

## 参黄胶囊对环磷酰胺致免疫低下小鼠免疫功能的影响

王叔桥, 张丽宏, 李 炎, 马 晶, 危红萍

四川省食品药品检验所, 四川 成都 610097

**摘要:** **目的** 探讨参黄胶囊对环磷酰胺致免疫抑制模型小鼠免疫功能的作用。**方法** 分别用环磷酰胺和限食法结合环磷酰胺两种方法建立小鼠免疫抑制模型, 分别给予 0.26、0.53、1.06 g/kg 参黄胶囊, 观察其对小鼠外周血 T 淋巴细胞率、胸腺指数、脾脏指数、白细胞数、巨噬细胞吞噬指数、血清溶血素含量 (半数溶血值) 的影响。**结果** 应用环磷酰胺后, 免疫抑制模型小鼠外周血 T 淋巴细胞率、胸腺指数、脾脏指数、白细胞数、巨噬细胞吞噬指数、血清溶血素含量均显著降低。0.26、0.53、1.06 g/kg 参黄胶囊均可明显提高用限食法结合环磷酰胺致免疫低下 (气虚模型) 小鼠外周血 T 淋巴细胞率、胸腺指数和脾脏指数和环磷酰胺致免疫低下小鼠体内白细胞数和巨噬细胞吞噬指数; 0.53、1.06 g/kg 参黄胶囊可明显促使溶血素生成增加。**结论** 参黄胶囊可明显改善环磷酰胺致免疫低下小鼠的免疫功能, 具有扶正固本、增强机体特异性免疫和非特异性免疫功能作用。

**关键词:** 参黄胶囊; 环磷酰胺; 小鼠免疫抑制模型; 免疫功能调节

**中图分类号:** R285.5; R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2013)04 - 0504 - 04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.009

## Effects of Shenhuang Capsule on immunofunction of cyclophosphamide-immunodepressed mice

WANG Shu-qiao, ZHANG Li-hong, LI Yan, MA Jing, WEI Hong-ping

Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610097, China

**Abstract: Objective** To explore the effects of Shenhuang Capsule on immunofunction of cyclophosphamide (CY)-immunodepressed mice. **Methods** The immunosuppressive mouse models were established respectively by CY and CY combined with food restriction. After ig administration of Shenhuang Capsule (0.26, 0.53, and 1.06 g/kg), the effects of Shenhuang Capsule on T lymphocyte percentage in peripheral blood, thymus index, spleen index, leucocyte count, macrophage engulfing index, and serum haemolysin content (HC<sub>50</sub>) in mice were observed. **Results** There were significant reductions in T lymphocyte percentage in peripheral blood, thymus index, spleen index, leucocyte count, macrophage engulfing index, and HC<sub>50</sub> in immunodepressive mice model induced by CY. Shenhuang Capsule (0.26, 0.53, and 1.06 g/kg) could obviously improve T lymphocyte percentage in peripheral blood, thymus index, and spleen index in immunosuppressive (Qi-asthenia model) mice treated by CY combined with food restriction, and elevate the leucocytes and macrophage engulfing index in CY-immunodepressed mice. Shenhuang Capsule (0.53 and 1.06 g/kg) could significantly promote haemolysin formation in CY-immunodepressed mice. **Conclusion** Shenhuang Capsule could significantly improve the immunofunction of CY-immunodepressed mice and have the effects on fostering resistance to disease and enhancing the body's specific and nonspecific immunofunction.

**Key words:** Shenhuang Capsule; cyclophosphamide; immunosuppressed mouse model; immunofunction regulation

参黄胶囊由人参等多味中药制成, 含有皂苷类、多糖类、丹参酮、丹酚酸、氨基酸等。研究表明皂苷、多糖、丹参酮等多种肿瘤具有明显的抑制作用, 并具有保护机体、减轻化疗药物抑制骨髓造血功能等不良反应、协同抑制肿瘤等功效<sup>[1-5]</sup>。本实验

用环磷酰胺诱导小鼠建立免疫功能抑制模型, 从扶正作用和减毒作用角度探讨参黄胶囊对经化疗药物处理的小鼠在活化巨噬细胞功能、促使 B 淋巴细胞产生抗体、调节外周血 T 淋巴细胞亚群、提高免疫器官指数和白细胞数方面的影响和作用特点。

收稿日期: 2013-03-28

作者简介: 王叔桥 (1959—), 男, 副主任药师, 从事生物制品检验与批签发、药品 (医疗器械) 生物学评价试验。

Tel: (028) 87877114 E-mail: wang028@yahoo.cn

## 1 实验材料

### 1.1 实验动物

昆明种小鼠, 体质量 20~25 g, 雌雄各半; NIH 小鼠, 体质量 18~22 g, 雄性, 均由成都生物制品研究所提供, 许可证号 07。

### 1.2 药物与试剂

参黄胶囊 (0.2 g/粒, 稀乙醇浸提物不小于 70 mg/粒, 批号 060801, 成都复兴医院制剂室提供), 注射用环磷酰胺 (山西普德药业有限公司, 批号 20070309), 气血康口服液 (10 mL/支, 云南白药集团文山七花有限责任公司, 批号 20070501), 盐酸左旋咪唑片 (南京白敬宇制药有限责任公司, 批号 061101),  $\alpha$ -醋酸萘酯 (乙酸-1-萘酯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 T20070131), 甲基绿 (成都市科龙化工试剂厂进口分装, 批号 20070601), 盐酸副品红 (上海三爱思试剂有限公司, 批号 20061106), 实验用水 (四川科伦药业股份有限公司, 符合《中国药典》纯水质量标准), 其他试剂 (都氏试剂、豚鼠血清、去纤维绵羊红细胞悬液、印度墨汁、1%明胶溶液、0.1%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液均为市售产品。

### 1.3 仪器

XT-2000iV 血球分析仪 (日本 Sysmex), UV2450 分光光度计 (日本岛津)。

## 2 方法

### 2.1 对环磷酰胺致免疫低下小鼠 T 淋巴细胞及免疫器官指数的影响

NIH 雄性小鼠 60 只, 随机均分为 6 组: 对照组、模型组、阳性药左旋咪唑组 (30 mg/kg)、参黄胶囊低、中、高剂量组 (0.26、0.53、1.06 g/kg)。除对照组外, 其余小鼠每日限制给食量, 连续 1 周, 从第 2 周起恢复正常给食量。恢复给食量后, 参黄胶囊剂量组 (低、中、高) 及左旋咪唑组按指定剂量 ig 给药, 1 次/d, 连续 10 d。模型组和对照组给予等体积生理盐水。于处理动物前 3 d, 除对照组外, 其余小鼠均每天 ip 环磷酰胺 (40 mg/kg) 造模 (气虚模型) [6-7]。末次给药后 2 h, 小鼠剪尾取血, 涂片, 染色 [6], 油镜下观察计数 T 淋巴细胞率。处死小鼠, 取胸腺、脾脏并称定质量, 计算脏器指数。

### 2.2 对环磷酰胺致免疫低下小鼠白细胞的影响

昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 随机均分为 6 组: 对照组、模型组、阳性药气血康口服液组 (10 mL/kg)、参黄胶囊低、中、高剂量组 (0.26、0.53、1.06 g/kg)。参黄胶囊剂量组 (低、中、高) 及气

康口服液组按指定剂量 ig 给药, 1 次/d, 连续 10 d。模型组和对照组给予等体积生理盐水。于给药第 7 天起, 除对照组外, 其余小鼠均每天 ip 环磷酰胺 50 mg/kg, 连续 3 d, 制造小鼠免疫功能抑制模型。给药结束后, 小鼠眼球采血, 用血球分析仪进行白细胞分类计数。

### 2.3 对环磷酰胺致免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

昆明种小鼠 60 只, 动物分组、给药及造模均同 2.2 项。于末次给药结束后 24 h, 经尾 iv 印度墨汁 (0.01 mL/g), 注毕即计时, 于 30 s ( $t_1$ ) 和 10 min ( $t_2$ ) 各采小鼠眼眶血 20  $\mu$ L, 立刻加入 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 2 mL 中。用分光光度计在 675 nm 波长处测定吸光度 ( $A$ ) 值, 另取未注射墨汁的小鼠血溶于 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 2 mL 中, 作为空白对照校零。处死小鼠, 取肝脏和脾脏并称定质量。计算吞噬指数 ( $K$ ) 和吞噬系数 ( $\alpha$ ) [8]。

$$K = (\lg A_1 - \lg A_2) / (t_2 - t_1)$$

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

$A_1$ 、 $A_2$  为不同时间所取血样的吸光度值,  $t_2 - t_1$  为取两血样的时间差

### 2.4 对环磷酰胺致免疫低下小鼠溶血素生成的影响

昆明种小鼠 60 只, 动物分组、给药及造模均同 2.2 项。于首次给药后第 6 天, 每鼠 ip 20% SRBC 悬液 0.2 mL。于免疫 4 d 取眼眶血, 2 000 r/min 离心 10 min, 收集血清。取血清 1 mL 于试管中, 依次再加 5% SRBC 悬液 0.5 mL, 置冰浴中, 每管加补体 1 mL, 摇匀。置 37  $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 冰浴终止反应。2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 1 mL (空白对照用生理盐水替代血样), 加都氏试剂 3 mL, 室温放置 10 min, 用分光光度计在 540 nm 波长处以对照管作空白, 测定各管的吸光度 ( $A$ ) 值。另取 5% SRBC 悬液 0.25 mL, 加都氏试剂 3.75 mL, 作为 SRBC 的半数溶血管, 室温放置 10 min, 测定其半数溶血管  $A$  值。血清溶血素含量以半数溶血值 ( $HC_{50}$ ,  $HC_{50} = A_{\text{样品}} / A_{\text{SRBC 半数溶血时}} \times \text{稀释倍数}$ ) 表示。

### 2.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 组间采用  $t$  检验, 所有计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

### 3.1 对环磷酰胺致免疫低下小鼠 T 淋巴细胞及免疫器官指数的影响

由表 1 可见, 与对照组相比, 模型组外周血 T

淋巴细胞率、胸腺指数和脾脏指数均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 说明造免疫抑制模型成功。与模型组相比, 低剂量参黄胶囊和左旋咪唑可明显提高外周血 T 淋巴细胞率, 中、高剂量参黄胶囊可显著提高外周血 T 淋巴细胞率 ( $P < 0.01$ ); 低、中剂量参黄胶囊和

左旋咪唑可明显提高胸腺指数 ( $P < 0.05$ ), 高剂量参黄胶囊可显著提高胸腺指数 ( $P < 0.01$ ); 低剂量参黄胶囊和左旋咪唑可明显提高脾脏指数 ( $P < 0.05$ ), 中、高剂量参黄胶囊可显著提高脾脏指数 ( $P < 0.01$ )。

表 1 参黄胶囊对气虚模型小鼠外周血 T 淋巴细胞及免疫器官指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Effects of Shenhuang Capsule on T lymphocyte in peripheral blood and immune organ index in Qi-asthenia model mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	T 淋巴细胞率/%	胸腺指数/(mg·g <sup>-1</sup> )	脾脏指数/(mg·g <sup>-1</sup> )
对照	—	60.15 ± 8.05	2.720 ± 0.475	4.290 ± 0.520
模型	—	30.10 ± 7.30 <sup>#</sup>	1.630 ± 0.510 <sup>#</sup>	2.892 ± 0.491 <sup>#</sup>
左旋咪唑	0.03	38.57 ± 9.24 <sup>*</sup>	2.077 ± 0.550 <sup>*</sup>	3.256 ± 0.422 <sup>*</sup>
参黄胶囊	0.26	39.50 ± 8.65 <sup>*</sup>	2.095 ± 0.468 <sup>*</sup>	3.455 ± 0.670 <sup>*</sup>
	0.53	42.90 ± 9.45 <sup>**</sup>	2.215 ± 0.372 <sup>*</sup>	3.620 ± 0.487 <sup>**</sup>
	1.06	43.95 ± 9.59 <sup>**</sup>	2.328 ± 0.502 <sup>**</sup>	3.880 ± 0.650 <sup>**</sup>

与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

### 3.2 对环磷酰胺致免疫低下小鼠白细胞的影响

由表 2 可见, 与对照组相比, 模型组小鼠白细胞显著减少 ( $P < 0.01$ ), 说明造免疫抑制模型成功。与模型组相比, 低剂量参黄胶囊可明显增加小鼠白

细胞 ( $P < 0.05$ ), 中、高剂量参黄胶囊和气血康口服液可显著增加小鼠白细胞 ( $P < 0.01$ )。表明参黄胶囊对环磷酰胺诱发白细胞下降的小鼠有保护作用。

表 2 参黄胶囊对环磷酰胺致免疫低下小鼠白细胞、巨噬细胞吞噬功能和溶血素生成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effects of Shenhuang Capsule on leucocytes, phagocytic function of macrophage, and haemolysin formation in CY-immunodepressed mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	白细胞数( $\times 10^9/L$ )	吞噬指数	吞噬系数	血清 HC <sub>50</sub>
对照	—	4.130 ± 1.280	0.032 9 ± 0.009 3	4.81 ± 0.506	17.96 ± 0.62
模型	—	0.795 ± 0.456 <sup>##</sup>	0.011 7 ± 0.003 8 <sup>##</sup>	3.70 ± 0.396 <sup>#</sup>	2.56 ± 0.83 <sup>##</sup>
气血康口服液	10 mg/mL	2.990 ± 0.362 <sup>**</sup>	0.019 8 ± 0.007 9 <sup>**</sup>	4.41 ± 0.952 <sup>*</sup>	10.35 ± 4.35 <sup>**</sup>
参黄胶囊	0.26	1.670 ± 0.690 <sup>*</sup>	0.018 9 ± 0.011 0 <sup>*</sup>	4.46 ± 0.590 <sup>*</sup>	3.90 ± 1.05
	0.53	1.780 ± 0.603 <sup>**</sup>	0.022 9 ± 0.009 2 <sup>**</sup>	4.60 ± 0.625 <sup>**</sup>	5.61 ± 0.91 <sup>*</sup>
	1.06	1.850 ± 0.528 <sup>**</sup>	0.025 1 ± 0.006 8 <sup>**</sup>	4.87 ± 0.521 <sup>**</sup>	8.46 ± 3.31 <sup>**</sup>

与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

### 3.3 对环磷酰胺致免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

由表 2 可见, 与对照组相比, 模型组巨噬细胞吞噬指数显著降低 ( $P < 0.01$ ), 吞噬系数明显降低 ( $P < 0.05$ ), 说明造免疫抑制模型成功。与模型组相比, 低剂量参黄胶囊可明显提高巨噬细胞吞噬指数 ( $P < 0.05$ ), 中、高剂量参黄胶囊和气血康口服液可显著提高巨噬细胞吞噬指数 ( $P < 0.01$ ); 低剂量参

黄胶囊和气血康口服液可明显提高巨噬细胞吞噬系数 ( $P < 0.05$ ), 中、高剂量参黄胶囊可显著提高巨噬细胞吞噬系数 ( $P < 0.01$ )。表明参黄胶囊有活化巨噬细胞功能, 对环磷酰胺诱发机体吞噬功能下降小鼠有保护作用。

### 3.4 对环磷酰胺致免疫低下小鼠溶血素生成的影响

由表 2 可见, 与对照组相比, 模型组小鼠溶血素 (SRBC 抗体) 生成显著减少 ( $P < 0.01$ ), 说明

造免疫抑制模型成功。与模型组相比,中剂量参黄胶囊可明显增加免疫低下小鼠溶血素的生成( $P < 0.05$ ),高剂量参黄胶囊和气血康口服液可显著增加免疫低下小鼠溶血素的生成( $P < 0.01$ )。表明参黄胶囊具有促使特异性抗体生成的功能,对环磷酰胺诱发特异性抗体生成下降的小鼠有保护作用。

### 3 讨论

中医学认为肿瘤形成是机体正气不足,而邪气踞之所致,并且正气虚弱伴随着肿瘤的发生、发展及治疗和预后全过程。因此扶正固本是中医药防治肿瘤的基本法则,尤以提高患者的免疫功能最为突出。中药抗肿瘤药主要有4个方面的作用:祛邪、扶正、增敏、减毒,即活血化瘀、清热解毒、软坚化结、扶正固本。

根据现代药理学研究,抗肿瘤中药主要有两大类:一类是细胞毒药物(直接杀伤肿瘤细胞),另一类是具有免疫增强作用和生物反应调节作用的药物。细胞毒药物主要含有天然抗肿瘤活性成分,可直接抑制肿瘤细胞的生长;免疫增强和生物反应调节药物通过调节脏腑气血阴阳的失衡,改善机体全身的病理状态,增加机体自身的抗病力。目前临床常用的细胞毒药物通常伴有一定的不良反应,而且这些不良反应通常与化疗的不良反应相互叠加,加重了对患者机体的损伤。因此免疫增强和生物反应调节药物的临床应用显得尤为重要。机体免疫系统具有限制肿瘤细胞生长的能力,通过改变宿主对肿瘤的生物反应,调节机体细胞和体液免疫功能,在肿瘤治疗中已经受到医学界的关注。

参黄胶囊含有大量的皂苷类、多糖类等成分,具有干扰癌细胞和增强免疫功能等作用<sup>[9]</sup>。该药功能主治为益气补中、健脾养胃,主要适用于瘵病、癯瘦病人,症见身体瘦弱、面色无华、头晕气短、四肢乏力、神疲懒言、不思饮食、舌质淡、苔薄白、脉虚软无力者。临床用于多种恶性肿瘤中、晚期患者辅助治疗,配合化疗有效协调抑瘤增效作用,减

轻化疗药物的不良反应,增强机体抗肿瘤免疫功能。鉴于临床应用情况,故本研究用限食法结合化疗药环磷酰胺建立小鼠气虚(免疫功能低下)模型。

本实验选用吞噬细胞(巨噬细胞、白细胞)作用作为非特异性免疫功能指标,免疫器官(胸腺、脾脏)和免疫细胞(淋巴细胞)作为特异性免疫功能指标,溶血素作为特异性体液免疫指标,T淋巴细胞作为细胞免疫指标,观察参黄胶囊对小鼠免疫抑制模型免疫功能的调节作用。结果提示,参黄胶囊对免疫功能低下小鼠出现的异常指标具有良好的恢复调节作用,能有效地改善机体的病理状态。表明该药物具有活化巨噬细胞、促使B淋巴细胞产生抗体、调节T淋巴细胞亚群作用,并有一定的量效关系;可明显升高环磷酰胺致免疫功能低下小鼠的白细胞数。参黄胶囊与气血康口服液作用一致,具有扶正固本作用,能增强机体特异性免疫和非特异性免疫功能。

### 参考文献

- [1] 李微,李雪萍,张慧芳.参黄口服液减低化疗毒副作用的临床观察[J].中医药学刊,2005,23(2):363-364.
- [2] 孔治庆,黄涛.黄芪对大剂量顺铂所致肾脏毒性的防护的实验研究[J].中国药理学杂志,1999,34(7):447.
- [3] 单磊,张卫东,张川,等.皂苷类成分抗肿瘤活性的研究进展[J].中草药,2005,36(2):234-236.
- [4] 张伟伟,陆茵.丹参抗肿瘤活性成分研究进展[J].中国药理学杂志,2010,35(3):391-392.
- [5] 陈建峰,张琰,贺建荣.黄芪多糖对小鼠化疗中白细胞和骨髓有核细胞减少的影响[J].中国现代应用药学杂志,2003,20(5):378-380.
- [6] 李业鹏,计融,韩春卉,等.建立小鼠免疫抑制模型的初步研究[J].中国食品卫生杂志,2001,13(6):7-10.
- [7] 陈奇.中药药理研究方法学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,2006.
- [8] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范[S].2003.
- [9] 张树功,李焕荣.富锗处理人参及其药理活性初报[J].中草药,1993,24(4):199-200.