

# 灵芪颗粒对小鼠免疫功能的影响

徐玥玮<sup>1,2</sup>, 陈光亮<sup>1</sup>

(1. 安徽中医药大学中西医结合临床学院, 安徽 合肥 230038;

2. 安徽中医药大学第二附属医院, 安徽 合肥 230061)

**[摘要]**目的 观察灵芪颗粒对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠和正常小鼠免疫功能的影响。方法 小鼠腹腔注射环磷酰胺, 复制免疫功能低下模型, 观察灵芪颗粒对小鼠血白细胞数、淋巴细胞数、T淋巴细胞转化率、NK细胞活性、碳粒廓清和免疫器官脏器系数的影响; 观察灵芪颗粒对正常小鼠溶血素、溶血空斑数和2,4-二硝基氟苯介导的皮肤迟发性超敏反应的影响。结果 灵芪颗粒能明显提高环磷酰胺致免疫功能低下小鼠的脾T淋巴细胞转化能力、NK细胞活性和碳粒廓清能力, 增加外周血白细胞数和淋巴细胞数, 并减轻免疫器官(脾、胸腺)的萎缩。灵芪颗粒能明显增加正常小鼠的半数溶血值和溶血空斑数, 并增强2,4-二硝基氟苯介导的小鼠迟发性超敏反应。结论 灵芪颗粒能增强小鼠的特异性免疫和非特异性免疫。

**[关键词]**灵芪颗粒; 环磷酰胺; 免疫功能低下; 细胞免疫; 体液免疫

**[中图分类号]**R573 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2017.01.018

灵芪颗粒为皖南徽州名老中医徐明德的祖传验方, 结合徐文龙临床经验总结而成。主要由灵芝、黄芪、茯苓、大枣等组成, 具有扶正固本、滋补强壮、延年益寿、安神镇静的功效, 主要用于免疫功能低下、年老体弱、倦怠乏力等症, 临床疗效显著。本研究拟观察灵芪颗粒对小鼠免疫功能的影响, 为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料

1.1 动物 SPF级昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量18~22 g, 由安徽省实验动物中心提供, 生产许可证号为SCXK(皖)2015-002号。

1.2 药物 灵芪颗粒: 安徽中医药大学第二附属医院制剂室配制, 批号20150511, 每10 g颗粒含生药量为9 g; 黄芪颗粒: 四川百利药业有限责任公司生产, 批号140108。

1.3 试剂 环磷酰胺注射液: 吉林省通化茂祥制药有限公司, 批号20150701; 刀豆球蛋白A (concanavalin A, ConA)、四甲基偶氮噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT): Sigma产品; NP40裂解液: 碧云天生物技术有限公司; Hanks液、RPMI 1640培养液: 美国Gibco产品; 绵羊红细胞 (sheep red blood cell, SRBC): 北京兰伯瑞生物技术有限责任公司; 2,4-二硝基氟苯 (dinitrofluorobenzene, DNFB): 上海试剂一厂; YAC-1细胞: 购自上海复祥生物科技有限公司; 印度墨汁: 北京笃信精细制剂

厂; 异丙醇: 天津生化三厂; 丙酮: 广东省东莞市源滔化工有限公司。

1.4 实验仪器 KX-21N血细胞分析测定仪: SYS-MEX希森美康医用电子有限公司; CO<sub>2</sub>培养箱: 上海精密仪器仪表公司; 754紫外分光光度计: 上海光学仪器厂; Stat Fax 2100-酶标仪: 美国Awareness公司; 3K15-低温离心机: 德国Sigma公司生产。

## 2 方法

2.1 灵芪颗粒对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠外周血白细胞、T淋巴细胞转化能力、NK细胞活性的影响 取昆明种小鼠60只, 雌雄各半, 随机分成6组, 每组10只, 分别为正常组, 模型组, 黄芪颗粒组(1.5 g/kg), 灵芪颗粒高剂量(9.0 g/kg)、中剂量(4.5 g/kg)、低剂量(2.3 g/kg)组。灌胃给药, 每日1次, 连续14 d, 正常组和模型组给予等容积蒸馏水; 第11天, 除正常组外其余各组小鼠腹腔注射环磷酰胺80 mg/kg, 连续3 d<sup>[1]</sup>, 正常组腹腔注射等容积生理盐水。

2.1.1 外周血白细胞和淋巴细胞计数 于末次给药1 h后, 摘眼球取血, 采用KX-21N血细胞分析测定仪, 测定小鼠外周血白细胞数和淋巴细胞数。

2.1.2 T淋巴细胞转化能力测定 处死小鼠, 无菌取脾, 置于盛有Hanks液的平皿中, 剪碎, 制成单个细胞悬液。采用MTT法<sup>[2]</sup>测定小鼠脾T淋巴细胞转化能力。T淋巴细胞转化能力 = ConA孔的光密度(optical density, OD)值 - 不加ConA孔的OD值。

2.1.3 NK细胞活性测定 制备脾细胞悬液, 采用乳酸脱氢酶法测定NK细胞活性。NK细胞活性 = [靶细胞OD值 - 实验组OD值] / 靶细胞OD值 ×

**基金项目:** 安徽中医药大学校级探索性科研项目(2016ts015)

**作者简介:** 徐玥玮(1985-), 女, 硕士研究生

**通信作者:** 陈光亮, [chguangl@163.com](mailto:chguangl@163.com)

100%。靶细胞是 YAC-1 细胞。

2.2 灵芪颗粒对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠碳粒廓清和脏器系数的影响<sup>[3]</sup> 昆明种小鼠 60 只,雌雄各半,分组与给药同“2.1”项。于末次灌胃给药 1 h 后,每鼠尾静脉注射 35% 印度墨汁(10 mL/kg),注射后 1 min( $t_1$ )和 5 min( $t_2$ )分别从小鼠眼眶后静脉丛取血 20  $\mu$ L,加入 2 mL 0.1% 碳酸钠溶液中,摇匀,于 650 nm 波长测定 OD 值,计算碳粒廓清指数(K)。K=[lg(OD1)-lg(OD2)]/( $t_2-t_1$ )。处死小鼠,取胸腺、肝脏和脾脏,称质量,计算胸腺和脾脏系数,并计算吞噬指数( $\alpha$ )。 $\alpha$ =体质量 $\times$ K<sup>1/3</sup>/(肝质量+脾质量)。

2.3 灵芪颗粒对正常小鼠溶血素和脾细胞溶血空斑数的影响<sup>[4]</sup> 取昆明种小鼠 50 只,雌雄各半,随机分成 5 组,每组 10 只,分别为正常组,灵芪颗粒高剂量(9.0 g/kg)、中剂量(4.5 g/kg)、低剂量(2.3 g/kg)组和黄芪颗粒(1.5 g/kg)组。灌胃给药,每日 1 次,连续 2 周,正常组以等容量蒸馏水灌胃。

2.3.1 半数溶血值(HC<sub>50</sub>)测定 每只小鼠腹腔注射 2% SRBC 0.2 mL,免疫 4 d 后,摘眼球取血,分离血清,用生理盐水稀释血清 200 倍,取 1 mL 加入试管,加 10% SRBC 0.5 mL 和补体(用生理盐水稀释 10 倍的豚鼠血清)1 mL。另设对照管。置 37  $^{\circ}$ C 水浴中保温 10 min,冰浴终止反应,2 000 r/min 离心 10 min。取上清 1 mL,都氏试剂 3 mL 加入试管内。取 10% SRBC 0.25 mL,加都氏试剂至 4 mL,于另一试管内充分混匀,放置 1 min。于 540 nm 波长处以对照管作空白,测定各管光密度值。HC<sub>50</sub>=受试药光密度值/SRBC 半数溶血时的光密度值 $\times$ 稀释倍数。

2.3.2 脾细胞溶血空斑数测量 上述小鼠摘眼球取血处死后,取脾,置含冷 Hanks 液的培养皿中,将脾在 100 目不锈钢网上研磨后,再经 200 目不锈钢网过滤,然后将细胞收集于刻度离心管中(将试管置冰浴中)。用 Hanks 液悬浮细胞,调细胞浓度到 2 $\times$

10<sup>6</sup>/mL。将表层培养基加热溶解后,与等量双倍 Hanks 液混合,分装小试管,每管 0.5 mL,再向管内加 50  $\mu$ L 10% SRBC、10  $\mu$ L 脾细胞悬液,混匀倾倒入琼脂糖玻片上,放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中温育 1.5 h,然后加补体,继续温育 1.5 h,计数溶血空斑数。

2.4 灵芪颗粒对小鼠迟发性超敏反应的影响<sup>[5]</sup> 取昆明种小鼠 60 只,雌雄各半,按体质量随机分为 6 组:正常组,模型组,黄芪颗粒(1.5 g/kg)组和灵芪颗粒高剂量(9.0 g/kg)、中剂量(4.5 g/kg)、低剂量(2.3 g/kg)组,每组 10 只。正常组、模型组给予等容量生理盐水,灌胃给药,每日 1 次,连续 7 d,给药第 2 天,小鼠腹部皮肤脱毛 3 cm $\times$ 3 cm。除正常组外,其余各组将 1% DNFB 溶液(溶媒为丙酮和麻油 1:1)50  $\mu$ L 均匀涂于去毛皮肤上,次日同剂量再涂 1 次。末次给药 1 h 后,将 1% DNFB 10  $\mu$ L 涂于小鼠右耳两面,24 h 后处死小鼠,用打孔器在两耳相同部位打取耳片、称质量。左右耳片质量之差为耳肿胀度<sup>[4]</sup>。

2.5 统计学方法 全部数据采用 SPSS 17.0 软件进行处理。连续型变量采用“均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )”进行统计学描述。多组间均数比较采用单因素方差分析,差异有显著性时,两组间均数比较采用 SNK 法。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 灵芪颗粒对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠外周血白细胞计数、脾 T 淋巴细胞转化率、NK 细胞活性的影响 与对照组比较,模型组小鼠外周血白细胞和淋巴细胞数量明显减少( $P<0.05$ ),脾 T 淋巴细胞转化率和 NK 细胞活性均显著下降( $P<0.05$ ),提示免疫功能低下小鼠模型复制成功。灵芪颗粒高、中、低剂量组和黄芪颗粒组小鼠外周血白细胞和淋巴细胞计数明显增加( $P<0.05$ ),提示灵芪颗粒和黄芪颗粒均能增强 ConA 诱导的脾 T 淋巴细胞转化能力和 NK 细胞活性。见表 1。

表 1 灵芪颗粒对免疫功能低下小鼠血白细胞计数、淋巴细胞计数、脾 T 淋巴细胞转化率和 NK 细胞活性的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	白细胞计数/ (10 <sup>9</sup> /L)	淋巴细胞计数/ (10 <sup>9</sup> /L)	脾 T 淋巴细胞转化 能力/OD 值	脾 NK 细胞活性/ %
正常	10	6.8 $\pm$ 0.7	4.3 $\pm$ 0.5	0.280 $\pm$ 0.045	16.25 $\pm$ 4.68
模型	10	3.4 $\pm$ 0.5*	2.1 $\pm$ 0.4*	0.130 $\pm$ 0.027*	8.37 $\pm$ 2.41*
黄芪颗粒	10	4.0 $\pm$ 0.6 <sup>#</sup>	3.0 $\pm$ 0.8 <sup>#</sup>	0.190 $\pm$ 0.056 <sup>#</sup>	12.03 $\pm$ 3.63 <sup>#</sup>
灵芪颗粒低剂量	10	4.9 $\pm$ 0.8 <sup>#</sup>	2.8 $\pm$ 0.7 <sup>#</sup>	0.210 $\pm$ 0.065 <sup>#</sup>	9.88 $\pm$ 3.51
灵芪颗粒中剂量	10	5.2 $\pm$ 1.0 <sup>#</sup>	3.5 $\pm$ 0.9 <sup>#</sup>	0.230 $\pm$ 0.072 <sup>#</sup>	13.29 $\pm$ 3.86 <sup>#</sup>
灵芪颗粒高剂量	10	5.6 $\pm$ 1.2 <sup>#</sup>	3.9 $\pm$ 0.6 <sup>#</sup>	0.240 $\pm$ 0.041 <sup>#</sup>	14.64 $\pm$ 3.47 <sup>#</sup>

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

3.2 灵芪颗粒对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠碳粒廓清和脏器系数的影响 与正常组比较,模型组小鼠碳粒廓清指数、吞噬指数降低、脾指数和胸腺指数均明显下降( $P < 0.05$ )。与模型组相比,黄芪颗粒

粒组和灵芪颗粒高、中、低剂量组小鼠碳粒廓清指数、吞噬指数、脾指数和胸腺指数均显著升高( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 灵芪颗粒对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠碳粒廓清和脏器系数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	廓清指数	吞噬指数	脾指数/(mg/g)	胸腺指数/(mg/g)
正常	10	0.515±0.153	9.53±2.42	4.60±0.81	2.61±0.58
模型	10	0.218±0.035*	5.23±1.05*	3.18±0.42*	1.80±0.34*
黄芪颗粒	10	0.321±0.121 <sup>#</sup>	7.26±1.86 <sup>#</sup>	3.72±0.70 <sup>#</sup>	2.27±0.41 <sup>#</sup>
灵芪颗粒低剂量	10	0.319±0.075 <sup>#</sup>	7.04±1.78 <sup>#</sup>	3.67±0.50 <sup>#</sup>	2.15±0.23 <sup>#</sup>
灵芪颗粒中剂量	10	0.356±0.117 <sup>#</sup>	7.51±2.24 <sup>#</sup>	3.90±0.72 <sup>#</sup>	2.32±0.67 <sup>#</sup>
灵芪颗粒高剂量	10	0.388±0.141 <sup>#</sup>	8.33±2.32 <sup>#</sup>	4.18±0.93 <sup>#</sup>	2.38±0.72 <sup>#</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

3.3 灵芪颗粒对正常小鼠 $HC_{50}$ 值和脾细胞溶血空斑数的影响 灵芪颗粒高、中、低剂量组和黄芪颗粒组 $HC_{50}$ 值较正常组明显增强( $P < 0.05$ ),灵芪颗粒高、中剂量组溶血空斑数较正常组明显增加( $P < 0.05$ )。提示灵芪颗粒能增强体液免疫。见表3。

表3 灵芪颗粒对正常小鼠溶血素和脾细胞溶血空斑数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	$HC_{50}$	溶血空斑数/ $10^6$
正常	10	84.6±10.2	17.4±5.1
黄芪颗粒	10	120.7±19.0*	24.1±10.3
灵芪颗粒低剂量	10	115.6±17.4*	22.7±7.9
灵芪颗粒中剂量	10	124.1±21.5*	28.1±7.2*
灵芪颗粒高剂量	10	148.7±25.3*	32.7±9.5*

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ 。

3.4 灵芪颗粒对小鼠迟发性超敏反应的影响 与正常组相比,模型组小鼠耳肿胀程度明显增高( $P < 0.05$ )。与模型组相比,黄芪颗粒组和灵芪颗粒高、中剂量组小鼠耳片肿胀度显著增加( $P < 0.05$ ),表明灵芪颗粒可以增强小鼠迟发性超敏反应。见表4。

表4 灵芪颗粒对正常小鼠迟发性超敏反应的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	肿胀度/mg
正常	10	0.12±0.36
模型	10	2.31±1.38*
黄芪颗粒	10	4.06±1.52 <sup>#</sup>
灵芪颗粒低剂量	10	3.57±1.22
灵芪颗粒中剂量	10	4.15±1.83 <sup>#</sup>
灵芪颗粒高剂量	10	4.64±2.00 <sup>#</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;

与模型组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

灵芪颗粒中灵芝和黄芪是中国传统的补益中药,被历代医家视为滋补强壮、扶正固本、延年益寿之珍品。随着中药研究手段和现代免疫学快速发

展,发现不少扶正固本类中药和方剂对人体免疫系统具有促进和调节作用<sup>[6]</sup>。

本次实验中,采用环磷酰胺复制免疫低下小鼠模型,环磷酰胺是治疗肿瘤最常用的烷化剂代表性药物,具有广谱的抗癌作用;此外,环磷酰胺还具有免疫抑制作用,能广泛抑制机体的免疫应答<sup>[7]</sup>。采用环磷酰胺复制模型后,小鼠的脾指数、胸腺指数、外周白细胞数、淋巴细胞数明显下降;脾T淋巴细胞转化能力、NK细胞活性和碳粒廓清试验中廓清指数和吞噬指数均明显下降,提示环磷酰胺对小鼠的细胞免疫和非特异性免疫均有抑制作用,与文献报道一致<sup>[8]</sup>。灵芪颗粒预防性给药能明显增强免疫功能低下小鼠的T淋巴细胞转化能力、NK细胞活性和腹腔巨噬细胞吞噬能力,增加外周血中白细胞和淋巴细胞数,并减轻免疫器官(脾、胸腺)的萎缩,增强BDNF介导的小鼠迟发性超敏反应,提示灵芪颗粒有增强细胞免疫和非特异免疫作用。同时正常小鼠给予灵芪颗粒2周后,能明显增加SRBC引起的 $HC_{50}$ 和溶血空斑数,提示灵芪颗粒能促进小鼠B淋巴细胞产生抗体,增强其体液免疫。

药理研究<sup>[9-10]</sup>业已证实,灵芝和黄芪均能增强机体免疫力,灵芝多糖和黄芪多糖是其调节机体免疫功能的主要物质基础<sup>[11-12]</sup>,两者均能促进机体表达IL-2和INF- $\gamma$ 等细胞因子<sup>[13-14]</sup>。这些细胞因子能促进淋巴细胞的增殖,增强NK细胞活性,激活单核-吞噬细胞,并增强其吞噬作用,从而增强机体特异性免疫和非特异性免疫。

综上所述,灵芪颗粒能增强小鼠的特异性免疫和非特异性免疫,这为灵芪颗粒改善患者的免疫状态提供依据,也为将扶正固本类方药开发成免疫增强剂提供依据。

#### 参考文献:

[1] 赵弋清,罗霞,陈东辉,等.不同剂量环磷酰胺诱导正常

- 小鼠免疫抑制的对比研究[J]. 免疫学杂志, 2005, 21(3):122-128.
- [2] 艾志琼, 申元英, 张态, 等. 黄芪对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 军医进修学院学报, 2010, 31(8): 805-807.
- [3] 孔祥廉, 梅全喜, 林慧, 等. 蛇黄肝炎汤对小鼠碳粒廓清功能的影响[J]. 今日药学, 2011, 21(9): 559-561.
- [4] 王庭欣, 王庭祥, 吴广臣. 黄芪多糖增强小鼠免疫功能的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1763-1764.
- [5] 孙科峰, 韩蕾, 田原, 等. 乌木胶囊抗小鼠迟发性超敏反应及抑制小鼠体液细胞免疫的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(1): 209-211.
- [6] 张云波. 环磷酰胺对免疫系统的影响[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(30): 12041-12042.
- [7] 祁元刚, 孟庆常. 扶正固本与肿瘤患者的免疫[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(16): 1823-1824.
- [8] 聂紫雯, 魏强华. 黄芪免疫调节机制及临床应用进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(8): 103-105.
- [9] 齐丽娟, 宋雁, 王伟, 等. 用环磷酰胺建立小鼠免疫抑制动物模型[J]. 卫生研究, 2010, 39(3): 313-315.
- [10] 秦葵, 钱彦. 从灵芝免疫药理研究进展[J]. 解放军药学学报, 2003, 19(5): 360-362.
- [11] 赵镛, 高永翔. 黄芪多糖的免疫调节作用研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 327-331.
- [12] 江振友, 林晨. 灵芝多糖对小鼠细胞免疫功能调节作用的实验研究[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(2): 51-54.
- [13] 刘印华, 李树义, 赵志强, 等. 黄芪多糖对免疫功能影响的体外实验研究[J]. 河北医药, 2014, 36(18): 2731-2733.
- [14] 雷林生, 王庆彪, 孙莉莎, 等. 灵芝多糖对小鼠脾细胞白细胞介素1、肿瘤坏死因子的产生及其 mRNA 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(2): 16-18.

(收稿日期: 2016-11-26; 编辑: 姚实林)

## Effect of Lingqi Granule on Immune Function in Mice

XU Yue-wei<sup>1,2</sup>, CHEN Guang-liang<sup>1</sup>

(1. Clinical School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230061, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the immunoregulatory effect of Lingqi Granule in mice with immunocompromise induced by cyclophosphamide and normal mice. **Methods** The mice were given intraperitoneal injection of cyclophosphamide to establish a mouse model of immunocompromise, and the effects of Lingqi Granule on leukocyte count, lymphocyte count, T lymphocyte transformation rate, natural killer (NK) cell viability, carbon particle clearance, and coefficient of immune organ were observed. The effects of Lingqi Granule on hemolysin, number of hemolytic plaques, and delayed-type hypersensitivity in skin mediated by 2,4-dinitrofluorobenzene in normal mice were observed. **Results** In the mice with immunocompromise induced by cyclophosphamide, Lingqi Granule significantly improved spleen T lymphocyte transformation ability, NK cell viability, and carbon particle clearance ability, increased peripheral blood leukocyte and lymphocyte counts, and reduced atrophy of immune organs (including the spleen and thymus). In the normal mice, Lingqi Granule significantly increased the half hemolytic concentration and number of hemolytic plaques and enhanced delayed-type hypersensitivity mediated by 2, 4-dinitrofluorobenzene. **Conclusion** Lingqi Granule can enhance specific and non-specific immunity in mice.

**[Key words]** Lingqi Granule; Cyclophosphamide; Immunocompromise; Cellular immunity; Humoral immunity