

中药免疫调节剂对免疫抑制模型小鼠的保护作用

韩春杨,刘翠艳

(安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036)

[摘要] **【目的】**研究中药免疫调节剂对免疫抑制小鼠的组织保护作用。**【方法】**用环磷酰胺(Cyclophosphamide,Cy)构建小鼠免疫抑制病理模型。分别给正常小鼠和环磷酰胺所致免疫抑制小鼠口服自制中药免疫调节剂玉屏风散加减(ZY)和经典方剂玉屏风散(YPF),检测 ZY、YPF 对不同免疫状态下小鼠血液学指标(白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、平均血红蛋白含量(MCH)、平均红细胞体积(MCV))、体质量、脾脏指数以及肝脾组织病理学的影响。**【结果】**(1)ZY 和 YPF 对健康小鼠血液学指标影响不显著($P>0.05$);ZY 对 Cy 所致的免疫抑制小鼠 WBC、RBC、HGB、HCT、MCH、MCV 值有显著影响($P<0.05$),YPF 对 Cy 所致的免疫抑制小鼠 RBC、HGB 和 MCH 值有显著影响($P<0.05$),且 ZY 的作用效果优于 YPF($P<0.05$)。(2)ZY 和 YPF 对正常小鼠体质量及脾脏指数的影响不明显($P>0.05$),而对 Cy 所致的免疫抑制小鼠体质量影响显著($P<0.05$),小鼠的脾脏指数显著低于 Cy 所致的免疫抑制小鼠($P<0.05$)。(3)ZY+Cy 组和 YPF+Cy 组小鼠脾脏白髓大而明显,肝细胞轻度变性坏死;而模型对照组(Cy 组)小鼠脾脏白髓不明显,肝细胞变性坏死严重。**【结论】**ZY 对正常小鼠血细胞数、体质量、脾脏指数的影响均不显著,而对免疫抑制小鼠血细胞数、体质量、脾脏指数以及脾、肝组织病理学均表现出一定的正向调节作用。

[关键词] 中药免疫调节剂;环磷酰胺;免疫抑制;玉屏风散加减

[中图分类号] S853.74

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)02-0047-05

Protective effect of Chinese herbal medicine immunomodulator on tissues of immunosuppressed mice by cyclophosphamide

HAN Chun-yang, LIU Cui-yan

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to explore the protective effect of Chinese herbal medicine immunomodulator on the tissues of immunosuppressed mice. **【Method】** The immunosuppressed mice were induced by cyclophosphamide (Cy). The normal mice and immunosuppressive mice were administered separately with the Chinese herbal immunomodulator (ZY) and traditional prescription Yupingfeng (YPF), and then their hematological parameters(WBC, RBC, HGB, HCT, MCH and MCV), body weight, spleen index and histopathological changes of liver and spleen in different immune status were detected. **【Result】** (1) Hematological parameters of healthy mice were not significantly affected by ZY and YPF ($P>0.05$); The hematological parameters(WBC, RBC, HGB, HCT, MCH and MCV) of immunosuppressive mice induced by Cy were significantly affected by ZY($P<0.05$), the hematological parameters(RBC, HGB and MCH) of immunosuppressive mice induced by Cy were significantly affected by YPF ($P<0.05$), and ZY was better than YPF. (2) Body weight and spleen index of healthy mice were not significantly affected by ZY and YPF ($P>0.05$); But the immunosuppressed mice induced by Cy were significantly affected ($P<0.05$). (3) It

* [收稿日期] 2009-07-01

[基金项目] 安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2009A033Z);山东省中青年科学家科研奖励基金项目(2008BS07001)

[作者简介] 韩春杨(1972—),男,河北冀州人,讲师,博士,主要从事临床兽医学研究。E-mail:luckyhey@163.com

[通信作者] 刘翠艳(1970—),女,河北迁西人,讲师,博士,主要从事中草药研究。E-mail:liucuiyan@163.com

showed that the splenic white pulp of mice in hispathologic slide was large and obvious and liver cells had mild degeneration and necrosis in group ZY+Cy and group YPF+Cy; splenic white pulp was not obvious and liver cells had a severe degeneration and necrosis in group Cy. 【Conclusion】 ZY had remarkable effects on the hematological parameters, body weight and organ index of normal mice. However, it had significant positive effects on hematological parameters, body weight, organ index and pathology in the liver and spleen tissue of immunosuppressive mice.

Key words: Chinese herb immunomodulator; cyclophosphamide; immune suppression; traditional prescription Yupingfeng

近年来,人和动物免疫抑制性疾病、病毒感染性疾病的发病率逐年上升^[1-3], 工业环境污染、生态失衡引发的多因子、多属性、多层次的代谢性疾病、慢性疾病也日渐增多。在这些疾病治疗过程中,西药作用单一,毒副作用明显,且对于免疫抑制性疾病、病毒感染性疾病及多因子多层次的慢性病没有特异疗效^[4-7]。而中药在组成上具有天然合理性,中药配伍讲究君臣佐使、协调配合,具有标本兼治、毒副作用小等特点。自制中药免疫调节剂玉屏风散加减(ZY)是本课题组筛选出的具有免疫增强作用的中药复方。前期研究结果表明,ZY 无急慢性毒性^[8],能显著提高环磷酰胺(Cyclophosphamide,Cy)所致免疫抑制小鼠的细胞免疫和体液免疫功能^[9]。为进一步探讨玉屏风散加减对免疫功能的调节作用,本试验以扶正固本的经典方剂玉屏风散(YPF)为对照药物,观察了 ZY 对不同免疫状态(正常和免疫抑制)小鼠血液学指标、体质量及脏器指数、肝脾组织病理学的影响,以期为 ZY 的临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 6 周龄昆明种小鼠 90 只,体质量 18~20 g,雌性,购自山东米歇尔生物制品有限公司动物饲养中心,实验动物生产许可证号:20030011。

1.1.2 药 物 Cy,上海华联制药有限公司,批号:080705。ZY:黄芪 60 g、白术 30 g、茯苓 30 g、桔梗 15 g、党参 30 g、防风 15 g。YPF:黄芪 90 g、白术 60 g、防风 30 g,选自《中国兽药典》。所用中药饮片均购自山东泰安金泰联医药商行。

中药药液的制备采用传统水煎法:蒸馏水预先浸泡 1 h,加热煎煮 2 次,第 1 次保持微沸 30 min,滤出药液;药渣加温水再煮沸,仍保持微沸 30 min,滤出药液。合并 2 次滤液,小火浓缩至生药含量为 1 g/mL。

1.1.3 仪 器 HANGPING JA1003 型电子天平,上海精科称量仪器厂生产;F-820 型全自动血液分析仪,日本希森美康生产;Leica 石蜡切片机,德国 Leica Microsystems Nussloch GmbH。

1.2 方 法

1.2.1 动物的分组与处理 90 只小鼠于购回后第 2 天空腹称体质量,随机分为 6 组,每组 15 只。第 1 组为正常对照组,不给中药,不注射 Cy;第 2 组为 ZY 组,给予 ZY,不注射 Cy;第 3 组为 YPF 组,给予 YPF,不注射 Cy;第 4 组为 Cy 对照组(Cy 组),注射 Cy;第 5 组为 ZY 治疗组(ZY+Cy),注射 Cy,并给予 ZY 治疗;第 6 组为 YPF 治疗组(YPF+Cy),注射 Cy,并给予 YPF 治疗。第 2,3,5,6 组小鼠灌胃给药 1.8 mL/只,第 1,4 组给予等量蒸馏水,连续 11 d。从试验的第 3 天起,4,5,6 组小鼠开始以 75 mg/kg 的剂量腹腔注射 Cy,隔日一次,连续注射 4 次,期间按正常剂量饮水(第 4 组)或饮药(第 5,6 组)至停止注射 Cy 的第 2 天。

1.2.2 样品的采集与检测 各组均于试验的第 11 天(即第 4,5,6 组停止注射 Cy 2 d 后)断尾采血,肝素抗凝,检测血常规(白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、平均血红蛋白含量(MCH)、平均红细胞体积(MCV))。采血后称体质量。所有小鼠采血后继续常规饲养 1 周(均供给正常的饲料和饮水,不使用任何药物处理),至试验的第 18 天时(即试验结束)处死,取脾脏和肝脏,观察病理变化,计算脾脏指数;然后将肝和脾用体积分数 10%甲醛固定,脱水,石蜡包埋,常规方法制备切片并 HE 染色,光镜下进行组织病理学检查。

1.2.3 数据处理 所有试验数据采用 SPSS10.0 软件进行 One-way ANOVA 统计处理,Duncan 氏比较差异显著性,所有数据用“平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 Cy 对小鼠精神状态的影响

给第 4,5,6 组小鼠腹腔注射中等剂量的 Cy(75 mg/kg)2~3 次后,小鼠即表现出精神沉郁、怕冷、扎堆现象,饮食欲明显减退,生长发育受到抑制,几天后体质量显著减轻;但只要停注 Cy,2~3 d 后小

鼠的精神会很快好转,饮食欲也随之逐渐恢复,体质量逐渐增加(与注药期间相比)。第 1,2,3 组小鼠在整个试验期内未见明显的精神异常。

2.2 中药方剂 ZY、YPF 对小鼠血液学指标的影响

各组均于试验的第 11 天断尾采血,肝素抗凝,检测血常规,结果见表 1。

表 1 ZY 和 YPF 对试验小鼠血液学指标的影响(n=10)

Table 1	Effect of Chinese herbal medicine immunopotentiator on hematological indexes of the experimental mice(n=10)					
组别 Group	WBC/(10 ⁹ · L ⁻¹)	RBC/(10 ¹² · L ⁻¹)	HGB/(g · L ⁻¹)	HCT/%	MCH/pg	MCV/fL
1	12.44±1.02 c	11.26±0.57 c	176.20±3.56 c	53.46±1.81 c	15.60±0.59 a	47.64±1.40 a
2	13.30±1.60 c	10.87±0.94 c	175.20±5.02 c	52.40±3.35 c	16.10±0.79 b	47.68±1.00 a
3	13.60±0.82 c	12.08±0.59 c	181.20±3.63 d	55.26±2.49 c	14.98±0.53 a	46.76±0.48 a
4	4.21±0.44 a	8.83±0.41 a	141.80±2.38 a	42.72±1.64 a	15.58±0.18 a	47.02±1.67 a
5	5.74±0.55 b	9.55±0.42 b	159.20±1.92 b	49.38±2.77 b	16.80±0.54 b	53.82±3.29 b
6	5.22±0.54 a	9.46±0.33 b	152.20±2.49 b	43.86±4.76 a	16.34±0.56 b	47.68±1.02 a

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。
Note:Different small letters in the same column mean significant difference(P<0.05). The same as below.

从表 1 可以看出,1,2 和 3 组小鼠 WBC、RBC、HCT、MCV 值差异均不显著(P>0.05),3 组 HGB 值显著高于 1,2 组,MCH 值 2 组显著高于 1,3 组(P<0.05),综合分析认为,正常小鼠饮服 ZY、YPF 对血液学指标没有显著影响。4,5 和 6 组小鼠腹腔注射 Cy 后,血液 WBC、RBC、HGB、HCT 值与 1 组相比均显著下降(P<0.05),4 组小鼠的 MCH 和 MCV 值与 1 组相比差异不显著(P>0.05);5 组小鼠的 MCH 和 MCV 值与 1 组相比差异显著(P<0.05);6 组小鼠的 MCH 值与 1 组相比差异显著(P<0.05),MCV 值与 1 组差异不显著(P>0.05);5,6 组小鼠 WBC、RBC、HGB、HCT、MCH、MCV 值较 4 组均有不同程度的提高,5 组所有指标与 4 组相比差异显著(P<0.05),6 组小鼠 RBC、HGB 和 MCH 值与 4 组相比差异显著(P<0.05),但 5 和

6 组小鼠 WBC、RBC、HGB 和 HCT 值均未能达到正常水平(与 1 组相比,P<0.05)。

2.3 中药方剂 ZY、YPF 对小鼠体质量及脾脏指数的影响

由表 2 可知,ZY 及 YPF 分别对第 2 和 3 组小鼠的生长有一定的促进作用,小鼠试验末体质量与 1 组相比差异显著(P<0.05),2,3 组之间差异不显著(P>0.05);注射 Cy 的 4,5,6 组小鼠试验末体质量明显下降,第 4 组呈负增长,而 5 和 6 组平均增重率分别为 3.37%和 1.08%,说明中药治疗组小鼠能在一定程度上拮抗 Cy 造成体质量下降的不良影响。脾脏指数 1,2,3 组之间差异不显著(P>0.05);4,5,6 组与 1,2,3 组均差异显著(P<0.05),5 和 6 组与 4 组差异显著(P<0.05),5 组与 6 组差异显著(P<0.05)。

表 2 ZY 和 YPF 对试验小鼠体质量和脾脏指数的影响(n=10)

Table 2	Effect of Chinese herbal medicine immunopotentiator on weight and organ index of the experimental mice (n=10)			
组别 Group	试验初体质量/(g · 只 ⁻¹) Initinal weight	试验末体质量/(g · 只 ⁻¹) Final weight	增重率/% GWR	脾脏指数 Spleen/weight ratio
1	20.35±0.96 a	25.90±0.79 c	27.00	8.00±0.81 a
2	20.84±0.84 a	26.89±0.92 d	29.10	8.20±0.51 a
3	21.27±1.07 a	26.51±0.66 d	29.00	8.50±1.03 a
4	20.85±0.85 a	19.81±0.77 a	-4.99	12.80±0.09 d
5	20.17±0.47 a	20.85±0.94 b	3.37	9.15±0.04 b
6	20.30±0.62 a	20.52±1.21 b	1.08	9.81±0.08 c

2.4 中药方剂 ZY、YPF 对小鼠肝脾组织病理学变化的影响

2.4.1 眼观变化 注射 Cy 的小鼠,脾脏均出现不同程度的肿胀,含血量增加,同时肝脏出现水肿,Cy

组尤为明显;注射 Cy 并饮服中药的 5 和 6 组小鼠仍有程度不同的肝脾肿胀现象,但肿胀程度较 Cy 组减轻;其他脏器未见明显肉眼病变。没有注射 Cy 的各组小鼠(1~3 组)肝脾等脏器未见明显变化。

2.4.2 组织病理学变化 对肝和脾进行组织病理学检查发现,Cy 组小鼠脾脏组织中的白髓不明显(图 1-A),红髓脾索变宽,脾窦不规则,淋巴细胞严重缺失,可见局灶性坏死、出血、纤维组织增生;肝细胞板不明显,胞质呈空泡状,核固缩或消失,变性、坏死明显(图 1-B)。ZY+Cy 和 YPF+Cy 组小鼠肝细

胞板完整,排列规则,细胞核大而深染,胞质染色均匀,肝组织未见明显病变,个别小鼠肝细胞轻度变性坏死(图 1-C,D);脾组织中的白髓大而明显(图 1-E,F),淋巴细胞密集,排列有规律,红髓的脾索变窄,淋巴细胞密集,脾窦规则。ZY+Cy 组肝脾损伤程度较 YPF+Cy 组轻。

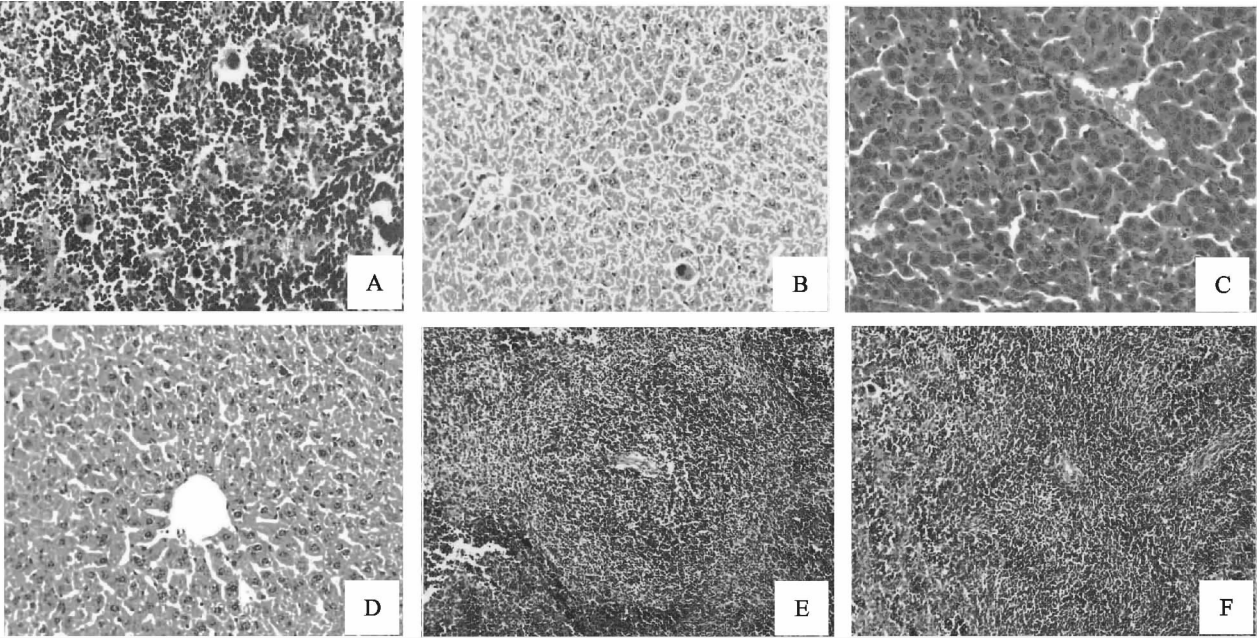


图 1 各组小鼠脾脏和肝脏的病理变化(HE 染色,×200)

A. Cy 模型组脾脏;B. Cy 模型组肝脏;C. ZY+Cy 组肝脏;D. YPF+Cy 组肝脏;E. ZY+Cy 组脾脏;F. YPF+Cy 组脾脏

Fig. 1 Pathological section of spleen and liver (HE,×200)

A. The splenic white pulp of group Cy;B. The liver of group Cy;C. The liver of group ZY+Cy;D. The liver of group YPF+Cy;

E. The splenic white pulp of group ZY+Cy;F. The splenic white pulp of group YPF+Cy

综合上述试验结果,分析得出以下结论:(1)ZY、YPF 对正常小鼠血液学指标(WBC、RBC、HGB、HCT、MCH、MCV)及脾脏指数没有显著影响,而对 Cy 所致的免疫抑制小鼠的血液学指标及脾脏指数有一定程度的促恢复作用,其中 ZY 作用效果优于 YPF,但 WBC、RBC、HGB 和 HCT 值未能达到正常水平。(2)ZY 及 YPF 能在一定程度上拮抗 Cy 造成的小鼠体质量下降、脾脏增生等毒副作用,ZY 作用效果优于 YPF。(3)组织病理学观察发现,ZY 及 YPF 能有效拮抗 Cy 对肝脾组织造成的损伤作用,其中 ZY 作用效果优于 YPF。

3 讨论

中药免疫调节剂玉屏风加减,应用于正常小鼠和免疫抑制小鼠后产生了不同的作用效果,即生理机能正常的小鼠饮服 ZY 后其血液学指标(WBC、RBC、HGB、HCT、MCH、MCV)及脾脏指数变化不

明显,而 Cy 所致的免疫抑制小鼠饮服中药后其血液学指标及脾脏指数变化较明显。这说明该中药免疫调节剂具有双向免疫调节作用^[10]。

中兽医学认为,脾为“后天之本”,为机体气血生化之源,肝藏血主疏泄,二者均是水谷消化吸收的主要器官。病理损伤必然会造成水谷得不到充分的消化吸收和运输,血液化生没有来源,出现精神短少、贫血,影响发育。本试验所用 ZY 复方即是基于中医学的这一理论,从维护巩固机体正气的角度进行遣方用药。方中黄芪、白术、党参均为补脾益气常用药;茯苓归心脾肾经,也能益脾和胃;桔梗入肺胃经,能调节肺胃,宣肺利咽喉;防风入肝脾膀胱经。本方剂重在补脾益气,同时还能利湿化痰。现代药理学研究表明,黄芪、白术、防风、茯苓、党参、桔梗均含有丰富的多糖成分,另外还含有黄酮、皂甙类等活性成分^[11-16],它们对动物免疫功能均具有不同程度的促进作用,可以活化机体免疫系统,提高免疫活性细胞

的数量,增强免疫细胞的活力,针对性地保护免疫器官,从而改善机体状况,增加抗感染能力。组成玉屏风散加减的各味中药相辅相成,共同发挥增强机体免疫机能的作用。ZY 对 Cy 小鼠肝、脾组织形态学变化的影响进一步佐证了其对机体免疫器官损伤具有较好的保护作用。

[参考文献]

[1] 崔治中. 免疫抑制性病毒多重感染在鸡群疫病发生和流行中的作用 [J]. 畜牧兽医学报,2003,34(5):417-421.
Cui Z Z. Effect of multiple immunosuppressive viral infections on pathogenesis and epidemiology in chicken flocks [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences,2003,34(5):417-421. (in Chinese)

[2] 韦平,丁家波. 几种引起家禽免疫抑制的病毒性疾病及其作用机理 [J]. 中国预防兽医学报,2000,22(4):316-318.
Wei P, Ding J B. Several immunosuppressive viral diseases in poultry and its mechanism [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2000,22(4):316-318. (in Chinese)

[3] Quere P, Rivas C, Ester K, et al. Abundance of IFN- α and IFN- γ mRNA in blood of resistant and susceptible chickens infected with Marek's disease virus (MDV) or vaccinated with turkey herpesvirus; and MDV inhibition of subsequent induction of IFN gene transcription [J]. Arch Virol,2005,150(3):507-519.

[4] 邓博文. 家禽病毒性免疫抑制病的分析与对策 [J]. 中国畜牧兽医,2007,34(4):104-107.
Deng B W. The countermeasure and analysis of immunosuppressive viral diseases in poultry [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine,2007,34(4):104-107. (in Chinese)

[5] Markowski-Grimsrud C J, Schat K A. Infection with chicken anaemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes [J]. Immunology,2003,109(2):283-294.

[6] 孙淑红,崔治中,孙爱军,等. 母源抗体对同源及异源禽网状内皮增生病病毒感染诱发免疫抑制的预防作用 [J]. 畜牧兽医学报,2007,38(5):488-492.
Sun S H, Cui Z Z, Sun A J, et al. Comparisons of preventive effects of maternal antibody on immunosuppression induced by homologous and heterologous reticuloendotheliosis viruses [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences,2007,38(5):488-492. (in Chinese)

[7] Marcus P I, Rojek J M, Sekellick M J. Interferon induction and/or production and its suppression by influenza A viruses [J]. J Virol,2005,79(5):2880-2890.

[8] 刘翠艳,赵宏坤. 中药免疫调节剂体外细胞毒性测定 [J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2007,38(2):225-229.
Liu C Y, Zhao H K. Cytotoxic assay of the Chinese medicinal herb immunomodulator in vitro [J]. Journal of Shandong Agri-

cultural University: Natural Science Edition,2007,38(2):225-229. (in Chinese)

[9] 刘翠艳,赵宏坤. 中药免疫调节剂对小鼠细胞免疫功能的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志,2007(2):178-180.
Liu C Y, Zhao H K. Effect of Chinese medicinal herb immunomodulator on cellular immunity in mice [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology,2007(2):178-180. (in Chinese)

[10] 杨翠萍,万红娇. 中药对免疫细胞双向调节作用的研究进展 [J]. 江西中医学院学报,2009,21(2):98-100.
Yang C P, Wan H J. Progress in studies on dual direction regulatory of cellular immunity of Chinese herbal medicine [J]. Journal of Jiangxi University of Traditional of Chinese Medicine,2009,21(2):98-100. (in Chinese)

[11] 金琦,曹静,王淑华. 大剂量茯苓的药理作用及临床应用概况 [J]. 浙江中医杂志,2003,9:410-411.
Jin Q, Cao J, Wang S H. The research of pharmacological effect and clinical application of Poria coccus [J]. Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine,2003,9:410-411. (in Chinese)

[12] 张训海,王德云,胡元亮,等. 黄芪多糖对鸡体液免疫增强作用 [J]. 中国兽医学报,2009,29(3):312-315.
Zhang X H, Wang D Y, Hu Y L, et al. Immunologic enhancement of Astragalus polysaccharide (APS) on the humoral immunity of chicken [J]. Chinese Journal of Veterinary Science,2009,29(3):312-315. (in Chinese)

[13] 宋杨,齐云. 桔梗的药理研究进展 [J]. 中国药房,2006,17(2):140-141.
Song Y, Qi Y. Progress on pharmacological functions of Platycodon grandiflorum [J]. China Pharmacy,2006,17(2):140-141. (in Chinese)

[14] 吴丽花,朴惠善,韩春姬. 轮叶党参化学与药理研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志,2005,12(10):97-99.
Wu L H, Piao H S, Han C J. Advances in studies on chemical constituents of Codonopsis lanceolata and their pharmacological activities [J]. Chinese Journal of Information on TCM,2005,12(10):97-99. (in Chinese)

[15] 李伟,文红梅,崔小兵,等. 白术的化学成分研究 [J]. 中草药,2007,38(10):1460-1462.
Li W, Wen H M, Cui X B, et al. Chemical constituents in rhizome of Atractylodes macrocephala [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2007,38(10):1460-1462. (in Chinese)

[16] 刘双利,张春红,张连学. 不同产地防风中 4 种色原酮成分比较研究 [J]. 中草药,2007,38(5):776-778.
Liu S L, Zhang C H, Zhang L X. Comparative study of four chromones of Saposhnikovia divaricata in different habitat [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2007,38(5):776-778. (in Chinese)