

乌药精颗粒对小鼠免疫功能影响的实验研究

戴关海 吴人照 杨 锋 童晔玲 陈 宇

摘 要 **目的** 观察乌药精颗粒对小鼠免疫功能的影响。**方法** 实验设乌药精颗粒低、中、高 3 个剂量组(1.0g/kg、2.0g/kg 和 6.0g/kg, 分别相当于人推荐量的 5、10、30 倍), 另设乌药组(0.9g/kg)、别直参组(2.0g/kg)及阴性对照组(H_2O), 经口给予 30 天。分别观察 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增生功能、对二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应、抗体生成细胞、血清溶血素含量及 NK 细胞活性的影响。**结果** 高、低剂量组乌药精颗粒均可明显提高 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增生功能, 与阴性对照组比较有明显差异($P < 0.05, 0.01$); 乌药精颗粒高剂量组可明显提高对二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应功能, 与阴性对照组比较有明显差异($P < 0.05$); 各剂量组乌药精颗粒对小鼠抗体生成细胞、血清溶血素含量及 NK 细胞活性均无明显差异($P > 0.05$)。**结论** 乌药精颗粒可明显提高小鼠 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞的增生功能及二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应功能。

关键词 乌药精颗粒 小鼠 免疫功能 实验研究

Experimental Study of the Effect of Wuyaojing Granules on the Immunological Function of Mice. Dai Guanhai, Wu Renzhao, Yang Feng, Tong Yeling, Chen Yu. Institute of Basic Medicine, Zhejiang Academy of TCM, Zhejiang 310007, China

Abstract **Objective** To observe the effect of Wuyaojing granules (WYJG) on immunological function of mice. **Methods** Mice were randomly divided into six groups: the high-dosage WYJG group (6.0g/kg), the mid-dosage WYJG group (2.0g/kg), the low-dosage WYJG group (1.0g/kg), the Linder aggregate group (0.9g/kg), the korean Ginseng group (2.0g/kg) and the normal control group (H_2O). After a period of 30-day treatment, the effects of WYJG on the T lymphocyte transformations capacity induced by ConA, delayed hypersensitivity led by DNFB, the number of lymphocyte B, serum level of hemolysin and NK activity were observed. **Results** The high-dosage and the low-dosage WYJG could significantly increase T lymphocyte transformations capacity induced by ConA ($P < 0.05 \sim 0.01$). The high-dosage WYJG could strengthen delay hypersensitivity led by DNFB ($P < 0.05$). And The WYJG could not affect the number of lymphocyte B, serum level of hemolysin and NK activity ($P > 0.05$). **Conclusion** WYJG can significantly increase T lymphocyte transformations capacity induced by ConA and strengthen delay hypersensitivity led by DNFB.

Key words Wuyaojing granules; Mice; Immunological function; Experimental study

天台乌药为樟科灌木或小乔木植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm 的根。是我国道地药材之一。古往今来, 天台乌药因其功效卓著、用途广泛而备受历代医家青睐。自始载于《开宝本草》以来, 各类本草专著皆有收载^[1]。乌药为理气散寒止痛之圣药, 历代医家均十分推崇, 认为“乌药辛温香窜, 上入脾肺, 下通肾经, 如中风中气, 膀胱冷结, 小便频数, 反胃吐食, 泄泻霍乱, 女人血气凝滞, 小儿蛔虫, 外而疮疖疥疔, 并凡一切病之属于气逆而胸腹不快者, 皆宜用之”。目前, 对乌药的临床应用又有新的认识, 现代研究表明, 乌药含有萜类挥发油等多种有效成分, 有良好的镇痛、消炎、扩张血管、抗疲劳等作用, 对冠

心病心绞痛、脉管炎、肝硬化腹腔积液、肾积水、泌尿系结石等均有疗效^[2]。药理研究证实, 乌药提取物能延长小鼠负重游泳时间, 降低运动后小鼠血清乳酸含量, 具有抗疲劳的作用^[3]。

材料与方法

1. 实验试剂: DMEM 高糖培养液 ($1 \times$): 吉诺生物医药技术有限公司产, 批号 06021502; 0.25% Trypsin: 吉诺生物医药技术有限公司产, 批号 06021501; 超级新生牛血清: 杭州四季青生物工程材料有限公司产, 批号 050430; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT): Amresco 公司生产, 批号 0602; 二硝基氟苯: 东京化成工业株式会社生产, 批号 FIM01; YAC-1 细胞: 由中国科学院上海药物研究所肿瘤室引进, 浙江省中医药研究院基础所液氮保存; 乌药精颗粒: 天台乌药、西洋参、黄精、刺五加等组成, 为棕黄色粉末, 样品批号为 051216, 实验以蒸馏水为溶媒配制制成不同浓度的样品液供试。

2. 主要仪器: CO_2 培养箱、离心机、可调移液器、电热不锈

基金项目: 浙江省科技厅开发专项资助项目 (2006F13015)

作者单位: 310007 杭州, 浙江省中医药研究院基础实验研究所

钢手提式压力蒸汽灭菌器、医用净化台、显微镜、液体闪烁计数仪、细胞收集仪、干燥箱、打孔器、BS210S 电子天平及酶标分析仪等。

3. 实验动物和检测条件:ICR 种小鼠,体重 18~22g,雌雄各半,由浙江省中医药研究院实验动物中心提供,许可证:SYXK(浙 2004-0034)。动物饲料由浙江省实验动物中心提供,执行标准 GB14924-2001。检测环境条件,温度范围 20℃~23℃,相对湿度范围 40%~70%。小鼠试验前在动物房环境中适应 2 天。

4. 剂量选择:该产品人推荐量为 12g/d 每 60kg 体重,本次实验设低(1.0g/kg)、中(2.0g/kg)、高(6.0g/kg)3 个剂量组,分别相当于人推荐量的 5、10、30 倍,另设乌药组(0.9g/kg)、别直参组(2.0g/kg)及阴性对照组(H_2O)。

5. ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验^[4]:取正常小鼠 60 只,随机分成 7 组,分别灌胃不同剂量的乌药精颗粒(1.0g/kg、2.0g/kg 和 6.0g/kg)、乌药(0.9g/kg)、别直参(2.0g/kg)及水,30 天后脱颈椎法处死小鼠,无菌取脾,置于盛有适量无菌 Hanks 液的小平皿中,用镊子轻轻撕碎,制成单细胞悬液,200 目筛网过滤,洗涤,计数,最后用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 3×10^6 /ml。将细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中,每孔 1ml,一孔加 75 μ l ConA 液(相当于 5.0 μ g/ml),另一孔作为对照,置 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 72h。培养结束前 4h,每孔轻轻吸去上清液 0.7ml,加入 0.7ml 不含小牛血清的 RPMI1640 培养液,同时加入 MTT(5mg/ml)50 微升/孔,继续培养 4h。培养结束后,每孔加入 1ml 酸性异丙醇,吹打混匀,使紫色结晶完全溶解。在 570nm 波长处测定光密度值(OD)。最后用加 ConA 孔的光密度值减去不加 ConA 孔的光密度值代表淋巴细胞的增生能力。

6. 二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应试验(耳肿胀法)^[4]:二硝基氟苯溶液应新鲜配制,称取二硝基氟苯 50mg,置清洁干燥小瓶中,将预先配好的 5ml 丙酮麻油溶液(丙酮:麻油=1:1)倒入小瓶,最好瓶塞并用胶布密封。混匀后,用 250 μ l 注射器通过瓶盖取用。实验分组及给药同 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验,各组动物连续给药 25 天后,每鼠腹部皮肤用硫化钡脱毛,范围约 3cm $\times$ 3cm,用二硝基氟苯溶液 50 μ l 均匀涂抹致敏。5 天后,用二硝基氟苯溶液 10 μ l 均匀涂抹于小鼠右耳两面进行攻击,攻击后 24h 颈椎脱臼处死小鼠,剪下左右耳壳,用打孔器取下直径 8mm 的耳片称重。

7. 抗体生成细胞检测(Jerne 改良玻片法)^[4]:实验分组及给药同 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验,实验连续给药 30 天,在试验第 25 天,每只鼠腹腔注射 0.2ml 2% (v/v) 压积绵羊红细胞(SRBC)悬液,进行免疫。5 天后,每鼠无菌取脾,置于盛有适量无菌 Hanks 液的小平皿中,用镊子轻轻撕碎,制成单细胞悬液,200 目筛网过滤,洗涤,计数,最后用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 5×10^6 /ml。将表层培养基(1g 琼脂糖加双蒸水至 100ml)加热溶解后,放 45℃ 水浴保

温,与等量 pH7.2~7.4、2 倍浓度的 Hank's 液混合,分装小试管,每管 0.5ml,再向管内加 50 μ l 10% SRBC(v/v,用 SA 液配制),20 μ l 脾细胞悬液(5×10^6 /ml),迅速混匀,倾倒入已刷琼脂糖薄层的玻片上,做平行片,待琼脂凝固后,将玻片水平扣放在片架上,放入 CO_2 培养箱中温育 1h,然后用 SA 缓冲液稀释的补体(1:8)加入到玻片架凹槽内,继续温育 1h 后,计数溶血空斑数。

8. 血清溶血素检测(HC50 检测法)^[4]:实验分组及给药同 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验,给药 26 天后,取羊血,用生理盐水洗涤 3 次,每次离心(2000r/min)10min,将压积绵羊红细胞(SRBC)用生理盐水配成 5% (v/v) 的细胞悬液,每只小鼠腹腔注射 0.2ml 进行免疫。4 天后,摘除眼球取血于离心管内,分离血清。用 SA 液将血清稀释(荷瘤动物组血清 25 倍稀释,正常对照组血清 200 倍稀释)。将稀释后血清 1ml 置试管内,依次加入 10% (v/v) SRBC 0.5ml,补体(用 SA 1:10 稀释)1ml。另设不加血清的对照管。37℃ 水浴中保温 15min,冰浴终止反应。离心取上清液 1ml,加都氏液 3ml,同时另取 10% (v/v) SRBC 0.25ml,加都氏液 4ml,充分混匀,放置 10min 后,于 540nm 波长处以对照管作空白,分别测定各管 OD 值。计算半数溶血值(HC50)。

9. NK 细胞活性测定(LDH 测定法)^[4]:实验分组及给药同 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验,无菌取脾,置于盛有适量无菌 Hanks 液的小平皿中,用镊子轻轻撕碎,制成单细胞悬液,200 目筛网过滤,洗涤,计数,最后用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 2×10^7 /ml。试验前 24h 将 YAC-1 细胞(靶细胞)传代培养,应用前用 Hanks 液洗 3 次,用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为 4×10^5 /ml。取靶细胞和脾细胞悬液(效应细胞)各 100 μ l(效靶比 50:1),加入 U 型 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 1% NP40 各 100 μ l;上述各项均设 3 个复孔,于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 4h,离心,每孔吸取上清 100 μ l 置平底 96 孔培养板中,同时加入 LDH 基质液 100 μ l,反应 5min,每孔加入 1mol/L 的 HCl 30 μ l,在 490nm 波长处测光密度(OD)值,计算 NK 细胞活性。

结 果

1. 乌药精颗粒对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验的影响(表 1)。由表 1 可见,高、低剂量组乌药精颗粒均可明显提高 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞的增生功能,与阴性对照组比较有明显差异($P < 0.05$ 、 0.01)。

2. 乌药精颗粒对二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应的影响(表 2)。由表 2 可见,乌药精颗粒 6.0g/kg 剂量组均可明显提高对二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应功能,与阴性对照组比较有明显差异($P < 0.05$)。

表 1 乌药精颗粒对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别与剂量	动物(n)	体重(g)		光密度差值
		实验前	实验后	
乌药精颗粒 6.0g/kg	10	19.7 ± 0.48	34.0 ± 4.94	0.810 ± 0.126 **
乌药精颗粒 2.0g/kg	10	19.2 ± 0.92	34.6 ± 5.76	0.583 ± 0.080
乌药精颗粒 1.0g/kg	10	19.2 ± 0.92	34.7 ± 5.44	0.704 ± 0.083 *
乌药 0.9g/kg	10	19.3 ± 0.82	33.4 ± 5.06	0.680 ± 0.106
别直参 2.0g/kg	10	19.0 ± 0.94	34.1 ± 5.28	0.754 ± 0.111 *
水对照组 25ml/kg	10	19.3 ± 0.67	34.1 ± 5.97	0.589 ± 0.126

* 表示与水对照组比较, $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

表 2 乌药精颗粒对二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应的影响($\bar{x} \pm s$)

组别与剂量	动物(n)	体重(g)		耳片重量差值(mg)
		实验前	实验后	
乌药精颗粒 6.0g/kg	10	19.4 ± 0.84	34.6 ± 5.46	13.2 ± 3.2 *
乌药精颗粒 2.0g/kg	10	19.3 ± 0.95	34.1 ± 5.88	12.2 ± 2.5
乌药精颗粒 1.0g/kg	10	19.6 ± 0.52	34.5 ± 5.78	12.2 ± 2.9
乌药 0.9g/kg	10	19.2 ± 0.92	34.7 ± 5.48	12.3 ± 3.5
别直参 2.0g/kg	10	19.1 ± 0.88	33.8 ± 4.96	13.3 ± 2.5 *
水对照组 25ml/kg	10	19.7 ± 0.48	33.9 ± 4.79	10.3 ± 2.1

* 表示与水对照组比较, $P < 0.05$

3. 乌药精颗粒对抗体生成细胞的影响(表 3)。胞均无明显影响,与水对照组比较, $P > 0.05$ 。由表 3 可见,各剂量组乌药精颗粒对小鼠抗体生成细

表 3 乌药精颗粒对抗体生成细胞的影响($\bar{x} \pm s$)

组别与剂量	动物(n)	体重(g)		溶血空斑数(个)
		实验前	实验后	
乌药精颗粒 6.0g/kg	10	19.2 ± 0.92	30.6 ± 1.71	26.4 ± 2.6
乌药精颗粒 2.0g/kg	10	19.6 ± 0.52	29.6 ± 1.26	25.6 ± 2.0
乌药精颗粒 1.0g/kg	10	19.4 ± 0.84	30.7 ± 1.34	25.2 ± 2.3
乌药 0.9g/kg	10	19.3 ± 0.95	31.0 ± 1.63	24.9 ± 2.9
别直参 2.0g/kg	10	18.9 ± 0.88	30.7 ± 2.21	27.0 ± 2.7 *
水对照组 25ml/kg	10	19.1 ± 0.88	30.7 ± 1.49	24.3 ± 2.3

* 表示与水对照组比较, $P < 0.05$

4. 乌药精颗粒对小鼠血清溶血素检测的影响(表 4)。由表 4 可见,各剂量组乌药精颗粒对小鼠血清溶血素半数溶血值(HC50)均无明显影响,与水对照组比较, $P > 0.05$ 。

表 4 乌药精颗粒对小鼠血清溶血素的影响($\bar{x} \pm s$)

组别与剂量	动物(n)	体重(g)		HC ₅₀ 值
		实验前	实验后	
乌药精颗粒 6.0g/kg	10	19.7 ± 0.48	34.0 ± 4.94	160.7 ± 32.11
乌药精颗粒 2.0g/kg	10	19.2 ± 0.92	34.6 ± 5.76	162.0 ± 59.32
乌药精颗粒 1.0g/kg	10	19.2 ± 0.92	34.7 ± 5.44	148.4 ± 59.16
乌药 0.9g/kg	10	19.3 ± 0.82	33.4 ± 5.06	152.4 ± 51.43
别直参 2.0g/kg	10	19.0 ± 0.94	34.1 ± 5.28	165.1 ± 49.51
水对照组 25ml/kg	10	19.3 ± 0.67	34.1 ± 5.97	139.4 ± 37.92

5. 乌药精颗粒对小鼠 NK 细胞活性的影响(表 5)。由表 5 可见,各剂量组乌药精颗粒对小鼠 NK 细胞活性均无明显影响,与水对照组比较, $P > 0.05$ 。

表 5 乌药精颗粒对小鼠 NK 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别与剂量	动物 (n)	体重 (g)		NK 细胞活性 (%)
		实验前	实验后	
乌药精颗粒 6.0g/kg	10	19.7 ± 0.48	34.0 ± 4.94	27.5 ± 5.30
乌药精颗粒 2.0g/kg	10	19.2 ± 0.92	34.6 ± 5.76	27.8 ± 4.34
乌药精颗粒 1.0g/kg	10	19.2 ± 0.92	34.7 ± 5.44	26.7 ± 4.13
乌药 0.9g/kg	10	19.3 ± 0.82	33.4 ± 5.06	27.5 ± 8.42
别直参 2.0g/kg	10	19.0 ± 0.94	34.1 ± 5.28	28.7 ± 5.87
水对照组 25ml/kg	10	19.3 ± 0.67	34.1 ± 5.97	26.4 ± 5.93

讨 论

本研究结果提示乌药精颗粒可显著提高小鼠 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞的增生功能及二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应功能。说明乌药精颗粒对细胞免疫功能提高作用较显著,对体液免疫功能和非特异性免疫功能的提高作用可能较弱,结果未见显著性意义。乌药单味对免疫功能的影响,也有上述作用趋势,但未见显著性意义。可能与剂量较小或研究样本较少有关,有待进一步研究。

目前的补益保健食品中,少有既滋补又行气不腻的产品,本品中西洋参具有显著提高氢化可的松所致阴虚小鼠免疫能力,提高迟发型超敏反应的强度和小鼠单核吞噬细胞的能力,具有提高机体免疫力及抗疲劳作用^[5,6]。黄精多糖有显著的抗肿瘤作用和免疫调节活性等作用^[7]。刺五加具有广泛的生物学活性,现代药理研究表明刺五加具有增强免疫力、抗血小板聚集、血栓形成、抗心肌缺血、扩张血管、抗衰老、抗有害应激、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗炎、镇静等功效^[8,9]。全方具有既滋补又能行气的特点,特别适用于中老年人。乌药作为浙江省中药特产——“浙八味”之一,乌药产品的开发,将为浙江的中药特色农业带来一定的贡献。

参考文献

- 1 周新蓓,欧阳荣. 乌药不同炮制品中乌药醚内酯的含量测定. 中药材 2008,31(3):350-351
- 2 顾莉蕴,罗琼,肖梅,等. 乌药叶总黄酮的抗氧化作用及对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用. 中药新药与临床药理,2008,19(6):447-450
- 3 刘卫东,温中京,郭伟娣,等. 乌药提取物抗疲劳作用的实验研究. 浙江中医杂志,2006,41(7):428-429
- 4 《保健食品检验与评价技术规范》. 中华人民共和国卫生部卫生部卫生法制与监督司编印. 2003:22
- 5 李冀,柴剑波,赵伟国,等. 西洋参抗疲劳作用及对迟发型超敏反应单核吞噬细胞功能影响的实验研究. 中华中医药学刊,2007,25(10):2002-2004
- 6 林海青,宋钦兰,赵茂林,等. 人参西洋参对大鼠“气虚”模型的实验研究. 中医药学刊,2006,24(11):2111-2112
- 7 张峰,高群,孔令雷,等. 黄精多糖抗肿瘤作用的实验研究. 中国实用医药,2007,2(21):95-96
- 8 Steinmann GG, Esperester A, Joller P. Immunopharmacological in vitro effects of Eleutherococcus senticosus extracts. Zneim Forsch Drug Res, 2001,51(1):76-83
- 9 Han SB, Yonn YD, Ahn HJ, et al. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of Acanthopanax senticosus. Int Immunopharmacol, 2003(9):1301-1312

(收稿:2009-09-11)

(修回:2009-12-03)

2009 年中国药学会大会召开

2009 年 11 月 21~23 日,由中国药学会主办的 2009 年中国药学会大会在长沙市举行。此次大会的主题是“药学科技创新与医药卫生改革”。通过专题报告和集中讨论,与会代表们一致认为,科技创新在医药卫生改革中具有极高战略地位。

会议开幕式上,全国人大常委会副委员长、中国药学会理事长桑国卫致开幕词,国家食品药品监督管理局局长邵明立出席会议并讲话。桑国卫在讲话中强调了医药卫生改革中科技创新的重要作用。邵明立在讲话中强调,医药卫生事业直接关系到广大人民群众身体健康和生命安全,也是社会进步和人的全面发展的重要标志。在新的历史时期,党和政府对药学工作提出了新的更高的要求,中国药学会作为国家创新体系的重要组成部分,要积极投身医疗卫生体制改革的大局,全面推动我国药学科技进步,不断提高药品安全保障水平。这是中国药学会和广大药学科技工作者肩负的历史使命。希望中国药学会一如既往地广泛团结广大药学科技工作者,全面落实科学发展观,解放思想,开拓创新,为繁荣和发展我国医药卫生事业,保障人民身体健康做出新的更大贡献。