巴细胞转化率; 与模型组相比, 两者均能提高免疫抑制小鼠各免疫指数, 且差异显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 在本实验用药剂量下 (牛膝饮片 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 牛膝多糖 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 2 者作用强度相当。结论: 牛膝多糖是牛膝中增强免疫的主要有效成分。

[关键词] 牛膝; 牛膝多糖; 免疫

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0141-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110622.1303.002 **[网络出版时间]** 2011-06-22 13:03

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110622.1303.002.html>

Effects of Achyranthis Bidentatae Radix and Achyranthes Bidentata Polysaccharides on Enhancing Immune Function

CUI Wei^{1,2}, WU Guo-xue^{1,3}, ZHANG Zhen-ling^{1*}

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
2. The Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
3. People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Achyranthis Bidentatae Radix and achyranthis bidentatae polysaccharides (ABPS) on the mice's immune function, and investigate the consistency of both effects. **Method:** Kunming mice were divided into 5 groups: blank control group, immunosuppression model group, decoction group of Achyranthis Bidentatae Radix, ABPS group and mushroom polysaccharides group. The immunosuppression model of mouse was established with injecting cyclophosphamide abdominally. The effects of the decoction of Achyranthes Bidentatae Radix and ABPS on thymus weight, spleen weight, percentage of phagocytosis, phagocytic index, hemolysin, hemolysis of plaque and lymphocyte transformation rate were compared. **Result:** The decoction of Achyranthes Bidentatae Radix and ABPS both could improve model mice spleen weight, phagocytic percentage and phagocytic index, promote the formation of hemolysin and hemolytic plaque, and increase the rate of lymphocyte transformation. Compared with model group, both of them could improve immune indexes of the immunosuppressed mouse, and there was significant difference ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). With the dosage in this study, the effect of

[收稿日期] 20110122(003)

[基金项目] 国家十一五科技支撑计划项目(2006BAI09B06-07)

[第一作者] 崔维, 副主任医师, 从事内科临床教学及研究, E-mail: cuiweigood2010@163.com

[通讯作者] * 张振凌, 教授, 从事中药炮制学教学与研究, Tel: 0371-65680970, E-mail: zhangz16758@163.com

the decoction of herbal pieces at $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ was equal to that of ABPS at $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for improving immune function.

Conclusion: ABPS is the main effective composition of *Achyranthes Bidentata Radix* for reinforcing immune function.

[**Key words**] *Achyranthis Bidentatae Radix*; *achyranthis bidentatae polysaccharides*; immunity

中药牛膝是临床常用中药,所含化学成分比较复杂,不仅含有皂苷类、植物甾酮类、黄酮类等成分,而且还富含多糖^[1]。近年的研究发现中药多糖具有广泛的生物活性,文献报道多糖具有抗肿瘤、抗氧化、抗糖尿病、抗病毒、抗辐射、调节性功能、调血脂等药理作用^[2]。牛膝具补肝肾,强筋骨,逐瘀通经,引血下行之功效,但是否具有提高免疫功能及其有效成分牛膝多糖对小鼠免疫功能的影响是否一致,尚未有研究报道。本文通过用环磷酰胺造成小鼠免疫抑制模型,研究牛膝饮片、牛膝多糖对免疫功能的影响。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠 150 只,雌性,体重(18 ± 2) g,普通级,购于郑州大学医学院实验动物中心,许可证号 SCXK(豫)2005-0001。

1.2 仪器 BI-2000 医学图像分析系统(成都泰盟科技公司);TDL-40B 型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);DY89-1 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);UV-2201 紫外-可见分光光度计(日本岛津)等。

1.3 药品及试剂 牛膝药材购于亳州药材市场,经河南中医学院生药学教研室董诚明教授鉴定为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bi. 的干燥根。牛膝饮片为实验室参照药典切制工艺自制样品;环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX 江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 08110921);香菇菌多糖片(湖北广仁药业有限公司,批号 080702);植物血凝素(上海伊华医学科技有限公司,批号 20085601);瑞氏染液(四川省迈克科技有限公司,批号 0908033);柠檬酸钠(天津化学试剂三厂,批号 20020228)等。

1.4 牛膝水煎液及阳性对照溶液的制备 取牛膝饮片 200 g,水煎 3 次,加水量分别为 10,8,6 倍量,每次 40 min,煎出液合并浓缩成每 1 mL 含 1 g 饮片的浓缩液;取香菇多糖片 0.2613 g,用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液制成 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混悬液。储存冰箱备用。

1.5 牛膝多糖的制备 取牛膝饮片粉末 100 g,水

提取 3 次,加水量分别为 10,8,6 倍量,每次提取 5 h,离心,合并 3 次上清液,减压浓缩,加入乙醇调至含醇量为 80%,搅拌均匀,静置 12 h,离心,收集沉淀,用适量蒸馏水使其溶解,加入 15% 三氯乙酸适量除去蛋白,上清液中再次加入乙醇调至乙醇含量为 80%,摇匀,静置 12 h,离心,收集沉淀,减压干燥即得牛膝粗多糖。取粗多糖 5.0011 g,用 200 mL 蒸馏水溶解,配制成 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的多糖溶液,储存冰箱备用。

2 方法

2.1 腹腔巨噬细胞吞噬功能测定 小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,分别为空白对照组,模型组,牛膝饮片组,牛膝多糖组,香菇菌多糖阳性对照组。除空白对照组外,其余各组小鼠 ip CTX $0.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,每日 1 次,连续 3 d。同时 ig 给药,空白对照组和模型组给予生理盐水,香菇菌多糖阳性对照组给予香菇菌多糖片混悬液 $0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,牛膝饮片组给予牛膝饮片水煎液 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (1 g 生药浓缩成 1 mL),牛膝多糖组给予牛膝多糖水溶液 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天给药 1 次,连续 7 d。第 7 天早上每鼠 ip 5% 鸡红细胞生理盐水混悬液 0.5 mL,于给鸡红细胞后 4 h,末次 ig 后 2 h 处死小鼠,按文献[3-4]方法取结果并计算吞噬率和吞噬指数。

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

吞噬指数 = 100 个巨噬细胞所吞噬的鸡红细胞的总数 / 100

2.2 胸腺和脾脏质量测定^[5] 方法 2.1 中的各组小鼠取出胸腺和脾脏并称重,计算胸腺、脾脏指数:

脾脏(胸腺)指数 = 脾脏(胸腺)质量(mg) / 体重(g)

2.3 小鼠溶血素形成测定 小鼠分组、造模及给药同 2.1。于给药第 1 天,每鼠 ip 5% 鸡红细胞生理盐水混悬液 0.2 mL/只(进行免疫),于最后 1 次给药后 2 h,小鼠眼眶取血离心,取血清。按文献[4-6]方法取结果,测定各组溶血素形成情况。

2.4 溶血斑形成测定 方法 2.3 中的各组小鼠眼球取完血后脱颈椎处死,解剖小鼠,取出脾脏,将同一组小鼠脾脏随机两两放在一起,用匀浆器匀浆,并

调整脾细胞混悬液中脾细胞数为 5×10^6 个/mL。按文献[4-6]方法取结果,测各组溶血空斑形成情况。

2.5 淋巴细胞转化测定 小鼠分组、造模及给药同

2.1。于给药前 3 d,每天每鼠均肌注植物血凝素(phytohaemagglutinin, PHA) $0.008 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,于最后 1 次给药后 2 h,小鼠剪尾取血,推片,瑞氏染液染色,油镜观察外周血淋巴细胞的转化率^[4-6]。

2.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 对数据进行方差分析,采用 *t* 检验进行组间比较。

表 1 样品对环磷酰胺免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及胸腺、脾脏质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 吞噬率/% | 吞噬指数 | 胸腺指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ | 脾脏指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ |
|-------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 正常对照 | - | $57.18 \pm 16.02^{(4)}$ | $0.59 \pm 0.16^{(4)}$ | $1.39 \pm 0.53^{(4)}$ | $4.90 \pm 2.30^{(4)}$ |
| 模型 | 0.08 | $35.82 \pm 10.00^{(2)}$ | $0.39 \pm 0.10^{(2)}$ | $0.78 \pm 0.50^{(2)}$ | $2.94 \pm 1.05^{(2)}$ |
| 香菇菌多糖 | 0.12 | $75.25 \pm 6.61^{(2,4)}$ | $0.83 \pm 0.08^{(2,4)}$ | 1.02 ± 0.27 | 3.93 ± 1.18 |
| 牛膝饮片 | 20 | $66.00 \pm 3.24^{(1,4)}$ | $0.73 \pm 0.04^{(2,4)}$ | 1.09 ± 0.31 | $5.11 \pm 1.83^{(4)}$ |
| 牛膝多糖 | 0.5 | $71.88 \pm 4.58^{(2,4)}$ | $0.84 \pm 0.09^{(2,4)}$ | $1.25 \pm 0.34^{(3)}$ | $4.65 \pm 1.05^{(3)}$ |

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$ ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对环磷酰胺致免疫抑制小鼠溶血素、溶血斑形成及淋巴细胞转化的影响 结果表明,模型组较生理盐水组及牛膝饮片组、牛膝多糖组在促进溶血素、

$P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对环磷酰胺免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及胸腺、脾脏质量的影响 结果表明模型组吞噬率、吞噬指数及胸腺、脾脏指数均明显降低,证明造模成功;与模型组比牛膝饮片组、牛膝多糖组均可明显提高免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率、吞噬指数及脾脏指数($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),牛膝多糖组的胸腺指数变化显著($P < 0.05$)。见表 1。

表 2 样品对环磷酰胺免疫抑制小鼠溶血素、溶血斑形成及淋巴细胞转化的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 溶血素形成/A | 溶血斑形成/A | 淋巴细胞转化率/% |
|-------|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常对照 | - | $0.110 \pm 0.035^{(4)}$ | $0.249 \pm 0.042^{(4)}$ | $74.73 \pm 15.10^{(4)}$ |
| 模型 | 0.08 | $0.027 \pm 0.036^{(2)}$ | $0.125 \pm 0.082^{(2)}$ | $37.30 \pm 12.28^{(2)}$ |
| 香菇菌多糖 | 0.12 | $0.086 \pm 0.022^{(4)}$ | $0.258 \pm 0.045^{(4)}$ | $79.18 \pm 13.75^{(4)}$ |
| 牛膝饮片 | 20 | $0.084 \pm 0.015^{(4)}$ | $0.211 \pm 0.019^{(3)}$ | $76.91 \pm 13.42^{(4)}$ |
| 牛膝多糖 | 0.5 | $0.077 \pm 0.015^{(1,4)}$ | $0.267 \pm 0.042^{(4)}$ | $89.42 \pm 4.06^{(4)}$ |

溶血斑形成及淋巴细胞转化率方面作用差异显著($P < 0.05$ 或 0.01),说明造模成功,且牛膝饮片、牛膝多糖组在改善这 3 个指标上作用显著,见表 2。

4 讨论

本实验的结果表明,牛膝多糖、牛膝饮片在增强小鼠免疫的作用上,部分指标牛膝多糖要优于牛膝饮片,而部分指标恰恰相反,这可能是因为本实验所选取牛膝饮片和牛膝多糖的用药剂量有关。文献研究表明不同商品等级规格的牛膝多糖含量不同,含量最高的牛膝头肥为 26.63%,而含量最低的杂条也在 9.27%^[7];本研究小鼠牛膝多糖的用量为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,按牛膝饮片所含的多糖最低量 9.27% 算,折合牛膝饮片的用量为 $5.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,而本实验牛膝饮片的用药剂量为 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,由此可以看出较低用量的牛膝多糖却表现出较强的增强免疫的作用,牛膝多糖在提高免疫方面有着较强的活性。

在提高免疫功能上牛膝饮片虽然没有相当量的牛膝多糖作用强,但同样可以起到提高免疫抑制小鼠免疫功能的作用,因而在提高免疫功能方面临床采用传统的饮片也可以起到相同的作用。

[参考文献]

- [1] 孟大利,李铤. 中药牛膝化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11(2): 120.
- [2] 刁波,唐瑛,王晓琨,等. 中药多糖研究新进展[J]. 中国医药导报, 2008, 5(3): 21.
- [3] 李仪奎. 中药药理研究方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 153, 163.
- [4] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 750, 1010.
- [5] 高天芸,孙玉芹,周娟,等. 黄芩苷对化疗药物所致小鼠免疫低下的调节作用[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(5): 327.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 946.
- [7] 修佳,陈红,张卫华,等. 不同商品等级规格牛膝多糖含量的比较[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(5): 426.

[责任编辑 聂淑琴]