

贞芪扶正分散片对荷瘤小鼠免疫功能的影响

景 明^{1*}, 蔺兴遥¹, 刘俊田², 苟 伟², 李西宽²

(1. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 西安交通大学医学院, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的: 观察贞芪扶正分散片对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用。方法: 用荷瘤的方法造成小鼠免疫功能低下, 观察贞芪扶正分散片对荷瘤免疫功能低下小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能、血清溶血素含量(HC₅₀法)和脾脏淋巴细胞转化(MIT法)的影响。结果: 贞芪扶正分散片可增强荷瘤小鼠吞噬细胞的吞噬功能, 提高荷瘤小鼠的血清特异性抗体水平及淋巴细胞增

[收稿日期] 2007-09-24

[通讯作者] * 景明, Tel: (0931) 8765459; E-mail: jm@gszy.edu.cn

殖指数,对小鼠的免疫器官发育无明显影响。**结论:**贞芪扶正分散片具有增强荷瘤小鼠免疫功能的作用。

[关键词] 贞芪扶正分散片;荷瘤;免疫调节

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)04-0066-03

贞芪扶正胶囊由黄芪、女贞子等药物组成,收载于中华人民共和国卫生部《药品标准》中药成方制剂第十七册,具有补气养阴之功效,临床用于久病虚损、气阴不足,配合手术、放疗、化疗。在临床应用中存在部分患者特别是鼻咽癌放疗、化疗患者服用困难的问题。本课题对贞芪扶正胶囊进行了二次开发,将制剂工艺、质量标准等重新进行研究,制成服用量较小、方便患者服用的分散片剂型。为了考察贞芪扶正分散片的药效作用,本实验进行了贞芪扶正分散片对荷瘤免疫抑制小鼠的免疫调节作用的观察。

1 实验材料

1.1 动物 ICR品系小白鼠,雌雄各半,体重(18~22)g,由西安交通大学医学院实验动物中心提供,合格证号:陕医动证字第08-004号。

1.2 药品与试剂 贞芪扶正分散片(FZP),每片0.3g,相当于生药6.25g,由甘肃中医学院科研实验中心提供,批号040801;贞芪扶正胶囊(FZN),每粒0.5g,相当于生药4.17g,由甘肃扶正药业科技股份有限公司提供,批号030703;RPMI1640培养液,MTT,Con A,Invitrogen公司产品;S₁₈₀肉瘤瘤株,购于陕西省中医药研究院实验动物中心。

1.3 实验仪器 DY-II酶标测定仪,上海华光光学仪器厂;DCCO-20二氧化碳培养箱,日本DICCO株式会社;T-500型电子天平,美国双杰兄弟有限公司;751型分光光度计,惠普上海分析仪器有限公司。

2 实验方法

2.1 模型制作 于无菌条件下抽取接种S₁₈₀肉瘤细胞8d的小鼠腹水,按1:4用无菌生理盐水稀释,然后无菌条件下每只小鼠右前肢腋窝皮下注射0.2mL,24h后模型成立。

2.2 分组及给药 正常对照组(小鼠不接种)和模型对照组分别灌胃等容积生理盐水;阳性对照组灌胃贞芪扶正胶囊17g生药/kg;贞芪扶正分散片小、中、大剂量组分别灌胃4.25,8.5,17g生药/kg。每组10只,雌雄各半。各组每天给药1次,0.02mL·g⁻¹,连续10d。

2.3 对小鼠胸腺指数和脾指数的影响 各组小鼠

给药10d后处死,摘除胸腺和脾脏,精确称取小鼠体重、胸腺重量及脾脏重量。

2.4 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响^[1,2] 各组小鼠于给药后第2天腹腔注射5%可溶性淀粉溶液每只0.5mL,第7天腹腔第二次注射5%可溶性淀粉溶液每只0.5mL。第10天各组小鼠腹腔注射普通肉汤每只2mL,轻揉腹部,10min后处死小鼠,剖开腹腔,吸取腹腔液0.1mL于洁净载物玻片,加1%鸡红细胞悬液0.1mL,充分混匀,置于湿盒内37℃水浴30min,用生理盐水漂洗3次,室温自然干燥。玻片瑞氏染色,光学显微镜下计数巨噬细胞中发生吞噬的巨噬细胞数以及被吞噬的鸡红细胞总数。

2.5 对小鼠血清溶血素含量的影响(HC₅₀法)^[1,3] 各组小鼠给药第5天腹腔注射50%绵羊红细胞悬液每只0.2mL。给药10d后,摘取小鼠眼球采血,分离血清,56℃30min灭活补体,用生理盐水稀释800倍,取0.5mL稀释血清与0.5mL5%绵羊红细胞1mL1:10稀释新鲜豚鼠血清(补体)于试管中混合,37℃水浴反应30min,冰浴终止反应,1500r·min⁻¹离心10min。取上清液1mL于另一试管,加入3mL都氏试剂,反应10min,同时制备50%标准溶血管,540nm比色。

2.6 对小鼠脾脏淋巴细胞转化的影响(MTT染色法)^[1,3] 各组小鼠给药10d后,处死小鼠,无菌摘取脾脏,将小鼠脾脏用含抗生素的无Ca²⁺、Mg²⁺的Hank's液冲洗3次,剥去包膜,置无菌玻璃平皿中,加入2mL完全细胞培养液,用无菌T.B.注射器芯在100目钢网上将脾脏研磨,用2~3mLRPMI1640液冲洗过滤成单个脾细胞悬液。计活脾细胞数(台盼蓝染色法),活细胞应不少于95%。用完全细胞培养液稀释成10⁶·mL⁻¹脾细胞悬液。将脾细胞悬液加入96孔细胞培养板,每孔0.1mL,每个样本平行4孔,前两孔每孔加入10μg·mL⁻¹ConA溶液0.1mL,后两孔每孔加入细胞培养液0.1mL作为平行对照。置5%CO₂培养箱37℃培养48h,每孔加1mg·mL⁻¹MTT溶液0.1mL,37℃反应6h。1500r·min⁻¹离心10min,弃去上清液,用pH7.40.01M PBS洗涤2次,每次1500r·min⁻¹离心10min,弃去上清液,每孔加

酸化异丙醇 0.2 mL, 室温反应 10 min, 在酶标仪 640 nm 处读取 OD 值。

2.7 统计方法 采用 SPSS13.0 统计软件进行组间单因素方差分析。

3 实验结果

3.1 对小鼠胸腺指数和脾指数的影响 贞芪扶正分散片对小鼠胸腺指数和脾指数无明显影响, 与荷瘤对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 数据省略。

3.2 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 荷瘤对照组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬百分率和吞噬指数降低(与正常对照组比较 $P < 0.001$)。贞芪扶正分散片能增加小鼠腹腔巨噬细胞吞噬百分率和吞噬指数, 与荷瘤对照组比较, 中、大剂量组有显著性差异 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.001$), 其作用强于贞芪扶正胶囊, 二者比较统计学均有显著性差异 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.3 对小鼠血清溶血素含量的影响 荷瘤对照组小鼠血清溶血素水平降低(与正常对照组比较 $P < 0.001$)。贞芪扶正分散片能增加小鼠血清溶血素水平, 与荷瘤对照组比较, 各剂量组均有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$)。大剂量组作用强于贞芪扶正胶囊, 二者比较统计学有显著性差异 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 1 FZP 对实验小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	吞噬百分率(%)	吞噬指数
正常对照组	—	70.40 ± 6.09 ³⁾	4.58 ± 0.68 ³⁾
荷瘤对照组	—	36.40 ± 4.83	1.36 ± 0.21
FZN 组	17.0	50.00 ± 6.14	2.04 ± 0.50
FZP 组	4.25	40.80 ± 3.67	1.52 ± 0.15
	8.5	48.00 ± 4.34 ¹⁾	2.12 ± 0.24 ¹⁾
	17.0	63.90 ± 4.79 ^{3,5)}	3.38 ± 0.23 ^{2,4)}

注: 与荷瘤对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; 与 FZN 比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$ (下同)。

表 2 FZP 对小鼠血清溶血素水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	血清溶血素滴度 (HC ₅₀ 单位)
正常对照组	—	485.25 ± 31.40 ³⁾
荷瘤对照组	—	205.78 ± 25.09
FZN 组	17.0	336.53 ± 26.75
FZP 组	4.25	244.45 ± 21.80 ¹⁾
	8.5	311.34 ± 32.54 ²⁾
	17.0	425.53 ± 33.83 ^{3,5)}

3.4 对小鼠脾脏淋巴细胞转化的影响 荷瘤对照组小鼠淋巴细胞增殖指数降低 ($P < 0.01$)。贞芪扶正分散片能增加小鼠淋巴细胞增殖指数, 与荷瘤对照组比较, 中、大剂量组有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。作用与贞芪扶正胶囊相当, 二者比较统计学无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 FZP 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	淋巴细胞增殖指数
正常对照组	—	3.31 ± 0.21 ²⁾
荷瘤对照组	—	1.74 ± 0.19
FZN 组	17.0	2.55 ± 0.14
FZP 组	4.25	1.91 ± 0.19
	8.5	2.24 ± 0.21 ¹⁾
	17.0	2.80 ± 0.25 ²⁾

4 讨论

中医理论认为黄芪有补脾益气、补肺固表、托毒排脓之效, 女贞子有滋补肝肾、明目乌发的功效。现代药理研究表明, 黄芪有保护缺血缺氧心肌、双向调节血压、增强免疫力、抗病毒、抗癌、抗衰老、保护肝脏等药理作用^[4]。女贞子有保护肝脏、增强免疫力、促进红细胞造血、缓解心绞痛和改善心肌缺血、抗衰老、抗诱变和抗癌等药理作用^[5]。

由于肿瘤生长过程中, 机体免疫功能或多或少地受到损失, 而接受化疗、放疗的肿瘤患者, 免疫功能更明显降低, 往往使治疗难以继续进行。具有扶正作用的药物可以有效调节荷瘤动物的免疫功能。

贞芪扶正分散片可以促进肿瘤小鼠吞噬细胞的吞噬功能, 提高肿瘤小鼠的血清特异性抗体水平, 还可以提高小鼠的淋巴细胞增殖指数。但对小鼠的免疫器官发育无明显影响。实验结果显示, 贞芪扶正分散片能明显增强小鼠的非特异性和特异性免疫功能, 效果优于同剂量的贞芪扶正胶囊。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 750.
- [3] 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. 448.
- [4] 吴发宝, 陈希元. 黄芪药理作用研究综述[J]. 中药材, 2004, 27(3): 332.
- [5] 张红. 女贞子药理作用研究状况[J]. 时珍国医国药, 1997, 8(3): 275.