

# 异黑成熟颗粒对免疫抑制小鼠免疫功能的调节作用

阿不都热依木·玉苏甫<sup>1</sup>, 古孜力努尔·依马木<sup>1</sup>, 努尔江·肉孜<sup>1</sup>, 艾尼娃尔·艾克木<sup>2</sup>, 哈木拉提·吾甫尔<sup>1</sup>

1. 新疆医科大学维吾尔医药系, 乌鲁木齐 830011

2. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011

**摘要** 为研究异黑成熟颗粒对环磷酰胺诱导免疫抑制小鼠的非特异性免疫功能、体液免疫功能、细胞免疫功能的影响, 将 84 只小鼠随机分为 6 组: 正常对照组, 环磷酰胺模型组, 阳性对照组, 异黑成熟颗粒低、中、高剂量组, 每组 14 只。除正常对照组外, 其他组小鼠均用 75mg/kg 环磷酰胺腹腔注射诱导免疫抑制小鼠模型, 阳性对照组和异黑成熟颗粒组连续灌胃给药 14d, 1 次/d。测定小鼠单核巨噬细胞吞噬功能、外周血 T 细胞亚群、NK 细胞活性、白介素-1(IL-1)活性、白介素-2(IL-2)活性、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )活性、血清溶血素抗体生成(CH<sub>50</sub>)、迟发型变态反应等。结果表明, 异黑成熟颗粒 3 个剂量组对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的单核巨噬细胞吞噬功能、外周血 T 细胞亚群数量、对 2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱导的迟发性变态反应、免疫器官重量和 IgM、IgG 值等均具有明显增强作用( $P<0.05$ ); 异黑成熟颗粒中、高剂量组明显增强小鼠 NK 细胞和 TNF- $\alpha$  活性( $P<0.05$ ); 异黑成熟颗粒能提高小鼠 IL-1 和 IL-2 的活性( $P<0.05$ )。异黑成熟颗粒对免疫抑制小鼠的免疫功能具有改善作用。

**关键词** 异黑成熟颗粒; 免疫抑制; 免疫功能

**中图分类号** R29, R392.5

**文献标识码** A

**文章编号** 1000-7857(2010)03-0082-05

## Effects of Immune Regulation of Abnormal Savda Munziq Granular on Immune Suppressed Mice

YUSUP Abdiryim<sup>1</sup>, IMAM Guzalnur<sup>1</sup>, ROZI Nurjan<sup>1</sup>, AIKEMU Ainiwaer<sup>2</sup>, UPUR Halmurat<sup>1</sup>

1. Faculty of Traditional Uighur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. Institute of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

**Abstract** This paper investigates the effects of abnormal savda munziq granular on nonspecific immunity, humeral immunity, cell immunity functions of cyclophosphamide induced immune suppressed mice. 84 qualified mice were randomly divided into 6 groups with 14 in each group: normal control group, model group, groups of abnormal savda munziq granular for high, medium, low dosages and the control group. Except for the normal control group, mice in all other groups were made immune suppression models by using cyclophosphamide (75mg/kg, OD). Abnormal savda munziq granular was orally administered for 14 days, once a day. The mononuclear phagocyte englobement function, the quantity of T cell subpopulation in peripheral blood, NK cyto-active, interleukin-1 and interleukin-2 activity, TNF- $\alpha$  activity, serum hemolysin (CH<sub>50</sub>), delayed allergy were monitored. Three groups of abnormal savda munziq granular were found to have made remarkable improvement in the mononuclear phagocyte englobement function, the quantity of T cell subpopulation in peripheral blood, serum hemolysin, delayed allergy ( $P<0.05$ ). The IgM and IgG values were also improved remarkably ( $P<0.05$ ). In the groups of abnormal savda munziq granular, the NK cyto-active, and TNF- $\alpha$ , activities were remarkably improved for the medium dose and the high dose groups. There was a tendency in abnormal savda munziq granular groups of increasing the activities of IL-1 in lower dose group and those of IL-2 in medium dose group ( $P<0.05$ ). Abnormal savda munziq granular could improve the immunological function of immune suppressed mice.

**Keywords** abnormal savda munziq granular; immune suppression; immune function

收稿日期: 2009-10-30

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技攻关和重点计划项目(200733146-4); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目; 高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(708058)

作者简介: 阿不都热依木·玉苏甫, 研究员, 研究方向为维吾尔医基础理论及新药开发, 电子信箱: ayusup@126.com; 哈木拉提·吾甫尔(通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S253002398M), 教授, 研究方向为维吾尔医药学现代化, 电子信箱: halmurat@263.net



## 1 材料及方法

### 1.1 实验动物

昆明种小鼠 252 只,雌雄各半,体重(20±2)g;C57 小鼠,252 只,雌雄各半,体重(15±2)g;清洁级,均由新疆医科大学实验动物中心提供。

### 1.2 试剂和仪器

异黑成熟颗粒(新疆奇康哈博维药研究有限公司,批号:081119,081120,081121);六味地黄丸(山西华康药业股份有限公司,国药准字 Z14020104);环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:08091921);生理盐水(新疆华世丹药业股份有限公司,批号:09010812);2,4 二硝基氯苯(天津市光复精细化工研究所,批号:20061207);刀豆蛋白(ConA)、脂多糖(LPS)均为 Sigma 公司产品;四甲基偶氮唑盐(MTT,Amresco 公司);RPMI1640 培养基(Hyclone 公司)。

S54-型分光光度计(上海第三分析仪器厂);AL204 精密电子天平(梅特勒力仪器厂)。

### 1.3 分组与给药

小鼠随机分组,设正常对照组,环磷酰胺(Cy)模型组,阳性对照组,异黑成熟颗粒低、中、高剂量组,每组 14 只。正常对照组经口灌胃生理盐水 20mL/kg;模型组经口灌胃生理盐水 20mL/kg;阳性对照组经口灌胃六味地黄丸 28.8g/kg;异黑成熟颗粒高剂量组经口灌胃 8g/kg,异黑成熟颗粒中剂量组经口灌胃 4g/kg,异黑成熟颗粒低剂量组经口灌胃 2g/kg。各组每天灌胃 1 次,连续给药 14d<sup>[1-2]</sup>。

### 1.4 动物模型建立

在给药第 3、5、7、9 天,除正常对照组外,其余各组小鼠均腹腔注射环磷酰胺 75mg/kg 各 1 次,共 4 次,诱导小鼠免疫功能低下小鼠模型。

### 1.5 实验方法

实验方法见文献[3]、[4]。

#### 1.5.1 小鼠单核巨噬细胞吞噬功能测定

各组小鼠经口灌胃 14d,末次给药后 1h,尾静脉注射 1:6.5 中华墨汁 5mL/kg,注射后 2 和 8min 分别从小鼠内眦取血 20μL,移入含 2mL 0.1%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液的试管中,混匀后用 S54-型分光光度计于 680nm 处测光密度 OD。各组小鼠颈椎脱臼处死后称重,无菌迅速取肝脏、脾和胸腺,用电子天平称重,按下列公式计算吞噬指数 α 和廓清指数 K:

$$\alpha = (\text{体重/肝脾重}) \times K^{1/3}$$

$$K = \lg(\text{OD}_1/\text{OD}_2)_{t_1-t_2}$$

#### 1.5.2 小鼠外周血 T 细胞亚群测定

进行上述实验后,每只小鼠以摘眼球取血法采血 0.2mL,采用流式细胞仪测定 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞在外周血中的表达。

#### 1.5.3 小鼠血清溶血素生成测定

首次给药后第 6 天,各组小鼠予腹腔注射 20%绵羊红细胞(SRBC)0.2mL/只,致敏。于末次给药后 1h 内眦取血 20μL,分离血清 10μL,置 5mL 生理盐水中,加入 SRBC 0.5mL 及 1:10 豚鼠血清补体 1mL。混匀后于 37℃ 孵育 30min,冰水中止

应,2000r/min 离心 10min,取上清液 1mL,加都氏试剂 3mL,摇匀,放置 10min,于 540nm 波长处,以空白对照管(生理盐水代替样品血清)调零,用 S54-型分光光度计测 OD 值。另取 20% SRBC 0.25mL,加都氏试剂 3.75mL,于 540nm 波长处测其 OD 值,即 SRBC 半数溶血 OD 值,按下式计算实验管溶血值。

$$HC_{50} = (\text{实验管 OD 值} / \text{SRBC 半数溶血 OD 值}) \times \text{稀释倍数}$$

#### 1.5.4 DNCB 所致迟发性超敏反应(DTH)测定

各组小鼠首次灌胃后第 4 天,在小鼠颈部皮肤上涂抹 5.0%DNCB 丙酮溶液 20μL/只,致敏。灌胃给药后第 14 天,在小鼠右耳两侧均匀涂抹 2.5%DNCB 丙酮溶液 20μL/只,进行攻击。24h 后,处死小鼠,用打孔器(直径 8mm)在左右相同部位打下耳片,天平称重,以左右耳片重量差(肿胀度)表示迟发型过敏反应的强度。

#### 1.5.5 小鼠 NK 细胞活性测定

取 84 只 C57 小鼠,分组及给药剂量同 1.3。给药后 14d,将小鼠断头处死,无菌取脾,置于盛有适量 D-Hank's 液的小平皿中,用镊子轻轻地将脾撕碎,经 200 目筛网过滤,制成单细胞悬液,1000r/min 离心 5min,倒去上清液,轻轻松细胞沉淀,加 0.4mL 双蒸水轻轻振荡 30s,低渗溶解红细胞,然后加 0.4mL 双倍生理盐水(1.7%)使溶液恢复等渗,同样转速离心 5min,D-hank's 液洗 1 次后,置于 RPMI 1640 培养液中,计数细胞,调整细胞浓度为 1×10<sup>7</sup>/mL,即为备用 NK 细胞。将传代培养的 L929 细胞在实验前一天换液,实验时用 0.25%的胰蛋白酶 2mL 消化 2min,加 RPMI 1640 培养液,轻轻吹打细胞使其完全从壁上脱落,1000r/min 离心 5min,倾去上清液,用 RPMI 1640 培养液调细胞浓度至 2×10<sup>5</sup>/mL,即为备用的靶细胞。将靶细胞悬液加入 96 孔培养板中,100μL/孔,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2h,后每孔加入 100μL 的 NK 细胞(效靶比 50:1),每一样本有 3 个复孔。将 96 孔板在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 20h,弃去上清液,在滤纸上吸干孔内水分,每孔加 100μL 的 0.1%中性红染液,37℃孵育 30min。弃去染液,用氯化钠注射液洗 3 次后,每孔再加入 100μL 的 0.1%细胞裂解液(50%醋酸和 50%乙醇配制),使细胞溶解释放中性红,轻轻摇匀,用酶标仪在 492 nm 处测 OD 值,按下式计算杀伤率:

$$\text{杀伤率} = [1 - (\text{实验组 OD 值} / \text{靶细胞 OD 值})] \times 100\%$$

#### 1.5.6 IL-1 活性测定

采用 ConA 诱导的小鼠胸腺淋巴细胞增殖法测定 IL-1 活性。取 84 只 C57 小鼠,分组及给药剂量同 1.3。经口灌胃给药 14d 后,将各组小鼠处死,无菌取胸腺,用 RPMI 1640 培养液制成 1×10<sup>10</sup>/mL 细胞悬液,在 96 孔培养板上每孔加入胸腺细胞悬液(终浓度 5×10<sup>9</sup>/mL)0.1mL、待测上清 50μL 和 ConA(终浓度 3mg/L)50μL,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48h。终止培养前 4h 每孔加 MTT(5g/L)10μL。继续培养 4h 后吸弃上清,每孔加入 DMSO 150μL,振荡 30s,在酶标仪上于 570nm 处读每孔的 OD 值,各设 3 个复孔。结果以 OD 的均值表示。

#### 1.5.7 IL-2 活性测定

采用活化的小鼠脾细胞淋巴细胞增殖法测定 IL-2 活性。









## 2.7 异黑成熟颗粒对小鼠血清溶血素抗体形成的影响

异黑成熟颗粒 3 个剂量组和阳性对照组 IgM、IgG 值均明

显高于模型组 ( $P<0.05$ ), 说明异黑成熟颗粒和阳性对照药具有拮抗环磷酸胺引起的小鼠 IgM 和 IgG 含量的降低作用(表 7)。

表 7 异黑成熟颗粒对免疫抑制小鼠血清溶血素抗体形成的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 7 Effect of Abnormal Savda Munziq granular on the serum hemolysin of immune suppressed mice ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别      | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | n  | IgM(OD 值) | IgG(OD 值)  |
|---------|--------------------------|----|-----------|------------|
| 正常对照组   | —                        | 14 | 44.0±1.3  | 23.0±0.06  |
| 模型组     | —                        | 14 | 7.7±1.1   | 18.4±0.03  |
| 阳性对照组   | 28.8                     | 14 | 16.4±1.2* | 29.5±0.02* |
| 异黑成熟颗粒组 | 2.0                      | 14 | 20.3±1.4* | 27.3±0.07* |
| 异黑成熟颗粒组 | 4.0                      | 14 | 16.7±1.2* | 24.4±0.02* |
| 异黑成熟颗粒组 | 8.0                      | 14 | 19.2±1.3* | 23.5±0.07* |

## 3 讨论

机体的免疫由特异性免疫和非特异性免疫所组成。非特异性免疫是特异性免疫的基础,特异性免疫所产生的免疫物质又能增强非特异性免疫的作用。因此,增强机体的非特异性免疫对提高机体的整个免疫功能意义重大。

非特异性免疫功能是巨噬细胞吞噬多种抗原所体现出来的抗感染等能力。实验结果表明,异黑成熟颗粒能增强单核巨噬细胞吞噬功能,提高碳粒廓清值及外周血白细胞数目,增强 NK 细胞、TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-2 的活性,说明异黑成熟颗粒能提高免疫功能低下小鼠非特异性免疫功能。

体液免疫是当 B 淋巴细胞受到抗原刺激后,分化成浆细胞并产生抗体,当再次受到同一抗原刺激时,抗体即会与抗原作用并使之发生溶合。实验结果表明,异黑成熟颗粒能促进抗体生成细胞的形成,提高半数溶血素抗体生成,说明异黑成熟颗粒能增加免疫功能低下小鼠体液免疫功能。

细胞免疫是当 T 淋巴细胞受到抗原的刺激后,转变为致敏 T 淋巴细胞并产生淋巴因子,以促进体内巨噬细胞对抗原的吞噬作用,同时扩大炎症反应。实验表明,异黑成熟颗粒促进小鼠 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞的迟发型变态反应,说明异黑成熟颗粒能增加免疫功能低下小鼠细胞免疫功能。

活性免疫调节剂主要通过以下途径作用于机体的免疫系统:激活巨噬细胞,促进 TH 细胞转变为活性 TC 细胞,提高 B 淋巴细胞和 NK 细胞的数量与活性;激活网状内皮系统和补体系统;诱生多种免疫因子;影响神经-内分泌-免疫系统网络;促进细胞中的 RNA、脱氧 DNA、蛋白质合成和细胞内环核苷酸(cGMP、cAMP)的含量<sup>[3,5]</sup>。

异黑成熟颗粒在临床上广泛应用于肿瘤等复杂性疾病的治疗,取得了良好的疗效。因此,其研发对肿瘤等复杂性疾病的治疗和预防具有重大的临床意义和学术价值。从异黑成熟颗粒改善免疫功能低下小鼠的非特异性免疫功能、细胞免疫功能及体液免疫功能的各项指标来看,异黑成熟颗粒多方位、多层次地激活免疫系统,提高机体的免疫功能,符合活性免疫调节剂的作用机制,应顺此路径进行更加全面的研究。

相信随着对异黑成熟颗粒免疫作用机制的深入研究,其作为安全、有效、无毒副作用的免疫调节剂将具有广阔的应用前景。

## 4 结论

异黑成熟颗粒能够增加免疫抑制小鼠吞噬指数、廓清指数、免疫器官指数;能够促进单核巨噬细胞吞噬功能;明显提高外周血 T 细胞亚群数量;提高 NK 细胞、TNF- $\alpha$  活性;提高 IL-1 及 IL-2 活性;促进抗体生成细胞的形成;拮抗小鼠 IgM 和 IgG 含量的降低作用;拮抗迟发性变态反应。说明异黑成熟颗粒对免疫抑制小鼠的非特异性免疫功能、细胞免疫功能及体液免疫功能都具有改善作用。

## 参考文献 (References)

- [1] 孙京惠, 许鹏飞, 高福云, 等. 玉丹荣心丸对小鼠免疫调节功能影响的实验研究[J]. 北京中医药大学学报: 中医临床版, 2007, 14(1): 6-8.  
Sun Jinghui, Xu Pengfei, Gao Fuyun, et al. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine: Clinical Medicine*, 2007, 14(1): 6-8.
- [2] 张连龙, 戴敏, 毛兆祥, 等. 灵芝多糖/硒化卡拉胶口服液对免疫抑制小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(12): 1381-1387.  
Zhang Lianlong, Dai Min, Mao Zhaoxiang, et al. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2008, 13(12): 1381-1387.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 752-759.  
Chen Qi. *The pharmacology research method of traditional Chinese medicine*[M]. Beijing: Public Healthy Publishing House, 2006: 752-759.
- [4] 刘亚娟, 张莉, 李晶, 等. 银翘散在不同煎煮时间下对免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J]. 中医杂志, 2008, 49(12): 1112-1115.  
Liu Yaxian, Zhang Li, Li Jin, et al. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2008, 49 (12): 1112-1115.
- [5] 孔小卫, 江力. 蜜环菌胞外多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 安徽大学学报: 自然科学版. 2007, 31(1): 87-90.  
Kong Xiaowei, Jiang Li. *Journal of Anhui University: Natural Sciences Edition*, 2007, 31(1): 87-90.

(责任编辑 李慧政)

