

# 复方石斛冲剂对小鼠免疫调节作用的影响

吴月国<sup>1</sup>, 赵铮蓉<sup>1</sup>, 张萍<sup>1</sup>, 滕士元<sup>2</sup>, 赵锋<sup>2</sup>, 李青青<sup>1</sup>, 刘骅<sup>1\*</sup> (1.浙江省医学科学院, 杭州 310013; 2.苏州神元生物科技股份有限公司, 江苏 苏州 215222)

**摘要:** 目的 研究复方石斛冲剂对小鼠的免疫调节作用的影响。方法 ICR 小鼠随机分为对照组和复方石斛冲剂低、中、高剂量组(0.65, 1.30, 4.00 g·kg<sup>-1</sup>), 连续灌胃 30~39 d 后进行脏器/体质量比值测定、淋巴细胞转化试验、碳廓清试验、血清溶血素试验、迟发型变态反应试验、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验、抗体生成细胞检测及自然杀伤(natural-killer, NK)细胞活性试验。结果 复方石斛冲剂能刺激淋巴细胞增殖; 提高小鼠血清溶血素含量和迟发型变态反应水平; 升高 NK 细胞活性; 增强小鼠吞噬细胞吞噬鸡红细胞及碳廓清的能力。结论 复方石斛冲剂具有一定的免疫增强作用。

**关键词:** 复方石斛冲剂; 铁皮石斛; 免疫功能

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)02-0182-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.007

## Effects of Dendrobium Compound Granules on Immune Function in Mice

WU Yueguo<sup>1</sup>, ZHAO Zhengrong<sup>1</sup>, ZHANG Ping<sup>1</sup>, TENG Shiyuan<sup>2</sup>, ZHAO Feng<sup>2</sup>, LI Qingqing<sup>1</sup>, LIU Hua<sup>1\*</sup> (1.Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2.Suzhou Shen Yuan Bio-Tech Co., Ltd., Suzhou 215222, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the effects of the Dendrobium compound granules on the immune function in mice. **METHODS** ICR mice were randomly divided into 4 groups, included 3 dosage groups (0.65, 1.30, 4.00 g·kg<sup>-1</sup>) and a negative control group. The spleen and thymus index, transformation level of lymphoid, carbon clearance index, the content of serum emolysin, the level of delayed type hypersensitivity(DTH), the phagocytic ability of celiac macrophage, the number of antibody formation cell and activity of natural-killer (NK) cells were measured respectively after gavage for 30–39 d. **RESULTS** Dendrobium compound granules could stimulate the lymphocyte proliferation, increase hemolysin content and DTH level, activity of NK cells, promote the phagocytic rate obviously. **CONCLUSION** Dendrobium compound granules can enhance the immune function in mice.

**KEY WORDS:** Dendrobium compound granules; *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; immune function

石斛是传统名贵中药, 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止渴、润喉明目、延年益寿之功效。铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)是石斛属中最为常用的品种之一, 已被证实具有抗氧化、护肝、抗肿瘤及免疫调节等作用<sup>[1-5]</sup>。复方石斛冲剂是以铁皮石斛为主要原料, 配伍西洋参、茯苓等中药组方, 通过现代技术工艺精制而成。本实验研究了复方石斛冲剂在小鼠免疫功能方面的影响, 为复方石斛冲剂的开发和应用提供研究基础。

## 1 材料

### 1.1 试药

复方石斛冲剂, 由铁皮石斛(苏州神元生物科技股份有限公司), 西洋参、茯苓(华东医药股份有限公司)中药经提取、浓缩、干燥、制粒等主要

工艺精制而成(每克试药含生药 0.875 g), 批号: 20131201。

### 1.2 主要试剂

RPMI1640 培养液(GIBCO 公司, 批号: 11875-093); 刀豆蛋白 ConA(上海源叶生物科技股份有限公司, 批号: 11028-71-0); 印度墨汁(南京都莱生物技术有限公司, 有效期: 2015 年 12 月); 绵羊血(金华利民试剂经营部, 采血日期: 2014 年 12 月 21 日); YAC-1 细胞(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所)。

### 1.3 主要仪器

MAX190 型紫外可见连续光谱酶标仪(美国分子仪器公司); TD12001 型电子天平(余姚市金诺天平仪器有限公司); AG285 型电子天平(瑞士 METTLER 公司); XS205 型电子天平(瑞士

基金项目: 浙江省科技计划项目(2015F50017); 浙江省医药卫生科技计划项目(201478211, 2017186376); 苏州市吴江区科技项目(WN201342)  
作者简介: 吴月国, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (0571)88215630 E-mail: wyg2004126@163.com \*通信作者: 刘骅, 男, 副研究员  
Tel: (0571)88215560 E-mail: xizhuliu@163.com

METTLERTOLEDO 公司); DM4000BLED 型荧光显微镜(德国莱卡公司)。

#### 1.4 动物

ICR 小鼠, 清洁级, ♂, 体质量 16~20 g, 由浙江省实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK(浙)2014-0001。实验环境条件: 室温 20~24 °C, 相对湿度 40%~70%, 试验前, 动物在实验室内适应 4 d。

### 2 方法

参照卫生部《保健食品技术评价规范》<sup>[6]</sup>和相关科学文献<sup>[7-9]</sup>设计实验方法。实验小鼠分为复方石斛冲剂低、中、高 3 个剂量组(0.65, 1.30, 4.00 g·kg<sup>-1</sup>)和对照组(饮用纯净水), 每组 10 只。试药灌胃体积为 20 mL·kg<sup>-1</sup>, 每天 1 次, 连续 30~39 d。

#### 2.1 对免疫器官质量的影响

给药 37 d 后, 颈椎脱臼法处死动物, 取其脾脏及胸腺称重, 计算脾脏/体质量及胸腺/体质量的比值。

#### 2.2 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

给药 33 d 后, 取脾脏制备单细胞悬液, 分 2 孔加入 24 孔培养板中, 一孔加 ConA 液, 另一孔作为对照。置 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 68 h, 每孔加 RPMI1640 培养液和 MTT 液, 再继续培养 4 h 加酸性异丙醇, 使紫色结晶完全溶解。转移至 96 孔培养板中, 570 nm 波长处测定 OD 值。用加 ConA 孔的 OD 值与不加 ConA 孔的 OD 值的差值代表淋巴细胞的增殖能力。

#### 2.3 对小鼠碳廓清能力的影响

给药 35 d 后, 按 10 mL·kg<sup>-1</sup> 计算, 尾静脉注射生理盐水稀释 4 倍的印度墨汁。在注射后 2, 10 min 从内眦静脉丛取血 20 μL, 加入到 2 mL 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中, 600 nm 波长测定 OD 值, 处死小鼠, 取肝脏、脾脏, 称重, 计算吞噬指数。

#### 2.4 对血清溶血素含量的影响

给药 31 d, 每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 2% 绵羊红细胞(SRBC)悬液进行免疫。再给药 5 d 后, 取血离心, 收集血清, 用生理盐水将血清倍比稀释, 于微量血凝板内与 SRBC 进行血凝实验, 观察并记录血球凝集程度, 计算抗体积数。

#### 2.5 对迟发型变态反应(delayed type hypersensitivity, DTH)的影响

给药 31 d, 每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 2% SRBC 悬液进行免疫。再给药 4 d 测量左后足跖部周长后, 在测量部位皮下注射 20 μL 20%SRBC, 24 h 后再次测量左后足跖部周长, 每次测量均在同一部位测 3 次取平均值, 以攻击前后足跖周长的差值来表示 DTH 的程度。

#### 2.6 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响

给药 37 d, 每只小鼠腹腔注射 1.0 mL 20% 鸡红细胞悬液, 30 min 后处死动物, 腹腔注射 2.0 mL 生理盐水, 然后吸取 1.0 mL 腹腔洗液, 制 2 片载玻片, 孵育 30 min 后固定, Giemsa-磷酸缓冲液染色, 油镜下计数巨噬细胞, 计算吞噬百分率。

#### 2.7 对抗体生成细胞数的影响

给药 35 d, 每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 2% SRBC 悬液进行免疫。再给药 4 d 后处死动物, 取脾制备单细胞悬液, 按 Jerne 改良玻片法<sup>[6]</sup>进行实验, 计算溶血空斑数。

#### 2.8 对小鼠自然杀伤(natural-killer, NK)细胞活性的影响

给药 38 d 后, 取脾脏制备单细胞悬液, 按 LDH 测定法<sup>[6]</sup>进行实验, 在酶标仪 490 nm 处测定 OD 值, 计算 NK 细胞活性。

#### 2.9 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 对小鼠脏器/体质量比值的影响

与对照组比较, 3 个剂量组小鼠脾脏/体质量比值及胸腺/体质量比值的差异均无统计学意义。结果见表 1。

表 1 对小鼠脏器/体质量比值的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The effect of the spleen and thymus index of mice ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ g·kg <sup>-1</sup>	脾脏/体质量 比值/mg·g <sup>-1</sup>	胸腺/体质量 比值/mg·g <sup>-1</sup>
对照组	0	3.62±0.54	1.73±0.28
低剂量组	0.65	3.64±0.33	1.74±0.11
中剂量组	1.30	3.60±0.31	1.67±0.20
高剂量组	4.00	3.67±0.24	1.72±0.18

#### 3.2 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

3 个剂量组 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖能力试验光密度值均增加, 与对照组比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ), 结果见表 2。

### 3.3 对小鼠碳廓清能力的影响

与对照组相比, 3 个剂量组小鼠的吞噬指数均增加, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 结果见表 2。

表 2 对小鼠淋巴细胞增殖能力和碳廓清能力的影响 ( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 The effect of the transformation level of lymphoid and the carbon clearance index of mice ( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	光密度差值	吞噬指数
对照组	0	0.117±0.044	6.53±0.64
低剂量组	0.65	0.301±0.026 <sup>2)</sup>	7.15±0.52 <sup>1)</sup>
中剂量组	1.30	0.403±0.027 <sup>2)</sup>	7.36±0.53 <sup>2)</sup>
高剂量组	4.00	0.420±0.029 <sup>2)</sup>	7.30±0.37 <sup>2)</sup>

注: 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

### 3.4 对小鼠血清溶血素水平的影响

与对照组相比, 3 个剂量组小鼠血清溶血素抗体数值均增加, 中、高剂量组差异具有统计学意义( $P<0.01$ ), 结果见表 3。

### 3.5 对小鼠迟发型变态反应的影响

与对照组相比, 高剂量组小鼠左后足跖部 24 h 与 0 h 的周长测量值差值显著增加( $P<0.05$ ), 结果见表 3。

表 3 对小鼠血清溶血素水平和迟发型变态反应的影响 ( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 The effect of serum hemolysin content and DTH of mice ( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	抗体数值	左后足跖部周长差/cm
对照组	0	63.2±25.6	0.049±0.022
低剂量组	0.65	78.9±16.9	0.048±0.024
中剂量组	1.30	115.1±13.3 <sup>2)</sup>	0.065±0.031
高剂量组	4.00	125.1±13.3 <sup>2)</sup>	0.090±0.046 <sup>1)</sup>

注: 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

### 3.6 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响

吞噬百分率的原始数据和经过转换后的数值  $X=\text{Sin}^{-1}P^{1/2}$  均符合方差齐性要求, 与对照组比较, 高剂量组小鼠吞噬百分率和  $X$  的差值有显著提高( $P<0.01$ ), 结果见表 4。

### 3.7 对小鼠抗体生成细胞的影响

如表 4 所示, 与对照组相比, 中、高剂量组小鼠溶血空斑数均增加, 并且差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。

表 4 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力和抗体生成细胞的影响 ( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 The effect of the phagocytic ability of celiac macrophage and the number of antibody formation cell of mice ( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	吞噬百分率/%	$X$	溶血空斑数/个
对照组	0	27.1±2.9	0.55±0.03	28.9±3.1
低剂量组	0.65	25.1±2.7	0.52±0.03	31.6±2.3
中剂量组	1.30	27.0±1.4	0.55±0.02	38.6±5.6 <sup>1)</sup>
高剂量组	4.00	34.8±2.3 <sup>1)</sup>	0.63±0.02 <sup>1)</sup>	43.6±4.0 <sup>1)</sup>

注: 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ .

### 3.8 对小鼠 NK 细胞活性的影响

NK 细胞活性通过  $X=\text{Sin}^{-1}P^{1/2}$  进行数据转换, 转换前后的数据均符合方差齐性要求。与对照组相比, 3 个剂量组小鼠 NK 细胞活性均明显增加, 差异均有统计学意义( $P<0.01$ ), 结果见表 5。

表 5 对小鼠 NK 细胞活性的影响 ( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 5 The effect of NK cells' activity of mice ( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NK 细胞活性/%	$X$
对照组	0	7.48±0.85	0.277±0.016
低剂量组	0.65	11.61±1.48 <sup>1)</sup>	0.347±0.023 <sup>1)</sup>
中剂量组	1.30	14.77±2.13 <sup>1)</sup>	0.394±0.031 <sup>1)</sup>
高剂量组	4.00	23.54±3.72 <sup>1)</sup>	0.506±0.043 <sup>1)</sup>

注: 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ .

## 4 讨论

本研究是用现代药理学方法从免疫器官指数、细胞免疫功能、体液免疫功能、单核-巨噬细胞功能、NK 细胞活性等方面考察复方石斛冲剂的免疫调节作用。根据实验结果可以看出, 复方石斛冲剂低、中、高 3 个剂量组(0.65, 1.30, 4.00 g·kg<sup>-1</sup>) 在免疫器官指数方面没有明显影响; 在细胞免疫功能方面, 复方石斛冲剂高剂量组可增强 SRBC 诱导的小鼠足肿胀, 3 个剂量组均能提高 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化能力; 在体液免疫功能方面, 中、高剂量组的复方石斛冲剂均能提高小鼠溶血空斑数和显著提升小鼠血清溶血素水平; 在单核-巨噬细胞功能方面, 复方石斛冲剂能提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬百分率和碳廓清能力; 另外在 NK 细胞活性方面, 复方石斛冲剂的 3 个剂量组均能明显升高小鼠 NK 细胞活性。综合可见复方石斛冲剂具有一定的免疫增

强作用,其在免疫系统的多个方面都起到了作用,要系统阐明复方石斛冲剂的作用机制,还需考虑多种因素进行多方面的实验考察。

复方石斛冲剂是依据中医理论及传统验方组方而成。方中铁皮石斛甘淡寒凉,入肺胃肾三经,能清肺热、养胃阴、补肾精,《神农本草经》谓其“补五脏虚劳羸瘦,强阴,久服厚肠胃”。西洋参<sup>[10-11]</sup>味甘微苦,性凉,入心肺肾三经,益肺阴,清虚火,生津止渴,《本草纲目拾遗》谓其“补肺降火,生津液,除烦倦,虚而有火者相宜。”茯苓<sup>[12-13]</sup>甘淡平,健脾开胃,益气渗湿,《药品化义》记载:“白茯苓味独甘淡,甘则能补,淡则能渗,甘淡属土,用补脾阴,土旺生金,兼益肺气。”诸品合而用之,生津益气滋阴、健脾清肺补肾。故复方石斛冲剂预计也将具有健脾清肺补肾的功效,这也是其特性,下步需进行系统的实验对此进行考察。

## REFERENCES

- [1] LI G J, SUN P, WANG Q, et al. *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. attenuates CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage in imprinting control region mice [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(3): 1015-1021.
- [2] LI B, WEI J, WEI X, et al. Effect of sound wave stress on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Dendrobium candidum* [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2008, 63(2): 269-275.
- [3] ZHAO X, SUN P, QIAN Y, et al. *D. candidum* has *in vitro* anticancer effects in HCT-116 cancer cells and exerts *in vivo* anti-metastatic effects in mice [J]. *Nutr Res Pract*, 2014, 8(5): 487-493.
- [4] SONG M F, LI G, CHEN X, et al. Primary study of *Dendrobium polysaccharides* improving immunity activity on mouse [J]. *Chin Pharm J(中国中药杂志)*, 2013, 48(6): 428-431.
- [5] GAO J P, JIN R M, WU Y P, et al. Comparative study of tissue cultured *Dendrobium* protocorm with natural *dendrobium candidum* on immunological function [J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2002, 25(7): 487-489.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[M]. 2003版. 清华同方电子出版社, 2003: 22-23.
- [7] WANG Y, JIN J, JIN Z, et al. Study on immune-enhancing effects of *Ganoderma lucidum* spore powder [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2016, 33(5): 544-546.
- [8] PENG L, WANG Y W, FU W Z, et al. Experimental study on effect of natto powder on immunological function mice [J]. *Chin J Food Hygi(中国食品卫生杂志)*, 2014, 26(4): 336-339.
- [9] YANG F, TONG Y L, DAI G H, et al. Effects of propolis and Ginseng soft capsule on the immunological function of mice [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2013, 32(2): 291-293.
- [10] ZHAO J Y, ZHOU D X, ZHAI P G. Experimental study on enhancing immune function of American Jinseng [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ(浙江中医药大学学报)*, 2011, 35(5): 755-757.
- [11] ZHAO Y L, WU H Z, YANG J, et al. Effect of panax ginsenoside on immunological function of immuno-suppressive mice [J]. *Chin J Biol(中国生物制品学杂志)*, 2011, 24(3): 305-308.
- [12] PENG X B, QIU X H, YU C L, et al. Effect of pachymaran on humoral immune function in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床)*, 2013, 29(5): 69-72.
- [13] XU T T, NIE S L, SHEN B X, et al. Research progress of *Poria cocos*'s Polysaccharides [J]. *Strait Pharm J(海峡药学)*, 2014, 26(7): 8-11.

收稿日期: 2016-08-22