

艾克清胶囊对荷瘤小鼠免疫功能的影响

王春雷*, 吕越, 李宗铎
(河南中医学院, 河南 郑州 450008)

[摘要] 目的: 观察艾克清胶囊对荷瘤小鼠免疫功能的作用。方法: 采用炭粒廓清法, T 淋巴细胞酯酶染色率法, 绵羊红细胞致小鼠溶血素抗体生成法, 验证艾克清胶囊对免疫功能的作用。结果: 艾克清胶囊对荷瘤小鼠的吞噬指数 K 及校正吞噬指数 α 均有明显的增强作用, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 能够提高荷瘤小鼠 T 淋巴细胞酯酶的染色率, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05 \sim 0.01$); 可提高荷瘤小鼠溶血素抗体生成, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。结论: 艾克清胶囊可提高荷瘤小鼠的免疫功能。

[关键词] 艾克清; 免疫功能; 荷瘤小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)11-0058-03

艾克清是临床治疗肺癌的经验方, 由连钱草、人参、黄芪、白术、茯苓、莪术等组成, 具有扶正祛邪, 散瘀消积的功能, 主治肺癌气虚夹瘀证。我们的前期研究表明, 艾克清具有较好的体内抗肿瘤作用。口服 $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 艾克清对小鼠 Lewis 肺癌、小鼠 S_{180} 肉瘤、小鼠 HepA 肝癌、小鼠 Esc 艾氏癌抑瘤率均达到 40% 以上^[1]。

本实验观察了艾克清对荷瘤小鼠网状内皮系统 (RES) 吞噬功能、对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞酯酶染色率, 以及对绵羊红细胞致小鼠溶血素抗体生成的影响。

1 材料

1.1 瘤株 小鼠肺癌 (Lewis), 由中国医学科学院实验动物中心引入。

1.2 药物 艾克清胶囊内容物 (由河南中医学院制剂研究室提供, 批号 20041218), 用 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 配置成混悬液 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (相当于生药 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 香菇多糖 (湖北迪晨药业有限公司, 批号 20030101)。

1.3 动物 昆明种小鼠, 体重 (20 ± 1) g, 雌雄各半, 由河南省实验动物中心提供, 合格证号: 医动字第 410115 号。

1.4 仪器 752-N 型紫外可见分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司。

2 方法

2.1 荷瘤和分组 无菌条件下, 抽取小鼠肺癌 Lewis 细胞接种后 9 d 生长状况良好的腹水为瘤源, 1:3 加入生理盐水, 反复冲打振摇以充分混匀, 于显微镜下计数, 并用生理盐水稀释调整至所需细胞浓度 $8.6 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 充分混匀, 3°C 储存备用。取昆明种小鼠 150 只, 每只小鼠腋下注入小鼠肺癌 Lewis 细胞悬液 0.2 mL ($8.6 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$), 分别用于以下 3 项各自独立的实验。每项实验选用 50 只小鼠, 随机分为 5 组: 艾克清 $1.0, 2.0, 4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于临床用量的 8.7, 17.4 和 34.8 倍) ig; 香菇多糖组: $0.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig; 荷瘤对照组: ig 同体积荷瘤生理盐水。

2.2 艾克清对荷瘤小鼠网状内皮系统吞噬功能的影响 艾克清每天给药 1 次, 连续 10 d, 末次给药后 1h, 立即尾 iv 1% 明胶溶液稀释的 25% 印度墨汁 $0.1 \text{ mL} \cdot 10 \text{ g}^{-1}$, 于注射后 1, 10 min 分别眼眶采血 20 μL , 立即吹入盛有 0.1% Na_2CO_3 液 2 mL 试管中。另取正常小鼠血液 20 μL 溶于 0.1% Na_2CO_3 溶液中校正, 用 752-N 型分光光度计在 675 nm 处测定其光密度。并于第 2 次采血后, 脱颈椎将小鼠处死, 称体重, 解剖取肝、脾称重, 计算出单位时间内炭粒廓清率即吞噬指数 K 及吞噬系数 α 。

$$\text{吞噬指数 } K = (\log OD_1 - \log OD_2) / (t_2 - t_1)$$

$$\text{校正吞噬指数 } \alpha = W / WLS \cdot \sqrt{K}$$

[收稿日期] 2008-05-06

[基金项目] 河南省科技攻关项目 (0623030900)

[通讯作者] * 王春雷, Tel: (0371) 65680082; E-mail: wcl0818@hactcm.edu.cn

(OD_1 、 OD_2 为 1 和 10 min 光密度, $t_1 = 1$, $t_2 = 10$; W 为体重, WLS 为肝脾合重)。

2.3 艾克清对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞酯酶染色率的影响 艾克清每天给药 1 次, 连续 10 d, 末次给药后 1h, 眼眶静脉丛取血, 迅速推成均匀的血涂片, 自然干燥; 解剖各鼠, 取脾脏、胸腺分别称重。将血涂片浸入已预热 30 min 的孵育液中 37℃ 孵育 3 h, 并用自来水冲洗(3~ 5) min, 用滤纸吸干。然后将玻片置于 0.067 mol·L⁻¹ pH7.6 的 PBS 缓冲液 89 mL 中并缓滴入六偶氮副品红液 6 mL, 充分混匀后再滴 2% 醋酸萘钠溶液 2.5 mL, 边滴边摇, 用冰醋酸调 pH 至 6.4。再加 1% 孔雀绿溶液复染(5~ 10) s, 自来水冲洗, 滤纸轻轻吸拂, 自然干燥。在油镜下检查, 每片计数 100 个淋巴细胞, 若细胞胞浆内见到散在细小的红色颗粒即为阳性。

2.4 艾克清对绵羊红细胞致小鼠溶血素抗体生成的影响 艾克清每天给药 1 次, 连续 8 d。于第 2 次给药后, 每鼠 ip 绵羊红细胞(SRBC) 悬液 0.2 mL/只 (SRBC 约 $2 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行免疫。于免疫后 6 d, 眼眶取血, 分离血清, 用生理盐水稀释好的血清样品 1 mL(稀释 500 倍) 加入反应管内, 再加入 10% 0.5 mL 绵羊红细胞(约 1×10^9 个), 置冰浴中, 并于每管中加入 1 mL 生理盐水 1:10 稀释过的豚鼠血清, 随即移置 37℃ 恒温水浴中保温 10 min, 孵毕放冰浴中终止反应, $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液; 同时取 SRBC 稀释液作空白对照管, 于 540 nm 处分别测定每管吸光度值(OD), 按下式计算每个样品的半数溶血值(HC_{50})。

$$\text{样品 } HC_{50} = \frac{\text{样品 } OD \text{ 值}}{\text{羊红细胞半数溶血的 } OD \text{ 值}}$$

2.5 统计学分析 数据均以($\bar{x} \pm s$) 表示; 采用 SPSS 11.0 软件完成统计学处理。两组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 艾克清对荷瘤小鼠网状内皮系统吞噬功能的影响 见表 1。

结果表明, 艾克清对荷瘤小鼠的吞噬指数 K 及校正吞噬指数 α 均有显著的增强作用, 与荷瘤对照组比较 $P < 0.05 \sim 0.01$ 。

3.2 艾克清对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞酯酶染色率的影响 见表 2。

结果表明, 艾克清能升高荷瘤小鼠 T 淋巴细胞

酯酶染色率, 且随着剂量的增加而升高, 与荷瘤对照组比较 $P < 0.05 \sim 0.01$ 。

3.3 艾克清对绵羊红细胞致小鼠溶血素抗体生成的影响 见表 3。

表 1 艾克清对荷瘤小鼠网状内皮系统吞噬功能的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	吞噬指数 K	校正吞噬 指数 α
荷瘤对照组	—	0.009 8 ± 0.000 6	3.24 ± 0.86
香菇多糖组	0.04	0.025 0 ± 0.003 7 ²⁾	5.59 ± 0.19 ²⁾
艾克清组	1.0	0.010 1 ± 0.008 8	4.78 ± 0.20 ¹⁾
	2.0	0.012 6 ± 0.001 1 ²⁾	5.65 ± 0.21 ²⁾
	4.0	0.027 6 ± 0.009 8 ²⁾	6.73 ± 0.24 ²⁾

注: 与荷瘤对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 艾克清对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞酯酶染色率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	100 个 T 淋巴细胞 酯酶染色的总数	酯酶染色率 (%)
荷瘤对照组	—	18.17 ± 0.93	18.17
香菇多糖组	0.04	37.83 ± 1.02 ²⁾	37.83
艾克清组	1.0	31.62 ± 2.03 ¹⁾	31.62
	2.0	35.55 ± 1.89 ²⁾	35.55
	4.0	41.61 ± 1.96 ²⁾	41.61

表 3 艾克清对 SRBC 致小鼠溶血素抗体生成的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	HC_{50}
荷瘤对照组	—	409.6 ± 15.3
香菇多糖组	0.04	615.7 ± 18.4 ²⁾
艾克清组	1.0	606.2 ± 13.1 ²⁾
	2.0	641.8 ± 13.2 ²⁾
	4.0	665.5 ± 12.9 ²⁾

结果表明, 艾克清可提高荷瘤小鼠的溶血素抗体生成, 与荷瘤对照组比较 $P < 0.01$ 。

4 讨论

艾克清中的单味中药多具有调节免疫功能的作用。人参内含的人参总多糖和皂苷能全面增强机体的免疫功能, 人参皂苷对多种动物均能增强网状内皮系统对碳粒、细菌、鸡红细胞等的吞噬廓清能力^[2-3]; 黄芪对辅助 T 细胞有明显的刺激作用, 使红细胞 C3b 受体活性增加, 免疫粘附功能增强^[4]; 白术可降低癌细胞的增殖率, 减低瘤组织的侵袭性, 提高机体抗肿瘤能力及对肿瘤细胞的细胞毒作用; 白茯苓的抗肿瘤作用显著, 其中的腺嘌呤和茯苓多糖是

抗肿瘤的有效成分;金钱草可抑制肿瘤的生长;女贞子能升高白细胞,明显提高T淋巴细胞功能,具有增强机体免疫功能的作用^[5];莪术具有抑杀癌细胞和增强机体免疫力的双重功效。

我们的研究表明,口服所设剂量的艾克清能显著升高荷瘤小鼠网状内皮系统吞噬指数 K 及校正吞噬指数 α . 升高T淋巴细胞酯酶染色率. 提高溶血素抗体生成,增强荷瘤小鼠的免疫功能。

[参考文献]

[1] 李宗铎,董玉秀,赵君玫,等. 连钱草、人参、黄芪等组

分的艾克清体内抗肿瘤作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(43): 145.

[2] 陶小军,龙静雯,贺建宇,等. 九节龙皂苷 I 的抗肿瘤作用和免疫调节作用[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(9): 1070.

[3] 金念祖,茅力,朱燕萍,等. 槐米提取物对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤细胞周期和 PCNA 表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 169.

[4] 宋怀宇,孙传歧. 黄芪对原发性肝癌病人免疫功能的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2000, 24(6): 459.

[5] 李阳,孙文基. 女贞子的药理作用研究[J]. 陕西中医学院学报, 2006, 29(5): 58.