

圣康源胶囊对正常小鼠免疫功能的影响

梁 坚*, 何为涛, 傅伟忠, 杨俊峰, 李凤文, 何 励, 刘荣珍, 王彦武
(广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西 南宁 530021)

[摘要] 目的: 研究圣康源胶囊对正常小鼠免疫功能的影响。方法: 分别以 175、350、700 mg/kg 剂量的圣康源胶囊给小鼠连续灌胃 30~38d, 测定各项免疫指标。结果: 圣康源胶囊能促进小鼠的脾淋巴细胞增殖, 促进小鼠的迟发型变态反应, 提高小鼠的抗体生成细胞数、血清凝集素水平, 促进小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力, 提高小鼠的 NK 细胞活性。结论: 圣康源胶囊具有增强免疫功能的作用。

[关键词] 圣康源胶囊; 免疫功能; 小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)05-0050-04

Effects of Shengkangyuan Capsule on Immune Function in Mice

LIANG Jian*, HE Wei-tao, FU Wei-zhong, YANG Jun-feng, LI Feng-wen, HE Li, LIU Rong-zhen, WANG Yan-wu
(Disease Prevention and Control Center of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Shengkangyuan Capsule on immune function in Mice. **Methods:** Several indices for immunoregulation in mice were detected after oral administration of the Capsule at doses of 175, 350 and 700 mg/kg for 30 to 38 days. **Results:** It was showed that proliferation of spleen lymphocytes increased, the delayed anaphylactic reactions intensified, the number of lymphocyte B and serum level of hemolysin increased, the phagocytosis of phagocyte in abdominal cavity and the activity of NK cells increased in mice. **Conclusion:** Shengkangyuan Capsule can potentiate immune function in mice.

[Key words] Shengkangyuan Capsule; immune function; mouse

免疫功能低下极易诱发各种疾病。圣康源胶囊由枸杞子、黄芪、杜仲、淫羊藿、沙棘、淀粉组成。用于免疫力低下, 易疲劳者。本文以小鼠为观察对象, 观察圣康源胶囊对免疫调节功能的影响, 为开发该产品提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 圣康源胶囊: 西安英美生物工程有限公司提供, 规格为 350mg/粒, 批号: 20040427。制法: 枸杞子 450g、黄芪 1000g、杜仲 650g、淫羊藿 120g、沙棘 130g, 用乙醇提取 2 次, 合并滤液, 减压回收乙醇, 溶液浓缩后与淀粉 50g 混合, 干燥制粒, 共制成 1000g, 装入胶囊(350mg/粒)。人体日推荐用量为 35mg/kg。

实验时取圣康源胶囊内容物用蒸馏水分别配成 8.75、17.5、35.0 mg/mL 浓度作为供试液。动物: 清洁级(II 级)昆明种健康小白鼠, 由广西医科大学医学实验动物中心提供, 批准号为: 桂动许字(2000)第 001 号。本中心实验动物房合格证号: 桂医动字第 23003 号。动物房温度: 22~25℃, 相对湿度 55%~70%。仪器: 全自动酶标仪、754 紫外可见光分光光度计、冷冻离心机、二氧化碳培养箱、微量血凝试验板、电子分析天平、显微镜、恒温培养箱等。试剂: NaCl、刀豆蛋白 A(ConA)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、2-ME、异丙醇、青霉素、链霉素、SRBC、琼脂糖、RPMI1640、丙酮、甲醇、二硝基氟苯(DNFB)、印度墨汁、YAC-1 细胞等。

1.2 方法 昆明种雄性小白鼠 336 只, 体重为 20~25g, 分为 7 批(免疫组), 每批 48 只, 每组 12 只。圣

[收稿日期] 2005-06-14

[通讯作者] 梁坚, Tel: (0771) 5320556; liangj0212@etang.com

康源胶囊设 175mg/kg、350mg/kg、700mg/kg 3 个剂量组,分别相当于人体推荐用量的 5 倍、10 倍、20 倍,另设一阴性对照组。圣康源胶囊溶液按 0.2mL/10g 的容量灌胃,阴性对照组给予同体积的蒸馏水。每天一次,连续 30~38d。末次灌胃 1h 后参照薛彬等^[1]以及《保健食品检验与评价技术规范》^[2]中的方法对小鼠进行免疫功能的测定。

1.2.1 脏器指数测定 试验结束处死动物,7 批实验动物均解剖取小鼠胸腺、脾脏,用电子分析天平称量后计算脏器指数。

$$\text{脏器指数} = \text{小鼠脏器湿重(g)} / \text{小鼠终体重(g)} \times 100。$$

1.2.2 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化试验(MIT 法) 末次给药 1h 后处死动物,无菌取脾,制成脾细胞悬液(3×10^6 个/mL),将每一份悬液分两孔加入 24 孔培养板中,每孔 1mL,一孔加 75 μ L ConA 液(相当于 7.5 μ g/mL),另一孔作为对照,置 5% CO₂, 37℃ 二氧化碳孵箱中培养 72h。培养至 68h 时,每孔吸去上清液 0.7mL,加入 0.7mL 不含小牛血清的 RPMI1640 培养液,同时加入 MTT(5 mg/mL) 50 μ L/孔,继续培养 4h。培养结束后,每孔加入 1mL 酸性异丙醇,吹打混匀,使紫色结晶完全溶解。然后将溶解液移入 1mL 比色杯中,用 754 紫外可见光分光光度计波长 570nm 处测定 OD 值。用加 ConA 孔的 OD 值减去不加 ConA 孔的 OD 值表示淋巴细胞的增殖能力。

1.2.3 二硝基氟苯诱导的小鼠迟发型变态反应(DTH)试验(耳肿胀法) 给药至 25d 将小鼠腹部皮肤脱毛后用 DNFB 溶液涂抹致敏,5d 后将 DNFB 涂抹于小鼠右耳攻击,24h 后处死小鼠,取 8mm 直径的耳片称重,左右耳重量之差表示 DTH 的程度。

$$\text{肿胀度(mg)} = \text{右耳耳片重量(mg)} - \text{左耳耳片重量(mg)}。$$

1.2.4 抗体生成细胞检测(Jerne 改良玻片法) 末次给药前 5d 给受试小鼠每只腹腔注射 0.2mL 2% (v/v) SRBC 细胞悬液进行免疫,5d 后处死,无菌取脾制成脾细胞悬液。将表层培养基(1g 琼脂糖加双蒸水至 100mL)加热溶解后,放 45~50℃ 水浴保温,与等量 pH7.2~7.4 的 2 倍浓度的 Hank's 液混合,分装小试管,每管 0.5mL,再向管内加 50 μ L 10% SRBC (v/v,用 SA 缓冲液配置),25 μ L 脾细胞悬液,迅速混匀,倾倒在已刷琼脂糖薄层的玻片上,待凝固后,将其水平倒扣于片架上,放入二氧化碳培养箱中孵育 1.5h,

然后用 SA 缓冲液稀释的补体(1:8)加入玻片架凹槽内,继续孵育 1.5h,计数溶血空斑数。用空斑数/ 10^6 脾细胞表示抗体生成细胞数。

1.2.5 血清凝集素的测定(凝集法) 末次给药前 5d 给受试小鼠每只腹腔注射 0.2mL 2% (v/v) SRBC 细胞悬液进行免疫,5d 后从眼内眦取血分离血清用生理盐水倍比稀释,分别置于加有定量 SRBC 的微量血凝板内,37℃ 孵育 3h,观察血球凝集程度。血球凝集程度分 5 级(0~4 级)记录,0 级:红细胞全部下沉,集中在孔底部形成致密的圆点状,四周液体清晰。1 级:红细胞大部分沉集在孔底成圆点状,四周有少量凝集的红细胞。2 级:凝集的红细胞在孔底形成薄层,中心可以明显见到一个疏松的红点。3 级:凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层,中心隐约可见一个小红点。4 级:凝集的红细胞均匀地铺散在孔底成一薄层,凝块有时成卷折状。

$$\text{抗体积数} = (S_1 + 2S_2 + 3S_3 + \dots + nS_n)$$

式中 1 2 3 ……n 代表对倍稀释的指数,S 代表凝集程度的级别。

1.2.6 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验(半体内法) 末次给药后 1h,给小鼠腹腔注射鸡红细胞悬液,注射后 30min 处死小鼠,腹腔注入 2mL 生理盐水,取腹腔洗液制片,放 37℃ 培养箱内孵育 30min,取出于生理盐水中漂洗后晾干,用 1:1 丙酮甲醛溶液固定,4% (v/v) Giemsa 磷酸缓冲液染色 3min,再用蒸馏水冲洗,晾干。油镜下计数巨噬细胞,每张片计数 100 个,观察记录吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数,被吞噬的鸡红细胞数。

$$\text{吞噬百分率(\%)} = \text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数} / \text{计数的巨噬细胞数} \times 100$$

$$\text{吞噬指数} = \text{被吞噬的鸡红细胞总数} / \text{计数的巨噬细胞数}$$

1.2.7 小鼠碳廓清试验 末次给药后 1h 经尾静脉给小鼠注射稀释的印度墨汁(用生理盐水稀释 4 倍)(10 mg/kg BW),墨汁注入后立即计时,2 min 和 10min 分别从眼内眦取血 20 μ L 加到 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中,用 754 紫外可见光分光光度计在 600 nm 波长处测光密度值(OD)。处死小鼠,取肝脏和脾脏称重。按下式计算吞噬指数 a。

$$a = K^{1/3} \times \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重})$$

$$\text{式中 } K = (\lg OD_1 - \lg OD_2) / (t_2 - t_1)$$

1.2.8 NK 细胞活性测定(LDH 测定法) 末次给药

1h 后处死动物、无菌取脾,制成脾细胞悬液(2×10^7 个/mL),取靶细胞(YAC-1 细胞 4×10^5 个/mL)和效应细胞(脾细胞)各 100 μ L,加入 U 型 96 孔培养板中;靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 100 μ L,靶细胞最大释放孔加靶细胞和 1% NP40 各 100 μ L,上述各项各设 3 个平行孔,置 5% CO₂ 37℃ 二氧化碳孵箱中培养 4h。然后将 96 孔培养板以 1500r/min 离心 5min,每孔吸取上清 100 μ L 置平底 96 孔培养板中,同时加入 LDH 基质液 100 μ L,反应 8min,每孔加入 1mol/L 的 HCl 30 μ L,在酶标仪 490 nm 处测定 OD 值。

表 1 圣康源胶囊对小鼠胸腺指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量(mg/kg)	免疫 1 组	免疫 2 组	免疫 3 组	免疫 4 组	免疫 5 组	免疫 6 组	免疫 7 组
圣康源胶囊	700	0.23 \pm 0.03	0.22 \pm 0.04	0.23 \pm 0.04	0.22 \pm 0.03	0.22 \pm 0.03	0.24 \pm 0.03	0.22 \pm 0.04
圣康源胶囊	350	0.24 \pm 0.03	0.24 \pm 0.03	0.24 \pm 0.04	0.22 \pm 0.03	0.22 \pm 0.03	0.24 \pm 0.03	0.23 \pm 0.04
圣康源胶囊	175	0.24 \pm 0.04	0.22 \pm 0.03	0.23 \pm 0.03	0.22 \pm 0.03	0.23 \pm 0.04	0.23 \pm 0.03	0.23 \pm 0.04
阴性对照	—	0.24 \pm 0.03	0.23 \pm 0.04	0.24 \pm 0.04	0.22 \pm 0.03	0.23 \pm 0.03	0.24 \pm 0.03	0.24 \pm 0.04

注:与阴性对照组比较 $P > 0.05$ 。

表 2 圣康源胶囊对小鼠脾指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量(mg/kg)	免疫 1 组	免疫 2 组	免疫 3 组	免疫 4 组	免疫 5 组	免疫 6 组	免疫 7 组
圣康源胶囊	700	0.36 \pm 0.04	0.35 \pm 0.05	0.39 \pm 0.06	0.38 \pm 0.06	0.36 \pm 0.06	0.40 \pm 0.02	0.39 \pm 0.04
圣康源胶囊	350	0.38 \pm 0.06	0.36 \pm 0.05	0.40 \pm 0.05	0.38 \pm 0.05	0.36 \pm 0.07	0.39 \pm 0.08	0.37 \pm 0.04
圣康源胶囊	175	0.36 \pm 0.03	0.36 \pm 0.04	0.38 \pm 0.06	0.38 \pm 0.05	0.39 \pm 0.08	0.38 \pm 0.03	0.36 \pm 0.05
阴性对照	—	0.36 \pm 0.03	0.37 \pm 0.03	0.37 \pm 0.05	0.40 \pm 0.04	0.38 \pm 0.07	0.38 \pm 0.06	0.37 \pm 0.04

注:与阴性对照组比较 $P > 0.05$ 。

2.2 圣康源胶囊对小鼠细胞免疫功能的影响 由表 3 可见,圣康源胶囊各剂量组的脾淋巴细胞转化 OD 差值均大于阴性对照组,其中中剂量组差异有显著性($P < 0.05$),表明圣康源胶囊具有刺激脾淋巴细胞增值作用。圣康源胶囊各剂量组小鼠的左右耳重量差值均大于阴性对照组,其中高、中剂量组具有显著性差异($P < 0.01$),表明圣康源胶囊能提高 DNFB 诱导小鼠耳肿胀程度,具有促进迟发型变态反应的作用。

表 3 圣康源胶囊对小鼠脾淋巴细胞转化及迟发型变态反应(DTH)的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量(mg/kg)	加 ConA 与未加 ConA OD 差值	左右耳重量差值(mg)
圣康源胶囊	700	0.062 \pm 0.026	11.28 \pm 3.00 ²⁾
圣康源胶囊	350	0.112 \pm 0.072 ¹⁾	11.63 \pm 3.21 ²⁾
圣康源胶囊	175	0.059 \pm 0.033	8.73 \pm 3.68
阴性对照	—	0.052 \pm 0.030	6.33 \pm 4.30

注:与阴性对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (下同)。

按下式计算 NK 细胞活性。NK 细胞活性(%) = (反应孔 OD - 自然释放孔 OD) / (最大释放孔 OD - 自然释放孔 OD) \times 100%

1.3 数据统计 采用 SPSS11.0 软件,用方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 圣康源胶囊对小鼠脏器指数的影响 由表 1 和表 2 可见,圣康源胶囊对小鼠的免疫器官重量无明显影响。

2.3 圣康源胶囊对小鼠体液免疫功能的影响 从表 4 可见,圣康源胶囊各剂量组小鼠的抗体生成细胞数(空斑数)均高于阴性对照组,其中高剂量组有显著性差异($P < 0.01$),表明圣康源胶囊具有促进抗体生成细胞增值的作用。圣康源胶囊各剂量组小鼠的血清凝集素抗体积数均高于阴性对照组,其中高、中剂量组具有显著性差异($P < 0.01$),表明圣康源胶囊具有提高小鼠血清凝集素水平的作用。

表 4 圣康源胶囊对小鼠抗体生成细胞及血清凝集素的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量(mg/kg)	空斑数(个)	血清凝集素抗体积数
圣康源胶囊	700	194.6 \pm 58.4 ²⁾	215.2 \pm 21.5 ²⁾
圣康源胶囊	350	137.1 \pm 37.9	180.8 \pm 22.4 ²⁾
圣康源胶囊	175	129.6 \pm 34.0	150.0 \pm 7.5
阴性对照	—	107.1 \pm 38.9	149.8 \pm 17.7

2.4 圣康源胶囊对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响 从表 5 可见,圣康源胶囊各剂量组小鼠腹腔

巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率及吞噬指数均高于阴性对照组, 吞噬鸡红细胞吞噬率(%) 经数据转换后再进行统计分析, 高剂量组的吞噬率和吞噬指数与阴性对照组的差异有显著性意义($P < 0.05$ 、 $P <$

0.01), 表明圣康源胶囊具有促进小鼠巨噬细胞吞噬功能的作用。而对小鼠的单核-巨噬细胞碳廓清功能无明显影响。

表 5 圣康源胶囊对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞及碳廓清的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量 (mg/kg)	吞噬鸡红细胞 吞噬率(%)	数据转换 (X)	吞噬鸡红细胞 吞噬指数	碳廓清 吞噬指数
圣康源胶囊	700	40.1 ± 13.6	0.68 ± 0.14 ¹⁾	1.07 ± 0.53 ²⁾	10.4 ± 1.8
圣康源胶囊	350	33.3 ± 8.8	0.61 ± 0.09	0.83 ± 0.29	10.3 ± 1.7
圣康源胶囊	175	33.2 ± 8.1	0.61 ± 0.09	0.75 ± 0.20	10.9 ± 1.6
阴性对照	—	28.4 ± 6.9	0.56 ± 0.07	0.58 ± 0.16	10.1 ± 1.6

2.5 圣康源胶囊对小鼠 NK 细胞活性的影响 从表 6 可见, 圣康源胶囊高中剂量组小鼠的 NK 细胞活性均显著高于阴性对照组, 经数据转换后统计分析, 圣康源胶囊高、中剂量组与阴性对照组的差异均有显著性意义($P < 0.01$), 表明圣康源胶囊具有显著提高小鼠 NK 细胞活性的作用。

表 6 圣康源胶囊对小鼠 NK 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量 (mg/kg)	NK 细胞活性 (%)	NK 细胞活性 转换值(X)
圣康源胶囊	700	60.5 ± 16.5	0.895 ± 0.173 ²⁾
圣康源胶囊	350	60.6 ± 8.7	0.894 ± 0.091 ²⁾
圣康源胶囊	175	45.7 ± 8.8	0.742 ± 0.089
阴性对照	—	43.7 ± 8.4	0.721 ± 0.085

3 讨论

圣康源胶囊所用的枸杞子, 黄芪, 杜仲, 淫羊藿、沙棘均具有良好的免疫调节功能^[3-7]。枸杞子能促进抗体积数、溶血空斑数、耳廓肿胀度、淋巴细胞转化吸光度差值、单核-巨噬细胞数的吞噬指数、NK 细胞活性显著增加^[3]。黄芪可以提高荷瘤小鼠的淋巴细胞转化率及 NK 细胞活性^[4]。杜仲能明显增加小鼠的足跖肿胀度和半数溶血值, 明显增强小鼠的腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的能力^[5]。淫羊藿多糖可致小鼠胸腺缩小, 淫羊藿中宝藿苷 V₁ 可增加小鼠巨噬细胞的吞噬功能, 促进 II-1 和 II-2 的生成和增殖 T、B 细胞的作用^[6]。沙棘能提高巨噬细胞的吞噬能力及 NK 细胞的杀伤能力, 提高 II-2 分泌水平^[7]。

本研究结果表明, 圣康源胶囊给予小鼠连续灌胃 30~ 38d, 能促进小鼠的脾淋巴细胞增殖, 促进小

鼠的迟发型变态反应。提高小鼠的抗体生成细胞数、血清凝集素水平, 促进小鼠的腹腔巨噬细胞的吞噬能力, 提高小鼠的 NK 细胞活性, 圣康源胶囊具有增强免疫功能作用。王宁元等^[8]报道, 枸杞子可以提高小鼠在低温环境下的耐寒冷能力, 同时也能延长小鼠在室温下的游泳时间, 还可延长小鼠在常压下的耐缺氧时间。枸杞子能显著提高小鼠肝糖元含量, 延长小鼠负重游泳时间, 具有抗疲劳作用^[3]。由此可见, 圣康源胶囊对免疫力低下, 易疲劳者具有良好的保健及辅助治疗作用。

[参考文献]

- [1] 薛彬, 雷志明, 魏雪涛, 等. 免疫毒理学实验技术[M]. 北京: 北京医科大学/中国协和医科大学联合出版社, 1995. 19-65.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 2003. 22-34.
- [3] 潘京一, 杨隽, 潘喜华. 枸杞子抗疲劳与增强免疫作用的实验研究[J]. 上海预防医学杂志, 2003, 15(8): 377-379.
- [4] 张小梅, 伦永志, 王仁军. 黄芪成分 F₃ 新制剂抗肿瘤免疫机理的研究[J]. 免疫学杂志, 2005, 21(1): 78.
- [5] 陈琼瑶, 谢惠萍, 刘科亮, 等. 杜仲滋身茶对小鼠免疫功能的影响[J]. 现代预防医学, 2004, 31(3): 365-377.
- [6] 黄云, 何志坚. 淫羊藿的研究进展及开发利用[J]. 中国民族民间医药杂志, 2003, 64: 267-271.
- [7] 张吉科, 林美珍. 沙棘药用研发的回顾与展望[J]. 国际沙棘研究与开发, 2004, 2(2): 35-39.
- [8] 王宁元, 刘斌钰, 李丽芬, 等. 枸杞对小鼠耐寒缺氧抗疲劳的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2002, 23(1): 1-2.