

丹参-苦参对免疫抑制小鼠的免疫调节功能探讨

杨宇, 吴佳伟, 成鹏, 韦忠红, 王爱云, 陈文星, 陆茵*
(南京中医药大学药学院, 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏省中医药
防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023)

[摘要] **目的:**通过使用环磷酰胺所致免疫抑制小鼠模型探讨丹参-苦参提取物对免疫缺陷小鼠的免疫调节作用的机制。**方法:**采用环磷酰胺造免疫抑制动物模型,空白组,模型组,丹参-苦参提取物低、中、高剂量组(25,50,100 mg·kg⁻¹),采用小鼠脏器指数评价脏器功能,采用小鼠碳粒廓清模型评价小鼠吞噬细胞功能,采用 luminex 法检测血清中相关细胞因子水平,流式检测辅助性 T 细胞数量。体外培养小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7,给予丹参-苦参提取物后,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测丹参-苦参提取物对 RAW264.7 细胞增殖的影响,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)对其增殖的影响及其可能机制进行探讨。**结果:**与空白组比较,模型组显著抑制肝指数($P < 0.01$)和脾脏指数($P < 0.05$),动物血清白细胞介素-6(IL-6)的分泌明显降低($P < 0.05$),吞噬指数显著下降($P < 0.01$),同时 50 mg·L⁻¹环磷酰胺显著抑制 RAW264.7 细胞的增殖($P < 0.01$);与模型组比较,丹参-苦参提取物中、高剂量均可以显著提高肝脏指数($P < 0.01$),并显著促进趋化因子 C-X-C 配体 1(CXCL1)的分泌($P < 0.01$),丹参-苦参提取物高剂量可以显著促进 IL-6 的分泌($P < 0.01$),丹参-苦参提取物中、高剂量能够明显提高小鼠腋下以及颈部淋巴结中辅助性 T 细胞的数量($P < 0.05$, $P < 0.01$),显著性升高吞噬指数的趋势($P < 0.01$),显著性促进 RAW264.7 细胞的增殖($P < 0.01$),且促进 IL-6 信号传导与转录激活因子(STAT3)调控下游 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 样蛋白 1(Bcl-2L1)以及细胞周期蛋白 D₁(CCND1)mRNA 的表达,起抗凋亡作用。**结论:**丹参-苦参提取物可对抗环磷酰胺所导致的免疫抑制,增强动物免疫功能。

[关键词] 丹参;苦参;中药配伍;免疫调节;巨噬细胞

[中图分类号] R285.5;R392;R446.63;R329.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)13-0060-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191138

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190219.1741.014.html>

[网络出版时间] 2019-02-20 11:05

Study on Immunoregulatory Effect of Compatibility of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* Combined with *Sophorae Flavescentis Radix* in Immunosuppressive Mice

YANG Yu, WU Jia-wei, CHENG Peng, WEI Zhong-hong, WANG Ai-yun, CHEN Wen-xing, LU Yin*
(*Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, School of Pharmacy, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of immunomodulatory effect of extracts from *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Sophorae Flavescentis Radix* on immunodeficiency mice by immunosuppressive mouse model induced by cyclophosphamide. **Method:** An immunosuppressive animal model was established by cyclophosphamide. The blank group, the model group, the low, medium and high dose group of *Salvia miltiorrhiza* and *Sophora* extract groups (25, 50, 100 mg·kg⁻¹), using mouse organs organ evaluation index using a mouse model to evaluate the carbon clearance phagocytic cell function using luminex to detect levels of relevant cytokines

[收稿日期] 20190108(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673725,81573859)

[第一作者] 杨宇,在读硕士,从事中药对肿瘤发生发展影响研究,E-mail:1633621316@qq.com

[通信作者] *陆茵,博士,教授,从事肿瘤转移研究,E-mail:luyingreen@126.com

in serum and using flow to detect the number of helper T cells. Mouse mononuclear macrophage leukemia cells (RAW264.7) were cultured *in vitro*, and the effect of *Salvia miltiorrhiza* extracts on the proliferation of RAW264.7 cells were detected by methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. The proliferation was induced by Real-time PCR. The impact and its possible mechanisms are explored. **Result:** Compared with blank group, cyclophosphamide significantly inhibited liver index ($P < 0.01$) and spleen index ($P < 0.05$), and the secretion of serum interleukin-6 (IL-6) was significantly decreased ($P < 0.05$), the phagocytic index decreased significantly ($P < 0.01$), while $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cyclophosphamide significantly inhibited the proliferation of mononuclear macrophage RAW264.7 ($P < 0.01$). Compared with model group, high dose of extracts from *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Sophorae Flavescentis Radix* can significantly increase the liver index ($P < 0.01$). The high dose of extracts from *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Sophorae Flavescentis Radix* can significantly promote the chemokine CXC motif ligand 1 (CXCL1, $P < 0.01$), high dose can significantly promote the secretion of IL-6 ($P < 0.01$). The high dose of extracts from *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Sophorae Flavescentis Radix* can significantly improve the auxiliary in the axillary and cervical lymph nodes of mice. The number of T cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the high dose of extracts from *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Sophorae Flavescentis Radix* could significantly increase the phagocytic index ($P < 0.01$). Medium and high saliency promoted the proliferation of RAW264.7 cells ($P < 0.01$), and promoted IL-6 signaling and activator of transcription 3 (STAT3) regulation of the downstream B lymphoma-2 gene (Bcl-2), Bcl-2 like protein 1 (Bcl-2L1) and the cyclin D₁ gene (CCND1) plays an anti-apoptotic role. **Conclusion:** The extracts from *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Sophorae Flavescentis Radix* can counteract the immunosuppression caused by cyclophosphamide and enhance the immune function of animals.

[Key words] *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; *Sophorae Flavescentis Radix*; compatibility of Chinese medicine; immunomodulation; macrophage

免疫系统的稳定是维持机体内环境稳定的关键,免疫系统的紊乱会导致多种疾病的发生,例如恶性肿瘤、类风湿及支气管哮喘等疾病^[1]。免疫系统由免疫器官、免疫细胞和免疫分子组成,是机体执行免疫功能的系统,是机体防卫病原体入侵最有效的武器,能识别和排除异己抗原性物质,识别和清除体内发生突变的肿瘤细胞、衰老细胞、死亡细胞等,从而维持机体的相对稳定性^[2]。丹参具有活血祛瘀,通经止痛,凉血消痈的作用^[3],苦参具有清热燥湿,杀虫抑菌的作用^[4]。临床实践应用证实,苦参可以联合丹参使用治疗乙型肝炎,而且效果显著。苦参中的有效成分苦参素主要是通过抗病毒直接发挥作用,达到治疗效果,而丹参则是通过改善肝脏的功能来治疗慢性乙肝^[5-6]。但是近年来也有研究显示,苦参可以明显增强胃癌患者 T 细胞数量促进白细胞介素 (IL)-18, γ -干扰素 (IFN- γ) 炎症因子的分泌^[7],有研究显示丹参中的有效成分具有免疫调节功能,可以显著上调环磷酸腺苷诱导的免疫低下小鼠的小鼠的脾脏指数、胸腺指数、碳粒廓清指数 K 及吞噬指数^[8]。既然苦参丹参的单独使用都被证明具有免疫调节作用,本研究主要通过实验探讨丹

参苦参的配伍使用后是否具有免疫调节的作用,进而进一步了解丹参苦参配伍使用的药理作用。本研究通过丹参苦参组方配伍,观察配伍组方对免疫抑制小鼠免疫调节功能的影响。建立环磷酸腺苷所致免疫低下动物模型,评价丹参-苦参提取物对小鼠吞噬细胞功能、辅助性 T 细胞数量、血清中相关炎症因子水平;同时体外培养单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞,观察丹参-苦参提取物对其增殖的影响,对丹参-苦参提取物免疫调节功能可能机制进行初步探索。

1 材料

1.1 动物及细胞 ICR 幼鼠,120 只,体质量 18 ~ 22 g,雄性,购自扬州大学比较医学院,合格证号 SCXK(苏)2012-0004。其中 60 只用于免疫抑制动物吞噬细胞功能实验,60 只用于免疫抑制动物免疫功能实验。动物实验获得扬州大学比较医学院动物伦理委员会批准。CD3, CD4 细胞由南京中医药大学中药药效与安全性评价重点实验室细胞库自存。

1.2 药物与试剂 丹参-苦参提取物:丹参-苦参 3:1 粉碎成细粉,按照质量/体积 1:10 加水提取,经浓缩、减压干燥后得干膏粉备用,每 1 g 干膏相当于

5. 102 g 生药量。丹参、苦参均购自安徽省亳州市中西药有限公司,经南京中医药大学药学院刘圣金副教授鉴定均为正品。噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 0100109546);环磷酸胺(南京博硕生物科技有限公司,批号 0100109546);印度墨汁(南京森贝伽生物科技有限公司,批号 0100109546);小鼠细胞因子/趋化因子磁珠板(美国 Millipore 公司,批号 MCYTPMAG-70K);鼠抗 CD3 抗体,鼠抗 CD4 荧光抗体(美国 Bioscience 公司,批号分别为 17-0032, 12-0081);trizol(美国 Thermo 公司,批号 15596);预混液形式的两步法实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂,高灵敏性染料法 Real-time PCR 检测试剂盒(南京诺维赞生物科技公司,批号分别为 R123-01, Q331-02);Bcl-2, Bcl-2 样蛋白 1(Bcl-2L1),细胞周期蛋白 D₁(CCND1)引物序列均由南京诺维赞生物科技公司设计合成,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
Bcl-2	上游 5'-ATGCCCTTGTGGAAGCTATATGGC-3'	120
	下游 5'-GGTATGCACCCAGAGTGATGC-3'	
Bcl-2L1	上游 5'-GACAAGGAGATGCAGGTATTGG-3'	124
	下游 5'-TCCCGTAGAGATCCACAAAAGT-3'	
CCND1	上游 5'-GCGTACCCTGACACCAATCTC-3'	183
	下游 5'-CTCCTCTTCGCACTTCTGCTC-3'	
GAPDH	上游 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3'	123
	下游 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	

1.3 仪器 BSA224S-CW 型电子天平(德国赛多利斯公司);MultiskanGO 型酶标仪,ABI7500 型 Real-time PCR 仪,Veriti96 型梯度 PCR 仪(美国 Thermo 公司);C6 型流式细胞仪(美国 BD 公司);Luminex 100 型多功能液相芯片检测分析平台(美国 Millipore 公司);270133 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模 将动物随机分为空白组,模型组(环磷酸胺 80 mg·kg⁻¹),丹参-苦参提取物低、中、高剂量组(25, 50, 100 mg·kg⁻¹),每组 10 只,丹参-苦参提取物中剂量按前期实验结果而定。环磷酸胺造模后,可发现造模小鼠在环磷酸胺注射的第 3 天

就出现闭目、少光泽、蜷缩弓背、毛蓬竖等体征,与正常小鼠有明显的区别,动物脏器指数,巨噬细胞吞噬活性与空白组出现显著性差异证明造模成功^[10]。空白组和环磷酸胺组每天灌胃生理盐水 0.1 mL·(10 g)⁻¹,丹参-苦参提取物低、中、高剂量组分别按照对应剂量给药,灌胃给药持续给药 7 d。除空白组外,其余各组第 6, 7, 8 天每天腹腔注射环磷酸胺 80 mg·kg⁻¹造模^[9],空白组腹腔注射等体积 0.9% 氯化钠溶液。

2.2 粒廓清指数法检测吞噬指数 小鼠碳廓清模型动物(60 只)于第 9 天称质量后,小鼠从尾静脉注射印度墨汁稀释液(1:5)0.1 mL·10 g⁻¹后,开始计时,分别于注射后 2 min(t₁)和 10 min(t₂)眼球静脉取血 30 μL,准确记录时间,将血加入到含 0.1% 的 Na₂CO₃ 2 mL 的试管中,摇匀。后用全波长酶标仪计在 600 nm 波长处测定吸光度 A(以下分别用 A₁ 和 A₂ 来表示 2 min 和 10 min 所取血样的积分吸光度)用 0.1% Na₂CO₃ 溶液做空白对照,断颈处死小鼠,取肝、脾脏称质量。

按如下公式计算碳廓清指数 K 以及吞噬指数^[11-12]:

$$K = (\lg A_1 - \lg A_2) / (t_2 - t_1)$$

$$\text{吞噬指数} = \text{体质量} \times K^{1/3} / (\text{肝重} + \text{脾重})$$

2.3 液相芯片法检测外周血血清中炎症细胞因子 免疫抑制动物免疫功能实验小鼠(60 只),于第 9 天小鼠眼眶取血后分离血清,按照试剂盒说明书,采用 luminex 100 检测血清中细胞因子的水平。

2.4 流式细胞仪检测腋下及颈部淋巴结 CD3, CD4 细胞数量 取小鼠腋下和颈部的淋巴结,研磨后过 400 目筛,离心后计数。根据细胞计数结果吸取适当的积压细胞悬液各加入鼠抗 CD3 抗体 2 μL,鼠抗 CD4 荧光抗体 0.5 μL,使得细胞数为 1 × 10⁵ ~ 1 × 10⁷ 个,避光染色 30 min, PBS 洗涤细胞 1 ~ 2 次后 1 500 r·min⁻¹ 离心 15 min 弃去上清,加入 PBS 0.5 mL 重悬细胞,采用 BD Accuri C6 流式细胞仪检测。

2.5 MTT 比色法检测丹参-苦参提取物对 RAW264.7 细胞增殖的影响 RAW264.7 细胞接种 96 孔板,分组为空白组,模型组,丹参-苦参提取物 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 g·L⁻¹ 组,每组设置 6 个复孔。常规培养过夜。细胞贴壁生长至 50% 后,按分组要求给药,继续培养 48 h 后,每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 20 μL 继续孵育 4 h 后,小心吸弃上清,加入 DMSO 200 μL 振荡溶解后,酶标仪

测定 A。

2.6 Real-time PCR 检测 RAW264.7 细胞 Bcl-2, Bcl-2L1, CCND1 mRNA 的表达 常规培养小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 调整细胞密度为 2.5×10^5 个/mL。铺 6 孔板, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的药物。置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内培养 24 h。收集细胞, 以 trizol 充分裂解细胞, 常规方法抽提细胞总 RNA。每个样品分别取 RNA 500 ng 进行逆转录反应。收集逆转录产物, 进行 PCR 反应, PCR 反应条件, 预变性 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 5 min; 循环反应 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s; 40 个循环; 融解曲线 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 60 s, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 15 s。用 Thermo Fisher ABI 7500 型 PCR 仪自带软件读取各样品 C_t 值, 结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 来表示相对 mRNA 表达水平。

2.7 统计学方法 所得实验数据进行归一化处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 Graph Pad Prism5 软件对实验数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 丹参-苦参提取物对免疫抑制小鼠免疫功能的影响

3.1.1 丹参-苦参提取物对免疫抑制小鼠脏器指数的影响 与空白组比较, 模型组可显著抑制肝指数 ($P < 0.01$) 和脾脏指数 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丹参-苦参提取物中、高剂量组肝指数显著升高 ($P < 0.01$), 丹参-苦参提取物高剂量组脾脏指数明显升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 丹参-苦参提取物 (SS) 对环磷酰胺诱导免疫抑制小鼠肝、脾指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of extracts from *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Sophorae Flavescentis Radix* (SS) on liver and spleen index of cyclophosphamide-induced immunosuppressive animals ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / /mg·kg ⁻¹	肝脏指数	脾脏指数
空白	-	0.664 ± 0.043	0.029 ± 0.005
模型	-	0.567 ± 0.074 ²⁾	0.024 ± 0.002 ¹⁾
丹参-苦参提取物	25	0.549 ± 0.053	0.026 ± 0.003
	50	0.594 ± 0.084 ⁴⁾	0.025 ± 0.003
	100	0.668 ± 0.050 ⁴⁾	0.029 ± 0.006 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.1.2 丹参-苦参提取物对免疫抑制小鼠血清细胞

因子分泌的影响 与空白组比较, 模型组小鼠血清 IL-6 的分泌明显降低 ($P < 0.05$), CXCL1 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 丹参-苦参提取物高剂量能够显著促进 IL-6 的分泌 ($P < 0.01$), 丹参-苦参提取物中、高剂量均能够显著促进 CXCL1 的分泌 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 DS 对免疫抑制动物细胞因子血清分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 3 Effect of SS on serum secretion of cytokines in immunosuppressed animals ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / /mg·kg ⁻¹	IL-6	CXCL1
空白	-	10.25 ± 2.260	31.26 ± 8.901
模型	-	4.442 ± 1.813 ¹⁾	17.07 ± 5.762 ²⁾
丹参-苦参提取物	25	4.406 ± 1.546	26.05 ± 6.536
	50	4.879 ± 0.9144	31.85 ± 8.636 ³⁾
	100	13.02 ± 8.422 ³⁾	29.78 ± 8.960 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.1.3 丹参-苦参提取物对 T 细胞亚群的影响 与空白组比较, 模型组可显著抑制小鼠的 T 细胞数 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 丹参-苦参提取物剂量依赖性的促进 $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ 双阳性的 T 细胞亚群, 丹参-苦参提取物中、高剂量组小鼠腋下以及颈部淋巴结中辅助性 $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ T 细胞 (Th) 的数量明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

表 4 DS 对小鼠 $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ T 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 4 Effect of SS on $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ T cell proliferation in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / /mg·kg ⁻¹	$\text{CD3}^+ \text{CD4}^+ / \%$
空白	-	18.22 ± 2.264
模型	-	12.25 ± 1.651 ¹⁾
丹参-苦参提取物	25	12.64 ± 1.896
	50	14.79 ± 2.217 ²⁾
	100	18.42 ± 1.522 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$, 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 6, 7 同)。

3.2 丹参-苦参提取物对环磷酰胺所致免疫抑制小鼠吞噬细胞功能的影响

3.2.1 丹参-苦参提取物对免疫低下小鼠碳粒廓清的影响 与空白组比较, 模型组吞噬指数显著性下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 丹参-苦参提取物中、高剂量均可明显逆转环磷酰胺所致的吞噬细胞功能降低 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 SS 对免疫低下小鼠 RAW264.7 吞噬功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of SS on RAW264.7 in immunocompromised mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	吞噬指数
空白	-	3.181 ± 0.397
模型	-	2.310 ± 0.454 ¹⁾
丹参-苦参提取物	25	2.786 ± 0.284
	50	3.071 ± 0.517 ²⁾
	100	3.164 ± 0.348 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P < 0.01;与模型组比较²⁾P < 0.01。

3.2.2 丹参-苦参提取物对 RAW264.7 细胞增殖的影响 与空白组比较,模型组 RAW264.7 的增殖明显受到抑制 (P < 0.01);与模型组比较,丹参-苦参提取物 2.5 g·L⁻¹ 开始就显著性促进 RAW264.7 细胞的增殖 (P < 0.01)。见表 6。

3.2.3 丹参-苦参提取物对 RAW264.7 细胞 Bcl-2, Bcl-2L1 以及 CCND1 mRNA 表达的影响 与空白组

表 7 SS 对 RAW264.7 细胞 Bcl-2, Bcl-2L1 以及 CCND1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effect of SS on Bcl-2, Bcl-2L1 and CCND1 mRNA expression in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	Bcl-2	Bcl-2L1	CCND1
空白	-	1.000 ± 0.080	1.000 ± 0.059	1.000 ± 0.080
模型	-	0.618 ± 0.174 ¹⁾	0.653 ± 0.155	0.503 ± 0.138
丹参-苦参提取物	10	0.939 ± 0.163 ²⁾	0.944 ± 0.240 ²⁾	0.921 ± 0.307 ²⁾

4 讨论

免疫系统由免疫器官、免疫细胞和免疫分子组成,它是机体执行免疫功能的系统,是机体防卫,病原体入侵最有效的武器,能识别和排除异己的抗原性物质,识别和清除体内发生突变的肿瘤细胞、衰老细胞、死亡细胞等,从而维持机体的相对稳定性^[2]。环磷酰胺是目前常用的烷化剂类的抗肿瘤药物,抗癌谱较广,其对肿瘤细胞和正常细胞的选择性不高,人体生长较快的组织如骨髓、淋巴组织、胃肠黏膜等均可受到抑制,导致机体免疫力降低^[14-16],因此环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠被用来研究药物的免疫调节活性是一种经典的方法^[17]。吞噬作用一般用于评价动物非特性性免疫状态,巨噬细胞的吞噬作用可防御大多数类型的入侵细胞,还可以通过分泌细胞因子和处理呈现抗原,间接发挥免疫系统调节作用。

近些年来,化疗药物的长期使用会导致患者免疫功能下降 T 细胞亚群数量减少^[18],中药具有的

表 6 DS 对 RAW264.7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of DS on proliferation of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	A
空白	-	1.158 ± 0.056
模型	-	0.673 ± 0.113 ¹⁾
丹参-苦参提取物	0.625	0.576 ± 0.224
	1.25	0.732 ± 0.054
	2.5	1.313 ± 0.090 ³⁾
	5	1.390 ± 0.069 ³⁾
	10	1.416 ± 0.055 ³⁾
	20	1.432 ± 0.072 ³⁾
	40	1.178 ± 0.072 ³⁾
80	1.150 ± 0.300 ²⁾	

比较,模型组显著抑制 Bcl-2 mRNA 的表达 (P < 0.01);与模型组比较,丹参-苦参提取物 10 g·L⁻¹ 显著促进 Bcl-2, Bcl-2L1, CCND1 mRNA 的表达 (P < 0.01)。见表 7。

免疫调节作用越来越受到重视,其所含的化学物质复杂,常见的具有免疫调节作用的成分包括多糖类、黄酮类、苷类、生物碱类,这些成分有些能促进机体的免疫调节功能,有些能抑制机体的免疫调节功能,有些具有双向调节作用。ICR 幼鼠灌胃给药丹参-苦参提取物后,丹参-苦参提取物中、高剂量可以显著对抗环磷酰胺所致的肝脏萎缩和逆转环磷酰胺组 CXCL1 水平抑制,丹参-苦参提取物高剂量还能对抗环磷酰胺所引起的脾脏萎缩和显著性促进 IL-6 的分泌,同时丹参-苦参提取物能够提高幼鼠腋下以及颈部淋巴结中辅助性 T 细胞的数量以及能够增强免疫抑制动物单核巨噬细胞的吞噬功能。在环磷酰胺介导的免疫抑制的过程中丹参-苦参提取物不仅仅促进了实验幼鼠巨噬细胞的吞噬功能与此同时还增加了辅助性 T 细胞的数量,而且辅助性 T 细胞可以和巨噬细胞相互作用,针对特定的抗原表位,提高巨噬细胞的抗原呈递的效率,促进免疫功能^[19]。

机体免疫系统包括固有免疫和适应免疫,其中

适应免疫又分为细胞免疫和体液免疫,巨噬细胞是体内固有免疫的主要组成部分,能够吞噬和清除外来异物^[20-21]。体外实验结果显示,丹参-苦参提取物可以逆转环磷酰胺对 RAW264.7 细胞增殖的抑制作用,并且是通过 IL-6/STAT3 信号激活下游 Bcl-2, Bcl-2L1 以及 CCND1 mRNA 的表达,促进巨噬细胞的增殖。以上实验结果表明丹参苦参组方的配伍对机体免疫功能有着一定的调节作用,主要是通过刺激巨噬细胞的增殖,以及增加 T 细胞的数量和维持细胞因子的水平,逆转环磷酰胺产生的免疫功能抑制。

[参考文献]

[1] 李金玉,李金耀,张富春. 中药抗肿瘤免疫调节机制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1705-1707.

[2] 周悦芳,范培红. 中药免疫调节作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 204-207.

[3] 蔡琳,彭鹏,郭甜. 丹参药理作用及临床研究进展[J]. 山东化工, 2016, 45(17): 51-52.

[4] 王悦,姜雪,丁菲,等. 中药苦参药理作用及应用研究进展[J]. 山东化工, 2017, 46(15): 66-67, 69.

[5] 王和木. 丹参酮联合苦参素治疗慢性乙肝的临床疗效分析[J]. 医学理论与实践, 2015, 28(9): 1207-1209.

[6] 郑洋,赵铁建. 苦参素联合复方丹参治疗慢性乙型肝炎临床疗效的 Meta 分析[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(5): 445-449.

[7] 黄俊婷. 苦参素注射液对晚期胃癌 TP 方案化疗的免疫调节作用[J]. 中国卫生产业, 2014, 11(8): 137-138.

[8] 张湘东,许定舟,李金华,等. 丹参多糖的免疫调节活性研究[J]. 中药材, 2012, 35(6): 949-952.

[9] 张雯,宋俊科,王海港,等. 破壁灵芝孢子粉对环磷酰胺致小鼠免疫抑制的调节作用[J]. 食品与药品, 2018, 20(6): 408-413.

[10] 蔡帆,张彦,臧林泉. 白扁豆多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J]. 免疫学杂志, 2018, 34(5): 407-411.

[11] 陈瑞明,张小丽,李芳,等. 祛风湿类中药免疫作用的

研究——对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠免疫功能的影响[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(5): 1171-1175.

[12] 许良,李瑞瑞,李心雨,等. 大蒜化学成分(组)对免疫抑制小鼠免疫功能的调节作用[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(6): 762-765.

[13] Ohkawara T, Mitsuyama K, Takeda H, et al. Lack of macrophage migration inhibitory factor suppresses innate immune response in murine dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. Scand J Gastroenterol, 2008, 43(12): 1497-1504.

[14] 张乔,姜苏洋,吕航,等. 参苓水煎液对免疫抑制小鼠免疫调节作用的研究[J]. 中医药信息, 2018, 35(6): 8-11.

[15] Pozios I, Knösel T, ZHAO Y, et al. Expression of phosphorylated estrogen receptor beta is an independent negative prognostic factor for pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2018, 144(10): 1887-1897.

[16] BAI Y, JIANG Y, LIU T, et al. Xinjiang herbal tea exerts immunomodulatory activity via TLR2/4-mediated MAPK signaling pathways in RAW264.7 cells and prevents cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2019, doi: 10.1016/j.jep.2018.09.032.

[17] 刚宏林,于雅楠,马英南,等. 玻璃苣水提取物对荷瘤小鼠免疫调节作用的实验研究[J]. 中医药信息, 2016, 33(1): 25-28.

[18] 马红芳,苏国新,朱小丽,等. 大株红景天注射液对乳腺癌化疗患者免疫功能调节的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 172-176.

[19] 杨继乐,张莉,王莉. 单核-巨噬细胞的分化和功能研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(11): 1213-1216.

[20] 孟祥云,郭树明,杨丽霞. 中药植物多糖对 2 型糖尿病胰岛素抵抗的作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 220-225.

[21] 廖海锋,邓向亮,罗霞,等. 羧甲基茯苓多糖对巨噬细胞极化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13): 122-126.

[责任编辑 孙丛丛]