

生脉类制剂生产过程中红参、麦冬、五味子固体废弃物组合对小鼠免疫功能的影响

郭晓彤¹, 倪秀一², 李汶泽¹, 万梅绪^{3, 4}, 张燕欣^{3, 4}, 李智^{3, 4}, 李德坤^{3, 4*}, 叶正良^{5*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 河北中医学院, 河北 石家庄 050200

3. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300402

4. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300402

5. 天士力医药集团股份有限公司, 天津 300410

摘要: 目的 以注射用益气复脉(冻干)生产过程中弃去的固体废弃物为例, 探讨生脉类制剂生产过程中红参、麦冬、五味子固体废弃物组合(SMGFW)对小鼠免疫功能的影响。方法 将280只SPF级ICR雄性小鼠随机分成4组: 对照组和SMGFW低、中、高剂量(0.86、1.71、3.43 g·kg⁻¹)组, 每组70只。通过刀豆蛋白A(ConA)诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验、绵羊红细胞(SRBC)诱导小鼠足跖增厚实验、抗体生成细胞检测实验、半数溶血值(HC₅₀)测定实验、碳廓清实验、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法)和NK细胞活性测定实验(乳酸脱氢酶测定法)评价SMGFW增强小鼠免疫功能的作用。结果 与对照组比较, SMGFW低剂量组小鼠血清抗体水平显著增加($P<0.001$); SMGFW中剂量组小鼠脾脏指数显著增加($P<0.05$), 小鼠脾淋巴细胞增殖率显著增加($P<0.001$), 小鼠足跖差值显著增加($P<0.001$), 小鼠溶血空斑数显著增加($P<0.001$), 小鼠血清抗体水平显著增加($P<0.001$), 小鼠碳廓清吞噬指数显著增加($P<0.05$), 小鼠巨噬细胞对鸡红细胞吞噬百分率显著增加($P<0.001$), 吞噬指数显著增加($P<0.001$), 小鼠NK细胞活性显著增加($P<0.001$); SMGFW高剂量组小鼠体质量增加值显著降低($P<0.01$), 小鼠足跖差值显著增加($P<0.001$), 小鼠溶血空斑数显著增加($P<0.001$), 小鼠血清抗体水平显著增加($P<0.001$), 小鼠巨噬细胞对鸡红细胞吞噬百分率显著增加($P<0.05$), 吞噬指数显著增加($P<0.01$), 小鼠NK细胞活性显著增加($P<0.01$)。结论 生脉类制剂生产过程中红参、麦冬、五味子固体废弃物组合具有增强小鼠免疫功能的作用。

关键词: 生脉制剂; 固体废弃物; 免疫功能; 细胞免疫; 体液免疫; 吞噬功能; 自然杀伤细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)10-2193-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.10.017

Effects of solid waste combination of *Panax ginseng*, *Ophiopogon japonicus* and *Schisandra chinensis* on immune function of mice during production of Shengmai preparations

GUO Xiaotong¹, NI Xiuyi², LI Wenzhe¹, WAN Meixu^{3, 4}, ZHANG Yanxin^{3, 4}, LI Zhi^{3, 4}, LI Dekun^{3, 4}, YE Zhengliang⁵

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

3. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300402, China

4. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of TCM Injections, Tianjin 300402, China

5. Tasly Holding Group Company Limited, Tianjin 300410, China

Abstract: **Objective** Carry out research on solid waste combination of *Panax ginseng*, *Ophiopogon japonicus* and *Schisandra chinensis* (SMGFW) in the production process of biogenic preparations, taking the solid waste discarded during the production of

收稿日期: 2023-05-05

第一作者: 郭晓彤,男,在读硕士研究生,研究方向为中药药理及药物分析。E-mail: xiaotongG666@163.com

*共同通信作者: 李德坤,男,高级工程师,主要从事中药工艺、质量控制、中药药理及药物警戒研究。E-mail: lidekun@tasly.com

叶正良,男,研究员,研究方向为中药质量标准国际化研究。E-mail: yezl@tasly.com

Yiqi Fumai Lyophilized Injection product for injection as an example, the effect of different doses of SMGFW on the immune function of mice was discussed. **Methods** A total of 280 male scrubs with SPF-grade ICR were randomly divided into four groups: control group, low, medium and high doses of SMGFW(0.86, 1.71, 3.43g·kg⁻¹), 70 in each group. The effect of SMGFW in enhancing the immune function of mice was evaluated by canavalin A (ConA)-induced mouse splenic lymphocyte transformation experiment, sheep red blood cell (SRBC) -induced mouse plantar thickening experiment, antibody-producing cell detection experiment, half-hemolytic value (HC₅₀) determination experiment, carbon clearance experiment, mouse intraperitoneal macrophage phagocytosis chicken erythrocytes experiment (semi-*in vivo* method) and NK cell activity determination experiment (lactate dehydrogenase assay). **Results** Compared with the control group, The serum antibody level of mice in the low-dose group of SMGFW increased significantly ($P < 0.001$), the spleen index of mice in the medium-dose group of SMGFW increased significantly ($P < 0.05$), the value-added rate of splenic lymphocytes in mice increased significantly ($P < 0.001$), the plantar difference of mice increased significantly ($P < 0.001$), the number of hemolytic spots in mice increased significantly ($P < 0.001$), the serum antibody level of mice increased significantly ($P < 0.001$), the carbon clearance phagocytosis index of mice increased significantly ($P < 0.05$), and the percentage of macrophages engulfing chicken erythrocytes by mouse macrophages increased significantly ($P < 0.001$), the phagocytosis index increased significantly ($P < 0.001$), the activity of mouse NK cells increased significantly ($P < 0.001$), the body weight gain value of mice in the high-dose group of SMGFW was significantly decreased ($P < 0.01$), the plantar difference of mice increased significantly ($P < 0.001$), the number of hemolytic empty spots in mice was significantly increased ($P < 0.001$), the serum antibody level of mice was significantly increased ($P < 0.001$), the percentage of mouse macrophages to engulf chicken red blood cells was significantly increased ($P < 0.05$), the phagocytic index was significantly increased ($P < 0.01$), and the activity of mouse NK cells was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** SMGFW has the effect of enhancing the immune function of mice.

Key words: Shengmai preparations; solid waste; immune function; cellular immunity; humoral immunity; phagocytic function; natural killer cell

中药废弃物是指在药材及饮片生产过程、中药提取物制备过程或中药配方颗粒等生产过程中,产生但未被利用的中药资源生物体废弃组织器官以及中药废渣、废水、废气等。中药废弃物主要按3种类型分类,即药材生产与加工过程产生的废弃物分类、中药资源深加工产业化过程产生的废弃物分类、废弃物理化性质分类。其中中药资源深加工产业化过程产生的废弃物包括固体废弃物(药渣及沉淀物)、液体废弃物、气体废弃物^[1]。在中药为主体的资源性产品制造过程中,由于提取和精制过程资源性物质的利用率偏低或一些制剂工艺规定的提取成分等因素,导致部分固体废弃物中的资源性化学成分未被充分利用,而这些化学成分仍具有一定的药效作用。如苦参在中药工业生产中以酸性溶液提取苦参碱类成分为主,采取醋酸乙酯渗漉法提取药渣,得到的总黄酮中以具有抗菌、抗炎活性的异戊烯基黄酮类成分为主^[2];温莪术药渣中含有姜黄素类活性成分,该类物质具有抗氧化作用,可以消除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)等自由基,能减少B16细胞黑色素水平、抑制酪氨酸酶活性,具有美白作用,可进行二次开发^[3]。因此对中药固体废弃物中的资源性成分应充分利用,进一步发挥其药效作用。

生脉制剂的剂型包括颗粒剂、注射液、片剂、胶

囊剂等^[4]。生脉制剂在深加工产业化过程中采用不同的提取工艺,如用高浓度乙醇对红参药材进行提取,用纯化水分别煎煮麦冬、五味子药材,3味药材在提取后经滤过,药渣被弃去;麦冬、五味子药材提取液分别浓缩后,经两次醇沉步骤后产生的沉淀物被弃去^[5]。红参药材中的人参皂苷、多糖类成分具有增强免疫、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤的药理作用^[6]。麦冬药材中的皂苷、黄酮及多糖类成分具有抗氧化、抗衰老、抗炎、免疫调节的药理作用^[7]。五味子药材中的木脂素、多糖类成分具有抗炎、抗氧化、调节免疫系统的药理作用^[8]。不同功效的中药在增强免疫功能方面具有显著的药效,如补气类的人参、补阴类的麦冬及敛肺涩肠类的五味子等,均具有免疫调节作用^[9]。药渣和沉淀物属于固体废弃物,应充分利用固体废弃物中的资源性成分,因此有必要探究生脉类制剂生产过程中固体废弃物(SMGFW)中剩余的资源性化学成分是否具有提高免疫力的药效。

根据《保健食品功能检验与评价技术指导原则(2022年版)》中免疫功能的检测方法,本研究检测注射用益气复脉(冻干)生产过程中的SMGFW对正常小鼠细胞免疫功能、体液免疫功能、单核-巨噬细胞功能、NK细胞活性的影响,探讨SMGFW在免疫增强方面的药效,为后期将生脉制剂固体废弃物

制备成宠物饲料提供参考,从而提高中药资源利用价值。

1 材料

1.1 原料及SMGFW的制备

红参来源于吉林长白山、麦冬来源于四川绵阳、五味子来源于辽宁新宾,经天津天士力之骄药业有限公司质量检验部门鉴定分别为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎、百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker. - Gawl. 的干燥块根和木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实。

红参固体废弃物:红参药材用高浓度的乙醇以固定比例的料液比回流提取3次,滤过,滤渣即为红参药渣,药渣烘干后粉碎备用。其中总皂苷质量分数(以人参皂苷Re计)约2%,多糖质量分数约50%。

麦冬固体废弃物:麦冬药材分别用纯化水以固定比例的料液比煎煮提取3次,滤过,滤渣即为麦冬药渣,药渣烘干后粉碎备用;一次醇沉沉淀、二次醇沉沉淀:提取并滤过后的滤液为药材提取液,浓缩后通过水提醇沉得到一次醇沉沉淀、二次醇沉沉淀,2次醇沉沉淀烘干后备用。麦冬药渣中麦冬皂苷D质量分数约0.01%,甲基麦冬黄烷酮A、B质量分数分别约0.01%、0.01%;2次醇沉沉淀中多糖质量分数约30%。将药渣烘干粉碎后与2次醇沉沉淀合并。

五味子固体废弃物:制备方法同麦冬固体废弃物。药渣中五味子醇甲质量分数约1%,两次醇沉沉淀中多糖质量分数约10%。将药渣烘干粉碎后与两次醇沉沉淀合并。

SMGFW中红参固体废弃物约占19%,麦冬固体废弃物约占52%,五味子固体废弃物约占29%。制备的SMGFW总质量约为3.3 g,其中对应的红参、麦冬、五味子的生药量分别约为0.7、2.2、1.1 g,SMGFW的总回收率约为83%。SMGFW搭配比例及剂量设置参考《中国兽药典》中人参、五味子药材项下犬、猫的用法与用量,麦冬药材项下兔、禽的用法与用量。

1.2 主要试剂

鸡红细胞(批号230415)、绵羊红细胞(SRBC,批号230410),广州鸿泉生物科技有限公司;YAC-1细胞(普诺赛公司)。

印度墨汁(批号20221102)、Giemsa染液(批号20221115),福州飞净生物科技有限公司;都氏试剂(厦门海标科技有限公司,批号20221121H);SA

缓冲液(北京雷根生物技术有限公司,批号1123A22);胎牛血清(Hyclone公司,批号DF29570026);青霉素-链霉素、台盼兰、Hank's液(上海碧云天生物技术有限公司);RPMI 1640细胞培养液(Gibco公司,批号2462011);琼脂糖(上海生工生物工程股份有限公司,批号E919BA0006);琼脂粉(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号20220318);刀豆蛋白A(ConA,北京兰博利德商贸有限公司);乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号110922230405);CCK-8试剂(东仁化学科技有限公司,批号AK218)盐酸、丙酮、甲醇、酸性异丙醇(天津市致远化学试剂有限公司)。

1.3 实验动物

SPF级ICR小鼠280只,雄性,体质量20~25 g;SPF级Hartley豚鼠6只,雌性,体质量180~200 g,均购于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为SCXK(京)2021-0011。分笼饲养于天士力控股集团有限公司动物设施屏障系统内,动物使用许可证SYXK(津)2022-0004。动物实验严格按照天津天士力集团动物伦理委员会标准执行,伦理批号为TSL-IACUC-2023-18。

1.4 主要仪器

MS204TS电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);Infinite M200酶标仪(东胜创新生物科技有限公司);STI6R高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技中国有限公司);MBR-022UP往复式恒温振荡器(日本TAITEC公司);18ESA数显游标卡尺(德国Mahr公司);80i正置荧光显微镜(日本Nikon公司);Heracell I50二氧化碳培养箱(Thermo公司);96孔培养板(Costar公司)。

2 方法

2.1 实验分组和给药

将ICR小鼠随机分为4组:对照组和SMGFW低、中、高剂量(0.86、1.71、3.43 g·kg⁻¹)组,每组70只。ig给药(体积20 mL·kg⁻¹),每天1次,连续30 d。对照组ig纯化水。

2.2 小鼠一般情况

给药期间,观察小鼠的生理状态;记录小鼠从给药开始的始质量及处死前的终质量。

2.3 ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验

小鼠ig给药第30天,无菌取脾,称量小鼠脾脏质量,计算脾脏指数。将脾脏放置于适量无菌

Hank's液的平皿中,用镊子磨碎,制成单个的细胞悬液,经200目筛网滤过,用Hank's液洗2次,每次1 000 r·min⁻¹离心10 min。将细胞悬浮于完全培养液中,用台酚兰染色计数后并调整细胞浓度为 $3 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将每份细胞悬液分2孔加到6孔培养板中,每孔1 mL,一孔加75 μL 的ConA液($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),另一孔作为对照,于5% CO₂、37 °C的孵箱中培养72 h。培养结束前4 h,每孔吸去上清液0.7 mL,加入0.7 mL RPMI1640细胞培养液,通过CCK-8法进行检测,以570 nm的波长用酶标仪检测吸光度(A)值,通过A值计算脾淋巴细胞增殖率。

$$\text{脾淋巴细胞增殖率} = (A_{\text{ConA孔}} - A_{\text{对照孔}}) / A_{\text{对照孔}}$$

2.4 SRBC诱导小鼠足跖增厚实验

在给药26 d后,用2%的SRBC对小鼠进行ip免疫,每只0.2 mL。免疫4 d后,测定每只小鼠的左后足跖部厚度,连续测量3次,取其平均值,然后在测量部位sc 20%的SRBC,每只20 μL ,注射后于24 h测量左后足跖部厚度,连续测量3次,取其平均值。以注射前后小鼠足跖平均厚度的差值来表示足跖增厚的程度。

足趾差值 = 注射后足趾厚度均值 - 注射前足趾厚度均值

2.5 抗体生成细胞检测实验

采集6只豚鼠血,分离出血清,混合,将1 mL压积SRBC加入到5 mL血清中,振荡,3 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清作为补体。在清洁玻片上刷上一层琼脂糖(0.5 g琼脂糖加双蒸水至100 mL,煮沸至透明),晾干备用。

在给药26 d后,用2% SRBC对小鼠进行ip免疫,每只0.2 mL。免疫4 d后,将小鼠脱颈椎处死,无菌取脾,将脾脏放置于适量无菌Hank's液的平皿中,用镊子磨碎,制成单个的细胞悬液,经200目筛网滤过,用Hank's液洗2次,使细胞悬浮于5 mL的完全培养液中,使脾细胞浓度为 $5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将表层培养基(1 g琼脂糖加双蒸水至100 mL)加热溶解后,水浴保温,与等量的Hank's液混合,分装至小试管,再向管内加50 μL 10%的SRBC、20 μL 脾细胞悬液,混匀,倾倒入玻片上,做平行片,待琼脂凝固后,将玻片水平扣放在片架上,放入二氧化碳培养箱中孵育1 h,再将用SA缓冲液稀释的补体(1:8)加入到玻片架凹槽内,继续温育1 h,计数溶血空斑数。

2.6 半数溶血值(HC₅₀)测定实验

补体的制备同“2.5”项。给药26 d后,用2%的SRBC对小鼠进行ip免疫,每只0.2 mL。免疫4 d

后,摘除小鼠眼球取血于离心管内,6 000 r·min⁻¹离心4 min,收集血清。设置样品孔和空白孔,样品孔:取血清用SA缓冲液稀释200倍,每孔加入稀释后的血清50 μL ;空白孔:每孔加入50 μL 的SA缓冲液。再依次加入10% SRBC 25 μL 、补体50 μL 。置37 °C恒温振荡器中保温30 min,冰浴终止反应,1 500 r·min⁻¹离心10 min,样品孔和空白孔各取上清液50 μL 加入到另一96孔培养板内,加150 μL 的都氏试剂。同时设半数溶血孔,加入的10% SRBC 12.5 μL ,再加都氏试剂187.5 μL 。充分混匀,放置10 min后,采用酶标仪于540 nm波长处测定各孔的A值。计算HC₅₀。

$$\text{HC}_{50} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{SRBC半数溶血}} - A_{\text{空白}}) \times 200$$

2.7 小鼠碳廓清实验

小鼠ig给药第30天,将印度墨汁原液用生理盐水稀释3倍,得印度墨汁工作液,小鼠iv印度墨汁工作液($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)后2、10 min从内眦静脉丛取血20 μL ,立即将其加入到2 mL 0.1%的Na₂CO₃溶液中,Na₂CO₃溶液作为空白对照,用酶标仪在600 nm波长处测定2(t_1)、10(t_2)min的A₁、A₂值。将小鼠处死,取其肝脏和脾脏,分别称质量,计算其吞噬指数。

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

$$\text{碳廓清吞噬指数} = \text{体质量} / (\text{肝质量} + \text{脾质量}) \times \sqrt[3]{k}$$

2.8 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(半体内法)

取琼脂3 g,加水100 mL,加热煮沸至透明,用3%的琼脂在玻片上划2个封闭的圆圈,晾干后在每个玻片上缠3次压敏胶带,形成两个凹槽,备用。

小鼠ig给药第30天,每只小鼠ip 20%鸡红细胞悬液1 mL,1 h后将小鼠脱颈椎处死,剪开腹壁皮肤,ip 2 mL 0.9%的氯化钠注射液,放置摇床2 min,吸出腹腔液1 mL,平均滴于2片载玻片上,放入湿盒中,在37 °C孵箱温孵30 min,孵毕,用0.9%的氯化钠注射液漂洗,晾干后以1:1丙酮及甲醇溶液固定,Giemsa染色3 min,蒸馏水漂洗。在油镜下计数巨噬细胞,每张片以100个计,计算巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬百分率及吞噬指数。

$$\text{吞噬百分率} = \text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数} / \text{计数的巨噬细胞数}$$

$$\text{吞噬鸡红细胞指数} = \text{被吞噬的鸡红细胞数} / \text{计数的巨噬细胞数}$$

2.9 自然杀伤(NK)细胞活性测定

靶细胞的传代:实验前将YAC-1细胞进行传代培养,用Hank's液洗3次,用RPMI1640细胞培养液

调整浓度为 $4 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,即为靶细胞。

效应细胞的制备:小鼠 ig 给药第30天,无菌取脾,将脾脏放置于适量无菌 Hank's 液的平皿中,用镊子磨碎,制成单个的细胞悬液,经200目筛网滤过,用台酚兰染色计数后调整细胞浓度为 $2 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,即为效应细胞。

NK 细胞活性检测:取靶细胞和效应细胞各100 μL (效靶比50:1),加入96孔培养板中,自然释放孔加靶细胞和培养液各100 μL ,最大释放孔加靶细胞和1% NP40各100 μL ,反应孔加靶细胞和效应细胞各100 μL ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养4 h,然后将96孔培养板1500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,每孔吸取上清100 μL 加入到LDH试剂盒中,在酶标仪490 nm处测定A值。

表1 SMGFW对小鼠体质量及脾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of SMGFW on body weight and spleen/body weight ratio of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	初始体质量/g	终末体质量/g	体质量增加值/g	脾脏指数/($\times 10^{-3}$)
对照	—	20.65 \pm 0.69	34.20 \pm 0.81	13.55 \pm 1.10	4.14 \pm 0.76
SMGFW	0.86	20.91 \pm 1.10	35.03 \pm 1.11	14.12 \pm 1.47	4.17 \pm 0.88
	1.71	20.28 \pm 0.81	35.58 \pm 0.82*	15.30 \pm 0.88	5.06 \pm 0.76*
	3.43	21.22 \pm 0.89	34.48 \pm 1.16	10.66 \pm 1.85**	4.59 \pm 0.66

与对照组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 SMGFW对小鼠细胞免疫功能的影响

在ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验中,与对照组相比,SMGFW中剂量组小鼠的脾淋巴细胞增殖率显著增加($P < 0.001$),其他剂量组小鼠的脾淋巴细胞增殖率均无显著差异。SRBC诱导小鼠足跖增厚结果表明,与对照组相比,SMGFW中、高剂量组小鼠的足跖差值均显著增加($P < 0.001$),低剂量组小鼠的足跖差值无显著差异。结果表明,SMGFW中剂量组提高小鼠细胞免疫能力效果较好。结果见表2。

3.3 SMGFW对小鼠体液免疫的影响

由表3可知,小鼠抗体生成细胞检测结果表明,与对照组相比,SMGFW中、高剂量组小鼠的溶血空斑数均显著增加($P < 0.001$),低剂量组小鼠的溶血空斑数无显著差异。与对照组相比,SMGFW低、中、高剂量组小鼠的 HC_{50} 均显著增加($P < 0.001$)。结果表明,SMGFW中、高剂量组可以提高小鼠体液免疫能力。

3.4 SMGFW对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响

由表4可知,以吞噬指数来表示小鼠的碳廓清

$$\text{NK细胞活性} = (A_{\text{反应孔}} - A_{\text{自然释放孔}}) / (A_{\text{最大释放孔}} - A_{\text{自然释放孔}})$$

2.10 数据处理

采用GraphPad 8.02统计软件分析,实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较用单因素检验。

3 结果

3.1 SMGFW对小鼠状态、体质量及脾脏指数的影响

高剂量组小鼠毛色略显暗淡,其他剂量组小鼠毛色发亮,精神状态好,活泼好动,饮水和进食均正常。如表1所示,与对照组相比,SMGFW高剂量组小鼠体质量增加值显著降低($P < 0.01$),其他剂量组小鼠体质量增加值均无显著差异。与对照组相比,SMGFW中剂量组小鼠的脾脏指数显著增加($P < 0.05$),其他剂量组小鼠的脾脏指数均无显著差异。

表2 SMGFW对小鼠淋巴细胞增殖能力及迟发型变态反应的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effects of SMGFW on lymphocyte proliferation and delayed allergic reaction of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	脾淋巴细胞增殖率/%	足跖差值/mm
对照	—	11.92 \pm 2.74	0.68 \pm 0.19
SMGFW	0.86	9.29 \pm 2.20	0.89 \pm 0.15
	1.71	19.94 \pm 19.39***	1.12 \pm 0.15***
	3.43	14.56 \pm 4.59	1.07 \pm 0.13***

与对照组比较:*** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

能力,与对照组相比,SMGFW中剂量组小鼠的碳廓清吞噬指数显著增加($P < 0.05$),其他剂量组小鼠的碳廓清吞噬指数均无显著差异。在半体内法实验中,与对照组相比,SMGFW中、高剂量组小鼠的吞噬百分率均显著增加($P < 0.05, 0.001$),低剂量组小鼠的吞噬百分率无显著差异;SMGFW中、高剂量组小鼠的吞噬指数均显著增加($P < 0.01, 0.001$),低剂量组小鼠的吞噬指数无显著差异。结果表明,

表 3 SMGFW 对小鼠抗体生成细胞数和 HC₅₀ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effects of SMGFW on number of antibody-producing cells and HC₅₀ of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	溶血空斑数/ (个·10 ⁻⁶)	HC ₅₀
对照	—	2.10±1.19	79.83±11.24
SMGFW	0.86	2.90±1.37	103.30±11.44***
	1.71	13.40±4.17***	122.50±15.05***
	3.43	5.70±1.83***	113.30±11.42***

与对照组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

表 4 SMGFW 对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清及巨噬细胞对鸡红细胞吞噬率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effects of SMGFW on carbon clearance of mouse monocyte-macrophages and macrophages on phagocytosis rate of chicken erythrocytes ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	单核-巨噬细胞碳廓清吞噬指数	巨噬细胞对鸡红细胞	
			吞噬百分率/%	吞噬指数
对照	—	5.84±1.04	22.33±2.88	0.73±0.09
SMGFW	0.86	5.91±2.54	21.33±1.75	0.76±0.06
	1.71	8.16±1.58*	28.67±2.16***	1.12±0.10***
	3.43	6.99±1.90	26.33±2.25*	0.91±0.06**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

表 5 SMGFW 对小鼠 NK 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effects of SMGFW on NK cell activity in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	NK 细胞活性/%
对照	—	35.91±1.74
SMGFW	0.86	39.86±5.20
	1.71	54.48±3.05***
	3.43	42.62±6.11**

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

无明显的毒性,并可以增强动物抵抗力及改善肉质,可作为动物饲料添加剂^[10];麦冬水提后药渣中剩余皂苷、黄酮及水提醇沉后的多糖类等成分,麦冬总皂苷能提高受损心肌细胞的活力和搏动频率,改善细胞能量代谢的继发作用,高异黄酮类化合物具有清除氧自由基、抗氧化和心肌保护等作用,麦冬多糖具有降血糖、抗肿瘤、免疫、抗氧化等作用^[11];五味子水提后药渣中主要剩余木脂素,水提醇沉步骤后主要剩余多糖类成分,陶小芳等^[12]对生脉注射液生产过程产生的五味子药渣中木脂素、蛋

白质类等资源性物质进行评价,通过酵母菌固态发酵药渣,为五味子药渣转化为蛋白饲料提供了科学依据。SMGFW 是在经典名方的基础上,对 3 种药材生产过程中的废弃物进行合理搭配,初步对正常小鼠进行提高免疫力方面的研究。

3.5 SMGFW 对小鼠 NK 细胞的影响

由表 5 可知,与对照组相比,SMGFW 中、高剂量组小鼠的 NK 细胞活性均显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001),低剂量组小鼠的 NK 细胞活性无显著差异,结果表明,SMGFW 中、高剂量组可以提高小鼠的免疫力。

4 讨论

生脉制剂的生产过程中,红参醇提后药渣中主要剩余皂苷、多糖类等成分,研究发现,人参药渣添加到小鼠、大鼠及家兔的饲料中,长期饲喂对动物

白质类等资源性物质进行评价,通过酵母菌固态发酵药渣,为五味子药渣转化为蛋白饲料提供了科学依据。SMGFW 是在经典名方的基础上,对 3 种药材生产过程中的废弃物进行合理搭配,初步对正常小鼠进行提高免疫力方面的研究。

参考《保健食品功能检验与评价技术指导原则(2022 年版)》中免疫力增强的检测方法开展关于 SMGFW 的研究,结果显示,在细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞吞噬功能、NK 细胞活性 4 个方面,SMGFW 具有提高免疫力的作用。细胞免疫与体液免疫都属于机体的特异性免疫应答,T 细胞主要介导细胞免疫,B 细胞主要介导体液免疫。给药组小鼠的 T 淋巴细胞受到 ConA 作用后引起脾淋巴细胞增殖。SRBC 与给药组小鼠皮肤蛋白结合为完全抗原,使 T 淋巴细胞致敏,使得小鼠足趾部位发生迟发型变态反应。SRBC 诱导小鼠体内的 B 淋巴细胞,产生的溶血素作为抗 SRBC 的抗体,数值有所增加。均可证明 SMGFW 具有增强小鼠特异性免疫功能。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标志之一,结果证明,SMGFW 可增加小鼠

腹腔巨噬细胞的数量,促进吞噬细菌等外来异物,说明 SMGFW 具有增强小鼠非特异性免疫功能。NK 细胞作为自然杀伤细胞,不需要特异性抗体和抗原,在杀伤靶细胞 YAC-1 时,SMGFW 显著提高小鼠的 NK 细胞活性,具有增强免疫力的作用^[13]。

将 SMGFW 低、中、高剂量组的实验结果进行比较发现,中剂量组提高免疫力的效果最好,高剂量组较好,低剂量组效果一般。高剂量组中的五味子药渣用量最高,五味子药材味酸、甘,性温,五味子药渣在烘干后以木脂素成分为主,味辛,刺鼻气味较强。五味子木脂素用于治疗消化系统疾病,可改善肠道蠕动,可以缓解因胃肠道疾病引起的腹泻症状,五味子醇甲介导的结肠非肾上腺素能可延缓结肠的推进速度,节结肠运输,改善腹泻^[14]。适量的五味子木脂素对消化系统中的不良症状有较好的治疗作用,但过量的木脂素可能会对正常的小鼠消化系统出现抑制作用,实验过程中高剂量组小鼠的体质量增质量值比正常小鼠低,且各项免疫力指标低于中剂量组,可能和 SMGFW 中含有的五味子药渣含量过高有关,后续将继续进行相关研究。

SMGFW 对正常小鼠增强免疫力效果好,后期会对环磷酸胺导致免疫力低下的小鼠继续进行相应的实验^[15],进一步确定其提高免疫力的功效。基于 SMGFW 中的资源性成分能具有其他的药效作用,从小鼠抗疲劳^[16]、抗氧化^[17]的角度出发,对小鼠生理状态、生长性能、各项生化指标等方面进行更深入、细致的研究。郭志欣等^[18]对护肝片生产过程中的五味子药渣进行提取并纯化,得到 3 种五味子多糖,对未经活化的淋巴细胞有促增殖作用,对经 ConA 活化的淋巴细胞增殖有显著促进作用,这为护肝片生产后的五味子药渣深度开发提供了理论基础。本研究对注射用益气复脉(冻干)生产过程中的固体废弃物进行合理搭配,极大程度上对固体废弃物进行利用,同时为生脉制剂在生产过程中产生的废弃物再利用提供参考,响应中药资源产业由线性经济模式向循环经济模式绿色转型的号召,期待实现中药资源产业低碳高效发展的目标^[19]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 段金威,宿树兰,郭盛,等. 中药资源产业化过程废弃物的产生及其利用策略与资源化模式 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2787-2797.
- Duan J A, Su S L, Guo S, et al. Production of castoff

from process in Chinese materia medica resources industrialization as well as resource utilization strategies and modes [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2013, 44(20): 2787-2797.

- [2] 曹雅琦. 苦参水提药渣中异戊烯基黄酮类物质资源价值发现 [D]. 江苏大学, 2020.
- Cao Y Q. Discovery of resource value of isoprenyl flavonoids in *Sophora flavescens* Ait water extracts the residue [D]. Acad J Jiangsu Univ, 2020.
- [3] 夏禹,张文珍,黄真,等. 温莪术药渣再提取工艺及其美白活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(03): 457-464.
- Xia Y, Zhang W Z, Huang Z, et al. Study on the re-extraction process and whitening activity of *Curcuma wenyujin* dregs [J]. Nat Prod Res Dev, 2022, 34(03): 457-464.
- [4] 肖燕. 生脉配方颗粒的制备工艺与质量控制研究 [D]. 成都: 西华大学, 2015.
- Xiao Y. Study on preparation technology and quality control of Shengmai formula granules [D]. Chengdu: Xihua University, 2015.
- [5] 王进. 生脉注射液生产工艺优化与质量标准提升研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- Wang J. Study on optimization of production technology and improvement of quality standard of Shengmai injection [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2013.
- [6] 樊伟旭,詹志来,侯芳洁,等. 红参的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(1): 137-149.
- Fan W X, Zhan Z L, Hou F J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of red ginseng [J]. Nat Prod Res Dev, 2021, 33(1): 137-149.
- [7] 迟宇昊,李暘,申远. 麦冬化学成分及药理作用研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2021, 38(2): 189-192.
- Chi Y h, Li Y, Shen Y. Research progress on chemical components and pharmacological effects of *Ophiopogon japonicus* [J]. Xinxiang Med Univ, 2021, 38(2): 189-192.
- [8] 马艳春,冯天甜,韩宇博,等. 五味子的化学成分和药理研究进展 [J]. 中医药学报, 2020, 48(11): 67-71.
- Ma Y C, Feng T T, Han Y B, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacology of *Schisandra chinensis* [J]. Acta Chin Med Pharm, 2020, 48(11): 67-71.
- [9] 韩飞,彭珍,周志渝,等. 功效性分类中药对提高机体免疫功能的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2549-2555.
- Han F, Peng Z, Zhou Z Y, et al. Research progress in functional classification of Chinese materia medica on improving organism immune function [J]. Chin Tradit

- Herb Drugs, 2016, 47(14): 2549-2555.
- [10] 宋玉琴. 人参药渣添加到动物饲料调节动物抵抗力和肉质的实验研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
Song Y Q. Experimental study on adding ginseng residue to animal feed to regulate animal resistance and meat quality [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2016.
- [11] 范明明, 张嘉裕, 张湘龙, 等. 麦冬的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2020, 37(4): 130-134
Fan M M, Zhang J Y, Zhang X L, et al. Research progress on chemical components and pharmacological action of *Radix ophiopogonis* [J]. Inf Tradit Chin Med, 2020, 37(4): 130-134
- [12] 陶小芳. 生脉注射液生产过程五味子药渣的资源化利用研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
Tao X F. Study on resource utilization of *Schisandra chinensis* dregs in the production process of Shengmai injection [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016.
- [13] 李晓凡, 付颖, 魏庆钢, 等. 复方阿胶粉对小鼠免疫功能的研究 [J]. 预防医学论坛, 2021, 27(11): 876-879.
Li X F, Fu Y, Wei Q G, et al. Study on immunomodulatory functions of Compound Ejiao Power in mice [J]. Preven Med Trib, 2021, 27(11): 876-879.
- [14] 邢楠楠, 屈怀东, 任伟超, 等. 五味子主要化学成分及现代药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 210-218.
Xing N N, Qu H D, Ren W C, et al. Main chemical constituents and modern pharmacological action of *Schisandrae Chinensis Fructus*: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(15): 210-218.
- [15] 胡逸中, 薛征, 胡炆. 黄芪甲苷对环磷酰胺所致免疫抑制小鼠免疫功能的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(8): 1843-1844.
Hu Y Z, Xue Z, Hu Y. Effect of astragaloside IV on immune function of immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(8): 1843-1844.
- [16] 李诺, 杨添淞, 冯楚文, 等. 慢性疲劳综合征动物模型研究概况 [J]. 医学综述, 2022, 28(6): 1144-1149.
Li N, Yang T S, Feng C W, et al. An overview of animal models of chronic fatigue syndrome [J]. Med Recapitul, 2022, 28(6): 1144-1149.
- [17] 张斌, 夏作理, 赵晓民, 等. 氧化应激模型的建立及其评价 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(44): 112-114.
Zhang B, Xia Z L, Zhao X M, et al. Establishment and evaluation of an oxidative stress model [J]. Chin J Clin Rehab, 2006, 10(44): 112-114.
- [18] 郭志欣, 朱俊义, 顾地周, 等. 五味子药渣多糖的提取及其免疫活性 [J]. 东北林业大学学报, 2016, 44(12): 80-82.
Guo Z X, Zhu J Y, Gu D Z, et al. Extraction and immunological activity of polysaccharide from dregs of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bailey [J]. Jour of Northeast Fore University, 2016, 44(12): 80-82.
- [19] 段金彪, 宿树兰, 郭盛, 等. 面向"双碳"目标的中药资源全产业链废弃物及副产物循环利用与循环经济产业发展策略 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(17): 4545-4551.
Duan J A, Su S L, Guo S, et al. Measures for waste and by-product recycling and circular economy of whole industry chain of TCM resources facing carbon peak and carbon neutrality (dual carbon) goals [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(17): 4545-4551.
- [20] 张海波, 申俊龙, 申远, 等. 中药产业化过程中废弃物资源化政策机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 3143-3148.
Zhang H B, Shen J L, Shen Y, et al. Study on policy mechanism of waste reutilization in process of Chinese materia medica industrialization [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(7): 3143-3148.

[责任编辑 兰新新]