

# 前列通片促进免疫功能的实验研究

尹 震 吴燕梅 吴 钢

(广州白云山中一药业有限公司, 广州, 510530)

**摘要** 目的:探讨前列通片对小鼠免疫功能的影响。方法:1)脾淋巴细胞转化试验:将 60 只小鼠随机分为阴性对照组、阳性对照组、前列通片低、中、高剂量组,每组 12 只。灌胃给药,1 次/d,连续给药 30 d 后各组动物无菌取脾,提取脾淋巴细胞进行脾淋巴细胞转化试验。2)NK 细胞活性影响试验:将 60 只小鼠随机分为阴性对照组、模型对照组、阳性对照组、前列通片低、中、高剂量组。除阴性对照组外,其余各组腹腔注射环磷酰胺建立免疫功能低下的小鼠模型。造模同时给药,连续给药 30 d 后,各组动物无菌取脾,提取脾淋巴细胞进行 NK 细胞活性影响试验。结果:1)与阴性对照组比较,前列通片高剂量组淋巴细胞转化能力显著升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。2)与模型对照组比较,阳性对照组及前列通片高剂量组 NK 细胞活性显著升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:在本实验条件下,前列通片能够提高机体淋巴细胞转化能力以及 NK 细胞的活性,具有一定的免疫促进作用。

**关键词** 前列通片;免疫调节;淋巴细胞转化能力;NK 细胞的活性

## Experimental Research on Effects of Qianlietong Tablets on Immune Function

Yin Zhen, Wu Yanmei, Wu Gang

(Guangzhou Baiyunshan Zhongyi Pharmaceutical Limited Company, Guangzhou 510530, China)

**Abstract Objective:** To study the effect of Qianlietong Tablets in regulating immune function on mice. **Methods:** 1) Splenic Lymphocyte transformation test; A total of 60 SPF grade BALB/c mice were randomly divided into negative control group, positive control group, and Qianlietong Tablets low-, medium-, and high-dose groups. After Intragastric administration of different medications for different groups for 30 days continuously, spleens of each group were obtained in aseptic condition. Then spleen lymphocytes were extracted for transformation test. 2) NK cell activity effect test; A total of 60 SPF grade BALB/c mice were randomly divided into negative control group, model group, positive control group and Qianlietong Tablets low-, medium-, and high-dose groups. Except the negative group, mice model with low immune function was built in other groups by intraperitoneal injection of cyclophosphamide, and the mice models were given medicines as well. After 30 days of medication, spleens were obtained in aseptic condition. Spleen lymphocytes were extracted for testing influence on NK cell activity. **Results:** 1) Compared with the negative control group, the spleen lymphocytes transformation ability of the Qianlietong Tablets high-dose group increased obviously with significant difference( $P < 0.05$ ). 2) Compared with the model group, the NK cell activity of the positive control group and the Qianlietong Tablets high-dose group increased obviously with statistical difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Under the experimental condition, Qianlietong Tablets can improve lymphocytes transformation ability and NK cell activity, which proves that Qianlietong Tablets has the effect of promoting immune function.

**Key Words** Qianlietong Tablets; Immune Regulation; Lymphocyte Transformation; NK cell activity

中图分类号:R285.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.06.047

随着中药研究的拓展,中药在机体免疫系统调节方面的作用越来越受到重视。目前已有研究证实中药具有免疫促进和免疫抑制的双向免疫调节作用<sup>[1]</sup>。罗夏等研究表明复方中药能够提高实验小鼠淋巴细胞转化率,增加巨噬细胞的免疫反应,提高机体免疫力<sup>[2]</sup>。施军等<sup>[3]</sup>的研究证实甘草提取物甘草甜素可明显抑制二硝基氟苯诱发的小鼠接触性超敏反应。

前列通片主要由广东王不留行、黄芪、车前子、关黄柏、两头尖、蒲公英、泽兰、琥珀、八角茴香油、肉桂油等组成,具有清利湿浊,化瘀散结的功能,现代

药理研究表明,其具有抑制前列腺增生、消炎镇痛、活血祛瘀的作用<sup>[4-5]</sup>,临床上主要用于治疗前列腺炎及前列腺增生。现代医学认为,慢性前列腺炎的发病与患者自身免疫能力有一定联系,患者发病后会伴有免疫功能的改变,而局部免疫功能异常正是导致患者病情反复的主要原因<sup>[6]</sup>。本研究通过小鼠脾淋巴细胞转化试验及 NK 细胞活性试验,初步探讨前列通片的免疫调节活性,为前列通片免疫调节活性的深入研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 1) SPF 级 BALB/c 小鼠, 132 只, 雄性; 体重范围: 18.7 ~ 22.9 g; 由广东省医学实验动物中心提供。2) 动物饲养条件: 群养, 3 只/箱, 饲养温度与湿度: 20.6 ~ 22.8 °C, 44.9% ~ 69.8%, 采用 10 h:14 h 昼夜间断照明; 饲养室条件始终保持稳定, 以保证试验结果的可靠性。试验期间动物均按实验要求喂以相应颗粒饲料, 所有饲料均由广东省医学实验动物中心提供。动物自由进食饮水。

1.1.2 药物 1) 转移因子口服液(批号: 150506、150901、150902), 由南京瑞尔医药有限公司生产。2) 前列通片(广州白云山中一药业有限公司生产, 批号: V00028)。

1.1.3 试剂与仪器 1) 实验用溶媒或乳化剂: 0.5% CMC-Na 溶液: 量取 4/5 总配制量的纯净水至烧杯中, 准确称取适量羧甲基纤维素钠, 磁力搅拌器边加热边搅拌下缓慢加入烧杯中, 搅拌至完全溶解, 4 ~ 8 °C 冰箱放置过夜, 第 2 天定容至所需量即可; 纯净水。2) 主要实验仪器: BS224S 电子天平: 感量: 0.0001 g, 赛多利斯科学仪器(北京)科技有限公司; KDC-2046 低速冷冻离心机: 科大创新股份有限公司中佳分公司; SW-CJ-2FD 型超净工作台: 苏州净化有限公司; CKX41 倒置显微镜: 日本奥林巴斯公司; 311 型二氧化碳培养箱: Thermo; 全波长酶标仪: 赛默飞世尔科技公司; LMQ.C 全自动灭菌器: 山东新华医疗器械股份有限公司; DHG-9245A 电热恒温鼓风干燥箱: 上海一恒科技有限公司。3) 主要试剂: 刀豆蛋白 A (ConA), 批号: SLBK7858V, Sigma 公司; MTT, 批号: M7905, MP Biomedicals, LLC; 浓盐酸: 批号: 20141005-1, 广州化学试剂厂; 异丙醇, 批号: 150812, 广州市中南化学试剂有限公司; Triton X-100, 批号: MR29539, MP Biomedicals, LLC; PBS, 批号: 10B16B30, 博士德生物工程有限公司; Tris base, 批号: 20121223, MBCHEM; 乳酸锂, 批号: P1076996, Adamas Reagent Co., Ltd;

## 1.2 方法

1.2.1 脾淋巴细胞转化实验 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为阴性对照组、阳性对照组、前列通片低、中、高剂量组, 12 只/组。阳性组按 20 mL/kg 的剂量灌胃给予转移因子口服液, 阴性对照组灌胃给予 0.5% CMC-Na 溶液, 前列通片低、中、高剂量组按 1.02 g/kg、2.04 g/kg、4.08 g/kg 的剂量灌胃给予前列通片, 1 次/d, 连续 30 d。末次给药 24 h 后, 各组动物无菌取脾, 配制脾淋巴细胞悬液。将每份脾细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 一孔

加 50  $\mu$ L ConA 液, 另一孔加入 50  $\mu$ L 培养液作对照。置 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 的细胞培养箱中培养 72 h。培养结束前 4 h, 每孔轻轻吸去上清液 0.7 mL, 加入 0.7 mL 不含胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 同时加入 5 mg/mL MTT 50  $\mu$ L/孔, 继续培养 4 h。培养结束后, 每孔加入 1 mL 酸性异丙醇, 吹打混匀, 使紫色结晶完全溶解, 然后分装至 96 孔板中, 每孔作 3 个平行孔, 酶标仪 570 nm 测定吸光度, 然后计算淋巴细胞增殖能力, 淋巴细胞增殖能力 = Con A 孔吸光度值 - 无 Con A 孔吸光度值。

1.2.2 NK 细胞活性影响试验 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为阴性对照组、模型组、阳性对照组、前列通片低、中、高剂量组, 12 只/组。除阴性对照组外, 其余各组按 60 mg/kg 腹腔注射环磷酰胺, 连续 3 d, 之后, 在第 15 天、第 26 天分别按 40、50 mg/kg 腹腔注射环磷酰胺建立免疫功能低下的小鼠模型。造模同时给药, 各给药组给药剂量及方法与脾淋巴细胞转化实验相同, 阴性对照组及模型组灌胃给予 0.5% CMC-Na 溶液, 1 次/d, 连续 30 d。末次给药 24 h 后, 各组动物无菌取脾, 配制脾淋巴细胞悬液。取靶细胞和效应细胞各 100  $\mu$ L (效靶比 50:1), 加入 U 型 96 孔培养板中; 靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 100  $\mu$ L; 靶细胞最大释放孔加靶细胞和 2.5% Triton 各 100  $\mu$ L; 上述各项均设 3 个平行孔, 于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h, 然后将 96 孔培养板以 1 500 r/min 离心 5 min, 每孔吸取上清 100  $\mu$ L 置平底 96 孔培养板中, 同时加入 LDH 基质液 100  $\mu$ L, 反应 6 min, 每孔加入 1 mol/L 的 HCL 30  $\mu$ L, 在酶标仪 490 nm 处测定光密度值(OD), 并计算 NK 细胞活性。

$$\text{NK 细胞活性}(\%) = \frac{\text{反应孔 OD} - \text{自然释放孔 OD}}{\text{最大释放孔 OD} - \text{自然释放孔 OD}} \times 100\%。$$

1.3 统计学方法 所有数据采用( $\bar{x} \pm s$ )表示, 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析; 计量资料数据方差齐, 或数据经转换后方差齐, 则采用单因素方差分析; 若数据经转换后方差仍不齐, 采用秩和检验进行统计分析。

## 2 结果

2.1 脾淋巴细胞转化实验 与阴性对照组比较, 前列通片高剂量组淋巴细胞转化能力显著升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.2 NK 细胞活性影响试验 与阴性对照组比较, 模型组 NK 细胞活性显著降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 阳性对照组及前列通

片高剂量组 NK 细胞活性显著升高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 2。

表 1 前列通片对淋巴细胞转化能力作用的  
试验结果( $\bar{x}\pm s, \delta, n=12$ )

| 组别       | 剂量        | 淋巴细胞转化能力   |
|----------|-----------|------------|
| 阴性对照组    | —         | 0.31±0.07  |
| 阳性对照组    | 20 mL/kg  | 0.37±0.16  |
| 前列通片低剂量组 | 1.02 g/kg | 0.30±0.16  |
| 前列通片中剂量组 | 2.04 g/kg | 0.43±0.16  |
| 前列通片高剂量组 | 4.08 g/kg | 0.49±0.10* |

注: \* 与阴性对照组比较,  $P<0.05$ 。

表 2 免疫功能低下小鼠的 NK 细胞活性  
影响试验结果( $\bar{x}\pm s, \delta$ )

| 组别       | 只数 | 剂量        | NK 细胞活性                  | NK 细胞活性转换(用于统计)          |
|----------|----|-----------|--------------------------|--------------------------|
| 阴性对照组    | 12 | —         | 0.71±0.17                | 1.02±0.20                |
| 模型对照组    | 12 | —         | 0.47±0.11 $\Delta\Delta$ | 0.76±0.11 $\Delta\Delta$ |
| 阳性对照组    | 12 | 20 mL/kg  | 0.72±0.13**              | 1.02±0.15**              |
| 前列通片低剂量组 | 12 | 1.02 g/kg | 0.63±0.15                | 0.93±0.16                |
| 前列通片中剂量组 | 12 | 2.04 g/kg | 0.53±0.18                | 0.82±0.20                |
| 前列通片高剂量组 | 12 | 4.08 g/kg | 0.65±0.18*               | 0.95±0.20*               |

注: 采用方差分析方法进行分析。与阴性对照组比较,  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$ ; 与模型组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ 。

3 讨论

淋巴细胞的增殖和分化是机体免疫应答过程中的一个重要阶段,淋巴细胞受到抗原或促有丝分裂原刺激时增殖能力的强弱反映了淋巴细胞功能的高低,淋巴细胞转化试验是细胞免疫功能评价的常用体外试验方法。NK 细胞主要存在于外周血和脾中,不依赖抗体也不需要抗原刺激和致敏就能杀伤靶细胞, NK 细胞的活性可反映机体细胞免疫应答功能的强弱<sup>[7]</sup>。因此本研究通过脾淋巴细胞转化实验及对 NK 细胞活性的影响来评价前列通片对正常小鼠免疫功能的影响。

中医学认为疾病的发生、发展和转归主要与正虚邪盛有关,正虚则抵抗力差,这与免疫低下密切相关,中医采用扶正祛邪治疗法则,取得良好疗效,发现不少补益类和清热解毒类中药具有免疫促进作用<sup>[8]</sup>。前列通片主要由广东王不留行、黄芪、车前子、关黄柏、两头尖、蒲公英、泽兰、琥珀、八角茴香油、肉桂油等组成。其中,广东王不留行为桑科榕属植物薜荔 *Ficus pumila* L. 的干燥花序托,主要含有三萜、黄酮、倍半萜等化合物,现代药理研究表明其

具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、增强免疫等作用<sup>[9]</sup>;黄芪为最常用的“扶正固本,补中益气”中药之一,其主要成分包括多糖、黄酮、苷类等化合物,其中,黄芪多糖与黄芪总苷具有显著的免疫调节作用<sup>[10]</sup>;车前子主要有多糖、苯乙醇苷等化学成分,现代药理研究表明其在免疫调节方面有一定的活性<sup>[11]</sup>;此外,蒲公英多糖、八角茴香油提取液等均具有免疫功能促进作用<sup>[12-13]</sup>。以上,为前列通片促进免疫功能的发挥奠定了一定的基础。本试验研究证实前列通片能够提高机体淋巴细胞转化能力以及 NK 细胞的活性,具有一定的促进免疫功能的作用,但关于其发挥免疫促进功能的主要成分有待进一步探讨。

参考文献

[1]马洪第,卢芳汀,陶艳艳,等. 中药免疫调节作用的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志,2011,27(5):462-466.

[2]罗夏,孙树青,陶格斯,等. 自制复方中药汤剂灌胃对小鼠淋巴细胞转化率和巨噬细胞吞噬功能的影响[J]. 微循环学杂志,2012,22(1):33-34.

[3]施军,曾耀英,蔡小嫦,等. 甘草甜素抑制小鼠接触性超敏反应的实验研究[J]. 中国病理生理杂志,2006,22(4):656-659.

[4]刑益源,叶木荣,廖惠芳,等. 前列通片的药理作用研究[J]. 中药材,1998,21(9):469-472.

[5]田少鹏,梁海清,倪依东,等. 前列通片对前列腺增生的抑制作用[J]. 中草药,2005,36(10):1538-1539.

[6]刘林海,王勇,浦永昌,等. 前列安通胶囊对治疗慢性前列腺炎及其患者免疫功能的影响[J]. 西部医学,2014,26(11):1490-1492.

[7]李敬双,刘英姿,唐雨顺,等. 苜蓿多糖对小鼠淋巴细胞增殖和 NK 细胞活性影响的研究[J]. 中国农学通报,2012,28(32):89-93.

[8]刘春发,胡建新,屈新辉. 中药制剂对免疫功能促进作用的研究进展[J]. 中国医药导报,2013,28(10):27-33.

[9]余世荣,周本宏,刘芳. 薜荔果本草考证及现代研究概况[J]. 中国药师,2010,13(9):1343-1345.

[10]房宇,刘尧. 黄芪的免疫调节作用研究进展[J]. 亚太传统医药,2012,8(7):208-209.

[11]郑秀棉,杨莉,王峰涛. 车前子的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中药材,2013,36(7):1190-1196.

[12]宋宝辉,念红. 蒲公英及其多糖提取物对小鼠免疫功能的调节研究[J]. 中国食物与营养,2011,17(10):68-70.

[13]杨栋林. 八角茴香提取液对运动小鼠免疫功能的影响[D]. 桂林:广西师范大学,2007:14-38.

(2017-04-10 收稿 责任编辑:徐颖)