

复方健胃消食浸膏粉免疫调节作用的实验研究

王楠, 杨睿悦, 张佳丽, 梁江, 龙珠, 王军波, 李勇

北京大学公共卫生学院, 北京 100191

摘要 为了探讨复方健胃消食浸膏粉对小鼠的免疫调节作用, 将 80 只 6~8 周龄、18~22g 的雌性 BALB/C 小鼠随机分为 1 个对照组和 3 个剂量的复方健胃消食浸膏粉干预组, 干预剂量分别为 0.2、0.6 和 1.8g/kgBW (body weight)。干预 30d 后, 进行细胞免疫、体液免疫和 NK 细胞功能检验, 测定脾脏 T 淋巴细胞增殖能力、迟发变态反应 (DTH) 的程度、抗体生成数、半数溶血值 (HC₅₀) 和 NK 细胞的活性。结果显示, 在细胞免疫功能试验中, 0.6 g/kgBW 复方健胃消食浸膏粉干预组明显增加小鼠 T 淋巴细胞的增殖能力, 0.6g/kgBW 和 1.8g/kgBW 干预组增加小鼠 DTH 的程度; 在体液免疫功能试验中, 各剂量组均能提高小鼠抗体生成数, 但各组间 HC₅₀ 值未见显著性差异, 在 NK 细胞功能实验中, 0.6g/kgBW 和 1.8g/kgBW 干预组能提高 NK 细胞活性。以上结果表明, 传统中药复方健胃消食浸膏粉具有增强小鼠细胞免疫、体液免疫和 NK 细胞活性的功能。

关键词 免疫调节; 复方健胃消食浸膏粉; 中药

中图分类号 R289.5, R392.5

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)05-0026-04

Experimental Study on Immunomodulating Effect of Formulation of Fufang Jianwei Xiaoshi

WANG Nan, YANG Ruiyue, ZHANG Jiali, LIANG Jiang, LONG Zhu, WANG Junbo, LI Yong

School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract To observe the immunomodulating effect of formulation of Fufang Jianwei Xiaoshi in mice, 80 healthy female BALB/C mice (6~8 weeks old) were administered with formulation of Fufang Jian Wwei Xiaoshi for 30 days with the dose of 0, 0.2, 0.6 and 1.8g/kgBW (body weight), then the capacity of spleen T lymphocyte proliferation, delayed allergic reaction (DTH), the number of plaque-forming cells, the level of serum HC₅₀ and natural killer cell activity were determined. In comparison with the values of the control group, the administration of Fufang Jianwei Xiaoshi of 0.6g/kgBW can significantly raise the capacity of the mitogen Concanavalin A (Con A)-induced lymphocyte proliferation, the administration of 1.8g/kgBW sees no significant effect, with only a slight increase. The administration of 0.6g/kgBW and 1.8g/kgBW of Fufang Jianwei Xiaoshi can enhance the delayed allergic reaction (DTH); all groups of Jianwei Xiaoshi see an increase of the number of plaque-forming cells; the administration of 0.6g/kgBW and 1.8g/kgBW of Fufang Jianwei Xiaoshi can increase the cell activity of the natural killer. Nevertheless, no significant differences on the level of serum HC₅₀ between control group and administration groups were observed in our study. These results suggest that the formulation of Fufang Jianwei Xiaoshi is a possible immune stimulant and may strengthen the immune function on cellular immunity, the humoral immunity and the cell activity of the natural killer.

Keywords immunomodulation; formulation of Fufang Jianwei Xiaoshi; Traditional Chinese Medicine (TCM)

0 引言

人体的免疫功能与疾病的易感性、病理过程、转归、康复等密切相关。在众多具有免疫调节作用的物质中, 传统中药材因

具有良好的免疫药理效用, 安全、毒副作用小的特点而有着独特的优势。因此, 具有免疫调节作用的中药对于疾病的预防、康复, 以及改善亚健康状态, 提高生命质量等方面具有重大的开

收稿日期: 2009-12-04

作者简介: 王楠, 硕士研究生, 研究方向为营养与疾病, 电子信箱: wangnan@bjmu.edu.cn; 李勇 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: M100102956M), 教授, 研究方向为营养与疾病, 电子信箱: liyong@bjmu.edu.cn

发和利用价值。

目前,国内外在免疫中药的研究中,单味药或单体成分占多数^[1-4],复方研究较少,而复方制剂常因方剂的有效组合,通过多环节、多层次、多靶点的作用获得更好的药效整体性。在祖国的医药宝库中有大量的保健食疗经验和药物资源见于中医经典医籍中,本试验采用的复方健胃消食浸膏粉,其方剂来源于东汉张仲景著述的《金匮要略》,同时也是目前广泛使用的非处方药(OTC)之一;其中太子参、山药、山楂、陈皮和麦芽的成分具有健脾益气之功效,而补脾是中医治疗虚证的主要治法,对机体免疫功能有重要影响^[5]。本研究以小鼠为模型,观察复方健胃消食浸膏粉对小鼠免疫功能的影响,初步探讨可能的机制,为进一步开发复方健胃消食浸膏粉的保健作用,以及开发调节免疫的中药新药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

复方健胃消食浸膏粉由江中制药股份有限公司提供,成分为太子参、山药、山楂、陈皮和炒麦芽,呈棕褐色粉末状。

1.2 仪器与试剂

Bio-Rad 酶标仪(美国),SANYO 二氧化碳培养箱(日本),超净工作台,721 分光光度计,96 孔培养板,24 孔培养板,高压灭菌器,游标卡尺。

SA 缓冲液(5×):将巴比妥酸 2.3g、氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.5g、氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1.0g、氯化钠(NaCl) 41.9g、碳酸氢钠(NaHCO_3) 1.26g、巴比妥钠 1.5g 按顺序依次在 800mL 双蒸水中加热溶解,待冷却后,再加双蒸至 1000mL,4℃备用。应用前 5 倍稀释,之后使用即可。

郡氏试剂:碳酸氢钠 1.0g、高铁氰化钾 0.2g、氯化钾 0.05g,加蒸馏水至 1000mL。

LDH 基质液:由乳酸锂 $5 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ 、硝基氯化四氮唑(INT) $6.6 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 、吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS) $2.8 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 、氧化型辅酶 I(NAD) $1.3 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 溶于 0.2mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH=8.2)配制而成。

刀豆蛋白 A (Con A)、噻唑蓝 (MTT)、十二烷基硫酸钠(SDS),购自 Sigma 公司;胎牛血清、RPMI1640 细胞培养液,购自 Hyclone 公司;绵羊红细胞(SRBC)、豚鼠血清补体,由北京大学医学部实验动物中心提供;小鼠淋巴瘤细胞(YAC-1),购自中国医学科学院细胞中心;其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 实验动物和剂量设计

BALB/C 健康雌性小鼠共 80 只,6~8 周龄,18~22g,由北京大学医学部实验动物中心提供(动物合格证号:SCXK(京)-2006-0008),清洁级动物房饲养,饲养环境温度 21~23℃,湿度 50%~60%。

40 只小鼠用于 Con A 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验和 NK 细胞活性测定,另外 40 只小鼠用于迟发型变态反应实验 DTH、抗体生成细胞检测和血清溶血素的测定。每 40 只动物随机分为 4 组,每组 10 只,1 个对照组和 3 个复方健胃消食浸膏

粉干预组。实验设人体推荐剂量的 3.3 倍、10 倍、30 倍,即每日分别给予 0.2、0.6 和 1.8g/kgBW 的复方健胃消食浸膏粉低、中、高剂量组。对照组喂饲普通饲料,干预组喂饲分别含健胃消食浸膏粉(0.2%、0.6%和 1.8%)的饲料,试验期间动物自由饮水。干预 30d 后,处死动物,检测各项免疫指标。

1.4 实验方法

1.4.1 Con A 诱导的小鼠脾 T 淋巴细胞转化实验

受试物干预 30d 后,颈椎脱臼处死动物,无菌取脾,磨碎,过滤(200 目),洗涤,悬浮,制备成细胞浓度为 5×10^6 个/mL 的脾细胞悬液。将上述脾细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中,每孔 1mL,实验孔加 75μL Con A;另一孔不加 Con A,作为对照孔。置 5% CO_2 、37℃ CO_2 培养箱中培养 72h。培养结束前 4h,每孔轻轻吸弃上清 0.7mL,加入 0.7mL 不含胎牛血清的 RPMI1640 培养液,同时加入 MTT 50μL,继续培养 4h。培养结束后,每孔加入 1mL 3% SDS,吹打混匀,使紫色结晶完全溶解,于 570nm 波长处测定 OD 值,以实验孔与对照孔 OD 值的差值代表淋巴细胞增殖能力。干预组的光密度差值高于对照组的光密度差值,且具有统计学差异($P < 0.05$)时,可判定该项实验结果阳性。

1.4.2 迟发型变态反应实验

受试物干预 30d 后,小鼠腹腔注射 2%(V/V)压积 SRBC 进行免疫,4d 后,以游标卡尺测量左后足跖部厚度,然后在测量部位皮下注射 20%(V/V)压积 SRBC 20μL,于注射后 24h 测量左后足跖部厚度,以攻击前后足跖厚度的差值来表示 DTH 的程度。干预组的差值高于对照组的差值,且具有统计学差异($P < 0.05$)时,可判定该项实验结果阳性。

1.4.3 抗体生成细胞检测

采用 Jerne 改良玻片法。受试物干预 30d 后,小鼠腹腔注射 2%(V/V)压积 SRBC 进行免疫。4d 后,颈椎脱臼处死动物,取脾,磨碎,过滤(200 目),洗涤,悬浮,制备成细胞浓度为 5×10^6 个/mL 的脾细胞悬液。将表层培养基(1%琼脂糖)加热溶解后,置 45~50℃水浴保温,与等量 pH7.2~7.4 及 2 倍浓度的 Hank's 液混合,分装小管,每管 0.5mL,向管内加入 50μL 10% SRBC(V/V,用 SA 缓冲液配制)、25μL 脾细胞悬液,迅速混匀,倾倒入已刷有 0.5%琼脂糖薄层的玻片上,做平行片,待凝固后将玻片扣置于片架上,置 CO_2 培养箱中孵育 1.5h,然后将 SA 缓冲液(成分见试剂部分)稀释的补体(1:8)加入玻片架凹槽内,继续孵育 1.5h,计数溶血空斑数。以空斑数/全脾细胞表示,干预组的空斑数高于对照组的空斑数,且具有统计学差异($P < 0.05$)时,可判定该项实验结果阳性。

1.4.4 血清溶血素测定

采用半数溶血值(HC_{50})法。受试物干预 30d 后,小鼠腹腔注射 2%(v/v)压积 SRBC 进行免疫。4d 后,摘眼球取血,分离血清,用 SA 缓冲液稀释 200 倍,取稀释后血清 1mL 置试管内,依次加入 10% SRBC 0.5mL、豚鼠补体 1mL(用 SA 液按 1:8 稀释)。另设不加血清的对照管(以 SA 缓冲液代替)。置 37℃恒温水浴中保温 30min 后,冰浴终止反应,离心,取上清 1mL,加入

都氏试剂 (成分见试剂部分)3mL, 同时取 10% SRBC 0.25mL 加都氏试剂至 4mL,充分混匀,作为 SRBC 半数溶血管。上述各管放置 10min 后,于 540nm 波长处测定 OD 值,溶血素的量以 HC_{50} 表示, HC_{50} 计算公式如下

$$HC_{50} = \frac{\text{样品 OD 值}}{\text{SRBC 半数溶血时 OD 值}} \times \text{稀释倍数}$$

干预组的 HC_{50} 高于对照组的 HC_{50} , 且具有统计学差异 ($P < 0.05$)时,可判定该项实验结果阳性。

1.4.5 NK 细胞活性测定

实验前 24h 将靶细胞 YAC-1 进行传代培养, 应用前以 Hank's 液洗 3 次, 用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL。

受试物干预 30d 后,颈椎脱臼处死动物,无菌取脾,磨碎,过滤(200 目),洗涤,裂解红细胞,悬浮,制备成细胞浓度为 2×10^7 个/mL 脾细胞悬液,即效应细胞。取经传代培养的细胞浓度为 4×10^5 个/mL 的靶细胞 (YAC-1 细胞) 和上述效应细胞各 100 μ L(效靶比 50:1),加入 96 孔培养板中;靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 100 μ L, 靶细胞最大释放孔加靶细胞和 2.5% Triton 各 100 μ L。置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱中培养 4h,离心, 每孔吸取上清 100 μ L 置另一 96 孔培养板中, 同时加入 LDH 基质液 (成分见试剂部分)100 μ L, 反应 5min, 每孔加入 1mol/L 的 HCl 30 μ L,于酶标仪 490nm 波长处测定 OD 值,按下列公式计算 NK 细胞活性

$$NK \text{ 细胞活性 } (\%) = \frac{OD_{\text{样品孔}} - OD_{\text{自然释放孔}}}{OD_{\text{最大释放孔}} - OD_{\text{自然释放孔}}} \times 100\%$$

干预组的 NK 细胞活性高于对照组的 NK 细胞活性,且具有统计学差异 ($P < 0.05$)时,可判定该项实验结果阳性。

1.5 统计方法

所有结果均以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),比较各实验组与对照组的差异。对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换,满足正态性或方差齐性要求后,用转换后的数据进行统计。若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的,改用秩和检验进行统计。

2 结果

2.1 复方健胃消食浸膏粉对小鼠细胞免疫功能的影响

2.1.1 Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验

表 1 给出了复方健胃消食浸膏粉对小鼠淋巴细胞增殖能力的影响。由表 1 可见,与对照组相比,0.6g/kgBW 剂量组小鼠脾 T 淋巴细胞增殖能力有显著性提高 ($P < 0.05$);1.8 g/kgBW 剂量组小鼠脾 T 淋巴细胞增殖能力未见显著增加 ($P > 0.05$),推测试验中存在一定剂量反应关系,中剂量组和较高剂量组在促进小鼠脾 T 淋巴细胞增殖上效果更明显。由此得知,复方健胃消食浸膏粉在 0.6g/kgBW 剂量组能增强 ConA 诱导的小鼠脾 T 淋巴细胞转化能力。

2.1.2 迟发型变态反应实验(DTH)

图 1 为复方健胃消食浸膏粉对小鼠迟发型变态反应的影

表 1 复方健胃消食浸膏粉对小鼠淋巴细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm S$, $n=10$)

Table 1 Effect of Fufang Jianwei Xiaoshi on proliferation response of lymphocytes to Con A ($\bar{x} \pm S$, $n=10$)

组别	动物数/只	ConA 诱导的淋巴细胞增殖能力(OD 差值)
对照组	10	0.197 $\pm$ 0.242
0.2g/kgBW 组	10	0.223 $\pm$ 0.050
0.6g/kgBW 组	10	0.281 $\pm$ 0.058*
1.8g/kgBW 组	10	0.224 $\pm$ 0.039

注: * 与对照组相比有显著性差异, $P < 0.05$ 。

Note: * means $P < 0.05$ as compared with the control group.

响结果。由图 1 可见,0.6g/kgBW 和 1.8g/kgBW 剂量组与对照组比较,足跖肿胀程度显著增强 ($P < 0.05$),即复方健胃消食浸膏粉在 0.6g/kgBW 和 1.8g/kgBW 剂量组均能增强小鼠迟发型变态反应能力。

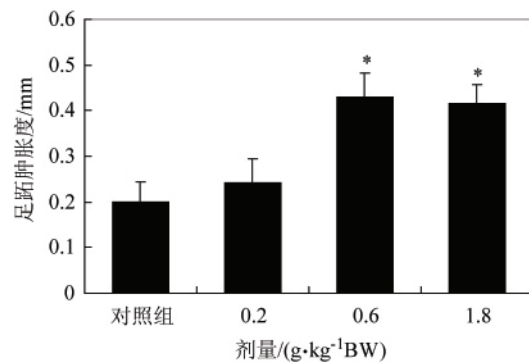


图 1 复方健胃消食浸膏粉对小鼠迟发型变态反应的影响 ($\bar{x} \pm S$, $n=10$)

Fig. 1 Effect of Fufang Jianwei Xiaoshi on delayed allergic reaction ($\bar{x} \pm S$, $n=10$)

注: * 与对照组相比有显著性差异, $P < 0.05$ 。

Note: * means $P < 0.05$ as compared with the control group.

2.2 复方健胃消食浸膏粉对小鼠体液免疫功能的影响

表 2 为复方健胃消食浸膏粉对小鼠体液免疫的影响结果。由表 2 可见,3 个剂量的干预组与对照组比较,溶血空斑数明显增加 ($P < 0.05$),即复方健胃消食浸膏粉在 0.2g/kgBW、0.6 g/kgBW 和 1.8g/kgBW 剂量组均能提高小鼠抗体生成细胞数;而各剂量组 HC_{50} 与对照组比较,无显著性差异,即复方健胃消食浸膏粉对血清溶血素的水平无影响。

2.3 复方健胃消食浸膏粉对小鼠 NK 细胞活性的影响

由表 3 可见,0.6g/kgBW 和 1.8g/kgBW 剂量组与对照组比较,NK 细胞活性显著增强 ($P < 0.05$),即复方健胃消食浸膏粉在 0.6g/kgBW 和 1.8g/kgBW 剂量组均能增强小鼠 NK 细胞的活性。

