文章编号:1001-6880(2016)3-0438-08

骨碎补总黄酮对免疫低下模型小鼠免疫功能的影响

赵 赶[1],何冠兰[2],卢春远[2],劳玲玲[2],潘宇政[3],周马林[2],韦锦斌[2]*

[1]广西壮族自治区妇幼保健院,南宁 530003;[2]广西医科大学;[3]广西医科大学第一附属医院,南宁 530021

摘 要:本文旨在研究骨碎补总黄酮(Rhizoma Drynariae Flavonoids,RDF)对环磷酰胺(CTX)诱导的免疫低下模型小鼠免疫功能的影响。通过腹腔注射 CTX 建立免疫低下小鼠模型,全自动生化仪检测小鼠血中白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、淋巴细胞百分率(LYNPH%)计数,ELISA 法检测血清 IL-2、TNF-α、IFN-γ 水平,MTT 法检测脾淋巴细胞的增殖反应,流式细胞仪检测外周血 T 淋巴细胞亚群 $CD4^+$、$CD8^+$ 水平,RT-PCR 检测脾组织 T-bet、GATA-3 mRNA 的表达。并对免疫器官指数,吞噬细胞吞噬功能,脾脏乳酸脱氢酶(LDH)和酸性磷酸酶(ACP)活性,血清溶血素水平和迟发型超敏反应等进行检测。结果显示,与模型组比较,RDF 可明显提高小鼠的免疫器官指数,廓清指数 K 和吞噬指数 α,WBC、RBC、HGB、LYNPH%,IL-2、TNF-α、IFN-γ 水平,脾脏 LDH 和 ACP 活性,血清溶血素,耳肿胀度,$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$ 比值和脾组织 T-bet mRNA 的表达($P<0.05$),而 $CD8^+$ T 细胞数,GATA-3 mRNA 的相对表达量明显降低($P<0.05$)。研究结果表明,RDF 能够提高 CTX 所致的免疫低下模型小鼠的非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫功能,对小鼠的免疫功能有正向调节作用。

关键词:骨碎补总黄酮;免疫低下;非特异性免疫;体液免疫;细胞免疫

中图分类号:R963 **文献标识码**:A DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.3.022

Immunoregulation Effect of Rhizoma Drynariae Flavonoids on Immunosuppressive Mice

ZHAO Gan[1],HE Guan-lan[2],LU Chun-yuan[2],LAO Ling-ling[2],PAN Yu-zheng[3],ZHOU Ma-lin[2],WEI Jin-bin[2]*

[1]*Guangxi Zhuang Autonomous Region Maternal and Child Health Hospital,Nanning 530003,China*;

[2]*Guangxi Medical University*;[3]*The first affiliated hospital of Guangxi Medical University,Nanning 530021,China*

Abstract:This study was designed to investigate the effect of Rhizoma Drynariae Flavonoids (RDF) on regulation of immune functions in cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice. Cyclophosphamide (CTX) was administrated (ip) to mice to establish immunosuppression model. The blood cells were counted by hematology analyzer and the level of IL-2,TNF-α,IFN-γ were counted by ELISA. T-lymphocyte subsets $CD4^+$,$CD8^+$ in peripheral blood were measured by FACS,the index of lymphocyte proliferation capacity was detected by MTT,the relative mRNA expression of transcription factor T-box-containing protein (T-bet),and GATA binding protein (GATA-3) in the spleen tissues were detected by RT-PCR. The indexs of thymus and spleen,the phagocytosis ability of macrophage,lactate dehydrogenase (LDH) and acid phosphatase (ACP) in spleen tissues,delayed type hypersensitivity and hemolysin were measured. The results showed that,compared with model group,RDF significantly increased the activities of the thymus and spleen indexs,clearance index K and phagocytic index α,WBC,RBC,HGB and LYNPH%,IL-2,TNF-α,IFN-γ,LDH,ACP,ConA-induced T- lymphocyte proliferation capacity,hemolysin and ear swellings,$CD4^+$,$CD4^+/CD8^+$ and T-bet mRNA relative expression ($P<0.05$). In addition,RDF markedly decreased the level of $CD8^+$ and GATA-3 mRNA expression ($P<0.05$). Hence,it was concluded that,RDF can regulate the non-specific immunity,humoral and cellular immune functions of CTX-induced immunosuppressive mice,and it had a positive regulatory role of immune function in mice.

Key words:Rhizoma Drynariae Flavonoids;immunosuppression;non-specific immune;humoral immune;cellular immune

中药骨碎补(Rhizoma Drynariae)是水龙骨科(Polypodiaceae)多年生蕨类植物槲蕨骨碎补的干燥根茎[1]。始载于唐《本草拾遗》,主治肾虚腰痛,跌打闪挫,骨伤,风湿麻痹,耳鸣耳聋,牙齿松动等。骨

收稿日期:2015-12-21 接受日期:2016-01-26

基金项目:广西自然科学基金(2014GXNSFAA118185);广西科技基础条件平台建设项目(10-108-19)

*通讯作者 Tel:86-771-5316851;E-mail:jbwei@sina.cn

碎补主要含有二聚物和三聚物类、黄酮类、三萜、酚酸及苷类化合物[2],其中黄酮类化合物是其主要的活性成分,有促进骨折愈合、防治骨质疏松、调血脂、抗氧化、抗炎镇痛等作用。本课题组前期研究发现骨碎补对免疫增强有一定的药理作用,其水提物对重型颅脑损伤大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 CD3、CD4、CD8 和 IL-2 水平有一定的恢复作用,能保护或增强重型颅脑损伤大鼠的细胞免疫功能[3],骨碎补乙醇提取物能提高环磷酰胺(CTX)所致免疫抑制小鼠的部分免疫功能[4]。因此,为进一步了解骨碎补总黄酮对免疫低下模型小鼠的免疫调节作用及其作用机制,本实验通过腹腔注射 CTX 制备免疫低下小鼠模型,进一步探讨骨碎补总黄酮对免疫低下小鼠非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫的调节机制,旨在为其研究开发用于免疫调节剂提供更多的基础材料。

1　材料与方法

1.1　实验动物

健康昆明种小鼠,SPF 级,18 ~ 22 g,雌雄各半,由广西医科大学实验动物中心提供,实验动物质量合格证:SCXK 桂 2014-0002。

1.2　材料与试剂

骨碎补(广西万丰药业有限公司,批号 20130403);注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 04131209);盐酸左旋咪唑片(桂林南药股份有限公司,批号 131105);印度墨水(北京博奥拓达科技有限公司,批号 20130718);考马斯亮蓝、乳酸脱氢酶试剂盒、酸性磷酸酶试剂盒(南京建成生物工程研究院,批号 20150128、20150121、20150113);小鼠 IL-2、TNF-α、IFN-γ ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号 G05011727、I04012974、D13012975),刀豆蛋白 A(ConA)、脂多糖(LPS)(美国 Sigma 公司),Anti-mouse CD3 FITC、Anti-mouse CD8a PE、Anti-mouse CD4 APC、Rat IgG2b K Isotype control FITC、Rat IgG2a K Isotype control PE、Rat IgG2b K Isotype control APC(美国 eBioscience 公司),Lysing solution for FACS 10 ×(联科生物 Multiscences)。

1.3　仪器

Spectra Marplus384 型酶标仪(Thermo Fisher 公司);721 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);TGL-16B 台式高速冷冻离心机(上海安亭科技仪器厂);XT-2000i 型全自动血液分析仪(希森美康);DW-86L628 型超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司);贝克曼低温高速离心机(美国 Beckman coulter 公司);手持式高速匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);CO_2 培养箱(Thermo Forma 公司);BD FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);ABI-7300 型 PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystem 公司)。

1.4　骨碎补总黄酮(RDF)的制备

由广西医科大学药理实验室提取,取骨碎补药材 500 g,加 10 倍量 70% 的乙醇溶液回流提取 3 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,旋转蒸发仪减压回收乙醇,浓缩至 250 mL,上 AB-8 大孔树脂柱分离,生药量与树脂量之比为 1∶2,洗脱液是 50%(体积比)乙醇,回收乙醇,烘干,得骨碎补总黄酮。使用时研细以生理盐水配制成相应浓度。

1.5　实验动物分组及给药

健康昆明种小鼠,雌雄各半,随机分为正常组、环磷酰胺模型组、阳性药左旋咪唑组[Levamisole(LMS),剂量为 0.05 g/kg]和 RDF 高、中、低剂量组(剂量分别为 0.8 g/kg、0.4 g/kg、0.2 g/kg)。灌胃给药,每天一次,连续 20 d。除正常组外,其余各组小鼠按 0.08 g/kg 腹腔注射 CTX 造模,每天一次,连续 3 d。

1.6　RDF 对免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬功能和免疫器官重量的影响

于第 20 d 给药后,每鼠尾静脉注射 5 倍稀释的印度墨汁(0.1 mL/10 g),2 min(t_1)和 10 min(t_2)后从眼球取血 40 μL,加到 4 mL 0.1% Na_2CO_3 溶液中,混匀,以 0.1% Na_2CO_3 溶液作为空白对照管,用 721 型分光光度计在 680 nm 处测吸光度值(A_2,A_{10}),分离肝脏、脾、胸腺,称量。按相应公式计算廓清指数 K、吞噬指数 α、胸腺指数和脾脏指数。以脾重(mg)/体重(10g)和胸腺重(mg)/体重(10g)作为脾脏和胸腺指数。廓清指数 $K = (1g\ A_2 - lgA_{10})/(t_2 - t_1)$,吞噬指数 $\alpha = K^{1/3} \times$ 体重/(脾重 + 肝重)。

1.7　RDF 对免疫低下小鼠 WBC、RBC、HGB 和 LYNPH% 的影响

于第 20 d 给药后,取血 100 μL,肝素抗凝,全自动生化分析仪检测小鼠血中 WBC、RBC、HGB 和 LYNPH%。

1.8　RDF 对免疫低下小鼠血清 IL-2、TNF-α、IFN-γ 的影响

于第 20 d 给药后,取血,分离血清,采用 ELISA

法检测,参考试剂盒操作说明书进行。于 450 nm 处测定各孔吸光度 OD 值,根据浓度标准曲线分别计算 IL-2、TNF-α、IFN-γ 的相应含量。

1.9 RDF 对免疫低下小鼠脾脏 LDH 和 ACP 活性的影响

于第 20 d 给药后处死小鼠,分离脾脏,将脾脏用冰冷生理盐水漂洗干净,放入 10 mL 的离心管内,加入适量体积的生理盐水,冰浴中充分匀浆,制成 5% 的组织匀浆液。离心取上清,按照试剂盒说明书分别测定 LDH 和 ACP 的活性。计算公式:LDH(U/Gprot) = ($OD_{测}$-$OD_{对}$)/($OD_{标}$-$OD_{对}$) × 标准品浓度/匀浆蛋白浓度;ACP(U/Gprot) = $OD_{测}$/$OD_{标}$ × 标准管含酚的量/[待测样品蛋白浓度 × 取样量]。

1.10 RDF 对免疫低下小鼠血清溶血素的影响

于第 14 d 给药后,每鼠腹腔注射 5% 绵羊红细胞(SRBC)0.2 mL 进行致敏,并继续给药。致敏后 6 d,眼球取血,按常规方法分离血清,用生理盐水稀释 100 倍后取血清样品 1 mL、10% SRBC 0.5 mL 至试管内,再加入 1 mL 10% 的豚鼠血清,空白管以生理盐水代替血清,37 ℃水浴 30 min,冰浴终止反应,离心取上清,于 540 nm 处测吸收度 OD 值,结果用 OD 值表示。

1.11 RDF 对 ConA 诱导的小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖反应和 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖反应的影响

于第 20 d 给药后处死小鼠,75% 乙醇浸泡 5 min,无菌分离脾,研磨,过 200 目尼龙筛网,用常规方法制备脾细胞悬液,用完全培养液配成 4×10^6 个/mL。加入 96 孔板中,100 μL 脾细胞悬液/孔,80 μL RPMI-1640 完全培养液并加入终浓度为 5 μg/mL 的 ConA 20 μL(LPS 终浓度为 20 μg/mL)。以 100 μL 脾细胞悬液和 100 μL RPMI-1640 完全培养液为对照,不加 ConA 或 LPS。对照孔和 ConA(LPS)刺激孔分别设 3 个复孔,于 37 ℃ 5% CO_2 培养箱中孵育 68 h 后,加 MTT(5 mg/mL)溶液 10 μL/孔,继续孵育 4 h, 离心,小心吸去上清,加 DMSO 150 μL,充分震荡后,用酶标仪于 570 nm 处测 OD 值,计算刺激指数 SI。SI = Con A(LPS)刺激孔 OD 值/对照孔 OD 值。

1.12 RDF 对二硝基氯苯(DNCB)诱导小鼠迟发型超敏反应的影响

分组及给药同上,除正常对照组外,给药第一天每鼠腹部均匀涂抹 1% 2,4-二硝基氯苯(DNCB)丙酮溶液 50 μL 致敏(范围为 3 cm × 3 cm),第二天同剂量强化 1 次。末次给药后,将 1% DNCB 均匀涂抹于每鼠右耳两面进行攻击,攻击后 24 h,处死小鼠,剪下左右耳壳. 用打孔器取下直径 8 mm 的耳片,称重,以左右耳片重量之差(△mg)作为肿胀度。

1.13 RDF 对免疫低下小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响

于第 20 d 给药后,小鼠尾静脉取血,肝素抗凝。取抗凝血 100 μL 于试管中,分别加入 1 × 溶血素 2 mL ,混匀后室温避光静置 15 min,离心,弃上清,用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,离心弃上清,重悬细胞团块,各样品管分别加入适量 FITC-CD3、PE-CD8a、CD4-APC 抗体,同型对照管加入等量的 Rat IgG2b K Isotype control FITC、Rat IgG2a K Isotype control PE、Rat IgG2b K Isotype control APC 同型对照,空白管不加抗体和同型对照。混匀后室温避光静置 15 min,加适量 PBS 重悬,流式细胞仪对 $CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞进行检测,结果经 CELL Quest 软件进行分析,并记录结果。

1.14 RDF 对免疫低下小鼠脾脏 T-bet、GATA-3 mRNA 表达的影响

于第 20 d 给药后,处死小鼠,迅速取出脾脏,采

表 1 目的基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of the targeted genes

目的基因 Targeted gene	引物序列 Primer sequence	片段长度 Fragment length (bp)
β-actin	F:CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC R:ATGGAGCCACCGATCCACA	171
T-bet	F:CTGCCTACCAGAACGCAGA R:AAACGGCTGGGAACAGGA	199
GATA-3	F:GGATGTAAGTCGAGGCCCAAG R:ATTGCAAAGGTAGTGCCCGGTA	117

用 Trizol 法提取脾脏组织的总 RNA,微量核酸检测仪测 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 ~2.0 之间。按照 TaKaRa 公司的逆转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成。PCR 扩增条件为:预变性 95 ℃ 30 sec,95 ℃ 5 sec,60 ℃ 31 sec,共 40 个循环。引物序列由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.15　统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行分析,数据资料用均值加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐时多组均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差不齐时采用秩和检验,组间差异比较采用 SNK 法,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　实验结果

2.1　RDF 对免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬功能和免疫器官重量的影响

CTX 模型组小鼠脾脏指数、胸腺指数、廓清指数 K 和吞噬指数 α 均比正常组降低($P<0.01$),RDF 中、高剂量组可提高 CTX 致免疫低下小鼠的胸腺指数,RDF 高剂量组可提高 CTX 致免疫低下小鼠的廓清指数 K 值,RDF 各剂量组对 CTX 致免疫低下小鼠的脾脏指数和吞噬指数 α 有提高作用($P<0.05$),提示 RDF 可提高免疫低下小鼠的巨噬细胞吞噬功能和免疫器官重量,见表 2。

表 2　RDF 对免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬功能和免疫器官重量的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2　Effect of RDF on the phagocytosis ability of macrophage and immune organ weights in immunosuppressive mice($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	胸腺指数 Thymus index	脾脏指数 Spleen index	廓清指数 K Clearance index ($\times 10^{-2}$)	吞噬指数 α Phagocytic index
正常组 Control	–	0.273 ±0.103	0.586 ±0.160	7.54 ±0.95	8.950 ±0.826
模型组 CTX	–	0.100 ±0.026**	0.229 ±0.026**	3.67 ±0.72**	5.911 ±0.496**
阳性药组 LMS	0.05	0.169 ±0.016△	0.352 ±0.08△	5.86 ±1.50△	7.675 ±0.898△△
RDF 低剂量 $RDF\text{-}_L$	0.2	0.145 ±0.024	0.353 ±0.141△	4.67 ±1.77	7.066 ±1.260△
RDF 中剂量 $RDF\text{-}_M$	0.4	0.170 ±0.026△	0.354 ±0.074△	5.43 ±1.26	7.243 ±1.224△
RDF 高剂量 $RDF\text{-}_H$	0.8	0.181 ±0.034△	0.385 ±0.048△	6.62 ±2.24△	7.675 ±0.898△

注:与正常组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$,与模型组比较,△$P<0.05$,△△$P<0.01$。

Note: Compared with Control group, *$P<0.05$, **$P<0.01$; compared with CTX group, △$P<0.05$, △△$P<0.01$.

2.2　RDF 对免疫低下小鼠 WBC、RBC、HGB 和 LYNPH% 的影响

与正常组比较,模型组小鼠外周血 WBC、RBC、HGB 和 LYNPH% 均明显降低($P<0.01$);RDF 各剂量组对 CTX 致免疫低下小鼠的 WBC、RBC、HGB 和 LYNPH% 有提高作用($P<0.01$),见表 3。

表 3　RDF 对免疫低下小鼠 WBC、RBC、HGB 和 LYNPH% 的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Table 3　Effect of RDF on WBC, RBC, HGB and LYNPH% in immunosuppressive mice($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	WBC ($\times 10^9$)	RBC ($\times 10^{12}$)	HGB (g/L)	LYNPH%
正常组 Control	–	7.83 ±0.26	10.58 ±0.64	162.29 ±9.27	92.73 ±1.83
模型组 CTX	–	3.94 ±0.67**	7.75 ±0.90**	126.14 ±15.87**	61.56 ±5.60**
阳性药组 LMS	0.05	6.05 ±0.22△△	8.77 ±0.50△	154.8 ±11.17△△	92.65 ±2.18△△
RDF 低剂量 $RDF\text{-}_L$	0.2	5.30 ±0.57△△	9.30 ±0.61△△	153.6 ±6.62△△	89.84 ±4.23△△
RDF 中剂量 $RDF\text{-}_M$	0.4	5.42 ±0.26△△	9.47 ±1.06△△	154.8 ±11.17△△	91.53 ±2.23△△
RDF 高剂量 $RDF\text{-}_H$	0.8	6.04 ±0.28△△	10.00 ±0.19△△	158.8 ±6.10△△	91.65 ±3.53△△

注:与正常组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$,与模型组比较,△$P<0.05$,△△$P<0.01$。

Note: Compared with Control group, *$P<0.05$, **$P<0.01$; compared with CTX group, △$P<0.05$, △△$P<0.01$.

2.3　RDF 对免疫低下小鼠血清 IL-2、TNF-α、IFN-γ 的影响

模型组小鼠 IL-2、TNF-α、IFN-γ 水平显著低于正常对照组($P<0.01$);与 CTX 模型组比较,RDF 高剂量组明显提高 CTX 致免疫低下小鼠血清 IL-2、IFN-γ 的水平($P<0.01$),RDF 各剂量组明显提高 CTX 致免疫低下小鼠血清 TNF-α 的水平($P<0.05$),说明 RDF 对 CTX 致免疫低下小鼠的细胞因子有免疫保护作用,见表 4。

表 4 RDF 对免疫低下小鼠血清 IL-2、TNF-α、IFN-γ 的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of RDF on the level of IL-2, TNF-α and IFN-γ in immunosuppressive mice($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	IL-2 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)
正常组 Control	–	105.87 ± 7.797	49.778 ± 5.058	166.77 ± 24.107
模型组 CTX	–	54.866 ± 18.358**	29.687 ± 4.372**	96.03 ± 6.706**
阳性药组 LMS	0.05	77.708 ± 13.654△	43.692 ± 11.289	135.7 ± 27.458△
RDF 低剂量 $RDF-_L$	0.2	76.064 ± 22.591	43.896 ± 9.800△	101.85 ± 35.83
RDF 中剂量 $RDF-_M$	0.4	77.708 ± 13.654	44.633 ± 8.305△	126.96 ± 16.88
RDF 高剂量 $RDF-_H$	0.8	86.581 ± 21.996△△	47.456 ± 9.435△	146.72 ± 15.88△△

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$。

Note: Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with CTX group, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$.

2.4 RDF 对免疫低下小鼠血清溶血素、ConA 诱导的脾脏 T 淋巴细胞和 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖反应的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠血清溶血素明显降低,ConA 诱导的脾脏 T 淋巴细胞和 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖反应均受到明显抑制($P<0.05$);RDF 中、高剂量组能明显提高 CTX 致免疫低下小鼠的血清溶血素水平,EDF 各剂量组对 ConA 诱导的脾脏 T 淋巴细胞的增殖反应有显著性提高($P<0.05$),对 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖反应有相应提高,但无统计学意义,见表 5。

表 5 RDF 对免疫低下小鼠血清溶血素、脾淋巴细胞增殖反应的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effect of RDF on hemolysin, lymphocyte proliferation capacity in immunosuppressive mice($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	ConA	LPS	血清溶血素 Hemolysin
正常组 Control	–	2.047 ± 0.339	1.374 ± 0.093	0.271 ± 0.005
模型组 CTX	–	1.24 ± 0.149**	1.175 ± 0.184*	0.116 ± 0.027**
阳性药组 LMS	0.05	1.856 ± 0.197△△	1.24 ± 0.155	0.181 ± 0.012△△
RDF 低剂量 $RDF-_L$	0.2	1.791 ± 0.439△△	1.185 ± 0.145	0.118 ± 0.017
RDF 中剂量 $RDF-_M$	0.4	1.804 ± 0.188△△	1.244 ± 0.191	0.134 ± 0.009△
RDF 高剂量 $RDF-_H$	0.8	1.893 ± 0.451△△	1.265 ± 0.138	0.204 ± 0.029△△

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$。

Note: Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with CTX group, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$.

表 6 RDF 对免疫低下小鼠 LDH、ACP 活性和迟发型超敏反应的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Table 6 Effect of RDF on LDH, ACP activities of spleen and delayed type hypersensitivity in immunosuppressive mice($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	LDH (U/gprot)	ACP (U/gprot)	耳肿胀度 Ear swellings
正常组 Control	–	2450.7 ± 176.49	574.93 ± 108.39	8.64 ± 1.32
模型组 CTX	–	1848.0 ± 163.47**	377.55 ± 96.11**	6.14 ± 1.56*
阳性药组 LMS	0.05	2458.1 ± 109.42△△	516.47 ± 72.72△△	8.4 ± 1.55△
RDF 低剂量 $RDF-_L$	0.2	2271.4 ± 168.51△	458.33 ± 30.04	6.14 ± 2.09
RDF 中剂量 $RDF-_M$	0.4	2392.7 ± 166.73△△	494.06 ± 58.36△	7.44 ± 1.98
RDF 高剂量 $RDF-_H$	0.8	2448.0 ± 175.5△△	514.53 ± 54.75△△	8.46 ± 1.31△

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$。

Note: Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with CTX group, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$.

2.5　RDF 对免疫低下小鼠 LDH、ACP 活性和迟发型超敏反应的影响

模型组小鼠 LDH、ACP 活性和耳肿胀度较正常对照组明显降低($P<0.01$);与模型组比较,RDF 各剂量组能明显提高 CTX 致免疫低下小鼠脾组织 LDH 活性,RDF 中、高剂量组能明显提高 ACP 活性,RDF 高剂量组的耳肿胀度有明显的恢复作用($P<0.05$),见表 6。

2.6　RDF 对免疫低下小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 $CD4^+$、$CD8^+$ 的影响

模型组小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群比例失调,$CD4^+/CD8^+$ 比值下降,显著低于正常组($P<0.01$);与模型组比较,RDF 各剂量组能明显提高 $CD4^+$ 细胞数以及降低 $CD8^+$ 细胞数,RDF 中、高剂量组能明显提升 $CD4^+/CD8^+$ 比值($P<0.05$),见表 7。

表 7　RDF 对免疫低下小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 $CD4^+$、$CD8^+$ 的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Table 7　Effect of RDF on T-lymphocyte subsets $CD4^+$, $CD8^+$ in peripheral blood of immunosuppressive mice($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	$CD4^+$ (%)	$CD8^+$ (%)	$CD4^+/CD8^+$
正常组 Control	–	82.20 ±6.19	16.62 ±5.45	5.511 ±2.22
模型组 CTX	–	67.22 ±4.91**	31.34 ±4.84**	2.203 ±0.567**
阳性药组 LMS	0.05	79.97 ±3.87△△	17.77 ±4.35△△	4.763 ±1.606△△
RDF 低剂量 $RDF-_L$	0.2	74.84 ±2.25△	22.39 ±2.19△	3.368 ±0.404
RDF 中剂量 $RDF-_M$	0.4	76.67 ±3.42△△	21.84 ±3.41△△	3.585 ±0.638△
RDF 高剂量 $RDF-_H$	0.8	80.42 ±3.27△△	16.98 ±2.18△△	4.802 ±0.722△△

注:与正常组比较,$^*P<0.05$,$^{**}P<0.01$,与模型组比较,$^{\triangle}P<0.05$,$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

Note: Compared with Control group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$; compared with CTX group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

2.7　RDF 对免疫低下小鼠脾脏 T-bet、GATA-3 mRNA 相对表达量的影响

模型组小鼠脾组织 T-bet mRNA 的相对表达量显著低于正常对照组,GATA-3 mRNA 的相对表达量显著高于正常对照组($P<0.01$);与模型组比较,RDF 各剂量组的 T-bet mRNA 的相对表达量明显提高,GATA-3 mRNA 的相对表达量明显降低($P<0.05$),见表 8。

表 8　RDF 对免疫低下小鼠 T-bet、GATA-3 mRNA 相对表达量的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Table 8　Effect of RDF on T-bet, GATA-3 mRNA relative expression in immunosuppressive mice($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别 Group	剂量 Dose(g/kg)	T-bet	GATA-3
正常组 Control	–	3.346 ±1.04	0.638 ±0.123
模型组 CTX	–	0.619 ±0.27**	2.139 ±0.525**
阳性药组 LMS	0.05	1.202 ±0.319△△	1.08 ±0.45△△
RDF 低剂量 $RDF-_L$	0.2	1.194 ±0.403△	1.39 ±0.359△
RDF 中剂量 $RDF-_M$	0.4	1.205 ±0.225△△	1.152 ±0.283△
RDF 高剂量 $RDF-_H$	0.8	1.349 ±0.313△△	1.036 ±0.274△△

注:与正常组比较,$^*P<0.05$,$^{**}P<0.01$,与模型组比较,$^{\triangle}P<0.05$,$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

Note: Compared with Control group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$; compared with CTX group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

3　讨论与结论

免疫器官的重量是反映机体非特异性免疫功能的重要指标,胸腺和脾脏指数都是重要的免疫器官,湿重指数可反映机体非特异性免疫的功能状况[5]。单核巨噬细胞是衡量机体非特异性免疫功能的指标之一,当墨汁被注入到小鼠尾静脉中,血液中的外周血单核巨噬细胞会吞噬异物颗粒,可用巨噬细胞的吞噬指数 α 反映其吞噬能力,吞噬指数 α 是衡量巨噬细胞吞噬能力的标志[6]。环磷酰胺是一种常用的烷化剂,大剂量的环磷酰胺可导致骨髓抑制如白细胞减少[7],而白细胞数量变化可影响机体的免疫力。本实验结果表明 RDF 能显著提高小鼠外周血白细胞的数量、脾脏指数和胸腺指数,也能提高巨噬细胞的吞噬功能,表明 RDF 具有增强小鼠非特异性免疫功能的作用。

血清中的溶血素是 B 细胞受到红细胞刺激后产生的一种抗体,故可反映机体的体液免疫水平[8]。TNF-α、IL-2 和 IFN-γ 等细胞因子参与机体炎症反应、抑制病毒、抗肿瘤繁殖,在机体免疫应答的调节中起着重要的作用。淋巴细胞的增殖和分化是机体免疫应答过程的一个重要阶段。从免疫调节角度分析,淋巴细胞的增殖活化能力和细胞因子分泌能力的提高对增强机体的免疫具有正向调节作用[9]。因此检测淋巴细胞增殖反应和细胞因子水平是细胞免疫研究和临床免疫功能检测的一种常用方法。T 细胞、B 细胞表面具有识别抗原的受体和有丝分裂原受体,在特异性抗原刺激下可使相应淋巴细胞克隆发生增殖。ConA 和 LPS 是 T、B 淋巴细胞特异性较强的活化刺激剂,在 ConA 和 LPS 活化条件下,起反应的主要是 T 细胞和 B 细胞[10]。二硝基氯苯诱导的迟发性超敏反应是由 T 细胞介导的细胞免疫反应,也是常见的一种免疫反应[11],实验结果表明,中、高剂量组的 RDF 能提高免疫低下小鼠的血清溶血素水平,各剂量组的 RDF 能提高小鼠血清 TNF-α 含量和 ConA 诱导的脾脏 T 淋巴细胞增殖反应,高剂量组的 RDF 对 IL-2、IFN-γ 水平和耳肿胀度也有不同程度的增强作用。表明 RDF 对免疫低下小鼠的体液免疫和细胞免疫有促进作用。

T 淋巴细胞分为 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞 2 个亚群,$CD4^+$ T 细胞主要是辅助性 T 细胞,$CD8^+$ T 细胞包括杀伤性 T 细胞和抑制性 T 细胞。在正常情况下,$CD4^+/CD8^+$ 比值维持动态平衡,以保持机体免疫功能稳定。当比值上升时表示在机体内的免疫应答中正调节占优势,而比值下降甚至比例倒置时,则表明机体处于免疫功能低下甚至免疫抑制状态,$CD4^+/CD8^+$ 比值是反映细胞免疫平衡与否的敏感指标[12]。实验结果显示,各剂量组的 RDF 能明显提高免疫低下小鼠外周血的 $CD4^+$ 细胞数、$CD4^+/CD8^+$ 的比值,明显降低外周血 $CD8^+$ 细胞数。说明 RDF 可能是通过改善免疫低下模型小鼠的 $CD4^+/CD8^+$ 比值来提高小鼠细胞免疫功能的。T-bet 是 Th1 细胞的特异性转录因子,GATA-3 是 Th2 细胞的特异性转录因子,Th1 和 Th2 是两种重要的细胞亚群,它们之间的相互平衡在机体免疫应答的调节中起着关键的作用[13]。因此,调控 T-bet/GATA-3 基因表达可以控制 Thl/Th2 之间的平衡。本实验结果显示,各剂量组的 RDF 能明显提高免疫低下小鼠脾组织 T-bet mRNA 的相对表达量,明显降低脾组织 GATA-3mRNA 的相对表达量,说明 RDF 可能通过调节免疫低下模型小鼠 T-bet 及 GATA-3 mRNA 的表达,使 Thl/Th2 保持平衡,从而恢复机体的免疫功能。

综上所述,骨碎补总黄酮对免疫系统的多个环节都有一定的保护或增强作用,能够提高 CTX 所致的免疫低下模型小鼠的非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫功能。本实验为其研究开发用于免疫调节剂提供有价值的实验依据。

参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典), Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 239-240.

2 Chang EJ, Lee WJ, Cho SH, *et al*. Proliferative effects of flavan-3-ols and propelargonidins from Rhizomes of *Drynaria fortunei* on MCF-7 and osteoblastic cells. *Arch Pharm Res*, 2003, 26: 620-630.

3 Wang WZ, Pan YZ, Wei JB, *et al*. The effects of Rhizoma drynariae on interleukin-2 and T-lymphocyte levels in rats after severe head injury. *J Ethnophamacol*, 2012, 142: 300-304.

4 He GL(何冠兰), Lu CY(卢春远), Lv SJ(吕淑娟), *et al*. 骨碎补醇提物对免疫抑制小鼠免疫功能的影响. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2015, 26: 2358-2360.

5 Long Z (龙珍), Long TY(龙腾云), Huang RB(黄仁彬), *et al*. Effect of Yulangsan polysaccharides on immune function of immunosuppressive mice induced by cyclophosphamide. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 666-670.

6 Zhong JC(钟建春), Zhang Y(张艳). Effect of polysaccharide extract from artificial *Cordyceps sinenisis* on immune function of mouse. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni* (中山大学学报,自科版), 2011, 50: 99-102.

7 Cheng JY(程嘉艺), Chai RH(柴瑞华), Yan XY(阎醒予), *et al*. Experimental study on effect of Fuzheng granules on immunologic function. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2007, 22: 794-797.

8 Zhu C(朱超), Yang MQ(杨鸣琦), Zhao SZ(赵守中). Effects of the secondary metabolites of rhizotonia leguminicola on immune functions of immunosuppressed mice. *Chin J Immunol*(中国免疫学杂志), 2010, 26(5): 51-53.

9 Wang ZH(王志宏), Lei MS(雷明盛), Peng S(彭胜), *et al*. Effects of flavonoid and flavone from *Eucommia ulmoides*

Oliv. on proliferation of splenocytes and production of IL-2 and IFN-γ in mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2015,27,Accepted.

10 Duan YQ(段永强),Cheng YX(成映霞),Cheng R(程容),*et al*. Variation of the specific and non-specific immune function of mice with spleen deficiency and effect of Chinese medicine. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志),2011,31:2874-2876.

11 Hu CM(胡成穆),Chen L(陈琳),Li R(李荣),*et al*. 豹皮樟总黄酮对免疫低下小鼠免疫功能的影响. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报),2007,23:804-808.

12 Song SJ(宋淑军),Liu JL(刘俊丽),Xu BX(徐冰心),*et al*. Effects of the vitamin D on the immune function of the immunosuppressant mice induced by glucocorticoid. *Chin J Clin*,*Elec Ed* (中华临床医师杂志,电子版),2013,23:10802-10805.

13 Zhang J(张俊),Huang R(黄睿),Hao YY(郝迎迎),*et al*. Influence of polysaccharidepeptide of *Coriolus versicolor* on Th1/Th2 balance in the cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice. *Chin J Hospital Pharm* (中国医院药学杂志),2013,33:1922-1925.

(上接第 470 页)

17 Li SL(李胜立),*et al*. Immunomodulatory active fraction of protocorm-like bodies in *Dendrobium huoshanense* and its toxicological safety. *Drug Evalu Res*,2012,35:321-327.

18 Hao R(郝冉),*et al*. Intestinal mucosal immunomodulating activity of polysaccharide from *Dendrobium huoshanense* and its absorption and distribution in small intestine. *Food Sci* (食品科学),2014,35:256-259.

19 Juway Lin,*et al*. The multifaceted effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium huoshanense* on immune functions with the induction of interleukin-1 receptor antagonist (IL-ra) in monocytes. *Plos One*,2014,9(4):1-12.

20 Zha XQ,*et al*. Induction of immunomodulating cytokines by polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*. *Pharml Biol*,2007,47(1):71-76.

21 Zha XQ,*et al*. Immunoregulatory activities of *Dendrobium huoshanense* polysaccharides in mouse intestine,spleen and liver. *Int J Biol Macromol*,2014,64:377-382.

22 Chen C(陈程),*et al*. Comparison on physicochemical properties and immune activities of polysaccharides from cultures at different development stages of *Dendrobium huoshanense*. *J Chin Med Mater* (中药材),2012,35:1195-1199.

23 Pan LH,*et al*. Comparison of hypoglycemic and antioxidative effects of polysaccharides from four different *Dendrobium* species. *Int J Biol Macromol*,2014,64:420-427.

24 Huang J(黄静),*et al*. Protective effects of polysaccharides from *Denrobium huoshanense* on CCl_4-induced acute liver injury in mice. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志),2013,38:528-532.

25 Tian CC(田长城),*et al*. Hepatoprotective effects of different polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*. *Food Sci* (食品科学),2015,36:162-166.

26 Pan LH,*et al*. Preventive effect of a galactoglucomannan (GGM) from *Dendrobium huoshanense* on selenium-induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Toxicol Pathol*,2012,64:899-904.

27 Wang XY,*et al*. The effects of daily supplementation of *Dendrobium huoshanense* polysaccharide on ethanol-induced subacute liver injury in mice by proteomic analysis. *Royal Soc Chem*,2014,5:2020-2035.

28 Wang XY,*et al*. *Dendrobium huoshanense* polysaccharide prevents ethanol-induced liver injury in mice by metabolomic analysis. *Int J Biol Macromol*,2015,78:354-362.

29 Li XF(李秀芳),*et al*. Antioxidant effect of polysaccharide from *Dendrobium huoshanense* on lens tissue of diabetic cataract rats. *China Tradit Pat Med* (中成药),2012,34:418-421.

30 Luo JP,*et al*. Mechanism of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* on streptozotocin-induced diabetic cataract. *Pharm Biol*,2008,46:243-249.

31 Zhang DD(张丹丹),*et al*. Inhibitory Effect of *Dendrobium huoshanense* polysaccharides on human gastric cell growth. *J Food Sci Biotechnol* (食品与生物技术学报),2014,33:542-547.

32 Huang S. Extraction,separation and anti-tumor activity of polysaccharides in *Dendrobium huoshanense*. Hefei:Hefei University of Technology,MSc. 2007.

33 Bao LJ,*et al*. Inhibitory effects of water extracts from four species of *Dendrobiums* on HelaS3 Cells and HepG2 Cells. *J Anhui Agric Sci*,2008,36:15968-15970.