

复方 HD 对环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能的影响

吕欢^{1,2}, 万龙^{1,2}, 姜明燕^{1,2*}

1. 中国医科大学附属第一医院 药学部, 辽宁 沈阳 110001

2. 中国医科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110122

摘要: 目的 探讨复方 HD 对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的免疫增强作用。方法 ICR 小鼠分别以蒸馏水(对照组、模型组)、香菇多糖(200 mg/kg)、复方 HD (5、10、20 g/kg) 每天 1 次 ig 给药, 连续 10 d; 除对照组外, 在第 4~6 天 ip 环磷酰胺(40 mg/kg) 制备免疫抑制小鼠模型(对照组除外); 每天给药前精确称量并记录小鼠体质量。于最后一次给药 24 h 后, 测定小鼠脾指数、胸腺指数; 流式细胞术进行全血中 T 细胞亚群分析; ELISA 法检测血浆中 IFN- γ 和 IL-4 水平。结果 与模型组比较, 复方 HD 低、中、高剂量组显著提高小鼠的胸腺指数, CD3⁺、CD3⁺CD4⁺ 细胞数以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值 ($P < 0.05$), 显著恢复血浆中 IFN- γ 水平和 IFN- γ /IL-4 比值 ($P < 0.05$), 纠正了 Th1/Th2 偏移, 并呈现出一定的浓度相关性。结论 复方 HD 能够促进环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠免疫功能的恢复, 证明其在预防及治疗免疫功能低下方面具有一定的疗效。

关键词: 复方 HD; 环磷酰胺; 免疫抑制; 免疫增强; Th1/Th2; IFN- γ ; IL-4

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)04-0577-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.04.014

Immuno-enhancement effects of Fufang HD on cyclophosphamide-induced immunosuppression in ICR mice

LÜ Huan^{1,2}, WAN Long^{1,2}, JIANG Mingyan^{1,2}

1. Department of Pharmacy, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

2. School of Pharmaceutical Science, China Medical University, Shenyang 110122, China

Abstract: Objective To systematically elucidate the *in vivo* immune-enhancement effects of Fufang HD in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide treatment. **Methods** ICR mice received gastric administration of physiological saline (control group), lentinan (200 mg/kg), Fufang HD low-, medium-, and high- dose (5, 10, and 20 g/kg) once daily for 10 consecutive days, respectively, accompanied by intraperitoneal injection of cyclophosphamide (40 mg/kg) on days 4-6. Accurately weighing and recording the body mass of mice every day. After 24 h of the last administration, spleen index and thymus index of mice were detected. Flow cytometry was used to analyze T cell subsets in whole blood, and the levels of IFN- and IL-4 in plasma were detected by ELISA. **Results** Compared with model group, low-, medium-, and high-dose Fufang HD treatment accelerated recovery dose-dependently of thymus index, lymphocytic percentages of CD3⁺, CD4⁺, and CD4⁺/CD8⁺ as well as restored the level of serum IFN- γ ($P < 0.05$) and corrected Th1/Th2 deviation. **Conclusions** The results demonstrate that treatment with Fufang HD results in accelerating recovery of immunosuppression in Cy-treated mice for the first time, which is competent in taking into consideration for both precautions and remedy.

Key words: Fufang HD; cyclophosphamide; immune suppression; immune enhancement; Th1/Th2; IFN- γ ; IL-4

免疫系统功能的稳定是维持机体内环境稳定的关键, 对于机体各项功能的正常发挥有着重要的生理意义。免疫系统的紊乱将会导致多种疾病的发生,

研究表明, 恶性肿瘤、艾滋病、类风湿及支气管哮喘等疾病都与免疫系统息息相关^[1]。传统中医理论认为疾病的发生、发展、转归取决于正邪的消长,

收稿日期: 2017-11-02

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目(2014226033); 中国医科大学校内课题基金项目(XZR20160007); 中国医科大学附属第一医院院内基金项目(FSFH201717); 中国医科大学附属第一医院药学部科室基金

第一作者: 吕欢, 研究方向为药物分析。E-mail: 918063889@qq.com

*通信作者: 姜明燕, syjmy@126.com

与机体的免疫系统功能密切相关,“扶正祛邪”理论是中医的主要治病原则。中药作为中医的重要组成部分,在协调机体整体平衡、增强机体抗病能力方面具有独特的疗效^[2]。复方 HD (由中国医科大学附属第一医院胸外科专家李厚文教授将传统的中医理论与现代医学观点相结合,经过多年潜心研究和临床实践而研制的复方中药制剂,曾用名仲罗三号),是由红参、黄芪、当归、甘草等十味中药组成的经典免疫调节方剂。前期的临床应用结果显示^[3],复方 HD 可以防治因肿瘤化疗导致的骨髓抑制及消化系统损伤等不良反应,提升 CD3⁺细胞数、CD3⁺CD4⁺细胞数以及 CD4⁺/CD8⁺比值,发挥免疫调节的作用,但具体作用机制尚未明确。本研究应用环磷酰胺造成免疫抑制小鼠模型,观察复方 HD 对免疫抑制小鼠的体质量、免疫器官指数、T 淋巴细胞亚群、IFN- γ 和 IL-4 水平等免疫学指标的影响,探讨复方 HD 发挥免疫调节作用的机制。

1 材料

1.1 试剂与仪器

注射用环磷酰胺冻干粉(批号 15121025,江苏盛迪医药有限公司);香菇多糖片(批号 151002,浙江普洛康裕天然药物有限公司);红细胞裂解液(批号 20170118,北京索宝来科技有限公司);PerCP anti-mouse CD3 ϵ Antibody、FITC anti-mouse CD4、PE anti-mouse CD8a 荧光抗体(批号分别为 B187521、B225057、B234269, Biolegend 公司);Mouse IL-4 ELISA Kit、Mouse IFN- γ ELISA Kit(批号分别为 220461031、228061043,杭州联科生物技术有限公司)。

1.2 主要仪器

FAC Scan 流式细胞仪(BECTON Dickinson);Gen5 酶标仪(BioTek);LD510-2D 电子天平(沈阳天平仪器有限公司);BSA124S 电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);HC-3018R 高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司);RE-52 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 36 只,6~8 周龄,体质量(30 $\pm$ 2)g,购自辽宁长生生物技术有限公司,实验动物生产许可证号为 SCXK(辽)2015-0001。

2 方法

2.1 中药的制备

称取复方 HD(红参、黄芪、当归、甘草、金

银花等 10 味中药,按照君、臣、佐、使一定配比组成,总计 69 g,各原料药均购于安徽致良中药饮片有限公司)一副,加入 10 倍量蒸馏水,浸泡 30 min,加热回流提取 2 h,过滤得滤液,连续提取 3 次,合并 3 次滤液,旋蒸浓缩至原料药质量浓度 1 g/mL,4 $^{\circ}$ C 备用,临用前恢复至室温。

2.2 分组及模型的建立

雄性 ICR 小鼠 36 只,适应性饲养 1 周后应用随机数字表法将小鼠分为 6 组:对照组、模型组、香菇多糖组和复方 HD 低、中、高剂量组,每组 6 只。小鼠连续 ig 给药 10 d,每天 1 次,低、中、高剂量复方 HD 组小鼠分别给予复方 HD 5、10、20 g/kg(本院临床常用剂量为每日生药量 69 g,转换为小鼠的等效剂量约为 10 g/kg),香菇多糖组给予香菇多糖 200 mg/kg,对照组和模型组给予等量蒸馏水。除对照组外,其余 5 组于给药第 4~6 天 ip 环磷酰胺 40 mg/kg 建立免疫抑制模型^[4],每天 1 次,对照组注射等量生理盐水。自实验开始,每天在处理小鼠前精确称量并记录小鼠体质量。

2.3 脾指数及胸腺指数的测定

末次给药 24 h 后,精确称取小鼠体质量,摘除眼球取血后,无菌条件下用电子分析天平称取小鼠脾脏、胸腺质量,计算其脾脏及胸腺指数:

$$\text{器官指数} = \text{器官质量 (mg)} / \text{体质量 (g)}$$

2.4 T 细胞亚群的测定

取 EDTA 抗凝全血 100 μ L 于流式管中,分别加入 CD3-PerCP、CD4-FITC、CD8-PE 荧光抗体各 10 μ L,充分混匀,避光下室温孵育 15 min。每管加入 2 mL 红细胞裂解液,涡旋震荡混匀,室温避光静置 20 min,400 $\times$ g 离心 5 min,小心弃去上清。加入 2 mL PBS 液重悬洗涤细胞,再次以 400 $\times$ g 离心 5 min,小心弃去上清。加入 0.5 mL PBS 液再次重悬细胞后上机检测,计数 20 000 个细胞。采用 FlowJo 7.6.1 软件进行数据分析。

2.5 ELISA 法测定血清 IFN- γ 和 IL-4 水平

小鼠摘眼球无菌取血,EDTA 抗凝,1 000 $\times$ g 离心 30 min 收集血浆样本,按 ELISA 试剂盒说明书检测各组血浆 IFN- γ 和 IL-4 水平。

2.6 数据处理和统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行数据分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间样本进行方差齐性检验后,采用 LSD-t 检验进行组间两两比较。

3 结果

3.1 体质量变化情况

如图1所示,第4~6天给予环磷酰胺造模后,除对照组外,各组小鼠体质量均有所下降,以模型组下降最为明显,复方HD各剂量及香菇多糖对体质量的维持起一定作用,复方HD组对于降低体质量减少的程度呈现出一定的浓度依赖性。

3.2 脾指数及胸腺指数

如表1所示,各组之间脾指数差异不大,无统计学意义,说明环磷酰胺对小鼠脾指数影响较小,

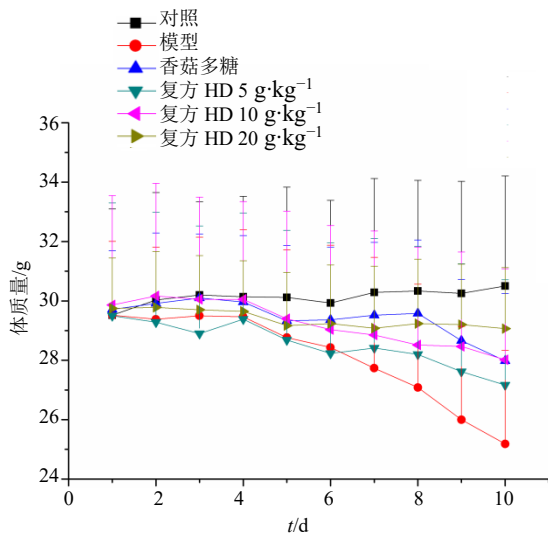


图1 小鼠时间-体质量变化曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Changes of body weight over time in mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表1 脾指数及胸腺指数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Spleen index and thymus index ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	剂量/ (g·kg ⁻¹)	脾指数/ (mg·g ⁻¹)	胸腺指数/ (mg·g ⁻¹)
对照	—	4.503 6±0.592 7	0.955 9±0.253 7
模型	—	4.190 6±0.786 9	0.275 6±0.187 3*
香菇多糖	0.2	5.044 3±1.201 8	0.393 8±0.152 1
复方 HD	5	4.214 5±1.074 9	0.433 5±0.167 9
	10	4.910 9±0.842 6	0.596 7±0.322 3 [#]
	20	4.549 6±1.294 7	0.737 9±0.264 1 [#]

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

但各给药组与模型组比较有升高趋势;环磷酰胺导致小鼠胸腺指数下降,与对照组比较,模型组小鼠胸腺指数明显下降 ($P<0.05$);与模型组比较,各剂量复方HD组及香菇多糖组胸腺指数有所恢复,中、高剂量复方HD组差异显著 ($P<0.05$)。

3.3 各组T细胞亚群分析结果

如表2所示,与对照组比较,模型组小鼠CD3⁺、CD3⁺CD4⁺细胞数、CD4⁺/CD8⁺比值明显降低 ($P<0.05$);与模型组比较,各给药组在各项数据上都有所恢复,复方HD低剂量组无统计学差异,但有一定趋势;复方HD中、高剂量组及香菇多糖组CD3⁺、CD3⁺CD4⁺细胞数、CD4⁺/CD8⁺比值均显著升高,差异显著 ($P<0.05$)。复方HD高剂量组效果更明显,呈浓度相关性,中剂量组与香菇多糖组效果相当。

表2 T细胞亚群分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Results of T cell subsets ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	剂量/ (g·kg ⁻¹)	CD3 ⁺ /%	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /%	CD3 ⁺ CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
对照	—	22.85±3.40	17.69±2.50	4.80±1.23	3.81±0.72
模型	—	12.01±2.62*	7.97±1.73*	3.88±0.92	2.07±0.23*
香菇多糖	0.2	15.35±3.17 [#]	11.43±2.46 [#]	3.57±1.18	3.44±1.24 [#]
复方 HD	5	12.02±1.45	8.84±1.37	2.98±0.47	3.03±0.71
	10	15.58±3.45 [#]	11.73±2.28 [#]	3.57±1.24	3.49±0.81 [#]
	20	20.08±4.40 [#]	15.07±3.02 [#]	4.71±1.51	3.39±0.88 [#]

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

3.4 血浆IFN-γ及IL-4测定结果

如表3所示,与对照组比较,模型组小鼠血浆IFN-γ含量及IFN-γ/IL-4均显著降低 ($P<0.05$),各组间血浆IL-4含量无明显差异;与模型组比较,除复方HD低剂量组IFN-γ/IL-4外,各剂量复方HD

及香菇多糖组血浆IFN-γ含量及IFN-γ/IL-4均显著提高 ($P<0.05$),且呈浓度依赖性。

4 讨论

环磷酰胺是临床上广泛应用的烷化剂类抗癌化疗药物之一,具有高度且广谱的细胞毒性作用,目

表3 血浆 IFN- γ 及 IL-4 测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Results of IFN- γ and IL-4 in plasma ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	剂量/(g·kg ⁻¹)	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ /IL-4
对照	—	203.78±6.58	25.48±3.28	8.13±1.18
模型	—	56.01±7.98*	24.52±4.70	2.38±0.66*
香菇多糖	0.2	118.92±5.84 [#]	24.84±9.88	5.54±2.32 [#]
复方 HD	5	79.86±7.33 [#]	28.04±9.02	3.08±0.82
	10	116.25±6.97 [#]	31.56±9.24	3.97±1.13 [#]
	20	164.54±18.68 [#]	26.12±3.02	6.40±1.13 [#]

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

前除了应用于治疗恶性淋巴瘤、急性白血病、多发性骨髓瘤、乳腺癌等恶性肿瘤外,也常常被用作免疫抑制剂,如骨髓移植时免疫抑制以减少排斥反应以及治疗一些自身免疫性疾病^[5]。环磷酰胺可作用于细胞周期的任何阶段,影响 DNA 的合成,抑制细胞增殖分裂,对细胞免疫和体液免疫都起到抑制作用,使循环中 T、B 淋巴细胞绝对数目减少,经常被用于动物实验中免疫抑制模型的建立^[6]。本研究表明 ip 环磷酰胺 40 mg/kg,连续 3 d,模型组小鼠出现活动减少,弓背、毛蓬竖、体质量减轻等体征,并且体质量、胸腺指数、CD3⁺细胞数、CD3⁺CD4⁺细胞数、CD3⁺CD8⁺细胞数及 CD4⁺/CD8⁺与对照组小鼠比较明显降低,表明免疫抑制小鼠模型建立成功^[7]。复方 HD 各剂量组及香菇多糖组小鼠,相比于模型对照组小鼠活动状态有所改善,对于体质量的维持起到一定作用,并且其对于小鼠体质量的维持呈现出浓度相关性。

免疫系统由免疫器官、免疫细胞和免疫分子组成,免疫器官的发育状态直接影响机体的免疫功能和抗病能力。胸腺和脾脏是机体最重要的免疫器官,是淋巴细胞分化、成熟及产生免疫效应的主要场所,其脏器指数可在一定程度上可以反映机体免疫功能的强弱^[8]。本研究中,模型组小鼠的脾指数和胸腺指数均有所降低,复方 HD 各剂量组及香菇多糖组小鼠的脾指数和胸腺指数均有所恢复,其中脾指数变化程度较小,无统计学意义,分析可能与小鼠体质量变化程度较大有关,胸腺指数变化较大,以复方 HD 高剂量组对于胸腺指数的恢复效果最为明显。

T 淋巴细胞在免疫系统中具有非常重要的作用,除了其本身的细胞免疫效应外,还能调控 B 淋巴细胞介导的体液免疫应答。其细胞功能取决于 T 淋巴细胞总值(CD3⁺)及其亚群(CD4⁺和 CD8⁺)

的相对组成。T 淋巴细胞亚群的稳定是维持机体正常免疫功能所必需的,是临床上评估机体免疫功能的重要指标^[9-10]。本研究中,与对照组小鼠比较,模型组小鼠 CD3⁺、CD4⁺细胞数及 CD4⁺/CD8⁺比值均显著降低,复方 HD 中、高剂量组及香菇多糖组 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺与模型对照组比较均有所提升,差异具有统计学意义,且高剂量组效果更为明显,呈浓度依赖性,中剂量组与香菇多糖组效果相当。

根据免疫效应功能不同,T 淋巴细胞又可分为辅助性 T 细胞(Th)、细胞毒性 T 细胞(Tc)和调节性 T 细胞(Treg)。Th 细胞是一类重要的淋巴细胞亚群,其分泌的细胞因子对机体细胞免疫和体液免疫起着重要的调控功能^[11]。Th1 和 Th2 是辅助性 T 细胞中的两个重要的亚群,最早在 1989 年由 Mosmann 和 Coffman^[12]提出,初始 CD4⁺ T 细胞接受抗原刺激后首先分化为 Th0 细胞,Th0 细胞的分化方向受抗原的性质、局部环境及细胞因子等多种因素的调控,其中细胞因子的种类是最为重要的影响因素。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2、IL-12 等细胞因子,促进细胞免疫应答,Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等细胞因子,促进体液免疫应答^[13]。正常情况下,它们的功能和数量处于动态平衡状态,维持着机体正常的免疫应答,一旦失衡,必然导致细胞因子网络的紊乱,从而影响细胞免疫和体液免疫^[14-15]。IFN- γ 主要由 Th1 细胞分泌而来,能够促进 Th0 细胞向 Th1 细胞转化,在抗体内感染、肿瘤免疫监视和免疫调节中起到重要的作用。IL-4 主要由 Th2 细胞分泌,主要功能是促进活化的 B 细胞增殖,诱导体液的产生,促进 Th0 细胞向 Th2 细胞转化,对 Th2 细胞的分化和增殖具有不可替代的作用。同时,IFN- γ 又可抑制 Th2 的分化,

而 IL-4 抑制 Th1 的分化,就这样两种因子的相互作用相互影响共同维持着 Th1 和 Th2 细胞间的平衡,调节着机体的免疫应答^[16]。本研究,与对照组比较,各组血浆 IFN- γ 水平及 IFN- γ /IL-4 均有所降低;各组小鼠血浆 IL-4 水平变化无明显差异;与模型组比较,复方 HD 各剂量组及香菇多糖组小鼠血浆 IFN- γ 水平及 IFN- γ /IL-4 均有所提高,且复方 HD 各剂量组呈浓度相关性;表明当给予环磷酰胺后, Th1/Th2 向 Th2 偏移,复方 HD 一定程度上纠正了 Th1/Th2 向 Th2 偏移,维持着 Th1 和 Th2 细胞间的平衡,发挥了免疫调节作用。

综上所述,本研究结果表明复方 HD 能够增强环磷酰胺诱导的免疫低下小鼠的免疫功能,且具有浓度相关性。应用复方 HD 作为免疫调节的有效辅助疗法具有巨大的潜力,本研究为该药进一步机制研究和临床应用提供基础。

参考文献

- [1] 刘春发,胡建新,屈新辉. 中药制剂对免疫功能促进作用的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2013(28): 27-33.
- [2] 王爱萍,徐今宁. 中药免疫调节作用研究进展 [J]. 中国药业, 2011(3): 75-77.
- [3] 陈苏宁,于飞,蔡炜嵩,等. 中西医结合治疗晚期神经母细胞瘤 44 例报道 [J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2008, 13(4): 178-180.
- [3] 陈苏宁,于飞,蔡炜嵩,等. 中西医结合治疗晚期神经母细胞瘤 44 例报道 [J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2008, 13(4): 178-180.
- [4] Wang J, Tong X, Li P, et al. Immuno-enhancement effects of Shenqi Fuzheng Injection on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(3): 788-795.
- [5] Mei Y X, Chen H X, Zhang J, et al. Protective effect of chitooligosaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 62: 330-335.
- [6] Hu T, Jiang C, Huang Q, et al. A comb-like branched beta-D-glucan produced by a Cordyceps sinensis fungus and its protective effect against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. Carbohydr Polym, 2016, 142: 259-267.
- [7] 史晶晶,时博,苗明三. 黄芪多糖对环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能的影响 [J]. 中医学报, 2016, (2): 243-246.
- [8] Wang Y, Qi Q, Li A, et al. Immuno-enhancement effects of Yifei Tongluo Granules on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 194: 72-82.
- [9] Bellissimo F, Pinzone M R, Celesia B M, et al. Baseline CD4/CD8 T-cell ratio predicts prompt immune restoration upon cART initiation [J]. Curr Hiv Res, 2016. DOI: 10.2174/1570162X14666160414111554
- [10] Sabins N C, Harman B C, Barone L R, et al. Differential Expression of Immune Checkpoint Modulators on In Vitro Primed CD4⁺ and CD8⁺ T Cells [J]. Front Immunol, 2016, 7: 221.
- [11] Yamane H, Paul W E. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4⁺ T cells toward distinct T-helper cell subsets [J]. Immunol Rev, 2013, 252(1): 12-23.
- [12] Mosmann T R, Coffman R L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties [J]. Annu Rev Immunol, 1989, 7: 145-173.
- [13] Blom L, Poulsen L K. *In vitro* Th1 and Th2 cell polarization is severely influenced by the initial ratio of naive and memory CD4⁺ T cells [J]. J Immunol Methods, 2013, 397(1/2): 55-60.
- [14] Cheadle E J, Sheard V, Rothwell D G, et al. Differential role of Th1 and Th2 cytokines in autotoxicity driven by CD19-specific second-generation chimeric antigen receptor T cells in a mouse model [J]. J Immunol, 2014, 192(8): 3654-3665.
- [15] Hussein M M, Ahmed M M. The Th1/Th2 paradigm in lambda cyhalothrin-induced spleen toxicity: The role of thymoquinone [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2016, 41: 14-21.
- [16] Li-Weber M, Krammer PH. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(7): 534-543.