

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.06.005

人参皂甙 Rg3 联合槐耳颗粒 对免疫抑制小鼠的免疫调节作用*

高慧婕 李春霞 刘树玲 刘超 司传平[△]

(济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067)

摘要 目的 探讨人参皂甙 Rg3 联合槐耳颗粒对免疫抑制小鼠免疫功能的影响。**方法** 实验小鼠随机分为正常对照组、环磷酰胺模型组、人参皂甙 Rg3 组以及联合用药组(人参皂甙 Rg3+槐耳颗粒)。正常对照组腹腔注射生理盐水,其余各组注射环磷酰胺建立免疫低下模型。正常对照组与模型组每日灌胃生理盐水,人参皂甙 Rg3 组每日灌胃 200mg/kg 人参皂甙 Rg3,联合用药组每日灌胃 100mg/kg 人参皂甙 Rg3 和 900mg/kg 槐耳颗粒,7d 后测定小鼠免疫功能。**结果** 与模型组比,人参皂甙 Rg3 组及联合用药组的脾指数、胸腺指数、吞噬指数、血清溶血素含量、淋巴细胞转化率明显提高,联合用药组效果更显著。**结论** 人参皂甙 Rg3 联合应用槐耳颗粒可改善免疫抑制小鼠的免疫功能,两种药物有一定的协同辅助作用。

关键词 人参皂甙 Rg3;槐耳颗粒;环磷酰胺;免疫抑制

中图分类号:R285 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9760(2014)120-399-04

Effects of Ginsenoside Rg3 combined with Huaier on immunological function in immunosuppression mice

GAO Huijie, LI Chunxia, LIU Shuling, LIU Chao, SI Chuanping

(Academy of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272027, China)

Abstract: Objective To investigate the immunoregulation effect of Ginsenoside Rg3 combined with Huaier on immunosuppression mice induced by cyclophosphamide (CTX). **Methods** ICR mice were randomly divided into four groups: control group, CTX model group, Ginsenoside Rg3 group, Ginsenoside Rg3 combined with Huaier group. The mice in control group received intraperitoneal injection of physiological saline and the other three groups received intraperitoneal injection of CTX (40 mg/kg once a day for 3 days from the 4th day beginning) to induce immunosuppression. The control group and the model group received intragastric administration of physiological saline daily and Ginsenoside Rg3 group received Ginsenoside Rg3 treatment (200mg/kg orally once a day for 7 days respectively), Huaier combined with Ginsenoside Rg3 group received 100mg/kg Ginsenoside Rg3 and 900mg/kg Huaier treatment (orally once a day for 7 days respectively). After 7 days, the phagocytosis of macrophage, the content of serum hemolysin, lymphocyte transformation rate, spleen index and thymus index were analyzed. **Results** CTX-treated mice showed significant decrease in the number of the phagocytosis of macrophage, hemolysin content, lymphocyte transformation rate, spleen index, thymus index. Ginsenoside Rg3 combined with Huaier significantly increased the number of the phagocytosis of macrophage, hemolysin content, lymphocyte transformation rate, spleen index, thymus index. **Conclusion** Ginsenoside Rg3 combined with Huaier can notably improve the immune function in immuno-depressed mice induced by CTX.

Key words: Ginsenoside Rg3; Huaier; Cyclophosphamide; Immunosuppression

人参皂甙 Rg3 是从人参中提取的四环三萜类

人参二型皂甙单体。研究表明, Rg3 能显著提高小鼠免疫功能, 可以减轻传统化疗毒副作用, 提高其生存质量^[1-2]。但由于人参皂甙 Rg3 提取困难, 价格昂贵, 对其实行单独应用造成了一定的限制。槐耳是我国民间重要的药用真菌, 有治风、破血、益力

* [基金项目] 2012 年济宁医学院青年科学基金资助项目 (编号: JYQ2011KM021)

[△] [通信作者] 司传平, E-mail: chuanpingsi@163.com

的功效,民间多用于治疗癌症及炎症^[3]。槐耳颗粒是一种新型的真菌类抗癌药物,主要成分为槐耳菌质多糖(PS-T)等多糖蛋白和氨基酸。基础研究表明,该药不仅能抑制肿瘤细胞的生长,还可增强机体免疫力,是一种较为理想的免疫增强剂^[4-5]。本实验将两种药物联合应用,观察其对免疫抑制小鼠的免疫调节及免疫保护作用,并探讨联合应用是否具有协同免疫增强作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 ICR 清洁级小鼠雌雄各半,6~8 周龄(体重 18~22g),购自郑州市华兴实验动物养殖场[合格证号:SCXK(鄂)2004-0007]。

1.1.2 试剂及配制 注射用环磷酰胺(Cyclophosphamide, CTX, 购自 Aladdin 公司,货号: C106991);人参皂甙 Rg3(购自 Aladdin 公司,批号: MUST-12041211);金克槐耳颗粒(启东盖天力药业有限公司生产,批准文号: 国药准字 Z20000109);PHA-P(购自 Sigma 公司,货号: L8754);鸡红细胞由济宁医学院医学实验中心提供健康鸡,抽取其颈静脉血,4℃ 保存于灭菌过的 Alsever 液中,用前以无菌生理盐水离心洗涤 3 次,配成一定比例的 CRBC 悬液。豚鼠心脏采血,分离血清,将 3 只豚鼠新鲜血清混合,经 CRBC 吸收后作为实验补体来源,-20℃ 保存,备用。

1.1.3 仪器 酶标仪(Thermo Labsystems 公司);SIGMA 台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);SW-CJ-2F 双人医用净化工作台(苏州净化公司);OLYMPUS CH30 显微镜(OLYMPUS 公司)。

1.2 方法

1.2.1 试验动物分组及给药 ICR 小鼠随机分成 4 组,每组 20 只。分别为:正常对照组、模型组、人参皂甙 Rg3 组、联合用药组(人参皂甙 Rg3 与槐耳颗粒合用)。除正常对照组外,其它各组小鼠于给药的第 5、6、7 天均每日腹腔注射 CTX 40mg/kg 造模^[6]。正常对照组:腹腔注射等量的生理盐水;人参皂甙 Rg3 组:每日灌胃 200mg/kg 人参皂甙 Rg3;联合用药组:每日灌胃 100mg/kg 人参皂甙 Rg3 和 900mg/kg 槐耳颗粒,每日 1 次,连续 7d。正常对照组和 CTX 模型组采用等体积生理盐水灌胃,每日 1 次,连续 7d。

1.2.2 小鼠免疫器官指数测定 于末次给药后次

日,用电子天平精确称取小鼠体重,眼球摘除取血后,无菌条件下称取小鼠胸腺、脾脏的质量,根据公式计算脾脏及胸腺指数:脾脏(胸腺)指数=脾脏(胸腺)质量/体重。

1.2.3 小鼠腹腔吞噬细胞吞噬功能测定 小鼠分组、造模、给药均同上。在实验第 5 天每只小鼠腹腔注射可溶性淀粉蛋白胨溶液 1ml,最后一次给药 2h 后,小鼠腹腔注射 5% 鸡红细胞悬液,每只 0.5ml,并轻揉腹部。注射 30min 后,小鼠腹腔注射生理盐水 2ml/只,并轻揉腹部数次,用注射器吸出小鼠腹腔液,取 1 滴于洁净的载玻片上,推成薄片,晾干后甲醇固定 5min。滴加瑞氏-吉姆萨染液,染色 5min,流水轻轻冲洗,自然晾干,油镜下观察。

1.2.4 小鼠淋巴细胞转化实验 小鼠分组、造模、给药均同上。在灌胃开始后第 5 天每组小鼠肌肉注射 PHA-P 8mg/kg·d。在最后一次给药 2h 后断尾取血、均匀涂片,晾干后吉姆萨染色 15min,水洗,自然晾干,油镜下观察。

1.2.5 小鼠血清溶血素测定 小鼠分组、造模、给药均同上。在实验第 3 天每组小鼠均腹腔注射 5% 的鸡红细胞进行初次免疫,最后一次给药 2h 后,摘眼球取血 2ml,取血清 20μl 与 1ml 的生理盐水、4% 的鸡红细胞 0.5ml、10% 的豚鼠血清 0.5ml 充分混合,立即置于 37℃ 恒温水浴箱中,30min 后立即取出,冰浴终止反应,冷却后 3000r/min 离心 5min。取上清,用酶标仪于 450nm 波长测定 OD 值。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS17.0 进行统计学处理。

2 结果

2.1 实验动物的一般情况及生存率

实验前,各组小鼠的体重、精神、摄食、活动以及皮毛色泽等状况均无异常。至第 7 天时,模型组小鼠普遍消瘦、精神萎靡、活动偏少,食量减少,体毛竖起、稀疏有脱落且缺乏光泽。人参皂甙 Rg3 组、联合用药组,小鼠活动基本正常,皮毛整齐有光泽,毛发脱落未及模型组明显。解剖后发现模型组小鼠肝脏有明显的坏死现象,而其它各组均少见到该现象。

2.2 对各组小鼠脾指数与胸腺指数变化

模型组小鼠脾指数及胸腺指数显著低于正常对照组($P<0.05$),表明 CTX 免疫抑制模型制备

成功。与模型组比,人参皂甙 Rg3 组、联合用药组脾和胸腺指数均有不同程度的提高($P<0.05$),以人参皂甙 Rg3 与槐耳颗粒合用组提高更为明显。见表 1。

表 1 各组小鼠脾指数与胸腺指数的变化($\bar{x}\pm s$,mg/g)

组 别	胸腺指数	脾指数
正常对照组	8.35±2.43	42.36±4.56
模型组	5.06±0.67*	34.81±5.54*
人参皂甙 Rg3 组	9.95±2.38**	47.28±5.60**
联合用药组	12.86±3.48**△	86.36±10.60**△
F 值	53.436	106.242
P	0.000	0.000

* 与正常对照组比较, $P<0.05$; ** 与模型组比较, $P<0.05$; △与人参皂甙 Rg3 组比较, $P<0.05$

2.3 对各组小鼠腹腔吞噬细胞吞噬功能的变化比较

与正常对照组比较,模型组小鼠腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬百分率和吞噬指数均显著降低($P<0.05$),说明造 CTX 免疫抑制模型制备成功。与模型组比较,人参皂甙 Rg3 组、人参皂甙 Rg3 与槐耳颗粒合用组均可显著提高免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬百分率和吞噬指数,且以人参皂甙 Rg3 与槐耳颗粒合用组效果明显,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠腹腔吞噬细胞吞噬功能的变化

组 别	吞噬率转换值	吞噬指数
正常对照组	49.19±5.6	1.30±0.09
模型组	32.69±4.2*	0.75±0.07*
人参皂甙 Rg3 组	37.98±4.7**	1.03±0.08**
联合用药组	48.86±5.5**△	1.26±0.09**△
F 值	75.197	176.965
P	0.000	0.000

* 与正常对照组比较, $P<0.05$; ** 与模型组比较, $P<0.05$; △与人参皂甙 Rg3 组比较, $P<0.05$ 。

2.4 各组小鼠淋巴细胞转化的变化

与正常对照组比,模型组小鼠外周血淋巴细胞转化率明显降低。与模型组比,人参皂甙 Rg3 组、联合用药组均可显著促进免疫抑制小鼠外周血淋巴细胞转化($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠淋巴细胞转化率的变化(%)

组 别	淋巴细胞转化率
正常对照组	58.62±7.7
模型组	42.37±5.6*
人参皂甙 Rg3 组	49.37±6.7**
联合用药组	58.34±7.6**△
F 值	24.056
P	0.000

* 与正常对照组比较, $P<0.05$; ** 与模型组比较, $P<0.05$; △与人参皂甙 Rg3 组比较 $P<0.05$ 。

2.5 各组小鼠血清溶血功能的变化

与正常对照组比,模型组 OD 值显著下降($P<0.05$),说明成功建立 CTX 免疫抑制模型。与模型组比,人参皂甙 Rg3 组、联合用药组均可显著促进免疫抑制小鼠血清溶血素的形成,OD 值显著升高($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组小鼠血清溶血功能的变化($\bar{x}\pm s$)

组 别	溶血素 OD 值
正常对照组	1.453±0.12
模型组	0.664±0.08*
人参皂甙 Rg3 组	1.014±0.08**
联合用药组	1.405±0.11**△
F 值	264.615
P	0.000

* 与正常对照组比较, $P<0.05$; ** 与模型组比较 $P<0.05$; △与人参皂甙 Rg3 组比较 $P<0.05$ 。

3 讨论

胸腺系数和脾脏系数是检测机体免疫功能的重要指标,免疫功能低下时胸腺、脾脏萎缩,体积变小^[7]。本文结果显示人参皂甙 Rg3 组、联合用药组均能明显提高模型组降低的胸腺指数和脾脏指数,以联合用药组效果更明显,提示槐耳颗粒可以加强人参皂甙 Rg3 对 CTX 抑制的免疫器官的保护作用。本实验选用巨噬细胞吞噬试验、溶血素试验、淋转试验测定小鼠免疫功能,观察药物对小鼠免疫功能的调节作用。结果显示人参皂甙 Rg3 与槐耳颗粒的联合应用可显著提高巨噬细胞的吞噬百分率及吞噬指数,促进溶血素的形成以及淋巴细胞的转化,提示槐耳颗粒可以进一步增强人参皂甙 Rg3 对 CTX 抑制小鼠的免疫保护作用。

治疗癌症的化疗药物严重地影响患者的生活

质量。因此,治疗癌症的同时可以提高患者生活质量的药物受到越来越多的重视^[8]。本实验将两种植物类抗癌及免疫保护药物的联合,结果表明槐耳颗粒对人参皂甙 Rg3 有良好的辅助、协同作用,可弥补人参皂甙 Rg3 单独应用的不足。一方面联合应用效果更好,另一方面也进一步克服了传统化疗药物的毒副作用,抗肿瘤的同时也能保护机体免疫功能,提高了患者的生存质量,为进一步的临床联合应用提供理论基础和依据。另外,我国人参、槐耳菌质资源丰富,可人工栽培,若能作为抗肿瘤药物和免疫保护药物进一步加以开发,将具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 陈明伟,陈健,姚煜,等. 人参皂甙 20(R)-Rg3 治疗肺癌的临床疗效观察[J]. 西安交通大学学报(医学版),2003,24(3): 288-289.
 - [2] Iishi H, Tatsuta M, Baba M, et al. Inhibition by ginsenoside Rg3 of bombesin-enhanced peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane in Wistar rats [J]. Clin Exp Metastasis, 1997, 15(6): 603-611.
 - [3] 徐华祥,朱小东,孔令群,等. 槐耳清膏抑制肝癌切除术后复发瘤的生长及机制[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(10): 1445-1447.
 - [4] 李德林,麦大海. 槐耳颗粒对胃癌术后同步放化疗患者生存质量和免疫功能的影响[J]. 中国肿瘤, 2010, 19(1): 73-76.
 - [5] 施丽飞,薛大方,郝爱国,等. 3 种抗肿瘤中成药中 10 种人体必需微量元素的含量分析[J]. 中国中医药科技, 2007, 14(3): 181-182.
 - [6] 杨宪勇. 应用环磷酸胺构建 C57BL/6J 小鼠免疫抑制模型[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(40): 7486-7490.
 - [7] Di I M, Del P B, De I M, et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells[J]. Exp Hematol, 2008, 36: 309-318.
 - [8] O'Shaughnessy J A, Wittes R E, Burke G, et al. Commentary concerning demonstration of safety and efficacy of investigational anticancer agents in clinical trials[J]. J Clin Oncol, 1991, 9(12): 2225-2232.
- (收稿日期 2014-7-29)
- +++++
- (上接第 398 页)
- [6] Li X, Yang Z, Zhang A. The effect of neurotrophin-3/chitosan carriers on the proliferation and differentiation of neural stem cells[J]. Biomaterials 2009, 30(28): 4978-4985.
 - [7] 张建,顾茵,罗学胜,等. 氯化锂通过激活 Wnt 信号通路促进神经干细胞增殖[J]. 济宁医学院学报, 2013, 36(6): 387-392.
 - [8] Nemati S N, Jabbari R, Hajinasrollah M, et al. Transplantation of adult monkey neural stem cells into a contusion spinal cord injury model in rhesus macaque monkeys[J]. Cell J, 2014, 16(2): 117-130.
 - [9] Lee K B, Choi J H, Byun K, et al. Recovery of CNS pathway innervating the sciatic nerve following transplantation of human neural stem cells in rat spinal cord injury[J]. Cell Mol Neurobiol, 2012, 32(1): 149-157.
 - [10] Wright K T, El Masri W, Osman A, et al. Concise review: bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications[J]. Stem Cells, 2011, 29(2): 169-178.
 - [11] Hollis E R, Tuszynski M H. Neurotrophins: potential therapeutic tools for the treatment of spinal cord injury[J]. Neurotherapeutics, 2011, 8: 694-703.
 - [12] McCall J, Weidner N, Blesch A. Neurotrophic factors in combinatorial approaches for spinal cord regeneration[J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(1): 327-337.
 - [13] Cohen-Cory S, Kidane A H, Shirkey N J, et al. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity[J]. Dev Neurobiol, 2010, 70(5): 271-288.
 - [14] Dicou E. Neurotrophins and neuronal migration in the developing rodent brain[J]. Brain Res Rev, 2009, 60(2): 408-417.
 - [15] Gu S, Huang H, Bi J, et al. Combined treatment of neurotrophin-3 gene and neural stem cells is ameliorative to behavior recovery of Parkinson's disease rat model[J]. Brain Res, 2009, 1257: 1-9.
 - [16] Lee S T, Chu K, Jung K H, et al. Slowed progression in models of huntington disease by adipose stem cell transplantation[J]. Ann Neurol, 2009, 66(5): 671-681.
 - [17] Hwang L, Choi I Y, Kim S E, et al. Dexmedetomidine ameliorates intracerebral hemorrhage-induced memory impairment by inhibiting apoptosis and enhancing brain-derived neurotrophic factor expression in the rat hippocampus[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(5): 1047-1056.
 - [18] Kim D H, Ko I G, Kim B K, et al. Treadmill exercise inhibits traumatic brain injury-induced hippocampal apoptosis[J]. Physiol Behav, 2010, 101(5): 660-665.
 - [19] Sung Y H, Kim S C, Hong H P, et al. Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice[J]. Life Sci, 2012, 91(25/26): 1309-1316.
- (收稿日期 2014-04-30)