玉屏风颗粒对地塞米松诱导的免疫抑制幼鼠的影响

朱绮芬[1,2,3]，郑　斌[1,2,3]，颜仁杰[1,2,3]，徐小涛[1,2,3]，区淑蕴[4]，刘　莉[1,2,3]*

（1. 中国医药工业研究总院药理评价研究中心，上海 200040；2. 上海市生物物质成药性评价专业技术服务平台，上海 200437；3. 上海医药工业研究院创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 200437；4. 国药集团广东环球制药有限公司，佛山 528305）

摘要：目的　探讨玉屏风颗粒对地塞米松致免疫抑制幼鼠的免疫调节作用。**方法**　BALB/c 幼鼠（3 周龄）随机分为 4 组，即正常对照组、模型组、玉屏风组和玉屏风＋模型组，每组各 10 只，正常对照组和模型组均灌胃给予饮用水，持续 21 d；玉屏风组和玉屏风＋模型组灌胃给予玉屏风颗粒（1.8 g/kg，一日 1 次），持续 21 d；模型组和玉屏风＋模型组均分别于试验第 15 天和第 16 天腹腔注射地塞米松（12 mg/kg，一日 1 次）。末次给药后，小鼠称重，处死，取脾脏和胸腺称重计算脏器指数，并分离脾细胞检测自然杀伤（NK）细胞杀伤活性和 $CD4^+/CD8^+$比值，取腹腔巨噬细胞分离纯化进行功能检测。**结果**　与正常对照组比较，模型组幼鼠体质量、胸腺和脾脏指数、淋巴细胞增殖活性、NK 细胞杀伤活性、巨噬细胞吞噬指数和脾淋巴细胞 $CD4^+/CD8^+$比值降低，脾淋巴细胞凋亡比例升高；与模型组比较，玉屏风＋模型组幼鼠体质量、胸腺和脾脏指数、淋巴细胞增殖活性、NK 细胞杀伤活性、巨噬细胞吞噬指数和脾淋巴细胞 $CD4^+/CD8^+$比值均明显升高，脾淋巴细胞凋亡比例显著降低，差异均具有统计学意义（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。**结论**　玉屏风颗粒对地塞米松诱导的幼鼠免疫抑制在不同环节均有显著的改善作用。

关键词：玉屏风颗粒；免疫调节；免疫抑制模型；幼鼠

中图分类号：R965；R978.7　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1672-9188(2018)05-329-05

DOI：10.13683/j.wph.2018.05.009

Effect of Yupingfeng granule on the immunosuppression induced by dexamethasone in immature mice

ZHU Qi-fen[1,2,3], ZHENG Bin[1,2,3], YAN Ren-jie[1,2,3], XU Xiao-tao[1,2,3], QU Shu-yun[4], LIU Li[1,2,3]*

(*1. Center for Pharmacological Evaluation & Research, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040;*
2. Shanghai Professional and Technical Service Center for Biological Material Druggability Evaluation, Shanghai 200437;
3. State Key Laboratory of New Drug &Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437;
4. National Pharmaceutical Group Guangdong Universal Pharmaceutical Co. LTD, Foshan 528305, China)

Abstract: ***Objective*** To investigate the immunomodulatory effects of Yupingfeng granule on the immunosuppression induced by dexamethasone in immature mice. ***Methods*** BALB/c mice（3 weeks old）were randomly divided into four groups: control group, model group, Yupingfeng group and Yupingfeng ＋model group, ten mice in each group. The control group and model group were given by gavage once a day for 21 d with drinking water; The Yupingfeng group and Yupingfeng ＋model group were given by gavage once a day for 21 d with Yupingfeng granule（1.8 g/kg）; the model group and Yupingfeng＋model group were given by intraperitoneal injection on day 15 and 16 with dexamethasone（12 mg/kg）. After last administration, the mice were weighed and sacrificed, the organ dexamethasone in spleen and thymus were measured. Meanwhile, the spleen cells and the peritoneal macrophage were isolated and purified for cell function test. Also,

收稿日期：2017-12-15；**修回日期**：2018-01-03

作者简介：朱绮芬，助理研究员，研究方向为药理学。

通信简介：刘　莉，研究员，博士研究生导师，中国医药工业研究总院药理评价研究中心主任，上海生物物质成药性评价研究中心主任，研究方向为中药药理、免疫药理及消化药理。

基金项目：中国医药集团新产品开发基金项目(编号：2013ZY04)；上海市科委资助项目(编号：15XD1523500)。

the nature kill（NK）cells and $CD4^+/CD8^+$ T cells were isolated from mice blood for testing. ***Results*** Compared with the control group, body weight, thymus and spleen index, lymphocyte proliferation activity, NK cell killing activity, macrophage phagocytosis index and spleen lymphocyte $CD4^+/CD8^+$ ratio in model group were decreased, and the proportion of spleen lymphocyte apoptosis in model group was increased. Compared with the model group, the body weight, thymus and spleen index, lymphocyte proliferation activity, NK cell killing activity, macrophage phagocytosis index and spleen lymphocyte $CD4^+/CD8^+$ ratio in Yupingfeng＋model group were increased, and the proportion of spleen lymphocyte apoptosis in Yupingfeng＋model group was decreased, the differences were statistically significant（$P<0.05$ or $P<0.01$）. ***Conclusion*** Yupingfeng granule can significantly improve the immune function of the immunosuppressive immature mice induced by dexamethasone.

Key words: Yupingfeng granule; immunomodulation; immunosuppressive model; immature mice

婴幼儿免疫系统发育不够成熟，功能尚欠完善，易于被微生物感染，且不易清除，导致机体反复感染，迁延不愈。目前临床用于治疗免疫功能低下导致的相关疾病的药物并不多，一般只能通过增强细胞或体液免疫的某一靶点而生效，但是机体免疫系统复杂，任何针对某个靶点的免疫增强药物，临床效果均不理想。近年来，随着分子生物学和免疫学的发展以及免疫实验技术的提高，中药复方的免疫调节作用及作用机制的研究有了深入的发展，对中药免疫治疗的药理作用特点及作用机制有了进一步的认识[1-3]。玉屏风方剂是中医“扶正固表”的传统名方，由黄芪、白术和防风三味药组成，该方临床效果确切，应用广泛，有扶正止汗、祛邪御风等功效[4]。现代医疗常用于治疗或预防儿童及成人反复发作的上呼吸道感染、肾小球肾炎、过敏性鼻炎、慢性荨麻疹和支气管哮喘等因外感风邪而致反复发作的过敏性疾病，或成人手术后、产后及儿童因表虚腠理不固而致的自汗等。目前玉屏风各种制剂已应用于临床，并获得一定疗效[5-7]。本文以玉屏风颗粒作为研究对象，探索其对地塞米松致免疫抑制幼鼠的免疫调节作用，为玉屏风治疗婴幼儿的剂量和疗程提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品、试剂和仪器

玉屏风颗粒，由国药集团广东环球制药有限公司生产，生产批号：130301，规格：5 g/ 袋；其他试剂如生理盐水、乙醇等均由国药集团化学试剂有限公司生产；刀豆球蛋白 A（ConA），生产批号：SLBF3258V，生产厂家：Sigma 公司；脂多糖（LPS），生产批号：011M4001V，生产厂家：Sigma 公司；无菌羊血，购自中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心；CD3 抗体，生产批号：557869，生产厂家：BD 公司（美国）；CD4 抗体，生产批号：553048，生产厂家：BD 公司（美国）；CD8a 抗体，生产批号：553030，生产厂家：BD 公司（美国）；荧光微球：carboxylate-modified microspheres（FluoSpheres），生产批号：1421049，生产厂家：赛默飞世尔科技有限公司（美国）；乳酸脱氢酶（LDH）试剂盒，生产批号：20140608，购自南京建成生物工程研究所。

酶标仪，型号：Variskan Flash，生产厂家：赛默飞世尔科技有限公司（美国）；流式细胞分选仪，型号：BD FACSAria Ⅱ，生产厂家：BD 公司（美国）；电子天平，型号：XP105DR，生产厂家：梅特勒 - 托利多公司（瑞士）；二氧化碳培养箱，型号：370 Series，生产厂家：赛默飞世尔科技有限公司（美国）；高速离心机，型号：5810R，生产厂家：艾本德公司（德国）。

1.1.2 动物

幼年雄性 BALB/c 小鼠（3 周龄）40 只，体质量 8 ～ 10 g，购自中国科学院上海斯莱克实验动物中心，实验动物生产许可证号：SCXK（沪）2012-0002，饲养于 SPF 级实验动物房，实验动物使用许可证号：SYXK（沪）2014-0018。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立

3 周龄 BALB/c 幼鼠随机分为 4 组，每组 10 只，分别为正常对照组、模型组、玉屏风组和玉屏风＋模型组。试验开始称重，玉屏风组幼鼠单独灌胃给予玉屏风颗粒（1.8 g/kg，一日 1 次），持续给药 21 d；模型组幼鼠每天灌胃给予等容积的饮用水，并于试验第 15 天和第 16 天，腹腔注射地塞米松（12 mg/kg，一日 1 次）；玉屏风＋模型组幼鼠每天灌胃给予玉屏风颗粒（方法同前），持续 21 d，并于试验第 15 天和第 16 天腹腔注射地塞米松（方法同前）。正常对照组幼鼠每天灌胃给予等容积的饮用水。每周记录动物体质量，给药末次后 24 h，称体质量，计算解剖当日体质量减去地塞米松给药前各组体质量变化值；处死动物后解剖，每组 5 只取胸腺和脾脏称重，以观察脾脏指数、胸腺指数，另取 5 只制备腹腔巨噬细胞。

1.2.2 脾淋巴细胞增殖

取 500 μl 脾淋巴细胞悬液（5×10^6 个 /ml），加入 2 μl 的 ConA（终浓度为 4 μg/ml）10 μl 的 LPS（终浓度为 20 μg/ml），混合后加入到 96 孔板，每孔 100 μl，每个样品设 3 个复孔，置 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养 72 h。培养结束后，每孔加入 10 μl CCK-8 试剂，2 h 后用酶标仪于 450 nm 波长下测量 OD 值。

1.2.3 自然杀伤（NK）细胞杀伤活性

制备 2.5×10^7 个 /ml 的脾淋巴细胞悬液，并以含 0.5% BSA 的 RPMI-1640 培养液重悬作为效应细胞，另取 5×10^5 个 /ml 的 YAC-1 细胞以含 0.5% 牛血清白蛋白（BSA）的 RPMI-1640 培养液重悬作为靶细胞。向 96 孔板分别加入 100 μl 的效应细胞和靶细胞（效应细胞：靶细胞＝ 50 ： 1），对照孔加 100 μl 的靶细胞和 100 μl 含 0.5% BSA 的 RPMI-1640 培养液，最大释放孔加 100 μl 的靶细胞和 100 μl 20% 的 NP-40 裂解液，置于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养 4 h，然后低温离心取上清。按照 LDH 测定试剂盒说明书测定细胞上清液的 LDH 活性。

NK 细胞杀伤活性百分比＝（试验孔 OD －对照孔 OD）/（最大释放孔 OD －对照孔 OD）×100%

1.2.4 巨噬细胞吞噬荧光微球

取 50 μl 荧光微球原液与 2.5 ml 2%BSA 37℃避光孵育 30 min, 超声处理 5 min。提取小鼠腹腔巨噬细胞，用含 5%FBS 的 Hank's 试剂调节至 5×10^5 个 /ml，接种于 6 孔板，每孔 1 ml，每孔加处理过的荧光微球 200 μl，置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养 2 h。用细胞刮刮下巨噬细胞，过滤，计数，浓缩，用流式细胞仪测定。观察吞噬指数，吞噬指数＝ $M_1\times1+M_2\times2+M_3\times3+M_n\times n$。其中 M_n 为吞噬 n 个荧光微球的巨噬细胞占总巨噬细胞的百分数。

1.2.5 脾淋巴细胞 $CD4^+/CD8^+$ 比值

制备 5×10^6 个 /ml 的脾淋巴细胞悬液，每个待测样品 100 μl，另准备 4 份对照样品，分别为空白对照（不加任何抗体）、CD3 对照组（只加 CD3 抗体）、CD4 对照组（只加 CD4 抗体）、CD8 对照组（只加 CD8a 抗体）；向待测样品中分别加入 2.5 μl CD4，1 μl CD8a，2.5 μl CD3，使每 1×10^6 个脾淋巴细胞对应 1 μg 抗体，混匀后室温下避光孵育 30 min，用流式细胞仪检测。

1.2.6 脾淋巴细胞凋亡

制备 1×10^7 个 /ml 的脾淋巴细胞悬液，每个待测样品 100 μl，另准备 3 份对照样品［（3 份对照样品分别为空白对照（不加任何试剂）、FITC Annexin V 对照（只加 FITC Annexin V）、PI 对照（只加 PI）］。10×Annexin V Binding Buffer 用超纯水稀释 10 倍，得到 1× Annexin V Binding Buffer，待测样品离心（1 000 rpm，5 min）去上清，加入 1× Annexin V Binding Buffer 100 μl 混悬，向待测样品中分别加入 5 μl FITC Annexin V 和 5 μl PI，混匀后室温下避光孵育 15 min，用流式细胞仪检测。

1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计处理，所有数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 玉屏风颗粒对地塞米松诱导的免疫抑制幼鼠体质量的影响

至试验结束，除模型组外，正常对照组和玉屏风组幼鼠体质量均出现增长，分别升高（0.50±0.27）g和（0.98±0.57）g；与正常对照组比较，模型组幼鼠体质量下降，差异有统计学意义（$P<0.05$）；造模后幼鼠体质量均出现下降，其中模型组幼鼠体质量较玉屏风＋模型组下降显著［(1.22±0.52) g对(0.26±0.47) g］，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.2 玉屏风颗粒对地塞米松诱导的免疫抑制幼鼠免疫器官脏器指数的影响

与正常对照组比较，模型组幼鼠胸腺和脾脏指数显著降低（$P<0.01$）；玉屏风组幼鼠的胸腺指数有所增加，但差异无统计学意义（$P>0.05$）；与模型组相比，玉屏风＋模型组幼鼠的胸腺（$P<0.01$）和脾脏指数（$P<0.05$）显著增加，差异有统计学意义，详见表1。

表1 玉屏风颗粒给药后对模型组幼鼠脏器指数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Table 1 Effect of Yupingfeng granule on viscera index of immature mice in model group（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	胸腺指数/mg·g^{-1}	脾脏指数/mg·g^{-1}
正常对照组	2.85±0.46	5.46±0.47
模型组	1.19±0.23**	3.40±0.60**
玉屏风组	3.21±0.20	4.97±0.53
玉屏风＋模型组	1.85±0.20$^{\#\#}$	4.46±0.68$^{\#}$

与正常对照组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

vs control group, ** $P<0.01$; *vs* model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$

2.3 玉屏风颗粒对地塞米松诱导的免疫抑制幼鼠脾淋巴细胞增殖的影响

与正常对照组比较，模型组幼鼠由ConA诱导或LPS诱导的脾淋巴细胞增殖活性呈显著降低（$P<0.01$），玉屏风组幼鼠由ConA诱导或LPS诱导的脾淋巴细胞增殖活性虽提高，但差异无统计学意义（$P>0.05$）；与模型组相比，玉屏风＋模型组幼鼠经ConA诱导或LPS诱导的脾淋巴细胞增殖活性显著提高（$P<0.01$），见表2。

表2 玉屏风颗粒给药后对模型组幼鼠脾淋巴细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Table 2 Effect of Yupingfeng granule on the proliferation of spleen lymphocyte of immature mice in model group（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	ConA诱导	LPS诱导
正常对照组	0.088±0.003	0.090±0004
模型组	0.049±0.009**	0.057±0.004**
玉屏风组	0.100±0.012	0.096±0.008
玉屏风＋模型组	0.100±0.010$^{\#\#}$	0.105±0.014$^{\#\#}$

与正常对照组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$

vs control group, ** $P<0.01$; *vs* model group, $^{\#\#}P<0.01$

2.4 玉屏风颗粒对地塞米松诱导的免疫抑制幼鼠自然杀伤细胞杀伤活性、巨噬细胞吞噬指数、脾淋巴细胞$CD4^+/CD8^+$比值和脾淋巴细胞凋亡的影响

与正常对照组比较，模型组幼鼠NK细胞杀伤活性（$P<0.01$）、巨噬细胞吞噬指数（$P<0.05$）和脾淋巴细胞$CD4^+/CD8^+$比值（$P<0.01$）显著降低，玉屏风组NK细胞杀伤活性（$P<0.05$）和巨噬细胞吞噬指数（$P<0.01$）显著提高；与模型组比较，玉屏风＋模型组幼鼠NK细胞杀伤活性、巨噬细胞吞噬指数和脾淋巴细胞$CD4^+/CD8^+$比值升高（$P<0.01$）。

与正常对照组相比，模型组幼鼠的脾淋巴细胞凋亡比例显著升高（$P<0.01$）；与模型组相比，玉屏风＋模型组幼鼠的脾淋巴细胞凋亡比例显著降低（$P<0.05$），见表3。

3 讨论

地塞米松是临床上常用的免疫抑制剂，对免疫反应的多个环节有抑制作用[8-9]。本文采用地塞米松诱导建立幼鼠免疫抑制模型，幼鼠注射地塞米松后，其体质量、胸腺及脾脏指数均显著降低，LPS或ConA诱导的脾淋巴细胞（T细胞或B细胞）增殖活性降低，脾淋巴细胞的凋亡增强，脾淋巴细胞$CD4^+/CD8^+$比值降低，提示巨噬细胞的吞噬能力和NK杀伤活性降低，提示，幼鼠免疫功能受到抑制。本次研究中，地塞米松诱导幼鼠免疫抑制的剂量为12 mg/kg，为地塞米松诱导成年鼠免疫抑制模型剂量（20 mg/kg）的60%，但幼鼠免疫抑制作用与成年鼠一致[10]。根据临床人用推荐剂量，玉屏风颗粒换算

表 3　玉屏风颗粒给药后对模型组幼鼠免疫功能的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Table 3　Effect of Yupingfeng granule on immune function of immature mice in model group（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	NK细胞杀伤活性	巨噬细胞吞噬指数	脾淋巴细胞$CD4^+/CD8^+$比值	脾淋巴细胞凋亡比例/%
正常对照组	77.62±1.07	189.5±3.7	4.45±0.51	27.92±3.28
模型组	51.69±2.60**	181.6±8.1*	3.58±0.07**	41.38±1.55**
玉屏风组	84.73±6.41*	205.3±10.8**	4.82±0.84	32.36±4.69
玉屏风＋模型组	69.68±11.43$^{\#\#}$	202.8±5.0$^{\#\#}$	4.08±0.24$^{\#\#}$	35.14±3.14$^{\#}$

与正常对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$;与模型组比较：$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

vs control group, *$P<0.05$, ** $P<0.01$; *vs* model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$

为成年鼠的剂量为 2.5 g/kg，在此剂量下，玉屏风颗粒可以显著拮抗地塞米松引起的免疫抑制作用，如提高脾淋巴细胞增殖能力，减少脾淋巴细胞凋亡，拮抗地塞米松引起的脾淋巴细胞 $CD4^+/CD8^+$ 比值降低，增强巨噬细胞和 NK 细胞的活性等。本次研究中，玉屏风颗粒给药剂量为 1.8 g/kg，是成年鼠推算剂量的 72%，可显著拮抗地塞米松导致的幼鼠免疫抑制，显著提高幼鼠免疫功能。

玉屏风颗粒是由黄芪、白术、防风组成的中药复方。方中黄芪补肺益气，固表止汗，是为君药。白术补气健脾，与黄芪合用，可增强固表止汗之功，是为臣药；防风走肌表而散风邪，是为佐使药。玉屏风颗粒为补益剂，具有益气、固表、止汗之功效。用于表虚不固，自汗恶风，面色㿠白，或体虚易感风邪者。玉屏风颗粒通过补充肺卫之气来提高自身机体免疫功能。玉屏风颗粒具有双向免疫调节作用，可以增强机体免疫功能，抑制变态反应，减少病毒感染，减少呼吸道疾病、过敏性疾病的反复发作。因此本研究采用地塞米松诱导的免疫抑制幼鼠模型模拟婴幼儿发育尚不成熟、功能不全的免疫系统来探索玉屏风颗粒对免疫系统的调节作用，为临床用药提供参考。

4　结论

玉屏风颗粒对地塞米松诱导的幼鼠免疫抑制在不同环境均有显著的改善作用，为其用于临床提高婴幼儿免疫力提供治疗依据。

参考文献：

[1] Ko KM, Leung HY. Enhancement of ATP generation capacity, antioxidant activity and immunomodulatory activities by Chinese Yang and Yin tonifying herbs[J]. Chin Med, 2007, 27(1): 1-10.

[2] Ho LJ, Chang WL, Chen A, *et al.* Differential immunomodulatory effects by Tripterygium wilfordii Hook f-derived refined extract PG27 and its purified component PG490 (triptolide) in human peripheral blood T cells: potential therapeutics for arthritis and possible mechanisms explaining in part Chinese herbal theory "Junn-Chenn-Zuou-SS"[J]. J Transl Med, 2013, 11(1): 1-15.

[3] Liu QY, Yao YM, Yu Y, *et al*. Astragalus polysaccharides attenuate postburn sepsis via inhibiting negative immunoregulation of $CD4^+$ CD25(high) T cells [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e19811.

[4] Li Y, Zheng B, Tian H, *et al*. Yupingfeng powder relieves the immune suppression induced by dexamethasone in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 200(1): 117-123.

[5] 樊凯芳, 赵建平, 冯振宇. 玉屏风散配方颗粒汤剂与传统饮片汤剂对免疫抑制小鼠 T 细胞亚群影响的比较[J]. 中国中医急症, 2013, 22 (4): 550-551.

[6] Jia MQ, Xiong YJ, Xue Y, *et al*. Using UPLC-MS/MS for characterization of active components in extracts of Yupingfeng and application to a comparative pharmacokinetic study in rat plasma after oral administration[J]. Molecules, 2017, 22(5): pii E810.

[7] 刘焕蓉, 秦雪梅, 王利平, 等. 玉屏风配伍剂量变化与有效成分的相关性研究[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1922-1924.

[8] 王汉裕, 高伟, 刘拥军, 等. 地塞米松损害间充质干细胞的免疫抑制功能[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(5): 1191-1194.

[9] 李相玲, 白莎莎, 周联, 等. 环磷酰胺和地塞米松对小鼠肠道黏膜免疫抑制的比较[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(1): 39-42.

[10] Li Y, Zheng B, Tian H, *et al*. Yupingfeng powder relieves the immune suppression induced by dexamethasone in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 200(4): 117-123.

（责任编辑：雷　玲）