

注射用益气复脉（冻干）对环磷酰胺诱导小鼠免疫低下的改善作用

刘晓光^{1,2}, 胡金芳³, 宋美珍^{1,2}, 万梅绪^{1,2}, 申秀萍³, 叶正良¹, 鞠爱春^{1,2*}

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

2. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

3. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: **目的** 探索注射用益气复脉（冻干, YQFM）对环磷酰胺致免疫低下小鼠的影响。**方法** ICR 小鼠随机分为 5 组: 对照组, 模型组, 注射用益气复脉高、中、低剂量（1417.00、708.50、354.25 mg/kg）组, 尾 iv 给药, 每天 1 次, 连续 6 d, 于第 2 天给药后, ip 环磷酰胺 100 mg/kg 制备小鼠免疫低下模型。尾 iv 印度墨汁检测小鼠炭廓清功能; 检测小鼠脾脏指数; ip 5% 鸡红细胞悬液检测血清溶血素水平; 采用 2, 4-二硝基氯苯（DNCB）建立耳廓迟发型超敏反应模型, 观察各组小鼠耳肿胀度的变化; 动物血液分析仪测定小鼠白细胞数和骨髓有核细胞数变化。**结果** 与对照组比较, 高、中、低剂量的 YQFM 均可显著促进免疫低下小鼠的炭廓清功能, 显著增加脾脏指数、骨髓有核细胞数和白细胞数 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 高剂量可显著增加溶血素的生成 ($P < 0.05$); 中、低剂量显著增强迟发型超敏反应 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** YQFM 可显著改善环磷酰胺导致的小鼠免疫低下, 有望成为一种新的抗肿瘤辅助用药。

关键词: 注射用益气复脉（冻干）; 环磷酰胺; 免疫低下; 炭廓清功能; 脾脏指数; 溶血素; 迟发型超敏反应; 抗肿瘤辅助用药

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)06-0962-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.06.009

Effect of Yiqi Fumai Injection (freeze drying) on immunosuppression induced by cytoxan in mice

LIU Xiao-guang^{1,2}, HU Jin-fang³, SONG Mei-zhen^{1,2}, WAN Mei-xu^{1,2}, SHEN Xiu-ping³, YE Zheng-liang¹, JU Ai-chun¹

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Company Limited, Tianjin 300410, China

2. Tianjin TCMI safety evaluation enterprise laboratory 300410, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective To investigate effect of Yiqi Fumai Injection (freeze drying, YQFM) on immunosuppression induced by cytoxan in mice. **Methods** ICR mice were divided into five groups: control group, model group, YQFM high, medium, and low dose (1417.00, 708.50, and 354.25 mg/kg) groups, iv relative drug in tail once daily for 6 d. Immunosuppression was induced by ip injection of cytoxan (100 mg/kg) after the second administration of YQFM. Clearance function of mice was detected through iv India ink in tail, and spleen index was detected. Detection of serum hemolysin level was taken by ip injection of 5% red blood cells. Using 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) to establish the delayed-type hypersensitivity model, the changes of ear swelling degree were observed. Changes in the number of leucocyte and bone marrow nucleated cells in mice were determined by animal blood analyzer. **Results** Compared with control group, YQFM of high, medium, and low doses could significantly promote the immunosuppressive mice's carbon clearance function, and significantly increased the spleen index and the number of leucocyte and bone marrow nucleated cells ($P < 0.05$, 0.01 , and 0.001); high dose YQFM could significantly increase the production of hemolysin ($P < 0.05$); and low dose significantly enhance delayed-type hypersensitivity ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** YQFM can significantly improve the

收稿日期: 2016-08-15

基金项目: 天津市科技小巨人领军企业培育重大项目 (14ZXLJSY00240)

作者简介: 刘晓光 (1985—), 男, 硕士, 研究方向为抗炎免疫药理级中药注射剂安全性评价 Tel: 18310112119 E-mail: tsl-liuxiaoguang2015@tasly

*通信作者 鞠爱春 (1973—), 男, 高级工程师, 从事中药注射剂工艺及生产管理方向研究。

immunosuppression of mice caused by cyclophosphamide, and is expected to become an antineoplastic assistant drug.

Key words: Yiqi Fumai Injection; cytoxan; immunosuppression; carbon clearance function; spleen index; hemolysin; delayed-type hypersensitivity; antineoplastic assistant drug

在我国,癌症的发病人数日益增加,严重影响居民健康,是城市死因第一、农村死因第二的疾病^[1]。化学治疗作为癌症治疗的主要手段,在杀伤肿瘤细胞的同时也会损伤正常的细胞,导致造血系统损伤,出现骨髓抑制及免疫功能损伤等许多不良反应。

注射用益气复脉(冻干,简称YQFM)是在传统中药处方生脉散的基础上研制成的中药注射剂,由红参、麦冬、五味子3味药组成。在临床上具有益气生津、敛阴止汗的功效,主要用于冠心病、心绞痛等疾病的治疗^[2-4]。现代研究显示,生脉散可以用作肿瘤的辅助治疗^[5],但YQFM相关研究很少,因此,本课题组对YQFM进行了一系列药效学研究。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

YQFM(天津天士力之骄药业,每瓶装0.65 g,批号20080701,密封、遮光保存);注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号08122421);生理盐水(天津市津兰药业有限公司);冰醋酸(天津市凯信化学工业有限公司);2,4-二硝基氯苯(DNCB,天津试剂一厂)。

1.2 主要仪器

HEMAVET950 动物血液分析仪(Drew Scientific, Inc);SUNRISE 酶标仪(奥地利 Tecan 公司)。

1.3 动物

SPF级ICR小鼠,体质量20~22 g,雌雄兼用,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号SCXK(京)2012-0003。购回小鼠后适应性喂养1周,自由进食进水,12 h/12 h明暗交替照射,控制室温度20~26℃,湿度40%~70%,实验过程中对动物处置符合医学伦理学标准。

2 方法

2.1 动物分组及给药

将ICR小鼠随机分为:对照组,模型组,注射用益气复脉高、中、低剂量(1417.00、708.50、354.25 mg/kg,以生药计分别为6.00、3.00、1.50 g/kg)组,每组10只,尾iv给药,每天1次,连续6 d,其中对照组和模型组尾iv同体积辅料溶液。于第2天给药后,除对照组外,其余各组小鼠均ip环磷酰胺100 mg/kg致小鼠免疫低下^[6]。

2.2 对小鼠炭廓清功能的影响

末次给药后1 h,尾iv 20%印度墨汁40 μL/10 g,于注射后2、10 min分别眼眶静脉丛取血10 μL,溶于1 mL 0.1% Na₂CO₃溶液中,充分摇匀,SUNRISE 酶标仪在650 nm波长下比色,测定光密度(A_{2 min}、A_{10 min})值。按下式计算吞噬指数(K)。

$$K = (\lg A_{2 \text{ min}} - \lg A_{10 \text{ min}}) / 8 \text{ min}$$

2.3 对脏器指数的影响

颈椎脱臼处死小鼠,称体质量、脾脏质量,计算脾脏指数。

$$\text{脾脏指数} = \text{脾脏质量} / \text{体质量}$$

2.4 对小鼠血清溶血素水平的影响

按照“2.1”项方式分组给药,于第2天给药后,除对照组外,其余各组小鼠ip环磷酰胺100 mg/kg,且每只小鼠ip 5%鸡红细胞悬液0.2 mL进行免疫,于末次给药24 h后,各组小鼠称体质量,眼眶静脉丛取血,2 000 r/min离心10 min,取血清用生理盐水稀释10倍后取200 μL,与5%鸡红细胞100 μL、10%补体(豚鼠血清)100 μL混合,在37℃恒温水浴中孵育30 min后,将试管立即移入0℃冰水中,终止反应。将反应管以2 000 r/min离心10 min,取上清液,用SUNRISE 酶标仪在540 nm波长下比色,测定A_{溶血素}值。

2.5 对环磷酰胺所致免疫低下小鼠迟发型超敏反应的影响

按照“2.1”项方式分组给药,于第3天给药后,将小鼠sc 5% DNCB 丙酮溶液50 μL/只进行致敏。末次给药后在每只小鼠右耳壳涂7%的DNCB 丙酮溶液50 μL进行攻击,24 h处死动物,剪下左、右耳,用8 mm打孔器在相同部位打下耳片,电子天平称质量,以左右耳片质量之差作为衡量变态反应程度指标。

2.6 对白细胞和骨髓有核细胞数的影响

按照“2.1”项方式分组给药,末次给药后1 h,动物称体质量,眼眶静脉丛取血,动物血液分析仪测定白细胞数;另取右侧股骨,用3%醋酸溶液1 mL冲出骨髓内细胞,用动物血液分析仪测定有核细胞数。

2.7 统计学处理

应用SPSS 16.0统计学软件进行数据处理分析,各组数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数间比较采用t 检

验, 多样本均数比较采用 One-way ANOVA 检验。

3 结果

3.1 对免疫低下小鼠炭廓清功能的影响

与对照组比较, 模型组的巨噬细胞的吞噬指数 (K) 明显降低 ($P < 0.05$), 吞噬活性有一定的减少, 证明模型成功。给予 YQFM 后, 各个剂量组对免疫低下的小鼠炭廓清功能具有明显促进作用 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 YQFM 对免疫低下小鼠炭廓清功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of YQFM on carbon clearance function in immunosuppressive mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

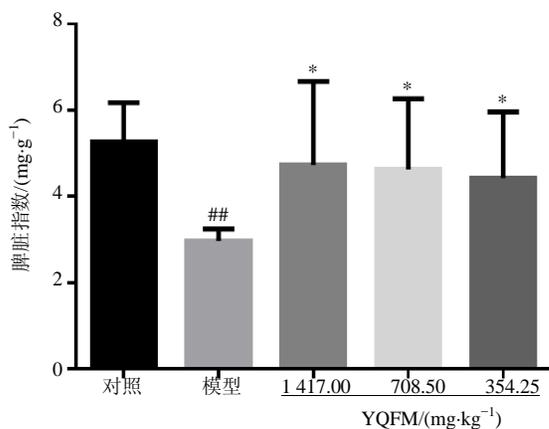
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	K/min ⁻¹
对照	—	0.047 ± 0.014
模型	—	0.032 ± 0.012 [#]
YQFM	1 417.00	0.049 ± 0.022 [*]
	708.50	0.050 ± 0.019 [*]
	354.25	0.048 ± 0.009 [*]

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

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

3.2 对免疫抑制小鼠脾脏指数的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠的脾脏指数明显降低 ($P < 0.01$), 给予低、中、高剂量 YQFM 后明显增加脾脏指数, 与模型组比较, 差异显著 ($P < 0.05$)。



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

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

图 1 YQFM 对小鼠脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of YQFM in spleen index in immunosuppressive mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.3 对免疫低下小鼠血清溶血素的影响

与对照组比较, 模型组小鼠血清溶血素生成显

著减少 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 高剂量的 YQFM 可显著增加免疫低下小鼠溶血素的生成 ($P < 0.05$)。结果表明, 高剂量 YQFM 可提高免疫抑制小鼠血清溶血素的水平。见表 2。

表 2 YQFM 对免疫低下小鼠血清溶血素的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of YQFM on hemolysin formation in immunosuppressive mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	A 溶血素
对照	—	0.445 ± 0.149
模型	—	0.090 ± 0.012 ^{###}
YQFM	1 417.00	0.156 ± 0.023 [*]
	708.50	0.095 ± 0.006
	354.25	0.100 ± 0.011

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

3.4 对免疫低下小鼠迟发型超敏反应的影响

与对照组比较, 模型组小鼠在环磷酰胺的作用下, 小鼠耳肿胀度显著减弱 ($P < 0.01$), 提示环磷酰胺可以抑制正常小鼠迟发型超敏反应。与模型组比较, YQFM 中、低剂量对 DNCB 诱导环磷酰胺所致免疫低下小鼠迟发型超敏反应有显著的增强作用 ($P < 0.05, 0.01$)。

表 3 YQFM 对免疫低下小鼠迟发型超敏反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of YQFM on contact hypersensitivity in immunosuppressive mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	耳肿胀度/mg
对照	—	30.0 ± 7.6
模型	—	17.2 ± 6.3 ^{##}
YQFM	1 417.00	22.4 ± 8.5
	708.50	24.0 ± 6.4 [*]
	354.25	26.8 ± 7.7 ^{**}

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

3.5 对环磷酰胺的减毒作用

与对照组比较, 环磷酰胺模型组小鼠在环磷酰胺的作用下, 小鼠的白细胞数和骨髓有核细胞数明显减少 ($P < 0.001$)。给予 YQFM 则能够非常显著增加小鼠骨髓有核细胞数和白细胞数 ($P < 0.01, 0.001$), 表明 YQFM 对环磷酰胺所致骨髓有核细胞数和白细胞数的减少有非常显著的保护作用。

4 讨论

随着现代社会发展节奏的加快, 环境因素、自身因素等导致癌症的发病率逐年升高, 而对于癌症

表 4 YQFM 对免疫低下小鼠白细胞数和骨髓有核细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of YQFM on number of bone marrow nucleated cell and leukocyte in immune-suppressive mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	骨髓有核细胞/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)	白细胞/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)
对照	—	9.06 ± 1.33	5.88 ± 0.81
模型	—	4.68 ± 1.34 ^{###}	1.42 ± 0.24 ^{###}
YQFM	1 417.00	8.63 ± 3.04 ^{**}	2.38 ± 0.56 ^{***}
	708.50	8.96 ± 2.65 ^{***}	2.21 ± 0.41 ^{***}
	354.25	7.99 ± 2.29 ^{**}	2.09 ± 0.47 ^{**}

与对照组比较: ^{###}*P* < 0.001; 与模型组比较: ^{*}*P* < 0.05 ^{**}*P* < 0.01

^{***}*P* < 0.001

^{###}*P* < 0.001 vs control group; ^{*}*P* < 0.05 ^{**}*P* < 0.01 ^{***}*P* < 0.001 vs model group

的治疗又常引起严重的不良反应,如机体免疫力低下等而被迫中断治疗。基于此,需要一些辅助肿瘤治疗的药物。环磷酰胺既是一种细胞毒化疗药物,也是一种免疫抑制类药物,其在杀伤肿瘤细胞同时,也可损伤机体的免疫器官,抑制机体的体液免疫和细胞免疫反应,因此,采用环磷酰胺造成的免疫低下的小鼠来评判药物疗效^[6],本研究中,与对照组比较,模型组小鼠脾脏指数、吞噬指数显著降低,血清溶血素生成显著减少,迟发型超敏反应被抑制,白细胞数和骨髓有核细胞数明显减少,证明模型成功。

脾脏是产生特异性免疫应答的重要场所,其重量的改变能反映机体的免疫状态。本实验中 YQFM 能明显的升高免疫低下小鼠的脾脏指数,从另一个侧面反映了药物能够增强机体的免疫能力。

小鼠腹腔巨噬细胞是一种多功能免疫细胞,在机体免疫反应中发挥着重要作用。研究表明, YQFM 能显著提高免疫低下小鼠的吞噬指数 *K*,使其恢复接近正常水平。因此, YQFM 对免疫低下的小鼠非特异性免疫功能有一定的恢复作用。

血清溶血素水平反映了 B 细胞增殖分化及分泌溶血素的能力,绵羊红细胞是溶血素特异性抗原,可评价药物对机体的体液免疫功能。实验证明,高剂量的 YQFM 能提高免疫功能低下的小鼠的巨噬细胞的吞噬能力。

迟发型超敏反应是由 T 细胞介导的细胞免疫,在病理状态下, Th1 和 Th2 细胞之间的细胞平衡可能会失调,可导致机体免疫功能紊乱^[7]。采用 DNFB 建立小鼠耳廓迟发型超敏反应模型是目前最常用的

模型之一。该模型以小鼠耳廓为靶部位,根据小鼠耳廓厚度评判药物疗效。YQFM 能明显增强免疫低下小鼠的迟发型超敏反应,使其接近正常水平。

骨髓抑制是化疗药物造成的最主要的不良反应之一,骨髓作为造血器官和中枢免疫器官,在机体免疫系统中发挥着重要作用^[8]。本实验结果显示, YQFM 可以显著拮抗环磷酰胺导致的骨髓抑制,明显增加免疫低下小鼠的有核细胞数量和白细胞数量。

以上结果提示, YQFM 能对环磷酰胺引起的免疫低下小鼠的细胞免疫有促进作用,能够改善环磷酰胺引起的白细胞和骨髓有核细胞减少症状, YQFM 有望成为一种新的肿瘤辅助用药,其作用机理有待进一步研究。

参考文献

- [1] 曾红梅, 陈万青. 中国癌症流行病学与防治研究现状 [J]. 化学进展, 2013, 9(9): 1415-1420.
- [2] Lu X, Min J, Lin Y D, et al. Cardioprotective effects of the YiQiFuMai injection and isolated compounds on attenuating chronic heart failure via NF-κB inactivation and cytokine suppression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(1): 239-245.
- [3] 孙 静, 王 凤, 刘影哲, 等. 注射用益气复脉(冻干)治疗冠心病心绞痛 136 例 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(9): 1034-1035.
- [4] Kou J, Cao G, Ye X, et al. YiQiFuMai powder injection ameliorates blood-brain barrier dysfunction and brain edema after focal cerebral ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 315-325.
- [5] Lo L C, Chen C Y, Chen S T, et al. Therapeutic efficacy of traditional Chinese medicine, Shen-Mai San, in cancer patients undergoing chemotherapy or radiotherapy: study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Trials*, 2012, 13(1): 232.
- [6] 王叔桥, 张丽宏, 李 炎, 等. 参黄胶囊对环磷酰胺致免疫低下小鼠免疫功能的影响 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 504-507.
- [7] Zhang Q H, Wu C F, Yang J Y, et al. Reduction of cyclophosphamide-induced DNA damage and apoptosis effects of ginsenoside Rb1 on mouse bone marrow cells and peripheral blood leukocytes [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2009, 27(3):384-389.
- [8] Vives M J, Esteve M, Mariné M, et al. Prevalence and clinical relevance of enteropathy associated with systemic autoimmune diseases [J]. *Dig Liver Dis*, 2012, 44(8): 636-642.