

## 不同产地金樱子的根和根茎免疫调节活性研究

彭海燕<sup>1</sup>, 寿晓云<sup>1</sup>, 王涛<sup>2</sup>, 赵郭林<sup>2</sup>, 张泽<sup>2</sup>, 江振洲<sup>2</sup>, 邹节明<sup>1\*</sup>

1. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004

2. 中国药科大学 江苏省新药筛选中心, 江苏 南京 210009

**摘要:** 目的 对广西、云南、贵州3个产地的金樱子的根和根茎样品的免疫调节活性进行评价。方法 采用小鼠迟发性超敏反应、小鼠溶血素抗体生成以及小鼠碳粒廓清试验, 分别考察对细胞免疫、体液免疫和非特异性免疫的影响。结果 金樱根提取物对于细胞免疫、体液免疫具有较明显的抑制作用, 但对非特异性免疫反应作用不明显。金樱子不同药用部位(根和根茎)和不同产地(广西、贵州、云南)的受试样品在免疫活性调节方面的作用基本一致, 无显著差异。结论 不同部位和不同产地金樱子样品具有相似的免疫抑制活性。

**关键词:** 金樱子; 根; 根茎; 免疫调节; 细胞免疫; 体液免疫; 非特异性免疫

中图分类号: R286.95 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)13-1903-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.018

## Study on immunomodulatory activity of root and rhizome of *Rosa laevigata* from different habitats

PENG Hai-yan<sup>1</sup>, SHOU Xiao-yun<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>2</sup>, ZHAO Guo-lin<sup>2</sup>, ZHANG Ze<sup>2</sup>, JIANG Zhen-zhou<sup>2</sup>, ZOU Jie-ming<sup>1</sup>

1. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541004, China

2. Center for Drug Screening, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract: Objective** To evaluate the immunomodulatory activity of the roots and rhizomes in *Rosa laevigata* (*Rosa Laevigata Radix*) in Guangxi, Yunnan, and Guizhou provinces. **Methods** The effects of cellular immunity, humoral immunity, and non-specific immunity were investigated on delayed-type hypersensitivity, serum hemolysin antibody, and carbon clearance of mice, respectively. **Results** *Rosa Laevigata Radix* could inhibit the delayed-type hypersensitivity and serum hemolysin antibody in mice, but had no effect on carbon clearance. All the roots and rhizomes of *R. laevigata* from different habitats had no statistically significant difference on immunomodulatory activity. **Conclusion** The roots and rhizomes of *R. laevigata* from different habitats have the similar immunosuppressive activity.

**Key words:** *Rosa Laevigata Radix*; roots; rhizomes; immunomodulation; cellular immunity; humoral immunity; non-specific immunity

金樱根 *Rosa Laevigata Radix* 又名金樱藟、脱骨丹,《中国药典》2010年版附录收载金樱根为蔷薇科植物金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 及同属植物小果蔷薇 *R. cymosa* Tratt. 和粉团蔷薇 *R. multiflora* Thunb. var *cathayensis* Rehd. et Wils 植物的干燥根。金樱子酸、涩、平,固精涩肠,用于滑精、遗尿、痢疾、泄泻、崩漏带下、子宫脱垂、痔疮<sup>[1]</sup>。临床上金樱子药材常用于治疗前列腺炎、妇科疾病、泌尿系统感染、烧伤烫伤及部分炎症性疾病等。在金樱子药材市场,时常将金樱子药材的根茎混入金樱

根中。而由于根茎与根混用及不同品种入药等,常常限制了金樱根在临床的进一步应用<sup>[2-3]</sup>。本实验就广西、云南、贵州3个不同产地金樱子药材的根和根茎2个药用部位的免疫调节作用进行了比较,为进一步开发利用此药材提供一定的药理学依据,保证金樱子药用植物资源的可持续发展。

### 1 材料

#### 1.1 样品

3个产地(广西、贵州、云南)金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 的根和根茎样品共6种,均由桂林

收稿日期: 2014-03-16

作者简介: 彭海燕(1973—),女,工程师,研究方向为现代中药制剂。

\*通信作者 邹节明,男,高级工程师,博士生导师。Tel: (0773)5842588 E-mail: zjm@sanjin.com.cn

三金药业股份有限公司高级工程师钟小清鉴定并提供。

将以上 3 个不同产地的金樱子的根和根茎分别常规水提, 提取 2 次, 合并提取液, 浓缩, 喷雾干燥即得。样品主要信息见表 1。临用前称取所需药量, 采用无菌蒸馏水溶解, 4 °C 保存备用。

表 1 金樱子提取物信息

Table 1 Information of roots and rhizomes of *R. laevigata*

编号	部位	批号	浸膏量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	产地
GX-J	根茎	20121103	24.7	广西
GX-G	根	20121104	21.9	广西
GZ-J	根茎	20121101	27.7	贵州
GZ-G	根	20121102	21.5	贵州
YN-J	根茎	20121105	21.4	云南
YN-G	根	20121106	35.5	云南

## 1.2 阳性药

注射用环磷酰胺 (CTX), 0.2 g/瓶, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 11122332; 阳性药物配制方法: 临用前称取所需药量, 采用 0.5% 羧甲基纤维素钠研磨混匀, 4 °C 保存备用。

## 1.3 动物

ICR 小鼠, 清洁级, 体质量 18~22 g, 雄性, 购自南通大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(苏) 2008-0010。小鼠均饲养于独立送风笼具 (IVC) 中, 空气洁净度万级, 实验室温度 (24±2) °C; 相对湿度 60%~80%; 空气交换次数为 10~15 次/h; 光照周期: 12 h (日) / 12 h (夜)。分开饲养, 每笼不超过 5 只。饲料为鼠全价颗粒饲料, 购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司。垫料为灭菌颗粒垫料, 购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司。饮水为饮用纯化水。

## 1.4 主要试剂

0.9% 氯化钠注射液, 南京小营制药厂, 批号 2012020602; 印度墨水, 北京笃信精细制剂厂, 批号 0051024; 无水碳酸钠 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), 上海虹光化工厂, 批号 100412; 氰化高铁血红蛋白试剂, 购自南京建成生物工程研究所, 批号 20130303; 新鲜绵羊红细胞, 由南京市绵羊血供应站提供; 2, 4-二硝基氟苯 (DNFB), 质量分数 99%, 湖北武汉福鑫化工有限公司, 批号 201212001; 丙酮, 南京化学试剂厂, 批号 201203030; 其余试剂均为市售分析纯。

## 1.5 主要仪器

BSA124S 精密电子天平, 德国赛多利斯公司;

KD-160 型电子秤, 东莞百利达健康器材有限公司; Safire 多功能酶标仪, 瑞士 TECAN 公司。

## 2 方法<sup>[4]</sup>与结果

### 2.1 剂量的设置

金樱子的临床最大用量为每人 60 g/d, 人体质量按 60 kg 计, 受试药物高、中、低剂量按体表面积折算, 分别约相当于人临床剂量的 2.0、1.0、0.5 倍。

### 2.2 对正常小鼠迟发性超敏反应的影响

**2.2.1 分组与给药** 200 只小鼠随机分为 20 组, 每组 10 只: 对照组、CTX (0.1 g/kg) 阳性对照组和 GX-J、GX-G、GZ-J、GZ-G、YN-J、YN-G 6 个样品组, 6 个样品均设高、中、低剂量 (18.0、9.0、4.5 g/kg)。

每组配制不同浓度, 给药体积均为 20 mL/kg, 各组动物连续 ig 给药 7 d, CTX 隔日给药, 其他每天 1 次。

**2.2.2 免疫方法** 上述各组动物给药的第 3 天, 小鼠用手术剪腹部去毛, 范围约 3 cm×3 cm, 将 1% DNFB 溶液 50 μL 均匀涂抹致敏。末次给药后, 将 1% DNFB 溶液用移液器吸取 10 μL 均匀涂抹于小鼠左耳两面进行攻击, 24 h 后颈椎脱臼处死小鼠, 剪下左右耳壳, 用打孔器取下直径 8 mm 的耳片称质量, 以左右耳片质量之差为肿胀度。

**2.2.3 结果** 与对照组相比, 金樱子药材样品对小鼠迟发性超敏反应均表现为抑制作用, 其中 YN-G、GX-G 和 GZ-G 3 个样品抑制作用相对较强, 见表 2。

### 2.3 对正常小鼠体液免疫功能的影响

**2.3.1 分组与给药** 200 只小鼠随机分为 20 组, 每组 10 只。分组及给药方案同“2.2.1”项方法。

**2.3.2 免疫方法** 给药开始和结束分别测定体质量 1 次。给药的第 3 天, 每只 ip 20% 绵羊红细胞悬液 0.2 mL。末次给药后 24 h 摘除小鼠眼球取血, 室温放置 1 h, 2 000 r/min 离心 20 min, 取上层血清, 同组 10 只混合, 用生理盐水进行 800 倍稀释, 然后分别取出 1 mL 依次放入试管中, 每管加入 0.5 mL 5% 绵羊红细胞悬液及 1 mL 1:10 稀释的豚鼠血清, 将反应管摇匀后移至 37 °C 恒温水浴中保温 1 h, 期间轻轻振摇 1 次, 反应毕, 立即移入冰浴中, 终止反应。将反应管以 2 000 r/min 离心 20 min 后取上清液 1 mL 加入 3 mL 氰化高铁血红蛋白试剂, 摇匀, 放置 10 min, 在紫外可见分光光度仪上以 540 nm 比色。另设不加补体而以生理盐水代替的空白对照管,

表 2 金樱子样品对小鼠迟发性超敏反应耳廓肿胀的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of roots and rhizomes of *R. laevigata* on ear swelling induced by delayed type hypersensitivity response in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	肿胀度 / mg	肿胀度抑制率 / %
对照	—	17.6±4.0	—
CTX	0.1	12.2±3.6**	30.7
GX-J	18.0	13.5±3.1*	23.3
	9.0	13.5±3.1*	23.3
GX-G	4.5	16.7±7.4	5.1
	18.0	13.2±5.1*	25.0
GX-G	9.0	9.4±2.9**	46.6
	4.5	9.5±4.9**	46.0
GZ-J	18.0	13.3±4.8*	24.4
	9.0	13.6±6.6	22.7
GZ-G	4.5	14.8±4.7	15.9
	18.0	13.1±4.9*	25.6
GZ-G	9.0	11.7±3.3**	33.5
	4.5	12.3±4.8*	30.1
YN-J	18.0	15.4±5.2	12.5
	9.0	14.4±7.2	18.2
YN-G	4.5	13.8±6.0	21.6
	18.0	11.8±3.7**	33.0
YN-G	9.0	7.4±3.2**	58.0
	4.5	8.6±4.3**	51.1

与对照组比较 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 下同  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group, same as below

其他操作均相同。取 0.25 mL 5% 绵羊红细胞悬液，用氰化高铁血红蛋白试剂稀释至 4 mL，摇匀，放置 10 min 后 540 nm 比色。计算样品半数溶血值 (HC<sub>50</sub>)。

**2.3.3 结果** 与对照组相比，金樱子药材样品对小鼠体液免疫（溶血素抗体生成）均表现为明显的抑制作用，各组剂量依赖性不明显，各产地根样品的抑制作用略强于根茎样品，见表 3。

**2.4 非特异性免疫功能对小鼠网状内皮系统 (RES) 吞噬功能的影响**

**2.4.1 分组与给药** 200 只小鼠随机分为 20 组，每组 10 只。分组及给药方案同“2.2.1”项方法。

**2.4.2 免疫方法** 于末次给药后 24 h，尾 iv 印度墨水 (1 : 3) 10 μL/g，于注入墨水后 2 min 及 10 min 时用毛细管从小鼠眼眶后静脉丛取血，用 5~40 μL

表 3 金樱子样品对小鼠体液免疫的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 3 Effects of roots and rhizomes of *R. laevigata* on humoral immunity in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	HC <sub>50</sub>
对照	—	516.2±40.8
CTX	0.1	375.6±29.7**
GX-J	18.0	424.1±12.4**
	9.0	410.4±12.4**
GX-G	4.5	439.9± 7.8**
	18.0	412.0±24.8**
GX-G	9.0	415.1±45.0**
	4.5	397.0±11.9**
GZ-J	18.0	419.6±28.8**
	9.0	406.1±32.7**
GZ-G	4.5	449.2±69.8
	18.0	384.0±16.8**
GZ-G	9.0	445.8±32.0**
	4.5	374.9±24.5**
YN-J	18.0	437.0±18.6**
	9.0	425.7± 5.5**
YN-G	4.5	418.2±10.4**
	18.0	400.8±12.9**
YN-G	9.0	383.1±12.4**
	4.5	396.9±10.7**

精密移液器吸取 20 μL 血，立刻吹入 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 2 mL 中，于 680 nm 处比色，于 10 min 采血后立即处死小鼠，并取肝、脾、胸腺称质量，按下式计算廓清指数 (K)、吞噬系数 (α) 值、肝脏系数和脾脏系数。所得数据进行 t 检验。

$$K = (\log A_2 - \log A_{10}) / 8$$

$$\alpha = \text{体质量} / \text{肝脾合计质量} \times K^{1/3}$$

$$\text{肝脏系数} = \text{肝质量} / \text{体质量}$$

$$\text{脾脏系数} = \text{脾质量} / \text{体质量}$$

A<sub>2</sub> 和 A<sub>10</sub> 表示 2 和 10 min 血样的吸光度值

**2.4.3 结果** 与对照组相比，金樱子药材各样品对 RES 吞噬功能均无明显影响，见表 4。

**2.5 统计学分析**

利用 SPSS 19 软件的一般线性模型，将设计的模型、给药剂量、植物的用药部位以及药物的产地 4 个因素对药效的影响进行了多因素方差分析。结果表明，模型因素和剂量因素 F 检验的  $P < 0.001$ ；“用药部位”因素 F 检验的 P 值为 0.000 7；“地区”因素 F 检验的 P 值为 0.524 9，远大于 0.05，且拟合优度  $R^2 = 0.995 5$ 。由此推断，在显著水平  $P = 0.05$  的条件下，模型的设计、给药剂量以及植物的用药部位对药效影响非常显著，而药物产地的影响较小。进一步，采用“Fisher's LSD”多重检验考察了来源

表4 金樱子样品对 RES 吞噬功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 4 Effects of roots and rhizomes of *R. laevigata* on RES phagocytic function in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	K	$\alpha$	肝脏系数	脾脏系数
对照	—	0.036±0.012	5.2±0.7	5.7±0.5	0.60±0.12
CTX	0.1	0.022±0.011*	4.4±1.1	6.1±0.9	0.26±0.11**
GX-J	18.0	0.026±0.022	4.8±1.0	5.3±0.6	0.51±0.17
	9.0	0.041±0.013	5.2±1.0	6.2±1.2	0.51±0.17
	4.5	0.045±0.008	5.6±0.7	5.9±0.8	0.51±0.13
GX-G	18.0	0.038±0.030	5.3±1.8	5.7±1.3	0.42±0.14**
	9.0	0.037±0.019	5.1±1.0	6.0±1.0	0.49±0.15
	4.5	0.036±0.006	5.1±0.8	6.1±0.9	0.51±0.11
GZ-J	18.0	0.033±0.016	5.1±1.7	6.0±1.4	0.63±0.49
	9.0	0.035±0.023	4.5±1.3	6.2±0.9	0.50±0.16
	4.5	0.032±0.005	4.8±0.7	6.2±1.0	0.51±0.12
GZ-G	18.0	0.047±0.017	5.2±0.9	6.3±1.1	0.71±0.37
	9.0	0.032±0.018	4.5±1.0	6.2±1.0	0.68±0.43
	4.5	0.033±0.011	4.8±0.7	6.1±0.7	0.56±0.09
YN-J	18.0	0.044±0.018	5.8±1.3	5.5±0.5	0.50±0.14
	9.0	0.045±0.023	5.5±1.2	6.0±1.0	0.46±0.16*
	4.5	0.038±0.017	5.3±0.5	5.7±0.8	0.54±0.14
YN-G	18.0	0.039±0.011	5.4±1.0	5.9±0.9	0.47±0.17
	9.0	0.035±0.013	6.1±2.0	5.2±1.4	0.45±0.14*
	4.5	0.033±0.014	4.8±1.0	6.0±0.8	0.67±0.18

于植物不同部位的药物作用的差异。结果表明,金樱子根茎和根的药物作用无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

金樱子的研究主要集中在临床应用方面,它已被制成多种剂型广泛应用于临床,如妇科千金片、金鸡胶囊、王老吉凉茶等,但对其的化学成分、鉴别方法和药理作用的研究报道鲜为少见,这对充分开发利用金樱子极为不利。经调查,金樱子临床应用情况混乱,存在金樱子根茎与根混用及不同品种入药现象等。

临床应用证实金樱根对妇科炎症和男性前列腺炎具有较好的疗效,此类疾病的发作除了各种病菌感染的因素之外,机体免疫功能的失衡也是发病的主要因素之一<sup>[5-6]</sup>,尤其是一些非感染性炎症的发病机制更多是由于免疫因素所致<sup>[7]</sup>。这提示金樱根在免疫调节方面可能具有一定功效,而此方面的研究未见文献报道。

本研究中选择3种体内免疫实验,分别考察金樱根药材样品对细胞免疫、体液免疫和非特异性免疫系统的影响,结果显示金樱子对于前2种特异性免疫反应具有较明显的抑制作用,但对非特异性免疫反应作用不明显。药效学数据的统计学分析显示,金樱子不同药用部位(根和根茎)

和不同产地(广西、贵州、云南)的受试样品在免疫活性调节方面的作用基本一致,无统计学显著差异。

本实验初步评价了不同部位和不同产地金樱子药材样品的免疫调节活性,明确了其具有一定的特异性免疫抑制活性,同时也表明不同来源的受试样品在免疫活性调节方面的作用基本一致,本实验的结果可为金樱子药材的开发利用提供一定的实验依据,有助于更广泛的临床应用。

### 参考文献

- [1] 广西中药材标准 [S]. 1990.
- [2] 钟小清,吕高荣,邹节明. 金樱根药材的名实考证 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1140-1143.
- [3] 谭年秀,郭巧玲,田素英,等. 金樱根的药用历史及现代研究概况 [J]. 亚太传统医药, 2010, 6(12): 167-169.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [5] 李萍. 中医药治疗盆腔炎免疫学相关实验研究进展 [J]. 河南中医, 2013, 33(1): 154-156.
- [6] 闵洁,王敏,赵健洁,等. 念珠菌性阴道炎病理变化与机体免疫反应的关系 [J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(28): 4016-4018.
- [7] 魏武然,张唯力. 慢性非细菌性前列腺炎的免疫学研究进展 [J]. 重庆医学, 2005, 33(11): 136-139.