

• 论 著 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.13.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210427.0851.002.html\(2021-04-27\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210427.0851.002.html(2021-04-27))

苗药铁筷子对免疫抑制小鼠免疫功能的影响*

丁晓丽^{1,2}, 索 萍^{1,2}, 钱海兵^{1△}

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 贵州省中医药方证药理研究特色重点实验室, 贵阳 550025)

[摘要] **目的** 研究铁筷子对免疫抑制小鼠免疫功能的影响。**方法** 将小鼠随机分为空白组、模型组、铁筷子高、中、低剂量组(1.00、0.50、0.25 g/mL), 阳性组(黄芪颗粒 0.50 g/mL), 每组 30 只。除空白组外, 其余各组小鼠均用环磷酰胺(50 mg/kg)隔日腹腔注射建立免疫抑制模型, 造模与灌胃同步进行, 最后测定各组小鼠的体重增长率、胸腺指数、迟发型超敏反应、巨噬细胞吞噬能力及肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6、IL-2、干扰素(IFN)- γ 、IgM、补体 C3、C4 的活性水平, 外周红细胞, 白细胞数。**结果** 与模型组相比, 铁筷子可提高小鼠体重增长率、胸腺指数($P<0.05$), 增强超敏反应($P<0.05$), 提高 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 、IgM、补体 C3 的水平($P<0.05$), 改善外周红细胞、白细胞数量($P>0.05$)。**结论** 铁筷子可增强免疫抑制小鼠的免疫能力。

[关键词] 民族药; 免疫抑制; 环磷酰胺; 铁筷子

[中图法分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)13-2171-05

Effects of Miao medicine Iron Chopsticks on immune function
in immunosuppressive mice*

DING Xiaoli^{1,2}, SUO Ping^{1,2}, QIAN Haibing^{1△}

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China;
2. Guizhou Provincial Specialized Key Laboratory of Pharmacological Study of
TCM Formula Syndrome, Guiyang, Guizhou 550025, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of iron chopsticks on the immune function of immunosuppressive mice. **Methods** The mice were randomly divided into the blank group, model group, high, medium and low dose iron chopsticks groups (1.00 g/mL, 0.50 g/mL, 0.25 g/mL) and positive group [astragalus granules (0.50 g/mL)], with 30 mice in each group. Except the blank group, the immunosuppressive model in the rest groups was constructed with cyclophosphamide (50 mg/kg) by intraperitoneal injection on the alternate day, the modeling and gavage were synchronously conducted, the growth rate of body weight, thymus index, delayed-type hypersensitivity, macrophage phagocytosis and TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ , IgM, the activity level of C3 and C4 levels, count of peripheral blood red blood cells and white blood cells were finally detected. **Results** Compared with the model group, iron chopsticks could increase the growth rate of body weight, thymus index ($P<0.05$), enhance the hypersensitivity ($P<0.05$), increase the levels of IFN- γ , IL-6, TNF- α , IgM, complement C3 ($P<0.05$), improve the number of peripheral blood red blood cells and white blood cells ($P>0.05$). **Conclusion** Iron chopsticks can enhance the immune ability of immunosuppressive mice.

[Key words] ethnic drug; immune suppression; cyclophosphamide; iron chopsticks

免疫通常是指非己抗原性物质进入体内, 机体能清除异物, 保持身体功能平衡的一种生理功能。当免疫过强时会引发超敏反应、类风湿性关节炎等自身免疫性疾病, 但当免疫功能过低时又会诱发其他免疫缺

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81760773)。 作者简介: 丁晓丽(1996—), 在读硕士研究生, 从事中药及民族药的基础研究与开发。
△ 通信作者, E-mail: 279753407@qq.com。

陷综合征^[1],因此寻找有效稳定的免疫调节剂十分重要。苗药铁筷子(*Helleborus thibetanus* Franch.)为蜡梅科蜡梅属(*Chimonanthus*)植物蜡梅(*Chimonanthus Praecox* L. Link)及山蜡梅(*Chimonanthus nitens* Oliv.)的干燥根及根茎^[2]。课题组前期有将其用于类风湿性关节炎的研究,但并未进行针对免疫影响的探索。因此本文采用环磷酰胺建立免疫力低下小鼠模型,探究铁筷子对免疫功能低下状态的影响,为苗药铁筷子用于免疫性疾病提供药理学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18~22 g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供,实验动物使用许可证:SCXK(辽)2015-0001。

1.1.2 主要仪器

紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司);低温高速离心机(XK-400,江苏新康医疗器械有限公司);电子分析天平(ALC-210.3,北京爱科勒有限公司);酶标仪(Infinite M200,北京新风机电技术公司);8 mm 小鼠耳朵打孔器;血细胞分析仪(XT-2000i,希森美康集团)。

1.1.3 药品与试剂

黄芪颗粒(贵州汉方药业有限公司,批号 20180312);环磷酰胺(源业生物有限公司,批号 X22D8Y51136);印度墨汁(源业生物有限公司,批号 L08A9G67537);干扰素(IFN)- γ 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(欣博盛生物有限公司,批号 M181128-101a);白细胞介素(IL)-6 ELISA 试剂盒(欣博盛生物有限公司,批号 M181128-004a);IL-2 ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号 ml083138);肿瘤坏死因子(TNF)- α ELISA 试剂盒(欣博盛生物有限公司,批号 M181128-102a);IgM ELISA 试剂盒(欣博盛生物有限公司,批号 M181128-129a);补体 C3 ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号 DP7VCQ53L1);补体 C4 ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号 ml002048)。

1.1.4 苗药铁筷子水煎液制备

苗药铁筷子,采自贵阳市乌当区三江镇农场,经贵州中医药大学药学院生药教研室刘晓龙博士鉴定为蜡梅科蜡梅属植物蜡梅的根。铁筷子水煎液的制备:取铁筷子药材 100 g,加水,浸泡 0.5 h,然后用电磁炉加热、过滤,连续 2 次,合并 2 次滤液,浓缩至 100 mL,最后得到铁筷子水煎液,其浓度为 1 g/mL,使用前用水稀释成相应倍数。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理

SPF 级昆明种小鼠,180 只,雌雄各半,适应性喂养 7 d 后分成空白组,模型组,铁筷子水煎液高、中、低剂量组(1.00、0.50、0.25 g/mL),阳性组(黄芪颗粒 0.50 g/mL)。于实验第 1 天,除空白组外,其余各组小鼠均用环磷酰胺(50 mg/kg)隔日腹腔注射给药,连续 30 d,共注射 15 次,建立免疫低下小鼠模型。空白组腹腔注射等体积生理盐水。给药组分别按铁筷子水煎液高、中、低剂量灌胃给药,阳性组给以黄芪颗粒水溶液,空白组和模型组灌胃等体积生理盐水,每天灌胃 1 次,连续 30 d。每天灌胃时间晚于环磷酰胺注射时间 30 min。

1.2.2 小鼠体重增长率、免疫器官指数的测定

末次给药 24 h 后,各组小鼠抽取 10 只,记录小鼠体重,摘眼球取血,颈椎脱臼处死,取胸腺,用滤纸吸干脏器并称重,计算脏器指数。计算公式:体重增长率%=(最终体重-初始体重)/初始体重 \times 100%。胸腺指数=胸腺重量(mg)/体重(g)。

1.2.3 迟发型超敏反应的测定

于给药后第 20 天,各组中选取 10 只小鼠腹部去毛,范围为 3 cm²。均匀涂抹配制好的 1% 的二硝基氟苯,连续致敏 5 d,实验最后 1 d 前将 1% 的二硝基氟苯 10 μ L 均匀涂抹在小鼠右耳两面进行攻击,左耳涂抹丙酮。24 h 后,摘眼球取血 0.6~1.0 mL 于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,处死小鼠后,用 8 mm 的小鼠耳打孔器,打下耳片,于万分之一的天平上精密称量其重量。左右耳重量之差即为肿胀度。肿胀度=右耳重量-左耳重量。

1.2.4 碳廓清实验

小鼠碳廓清实验:末次给药 24 h 后,在各组中取 10 只小鼠,每只小鼠的尾部静脉注入 20% 的印度墨汁,注入印度墨汁 2 min 和 10 min 后用定量毛细管从眼球取血 40 μ L,并将其加到 4 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中,以 40 μ L 正常小鼠血的 0.1% Na₂CO₃ 溶液作空白对照,用紫外可见分光光度计在 600 nm 波长测定吸光度值(A)。并分离肝、脾称重,按公式计算吞噬指数 α 。 α =小鼠体重(g)/(肝重+脾重,mg) $\times\sqrt[3]{K}$ 。 $K=\lg A_1-\lg A_2/(T_1-T_2)$ 。 T_1 、 T_2 分别代表第 1 次和第 2 次凝血时间。

1.2.5 小鼠血清中 IFN- γ , IL-2, IL-6, TNF- α , IgM, 补体 C3、C4 水平及全血中红细胞与白细胞数的测定

将 1.2.2 所取的小鼠血进行离心,3 000 r/min 离心 10 min 分离血清,装入 EP 管,-80℃ 保存备用,参

照 ELISA 试剂盒说明书,检测血清中 IFN- γ , IL-2, IL-6, TNF- α , IgM, 补体 C3、C4 的水平。将 1. 2. 3 取得的小鼠全血在 4 h 内,利用血细胞分析仪对小鼠全血中的红细胞和白细胞的数量进行检测。

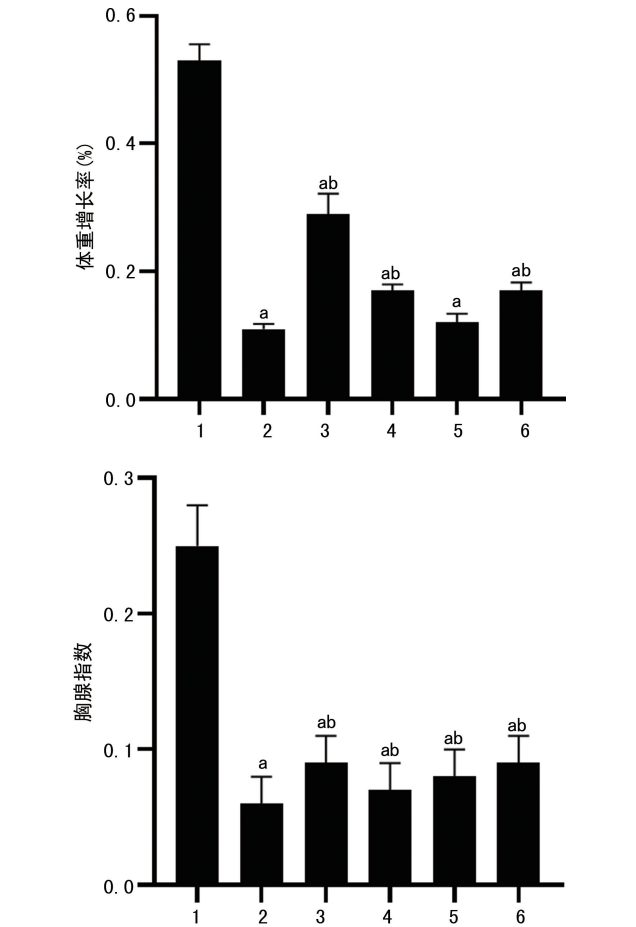
1.3 统计学处理

所有数据均采用 SPSS16.0 进行单因素方差分析,计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,采用 GraPhPad Prism 8 作图分析结果。

2 结 果

2.1 对免疫抑制小鼠体重增长率和免疫器官指数的影响

模型组小鼠体重增长率、胸腺指数显著下降($P < 0.05$),免疫抑制小鼠造模成功。铁筷子水煎液低、中剂量组及阳性组可提高免疫抑制小鼠的体重增长率,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);铁筷子各给药组和阳性组提高了免疫抑制小鼠胸腺指数($P < 0.05$),见图 1。

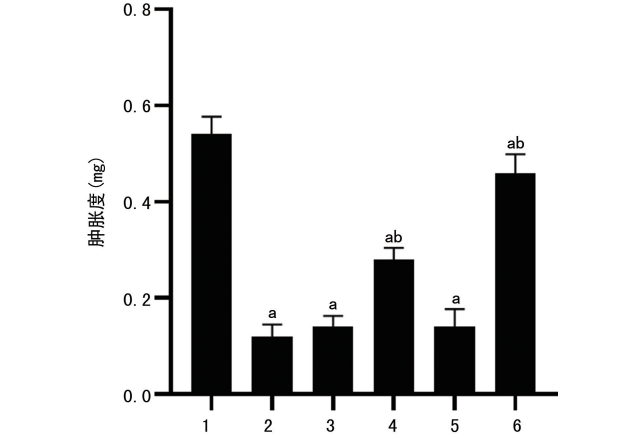


1:空白组;2:模型组;3:低剂量组;4:中剂量组;5:高剂量组;6:阳性组;^a: $P < 0.05$,与空白组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较。

图 1 苗药铁筷子对免疫抑制小鼠体重增长率、胸腺指数的影响

2.2 对免疫抑制小鼠迟发型超敏反应的影响

模型组小鼠耳肿胀与空白组相比明显降低($P < 0.05$),与模型组相比,铁筷子中剂量、阳性组可显著增加小鼠耳肿胀度,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

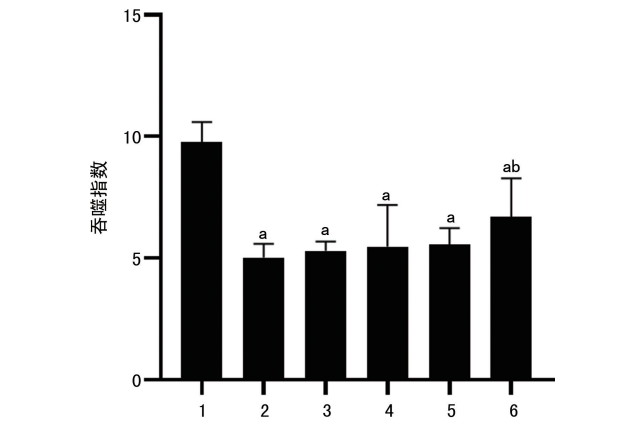


1:空白组;2:模型组;3:低剂量组;4:中剂量组;5:高剂量组;6:阳性组;^a: $P < 0.05$,与空白组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较。

图 2 苗药铁筷子对免疫抑制小鼠迟发型超敏反应的影响

2.3 对免疫抑制小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

与空白组比较,模型组和各给药组小鼠吞噬指数降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,除阳性组外,各给药组小鼠吞噬指数虽有增长但不显著($P > 0.05$),见图 3。



1:空白组;2:模型组;3:低剂量组;4:中剂量组;5:高剂量组;6:阳性组;^a: $P < 0.05$,与空白组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较。

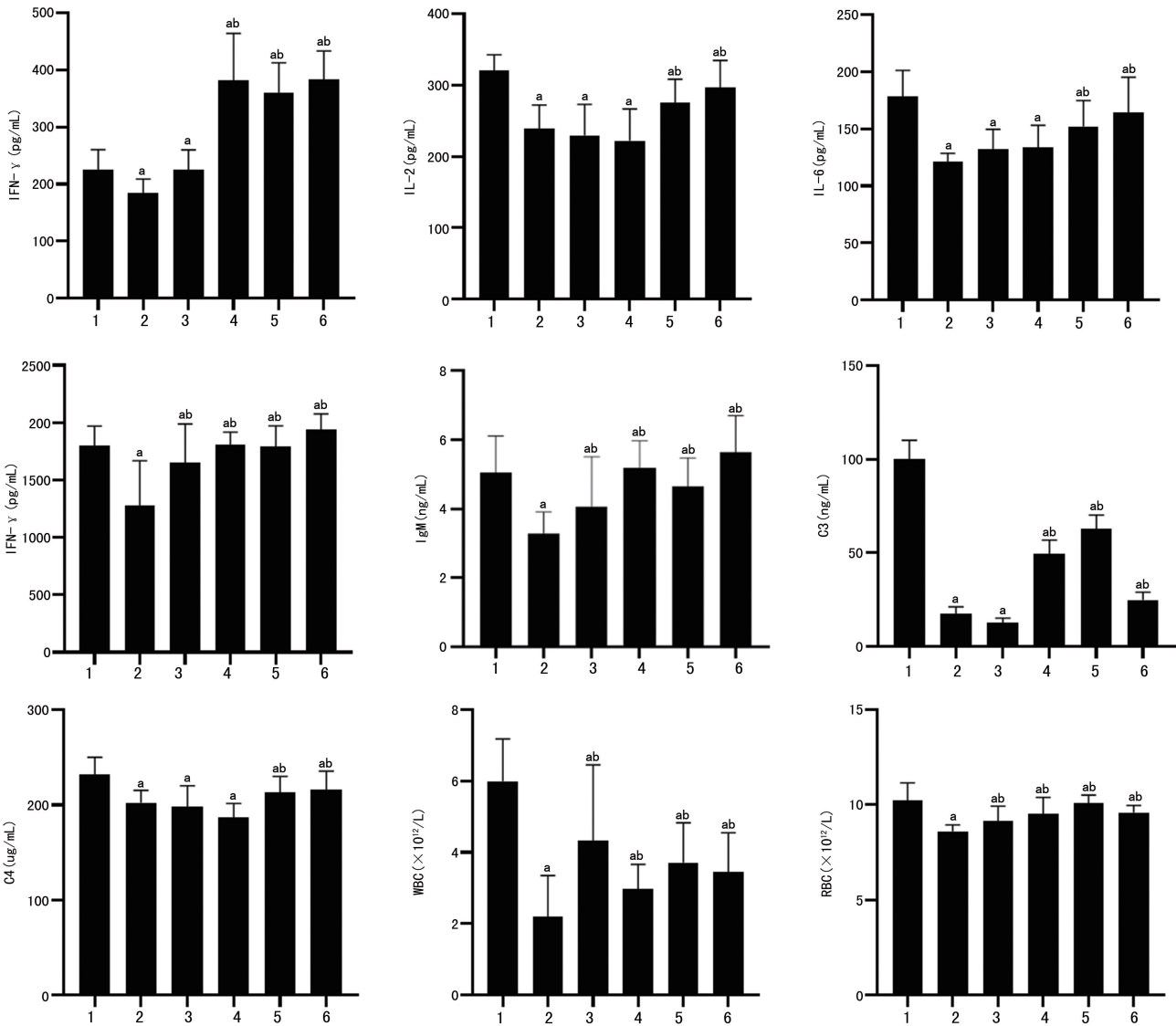
图 3 苗药铁筷子对免疫抑制小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

2.4 对免疫抑制小鼠血清中 IFN- γ , IL-2, IL-6, TNF- α , IgM, 补体 C3、C4 及全血中红细胞(RBC),白细胞(WBC)的影响

模型组小鼠体内 IFN- γ , IL-2, IL-6, TNF- α , IgM, 补体 C3、C4 水平及 RBC 和 WBC 计数均降低,与空白组比较具差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,铁筷子中、高剂量及阳性组 IFN- γ 水平升高,铁筷子高剂量及阳性组 IL-6、IL-2、补体 C4 水平升高,

铁筷子组及阳性组 TNF- α 水平升高,铁筷子中、高剂量及阳性组小鼠体内 IgM、补体 C3 水平均升高,且铁

筷子各剂量给药组都提高免疫抑制小鼠的 RBC 与 WBC 计数,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见图 4。



1:空白组;2:模型组;3:低剂量组;4:中剂量组;5:高剂量组;6:阳性组;^a: $P<0.05$,与空白组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较。

图 4 苗药铁筷子对免疫抑制小鼠 IFN- γ ,IL-2,IL-6,TNF- α ,IgM,补体 C3、C4 及红细胞,白细胞的影响

3 讨 论

免疫器官、免疫细胞和免疫分子共同构成了人体免疫系统,免疫功能紊乱时常引起疾病的发生,其中免疫力低下对机体防御能力有很大的影响,因此增强免疫能力是预防疾病发生的关键^[3]。胸腺是一重要的中枢免疫器官,T 淋巴细胞的生长发育与胸腺密切相关,T 淋巴细胞可直接杀伤靶细胞,释放淋巴因子加强免疫应答^[4-5],胸腺指数反映了机体免疫能力的强弱。本次造模药物选用环磷酰胺构建免疫抑制小鼠模型,环磷酰胺可引起免疫器官重量减轻,产生免疫抑制^[6-7]。因此,本次实验采用小剂量多次注射环磷酰胺(50 mg/kg)的方法建立免疫力低下小鼠模型^[8],结果表明注射过环磷酰胺的小鼠体重增长率明

显下降,胸腺指数显著降低,说明免疫抑制小鼠模型造模成功,灌胃给药后,铁筷子可提高免疫抑制小鼠的体重增长率、胸腺指数来改善免疫抑制小鼠的免疫能力,说明铁筷子具有机体免疫保护作用。

吞噬指数主要用于判断巨噬细胞吞噬能力的强弱^[9],碳廓清实验常用于巨噬细胞吞噬能力的检测。研究表明苗药铁筷子对免疫抑制小鼠巨噬细胞吞噬能力有改善作用。迟发型超敏反应是Ⅳ型细胞介导的迟发型变态反应,当机体再次受到相同抗原刺激后,抗原提呈细胞会作用于效应 T 细胞,CD4⁺ 细胞可通过分泌趋化因子,产生免疫损伤作用,出现炎症反应、肿胀^[10]。模型组小鼠其免疫受到抑制,耳肿胀不明显,但铁筷子可增强免疫抑制小鼠免疫能力,提高

免疫应答。红细胞、白细胞水平同样也反映了机体免疫能力的强弱,红细胞可识别携带抗原、促进巨噬细胞的吞噬能力,白细胞参与了机体的防御反应^[11],铁筷子可提高免疫抑制小鼠 RBC、WBC 数量,表明苗药铁筷子可通过调节 RBC、WBC 的数量调节免疫能力。

血清中的细胞因子、免疫球蛋白以及补体含量的变化反映了机体免疫能力的强弱,Th 细胞可辨识抗原提呈细胞,维持机体正常免疫功能,主要分为 Th1 和 Th2 两个亚型,Th1 型包括 IL-2、TNF- α 、IFN- γ ;Th2 型包括 IL-6、IL-9 等^[12]。IFN- γ 具有抗病毒、抑制细胞增殖、调节免疫及抗肿瘤作用;TNF- α 主要由活化的巨噬细胞、NK 细胞及 T 淋巴细胞产生;IL-6 由活化巨噬细胞产生,可促进淋巴细胞增殖^[13];IL-2 由活化 T 淋巴细胞产生,在调节免疫应答中具有重要作用^[14]。免疫球蛋白是 B 淋巴细胞在抗原刺激下转化为浆细胞,可以产生能与抗原发生特异性结合的抗体^[15]。其中 IgM 是分子量最大的免疫球蛋白,具有强大的杀菌、激活补体、免疫调理和凝集作用;补体 C3 主要由巨噬细胞和肝脏合成,在补体经典激活途径和旁路激活途径中发挥着重要的作用。注射了环磷酰胺的小鼠 IFN- γ ,IL-2,IL-6,TNF- α ,IgM,补体 C3、C4 水平显著降低,铁筷子可明显提高这些因子的含量,特别是高、中剂量组,提示铁筷子可通过调节细胞因子,IgM,补体 C3、C4 来调节机体免疫能力。

免疫系统是一个复杂的综合体,其调节可能受多种因素的影响,前期课题组在对类风湿性关节炎的研究中,铁筷子的免疫抑制作用并不是其治疗的主要途径。本次实验发现铁筷子具有增强免疫的能力,可通过提高胸腺指数、巨噬细胞吞噬能力以及调节体内细胞因子,IgM,补体 C3、C4 的水平,RBC、WBC 数量来增强机体免疫能力,改善免疫抑制状态。

参考文献

- [1] 孙月佳. 环磷酰胺联合泼尼松治疗风湿免疫系统疾病的疗效观察[J]. 中国处方药,2020,18(7):101-102.
- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科学技术出版社,2003:304.
- [3] 李俊莲,王笈. 浅析免疫与祖国医学理论的关系[J]. 中医药学刊,2005,23(7):1242-1243.
- [4] JUNG W C, LEVESQUE J P, RUITENBERG M J. It takes nerve to fight back: The significance of neural innervation of the bone marrow and spleen for immune function[J]. Semin Cell Dev Biol,2017,61(61):60-70.
- [5] 田嘉军,黄聘和,岳茜岚,等. 免疫力低下小鼠动物模型建立及快速检测研究[J]. 中国比较医学杂志,2020,30(3):77-82.
- [6] POL J G, ATHERTON M J, STEPHENSON K B, et al. Enhanced immunotherapeutic profile of oncolytic virus-based cancer vaccination using cyclophosphamide preconditioning [J]. J Immunother Cancer,2020,8(2):e000981.
- [7] 高芃,钱嘉林,刘长喜,等. 环磷酰胺对小鼠免疫抑制的动物模型建立[J]. 环境与职业医学,2004,21(4):314-318.
- [8] 朱亚男,徐蕊阳,丁慧敏,等. 白玉菇多糖对免疫抑制型小鼠的免疫调节作用[J]. 食品工业科技,2020,41(7):295-300,308.
- [9] 曹景文,任玲,王秋红,等. 广陈皮总多糖对小鼠迟发型超敏反应的影响[J]. 广东药科大学学报,2019,35(6):779-782.
- [10] 陈进汝,吴道勋,张海珠,等. 云南松松塔提取物对免疫抑制和正常小鼠血常规的影响[J]. 亚太传统医药,2016,12(24):4-7.
- [11] 张珊珊,童微,胡婕伦,等. 铁皮石斛多糖不同分级组分对小鼠免疫调节及肠道健康的影响[J]. 中国食品学报,2019,19(12):14-21.
- [12] 时菲菲,王姐姐,曹金花,等. 双连续型党参多糖纳米乳对免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J]. 动物营养学报,2020,32(12):5925-5931.
- [13] 林颖韬,陈伶俐,胡雪峰. 免疫细胞的种类、功能及相关疾病概述[J]. 生物学教学,2020,45(4):77-80.
- [14] 王蓉,李胜男,陈春,等. 沙棘多糖对巨噬细胞和免疫抑制小鼠的免疫调节作用研究[J]. 中南药学,2020,18(3):384-388.
- [15] 甘思言,衣伟萌,乔石,等. 太子参参须提取物对免疫抑制小鼠血清免疫指标和抗氧化指标的影响[J]. 畜牧与兽医,2020,52(8):121-124.