

川续断水煎液对小鼠非特异性免疫功能的影响

周炳鑫¹, 张雷^{1,2}, 李颜桃¹, 马跃^{1,3,4}, 曹立亭^{1,3,4*}

(1. 西南大学动物医学院, 重庆 402460; 2. 毕节市七星关区农牧局, 毕节 551700; 3. 西南大学中兽医研究所, 重庆 402460; 4. 重庆市兽医科学工程研究中心, 重庆 402460)

摘要: 为探讨川续断水煎液对小鼠非特异性免疫功能的影响。40只昆明系健康小白鼠随机分为5组, 每组8只, 分别灌胃不同剂量终浓度为 $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的川续断水煎液(按体质量分别为10、20、30和 $40\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 连续灌胃7d, 空白对照组灌胃等体积的生理盐水。通过对给药前后平均日增重、胸腺脾脏组织病理变化、巨噬细胞吞噬活性和血清溶血素等指标的检测, 评价其对动物机体非特异性免疫功能的调节作用。结果显示, 与空白对照组相比, 灌胃川续断水煎液后能不同程度地提高试验各组小鼠平均日增重, 各剂量组日增重率分别为9.8%、29.2%、24.4%和24.3%; 可显著提高小鼠脾脏和胸腺指数($P<0.05$), 对小鼠免疫组织有明显促进作用, 脾脏中央动脉周围淋巴鞘的淋巴细胞密集, 胸腺皮质与髓质分界清晰且胸腺细胞增多; 极显著增强小鼠廓清指数($P<0.01$), 显著增强吞噬指数及血清溶血素水平($P<0.05$)。提示川续断水煎液可增强小鼠的非特异性免疫功能。

关键词: 川续断水煎液; 小鼠; 脏器指数; 廓清指数; 吞噬指数; 血清溶血素; 非特异性免疫

中图分类号: S 853.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2021)05-0796-05

Effect of *Radix Dipsaci* decoction on nonspecific immune function in mice

ZHOU Bingxin¹, ZHANG Lei^{1,2}, LI Yantao¹, MA Yue^{1,3,4}, CAO Liting^{1,3,4}

(1. College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460; 2. Qixing District Agriculture and Animal Husbandry Bureau in Bijie City, Bijie 551700; 3. Research Institute of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460; 4. Chongqing Engineering Research Center of Veterinary Medicine, Chongqing 402460)

Abstract: In order to estimate the regulatory effects on immune function, this study was conducted to investigate the effect of *Radix Dipsaci* decoction on nonspecific immune function in mice in order to estimate the regulatory effects on immune function. Forty healthy Kunming mice were randomly divided into 5 groups with 8 mice each. All the experimental mice were intragastrically administrated different doses of *Radix Dipsaci* decoction respectively (10, 20, 30 and $40\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight) with the final concentration of $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 7 d, and physiological saline was administrated for the control group. The average daily gain (ADG), pathological changes of thymus and spleen, phagocytic activity of macrophages and serum hemolysin were detected before and after administration to evaluate the nonspecific immune function of the experimental animals. The results indicated that the average daily gain was increased at different extent after oral administration of *Radix Dipsaci* decoction compared with control group, and the ADG rates were 9.8%, 29.2%, 24.4% and 24.3% in each group, respectively. And it could significantly increase the spleen and thymus index of mice ($P<0.05$), and significantly promote the immune tissue of mice. The lymphocytes in the lymphatic sheath around the central artery of the spleen were concentrated, the boundary between the thymus cortex and medulla was clear, and the thymic cells were increased. It can also significantly enhance the clearance index ($P<0.01$), phagocytosis index and serum hemolysin level ($P<0.05$). It suggested that *Dipterus chinensis* decoction enhance the non-specific immune function of mice.

Key words: *Dipsacus asperoides* decoction; mice; immune organ index; clearance index; phagocytic index; serum hemolysin; non-specific immunity

收稿日期: 2021-01-27

基金项目: 西南大学博士基金(09BSR04)和西南大学荣昌校区青年基金共同资助。

作者简介: 周炳鑫, 硕士研究生。E-mail: 1059475677@qq.com

* 通信作者: 曹立亭, 博士, 副教授。E-mail: caoliting@swu.edu.cn

川续断为川续断科 (*Dipsacaceae*) 多年生草本植物川续断 (*Dipsacus asperoides*) 的干燥根, 因能“续折接骨”而得名。川续断味苦、辛, 性微温, 归肝、肾经, 具有补肝肾、强筋骨、续折伤、止崩漏及安胎等功效, 可用于治疗肝肾不足所致的腰膝痠软、风湿痹痛以及筋伤骨折、崩漏、胎漏和跌扑损伤等病证。现代研究表明, 川续断含有三萜皂苷、生物碱、挥发油和多糖等多种化学成分^[1], 其中三萜皂苷具有抗骨质疏松、增加骨密度等药理作用^[2], 总生物碱能抑制妊娠大鼠在体子宫平滑肌的收缩活动, 并降低收缩幅度和张力^[3], 挥发油对金黄色葡萄球菌具有抑制作用。除此之外, 川续断还能对神经系统、骨组织以及免疫系统产生影响^[4]。然而, 对川续断在机体免疫功能方面的研究报道较少。因此, 本试验拟将川续断水煎液灌胃小鼠, 观察其对机体非特异性免疫功能的影响, 为深入探究其免疫作用机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验药物及主要试剂

川续断饮片, 购自重庆泰尔森制药有限公司。豚鼠冻干血清补体, 购自北京博尔西科技有限公司; 印度墨汁, 购自南京都莱生物技术有限公司。

1.2 试验动物

昆明系小鼠, 雌雄各半, 体重 (20 ± 2) g, 委托西南大学荣昌校区实验动物平台统一订购。

1.3 试验方法

1.3.1 川续断水煎液的制备 采用水煎法, 按照 1:5 加入提取溶剂进行提取, 每次提取 1 h, 合并两次提取液, 最后浓缩至相当于生药量 2 g·mL⁻¹ 的药液, 保存备用。

1.3.2 试验设计及处理 40 只昆明系小鼠, 雌雄各半, 体重 (20 ± 2) g, 随机分为 5 组, 即 A、B、C、D4 个试验组和对照组。试验组分别按体质量灌胃 10 g·kg⁻¹、20 g·kg⁻¹、30 g·kg⁻¹ 和 40 g·kg⁻¹ 终浓度为 2 g·mL⁻¹ 的川续断水煎液, 对照组灌胃等量生理盐水, 1 次·d⁻¹, 连续灌胃 7 d。

1.3.3 小鼠平均日增重的测定 分别于给药前 1 d、末次给药后 1、7 d 早晨空腹称量各试验组小鼠体重并记录, 计算小鼠的平均日增重。

平均日增重 = (终末体重 - 初始体重) / 饲喂周期

1.3.4 免疫器官指数的测定 末次给药后 7 d 脱颈椎处死各试验组小鼠, 摘取胸腺、脾脏, 用滤纸吸干血迹以及表面水分后称重, 计算其脏器指数。

脏器指数 (%) = 脏器重量 (mg) / 体质量 (g)

1.3.5 免疫器官组织切片的制备 无菌操作采取各试验组小鼠胸腺和脾脏组织块, 按照常规方法制备组织切片, 光学显微镜下观察脏器的组织结构变化情况。

1.3.6 小鼠巨噬细胞吞噬功能的测定^[5] 于末次给药后按 0.01 mL·g⁻¹ 体质量尾静脉注射 4 倍稀释的印度墨汁, 分别于注射后 2, 10 min 用肝素处理的毛细玻管采集眼眶静脉血 0.04 mL, 溶入 4 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中, 摇匀, 然后以 0.1% Na₂CO₃ 溶液作为空白对照, 650 nm 处检测其吸光度值 (OD₁ 和 OD₂), 计算碳粒廓清指数 (K); 准确摘取小鼠肝脏、脾脏并称量, 计算吞噬指数 α 值。

$$K = (\lg OD_1 - \lg OD_2) / (t_2 - t_1)$$

$$\alpha = \sqrt[3]{K} \times m_t / (m_g + m_p)$$

OD₁、OD₂ 代表先后两次所测的吸光度, m_t 为体质量, m_g 为肝质量, m_p 为脾质量, t₁ 和 t₂ 分别代表代表 2 min 和 10 min。

1.3.7 小鼠血清溶血素的测定 灌胃给药 7 d 后按 0.01 mL·g⁻¹ 体质量腹腔注射 5% 鸡红细胞 (CRBC) 悬液, 连续免疫 7 d, 末次免疫 24 h 后, 眼球取血, 室温静置 2 h, 4 °C 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血清, 保存备用。检测前, 待检血清用生理盐水进行 100 倍稀释, 取稀释后的血清 2 mL 与 5% CRBC 悬液 1 mL、10% 豚鼠血清补体 1 mL 混匀。另设空白对照管 (生理盐水代替血清) 作为调“0”和 CRBC 半数溶血管。37 °C 培养箱中反应 30 min 后转入至 0 °C 终止反应。3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清于紫外分光光度计 540 nm 处测光密度 OD 值, 溶血素值以半数溶血值 HC₅₀ 表示。

取 5% CRBC 0.25 mL 加生理盐水至 2 mL, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清于 540 nm 处比色, 得到 CRBC 半数溶血时的吸光度^[6-7]。

HC₅₀ = (样品光密度值 / CRBC 半数溶血光密度值) × 稀释倍数

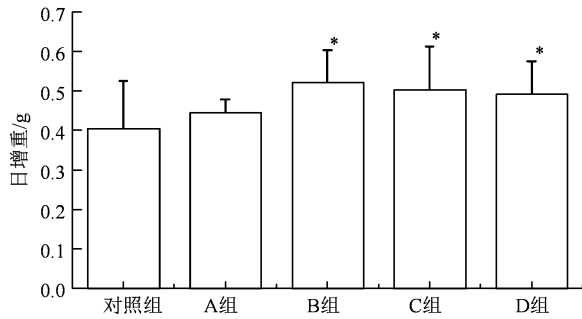
1.3.8 数据统计与分析 试验计量数据用平均数 ± 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示, 采用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 用 LSD 法和邓肯氏 (Duncan) 法对数据进行差异性分析。

2 结果与分析

2.1 川续断水煎液对小鼠平均日增重的影响

与空白对照组相比, 灌胃川续断水煎液后均能不同程度地提高试验小鼠的平均日增重。除 10 g·kg⁻¹ 灌胃剂量组外, 其余剂量组平均日增重均显著升高 (P < 0.05), 分别提高 29.2%、24.4% 和 24.3%,

但各剂量组之间统计学比较差异不显著 ($P>0.05$)。详见图 1。



A. 10 g·kg⁻¹ 剂量组; B. 20 g·kg⁻¹ 剂量组; C. 30 g·kg⁻¹ 剂量组; D. 40 g·kg⁻¹ 剂量组。

*表示与对照组比较差异显著 ($P<0.05$), **表示与对照组比较差异极显著 ($P<0.01$)。下同。

图 1 川续断水煎液灌胃后平均日增重变化情况

Figure 1 Effect of *Dipsacus asperoides* decoction on average daily gain in mice

2.2 川续断水煎液对免疫器官指数的影响

由图 2 可知, 与空白对照组相比, 灌胃川续断水煎液后均显著或极显著提高试验小鼠胸腺指数和

脾脏指数, 分别提高 23%、30%、27%、26%和 24%、34%、27%、27%, 其中以 20 g·kg⁻¹ 灌胃剂量效果最佳 ($P<0.01$)。但各剂量组之间比较差异不显著 ($P>0.05$)。

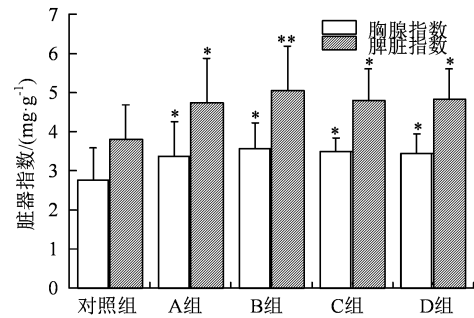
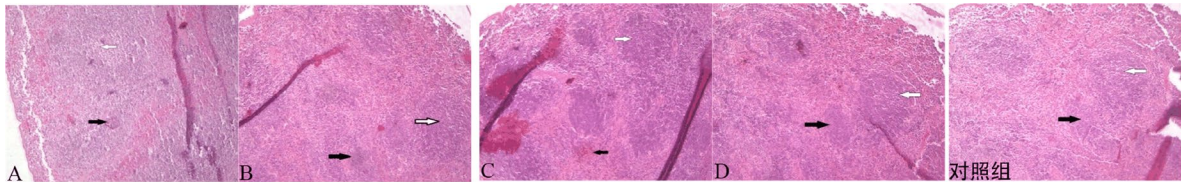


图 2 川续断水煎液灌胃后免疫器官指数的变化情况
Figure 2 Effect of *Dipsacus asperoides* decoction on the indexes of immune organs in mice

2.3 川续断水煎液对小鼠免疫器官组织结构影响

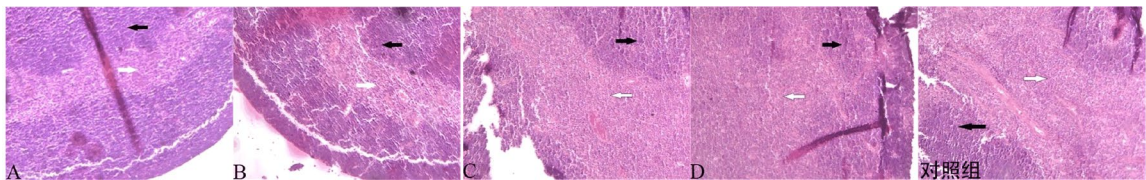
2.3.1 对脾脏组织结构的影响 由图 3 可知, 与空白对照组相比, 灌胃川续断水煎液后, 小鼠脾脏组织生发中心和淋巴鞘的淋巴细胞密集程度明显增高, 其中以 20 g·kg⁻¹ 灌胃剂量效果最明显。



白色箭头所示为生发中心, 黑色箭头所示为淋巴鞘。

图 3 小鼠脾脏组织显微结构 (HE, 100×)

Figure 3 The microstructure of spleen tissue in mice (HE, 100×)



白色箭头是髓质, 黑色箭头是皮质。

图 4 小鼠胸腺组织显微结构 (HE, 100×)

Figure 4 The microstructure of thymus tissue in mice (HE, 100×)

2.3.2 对胸腺组织的影响 由图 4 可知, 空白对照组小鼠胸腺组织细胞较稀疏, 灌胃川续断水煎液后小鼠胸腺的皮质与髓质分界清楚, 皮质中胸腺细胞密集。

2.4 川续断水煎液对小鼠巨噬细胞吞噬功能影响

从图 4 和图 5 可知, 灌胃川续断水煎液后碳粒廓清指数 (K) 均极显著性升高 ($P<0.01$), 同时显著或极显著升高吞噬细胞的吞噬指数 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 但各剂量组之间统计学比较差异不显著。其中以 20 g·kg⁻¹ 灌胃剂量组效果最佳。

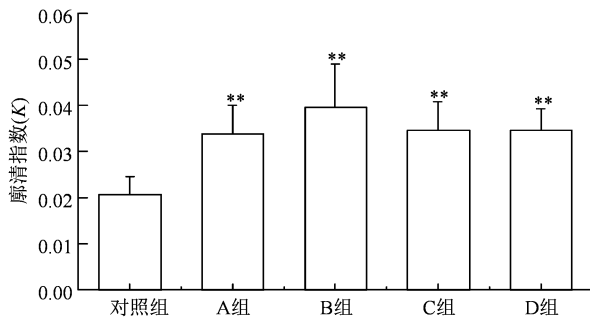


图 5 川续断水煎液对小鼠碳粒廓清指数的影响

Figure 5 Effect of *Dipsacus asperoides* decoction on the carbon clearance index in mice

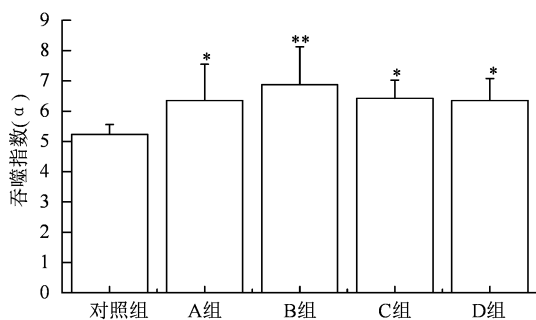


图 6 川续断水煎液对吞噬指数的影响

Figure 6 Effect of *Dipsacus asperoides* decoction on the phagocytic index in mice

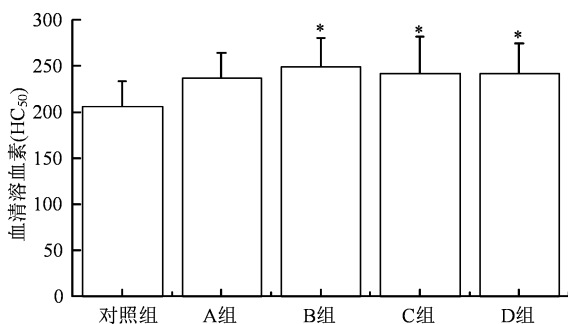


图 7 川续断水煎液对小鼠血清溶血素的影响

Figure 7 Effects of *Dipsacus asperoides* decoction on serum hemolysin level in mice

2.5 川续断水煎液对血清溶血素的影响

与空白对照组相比,灌胃不同剂量川续断后血清溶血素含量明显升高,其中灌胃 $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $40 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组统计学比较差异显著 ($P<0.05$)。但各剂量组之间统计学比较差异不显著(图 6)。

3 讨论

“药食同源”是中(兽)医养生保健的物质基础,中药不仅可用于临床病证的防治,还可以用于调理机体功能,如促进动物生长、增强机体免疫力、提高动物生产能力等。中药含有多种活性成分如多糖、皂苷、生物碱、黄酮、挥发油等,不同的有效药用成分对机体产生不同的药理作用^[8-9]。三萜皂苷是川续断中的主要有效成分,具有抗菌、抗炎、保肝以及调节机体免疫力的作用。本研究以小鼠为试验动物探究灌胃川续断水煎剂对其生长性能的影响,结果显示,灌胃川续断水煎液后可明显提高试验小鼠的平均日增重,分别提高了 9%、29%、24% 和 22%,其中 $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组效果最佳。这可能是川续断在煎煮过程中三萜皂苷与多糖形成糖萜素^[10],从而提高了饲料利用率。

胸腺与脾脏分别是动物机体中枢免疫系统和外

周免疫系统的重要器官,胸腺的生理性萎缩最先发生于皮质,皮质区淋巴细胞减少,皮质区域的大小表明胸腺细胞的增殖情况^[11]。谭文波等^[12]报道川续断含有的维生素 E 可以通过提高 SOD 和 GSH-Px 的活性,降低 MAD 的生成,延缓免疫器官的萎缩。本试验发现,灌胃川续断水煎液后可显著提高试验小鼠胸腺指数 ($P<0.05$),皮质部与髓质部分界线清晰,皮质中胸腺细胞大量密集,减缓了胸腺组织的生理性萎缩进程,这与郑素玲等^[13]报道的结果相一致。脾脏淋巴鞘和生发中心的多少和大小可以表明脾脏淋巴细胞的增殖情况,灌胃不同剂量川续断水煎液后能极显著提高试验小鼠脾脏指数 ($P<0.01$),提高脾脏组织生发中心和淋巴鞘的淋巴细胞密集程度,促进脾脏淋巴细胞的增殖。这与中药增强动物机体免疫功能的相关研究报道结果相一致^[14-16]。

巨噬细胞作为天然免疫调节细胞具有极强的吞噬能力,该功能的激活包括细胞增殖及功能活跃两个方面,常用廓清指数(K)和吞噬指数(α)相结合反映巨噬细胞的增殖状态及功能状态。大量研究证实中药及其提取物可显著增强吞噬细胞的吞噬功能,提高吞噬细胞的吞噬指数和吞噬活性^[17-19]。本试验中,灌胃不同剂量的川续断水煎剂后均显著或极显著提高了试验小鼠吞噬细胞的碳粒廓清指数和吞噬指数,说明川续断水煎剂可提高机体巨噬细胞的吞噬功能,从而增强机体的非特异性免疫功能。

体液免疫是由 B 淋巴细胞介导的免疫应答反应。许多中草药及其活性成分均能促进机体的体液免疫功能,促进抗体的生成,从而提高机体的免疫力^[20-22]。血清溶血素是机体 B 淋巴细胞在受到抗原刺激后分化为浆细胞,由浆细胞产生免疫球蛋白,其含量反映了抗原刺激后机体的特异性免疫反应水平。本研究结果显示,灌服川续断水煎液后试验小鼠血清溶血素含量呈现升高趋势,表明川续断水煎液可提高机体的体液免疫功能,这与相关中药研究报道结果一致^[7]。

综上所述,川续断水煎液可有效增强小鼠非特异性免疫功能,尤以 $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃剂量效果最佳,为进一步研究川续断作为免疫增强剂或饲料添加剂提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 孙欣光, 黄文华, 郭宝林. 续断的化学成分研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(5):459-464.
- [2] 刘介, 樊松强, 陈明亮. 不同浓度的续断总皂甙对成骨细胞增殖、分化和细胞周期的影响[J]. 世界最新医学信

- 息文摘, 2018, 18(41): 1-2,5.
- [3] 龚晓健, 季晖, 王青, 等. 川续断总生物碱对妊娠大鼠子宫的抗致痉及抗流产作用[J]. 中国药科大学学报, 1998, 29(6):459-461.
- [4] 郑建君, 毛玲群, 张开宇, 等. 川续断总皂苷对血管性痴呆大鼠的神经保护作用及对海马 CA1 区凋亡调控基因表达的影响[J]. 新中医, 2020, 52(19):9-13.
- [5] 苏萌, 杨柳, 候京玲, 等. 五加芪水煎液对小鼠免疫功能的影响[J]. 动物医学进展, 2015, 36(3):45-49.
- [6] 徐文琴, 吴艳红, 余方流, 等. 香菇多糖抑制乳腺癌 4T1 细胞小鼠移植瘤增殖机制研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(2):111-116.
- [7] 李婉, 刘水平, 史若男, 等. 紫锥菊提取物对小鼠免疫器官指数及血清溶血素水平的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2015, 34(6):40-42.
- [8] 相雪莲, 许丹宁, 曹楠, 等. 白术多糖对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠白细胞数量及功能的修复作用[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(7):36-41+2.
- [9] 罗艺晨, 黄利明, 杨颖, 等. 绿原酸抑制金黄色葡萄球菌机理研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2016, 38(3): 15-19.
- [10] 钟敏, 胡艳. 新型饲料添加剂: 糖萜素[J]. 江西饲料, 2011(4): 11-12.
- [11] 杜伯雨, 姚振江, 李蓉. 胸腺增龄性萎缩的机理及其逆转[J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18(2): 143-145.
- [12] 谭文波, 李国贵. 五鹤续断洗脱液抗衰老作用的实验研究[J]. 湖北民族学院学报(医学版), 2011, 28(3): 24-26.
- [13] 郑素玲, 郑素琴, 石洪陵, 等. 亚硒酸钠对小鼠免疫器官组织结构的影响[J]. 动物医学进展, 2004, 25(4): 94-96.
- [14] 赵怡, 潘贵珍, 施君, 等. 天门冬多糖对免疫抑制小鼠免疫功能调节的初步研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40(5): 1-5,9.
- [15] 王可, 尤良震, 胡静波, 等. 橘红多糖增强小鼠免疫功能及抗疲劳作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(21): 180-182.
- [16] 帅学宏, 施君, 陈吉轩, 等. 青蒿多糖对免疫抑制小鼠免疫器官的影响[J]. 动物医学进展, 2015, 36(11): 59-62.
- [17] 田瑞雪, 孙耀宗, 姚有昊, 等. 槲皮素对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J]. 中国现代医药杂志, 2019, 21(9): 13-16.
- [18] 胡天惠, 林超, 项媛媛, 等. 潞党参口服液对免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J]. 药学与临床研究, 2019, 27(3): 171-174,186.
- [19] 高丹丹, 张杰. 鹿衔草多糖对小鼠免疫活性的影响[J]. 海峡药学, 2019, 31(6): 17-19.
- [20] ZHAI L, LI Y, WANG W, et al. Enhancement of humoral immune responses to inactivated Newcastle disease and avian influenza vaccines by oral administration of ginseng stem-and-leaf saponins in chickens[J]. Poultry Sci, 2011, 90(9): 1955-1959.
- [21] 武彩红, 蒋春茂, 李玲, 等. 3 种中药活性成分对猪圆环病毒 2 型疫苗免疫效果的影响[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(8): 611-615.
- [22] SALEH A A, EBEID T A, ABUDABOS A M. Effect of dietary phytochemicals (herbal mixture) supplementation on growth performance, nutrient utilization, antioxidative properties, and immune response in broilers[J]. Environ Sci Pollut Res, 2018, 25(15): 14606-14613.