

两种工艺制备的参芪扶正注射液对荷 S₁₈₀ 小鼠细胞免疫功能的影响

丁治国¹, 史晓光¹, 李兰芳², 汪唐顺¹, 陈振宙¹, 杨庆², 张建松¹,
叶广铎¹, 崔巍¹, 刘福鼎¹, 李乃卿^{1*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 比较两种工艺制备的参芪扶正注射液对荷 S₁₈₀ 小鼠细胞免疫功能的影响。方法: 将 42 只荷瘤小鼠随机分成 5 组, 分别为对照组、现工艺制备的参芪扶正注射液高剂量组(8 g•kg⁻¹) 和临床等效剂量组(4 g•kg⁻¹)、原工艺制备的参芪扶正注射液高剂量组(8 g•kg⁻¹) 和临床等效剂量组(4 g•kg⁻¹)。腹腔注射给药, 1 次/d, 实验组给予不同剂量的相应参芪扶正注射液, 对照组给予生理盐水。7 d 后从小鼠眼眶后静脉丛取血进行全血细胞检测及 T 淋巴细胞亚群检测。结果: 4 个实验组白细胞和淋巴细胞总数皆高于对照组, 其中现工艺 4 g•kg⁻¹ 组与对照组的差异有统计学意义(P < 0.01); 4 g•kg⁻¹ 剂量组中, 现工艺淋巴细胞总数显著高于原工艺(P < 0.05); 现工艺 4 g•kg⁻¹ 组的 CD4⁺ 淋巴细胞比例显著高于对照组(P < 0.05); 同一剂量两种工艺制剂之间 T 淋巴细胞亚群比例无显著差异。结论: 在临床等效剂量上, 现工艺制备的参芪扶正注射液可提高荷 S₁₈₀ 小鼠白细胞、淋巴细胞及 CD4⁺ T 细胞的水平, 效果优于或等于原工艺。

[关键词] 参芪扶正注射液; 制备工艺; S₁₈₀ 细胞; 细胞免疫

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)12-0065-03

Effects of Shenqi Fuzheng Injections Prepared by Two Different Crafts on the Cellular Immune Function in S₁₈₀-bearing Mice

DING Zhi-guo¹, SHI Xiao-guang¹, LI Lanfang², WANG Tang-shun¹, CHEN Zhen-zhou¹, YANG Qing²,
ZHANG Jian-song¹, YE Guang-duo¹, CUI Wei¹, LIU Fu-ding¹, LI Nai-qing^{1*}

(1. Dong Zhi Men Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To compare effects of Shenqi Fuzheng Injections prepared by two different crafts on the cellular immune function in S₁₈₀-bearing Mice. **Methods:** 42 tumor-bearing mice randomly divided into five groups: the model group, the high dose group (8 g•kg⁻¹) and the clinical equivalent dose group(4 g•kg⁻¹) of Shenqi Fuzheng Injection on current craft, the high dose group (8 g•kg⁻¹) and the clinical equivalent dose group(4 g•kg⁻¹) of Shenqi Fuzheng injection on previous craft. The model group was given physiological saline by intraperitoneal injection once a day, while the other groups was given different Shenqi Fuzheng Injections in the same way. 7 days later, blood sample was taken from the vena orbitalis posterior of the mice and blood count and the subpopulation of T lymphocyte were determined. **Results:** The counts of the white blood cell and lymphocyte in four Shenqi Fuzheng Injection groups were higher than the model group, and the difference between the 4 g•kg⁻¹ group of Shenqi Fuzheng Injection on current craft

[收稿日期] 2008-07-31

[基金项目] 教育部产学研综合项目(2006D90504018)

[通讯作者] * 李乃卿 Tel: (010) 84013403, E-mail: 13301119560@m165.com

and the model group was very significant ($P < 0.01$), and in the $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ groups, the count of lymphocyte in the current craft group was significantly higher than the previous one ($P < 0.05$). The ratio of CD4^+ T lymphocyte in the $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ group on current craft was significantly higher than the model one ($P < 0.05$). There was no significant difference between the ratio of the subpopulation of T lymphocyte on the current craft and the previous one at the same dose. **Conclusion:** In clinical equivalent dose ($4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), the Shenqi Fuzheng Injection prepared by the current craft could enhance the counts of the white blood cell and lymphocyte and the ratio of CD4^+ T lymphocyte, and the effectiveness was better than or equal to the previous craft.

[**Key words**] Shenqi Fuzheng Injection; crafts; S_{180} cells; cellular immune function

目前,参芪扶正注射液的生产采用党参和黄芪分别提取的工艺(简称现工艺),而原生产工艺则采用党参和黄芪混合提取的方法(简称原工艺),既往的药效学研究完全基于原生产工艺制备的药物,工艺改进之后,我们研究^[1-2]发现:现工艺制备的参芪扶正注射液可以上调肿瘤细胞的凋亡基因促进肿瘤凋亡而发挥抗肿瘤作用。我们通过建立荷瘤小鼠模型进行对照研究,比较两种工艺制备的参芪扶正注射液对荷瘤小鼠细胞免疫功能的影响,判断两者的差异。

1 材料

1.1 动物 BALB/C 小鼠 42 只,SPF 级,雄性,体重 18~20 g,由中国医学科学院实验动物研究所提供。合格证:SCXK(京)2004-0001。实验动物使用许可证:SYXK(京)2004-0009。动物饲料为⁶⁰Co 灭菌的 SPF 级大小鼠维持饲料,由中国医学科学院实验动物研究所提供。

1.2 瘤株 S_{180} 细胞株,中国中医科学院中药研究所提供。

1.3 主要药物 参芪扶正注射液(参、芪单独提取工艺,简称现工艺),药物来源:丽珠集团利民制药厂(批号:071001),生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$;参芪扶正注射液(参、芪混合提取工艺,简称原工艺),药物来源:丽珠集团利民制药厂提供,生产批号 071005,生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.4 主要试剂 CD 3e(FITC) Lot: 76222; CD4(PE) Lot: 60615; CD 8a(PE) Lot: 92371,单克隆抗体均购自美国 BD 公司。

1.5 仪器及软件 美国 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪, BECKMAN COULTER AC-T-DIFF-2 全血细胞分析仪, The SAS System for Windows v6.12 软件, CellQuest 软件

2 方法

2.1 肿瘤细胞悬液的制备 取生长良好的 S_{180} 传代小鼠,无菌条件下抽取小鼠腹水,用生理盐水稀释, $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,重复 2 次,然后将细胞吹散至单个细胞,在显微镜下计数并将细胞调至 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 分组及给药 将 BALB/C 小鼠 42 只按体重随机共分为 5 组,分别为模型对照组(简称对照组),小鼠 10 只;现工艺参芪扶正注射液高剂量组(生药 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,相当于临床人用药量 2 倍),小鼠 8 只,低剂量组(生药 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组,相当于临床人用药量),小鼠 8 只;原工艺参芪扶正注射液高剂量组(生药 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),小鼠 8 只,低剂量组(生药 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组),小鼠 8 只。对照组给予无菌生理盐水,按照 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ip 给药;现工艺参芪扶正注射液高、低剂量组:各组分别取现工艺参芪扶正注射液 4 mL, 2 mL,各加无菌生理盐水稀释至 10 mL,混匀,按照 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ip 给药;原工艺参芪扶正注射液高、低剂量组:使用原工艺参芪扶正注射液,配制及给药方法与现工艺相同,连续 ip 7 d。

2.3 荷瘤与样品收集 于第 3 次注射后 12 h 右腋部常规消毒,皮下接种 S_{180} 瘤细胞液 0.2 mL/只,末次给药后 24 h,将小鼠称重,从小鼠眼眶后静脉丛取血,各收集血液 100 μL 和 200 μL 至 2 只肝素处理过的 EP 管中,分别进行全血细胞检测及 T 淋巴细胞亚群检测。

2.4 全血细胞检测 取血后用 BECKMAN COULTER AC-T-DIFF-2 全血细胞分析仪进行常规计数。

2.5 T 淋巴细胞亚群检测 将 1 个 200 μL 血液标本平分 2 份,按照 BD 公司的产品说明书,将 1test 量抗体 CD 3e(FITC), CD4(PE) 加至一份标本试管底部,同样将 1test 量抗体 CD 3e(FITC), CD 8a(PE) 加至另一份标本试管底部,摇匀,室温下避光 30 min,

加入 2 mL 稀释 10 倍的红细胞裂解液, 室温静置 15 min, 1 000 r·min⁻¹, 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗涤 2 次, 加入 300 μL PBS, 美国 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪进行检测, CellQuest 软件获取和分析数据。

2.6 统计学方法 各组均数用($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 The SAS System for Windows v6.12 进行统计处理, 多组均数比较用方差分析及 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 对荷瘤小鼠白细胞总数和淋巴细胞总数的影响 4 个实验组白细胞和淋巴细胞总数皆高于对照组, 其中现工艺 4 g·kg⁻¹ 组和原工艺两个剂量组的白细胞总数差异有统计学意义($P < 0.01 \sim 0.05$); 现工艺 4 g·kg⁻¹ 组和原工艺 8 g·kg⁻¹ 组的淋巴细胞总数与对照组差异有统计学意义($P < 0.01 \sim 0.05$); 4 g·kg⁻¹ 剂量组中, 现工艺淋巴细胞总数显著高于原工艺($P < 0.05$); 现工艺两个剂量组中, 4 g·kg⁻¹ 剂量组的白细胞和淋巴细胞总数皆高于 8 g·kg⁻¹ 剂量组。见表 1。

表 1 两种工艺制备的参芪扶正注射液对荷瘤小鼠白细胞总数和淋巴细胞总数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	<i>n</i>	白细胞总数 (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	淋巴细胞总数 (×10 ⁹ ·L ⁻¹)
对照组	—	10	8.30 ± 1.82	4.84 ± 1.43
现工艺参芪扶正	8	8	9.89 ± 3.24	5.09 ± 2.24 ³⁾
	4	8	13.08 ± 3.17 ^{2, 4)}	7.31 ± 2.09 ^{2, 3, 4)}
原工艺参芪扶正	8	8	12.50 ± 2.38 ²⁾	6.91 ± 1.17 ¹⁾
	4	8	11.41 ± 2.66 ¹⁾	5.25 ± 1.47

注: 与对照组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 相同剂量不同工艺组比较³⁾ $P < 0.05$; 相同工艺不同组比较⁴⁾ $P < 0.05$

3.2 对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响 4 个实验组的 CD4⁺ 淋巴细胞比例皆高于对照组, 其中现工艺 4 g·kg⁻¹ 组差异有统计学意义($P < 0.05$); 4 个实验组的 CD8⁺ 淋巴细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 与对照组差异不显著。见表 2。

表 2 两种工艺制备的参芪扶正注射液对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	<i>n</i>	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ / CD8 ⁺
对照组	—	10	40.92 ± 5.06	9.41 ± 0.93	4.39 ± 0.68
现工艺参芪扶正	8	8	46.31 ± 4.32	9.40 ± 1.11	5.02 ± 1.00
	4	8	47.41 ± 3.34 ¹⁾	10.53 ± 2.07	5.42 ± 2.50
原工艺参芪扶正	8	8	42.55 ± 7.08	9.58 ± 2.22	4.57 ± 0.98
	4	8	43.59 ± 7.67	10.28 ± 2.51	4.35 ± 0.75

注: 与对照组比较 ¹⁾ $P < 0.01$

4 讨论

参芪扶正注射液以传统的扶正补气中药党参、黄芪为原料制成。《本经正义》云:“党参力能补脾养肾, 润肺生津, 健运中气”。黄芪也为补气要药, 临床研究^[3]证实: 参芪扶正注射液具有显著的益气扶正, 提高免疫力的作用。本研究通过构建荷 S₁₈₀ 小鼠模型进行对比研究, 判别两种工艺制备的参芪扶正注射液在细胞免疫方面的差异。

T 淋巴细胞在抗肿瘤免疫中起着重要的作用^[3], 其中 CD4⁺ 淋巴细胞具有辅助和诱导作用, 在抗肿瘤过程中起着积极作用, CD8⁺ 淋巴细胞具有负调节效应, 并能抑制 B 细胞产生抗体。CD4⁺/CD8⁺ 的比值的恒定维持着细胞免疫反应的平衡。我们研究发现: 现工艺制备的参芪扶正注射液临床等效剂量(4 g·kg⁻¹) 可显著提升荷瘤小鼠的白细胞、淋巴细胞总数及 CD4⁺ 淋巴细胞比例。这与既往的临床报道^[4]的结果相符。说明新工艺制备的参芪扶正注射液同样具有提高免疫力的功效。同时我们发现在淋巴细胞总数方面, 现工艺制备的药效优于原工艺, 在白细胞总数方面两种工艺制剂无明显差异, 这说明现工艺制备的药物在提高荷瘤小鼠的细胞免疫方面不劣于原工艺。

总之, 我们研究认为: 在临床等效剂量上, 现工艺制备的参芪扶正注射液可提高荷 S₁₈₀ 小鼠白细胞、淋巴细胞及 CD4⁺ T 细胞的水平, 效果优于或等于原工艺。

[参考文献]

- [1] 丁治国, 李乃卿, 陶德胜, 等. 参芪扶正注射液对小鼠肝转移癌组织基因表达谱的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 15(2): 135-138.
- [2] 丁治国, 史晓光, 李兰芳, 等. 参芪扶正注射液对荷 S₁₈₀ 小鼠肿瘤细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(10): 35-37.
- [3] 陶德胜, 曹 晖, 李乃卿. 数字化中药探索[M]. 香港: 世界医药出版社, 2007. 187.