网络出版时间:2018-07-06　13:25　　DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.01.005
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180706.1323.010.html

桔梗皂苷 D 对小鼠淋巴细胞和巨噬细胞免疫功能的影响

李敬双,冯慧慧,王　萌,于　洋
(锦州医科大学 畜牧兽医学院,辽宁 锦州 121001)

[摘　要] 【目的】探讨桔梗皂苷 D 对小鼠淋巴细胞和巨噬细胞免疫功能的影响。【方法】无菌分离小鼠脾淋巴细胞和腹腔巨噬细胞,制备淋巴细胞和巨噬细胞悬液。分别培养这 2 类细胞,并分为空白对照组、阳性对照组(左旋咪唑处理细胞)及 25,50,75 和 100 μg/mL 桔梗皂苷 D 组,采用 MTT 法检测桔梗皂苷 D 对淋巴细胞增殖和巨噬细胞吞噬功能的影响,采用 ELISA 法检测桔梗皂苷 D 对淋巴细胞 IL-2、IL-4 和巨噬细胞 TNF-α、IL-12 分泌的影响。【结果】桔梗皂苷 D 能够促进淋巴细胞增殖,增强巨噬细胞的吞噬功能,并可刺激淋巴细胞 IL-2、IL-4 和巨噬细胞 TNF-α、IL-12 的分泌,其中以 50 μg/mL 组效果最佳。【结论】桔梗皂苷 D 能增强小鼠淋巴细胞和巨噬细胞的免疫调节活性。

[关键词] 桔梗皂苷 D;淋巴细胞;巨噬细胞;免疫功能
[中图分类号] S859.7　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1671-9387(2019)01-0039-06

Effect of platycodin D on lymphocyte and macrophage immune function of mice

LI Jingshuang, FENG Huihui, WANG Meng, YU Yang
(*College of Animal Husbandry and Veternary Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning* 121001, *China*)

Abstract:【Objective】The study investigated the effects of platycodin D on immune function of lymphocyte and macrophage of mouse.【Method】The lymphocytes and macrophage suspensions were prepared through sterile isolation of mouse spleen lymphocytes and peritoneal macrophages. Two types of cells were cultured separately with blank control group, positive control group (cells were treated by levamisole), and four experimental groups with platycodin D concentrations of 25, 50, 75 and 100 μg/mL. The effects of platycodin D on lymphocyte proliferation and macrophage phagocytosis were detected by MTT assay. The effects of platycodin D on secretion of IL-2 and IL-4 in lymphocyte and secretion of TNF-α and IL-12 in macrophages were detected by ELISA.【Result】Platycodin D promoted lymphocyte proliferation, enhanced phagocytosis of macrophage, and stimulated secretion of IL-2 and IL-4 in lymphocyte and secretion of TNF-α and IL-12 in macrophages. The concentration of 50 μg/mL was the best.【Conclusion】Platycodin D enhanced the immunomodulatory activities of mouse lymphocytes and macrophages.

Key words: platycodin D; lympocytes; macrophage; immunity

[收稿日期] 2017-10-03
[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(20170540369);2017 年国家级“大学生创新创业训练计划”项目(201610160011)
[作者简介] 李敬双(1963-),女,辽宁锦州人,教授,硕士,硕士生导师,主要从事兽医药理学与兽医免疫学研究。
E-mail:ljs4680399@163.com
[通信作者] 于　洋(1962-),男,辽宁复县人,教授,博士,硕士生导师,主要从事兽医药理学与兽医免疫学研究。
E-mail:spyuyang@163.com

桔梗是我国重要的传统中药,始载于《神农本草经》,是多年生植物桔梗(*Platycodon grandiflorum* A. DC.)的干燥根,具有祛痰、抗炎、免疫调节、抗肿瘤、保肝、保护心血管、治疗糖尿病、抗肥胖、镇痛等多种作用[1-2]。桔梗的活性成分主要由多种皂苷、多聚糖、甾醇类及其糖苷和脂肪酸等构成,其中以皂苷为主,桔梗皂苷D是桔梗中主要的皂苷成分,含量相对较高,是其药材及制剂质量控制的指标[3]。桔梗皂苷D在抗炎镇痛、抗肿瘤、保肝、调节免疫等方面均表现出良好的药理活性[4-8]。近年来,国内外对桔梗药理活性的研究与日俱增,但多数还停留在水提取物和总皂苷上。Choi等[9]的研究表明,桔梗水提取物可促进小鼠巨噬细胞增殖、分化、吞噬和产生细胞毒性,还可以促进一氧化氮及细胞因子的分泌。Choi等[10]研究发现,桔梗水提取物可以刺激小鼠巨噬细胞NO和TNF-α的分泌,并可以通过NF-κB信号上调iNOS和TNF-α基因的表达水平。然而目前对桔梗皂苷D免疫调节活性的研究尚不够深入,对其药理作用机制有待进一步研究。在我国,桔梗的药用资源非常丰富,南北各省区均有种植,对桔梗药用资源的进一步研究,将有助于桔梗资源的高效利用。

本研究通过体外试验探讨了桔梗皂苷D对小鼠脾淋巴细胞增殖和IL-2、IL-4分泌及对腹腔巨噬细胞吞噬功能和TNF-α、IL-12分泌的影响,旨在探讨桔梗皂苷D的免疫调节活性,为桔梗皂苷D的开发和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

SPF级雄性小鼠,6~8周龄,体质量(20±2) g/只,由锦州医科大学生命科学院提供。金黄色葡萄球菌,购自中国微生物研究院(菌种号:AB91093)。桔梗皂苷D标准品,购自成都曼斯特生物科技有限公司,纯度98%;左旋咪唑,购自广东华南药业集团有限公司;新生牛血清,购自浙江天杭生物科技有限公司;小鼠TNF-α、IL-2、IL-4、IL-12细胞因子检测试剂盒,购自武汉博士德公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)、RPMI-1640培养基、三羟甲基氨基甲烷(Tris)和磷酸盐缓冲溶液(PBS),购自北京索莱宝科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO),Solarbio公司产品。

超净工作台,苏州净化设备有限公司产品;倒置显微镜,日本OLYMPUS公司产品;低速离心机,湖南赫西仪器装备有限公司生产;96孔或24孔板台式离心机,上海安亭科学仪器厂产品,用时根据试验设计;CO_2培养箱,日本SHELLAB公司生产;酶标仪,瑞士TeCan公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 试剂的配制 (1)桔梗皂苷D溶液。称取0.5 mg桔梗皂苷D标准品,加入1.0 mL RPMI-1640完全培养基配制成质量浓度为500 mg/L的溶液,用RPMI-1640完全培养基稀释至所需质量浓度。

(2)红细胞裂解液(Tris-NH_4Cl)。称取Tris 1.3 g、NH_4Cl 3.735 g,加入三蒸水溶解至500 mL,0.22 μm滤膜过滤除菌。

(3)四甲基偶氮唑盐(MTT)溶液。称取MTT标准品100 mg,加入新生牛血清20 mL,配制成MTT溶液,0.22 μm滤膜过滤除菌,避光保存。

1.2.2 淋巴细胞悬液的制备 参考文献[11-12],用颈部断髓法处死小鼠,用体积分数75%酒精浸泡3 min消毒,在无菌超净工作台内取脾,用PBS冲洗2次,置于RPMI-1640培养基中,用注射器拉杆柄将其磨碎,用孔径75 μm(200目)滤网过滤。收集滤液置于离心管中,1 500 r/min离心5 min,弃上清,加入Tris-NH_4Cl 3 mL裂解红细胞,静置5 min,1 500 r/min离心5 min,弃上清,重复操作直至红细胞完全裂解。沉淀细胞用RPMI-1640完全培养基悬浮过滤,检查细胞活力(台盼蓝染色计数法),细胞活力达95%以上。调整淋巴细胞密度为5×10^6 mL^{-1},制成淋巴细胞悬液。

1.2.3 巨噬细胞悬液的制备 参考文献[13-14],用颈部断髓法处死小鼠,用体积分数75%酒精浸泡3 min消毒,在无菌超净工作台内从腹白线处剪开皮肤,将皮肤剥离向两侧,暴露出腹壁肌肉,腹腔注入4 mL RPMI-1640培养基,轻揉腹部3 min,静置5 min后抽取腹腔液,置于离心管中,1 800 r/min离心5 min,弃上清,PBS洗2遍。沉淀细胞用RPMI-1640完全培养基悬浮,检查细胞活力(台盼蓝染色计数法),细胞活力达95%以上。调整细胞密度为5×10^6 mL^{-1},制成巨噬细胞悬液。

1.2.4 金黄色葡萄球菌悬液的制备 参考文献[15]的方法,制备营养琼脂平板培养基,接种金黄色葡萄球菌,放恒温箱培养8 h后划线接种到营养平皿中,36 ℃培养24 h,挑取菌落,用肉汤稀释细菌密度为10^7~10^9 CFU/mL,即为金黄色葡萄球菌悬液,4 ℃冰箱中保存备用。

1.2.5　桔梗皂苷 D 对淋巴细胞增殖的影响　参考文献[16-17]，采用 MTT 法进行试验。试验设空白对照组、阳性对照组及 25，50，75 和 100 μg/mL 桔梗皂苷 D 组。用 96 孔细胞培养板培养淋巴细胞，每组均设 3 个复孔，每孔加入 100 μL 脾淋巴细胞悬液。空白对照组每孔加入 100 μL RPMI-1640 完全培养基，阳性对照组每孔加入 100 μL 左旋咪唑溶液，使左旋咪唑在培养基中的终质量浓度为 50 mg/L，桔梗皂苷 D 各组每孔分别加入 100 μL 含不同质量浓度的桔梗皂苷 D 溶液，使桔梗皂苷 D 在培养基中的终质量浓度分别为 25，50，75 和 100 μg/mL。将各处理细胞置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 44 h 后，每孔分别加入 20 μL MTT 溶液，培养 4 h 后，1 800 r/min 离心 5 min，弃上清，每孔分别加入 150 μL DMSO，用酶标仪于 570 nm 处测定吸光值（$D_{570\ nm}$）。刺激指数＝药物刺激孔 $D_{570\ nm}$/空白对照孔 $D_{570\ nm}$。

1.2.6　桔梗皂苷 D 对巨噬细胞吞噬功能的影响　参考文献[18-19]，采用 MTT 法进行试验。试验设空白对照组、阳性对照组及 25，50，75 和 100 μg/mL 桔梗皂苷 D 组。用 96 孔细胞培养板培养巨噬细胞，每组均设 3 个复孔，每孔加入 100 μL 巨噬细胞悬液。空白对照组每孔加入 100 μL RPMI-1640 完全培养基，阳性对照组每孔加入 100 μL 左旋咪唑溶液，使左旋咪唑在培养基中的终质量浓度为 50 mg/L，桔梗皂苷 D 各组每孔分别加入 100 μL 含不同质量浓度的桔梗皂苷 D 溶液，使桔梗皂苷 D 在培养基中的终质量浓度分别为 25，50，75 和 100 μg/mL。将各处理细胞置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后，每孔加入 50 μL 金黄色葡萄球菌悬液，培养 9 h，每孔加 20 μL MTT 溶液，培养 4 h，每孔加入 150 μL DMSO，用酶标仪测定 $D_{570\ nm}$。

1.2.7　桔梗皂苷 D 对细胞因子的影响　参考文献[20-21]，采用 ELISA 法进行试验。试验设空白对照组、阳性对照组及 25，50，75 和 100 μg/mL 桔梗皂苷 D 组。用 24 孔细胞培养板培养淋巴细胞（或巨噬细胞），每组均设 3 个复孔，每孔加入 1 mL 淋巴细胞（或巨噬细胞）悬液，空白对照组每孔加入 1 mL RPMI-1640 完全培养基，阳性对照组每孔加入 1 mL 左旋咪唑溶液，使左旋咪唑在培养基中的终质量浓度为 50 mg/L，桔梗皂苷 D 各组每孔分别加入 1 mL 含不同质量浓度的桔梗皂苷 D 溶液，使桔梗皂苷 D 在培养基中的终质量浓度分别为 25，50，75 和 100 μg/mL。将各处理细胞置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 48 h，淋巴细胞 1 500 r/min（巨噬细胞 1 800 r/min）离心 5 min，收集上清。用 ELISA 法检测桔梗皂苷 D 对淋巴细胞 IL-2、IL-4 和巨噬细胞 TNF-α、IL-12 分泌的影响，按照小鼠细胞因子试剂盒说明书进行操作。

1.2.8　统计学分析　各组数据以“平均值±标准差”表示。应用 SPSS 17.0 统计软件进行一维方差分析。

2　结果与分析

2.1　桔梗皂苷 D 对淋巴细胞增殖的影响

由表 1 可知，阳性对照组和桔梗皂苷 D 各剂量组淋巴细胞刺激指数均极显著高于空白对照组（$P<0.01$）；50 μg/mL 桔梗皂苷 D 组极显著高于阳性对照组及其他桔梗皂苷 D 试验组（$P<0.01$）；25 和 75 μg/mL 桔梗皂苷 D 组低于阳性对照组，但无统计学意义（$P>0.05$）；100 μg/mL 桔梗皂苷 D 组极显著低于阳性对照组（$P<0.01$）。上述结果表明，桔梗皂苷 D 能够刺激淋巴细胞增殖，其中 50 μg/mL 桔梗皂苷 D 组的效果优于其他试验组。

表 1　桔梗皂苷 D 对淋巴细胞增殖和巨噬细胞吞噬功能的影响（$n=3$）

Table 1　Effects of platycodin D on proliferation of lymphocytes and phagocytosis of macrophage ($n=3$)

组别 Group	淋巴细胞刺激指数 Stimulation index of lymphocytes	巨噬细胞 $D_{570\ nm}$值 $D_{570\ nm}$ of macrophage
空白对照组 Blank control group	1.00±0.000 dD	0.16±0.003 dD
阳性对照组 Positive control group	2.49±0.800 bB	0.23±0.014 bB
25 μg/mL 桔梗皂苷 D 组 25 μg/mL platycodin D group	2.41±0.100 bB	0.22±0.008 bB
50 μg/mL 桔梗皂苷 D 组 50 μg/mL platycodin D group	2.68±0.038 aA	0.28±0.012 aA
75 μg/mL 桔梗皂苷 D 组 75 μg/mL platycodin D group	2.44±0.096 bB	0.21±0.014 bB
100 μg/mL 桔梗皂苷 D 组 100 μg/mL platycodin D group	2.14±0.046 cC	0.19±0.007 cC

注：同列数据后标不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），标不同大写字母表示差异极显著（$P<0.01$）。下表同。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$), while different uppercase letter indicate extremely significant difference ($P<0.01$). The same below.

2.2 桔梗皂苷D对巨噬细胞吞噬功能的影响

表1表明,阳性对照组和桔梗皂苷D各剂量组巨噬细胞 $D_{570\ nm}$ 值均极显著高于空白对照组($P<0.01$);50 μg/mL桔梗皂苷组极显著高于阳性对照组和其他试验组($P<0.01$);25和75 μg/mL桔梗皂苷D组低于阳性对照组,但无统计学意义($P>0.05$);100 μg/mL桔梗皂苷D组极显著低于阳性对照组。表明桔梗皂苷D可提高巨噬细胞的吞噬功能,其中以50 μg/mL质量浓度组效果最优。

2.3 桔梗皂苷D对淋巴细胞分泌细胞因子的影响

2.3.1 对IL-2分泌的影响 由表2可见,阳性对照组和桔梗皂苷D各剂量组的IL-2含量均极显著高于空白对照组($P<0.01$);50 μg/mL桔梗皂苷D组极显著高于阳性对照组和其他试验组($P<0.01$);25 μg/mL桔梗皂苷D组低于阳性对照组,但无统计学意义($P>0.05$);75和100 μg/mL桔梗皂苷D组均极显著低于阳性对照组($P<0.01$)。表明桔梗皂苷D能够促进淋巴细胞IL-2的分泌,其中以50 μg/mL质量浓度组的效果优于其他试验组。

2.3.2 对IL-4分泌的影响 由表2可知,阳性对照组和桔梗皂苷D各剂量组的IL-4含量均极显著高于空白对照组($P<0.01$);50 μg/mL桔梗皂苷D组极显著高于阳性对照组和其他试验组($P<0.01$);25和75 μg/mL桔梗皂苷D组均低于阳性对照组,但无统计学意义($P>0.05$);100 μg/mL桔梗皂苷D组极显著低于阳性对照组($P<0.01$)。可见,桔梗皂苷D能够促进淋巴细胞IL-4的分泌,其中以50 μg/mL质量浓度组的效果最优。

表2 桔梗皂苷D对淋巴细胞IL-2和IL-4分泌的影响($n=3$)

Table 2 Effects of platycodin D on secretion of IL-2 and IL-4 in lymphocytes ($n=3$) pg/mL

组别 Group	IL-2含量 Content of IL-2	IL-4含量 Content of IL-4
空白对照组 Blank control group	5.30±0.382 eE	110.3±8.74 dD
阳性对照组 Positive control group	13.63±0.372 bB	195.3±7.51 bB
25 μg/mL桔梗皂苷D组 25 μg/mL platycodin D group	13.14±0.424 bB	188.7±12.10 bB
50 μg/mL桔梗皂苷D组 50 μg/mL platycodin D group	17.34±0.544 aA	239.3±9.02 aA
75 μg/mL桔梗皂苷D组 75 μg/mL platycodin D group	12.78±0.781 cC	180.0±3.61 bB
100 μg/mL桔梗皂苷D组 100 μg/mL platycodin D group	10.49±0.561 dD	153.0±5.00 cC

2.4 桔梗皂苷D对巨噬细胞分泌细胞因子的影响

2.4.1 对TNF-α分泌的影响 表3结果表明,阳性对照组和桔梗皂苷D各剂量组的TNF-α含量均极显著高于空白对照组($P<0.01$);50 μg/mL桔梗皂苷D组极显著高于阳性对照组和其他试验组($P<0.01$);25和75 μg/mL桔梗皂苷D组均高于阳性对照组,100 μg/mL桔梗皂苷D组低于阳性对照组,但均无统计学意义($P>0.05$)。结果表明,桔梗皂苷D能够促进巨噬细胞TNF-α的分泌,其中以50 μg/mL质量浓度组的效果优于其他试验组。

表3 桔梗皂苷D对巨噬细胞TNF-α和IL-12分泌的影响($n=3$)

Table 3 Effects of platycodin D on secretion of TNF-α and IL-12 in macrophage ($n=3$) pg/mL

组别 Group	TNF-α含量 Content of TNF-α	IL-12含量 Content of IL-12
空白对照组 Blank control group	77.0±11.53 cC	6.26±0.647 cC
阳性对照组 Positive control group	211.0±24.76 bB	10.94±1.499 bB
25 μg/mL桔梗皂苷D组 25 μg/mL platycodin D group	242.0±18.52 bB	11.75±0.969 bB
50 μg/mL桔梗皂苷D组 50 μg/mL platycodin D group	294.3±21.01 aA	14.11±1.507 aA
75 μg/mL桔梗皂苷D组 75 μg/mL platycodin D group	227.7±6.81 bB	11.53±0.819 bB
100 μg/mL桔梗皂苷D组 100 μg/mL platycodin D group	197.0±31.43 bB	9.92±0.819 bB

2.4.2 对IL-12分泌的影响 表3表明,阳性对照组和桔梗皂苷D各剂量组的IL-12含量均极显著高于空白对照组($P<0.01$);50 μg/mL桔梗皂苷D组极显著高于阳性对照组和其他试验组($P<0.01$);25和75 μg/mL桔梗皂苷D组均高于阳性对照组,100 μg/mL桔梗皂苷D组低于阳性对照组,但均无统计学意义($P>0.05$)。由上述结果可知,桔梗皂苷D能够促进巨噬细胞IL-12的分泌,其中以50 μg/mL质量浓度组的效果优于其他试验组。

3 讨 论

淋巴细胞是机体主要的免疫活性细胞,淋巴细胞的增殖可增强机体的免疫应答能力,也可间接反映机体的免疫功能[22]。巨噬细胞是抗原递呈细胞,是T、B细胞免疫应答的主要承担者。巨噬细胞是防御微生物入侵和恶性肿瘤的第一道防线。巨噬细胞发生吞噬吸收后,通过表达更高水平的共刺激分子,发挥抗原递呈的作用,从而调节T细胞和巨噬

细胞之间的相互作用[23-24]。细胞因子是机体免疫系统的组成部分，能够参与调节细胞分化增殖和活化，其分泌量的多少直接反映出机体的免疫状况。TNF-α 是由巨噬细胞和淋巴细胞分泌的细胞因子，在机体防御机制中发挥着重要作用，能够引起肿瘤组织的出血坏死，通过介导免疫调节、诱导肿瘤细胞凋亡、放化疗增敏等发挥抗肿瘤作用。在细胞免疫方面，TNF-α 以细胞相互接触的方式发挥免疫作用，能诱导 B 淋巴细胞分泌细胞因子，激活巨噬细胞，并刺激 T 细胞增殖而参与免疫调节[25]。IL-2 能对 T 细胞产生影响，可促进 T 细胞活化和增殖，提高免疫细胞应答反应，细胞对 IL-2 的分泌是检测免疫调节活性的一个指标[26]。IL-4 主要由活化 T 细胞产生，是具有多种生物学功能的细胞因子，可促进 Th1 细胞向 Th2 分化，刺激 B 细胞增殖及产生抗体。IL-12 是由单核-巨噬细胞以及 B 淋巴细胞对细菌、细菌产物以及细菌内的寄生物等发生反应而产生的，IL-12 作为 Th1 细胞产生的必需因子之一，可引起 Th1 细胞分化[27]。Choi 等[9]研究表明，桔梗水提取物可促进巨噬细胞增殖、分化、吞噬和一氧化氮及细胞因子的分泌。贾林等[28]研究表明，桔梗多糖能显著提高环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠胸腺和脾脏指数，显著提高血清中 IL-2 和 TNF-α 的分泌。Han 等[29]研究表明，桔梗多糖可促进巨噬细胞中 NO 产生和诱导型 NO 合成酶表达的提高。Yoon 等[30]研究表明，桔梗多糖通过结合巨噬细胞表面的 TLR4 受体并引起 NO 的释放来激活巨噬细胞，可通过 TLR4/NK-κB 信号途径来调节巨噬细胞功能。Xie 等[31]研究表明，桔梗皂苷 D2 能够引起 Thl 及 Th2 细胞的免疫应答，增强机体免疫能力。谢勇[32]研究表明，桔梗皂苷 D 可以显著提高重组乙型肝炎表面抗原疫苗受免小鼠脾细胞 IL-2 和 IFN-γ mRNA 的表达水平，并可显著提高禽流感新城疫二联活疫苗免疫小鼠脾细胞 IL-10、IFN-γ mRNA 的表达水平，从而增强受免小鼠 Thl 型和 Th 型细胞的免疫应答水平。本试验结果表明，桔梗皂苷 D 能够促进小鼠脾琳巴细胞增殖，提高小鼠脾淋巴细胞 IL-2 和 IL-4 的分泌，从而增强受免小鼠 Thl 型和 Th 型细胞的免疫应答水平；并能够促进小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能，促进巨噬细胞 IL-12 和 TNF-α 的分泌，从而增强受免小鼠 Thl 型细胞的免疫应答水平。

[参考文献]

[1] 李　婷，徐文珊，李西文，等. 中药桔梗的现代药理研究进展 [J]. 中药药理与临床，2013，29(2)：205-208.
Li T，Xu W S，Li X W，et al. Research progress in modern pharmacology of *Platycodon grandiflorum* [J]. Pharmacology and Clinical of Traditional Chinese Medicine，2013，29(2)：205-208.

[2] 任　奕. 桔梗皂苷提取纯化工艺研究进展 [J]. 农业科技与装备，2016(10)：58-59.
Ren Y. Research progress in extraction and purification of *Platycodon grandiflorum* [J]. Agricultural Science，Technology and Equipment，2016(10)：58-59.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2010 年版一部 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2010：259-260.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China：2010 edition，Part 1 [M]. Beijing：China Medical Science Press，2010：259-260.

[4] 邹葭霜，单进军，谢　彤，等. 桔梗皂苷 D 的研究进展 [J]. 中成药，2014，36(4)：823-827.
Zhou X S，Shan J J，Xie T，et al. Research progress of platycodin D [J]. Traditional Chinese Medicine Patent Prescription，2014，36(4)：823-827.

[5] 李国强. 分析桔梗皂苷活性成分及其生物活性 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志，2015，27(3)：192-193.
Li G Q. The active ingredient and biological activities of platycodin D analysis [J]. Cardiovascular Disease Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine，2015，27(3)：192-193.

[6] 朱立芬，王　冰. 桔梗皂苷 D 防御口腔黏膜上皮细胞感染白色念珠菌的作用 [J/OL]. 中国病理生理杂志，2017，33(1)：161-165.
Zhu L F，Wang B. The effect of platycodin D on oral mucosal epithelial cells infected with *Candida albicans* [J/OL]. Chinese Journal of Pathophysiology，2017，33(1)：161-165.

[7] 孔　亚，王佳佳，卢宗亮，等. 桔梗皂苷 D 诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡 [J/OL]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2016，23(3)：350-354.
Kong Y，Wang J J，Lu Z L，et al. platycodin D induce breast cancer cells MDA-MB-231 apoptosis [J/OL]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy，2016，23(3)：350-354.

[8] 张　程，邢德刚. 桔梗皂苷 D 对 MG-63 细胞的凋亡作用 [J/OL]. 广东药科大学学报，2017，33(1)：123-126.
Zhang C，Xing D G. Effect of platycodin D on the apoptosis of MG-63 cell [J/OL]. Academic Journal of Guangdong College of Pharmacy，2017，33(1)：123-126.

[9] Choi C Y，Kim J Y，Kim Y S，et al. Augmentation of macrophage functions by an anaqeous extract isolated from *Platycodon grandiflorum* [J]. Cancer Lett，2001，166(1)：17-25.

[10] Choi C Y，Kim J Y，Kim Y S，et al. Aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum* elicits the release of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha from murine macrophages [J]. Lnt lmmunopharmacol，2001，1(6)：1141-1151.

[11] 宋博翠. 瑞香素对小鼠淋巴细胞免疫抑制效果及其作用机制的研究 [D]. 长春：吉林大学，2014.
Song B C. The immunosuppressive effects and mechanisms of

daphnetin on mouse lymphocytes [D]. Changchun: Jilin University, 2014.

[12] 贺惠娟. 积雪草提取物对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 [D]. 广州:暨南大学,2010.
He H J. The influence of *Centella asiatica* extracts on lymphocyte proliferation in mice [D]. Guangzhou: Jinan University, 2010.

[13] Yu Y, Lu Y, Bo R, et al. The preparation of gypenosides liposomes and its effects on the peritoneal macrophages function *in vitro* [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2014, 460 (1/2): 248.

[14] Nishi C, Toda S, Segawa K, et al. Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages [J]. Molecular & Cellular Biology, 2014, 34(8): 1512.

[15] 付 越,李敬双,刘英博,等. 紫薯花色苷对小鼠免疫细胞的调节作用 [J]. 饲料研究,2015(21):59-64.
Fu Y, Li J S, Liu Y B, et al. Regulatory effect of purple sweet potato anthocyanins on immune cells in mice [J]. Feed Research, 2015(21): 59-64.

[16] 刘英博,付 越,郝 璐,等. 白藜芦醇对小鼠脾淋巴细胞免疫调节活性的影响 [J]. 食品工业科技,2016,37(8):335-339.
Liu Y B, Fu Y, Hao L, et al. The influence of resveratrol on immunoregulatory activity of mouse splenic lymphocyte [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(8): 335-339.

[17] Mufidah Z, Rifa I M, Rahayu S. Immunomodulators activity of noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit extract in mice infected with *Staphylococcus aureus* [J]. Jurnal Veteriner, 2013(12): 501-510.

[18] Deloid G M, Sulahian T H, Imrich A, et al. Heterogeneity in macrophage phagocytosis of staphylococcus aureus strains [J]. High-Throughput Scanning Cytometry-Based Analysis, 2009, 4(7): e6209.

[19] 安 妮,冯慧慧,付 越,等. 辣椒碱对小鼠淋巴细胞和巨噬细胞体外免疫调节活性的影响 [J]. 饲料研究,2016(18):39-44.
An N, Feng H H, Fu Y, et al. The effect of capsaincine on murine lymphocytes and macrophages on immunoregulation *in vitro* [J]. Feed Research, 2016(18): 39-44.

[20] Xie W, Ding W, Dai W, et al. Effects of Bingxiang powder on lymphocyte proli-feration and cytokine secretion in mice infected with influenza A [J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2013, 6: 578-581.

[21] 孟显华,于 洋,郝 璐,等. 华蟾毒精对小鼠巨噬细胞功能的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2016,44(8):61-65.
Meng X H, Yu Y, Hao L, et al. Effect of cinobufagin on macrophage function of mice [J]. Journal of Northwest A&F Universit (Nat Sci Ed), 2016, 44(8): 61-65.

[22] 陈黎龙,朱晓彤,江青艳,等. 三肽囊素对鸡脾脏淋巴细胞增殖转化、IL-2 和 IL-6 分泌及其基因表达的影响 [J]. 动物学报,2006,52(1):170-174.
Chen L L, Zhu X T, Jiang Q Y, et al. Bursin on chicken spleen lymphocyte increment transformation, IL-2 and IL-6 secretion and their gene expression influence [J]. Current Zoology, 2006, 52(1): 170-174.

[23] Segal B H. Role of macrophages in host defense against aspergillosis and strategies for immune augmentation [J]. The Concologist, 2007, 12(Suppl 2): 7-13.

[24] Woods J, Lu Q, Lowder T. Exercise-induced modulation of macrophage function [J]. Immunology and Cell Biology, 2000, 78(5): 545-553.

[25] 孟显华. 华蟾毒精对淋巴细胞和巨噬细胞免疫调节活性的研究 [D]. 辽宁锦州:锦州医科大学,2016.
Meng X H. The study of cinobufagin for lymphocytes and macrophages immunomodulatory activity [D]. Jinzhou, Liaoning: Jinzhou Medical University, 2016.

[26] Lillehoj H S. Avian interferon and interleukin-2: a review by comparison with m-ammalian homologues [J]. Poultry Science Reviews, 1992(4): 67-85.

[27] 刘天明. 淫羊藿苷对小鼠免疫细胞功能的调节作用 [D]. 辽宁锦州:锦州医科大学,2016.
Liu T M. Regulation of icariin on immune cell function in mice [D]. Jinzhou, Liaoning: Jinzhou Medical University, 2016.

[28] 贾 林,陆金健,周文雅,等. 桔梗多糖对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的免疫调节 [J]. 食品与机械,2012,28(3):112-114.
Jia L, Lu J J, Zhou W Y, et al. Immunoregulatory effect of polysaccharides from *Platycodon grandiflorum* A. DC on immunosppressive mice induced by cyclophosphamide [J]. Food & Machinery, 2012, 28(3): 112-114.

[29] Han S B, Park S H, Lee K H, et al. Polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* selectively activates B cells and macrophages but not T cells [J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(11): 1969-1978.

[30] Yoon Y D, Han S B, Kang J S, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of macrophages by polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* [J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(13/14): 1873-1882.

[31] Xie Y, Deng W, Sun H X, et al. Platycodin D is a potential less hemolytic saponin adjuvant elieiting Thl and Th2 immune responses [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(8): 1143-1150.

[32] 谢 勇. 桔梗中皂苷的免疫佐剂活性研究 [D]. 杭州:浙江大学,2008.
Xie Y. Immunological adjuvant activity of saponins from roots *Platycodon grandiflorum* A. DC [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.