

金钗石斛破壁粉对环磷酰胺致免疫低下小鼠免疫功能的调节作用

税小红¹, 税 璘², 牛曼思³, 李薪宇³, 孙 琴³, 庄元春^{3*}

1. 泸州市中医医院 药剂科, 四川 泸州 646000

2. 四川大学 华西临床医学院, 四川 成都 610000

3. 西南医科大学 药学院, 四川 泸州 646000

摘要: 目的 研究金钗石斛破壁粉对免疫低下小鼠免疫功能的影响。方法 将180只小鼠随机分为6组, 每组30只, 分别为对照组、模型组、左旋咪唑(阳性对照, ig给予盐酸左旋咪唑片0.025 g/kg)组及金钗石斛破壁粉低、中、高剂量(0.5、1.0、2.0 g/kg)组。除对照组外, 其余5组于给药前3 d ip 75 mg/kg新配制的环磷酰胺, 每天1次, 连续3 d, 制备免疫功能低下小鼠模型。造模完成后每天ig给药1次, 对照组和模型组给予等体积的生理盐水, 连续14 d。通过计算脾指数与胸腺指数、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验、血清溶血素测定、淋巴细胞转化试验及western blotting检测脾脏中细胞因子IL-2、TNF- α 的蛋白表达, 观察金钗石斛破壁粉对免疫低下小鼠免疫功能的调节作用。结果 与模型组比较, 金钗石斛破壁粉1.0、2.0 g/kg显著升高免疫低下小鼠的脾指数与胸腺指数, 提高巨噬细胞吞噬功能, 升高血清溶血素含量, 促进淋巴细胞转化反应, 上调小鼠脾脏中细胞因子白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的蛋白表达($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 金钗石斛破壁粉显著增强免疫低下小鼠的免疫功能。

关键词: 金钗石斛破壁粉; 免疫低下; 细胞因子; 环磷酰胺; 吞噬功能; 溶血素; 淋巴细胞转化反应

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)12-2189-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.12.010

Effects of *Dendrobium nobile* wall-broken powder on immune function in immunosuppression mice induced by cyclophosphamide

SHUI Xiaohong¹, SHUI Lin², NIU Mansi, LI Xinyu, SUN Qin, ZHUANG Yuanchun

1. Department of pharmacy, Luzhou traditional Chinese medicine hospital, Luzhou 646000, China

2. West China School of Clinical Medicine, Sichuan University, Chengdu 610000, China

3. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: Objective To observe the effects of *Dendrobium nobile* Lindl. wall-broken powder (DNLP) on immune function in immunosuppression mice induced by cyclophosphamide. **Methods** A total 180 mice were randomly divided into six groups, 30 mice in each group, namely control group, model group, levamisole (positive control, ig 0.025 g/kg levamisole hydrochloride tablets) group and low, medium and high dose (0.5, 1.0, 2.0 g/kg) group of DNLP. Except for the control group, the other five groups were ip given 75 mg/kg of cyclophosphamide for three days before administration, once a day for three days to prepare immunodeficient mice model. Mice was ig administered once a day after the completion of the model for 14 consecutive days. The control group and the model group were given saline of the same volume. The effect of DNLP was investigated by spleen index and thymus index, experiment of peritoneal macrophages phagocytizing chicken red blood cells, serum hemolysin test, T lymphocyte proliferation test, and Western blotting to detect IL-2 and TNF- α protein expression of spleen in mice. **Results** Compared with the model group, 1.0g/kg and 2.0g/kg DNLP significantly increased the spleen index, thymus index, and the content of serum hemolysin, improved the phagocytosis of macrophage, and enhanced the T lymphocytes proliferation, and IL-2 and TNF- α protein expression of spleen in immunosuppression mice ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** DNLP can significantly improve the immune function in immunosuppression mice.

收稿日期: 2018-05-07

基金项目: 泸州市科技局支撑项目[2015LZCYD-S09(2/8)]

第一作者: 税小红 E-mail: 1018989427@qq.com

*通信作者: 庄元春(1973-), 女, 副教授, 主要从事道地药材研究。

Key words: *Dendrobium nobile* Lindl. wall-broken powder; immunosuppression; cytokine; cyclophosphamide; phagocytosis; hemolysin; lymphocyte transformation reaction

金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 俗称金钗石、扁金钗、扁黄草,为兰科石斛属多年生附生草本植物。金钗石斛是《中国药典》记载的名贵中药材,具有滋阴清热、生津益胃、清肝明目和润肺止咳等功效,由于其特殊的生存环境和卓越的滋补功效而名列“中华九大仙草”之首,被国际药用植物界称为“药界大熊猫”。《神农本草经》将金钗石斛列为上品,味甘,微寒,无毒,入胃、肾经,具有益胃生津、滋阴清热功效。现代研究发现,金钗石斛中的小分子化学成分主要包括生物碱、萜类、木脂素和酚类等^[1],对心脑血管、消化系统、呼吸系统和眼科等疾病有明显治疗作用。近年来的研究发现,生物大分子多糖也是金钗石斛的主要生物活性分子之一,具有免疫促进、抗氧化、抗白内障等活性^[2-4]。金钗石斛破壁粉是采用超音速气流粉碎方法对金钗石斛进行超微粉碎制备的,以压缩空气或过热蒸汽通过喷嘴产生的超音速高速气流作为颗粒的载体,颗粒与颗粒之间或颗粒与固定板之间发生冲击性挤压、摩擦和剪切等作用,从而达到粉碎的目的^[5-7]。本研究通过计算脾、胸腺指数、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验、血清溶血素测定、淋巴细胞转化实验及 western blotting 法检测脾脏中细胞因子白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的蛋白表达,观察金钗石斛破壁粉对免疫低下小鼠免疫功能的调节作用,旨在为金钗石斛破壁粉的开发应用提供科学的实验依据。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

金钗石斛破壁粉由西南医科大学生药教研室税丕先教授提供,破壁颗粒细度为3~5 μm ,细胞破壁率 $\geq 96\%$ 。环磷酰胺,0.2 g/支,山西德普药业有限公司生产,批号160423;盐酸左旋咪唑片,桂林南药有限公司,批号160713。

鸡红细胞,泸州卫生防疫站提供。RPMI1640培养基,购自Gibco公司;胎牛血清,杭州四季青公司;CCK8试剂盒,碧云天生物技术研究;瑞氏染液,上海生工公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、丙烯酰胺(Arc)、甲叉双丙烯酰胺(Bis)、刀豆蛋白(ConA)和二甲基亚砜(DMSO),美国Sigma公司产品;兔多克隆抗体IL-2、TNF- α 、 β -actin,辣根

过氧化物酶(HRP)标记的二抗,均购自英国Abcam公司。

1.2 动物

昆明种小白鼠,18~22 g,雌雄各半,由西南医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(川)2013-017。给药前后,动物分笼以全价颗粒饲养,自由饮水。室温在22~24 $^{\circ}\text{C}$,湿度50%~60%。

1.3 主要仪器

电子天平(德国Sartorius,型号BT323S);高速冷冻离心机(美国Beckman,型号GS-15R);微量离心机(美国Beckman,型号MSD97K49);酶标仪(美国MD,型号SPECTRA MAX190)。

2 方法

2.1 小鼠分组给药及免疫低下模型的制备

将180只小鼠随机分为6组,每组30只,分别为对照组、模型组、左旋咪唑(阳性对照,ig给予盐酸左旋咪唑片0.025 g/kg)组及金钗石斛破壁粉低、中、高剂量(0.5、1.0、2.0 g/kg)组。除对照组外,其余5组于给药前3 d ip 75 mg/kg新配制的环磷酰胺,每天1次,连续3 d,制备免疫功能低下小鼠模型^[8-9]。造模完成后每天ig给药1次,对照组和模型组给予等体积的0.9%生理盐水,连续14 d。

2.2 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验^[10]

末次给药当日,每组各取小鼠10只,每只小鼠ip 2%淀粉1 mL,24 h后每只小鼠ip新鲜配置的5%鸡红细胞0.5 mL^[7]。处死小鼠,剪开腹部皮肤,经腹膜注射生理盐水2 mL,轻揉腹部1 min后,吸出腹腔洗液涂片于载玻片上。将玻片置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱温育30 min,用生理盐水漂洗、晾干,用丙酮-甲醇溶液1:1固定2 min。晾干后,涂片Giemsa染色30 min,蒸馏水漂洗,磷酸盐缓冲液分色,晾干。油镜下计数200个巨噬细胞,计算巨噬细胞吞噬百分率和吞噬指数。

吞噬率=吞噬红细胞的巨噬细胞数/巨噬细胞总数

吞噬指数=被吞噬的红细胞数/巨噬细胞总数/2

2.3 对免疫低下小鼠免疫器官质量的影响

取腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验小鼠,剖取脾脏和胸腺,用滤纸吸干脏器表面血污,称质量,按下列公式计算脾(胸腺)指数。

脾(胸腺)指数=脾(胸腺)质量/体质量

2.4 血清溶血素形成实验^[11]

ig 3 d后,每组各取小鼠10只,ip 5%鸡红细胞

0.5 mL/只致敏。免疫7 d,摘眼球取血并分离血清。按文献方法^[10]取稀释100倍血清1 mL加5%鸡红细胞、10%补体0.5 mL混匀,置37℃恒温水浴箱温浴30 min,取出放在冰水冷却,离心,取上清液,于酶标仪测540 nm处吸光度(A_{540})值,以半数溶血值(HC_{50})表示溶血素水平。

HC_{50} = 样品 A_{540} 值/半数溶血 A_{540} 值×样品稀释倍数

2.5 对Con A诱导的淋巴细胞转化反应的影响

于末次给药24 h后,取血清溶血素形成实验小鼠,泡入70%酒精5 min,无菌取脾,放入含抗生素生理盐水的培养皿内。浸泡20 min后将脾脏剪切成2~3 mm²的小块,用毛玻片研磨碎,然后用200目不锈钢细胞筛过滤,离心后用含10%小牛血清的RPMI 1640培养基将细胞调成浓度为 3×10^6 /mL的细胞悬液。将脾细胞悬液分2孔加入96孔培养板,每孔90 μ L,一孔加入0.1 mg/mL Con A 10 μ L(终质量浓度为10 μ g/mL)为实验组,另一孔加入10 μ L培养液作为对照。培养48 h后每孔加入CCK-8继续培养1 h,酶标仪450 nm波长下检测各孔 A_{450} 值,按下列公式计算增殖指数(PI)。

$PI = \text{实验组 } A_{450} / \text{对照组 } A_{450}$

2.6 Western blotting检测IL-2、TNF- α 蛋白表达^[12]

末次给药24 h后,每组各取小鼠10只,分离脾脏,匀浆后提取总蛋白,BCA法测蛋白含量,SDS-PAGE胶电泳,转膜后将PVDF膜进行封闭2 h,一抗(IL-2、TNF- α 和 β -actin一抗,1:1 000稀释)孵育1 h后,加入稀释HRP标记的二抗室温或4℃孵育1 h,用Luminate crescendo western HRP Substrate显影液对膜进行预染,在Bio-Rad凝胶成像系统内曝光显影,Quantity One软件分析相对表达量。

3 结果

3.1 对免疫器官质量的影响

与对照组比较,模型组小鼠胸腺、脾指数显著下降($P < 0.01$),证明模型成功。与模型组比较,左旋咪唑及金钆石斛破壁粉1.0、2.0 g/kg显著提高免疫低下小鼠的胸腺指数和脾指数($P < 0.05$ 、 0.01),金钆石斛破壁粉0.5 g/kg显著提高胸腺指数($P < 0.05$),结果见表1。

3.2 对小鼠巨噬细胞功能的影响

与对照组比较,模型小鼠巨噬细胞吞噬指数及吞噬百分率明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,金钆石斛破壁粉高剂量组吞噬百分率及中、高剂量组吞噬指数均显著升高($P < 0.05$ 、 0.01),结果见图1、表2。

表1 金钆石斛破壁粉对小鼠免疫器官质量的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of DNLP on weight of immune organs in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	脾指数/ (mg·g ⁻¹)	胸腺指数/ (mg·g ⁻¹)
对照	—	96.7±20.9	36.5±6.4
模型	—	47.4±11.0 ^{##}	19.3±3.7 ^{##}
左旋咪唑	0.025	67.1±13.5 ^{**}	30.4±5.5 ^{**}
金钆石斛	0.5	55.3±14.5	23.1±4.5 [*]
破壁粉	1.0	64.9±15.9 [*]	27.2±4.7 [*]
	2.0	78.1±17.1 ^{**}	30.1±5.4 ^{**}

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

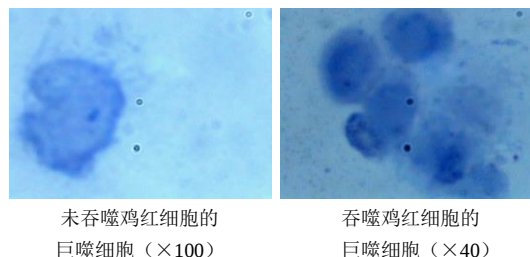


图1 腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的情况

Fig. 1 Observation of phagocytic phenomena of peritoneal macrophages

表2 金钆石斛破壁粉对免疫低下小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of DNLP on phagocytic function of peritoneal macrophages in immunocompromised mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	吞噬率/%	吞噬指数
对照	—	45.12±6.27	1.9±0.7
模型	—	29.57±3.12 ^{##}	1.1±0.3 ^{##}
左旋咪唑	0.025	39.37±5.68 ^{**}	1.8±0.5 ^{**}
金钆石斛	0.5	33.56±4.38	1.3±0.4
破壁粉	1.0	37.07±4.63	1.6±0.4 [*]
	2.0	40.24±5.35 ^{**}	1.7±0.5 [*]

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

3.3 对小鼠血清溶血素形成的影响

模型小鼠血清溶血素水平明显下降,与对照组比较差异显著($P < 0.01$)。ig给予中、高剂量金钆石斛破壁粉及阳性对照左旋咪唑后,免疫低下小鼠的小鼠血清溶血素水平明显升高,与模型组比较,差异显著($P < 0.05$ 、 0.01),结果见表3。

表3 金钗石斛破壁粉对免疫低下小鼠血清溶血素形成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of DNLP on formation of serum hemolysin in immunocompromised mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

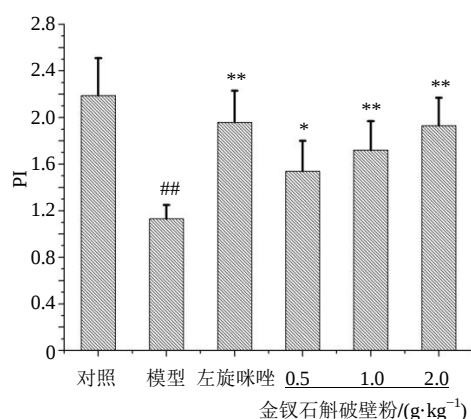
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	HC ₅₀
对照	—	288.37±42.27
模型	—	197.78±35.05 ^{##}
左旋咪唑	0.025	249.79±42.36 ^{**}
金钗石斛	0.5	218.54±36.26
破壁粉	1.0	233.45±39.72 [*]
	2.0	257.22±41.07 ^{**}

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

3.4 对ConA诱导的淋巴细胞转化反应的影响

模型小鼠淋巴细胞转化反应明显下降,与对照组比较,PI值明显下降,差异显著($P < 0.01$)。ig给予金钗石斛破壁粉及阳性对照左旋咪唑后,均能促进小鼠脾淋巴细胞转化反应,与模型组比较,PI值明显上升,差异显著($P < 0.05, 0.01$)。结果见图2。



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

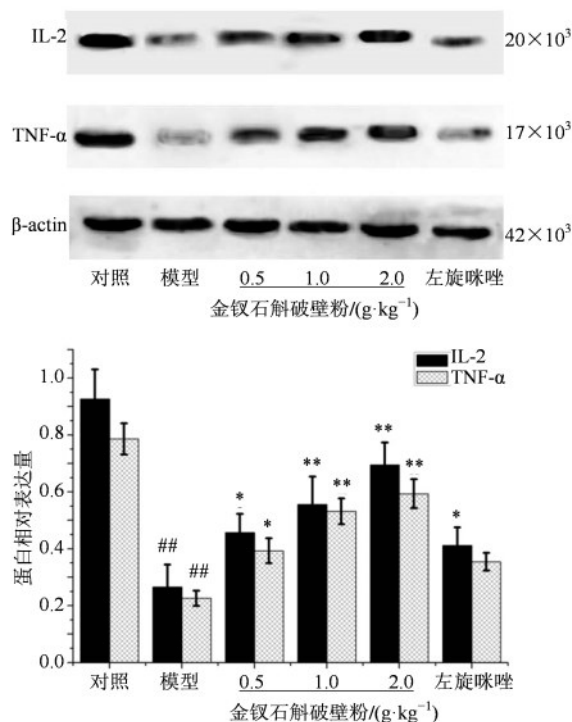
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图2 金钗石斛破壁粉对ConA诱导的小鼠淋巴细胞转化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Effect of DNLP on ConA-induced lymphocyte transformation in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.5 对IL-2、TNF- α 蛋白表达的影响

模型小鼠脾脏中IL-2、TNF- α 的蛋白表达明显下调,与对照组比较差异显著($P < 0.01$)。ig给予金钗石斛破壁粉后,明显上调小鼠脾脏中IL-2和TNF- α 的蛋白表达,与模型组比较差异显著($P < 0.05, 0.01$)。阳性对照左旋咪唑显著上调IL-2蛋白表达($P < 0.01$),但对TNF- α 的表达无明显影响。结果见图3。



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

图3 Western blotting检测脾组织中IL-2、TNF- α 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Detection of expression of IL-2 and TNF- α in splenic tissue by Western blotting ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

4 讨论

细胞破壁技术是一种超微粉碎加工技术,是中药临床应用的一场革命,中药材细胞破壁超微粉碎后的药效释出、药性变化、治疗效果发生质的飞跃^[13]。药材(植物及动物)的细胞直径通常为10~100 μm ,超微粉碎的颗粒细度为3~5 μm ^[14]。中药材的有效成份主要分布于细胞内,中药若采用常规方式粉碎,其单个粒子常由数个或数十个细胞所组成,细胞的破壁率极低,其有效成分不易透过细胞壁而释放出来。中药材细胞破壁后,有效成分充分释放出来,可以增加药物的吸收率,提高其生物利用度,便于服用,有利于环保、绿化和植被保护;细胞破壁技术可节约药材40%~60%,个别药材可提高4倍的药效,对中药产业的长期和可持续发展起到了巨大作用。该方法可直接破坏植物类药材的细胞壁,动物类药材细胞膜,使有效成分充分释放,使药效提高1~3倍,节约资源,现广泛用于贵重药材,如虫草、灵芝孢子、灵芝、人参、三七、天麻、水蛭、地龙等的粉碎^[15]。

金钗石斛为亚热带附生植物,在我国主要分布于乌蒙山片区的泸州、赤水、云南等地。金钗石斛

对生长环境要求苛刻,栽培困难,野生产量少。随着石斛产业的发展和栽培,繁育、栽培等关键技术不断被攻克,多地纷纷建立起金钗石斛种植基地,其中就包括贵州赤水 and 四川泸州等地^[16]。本课题组采用超音速气流粉碎方法对泸州道地药材金钗石斛进行超微粉碎,以压缩空气或过热蒸汽通过喷嘴产生的超音速高速湍流作为颗粒的载体,颗粒与颗粒之间或颗粒与固定板之间发生冲击性挤压,摩擦和剪切等作用,从而达到粉碎的目的。

目前此类研究中,环磷酰胺常被国内外研究者用于建立小鼠免疫抑制模型,以观察免疫促进药物对免疫功能的影响^[8-9]。免疫器官的脏器系数是衡量机体免疫功能的初步指标,是衡量机体非特异性免疫功能的指标之一^[17],金钗石斛破壁粉能对抗环磷酰胺引起的脾脏、胸腺萎缩,具有增强非特异免疫的功能。单核巨噬细胞的吞噬能力也是衡量机体非特异性免疫功能的重要指标之一^[18],巨噬细胞吞噬百分率和吞噬指数的大小可以反映内皮网状系统吞噬功能的强弱,当细菌、异物等抗原性物质进入机体后,可迅速被单核巨噬系统吞噬和清除。实验结果显示,金钗石斛破壁粉可提高巨噬细胞的吞噬百分率和吞噬指数,揭示金钗石斛破壁粉能够促进非特异性免疫功能。

血清溶血素水平可以反应机体内抗体量,反映B淋巴细胞体液免疫功能^[19],在实验中鸡红细胞致敏的动物血清中存在循环抗体IgM和IgG,抗体与鸡红细胞在体外补体的参与下产生溶血反应,用分光光度计测定溶血程度来反应抗体水平。实验结果显示,金钗石斛破壁粉对免疫低下小鼠体液免疫功能有一定的增强作用。在免疫系统中,T淋巴细胞经ConA等激活后,转化为淋巴母细胞,可介导细胞免疫应答,并辅助机体针对T细胞依赖性抗原产生体液免疫应答,因此脾淋巴细胞增殖反应可以作为机体细胞免疫功能的指标之一^[20],结果显示,金钗石斛破壁粉可促进在有丝分裂原ConA的作用下小鼠脾淋巴细胞的增殖,提高免疫活性细胞对特异性抗原应答的能力。

IL-2是T细胞在体外长期生长所必需的因子,它可促进已活化的T细胞增殖并分化成熟为效应迟发型超敏反应T细胞(TD)和CTL,诱导T细胞表面IL-2受体(IL-2R)的表达增加,还可刺激其它细胞因子如TNF、干扰素- γ (IFN- γ)的分泌。除了T细胞,IL-2也对B细胞、NK细胞、巨噬细胞的功能具有上调作用^[21]。TNF- α 是一种主要由活化的单核巨噬

细胞产生的细胞因子,它具有多种生物学活性,不仅在细胞增殖、分化、炎症反应等过程中都发挥着重要作用,还能增强炎症部位单核巨噬细胞系统活性及NK细胞的细胞毒作用^[22]。Western blotting检测结果表明,金钗石斛破壁粉明显上调小鼠脾脏中IL-2和TNF- α 的蛋白表达,从而调节淋巴细胞的生长分化、激活巨噬细胞,在免疫调节中起着重要的作用。

金钗石斛破壁粉对免疫低下小鼠特异性免疫与非特异性免疫、细胞免疫与体液免疫均有明显的增强作用,可能与通过以下几个途径作用于人体的免疫系统有关:激活巨噬细胞,促进T细胞转化,活化Tc细胞,提高B淋巴细胞和NK细胞的数量与活性等。

参考文献

- [1] 汪代芳,俞桂新,赵宁毅,等.金钗石斛茎的化学成分研究[J].中草药,2012,43(8):1492-1495.
- [2] 张晓敏,孙志蓉,陈龙,等.金钗石斛的化学成分和药理作用研究进展[J].中国现代应用药学,2014,31(7):895-898.
- [3] 尚迪,张军,刘静,等.运用AHP法评价五种药用石斛在成都的引种栽培[J].南方农业,2017,11(19):1-3.
- [4] 李清,李标,郭顺星.金钗石斛中3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A合酶基因的克隆及特征分析[J].中草药,2017,48(12):2502-2508.
- [5] 王艳萍,刘宇灵,杨立新,等.超微粉碎技术对三七药材粉碎效果及有效成分含量的影响[J].中国中药杂志,2014,39(8):1430-1434.
- [6] 陈光静,汪莉莎,张甫生,等.超微粉碎对桑叶粉理化性质的影响(英文)[J].农业工程学报,2015,24:307-314.
- [7] 陈熹.超微粉碎技术对肉苁蓉的粉碎效果及有效成分含量的影响[J].临床合理用药杂志,2017,10(2):86-87.
- [8] 宋雁,贾旭东,崔文明,等.不同途径和剂量环磷酰胺建立小鼠免疫抑制模型的对比研究[J].中国食品卫生杂志,2013,25(3):218-225.
- [9] Gong Y, Wu J, Li S T. Immuno-enhancement effects of Lycium ruthenicum Murr. polysaccharide on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice[J]. Int J Clin Exp Med, 2015; 8(11): 20631-20637.
- [10] 许华,杨晓明,明章银,等.脂麻花醇提取物对环磷酰胺模型小鼠免疫功能的影响[J].华中科技大学学报(医学版),2006,35(4):449-451.
- [11] 高笑笑,王刚,杨歆睿,等.雪灵芝粗多糖对环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J].免疫学杂志,2017,33(3):191-196.
- [12] Huang H, Tang Q, Chu H, et al. MAP4K4 deletion

- inhibits proliferation and activation of CD⁴⁺ T cell and promotes T regulatory cell generation *in vitro* [J]. Cell Immunol, 2014, 289(1-2): 15-20.
- [13] 梁兆昌, 褚洪标, 肖琳, 等. 杜仲超微粉体理化特性及体外溶出性能研究 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1609-1614.
- [14] 李建芝. 中药制剂中应用中药细胞级微粉碎技术分析 [J]. 河南中医, 2016, 36(5): 906-909.
- [15] 李娟, 麻晓雪, 李顺祥, 等. 铁皮石斛超微粉碎破壁工艺的优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014; 20(7): 31-33.
- [16] 汪代芳, 俞桂新, 赵宁毅, 等. 金钗石斛茎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1492-1495.
- [17] 江泽波, 胡金萍, 温晓文, 等. 猪苓多糖对巨噬细胞 RAW264.7 的双向免疫调节作用 [J]. 免疫学杂志, 2014, 30(12): 1033-1038.
- [18] Wang C L, Cui H Y, Wang Y R, et al. Bidirectional immunomodulatory activities of polysaccharides purified from *Pleurotus nebrodensis* [J]. Inflammation, 2014, 37(1): 83-93.
- [19] 张恩户, 王瑞县, 岳明. 不同分子量的黄芪多糖对免疫低下小鼠淋巴细胞转化和血清溶血素的影响 [J]. 陕西中医学院学报, 2010, 33(3): 75-76.
- [20] 王刚, 王海燕, 张华, 等. 雪灵芝水提取物对淋巴细胞增殖及 Th1 型细胞因子表达的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(9): 905-909.
- [21] 翟志敏. IL-2 对免疫激活和免疫耐受的双向调节作用 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(3): 319-322.
- [22] Song Y, Kim Y R, Kim S M, et al. RNAi-mediated silencing of TNF- α converting enzyme to down-regulate soluble TNF - α production for treatment of acute and chronic colitis [J]. J Control Release, 2016, 239(10): 231-241.