

荆防颗粒增强免疫作用机制研究

吕 婧¹, 高 燕^{1*}, 赵渤年¹, 姚景春², 梁红宝²

1. 山东中医药大学 药物研究院, 黄河流域特色中药生态保护和高质量发展协同创新中心, 山东 济南 250355

2. 鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276002

摘要: **目的** 探讨荆防颗粒增强免疫作用及作用机制。**方法** 采用模式生物斑马鱼, 分别建立雷帕霉素致中性粒细胞减少、酒石酸长春瑞滨致巨噬细胞和胸腺 T 细胞减少的斑马鱼免疫低下模型, 以中性粒细胞数目、巨噬细胞荧光强度、T 细胞荧光强度以及 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 含量为药效评价指标, 探究荆防颗粒增强免疫的药效作用。采用环磷酰胺免疫低下小鼠模型, 以脏器指数、血清细胞因子、血清免疫球蛋白等指标评价荆防颗粒的免疫调节活性, 采用 qRT-PCR 探究荆防颗粒的免疫调节作用机制。**结果** 荆防颗粒可以增加中性粒细胞、巨噬细胞和 T 细胞数量及 IFN- γ 含量 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 增加环磷酰胺免疫低下小鼠的脏器指数 ($P < 0.05$), 增加小鼠血清中白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) 的含量 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著下调小鼠脾组织中核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路相关基因表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 从而起到增强免疫的作用。**结论** 荆防颗粒具有增强免疫的作用, 其作用机制与抑制 NF- κ B 通路有关。

关键词: 荆防颗粒; 斑马鱼; 免疫; 中性粒细胞; 巨噬细胞; 核因子- κ B 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)16-5541-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.016

Mechanism of Jingfang Granules in enhancing immune function

LYU Jing¹, GAO Yan¹, ZHAO Bonian¹, YAO Jingchun², LIANG Hongbao²

1. Collaborative Innovation Center for Ecological Protection and High-Quality Development of Characteristic Traditional Chinese Medicine in Yellow River Basin, Institute of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276002, China

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of Jingfang Granules (荆防颗粒) on enhancing immunity. **Methods** A model organism zebrafish was used to establish immunocompromised models of rapamycin-induced neutropenia, vinorelbine tartrate-induced macrophage and thymic T cell reduction in zebrafish. The number of neutrophils, macrophage fluorescence intensity, T cell fluorescence intensity and interferon- γ (IFN- γ) content were used as a pharmacological evaluation index to explore the pharmacological effect of Jingfang Granules on enhancing immunity. Using a cyclophosphamide immunocompromised mouse model, the immune regulatory activity of Jingfang Granules was evaluated using indicators such as organ index, serum cytokines and serum immunoglobulin, qRT PCR was used to explore the immune regulatory mechanism of Jingfang Granules. **Results** Jingfang Granules could increase the numbers of neutrophils, macrophages and T cells, as well as IFN- γ content ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001), increase the organ index of immunocompromised mice with cyclophosphamide ($P < 0.05$), increase levels of interleukin-2 (IL-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin M (IgM) in serum ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001), and significantly down-regulate nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway related gene expressions in spleen tissue of mice ($P < 0.05$, 0.01), thereby playing a role in enhancing immunity. **Conclusion** Jingfang Granules has the effect of enhancing immunity, and its mechanism is related to the inhibition of NF- κ B pathway.

Key words: Jingfang Granules; zebrafish; immunity; neutrophils; macrophage; nuclear factor- κ B pathway

收稿日期: 2024-01-12

基金项目: 山东省自然科学基金联合基金项目 (ZR2021LZY021); 国家中医药管理局高水平重点学科-中药药剂学 (zyzdxx-2023119)

作者简介: 吕 婧, 女, 二级讲师。Tel: 13589056006 E-mail: 13589056006@126.com

*通信作者: 高 燕, 硕士生导师, 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: gaoyaningyes@163.com

荆防颗粒由荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、前胡、川芎、枳壳、茯苓、桔梗和甘草 11 味中药组成, 主要功效为发汗解表、散风祛湿, 主治外感风寒湿邪, 用于风寒感冒、头痛身痛^[1]。现代药理研究证实, 荆防颗粒具有解热、抗炎和镇痛作用^[2]。荆防颗粒由荆防败毒散优化而来, 临床研究表明, 荆防败毒散能缓解咳嗽、发热、疼痛等作用, 调节细胞免疫和炎症因子, 提高机体免疫系统功能^[3]。但荆防颗粒对于机体免疫系统的作用靶点与作用机制尚不明确, 其次, 荆防颗粒在临床应用中的安全性、有效性和剂量相关性等方面尚存在争议。此外, 荆防颗粒的药效学特性、质量控制标准以及其在不同疾病治疗中的应用范围等方面也尚不明确。因此, 本研究从多个层面探讨荆防颗粒的免疫调节活性及其作用机制。

斑马鱼幼鱼以先天免疫存活, 适应性免疫系统在 4~6 周后逐渐成熟^[4]。幼鱼在感染炎症初始阶段, 中性粒细胞最先对损伤作出反应; 随后巨噬细胞被召集到炎症组织, 吞噬病原体和组织碎片。T 淋巴细胞简称 T 细胞, 是来源于骨髓的淋巴干细胞, 前体 T 细胞最早在肾脏骨髓里被发现, 随后在胸腺中分化、发育成熟后, 通过淋巴和血液循环而分布到全身的免疫器官和组织中发挥免疫功能^[5]。 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 又称免疫干扰素, 由活化 T 细胞、自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 产生, 可以激活巨噬细胞, 诱导辅助性 T 细胞 (Thelper cells, Th1) 细胞分化并抑制 Th2 细胞分化, 增强机体免疫能力。因此本研究建立斑马鱼幼鱼免疫低下模型, 通过中性粒细胞数目、巨噬细胞荧光强度及 T 细胞荧光强度为评价指标, 初步评价荆防颗粒增强免疫作用。本研究同时建立环磷酰胺免疫低下小鼠模型, 以脏器指数、细胞因子、血清免疫球蛋白等指标结合脾组织中免疫相关基因表达情况探讨荆防颗粒免疫调节机制, 为荆防颗粒调节免疫作用临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

AB 系野生型斑马鱼、转基因中性粒细胞红色荧光 [Tg (lyz: EGFP)] 斑马鱼、转基因巨噬细胞绿色荧光 [Tg (mpeg1: EGFP)] 斑马鱼均购自山东第一医科大学; 转基因 T 细胞红色荧光 [Tg (rag2: DsRed)] 斑马鱼购自杭州环特生物科技股份有限公司。

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 体质量 (18 ± 5) g, 6 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2021-0006。动物于 SPF 级环境下饲养, 温度 $20 \sim 22^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%~60%。动物实验经山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会批准 (批准号 SDUTCM20221125216)。

1.2 药品与试剂

雷帕霉素 (批号 622R031) 购自北京索莱宝科技有限公司; 酒石酸长春瑞滨 (批号 A19GB145811)、盐酸小檗胺 (批号 D24GB167626)、环磷酰胺 (批号 J25GS155966)、左旋咪唑 (批号 M27GS143081) 购自上海源叶生物科技有限公司; 荆防颗粒 (批号 0012009003) 购自山东新时代药业有限公司; IFN- γ ELISA 试剂盒 (批号 202203) 购自江苏晶美生物科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 ED-20852)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) ELISA 试剂盒 (批号 ED-20176)、免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) ELISA 试剂盒 (批号 ED-20509)、免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) ELISA 试剂盒 (批号 ED-20513) 购自厦门仑昌硕生物科技有限公司; RNA prep Pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒 (批号 X0516) 购自天根生化科技有限公司; PrimeScript RT reagent (批号 ALG2080A)、TB Green Premix Ex (批号 ALG1229A) 购自青岛麦迪赛斯生物科技有限公司。

1.3 仪器

LRHS-300A 型恒温恒湿培养箱 (山东博科科学仪器有限公司); IX73 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); PL-S20 型数码超声清洗机 (东莞康士洁超声波科技有限公司); Allegra X-30R 型离心机 [贝克曼库尔特 (英国) 股份有限公司]; FA1004N 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); Neo 13R 型高速冷冻离心机 (上海力申科学仪器有限公司); CFX Connect 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); Multiskan Sky High 全自动酶标仪、NanoDrop One 超微量紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SCIENTZ-48 型高通量组织研磨仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 斑马鱼免疫低下模型的建立及荆防颗粒的干预作用

2.1.1 样品溶液的制备 取荆防颗粒 0.5 g, 精密称

定,加纯水 50 mL 使其溶解,制备成质量浓度为 10 mg/mL 的母液,给药前采用养鱼水稀释至适宜质量浓度。

2.1.2 斑马鱼的培养及胚胎的收集 将斑马鱼养殖于 28 °C 的养鱼水中,雌鱼与雄鱼分开饲养。保证明暗交替,给予充足的氧气,每天投喂斑马鱼食和丰年虾。通过实验要求挑选适龄繁殖斑马鱼,将斑马鱼按雌雄比例(雌:雄=1:1 或 1:2)置于产卵缸中,并用隔板将雌雄隔开,第 2 天光照前将隔板取出,使斑马鱼自由受精,从取出隔板开始计时,2 h 后收集受精卵,挑选合适的受精卵置于清洁的培养液中,28 °C 恒温继续培养。

2.1.3 荆防颗粒耐受性考察 经过脱膜处理(1 mg/mL 链蛋白酶)的受精后 48 h (48 h post fertilization, 48 hpf) 的 AB 系斑马鱼,荧光显微镜下筛选发育正常的幼鱼,放置 24 孔板中,每孔 10 条,每组平行 2 孔;设置空白组和不同质量浓度的给药组(荆防颗粒终质量浓度分别为 100、500、1 000、1 500、2 000 $\mu\text{g/mL}$),空白组加入不含药物的养鱼水,加盖置于 28 °C 恒温光照培养箱中孵育,记录给药后 48 h 斑马鱼死亡情况。

2.1.4 斑马鱼中性粒细胞减少模型的建立 课题组前期研究了雷帕霉素对斑马鱼的免疫抑制作用^[6],确定雷帕霉素的造模质量浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$,具体操作如下:选用经过脱膜处理(1 mg/mL 链蛋白酶)的 48 hpf 的 Tg (lyz: EGFP) 转基因斑马鱼,每孔 10 条,每组平行 2 孔;加入终质量浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ 的雷帕霉素,同时设置空白组,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。

2.1.5 斑马鱼巨噬细胞减少模型的建立 选用 48 hpf 的 Tg (mpeg1: EGFP) 转基因斑马鱼,每孔 10 条,每组平行 2 孔;加入终质量浓度为 2、5、10、20、50 $\mu\text{g/mL}$ 的酒石酸长春瑞滨,同时设置空白组,加盖置于 28 °C 培养箱中孵育至 3 dpf,在荧光显微镜下观察斑马鱼尾部静脉血管中巨噬细胞荧光强度,并拍照,使用 Image pro 高级图像处理软件采集数据,计算巨噬细胞抑制率。

巨噬细胞抑制率=(空白组荧光强度-模型组荧光强度)/空白组荧光强度

2.1.6 斑马鱼 T 细胞减少模型的建立 选取 4 dpf 的 Tg (rag2: DsRed) 转基因斑马鱼,每孔 10 条,每组平行 2 孔;加入终质量浓度为 20、50、100、

200、300 $\mu\text{g/mL}$ 的酒石酸长春瑞滨,同时设置空白组,加盖置于 28 °C 培养箱中孵育至 24 h,在荧光显微镜下观察斑马鱼 T 细胞荧光强度,并拍照,使用 Image pro 高级图像处理软件采集数据,计算 T 细胞抑制率。

T 细胞抑制率=(空白组荧光强度-模型组荧光强度)/空白组荧光强度

2.1.7 荆防颗粒对斑马鱼中性粒细胞数目的影响 选用经过脱膜处理(1 mg/mL 链蛋白酶)的 48 hpf 的 Tg (lyz: EGFP) 转基因斑马鱼,每孔 10 条,每组平行 2 孔;设置空白组、模型组和荆防颗粒(20、50、100、500 $\mu\text{g/mL}$)组,空白组给予养鱼水,其余各组给予终质量浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ 的雷帕霉素,各给药组给予相应浓度的药物。加盖孵育 24 h,采集图像,统计斑马鱼尾部中性粒细胞数目并计数,计算中性粒细胞增长率。

中性粒细胞增长率=(给药组中性粒细胞数目-模型组中性粒细胞数目)/(空白组中性粒细胞数目-模型组中性粒细胞数目)

2.1.8 荆防颗粒对斑马鱼巨噬细胞生成的影响 盐酸小檗胺作为一种生物碱类药物,已在临床实践中展现出良好的免疫调节功效,可以刺激 T 细胞的分化、增殖和活化,同时对巨噬细胞的吞噬活性具有促进作用^[7]。因此,使用盐酸小檗胺(5 $\mu\text{g/mL}$)作为阳性对照组,以评估实验药物或处理方法在促进巨噬细胞生成方面的效果。取 48 hpf 的 Tg (mpeg1: EGFP) 转基因斑马鱼于 24 孔板中,每孔 10 条,每组平行 2 孔;设置空白组、模型组、盐酸小檗胺(5 $\mu\text{g/mL}$)组和荆防颗粒(10、50、100、250、500 $\mu\text{g/mL}$)组,空白组给予养鱼水,其余各组给予终质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的酒石酸长春瑞滨,各给药组给予相应浓度的药物。加盖置于 28 °C 培养箱中孵育至 3 dpf,在荧光显微镜下观察斑马鱼尾部静脉血管中巨噬细胞荧光强度并拍照,使用 Image pro 图像处理软件采集数据,计算巨噬细胞改善率。

巨噬细胞改善率=(给药组荧光强度-模型组荧光强度)/(空白组荧光强度-模型组荧光强度)

2.1.9 荆防颗粒对斑马鱼 T 细胞生成的影响 选取 4 dpf 的 Tg (rag2: DsRed) 转基因斑马鱼于 24 孔板中,每孔 10 条,每组平行 2 孔;设置空白组、模型组、盐酸小檗胺(5 $\mu\text{g/mL}$)组和荆防颗粒(10、50、100、250、500、1 000、1 500 $\mu\text{g/mL}$)组,空白组给予养鱼水,其余各组给予终质量浓度为 200

μg/mL 的酒石酸长春瑞滨, 各给药组给予相应浓度的药物。加盖置于 28 ℃ 培养箱中孵育至 24 h, 在荧光显微镜下观察斑马鱼 T 细胞荧光强度并拍照, 使用 Image pro 高级图像处理软件采集数据, 计算 T 细胞增长率。

T 细胞增长率=(给药组荧光强度-模型组荧光强度)/(空白组荧光强度-模型组荧光强度)

2.1.10 荆防颗粒对斑马鱼体内 IFN-γ 含量的影响 选用经过脱膜处理 (1 mg/mL 链蛋白酶) 的 48 hpf 的 AB 系斑马鱼, 每孔 30 条, 每组平行 2 孔; 设置空白组、模型组 and 不同批次 (1~11 批次) 荆防颗粒组, 空白组给予养鱼水, 其余各组给予终质量浓度为 4 μg/mL 的雷帕霉素, 各给药组给予 100 μg/mL 的药物。加盖置于 28 ℃ 培养箱中孵育至 24 h, 各组斑马鱼分别用 PBS 清洗, 收集于 EP 管中, 每管 60 条, 每 100 毫克样本加入 1 mL PBS, 匀浆后 4 ℃、5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 采用 ELISA 试剂盒说明书测定 IFN-γ 含量。

2.2 环磷酰胺致小鼠免疫低下模型的复制及荆防颗粒的干预作用

2.2.1 分组、造模、给药及取材 左旋咪唑可提高病人对细菌及病毒感染的抵抗力, 目前适用于肺癌、乳腺癌手术后或急性白血病、恶化淋巴瘤化疗后作为辅助治疗及免疫缺陷疾病的辅助治疗, 使用左旋咪唑作为阳性对照药物。BALB/c 雄性小鼠适应性饲养 7 d 后, 根据随机数字表法分为空白组、模型组、左旋咪唑 (40 mg/kg) 组和荆防颗粒低、中、高剂量 (117、234、468 mg/kg, 分别相当于 1、2、4 倍临床等效剂量) 组, 每组 10 只。模型组和各给药 ip 环磷酰胺 (50 mg/kg), 1 次/d, 连续注射 3 d。注射结束后模型组小鼠出现体质量减轻、活动减少、反应迟钝、蜷缩弓背、毛发疏松等体征, 提示模型复制成功。各给药组 ig 相应药物, 空白组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续给药 14 d。给药结束后, 小鼠摘眼球取血, 收集血清; 摘取胸腺、脾脏, 计算胸腺指数和脾脏指数。

2.2.2 ELISA 检测小鼠血清中 IL-2、TNF-α、IgG 和 IgM 水平 采用 ELISA 试剂盒说明书测定各组小鼠血清中 IL-2、TNF-α、IgG 和 IgM 水平。

2.2.3 qRT-PCR 检测小鼠脾组织 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, *TLR4*)、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, *MyD88*)、TNF 受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, *TRAF6*)、核

因子-κB p65 (nuclear factor-κB p65, *NF-κB p65*)、*p-NF-κB p65*、磷酸化 NF-κB 抑制蛋白 α (phosphorylated NF-κB inhibitor α, *p-IκBα*) mRNA 表达 取小鼠脾组织, 加入裂解液匀浆, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>TLR4</i>	F: GAGCCGGAAGGTTATTGTGGTAGTG R: TCAAGGACAATGAAGATGATGCCAGAG
<i>MyD88</i>	F: CGGCAACTAGAACAGACAGACTATCG R: TCTCAATTAGCTCGCTGGCAATGG
<i>TRAF6</i>	F: CATCTTCAGTTACCGACAGCTCAG R: TGGTCGAGAATTGTAAGGCGTAT
<i>NF-κB p65</i>	F: TCCTGTTCGAGTCTCCATGCAG R: GGTCTCATAGGTCCTTTTGCGC
<i>p-NF-κB p65</i>	F: GCTGCCAAAGAAGGACACGACA R: GGCAGGCTATTGCTCATCACAG
<i>p-IκBα</i>	F: GCCAGGAATTGCTGAGGCACTT R: GTCTGCGTCAAGACTGCTACAC
<i>GAPDH</i>	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG R: GGGGTCGTTGATGGCAACA

2.3 统计学分析

实验数据用 SPSS 23.0 软件统计分析, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 荆防颗粒对斑马鱼免疫低下模型的影响

3.1.1 耐受性实验 如图 1 所示, 斑马鱼给予荆防颗粒干预 48 h 后, 当荆防颗粒质量浓度高于 2 000 μg/mL 时, 随着药物质量浓度的增加, 斑马鱼死亡率升高。

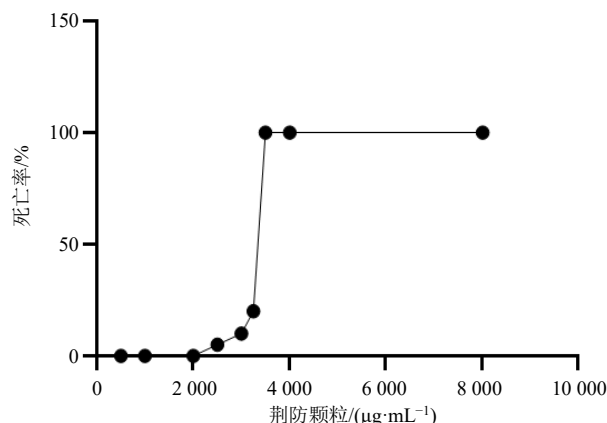


图 1 给药后 48 h 斑马鱼对荆防颗粒的耐受性

Fig. 1 Tolerance of zebrafish to Jingfang Granules 48 h after administration

3.1.2 酒石酸长春瑞滨对斑马鱼免疫功能的影响
如图 2 和表 2 所示, 与空白组比较, 酒石酸长春瑞滨 (10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组斑马鱼尾部巨噬细胞荧

光强度显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 且呈剂量相关性。因此选择 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 酒石酸长春瑞滨为斑马鱼巨噬细胞减少模型的建模条件。

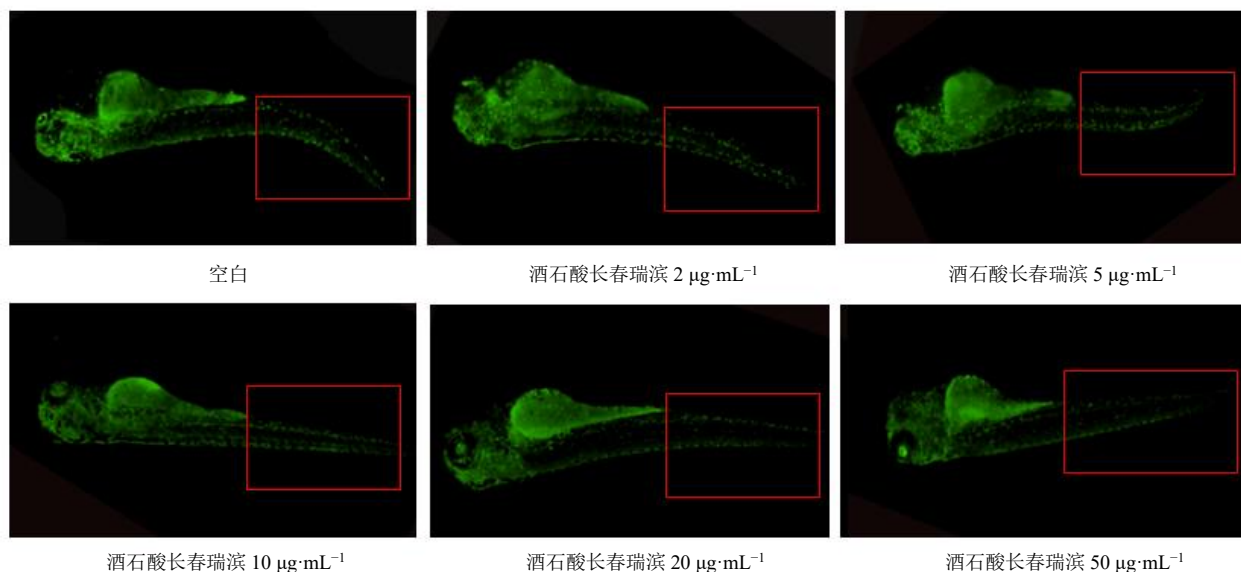


图 2 不同质量浓度的酒石酸长春瑞滨对斑马鱼尾部巨噬细胞荧光强度的影响 ($\times 4$)

Fig. 2 Effect of different concentrations of vinorelbine tartrate on fluorescence intensity of macrophages in tail of zebrafish ($\times 4$)

表 2 不同质量浓度的酒石酸长春瑞滨对斑马鱼尾部巨噬细胞荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of different concentrations of vinorelbine tartrate on fluorescence intensity of macrophages in tail of zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	巨噬细胞 荧光强度	巨噬细胞 抑制率/%
空白	—	12.59 ± 0.77	—
酒石酸长春瑞滨	2	11.44 ± 1.15	9.11
	5	11.55 ± 0.82	8.23
	10	$10.56 \pm 0.94^{**}$	16.13
	20	$9.59 \pm 0.86^{***}$	23.82
	50	$8.22 \pm 1.30^{***}$	34.68

与空白组比较: $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$, 下表同。

$^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ vs control group, same as below tables.

如图 3 和表 3 所示, 与空白组比较, 酒石酸长春瑞滨 (50、100、200、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组斑马鱼 T 细胞荧光强度显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 且呈剂量相关性。因此选择 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 酒石酸长春瑞滨为斑马鱼 T 细胞减少模型的建模条件。

3.1.3 荆防颗粒对免疫低下斑马鱼模型的免疫调节作用
如图 4 和表 4 所示, 与空白组比较, 模型组斑马鱼尾部中性粒细胞数目显著减少 ($P<0.001$),

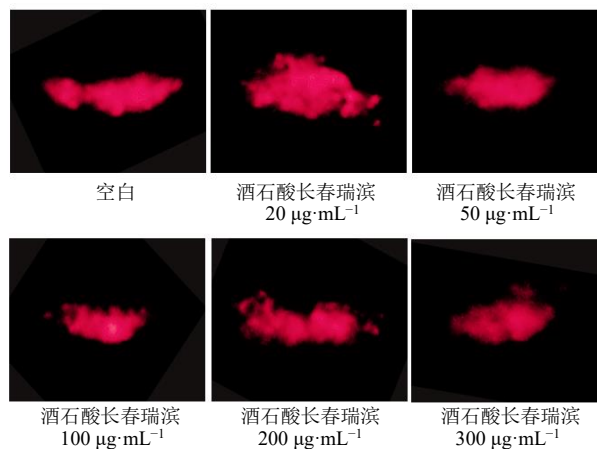


图 3 不同质量浓度的酒石酸长春瑞滨对斑马鱼 T 细胞荧光强度的影响 ($\times 20$)

Fig. 3 Effect of different concentrations of vinorelbine tartrate on fluorescence intensity of T cells in zebrafish ($\times 20$)

表明雷帕霉素致斑马鱼免疫低下模型复制成功; 与模型组比较, 荆防颗粒 (20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组中性粒细胞数目均显著增加 ($P<0.05$ 、 0.001), 表明荆防颗粒具有抑制雷帕霉素引起的免疫力低下作用。且在一定质量浓度范围内随给药质量浓度的增加, 免疫调节作用增强。

表 3 不同质量浓度的酒石酸长春瑞滨对斑马鱼 T 细胞荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of different concentrations of vinorelbine tartrate on fluorescence intensity of T cells in zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	T 细胞荧光强度	T 细胞抑制率/%
空白	—	87.76 $\pm$ 3.30	—
酒石酸长春瑞滨	20	83.04 $\pm$ 3.10	5.38
	50	79.47 $\pm$ 4.42**	9.45
	100	77.24 $\pm$ 2.87**	11.99
	200	71.49 $\pm$ 7.61***	18.54
	300	69.79 $\pm$ 6.80***	20.47

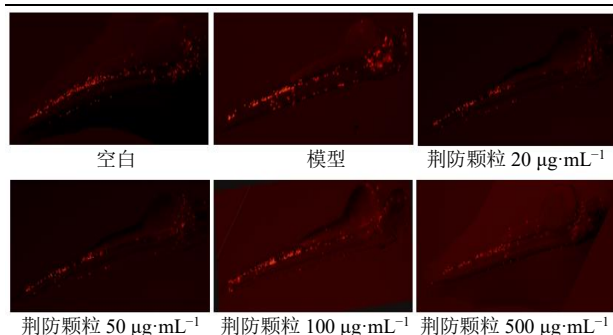


图 4 荆防颗粒对斑马鱼中性粒细胞减少模型尾部中性粒细胞的影响 ($\times 4$)

Fig. 4 Effect of Jingfang Granules on tail neutrophils of zebrafish neutropenia model ($\times 4$)

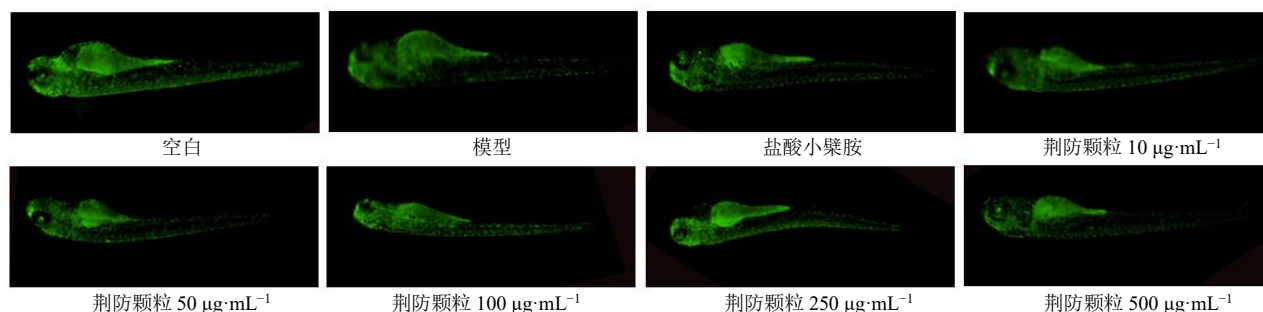


图 5 荆防颗粒对斑马鱼巨噬细胞减少模型巨噬细胞荧光强度的影响 ($\times 4$)

Fig. 5 Effect of Jingfang Granules on fluorescence intensity of macrophages in zebrafish macrophage reduction model ($\times 4$)

表 5 荆防颗粒对斑马鱼巨噬细胞减少模型巨噬细胞荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Jingfang Granules on fluorescence intensity of macrophages in zebrafish macrophage reduction model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	巨噬细胞荧光强度	巨噬细胞改善率/%
空白	—	13.01 $\pm$ 1.04	—
模型	—	9.63 $\pm$ 0.74***	—
盐酸小檗胺	5	12.45 $\pm$ 1.37##	78.16
荆防颗粒	10	9.63 $\pm$ 1.56	0.12
	50	11.27 $\pm$ 0.78#	45.34
	100	11.94 $\pm$ 1.67##	63.91
	250	11.04 $\pm$ 0.93	39.13
	500	10.31 $\pm$ 1.86	18.87

表 4 荆防颗粒对斑马鱼中性粒细胞减少模型尾部中性粒细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Jingfang Granules on tail neutrophils of zebrafish neutropenia model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	中性粒细胞数目	中性粒细胞增长率/%
空白	—	95.0 $\pm$ 9.3	—
模型	—	66.7 $\pm$ 3.8***	—
荆防颗粒	20	77.3 $\pm$ 8.0#	37.65
	50	84.0 $\pm$ 7.1####	61.18
	100	87.8 $\pm$ 8.9####	74.71
	500	69.0 $\pm$ 8.6	8.24

与模型组比较: * $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ #### $P < 0.001$, 下表同。

* $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ #### $P < 0.001$ vs model group, same as below tables.

选用有广谱抗肿瘤活性的酒石酸长春瑞滨作为造模药物,能直接引起斑马鱼免疫相关粒细胞等的减少,阳性药物选择能促进造血功能、升高血细胞、用于防治肿瘤患者由于放、化疗引起的白细胞减少症的盐酸小檗胺,能够反映对模型药物免疫缺陷的纠正作用。如图 5 和表 5 所示,与空白组比较,模型组斑马鱼巨噬细胞荧光强度显著降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,荆防颗粒 (50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组巨噬细胞荧光强度显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。

如图 6 和表 6 所示,与空白组比较,模型组斑马鱼 T 细胞荧光强度显著降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,荆防颗粒 (100、250、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组 T 细胞荧光强度显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。

由以上结果可知,雷帕霉素可以导致斑马鱼体内中性粒细胞显著减少,20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 荆防颗粒可以显著改善斑马鱼免疫受损情况,并且随着给药质量浓度增加,改善作用越明显。因此本实验选择雷帕霉素作为模型药物,给予 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同批次的荆防颗粒进行干预,探讨荆防颗粒对免疫受损斑马鱼体内 IFN- γ 水平的改善情况。如表 7 所示,

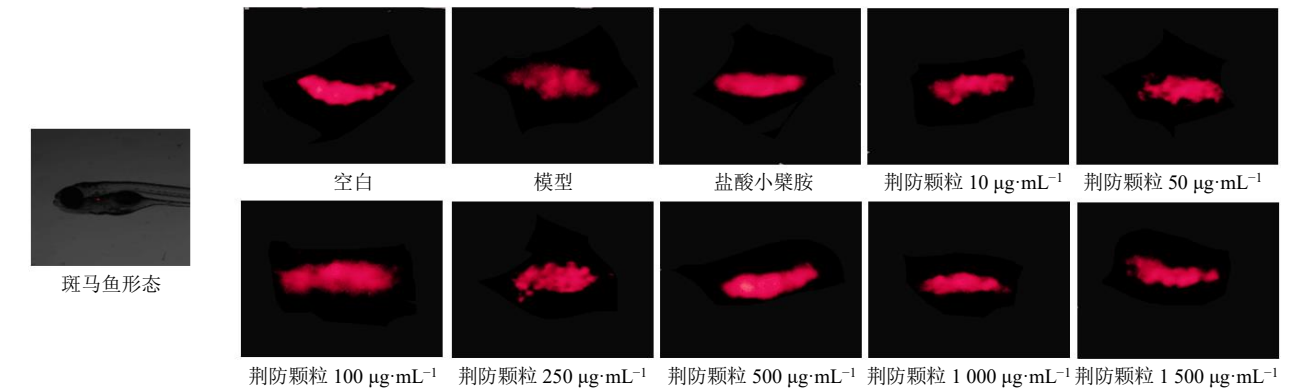


图 6 荆防颗粒对斑马鱼 T 细胞减少模型 T 细胞荧光强度的影响 (×20)

Fig. 6 Effect of Jingfang Granules on fluorescence intensity of T cells in zebrafish T cell reduction model (× 20)

表 6 荆防颗粒对斑马鱼 T 细胞减少模型 T 细胞荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 7 不同批次荆防颗粒对免疫受损斑马鱼体内 IFN- γ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effect of Jingfang Granules on fluorescence intensity of T cells in zebrafish T cell reduction model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	T 细胞荧光强度	T 细胞增长率/%
空白	—	91.57 ± 4.17	—
模型	—	$68.04 \pm 6.28^{***}$	—
盐酸小檗胺	5	74.65 ± 28.11	28.11
荆防颗粒	10	70.38 ± 7.11	9.95
	50	71.15 ± 4.95	13.24
	100	$75.54 \pm 3.10^{\#}$	31.86
	250	$75.66 \pm 5.40^{\#}$	32.40
	500	$78.31 \pm 6.10^{\#\#}$	43.63
	1 000	72.40 ± 18.52	18.52
	1 500	70.64 ± 11.04	11.04

与空白组比较，模型组斑马鱼体内 IFN- γ 水平显著降低 ($P < 0.001$)，免疫力下降；与模型组比较，各批次荆防颗粒给药组均显著提高斑马鱼体内的 IFN- γ 水平。

3.2 荆防颗粒对环磷酰胺致小鼠免疫低下模型的影响

3.2.1 荆防颗粒对小鼠体质量的影响 如表 8 所

Table 7 Effect of different batches of Jingfang Granules on IFN- γ level in immunocompromised zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IFN- γ /($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)
空白	—	144.97 ± 13.26
模型	—	$105.70 \pm 9.28^{***}$
批号 1	100	$132.07 \pm 17.03^{\#\#}$
批号 2	100	$139.66 \pm 9.71^{\#\#\#}$
批号 3	100	$130.07 \pm 12.52^{\#\#}$
批号 4	100	$126.02 \pm 16.55^{\#}$
批号 5	100	$134.01 \pm 21.57^{\#\#}$
批号 6	100	$128.13 \pm 16.70^{\#\#}$
批号 7	100	$132.73 \pm 11.16^{\#\#}$
批号 8	100	$141.20 \pm 14.08^{\#\#\#}$
批号 9	100	$137.20 \pm 15.19^{\#\#\#}$
批号 10	100	$139.49 \pm 10.75^{\#\#\#}$
批号 11	100	$139.49 \pm 12.41^{\#\#\#}$

示，模型建立后，与空白组比较，模型组和各给药组小鼠体质量均显著减轻 ($P < 0.001$)。给药后，与模型组比较，荆防颗粒中、高剂量组和左旋咪唑组小鼠体质量显著升高 ($P < 0.05$)。

表 8 荆防颗粒对环磷酰胺致小鼠免疫低下模型体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 8 Effect of Jingfang Granules on body weight of cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice model ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	体质量/g		
		造模前	造模后	第 14 天
空白	—	17.28 ± 1.03	17.42 ± 1.18	19.46 ± 1.25
模型	—	17.40 ± 0.81	$15.50 \pm 0.68^{***}$	$17.36 \pm 0.80^{***}$
左旋咪唑	40	17.43 ± 0.39	$15.91 \pm 0.48^{***}$	$18.22 \pm 0.51^{\#}$
荆防颗粒	117	17.37 ± 0.99	$15.74 \pm 0.85^{***}$	18.10 ± 0.86
	234	17.09 ± 0.76	$15.42 \pm 0.68^{***}$	$18.32 \pm 0.83^{\#}$
	468	17.56 ± 0.95	$15.96 \pm 0.81^{***}$	$18.34 \pm 0.76^{\#}$

3.2.2 荆防颗粒对小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响 如表 9 所示,与空白组比较,模型组小鼠脾脏指数和胸腺指数显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001),表明环磷酰胺致小鼠免疫功能低下可以导致小鼠脾脏和胸腺损伤;与模型组比较,左旋咪唑组和荆防颗粒中、高剂量组脾脏指数显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01),左旋咪唑组和荆防颗粒各剂量组胸腺指数均显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001),表明荆防颗粒可以改善由环磷酰胺导致的小鼠免疫器官损伤。

表 9 荆防颗粒对环磷酰胺致小鼠免疫低下模型脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 9 Effect of Jingfang Granules on organ indexes of cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice model ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脾脏指数/%	胸腺指数/%
空白	—	0.53±0.04	0.35±0.03
模型	—	0.46±0.03**	0.20±0.04***
左旋咪唑	40	0.53±0.06###	0.31±0.04####
荆防颗粒	117	0.47±0.02	0.28±0.04##
	234	0.50±0.04#	0.29±0.04##
	468	0.51±0.03#	0.32±0.07###

3.2.3 荆防颗粒对小鼠血清中细胞因子水平的影响 如表 10 所示,与空白组比较,模型组小鼠血清中 IL-2、TNF- α 水平显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001);与模型组比较,左旋咪唑组和荆防颗粒中、高剂量组小鼠血清中 IL-2、TNF- α 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01),表明荆防颗粒可以显著改善小鼠免疫情况,增加细胞因子 IL-2、TNF- α 水平。

3.2.4 荆防颗粒对小鼠血清中免疫球蛋白的含量测定结果 如表 11 所示,与空白组比较,模型组小鼠血清中 IgG、IgM 含量显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001);与模型组比较,左旋咪唑组和荆防颗粒中、高剂量组 IgG 含量明显升高 ($P<0.05$ 、 0.01),左旋咪唑组

表 10 荆防颗粒对环磷酰胺致小鼠免疫低下模型血清中细胞因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 10 Effect of Jingfang Granules on cytokines levels in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice model ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-2/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
空白	—	83.01±17.70	233.00±23.74
模型	—	56.75±11.75**	152.69±44.16***
左旋咪唑	40	75.98±11.17#	214.72±21.07##
荆防颗粒	117	65.35±12.67	181.13±35.61
	234	73.78±11.56#	192.17±20.59#
	468	74.52±14.52#	209.93±25.41##

表 11 荆防颗粒对环磷酰胺致小鼠免疫低下模型血清中免疫球蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 11 Effect of Jingfang Granules on immunoglobulin levels in serum of cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice model ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IgG/(mg·mL ⁻¹)	IgM/(μ g·mL ⁻¹)
空白	—	13.27±2.31	824.00±173.97
模型	—	8.41±2.04***	438.17±218.93**
左旋咪唑	40	12.04±1.59###	718.17±256.71#
荆防颗粒	117	9.43±1.83	530.25±189.37
	234	10.86±1.61#	648.17±190.66
	468	11.77±2.63###	705.67±153.03#

和荆防颗粒高剂量组 IgM 含量明显升高 ($P<0.05$),表明荆防颗粒可以显著改善小鼠免疫情况,增加 IgG、IgM 含量。

3.2.5 荆防颗粒对小鼠脾组织中 NF- κ B 信号通路相关基因表达水平的影响 如表 12 所示,与空白组比较,模型组脾组织中 *TLR4*、*MyD88*、*TRAF6*、*NF- κ B p65*、*p-I κ B α* 、*p-NF- κ B p65* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,左旋咪唑组和荆防颗粒中、高剂量组 *TLR4*、*MyD88*、*NF- κ B p65*、*p-I κ B α* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),左旋咪唑组和荆防颗粒高剂量组 *TRAF6*

表 12 荆防颗粒对环磷酰胺致小鼠免疫低下模型脾组织中 *TLR4*、*MyD88*、*TRAF6*、*NF- κ B p65*、*p-I κ B α* 、*p-NF- κ B p65* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 12 Effect of Jingfang Granules on *TLR4*, *MyD88*, *TRAF6*, *NF- κ B p65*, *p-I κ B α* and *p-NF- κ B p65* mRNA expressions in spleen of cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice model ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量					
		<i>TLR4</i>	<i>MyD88</i>	<i>TRAF6</i>	<i>NF-κB p65</i>	<i>p-IκBα</i>	<i>p-NF-κB p65</i>
空白	—	1.03±0.31	1.01±0.14	1.00±0.10	1.02±0.22	1.01±0.16	1.01±0.16
模型	—	2.38±0.29***	2.77±0.15***	2.08±0.30**	2.25±0.07***	2.73±0.13***	2.42±0.41**
左旋咪唑	40	1.25±0.12###	1.59±0.23###	1.14±0.19##	1.12±0.24##	1.10±0.29###	1.15±0.23##
荆防颗粒	117	1.81±0.34	2.60±0.46	1.73±0.42	1.77±0.42	2.09±0.31	1.56±0.45#
	234	1.54±0.26#	2.06±0.10#	1.38±0.22	1.43±0.24#	1.76±0.13#	1.37±0.07##
	468	1.34±0.26###	1.90±0.09##	1.19±0.22#	1.21±0.22##	1.39±0.32##	1.19±0.27##

mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，左旋咪唑组和荆防颗粒各高剂量组 *p*-NF- κ B *p*65 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，表明环磷酰胺可以导致小鼠免疫功能异常，表现为 *TLR4*、*MyD88*、*TRAF6*、*NF- κ B p65*、*p-I κ B α* 、*p*-NF- κ B *p*65 表达显著升高，荆防颗粒给药后可以显著改善小鼠免疫情况，下调 *TLR4*、*MyD88*、*TRAF6*、*NF- κ B p65*、*p-I κ B α* 、*p*-NF- κ B *p*65 表达。

4 讨论

雷帕霉素是一种大环内酯类化合物，具有免疫抑制作用，主要通过抑制 *TLR4*/*MyD88* 信号通路及其下游的蛋白激酶活性而起作用^[8]。长春瑞滨是一种半合成的长春花生物碱细胞毒类化疗药，研究表明，大剂量长春瑞滨骨髓抑制明显，会导致血小板、红细胞和白细胞（中性粒细胞、巨噬细胞、T 细胞等）数目减少，最终诱导免疫力低下^[9]。环磷酰胺是一种强效免疫抑制剂，在体内可被肝细胞微粒体羟化，产生的代谢产物具有烷化作用，干扰 DNA 合成，抑制细胞增殖，发挥免疫抑制作用；环磷酰胺还可减弱 B 淋巴细胞功能，抑制 B 细胞分泌相关抗体，抑制 T 细胞介导非特异性免疫反应和细胞免疫，进而减少免疫复合物聚集和细胞因子释放^[10]，导致机体整体免疫功能障碍。本研究采用雷帕霉素及长春瑞滨建立斑马鱼免疫低下模型，环磷酰胺建立小鼠免疫低下模型。

免疫器官指数是评价机体免疫力的一项重要指标，能反映身体免疫反应的水平，脾、胸腺是机体的免疫器官，具有免疫功能，其中脾是免疫细胞储存的场所，主要参与机体的体液免疫；脾脏中含有大量 NK 细胞、巨噬细胞和淋巴细胞，其中 NK 细胞通过分泌 *TNF- α* 、*IFN- γ* 等细胞因子发挥免疫调节作用^[11]。胸腺是 T 细胞成熟的场所，通过影响机体 T 淋巴细胞的增殖进而参与机体的细胞免疫^[12]。研究发现，环磷酰胺致小鼠免疫低下后，脾脏及胸腺免疫器官均受到了损伤，表现为脏器指数较空白组显著降低，而荆防颗粒治疗后可以显著改善免疫器官损伤，帮助免疫功能恢复。

IL-2 是一类由活化的 T 细胞分泌产生的糖蛋白，具有抗感染、抗病毒等功效，能够提高动物机体的免疫功能。*IL-2* 不但能诱导 T 淋巴细胞增殖和分化，还能刺激已活化的 B 细胞增殖，促进 B 细胞分泌免疫球蛋白^[13]。*TNF- α* 是免疫系统的产物，主要由单核细胞和巨噬细胞产生，也由淋巴细胞和

NK 细胞产生，在免疫反应中发挥多种作用，可激活淋巴细胞及中性粒细胞，增加血管内皮通透性，诱导并促进其他炎性因子释放，加剧炎症反应^[14]。

免疫球蛋白是机体在抗感染方面的重要屏障，*IgG*、*IgM* 是活化 B 淋巴细胞产生的主要免疫球蛋白，可反映机体的体液免疫功能。*IgG* 是血清中含量最高的免疫球蛋白，是主动免疫后机体产生的主要抗体，在体液免疫中最为重要。*IgM* 是血清中相对分子质量最大的免疫球蛋白，在初次免疫中占有重要地位，在机体防御机制中发挥抗感染作用，其在血清中的含量能体现机体的体液免疫功能。恢复 *IgG* 和 *IgM* 含量可以增强机体的体液免疫^[15]。本研究发现，环磷酰胺致小鼠免疫低下后，体内免疫相关细胞因子及免疫球蛋白含量均减少，而荆防颗粒治疗后可以显著提高其含量，增强机体的体液免疫。

NF- κ B 通路在固有免疫和适应性免疫中都发挥着重要作用，通过模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 时开始激活、使其受体改变，活化 *I κ B* 激酶 α (*I κ B kinase α* , *IKK α*)，*IKK α* 磷酸化 *I κ B α* ，致 *I κ B α* 活化解离，自由的 NF- κ B 立即从胞质入核、开启基因转录过程，当 *TLR4* 识别到配体后，迅速与接头蛋白 *MyD88* 结合^[16]，白细胞介素-1 受体相关激酶-1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase-1*, *IRAK-1*) 被磷酸化且与 *TRAF-6* 形成复合物，激活 *I κ B* 激酶复合物，诱导 *I κ B α* 和 NF- κ B *p*65 亚基磷酸化，使 *p65/p50-I κ B α* 聚合态解离，游离态 *p*-NF- κ B *p*65 核转位后能够促使相关炎症细胞因子合成并释放，诱发炎症和免疫应答^[17]。已有研究报道，*TNF- α* 、*IL-1 β* 基因的启动子均存在 NF- κ B 的相应结合位点，这些因子表达受 NF- κ B 活性的调控。本研究发现荆防颗粒能够使免疫低下小鼠血清中细胞因子 *IL-2*、*TNF- α* 的含量升高，说明荆防颗粒可能是通过激活 NF- κ B 信号通路来调节机体的免疫功能。因此本研究选取了 NF- κ B 信号通路中 *TLR4*、*MyD88*、*TRAF-6*、*NF- κ B p65*、*p-I κ B α* 、*p*-NF- κ B *p*65 几个关键的靶点进行分析，发现荆防颗粒可以显著降低 *TLR4*、*MyD88*、*TRAF6*、*NF- κ B p65*、*p-I κ B α* 、*p*-NF- κ B *p*65 mRNA 的表达，说明荆防颗粒的免疫调节活性是通过 NF- κ B 信号通路实现的。

本研究通过建立斑马鱼免疫低下模型，首次从模式生物角度证明荆防颗粒具有免疫调节活性。结果显示，荆防颗粒可以通过增加雷帕霉素、酒石酸长春瑞滨导致的免疫低下斑马鱼体内中性粒细胞数

目、巨噬细胞荧光强度、T 细胞荧光强度以及体内细胞因子含量发挥增强免疫作用。同时,通过复制小鼠免疫低下模型,验证了荆防颗粒的免疫调节活性。荆防颗粒可以显著改善环磷酰胺致免疫低下小鼠免疫器官损伤,提高血清中 IL-2、TNF- α 及免疫球蛋白 IgG、IgM 含量。进一步机制研究发现,荆防颗粒通过降低脾脏中 *TLR4*、*MyD88*、*TRAF6*、*NF- κ B p65*、*p-I κ B α* 、*p-NF- κ B p65* mRNA 的表达,作用于 NF- κ B 信号通路发挥增强免疫作用。本研究为荆防颗粒增强免疫的药理药效作用提供了科学依据和技术支持,同时也证实了模式生物斑马鱼作为药效评价手段的科学性和可信性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 高铭,张霞,罗戴民,等.荆防颗粒对急性醉酒模型小鼠的解酒作用及作用机制[J].中草药,2023,54(4): 1164-1172.
- [2] 张永康,孙成宏,王西双,等.基于网络药理学和实验验证探讨荆防颗粒对自身免疫性肝炎小鼠的治疗作用及作用机制[J].中草药,2023,54(5): 1461-1470.
- [3] 冯群,关永霞,黄志艳,等.基于网络药理学和分子对接的荆防败毒散预防新型冠状病毒肺炎的活性成分研究[J].药学实践杂志,2020,38(6): 485-491.
- [4] 任雪阳,王宇,魏胜利,等.“保健功能-中药-中药”关联的石斛保健食品配方规律分析及斑马鱼增强免疫力和缓解体力疲劳功能评价[J].中草药,2022,53(8): 2435-2448.
- [5] 史琬,李昊虬,王龙,等.3种乳制品对低免疫力模型斑马鱼免疫功能的影响[J].食品科学,2022,43(11): 113-120.
- [6] 吕婧,高燕,李晨,等.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[J].中草药,2020,51(14): 3728-3733.
- [7] 葛明珠,刘昕,张勇.盐酸小檗胺对辐射小鼠的免疫防护作用的实验研究[J].免疫学杂志,1998,14(4): 3.
- [8] 齐林,张朝,王素云,等.雷帕霉素对人红白血病 HEL 细胞分泌体及 PD-1/PD-L1 的影响[J].肿瘤防治研究,2022,49(10): 1021-1027.
- [9] 庄瑞春,李光灿,向安玲.酒石酸长春瑞滨注射液致过敏反应 1 例[J].中国药物警戒,2019,16(4): 252.
- [10] 陈金花,郭雨,覃琳.他克莫司与环磷酰胺分别联合激素治疗小儿 III~IV 级紫癜性肾炎的对比研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2022,23(8): 728-730.
- [11] 杨许花.藏药柳茶多糖分离纯化及其免疫活性研究[D].兰州:西北民族大学,2022.
- [12] 赵素洵.骆驼胎盘提取物的免疫增强作用及其机制研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2021.
- [13] 吕莹莹.中国黄羽鹌鹑中枢免疫器官的增龄变化及 IL-2、IL-21 在其中的定位[D].雅安:四川农业大学,2019.
- [14] 谢浪.先天无脾对斑马鱼系统免疫的影响及机制研究[D].重庆:西南大学,2021.
- [15] 王莹.枸杞多糖的分离纯化及基于对肠道菌群调节的免疫作用机制研究[D].北京:北京中医药大学,2020.
- [16] 王继达,王丽,满姗姗,等.基于 TLR4 信号通路探讨扶正膏增强细胞免疫功能机制[J].现代中西医结合杂志,2023,32(23): 3242-3247.
- [17] 胡科,李晓蕾,麻瑞娟.藏红花素减轻皮质神经元缺氧复氧损伤与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路有关[J].动脉硬化杂志,2023,31(4): 329-335.

[责任编辑 李亚楠]