

· 药物研究 ·

复方党参口服液的免疫增强功能研究

马玉玲¹, 白瑞斌¹, 郑晓萍¹, 胡林海², 孙伯禄¹, 胡芳弟^{1*} (1. 兰州大学药学院, 兰州 730000, 2. 甘肃省嘉峪关市第一人民医院, 脊柱外科, 嘉峪关 735100)

摘要 目的: 研究复方党参口服液对环磷酰胺所致免疫低下小鼠免疫功能的影响。方法: 昆明种小鼠240只, 分为4批, 每批60只。每批小鼠随机分为空白组、模型组、阳性药物组、复方党参口服液高、中、低剂量组, 每组10只, 各组均连续灌胃4周, 小鼠于给药3周后开始腹腔注射环磷酰胺 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天1次, 连续2 d, 建立小鼠免疫力低下模型; 通过碳粒廓清试验、迟发型变态反应试验、脾淋巴细胞增殖转化试验、外周血白细胞计数、免疫器官指数五项相关免疫学指标, 综合评价复方党参口服液对免疫低下小鼠免疫功能的调节作用。结果: 与模型组比较, 复方党参口服液可显著提高免疫功能低下小鼠的碳廓清吞噬指数、增强小鼠的迟发型变态反应的DTH程度; 对抗环磷酰胺所致的小鼠外周血白细胞数、胸腺指数、脾脏指数以及脾淋巴细胞增殖转化能力的降低, 显示出该制剂对免疫低下小鼠单核-巨噬细胞功能、细胞免疫功能的增强作用。结论: 复方党参口服液可显著增强免疫低下小鼠的免疫功能, 对免疫失衡机体具有一定的调节作用。

关键词: 复方党参口服液; 碳粒廓清试验; 迟发型变态反应; 脾淋巴细胞增殖转化

中图分类号: R951.3/.7; R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)12-1488-06
doi:10.16153/j.1002-7777.2017.12.020

Effect of Complex Dangshen Oral Solution on the Immunological Function of Hypoimmune Mice

Ma Yuling¹, Bai Ruibin¹, Zeng Xiaoping¹, Hu Linhai², Sun Bolu¹, Hu Fangdi^{1*} (1. College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Department of Spinal Surgery, The First People's Hospital of Jiayuguan City, Jiayuguan, 735100, China)

Abstract Objective: This paper were designed to explore the effect of Complex Dangshen Oral Solution (CDOS) on the immunological function of immune-suppressed mice induced by cyclophosphamide (CY). **Method:** 240 Kunming mice were divided into 4 batches, with 60 in each batch. Each batch of mice were randomly divided into six groups as follows: a blank group, a negative control group, a positive control group and CDOS groups with high, middle and low dosages respectively. All the groups received intragastric administration once a day for four weeks. At the beginning of the fourth week, except the blank groups, all the other groups received a daily intraperitoneal injection of CY ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for two days. By the determination of five immune indexes which were related with carbon clearance test, delayed type hypersensitivity, lymphocyte proliferation test, white blood cells(WBC) and immune organ indexes respectively, a comprehensive evaluation was made on the immunoenhancement effects of CDOS on Hypoimmune Mice. **Results:** Compared with the negative control

基金项目: 甘肃省中医药管理局科研课题(编号GZK-2013-13); 兰州市科技计划项目(编号2013-4-75, 214-2-30)

作者简介: 马玉玲, 硕士在读, 主要从事中药活性成分分离分析的研究, E-mail: may12014@lzu.edu.cn

通信作者: 胡芳弟, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药成分分离分析及中药新药研究; Tel: 13919780068, E-mail: hufd@lzu.edu.cn

group, CDOS treatment could obviously improve the phagocytic indexes of mononuclear macrophage in carbon clearance test and the DTH degree in delayed type hypersensitivity. Further more, CDOS had a confrontation effect on the decrease of WBC, thymus index, spleen index and the lymphocyte proliferation ability induced by CY. CDOS presented a significant promotion of mononuclear macrophage and cellular immune function.

Conclusion: These results demonstrated that CDOS could enhance the immune function of hypimmune mice and bring some regulations to the immune imbalance body .

Keywords: CDOS; carbon clearance test; delayed type hypersensitivity; lymphocyte proliferation

近年来,随着社会经济的快速发展、竞争意识的加强、生活压力的加大,人类的健康面临着巨大的挑战,越来越多的人处于亚健康状态,其中免疫力低下是人群中常见现象^[1-2]。选择具有免疫功能的保健品,对改变机体亚健康状态是一个不错的选择^[3]。中药具有资源丰富、毒副作用小、无药物残留等优点逐渐得到人们的认可,中药免疫增强剂的研究和开发已逐渐成为免疫增强剂研究的一个新的发展方向^[4-5]。

党参味甘、性平,为我国传统的补益药,具有补中益气,健脾益肺之功效^[6];山楂味甘,性微温,具有消食健胃,行气散瘀之功效,为药食两用的上等补品^[7-8];枸杞,为我国传统的名贵中药材,传统中医理论认为其味甘,性平,具有补肝肾、益精血、明目之功,为药食两用的上品^[9]。

现代药理学研究表明党参、枸杞中的多糖类成分能够增强机体免疫功能^[10-14],山楂中的主要活性成分黄酮类物质也因其降压、降血脂、强心、保护人血管内皮细胞、增强免疫等多种功效而备受关注^[15]。复方党参口服液是以中药党参、山楂、枸杞子为主要原料,以制剂中多糖和黄酮为质量控制指标,运用传统理论结合现代制剂工艺研发的一种旨在提高亚健康人群免疫功能的中药复方制剂。为了评价该复方制剂的免疫增强功能,本文系统研究了该制剂对环磷酰胺所致的免疫低下小鼠免疫器官指数、外周血白细胞数、碳粒廓清吞噬指数、迟发型变态反应以及对脾淋巴细胞增殖转化能力的影响,为该制剂的开发和利用提供一定的功能学评价依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

党参、山楂、枸杞均购自兰州复兴厚药材有限公司,贞芪扶正胶囊(批号:J20150504)购自甘肃扶正药业科技有限公司;环磷酰胺(CTX,批号:5K086A,百特国际有限公司)购自兰州大学

第一医院;二硝基氟苯(批号:C10033137)购自上海麦克林生化科技有限公司;印度墨汁购自西安市碑林区鸿瑞实验用品经营部;完全RPMI1640培养基、噻唑兰(MTT)、刀豆蛋白(ConA)、红细胞裂解液均购于北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清购于杭州四季青生物公司;硫化钡、碳酸钠等试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

动物全血细胞分析仪(Sysmex, XT200i, 日本);十万分之一分析天平(赛多利斯科学仪器,北京有限公司);CO₂培养箱(LS-CO150, Thermo Fisher Scientific, 美国);凤凰牌倒置显微镜(江西凤凰光学控股有限公司);紫外分光光度计(UV-1700, Shimadzu);SW-CJ-1D型单人净化操作台(沪净净化);Bio-Rad 680 酶标仪(Bio-Rad, 日本)。

1.3 实验动物

KM小鼠240只,雄性,清洁级,体重(20±2)g,由兰州大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(甘)2013-0002,所有动物实验过程均符合兰州大学动物实验伦理准则。

1.4 复方党参口服液的制备

原料按处方比例配伍,以水浸泡药材2 h,以料液比12, 10, 10分别提取3次,每次1.5 h,合并提取液,减压(70℃)浓缩至总生药量的浓度为0.1875 g·mL⁻¹。分别以0.2 g·kg⁻¹, 1.0 g·kg⁻¹的剂量添加矫味剂甜菊糖苷和防腐剂苯甲酸钠,搅拌均匀,经高温高压湿热灭菌,灌装即得受试药物。

2 方法与结果

2.1 外周血白细胞及免疫器官指数的测定

KM小鼠60只,雄性,随机分为6组,分别为空白组、模型组、阳性药物组、复方党参口服液高、中、低剂量组,每组10只。各组每天灌胃给药1次,连续28 d,空白组、模型组灌胃蒸馏

水, 阳性对照组以 $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌服贞芪扶正胶囊混悬液, 受试药物组分别灌服高、中、低剂量的复方党参口服液 ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, $40 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)。于灌胃给药第4周开始造模, 空白组腹腔注射生理盐水 ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 其余各组均开始腹腔注射环磷酰胺 ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每天1次, 连续2d, 进行模型与预防性给药相结合的实

验, 末次注射给药后第5 d, 以摘除小鼠眼球的方法采集全血并用EDTA·K2抗凝, 以动物全血细胞分析仪检测各组小鼠外周血白细胞数; 采血后, 小鼠脱颈椎处死, 取其脾脏、胸腺, 称重, 以公式计算: 胸腺指数=胸腺/体重, 脾脏指数=脾脏/体重, 分别计算小鼠的胸腺指数、脾脏指数^[16], 结果见表1和表2。

表1 复方党参口服液对免疫抑制小鼠体重及免疫器官指数的影响 ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n=10$)

组别	剂量 / ($\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)	注射 CTX 前体重 /g			注射 CTX 后体重 /g	脾指数 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	胸腺指数 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
		第1周	第2周	第3周			
空白对照组	--	24.35 ± 1.53	25.92 ± 1.42	27.12 ± 1.33	27.47 ± 1.15	$3.59 \pm 0.39^{**}$	$2.28 \pm 0.77^{**}$
模型组	--	25.00 ± 2.76	26.20 ± 2.78	26.92 ± 2.89	25.74 ± 3.07	2.49 ± 0.32	1.61 ± 0.37
阳性药对照组	--	24.85 ± 2.37	26.65 ± 2.35	27.65 ± 2.49	26.65 ± 2.23	2.37 ± 0.43	1.81 ± 0.19
口服液低剂量组	10	25.20 ± 2.95	26.58 ± 2.81	27.57 ± 2.93	27.18 ± 2.66	2.82 ± 0.46	$2.00 \pm 0.26^*$
口服液中剂量组	20	25.65 ± 2.93	26.87 ± 3.07	28.19 ± 3.14	27.24 ± 3.14	$3.12 \pm 0.61^{**}$	$2.04 \pm 0.41^*$
口服液高剂量组	40	24.39 ± 1.70	25.26 ± 1.46	26.80 ± 1.40	26.00 ± 1.15	$3.16 \pm 0.34^{**}$	$2.09 \pm 0.29^{**}$

注: 与模型组比较 * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$

由表1可知, 小鼠造模前3周各组体重均有增长的趋势, 第4周造模后除空白组外其余各组的体重都有不同程度的下降。其中模型组体重下降较明显, 且鼠毛的光泽弱于其他组, 说明环磷酰胺具有一定的免疫抑制作用。

与空白组相比, 模型组小鼠注射环磷酰胺后脾脏指数、胸腺指数显著降低 ($P \leq 0.01$); 与模型组相比, 复方党参口服液高、中剂量组小

鼠的脾脏指数、胸腺指数均显著升高 ($P \leq 0.01$ 或 $P \leq 0.05$); 灌服低剂量口服液组的小鼠脾脏指数与模型组相比虽有所升高但差异不显著 ($P \geq 0.05$); 胸腺指数高于模型组且差异显著 ($P \leq 0.05$)。由此表明, 复方党参口服液能够在一定程度上逆转环磷酰胺所致的小鼠的免疫器官指数的下降。

表2 复方党参口服液对免疫抑制小鼠白细胞的影响 ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n=10$)

组别	剂量 / $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	白细胞数 / $10^3 \text{ 个} \cdot \text{uL}^{-1}$
空白对照组	--	$6.44 \pm 0.48^{**}$
模型组	--	2.71 ± 0.37
阳性药对照组	--	$3.42 \pm 0.45^*$
口服液低剂量组	10	$3.37 \pm 0.70^*$
口服液中剂量组	20	$3.85 \pm 0.32^{**}$
口服液高剂量组	40	$3.98 \pm 0.25^{**}$

注: 与模型组比较 * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$

由表2可知,与空白组相比,模型组小鼠注射环磷酰胺后外周血白细胞数明显下降 ($P \leq 0.01$),说明环磷酰胺可致小鼠外周血白细胞水平下降,造模成功;与模型组相比复方党参口服液低、中、高剂量组小鼠的外周血白细胞数均显著升高 ($P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$),且呈现出一定的剂量依赖性,说明复方党参口服液能够促进环磷酰胺所致的免疫抑制小鼠白细胞的生成。

2.2 小鼠碳廓清实验

小鼠分组、给药、造模同“2.1”节下所述,造模后第5 d,称重,每只小鼠尾静脉注入稀释的印度墨汁 ($0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,以4倍体积的生理盐水稀

释印度墨汁原液)。待墨汁注入,立即计时,注入墨汁后2 min, 10 min,分别从小鼠眼内眦静脉丛取血20 μl ,并立即将其加到2 mL 0.1% Na_2CO_3 溶液中。用分光光度计在600 nm波长处测光密度值(OD),以 Na_2CO_3 溶液作空白对照。将小鼠处死,取肝脏和脾脏,用滤纸吸干脏器表面血污,称重^[17]。以吞噬指数表示小鼠碳廓清的能力。按下式计算吞噬指数a:

$$K = (\lg OD_1 - \lg OD_2) / (t_2 - t_1)$$

吞噬指数 $\alpha = K^{(1/3)} \times \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重})$
见表3。

表3 复方党参口服液对免疫抑制小鼠碳廓清吞噬指数的影响

组别	剂量 / $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	吞噬指数
空白对照组	--	$6.42 \pm 1.48^*$
模型组	--	5.40 ± 0.67
阳性药对照组	--	$6.37 \pm 1.36^*$
口服液低剂量组	10	$5.84 \pm 0.9^*$
口服液中剂量组	20	$6.35 \pm 0.54^*$
口服液高剂量组	40	$7.09 \pm 0.180^{**}$

注:与模型组比较 * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$

由表3可知,与空白组相比,模型组注射环磷酰胺后碳廓清吞噬指数显著降低 ($P \leq 0.05$),提示环磷酰胺能够诱导小鼠单核-巨噬细胞功能的降低,造模成功;与模型组相比,复方党参口服液3个剂量组小鼠碳廓清的吞噬指数均显著或极显著提

高 ($P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$),且随着给药剂量的增大吞噬指数呈现一定的剂量依赖性。说明复方党参口服液,能够对抗环磷酰胺所致的免疫抑制小鼠碳廓清吞噬指数的降低,能够一定程度上增强小鼠单核-巨噬细胞功能。

表4 党参山楂复方口服液对免疫抑制小鼠迟发型变态反应的影响 ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n=10$)

组别	剂量 / $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	DTH 程度 / mg
空白对照组	--	$15.24 \pm 2.82^*$
模型组	--	9.47 ± 2.13
阳性药对照组	--	$14.70 \pm 2.92^*$
口服液低剂量组	10	$15.04 \pm 3.73^*$
口服液中剂量组	20	$17.65 \pm 3.75^{**}$
口服液高剂量组	40	$19.01 \pm 3.11^{**}$

注:与模型组比较 * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$

2.3 迟发型变态反应 (DTH)

小鼠分组、给药、造模同“2.1”节下所述,于造模第1天,将各组小鼠腹部皮肤用硫化钡脱毛,范围约3 cm×3 cm,用0.1% DNFB 溶液50 μl 均匀涂抹致敏。5 d后,再用0.1% DNFB溶液10 μl 均匀涂抹于小鼠右耳(两面)进行攻击。攻击后24 h 颈椎脱臼处死小鼠,剪下左右耳壳。用打孔器取下直径8 mm的耳片,称重。以左、右耳的重量差值表示DTH的程度^[18],见表4。

由表4可知,与空白组相比,模型组注射环磷酰胺后小鼠迟发型变态反应的DTH程度明显降低($P \leq 0.05$),说明环磷酰胺能够降低小鼠迟发型变态反应能力,造模成功;与模型组相比,复方党参口服液3个不同剂量组的小鼠DTH程度均显著或极显著提高($P \leq 0.05$ 或 $P \leq 0.01$),且呈一定的剂量依赖性,说明复方党参口服液能够提高免疫低下小鼠迟发型变态反应的耳廓肿胀度,能够在一定程度上改善由环磷酰胺所致的小鼠细胞免疫功能的降低。

2.4 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验

采用 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化, MTT

法检测脾淋巴细胞的活力^[19]。小鼠分组、给药、造模同“2.1”节下所述,造模后第5 d,脱颈椎处死小鼠,于操作台内无菌取脾,剔除多余脂肪和结缔组织,置于盛有适量预冷的红细胞裂解液的平皿中,并在脾下放置一块200目的尼龙膜,用注射器内芯轻轻将脾磨碎,制成单个细胞悬液。用Hank's液洗涤3次,每次离心5 min (1000 r·min⁻¹),弃上清,用吸管小心将呈雾状的脾细胞层吸出,用含10%胎牛血清的培养基将细胞调整为所需浓度。

将所制备的脾淋巴细胞悬液按照小鼠灌胃给药的分组进行种板,每孔50 μL (约含细胞 1×10^4 个),每组设置10个复孔,5个孔加以培养基配制的ConA (终浓度0.325 μg·mL⁻¹) 100 μL,另外5个孔加同体积的空白培养基。

于培养箱中孵育72 h,加入MTT,继续置于培养箱中4 h后,加入10%的十二烷基磺酸钠100 μL。继续孵育12 h后,于570 nm测量各孔光密度(OD)值。以光密度差值表示脾淋巴细胞的增殖能力,光密度差值=ConA 诱导孔OD均值 - 无ConA 诱导孔OD均值,见表5。

表5 复方党参口服液对刀豆蛋白诱导的脾淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{X} \pm SD, n=10$)

组别	剂量 / mL·kg ⁻¹	Δ OD
空白对照组	--	0.166 ± 0.040**
模型组	--	0.093 ± 0.037
阳性药对照组	--	0.131 ± 0.030*
口服液低剂量组	10	0.131 ± 0.041*
口服液中剂量组	20	0.144 ± 0.043*
口服液高剂量组	40	0.156 ± 0.029**

注:与模型组比较 * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$

结果见表5,与空白组相比,模型组注射环磷酰胺后小鼠脾淋巴细胞的光密度差值ΔOD极显著地降低($P \leq 0.01$),说明环磷酰胺可抑制小鼠脾淋巴细胞的增殖转化,造模成功;与模型组相比,复方党参口服液3个不同剂量组小鼠的脾淋巴细胞光密度差值均显著或极显著地升高($P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$),且呈一定的剂量依赖性,说明复方党参口服液能够一定程度上逆转环磷酰胺所致的小鼠脾淋巴细胞增殖转化能力的降低,增强小鼠的细胞免疫功能。

2.5 数据处理

以上各组实验数据的处理均应用统计软件SPSS19.0 进行处理分析。数据均以 $\bar{X} \pm SD$ 表示,两组小样本均数的比较均采用student's t-test。

3 讨论

根据《保健食品检验与评价技术规范》中增加免疫力功能的判定标准“血液白细胞总数、细胞免疫功能、体液免疫功能、单核-巨噬细胞功能及NK细胞活性五个方面测定中,任两个方面试验结果为阳性,则判定受试药物具有增强免疫力的作

用”^[25]，本文各相关免疫学实验结果表明：复方党参口服液能够提高环磷酰胺所致的免疫低下小鼠的免疫器官指数、血液白细胞数、小鼠的碳粒廓清吞噬指数和迟发型变态反应的DTH程度，促进脾淋巴细胞的增殖，显示出复方党参口服液对白细胞的生成、单核-巨噬细胞功能、细胞免疫功能、有明显的增强作用，提示该制剂对免疫低下机体有一定的免疫增强作用。

参考文献：

- [1] 黄琬凌, 李仲雄, 曾里, 等. 免疫调节功能壳寡糖胶囊的研制[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(10): 198-201.
- [2] 刘华. 双功能富莱欣牌蜂胶软胶囊的研制[J]. 食品科技, 2012, 37(1): 89-93.
- [3] 叶放. 增强免疫力保健食品人体试食试验人群筛选标准的探讨[J]. 中国全科医学, 2014, 17(5): 542-545.
- [4] 高峰. 中药免疫增强剂作用机理的研究进展[J]. 中兽医学杂志, 2007, (2): 41-43.
- [5] 王欢, 李宛真, 汪弋力, 等. 中药复方作为免疫增强剂的可行性分析及探讨[J]. 中国卫生产业, 2013, (24): 172, 174.
- [6] 陈文霞, 张培, 高霞, 等. 硒化纹党参多糖和其抗A549细胞的活性[J]. 中成药, 2015, 37(11): 2408-2413.
- [7] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [8] 于蓓蓓, 闫雪生, 孙丹丹. 山楂药理作用及其机制研究进展[J]. 中南药学, 2015, 13(7): 745-748.
- [9] 植飞, 郑卫平, 陈平, 等. 枸杞多糖水提工艺的优选[J]. 中药材, 2004, 27(12): 948-950.
- [10] 陈克克. 中药党参的研究概况[J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2008, 11(2): 33-39.
- [11] 张晓君, 祝晨, 胡黎, 等. 党参多糖对小鼠免疫和造血功能的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(3): 174-176.
- [12] Yongxu S, Jicheng L. Structural Characterization of A Water-soluble Polysaccharide from the Roots of *Codonopsis Pilosula* and Its Immunity Activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 43(3): 279-282.
- [13] 邓自辉, 牛阳, 王荣, 等. 枸杞多糖药理作用的研究现状[J]. 临床合理用药, 2011, 4(12B): 164-165.
- [14] 高翔. 枸杞多糖对小鼠巨噬细胞免疫功能的影响研究[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(12): 237-238.
- [15] 陈佳, 宋少江. 山楂的研究进展[J]. 中药研究与信息, 2005, 7(7): 20-23, 26.
- [16] 郭美仙, 施贵荣, 刘晓波. 三叶悬钩子对小鼠免疫器官和巨噬细胞吞噬功能的影响[J]. 中国药事, 2009, 23(5): 428-429.
- [17] 古秋莉, 黄聪琳, 姜华, 等. 镰形棘豆黄酮苷元对免疫抑制小鼠非特异免疫功能的影响[J]. 西部中医药, 2016, 29(4): 14-16.
- [18] 江长优, 张健, 赵江贺. 牡蛎多糖增强小鼠免疫功能作用研究[J]. 中成药, 2013, 35(5): 1062-1065.
- [19] 张娟, 卿德刚, 孙宇, 等. 复方大枣片增强免疫功能的实验研究[J]. 西部中医药, 2014, (3): 28-31.
- [20] 李佳川, 程雪瑶, 沈晓飞, 等. 杞圆桂花膏对免疫低下模型小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药理与临床, 2012, 28(5): 204-205.

(收稿日期 2017年1月21日 编辑 范玉明)