

复方苦参总黄酮对免疫抑制小鼠免疫功能的影响^①

刘付国树, 刘俊玮, 朱兆荣, 罗艺晨,
邱 洪, 赖建彬, 刘 娟

西南大学(荣昌校区)兽医科学研究中心中药创新研究室, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为了观察复方苦参总黄酮对免疫抑制小鼠的免疫增强作用, 用环磷酰胺构建小鼠免疫抑制模型, 给免疫抑制小鼠灌服复方苦参总黄酮, 检测碳粒廓清指数, 脾脏指数, 胸腺指数, 血清溶血素水平及 T、B 淋巴细胞转化率。结果显示: 复方苦参总黄酮能够提高免疫抑制小鼠的碳粒廓清指数、脾脏指数、胸腺指数, 同时也能够提高小鼠血清溶血素水平和增强 T、B 淋巴细胞转化率, 与模型组比较差异极具有统计学意义($p < 0.01$), 且高剂量和中剂量组效果优于低剂量组, 差异具有统计学意义($p < 0.05$)或者极具有统计学意义($p < 0.01$), 表明复方苦参总黄酮能增强机体的免疫功能。

关键词: 复方苦参总黄酮; 免疫抑制; 免疫功能

中图分类号: S853.75

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)07-0025-05

复方苦参是由苦参、黄芩、黄芪、金银花、白头翁等组成的中药复方, 具有清热利湿、止痢的作用^[1]。前期研究表明^[1-4], 复方苦参能够抑制凋亡基因 Bax 的表达, 促进抗凋亡基因 Bcl-2 的表达; 同时也能够通过提高干扰素的表达和吞噬细胞的指数增进机体免疫力。中药中广泛存在着一种由光合作用产生的黄酮类化合物, 研究表明^[5-7], 黄酮类化合物具有抗氧化、提高机体免疫力等作用。本文通过分离复方苦参中的总黄酮, 并作用于免疫抑制小鼠模型, 测定小鼠的免疫功能, 以探索复方苦参中总黄酮的作用, 为复方苦参有效成分的研究提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

健康昆明种小鼠, 体质量 18~22 g, 由西南大学荣昌校区实验动物科提供。

1.2 试验药品及试剂

复方苦参总黄酮(以下简称总黄酮), 由西南大学荣昌校区兽医科学研究中心中药创新研究室研制; 豚鼠血清补体, 购于广州蕊特生物科技有限公司; 环磷酰胺, 购于山西普德药业有限公司; 黄芪多糖注射液, 购于重庆天龙牧业科技有限公司, 批号: 140225; RPMI-1640, 购于 Gibco 公司; MTT、脂多糖, 均购于 Sigma 公司; 刀豆蛋白 A: 购于北京邦定泰克生物技术公司, 其他试剂均为分析纯。

1.3 试验分组及免疫抑制模型的建立^[8]

将 60 只昆明种健康小鼠平均随机分为空白对照组、模型组、阳性药物组、复方苦参总黄酮(高、中、低)剂量组, 每组小鼠 10 只。各组(除空白对照组外)腹腔注射环磷酰胺 0.2 mL(80 mg/kg)构建免疫抑

① 收稿日期: 2014-06-07

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303040); 国家自然科学基金(31172357); 科技基础性工作专项(2013FY110600)。

作者简介: 刘付国树(1989-), 男, 广东茂名, 硕士研究生, 主要从事中兽医医药研究。

通信作者: 刘 娟, 教授。

制模型, 1 次/d, 共 5 d. 模型成功后, 阳性药物组给予黄芪多糖注射液(30 mg/kg), 复方苦苓总黄酮(高、中、低)剂量组给予 40 mg/kg、20 mg/kg、10 mg/kg 总黄酮, 空白对照组和模型组给予等量生理盐水, 灌胃给药, 1 次/d, 连续 14 d.

1.4 碳粒廓清指数和免疫器官指数的测定

参照文献[9–10], 末次给药 24 h, 对小鼠称量, 然后小鼠尾静脉注射印度墨汁(0.01 mL/g), 分别在注射 2 min, 10 min 后摘眼球采血, 并迅速加入 2 mL 0.1 % Na₂CO₃ 溶液中, 充分混匀 10 min 并以 Na₂CO₃ 溶液作为空白对照校对, 最后在 650 nm 下测定吸光值(OD). 采血结束后, 剖解小鼠取脾脏和胸腺, 称其质量, 计算脾脏指数(A)、胸腺指数(B)、碳粒廓清指数(K)和校正廓清指数(α). $A = \text{脾脏}(\text{mg}) / \text{体质量}(\text{g})$; $B = \text{胸腺}(\text{mg}) / \text{体质量}(\text{g})$; $K = (\lg OD_1 - \lg OD_2) / T$, $\alpha = K^{1/3} \times \text{体质量} / (\text{肝质量} + \text{脾质量})$, T 为 2 次采血的时间间隔 8 min.

1.5 血清溶血素的测定

按照文献[11]操作, 在给药第 7 d 时, 各组小鼠腹腔注射 5% 鸡红细胞悬液 0.2 mL, 连续 7 d, 末次给药 24 h, 各组小鼠摘眼球采血制备成血清, 经生理盐水稀释成 100 倍后, 取其 1 mL, 0.5 mL 5% 鸡红细胞悬液和 0.5 mL 10 % 补体混匀, 放置于 37 °C 恒温箱中 30 min, 于 0 °C 冰箱终止反应, 最后离心取上清液于 540 nm 处测定吸光值(OD), 溶血素半数溶血值 $HC_{50} = (\text{样品吸光度值} / \text{鸡红细胞半数溶血时吸光度值}) \times \text{稀释倍数}$.

1.6 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞转化试验测定

参照文献[12], 取脾脏在无菌条件下, 经研磨器研磨后制备脾细胞悬浮液, 经细胞计数器计数使脾细胞为 3×10^6 个/mL.

1.6.1 T 淋巴细胞转化试验

参照改进的 MTT 法^[13], 在 96 孔细胞培养板中, 每孔加脾细胞悬液 200 μ L, 刀豆蛋白 A 15 μ L(终质量浓度为 6 mg/L), 于细胞培养箱中培养 72 h. 于培养结束前 4 h 时, 弃上清, 加入 20 μ L MTT 溶液继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 150 μ L DMSO 终止反应, 用酶标仪在 630 nm 处测定每孔吸光值(OD 值).

1.6.2 B 淋巴细胞转化试验

将 1.6.1 试验中的刀豆蛋白 A 换成每孔 20 μ L 脂多糖(终质量浓度为 50 mg/L), 其余操作方法同 1.6.1.

1.7 数据统计分析方法

所有数据用 Excel 进行收集, 然后用 SPSS 20.0 软件对所有数据进行方差分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm SD$ 表示.

2 结 果

2.1 复方苦苓总黄酮对小鼠碳粒廓清指数的影响

结果显示, 模型组小鼠校正廓清指数平均值为 3.159, 与空白对照组比较差异极具有统计学意义($p < 0.01$); 总黄酮(高、中、低)剂量组小鼠校正廓清指数平均值分别为 4.907, 4.063 和 3.507, 与模型组比较总黄酮校正廓清指数 α 升高, 其中高、中剂量组差异极具有统计学意义($p < 0.01$)(表 1).

表 1 复方苦苓总黄酮对免疫抑制小鼠碳粒廓清指数的影响($\bar{x} \pm SD$)

组 别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	校正廓清指数 α
空白对照组	—	6.288±0.53
模型组	—	3.159±0.12 ^{ΔΔ}
阳性药物组	30	5.289±0.31 ^{**}
总黄酮高剂量组	40	4.907±0.13 ^{**}
总黄酮中剂量组	20	4.063±0.04 ^{**}
总黄酮低剂量组	10	3.507±0.01 [*]

注: 与模型组比较, ** 表示 $p < 0.01$, * 表示 $p < 0.05$; 与空白对照组比较, $\Delta\Delta$ 表示 $p < 0.01$. 下同.

2.2 复方苦苓总黄酮对免疫低下小鼠免疫器官指数的影响

结果显示, 模型组小鼠胸腺指数、脾脏指数平均数分别为 0.48 和 1.84, 与空白对照组比较差异极具有

统计学意义($p<0.01$);与模型组比较总黄酮(高、中、低)剂量组小鼠胸腺指数升高,差异极具有统计学意义($p<0.01$);与模型组比较总黄酮高、中剂量组小鼠脾脏指数升高,差异极具有统计学意义($p<0.01$),低剂量组差异不具有统计学意义(表 2)。

表 2 复方苦苓总黄酮对免疫抑制小鼠免疫器官指数的影响($\bar{x}\pm SD$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脾脏指数	胸腺指数
空白对照组	—	4.31±0.12	1.87±0.11
模型组	—	1.84±0.15 ^{ΔΔ}	0.48±0.08 ^{ΔΔ}
阳性药物组	30	3.16±0.12 ^{**}	1.57±0.06 ^{**}
总黄酮高剂量组	40	3.86±0.03 ^{**}	1.99±0.01 ^{**}
总黄酮中剂量组	20	3.22±0.31 ^{**}	0.94±0.04 ^{**}
总黄酮低剂量组	10	1.95±0.41	0.76±0.03 ^{**}

2.3 复方苦苓总黄酮对免疫抑制小鼠血清溶血素的影响

结果显示,模型组小鼠血清溶血素 HC_{50} 平均值为 0.620,与空白对照组比较,差异极具有统计学意义($p<0.01$);与模型组比较,总黄酮高、中剂量组小鼠血清溶血素 HC_{50} 升高,差异极具有统计学意义($p<0.01$),低剂量组差异不具有统计学意义($p>0.05$)(表 3)。

表 3 复方苦苓总黄酮对免疫抑制小鼠血清溶血素的影响($\bar{x}\pm SD$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血清溶血素 HC_{50}
空白对照组	—	1.515±0.31
模型组	—	0.620±0.25 ^{ΔΔ}
阳性药物组	30	1.486±0.11 ^{**}
总黄酮高剂量组	40	1.496±0.02 ^{**}
总黄酮中剂量组	20	1.096±0.01 ^{**}
总黄酮低剂量组	10	0.582±0.14

2.4 复方苦苓总黄酮对小鼠 T、B 淋巴细胞增殖的影响

结果显示,与空白对照组比较,模型组小鼠 T、B 淋巴细胞转化率降低,T 淋巴细胞、B 淋巴细胞 OD 平均值分别为 0.193,0.148,差异极具有统计学意义($p<0.01$);与模型组比较总黄酮高、中剂量组能明显增加 T、B 淋巴细胞的转化率,差异极具有统计学意义($p<0.01$)(表 4)。

表 4 复方苦苓总黄酮对免疫抑制小鼠 T、B 淋巴细胞增殖的影响($\bar{x}\pm SD$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	T 淋巴细胞(OD_{630})	B 淋巴细胞(OD_{630})
空白对照组	—	0.452±0.12	0.318±0.11
模型组	—	0.193±0.05 ^{ΔΔ}	0.148±0.08 ^{ΔΔ}
阳性药物组	30	0.316±0.12 ^{**}	0.357±0.06 ^{**}
总黄酮高剂量组	40	0.455±0.06 ^{**}	0.352±0.03 ^{**}
总黄酮中剂量组	20	0.309±0.01 ^{**}	0.286±0.04 ^{**}
总黄酮低剂量组	10	0.211±0.11	0.237±0.09 [*]

3 分析与讨论

复方苦苓是由苦参、黄芩、黄芪等中药组成的中药复方,具有清热解毒、利湿止痢等功效.苦参具有清热燥湿、利水、杀虫去积等作用,也能够有效地治疗湿热泻痢、水肿、黄疸等疾病^[14];黄芩富含黄芩苷能清热燥湿、泻火解毒、抗病毒、抗菌消炎,可有效防止由动物机体免疫抑制引起其他疾病的并发^[15].黄芪以黄芪多糖的有效成分最多,黄芪多糖能增加巨噬细胞数量,增强其吞噬功能,刺激巨噬细胞产生白细胞介素,促进机体胸腺细胞和脾细胞的增殖,诱导 T 细胞对淋巴因子的释放量^[16].诸药配伍组成复方苦苓方剂,可起到清热解毒,调节免疫的功效.现代药理表明^[17-18],中药总黄酮具有抗炎、抗过敏、抑制细菌和病毒及

调节机体免疫功能的功效。

单核巨噬细胞系统功能主要是对颗粒性物质如外来病毒等病原体进行吞噬和清除,主要是发挥非特异性免疫. 本试验是用印度墨汁尾静脉注入小鼠后,它可被肝、脾内的巨噬细胞及机体的单核巨噬细胞系统的其他巨噬细胞吞噬,从而使血液中的墨汁被清除,因此能够在一定程度上反应出机体单核巨噬细胞系统的吞噬功能. 免疫器官称质量方法^[19]是通过测定免疫器官质量,可间接反映 T,B 淋巴细胞的水平. 本研究表明复方苦芩总黄酮能够提高小鼠吞噬细胞的吞噬能力,提高胸腺及脾脏指数,并在一定程度上具有促进免疫力的功能.

当机体受到外来病原微生物等抗原刺激后,机体的 B 淋巴细胞会产生一种抗体——血清溶血素. 在体外,它能够与鸡红细胞和补体产生反应,使红细胞发生破裂与溶解,因此血清溶血素的质量分数可以反映机体 B 淋巴细胞免疫的能力^[20]. 本试验表明,总黄酮能增加小鼠血清溶血素,表明总黄酮可以提高小鼠的体液免疫水平. T 细胞主要的免疫作用是细胞免疫,一是与靶细胞结合,通过破坏细胞膜而让靶细胞死亡;二是释放淋巴因子,使免疫作用增强. 当机体受抗原刺激后, B 淋巴细胞能够迅速分化增殖,并且能够分化为浆细胞,合成和分泌各类免疫球蛋白,从而发挥体液免疫的作用^[21]. T,B 淋巴细胞增殖试验反应淋巴细胞数量增加,从而反映机体免疫应答反应的状态^[22]. 本研究发现,复方苦芩总黄酮高剂量组能明显增加 T, B 淋巴细胞的转化率,亦表明总黄酮能够增强机体的免疫水平.

4 结 论

复方苦芩总黄酮能够增强动物机体的免疫功能,主要是通过升高免疫抑制的小鼠的碳粒廓清指数,脾脏指数,胸腺指数,提高血清溶血素的水平及增强 T,B 淋巴细胞转化率.

参考文献:

- [1] 朱兆荣,刘 娟,杜林林,等. 复方苦芩对小鼠免疫功能及犬 IL-4, mRNA 和 IFN- γ mRNA 表达的影响 [J]. 中国兽医科学, 2012, 42(8): 875—880.
- [2] 邵秋红,凌榕镔,朱兆荣,等. 复方苦芩对感染猪传染性胃肠炎病毒的 PK-15 细胞中 Bcl-2/BAXmRNA 转录的影响 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(11): 2242—2250.
- [3] 杜林林,李 梁,刘 娟,等. 复方苦芩对犬细小病毒致肠黏膜细胞凋亡及相关基因表达的影响 [J]. 中国兽医学报, 2012, 32(10): 1511—1515, 1541.
- [4] 聂晨睿. 复方苦芩对犬细小病毒病防治作用及药理研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [5] 许效群,刘志芳,霍乃蕊,等. 苦荞糠皮总黄酮的抗氧化活性及免疫调节活性 [J]. 中国食品学报, 2012, 12(6): 42—47.
- [6] 封桂英. 黄芩茎叶总黄酮对 CIA 小鼠细胞免疫功能的影响 [D]. 承德: 承德医学院, 2013.
- [7] 徐 璐,李艳明,刘婧陶,等. 黄芪总黄酮对小鼠免疫功能的影响 [J]. 动物医学进展, 2013, 34(11): 36—39.
- [8] 王 慧,张 霞,程富胜,等. 酵母多糖对环磷酰胺所致免疫损伤大鼠的拮抗作用 [J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(3): 188—191.
- [9] 李杏媛,郭 丽,刘建伟,等. 不同中药复方对蛋鸡 ND 免疫效果的影响 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(5): 62—65.
- [10] 尚 军,李建菊,张国燕. 高寒乳白栓菌多糖对免疫抑制小鼠免疫活性的调节 [J]. 西南农业学报, 2012, 25(6): 2393—2395.
- [11] 于文会,张春燕,柏慧敏,等. 沙棘对大鼠免疫功能的影响 [J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(3): 11—12.
- [12] 于生兰,余祖功,葛竹兴,等. 蓝芩注射液对动物免疫功能的影响 [J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(2): 39—41.
- [13] 赵世云,赵新新,苏华荔,等. 猪外周血 T 淋巴细胞增殖反应 MTT 检测方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2010(12): 35—38.
- [14] 姚梅芬,张思巨,李 琳,等. 苦参中黄酮类成分及其药理作用研究现状 [J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(3): 110—112.
- [15] AHMED K A, XIE Y, ZHANG X, et al. Acquired pMHC I Complexes Greatly Enhance CD4(+) Th Cell's Stimulatory Effect on CD8(+) T Cell-Mediated Diabetes in Transgenic RIP-mOVA Mice [J]. Cell Mol Immunol, 2008, 5(6): 407—415.

- [16] NAGAI T, MORIGUCHI R, SUZUKI Y, et al. Mode of Action of the Anti-Influenza Virus Activity of Plant Flavonoid, 5, 7, 4'-Trihydroxy-8-Methoxyflavone, from the Roots of *Scutellaria Baicalensis* [J]. *Antiviral Res*, 1995, 26(1): 11—25.
- [17] 高晓雯, 郑维发, 彭烨城. 芫花根总黄酮含药血清对小鼠细胞免疫功能的影响 [J]. *中草药*, 2006, 37(5): 721—725.
- [18] 阎 莉, 郑作文, 卫智权. 广西藤茶总黄酮对免疫抑制小鼠体液免疫功能的影响 [J]. *中国民族医药杂志*, 2009, 15(10): 53—54.
- [19] 吕 英, 刘家福, 郑世民. 雏鸡应用益生素后胸腺和脾脏 T 细胞数量变化 [J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(5): 103—106.
- [20] 郭 兰, 吴爱萍, 赵志宇, 等. 荞麦花叶提取物对荷瘤小鼠免疫功能的影响 [J]. *医药导报*, 2013, 32(11): 1421—1424.
- [21] 赵 卓, 吴 超, 邹全明. T 细胞免疫优势应答机制的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(9): 1021—1023.
- [22] MA D, SHAN A, LI J, et al. Influence of an Aqueous Extract of *Ligustrum Lucidum* and an Ethanol Extract of *Schisandra Chinensis* on Parameters of Antioxidative Metabolism and Spleen Lymphocyte Proliferation of Broilers [J]. *Arch Anim Nutr*, 2009, 63(1): 66—74.

Effect of the Total Flavonoids in Kuqin Compound on Immune Function of Immunosuppressed Mice

LIUFU Guo-shu, LIU Jun-wei, ZHU Zhao-rong,
LUO Yi-chen, QIU Hong, LAI Jian-bin, LIU Juan

*Traditional Chinese Medicine Innovation Research laboratory, Department of Veterinary Medicine,
Southwest University (Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China*

Abstract: In order to study the effects of the total flavonoids in Kuqin compound on immunosuppressed mice. The model of immune suppression in mice was induced by cyclophosphamide and the immunosuppressed mice were fed by the total flavonoids in Kuqin compound, then detected the carbon clearance index, the spleen index, the thymus index, the serum hemolysim and the T,B lymphocyte proliferation rate in immunosuppressed mice. The results showed that the total flavonoids in Kuqin compound could increased the carbon clearance index, the immune organ index, the serum hemolysim and enhanced the T,B lymphocyte proliferation rate in immunosuppressed mice. The difference was significant compared with model group ($p < 0.01$), and the effect of high-dose group, mid-dose group were better the low-dose group, appeared difference ($p < 0.05$) or significant difference ($p < 0.01$). Therefore the total flavonoids in Kuqin compound could increase the body's immune function.

Key words: the total flavonoids in Kuqin compound; immunosuppression; immune function

责任编辑 夏 娟

