

复方蛹虫草制剂对 C57BL/6 荷瘤小鼠免疫功能的影响

季锡中, 宁青, 谈唯, 张润桐, 宋捷*

(江苏省中医药研究院中药新型给药系统重点实验室/国家中医药管理局
中药口服释药系统重点研究室, 南京 210028)

[摘要] 目的: 研究蛹虫草复方制剂 (CCM) 对 C57BL/6 荷瘤小鼠免疫功能影响。方法: C57BL/6 雄性小鼠腋下皮下注入 Lewis 肺癌小鼠移植瘤动物模型, 将荷瘤鼠分为模型组、阳性对照组以环磷酰胺 ip 20 mg·kg⁻¹, 复方蛹虫草制剂低、中、高剂量组 (1.2, 2.5, 7.5) g·kg⁻¹ ig 给药, 连续给药 14 d, 以抑瘤率为指标考察 CCM 的体内抗肿瘤活性, 分别测定其抑瘤率、T 淋巴细胞亚群 CD4⁺/CD8⁺; 荷瘤小鼠血清中白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-12 (IL-12)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 水平; 抗体生成细胞数以及力竭游泳时间。结果: CCM 高剂量组 (7.5 g·kg⁻¹) 对肿瘤生长有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), 其抑瘤率为 40.3%, CCM 高剂量组 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ 均高于模型对照组; 同时中、高剂量组能显著提高荷瘤小鼠血清 TNF-α, IL-2, IL-12 的水平; 抗体生成细胞数和力竭游泳时间也均高于荷瘤对照组 ($P < 0.05$)。结论: CCM 具有提高荷瘤小鼠免疫功能的作用。

[关键词] 蛹虫草; 荷瘤小鼠; 抗肿瘤; 免疫调节

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)15-0227-04

Effects of Compound *Cordyceps militaris* on Immune Function in C57BL/6 Tumor Bearing Mice

Ji Xi-zhong, Ning Qing, Tan Wei, Zhang Run-tong, Song Jie*

(Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Key Laboratory of Drug Release System of Oral Traditional Chinese Medicine (TCM), State Administration of TCM, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of compound *Dcordyceps militaris* (CCM) on immune function in C57BL/6 tumor bearing mice. **Method:** Transplanted Lewis tumor mice were established using subcutaneous injection of Lewis cells into C57BL/6 mice. C57BL/6 tumor bearing mice were randomly divided into five groups, namely, control group and positive group (cyclophosphamide ip 20 mg·kg⁻¹), the low, middle and high dosage groups (ig 1.2, 2.5, 7.5 g·kg⁻¹) for 14 constitutive days. The tumor inhibition rate, CD4⁺/CD8⁺ ratio, contents of interleukin (IL) -2, IL-12 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in tumor bearing mice serum, antibody-producing cells and forced swimming time were respectively determined. **Result:** CCM (7.5 g·kg⁻¹), orally administered, had a significant inhibitory action on the growth of tumor, with the inhibition rate as 40.3% ($P < 0.05$). CCM (7.5 g·kg⁻¹) also improved CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ ratio compared with the control group. Meanwhile, CCM (2.5, 7.5 g·kg⁻¹) enhanced the content of IL-2, IL-12 and TNF-α level, forced swimming time and antibody-producing cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** These findings suggested that CCM could promote the function of immunity in C57BL/6 tumor bearing mice.

[Key words] *Cordyceps militaris*; tumor bearing mice; anti-tumor; immunoregulation

[收稿日期] 20110828(005)

[第一作者] 季锡中, 副研究员, 从事中药制药工程研究, Tel: 025-85637817, E-mail: 285151759@qq.com

[通讯作者] * 宋捷, 研究实习员, 从事中药制剂研究, Tel: 025-85637809, E-mail: momo198420@hotmail.com

肺癌的综合治疗成为一种趋势,中药在肺癌的综合治疗中有一定的优势,发挥了巨大的作用,已应用到肺癌综合治疗的各个方面。中医认为,虫草入肺肾二经,既能补肺阴,又能补肾阳,主治肾虚,阳痿遗精,腰膝酸痛,病后虚弱,是唯一能同时平衡、调节阴阳的中药。前期已做了复方蛹虫草制剂对正常小鼠免疫力调节的观察,药效显著。蛹虫草提取物还可通过激活机体免疫系统使宿主特异性免疫功能增强而获得明显的免疫保护效应^[1]。本实验通过小鼠移植瘤模型,研究复方蛹虫草制剂对小鼠 Lewis 肺癌生长的影响,并进一步研究其对荷瘤小鼠免疫功能的影响,借以探讨其抗肿瘤机制。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6 雄性小鼠,体重(20 ± 2)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号 SCXX(沪)2007-0005。

1.2 瘤株 体外培养的 Lewis 细胞,由中国医学科学院药物研究所药理室提供。

1.3 药物 小鼠 CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺ 抗体(批号 8L576S)上海联科生物技术有限公司;新生牛血清(NBS)(批号:101024)杭州四季青公司产品;白细胞介素-2(IL-2)(批号 20100925)、白细胞介素-12(IL-12)(批号 20101123)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)(批号 20110218)ELISA 试剂盒购自北京普尔伟业生物科技有限公司。

1.4 仪器 酶标仪,二氧化碳培养箱均购自美国 Thermo Electron 公司, FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 荷瘤小鼠模型制备 体外培养的 Lewis 细胞,离心收集细胞,细胞计数,将细胞密度调至 1 × 10⁷/mL,每只小鼠于腋下皮下注入细胞瘤悬液 100 μL,每组 8 只。

2.2 复方蛹虫草制剂的制备 复方蛹虫草制剂为由蛹虫草、黄芪、黄精、红参、陈皮、制何首乌、茯苓组成(质量比 4:8:8:3:3:3:8),均购自安徽省亳州市联华医药有限公司,以水煎煮 3 次,合并滤液,常压浓缩后加 95% 的乙醇沉淀至含醇量为 30%,上清回收乙醇后得浸膏,加纯化水混匀。

2.3 对荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用 造模后 24 h 随机分组并开始给药,实验分为 5 组:模型组(0.9% NaCl 10 mL·kg⁻¹, ip)、环磷酰胺(CTX)组[20 mg·kg⁻¹ ip, (1,6,11,14 d, 1 次/d)]、CCM 低、中、高剂量组[(1.2, 2.5, 7.5 g·kg⁻¹, ig), 1 次/d],连续给

药 14 d,于末次给药 24 h 后处死小鼠,称量瘤体质量,计算各组的抑瘤率。小鼠眼球采血,收集血清,测定各项免疫指标,以 ELISA 试剂盒检测对 TNF-α, IL-2 和 IL-12 水平的影响。

2.4 对小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响 小鼠眼球采血,以肝素抗凝后,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,用 PBS 洗涤 2 次后,加入荧光标记的抗 CD4 和 CD8 抗体,4 ℃ 避光反应 30 min,30 min 后用 PBS 洗涤 2 次,用 400 μL 1% 的多聚甲醛固定,以流式细胞仪检测 CD4⁺, CD8⁺ 细胞数。

2.5 脾脏抗体生成细胞检测(PFC) ip 2% 绵羊红细胞(SRBC)0.2 mL,将 SRBC 免疫 5 d 后的 C57BL/6J 小鼠处死,取脾制成细胞悬液。将培养基与等量双倍 HanK's 液混合,分装小试管,每管 0.5 mL,再向管内加 50 μL 10% SRBC,10 μL 脾细胞悬液,迅速混匀后倾倒入已刷琼脂糖薄层的玻片上,放入二氧化碳培养箱中温育 1.5 h,将 SA 缓冲液稀释的补体(1:8)放入到玻片架凹槽内,继续温育 1.5 h 后计溶血空斑数。

2.6 力竭性游泳运动试验 小鼠游泳池选用大小为 80 cm × 60 cm × 60 cm 的玻璃水槽,训练时注水深约 40 cm,水温(22 ± 1) ℃。各组小鼠末次 ig 30 min 后,将小鼠放入水槽内进行游泳实验,每鼠尾部负重体重 4% 的铅块,记录每只小鼠游泳持续时间。小鼠游泳时间:小鼠置于水中后立即计时,当小鼠头部沉入水面 10 s 不能浮出,即刻计时为小鼠游泳时间(min)。

2.7 统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件对结果数据进行统计分析,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠肿瘤生长的影响 不同剂量的复方蛹虫草制剂对小鼠肿瘤的生长均具抑制作用,抑制率呈剂量依赖性增加。高剂量组的抑瘤率(40.3%)显著高于其余各组,与对照组比较差异具统计学意义(*P* < 0.05),见表 1。

表 1 复方蛹虫草制剂对小鼠肿瘤生长的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	<i>n</i>	瘤重/g	抑瘤率/%
荷瘤对照	-	8	1.96 ± 0.78	-
环磷酰胺	0.02	10	0.92 ± 0.52	53.1
复方蛹虫草	1.2	9	1.68 ± 0.63 ¹⁾	14.3
	2.5	8	1.31 ± 0.66 ¹⁾	33.2
	7.5	12	1.17 ± 0.58 ¹⁾	40.3

注:与荷瘤对照组比较¹⁾*P* < 0.05。

3.2 对荷瘤小鼠血清 TNF- α , IL-2, IL-12 水平的影响

不同剂量的复方蛹虫草制剂可显著提高荷瘤小

鼠血清 TNF- α , IL-2, IL-12 的水平,与对照组比较差异具统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 复方蛹虫草制剂对荷瘤小鼠血清 TNF- α , IL-2 以及 IL-12 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	TNF- α / $pg \cdot mL^{-1}$	IL-2/A	IL-12/A
正常对照	-	10	262.4 \pm 5.1	0.71 \pm 0.20	0.29 \pm 0.06
荷瘤对照	-	10	273.8 \pm 4.9 ¹⁾	0.28 \pm 0.15 ¹⁾	0.38 \pm 0.07 ¹⁾
复方蛹虫草	1.2	9	298.4 \pm 6.5	0.37 \pm 0.04	0.45 \pm 0.08
	2.5	8	307.2 \pm 5.3	0.44 \pm 0.11	0.51 \pm 0.11
	7.5	12	322.8 \pm 7.7 ²⁾	0.59 \pm 0.12 ²⁾	0.72 \pm 0.12 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与荷瘤对照组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3~4 同)。

3.3 对荷瘤小鼠 T 细胞亚群的影响

复方蛹虫草制剂高、中、低剂量组 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞数以及 CD4⁺/CD8⁺ 均高于模型对照组,

CD8⁺ T 细胞数低于模型对照组,与荷瘤对照组比较差异具统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 复方蛹虫草制剂对荷瘤小鼠 T 细胞亚群的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	CD3 ⁺ /10 ⁶	CD4 ⁺ /10 ⁶	CD8 ⁺ /10 ⁶	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常对照	-	10	72.31 \pm 6.25	48.30 \pm 4.61	21.55 \pm 4.61	2.24 \pm 0.33
荷瘤对照	-	10	45.41 \pm 0.61 ¹⁾	36.27 \pm 3.88	30.47 \pm 3.93	1.29 \pm 0.18 ¹⁾
复方蛹虫草	1.2	9	52.11 \pm 3.42	38.37 \pm 3.76	28.41 \pm 4.01	1.42 \pm 0.28
	2.5	9	60.73 \pm 5.37	41.28 \pm 6.45	26.21 \pm 3.88	1.61 \pm 0.31
	7.5	11	69.16 \pm 7.34 ²⁾	48.43 \pm 7.24 ²⁾	24.78 \pm 2.89 ²⁾	1.88 \pm 0.45 ²⁾

3.4 荷瘤小鼠抗体生成细胞、力竭游泳时间的影响

复方蛹虫草制剂中高低剂量组小鼠抗体生成细胞数和力竭游泳时间均高于荷瘤对照组,且高剂量组和荷瘤对照组相比有显著性差异($P < 0.05$),见表 4。

表 4 复方蛹虫草制剂对荷瘤小鼠抗体生成细胞、力竭游泳时间的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	溶血空斑数	游泳时间/ min
正常对照	-	8	151.6 \pm 41.8	42.32 \pm 3.93
荷瘤对照	-	9	109.2 \pm 38.8 ¹⁾	15.17 \pm 2.42 ¹⁾
复方蛹虫草	1.2	9	118.7 \pm 33.6	20.63 \pm 4.32
	2.5	9	125.8 \pm 46.5	26.33 \pm 3.92
	7.5	11	133.4 \pm 35.4 ²⁾	32.88 \pm 2.57 ²⁾

4 讨论

机体的细胞免疫功能失调与肿瘤的发生和发展有着密切的关系,T 淋巴细胞浸润程度可直接反映机体的抗肿瘤状态。当宿主免疫功能低下或者受到抑制时,肿瘤的发生率明显增高,在肿瘤进行性生长时肿瘤患者的免疫功能也能受到抑制^[2-3],二者互为因果进而导致恶性循环并加剧肿瘤的危害。在机

体的抗肿瘤免疫反应中,主要依靠 T 淋巴细胞介导的细胞免疫^[4]。成熟的 T 淋巴细胞通常可分为 CD4⁺ 和 CD8⁺ 两个亚群,其中 CD4⁺ T 淋巴细胞可产生大量的细胞因子,而 CD8⁺ T 淋巴细胞在可 CD4⁺ T 淋巴细胞的辅助以及细胞因子的共同作用下可杀伤肿瘤细胞,初次的抗肿瘤免疫反应主要依赖 CD8⁺ T 淋巴细胞和自然杀伤细胞的参与^[5-7]。

蛹虫草与天然冬虫夏草具有相似的药理功效,其富含的虫草酸、虫草素、虫草多糖等多种有效成分,对特异性和非特异性的免疫反应均具显著的增强作用。本研究中,我们考察了复方蛹虫草制剂对小鼠肿瘤的抑瘤作用、对细胞因子分泌、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞数目的影响。研究表明,复方蛹虫草制剂对小鼠肿瘤的生长均具抑制作用,且抑制作用呈剂量依赖性增加,与对照组比较差异具统计学意义,与其提高荷瘤小鼠血清 TNF- α , IL-2, IL-12 的水平以及 CD4⁺/CD8⁺ 有关。

以上结果表明,复方蛹虫草制剂具一定的抑瘤作用,同时从免疫细胞和免疫分子水平提高荷瘤小鼠抗肿瘤免疫功能,可见复方蛹虫草制剂的抑瘤作用与其改善免疫系统状态、增强机体抗肿瘤能力有关,其确切的机制有待于进一步的研究。

附子理中汤对脾阳虚证大鼠血糖、甘油三酯及总胆固醇的影响

唐汉庆*

(右江民族医学院,广西百色 533000)

[摘要] 目的:分析附子理中汤对脾阳虚证大鼠血糖、甘油三酯(TG)以及总胆固醇(TC)水平的影响和内在联系。方法:大鼠共4组,每组16只。①对照组:普通饲料喂养,自由饮水;②阳虚组:手术切除肩胛骨间棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT),余同①组;③脾阳虚组:高脂饲料(83%普通饲料,15% TG(TG),2%(TC)在19℃环境喂养,余同②组;④中药组:附子理中汤每天按4 g·kg⁻¹ ig;余同③组。全部4组动物4周后第1天左颈总动脉插管取血检测血糖、血清甘油三酯(TG),血清总胆固醇(TC)含量。结果:①各组血糖含量(mmol·L⁻¹)的比较:阳虚组(1.40±0.071)与对照组(5.41±0.08)相比血糖降低(P<0.01);脾阳虚组(5.81±0.08)与阳虚组相比血糖升高(P<0.01);附子理中汤组(5.01±0.08)与阳虚组相比,血糖升高(P<0.01);附子理中汤组与脾阳虚组相比,血糖有下降趋势。②各组血清TG含量(mmol·L⁻¹)的比较:阳虚组(0.284±0.110)与对照组(0.487±0.076)相比血清TG降低(P<0.01);脾阳虚组(0.620±0.184)与阳虚组相比血清TG增加(P<0.01);附子理中汤组(0.462±0.111)与阳虚组相比,血清TG升高(P<0.01),附子理中汤组与脾阳虚组相比,血清TG有下降趋势。③各组血清TC含量(mmol·L⁻¹)的比较:脾阳虚组(0.183±0.025)、附子理中汤组(0.211±0.026)与对照组(0.081±0.020)相比血清总TC均升高(P<0.01)。结论:附子理中汤使血清TG降低;增加对葡萄糖的利用及加强其代谢,使血糖水平降低。附子理中汤“健脾”功效表现为促使糖和脂类代谢趋向正常,从而使血糖和血脂向恢复正常水平的方向转化。

[关键词] 附子理中汤;脾阳虚证;代谢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)15-0230-04

Influences of Fuzi Lizhong decoction on Blood Sugar, Triglyceride and Total Cholesterol in Rats with Spleen Yang Deficiency Syndrome

TANG Han-qing*

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[收稿日期] 20111011(010)

[基金项目] 广西教育厅科研项目(201106LX443)

[通讯作者] *唐汉庆,副教授,从事中西医结合基础研究, Tel: 0776-2420488, E-mail: iloveyouverymuch0000@yahoo.com.cn

[参考文献]

- [1] 张安宁,袁书林.不同剂量蛹虫草菌丝体对大鼠免疫功能的影响[J].食品研究与开发,2009,30(3):30.
- [2] 罗春丽.余甘子对肿瘤细胞抑制作用及免疫调节的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(13):155.
- [3] 焦河玲,邓虹珠,王晓娟,等.苦豆子总碱对S180荷瘤小鼠的抑瘤作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):163.

- [4] 于明薇,杨国旺,王笑民.化痰丸对小鼠Lewis肺癌生长及血栓形成相关因子的干预作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):163.
- [5] 刘建明,陈素红,吕圭源.扶正、化积、解毒中药抗肿瘤作用研究进展[J].亚太传统医药,
- [6] 程书钧.肿瘤防治研究任重道远[J].首都医科大学学报,2009,30(3):271.
- [7] 宋长城,朱美玲.中药所含三萜类化合物抗肿瘤活性及其作用机制的研究进展[J].现代肿瘤医学,2011,19(9):1880.

[责任编辑 聂淑琴]