

注射用益气复脉（冻干）对辐射所致小鼠免疫低下的改善作用

曾永君¹, 胡金芳⁴, 万梅绪^{2,3}, 李智^{2,3}, 宋美珍^{2,3}, 李德坤^{2,3}, 申秀萍⁴, 鞠爱春^{2,3*}, 陈真^{1*}

1. 中国药科大学 药学院, 江苏 南京 211198

2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

3. 天津市中药注射剂安全评价企业重点实验室, 天津 300410

4. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: **目的** 研究注射用益气复脉（冻干, YQFM）对¹³⁷Cs辐照后小鼠免疫系统的影响。**方法** 按体质量将昆明小鼠随机分为5组: 对照组、模型组和YQFM低、中、高剂量（354.55、709.09和1 418.18 mg/kg）组, 每组10只。除对照组外, 其余各组小鼠放在圆形有孔的照射盒中采用¹³⁷Cs全身1次性照射剂量为3 Gy的射线, 制备免疫低下小鼠模型, 于照射24 h后, 尾iv给药, 每天1次, 连续6 d, 对照组和模型组尾iv同体积辅料溶液。检测小鼠胸腺指数; ip 5%的鸡红细胞悬液检测血清溶血素的含量; 耳廓迟发型过敏反应模型采用2, 4-二硝基氯苯制备, 以小鼠耳肿胀度为观测指标; 采用动物血液分析仪测定小鼠骨髓有核细胞（BMNC）和白细胞（WBC）数; 用全自动生化仪测定血清中尿素氮（BUN）和丙氨酸转氨酶（ALT）的含量变化。**结果** 与模型组比较, YQFM各剂量组均可显著增加免疫低下小鼠的胸腺指数、显著增强迟发型过敏反应和增加BMNC、WBC数（ $P<0.05$ 、 0.01 ）; 低、高剂量组显著增加血清溶血素水平（ $P<0.01$ ）; 低剂量组显著减少血清中ALT含量（ $P<0.05$ ）。**结论** YQFM可显著改善¹³⁷Cs所致的小鼠免疫低下, 有可能成为一种新型的抗肿瘤辅助用药。

关键词: 注射用益气复脉（冻干）; 抗辐射; 辐射损伤; 免疫低下; 抗肿瘤辅助用药

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)03-0386-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.03.006

Effect of Yiqi Fumai Lyophilized Injection on immune suppression induced by irradiation in mice

ZENG Yongjun¹, HU Jinfang⁴, WAN Meixu^{2,3}, LI Zhi^{2,3}, SONG Meizhen^{2,3}, LI Dekun^{2,3}, SHEN Xiuping⁴, JU Aichun^{2,3}, CHEN Zhen¹

1. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

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

3. Tianjin TCMI safety evaluation enterprise laboratory, Tianjin 300410, China

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

Abstract: Objective To study the effect of Yiqi Fumai Lyophilized Injection (YQFM) on immune system of mice after exposure to¹³⁷Cs irradiation. **Methods** KM mice were divided into five groups: control group, model group, YQFM low, medium, high dose (354.55, 709.09 and 1 418.18 mg/kg) groups, with 10 mice in each group. Except for control group, mice in remaining groups were placed in a circular perforated irradiation box using¹³⁷Cs systemic irradiation dose of 3 Gy radiation, preparing immune compromised mouse model. After 24 h exposure, drugs were administrated in tail vein continued for six days, once a day. Mice in control and model group were injected with the same volume of intravenous infusion solution. Thymus index of mice was detected. Detection of serum hemolysin level was taken by ip injection of 5% chicken erythrocyte suspension. Using 2, 4-dinitrochlorobenzene to establish the delayed type hypersensitivity model, and the changes of ear swelling degree were observed. Moreover, the number of bone marrow nucleated cells (BMNC) and leucocyte (WBC) in mice were determined by animal blood analyzer. Change of the level

收稿日期: 2018-01-15

基金项目: 天津市中药注射剂关键技术校企协同创新实验室建设基金（17PTSYJC00090）

第一作者: 曾永君（1990—），男，贵州，硕士生，研究方向为中药药理, Tel: 15900343783 E-mail: 1151930472@qq.com

*通信作者 陈真（1963—），女，教授，博士，博士生导师，研究方向为生化药理, Tel: (025) 83271181 E-mail: czcpu@163.com;

鞠爱春（1973—），男，高级工程师，研究方向为中药注射剂工艺及生产管理, Tel: (022)86342096 E-mail: juach@tasly.com

of serum Urea nitrogen (BUN) and alanine amino transferase (ALT) were measured by automatic biochemical analyzer. **Results** Compared with model group, low, medium and high doses of YQFM significantly increased the thymus index in immune compromised mice, and significantly enhanced delayed type hypersensitivity and increased the number of BMNC and WBC ($P < 0.05, 0.01$); YQFM at the low and high doses increased the production of hemolysin; Low dose of YQFM significantly decreased the level of serum ALT ($P < 0.05$). **Conclusion** YQFM can markedly enhance the immune function in mice with immunodeficiency induced by ^{137}Cs , and is expected to become a novel antineoplastic assistant drug.

Key words: Yiqi Fumai Lyophilized Injection; antiradiation; radiation injury; immune suppression; antineoplastic assistant drug

注射用益气复脉(冻干, YQFM)是从著名古方生脉散中利用现代技术研制而得的中药注射剂, 由红参、麦冬和五味子组成^[1]。它具有益气复脉和敛阴止汗的作用, 临床上用于治疗冠心病和心绞痛等心脑血管疾病^[2-4]。前期研究显示, YQFM 能够增强环磷酰胺所致免疫低下小鼠的免疫功能^[5], 但 YQFM 对放疗所致免疫功能损伤的影响还未见报道, 因此, 本课题组对 YQFM 进行以下药效学研究。

1 材料

1.1 动物

SPF 级昆明种小鼠, 体质量 18~22 g, 雌雄各半, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2016-0011。小鼠购买后适应性饲养 7 d, 自由进食饮水, 明暗 12 h/12 h 交替照射, 饲养室温度 (22 ± 2) °C, 湿度 40%~70%, 实验中对动物的处置符合医学伦理学标准。

1.2 药物和主要试剂

注射用益气复脉(冻干, YQFM), 每瓶装 0.65 g, 批号 20080701, 由天津天士力之骄药业有限公司提供; 生理盐水, 购自天津市津兰药业有限公司; 冰醋酸, 购自天津市凯信化学工业有限公司; 印度墨汁, 购自北京市西中化工厂; 2, 4-二硝基氯苯(DNCB), 购自天津试剂一厂。

1.3 主要仪器

LXJ-IIB 型低速大容量多管离心机, 上海安亭科学仪器有限公司; SUNRISE 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; HEMAVET 950 动物血液分析仪, Drew Scientific, InC。

2 方法

2.1 动物分组及给药

按体质量将 KM 小鼠随机分为 5 组, 分别为: 对照组、模型组和 YQFM 低、中、高剂量 (354.55、709.09、1 418.18 mg/kg) 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组小鼠放在圆形有孔的照射盒中采用 ^{137}Cs 源 $-\gamma$ 射线全身 1 次性照射, 剂量为 3 Gy, 制备免疫低下模型^[6], 于照射 24 h 后, 尾 iv 给药, 连

续 6 d, 每天 1 次, 对照组和模型组尾 iv 同体积辅料溶液。末次给药 1 h 后, 小鼠颈椎脱臼处死, 测定各项免疫指标。

2.2 对免疫器官指数的影响

将小鼠颈椎脱臼处死, 称体质量、胸腺质量, 计算胸腺指数。

胸腺指数 = 胸腺质量 (mg) / 体质量 (g)

2.3 对小鼠血清溶血素的影响

按照“2.1”项下方法分组和给药, 在第 2 天给药后, 各组小鼠均 ip 5% 的鸡红细胞悬液 0.2 mL 致敏。在末次给药 24 h 后, 称各组小鼠的体质量, 摘眼球取血, 分离血清, 1:20 生理盐水稀释。向反应管中依次加入稀释血清 0.2 mL、5% 的鸡红细胞 0.1 mL 和 10% 的豚鼠血清 0.1 mL, 混匀后 37 °C 水浴孵育 30 min, 孵育结束后立即冰浴终止反应。离心, 取上清, 用酶标仪在 540 nm 波长下检测吸光度 (A_{540}) 值。

2.4 对小鼠迟发型超敏反应的影响

按照“2.1”项下方法分组和给药, 在第 3 天给药后, 对每只小鼠 sc 5% 的 DNCB 丙酮溶液 50 μL 进行致敏, 最后 1 次给药后, 在每只小鼠右耳(背侧耳廓)均匀涂抹 7% 的 DNCB 丙酮溶液 50 μL 进行攻击。攻击后 24 h, 颈椎脱臼处死小鼠, 剪下左右耳壳, 用 8 mm 打孔器在同一部位取下耳片, 称质量。以左右耳片质量之差作为衡量变态反应程度的指标。

2.5 对小鼠骨髓有核细胞(BMNC)及白细胞(WBC)数的影响

按照“2.1”项下方法分组和给药, 末次给药后 1 h, 称小鼠体质量, 眼眶取血, 用 HEMAVET950 动物血液分析仪测定 WBC; 小鼠颈椎脱臼处死, 取右侧股骨, 用 3% 的醋酸溶液 1 mL 冲出骨髓内的细胞, 用 HEMAVET 950 动物血液分析仪测定 BMNC 数。

2.6 对小鼠血液生化的影响

按照“2.1”项下方法分组和给药, 末次给药后 1 h, 称小鼠体质量, 摘眼球取血, 离心, 取血清,

用 7080 型全自动生化仪测定血清中丙氨酸转氨酶 (ALT) 及尿素氮 (BUN) 的含量。

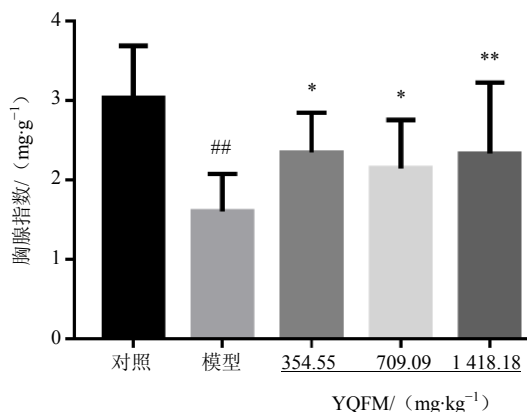
2.7 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行处理和分析, 实验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较用 t 检验, 多组间均数比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对免疫低下小鼠胸腺指数的影响

模型组小鼠胸腺指数与对照组比较明显降低, 具有极显著性差异 ($P < 0.01$); 给予各剂量 YQFM 后胸腺指数明显增加, 与模型组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05, 0.01$), 结果见图 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

图1 YQFM对免疫低下小鼠胸腺指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

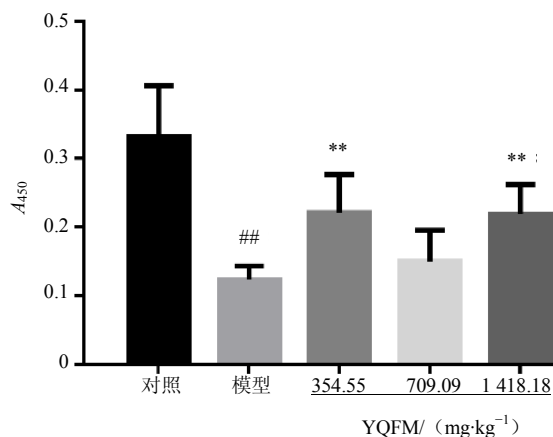
Fig. 1 Effect of YQFM on thymus index in immunosuppressive mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 对免疫低下小鼠血清溶血素的影响

如图2所示, 模型组小鼠血清溶血素与对照组比较明显减少, 具有极显著性差异 ($P < 0.01$); 给予低、高剂量 YQFM 后, 小鼠血清溶血素生成显著增加, 与模型组比较, 具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。结果显示, 低、高剂量 YQFM 可提高免疫低下小鼠血清溶血素水平。

3.3 对免疫低下小鼠迟发型超敏反应的影响

如图3所示, 模型组小鼠在 ^{137}Cs 作用下, 与对照组比较, 耳肿胀度显著降低 ($P < 0.05$), 表明 ^{137}Cs 源 - γ 射线辐射抑制正常小鼠的迟发型超敏反应。与模型组比较, YQFM 低、中、高剂量组耳肿胀度显著增加 ($P < 0.05$), 表明 YQFM 对 DNCB 诱导免疫低下小鼠迟发型超敏反应发挥显著增强作用。

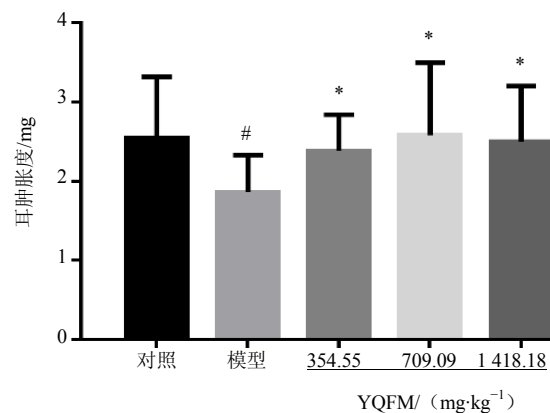


与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

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

Fig. 2 Effect of YQFM on serum hemolysin level in immunosuppressive mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



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

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

Fig. 3 Effect of YQFM on delayed type hypersensitivity in immune - suppressive mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.4 对放疗 (^{137}Cs 照射) 的减毒作用

模型组小鼠在 ^{137}Cs 的作用下, 小鼠 BMNC 和 WBC 数显著减少, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。低、中、高剂量 YQFM 均能显著增加小鼠 BMNC 和 WBC 数 ($P < 0.05, 0.01$), 见图 4。

与对照组比较, 模型组小鼠 BUN 和 ALT 显著增加 ($P < 0.01$); 给予 YQFM 后, BUN 与模型组

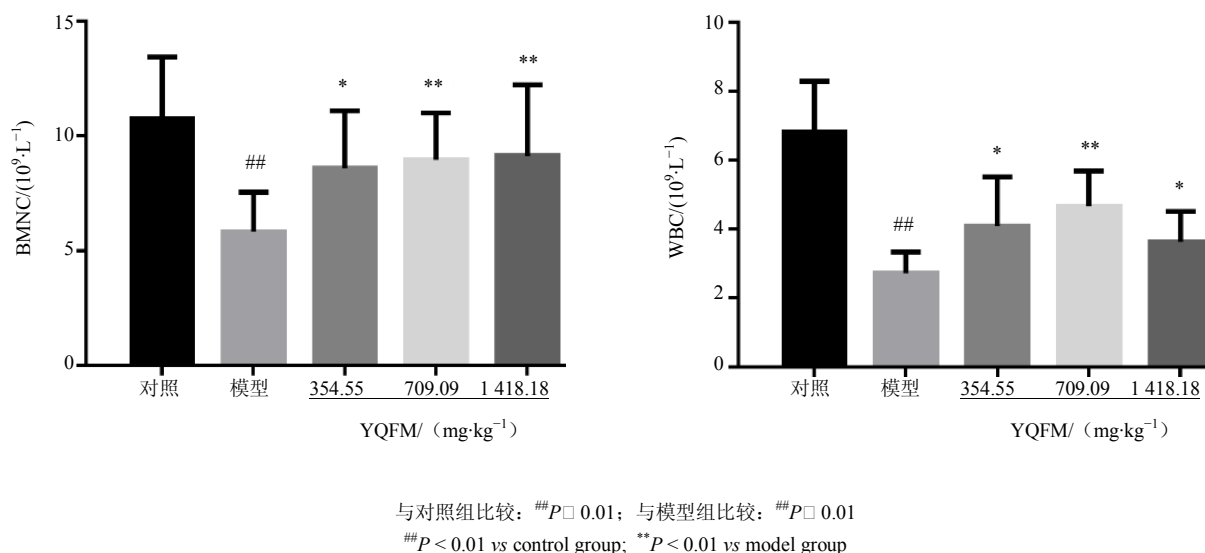


图4 YQFM对免疫低下小鼠BMNC和WBC数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of YQFM on number of BMNC and WBC in immunosuppressive mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

比较无显著差异;YQFM低剂量组ALT活性显著降低,与模型组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见表1。

结果提示,YQFM对 ^{137}Cs 所致免疫低下小鼠的BMNC、WBC数减少和肝脏损伤发挥显著保护作用。

表1 YQFM对免疫低下小鼠ALT和BUN的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of YQFM on ALT and BUN in immunosuppressive mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ALT/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	BUN/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	54.5 ± 9.3	7.62 ± 0.75
模型	—	$100.4 \pm 54.0^{\#}$	$8.61 \pm 1.21^{\#}$
YQFM	1418.18	72.7 ± 28.0	9.15 ± 0.93
	709.09	62.8 ± 14.6	8.72 ± 0.82
	354.55	$53.6 \pm 6.4^*$	8.40 ± 1.59

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

4 讨论

放疗是一种有效的癌症治疗方法,但放疗产生的电离辐射会导致肿瘤患者免疫功能低下,引起患者对病原微生物的抵抗力下降,最终导致各种并发症^[7]。因此减轻肿瘤患者由于放疗导致的免疫功能抑制对其健康恢复非常重要。

YQFM是由红参、麦冬和五味子3味中药组成的复方中药注射剂。研究显示,人参、麦冬具有调

节免疫力、增强免疫功能的作用^[8-9],五味子作用于免疫系统发挥抗炎和抗过敏作用^[10]。前期研究显示,YQFM可改善化疗药所致免疫抑制小鼠的免疫功能^[5]。本研究检测YQFM对辐射后小鼠胸腺指数,血清溶血素,迟发型超敏反应,BMNC、WBC数、ALT和BUN水平的影响,目的在于研究YQFM是否对辐射小鼠的免疫系统具有保护作用,为其作为肿瘤放疗用药提供一定的临床依据。

在本研究中,与对照组比较,模型组小鼠胸腺指数和血清溶血素水平显著降低,迟发型超敏反应受到抑制,BMNC和WBC数显著减少,ALT、BUN显著升高,说明造模成功。

胸腺是机体的中枢免疫器官,是淋巴细胞分化成熟的场所^[11]。胸腺指数的变化能从一定程度上反映机体的免疫状态,免疫器官质量能反映其内部所含淋巴细胞的数量,从而了解机体免疫细胞的功能状态。研究显示,YQFM能够显著增加免疫低下小鼠的胸腺指数,表明YQFM能够增强机体的免疫功能。

血清溶血素可以代表B细胞分泌抗体的量,因此血清溶血素的水平能够反映体液免疫的功能^[12]。结果表明,YQFM低、高剂量可显著提高免疫低下小鼠的血清溶血素水平,提示YQFM对体液免疫具有一定的保护作用。

迟发型超敏反应受到T细胞介导的细胞免疫的调控,因此其能反映细胞免疫的功能状态^[13]。结果

表明, YQFM 低、中、高剂量能够显著增强免疫低下小鼠的迟发型超敏反应, 使其几乎恢复到正常水平, 提示 YQFM 对免疫低下小鼠的细胞免疫具有增强作用。

放疗的主要不良反应包括骨髓抑制和肝毒性。骨髓属于中枢免疫器官, 是各类血细胞及免疫细胞发生发育的场所, 在造血和免疫系统中发挥着不可替代的作用; 肝脏是机体最重要的药物代谢器官, 对来自体内体外的各种药物、毒物都具有生物转化作用。实验研究显示, YQFM 低、中、高剂量能够减轻 ^{137}Cs 引起的骨髓抑制, 使免疫低下小鼠 BMNC 和 WBC 数明显增加; 低、中剂量 YQFM 能够改善 ^{137}Cs 导致的肝毒性, 明显降低免疫低下小鼠外周血 ALT 的水平。

在本实验中, YQFM 对 ^{137}Cs 诱导的免疫低下小鼠体液和细胞免疫具有增强作用, 能够减轻 ^{137}Cs 引起的 BMNC 和 WBC 数下降、改善肝功能损害, 因此 YQFM 有可能成为肿瘤患者放疗过程中的保护药, 其具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 褚延斌, 苏小琴, 李德坤, 等. 基于一测多评法对注射用益气复脉(冻干)中 9 种成分的质量控制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3537-3544.
- [2] Pang L Z, Ju A C, Zheng X J, et al. YiQiFuMai Powder Injection attenuates coronary artery ligation-induced myocardial remodeling and heart failure through modulating MAPKs signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 202: 67-77.
- [3] 张崇荣, 牛昱光, 李欣, 等. 注射用益气复脉治疗气阴两虚型冠心病心绞痛的临床疗效观察 [J]. 中国医药指南, 2016, 14(8): 211-212.
- [4] Cao G, Zhou H, Jiang N, et al. YiQiFuMai Powder Injection ameliorates cerebral ischemia by inhibiting endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016(2016): 1-14.
- [5] 刘晓光, 胡金芳, 宋美珍, 等. 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 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(6): 962-965.
- [6] 李业鹏, 李燕俊, 韩春卉, 等. 小鼠放射性免疫低下模型的研究 [J]. 卫生研究, 2006, 35(1): 100-102.
- [7] 倪金星, 王康. 放疗对肿瘤患者免疫功能影响的研究进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, 36(7): 1037-1039.
- [8] Patel S, Rauf A. Adaptogenic herb ginseng (*Panax*) as medical food: Status quo and future prospects [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 85: 120-127.
- [9] Chen M H, Chen X J, Wang M, et al. *Ophiopogon japonicus*-A phytochemical, ethno medicinal and pharmacological review [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 181: 193-213.
- [10] Lee K P, Kang S, Park S J, et al. Anti-allergic effect of α -cubebenoate isolated from *Schisandra chinensis* using *in vivo* and *in vitro* experiments [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 173: 361-369.
- [11] 王思芦, 汪开毓, 赵玲, 等. 鸡枞菌多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(1): 59-63.
- [12] 周娅红. 人参总皂苷对免疫低下小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国中医急症, 2010, 19(9): 1559-1561.
- [13] Singh S, Cps Y, Noolvi M N. Immunomodulatory activity of butanol fraction of *Gentiana olivieri* Griseb. on Balb/C mice [J]. Asian Pac J Trop Med, 2012, 2(6): 433-437.