

复合白刺籽油软胶囊免疫调节作用研究

丁晨旭^{1,2}, 索有瑞^{1*}, 李玉林^{1,2}, 王洪伦^{1,2}, 王凌云^{1,2}, 王小艳^{1,2}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所,青海 西宁 810001; 2 中国科学院研究生院,北京 100039)

关键词:复合白刺籽油软胶囊; 调节; 免疫能力

中图分类号: R285.6

文献标识码: B

文章编号: 1001-1528(2008)01-0125-03

唐古特白刺 (*Nitraria tangutonm* Bohr) 是蒺藜科白刺属的一个品种,在柴达木盆地的沙漠绿洲边缘,盐碱沙滩地大量分布,生长环境海拔 1 900 ~ 3 500 m,分布面积约 25 万 km²。据我们调查,盆地相对集中成片具有开发价值的天然白刺林约 50 ~ 60 万亩,每年产白刺鲜果 5 ~ 10 万吨。具有较高的经济和药用价值^[1,2];同时白刺作为防风固沙的优势灌木,在生态环境保护中具有重要的作用^[3]。

柴达木盆地特殊的生境和气候条件造就了唐古特白刺果实中含有极为丰富的可提高人体免疫功能的氨基酸、维生素、黄酮、皂苷、矿物质元素等营养素和活性成分,民间食用和临床观察白刺果实制品均证明白刺有较为显著的提高人体免疫功能、抗疲劳、耐寒冷以及抗缺氧等应激能力。为了配合国家西部开发,通过资源开发利用达到生态环境保护的目的,我们对白刺资源进行了系统研究,证明白刺果实具有降血糖、降血脂和抗氧化等作用^[4,5]。本文旨在观察以唐古特白刺籽油为主料研制的复合白刺籽油软胶囊(商品名:活力源软胶囊)的免疫调节作用,为白刺深度开发和综合利用,研制调节机体免疫功能的天然保健食品和药品,提供较为翔实的科学依据。

1 实验材料

1.1 实验药物

复合白刺籽油软胶囊(商品名:活力源软胶囊)为乳白色药用明胶软胶囊,规格为 700 mg/粒,内容为黄色油状物,装量为 500 mg/粒。成人推荐日口服内容物剂量为 2 000 mg。项目组研制,委托青海明杏公司加工软胶囊。

1.2 实验动物

昆明种小白鼠,由兰州医学院实验动物中心提供(实验动物合格证:医动字第 14-006号)。

1.3 药品和试剂

环磷酰胺:上海华联制药有限公司,用前以生理盐水配成 0.8% 的溶液。2,4-二硝基氯苯(DNCB):上海试剂厂。都氏试剂:称取 NaHCO₃ 1.0 g, KCN 0.05 g,高铁氰化钾 0.2 g 溶于水后,稀释成 1 000 mL。绵羊红细胞悬液:绵羊血液采自西宁市城西屠宰场。二苯胺:天津化学试剂二厂。脱

氧核糖核酸:美国 Sigama 公司。

1.4 仪器

CARY300 Bio 紫外-可见光分光光度仪,美国 VARAN 公司出品。低温冰箱、恒温培养箱、离心机、水浴锅等。

2 实验方法

2.1 对单核巨噬细胞吞噬功能的影响

随机将 50 只小鼠分成空白对照组、环磷酰胺模型组和复合白刺籽油软胶囊低、中、高剂量 + 环磷酰胺组,每组 10 只,兼用。每日灌胃给予受试物,连续 28 d,给予受试物的第 24 天、第 26 天除空白对照外,其它各组小鼠腹腔注射环磷酰胺(CPA) 80 mg/kg,末次给药 1 h 后,用 1:4 稀释的印度墨汁,按每鼠 10 g 体重 0.1 mL 量尾静脉注射,注射后立即计时,间隔 2 min 和 10 min 分别从内眦静脉丛取血 20 μ L,并将其加到 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中,在分光光度计上于 600 nm 处测定吸光度,用 Na₂CO₃ 溶液做空白对照。将小鼠处死,取肝脏、脾脏,称重。以廓清指数(K)和吞噬指数(a)表示小鼠碳廓清能力。

2.2 细胞免疫功能试验-2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱导迟发型超敏反应和胸腺、脾脏重量测定

正常小鼠试验:随机将 40 只小鼠分成空白对照组、复合白刺籽油软胶囊低、中、高剂量组,每组 10 只,兼用。灌胃给予受试物,连续 28 d,对照组给予同体积蒸馏水。给药第 24 天,小鼠腹部去毛,用 1% 2,4-二硝基氯苯(DNCB)乙醇液 10 μ L 涂布,使腹部皮肤致敏。另于致敏后第 11 天,用 1% DNCB 橄榄油 10 μ L 涂布右耳,24 h 后处死小鼠,以左右两耳重量之差做为迟发型超敏反应值,同时取小鼠胸腺和脾脏称重,计算小鼠胸腺和脾脏指数(mg/10 g 体重)。

环磷酰胺模型小鼠试验:随机将 50 只小鼠分成空白对照组、环磷酰胺(CPA)模型组,复合白刺籽油软胶囊低、中、高剂量 + 环磷酰胺组,每组 10 只,兼用,对照组和 CPA 模型组灌胃同体积自来水,给药第 4 天,于小鼠腹部剪毛区,用 5% 2,4-二硝基氯苯(DNCB)乙醇液 10 μ L 涂布,使腹部皮肤致敏,给药第 9 天开始,连续 3 d 腹腔注射 0.8% 的 CPA 注射液 80 mg/kg,每天 1 次,对照组和复合白刺籽油软胶囊

收稿日期:2007-01-10

基金项目:青海省重点科技攻关计划(2003-G-146)和中国科学院“西部之光”人才培养计划(20060001)资助。

作者简介:丁晨旭(1973~),男,博士生,助理研究员。从事天然产物化学和野生植物资源开发利用研究。

*通讯作者:索有瑞,研究员,博士生导师, E-mail: yrsuo@nwipb.ac.cn; 电话:0971-6143857。

组腹腔注射同体积生理盐水。另于给药第 11 天,用 1% DNCB 橄榄油 10 μ L 涂布右耳,24 h 后处死小鼠,以左右两耳重量之差做为迟发型超敏反应值,同时取小鼠胸腺和脾脏称重,计算小鼠胸腺和脾脏指数 (mg/10 g 体重)。

2.3 体液免疫功能试验—小鼠血清溶血素测定

环磷酰胺模型小鼠试验:健康小白鼠,各半,体重 (22 \pm 2) g,随机分为对照组、复合白刺籽油软胶囊 2 g/kg 组、CPA 模型组、CPA + 复合白刺籽油软胶囊 1 g/kg、2 g/kg 组、CPA + 左旋咪唑 25 mg/kg 组。灌胃给药每天 1 次,连续 14 d,对照组和 CPA 模型组灌胃同体积自来水,给药第 10 天,每鼠腹腔注射 3-5 (V/V) 稀释的 SRBC 悬液 0.2 mL,1 h 后再腹腔注射 0.8% 的 CPA 注射液 80 mg/kg,每天 1 次,连续 3 d,对照组和复合白刺籽油软胶囊组腹腔注射同体积生理盐水。免疫 4 d 后,于末次给药 1.5 h,摘眼球取血,分离血清,并用生理盐水 1:250 稀释,在该血清中加入 10% SRBC 悬液和 1:10 稀释的豚鼠血清 (补体),37 $^{\circ}$ C 温箱中保温,冰浴,离心,取上清液加都氏试剂,540 nm 比色测定。

另取上述半量 SRBC 悬液,加都氏试剂,同样比色,该吸收度即为 SRBC 半数溶血吸收度。计算样品的 50% 溶血值 (HC_{50})。

2.4 环磷酰胺模型小鼠胸腺 DNA 含量测定

健康小白鼠 50 只,各半,体重 (21.7 \pm 1.8) g,随机分为 5 组。复合白刺籽油软胶囊灌胃给药,每天 1 次,连续 14 d,给药第 6 天、第 10 天除空白对照 (生理盐水) 外,其它各组小鼠腹腔注射环磷酰胺 (CPA) 40 mg/kg,末次给药 1 h 后按文献方法^[9]制备核酸提取液,用二苯胺法测定小鼠胸腺 DNA 含量。

3 实验结果

3.1 复合白刺籽油软胶囊对正常小鼠体重的影响

各实验组小鼠试验开始体重、中期体重和试验结束体重变化情况见表 1。与同期空白对照组比较,复合白刺籽油软胶囊各剂量组小鼠体重变化无显著性差异,说明复合白刺籽油软胶囊对小鼠的体重无显著性影响。

表 1 复合白刺籽油软胶囊对小鼠体重的影响

组别	剂量 / mg/kg	n	体重 / g			体重差异
			开始体重	中期体重	结束体重	
空白对照组	0	10	20.7 \pm 1.7	24.7 \pm 1.9	29.0 \pm 1.6	8.3 \pm 0.6
低剂量组	33	10	21.2 \pm 1.5	25.1 \pm 1.5	29.3 \pm 1.8	8.1 \pm 0.7
中剂量组	67	10	20.6 \pm 1.6	25.3 \pm 1.5	28.6 \pm 1.7	8.0 \pm 0.8
高剂量组	100	10	20.9 \pm 1.8	24.6 \pm 1.4	28.7 \pm 1.7	7.8 \pm 0.8

3.2 复合白刺籽油软胶囊对正常和环磷酰胺 (Cy) 免疫抑制小鼠单核吞噬细胞功能的影响

对正常小鼠的影响:结果见表 2,复合白刺籽油软胶囊对正常小鼠的碳廓清指数有提高的趋势,但差异无显著性;而中、高剂量组的吞噬指数显著高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明复合白刺籽油软胶囊可提高正常小鼠的碳粒廓清能力。

对环磷酰胺致变小鼠的影响:结果见表 2,环磷酰胺模型小鼠炭粒廓清能力比空白对照组显著下降,廓清指数 K 值极显著降低 ($P < 0.001$);吞噬指数 α 值也明显降低 ($P < 0.05$)。而复合白刺籽油软胶囊各灌胃剂量均能显著提高环磷酰胺诱导的免疫力低下小鼠的碳粒廓清能力, K 值及 α 值明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),并且有良好的量效线性关系。

表 2 复合白刺籽油软胶囊对小鼠单核巨噬细胞吞噬功能的影响

组别	剂量 / mg/kg	n	廓清指数 / K	吞噬指数 / α
空白对照组	0	10	0.038 1 \pm 0.007 6	4.98 \pm 0.53
低剂量	33	10	0.038 6 \pm 0.005 3	5.16 \pm 0.66
中剂量组	66	10	0.039 3 \pm 0.003 9	5.71 \pm 0.69
高剂量组	100	10	0.039 0 \pm 0.004 8	6.28 \pm 0.71
空白对照组	0	10	0.039 1 \pm 0.007 1	4.98 \pm 0.53
模型组	0	10	0.027 2 \pm 0.005 3	4.47 \pm 0.66
低剂量 + CPA 组	33	10	0.031 4 \pm 0.006 5*	5.06 \pm 0.77*
中剂量 + CPA 组	66	10	0.034 2 \pm 0.004 4*	5.21 \pm 0.68*
高剂量 + CPA 组	100	10	0.037 9 \pm 0.005 6**	5.56 \pm 0.73**

注:与对照组相比 * $P < 0.05$, * $P < 0.01$, * $P < 0.001$;与 CPA 模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.3 复合白刺籽油软胶囊对小鼠 DNCB 诱导的迟发型超敏反应和胸腺、脾脏重量的影响

对正常小鼠的影响:结果表明 (表 3),复合白刺籽油软胶囊中、高剂量组能显著提高小鼠耳肿胀度 ($P < 0.05$, $P <$

0.01),即复合白刺籽油软胶囊可增强小鼠迟发型超敏反应,结果说明复合白刺籽油软胶囊对正常小鼠有一定的免疫促进作用。对正常小鼠的脾脏/体重比值和胸腺/体重比值本品无明显的影响。

表 3 复合白刺籽油软胶囊对正常小鼠迟发型超敏反应和脏器体重比的影响

组别	剂量 /mg/kg	n	肿胀 /mg	胸腺 体重 /mg/10 g	脾脏 体重 /mg/10 g
空白对照组	0	10	7.93 ±1.60	25.73 ±4.86	48.76 ±5.21
低剂量组	33	10	8.21 ±1.44	26.17 ±2.51	49.31 ±4.38
中剂量组	66	10	9.76 ±1.36*	27.21 ±3.01	49.24 ±6.14
高剂量组	100	10	11.52 ±1.17**	27.56 ±2.76	51.06 ±4.07

注:与对照组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01。

对环磷酰胺致变小鼠的影响:测定结果见表 4。结果表明,复合白刺籽油软胶囊中、高剂量能明显升高 CPA 所致免疫功能低下小鼠的耳肿胀程度和胸腺 体重比 (P < 0.05, P

< 0.01),同时高剂量也显著提高小鼠的脾脏 体重比,说明活力源可增强小鼠迟发型超敏反应,对免疫功能低下的小鼠,具有显著提高其免疫功能的作用。

表 4 复合白刺籽油软胶囊对环磷酰胺致小鼠迟发型超敏反应和小鼠脏器 体重比下降的抑制作用

组别	剂量 /mg/kg	n	肿胀 /mg	胸腺 体重 /mg/10 g	脾脏 体重 /mg/10 g
空白对照组	0	10	7.93 ±1.60	25.73 ±4.86	48.76 ±5.21
模型组	0	10	2.93 ±1.14	17.24 ±3.17	39.56 ±3.76
低剂量 + CPA 组	33	10	3.24 ±1.17	19.34 ±4.21	42.34 ±5.11
中剂量 + CPA 组	66	10	4.78 ±1.36*	21.67 ±2.94*	43.76 ±4.57
高剂量 + CPA 组	100	10	5.77 ±1.21**	23.81 ±2.34**	46.37 ±4.19*

注:与对照组相比 P < 0.01, P < 0.001;与 CPA 模型组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01。

3.4 复合白刺籽油软胶囊对正常和环磷酰胺 (Cy)致变小鼠血清溶血素水平的影响

对正常小鼠的影响:实验结果见表 5。结果显示,复合白刺籽油软胶囊可以提高正常小鼠血清溶血素水平,并且量效关系明确,中、高剂量组的溶血素水平显著高于对照组。表明复合白刺籽油软胶囊对正常小鼠体液免疫功能有提高作用,提示服用复合白刺籽油软胶囊可提高人体免疫功能。

对环磷酰胺致变小鼠的影响:实验结果见表 5。结果表明,CPA 可造成小鼠溶血素水平极度下降,形成免疫抑制模型。复合白刺籽油软胶囊各剂量组对 CPA 所致小鼠血清溶血素水平的低下,具有极为显著的拮抗作用。结果提示对 CPA 所致的体液免疫功能低下的小鼠,复合白刺籽油软胶囊具有显著的改善与提高作用,即复合白刺籽油软胶囊有显著提高机体免疫功能的保健作用。

表 5 复合白刺籽油软胶囊对小鼠血清溶血素水平的影响

组别	剂量 /mg/kg	n	血清溶血素 值 /HC ₅₀)
空白组	0	10	254.3 ±24.6
低剂量组	33	10	260.1 ±30.4
中剂量组	67	10	281.3 ±17.6
高剂量组	100	10	306.7 ±25.1
模型组	0	10	126.7 ±14.3
低剂量 + CPA 组	33	10	157.8 ±15.7*
中剂量 + CPA 组	67	10	173.6 ±19.2**
高剂量 + CPA 组	100	10	196.4 ±21.4**

注:与对照组相比 P < 0.05, P < 0.001;与 CPA 模型组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。

3.5 复合白刺籽油软胶囊对小鼠胸腺 DNA 含量的影响

如表 6 所示,环磷酰胺模型小鼠的胸腺 DNA 含量比空白对照组显著降低 (P < 0.001),复合白刺籽油软胶囊各剂

量组均能显著增加环磷酰胺致免疫功能低下小鼠胸腺 DNA 含量,并且量效关系非常显著。

表 6 复合白刺籽油软胶囊对环磷酰胺模型小鼠胸腺 DNA 含量的影响

组别	剂量 /mg/kg	n	胸腺 DNA 含量 /%
空白对照组	0	10	3.76 ±0.51
模型组	0	10	1.93 ±0.44
低剂量 + CPA 组	33	10	2.34 ±0.39*
中剂量 + CPA 组	67	10	2.67 ±0.61**
高剂量 + CPA 组	100	10	2.97 ±0.52***

注:与对照组相比 P < 0.001;与 CPA 模型组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。

4 复合白刺籽油软胶囊免疫调节功能讨论与评价

一些学者认为,多数中药的作用有其病理性和整体性等特点,机体的自稳态 (内环境恒定)未被破坏之前,其储备能力很强,除非是药性极偏的大热、大寒、大毒的中药,一般药性不太偏的药物对健康人或正常动物的影响不很显著,对于保健食品而言,其保健作用温和,更在于整体调理性。因此研究中药和保健食品对免疫系统的影响,以病态模型进行研究效果较为理想。考虑到免疫调节保健食品的适宜人群和应用范围,本项研究既采用了正常动物,又采用了免疫功能低下的模型动物。

在中药免疫药理学和保健食品功效学研究中,较常用的免疫功能低下的动物模型是用环磷酰胺造成。因此本项系列功效学试验中,除了正常动物外,主要研究了复合白刺籽油软胶囊对环磷酰胺模型动物各项免疫生化指标的影响。

从实验结果分析,复合白刺籽油软胶囊能显著拮抗环磷酰胺对小鼠炭粒廓清能力、迟发型超敏反应的抑制作用;能够显著拮抗环磷酰胺对小鼠血清溶血素水平的抑制作用。

表明复合白刺籽油软胶囊既能提高体液免疫功能,又能增强细胞免疫功能。

胸腺是生物体的一个重要免疫中枢,是 T淋巴细胞分化与成熟的核心组织,同时又是产生多种免疫因子的基地,胸腺上皮细胞产生与释放胸腺肽,对前体 T淋巴细胞分化为成熟免疫活性 T细胞具有重要作用。而且对复合白刺籽油软胶囊免疫调节作用的可能机制提供了药理学实验依据。本项试验结果表明,环磷酰胺能显著抑制胸腺组织中 DNA 合成,使胸腺组织中的 DNA 含量显著降低,小鼠给予复合白刺籽油软胶囊,可显著产生拮抗作用,明显提高环磷酰胺致免疫功能低下小鼠胸腺中 DNA 含量,从另一个角度反映出复合白刺籽油软胶囊具有显著的免疫调节功能。

参考文献:

[1] 江苏新医学院编. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版

社, 1977: 644-647.

- [2] Duan J A, Williams ID, Che C T, et al. Tangutorine: A Novel - Carboline Alkaloid from *Nitratia tangutonom* [J]. *Tetrahedron Letters*, 1999, 40: 2591-2599.
- [3] 李天才, 索有瑞. 红珍珠降糖胶囊开发研究的生态学意义 [J]. 青海科技, 2001, (5): 35-37.
- [4] 索有瑞, 王洪伦, 汪汉卿. 柴达木盆地唐古特白刺果实降血脂和抗氧化作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(1): 54-58.
- [5] 索有瑞, 汪汉卿. 青海柴达木盆地唐古特白刺果实的降血糖作用研究 [J]. 食品科学, 2004, 25(7): 164-167.

微米复方黄连制剂对高脂饮食喂养家兔炎症因子表达的影响

王 斌, 管思明, 李西栋

(华中科技大学同济医学院附属协和医院老年病科, 湖北 武汉 430022)

关键词: 微米; 黄连; 血脂; C反应蛋白; 白介素 -1; 肿瘤坏死因子 - ; 动脉粥样硬化

中图分类号: R285.6

文献标识码: B

文章编号: 1001-1528(2008)01-0128-02

黄连解毒汤出自《外台秘要》,由黄连、黄芩、黄柏、栀子组成,为常用清热解暑代表方。近年已有报道发现该方具有抑制细胞黏附^[1],并可抑制小鼠球囊损伤的颈动脉的再狭窄,并抑制血管平滑肌细胞的增殖^[2],从而表现出抗动脉粥样硬化的作用,但其作用机制尚未完全阐明。本研究在黄连解毒汤基础上加入甘草调节上述药物的苦寒特性,并将其加工成 10~100 μm 级颗粒,探讨微米复方黄连制剂抗动脉粥样硬化的作用及其机制。

1 材料

1.1 微米复方黄连制剂及试剂盒:取黄连、黄芩、黄柏、栀子、甘草按一定比例均匀混合,于武汉理工大学加工成 10~100 μm 粉末备用。家兔血清 CRP、L-1 及 TNF-α ELISA 试剂盒购自上海天呈生物制品有限公司。

1.2 实验动物及分组:选纯种健康 性大白兔 24 只,体重 2.0~2.5 kg,兔龄 3 个月,随机分为对照组、高脂饮食组和微米复方黄连制剂治疗组,每组各 8 只,单笼喂养。

2 方法

对照组喂饲普通颗粒饲料;高脂饮食组每日喂饲 150 g

高脂饲料(含 1.5%胆固醇和 5%猪油);治疗组在喂饲高脂饮食基础上加喂微米复方黄连制剂粉末 5 g/d。以上 3 组动物均自由饮水,喂养 16 周。分别于喂养开始、喂养后 8 周及 16 周取兔耳正中动脉血数毫升于 4~1500 r/min,离心 15 min,取血清存于 -20℃ 冰箱中备用。对家兔主动脉进行病理切片观察光镜、电镜结构,血脂用自动生化分析仪测定。ELISA 法检测血清 CRP、L-1 及 TNF-α,所有操作均严格按试剂盒说明书进行。各数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为统计学上差异具有显著性。

3 结果

3.1 主动脉内膜病理变化

主动脉内膜肉眼变化:苏丹 III 染色,斑块染成红色。正常对照组内膜光滑,未见脂质斑块及脂纹变化。高脂饮食组内膜可见明显脂质斑块及脂纹病变,所有动物的主动脉内膜几乎完全被粗糙不平隆起的脂质斑块覆盖,并融合成片。复方微米黄连制剂组动物的主动脉内膜仅见针尖到绿豆大小的斑块。

收稿日期: 2007-01-10

基金项目: 中央保健委员会资助课题(鄂 C015)

作者简介:王 斌(1972~),男,主治医师,硕士,从事动脉粥样硬化的发病机制及其防治的研究,电话: 027-85351545, E-mail: wangbin721025@163.com.