

阿胶对免疫低下模型小鼠免疫功能的影响

安梦培^{1,2}, 张守元^{3,4}, 张 淹^{3,4}, 朱振娜^{1,2}, 胡金芳^{1,2*}, 申秀萍^{1,2*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

3. 东阿阿胶股份有限公司, 山东 聊城 252000

4. 国家胶类中药工程技术研究中心, 山东 聊城 252000

摘要: 目的 研究阿胶对免疫低下小鼠免疫功能的影响。方法 小鼠 ip 环磷酰胺或氢化可的松建立免疫低下模型, 高、中、低 (3.00、1.50、0.75 g/kg) 剂量阿胶 ig 给予小鼠 14 d 后, 测定血清溶血素水平, 观察阿胶对体液免疫的影响; 进行二硝基氯苯诱导的小鼠耳廓肿胀实验, 检测小鼠耳廓肿胀度, 观察阿胶对细胞免疫的影响; 流式细胞术检测阿胶对淋巴细胞亚群的影响; 进行碳廓清实验, 检测廓清指数 K 和吞噬指数 α , 观察阿胶对非特异性免疫的影响。结果 与模型组比较, 阿胶 3.0、1.5、0.75 g/kg 均可显著提高免疫功能低下小鼠血清溶血素含量 ($P < 0.001$); 3.0、1.5 g/kg 能明显提高小鼠耳廓肿胀度 ($P < 0.01$ 、 0.001); 3 g/kg 能显著提高小鼠 $CD3^+$ (T 淋巴细胞)、 $CD3^+CD4^+$ (辅助性和迟发超敏性 T 细胞) 占淋巴细胞百分比 ($P < 0.05$); 阿胶对小鼠的碳粒廓清指数 K 和吞噬指数 α 无显著影响。结论 阿胶能显著提高免疫低下小鼠的体液免疫和细胞免疫, 提高 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 阳性细胞比例, 对非特异性免疫无明显影响。

关键词: 阿胶; 溶血素; 体液免疫; 细胞免疫; 淋巴细胞; 非特异性免疫; 迟发型超敏反应

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 04- 0567 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.04.012

Effect of Asini Corii Colla on immune function in hypimmune mice

AN Mengpei^{1,2}, ZHANG Shouyuan^{3,4}, ZHANG Yan^{3,4}, ZHU Zhenna^{1,2}, HU Jinfang^{1,2}, SHEN Xiuping^{1,2}

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Drug Assessment Co. Ltd., Tianjin 300301, China

2. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China

3. Dong'e Ejiao Co., Ltd., Liaocheng 252000, China

4. National Engineering Research Center for Gelatin-based Traditional Chinese Medicine, Liaocheng 252000, China

Abstract: Objective To study the effect of *Asini Corii Colla* (ACC) on immune function in hypimmune mice. **Methods** ACC of 3.00, 1.50 and 0.75 g/kg was given to hypimmune model mice induced by Cyclophosphamide or Hydrocortisone for 14 d. The serum hemolysin content were measured to determine the effect of ACC on humoral immunity. The mouse auricle swelling test induced by two nitrochlorobenzene was carried out to detect the swelling of the auricle in mice, and the effect of ACC on the cell immunity was observed. Flow cytometry was used to detect the effect of ACC on lymphocyte subsets. The carbon clearance experiment was carried out to detect the clearance index K and phagocytic index α , and the effect of ACC on non-specific immunity was observed. **Results** Compared with model group, ACC could significantly promote the serum hemolysin content ($P < 0.001$) at dose of 3.00, 1.50, and 0.75 g/kg, significantly increase the swelling of auricle in mice ($P < 0.01$, 0.001) at doses of 3.00 and 1.50 g/kg, and significantly increase percentage of $CD3^+$ (T lymphocytes), $CD3^+CD4^+$ (helper T cells and delayed hypersensitive T cells) at dose of 3.00 g/kg. There was no significant effect on the phagocytic index K and the clearing index α . **Conclusion** ACC can stimulate specific immune function and promote the proportion of $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ positive cells, it has no obvious effect on non-

收稿日期: 2017-10-27

基金项目: 国家科技重大专项 (2015ZX09501004); 天津市科技计划项目 (16PTGCCX00090); 山东省重点研发计划项目 (2016GGH4514); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-SD-31)

第一作者: 安梦培 (1989-), 女, 河北衡水人, 研究实习员, 学士, 从事药理、毒理学研究。Tel: (022)84845264 E-mail: anmp@tjipr.com

*通信作者: 胡金芳 Tel: (022)84845248 E-mail: hujf@tjipr.com

申秀萍 Tel: (022)84845266 E-mail: shenxp@tjipr.com

specific immunity.

Keywords: *Asini Corii Colla*; hemolysin; humoral immunity; cellular immunity; lymphocyte; non-specific immunity; delayed-type hypersensitivity

阿胶为马科动物驴的干燥皮或鲜皮经煎煮浓缩而制成的固体胶,与人参、鹿茸并称为“滋补三宝”,始载于《神农本草经》,列为上品^[1]。阿胶味甘、性平,在临床上有着广泛的应用,尤其在补血、止血、抗氧化、抗休克、增强免疫力等方面应用最为广泛^[2]。近年来,阿胶对机体免疫功能的调节得到了一些实验证实,但是,其对免疫低下小鼠模型的免疫调节还鲜见报道。本研究拟通过观察阿胶对免疫低下模型小鼠的体液免疫、细胞免疫、淋巴细胞亚群比例和非特异性免疫的影响,探讨和分析阿胶对免疫低下小鼠免疫功能的调节作用。

1 材料

1.1 药品和主要试剂

阿胶,棕色粉末(粉碎),批号 1605008,东阿阿胶股份有限公司,按《中国药典》一部(2015年版)及 Q/DJ-J02.01-2015 检验合格。生血丸,批号 9880029,天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂。环磷酰胺,批号 16031225,江苏恒瑞医药股份有限公司。二硝基氯苯,批号 20120326,天津市光复精细化工研究所。印度墨汁,批号 10261021,北京索莱宝科技有限公司。氢化可的松,批号 011604044,天津生物化学制药有限公司。淋巴细胞亚群检测试剂:PE Anti-Mouse CD3e,批号 6054668; PerCP-Cy5.5 Anti-Mouse CD335,批号 5324976; APC Anti-Mouse CD4,批号 6067772; APC-Cy7 Anti-Mouse CD19,批号 6070644; FITC Anti-Mouse CD8a,批号 6089913; 均来自 BD Biosciences。

1.2 动物

SPF 级 ICR 小鼠,体质量 18~20 g; SPF 级 Hartley 豚鼠,体质量 280~320 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号 SYXK(津)2016-0009。饲养温度 20~26 °C,湿度 40~70%,12 h 明暗光照。给予 SPF 级大小鼠维持饲料。动物使用方案经天津药物研究院新药评价有限公司实验动物管理和使用委员会(IACUC)审查并批准。

1.3 主要仪器

酶标仪, Thermo Fisher Scientific Inc.; FACS Aria II 型流式细胞仪, Becton, Dickinson and

Company。

2 方法

2.1 体液免疫

小鼠随机分为:对照组、模型组、生血丸(3.00 g/kg)组和阿胶高、中、低剂量(3.00、1.50、0.75 g/kg)组,每组 10 只,雌雄各半。连续 ig 给药 14 d,对照及模型组给予去离子水。给药第 9 天,除对照组外,其余小鼠 ip 环磷酰胺 100 mg/kg,随后全部小鼠 ip 5%鸡红细胞 0.2 mL,末次给药 24 h 后,摘眼球取血,离心制备血清。血清以生理盐水稀释 10 倍,取稀释血清 0.5 mL 与 5%鸡红细胞混悬液 0.25 mL、10%补体血清(豚鼠)0.25 mL 混合,37 °C 恒温水浴 30 min 后,置冰水混合物中终止反应,离心取上清液于 540 nm 处测定吸光度(A)值,检测血清内溶血素含量。

2.2 细胞免疫

小鼠随机分为:空白对照组、对照组、模型组、生血丸(3.00 g/kg)组和阿胶高、中、低(3.00、1.50、0.75 g/kg)剂量组,每组 10 只,雌雄各半。连续 ig 给药 14 d,对照及模型组给予去离子水。给药第 1 天,除对照组和空白对照组外,其余小鼠 ip 环磷酰胺 150 mg/kg,除空白对照组外,其余小鼠 sc 20 μL 1%二硝基氯苯丙酮溶液,末次给药后将 1%二硝基氯苯丙酮溶液 20 μL 均匀涂抹于全部小鼠的右耳两面进行攻击,24 h 后脱颈处死,剪下左右两耳以打孔器取下相同大小的耳片称质量。计算差值作为耳廓肿胀度。

2.3 对淋巴细胞亚群的影响

小鼠随机分为:对照组、模型组、生血丸(3.00 g/kg)组和阿胶高、中、低剂量(3.00、1.50、0.75 g/kg)组,每组 10 只,雌雄各半。连续 ig 给药 14 d,对照及模型组给予去离子水。除对照组外,其余小鼠于给药第 6、8、10、12、14 天 ip 氢化可的松 40 mg/kg,末次给药 24 h 后,眼眶取血,EDTA 抗凝,用于流式细胞仪检测淋巴细胞表面抗原:CD3⁺(T 细胞)、CD3⁺CD4⁺(辅助性和迟发超敏性 T 细胞)、CD3⁺CD8⁺(抑制性和杀伤性 T 细胞)、CD3⁻CD19⁺(B 细胞)、CD3⁻CD335⁺(NK 细胞),统计各阳性细胞占淋巴细胞的百分比,并计算 CD4⁺/CD8⁺的比值。

2.4 非特异性免疫

小鼠随机分为:对照组、模型组、生血丸(3.00 g/kg)组和阿胶高、中、低剂量(3.00、1.50、0.75 g/kg)组,每组10只,雌雄各半。连续ig给药14 d,对照及模型组给予去离子水。除对照组外,其余小鼠于给药第10、12、14天ip氢化可的松80 mg/kg,末次给药1 h后,iv 20%印度墨汁5 mL/kg,并分别于注射后2、10 min眼眶静脉丛取血20 μ L,加至0.1%碳酸钠溶液1 mL中混匀测定A值,取血完毕后立即脱颈处死小鼠称体质量、肝质量、脾质量,计算廓清指数K和吞噬指数 α ^[3-4]。

3 结果

3.1 对体液免疫的影响

与对照组比较,模型组A值显著降低($P<0.001$),提示模型建立成功;与模型组比较,阿胶3.00、1.50、0.75 g/kg组A值显著升高($P<0.001$)。见表1。

表1 对小鼠血清内溶血素含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 1 Effect of ACC on hemolysin in mice serum ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	A值
对照	—	0.739±0.242
模型	—	0.095±0.027***
生血丸	3.00	0.177±0.102###
阿胶	3.00	0.325±0.089###
	1.50	0.310±0.219###
	0.75	0.150±0.149###

与对照组比较:*** $P<0.001$;与模型组比较:### $P<0.001$

*** $P<0.001$ vs control group;### $P<0.001$ vs model group

3.2 对细胞免疫的影响

空白对照组小鼠左右两耳质量几无差异,对照组小鼠耳廓肿胀度明显高于空白对照组($P<0.001$);模型组小鼠耳廓肿胀度明显低于对照组($P<0.001$);与模型组比较,阿胶3.0、1.5 g/kg可显著提高肿胀度($P<0.01$ 、0.001)。结果见表2。

3.3 对淋巴细胞亚群的影响

与对照组比较,模型组小鼠CD3⁺、CD3⁺CD4⁺表达阳性细胞比例显著下降($P<0.05$ 、0.01);与模型组比较,阿胶3 g/kg能够显著提高CD3⁺、CD3⁺CD4⁺阳性细胞比例($P<0.05$)。结果见表3。

表2 对小鼠耳廓肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 2 Effect of ACC on auricle swelling in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀度/mg
空白对照	—	0±2
对照	—	9±3 $\Delta\Delta\Delta$
模型	—	3±1***
生血丸	3.00	4±1 [#]
阿胶	3.00	7±2###
	1.50	5±2###
	0.75	4±2

与空白对照组比较: $\Delta\Delta\Delta P<0.001$;与对照组比较:*** $P<0.001$;

与模型组比较:[#] $P<0.05$ ### $P<0.01$ #### $P<0.001$

$\Delta\Delta\Delta P<0.001$ vs black control group;*** $P<0.001$ vs control group;

[#] $P<0.05$ ### $P<0.01$ #### $P<0.001$ vs model group

表3 对小鼠淋巴细胞亚群的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of ACC on lymphocyte in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	CD3 ⁺ /%	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /%	CD3 ⁺ CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD19 ⁺ /%	CD3 ⁺ CD335 ⁺ /%
对照	—	48.9±7.0	37.6±5.9	9.4±2.4	4.2±1.1	13.3±4.1	1.9±0.8
模型	—	42.6±6.1*	28.9±4.3**	11.2±2.7	2.7±0.6	14.8±2.8	2.0±0.6
生血丸	3.00	49.7±8.1 [#]	33.7±6.3	13.7±2.1 [#]	2.5±0.4	13.4±2.9	2.0±0.6
阿胶	3.00	49.7±7.2 [#]	35.0±6.6 [#]	11.7±1.9	3.0±0.7	13.5±3.0	1.9±0.7
	1.50	47.6±4.9	31.6±3.7	13.9±2.0 [#]	2.3±0.4	13.7±2.2	2.1±0.5
	0.75	45.3±8.5	31.0±6.2	11.5±2.8	2.8±0.7	15.0±3.4	1.8±0.6

与对照组比较:* $P<0.05$ ** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group;[#] $P<0.05$ vs model group

3.4 对非特异性免疫的影响

与对照组比较,模型组廓清指数K和吞噬指数 α 显著降低($P<0.001$);与模型组比较,阿胶各剂量的廓清指数K和吞噬指数 α 无显著变化。结果见表4。

4 讨论

阿胶的推荐日用量为3~9 g,人体质量按70 kg计,小鼠体质量按20 g计,小鼠等效剂量为1.5 g/kg。本研究选取等效剂量作为中剂量,3.00、0.75 g/kg分别作为高、低剂量。

表4 对廓清指数 K 和吞噬指数 α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 4 Effect of ACC on phagocytic index K and clearing index α ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	K	α
对照	—	0.103±0.015	7.58±0.40
模型	—	0.054±0.028***	5.83±1.58***
生血丸	3.00	0.054±0.023	6.38±1.26
阿胶	3.00	0.062±0.014	6.51±0.62
	1.50	0.056±0.024	6.14±1.13
	0.75	0.061±0.021	6.21±0.61

与对照组比较: *** $P<0.001$ *** $P<0.001$ vs control group

环磷酰胺作为经典的免疫抑制剂,可使 DNA 烷基化,破坏 DNA 的合成,从而非特异性地杀伤淋巴细胞,并抑制淋巴细胞的转化。在溶血素测定实验中,小鼠 ip 100 mg/kg 环磷酰胺,可造成模型组 A 值降低,与对照组比较差异显著,提示造模成功。 A 值与溶血素水平呈正相关,反映了 B 细胞的增殖分化以及与补体结合后向体液中分泌溶血素的能力,是检测机体体液免疫功能的主要指标,与机体体液免疫呈正相关^[5]。实验测得阿胶各剂量组 A 值升高,与模型组比较具有显著性差异,提示阿胶可提高溶血素的含量,增强鸡红细胞诱导溶血素的产生,逆转免疫低下造成的溶血素水平下降,具有增强体液免疫的能力。

二硝基氯苯诱导的小鼠迟发型超敏反应(DTH)是由特异性致敏 T 淋巴细胞介导的细胞免疫反应,是检测细胞免疫功能的常用方法之一。二硝基氯苯是一种化学性半抗原,可与皮肤蛋白结合成完全抗原,从而引发对半抗原敏感的 T 淋巴细胞增殖并由淋巴结扩散至血液和组织,当机体再次接触相同致敏原时,特异性的 T 淋巴细胞可释放多种炎症性细胞因子,引发炎症反应^[6]。经二硝基氯苯致敏过的小鼠耳部再次接触二硝基氯苯时会引起耳廓肿胀,耳廓的肿胀度与细胞免疫功能呈正相关。对照组为正常免疫小鼠,与空白对照组比较,其肿胀度明显升高,提示造模成功。模型及给药组小鼠 ip 环磷酰胺 150 mg/kg 破坏免疫功能,实验结果表明,阿胶 3 g/kg、1.5 g/kg 剂量组耳廓肿胀度明显高于模型组,并具有显著性差异,表明阿胶可增强细胞免疫。

淋巴细胞依据其表面标志物及生物学功能,大致分为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞 3 个亚群,不同淋巴细胞免疫分型在机体免疫的调控中

均起着重要作用。T 淋巴细胞介导细胞免疫应答,在机体免疫应答中占据主导作用, B 淋巴细胞介导体液免疫, NK 细胞在机体免疫应答中起着辅助作用^[7]。CD3⁺是成熟 T 细胞所共有的标志,成熟的外周血 T 细胞分为 CD4⁺辅助性、迟发超敏性 T 细胞(CD3⁺CD4⁺细胞)和 CD8⁺抑制性、杀伤性 T 细胞(CD3⁺CD8⁺细胞)两个亚群。CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞维持动态平衡,共同调节机体免疫活动。CD4⁺/CD8⁺比值增大时,正向免疫调节占主导,反之,负向免疫调节占主导^[8-9]。与对照组比较,模型组小鼠 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞数量显著下降,其余各组小鼠 CD4⁺/CD8⁺比例下降,但并无统计学差异, B 细胞及 NK 细胞与对照组无明显差异。上述结果的产生,可能与氢化可的松造模剂量、频率等因素有关,导致模型过轻。阿胶 3 g/kg 能使 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺T 细胞数量与模型组比较显著升高,并具有统计学意义,与迟发超敏实验和血清溶血素实验结果相印证,进一步证明阿胶具有提高特异性免疫功能的药理作用。

碳粒廓清实验可检测腹腔巨噬细胞吞噬能力,是测定非特异性免疫功能的常用方法之一。单核巨噬细胞系统(网状内皮系统)具有吞噬颗粒状异物的能力。颗粒状异物(碳粒)由静脉注射进入血液循环后,迅速被单核巨噬细胞吞噬。异物量恒定时,测其在血液中的消除速率,可反映单核巨噬细胞的吞噬功能,而单核巨噬细胞的吞噬功能则反映机体的非特异性免疫功能。小鼠肝脏、脾脏、体质量的大小对碳粒廓清速率有一定的影响,廓清指数 K 和吞噬指数 α (校正吞噬指数)反映了巨噬细胞的吞噬能力^[3-4]。氢化可的松能抑制巨噬细胞对抗原的吞噬和处理,本实验中通过 ip 氢化可的松破坏小鼠非特异性免疫系统,模型组 K 值和 α 值显著低于对照组,提示模型组小鼠吞噬功能受到抑制,造模成功。与模型组比较,阿胶各剂量组 K 值和 α 值无显著变化,表明本次实验中阿胶对小鼠单核巨噬细胞的吞噬功能无明显影响。有文献^[10]报道,阿胶 7.4 g/kg 能提高正常小鼠非特异性免疫功能;也有文献^[11]提示,氢化可的松造模剂量为 22.5 mg/kg。本次实验中阿胶最高剂量为 3 g/kg, ip 氢化可的松 80 mg/kg,实验结果可能与阿胶剂量偏低,造模稍重有关。其次,造模频率,给药次数对实验结果的影响也有待探讨。

阿胶为传统中药,在我国的应用已经有 2 500 多

年的历史。阿胶中含有胶原蛋白、多肽、氨基酸、硫酸皮肤素及硒、锌等多种微量元素^[12]。现代医学研究已经证明,阿胶具有补血、抗疲劳等多种功效,并且能够提高机体免疫功能^[13]。本研究通过测定小鼠血清溶血素水平、迟发型超敏反应、淋巴细胞百分比以及腹腔巨噬细胞吞噬能力,表明阿胶能显著提高免疫低下模型小鼠体液免疫、细胞免疫以及CD3⁺(T淋巴细胞)、CD3⁺CD4⁺(辅助性和迟发超敏性T细胞)占淋巴细胞百分比,对非特异性免疫影响不显著。

参考文献

- [1] 陈慧慧,冯明建,朱海芳,等. 阿胶药理研究进展 [J]. 中国药物评价, 2014, 31(1): 23-26.
- [2] 李志,陈壁锋,黄俊明,等. 阿胶口服液对小鼠细胞免疫和体液免疫功能的影响 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(7): 1426-1427.
- [3] 高丽松,曾凡潘,宁榴贤,等. 磁处理党参药液对小白鼠碳粒廓清功能影响的研究 [J]. 生物磁学, 2004, 4(4): 1-4.
- [4] 杨莲,段小花,李松梅,等. 普洱茶对免疫低下小鼠单核-巨噬细胞系统碳粒廓清功能的影响 [J]. 云南中医中药杂志, 2008, 29(10): 43-44.
- [5] 刘子明,何永侠,杨景华,等. 阿胶补血软胶囊对小鼠免疫功能的影响 [J]. 河南中医, 2014, 34(11): 2107-2109.
- [6] 李覃,陈虹,白淑芳,等. 青蒿琥酯对迟发型超敏反应小鼠脾脏T淋巴细胞的免疫调节作用 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 843-846.
- [7] 周建光,杨梅,曹海涛,等. 淋巴细胞亚群的检测在临床的应用 [J]. 东南国防医药, 2015, 17(3): 298-300.
- [8] 朱孝娟,孙玉薇,宋柏捷,等. 大豆皂苷对荷瘤小鼠化疗疗效及T淋巴细胞亚群的影响 [J]. 实用预防医学, 2015, 22(3): 292-294.
- [9] 罗强,任鸿,孙黎,等. 刺五加多糖对小鼠淋巴细胞转化率及外周淋巴细胞亚群的影响 [J]. 河南农业科学, 2013, 42(8): 137-140.
- [10] 毛跟年,宋怡敏,毛瑞娟,等. 阿胶泡腾片对小鼠免疫功能的影响 [J]. 陕西科技大学学报, 2012, 30(3): 70-72.
- [11] 张珣,王静凤,李冰,等. 阿胶对小鼠免疫功能的影响 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 400-402.
- [12] 那丽丹,陈建丽,秦雪梅,等. 基于¹H-NMR代谢组学的阿胶化学成分差异性分析方法初探 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2573-2579.
- [13] 宋怡敏,毛跟年,康荣荣,等. 阿胶泡腾颗粒小鼠免疫功能的影响 [J]. 动物医学进展, 2011, 32(9): 73-75.