

太子参须提取物对免疫抑制小鼠免疫保护作用的研究

衣伟萌¹, 陈赛红¹, 闵思明¹, 陈俊宇¹, 甘思言², 黄一帆², 张炎达^{3*}, 马玉芳^{1*}

¹中西兽医结合与动物保健福建省高等学校重点实验室;

²福建农林大学 福建省兽医中药与动物保健重点实验室, 福州 350002;

³福建贝迪药业有限公司, 宁德 355399

摘要: 本试验旨在研究太子参须提取物(RPFRE)对免疫抑制小鼠的免疫保护作用。选取3~4周龄, 体重 20 ± 2 g的KM雄性小鼠, 随机分为对照(CK)组、环磷酰胺(CY)模型组、黄芪多糖(APS)组、RPFRE低、中、高剂量组, 每组20只。第1~14天, CK组、CY组小鼠灌服双蒸水; APS组小鼠灌服200 mg/kg黄芪多糖; RPFRE低、中、高剂量组小鼠分别灌胃100、200、400 mg/kg太子参须提取物; 第15~17天, CK组小鼠腹腔注射生理盐水, 其他五组小鼠腹腔注射80 mg/kg环磷酰胺。第18天采样, 碳粒廓清法检测小鼠巨噬细胞吞噬功能; MTT法检测小鼠脾淋巴细胞增殖能力; ELISA法检测细胞因子(IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ)的含量; 免疫比浊法检测血清免疫球蛋白(IgA、IgM、IgG)及补体(C₃和C₄)含量。结果显示, 与模型组相比, RPFRE高剂量能显著升高小鼠脾脏指数和肝指数($P < 0.01$), 增强小鼠巨噬细胞吞噬能力($P < 0.05$), 促进脾淋巴细胞增殖($P < 0.01$), 促进细胞因子IL-2、IL-4和IFN- γ 分泌($P < 0.01$, $P < 0.05$), 升高免疫球蛋白IgA、IgM、IgG和补体C₃和C₄($P < 0.01$)含量。上述结果表明, RPFRE能拮抗CY所致的脾脏、胸腺和肝脏的萎缩, 提高免疫器官指数; 高浓度RPFRE能干预CY损伤, 维持巨噬细胞的吞噬能力, 促进T淋巴细胞增殖, 拮抗CY造成的免疫球蛋白和补体分泌水平降低, 从而对免疫抑制小鼠发挥免疫保护作用。

关键词: 太子参须提取物; 免疫抑制小鼠; 脾淋巴细胞增殖; 细胞因子; 免疫球蛋白; 补体

中图分类号: S85; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)5-0837-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.5.017

Study on the immunoprotective effects of Radix Pseudostellariae fibrous root extraction in immunosuppressed mice

YI Wei-meng¹, CHEN Sai-hong¹, MIN Si-ming¹,
CHEN Jun-yu¹, GAN Si-yan², HUANG Yi-fan², ZHANG Yan-da^{3*}, MA Yu-fang^{1*}

¹University Key Laboratory for Integrated Chinese Traditional and Western
Veterinary Medicine and Animal Healthcare in Fujian Province;

²Fujian Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine and Animal
Health, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 35002, China;

³Fujian Beidi Pharmaceutical Co., Ltd., Ningde 355399, China

Abstract: This study was designed to investigate the immunoprotective effects of Radix Pseudostellariae fibrous root extraction (RPFRE) on immunosuppressed mice. KM male mice of 3~4 weeks old and weighing (20 ± 2 g) were randomly divided into blank group (CK), cyclophosphamide (CY) model group, *Astragalus* polysaccharide group (APS), RPFRE low, medium and high dose groups, with 20 mice in each group. On the day of 1th-14th, mice both CK and CY group were given by distilled water, mice in ASP group were given by *Astragalus* polysaccharide at the dose of 200 mg/kg, RPFRE low, medium and high dose groups were administered by gavage in 100, 200, 400 mg/kg RPFRE; At the day of 15th-17th, mice in CK group were given by normal saline and the other mice were intraperitoneally injected with 80 mg/kg CY. On the 18th day, mice were weighed, blood sample was collected. The phagocytic function of macrophages was determined by carbon particle clearance

收稿日期: 2019-09-03 接受日期: 2020-05-07

基金项目: 校企合作横向课题(104/KH180151A); 福建省科技厅产学研专项(2014N5004); 福建省科技厅创新资金(2018C0041)

* 通信作者 E-mail: zyd0070@163.com, myfau850@sohu.com

test; the splenic lymphocyte proliferation ability was detected by MTT assay; the contents of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6 and IFN- γ) in the serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Contents of the serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA), complement (C₃ and C₄) were determined by immunoturbidimetry. The results showed as follows: compared with model group, the spleen index and liver index in high-dose RPFRE group were increased ($P < 0.01$). The phagocytic index was increased ($P < 0.05$), the SI of T and B lymphocytes were increased ($P < 0.01$), IL-2, IL-4 and IFN- γ levels were increased ($P < 0.05$) and the content of IgA, IgM and complement C₃ and C₄ were increased ($P < 0.01$). It was concluded that RPFRE could antagonize the atrophy of spleen, thymus and liver caused by CY, and improve immune organ index; High concentration of RPFRE could interfere with the damage caused by CY, maintain the phagocytic ability of macrophages, promote proliferation of T lymphocytes, and antagonize the decrease of immunoglobulin and complement secretion induced by CY, thus exerting immunoprotection effects on immunosuppressed mice.

Key words: Radix Pseudostellariae fibrous root extraction; immunosuppressed mice; cytokines; splenic lymphocyte proliferation; immunoglobulin; complement

太子参又名孩儿参、童参、四叶参或米参,来源于石竹科太子参属多年草本根性植物异叶假繁缕的干燥块根,是临床常用的补益中药^[1]。太子参味甘、微苦而性平,偏微寒,既能益气,又可养阴生津,且药力平和,是一味清补之药,适用于脾肺亏虚、气阴不足、气津不足诸症^[2]。目前已被分离出多糖、皂苷、环肽等多种生物活性成分^[3]。研究表明,太子参提取物能增强机体免疫力,拮抗环磷酰胺(CY)造成的免疫抑制^[4]。太子参须化学成分与太子参成分相似,研究表明太子参须中多糖含量和皂苷含量达18.79%和0.22%^[5]。Wu等^[6]研究表明太子参须能够增加血液中白细胞数,提高猪瘟抗体水平并延长作用时间,从而增强仔猪免疫能力。目前关于太子参须提取物对免疫抑制小鼠免疫功能的研究鲜见报道。本试验先给小鼠灌胃太子参须提取物(RPFRE)2周后,再腹腔注射CY,通过检测小鼠的免疫器官指数、脾淋巴细胞增殖、巨噬细胞吞噬功能、血清细胞因子含量等指标以及血清免疫球蛋白、补体含量的变化,探讨RPFRE对免疫抑制小鼠的免疫保护作用,为RPFRE的临床推广应用提供参考依据和数据借鉴。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 太子参须提取物

太子参须提取物由福建贝迪药业有限公司提供,该产品主要成为多糖和皂苷。阳性对照药物黄芪多糖(APS),由北京爱迪森生物科技有限公司生产。

1.1.2 试验动物

清洁级KM小鼠,雄性,3~4周龄,20±2g,购于福建医科大学实验动物中心。

1.1.3 主要试剂

RPMI 1640培养基(美国HyClone公司);胎牛血清(CellMax公司);Hank's平衡盐溶液(HBSS),磷酸盐缓冲液(PBS)(上海源培生物科技有限公司);刀豆蛋白(ConA),脂多糖(LPS)(美国Sigma公司);碳酸钠(国药集团);四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国Merck公司);二甲基亚砷(DMSO)(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);印度墨汁(上海源叶生物科技有限公司);免疫球蛋白试剂盒、补体试剂盒(浙江伊利康生物技术有限公司);注射用CY(上海Baxter公司);氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司)。

1.1.4 主要仪器

独立送回风净化笼具(IVC)(苏州市苏杭科技器材有限公司);X-22R台式高速冷冻离心机(美国Beckman公司);Milli-Q Direct8/16超纯水系统(美国Merck Millipore公司);SE202F型电子天平(奥豪斯仪器(上海)有限公司);AL104微量电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);V-1200可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);RT-9900全自动生化分析仪(雷杜生命科学股份有限公司);HH-4数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);SW-CJ-2G双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);倒置显微镜(日本Nikon公司);CO₂培养箱(美国Thermo公司);Infinite M200 Pro多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);酶联免疫检测仪(BIO-RAD,美国伯乐公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组及处理

120只KM小鼠,随机分为对照(CK)组、模型(CY)组、黄芪多糖(APS)组、RPFRE高、中、低剂量

组,共6组,每组20只。第1~14天,CK和CY小鼠灌胃双蒸水,RPFRE高、中、低剂量组(H-RPFRE组、M-RPFRE组、L-RPFRE组)小鼠分别灌胃太子参参须提取物400、200、100 mg/kg,APS组小鼠灌胃200 mg/kg APS;第15天起,CK组小鼠腹腔注射生理盐水,其余五组小鼠腹腔注射80 mg/kg BW环磷酰胺,连续给药3天。第18天,每组小鼠5只用于碳粒廓清法测定小鼠吞噬功能;5只用于MTT法测定脾T和B淋巴细胞增殖;剩余小鼠正常采样。

1.2.2 体重

试验开始后,每两天称重1次,观察试验过程中小鼠的体重变化和生长状态。

1.2.3 血样采集与处理

小鼠摘眼球采血,3 000 rpm,离心10 min,收集血清,分装于Eppendorf管,-20℃保存。

1.2.4 免疫器官指数的测定

试验第18天,小鼠称重,颈椎脱臼法处死,取脾脏、胸腺、肝脏,称量,计算上述器官指数,脏器指数=脏器重量(mg)/体重(g)。

1.2.5 巨噬细胞吞噬功能的测定

巨噬细胞吞噬指数的测定参见文献^[7]。小鼠尾静脉注射印度墨汁(0.1 mL/10g),分别于注射后第2 min(T₂)和10 min(T₁₀)眼底静脉丛取血20 μL,加入2 mL 0.1% Na₂CO₃溶液中,充分吹打混匀,测定600 nm波长处吸光度(OD值),以OD₂、OD₁₀分别表示T₂和T₁₀时的吸光值。计算廓清指数K吞噬指数α,公式如下:

$$K = (\lg OD_2 - \lg OD_{10}) / (T_{10} - T_2); \text{吞噬指数 } \alpha = \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重}) \times \sqrt{K}$$

1.2.6 小鼠脾T和B淋巴细胞增殖

1.2.6.1 制备脾淋巴细胞悬液

脾淋巴细胞的制备参见文献^[8]。试验组各取5只小鼠,颈椎脱臼法处死,无菌取脾,置于灭菌的研钵中,磨碎脾脏,加入Hank's液3.75 mL,混匀,过滤,制成单个脾细胞悬液,以Hank's液洗涤3次,1 500 rpm离心5 min。加入含有10%胎牛血清的RPMI-1640(完全培养液)2 mL,涡旋混匀,计数,调整至 7.5×10^6 个/mL的细胞稀释液,供脾细胞增殖用。

1.2.6.2 脾淋巴细胞增殖的测定

取96孔细胞培养板,每孔加入100 μL上述脾细胞悬液,空白孔加100 μL RPMI-1640完全培养液,试验孔分别加100 μL ConA(终浓度为5 μg/mL)和100 μL LPS(终浓度为10 μg/mL),每只小鼠

设4复孔。置于5% CO₂培养箱中培养44 h后,每孔加入50 μL MTT溶液,继续培养4 h,1 000 rpm,离心5 min,弃上清,每孔加入150 μL DMSO,低速震荡5 min,在波长为570 nm的酶标仪处读数,以空白对照孔调零。计算方法参照参考文献^[9]。计算刺激指数SI,公式如下:

$$\text{刺激指数(SI)} = \text{试验孔OD值} / \text{空白孔OD值}$$

1.2.7 血清细胞因子含量的测定

将1.2.3收集到的血清,以ELISA法按照血清细胞因子IL-2、血清细胞因子IL-4、血清细胞因子IL-6以及血清细胞因子IFN-γ试剂盒说明,用酶联免疫检测仪(BIO-RAD,美国伯乐公司)检测,记录每个样品在相应波长下的吸光度值,根据标准曲线计算各细胞因子含量。

1.2.8 血清中免疫球蛋白、补体含量的测定

将1.2.3分装的血清,以免疫比浊法按照血清免疫球蛋白(IgG、IgM、IgA)、补体(C₃和C₄)的试剂盒的说明检测,按说明对样品进行处理,后借RT-9900半自动生化分析仪检测各样品抗原-抗体复合物的浊度,通过与同样处理的校准液比较,计算各样品的免疫球蛋白和补体含量,具体处理步骤见试剂盒说明书。

1.2.9 数据统计

数据处理采用SPSS Statistics 23软件进行单因素方差分析(ANOVA),LSD法进行多重比较,结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 则表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 试验小鼠体重变化

试验小鼠体重变化见表1。由表1可知:与CK组相比,CY组小鼠末重显著低于CK组小鼠($P < 0.01$),增重较CK组差异极显著($P < 0.01$)。与CY组相比,RPFRE各剂量组小鼠末重均高于CY组,但差异不显著($P > 0.05$),其中RPFRE高剂量组和APS组小鼠增重明显($P < 0.05$)。

2.2 RPFRE对免疫抑制小鼠器官指数的影响

RPFRE对免疫抑制小鼠器官指数的影响如表2所示。与CK相比,CY小鼠的胸腺指数、脾脏指数以及肝指数都明显降低,且差异极显著($P < 0.01$);与CY小鼠相比,RPFRE高剂量组小鼠的脾脏指数、肝指数极显著升高($P < 0.01$);RPFRE低、中剂量组小鼠的脾脏指数、胸腺指数、肝指数也有升高,但无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 RPFRE 对免疫抑制小鼠体重的影响 (mg/g)

Table 1 Effect of RPFRE on weight of immunosuppressed mice (mg/g)

组别 Group	初重 Initial weight(g)	15 天重 Weight on day 15(g)	末重 Final weight(g)	增重 Weight gain(g)
CK 组	23.29 ± 0.37	27.39 ± 0.46	28.59 ± 0.42	5.30 ± 0.34
CY 组	23.12 ± 0.35	27.22 ± 0.45	25.88 ± 0.48 ^A	2.76 ± 0.21 ^A
L-RPFRE 组	23.10 ± 0.38	28.00 ± 0.61	26.10 ± 0.39	3.00 ± 0.28
M-RPFRE 组	23.39 ± 0.64	28.21 ± 0.56	26.73 ± 0.78	3.34 ± 0.52
H-RPFRE 组	23.17 ± 0.62	28.31 ± 0.48	27.11 ± 0.65	3.94 ± 0.40 ^b
APS 组	23.34 ± 0.44	28.33 ± 0.59	27.23 ± 0.68	3.89 ± 0.30 ^b

注:^a与 CK 组相比,差异显著($P < 0.05$);^A与 CK 组相比,差异极显著($P < 0.01$);^b与 CY 组相比,差异显著($P < 0.05$);^B与 CY 组相比,差异极显著($P < 0.01$);下同。

Note:^aCompared with the blank group,the difference is significant ($P < 0.05$);^ACompared with the blank group,the difference is extremely significant ($P < 0.01$);^bCompared with the model group,the difference was significant ($P < 0.05$);^BCompared with the model group,the difference was extremely significant ($P < 0.01$);The same below.

表 2 RPFRE 对免疫抑制小鼠脾指数、胸腺指数及肝指数的影响

Table 2 Effect of RPFRE on thymus index, spleen index and liver index of immunosuppressed mice

组别 Group	脾脏指数 Spleen index (mg/g)	胸腺指数 Thymus index(mg/g)	肝指数 Liver index (mg/g)
CK 组	3.181 2 ± 0.134 6	2.035 7 ± 0.174 8	52.837 9 ± 1.846 1
CY 组	1.507 3 ± 0.061 5 ^A	0.887 5 ± 0.091 3 ^A	43.070 7 ± 1.877 0 ^A
L-RPFRE 组	1.668 8 ± 0.054 0	0.942 5 ± 0.115 9	44.717 0 ± 1.433 5
M-RPFRE 组	1.778 8 ± 0.083 4	1.082 1 ± 0.164 7	45.777 0 ± 1.164 4
H-RPFRE 组	1.907 5 ± 0.117 9 ^b	1.164 8 ± 0.117 8	48.970 9 ± 1.351 8 ^B
APS 组	1.875 0 ± 0.118 7 ^b	1.199 6 ± 0.107 7	49.021 3 ± 1.074 5 ^B

2.3 RPFRE 对免疫抑制小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

RPFRE 对免疫抑制小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响见表 3。数据显示:与 CK 组相比,CY 组小鼠的碳粒廓清指数 K 及吞噬指数 α 均降低,且碳粒廓清

指数 K 降低极显著($P < 0.01$)而吞噬指数降低显著($P < 0.05$);与 CY 相比,RPFRE 低、高剂量组的碳粒廓清指数 K 均升高($P < 0.05$),RPFRE 高剂量组的吞噬指数 α 升高($P < 0.05$)。

表 3 RPFRE 对免疫抑制小鼠吞噬功能的影响

Table 3 Effect of RPFRE on the phagocytic function of immunosuppressed mice

组别 Group	碳廓清指数 K Clearance index K	吞噬指数 α Phagocytic index α
CK 组	0.031 9 ± 0.003 3	5.665 4 ± 0.382 4
CY 组	0.012 7 ± 0.001 5 ^A	3.901 2 ± 0.702 5 ^A
L-RPFRE 组	0.026 4 ± 0.002 0 ^b	4.893 0 ± 0.249 9
M-RPFRE 组	0.018 0 ± 0.004 7	4.795 3 ± 0.265 0
H-RPFRE 组	0.027 1 ± 0.004 5 ^b	5.338 4 ± 0.318 4 ^b
APS 组	0.022 9 ± 0.005 1	5.214 5 ± 0.785 8

2.4 RPFRE 对免疫抑制小鼠脾 T 和 B 淋巴细胞增殖的影响

RPFRE 对免疫抑制小鼠脾 T 和 B 淋巴细胞增

殖的影响见表 4。由表 4 可知,与 CK 比较,CY 组小鼠脾 T 和 B 淋巴细胞的刺激指数 SI 均显著降低($P < 0.01$)。与 CY 比较,RPFRE 各剂量组 T 淋巴细

胞增殖指数均显著升高($P < 0.01$),而 B 细胞的 SI 仅有 RPFRE 高剂量组达到显著水平($P < 0.05$)。

表 4 RPFRE 对免疫抑制小鼠淋巴细胞增殖的影响

Table 4 Effect of RPFRE on the proliferation in spleen lymphocytes in immunosuppressed mice

组别 Group	T 细胞刺激指数 SI	B 细胞刺激指数 SI
CK 组	5.170 5 ± 0.154 7	5.167 2 ± 0.313 5
CY 组	2.727 9 ± 0.123 9 ^A	3.467 3 ± 0.260 5 ^A
L-RPFRE 组	3.722 7 ± 0.173 1 ^B	3.703 4 ± 0.281 6
M-RPFRE 组	4.265 1 ± 0.252 8 ^B	4.181 9 ± 0.133 3
H-RPFRE 组	4.678 4 ± 0.365 8 ^B	4.717 2 ± 0.277 1 ^b
APS 组	4.634 4 ± 0.214 9 ^B	4.803 1 ± 0.171 0 ^b

2.5 RPFRE 对免疫抑制小鼠血清中细胞因子含量的影响

RPFRE 对免疫抑制小鼠血清中细胞因子 IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 含量的影响见表 5。从表 5 可知,与 CK 相比,CY 小鼠血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 含量

降低($P < 0.01$);与 CY 相比,RPFRE 各剂量组及 APS 组的 IL-2 含量均升高($P < 0.01$);RPFRE 高剂量组 IL-4 含量极显著升高($P < 0.01$)、IFN- γ 含量显著升高($P < 0.05$)。RPFRE 各剂量组小鼠的 IL-6 含量与剂量呈正相关,但差异不显著。

表 5 RPFRE 对免疫抑制小鼠 IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 含量的影响

Table 5 Effect of RPFRE on contents of cytokines IL-2, IL-4, IL-6 and IFN- γ in immunosuppressed mice

组别 Group	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
CK 组	420.61 ± 58.34	62.04 ± 6.07	30.28 ± 3.69	179.91 ± 14.66
CY 组	243.53 ± 12.22 ^A	45.49 ± 2.81 ^A	22.15 ± 2.91	108.68 ± 12.38 ^A
L-RPFRE 组	383.41 ± 18.05 ^B	48.09 ± 1.30	25.78 ± 3.67	138.60 ± 8.29
M-RPFRE 组	370.81 ± 22.74 ^B	53.08 ± 3.39	26.19 ± 2.30	119.91 ± 17.09
H-RPFRE 组	392.62 ± 7.61 ^B	61.84 ± 5.10 ^B	29.99 ± 2.12	160.32 ± 14.29 ^b
APS 组	387.43 ± 44.74 ^B	61.61 ± 5.25 ^B	27.77 ± 3.53	135.50 ± 7.45

2.6 RPFRE 对免疫抑制小鼠免疫球蛋白(IgA、IgM、IgG)和补体(C₃和C₄)的影响

RPFRE 对免疫抑制小鼠免疫球蛋白 IgA、IgM、IgG 的影响见表 6。由表 6 可知,与 CK 相比,CY 小鼠 IgA、IgM、IgG 含量均极显著降低($P < 0.01$)。与 CY 相比,RPFRE 低剂量组 IgA 和 IgG 含量显著升

高($P < 0.05$),IgM 含量极显著升高($P < 0.01$);RPFRE 中剂量组 IgA 含量显著升高($P < 0.05$);RPFRE 高剂量组 IgA 和 IgM 含量极显著升高($P < 0.01$),IgG 含量显著升高。高剂量组 IgA、IgM 以及 IgG 水平与 APS 组相当甚至略高于 APS 组。

表 6 RPFRE 对免疫抑制小鼠免疫球蛋白 IgA、IgM、IgG 含量的影响(mg/L)

Table 6 Effect of RPFRE on contents of IgA, IgM, IgG in immunosuppressed mice (mg/L)

组别 Group	IgA	IgM	IgG
CK 组	174.12 ± 6.35	503.33 ± 29.42	2 656.43 ± 270.79
CY 组	93.52 ± 16.57 ^A	336.66 ± 14.09 ^A	1 556.7 ± 216.18 ^A
L-RPFRE 组	155.54 ± 22.03 ^b	483.32 ± 39.35 ^B	1 867.39 ± 185.51
M-RPFRE 组	154.25 ± 20.83 ^b	381.66 ± 19.61	2 025.20 ± 91.58
H-RPFRE 组	186.27 ± 19.33 ^B	499.99 ± 22.64 ^B	2 314.51 ± 255.00 ^b
APS 组	163.86 ± 26.83 ^b	499.99 ± 28.63 ^B	2 104.10 ± 260.64

RPFRE 对免疫抑制小鼠补体 C_3 和 C_4 的影响见表 7。由表可知,与 CK 相比,CY 小鼠补体 C_3 和 C_4 含量均极显著降低($P < 0.01$);与 CY 相比,RP-

FRE 低、中剂量组 C_4 含量显著升高($P < 0.05$), C_3 含量有所增加但差异不显著。APS 及 RPFRE 高剂量组小鼠 C_3 和 C_4 含量升高极显著($P < 0.01$)。

表 7 RPFRE 对免疫抑制小鼠补体 C_3 和 C_4 含量的影响 (mg/L)

Table 7 Effect of RPFRE on contents of C_3 and C_4 in immunosuppressed mice(mg/L)

组别 Group	C_3	C_4
CK 组	620.63 ± 40.50	108.62 ± 6.29
CY 组	444.92 ± 39.40 ^A	71.48 ± 3.91 ^A
L-RPFRE 组	520.09 ± 27.22	88.12 ± 5.13 ^b
M-RPFRE 组	518.04 ± 32.64	88.35 ± 5.35 ^b
H-RPFRE 组	592.86 ± 40.63 ^B	107.20 ± 8.27 ^B
APS 组	593.81 ± 35.46 ^B	103.20 ± 3.90 ^B

3 讨论

环磷酰胺是一种强免疫抑制药,通过 DNA 烷基化破坏 DNA 的合成,进而抑制 DNA 的复制和蛋白质的合成,从而导致免疫功能低下,因此常作为复制动物免疫低下模型的造模药物^[10]。研究表明,CY 造模成功的小鼠常表现为精神萎靡、被毛松散、体重下降,有的出现眼结膜充血、掉毛等现象^[11]。本试验中,腹腔注射 CY 后,CY 组及各试验组小鼠均表现不同程度的被毛松散、精神不振,与 CK 组相比,CY 小鼠增重极显著降低。与 CY 相比,各试验组增重有不同程度的升高这从侧面反映出预先给予 RPFRE,能拮抗 CY 所致的体重降低,对 CY 模型小鼠有一定的免疫保护作用。

脾脏、胸腺是重要的免疫器官,其器官指数能直观地反映有机体的免疫功能。CY 是作用显著的免疫抑制剂,能使胸腺、脾脏萎缩,造成胸腺、脾脏指数下降^[10]。研究表明,香菇多糖、茯苓多糖、银耳多糖以及虫草多糖均能不同程度的升高 CY 所致的免疫抑制小鼠的胸腺系数,且各多糖按一定比例混合而成的复合多糖效果最好^[12]。款冬皂苷和多糖均能不同程度的提高小鼠胸腺和脾脏系数^[13]。天门冬多糖能够提高免疫抑制小鼠的脾脏指数和胸腺指数^[20]。本试验中太子参参须提取物含有太子参多糖、太子参皂苷等多种太子参药用成分,经检测该产品中糖含量为 54.26%,皂苷含量为 0.82%。课题组前期研究表明太子参多糖可以改善 CY 造成的免疫损伤,提高免疫抑制小鼠的免疫器官指数,促进其淋巴细胞增殖和细胞因子(IL-2 和 IFN- γ)分泌^[14]。本试验结果显示,RPFRE 能拮抗 CY 免疫抑制作用,

缓解 CY 所致的免疫器官萎缩,从而提高机体的免疫力。这与大多数试验研究得出的结论“多糖能缓解机体的免疫抑制,提高机体免疫器官指数,增强免疫力”一致^[15,16]。

临床中常采用碳粒廓清法来测定吞噬细胞的吞噬指数^[17]。Sun 等^[18]研究表明刺五加酸性多糖能缓解 CY 所致的小鼠外周血白细胞数目减少、巨噬细胞吞噬功能减弱,增强免疫抑制小鼠的巨噬细胞吞噬能力,提高 TNF- α 和 IFN- γ 水平。桔梗皂苷 D 能够促进淋巴细胞增殖,增强巨噬细胞的吞噬能力,并可刺激淋巴细胞 IL-2、IL-4 和巨噬细胞 TNF- α 、IL-12 的分泌,从而增强小鼠淋巴细胞和巨噬细胞的免疫调节活性^[19]。本试验中,CY 小鼠 K 值和 α 值均显著降低,这与上述研究结果一致,说明已造成小鼠免疫抑制。RPFRE 高剂量组能增强 K 值和 α 值,拮抗 CY 损伤,并且与阳性对照组 APS 作用效果相当,这同 Zhang 等^[20]“黄芪多糖可提高正常小鼠及免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率及吞噬指数”这一结论一致。说明该太子参参须提取物具有其他药用植物的多糖、皂苷提取物同样的功能,能缓解 CY 小鼠巨噬细胞吞噬能力减弱,增强 CY 小鼠的免疫能力。

淋巴细胞增殖是对抗原或有丝分裂原诱导的刺激的反应,其广泛用于评估细胞免疫应答^[21]。一般而言,ConA 刺激 T 淋巴细胞免疫,而 LPS 刺激 B 淋巴细胞免疫。研究表明,党参总皂苷纳米乳能提高免疫抑制小鼠血清 IL-2 和 IFN- γ 水平、升高脾 T 细胞增殖刺激指数,从而提高免疫抑制小鼠的细胞免疫水平^[22]。天门冬多糖能在 Con A 或者 LPS 刺激

下提高 T、B 淋巴细胞增殖率^[23]。本试验中, RPFRE 借助 Con A 和 LPS 刺激, 激发脾细胞更快增殖, 结果显示 RPFRE 能显著刺激 T 细胞增殖 ($P < 0.01$), 提高 B 细胞 SI 值。说明 RPFRE 能干预 CY 对细胞增殖的抑制, 拮抗 CY 损伤, 从而增强小鼠的免疫抵抗能力。

IL-2、IFN- γ 是由 TH1 细胞分泌的细胞因子, 主要参与细胞免疫; IL-4、IL-6 由 TH2 细胞分泌, 参与机体液免疫。Tong 等^[23]研究表明, 天门冬多糖能增加 CY 诱导的小鼠的 IL-2、IL-4 含量, 从而提高小鼠的免疫防御功能。六苓扶正方剂量依赖性地提高模型小鼠 IL-2 和 IgG 水平^[11]。丹参-苦参提取物高剂量可以显著促进 IL-6 和 CXCL1 的分泌^[24]。研究表明, 太子参多糖能够拮抗环磷酰胺对小鼠回肠中 IL-6 分泌的抑制作用^[25], 且太子参多糖和硒化修饰以后均可以增加免疫小鼠 TNF- α 和 IL-6 的分泌^[26]。本试验中, RPFRE 能抵抗 CY 对机体造成的免疫抑制, 增加 IL-2、IL-4、IFN- γ 含量 ($P < 0.05$), 促进 IL-6 分泌 ($P > 0.05$)。结果表明 RPFRE 具有天然药用植物的功能, 能通过遏制细胞因子含量降低, 拮抗 CY 所致的免疫损伤, 从而增强机体防御能力。

研究表明天然中药对免疫球蛋白 IgM、IgG、IgA 有正向调节作用^[27]。Lin 等^[28]研究表明, 党参多糖和硒化党参多糖均能够增加免疫抑制小鼠血清中 IgG 和 IgM 的含量, 且硒化修饰过后的党参多糖效果显著。Zhang 等^[29]研究表明茯苓多糖可以促进小鼠血清中 IgG 和 IgM 的生物合成, 提高小鼠免疫功能。Song 等^[26]研究表明, 硒化太子参多糖能够减缓 CY 所致的免疫损伤小鼠 IgG 和 IgM 的降低, 从而提高免疫能力。RPFRE 系天然中药太子参的参须提取物, 试验中, 高剂量 RPFRE 能拮抗 CY 对免疫球蛋白和补体分泌的抑制作用, 增加 IgM 和 IgG 含量 ($P < 0.01$), 促进 C₃ 和 C₄ 分泌 ($P < 0.01$)。说明 RPFRE 保有天然中药太子参的有效药用成分, 能通过调节免疫球蛋白和补体含量起到免疫保护作用。

上述结果表明, 先灌胃小鼠 RPFRE 能通过拮抗 CY 所致的免疫抑制小鼠脏器指数降低, 巨噬细胞吞噬功能减弱, 脾 T 淋巴细胞增殖能力减弱, 血清免疫球蛋白、补体及细胞因子含量降低等, 发挥对免疫抑制小鼠免疫保护作用, 该作用可能是由于 RPFRE 是天然药用植物太子参的参须所提, 其含有太子参参须多糖和皂苷, 保有太子参的药用价值。但有关

太子参参须多糖和皂苷单独对免疫抑制小鼠免疫调节作用仍有待进一步深入研究。

参考文献

- 1 Wang WK, et al. Overview of research on Pseudostellariae in recent years[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17:264-267.
- 2 Fu XS, et al. Research status and development trend of *Radix Pseudostellariae* [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2012, 21:757-760.
- 3 Liu D, et al. Progress in the chemical constituents of *Radix Pseudostellariae* [J]. Chin J Eth Med Ethnopharm(中国民族民间医药), 2014, 16:18-20.
- 4 Huang WZ, et al. Effects of *Radix Pseudostellariae* extract on immunefunction in mice [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2005(6):35-37.
- 5 Ding CH, Lin PL, Zeng JW, et al. Determination of polysaccharides and total saponins in roots and fibers of *Radix Pseudostellariae* [J]. J Fujian Univ Tradit Chin Med(福建中医药大学学报), 2012(3):40-43.
- 6 Wu JH, Yang RP, Zhang YD, et al. Study on the regulating effect of *Radix Pseudostellariae* on immune system of piglets [J]. Fujian Anim Husb Vet Med(福建畜牧兽医), 2018, 40(5):1-3.
- 7 Ren Z, He CH, Fan YH, et al. Immune-enhancing activity of polysaccharides from *Cyrtomium macrophyllum* [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 70:590-595.
- 8 Ma YF, Zheng XX, Zheng NZ, et al. Effects of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharides and ConA on Th1 and Th2 cytokines secreted by splenic lymphocyte and their expression in mice [J]. J Chin Inst Food Sci Tech(中国食品学报), 2018, 18(4):72-78.
- 9 Tan XZ, Chen YY, Chen SH, et al. Effects of *Radix Pseudostellariae* stem and leaf polysaccharide on immune function of immunosuppressed mice [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:2134-2140.
- 10 Zhong JF, Fang RJ. Immunosuppressive mechanism of cyclophosphamide and its application in animal models [J]. Chin J Immunol(中国免疫学杂志), 2016, 32:1541-1546.
- 11 Zhang YT, Chen JW, Dong RM. Immune effect of Liuling Fuzheng Recipe on immune enhancement in cyclophosphamide-induced immunosuppression mice [J]. China Pharm(中国药师), 2019, 22:660-664.
- 12 Liang JQ, Wang YY, Hu MH, et al. Immune enhancement effect of compound polysaccharides on mice induced by CTX immunization [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2017, 40:953-956.

- 13 Liu XH, Gao C, Ding TT, et al. Experimental study on the immunomodulatory effects of three functional ingredients of coltsfoot on mice [J]. *J Light Ind (轻工学报)*, 2018, 33(2):35-41.
- 14 Yan SZ. Protective effect of polysaccharides from *Radix Pseudostellariae* on mice immune injury induced by cyclophosphamide [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (福建农林大学), 2015.
- 15 Chen Y, Tang J, Wang X, et al. An immunostimulatory polysaccharides (SCP-IIa) from the fruit of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50:844-848.
- 16 Li Q, Zhang F, Chen G, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharides from *Grifola frondosa* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111:1293-1303.
- 17 Yang L, Duan XH, Li SM, et al. Effect of Pu'er Tea on carbon clearance function of monocyte-macrophage system in immunocompromised mice [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med (云南中医中药杂志)*, 2008, 29(10):43-44.
- 18 Sun SK, Song T, Lu Y. Immunomodulatory effects of *Acanthopanax senticosus* acid polysaccharide on immunocompromised mice [J]. *J Immunol (免疫学杂志)*, 2018, 34:863-868.
- 19 Li JS, Feng HH, Wang M, et al. Effects of *Platycodon grandiflorum* saponin D on immune function of lymphocytes and macrophages in mice. [J]. *J Northwest A&F Univ: Nat Sci (西北农林科技大学学报: 自科版)*, 2019, 47(1):39-44.
- 20 Zhang YQ, Chen ZL, Luo QH. Immune function of *Astragalus* polysaccharides in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin (中国实验动物学报)*, 2015, 23:389-394.
- 21 Fu LH, Wang YP, Wang JJ, et al. Evaluation of the antioxidant activity of extracellular polysaccharides from *Morchella esculenta* [J]. *Food Funct*, 2013, 4:871-879.
- 22 Cao FH, Wang YP. Effects of total saponins of *Codonopsis pilosula* nanoemulsion on immune function in mice [J]. *J Northwest A&F Univ: Nat Sci (西北农林科技大学学报: 自科版)*, 2019, 47:125-131.
- 23 Tong CY, Sun YC, Qin XG, et al. Immunomodulatory effects of *Asparagus* polysaccharides on cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2013, 25:1112-1114.
- 24 Yang Y, Wu JW, Cheng P, et al. Study on the immunoregulatory function of *Salvia Miltiorrhiza-Sophora Flavescens* Compatibility in immunosuppressive mice [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2019, 22(6):1-7.
- 25 Yan SZ, Ma YF, Liao LY, et al. Effects of polysaccharides from *Radix Pseudostellaria* on the contents of SIgA, IL-2 and IL-6 contents of intestinal mucosal injured mice caused by cyclophosphamide [J]. *Chin Anim Husb Vet Med (中国畜牧兽医)*, 2015, 42:1187-1192.
- 26 Song YL, Qiu FA, Wu XQ, et al. Immunoprotective effects of selenium-modified polysaccharides from *Radix Pseudostellariae* on immunologically injured mice [J]. *Chin J Vet Sci (中国兽医学报)*, 2017, 37:2163-2167.
- 27 Xu DN. Study of *Anoectochilus fimosanus* polysaccharides on immune function of mice. [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (福建农林大学), 2011.
- 28 Lin DD, Qin T, Ren Z, et al. Effects of selenium *Codonopsis* polysaccharides on immune function in immunosuppressed mice [J]. *Chin Anim Husb Vet Med (中国畜牧兽医)*, 2016, 43:1544-1549.
- 29 Zhang ZJ, Feng X, Jiang J, et al. Effects of *Poria cocos* polysaccharide on the levels of serum IgA, IgG and IgM biosynthesis in mice [J]. *Chin J Immunol (中国免疫学杂志)*, 2013, 29:1213-1215.

(上接第 741 页)

- 13 Yang HJ, Guo WB, Zheng SF, et al. RP-HPLC simultaneous determination of four active components in compound liquorice tablets [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2013, 33:141-145.
- 14 Zhang X, Qi YC, Yang LR, et al. Improved determination of glycyrrhizic acid in compound liquorice tablets [J]. *Drugs Stand China (中国药品标准)*, 2019, 20:133-137.
- 15 Yu XM, Xu HY, Liang YZ, et al. Study on HPLC fingerprint of *Glyrrhiza* [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2007, 19:1009-1012.
- 16 Xu LL, Liu B, Wang F, et al. Rapid characterization of chemical constituents and rat metabolites of FufangGancao tablets by UHPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometer [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2018, 43:4534-4540.
- 17 Hosseinzadeh H, Nassiri-Asl M. Pharmacological effects of *Glycyrrhiza* spp. and its bioactive constituents: update and review [J]. *Phytother Res*, 2015, 29:1868-1886.
- 18 Ye J, Qiu DY, Zeng QY, et al. Comparison of yields and effective constituents of various kinds of licorice in different picking time [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2016, 38:1088-1092.