

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.15.012

银参胶囊对小鼠免疫功能的调节作用*

刘玉明,蒋定文,李珂娴,陈伟,何颖[△]

(中国人民解放军海军特色医学中心,上海 200433)

摘要:目的 探讨银参胶囊对ICR小鼠的免疫调节作用。方法 取雄性昆明种SPF级ICR小鼠40只,分为对照组(等体积生理盐水)银参胶囊低、中、高剂量组(87.5,175.0,525.0 mg/kg),各10只,灌胃给药。30 d后,分别进行细胞免疫功能、体液免疫功能、单核-巨噬细胞吞噬能力及自然杀伤(NK)细胞活性的测定。结果 与对照组比较,银参胶囊高剂量组小鼠耳廓肿胀度显著升高($P < 0.01$);低、中、高剂量组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验的吞噬百分率及吞噬指数均显著高于对照组($P < 0.05$);中、高剂量组小鼠的NK细胞活性均显著高于对照组($P < 0.01$)。与对照组比较,低、中、高剂量组小鼠经刀豆蛋白A诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验光密度差值、血清半数溶血值(HC_{50})、琼脂糖平板法检测溶血空斑数、小鼠碳廓清实验吞噬指数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 银参胶囊不具有明显增强ICR小鼠淋巴细胞的增殖能力,以及产生血清溶血素、抗体生成细胞、碳廓清能力的作用,但可显著增强二硝基氟苯诱导的小鼠迟发性变态反应,增强小鼠免疫功能。

关键词:银参胶囊;细胞免疫;体液免疫;巨噬细胞;小鼠

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)15-0057-04

Regulating Effect of Yinshen Capsules on the Immune Function of Mice

LIU Yuming,JIANG Dingwen,LI Kexian,CHEN Wei,HE Ying

(Naval Characteristic Medical Center of PLA,Shanghai,China 200433)

Abstract: **Objective** To investigate the regulating effect of Yinshen Capsules on the immune function of ICR mice. **Methods** A total of 40 male, Kunming, SPF and ICR mice were selected and divided into the control group (equal volume of normal saline), Yinshen Capsules low-, medium- and high-dose groups (87.5, 175.0, 525.0 mg/kg), with 10 mice in each group. All mice were administrated by gavage. The cellular immunity function, the humoral immunity function, the mononuclear-macrophage phagocytic ability and the natural killer (NK) cell activity of the ICR mice were measured after 30 d. **Results** Compared with those in the control group, the auricle swelling degree in the Yinshen Capsules high-dose group was significantly higher ($P < 0.01$). The phagocytosis percentage and phagocytosis index in the test of the peritoneal macrophages phagocytizing chicken red blood cells in the Yinshen Capsules low-, medium- and high-dose groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The NK cell activities in the Yinshen Capsules medium- and high-dose groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). Compared with those in the control group, the optical density difference in the test of splenic lymphocyte transformation induced by concanavalin A, serum half value of hemolysis (HC_{50}), the number of plaque forming cell detected by the agarose plate method and the phagocytosis index of the carbon clearance test in the Yinshen Capsules low-, medium- and high-dose groups had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** Yinshen Capsules can not promote the proliferation of lymphocytes, the production of serum hemolysin and antibody producing cells or the ability of carbon clearance of ICR mice, but it can significantly enhance the delayed allergic reaction induced by dinitrofluorobenzene, and improve the immune function of mice.

Key words: Yinshen Capsules; cellular immunity; humoral immunity; macrophage; mice

在航海特殊作业环境中,海军部队常受辐射、噪声、振动、有害气体、天气炎热、空气潮湿等各种外来因素的侵袭,加之淡水缺乏、蔬菜较少,免疫功能下降已成为广大官兵的常见症状。近年来,随着海军战略转型的推进,由近海防御转向远海护卫,海军军事训练频次增多、任务加重^[1],高强度训练会引起机体免疫功能下降^[2]。增强部队官兵免疫力,有效提高作业能力和作战效能,这已是广大科学学者亟需研究的重要课题。银参胶囊以刺五加提取物、银耳提取物、维生素C等为主要原料,主治脾肾阳虚、体虚乏力、食欲不振^[3],对提高机

体免疫力有重要作用^[4-5]。《中药大辞典》《实用中药手册》记载,银耳滋阴润肺,养胃生津;《中国药用真菌图鉴》指出,银耳益气、强心、补肾,提高机体免疫功能作用良好^[6-7]。课题组之前已对银参胶囊的毒性^[8-9]、中试制备工艺^[10]和稳定性^[11]进行了研究。本研究中探讨了银参胶囊调节免疫系统的作用,为提高部队战斗力提供新品种。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器:AL204型电子天平(瑞士Mettler公司);LD5-2A

*基金项目:中国人民解放军海军特色医学中心横向合作项目[12F201]。

第一作者:刘玉明,男,博士,副研究员,研究方向为中药现代化和核辐射药物防护,(电子信箱)liuyuming888627@sohu.com。

[△]通信作者:何颖,女,博士,研究员,研究方向为海洋生物医药及新药开发,(电子信箱)yinghe_hys@163.com。

型离心机(北京医用离心机厂);550型酶标仪(Biorad公司);7200分光光度计(日本岛津公司);HERA cell 150i型CO₂培养箱(美国Thermo Electron公司);DHG-9140A型烤箱(上海慧泰仪器制造有限公司);XDS-1B型显微镜(重庆光电仪器有限公司);NU-430-400E型超净工作台(美国Nuaire公司)。

试药:银参胶囊(上海麦迪普生物有限公司,批号为Y12061331);刀豆蛋白A(ConA,上海Aladdin公司,批号为D1328039);二硝基氟苯(上海西亚试剂有限公司,批号为20120618);RPMI 1640培养液(Gibco公司,批号为6123018);小牛血清(杭州天杭生物科技有限公司,批号为121218);YAC-1细胞株(上海名劲生物科技有限公司);Giemsa染液(美国Sigma公司,批号为BCBF9150);碘伏消毒液(德州名德消毒科技有限公司,批号为20120202)。

动物:昆明种SPF级ICR小鼠40只,雄性,体质量(18±2)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,动物许可证号为SCXK(沪)2012-0002号,动物环境合格证号为SYXK(苏)2012-0037,均自由饮食。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药

分别按不同给药方法分为4组,每组10只。成人(按60 kg体质量计)每日推荐摄入量为1 050 mg,相当于每日摄入量为17.5 mg/kg,根据《保健食品检验与评价技术规范(卫生部2003)》(简称《规范2003》)要求,制备分别相当于成人推荐摄入量的5倍、10倍和30倍银参胶囊[剂量为87.5,175,525 mg/(kg·d)]。称取样品0.875,1.750,5.250 g,加入纯净水定容至200 mL,分别作为高、中、低剂量组受试液,灌胃给药,对照组以等体积纯净水灌胃,连续30 d。

1.2.2 对细胞免疫功能的影响

二硝基氟苯(DNFB)诱导的小鼠迟发性变态反应(DTH):在连续用药25 d后,将各组小鼠的腹部脱毛,致敏^[12],最后取耳片、称定质量,计算左右耳片质量之差作为肿胀度。

ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验(MTT法):连续用药30 d后,将各组小鼠脾组织无菌取出,制备脾细胞悬液^[13]。于570 nm波长处用酶标仪测定其光密度(A)值,以加ConA孔与不加ConA孔的A值的差值计算淋巴细胞的增殖能力。

1.2.3 对体液免疫功能的影响

小鼠血清溶血素测定:连续用药30 d后,将每只小鼠腹腔注射0.2 mL 2%(V/V)压积绵羊红细胞(SRBC),进行致敏^[14],计算各个样品的半数溶血值(HC₅₀),HC₅₀=样品光密度值/SRBC半数溶血时的光密度值×血清稀释倍数。

抗体生成细胞(PFC)检测(琼脂糖平板法):连续用药30 d后,将每只小鼠腹腔注射0.2 mL 2%(V/V)压积SRBC,进行致敏^[13],分别计数各样品溶血空斑数,用空斑数/10⁶脾细胞表示抗体生产细胞数。

1.2.4 单核巨噬细胞功能测定

小鼠碳廓清实验:连续用药30 d后,将小鼠尾静脉注射1:7(V/V)印度墨汁^[13],脱臼处死,分别取肝组织和脾组织,称定质量,并计算吞噬指数。

小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验:小鼠连续用药30 d后,给小鼠腹腔注射0.2 mL 2%(V/V)压积SRBC激活小鼠的巨噬细胞,颈椎脱臼处死小鼠。分别计算吞噬百分率和吞噬指数^[15]。

1.2.5 自然杀伤(NK)细胞活性测定

连续用药30 d后,将各组小鼠脾组织无菌取出,制备成脾细胞悬液,采用酶标仪于490 nm波长处测定A值。分别计算NK细胞活性^[16]。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行ANOVA分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNFB诱导的小鼠DTH

由表1可见,高、中、低剂量组小鼠耳廓肿胀度均高于对照组,经方差分析及两两比较显示,高剂量组差异具有统计学意义($P < 0.01$),表明银参胶囊可增强DNFB诱导的小鼠DTH。

表1 对小鼠耳廓迟发性变态反应的影响($\bar{X} \pm s$, mg, $n = 10$)
Tab.1 Effects on the delayed allergic reaction of auricle in mice ($\bar{X} \pm s$, mg, $n = 10$)

组别	耳廓肿胀度	P值
对照组	20.50 ± 5.32	
低剂量组	20.80 ± 5.06	0.885
中剂量组	24.20 ± 4.36	0.080
高剂量组	26.16 ± 3.37	0.009

2.2 ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验(MTT法)

由表2可见,高、中、低剂量组与对照组光密度差值经ANOVA分析,差异无统计学意义($P > 0.05$),表明银参胶囊不具有明显增强小鼠脾淋巴细胞增殖的能力。

表2 对小鼠脾淋巴细胞转化的影响($\bar{X} \pm s$, $n = 10$)
Tab.2 Effects on the splenic lymphocyte transformation of mice ($\bar{X} \pm s$, $n = 10$)

组别	光密度值		光密度差
	不加ConA	加ConA	
对照组	0.176 ± 0.019	0.628 ± 0.079	0.452 ± 0.073
低剂量组	0.191 ± 0.037	0.649 ± 0.161	0.458 ± 0.150
中剂量组	0.181 ± 0.013	0.692 ± 0.092	0.511 ± 0.094
高剂量组	0.179 ± 0.011	0.697 ± 0.054	0.518 ± 0.052

2.3 血清溶血素测定

由表3可见,高、中、低剂量组与对照组小鼠 HC_{50} 经ANOVA分析,差异无统计学意义($P > 0.05$),表明银参胶囊不具有明显增强小鼠产生血清溶血素的能力。

表3 对小鼠血清溶血素水平和脾抗体产生细胞量的影响
($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Tab.3 Effects on the serum hemolysin levels and the number of spleen antibody producing cells of mice ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	HC_{50}	空斑数 / 10^6 脾细胞
对照组	200.2 ± 4.68	216.3 ± 82.0
低剂量组	201.3 ± 2.38	216.6 ± 86.6
中剂量组	201.1 ± 3.70	234.5 ± 117.5
高剂量组	200.5 ± 4.36	223.6 ± 58.5

2.4 PFC检测(琼脂糖平板法)

由表3可见,高中低剂量组与对照组小鼠溶血空斑数经ANOVA分析,差异无统计学意义($P > 0.05$),表明银参胶囊不具有明显增强小鼠产生PFC的能力。

2.5 小鼠碳廓清实验

由表4可见,高、中、低剂量组与对照组小鼠廓清指数及吞噬指数经ANOVA分析,差异无统计学意义($P > 0.05$),表明银参胶囊不具有明显增强小鼠碳廓清能力的作用。

表4 对小鼠碳廓清的影响($\bar{X} \pm s, n = 10$)
Tab.4 Effects on the ability of carbon clearance of mice ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	廓清指标	吞噬指数
对照组	0.0374 ± 0.0070	5.586 ± 0.314
低剂量组	0.0365 ± 0.0048	5.776 ± 0.359
中剂量组	0.0401 ± 0.0095	5.887 ± 0.349
高剂量组	0.0389 ± 0.0084	5.894 ± 0.560

2.6 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

由表5可知,高、中、低剂量组小鼠的巨噬细胞吞噬百分率及吞噬指数均高于对照组,经方差分析和两两比较显示,低、中、高剂量组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明银参胶囊具有增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的作用。

表5 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响($\bar{X} \pm s, n = 10$)
Tab.5 Effects on the phagocytic ability of peritoneal macrophages of mice ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	吞噬百分率(%)	P 值	吞噬指数	P 值
对照组	9.80 ± 2.15		0.120 ± 0.037	
低剂量组	15.60 ± 5.68	0.005	0.196 ± 0.069	0.025
中剂量组	15.90 ± 5.45	0.004	0.201 ± 0.085	0.018
高剂量组	19.90 ± 5.43	0.000	0.289 ± 0.088	0.000

2.7 NK细胞活性测定

由表6可见,高、中、低剂量组小鼠的NK细胞活性均高于对照组,方差分析及两两比较显示,高剂量组与

对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明银参胶囊具有增强小鼠NK细胞活性的作用。

表6 对小鼠NK细胞活性的影响($\bar{X} \pm s, \%, n = 10$)
Tab.6 Effects on the NK cell activity of mice ($\bar{X} \pm s, \%, n = 10$)

组别	NK细胞活性	P 值
对照组	32.00 ± 3.32	
低剂量组	33.46 ± 7.19	0.599
中剂量组	34.91 ± 6.19	0.270
高剂量组	50.41 ± 5.70	0.000

3 讨论

免疫是指机体识别和排除抗原性异物,维持自身生理动态平衡与相对稳定的功能^[17]。机体的免疫功能分为特异性和非特异免疫,特异性免疫又分为细胞免疫和体液免疫,非特异性免疫主要以吞噬系统功能为主要判断指标及NK细胞功能指标。参与细胞免疫的主要是T淋巴细胞,其受到抗原刺激后,会转化为致敏淋巴细胞,并表现出特异性免疫应答^[18]。参与体液免疫的主要是B淋巴细胞,抗体生成细胞和血清溶血素测定是经典的体液免疫试验。机体参与非特异性免疫主要是吞噬细胞和NK细胞,无需对其抗原进行识别,即可直接发挥免疫作用。

机体免疫功能低下或紊乱均可能导致多种疾病发生,免疫调节药物作用于免疫反应的不同环节,具有不同的作用机制。由表1可知,与对照组比较,高剂量组小鼠耳廓肿胀度的差异有统计学意义($P < 0.01$)。银参胶囊可增强DNFB诱导的小鼠DHT作用,在细胞免疫功能方面具有一定作用。由表3可知,与对照组比较,高、中、低剂量组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。银参胶囊不具有产生血清溶血素的能力,以及增强小鼠产生PFC的能力,表明银参胶囊在体液免疫功能方面未发挥作用。由表5和表6可知,与对照组比较,高、中、低剂量组的差异有统计学意义($P < 0.05$)。银参胶囊可明显增强单核-巨噬细胞的功能。

根据《规范2003》中增强免疫力功能评价标准,在细胞免疫功能、体液免疫功能、单核巨噬细胞功能、NK细胞活性4项功能实验中,如果有2个功能检测呈阳性,则可判断样品具有增强免疫力的作用。

综上所述,银参胶囊主要成分包括刺五加多糖和银耳多糖,植物多糖作为植物的重要活性成分,对免疫调节的作用主要表现为免疫增强,其作用机制可能与激活巨噬细胞、激活补体系统、调节蛋白质的合成和抗体的生成,达到影响机体的免疫功能,同时调节神经-内分泌-免疫系统,提高免疫系统对抗原的识别能力。但银参胶囊增强免疫功能的具体作用机制和功效因子尚须进一步深入研究。

参考文献

[1] 王新伟. 海军水面舰艇官兵训练伤发生特点与干预策略研