

# 五加芪粉对小鼠淋巴细胞增殖功能和抗体形成细胞的影响

桑卡娜,高艳艳,周德刚

(国家兽用药品工程技术研究中心/洛阳惠中兽药有限公司,河南洛阳 471003)

[收稿日期]2016-12-05 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2017)03-0044-04 [中图分类号]S853.74

**[摘要]** 为了考察五加芪粉对小鼠淋巴细胞增殖功能和抗体形成细胞的影响,为临床应用提供理论依据,设不同剂量的(60、120、240 mg·kg·d<sup>-1</sup>)五加芪粉组,同时设黄芪多糖粉对照组和空白对照组。连续灌胃7 d后,无菌取小鼠脾脏,制备脾淋巴细胞,采用MTT法检测小鼠淋巴细胞增殖功能,定量溶血分光光度(QHS)法测定小鼠抗体形成细胞。结果显示:五加芪粉中、高剂量组可显著(0.01 < P ≤ 0.05)或极显著(P ≤ 0.01)的提高小鼠淋巴细胞的吸光度值,具有提高机体细胞免疫力的作用;五加芪粉各给药组均显著和极显著的提高了小鼠抗体形成细胞水平(0.01 < P ≤ 0.05, P ≤ 0.01),具有提升动物体液免疫功能的作用。表明五加芪粉可同时提高机体的细胞免疫和体液免疫功能,增强机体免疫力。

**[关键词]** 五加芪粉;淋巴细胞增殖;抗体形成细胞;小鼠

## Influence of Wujiaqi Powder on Lymphocyte Proliferation and Antibody – Forming Cells of Mice

SANG Ka – na, GAO Yan – Yan, ZHOU De – gang

(Luoyang Huizhong Animal Medicine Co., Ltd, National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang, Henan 471003, China)

**Abstract:** Explored the effect of Wujiaqi powder on lymphocyte proliferation and antibody – forming cells of mice, and to provide theoretical basis for clinical application. Three groups of Wujiaqi powder with different doses (60, 120, 240 mg·kg·d<sup>-1</sup>) were explored and with the astragalosides group and blank group as control group. After 7 d of continuous intragastrical administration and spleen lymphocytes cells were prepared by aseptic separation. Using MTT to measure the proliferations of T lymphocytes, and (QHS) to analyze antibody – forming cells. The results show that: the middle and high dose groups of Wujiaqi powder can significantly (0.01 < P ≤ 0.05) or extremely significantly (P ≤ 0.01) improve the absorbance value of lymphocytes and can improve the immune function of mice, all treated groups can significantly or extremely significantly improve the antibody – forming cells level (0.01 < P ≤ 0.05, P ≤ 0.01) and can enhance the function of humoral immune function in mice. Wujiaqi powder can obviously improve the humoral and cellular immune function, and enhance the body

immunity of mice.

**Key words:** Wujiaqi powder; lymphocyte proliferation; antibody-forming cells; mice

五加芪粉主要成分为黄芪和刺五加, 黄芪主要活性成分为黄酮、皂苷和黄芪多糖(APS)。总黄酮对小鼠具有免疫增强和调节作用。黄芪皂苷可保护心肌、增强心肌收缩力, 改善心功能。黄芪多糖具有多重功效, 可以提升动物机体的免疫力、抗病力、降低发病率<sup>[1]</sup>、有抗肿瘤、抗病毒<sup>[2]</sup>、抗氧化、抗衰老作用<sup>[3]</sup>、同时可以保肝护肾、调节血糖<sup>[4]</sup>、补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌<sup>[5]</sup>, 其中以免疫调节功能最为突出, 能增强细胞免疫和体液免疫的免疫功能<sup>[6]</sup>。

刺五加主要活性成分为黄酮、苷类、多糖等, 其多糖是干扰素促诱生剂, 通过提高干扰素的水平, 提高机体免疫力<sup>[7]</sup>。黄芪和刺五加有相互协同的药理作用, 都能增强机体免疫力, 配合疫苗使用可提高疫苗的免疫效果。

脾脏作为重要的外周免疫器官, 含有 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞, 其中 T 淋巴细胞主要参与细胞免疫, B 细胞主要参与体液免疫。本研究通过无菌制备脾脏淋巴细胞悬液, 采用 MTT 法和定量溶血分光光度测定(QHS)法分别检测小鼠脾脏 T 淋巴细胞体外增殖功能和 B 淋巴细胞功能。通过体液免疫和细胞免疫两方面探讨五加芪粉对机体免疫功能的影响, 为其基础研究和临床应用提供理论依据。

## 1 材料

1.1 试验动物 6 周龄的 BALB/C 小鼠 120 只, SPF 级, 雌雄各半, 体重 18~22 g, 8 周龄豚鼠 6 只, SPF 级, 雄性, 体重 250~300 g; 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2012-0001。

1.2 试验药品 五加芪粉: 规格 50 g:165 g 生药, 批号 20120203, 由洛阳惠中兽药有限公司提供; 黄芪多糖粉: 每 1 g 含黄芪多糖  $\geq 450$  mg, 批号 1107121, 爱迪森(北京)生物科技有限公司。

1.3 主要试剂 RPMI-1640 培养基, 批号: 1042186, Invitrogen 公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT),

批号: MKBH7489V, Sigma 公司; 胎牛血清, 批号: NSF0051, 海克隆生物化学制品(北京)有限公司; 脱纤维绵羊血, 批号: 20140310, 郑州益康生物工程有限公司。

1.4 主要仪器 8000WJ-3423 CO<sub>2</sub> 培养箱: 美国 Thermo 公司; 37XB 生物显微镜: 上海光学仪器六厂; Sunrise 酶标仪: 瑞士 Teacan 公司; Nu-425-400S 生物安全柜: 美国 Nuaire 公司; TGL-16G 台式高速离心机: 江苏金坛市科兴仪器厂。

## 2 方法

### 2.1 试剂配制

2.1.1 绵羊红细胞悬液的制备 取脱纤维绵羊血 20 mL, 2500 转/min 离心 10 min, 弃上清。加 PBS 液 10 mL, 重悬, 重复洗涤 3 次后加入 PBS 液, 配制 10% 和 0.2% 的绵羊红细胞悬液。

2.1.2 补体的制备 取 8 mL 豚鼠血清加入 2 mL 压缩体积的绵羊红细胞, 混匀, 4 °C 冰箱放置 1 h, 2500 转/min 离心 5 min, 取上清, 用 PBS 液进行 20 倍稀释, 备用。

2.2 试验设计与分组 挑选体重在 18~22 g 的小鼠 100 只, 随机分为 5 组, 每组 20 只, 雌雄各半, 具体分组见表 1。五加芪组小鼠每日灌服 0.2 mL 浓度为 6、12、24 mg/mL 五加芪溶液 1 次, 黄芪多糖组每日灌服 0.2 mL 浓度为 12 mg/mL 黄芪多糖溶液 1 次, 空白组灌服等量的纯化水, 连续 7 d。

表 1 试验分组和给药剂量

组别	组名	给药剂量/(mg·kg·d <sup>-1</sup> )
1	五加芪粉低剂量组	60
2	五加芪粉中剂量组	120
3	五加芪粉高剂量组	240
4	黄芪多糖粉对照组	120
5	空白对照组	纯化水

### 2.3 MTT 法测定淋巴细胞增殖试验

2.3.1 脾脏淋巴细胞悬液的制备 第 7 次给药后 24 h, 颈椎骨脱位法处死小鼠, 每组 10 只, 雌雄各半。

酒精浸泡消毒后无菌取脾脏,D-Hank's液漂洗后置于200目的无菌尼龙网上,用无菌玻璃针芯研磨,加D-Hank's液过滤,2000转/min离心5 min,去上清。加入4 mL红细胞裂解液重悬,置于37℃培养箱内孵育10 min,2000转/min离心5 min,去上清。用D-Hank's液和完全1640培养液重复离心洗涤1次。用0.5%台盼蓝染色,取10 μL加入细胞计数板内于显微镜下观察,当细胞存活率在90%以上,且计数区域内细胞分布均匀时,计数四个大方格内的活细胞数,根据以下公式计算每毫升细胞悬液中的活细胞浓度。根据计数结果,用完全1640培养液将细胞浓度调至 $1.5 \times 10^6$ /mL。

细胞浓度(个/mL) = 4个大方格中的细胞数 / 4 × 稀释倍数 ×  $10^4$

2.3.2 淋巴细胞增殖试验 采用MTT法测定淋巴细胞增殖。取分离得到的淋巴细胞于96孔板中,37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养48 h。在培养44 h后,每孔各加入5 mg/mL的MTT 10 μL(初始浓度为)继续培养4 h。培养结束后,每孔吸取上清液150 μL弃去,然后加入150 μL的DMSO,置微量振荡仪振荡10 min,使紫色结晶完全溶解,用酶标仪测定570 nm波长下OD值,作为T淋巴细胞增殖的指标。

2.4 小鼠的抗体形成细胞试验

2.4.1 动物的免疫 第7日给药后,每组取10只小鼠,雌雄各半,每只小鼠腹腔注射10%的绵羊红

细胞0.5 mL。

2.4.2 脾脏淋巴细胞悬液的制备 免疫后第6日,颈椎脱臼处死免疫后的各组小鼠,常规取脾脏,分离脾淋巴细胞,并进行细胞计数,调整细胞浓度至 $5.0 \times 10^6$ /mL。

2.4.3 脾细胞介导绵羊红细胞定量溶血分光光度试验(QHS) 取小鼠脾脏淋巴细胞悬液1 mL,补体1 mL,0.2%绵羊红细胞(SRBC) 1 mL,混匀,37℃水浴1 h,1500转/min离心10 min,取上清液200 μL加入96孔细胞培养板,用酶标仪测定其在413 nm波长处吸光度值,作为QHS反应值。

2.5 数据分析 每只小鼠6个重复,取平均值进行分析比较。数据处理用SPSS 18.0统计软件进行单因素方差分析,所有数据均以 $\bar{X} \pm SD$ 表示,其中( $P > 0.05$ )差异不显著, $0.01 < P \leq 0.05$ 表示差异显著, $P \leq 0.01$ 表示差异极显著。

3 结果与分析

3.1 MTT法测定淋巴细胞增殖试验 五加芪粉对小鼠淋巴细胞增殖试验各组淋巴细胞增殖结果见表2。从表2可以看出,给药各组与空白对照组相比,小鼠脾脏淋巴细胞的吸光度值均有不同程度的增高。其中,五加芪粉中剂量组、黄芪多糖粉对照组与空白对照组比,差异显著( $0.01 < P \leq 0.05$ ),五加芪粉高剂量组与空白对照组相比差异极显著( $P \leq 0.01$ )。五加芪粉各剂量组与黄芪多糖粉对照组相比,差异不显著。

表2 试验各组淋巴细胞增殖结果( $\bar{X} \pm SD, n = 10$ )

组别	组名	570 nm的吸光度值	与黄芪多糖粉对照组相比P值	与空白对照组相比P值
1	五加芪粉低剂量组	0.277 ± 0.027	0.101	0.415
2	五加芪粉中剂量组	0.299 ± 0.037	0.915	0.021 *
3	五加芪粉高剂量组	0.311 ± 0.026	0.427	0.002 * *
4	黄芪多糖粉对照组	0.300 ± 0.035	—	0.016 *
5	空白对照组	0.265 ± 0.030	0.016 *	—

表中“\*”表示与空白对照组相比差异显著( $0.01 < P \leq 0.05$ ),“\* \*”表示与空白对照组差异极显著( $P \leq 0.01$ )。(下同)

3.2 小鼠抗体形成细胞的影响 五加芪粉对小鼠抗体形成细胞的影响试验采用定量溶血分光光度法(QHS)对小鼠的QHS的影响结果见下表3。从表3可以看出,与空白对照组相比,五加芪粉各剂量组与黄芪多糖粉对照组脾细胞介导绵羊红细胞定量溶血分光

度值均有明显的增高。其中,五加芪粉低剂量组、黄芪多糖粉对照组与空白对照组比,差异显著( $0.01 < P \leq 0.05$ );五加芪粉高剂量组、中剂量组与空白对照组比,差异极显著( $P \leq 0.01$ );五加芪粉各剂量组与黄芪多糖粉对照组相比,差异不显著。

表3 五加芪粉对小鼠 QHS 影响( $\bar{X} \pm SD, n=10$ )

组别	组名	413 nm 吸光度值	与黄芪多糖粉对照组相比 P 值	与空白对照组相比 P 值
1	五加芪粉低剂量组	0.522 ± 0.074	0.951	0.036 *
2	五加芪粉中剂量组	0.549 ± 0.107	0.542	0.007 **
3	五加芪粉高剂量组	0.562 ± 0.089	0.338	0.003 **
4	黄芪多糖粉对照组	0.525 ± 0.060	—	0.031 *
5	空白对照组	0.438 ± 0.096	0.031 *	—

#### 4 讨论与小结

中药黄芪和刺五加都具有提高机体免疫力的功效,试验主要研究黄芪和刺五加提取的五加芪粉,通过采用 MTT 法测定淋巴细胞增殖功能,反应细胞免疫功能, QHS 法测定小鼠的抗体形成细胞,反应体液免疫功能。

脾脏淋巴细胞增殖功能的高低反映了机体细胞免疫功能的状况。ConA(刀豆蛋白 A)可诱导小鼠脾脏淋巴细胞增殖, ConA 促进有丝分裂,能选择性的作用于 T 细胞。参与细胞免疫,促进其增殖转化。五加芪粉灌胃后,小鼠脾脏淋巴细胞增殖的吸光度值与增殖能力呈正比,吸光度值增高,对 ConA 的刺激反应增强,表明五加芪粉具有促进细胞免疫功能的作用。刘永杰等<sup>[7]</sup>研究发现雏鸡注射黄芪多糖后,淋巴细胞增殖反应均增加或显著增加,说明黄芪多糖能明显提高机体免疫功能。王远阁等<sup>[8]</sup>研究黄芪多糖(APS)、牛膝多糖(ABPS)、板蓝根多糖(IR-PS)、山药多糖(DOPS)等 4 种中药多糖用 MTT 法测定淋巴细胞增殖的变化。结果表明 4 种多糖在适宜的浓度下均能促进淋巴细胞增殖作用。

以上文献报道与本试验结果一致,均表明多糖类成分能明显协同 ConA 刺激淋巴细胞增殖,促进白细胞介素-2(IL-2)产生及协同细菌脂多糖(LPS)的作用,同时能增强 B 淋巴细胞和巨噬细胞的功能,增强正常小鼠外周血 NK 细胞的活性,刺激 NK 细胞增殖,对小鼠的免疫功能具有较好的促进作用。

体液免疫是机体特异性免疫的重要组成部分,负责体液免疫的细胞是 B 细胞。脾细胞介导绵羊红细胞定量溶血分光光度值的高低反映了脾脏中 B 细胞分泌抗体的能力,是评价动物机体体液免疫功能的重要指标。五加芪粉各剂量组可提高脾细胞介导绵羊红细胞定量溶血分光光度值,表明五加芪粉具有提升动物体液免疫能力的作用。王志强<sup>[9]</sup>等采用定量溶血分光光度测定法(QHS)体外测定 B 细胞产生分泌抗体水平,结果表明黄芪能增强小鼠抗体形成细胞活性,促进 B 细胞增殖。高春艳<sup>[10]</sup>等研究结果表明复方黄芪煎剂可以明显提高小鼠脾脏抗体形成细胞(PFC)的数量,具有改善体

液免疫功能的作用。以上文献资料报道与本试验结果一致,均表明多糖类中药能增强小鼠抗体形成细胞(B 细胞)活性,促进 B 细胞分化、增殖为浆细胞,同时可增加脾脏重量,促进免疫细胞的分裂增殖,明显增强小鼠抗体形成,对体液免疫和细胞免疫功能有促进作用。

随着畜牧养殖业的迅速发展和集约化养殖的增加,畜禽的疾病也越来越复杂,由于频繁和不正当的使用抗生素进行病菌感染的治疗和预防,导致耐药性和药物残留问题,严重危害环境和人类健康。我国中药资源丰富,研究历史深远,由于中药具有毒性小、无耐药性等优势,采用中药制剂对畜禽疾病进行预防治疗,意义深远。本试验通过研究中药五加芪粉对小鼠淋巴细胞增殖和抗体形成细胞水平的影响,表明五加芪粉可提高机体细胞免疫和体液免疫功能,具有提升机体免疫力的作用。

#### 参考文献:

- [1] 杜志德. 黄芪的免疫作用研究进展[J]. 中草药, 1988, 19(9): 40-42.
- [2] 张 蕾, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3203-3207.
- [3] 钟 灵, 王振富, 文德鉴. 黄芪多糖抗衰老作用的实验研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2013, 04: 350-352.
- [4] 姜琛璐, 汤 承, 蹇 宇, 索化夷, 李 林. 黄芪多糖免疫调节作用研究进展[J]. 食品科学, 2013, 11: 327-332.
- [5] 全 欣. 黄芪主要活性成分的药理作用[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1246-1249.
- [6] 高微微, 曹 丽, 李 展, 等. 黄芪成分对鸡外周血淋巴细胞增殖反应的影响[J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(6): 16-18.
- [7] 涂正伟, 周渭渭, 单 淇, 等. 刺五加的研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 03: 213-216.
- [8] 刘永杰, 李庆章, 郝艳红. 黄芪多糖和香菇多糖对雏鸡 IL-2 活性和淋巴细胞增殖反应的影响[J]. 吉林农业大学学报, 1999, 21(3): 89-91.
- [9] 王远阁, 崔保安, 张红英, 等. 黄芪板蓝根等多糖成分对鸡淋巴细胞体外增殖的影响[J]. 河南农业大学学报, 2007, 41(2): 196-199, 203.
- [10] 王志强. 黄芪对小鼠抗体形成细胞作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(3): 230-230.
- [11] 高春艳. 复方黄芪煎剂对小鼠体液免疫的调节作用[J]. 西部医学, 2010, 22(5): 800-801.

(编辑:陈 希)