

海马补肾丸免疫调节及抗应激作用的实验研究

庞纪平^{1,2}, 只德广^{3*}, 金兆祥², 陈芙蓉³, 王玉晶², 范迪², 姜溪³, 岳南³, 孙双勇³

1. 天津中新药业集团股份有限公司中新制药厂, 天津 300457

2. 天津中新药业集团股份有限公司乐仁堂制药厂, 天津 300112

3. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: 目的 采用不同模型评价海马补肾丸免疫调节作用和抗应激作用。方法 健康昆明种小鼠随机分为对照组、模型组、香菇菌多糖(100 mg/kg)组、龟龄集(0.24 g/kg)组和海马补肾丸0.55、1.10、2.20 g/kg组, 每天ig给药1次, 连续14 d。①采用注射盐酸环磷酰胺致小鼠免疫抑制模型, 给药结束尾iv 25%印度墨汁, 计算廓清指数(κ)和吞噬指数(α), 观察小鼠肝指数、脾指数和胸腺指数; ②采用注射盐酸环磷酰胺致小鼠免疫抑制模型, ip 5%鸡红细胞悬液0.3 mL致敏, 观察各组血清溶血素生成量; ③给药第8~10天, 除对照组外, 剩余各组开始ip 环磷酰胺80 mg/kg, 连续3 d, 继续给药, 至给药第14天眼眶静脉取血, 测定白细胞数及免疫球蛋白IgG、IgM、IgA含量; ④SD大鼠随机分为对照组、模型组、单硝酸异山梨酯片20 mg/kg、龟龄集0.12 g/kg和海马补肾丸低、中、高剂量(0.28、0.56、1.12 g/kg)组, 每天ig给药1次, 连续14 d, 观察海马补肾丸对运动疲劳大鼠游泳时间及运动后对血清尿素氮(BUN)、乳酸(LD)、肝糖原水平的影响; ⑤健康昆明种小鼠随机分为对照组、模型组、单硝酸异山梨酯片(40 mg/kg)组、龟龄集(0.24 g/kg)组和海马补肾丸低、中、高剂量(0.55、1.1、2.2 g/kg)组, 每天ig给药1次, 连续5 d, 于末次给药后1 h, 采用注射异丙肾上腺素致小鼠缺氧模型, 将小鼠置于密封瓶中, 观察存活时间。结果 与模型组比较, 海马补肾丸2.2 g/kg显著增加 α 及 κ ($P<0.05, 0.01$), 海马补肾丸1.1、2.2 g/kg剂量显著增加脾、胸腺系数($P<0.05, 0.01$); 海马补肾丸各剂量组显著增加血清溶血素生成量($P<0.05, 0.01$); 海马补肾丸2.2 g/kg剂量组显著增加白细胞数量及免疫球蛋白IgG、IgM、IgA的含量($P<0.05$); 海马补肾丸0.56、1.12 g/kg剂量显著延长大鼠力竭游泳时间($P<0.05, 0.01$), 1.12 g/kg剂量能显著减少血清中BUN、LD含量, 减少肝糖原消耗($P<0.05, 0.01$); 海马补肾丸1.1、2.2 g/kg剂量能显著延长小鼠缺氧存活时间($P<0.05, 0.01$)。结论 海马补肾丸具有明显免疫增强和抗应激作用。

关键词: 海马补肾丸; 免疫调节; 耐缺氧; 抗应激

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)07-1297-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.07.007

Experimental study on immune regulation and anti-stress effect of Haima Bushen Pills

PANG Jiping^{1,2}, ZHI Deguang³, JIN Zhaoxiang², CHEN Furong³, WANG Yujing², FAN Di², JIANG Xi³, YUE Nan³, SUN Shuangyong³

1. Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co., LTD. Zhongxin Pharmaceutical Factory, Tianjin 300457, China

2. Tianjin zZhongxin Pharmaceutical Group Co., LTD. Lerentang Factory, Tianjin 300112, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd, Tianjin 300301, China

Abstract: **Objective** Different models were used to evaluate the immunomodulatory effect and anti-stress effect of Haima Bushen Pills. **Methods** The healthy Kunming mice were randomly divided into control group, model group, lentinan group (100 mg/kg), Guilingji group (0.24 g/kg) and Haima Bushen Pills group (0.55, 1.10 and 2.20 g/kg). The mice were ig given relevant drugs once a day for 14 days. ① Immunosuppressive model of mice was induced by cyclophosphamide hydrochloride injection. Indian ink of 25% was iv at the end of administration. Clearance index (κ) and phagocytic index (α) were calculated. Liver index, spleen index and thymus index of mice were observed. ② Immunosuppressive model of mice was induced by injection of cyclophosphamide hydrochloride, and sensitized by 0.3 mL of IP 5% chicken erythrocyte suspension. Serum hemolysin production was observed in

收稿日期: 2018-12-24

*通信作者: 只德广(1973—),男,本科,副研究员,研究方向为药理学。E-mail: zdg_tj@163.com

each group. ③ On the 8th to 10th day of administration, except the control group, the remaining groups began ip cyclophosphamide 80 mg/kg for 3 consecutive days. The orbital vein blood was collected on the 14th day of administration, and the number of white blood cells and the contents of immunoglobulin IgG, IgM and IgA were measured. ④ SD rats were randomly divided into control group, model group, isosorbide mononitrate tablets 20 mg/kg, Guilingji 0.12 g/kg and low, medium and high dose groups (0.28, 0.56, 1.12 g/kg) of Hippocampus Kidney-tonifying Pills. The effects of Hippocampus Kidney-tonifying Pills on the levels of serum urea nitrogen (BUN), lactic acid (LD) and hepatic glycogen in exercise-fatigue rats were observed once a day for 14 days. ⑤ Healthy Kunming mice were randomly divided into control group, model group, isosorbide mononitrate tablet (40 mg/kg), Guilingji (0.24 g/kg) group and Hippocampus Kidney-tonifying Pills (0.55, 1.1, 2.2 g/kg) group. The mice were given Ig once a day for 5 days. One hour after the last administration, the mice were injected with isoprenaline to induce hypoxia. The mice were placed in sealed bottles for observation of survival time. **Results** Compared with model group, 2.2 g/kg of Haima Bushen Pills significantly increased α and κ ($P < 0.05$ and 0.01), 1.1 and 2.2 g/kg of Haima Bushen Pills significantly increased spleen and thymus coefficient ($P < 0.05$ and 0.01), and each dose of Haima Bushen Pills significantly increased serum hemolysin production ($P < 0.05$ and 0.01); 2.2 g/kg of Haima Bushen Pills significantly increased the number of white blood cells and the IgG, IgM and IgA ($P < 0.05$); the dosage of Haima Bushen Pills (0.56, 1.12 g/kg) significantly prolonged the exhaustive swimming time of rats ($P < 0.05$, 0.01); the dosage of 1.12 g/kg could significantly reduce the contents of BUN and LD in serum and the consumption of hepatic glycogen ($P < 0.05$, 0.01); the dosage of Haima Bushen Pills (1.1, 2.2 g/kg) could significantly prolong the hypoxic survival time of mice ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Haima Bushen Pills has obvious immune enhancement and anti-stress effect.

Key words: Haima Bushen pills; immunomodulatory; anti-hypoxia; anti-stress

海马补肾丸是根据清代康熙年间名医秘方制成的中成药,由36味药组成,具有滋阴补肾、强壮健脑的功效,用于身体衰弱、气血两亏、肾气不足、面黄肌瘦、心跳气短、腰酸腿疼、健忘虚喘等临床症状。现代药理研究提示,海马提取液有雄性激素样作用。臣以蛤蚧补肺润肾,益精助阳;鲜雀肉壮阳益精,暖腰膝,缩小便;鹿茸补肾阳,益精血,强筋骨。佐以驴肾、狗肾、干海米、母丁香、肉苁蓉、淫羊藿、核桃仁、补骨脂、狗脊、杜仲、牛膝、鹿筋、豹骨温肾壮阳,强筋壮骨;菟丝子、沙苑子、枸杞子、五味子、覆盆子、山茱萸补益肝肾,固精填髓;熟地黄、当归滋补精血;人参、党参、黄芪、山药、茯苓补气健脾,资生气血;附子、茴香、肉桂补火助阳,鼓舞气血;龙骨镇静安神。使以甘草调和诸药。诸药配合,共奏滋阴补肾、强壮健脑之功^[1]。中医认为“阳虚”的主要临床表现是畏寒喜暖、四肢不温或厥逆、小便清长、脉细、舌淡胖等,动物模型的阳虚表现,特别是免疫抑制现象和临床上“阳虚”病人表现的免疫功能低下基本一致^[2],所以本实验采用多种动物模型,考察其免疫调节作用及机制,为临床应用提供依据。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

海马补肾丸,规格0.27 g/丸,批号0340157,天津乐仁堂制药厂;龟龄集胶囊,规格0.3 g/粒,批号103170408,山西广誉远国药有限公司;香菇菌多糖片,批号20171006,武汉迪奥药业有限公司。

丙酸睾酮注射液,规格25 mg/mL,批号1405221,天津金耀药业公司;丙酸睾酮注射液,规格50 mg/mL,批号20170602,哈尔滨三马兽药业有 限 公 司 ; 六 味 地 黄 丸 , 批 号 171210048, 药 圣 堂 (湖 南) 制 药 有 限 公 司 ; 单 硝 酸 异 山 梨 酯 片 , 批 号 07160204, 鲁 南 贝 特 制 药 有 限 公 司 ; 吡 拉 西 坦 (脑 复 康), 批 号 2016030, 天 津 今 世 制 药 有 限 公 司 ; 复 方 利 血 平 片 , 批 号 361171111, 石 药 集 团 欧 意 药 业 有 限 公 司 ; 甲 状 腺 片 , 规 格 40 mg/片 , 批 号 170205, 山 东 省 惠 诺 药 业 有 限 公 司 ; 氢 化 可 的 松 注 射 液 , 规 格 10 mg/2 mL, 批 号 1702015、1702016, 百 正 药 业 有 限 公 司 ; 橄 榄 油 , 分 析 纯 , 批 号 F20100512, 国 药 集 团 化 学 试 剂 有 限 公 司 ; 印 度 墨 水 , 货 号 18060, Solorbio 公 司 ; 水 合 氯 醛 , 批 号 20140227, 天 津 市 瑞 金 特 化 学 品 有 限 公 司 ; 羧 甲 基 纤 维 素 钠 , 批 号 20110520, 上 海 禾 丰 化 学 试 剂 有 限 公 司 ; 钠 石 灰 , 批 号 180121, 上 海 五 四 化 学 试 剂 有 限 公 司 ; 盐 酸 异 丙 肾 上 腺 素 , 批 号 RH09204, 罗 恩 试 剂 ; 5% 鸡 红 细 胞 , 批 号 180326, 鸿 泉 生 物 ; 豚 鼠 血 清 , 批 号 180302, 鸿 泉 生 物 。 环 磷 酰 胺 , 批 号 X22D8Y51136, 源 叶 生 物 。 总 蛋 白 定 量 测 试 盒 , 批 号 20180516; AchE 测 试 盒 , 批 号 20180514、20180622; SOD 试 剂 盒 , 批 号 20180518; 丙 二 醛 测 试 盒 , 批 号 20180517; 乳 酸 (LD) 测 试 盒 , 批 号 20180315; 肝 / 肌 糖 原 试 剂 盒 , 批 号 20180314; 尿 素 氮 (BUN), 批 号 20180313, 均 购 自 南 京 建 成 。 Mouse 5-HT ELISA KIT, 批 号 201805; Mouse NE ELISA KIT, 批 号 201805; Mouse DA ELISA KIT, 批

号 201805; Mouse IgG ELISA KIT, 批号 L201803; Mouse IgA ELISA KIT, 批号 L201803; Mouse IgM ELISA KIT, 批号 L201803, 均购自上海依赫生物科技有限公司。

1.2 仪器

RT-6100 型酶标仪: 深圳雷杜生命科学股份有限公司产品; FA1104 型电子天平: 上海天平仪器厂; TU-1810 型紫外可见分光光度计: 北京普析通用仪器有限责任公司; TGL-16B 型高速台式离心机: 上海安亭科学仪器厂; SSW-600-2S 型电热恒温水槽: 上海博远实业有限公司医疗设备厂; ECA522、ECC2201 电子天平: 南京博尼塔科学仪器有限公司; ST16R 冷冻离心机: Thermo; SCIENT2-IID 超声波细胞粉碎机: 新芝。

1.3 动物

昆明种小鼠, SPF 级, 北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2016-0011。SD 大鼠, SPF 级, 北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2016-0006。动物于屏障环境饲养 3 d 后, 进行实验, 温度控制 20~26 °C, 湿度控制 40%~70%。

2 方法

2.1 对非特异性免疫的影响^[3-4]

选用健康昆明种小鼠 84 只, 雌雄各半, 体质量 18~20 g, 随机分组, 每组 12 只, 设对照组、模型组、香菇菌多糖(100 mg/kg)组、龟龄集(0.24 g/kg)组和海马补肾丸低、中、高剂量(0.55、1.10、2.20 g/kg)组, 共 7 组。各剂量组每天 ig 给药 1 次, 连续 14 d, 给药体积为 20 mL/kg, 对照组和模型组给予等体积 0.5% CMC-Na。采用注射盐酸环磷酰胺致小鼠免疫抑制模型, 实验第 11 天, 除对照组外, 其余动物均每天 ip 盐酸环磷酰胺 80 mg/kg, 连续 3 d。实验第 14 d, 尾 iv 25% 印度墨汁(10 mL/kg), 于注射后 2、10 min 用毛细管从眼眶静脉丛取血 20 μL, 溶于 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中摇匀, 置分光光度计在波长 600 nm 测吸光度(A)值, 以 Na₂CO₃ 溶液作空白对照, 校零。将小鼠处死, 摘除肝、脾和胸腺, 称质量, 计算肝指数、脾指数和胸腺指数, 并计算廓清指数(κ)和肝脾网状内皮系统吞噬指数(α)。

$$\kappa = (\lg A_{10} - \lg A_2) / (t_2 - t_1)$$

$$\alpha = \sqrt[3]{\bar{k}} \times \text{体质量} / (\text{肝质量} + \text{脾质量})$$

A_2 、 A_{10} 为 2 min 和 10 min 时的 A 值, t 为时间。

2.2 对小鼠体液免疫的影响^[5]

选用健康昆明种小鼠 70 只, 体质量 18~20 g,

随机分组, 每组 10 只, 设对照组、模型组、香菇菌多糖 100 mg/kg、龟龄集 0.24 g/kg 和海马补肾丸低、中、高剂量(0.55、1.10、2.20 g/kg)组, 共 7 组。各给药组每天 ig 给药 1 次, 对照组和模型组给予等体积 0.5% CMC-Na, 连续 14 d, 给药体积为 20 mL/kg。采用注射盐酸环磷酰胺致小鼠免疫抑制模型, 实验第 9 天, 除对照组 ip 相应量的生理盐水外, 其余动物均 ip 盐酸环磷酰胺 100 mg/kg。实验第 7、10 天, 每只小鼠 ip 5% 鸡红细胞悬液 0.3 mL 致敏。实验第 14 天, 给药后 1 h, 用毛细管于小鼠眼球后静脉丛采血, 静置 30 min, 2 000 r/min 离心 15 min, 分离血清。取稀释血清(血清 2 μL + 生理盐水 1 mL), 加入 5% 鸡红细胞悬液 0.5 mL, 将反应体系放入冰水浴中, 加入 1.0 mL 10% 补体, 在 37 °C 水浴中保温 30 min 后, 冰水浴中终止反应, 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用紫外分光光度计 540 nm 处比色读取吸光度(A)值, 以生理盐水代替小鼠血清依法作空白管。

2.3 对外周血白细胞及免疫球蛋白水平的影响^[6-8]

选用健康昆明种小鼠 70 只, 体质量 18~20 g, 雌雄各半, 按体质量随机分成 7 组, 即: 对照组、模型组、香菇菌多糖 100 mg/kg、龟龄集 0.24 g/kg 和海马补肾丸低、中、高剂量(0.55、1.10、2.20 g/kg)组。每天 ig 给药 1 次, 对照组和模型组给予等体积 0.5% CMC-Na, 给药体积均为 20 mL/kg, 连续 14 d。给药第 8~10 天, 除对照组注射相应量的生理盐水外, 剩余各组开始 ip 环磷酰胺 80 mg/kg, 连续 3 d, 继续给药, 至给药第 14 天眼眶静脉取血, 测定白细胞数及免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 含量。

白细胞计数: 20 μL 血液加入白细胞稀释液(冰醋酸 2.0 mL、1% 甲紫 1.0 mL, 定容 100 mL) 380 μL, 充分混匀; 滴入计数盘内, 静置 2~3 min; 计数 4 个大方格的白细胞数。

$$\text{白细胞数}(/\text{mm}^3) = 4 \text{ 个大方格的白细胞数} \times 10 \times 20/4$$

2.4 抗应激作用

2.4.1 对运动疲劳大鼠游泳时间及运动后对血尿素氮、乳酸、肝糖原水平的影响^[9-11] 选用健康雄性 SD 种大鼠, SPF 级, 体质量 180~200 g, 将大鼠适应性饲养 3 d 后, 按体质量随机分组, 每组 10 只, 设对照组、模型组、单硝酸异山梨酯片 20 mg/kg、龟龄集 0.12 g/kg 和海马补肾丸低、中、高剂量(0.28、0.56、1.12 g/kg)组。各给药组每天 ig 给药 1 次, 对照组和模型组给予等体积 0.5% CMC-Na, 连续 14 d, 给药体积为 10 mL/kg。实验第 1 天, 除对照组外, 其余各组大鼠放入塑料桶中适应性游泳, 水深 20 cm, 水

温(24±2)℃,每天1次,每次20 min,连续3 d。随后开始9 d的正式游泳训练,每天进行2次游泳训练,时间为20 min。个别大鼠游泳过程中出现协调性明显下降、反复下沉时取出。一旦发现动物浮在水面不运动,用木棒驱赶迫使其维持运动状态。实验第13天,各组分别ig给药1 h后游泳15 min,眼眶静脉取血,试剂盒法测定血清中尿素氮(BUN)及乳酸(LD);实验第14天,各组分别给药后1 h进行力竭游泳实验,记录大鼠从开始游泳到反复下沉的时间。40 mg/kg戊巴比妥钠麻醉后,取右叶部分肝组织入-80℃冰箱保存备用,试剂盒法测定肝糖原水平。

2.4.2 对耐缺氧的影响^[12-13] 采用注射异丙肾上腺素致小鼠缺氧模型。选用健康昆明种小鼠84只,雌雄各半,体质量16~18 g,按体质量随机均衡分组,每组12只,设对照组、模型组、单硝酸异山梨酯片40 mg/kg组、龟龄集0.24 g/kg组和海马补肾丸低、中、高剂量(0.55、1.1、2.2 g/kg)组,共7组。各给药组每天ig给药1次,对照组给予等量的蒸馏水,模型组给予相应体积0.5%CMC-Na,连续5 d,给药体积为20 mL/kg。于末次给药后1 h,对照组注射等体积

的生理盐水,其余各组均sc盐酸异丙肾上腺素20 mg/kg(10 mL/kg)。15 min后,将各组小鼠分别放入盛有10 g钠石灰的200 mL广口瓶中,每瓶放置1只小鼠,瓶塞用凡士林密封,立即计时,记录小鼠的缺氧存活时间,计算存活延长率。

存活延长率=(给药组存活时间-模型组存活时间)/模型组存活时间

2.5 统计学方法

实验数据采用SPSS 13.0软件进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验和方差分析。

3 结果

3.1 免疫调节作用

3.1.1 对非特异性免疫的影响 与对照组比较,模型组 κ 、 α 显著减小($P<0.05$ 、 0.01),脾、胸腺系数显著降低($P<0.01$),显示已造成免疫功能低下模型。与模型组比较,海马补肾丸2.2 g/kg能显著增加增加 α 及 κ ,海马补肾丸1.1 g/kg、龟龄集、香菇菌多糖能显著增加 κ ($P<0.05$ 、 0.01),结果见表1。与模型组比较,海马补肾丸1.1、2.2 g/kg剂量,龟龄集0.24 g/kg能显著增加胸腺指数,阳性药香菇菌多糖显著增加脾、胸腺系数($P<0.05$ 、 0.01),结果见表2。结

表1 海马补肾丸对免疫抑制小鼠 α 和 κ 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Haima Bushen Pills on phagocytosis index and clearance index of immunosuppressed mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	κ	α
对照	—	11	0.031±0.008	5.350±0.719
模型	—	12	0.017±0.006 ^{##}	4.541±0.873 ^{##}
海马补肾丸	0.55	11	0.022±0.005	4.849±0.632
	1.10	12	0.023±0.004 [*]	4.939±0.553
	2.20	12	0.025±0.007 ^{**}	5.377±0.886 [*]
龟龄集	0.24	11	0.024±0.007 [*]	5.124±0.926
香菇菌多糖	0.10	11	0.027±0.007 ^{**}	5.132±0.716

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

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

表2 海马补肾丸对免疫抑制小鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Haima Bushen Pills on organ coefficient in immunosuppressed mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	肝脏系数/(mg·g ⁻¹)	脾系数/(mg·g ⁻¹)	胸腺指数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	11	55.33±8.24	3.60±0.62	4.60±1.77
模型	—	12	55.39±6.77	1.90±0.43 ^{##}	1.07±0.32 ^{##}
海马补肾丸	0.55	11	55.83±5.84	1.81±0.22	1.43±0.54
	1.10	12	55.79±6.71	1.84±0.32	1.46±0.50 [*]
	2.20	12	53.16±6.77	1.93±0.64	1.74±0.27 ^{**}
龟龄集	0.24	11	54.09±5.35	2.30±0.62	1.66±0.30 ^{**}
香菇菌多糖	0.10	11	56.78±7.22	2.36±0.54 [*]	1.81±0.20 ^{**}

与对照组比较:^{##} $P<0.01$;与模型组比较:^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

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

果提示,海马补肾丸明显增强免疫抑制小鼠的非特异性免疫功能。

3.1.2 对小鼠体液免疫的影响 与对照组比较,模型组 A 值显著减少($P<0.01$),表明血清溶血素生成量减少,已造成免疫抑制模型。与模型组比较,海马补肾丸、龟龄集、香菇菌多糖显著增加血清溶血素生成量($P<0.05, 0.01$),结果见表3。结果表明,海马补肾丸能明显增强免疫抑制小鼠的体液免疫。

表3 海马补肾丸对免疫抑制小鼠体液免疫的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 3 Effect of Haima Bushen Pills on humoral immunity of immunosuppressed mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	A 值
对照	—	0.086 6±0.003 7
模型	—	0.065 2±0.005 6 [#]
海马补肾丸	0.55	0.070 5±0.004 9*
	1.10	0.075 8±0.003 2**
	2.20	0.077 0±0.008 4**
龟龄集	0.24	0.071 3±0.002 9**
香菇菌多糖	0.1	0.088 2±0.003 8**

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

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

3.1.3 对外周血白细胞及免疫球蛋白水平的影响 与对照组比较,模型组白细胞数和免疫球蛋白含量显著降低($P<0.05, 0.01$),显示已造成小鼠免疫抑制模型。与模型组比较,海马补肾丸 2.2 g/kg 剂量组显著增加白细胞数量及免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 的含量($P<0.05$),龟龄集 0.24 g/kg 显著增加免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 的含量($P<0.05, 0.01$),阳性药香菇菌多糖能显著增加白细胞数量及免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 的含量($P<0.01$)。结果见表4、

表4 海马补肾丸对免疫抑制小鼠白细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of Haima Bushen Pills on white blood cell count in immunosuppressed mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	白细胞数(mm ⁻³)
对照	—	814 5±233 9
模型	—	308 0±703 [#]
海马补肾丸	0.55	354 0±464
	1.10	375 0±785
	2.20	448 5±972 [△]
龟龄集	0.24	348 0±875
香菇菌多糖	0.1	419 0±833 ^{**}

与对照组比较:[#] $P<0.01$;与模型组比较:^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$;与龟龄集组比较:[△] $P<0.05$

[#] $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs guilingji group

5。结果表明,海马补肾丸通过增加免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 含量及白细胞数量,增强免疫抑制小鼠的特异性体液免疫。

3.2 抗应激作用

3.2.1 对运动疲劳大鼠游泳时间及运动后对血清 BUN、LD、肝糖原的影响 与对照组比较,模型组游泳时间显著缩短($P<0.05$),显示已造成疲劳模型。与模型组比较,海马补肾丸 0.56、1.12 g/kg 剂量组、龟龄集能显著延长大鼠力竭游泳时间($P<0.05, 0.01$),单硝酸异山梨酯未见显著作用,结果见表6。

与对照组比较,模型组肝糖原含量显著降低,血清中 BUN、LD 显著增加($P<0.05, 0.01$)。与模型组比较,海马补肾丸 1.12 g/kg 能显著地减少血清中 BUN、LD 含量,减少肝糖原消耗($P<0.05, 0.01$)。龟龄集 0.12 g/kg 作用相似,阳性药单硝酸异山梨酯未见显著作用,结果见表7。结果表明,海马补肾丸

表5 海马补肾丸对免疫抑制小鼠免疫球蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Effect of Haima Bushen Pills on immunoglobulin in immunosuppressed mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IgG/(g·L ⁻¹)	IgM/(μg·mL ⁻¹)	IgA/(μg·mL ⁻¹)
对照	—	1.36±0.39	398.6±17.1	64.9±2.6
模型	—	0.99±0.24 [#]	347.2±17.9 [#]	53.7±2.0 [#]
海马补肾丸	0.55	1.19±0.36	355.8±11.9	55.8±6.1
	1.10	1.23±0.28	371.9±27.3*	55.9±2.4*
	2.20	1.29±0.31*	381.9±33.4*	58.4±6.0*
龟龄集	0.24	1.24±0.26*	377.1±26.3**	57.6±2.4**
香菇菌多糖	0.1	1.29±0.19**	389.0±24.1**	57.8±3.2**

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

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

表6 海马补肾丸对疲劳大鼠力竭游泳时间影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 6 Effect of Haima Bushen Pills on swimming time in tired rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	力竭游泳时间/min
对照	—	30.2±10.1
模型	—	22.4±4.2 [#]
海马补肾丸	0.28	25.6±5.3
	0.56	27.3±4.3 [*]
	1.12	28.2±4.6 ^{**}
龟龄集	0.12	27.8±6.6 [*]
单硝酸异山梨酯	0.02	25.2±3.9

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

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

表7 海马补肾丸对疲劳大鼠BUN、LD、肝糖原的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 7 Effects of Haima Bushen Pills on BUN, LD and liver glycogen in fatigued rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	LD/(mmol·L ⁻¹)	肝糖原(mg·g ⁻¹)
对照	—	7.72±0.94	4.97±0.38	34.99±9.77
模型	—	10.53±0.72 ^{##}	5.85±0.74 ^{##}	17.76±6.97 ^{##}
海马补肾丸	0.28	9.70±1.15	5.68±0.69	21.22±2.92
	0.56	8.85±1.11 ^{**}	5.51±0.95	23.75±3.91 [*]
	1.12	8.35±0.93 ^{**}	5.13±0.68 [*]	28.80±6.56 ^{**}
龟龄集组	0.12	8.27±0.94 ^{**}	5.11±0.79 [*]	24.14±4.39 [*]
单硝酸异山梨酯	0.02	9.76±1.56	5.36±0.96	17.35±5.80

与对照组比较:^{##} $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

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

表8 海马补肾丸对异丙肾上腺素致小鼠缺氧存活时间、存活延长率影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 8 Effect of Haima Bushen Pills on survival time and prolongation rate of hypoxia induced by isoproterenol in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	存活时间/min	延长率/%
对照	—	39.5±5.7	—
模型	—	24.4±6.7 ^{##}	—
海马补肾丸	0.55	27.3±7.5	12.0
	1.10	31.1±6.8 [*]	27.6
	2.20	32.4±5.9 ^{**}	32.7
龟龄集	0.24	32.2±8.7 [*]	32.0
单硝酸异山梨酯	0.04	31.7±8.5 [*]	30.1

与对照组比较:^{##} $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

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

通过减少蛋白质、肝糖原有氧代谢产生的BUN和葡萄糖无氧酵解产生的LD,提高运动能力,减缓运动疲劳。

3.2.2 对耐缺氧的影响 与对照组比较,模型组缺氧存活时间显著缩短($P < 0.01$),模型成功。与模型组比较,海马补肾丸1.1、2.2 g/kg剂量组、龟龄集、单硝酸异山梨酯能显著延长小鼠缺氧存活时间($P < 0.05$ 、 0.01),提示有显著增强小鼠耐缺氧能力。结果见表8。

4 讨论

单核巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的重要指标。巨噬细胞碳粒 κ 和 α 的大小可以反映内皮网状系统吞噬功能的强弱,当细菌、异物等抗原性物质进入机体后,可迅速被单核

巨噬系统吞噬和清除。实验结果显示海马补肾丸均明显增加免疫功能低下小鼠的碳粒 κ 和 α 。免疫器官的脏器系数是衡量机体非特异性免疫功能的指标之一,海马补肾丸均明显抑制环磷酰胺引起的胸腺萎缩,表明具有明显的非特异性免疫增强作用功能。血清溶血素反映机体体内抗体量,是体液免疫功能的重要指标,致敏动物血清中存在循环抗体,在体外补体的参与下产生溶血反应,可以用溶血程度来测定抗体水平的高低。免疫球蛋白在体液免疫中起着重要的作用,是免疫系统的重要组成部分,IgG、IgM、IgA是3种体内重要的免疫球蛋白,IgG含量最高,具有抗菌、抗病毒、抗毒素的作用;IgM在初次体液免疫应答早期产生,具有杀菌、溶菌、促吞噬、抗病毒的作用;IgA对机体呼吸道、消化道等局部黏膜免疫起着相当重要的作用。海马补肾丸显著增加免疫抑制小鼠的白细胞数量及IgG、IgM、IgA的含量。推测其作用机制是:通过增加免

疫球蛋白IgG、IgM、IgA的含量及白细胞的数量来增强免疫抑制小鼠的免疫功能。

运动能力是指机体运动时无氧、有氧代谢系统能量供应和利用能力。疲劳的产生主要涉及能量消耗、代谢紊乱、中枢神经系统和内分泌系统功能失调等几个方面。机体运动的供能系统分别有磷酸原代谢系统、糖、脂、蛋白质的有氧代谢系统及糖的无氧酵解系统。BUN、血清LD分别是有氧代谢、糖的无氧酵解的产物,通过BUN和血清LD的变化可以得知机体体内代谢情况。大鼠力竭游泳时间、缺氧状态的存活时间也是抗应激的重要方面。海马补肾丸能明显延长大鼠力竭游泳时间,减少BUN、LD生成及肝糖原消耗,增加缺氧存活时间。推测其作用机理是:海马补肾丸通过提高有氧代谢效率,减少无氧酵解,从而减缓运动疲劳,增强抗应激作用。

本研究结果表明海马补肾丸具有明显免疫增强和抗应激作用,也阐释了海马补肾丸滋阴补肾、强壮健脑功效的部分机制,为临床提供有力依据。

参考文献

- [1] 徐迎年. 海马补肾丸[J]. 开卷有益(求医问药), 2015(2): 51. Doi: 10.3969/j.issn.1007-2950.2015.02.045
- [2] 刘若庸, 路红莉, 于云, 等. 海马补肾丸的药理作用研究[J]. 中草药, 1992, 23(7): 363-365, 391.
- [3] 吴欣, 张纯东, 戴敏. 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, 2007, 12(11): 1269-1273.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学(第二版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [5] 吴红娟, 肖锦仁, 黄雪梅, 等. 参苓白术散颗粒剂与煎剂对小鼠免疫功能的比较研究[J]. 中药材, 2002, 25(11): 811-812.
- [6] 樊彦, 王钦茂, 宿秀兰. 当归养血口服液补血作用实验研究[J]. 基层中药杂志, 1998, 12(2): 49-50.
- [7] 许丹妮, 马玉芳, 李健, 等. 金线莲多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 福建农林大学学报, 2013, 42(9): 536-538.
- [8] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学(第4版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [9] 宁青, 宋捷, 陈斌, 等. 复方蛹虫草制剂抗疲劳作用的实验研究[J]. 江苏中医药, 2011, 43(11): 88-89.
- [10] 卢峻, 葛桂玲, 张红林, 等. 艾灸对运动性疲劳大鼠肝糖原及肝脏超微结构的影响[J]. 针刺研究, 2011, 36(1): 32-34.
- [11] 张蓉. 运动性疲劳所致学习记忆能力改变的证候特点及分子生物学机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.
- [12] 江溪, 邵凤, 郑歆, 等. 川芎救心滴丸对动物实验性心肌缺血的保护作用研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(5): 453-457.
- [13] 伍湘瑾, 王晓鸣, 兰克非. 单硝酸异山梨酯的药理实验研究[J]. 辽宁药物与临床, 1999, 2(3): 4-5.