

管远红,张家禾,秦 枫,等. 4 种中药复方对小鼠的免疫增强作用[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):224-226.

4 种中药复方对小鼠的免疫增强作用

管远红¹, 张家禾², 秦 枫¹, 周广生¹, 左伟勇¹

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 江西农业大学动物科学技术学院, 江西南昌 330045)

摘要:通过 4 种中药复方对小鼠的脾脏指数、体重、腹腔巨噬细胞吞噬指数和吞噬率、溶血素、溶血空斑、淋巴细胞增殖、血清中一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、自然杀伤细胞(NK 细胞)的影响作用,测得不同中药复方与对照组的差异。结果表明,复方 1 对小鼠的脾脏指数、腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数、血液中溶血素水平差异显著,复方 2 对小鼠的脾脏指数、腹腔巨噬细胞吞噬率、血液中溶血素和溶血空斑差异显著;复方 3 对小鼠吞噬指数、血液中溶血素和溶血空斑、淋巴细胞增殖(ConA)差异显著;复方 4 对小鼠的脾脏指数、腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数、血液中溶血素和溶血空斑、淋巴细胞增殖(LPS)、血液中 NO 和 NK 细胞均差异显著。不同中药复方中复方 4 的免疫增强作用最强。

关键词:中药复方;免疫增强;淋巴细胞增殖;溶血素

中图分类号:S852.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)08-0224-03

众所周知,在治疗多数疾病中,西药作为常选药物在治疗重症、急症、疼痛性疾病中发挥了不可替代的作用。但与中药相比,西药也表现出许多不足,新药物的开发难度增加,对机体的刺激作用和伤害也不容忽视,在治疗细菌性疾病时容易产生细菌耐药性,在杀灭有害菌的同时对机体的有益菌也造成了不同程度的伤害,在治疗病毒性疾病时表现力有所不足,尤其对新出现的病毒性疾病常常会在一段时间内出现无治疗药物时期,比如 SARS、H1N1、H7N9 等疾病,在初发现时总是无特定的药物治疗,只有在一段时间后才西药的研发产品,这时人们往往想到的是中药,如对板蓝根的抢购。与西药相比,中药复方被广泛用于病毒性传染病的预防和治疗^[1]。中国传统中药复方在数千年发展过程中,在保障人体和动物机体健康的过程中发挥了不可替代的作用,但新药复方的研发相对比较缓慢。中药复方除了有能够治疗慢性疾病、毒副作用小等优点外,近年来相关学者提出中药思维模式的研究,Lu 等指出中药模式可能导致革新^[2]。本试验根据中药复方的组方原则,选取多味中药,制成 4 种复方制剂,研究各中药复方的免疫增强作用。

收稿日期:2013-11-26

基金项目:江苏农牧科技职业学院科技攻关(编号:YB201103)。

作者简介:管远红(1978—),男,江西玉山人,硕士,讲师,主要从事兽

医药理教学及相关研究。E-mail:gyh235@163.com。

通信作者:左伟勇,博士,副教授。E-mail:jsmyjwc@126.com。

[3] 杨玉琴,杨晓野,杨莲茹,等. 少孢节丛孢菌的生长特性研究[J]. 中国兽医科技,1998,28(10):24-25.

[4] 杨莲茹,杨晓野,杨玉琴,等. 捕食线虫真菌的分离鉴定[J]. 中国农业大学学报,1998,7(S2):76-78.

[5] 秦泽荣,缪作清,李美子,等. 新鲜牛粪便中食线虫真菌的分离和鉴定[J]. 中国兽医学报,2001,21(1):58-59.

[6] 杨晓野,汪 明,杨莲茹,等. 寄生虫生物控制概述[J]. 中国兽医杂志,2003,39(7):30-32.

[7] Grønvold J, Wolstrup J, Nansen P, et al. Nematode-trapping fungi

1 材料与方法

1.1 试验药物

蒲公英、山银花、淡竹叶、山楂、连翘、党参、生姜、红芪、三七、甘草、桔梗、黄连、栀子、丹皮、黄芪、赤芍、玄参、知母、石膏、水牛角、生地、金银花、野菊花、紫花地丁、紫背天葵、黄芩、黄药子、白药子、大黄、浙贝母、防风、蝉蜕、郁金、朴硝、喜炎平、木蓝,试验药物均购自江苏泰州市同仁堂药店。

1.2 试剂与仪器

刀豆蛋白 A(ConA)、脂多糖(LPS)、瑞氏染液、细胞培养板、小鼠淋巴细胞分离液、RPMI 1640 液体培养基、青链霉素混合液、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、苯酚红、酶标条、水解乳蛋白、细胞计数板、无菌脱纤维羊血等购自江苏扬州科能生物科技有限公司;一氧化氮(NO)试剂盒、一氧化氮合酶(NOS)分型试剂盒购于南京建成生物工程研究所;自然杀伤细胞(NK 细胞)酶免疫分析试剂盒购自上海桥杜商贸有限公司。U-2901 型紫外、可见及近红外分光光度计(日本 HITACHI 公司生产)、ELX800 型酶标仪(美国 Biotek 公司生产)、NU-4750E 型 CO₂ 培养箱(美国 Nuair 公司生产)、RE-3000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂生产)、DW-20K 调温电热器(上海苏达实验仪器有限公司生产)。

1.3 试验动物

4~6 周龄 ICR 小鼠,雌性各 50%,购于扬州大学试验动物中心。

against parasitic cattle nematodes[J]. Parasitology Today,1993,9(4):137-140.

[8] Waller P J, Larsen M. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock[J]. International Journal for Parasitology,1993,23(4):539-546.

[9] Cooke R C, Godfrey B. A key to the nematode-destroying fungi[J]. Transactions of the British Mycological Society,1964,47(1):61-74.

[10] 李天飞,张克勤,刘杏忠. 食线虫菌物分类学[M]. 北京:中国科学技术出版社,2000.

1.4 组方原则

(1)八纲辨证:表里、寒热、盛衰、虚实;(2)气血津液辨证:气行血,血以养津;(3)脏腑辨证:各脏及其腑;(4)三焦辨证:上焦、中焦、下焦;(5)因畜因地因时制宜:道法自然;(6)整体观念:天人合一的思想;(7)阴阳组方:易经;(8)多种治法综合应用:寒热、补泻、上下、走守、升降、表里、润燥,根据以上原则将上述中药组成复方 1、复方 2、复方 3 和复方 4。

1.5 复方制剂

药材与水比例 1 g: 10mL 过夜浸泡,武火煮沸后再文火保持微沸状态 2 h,过滤,再加入等量水提取,如此重复 2 次,合并滤液,各组方药物均在冷凝回流条件提取下,提取液 40~50℃ 浓缩为 1 g 生药/mL,高压蒸汽灭菌后 4℃ 保存,备用。

1.6 脾脏指数和体重

试验小鼠平均随机分为 5 组,试验组分别注射各复方制剂每只 0.2 mL/d,连续腹腔注射 14 d,对照组注射等量蒸馏水,脾脏指数计算公式:脾脏指数=脾脏质量/体质量。

1.7 4 组复方对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

小鼠分组与处理同“1.6”节,连续注射 14 d,不同的是在第 4 天各试验组注射 0.2 mL 5% 的绵羊红细胞生理盐水混悬液。试验方法根据参考文献[3],给药后 15 d 乙醚麻醉 5 组小鼠,腹腔消毒后注射生长液 3 mL,后轻揉腹部 5 min,接着注射 1 mL 5% 鸡红细胞,轻揉 10 min 后吸取腹腔液滴于载玻片,置湿盒内在 37℃ 恒温孵育 30~45 min,生理盐水冲去浮着的细胞后常规瑞氏染色。根据公式计算吞噬细胞吞噬率和吞噬指数:吞噬率=吞噬鸡红细胞的吞噬细胞数/100 个吞噬细胞×100%;吞噬指数=被吞噬的红细胞数/100 个吞噬细胞×100%。

1.8 4 组复方对小鼠溶血素和溶血空斑的影响

小鼠分组与处理同“1.6”节,溶血素测定见文献[3],给药后 15 d 摘眼球取血,离心分离血清,用生理盐水 1:100 稀释后取 1 mL,与 5% 绵羊红细胞混悬液 0.5 mL 和 10% 补体 0.5 mL 混匀,37℃ 温育 30 min,冰水中止反应,以不加补体的空白管作对照,取上清液测 540 nm 处的吸光度($D_{540\text{ nm}}$),作为血清中溶血素的指标。

溶血空斑测定参考文献[4],给药后 15 d 断颈处死小鼠,无菌采取脾脏,制取脾细胞悬液并调节浓度为 5×10^6 个/mL。取脾细胞混悬液 0.5 mL 加 0.2% 绵羊红细胞混悬液和 10% 补体各 0.5 mL,混匀,37℃ 温育 1 h,离心,以不加补体的空白管调零点。取上清液测 540 nm 处的吸光度($D_{540\text{ nm}}$),作为溶血空斑的指标。

1.9 淋巴细胞增殖测定

采用 MTT 比色法^[5],小鼠断颈处死,无菌取出脾脏,组织匀浆,加入淋巴细胞分离液,1 800 r/min,离心 25 min,吸取中间环状乳白色淋巴细胞,Hank's 液反复洗 3 次,用 RPMI 1640 营养液稀释成 5×10^6 个/mL 细胞的淋巴细胞悬液。细胞培养板中依次对照组(A)、复方 1(B)、复方 2(C)、复方 3(D)、复方 4(E)、RPMI 1640(F),1、2、3、4 列加入 ConA(终浓度为 5 μg/mL),5、6、7、8 列加入 LPS(终浓度为 10 μg/mL),9、10、11、12 列加入 RPMI 1640,每孔各加 100 μL。37℃、5% CO₂ 条件下培养 68 h,加入 20 μL MTT 溶液,继续培养 4 h 后,吸取上清液加入 100 μL DMSO,微量振荡器混匀,使其颜色变澄

清,酶联免疫仪检测 570 nm 处的吸光度($D_{570\text{ nm}}$),作为淋巴细胞增殖的指标。

1.10 血清中 NO、NOS、NK 细胞测定

采用上述相关试剂盒测定。

1.11 数据分析

所有数据均用 SPSS 软件进行 Duncan's 多重分析,以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 脾脏指数和体质量变化

由表 1 可知,与对照组相比,4 种中药复方对小鼠的体质量影响差异不显著,复方 3 对小鼠的脾脏指数影响差异不显著,复方 1、复方 2、复方 4 均对小鼠的脾脏指数有显著影响。

表 1 4 种中药复方对小鼠脾脏指数和体质量的影响

组别	脾脏指数(%)	体质量(g)
对照	0.394 0±0.0391 9	29.269 7±0.971 1
复方 1	0.505 8±0.027 9*	31.573 8±0.7890
复方 2	0.663 1±0.059 7*	30.093 2±1.395 7
复方 3	0.640 0±0.127 9	30.416 2±1.464 2
复方 4	0.687 9±0.070 4*	31.034 2±0.581 2

注:“*”表示差异显著($P<0.05$)。表 2 至表 5 同。 $n=4$ 。

2.2 腹腔巨噬细胞活性的变化

由表 2 可知,与对照组比较,4 种中药复方对小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率表现为,复方 1、复方 2、复方 4 的作用显著,复方 3 作用不显著;对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬指数表现为复方 1、复方 3、复方 4 作用显著,复方 2 作用不显著。

表 2 4 种中药复方对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数的影响

组别	吞噬率(%)	吞噬指数(%)
对照	46.0±2.121	123.2±8.614
复方 1	55.0±2.449*	151.4±5.030*
复方 2	60.8±1.483*	123.6±7.232
复方 3	47.0±2.000	149.8±12.775*
复方 4	66.6±2.966*	155.2±10.474*

注: $n=5$ 。

2.3 溶血素和溶血空斑的变化

由表 3 可知,4 种中药复方对小鼠血液中溶血素的影响,4 种中药复方与对照差异显著;对小鼠血液中溶血空斑的影响,复方 2、复方 3、复方 4 与对照差异显著,复方 1 与对照差异不显著。

表 3 4 种中药复方对小鼠血液中溶血素和溶血空斑的影响

组别	溶血素($D_{540\text{ nm}}$)	溶血空斑($D_{540\text{ nm}}$)
对照	0.510 6±0.013 7	0.149 75±0.005 74
复方 1	0.7390±0.021 1*	0.160 25±0.002 10
复方 2	0.7520±0.042 4*	0.226 25±0.007 68*
复方 3	0.658 2±0.017 1*	0.215 75±0.018 03*
复方 4	0.749 2±0.018 0*	0.190 00±0.008 41*

注:溶血素 $n=5$;溶血空斑 $n=4$ 。

2.4 脾脏淋巴细胞增殖变化

由表 4 可知,与对照组相比,复方 3 能显著增强 ConA 诱导的脾脏淋巴细胞的增殖反应,复方 1、复方 2、复方 4 与对照差异不显著;复方 4 能显著增强 LPS 诱导的脾脏淋巴细胞的增殖反应,复方 1、复方 2、复方 3 与对照差异不显著。

表 4 4 种中药复方对小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响

组别	<i>D</i> _{570 nm}	
	刀豆素 A	脂多糖
对照	0.465 5 ± 0.013 5	0.413 5 ± 0.039 7
复方 1	0.553 8 ± 0.036 3	0.487 8 ± 0.017 7
复方 2	0.578 8 ± 0.052 8	0.495 3 ± 0.017 2
复方 3	0.517 0 ± 0.009 8 *	0.483 0 ± 0.030 9
复方 4	0.683 0 ± 0.105 1	0.625 3 ± 0.064 5 *

注: *n* = 4。

表 5 4 种中药复方对小鼠血液中 NO、NOS、NK 的影响

组别	NO(μmol/L)	NOS(U/mL)	NK(nmol/L)
对照	20.544 2 ± 2.822 9	38.426 7 ± 2.729 2	23.781 6 ± 0.296 8
复方 1	20.025 2 ± 2.839 5	39.214 7 ± 10.451 7	23.523 0 ± 0.196 3
复方 2	22.823 6 ± 3.925 0	33.107 7 ± 3.754 1	25.189 7 ± 1.154 7
复方 3	24.268 9 ± 5.9190	44.777 3 ± 16.516 0	23.063 2 ± 0.926 1
复方 4	28.079 7 ± 3.890 4 *	35.918 9 ± 6.483 4	27.833 3 ± 0.747 1 *

疫器官质量的增加可以在一定程度上反映机体的免疫能力^[6],本研究中除复方 3 外,其余 3 种复方均能显著增强小鼠的脾脏指数,但对小鼠的体质量增加表现不明显,与付秀华等报道的中药可显著增加小鼠脾脏指数,对增加体质量作用不显著^[7-8]一致。单核巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的重要指标之一^[9],巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数可以反映腹腔巨噬细胞吞噬能力的强弱,本研究中 4 种中药复方都能够增强小鼠的非特异性免疫。当鸡红细胞作为外来抗原被注射入小鼠体内时,小鼠机体特异性免疫系统则产生针对此种抗原的特异性抗体,在体外再次利用抗原与抗体在补体的作用下反应,通过吸光值的大小反映机体的溶血素水平高低,得出 4 种复方对机体的特异性免疫水平影响。结果表明,4 种复方均能够显著增强机体的溶血素水平,显著增强特异性免疫能力。绵羊细胞溶解后即产生溶血空斑,溶血空斑可反映 B 细胞介导的特异性免疫反应^[10],本研究中除复方 1 外,其余 3 种复方对溶血空斑的形成均有显著作用。MTT 法作为淋巴细胞增殖常用方法,本试验采用此法测得经 ConA 诱导的增殖反应中复方 3 差异显著,经 LPS 诱导的增殖反应中复方 4 差异显著,结果表明,不同的诱导剂在淋巴细胞增殖试验中产生不同的作用。本试验中 NO、NOS 和 NK 细胞均采用的是商业性试剂盒测试,测试结果,4 组复方作用结果 NOS 差异均不显著,复方 4 显著提高血清中 NO、NK 细胞差异较显著,原因可能是受给药剂量的影响,据报道药剂量、药材产地会影响药效,刘盛等在研究不同种质板蓝根和大青叶时,各种质药材样品抗病毒活性的有无及强度有明显差异^[11],王远阁通过试验 4 种中药多糖刺激细胞表达 NOS 并产生 NO 有一定的量效关系^[12]。综上所述,复方 4 在 4 种中药复方中的免疫增强作用最强。

阴阳和五行是传统中药复方制剂治疗和预防疾病的核心依据^[13],被用于解释世界的变化,本研究中的重要复方在选方组方时严格遵循中医的理论,所以取得了良好的增强小鼠免疫的效果。也有研究表明,复方中药在治疗疾病过程中,重要作用之一是众多的药材在体内外使得机体的氧化应激和氧化还原处于平衡^[14],本试验 4 种中药复方对机体的氧化应激和氧化还原之间平衡的机理还有待于进一步深入研究。

2.5 血液中 NO、NOS 和 NK 细胞变化

由表 5 可知,与对照组相比,复方 4 可以显著提高血液中 NO 水平,复方 1、复方 2、复方 3 处理间差异不显著;4 组中药复方均不能提高血清中 NOS 水平;复方 4 能显著提高血液中 NK 细胞的含量,复方 1、复方 2、复方 3 与对照差异不显著。

3 讨论与结论

脾脏是小鼠体内最大的外周免疫器官。李赞阳等指出免

参考文献:

[1] Li T, Peng T. Traditional Chinese herbal medicine as a source of molecules with antiviral activity[J]. Antiviral Res, 2013, 97(1): 1-9.

[2] Lu A P, Chen K J. Chinese medicine pattern diagnosis could lead to innovation in medical sciences[J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(11): 811-817.

[3] 傅圣斌, 钱建涛, 陈乐意, 等. 黄精多糖的提取及其对小鼠免疫活性的影响[J]. 中国食品学报, 2013, 13(1): 68-72.

[4] 杜念兴. 兽医免疫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 196-197.

[5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1): 55-63.

[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] 付秀华. 中草药组方对小鼠免疫功能的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2003.

[8] 刘翠艳. 兽医中药免疫增强剂的筛选试验及其药理学研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.

[9] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社医学出版分社, 2004.

[10] 徐坤, 苗明三. 无花果多糖对氢化可的松致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 中医学报, 2011, 26(3): 324-325.

[11] 刘盛, 陈万生, 乔传卓, 等. 不同种质板蓝根和大青叶的抗甲型流感病毒作用[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(3): 204-206.

[12] 王远阁. 4 种中药多糖免疫增强作用的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2007.

[13] Liang F, Li L, Wang M, et al. Molecular network and chemical fragment-based characteristics of medicinal herbs with cold and hot properties from Chinese medicine[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(3): 770-779.

[14] Wang Y, Ma L, Sun Y, et al. Metabonomics study on the hot syndrome of traditional Chinese medicine by rapid resolution liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. Arch Pharm Res, 2013. DOI: 10.1007/s12272-013-0250-z.