

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.16.003

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190625.1146.023.html(2019-06-26)

壮药依肝达对免疫抑制小鼠免疫功能的影响*

李以军¹, 张文涛², 郑作文^{2△}

(1. 广西医科大学附属民族医院药剂科, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学药理教研室, 南宁 530200)

[摘要] **目的** 观察壮药依肝达对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠免疫功能的调节作用。**方法** 将小鼠分为空白组, 模型组, 阳性组(左旋咪唑 0.5 g/kg), 依肝达高、中、低剂量组(依肝达剂量分别为 17.00、8.50、4.25 g/kg), 每组 12 只。除空白组外, 其余各组小鼠腹腔注射环磷酰胺(0.4 g/kg)制作免疫抑制模型, 造模同步灌胃给药, 最后检测用药后小鼠血清溶血素(IgM)水平, 巨噬细胞吞噬功能, 补体 C3、C4 水平, 迟发超敏反应及脾淋巴细胞增殖作用。**结果** 与模型组比较, 壮药依肝达可显著提高小鼠 IgM 的水平, 增强巨噬细胞吞噬功能, 提高补体 C3 水平, 增强迟发超敏反应及脾淋巴细胞增殖能力, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 壮药依肝达可增强免疫抑制小鼠免疫功能。

[关键词] 依肝达; 环磷酰胺; 免疫耐受; 免疫

[中图分类号] R392 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)16-2710-04

Effect of Yiganda on immune function in immunosuppressed mice*

LI Yijun¹, ZHANG Wentao², ZHENG Zuowen^{2△}

(1. Department of Pharmacy, National Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530001, China; 2. Department of Pharmacology, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530200, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Yiyida (YGD) on immune function of immunosuppressive mice induced by cyclophosphamide. **Methods** The mice were randomly divided into the blank group, the model group, the positive group (levamisole 0.5 g/kg) and the high, the medium, the low dose group of YGD (17.00, 8.50, 4.25 g/kg), 12 mice in each group. Except for the blank group, mice in the other groups were injected intraperitoneally with cyclophosphamide (0.4 g/kg) to induce immunosuppressive model, simultaneous intragastric administration was performed during model establishment. Finally, the level of serum hemolysin (IgM), macrophage phagocytosis, levels of complement C3 and C4, delayed hypersensitivity and splenic lymphocyte proliferation in mice were detected after administration. **Results** YGD could significantly improve the level of IgM, enhance the phagocytic function of macrophages, delayed hypersensitivity and the proliferation of spleen lymphocytes, increase the level of complement C3, which were significantly different from the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** YGD can enhance the immune function of immunosuppressive mice.

[Key words] YGD; cyclophosphamide; immune tolerance; immunity

壮药依肝达是由饭汤子、田基黄、三姐妹 3 味药组成, 其中饭汤子具有清热利湿、活血止血的功效; 田基黄有散瘀止痛、清热利湿、消肿解毒的功效; 三姐妹具有发散风寒、解毒、消肿止痛的功效。三味药在广西地区广泛用于治疗急慢性肝炎^[1-3]。依肝达以饭汤子为公药, 田基黄与三姐妹为母药组成复方中药, 用于乙型肝炎治疗, 课题组前期研究已证实其不仅能抗乙型肝炎病毒^[4-6], 而且有保肝降酶的作用^[7], 故本实验以免疫抑制小鼠为模型, 观察依肝达对免疫抑制小

鼠免疫功能的影响, 以阐明依肝达是通过直接抑制病毒、保肝护肝及增强免疫功能三个方面协同起到治疗乙型肝炎的, 为进一步研究其作用机制提供药理学基础, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂及仪器 无特定病原体(SPF)级昆明小鼠, 体质量 18~22 g, 雌雄兼用, 购自广西医科大学实验动物中心(生产许可证号: SCXK 桂 2009-0002), 适应喂养 3 d 后进行实验。环磷酰胺(江苏恒瑞医药

* 基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAI06A17-03)。 作者简介: 李以军(1970—), 主管药师, 本科, 主要从事中药临床药理学研究。 △ 通信作者, E-mail: 215079602@qq.com。

股份有限公司,批号 H32020857);刀豆蛋白(ConA,美国 Sigma 公司,批号 C8110);印度墨水(北京市西中化工厂,批号 060524);盐酸左旋咪唑片(桂林南药股份有限公司,批号 120202);RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号 1243097);2,4-二硝基氯苯(DNCB,成都西亚化工股份有限公司,批号 201002161);紫外分光光度计(美国 PeiRinElmer 公司);电子天平(德国 Sartorius 公司,型号 BP211D);酶标仪(奥地利 Sunrise 公司);高速低温离心机(德国 Biofuge Stoctos 公司)。

1.2 方法

1.2.1 药物的制备 依肝达浸膏:由广西中医药大学药学院药剂教研室制备。制备方法:取三姐妹 200 g、饭汤子 300 g、田基黄 150 g,混匀后用 10 倍体积量 95%乙醇浸泡 2 h 后水浴回流提取 1.5 h,趁热过滤,药渣继续用 8 倍体积量 95%乙醇水浴回流提取 1.0 h,趁热过滤,再合并两次滤液浓缩得 40.4 g 黑棕色浸膏,1.0 g 浸膏相当于 13.6 g 生药量。依肝达高剂量:取 10.0 g 浸膏(相当于 136.0 g 生药量)用纯净水溶解稀释定容至 160 mL,得 0.85 g 生药/mL;依肝达中剂量:取高剂量依肝达加纯净水稀释 1 倍;依肝达低剂量:取中剂量依肝达加纯净水稀释 1 倍。

1.2.2 依肝达对免疫抑制小鼠血清溶血素(IgM)水平的影响 将 SPF 级昆明小鼠按体质量分为空白组(生理盐水),模型组(生理盐水),阳性组(左旋咪唑 0.5 g/kg),依肝达高、中、低剂量组(依肝达剂量分别为 17.00、8.50、4.25 g 生药/kg),每组 12 只小鼠。各组灌胃给药,1 次/d,连续 10 d,给药体积均为 20 mL/kg。除空白组外,其余各组小鼠从给药第 1 天起,每 2 天背部皮下注射环磷酰胺溶液,剂量 0.4 g/kg。在第 5 天,每只小鼠腹腔注射 5%(v/v)的鸡红细胞悬液 0.2 mL。小鼠末次给药 1 h 后,拔眼球取血,离心制备血清,参照血清 IgM 的检测方法^[8],先用生理盐水将血清稀释 500 倍后取 0.5 mL 加入试管中(空白对照用生理盐水代替血清),再依次加入 0.5 mL 的 5% 鸡红细胞悬液、10% 补体(采集 3 只豚鼠血,混合分离血清,用生理盐水稀释成 10% 浓度)、生理盐水,充分混匀后,37 °C 孵育 1 h,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液测量其 540 nm 处光密度值(OD)值,按下面公式计算 IgM 水平以 HClgM 表示。HClgM=标本血清的 OD 值×稀释倍数。

1.2.3 依肝达对免疫抑制小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响 末次给药 1 h 后,参照巨噬细胞吞噬功能测定方法^[9],各组小鼠尾静脉注射 10% 印度墨水(0.1 mL/10 g)。分别于注射后 2 min(t₁)、10 min(t₂)用毛细管从眼眶取血 0.02 mL,加入含 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液的试管中混匀,在波长 600 nm 下测 OD

值(得 OD₁、OD₂ 值)。然后取出肝和脾称质量,按下面公式计算吞噬指数 K 值和吞噬系数 α 值。K=(lgOD₁-lgOD₂)/(t₂-t₁),α=1/3×K×体质量/(肝质量+脾质量)。

1.2.4 依肝达对免疫抑制小鼠补体 C₃、C₄ 水平的影响 末次给药 1 h 后小鼠眼球取血,低温分离血清,当日送往广西中医药大学第一附属医院检测补体 C₃、C₄ 水平。

1.2.5 依肝达对免疫抑制小鼠迟发型超敏反应的影响 各小鼠第 1 天给药后均腹部脱毛,并在脱毛部位均匀涂上 1% DNCB 丙酮溶液致敏。末次给药 1 h 后,在各小鼠右耳均匀涂抹 1% DNCB 丙酮溶液,24 h 后处死小鼠,剪下左、右耳壳,用 8 mm 打孔器在双耳同一部位打下耳片并称质量,计算左、右耳片质量差值。

1.2.6 依肝达对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响 于末次给药后第 2 天处死小鼠,参照脾淋巴细胞增殖实验方法^[10],无菌环境中取脾,用无菌 D-Hanks 液冲洗后,200 目不锈钢细胞筛过滤,细胞液 1 000 r/min 离心,弃上清液,加入红细胞裂解液,吹打混匀后离心,弃上清液,用 D-Hanks 液洗涤 2 次后转移至含 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液中,于 CO₂ 培养箱中培养 2 h,培养液中悬浮着脾淋巴细胞,小鼠脾巨噬细胞贴壁生长,分离脾淋巴细胞后,将细胞浓度调成 1×10⁷/mL,加入 96 孔板,每孔 100 μL,再加入含有 ConA 的培养液 100 μL,使 ConA 终浓度为 10 μg/mL。置培养箱培养 44 h,四甲基偶氮蓝(MTT)法检测,用酶标仪在波长 570 nm 处测 OD 值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件分析数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 依肝达对免疫抑制小鼠血清 IgM 水平的影响 模型组小鼠的血清 IgM 水平低于空白组,差异有统计学意义(P<0.01)。与模型组比较,阳性组,依肝达高、中、低剂量组 IgM 水平均有显著提高,差异均有统计学意义(P<0.01)。见表 1。

表 1 依肝达对小鼠 IgM 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	HClgM
空白组	12	—	282.90±175.81
模型组	11	—	87.40±4.64 ^a
阳性组	12	0.5	102.90±10.04 ^b
依肝达高剂量组	12	17.00	101.90±7.85 ^b
依肝达中剂量组	12	8.50	110.30±12.00 ^b
依肝达低剂量组	12	4.25	106.90±7.90 ^b

^a:P<0.01,与空白组比较;^b:P<0.01,与模型组比较;—:无数据

2.2 依肝达对免疫抑制小鼠巨噬细胞吞噬功能的影

响 模型组小鼠吞噬指数 K 与吞噬系数 α 较空白组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明免疫抑制小鼠模型制备成功。与模型组比较阳性组小鼠的吞噬指数 K 与吞噬系数 α 升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,高剂量依肝达组小鼠吞噬指数 K 与吞噬系数 α 也升高,与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 依肝达对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (g/kg)	K	α
空白组	12	—	0.039±0.007	5.65±0.62
模型组	12	—	0.023±0.008 ^b	4.77±0.95 ^a
阳性组	12	0.5	0.033±0.009 ^c	5.51±0.61 ^c
依肝达高剂量组	11	17.00	0.033±0.011 ^c	5.74±1.08 ^c
依肝达中剂量组	12	8.50	0.027±0.006	5.18±0.44
依肝达低剂量组	11	4.25	0.028±0.009	5.29±0.82

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与空白组比较; ^c: $P < 0.05$, 与模型组比较; —: 无数据

2.3 依肝达对免疫抑制小鼠血清补体 C3、C4 水平的影响 模型组小鼠血清补体 C3、C4 水平与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明免疫抑制小鼠模型制备成功。与模型组比较,阳性组小鼠血清补体 C3、C4 水平均增高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);依肝达高、中、低剂量组 C3 水平均升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),但对 C4 水平并无影响,见表 3。

表 3 依肝达对补体 C3、C4 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (g/kg)	C4(g/L)	C3(g/L)
空白组	12	—	0.023±0.008	0.024±0.012
模型组	10	—	0.014±0.010 ^a	0.015±0.007 ^a
阳性组	12	0.5	0.021±0.006 ^b	0.025±0.007 ^c
依肝达高剂量组	12	17.00	0.013±0.008	0.066±0.014 ^c
依肝达中剂量组	12	8.50	0.011±0.008	0.041±0.015 ^c
依肝达低剂量组	11	4.25	0.019±0.012	0.024±0.007 ^c

^a: $P < 0.05$, 与空白组比较; ^b: $P < 0.05$, ^c: $P < 0.01$, 与模型组比较; —: 无数据

2.4 依肝达对免疫抑制小鼠迟发型超敏反应的影响 模型组小鼠左、右耳质量差值与空白组比较明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示迟发超敏反应降低,免疫抑制小鼠模型制备成功。与模型组比较,阳性组小鼠左、右耳质量差值显著增高,依肝达高剂量组左、右耳质量差值显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

2.5 依肝达对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响 模型组小鼠脾淋巴细胞增殖能力较空白组显

著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明免疫抑制小鼠模型制备成功。阳性组与依肝达高、中、低剂量组小鼠脾淋巴细胞增殖能力较模型组均显著提高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 5。

表 4 依肝达对小鼠迟发超敏反应的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	左、右耳质量差(mg)
空白组	12	—	7.75±0.99
模型组	12	—	6.36±1.08 ^a
阳性组	12	0.5	7.36±0.98 ^b
依肝达高剂量组	12	17.00	7.32±0.76 ^b
依肝达中剂量组	12	8.50	6.70±0.87
依肝达低剂量组	12	4.25	6.76±1.06

^a: $P < 0.01$, 与空白组比较; ^b: $P < 0.05$, 与模型组比较; —: 无数据

表 5 依肝达对脾淋巴细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	OD 值
空白组	5	—	1.38±0.07
模型组	5	—	0.85±0.07 ^a
阳性组	5	0.5	1.30±0.11 ^b
依肝达高剂量组	5	17.00	1.27±0.10 ^b
依肝达中剂量组	5	8.50	1.26±0.09 ^b
依肝达低剂量组	5	4.25	1.21±0.10 ^b

^a: $P < 0.01$, 与空白组比较; ^b: $P < 0.01$, 与模型组比较; —: 无数据

3 讨 论

机体免疫功能低下是乙型肝炎患者的表现之一^[11],主要原因是体内免疫功能长期处于耐受状态,不能清除病毒而导致,针对乙型肝炎的治疗,需从抑制病毒、保肝护肝和增强机体免疫功能 3 个环节同时入手。壮药依肝达作为复方中药,能起到“多环节、多靶点、综合调节”的临床作用,前期研究已发现其能抑制乙型肝炎病毒复制及保肝降酶,故本研究着重探讨其对机体免疫功能的作用。

机体免疫系统由免疫器官、免疫细胞及免疫活性因子构成。免疫器官包括骨髓、胸腺、肝脏、淋巴结、脾和黏膜等,免疫细胞包括巨噬细胞和淋巴细胞,免疫活性因子包括抗体、溶菌酶、补体、免疫球蛋白、细胞因子等,当机体受到外来毒素侵袭时,3 个部分的免疫物质会通过协同作用发挥机体免疫功能。

单核-巨噬细胞系统在机体免疫系统中占有重要的作用,担负着机体非特异性的防御功能,其组成有单核细胞和巨噬细胞,其主要功能是吞噬和杀灭病原菌、对细菌毒素进行灭活、抗原递呈作用及释放干扰素和白细胞介素等细胞因子,参与细胞免疫^[12],因此,巨噬细胞的吞噬指数 K 和吞噬系数 α 是反映机体非特异性免疫功能的重要指标。实验结果发现,高剂量依肝达(17 g/kg)能提高吞噬指数 K 及吞噬系数 α ,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),提示依

肝达能提高巨噬细胞的吞噬功能。

免疫球蛋白包括 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM, 主要存在于血液及组织液当中。当机体被病原微生物等抗原刺激后, 免疫球蛋白会与抗原生成抗原-抗体复合物, 能有效阻断病原体的致病作用^[13]。其中 IgM 是机体体液免疫应答中最早合成和分泌的抗体, 在机体特异性免疫中起到重要作用, 它的变化能及时体现 B 细胞活性状况, 是反映机体免疫功能的重要指标之一^[14]。实验结果发现, 依肝达高、中、低剂量组均能提高免疫抑制小鼠 IgM 水平, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 结果提示依肝达能增加免疫球蛋白 IgM 水平。

补体系统是体内非特异性免疫系统的重要组成部分, C3 是补体经典激活途径、替代激活途径和凝集素激活途径都必要的枢纽成分, 在血清中诸补体成分中水平最高^[15]。C4 在血清中诸补体成分中水平仅次于 C3, 是参与补体传统途径活化的成分, 合成于肝细胞和巨噬细胞。C4 在激活补体, 促进吞噬, 防止免疫复合物沉淀和中和病毒等方面发挥作用。实验结果发现依肝达高、中、低剂量组均能提高免疫抑制小鼠补体 C3 水平, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 但对 C4 水平无影响。

迟发型超敏反应是抗原诱导引起的细胞性免疫应答, 当效应 T 细胞与特异性抗原结合反应, 引起的以单核细胞浸润和组织损伤为主要特征的炎性反应。此超敏反应发生与抗体和补体无关, 而与效应 T 细胞和吞噬细胞及其产生的细胞因子或细胞毒性介质有关。实验结果发现, 依肝达高剂量组能提高免疫抑制小鼠左、右耳质量差值, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示依肝达能增强免疫抑制小鼠迟发型超敏反应。

脾淋巴细胞是体内免疫活性细胞, 其增殖和分化能力是评价机体细胞免疫功能的重要指标之一。脾脏中 T 淋巴细胞是重要的免疫活性细胞, 它可被有丝分裂原 ConA 所激活并向淋巴母细胞转化, 在转化过程中 DNA、RNA 及蛋白质合成增加, 使细胞分裂增殖, 测定体外脾淋巴细胞转化功能是研究细胞免疫功能的重要手段^[16]。实验结果发现, 依肝达高、中、低的剂量组均能促进免疫抑制小鼠脾淋巴细胞的增殖, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

综上所述, 壮药依肝达能提高免疫抑制小鼠的免疫功能, 其作用主要包括提高 IgM 水平, 增强巨噬细胞的吞噬功能, 提高补体 C3 水平, 增强迟发型超敏反

应及脾淋巴细胞增殖活性。

参考文献

- [1] 韦松基, 郑作文, 庞宇舟, 等. 饭汤子对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 广西中医药, 2005, 29(3): 50-51.
- [2] 马冬梅, 高雅, 郭丹, 等. 田基黄提取物抗 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化的作用及其机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(11): 1890-1897.
- [3] 秦华珍, 王硕. 中药三姐妹的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2006, 22(8): 1155-1156.
- [4] 梁宁, 韦松基. 壮药依肝达含药血清对 2215 细胞 HBV-DNA 的抑制作用[J]. 山东医药, 2009, 49(7): 52-53.
- [5] 梁宁, 邓家刚, 韦松基. 壮药依肝达含药血清对 2215 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的影响[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1867-1868.
- [6] 阎莉, 郑作文, 韦松基. 依肝达对鸭乙型肝炎病毒 DNA 的抑制作用[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(3): 265-266.
- [7] 李以军, 张文涛, 郑作文. 壮药依肝达对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中成药, 2015, 37(11): 2518-2520.
- [8] 安静思, 胡相卡, 杨伟, 等. 芪胶升白胶囊对正常小鼠及免疫抑制小鼠免疫调控作用的研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(5): 78-82.
- [9] 叶颖霞, 林岚, 赵菊香, 等. 杜仲叶多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 中药材, 2015, 38(7): 1496-1498.
- [10] 姚平, 黄开珍, 冼寒梅, 等. 补肺片对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2733-2734.
- [11] 张敏, 杨丽莎, 彭德珍, 等. 慢性 HBV 感染不同免疫状态及乙型肝炎肝硬化外周血 T、B 细胞亚群和 NK 细胞的变化及意义[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(20): 3233-3236.
- [12] WYNN T A, VANNELLA K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis[J]. Immunity, 2016, 44(3): 450-462.
- [13] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 46-52.
- [14] SHENG X, YAN J, MENG Y, et al. Immunomodulatory effects of Hericium erinaceus derived polysaccharides are mediated by intestinal immunology[J]. Food Funct, 2017, 8(3): 1020-1027.
- [15] 笱琦, 刘欣, 逢越, 等. 补体 C3 结构与功能研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(4): 549-553.
- [16] XING J, XIAO Y, TANG X, et al. Inhibition of Cyclosporine A or rapamycin on T lymphocyte counts and the influence on the immune responses of B lymphocytes in flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 66: 78-85.

(收稿日期: 2019-03-18 修回日期: 2019-04-29)