

养正合剂的免疫作用研究

李 明¹, 曹于平², 柳晓泉², 刘国卿²

(1. 浙江尖峰药业有限公司, 浙江 金华 321000; 2. 中国药科大学 药理教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 考察养正合剂的免疫调节作用。方法 对小鼠碳粒廓清速率进行测定; 对三硝基氯苯 (DN CB) 所致迟发型超敏反应 (DN CB-DTH) 进行测定; 对小鼠血清溶血素含量进行测定, 对大鼠脾细胞产生 IL-2 水平进行测定。结果 养正合剂可使小鼠碳粒廓清速率明显升高; 大剂量养正合剂可明显增加荷瘤小鼠低下的 DTH; 显著增加接种 S₁₈₀ 瘤株小鼠的血清溶血素含量并明显促进大鼠脾细胞的 IL-2 的生物活性。结论 养正合剂可对抗环磷酰胺的免疫抑制作用, 对荷瘤小鼠免疫功能有明显增强作用。

关键词: 养正合剂; 免疫调节; 抗肿瘤

中图分类号: R285; R967 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)01-0054-03

Studies on effect of YANGZHENG COMPOUND MIXTURE on immunity

LI Ming¹, CAO Yu-ping², LIU Xiao-quan², LIU Guo-qing²

(Zhejiang Jianfeng Pharmaceutical Co. Ltd., Jinhua Zhejiang 321000, China; 2. Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu 210009, China)

Key words YANGZHENG COMPOUND MIXTURE; regulation of immunity; antitumor

养正合剂由人参、黄芪、猪苓、茯苓、枸杞子和女贞子等药物组成。据文献报道猪苓、枸杞和茯苓有较强的抑瘤作用^[1-3], 黄芪能明显提高机体免疫功能^[4]。为考察其药理活性, 我们对其免疫调节作用进行了实验研究。

1 材料

1.1 药品与试剂: 养正合剂由浙江衢州制药总厂提供, 批号 931206, 每毫升相当于原药材 0.6 g; 强的松龙注射液, 上海第九制药厂生产, 批号 930210; 印度墨汁, 上海向群中学化学试剂厂产品; 环磷酰胺, 上海第十二制药厂生产, 批号 921217; 刀豆素 A (Con A), Sigma 产品; 白介素-2 (IL-2) 标准品及 CTIL-2 细胞, 由上海第二军医大学免疫组曹雪涛教授提供; MTT, Sigma 产品; RPMI1640, Gibco 产品, 内含 25 mmol/L HEPES, 16 mmol/L NaHCO₃, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 50 μmol/L 2-巯基乙醇, 100 μg/mL 链霉素, 100 μg/mL 青霉素及 10% 灭活新生小牛血清。

1.2 动物: NIH 小鼠, 体重 18~22 g, 由江苏省卫生防疫站提供; 昆明种小鼠, 体重 18~22 g, 由中国药科大学动物房提供; Wistar 大鼠, 250 g 左右, 雄性, 由苏州医学院动物房提供。

1.3 瘤株: 肉瘤 180 (S₁₈₀) 由江苏省肿瘤防治研究

所提供。

1.4 仪器: CO₂ 培养箱 (日本平泽制作所); 酶标仪 (南京分析仪器厂); Costar 96 孔培养板 (美国)。

2 方法和结果

2.1 对小鼠碳粒廓清速率的影响: NIH 小鼠 80 只, 雌雄各半, 随机分成 8 组, 设正常对照组、环磷酰胺模型组 (剂量为 50 mg/kg, ip), 3 组单用养正合剂组 (剂量为 7.5, 15, 30 g/kg) 及 3 组环磷酰胺与养正合剂合用组, 连续给药 7 d, 于末次给药后 1 h, 每鼠尾 iv 印度墨汁 10 mL/kg, 2, 15 min 各采血 20 μL, 置于 0.1% NaHCO₃ 溶液 2 mL 中, 1 h 后测定吸光度 (A), 按下列公式计算廓清指数 (K) 及校正廓清指数 (X), 结果见表 1。

$$K = \frac{1}{13 \log(A_2/A_{15})}$$

$$X = \sqrt[3]{K \times \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}}}$$

2.2 对三硝基氯苯 (DN CB) 所致迟发型超敏反应 (DN CB-DTH) 的影响

2.2.1 对正常及强的松龙免疫抑制小鼠 DN CB-DTH 的影响: 昆明种小鼠 80 只, 雄性, 每鼠颈背部 sc 7% DN CB 丙酮液 20 μL 致敏。致敏后随机分为正常对照组、强的松龙模型组 (剂量为 5 mg/kg, im), 单用养正合剂组 (剂量为 7.5, 15, 30 g/kg, ig)

(20) 收稿日期: 2000-06-12

作者简介: 李 明, 1962 年 8 月生, 男, 山东人, 工程师, 硕士, 主要从事抗肿瘤中药新药的开发。

Tel (0579) 2326868 转 3602 E-mail: zjfy@mail.jhptt.j.cn

及强的松龙与养正合剂合用组,小鼠连续给药 9 d,每天 1次。并在给药 8 d后,各鼠右耳廓涂以同样量的 DNCB丙酮液攻击,16 h后测量左、右耳廓厚度差以此表示 DTH强度。结果见表 2

表 1 养正合剂对正常及环磷酰胺免疫抑制小鼠碳粒廓清速率的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	K	α
对照	—	0.021 0 $\pm$ 0.004 0	4.42 $\pm$ 0.57
养正合剂	7.5	0.020 3 $\pm$ 0.005 9	4.62 $\pm$ 1.10
	15	0.024 7 $\pm$ 0.005 8	5.07 $\pm$ 0.59 ^g
	30	0.028 2 $\pm$ 0.006 6 [*]	5.27 $\pm$ 1.12 ^g
	环磷酰胺	0.014 4 $\pm$ 0.005 1 [*]	3.70 $\pm$ 0.70 ^g
养正合剂+ 环磷酰胺	7.5+ 0.05	0.016 5 $\pm$ 0.007 0	4.22 $\pm$ 1.32
	15+ 0.05	0.020 5 $\pm$ 0.005 0 ^{Δ}	4.62 $\pm$ 0.74 ^{Δ}
	30+ 0.05	0.022 6 $\pm$ 0.006 5 ^{$\Delta\Delta$}	4.78 $\pm$ 0.71 ^{$\Delta\Delta$}

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与环磷酰胺组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$

表 2 养正合剂对正常及强的松龙免疫抑制小鼠 DNCB-DTH的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	左、右耳廓厚度差 ($\times 10^{-2}$ mm)
对照	—	12.5 $\pm$ 2.5
养正合剂	7.5	12.8 $\pm$ 4.0
	15	15.2 $\pm$ 2.9 ^g
	30	16.4 $\pm$ 4.2 ^g
强的松龙	0.005	6.7 $\pm$ 2.8 [*]
养正合剂+ 强的松龙	7.5+ 0.005	8.4 $\pm$ 2.1
	15+ 0.005	10.7 $\pm$ 3.4 ^{Δ}
	30+ 0.005	11.1 $\pm$ 3.8 ^{$\Delta\Delta$}

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

与强的松龙组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$

2.2.2 对荷瘤小鼠 DNCB-DTH的影响:昆明种小鼠,雌性,50只,分成 5组,设 1组为正常对照组,另 4组小鼠右腋窝下 sc经生理盐水稀释的 S₁₈₀瘤株 0.2 mL^[5],并于接种次日,5组小鼠颈背部 sc 2% DNCB丙酮液致敏,致敏后,3组荷瘤小鼠分别给予养正合剂(剂量为 7.5、15、30 g/kg,ig)连续 9 d,并在给药 8 d后各组小鼠右耳廓涂以同样量的 DNCB丙酮液攻击,16 h后测量左、右耳廓厚度差,结果见表 3

表 3 养正合剂对荷瘤小鼠 DNCB-DTH的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	左、右耳廓厚度差 ($\times 10^{-2}$ mm)
正常组	—	16.7 $\pm$ 5.3
对照组	—	10.4 $\pm$ 2.8
养正合剂	7.5	9.3 $\pm$ 3.4
	15	11.6 $\pm$ 3.8
	30	14.1 $\pm$ 2.6

与对照组比较: * $P<0.01$

2.3 对血清溶血素含量的影响

2.3.1 对正常及环磷酰胺免疫抑制小鼠血清溶血素的影响:NIH小鼠,雌雄兼用,随机分为正常对照组、环磷酰胺模型组、养正合剂组及环磷酰胺合用养

正合剂组,每组小鼠 sc 20% 绵羊红细胞 (SRBC)0.2 mL免疫,养正合剂组于 SRBC致敏前 1 d开始给药,连续 7 d,环磷酰胺组与环磷酰胺合用养正合剂组分别于致敏当日及其后第 3、5天 ip环磷酰胺 50 mg/kg,给药 7 d后眼眶取血,离心,取血清稀释,以稀释血清 1 mL加 5% SRBC 0.5 mL及稀释的豚鼠血清 (1∶10) 1 mL,37℃温育 20 min,按比色法测定,并计算半数溶血值 (HC₅₀),结果见表 4

表 4 养正合剂对正常及免疫抑制小鼠血清溶血素含量的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	HC ₅₀
对照组	—	205.7 $\pm$ 60.8
养正合剂	7.5	210.8 $\pm$ 70.2
	15	237.7 $\pm$ 85.0
	30	233.3 $\pm$ 78.0
环磷酰胺	0.05	94.3 $\pm$ 31.7 [*]
养正合剂+ 环磷酰胺	7.5+ 0.05	113.8 $\pm$ 38.0
	15.0+ 0.05	121.7 $\pm$ 32.6
	30.0+ 0.05	142.0 $\pm$ 57.7 ^{Δ}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与环磷酰胺组比较: $\Delta P<0.05$

2.3.2 对荷瘤小鼠血清溶血素的影响:NIH小鼠 50只,雄性,分成 5组,1组为正常对照组,另 4组小鼠接种 S₁₈₀瘤株,取 3组荷瘤鼠自接种次日 ig养正合剂(剂量为 7.5、15、30 g/kg),连续 9 d,各组小鼠于接种后第 3天进行致敏。给药 9 d后眼眶取血,离心,取血清稀释,以稀释血液 1 mL SRBC 0.5 mL及稀释的豚鼠血清 (1∶10) 1 mL,37℃温育 20 min,按比色法测定,并计算 HC₅₀,结果见表 5

表 5 养正合剂对荷瘤小鼠血清溶血素含量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂 量 (g/kg)	动物数 (只)	HC ₅₀
正常组	—	10	205.7 $\pm$ 60.8 [*]
对照组	—	10	79.4 $\pm$ 29.2 ^g
养正合剂	7.5	10	108.1 $\pm$ 33.6
	15	10	115.4 $\pm$ 31.3
	30	10	141.6 $\pm$ 44.7 [*]

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

2.4 养正合剂对大鼠脾细胞产生 IL-II 的影响:
Wistar大鼠,雄性,制备脾细胞悬液,以 RPMI 1640
洗涤 3次后,配成 5×10^6 cfu/mL悬液,加入 Con A
 $5 \mu\text{g/mL}$,将含 ConA的细胞悬液分为 5份,分别为
空白对照和养正合剂 2.5, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$,置
37℃ 含 5% CO₂的培养箱中培养 72 h,吸取上清
液,置 - 20℃保存备用。采用 MTT比色法检测 IL-
II 活性,将 CTIL细胞洗涤后配成 2.5×10^5 cfu/mL
悬液,在微孔培养板中每孔加入 50 μg ,将待测样品
及 IL-II 标准品作 2倍连续稀释,稀释标本再加于
微孔培养板中,每孔 100 μL ,每一稀释度均为复孔,
培养 36 h后,每孔加 MTT($5 \mu\text{g/mL}$) 10 μg ,再培
养 4 h,加酸化异丙醇溶解甲微结晶,然后将微孔板
放入酶标仪作比色分析,测定波长为 570 nm,参比
波长为 630 nm,每孔两个波长处的吸光度 (*A*)-之差
即为该孔的实测 *A* 值。将待测样品与参比标准品同
时作倍比稀释,分别测出二者使检测细胞达到最大
增殖 50% 的稀释度,按下式计算 IL-II 活性单位,结
果见表 6

样品 IL-II 活性单位 (U/mL) = (样品使检测细
胞达最大增殖 50%时的稀释倍数 / 标准品使检测细
胞达最大增殖 50%时的稀释倍数) × 标准品 IL-II
活性单位

3 讨论

实验发现养正合剂对调节机体免疫功能及肿瘤
所致的免疫功能降低具有明显恢复作用,使正常小

表 6 养正合剂对大鼠脾细胞产生 IL-II 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	IL-II 活性 (U/mL)
对照组	-	1.30 ± 0.23
养正合剂	200	2.95 ± 0.81 *
	100	1.58 ± 0.06
	50	1.36 ± 0.23
	25	1.55 ± 0.44

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

鼠 *K* *X* 值明显升高;可明显对抗环磷酰胺所致小
鼠碳粒廓清速率低下,使 *K* *X* 值恢复至正常水平。
大剂量养正合剂可明显增加荷瘤小鼠低下的 DTH
养正合剂还显著增强接种 S₁₈₀瘤株小鼠低下的血清
溶血素含量,并明显促进大鼠脾细胞的 IL-II 生物
活性。综上所述,养正合剂可提高机体的体液免疫和
细胞免疫功能,对临床用于癌症患者的辅助治疗有
一定的实际意义。

参考文献:

[1] 王柏昆,邢善田,周金黄,等. 枸杞子多糖对 S₁₈₀荷瘤小鼠细胞
免疫功能的影响及其抑瘤作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂
志, 1988, 2(2): 127-130.
[2] 吕苏成,曹巧利,洗显秀. 茯苓多糖对正常及荷瘤小鼠免疫功
能的影响 [J]. 第一军医大学学报, 1990, 10(3): 267-268.
[3] 杨德安,石炳毅,李炎唐,等. 猪苓、土茯苓和硒对膀胱化学致
癌抑制作用的实验研究 [J]. 中华医学杂志, 1987, 67: 622-
625.
[4] 毛小娟,王军志,王凤莲. 红芪多糖和黄芪多糖的免疫调节作
用 [J]. 中国药理学通报, 1989, 5(6): 367-372.
[5] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫
生出版社, 1991.

墓头回诱导脐血基质细胞形成及分泌 GM-CSF的实验研究

赵 丽,李兴玉,马海珍

(兰州医学院血液病研究所,甘肃 兰州 730000)

摘 要: 目的 应用细胞培养技术检测了墓头回水提物对人脐血基质细胞生成及其分泌粒造血刺激因子的实验
研究。方法 将不同浓度的墓头回水提物与脐血共同培养 14 d,检测基质细胞上清液中的 GM-CSF活性。结果
墓头回水提物对人脐血基质细胞具有促进形成的作用,最高峰为 0.01 $\mu\text{g/mL}$,为了检测基质细胞上清液中的 GM-
CSF活性,进行了 GM-CFU实验,结果表明,实验各组数据与对照组比较,具有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。结论
墓头回水提物不仅是一种强烈的抗癌药物,也是一种造血祖细胞促进剂。

关键词: 墓头回;基质细胞; GM-CSF

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2001) 01- 0056- 03

② 收稿日期: 2000-08-18

作者简介: 赵 丽 (1963-),女,云南省巍山县人,硕士学位,现任兰州医学院第一附属医院血液科副主任医师,副教授。1984年至今从事血
液病的临床、教学及科研工作。研究白血病细胞耐药逆转及外周造血干细胞移植治疗恶性肿瘤的基础与临床。
Tel (0931) 8625200转 6251 E-mail lily jin shan@ sina.com