

金翁止痢颗粒对免疫低下小鼠的免疫调节作用^①

易 强¹, 孙振华², 朱兆荣¹,
彭 诗¹, 朱买勋¹, 刘 娟¹

1. 西南大学(荣昌校区)兽医科学研究中心中药创新实验室, 重庆 荣昌 402460;
2. 四川巴尔农牧集团有限公司兽药研究所, 四川 荣县 643100

摘要: 为探讨金翁止痢颗粒对免疫低下小鼠的免疫调节作用, 将 72 只小鼠随机分为空白组、模型组、阳性药物组、金翁止痢颗粒高剂量组、中剂量组、低剂量组, 其中空白组小鼠给予生理盐水, 模型组与各药物组小鼠腹腔注射环磷酰胺构建免疫低下模型。造模成功后, 模型组给予生理盐水, 阳性药物组给予 2 g/kg 黄芪多糖液, 金翁止痢颗粒高剂量组、中剂量组、低剂量组分别灌胃 20 g/kg、16 g/kg、12.8 g/kg 的金翁止痢颗粒提取液, 1 次/d, 连续治疗 7 d 后, 检测小鼠碳粒廓清指数、免疫器官指数, T/B 淋巴细胞转化等指标。结果表明, 金翁止痢颗粒能显著提高免疫低下小鼠碳粒廓清指数、免疫器官指数, 促进 T/B 淋巴细胞转化, 与模型组相比差异极具有统计学意义($p < 0.01$), 表明金翁止痢颗粒具有增强免疫低下小鼠免疫功能的作用。

关键词: 金翁止痢颗粒; 免疫低下; 增强免疫

中图分类号: S853.74

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)01-0019-06

近年来, 随着集约化养殖的兴起, 免疫抑制性疾病不同程度地出现, 并引发混合感染, 对免疫系统造成严重损伤, 导致对其他病原体的保护力下降, 增加了感染和致病机率, 加大了治疗难度, 提高了死亡率, 给养殖业造成巨大损失。近年的研究表明, 中药具有增加免疫细胞数量、增强免疫力、提高疫苗抗体水平、抗病毒、保护细胞、抗炎^[1-4]、增强抗氧化酶活性^[5]等作用。本研究将具有清热解毒, 除湿止痢, 扶正祛邪等功能的金石翁芍散^[6]组分进行调整, 并根据其有效活性成分特点, 提取制备成金翁止痢颗粒, 通过建立环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)致小鼠免疫低下模型, 研究其对免疫低下小鼠的免疫调节作用, 为今后临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 动 物

小鼠, 昆明种, 体质量(20±2) g, 健康无病, 雌、雄各半, 购于西南大学(荣昌校区)实验动物中心。

^① 收稿日期: 2014-02-10

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201303040-05)。

作者简介: 易 强(1989-), 男, 重庆荣昌人, 硕士研究生, 主要从事中兽药药理与毒理学研究。

通信作者: 刘 娟, 教授。

1.1.2 主要试剂

HBSS 缓冲液(美国 Gibco 产品, 8112128), RPMI-1640(美国 Gibco 产品, 8113075); 小鼠淋巴细胞分层液(上海生工生物产品, LJ 0407S0513 J), 刀豆球蛋白(ConA, 上海生工生物产品 CAS 11028-71-0); 脂多糖(美国 Sigma 产品, 2070 B 67)、MTT(美国 Sigma 产品, 2070 B 67); 注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司产品, 12052025); 黄芪多糖注射液(质量浓度: 10 mg/mL, 重庆天龙牧业科技有限公司产品, 20120310); 金翁止痢颗粒, 由西南大学(荣昌校区)兽医科学研究中心中药创新实验室摸索提取工艺, 四川巴尔农牧集团有限公司质量技术部研制; 其他均为国产分析纯或化学纯。

1.1.3 主要仪器

TU-1800PC 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); AE-240S 电子分析天平(梅特勒—托利多仪器有限公司); 3111 型隔水式二氧化碳培养箱(Thermo Electron Corporation USA); SE-2000 型 Noink 倒置显微镜(日本 Noink 公司); Model 680 酶标仪(Bio-Rad Laboratories, USA); RE-5205 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)等实验室常规仪器。

1.2 方 法

1.2.1 金翁止痢颗粒提取液的制备

金翁止痢颗粒由金银花、黄芪、板蓝根、苦参、甘草、白头翁等组成, 采用水醇法提取, 蒸馏水和无水乙醇按照 1:1 的比例混合, 提取中药 3 次, 合并溶液, 浓缩至需要的药物质量浓度(生药 1 g/mL), 制备成 1 g 颗粒含 1 g 生药; 临用前用 50%乙醇溶液提取成提取液(生药 1 g/mL), 105 °C 灭菌 15 min, 4 °C 保存, 使用时用生理盐水按试验要求进行稀释。

1.2.2 分组、模型建立与处理^[7-11]

将 72 只小鼠随机分为空白组、模型组、阳性药物组、金翁止痢颗粒提取液高剂量组、中剂量组、低剂量组, 其中空白组小鼠给予生理盐水, 模型组与各药物组小鼠腹腔注射环磷酰胺(80 mg/kg)0.2 mL, 制造免疫低下模型, 1 次/d/只, 共 5 d。模型组给予生理盐水、阳性药物组给予 2 g/kg 黄芪多糖液、高剂量组给予 20 g/kg 的金翁止痢颗粒提取液、中剂量组灌喂 16 g/kg 的金翁止痢颗粒提取液、低剂量组给予 12.8 g/kg 的金翁止痢颗粒提取液, 每组小鼠 12 只。按 0.02 mL/g 采取灌胃方式给药, 1 次/d, 连续给药 7 d。治疗后, 各组一半小鼠眼眶采血, 血液用于碳粒廓清指数测定; 取各组另一半小鼠脾脏、胸腺用于免疫器官指数测定(mg/g)及 T、B 淋巴细胞转化试验。

1.2.3 碳粒廓清指数测定^[12]

每组取一半小鼠于末次给药 24 h 后尾静脉注射体积分数为 25%的印度墨汁 10 mL/kg, 然后分别在 2 min 和 10 min 于每鼠眼球后静脉丛取血 20 μ L, 立刻吹入 2 mL 质量分数为 0.1%的 Na_2CO_3 溶液中, 取血完毕后以 2 mL 质量分数为 0.1%的 Na_2CO_3 溶液校零, 于 570 nm 测吸光度(OD)。按下式计算廓清指数 K。

碳粒廓清指数 $K = (\log OD_2 - \log OD_{10}) / (T_{10} - T_2) (OD_2, OD_{10}$ 分别为 2, 10 min 时的吸光度) ($T_{10} = 10$ min, $T_2 = 2$ min)。

1.2.4 免疫器官指数的测定^[13]

依据 1.2.2, 各组取一半小鼠, 称其体质量, 取脾脏和胸腺, 称湿质量, 并按下列公式计算脾指数和胸腺指数。脾指数 = 脾质量/体质量(mg/g); 胸腺指数 = 胸腺质量/体质量(mg/g)。

1.2.5 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞转化试验测定^[14-15]

在无菌条件下, 取 1.2.2 各组小鼠脾脏, 然后用 PBS 缓冲液冲洗两遍。用无菌的研磨器研磨后取浆液, 离心(1 000 r/min) 5 min, 弃上清液, 加入 pH 为 7.2 的 TrisNH_4Cl 5 mL, 轻轻吹打, 使红细胞完全破裂。离心(1 000 r/min) 5 min, 弃上清液, 用 PBS 缓冲液冲洗 1 次, 再以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上

清液. 用含 10% 的新生牛血清及 2% 庆大霉素的 RPMI-1640 全培养液重悬细胞, 调整脾细胞浓度为 3×10^6 个/mL, 备用.

(1) T 淋巴细胞转化试验

参照改进 MTT 法, 取 96 孔细胞培养板, 每孔加制备成的脾细胞悬液 200 μ L, 刀豆蛋白 A 15 μ L (终质量浓度为 6 mg/L), 每组 8 复孔, 于 37 $^{\circ}$ C 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 72 h. 于培养结束前 4 h 弃上清 100 μ L, 加入 MTT 液 20 μ L 继续培养 4 h, 吸去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μ L 终止反应, 将 96 孔板移入平板震荡器, 水平震荡 10 min, 使 MTT 还原产物完全溶解, 用酶联免疫检测仪于 630 nm 波长处测定每孔吸光度(OD 值).

(2) B 淋巴细胞转化试验

操作方法与 T 淋巴细胞转化试验相同. 仅将试验中刀豆蛋白 A 换成脂多糖 20 μ L/孔 (终质量浓度为 50 mg/L).

1.2.6 数据统计方法

所有数据均输入 EXCEL 2003, 再用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行显著性检验和方差分析. 试验数据均采用 $\bar{x} \pm SD$ 表示.

2 结 果

2.1 注射用环磷酰胺致免疫低下小鼠模型临床表现

腹腔注射环磷酰胺 1 d 后, 小鼠表现为焦躁不安, 2 d 后表现出精神沉郁、嗜睡、采食量降低、逐渐消瘦、毛发有脱落.

2.2 免疫器官指数测定结果

试验结果从表 1 可知, 模型组小鼠脾脏指数和胸腺指数明显降低, 与空白组相比, 差异极具有统计学意义($p < 0.01$); 金翁止痢颗粒高、中剂量组脾脏指数和胸腺指数升高, 与模型组相比, 差异极具有统计学意义($p < 0.01$); 金翁止痢颗粒高、中剂量组脾脏指数和胸腺指数, 与阳性药物组相比, 差异不具有统计学意义($p > 0.05$).

表 1 金翁止痢颗粒对免疫低下小鼠免疫器官指数的影响($\bar{x} \pm SD$)

组 别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	脾脏指数/ (mg · g ⁻¹)	胸腺指数/ (mg · g ⁻¹)
空白组	—	4.465 ± 0.43Aa	1.122 ± 0.29Aa
模型组	—	3.131 ± 0.20B	0.865 ± 0.30Bd
阳性药物组	2	4.453 ± 0.62Aa	1.190 ± 0.30Aa
金翁止痢颗粒高剂量组	20	4.445 ± 0.62Aa	1.149 ± 0.15Aa
金翁止痢颗粒中剂量组	16	4.329 ± 0.31Aa	1.131 ± 0.12Aa
金翁止痢颗粒低剂量组	12.8	4.029 ± 0.18Ab	0.976 ± 0.24Bb

注: 表 1 中组间比较, 不同大写字母表示差异极具有统计学意义($p < 0.01$), 不同小写字母表示差异具有统计学意义($p < 0.05$), 无字母或字母相同者表示差异不具有统计学意义($p > 0.05$), 下同.

2.3 碳粒廓清指数测定结果

从表 2 可知, 模型组小鼠血液碳粒廓清指数明显降低, 与空白组相比, 差异极具有统计学意义($p < 0.01$); 金翁止痢颗粒提取液高、中剂量组和阳性药物组碳粒廓清指数提高, 与模型组相比, 差异极具有统计学意义($p < 0.01$), 金翁止痢颗粒提取液高、中剂量组与阳性药物组相比较, 差异不具有统计学意义($p > 0.05$), 表明金翁止痢颗粒高、中剂量免疫增强效果较好.

表 2 金翁止痢颗粒对免疫低下小鼠碳粒廓清指数(α)的影响($\bar{x}\pm SD$)

组 别	剂量/(g·kg ⁻¹)	碳粒廓清指数(α)
空白组	—	6.288±0.53A
模型组	—	3.159±0.12Cb
阳性药物组	2	5.289±0.31B
金翁止痢颗粒高剂量组	20	5.368±0.12B
金翁止痢颗粒中剂量组	16	5.164±0.01B
金翁止痢颗粒低剂量组	12.8	3.629±0.21Ca

2.4 金翁止痢颗粒剂对 T,B 淋巴细胞增殖的影响

由表 3 可知,模型组小鼠 T,B 淋巴细胞转化率明显下降,与空白组相比,差异极具有统计学意义($p<0.01$);金翁止痢颗粒能明显增加 T,B 淋巴细胞的转化率,各剂量组均增加,与模型组相比,差异极具有统计学意义($p<0.01$);金翁止痢颗粒高、中剂量组 T,B 淋巴细胞转化率与阳性药物组相比,差异不具有统计学意义($p>0.05$).结果表明金翁止痢颗粒高、中剂量免疫增强效果较好,且各剂量组间有一定的量效关系.

表 3 金翁止痢颗粒剂对小鼠 T,B 淋巴细胞增殖的影响($\bar{x}\pm SD$)

组 别	剂量/(g·kg ⁻¹)	T 淋巴细胞 OD ₆₃₀ 值	B 淋巴细胞 OD ₆₃₀ 值
空白组	—	0.414±0.09Aa	0.393±0.04Aa
模型组	—	0.263±0.01B	0.143±0.01B
阳性药物组	2	0.514±0.01Ab	0.435±0.01Aa
金翁止痢颗粒高剂量组	20	0.510±0.03Ab	0.416±0.08Aa
金翁止痢颗粒中剂量组	16	0.483±0.04Ab	0.390±0.03Aa
金翁止痢颗粒低剂量组	12.8	0.427±0.03Aa	0.327±0.01Ab

3 分析讨论

1) 注射用环磷酰胺是一种烷化类的抗肿瘤药物,对免疫反应的许多环节均有抑制作用,从而抑制机体的细胞免疫和体液免疫反应过程,导致免疫力下降^[16].本试验注射用环磷酰胺所致的免疫低下小鼠表现为精神萎靡、嗜睡,采食量和饮水量减少,体温升高,尿淡黄色;免疫相关器官质量减轻;T,B 淋巴细胞转化率降低,巨噬细胞吞噬能力降低等,与相关研究报道^[15-16]一致.

2) 金翁止痢颗粒由金银花、黄芪、板蓝根、苦参、甘草、白头翁等药物组成,具有清热解毒,燥湿止痢,护正补虚、保肝利胆等功能.配方中主要药物金银花含有绿原酸^[17]、挥发油,可增强白细胞的吞噬功能和淋巴细胞的转化,促进炎性细胞的消散,降低中性粒细胞的体外分泌功能,调理淋巴细胞活性,显著增加白介素-Ⅱ的产生^[18];黄芪、板蓝根有效成分为多糖类,可增加抗体生成量,提高巨噬细胞、白细胞吞噬功能^[19],促进 IL-1,IL-2,IL-6,TNF 等细胞因子的产生与分泌^[20],促使小鼠 B 细胞分泌 IgG 2 a,介导细胞免疫^[17];苦参中苦参碱可改善微循环,增强吞噬细胞吞噬功能,从而调节机体免疫力;甘草酸中 K,Na,Ca 等金属离子可提高肺泡巨噬细胞的捕捉率,提高其吞噬活性和加快对尘粒的清除速度,还可维持巨噬细胞的生理功能,改善 T 淋巴细胞亚群间比例关系,调整 T 淋巴细胞的平衡,并能解除细胞免疫的抑制状态,提高细胞免疫功能^[21];白头翁中白头翁苷具有促进淋巴细胞转化,增强网状内皮系统功能的作用,且黄芪皂苷还可增强巨噬细胞酶蛋白合成系统功能,促进溶酶体生成,提高 NK 细胞数量^[22]的作用.

3) 网状内皮系统具有强大又迅速地吞噬某些可溶性异物或者廓清异物颗粒的能力,能快速清除机体

里产生的有害物质,其吞噬功能是机体非特异性免疫功能的衡量指标之一,可通过测定血液中的碳粒廓清指数来反应单核巨噬细胞系统的吞噬能力^[18];当机体处于免疫抑制状态时,机体非特异性免疫功能失调,可表现为淋巴细胞增殖和分化能力下降,NK 细胞、LAK 细胞功能降低,巨噬细胞的功能下降等,所以检测脾脏淋巴细胞中 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增殖能力是反映细胞免疫功能的常用方法^[15];免疫器官的发育状况直接影响机体免疫应答水平和抵抗外来微生物感染和侵入的能力,故检测免疫器官指数来反应机体细胞免疫和体液免疫机能的强弱水平.

4 结 语

金翁止痢颗粒能显著提高免疫低下小鼠碳粒廓清指数和免疫器官指数,促进 T,B 淋巴细胞转化,对环磷酸胺引起的免疫抑制具有调节作用,具有促进机体免疫力恢复,提高机体免疫功能的功效.

参考文献:

[1] 封海波,刘 娟,曾宪垠,等. 16 种四川道地药材对鸡胚成纤维细胞生长的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(6): 6—11.

[2] 王和勇,向 阳,唐 亮,等. 不同部位皮下注射 DNA 疫苗对小鼠体液免疫的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2008, 30(10): 89—94.

[3] 王 强,邹剑敏,童海兵,等. 中草药制剂对高邮鸭生产性能及肠道健康状况的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(8): 11—17.

[4] 余 姣,聂 奎,孙 哲,等. 中药“炎痢饮”抗炎镇痛活性研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(5): 26—29.

[5] 桂志胜,刘 娟,杜林林,等. 复方参苓对防止心肌细胞免受犬细小病毒损伤的保护和抗氧化作用 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(7): 27—31.

[6] 李锦宇,郑继方,罗超应,等. 金石翁芍散(禽瘟王)对鸡白痢治疗试验 [J]. 中兽医医药杂志, 2010, 29(1): 46—47.

[7] MOTOYOSHI Y, KAMINODA K, SAITOH O, et al. Different Mechanisms for Anti-Tumor Effects of Low-and High-Dose Cyclophosphamide [J]. Oncology Reports, 2006, 16(1): 141—146.

[8] MOSER S A, DOMER J E. Effects of Cyclophosphamide on Murine Candidiasis [J]. Infection and Immunity, 1980, 27(2): 376—386.

[9] MCCORMICK S, DOWLER K, ARMSTRONG J A, et al. Cyclophosphamide Immunosuppression During Lymphotropic Herpesvirus Infection in the Guinea Pig Model. A Histopathologic and Virologic Study [J]. The American Journal of Pathology, 1987, 127(3): 538—548.

[10] 周顺长,史宵燕,辛华雯,等. 不同途径给以环磷酸胺诱发 BALB/c 小鼠免疫低下的结果比较 [J]. 实验动物与比较医学, 2006, 26(1): 38—39.

[11] 高 芃,钱嘉林,刘长喜,等. 环磷酸胺对小鼠免疫抑制的动物模型建立 [J]. 劳动医学, 2004, 21(4): 314—318.

[12] 张 丹,张建军. CE 对衰老小鼠免疫器官指数以及神经系统病理改变的影响 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2005, 12(5): 296—299, 318.

[13] 袁思霓,张 峰. 银耳多糖的提取及其对小鼠免疫功能的影响 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(26): 8090—8091.

[14] 赵 洁,王哦鸣,李继祥. MTT 法检测淋巴细胞增殖能力的影响因素 [J]. 畜禽业, 2008(2): 28—30.

[15] 张有聪,刘淑英. T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2006, 27(5): 75—78.

[16] 胡成穆,陈 琳,李 荣,等. 豹皮樟总黄酮对免疫低下小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(6): 804—808.

[17] 余 姣,聂 奎,孙 哲,等. 中药“炎痢饮”抗炎镇痛活性研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(5): 26—29.

[18] 路西明,王学廷,王建刚,等. 白头翁对小鼠免疫功能的影响 [J]. 甘肃中医学院学报, 1998, 15(2): 32—34.

- [19] 陈章宝, 彭 霞, 何江梅, 等. 掌叶蝎子草多糖降血糖活性及其体内外抗氧化能力研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(12): 54—60.
- [20] 张 磊, 胡 格, 索占伟, 等. 黄芪多糖对体外培养大鼠肠黏膜微血管内皮细胞增殖的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(3): 80—83.
- [21] 孙 姝. 石膏的药理作用与微量元素的探究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2009, 7(5): 170.
- [22] 杨凤华. 黄芪及其有效成分的研究概况 [J]. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(10): 1112—1114.

The Effects of the Jin Weng Zhi Li Granule on the Immune Regulation in Immunodepressed Mice

YI Qiang¹, SUN Zhen-hua², ZHU Zhao-rong¹,
PENG Shi¹, ZHU Mai-xun¹, LIU Juan¹

1. Chinese Herbal Drugs Innovation Research Lab, Veterinary Science Experiment Teaching Center, Southwest University (Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China;
2. Research Institute of Veterinary Medicine, Sichuan Baer Agriculture and Animal Husbandry Group co. , LTD. , Rongxian Sichuan 643100, China

Abstract: This study was designed to explore the effect of the Jin Weng Zhi Li granule on immune regulation of immunosuppressed mice. 72 mice were divided randomly into blank group which was given physiological saline, the high dose, middle dose, low dose group of Jin Weng Zhi Li granule, model group and positive medicine group were used to establish the immunosuppressed mice models by abdominal injection of cyclophosphamide. After successful modeling, model group was given physiological saline, positive medicine group was given 2 g/kg Astragalus polysaccharides. 20 g/kg, 16 g/kg, 12.8 g/kg of the Jin Weng Zhi Li granule extract were given to the high dose, middle dose, low dose group of Jin Weng Zhi Li granule with once a day for 7 days by gavage. The carbon clearance index, immune organ index, T and B lymphocyte proliferation in immunosuppressed mice were measured. The results showed that Jin Weng Zhi Li granule could increase the carbon clearance index, immune organ index and T, B lymphocyte proliferation in immunosuppressed mice, compared with model group, the difference was extremely significant ($p < 0.01$). It suggested that Jin Weng Zhi Li granule could enhance immune function of immunosuppressed mice.

Key words: Jin Weng Zhi Li granule; immunosuppressed; enhance immune function

责任编辑 夏 娟

