

基于斑马鱼模式生物的西洋参皂苷类成分增强免疫作用研究

吕 婧, 高 燕*, 李 晨, 杨龙飞, 赵瀚年

山东中医药大学, 山东 济南 250355

摘 要: **目的** 研究西洋参皂苷类成分增强免疫作用及其作用机制。**方法** 通过耐受性考察及免疫低下模型确定西洋参皂苷类成分提取物的给药剂量以及雷帕霉素的最优造模剂量后, 将受精后 48 h (48 hpf) 的斑马鱼分为对照组 (0.5%二甲亚砜)、模型组 (4 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素) 和 3 个产地 (中国山东、中国吉林、加拿大) 不同质量浓度的西洋参组 (4 $\mu\text{g/mL}$ 雷帕霉素 + 10、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 西洋参皂苷类成分提取物); 孵育一定时间后, 以斑马鱼尾部中性粒细胞数目、巨噬细胞吞噬功能及体内 γ 干扰素 (IFN- γ) 含量为指标, 计算中性粒细胞增长率, 考察西洋参皂苷类成分提取物的增强免疫作用。**结果** 西洋参皂苷类成分提取物给药质量浓度高于 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 幼鱼死亡率随给药质量浓度的增大及给药时间的延长逐渐升高; 与对照组相比, 模型组斑马鱼尾部中性粒细胞数目显著减少 ($P < 0.01$), 体内 IFN- γ 含量显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 10、25 $\mu\text{g/mL}$ 西洋参组斑马鱼尾部中性粒细胞数目显著增加 ($P < 0.01$), 吞噬墨水颗粒的巨噬细胞数目显著增加 ($P < 0.01$), 体内 IFN- γ 含量显著增加 ($P < 0.01$); 中性粒细胞增长率在 19.73%~96.49%。**结论** 西洋参皂苷类成分具有较好的增强机体免疫功能作用。

关键词: 斑马鱼; 西洋参皂苷; 中性粒细胞; 巨噬细胞; 增强免疫; γ 干扰素

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)14-3728-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.14.016

Effect of American ginseng saponins on enhancing immunity based on zebrafish model organisms

LV Jing, GAO Yan, LI Chen, YANG Long-fei, ZHAO Bo-nian

Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To study the immune enhancing effect of saponins from American ginseng and its mechanism. **Methods** The drug dosage of American ginseng saponin extract and the optimal modeling dose of rapamycin were determined by tolerance test and immunodeficiency model establishment experiments. Zebra fish were divided into control group (0.5% dimethyl sulfoxide), model group (4 $\mu\text{g/mL}$ rapamycin), and three origins American ginseng treatment groups with different concentrations (Shandong, Northeast, Canada, 4 $\mu\text{g/mL}$ rapamycin +10, 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$ American ginseng saponin extract) 48 h after fertilization (48 hpf). After a certain period of incubation, the number of neutrophils in the tail of zebrafish, macrophage phagocytosis, and interferon gamma (IFN- γ) content in the body were used as indexes, and the growth rate of neutrophils was calculated to investigate the immune-enhancing effect of American ginseng saponins. **Results** When the dosage of American ginseng saponins was higher than 50 $\mu\text{g/mL}$, the mortality of Zbra-fish increased with the increase of the concentration and the time of administration; Compared with control group, in model group, the number of neutrophils in the tail of zebrafish was decreased significantly ($P < 0.01$), and the content of IFN- γ in the body was decreased significantly ($P < 0.01$); Compared with model group, in 10 $\mu\text{g/mL}$ and 25 $\mu\text{g/mL}$ American ginseng treatment group, the number of neutrophils in the tail of zebrafish was increased significantly ($P < 0.01$), the number of macrophages engulfing ink particles was increased significantly ($P < 0.01$), the content of IFN- γ *in vivo* was increased significantly ($P < 0.01$), and the growth rate of neutrophils was between 19.73% and 96.49%. **Conclusion** The American ginseng saponins have a better effect on enhancing immunity.

Key words: zebrafish; American ginseng saponins; neutrophils; macrophages; enhancement of immunity; IFN- γ

收稿日期: 2019-12-26

基金项目: 国家重点研发计划子课题 (2017YFC1701501)

作者简介: 吕 婧, 女, 2017 级博士研究生。Tel: 13589056006 E-mail: 13589056006@126.com

*通信作者 高 燕, 副教授, 从事中药质量综合评价、新药研究、中药有效成分分离研究。E-mail: gaoyaninges@163.com

西洋参 *Panax quinquefolium* L. 味甘、微苦，性凉，归心、肺、肾经，可补气养阴，常用于治疗气虚阴亏等^[1]，具有增强机体免疫力、抗疲劳等多种生理活性^[2-3]，但其质量控制方式仍是亟需解决的难点问题^[4-6]。已有实验研究表明^[7-9]，西洋参可提高刀豆蛋白 A 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖能力、小鼠血清溶血素抗体水平，增加小鼠溶血空斑数，提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率。但是采用小鼠为动物模型进行免疫功能研究具有造模时间长、操作复杂、重复性差，不适宜进行高通量药材药效活性筛选的缺点。

斑马鱼 (*Danio rerio*, zebrafish) 是国际认可的新型模式生物，具有体型小，发育周期全透明、繁殖周期短、产卵量大、发育迅速等优点^[10-11]。本研究采用斑马鱼制备免疫低下模型^[12-13]，以中性粒细胞数目、巨噬细胞吞噬功能及 γ 干扰素 (IFN- γ) 的含量为考察指标研究西洋参的增强免疫作用，为免疫功能的研究提供良好的建模方法及指标选择思路，同时为高通量筛选西洋参增强免疫功能药效指标及谱-效相关质量评价系统^[14]的建立提供良好的技术支撑。

1 材料

1.1 仪器

SPX-280B-G 光照培养箱，上海基星生物科技有限公司；AGBP210S 电子天平，德国 Sartorius 公司；Milli-Q IQ7000 纯水机，美国 MILLIPORE 公司；KDM-A 控温电热套，金坛市医疗仪器厂；SW-CJ-1FD 净化工作台，苏净集团苏州安泰空气技术有限公司；HWS 智能型恒温恒湿培养箱，宁波江南仪器厂；GZX-9140MBE 电热鼓风干燥箱，上海博讯仪器厂；GI54DWS 高压灭菌机，南京庚辰科学仪器有限公司；BIORAD xMark 酶标仪，美国 Bio-Rad 公司；KQ2200DV 超声波清洗机，昆山市超声仪器有限公司；AXIO Zoom.V16 体式荧光显微镜，德国 ZEISS 公司；PCO-1500 显微注射仪，力钧生物科技有限公司。

1.2 试剂与试药

二甲基亚砜 (DMSO)，上海阿拉丁生化科技股份有限公司，分析纯，批号 39075；雷帕霉素 (批号 511E032)、印度墨水 (批号 317N021)、中性红 (批号 506C042)，北京索莱宝科技有限公司；IFN- γ 酶联免疫试剂盒 (批号 C0181100167) 购自武汉华美生物工程有限公司。

1.3 模型动物

AB 系及 Tg (*lyz*: EGFP) 转基因斑马鱼，由山东省科学院生物所提供。

2 方法

2.1 样品的收集及处理

西洋参饮片 3 批 (中国山东，批号 2018002；中国吉林，批号 2018012；加拿大，批号 2018029；均为散购或大田直接收购药材，经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定均为五加科人参属植物西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的干燥根。3 批西洋参饮片人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 总皂苷含量均符合《中国药典》2015 年版一部规定^[1]，总皂苷质量分数分别为 2.98%、3.50%、4.22%) 粉碎过三号筛，各取 1 g，分别置于圆底烧瓶中，加入 70% 乙醇 50 mL，称定质量，加热回流提取 2 h，放冷，补足减失的质量，摇匀滤过。取续滤液 25 mL 蒸干，干燥物分别以 DMSO 溶解，制备成 160 mg/mL 的西洋参提取物母液。

2.2 斑马鱼的培养及胚胎收集

斑马鱼成鱼明暗交替、品系及雌雄分开、恒温恒湿饲养，每日饲喂丰年虾。按照实验需要选取同品系斑马鱼按照雌雄比例 1:1 或 1:2 放置于产卵缸，采用隔板将雌雄斑马鱼隔开，次日光照前抽离隔板，使其自由受精，于抽离隔板时计时为 0 hpf (hours post fertilization, 受精后时间)，抽离隔板后 2 h 收集受精卵，置于清洁培养液中滴加适量亚甲基蓝溶液，28 °C 恒温光照继续培养。

2.3 西洋参提取物耐受性考察

选用 48 hpf 的 AB 系斑马鱼受精卵，经过脱膜处理 (链蛋白酶，1 mg/mL)，显微镜下筛选发育正常的幼鱼，每孔 10 条，每组平行 2 孔；设置加药组：西洋参提取物终质量浓度分别为 10、50、100、200、400、800 μ g/mL，DMSO 体积分数极值为 0.5%，同时设对照组：DMSO 体积分数为 0.5%。加盖置于 28 °C 恒温光照培养箱中孵育，每隔 24 h 更换药液，记录给药后 24、48、72 h 时斑马鱼死亡情况。

2.4 雷帕霉素对斑马鱼免疫功能的影响

选用 48 hpf 的 Tg (*lyz*: EGFP) 转基因斑马鱼，脱膜后在荧光显微镜下筛选中性粒细胞荧光标记正常的幼鱼，每孔 10 条，每组平行 2 孔；设置分组使雷帕霉素终质量浓度为 2、4、8 μ g/mL，同时对照组的 DMSO 体积分数为 0.5%，加盖置于 28 °C 恒温光照培养箱中孵育 24 h，采用荧光显微镜对斑马鱼

尾部中性粒细胞拍照并计数,采用 SPSS 统计软件进行 One-way ANOVA 分析。

2.5 西洋参对中性粒细胞数目的影响

按照“2.4”项下方法,另设西洋参组给予不同批次西洋参提取物,模型组及西洋参组雷帕霉素终质量浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$,西洋参组西洋参提取物终质量浓度分别为 10、25、50 $\mu\text{g/mL}$,对照组的 DMSO 体积分数为 0.5%。加盖置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温光照培养箱中孵育 24 h,采用荧光显微镜对斑马鱼尾部中性粒细胞拍照并计数,采用 SPSS 23.0 统计软件进行 One-way ANOVA 分析。

2.6 西洋参对巨噬细胞吞噬功能的影响

选用 48 hpf 的 AB 系斑马鱼(为减少黑色素对计数的影响,6 hpf 时加入苯硫脲)脱膜并筛选正常幼鱼,麻醉后在其卵黄囊内注射微量的印度墨水。按照“2.5”项下分为模型组及西洋参组,未注射印度墨水的斑马鱼作为对照组。加药后置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温光照培养箱中,每天更换药液并清除死亡斑马鱼,72 h 后采用中性红(1.25 $\mu\text{g/mL}$)染色 3 h,结束后清洗幼鱼,采用显微镜观察并统计吞噬了墨水颗粒的巨噬细胞数量,并采用 SPSS 23.0 统计软件进行 One-way ANOVA 分析。

2.7 西洋参对斑马鱼体内 IFN- γ 含量的影响

选用 48 hpf 的 AB 系斑马鱼经过脱膜处理,每孔 30 条,每组平行 2 孔;使模型组及西洋参组雷帕霉素终质量浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$,西洋参组西洋参提取物终质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$,另使对照组的 DMSO 体积分数为 0.5%。共同作用 24 h 后各组斑马鱼分别用 1 倍量 PBS 清洗,以每管 60 条收集于 EP 管中,并按照每 100 mg 样本加入缓冲液 1 mL 的原则加入相应体积的 PBS,匀浆后离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 5 000 r/min, 5 min)取上清液,采用酶联免疫反应法检测样本中 IFN- γ 的含量,采用 SPSS 23.0 统计软件进行 One-way ANOVA 分析。

3 结果

3.1 西洋参提取物耐受性

由图 1 可知,给药后 72 h 内,当给药质量浓度高于 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,随着给药质量浓度的增大,幼鱼死亡率显著升高;同时随着给药时间的延长,死亡率也逐渐升高。

3.2 雷帕霉素对斑马鱼免疫功能的影响

由统计结果(表 1 和图 2)可知,雷帕霉素导致斑马鱼免疫力下降,表现为与对照组相比,雷帕

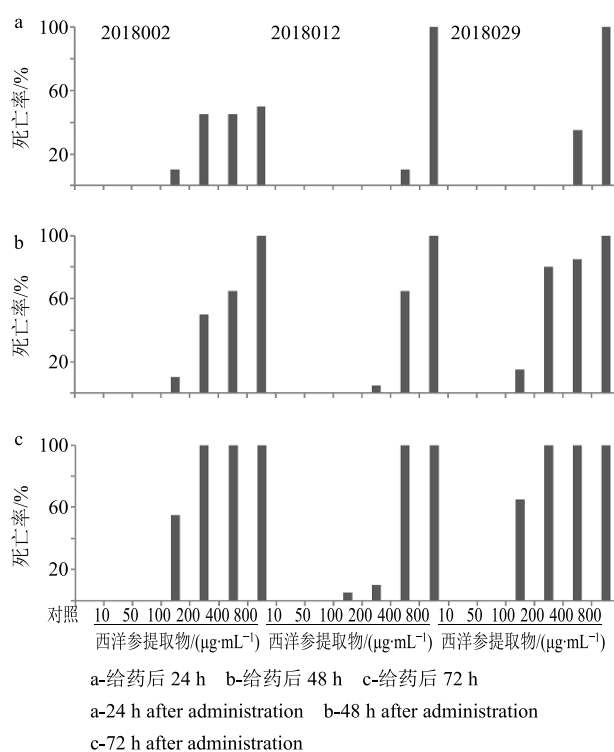


图 1 给药后 24、48、72 h 斑马鱼对西洋参提取物的耐受性
Fig. 1 Tolerance of zebrafish to American ginseng extract at 24, 48 and 72 h after administration

表 1 中性粒细胞统计结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Statistical results of neutrophil numbers ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	西洋参提取物($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	中性粒细胞数目	抑制率/%
对照	0.5% DMSO	87.0 ± 7.2	—
模型	2	$54.0 \pm 8.1^{**}$	38.28
	4	$50.0 \pm 4.0^{**}$	42.87
	8	$36.0 \pm 5.1^{**}$	58.27

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group

霉素组斑马鱼中性粒细胞数目极显著减少;同时,随着雷帕霉素质量浓度增加,中性粒细胞数目减少明显,免疫抑制作用呈现剂量依赖性。

3.3 西洋参对中性粒细胞数目的影响

由统计结果可知(表 2 和图 3),与对照组相比,模型组斑马鱼尾部中性粒细胞数目显著减少,说明雷帕霉素造成了斑马鱼免疫抑制。与模型组相比,3 批西洋参提取物低、中浓度组均可显著增加中性粒细胞数目,说明西洋参具有抗雷帕霉素引起的免疫力低下作用。同时,在一定质量浓度范围内随给药质量浓度的增加,增强免疫力作用增强;当给药量为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,增强免疫力作用减弱,甚至表现出

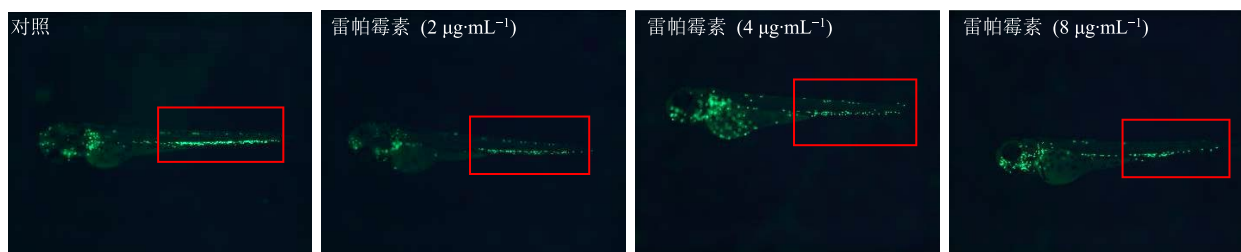


图 2 雷帕霉素对斑马鱼中性粒细胞数目的影响

Fig. 2 Results of rapamycin on neutrophils number in zebrafish

表 2 西洋参对中性粒细胞数目的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Statistical results of neutrophil numbers ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	中性粒细胞数目	增长率/%
对照	0.5% DMSO	87.0 ± 7.2	—
模型	4	$50.0 \pm 4.0^{**}$	—
西洋参	10	$63.0 \pm 5.8^{***}$	35.68
2018002	25	$86.0 \pm 6.8^{***\Delta}$	96.49
	50	$51.0 \pm 5.8^{**}$	1.35
西洋参	10	$57.0 \pm 9.2^{**\#}$	19.73
2018012	25	$60.0 \pm 9.5^{***}$	26.76
	50	$16.0 \pm 6.4^{***}$	-92.97
西洋参	10	$65.0 \pm 8.1^{***\Delta}$	39.19
2018029	25	$82.0 \pm 7.6^{***\Delta}$	87.30
	50	$19.0 \pm 8.1^{***}$	-83.24

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

与西洋参 2018012 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组比较: $^{\Delta}P < 0.05$; 与西洋参

2018012 ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组比较: $^{**}P < 0.01$

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

$^{\Delta}P < 0.05$ vs American ginseng 2018012 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) group; $^{**}P < 0.01$ vs American ginseng 2018012 ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) group

免疫抑制作用。另外, 与中、低质量浓度的吉林产西洋参相比, 山东及加拿大产西洋参促中性粒细胞数目增长作用明显, 且具有显著差异, 说明不同产地的西洋参增强免疫力作用不同。

增长率 = (给药组中性粒细胞数目 - 模型组中性粒细胞数目) / (空白对照组中性粒细胞数目 - 模型组中性粒细胞数目)

3.4 西洋参对巨噬细胞吞噬功能的影响

由统计结果可知 (表 3), 西洋参可以提高巨噬细胞吞噬能力, 表现为西洋参组斑马鱼吞噬了印度墨水的巨噬细胞数目较模型组显著增加, 与中性粒细胞数目统计结果相似。

3.5 西洋参对斑马鱼体内 $\text{IFN-}\gamma$ 含量的影响

由统计结果可知 (图 4), 雷帕霉素可导致斑马鱼体内的 $\text{IFN-}\gamma$ 含量显著降低; 3 批西洋参组均可以提高斑马鱼体内的 $\text{IFN-}\gamma$ 含量; 与吉林产西洋参

相比, 山东及加拿大产西洋参提高斑马鱼体内的 $\text{IFN-}\gamma$ 含量作用较好, 且具有显著差异; 与中性粒细胞数目、巨噬细胞吞噬功能统计结果一致。

4 讨论

本研究选用雷帕霉素免疫抑制剂建立斑马鱼免疫力低下模型, 结果显示 2、4、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的雷帕霉素均可导致斑马鱼中性粒细胞数目显著下降, 选用 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为造模质量浓度, 此时中性粒细胞的抑制率为 43%。

根据文献报道^[2,15]及前期实验中对西洋参皂苷类成分 UPLC-Q-TOF-MS/MS 指纹图谱的研究, 采用 70%乙醇提取西洋参中皂苷类成分, 并对其中人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rd 、 Rc 、 Ro 及拟人参皂苷 F_{11} 等 17 种皂苷类成分进行了定性、定量分析^[16]。

通过耐受性实验确定了西洋参皂苷类提取物最高给药质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 通过统计中性粒细胞数目及巨噬细胞吞噬能力, 确定了西洋参皂苷类提取物质量浓度为 10、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 表现为增强免疫作用, 同时随着质量浓度升高, 作用越好, 当质量浓度高于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 增强免疫作用减弱。

综合考虑药效指标及凸显不同产地西洋参的药效差异, 选择 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为西洋参增强免疫药效考察的给药剂量。

$\text{IFN-}\gamma$ 为 II 型干扰素^[17], 由活化 T 细胞、NK 细胞产生, 可以激活巨噬细胞, 诱导 Th1 细胞分化并抑制 Th2 细胞分化, 增强机体免疫能力^[18-20]。雷帕霉素造成斑马鱼自身免疫系统损伤, 导致 $\text{IFN-}\gamma$ 分泌减少; 西洋参给药后可以促进 $\text{IFN-}\gamma$ 的分泌, 进而促进斑马鱼的免疫功能恢复正常。

本研究建立的斑马鱼免疫功能评价模型具有建模周期短、检测指标科学合理、客观、灵敏易测的优点。西洋参皂苷类成分具有增强机体免疫力作用, 表现为可以增加斑马鱼中性粒细胞数量、改善巨噬细胞吞噬功能及促进体内 $\text{IFN-}\gamma$ 的分泌; 其中, 各产地中、低浓度西洋参皂苷类成分提取物较高浓度

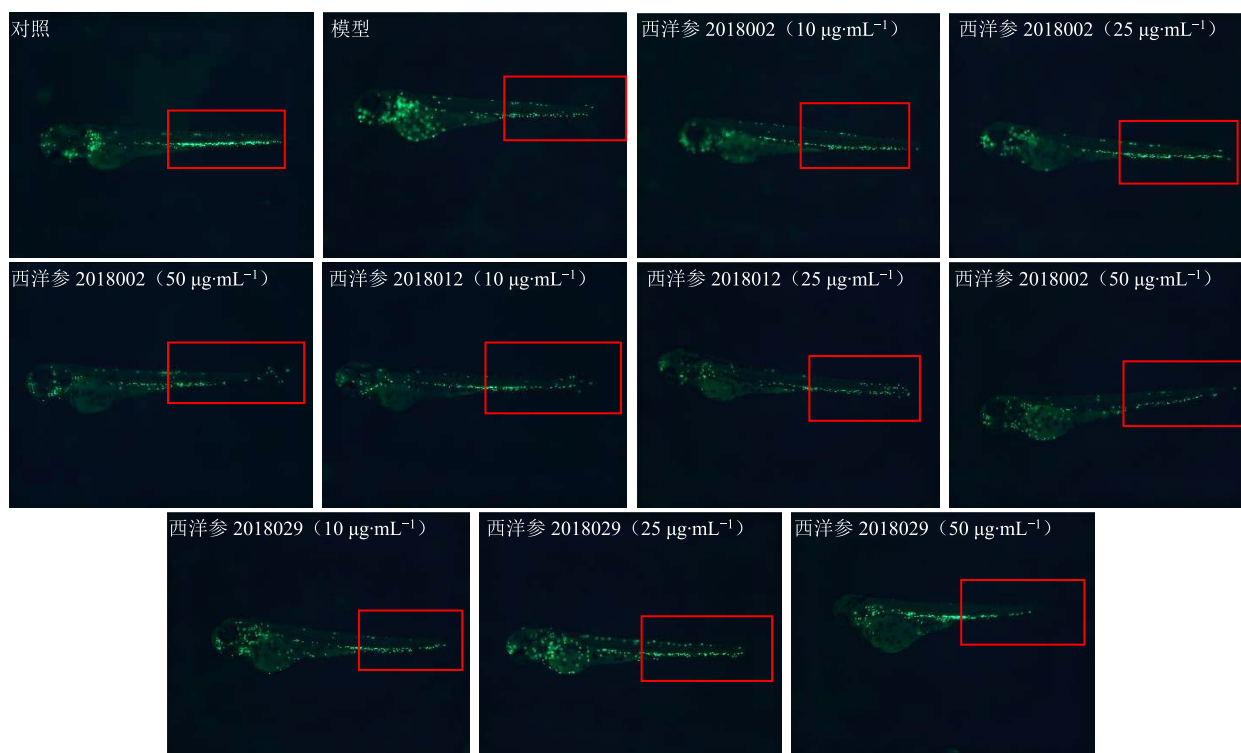


图3 西洋参对斑马鱼中性粒细胞数目的影响

Fig. 3 Effect of American ginseng on number of neutrophils in zebrafish

表3 巨噬细胞统计结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 3 Statistical results of macrophage numbers ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

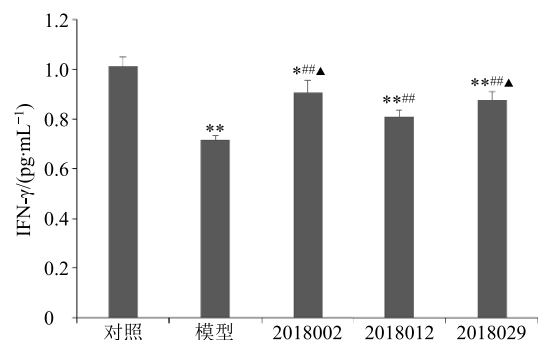
组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	吞噬墨水的巨噬细胞数目
对照	0.5% DMSO	0 ^{##}
模型	4	3.3 ± 1.4 ^{**}
西洋参	10	5.0 ± 1.2 ^{*##}
2018002	25	5.7 ± 1.3 ^{*##}
	50	2.7 ± 1.3 ^{**}
西洋参	10	4.3 ± 1.1 ^{**}
2018012	25	4.2 ± 1.4 ^{**}
	50	1.7 ± 1.2 ^{*##}
西洋参	10	5.5 ± 1.2 ^{*##}
2018029	25	5.6 ± 1.4 ^{*##}
	50	2.5 ± 0.9 ^{**}

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与西洋参 2018012 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组比较: [▲] $P < 0.05$; 与西洋参 2018012 ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs American ginseng 2018012 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs American ginseng 2018012 ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) group

组均具有较好的增强免疫力作用。

另外,本研究建立的模型及选用的检测指标可以很好地反映不同产地西洋参间的药效差异:中国



与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与西洋参 2018012 组比较: [▲] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs American ginseng 2018012 group

图4 IFN-γ 含量均值图及统计分析结果

Fig. 4 IFN-γ content mean value and statistical analysis results

山东及加拿大产西洋参,较中国吉林产西洋参增强免疫力作用较好,本实验为西洋参增强免疫力高通量药效指标筛选提供了良好的实验方法,同时为西洋参谱-效相关质量评价系统的建立提供了科学的数据支撑。

参考文献

- [1] 刘 鹏,王士伟,夏广萍. 西洋参花蕾中人参皂苷 Re、拟人参皂苷 F₁₁、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd 的含量

- 测定 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 4144-4147.
- [2] 李囡囡, 卢莉蓉, 刘芳, 等. 基于 MATLAB 优化工具箱优化西洋参总皂苷提取工艺 [J]. 中成药, 2017, 39(10): 2187-2190.
- [3] 白雪, 黄鑫, 刘淑莹. 不同来源西洋参药材及产品皂苷成分评价研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(6): 652-655.
- [4] Zou L Q, Kuang X J, Sun C. Advances in transcriptomic studies and ginsenoside biosynthesis of American ginseng [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(2): 116-122.
- [5] 王欢, 曾凡琳, 谢彩香. 西洋参 UPLC-UV-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 143-148.
- [6] 杨雨, 金银萍, 郑培和, 等. 西洋参茎叶中三萜皂苷成分研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(9): 2086-2087.
- [7] 吴月国, 赵铮蓉, 张萍, 等. 紫皮石斛西洋参颗粒的研制及增强免疫力功能评价 [J]. 食品研究与开发, 2019, 40(3): 131-135.
- [8] 杨锋, 童晔玲, 戴关海, 等. 蜂胶西洋参软胶囊对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 291-293.
- [9] 赵珺彦, 周大兴, 翟鹏贵. 西洋参提取物增强免疫力作用的实验研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(5): 755-757.
- [10] 赵崇军, 田敬欢, 王金凤, 等. 斑马鱼在中药研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2635-2648.
- [11] 韩利文, 袁延强, 何秋霞, 等. 斑马鱼模型在中药活性筛选中的适用性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2037-2041.
- [12] 刘发生. 利用斑马鱼模型研究新阿胶对化疗引起免疫与造血损伤的保护作用 [D]. 太原: 山西医科大学, 2018.
- [13] 刘发生, 王荣春, 郭敬兰, 等. 利用斑马鱼模型研究芦笋有效成分对免疫功能的调节作用 [J]. 山东科学, 2017, 30(6): 29-34.
- [14] 杨龙飞, 赵渤年, 丁晓彦, 等. 丹参水溶性成分促斑马鱼血管生成及心脏保护活性的谱-效关系研究 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2899-2907.
- [15] 李素婷, 刘郁. 正交试验法优选西洋参提取工艺 [J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(6): 478-479.
- [16] 吕婧, 高燕, 赵渤年. 基于 LC-QTOF-MS/MS 的西洋参皂苷类成分表征及增强免疫力作用谱效关系研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(5): 2298-2304.
- [17] 赵克明, 鞠宝兆, 曲妮妮, 等. 加味小柴胡汤对哮喘大鼠血清中 IL-4 和 IFN- γ 水平的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(6): 2076-2078.
- [18] Niethammer P, Grabher C, Look A T, *et al.* A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish [J]. *Nature*, 2009, 459(7249): 996-999.
- [19] Bennett C M, Kanki J P, Rhodes J, *et al.* Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Blood*, 2001, 98(3): 643-651.
- [20] Ellett F, Pase L, Hayman J W, *et al.* Mpeg promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish [J]. *Blood*, 2010, 117: e49-e56.
- [21] 中国药典 [S]. 一部. 2015.