

乔海博,谷新利,朱晓庆,等.复方中药多糖不同给药途径对鸡淋巴细胞转化率的影响[J].江苏农业科学,2013,41(10):183-185.

# 复方中药多糖不同给药途径对鸡淋巴细胞转化率的影响

乔海博,谷新利,朱晓庆,李效振,张东升,贾书红

(石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832003)

**摘要:**将中药复方多糖制成口服剂和针剂,对鸡进行灌胃和注射给药,采用 MTT 比色法计算淋巴细胞转化率,探讨不同给药途径、不同药物浓度对细胞免疫的影响。结果表明:不同剂型、不同剂量的最佳纯度复方中药多糖均可显著提高淋巴细胞转化功能;在同剂型下均以中剂量效果最好;在不同剂型下以针剂中剂量见效最快,以口服中剂量药效最长。

**关键词:**复方中药多糖;口服剂;针剂;淋巴细胞;鸡

**中图分类号:** S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0183-03

在体外培养的正常机体淋巴细胞,在受到非特异性有丝分裂原(如 PHA、ConA)或特异性抗原刺激后,细胞代谢及其形态可发生一系列变化,主要表现为电荷改变、细胞内蛋白质和核酸合成增加、细胞形态的转化。因此在体外利用各种刺激剂激发淋巴细胞,根据其转化程度可测定淋巴细胞的应答功能,以此作为测定机体细胞免疫功能的指标<sup>[1-2]</sup>。

近年来,研究者发现左旋咪唑和中药多糖都具有增强机体免疫功能的效果,特别是由于多糖为非细胞毒性物质<sup>[3]</sup>而成为研究热点,其中又以对黄芪多糖<sup>[4-5]</sup>的研究最深入,而对复方中药多糖的研究较少。中药的精髓是复方,很少以单味成药。本研究将已分离纯化到一定纯度的中药复方多糖<sup>[6]</sup>制成口服剂和针剂,对鸡进行灌胃和注射给药,采用 MTT 比色法<sup>[7]</sup>计算淋巴细胞转化率<sup>[8]</sup>,探讨不同给药途径、不同药物浓度对细胞免疫的影响,以期将中药多糖活性成分开发

成免疫增强剂提供理论依据,为其临床用药奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验药物 中药复方原料:党参、山楂、熟地、川芎、何首乌、当归等 11 味中药(新疆石河子市医药公司)。

最佳纯度复方中药多糖<sup>[9]</sup>由石河子大学化学化工学院提供,含糖量 77.10%。用蒸馏水分别将其配制成高(50 mg/mL)、中(25 mg/mL)、低(12.5 mg/mL)剂量浓度。

黄芪多糖由石河子大学化学化工学院提供,含糖量 29.42%。用蒸馏水将其配制成 25 mg/mL 剂量浓度。

1.1.2 其他试剂及器材 盐酸左旋咪唑片(25 mg×100 片,批号 100608,杭州萧山兴农兽药制造有限公司);鸡淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);RPMI-1640 培养基(GIBCO 公司);胎牛血清(GIBCO 公司);刀豆蛋白(ConA)、脂多糖(LPS)、二甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma 公司);Synergy2 多功能酶标仪(Synergy2 Multi-Mode Microplate Reader)等。

1.1.3 试验动物 600 羽 1 日龄麻花鸡(新疆石河子市养鸡场)经临床检测合格后,按常规肉鸡饲养方式进行饲养,自由

收稿日期:2013-04-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:30960291)。

作者简介:乔海博(1984—),男,河南孟津人,硕士研究生,研究方向为中草药开发与利用。E-mail:harborjoe@163.com。

通信作者:谷新利,教授,博士生导师,从事中草药开发与利用研究。

E-mail:xlgu@shzu.edu.cn。

## 参考文献:

- [1] 韩建滨,侯小露,张 宇,等.奶牛胎衣不下与部分氧化和抗氧化指标变化的关系研究[J]. 广西畜牧兽医,2012,28(3):134-136.
- [2] 周帮会,王凤霞.奶牛胎衣不下发病机理研究进展[J]. 动物医学进展,2008,29(6):83-86.
- [3] 冯士彬,张 磊,李志明,等.乳房炎奶牛血液流变学指标及细胞因子的变化[J]. 中国兽医学报,2011,31(5):730-733,739.
- [4] 周帮会,刘荣欣,姜国均,等.“益母生化散”对胎衣不下奶牛胎盘激素含量的影响[J]. 中国兽医学报,2010,30(7):988-991.
- [5] Dudley D J, Trautman M S, Mitchell M D. Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1993, 76(2): 404-410.
- [6] Szekeres-Bartho J, Wegmann T G. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance[J]. Journal of Reproductive Immunology, 1996, 31(1/2):81-95.
- [7] 王爱华,闫 华.自然流产时蜕膜、绒毛组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-10 的水平研究[J]. 承德医学院学报,2002,19(3):189-192.
- [8] 吴琦嫦,陈美波. p53, bcl-2 和 bax 基因表达与 IUGR 胎盘细胞凋亡的相关性研究[J]. 现代妇产科进展,2000,9(4):265-267.
- [9] 刘智喜,李权武,武 浩,等.奶牛分娩前后血浆类固醇激素水平变化与胎衣不下的关系[J]. 核农学报,1994,8(3):172-176.
- [10] Laird S M, Tuckerman E M, Saravelos H, et al. The production of tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) by human endometrial cells in culture[J]. Human Reproduction, 1996, 11(6):1318-1323.
- [11] 吕建存,刘荣欣.四君子散与益母生化散对围产期奶牛血浆 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的影响[J]. 中国兽医杂志,2011,47(6):45-47.
- [12] 吕建存,安胜英,王凤霞.中药对围产期奶牛血浆 IL-2、IL-6 含量的影响[J]. 畜牧与兽医,2010,42(6):79-81.

饮水,自由采食(新疆天康饲料厂全价料)。

1.2 试验方法

在试验鸡 7 日龄后,将其随机分为 12 组,每组 50 羽。在试验鸡 8~14 日龄时,将 I~Ⅵ组设为口服组,Ⅶ~Ⅻ组设为针剂组。口服组和针剂组分别对应给予:生理盐水、15 mg/kg 盐酸左旋咪唑和高、中、低 3 种剂量的黄芪多糖、复方中药,每天 1 次,每次 0.2 mL/羽。在试验鸡 15、22、29、36、43、50 日龄时,每组随机取 10 羽,采集抗凝血备用。

1.2.1 外周血淋巴细胞分离 采用文献[10-11]报道的方法,取抗凝血 2 mL,用等量 Hanks 液稀释,将其加于 2 mL 淋巴细胞分离液上层,2 000 r/min 离心 10 min,吸取淋巴细胞,移入无菌离心管,适量 Hanks 液洗涤 2 次,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清,RMPI 1640 完全培养基(含 100 mL/L 小牛血清)悬浮沉淀,6 g/L 台盼蓝拒染,活细胞计数,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL 的单细胞悬液,取 96 孔平底细胞培养板,每孔加淋巴细胞悬液 100  $\mu$ L,并取 1640 培养液补加到 200  $\mu$ L 共同培养。以每孔 100  $\mu$ L 1640 培养液作阴性对照,然后在每孔加入 20  $\mu$ L ConA(终浓度 5  $\mu$ g/mL)和 10  $\mu$ L 脂多糖 LPS(终浓度 10  $\mu$ g/mL),再用 1640 培养液补加到 200  $\mu$ L,作阳性空白对照。每试验点设 3 个复孔,置 40  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。培养结束前 3 h 加入 10 g/L MTT 10  $\mu$ L。培养结束后室温下 2 000 r/min 离心 10 min,去上清,加入 150  $\mu$ L

DMSO 溶液,用酶标仪在 570 nm 波长下检测各孔吸光度(*D*)。

1.2.2 淋巴细胞转化率的计算 淋巴细胞转化率=(试验组平均吸光度-对照平均吸光度)/对照平均吸光度 $\times 100\%$ 。

1.2.3 数据处理和分析 采用 SPSS 18.0 统计软件分析试验数据,结果以“平均值 $\pm$ 标准误”表示,显著性分析采用方差分析和多重比较。

2 结果与分析

由表 1 可知:Ⅱ组的淋巴细胞转化率在 15、22 日龄时显著或极显著高于 I、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组,36、43、50 日龄时Ⅱ组的淋巴细胞转化率与 I 组差异不显著。Ⅲ组的淋巴细胞转化率在 15、22、29、36、43 日龄时显著或极显著高于 I 组,50 日龄时和Ⅳ组差异不显著。Ⅳ组的淋巴细胞转化率极在 15、22、29、36 日龄时显著高于 I 组,29、36 日龄时极显著高于Ⅱ组。Ⅴ组的淋巴细胞转化率在 15、22、29、36、43 日龄时极显著高于 I 组,在 29、36、43 日龄时极显著高于Ⅱ组,22、29、36、43 日龄时显著或极显著高于Ⅲ、Ⅳ组。Ⅵ组的淋巴细胞转化率在 15、22、29、36、43 日龄时极显著高于 I 组,29、36、43 日龄时极显著高于Ⅱ组,22、29、36 日龄时极显著高于Ⅲ组,22、29、36、43 日龄时极显著或显著高于Ⅳ组。

表 1 口服剂对淋巴细胞转化率的影响

组别	不同日龄淋巴细胞转化率(%)					
	15 d	22 d	29 d	36 d	43 d	50 d
I	20.332 $\pm$ 0.186aA	21.514 $\pm$ 0.183aA	22.391 $\pm$ 0.209aA	21.618 $\pm$ 0.212aA	20.863 $\pm$ 0.176aA	20.498 $\pm$ 0.235aA
Ⅱ	25.312 $\pm$ 0.175cC	29.732 $\pm$ 0.214fC	23.153 $\pm$ 0.267bAB	21.421 $\pm$ 0.243aA	20.619 $\pm$ 0.337aA	20.235 $\pm$ 0.335aA
Ⅲ	22.517 $\pm$ 0.203bB	25.421 $\pm$ 0.208bB	24.215 $\pm$ 0.312cB	22.254 $\pm$ 0.316bAB	21.545 $\pm$ 0.217bAB	20.514 $\pm$ 0.202abA
Ⅳ	22.508 $\pm$ 0.169bB	26.243 $\pm$ 0.198cC	26.341 $\pm$ 0.276dC	24.514 $\pm$ 0.343cBC	22.458 $\pm$ 0.181cABC	21.038 $\pm$ 0.252bcA
Ⅴ	23.886 $\pm$ 0.195cBC	29.035 $\pm$ 0.183cC	28.316 $\pm$ 0.268fD	26.423 $\pm$ 0.227eD	23.774 $\pm$ 0.261eC	21.617 $\pm$ 0.266cA
Ⅵ	23.362 $\pm$ 0.166cB	28.133 $\pm$ 0.178dC	27.639 $\pm$ 0.243eCD	25.246 $\pm$ 0.275dCD	22.936 $\pm$ 0.289dBC	21.268 $\pm$ 0.277bcA

注:同列数据后不同大写、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。下同。

由表 2 可知:Ⅱ组的淋巴细胞转化率在 15、22 日龄时极显著高于 I、Ⅲ、Ⅳ组,36、43、50 日龄时与 I 组差异不显著;Ⅲ组的淋巴细胞转化率在 15、22、29、36、43 日龄时显著或极显著高于 I 组,29、36、43 日龄时显著高于Ⅱ组;Ⅳ组的淋巴细胞转化率在 15、22、29、36 日龄时极显著高于 I 组,29、36、43 日龄时极显著高于Ⅱ组,29、36、43、50 日龄时显著或极显

著高于Ⅲ组;Ⅴ组的淋巴细胞转化率在 15、22、29、36、43 日龄时极显著高于 I 组,29、36、43 日龄时极显著高于Ⅱ组,22、29、36 日龄时极显著高于Ⅲ、Ⅳ组;Ⅵ组的淋巴细胞转化率在 15、22、29、36、43 日龄时极显著高于 I 组,29、36、43 日龄时极显著高于Ⅱ组,22、29、36 日龄时极显著高于Ⅲ组,22、29、36、43 日龄时极显著或显著高于Ⅳ组。

表 2 针剂对淋巴细胞转化率的影响

组别	不同日龄淋巴细胞转化率(%)					
	15 d	22 d	29 d	36 d	43 d	50 d
I	20.463 $\pm$ 0.288aA	21.637 $\pm$ 0.205aA	23.090 $\pm$ 0.238aA	22.511 $\pm$ 0.204abAB	21.212 $\pm$ 0.176aA	20.562 $\pm$ 0.235aA
Ⅱ	27.331 $\pm$ 0.224fD	31.119 $\pm$ 0.230fC	25.206 $\pm$ 0.272bB	22.168 $\pm$ 0.271aA	21.017 $\pm$ 0.337aA	20.154 $\pm$ 0.335aA
Ⅲ	24.221 $\pm$ 0.270bB	26.425 $\pm$ 0.249bB	25.378 $\pm$ 0.296bcB	22.827 $\pm$ 0.384bAB	21.204 $\pm$ 0.217aA	20.266 $\pm$ 0.202aA
Ⅳ	25.270 $\pm$ 0.251cBC	28.364 $\pm$ 0.228cB	25.275 $\pm$ 0.281bB	23.041 $\pm$ 0.391bAB	21.289 $\pm$ 0.181abA	20.215 $\pm$ 0.252aA
Ⅴ	26.681 $\pm$ 0.206eCD	30.616 $\pm$ 0.195cC	26.491 $\pm$ 0.363dB	23.845 $\pm$ 0.253cB	21.988 $\pm$ 0.261bA	20.656 $\pm$ 0.266aA
Ⅵ	25.847 $\pm$ 0.216dBCD	29.534 $\pm$ 0.186dBC	25.868 $\pm$ 0.267cdB	23.352 $\pm$ 0.281cAB	21.425 $\pm$ 0.289abA	20.304 $\pm$ 0.277aA

由图 1 可知,无论是针剂还是口服剂,淋巴细胞转化率均在第 2 周升到最高;在 1~2 周相同剂量下针剂要优于口服剂;从第 3 周开始,针剂与口服剂的淋巴细胞转化率均随时间

延长逐渐降低,针剂的淋巴细胞转化率均比口服剂下降更快,相同剂量下口服剂药效时间要比针剂长。从见效时间来看,以针剂中剂量效果最好;从药效延续性来看,以口服剂中剂量

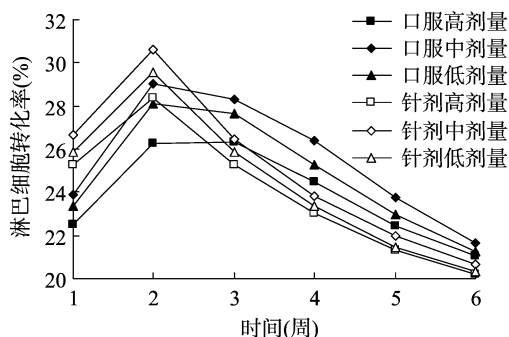


图1 口服剂与针剂的淋巴细胞转化率对比

效果最好。

### 3 结论与讨论

细胞免疫主要包括淋巴细胞的增殖与转化、淋巴因子分泌等,淋巴细胞转化率的高低可以反映机体的细胞免疫水平,因此可将其作为测定机体免疫功能的指标之一。本研究表明:雏鸡的免疫功能随着日龄增加不断发育完善,其淋巴细胞转化功能一般在第2周便接近成年鸡,这与以往研究结果<sup>[12-13]</sup>相似;而通过口服剂和针剂进行盐酸左旋咪唑、黄芪多糖和不同浓度的复方中药多糖给药均能不同程度地提高淋巴细胞转化率。

盐酸左旋咪唑处理可提高淋巴细胞转化率,这与乔彦良等的报道<sup>[14]</sup>基本一致,但该处理的淋巴细胞转化率在后期又低于空白组,可能与其毒副作用有关。黄芪多糖处理在第1~5周均显著提高了淋巴细胞转化率,这与姜国均等的报道<sup>[15]</sup>基本一致,验证了黄芪多糖有较强的淋巴细胞转化率效果。从不同浓度复方中药多糖对淋巴细胞转化率的影响来看,复方中药多糖在一定程度上存在剂量依赖性,但超过某限度则会减弱,只有合适浓度才能起到更好的免疫作用。从整体来看,随着时间的推移、血药浓度的下降,雏鸡自身细胞功能的完善,药物对其免疫系统的作用已不明显,但是可在雏鸡免疫系统未完善阶段加速其细胞免疫功能的发育和完善。

盐酸左旋咪唑针剂可提高机体免疫功能,但在后期也出现淋巴细胞转化率下降现象,说明盐酸左旋咪唑的副作用确实存在。黄芪多糖针剂也表现出较高的淋巴细胞转化效果,这与唐雪明等的报道<sup>[7]</sup>基本一致。对比3种剂量针剂复方中药多糖淋巴细胞转化率,以中剂量(25.0 mg/mL)组效果最好,其次是低剂量(12.5 mg/mL)组,最后是高剂量(50.0 mg/mL)组,显示出淋巴细胞转化率的提高幅度与多糖浓度不呈正相关,只有合适药物浓度才能起到更好的免疫作用,这也印证了多糖双向调节作用的事实<sup>[16]</sup>。

在复方中药多糖对淋巴细胞转化率的影响方面,整体来说,皮下注射效果在前2周要优于口服剂,原因是针剂不经胃肠道,受消化系统的影响较小,吸收快,药效迅速;从第3周到试验结束,口服剂效果要优于针剂,这可能与药物的消化吸收有关,随着药物进入机体,见效较缓,但是药效时间长。

目前在家禽疾病日益复杂、免疫效果不太理想的情况下,对免疫增强剂的推广应用有重要意义。以盐酸左旋咪唑为代表的西药免疫增强剂虽然见效快,但是也出现了毒副作用大、残留时间长等问题<sup>[17-19]</sup>,作为新型免疫增强剂的中药多糖逐

渐被接受,而免疫增强剂的免疫增强作用过程十分复杂,中药多糖免疫增强剂会因其成分、浓度、剂量、剂型的改变而不同。能否将复方中药多糖针剂与添加缓释剂相结合,研制出缓释的复方免疫增强剂针剂,以进一步延长其药效时间,还有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 王昌梅,张丽芬,管荣花,等. 不同方式给予植物凝集素对昆明白小鼠淋巴细胞转化率的影响[J]. 现代预防医学,2012,39(1): 107-109,113.
- [2] 李和平,邓俊良,任俊玲,等. 复方中药“禽康散”对肉鸡血液免疫球蛋白含量及T淋巴细胞转化能力的影响[J]. 中国家禽,2011,33(12):22-25.
- [3] 吉佩忠. 植物多糖的免疫活性研究[J]. 吉林医学,2010,31(6): 821-822.
- [4] 陈洪亮,褚宝山,李德发,等. 黄芪多糖对肉鸡脾淋巴细胞转化及信息分子的影响[J]. 中国兽医杂志,2003,39(10):11-14.
- [5] 安静,田河. 黄芪多糖的免疫药理作用概述[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(5):202-204.
- [6] 李赞阳,刘红,罗燕,等. 不同组分、不同纯度中药复方多糖对小鼠免疫活性影响的研究[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(9): 181-184.
- [7] 唐雪明,胡元亮,张宝康,等. 黄芪多糖对雏鸡外周血T淋巴细胞转化功能的影响[J]. 中国兽医学报,1998,18(3):269-271.
- [8] 边兴艳,尹学念. MTT比色法及其应用[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册,1998,19(2):83-85.
- [9] 李赞阳,刘红,李炳奇,等. AB-8大孔树脂吸附、解吸中药复方多糖的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011,10(19):115-117.
- [10] Kong X, Hu Y, Rui R, et al. Effects of Chinese herbal medicinal ingredients on peripheral lymphocyte proliferation and serum antibody titer after vaccination in chicken[J]. International Immunopharmacology, 2004, 4(7):975-982.
- [11] 柳志辉,吕昌龙. 免疫学常用实验技术[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [12] 程朝朝,甄永臣. 中药免疫增强剂对MD鸡外周血液ANAE+T淋巴细胞动态的影响[J]. 河南农业科学,1998(1):34-36.
- [13] 唐雪明,胡元亮. 黄芪多糖对雏鸡外周血T淋巴细胞转化功能的影响[J]. 中国兽医学报,1998,18(3):269-271.
- [14] 乔彦良,杨汉春,郭玉璞,等. 左旋咪唑对鸡细胞免疫和体液免疫功能的作用[J]. 畜牧与兽医,2000,32(2):1-4.
- [15] 姜国均,周帮会,马清河,等. 黄芪的免疫增强作用及在鸡病防治中的应用[J]. 中国家禽,2005,27(22):43-46.
- [16] 谷新利,李宏全,王俊东,等. 从中药方剂中提取的复合多糖对雏鸡免疫功能的影响[J]. 中国农业科学,2005,38(4): 813-820.
- [17] 杨学志,郑荣远,殷为勇,等. 左旋咪唑上市后安全性再评价 I:免疫调节药的临床应用[J]. 药物流行病学杂志,2007,16(5):259-262.
- [18] 杨学志,郑荣远,殷为勇,等. 左旋咪唑上市后安全性再评价 II:严重不良反应文献分析[J]. 药物流行病学杂志,2007,16(5):280-283.
- [19] 杨学志,郑荣远,殷为勇,等. 左旋咪唑上市后安全性再评价 III:风险预防对策[J]. 药物流行病学杂志,2007,16(6): 335-337.