

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.07.09

两种中药颗粒剂对正常小鼠免疫细胞因子调节作用的研究

叶志惠, 兰新财, 欧彬, 赵丽丽, 麻军法, 卢骏

(浙江金大康动物保健品有限公司, 浙江金华 321016)

[收稿日期] 2019-04-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 07-0056-05 [中图分类号] S853.74

[摘要] 为评价芪贞增免颗粒和人参茎叶总皂苷颗粒两种中药颗粒剂对正常小鼠相关免疫细胞因子的作用, 采用 ICR 小鼠为试验动物, 将芪贞增免颗粒和人参茎叶总皂苷颗粒通过口服给药, 观察其对小鼠的临床表现、生长的影响, 并通过对其血清 IL-2、IL-4、TNF- α 及 INF- γ 细胞因子含量的检测, 结果显示, 两种中药颗粒剂均能够显著提高小鼠血清 IL-2、IL-4、INF- γ 和 TNF- α 的分泌, 对雌性小鼠的作用尤为显著。表明该两种中药颗粒剂具有显著提高小鼠相关免疫细胞因子的作用。

[关键词] 芪贞增免颗粒; 人参茎叶总皂苷颗粒; 小鼠; IL-2; IL-4; TNF- α ; INF- γ

Study on the Regulation of Immunocytokines in Mice by Two Kinds of Granules of Traditional Chinese Medicine

YE Zhi-hui, LAN Xin-cai, OU Bing, ZHAO Li-li, MA Jun-fa, LU Jun

(Zhejiang Jindakang Animal Health Co., Ltd, Jinhua, Zhejiang 321016, China)

Abstract: In order to evaluate the effect of Qizhen Zengmian Granule and Ginseng Stem and Leaf Total Saponins Granule on immune cytokines in normal mice, ICR mice were used as experimental animals. Qizhen Zengmian Granule and Ginseng Stem and Leaf Total Saponins Granule were orally administered to observe the clinical manifestations and growth of mice, and the contents of IL-2, IL-4, TNF- α and INF- γ cytokines in serum of mice. The results showed that the two granules could significantly increase the secretion of serum IL-2, IL-4, INF- γ and TNF- α in mice, especially in female mice. The results showed that the two kinds of Chinese herbal granules could significantly improve the related immune cytokines in mice.

Key words: Yinzhi Jiedu Granule; Ginseng stem and leaf saponins granules; mice; IL-2; IL-4; TNF- α ; INF- γ

机体免疫系统担负着调节各细胞间多种生理功能的任务, 而发挥这些重要调节功能的蛋白质之

一是细胞因子。IL-2、INF- γ 、TNF 等细胞因子主要介导与细胞免疫有关的免疫应答, IL-4 等细胞

因子主要参与体液免疫。IL-2 可促进 T 细胞生长、B 细胞增殖分化,增强细胞毒 T 淋巴细胞的杀伤作用,提高 NK 细胞活性;IL-4 在调节 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞的分化和活化,促进以 Th₂ 细胞为特征的免疫应答过程中发挥重要作用。

随着养殖集约化程度的不断提高,因免疫抑制性疾病、霉菌毒素中毒、抗生素滥用、应激等造成免疫抑制问题较为突出,补益类中药和方剂对调节机体免疫力方面具有独特的优势。

芪贞增免颗粒被收载于国家标准,并已获得发明专利授权;人参茎叶总皂苷颗粒为国家三类新药。该两种中药颗粒剂在增强体液免疫方面已进行了大量研究工作,为了进一步考察该两种中药颗粒剂对正常小鼠 IL-2、IL-4、IFN- γ 、TNF 等细胞因子的作用,特进行本试验,为下一步进行芪贞增免颗粒和人参茎叶总皂苷颗粒的临床研究和推广应用提供依据。

1 材料

1.1 试验药物 芪贞增免颗粒(由浙江金大康动物保健品有限公司提供,批号:20180505,试验给药剂量定为低剂量组 0.3 g/kg·bw,高剂量组 0.9 g/kg·bw)。

人参茎叶总皂苷颗粒(由浙江金大康动物保健品有限公司提供,批号:20180506,试验给药剂量定为低剂量组 50 mg/kg·bw,高剂量组 150 mg/kg·bw)。

以上两种中药颗粒剂的低剂量组为临床推荐用量,高剂量组为临床推荐用量的 3 倍。

1.2 试验动物 ICR 小鼠,SPF 级,体重为 18~20 g,雌雄各半。南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供。

1.3 试验材料 小鼠血清 IL-2、IL-4、TNF- α 及 INF- γ 细胞因子含量 ELISA 试剂盒:采购自南京建成生物工程有限公司,生产批号均为 201806。注射器、灌胃针、烧杯、解剖器械、电子天平等。

2 方法

2.1 饲养管理 试验动物饲养于清洁、安静的环境中,环境温度控制在 20℃ 左右,自然光照,饲喂

鼠全价颗粒料(采购自南京江宁区青龙山动物繁殖场,生产批号:2018060501),自由采食和饮水。试验前适应性饲养 3 d,观察其健康状况,选择健康、营养状况良好的进行试验。

2.2 试验分组 将芪贞增免颗粒与人参茎叶总皂苷颗粒分别配置成高、低两个浓度,每天每只小鼠灌胃不同浓度的溶液 0.1 mL/10 g。试验小鼠随机分为 5 组,分别为对照组及两个药物的高剂量组、低剂量组,每组 10 只,雌雄各半。试验期 15 d。

2.3 检测指标及方法

2.3.1 一般状态 分别于试验开始、第 7 d、第 15 d 每天早上于固定时间点测定各组小鼠的饮食量、饮水量、体重,观察小鼠外观、精神状态等变化情况。

2.3.2 胸腺指数和脾脏指数测定 小鼠末次给药后 12 h,禁食不禁水,称量体重、眼球采血后,脱颈处死,剖取胸腺和脾脏,滤纸吸取表面残血及多余水分,称取湿重,计算胸腺指数和脾脏指数。

2.3.3 小鼠血清细胞因子含量检测 小鼠眼球采血后静置 2 h,4000 rpm 离心,收集血清,分装,于 -20℃ 保存。按照 ELISA 试剂盒说明,检测小鼠血清细胞因子 IL-2、IL-4、TNF- α 及 INF- γ 含量。

2.4 统计方法 各项数据采用 $\bar{X} \pm SD$ 表示,所有资料的统计分析均用 SPSS 17.0 进行统计,并进行单因素方差分析。

3 结果与分析

3.1 临床表现 试验过程中,各组小鼠精神状态良好,毛发顺畅,采食饮水正常,粪便干燥无异常,未观察到临床可见的异常情况(见图 1)。试验结束后,剖检大体检查,内脏器官均正常,无可见的大体病变(见图 2)。

3.2 小鼠体重变化 从表 1 可知,整个试验过程中两种中药颗粒剂的高剂量组和低剂量组小鼠的不同时间的体重均与对照组差异不显著($P > 0.05$)。表明两种中药颗粒剂对小鼠的生长基本无影响。



图 1 试验小鼠外观正常

Fig 1 The appearance of the test mice was normal



图 2 解剖无可见病变

Fig 2 No visible lesion in anatomy

表 1 对小鼠体重的影响(单位:g)

Tab 1 Effects on body weight of mice

分组	0 d		7 d		15 d	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
对照组	25.30 ± 0.83	21.92 ± 0.80	29.29 ± 0.86	23.76 ± 0.56	34.58 ± 1.46	25.28 ± 1.56
芪贞-H	25.36 ± 0.43	21.90 ± 0.47	30.13 ± 1.23	23.72 ± 0.77	35.02 ± 3.73	26.48 ± 1.98
芪贞-L	24.59 ± 0.73	21.37 ± 0.38	28.06 ± 0.31	22.85 ± 0.71	31.57 ± 3.08	24.09 ± 0.86
人参-H	24.68 ± 1.30	21.92 ± 0.73	28.53 ± 0.98	23.68 ± 1.25	32.62 ± 3.27	24.36 ± 2.09
人参-L	24.77 ± 1.02	21.55 ± 0.71	28.79 ± 1.22	23.09 ± 0.99	32.21 ± 2.79	24.47 ± 1.85

3.3 对小鼠免疫器官指数的影响

由表 2 可见,两种中药颗粒剂高、低剂量组对雌性小鼠的脾脏和胸腺的器官指数均影响较小,未见显著差异,但各给药组对雄性小鼠的胸腺均有较

显著的促进作用($P < 0.05$),但对脾脏的影响较小,人参茎叶总皂苷高剂量组的脾脏指数显著小于对照组($P < 0.01$)。

表 2 对小鼠免疫器官指数的影响

Tab 2 Effect on immune organ index in mice

分组	脾脏		胸腺	
	♂	♀	♂	♀
对照组	0.59 ± 0.06	0.64 ± 0.15	0.33 ± 0.07	0.55 ± 0.06
芪贞-H	0.56 ± 0.09	0.67 ± 0.03	0.42 ± 0.03 *	0.52 ± 0.09
芪贞-L	0.59 ± 0.14	0.66 ± 0.07	0.42 ± 0.09 *	0.47 ± 0.03
人参-H	0.46 ± 0.05 **	0.63 ± 0.07	0.43 ± 0.11 *	0.53 ± 0.09
人参-L	0.50 ± 0.09	0.66 ± 0.06	0.41 ± 0.08 *	0.50 ± 0.04

3.4 对血清细胞因子含量的影响

由表 3 可见,两种中药颗粒剂的低剂量组均能够显著的促进雌性小鼠的血清 IL-2、IL-4 和 TNF- α

的分泌($P < 0.01$),其中芪贞增免颗粒和人参茎叶总皂苷颗粒的低剂量组同时对雌性小鼠的血清 IFN- γ 有极显著的促进作用($P < 0.01$);人参茎叶

总皂苷颗粒的低剂量组对雄性小鼠的血清 IL - 2、IL - 4、IFN - γ 和 TNF - α 具有显著的促进作用($P < 0.05$),但高剂量组则差异不显著,同时芪贞增免颗粒的低剂量组对雄性小鼠的 IL - 4 和 IFN - γ 也

有显著的促进作用,但其他指标影响不大。从总体试验结果看,两种中药颗粒剂的低剂量组对小鼠血清几种细胞因子的促进作用要优于高剂量组。

表 3 对细胞因子 IL - 2、IL - 4 的影响

Tab 3 Effect on cytokines IL - 2 and IL - 4

分组	IL - 2 (ng/L)		IL - 4 (ng/L)	
	♂	♀	♂	♀
对照组	43.17 ± 4.24	42.02 ± 3.01	14.20 ± 1.63	14.39 ± 1.27
芪贞 - H	49.32 ± 4.46	58.42 ± 4.77 **	15.31 ± 1.86	19.95 ± 1.22 **
芪贞 - L	46.17 ± 5.62	55.12 ± 5.94 **	16.77 ± 1.19 *	20.54 ± 1.65 **
人参 - H	37.61 ± 6.03	54.33 ± 3.31 **	12.85 ± 1.70	18.51 ± 1.62 **
人参 - L	52.19 ± 2.90 **	64.48 ± 7.31 **	16.58 ± 1.16 *	23.18 ± 1.96 **

表 4 对细胞因子 IFN - γ 、TNF - α 的影响

Tab 4 Effect on cytokines IFN - γ and TNF - α

分组	IFN - γ (pg/ml)		TNF - α (ng/L)	
	♂	♀	♂	♀
对照组	107.71 ± 7.65	117.50 ± 9.69	117.75 ± 16.16	115.62 ± 14.31
芪贞 - H	112.14 ± 4.89	133.38 ± 13.19	144.24 ± 25.49	181.01 ± 23.99 **
芪贞 - L	120.03 ± 7.62 *	138.73 ± 9.52 **	129.97 ± 13.77	167.97 ± 28.31 **
人参 - H	108.20 ± 10.70	129.86 ± 6.45 *	112.23 ± 9.07	165.21 ± 20.91 **
人参 - L	125.28 ± 6.20 **	151.10 ± 12.22 **	154.87 ± 17.08 **	190.85 ± 41.14 **

4 讨论与结论

4.1 芪贞增免颗粒和人参茎叶总皂苷颗粒对小鼠血清中 IL - 2 的影响 IL - 2 是由 T 淋巴细胞在促有丝分裂素或特异性抗原刺激下产生的,在机体免疫反应中具有重要调节作用的一种淋巴因子,IL - 2 具有广泛的生物学特性:促进 T 淋巴细胞的克隆扩增,通过 T 淋巴细胞数目增多及 CD⁴⁺ T 细胞活性的增强提高机体的免疫功能^[1];促进胸腺细胞的分裂,并由 IL - 2 与 T 或 B 淋巴细胞表面特异受体相互作用,诱导合成 DNA;使静止的前细胞毒 T 细胞转化为细胞毒性 T 细胞,以发挥其细胞毒作用^[2];提高自然杀伤细胞的活性;协同刺激 B 细胞增殖和分泌 Ig^[3];调控免疫干扰素的释放,诱导淋巴细胞产生干扰素等,从而进一步增强了机体的免疫功能。

试验中,两种中药颗粒剂的不同剂量均能够显著的促进雌性小鼠血清 IL - 2 的分泌,并且人参茎叶总皂苷的低剂量对雄性小鼠也有极显著的促进作用,芪贞增免颗粒两个剂量虽能一定程度上提高,但是差异不显著($P > 0.05$)。

4.2 芪贞增免颗粒和人参茎叶总皂苷颗粒对小鼠血清 IL - 4 的影响 有学者认为,Th₁/Th₂通过自身或其它免疫细胞分泌的细胞因子进行自我调节和相互调节,维持 Th₁/Th₂ 细胞之间的免疫平衡^[4]。Th₁/Th₂ 的平衡状态作为机体免疫平衡的核心,在机体的内环境特别是免疫系统稳定方面起着重要调节作用。Abehsira - Amor 等^[5]证实 IL - 4 对 Th₀ 细胞分化为 Th₁ 和 Th₂ 起着关键性调控作用。IL - 4 是 II 型辅助 T 细胞(Th₂ 细胞)分泌的细胞因子。IL - 4 的生物作用,包括刺激活化 B 细胞和 T

细胞增殖、CD⁴⁺T 细胞分化成 II 型辅助 T 细胞。它也在调节体液免疫和适应性免疫中起关键作用。

试验中,两种中药颗粒剂的不同剂量均能够极显著的提高血清中 IL-4 的含量,同时低剂量组对雄性小鼠的 IL-4 也有显著的提升作用,但是高剂量组却没有达到显著水平。

4.3 芪贞增免颗粒和人参茎叶总皂苷颗粒对小鼠血清 IFN- γ 的影响 干扰素是细胞受到适度的刺激后产生的一种微量的、具有广泛生物学活性的糖蛋白,一般可分为 IFN- α 、IFN- β 和 IFN- γ 。其中 IFN- γ 的抗肿瘤及免疫调节作用均比 IFN- α 和 IFN- β 强。现代研究表明,许多中药能诱导机体产生 IFN- γ ,且中药具有来源广泛、价格低廉及毒副作用小等优点。

试验中,两种中药颗粒剂的低剂量组均可极显著提高小鼠血清中 IFN- γ 含量,但是两种中药颗粒剂的高剂量组与对照组相比虽有升高但是差异不显著。两种中药颗粒剂中活性成分本身就是免疫活性物质,所含的多糖与皂甙,能够促进机体网状内皮系统,增强巨噬细胞吞噬功能,提高免疫细胞活性,诱导干扰素等细胞因子的产生,从而提高机体免疫力。

4.4 芪贞增免颗粒和人参茎叶总皂苷颗粒对小鼠血清 TNF- α 的影响 TNF 按结构可分为 TNF- α 和 TNF- β ,目前对 TNF- β 功能所知有限,研究较多的是 TNF- α 。TNF- α 来源广泛,体内的多种细胞,如单核/巨噬细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、内皮细胞、表皮细胞、角质细胞、成骨细胞和星形细胞等均具有产生和释放 TNF- α 的能力,是机体维持内部自稳、抵抗各种致病因素不可或缺的免疫调节因子^[6]。TNF- α 具有广泛的生物学功能:强大的抗肿瘤作用,可直接杀伤肿瘤细胞及抑制 DNA 的合成;可活化巨噬细胞,增加 NK 细胞活性,诱导如 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、CSF 等多种免疫调节介质,还能调节 T、B 淋巴细胞的增殖和分化,在宿主防御机制中起重要作用^[7]。

试验中,两种中药颗粒剂对雌性小鼠的血清

TNF- α 的含量具有极显著的促进作用,人参茎叶总皂苷颗粒的低剂量组对雄性小鼠亦有极显著的促进作用,芪贞增免颗粒对雄性小鼠的 TNF- α 虽有提升但是差异不显著。

通过试验研究,芪贞增免颗粒和人参茎叶总皂苷颗粒在一定剂量范围内能够显著提高小鼠血清 IL-2、IL-4、IFN- γ 和 TNF- α 的分泌,对雌性小鼠的作用尤为显著。表明该两种中药颗粒剂具有显著提高小鼠相关免疫细胞因子的作用。对下一步该两种中药颗粒剂的临床研究和推广应用具有重要意义。

参考文献:

- [1] Jin H, Li X - R, Yu K - Zh. Quantitative mesuration of biological activity and characterization of recombinant bovine interleukin - 2 [J]. Chin J Animal Poultry Infection Diseases, 1998, 20(2): 79 - 82.
- [2] Hmmei C S, Kuribayashi K, Kern D E, *et al.* Interleukin - 2 augments natural killer cell activity[J]. Nature, 1981, 291: 335 - 338.
- [3] Mingari M C, Gerosa F, Carra G, *et al.* Human interleukin - 2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cell[J]. Nature, 1984, 312: 641 - 643.
- [4] Mosmann T R, Coffman R L. Th1 and Th2 cell; different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties [J]. Anrv Rev Immunol, 1989, 7: 145 - 173.
- [5] Abeh S A. IL - 4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells [J]. Immonol, 1992, 148: 3820 - 3829.
- [6] Kapadia S, Lee J, Torre - Amione G. Tumor necrosis factor geneand protein expression in adult feline myocardium afer endotoxin administration[J]. J Clin Invest, 1995, 96(2): 1042 - 1052.
- [7] Tracey K J, Lane F, Hilkens C M, *et al.* Introduction of tolerance by TNF - treated dentritic cells [J]. Lancet, 1990, 8648(1): 1721 - 1728.

(编辑:陈希)